



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 690 565**

⑮ Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2012 PCT/CU2012/000009**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113296**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2012 E 12821102 (6)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2811031**

⑮ Título: **Composición a partir de extracto de hemocitos de langosta para la detección de lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3-β-d-glucanos**

⑯ Prioridad:

27.12.2011 CU 20110243

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2018

⑮ Titular/es:

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS (CIDEM) (50.0%)
Avenida 26 No.1605 e/ Boyeros y Puentes
Grandes Nuevo Vedado Plaza
La Habana 10400, CU y
UNIVERSIDAD DE LA HABANA (50.0%)

⑯ Inventor/es:

PERDOMO MORALES, ROLANDO;
MONTERO ALEJO, VIVIAN;
PERERA BRAVET, ERICK;
CALERO CARBONELL, JORGE ERNESTO;
PARDO RUIZ, ZENIA;
PORTO VERDECIA, MARLENE y
VEGA HURTADO, YAMILE

⑯ Agente/Representante:

CAPITAN GARCÍA, Nuria

ES 2 690 565 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

5 Composición a partir de extracto de hemocitos de langosta para la detección de lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1 ,3-β-d-glucanos

10 **5 Campo técnico de la Invención**

15 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.

20 **15 Antecedentes de la Invención**

25 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 30 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].

35 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 40 septicemia causada por bacterias Gram negativas, y constituyen la principal señal de alarma de la presencia de estas bacterias para el 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].

45 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).

50 50 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].

55 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).

60 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.

65 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 5 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 10 oscilaba alrededor de un 15 % [Wall 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 15 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).

20 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 25 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.

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. 30 La regulación de cuotas anuales de cangrejos herraduras que pueden ser empleados por la industria para producir reactivo 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.

35 Las patentes US4229541, US5082782, US6790659 y US20030186432 describen el 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.

40 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 formulaciones de este reactivo que combinan el Factor C recombinante y detergentes 45 (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 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 (US201001 1266).

55 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 deben 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 60 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].

10 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 15 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 20 reconocedoras de PMAPs, la enzima activadora de la profenoloxidasa (EAPFO), y la profenoloxidasa. Se ha descrito en varios artrópodos que el sistema proFO se activa en presencia de pequeñas cantidades de 25 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 profenoloxidasa (zimógeno inactivo) en fenoloxidasa activa. La fenoloxidasa oxida monofenoles y o-difenoles a aminocromos, iniciando así la síntesis de melanina.

25 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 inglés de silkworm larvae plasma) para la detección de BG y PG mediante la determinación de la actividad fenoloxidasa o la actividad peptidasa de la EAPFO. Ahí se describen modificaciones del reactivo que suponen la determinación específica de BG o PG. 30 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 35 contaminación bacteriana en plaquetas (US 7598054 B2).

35 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.

40 El sistema proFO de la langosta espinosa *P. argus* se encuentra en los hemocitos [Perdomo-Morales y cols, Fish Shellfish Immunol (23): 1 187-1 195, 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 45 peptidasa 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 inglés 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 fenoloxidasa porque potencia la actividad peptidasa de la EAPFO en el LHL.

50 Descripción de la Invención

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 55 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.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición para detectar lipopolisacáridos, 60 peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos, que comprende un extracto de hemocitos de langosta que contiene componentes del sistema de activación de prophenoloxidasa que tiene un peso molecular superior a 30 kDa y no contiene inhibidores de peptidasa, el peso molecular medido por cromatografía de gel filtración utilizando resinas con un límite de exclusión de 30 kDa y con un flujo entre 3 y 60 cm/h, preferiblemente a 9 cm/h, y con un volumen de muestra entre 1 y 5%, preferiblemente 3 %, del volumen total de la columna.

