



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 368 054**

② Número de solicitud: 200901425

⑤ Int. Cl.:
C12N 5/0793 (2010.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **16.06.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
14.11.2011

⑦ Solicitante/s: **Universidad del País Vasco
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Bizkaia, ES**

⑦ Inventor/es: **Cavaliere, Fabio y
Matute Almu, Carlos**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Modelo organotípico de enfermedades neuro-degenerativas, proceso de obtención y usos del mismo.**

⑤ Resumen:

Modelo organotípico de enfermedades neuro-degenerativas, proceso de obtención y usos del mismo.

La presente invención se relaciona con un modelo organotípico de enfermedades neurodegenerativas así como un método para la obtención de dicho cultivo organotípico. La presente invención también se refiere a los usos de dicho modelo para el rastreo de compuestos farmacológicamente activos.

ES 2 368 054 A1

DESCRIPCIÓN

Modelo organotípico de enfermedades neuro-degenerativas, proceso de obtención y usos del mismo.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se encuadra, en general, dentro del sector de las enfermedades neurodegenerativas; más concretamente, en el desarrollo de modelos organotípicos tridimensionales de enfermedades neurodegenerativas.

10

Antecedentes de la invención*Enfermedad de Parkinson*

15 La enfermedad de Parkinson (PD, del inglés “Parkinson Disease”) es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva que lleva consigo problemas de control del movimiento, tremor, rigidez, bradiquinesia en todo tipo de movimientos como al andar, estar sentado, comer, hablar etc., así como inestabilidad postural. La etiología de la PD aún no ha sido completamente esclarecida, pero los síntomas están claramente asociados a la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*. El déficit dopaminérgico en la vía nigroestriatal induce una consiguiente pérdida de neuronas estriatales ocasionando una variedad de cambios citológicos que incluyen la agregación de alfa-sinucleína en los denominados cuerpos de Lewy.

25 Las estrategias actualmente utilizadas para restaurar el sistema dopaminérgico son de naturaleza farmacológica, como la administración de levodopa (1-DOPA), o bien de naturaleza restaurativa como el injerto de células madre. Recientemente, se ha identificado células madre endógenas en regiones neurogénicas del cerebro adulto; en particular, en la zona subventricular, se piensa que se encuentra el mayor nicho neurogénico con potencial para generar neuronas en áreas primariamente no neurogénicas, como la zona del cerebro medio y el estriatum (Arias-Carrión, O. *et al.*, 2007. CNS Neurol Disord Drug Targets. 6, 326-335). La modulación de la neurogénesis representa, por tanto, una línea de terapia interesante ya que se trata de un tratamiento no invasivo que conlleva el replazamiento neuronal autólogo.

30

Modelos para el estudio de la enfermedad de Parkinson (PD)

35 Existen diferentes modelos que han sido utilizados en los últimos años para estudiar la PD. Un modelo bien establecido de PD es el modelo de rata 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). En dicho modelo, 6-OHDA es administrado estereotáxicamente en el cerebro induciendo una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas comparable a la observada en pacientes con PD. 6-OHDA usa el mismo mecanismo de transporte intracelular que la dopamina y la noradrenalina llevando a una muerte celular mediada por estrés oxidativo. Otro modelo utilizado para el estudio de los procesos degenerativos de la enfermedad así como para el estudio de nuevas drogas y terapias para PD, es la inyección de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en el cerebro de monos o ratones (Jackson-Lewis, *et al* 2007 Nature Protocols. 2, 141-151). Este modelo también imita las características de la enfermedad de PD ya que el compuesto MPTP es transportado de manera selectiva a las neuronas de la *substantia nigra* y allí es convertido intracelularmente en un metabolito altamente reactivo (1-metil-4-fenilpiridino (MPP+)) que provoca el bloqueo del complejo I mitocondrial causando así muerte neuronal.

45

Por otro lado, se ha utilizado modelos *in vitro* para el estudio de la PD. Sin embargo, el valor de los modelos *in vitro* con respecto a la recapitulación de las características de la PD es menos clara. El uso de cultivos celulares tales como el cultivo de líneas celulares de células mesecefálicas primarias o de líneas celulares derivadas de neuronas dopaminérgicas (e.g., células SH-SY5Y humanas y PC12 de rata) se ha utilizado para estudiar el mecanismo de degeneración dopaminérgica. En dichas células se aplican de manera crónica drogas que afectan complejos mitocondriales lo que lleva consigo la generación de especies de oxígeno reactivas. Sin embargo, todos los modelos celulares *in vitro* usan tipos celulares sustitutivos por lo que la relevancia con la PD humana es reducida (Shimohama *et al.*, 2003 Trends in Molecular Medicine. 9, 360-365).

55 Por otro lado, se han utilizado cultivos organotípicos obtenidos de diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC) para el estudio de diferentes enfermedades neurodegenerativas (Cavaliere, F. *et al*, 2006 Exp Neurol. 201, 66-74; Norberg, J. *et al*; 1999 Brain Res Brain Res Protoc. 3, 278-290 y Gogolla, N. *et al*; 2006 Nature Protocols. 1, 1165-1171).

60 Estos modelos tienen mayores similitudes con la situación *in vivo* ya que se mantienen tanto la estructura organotípica de la zona como las interacciones célula-célula naturales. Además, estos cultivos permiten la realización de experimentos de electrofisiología así como análisis de inmunofluorescencia.

65 Un ejemplo de modelo de cultivo organotípico para el estudio de las interacciones del córtex y el striatum con la *substantia nigra*, es el modelo de co-cultivo de córtex y el striatum con la *substantia nigra* desarrollado por Plenz and Kitai (1996 Neurosci Lett. 209, 177-80). En dicho modelo, se han dispuesto diferentes cultivos organotípicos de diferentes regiones del cerebro, lo que lleva consigo la desventaja de que la vía nigroestriatal original sufre una remodelación en cultivo excluyéndose además parte del circuito.

La solicitud de patente WO 06/047299 describe un modelo organotípico para el estudio de la PD. En dicho modelo se realiza la disección de diversas regiones del cerebro que son posteriormente cultivadas y tratadas con 6-OHDA para provocar una degeneración neuronal así como una denervación de la ruta nigroestriatal.

5 Sin embargo, a la hora de realizar estudios de rastreo (screening) de nuevas drogas así como de testado de drogas ya existentes, el uso de modelos de PD que lleven consigo la adición de productos químicos presenta diversas desventajas. Por un lado, la presencia en el cultivo de compuestos químicos puede interferir con el mecanismo de acción de las moléculas testadas. Por otro lado, puesto que todavía no ha sido demostrado si los oligodendrocitos y la mielina de las fibras neuronales de la *substantia nigra* pueden afectar la captación *in vitro* de compuestos químicos, los compuestos
10 químicos utilizados en dichos modelos para realizar la lesión podrían interferir con la función de las células gliales.

Por ello, uno de los objetivos principales que persigue la investigación en este campo es el desarrollar métodos que permitan estudiar los mecanismos neurodegenerativos de la PD y que permitan realizar el screening de drogas y el testado de drogas sin usar productos químicos.

15

Compendio de la invención

Ahora, los inventores han observado que la generación de una lesión mecánica en cultivos organotípicos tridimensionales que mantienen intacta las conexiones nigroestriatales entre la *substantia nigra* y el estriatum, provoca una degeneración dopaminérgica similar a la encontrada en los pacientes con PD, sin la necesidad de tener que utilizar drogas o sustancias químicas.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener un cultivo organotípico de una porción de cerebro de un animal no humano que comprende las zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular, comprendiendo dicho método las etapas de:

25

a) diseccionar el cerebro de dicho animal no humano, seleccionar una porción de dicho cerebro que comprende dichas zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular y que, además, mantiene intacta la vía de señalización nigro-estriatal, y mantener dicha porción de cerebro en las condiciones adecuadas para su supervivencia;

30

b) transferir dicha porción de cerebro a un soporte que permite la captación de oxígeno y nutrientes por dicha porción de cerebro;

35

c) mantener dicha porción de cerebro bajo condiciones que garantizan la supervivencia celular del mismo; y

40

d) generar en dicha porción de cerebro una lesión mecánica de las vías de señalización nigro-estriatales que conduce a una denervación de dichas vías de señalización.

El cultivo organotípico tridimensional obtenible según dicho método constituye un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de dicho cultivo organotípico tridimensional como modelo para el estudio de una enfermedad neurodegenerativa o como modelo para el estudio de la denervación dopaminérgica. Los métodos para el estudio de enfermedades neurodegenerativas o de la denervación dopaminérgica que comprenden el empleo de dicho cultivo organotípico tridimensional también constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

50

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de rastreo ("screening") para identificar compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas basado en el empleo de dicho modelo organotípico tridimensional.

55

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una forma de realizar la disección del cerebro. (A) Las líneas indican la localización y dirección del corte para abrir el cráneo y retirar el cerebro para su disección posterior. La letra "b" en el círculo indica el punto Bregma. (B) Un tercio del córtex cerebral y la totalidad del cerebelum son retirados (flechas).

60

La Figura 2 muestra la Orientación del tejido, disección y cultivo. (A) Las porciones de cerebro (350 micrómetros) se cortan a 45° para obtener, incluido en el corte, la *substantia nigra* (sn), el *striatum-caudate putamen* (cp), la zona subventricular del ventrículo lateral (lv) y el córtex cerebral (ex). Las líneas diagonales indican el plano de corte, las líneas verticales la superficie pegada. En (C) y (D) se muestran las porciones de cerebro cultivadas durante 10 días *in vitro* (DIV) usando el método de interfase ilustrado en (B), antes (C) y después (D) de la denervación de la vía nigroestriatal.

65

ES 2 368 054 A1

La Figura 3 muestra unas células dopaminérgicas en la *substantia nigra* antes y después de la transección de la vía nigro-striatal. Porciones de cerebro de 10 DIV sin denervación (A) y tras 3 días de la transección (B) fueron examinadas usando inmunofluorescencia para tirosina hidrolasa en la *substantia nigra*. *Substantia nigra* (sn), *striatum-caudate putamen* (cp), ventrículo lateral (lv) y córtex cerebral (ex). Escala: 50 micrómetros.

La Figura 4 muestra la pérdida de inervación dopaminérgica en el striatum tras la transección de la vía nigro-striatal. En (A) y (B) se muestra la inmunoreactividad frente a tirosina hidroxilasa (TH) y NeuN en el striatum de un corte tras 10 DIV sin denervación (A) o a los 3 días de la denervación (B). La denervación de la vía nigro-striatal induce la agregación citoplasmática de alfa-sinucleína (C). Los núcleos en (C) fueron teñidos con DAPI. *Substantia nigra* (sn), *striatum-caudate putamen* (cp), ventrículo lateral (lv) y córtex cerebral (ex). Escala: 10 micrómetros.

