

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 731**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2009 E 09783096 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2329265**

54 Título: **Métodos de identificación sistemática que usan insectos con barrera hematoencefálica**

30 Prioridad:

22.09.2008 US 98803 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.01.2014

73 Titular/es:

**ENTOMOPHARM APS (100.0%)
Lundekaersvej 33
5250 Odense SV, DK**

72 Inventor/es:

**AADAL NIELSEN, PETER y
ANDERSSON, GUNNAR**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 436 731 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de identificación sistemática que usan insectos con barrera hematoencefálica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se dirige a modelos de insectos que están destinados a reflejar la penetración de la barrera hematoencefálica de los vertebrados (BHE). La investigación de la penetración de la BHE es extremadamente importante en el descubrimiento de fármacos; los fármacos satisfactorios para el SNC tienen que atravesar la BHE, mientras que la penetración de la BHE puede causar efectos secundarios no deseados para fármacos de acción periférica. Específicamente, la presente invención se refiere al uso de insectos en la identificación sistemática de sustancias con un efecto biológico sobre el cerebro o el sistema nervioso central y/o efecto en una enfermedad o trastorno del cerebro o del sistema nervioso central. Además, se refiere al uso de dichos insectos en la identificación sistemática de sustancias que tienen una actividad biológica deseada y que no cruzan la barrera hematoencefálica.

15 **Antecedentes de la invención**

El descubrimiento de fármacos es un asunto costoso en el que uno de los mayores gastos en términos económicos y de tiempo es el estudio *in vivo*. Para reducir estos costes, un gran número de modelos *in vitro* se desarrollan y se aplican como filtros para seleccionar los compuestos más adecuados para los estudios *in vivo*. Sin embargo, los modelos *in vitro* a menudo son demasiado simplificados y, como tal, pueden inducir a error en el proceso de toma de decisiones. Por lo tanto, existe una demanda de modelos intermedios que sean más fiables que los modelos *in vitro* y que al mismo tiempo sean más rápidos y más baratos que los modelos tradicionales de vertebrados *in vivo*. Los insectos pueden servir a esta función y las moscas de la fruta se usan actualmente como modelos farmacodinámicos intermedios (PD) por EnVivo Pharmaceuticals Inc., que desarrolla fármacos para el SNC

Existen varios problemas con los ensayos *in vitro* existentes. Es imposible realizar ensayos *in vitro* para justificar todos los sucesos biológicos que se producen *in vivo*. Hay sucesos biológicos que todavía no se entienden o deficiencias en los ensayos *in vitro* existentes, por ejemplo, los ensayos pueden carecer de las características importantes que están presentes *in vivo*, que incluyen moléculas de transportadores activos, enzimas metabólicas, o incluso sucesos biológicos imprevistos. A pesar de las deficiencias evidentes, los modelos *in vitro* se usan intensivamente en el proceso de descubrimiento de fármacos en el que la mayor parte de las compañías farmacéuticas usan grandes baterías de identificaciones sistemáticas *in vitro*. Los compuestos de ensayo en un gran número de ensayos *in vitro* no siempre pueden reflejar el comportamiento *in vivo*. De hecho, no es inusual que los compuestos que tienen perfiles aceptables *in vitro* resulten que tengan perfiles inadecuados *in vivo*. Por el contrario, los compuestos se pueden descartar por razones erróneas. Por lo tanto, existe una necesidad de modelos *in vitro/in vivo* intermedios, que podrían apoyar la investigación de descubrimiento de fármacos con mejores datos y por lo tanto reducir el número de experimentos *in vivo* de coste elevado.

Los modelos *in vitro* se usan con la suposición de que cada uno de los modelos refleja un solo suceso biológico *in vivo* y aislado. Sin embargo, el gran número de modelos *in vitro* que se usan en la fase de descubrimiento (Ruiz-García y col. 2007) tienen como objetivo reflejar la complejidad de la biología *in vivo* en la que se producen numerosos sucesos biológicos en múltiples compartimentos. Una limitación principal debida al uso de muchos modelos *in vitro* es la falta de interacción entre diferentes sucesos biológicos y la interacción entre diferentes compartimentos. Sin embargo, una ventaja principal del uso de insectos como modelos intermedios es que estos modelos cumplen el requisito de una interacción compleja no solamente entre diferentes componentes de la estructura de la barrera cerebral sino también entre los diferentes compartimentos que aparecen en los insectos ya que son especies vivas con compartimentos que en gran medida son similares a los de los vertebrados.

La barrera hematoencefálica de los vertebrados (BHE) representa la barrera fisiológica entre el tejido cerebral y los vasos sanguíneos, que limita el intercambio de solutos y regula la absorción de agentes exógenos (por ejemplo fármacos) de la sangre en el cerebro. La función del sistema nervioso central (SNC) requiere un entorno extracelular altamente regulado. Anatómicamente, la BHE de los vertebrados está compuesta de células endoteliales microvasculares interconectadas a través de puntos de unión estrechos altamente especializados (TJ), que proporcionan una barrera de difusión y de este modo desempeñan un papel central para la permeabilidad. Componentes identificados recientemente de los TJ incluyen las claudinas, una familia de proteínas de cuatro segmentos transmembrana que se sugieren como responsables en la función de la barrera de los TJ (Turksen y Troy 2004). La penetración de la BHE es uno de los principales obstáculos en el desarrollo de fármacos satisfactorios para el SNC. Por otro lado, cuando se produce la penetración de la BHE, puede provocar efectos secundarios no deseados para los fármacos de actuación periférica (Schinkel 1999) (para una revisión, véase Pardridge 2002).

