

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de octubre de 2013 (03.10.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/144393 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 5/079 (2010.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/000081

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de marzo de 2013 (21.03.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201230490 30 de marzo de 2012 (30.03.2012) ES

(71) Solicitantes: UNIVESIDAD DE MÁLAGA [ES/ES];
Avenida de Cervantes, N° 2., 29071 Málaga (ES).
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD [ES/ES]; Avda. De
La Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES).

(72) Inventores: MATEOS GRONDONA, Jesús; Dpto.
Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de
Ciencias, Campus de Teatinos, 29071 - Málaga (ES). RUIZ
MALDONADO, Inmaculada; Avda. De La Constitución,
18, 41071 Sevilla (ES). DOMÍNGUEZ PINOS, María
Dolores; Avda. De La Constitución, 18, 41071 Sevilla
(ES). MARTÍNEZ LEON, María; Avda. De La
Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). FERNÁNDEZ-
FÍGARES PÉREZ, José Manuel; Dpto. Biología Celular,
Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Campus de
Teatinos, 29071 - Málaga (ES). JIMÉNEZ LARA,
Antonio Jesús; Dpto. Biología Celular, Genética y

Fisiología, Facultad de Ciencias, Campus de Teatinos,
29071 - Málaga (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: *IN-VITRO* MODEL OF DEGENERATION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Título : MODELO *IN VITRO* DE DEGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL MISMO

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing a three-dimensional *in vitro* model for degeneration of the central nervous system (CNS). Furthermore, the present invention relates to a three-dimensional *in vitro* model for degeneration of the CNS that can be produced by means of said method and to the use of said model for studying hydrocephalia. Lastly, the present invention relates to a method for searching for neuroprotective drugs which comprises the culture of said three-dimensional *in vitro* model for degeneration of the CNS.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método para la obtención de un modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del sistema nervioso central (SNC). Además, la presente invención se refiere a un modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del SNC obtenible mediante dicho método y al uso de dicho modelo para el estudio de la hidrocefalia. Por último, la presente invención se refiere a un método de búsqueda de fármacos neuroprotectores que comprende el cultivo de dicho modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del SNC.



WO 2013/144393 A1

**MODELO *IN VITRO* DE DEGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL Y MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL MISMO**

5

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un método para la obtención de un modelo *in vitro* de degeneración del sistema nervioso central (SNC), al modelo obtenible por dicho método, a su uso para el estudio de la hidrocefalia y a un método de
10 búsqueda de fármacos neuroprotectores que comprende el cultivo de dicho modelo. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la Biotecnología.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

La formación de una cicatriz glial por astrocitos reactivos, supone uno de los principales impedimentos en la regeneración del SNC. El papel de los astrocitos en las lesiones y en la neurodegeneración está cuestionado hoy en día. Los astrocitos se activan en las lesiones y reclutan a otros para formar la cicatriz glial.
20 Dicha cicatriz glial bloquea la regeneración neuronal y la revascularización, interfiriendo por tanto con la recuperación de la región dañada. Por tanto, existe un debate sobre si la reacción astrocitaria tiene un papel beneficioso o perjudicial (Sofroniew 2005 *Neuroscientist*. 11:400-7). La reacción astrocitaria puede tener efectos beneficiosos en las fases agudas de los traumas, donde limitaría las
25 respuestas inflamatorias. Es por tanto necesario estudiar más a fondo dicha respuesta astrocitaria.

Por un lado, los modelos animales constituyen herramientas esenciales para el estudio de los daños moleculares y celulares y la neurodegeneración en el SNC. No obstante, son con frecuencia demasiado complejos para el aislamiento y
30 control de variables específicas. Aunque reflejan bastante bien la realidad de las enfermedades, en comparación con los modelos *in vitro*, los modelos animales son más costosos y requieren más trabajo y tiempo.

Por otro lado, los estudios *in vitro* permiten evaluar los efectos terapéuticos sobre las células aisladas de su contexto habitual y de sus interacciones, lo cual aleja el modelo de la realidad y lo hace menos eficaz. En el caso de las reacciones astrocitarias, se emplean modelos en dos dimensiones
5 (2D) en los que se induce a los astrocitos a formar una especie de cicatriz en la placa de cultivo (Yu et al 1993 J Neurosci Res, 34:295-303), o se los cultiva sobre membranas (McKeon et al 1991 J Neurosci. 11(11):3398-411.), o alrededor de microelectrodos (Polikov 2006 Biomaterials. 27(31):5368-76), entre otros. No obstante, en muchos modelos 2D los astrocitos se encuentran altamente
10 reactivos, por lo que no son útiles para monitorizar la activación astrocitaria que ocurre en las enfermedades o daños del SNC.