La Figura 5 muestra el aumento de las terminales dopaminérgicas en la zona subventricular tras la transección de la vía nigro-striatal. Los cortes tras 10 DIV antes (A-C) y tras la denervación (D-F), fueron analizados usando inmunofluorescencia para medir la expresión de tirosina hidroxilasa a nivel del ventrículo lateral (lv), zona subventricular (SVZ) y striatum (cp, *caudate putamen*). A un mayor aumento (B-C en cortes control y E-F en cortes con denervación dopaminérgica) es posible comprobar la inducción de neuronas dopaminérgicas en el SVZ (E) y la reducción de terminales dopaminérgicas en el striatum (F) de los cortes con denervación dopaminérgica. Las flechas muestran las células positivas para tirosina hidroxilasa.

La Figura 6 muestra el diseño de un experimento de rastreo de drogas usando un modelo organotípico tridimensional de la invención con los distintos procedimientos realizados en las distintas fases del protocolo y en los distintos días de cultivo.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En la presente invención, por “cultivo organotípico” se entiende un cultivo tridimensional de tejido que mantiene en gran parte la estructura, conexiones celulares y fisiología similares a las presentes en el órgano del que ha sido extraído (Gahwiler, 1981 J. Neurosci. Meth. 4, 329-42; Gahwiler 1984 Neuroscience. 11:751-60; Gahwiler 1988 Trends Neurosc. 11:484-9; Stoppini *et al.* 1991 J. Neuroscience Methods 37:173-82).

En la presente invención por “cerebro” se entiende la parte superior y más masiva del sistema nervioso rico en neuronas con funciones especializadas. En otros invertebrados, se denomina también al principal ganglio o conjunto de ganglios. El cerebro se divide, visto desde fuera en dos hemisferios (izquierdo y derecho). El cerebro a su vez, por convención y fijándose en ciertos límites marcados por algunas de las cisuras, se divide en lóbulos: frontal, parietal, temporal, occipital y parieto-parietal. En el cerebro de los cordados se identifican las siguientes regiones:

- el rombencéfalo con el mielencéfalo (médula oblonga) y el metencéfalo (puente de Varolio y el cerebelo);
- el mesencéfalo con el tectum, tegumento mesencefálico y el *crus cerebri*; y
- el prosencéfalo formado por el diencefalo (epitálamo, tálamo, subtálamo, hipotálamo y glándula pituitaria) y el telencéfalo, que está formado a su vez por el arquipalio (ganglios basales y la amígdala cerebral), el paleopalio (corteza piriforme, bulbo olfatorio y amígdala cerebral) y el neopalio (corteza cerebral: lóbulo frontal, lóbulo temporal, lóbulo parietal, lóbulo occipital, ínsula y corteza cingulada).

Los “ganglios basales” son una colección de núcleos que se encuentran a ambos lados del tálamo, fuera y alrededor del sistema límbico, pero debajo del giro cingulado y dentro de los lóbulos temporales. A pesar de que el glutamato es el neurotransmisor más común tanto aquí como en el resto del cerebro, el neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido gamma-aminobutírico) juega el papel más importante en los ganglios basales.

El “striatum” o cuerpo estriado, es el grupo más grande de los núcleos basales y está compuesto por el núcleo caudado, el putamen, el globo pálido y el núcleo acumbens.

Todas estas estructuras son dobles, un conjunto a cada lado del septum central.

El “núcleo caudado” comienza justo debajo del lóbulo frontal y se curva hacia el lóbulo occipital. El “putamen” descansa justo debajo y detrás del núcleo caudado. Parece estar implicado en coordinar los comportamientos automáticos. El “globo pálido” está localizado dentro del putamen, con una parte exterior y otra interior. Recibe información desde el núcleo caudado y el putamen y envía información a la *substantia nigra*.

La “*substantia nigra*” es otro núcleo de los ganglios basales; está localizada en las porciones superiores del cerebro medio, bajo el tálamo, y toma su color de la neuromelanina. Una parte (*substantia nigra compacta*) usa neuronas dopaminérgicas para enviar señales hacia el cuerpo estriado. La otra parte de la sustancia negra (*substantia nigra reticulada*) es en su mayor parte neuronas GABA.

ES 2 368 054 A1

La “zona subventricular” (SVZ) es una estructura que aparece situada a lo largo de las paredes laterales de los ventrículos laterales. Esta zona es una fuente de células madre neuronales en el proceso de neurogénesis adulta.

5 El “tálamo” es una estructura neuronal que se origina en el diencefalo, siendo la estructura más voluminosa de esta zona. Se halla en el centro del cerebro, encima del hipotálamo y separado de éste por el surco hipotalámico de Monroe.

10 El “subtálamo” es la estructura diencefálica situada entre mesencéfalo, tálamo e hipotálamo; se encuentra junto al lado medial de la cápsula interna.

El “núcleo subincerto” es un núcleo subtalámico. Sus funciones y conexiones son “incierto”, de ahí su nombre. Se asocia funcionalmente al sistema motor extrapiramidal.

15 El “córtez” es una estructura de tejido nervioso que cubre la superficie de los hemisferios cerebrales. El córtex está dividido en isocorteza (o neocorteza), pleocorteza, que comprende el cerebro olfatorio, y arquicorteza, constituido por la formación del hipocampo.

20 El término “enfermedad neurodegenerativa”, tal como aquí se utiliza, incluye los procesos crónicos y progresivos que están caracterizados por pérdidas selectivas y simétricas de neuronas en los sistemas motor, sensorial y cognitivo.

Método de la invención

25 Los autores de la presente invención, usando un cultivo organotípico tridimensional que comprende las zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular, han observado que la generación de una lesión mecánica entre *substantia nigra* y el estriatum, sorprendentemente, reproduce las características de la enfermedad de Parkinson (PD).

30 Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método, a partir de ahora método de la invención, para obtener un cultivo organotípico de una porción de cerebro de un animal no humano que comprende las zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 35 a) diseccionar el cerebro de dicho animal no humano, seleccionar una porción de dicho cerebro que comprende dichas zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular y que, además, mantiene intacta la vía de señalización nigro-estriatal, y mantener dicha porción de cerebro en las condiciones adecuadas para su supervivencia;
- 40 b) transferir dicha porción de cerebro a un soporte que permite la captación de oxígeno y nutrientes por dicha porción de cerebro;
- c) mantener dicha porción de cerebro bajo condiciones que garantizan la supervivencia celular del mismo; y
- 45 d) generar en dicha porción de cerebro una lesión mecánica de las vías de señalización nigro-estriatales que conduce a una denervación de dichas vías de señalización.

50 De acuerdo con el método de la invención, en la primera etapa [etapa a)], se disecciona el cerebro de un animal no humano, y se selecciona una porción de dicho cerebro que (i) comprende las zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular, y que, además, (ii) mantiene intacta la vía de señalización nigro-estriatal. Asimismo, dicha porción de cerebro se mantiene en las condiciones adecuadas para su supervivencia.

55 El animal no-humano al que se le disecciona el cerebro puede ser cualquier animal, preferentemente, un vertebrado, tal como un mamífero, por ejemplo, un roedor, más preferentemente, un ratón o una rata. Dicho animal no-humano puede ser un animal con un fondo genético modificado genéticamente, es decir, cuyo material genético ha sido manipulado y diseñado o alterado deliberadamente con el fin de otorgarle alguna característica de interés, o puede ser un animal no modificado genéticamente. Dichos animales no humanos genéticamente modificados pueden ser animales transgénicos, es decir, animales que presentan, insertada en su genoma, la secuencia de un gen de interés, e.g., EYFP (Winter SM *et al.*, 2007 *Respir Physiol Neurobiol.* 159:108-14) o genes-GFP para la expresión de la proteína fluorescente GFP bajo el control del operador de nestina (Friling *et al.*, 2009 *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(18):7613-8). También puede ser un animal que presenta bloqueada la expresión de un gen específico (e.g., ratones knock-out). Los métodos para la generación de animales de este tipo son bien conocidos por un experto en la materia.

65 Aunque la edad del animal no-humano utilizado como fuente de la porción de cerebro según el método de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización particular, dicho animal no-humano tiene 3 meses o menos, por ejemplo, 20 días o menos, preferentemente, 10 días o menos, más preferentemente, 5 días o menos. En una realización particular, dicho animal no-humano es un ratón de 3 ó 4 días de edad.

Para la realización de la disección, el animal no humano es convenientemente anestesiado siguiendo las normas de experimentación animal correspondientes. Tras la decapitación, el cerebro es extraído usando material quirúrgico necesario adaptado al tamaño del cráneo del animal.

5 A continuación, se selecciona una porción de cerebro de un animal no humano que (i) comprende las zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular, y que, además, (ii) mantiene intacta la vía de señalización nigro-estriatal.

10 Como es conocido, la arquitectura del cerebro va a depender del animal no humano utilizado; un experto en la materia entiende que la determinación y localización de las distintas regiones cerebrales puede ser realizada usando un atlas de anatomía apropiado y otras fuentes bibliográficas bien conocidos en el estado de la técnica. En una realización particular, se utiliza un cerebro de ratón de 3 ó 4 días de edad y el corte se realiza utilizando un vibratomo de manera que la porción de cerebro seleccionada comprende una porción dorso-ventral del cerebro que incluye, al menos, las regiones *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular.

15 Dicha “vía de señalización nigro-estriatal” se refiere a las conexiones neuronales tanto aferentes como eferentes que conectan las regiones de la *substantia nigra* con el striatum a través del núcleo subtalámico y talámico reticular. Las neuronas de la parte compacta reciben señales inhibitorias desde los axones de la parte reticulada. Los axones dopaminérgicos inervan también otros elementos del sistema de ganglios basales incluyendo el pallidum medial, la parte reticulada de la *substantia nigra* y el núcleo subtalámico.

20 Tal como aquí se utiliza, una porción del cerebro que contiene las zonas indicadas en (i) mantiene intacta la vía de señalización nigro-estriatal cuando las conexiones neuronales entre las zonas de la *substantia nigra* y el striatum son funcionales (Cardozo DL, *et al.*; 1993 Neuroscience. 56(2):409-21). La comprobación de que dichas conexiones neuronales son funcionales se puede realizar usando métodos bien conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, métodos de electrofisiología, inmunofluorescencia con marcadores vitales y de compuestos que se transportan de manera retrógrada en los axones, etc. Así, la conexión entre las zonas de la *substantia nigra* y el striatum puede determinarse mediante técnicas de electrofisiología bien conocidas por un experto en la materia (Schwartz RK, Huston JP. 1996 Prog Neurobiol. 50(2-3):275-331). Alternativamente, pueden utilizarse otros métodos para determinar la funcionalidad de las conexiones neuronales basados en el empleo de marcadores axonales, e.g., neurofilamentos, MAP2, o, más específicamente, tirosina hidroxilasa (TH), y el empleo de técnicas de immuno-fluorescencia o inmunohistoquímica. Adicionalmente, se pueden utilizar métodos que comprenden la inyección de compuestos que se transportan de manera retrógrada en los axones, tales como los compuestos comerciales dialquil-carbocianinas, vibrant, DiI, DiO y DiD (Elias LA *et al.*, 2007 Nature. 448(7156):901-7; Vergni D *et al.*, 2009 PLoS ONE 4(4):e5278). La inyección de estos compuestos en la *substantia nigra* se realiza usando, por ejemplo, un micromanipulador, y, al cabo de algunos días, preferentemente de 1 a 3 días, se procede a detectar la fluorescencia en regiones anterógradas conectadas con dicha región, e.g., el striatum, usando métodos para detectar la fluorescencia suficientemente conocidos en el estado de la técnica, e.g., utilizando microscopios de fluorescencia.