La penetración de la BHE normalmente se clasifica como basada en química o en biología. La penetración basada en la química está unida a la difusión pasiva mediada por lípidos, que depende de las propiedades fisicoquímicas de la molécula, es decir, las moléculas hidrofóbicas pequeñas tienden a penetrar la BHE más fácilmente que las moléculas grandes e hidrófilas. La penetración basada en la biología implica compuestos que son sustratos para los

sistemas de transporte de influjo o eflujo de la BHE endógena, por ejemplo, muchas moléculas pequeñas (por ejemplo fármacos) han demostrado que son sustratos para el transportador de glicoproteína P (P-gp). Los P-gp son proteínas transportadoras ubicadas en las paredes de las células que componen la BHE (Schinkel 1999) y que se conservan entre taxones tan diversos como protozoos, plantas, insectos y mamíferos (en Gaertner y col. 1998). Los P-gp están presentes en muchos tipos de células y desempeñan papeles importantes en la absorción, disposición, metabolismo, y toxicidad de fármacos (Xia y col. 2006).

Evidentemente, es fundamental tener una comprensión de la penetración de la BHE en los proyectos de descubrimiento de fármacos y preferentemente, ésto se debería obtener sin usar un número excesivo de estudios *in vivo*. En consecuencia, se desarrollan varios modelos de absorción de la BHE *in vitro* para predecir el comportamiento *in vivo* de los compuestos de ensayo. Sin embargo, incluso los modelos complejos *in vitro* que incluyen los sistemas transportadores de P-gp (Di y Kerns 2003, Summerfield y col. 2005) parece que no cumplen con la intrincada complejidad de los TJ y por lo tanto no pueden describir muy bien el comportamiento *in vivo*. Esto está muy indicado en un estudio extenso de absorción de la BHE, en el que se sometieron a ensayo 22 compuestos en diez modelos diferentes de absorción de la BHE *in vitro* (Garberg 2005). Ninguno de los diez modelos mostraron correlación alguna entre la permeabilidad *in vitro* e *in vivo*. Esto indica que los modelos específicos de la BHE no proporcionan necesariamente mejor predicción que los modelos que no derivan de la BHE. Además, se sugirió que la unión a proteínas, flujo sanguíneo, estabilidad metabólica y lipofilia, así como la afinidad por otros transportadores en la BHE son factores necesarios a tener en consideración cuando se van a hacer predicciones de distribución cerebral *in vivo*. En consecuencia, parece que los modelos *in vitro* son adecuados principalmente para medidas cualitativas de compuestos que atraviesan la BHE por difusión pasiva o compuestos que experimentan eflujo a través del transportador de P-gp (Garberg 2005).

Determinados invertebrados han servido como modelos útiles para la comprensión de muchos procesos biológicos diferentes. Especialmente la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* es un organismo de investigación modelo bien reconocido, que ha hecho contribuciones significativas en la comprensión de la genética, neurobiología, biología molecular, etc. (Gullan y Cranston 2000). Generalmente, los insectos y los vertebrados tienen muchas características fisiológicas en común. Son organismos pluricelulares con sistemas nerviosos compartimentados complejos para funciones especializadas como la visión, olfato, aprendizaje, y memoria. Los sistemas nerviosos de los insectos responden fisiológicamente de formas similares a las de los vertebrados con muchas neurohormonas y receptores idénticos. Los insectos tienen sistemas nerviosos avasculares en los que la hemolinfa baña todas las superficies externas de ganglios y nervios. Por lo tanto, muchos insectos requieren un sistema sofisticado de BHE para proteger su SNC de neurotoxinas derivadas de plantas y para mantener un microentorno iónico apropiado de las neuronas. De hecho, también en insectos, un sistema sofisticado de BHE ha sido una ventaja evolutiva. En insectos, esta BHE se basa principalmente en el sistema de células gliales que sin duda se desplazaron al sistema endotelial como una respuesta a la mayor importancia de la microvasculatura en el cerebro de vertebrados. Como apoyo a este punto de vista está la aparición del sistema glial en peces elasmobranquios y los restos de su barrera glial en el SNC de mamíferos modernos. De este modo, los insectos poseen una BHE que es un componente importante en el tejido de cobertura del sistema nervioso. Las BHE de insectos son muy sofisticadas pero varían en la estructura entre diferentes órdenes de insectos. De este modo, los insectos con barreras cerebrales altamente sofisticadas con componentes integrantes complejos que imitan las barreras de los vertebrados serán modelos excelentes para la documentar la penetración de diversas moléculas a través de esta estructura.

El documento EP1644733B1 desvela un método para evaluar si un compuesto químico se puede transportar a través de la barrera hematoencefálica de un ser humano, y dicho método comprende las etapas de: administrar el compuesto químico al pez cebra, incubar el pez cebra, analizar el pez cebra.

Khan y col. (2007) desvelan un método para evaluar si *E. coli* se puede transportar a través de la barrera hematoencefálica de un ser humano, y dicho método comprende las etapas de: administrar *E. coli* a un insecto que tiene una barrera hematoencefálica; incubar los insectos; diseccionar los cerebros de los insectos; y medir la concentración de *E. coli* en los cerebros.

El documento US20050132425A1 desvela una mosca transgénica que expresa la versión mutante italiana del péptido Abeta42 humano de la proteína precursora de beta amiloides humanos (APP), y una mosca doblemente transgénica que expresa tanto la proteína Tau como el péptido Abeta42^{italiano} humano de la proteína precursora de beta amiloides humanos (APP). Las moscas transgénicas proporcionan modelos de trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer. El documento US20050132425A1 desvela adicionalmente métodos para identificar modificadores genéticos, así como métodos de identificación sistemática para identificar compuestos terapéuticos para tratar trastornos neurodegenerativos usando las moscas transgénicas.

