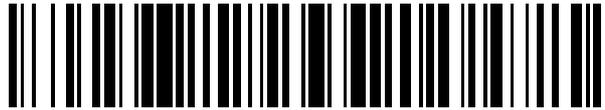


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 952**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2009 PCT/EP2009/050235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2009 WO09087229**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2009 E 09701290 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2235505**

54 Título: **Procedimiento fluorométrico para evaluar la influencia de una condición en una muestra biológica y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

10.01.2008 FR 0850136

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.03.2020

73 Titular/es:

**ANTI OXIDANT POWER - AOP (100.0%)
78 Allée Jean Jaurès
31000 Toulouse , FR**

72 Inventor/es:

**DERICK, SYLVAIN;
FURGER, CHRISTOPHE y
TOCANNE, JEAN-FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 745 952 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

Procedimiento fluorométrico para evaluar la influencia de una condición en una muestra biológica y sus aplicaciones

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo técnico de los ensayos fluorométricos aplicados a la biología y, más particularmente, a la biología celular.

10 La presente invención se refiere a un procedimiento fluorométrico para evaluar la influencia de una condición experimental y/o ambiental en una muestra biológica y propone aplicaciones en el campo del diagnóstico *in vitro*, en el campo del cribado de compuestos que presentan un potencial elevado desde el punto de vista terapéutico y en el campo del control de calidad.

15 **Estado de la técnica anterior**

La detección de la muerte celular tiene muchas aplicaciones, particularmente en los campos de la oncología y la toxicología. La medición de la muerte celular se basa generalmente en la observación y el análisis de los principales eventos que se producen en las últimas etapas de la vida de la célula, en particular las modificaciones en el funcionamiento de las mitocondrias, en la organización y permeabilidad de la membrana plasmática o en la estructura del ADN.

25 Se han desarrollado varias tecnologías que generalmente tienen como objetivo detectar una de estas etapas principales. La detección de la modificación en la organización de la membrana plasmática se aborda, por ejemplo, mediante el método de la "anexina", que aprovecha la capacidad de la anexina para unirse a las fosfatidilserinas en la superficie externa de la membrana plasmática a medida que se aproxima la muerte celular ("Annexin V affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure", Van Engelans *et al*, Cytometry, 31:1-9, 1998).

30 Otros métodos se centran en la remodelación y fragmentación del ADN durante la muerte celular y utilizan marcadores nucleares como SYTO (solicitud de patente US 2006/099638 A1; Bradford *et al*, patente US 2006/263844 A1), cuya fluorescencia se describe como variable en función del estado de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) en la célula ("Discrimination of DNA and RNA in cells by a vital fluorescent probe: lifetime imaging of SYTO13 in healthy and apoptotic cells", Van Zandvoort *et al*, Cytometry, 47 :226-235, 2002). Los métodos anteriores requieren una instrumentación de tipo citometría de flujo que sigue siendo muy costosa, difícil de manejar y que solo permite tratar muestras en forma de suspensiones celulares.

40 La solicitud de patente US 2005/048539 A1 describe un método de evaluación de la distancia entre dos moléculas que comprende la obtención de una muestra biológica que comprende una primera molécula marcada con un fluoróforo donante y una segunda molécula marcada con un fluoróforo aceptor, exponer la muestra biológica a una fuente de excitación con impulsos, medir la vida útil de la fluorescencia del fluoróforo donante, calcular la distancia entre el fluoróforo donante y el fluoróforo aceptor como medida de la distancia entre las primera y segunda moléculas, correlacionándose la duración de la vida útil de la fluorescencia con la distancia entre las primera y segunda moléculas.

45 Por lo tanto, existe una necesidad real de métodos más fáciles de implementar y para detectar condiciones apoptogénicas y/o identificar compuestos capaces de modular la apoptosis. Esta necesidad es real en el contexto del cribado de alto rendimiento llevado a cabo por las empresas farmacéuticas, que requieren la implementación de pruebas simples y robustas. La contribución de estos métodos *in vitro* permite finalmente limitar los ensayos con animales, que son caros y no compatibles con el cribado de alto rendimiento.

Descripción de la invención

55 La presente invención permite aportar una solución a los problemas técnicos anteriores describiendo un nuevo procedimiento fluorométrico que permite caracterizar la influencia de una condición ambiental y/o experimental en una muestra biológica basándose en el perfil cinético de la fluorescencia emitida por un compuesto fluorescente en contacto con dicha muestra biológica sometida a dicha condición ambiental y/o experimental.

60 La presente invención se basa en el trabajo de los inventores que desarrollaron un método para el análisis de la muerte celular. Aprovecha la capacidad de los fluoróforos que se unen al ADN para ver sus propiedades de fluorescencia perturbadas por esta unión.

65 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, parece que los fluoróforos ligados al ADN están situados en un espacio confinado que, para una tasa de marcado suficiente, favorece un amplio mecanismo de transferencia de energía por resonancia entre las mismas moléculas que conduce a una inhibición parcial de su emisión de fluorescencia (se habla de homotransferencia u homo-FRET).

Bajo iluminación continua de la muestra, los fluoróforos son fotodestruídos ("fotoblanqueados", resultando en una elevación gradual del proceso de homoFRET y por lo tanto en una restauración de las propiedades de emisión de fluorescencia de los fluoróforos aún intactos. Estos últimos pueden considerarse entonces como "fotoactivados". Esta "fotoactivación" permite, por tanto, medir en cinética el nivel de restauración de la fluorescencia emitida por la muestra. La capacidad de "fotoactivación" de los fluoróforos que se unen al ADN está estrechamente relacionada con la distancia existente entre las diferentes moléculas presentes en la molécula de ADN. Recientemente se ha descrito un ejemplo de estas moléculas ("BENA435, a new cell-permeant photoactivated green fluorescent DNA probe", Erve *et al*, Nucleic Acids Research, vol. 34, n.º 5, 2006).

Además, se sabe que el estado del ADN puede ser modificado en muchas situaciones fisiológicas, incluida la muerte celular ("Degradation of chromosomal DNA during apoptosis", Nagata *et al*, Cell Death and Differentiation, 10:108-116, 2003). La invención se basa en la premisa de que el nivel de restauración de la fluorescencia descrito anteriormente variará en función del estado del ADN (normal, condensado, degradado, fraccionado,...), los diferentes estados inducen distancias entre fluoróforos variables, por lo tanto un estado diferente de inhibición de la fluorescencia. Esto resulta en un nivel de restauración variable de la fluorescencia que se asocia con el estado del ADN.

El procedimiento de invención presenta tres intereses fundamentales que lo diferencian de los métodos anteriores:

- funciona en células en cultivo adherentes o en suspensión,
- el resultado es cuantificable (establecimiento de relaciones dosis-respuesta),
- el protocolo experimental implementado es extremadamente sencillo (adición de la molécula al medio de cultivo y medición en lectores de fluorescencia convencionales y económicos).

Además, la presente invención es notable porque, basándose en los resultados obtenidos de estudios relacionados con la apoptosis, puede generalizarse a muchos procedimientos fisiológicos en los que se puede aprovechar la evolución del perfil cinético de fluorescencia de una muestra fluorescente mantenida bajo iluminación, los diferentes perfiles cinéticos obtenidos a partir de diferentes condiciones experimentales que reflejan diferentes estados de la muestra. Los procesos fisiológicos que pueden ser estudiados por el procedimiento de invención deben presentar dos estados extremos, de ahora en adelante referidos como estado 1 y estado 2.