- 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-ethylmaleimida. 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 1.15 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).
- 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, 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.
- 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, 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 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 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 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).
- 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).
- La actividad de la enzima fenoloxidasa se determina empleando sustratos monofenólicos (ej. tiramina, tirosina, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 4-hidroxifenilpropiónico), o difenólicos (ej. dihidroxí L-fenilalanina (L-DOPA), dopamina, ácido 3,4 dihidroxifenilacético, catecol, metilcatecol, y ácido 3,4 dihidroxifenilpropiónico). Preferentemente se determina con dopamina a una 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-metil-2-benzotiazolinona hidrazone (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH)) o hidrazone 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 absorbividad mucho mayor que el del aminocromo correspondiente [Espín JC y cols, Eur. J. Biochem., 267:1270-1279, 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.
- 10 La actividad peptidasa de las EAPFO inducida por BG, LPS y PG, se determina 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 aminoácidos, o su combinación, protegido en su N-terminal por un grupo protector.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 30 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.
- 35 40 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.
- 45 45 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 isoelectrónica [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.

Breve descripción de las Figuras

- 50 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.
- 55 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.
- 60 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 a 490 nm.

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.

- 5 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).
- 10 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.
- 15 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.

20 **Exposición Detallada de la Invención**

La invención proporciona una composición para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3-β-D-glucanos, que comprende un extracto de hemocitos de langosta que contiene componentes del sistema de activación de prophenoloxidasa que tiene un peso molecular superior a 30 kDa y no contiene inhibidores de peptidasa, el peso molecular medido por cromatografía de gel filtración utilizando resinas con un límite de exclusión de 30 kDa y con un flujo entre 3 y 60 cm/h, preferiblemente a 9 cm/h, y con un volumen de muestra entre 1 y 5%, preferiblemente 3 %, del volumen total de la columna.

- 30 Los inhibidores de proteasa tienen un peso molecular de 5 kDa y una carga positiva neta.
- 35 La invención también proporciona un procedimiento para obtener la composición anterior, que comprende eliminar inhibidores de peptidasas, basándose en la separación por tamaño y forma molecular, afinidad, inmunoafinidad o carga molecular.
- 40 La presencia de lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3-β-D-glucanos se verifica determinando la actividad peptidasa de las enzimas que activan la prophenoloxidasa o la actividad fenoloxidasa mediante métodos cinéticos, pseudocinéticos o de punto final.
- La actividad enzimática de las enzimas que activan la prophenoloxidasa se determina con sustrato cromogénico o fluorogénico para enzimas serino proteasa de tipo tripsina.
- 45 La actividad de la fenoloxidasa se determina usando sustratos monofenólico u o-difenólico. La sensibilidad de la respuesta de la fenoloxidasa usando sustratos monofenólicos u o-difenólicos se incrementa al incluir 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazone en concentraciones entre 0,3 y 10 mMolar en la mezcla de reacción.
- 50 El proceso para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3-β-D-glucanos aumenta sustancialmente la sensibilidad de detección de lipopolisacáridos y 1,3-β-D-glucanos mediante 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.

Ejemplos de realización:

- 55 **Ejemplo 1:**
Preparación del lisado de hemocitos de la langosta (LHL).
- 60 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 centrífuga 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.

5 **Ejemplo 2:**
Comparación del efecto en el empleo de la dopamina y la L-DOPA en la sensibilidad de la respuesta fenoloxidasa del LHL.

10 Se incubaron 420 μ l 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 μ l a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos que contenían 150 μ l 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.

15 **Ejemplo 3:**
Determinación de la presencia de PG, BG y LPS empleando el LHL y detectando la actividad fenoloxidasa por método cinético.

20 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, CaCl₂ 50 mM, 20 μ l de LHL, y 50 μ l de activador (LPS, PG o BG). 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 (AOD 490/min). Alternativamente, se determinó el tiempo umbral, definido como el tiempo 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.

25 **Ejemplo 4:**
Determinación del efecto del MBTH en el incremento de la respuesta fenoloxidasa del LHL. Titulación.

30 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 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.

35 **Ejemplo 5:**
Determinación de respuesta del LHL frente a LPS empleando sustratos cromogénicos para serino peptidasas.