40 El experto en la materia entiende que dicha porción de cerebro de un animal no-humano que comprende las zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular, puede contener otras zonas del cerebro colindantes a dichas zonas, por ejemplo, del tálamo, subtálamo, núcleo subincierto, etc. En una realización particular, la parte del córtex presente en dicha porción de cerebro seleccionada, y, consecuentemente, en el cultivo organotípico proporcionado por esta invención, comprende el neo-córtex, preferentemente, comprende la corteza primaria somato sensorial.

45 A continuación, la porción de cerebro previamente seleccionada se mantienen en las condiciones adecuadas para su supervivencia; es decir, bajo condiciones que permiten que el cultivo no sea dañado y las células que forman parte del tejido (neuronas, oligodendrocitos, astrocitos, etc.) se mantengan vivas; para ello, el proceso de disección se realiza en condiciones de esterilidad usando instalaciones y métodos de esterilización bien descritos en el estado de la técnica, tales como campanas de flujo, materiales esterilizados o filtrados, etc. Para garantizar la supervivencia del cultivo, además de las condiciones de esterilidad, la disección se realiza de manera rápida, usando medios de cultivo con la temperatura, los nutrientes, pH, etc. adecuados. Medios de cultivo con diferentes composiciones de nutrientes, compuestos tampones (como el HEPES) y gases, que puedan ser utilizados en la puesta en práctica del método de la invención, aparecen ampliamente descritos en el estado de la técnica (Gahwiler, 1981 J. Neurosci. Meth. 4, 329-42; Gahwiler 1984 Neuroscience. 11:751-60; Gahwiler 1988 Trends Neurosc. 11:484-9; Stoppini *et al.* 1991 J. Neuroscience Methods 37:173-82).

60 Para la realización de los cortes de las porciones de cerebro, se pueden utilizar una diversidad de técnicas y aparatos. Dichas técnicas y aparatos son bien conocidos por el experto en la materia (Vergni *et al.*, 2009 PLoS ONE4(4):e5278, Chechneva *et al.*, 2006 Neurobiol of Dis. 23(2):247-59). El grado de inclinación del corte y el grosor del corte puede ser determinado por el experto en la materia dependiendo de la edad y del tipo de animal no-humano usado, y optimizado para que las regiones *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular estén incluidas en dicho corte.

65 El grosor del corte de la porción de cerebro puede variar dentro de un amplio intervalo, aunque siempre debe ser el adecuado para que durante el cultivo las zonas interiores de la porción de cerebro seleccionada reciba los nutrientes en la cantidad adecuada y la difusión de los gases sea correcta. No obstante, en una realización particular, la porción de cerebro seleccionada tiene un espesor comprendido entre 100 micrómetros y 500 micrómetros, preferentemente, entre 200 micrómetros y 450 micrómetros, más preferentemente, entre 300 y 400 micrómetros.

ES 2 368 054 A1

En la segunda etapa [etapa b)] del método de la invención, se transfiere la porción de cerebro seleccionada en la etapa a) a un soporte que permite la captación de oxígeno y nutrientes por dicha porción de cerebro.

5 Brevemente, para su cultivo, la porción de cerebro seleccionada en la etapa a) es trasladada a un soporte que permite la captación por parte de dicha porción de cerebro de los nutrientes y gases necesarios para su supervivencia. Soportes adecuados son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y pueden ser utilizados en la puesta en práctica de la presente invención. Dichos soportes comprenden, en general, una membrana porosa que contiene poros con un tamaño de poro adecuado para permitir el paso tanto de nutrientes como de gases tales como O₂, CO₂, etc., hasta el cultivo. En una realización particular, dicho soporte comprende una membrana porosa que contiene poros con un tamaño de poro igual o menor de 1 micrómetro (μm) de diámetro, ventajosamente, igual o menor de 0,8 μm de diámetro, preferentemente, igual o menor de 0,5 μm de diámetro, más preferentemente, de 0,4 μm de diámetro, tal como una membrana Millicell (Millipore PICORG50) - una membrana porosa con poros de 0,4 μm de diámetro.

15 En la tercera etapa [etapa c)] del método de la invención, la porción de cerebro seleccionada en la etapa a) y transferida a un soporte adecuado que permite la captación de oxígeno y nutrientes para su supervivencia se mantiene bajo condiciones que garantizan la supervivencia celular de dicha porción del cerebro. Dichas condiciones adecuadas para la supervivencia de dicha porción del cerebro incluyen las condiciones que garantizan que el cultivo no se necrose y se mantenga vivo. Dichas condiciones incluyen el mantenimiento de los cultivos en condiciones de humedad, temperatura y concentraciones de gases (habitualmente, 37°C, 5% CO₂ y 95% O₂) adecuadas, condiciones que pueden ser conseguidas manteniendo los cultivos en incubadores especialmente diseñados para dicho fin. El estado de la técnica incluye numerosos ejemplos de incubadores adecuados para mantener vivo un cultivo organotípico. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo de cultivo organotípico.

20 Además de la temperatura y la mezcla de gases, el factor más comúnmente variado en los sistemas de cultivo es el medio de crecimiento. Las recetas para los medios de crecimiento pueden variar en pH, concentración de glucosa, factores de crecimiento y la presencia de otros componentes nutritivos. Se conocen diversas recetas de medios utilizados para el mantenimiento de cultivos organotípicos (Vergni *et al.*, 2009 PLoS ONE4(4):e5278, Chechneva *et al.*, 2006 Neurobiol of Dis. 23(2):247-59).

30 Además, es necesario mantener los cultivos bajo condiciones de esterilidad usando métodos apropiados, por ejemplo, esterilización, etc., así como llevando a cabo el manejo del cultivo en condiciones de esterilidad. El objetivo de todo ello es evitar la contaminación microbiana (e.g., bacterias, levaduras, micoplasmas, etc.) que competirían con las células de la porción de cerebro por los nutrientes y/o podrían infectar y eliminar dichas células. En una realización particular, toda manipulación se lleva a cabo, típicamente, en una campana de flujo laminar para evitar la entrada de microorganismos contaminantes. También pueden añadirse antibióticos al medio de cultivo.

40 Asimismo, para la correcta supervivencia del cultivo organotípico puede ser necesario, en ocasiones, realizar cambios del medio de cultivo de manera regular; así, en una realización particular, se realizan cambios del medio de cultivo cada 3 ó 4 días.

En la cuarta etapa [etapa d)] del método de la invención, se genera una lesión mecánica de las vías de señalización nigro-estriatales que conduce a una denervación de dichas vías de señalización, en dicha porción de cerebro seleccionada en la etapa a), transferida a un soporte adecuado en la etapa b) y mantenida bajo condiciones que garantizan su supervivencia celular en la etapa c).

45 Por "lesión mecánica" se entiende cualquier lesión o daño del tejido que no ha sido generado por medios químicos; en general, dicha lesión mecánica se realiza bajo condiciones de esterilidad. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de lesiones mecánicas, incluyen las producidas en la porción de cerebro seleccionada mediante punción, torsión, presión, corte, rasgado, etc. En una realización particular, dicha lesión mecánica se produce mediante un corte realizado con un objeto puntiagudo y cortante, por ejemplo, con una cuchilla afilada estéril.

50 Dicha lesión mecánica de las vías de señalización nigro-estriatales conduce a una denervación de dichas vías de señalización en la porción de cerebro seleccionada. En el sentido utilizado en esta descripción, se entiende por "denervación", el proceso de pérdida de conexiones neuronales entre dos regiones. La denervación puede ser total o parcial e incluye la pérdida de las conexiones sinápticas entre dos neuronas. También incluye la degeneración de los axones que han perdido los contactos sinápticos con otras neuronas. En una realización particular, dicha denervación es una "denervación dopaminérgica", es decir, una denervación de las neuronas cuyo neurotransmisor es la dopamina. La denervación se puede medir usando métodos similares a los anteriormente descritos para medir la funcionalidad de las vías de señalización nigro-estriatales.

60 Aunque la lesión mecánica se puede producir en cualquier zona que comprenda la *substantia nigra*, el striatum, el córtex y/o la zona subventricular de la porción de cerebro seleccionada previamente, en una realización particular, dicha lesión mecánica se realiza mediante un corte entre el *caudate putamen* y la *substantia nigra*, aproximadamente en el núcleo subtalámico. En una realización preferida, el corte entre el *caudate putamen* y la *substantia nigra* se realiza dentro de un periodo de días *in vitro* (DIV) del cultivo comprendido entre 2 y 20 DIV, preferentemente entre 4 y 10 DIV, más preferentemente al cabo de 7 DIV. Por "DIV" se entiende los días que la porción de cerebro seleccionada ha transcurrido en cultivo desde su disección.

El método de la invención incluye, opcionalmente, en una realización particular, la posibilidad de determinar la viabilidad del cultivo antes y/o después de producir la lesión mecánica. Existen múltiples métodos en el estado de la técnica para determinar la viabilidad de un cultivo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de tales métodos incluyen la inspección visual bajo microscopio usando criterios morfológicos tales como la conservación de la estructura, el uso de colorantes vitales, la cuantificación de la expresión de marcadores de viabilidad celular, la determinación de la muerte celular, etc.

La muerte celular puede ser determinada usando métodos bien descritos en el estado de la técnica tales como la incorporación de yoduro de propidio. La cuantificación de las células que se están degenerando se puede realizar midiendo la incorporación de dichas sustancias a la célula.

La cuantificación de los niveles de expresión de los marcadores de viabilidad celular, se puede realizar usando diferentes métodos bien conocidos en el estado de la técnica. El término “expresión”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un proceso mediante el cual se produce una proteína a partir del ADN. Este proceso implica la transcripción del gen a un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de este ARNm al polipéptido. Los términos proteína o polipéptido son utilizados en la presente invención de manera equivalente. En el contexto de la invención “cambios en los niveles de expresión” de los marcadores de viabilidad celular se refiere a cualquier cambio en la producción del ARNm, de la proteína o de ambos, que produce niveles relativos alterados del ARNm, proteína o ambos, en una muestra con respecto a otras moléculas en la misma muestra. Se apreciará que los niveles de expresión de un marcador de viabilidad celular se puede determinar mediante la determinación de los niveles de ARNm en una muestra o mediante la determinación de los niveles del polipéptido correspondiente. De forma alternativa, los marcadores de viabilidad polipeptídicos pueden ser variantes resultantes de modificaciones postraduccionales, incluyendo fragmentos de los mismos.

