

(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
8 de agosto de 2013 (08.08.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/113296 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/04 (2006.01) C12Q 1/37 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2012/000009
- (22) Fecha de presentación internacional:
27 de diciembre de 2012 (27.12.2012)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
CU/P/2011/0243
27 de diciembre de 2011 (27.12.2011) CU
- (71) Solicitantes: CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO DE LOS MEDICAMENTOS(CIDEM) [CU/CU]; Avenida 26 No.1605 e/ Boyeros y Puentes Grandes Nuevo Vedado, Plaza, La Habana 10400 (CU). CENTRO DE INVESTIGACIONES MARINAS [CU/CU]; Calle 16 e/ 1ra y 3ra No. 114 Miramar Playa, La Habana 11300 (CU).
- (72) Inventores; e
- (71) Solicitantes : PERDOMO MORALES, Rolando [CU/CU]; Porvenir # 563 apto D entre Tejar y Dolores. Lawton. 10 de Octubre. CP 10700, La Habana 10700 (CU). MONTERO ALEJO, Vivian [CU/CU]; San Francisco No. 209 entre San Anastasio y Lawton. Lawton. 10 de Octubre CP 10700, La Habana 10700 (CU). PERERA BRAVET, Erick [CU/CU]; D´Strampes No.168 entre Estrada Palma y Libertad, Santos Suárez. 10 de Octubre. CP 10500, La Habana 10700 (CU). CALERO CARBONELL, Jorge Ernesto [CU/CU]; San José 1260 apto. 1 e/ Mazón y Ronda. Plaza de la Revolución. CP 10600, La Habana 10600 (CU). PARDO RUIZ, Zenia [CU/CU]; Calle 124 # 7120 entre 71 y 81. Marianao. CP 11500, La Habana 11500 (CU). PORTO VERDECIA, Marlene [CU/CU]; Ave. 19A # 20804 entre 208 y 210. Reparto Atabey. Playa. CP 11300, La Habana 11300 (CU). VEGA HURTADO, Yamile [CU/CU]; Calle Santovenia #113 entre Patria y Lindero. Cerro. CP 10600, La Habana 10600 (CU).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: COMPOSITION FROM LOBSTER HEMOCYTE EXTRACT FOR DETECTION OF LIPOPOLYSACCHARIDES, PEPTIDOGLYCANS AND 1,3-BETA-D-GLUCANS

(54) Título : COMPOSICIÓN A PARTIR DE EXTRACTO DE HEMOCITOS DE LANGOSTA PARA LA DETECCIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDOS, PEPTIDOGLICANOS Y 1,3-β-D-GLUCANOS.

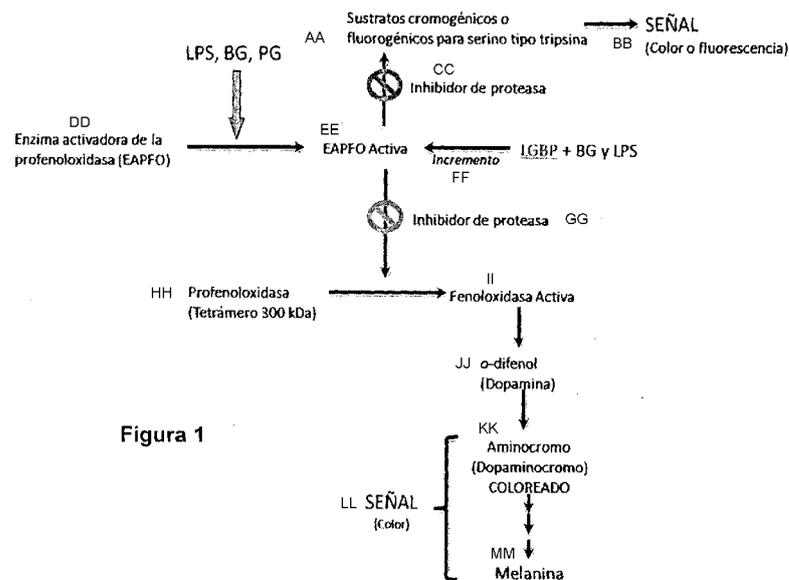


Figura 1

(57) Abstract: The present invention relates to the field of pharmaceuticals, chemistry and biotechnology and, in particular, to a method for preparing a composition for detecting and measuring the concentration of endotoxins or lipopolysaccharides, peptidoglycans and (1,3)-β-D-glucans, using a lobster hemocyte extract as starting material, to the modifications of the composition for increasing the sensitivity thereof, and to the methods for measuring endotoxins, peptidoglycans and (1,3)-β-D-glucans using said composition.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]



WO 2013/113296 A1



- (74) **Mandatario:** VÁZQUEZ D' ALVARÉ, Dánice; Ave. Ira. No.1001 Esq. a 10, Miramar, Playa, La Habana 11300 (CU).
- (81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

La presente invención se relaciona con la farmacéutica, la química y la biotecnología, y en particular con un proceso para preparar una composición para detectar y medir la concentración de endotoxinas o lipopolisacáridos, peptidoglicanos y (1,3)- β -D-glucanos, con un extracto de los hemocitos de las langosta como material de partida, las modificaciones a la composición para incrementar su sensibilidad, así como los procesos para medir endotoxinas, peptidoglicanos y (1,3)- β -D-glucanos empleando dicha composición.

COMPOSICIÓN A PARTIR DE EXTRACTO DE HEMOCITOS DE LANGOSTA PARA LA DETECCIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDOS, PEPTIDOGLICANOS Y 1,3-β-D-GLUCANOS.

5

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se relaciona con las ramas Química, Farmacéutica y Biotecnológica, y en particular con la detección de microorganismos, y de estructuras asociadas a su pared celular como lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas de bacterias Gram negativas, peptidoglicanos (PG) de bacterias Gram negativas y positivas, y (1,3)-β-D-glucanos (BG) de hongos y levaduras. La presente invención también tiene aplicación en la evaluación de contaminación microbiana en aguas ultrapuras, como la empleada en la industria de los semiconductores, y como medio de diagnóstico para el laboratorio clínico.

15

El sistema inmune innato proporciona mecanismos de respuesta muy efectivos para la detección de microorganismos a través del reconocimiento de estructuras moleculares conservadas y compartidas por un gran número de microbios. Estas estructuras denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs), no se encuentran en el huésped y son esenciales para la sobrevivencia o patogenicidad de los microorganismos. Entre los PMAPs mejor caracterizados están los LPS, BG y PG, entre otros [Medzhitov y Janeway, *The New England Journal of Medicine* 343(5):338-344, 2000].

25

Se ha establecido por mucho tiempo que las endotoxinas son el PMAP o pirógeno exógeno más relevante para la industria farmacéutica y biotecnológica por su alta potencia biológica, ubicuidad, resistencia a métodos convencionales de esterilización, y la alta probabilidad relativa de su presencia en soluciones parenterales [Williams K.L. Endotoxin Relevance and Control Overview. en Williams K.L (eds). *Endotoxins, Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation*. Tercera edición. Informa Healthcare, New York, London. 2007, 27-46]. Además, son los principales responsables del shock endotóxico asociado con la septicemia causada por bacterias Gram negativas, y constituyen la principal señal de alarma de la presencia de estas bacterias para el

30

sistema inmune innato. El acceso de los LPS a la circulación sanguínea produce profundos efectos deletéreos en la salud humana, como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), fallo de múltiples órganos (FMO), shock, y muerte [Opal SM, Contrib Nephrol 167, 14-24, 2010; Hodgson JC, J Comp Pathol 135, 157-175, 2006].

Para la detección de endotoxinas bacterianas, y particularmente en el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos inyectables, se ha utilizado ampliamente el método del Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) (US4107077, US4279774, US4322217, US3954663, US4038029, US4188264, US4510241, US5310657).

El reactivo LAL se prepara a partir de un extracto o lisado de los amebocitos presentes en la hemolinfa de los cangrejos herradura. Está compuesto por una cascada de enzimas serino peptidasas tipo tripsina, que se activa por las endotoxinas y por los (1,3)- β -D-glucanos a través del Factor C y el Factor G, respectivamente. El reactivo se basa en la respuesta de coagulación de los cangrejos herraduras y forma parte de su sistema inmune innato. No se ha encontrado hasta la fecha un sistema similar en otra especie de invertebrado [Iwanaga S y Lee BL, J Biochem Mol Biol 38, 128-150, 2005].

