

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 057**

21 Número de solicitud: 201500766

51 Int. Cl.:

C12N 5/079 (2010.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

05.07.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.12.2018

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

14.01.2019

Fecha de concesión:

24.10.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

31.10.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias s/n
41012 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**NÚÑEZ ABADES, Pedro Antonio;
CARRASCAL MORENO, Livia;
PARDILLA DIAZ, Ricardo;
CANO RODRÍGUEZ, Mercedes;
MUÑOZ PINTO, Mario Faustino y
AYALA GÓMEZ, Antonio**

54 Título: **Kit y método de cuantificación de la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral para la detección de enfermedades neurodegenerativas**

57 Resumen:

La presente invención describe un método electrofisiológico y un kit consistente en una concentración de 10 µM de hidróperóxido de cumeno puro en líquido cefalorraquídeo para cuantificar los efectos de la toxicidad sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas de la corteza motora a los 5 minutos de exposición a la acción tóxica y su uso en la detección de enfermedades neurodegenerativas, tal como la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Esta invención se encuadra en las áreas analítica y científico-técnica farmacéutica, concretamente en el sector de actividad farmacéutica de evaluación de propiedades de fármacos neuroprotectores.

ES 2 694 057 B1

DESCRIPCIÓN

Kit y método de cuantificación de la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral para la detección de enfermedades neurodegenerativas.

5

Objeto de la invención

La presente invención describe un método electrofisiológico y un kit, consistente en una concentración de $10\ \mu\text{M}$ de hidroperóxido de cumeno puro en líquido cefalorraquídeo, para cuantificar los efectos de la toxicidad sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas de la corteza motora a los 5 minutos de exposición a la acción tóxica y su uso en la detección de enfermedades neurodegenerativas, tal como la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

10

Esta invención se encuadra en las aéreas analítica y científico-técnica farmacéutica, concretamente en el sector de actividad farmacéutica de evaluación de propiedades de fármacos neuroprotectores.

15

Antecedentes en el estado de la técnica

A día de hoy hay muchos aspectos desconocidos en cuanto al origen de diversas enfermedades neurodegenerativas. Algunas de las más importantes, tanto por su sintomatología como por el gran impacto que tienen en la población, son la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer o la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Basándonos en los numerosos resultados acumulados a lo largo de la pasada década podemos afirmar que el estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) están involucrados en los procesos de daño neuronal que subyacen en estas patologías neurodegenerativas. Desde hace más de 20 años llevamos investigando los procesos bioquímicos y fisiológicos que acompañan al estrés oxidativo (ver revisión Ayala y col., 2014; Pardillo-Díaz y col., 2015) y su prevención con antioxidantes (ver como ejemplo trabajo de Parrado y col., 2003). Si la oxidación se considera un factor determinante en la aparición de dichas patologías, entonces, es necesario encontrar procedimientos que de manera eficiente midan la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral. Sin embargo, el avance de estas enfermedades y la falta de tratamientos eficaces que detengan la neurotoxicidad de los agentes oxidantes que las causan, hace precisa, por un lado, definir el efecto de la toxicidad en las neuronas, pero también probar correctamente los beneficios de los fármacos que se desarrollan a tal efecto.

20

25

30

35

Esta invención utiliza por un lado el hidroperóxido de cumeno, como solución oxidante y, por otro lado, la técnica neurofisiológica de patch-clamp, como método para acceder de manera precisa a las neuronas que efectivamente se ven afectadas por este tipo de patología, que son las neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza motora (en el caso de la ELA). Esta invención se puede aplicar con dos orientaciones: se propone para medir los efectos de los tóxicos en neuronas de la corteza cerebral y, además, para evaluar el efecto neuroprotector de sustancias antioxidantes.

40

El hidroperóxido de cumeno (HC) es un agente oxidante orgánico estable, que tiene el grupo funcional peróxido, $-\text{O}-\text{O}-$, en su fórmula molecular, $\text{C}_6\text{H}_5 - (\text{CH}_3)_2 - \text{COOH}$ (figura 1). Las técnicas existentes hasta la fecha han utilizado componentes oxidantes diferentes. El más frecuente es el H_2O_2 (Jovanovic y Jovanovic, 2013) que presenta propiedades oxidantes más débiles que el HC. Esta invención utiliza el HC porque permite su medición temporal de manera estable y más rápida aplicable antes de que las neuronas analizadas mueran. Por otra parte, la presente invención describe un método y un kit a cantidades de HC sensiblemente inferiores a las utilizadas en estudios previos (Tsai et al, 1997).

