



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 363 853**

② Número de solicitud: 200930424

⑤ Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 27/00 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **07.07.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2011**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
17.08.2011

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Ortea García, Ignacio;**
Gallardo Abuín, José Manuel;
Medina Méndez, Isabel y
Barros Tajés, Lorena

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Procedimiento y kit para la identificación de las principales especies comerciales de langostinos y camarones.**

⑤ Resumen:

Procedimiento y kit para la identificación de las principales especies comerciales de langostinos o camarones (Orden Decapoda) pertenecientes a las familias Penaeidae (*Penaeus monodon*, *Farfantepenaeus notialis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Litopenaeus vannamei*) Solenoceridae (*Pleoticus muelleri*) y Pandalidae (*Pandalus borealis*), en productos y subproductos frescos, refrigerados, congelados y/o elaborados.

ES 2 363 853 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y kit para la identificación de las principales especies comerciales de langostinos y camarones.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la bioquímica y de la taxonomía, y se refiere a un procedimiento rápido mediante espectrometría de masas, para la identificación de las principales especies comerciales de langostinos o camarones (Orden Decapoda) pertenecientes a las familias Penaeidae (*Penaeus monodon*, *Farfantepenaeus notialis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Litopenaeus vannamei*) Solenoceridae (*Pleoticus muelleri*) y Pandalidae (*Pandalus borealis*). Este procedimiento permite la identificación inequívoca de la especie
10 concreta en productos y subproductos frescos, refrigerados, congelados y/o elaborados, de indiscutible aplicación en los sectores alimentario, importador, sanitario y de control de calidad.

Estado de la técnica anterior

15 En la actualidad, dentro del mercado de los productos pesqueros, los langostinos y camarones son productos de gran valor. Así, en 2004 representaban el 16.5% del total del mercado internacional de productos pesqueros y su producción mundial en 2006 fue de unos 6.5 millones de toneladas, equivalentes a un valor de más de 24.000 millones de dólares (FAO), producción que no ha dejado de crecer en los últimos años. Destacan las especies *L. vannamei*, con 2.300.000 toneladas, *P. monodon*, con 833.000 toneladas, y *P. borealis*, con 421.000 toneladas de producción (FIGIS
20 - *Fisheries Global Information System*- FAO; <http://www.fao.org/fishery/figis>).

Diversos países, entre ellos los integrantes de la Unión Europea, destacan entre sus objetivos prioritarios lograr la transparencia en los mercados pesqueros y ofrecer al consumidor información fiable sobre los productos que van a consumir. Este hecho resulta fundamental en un mercado cada vez más globalizado, en el que se pueden encontrar varias especies distintas bajo una misma denominación. Este es el caso concreto de las especies de langostinos y camarones pertenecientes al Orden Decapoda, del que las especies más comerciales se engloban en la superfamilia Penaeoidea (familias Penaeidae y Solenoceridae) y la familia Pandalidae. La incorrecta catalogación, entre otras razones, debida a que especies de origen y características muy diversas no son adecuadamente identificadas, puede ocasionar problemas de sustituciones que afectarían tanto al etiquetado como a la actividad comercial del sector y al propio consumidor.
25 Como el valor comercial varía según las especies y los productos derivados, las entidades administrativas deben proteger a los consumidores de casos de sustitución de especies, mediante medidas de control que aseguren un adecuado etiquetado del producto.

El control de origen y autenticidad de especies se hace más necesario cuanto mayor es la diversidad de especies susceptibles de ser comercializadas bajo el mismo nombre. En el mercado existe una notable heterogeneidad de las especies y géneros que constituyen las principales denominaciones comerciales de langostinos. Cabe destacar que bajo los términos “langostino banana”, “langostino blanco” o “langostino tigre” se encuadran distintas especies de langostinos e incluso distintos géneros. Respecto a la captura, cuanto mayor es el grado de solapamiento geográfico entre los caladeros de las distintas especies, mayor es la frecuencia con la que se pueden pescar dos especies distintas y difícilmente distinguibles en una misma área. Así, por ejemplo, en el océano Índico coexisten tres de las especies de langostinos más comerciales, *P. monodon*, *F. indicus* y *F. merguensis*, las cuales son habitualmente capturadas en una misma pesquería. Y por último, cuanto mayor es el grado de procesado o manipulación del crustáceo previo a la venta, mediante procesos tales como el pelado, eviscerado, descabezado, etc., mayor es la dificultad de la identificación de los especímenes utilizados en dicho producto. A estas circunstancias hay que añadir la creciente exigencia del consumidor por estar adecuadamente informado de la composición de los alimentos en un mercado cada vez más liberalizado y global, y, por tanto, más expuesto a riesgos sanitarios imprevisibles.
35
40
45

Por todo lo anteriormente expuesto, es imprescindible lograr una información contrastada y veraz sobre la naturaleza y el origen de los alimentos, con lo cual a su vez se protegerán a los productos de calidad frente a casos de sustitución de especies, que dan lugar a fraudes al consumidor y a competencia desleal entre productores.
50

En materia de etiquetado a nivel internacional el Codex Alimentarius (una acción conjunta de la FAO y la OMS) es punto de referencia para armonizar las normas alimentarias a nivel mundial. Por otro lado, en la Unión Europea, el Reglamento (CE) nº 104/2000 establece la Organización Común de Mercados en el sector de los productos de la pesca y de la acuicultura, y dispone que “los Estados miembros establecerán y publicarán el Listado de denominaciones comerciales de especies pesqueras y de acuicultura”. En España, el Real Decreto 1380/2002 y el Real Decreto 121/2004 - teniendo en cuenta la Ley 3/2001 de Pesca Marítima del Estado - regulan la identificación y el etiquetado de los productos de la pesca, la acuicultura y el marisqueo, congelados o ultracongelados el primero, y vivos, frescos, refrigerados o cocidos el segundo. Un requisito fundamental del etiquetado de productos pesqueros es la identificación clara del nombre de la especie utilizada.
55
60

La existencia de toda esta serie de normativas necesita herramientas fiables que permitan la identificación certera del origen y naturaleza del producto. Estas herramientas han de basarse en metodologías analíticas que identifiquen la especie a partir de la cual se ha elaborado el producto a analizar, aunque ya no existan indicios morfológicos o sensoriales. De hecho, solamente los expertos son capaces de identificar las especies mediante una serie de caracteres tanto morfológicos como anatómicos cuando el crustáceo se presenta intacto, ya sea fresco o congelado (Mafra *et al.*, 2008. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649-665). En cambio una vez procesado (pelado, conge-
65

lado, descabezado, etc.), la mayoría de los caracteres morfológicos desaparecen por lo que la identificación se hace prácticamente imposible.

Como una primera alternativa a la identificación morfológica para las especies de langostinos del Orden Decapoda, se abordaron herramientas analíticas encaminadas al análisis de las proteínas procedentes de sus tejidos. Los primeros trabajos de investigación fueron dos estudios de An y colaboradores (An *et al.*, 1988. *Journal of Food Science*, 53(2), 313-318; An *et al.*, 1989. *Journal of Food Science*, 54(2), 233-236), utilizando SDS-PAGE el primero e isoelectroenfoque el segundo. En estos trabajos sólo se incluyeron tres especies minoritarias (*Penaeus duorarum*, *Penaeus setiferus* y *Sicyonia brevirostris*), consiguiendo distinguir el segundo estudio entre las tres especies, pero no cuando se presentaba una mezcla con dos de las especies.

Más recientemente, se han propuesto dos métodos basados en el análisis del ADN para la identificación de especies de langostinos y camarones. En el primero (Khamnamtong *et al.*, 2005. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(4), 491-499) se cita un método para la identificación de especies de langostinos peneideos en base al polimorfismo del gen 16S rRNA, utilizando polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP), previa amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este estudio se pudo identificar distintivamente las especies *P. monodon*, *L. vannamei* y *F. merguensis*, pero no la *Penaeus semisulcatus* y la *Marsupenaeus japonicus*. En el segundo de los estudios basados en ADN (Pascoal *et al.*, 2008. *Electrophoresis*, 29(2), 499-509) se recoge un método, que ha sido patentado (PCT/ES2007/070212), para la identificación de especies de langostinos de la superfamilia Penaeoidea utilizando la combinación de PCR y RFLP, en el que es necesario el corte con 3 enzimas de restricción distintos para conseguir una correcta identificación de las especies. Estos mismos autores describen otro método, también utilizando PCR y RFLP, para un número menor de especies (Pascoal *et al.*, 2008. *Electrophoresis*, 29 (15), 3220-3228).

Las técnicas de Biología Molecular no se han aplicado a la especie *Pandalus borealis*, conocida como camarón nórdico o boreal, de gran interés comercial, al ser la especie de camarón con una mayor cantidad de capturas (FIGIS, FAO). Por otro lado, las técnicas genéticas disponibles hasta el momento para la identificación de especies de langostinos, proporcionan una metodología muy laboriosa, con numerosos etapas necesarias para la determinación final de la especie, incluyendo la amplificación del ADN mediante PCR, el corte con varios enzimas de restricción y la resolución de los fragmentos de restricción resultantes en geles de electroforesis, al mismo tiempo que son técnicas que exigen largos tiempos de análisis, ya que el resultado final suelen obtenerse tras un periodo de tiempo de unas 18-48 horas. Por tanto, existe la necesidad de un método alternativo y/o complementario a las técnicas existentes que resuelvan los inconvenientes anteriormente citados, mejorando en este sentido la rapidez en el diagnóstico y la sencillez en el análisis, para las principales especies de langostinos y camarones pertenecientes al Orden Decapoda, incluyendo la especie *P. borealis*. Metodologías sencillas, rápidas y eficientes que logren la identificación de la especie en cualquier etapa de la cadena alimentaria y en cualquier producto ya sea fresco, refrigerado, congelado y/o procesado.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la identificación rápida, sencilla, sensible e inequívoca de las principales especies comerciales de langostinos y camarones pertenecientes al orden Decapoda en cualquier punto de la cadena alimentaria y en cualquier producto fresco, refrigerado, congelado y/o procesado. La invención se basa en la identificación de una serie de péptidos específicos resultantes de la digestión del extracto proteico sarcoplásmico.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de datos útiles en la identificación de especies langostinos y camarones pertenecientes al Orden Decapoda, de ahora en adelante primer procedimiento de la invención, que comprende:

- a) extracción de las proteínas sarcoplásmicas del músculo blanco de una muestra biológica aislada
- b) digerir las proteínas del extracto sarcoplásmico del paso (a), e
- c) identificar la presencia o ausencia, en el extracto digerido del paso (b), de los péptidos que se seleccionan de la lista que comprende: S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7).