En el estado 1, los biosensores situados a una distancia compatible con el fenómeno de homo-FRET (FRET entre moléculas idénticas) emiten poca fluorescencia observable cuando se excitan (fenómeno de inhibición de la fluorescencia). Esta inhibición de la fluorescencia es luego eliminada bajo iluminación continua de la muestra, resultando en un aumento de la fluorescencia observada. El aumento de la fluorescencia causado por la iluminación podría ser el resultado de un fenómeno de fotodegradación de un número progresivo de moléculas del biosensor. Esta fotodegradación provocaría un aumento de la distancia entre moléculas no degradadas, distancia que gradualmente se vuelve incompatible con el fenómeno de inhibición de la fluorescencia. Esta elevación progresiva de la inhibición de la fluorescencia se manifiesta entonces por un aumento de la fluorescencia observada.

En el estado 2, los biosensores situados a una distancia incompatible con el fenómeno de homo-FRET no están sometidos a la inhibición de la fluorescencia descrita anteriormente. La iluminación no permite observar un aumento de la fluorescencia.

Así, entre los procesos fisiológicos que pueden estudiarse ventajosamente a través del procedimiento de invención, se puede mencionar los procesos fisiológicos que implican:

- variaciones en el estado de la estructura del ADN, tal como reorganización, degradación o segmentación, como la apoptosis, la necrosis o la división celular,
- variaciones en la ubicación y/o concentración celular de compuestos tales como proteínas o ácidos nucleicos como ARNm característicos, como la interacción entre proteínas idénticas o diferentes.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la influencia de una condición en una muestra biológica de acuerdo con la reivindicación 1 y la reivindicación 2.

Cabe señalar que el procedimiento de acuerdo con la invención contempla dos alternativas de implementación con, en un caso, la muestra biológica que está sometida a la condición, mientras que el compuesto fluorescente ya está fijado en la muestra y, en el otro caso, la muestra que está sometida a la condición, antes de que el compuesto fluorescente esté fijado en la muestra.

El procedimiento de la presente invención difiere de la técnica anterior en que, por una parte, no requiere el uso de un miembro donante de fluorescencia y un miembro aceptor de fluorescencia diferente como en los pares de socios de FRET y, por otra parte, que la excitación del compuesto fluorescente en la longitud de onda de excitación de dicho compuesto es larga (varios segundos). Así, el procedimiento de esta invención implementa ventajosamente solo un tipo de compuesto fluorescente. Varias moléculas de un mismo compuesto fluorescente pueden ser utilizadas en el procedimiento de acuerdo con la invención y no varias moléculas de al menos dos compuestos

fluorescentes diferentes como en la técnica de FRET.

Ventajosamente, la muestra biológica implementada en el contexto de la presente invención es seleccionada entre el grupo constituido por una célula, varias células, una parte de una célula, una preparación celular y sus mezclas.

5 En el contexto de la presente invención, se entiende por "célula" tanto una célula de tipo procariota como de tipo eucariota. Entre las células eucariotas, la célula puede ser una levadura tal como una levadura del género *Saccharomyces* o *Candida*, una célula de mamífero, una célula vegetal o una célula de insecto. Las células de mamíferos pueden ser en concreto células tumorales, células de linaje somático normal o células madre. Puede tratarse de manera no exclusiva de glóbulos rojos, osteoblastos, células neurales, hepatocitos, células musculares, linfocitos o células progenitoras. Las células de tipo procariota son bacterias que pueden ser gram + o -. Entre estas bacterias, se puede citar, a modo de ejemplo y de manera no exhaustiva, las bacterias que pertenecen a las divisiones de espiroquetas y clamidia, las bacterias que pertenecen a las familias de las *enterobacteriaceae* (tales como *Escherichia coli*), *streptococcaceae* (tales como estreptococos), *micrococcaceae* (tales como estafilococos), *legionela*, micobacterias, *bacillaceae* y otras.

15 Las células aplicadas en el contexto de la presente invención pueden obtenerse a partir de un cultivo celular primario o de un cultivo de una estirpe celular o a partir de una muestra de un fluido tal como agua o un fluido biológico previamente extraído de un cuerpo humano o animal, dicha muestra puede haber sido sometida a diferentes tratamientos previos tales como centrifugación, concentración, dilución, etc.

25 Por "parte de célula" se entiende en el contexto de la presente invención en concreto la totalidad o una porción de la membrana celular. Por "membrana celular", se entiende en el contexto de la presente invención tanto la membrana plasmática rica en fosfolípidos de las células eucariotas (también llamada membrana citoplasmática, plasmalema o membrana plasmática) como a la membrana plasmática y la pared celular glucídica (que contiene peptidoglicano) de bacterias o células de plantas.

30 Por "preparación celular", se entiende en el contexto de la presente invención tanto un extracto celular como una preparación enriquecida en organitos celulares tales como núcleos, mitocondrias, aparato de Golgi, endosomas o lisosomas. Entre los extractos celulares preferidos, se puede mencionar los ácidos nucleicos y en particular el ADN celular.

35 Las partes de las células y las preparaciones celulares implementadas en el contexto de la presente invención pueden obtenerse a partir de células derivadas de cultivos celulares o de una muestra de un fluido como se ha definido previamente. El experto en la materia conoce diferentes técnicas que permiten obtener, a partir de células o cultivos celulares, membranas celulares, partes de membranas celulares, fracciones ricas en membranas celulares, extractos y preparaciones celulares que implican técnicas tales como la técnica de compartición de fases o etapas tales como etapas de centrifugación.

40 Por "compuesto fluorescente", se entiende, en el contexto de la presente invención, un compuesto que, cuando se excita a una longitud de onda característica llamada longitud de onda de excitación, absorbe un fotón en este intervalo de excitación y regresa a su estado fundamental restaurando un fotón emitido a una longitud de onda de idéntica característica también llamada longitud de onda de emisión.

45 Cualquier compuesto fluorescente conocido por el experto en la materia puede ser utilizado en el contexto de la presente invención. Ventajosamente, el compuesto fluorescente aplicado en el contexto de la presente invención presenta un recubrimiento espectral favorable entre los espectros de excitación y emisión. Se puede mencionar, a modo de ejemplos no limitativos, compuestos fluorescentes que pueden ser usados en la presente invención colorantes tales como Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, alofocianina, raminometilcumarina, ácido acético, Cy2®, Cy 5.1®, Cy 5®, Cy 5.5®, diclorfluoresceína (DCFH), dihidrorodamina (DHR), eGFP (para "GFP mejorada"), Fluo-3, FluorX®, fluoresceína, 5-maleimida fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), PerCP, r-ficoeritrina (PE), r-ficoeritrina-cianina 5.5 en tándem o SpectralRed® o CyChrome®, r-ficoeritrina-cianina 5.5 (PE-CY 5.5®), r-ficoeritrina-cianina 7 (PE-CY 7®), r-ficoeritrina-Texas Red-x®, Red 613®, rodamina 110, rodamina 123, S65L, S65T, isotiocianato de tetrametilrodamina, Texas-Red-x®, TruRed®, indo 1, nanocristales (puntos cuánticos), Fura 2, Fura 3, quin y DS Red.

60 En una variante preferida de la invención, el compuesto fluorescente aplicado es un compuesto fluorescente específico de ácidos nucleicos. Por "ácido nucleico" se entiende un ácido desoxirribonucleico (ADN) monocatenario o bicatenario, un ácido ribonucleico (ARN) tal como un ARN mensajero o un ARN ribosómico.