50

La corteza motora, como el resto de la corteza cerebral, está conformada por seis capas de células bien diferenciadas entre sí, tanto morfológica como funcionalmente. Las capas III y V están formadas por los cuerpos celulares de las neuronas piramidales. Estas neuronas presentan un cuerpo celular de gran tamaño (mayor a 30 μ M; figura 3), con forma triangular o piramidal en la mayor parte de los casos, y un árbol dendrítico orientado en sentido perpendicular a la superficie del cerebro al que se dirige atravesando varias capas situadas sobre ellas (Oswald y col., 2013). Dicha región está implicada en el control fino de los movimientos voluntarios y en el aprendizaje de nuevas habilidades motoras (Hosp y col., 2011). Su disfunción/muerte es la que desencadena los síntomas asociados al ELA. Hasta la fecha no se han hecho estudios de como el estrés oxidativo induce la muerte neuronal de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora que son utilizadas en la presente invención como ejemplo de medición de la toxicidad neuronal.

Hace más de 200 años Luigi Galvani descubrió que la funcionalidad del sistema nervioso está ligada intrínsecamente a la actividad eléctrica. Desde entonces generaciones de investigadores han invertido un gran esfuerzo para intentar construir instrumentos capaces de medir esta actividad eléctrica. La sensibilidad y resolución de los instrumentos de electrofisiología de hoy en día nos permiten estudiar desde las propiedades de un solo canal iónico hasta fenómenos mas complejos que comprenden la actividad de numerosas neuronas que se encuentran formando los circuitos neuronales (Verkhratsky y col., 2006).

El análisis de la toxicidad en la capa V de la corteza motora comporta tres problemas fundamentales. Primero, hasta la fecha se han hecho algunos estudios en miocitos y en rodajas del hipocampo, que son células más resistentes a la anoxia por poseer menor tamaño. Las neuronas de la capa V se caracterizan por su gran tamaño, lo cual dificulta obtenerlas vivas para analisis que requieren rodajas de cerebro.

Segundo, atravesar las capas en cerebro vivo implica una dificultad añadida para el acceso con electrodos y para la aplicación de las drogas, con lo cual hay que intentar obtener rodajas de cerebro finas pero que mantengan la viabilidad de la célula. Esta invención permite conseguir neuronas viables de la corteza cerebral.

Tercero, en la actualidad, las técnicas de analisis toxicológico tienen un carácter esencialmente bioquímico (Vimard y col. 2011). Para conocer si ante un determinado tóxico, o un fármaco neuroprotector, el sistema nervioso central se ve afectado, el método a utilizar seria en todo caso de observación de las propiedades intrínsecas de las neuronas. Estas propiedades no son otras que las electrofisiológicas y de su observación se puede concluir fehacientemente que las neuronas siguen viables, es decir, que mantienen su excitabilidad. Dicha excitabilidad se determina a partir de los valores en reobase, resistencia, ganancia de disparo, frecuencia máxima. Esta invención cuantifica dichos valores para determinar la acción de los tóxicos en la neurona.

Esta invención aporta como beneficio a las técnicas actuales la combinación de procedimientos de naturaleza bioquímica, como es la utilización de un oxidante orgánico (el HC), con otros de naturaleza exclusivamente neurofisiológica, como es la técnica de preparación de rodajas in vitro y un abordaje electrofisiológico de acceso directo a las neuronas denominado de patch-clamp. Los beneficios de la preparación de rodajas in vitro es que se pueden conseguir rodajas muy finas de cerebro y, además, una vez bañadas en líquido cefalorraquídeo artificial a temperatura y pH controlados (Nunez-Abades y col., 1993; Carrascal 2005), se mantienen vivas. Los beneficios de la técnica de patch-clamp se basan en el acceso directo a las neuronas, tanto para medir sus propiedades electrofisiológicas como para aplicarles drogas. Se usa una micro pipeta de vidrio con una apertura de aproximadamente 1-5 μ M en su punta. La pipeta se puede rellenar con soluciones. El gran beneficio es que se puede exponer el interior

mismo de la célula a la droga que se esté estudiando. Dentro del vidrio se sitúa un electrodo de metal, normalmente plata, en contacto con esta solución. Una gran ventaja de esta técnica es que la apertura de la punta de la micro pipeta permite un buen acceso eléctrico al interior de la célula. Este electrodo es el encargado de conducir los cambios eléctricos a un amplificador de voltaje. Para conseguir el registro de las células la micro pipeta se coloca presionando contra la membrana celular, y a continuación se aplica succión para absorber la membrana dentro de ella para formar un sello eléctrico, el “giga-ohm” o giga-sello. En el patch-clamp se puede mantener el voltaje en un nivel constante (voltage clamp) mientras se registran los cambios de corriente o se puede fijar la corriente (current clamp) en la célula y registrar los cambios de voltaje. Dentro de la técnica de patch-clamp existen diversas configuraciones (Purves y col., 2008). Con la configuración de célula completa (whole-cell patch) se realiza el sello en la membrana con la micro pipeta y a continuación se aplica mas succión para romper parte de la membrana, produciéndose un acceso al espacio intracelular.