Todos estos péptidos aislados están comprendidos en las distintas secuencias de la proteína arginina kinasa de cada una de las especies de langostinos o camarones.

En esta memoria se entiende por "muestra biológica" cualquier material biológico de origen animal, preferiblemente de animales invertebrados, del *Phylum Arthropoda*, del *Subphylum Crustacea*, y del Orden Decapoda, y que pueda albergar información sobre la dotación genética característica de dicho animal, como tejidos, células y proteínas. Así, podría ser, pero sin limitarse, cualquier material del que se sospeche la presencia de material biológico de origen animal, y cuya procedencia quiera ser determinada, como alimentos frescos, refrigerados, congelados y/o procesados.

ES 2 363 853 A1

Las especies identificables con el procedimiento de la invención son las siguientes: i) Familia Penaeidae: *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *Farfantepenaeus notialis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Fenneropenaeus merguensis*; ii) Familia Solenoceridae: *Pleoticus muelleri*; y iii) Familia Pandalidae: *Pandalus borealis*.

5 Estas especies son las principales especies comerciales de langostinos y camarones, constituyendo dos de ellas (*Litopenaeus vannamei* y *Penaeus monodon*) el 80% a nivel mundial (Pascoal *et al.*, 2008. *Electrophoresis*, 29 (15), 3220-3228).

10 Así, la identificación de los péptidos específicos resumidos en la Tabla 1, permite de forma escalonada discriminar si en una muestra biológica, por ejemplo de alimento, existen trazas de langostino o camarón, si éstas pertenecen a una u otra familia y la especie/s concreta/s utilizadas en dicho producto. La determinación de la presencia o ausencia en la muestra problema de la Familia Penaeidae, de la Familia Solenoceridae, y/o de la Familia Pandalidae, se lleva a cabo valorando la presencia/ausencia de un total de 3 péptidos específicos, uno para cada familia:

15 - Péptido específico para la Familia Penaeidae: S-PEN829 (13 aminoácidos, SEQ ID NO: 1).

- Péptido específico para la Familia Solenoceridae: S-MUE643 (11 aminoácidos, SEQ ID NO: 2).

20 - Péptido específico para la Familia Pandalidae: S-BOR817 (13 aminoácidos, SEQ ID NO: 3).

Si la muestra no presenta ninguno de los péptidos específicos de Familia, el procedimiento termina en esta etapa, y se puede concluir que en la muestra no existe langostino o camarón. Si la muestra es positiva para la Familia Solenoceridae, se identificará la especie *Pleoticus muelleri*. Si la muestra es positiva para la Familia Pandalidae, se identificará la especie *Pandalus borealis*.

25 Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el procedimiento para la identificación de especies langostinos y camarones, de ahora en adelante segundo procedimiento de la invención, que comprende los pasos (a)-(c) del primer procedimiento de la invención y, adicionalmente:

30 d1) asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Pleoticus muelleri* de la Familia Solenoceridae, si el péptido identificado en el paso (c) es S-MUE643 (SEQ ID NO: 2).

En otra realización preferida, el segundo procedimiento de la invención comprende, adicionalmente a los pasos (a)-(c) del primer procedimiento de la invención:

35 d2) asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Pandalus borealis* de la Familia Pandalidae, si el péptido identificado en el paso (c) es S-BOR817 (SEQ ID NO: 3).

40 En otra realización preferida, el procedimiento de la invención comprende, adicionalmente a los pasos (a)-(c) del primer procedimiento de la invención, la etapa:

d3) asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la Familia Penaeidae, si el péptido identificado en el paso (c) es S-PEN829 (SEQ ID NO: 1).

45 Si el análisis ha dado positivo para la Familia Penaeidae, la combinación de presencia/ausencia de una serie de otros péptidos permitirá la identificación concreta de la especie. El péptido S-PEN759 (13 aminoácidos, SEQ ID NO: 4) permitirá la identificación del origen geográfico de los langostinos. Su presencia revela la existencia en la muestra de alguna de las especies de langostino de los océanos Índico y Pacífico (*P. monodon*, *L. vannamei*, *F. indicus* y *F. merguensis*); por el contrario, su ausencia es indicativa de la presencia de una especie del océano Atlántico (*F. notialis*). Así, en una realización aún más preferida, el segundo procedimiento de la invención comprende, adicionalmente a la etapa d3, la etapa:

50 e1) asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Farfantepenaeus notialis*, si en el paso (c) no se ha identificado el péptido S-PEN759 (SEQ ID NO: 4).

55 Conocida ya la procedencia, una serie de péptidos permitirán diferenciar las especies. Los péptidos:

- S-PEN675 (13 aminoácidos, SEQ ID NO: 5)

60 - S-PEN539 (9 aminoácidos, SEQ ID NO: 6)

- S-PEN603 (10 aminoácidos, SEQ ID NO: 7)

65 permitirán la identificación inequívoca en la muestra de *P. monodon*, *L. vannamei*, *F. indicus* y *F. merguensis*. De esta manera, por ejemplo *P. monodon* se identifica de forma precisa con la determinación en la muestra de los péptidos S-PEN675 y S-PEN539; *L. vannamei* se identifica de forma precisa con la presencia en la muestra del péptido S-PEN675 y la ausencia del péptido S-PEN539; *F. merguensis* se identifica de forma precisa con la presencia en la muestra del péptido S-PEN603; *F. indicus* se identifica de forma clara con la ausencia de todos los anteriores (Tabla 1).

ES 2 363 853 A1

Así, en otra realización más preferida, el segundo procedimiento de la invención comprende, adicionalmente, y además de la etapa d3, la etapa:

5 e2) asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *P. monodon*, si en el paso (c) se identifican los péptidos S-PEN675 (SEQ ID NO: 5) y S-PEN539 (SEQ ID NO: 6).

En otra realización más preferida, el segundo procedimiento de la invención comprende, adicionalmente a la etapa d3, la etapa:

10 e3) asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Litopenaeus vannamei*, si en el paso (c) se identifica la presencia del péptido S-PEN675 (SEQ ID NO: 5) y la ausencia del péptido S-PEN539 (SEQ ID NO: 6).

15 En otra realización más preferida, el segundo procedimiento de la invención comprende, adicionalmente a la etapa d3, la etapa:

20 e4) asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Fenneropenaeus merguensis*, si en el paso (c) se identifica la presencia del péptido S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) y la ausencia de los péptidos S-PEN675 (SEQ ID NO: 5) y S-PEN539 (SEQ ID NO: 6).

En otra realización más preferida, el segundo procedimiento de la invención comprende, adicionalmente a la etapa d3, la etapa:

25 e5) asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Fenneropenaeus indicus*, si en el paso (c) se identifica la presencia del péptido S-PEN759 (SEQ ID NO: 4) y la ausencia de los péptidos S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7).

30 Los pasos (a), (b) y/o (c) del procedimiento descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la identificación de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) en el paso (c). Además de los pasos especificados anteriormente puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los resultados obtenidos mediante este procedimiento.

35 Las técnicas y procedimientos necesarios para extraer las proteínas sarcoplásmicas del músculo blanco a partir de una muestra biológica son ampliamente conocidos por los técnicos y expertos en el campo de la técnica, y pueden ser llevados a cabo igualmente por técnicas similares o ligeramente modificadas. Así, en una realización preferida, la extracción a partir del músculo blanco se realiza por homogeneización de la muestra, por ejemplo, pero sin limitarnos, con agua o con un extractante de baja fuerza iónica, centrifugando posteriormente, preferiblemente a 30.000 x g 10 min.

40 La digestión de las proteínas puede llevarse a cabo por varios métodos, como por ejemplo mediante una incubación tradicional con una enzima, como la tripsina. Además, se puede sustituir la tripsina por otras proteasas como la quimiotripsina, endoproteinasa Glu-C, endoproteinasa Lys-C, etc., o alternativamente se puede realizar la digestión mediante tratamientos de hidrólisis química tales como el bromuro de cianógeno, hidroxilamina, etc. Además, la digestión puede realizarse de forma simultánea o secuencial mediante hidrólisis química y enzimática. En este sentido, la aplicación de ultrasonidos a la muestra permite reducir el tiempo de realización de la etapa de digestión. Con estos métodos alternativos se podrían generar otros péptidos distintos a los descritos como específicos en la presente invención, si bien la presencia de éstos últimos en la muestra permitiría reproducir de igual manera el procedimiento particular.

50 Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la digestión de las proteínas del paso (b) se realiza con una enzima proteasa, más preferiblemente con la enzima tripsina. Aún más preferiblemente, la digestión de las proteínas del paso (b) es ultrarrápida, y se realiza mediante la aplicación de ultrasonidos focalizados de alta intensidad.

55 En otra realización preferida, la digestión de las proteínas del paso (b) se realiza mediante hidrólisis química, y más preferiblemente, la digestión de las proteínas del paso (b) es ultrarrápida, y se realiza mediante la aplicación de ultrasonidos focalizados de alta intensidad.

