

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502937

(P2004-502937A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 G O 4 5
CO 7 K 14/435	CO 7 K 14/435	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 H O 4 5
GO 1 N 33/02	GO 1 N 33/02	
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	A
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-508072 (P2002-508072)	(71) 出願人	503010715 ユニヴァーシタ' デグリ ステュディ デ ィ モデナ エ レッジオ エミリア イタリア国、4 1 1 0 0 モデナ、ヴィア ユニヴァーシタ'、4
(86) (22) 出願日	平成13年6月29日 (2001. 6. 29)	(74) 代理人	100065385 弁理士 山下 穰平
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月27日 (2002. 12. 27)	(72) 発明者	ロッシニ・ジャン・パオロ イタリア国、4 0 0 6 8 サン ラザッロ 、ヴィア イデイス、2 6 / ビー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/007487	Fターム(参考)	2G045 AA40 BB10 BB20 BB41 CB01 CB17 FB01 FB03 FB05 FB08 GC10 4B063 QA18 QQ08 QQ16 QQ96 QR02 QR66 QS33 QX02
(87) 国際公開番号	W02002/003060		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002. 1. 10)		
(31) 優先権主張番号	MI2000A001474		
(32) 優先日	平成12年6月30日 (2000. 6. 30)		
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)		

(54) 【発明の名称】 ジノフィシス毒素及びイエソー毒素の測定方法

(57) 【要約】

本発明は、生体外の細胞培養の使用に基づく、ジノフィシス毒素及びイエソー毒素の群に属する毒素の検知、識別及び測定の方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

毒素を含む試料を使って処理された生体外の細胞システムでの E - カドヘリンタンパク質及び関連抗原、E C R A_{1 0 0} と E C R A_{1 3 5} の量の評価に基づいた、該試料中のジノフィシス毒素及びイエソー毒素の群に属する毒素の質的及び量的決定の方法。

【請求項 2】

前記質的決定が、汚染が測定されなければならない試料を使って処理された細胞システムにおける E - カドヘリンタンパク質及び関連抗原、E C R A_{1 0 0} と E C R A_{1 3 5} の細胞の含有量の観測からなる請求項 1 による方法。

【請求項 3】

前記量的決定が、対照標準で処理された細胞システムに関して、汚染が測定されなければならない試料を使って処理された細胞システムにおける E - カドヘリンタンパク質及び関連抗原、E C R A_{1 0 0} と E C R A_{1 3 5} の細胞の含有量の変化観測を含む請求項 1 による方法。

【請求項 4】

前記評価が、抗 E - カドヘリン抗体を使って生体外の細胞システムから作製された細胞抽出物中で行われた E - カドヘリン及び E - カドヘリン関連抗体の免疫学の識別後に行なわれる請求項 1 による方法。

【請求項 5】

前記免疫学の識別が、免疫沈殿、固体相免疫プロット法（ウェスタンプロット法）、エンザイムリンクド免疫吸着剤測定法からなる群から選ばれる技術によって行なわれる請求項 4 による方法。

【請求項 6】

前記技術が固体相免疫プロット法（ウェスタンプロット法）である請求項 5 による方法。

【請求項 7】

前記毒素が、イエソー毒素とそれらの派生体と構造上関連する類似体の群及びオカダ酸とその派生体と構造上関連する類似体の群に属する請求項 1 による方法。

【請求項 8】

前記イエソー毒素が、イエソー毒素、ホモイエソー毒素、45 - 水酸化イエソー毒素、44 - カルボキシイエソー毒素からなる群から選ばれる請求項 7 による方法。

【請求項 9】

前記オカダ酸の構造上関連する類似体が、ジノフィシス毒素 1、ジノフィシス毒素 2、ジノフィシス毒素 3 からなる群から選ばれる請求項 7 による方法。

【請求項 10】

更に次のステップを含む請求項 1 - 9 による方法：

- a) 汚染を評価しなければならない試料の作製、
- b) 生体外の細胞システムでの試料の培養、
- c) 細胞システムの可溶性細胞質抽出物の作製及びタンパク質成分の分子容量に基づく抽出物の分留、
- d) 抗 E - カドヘリン抗体による E - カドヘリン及び関連抗原、E C R A_{1 0 0} と E C R A_{1 3 5} の識別。

【請求項 11】

前記試料が未精製の軟体動物抽出物である請求項 10 による方法。

【請求項 12】

前記未精製抽出物が有機溶媒を使った抽出及び分離によって作製された請求項 11 による方法。

【請求項 13】

方法のステップ b) の前記細胞システムが、ヒト E - カドヘリン抗原を表す細胞系統中から選ばれる請求項 10 による方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記 E - カドヘリンを表す細胞系統が M C F - 7、A 5 4 9、B x P c 3 である請求項 1 3 による方法。

【請求項 1 5】

細胞系統が M C F - 7 で表わされ、かつ方法のステップ b) の培養の時間が 1 2 ~ 2 4 時間の間に含まれる請求項 1 3 による方法。

【請求項 1 6】

方法のステップ d) の前記識別が、抗 E - カドヘリン抗体を使った免疫プロット法により行なわれた請求項 1 0 による方法。

【請求項 1 7】

前記抗体が単クローンである請求項 1 6 による方法。

10

【請求項 1 8】

方法のステップ c) の前記分留が、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法より行なわれた請求項 1 0 による方法。

【請求項 1 9】

前記ゲルが更に還元している請求項 1 8 による方法。

【請求項 2 0】

方法のステップ d) の前記識別に続き、ステップ e) 抗原、E - カドヘリン、E C R A _{1 0 0} 及び E C R A _{1 3 5} から得られた免疫反応性のレベルの評価がある請求項 9 - 1 9 による方法。

【請求項 2 1】

前記評価が視覚検査によって行われる請求項 2 0 による方法。

20

【請求項 2 2】

前記評価が、濃度計分析の使用と総免疫反応性及び試料の相対的な総免疫反応性 () の値の計算によって行われる請求項 2 0 による方法。

【請求項 2 3】

前記試料が海産物である請求項 1 - 2 2 による生体外の細胞システムで、E - カドヘリンタンパク質及び関連抗原、E C R A _{1 0 0} と E C R A _{1 3 5} の量の評価に基づいて、ジノフィシス毒素とイエソー毒素の群に属する毒素の質的・量的決定の方法。

【請求項 2 4】

前記海産物が人間及び動物消費のための食料である請求項 2 3 による方法。

30

【請求項 2 5】

前記産物が軟体動物である請求項 2 4 による方法。

【請求項 2 6】

前記軟体動物がイガイとホタテガイである請求項 2 5 による方法。

【請求項 2 7】

1 0 0 k D a の分子質量で、E - カドヘリンと免疫学的に関係する抗原 E C R A _{1 0 0} 。

【請求項 2 8】

存在を検知し、毒素の属する群を識別し及び試料中の毒素レベルを測定する抗原 E - カドヘリン、E C R A _{1 0 0} 及び E C R A _{1 3 5} の使用。

【請求項 2 9】

前記毒素は、ジノフィシス毒素及びイエソー毒素の群に属する請求項 2 8 による抗原使用。

40

【請求項 3 0】

前記毒素が、イエソー毒素、ホモイエソー毒素、4 5 - 水酸化イエソー毒素、4 4 - カルボキシイエソー毒素、ジノフィシス毒素 1、ジノフィシス毒素 2、ジノフィシス毒素 3、オカダ酸またそれらの派生体及び構造上関連する類似体のものの中から選ばれる請求項 2 9 による抗原使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

50

本発明の技術分野は、毒素の検知及び生体外での培養細胞システムによるそれらの測定に関する。

【0002】

(背景技術)

毒性物質を作り出す藻類によって汚染された甲殻類又は魚の食物摂取によって引き起こされた人間の中毒は、昨年恐ろしい進化を示した現象で、事実上中毒期間がより頻繁に及びそれらが過去に報告されていなかったこの惑星の地域で生じた。

【0003】

中毒のいくつかのタイプは、動物に引き起こされた症候学上に基づいて、また可能な場合は常に、誘因物質の化学特性及びそれらの作用メカニズムが、これまで記述されてきた。これらのうちの1つは、汚染された軟体動物(主としてイガイ及びホタテガイ)の食物摂取による甲殻類中毒下痢(DSP)である(ヤスモト T、オシマ Y、ヤマグチ M、1978年、Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish、44:1249)。

10

【0004】

人間のDSP中毒による致死量は記述されていないが、人間のDSP中毒は公衆衛生に重大問題を引き起こすことができるので、本規則(欧州連合、指令CE/91/492/CEE)に従って管理された、軟体動物の毒性の連続的な監視によって実行された正確な予防によって、一旦それが制定されることは軟体動物収穫及び販売の禁止を暗示し、軟体動物が毒素混合物の有効水準を示すまで、それは継続される。

【0005】

現在、DSP毒素中に分類された物質の測定は、化学的方法(末端が質量分析に繋がったHPLC)(Quilliam M. A.; J. AOAC Int、1995年、78:555)、そして免疫学方法(RIA、ELISA;それらが例えばEP509819記述のように)で行なうことができ、それは軟体動物組織から得られた未精製又は半精製の抽出物で行なわれ、免疫学方法の場合には、単にオカダ酸(OA)及びあるジノフィシス毒素(DTX)のために得られた特定抗体の有効性に基づく。

20

【0006】

化学的方法は、DSP物質中に分類された成分の大部分を正確な測定をもたらすことができるが、汚染された材料の実際の毒性が過小評価されるかもしれないので、二枚貝軟体動物中の毒性プログラムを監視するのに日常的に用いることはない。確かに、その一方で化学上異なる成分の3つの群がDSP毒素(ジノフィシス毒素、イエソー毒素及びペクテノ毒素)(ヤスモト T、ムラタ M、1993年、Chem. Rev、93:1897)として分類されており、実際に人間が汚染された軟体動物の毒性の全成分を見つけることができるのが、十分に確立されたとは限らなかった。

30

【0007】

更に、軟体動物において検知できるDSPとして分類された成分のタイプ及び濃度は、それらの地理的な出所及び収穫時期に依存して変わることができ、その結果、全ての試料は個々の“毒素学プロフィール”を示す。

【0008】

更に、毒素の3つの群の各々の分析のために使用することができる化学的-物理的方法は、個々に、同じ試料中に存在するかもしれない1以上の群に属する成分の同時期の検知は可能でない。

40

【0009】

生化学や細胞方法(機能的分析)もDSP毒素の検知を行うことができ、毒素がそれらの活動の修正により特定分子の目標への結合が引き起こすことができる測定結果に基づくか、さもないと、毒素に感じて反応する有能な培養細胞が、毒素によって影響を及ぼされた全ての細胞毒性に基づく。現在、生化学分析はリンタンパク質ホスファターゼ活動抑制を含む測定に制限され、ジノフィシス毒素1及びオカダ酸を測定するWO96/40983に記述されたように、この後者の混合物と機能的に関係する毒素の場合にのみ適切であり、(Tubaro Aら、1996年、Toxicol、34:743)、そして、そ

50

の酵素群の同じメカニズム抑制を表している。今度は培養細胞の使用に基づいた分析で、分析はシステムに供給された毒素の用量と、残存する細胞の数の減少又は出現形態の変化の影響を受けた細胞の一方の間の相関性に制限される (Fladmark K. E. ら、1998年、Toxicol. 36: 1101)。

【0010】

最後に第3のタイプの検知方法は、DSP毒性を検知するのに有能な生物学的検定を含んでいる。これらの分析では、複合システムでの個々の物質ではなく、成分群の全面的な影響は、正確なパラメーターを表わす。

【0011】

これらの方法は、全ての生きた動物に用いられる全毒素プールの生物学的検定を含んでいる (ヤスモト T. ら: “シーフード毒素” 章、Ragelis E. P, 編、ACSシンポジウム・シリーズ、262、1984年、pp. 207-214)。より明確には、有機溶媒を使った軟体動物の抽出によって得られた汚染された材料は、通常腹腔内注射によって (同章)、ネズミ達に投与される、さもなければ、それは D. magna (Vernoux J. P ら、1993年、Food Addit. Contam. 10: 603) のように、小さな甲殻類動物を培養器に加え、そして動物達の死は定時時間内モニターされる。

【0012】

上述されたマウス生物学的検定は、DTX及びノ又は YTX により汚染された軟体動物の総 DSP 毒性を検知するために、EU のほとんどの国々及び日本で使用された検知方法である。確かに、これら毒素のために国際的 LD₅₀ セットはマウス生物学的検定を参照する (ヤスモト T ら: “有害な藻類” 章、B Reguera, J. Blanco, M A Fernandez T. Wyatt, 医師編、Xunta de Galicia 及びユネスコ政府間海洋学委員会、1998年、pp 461-464)。しかしながら、この検定は、ヨーロッパの国々の中で高まっている適正な倫理的問題を引き起こす懸念を示し、一つの軟体動物試料の分析が少なくとも5匹の動物の犠牲を意味するともしある人が思う場合、そのインパクトはなお一層明白である。更に、この生物学的検定の結果は、おそらくネズミ達に注射された材料中の脂肪酸が高レベルであることにより、無病誤診を含んでいるかもしれない (Quilliam M. A., Wright J. L. C.; “有害な海の微藻類マニュアル” 章、Hallgraeff G. M., Anderson D. M., Cembella A. D, 医師編、IOC マニュアル及びガイド、No. 33、ユネスコ、1995年、pp 95-111)。

【0013】

(発明の要約)

本発明は、生体外細胞システムでの E - カドヘリンと呼ばれるタンパク質及びこのタンパク質の関連抗原、ECRA₁₀₀ と ECRA₁₃₅ の量の測定に基づくジノフィシス毒素及びイエソー毒素の質的・量的検知の方法に関する。発明によれば、本方法は、ホモイエソー毒素、45 - 水酸化イエソー毒素、44 - カルボキシイエソー毒素のようなイエソー毒素群に属し及びその派生体、構造上関連する類似体を含み、及びオカダ酸またその派生体、又はジノフィシス毒素1、ジノフィシス毒素2及びジノフィシス毒素3のような構造上関連する類似体の定性分析及び毒素測定が可能である。方法は次のステップを含む: a) 試料調製; b) 生体外細胞システムでの試料培養; c) 試料処理された細胞からの可溶性細胞質抽出物の作製及びタンパク質の分子量に基づくそれらが含んでいるタンパク質の分留; d) 抗 E - カドヘリン抗体による E - カドヘリン抗原及びその関連抗原 ECRA₁₀₀ と ECRA₁₃₅ の検知。更に本発明は、シーフードの汚染を評価する目的と共に、上述の毒素を測定するための方法の使用に関係ある。

【0014】

より具体的には、発明は E - カドヘリンの関連抗原 ECRA₁₀₀ に関し、また E - カドヘリンの関連抗原 ECRA₁₀₀ と ECRA₁₃₅ を用いた試料中の毒素レベルの存在検知と測定である。

10

20

30

40

50

【0015】

(図面の詳細な説明)

(図 1) MCF - 7 細胞中での E - カドヘリン及び関連抗原のオカダ酸及びイエソー毒素の影響。

【0016】

MCF - 7 細胞は、50 nM のオカダ酸、50 nM のイエソー毒素、両物質の最終濃度が50 nM 又は媒体 (対照標準) を使って 37 °C で 18 時間処理された。

【0017】

処理の終わりに、細胞は可溶性細胞質抽出物を作製するために使用され、また各抽出物からタンパク質 50 µg に相当する試料は SDS - PAGE による分留によって得られ及び抗 E - カドヘリン抗体を用いた免疫プロット法を受けた。図の上方に、その処理を詳述して、また分子量マーカーとして使用される α - ガラクトシダーゼ (118 kDa) 及び果糖糖、6 - P のキナーゼ (90 kDa) サブユニットの電気泳動可動性は左側に示した。

10

【0018】

対照標準に比べ、OA、YTX 又は両方を使った細胞処理後には顕著な典型的なパターンが観測することができる：確かに、ECRA₁₃₅ の出現は OA 単独を使った処理に相当するレーン中に観測することができ、また更に、2重処理 (オカダ酸 + イエソー毒素) の後にも検知でき、ECRA₁₀₀ に相当する免疫反応性の顕著な増加が、イエソー毒素単独を使った処理に相当するレーンにおいて顕著で、また更に 2重処理後にも維持される。

20

【0019】

(図 2) MCF - 7 細胞中での E - カドヘリン及び関連抗原のオカダ酸濃度レベルを増加させたときの影響。

【0020】

MCF - 7 細胞は、図示されたオカダ酸濃度を使って 37 °C で 20 時間処理された。処理の終わりに可溶性細胞質抽出物が得られ、また “ 材料及び方法 ” 節に記述されたように、E - カドヘリン (黒丸)、ECRA₁₃₅ (正方形) 及び ECRA₁₀₀ (三角形) のそれらの含有量を検知するために、SDS - PAGE 及び免疫プロット法によって分留を受けた。