Se han desarrollado reactivos LAL específicos para endotoxinas separando el factor G o factor sensible a (1,3)- β -D-glucanos del resto de los componentes de la cascada enzimática del LAL (US5401647, US5605806, US20030104501), o inhibiendo su activación (US5047353, US5155032, US547984, US5702882, US5998389, US5179006).

Los cangrejos herraduras son artrópodos marinos conocidos como fósiles vivientes puesto que han evolucionado muy poco en los últimos 300 millones de años. Existen cuatro especies de cangrejos herradura de las cuales se puede obtener un reactivo de propiedades similares.

Las especies *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* y *Carcinoscorpius rotundicauda* se encuentran exclusivamente en el continente asiático. La escasa población de las dos últimas nunca ha sostenido la producción del reactivo. Por otra parte, el *Tachypleus tridentatus*, comúnmente conocido como el cangrejo herradura chino o

cangrejo herradura de tres espinazos, tuvo una densidad poblacional alta a lo largo de la costa de China, especialmente en el norte del Mar del Sur de China y en la región de las islas de Hainan. Sin embargo, estudios recientes de *T. tridentatus* en Taiwán, Japón, Hong Kong, Tailandia y China continental, han indicado que las poblaciones se han reducido drásticamente casi hasta la extinción. Las principales causas han sido la sobrepesca y la contaminación de los mares.

Debido a la baja densidad poblacional de las especies asiáticas, el reactivo LAL comercializado actualmente se obtiene del *Limulus polyphemus*, también conocido como cangrejo herradura americano, cangrejo cacerola o cangrejo bayoneta. El *Limulus* habita en la costa del Atlántico de los Estados Unidos, desde el norte de Maine hasta la península de Yucatán y el golfo de México. En la Bahía de Delaware se encuentra la mayor población conocida de esta región, en la cual se ha comprobado un drástico declive en su población y actividad de desove [Widener JW y Barlow RB, Biological Bulletin (197): 300-302, 1999]. Las causas principales han sido la pérdida de hábitat y su empleo como carnada en la pesca de ostras y anguilas [Rudloe A, Journal of Invertebrate Pathology (42):167-176, 1983; Botton ML, Biologist (49): 193-198, 2002]. La mortalidad debido al proceso de desangre para la preparación del reactivo LAL oscilaba alrededor de un 15 % [Walls EA y Berkson J, Virginia Journal of Science 51(3):195-198, 2000], sin embargo se ha duplicado en los últimos tiempos, incidiendo en el deterioro de la población.

De acuerdo con la Organización de Agricultura y Alimentos (FAO), debido al alto precio del reactivo LAL, el estrecho rango de distribución del cangrejo herradura, y el tiempo extremadamente largo que toman para alcanzar la madurez sexual, es fácil reducir la población de cangrejos herraduras por debajo de su tasa de recuperación. Las cuatro especies están en peligro de extinción y recogidos en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN, de sus siglas en inglés).

Considerando la crítica situación poblacional actual de los cangrejos herraduras, la Comisión de Pesquería Marítima de los Estados del Atlántico de los Estados Unidos (ASMFC, de sus siglas en inglés), ha regulado varios aspectos relativos a la pesca y explotación del *Limulus*. Con respecto a la industria del LAL, estableció que los especímenes no pueden ser desangrados hasta la muerte y que deben ser regresados

sanos y marcados al sitio de captura en un plazo menor de 72 horas. También estableció cuotas anuales de animales a emplear para producir LAL, y que la mortalidad asociada a la manipulación de los animales no podía superar el 15 % de esta cuota.

5
Mundialmente se ha planteado la necesidad del estudio de alternativas para la detección de endotoxinas y otros pirógenos antes de que la fuente de materia prima, la hemolinfa del *Limulus*, no esté más disponible. La regulación de cuotas anuales de cangrejos herraduras que pueden ser empleados por la industria para producir reactivo
10 LAL, mientras que su demanda continúa en franco ascenso, aparejado a la recesión de la población, indican que no es posible sostener el incremento en captura y desangre de cangrejos herraduras para producir reactivo LAL.

Las patentes US4229541, US5082782, US6790659 y US20030186432 describen el
15 desarrollo de estrategias para el cultivo in vitro de amebocitos como posible alternativa a la hemolinfa de los cangrejos herraduras como fuente natural de amebocitos para preparar LAL. Hasta la fecha no existe reactivo comercial obtenido por esta vía, ni proyecto para su obtención.

20 Por otra parte, se ha logrado con éxito clonar y producir por vía recombinante a través de una novedosa metodología el Factor C sensible a endotoxinas del cangrejo herradura de Singapur, *Carcinoscorpius rotundicauda* (US5712144, US5858706, US5985590), estableciéndose su uso para la detección y cuantificación de LPS o endotoxinas de manera similar al reactivo LAL natural (US6645724). Se han patentado
25 formulaciones de este reactivo que combinan el Factor C recombinante y detergentes (US20030054432), o Factor C recombinante u obtenido por purificación de la fuente natural en formulaciones que presentan mayor sensibilidad y estabilidad (US20040235080). Sin embargo, al carecer de las otras enzimas presentes en el reactivo natural, estas formulaciones carecen de la sensibilidad proporcionada por el
30 efecto amplificador de la cascada enzimática, lo cual se ha resuelto parcialmente mediante el empleo de sustratos fluorescentes más sensibles. También se han producido por vía recombinante otros componentes del reactivo LAL como la enzima procoaguladora (US20090208995) y el Factor G (US2010011266).

Tanto el LAL como el Factor C recombinante detectan LPS, pero no detectan peptidoglicanos. Sin embargo, estudios recientes evidencian la urgencia de detectar y controlar también el contenido de peptidoglicanos en formulaciones para uso parenteral, y en otras soluciones y accesorios que deban ser no pirogénicos. Los PG son componentes invariables de la pared celular bacterias Gram positivas y Gram negativas, y son el principal responsable de la respuesta inflamatoria y sus nocivas consecuencias para la salud provocada por los organismos Gram positivos, incluyendo el shock séptico [Silhavy TJ y cols., Cold Spring Harbor perspectives in biology 2, a000414, 2010]. Al igual que los LPS, los PG son capaces de inducir la liberación de citocinas proinflamatorias [Verhoef J y Mattsson E, Trends in Microbiology 3:136-140, 1995; Teti G, Trends in Microbiology 7:100-101, 1999], son pirogénicos, liberados al medio durante el crecimiento y muerte de las bacterias, y son resistentes a los medios ordinarios de esterilización [Moesby L, European Journal of Pharmaceutical Science 35, 442-446, 2008]. Debido a las similitudes entre los LPS y los PG, se ha propuesto que a ambos se les otorgue la misma importancia [Myhre AE y cols, Shock 25(3):227-35, 2006].

Además, la presencia de PG es capaz de sensibilizar marcadamente la respuesta inflamatoria provocada por los LPS por sinergismo [Takada H y cols, Journal of Endotoxin Research 8, 337-342, 2002; Hadley JS y cols, Infection and Immunity, 73: 7613-7619, 2005; Wray GM, Shock,15(2):135-42, 2001; Shikama Y y cols, Innate Immunity, 17(1):3-15, 2009] o por efecto aditivo [Sprong T, Journal of Leukocyte Biology,70:283-288, 2001].

Al igual que la cascada del LAL para los cangrejos herraduras, el sistema activador de la profenoloxidasa (sistema proFO) es un componente esencial de la respuesta inmune innata humoral en invertebrados [Cerenius y cols, Trends Immunol. (29): 263-271, 2008]. La capacidad del sistema proFO de reconocer PMAP a través de un biosensor(es) y producir una respuesta, que puede ser visible y cuantificable mediante la determinación de la actividad enzimática de la EAPFO o de la fenoloxidasa, lo convierte en un candidato atractivo para el desarrollo de un reactivo o composición para la detección de microorganismos y sus PMAPs.

El sistema proFO está compuesto por un complejo arreglo de proteínas que incluye proteínas reconocedoras de PMAPs, la enzima activadora de la profenoloxidasas (EAPFO), y la profenoloxidasas. Se ha descrito en varios artrópodos que el sistema proFO se activa en presencia de pequeñas cantidades de ciertos PMAPs a través de un mecanismo que no ha sido dilucidado completamente. En general, se conoce que en presencia de PMAPs la EAPFO se activa y que, mediante un ataque proteolítico, convierte la profenoloxidasas (zimógeno inactivo) en fenoloxidasas activa. La fenoloxidasas oxida monofenoles y o-difenoles a aminocromos, iniciando así la síntesis de melanina.

