

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 787**

21 Número de solicitud: 201030830

51 Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 5/079** (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **31.05.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.10.2012**

71 Solicitante/s:  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
CIUDAD UNIVERSITARIA DE CANTOBLANCO,  
C/ EINSTEIN, 3  
28049 MADRID, ES y  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMEDICA EN  
RED DE ENFERMEDADES RARAS (CIBERER)**

72 Inventor/es:  
**DÍAZ NIDO, JAVIER;  
KATSU JIMÉNEZ, YURIKA y  
PÉREZ-LUZ, SARA**

74 Agente/Representante:  
**Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **LINEA CELULAR NEURAL INDUCIBLE DE DEFICIENCIA DE FRATAXINA.**

57 Resumen:

Línea celular neural inducible de deficiencia de frataxina.

La presente invención se refiere a una línea celular de origen neural y capaz de diferenciarse a células neuronales, en la que se puede inducir la deficiencia de frataxina. La presente invención se refiere también al uso de dicha línea celular como modelo de la enfermedad de la ataxia de Friedreich para ensayos de alto rendimiento de búsqueda de moléculas con potencial terapéutico en el tratamiento de esta enfermedad.

ES 2 387 787 A1

DESCRIPCION

**Línea celular neural inducible de deficiencia de frataxina**

La presente invención se refiere a una línea celular de origen neural y capaz de diferenciarse a células neuronales, en la que se puede inducir la deficiencia de frataxina. La presente invención se refiere también al uso de dicha línea celular como modelo de la enfermedad de la ataxia de Friedreich para ensayos de alto rendimiento de búsqueda de moléculas con potencial terapéutico en el tratamiento de esta enfermedad.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La ataxia de Friedreich (AF) es la ataxia hereditaria más frecuente, con una prevalencia en España de casi 5 enfermos por cada 100.000 habitantes. Desde el punto de vista genético, la ataxia de Friedreich es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen Fxn (localizado en el cromosoma 9q13). Este gen codifica para una proteína denominada frataxina, cuya localización y función ocurre en la mitocondria (Campuzano et al. 1996. Science 5254; 1423-1427).

20 La mutación mayoritariamente responsable de la AF consiste en una expansión de un trinucleótido GAA repetido, localizada en el primer intrón del gen de la frataxina. Dicha expansión tiene un efecto inhibitor de la transcripción del gen, por lo que conlleva una reducción de la expresión de la frataxina (Sakamoto et al. 1999. Molecular Cell 3; 465-475).

25 Tanto la edad de la aparición de la enfermedad como la severidad de la misma están inversamente correlacionadas con la longitud de la expansión de tripletes GAA. A mayor longitud de expansión se observa un nivel celular menor de frataxina, y la enfermedad es más severa y de inicio más temprano. Así pues, la deficiencia de frataxina parece ser la responsable del proceso degenerativo que caracteriza la AF. La mayoría de los pacientes presentan niveles de frataxina en torno al 5-10% de los niveles normales. Los pacientes con las

formas de AF de inicio más tardío y afectación menos drástica tienen niveles de frataxina en torno al 20-25% de los niveles normales. Las personas portadoras presentan unos niveles de frataxina en torno al 55-60% de los niveles normales y no manifiestan ningún signo clínico de la enfermedad (Pianese et al. 2004. 5 Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry 75; 1061-1063)

El proceso neurodegenerativo típico de la AF afecta preferentemente a algunos tipos de neuronas en los ganglios espinales dorsales, en la médula espinal, en el tronco del encéfalo y en el cerebelo. Las regiones más afectadas son la 10 médula espinal (fundamentalmente los tractos espinocerebelosos, las columnas posteriores y las raíces dorsales) y el núcleo dentado del cerebelo. La manifestación extraneurológica más importante es la cardiomiopatía hipertrófica, presente en entre el 70 y el 90 % de los pacientes. Además, entre el 10 y el 30 % de los enfermos de AF desarrollan diabetes mellitus (Palau, F. 15 2001. International Journal of Molecular Medicine 7; 581-589).

Se han utilizado diferentes modelos experimentales para avanzar en la comprensión de la función biológica de la frataxina, así como para entender los mecanismos moleculares patogénicos implicados en la enfermedad. Como 20 modelos celulares, se han utilizado tanto cultivos primarios de fibroblastos (Calmels et al. 2009. PloS one 4; e6379) o de linfoblastos (Pastore et al. 2003. The Journal of biological chemistry 278; 42588-42595) de pacientes con AF, como líneas celulares establecidas en las que se ha inducido una deficiencia de frataxina mediante distintos procedimientos, incluyendo ribozimas 25 específicos o ARN de interferencia.

Curiosamente, apenas se han utilizado modelos celulares neuronales de deficiencia de frataxina, a pesar del hecho de que la AF es una enfermedad fundamentalmente neurodegenerativa. Lu y colaboradores han estudiado el 30 efecto de la reducción en los niveles de frataxina (mediante la transfección de ARN de interferencia) en varias líneas celulares neurales, algunas neuronales, otras oligodendrogiales y otras de células de Schwann (Lu et al. 2009.

Biochimica et Biophysica Acta 1972; 1052-1061). Sin embargo, Lu y colaboradores se han centrado en el efecto de la deficiencia de frataxina en las líneas de células de Schwann, y no han estudiado en profundidad el mecanismo de neurodegeneración en líneas neuronales. Más aún, no han encontrado coherencia en los resultados de viabilidad en las distintas líneas neuronales estudiadas.

El desarrollo de modelos celulares neuronales de deficiencia de frataxina es actualmente una necesidad para el descubrimiento de sustancias terapéuticas dirigidas a retrasar o inhibir el proceso neurodegenerativo característico de la enfermedad.

Otra dificultad asociada al manejo de los modelos celulares de deficiencia de frataxina proviene del hecho de que dicha deficiencia provoca una disminución de la proliferación celular. Así pues, existe una fuerte presión selectiva en contra de las células deficientes de frataxina. Como consecuencia de ello, se ha descrito que las líneas celulares de fibroblastos van incrementado el nivel de frataxina con los pases sucesivos. La única manera de solventar este problema, que es inherente al déficit proliferativo de las células deficientes de frataxina, es el desarrollo de modelos celulares en los que sea posible inducir la deficiencia de frataxina.

En resumen, es preciso solventar las dos carencias principales en el ámbito de los modelos celulares de deficiencia de frataxina: la ausencia de modelos celulares neuronales y la posibilidad de inducir la deficiencia de frataxina.

Los autores de la presente invención han desarrollado líneas celulares establecidas a partir de células de linaje neural que tienen la capacidad de diferenciarse a neuronas y en las que es posible inducir el silenciamiento de la expresión del gen de frataxina.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un nuevo modelo celular de la ataxia de Friedreich (AF), constituido por una célula, línea o población celular de origen neural capaz de diferenciarse a células neuronales y en la que se puede inducir la deficiencia de frataxina (Fxn). La ventaja principal de que la deficiencia de frataxina pueda inducirse en la célula de la invención es que se puede controlar temporalmente la expresión de la frataxina. Así, se puede mantener a la célula en proliferación o bien diferenciarla a neuronas, sin que se vea afectada su viabilidad por la ausencia de frataxina, y activar la deficiencia de frataxina en el momento deseado para provocar la neurodegeneración.