【0021】

値は、各試料 (黒シンボル) での総免疫反応性 (E - カドヘリン + ECRA₁₃₅ + ECRA₁₀₀) あるいは対照標準細胞 (あるいは媒体のみを与えられた細胞から得られた抽出物) (白丸) で測定されたのと比較した、その試料の総免疫反応性のパーセンテージとして表される、相対的な総免疫反応性 () のパーセンテージとして表された。データは、3 - 7 の別個の実験の ± S . D . 平均を表す。

30

【0022】

(図 3) MCF - 7 細胞中での E - カドヘリン及び関連抗原のイエソー毒素濃度レベルを増加させたときの影響。

【0023】

MCF - 7 細胞は、図示されたイエソー毒素濃度を使って 37 °C で 20 時間処理された。処理の終わりに可溶性細胞質抽出物が得られ、また “ 材料及び方法 ” 内に記述されたように、E - カドヘリン (黒丸) 及び ECRA₁₀₀ (三角形) のそれらの含有量を検知するために、SDS - PAGE 及び免疫プロット法によって分留を受けた。

40

【0024】

値は、各試料 (黒シンボル) での総免疫反応性 (E - カドヘリン + ECRA₁₃₅ + ECRA₁₀₀) あるいは対照標準細胞 (あるいは媒体のみを与えられた細胞から得られた抽出物) (白丸) で測定されたのと比較したその試料の総免疫反応性のパーセンテージとして表される、相対的な総免疫反応性 () のパーセンテージとして表された。データは、3 - 7 の別個の実験の ± S . D . 平均を表す。

【0025】

(図 4) MCF - 7 細胞中での E - カドヘリン及び関連抗原のオカダ酸濃度レベルを増加

50

させることによるイエソー毒素の変化が引き起こす影響。

【0026】

MCF-7細胞は、図示されたオカダ酸濃度及び10 nMのイエソー毒素が存在（実線）あるいは欠如（点線）のどちらか一方を使って37 で20時間処理された。

【0027】

処理の終わりに、可溶性細胞質抽出物が得られ、また“材料及び方法”内に記述されたように、E-カドヘリン（パネルA）、ECRA₁₃₅（パネルB）及びECRA₁₀₀（パネルC）のそれらの含有量及び試料（パネルD）の相対的な総免疫反応性（ ）を検知するために、SDS-PAGE及び免疫ブロット法によって分留を受けた。

【0028】

値は、各試料（パネルA-C）での総免疫反応性（E-カドヘリン+ECRA₁₃₅+ECRA₁₀₀）あるいは対照標準細胞（あるいは媒体のみを与えられた細胞から得られた抽出物）で測定されたのと比較したその試料の総免疫反応性のパーセンテージとして表される、相対的な総免疫反応性（ 、パネルD）のパーセンテージとして表された。データは、3つの別個の実験の±S.D.平均を表す。

【0029】

（図5）MCF-7細胞中でのE-カドヘリン及び関連抗原のイエソー毒素濃度レベルを増加させることによるオカダ酸の変化が引き起こす影響。

【0030】

MCF-7細胞は、図示されたイエソー毒素濃度及び50 nMのオカダ酸が存在（実線）あるいは欠如（点線）のどちらか一方を使って37 で20時間処理された。

【0031】

処理の終わりに、可溶性細胞質抽出物が得られ、また“材料及び方法”内に記述されたように、E-カドヘリン（パネルA）、ECRA₁₃₅（パネルB）及びECRA₁₀₀（パネルC）のそれらの含有量及び試料（パネルD）の相対的な総免疫反応性（ ）を検知するために、SDS-PAGE及び免疫ブロット法によって分留を受けた。

【0032】

値は、各試料（パネルA-C）での総免疫反応性（E-カドヘリン+ECRA₁₃₅+ECRA₁₀₀）あるいは対照標準細胞（あるいは媒体のみを与えられた細胞から得られた抽出物）で測定されたのと比較したその試料の総免疫反応性のパーセンテージとして表される、相対的な総免疫反応性（ 、パネルD）のパーセンテージとして表された。データは、3つの別個の実験の±S.D.平均を表す。

【0033】

（図6）AOとYTXを増したイガイ肝臓から作製された未精製抽出物のE-カドヘリン及び関連抗原の影響。

【0034】

MCF-7細胞は、図に記述されるように作製され、図示された抽出物又は媒体単独（対照標準）を使って37 で18時間処理された。

【0035】

処理の終わりに、細胞は可溶性細胞質抽出物を作製するために使用され、また各抽出物からタンパク質50 µgに相当する試料は、SDS-PAGEによる分留によって得られ及び抗E-カドヘリン抗体を用いた免疫ブロット法を受けた。

【0036】

対照標準に比べ、OA、YTX又は両方を加えた未精製のイガイ抽出物を使って処理された細胞及び毒素が除かれたイガイ抽出物を使って処理された細胞場合、図1中で示される典型的なパターンも得られることが観測できるかもしれない：ECRA₁₃₅の出現はOA単独を使った処理に相当するレーン中に観測することができ、また更にこの抗原は2重処理（OA+YTX）後にも検知でき；今度はECRA₁₀₀抗原の増加したレベルは、YTX単独を使った処理に相当するレーンにおいて検知できて、また更に2重処理（OA+YTX）後にも維持される。

10

20

30

40

50

【0037】

(発明の詳細な説明)

本発明の方法は、存在を検知し、群を識別し、細胞性のシステムでE - カドヘリン抗原及びE - カドヘリン関連抗原 (ECRA₁₀₀とECRA₁₃₅) の細胞内レベルの測定に基づいて、ジノフィシス毒素及びイエソー毒素の群に属する毒素量を評価する方法に関する。

【0038】

適切な細胞性のシステムで、ジノフィシス毒素 (ヤスモト Tら、1993年、Chem Rev: 93、1897) 及びイエソー毒素 (ヤスモト Tら、同箇所; サタケら、1977年、ナット毒素、5: 107; Ciminelliら、2000年、Eur J Org Chem、291) の部類に属する毒素の存在が、E - カドヘリン及びその関連抗原ECRA₁₀₀とECRA₁₃₅の細胞性のレベルで測定可能な変化に関係していることは驚くほど知られた。

【0039】

E - カドヘリンは細胞接着分子で、更にウボモルリンあるいはL - CAM、又は他に、人間の配列はデータベース (スイスProt) 内の録番号Z18923に預けられたCell CAM120/80と名付けられる。本発明の範囲内で、E - カドヘリンは、更に分子質量が約126 kDa (126.1 ± 4.1 kDa) を示すタンパク質に関係し、変性する及び還元する条件下 (-メルカプトエタノール存在下でのSDS - PAGE) でのポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって決定され、また抗E - カドヘリン抗体によって識別された文献データ (Damsky C. H.ら、1983年、Cell、34: 455) と一致する。更に、定義されたE - カドヘリン関連抗原のECRA₁₀₀とECRA₁₃₅の抗原 (ECRA: E - カドヘリン関連抗原) は、SDS - PAGEによって行なわれた一連の測定によって決定されるように、それぞれ100 kDa (101.9 ± 3.2 kDa) 及び135 kDa (136.3 ± 3.3) の分子質量を示す。更に、これらの抗原は特定の抗E - カドヘリン抗体によって識別できる。

【0040】

本発明の範囲内で、もしそれらがE - カドヘリン、好ましくはヒトタンパク質のもので表せられ、細胞のシステム (あるいは細胞システム) は細胞系統に属し、当技術の既知の方法による培養中で維持されて、連続継代細胞系又は初代培養のいずれか一方に由来する。好ましくはこれらの細胞系統は哺乳類起源であり、更に好ましくはCaco-2、A549、BxPc3、MCF-7のように、これらはヒト細胞である。最も好ましい具体化のうちの一つは、当技術に熟練したものが概知の下記方法によって培養した、細胞のシステムはMCF-7細胞系統 (ECACC No: 86012803) によって構成される。更に、人間以外の細胞系統又はE - カドヘリン、好ましくはヒトE - カドヘリンのDNA配列の決定コードを並べ替えた、当然、E - カドヘリン抗原で表されない、定義内の適切な細胞システムで構成される。

【0041】

本発明の方法によって検知可能かつ測定可能な毒素は、ジノフィシス毒素群に属し、好ましくはジノフィシス毒素1 (DTX1)、ジノフィシス毒素2 (DTX2)、ジノフィシス毒素3 (DTX3) とオカダ酸及びオカダ酸と構造上関係する毒素を含んだそれらの派生体だけでなく、イエソー毒素 (YTX)、44 - カルボキシイエソー毒素、ホモイエソー毒素、45 - 水酸化イエソー毒素 (ヤスモト Tら、1993年、Chem Rev: 93、1897; サタケら、1977年、ナット毒素、5: 107; Ciminelliら、2000年、Eur J Org Chem、291の同箇所)、イエソー毒素と構造上関係する毒素を含んだようなイエソー毒素群に属するものもである。

【0042】

本発明によって、2つの群に属する毒素の様々な濃度及び組み合わせで処理された培養からの細胞抽出物で観測されたE - カドヘリン及び免疫学的に関連抗原中の分子の「パターン」は、下記の表中で要約され、それは、E - カドヘリン及び免疫学的に関連抗原の相対

的なレベルを報告する。

【 0 0 4 3 】

【 表 1 】

表 1

抗原	コントロール ^C	YTX ¹	DTX ²	YTX + DTX ³	YTX + DTX ⁴
E-カドヘリン*	85-100	40-60	60-70	40-80	40-70
ECRA ₁₀₀ *	0-15	40-60	0-10	10-50	20-30
ECRA ₁₃₅ *	0	n.d.	20-40	10-30	10-30
Σ♦	100	150-250	10-20	20-100	15-20

10

【 0 0 4 4 】

この表中で、免疫反応性抗原のレベル（*）は、試料の総免疫反応性（E-カドヘリン + ECRA₁₀₀ + ECRA₁₃₅）と比較したパーセンテージとして表された。更に、相対的な総免疫反応性（ ）のレベル（ ）は、対照標準での総免疫反応性と比較した試料の総免疫反応性のパーセンテージとして表される。値は個々に示された毒素濃度の合計から得られた：（^C） $[YTX] < 0.2 nM_E / [DTX] < 25 nM_E$ ；（¹） $[YTX] 0.5 nM_E / [DTX] < 25 nM_E$ ；（²） $[DTX] 40 nM_E / [YTX] < 0.2 nM_E$ ；（³） $[YTX] 0.2 - 0.5 nM_E / [DTX] 25 - 40 nM_E$ ；（⁴） $[DTX] 40 nM_E / [YTX] 0.5 nM_E$ 。

20

【 0 0 4 5 】

従って、細胞のシステムでの $25 nM_E$ （オカダ酸濃度と等価な濃度を表す）以上の濃度のジノフィシス毒素及びそれらの派生体あるいは構造上関連する毒素の存在は、典型的な E-カドヘリン及び関連抗原パターンに関係し：a) E-カドヘリン免疫反応性の減少；b) E-カドヘリン関連抗原、ECRA₁₃₅の出現；c) 相対的な総免疫反応性（ ）の減少、を含んでいる。 $0.2 nM_E$ （イエソー毒素と等価な濃度を表す）以上の濃度のイエソー毒素又はその派生体又は構造上関連する毒素の存在は：d) E-カドヘリン免疫反応性の減少；e) E-カドヘリン関連抗原、ECRA₁₀₀の増加；f) 例えば免疫ブロット法によって測定されるような ECRA₁₃₅ レベルが検出できない；g) 相対的な総免疫反応性（ ）の増加、を導く。

30

【 0 0 4 6 】

従って、その具体化のうちの1つは、発明は質的にジノフィシス毒素及びイエソー毒素の存在を、どちらか別々又は組み合わせで、細胞のシステム中又は試料中での識別するのに適した方法を生み出し、出現又は ECRA₁₃₅ と ECRA₁₀₀ 抗原及び E-カドヘリンレベルの増加の分析によって、その汚染は決定される。むしろ、この評価は、毒素を使って処理されなかった細胞又は別に試料として作製されて、媒体単独を使って処理されたで表される、対照標準に関して実行される。

【 0 0 4 7 】

従って、要約は本発明の範囲内の、E-カドヘリン及びその免疫学的に関連する抗原のレベルを検知する、及び/又は各抗原を視覚化する又は表1に記述されるような1つあるいは別の典型的なパターンを識別するのに有用な任意の方法を含む。

40

【 0 0 4 8 】

表1中で要約され及び図1中で示された毒素の各群のパターン特性の観測は、 $35 nM$ オカダ酸及び $0.4 nM$ イエソー毒素以上の濃度で、毒素の2つの群が細胞培養の中に同時に存在する場合、更に維持される。従って、本発明は、更に細胞のシステム中又は試料中の毒素の2つの群の各々の存在を共に又は別々のいずれかで検知する及び毒素の属する群を識別する方法に関する。

【 0 0 4 9 】

検知又は評価の好ましい具体化は、E-カドヘリン及びE-カドヘリン関連抗原の免疫学識別後、抗E-カドヘリン抗体を使った生体外の細胞システムで作製された細胞抽出物で

50

行う。従って、その分析は、好ましくは免疫学の方法によって行なわれ、より好ましくは細胞の抽出物の分留の後に行われる。

【0050】

E-カドヘリン及び関連抗原 E C R A₁₃₅ と E C R A₁₀₀ を免疫学以外で特性を評価する生化学方法のような、分子種 E-カドヘリン、E C R A₁₃₅ と E C R A₁₀₀ を識別する他の方法は使用することができ及び本発明の範囲内に含まれる。

【0051】

E-カドヘリン、E C R A₁₀₀ 及び E C R A₁₃₅ のレベルの変化は、利用毒素濃度に比例し、実際、細胞のシステムでのイエソー毒素の存在は E C R A₁₀₀ レベルの増加を導き（処理細胞から作製された抽出物での観測）、毒素で処理されていない対照標準細胞と比較して（これらの条件の下では、E C R A₁₃₅ 抗原は未検出）、総免疫反応性（E-カドヘリン + E C R A₁₃₅ 及び E C R A₁₀₀）の60%に達して、試料中のジノフィシス毒素の存在は E C R A₁₃₅ の出現に関係しているとしても、毒素で処理されていない対照標準細胞と比較して、そのレベルは総免疫反応性の40%以内を占めることができ、かつ E C R A₁₀₀ は総免疫反応性の10%未満の存在又は欠損のどちらかである。本発明の範囲内での、“総免疫反応性”なる用語は、例えば電気泳動図の濃度計の分析によって測定された、任意の特定の試料中のE-カドヘリン、E C R A₁₃₅ 及び E C R A₁₀₀ による免疫反応性の総量を示す。今度“相対的な総免疫反応性”（ ）なる用語は、媒体単独で処理された細胞あるいは処理されていない細胞で表わされるその対照標準と比較して、処理細胞から得られた任意の試料の総免疫反応性のパーセンテージで示される。

【0052】

従って、本発明は、細胞培養中又は試料中でどちらかを別々又は組み合わせた、ジノフィシス毒素及び/又はイエソー毒素の群に属する毒素を検知する方法にも関し、それは次のものを含む：a) 試料及びパラレル内の系列希釈を備えた、毒素の2つの群の各々に属する個々の代表的な混合物の濃度増加を備えた細胞のシステムの処理；b) 抗原E-カドヘリン、E C R A₁₃₅、E C R A₁₀₀ 用免疫反応性及び毒素の2つの群の各々用の相対的な総免疫反応性（ ）の標準カーブを構築する、該標準カーブは、好ましくはジノフィシス毒素類のための照合混合物としてオカダ酸、またイエソー毒素類のための照合混合物としてのイエソー毒素が、ジノフィシス毒素のために0~80 nM含有のオカダ酸濃度、またイエソー毒素のために0~1 nM含有のイエソー毒素濃度、で使用して構築される；c) 試料中又は細胞のシステム中で測定された、3つの抗原の各々の免疫反応性の値及び（相対的な総免疫反応性）に相当する毒素濃度の標準カーブを書き入れる。