65 Los compuestos fluorescentes específicos de los ácidos nucleicos se seleccionan, en particular, entre los intercalantes fluorescentes, los colorantes que unen las bases A:T o las bases G:C y las cianinas permeantes o impermeantes. Más concretamente, dichos compuestos fluorescentes se seleccionan entre el grupo constituido por bromuro de etidio, tiazol naranja, tiazol azul y sus derivados, tioflavina S, tioflavina T, tioflavina TCN®, yoduro de dietilquinolitrocianina (DEQTC), TOTOI®, TO-PRO-1®, o YOYO-1®, Hoechst® 33258, Hoechst® 33342, Hoechst®

34580, diamidino fenilindol (DAPI), yoduro de propidio, pironina Y, 7-aminoactinomicina D (7 AAD), acridina naranja, rauramina O, calceína, nuevo azul de metileno, olamina-O, oxazina 750, azul de Astra, SYTOX® verde, series de SYTO® que comprende SYTO 11®, SYTO 12®, SYTO 13®, SYTO 15®, SYTO 16®, SYTO 18®, SYTO 62®, SYTO 80® o SYTO 81®.

5 En el contexto de la presente invención, la fijación del compuesto fluorescente a dicha muestra biológica puede ser directa. Este aspecto de la invención es en particular aquel descrito en la siguiente parte experimental con compuestos fluorescentes de la serie SYTO® que se fijan directamente al ADN contenido en la muestra biológica.

10 En una variante de la presente invención, la fijación del compuesto fluorescente a dicha muestra biológica puede ser indirecta. En esta variante, el compuesto fluorescente solo se fija a dicha muestra biológica a través de un agente de fijación. Por "agente de fijación", se entiende, en el contexto de la presente invención, un compuesto capaz de fijarse a dicha muestra biológica y al cual se fija, directamente o indirectamente, el compuesto fluorescente. Ventajosamente, el agente de fijación se selecciona entre el grupo constituido por un péptido, proteína, anticuerpo, agonista o antagonista de receptores de membrana o nucleares, hormona, ácido nucleico, etc. La fijación del compuesto fluorescente se puede fijar directamente sobre dicho agente de fijación y, en particular, mediante una unión covalente. En una variante, esta fijación puede ser indirecta a través de un brazo de unión que puede unir el compuesto fluorescente a dicho agente de unión. El experto en la materia conoce diferentes tipos de agentes de unión y sabrá, en función del compuesto fluorescente y del agente de unión aplicado, cuál es el agente de unión más apropiado. Del mismo modo, el experto conoce diferentes técnicas que permiten preparar los agentes de unión que portan, directa o indirectamente, un compuesto fluorescente. Estas técnicas pertenecen en particular al campo de la ingeniería genética y de la síntesis química.

25 Por "condición", se entiende en el contexto de la presente invención tanto una condición ambiental o experimental, física o química, capaz de causar modificaciones en la muestra biológica y, en particular, modificaciones fisiológicas en esta muestra biológica. Ventajosamente, la condición cuya influencia se determinará en una muestra biológica es una condición física o química.

30 Por "condición física", se entiende una condición física que modifica el ambiente en el que se encuentra la muestra biológica, tal como una condición térmica (modificación de la temperatura de dicho ambiente), una condición eléctrica (ambiente y por lo tanto una muestra biológica sometida a estimulación eléctrica) o una condición mecánica.

35 Por "condición química", se entiende una condición química que modifica el ambiente en el que se encuentra la muestra biológica, tal como la adición de un compuesto a ensayar o una muestra E tal como se define posteriormente en el ambiente y/o la modificación de su concentración, la modificación de la naturaleza y/o la concentración de los iones contenidos en dicho medio ambiente.

40 La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la influencia de una condición en una muestra biológica que comprende las etapas que consisten en:

- a) someter dicha muestra biológica a dicha condición;
- b) poner en contacto un compuesto fluorescente con dicha muestra, siendo cualquiera el orden de las etapas (a) y (b);
- 45 c) excitar dicho compuesto fluorescente a la longitud de onda de excitación apropiada durante un tiempo t cuyo punto de partida es t_0 ,
- d) establecer el perfil cinético de la fluorescencia emitida por dicho compuesto fluorescente fijado a dicha muestra durante el tiempo t de excitación, la fluorescencia medida a t_0 sirve como valor de referencia, aplicando dicho procedimiento un solo tipo de compuesto fluorescente.

50 Las etapas (a) y (b) del procedimiento de acuerdo con la invención son etapas de rutina para el experto en la materia que sabrá aplicarlas adecuadamente teniendo en cuenta el tipo de muestra biológica, el tipo de condición y el tipo de compuesto fluorescente utilizados.

55 A tal fin, el procedimiento de la presente invención puede requerir una etapa adicional de permeabilización. Esta etapa adicional puede ser obligatoria cuando el compuesto fluorescente no puede, por su naturaleza, fijarse a dicha muestra biológica en ausencia de permeabilización. Cualquier técnica de permeabilización conocida por el experto en la materia puede ser utilizada en el contexto de la presente invención. Ventajosamente, esta etapa de permeabilización puede requerir el empleo de detergentes como Tritón X100.

60 El procedimiento de la presente invención puede requerir una etapa adicional de fijación de la muestra biológica. Cualquier técnica de fijación de muestras biológicas y en particular células conocida por el experto en la materia puede ser utilizada en el contexto de la presente invención como una fijación en etanol al 70 %.

65 La longitud de onda de excitación apropiada utilizada en la etapa (c) del procedimiento de acuerdo con la invención corresponde a la longitud de onda de excitación característica definida previamente del compuesto fluorescente

aplicado en la etapa (b) del procedimiento. El experto en la materia conoce el valor de esta longitud de onda o puede obtenerla fácilmente sin ningún esfuerzo inventivo.

5 El tiempo t durante el cual dicho compuesto fluorescente se excita a la longitud de onda de excitación apropiada es un tiempo prolongado. Ventajosamente, este tiempo t está comprendido entre 1 y 1000 segundos, en particular entre 10 y 800 segundos, en particular entre 20 y 500 segundos, más particularmente entre 30 y 200 segundos y, en particular, entre 40 y 100 segundos. Esta excitación continua puede ser generada por varios destellos de excitación sucesivos.

10 La etapa (d) del procedimiento consiste en establecer el perfil cinético de la fluorescencia emitida por dicho compuesto fluorescente durante el tiempo t de excitación cuyo punto inicial es t_0 . Esta etapa (d) consiste, más particularmente, en medir la fluorescencia emitida por el compuesto fluorescente en diferentes momentos del tiempo t de excitación. Estos diferentes tiempos pueden ser seleccionados a intervalos regulares o irregulares. De forma ventajosa, las mediciones se realizan a intervalos regulares comprendidos entre 0,1 y 10 segundos, y en concreto
15 entre 1 y 5 segundos y, en particular, 2 segundos. Los valores de fluorescencia emitida medidos se expresan entonces en relación con el valor obtenido a t_0 , sirviendo este último como valor de referencia. Cabe señalar que la expresión de los valores medidos en relación con el valor inicial obtenido a t_0 permite superar problemas relacionados con la naturaleza de la muestra biológica aplicada. A modo de ejemplo, pueden citarse problemas relacionados con el número de células contenidas en la muestra biológica, especialmente en el caso de que la
20 muestra biológica sea un cultivo celular adherido o suspendido. De hecho, con el método de cálculo descrito anteriormente, el perfil cinético medido para una muestra será estrictamente idéntico independientemente del número de células presentes en la muestra. Esto permitirá comparar los resultados obtenidos en muestras de tamaño variable (número de células).