Concretamente, la presente invención muestra la obtención de líneas clonales estables de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y capaces de diferenciarse a células neuronales y en las que es posible la inducción de la deficiencia de frataxina mediante la adición de un análogo de tetraciclina, como la doxiciclina, al medio de cultivo.

Las líneas clonales inducibles obtenidas a partir de la transducción del neuroblastoma humano SH-SY5Y con un vector lentiviral inducible por doxiciclina, pueden diferenciarse a células neuronales en las que es posible inducir una deficiencia de frataxina, lo que dispara un proceso neurodegenerativo. Estas líneas permiten estudiar las bases moleculares de dicho proceso neurodegenerativo, así como ensayar el efecto de potenciales sustancias terapéuticas que puedan detener o retrasar dicho proceso neurodegenerativo.

El término “modelo celular”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un cultivo celular en el que se reproducen los fenómenos característicos de una enfermedad o condición, en este caso, la AF. En particular, la característica de la AF que reproduce el modelo celular de la invención es que presenta bajos niveles de expresión de la proteína frataxina.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una célula neural (en adelante llamada célula de la invención) que comprende un vector de expresión de un ARN de interferencia de la frataxina, controlado por un operador inducible.

5

El término “neural”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al origen del tejido del que procede la célula o línea celular. El origen neural se refiere a un tejido del sistema nervioso. A nivel celular, el término neural hace referencia a los tres linajes o tipos celulares que incluyen las neuronas, los  
10 astrocitos y los oligodendrocitos.

El término “vector”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una construcción génica o secuencia de ADN o ARN que contiene una serie de elementos funcionales, que incluyen secuencias de control, tales como, por  
15 ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión de factores de transcripción o elementos reguladores). El vector puede incluir plásmidos bacterianos, vectores virales y otros vectores bien conocidos y documentados en el estado de la técnica. Se conoce, así mismo,  
20 una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarióticas o eucarióticas (células hospedadoras) para su expresión. Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en el estado de la técnica. Un “vector” es un replicón al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del  
25 segmento unido. Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación génica dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control. El término “secuencia de control” se refiere a secuencias de nucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La  
30 naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en

eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también  
5 puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

El término “inducible”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la posibilidad de controlar la expresión de una secuencia polinucleotídica en el tiempo, y hace referencia a la presencia de un elemento  
10 de control. Dicho elemento de control permite activar o desactivar la expresión mediante, por ejemplo, la adición de una sustancia al medio de cultivo.

El término “deficiencia”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la disminución de los niveles de la proteína frataxina o a su ausencia,  
15 con respecto a los niveles de una célula o situación control.

La frataxina es la proteína codificada por el gen de la frataxina (Fxn) localizado en el cromosoma 9q13.

20 Preferiblemente, la célula neural de la invención es capaz de diferenciarse a neuronas.

Preferiblemente, el vector inducible comprende la secuencia de ARN de interferencia de la frataxina SEQ ID NO: 1. El término “ARN de interferencia” tal  
25 y como se emplea en la presente descripción, se refiere a secuencias de ARN que interfieren en la expresión de otras secuencias. Se han descrito hasta la fecha distintos tipos de ARN de interferencia o ARN interferente, que son generalmente pequeñas secuencias de entre 20-25 nucleótidos, entre los que se encuentran los ARN interferentes pequeños (siRNA de “*small interfering RNA*”), los ARN de horquilla pequeña (shRNA de “*short hairpin RNA*”) y los  
30 micro ARN (miRNA de “*micro RNA*”).

- Preferiblemente, el vector inducible es un vector lentiviral. El término “lentiviral”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al origen de algunos de los elementos del vector, cuyo origen es un genoma de un lentivirus. Los lentivirus son virus cuyo genoma es de ARN, que se retro-transcribe transitoriamente a ADN para integrarse en el genoma de la célula hospedadora, gracias a las secuencias LTR (del inglés “*Long Terminal Repeats*”) por un mecanismo bien conocido y descrito en el estado de la técnica.
- 10 Preferiblemente, el vector inducible comprende el módulo TetO. Preferiblemente, el vector inducible comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión formada por TetR y el dominio KRAB (del inglés “*Krüppel-associated box*”, es un dominio de tipo dedo de zinc, del inglés “*Zinc finger*”). El término “módulo TetO”, (de “Operador Tet”), también conocido como TRE (del inglés “*Tetracycline-responsive Element*”) se refiere a la
- 15 secuencia de nucleótidos del operador Tet, a la que se une la proteína TetR o represor Tet en ausencia de tetraciclina o un análogo de la misma, como por ejemplo la doxiciclina. Cuando no está presente la tetraciclina o un análogo, la proteína de fusión TetR-KRAB está unida a TetO de forma que altera la
- 20 estructura de la cromatina e impide la expresión de las secuencias de nucleótidos que se encuentran en las proximidades de dicho operador. En presencia de tetraciclina o un análogo, TetR-KRAB se libera, permitiendo así la transcripción de dichas secuencias.
- 25 Preferiblemente, el vector inducible comprende una secuencia que codifica para un marcador. Más preferiblemente, el marcador es la proteína verde fluorescente (GFP). El término “marcador”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una proteína que permite su fácil detección y/o cuantificación, en la célula, el tejido o el organismo en la que se expresa, como
- 30 puede ser una proteína autofluorescente o una enzima que, en presencia de su sustrato, genera un producto coloreado, como la beta-galactosidasa. Se han descrito multitud de proteínas fluorescentes de diferentes colores, según la

longitud de onda de la luz que emitan. La proteína verde fluorescente (GFP) tiene 238 aminoácidos y emite luz verde (su pico máximo de emisión es de 509 nm) cuando recibe luz azul (su pico máximo de excitación es de 395 nm).

5 Preferiblemente, el vector inducible es SEQ ID NO: 2.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una línea celular que comprende la célula de la invención. El término "línea celular", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al cultivo de una célula capaz de dividirse ilimitadamente en el tiempo, sin sufrir envejecimiento o senescencia. Las líneas celulares son una herramienta útil y de uso frecuente en la búsqueda de nuevos fármacos. Las líneas celulares se obtienen de forma espontánea o artificial a partir de cultivos celulares primarios. Estas células pueden proliferar indefinidamente y se usan frecuentemente como modelos para el estudio de las células de las que proceden.

Preferiblemente, la línea celular neural de la invención es una línea neuronal. El término "neuronal", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una línea celular que se diferencia a neuronas.

Preferiblemente, la línea celular neural de la invención es la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Esta línea celular se obtuvo tras tres clonaciones consecutivas a partir de las células extraídas de un aspirado de médula ósea donde había células metastásicas de un neuroblastoma. Esta línea celular puede mantenerse en condiciones proliferativas en presencia de FBS (suero fetal bovino) o puede diferenciarse a neuronas en un medio de cultivo neuronal definido, sin FBS, con BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés "*Brain-derived Neurotrophic Factor*") y con dbAMPC (dibutilil adenosín monofosfato cíclico).

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una población celular que comprende la célula o la línea celular de la invención.

La presente invención se refiere también al uso de la célula de la invención como modelo de la enfermedad de la AF para ensayos de alto rendimiento de búsqueda de moléculas con potencial terapéutico en el tratamiento de esta enfermedad.

