



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 255 343**

② Número de solicitud: 200300629

⑤ Int. Cl.

**C07K 16/18** (2006.01)

**C12N 5/20** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **15.03.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2006**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.06.2006**

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Vigo**  
**c/ Oporto, 1**  
**36201 Vigo, Pontevedra, ES**  
**Xunta de Galicia**

⑦ Inventor/es: **González Fernández, África;**  
**Lorenzo Abalde, Silvia y**  
**Fuentes González, José Miguel**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Anticuerpos monoclonales de ratón y su aplicación en la identificación específica de larvas en D del mejillón *Mytilus galloprovincialis*.**

⑤ Resumen:

Anticuerpos monoclonales de ratón y su aplicación en la identificación específica de larvas en D del mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

Las larvas de muchos moluscos bivalvos son muy similares en morfología, requiriendo tecnología sofisticada y lenta para su identificación precisa. A partir de ratones Balb/C inmunizados con larvas de mejillón de dos días de vida (en D) de la especie *Mytilus galloprovincialis*, hemos generado dos hibridomas (HYB-M36.5 e HYB-M22.8) productores de los anticuerpos monoclonales de ratón M36.5 y M22.8, respectivamente.

Ambos anticuerpos, M36.5 y M22.8, reconocen de forma específica a las larvas en D de mejillón *Mytilus galloprovincialis*, pero no reconocen a las larvas en D de otros bivalvos como *Ostrea edulis*, *Cerastoderma edule*, *Aequipecten opercularis*, *Tapes decussatus* y *Tapes philippinarum*, por lo que la presente invención podría utilizarse en técnicas que permitan la identificación selectiva de las larvas de mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

ES 2 255 343 A1

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales de ratón y su aplicación en la identificación específica de larvas en D del mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

La presente invención se refiere a dos anticuerpos monoclonales de ratón denominados M36.5 y M22.8 que reconocen de forma específica a larvas en D de mejillón de la especie *Mytilus galloprovincialis*, pero no reconocen a larvas en D de otros bivalvos como *Ostrea edulis*, *Cerastoderma edule*, *Aequipecten opercularis*, *Tapes decussatus* y *Tapes philippinarum*.

### Sector de la técnica

El sector de la técnica al que se refiere la invención se incluye dentro del ámbito de la biología marina y de la acuicultura, concretamente en el sector de las técnicas de identificación de larvas de moluscos bivalvos. Los anticuerpos podrían utilizarse para su uso en técnicas que permitan la identificación selectiva de larvas del mejillón *Mytilus galloprovincialis* con respecto a las larvas de otros moluscos bivalvos.

### Estado de la técnica

Las larvas de los moluscos bivalvos son muy semejantes entre sí, especialmente en los primeros estados de desarrollo, por lo que la discriminación entre especies resulta difícil y laboriosa. Hasta los años noventa, el método más riguroso y preciso de identificación se basaba en la observación, mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), de determinadas características morfológicas diagnóstico de la charnela de las larvas, tales como las estructuras denticuladas del provinculum y la forma del sistema charnelar lateral (ver revisión al respecto de Lutz en American Malacological Bulletin, 1:58-78, 1985). Sin embargo, este método, debido al tiempo que requiere la preparación de las muestras para la correcta observación con MEB, resulta poco adecuado en los estudios ecológicos de campo, en los que se necesita una identificación precisa, y, al mismo tiempo, rápida, de las distintas especies larvianas presentes en las numerosas y complejas muestras de plancton que estos estudios generan.

En los últimos años, el gran impulso experimentado por las tecnologías moleculares, ha permitido el desarrollo de métodos alternativos de identificación, rápidos, específicos y fiables, que utilizan o bien sondas moleculares basadas en la tecnología del ADN o bien anticuerpos policlonales y/o monoclonales obtenidos mediante técnicas inmunológicas (revisión de Garland y Zimmer en Marine Ecology Progress Series, 225:299-310, 2002).