Los niveles de expresión de los marcadores de viabilidad celular se pueden evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión de una molécula transcrita (ARNm) o su proteína correspondiente. En una realización particular, para medir los niveles de expresión de un marcador de viabilidad celular, se determinan los niveles de la molécula transcrita. En este caso, el método de la invención puede incluir, adicionalmente, la realización de una etapa de extracción de ARN con el fin de obtener el ARN total, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales. Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por los genes de los marcadores de viabilidad celular y de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dichos genes 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 Southern blot y empleo de sondas apropiadas, Northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm de los genes de interés o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa SI, transcripción inversa (RT) seguida de reacción en cadena de la ligasa (LCR) [RT-LCR], hibridación, microarrays, etc., preferentemente, mediante PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real usando juegos de sondas y cebadores apropiados. Análogamente, el nivel de ADNc correspondiente al ARNm codificado por los genes marcadores de viabilidad 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 RT del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales para 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. En una realización particular de la invención, la cuantificación de los marcadores de viabilidad celular se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en cualquiera de sus variantes, o mediante un array de ADN o ARN.

En otra realización particular, la determinación de los niveles de expresión de genes de marcadores de viabilidad celular se realiza cuantificando el nivel de la proteína codificada por dicho gen. En este caso, el nivel de expresión de dichos genes marcadores de viabilidad celular puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dichas proteínas en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de las proteínas que codifican para dichos genes marcadores de viabilidad celular pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a las proteínas que codifican dichos genes y posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dichas proteínas marcadores de viabilidad incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

Aunque prácticamente cualquier marcador de viabilidad celular puede ser utilizado, en una realización particular, se determinan los niveles de tirosina hidrolasa y la presencia de agregados de alfa-sinucleína como marcadores de viabilidad celular. Asimismo, en otra realización particular, los marcadores de viabilidad celular utilizados son sustancias

secretadas al medio de cultivo por las células cuya viabilidad se desea determinar, por ejemplo, dopamina, neurotransmisores, lactato deshidrogenasa (LDH), etc. La cuantificación de dichas sustancias puede ser realizada usando kits comerciales y métodos bien descritos en el estado de la técnica. En una realización particular, la cuantificación de dopamina en el medio se realiza mediante técnicas de inmuno-precipitación o cromatografía.

5 En otra realización particular de la invención, la viabilidad celular se puede determinar usando colorantes vitales bien conocidos por un experto en la materia, e.g., el crisol violeta. Para su detección, se pueden utilizar diversas técnicas de inmunoensayo y microscopía descritas anteriormente.

10 El experto en la materia entiende que dichos métodos para determinar la viabilidad celular del cultivo bajo estudio se pueden utilizar independientemente entre sí o en combinación.

Durante el procedimiento de preparación del cultivo, algunas células pueden haber perdido su viabilidad, aunque el conjunto de las células sea viable. Por tanto, de los cultivos mantenidos en condiciones que garantizan sus condiciones de supervivencia celular [etapa c) del método de la invención], para ser sometidos a la generación de la lesión mecánica [etapa d) del método de la invención] se seleccionarán aquellos cultivos viables, es decir, que posean un porcentaje bajo de células no viables, típicamente menos de 50% de células no viables, ventajosamente menos de 40% de células no viables, más ventajosamente menos de 30% de células no viables, preferentemente menos de 20% de células no viables, más preferentemente menos de 10% de células no viables, aún más preferentemente menos de 5% de células no viables, todavía más preferentemente menos de 1% de células no viables. El porcentaje de células no viables puede ser determinado usando los métodos descritos anteriormente.

Cultivo organotípico de la invención

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un cultivo organotípico tridimensional obtenible mediante el método de la invención, a partir de ahora cultivo organotípico de la invención. Dicho cultivo está caracterizado porque presenta una porción de cerebro de un animal no humano que comprende las zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular y presenta una lesión mecánica en las vías de señalización nigro-estriatal que conduce a una denervación de dichas vías de señalización. Como se ha mencionado previamente, dicha porción de cerebro de un animal no-humano que comprende las zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular, puede contener otras zonas del cerebro colindantes a dichas zonas, por ejemplo, del tálamo, subtálamo, núcleo subincerto, etc. En una realización particular, la parte del córtex presente en dicha porción de cerebro seleccionada, y, consecuentemente, en el cultivo organotípico de la invención, comprende el neo-córtex, preferentemente, comprende la corteza primaria somato sensorial.

Método de estudio de enfermedades neurodegenerativas de la invención

40 Los inventores han visto que el cultivo organotípico de la invención, sorprendentemente, reproduce las características funcionales de la PD, tales como la pérdida de neuronas dopaminérgicas, la formación de cuerpos de Lewy, la muerte de neuronas estriatales, etc.

45 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un cultivo organotípico de la invención como modelo para el estudio de una enfermedad neurodegenerativa; es decir, en otros palabras, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el estudio de una enfermedad neurodegenerativa que comprende el empleo de un cultivo organotípico de la invención como modelo.

50 En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo formado por enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, encefalopatía espongiiforme (BSE), síndrome de cocaína, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, demencia asociada a VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis múltiple, atrofia sistémica múltiple, neuroborreliosis, enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades causadas por priones ("prion diseases"), enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, esquizofrenia, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten, ataxia espinocerebelar, atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski, tabes dorsalis y enfermedad inflamatoria cerebral.

60 En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es cualquier enfermedad neurodegenerativa debida a un mal funcionamiento de las vías nigro-estriatales o de las vías cortico-estriatales (es decir, las conexiones axonales tanto aferentes como eferentes que conectan las regiones del córtex con el estriatum). En una realización concreta, dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson (PD).

65 En otra realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es la demencia.

En otra realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad causada por la toxicidad de algunos herbicidas tales como el Paraquat.

En otra realización preferida el cultivo organotípico de la invención puede ser utilizado para estudiar la denervación dopaminérgica; es decir, en otras palabras, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el estudio de la denervación dopaminérgica que comprende el empleo de un cultivo organotípico de la invención como modelo.

5 *Método de rastreo (“screening”) de agentes terapéuticos de la invención*

Los inventores han observado que el cultivo organotípico de la invención reproduce las características patológicas de una enfermedad degenerativa tal como la PD. En consecuencia, aquellos agentes que provoquen una mejora de los estadios patológicos observados en el cultivo organotípico de la invención podrían ser potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en general, y, en particular, en el tratamiento de la PD.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método de rastreo (“screening”) para identificar compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que comprende:

- a) poner en contacto un cultivo organotípico de la invención con el compuesto a ensayar; y
- b) analizar la viabilidad celular del cultivo,

en donde un compuesto se considera que es potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas cuando dicho cultivo organotípico permanece viable tras el tratamiento con dicho compuesto.

Así, en una primera etapa [etapa a)], el método de rastreo de agentes terapéuticos de la invención comprende poner en contacto un cultivo organotípico de la invención con el compuesto a ensayar. La expresión “poner en contacto”, tal como aquí se usa, se refiere al proceso por el cual un compuesto (o agente candidato) entra en contacto con un cultivo organotípico de la invención, e incluye cualquier posible forma “*in vitro*” de poner en contacto el compuesto de manera extracelular así como cualquier método que permita la introducción del compuesto en las células que forman parte del cultivo organotípico de la invención.

En una realización particular, la viabilidad de los cultivos organotípicos de la invención usados en este método ha sido previamente analizada antes de proceder a la puesta en contacto con el compuesto a ensayar de la invención. Los métodos para determinar la viabilidad de un cultivo organotípico de la invención que pueden ser utilizados en este aspecto inventivo ya han sido previamente descritos en relación con el método de la invención.

Los compuestos utilizados en el método de rastreo pueden ser compuestos químicos tanto orgánicos como inorgánicos. Entre los compuestos orgánicos, dicho compuesto puede ser un polímero biológico tal como un ácido nucleico o una proteína.

En una realización 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 formadas tanto por péptidos como por análogos peptídicos que comprenden D-aminoácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos formadas por 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 contener compuestos que puedan acceder al interior celular con mayor facilidad. Así, los compuestos se pueden seleccionar en base a determinados parámetros tales como tamaño, lipofiliidad, hidrofiliidad, 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, la invención comprende adicionalmente una o varias etapas de fraccionamiento de dicha mezcla y la repetición del método de la invención un número variable de veces hasta que el compuesto de la mezcla responsable de la separación de los elementos que forman el primer complejo de la invención se encuentre aislado. 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 o vegetal y estar obtenida de cualquier entorno, incluyendo, sin limitación, extractos de organismos terrestres, aéreos, marinos y similares.

Un experto en la materia entiende que para la realización de un ensayo “*in vitro*”, se pueden utilizar péptidos aislados de lisados de fracciones o de células enteras derivados sin limitación de células primarias, transformadas, líneas celulares, recombinantes, bacterias etc.

La incubación con el agente a ensayar se realiza a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Por otro lado, el uso de reacciones control negativas (sin agente) y positivas es recomendable.

En una realización particular de la invención, el agente a ensayar se trata de un péptido. Para la introducción del péptido en las células del cultivo de la invención se pueden usar diversos procedimientos bien descritos en el estado de la técnica. También se puede introducir el fragmento de ADN que codifica dicho péptido. Métodos de clonaje y propagación de dicho fragmento de ADN son bien conocidos en el estado de la técnica. Los medios para la distribución de genes a una célula o tejido in vivo incluyen (pero no están limitados a) inyección directa de ADN desnudo, métodos balísticos, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por receptores (complejo ligando-ADN), electroporación, y precipitación con fosfato cálcico (véase, por ejemplo, US 4970154, WO 96/40958, US 5679559, US 5676954 y US 5593875). También se incluye el uso de vectores virales tales como un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, poxvirus, lentivirus, virus del papiloma o el herpes simplex virus, uso de un conjugado ADN-proteína y el uso de un liposoma.

La segunda etapa [etapa b)] del método de rastreo de compuestos potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la invención comprende la determinación de la viabilidad del cultivo resultante de la etapa a) anterior. La determinación de la viabilidad del cultivo puede llevarse a cabo por cualquiera de los métodos de determinación de la viabilidad celular de un cultivo previamente descritos en relación con el método de la invención.

Adicionalmente, si se desea, en una realización particular, el método de rastreo de compuestos potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la invención comprende una etapa adicional [etapa c)] en la que se analiza la viabilidad de un cultivo control. En esta realización particular, se considera que el compuesto es potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas cuando el cultivo organotípico de la invención es igual o más viable que el cultivo control tras el tratamiento con dicho compuesto.