40 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.

45 **Ejemplo 6:**
Separación de inhibidor de proteasas por cromatografía de gel filtración.

50 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.

55 **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 (AI)		
	AI/ml	AI/mg
FO	2378.81 \pm 258.938	225.55 \pm 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 \pm 0.0240	1.366 \pm 0.01240
F1	0.089 \pm 0.0090	1.483 \pm 0.01650

10 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 μ l de LPS, 150 μ l de Tris-HCl, pH 75, CaCl₂ 50 mM y 20 μ l de lisado a 0.8 mg/ml, y se incubó a 37°C por 30 min. Se adicionó 50 μ l 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.

15 Ejemplo 9:
20 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 diáisis 25 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-30 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.

REIVINDICACIONES

1. Composición para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos, que comprende un extracto de hemocitos de la langosta que contiene componentes del sistema activador de la profenoloxidasa que tiene un peso molecular superior a 30 kDa y no contiene inhibidores de peptidasa, el peso molecular medido por cromatografía de gel filtración utilizando resinas con un límite de exclusión de 30 kDa y con un flujo entre 3 y 60 cm/h, preferiblemente a 9 cm/h, y con un volumen de muestra entre 1% y 5%, preferiblemente 3%, del volumen total de la columna.
- 5 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que el extracto de hemocitos puede ser obtenido a partir de langostas incluidas en los infraordenes Astacidea, Palinura (Achelata) y Thalassinidea.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, en la que los inhibidores de peptidasa tienen un peso molecular de 5 KDa y carga neta positiva.
4. Procedimiento para obtener la composición según la reivindicación 1, que comprende eliminar los inhibidores de peptidasas, basado en la separación por tamaño y forma molecular, afinidad, inmunofu-
- 20 5. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos usando la composición de la reivindicación 1, en el que 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 o la actividad fenoloxidasa por métodos cinético, pseudocinético o de punto final.
- 25 6. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos según la reivindicación 5, en el que la actividad enzimática de las enzimas activadoras de la profenoloxidasa se determina con sustratos cromogénicos o fluorogénicos para enzimas serina proteasa tipo tripsina.
- 30 7. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos según la reivindicación 5, en el que la actividad fenoloxidasa se determina con sustratos monofenólicos u o-difenólicos.
- 35 8. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos según la reivindicación 5, en el que la sensibilidad de la actividad fenoloxidasa con sustratos monofenólicos u o-difenólicos se incrementa por inclusión en la mezcla de reacción de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazone en concentraciones entre 0.3 y 10 mMolar.
- 40 9. Procedimiento para detectar lipopolisacáridos, peptidoglicanos y 1,3- β -D-glucanos según la reivindicación 5, 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 μ g/ml de la proteína reconocedora de lipopolisacáridos y 1,3- β -D-glucanos aislada del plasma de la langosta.