15 BIBLIOGRAFÍA

Ayala A, Munoz M.F. y Arguelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2- Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014: 360-438.

Carrascal L, Nieto-Gonzalez JL, Cameron WE, Torres B y Nunez-Abades PA (2005). Changes during the postnatal development in physiological and anatomical characteristics of rat motoneurons studied in vitro. *Brain Res Brain Res Rev.* 49:377-387.

Hosp J.A., Pekanoivic A, Rioult-Pedotti MS y Luft AR (2011). Dopaminergic projections from midbrain to primary motor cortex mediate motor skill learning. *J. Neurosci.* 31: 2481-2487.

Jovanovic Z y Jovanovic S (2013). A Comparison of the Effects of Cumene Hydroperoxide and Hydrogen Peroxide on Retzius Nerve Cells of the Leech *Haemopsis sanguisuga*. *Exp. Anim.* 62: 9-17.

Nunez-Abades PA, Spielmann JM, Barrionuevo G y Cameron WE (1993). In vitro electrophysiology of developing genioglossal motoneurons in the rat. *J Neurophysiol.* 70:1401-1411.

Oswald MJ, Tantirigama MLS, Sonntag I, Hughes SM y Empson, RM (2013). Diversity of layer 5 projection neurons in the mouse motor cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 7: 174. Pag 1-18.

Pardillo-Diaz, R, Carrascal, L y Nunez-Abades, P (2015). Oxidative Stress Induced by Cumene Hydroperoxide Evokes Changes in Neuronal Excitability of Rat Motor Cortex Neurons. *Neuroscience*, doi: 10.1016/j. neuroscience. 2014.12.055.

Parrado J, Absi EH, Machado A, Ayala A (2003). "In vitro" effect of cumene hydroperoxide on hepatic elongation factor-2 and its protection by melatonin. *Biochim Biophys Acta.* 1624:139-44.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall, WC Lamantia AS, McNamara JO y Williams SM (2008). *Neurociencia*. Tercera edicion. Ed. Panamericana. Madrid. Tsai MC, Chen YH y Chiang LY (1997) Hydrogen Peroxide- and Cumene Hydroperoxide-Elicited Changes in Rat Hippocampus In-Vitro. *J Pharm and Pharmacol.* 49:438-445.

Verkhratsky A, Krishtal OA y Petersen OH (2006). From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflugers Arch.* 453: 233-247.

Vimard F, Saucet M, Nicole O, Feuilleley M y Duval, D (2011). Toxicity induced by cumene hydroperoxide in PC 12 cells: protective role of thiol donors. J. Biochem. Mol. Toxicol. 25: 205-215.

5 Explicación de la invención

La presente solicitud de patente se refiere a un método y a un kit para detectar y/o cuantificar los efectos de la toxicidad sobre las propiedades intrínsecas de la membrana que determinan la excitabilidad neuronal, a partir de la detección temporal del cambio en dichas variables. Este método y este kit actúan directamente sobre neuronas de la corteza motora que son las que pueden desencadenar ELA o Parkinson. Además, el método se prueba en rodajas de cerebro vivas de animales adultos que mantienen intactas las conexiones sinápticas y, por tanto, sus propiedades de membrana, por primera vez en corteza cerebral. El kit utiliza una cantidad sensiblemente inferior ($10 \mu\text{M}$) a las utilizadas hasta la fecha para medir toxicidad. El método también permite una medida rápida de los efectos del tóxico en las neuronas midiendo sus alteraciones electrofisiológicas (5 min).

Las ventajas de la invención residen en la fiabilidad de la técnica en tanto accede directamente al interior celular en rodajas con neuronas interconectadas. La invención identifica las variables que verdaderamente definen la viabilidad neuronal por oposición a técnicas de naturaleza exclusivamente bioquímica (reobase, resistencia, potencial de membrana, frecuencia media y máxima de disparo de potenciales de acción).

Esta invención se encuadra en las áreas analítica y científico-técnica farmacéutica. Como mejora con respecto a otras técnicas anteriores este procedimiento puede aplicarse a la determinación de las propiedades neuroprotectoras de fármacos desarrollados para paliar la oxidación neuronal.