60 En la presente invención la separación y/o identificación de los distintos péptidos se puede llevar a cabo por distintos métodos. Así, por ejemplo, directamente mediante un espectrómetro de masas sin separación previa, o también por LC-MS, mediante cromatografía HPLC acoplada a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray y con una trampa iónica tridimensional o lineal, triple cuadrupolo o QqTof como analizador, configurado en modo SIRM (*selected ion reaction monitoring, monitorización de la reacción de un ión seleccionado*), SIM (*selected ion monitoring, monitorización de un ión seleccionado*) monitorización de cada uno de los iones específicos) o SMIM (*selected MS/MS ion monitoring, monitorización de la fragmentación de un ión seleccionado*) (Jorge *et al.*, 2007. *Journal of Mass Spectrometry*, 42: 1391-1403). Para todas estas estrategias los espectros de fragmentación de cada uno de los péptidos específicos se muestran en la Fig. 5.

ES 2 363 853 A1

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la identificación de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) se realiza mediante espectrometría de masas. En otra realización más preferida, se realiza mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) previa. En otra realización aún más preferida, el espectrómetro de masas acoplado a un sistema HPLC previo trabajan en cualquiera de los siguientes modos Data Dependent, SIM (*selected ion monitoring*), SIRM (*selected ion reaction monitoring*) y SMIM (*selected MS/MS ion monitoring*).

En otra realización preferida, la detección de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7), se realiza mediante un anticuerpo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con la muestra obtenida. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: hibridación de las proteínas en membrana y posterior detección mediante anticuerpo, ya sea tras electroforesis previa de las proteínas (*western-blot*) o tras su aplicación directa (*dot-blot*), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica o *chips* de proteína (“microarrays”).

El término “anticuerpo” tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con alguno/s de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7). Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de alguno/s de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7). y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo recombinante” es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del anticuerpo, o que lo produce como resultado de la recombinación homóloga.

De la misma manera, una vez conocida la secuencia aminoacídica de un péptido, pueden diseñarse sondas para la identificación en una muestra de dicho péptido a nivel de los ácidos nucleicos. Puesto que una misma secuencia polipeptídica puede estar codificada por distintos oligonucleótidos, sin embargo, se pueden localizar las secuencias de interés mediante un simple procedimiento de ensayo y error. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, todas las secuencias de ADN que codifican para la secuencia polipeptídica dada (cada uno de los péptidos de la invención o sus secuencias complementarias) se sintetizan (por ejemplo mediante un método en fase sólida) y se marcan radiactivamente mediante la fosforilación en sus extremos 5' con ³²P. Se coloca una membrana de nitrocelulosa que contengan clones con los péptidos de la invención en presencia de una mezcla que contenga todas estas sondas y se somete a autorradiografía para determinar cuales contienen una secuencia que coincida con la del péptido de interés. Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7), se realiza mediante un oligonucleótido.

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido denominado S-PEN829, de ahora en adelante primer péptido de la invención, cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 1.

En esta memoria, el péptido S-PEN829 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del péptido S-PEN829, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1,

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del péptido S-PEN829. Incluye, por tanto, diversas variantes del péptido S-PEN829, esto es, péptidos resultantes de modificaciones postraducción como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación. El término “variante” se define más adelante en esta memoria.

ES 2 363 853 A1

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido denominado S-MUE643, de ahora en adelante segundo péptido de la invención, cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 2.

5 En esta memoria, el péptido S-MUE643 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del péptido S-MUE643, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

10 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

15 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2.

20 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del péptido S-MUE643. Incluye, por tanto, diversas variantes del péptido S-MUE643, esto es, péptidos resultantes de modificaciones postraduccion como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido denominado S-BOR643, de ahora en adelante tercer péptido de la invención, cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 3.

25 En esta memoria, el péptido S-BOR643 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del péptido S-BOR643, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 3,

30 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

35 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 3.

40 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del péptido S-BOR643. Incluye, por tanto, diversas variantes del péptido S-BOR643, esto es, péptidos resultantes de modificaciones postraduccion como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido denominado S-PEN759, de ahora en adelante cuarto péptido de la invención, cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 4.

45 En esta memoria, el péptido S-PEN759 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del péptido S-BOR643, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,

50 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

55 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4.

60 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del péptido S-PEN759. Incluye, por tanto, diversas variantes del péptido S-PEN759, esto es, péptidos resultantes de modificaciones postraduccion como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido denominado S-PEN675, de ahora en adelante quinto péptido de la invención, cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 5.

65 En esta memoria, el péptido S-PEN675 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del péptido S-BOR643, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 5,

ES 2 363 853 A1

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 5.

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del péptido S-PEN675. Incluye, por tanto, diversas variantes del péptido S-PEN675, esto es, péptidos resultantes de modificaciones postraduccion como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido denominado S-PEN539, de ahora en adelante sexto péptido de la invención, cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 6, y su masa para el ión doblemente cargado de 539,3 Da.

En esta memoria, el péptido S-PEN539 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del péptido S-BOR643, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 6,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 6.

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del péptido S-PEN539. Incluye, por tanto, diversas variantes del péptido S-PEN539, esto es, péptidos resultantes de modificaciones postraduccion como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido denominado S-PEN603, de ahora en adelante séptimo péptido de la invención, cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 7.

En esta memoria, el péptido S-PEN603 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante del péptido S-PEN603, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 7,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 7.

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del péptido S-PEN603. Incluye, por tanto, diversas variantes del péptido S-PEN603, esto es, péptidos resultantes de modificaciones postraduccion como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a un péptido sustancialmente homólogo a cualquiera de los péptidos que se seleccionan de la lista que comprende: S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7). En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término “variante” incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postraduccion como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Tal como aquí se utiliza esta expresión, un péptido es “sustancialmente homólogo” a cualquiera de los péptidos que se seleccionan de la lista que comprende: S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7), cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los péptidos que se seleccionan de la lista que comprende: S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643

ES 2 363 853 A1

(SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7), es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 de, al menos, un 60%, típicamente de, al menos, un 80%,
5 ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoacídicas que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos
10 secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias, que incluye, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410).

El término “fragmento”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de cualquiera de
15 los péptidos que se seleccionan de la lista que comprende: S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) o de una sus variantes.

La expresión “funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que el péptido o el fragmento del
20 péptido en cuestión mantienen esencialmente las propiedades inmunológicas descritas más adelante en este documento. Dichas propiedades inmunológicas se pueden determinar mediante métodos convencionales en el estado de la técnica.

Los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) de la presente
25 invención pueden emplearse para generar anticuerpos, que son herramientas que permiten la identificación de los péptidos de la presente invención. Técnicas para la generación de anticuerpos son conocidas en el estado de la técnica por los expertos en la materia. Así, por ejemplo, pero sin limitarnos, inyectando un antígeno en un mamífero, como un ratón, rata o conejo (en el caso de que se requiera poca cantidad) o una cabra, oveja o caballo (si se requiere grandes cantidades) se puede generar un antisuero a partir de estos animales, que está constituido por anticuerpos policlonales.
30 O por ejemplo, si se desea obtener anticuerpos específicos para un único epítipo de un antígeno, se aíslan linfocitos secretadores de anticuerpos de un animal y se immortalizan fusionándolos con una línea celular cancerosa. Las células fusionadas se denominan hibridomas y continuarán creciendo y secretando anticuerpo en el cultivo. Se aíslan las células de hibridoma individuales mediante clonado por dilución para generar clones que produzcan todos el mismo anticuerpo. A estos anticuerpos se les denomina anticuerpos monoclonales.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), y/o S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) para la generación de anticuerpos. Preferiblemente, los anticuerpos
40 se emplean para la identificación de especies de langostinos y camarones pertenecientes al Orden Decapoda según el procedimiento de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la identificación de especies de langostinos y camarones pertenecientes al Orden Decapoda, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los medios necesarios para
45 la identificación de los péptidos de la invención. Así, puede contener, por ejemplo pero sin limitarse, tampones, agentes para prevenir la contaminación, concentraciones adecuadas de tripsina y/o otras enzimas, en el caso de la detección de los péptidos mediante anticuerpos, podría contener anticuerpos capaces de reconocer específicamente a dichos péptidos, o en el caso de la detección mediante oligonucleótidos, podrá comprender cebadores, sondas, anticuerpos poli o monoclonales, y todos aquellos reactivos necesarios para realizar los procedimientos descritos anteriormente en este documento y/o conocidos en el estado de la técnica. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el
50 uso de tampones, enzimas, enzimas polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además otras proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, el Kit comprende además todos los medios necesarios para llevar a cabo los procedimientos de la invención, y más preferiblemente, puede incluir las instrucciones.

Los términos “oligonucleótido”, “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN) como desoxiribonucleótidos (ADN).

Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de
60 manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir
65 otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. *Esquema general del procedimiento de la invención.*

5 Fig. 2. *Resultado de la monitorización de los péptidos específicos del ejemplo de realización 2.* A) Cromatogramas para identificar la familia. B) Cromatograma para identificar el origen geográfico. C) Cromatogramas para la determinación de la especie.

10 Fig. 3. *Resultado de la monitorización de los péptidos específicos del ejemplo de realización 3.* A) Cromatogramas para identificar la familia. B) Cromatogramas para identificar el origen geográfico. C) Cromatogramas para la determinación de la especie.

15 Fig. 4. *Resultado de la monitorización de los péptidos específicos del ejemplo de realización 4.* A) Cromatogramas para identificar la familia. B) Cromatograma para identificar el origen geográfico. C) Cromatogramas para la determinación de la especie.

20 Fig. 5. *Espectros de fragmentación de los iones doblemente cargados para los distintos péptidos de la invención.* A) Espectro de fragmentación del péptido S-PEN829 (SEQ ID NO: 1). B) Espectro de fragmentación del péptido S-MUE643 (SEQ ID NO: 2). C) Espectro de fragmentación del péptido S-BOR817 (SEQ ID NO: 3). D) Espectro de fragmentación del péptido S-PEN759 (SEQ ID NO: 4). E) Espectro de fragmentación del péptido S-PEN675 (SEQ ID NO: 5). F) Espectro de fragmentación del péptido S-PEN539 (SEQ ID NO: 6). G) Espectro de fragmentación del péptido S-PEN603 (SEQ ID NO: 7).