5

Por tanto, un cuarto aspecto de la invención se refiere a un uso del modelo celular de la invención para la identificación de moléculas con potencial terapéutico para el tratamiento de la AF. Preferiblemente, dicho uso tiene como objetivo la criba de librerías de moléculas.

10

El término “potencial terapéutico”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la posibilidad de que una molécula tenga utilidad en el tratamiento de una enfermedad o condición, provocando una mejora de los síntomas asociados a la misma, cuando es administrada.

15

El término “criba”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al concepto expresado en inglés con la palabra “*screening*” que, en este caso particular, se refiere a analizar un elevado número de compuestos o moléculas en un ensayo que permita discriminar y seleccionar aquellos que presenten el efecto deseado.

20

El término “librería de moléculas”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un conjunto de moléculas con un origen común (vegetal, de organismos marinos, sintéticos, etc.) que se generan para su estudio en ensayos de alto rendimiento de búsqueda de fármacos y compuestos activos.

25

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un método (en adelante, método de la invención) de búsqueda e identificación de sustancias potencialmente útiles en el tratamiento de la AF que comprende:

30

- a) cultivar la célula de la invención,
- b) inducir la deficiencia de frataxina en la célula de (a),

- c) poner en contacto la célula neural obtenida en (b) y/o la célula neural del paso (a) con la sustancia a ensayar, y
- d) cuantificar la supervivencia de la célula neural de paso (c).

5 En el paso (c) del método de la invención se puede poner en contacto la sustancia a ensayar con la célula neural de la invención antes o después de inducir la deficiencia de frataxina. De esta forma, la célula neural sin deficiencia de frataxina (célula neural del paso (a)), serviría como control, ya que será una célula que no sufra neurodegeneración por carecer de esta proteína.

10

La expresión "cuantificar la supervivencia", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la medida de la proporción de las células del cultivo que sobreviven tras la inducción de la deficiencia de frataxina. Existen multitud de técnicas para cuantificar la supervivencia celular, entre las que se encuentran ensayos colorimétricos o fluorimétricos asociados a la actividad de enzimas mitocondriales, o a la de enzimas citoplasmáticas. El estudio de la supervivencia al que se hace referencia en el paso (d) del método de la invención puede ser llevado a cabo por cualquier técnica conocida hasta la fecha.

20

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30

**Figura. 1.** Muestra el esquema del vector lentiviral condicional que se integra en la célula neural y permite inducir la expresión de un ARN de interferencia de

la frataxina, y por tanto la deficiencia de esta proteína en dicha célula, cuando se añade al medio de cultivo la tetraciclina o un análogo como la doxiciclina.

5 **Figura. 2.** Muestra cómo los niveles de expresión de frataxina (Fxn) disminuyen en respuesta a las dosis crecientes de doxiciclina. Muestra los niveles de expresión de frataxina analizados por inmunoblot en muestras de células SH-SY5Y en proliferación y en diferenciación, y su representación gráfica. Los niveles de expresión de  $\beta$ -actina se utilizaron como control.

10 **Figura. 3.** Muestra unas fotografías tomadas al microscopio óptico de las células SH-SY5Y en proliferación **(A)** y en diferenciación tras 5 días en medio con 5%FBS + 10  $\mu$ M ácido retinoico y 2 días en Neurobasal con B27 + BDNF + dbAMPc **(B)**.

15 **Figura. 4.** Muestra la disminución de la viabilidad de los cultivos de células SH-SY5Y en proliferación cuando se reducen los niveles de frataxina al administrar dosis crecientes de doxiciclina.

20 **Figura. 5.** Muestra la disminución de la viabilidad de los cultivos de células SH-SY5Y en diferenciación cuando se reducen los niveles de frataxina al administrar dosis crecientes de doxiciclina.

25 **Figura 6.** Muestra los niveles de frataxina, caspasa 3 activada y GFP en células SH-SY5Y en diferenciación durante 3 ó 4 días, al administrar dosis crecientes de doxiciclina.

## EJEMPLOS

30 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

**EJEMPLO 1: Construcción del vector inducible.**

La construcción del vector inducible se realizó tomando como base un vector de silenciamiento para la proteína frataxina, pLKO.1shRNA37 (Sigma), del que  
 5 previamente se había comprobado que silenciaba la expresión de dicha proteína de una manera eficaz en células neuronales.

Para convertir este vector (no inducible) en un vector inducible, le añadimos los elementos genéticos necesarios para regular el silenciamiento de la expresión  
 10 de frataxina. De forma resumida, los elementos que se añadieron fueron: la construcción bicistrónica GFP-tTRKRAB y el elemento tetO (Figura 1).

La construcción bicistrónica GFP-tTRKRAB se obtuvo a partir del vector pLVPT-tTRKRAB (Trono Lab), tras digestión con ClaI/MscI. Este fragmento fue  
 15 clonado en pBluescript en ClaI/EcoRV para así obtener pBS-GFP-KRAB. De aquí se sacó con BamHI para introducirlo en pLKO.1shRNA37 en el único sitio BamHI existente. La correcta orientación del inserto se comprobó mediante digestión con la enzima de restricción KpnI, que producía fragmentos de tamaño diferente según la dirección en que hubiera entrado dicho inserto.

20 El operador tetO fue obtenido del vector pLVTHM (Trono Lab) tras digestión con BamHI/EcoRI para introducirlo en el vector pBluescript. Tras varios procesos de digestión y reintroducción del fragmento en pBluescript para conseguir a ambos lados del inserto la diana de la enzima ClaI, el inserto se  
 25 digirió con dicha enzima y se clonó en pLKO.1+GFPKRAB en el único sitio ClaI del vector, situado antes de la secuencia de ARN de interferencia.

**EJEMPLO 2: Producción de sobrenadantes y transducción de la línea celular SH-SY5Y con el vector inducible.**

30 La producción de partículas lentivirales conteniendo el vector inducible se realizó mediante transfección con Lipofectamina (Invitrogen) en células 293T.

El título de los sobrenadantes obtenidos se determinó mediante citometría de flujo obteniéndose títulos de los sobrenadantes del orden de  $10^6$  unidades de transducción/ml. Los vectores lentivirales obtenidos se utilizaron de nuevo para transducir células 293T con el fin de comprobar si la construcción inducible  
5 funcionaba correctamente, inhibiendo la expresión de la frataxina. Además, se determinó el rango de doxiciclina necesario para conseguir la expresión del ARN de interferencia y silenciar la expresión de la frataxina.

El vector inducible lleva un transgén de la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés "*green fluorescent protein*"), por lo que, para determinar la medida en  
10 que la doxiciclina regulaba la expresión del vector inducible, monitorizamos la expresión de la GFP mediante citometría de flujo.

**EJEMPO 3: Obtención y caracterización de la línea celular inducible.**

15 La obtención de los clones inducibles se realizó mediante la transducción con partículas lentivirales conteniendo el vector inducible sobre la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano. Estas células son de linaje neural y tienen la capacidad de diferenciarse a células neuronales. Dado que el vector inducible  
20 no lleva ningún marcador de selección, se utilizó la técnica de la dilución límite para obtener los distintos clones. Para favorecer el crecimiento de las células a dicha dilución límite, el cultivo se realizó utilizando medio condicionado obtenido a partir de cultivos de células SH-SY5Y a alta densidad.