Así pues, la presente invención en un primer aspecto se refiere a un método electrofisiológico para la detección y/o cuantificación de la toxicidad de oxidantes y evaluación de fármacos neuroprotectores en las neuronas de la corteza cerebral:

a) Elaborar la dilución de un compuesto oxidante a $10 \mu\text{M}$, a partir de una solución pura de hidroperóxido de cumeno añadida al líquido cefalorraquídeo artificial que se utiliza para oxidar las membranas celulares.

b) Cuantificar los parámetros electrofisiológicos de las neuronas sometidas a la acción del toxico oxidante midiendo las alteraciones en la excitabilidad neuronal a partir del minuto 5 de exposición.

En un aspecto más en particular de la presente invención, para obtener neuronas viables, donde previamente al paso a): se perfunde al animal transcárdiacamente con líquido cefalorraquídeo con bajo calcio/alto magnesio a 4°C , para bajar rápidamente el metabolismo celular y bloquear la transmisión sináptica por la ausencia de calcio. A continuación se cortan las rodajas de cerebro con el mismo líquido cefalorraquídeo modificado con bajo calcio para seguir bloqueando la transmisión sináptica en condiciones de baja actividad metabólica.

En un aspecto más particular de la presente invención y como novedad para obtener neuronas viables, las rodajas de cerebro ($300 \mu\text{m}$) se mantienen vivas incubadas en líquido cefalorraquídeo artificial durante 30 minutos a 36°C y posteriormente a 21°C hasta el final del proceso.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la medición de la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral que comprende los reactivos necesarios para producir la oxidación.

- 5 En un aspecto más particular de la presente invención, el kit comprende para una solución stock de 60 mM:

5.5 μ L de HC puro

- 10 494.5 μ L de líquido cefalorraquídeo artificial

En un aspecto más particular, la presente invención se refiere al uso de un kit según se ha descrito anteriormente para la oxidación de los componentes de la membrana plasmática.

- 15 En un tercer aspecto de la presente invención, la oxidación neuronal se mide a partir de la cuantificación de los parámetros electrofisiológicos de las neuronas sometidas a la acción del toxico oxidante que son: potencial de membrana de reposo, resistencia de entrada, reobase, voltajes de despolarización y umbral, amplitud y duración del potencial de acción, ganancia de la frecuencia de disparo, frecuencia máxima de disparo y corriente de cancelación.

- 20 En un aspecto más particular de la presente invención, la toxicidad se identifica cuando se producen alteraciones de las propiedades electrofisiológicas a partir del minuto 5.

- 25 En un cuarto aspecto, la siguiente invención se refiere a la determinación de las propiedades neuroprotectoras de fármacos desarrollados para paliar la oxidación neuronal mediante la incubación de las rodajas de cerebro con el neuroprotector previo a la adición del oxidante.

Descripción de las figuras

- 30 Figura 1.- Representa la formula molecular del Hidroperóxido de cumeno (HC) y como se produce la oxidación lipidica en cadena por dicho toxico. El HC es un agente oxidante orgánico estable que tiene el grupo funcional peróxido, -O-O-, en su formula molecular, $C_6H_5 - (CH_3)_2 - COOH$. Este grupo funcional es el responsable de inducir la peroxidación lipidica. La figura muestra como el HC en presencia de metales iónicos de transición produce radicales cumoxilo en las membranas de las neuronas (paso 1), que quitan un hidrogeno (H^+) de una molécula lipidica generando así alcohol cumilico y un radical lipidico que reacciona con el oxígeno (O_2) promoviendo la iniciación o la propagación de la peroxidación lipidica (paso 2). Los radicales cumoxilo pueden reaccionar también con otras moléculas de HC para producir alcohol cumilico y radicales cumoperoxilo (paso 3). Finalmente, el radical cumoperoxilo puede llevarse un hidrogeno del lípido mas cercano disponible para producir un nuevo HC y un radical lipidico, que de nuevo puede afectar al ciclo de la peroxidacion lipidica (paso 4). El radical cumoperoxilo también puede reaccionar con oxígeno para producir un nuevo radical cumoxilo, y así iniciar de nuevo la reacción en cadena (paso 5).

- 45 Figura 2A.- Representa la zona de estudio (M1: corteza motora primaria) en una rodaja típica y la localización del electrodo de registro.

- 50 Figura 2B.- Representa diferentes electrodos. En la parte superior se muestra un electrodo que sería descartado por tener la punta demasiado fina, y en la parte inferior se muestra un electrodo de patch de características idóneas para realizar el procedimiento.

Figura 3.- Representa la aproximación (figura 3A) de la punta del electrodo a la superficie del soma (3B-C) de la neurona seleccionada vista en el monitor del microscopio. En el dibujo D = dorsal, y M = medial; En el margen inferior izquierdo figura la escala.