El experto en la materia entiende que existen diversos “cultivos control” para determinar la efectividad de un compuesto testado dependiendo del método utilizado para medir la viabilidad. Así, en general, los “cultivo control” utilizados pueden ser de tres tipos:

- i) el mismo cultivo organotípico de la invención antes de añadir el compuesto a ensayar;
- ii) un cultivo organotípico desarrollado usando el método de la invención, pero en el que no se ha generado la lesión mecánica por lo que dicho cultivo organotípico mantiene intactas las vías de señalización nigro-estriatales o nigro-estriatales-corticales; o
- iii) un cultivo organotípico de la invención, es decir un cultivo con las vías de señalización nigro-estriatales o nigro-estriatales-corticales no intactas, no expuesto al compuesto a ensayar.

En caso de que se usen cultivos control del tipo i), se compararía la viabilidad del cultivo antes y después del tratamiento con el compuesto a ensayar. En los casos ii) y iii), el cultivo control es preparado, preferentemente, de forma paralela al cultivo organotípico de la invención usado para ensayar el compuesto en cuestión.

En otra realización particular, se seleccionan aquellos compuestos que disminuyen la degeneración dopaminérgica, o que disminuyen el daño neuronal, o que inducen neurogénesis o que producen regeneración neuronal en el cultivo organotípico de la invención tratado con el compuesto a ensayar en comparación con un cultivo control. En esta realización particular, se pueden utilizar los mismos cultivos controles de la realización particular anterior.

En caso de que se usen cultivos control del tipo i), se compararía la disminución de la degeneración dopaminérgica, o la disminución del daño neuronal, o la inducción de la neurogénesis o la regeneración neuronal del cultivo, antes y después del tratamiento con el compuesto a ensayar.

En una realización particular, los compuestos a ensayar se administran antes de que se genere la lesión mecánica, lo que permite determinar si dichos compuestos tienen propiedades neuroprotectoras y pueden actuar como agentes neuroprotectores. Un “neuroprotector” o “agente neuroprotector” es una sustancia que previene daños en el cerebro debidos a isquemia, infarto cerebral, convulsiones o trauma. Algunos neuroprotectores deben ser administrados antes de que suceda el evento, aunque también es posible que ejerzan su efecto neuroprotector después.

La degeneración dopaminérgica se refiere a la degeneración que afecta a las células neuronales que producen dopamina. La determinación de la degeneración dopaminérgica se puede llevar a cabo usando, entre otros métodos conocidos por el experto en la materia, la determinación de marcadores de degeneración de neuronas dopaminérgicas así como cualquiera de los métodos anteriormente descritos en relación con el método de la invención, usados para verificar la funcionalidad de las conexiones neuronales. En una realización particular, se mide la funcionalidad de la vía nigro-estriatal midiendo la dopamina liberada en el medio de cultivo. En este caso, se considera que un compuesto disminuye la degeneración dopaminérgica cuando los valores de los marcadores de degeneración de neuronas dopaminérgicas entre dicho cultivo y los valores control han disminuido significativamente.

El término “neurogénesis”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la generación de nuevas neuronas. Estas neuronas se denominan precursores primarios que posteriormente se desarrollan en neuronas adultas. Para determinar la presen-

cia de neurogénesis en el cultivo organotípico de la invención se pueden usar diversos procedimientos bien descritos en el estado de la técnica para medir la proliferación celular o la generación de nuevas neuronas, así como la migración de las nuevas células. En una realización particular, la proliferación celular se mide mediante un método basado en la incorporación de bromodeoxiruridina (BrdU) por las células proliferantes presentes en el cultivo organotípico de la invención. En otra realización particular, se mide la migración de los neuroblastos usando marcadores apropiados, tales como la doblecortina (DCX) y la incorporación de BrdU. En otra realización particular, la migración celular de las nuevas células generadas en la región del SVZ se puede medir mediante transfección de moléculas fluorescentes en dicha región. Se conocen moléculas fluorescentes que pueden ser utilizadas en estos métodos así como métodos de transfección en cultivos organotípicos de vectores que contienen los nucleótidos que codifican dichas moléculas. En una realización particular, se sobreexpresa EGFP (proteína verde fluorescente) en la región SVZ mediante una infección lentiviral para seguir las células que migran desde dicha región. También pueden utilizarse marcadores de neurogénesis, es decir, moléculas cuyos cambios de expresión en las células que forman parte del cultivo organotípico de la invención sean indicadoras de un proceso de neurogénesis. Los métodos para la detección de los niveles de expresión de marcadores de neurogénesis son similares a los descritos para los marcadores de viabilidad celular. En una realización particular, la neurogénesis se visualiza usando un doble mareaje con BrdU y el marcador neuronal NeuN.

“Regeneración neuronal” o “Neuroregeneración” se considera sinónimo de “reparación de los nervios”, y se refiere a la renovación o reparación fisiológica de tejido nervioso dañado. Ejemplos de métodos para estudiar la regeneración neuronal incluyen la medición de características morfológicas, tales como la bajada de densidad de espinas sinápticas, la medición de marcadores de regeneración neuronal, etc.

En general, se considerará que un compuesto es potencialmente útil como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas cuando dicho compuesto disminuye significativamente la degeneración dopaminérgica, o disminuye significativamente el daño neuronal, o aumenta significativamente la neurogénesis o aumenta significativamente la regeneración neuronal en el cultivo organotípico de la invención tratado con el compuesto a ensayar (testar) en comparación con un cultivo control.

En la presente invención, se considera que el daño neuronal en el cultivo organotípico a estudiar tratado con el compuesto ha “disminuido significativamente” con respecto a un valor de referencia control cuando los valores obtenidos con los métodos descritos anteriormente para medir el daño neuronal en el cultivo organotípico a estudiar tratado con dicho compuesto se ven disminuidos con respecto al valor control obtenido del cultivo control en, al menos 2%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, o más.

Asimismo, en la presente invención, se considera que la degeneración dopaminérgica en el cultivo organotípico a estudiar tratado con el compuesto en cuestión ha “disminuido significativamente” con respecto a un valor de referencia control cuando los valores obtenidos con los métodos descritos anteriormente para medir la degeneración dopaminérgica en el cultivo organotípico a estudiar tratado con dicho compuesto se ven disminuidos con respecto al valor control obtenido del cultivo control en, al menos 2%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, o más.

En la presente invención, se considera que la neurogénesis en el cultivo organotípico a estudiar tratado con el compuesto ha “aumentado significativamente” con respecto a un valor de referencia control cuando los valores obtenidos con los métodos descritos anteriormente para medir la neurogénesis en el cultivo organotípico a estudiar tratado con dicho compuesto se ve incrementado con respecto al valor control obtenido del cultivo control en, al menos 2%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, o más.

Asimismo, se considera que la regeneración neuronal en el cultivo organotípico a estudiar tratado con el compuesto ha “aumentado significativamente” con respecto a un valor de referencia control cuando los valores obtenidos con los métodos descritos anteriormente para medir la regeneración neuronal en el cultivo organotípico a estudiar tratado con el compuesto en cuestión se ve incrementado con respecto al valor control obtenido del cultivo control en, al menos 2%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, o más.

En otra realización particular, se seleccionan aquellos compuestos que disminuyen la degeneración dopaminérgica, o disminuyen el daño neuronal, o inducen neurogénesis o producen regeneración neuronal en el cultivo organotípico de la invención tratado con el compuesto a ensayar en comparación con un cultivo control y no disminuyen la viabilidad del cultivo control. Los métodos para medir la viabilidad, la degeneración dopaminérgica, la disminución del daño neuronal, la inducción de neurogénesis o la regeneración neuronal, ya han sido descritos previamente.

ES 2 368 054 A1

En otra realización particular, para la selección de los compuestos que pueden ser potencialmente interesantes para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas se puede medir adicionalmente si dicho compuesto induce gliogénesis y regeneración de la glía (tanto oligodendroglia como astroglía), y/o disminuye el posible daño en las células gliales en el cultivo de la invención, y que no reducen la viabilidad del cultivo control. En una realización particular, la viabilidad de ambos cultivos se determina a través de ensayos de viabilidad celular, funcionalidad celular (electrofisiología) o producción y liberación de dopamina en el medio de cultivo.

En otra realización particular, se puede tratar el cultivo organotípico de la invención con células madre a través de co-cultivos o con “trasplantes” de células previamente pre-diferenciadas y que sobre-expresan proteínas fluorescentes, en la zona degenerada. Dichas células pueden ser también modificadas genéticamente para sobreexpresar moléculas protectoras o bien usadas como vectores para la sobreexpresión y liberación de dopamina. Métodos para la generación de dichas células así como los métodos de trasplante son conocidos en el estado de la técnica (Cho JS, *et al.*, 2009 Neurosci Lett. 454(1):43-8).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

Ejemplo 1

Generación de un modelo organotípico para la enfermedad de Parkinson

Materiales y métodos

Materiales

- Crías de rata de 3-4 días de vida.
- Medio de disección: Solución HBSS (Gibco 24020).
- Medio de cultivo: 50% HMBE (con 17 mM Hepes, Cell concepts M-L3397-I), 23% HBSS, 25% suero de caballo (Gibco 16050-122), 2% glucosa, 2 mM glutamina (Sigma G8540), antibióticos y antimicóticos (AntiAnti-Sigma, A5955).
- Solución salina fosfatada tamponada (PBS).
- Solución bloqueante (PBS, 0,1% Tritón, 3% albúmina de suero bovina (BSA)).
- Solución de lavado (PBS, 0,1% Tritón).
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-tirosina hidroxilasa (Chemicon MAB5280).
- Anticuerpo anti-alpha sinucleina (Ab Novocastra NCL-ASY).
- Anticuerpo anti-ratón Alexa Fluor 488 antibody (Invitrogen MLM20).

Equipamiento

- Materiales de disección: fórceps, pinzas, 2 espátulas de plástico, tijeras, pipeta Pasteur invertida.
- Bomba para pipetas (1 ml).
- Pegamento para electrofisiología.
- Vibratomo (Peleo 3000).
- Carbogeno (90-95% O₂ + 5-10% CO₂).
- Microscopio de disección.
- Membranas Millicell (Millipore PIC0RG50).
- Placas petri (Iwaki 3810-006).
- Incubador de cultivo celular (37°C, 5% CO₂).
- Cabina de flujo laminar.
- Microscopio confocal (Zeiss).

Para obtener el modelo organotípico, se prepararon placas con el medio de cultivo y se limpiaron los instrumentos de disección con etanol. El medio de disección se oxígeno usando carbogeno durante 15 minutos. La crías fueron decapitadas y tras retirar la piel se procedió a abrir el cráneo con unas tijeras (Fig. 1A). Tras retirar el cráneo, el cerebro se depositó en una placa con medio de disección oxigenado. A continuación, se cortó el cerebelo y se separaron los dos hemisferios cerebrales. Tras eliminar 1/3 del córtex cerebral (Fig 1B) se pegaron las partes caudales de cada hemisferio a la placa de cortar del vibratomo y se realizaron cortes de 350 μm de espesor con un corte de 45° (Fig. 2A) de manera que los cortes comprendiesen la *substantia nigra-caudate putamen*-zona subventricular y el córtex cerebral. Los cortes fueron depositados en membranas Millicell con medio de cultivo.