【0053】

この好ましい具体化で、E-カドヘリン、E C R A₁₃₅ 及び E C R A₁₀₀ は、免疫化学手段によって細胞抽出物内から検出される。それらは細胞抽出物の電気泳動の分留後に視覚化されるのが好ましく、フィルタ上の分留タンパク質が転移し及び抗E-カドヘリン抗体（免疫プロット法又はウェスタンプロット技術による）によって抗原が識別される。E-カドヘリン及び関連抗原の選択的な検知に適した他の免疫学方法も使用されてもよく、また本発明の範囲内に含まれる。本発明によって使用することができる方法の例：放射免疫測定法（RIA）、酵素結合免疫吸着剤測定法（ELISA）は、E-カドヘリン及び/又はE C R A₁₃₅ 及び/又は特異性E C R A₁₀₀ を運ぶ単クローン又は多クローン抗体を使用する。当技術で既知の他の免疫学方法も、E-カドヘリン及び関連抗原パターンを識別するために使用されてもよい。更に、免疫学のもの以外に、これらのタンパク質の生化学の特性に基づくような、E C R A₁₃₅ 及び E C R A₁₀₀ の選択的な識別に適したどんな方法も、本発明内に含まれる。本発明の方法によって、食料の汚染の確認を目指したジノフィシス毒素類とイエソー毒素類の毒素レベルの検知及び測定は、人間の消費のために意図されたシーフード、特に二枚貝の軟体動物、好ましくはイガイ及びホタテガイにとても役立ち、また汚染された材料の商業化防止を目的とした監視プログラムの日常的な分析として使用することができる。

【0054】

従って、本発明による方法の好ましい具体化のうちの1つは、試料は好ましくはアセトンの均質化ステップ及びジエチルエーテル又は酢酸エチル又はジクロロメタンを有する残留物の再抽出を含む、標準方法によって作製されたイガイ抽出物により構成され（イタリアで報告されたG. U. n. ° 279、1995年11月29日、D. M. Sanita、1995年7月31日又は指令91/942/EU）、ここで未精製抽出物、更に好ましくは精製された、より好ましくは有機溶媒を用いた抽出及び分留によって精製されたことを特徴とし、前に詳細に明示されたように、培養容器、系列希釈、細胞のシステムの選択を包含し、またそれらの培養条件下（例えば37、5%CO₂）で12～24時間、好ましくは20時間の間、細胞を培養した。

10

【0055】

その後、培養細胞は、燐酸塩緩衝食塩水のような等張液で数回洗われ、次に、例えばSDSとデオキシコール酸ナトリウムのようなイオン洗剤、オプシオンでトリトンX-100のような非イオンの洗剤と例えばPMSE、アプロチニン等のようなプロチアーゼ抑制剤が結合した存在中で、当技術で既知の方法によって溶解された。溶解方法は、試料中のタンパク質低下を最小限にするために4で行なわれた。とにかく、細胞溶解方法におけるバリエーションは、当技術に熟練しているものから容易に入手可能で、洗剤濃度、溶解時間等の変化の導入によって、タンパク質分解に限定条件を付けて使用される。

【0056】

その後、細胞の溶解物は、好ましくは遠心分離によって部分的に精製され、また、可溶性になった細胞のタンパク質を含んでいる可溶性細胞質抽出物が作製される。その後、可溶性細胞質抽出物は -メルカプトエタノール（5%）のようなメルカプト基還元剤で処理また同様に当技術で知られた2%SDS存在で100に加熱することによりタンパク質の全変性するためにさらすことができる。可溶性細胞質抽出物の一部分は、約30-50μgのタンパク質の合計に相当する、その後それらの分子質量に基づいて分留される。Laemmli（Laemmli U. K. 1970年、Nature、227:680）によれば、分留は、変性状況下（SDS-PAGE）、好ましくはメルカプト基還元剤存在中で、混合アクリルアミド-ビスアクリルアミド含有濃度7～12%、好ましくは10%ポリアクリルアミドゲルを使用した電気泳動によって起こる。毛細電気泳動（マナベT、電気泳動、1999年、20:3116）及びゲル透過クロマトグラフィー（Siegelら、Biochem. Biophys. Acta、1966年、112:346）のような、それらの分子質量によるタンパク質分留に適した他の確立している方法も使用してもよい。

20

30

【0057】

その後、分留タンパク質は、プロット法、電気プロット法又は毛細プロット法のような当技術で既知の方法により、固体基質又はフィルタ、例えばPVDF又はニトロセルロース薄膜の上に転移される。ウェスタンプロット法によれば、好ましくは電気プロット法を用い、またその後固体基質は抗E-カドヘリン抗体を備えた次の免疫学検知を用いる：この方法によれば、転移タンパク質を運ぶ支援基質は、含有濃度0.5～3mM、好ましくは1mMのCaCl₂を含んでいる緩衝液中（例えばTBS:20mM三塩化水素、pH7.5、150mM NaCl）で主要な抗E-カドヘリン抗体（単クローンか多クローンそのもの又は単一特異的）で精査される。

40

【0058】

抗E-カドヘリン抗体は、Zymed研究所社によって出荷された抗E-カドヘリン抗体（クローンHECD-1）のような、単クローンが好ましく、含有濃度1-10μg/ml、好ましくは2μg/mlの緩衝液が好ましく使用される。どんな場合も、ここで記述した抗体濃度及び免疫プロット法条件は、当技術に熟練しているものにより容易に修正することができる、また使用抗体に応じて変えてもよい。もしそれらが抗E-カドヘリン抗体の多クローン又は単一特異的又は単クローンのいずれかのかならば、他の主要な抗体を使用することができる。好ましい具体化では、単クローン抗体はE-カドヘリン分子のN-

50

終末部に位置する特定の抗原決定基である。

【0059】

その後、主要抗体は適切な特異性を表示する第2の抗体によって検知され、抗マウスIg抗体が、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、ピオチンなどと結合して一部検知できる。一方、主要抗体は標識分子と直接接合してもよい。その後、E-カドヘリン、ECRA₁₃₅及びECRA₁₀₀に対応するバンドの検知は当技術の既知の方法、例えばアメラサーム-ファラマシア社からのECL方法による化学発光信号開発によって得られる。

【0060】

ウェスタンブロット法の代わりとして、可溶性細胞質抽出物がタンパク質標識、例えば放射性同位体(³⁵S又は¹²⁵Iのような)を含有している、例えばRIPA法(放射免疫投下分析)によって、電気泳動的な分留をする前に抗E-カドヘリン抗体で精査することができ、また免疫沈殿された成分の分子質量はポリアクリルアミドゲル電気泳動法によってついに決定することができる。

【0061】

その後、試料中のE-カドヘリン及び関連抗原ECRA₁₃₅とECRA₁₀₀の相対的なレベルは、例えばコダックX-Omatの写真用フィルムの露光によって起こる。好ましくは、電気泳動図は濃度計の走査を受け、また任意のユニットで吸光度値は各試料のピークの面積として測定されて、抗体によって検知されるような抗原量を計り、かつ総免疫反応性及び相対的な総免疫反応性()の値を決定するために使用される。簡単な定性分析の場合には、自動X線撮影フィルムの視覚検査が毒素の2つの群に関係する特徴的な分子パターンを直接識別することが可能である。処理細胞からの成分と、毒素で処理されていない又は別の分子質量マーカーを用いた細胞のシステムのような対照標準で見つかったものとの直接比較によって、その分析は行なうことができる。

【0062】

既に利用可能な方法と比較して、この発明による検知方法は次の長所を有する：

- ・選択性、2つの別個の分子抗原(ECRA₁₃₅とECRA₁₀₀)の測定により、それぞれDTX毒素とYTX毒素の2つの異なる部類に対する反応を示し、試料中の毒素の2つの部類のうちの一つ又は両方の存在を決定することが可能で、また毒素の属する群を識別する(質的決定)、
- ・実施の平易性、ただ1回の分析及び1つの抗体により同時に毒素の両方の部類が検知される、
- ・精度、主観的またほとんど量れない形態構造変質の見積もりではなく、測定可能なパラメーターを正確に定量化する、
- ・測定の的確さ、測定した分子パラメーターを明確な特徴づけをする(量的決定)。

【0063】

一層の具体化により、この発明は、抗E-カドヘリン抗体によって識別され、かつ平均分子質量が100kDa(101.9+3.2kDa)と表示される抗原ECRA₁₀₀分子にも関する(Laemmli U.K.によるSDS-PAGEによって行なわれた測定から得られた平均値、1970年、Nature、227:680、そして抗原及び既知分子量を有するこれら分子マーカーが、パラレルレーンを走り、特に-ガラクトシダーゼ(118kDa)及び果糖、6-Pキナーゼ(90kDa)サブユニット、である相対的な電気泳動可動性を補間する)。更に本発明は、E-カドヘリン、ECRA₁₃₅及びECRA₁₀₀抗原を用いて、存在を検知する、毒素に付属の構造的に関連した類似性の官能基を識別する、また毒素レベルを測定する、好ましくは存在を検知する、またイエソー毒素類(YTX)及びジノフィシス毒素類(DTX)の毒素レベルを測定するに関する。更に好ましいそのような毒素は：イエソー毒素、ホモイエソー毒素、45-水酸化イエソー毒素、44-カルボキシイエソー毒素、ジノフィシス毒素1、ジノフィシス毒素2、ジノフィシス毒素3、オカダ酸、またそれらの派生体及び構造上関連する類似体である。

10

20

30

40

50

【0064】

この発明は、下記に報告された実験例で更に記述されるであろうが、それは発明を何ら制限することを示さない。

【0065】

(実施例)

<材料と方法>

材料．洋わさびペルオキシダーゼと結合した抗マウスIg抗体及びECL検知のために使用された試薬は、アメラサム・ファラマシア社製品であった。細胞培養器はライフ・テクノロジーズ社及び細胞培養のために使用されたプラスチック器はヌーク社のを得た。オカダ酸(アンモニウム塩)は、アレクシス株式会社から購入した。イエソー毒素は、有限会社サイエンスアンドリサーチ環境研究所(ニュージーランド)から得た。これらの実験中で用いた単クローン抗E-カドヘリン抗体(クローンHECD-1)は、有限会社ジミード研究所社の製品であった。前染色分子質量マーカーは、シグマ社から得た。ニトロ細胞口ス薄膜“プロトランB83”は、シュライヒャー&シュエール社からであった。

10

【0066】

<細胞培養と処理>

これらの実験中で用いたMCF-7細胞系統は、細胞培養のヨーロッパコレクション(EGACC No: 86012803; CB No: CB2705)から得た。細胞は、CO₂ 5%を含有の大気中に37℃で維持されたペトリ皿中にあり、培地基は胎児牛の血清(10%)、非本質的アミノ酸(1%)及び2mMグルタミンを含んでいるダルベッコ改良MEMから構成された。

20

【0067】

細胞処理は、無水エタノールで作製された原液からの適切な毒素の一部を加えることにより実行され、また対照標準培養は、媒体の同一容量を受け取った。異なる物質の溶解作用は原液の系列希釈、それぞれ50µMオカダ酸及び500µMイエソー毒素で表されるものが得られ、遮光されたガラス薬瓶に-20℃で貯蔵された。培養器中のエタノール濃度は0.5%(v/v)以上ではなく、それはこれらの実験中で測定された分子パラメーターに影響しない濃度を表わす。

【0068】

培養容器中の物質の最終濃度及び個々の処理時間が、私たちが得た記述の結果を明確にした。

30

【0069】

<細胞抽出物の作製>

本分析で使用された細胞抽出物は、示された処理の終わりに培養容器に付着する細胞から得られ、また方法は4で行なわれた。細胞は、pH7.4、0.15MのNaCl(PBS)を含んでいる20mMリン酸緩衝液で3回洗われ、またその後、培養表面積cm²当たり溶解緩衝液25µlの追加によって溶解され、そしてこの溶液に接する細胞を10分間4℃で保存し続けた。溶解緩衝液は次のものを含んでいるPBSから構成された: 0.5%(w/v)デオキシコール酸塩、0.1%(w/v)ドデシルサルフェート塩(SDS)、1%(v/v)トリトンX-100、0.1mg/mlフェニルメチルスルホン基フッ化物(PMSF)。その後、細胞も溶解物は16000×gで30分間遠心分離され、この遠心分離の上澄み(可溶性細胞質抽出物)は再利用され、ピチンチヨニック酸を用いた比色定量方法によってそれらの総タンパク質容量を測定するために使用された(スミスP.Kら、1985年、Anal. Biochem. 150:76)。その後、可溶性細胞質抽出物は、最終的に2%SDS、5%β-メルカプトエタノール及び20%グリセリンの濃度に至り、電気泳動によってタンパク質分留のために使用される前に、100℃で5分間で処理された。

40

【0070】

<SDS存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)及び免疫ブロット法分析によるタンパク質分留>

50

通常、約50mgに相当する同量のタンパク質を含んでいる試料は、ラエミリーによる方法によって(Laemmli U.K, 1970年、Nature、227:680)、10%アクリルアミド・モノマーを含んでいる分離するゲルを使用して、SDS存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動法を受けた。電気泳動(170ボルトで3時間の運転時間)が終わり、タンパク質はニトロ細胞ロース薄膜(プロトランB83)に電気泳動的に転送され、そしてその後ボンソーSで染色された。

【0071】

その後、薄膜上の特定結合した部位を、20mMの三塩化水素、25 でpH7.5、150mMのNaCl(TBS)、3%(w/v)含有の低脂肪粉ミルク及び1mMのCaCl₂から構成された溶液で室温にて1時間飽和させた。その後、薄膜は、1%(w/v)含有の低脂肪粉ミルク、1mMのCaCl₂及び2µg抗E-カドヘリン抗体/緩衝液mlを含んでいるTBSで、室温にて1時間培養された。培養が終わった薄膜は、0.05%(w/v)のトゥイン20(TBSTゥイン緩衝液)を含んでいるTBSで、5分間を4回そして5回目に10分間洗浄された。その後、薄膜は1%(w/v)の低脂肪粉ミルク及び1:3000希釈の第2抗体(西洋わさびペリオキシダーゼが結合した抗マウスIg抗体)を含んでいるTBSトゥインで、室温にて1時間培養された。培養が終わったこの薄膜は、前述されるように洗浄され、また抗原は、ECL法及びコダックX-Omatフィルムを用いた自動X線撮影法によって検知された。その後、電気泳動図は濃度計走査を受け、また、ピーク面積から測定された吸光度は記録され、検知された抗原量を計るために使用された。

10

20

【0072】

<これらの実験中で使用された照合混合物>

これらの実験で具体化した範囲内で、オカダ酸(OA)及びイエソー毒素(YTX) (“材料”セクション参照)は、それぞれジノフィシス毒素類とイエソー毒素類の照合混合物として使用される(同箇所ニヤスモト Tら、1993年、Chem Rev:93、1897;サタケら、1977年、ナット毒素、5:107;Ciminelloら、2000年、Eur J Org Chem、291)。その後、使用される毒素濃度は、それらの2つの照合混合物への等価物として表される。

【0073】

実施例1:オカダ酸(OA)及びイエソー毒素(YTX)培養の下記細胞処理での細胞中のE-カドヘリン及び関連抗原ECRA₁₃₅とECRA₁₀₀の含有量変化。

30

【0074】

MCF-7細胞は、50nM OA、50nM YTX、両物質の最終濃度が50nM又は媒体(対照標準)を使って37 で18時間処理した。処理が終わりに、細胞は細胞抽出物を作製するために使用され、各試料から50µgのタンパク質がSDS-PAGEの分留によって得られ、抗E-カドヘリン抗体を使用してを免疫ブロット法分析を受けた。

【0075】

それは図1中で示されるように、免疫反応性の材料として主要な126kDa(126.1±4.1kDa)の分子質量バンド、対照標準及びオカダ酸で処理した両方は、この処理に関連したECRA₁₃₅(136.3±3.3kDa)の出現以外は、文献に報告されたデータと一致した(Damsky C.Hら、1983年、Cell、34:455)。今度はイエソー毒素処理の後に、ほとんどの免疫反応性はECRA₁₀₀に付随して、100kDa(101.9±3.2kDa)バンドに関連し、また、E-カドヘリンもわずかにより少ない暗いバンドとして検知される。ECRA₁₃₅及びECRA₁₀₀の両方、OA及びYTX処理の特性は、それぞれ、在来のE-カドヘリンのバンドと一緒に2重処理(OA+YTX)の後に検知される。

40

【0076】

同様の方法及び同様の実験条件下によって得られた電気泳動図の濃度計の走査は、更に細胞処理後ではE-カドヘリン媒体(対照標準)が総免疫反応性の主要成分(92.1±5.4%、n=6)を構成するのを示している。時々、そして次のフィルムの過剰露出が、

50

抗原 E C R A₁₀₀ (E - カドヘリン関連抗原) は少数成分として観測することができる。50 n M O A で処理された細胞では、対照標準細胞から作製された抽出物での検知の 15.4 ± 8.7 % に達する相対的な総免疫反応性 () の実質減少が検知された。O A 処理後、E - カドヘリンはまだ主要な免疫反応性成分を表し (総免疫反応性の 77.6 ± 12.3 %)、しかし E C R A₁₃₅ は重要な程度検知され総免疫反応性の 20.6 ± 9.6 % を占めて、ところが E C R A₁₀₀ は常に観測されないかもしれず総免疫反応性の 1.8 ± 3.1 % を占めている。Y T X (1 μ M) を使った M C F - 7 細胞の処理は、更に E - カドヘリン及び関連抗原の相対的な比率の変化に結びつく。事実、この物質を 24 時間培養し、相対的な総免疫反応性 () を対照標準と比較した時、ほとんど 2 倍になる (190 ± 32 %、n = 4)。これらの実験条件下では、E C R A₁₃₅ は検出できないが、ところが E - カドヘリン及び E C R A₁₀₀ は、ほとんど同レベルの総免疫反応性の 52.0 ± 1.7 及び 48.0 ± 1.7 (n = 4) にそれぞれ現れる。