El documento WO04006854A2 desvela un método para identificar sistemáticamente el efecto de un agente de ensayo en una población de insectos que comprende las etapas de proporcionar una población de muestra de ensayo, administrar al menos un agente de ensayo a la población, crear una película digitalizada que muestra los movimientos de los insectos, medir al menos un rasgo de los insectos de la población con el efecto del agente de ensayo. El documento también proporciona un método para preparar un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad de mamíferos.

Marsh y Thompson (Marsh y Thompson 2006) enseñan que los insectos son muy útiles como sistemas modelo debido a la simplicidad combinada con la rápida reproducibilidad. Algunos de los modelos (con *Drosophila*) han demostrado su eficacia para someter a ensayo fármacos pertinentes y revelaron una concordancia de la eficacia del fármaco en moscas y en mamíferos para enfermedades como Huntington, Parkinson y Alzheimer.

5 Marsh y Thompson (Marsh y Thompson 2004) sugieren que las enfermedades neurodegenerativas dominantes en el hombre se pueden usar como modelo exactamente en insectos, tales como *Drosophila* (mosca de la fruta), ya que presentan las características fundamentales de estas enfermedades tales como degeneración que progresa lentamente, aparición tardía, formación de agregados proteicos anómalos, etc. De acuerdo con los autores, la capacidad para manipular dichos organismos sometidos a ingeniería genética permite la identificación de mecanismos patogénicos y regímenes farmacológicos potenciales a someter a ensayo rápidamente. Los autores sugieren que el excelente acuerdo hasta la fecha de tratamientos farmacológicos que son eficaces en la supresión de la patología tanto en moscas como en ratones proporciona una confianza creciente de que los organismos modelo de invertebrados pueden acelerar de forma prolífica la identificación de agentes que probablemente van a ser eficaces en el tratamiento de enfermedades en mamíferos.

Tal como se desprende a partir de la literatura que se ha mencionado anteriormente, la técnica anterior se dirige principalmente al ensayo de compuestos en moscas (*Drosophila*) para su uso en el tratamiento de enfermedades humanas neurodegenerativas. Sin embargo, aún existe la necesidad de identificar modelos apropiados de identificación sistemática más allá de los métodos de ensayo *in vitro* usados normalmente para determinar/evaluar la penetración de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. En este sentido, se debería tener en cuenta que las moscas tienen uniones septadas y no uniones estrechas como vertebrados y langosta, polilla y cucarachas.

20 Existe una necesidad urgente no solamente de modelos de identificación sistemática más sofisticados en el descubrimiento de fármacos sino también de ensayos de toxicidad de agentes químicos en el SNC en el mercado con menos efectos conocidos sobre la función cerebral.

Por lo tanto, en el descubrimiento de fármacos existe:

30 a) una necesidad de identificación sistemática eficaz de compuestos dirigidos a dianas dentro del sistema del SNC. Esta identificación sistemática se realiza preferentemente en modelos de insectos con la función de la BHE intacta y contribuirán a una selección positiva de compuestos que atraviesen la BHE. Dicha identificación sistemática comprende compuestos de bajo peso molecular dentro del número de indicaciones (por ejemplo, dolor, epilepsia, Parkinson, esquizofrenia, Alzheimer, trastornos del sueño, ansiedad, depresión, trastornos alimentarios, abuso de drogas que incluyen tabaquismo).

35 b) una necesidad de identificación sistemática eficaz de compuestos que se dirigen a tener eficacia fuera del SNC y que cuando penetran en el SNC pueden inducir efectos secundarios no aceptables.

40 c) una necesidad de identificación sistemática eficaz en modelos de insectos caracterizada por cambios selectivos en la función de la BHE. Dicha identificación sistemática comprende compuestos o péptidos o macromoléculas de peso molecular bajo a muy elevado en enfermedades caracterizadas por el deterioro de la función de la BHE (por ejemplo, apoplejía isquémica, lesión cerebral traumática, abuso de fármacos, enfermedades neurodegenerativas del tipo Parkinson y Alzheimer, epilepsia, infecciones, inflamación de tipo meningitis y MS, VIH).

También existe una necesidad de identificación esquemática de compuestos químicos en el mercado, que no se han clasificado ni documentado por su neurotoxicidad potencial.

50 Sumario de la invención

El objetivo general de la presente invención es desarrollar modelos de identificación sistemática en insectos para determinar/evaluar la penetración de la barrera hematoencefálica en vertebrados, tales como mamíferos, preferentemente seres humanos, de diferentes compuestos químicos para mejorar los procedimientos/procesos de identificación sistemática de compuestos en el proceso de descubrimiento temprano de fármacos. Este objetivo ofrece muchas ventajas con respecto a las tecnologías anteriores ya que los modelos de insectos son herramientas más fiables para el proceso de toma de decisiones que los modelos existentes *in vitro*, y acelerará el proceso de identificación sistemática de fármacos y reducirá la velocidad de desgaste en fase tardía. Además, reducirá el número de mamíferos sacrificados durante la fase de descubrimiento de fármacos.

60 Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la barrera hematoencefálica (BHE) en insectos seleccionados entre el grupo que consiste en cucarachas, langostas y polillas tiene más en común con la BHE de los mamíferos de lo que se había supuesto anteriormente. Se ha encontrado que el sistema de barrera en estos insectos se compone de TJ mientras que en las moscas (por ejemplo, *Drosophila*) se compone de uniones septadas (SJ) (Banerjee y Baht 2007). Por lo tanto, los insectos de la presente invención pueden servir como un modelo intermedio para la determinación de la penetración de sustancias químicas a través de la BHE.