Ejemplos de realización

25 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del procedimiento de la invención. La identificación de los péptidos en el ejemplo de la invención se ha realizado mediante un sistema HPLC (Surveyor-LC System, Thermo-Electron, San José, CA, USA), acoplado a un espectrómetro de masas, lo que unido a una digestión ultrarrápida de las proteínas, permitió la
30 identificación de las especies de langostinos y camarones en unos 90 minutos.

Ejemplo 1*Identificación de las distintas especies del Orden Decapoda*

35 Con el objeto de identificar el patrón de péptidos específicos de cada una de las principales especies de langostinos o camarones pertenecientes al Orden Decapoda, se procedió tal y como se describe en los siguientes apartados.

40 Todas las soluciones y el material empleado para el tratamiento de la muestra deben estar libres de proteínas contaminantes. Se requiere desde el inicio: *i*) una manipulación cuidadosa; *ii*) instrumental libre de proteínas y con baja capacidad de adsorción proteica, y *iii*) reactivos de calidad extra (grado HPLC).

1.- Extracción de las proteínas sarcoplásmicas

45 La extracción de las proteínas sarcoplásmicas de cada especie se realizó a partir de la homogenización de 1 g de músculo blanco obtenido de la cola de cada individuo analizado. Los trozos de tejido previamente triturados con una espátula y un bisturí, se introdujeron en tubos de ensayo y se les añadió 2 mL de agua milliQ con 5 mM de PMSF (este último de manera opcional). La muestra se homogeneizó con un Ultra-Turrax (IKA-Werke, Staufen, Alemania), durante 2 ciclos de aproximadamente 30 s. Posteriormente, el homogenizado fue centrifugado a 30.000 g durante 10
50 minutos (y se recogió el sobrenadante conteniendo las proteínas sarcoplásmicas. La concentración de proteína en el mismo fue cuantificada mediante el método del ácido bicincoónico (Smith *et al.*, 1985. *Anal Biochem.* 150(1):76-85. Erratum in: *Anal Biochem* 1987; 163(1):279).

2.- Digestión de las proteínas sarcoplásmicas con tripsina

55 Unos 100 µg del extracto de proteínas sarcoplásmicas de cada una de las muestras fueron digeridos con 4 µg de tripsina, aplicando simultáneamente ultrasonidos focalizados de alta intensidad (López-Ferrer *et al.*, 2005. *Journal of Proteome Research* 4: 1569-1574) durante 1 min.

3.- Separación y monitorización de péptidos de las muestras mediante sistema LC-MS y SMIM

60 Como etapa recomendable, pero opcional, los péptidos resultantes de la digestión fueron acidificados y purificados a través de pequeñas columnas de fase reversa. Del extracto peptídico de cada una de las muestras se inyectaron 5 µL en un sistema HPLC (Surveyor-LC System, Thermo-Electron, San José, CA, USA), acoplado a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización electrospray y con una trampa iónica como analizador (LCQ-MS Thermo-Finnigan, San José, CA, USA). La separación se realizó a través de una columna de fase reversa (Thermo Hypersil-Keystone, San José, CA, USA), a un flujo de 1,5-2 µL/min. Los péptidos fueron eluidos en un gradiente de 65 min del 5% al 45% de solvente B (Solvente A: 0,5% ácido acético. Solvente B: 0,5% ácido acético, 80% acetonitrilo). A

ES 2 363 853 A1

medida que los péptidos iban eluyendo, el espectrómetro de masas configurado en modo SMIM realizó una monitorización continua de la fragmentación de los iones doblemente cargados de los 7 péptidos específicos recogidos en la Tabla 1.

5 A partir de la fragmentación de los 7 péptidos o iones seleccionados, contenidos en la Tabla 1, se pudo discriminar de forma escalonada si la muestra pertenecía a un langostino o camarón, si éste pertenecía a una u otra familia, su procedencia geográfica y determinar la especie concreta.

10 Estos péptidos específicos se seleccionaron teniendo en cuenta la especificidad de los mismos, en comparación con las secuencias de proteínas disponibles en las bases de datos (Swiss-Prot, UNIPROT). Los espectros de fragmentación para cada uno de los péptidos específicos se muestran en la Fig. 5.

15 Los siguientes ejemplos permiten ilustrar casos en los que la utilización del procedimiento de la invención con o sin las etapas adicionales descritas anteriormente permite un mayor control de productos de la cadena alimentaria.

Ejemplo 2

Utilización del procedimiento de invención para el control de fraude en importaciones

20 Se plantea el problema de identificar la especie de langostino de una partida de langostinos congelados, provenientes del mismo caladero (caladero de Mozambique) e importadas a España para el consumo humano etiquetadas como *Penaeus* spp. Para la descripción completa del procedimiento véase etapas consecutivas (1-3) del Ejemplo 1.

25 Tras la monitorización SMIM en el sistema LC-MS (etapa 3), se llevó a cabo, como etapa 4, un procedimiento escalonado para la identificación de cada especie en particular, iniciando la discriminación de la existencia de langostino o camarón o no en la muestra, la determinación de la familia de langostino o camarón si esta existiese en la muestra, la procedencia geográfica y finalmente la determinación particular de la especie concreta.

30 4.- Identificación de las especies capturadas

A partir de la fragmentación de los péptidos o iones seleccionados se realizó la identificación de la especie de las cuatro muestras de trabajo en dos etapas consecutivas:

35 4.1.- Determinación de la presencia/ausencia en la muestra de la Familia Penaeidae, la Familia Solenoceridae o la familia Pandalidae

40 En esta primera etapa se comprobó la presencia o ausencia para cada una de las muestras de tres posibles combinaciones de péptidos específicos: Familia Penaeidae, S-PEN829 (SEQ ID NO: 1); Familia Solenoceridae S-MUE643 (SEQ ID NO: 2); Familia Pandalidae S-BOR817 (SEQ ID NO: 3). Todos los especímenes fueron identificados como pertenecientes a la Familia Penaeidae (Fig. 2A).

4.2.- Identificación del origen geográfico y de la especie de langostino presente en la muestra

45 En una primera aproximación la presencia del péptido S-PEN759 (SEQ ID NO: 4) permitió confirmar que se trataba de langostinos del Índico-Pacífico (Fig. 2B).

50 Finalmente la combinación de una serie de péptidos específicos recogidos en la Tabla 1 determinó inequívocamente la especie (Fig. 2C). Así, las cuatro muestras fueron identificadas como *Penaeus monodon* (langostino tigre).

55 De esta forma los organismos oficiales encargados del control de importaciones habrían verificado la especie presente en esta partida comercial, ya que la información proporcionada por el suministrador era insuficiente, además de que se han importado langostinos de una zona donde se solapan geográficamente dos especies distintas, lo que puede inducir a errores en el etiquetado.

Ejemplo 3

Utilización del procedimiento de la invención para la autenticación de producto final y control de fraude al consumidor

60 Se plantea el problema de identificar un lote de 4 muestras congeladas etiquetadas como “colas de langostino vannamei congeladas”.

65 Para la descripción completa del procedimiento véase etapas consecutivas (1-3) del Ejemplo 1. Tras la monitorización SMIM en el sistema LC-MS (etapa 3), se llevó a cabo la etapa 4.

ES 2 363 853 A1

4.- Identificación de las especies capturadas

Realizada en dos etapas consecutivas:

5 4.1.- Determinación de la presencia en la muestra de la Familia Penaeidae, la Familia Solenoceridae o la familia Pandalidae

10 Para cada una de las muestras se comprobó la presencia o ausencia de tres posibles combinaciones de péptidos específicos: S-PEN829 (SEQ ID NO: 1) para la Familia Penaeidae; S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) para la Familia Solenoceridae; y S-BOR817 (SEQ ID NO: 3) para la Familia Pandalidae.

El resultado obtenido mostró que en todas las muestras existen especímenes pertenecientes a la Familia Penaeidae (Fig. 3A).

15 4.2.- Identificación del origen geográfico y de la especie de langostino presente en la muestra

Una vez identificadas las muestras como langostinos Penaeidae, se procedió a la determinación del origen geográfico. La presencia del péptido S-PEN759 (SEQ ID NO: 4) en todas las muestras confirmó que se trataba de langostinos del Índico-Pacífico (Fig. 3B).

20 Posteriormente, la combinación de una serie de péptidos recogidos en la Tabla 1 permitió la determinación de especie (Fig. 3C). Todas las muestras fueron identificadas como *Litopenaeus vannamei* (camarón patiblanco).

25 Como resultado, las autoridades competentes, o las empresas responsables de la inspección de los productos, habrían verificado el correcto etiquetado del producto por parte de la empresa responsable del envasado, etiquetado o distribución.

Ejemplo 4

30 Utilización del procedimiento de la invención para la identificación de mezcla de especies

Se planteó la posibilidad de utilizar esta técnica para la discriminación de mezclas de especies.

35 Para preparar la mezcla de estudio, se procedió a la homogenización en partes iguales de músculo de distintas especies de langostinos o camarones. Con esta mezcla se realizó el procedimiento de extracción, digestión y separación ya descrito en el Ejemplo 1 (etapas 1-3). Tras la monitorización SMIM en el sistema LC-MS (etapa 3), se llevó a cabo la etapa 4.

40 4.- Identificación de las especies capturadas

4.1.- Determinación de la presencia en la muestra de la Familia Penaeidae, la Familia Solenoceridae o la familia Pandalidae

45 Se comprobó la presencia o ausencia de las tres posibles combinaciones de péptidos específicos de familia: S-PEN829 (SEQ ID NO: 1) para la Familia Penaeidae; S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) para la Familia Solenoceridae; y S-BOR817 (SEQ ID N03) para la Familia Pandalidae.