10

【 0 0 7 7 】

図 1 中で示される結果に基づき、O A 処理は、在来の内因性の E - カドヘリン (約 126 k D a 分子質量) に伴う約 135 k D a (E C R A₁₃₅) の分子質量に相当する電気泳動の可動性を示す抗原の検知を引き起こし、ところが同じ実験のシステムの Y T X 処理は、約 100 k D a (E C R A₁₀₀) の分子質量に相当する電気泳動の可動性を示す抗原の相対的な増加を引き起こし、対照標準細胞は低レベルである。その後、これらの結果は、量的関係が E - カドヘリン、E C R A₁₃₅ 及び E C R A₁₀₀ レベルの間にあること示唆し、また一方では、培養細胞に処方された O A と Y T X の濃度、また他方では、更に

20

【 0 0 7 8 】

実施例 2 . E - カドヘリンと E C R A₁₃₅ 及び E C R A₁₀₀ レベルの間及び培養細胞に処方された O A と Y T X の濃度の量的関係。

【 0 0 7 9 】

前記発見に基づいて、実験は、M C F - 7 細胞での E - カドヘリン及び関連抗原レベルの変化を引き起こすことができる最低の O A 及び Y T X の濃度の検知を目指して行われた。

【 0 0 8 0 】

O A を用いた細胞処理後に得られ結果は図 2 中で報告され、M C F - 7 細胞が 10 n M 以上、最大が 75 n M 以上の濃度の O A 濃度で 20 時間処理された場合、私たちが分析した試料を供給する培養容器の表面領域のために標準化された私たちが使用した抗 E - カドヘリン抗体への免疫反応性材料のレベル減少を検知できることを示す。M C F - 7 細胞が 20 - 30 n M O A で処理された場合、その検知が始まり、最大 75 n M O A 処理で終わる際の相対的な総免疫反応性 () の減少には、E C R A₁₃₅ レベルの進歩的な増加が伴う (図 2)。同間隔で含んだ O A 濃度での M C F - 7 細胞処理は、E C R A₁₀₀ レベルの相対的な減少を導き 50 n M 以上の O A 濃度で最低となる。

30

【 0 0 8 1 】

図 2 中で報告された結果は更に、一定の実験条件の下では、O A の相対濃度が 30 - 75 n M、約 25 - 60 n g O A / m l に相当する間で含まれる場合、分析中の比例数が維持されることも示している。

40

【 0 0 8 2 】

この種の分析は Y T X を繰り返し使用し、また結果 (図 3) は、M C F - 7 細胞が 20 時間約 0.2 n M Y T X、Y T X 濃度で同等又は 1 n M 以上の最大のレベルに達する処理がなされた場合、私たちが分析した試料を供給する培養容器の表面領域のために標準化された抗 E - カドヘリン抗体への免疫反応性材料の増加が検知できることを示している。在来の E - カドヘリンの縮小に伴った E C R A₁₀₀ の増加は、実は、E C R A₁₃₅ が Y T X 単独を使った M C F - 7 細胞処理後に検知されていない 0.2 ~ 1 n M (図 3) 間に含まれた Y T X 濃度によって引き起こされたように見える。

【 0 0 8 3 】

50

図3中で報告された結果は更に、一定の実験条件の下では、YTXの相対濃度が0.2~0.5 nM、約240-600 pgのYTX/mlに相当する間で含まれる場合、分析中の比例数が維持されることも示している。

【0084】

実施例3. 培養細胞中のOA及びYTXの同時期測定の影響。

【0085】

この差異はOAとYTXによって引き起こされた反応から見つかри、また細胞の上澄み中の物質濃度にそれらの程度を関連づける可能性がOA及びYTXが同時期に培地器に存在するMCF-7細胞処理にあるかどうかチェックし、細胞が私たちの実験システムでは別々に添加された2つの物質を使って処理された時に既に観測されたものに類似のE-カドヘリン及び関連抗原の細胞プールの変化の検知に帰着した。

10

【0086】

その結果は実施例1(図1)において概説され、測定可能なレベルのE-カドヘリン、ECRA₁₃₅、ECRA₁₀₀を含み、かつ同時に培地中が50 nMの濃度のOAとYTXを使って18時間処理されたMCF-7細胞から得られ抽出物が示しており、また培養細胞に単独で加えたOAとYTXによって引き起こされたE-カドヘリン及び関連抗原のプールの質的变化は、MCF-7細胞が2つの毒素を同時に加えて処理される、私たちの実験システムの培養細胞の時でさえ維持される。

【0087】

別のものの存在下でさえ、毒素の2つの部類の各々の用量作用の関係を識別するために、更なる実験は先の例において報告された一般的な実施手順に従って行なわれた。その後、MCF-7細胞は、2つの物質の各々の濃度が増加していき、かつ他方の物質の有効濃度の存在又は欠如のどちらかで20時間処理された。図4はMCF-7細胞が10 nM YTXの存在又は欠如においてOA濃度が増加しながら処理された時に得られた結果を表し、また30 nM以上の濃度でOAによって引き起こされたECRA₁₃₅の細胞のレベルの増加が10 nM YTX存在下で維持されることを示す、しかしECRA₁₃₅の相対的なレベルはYTX欠如状態で測定したのと比較するとほとんど半分である。OAを使って処理された細胞から得られた抽出物より低レベルのECRA₁₀₀が検知され(図2)、それどころか、細胞培養がOA及び10 nM YTXの両方の存在下で実行される場合には観測されない、それは総免疫反応性の40~50%間のECRA₁₀₀の相対的なレベルを維持する。この結果には在来のE-カドヘリンの相対的な減少が伴い、10 nM YTXと共に加えられたOA濃度を増加させることが相対レベルを更に縮小し、相対的な総免疫反応性()の約40%に達する(図4)。これらの実験条件下では、MCF-7細胞から作製された抽出物から検知された総免疫反応性のレベルは、OA濃度を増加させながら細胞処理した後とにかく次第に減少し、また低OA濃度でさえ同時期の10 nM YTXの存在が免疫反応性の相対的な増加を維持するようには見えなかった、(図4)。

20

30

【0088】

これらの実験が、私たちの実験のシステム及び50 nM OAの存在又は欠如でYTXの濃度を増加させた結果を分析するために繰り返された場合、私たちは前結果に従って結果を得た(図5)。従って、YTXが同時期の培地中のOAの存在によってそのレベルは縮小されたECRA₁₀₀の用量依存の増加を引き起こすことが確認された(図5)。更にECRA₁₃₅がOA欠如で検出できない、またYTX濃度を増加させることでECRA₁₃₅の相対的なレベルが減少することが確認された(図5)。更に、総免疫反応性に関して、培地中のYTX濃度を増加させることにより、E-カドヘリンの相対的なレベルが次第に減少することが確認された。しかしながら、MCF-7細胞が50 nM OA存在下で処理された時、この結果は検知されず、またE-カドヘリンの相対的なレベルは処理で使用されたYTX濃度と無関係に総免疫反応性の70%付近で維持された。最後に、細胞が50 nM OA存在下でYTXを使って処理された時、YTX濃度を増加させることにより引き起こされて相対的な総免疫反応性()が2倍になることは観測されなかった(図5)。実際これらの実験条件の下では、その相対的な総免疫反応性()のレベルは、

40

50

50 nM OAを使って処理中のYTX濃度と無関係に処理していない細胞に検知されたものの約20%で維持された。

【0089】

これらの発見に基づいて、本方法が合理的な精度で同時期に同じ試料中のYTX及びDTXの群に属する毒物の全面的なレベルの検知を可能すると結論を下せるかもしれず、また従って、本方法は、汚染された材料からここまで加工された抽出物の上述の成分を測定するのに役立つものの範囲を超える。

【0090】

実施例4. OA及びYTXを含有する未精製イガイを使って処理されたMCF-7細胞のE-カドヘリン及び関連抗原のレベルの変化。

10

【0091】

イガイ肝臓からの未精製抽出物の作製

未精製抽出物は、市場で見つけた未汚染の青イガイ (*Mitylus galloprovincialis*) から作製されている。その抽出物は、公式のイタリア方法によって作製されている (G.U.N. 279, 29 novembre 1995年, D.M. Sanita 31 Luglio, 1995)。肝臓は解剖され、そして25grが(登録商標)テフロンすりこ木を備えたポッター-エレベジャム社のホモジナイザー中でアセトン125mlで均質化された。ホモジェネートは紙上でろ過され、また残留物はアセトン50mlで再抽出され、そしてろ過を2度された。3つの抽出物が組み合わせられ、またアセトンは40で蒸発した。水の残留物はジエチルエーテル50mlで次に抽出され、そしてエーテル溶液が集められた。その後、水の試料は、ジエチルエーテル50mlで2度再抽出され、そして3つのエーテル抽出物が組み合わせられた。その後、エーテルは蒸発し、そして最終材料がイガイ肝臓からの未精製抽出物であった。

20

【0092】

(MCF-7細胞中にE-カドヘリン及び関連抗原のレベルでOA及びYTXを含んでいるイガイ抽出物によって引き起こされた影響の分析...)

これらの実験の目的は、更に毒素が、食用の軟体動物、特にイガイから得られた未精製抽出物のような複雑な材料中にある場合、OA及びYTXがE-カドヘリン及び関連抗原の変化を引き起こすことができるかどうかを確認することである。

【0093】

この目的は、未精製抽出物は、名目上DSP毒素が不足している市場で使用可能なイガイから作製され、決められた多量のOA及び/又はYTXを添加されている。その後、その未精製抽出物は、ここで“オリジナルの未精製抽出物”と定義され、方法の項目で記述されたように得られ、実験中で以下のように使用されている。第1の実例では、細胞培養への試料の正確な添加を可能にすることができる解決法を得るためにオリジナルの未精製抽出物の1容量が5容量のエタノール:ジメチルスルホキシド(1:1)で希釈され、それによって不安定な容量の機会を最小限にする。これら後者の抽出物は、ここで“希釈された未精製抽出物”と定義され、汚染されたイガイ試料で見つかるものに匹敵するレベルのOA及び/又はYTXの添加を受けた。

30

【0094】

その後、希釈された未精製抽出物はOA及び/又はYTXを加えられ、また以下に述べるように、もう3つの抽出物が得られた:

- オリジナルの未精製抽出物に36 ng YTX / μ l含んで希釈された未精製抽出物(「イガイ抽出+YTX」と定義);
- オリジナルの未精製抽出物に125 ng OA / μ l含んで希釈された未精製抽出物(「イガイ抽出+OA」と定義);
- オリジナルの未精製抽出物に36 ng YTX / μ l及び125 ng OA / μ l含んで希釈された未精製抽出物(「イガイ抽出+YTX+OA」と定義)。

40

【0095】

図6はMCF-7細胞中で得られた結果を示す。実験は培地に計5mlの融合性の細胞を

50

含有しているペトリ皿の使用により行われた。細胞へ加えられたイガイ抽出物の量は、50 ng の Y T X 及び / 又は 170 ng の O A を含有と示されるような、オリジナルの未精製抽出物の 1.3 μ l と等価であった。

【0096】

試料に対照標準細胞及び毒素が不足しているイガイ抽出（イガイ抽出、図6）を使って処理された細胞の試料から得られた結果を比較すると、DSP毒素（OAとYTX）によって汚染されていなかったイガイから作製された抽出物を使った細胞処理の結果が、検知可能なE-カドヘリン及び関連抗原で表示される質的变化はないことを示す。その代わりに、YTXを含むイガイ抽出物を使ったMCF-7細胞処理は、E-カドヘリンのものに匹敵するレベルにECRA₁₀₀の実質増加を引き起こし、私たちが検知した相対的な総免疫反応性（ ）がほとんど2倍になることを導いた（図6）。

10

【0097】

次に、OAを含んでいる抽出物を使った細胞処理は、相対的な総免疫反応性（ ）の実質減少に伴って、ECRA₁₃₅の出現を検知できることに結びついた。最後に、両方の毒素が、処理に使用されたイガイ抽出物中に存在した時、相対的な総免疫反応性（ ）の減少に伴って、ECRA₁₀₀のレベルの増加及びECRA₁₃₅の出現の両方は検知された（図6）。

【0098】

その後、OAとYTXによって引き起こされたE-カドヘリン及び関連抗原の変化は、これらの毒素がイガイ肝臓から作製された未精製抽出物のような複雑な生物学の基材に存在する時でさえ検知可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

MCF-7細胞中でのE-カドヘリン及び関連抗原のオカダ酸及びイエソー毒素の影響。

【図2】

MCF-7細胞中でのE-カドヘリン及び関連抗原のオカダ酸濃度レベルを増加させたときの影響。

【図3】

MCF-7細胞中でのE-カドヘリン及び関連抗原のイエソー毒素濃度レベルを増加させたときの影響。

30

【図4】

MCF-7細胞中でのE-カドヘリン及び関連抗原のオカダ酸濃度レベルを増加させることによるイエソー毒素の変化が引き起こす影響。

【図5】

MCF-7細胞中でのE-カドヘリン及び関連抗原のイエソー毒素濃度レベルを増加させることによるオカダ酸の変化が引き起こす影響。

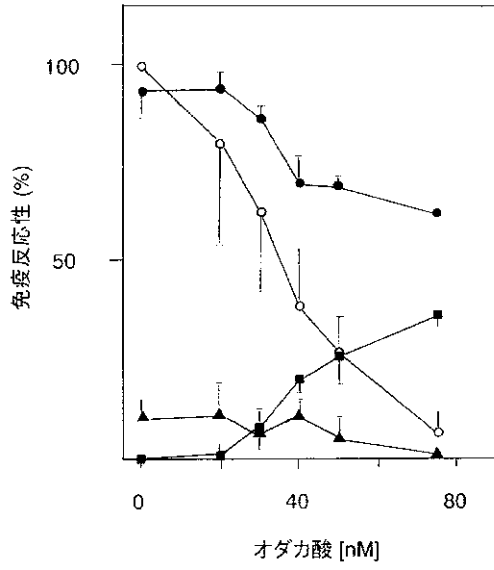
【図6】

OAとYTXを増したイガイ肝臓から作製された未精製抽出物のE-カドヘリン及び関連抗原の影響。

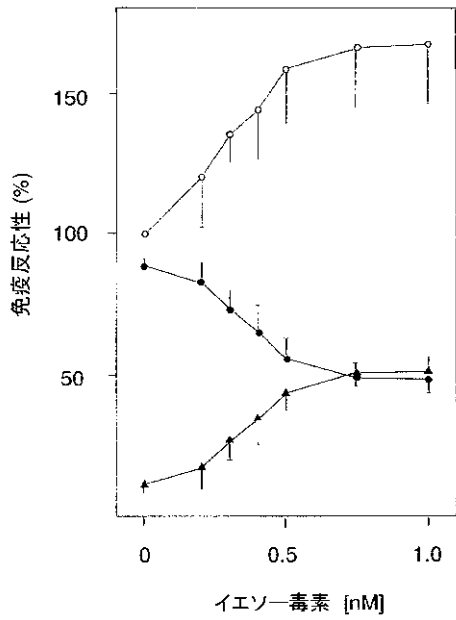
【 図 1 】



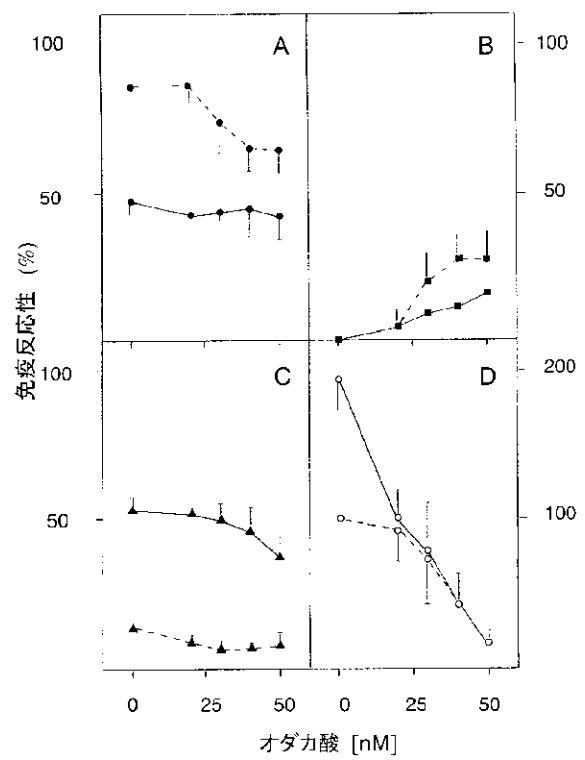
【 図 2 】



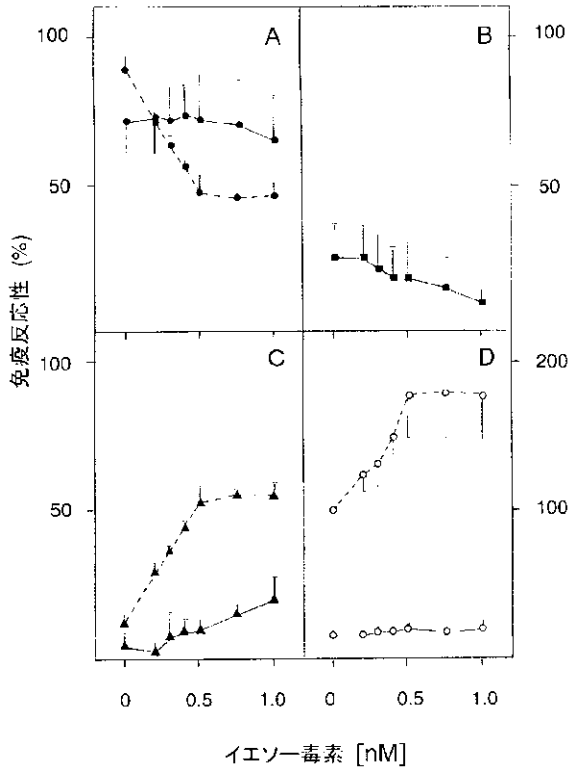
【 図 3 】



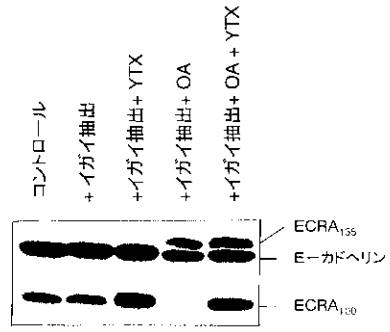
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/03060 A2