5 Por lo tanto, la presente invención es capaz de proporcionar por primera vez estrategias racionales de compuestos de identificación sistemática para indicaciones neurológicas, así como la generación de un sistema sencillo in vivo para determinar la penetración de un compuesto a través de la barrera. La presente invención también es capaz de proporcionar una identificación sistemática racional de compuestos en modelos de insectos que imitan la disfunción de la BHE como una consecuencia de trastornos neurológicos.

10 El descubrimiento de fármacos es un proceso largo y costoso, que requiere una gran cantidad de recursos químicos y biológicos. En la presente invención, las posibilidades de usar insectos como sistemas modelo se han explotado a fondo con el fin de mejorar los procesos de selección de compuestos y reducir los costes durante la fase de descubrimiento de fármacos. En base a recientes descubrimientos, los inventores han contemplado totalmente que los modelos de insectos de la presente invención proporcionan una mejor base que los modelos *in vitro* existentes para la selección de compuestos a someter a ensayo en vertebrados.

15 En un aspecto, la invención proporciona un método para identificar sistemáticamente la penetración de un compuesto químico a través de la BHE, y dicho método comprende las etapas:

20 administrar el compuesto químico a insectos seleccionados entre los órdenes que consisten en Blattodea, Acridoidea, Cheleutoptera, Brachycera y Lepidoptera, incubar los insectos durante un período de tiempo entre 0,05 horas y 72 horas, diseccionar cerebros de los insectos, medir la concentración del compuesto químico en los cerebros diseccionados.

25 En una realización preferente de la presente invención los insectos están seleccionados entre los órdenes de los Acridoidea (langostas) y Blattodea (cucarachas).

En otra realización preferente de la presente invención los insectos se incuban durante un período de tiempo entre 0,5 horas y 5 horas antes de diseccionar los cerebros de los insectos desde un punto de vista de cuantificación de la concentración del compuesto químico administrado en los cerebros.

30 La disección de los cerebros se debería realizar preferentemente de forma inmediata después de sacrificar a los insectos. Como alternativa, los cerebros se diseccionan y se retiran de insectos vivos.

35 Preferentemente, los cerebros diseccionados se homogeneizan y finalmente se lisan para obtener un líquido homogéneo que refleja la composición de los cerebros. El líquido se centrifuga y el sobrenadante se almacena hasta el análisis. El análisis adicional del líquido se puede realizar por medio de cromatografía líquida, posiblemente con detección espectrométrica de masas de los compuestos eluidos.

40 En realizaciones adicionales, la invención proporciona métodos de identificación sistemática de compuestos químicos que ejercen una actividad biológica deseada en el organismo y además una actividad biológica no deseada sobre una diana que existe en el cerebro, sistema nervioso central y/o ojos.

45 Por lo tanto, un método de identificación sistemática de la presente invención se puede usar para determinar la actividad biológica de un compuesto químico y para determinar/evaluar la capacidad o incapacidad del compuesto químico para cruzar la barrera hematoencefálica, en particular la barrera hematoencefálica humana, por ejemplo, mediante la determinación de si el compuesto químico aparece o no hasta un punto significativo dentro del cerebro, sistema nervioso central u ojos cuando no se administra directamente a estos tejidos.

50 En diversos aspectos y realizaciones, la presente invención proporciona la materia de objeto que se establece en las reivindicaciones que siguen a continuación.

55 La invención se aplica por lo general a cualquier programa de descubrimiento de fármacos que se dirigen a una diversidad de enfermedades y trastornos, específicamente trastornos degenerativos, que incluyen: Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Huntington, Enfermedades con inclusiones de neuronas motoras, Tauopatías, Degeneración corticobasal; Trastornos neuropsiquiátricos, que incluyen: Enfermedad por depresión bipolar, Esquizofrenia, Ansiedad, y Agresión. Además, la invención es aplicable en programas de descubrimiento de fármacos que se dirigen a dianas periféricas en las que no se pueden tolerar efectos secundarios dirigidos por el SNC o identificación sistemática de compuestos químicos cuyos efectos sobre las funciones del SNC se desconocen.

60 Por lo tanto, la invención es igualmente aplicable a la identificación sistemática de compuestos químicos que ejercen un efecto biológico que altera una actividad o función en el sistema nervioso central, cerebro u ojos, ya sea normal o sujeta a una enfermedad o trastorno, así como a la identificación sistemática de compuestos químicos que ejercen un efecto biológico que significa la mejora de un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno. Además, la presente invención ofrece la posibilidad de comprobar si fármacos de compuestos químicos que actúan periféricamente y químicos compuestos tóxicos, tales como pesticidas, penetran accidentalmente la BHE o no lo hacen.

Después de la identificación de una sustancia de ensayo con una actividad biológica deseada usando un método de identificación sistemática de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención, la sustancia de ensayo se puede formular en una composición que comprende al menos un componente adicional, por ejemplo un vehículo, medio de soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una nueva metodología para la identificación sistemática de la penetración de sustancias químicas a través de la BHE, que entran en el torrente sanguíneo. La invención generalmente es de utilidad en particular para la identificación sistemática de alto rendimiento de agentes desarrollados en programas de descubrimiento de fármacos que se dirigen a una diversidad de enfermedades y trastornos, específicamente trastornos degenerativos, que incluyen: Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Huntington, Enfermedades con inclusiones de neuronas motoras, Tauopatías, Degeneración corticobasal; Trastornos neuropsiquiátricos, que incluyen: Enfermedad por depresión bipolar, Esquizofrenia, Ansiedad, y Agresión. Además, la invención es aplicable en programas de descubrimiento de fármacos que se dirigen a dianas periféricas en las que no se pueden tolerar efectos secundarios dirigidos por el SNC. Además, la presente invención es aplicable en la identificación sistemática de agentes desarrollados en programas de descubrimiento de fármacos que se dirigen a trastornos alimentarios y trastornos del sueño, etc.