La obtención de anticuerpos monoclonales se basa en la técnica de fusionar células para obtener líneas celulares híbridas (hibridomas) que pueden crecer de forma indefinida en cultivos (técnica desarrollada por los Dres. Köhler y Milstein y descrita en Nature 256: 495-497, 1975). Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos homogéneos e idénticos entre sí que tienen la propiedad de unirse a un único determinante antigénico. La ventaja de los anticuerpos monoclonales sobre los antiseros convencionales radica en su mayor especificidad y en la posibilidad de su producción ilimitada. Sin embargo, aunque existe una gran variedad de anticuerpos que se utilizan para técnicas de diagnóstico, investigación o incluso en terapia humana, ninguno de los anticuerpos monoclonales obtenidos hasta el momento ha sido aplicado a la identificación de larvas del mejillón de la especie *Mytilus*

*galloprovincialis*.

El cultivo del mejillón *Mytilus galloprovincialis* en las Rías Gallegas, tiene una gran importancia económica y social. En los últimos años, la optimización de las estrategias de cultivo ha permitido alcanzar cifras récord de producción, superiores a las 250.000 toneladas anuales, convirtiéndose a España en el primer productor europeo y segundo mundial, después de China, de este recurso marino. El cultivo se basa en el engorde, en bateas fondeadas en las rías, de semilla salvaje obtenida mediante dos métodos de captación natural. El rendimiento de uno de estos métodos, la captación de postlarvas mediante artefactos colectores colgados de las propias bateas, puede optimizarse considerablemente conociendo previamente en que zonas y en que meses deben colocarse estos artefactos. Para ello, es imprescindible llevar a cabo estudios de la distribución espacio-temporal de las larvas del mejillón en las rías. Uno de los problemas inherentes a este tipo de estudios, es la dificultad de diferenciar de un modo fiable, pero al mismo tiempo rápido, las larvas de mejillón de la especie *Mytilus galloprovincialis* de las larvas de otras especies de moluscos bivalvos coexistentes en el plancton, especialmente en los primeros estadios de desarrollo.

### Explicación de la invención

Para resolver este problema, los grupos de investigación de Inmunología (Universidad de Vigo) y Bioecología del mejillón (CIMA-Xunta de Galicia), han obtenido, trabajando de forma coordinada, dos anticuerpos monoclonales de ratón denominados M36.5 y M22.8 que reconocen a larvas en D (de dos días) del mejillón *Mytilus galloprovincialis* y no reconocen a larvas en D de las especies *Ostrea edulis*, *Cerastoderma edule*, *Aequipecten opercularis*, *Tapes decussatus* y *Tapes philippinarum*. Estos dos anticuerpos monoclonales muestran un patrón de reconocimiento específico y diferente entre sí, frente a larvas de *Mytilus galloprovincialis*. La presente invención proporciona además dos nuevas líneas de hibridomas designadas HYB-M36.5 e HYB-M22.8, que fueron generadas por fusión de células de mieloma de ratón NSO con células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con larvas en D de *Mytilus galloprovincialis*. Los hibridomas obtenidos fueron analizados y seleccionados por su capacidad de secretar anticuerpos de ratón específicos para larvas en D de *Mytilus galloprovincialis*. Cada hibridoma fue clonado de forma independiente y el anticuerpo secretado fue analizado por inmunofluorescencia indirecta. Asimismo, las líneas de hibridoma HYB-M36.5 e HYB-M22.8 se mantienen en cultivo obteniéndose los anticuerpos monoclonales M36.5 y M22.8 del sobrenadante de cada cultivo, respectivamente. Los hibridomas han sido depositados en la European Collection of Cell cultures (ECACC), Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR), Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG (Reino Unido), el 20 de diciembre de 2002, con los números de referencia 02122022 para el HYB-M36.5, hibridoma productor del anticuerpo monoclonal M36.5, y 02122021 para el HYB-M22.8, hibridoma productor del anticuerpo monoclonal M22.8. Tanto la célula secretora del anticuerpo monoclonal M36.5 (el hibridoma HYB-M36.5), como la célula secretora del anticuerpo monoclonal M22.8 (el hibridoma HYB-M22.8) presentan los genes reagrupados de la cadena pesada y de la cadena ligera k, ambas de ratón. El anticuerpo monoclonal M36.5 es de isotipo