(51) International Patent Classification: G01N 33/48

(21) International Application Number: PCT/EP91/07487

(22) International Filing Date: 29 June 2001 (29.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
MI2000A001474 30 June 2000 (30.06.2000) IT

(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA (IT/IT); Via Università, 4, I-41100 Modena (IT).

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): ROSSINI, Gian, Paolo (IT/IT); Via Ilice, 26/B, I-40068 San Lazzaro (IT).

(74) Agent: GERVASI, Gemma, Noverbato & Gervasi, Corso di Porta Vittoria, 9, I-20122 Milan (IT).

(81) Designated States (national): AP, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette



WO 02/03060 A2

(54) Title: PROCESS FOR THE MEASUREMENT OF DINOPHYSISTOXIN AND OF YESSOTOXIN

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the detection, identification and measurement of toxins belonging to the group of dinophysistoxins and of yessotoxins, based upon the use of *in vitro* cell cultures.

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

1

PROCESS FOR THE MEASUREMENT OF DINOPHYSISTOXIN AND OF
YESSOTOXIN

Field of the invention

The technical field of the present invention relates to the detection of toxins and their
5 measurement by a system of *in vitro* cultured cells.

Background art

The human intoxication caused by ingestion of shellfish or fish contaminated by
algae producing toxic substances is a phenomenon which has shown a
threatening development in the last years, inasmuch as episodes of intoxication
10 occurs more often and in areas of the planet where they had never been reported
in the past.

Several types of intoxication have been described so far, based onto the
symptomatology induced in animals and, whenever possible, on the chemical
characteristics of causative agents and their mechanism of action. One of these is
15 the Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) which is due to the ingestion of
contaminated molluscs (mainly mussels and scallops) (Yasumoto T., Oshima Y.,
Yamaguchi M., 1978, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44: 1249).

Although lethal outcomes have never been described for DSP intoxication in
humans, this can cause serious problems of public health, which are managed
20 following the present rules (in the European Union, Directive CE 91/492/CEE), by
an accurate prevention implemented by a continuous monitoring of toxicity of
molluscs which, once it is established, implies the prohibition of mollusc harvest
and marketing, which lasts until molluscs show significant levels of toxic
compounds.

25 Presently, the measurement of agents classified among DSP toxins can be carried
out by chemical (HPLC eventually coupled to Mass Spectrometry) (Quilliam M.A.;
J. AOAC Int., 1995, 78:555) and immunological (RIA, ELISA; like those described
for instance in EP 509819) methods, which are performed on crude or semi-
purified extracts obtained from mollusc tissues, and, in the case of immunological
30 methods, are based on the availability of specific antibodies which have been
obtained only for okadaic acid (OA) and for some dinophysistoxins (DTX).

Chemical methods can yield accurate measurements of most components

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

2

classified among DSP agents but are not routinely employed in monitoring programmes of toxicity in bivalve molluscs, because the actual toxicity of contaminated material may be underestimated. Indeed, while three groups of chemically distinct components have been classified as DSP toxins (Dinophysistoxins, Yessotoxins and Pectenotoxins) (Yasumoto T., Murata M., 1993, *Chem. Rev.*, 93:1897), the actual human toxicity of every component which can be found in contaminated molluscs has not been firmly established. Furthermore, the type and concentrations of components classified as DSP detectable in molluscs, can change depending on their geographical origin and the time of harvest, so that every sample shows an individual "toxinological profile". Moreover, the chemico-physical methods which can be employed for the analysis of each of the three groups of toxins, individually, do not allow the contemporary detection of components belonging to more than one group, which may be present in the same sample.

15 The detection of DSP toxins can be also carried out by biochemical or cellular methods (functional assays), based onto the measurements of the effects that the toxins can trigger upon association to their specific molecular targets, by modifying their activities, or else based onto the total cytotoxic effect exerted by the toxins on cultured cells capable to sense and react to the toxins. Presently, the biochemical assays are confined to those involving measurements of the inhibition of phosphoprotein phosphatase activity, such as described in WO 96/40983 for measurement of dinophysistoxin 1 and okadaic acid, which are suitable only in the case of toxin functionally related to this latter compound (Tubaro A et al., 1996, *Toxicol.*, 34:743) and displaying the same mechanism of inhibition of that group of enzymes. In the assays based on the use of cultured cells, in turn, the analysis is confined to correlations between the dose of toxin supplied to the system and either the decrease in the number of surviving cells, or the appearance of morphological alterations in affected cells (Fladmark K.E. et al., 1998, *Toxicol.*, 36:1101).

30 Finally, the third type of detection method involves biological assays capable to detect DSP toxicity. In these assays, the overall effect of the set of components, but not that of individual substances in a complex system, represents the

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

3

measured parameter. These methods include bioassays of the total toxin pool employing whole living animals (Yasumoto T. et al in: "Seafood Toxins", Ragelis E.P., Ed., *ACS Symposium Series*, 262, 1984, pp. 207-214). More specifically, the contaminated material, obtained by extraction of molluscs with organic solvents, is administered to mice, usually by intra-peritoneal injection (ibidem), or else it is added to the culture media of small crustacean, such as *D. magna* (Vernoux J.P et al., 1993, *Food Addit. Contam.* 10:603), and the death of the animals is monitored within a fixed time span.

The mouse bioassay described above is the detection method employed in most Countries of the EU and in Japan, to detect total DSP toxicity due to DTX and/or YTX in contaminated molluscs. Indeed the LD₅₀ internationally set for these toxins refer to the mouse bioassay (Yasumoto T et al. in: "Harmful Algae", B Reguera, J. Blanco, MA Fernandez T. Wyatt, Edd.; Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1998, pp 461-464). This assay, however, poses relevant ethical problems, showing an increasing concern in European Countries, whose impact is even more pronounced if one considers that the analysis of a single mollusc sample implies the sacrifice of at least five animals. Furthermore the results of this bioassay may include false positives, probably due to the presence of high levels of fatty acids in the material injected into mice (Quilliam M.A., Wright J.L.C.; in "Manual on Harmful Marine Microalgae", Hallgraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., Edd., *IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO 1995*, pp.95-111).

Summary of the Invention

The present invention relates to a process for the qualitative and quantitative detection of dinophysistoxins and of yessotoxins, based onto the measurement of the amount of the protein called E-cadherin and of the antigens correlated to this protein, ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅, in an *in vitro* cellular system. The process, according to the invention, allows the qualitative analysis and the measurement of toxins belonging to the group of yessotoxin and comprising its derivatives and structurally related analogs, such as homoyessotoxin, 45-hydroxyyessotoxin, 44-carboxyessotoxin, and okadaic acid and its derivatives or structurally related analogs such as dinophysistoxin 1, dinophysistoxin 2 and dinophysistoxin 3. The

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

4

method comprises the following steps: a) sample preparation; b) incubation of the samples in a cellular system *in vitro*; c) preparation of cytosoluble extracts from the sample-treated cells and fractionation of the proteins they contain according to the molecular mass of the proteins; d) detection of the E-cadherin antigen and of its related antigens ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅, by anti-E-cadherin antibodies. The present invention further relates to the use of the process to measure the abovementioned toxins, with the aim to evaluate the contamination of seafood.

In a further embodiment, the invention relates the E-cadherin related antigen ECRA₁₀₀ and the use of the E-cadherin related antigens ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅ to detect the presence and measure the levels of toxins in a sample.

Brief description of the figures

Fig. 1. Effect of okadaic acid and yessotoxin on E-cadherin and related antigens in MCF-7 cells.

MCF-7 cells were treated with 50 nM okadaic acid, 50 nM yessotoxin, with both agents at a 50 nM final concentration, or with vehicle (control) for 18 hr at 37° C. At the end of the treatment, the cells have been used to prepare cytosoluble extracts and samples corresponding to 50 µg of protein from each extract have been fractionated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting using an anti-E-cadherin antibody. The treatments have been specified on the top of the figure, and the electrophoretic mobilities of the β-galactosidase (118 kDa) and fructose, 6-P kinase (90 kDa) subunits, used as molecular weight markers, have been indicated on the left.

The typical pattern observable after cell treatment with OA, YTX or both, as compared to controls, can be observed: indeed, the appearance of ECRA₁₃₅ can be observed in the lane corresponding to the treatment with OA alone, and is also detectable after the double treatment (okadaic acid + yessotoxin), whereas a notable increase in the immunoreactivity corresponding to ECRA₁₀₀ is observable in the lane corresponding to the treatment with yessotoxin alone and is maintained also after the double treatment.

Fig. 2. Effect of increasing okadaic acid concentrations on the levels of E-cadherin and related antigens in MCF-7 cells.

MCF-7 cells have been treated with the indicated okadaic acid concentrations for

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

5

20 hr at 37°C. At the end of the treatment cytosoluble extracts have been obtained, and have been subjected to fractionation by SDS-PAGE and immunoblotting, to detect their content in E-cadherin (filled circles), ECRA₁₃₅ (squares) and ECRA₁₀₀ (triangles), as described in the paragraph "Materials and Methods".

5 Values are expressed as percentages of total immunoreactivity (E-cadherin + ECRA₁₃₅ + ECRA₁₀₀) in each sample (filled symbols), or as relative total immunoreactivity (Σ), which has been expressed as percentages of the total immunoreactivity of that sample, as compared to that measured in control cells (or the extract obtained from cells which have received vehicle only) (void circles).
10 Data represent means \pm S.D. from 3-7 separate experiments.

Fig. 3. Effect of increasing yessotoxin concentrations on the levels of E-cadherin and related antigens in MCF-7 cells.

15 MCF-7 cells have been treated with the indicated yessotoxin concentrations for 20 hr at 37°C. At the end of the treatment cytosoluble extracts have been obtained, and have been subjected to fractionation by SDS-PAGE and immunoblotting, to detect their content in E-cadherin (filled circles) and ECRA₁₀₀ (triangles), as described under "Materials and Methods".

20 Values are expressed as percentages of total immunoreactivity (E-cadherin + ECRA₁₃₅ + ECRA₁₀₀) in each sample (filled symbols), or as relative total immunoreactivity (Σ), which has been expressed as percentages of the total immunoreactivity of the sample as compared to that measured in control cells (or the extract obtained from cells which have received vehicle only) (void circles).
Data represent means \pm S.D. from 3-7 separate experiments.

25 **Fig. 4.** Effect of yessotoxin on the alterations induced by increasing okadaic acid concentrations on the levels of E-cadherin and related antigens in MCF-7 cells.

MCF-7 cells have been treated with the indicated okadaic acid concentrations, and either in the presence (solid line) or in the absence (dashed line) of 10 nM yessotoxin for 20 hr at 37°C. At the end of the treatment, cytosoluble extracts have
30 been obtained, and have been subjected to fractionation by SDS-PAGE and immunoblotting, to detect their content in E-cadherin (Panel A), ECRA₁₃₅ (Panel B) and ECRA₁₀₀ (Panel C), and the relative total immunoreactivity (Σ) of the samples

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

6

(Panel D), as described under "Materials and Methods".

Values are expressed as percentages of total immunoreactivity (E-cadherin + ECRA₁₃₅ + ECRA₁₀₀) in each sample (Panels A-C), or as relative total immunoreactivity (Σ , Panel D), which has been expressed as percentages of the total immunoreactivity of that sample as compared to that measured in control cells (or the extract obtained from cells which have received vehicle only). Data represent means \pm S.D. from 3 separate experiments.

Fig. 5. Effect of okadaic acid on alterations induced by increasing yessotoxin concentrations on the levels of E-cadherin and related antigens in MCF-7 cells.

MCF-7 cells have been treated with the indicated okadaic acid concentrations, and either in the presence (solid line) or in the absence (dashed line) of 50 nM okadaic acid for 20 hr at 37°C. At the end of the treatment, cytosoluble extracts have been obtained, and have been subjected to fractionation by SDS-PAGE and immunoblotting, to detect their content in E-cadherin (Panel A), ECRA₁₃₅ (Panel B) and ECRA₁₀₀ (Panel C), and the relative total immunoreactivity (Σ) of the samples (Panel D), as described under "Materials and Methods".

Values are expressed as percentages of total immunoreactivity (E-cadherin + ECRA₁₃₅ + ECRA₁₀₀) in each sample (Panels A-C), or as relative total immunoreactivity (Σ , Panel D), which has been expressed as percentages of the total immunoreactivity of that sample as compared to that measured in control cells (or the extract obtained from cells which have received vehicle only). Data represent means \pm S.D. from 3 separate experiments.

Fig. 6. Effect of AO and YTX added to crude extracts prepared from mussel hepatopancreas on E-cadherin and related antigens.

MCF-7 cells have been treated with either the indicated extracts, prepared as described in the text, or vehicle alone (control), for 18 hr at 37°C. At the end of the treatment, cells have been used to prepare cytosoluble extracts and samples corresponding to 50 μ g of protein from each extract have been fractionated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting using an anti-E-cadherin antibody.

It can be observed that the typical pattern shown in figure 1 is also obtained when cells are treated with crude mussel extracts spiked with OA, YTX, or both, as compared to control cells and cells which have been treated with a mussel extract

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

7

devoid of toxins: in the lane corresponding to the treatment with OA alone, the appearance of ECRA₁₃₅ antigen can be detected, and this antigen is also detected after the double treatment (OA + YTX); the increased levels of the ECRA₁₀₀ antigen, in turn, is detectable in the lane corresponding to the treatment with YTX alone, and is also maintained after the double treatment (OA + YTX).

Detailed description of the invention

The method of the present invention relates to a process to detect the presence, to identify the group and to evaluate the amounts of toxins belonging to the group of dinophysistoxins and of yessotoxins, based on the measurements of the intracellular levels of the E-cadherin antigen and of E-cadherin-related antigens (ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅), in a cellular system.

It has been surprisingly found that the presence of toxins belonging to the classes of dinophysistoxins (Yasumoto T et al., 1993, Chem Rev: 93, 1897) and yessotoxins (Yasumoto T et al. *ibid.*; Satake et al., 1977, Nat Toxins, 5: 107; Ciminiello et al., 2000, Eur J Org Chem, 291), in an appropriate cellular system, is associated with measurable changes in the cellular levels of E-cadherin and of its related antigens ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅.