20 La presente invención se refiere, pero no se limita, al uso de insectos seleccionados entre los siguientes órdenes: (Taxonomía de acuerdo con: Djurens Värld, Ed B.Hanström; Förlagshuset Norden AB, Maölmö, 1964):

Orden	Suborden/familia	Comentario
Dictyoptera	Blattodea	Cucaracha
	Mantodea	
Orthoptera	Grylloidea	Grillos
	Acridoidea	Saltamontes
Cheleutoptera		Insectos palo
Lepidoptera		Polillas
Hymenoptera	Formicoidea	Hormigas
	Vespoidea	Avispas
	Apoidea	Abeja como himenópteros
	Bombinae	Abejorros
	Apine	Abejas comunes
Odonata		Libélulas
Diptera	Nematocera	Mosquitos
	Brachycera	Moscas, por ejemplo Drosophila

25 En particular, la invención se refiere a especies de insectos seleccionadas entre Blattodea, Acridoidea, Cheleutoptera, Brachycera y Lepidoptera y más particularmente a los Acridoidea (Locusta migratoria y Schistocera gregaria).

La invención también se refiere a los siguientes órdenes que comprenden especies de insectos relevantes para el método de identificación sistemática:

30

Orden	Suborden/familia	Comentario
Ephemera		Efímera
Plecoptera		
Dermoptera	Forficuloidea	Tijeretas
Homoptera	Cicadinea	Cigarras
	Aphidine	Pulgón
Heteroptera		Hemípteros

Coleoptera		Escarabajos
Trichoptera		Mosca Caddis

La presente invención usa preferentemente insectos grandes, tales como la langosta migratoria, *Locusta migratoria* y la langosta del desierto, *Schistocera gregaria* o cucaracha los que es factible alimentar e inyectar fármacos y posteriormente tomar muestras de hemolinfa y diseccionar tejidos cerebrales, para análisis. La langosta se ha usado para desarrollar modelos de identificación sistemática para determinar la penetración de la BHE de diferentes fármacos terapéuticos y comparar este modelo con los datos existentes en la literatura de estudios convencionales en vertebrados *in vivo*.

El descubrimiento de fármacos es un proceso largo y costoso, que requiere una gran cantidad de recursos químicos y biológicos. En la presente invención se usan insectos específicos como sistemas modelo para mejorar los procesos de selección de compuestos y reducir los costes durante la fase de descubrimiento de fármacos. En base a los experimentos, se ha encontrado sorprendentemente que los modelos de insectos de la presente invención proporcionan una mejor base que los modelos existentes *in vitro* para selección de compuestos a someter a ensayo en vertebrados.

En consecuencia, la presente invención se centra en modelos de insectos que están destinados a reflejar la penetración de la barrera hematoencefálica de vertebrados (BHE). Tal como se ha indicado anteriormente, la investigación de la penetración de la BHE es extremadamente importante en el descubrimiento de fármacos; los fármacos satisfactorios para el SNC tienen que atravesar la BHE, mientras que la penetración de la BHE puede causar efectos secundarios no deseados para fármacos de actuación periférica.

De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, se usa la langosta migratoria, *Locusta migratoria* y/o la langosta del desierto, *Schistocera gregaria*, ya que es fácil de criar y es un insecto relativamente grande (40 - 60 mm long, peso: aprox. 2 g, volumen de hemolinfa: aprox. 300 µl, peso cerebral: aprox. 2 mg).

La invención se describe en detalle en las siguientes secciones, sin embargo, una breve descripción introductoria de una realización ilustrativa ayudará al lector a la comprensión de la invención. Sin embargo, esta introducción que describe una realización en particular no se debe interpretar como limitante de la invención.

La aplicación de un compuesto de ensayo químico a insectos de la presente invención en un método de identificación sistemática puede ser como sigue a continuación, de acuerdo con una realización preferente de la presente invención.

Ejemplos

En una realización preferente de la presente invención, los insectos se seleccionan a partir del orden de los Acridoideos y se usan específicamente *Locusta migratoria* y *Schistocera gregaria*. Los insectos se pueden obtener a partir de proveedores locales o criar en el laboratorio y mantener y alimentar de acuerdo con Goldsworthy y col. (2003). Los compuestos de ensayo se administran en la hemolinfa tal como se describe en Goldsworthy y col. (2003) o se administran por vía oral en el alimento o mediante el uso de una sonda. Para la determinación cuantitativa de la concentración del fármaco en el cerebro, los cerebros se diseccionan de acuerdo con Mokri-Moayyed y col. (2008), se lavan, se congelan instantáneamente y se almacenan hasta los análisis. En el análisis, los cerebros se homogeneizan/someten a agitación vorticial y se centrifugan. El fármaco que contiene sobrenadante se analiza para su concentración de fármaco por HPLC, LC/MSMS u otros métodos pertinentes. El efecto del tratamiento con fármacos se puede documentar mediante el registro de los efectos farmacológicos en el comportamiento o mediante el uso de registros de las señales nerviosas del sistema nervioso central.

Ejemplo A

Se inyectaron 20 µl de una solución de 9,8 mg/ml de mianserina en 6 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 5 minutos, los cerebros se diseccionaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de acuerdo con Mokri-Moayyed y col. (2008). Se colocaron tres cerebros en cada tubo de ensayo y se añadieron 100 µl de H₂O destilada y 80 µl de ácido perclórico (PCA). Los tubos de ensayo se colocaron en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. Las muestras que contenían los cerebros desintegrados se centrifugaron durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 µl de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 27 ng/ml de mianserina se midió por LCMS.

