

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 327 023**

②1 Número de solicitud: 200901255

⑤1 Int. Cl.:

G01N 33/12 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **13.05.2009**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2009**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.10.2009

⑦1 Solicitante/s: **Universidad de Oviedo
Plaza de Riego, 4 - Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES**

⑦2 Inventor/es: **Pérez Gómez, Anabel;
Novelli Ciotti, Antonello y
Fernández Sánchez, M. Teresa**

⑦4 Agente: **No consta**

⑤4 Título: **Método para la detección y cuantificación selectiva de ácido domoico mediante sus efectos tóxicos sobre células excitables.**

⑤7 Resumen:

Método para la detección y cuantificación selectiva de ácido domoico mediante sus efectos tóxicos sobre células excitables. La presente invención se refiere a un método para la detección y cuantificación sistemática de la presencia de ácido domoico (DOM) en muestras problema, como extractos de alimentos marinos o muestras de aguas, mediante la utilización de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido. La exposición de los cultivos de células excitables a DOM en un medio como el mencionado, da lugar a una disminución de la viabilidad celular superior a la observada en presencia de ión sodio, mientras que el pretratamiento con un inhibidor de los receptores activados por DOM inhibidor dicho efecto tóxico. Con este método, es posible determinar la presencia de concentraciones de DOM en la muestra problema que no serían detectables en presencia de ión sodio en el medio extracelular.

ES 2 327 023 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección y cuantificación selectiva de ácido domoico mediante sus efectos tóxicos sobre células excitables.

La presente invención se refiere a un método para la detección y cuantificación sistemática de la presencia de ácido domoico (DOM) en muestras problema, como extractos de alimentos marinos o muestras de aguas, mediante la utilización de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido.

La invención resulta de aplicación en aquellos sectores que precisen de la detección, identificación y cuantificación de sustancias químicas y bioquímicas de carácter tóxico en seres vivos, como por ejemplo en los sectores medioambiental o agroalimentario, y en particular en el campo de la seguridad alimentaria de productos marinos.

Estado de la técnica

El DOM es una potente neurotoxina producida por el alga diatomea *Pseudo-nitzschia* y acumulada por moluscos y otros animales marinos de habitual consumo sin que se aprecien cambios en su morfología o viabilidad. El DOM es un ácido tricarbóxico que interacciona con los receptores ionotrópicos no-NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) del glutamato. Pertenece al grupo de las denominadas toxinas de tipo amnésico (ASP) y su ingestión mediante alimentos contaminados da lugar a intoxicaciones que en los casos más severos provocan daños cerebrales irreversibles. Por esta razón se hace necesario el desarrollo de métodos rápidos y específicos para su detección y cuantificación.

Existen varios métodos para determinar la presencia de DOM, entre los que se encuentra el bioensayo en ratón. Dicho método es universalmente aceptado para la detección de toxinas (Yasumoto T., Oshima Y., Sugawara M., Fukuyama Y., Oguri H., Igarashi T., Fujita N. (1980) *Bull Japan Soc Sci Fish.* 46: 1405-1411) y se basa en la observación de los efectos producidos tras la inyección intraperitoneal de extractos de hepatopáncreas de moluscos en ratones. Este bioensayo es de sencilla realización y ha resultado de gran utilidad para determinar si el producto es apto o no para el consumo humano. Sin embargo, cuenta con grandes inconvenientes:

- Económicos: Es un procedimiento costoso.
- Baja sensibilidad: los resultados obtenidos llevan implícito un gran margen de error.
- Falta de especificidad: no permite obtener información precisa de la naturaleza del agente tóxico.
- Elevada variabilidad: los resultados obtenidos pueden variar para el mismo extracto de marisco contaminado.
- Éticos: requiere el empleo masivo de animales de laboratorio.