Por tanto, mantener los astrocitos inactivos para después activarlos ha sido uno de los requerimientos que se han buscado a la hora de diseñar modelos. Una de las estrategias seguidas para solventar este requerimiento ha consistido en
15 cultivar los astrocitos en monocapa confluyente y someterlos a un daño mecánico que provoque una discontinuidad y, de esa forma, inducir que se activen (Lanosa y Colombo 2007 In Vitro Cell Dev Biol Anim 43:186-95). También se han diseñado modelos tridimensionales (3D) para poder investigar el comportamiento astrocitario en un estado fisiológico más relevante en su interrelación y con el
20 entorno (East et al 2009 J Tissue Eng Regen Med, 3:634-46).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la
25 obtención de un modelo *in vitro* en tres dimensiones (3D) de degeneración del SNC.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del SNC obtenible mediante el método del primer aspecto de la presente invención.

30 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso del modelo del segundo aspecto de la invención para el estudio de la hidrocefalia.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método de búsqueda de fármacos neuroprotectores que comprende el cultivo del modelo del segundo aspecto de la presente invención.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han diseñado un modelo *in vitro* a partir de explantes de paredes ventriculares. Este modelo emula una neurodegeneración periventricular como ocurre en la hidrocefalia congénita, donde interviene una
10 reacción astrocitaria. Al tratarse de un modelo *in vitro* en tres dimensiones (3D), aporta las ventajas de poder estudiarlo de una forma controlada y manteniendo las interacciones celulares entre neuronas, glía, ependimocitos, células endoteliales, etc.

El modelo de la presente invención combina las ventajas de los modelos
15 animales y de los modelos *in vitro*, y permite el estudio *in vitro* del tejido en el que diferentes tipos de células interactúan. Los cultivos de explantes ofrecen una disposición 3D, así como la posibilidad de mantener las interacciones celulares.

En el estudio de nichos neurogénicos se emplean explantes de la región ventricular que cubre el estriado. Esos estudios se han llevado a cabo colocando
20 los explantes sobre una matriz a partir de membrana basal (Matrigel), mediante la cual se ensayan factores de crecimiento, sobre matrices de fibronectina y sobre colágeno.

La presente invención representa un modelo donde aparecen fenómenos neurodegenerativos neuronales y de la mielina asociados con reacciones
25 astrocitarias y microgliales. La presente invención permite estudiar los efectos de distintos procedimientos terapéuticos sobre las reacciones neurodegenerativas que incluyan reacciones astrocitarias.

El modelo de la presente invención es útil para el estudio terapéutico de la hidrocefalia congénita, pero además puede ser útil para otras enfermedades
30 neurodegenerativas y daños al SNC. Además, permite evaluar la capacidad neurorregenerativa de los nichos neurogénicos que contienen células madre.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la obtención de un modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del SNC que comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) la obtención de al menos un explante de tejido periventricular a partir de al menos una muestra aislada; y
- (b) el cultivo del explante obtenido en la etapa (a).

En la presente descripción, el término “degeneración” se refiere a la pérdida progresiva de la estructura o la función del sistema nervioso.

10 En la presente descripción, el término “explante” se refiere a una porción de tejido procedente de un sujeto. El tejido en este caso es tejido del SNC, más particularmente es tejido periventricular. En la presente descripción, el término “periventricular” se refiere a que rodea o circunda los ventrículos cerebrales. Dichos ventrículos son los dos ventrículos laterales, el tercer y el cuarto
15 ventrículo, y son estructuras que contienen líquido cefalorraquídeo.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la degeneración del SNC comprende una neurodegeneración periventricular. Preferiblemente, la degeneración periventricular comprende una reacción astrocitaria. En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la
20 degeneración del SNC comprende la formación de una cicatriz glial.

En la presente descripción, el término “reacción astrocitaria” se refiere a la reacción de las células del SNC denominadas astrocitos, también conocida como astrogliosis. Los astrocitos son células que reaccionan ante lesiones, ya sean físicas o químicas, al SNC. Dicha reacción ha sido ampliamente estudiada y
25 caracterizada y es conocida por el experto en la materia. El término “cicatriz glial” se refiere a la estructura celular que se forma como consecuencia de la reacción astrocitaria.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el explante periventricular es de los ventrículos laterales.