5 Figura 4.- Representa los efectos del hidróperóxido de cumeno sobre el potencial de membrana en neuronas de la corteza motora. Se muestra la respuesta típica del potencial de membrana y la respuesta en voltaje a pulsos de corriente negativa de -100 pA al añadir HC 10 μ M al baño de perfusión. La primera flecha negra, situada a la izquierda, indica el cambio en voltaje en situación control, la segunda a los 5 minutos tras la aplicación de HC y la tercera a los 15 minutos tras la aplicación de HC. Se observa que a los cinco minutos se altera la resistencia de la membrana.

15 Figura 5. Muestra los efectos del hidróperóxido de cumeno sobre la corriente de cancelación y la frecuencia máxima de disparo de potenciales de acción en neuronas piramidales de la corteza motora. Se muestra las respuestas del potencial de membrana a pulsos triangulares de corriente despolarizante de 1 s de duración y 900 pA de intensidad en situación control (A) y a 5 (B), 15 (C) y 30 (D) minutos. Se observa que ya a los cinco minutos empieza a disminuir la frecuencia de disparo de potenciales de acción.

20 **Ejemplo de realización de la invención**

A modo de ejemplo de la detección y cuantificación de los efectos de los tóxicos en la corteza motora:

25 El animal se anestesia con hidrato de cloral 4% y se perfunde transcardiacamente con líquido cefalorraquídeo artificial con bajo calcio/alto magnesio a 4°C para bajar el metabolismo celular y bloquear la transmisión sináptica en el sistema nervioso central. Posteriormente, el animal se decapita, el cerebro se extrae rápidamente y se coloca en una placa de Petri con líquido cefalorraquídeo con bajo calcio/alto magnesio. Con la ayuda de un bisturí, se secciona el cerebro quedándonos únicamente con la parte que contenga neuronas de la corteza motora (Figura 2A). Esta estructura se ha propuesto que es muy sensible al estrés oxidativo, lo que desencadena patologías tan graves como la Esclerosis Lateral Amiotrofica. El tejido se corta en secciones transversas de 300 μ m usando un vibratomo bañado de líquido cefalorraquídeo con bajo calcio. Se colocan durante 30 minutos en los pocillos de una cámara de mantenimiento rellena de líquido cefalorraquídeo artificial a ~36°C. Posteriormente, se mantienen las rodajas durante un periodo <6 horas a ~21°C en la misma cámara y solución. A continuación las rodajas se pasan de una en una a la cámara de registro, donde se perfunden con líquido cefalorraquídeo artificial (pH 7,4; 33°C) con una bomba peristáltica a una tasa de 1 mL/min. El líquido cefalorraquídeo artificial se burbujea con una mezcla de gases que contiene 95% O₂ - 5% CO₂. La composición del líquido cefalorraquídeo artificial es la siguiente (datos en mM): 126 NaCl, 2 KCl, 1,25 Na₂HPO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucosa, 2 MgCl₂ y 2 CaCl₂. Para la perfusión y el corte se modifica el líquido cefalorraquídeo ligeramente disminuyendo el calcio y aumentando el magnesio (0,1 CaCl₂ mM y 4 MgCl₂ mM).

45 Las micropipetas de patch se obtienen utilizando un estirador de pipetas vertical a partir de tubos de vidrio de borosilicato de 1 mm de grosor con capilar interno y se rellenan con una solución de gluconato de potasio (datos en mM): 120 Kgluconato, 10 KCl, 10 fosfocreatina, 2 MgATP, 0,3 NaGTP, 0,1 EGTA, 10 HEPES, ajustado a un pH de 7,3 con KOH. La figura 2B ilustra en la parte inferior un electrodo de patch que cumple visualmente todas las características para un buen registro, y en la parte superior otro que sería directamente descartado por su aspecto (por ser demasiado fino, característico de configuraciones más rudimentarias de acceso al interior celular, o técnica de registro con electrodos de punta fina o Sharp electrodos). Las neuronas se visualizan usando un microscopio, equipado con una

óptica de contraste interferencial diferencial para visualizar infrarrojo (IR-DIC), y una cámara de infrarrojos.

5 Los registros se realizan en la configuración de whole-cell o célula entera con la ayuda de un micromanipulador monitorizado que acerca la punta de la pipeta a la superficie de la membrana (Figura 3). Cuando se posiciona la punta de la pipeta sobre la membrana del soma de la neurona y aparece un halo blanco en la superficie del soma (Figura 3.C) se suprime la presión positiva y se aspira levemente hasta que haya una adhesión perfecta entre el exterior de la pipeta y la membrana de la célula consiguiéndose un sello de alta resistencia o giga-seal
10 (aceptable entre 10 a 100 gigaohms). Al aplicar una leve succión se consigue que el sello se rompa y que el interior de la pipeta entre en contacto con el citoplasma. Estos registros se llevaron a cabo utilizando un amplificador. Solo los registros con una resistencia de acceso entre 5 y 20 M Ω son aceptados para su posterior análisis. Los registros se pasan por un filtro de baja frecuencia a 10 kHz y los datos obtenidos son digitalizados a 20 kHz con un convertidor
15 analógico-digital y analizados en el ordenador con software de adquisición y análisis de datos electrofisiológicos.