Así, para la detección de rutina de las toxinas ASP, el método de bioensayo en ratón ha sido sustituido por métodos de cromatografía líquida con detector fluorométrico (James K.J., Gilhnan M., Lehane M., Gago-Martinez A. (2000) *J Chromatogr A*, 871:1-6) que resultan herramientas más sensibles y selectivas. Sin embargo, tanto este método como otros procedimientos de tipo analítico-químico (Zhao J.Y., Thibault P., Quilliam M.A. (1997) *Electrophoresis* 18:268-276; Thibault P., Quilliam M.A., Jamieson W.D., Boyd R.K. (1989) *Biomed Environ Mass Spectrom* 18: 373-386) requieren de un equipamiento costoso, complejo, de muestras muy elaboradas y, en muchos de los casos, de personal especializado. Además, sólo permiten cuantificar análogos de los que estén disponibles patrones purificados, lo cual no siempre está asegurado.

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs) (Garthwaite I., Ross K.M., Miles C.O., Hansen R.P., Foster D., Wilkins A.L., Towers N.R. (1998) *Nat Toxins* 6:93-104) aunque son sensibles y relativamente rápidos en la detección, no discriminan entre isómeros biológicamente activos y no activos. Además, existen análogos de las toxinas que no son reconocidos por los anticuerpos o tienen una afinidad por el receptor muy baja para ser detectados con los ensayos de unión al receptor (London E.D., Coyle J.T. (1979) *Molec Pharmacol.* 15: 492-505), pero que si pueden ser evaluados por su actividad funcional. De esta manera se han desarrollado bioensayos celulares "in vitro" para la detección y cuantificación del DOM como la técnicas electrofisiológicas en preparaciones de rodajas de hipocampo de rata (Kerr D.S., Briggs D.M., Saba H.I. (1999) *Toxicon.* 37:1803-1825) pero cuentan con el problema de que no son capaces de detectar la presencia de varios compuestos en la muestra de estudio. Se han desarrollado también métodos citotóxicos, como el bioensayo para toxinas paralizantes y amnésicas basado en la detección fluorimétrica del aumento de la concentración de calcio intracelular en cultivos primarios corticales de rata (Beani L., Bianchi C., Guerrini F., Marani L., Pistocchi R., Tomasini M.C., Ceredi A., Milandri A., Poletti R., Boni L. (2000) *Toxicon.* 38: 1283-1297), para el que se requieren aparatos para la estimulación eléctrica celular. Otro método basado en la detección de neurotoxicidad es el bioensayo para la detección de ácido okadaico y DOM en cultivos primarios de cerebelo de rata en cultivo primario (Pat. no. ES2047403), para el que sólo se requiere microscopía de epifluorescencia. Sin embargo, el método no es excesivamente sensible, siendo su límite de detección de 5 μM de DOM; además, se requieren 24 h de incubación con la muestra problema para cuantificar la toxina.

Descripción de la invención

El método propuesto en el presente documento se basa en que la exposición de los cultivos de células excitables a DOM en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido, da lugar a una disminución de su viabilidad superior a la observada en presencia de ión sodio, mientras que el pretratamiento con un inhibidor de los receptores activados por DOM inhibe dicho efecto tóxico. Con este método, es posible determinar la presencia de concentraciones de DOM en la muestra problema que no serían detectables en presencia de ión sodio en el medio extracelular.

La presente invención se refiere a un método para la detección y cuantificación selectiva de DOM en células excitables, que comprende las siguientes etapas:

- a) Establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de distintas concentraciones de DOM a un primer grupo de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido.
- b) Establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un segundo grupo de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido. A efectos de la presente invención, una muestra problema se refiere a extractos de alimentos o muestras de aguas en los que se quiere detectar la presencia de DOM.
- c) Establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un tercer grupo de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido y tratadas con una concentración efectiva de un inhibidor de los receptores activados por DOM.
- d) Detección de los efectos citotóxicos inducidos en cada grupo de células y cuantificación de los niveles de viabilidad celular mediante el uso de protocolos o métodos efectivos para estos propósitos.
- e) Comparación de los niveles de viabilidad entre los diferentes grupos de células para identificar al DOM como el agente causante de citotoxicidad y determinar su concentración en la muestra problema.