25 Cualquier instrumento conocido por el experto en el campo de la fluorescencia puede utilizarse durante la excitación de la etapa (c) y durante la medición de la fluorescencia emitida de la etapa (d). A modo de ejemplos no limitativos, se puede citar un microscopio de fluorescencia equipado con una lámpara de mercurio o un microscopio de fluorescencia equipado con una lámpara flash de xenón.

30 El perfil cinético obtenido permite, por tanto, evaluar la influencia sobre una muestra biológica de la condición a la que está sometida. De hecho, cuando el perfil cinético obtenido presenta valores superiores al valor de referencia del tiempo t_0 , se puede concluir que la muestra biológica se encuentra en un estado que permite o no afecta al fenómeno de homo-FRET para el compuesto fluorescente aplicado. A modo de ejemplo, y en el caso de un compuesto fluorescente que se fija al ADN bicatenario, tal perfil lleva a la conclusión de que la condición permite que
35 el ADN contenido en la muestra biológica mantenga o adopte una estructura compactada.

Por el contrario, cuando el perfil cinético presenta valores inferiores al valor de referencia del tiempo t_0 , se puede concluir que la muestra biológica se encuentra en un estado en el que no es posible homo-FRET. A modo de ejemplo, y en el caso de un compuesto fluorescente que se fija al ADN bicatenario, tal perfil lleva a la conclusión de
40 que la condición ha inducido una degradación, reorganización y/o segmentación del ADN contenido en la muestra biológica.

De este modo, el procedimiento de invención puede permitir distinguir dos estados celulares correspondientes a dos estados en la estructura del ADN. Por ejemplo, la invención puede aplicarse al tratamiento con un inductor de
45 apoptosis, un evento conocido por modificar la estructura del ADN (reorganización, degradación y segmentación). El estado 1 corresponde entonces a las células que no son tratadas o no son sensibles al inductor. A continuación, se observa un aumento de la fluorescencia observada bajo iluminación. El estado 2 corresponde en particular a las células apoptóticas (ADN degradado). No se observa aumento alguno de la fluorescencia bajo iluminación.

50 Sin embargo, puede ser necesario comparar el perfil cinético obtenido en la etapa (d) con un perfil cinético de referencia en el que el estado de la muestra biológica está perfectamente definido. Así, el procedimiento de la invención puede comprender una etapa (e) adicional y opcional que consiste en comparar el perfil cinético obtenido en la etapa (d) con un perfil cinético de referencia.

55 A modo de ejemplo, y en el caso de un compuesto fluorescente que se fija al ADN bicatenario, puede ser un perfil cinético de referencia:

- el perfil cinético obtenido cuando la muestra biológica se expone a un compuesto como un agente apoptógeno o un agente anticancerígeno en condiciones tales que la mayor parte o la totalidad del ADN contenido en la
60 muestra ha sido degradado, reorganizado y/o segmentado,
- el perfil cinético obtenido cuando la muestra biológica no se somete a ningún tratamiento o estimulación que pueda conducir a la degradación, reorganización o segmentación del ADN.

65 Esta etapa (e) de comparar diferentes perfiles cinéticos puede ser necesaria cuando la condición a la que está sometida la muestra biológica resulta en un estado intermedio entre los estados 1 y 2 de acuerdo como se ha definido previamente.

Conviene señalar que, en el contexto de la comparación de muestras biológicas idénticas sometidas a al menos una condición diferente, no es obligatorio tener una medición de la fluorescencia emitida por el compuesto fluorescente en diferentes momentos durante el tiempo t de excitación, y que la medición en un solo tiempo dado es suficiente.

5 En esta forma de implementación particular de la invención, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la influencia de una condición sobre una muestra biológica que comprende las etapas que consisten en:

a') dividir dicha muestra biológica en una primera parte A y una segunda parte B;

b') someter dicha parte A a dicha condición;

10 c') poner en contacto dicho compuesto fluorescente con las partes A y B de dicha muestra biológica, siendo cualquiera el orden de las etapas (b') y (c');

d') excitar dicho compuesto fluorescente a la longitud de onda de excitación apropiada durante un tiempo t cuyo punto de partida es t_0 ,

15 e') medir, para cada parte de la muestra, la fluorescencia emitida por dicho compuesto fluorescente fijado a dicha parte de la muestra en un tiempo T incluido en el tiempo t de excitación, y la fluorescencia medida a t_0 para la parte A y la parte B que sirven como valor de referencia para las fluorescencias medidas respectivamente para la parte A y la parte B,

f') comparar los valores obtenidos en la etapa (e') para la parte A y la parte B de dicha muestra biológica, dicho procedimiento aplica un solo tipo de compuesto fluorescente.

20 Todo lo anteriormente descrito para el procedimiento de acuerdo con la invención y en particular para las etapas (a) a (e) del procedimiento de acuerdo con la invención se aplicará *mutatis mutandis* a las etapas (a') a (f') de esta variante.

25 El tiempo T en el que se realiza la medición de fluorescencia puede incluirse en cualquier momento en el tiempo t de excitación con la excepción del tiempo t_0 . Ventajosamente, dicho tiempo T es superior a ($t_0 + 0,5$ segundos), en concreto superior a ($t_0 + 10$ segundos) y, en particular, superior a ($t_0 + 15$ segundos). Otras mediciones de la fluorescencia emitida se pueden realizar en otros tiempos T_1, T_2 , etc.

30 La comparación en la etapa (f') puede hacerse restando el valor obtenido en el momento T para la parte B de la muestra (es decir, la parte de la muestra que sirve de control) del valor obtenido en el momento T para la parte A de la muestra (es decir, la parte de la muestra que estaba sometida a la condición). Si el valor obtenido tras dicha sustracción es negativo, puede concluirse que la condición a la que se sometió la muestra ha inducido una disminución o incluso una desaparición del fenómeno de homo-FRET que existía en la parte B de la muestra.

35 La presente invención comprende muchas aplicaciones, particularmente en el cribado de compuestos de interés farmacéutico. En consecuencia, un modo de realización de la presente invención también se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto capaz de modular un proceso biológico que comprende una etapa de implementación de un procedimiento previamente definido, siendo dicho compuesto a ensayar la condición a la cual la muestra biológica está sometida.

40 Por "compuesto capaz de modular un proceso biológico", se entiende, en el contexto de la presente invención, un agente capaz de inhibir, activar, acelerar o ralentizar dicho proceso biológico. A modo de ejemplos no limitativos de procesos biológicos que pueden ser estudiados en el contexto de la presente invención, se puede citar, apoptosis, necrosis, reordenamiento proteico membranal y división celular.

45 El término "compuesto" utilizado en la presente invención se hace referencia a una molécula de cualquier tipo que comprenda un compuesto químico o una mezcla de compuestos químicos, una secuencia peptídica, una secuencia nucleótida como una secuencia antisentido, una macromolécula biológica o un extracto de material biológico derivado de algas, bacterias, células o tejidos de animales, en particular mamíferos, plantas u hongos. Por lo tanto, dicho compuesto puede ser un compuesto natural o sintético, en particular obtenido por química combinatoria.

