



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 200 063**

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/42**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud: **96914216 .5**

⑧6 Fecha de presentación: **24.05.1996**

⑧7 Número de presentación de la solicitud: **0790317**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.1997**

⑤4 Título: **Proceso basado en la inhibición de fosfatasas para la detección y cuantificación de toxinas diarreicas de mariscos.**

③0 Prioridad: **07.06.1995 ES 9501137**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2004**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2004**

⑦3 Titular/es:  
**Universidade de Santiago de Compostela  
Praza do Obradoiro, Pazo de San Xerome  
15705 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

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

⑦4 Agente: **Dávila Baz, Ángel**

ES 2 200 063 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

Proceso basado en la inhibición de fosfatasa para la detección y cuantificación de toxinas diarreas de mariscos.

En ciertos períodos del año aparecen dinoflagelados productores de diarreas, y su proliferación produce una marea roja que origina la paralización de la recolección y la comercialización de moluscos en las zonas contaminadas. El control de la posible contaminación de los moluscos se comprueba mediante el bioensayo de ratón, que consiste en la administración oral a ratones de un extracto de moluscos, y su observación durante 12 horas. La muerte de dos de tres ratones inoculados en menos de 12 horas se considera un resultado positivo del bioensayo.

Este método implica el uso de una gran cantidad de ratones, lo cual aumenta el coste del bioensayo y una gran inversión en horas de trabajo, y este ensayo carece de sensibilidad. Además, tiene una gran variabilidad, dependiendo del peso del ratón, la raza, etc. que puede reducirse en alguna medida usando ratones de ciertas características, lo cual hace que los costes y las limitaciones sean aún mayores.

- el documento *NATURAL TOXINS*, vol. 2, 1994, páginas 293-301 describe un bioensayo de inhibición de fosfatasa colorimétrico para la medición cuantitativa del ácido okadaico, una toxina responsable de la intoxicación por mariscos diarreicos. El ensayo usa un sustrato artificial, paranitrofenilfosfato, y un PP2A semipurificado preparado a partir de músculo de conejo; este método tiene el inconveniente de presentar una baja sensibilidad, de la posibilidad de que aparezcan falsos positivos debidos a interferencias de la matriz de la muestra con el colorante, y de necesitar una extracción compleja para evitar la interferencia de los colorantes de la matriz.
- El documento *WO-A-92 09891 (National Council of Canada)*, 11 de junio de 1992, describe un ensayo espectrofluorimétrico continuo de fosfatasa dependiente de calmodulina, que controla la formación de un 4-metilumbeliferil fosfato fluorescente.

Las toxinas diarreas (ácido okadaico, dinofisistoxina I, II, III y yesotoxinas y pectenotoxinas identificadas recientemente), actúan inhibiendo potente y selectivamente las fosfatasa citosólicas PP1 y PP2A. Estas fosfatasa se han caracterizado hace varios años y se pueden obtener en grandes cantidades usando fuentes ricas en fosfatasa, tales como músculo esquelético o cerebro. Por lo tanto, ya se ha descrito el estudio *in vitro* del efecto inhibitor de las toxinas DSP sobre las fosfatasa por medio del uso de marcadores radiactivos, que de ninguna manera podrían usarse para un método de detección debido a los problemas que tiene la radiación de fósforo, así como su corta vida media, su coste y el alto grado de error asociado con este procedimiento.

Las fosfatasa pueden purificarse a partir de un homogeneizado tisular por cromatografía de intercambio iónico (eluyendo la fase móvil con baja presión) y posteriormente por repurificación de las fracciones obtenidas que contienen las fosfatasa.

Este procedimiento puede continuarse hasta la pu-

rificación total de cada enzima, aunque es un proceso muy laborioso y delicado. Las fosfatasa obtenidas son activas y pueden conservarse a bajas temperaturas durante un periodo de hasta 6 meses. Este procedimiento de purificación puede acelerarse y mejorarse usando sistemas de alta presión, reduciendo de esta forma el tiempo de separación y aumentando la eficacia de la separación.

Las fosfatasa pueden usarse sin la necesidad de alcanzar una purificación total, ya que mantienen la sensibilidad al efecto inhibitor de las toxinas DSP, pero con un menor esfuerzo y coste de purificación. Las fosfatasa enriquecidas se ponen en una placa de microtitulación, y se realiza el ensayo de inhibición para determinar la presencia o la ausencia de las toxinas incubando en los pocillos de la placa un extracto metanólico al 80% en presencia de una cierta cantidad de enzima. Las toxinas se determinan comparando la actividad de la fosfatasa con patrones conocidos de ácido okadaico (que es la toxina diarrea principal). La cuantificación de la actividad de la toxina se realiza por cuantificación del color de fosfato libre, de la fluorescencia (en el caso de sustratos fluorescentes) o de la luminiscencia (en el caso de sustratos luminiscentes) en un espectrofotómetro, fluorímetro o luminómetro, respectivamente, que generan los diferentes tipos de sustratos de fosfatasa PP2A.