La solución oxidante se prepara para obtener una dilución de hidroperóxido de cumeno a 10 μ M a partir de los siguientes pasos: 1) Se toma 5,5 μ L de HC puro y se mezcla con 494,5
20 μ L de líquido cefalorraquídeo. 2) Dado que el HC es muy hidrófobo, la mezcla tiene que homogeneizarse con la ayuda de un baño ultrasónico. Se sabe que estaba bien disuelto porque la solución adquiere un color blanquecino. 3) Una vez disuelto se obtiene una solución stock de 60 mM. De esa solución tomamos 17 μ L y lo añadimos a 100 ml de líquido cefalorraquídeo artificial obteniendo una concentración final de 10 μ M. Esta solución a 10 μ M se preparajusto
25 antes de cada experimento, a partir de la solución stock de 60 mM. El protocolo usado para estudiar el efecto del HC es el siguiente: cada motoneurona registrada en las rodajas de cerebro, que contienen corteza motora, se perfundió inicialmente con líquido cefalorraquídeo artificial para estudiar sus propiedades electrofisiológicas en condiciones control. Después de esto las rodajas de cerebro se perfunden con la solución oxidante, compuesta por HC 10 μ M
30 en líquido cefalorraquídeo artificial. Para ello la solución oxidante que contiene HC se perfunde, sobre la rodaja de cerebro situada en la cámara de registro, a una tasa de 1 mL/min durante 30 min con la ayuda de una bomba peristáltica.

Para el test de toxicidad se cuantifican antes y después de la exposición al hidroperóxido de cumeno las siguientes variables de la membrana: potencial de membrana de reposo, resistencia de entrada, reobase, voltajes de despolarización y umbral, amplitud y duración del potencial de acción, ganancia de la frecuencia de disparo, frecuencia máxima de disparo y corriente de cancelación (ver la modificación en la respuesta en voltaje que ocurre en el minuto cinco en la Figura 4 y la disminución en la frecuencia de disparo que aparece a los cinco minutos en la Figura 5 tras la aplicación del hidroperóxido de cumeno. La toxicidad se determina como positiva si a los 5 minutos de aplicación del tóxico se produce una disminución en la amplitud del potencial de acción, disminución en la frecuencia media y máxima de disparo, y se modifica la resistencia y la reobase de la membrana plasmática.

45

REIVINDICACIONES

1. Método de cuantificación de la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral caracterizado porque comprende los pasos de a) elaborar la dilución de hidróperóxido de cumeno a $10 \mu\text{M}$ a partir de una solución pura de hidróperóxido de cumeno añadida al líquido cefalorraquídeo artificial; b) perfundir sobre la rodaja de cerebro situada en la cámara de registro, a una tasa de 1 mL/min durante 30 min con la ayuda de una bomba peristáltica y c) medir los parámetros electrofisiológicos de las neuronas sometidas a la acción de la solución oxidante, preferentemente resistencia de membrana, rebote, amplitud y anchura de los potenciales de acción, frecuencia media y máxima de disparo.
2. Método de cuantificación de la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral, según reivindicación anterior, caracterizado porque las rodajas de corteza cerebral se mantienen vivas incubadas en líquido cefalorraquídeo artificial de composición 126 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,25 mM Na_2HPO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 10 mM glucosa, 2 mM MgCl_2 y 2 mM CaCl_2 , durante 30 minutos a 36°C , y posteriormente a 21°C , hasta el final.
3. Método de cuantificación de la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral según reivindicaciones anteriores caracterizado porque los parámetros electrofisiológicos se miden a partir del minuto 5 de la acción del compuesto oxidante.
4. Kit para llevar a cabo el método descrito en las reivindicaciones anteriores caracterizado porque comprende hidróperóxido de cumeno puro y líquido cefalorraquídeo artificial, preferentemente $5,5 \mu\text{L}$ de HC puro mezclado con $494,5 \mu\text{L}$ de líquido cefalorraquídeo artificial.
5. Uso del método descrito en las reivindicaciones 1 a 3 para la oxidación de la membrana plasmática.
6. Uso del kit descrito en las reivindicación 4 para la oxidación de la membrana plasmática.
7. Uso del método en las reivindicaciones 1 a 3 para la detección de enfermedades neurodegenerativas.
8. Uso del kit descrito en las reivindicación 4 para la detección de enfermedades neurodegenerativas.