En una realización preferida el ión sodio extracelular se sustituye mediante la reducción o eliminación del cloruro sódico extracelular y la adición de una concentración equivalente a la eliminada de cloruro de colina. En una realización más preferida el cloruro sódico extracelular se sustituye entre 10 y 30 min antes de la adición de la toxina o el bloqueante.

En otra realización preferida, el inhibidor de los receptores activados por DOM es 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX).

En otra realización preferida, el inhibidor de los receptores activados por DOM es un inhibidor de los receptores no-NMDA de tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico).

En una realización más preferida, el inhibidor de los receptores activados por DOM es 1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilendioxi-5H-2,3-benzodiazepina (GYKI).

En otra realización específica, las células excitables son neuronas del sistema nervioso central. En una realización más específica, las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario.

En una realización todavía más preferida, las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario y la detección de los efectos citotóxicos se realiza mediante la observación de los cultivos celulares con microscopía en contraste de fase. En una realización aún más específica la detección de los efectos citotóxicos del DOM se realiza transcurridos entre 5 y 15 min desde las adiciones.

En otra realización todavía más preferida, las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario y la detección de los efectos citotóxicos se realiza utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia.

En otra realización todavía más específica, las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario y la cuantificación de los niveles de viabilidad celular se realiza utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia. En una realización aún más específica, la cuantificación de los efectos citotóxicos se realiza transcurridas 9 h desde las adiciones.

La presencia de DOM se determina mediante la comparación de los niveles de supervivencia de las células tratadas con la muestra problema respecto a las tratadas con la muestra problema y el inhibidor de los receptores activados por DOM, de manera que la protección observable en las células expuestas a la muestra problema y el inhibidor respecto a las expuestas sólo a la muestra problema indica que el agente causante de toxicidad es DOM. La cuantificación

ES 2 327 023 A1

de DOM se realiza mediante la comparación de los niveles de supervivencia de las células tratadas con la muestra problema respecto a las tratadas con el DOM.

La aplicación del presente bioensayo para la detección y cuantificación de DOM en el análisis rutinario de muestras problema requiere una inversión mínima, lo que le otorga una gran ventaja sobre otras técnicas. De esta manera, sólo requiere de la adquisición de:

- Una campana de flujo laminar.
- Un incubador de CO₂.
- Un microscopio de contraste de fases con epifluorescencia.

El bioensayo con células excitables es un método sencillo, fiable y fácilmente utilizable, que requiere equipos de coste limitado y personal con cualificación media, siendo estas grandes ventajas para su aplicación y generalización, frente a otras técnicas y métodos, como los analítico-químicos, que requieren un equipamiento costoso, complejo, de muestras muy elaboradas y, en muchos de los casos, de personal especializado.

Por otro lado, aunque en el bioensayo del ratón la inyección de DOM induce la aparición de algunos síntomas característicos antes de la muerte del animal, no es posible detectar inequívocamente la naturaleza del agente causal. El procedimiento que se propone permite detectar cualitativa y cuantitativamente la presencia de DOM mediante un único ensayo, suponiendo por tanto un ahorro considerable tanto de tiempo como de animales necesarios, respecto al bioensayo del ratón.

En el presente bioensayo las toxinas son evaluadas por su actividad funcional, lo que le otorga ventaja frente a otros métodos como los ensayos inmunológicos o los de unión al receptor. Otras técnicas determinan un perfil electrofisiológico para cada toxina, pero no son capaces de diferenciar la presencia de varias en una misma muestra problema, mientras que este nuevo método determina la presencia de DOM específicamente. El bioensayo para la detección y cuantificación de DOM en células excitables expuestas a un medio extracelular con el ión sodio sustituido total o parcialmente posee una sensibilidad superior que los ensayos en cultivos neuronales previamente descritos, ya que mediante su aplicación es posible detectar concentraciones de toxina superiores a 1 μ M, además de requerir tiempos más reducidos para su cuantificación.

La invención resulta de aplicación en aquellos sectores que precisen de la detección, identificación y cuantificación de sustancias químicas y bioquímicas de carácter tóxico en seres vivos, como por ejemplo en los sectores medioambiental o agroalimentario, y en particular en el campo de la seguridad alimentaria de productos marinos.

Explicación de una forma de realización preferente

Para una mejor comprensión de la presente invención, se expone el siguiente ejemplo de realización preferente, descrito en detalle, que debe entenderse sin carácter limitativo del alcance de la invención.

La preparación de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario se llevó a cabo mediante el procedimiento previamente establecido que se describe a continuación:

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución I

NaCl 124 mM, KCl 5,37 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, D-glucosa 14,5 mM, Hepes 25 mM, rojo fenol 27 μ M, MgSO₄ 1,2 mM, seroalbúmina bovina (BSA) 3 mg/mL. La solución se equilibró a pH 7,4 con NaOH.

Solución II

Solución I suplementada con 0,25 mg/mL de tripsina.

Solución III

Solución I suplementada con 80 μ g/mL de Desoxirribonucleasa I (DNAsa I), 0,52 mg/mL de inhibidor de tripsina y MgSO₄ elevado a 2,8 mM.

Solución IV

Solución I suplementada con 25,6 μ g/mL de DNAsa I, 166,4 μ g/mL de inhibidor de tripsina y MgSO₄ elevado a 1,7 mM.

ES 2 327 023 A1

Solución V

Solución I suplementada con 0,1 mM de CaCl_2 y elevada a 2,5 mM de MgSO_4 .

5

A continuación se extrajeron por disección 8-13 cerebelos procedentes de crías de rata de 8 días de edad y se depositaron en 2 mL de solución I. Con ayuda de unas pinzas, se eliminó la meninge que individualiza el cerebelo de otras partes del cerebro y lo separa del hueso del cráneo. Los cerebelos se desmenuzaron mediante cortes ortogonales con una cuchilla, y los pequeños fragmentos de tejido se resuspendieron en 30 mL de solución I. Tras una centrifugación a

10 baja velocidad, el tejido se resuspendió en 30 mL de solución II y se incubó a 37°C durante 10 min con agitación con el fin de producir la tripsinización del mismo. La reacción se detuvo añadiendo 15 mL de la solución IV. La suspensión se agitó ligeramente durante 1 minuto y después se centrifugó. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 mL de solución III.

15

El tejido se sometió entonces a una disgregación mecánica, disociando por aspiración-expulsión con una pipeta Pasteur, y se añadieron 5 mL de solución V. La suspensión se agitó y se dejó reposar verticalmente durante 5-10 min con el fin de permitir la sedimentación de posibles grumos de células no disociadas. Las células en suspensión se recogieron por centrifugación a baja velocidad durante 5 min y el precipitado obtenido se resuspendió en medio de cultivo Basal Eagle's Medium suplementado con 10% de suero fetal de ternera (inactivado por calor a 56°C durante

20 30 min), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 2 mM de glutamina y 25 mM de KCl.

20

Los grumos de células no disociadas se sometieron a un nuevo tratamiento de trituración con una pipeta Pasteur, y las células disociadas así obtenidas se añadieron a las anteriores. Las células se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/cm² sobre placas Petri de plástico pretratadas con poli-L-lisina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los cultivos se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO_2 al 5% y una humedad del 95%. Tras este proceso se obtuvieron 10-12 placas de cultivo de 35 mm de diámetro por cerebelo, y la preparación se llevó a cabo en aproximadamente 3 h. La utilización de placas de menor diámetro permitió aumentar considerablemente el rendimiento sin perjudicar la sensibilidad del método.

25

Con objeto de impedir la replicación de las células no neuronales se añadió, al cabo de 20-24 h, un agente citostático (arabinofuranósido de citosina, 10 μM). Tras ocho días en cultivo, las células estuvieron listas para su utilización, y pudieron mantenerse en cultivo durante al menos un mes añadiendo periódicamente glucosa (5,6 mM) al medio de cultivo y reponiendo la pérdida de agua debida a la evaporación. Después de ocho días en cultivo, más del 95% de la población neuronal pudo ser identificada morfológicamente como perteneciente al tipo de neurona granular, siendo el 5% restante neuronas GABAérgicas fundamentalmente. La proporción de astrocitos no superó el 3%.

35

Para la realización del bioensayo, se formaron 3 grupos con las placas que contienen las neuronas y se substituyó el medio de todas las células por una solución de Locke (NaCl 130 mM, Ca_2Cl 2,3 mM, KCl 5,6 mM, Hepes 8,4 mM, Mg_2Cl 1 mM, glucosa 5,6 mM) con el cloruro sódico substituido por cloruro de colina (solución Locke modificada). Las neuronas mantenidas en esta solución sin ión sodio no presentaron alteraciones significativas en su viabilidad durante al menos 10 h respecto a las mantenidas en una solución Locke normal. Se añadió (5R,10S)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imino hidrogeno maleato (MK-801, 1 μM) a todas las placas de neuronas para evitar la posible excitotoxicidad por glutamato endógeno o exógeno, a través del receptor NMDA. Cada concentración o dilución se ensayó por duplicado y se adicionó a cada grupo:

40

- Grupo 1. Concentraciones crecientes de DOM comercial (1 μM , 2 μM , 5 μM , 7 μM). En este grupo se incluyeron dos placas control que no contienen DOM.

45

- Grupo 2. 200 μL de cada una de las siguientes diluciones de la muestra problema: 0, 10, 50, 100.

50

- Grupo 3. El inhibidor de los receptores activados por ácido domoico GYKI a una concentración final de 50 μM y 15 min después 200 μL de cada una de las siguientes diluciones de la muestra problema: 0, 10, 50, 100. En este grupo se incluyeron 2 placas que contienen el inhibidor GYKI en ausencia de la muestra problema.

55

La neuroprotección observada en el grupo 3 respecto al grupo 2 indicó la presencia de DOM en la muestra problema, mientras que la comparación de los porcentajes de supervivencia entre el grupo 1 y el grupo 2 indicó su concentración.

60

La detección de DOM en la muestra problema se llevó a cabo tras 5-15 min de exposición observando los cultivos con microscopía óptica en contraste de fase y determinando la presencia de "toxicidad temprana", caracterizada por el hinchamiento y ennegrecimiento de las neuronas tratadas con DOM purificado o muestras problema contaminadas con DOM, en ausencia de GYKI. Con este procedimiento rápido se detectaron concentraciones iguales o superiores a 2 μM de toxina.

65

La cuantificación de DOM mediante el recuento de la supervivencia neuronal se llevó a cabo tras 9 h usando el siguiente protocolo:

- Se aspiró el medio de cultivo.

ES 2 327 023 A1

- Se adicionó 1 mL de la solución Locke modificada.

- Se aspiró y adicionó nuevamente 1 mL de la misma solución.

5 - Se aspiró y adicionó nuevamente 1 mL de solución Locke modificada que contiene 150 $\mu\text{g/mL}$ de diacetato de fluoresceína.

- Se incubó 4 min a 37°C.

10 - Se visualizó en un microscopio de epifluorescencia.