50 La presente invención también tiene una aplicación en el control de calidad. De hecho, esta última puede utilizarse para detectar la presencia de un compuesto capaz de modular un proceso biológico en una muestra E. Así, un modo de realización de la presente invención también se refiere a un procedimiento para detectar la presencia de un compuesto capaz de modular un proceso biológico en una muestra E que comprende una etapa de implementación de un procedimiento previamente definido, siendo dicha muestra E la condición a la que se somete la muestra biológica.

60 En esta aplicación, el compuesto que probablemente estará presente en la muestra es el definido anteriormente. Puede tratarse de una toxina o una mezcla de toxinas. La muestra E podrá ser cualquier muestra que pueda someterse a un control de calidad y, en concreto, una materia prima natural o sintética, un producto natural, un producto farmacéutico, un producto manufacturado, un producto alimenticio, etc.

65 Además, se puede obtener el perfil de referencia tal y como se ha descrito anteriormente a partir de:

- un control exento de un compuesto capaz de modular un proceso biológico, como una muestra E de control que no comprenda ningún compuesto capaz de modular un proceso biológico, o
- un control que contiene una cantidad conocida de un compuesto o mezcla de compuestos capaz(es) de modular un proceso biológico.

5 Del mismo modo, la parte B de la muestra biológica descrita anteriormente puede estar sometida opcionalmente a una muestra E de control que no comprenda ningún compuesto capaz de modular un proceso biológico o que comprenda una cantidad conocida de un compuesto o mezcla de compuestos capaz(es) de modular un proceso biológico.

10 Esta aplicación en el control de calidad es de particular interés en la detección de al menos una toxina marina o mezcla de toxinas marinas, siendo dicha toxina marina o dicha mezcla el compuesto capaz de modular un proceso biológico de acuerdo con la presente invención. Por "toxina marina", se entiende también una ficotoxina y, en concreto, una toxina seleccionada entre ácido domoico, ácido ocaidaico, azaspirácidos, ciguatoxinas, gambiertoxina, 15 gimnodimina, maitotoxinas, palitoxina, pectenotoxinas, espirólidos y sus mezclas. En este caso, la muestra E implementada podrá ser un extracto de moluscos como ostras, mejillones, almejas, berberechos, vieiras, pectínidos, abulones y sus mezclas. Por "extracto de moluscos", se entiende en el contexto de la presente invención un extracto obtenido por trituración de moluscos enteros (es decir, con concha), un extracto obtenido por trituración del cuerpo del molusco o un extracto obtenido por trituración de partes particulares del cuerpo del molusco, como la parte 20 digestiva o la fracción grasa de la parte digestiva. Este extracto puede someterse opcionalmente a otros tratamientos, antes de ser puesto en contacto con la muestra biológica, tales como centrifugación, solubilización, etc.

25 La invención se entenderá mejor tras la lectura de las siguientes figuras y ejemplos. No tiene por objeto limitar la invención en sus aplicaciones, solo se trata de ilustrar aquí las posibilidades que ofrece el procedimiento de la invención.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 presenta el perfil cinético de la iluminación de las células eucariotas tratadas o no con diferentes cantidades de un agente apoptótico y en presencia de SYTO62. Las células HeLa fueron tratadas durante 7 horas con (Δ , \square , \diamond) o sin (\circ) 0,1 μM (Δ), 0,5 μM (\square) y 1 μM (\diamond) de estaurosporina. A continuación, las células se marcaron con una solución de SYTO62 con 10 μM y se sometieron a una iluminación continua durante 40 segundos. La intensidad de la fluorescencia se mide cada segundo. Cada valor de intensidad se expresa como un porcentaje del primer valor de fluorescencia medido. (IF: intensidad de fluorescencia; T: tiempo de 35 iluminación).

La figura 2 presenta el perfil cinético de la iluminación de las células eucariotas tratadas o no con diferentes cantidades de un agente anticancerígeno y en presencia de SYTO62. Las células HeLa fueron tratadas durante 24 horas con (Δ , \square) o sin (\circ) 0,1 μM (Δ) y 1 μM (\square) de Paclitaxel (Taxol). A continuación, las células se marcaron con una solución de SYTO62 con 10 μM y se sometieron a una iluminación continua durante 50 segundos. La 40 intensidad de la fluorescencia se mide cada segundo. Cada valor de intensidad se expresa como un porcentaje del primer valor de fluorescencia medido. (IF: intensidad de fluorescencia; T: tiempo de iluminación).

La figura 3 presenta el perfil cinético de la iluminación de las células eucariotas tratadas o no con diferentes cantidades de un agente apoptótico y en presencia de SYTO13 o SYTO15. Las células HeLa fueron tratadas durante 7 horas con (\circ , Δ) o sin (\bullet , \blacktriangle) 1 μM de estaurosporina. A continuación, las células se marcaron con una solución de SYTO13 (Δ , \blacktriangle) o de SYTO15 (\circ , \bullet) con 10 μM y se sometieron a una iluminación continua durante 45 300 segundos. La intensidad de la fluorescencia se mide cada 5 segundos. Cada valor de intensidad se expresa como un porcentaje del primer valor de fluorescencia medido. (IF: intensidad de fluorescencia; T: tiempo de iluminación).

La figura 4 presenta el perfil cinético de la iluminación de las células procarióticas en presencia de diferentes cantidades de SYTO62. Las bacterias se marcaron durante 30 minutos con solución de SYTO62 con 6,25 μM (\diamond), 50 12,5 μM (Δ), 25 μM (\square) o 50 μM (\circ). Las bacterias son sometidas a una iluminación continua durante 40 segundos. La intensidad de la fluorescencia se mide cada 5 segundos. Cada valor de intensidad se expresa como un porcentaje del primer valor de fluorescencia medido. (IF: intensidad de fluorescencia; T: tiempo de iluminación).

La figura 5 presenta el perfil cinético de la iluminación de las células HepG2 tratadas durante 24 horas con 0,01 μM (Δ), 0,031 μM (\diamond), 0,1 μM (\bullet), 0,31 μM (\blacktriangle) y 1 μM (\blacklozenge) de ácido okadaico o sin (\circ). A continuación, las células se marcaron con una solución final de SYTO13 con 2 μM y se sometieron a una iluminación continua durante 20 segundos. La intensidad de la fluorescencia se mide cada 0,4 segundos. Cada valor de intensidad se expresa como un porcentaje del primer valor de fluorescencia medido. (IF: intensidad de fluorescencia; T: tiempo de 60 iluminación).

Descripción detallada de modos de realización particulares

65 **Ejemplo 1: Procedimiento de acuerdo con la invención implementada en células eucariotas con diferentes cantidades de un agente apoptótico.**

Las células HeLa (Sigma-Aldrich) se siembran en una microplaca negra con un fondo transparente de 96 pocillos con 20.000 células por pocillo el día antes del experimento. El día de la prueba, las células se tratan o no con 0,1; 0,5 y 1 μM de estaurosporina (Sigma-Aldrich) durante 7 horas. A continuación, las células se marcan durante 20 minutos con 50 μl de 10 μM de solución de SYTO62 (Invitrogen) preparada en un tampón que contiene Hepes 25 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, 0,1 % de albúmina de suero bovino (ASB), pH 7,4 (tampón A).

Las muestras se colocan en un microscopio de fluorescencia (Leica DMIRB) con un aumento X100 y luego se someten a una iluminación continua a 488 nm con una lámpara de mercurio (HBO 103W/2) durante 40 segundos. La intensidad de fluorescencia emitida por el biosensor se mide cada segundo. Los resultados se presentan en la figura 1.