El resultado obtenido reveló que en la muestra existía una mezcla de especímenes pertenecientes a las familias Penaeidae y Solenoceridae (Figura 4A).

50 4.2.- Determinación del origen geográfico y de la especie

55 Una vez identificada en la muestra la mezcla de familias, se determinó la procedencia geográfica de los langostinos Penaeidae. La ausencia del péptido S-PEN759 (SEQ ID N04) (Figura 4B) indicó que en la mezcla existían langostinos del Atlántico.

La combinación de la serie de péptidos recogidos en la Tabla 1 determinó inequívocamente que las especies de langostinos Penaeidae de la mezcla eran *Farfantepenaeus notialis* (Fig. 4C).

60 Por tanto la mezcla de especies contenía *Farfantepenaeus notialis* (langostino rosado sureño) y *Pleoticus muelleri* (camarón argentino).

65

ES 2 363 853 A1

TABLA 1

Péptidos e iones doblemente cargados necesarios para la identificación de las especies del Orden Decapoda

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

	S-EN829	S-UJ643	S-OR817	S-EN759	S-EN675	S-EN539	S-EN603
Ion (2+)	829,4	643,85	817,9	759,9	675,35	539,3	603,35
Familia/Especie							
Familia Penaeidae	■						
Familia Solenoceridae		■					
Familia Pandalidae			■				
<i>Penaeus monodon</i>	■			■	■	■	
<i>Litopenaeus vannamei</i>	■			■	■	■	
<i>Farfantepenaeus notialis</i>	■			■	■	■	
<i>Fenneropenaeus indicus</i>	■			■	■	■	
<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	■			■	■	■	■
<i>Pleoticus muelleri</i>		■					
<i>Pandalus borealis</i>			■				

ES 2 363 853 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de datos útiles para la identificación de especies de langostinos y camarones que comprende:
- a. extraer las proteínas sarcoplásmicas del músculo blanco de una muestra biológica aislada,
 - b. digerir las proteínas del extracto sarcoplásmico del paso (a), e
 - 10 c. identificar la presencia o ausencia en el extracto digerido del paso (b) de los péptidos que se seleccionan de la lista que comprende: S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2), S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7).
- 15 2. Procedimiento para la identificación de especies de langostinos y camarones que comprende los pasos (a) - (c) según la reivindicación anterior, y además comprende:
- d1. asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Pleoticus muelleri* de la Familia Solenoceridae, si el péptido identificado en el paso (c) es S-MUE643 (SEQ ID NO: 2).
- 20 3. Procedimiento para la identificación de especies de langostinos y camarones que comprende los pasos (a) - (c) según la reivindicación 1, y además comprende:
- d2. asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Pandalus borealis* de la Familia Pandalidae, si el péptido identificado en el paso (c) es S-BOR817 (SEQ ID NO: 3).
- 25 4. Procedimiento para la identificación de especies de langostinos y camarones que comprende los pasos (a) - (c) según la reivindicación 1, y además comprende:
- d3. asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la Familia Penaeidae, si el péptido identificado en el paso (c) es S-PEN829 (SEQ ID NO: 1).
- 30 5. Procedimiento para la identificación de especies de langostinos y camarones según la reivindicación 4, que además comprende:
- e1. asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Farfantepenaeus notialis*, si en el paso (c) se identifica la ausencia del péptido S-PEN759 (SEQ ID NO: 4).
- 35 6. Procedimiento para la identificación de especies de langostinos y camarones según la reivindicación 4, que además comprende:
- e2. asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *P. monodon*, si en el paso (c) se identifican los péptidos S-PEN675 (SEQ ID NO: 5) y S-PEN539 (SEQ ID NO: 6).
- 40 7. Procedimiento para la identificación de especies de langostinos y camarones según la reivindicación 4, que además comprende:
- e3. asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Litopenaeus vannamei*, si en el paso (c) se identifica la presencia del péptido S-PEN675 (SEQ ID NO: 5) y la ausencia del péptido S-PEN539 (SEQ ID NO: 6).
- 45 8. Procedimiento para la identificación de especies de langostinos y camarones según la reivindicación 4, que además comprende:
- e4. asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Fenneropenaeus merguensis*, si en el paso (c) se identifica la presencia del péptido S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) y la ausencia de los péptidos S-PEN675 (SEQ ID NO: 5) y S-PEN539 (SEQ ID NO: 6).
- 50 9. Procedimiento para la identificación de especies de langostinos y camarones según la reivindicación 4, que además comprende:
- e5. asignar la muestra biológica del paso (a) como perteneciente a la especie *Fenneropenaeus indicus*, si en el paso (c) se identifica la presencia del péptido S-PEN759 (SEQ ID NO: 4) y la ausencia de los péptidos S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7).
- 55 60 65 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la extracción a partir del músculo blanco se realiza por homogeneización y centrifugación de la muestra.

ES 2 363 853 A1

11. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde la homogenización de la muestra se realiza con un extractante de baja fuerza iónica.

5 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, donde la centrifugación se realiza a 30.000 x g 10 min.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde la digestión de las proteínas del paso (b) se realiza con una enzima proteasa.

10 14. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde la enzima es la tripsina.

15 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la digestión de las proteínas del paso (b) se realiza mediante hidrólisis química.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde la digestión de las proteínas del paso (b) se realiza mediante la aplicación de ultrasonidos focalizados de alta intensidad.

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde la identificación de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) se realiza mediante espectrometría de masas.

18. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde la identificación de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) se realiza mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

19. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde el espectrómetro de masas acoplado a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución trabajan en cualquiera de los siguientes modos Data Dependent, SIM (*selected ion monitoring*), SIRM (*selected ion reaction monitoring*) y SMIM (*selected MS/MS ion monitoring*).

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde la identificación de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) se realiza mediante un anticuerpo.

21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde la identificación de los péptidos S-PEN829 (SEQ ID NO: 1), S-MUE643 (SEQ ID NO: 2) y/o S-BOR817 (SEQ ID NO: 3), S-PEN759 (SEQ ID NO: 4), S-PEN675 (SEQ ID NO: 5), S-PEN539 (SEQ ID NO: 6), S-PEN603 (SEQ ID NO: 7) se realiza mediante un oligonucleótido.

22. Péptido S-PEN829 cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 1.

23. Péptido S-MUE643 cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 2.

24. Péptido S-BOR643 cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 3.

25. Péptido S-PEN759 cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 4.

26. Péptido S-PEN675 cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 5.

27. Péptido S-PEN539 cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 6.

28. Péptido S-PEN603 cuya secuencia aminoacídica consiste en la SEQ ID NO: 7.

29. Uso de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 22-28, para la generación de anticuerpos.

30. Uso de los anticuerpos según la reivindicación anterior, para la identificación de los péptidos según la reivindicación 20.

31. Kit para la identificación de especies langostinos y camarones que comprende los medios necesarios para la identificación de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 22-28.

32. Kit según la reivindicación anterior que además comprende los medios necesarios para llevar a cabo un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-21.