30 Los cuernos anteriores de los ventrículos laterales están separados por el septum, que va desde el cuerpo calloso hasta el fórnix. Lateralmente hacia fuera, los ventrículos laterales están limitados por el estriado. En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el explante comprende la pared

ventricular que cubre el septum o la pared ventricular que cubre el estriado. Preferiblemente, el explante comprende la pared ventricular que cubre el estriado.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la muestra aislada de la etapa (b) procede de un sujeto control o de un sujeto con
5 hidrocefalia.

En la presente descripción, el término "sujeto control" se refiere a un sujeto sano o al menos sin ninguna enfermedad o lesión del SNC. La hidrocefalia es un trastorno cuya principal característica es la acumulación excesiva de líquido cefalorraquídeo en el cerebro. La acumulación excesiva de líquido
10 cefalorraquídeo tiene como consecuencia una dilatación anormal de los ventrículos, que ocasiona una presión potencialmente perjudicial en los tejidos del cerebro.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la muestra aislada de la etapa (b) procede de un sujeto control.

15 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el sujeto es un roedor. Preferiblemente, el roedor es un ratón. Más preferiblemente, el ratón es un ratón mutante de la cepa *hyh*.

La cepa *hyh*, cuyo nombre deriva del inglés "*Hydrocephalus with hop gait*" proviene de la cepa C57BL/10J y tiene una mutación letal recesiva localizada en
20 el final del cromosoma 7, cerca del locus *Gpi-1*. Este mutante homocigótico se caracteriza clínicamente por tener la cabeza abovedada y caminar a pequeños saltos desde las dos semanas de edad, y por tener una esperanza de vida de entre 4 y 10 semanas. Además, estos ratones tienen los ventrículos laterales dilatados y un gran quiste en el tercer ventrículo, además de no tener
25 comunicación con el cuarto ventrículo y de presentar una grave malformación cortical.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el explante tiene entre 0,5 y 1,5 mm de grosor.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el explante
30 tiene un tamaño de entre 3.000 y 5.000 micrómetros cuadrados de superficie y 500 micrómetros de grosor. Preferiblemente, el explante tiene un tamaño de 4.000 micrómetros cuadrados de superficie.

Un explante puede cultivarse adherido a un sustrato o embebido en una matriz, o puede cultivarse también sin adherirse a ningún sustrato, de manera que el explante se cultiva en flotación en el medio de cultivo. En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el cultivo de la etapa (b) se lleva a cabo en flotación.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el cultivo de la etapa (b) se lleva a cabo en ausencia de un recubrimiento o una matriz. Para la supervivencia de las células del explante o para otros efectos, como por ejemplo estudios de proliferación, diferenciación y/o migración celular, un explante puede cultivarse sobre una superficie de cultivo previamente recubierta. Para dicho recubrimiento se suelen emplear proteínas de la matriz extracelular, como por ejemplo colágeno, fibronectina o laminina, o polímeros de aminoácidos tales como polilisina o poliornitina. Además, un explante puede cultivarse embebido en una matriz. Sin embargo, el modelo de la presente invención se obtiene preferiblemente cultivando el explante en ausencia de recubrimiento o matriz.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el cultivo de la etapa (b) se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende Neurobasal y el suplemento B27. La composición del medio de cultivo Neurobasal y del suplemento B27 es conocida puesto que se ha descrito en Price y Brewer, 2001, *Protocols for Neural Cell Culture, Humana Press Inc*, capítulo 19, páginas 255-264.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del SNC obtenible mediante el método del primer aspecto de la invención.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el modelo comprende al menos dos explantes. Preferiblemente, un explante procede de una muestra aislada de un sujeto control y otro explante procede de una muestra aislada de un sujeto con hidrocefalia. Preferiblemente, un explante comprende la pared ventricular que cubre el septum y otro explante comprende la pared ventricular que cubre el estriado.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del modelo del segundo aspecto de la invención para el estudio de la degeneración del SNC, y preferiblemente de la hidrocefalia.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método de búsqueda de fármacos neuroprotectores que comprende las siguientes etapas:

- (a) el cultivo de un modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del SNC según el segundo aspecto de la invención;
- 5 (b) la adición de un compuesto a ensayar o una mezcla de compuestos activos al modelo de la etapa (a); y
- (c) el estudio del efecto de la adición del compuesto a ensayar o la mezcla de compuestos de la etapa (b) en el modelo de la etapa (a).