En las condiciones experimentales descritas, las células HeLa no tratadas con el agente apoptótico, estaurosporina presenta, bajo iluminación continua, un aumento en la intensidad de la fluorescencia medida en función del tiempo de iluminación. Cuando las células son tratadas con 0,1 de μM estaurosporina, una dosis que permite inducir un nivel de apoptosis intermedio, se mide un aumento de fluorescencia menor que en la condición no tratada. Cuando las células son tratadas con 0,5 μM y 1 μM de estaurosporina, dosis que permiten inducir respectivamente un nivel de apoptosis subóptimo y óptimo, ya no se mide el aumento de la fluorescencia.

En el caso de las células no tratadas, la proximidad entre moléculas marcadoras permite establecer un mecanismo de homoFRET debido al nivel de compactación del ADN. En esta condición, la iluminación permite eliminar la inhibición de la fluorescencia. Cuando las células entran en apoptosis, en diferentes grados de acuerdo con la concentración del agente utilizado, se altera la integridad del ADN, que se caracteriza por un aumento de la distancia entre las moléculas de SYTO62. En estas condiciones, la inhibición de la fluorescencia es menor y la amplitud de la variación de la fluorescencia bajo iluminación es menor (0,1 μM). A concentraciones de 0,5 μM y 1 μM , la distancia entre moléculas es demasiado grande para que se pueda establecer homoFRET. Por lo tanto, no se puede medir la elevación de la inhibición.

Ejemplo 2: Procedimiento de acuerdo con la invención implementada en células eucariotas con diferentes cantidades de un agente anticancerígeno.

Las células HeLa (Sigma-Aldrich) se siembran en una microplaca negra con un fondo transparente de 96 pocillos con 20.000 células por pocillo el día antes del experimento. El día de la prueba, las células se tratan o no con 0,1 y 1 μM de Paclitaxel o "Taxol" (Sigma-Aldrich) durante 24 horas. A continuación, se marcan las células durante 20 minutos con 50 μl de 10 μM de solución de SYTO62 (Invitrogen) preparada en el tampón A.

Las muestras se colocan bajo un microscopio de fluorescencia (Leica DMIRB) con un aumento de X100 y se someten a una iluminación continua a 488 nm con una lámpara de mercurio (HBO 103W/2) durante 50 segundos. La intensidad de fluorescencia emitida por el biosensor se mide cada segundo. Los resultados se presentan en la figura 2.

Las células HeLa no tratadas sometidas a iluminación continua presentan un aumento cinético en la fluorescencia medida. El tratamiento de las células con 0,1 μM y 1 μM del agente anticancerígeno Taxol (Paclitaxel), induce una disminución dependiente de la dosis en la variación de la fluorescencia medida bajo iluminación.

Ejemplo 3: Procedimiento de acuerdo con la invención implementada en células eucariotas con diferentes cantidades de un agente apoptótico en presencia de diferentes compuestos fluorescentes (SYTO13 y SYTO15).

Las células HeLa (Sigma-Aldrich) se siembran en una microplaca negra con un fondo transparente de 96 pocillos con 20.000 células por pocillo el día antes del experimento. El día de la prueba, las células se tratan o no con 1 μM de estaurosporina durante 7 horas. A continuación, se marcan las células durante 20 minutos con 50 μl de 10 μM de solución de SYTO13 (Invitrogen) o SYTO15 (Invitrogen) preparada en el tampón A.

Las celdas marcadas se colocan bajo un lector de fluorescencia de tipo Varioskan (Thermo Electron Corporation) equipado con una lámpara flash de xenón. Las muestras marcadas con SYTO13 y SYTO15 se someten a una iluminación continua durante 300 segundos a 488 nm y 516 nm, respectivamente. Las intensidades de fluorescencia emitidas por los biosensores se miden cada 5 segundos. Los resultados se presentan en la figura 3.

En células HeLa sin tratar y marcadas con 10 μM de SYTO13 o SYTO15, se mide un aumento de la fluorescencia bajo iluminación continua, como en el caso de SYTO62. Cuando las células son tratadas con 1 μM de estaurosporina, la iluminación continua no induce un aumento de la fluorescencia medida.

Ejemplo 4: Procedimiento de acuerdo con la invención implementada en células procariontes en presencia de diferentes cantidades de un compuesto fluorescente (SYTO62).

Las bacterias procedentes de aguas residuales se siembran en un tubo el día antes del experimento. El día de la

5 prueba, se centrifugan 1 ml de suspensión bacteriana y los sobrenadantes bacterianos se absorben en 100 μ l de 6,25; 12,5; 25 y 50 μ M de soluciones de SYTO62 (Invitrogen) preparadas en tampón A. Las bacterias se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las bacterias marcadas se colocan bajo un microscopio de fluorescencia (Leica DMIRB) con un aumento de X100 y se someten a una iluminación continua a 488 nm con una lámpara de mercurio (HBO 103W/2) durante 40 segundos. La intensidad de fluorescencia emitida por el biosensor se mide cada segundo. Los resultados se presentan en la figura 4.

10 El marcado de las bacterias con una concentración de 6,25 μ M de SYTO62, induce bajo iluminación continua, una disminución de la fluorescencia medida con el tiempo. Cuando las bacterias son tratadas con 12,5 μ M de marcador, la señal fluorescente medida es estable y luego disminuye después de 10 segundos de iluminación. Con 25 μ M y luego 50 μ M de SYTO62, se produce un aumento de la fluorescencia medida cuya amplitud varía de manera dependiente de la dosis.

15 Con concentraciones de SYTO62 demasiado bajas, la distancia entre las moléculas marcadoras es demasiado alta, lo que hace imposible instalar un mecanismo de inhibición. El aumento de la concentración de SYTO62 utilizada permite disminuir esta distancia y permite la implementación del mecanismo homoFRET. Esto se caracteriza por la aparición gradual de un aumento de la señal medida bajo iluminación.

20 **Ejemplo 5: Procedimiento de acuerdo con la invención implementada en células eucariotas en presencia de diferentes cantidades de ácido okadaico.**

25 Las células HepG2 (ATCC) se siembran en una microplaca negra con un fondo transparente de 96 pocillos con 20.000 células por pocillo el día antes del experimento. El día anterior a la prueba, las células se tratan o no con 75 μ l de 0,01; 0,031; 0,1; 0,31 y 1 μ M de soluciones de ácido okadaico (Sigma-Aldrich). Las células se incuban durante 24 horas.

El día de la prueba, las células se marcan durante 30 minutos a 37 °C con 25 μ l de 8 μ M de solución de SYTO13 (Invitrogen) (2 μ M final) preparada en medio de cultivo MEM (Invitrogen).

30 Las muestras se colocan bajo un microscopio de fluorescencia con un aumento de X100 y luego se someten a una iluminación continua a 488 nm con una lámpara de mercurio durante 20 segundos. La intensidad de fluorescencia emitida por el biosensor se mide cada 0,4 segundos. Los resultados se presentan en la figura 5.

