



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 325 049**

② Número de solicitud: 200800608

⑤ Int. Cl.:
C07C 251/02 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **21.02.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
24.08.2009

⑦ Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑦ Inventor/es: **Botana López, Luis Miguel;**
Vilariño del Río, Natalia;
Fonfría Subirós, Eva;
Molgó, Jordi y
Araoz, Rómulo

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Detección y cuantificación de iminas cíclicas basada en la unión competitiva a receptores nicotínicos de acetilcolina.**

⑦ Resumen:

Detección y cuantificación de iminas cíclicas basada en la unión competitiva a receptores nicotínicos de acetilcolina. Procedimiento de cuantificación de iminas cíclicas basado en la unión competitiva a receptores nicotínicos de acetilcolina. Las iminas cíclicas gymnodiminas y espirólidos pueden aparecer como contaminantes en moluscos marinos destinados al consumo humano. Se ha utilizado la capacidad de estas iminas cíclicas de unirse a los receptores nicotínicos de acetilcolina de forma competitiva con la a-bungarotoxina para desarrollar un método de detección de estas toxinas en solución. La invención se basa en la cuantificación de la unión de los receptores nicotínicos a la a-bungarotoxina utilizando técnicas que detectan interacciones moleculares, como la medición de los cambios de polarización de fluorescencia o la monitorización de cambios del índice de refracción en las proximidades de una superficie. Esta señal de unión de a-bungarotoxina al receptor se inhibe por la presencia de iminas cíclicas en solución permitiendo la cuantificación de estas toxinas marinas mediante una calibración previa.

ES 2 325 049 A1

DESCRIPCIÓN

Detección y cuantificación de iminas cíclicas basada en la unión competitiva a receptores nicotínicos de acetilcolina.

5 **Sector de la técnica**

Detección y cuantificación de toxinas.

10 **Antecedentes de la invención**

Gymnodiminas y espirólidos fueron descubiertos en la primera mitad de los años 90 (flu, T., *et al.* 2001. J Nat Prod, 64, 308-12; Molgó, J., *et al.* 2007. Phycotoxins. Chemistry and Biochemistry., Botana, L.M., 319-335; Seki, T., *et al.* 1995. Tetrahedron Lett, 36, 7093-7096). Son toxinas producidas por especies planctónicas que se acumulan en el cuerpo de los mariscos filtradores que se alimentan de ellas. Como consecuencia, estas toxinas llegan al hombre por el consumo de moluscos contaminados. La presencia de las iminas cíclicas gymnodimina y espirólidos en mariscos se puede detectar en la actualidad mediante dos técnicas. La primera de ellas, denominada técnica de bioensayo en ratón, consiste en la inyección intraperitoneal a ratones de un cierto peso de un extracto de la vianda (Munday, R., *et al.* 2004. Toxicol, 44, 173-8; Richard, D., *et al.* 2000. Harmful Algal Blooms, 383; Yasumoto, T., *et al.* 1978. Bulletin of Japanese Society of Science and Fisheries, 44, 1249-1255). Esta técnica, además de problemas éticos por requerir el sacrificio de gran número de animales, presenta problemas técnicos como el gran número de falsos positivos y la falta de selectividad para los distintos grupos de toxinas. Esta falta de selectividad del bioensayo en ratón dificulta el cumplimiento de los límites máximos de toxina en mariscos destinados al consumo humano ya que la toxicidad de las toxinas lipofílicas que se co-extraen con las iminas cíclicas es muy variable y distinta según las vías de administración. De hecho, la toxicidad de estas iminas cíclicas por vía intraperitoneal supera la del ácido okadaico, dinofisistoxinas, yessotoxinas, pectenotoxinas y azaspirácidos (Miles, C.O. 2007. Phycotoxins. Chemistry and Biochemistry, Botana, L.M., 159-186; Ogino, H., *et al.* 1997. Nat Toxins, 5, 255-9; Satake, M., *et al.* 1998. J Am Chem Soc, 120; Vieytes, M.R., *et al.* 2000. Seafood and Freshwater Toxins, Botana, L.M., 239-256), con valores de dosis letal 50 de 96 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para la gymnodimina y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para los espirólidos (Munday, R., *et al.* 2004. Toxicol, 44, 173-8; Richard, D., *et al.* 2000. Harmful Algal Blooms, 383). Sin embargo, su toxicidad por vía oral es considerablemente menor que la de las toxinas diarreas. La detección y cuantificación de cada grupo de toxinas de forma específica permitiría cumplir los límites máximos establecidos por la legislación para cada grupo de toxinas minimizando las pérdidas económicas en el sector de la acuicultura. La segunda técnica de detección se realiza mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Aunque este método diferencia perfectamente las distintas toxinas requiere equipos muy costosos y sofisticados y personal técnicamente muy cualificado. Además la técnica de LC-MS no detectaría nuevos análogos de la toxina aún no caracterizados o para los que no existen estándares (muy frecuente en el campo de las toxinas marinas) y que sin embargo pueden tener una alta actividad tóxica (Fux, E., *et al.* 2007. J Chromatogr A, 1157, 273-80).