Los cortes se cultivaron usando el método de interfases (Stoppini L *et al.*, 1991 J Neurosci Methods. 37(2): 173-82) (Fig. 2B-D) de manera que los cortes reciben los nutrientes solamente por la parte posterior por medio de la membrana semipermeable mientras que la parte superior está expuesta a aeración. Cada 3-4 días se procedió a reemplazar el medio de cultivo por medio de cultivo fresco.

15 *Determinación del daño celular*

Para seleccionar los cortes viables, se determinó el daño celular en los cortes usando el método de incorporación de yoduro de propidio (PI) (Pozzo Millar *et al.*, 1994 Neuroscience 63: 471-487). Los cultivos se incubaron con medio de cultivo que contenía PI (10 μM) durante 2 horas en el incubador a 37°C. Posteriormente, los cortes fueron analizados al microscopio invertido usando una luz de excitación de 510-560 nm. Las imágenes se adquirieron usando filtros para rodamina y una cámara CCD. Las imágenes fueron analizadas con un programa de imagen en el ordenador.

25 *Generación de la degeneración neuronal dopaminérgica y estriatal*

El daño dopaminérgico similar al encontrado en la enfermedad de Parkinson fue generado cortando entre el *caudate putamen* y la *substantia nigra* con una bisturí tal y como se muestra en la Figura 2D tras 7 DIV (días *in vitro*). Cortes dañados y cortes control se analizaron usando inmunofluorescencia tras 10 DIV (véase Fig 3-6 y Tabla 1).

El daño nigro-estriatal se estudió usando inmunofluorescencia para el marcador de inervación dopaminérgica, tirosina hidroxilasa, y para el marcador de los cuerpos de Lewy, alfa-sinucleína.

Los cultivos organotípicos fueron lavados 2 veces con PBS y fijados durante 40 minutos con paraformaldehído en PBS al 4% durante 40 minutos. Tras 2 lavados con PBS, los cortes fueron incubados en agitación leve durante 30 minutos a temperatura ambiente con solución bloqueante de BSA al 5% para bloquear los epítomos no específicos. Los cortes fueron incubados una noche a 4°C con el anticuerpo primario contra tirosina hidroxilasa (1:500) o con el anticuerpo primario contra alfa-sinucleína (1:200) en solución bloqueante. Tras lavar los cortes 3 veces a temperatura ambiente con solución de lavado, los cortes se incubaron en agitación leve con los anticuerpos secundarios (1:500) diluidos en solución bloqueante durante 90 minutos. Los cortes se lavaron 3 veces a temperatura ambiente con solución de lavado. Para retirar el Tritón de los cortes, éstos se incubaron durante 10 minutos con PBS. Opcionalmente, los cortes pueden ser tratados con la tinción de Hoechst durante 1 minuto y posteriormente lavados. Los cortes se montan en un porta con solución de montaje (anti-fading gel).

Por último los cortes se analizaron usando microscopía confocal usando los láseres y filtros adecuados para la detección de las moléculas fluorescentes utilizadas. La tinción de Hoechst se visualiza usando luz ultravioleta.

50 *Resultados*

Para confirmar que la sección de la vía nigro-estriatal tiene efectos en la inervación dopaminérgica del *caudate putamen*, se examinó la expresión de tirosina hidroxilasa por medio de inmunofluorescencia en la *substantia nigra* (Fig. 3A-B) y el estriatum (Fig. 4A-C).

Con respecto a la *substantia nigra*, los cortes mantenidos durante 10 DIV sin degeneración dopaminérgica (Fig. 3A), presentan células con niveles altos de expresión de tirosina hidroxilasa. La tirosina hidroxilasa es expresada en células con la morfología típica de neuronas dopaminérgicas. Al cabo de 3 tres días de la denervación dopaminérgica, el número de neuronas en la *substantia nigra* que expresan dicho marcador desciende de manera clara como se puede apreciar en la Figura 3B. En el striatum (*caudate putamen*) también se puede observar que la expresión de tirosina hidroxilasa también se ve afectada por la denervación. En cortes control sin denervación (Fig. 4A), se puede observar una densidad moderada de terminales dopaminérgicas rodeando las células estriatales. En el cultivo organotípico sometido a denervación, el número de terminales dopaminérgicas rodeando las células estriatales disminuye drásticamente (Fig. 4B). Es de destacar que en este punto, la viabilidad neuronal no parece estar afectada, como se puede comprobar por la inmunofluorescencia de NeuN en los núcleos neuronales (Figs. 4A y 4B). Sin embargo, las terminales dopaminérgicas aparecen disminuidas, por lo que este es un espacio de tiempo adecuado para estudiar los efectos de la denervación dopaminérgica.

Tres días después de la denervación dopaminérgica, el *caudate putamen* presenta síntomas de daño neuronal similar al observado en la enfermedad de Parkinson. Como se puede ver en la Figura 4C, en este momento se pueden observar en el cultivo organotípico una disminución de las neuronas dopaminérgicas (Fig. 3-*substantia nigra*) así como una degeneración de fibras dopaminérgicas (Fig. 4B-*caudate putamen*) y la presencia de agregaciones de alfa sinucleína (Fig. 4C).

El modelo presentado en esta invención, además de ser un nuevo modelo *in vitro* de la enfermedad de Parkinson, también es una herramienta válida para el estudio de la neurogénesis inducida por denervación dopaminérgica, debido a la presencia de la zona subventricular en el corte. Como se puede observar en las Figuras 5A-C, la tirosina hidroxilasa se expresa mayoritariamente en las fibras aferentes terminales del *caudate putamen* (Fig. 5C), mientras que unas pocas células positivas se localizan en la zona subventricular (Fig. 5B). La denervación dopaminérgica inducida por la transección de la vía nigro-estriatal, (Fig. 5D-F) estimula la sobre-regulación de la tirosina hidroxilasa en células de la zona subventricular (Fig. 5E), mientras que produce una reducción de terminales dopaminérgicas en el *caudate putamen* (Fig. 5F). Por ello, la denervación dopaminérgica, puede estimular células precursoras de la zona subventricular a pre-diferenciarse en precursores neuronales.

Ejemplo 2

Evaluación y rastreo de drogas usando un modelo organotípico de Parkinson

Para la evaluación y el rastreo de fármacos o bibliotecas de fármacos se consideran 4 fases (Figura 6). La transección dopaminérgica y el daño se inducen después de 4 DIV.

Fase 0: selección; antes de cada experimento, la viabilidad del cultivo es testada a través la incorporación de yoduro de propidio y la liberación de LDH en el medio de cultivo, u opcionalmente a través la inyección de compuestos trazadores neuronales anterógrados en la *substantia nigra*. Solo las rodajas que no incorporan yoduro de propidio son incluidas en el diseño experimental.

Fase 1: dosis respuesta en rodajas controles y denervadas; el rango de dosis respuesta está establecido entre 1 nM y 1 mM. La viabilidad celular y la activación de la neurogénesis (medida a través de proliferación celular y migración de neuroblastos se evalúa un día después de la denervación).

Fase 2: curso temporal en rodajas controles y denervadas; la eficiencia de la concentración elegida para cada fármaco se se examina en tiempos distintos de tratamiento (entre 6 horas y 5 días).

Fase 3: evaluación y valoración de la concentración y del tiempo de tratamiento del fármaco elegido combinando diferentes parámetros (viabilidad celular: incorporación de yoduro de propidio o cresil violeta combinado con medición de liberación de LDH, inmunofluorecencia y tinción con Hoechst; neurogénesis: inmunofluorescencia para marcadores específicos-DCX/BrdU-, uso de animales transgénicos para la expresión de proteínas fluorescentes, como YFP o GFP, reguladas por promotores de genes específicos en neuroblastos-*pNestina*-).

Parámetros evaluados: viabilidad celular y activación de neurogénesis (Fase 1 y Fase 2); viabilidad celular y neurogénesis (Fase 3).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para obtener un cultivo organotípico de una porción de cerebro de un animal no humano que comprende las zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 a) diseccionar el cerebro de dicho animal no humano, seleccionar una porción de dicho cerebro que comprende dichas zonas *substantia nigra*, striatum, córtex y zona subventricular y que, además, mantiene intacta la vía de señalización nigro-estriatal, y mantener dicha porción de cerebro en las condiciones adecuadas para su supervivencia;
- 15 b) transferir dicha porción de cerebro a un soporte que permite la captación de oxígeno y nutrientes por dicha porción de cerebro;
- 20 c) mantener dicha porción de cerebro bajo condiciones que garantizan la supervivencia celular del mismo; y
- d) generar en dicha porción de cerebro una lesión mecánica de las vías de señalización nigro-estriatales que conduce a una denervación de dichas vías de señalización.
- 25 2. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa d) se genera una lesión mecánica de las vías de señalización nigro-estriatales-corticales.
- 30 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el animal no-humano es un roedor.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la disección en la etapa a) se realiza de manera que la porción de cerebro seleccionada comprende una porción dorso-ventral.
- 35 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la porción de cerebro seleccionada tiene un espesor comprendido entre 100 micrómetros y 500 micrómetros, preferentemente, entre 300 y 400 micrómetros.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la lesión mecánica generada en la etapa d) se realiza por medio de un corte entre el *caudate putamen* y la *substantia nigra*.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende, además, la determinación de la viabilidad del cultivo.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la viabilidad del cultivo se determina mediante un método seleccionado entre inspección visual bajo microscopio, un inmunoensayo utilizando colorantes vitales, la cuantificación de la agregación de alfa-sinucleína, la cuantificación de neuronas positivas a tirosina hidrolasa, la secreción de dopamina o neurotransmisores, o combinaciones de los mismos.
- 45 9. Un cultivo organotípico tridimensional obtenible mediante un método como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Uso de un cultivo organotípico tridimensional según la reivindicación 9, como modelo para el estudio de una enfermedad neurodegenerativa.
- 50 11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad neurodegenerativa debida a un mal funcionamiento de las vías nigro-estriatal o cortico-estriatal.
12. Uso según la reivindicación 10, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa es la Enfermedad de Parkinson.
- 55 13. Uso de un cultivo organotípico tridimensional según la reivindicación 9, como modelo para el estudio de la denervación dopaminérgica.
14. Un método para el estudio de una enfermedad neurodegenerativa o de la denervación dopaminérgica que comprende el empleo como modelo de un cultivo organotípico tridimensional según la reivindicación 9.
- 60 15. Método según la reivindicación 14, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad neurodegenerativa debida a un mal funcionamiento de las vías nigro-estriatal o cortico-estriatal.
- 65 16. Método según la reivindicación 14, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa es la Enfermedad de Parkinson.

