



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 N.º de publicación: **ES 2 093 566**

21 Número de solicitud: 9501137

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: C12Q 1/42

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **07.06.95**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.96**

Fecha de concesión: **23.05.97**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.97**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.07.97**

73 Titular/es:  
**Universidad de Santiago de Compostela y  
en su nombre y representación El Rector  
Centro de Transferencia de Tecnología -  
Avda. das Ciencias s/n  
15706 Santiago de Compostela, Coruña, ES**

72 Inventor/es: **Botana López, Luis Miguel;  
Rodríguez Vieytes, Mercedes;  
Vieites Baptista De Sousa, Juan Manuel y  
Leira Sanmartín, Francisco**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento para la detección y cuantificación de toxinas diarreas de dinoflagelados (DSP (Diarrhetic Shellfish Poison) basado en la inhibición de fosfatasas.**

57 Resumen:

Procedimiento para la detección y cuantificación de toxinas diarreas de dinoflagelados (DSP (Diarrhetic Shellfish Poison)) basado en la inhibición de fosfatasas. La presencia de mareas rojas productoras de DSP contamina los moluscos, que deban ser continuamente monitorizados antes de su comercialización. La técnica actual es el bioensayo, que consiste en la administración de un extracto a ratones, el resultado es positivo si el ratón muere antes de 12 horas. Este método es lento, costoso, errático y poco específico. El procedimiento detecta y cuantifica las toxinas midiendo la inhibición de fosfatasas parcialmente purificadas. La inhibición de las fosfatasas se cuantifica empleando como soporte una placa de microtitulación, y revelando la actividad enzimática con un sustrato de fosfatasas que según sus características químicas se convierta en un producto fluorescente, luminiscente o con color. Esta técnica es rápida, económica y fiable. El sector favorecido será la industria productora y conservera de moluscos.

ES 2 093 566 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Procedimiento para la detección y cuantificación de toxinas diarreas de dinoflagelados (DSP (Diarrhetic Shellfish Poison)) basado en la inhibición de fosfatasa.

Los dinoflagelados productores de toxinas diarreas aparecen durante ciertos períodos del año, y su proliferación da lugar a una marea roja, lo cual supone la paralización de la recogida y comercialización de los moluscos de las zonas contaminadas. La monitorización de la posible contaminación de los moluscos se realiza mediante el bioensayo, que consiste en la administración oral a ratones de un extracto de los moluscos, y la observación de los mismos durante 12 horas. La muerte de dos ratones, de tres inoculados, en menos de 12 horas supone un resultado positivo.

Este método implica el uso de una gran cantidad de ratones, lo que eleva el coste del ensayo, una gran inversión en horas laborales, y carece de sensibilidad. Además, tiene una elevada variabilidad, en función del peso de ratón, raza, etc., que se reduce algo empleando ratones con unas características concretas, por lo que su coste y limitaciones es aún mayor.

Las toxinas diarreas (ácido okadaico, dinofisistoxinas I, II y III, y las recientemente identificadas yessotoxinas y pectenotoxinas), actúan mediante la inhibición potente y selectiva de las fosfatasa citosólicas PPI y PP2A. Estas fosfatasa han sido caracterizadas hace varios años, y su obtención en cantidades elevadas es posible, empleando fuentes ricas en fosfatasa, como son el músculo esquelético o el cerebro. El estudio in vitro del efecto inhibidor de las toxinas DSP sobre las fosfatasa ha sido por lo tanto ya descrito mediante el empleo de marcadores radioactivos, que en ningún caso se podrían utilizar para un método de detección por los problemas que plantea la radiación del fósforo, su corta vida media, el coste y el alto grado de error asociado a este procedimiento.

Las fosfatasa se pueden purificar a partir de un homogeneizado de un tejido mediante cromatografía de intercambio iónico (impulsando la fase móvil con baja presión) y sucesiva repurificación de las fracciones obtenidas que contienen las fosfatasa en cuestión. Este proceso puede prolongarse hasta la purificación total de cada enzima, aunque es muy laborioso y un proceso delicado. Las fosfatasa así obtenidas son activas y si se conservan a bajas temperaturas pueden almacenarse durante 6 meses. El proceso de purificación puede acelerarse y mejorarse mediante el empleo de sistemas que trabajen con presiones de separación medias a altas, reduciendo el tiempo y eficacia de la separación.