Ejemplo B

Se inyectaron 20 µl de una solución de 9,8 mg/ml de mianserina en 3 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 15 minutos, los cerebros se diseccionaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de acuerdo con Mokri-Moayyed y col. (2008). Se colocaron tres cerebros en un tubo de ensayo y se añadieron 100 µl de H₂O

destilada y 80 ul de ácido perclórico (PCA). El tubo de ensayo se colocó en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. La muestra que contenía los cerebros desintegrados se centrifugó durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul del sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo de ensayo y la concentración de 73 ng/ml de mianserina se midió por LCMS.

5

Ejemplo C

Se inyectaron 20 ul de una solución de 9,8 mg/ml de mianserina en 6 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 5 minutos, los cerebros se diseccionaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de acuerdo con Mokri-Moayyed y col. (2008). Los cerebros se lavaron una vez en PBS. Se colocaron tres cerebros en cada tubo de ensayo y se añadieron 100 ul de H₂O destilada y 80 ul de ácido perclórico (PCA). Los tubos de ensayo se colocaron en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. Las muestras que contenían los cerebros desintegrados se centrifugaron durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 10 ng/ml de mianserina se midió por LCMS.

10

15

Ejemplo D

Se inyectaron 20 ul de una solución de 9,8 mg/ml de mianserina en 3 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 15 minutos, los cerebros se diseccionaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de acuerdo con Mokri-Moayyed y col. (2008). Los cerebros se lavaron una vez en PBS. Los tres cerebros se colocaron en un tubo de ensayo y se añadieron 100 ul de H₂O destilada y 80 ul de ácido perclórico (PCA). El tubo de ensayo se colocó en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. La muestra que contenía los cerebros desintegrados se centrifugó durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul del sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo de ensayo y una concentración de 97 ng/ml de mianserina se midió por LCMS.

20

25

Ejemplo E

Se inyectaron 20 ul de una solución de 9,8 mg/ml de mianserina en 6 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 5 minutos, los cerebros se diseccionaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de acuerdo con Mokri-Moayyed y col. (2008). Los cerebros se lavaron dos veces en PBS. Se colocaron tres cerebros en cada tubo de ensayo y se añadieron 100 ul de H₂O destilada y 80 ul de ácido perclórico (PCA). Los tubos de ensayo se colocaron en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. Las muestras que contenían los cerebros desintegrados se centrifugaron durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 32 ng/ml de mianserina se midió por LCMS.

30

35

Los estudios en los Ejemplos A-G muestran que existe un aumento en la concentración de mianserina en el cerebro de 5 a 15 minutos y ésto se explica mediante un tiempo de exposición más largo, (compárese con los Ejemplos G-I). Además, se puede concluir que el lavado del cerebro no lleva a ninguna reducción significativa de la concentración en el cerebro.

40

Ejemplo F

Se inyectaron 20 ul de una solución de 9,8 mg/ml de mianserina en 9 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 5 minutos, se hizo un corte a través de la parte frontal de la cabeza de la langosta que comprendía las partes más frontales incluyendo las antenas, los ojos compuestos, el cerebro y todas las conexiones neurales entre el cerebro y las antenas y los ojos. A continuación se diseccionó el cerebro en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Azul de Evans. La lámina neural se retiró y los tres cerebros se colocaron en cada tubo de ensayo y se añadieron 100 ul de H₂O destilada y 80 ul de ácido perclórico (PCA). Los tubos de ensayo se colocaron en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. Las muestras que contenían los cerebros desintegrados se centrifugaron durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 9 ng/ml de mianserina se midió por LCMS.

45

50

55

El Ejemplo F muestra que la mianserina atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) en saltamontes y ésto refleja la penetración de la BHE en vertebrados. A partir de los ejemplos A-F se puede concluir que algo del compuesto se une a la lámina neural. Por lo tanto, la concentración medida en el cerebro se tiene que corregir para esta contribución antes de que se pueda concluir la penetración de la BHE. Como una alternativa, se puede retirar la lámina neural y la concentración en el cerebro es entonces una medida directa de la penetración de la BHE.

60

Ejemplo G

40ul de una solución de 8,8 mg/ml de mianserina en DMSO al 5 % se inyectaron a 18 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 5 minutos, se extrajeron 20 ul de hemolinfa de cada langosta. Se hizo un corte a

65

través de la parte frontal de la cabeza de la langosta que comprendía las partes más frontales incluyendo las antenas, los ojos compuestos, el cerebro y todas las conexiones neurales entre el cerebro y las antenas y los ojos. A continuación el cerebro se diseccionó en solución salina que contenía Azul de Evans.

5 2 muestras de hemolinfa se colocaron en un tubo de ensayo que contenía 60 ul de H₂O destilada y 200 ul de acetonitrilo. Cada muestra se centrifugó durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 38 ug/ml de mianserina se midió por LCMS.

10 Cada cerebro se lavó en solución salina y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 100 ul de H₂O destilada. La lámina neural se retiró y se colocaron 6 cerebros en cada tubo de ensayo y se añadieron 200 ul de acetonitrilo. Los tubos de ensayo se colocaron en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. Las muestras que contenían los cerebros desintegrados se centrifugaron durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 152 ng/ml de mianserina se midió por LCMS.

15 Ejemplo H

20 40 ul de una solución de 8,8 mg/ml de mianserina en DMSO al 5 % se inyectaron a 18 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 15 minutos, se extrajeron 20 ul de hemolinfa se extrajo de cada langosta. Se hizo un corte a través de la parte frontal de la cabeza de la langosta que comprendía las partes más frontales incluyendo las antenas, los ojos compuestos, el cerebro y todas las conexiones neurales entre el cerebro y las antenas y los ojos. A continuación el cerebro se diseccionó en solución salina que contenía Azul de Evans.