35 Las células HepG2 no tratadas sometidas a iluminación continua presentan un aumento cinético de la fluorescencia medida. El tratamiento de las células con diferentes cantidades de ácido okadaico induce una disminución dependiente de la dosis en la variación de la fluorescencia medida bajo iluminación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la influencia de una condición en una muestra biológica, que comprende las etapas que consisten en:
- 5 a) someter dicha muestra biológica a dicha condición;
 b) poner en contacto un compuesto fluorescente con dicha muestra, siendo cualquiera el orden de las etapas a) y b);
 c) excitar dicho compuesto fluorescente a la longitud de onda de excitación adecuada durante una duración t cuyo punto de partida es t_0 ;
 10 d) establecer el perfil cinético de la fluorescencia emitida por dicho compuesto fluorescente fijado a dicha muestra durante la duración t de excitación, sirviendo la fluorescencia medida a t_0 como valor de referencia;
- implementando dicho procedimiento un solo tipo de compuesto fluorescente.
- 15 2. Procedimiento para determinar la influencia de una condición en una muestra biológica, **caracterizado por que** comprende las etapas que consisten en:
- a') dividir dicha muestra biológica en una primera parte A y una segunda parte B;
 20 b') someter dicha parte A a dicha condición;
 c') poner en contacto un compuesto fluorescente con las partes A y B de dicha muestra biológica, siendo cualquiera el orden de las etapas (b') y (c');
 d') excitar dicho compuesto fluorescente a la longitud de onda de excitación apropiada durante una duración t cuyo punto de partida es t_0 ;
 25 e') medir, para cada parte de la muestra, la fluorescencia emitida por dicho compuesto fluorescente fijado a dicha parte de la muestra en un tiempo T incluido en la duración t de excitación, la fluorescencia medida a t_0 para la parte A y la parte B que sirven como valor de referencia para la parte A y la parte B, respectivamente,
 f') comparar los valores obtenidos en la etapa (e') para la parte A y la parte B de dicha muestra biológica,
- 30 implementando dicho procedimiento un solo tipo de compuesto fluorescente.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** dicha muestra biológica se selecciona entre el grupo formado por una célula, varias células, una parte de una célula, una preparación celular y sus mezclas.
- 35 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** dicha condición se selecciona entre las condiciones físicas y las condiciones químicas.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicho compuesto fluorescente se fija a dicha muestra biológica de forma directa.
- 40 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** dicho compuesto fluorescente se fija a dicha muestra biológica de forma indirecta mediante un agente de fijación.
- 45 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** dicho agente de fijación se selecciona entre el grupo formado por un péptido, una proteína, un anticuerpo, un agonista o antagonista de receptores de membrana o nucleares, una hormona o un ácido nucleico.
- 50 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicho compuesto fluorescente es un compuesto fluorescente específico de los ácidos nucleicos.
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicho compuesto fluorescente se selecciona entre los agentes intercalantes fluorescentes, los colorantes que se unen a las bases A:T o a las bases G:C y las cianinas permeantes o impermeantes.
- 55 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la duración de excitación t está comprendida entre 1 y 1000 segundos.
- 60 11. Procedimiento para identificar un compuesto capaz de modular un proceso biológico que comprende una etapa de implementación de un procedimiento como se define en las reivindicaciones anteriores, siendo dicho compuesto a ensayar la condición a la que se somete la muestra biológica.
- 65 12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado por que** dicho proceso fisiológico se selecciona entre apoptosis, necrosis, reordenamiento de proteínas de membrana y división celular.
13. Procedimiento para detectar la presencia de un compuesto capaz de modular un proceso biológico en una

muestra E que comprende una etapa de implementación de un procedimiento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, siendo dicha muestra E la condición a la que se somete la muestra biológica.

5 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado por que** dicho compuesto capaz de modular un proceso biológico es una toxina marina o una mezcla de toxinas marinas.

15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, **caracterizado por que** dicha muestra E es un extracto de moluscos.