En la patente US 497052, se describe el desarrollo y uso de un reactivo obtenido a partir del plasma de larvas de gusanos de seda (SLP, de las siglas en ingles de silkworm larvae plasma) para la detección de BG y PG mediante la determinación de la actividad fenoloxidasas o la actividad peptidasas de la EAPFO. Ahí se describen modificaciones del reactivo que suponen la determinación específica de BG o PG. Basados en este invento, la patente US 5585248 describe el empleo de sustratos cromogénicos sintéticos más sensibles para la detección de la actividad EAPFO. En la patente US 6274565 B1, se protege una modificación del reactivo que permite la detección específica de PG mediante la inhibición de la ruta de activación mediada por BG. EL ensayo SLP parece ser particularmente útil en la detección de contaminación bacteriana en plaquetas (US 7598054 B2).

También haciendo uso del sistema proFO, las patentes US 6987002 B2 y US 2002/0197662 A1 describen un reactivo obtenido de la hemolinfa completa de larvas de insectos (*Tenebrio molitor* u *Holotrichia diomphalia*) para la detección y cuantificación de (1,3)- β -D-glucanos.

El sistema proFO de la langosta espinosa *P. argus* se encuentra en los hemocitos [Perdomo-Morales y cols, Fish Shellfish Immunol (23):1187-1195, 2007], y es capaz de activarse en presencia de pequeñas concentraciones de PG, BG y LPS. Existen al menos dos peptidasas relacionadas con la activación de la proFO, una dependiente de calcio y la otra no. El sistema proFO está regulado por un inhibidor de peptidasas de 5 kDa y carga neta positiva. La separación del inhibidor del resto de los componentes activos del sistema incrementa sustancialmente la sensibilidad de la respuesta frente a PG, BG y LPS. El sistema proFO de la langosta también incluye una proteína

reconocedora de LPS y BG (LGBP, de las siglas en ingles para lipopolysaccharide and (1,3)- β -D-glucan binding protein), la cual se localiza en la fracción plasmática de la hemolinfa. Una vez que la LGBP se une a LPS o BG se activa y es capaz de incrementar la actividad fenoxidasa porque potencia la actividad peptidasa de la EAPFO en el LHL.

La composición, que aquí se presenta por primera vez, consiste en un extracto acuoso de los hemocitos de la hemolinfa de las langostas, denominado en lo adelante como Lisado de Hemocitos de la Langosta (LHL). El componente activo de interés en el LHL es el sistema proFO, y la composición está dirigida a la detección y cuantificación de LPS, PG y BG. El término langosta o langostas en este documento se refiere a las especies incluidas dentro de los Infraordenes Astacidea, Palinura (Achelata) y Thalassinidea, Suborden Reptantia (Macrura), Orden Decapoda, Clase Crustacea, Phylum Arthropoda.

Aunque las langostas están sometidas también a la sobrepesca en algunas regiones, son especies muy abundantes que representan el principal recurso pesquero de muchos países (ej. Cuba, Brasil, Australia, Estados Unidos, entre otros). La producción de la composición que presentamos no afecta la disponibilidad de estos animales para el consumo humano como alimento pues la hemolinfa es un subproducto que se desecha. La langosta es uno de los crustáceos más grandes, y presenta un volumen significativo de hemolinfa de fácil obtención.

Para la preparación del LHL, la hemolinfa se extrae del animal empleando un anticoagulante adecuado que evite la coagulación del plasma, pero que preferentemente evite tanto la coagulación plasmática como la activación y coagulación celular. Como anticoagulantes pueden utilizarse una solución isotónica que contenga metil derivados de las xantinas como la teofilina, teobromina o cafeína, o sus sales, o reactivos capaces de modificar grupos sulfhidrilos (-SH) como la cisteína, iodoacetamida y la N-etilmaleimida. También son adecuadas soluciones que contengan agentes quelantes y que presenten un pH entre 4.5-8 proporcionado por un tampón adecuado, por ejemplo, el anticoagulante de Alsever modificado (citrato de sodio 27 mM, NaCl 336 mM, glucosa 115 mM, EDTA 9 mM, pH 7) o el anticoagulante citrato-EDTA (NaCl 0.4 M, glucosa 0.1 M, citrato trisódico 30 mM, ácido cítrico 26 mM y EDTA

10 mM, pH 4.6). Preferentemente se emplea el anticoagulante de Alsever modificado a una proporción hemolinfa: anticoagulante 1:1 (v/v).

5 Los hemocitos se separan del plasma por centrifugación a 700 g por 10 min a 4°C. El plasma (sobrenadante) se desecha, y los hemocitos sedimentados se lavan para eliminar restos de componentes plasmáticos. Para ello los hemocitos se resuspenden con anticoagulante a un volumen no mayor al correspondiente de la mezcla inicial hemolinfa: anticoagulante, seguido de otro ciclo idéntico de centrifugación. Se realizan al menos dos lavados. El botón de hemocitos lavados se suspende en tampón de lisis, 10 preferentemente con un volumen entre 1 y 10 ml. El tampón de lisis puede contener NaCl a una concentración entre 0.001 y 600 mM, agentes capaces de estabilizar enzimas (estabilizantes) y un pH entre 5 y 8.5, proporcionado por un tampón adecuado que no secuestre cationes divalentes. Preferentemente, se emplea Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 450 mM.

15 Los hemocitos se desintegran empleando un método de ruptura adecuado entre los usados comúnmente en bioquímica para la preparación de extractos celulares, que pueden ser mecánicos, químicos o enzimáticos. Considerando las características de estas células, los métodos de ruptura más adecuados son el shock osmótico, 20 congelación/descongelación, homogenización con agitación (Vortex) o manual (Dounce y Potter-Elvehjem), y ultrasonido. El homogenato de hemocitos se centrifuga a 13 000 rpm a 4°C por 30 min para obtener el sobrenadante clarificado o LHL.

La presente invención incluye un procedimiento para incrementar la sensibilidad de la 25 respuesta del sistema proFO en el LHL frente a LPS, PG y BG. Esta modificación se basa en la eliminación o inactivación de inhibidores de peptidasa presentes en el LHL. El inhibidor se puede separar mediante técnicas basadas en la separación por tamaño y forma molecular, carga o afinidad. Preferentemente se van a emplear técnicas de exclusión molecular como la cromatografía de gel filtración, la ultrafiltración y la 30 diafiltración. Para la gel filtración se deben emplear resinas cromatográficas con un límite máximo de exclusión entre 10 y 60 kDa, preferentemente 30 kDa. El fraccionamiento cromatográfico se realiza a un flujo lineal entre 3 y 60 cm/h, preferentemente a 9 cm/h, y se aplica un volumen de muestra entre el 1 y el 5 % del volumen total de la columna, preferentemente el 3 %. En estas condiciones, el resto de 35 las proteínas activas del sistema proFO eluyen en el volumen muerto de la columna.

Cuando se utiliza ultrafiltración y diafiltración, se emplean membranas de corte entre 5 y 60 kDa, preferentemente entre 10 y 40 kDa. El LHL sin inhibidor se denominará en lo adelante LHL modificado (LHL-M).

5 Tanto el reactivo LHL como el LHL-M se emplean para la detección de PG, BG y LPS. Esta detección se basa en su activación del sistema proFO de las langostas (Figura 1). Por lo tanto, la detección de PG, BG y LPS se realiza determinando la actividad de la fenoloxidasa activa (FO), o la actividad peptidasa de las EAPFO activa (Figura 1).

10 La actividad de la enzima fenoloxidasa se determina empleando sustratos monofenólicos (ej. tiramina, tirosina, ácido 4-hidrofenilacético, ácido 4-hidrofenilpropiónico), o difenólicos (ej. dihidroxi L-fenilalanina (L-DOPA), dopamina, ácido 3,4 dihidroxifenilacético, catecol, metilcaltecol, y ácido 3,4 dihidroxifenilpropiónico). Preferentemente se determina con dopamina a una
15 concentración de 1.2 mM. La formación de productos coloreados permite que la actividad fenoloxidasa pueda ser determinada visual o espectrofotométricamente

La sensibilidad del método para determinar la actividad fenoloxidasa se puede incrementar por la combinación de los sustratos monofenólicos u *o*-difenólicos con 3-
20 metil-2-benzotiazolinona hidrazona (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH)) o hidrazona de Besthorn. El MBTH es un potente agente nucleofílico que forma un aducto estable coloreado con las *o*-quinonas generadas por las fenoloxidasas (quinonas-MBTH), con un coeficiente de extinción molar o absortividad mucho mayor que el del aminocromo correspondiente [Espín JC y cols, Eur. J. Biochem., 267:1270-
25 1279, 2000; García-Molina F y cols, J. Agric. Food Chem., 55: 9739–9749, 2007]. El MBTH se emplea a una concentración final entre 0.3-15 mM, preferentemente de 2 a 7 mM.

La actividad peptidasa de las EAPFO inducida por BG, LPS y PG, se determina
30 empleando sustratos cromogénicos o fluorogénicos para serino proteasas tipo tripsina. Estos sustratos son de fórmula general R-Arg-Y o R-Lys-Y, donde Y es un cromóforo como la *p*-nitroanilina (*p*-NA) o un fluoróforo como la 7-amido-4-metil cumarina, rodamina, o 7-amido-4-trifluoro metilcumarina. R representa un L o D aminoácido protegido por su N-terminal por un grupo protector, o un péptido compuesto por L o D
35 aminoácidos, o su combinación, protegido en su N-terminal por un grupo protector.

Los ensayos para detectar PG, LPS y BG empleando el LHL o el LHL-M se pueden realizar por método cinético, pseudocinético o de punto final. Para detectar la reacción se emplea espectrofotómetros o fluorímetros convencionales. Sin embargo, debido a la mayor capacidad de procesamiento de muestra y ahorro de reactivos, se prefiere lectores capaces de leer microplacas de 96 pocillos, equipados para leer longitudes de onda en el visible, fluorescencia, o aquellos capaces de realizar ambas funciones.

Como ensayo cinético se define la detección de la señal en el tiempo inmediatamente después de la adición de todos los componentes de la mezcla de reacción, incluyendo el sustrato. Los ensayos pseudocinéticos se definen como aquellos donde la señal se determina después de la adición del sustrato a una mezcla de reacción previamente incubada. Los ensayos de punto final se definen como la lectura única de la señal después de la(s) incubación(es) por un tiempo fijo de la mezcla de reaccionantes con el sustrato.

El pH de la mezcla de reacción deberá estar entre 6 y 9, preferentemente 7.5, y puede o no contener cationes divalentes. Debe contener calcio, magnesio o manganeso a una concentración mínima de 5 mM, preferentemente 50 mM. La temperatura del ensayo debe estar entre la temperatura ambiente y 45°C, preferentemente 37°C.

La presente invención también concibe el empleo de la LGBP para incrementar la sensibilidad tanto del LHL como del LHL-M frente a BG y LPS. La LGBP puede incluirse en la formulación del reactivo, o puede adicionarse posteriormente a la mezcla de reacción. La LGBP puede estar en un rango de concentración en el ensayo para la detección de PG y BG entre 3 y 200 µg/ml, preferentemente de 50 a 125 µg/ml.

La LGBP se obtiene a partir del plasma, el cual además es un subproducto abundante de la preparación del LHL. Después de un paso de precipitación isoeléctrica [Vargas-Albores F y cols, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 116(4):453-458, 1997], la LGBP se puede purificar por cromatografía de afinidad empleando matrices hidrofílicas ligadas a (1,3)-β-D-glucanos [Vargas-Albores F y cols, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 116(4): 453-458, 1997], inmunoafinidad [Duvic B y Söderhäll K, *J Biol. Chem.*, 265(16): 9327-9332, 1990] o heparina [Jimenez-Vegas F y cols *Fish Shellfish Immunol* 13(3):171-181, 2002]. Preferentemente, se utiliza heparina como

ligando, con la cual se obtienen grandes cantidades de LGBP con alto grado de pureza y altos rendimientos en un solo paso cromatográfico.

Figura 1. Esquema del sistema activador de la profenoloxidasa (sistema proFO) de la langosta, y principio del método para el empleo del Lisado de Hemocitos de la Langosta (LHL) en la detección de lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos (PG) y (1,3)- β -D-glucanos (BG). LGBP: Proteína que une LPS y BG.

Figura 2. Efecto de la concentración de los sustratos *o*-difenólicos dopamina y L-DOPA en la actividad fenoloxidasa del Lisado de Hemocitos de la Langosta.

Figura 3. Respuesta del LHL a lipopolisacáridos (LPS), (1,3)- β -D-glucanos (BG) y peptidoglicanos (PG). Paneles A-C actividad fenoloxidasa en unidades arbitrarias (Δ DO 490 nm/min). Panel D-F se presentan los gráficos que representan la relación lineal entre la respuesta fenoloxidasa y la concentración de cada activador microbiano LPS (0.185-1850 ng/ml), BG (1.8-18000 ng/ml) y PG (0.19-19000 ng/ml). Tiempo umbral: tiempo de reacción para alcanzar una densidad óptica determinada o DO umbral.

Figura 4. Influencia del MBTH en la sensibilidad de la respuesta fenoloxidasa. Panel izquierdo: Densidad óptica a 490 nm después de una hora de reacción a 37°C (punto final). Panel Derecho: Velocidad de la formación de dopacromo (Control) y de los complejos coloreados de quinonas-MBTH a diferentes concentraciones de MBTH.

Figura 5. Determinación de la respuesta del sistema pro-FO frente a LPS empleando sustrato cromogénicos para serino peptidasa S-2222 (Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA-HCl).

Figura 6. Separación del inhibidor de los componentes activos del sistema proFO (F1) por cromatografía de gel filtración en Sephadex G-50.

Figura 7. Respuesta del lisado sin inhibidor a LPS utilizando dopamina como sustrato. Sensibilidad de 0.01 ng/ml de LPS.

Figura 8. Purificación de LGBP por cromatografía de afinidad en heparina-Sepharosa CL-6B (Panel A). Electroforesis en SDS-PAGE (Panel B). Carril 1: Patrones de peso

molecular; Carril 2: Plasma completo; Carril 3 y 4: LGBP obtenida por cromatografía de afinidad analizada en condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250.

5 Ejemplos de realización:

Ejemplo 1:

Preparación del lisado de hemocitos de la langosta (LHL).

Se extrajeron 10 ml de hemolinfa a través del seno cisternal ubicado en el último par de patas de la langosta empleando jeringuillas desechables de 20 ml estériles y libres de pirógenos, que contenían 10 ml de anticoagulante frío. Como anticoagulante se empleó la solución de Alsever modificada, compuesta por citrato de sodio 27 mM, NaCl 336 mM, Glucosa 115 mM, EDTA 9 mM, pH 7 (1000 mOsmol). La mezcla hemolinfa: anticoagulante se vertió en tubos de centrifuga de 50 ml de polipropileno estériles y libres de endotoxinas, y se centrifugó a 700 x g a 4°C por 10 min. El sobrenadante que contiene el plasma se separó. Posteriormente los hemocitos se lavaron para eliminar restos de componentes plasmáticos. Para ello el botón de hemocitos se suspendió con 20 ml de anticoagulante frío, se llevó al volumen original de la mezcla anticoagulante-hemolinfa (50 ml), y se volvió a centrifugar como se describió anteriormente. El paso de lavado se repitió una vez más. El botón de hemocitos lavados se resuspendió en 3 ml de tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 50 mM, NaCl 450 mM, pH 7.5, y se trasvasó a tubos de borosilicato de 13 mm x 10 cm. La suspensión de hemocitos se lisó por sonicación empleando tres ciclos de 20 Watts por 10 seg. en baño de hielo. El homogenato de hemocitos se centrifugó a 13 000 rpm por 30 min. a 4°C para obtener el LHL clarificado.

Ejemplo 2:

Comparación del efecto en el empleo de la dopamina y la L-DOPA en la sensibilidad de la respuesta fenoloxidasa del LHL.

Se incubaron 420 µl de lisado a 0.1 mg/ml con 4.2 ml de tripsina bovina a 1 mg/ml por 30 min a 37°C. De esta mezcla se adicionaron 100 µl a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos que contenían 150 µl de varias concentraciones L-DOPA (0.3-8 mM) o dopamina (0.15-9 mM) en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. La actividad fenoloxidasa se determinó cinéticamente a 490 nm por 20 min a 37°C en un lector de microplacas.

Ejemplo 3:

Determinación de la presencia de PG, BG y LPS empleando el LHL y detectando la actividad fenoloxidasa por método cinético.

5

El LHL (12 mg/ml) se diluyó a una concentración de 0.5 mg/ml con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos de fondo plano certificadas estériles y libres de pirógenos. La mezcla de reacción consistió en 150 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, CaCl_2 50 mM, 20 μ l de LHL, y 50 μ l de activador (LPS, PG o BG).
10 Como control se empleó agua libre de endotoxinas. Finalmente se adicionó 50 μ l de dopamina a 3.75 mM. La formación de dopaminocromo se leyó cinéticamente a 490 nm durante 1 h cada 15 seg a 37°C en un lector de microplacas. Se determinó la velocidad de la reacción enzimática en la porción lineal del gráfico OD 490 nm vs tiempo (Δ OD 490/min). Alternativamente, se determinó el tiempo umbral, definido como el tiempo
15 necesario para alcanzar un valor de absorbancia determinado, en este caso de 0.1. El logaritmo del tiempo umbral vs el logaritmo de la concentración de PMAP produce gráficos lineales útiles con fines cuantitativos.

Ejemplo 4:

20 **Determinación de efecto del MBTH en el incremento de la respuesta fenoloxidasa del LHL. Titulación.**

El LHL a 0,8 mg/mL se diluyó a 0,1 mg/mL con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos de fondo plano. La mezcla de reacción consistió
25 en 40 μ L de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 160 μ L de tripsina 1 mg/mL disuelta en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 10 μ L de LHL y 40 μ L de MBTH disuelto en agua destilada. Esta mezcla se incubó por 20 minutos a 37°C y finalmente se adicionó 50 μ L de dopamina 3.75 mM. La reacción se leyó cinéticamente a 490 nm durante 1 h cada 15 seg a 37°C en un lector de microplacas.

30

Ejemplo 5:

Determinación de respuesta del LHL frente a LPS empleando sustratos cromogénicos para serino peptidasas.

Cincuenta microlitros de LHL (1 mg/ml) obtenido como se describe en el ejemplo 1, pero sin cloruro de sodio en el tampón de lisis, se combinaron con 150 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, y 50 μ l de LPS. Finalmente se adicionaron 50 μ l de sustrato cromogénico S-2222 (Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA-HCl) 0.6 mM. La paranitroanilina liberada se detectó cinéticamente a 405 nm por 1 h a 37°C.

Ejemplo 6:

Separación de inhibidor de proteasas por cromatografía de gel filtración.

El inhibidor de proteasas se separa del resto de los componentes activos del sistema activador de la profenoloxidasa del LHL empleando cromatografía de gel filtración en Sephadex G-50 superfino empacado en una columna XK 16/70 ($V_t = 131.4$ ml) equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.2 M. Cuatro mililitros de LHL (3 % V_t de columna) a 8 mg/ml se fraccionaron a un flujo de 0.3 ml/min. La corrida se monitoreó a 280 nm. La fracción correspondiente al volumen muerto de la columna se colectó y designó como F1.

Ejemplo 7:

Separación de inhibidor de proteasas por columna "spin".

El extracto se fraccionó en una spin column empacada con Sephadex G-50 (1.5 ml). La columna se equilibró lavando 4 veces con centrifugación a 1000 rpm por 1 min con Tris-HCl pH 7.5, NaCl 450 mM. Se aplicaron 150 μ l de lisado preparado según el ejemplo 1 a la columna spin, y se centrifugó a 1000 rpm por 1 min. Se colectó el eluato y se analizó la concentración de proteínas, la actividad inhibitoria frente a la tripsina, y la actividad fenoloxidasa tanto en la fracción no tratada (LHL) como la fracción obtenida de la columna spin (F1).

Concentración de Proteínas		
FO	150 μ l	9.7 mg/ml
F1	150 μ l	3 mg/ml
Actividad Inhibitoria		
	Al/ml	Al/mg
FO		225.55 \pm
	2378.81 \pm 258.938	36.586
F1	19.66 \pm 0.277	6.598 \pm 0.093

Actividad Fenoloxidasa (Act. FO)		
	Act. FO/ml	Act. FO/mg
FO	0.265 ± 0.0240	1.366 ± 0.01240
F1	0.089 ± 0.0090	1.483 ± 0.01650

Ejemplo 8:**Determinación de respuesta fenoloxidasa frente a LPS en lisado sin inhibidor.**

El lisado sin inhibidor se obtuvo según el ejemplo 5. Se mezclaron 50 µl de LPS, 150 µl de Tris-HCL, pH 7.5, CaCl₂ 50 mM y 20 µl de lisado a 0.8 mg/ml, y se incubó a 37°C por 30 min. Se adicionó 50 µl de dopamina a 3.75 mM y se leyó la reacción cinéticamente a 490 nm por 1 hora a 37°C. Se calculó el tiempo umbral, como el tiempo requerido por la reacción para llegar a una densidad óptica de 0.3 y se graficó el log del tiempo umbral frente al logaritmo de las concentraciones de LPS.

Ejemplo 9:**Purificación de proteína que reconoce LPS y BG plasmática (LGBP de las siglas en inglés para lipopolysaccharide and β-1,3 glucan binding protein).**

El plasma obtenido durante la preparación del LHL se centrifugó a 5000 rpm por 20 min. a 4°C para su clarificación. Cien mililitros de plasma clarificado se dializaron a 4°C empleando membranas de diálisis con un corte de 8000 Da vs 5 L de agua destilada a 4°C por 48 horas, incluyendo 4 cambios del agua dializante cada 12 horas durante el período. El dializado se centrifugó a 5000 rpm por 20 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. El pellet de proteínas se suspendió en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.2 M, pH 7.5 (Tampón A), y se centrifugó nuevamente para eliminar las proteínas desnaturalizadas insolubles. Treinta y cinco miligramos de muestra en 5 ml se aplicaron a una columna empacada con Heparina-Sepharosa CL-6B previamente equilibrada en tampón A, después que eluyeron las proteínas que no se unieron a la matriz, se hizo un lavado con 2.5 volúmenes de columna con una mezcla de Tampón A: Tampón B (60:40 v/v). Tampón B: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 1 M. Finalmente la LGBP se eluyó con 5 volúmenes de columna con Tampón A: Tampón B (30:70 v/v). El proceso cromatográfico se realizó a un flujo de 1 ml/min y las fracciones proteicas se detectaron a 280 nm.

Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré
5 Agente Oficial
LEX S.A
Ave. 1ra. No. 1001 Esq. a 10
Miramar. Playa. CP 11300
Ciudad Habana. Cuba
10 TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

15

Reivindicaciones:

- 5 1. Composición para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3-β-D-glucanos, caracterizada por ser un extracto de hemocitos de la langosta que contiene el sistema activador de la profenoloxidasa.
- 10 2. Composición acorde a la reivindicación 1, caracterizada porque el extracto de hemocitos puede ser obtenido a partir de langostas incluidas en los Infraordenes Astacidea, Palinura (Achelata) y Thalassinidea.
- 15 3. Procedimiento para la obtención de la composición acorde a la reivindicación 1, caracterizado por comprender las etapas de extracción de la hemolinfa de la langosta, seguido de la separación, lavado y desintegración de los hemocitos.
- 20 4. Procedimiento acorde a la reivindicación 3, donde la extracción de la hemolinfa se realiza con anticoagulantes compuestos por soluciones isotónicas combinadas con reactivos capaces de modificar grupos sulfhidrilos, metil derivados de las xantinas, o agentes quelantes de cationes divalentes.
- 25 5. Procedimiento acorde a la reivindicación 3, donde los hemocitos son separados del plasma por centrifugación o gravedad, se lavan, y se lisan en un tampón de lisis que contiene cloruro de sodio a una concentración entre 0,001 y 600 mMolar, y agentes estabilizantes de enzimas.
- 30 6. Procedimiento acorde a la reivindicación 3, donde los hemocitos se desintegran mediante shock osmótico, congelación/descongelación, homogenización manual, con agitación o ultrasonido.
- 35 7. Composición acorde a la reivindicación 1, caracterizada porque no contiene inhibidores de peptidasa, lo que incrementa sustancialmente la sensibilidad en la detección de lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3-β-D-glucanos.
8. Procedimiento para efectuar la modificación de la composición acorde a la reivindicación 7, donde la eliminación de los inhibidores de peptidasas se basa

en la separación por tamaño y forma molecular, afinidad, inmutofafinidad, o carga.

- 5 9. Procedimiento basado en las composiciones reivindicadas en 1 y 7, donde la presencia de lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos se verifica por determinación de la actividad peptidasa de las enzimas activadoras de la profenoloxidasa.
- 10 10. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos según la reivindicación 9, donde la actividad enzimática de las enzimas activadoras de la profenoloxidasa se determina con sustratos cromogénicos o fluorogénicos para enzimas serino proteasa tipo tripsina.
- 15 11. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos acorde a la reivindicación 9, donde se mezcla la composición reivindicada en 1 o 7 con la muestra y el sustrato, y la actividad peptidasa se determina espectrofotométricamente por método cinético, pseudocinético o de punto final.
- 20 12. Procedimiento basado en las composiciones reivindicadas en 1 y 7, donde la presencia de lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos se verifica por determinación de la actividad de la enzima fenoloxidasa activa.
- 25 13. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos según la reivindicación 12, donde la actividad fenoloxidasa se determina con sustratos monofenólicos u o-difenólicos.
- 30 14. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos según la reivindicación 12, donde se mezcla la composición reivindicada en 1 o 7 con la muestra y el sustrato, y la respuesta fenoloxidasa se mide espectrofotométricamente por método cinético, pseudocinético o de punto final.
- 35 15. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos según la reivindicación 12, donde la sensibilidad de la actividad

tenoloxidasa con sustratos monofenólicos u o-difenólicos, se incrementa por inclusión en la mezcla de reacción de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona en concentraciones entre 0.3 y 10 mMolar.

5 16. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3-β-D-glucanos acorde a las reivindicaciones 9 y 12, caracterizado porque se incrementa considerablemente la sensibilidad de la detección de lipopolisacáridos y 1,3-β-D-glucanos por la adición a la mezcla de reacción de concentraciones entre 3 y 200 μg/ml de la proteína reconocedora de lipopolisacáridos y 1,3-β-D-glucanos aislada del plasma de la langosta.

10

15

20



Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré

25 Agente Oficial

LEX S.A

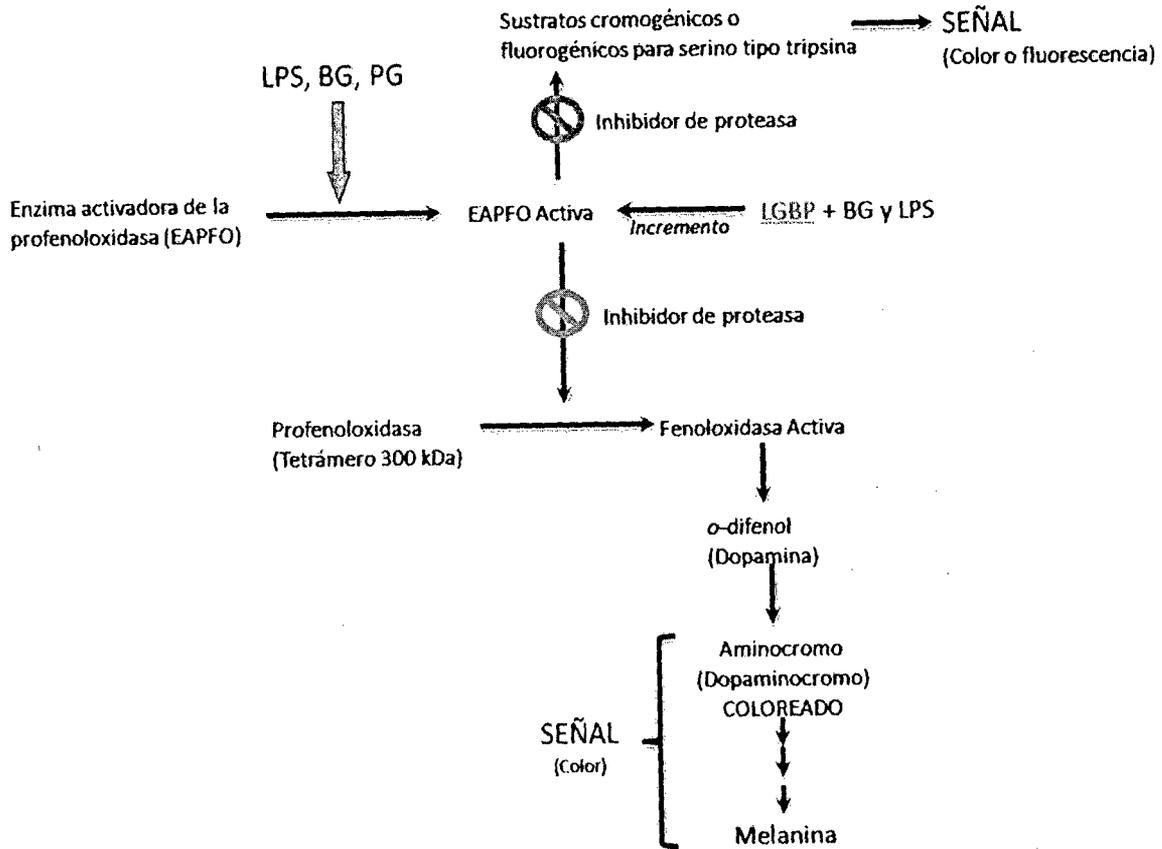
Ave. 1ra. No. 1001 Esq. a 10

Miramar. Playa. CP 11300

Ciudad Habana. Cuba

30 TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

Figura 1



5

10

Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré

Agente Oficial

LEX S.A

15 Ave.1ra. No.1001 Esq. a 10

Miramar. Playa. CP 11300

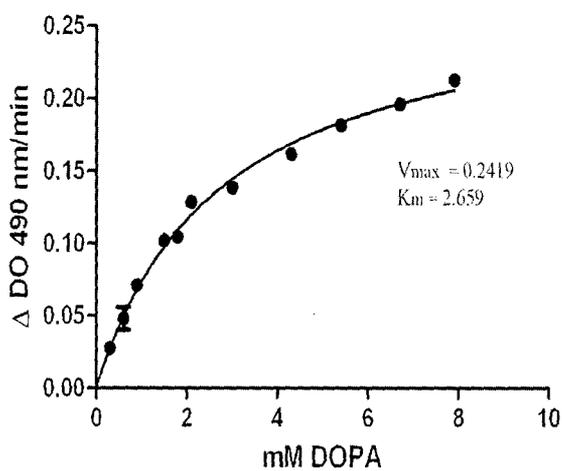
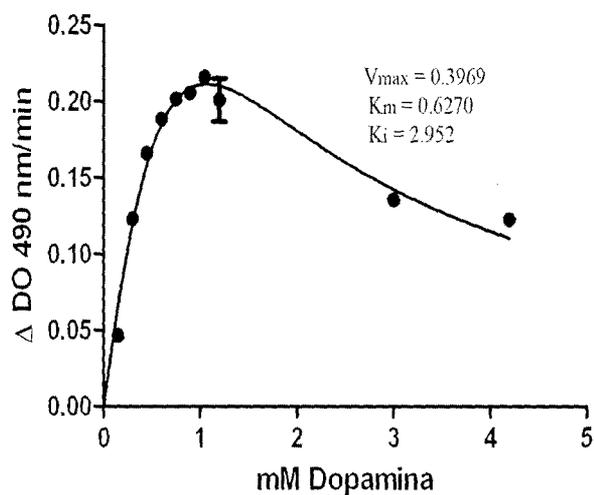
Ciudad Habana. Cuba

TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

Figura 2

5

10



15

20

Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré

Agente Oficial

LEX S.A

Ave.1ra. No.1001 Esq. a 10

Miramar. Playa. CP 11300

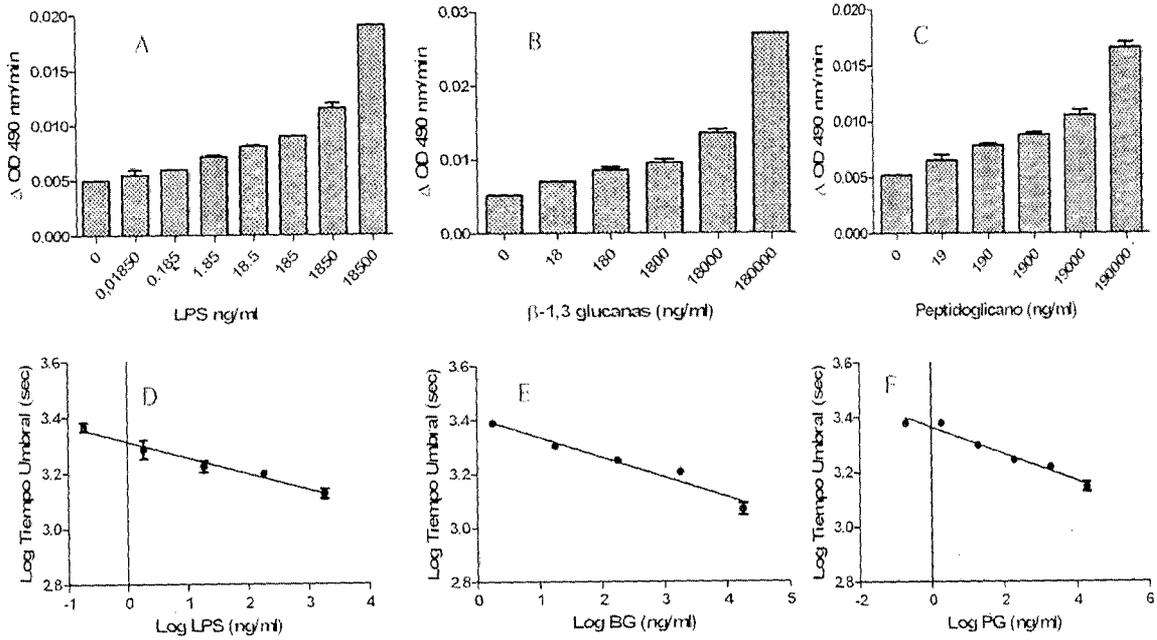
25

Ciudad Habana. Cuba

TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

Figura 3

5



10

Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré

15

Agente Oficial

LEX S.A

Ave.1ra. No.1001 Esq. a 10

Miramar. Playa. CP 11300

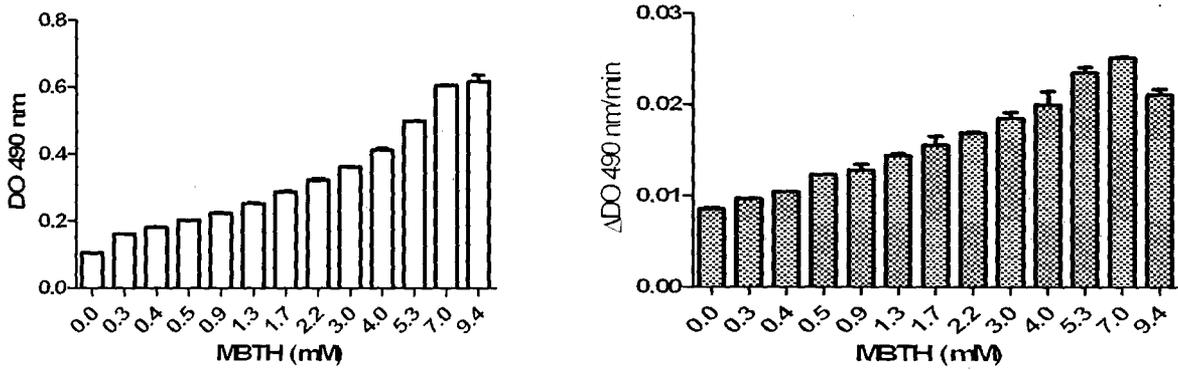
Ciudad Habana. Cuba

20

TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

Figura 4

5



10

15

20

Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré

Agente Oficial

LEX S.A

Ave.1ra. No.1001 Esq. a 10

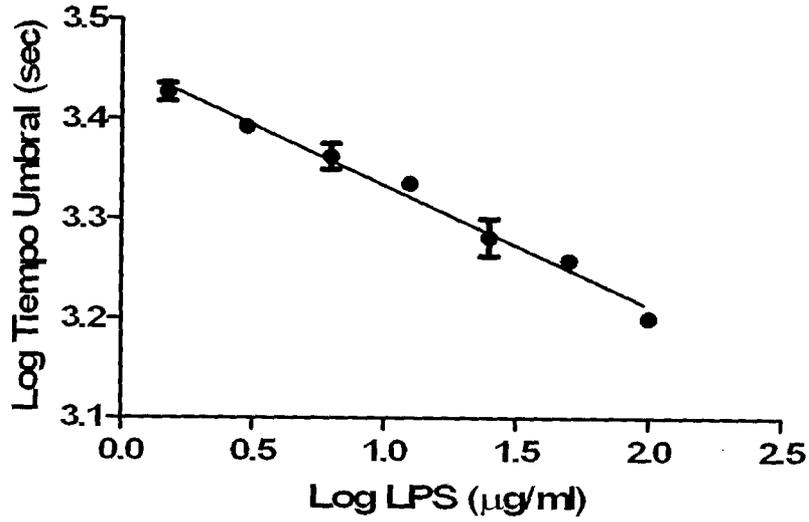
25

Miramar. Playa. CP 11300

Ciudad Habana. Cuba

TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

Figura 5



Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré

Agente Oficial

LEX S.A

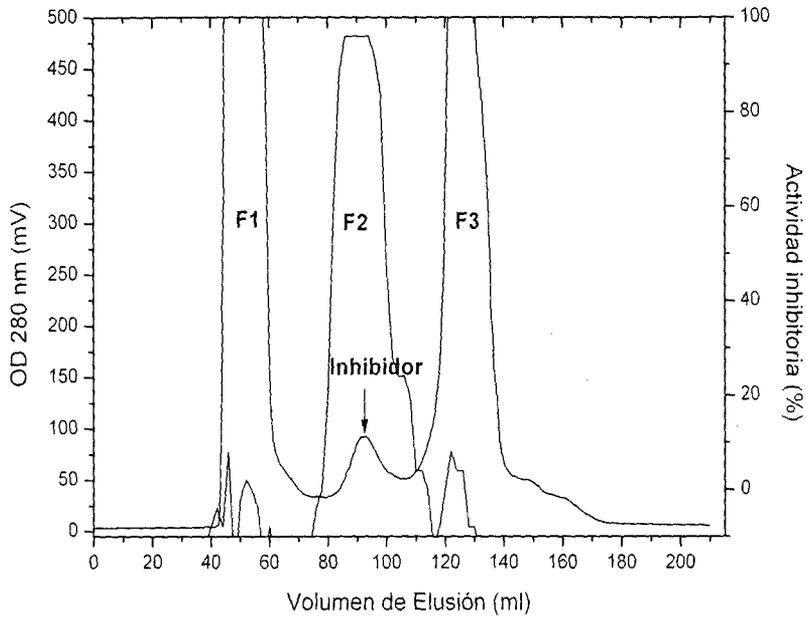
Ave.1ra. No.1001 Esq. a 10

Miramar. Playa. CP 11300

Ciudad Habana. Cuba

TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

Figura 6



Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré

Agente Oficial

LEX S.A

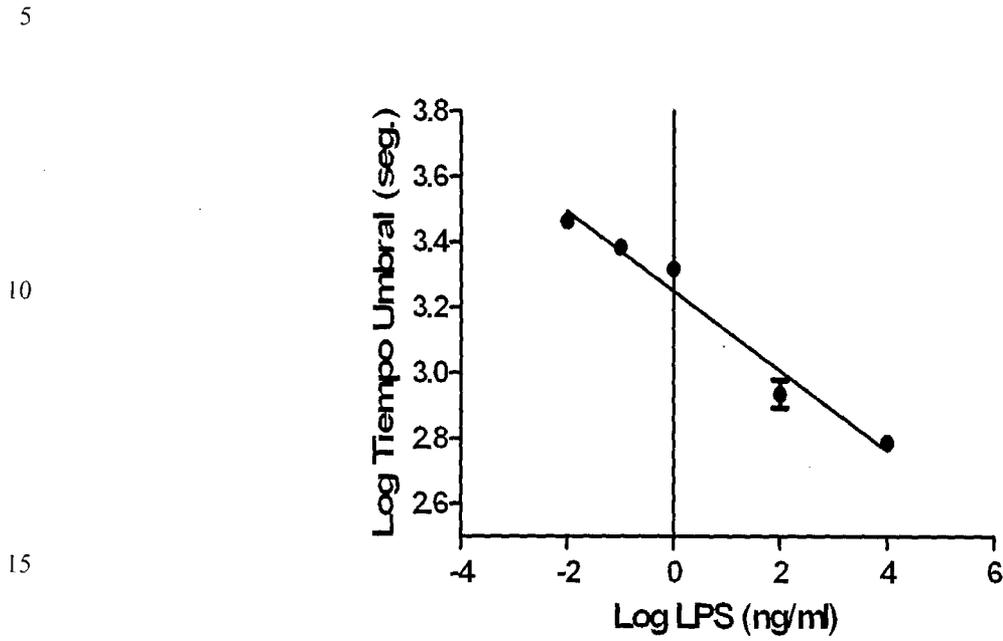
Ave.1ra. No.1001 Esq. a 10

Miramar. Playa. CP 11300

Ciudad Habana. Cuba

TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

Figura 7



5

10

15

20

25

Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré

Agente Oficial

30

LEX S.A

Ave.1ra. No.1001 Esq. a 10

Miramar. Playa. CP 11300

Ciudad Habana. Cuba

TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

35

Figura 8

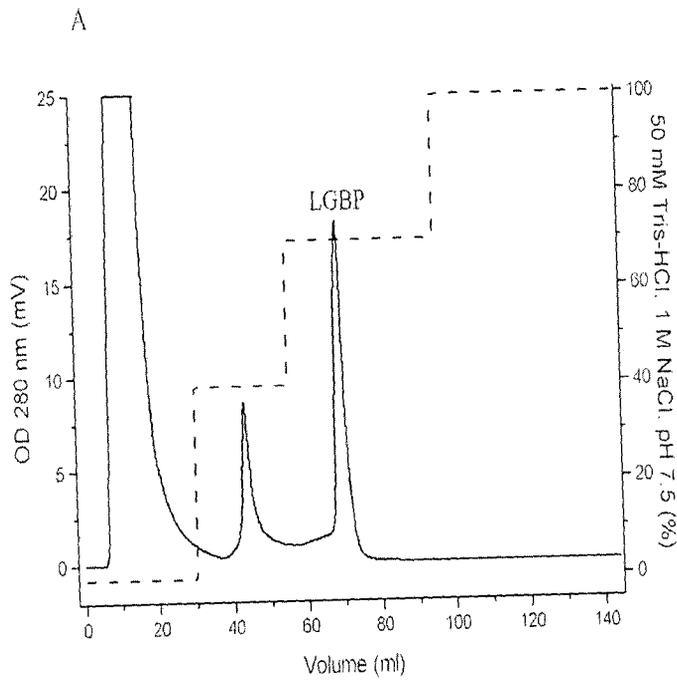
5

10

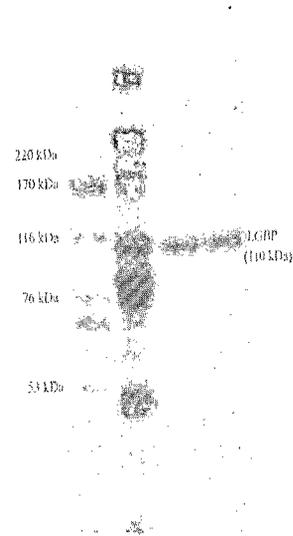
15

20

25



B



Dra. Dánice Vázquez D' Alvaré

Agente Oficial

30 LEX S.A

Ave. 1ra. No. 1001 Esq. a 10

Miramar. Playa. CP 11300

Ciudad Habana. Cuba

TELF. (537)204-9093 FAX (537)2079533

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2012/000009

C (continuación).	DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES	
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>US 4 970 152 A (ASHIDA MASA AKI [JP] ET AL) 13 November 1990 (1990-11-13) página 1188, párrafo 2.2; reivindicación 9 ejemplo 1</p>	1-16
A	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>US 7 598 054 B2 (KOVALENKO VICTOR [US] ET AL) 6 October 2009 (2009-10-06) columna 10, section 3.; resumen 1</p>	1-16
A	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>US 2002/197662 A1 (AUH JOONG HYUCK [KR] ET AL) 26 December 2002 (2002-12-26) párrafo [0025]; reivindicación 15</p>	1-16
A	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>JORGE HERNÁNDEZ-LÓPEZ ET AL: "In the spiny lobster (Panulirus interruptus) the prophenoloxidase is located in plasma not in haemocytes", FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY, vol. 14, no. 2, 1 de febrero de 2003 (2003-02-01), páginas 105-114, XP055060092, ISSN: 1050-4648, DOI: 10.1006/fsim.2002.0419 todo el documento</p>	1-16
A	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>US 5 310 657 A (BERZOF SKY RONALD N [US]) 10 de mayo de 1994 (1994-05-10) todo el documento</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU2012/000009

US 4970152	A	13-11-1990	AT	119204	T	15-03-1995
			AT	188777	T	15-01-2000
			DE	3751109	D1	06-04-1995
			DE	3751109	T2	12-10-1995
			DE	3752307	D1	17-02-2000
			DE	3752307	T2	06-07-2000
			EP	0270039	A2	08-06-1988
			EP	0634656	A1	18-01-1995
			ES	2068180	T3	16-04-1995
			US	4970152	A	13-11-1990

US 7598054	B2	06-10-2009	US	2006269982	A1	30-11-2006
			WO	2007127459	A2	08-11-2007