65

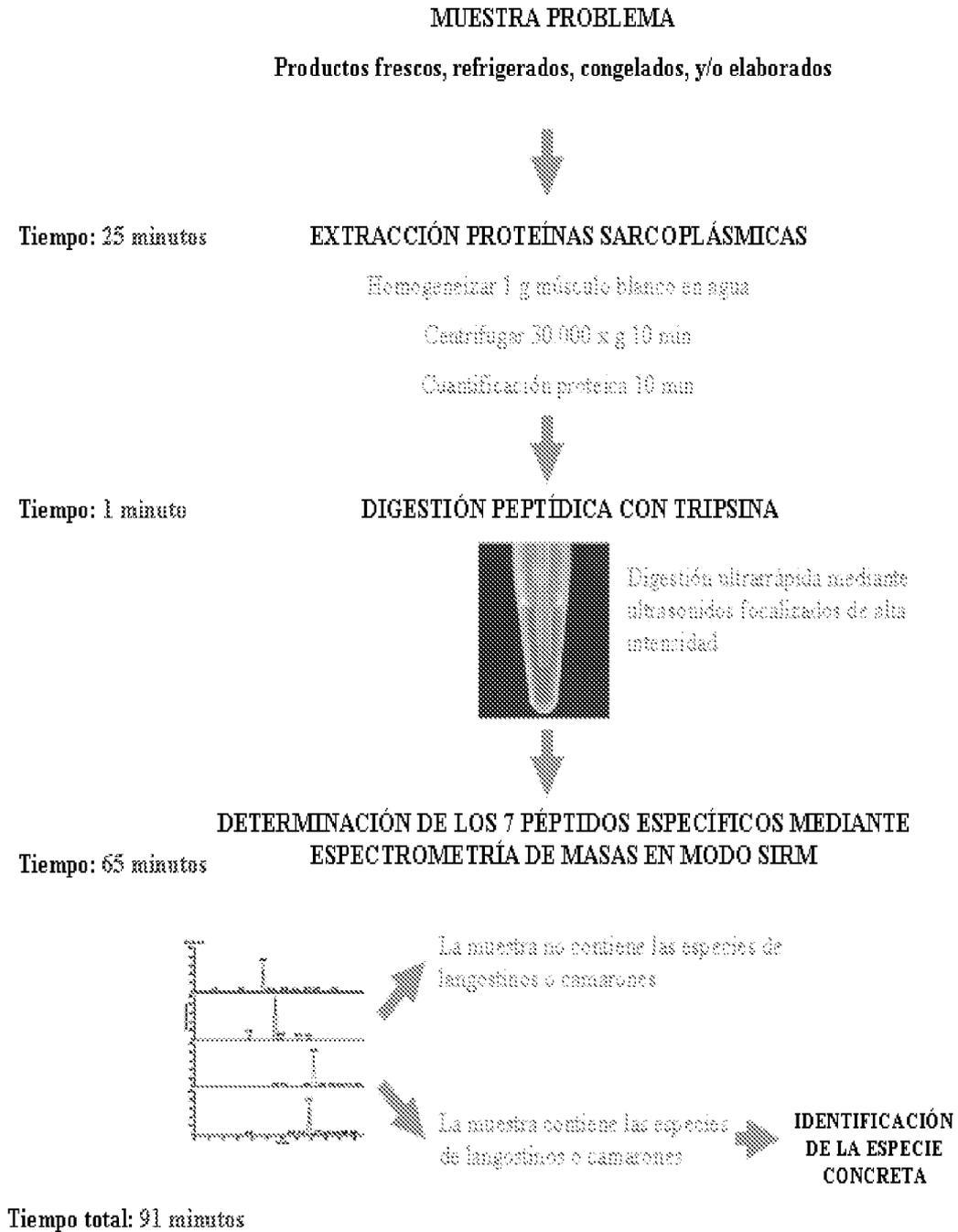


FIG.1

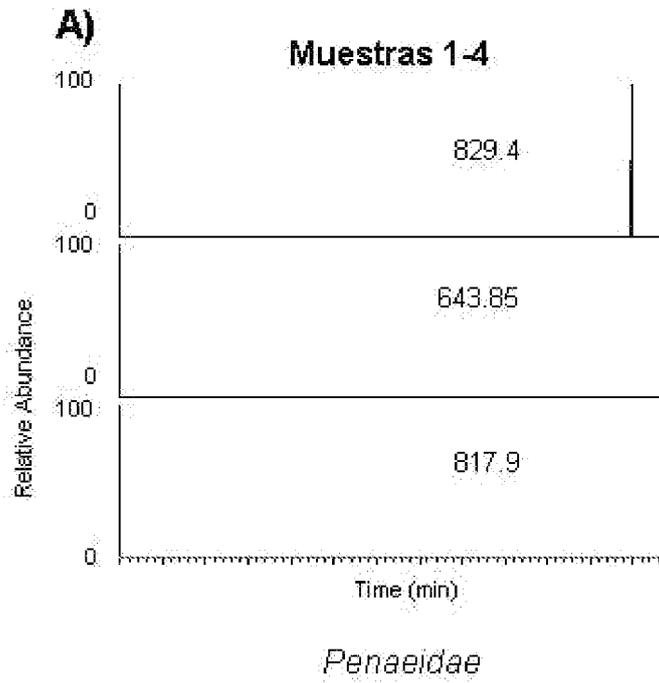


FIG. 2A

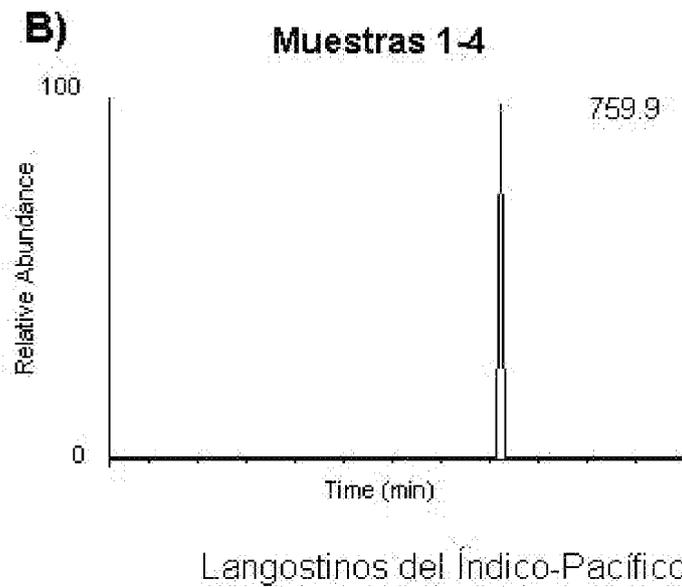
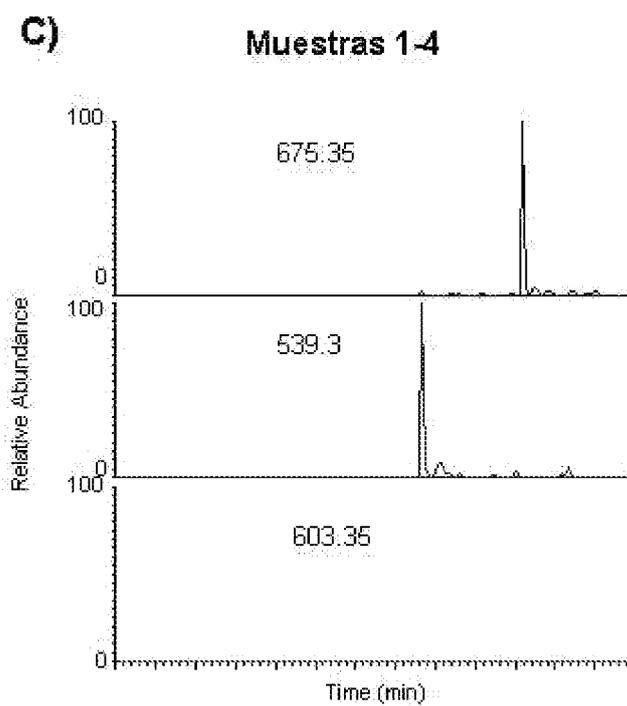


FIG.2B



Penaeus monodon

FIG. 2C

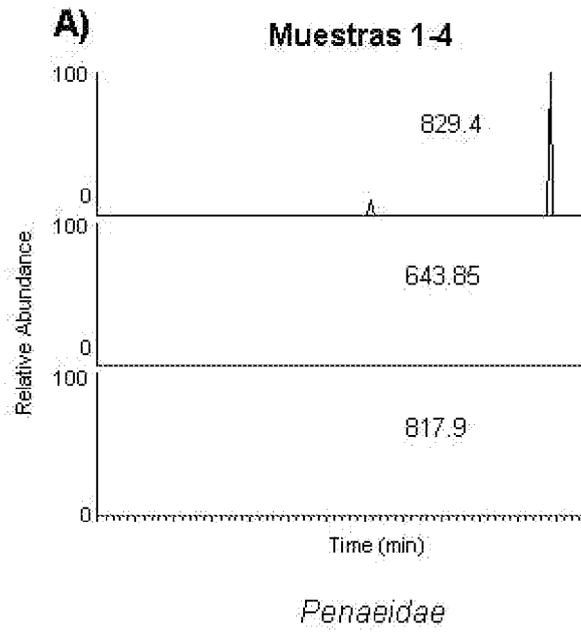


FIG. 3A

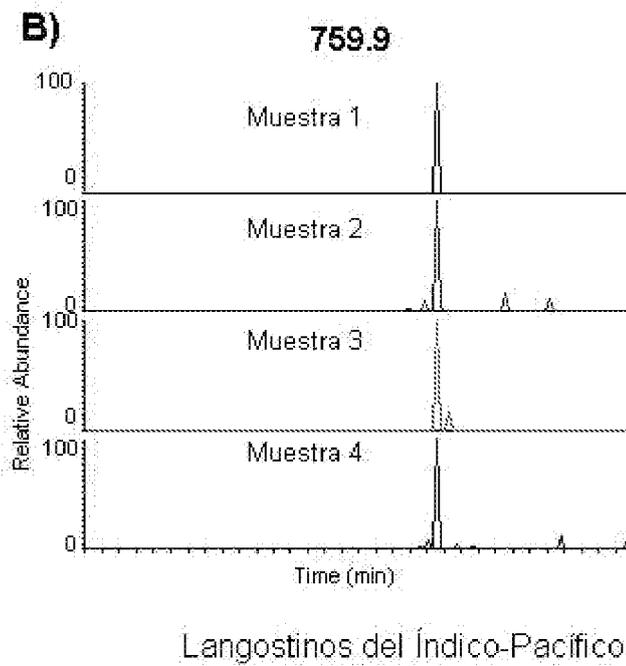
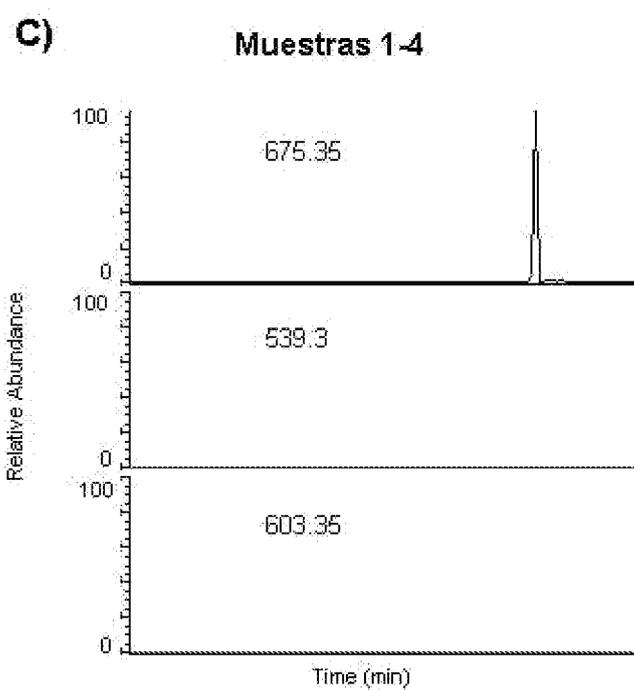