El mecanismo de acción de estas iminas cíclicas parece estar relacionado con la inhibición de los receptores de acetilcolina (Molgó, J., *et al.* 2007. Phycotoxins. Chemistry and Biochemistry., Botana, L.M., 319-335; Munday, R., *et al.* 2004. Toxicol, 44, 173-8; Richard, D., *et al.* 2000. Harmful Algal Blooms, 383; Gill, S., *et al.* 2003. Neurotoxicology, 24, 593-604). Ambos tipos de compuestos, gymnodiminas y espirólidos, se unen a los receptores nicotínicos de acetilcolina de forma competitiva con la α -bungarotoxina y la epibatidina. La ventaja de utilizar la monitorización de la interacción toxina-receptor nicotínico en un método de detección de iminas cíclicas es que la eficacia de la detección se correlacionaría con la actividad tóxica de cada compuesto de estos grupos.

La polarización de fluorescencia y la resonancia de plasmones superficiales son técnicas ampliamente utilizadas para la detección de interacciones a nivel molecular (Alfonso, C., *et al.* 2005. Anal Biochem, 344, 266-74; Kakehi, K., *et al.* 2001. Anal Biochem, 297, 111-6; Karlsson, R. 2004. J Mol Recognit, 17, 151-61). La polarización de fluorescencia se basa en la capacidad de las moléculas fluorescentes en solución de inducir cambios en el plano de polarización de la luz dependientes de su tamaño. La técnica requiere el marcaje fluorescente de una de las moléculas que van a interactuar, preferiblemente la más pequeña. Dado que la polarización de la fluorescencia depende de la movilidad de la molécula y por tanto del tamaño, cuando la molécula marcada fluorescentemente interactúa con otra se produce un cambio en el tamaño del agregado y como consecuencia la polarización de la fluorescencia también cambia. La resonancia de plasmones superficiales permite la monitorización de cambios del índice de refracción inducidos por la interacción entre dos moléculas en las proximidades de una superficie detectora. Estas técnicas se usan cada vez más para cuantificar contaminantes de alimentos, ya que son relativamente sencillas y fáciles de utilizar de forma rutinaria en el laboratorio.

60 **Descripción de la invención***Definiciones*

65 **Compuesto competidor:** molécula que se une a los receptores nicotínicos de acetilcolina en los mismos sitios de unión que las iminas cíclicas.

ES 2 325 049 A1

Marcador: molécula que se une mediante un enlace covalente a otra y cuyas propiedades físicas o químicas permiten la detección mediante técnicas de laboratorio de la presencia del compuesto formado por la unión de ambas en una mezcla.

5 *Disolución problema*: cualquier disolución en la que se desee detectar la presencia o ausencia de iminas cíclicas, obtenida de la extracción de moluscos, plankton, agua de mar, o cualquier otro origen que pueda resultar de interés.

La invención tiene por objetivo proporcionar un procedimiento de cuantificación de iminas cíclicas.

10 El método consiste en a) poner en contacto el receptor nicotínico de la acetilcolina con una disolución problema y con un compuesto competidor; b) detectar la unión o la interacción entre el receptor nicotínico de la acetilcolina y el compuesto competidor; c) calcular la concentración de iminas cíclicas que contiene la disolución problema.