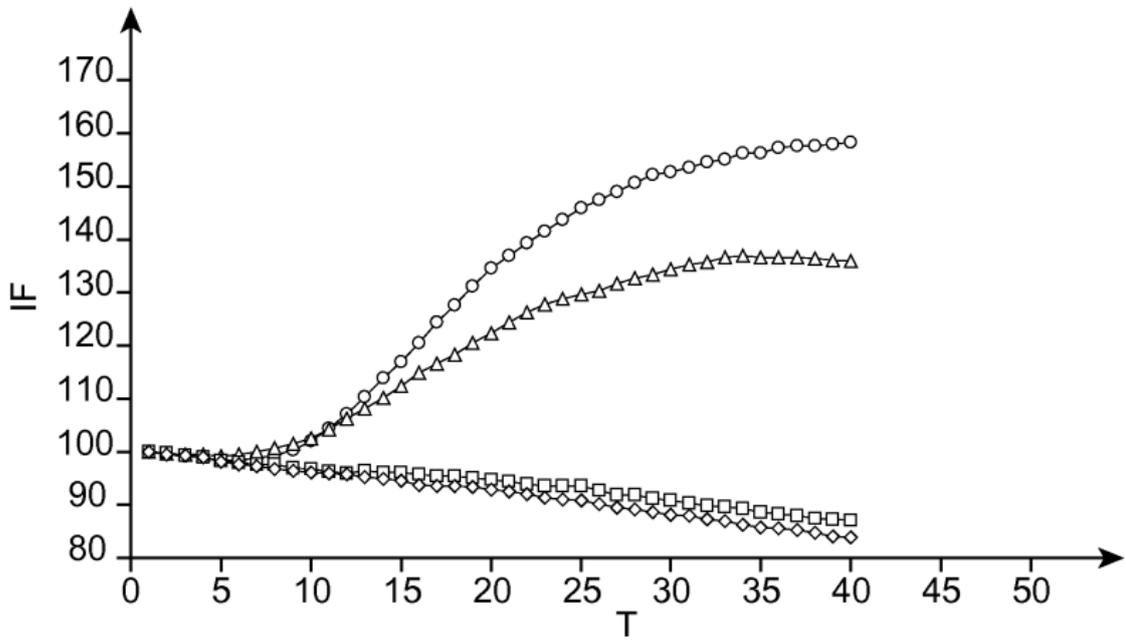


FIG. 1

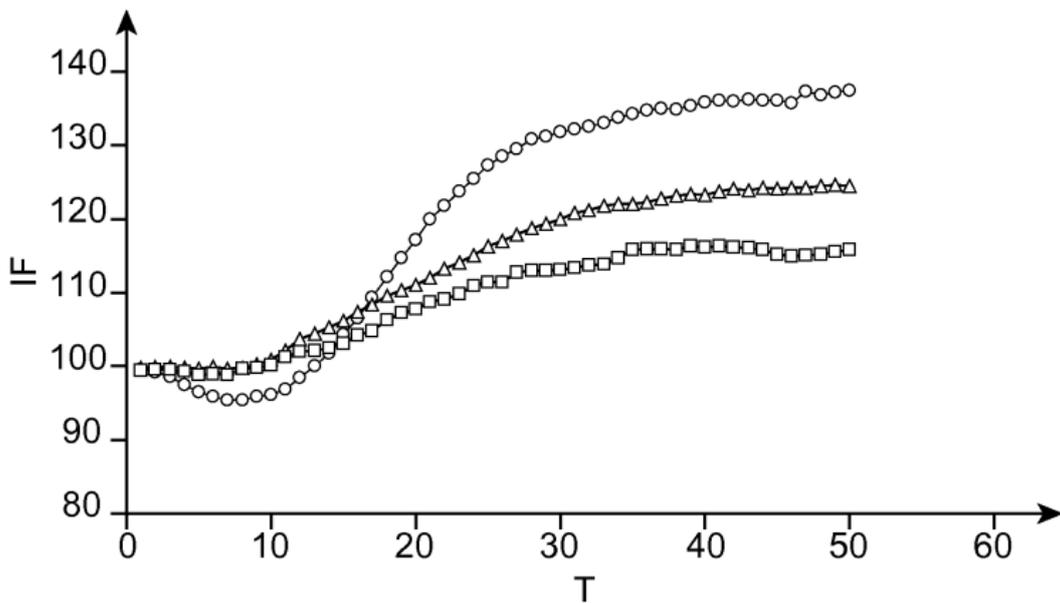


FIG. 2

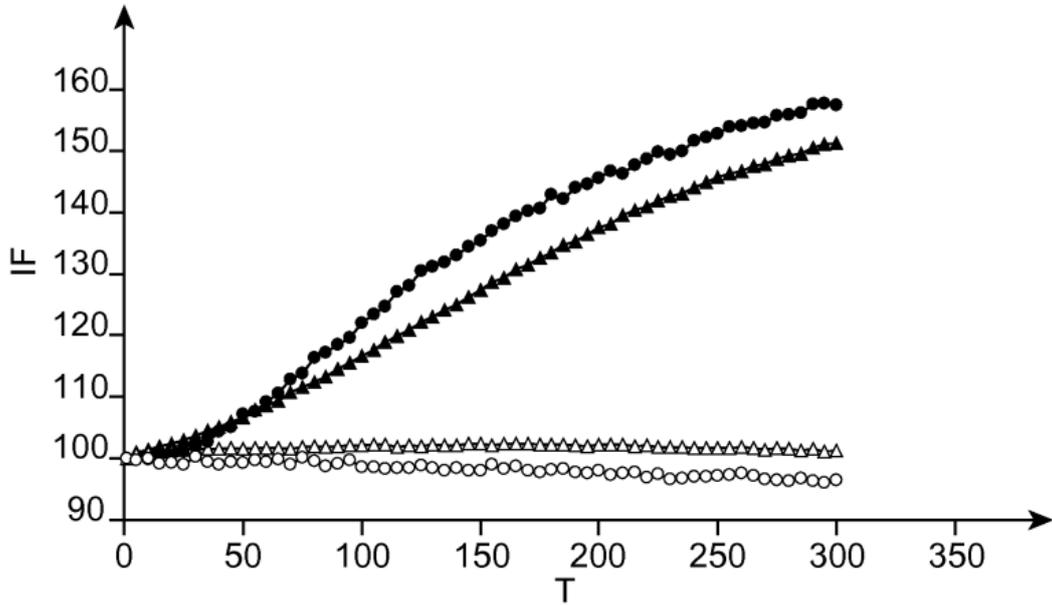


FIG. 3

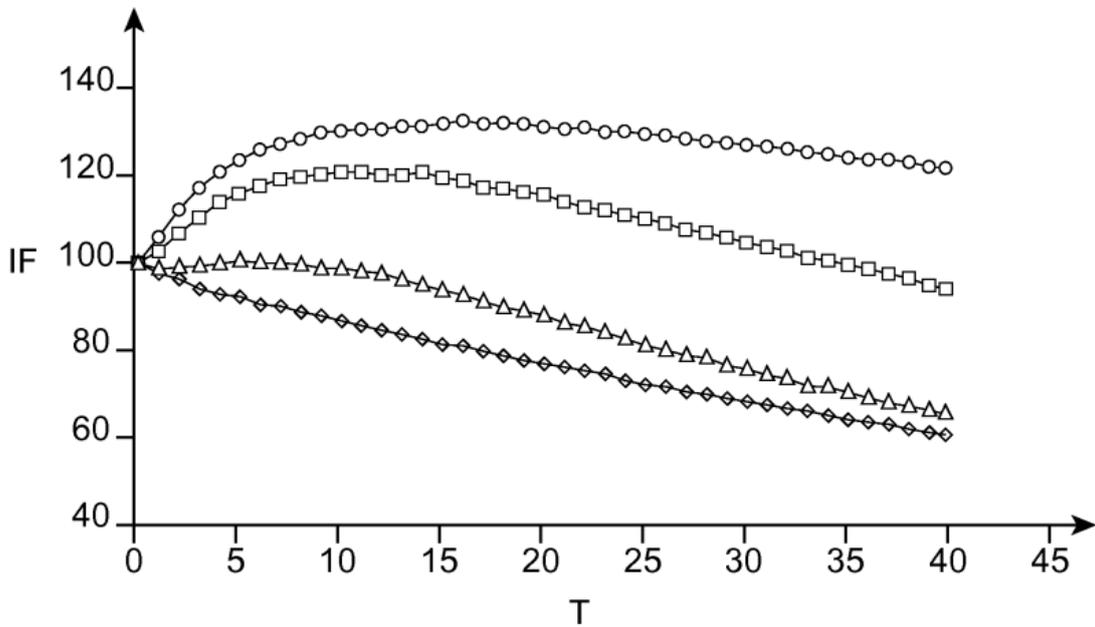


FIG. 4

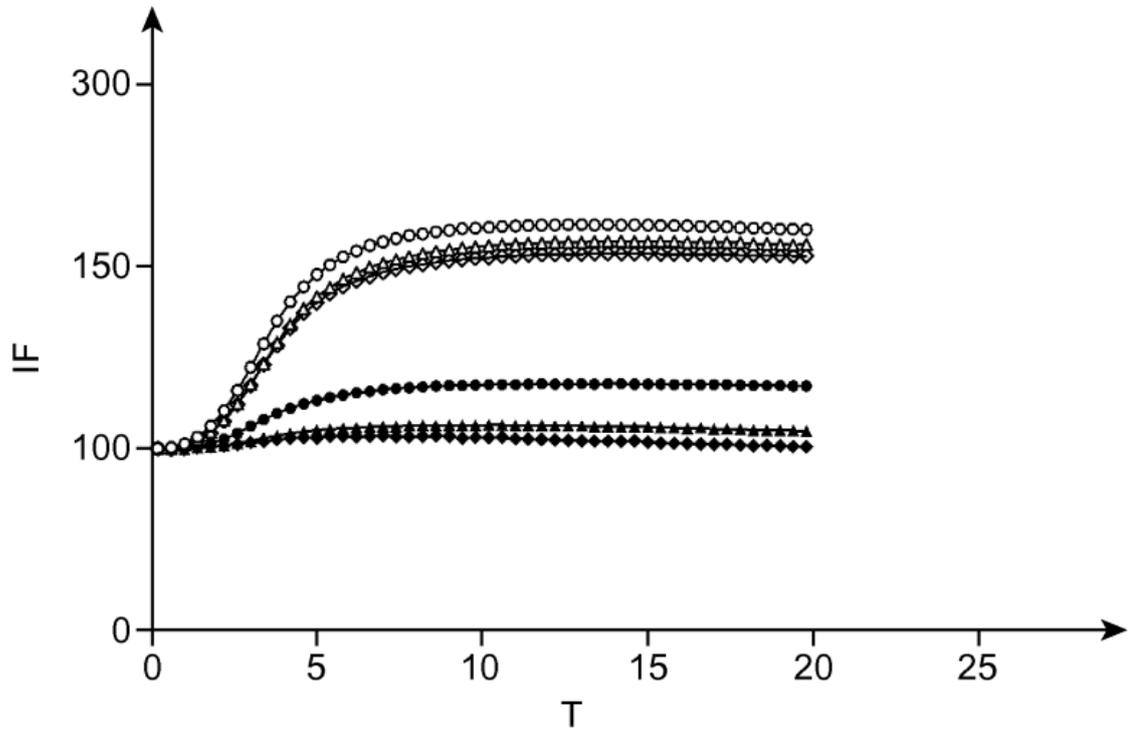


FIG. 5