FIG. 3B



Litopenaeus vannamei

FIG. 3C

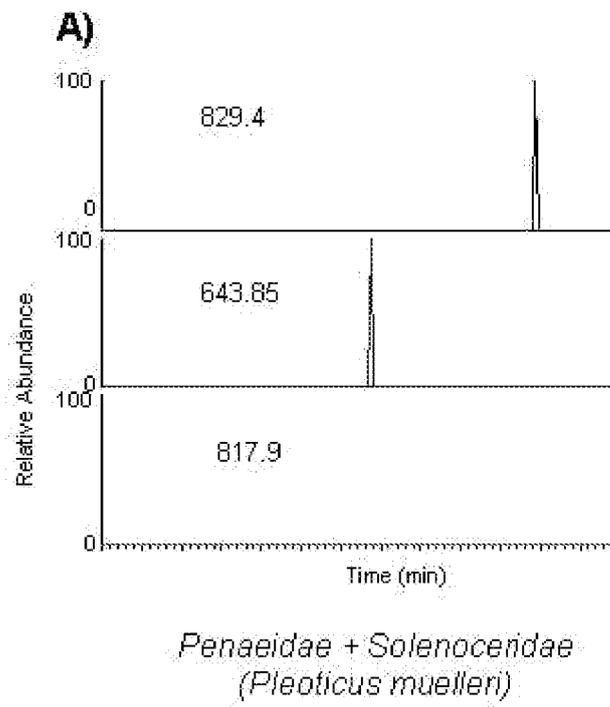


FIG. 4A

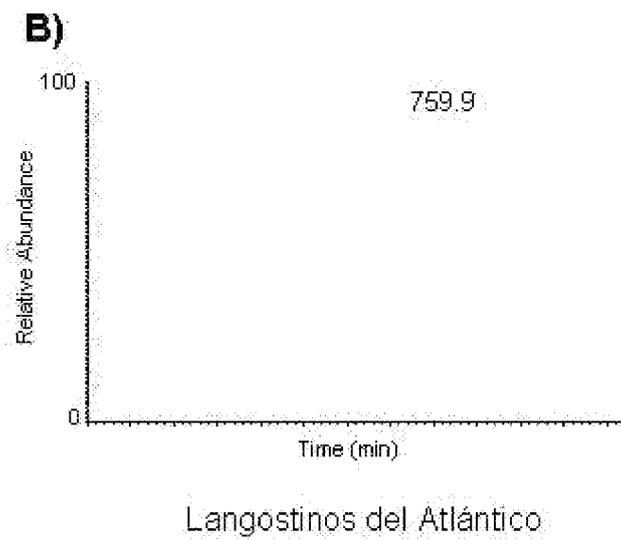


FIG. 4B

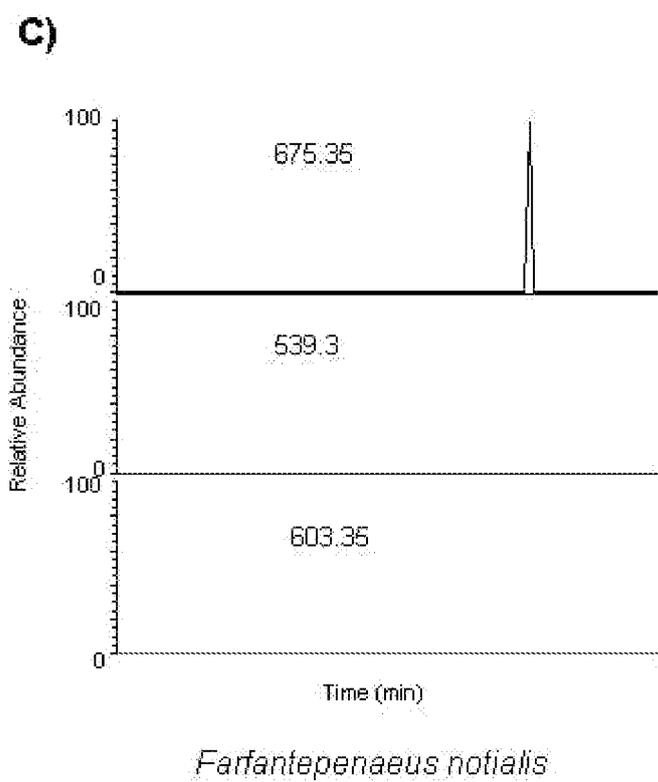


FIG. 4C

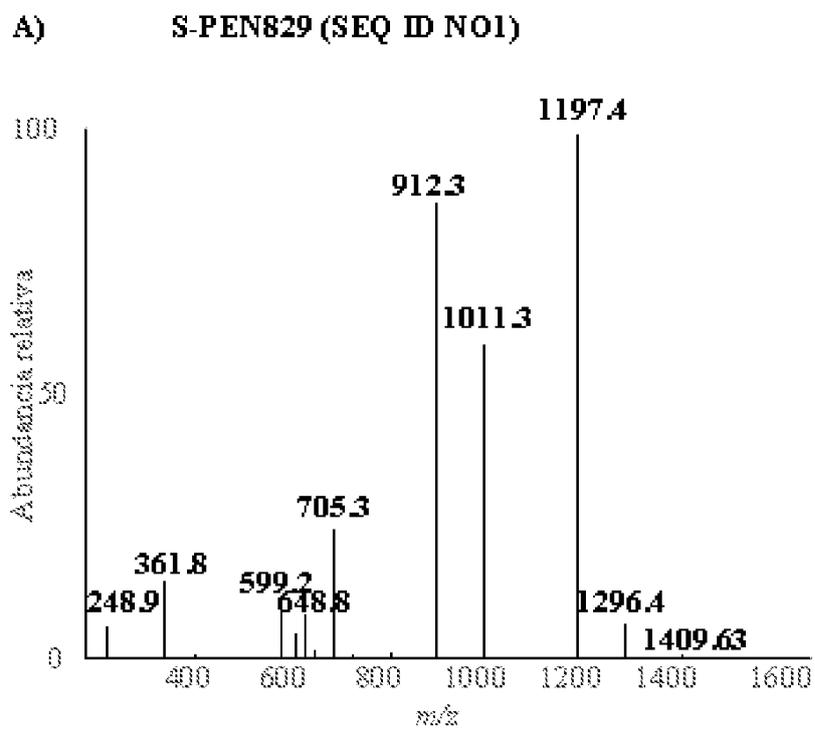


FIG. 5A

B) S-MUE643 (SEQ ID NO2)