15 Este método se basa en que la señal detectada cuando el receptor se une al compuesto competidor será menor cuanto mayor sea la cantidad de iminas cíclicas en la disolución problema, que se unan al receptor compitiendo con el compuesto competidor e inhibiendo la unión de este último al receptor.

20 La disolución problema se pone en contacto con el receptor nicotínico previamente a la adicción del compuesto competidor. El tiempo que la disolución problema debe estar en contacto con el receptor nicotínico antes de la adicción del compuesto competidor puede ser desde 0 minutos a horas, dependiendo de las afinidades del compuesto competidor y del compuesto que se desea detectar en la disolución problema (iminas cíclicas) por los receptores nicotínicos.

25 Utilizando distintas concentraciones de patrones de iminas cíclicas, como las toxinas marinas gymnodimina o espi-rólidos, se obtiene una curva de calibrado que permitirá calcular la concentración de iminas cíclicas en una disolución problema a partir del grado de inhibición de la interacción compuesto competidor-receptor nicotínico.

Se trata de un procedimiento utilizable como método de criba, que detecta selectivamente iminas cíclicas. Además, al utilizar la diana biológica de las toxinas como “cebo”, la eficacia de la detección de cada compuesto de este grupo de toxinas se correlacionaría con la actividad tóxica “*in vivo*”.

30 De un modo particular, el compuesto competidor se selecciona preferentemente entre la α -bungarotoxina, α -conotoxinas, cobratoxina, iminas cíclicas o epibatidina.

35 De otro modo particular, el compuesto competidor se marca preferiblemente con los siguientes marcadores Alexa Fluor[®] 488, tetramethylrhodamina, AlexaFluor[®] 555, AlexaFluor[®] 680, AlexaFluor[®] 647 AlexaFluor[®] 594, Oregon Green[®] 514, fluoresceína, Texas Red[®]-R, biotina, HRP (horseradish peroxidase), yodo radiactivo o tritio.

40 La unión o la interacción entre el receptor nicotínico y el compuesto competidor puede cuantificarse mediante distintas estrategias que detecten interacciones moleculares. De un modo particular, el método de detección se selecciona preferentemente entre

- 45 i. la técnica de polarización de fluorescencia cuando el marcaje se realiza preferentemente con los marcadores fluorescentes AlexaFluor[®] 488, tetramethylrhodamina, AlexaFluor[®] 555, AlexaFluor[®] 680, AlexaFluor[®] 647 AlexaFluor[®] 594, Oregon Green 514, Texas Red[®]-R o fluoresceína.
- 50 ii. la técnica biosensores de resonancia de plasmones superficiales o de espejo óptico cuando la inmovilización se realiza preferentemente mediante reacción química o marcaje con biotina,
- 55 iii. técnicas fluorimétricas, luminiscentes, quimioluminiscentes o radioactivas cuando el marcaje se realiza preferentemente con AlexaFluor[®] 488, tetramethylrhodamina, AlexaFluor[®] 555, AlexaFluor[®] 680, Alexa Fluor[®] 647 AlexaFluor[®] 594, Oregon Green[®] 514, fluoresceína, Texas Red[®]-R, biotina, HRP (horseradish peroxidase), yodo radiactivo o tritio.

60 La invención también se dirige hacia un kit para la cuantificación de iminas cíclicas que comprende al menos el receptor nicotínico de la acetilcolina y un compuesto competidor en la unión con el receptor nicotínico de la acetilcolina.

De un modo particular, el compuesto competidor de este kit se selecciona preferentemente entre α -bungarotoxina, α -conotoxinas, cobratoxina, iminas cíclicas o epibatidina.

65 De un modo más particular, el compuesto competidor de este kit se marca preferiblemente con AlexaFluor 488, AlexaFluor[®] 488, tetramethylrhodamina, AlexaFluor[®] 555, AlexaFluor[®] 680, AlexaFluor[®] 647 AlexaFluor[®] 594, Oregon Green[®] 514, fluoresceína, Texas Red[®]-R, biotina, HRP (horseradish peroxidase), yodo radiactivo o tritio.