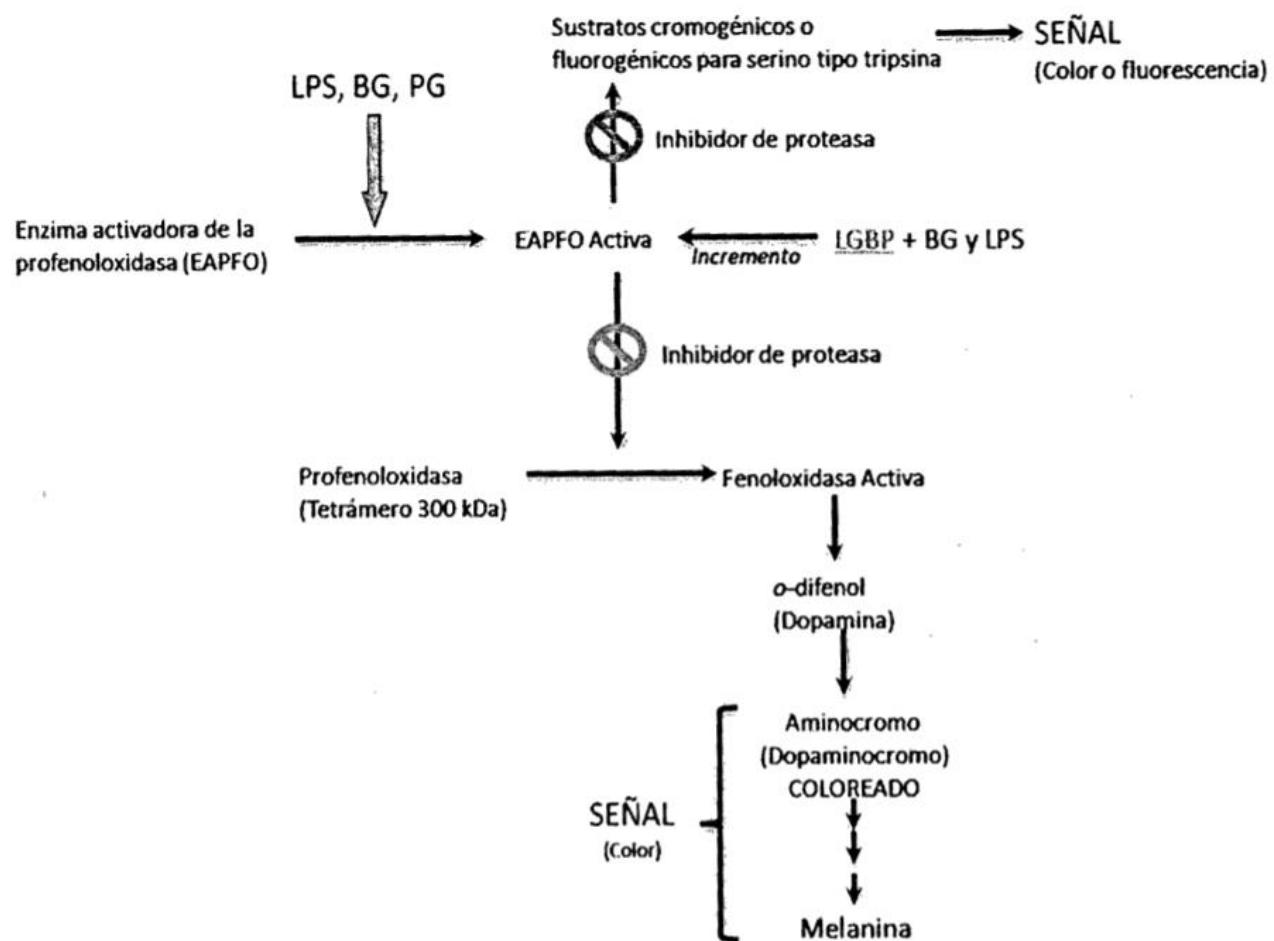


Fig.1

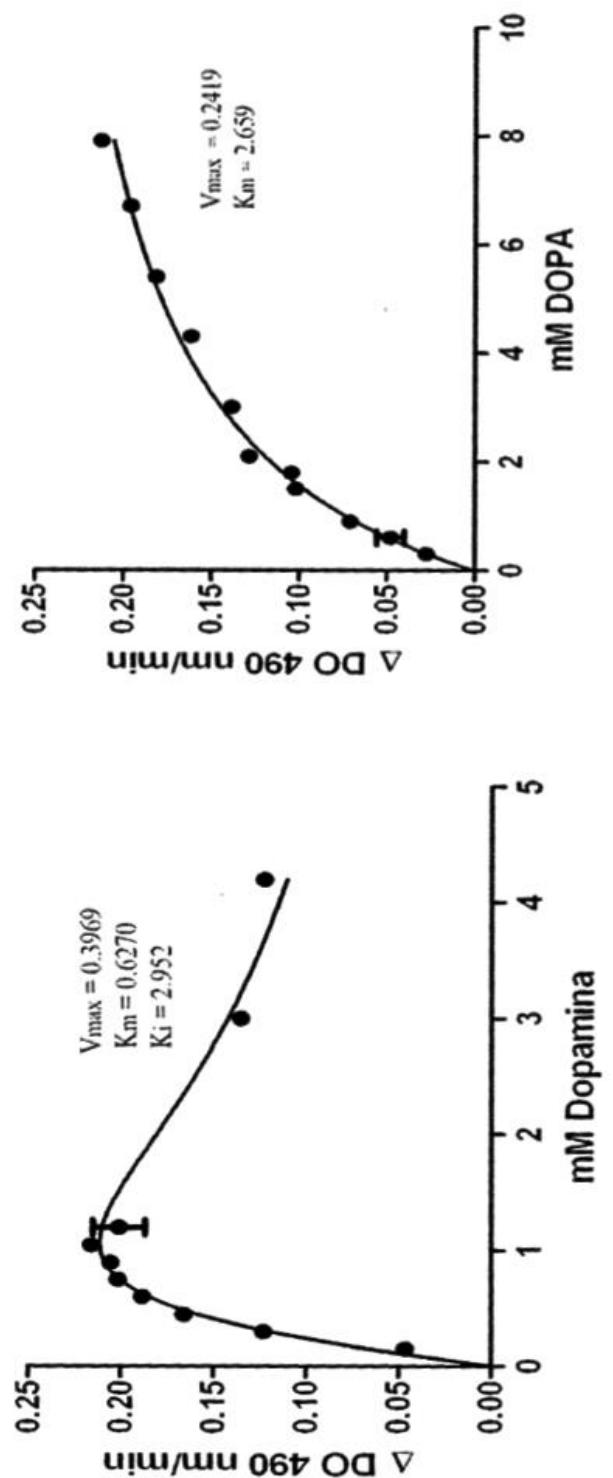


Fig.2

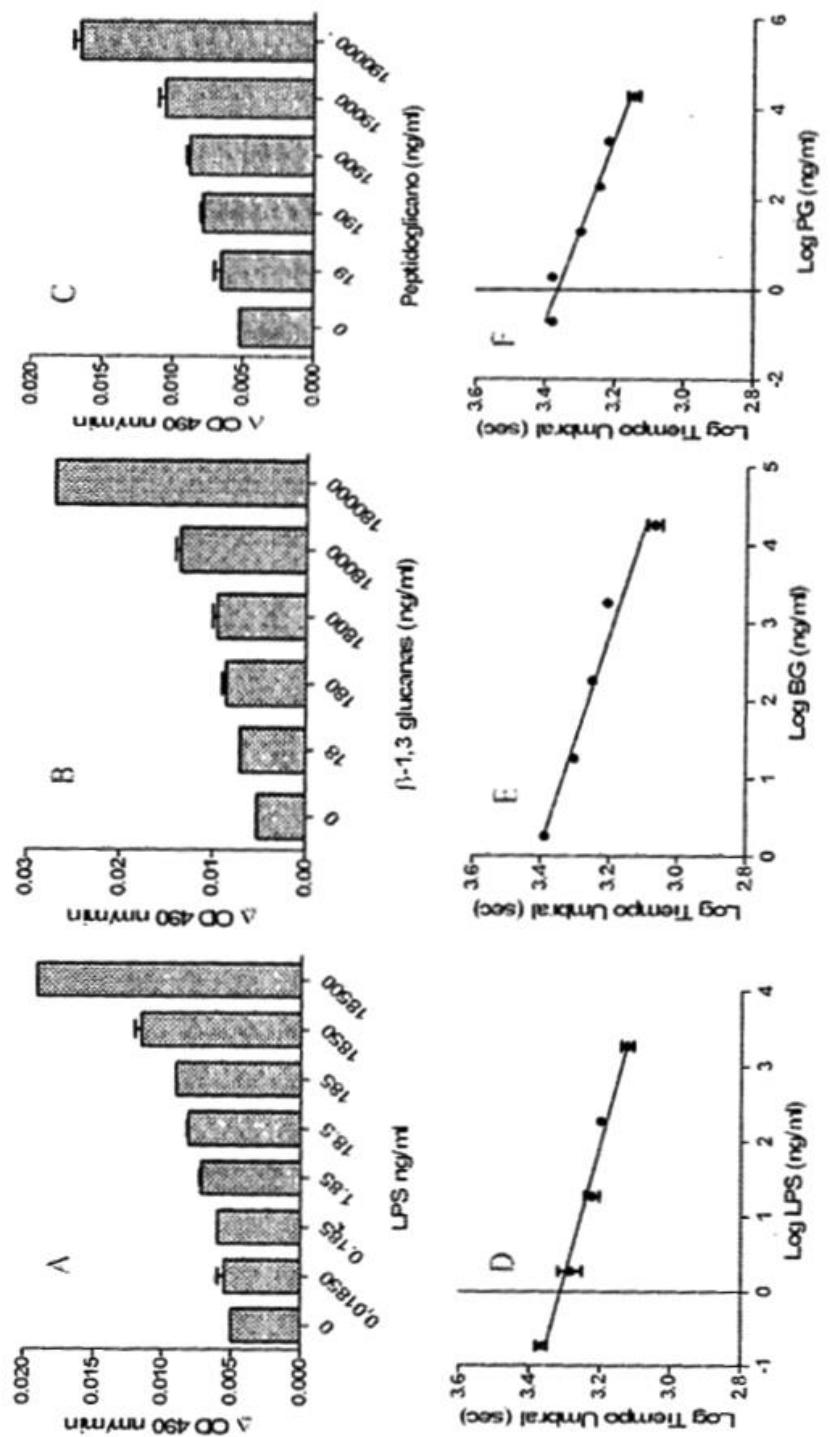


Fig.3

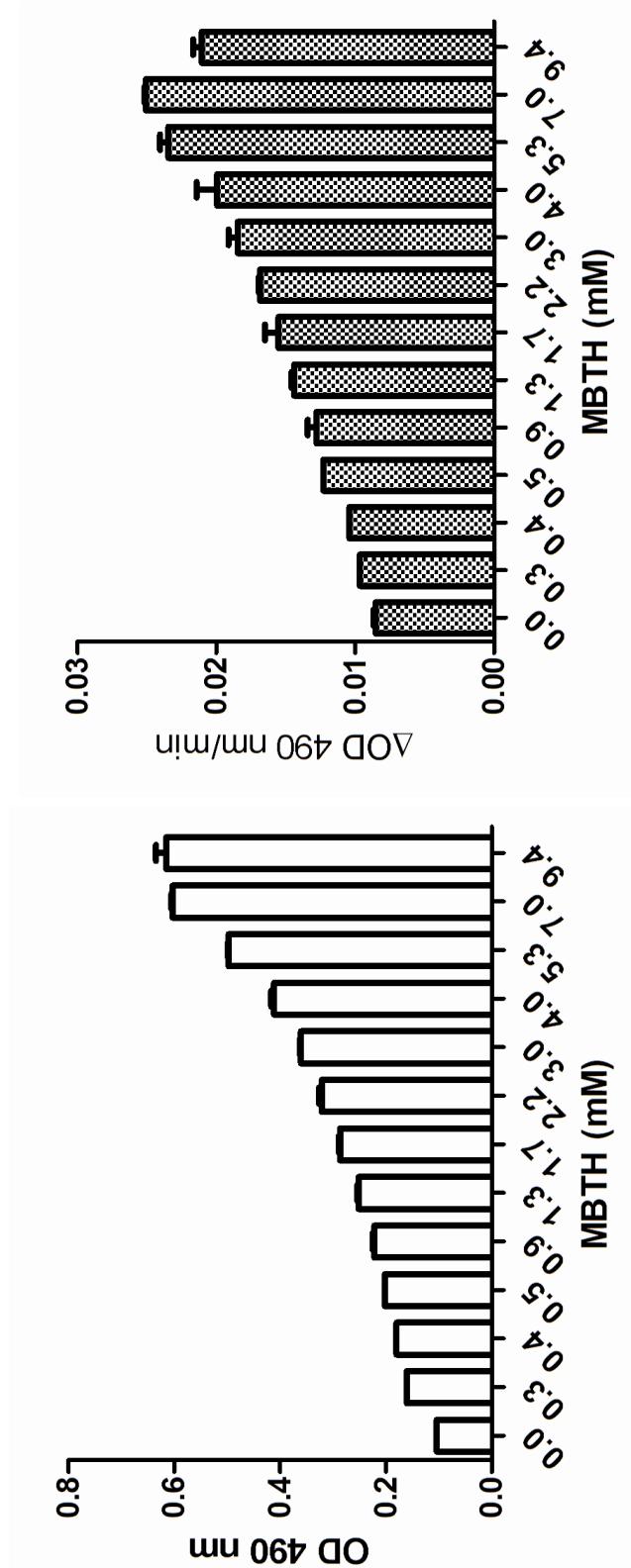


Fig.4

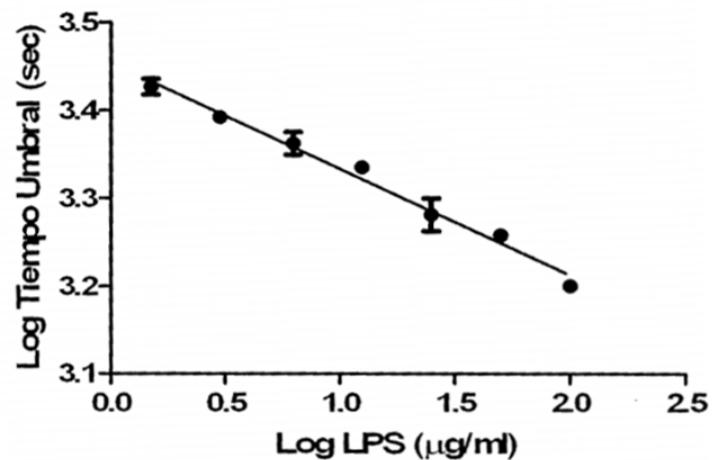