ES 2 368 054 A1

17. Un método de rastreo para identificar compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que comprende:

- a) poner en contacto un cultivo organotípico según la reivindicación 9 con el compuesto a ensayar; y
- b) analizar la viabilidad celular del cultivo,

en donde un compuesto se considera que es potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas cuando dicho cultivo organotípico permanece viable tras el tratamiento con dicho compuesto.

18. Método según la reivindicación 17, que comprende, además, la realización de una etapa c) adicional en la que se analiza la viabilidad de un cultivo control, y el compuesto se considera que es potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas cuando dicho cultivo organotípico tratado con dicho compuesto permanece igual o más viable que el cultivo control.

19. Un método de rastreo para identificar compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que comprende poner en contacto un cultivo organotípico tridimensional según la reivindicación 9 con el compuesto a ensayar, y seleccionar aquellos compuestos que disminuyen la degeneración dopaminérgica, o que disminuyen el daño neuronal, o que inducen neurogénesis o que producen regeneración neuronal en dicho cultivo organotípico tratado con el compuesto a ensayar en comparación con un cultivo control.

20. Método según la reivindicación 19, en el que, adicionalmente, se mide la viabilidad del cultivo organotípico tridimensional según la reivindicación 9 después de la administración del compuesto a ensayar y la viabilidad del cultivo control, y se seleccionan aquellos compuestos que no disminuyen la viabilidad del cultivo control.