La técnica descrita en la presente invención permite el uso de receptores nicotínicos de distinta procedencia, bien de origen muscular o nervioso, de cualquier especie que exprese este tipo de receptores o recombinantes, aislados de tejidos o de cultivos celulares.

El procedimiento que se describe en la presente invención sería útil para cuantificar cualquier otra sustancia que se una de forma competitiva con un compuesto marcado a receptores nicotínicos de acetilcolina en el mismo sitio de unión que las iminas cíclicas.

5 Descripción de las figuras

Figura 1. Curva de calibración de gymnodimina (estándar comprado a Institute for Marine Biosciences, National Research Council, Halifax, NS, Canada) en un ensayo de competición con α -bungarotoxina por la unión a receptores nicotínicos utilizando polarización de fluorescencia. Se prepararon varias diluciones de gymnodimina (2000, 1000, 500, 100 y 50 nM) y se mezclaron con receptor nicotínico de acetilcolina. Después de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, se añadió una dilución 40 nM de α -bungarotoxina marcada fluorescentemente con el fluoróforo Alexa Fluor 488. Tras una incubación de 30 minutos se midieron los valores de polarización de fluorescencia. En cada experimento se incluyó una mezcla de α -bungarotoxina fluorescente y receptor como control de respuesta máxima, α -bungarotoxina fluorescente sola como control de respuesta mínima y un control de fluorescencia basal sin α -bungarotoxina fluorescente. La presencia de gymnodimina inhibe el cambio de polarización de fluorescencia inducido por la unión del receptor nicotínico a la α -bungarotoxina fluorescente. Esta inhibición es proporcional a la concentración de gymnodimina en disolución. Graficando la respuesta de polarización de fluorescencia en valores de porcentaje respecto a la respuesta máxima frente a la concentración de gymnodimina se obtiene un ajuste lineal. Los datos presentados son la media de 3 experimentos realizados por triplicado. Las concentraciones finales de gymnodimina en el pocillo fueron 500, 250, 125, 25 y 12.5 nM. La autofluorescencia propia de las membranas purificadas no afecta a los test realizados para la detección de las iminas cíclicas.

Figura 2. Curva de calibración de 13-desmetil espirólido C (Institute for Marine Biosciences, National Research Council, Halifax, NS, Canada) en un ensayo de competición con α -bungarotoxina por la unión al receptor nicotínico utilizando polarización de fluorescencia. Se prepararon varias diluciones de 13-desmetil espirólido C (2000, 1000, 500, 100 y 50 nM) y se mezclaron con receptor nicotínico de acetilcolina. Después de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, se añadió una dilución 40 nM de α -bungarotoxina marcada fluorescentemente con el fluoróforo Alexa Fluor 488. Tras una incubación de 30 minutos se midieron los valores de polarización de fluorescencia. En cada experimento se incluyó una mezcla de α -bungarotoxina fluorescente y receptor como control de respuesta máxima, α -bungarotoxina fluorescente sola como control de respuesta mínima y un control de fluorescencia basal sin α -bungarotoxina fluorescente. La presencia de espirólidos inhibe el cambio de polarización de fluorescencia inducido por la unión del receptor nicotínico a la α -bungarotoxina fluorescente. Esta inhibición es proporcional a la concentración de espirólido en disolución. Graficando la respuesta de polarización de fluorescencia en valores de porcentaje respecto a la respuesta máxima frente a la concentración de espirólido se obtiene un ajuste exponencial. Las concentraciones finales de espirólido en el pocillo fueron 500, 250, 125, 25 y 12.5 nM. La autofluorescencia propia de las membranas purificadas no afecta a los test realizados para la detección de las iminas cíclicas.

Modo preferente de realización de la invención

Ejemplo de cuantificación de iminas cíclicas mediante polarización de fluorescencia en placa utilizando receptores nicotínicos de acetilcolina en trozos de membrana de la raya Torpedo o receptores neuronales alfa 7 centrales.