Las ventajas de esta técnica son:

- No requiere el uso de ratones.
- No requiere tiempo de observación.
- Corrige la falta de sensibilidad y especificidad del bioensayo.
- El tiempo de preparación del ensayo es de 30 minutos.
- El tiempo de obtención de resultados es de 5 minutos.
- Pueden procesarse simultáneamente varios cientos de muestras.
- El coste es inferior al coste de las técnicas actuales.
- Puede realizarse por personal que no esté altamente cualificado.
- Carece de los inconvenientes de otras técnicas basadas en el uso de marcadores radiactivos o en la detección cromatográfica de las toxinas (alto coste, ausencia de reproducibilidad, riesgo de radiactividad, residuos).

Una manera de realizar la invención es:

La obtención por técnicas cromatográficas de fracciones enriquecidas en fosfatasa PP2A:

Se sacrifica un conejo con una sobredosis de anestesia. Se aíslan los músculos del lomo y de las patas, y se mantienen en frío. Después de cortar el tejido, se homogeneiza en un tampón a pH 7,4. El homogeneizado se centrifuga a 100.000 g durante 1 hora y se recogen los sobrenadantes.

El sobrenadante se introduce en una columna de DEAE-celulosa, que se había activado previamente, y se eluye con un gradiente de cloruro sódico de 0 a 0,4 molar, tamponado con Tris HCL 500 mM a pH 7,4 y con glicerol al 10%.

Los picos obtenidos se detectan en un espectrofo-

tómetro a 600 nm. Se obtienen seis picos de absorbancia principales, de los cuales el segundo y el tercero están enriquecidos en PP2A. La actividad de la fosfatasa se comprueba midiendo el color generado por la fosfatasa liberada del fosfopéptido de serina/treonina. La actividad se comprueba frente a una curva de calibración obtenida con el fosfato libre.

Determinación de la presencia de toxinas DSP en muestras contaminadas.

El desarrollo de esta técnica se realizó usando, independientemente y con resultados similares, las siguientes fuentes de fosfatasa PP2A:

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

El ensayo se realiza en una placa de microtitulación con 96 pocillos, en la que se incuba PP2A con el tampón de reacción (Tris HCL 50 mM, pH 8,5) a 37 grados centígrados durante 15 minutos en un volumen de 50-80  $\mu$ l. Después de 15 minutos, se añade una alícuota a diferentes diluciones del extracto metanólico obtenido a partir de moluscos contaminados con DSP (el extracto obtenido se seca y se resuspende en DMSO (dimetilsulfóxido) al 10% antes de su uso) y la mezcla se incuba de nuevo durante unos minutos a 37 grados centígrados. Para medir la actividad de PP2A, se añade el sustrato enzimático en un volumen de 150-180  $\mu$ l en Tris HCL 50 mM, pH 8,5, para obtener un volumen final de 200  $\mu$ l. En el caso de una técnica fluorimétrica, para medir la actividad, se añe-

de un sustrato fluorescente de la enzima, tal como fosfato de metilumbeliferona 70  $\mu$ M, o difosfato de fluoresceína 30  $\mu$ M. Si se usa la técnica colorimétrica, se añade un sustrato específico de la enzima, tal como el fosfopéptido de serina/treonina, y después se cuantifica la liberación de fosfato libre en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

La actividad de la fosfatasa PP2A se inhibirá proporcionalmente a la cantidad de toxinas DSP. Para cuantificar las toxinas, se requiere una curva de calibración obtenida con cantidades conocidas de ácido okadaico, donde los datos de fluorescencia o densidad óptica obtenidos a partir de los pocillos con las muestras proporcionan la concentración de toxinas DSP capaz de inhibir la actividad fosfatasa. Dependiendo del sustrato, que puede estar coloreado, ser fluorescente o luminiscente debido a la liberación de grupos fosfato, habrá tres tipos de técnicas no radiactivas, particularmente las técnicas espectrofotométrica, luminométrica o fluorimétrica, para detectar toxinas DSP.

Para realizar estas técnicas no radiactivas, es necesario usar compuestos con dos características principales:

- 1) Que sean buenos sustratos de fosfatasa PP2A.
- 2) Que los disolventes usados para obtener el extracto (metanol) no interfieran con la determinación.

Los sustratos adecuados que tienen estas dos características, críticas para realizar un ensayo de toxinas DSP rutinario, son los siguientes:

- 1) fosfato de 4-metilumbeliferona (4-MUP). Excitación 370/Emisión 430.
- 2) Difosfato de fluoresceína (FDP). Excitación 480/Emisión 520.
- 3) Un fosfopéptido de serina/treonina. La lectura de la densidad óptica debe realizarse en placas de microtitulación a una longitud de onda de 600 nm.

### REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección y cuantificación de toxinas diarreas de dinoflagelados (DSP (toxina diarrea de mariscos)) basado en la inhibición de fosfatasas, midiendo la actividad de la fosfatasa PP2A, obtenida a partir de glóbulos rojos humanos o después de su purificación parcial a partir de un tejido que es rico en estas enzimas, con sustratos de

fosfatasa PP2A fluorescentes que son sensibles a la acción de la fosfatasa y que experimentan un cambio cuantificable en su fluorescencia.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque los sustratos de fosfatasa PP2A fluorescentes se seleccionan entre el grupo compuesto por 4-metiltumbeliferona (4-MUP) y difosfato de fluoresceína (FDP).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

---

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---