Las fosfatasa pueden ser utilizadas sin necesidad de alcanzar una total purificación, de forma que mantienen la sensibilidad al efecto inhibidor de las toxinas DSP pero con un menor esfuerzo y coste de purificación. Las fosfatasa enriquecidas se disponen en una fase sólida (una placa de microtitulación) y el ensayo de inhibición para determinar la presencia o no de las toxinas se realiza mediante una incubación en los pocillos de la placa de un extracto en metanol al 80% de las

toxinas en presencia de una determinada cantidad de enzima. Las toxinas se determinan mediante la comparación de la actividad fosfatasa con patrones conocidos de ácido okadaico (que es la principal toxina diarrea). La forma de revelar la actividad de la toxina consiste en cuantificar el color del fosfato libre, la fluorescencia (para sustratos fluorescentes) o la luminiscencia (para sustratos luminiscentes) en un espectrofotómetro, fluorímetro o luminómetro, que generan los distintos tipos de sustratos para la PP2A.

Las ventajas de esta técnica son:

- No se necesita emplear ratones.
- No es necesario un período de observación de los ratones.
- Se suprime la falta de sensibilidad y especificidad del bioensayo.
- El tiempo de preparación del ensayo es de 30 minutos.
- El tiempo de obtención de los resultados es de 5 minutos
- Se pueden procesar varios cientos de muestras simultáneamente.
- El coste es menor que el de las técnicas que se llevan a cabo actualmente.
- Puede ser realizado por personal poco cualificado.
- No tiene los inconvenientes de otras técnicas basadas en el empleo de marcadores radioactivos o en la detección cromatográfica de las toxinas (coste, falta de repetitividad, peligro de la radioactividad, residuos).

Un modo de realización de la invención:

Obtención mediante técnicas cromatográficas de fracciones enriquecidas en fosfatasa PP2A:

Se sacrifica un conejo por sobredosis de anestésico. Se aíslan enteros los paquetes musculares de las patas y la espalda y se mantienen en frío. Se homogeneiza el tejido, previamente cortado, en una solución tampón (pH 7,4). El homogeneizado se centrifuga a 100.000 g durante 1 hora, y se recogen los sobrenadantes.

Este sobrenadante se carga sobre una columna de DEAE-celulosa, previamente activada, y se eluye con un gradiente de cloruro sódico entre 0 y 0,4 molar, tamponado con Tris ClH 500 mM, pH 7,4 y con glicerol al 10%.

Los picos obtenidos se detectan en un espectrofotómetro (600 nm). Se obtienen seis picos de absorbancia, de los que el segundo y el tercero están enriquecidos en PP2A. La actividad fosfatasa se comprueba determinando espectrofotométricamente (600 nm) el color generado por el fosfato liberado a partir del fosfopéptido serina/treonina. La actividad se contrasta con una recta de calibrado obtenida con fosfato libre.

Determinación de la presencia de toxinas DSP en muestras contaminadas:

El desarrollo de esta técnica se llevó a cabo utilizando, de forma independiente y con resultados similares, las siguientes fuentes de fosfatasa PP2A:

- 1) La subunidad catalítica de la proteína fosfatasa tipo-2A (PP2A) proveniente de músculo de conejo y con una pureza mayor del 70%, obtenida comercialmente.
- 2) La proteína fosfatasa tipo-2A (PP2A) procedente de glóbulos rojos humanos aislado como el heterodímero formado por las subunidades A (60kDa) y B (36kDa), obtenida comercialmente.
- 3) Las fracciones cromatográficas enriquecidas en PP2A obtenidas por la purificación parcial de fosfatasas a partir de músculo de conejo.

El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación de 96 pocillos donde se incuba la PP2A con el tampón de reacción (Tris HCl 50 mM, pH 8,5) a 37°C durante un tiempo de 15 minutos en un volumen de 50 - 80  $\mu$ l. Una vez transcurridos los 15 minutos se añade una alícuota de distintas diluciones de extracto metanólico del molusco contaminado con toxinas DSP (el extracto obtenido se seca y resuspende en dimetilsulfóxido al 10% antes de su uso para la técnica) y se vuelve a incubar durante unos minutos a 37°C. Para valorar la actividad PP2A se añade el sustrato de la PP2A disuelto en un volumen de 150 - 180  $\mu$ l de tampón Tris HCl 50 mM, pH 8,5, para dar un volumen final de 200  $\mu$ l. En el caso de la técnica fluorimétrica, para revelar la actividad PP2A se añade un sustrato fluorescente de la PP2A que puede ser metilumbeliferona fosfato (70  $\mu$ M), o fluoresceína difosfato (30  $\mu$ M). Cuando se utiliza la técnica colorimétrica se añade un sustrato específico de la PP2A, como es el fosfopéptido serina/treonina, con la que se valora la liberación de fosfato libre en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

La actividad de la fosfatasa PP2A se inhibirá

de forma proporcional a la cantidad de las toxinas DSP. Para la cuantificación de las toxinas DSP se emplea una recta de regresión obtenida a partir de cantidades conocidas de ácido okadaico en la que de los datos de fluorescencia o densidad óptica obtenidos en los pocillos problema se puede extraer la concentración de toxinas DSP capaces de inhibir la actividad fosfatasa. Dependiendo de que el sustrato elegido produzca color, fluorescencia o luminiscencia, por la liberación del grupo fosfato, tendremos tres tipos de técnicas, no radioactivas, espectrofotométricas, luminométricas o fluorimétricas para la determinación de toxinas DSP.