1. Preparación de tampón de ensayo PBS-BT: 130 mM NaCl, 1.5 mM NaH₂PO₄, 8.5 mM Na₂HPO₄, pH=7, 0.1% w/v BSA y 0.1% v/v Tween 20.
2. Preparación de una dilución seriada de estándar de toxina, gymnodimina o espirólidos, para obtener una curva de calibrado (2000, 1000, 500, 100 y 50 nM).
3. Preparación de una dilución adecuada de la disolución madre de fragmentos de membrana del órgano eléctrico de la raya Torpedo que contienen el receptor nicotínico de acetilcolina (dilución 1:20 de un stock de 3.5 mg/ml de proteína).
4. Se mezclan 40 μ l de cada dilución de toxina para calibración o de una disolución problema con 40 μ l de la dilución de receptor en un pocillo de una placa negra de 96 pocillos. También se incluyen pocillos "blanco" y pocillos control de respuesta máxima a los que se añaden 40 μ l de disolución sin toxina y 40 μ l de dilución de receptor. Finalmente, en el pocillo control de respuesta mínima o cero se sustituye la dilución de receptor por tampón. Cada condición experimental se realiza por triplicado.
5. Tras agitar durante un minuto, se incuba la placa a temperatura ambiente durante 2 horas.
6. Se añaden a cada pocillo 80 μ l de una dilución de α -bungarotoxina marcada con AlexaFluor 488 (40 nM), excepto en los pocillos "blanco", en los que se añade el mismo volumen de tampón sin α -bungarotoxina fluorescente.
7. De nuevo se mezcla el contenido de los pocillos agitando durante 1 minuto y se incuba la placa a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 30 minutos.

ES 2 325 049 A1

8. Se detecta la polarización de fluorescencia para cada pocillo utilizando un espectrofluorímetro Plate Chameleon de Hidex (Turku, Finlandia). La longitud de onda de la luz de excitación se selecciona con un filtro de 485 nm, mientras que la fluorescencia emitida por la muestra se detecta con filtros de polarización a 535 nm (vertical y horizontal).

5

9. A continuación se procede al cálculo de los valores de polarización de fluorescencia. A los resultados de fluorescencia vertical y horizontal obtenidos para cada pocillo se le restan los valores de fluorescencia vertical y horizontal del blanco. Así se obtienen los valores I_v e I_H (intensidad de fluorescencia vertical y horizontal respectivamente) para cada pocillo. La polarización de fluorescencia en mP (mili unidades de polarización) se obtiene aplicando la siguiente fórmula.

10

$$\text{mP} = 1000 \left[\frac{I_v - G I_H}{I_v + G I_H} \right]$$

15

La constante G se determina para cada combinación de filtros y molécula fluorescente de forma experimental, en este caso tiene el valor de 0,98.

20

10. Se calcula la respuesta en porcentaje para cada concentración de calibrado o muestra considerando como respuesta máxima ó 100% la α -bungarotoxina con receptor y como respuesta mínima ó 0% la α -bungarotoxina sola sin receptor.

25

11. Los valores de respuesta de las soluciones de calibrado se representan gráficamente frente a la concentración de toxina correspondiente y se obtiene una curva de calibrado mediante un ajuste matemático.

12. Los valores de respuesta obtenidos para la disolución problema se sustituyen en la ecuación matemática y se calcula así la concentración de toxina que contiene dicha disolución problema.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de cuantificación de iminas cíclicas que comprende

5 a) poner en contacto el receptor nicotínico de la acetilcolina con una disolución problema y con un compuesto competidor; b) detectar la unión o la interacción entre el receptor nicotínico de la acetilcolina y el compuesto competidor; c) calcular la concentración de iminas cíclicas que contiene la disolución problema.

10 2. Procedimiento de cuantificación de iminas cíclicas según la reivindicación 1 apartado a), en donde el compuesto competidor se selecciona preferiblemente entre α -bungarotoxina, α -conotoxinas, cobratoxina, iminas cíclicas o epibatidina.

15 3. Procedimiento de cuantificación de iminas cíclicas según la reivindicación 1 y 2, en donde el compuesto competidor se marca preferiblemente con los siguientes marcadores AlexaFluor[®] 488, tetramethylrhodamina, AlexaFluor[®] 555, AlexaFluor[®] 680, AlexaFluor[®] 647 AlexaFluor[®] 594, Oregon Green[®] 514, fluoresceína, Texas Red[®]-R, biotina, HRP (horseradish peroxidase), yodo radiactivo o tritio.