10 En una realización preferida, el método de búsqueda de fármacos neuroprotectores del cuarto aspecto de la invención se emplea para la búsqueda de fármacos útiles para el tratamiento de la hidrocefalia.

En la presente descripción, el término "neuroprotector" se refiere a fármacos capaces de potenciar la supervivencia celular del SNC, particularmente
15 la supervivencia neuronal, o capaces de impedir la degeneración o la muerte de las células del SNC, especialmente de las neuronas.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, en la etapa (c) se estudia al menos uno de los parámetros de la lista que comprende: viabilidad celular, la reactividad glial, la reacción inflamatoria, la morfología celular,
20 la fisiología celular. Estos parámetros pueden analizarse mediante cualquiera de los métodos del estado de la técnica descritos para ello, ya sea mediante análisis histológico, citológico, molecular y/o bioquímico.

En otra realización preferida, el compuesto a testar se añade en distintas concentraciones. Esto permite observar la variación del efecto, si existe, según
25 varían las concentraciones del compuesto.

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
30 parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Sección de 10 micrómetros de grosor en parafina de un explante de la pared del estriado de un ratón normal teñido con hematoxilina-eosina. Se aprecia una zona correspondiente a la superficie ventricular y que contiene epéndimo. En las zonas de los cortes y en el parénquima nervioso se produce una reacción astrocitaria (flechas), cuyas células se disponen a cubrir las superficies de corte del explante y otras sin epéndimo. Las cabezas de flechas indican degeneraciones en el parénquima nervioso.

FIG. 2. Detalle de una sección de un explante de un ratón normal con inmunotinción contra la proteína GFAP presente en los astrocitos reactivos. Los astrocitos se encuentran cubriendo una superficie del explante carente de epéndimo.

15

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la eficacia del método de obtención del modelo del primer aspecto de la invención así como del propio modelo.

20

Ejemplo 1: Obtención del modelo.

Se obtienen explantes de dos regiones diferentes de los ventrículos laterales del ratón joven (20 días de edad). Una de ellas es la que cubre el estriado y donde se encuentran los nichos neurogénicos con células madres nerviosas. La otra es la que cubre caudalmente el septum en el ventrículo lateral, pues allí no existen nichos neurogénicos. Para ello, en condiciones de esterilidad, se extraen los encéfalos y se obtienen lonchas transversales (1 mm de grosor) de las regiones telencefálicas que se emplearán para obtener explantes de la pared ventricular. Los explantes, de un tamaño aproximado de 4.000 micrómetros de superficie y 500 micrómetros de grosor, se mantienen en un medio de cultivo definido consistente en Neurobasal suplementado con B27 y HEPES. Este medio básico

30

es el utilizado normalmente para cultivo de neuroblastos en placas multipocillo de 6 pocillos con 3 ml de medio en cada uno de ellos.

Tras 4-7 días en condiciones de cultivo (37° C y 5% CO₂), los explantes se fijan en metanol a -80°C y se incluyen en parafina de bajo punto de fusión (40°C), con el objeto de obtener secciones de 10 micrómetros de grosor para su procesamiento (inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, hibridación *in situ*).

Los explantes se obtienen a partir de ratones jóvenes de entre 20 y 30 días de edad, normales y mutantes *hyh*, que desarrollan hidrocefalia congénita. En el caso de los explantes de animales normales, aparece una reacción astrocitaria periventricular que emula la que tiene lugar en la hidrocefalia. En los explantes de animales *hyh* se añade una nueva reacción a la preexistente. En ambos tipos de animales se emplean explantes de diferentes regiones, en concreto de la pared ventricular que cubre el estriado y de la pared ventricular que cubre el septum.

En la pared del estriado los explantes contienen células madres nerviosas constituyendo nichos neurogénicos y gliogénicos. Estos nichos son unos de los pocos lugares exclusivos del SNC donde tiene lugar una neurogénesis postnatal. Por tanto, el uso de estos explantes es útil también para evaluar los efectos de las terapias sobre la capacidad de originar neuronas y oligodendrocitos.

Además, este modelo permite estudiar histológicamente las diferentes reacciones celulares con técnicas inmunohistológicas y de hibridación *in situ*. El tipo de procesamiento permite tener una alta calidad antigénica necesaria para las técnicas inmunohistológicas, que es uno de los obstáculos principales que aparecen en otros tipos de procedimientos.

El modelo de la presente invención permite:

- comparar regiones con nichos con células madres y sin nichos.
- comparar explantes de animales normales con hidrocefálicos, ya que en los animales normales existe una reacción astrocitaria que emula a la que tiene lugar en los hidrocefálicos.
- ensayar *in vitro* terapias celulares y farmacológicas en los fenómenos neurodegenerativos y lesivos del SNC donde estén implicadas células astrogliales, microgliales y respuestas inflamatorias.

Los explantes no se colocan sobre ninguna matriz, sino flotando en el medio. En esta condición el comportamiento del explante es diferente a la que tiene lugar sobre matrices. El no usar una matriz aporta las siguientes ventajas:

- menor tiempo de preparación que precisa el modelo porque no requiere preparar la matriz, lo que aumenta la viabilidad celular,
- menor coste económico que precisa el modelo porque no requiere preparar la matriz,
- al estar en un medio fluido (medio de cultivo) simula mejor la presencia del ventrículo que contiene el líquido cefalorraquídeo,
- el acceso de los fármacos (terapia farmacológica) y células (terapia celular) está facilitado en un medio líquido (medio de cultivo).

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para la obtención de un modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del sistema nervioso central que comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) la obtención de al menos un explante de tejido periventricular a partir de al menos una muestra aislada; y
- (b) el cultivo del explante obtenido en la etapa (a).
- 10 2.- El método según la reivindicación 1, donde la degeneración del sistema nervioso central comprende una neurodegeneración periventricular.
- 3.- El método según la reivindicación 2, donde la degeneración periventricular comprende una reacción astrocitaria.
- 15 4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la degeneración del sistema nervioso central comprende la formación de una cicatriz glial.
- 20 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el explante periventricular es de los ventrículos laterales.
- 6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el explante comprende la pared ventricular que cubre el septum o la pared ventricular que cubre el estriado.
- 25 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el explante comprende la pared ventricular que cubre el estriado.
- 30 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la muestra aislada de la etapa (b) procede de un sujeto control o de un sujeto con hidrocefalia.

12

- 9.- El método según la reivindicación 8, donde la muestra aislada de la etapa (b) procede de un sujeto control.
- 10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde el sujeto es un roedor.
- 11.- El método según la reivindicación 10, donde el roedor es un ratón.
- 12.- El método según la reivindicación 11, donde el ratón es un ratón mutante de la cepa *hyh*.
- 13.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el explante tiene entre 0,5 y 1,5 mm de grosor.
- 14.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el explante tiene un tamaño de entre 3.000 y 5.000 micrómetros cuadrados de superficie y 500 micrómetros de grosor.
- 15.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el cultivo de la etapa (b) se lleva a cabo en flotación.
- 16.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde el cultivo de la etapa (b) se lleva a cabo en ausencia de un recubrimiento o una matriz.
- 17.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde el cultivo de la etapa (b) se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende Neurobasal y el suplemento B27.
- 18.- Un modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del sistema nervioso central obtenible mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

- 19.- El modelo según la reivindicación 18, caracterizado porque comprende al menos dos explantes.
- 20.- El modelo según la reivindicación 18, caracterizado porque un explante
5 procede de una muestra aislada de un sujeto control y otro explante procede de una muestra aislada de un sujeto con hidrocefalia.
- 21.- El modelo según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, caracterizado porque un explante comprende la pared ventricular que cubre el septum y otro
10 explante comprende la pared ventricular que cubre el estriado.
22. Uso del modelo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 para el estudio de la hidrocefalia.
- 15 23.- Un método de búsqueda de fármacos neuroprotectores que comprende las siguientes etapas:
- (a) el cultivo de un modelo *in vitro* en tres dimensiones de degeneración del sistema nervioso central según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21;
 - (b) la adición de un compuesto a ensayar o una mezcla de compuestos
20 activos al modelo de la etapa (a); y
 - (c) el estudio del efecto de la adición del compuesto a ensayar o la mezcla de compuestos de la etapa (b) en el modelo de la etapa (a).
- 24.- El método según la reivindicación 23, donde en la etapa (c) se estudia al
25 menos uno de los parámetros de la lista que comprende: viabilidad celular, la reactividad glial, la reacción inflamatoria, la morfología celular, la fisiología celular.