25 2 muestras de hemolinfa se colocaron en un tubo de ensayo que contenía 60 ul de H₂O destilada y 200 ul de acetonitrilo. Cada muestra se centrifugó durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 17 ug/ml de mianserina se midió por LCMS.

30 Cada cerebro se lavó en solución salina y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 100 ul de H₂O destilada. La lámina neural se retiró y se colocaron 6 cerebros en cada tubo de ensayo y se añadieron 200 ul de acetonitrilo. Los tubos de ensayo se colocaron en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. Las muestras que contenían los cerebros desintegrados se centrifugaron durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 305 ng/ml de mianserina se midió por LCMS.

35 Ejemplo I

40 40 ul de una solución de 8,8 mg/ml de mianserina en DMSO al 5 % se inyectaron a 18 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 45 minutos, se extrajeron 20 ul de hemolinfa de cada langosta. Se hizo un corte a través de la parte frontal de la cabeza de la langosta que comprendía las partes más frontales incluyendo las antenas, los ojos compuestos, el cerebro y todas las conexiones neurales entre el cerebro y las antenas y los ojos. El cerebro se diseccionó en solución salina que contenía Azul de Evans.

45 2 muestras de hemolinfa se colocaron en un tubo de ensayo que contenía 60 ul de H₂O destilada y 200 ul de acetonitrilo. Cada muestra se centrifugó durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 13 ug/ml de mianserina se midió por LCMS.

50 Cada cerebro se lavó en solución salina y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 100 ul de destilada H₂O. La lámina neural se retiró y se colocaron 6 cerebros en cada tubo de ensayo y se añadieron 200 ul de acetonitrilo. Los tubos de ensayo se colocaron en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. Las muestras que contenían los cerebros desintegrados se centrifugaron durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 393 ng/ml de mianserina se midió por LCMS.

55 A partir de los Ejemplos G-I se puede concluir que la concentración de hemolinfa de mianserina se reduce con el tiempo mientras que la concentración en el cerebro se incrementa de 5-15 minutos y los niveles de salida hasta 15-45 minutos. Esto refleja la situación en vertebrados en la que una exposición cerebral mayor aumenta el nivel en el cerebro hasta un determinado límite. Además, el aclarado del compuesto en el cerebro de vertebrados es menor que en el fluido corporal, es decir, exactamente tal como se observa en los ejemplos G-I.

60 Ejemplo J

65 20 ul de una solución de 630 ug/ml de serotonina se inyectaron a 6 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 5 minutos, se extrajeron 20 ul de hemolinfa de cada langosta. Se hizo un corte a través de la parte frontal de la cabeza de la langosta que comprendía las partes más frontales incluyendo las antenas, los ojos compuestos, el cerebro y todas las conexiones neurales entre el cerebro y las antenas y los ojos y el cerebro se diseccionó en solución salina. Cada muestra de hemolinfa se colocó en un tubo de ensayo que contenía 80 ul de

H₂O destilada y 200 ul de acetonitrilo. Cada muestra se centrifugó durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 4,7 ug/ml de serotonina se midió por LCMS.

- 5 Cada cerebro se lavó en solución salina y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 100 ul de H₂O destilada. Se colocaron tres cerebros en cada tubo de ensayo y se añadieron 200 ul de acetonitrilo. Los tubos de ensayo se colocaron en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. Las muestras que contenían los cerebros desintegrados se centrifugaron durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 86,5 ng/ml de serotonina se midió por LCMS.

Ejemplo K

- 15 3 cerebros de Saltamontes, *Locusta migratoria* (machos), se usaron para medir el nivel de serotonina endógena en el cerebro. Se hizo un corte a través de la parte frontal de la cabeza de la langosta que comprendía las partes más frontales incluyendo las antenas, los ojos compuestos, el cerebro y todas las conexiones neurales entre el cerebro y las antenas y los ojos y el cerebro se diseccionó en solución salina. Cada cerebro se lavó en solución salina y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 100 ul de H₂O destilada. Se colocaron tres cerebros en un tubo de ensayo y se añadieron 200 ul de acetonitrilo. El tubo de ensayo se colocó en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. La muestra que contenía los cerebros desintegrados se centrifugó durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul del sobrenadante se trasladaron a un nuevo tubo de ensayo y una concentración de 20 ng/ml de serotonina se midió por LCMS.

- 25 Los Ejemplos A-F mostraron que la concentración medida de mianserina se incrementa por un factor 3 cuando la lámina neural se incluye en la medida de la concentración en el cerebro. Es razonable asumir que la serotonina unida a la lámina neural representa una contribución similar al igual que en los estudios con mianserina. Por lo tanto, la introducción de un factor de corrección en base a los experimentos con mianserina sugiere que la concentración real medida de serotonina en el cerebro en el Ejemplo J es próxima al nivel de serotonina endógena medida en el Ejemplo K.

- 30 A partir del Ejemplo J y K se puede concluir que la serotonina solo atraviesa la BHE del saltamontes en una proporción muy baja, si la hubiera. Una penetración muy baja de la BHE de serotonina también se observa en vertebrados.

35 Ejemplo L

- 40 20 ul de una solución de 8,4 mg/ml de DMSO al 5 % de buspirona se inyectaron a 6 saltamontes, *Locusta migratoria* (machos). Después de 5 minutos, se extrajeron 20 ul de hemolinfa de cada langosta. Se hizo un corte a través de la parte frontal de la cabeza de la langosta que comprendía las partes más frontales incluyendo las antenas, los ojos compuestos, el cerebro y todas las conexiones neurales entre el cerebro y las antenas y los ojos y el cerebro se diseccionó en solución salina. Cada muestra de hemolinfa se colocó en un tubo de ensayo que contenía 80 ul de H₂O destilada y 200 ul de acetonitrilo. Cada muestra se centrifugó durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y la concentración promedio de 4,5 ug/ml de buspirona se midió por LCMS.