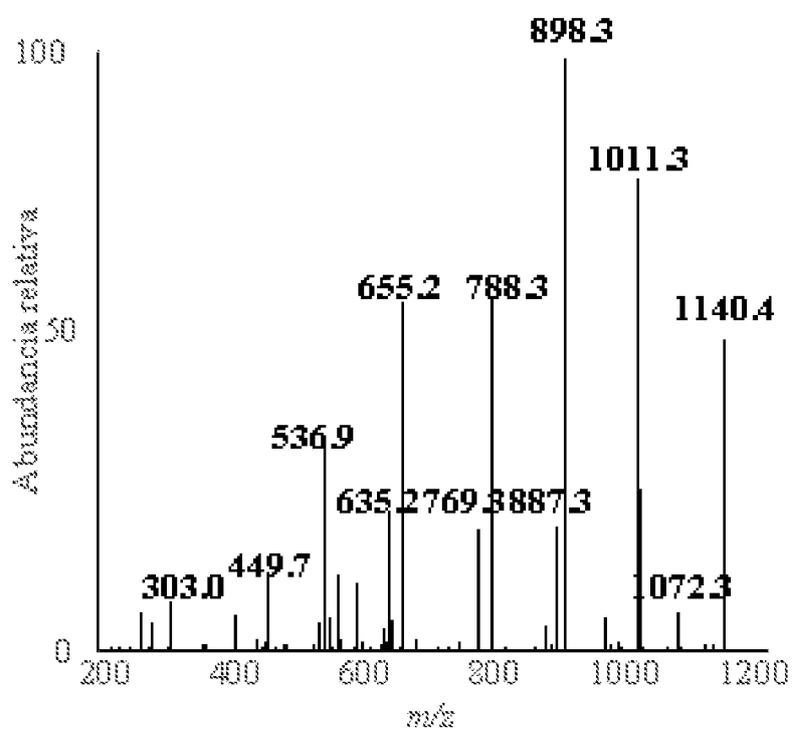


FIG. 5B

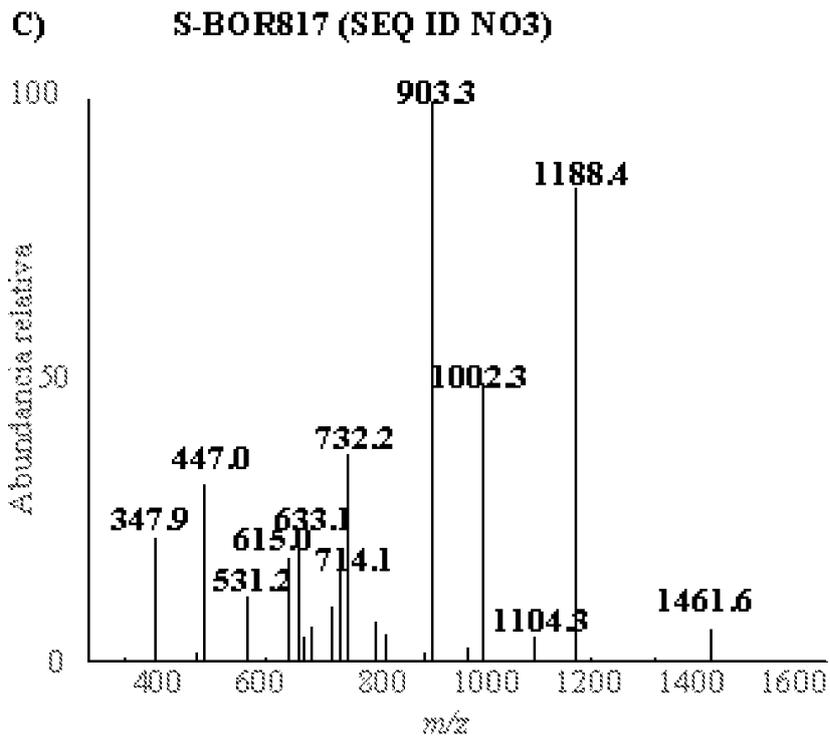


FIG. 5C

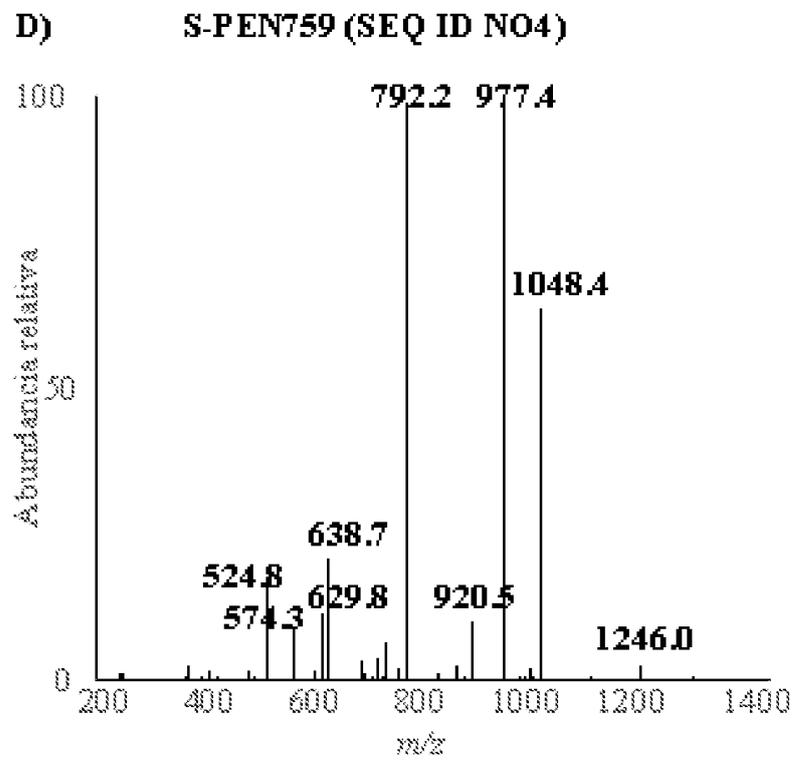


FIG. 5D

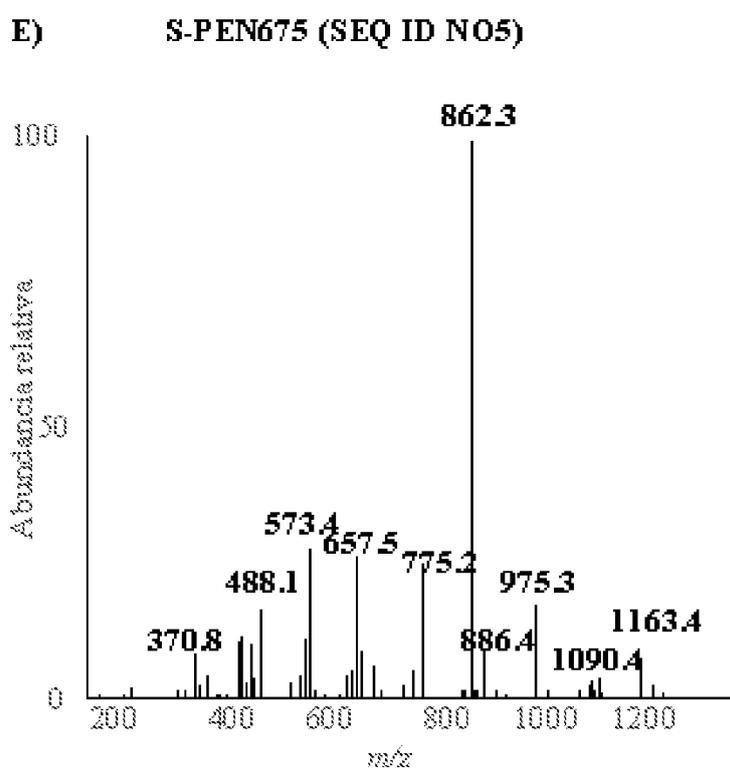


FIG. 5E

F) S-PEN539 (SEQ ID NO6)

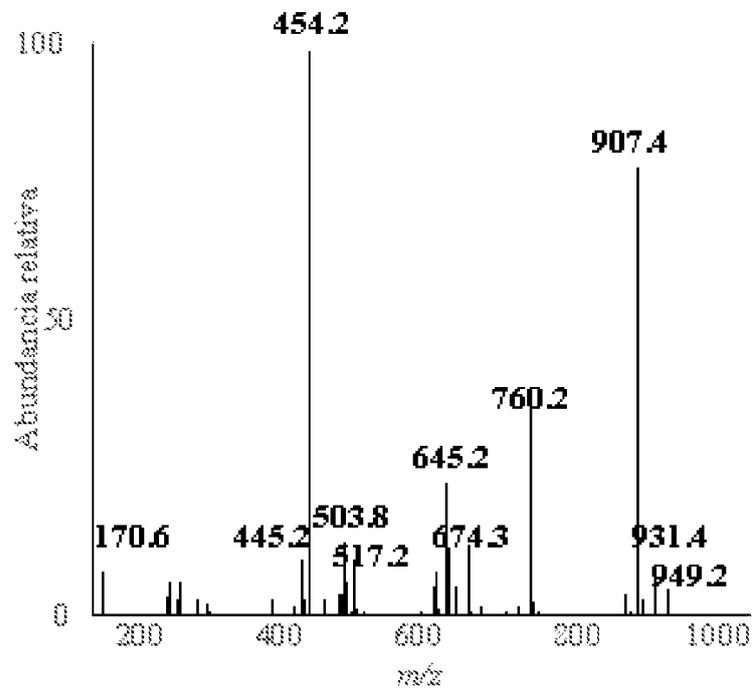


FIG. 5F

G) S-PEN603 (SEQ ID NO7)

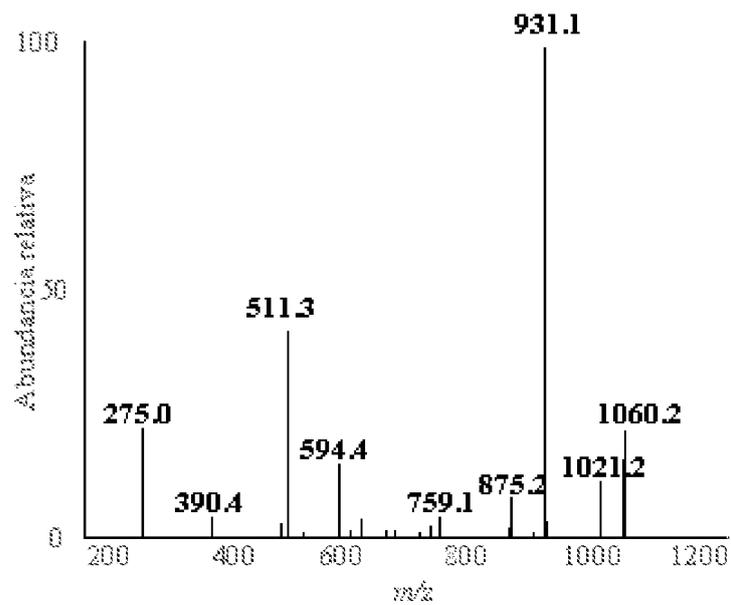


FIG. 5G



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930424

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ORTEA I. ET AL., "Arginine kinase peptide mass fingerprinting as a proteomic approach for species identification and taxonomic analysis of commercially relevant shrimp species" . J. Agric. Food Chem., (2009), 57 (13), pp 5665–5672. Publicado online 03.06.2009. todo el documento.	1-32
A	MAZZEO F.M. ET AL., " Fish Authentication by MALDI-TOF Mass Spectrometry" J. Agric. Food Chem., (2008), 56 (23), pp 11071–11076. todo el documento.	1-32

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.07.2011

Examinador
M. Hernandez Cuellar

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/48 (2006.01)

G01N27/00 (2006.01)

C07K7/00 (2006.01)

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

C12Q, G01N, C07K

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

INVENES, EPODOC,WPI,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE,REGISTRY,CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-32	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-32	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ORTEGA I. ET AL., "Arginine kinase peptide mass fingerprinting as a proteomic approach for species identification and taxonomic analysis of commercially relevant shrimp species" . J. Agric. Food Chem., (2009), 57 (13), pp 5665–5672. Publicado online 03.06.2009. todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención proporciona un procedimiento para la identificación, mediante la espectrometría de masas, de las principales especies comerciales de langostinos y camarones pertenecientes al orden Decapoda. El procedimiento comprende las siguientes etapas: a) extracción de las proteínas sarcoplásmicas del músculo blanco de una muestra biológica aislada, b) digestión de las proteínas del extracto sarcoplásmico de la etapa a) e c) identificación de la presencia o ausencia, en el extracto digerido de la etapa b), de una serie péptidos correspondientes a las secuencias SEQ ID NO: 1-7. Todos estos péptidos están comprendidos en las distintas secuencias de la proteína arginina kinasa de cada una de las especies de langostinos y camarones.

1.- NOVEDAD

En opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-32 cumplen con el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

El documento D01 se considera el estado de la técnica más cercano al objeto de la invención de la presente solicitud. Este estudio describe la identificación de especies y el análisis taxonómico de seis especies de langostinos pertenecientes al orden Decapoda. En primer lugar se efectúa una electroforesis bidimensional en gel de las proteínas sarcoplásmicas que revela una variabilidad interespecífica en el punto isoelectrico de la arginina kinasa. Por este motivo, la arginina kinasa se selecciona como biomarcador potencial y se somete a una digestión con tripsina seguida de un análisis MALDI-TOF PMF que permite diferenciar entre las seis especies estudiadas. La diferencia con la presente invención es que en esta se aportan las secuencias de 7 péptidos concretos en función de cuya identificación es posible diferenciar entre 7 especies distintas del orden Decapoda. En consecuencia, esta Oficina considera que la determinación de estos 7 péptidos no resulta obvia para un experto en la materia y por tanto las reivindicaciones 1-32 cumplen con el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP.