

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
10 de Febrero de 2005 (10.02.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/012543 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: **C12Q 1/44**,
G01N 21/64, A61K 31/35, A61P 11/06, 37/08, 35/00

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2004/000343

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de Julio de 2004 (21.07.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 2003 01773 25 de Julio de 2003 (25.07.2003) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COM-
POSTELA** [ES/ES]; Edificio CACTUS - CIIT - Campus
sur, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

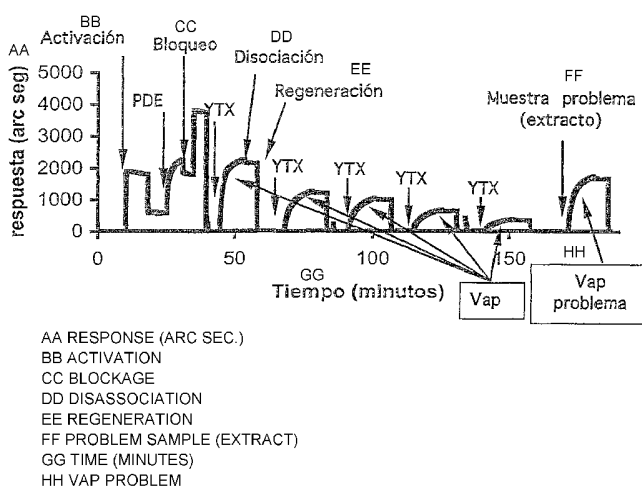
(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BOTANA
LÓPEZ, Luis Miguel** [ES/ES]; UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA, Depto de Farmacología
- Fde de Veterinaria, E-27002 Lugo (ES). **ALFONSO
RANCAÑO, Amparo** [ES/ES]; UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA, Depto de Farma-
cología - Fde de Veterinaria, E-27002 Lugo (ES). **PAZOS
GULDRÍS, María José** [ES/ES]; UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, Depto de Farma-
cología - Fde de Veterinaria, Lugo, 27002. **RODRÍGUEZ
VIEYTES, Mercedes** [ES/ES]; UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA, Depto de Farma-
cología - Fde de Veterinaria, E-27002 Lugo (ES). **LOZA
GARCÍA, María Isabel** [ES/ES]; UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA, Depto de Farmacia
e Tecnología Farmacéutica - Fde de Farmacia, E-15782
Santiago de Compostela (ES). **VIEITES BAPTISTA DE**

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: QUANTITATIVE METHOD FOR DETECTING YESSOTOXINS IN FISH PRODUCTS BASED ON THE ACTIVA-
TION CAUSED BY THE TOXIN IN CELLULAR PHOSPHODIESTERASE AND THERAPEUTIC USEFULNESS OF SAID
ACTIVATION

(54) Título: MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETECCIÓN DE YESOTOXINAS EN PRODUCTOS PESQUEROS BA-
SADO EN LA ACTIVACIÓN QUE LA TOXINA PRODUCE EN LAS FOSFODIESTERASAS CELULARES Y UTILIDAD TE-
RAPÉUTICA DE ESTA ACTIVACIÓN.



(57) Abstract: The invention relates to a quantitative method for detecting yessotoxins in fish products based on the activation caused by the toxin in cellular phosphodiesterase and therapeutic usefulness of said activation. The cellular target of yessotoxin (YTX) and analogues is the activation of phosphodiesterases (PDEs). The PDEs-YTX union emits a measurable signal. The union can be quantified by means of an affinity biosensor or fluorescence. The biosensor detects bimolecular interactions and makes it possible to determine the presence of YTX due to its interaction with PDEs. Plate fluorescence makes it possible to determine variations in the speed of degradation of fluorescent derivative anthraniloil-AMPc. The speed with which the PDEs degrade this molecule increases in the presence of YTX. The YTX inhibits the immunological activation of rat mastocytosis and induces a cytotoxic effect in human hepatocarcinoma cells, which provides two therapeutic utilities of YTXs as anti-allergic and anti-tumoral compound.

[Continúa en la página siguiente]

WO 2005/012543 A3



SOUSA, Juan Manuel [ES/ES]; ANFACO, Crtá Colexio Universitario, 16, E-36310 Vigo (ES).

RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

(88) **Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:** 17 de Marzo de 2005

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) **Resumen:** Método cuantitativo para la detección de yesotoxinas en productos pesqueros basado en la activación que la toxina produce en las fosfodiesterasas celulares y utilidad terapéutica de esta activación. La diana celular de la yesotoxina (YTX) y análogos es la activación de las fosfodiesterasas (PDEs). La unión PDEs-YTX da una señal medible. La unión se puede cuantificar mediante un biosensor de afinidad o por fluorescencia. El biosensor detecta interacciones biomoleculares y permite determinar la presencia de YTX por su interacción con las PDEs. Mediante la fluorescencia en placa se determinan las variaciones en la velocidad de degradación del derivado fluorescente antraniloil-AMPc. La velocidad con que las PDEs degradan esta molécula se incrementa en presencia de YTX. La YTX inhibe la activación inmunológica de mastocitos de rata e induce un efecto citotóxico en células de hepatocarcinoma humano lo que implica dos utilidades terapéuticas de las YTXs como compuesto antialérgico y antitumoral.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C12Q1/44, G01N21/64, A61K31/35, A61P11/06, 37/08, 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12Q, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, CAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	ALFONSO, A. et al.: "A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases", Anal. Biochem. (01.03.2004) vol. 326, n° 1, pp.: 93-99, ISSN 0003-2697, the whole document .	1, 4-7
X	LEIRA, F. et al.: "Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line", Toxicology in Vitro (2002), vol. 16, pp.: 23-31, the whole document	10
A	ALFONSO, A. et al.: "Determination of phosphodiesterase activity in rat mast cells using the fluorescent cAMP analogue anthraniloyl cAMP", Cellular Signalling (1995), vol. 7, n° 5, pp.: 513-518, the whole document	3-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2005 (15.01.05)

Date of mailing of the international search report

25 January 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000343

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAMSTAD, H. et al.: "Repeatability and validity of a fluorimetric HPLC method in the quantification of yessotoxin in blue mussels (<i>Mytilus edulis</i>) related to the mouse bioassay", <i>Toxicon</i> (2001), vol. 39, pp.: 1393-1397, the whole document .	1-7
A	ALFONSO, A. et al.: "Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes", <i>Biochem. Pharmacol.</i> (15.01.2003), vol. 65, pp.: 193-208, the whole document	1-7
A	US 2003/0138856 A1 24.07.2003 (ROSSINI, G.P.), the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2004/000343

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1 to 7 relating to a method for detecting yessotoxins (claims 1 to 6) or for detecting activities equivalent to yessotoxin (claim 7); invention 2: claim 8 relating to a method "for using PDE activation in HTS protocols: detection of a high yield of pharmacological activity"; invention 3: claim 9 relating to the use of the yessotoxins as an antiallergenic or antiasthmatic drug on mast cells; invention 4: claim 10 relating to the use of the yessotoxins as an antitumour agent on neoplastic cells.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/000343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003138856 A	24.07.2003	ITMI 20001474	31.12.2001
		CA 2414594 A	10.01.2002
		WO 0203060 A	10.01.2002
		AU 7752201 A	14.01.2002
		NO 20026065 A	10.02.2003
		EP 1297335 A	02.04.2003
		EP 20010955326	29.06.2001
		IT 1318605 B	27.08.2003
		NZ 523840 A	29.08.2003
		JP 2004502937 T	29.01.2004

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/000343

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12Q1/44, G01N21/64, A61K31/35, A61P11/06, 37/08, 35/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

CIP⁷ C12Q, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, CAS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P, X	ALFONSO, A. et al.: "A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases", Anal. Biochem. (01.03.2004) vol. 326, nº 1, pp.: 93-99, ISSN 0003-2697, todo el documento.	1, 4-7
X	LEIRA, F. et al.: "Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line", Toxicology in Vitro (2002), vol. 16, pp.: 23-31, todo el documento	10
A	ALFONSO, A. et al.: "Determination of phosphodiesterase activity in rat mast cells using the fluorescent cAMP analogue anthraniloyl cAMP", Cellular Signalling (1995), vol. 7, nº 5, pp.: 513-518, todo el documento	3-5

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

15. Enero.2005 (15.01.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

25 ENF 2005 25. 01. 2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Maquedano Herrero

Nº de teléfono + 34 91 3495474

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES 2004/000343

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	RAMSTAD, H. et al.: "Repeatability and validity of a fluorimetric HPLC method in the quantification of yessotoxin in blue mussels (<i>Mytilus edulis</i>) related to the mouse bioassay", <i>Toxicon</i> (2001), vol. 39, pp.: 1393-1397, todo el documento.	1-7
A	ALFONSO, A. et al.: "Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes", <i>Biochem. Pharmacol.</i> (15.01.2003), vol. 65, pp.: 193-208, todo el documento	1-7
A	US 2003/0138856 A1 24.07.2003 (ROSSINI, G.P.), todo el documento	1-7

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000343

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17(2)(a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Invención 1: reivindicaciones 1-7 relativas a un método para la detección de yesotoxinas (reivindicaciones 1-6) o para detectar actividades equivalentes a la yesotoxina (reiv. 7); invención 2: reivindicación 8 relativa a un método "para emplear la activación de PDEs en protocolos de HTS: detección de alto rendimiento de actividades farmacológicas"; invención 3: reivindicación 9 relativa al uso de las yesotoxinas como antialérgico o antiasmático vía mastocitos; invención 4: reivindicación 10 relativa al uso de las yesotoxinas sobre células neoplásicas como antitumoral.

1. ☒ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una protesta por parte del solicitante.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000343

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 2003138856 A	24.07.2003	ITMI 20001474	31.12.2001
		CA 2414594 A	10.01.2002
		WO 0203060 A	10.01.2002
		AU 7752201 A	14.01.2002
		NO 20026065 A	10.02.2003
		EP 1297335 A	02.04.2003
		EP 20010955326	29.06.2001
		IT 1318605 B	27.08.2003
		NZ 523840 A	29.08.2003
		JP 2004502937 T	29.01.2004