20 4. Procedimiento de cuantificación de iminas cíclicas según las reivindicaciones anteriores, en donde el método de detección se selecciona entre

i. la técnica de polarización de fluorescencia cuando el marcaje se realiza preferentemente con los marcadores fluorescentes AlexaFluor[®] 488, tetramethylrhodamina, AlexaFluor[®] 555, AlexaFluor[®] 680, AlexaFluor[®] 647 AlexaFluor[®] 594, Oregon Green 514, Texas Red[®]-R o fluoresceína,

25 ii. la técnica biosensores de resonancia de plasmones superficiales o de espejo óptico cuando la inmovilización se realiza preferentemente mediante reacción química o marcaje con biotina,

30 iii. técnicas fluorimétricas, luminiscentes, quimioluminiscentes o radioactivas cuando el marcaje se realiza preferentemente con AlexaFluor[®] 488, tetramethylrhodamina, AlexaFluor[®] 555, AlexaFluor[®] 680, AlexaFluor[®] 647 AlexaFluor[®] 594, Oregon Green[®] 514, fluoresceína, Texas Red[®]-R, biotina, HRP (horseradish peroxidase), yodo radiactivo o tritio.

35 5. Procedimiento de cuantificación de iminas cíclicas según las reivindicación 1 apartado c) en donde el cálculo de la concentración de iminas cíclicas en la disolución problema se realiza mediante una recta de calibrado.

6. Kit para la cuantificación de iminas cíclicas que comprende al menos el receptor nicotínico de la acetilcolina y un compuesto competidor en la unión con el receptor nicotínico de la acetilcolina.

40 7. Kit para la cuantificación de iminas cíclicas según la reivindicación 6, donde el compuesto competidor se selecciona preferiblemente entre α -bungarotoxina, α -conotoxinas, cobratoxina, iminas cíclicas o epibatidina.

45 8. Kit para la cuantificación de iminas cíclicas según la reivindicación 6 y 7, donde el compuesto competidor se marca preferentemente con AlexaFluor[®] 488, AlexaFluor[®] 488, tetramethylrhodamina, AlexaFluor[®] 555, AlexaFluor[®] 680, AlexaFluor[®] 647 AlexaFluor[®] 594, Oregon Green[®] 514, fluoresceína, Texas Red[®]-R, biotina, HRP (horseradish peroxidase), yodo radiactivo o tritio.

50

55

60

65

Figura 1

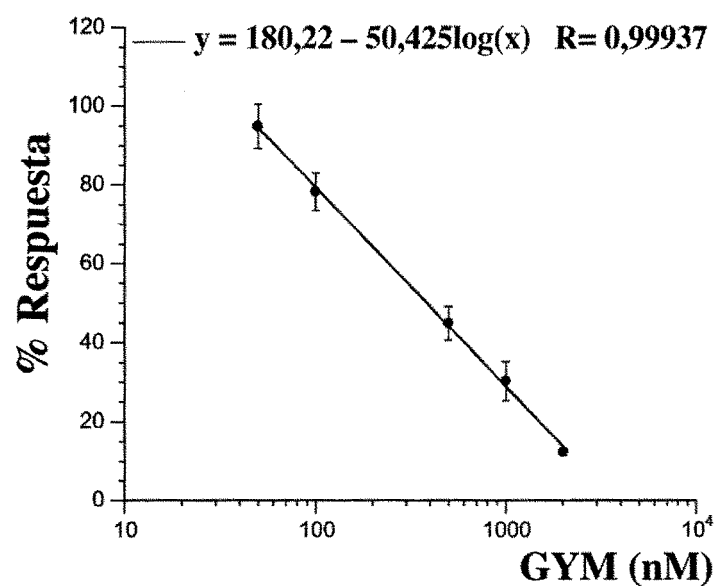
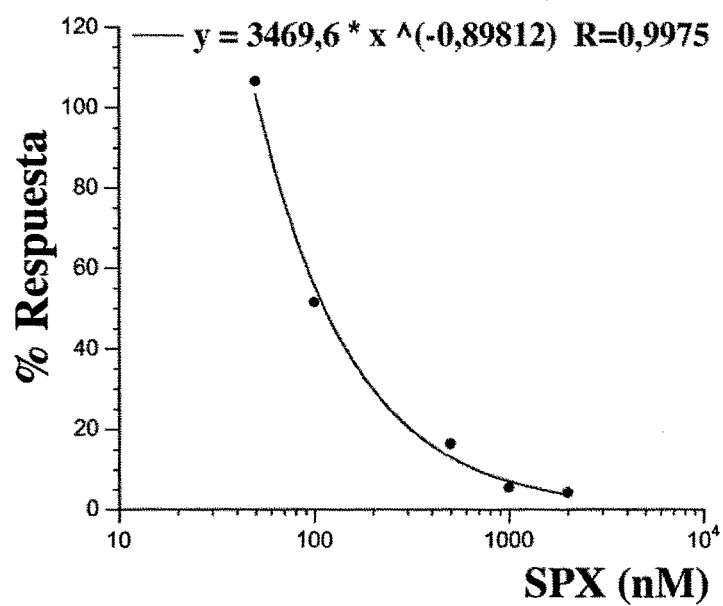