IgG<sub>2b</sub> (cadenas pesadas  $\gamma_{2b}$  y cadenas ligeras k) y el anticuerpo monoclonal M22.8 es de isotipo IgG<sub>1</sub> (cadenas pesadas  $\gamma_1$  y cadenas ligeras k). La monoclonalidad y la estabilidad de los hibridomas en cultivo se aseguraron realizando la clonación de los mismos mediante dilución límite (dos diluciones límite en el caso del HYB-M36.5 y una en el HYB-M22.8). Los anticuerpos secretados, o sus fragmentos reactivos [partes de reconocimiento antigénico como son los fragmentos Fab, (Fab)<sub>2</sub> o fragmentos Fv], pueden así ser utilizados para realizar la identificación rápida, precisa y específica de larvas en D del mejillón *Mytilus galloprovincialis*, y diferenciarlas de larvas en D de otros moluscos bivalvos. Estos anticuerpos, además presentan la ventaja, con respecto a las sondas moleculares utilizadas en métodos anteriores, de que pueden ser aplicados directamente a larvas intactas, sin requerir la extracción previa del ADN de los tejidos.

#### Modo de realización de la invención

##### Obtención de las larvas

Para la obtención de larvas en D del mejillón *Mytilus galloprovincialis* partimos de mejillones adultos de esta especie, procedentes de distintas áreas de cultivo de las rías gallegas. Los mejillones se limpiaron y se mantuvieron en seco a una temperatura de 4°C. La liberación de gametos se realizó por estimulación térmica. Para ello, los mejillones se introdujeron en agua de mar, previamente calentada a 20-22°C, filtrada mediante un filtro de cartucho de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y esterilizada con luz ultravioleta. Cuando los mejillones comenzaron la liberación de los gametos, fueron transferidos, individualmente, a vasos de precipitado con agua de mar estéril y calentada a 18°C, donde continuó este proceso biológico. Tanto los ovocitos como los espermatozoides se contaron y se transfirieron a tanques de cultivo de 50 L, a una concentración de 20-30 ovocitos por mL, donde se provocó la fecundación mediante la adición de 10-20 mL de la solución de esperma liberado por los machos. El contenido del tanque de cultivo se agitó suavemente con el fin de conseguir una distribución homogénea de los gametos y se dejó sin suplemento alimenticio, con aireación suave, a una temperatura de 20°C. Dos días después de la fecundación se recogieron las larvas en D de mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Para ello se filtró el agua de mar donde se había realizado el cultivo, a través de una malla de 40  $\mu\text{m}$ , donde quedaron retenidas las larvas. Una vez recogidas, las larvas fueron lavadas en solución salina y congeladas a una temperatura de -80°C, o en nitrógeno líquido a -176°C.

##### Inmunización de ratones

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/C, mantenidos en el animalario de la Universidad de Vigo en condiciones estándar de alimentación, agua, y ciclo de luz-oscuridad convencionales. Las larvas utilizadas como antígeno fueron lavadas previo a la inmunización con tampón fosfato salino pH 7.4 estéril (0.15 M ClNa, 2.7 mM ClK, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) centrifugando a 1000 r.p.m. durante 3 min. El hibridoma M36.5 procede de un ratón inmunizado con 15000 larvas en D enteras de *Mytilus galloprovincialis*, mientras que el ratón que dio lugar al hibridoma M22.8 fue inmunizado con 20000 larvas en D de *Mytilus galloprovincialis* previamente sonicadas. La sonicación de las larvas se realizó en un sonicador (Branson, Model 250/450 sonifier, Danbury, USA) a baja intensidad aplicando ciclos sucesivos, evitando