Para la realización de estas técnicas, no radioactivas, se necesitan compuestos que reúnan dos características principales:

- 1) Ser buenos sustratos de la fosfatasa PP2A.
- 2) Que en la determinación de la actividad fosfatasa por fluorimetría, espectrofotometría o luminometría, según las características del sustrato de que se trate, no interfieran los componentes de un extracto metanólico del molusco.

Son sustratos que reúnen estas dos características imprescindibles para la realización de un ensayo rutinario de toxinas DSP:

- 1) La 4-metilumbeliferona fosfato (4 MUP). Excitación 370 / Emisión 430.
- 2) La fluoresceína difosfato (FDP). Excitación 480 / Emisión 520.
- 3) El fosfopéptido serina/treonina. Lectura de la densidad óptica de la muestra en un lector de placas a una longitud de onda de 600 nm.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección y cuantificación de toxinas diarreas de dinoflagelados que no necesita bioensayo (sacrificio de ratones) ni empleo de sustancias radioactivas, **caracterizado** por el empleo de distintos reactivos que permiten, empleando el mismo principio bioquímico (obtención de un compuesto que emite luz, fluorescente o de color, al perder uno o varios grupos fosfato por acción de la fosfatasa PP2A), cuantificar la presencia de toxinas diarreas, que actúan porque inhiben las fosfatasas PP2A.

2. Procedimiento para la detección y cuantificación de toxinas diarreas de dinoflagelados que no necesita bioensayo (sacrificio de ratones) ni empleo de sustancias radioactivas según la reivindicación 1 para la detección y cuantificación de la actividad de las toxinas diarreas de dinoflagelados (DSP (Diarrhetic shellfish poison)) basada en la inhibición de fosfatasas, **caracterizado** por que la valoración de la actividad PP-2A se realiza con enzimas obtenidos a partir de glóbulos rojos humanos o de su purificación parcial a partir de un tejido rico en estas enzimas.

3. Procedimiento para la detección y cuantificación fluorimétrica de toxinas diarreas, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque para la detección y cuantificación de toxinas diarreas se emplean sustratos que sufren un cambio cuantificable en su fluorescencia mediante inhibición de la actividad PP2A con sustratos fluorescen-

tes fosfatados sensibles a la acción de la fosfatasa.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque para la detección cuantificación de toxinas diarreas se emplean los sustratos 4-metilumbeliferona fosfato (4 MUP) y fluoresceína difosfato (FDP), que sufren un cambio cuantificable en su fluorescencia por efecto de la acción de la fosfatasa PP2A.

5. Procedimiento para la detección y cuantificación luminométrica de toxinas diarreas, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque para la detección y cuantificación de toxinas diarreas se emplean sustratos que sufren un cambio cuantificable en su luminiscencia mediante inhibición de la actividad PP2A con sustratos luminiscentes fosfatados sensibles a la acción de la fosfatasa.

6. Procedimiento para la detección y cuantificación colorimétrica de toxinas diarreas, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque para la detección y cuantificación de toxinas diarreas se emplean sustratos que sufren un cambio cuantificable en su emisión/absorción de luz visible mediante inhibición de la actividad PP2A con sustratos de color fosfatados sensibles a la acción de la fosfatasa.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque para la detección y cuantificación de toxinas diarreas se emplea el sustrato fosfopéptido serina/treonina que sufre un cambio cuantificable en la generación de color por efecto de la acción de la fosfatasa PP-2A.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12Q1/42

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SIMON, J.F. et al., "Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate", 1994, Natural Toxins, vol. 2, pp.:293-301.	5
Y	* todo el documento *	1-3
Y	ANTHONY, F.A. et al., "A spectrofluorimetric assay of calmodulin-dependent protein phosphatase using 4-methylumbelliferyl phosphate" 1986, Analytical Biochem., New York, US, vol. 155, pp.:103-107. * todo el documento *	1-3
A	WO-9209891-A (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 11.06.92 * todo el documento *	1-5
A	CHENG, Q. et al., "A continous spectrophotometric assay for protein phosphatases", 20.03.95, Analytical Biochem., New York, US, vol. 226, n° 1, pp.:68-73. * todo el documento *	1-5

**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 n°:

**Fecha de realización del informe**  
29.10.96

**Examinador**  
A. Maquedano Herrero

**Página**  
1/1