25 De los clones obtenidos, se seleccionaron aquellos que cumpliesen con los dos requisitos siguientes:

- que respondieran a la inducción del silenciamiento de la expresión de frataxina con la adición de doxiciclina, y
- que tuvieran la capacidad de diferenciación neuronal.

30 La determinación de la concentración de doxiciclina capaz de producir un silenciamiento suficiente en la expresión de la frataxina se realizó midiendo la

expresión de frataxina por inmunoblot, en respuesta a concentraciones crecientes de doxiciclina que oscilaron entre 0,1 y 5 µg/ml. Los resultados indican que concentraciones crecientes de la droga inducen un silenciamiento proporcional de la frataxina y, por lo tanto, una disminución en los niveles de la proteína frataxina, todo ello apuntando a que existe una respuesta dependiente de la dosis. Estos experimentos se realizaron tanto en células en proliferación como en células diferenciadas a neuronas, obteniéndose en ambas los mismos resultados (Figura 2).

#### 10 **EJEMPLO 4: Diferenciación neuronal de la línea celular inducible.**

La diferenciación de las células SH-SY5Y a células similares a neuronas humanas en cultivo se realizó siguiendo un protocolo optimizado previamente en el laboratorio: las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se sembraron en placas o cubres previamente recubiertos con Matrigel™ (BD Biosciences) diluido 1:50 en DMEM (medio de cultivo conocido como “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*”). Al día siguiente, se cambió el medio a DMEM suplementado con FBS (suero fetal bovino) al 5%, L-glutamina 2 mM, ácido retinoico 10 µM y mezcla de antibióticos (estreptomina-penicilina). Las células se mantuvieron en este medio durante 5 días, reemplazándolo por medio fresco cada 2 días. A continuación, se cambió el medio por un medio definido consistente en Neurobasal suplementado con B-27 (ambos de Invitrogen), KCl 20 mM, GlutaMax1 2 mM (Invitrogen), dbAMPc (dibutiril AMP cíclico) 2 mM, BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés “*Brain-derived Neurotrophic Factor*”) 50 ng/ml y mezcla de antibióticos. Las células se dejaron en este medio 5 días más (Figura 3).

#### 30 **EJEMPLO 5: Efecto de la inducción de la deficiencia de frataxina en la línea celular inducible.**

La inducción de la deficiencia de frataxina en células en proliferación produce una disminución de los niveles de absorbancia en un ensayo colorimétrico de

viabilidad y proliferación con MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), asociado a una disminución de la proliferación celular (Figura 4).

- 5 Al inducir la deficiencia de frataxina en células neuronales previamente diferenciadas a neuronas, se observa igualmente una disminución de los niveles de absorbancia en un ensayo colorimétrico de viabilidad y proliferación con MTS (Figura 5) y una activación de la caspasa 3, (Figura 6) que se asocia a la inducción de un proceso neurodegenerativo de tipo apoptótico.

REIVINDICACIONES

1. Una célula neural que comprende un vector de expresión de un ARN de interferencia de la frataxina, controlado por un operador inducible.  
5
2. La célula neural según las reivindicaciones 1 donde el vector comprende la secuencia del ARN de interferencia de la frataxina con SEQ ID NO: 1.
3. La célula neural según las reivindicaciones 1-2 donde el vector es un vector  
10 lentiviral.
4. La célula neural según las reivindicaciones 1-3 donde el vector comprende el módulo TetO.
- 15 5. La célula neural según las reivindicaciones 1-4 donde el vector comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión TetR-KRAB.
6. La célula neural según las reivindicaciones 1-5 donde el vector comprende  
20 una secuencia que codifica para un marcador.
7. La célula neural según la reivindicación 6 donde el marcador es la proteína verde fluorescente (GFP).
- 25 8. La célula neural según las reivindicaciones 1-7 donde el vector es SEQ ID NO: 2.
9. Una línea celular neural que comprende la célula según las reivindicaciones 1-8.  
30
10. Una línea celular según la reivindicación 9 donde la línea celular neural es neuronal.

11. La línea celular según las reivindicaciones 9-10 donde la línea celular es la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
12. Una población celular que comprende la célula según las reivindicaciones 1-8 o la línea celular según las reivindicaciones 9-10.
13. Un uso de la célula neural según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para la identificación de moléculas con potencial terapéutico para el tratamiento de la ataxia de Friedreich.
14. Un método de búsqueda e identificación de sustancias potencialmente útiles en el tratamiento de la ataxia de Friedreich que comprende:
- a) cultivar la célula neural según las reivindicaciones 1-8,
  - b) inducir la expresión del ARN de interferencia de la frataxina en la célula neural de (a),
  - c) poner en contacto la célula neural obtenida en (b) y/o la célula neural del paso (a) con la sustancia a ensayar, y
  - d) cuantificar la supervivencia de la célula neural de paso (c).