Mediante esta técnica, las células vivas y los circuitos neuronales funcionales aparecieron perfectamente teñidos con el colorante fluorescente, mientras que los núcleos de las células muertas se visualizaron como puntos rojos. Se fotografiaron al azar varios campos representativos del cultivo y se procedió al recuento tanto de las células vivas (de color verde), como de las muertas (de color rojo), calculando finalmente el porcentaje de supervivencia neuronal al dividir el número de neuronas vivas entre el número total de neuronas (vivas y muertas) en cada fotografía.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para la detección y cuantificación selectiva de DOM en células excitables, que comprende las siguientes etapas:

a) establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de distintas concentraciones de DOM a un primer grupo de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido;

10 b) establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un segundo grupo de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido;

15 c) establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un tercer grupo de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido y tratadas con una concentración efectiva de un inhibidor de los receptores activados por DOM;

20 d) detección de los efectos citotóxicos inducidos en cada grupo de células y cuantificación de los niveles de viabilidad celular mediante el uso de protocolos o métodos efectivos para estos propósitos;

e) comparación de los niveles de viabilidad entre los diferentes grupos de células para identificar al DOM como el agente causante de citotoxicidad y determinar su concentración en la muestra problema.

25 2. Método, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el ión sodio extracelular se sustituye mediante la reducción o eliminación del cloruro sódico extracelular y la adición de una concentración equivalente a la eliminada de cloruro de colina.

30 3. Método, según reivindicación 2, **caracterizado** porque el cloruro sódico extracelular se sustituye entre 10 y 30 min antes de la adición de la toxina o el bloqueante.

35 4. Método, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el inhibidor de los receptores activados por DOM es CNQX.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 327 023

② Nº de solicitud: 200901255

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.05.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/12** (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2047403 A1 (UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 16.02.1994, todo el documento.	1
A	LARM, J.A. et al. "Neurotoxin Domoic Acid produces cytotoxicity via kainate and AMPA-sensitive receptors in cultured cortical neurones". Neurochem Int N° 5, pp 677-682, 1997. Todo el documento.	1,4
A	JAKOBSEN, B. et al. "Domoic acid neurotoxicity in hippocampal slice cultures". Amini Acids (2002) 23: 37-44. Todo el documento.	1
A	SCHMUED, L.C. et al. "Fluoro-jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration". Toxicol Pathol 2000, 28,91, pp 91-99. Todo el documento.	1

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

23.09.2009

Examinador

I. Galíndez Labrador

Página

1/4

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

G01N, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, FSTA, BIOSIS, NPL, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SÍ
	Reivindicaciones	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	ES 2047403 A1	16-02-1994
D02	Neurochem Int Vol 31, N° 5, pp 677-682	1997
D03	Amino Acids 23: 37-44	2002
D04	Toxicologic Pathology , 28, 91, pp 91-99	2000

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

El documento a estudio versa sobre un método de detección y cuantificación selectiva de ácido domoico (DOM) mediante sus efectos tóxicos sobre células excitables, neuronas, cuyas etapas principales son:

- establecimiento de una relación dosis respuesta mediante la adición de distintas concentraciones de DOM a un primer grupo de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido por cloruro de colina
- adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un segundo grupo de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido por cloruro de colina
- adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un tercer grupo de células excitables en un medio extracelular con el ión sodio total o parcialmente sustituido por cloruro de colina y tratadas con un inhibidor de los receptores activados por DOM. Tales inhibidores son CNQX, inhibidores de receptores no-NMDA de tipo AMPA o GYKI.
- detección de los efectos citotóxicos inducidos en las células mediante microscopía de contraste de fase, microscopía de epifluorescencia y colorantes vitales, y cuantificación de los niveles de viabilidad celular, comparando dichos niveles en cada grupo de células para determinar la concentración de DOM en la muestra problema.

Con este método es posible detectar concentraciones de DOM en la muestra problema que no serían detectables en presencia de sodio en el medio extracelular. Tal sustitución de sodio no se da en ninguno de los documentos mencionados como Estado de la Técnica anterior.