US 2002197662	A1	26-12-2002	AU	2891401	A	31-07-2001
			CA	2397495	A1	26-07-2001
			CN	1406139	A	26-03-2003
			EP	1274466	A1	15-01-2003
			JP	3657913	B2	08-06-2005
			JP	2003520043	A	02-07-2003
			US	2002197662	A1	26-12-2002
			WO	0152905	A1	26-07-2001

US 5310657	A	10-05-1994	AT	148230	T	15-02-1997
			AU	644109	B2	02-12-1993
			AU	6555690	A	02-05-1991
			CA	2028789	A1	01-05-1991
			DE	69029785	D1	06-03-1997
			DE	69029785	T2	28-05-1997
			DK	0426395	T3	03-03-1997
			EP	0426395	A1	08-05-1991
			ES	2098256	T3	01-05-1997
			GR	3023298	T3	30-07-1997
			JP	2955345	B2	04-10-1999
			JP	H03220456	A	27-09-1991
			US	5310657	A	10-05-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CU2012/000009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/04 C12Q1/26 C12Q1/37
ADD.
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)
C12Q
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)
EPO-Internal, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PERDOMO-MORALES ET AL: "Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster Panulirus argus", FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 23, no. 6, 5 November 2007 (2007-11-05), pages 1187-1195, XP022328399, ISSN: 1050-4648, DOI: 10.1016/J.FSI.2007.04.001 abstract Page 1188, paragraph 2.2; page 1192, line 10 - page 1193, line 11 ----- -/--	1-8

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 application or patent 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 17 April 2013	Date of mailing of the international search report 29/04/2013
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Jacques, Patrice
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CU2012/000009

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 970 152 A (ASHIDA MASAOKI [JP] ET AL) 13 November 1990 (1990-11-13) Page 1188, paragraph 2.2; claim 9 example 1	1-16
A	----- US 7 598 054 B2 (KOVALENKO VICTOR [US] ET AL) 6 October 2009 (2009-10-06) Column 10, section 3.; claim 1	1-16
A	----- US 2002/197662 A1 (AUH JOONG HYUCK [KR] ET AL) 26 December 2002 (2002-12-26) paragraph [0025]; claim 15	1-16
A	----- JORGE HERNÁNDEZ-LÓPEZ ET AL: "In the spiny lobster (Panulirus interruptus) the prophenoloxidase is located in plasma not in haemocytes", FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY, vol. 14, no. 2, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 105-114, XP055060092, ISSN: 1050-4648, DOI: 10.1006/fsim.2002.0419 the whole document	1-16
A	----- US 5 310 657 A (BERZOFKY RONALD N [US]) 10 May 1994 (1994-05-10) the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/CU2012/000009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4970152	A	13-11-1990	AT 119204 T 15-03-1995
			AT 188777 T 15-01-2000
			DE 3751109 D1 06-04-1995
			DE 3751109 T2 12-10-1995
			DE 3752307 D1 17-02-2000
			DE 3752307 T2 06-07-2000
			EP 0270039 A2 08-06-1988
			EP 0634656 A1 18-01-1995
			ES 2068180 T3 16-04-1995
			US 4970152 A 13-11-1990

US 7598054	B2	06-10-2009	US 2006269982 A1 30-11-2006
			WO 2007127459 A2 08-11-2007

US 2002197662	A1	26-12-2002	AU 2891401 A 31-07-2001
			CA 2397495 A1 26-07-2001
			CN 1406139 A 26-03-2003
			EP 1274466 A1 15-01-2003
			JP 3657913 B2 08-06-2005
			JP 2003520043 A 02-07-2003
			US 2002197662 A1 26-12-2002
			WO 0152905 A1 26-07-2001

US 5310657	A	10-05-1994	AT 148230 T 15-02-1997
			AU 644109 B2 02-12-1993
			AU 6555690 A 02-05-1991
			CA 2028789 A1 01-05-1991
			DE 69029785 D1 06-03-1997
			DE 69029785 T2 28-05-1997
			DK 0426395 T3 03-03-1997
			EP 0426395 A1 08-05-1991
			ES 2098256 T3 01-05-1997
			GR 3023298 T3 30-07-1997
			JP 2955345 B2 04-10-1999
			JP H03220456 A 27-09-1991
			US 5310657 A 10-05-1994