Fig.5

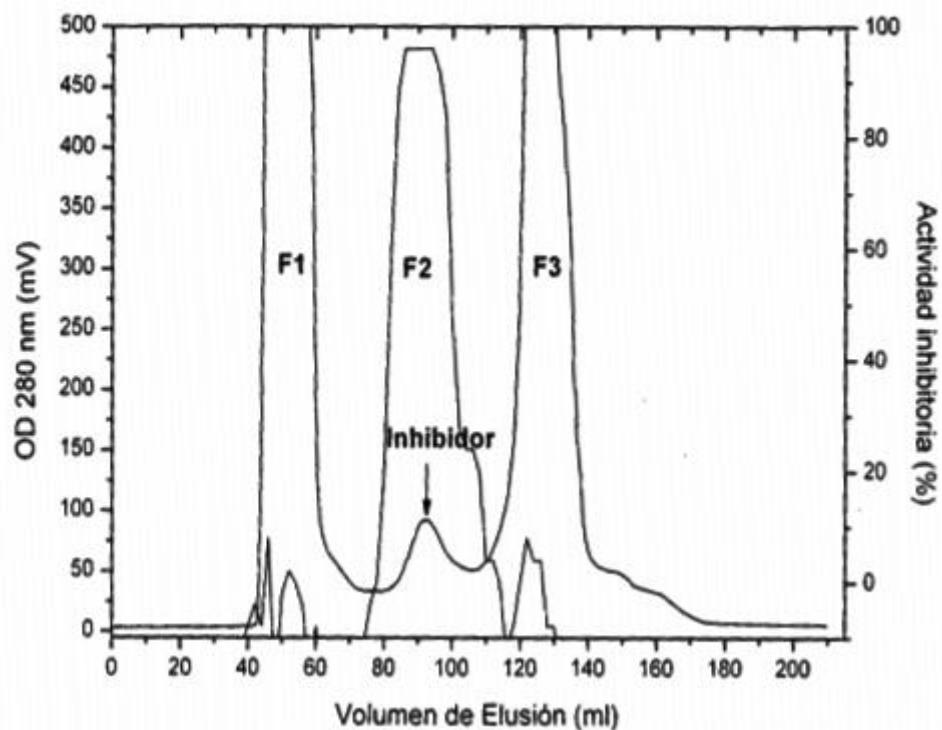


Fig.6