FIG. 2

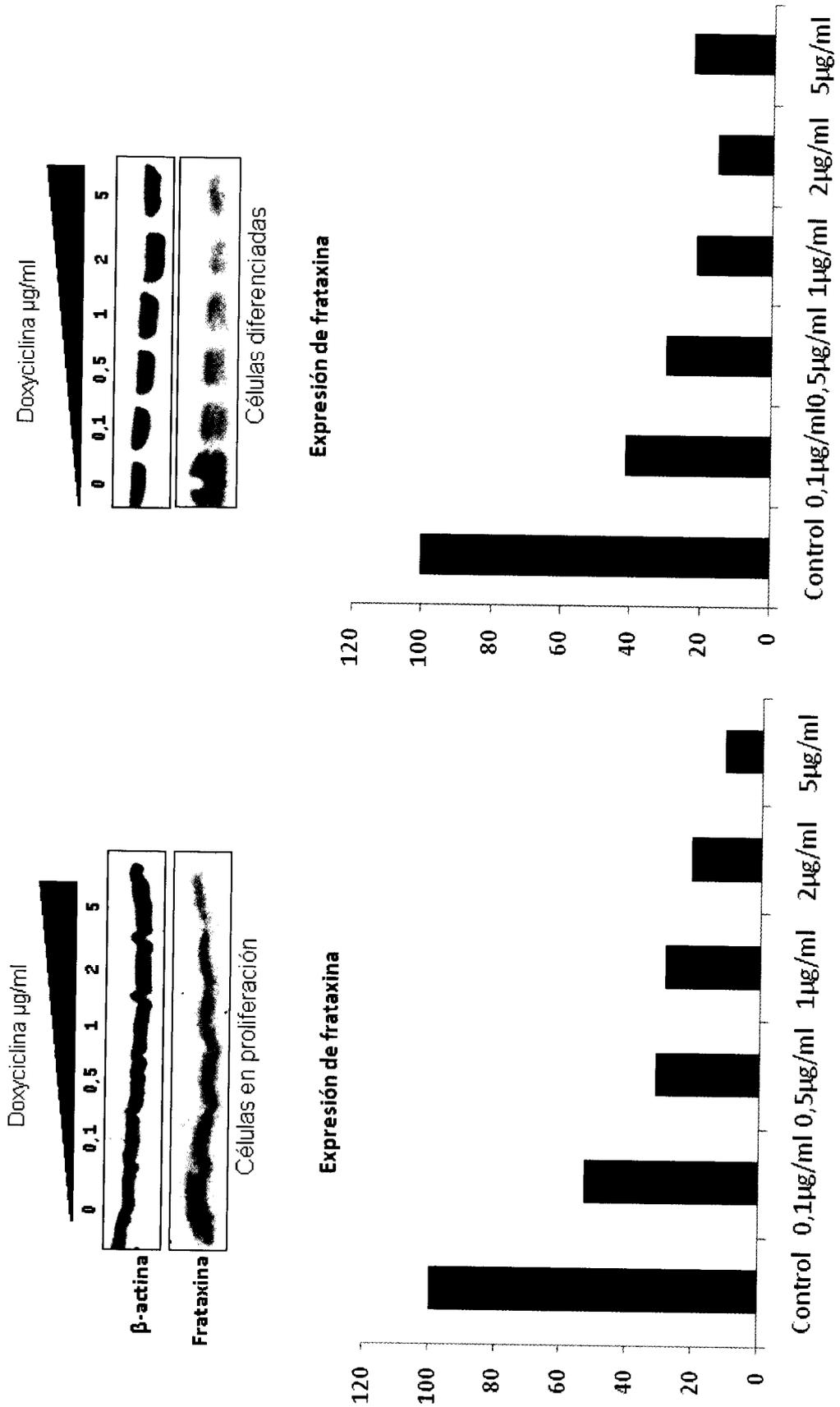


FIG. 3

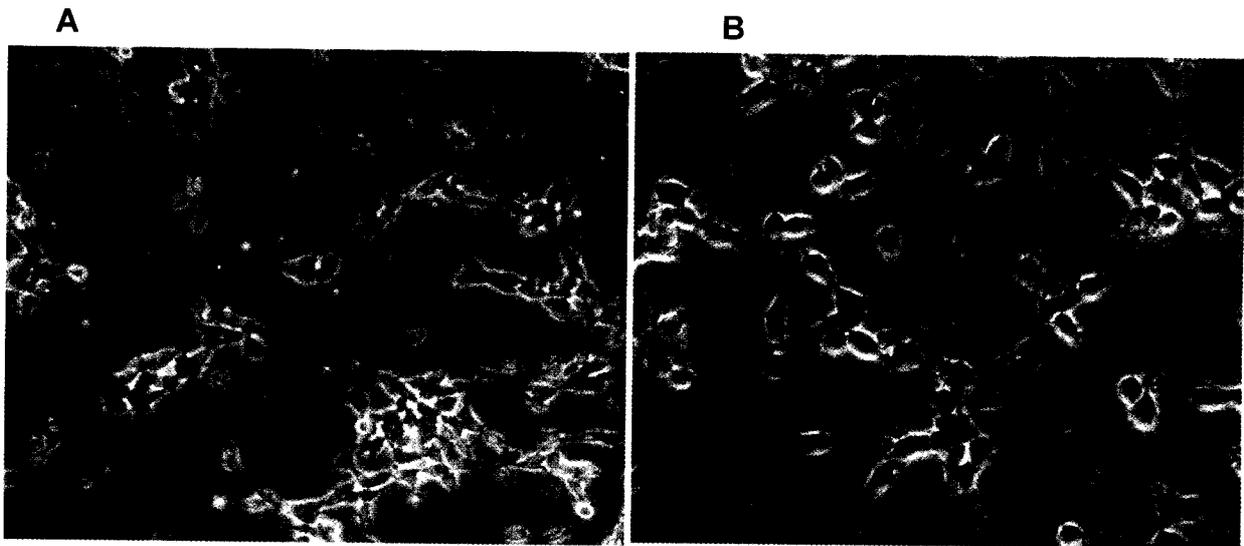


FIG. 4

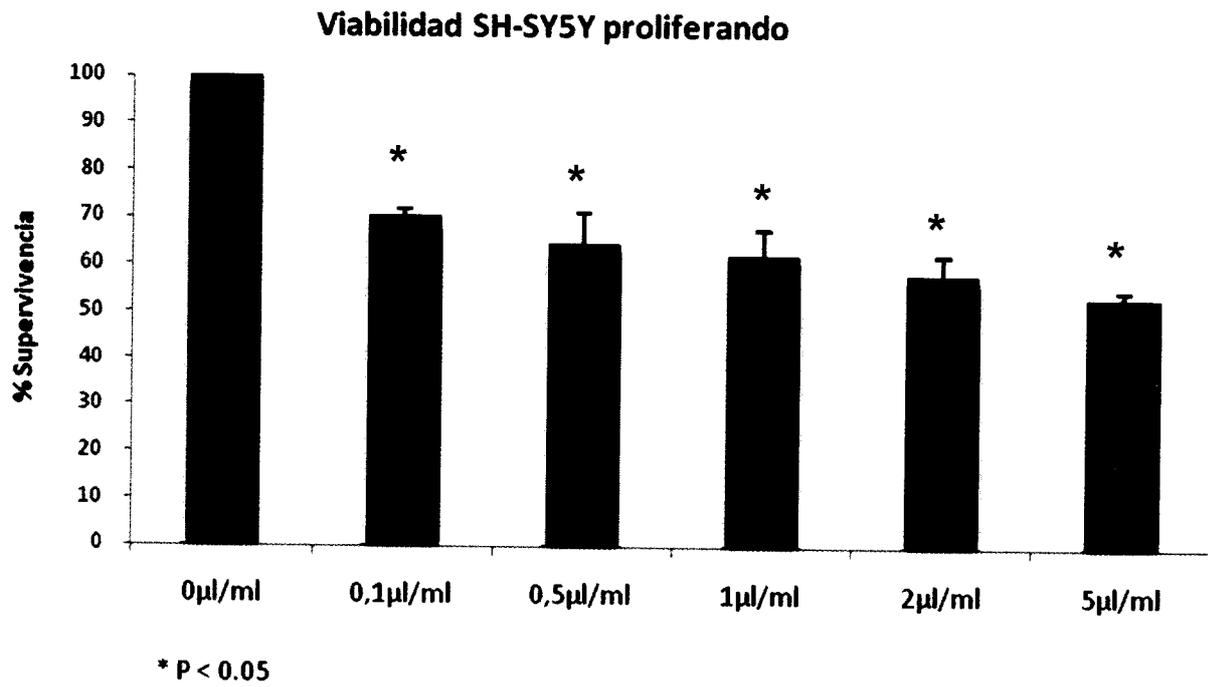


FIG. 5

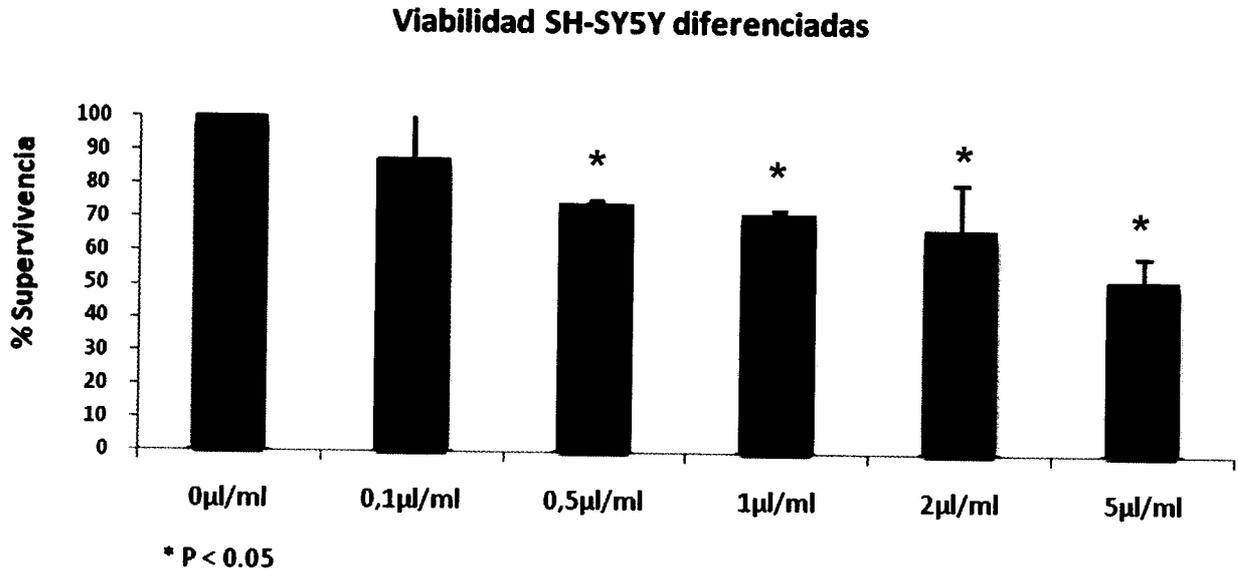
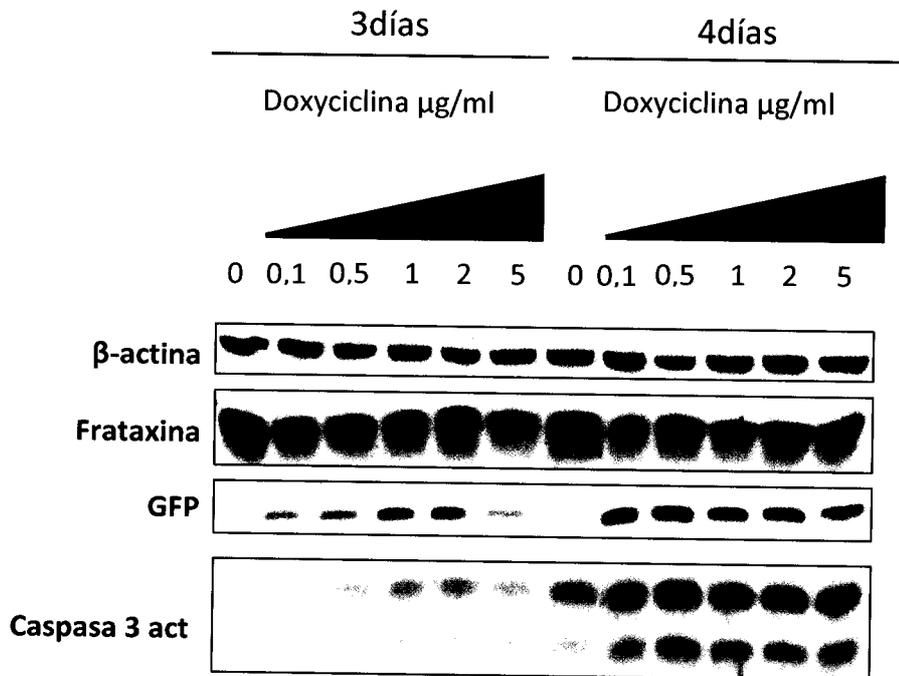


FIG. 6



# ES 2 387 787 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid  
 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras  
 (CIBERER)

<120> Línea celular neural inducible de deficiencia de frataxina

<130> ES1595.35

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 55

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ccggcagacg ccaacaagc aatctcgag attgcttgt ttggcgtctg ctttt 55

<210> 2

<211> 7095

<212> DNA

<213> SECUENCIA HÍBRIDA

<400> 2

gggtctctct ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaacca 60  
 ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc cgtctgttg 120  
 tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc 180  
 agtggcgccc gaacagggac ttgaaagcga aagggaaacc agaggagctc tctcgacgca 240  
 ggactcggct tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc 300  
 caaaaatttt gactagcggg ggctagaagg agagagatgg gtgagagagc gtcagtatta 360  
 agcgggggag aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa 420  
 aatataaatt aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc 480  
 ctggcctgtt agaaacatca gaaggctgta gacaaact gggacagcta caaccatccc 540  
 ttcagacagc atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg 600  
 tgcacaaag gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc 660  
 aaaacaaaag taagaccacc gcacagcaag cggccgctga tcttcagacc tggaggagga 720  
 gatatgaggg acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca 780  
 ttaggagtag caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg 840  
 ggaataggag ctttgttcct tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgcagcg 900  
 tcaatgacgc tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgca gcagcagaac 960  
 aatttgctga gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc 1020  
 aagcagctcc aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg 1080  
 gggatttggg gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt 1140  
 tggagtaata aatctctgga acagatttgg aatcacacga cctggatgga gtgggacaga 1200