Figura 2





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 325 049

② Nº de solicitud: 200800608

③ Fecha de presentación de la solicitud: 21.02.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20020045618 A1 (NIELSEN, S. F. et al.) 18.04.2002, página 1, párrafo 1; páginas 2 y 3, párrafos 22-38; página 6, párrafo 138; página 7, párrafos 159-162.	1-8
A	ARAOZ, R. et al. "Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS". Microbiology, 2005, Volumen 151, páginas 1263-1273. Ver página 1268, columna 2, párrafo 4; Figura 2.	1-8
A	US 20050131003 A1 (CHANG, H. & PHILLIPS, E.) 16.06.2005, página 1, párrafos 1-4; página 5, párrafos 74-80.	1-8
A	KAWAY, H. et al. "Epibatidine binds to four sites on the torpedo nicotinic acetylcholine receptor". Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, Volumen 366, páginas 834-839. Ver apartado "Materiales y métodos".	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

29.05.2009

Examinador

N. Martín Laso

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C 251/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

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

C07C, G01N, C07K

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

INVENES, EPODOC, WIPI, TEXT, BIOSIS, NPL, MEDLINE, XPESP, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.05.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-8	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 ha sido publicada.

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	US2002/0045618 A1	18/04/2002

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 solicitud se refiere a un procedimiento de cuantificación de iminas cíclicas basado en la unión competitiva a receptores nicotínicos de acetilcolina y a un kit para llevar a cabo dicho procedimiento.

El documento D01 divulga el cálculo de afinidad de derivados de heteroaril-diazacicloalcanos a receptores nicotínicos de acetilcolina. Entre los compuestos descritos se encuentran compuestos sustituidos por heterociclos no aromáticos como 3,4-dihidropirrol (página 1, párrafo 1; páginas 2 y 3, párrafos 22-38; página 6, párrafo 138). El cálculo de afinidad por los receptores se realiza poniendo en contacto una preparación rica en receptores nicotínicos de acetilcolina con una concentración conocida del compuesto a estudiar y un compuesto competidor marcado radiactivamente (3H- Bungarotoxina), detectando por otro lado la unión del compuesto competidor marcado a los receptores nicotínicos de acetilcolina, midiendo las emisiones de radiactividad y calculando el enlace específico a los receptores (página 7, párrafos 159-162).

Aunque el documento anterior no divulga un método de cuantificación de iminas como el definido en las reivindicaciones 1-8 de la solicitud y se puede reconocer novedad, no es posible reconocer actividad inventiva. El método anterior se basa en la determinación de la afinidad de distintos compuestos por los receptores nicotínicos de acetilcolina, resultaría obvio para un experto en la materia utilizar el mismo método para la determinación de una concentración de dichos compuestos una vez conocida la afinidad de dichos compuestos por los receptores.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-8 de la solicitud carece de actividad inventiva a la luz del documento D01 (Art. 8.1 LP11/1986).