FIGURA 1

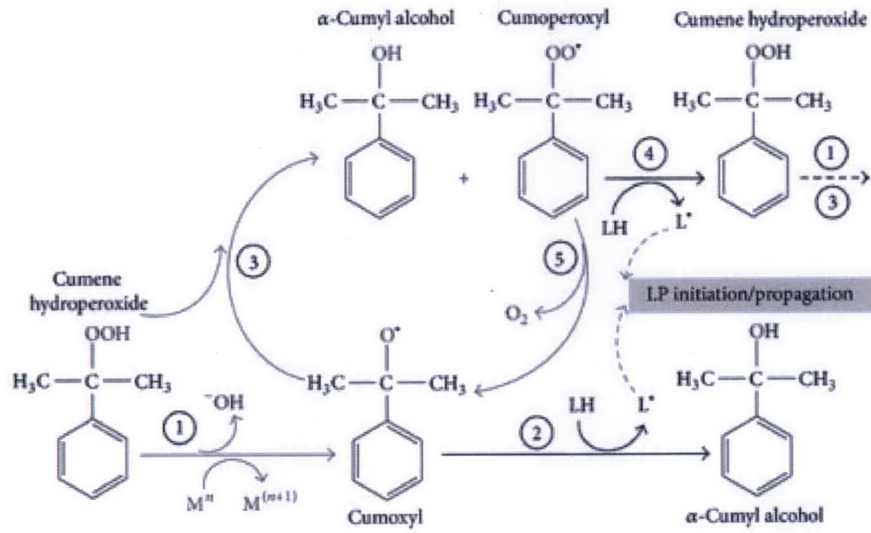


FIGURA 2

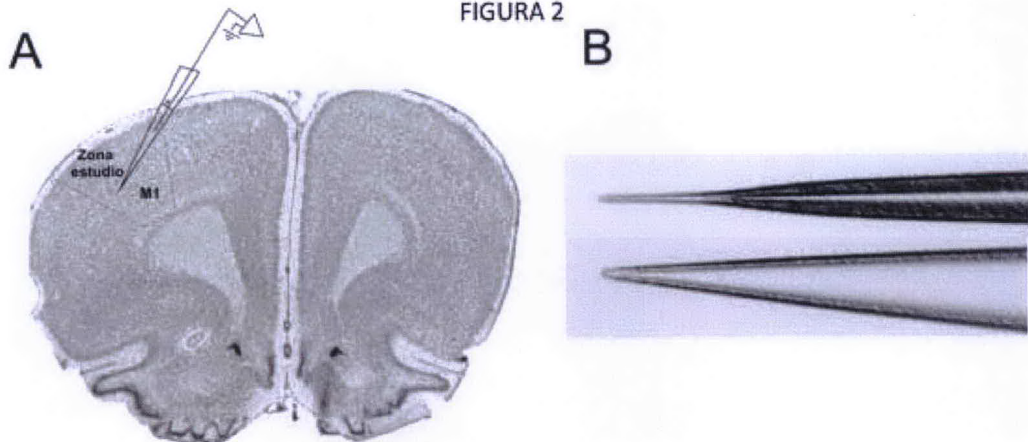


FIGURA 3

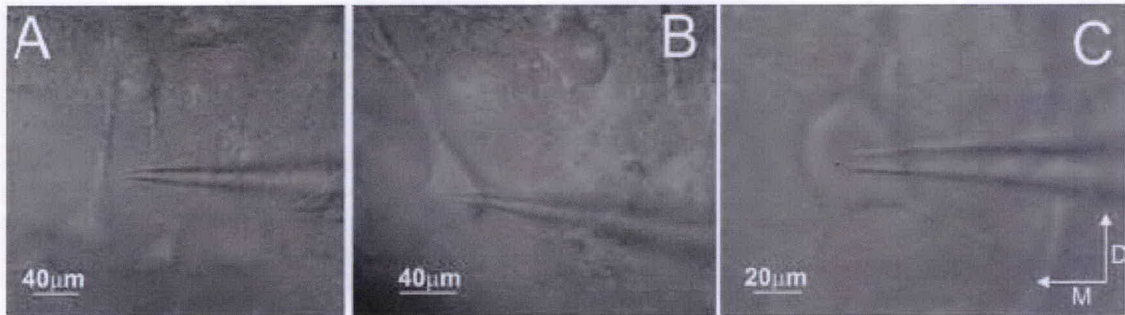
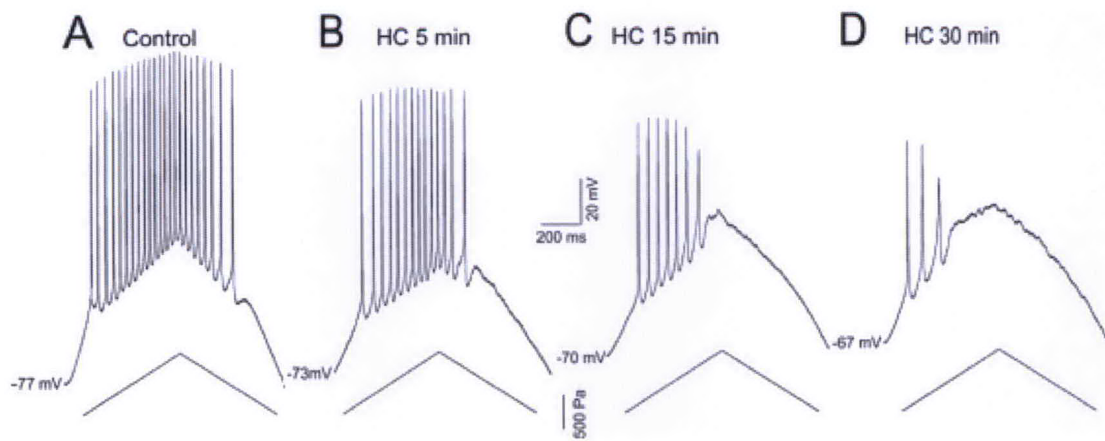