- 45 Cada cerebro se lavó en solución salina y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 100 ul de H₂O destilada. Se colocaron tres cerebros en cada tubo de ensayo y se añadieron 200 ul de acetonitrilo. Los tubos de ensayo se colocaron en un sonicador y los cerebros se desintegraron mediante aproximadamente 5 segundos de sonicación. Las muestras que contenían los cerebros desintegrados se centrifugaron durante 5 minutos (10000 g a 4 °C). 100 ul de los sobrenadantes se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y una concentración promedio inferior a 20 ng/ml de buspirona se midió por LCMS.

- 50 Fue evidente a partir de este ejemplo que la buspirona atraviesa la BHE del saltamontes, pero está en una fracción mucho menor que en el caso de la mianserina. Este resultado refleja la penetración de la BHE de vertebrados en la que existe una penetración de la BHE mucho más baja de buspirona que la penetración correspondiente de mianserina.

Referencias

- 60 Banerjee y Baht (2007), Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation Annual Review of Neuroscience 30: 235-258.
- Di, L. y Kerns, E.H. (2003). Profiling drug-like properties in discovery research. Current Opinion in Chemical Biology 7, 402-408.
- 65 Gaertner, L.S., Murray, C.L., Morris, C.E. (1998). Transepithelial transport of nicotine and vinblastine in isolated malpighian tubules of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) suggests a P-glycoprotein-like mechanism. The

- Journal of Experimental Biology 201, 2637-2645.
- Garberg, P. y col. (2005). In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicology in Vitro* 19, 299-334.
- 5 Goldsworthy, G y col. (2003) Adipokinetic hormone enhances nodule formation and phenoloxidase activation in adult locusts injected with bacterial lipopolysaccharide. *J. Insect. Physiol.*, 49, 793-803.
- Gullan, P.J y Cranston, P.S. (2000). *The insects. An outline of entomology.* Blackwell Science Ltd.
- 10 Marsh, J.L., y Thompson, L.M. (2004). Can flies help humans treat neurodegenerative diseases? *Bioessays* 26, 485-496.
- Marsh, J.L. y Thompson, L.M. (2006). *Drosophila in the Study of Neurodegenerative Disease.* *Neuron* 52, 169-178.
- 15 Mokri-Moayyed, B y col., (2008). Development of a novel ex vivo insect model for studying virulence determinants of *Escherichia coli* K1. *J. Medical Microbiol.* 57, 106-110.
- Pardridge, W.M. (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 131-139.
- 20 Ruiz-Garcia, A., Bermejo, M., Moss A., Casabo, V.G. (2007). Pharmacokinetics in drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-37.
- 25 Schinkel, A.H. (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* 36, 179-194.
- Summerfield, S. y col. (2005). Improving the In Vitro Prediction of In Vivo SNC Penetration: Integrating Permeability, Pgp Efflux and Free Fractions in Blood and Brain. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*.
- 30 Turksen, K. y Troy, T.-C. (2004). Barriers built on claudins. *Journal of Cell Science* 117, 2435-2447.
- 35 Xia, C.Q., Xiao, G., Liu, N., Pimprale, S., Fox, L., Patten, C.J., Crespi, C.L., Miwa, G., Gan, L.-S. (2006). Comparison of Species Differences of P-Glycoproteins in Beagle Dog, Rhesus Monkey, and Human Using ATPase Activity Assays. *Molecular Pharmaceutics* 3 (1), 78-86.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar si un compuesto químico se puede transportar a través de la barrera hematoencefálica (BHE) de un vertebrado, preferentemente un mamífero, tal como un ser humano, y dicho método comprende las etapas de:
- administrar el compuesto químico a un insecto que tiene una BHE,
 - incubar los insectos,
 - diseccionar cerebros de los insectos, y
 - 10 • medir la concentración del compuesto químico en los cerebros.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que los insectos están seleccionados entre el grupo que consiste en los órdenes Blattodea, Diptera, Acridoidea, Cheleutoptera, Brachycera y Lepidoptera.
3. El método de la reivindicación 1, en el que los insectos se incuban durante un periodo de entre 0,5 horas y 5 horas antes de diseccionar los cerebros de los insectos con un punto de vista de cuantificación de la concentración del compuesto químico administrado en los cerebros.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la disección de los cerebros se realiza inmediatamente después de sacrificar a los insectos.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la medida de la concentración del compuesto químico se realiza mediante homogeneización de los cerebros diseccionados, preferentemente por centrifugación del homogenado y analizando la concentración del compuesto químico en el homogenado mediante cromatografía líquida, posiblemente con detección espectrométrica de masas de los compuestos eluidos.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el compuesto químico se administra por vía parenteral o por vía oral.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la determinación de gradientes de concentración de compuesto químico cuerpo:cerebro para determinar cuantitativamente la penetración de la BHE.
- 35 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende comparar las eficacias relativas de compuestos químicos con la actividad deseada en el sistema nervioso central en presencia de una barrera hematoencefálica.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende determinar si un compuesto químico se metaboliza en la barrera hematoencefálica.
- 40 10. Uso de insectos seleccionados entre el grupo que consiste en los órdenes Blattodea, Diptera, Acridoidea, Cheleutoptera, Brachycera y Lepidoptera para evaluar si un compuesto químico se transporta a través de la barrera hematoencefálica de un vertebrado, preferentemente un mamífero, tal como un ser humano.