1/1

DIBUJOS

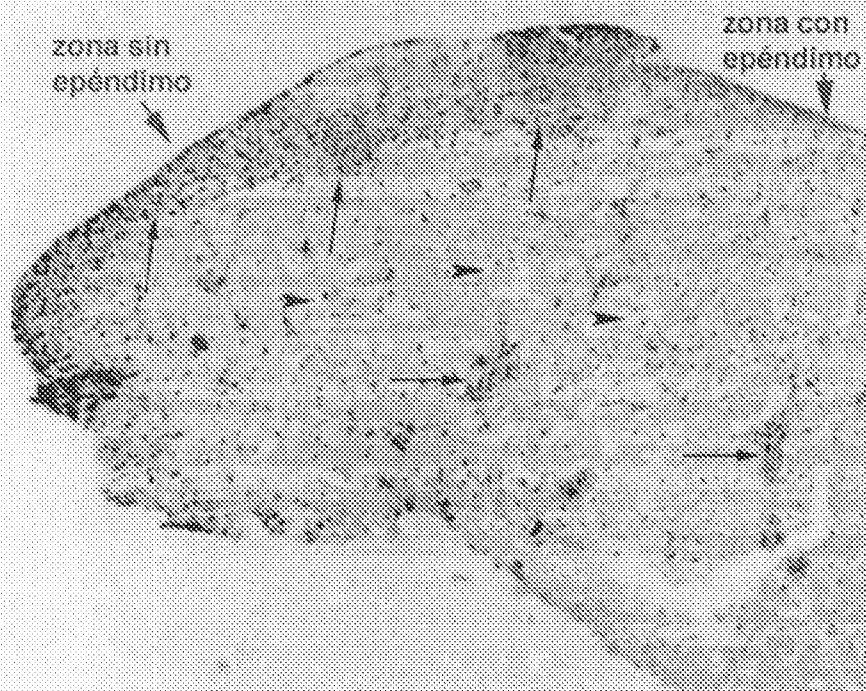


FIG.1



FIG.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2013/000081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/079 (2010.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VICTOROV IV ET AL., "A modified roller method for organotypic brain cultures: free-floating slices of postnatal rat hippocampus" Brain Res Brain Res Protoc. (2001), vol.7, n°1, pág.30-7, the whole document.	1-24
A	RZECZINSKI S ET AL., "Roller culture of free-floating retinal slices: a new system of organotypic cultures of adult rat retina." Ophthalmic Res. (2006) vol.8, n°5, pág.263-9, the whole document.	1-24
A	Honegger P "Overview of cell and tissue culture techniques." Current Protocols in Pharmacology (1999) Chapter 12:Unit12.1, pág.12.1.1-12.1.12, the whole document.	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12/07/2013

Date of mailing of the international search report
(26/07/2013)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. Hernandez Cuellar

Telephone No. 91 3498409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/000081

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GÄHWILER BH ET AL., "Organotypic slice cultures: a technique has come of age." Trends Neurosci. (1997) vol.20, n°10, pág.471-7, the whole document.	1-24

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/000081

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/079 (2010.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	VICTOROV IV ET AL., "A modified roller method for organotypic brain cultures: free-floating slices of postnatal rat hippocampus" Brain Res Brain Res Protoc. (2001), vol.7, nº1, pág.30-7, todo el documento.	1-24
A	RZECZINSKI S ET AL., "Roller culture of free-floating retinal slices: a new system of organotypic cultures of adult rat retina." Ophthalmic Res. (2006) vol.8, nº5, pág.263-9, todo el documento.	1-24
A	Honegger P "Overview of cell and tissue culture techniques." Current Protocols in Pharmacology (1999) Chapter 12:Unit12.1, pág.12.1.1-12.1.12, todo el documento.	1-24

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
12/07/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
26-JULIO-2013 (26/07/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Hernandez Cuellar
Nº de teléfono 91 3498409

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/000081

C (Continuación).			DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES	
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes		Relevante para las reivindicaciones nº	
A	GÄHWILER BH ET AL., "Organotypic slice cultures: a technique has come of age." Trends Neurosci. (1997) vol.20, nº10, pág.471-7, todo el documento.		1-24	