El documento D01 mencionado en el Informe de Búsqueda, de los mismos solicitantes, hace referencia al análisis de biotoxinas contaminantes de mejillones, almejas y ostras, utilizando cultivos primarios de neuronas de cerebelo de rata. Las biotoxinas estudiadas en este caso son el ácido okadaico y el ácido domoico. Se añade a los cultivos un antagonista específico: MK801, que elimine o reduzca drásticamente el efecto tóxico sobre las neuronas del glutamato y el aspartato existentes en la muestra problema, evaluándose después morfológicamente el daño neuronal.

El D02 evalúa la morfología y la viabilidad de neuronas en cultivo expuestas a la acción del ácido domoico, que ejerce su neurotoxicidad a través de receptores determinados. En este caso se utiliza el antagonista de receptor no-NMDA: CNQX. Los cultivos se examinan al microscopio de contraste de fase.

El D03 estudia la neurotoxicidad del ácido domoico en células del hipocampo, evaluando la degeneración celular por la fijación neuronal de un colorante fluorescente.

El D04 estudia nuevos colorantes, derivados aniónicos de la fluoresceína, : Fluoro-Jade, para detectar la neurotoxicidad del ácido domoico.

A la vista del Estado de la Técnica, las reivindicaciones 1-4 del documento a estudio cumplen los requisitos de Novedad y Actividad Inventiva, de acuerdo con los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986, de 20 de Marzo, de Patentes



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N° de publicación : ES 2 327 023 A1

② Número de solicitud: 200901255

CORRECCIÓN DE ERRATAS DEL FOLLETO DE PATENTE

Pág./Línea	Omisión	Corrección
7/35	Faltan reivindicaciones de la 5 a la 13	Reivindicaciones 5 a 13

5. Método, según reivindicación 1, caracterizado porque el inhibidor de los receptores activados por DOM es un inhibidor de los receptores no-NMDA de tipo AMPA.
6. Método, según reivindicación 5, caracterizado porque el inhibidor de los
5 receptores activados por DOM es GYKI.
7. Método, según reivindicación 1, caracterizado porque las células excitables son neuronas del sistema nervioso central.
8. Método, según reivindicación 7, caracterizado porque las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario.
- 10 9. Método, según reivindicación 8, caracterizado porque la detección de los efectos citotóxicos se realiza mediante la observación de los cultivos celulares con microscopía en contraste de fase.
10. Método, según reivindicación 9, caracterizado porque la detección de los efectos citotóxicos del DOM se realiza transcurridos entre 5 y 15 min desde las
15 adiciones.
11. Método, según reivindicación 8, caracterizado porque la detección de los efectos citotóxicos se realiza utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia.
12. Método, según reivindicación 8, caracterizado porque la cuantificación de los
20 niveles de viabilidad celular se realiza utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia.
13. Método, según reivindicación 12, caracterizado porque la cuantificación de los efectos citotóxicos se realiza transcurridas 9 h desde las adiciones.



CORRECCIÓN DE ERRATAS DEL FOLLETO DE PATENTE (IET)

- 11 N° de publicación : ES 2 327 023 A1
21 Número de solicitud: 200901255
43 Fecha de publicación de la solicitud: 13.05.2009
51 Int. Cl.⁷: **G01N 33/12** (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

Pág/Línea	Errata/Omisión	Corrección
1/1	1º Documento. Reivindicaciones citadas 1	1º Documento. Reivindicaciones citadas 1,7-8
1/2	2º Documento. Reivindicaciones citadas 1,4	2º Documento. Reivindicaciones citadas 1,4,7-9
1/4	4º Documento. Reivindicaciones citadas 1	4º Documento. Reivindicaciones citadas 1, 7-8, 11-12
1	Fecha de realización del informe 23.09.2009	Fecha de realización del informe 04.12.2009
3	Novedad, Reivindicaciones 1-4	Novedad, Reivindicaciones 1-13
3	Actividad inventiva. Reivindicaciones 1-4	Actividad inventiva. Reivindicaciones 1-13
4	Último párrafo Opinión escrita: ...reivindicaciones 1-4...	Último párrafo Opinión escrita: ...reivindicaciones 1-13...