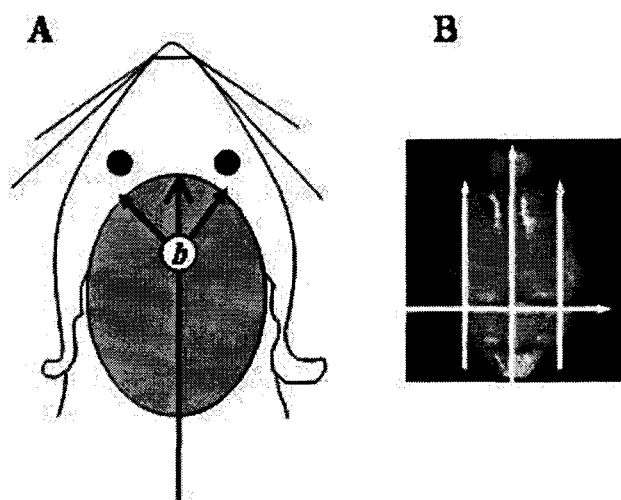


Figura 1

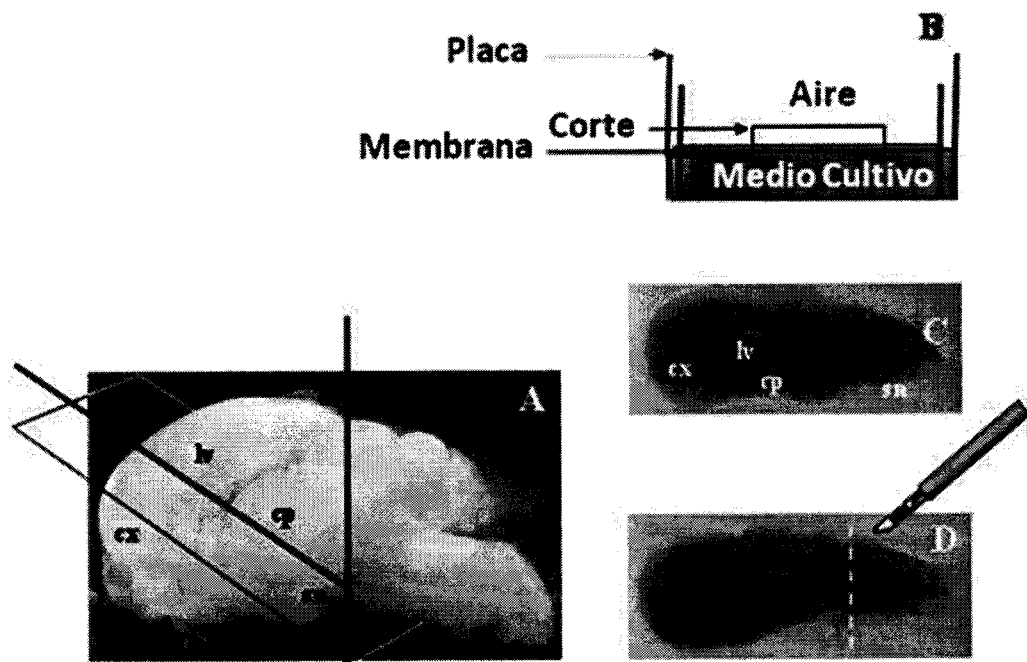


Figura 2

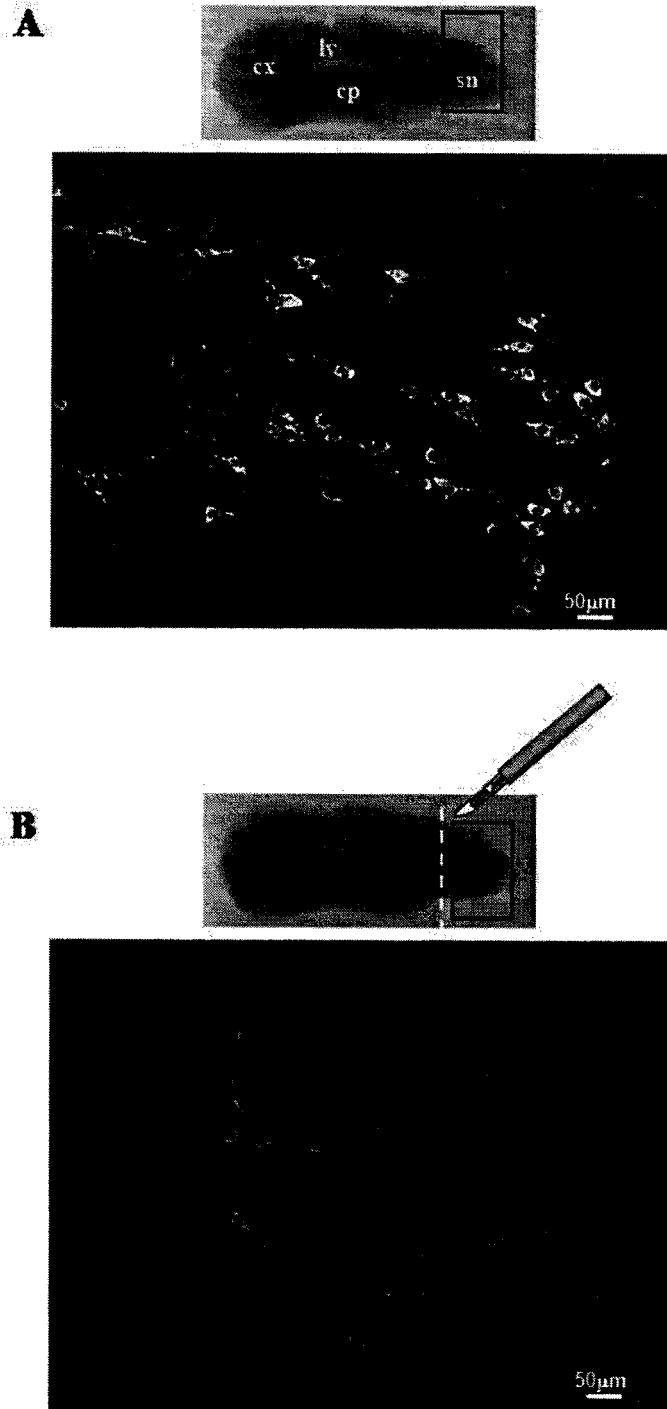


Figura 3

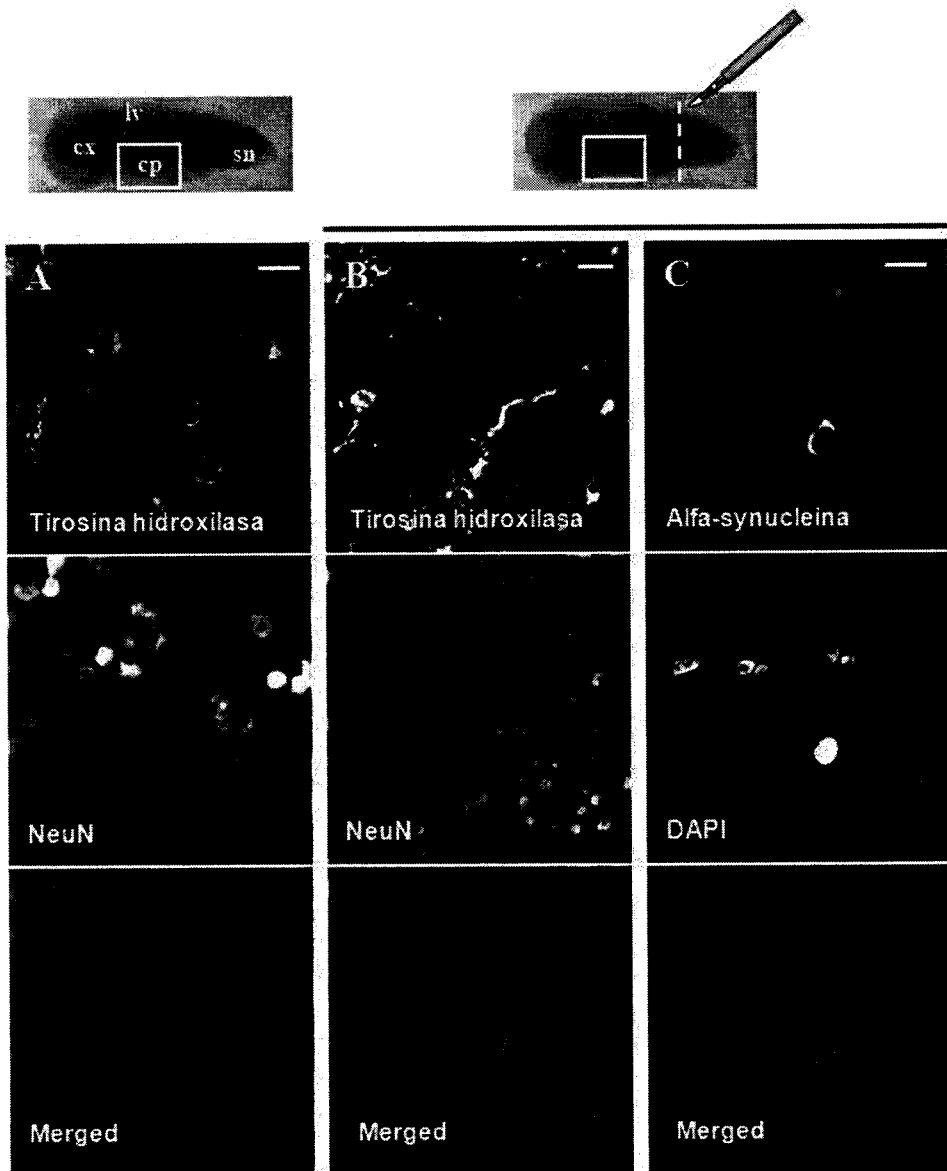


Figura 4

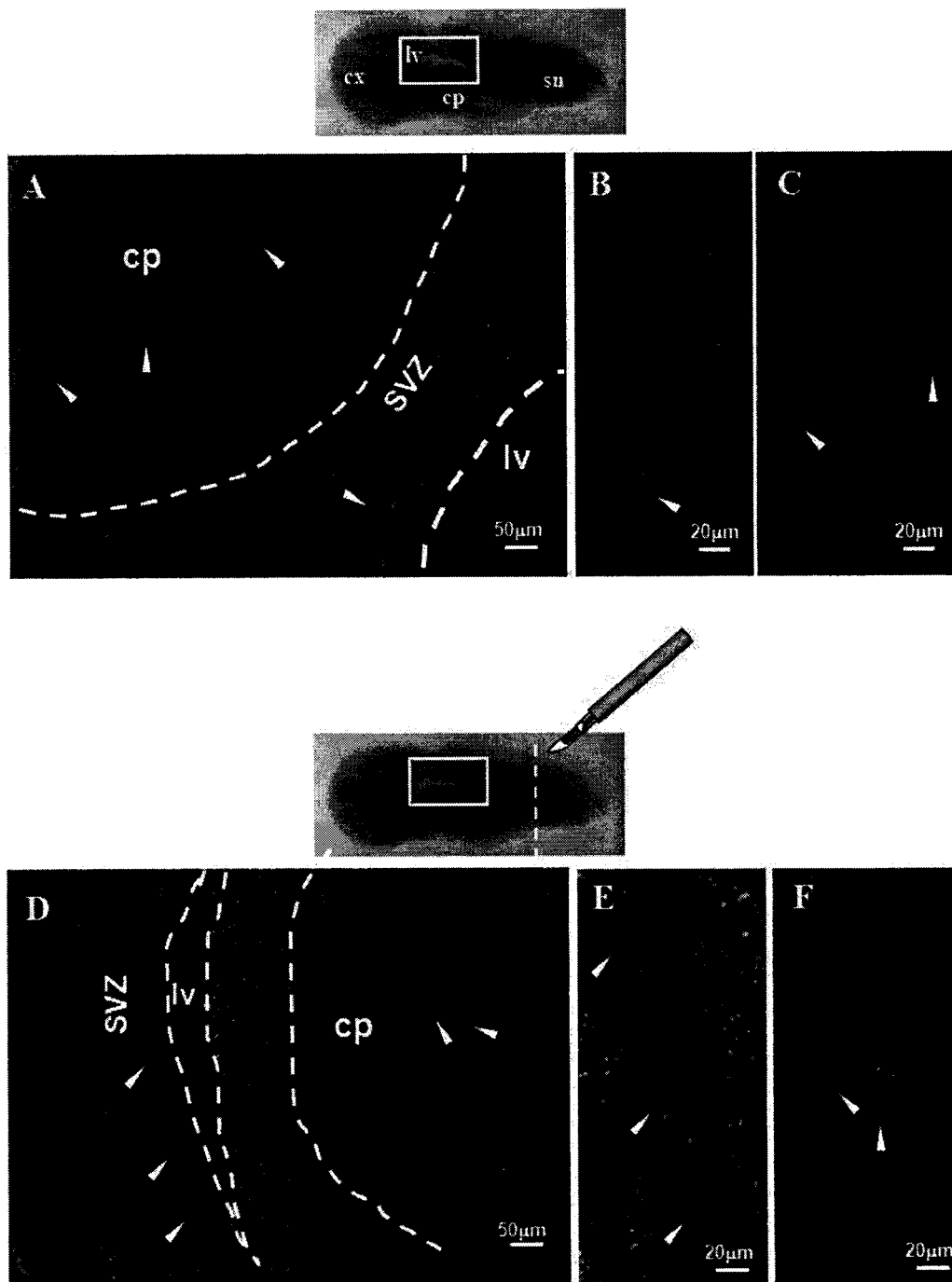


Figura 5

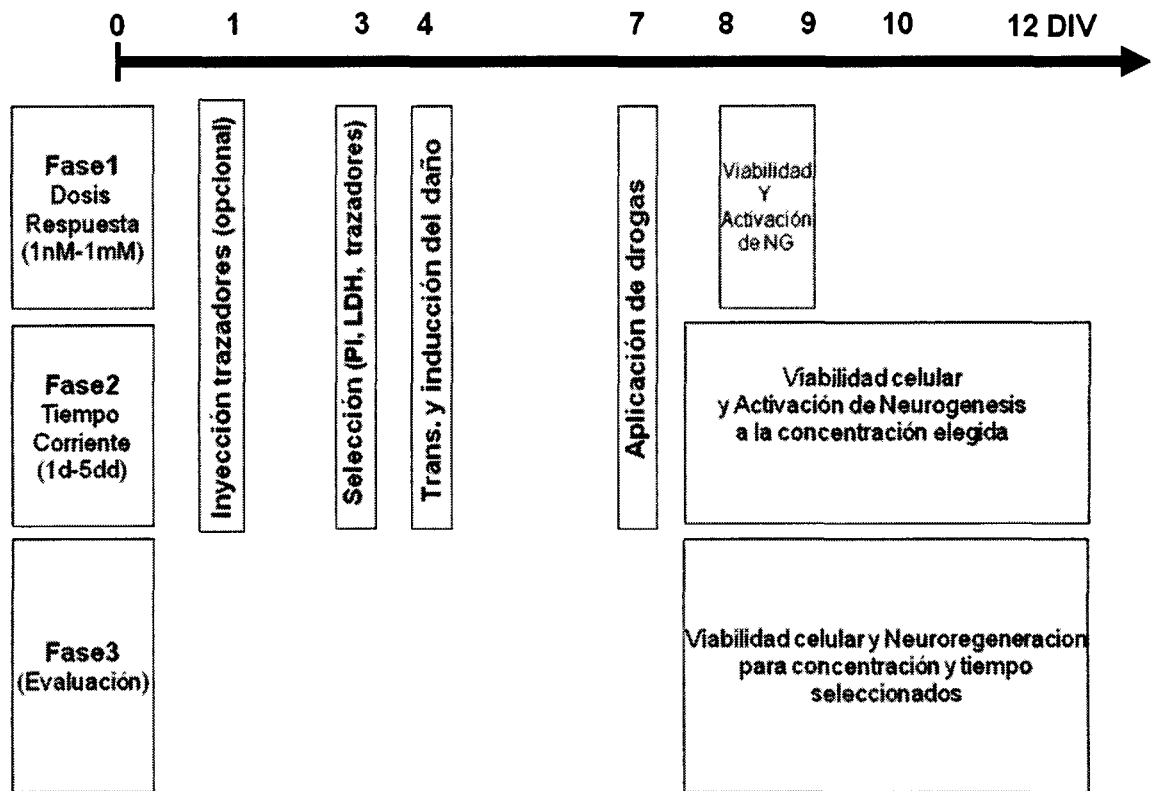


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901425

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.06.2009

②③ Fecha de prioridad: **00-00-0000**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2006047299 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC) 04.05.2006, todo el documento.	1-20
A	KEARNS, SM et al.: "A Method for a More Complete <i>in vitro</i> Parkinson's Model: Slice Culture Bioassay for Modeling Maintenance and Repair of the Nigrostriatal Circuit", J. Neurosci. Methods (2006) vol. 157, pp.: 1-9, todo el documento.	1-20
A	WO 0226107 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 04.04.2002, todo el documento.	1-20
A	WO 0156647 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 09.08.2001, todo el documento.	1-20
A	TESTA, CM et al.: "Rotenone Induces Oxidative Stress and Dopaminergic Neuron Damage in Organotypic <i>Substantia Nigra</i> Cultures", Mol. Brain Res. (2005), vol. 134, pp.: 109-118, todo el documento.	1-20
A	MATHUR, BN et al.: "Systemic Administration of a Proteasome Inhibitor Does Not Cause Nigrostriatal Dopamine Degeneration", Brain Res. (2007), vol. 1168, pp.: 83-89, todo el documento.	1-20
A	EP 1340424 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 19.02.2003, todo el documento.	1-20

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: TODAS

Fecha de realización del informe

23.11.2010

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/0793 (2010.01)

G01N33/68 (2006.01)

G01N33/74 (2006.01)

G01N33/573 (2006.01)

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

C12N G01N, G01N

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, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-20	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.

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006047299 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC) 04.05.2006, todo el documento.	
D02	KEARNS, SM et al.: "A Method for a More Complete in vitro Parkinson's Model: Slice Culture Bioassay for Modeling Maintenance and Repair of the Nigrostriatal Circuit", J. Neurosci. Methods (2006) vol. 157, pp.: 1-9, todo el documento.	
D03	WO 0226107 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 04.04.2002, todo el documento.	
D04	WO 0156647 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 09.08.2001, todo el documento.	
D05	TESTA, CM et al.: "Rotenone Induces Oxidative Stress and Dopaminergic Neuron Damage in Organotypic Substantia Nigra Cultures", Mol. Brain Res. (2005), vol. 134, pp.: 109-118, todo el documento.	
D06	MATHUR, BN et al.: "Systemic Administration of a Proteasome Inhibitor Does Not Cause Nigrostriatal Dopamine Degeneration", Brain Res. (2007), vol. 1168, pp.: 83-89, todo el documento.	
D07	EP 1340424 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 19.02.2003, todo el documento.	

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 solicitud reivindica un procedimiento para obtener un cultivo organotípico de una porción de cerebro de un animal (no humano) que incluye las regiones *substantia nigra*, *striatum*, córtex y zona subventricular. Así mismo, se reivindica el uso de este cultivo como modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson.

Se entiende por cultivo organotípico, aquel cultivo celular adherente que no crece sólo en dos dimensiones (bidimensional) sino en tres, por lo que es más cercano al crecimiento de un tejido real.

El procedimiento de obtención del cultivo incluye disección del cerebro del animal y selección de la porción adecuada; transferir dicha porción a un medio de cultivo adecuado y generar en la misma una lesión mecánica de las vías de señalización nigro-estriatales (denervación de estas vías).

El método de estudio de enfermedades neurodegenerativas incluye el rastreo ("screening") de compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de las mismas (reivindicado).

D01-D07 constituyen un reflejo del estado de la técnica anterior. Se refieren a modelos, como el de la solicitud, para el estudio de enfermedades como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y otras. Sin embargo, tanto los modelos en sí, como los métodos para obtenerlos son distintos. En unos casos, la parte elegida del cerebro es otra. En otros, además, no se provoca lesión cerebral o, si se provoca, se lleva a cabo mediante agentes químicos y no de forma mecánica. En cualquier caso, de los documentos citados D01-D07 no se desprende de manera obvia para un experto en la materia el objeto de la invención tal y como consta en las reivindicaciones de la solicitud.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-20 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad y de actividad inventiva.