ES 2 387 787 A1

gaaattaaca	attacacaag	cttaatacac	tccttaattg	aagaatcgca	aaaccagcaa	1260
gaaaagaatg	aacaagaatt	attggaatta	gataaatggg	caagtttgtg	gaattggttt	1320
aacataacaa	attggctgtg	gtatataaaa	ttattcataa	tgatagtagg	aggcttggtg	1380
ggtttaagaa	tagtttttgc	tgtactttct	atagtgaata	gagttaggca	gggatattca	1440
ccattatcgt	ttcagacca	cctccaacc	ccgaggggac	ccgacaggcc	cgaaggaata	1500
gaagaagaag	gtggagagag	agacagagac	agatccattc	gattagtga	cggatctcga	1560
cggtatcgat	accgtcgagt	ttaccactcc	ctatcagtga	tagagaaaag	tgaaagtcga	1620
gtttaccact	ccctatcagt	gatagagaaa	agtgaaagtc	gagtttacca	ctccctatca	1680
gtgatagaga	aaagtgaag	tcgagtttac	cactccctat	cagtgataga	gaaaagtga	1740
agtcgagttt	accactccct	atcagtgata	gagaaaagtg	aaagtcgagt	ttaccactcc	1800
ctatcagtga	tagagaaaag	tgaaagtcga	gtttaccact	ccctatcagt	gatagagaaa	1860
agtgaaagtc	ggggctgcag	gaattcgata	tcaagcttat	cgatcacgag	actagcctcg	1920
agcggccgcc	cccttcaccg	agggcctatt	tcccatgatt	ccttcatatt	tgcatatacg	1980
atacaaggct	gtagagaga	taattggaat	taatttgact	gtaaacacaa	agatattagt	2040
acaaaatacg	tgacgtagaa	agtaataatt	tcttgggtag	tttgcagttt	taaaattatg	2100
ttttaaaatg	gactatcata	tgcttaccgt	aacttgaaag	tatttcgatt	tcttggcttt	2160
atatatcttg	tggaaaggac	gaaacaccgg	tccgggcaga	cgccaaacaa	gcaaatctcg	2220
agatttgctt	gtttggcgtc	tgctttttga	attctcgacc	tcgagacaaa	tggcagtatt	2280
catccacaat	tttaaaagaa	aaggggggat	tggggggtac	agtgacagggg	aaagaatagt	2340
agacataata	gcaacagaca	tacaaactaa	agaattacaa	aaacaaatta	caaaaattca	2400
aaattttcgg	gtttattaca	gggacagcag	agatccactt	tggccgcggc	tcgagggggt	2460
tggggttgcg	ccttttccaa	ggcagcccctg	ggtttgcgca	gggacgcggc	tgctctgggc	2520
gtggttccgg	gaaacgcagc	ggcgcggacc	ctgggtctcg	cacattcttc	acgtccgttc	2580
gcagcgtcac	ccggatcttc	gccgctacc	ttgtgggcc	cccggcgacg	cttctgctc	2640
cgcccctaag	tcgggaaggt	tccttgcggt	tcgcggcgtg	ccggacgtga	caaacggaag	2700
ccgcacgtct	cactagtacc	ctcgagacg	gacagcgcca	gggagcaatg	gcagcgcgcc	2760
gaccgcgatg	ggctgtggcc	aatagcggct	gctcagcagg	gcgcgccgag	agcagcggcc	2820
gggaaggggc	ggtgcgggag	gcggggtgtg	gggcggtagt	gtgggccctg	ttctgcccg	2880
cgcgggtgtc	cgcattctgc	aagcctccgg	agcgcacgtc	ggcagtcggc	tccctcgttg	2940
accgaatcac	cgacctctct	ccccaggggg	atccaggcct	aagcttacgc	gtcctagcgc	3000
taccggtcgc	caccatggtg	agcaagggcg	aggagctggt	caccggggtg	gtgcccattc	3060
tggtcgagct	ggacggcgac	gtaaacggcc	acaagttcag	cgtgtccggc	gagggcgagg	3120
gcgatgccac	ctacggcaag	ctgaccctga	agttcatctg	caccaccggc	aagctgcccg	3180
tgccctggcc	caccctcgtg	accaccctga	cctacggcgt	gcagtgcttc	agccgctacc	3240
ccgaccacat	gaagcagcac	gacttcttca	agtccgccat	gcccgaaggc	tacgtccagg	3300

ES 2 387 787 A1

agcgcacccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcgccgag gtgaagtctg 3360  
 agggcgacac cctggtgaac cgcatcgagc tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca 3420  
 acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca caacgtctat atcatggccg 3480  
 acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca 3540  
 gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acacccccat cggcgacggc cccgtgctgc 3600  
 tgcccgacaa ccaactacctg agcaccagc cgcacctgag caaagacccc aacgagaagc 3660  
 gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgcccggcg gatcactctc ggcatggacg 3720  
 agctgtacaa gtccggactc agatctcgac tagctagtag cttagctagct agtcgagctc 3780  
 aagcttcgaa ttcccgggct gcaggaattc cgccccccc ccctaactg tactggccga 3840  
 agccgcttg aataaggccg gtgtgctgtt gtctatatgt tattttccac catattgccg 3900  
 tcttttgca atgtgagggc ccggaaacct ggccctgtct tcttgacgag cattcctagg 3960  
 ggtctttccc ctctcgcaa aggaatgcaa ggtctgttga atgtcgtgaa ggaagcagtt 4020  
 cctctggaag cttcttgaag acaacaacg tctgtagcga ccctttgag gcagcggaac 4080  
 cccccacctg gcgacaggtg cctctgctgc caaaagccac gtgtataaga tacacctgca 4140  
 aaggcggcac aacccagctg ccacgttctg agttggatag ttgtggaaag agtcaaatgg 4200  
 ctctcctcaa gcgtattcaa caaggggctg aaggatgcc agaaggtacc ccattgtatg 4260  
 ggatctgatc tggggcctcg gtgcacatgc tttacatgtg tttagtcgag gttaaaaaac 4320  
 gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga tgataatacc 4380  
 atggctagat tagataaaaag taaagtgatt aacagcgcac tagagctgct taatgaggtc 4440  
 ggaatcgaag gtttaacaac ccgtaaacct gccagaagc taggtgtaga gcagcctaca 4500  
 ttgtattggc atgtaaaaaa taagcgggct ttgctcgacg ccttagccat tgagatgtta 4560  
 gataggcacc atactcactt ttgcccttta gaaggggaaa gctggcaaga ttttttacgt 4620  
 aataacgcta aaagtttttag atgtgcttta ctaagtcac gcgatggagc aaaagtacat 4680  
 ttaggtacac ggcctacaga aaaacagtat gaaactctcg aaaatcaatt agccttttta 4740  
 tgccaacaag gtttttact agagaatgca ttatatgcac tcagcgtgt ggggcatttt 4800  
 actttagggt gcgtattgga agatcaagag catcaagtcg ctaaagaaga aagggaaaca 4860  
 cctactactg atagtatgcc gccattatta cgacaagcta tcgaattatt tgatcaccaa 4920  
 ggtgcagagc cagccttctt attcggcctt gaattgatca tatgctgatt agaaaaaca 4980  
 cttaaatgtg aaagtgggtc gccaaaaaag aagagaaagg tcgacggcg tgggtctttg 5040  
 tctcctcagc actctgctgt cactcaagga agtatcatca agaacaagga gggcatggat 5100  
 gctaagtcac taactgcctg gtcccggaca ctggtgacct tcaaggatgt atttgtggac 5160  
 ttcaccaggg aggagtggaa gctgctggac actgctcagc agatcgtgta cagaaatgtg 5220  
 atgctggaga actataagaa cctggtttcc ttgggttatc agcttactaa gccagatgtg 5280  
 atcctccggt tggagaaggg agaagagccc tggctggtg agagagaaat tcaccaagag 5340