E-cadherin is a cell adhesion molecule, termed also uvomorulin or L-CAM, or else Cell CAM 120/80, whose human sequence is deposited in the database (SwissProt) under the accession number Z18923. Within the scope of the present invention, E-cadherin refers also to a protein showing a molecular mass of about 126 kDa (126.1 ± 4.1 kDa), in agreement with literature data (Damsky C.H. et al., 1983, *Cell*, 34:455), as determined by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing and reducing conditions (SDS-PAGE in the presence of β -mercaptoethanol), and recognized by anti-E-cadherin antibodies. Furthermore are defined E-cadherin related antigens the ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅ antigens (ECRA: E-Cadherin Related Antigens), showing respectively a molecular mass of 100 kDa (101.9 ± 3.2 kDa) and 135 kDa (136.3 ± 3.3), as determined by a series of measurements carried out by SDS-PAGE. Also these antigens are recognized by specific anti-E-cadherin antibodies.

Within the scope of the present invention, a cellular system (or cell system) refers to a cell line, maintained in culture according to methods known to the art, derived

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

8

either from continuous cell lines or primary cultures, provided that they express E-cadherin, preferably the human protein. Preferably, these cell lines are of mammalian origin and even more preferably, these are human cells, such as: Caco-2, A549, BxPc3, MCF-7. In one of the most preferred embodiments, the cellular system is constituted by the MCF-7 cell line (ECACC No: 86012803), cultured following to methods known by one skilled in the art. Are also comprised within the definition of appropriate cell system, cell lines other than human or naturally not expressing the E-cadherin antigen, transfected by DNA sequences encoding for E-cadherin, preferably human E-cadherin.

The toxins detectable and measurable according to the method of the present invention are the ones belonging to the group of dinophysistoxins, preferably represented by dinophysistoxin 1 (DTX1), dinophysistoxin 2 (DTX2), dinophysistoxin 3 (DTX3) and okadaic acid and their derivatives, included toxins structurally related to okadaic acid, as well as those belonging to the group of yessotoxins, such as yessotoxin (YTX), 44-carboxyyessotoxin, homoyessotoxin, 45-hydroxyessotoxin (in agreement with Yasumoto T et al., 1993, Chem Rev: 93, 1897; Satake et al., 1977, Nat Toxins, 5: 107; Ciminiello et al., 2000, Eur J Org Chem., 291), included toxins structurally related to yessotoxin.

The molecular "patterns" in E-cadherin and immunologically related antigens observed in cellular extracts from cultures treated with various concentrations and combinations of the toxins belonging to the two groups, according to the present invention are summarized in the following table, which reports the relative levels of E-cadherin and immunologically related antigens :

Table 1

Antigens	control ^a	YTX ^b	DTX ^c	YTX + DTX ^d	YTX + DTX ^e
E-cadherin ^f	85-100	40-60	60-70	40-80	40-70
ECRA ₁₀₀ ^g	0-15	40-60	0-10	10-50	20-30
ECRA ₁₃₅ ^g	0	n.d.	20-40	10-30	10-30
Σ ^h	100	150-250	10-20	20-100	15-20

In this table the levels (*) of immunoreactive antigens have been expressed as percentages, as compared to the total immunoreactivity (E-cadherin + ECRA₁₀₀ + ECRA₁₃₅) of the sample. Also indicated are the levels (*) of relative total

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

9

immunoreactivity (Σ) expressed as percentages of the total immunoreactivity of the sample compared to the total immunoreactivity in the controls. Values have been obtained at each indicated total toxin concentration: ⁽⁰⁾ [YTX] < 0.2 nM_E / [DTX] < 25 nM_E; ⁽¹⁾ [YTX] ≥ 0.5 nM_E / [DTX] < 25 nM_E; ⁽²⁾ [DTX] ≥ 40 nM_E / [YTX] < 0.2 nM_E; ⁽³⁾ [YTX] 0.2-0.5 nM_E / [DTX] 25-40 nM_E; ⁽⁴⁾ [DTX] ≥ 40 nM_E / [YTX] ≥ 0.5 nM_E.

Thus, the presence of dinophysistoxins and their derivatives or structurally related toxins at concentrations higher than 25nM_E (expressed as concentrations equivalent to okadaic acid concentration) in a cellular system is associated with a typical E-cadherin and related antigens pattern, comprising: a) a decreased E-cadherin immunoreactivity; b) appearance of the E-cadherin related antigen, ECRA₁₃₅; c) decreased relative total immunoreactivity (Σ). The presence of yessotoxin or its derivatives or structurally related toxins at concentrations higher than 0.2 nM_E (expressed as concentrations equivalent to yessotoxin) leads to: d) decreased E-cadherin immunoreactivity; e) increase in the E-cadherin related antigen, ECRA₁₀₀; f) undetectable levels of ECRA₁₃₅ as measured for instance, by immunoblotting; g) increased relative total immunoreactivity (Σ).

In one of its embodiments, therefore, the invention yields a process suitable for identifying qualitatively the presence of dinophysistoxins and yessotoxins present either separately, or in combination, in a cellular system, or in a sample whose contamination is to be determined, by the analysis of the appearance or of the increase in ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀ antigens and the levels of E-cadherin. Preferably, this evaluation is carried out with reference to a control, represented by cells which have not been treated with toxins, or else have been treated with vehicle alone, prepared as the sample.

In summary is therefore comprised within the scope of the present invention, any method useful to detect the levels of E-cadherin and its immunologically related antigens, and/or to visualize each antigen or to identify one or the other typical pattern as described in table 1.

It has been observed that the pattern characteristic for each group of toxins, as summarized in table 1 and shown in figure 1, is maintained also when the two groups of toxins are present at the same time in the cell culture, at concentrations

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

10

higher than 35 nM okadaic acid and 0.4 nM yessotoxin. The present invention, therefore, also relates to a process to detect the presence of each of the two group of toxins present either together or separately in a cellular system or in a sample and to identify the belonging group of the toxin.

5 In a preferred embodiment the detection or evaluation is performed after immunological recognition of E-cadherin and E-cadherin related antigens performed in cell extracts prepared from the in vitro cell system, with anti-E cadherin antibodies. The analysis is therefore preferably carried out by means of immunological methods, and even more preferably after fractionation of cellular
10 extracts.

Other methods recognizing the molecular species E-cadherin, ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, can be used and are comprised within the scope of the present invention, such as biochemical methods to evaluate characteristics other than immunological of the E-cadherin and related antigens: ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀.

15 The changes in the levels of E-cadherin, ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅ are proportional to the toxin concentrations utilized, and indeed, the presence of yessotoxins in a cellular system leads to an increase in ECRA₁₀₀ levels (as observed in extracts prepared from treated cells), reaching 60% of total immunoreactivity (E-cadherin + ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀), as compared to control cells not treated with the toxin
20 (and under these conditions, the ECRA₁₃₅ antigen is undetectable), whereas the presence of dinophysistoxin in the sample is associated with the appearance of ECRA₁₃₅, whose level can account for up to 40% of total immunoreactivity, as compared to control cells which are not treated with the toxin, and ECRA₁₀₀ is either absent or represent less than 10% of total immunoreactivity. Within the
25 scope of the present invention, the term "total immunoreactivity" indicates the sum of the immunoreactivity due to E-cadherin, ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀ in any specific sample, measured, for instance, by densitometric analysis of an electropherogram. The term "relative total immunoreactivity" (Σ), in turn, indicates the percentage of the total immunoreactivity of any sample obtained from treated cells, as compared
30 to that of controls, represented by cells treated with vehicle alone or untreated cells.

The present invention, therefore, also relates to a process to detect toxins

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

11

belonging to the groups of dinophysistoxins and/or yessotoxins, present either separately or combined in a cell culture or in a sample, which comprises: a) the treatment of a cellular system with serial dilutions of the sample and, in parallel, with increasing concentrations of each representative compound belonging to each of the two group of toxins; b) the construction of standard curves of immunoreactivity for the antigens E-cadherin, ECRA₁₃₅, ECRA₁₀₀, and of the relative total immunoreactivity (Σ) for each of the two groups of toxins, where the abovementioned standard curves are constructed preferably using okadaic acid as the reference compound for the class of dinophysistoxins, and yessotoxin as the reference compounds for the class of yessotoxins, at okadaic acid concentrations comprised between 0 and 80 nM for dinophysistoxins, and at yessotoxin concentrations comprised between 0 and 10 nM for yessotoxins; c) the interpolation on the standard curve of the toxin concentration corresponding to value of immunoreactivity of each of the three antigens and to Σ (relative total immunoreactivity), as measured in the sample or in the cellular system.

In this preferred embodiment, E-cadherin, ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, are detected in cellular extracts by immunochemical means. They are preferably visualized after electrophoretic fractionation of cell extracts, transfer of fractionated proteins on a filter and recognition of antigens by anti-E-cadherin antibodies (by immunoblotting or Western blotting techniques). Other immunological methods suitable for selective detection of E-cadherin and related antigens may be also used, and are comprised within the scope of the present invention. Examples of methods which can be used according to the present invention are: RadioImmunoAssays (RIA), Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA), using monoclonal or polyclonal antibodies carrying or the E-cadherin and/or the ECRA₁₃₅ and/or ECRA₁₀₀ specificity. Other immunological methods known in the art may be also used to identify the E-cadherin and related antigens pattern. Also, any method suitable for selective recognition of ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, other than immunological ones, such as those based upon the biochemical characterization of these proteins, are comprised within the present invention. The detection and measurement of the levels of toxins of the classes of dinophysistoxins and yessotoxins, aimed at ascertaining the contamination of foodstuff, according to the process of the

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

12

present invention, is particularly useful for seafood, particularly for bivalve molluscs, preferably mussels and scallops, intended for human consumption, and can be used as a routine assay in monitoring programmes aimed at preventing the commercialization of contaminated material.

- 5 In one of its preferred embodiments, the process according to the invention provides, therefore, that the sample, preferably constituted by mussel extracts prepared according to standard processes, comprising a homogenization step in acetone and a re-extraction of the residue with diethylether or ethylacetate or dichloro-methane (as reported in the Italian G.U. n° 279, november 29, 1995, D.M. Sanità July 31, 1995, or in the Directive 91/942/EU), here defined as crude
10 extracts, preferably further purified, even more preferably purified by extraction and fractionation by the use of organic solvents, is included in the culture vessels, upon serial dilutions, in the cellular system of choice, as previously defined in details, and incubated with the cells under their culture conditions (for instance
15 37°C, 5% CO₂) for a time span comprised between 12 and 24 hr, preferably 20 hr. The cultured cells are then washed a few times with isotonic solutions, such as a Phosphate Buffered Saline, and are then lysed according to methods known in the art, in the presence of ionic detergents such as, for instance, SDS and sodium deoxycholate, optionally associated with non-ionic detergents, such as TritonX-
20 100, and protease inhibitors, such as, for instance, PMSF, aprotinin, etc. The lysis procedure is carried out at 4°C, in order to minimize protein degradation in the samples. Anyway, variations in the cell lysis procedure are easily obtainable by one skilled in the art, by introducing changes in the concentrations of detergents, the time of lysis, etc, provided that conditions of limited proteolysis are used.
- 25 The cellular lysate is then partially purified, preferably by centrifugation, and cytosoluble extracts containing the solubilized cellular proteins are prepared. The cytosoluble extract can then be treated with sulfhydryl reducing agents, such as β -mercaptoethanol (5%) and subjected to total denaturation of proteins by heating at 100°C in the presence of 2% SDS, as well known in the art. Aliquots of
30 cytosoluble extracts corresponding to about 30-50 μ g total protein, are then fractionated on the basis of their molecular mass. The fractionation takes place preferably by electrophoresis using polyacrylamide gels at concentrations

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

13

comprised between 7 and 12%, preferably 10%, of a mixture acrylamide-bisacrylamide, under denaturing conditions (SDS-PAGE), preferably in the presence of sulphydryl reducing agents, according to Laemmli (Laemmli U.K., 1970, *Nature*, 227:680). Other established methods suitable for protein

5 fractionation according to their molecular mass, such as capillary electrophoresis (Manabe T., *Electrophoresis*, 1999, 20:3116), and gel permeation chromatography (Siegel et al. *Biochem. Biophys Acta*, 1966, 112:346), may also be used.

The fractionated proteins are then transferred on a solid matrix or a filter, for instance a PVDF or nitrocellulose membrane, following methods known in the art, such as the blotting, the electroblotting, or the capillary blotting. Preferably, electroblotting is used and the solid matrix is then employed for the subsequent immunological detection with an anti-E-cadherin antibody, according to the Western Blotting procedure: according to this method, the support matrix carrying

15 the transferred proteins is probed with the primary anti-E-cadherin antibody (monoclonal or polyclonal as such or monospecific) in an appropriate buffer (for instance, TBS: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) preferably containing CaCl_2 at concentrations comprised between 0.5 and 3 mM, preferably 1 mM. Preferably, anti-E-cadherin antibodies are monoclonal, such as the anti-E-cadherin

20 antibody marketed by Zymed Labs. Inc. (clone HECD-1), used preferably at a concentration comprised between 1-10 $\mu\text{g/ml}$ buffer, preferably 2 $\mu\text{g/ml}$. In any case, the antibody concentrations and the immunoblotting conditions described here can be easily modified by one skilled in the art, and may be varied according to the antibody used. Other primary antibodies can be used, provided they are

25 anti-E-cadherin antibodies either polyclonal or monospecific or monoclonal. In a preferred embodiment, the monoclonal antibody is specific for an epitope located at the N-terminal part of the E-cadherin molecule.

The primary antibody is then detected by a secondary antibody displaying the appropriate specificity, which is an anti-mouse Ig antibody conjugated with a detectable moiety, for instance horse radish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase, biotin, etc. As an alternative, the primary antibody may be directly

30 conjugated with the label molecule. The detection of bands corresponding to E-

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

14

cadherin, ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, is then obtained according to procedures known in the art, for instance by development of a chemoluminescent signal according to the ECL method from Amersham-Pharmacia.

As an alternative to Western blotting procedures, cytosoluble extracts containing proteins labelled for instance with radioactive isotopes (such as ³⁵S or ¹²⁵I), can be probed with the anti-E-cadherin antibody before being electrophoretically fractionated, for instance according to a RIPA procedure (Radio Immuno Precipitation Assay), and the molecular mass of immunoprecipitated components can be eventually determined by polyacrylamide gel electrophoresis.

The relative levels of E-cadherin and related antigens, ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, in the sample, then takes place by exposure of a photographic film, for instance Kodak X-Omat. The electropherogram is preferably subjected to densitometric scanning, and the absorbance values measured as the area of the peaks of each sample, in arbitrary units, is used to quantify the antigens as detected by the antibody and to determine the values of the total immunoreactivity and of the relative total immunoreactivity (Σ). In the case of a simple qualitative analysis, a visual examination of the autoradiography film allows the direct recognition of the molecular pattern characteristically related to the two groups of toxins. The analyses can be also carried out by a direct comparison between the components from treated cells and those found in controls, such as a cellular system which has not been treated with toxins, or else by the use of molecular mass markers.

The detection procedure according to the invention has the following advantages, as compared to already available methods:

- selectivity, due to the measurement of two distinct molecular antigens (ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀) representing the response to the two different classes of DTX and YTX toxins, respectively, which allows to determine the presence of one of the two classes of toxins, or both, in a sample, and to identify to which group the toxin belongs (qualitative determination)
- simplicity in the execution, as both classes of toxins are detected at the same time by a single assay and one antibody,
- precision, due to a precise quantification of a measurable parameter, rather than to a subjective and hardly quantifiable evaluation of morphological alterations,

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

15

• accuracy of measurements, due to the unequivocal characterization of the measured molecular parameters (quantitative determination).

According to a further embodiment, the invention also relates to the molecular antigen ECRA₁₀₀, which is recognized by anti-E-cadherin antibodies and displays
5 a mean molecular mass of 100 kDa (101.9 ± 3.2 kDa) (mean values obtained from measurements performed by SDS-PAGE according to Laemmli U.K. 1970, *Nature*, 227:680, and by interpolation of the relative electrophoretic mobility of the antigen and those of molecular markers having a known molecular weight, run in parallel lanes, in particular the β -galactosidase (118 kDa) and the fructose,6-P kinase (90
10 kDa) subunits). The present invention also relates to the use of the antigens E-cadherin, ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀ to detect the presence, to identify the functional group to which a toxin belongs related to structural similarities, and to measure the levels of toxins, preferably to detect the presence and to measure the levels of
15 toxins of the classes of yessotoxins (YTX) and dinophysistoxins (DTX). Even more preferably such toxin are: yessotoxin, homoyessotoxin, 45-hydroxyyessotoxin, 44-carboxyyessotoxin, dinophysistoxin 1, dinophysistoxin 2, dinophysistoxin 3, okadaic acid, and their derivatives and structurally related analogs.

The invention will be further described in the experimental examples reported below, which do not represent any limitation to the invention.