el sobrecalentamiento de la muestra. El ratón del que procede el hibridoma M36.5 fue inmunizado 6 veces antes de realizar la fusión. Todas las inmunizaciones se llevaron a cabo vía intraperitoneal. La primera se realizó en presencia de adyuvante completo de Freund (CFA) (Sigma, St. Louis, USA). Las larvas, tras haber sido lavadas en PBS, se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de salino estéril y lentamente se entremezclaron con un volumen igual de CFA hasta formar una emulsión homogénea. Todo este proceso se realizó en condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar. La inyección intraperitoneal se realizó con una jeringuilla de 1 mL con aguja de 20 G (Microlance, Becton Dickinson). Sin anestesiarse al ratón, se le sujeta por detrás de las orejas con el vientre hacia arriba y se pincha en la parte izquierda del abdomen con el bisel de la aguja hacia arriba. Transcurrido un mes desde la primera inmunización, se realizó la inmunización secundaria, del mismo modo que la primaria, pero utilizando adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma, St. Louis, USA). Las siguientes inmunizaciones se llevaron a cabo del mismo modo, excepto la última, que se realizó sin adyuvante, resuspendiendo las larvas únicamente en 300  $\mu\text{L}$  de solución salina estéril.

##### Obtención de los hibridomas

Para la obtención de los hibridomas se fusionaron células del mieloma de ratón NSO (defectivas en su capacidad de secretar anticuerpos, y carentes del enzima hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT-), mantenidas en cultivo con DMEM al 10% de suero bovino fetal (FCS), con células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con larvas de *Mytilus galloprovincialis*. Antes de llevar a cabo la fusión, el suero del ratón fue analizado frente a las larvas por inmunofluorescencia indirecta, para comprobar que su sistema inmune estaba produciendo anticuerpos frente a dichas larvas. Para realizar la fusión, se extirpó en esterilidad el bazo del ratón, y se contaron las células obtenidas del mismo. Se centrifugaron a 1300 r.p.m. durante 5 min. a 4°C y se resuspendieron en 10 mL de medio de cultivo sin suero. Las células de mieloma también se lavaron, se resuspendieron en medio sin suero y se contaron. Estos dos tipos celulares se mezclaron en un tubo de 50 mL a una proporción de 1 célula de mieloma por 3 de bazo. Se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 5 min. a temperatura ambiente y tras eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet, se provocó la fusión de las células en presencia de polietilenglicol (PEG) a 37°C. Las células se mantuvieron a esta temperatura durante 20-30 min. y después se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 5 min. El pellet celular se resuspendió en medio de cultivo selectivo, con 20% FCS y con HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina), donde sólo crecerán las células híbridas. Las células se distribuyeron en placas de 24 pocillos y tras unos días en cultivo aparecieron colonias celulares. Los sobrenadantes de cada uno de los pocillos se analizaron mediante ELISA tipo sándwich para detectar la presencia de inmunoglobulinas de ratón, y por inmunofluorescencia sobre larvas de *Mytilus galloprovincialis* para comprobar si el anticuerpo secretado es específico del antígeno inmunizante. Los clones de los pocillos positivos se aislaron a pocillos individuales y pasados unos días, se volvió a analizar el sobrenadante. Una vez seleccionados, los clones secretores de inmunoglobulinas que reconocen larvas en D de *Mytilus galloprovincialis* se expandieron, y se les fue sustituyendo el medio selectivo por

medio normal (DMEM 10% FCS). Una vez que el hibridoma era estable, se clonó mediante dilución límite para asegurar la monoclonalidad del anticuerpo.

#### *Inmunofluorescencia indirecta*

La inmunofluorescencia se realizó utilizando larvas en D de *Mytilus galloprovincialis* enteras. Se añadieron entre 1000-2000 larvas de mejillón en cada tubo y se incubaron durante 1-2 horas con 50  $\mu$ l de suero del ratón a testar diluido 1/10 en PBS-BSA 1%, para permitir la unión de los anticuerpos a sus antígenos específicos. Posteriormente se lavaron 3 veces centrifugando a 600 r.p.m. durante 3 min., se añadió el anticuerpo secundario (anticuerpos policlonales de conejo anti- Igs de ratón marcado con biotina) (Dako, Denmark) diluido 1/500 en PBS-BSA 1%, y se dejó incubando durante 30 min. a temperatura ambiente. Tras otros tres lavados se añadió estreptavidina-FITC (Dako, Denmark) a una dilución 1/20 y se incubó durante 15 min. Las larvas se volvieron a lavar y se resuspendieron en medio montante comercial (Inova

Diagnostics, San Diego, USA). Estas larvas se dispusieron en un portaobjetos para ser observadas en un microscopio de fluorescencia.