ES 2 387 787 A1

acccatcctg attcagagac tgcatttgaa atcaaatcat cagtttaagg atctcgacta 5400  
 gctagtagct agctagctag tcgagctcaa gcttcgaatt cgatatcaag cttatcgcga 5460  
 taccgtcgac ctcgacctcg actagtcata tgataatcaa cctctggatt acaaaatttg 5520  
 tgaaagattg actggtattc ttaactatgt tgctcctttt acgctatgtg gatacgctgc 5580  
 tttaatgcct ttgtatcatg ctattgcttc ccgataggct ttcattttct cctccttgta 5640  
 taaatcctgg ttgctgtctc tttatgagga gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt 5700  
 ggtgtgcaact gtgtttgctg acgcaacccc cactgggttg ggcaattgcca ccacctgtca 5760  
 gctcctttcc gggactttcg ctttccccct ccctattgcc acggcggaac tcatcgccgc 5820  
 ctgccttgcc cgctgctgga caggggctcg gctgttgggc actgacaatt ccgtggtggt 5880  
 gtcggggaag ctgacgtcct ttccatggct gctcgctgtg gttgccacct ggattctgcg 5940  
 cgggacgtcc ttctgctacg tcccttcggc cctcaatcca gcggacctc cttcccgcgg 6000  
 cctgctgccg gctctgcggc ctcttccgcg tcttcgcctt cgccctcaga cgagtcggat 6060  
 ctccccttg gccgcctccc cgcacggtgta cgtatggatc gaattcctgc agcccggggg 6120  
 atccaccgga gcttaccatg accgagtaca agcccacggt gcgcctcgcc acccgcgacg 6180  
 acgtccccag ggccgtacgc accctcgccg ccgcgcttcgc cgactacccc gccacgcgcc 6240  
 acaccgtcga tccggaccgc cacatcgagc gggtcaccga gctgcaagaa ctcttctca 6300  
 cgcgcgtcgg gctcgacatc ggcaagggtg gggtcgcgga cgacggcgcc gcggtggcgg 6360  
 tctggaccac gccggagagc gtcgaagcgg gggcggtggt cgccgagatc ggcccgcgca 6420  
 tggccgagtt gagcggttcc cggctggccg cgcagcaaca gatggaaggc ctcttggcgc 6480  
 cgcaccggcc caaggagccc gcgtggttcc tggccaccgt cggcgtctcg cccgaccacc 6540  
 agggcaaggg tctgggcagc gccgtcgtgc tccccggagt ggaggcgcc gagcgcgccg 6600  
 gggtgcccgc cttcctggag acctccgcgc cccgcaacct ccccttctac gagcggctcg 6660  
 gcttcaccgt caccgccgac gtcgaggtgc ccgaaggacc gcgcacctgg tgcacgccc 6720  
 gcaagcccgg tgcttgacgc ccgcccacg acccgacagc cccgaccgaa aggagcgcac 6780  
 gaccccatgc atcggtacct ttaagaccaa tgacttaciaa ggcagctgta gatcttagcc 6840  
 actttttaa agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctcccaacga agacaagatc 6900  
 tgctttttgc ttgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg 6960  
 gctaactagg gaaccactg ctttaagcctc aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag 7020  
 tgtgtgcccc tctgttgtgt gactctggta actagagatc cctcagacc ttttagtcag 7080  
 tgtgaaaaat ctcta 7095



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201030830

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 31.05.2010

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12N5/10** (2006.01)  
C12N5/079 (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GIMENEZ-CASSINA A. et al. "Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by Herpesviral vectors" Journal of Neuroscience Research (septiembre 2006) Vol. 84, N.º. 4, páginas 755-767; DOI 10.1002/jnr.20976; todo el documento.	1-14
A	LUFINO M.M.P. et al. "A novel genomic DNA-reporter gene model for the study of Friedreich's ataxia in neuronal cells" Molecular Therapy (mayo 2009) Vol. 17, N.º. 1, páginas S325-S326; resumen de una conferencia dentro de la "12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy" ofrecida en San Diego, CA; USA los días 27-30 de mayo de 2009; todo el documento.	1-14
A	BABADY N.E. et al. "Advancements in the pathophysiology of Friedreich's ataxia and new prospects for treatments" Molecular Genetics and Metabolism (septiembre 2007) Vol. 92, N.º. 1-2, páginas 23-35; ISSN 1096-7192; DOI 10.1016/j.ymgme.2007.05.009; todo el documento.	1-14
A	KAKHLON O. et al. "Cell functions impaired by frataxin deficiency are restored by drug-mediated iron relocation" BLOOD (15 diciembre 2008) Vol. 112, N.º. 13, páginas 5219-5227; DOI 10.1182/blood-2008-06-161919; 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  
17.09.2012

Examinador  
M. A. García Coca

Página  
1/4

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

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, NCBI, EMBL-EBI, GENE BANK, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, MEDLINE/NML, EMBASE/ELSEVIER, NPL/EPO

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.09.2012

**Declaración**

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

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	GIMENEZ-CASSINA A. et al. "Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by Herpesviral vectors" <i>Journal of Neuroscience Research</i> (septiembre 2006) Vol. 84, N°. 4, páginas 755-767; DOI 10.1002/jnr.20976.	Septiembre 2006
D02	LUFINO M.M.P. et al. "A novel genomic DNA-reporter gene model for the study of Friedreich's ataxia in neuronal cells" <i>Molecular Therapy</i> (mayo 2009) Vol. 17, N°. 1, páginas S325-S326; resumen de una conferencia dentro de la "12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy" ofrecida en San Diego, CA; USA los días 27-30 de mayo de 2009.	Mayo 2009
D03	BABADY N.E. et al. "Advancements in the pathophysiology of Friedreich's ataxia and new prospects for treatments" <i>Molecular Genetics and Metabolism</i> (septiembre 2007) Vol. 92, N°. 1-2, páginas 23-35; ISSN 1096-7192; DOI 10.1016/j.ymgme.2007.05.009.	Septiembre 2007
D04	KAKHLON O. et al. "Cell functions impaired by frataxin deficiency are restored by drug-mediated iron relocation" <i>BLOOD</i> (15 diciembre 2008) Vol. 112, N°. 13, páginas 5219-5227; DOI 10.1182/blood-2008-06-161919.	15.12.2008

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-14, es una célula neural que comprende un vector (lentiviral) de expresión de un ARN de interferencia de la frataxina, controlado por un operador inducible (módulo TetO) y que comprende además las secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína de fusión TetR-KRAB y para la proteína verde fluorescente GFP (reiv. 1-8). Es también objeto de la invención la línea celular neural y la población celular que comprenden dicha célula neural (reiv. 9-12). Por último, es también objeto de la invención el uso de dicha célula neural para la identificación de moléculas con potencial terapéutico para el tratamiento de la ataxia de Friedreich y el método de búsqueda de dichas moléculas (reiv. 13 y 14).

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga el uso de lentivirus (concretamente vectores derivados del vector HSV-1) que codifican shRNAs complementarios al gen de la frataxina en las células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y, para el establecimiento de una línea celular neural como modelo para el estudio de la genómica funcional en células neuronales humanas, como el estudio de las funciones de distintos genes, validación de dianas terapéuticas o para el estudio de terapia génica en un contexto neuronal.

El documento D02 divulga el uso de cromosomas bacterianos artificiales infecciosos (iBAC) basado en el uso del virus HSV-1 como vector, como parte de un modelo para el análisis de la expresión de la frataxina en células neuronales.

El documento D03 divulga distintos modelos tanto de microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans*,...) como de animales (*Drosophila melanogaster*, *M. musculus*) para la ataxia de Friedreich, y un único modelo de línea celular, basado en el uso de lentivirus (derivados del vector HSV-1) que codifican shRNAs complementarios al gen de la frataxina en las células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y.

El documento D04 divulga un estudio sobre la ataxia de Friedreich y la posibilidad de una terapia basada en el uso de sideróforos para paliar la deficiencia de frataxina que se traduce en un uso defectivo del hierro. Este estudio lo realizan en una línea celular embrionaria humana de riñón (HER-293) que expresa de forma estable el represor de tetraciclina y un shRNA complementario al gen de la frataxina inducible por tetraciclina.

Ninguno de los documentos citados del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-14. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-14. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-14 es con referencia a los documentos D01-D04 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).