20 EXPERIMENTAL EXAMPLES

MATERIALS AND METHODS

Materials. Horse-radish-peroxidase conjugated anti-mouse Ig antibodies and the reagents employed for ECL detection were products from Amersham-Pharmacia. Cell culture media have been obtained from Life Technologies, and plasticware
25 used for cell culture were from Nunc. Okadaic acid (ammonium salt) was purchased from Alexis Corporation. Yessotoxin has been obtained from the Institute of Environmental Science and Research Limited (New Zealand). The monoclonal anti-E-cadherin antibody (clone HECD-1) employed in these experiments was a product from Zymed Laboratories, Inc. The pre-stained
30 molecular mass markers have been obtained from Sigma. The nitrocellulose membrane "Protran B63" was from Schleicher & Schuell.

Cell cultures and treatments.

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

16

The MCF-7 cell line employed in these experiments has been obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC No: 86012803; CB No: CB2705). Cells have been maintained at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ in Petri dishes, in a culture medium composed of Dulbecco's modified MEM, containing foetal bovine serum (10%), nonessential aminoacids (1%) and 2 mM glutamine. Cell treatments have been carried out by adding appropriate aliquots of toxins from stock solutions prepared with absolute ethanol, and control cultures received an identical volume of vehicle. Working solutions of the different agents were obtained by serial dilutions of stock solutions, represented by 50 µM okadaic acid and 500 µM yessotoxin, respectively, and were stored at -20°C, in glass vials, protected from light. The ethanol concentrations in culture media has never been higher than 0.5% (v/v), which represents a concentration incapable to affect the molecular parameters measured in these experiments.

The final concentrations of the agents in the culture vessels and the times of individual treatments are specified in the description of the results we obtained.

Preparation of cellular extracts.

The cellular extracts employed in the present analyses have been obtained from the cells adhering to culture vessels at the end of the indicated treatments, and the procedure was carried out at 4°C. Cells were washed three times with 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.15 M NaCl (PBS) and were then lysed by the addition of 25 µl of lysis buffer/cm² of culture surface area, and by keeping cells in contact with this solution for 10 minutes at 4°C. The lysis buffer was composed of PBS, containing: 0.5% (w/v) Na deoxycholate, 0.1% (w/v) Na dodecylsulfate (SDS), 1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF). Cellular lysates were then centrifuged for 30 minutes at 16000xg, and the supernatants of this centrifugation (cytosoluble extracts) were recovered and used to measure their total protein content by a colorimetric method, using bicinchoninic acid (Smith P.K et al., 1985, *Anal. Biochem.*, 150:76). Cytosoluble extracts were then brought to a final 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol and 20% glycerol concentration, and were treated for 5 min at 100°C, before being used for protein fractionation by electrophoresis.

Protein fractionation by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

17

(SDS-PAGE) and immunoblotting analysis.

Samples, usually containing the same amount of protein, corresponding to about 50 µg, were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS, according to the procedure by Laemmli (Laemmli U.K., 1970, *Nature*, 227:680), using separating gels containing 10% acrylamide monomer. At the end of the electrophoresis (running time about 3 hr at 170 Volts), proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Protran B83), and were then stained with Ponceau S.

Aspecific binding sites on the membrane were then saturated by a 1 hr incubation at room temperature with a solution composed of 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 at 25°C, 150 mM NaCl (TBS), containing 3% (w/v) low fat dry milk and 1 mM CaCl₂. The membrane was then incubated with TBS containing 1% (w/v) low fat dry milk, 1 mM CaCl₂, and 2 µg of anti-E-cadherin antibody/ml buffer, for 1 hr at room temperature. At the end of the incubation the membrane was washed four times for 5 min and then a fifth time for 10 min with TBS containing 0.05% (w/v) Tween 20 (TBS-Tween buffer). The membrane was then incubated with TBS-Tween containing 1% (w/v) low fat dry milk and secondary antibody (horse radish peroxidase conjugated anti-mouse Ig antibody) at a 1:3000 dilution, for 1 hr at room temperature. At the end of this incubation, the membrane was washed as previously described, and the antigens were then detected by the ECL procedure and autoradiography, using Kodak X-Omat films. The electropherogram was then subjected to densitometric scanning, and the absorbance measured from the peak area was recorded and used to quantify the detected antigens.

Reference compounds used in these experiments

Within the embodiment of these experiments, okadaic acid (OA) and yessotoxin (YTX) (see the "Materials" section), have been used as the reference compounds for the classes of dinophysistoxins and yessotoxins, respectively (in agreement with Yasumoto T et al., 1993, *Chem Rev*: 93, 1897; Satake et al., 1977, *Nat Toxins*, 5: 107; Ciminiello et al., 2000, *Eur J Org Chem*, 291). The toxin concentrations used are then expressed as equivalents to those two reference compounds.

Example 1: Changes in the cellular content of E-cadherin and related antigens

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

18

ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, following treatment of cells in culture with okadaic acid (OA) and yessotoxin (YTX).

MCF-7 cells were treated with 50 nM OA, 50 nM YTX, with both agents at a 50 nM final concentration, or with vehicle (control), for 18 hr at 37°C. At the end of the treatment, the cells were used to prepare cellular extracts, and 50 µg of protein from each sample were fractionated by SDS-PAGE and were subjected to immunoblotting analysis using anti-E-cadherin antibody.

As it is shown in figure 1, the immunoreactive material is mainly present as a 126 kDa (126.1 ± 4.1 kDa) molecular mass band, in agreement with data reported in literature (Damsky C.H et al., 1983, *Cell*, 34:455), both in control and in the treatment with okadaic acid, but in this treatment it is associated with the appearance of ECRA₁₃₅ (136.3 ± 3.3 kDa). After yessotoxin treatment, in turn, most immunoreactivity is associated with the 100 kDa (101.9 ± 3.2 kDa) band, corresponding to ECRA₁₀₀, and E-cadherin is also detected as a slightly less dark band. Both ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, characteristic of OA and YTX treatment, respectively, are detected after the double treatment (OA + YTX), together with the band of native E-cadherin.

The densitometric scanning of electropherograms obtained by similar procedures and under similar experimental conditions has also shown that: after cell treatment with vehicle (control) E-cadherin constitutes the major ($92.1 \pm 5.4\%$, $n = 6$) component of total immunoreactivity. Sometimes, and following overexposure of the film, the antigen ECRA₁₀₀ (E-Cadherin Related Antigen) can be observed as a minor component. In cells treated with 50 nM OA, a net decrease in the relative total immunoreactivity (Σ) is detected, reaching $15.4 \pm 8.7\%$ of that detected in the extracts prepared from control cells. After OA treatment, E-cadherin still represents the major immunoreactive component ($77.6 \pm 12.3\%$ of total immunoreactivity), but ECRA₁₃₅ is detected at a significant extent, accounting for $20.6 \pm 9.6\%$ of total immunoreactivity, whereas ECRA₁₀₀ may not be invariably observed, accounting for $1.8 \pm 3.1\%$ of total immunoreactivity. The treatment of MCF-7 cells with YTX ($1 \mu\text{M}$) also leads to a change in the relative proportions of E-cadherin and related antigens. A 24 hr incubation with this agent, in fact, leads to an almost doubling ($190 \pm 32\%$, $n = 4$) of relative total immunoreactivity (Σ), as

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

19

compared to controls. Under these experimental conditions, ECRA₁₃₅ is undetectable, whereas E-cadherin and ECRA₁₀₀ are present at almost the same level, constituting the 52.0 ± 1.7 and 48.0 ± 1.7 ($n = 4$) of total immunoreactivity, respectively.

5 Based on the data shown in figure 1 it can be summarized that: OA treatment induces the detection of an antigen showing an electrophoretic mobility corresponding to a molecular mass of about 135 kDa (ECRA₁₃₅), accompanying the native, endogenous E-cadherin (molecular mass about 126 kDa), whereas in the same experimental system, YTX treatment induces a relative increase in an
10 antigen showing an electrophoretic mobility corresponding to a molecular mass of about 100 kDa (ECRA₁₀₀), present at low levels in control cells. These results then suggest that there is a quantitative relation between the levels of E-cadherin, ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, on the one hand, and the concentrations of OA and YTX administered to cultured cells, on the other hand, and also show that the
15 qualitative changes in the cellular pool of E-cadherin and related antigens are maintained even in the case MCF-7 cells are treated with both toxins at the same time.

Example 2. Quantitative relationships between the levels of E-cadherin, ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, and the concentrations of OA and YTX administered to cultured cells.

20 On the basis of the previous findings, experiments have been carried out aimed at the detection of the minimal OA and YTX concentrations which could induce changes in the levels of E-cadherin and related antigens in MCF-7 cells.

The results obtained after cell treatment with OA are reported in figure 2 and show
25 that the decrease in the levels of material immunoreactive to the anti-E-cadherin antibody we have employed, normalized for the surface area of culture vessel supplying the sample we have analyzed, can be detected when MCF-7 cells are treated for 20 hr with OA concentrations higher than 10 nM, and it is maximal at concentrations higher than 75 nM. This decrease in relative total immunoreactivity
30 (Σ) is accompanied by a progressive increase in the levels of ECRA₁₃₅, whose detection starts when MCF-7 cells are treated with 20-30 nM OA, and is maximal after treatment with 75 nM OA (Fig. 2). MCF-7 cell treatments with OA

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

20

concentrations comprised in the same interval lead to a relative decrease in the levels of ECRA₁₀₀, which are minimal at OA concentrations higher than 50 nM. The results reported in figure 2 also show that, under the stated experimental conditions, the proportionality in the assay is kept when the equivalent concentrations of OA are comprised between 30-75 nM, corresponding to about 25-60 ng OA/ml.

This type of analysis has been repeated using YTX, and the data (Fig. 3) show that an increase in the material immunoreactive to the anti-E-cadherin antibody, normalized for the surface area of culture vessel supplying the sample we have analyzed, is detectable when MCF-7 cells have been treated for 20 hr with about 0.2 nM YTX, reaching maximal levels at YTX concentrations equal to or higher than 1 nM. The increase in ECRA₁₀₀, accompanied by the reduction in native E-cadherin, appears to be induced by YTX concentrations comprised between 0.2 and 1 nM (Fig. 3), whereas ECRA₁₃₅ has never been detected after MCF-7 cell treatment with YTX alone.

The data reported in figure 3 also show that, under the stated experimental conditions, the proportionality in the assay is maintained when the equivalent concentrations of YTX are comprised between 0.2 and 0.5 nM, corresponding to about 240-600 pg YTX/ml.

20 Example 3. Contemporary measurement of the effects of OA and YTX in cultured cells.

The differences found in the responses induced by OA and YTX, and the possibility to relate their extent to the concentrations of the agent present in the supernatant of the cells, have led to check whether MCF-7 cell treatments with OA and YTX, contemporary present in the culture medium, would result in the detection of changes in the cellular pool of E-cadherin and related antigens similar to those already observed when cells have been treated with the two agents, separately added to our experimental systems.

The results outlined in Example 1 (Fig. 1), showed that extracts obtained from MCF-7 cells which have been treated for 18 hr with OA and YTX, present at the same time in the culture medium at a concentration of 50 nM, contain measurable levels of E-cadherin, ECRA₁₃₅ and ECRA₁₀₀, and that the qualitative alterations in

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

21

the pool of E-cadherin and related antigens which have been induced by OA and YTX, added alone to cultured cells, are maintained even when MCF-7 cells were treated with the two toxins added contemporary to cultured cells in our experimental system.

5 In order to identify the dose-response relationship for each of the two classes of toxins, even in the presence of the other one, further experiments have been performed, following the general protocols reported in the preceding examples. MCF-7 cells were then treated for 20 hr with increasing concentrations of each of the two agents, and either in the presence, or in the absence of an effective
10 concentration of the other agent. Figure 4 reports the data obtained when MCF-7 cells have been treated with increasing concentrations of OA, in the presence or absence of 10 nM YTX, and shows that the increase in the cellular levels of ECRA₁₃₅ induced by OA at concentrations higher than 30 nM is maintained in the presence of 10 nM YTX, but the relative levels of ECRA₁₃₅ are almost halved as
15 compared to those measured in the absence of YTX. The low levels of ECRA₁₀₀ detected in extracts obtained from cells treated with OA (Fig. 2), instead, have not been observed when the cell incubation is carried out in the presence of both OA and 10 nM YTX, which maintains the relative levels of ECRA₁₀₀ between 40 and 50% of total immunoreactivity. This effect is accompanied by a relative decrease in
20 native E-cadherin, whose relative levels are further diminished upon increasing the OA concentrations added together with 10 nM YTX, reaching about 40% of relative total immunoreactivity (Σ) (Fig. 4). Under these experimental conditions, the levels of total immunoreactivity detected in extracts prepared from MCF-7 cells were anyhow progressively decreased after cell treatments with increasing OA
25 concentrations, and the contemporary presence of 10 nM YTX did not appear to maintain the relative increase in immunoreactivity, even at low OA concentrations (Fig. 4).

When these experiments have been repeated to analyse the effect of increasing concentrations of YTX in our experimental system, and in the presence or in the
30 absence of 50 nM OA, we have obtained results in line with previous data (Fig. 5). Thus, it was confirmed that YTX causes a dose-dependent increase in ECRA₁₀₀, whose levels are reduced by the contemporary presence of OA in the culture

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

22

medium (Fig. 5). It was also confirmed that ECRA₁₃₅ is undetectable in the absence of OA, and that the relative levels of ECRA₁₃₅ decrease upon increasing YTX concentrations (Fig. 5). Furthermore, it was confirmed that the relative levels of E-cadherin, with regard to total immunoreactivity, are progressively decreased by increasing YTX concentrations in the culture medium. When MCF-7 cells were treated in the presence of 50 nM OA, however, this effect was not detected, and the relative levels of E-cadherin were maintained around 70% of total immunoreactivity, independently of the YTX concentrations employed in the treatment. Finally, when cells were treated with YTX in the presence of 50 nM OA, the doubling of the relative total immunoreactivity (Σ) induced by increasing YTX concentrations was not observed (Fig. 5). Under these experimental conditions, in fact, the levels of relative total immunoreactivity (Σ) were maintained at about 20% of those detected in untreated cells, independently of the YTX concentrations present during the treatment with 50 nM OA.

On the basis of these findings, it can be concluded that the present procedure allows the detection of the overall levels of toxic agents belonging to the groups of YTX and DTX contemporary present in the same sample, with a reasonable accuracy, and hence the present process overcomes the limits of those which have been available to measure the abovementioned components in extracts prepared from contaminated material so far.

Example 4. Alterations in the levels of E-cadherin and related antigens in MCF-7 cells treated with crude mussel extracts containing OA and YTX.

Preparation of crude extracts from mussel hepatopancreas.

Crude extracts have been prepared from uncontaminated blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) found on the market. The extracts have been prepared according to the official Italian method (G.U. N. 279, 29 novembre 1995, D.M. Sanità 31 Luglio 1995). The hepatopancreas has been dissected and 25 gr have been homogenized with 125 ml of acetone, in a Potter-Elvehjem homogenizer with a teflon pestle. The homogenate was filtered on paper and the residue was re-extracted with 50 ml of acetone and filtration twice. The three extracts were combined and acetone was evaporated at 40°C. The aqueous residue was next extracted with 50 ml of diethyl ether, and the ether solution was collected. The

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

23

aqueous sample was then re-extracted with 50 ml of diethyl ether twice, and the three ether extracts were combined. Ether has then be evaporated, and the resulting material was the crude extract from mussel hepatopancreas.

5 *Analysis of the effect induced by mussel extracts containing OA and YTX on the levels of E-cadherin and related antigens in MCF-7 cells.*

The aim of these experiments was to ascertain whether OA and YTX can induce alterations of E-cadherin and related antigens also when toxins are present in complex matrices, such as crude extracts obtained from edible molluscs, particularly mussels.

10 To this aim, a crude extract has been prepared from mussels available on the market, nominally devoid of DSP toxins, which has been spiked by defined quantities of OA and/or YTX. The crude extract, defined here as "original crude extract", has then been obtained as described in the section of Methods, and has been employed in the experiment as follows. In the first instance, 1 volume of
15 original crude extract was diluted with 5 volumes of ethanol:dimethylsulfoxide (1:1), in order to obtain a solution which could allow an accurate addition of samples to cell cultures, minimising, thereby, the chance of erratic volumes. These latter extracts, here defined as "diluted crude extract", received the addition of OA and/or YTX at levels comparable to those which are found in samples from
20 contaminated mussels.

The diluted crude extracts were then added with OA and/or YTX, and three more extracts have been obtained, as specified below:

- diluted crude extract containing 36 ng of YTX/ μ l of original crude extract (defined "mussel extract +YTX");
- 25 - diluted crude extract containing 125 ng of OA/ μ l of original crude extract (defined "mussel extract + OA");
- diluted crude extract containing 36 ng of YTX and 125 ng of OA/ μ l of original crude extract (defined "mussel extract +YTX +OA").