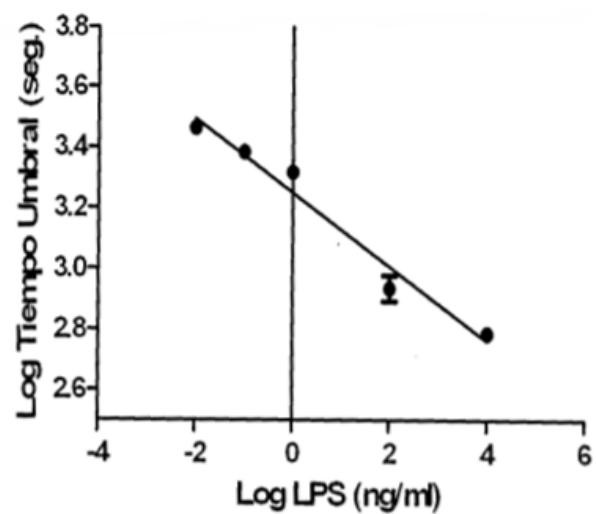


Fig.7

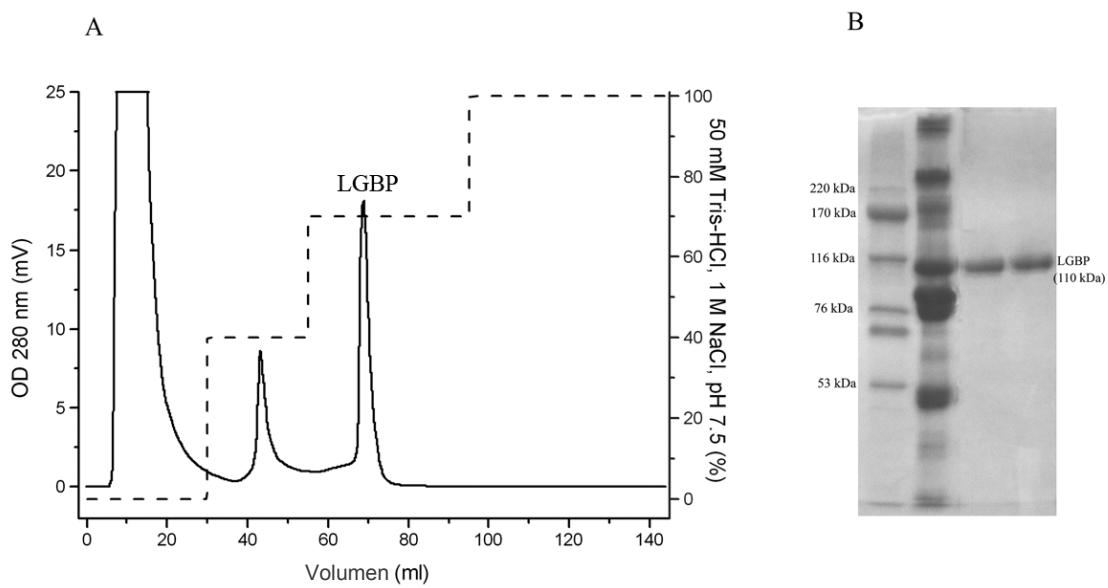


Fig.8