#### **Aplicaciones**

Los dos anticuerpos monoclonales de ratón denominados M36.5 y M22.8 reconocen de forma específica a larvas en D de mejillón de la especie *Mytilus galloprovincialis*. Ambos anticuerpos podrían ser utilizados, bien de forma individual o bien combinados, en rutinas de control del medio marino (tales como las realizadas por el Centro de Control do Medio Mariño-Xunta de Galicia), para la determinación rigurosa de la abundancia de las larvas de mejillón presente en muestras de plancton, con el fin de asesorar al sector mitilicultor en su estrategia de colocación de artefactos colectores de semilla de mejillón. Estos anticuerpos podrían ser utilizados, además, en estudios ecológicos y de dinámica de poblaciones de la especie identificada, *Mytilus galloprovincialis*.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

### REIVINDICACIONES

1. Nuevas líneas de hibridomas denominadas HYB-M36.5 e HYB-M22.8, ambas depositadas en la European Collection of Cell cultures (ECACC), con los números de referencia 02122022 y 02122021, respectivamente, **caracterizadas** por resultar de la fusión de células del bazo de ratones Balb/c inmunizados con larvas en D de mejillón de la especie *Mytilus galloprovincialis*, con células de mieloma NSO.

2. Los hibridomas HYB-M36.5 e HYB-M22.8, según reivindicación 1, secretan los anticuerpos monoclonales de ratón M36.5 y M22.8, respectivamente,

**caracterizados** por reconocer de forma específica a larvas en D de mejillón de la especie *Mytilus galloprovincialis*,

3. Los anticuerpos monoclonales de ratón M36.5 y M22.8, según reivindicación 2, se **caracterizan** por ser de isotipo IgG<sub>2b</sub> (cadenas pesadas  $\gamma_{2b}$  y cadenas ligeras k) e IgG<sub>1</sub> (cadenas pesadas  $\gamma_1$  y cadenas ligeras k), respectivamente.

4. Uso de los anticuerpos monoclonales de ratón M36.5 y M22.8 anteriormente descritos, en el reconocimiento específico de larvas en D de mejillón de la especie *Mytilus galloprovincialis*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 255 343

② Nº de solicitud: 200300629

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.03.2003

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C07K 16/18** (2006.01)  
**C12N 5/20** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LORENZO, S.; FUENTES, J.; LÓPEZ, J.L. Application of the proteomics for the search of specific proteins of larvae of the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> . Sesión V. Animal Proteomics, SV C2. Jornadas sobre Proteómica. Campus de Rabanales de la Universidad de Córdoba. 2-7 Febrero 2003, [recuperado el 10.05.2006] Recuperado de internet: <URL:http://www.uco.es/vida/congresos/proteomica-uco2003/V.pdf>	1-4
A	JP 11196866 A ((SUIS-N) SUISANCHO SEINANKAIKU SUISAN KENKYUSHO & (SUIS-N) SUISANCHO SETONAIKAIKU SUISAN KENKYUSHOCHO) 27.07.1999 (resumen) [en línea] [recuperado el 08.05.2006]. Recuperado de: EPO WPI Database.	1-4
A	PAUGAM, A.; LE PENNEC, M.; GENEVIÉVE, A.-F. Immunological recognition of marine bivalve larvae from plankton samples. <i>Journal of Shellfish Research</i> . Junio 2000, Vol. 19, Nº 1, páginas 325-331. ISSN 0730-8000.	1-4
A	WOOD, A.R.; BEAUMONT, A.R.; SKIBINSKI, D.O.F.; TURNER, G. Analysis of a nuclear-DNA marker for species identification of adults and larvae in the <i>Mytilus edulis</i> complex. <i>Journal of Molluscan Studies</i> . Febrero 2003, Vol. 69, Nº 1, páginas 61-66. ISSN 0260-1230.	4
A	TORO, J.E. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic surveys. <i>Journal of Shellfish Research</i> . Diciembre 1998, Vol. 17, Nº 4, páginas 1203-1205. ISSN 0730-8000.	4

#### 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  
16.05.2006

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/1