FIGURA 4



FIGURA 5





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201500766

②² Fecha de presentación de la solicitud: 05.07.2016

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N5/079** (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PARDILLO-DIAZ, R., et al. Time and dose dependent effects of oxidative stress induced by cumene hydroperoxide in neuronal excitability of rat motor cortex neurons. Neurotoxicology, Marzo-2016, Vol. 53, Páginas 201-214 Páginas 202 y 203.	1-3, 5 y 7
A	PARDILLO-DÍAZ, R., et al. Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide evokes changes in neuronal excitability of rat motor cortex neurons. Neuroscience, 2015, vol. 289, p. 85-98. (19 March 2015). Todo el documento.	1-8
A	TSAI, M.-C.; CHEN, Y. H.; CHIANG, L. Y. Polyhydroxylated C60, fulleranol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide-and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in-vitro. Journal of pharmacy and pharmacology, 1997, vol. 49, no 4, p. 438-445. Todo el documento.	1-8

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
26.12.2018

Examinador
M. J. García Bueno

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, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.12.2018

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4, 6 y 8	SI
	Reivindicaciones 1-3, 5 y 7	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 4, 6 y 8	SI
	Reivindicaciones 1-3, 5 y 7	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PARDILLO-DIAZ, R., et al. Time and dose dependent effects of oxidative stress induced by cumene hydroperoxide in neuronal excitability of rat motor cortex neurons. Neurotoxicology, Vol. 53, Páginas 201-214	Marzo-2016

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

La presente solicitud de invención consiste en un método de cuantificación de la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral.

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 LP) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP).**1.1.- Reivindicaciones 1-3, 5 y 7.**

El documento D01 divulga un método de cuantificación de la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral que comprende los pasos de elaborar una dilución de hidróperóxido de cumeno a 10 μ M a partir de una solución pura de hidróperóxido de cumeno añadida al líquido cefalorraquídeo artificial, perfundir sobre una rodaja de cerebro situada en cámara de registro a una tasa de 1 mL/min durante 30 minutos y medir los parámetros electrofisiológicos de las neuronas sometidas a la acción de la solución oxidante, como reobase, a partir de minuto 5 de la acción del compuesto oxidante. (ver páginas 202 y 203).

El documento D01 también divulga una composición de líquido cefalorraquídeo artificial con 126 mM NaCl, 2mM KCl, 1,25 mM Na₂HPO₄, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucosa, 2 mM MgCl₂ y 2 mM CaCl₂ durante 30 minutos a 36°C y posteriormente a 21°C hasta el final (ver página 202).

Las reivindicaciones 1-3, 5 y 7 ya han sido divulgadas en el documento D01. Por tanto se considera que dichas reivindicaciones carecen de novedad y actividad inventiva en el sentido del artículo 6.1 y 8.1 LP.

1.2.- Reivindicaciones 4, 6 y 8.

El documento D01 no divulga un kit con las cantidades de hidróperóxido de cumeno y líquido cefalorraquídeo reivindicadas en la reivindicación 4. Por lo tanto se considera que las reivindicaciones 4, 6 y 8 son nuevas e implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 LP.

2.- PATENTABILIDAD (Art. 4 LP).

Las reivindicaciones 1-3, 5 y 7 no cumplen con los requisitos de patentabilidad en el sentido del artículo 4.1 LP.

Las reivindicaciones 4, 6 y 8 cumplen con los requisitos de patentabilidad según el artículo 4.1 LP.