The figure 6 shows the results obtained in MCF-7 cells. The experiment has been
30 carried out by using Petri dishes containing confluent cells in 5 ml of total culture medium. The quantity of mussel extract added to the cells was equivalent to 1.3 μ l of original crude extract, containing 50 ng YTX and/or 170 ng OA, as indicated.

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

24

The comparison between results obtained with samples from control cells and from cells which have been treated with a mussel extract devoid of toxins (mussel extract, Fig. 6), shows that no qualitative changes in the expression of E-cadherin and related antigens is detectable, as a consequence of cell treatment with extracts prepared from mussels which were not contaminated by DSP toxins (OA and YTX). MCF-7 cell treatment with mussel extracts containing YTX, instead, caused a net increase in ECRA₁₀₅, at levels comparable to those of E-cadherin, leading to an almost doubling of the relative total immunoreactivity (Σ) we have detected (Fig. 6). Cell treatment with extracts containing OA, in turn, led to the detectable appearance of ECRA₁₃₅, accompanied by a net decrease in the relative total immunoreactivity (Σ). Finally, when both toxins were present in the mussel extract employed in the treatment, both an increase in the levels of ECRA₁₀₀ and the appearance of ECRA₁₃₅ were detected (Fig. 6), accompanied by a decrease in the relative total immunoreactivity (Σ).

15 The alterations of E-cadherin and related antigens induced by OA and YTX, are then detectable even in the case these toxins are present in complex biological matrices, such as the crude extracts prepared from mussel hepatopancreas.

CLAIMS

- 1 1. A process for the qualitative and quantitative determination of toxins belonging
2 to the group of dinophysistoxins and yessotoxins in a sample, based on the
3 evaluation of the quantity of the E-cadherin protein and of the related antigens,
4 ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅ in an *in vitro* cell system treated with said sample.
- 1 2. The process according to claim 1, wherein said qualitative determination
2 consists of an observation of the cellular content of the E-cadherin protein and
3 related antigens, ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅, in the cell system treated with a sample
4 whose contamination has to be measured.
- 1 3. The process according to claim 1, wherein said quantitative determination
2 comprises an observation of the changes in the cellular content of the E-cadherin
3 protein and related antigens, ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅, in the cell system treated
4 with a sample whose contamination has to be measured, with reference to a cell
5 system treated with a control.
- 1 4. The process according to claim 1 wherein said evaluation is performed after
2 immunological recognition of E-cadherin and E-cadherin related antigens
3 performed in cell extracts prepared from the *in vitro* cell system, with anti-E
4 cadherin antibodies.
- 1 5. The process according to claim 4 wherein said immunological recognition is
2 performed by techniques chosen in the group consisting of: immunoprecipitation,
3 immunoblotting on a solid phase (Western-blotting), Enzyme Linked
4 Immunosorbent Assay.
- 1 6. The process according to claim 5 wherein said technique is an immunoblotting
2 on a solid phase (Western-blotting).
- 1 7. The process according to claim 1, wherein said toxins belongs to the group of:
2 yessotoxins and their derivatives and structurally related analogs and to the group
3 of okadaic acid and its derivatives and structurally related analogs.
- 1 8. The process according to claim 7, wherein said yessotoxins are chosen in the
2 group consisting of: yessotoxin, homoyessotoxin, 45-hydroxyessotoxin, 44-
3 carboxyessotoxin
- 1 9. The process according to claim 7, wherein said okadaic acid structurally related

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

26

- 2 analogs are chosen in the group consisting of: dinophysistoxin 1, dinophysistoxin
3 2, dinophysistoxin 3.
- 1 10. The process according to claims 1-9 further comprising the following steps:
2 a) preparation of a sample whose contamination has to be evaluated,
3 b) incubation of the sample in an *in vitro* cell system,
4 c) preparation of cytosoluble extracts of the cell system and fractionation of
5 the extracts on the basis of the molecular mass of the proteic components,
6 d) recognition of the E-cadherin and related antigens, ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅,
7 by anti-E-cadherin antibodies.
- 1 11. The process according to claim 10 wherein said sample is a crude mollusc
2 extract.
- 1 12. The process according to claim 11 wherein said crude extract is prepared by
2 extraction and separation with organic solvents.
- 1 13. The process according to claim 10 wherein said cell system in step b) of the
2 process is chosen among cell lines expressing the human E-cadherin antigen.
- 1 14. The process according to claim 13 wherein said E-cadherin expressing cell
2 lines are MCF-7, A549, BxPc3.
- 1 15. The process according to claim 14 wherein the cell line is represented by
2 MCF-7 and the time of incubation in step b) of the process is comprised between
3 12 and 24 hours.
- 1 16. The process according to claim 10 wherein said recognition in step d) of the
2 process is performed by immunoblotting with an anti-E-cadherin antibody.
- 1 17. The process according to claim 16 wherein said antibody is monoclonal.
- 1 18. The process according to claim 10 wherein said fractionation in step c) of the
2 process is performed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.
- 1 19. The process according to claim 18 wherein said gel is also reducing.
- 1 20. The process according to claims 9-19, wherein said recognition in step d) of
2 the process is followed by a step e) of estimation of the levels of immunoreactivity
3 obtained for the antigens: E-cadherin, ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅.
- 1 21. The process according to claim 20 wherein said estimation is carried out by
2 visual inspection.
- 1 22. The process according to claim 20 wherein said estimation is carried out by

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

27

- 2 the use of densitometric analyses and calculation of the value of total
3 immunoreactivity and of relative total immunoreactivity (Σ) of the sample.
- 1 23. A process for the qualitative and quantitative determination of toxins belonging
2 to the group of dinophysistoxins and yessotoxins, based on the evaluation of the
3 quantity of the E-cadherin protein and of the related antigens, ECRA₁₀₀ and
4 ECRA₁₃₅, in an *in vitro* cell system, according to claims 1-22 wherein said sample
5 is a sea product.
- 1 24. Process according to claim 23 wherein said sea product is foodstuff for human
2 and animal consumption.
- 1 25. Process according to claim 24 wherein said product are molluscs.
- 1 26. Process according to claim 25 wherein said molluscs are mussels and
2 scallops.
- 1 27. Antigen ECRA₁₀₀ immunologically related to E-cadherin, with a molecular
2 mass of 100 kDa.
- 1 28. Use of the antigens E-cadherin, ECRA₁₀₀ and ECRA₁₃₅ to detect the presence,
2 to identify the belonging group of a toxin and to measure a toxin level in a sample.
- 1 29. Use of the antigens according to claim 28, wherein said toxins belong to the
2 groups of dinophysistoxins and of yessotoxins.
- 1 30. Use of the antigens according to claim 29 wherein said toxins are chosen
2 among: yessotoxin, homoyessotoxin, 45-hydroxyessotoxin, 44-
3 carboxyessotoxin, dinophysistoxin 1, dinophysistoxin 2, dinophysistoxin 3,
4 okadaic acid, and their derivatives and structurally related analogs.

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

1/6

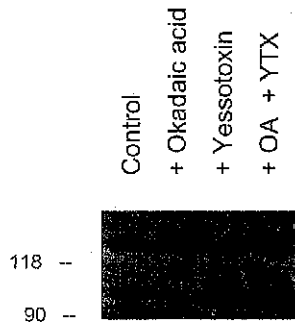


Figure 1

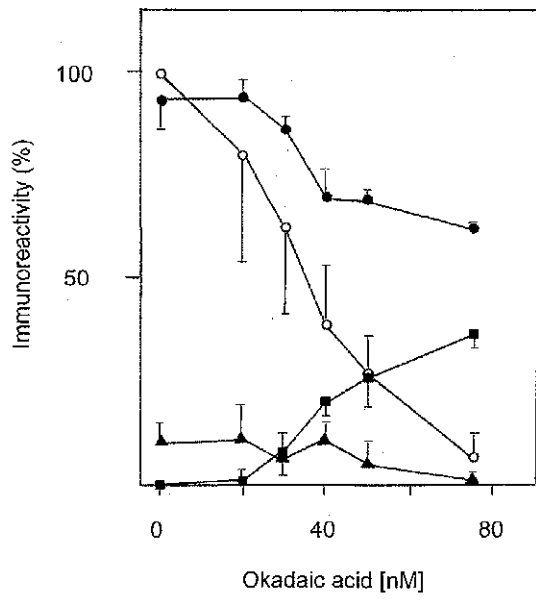


Figure 2

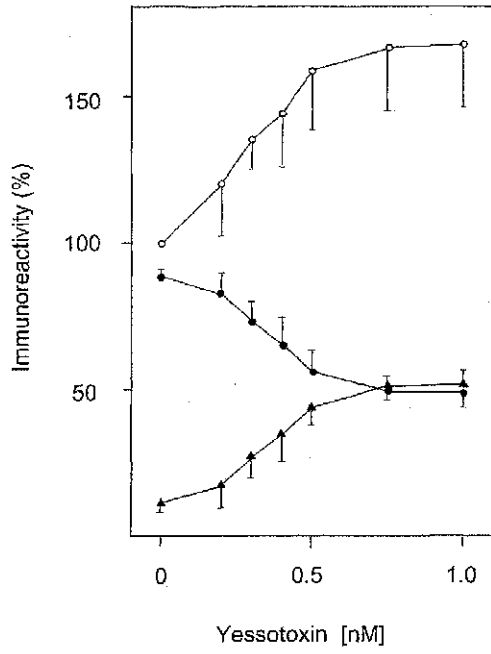


Figure 3

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

4/6

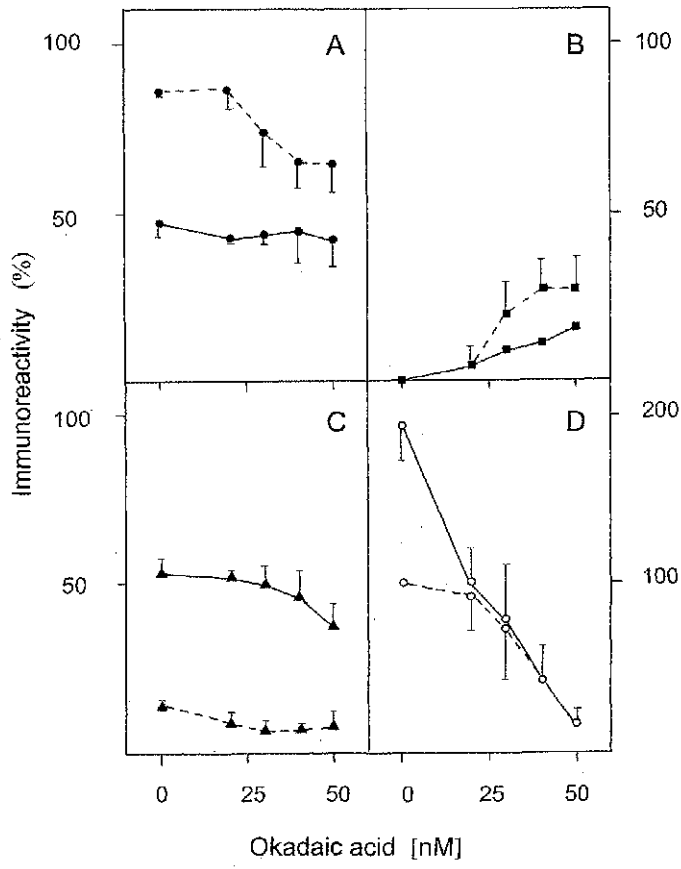


Figure 4

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

5/6

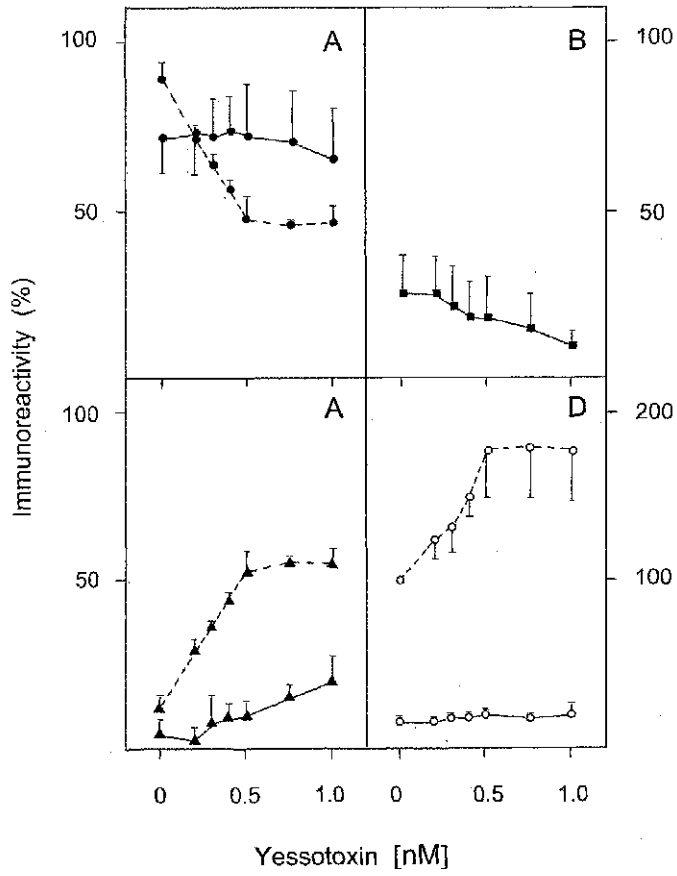


Figure 5

WO 02/03060

PCT/EP01/07487

6/6

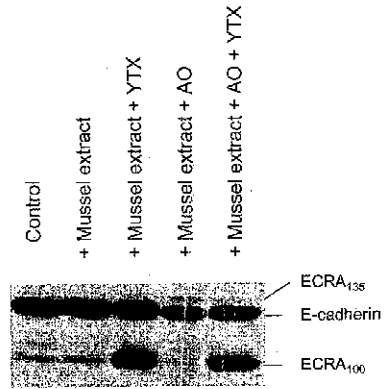


Figure 6

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/03060 A3

- (51) International Patent Classification³: G01N 33/50, C07K 14/705
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IB, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NG, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/EP01/07487
- (22) International Filing Date: 29 June 2001 (29.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: M2000A001474 30 June 2000 (30.06.2000) IT
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA (IT); Via Università, 4, I-41100 Modena (IT).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): ROSSINI, Gian, Paolo (IT/IT); Via Idice, 26/B, I-40068 San Lazzaro (IT).
- (74) Agent: GERVASI, Gemma; Nolarbortolo & Gervasi, Corso di Porta Vittoria, 9, I-20122 Milan (IT).
- (81) Designated States (optional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IB, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NG, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (optional): ARIPO patent (GH, GM, RF, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UZ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, J, C, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments.
- (88) Date of publication of the international search report: 2 May 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/03060 A3

(54) Title: PROCESS FOR THE MEASUREMENT OF DINOPHYSISTOXIN AND OF YESSOTOXIN

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the detection, identification and measurement of toxins belonging to the group of dinophysistoxins and of yessotoxins, based upon the use of *in vitro* cell cultures.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC1/EP 01/07487
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/50 C07K14/705 According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K Documentation searched (other than minimum documentation) in the event that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 180 665 A (HOLMES CHARLES) 19 January 1993 (1993-01-19) abstract	1,27,28
A	EP 0 554 458 A (IATRON LAB ;OSAKA PREFECTURE (JP)) 11 August 1993 (1993-08-11) abstract	1,27,28
A	EP 0 857 972 A (TEPUAL S A ;ESTUDIOS CIENTIFICOS DE SANTIAGO (CL)) 12 August 1998 (1998-08-12) abstract	1,27,28
A	WO 98 41869 A (CHROMAXOME CORP) 24 September 1998 (1998-09-24) abstract	1,27,28
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex
*Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "F" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of an earlier related or other special reason (see specification) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other disclosure "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 February 2002		11/03/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1374 Strasbourg, France Tel: (+31) 70 340 2040, 1x 31 654 4000 Fax: (+31) 70 340 2076		Authorized officer Moreno, C

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC1/EP 01/07487

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE CA 'Online'</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US:</p> <p>SHIRAKI, KOICHI: "Determination of dinophysistoxin-1 by measuring 50% acid phosphatase activity inhibitory concentration"</p> <p>retrieved from STN</p> <p>Database accession no. 121:101350</p> <p>XP002190963</p> <p>abstract</p> <p>& GIFU-KEN HOKEN KANKYO KENKYUSHOHU (1993), 1, 15-18 ,</p> <p>-----</p>	1,27,28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/07487

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
US 5180665	A	19-01-1993	AU 8917291 A	25-06-1992			
			CA 2055935 A1	22-05-1992			
			WO 9209891 A1	11-06-1992			
EP 0554458	A	11-08-1993	CA 2093521 A1	10-02-1993			
			DE 69228739 D1	29-04-1999			
			DE 69228739 T2	02-09-1999			
			EP 0554458 A1	11-08-1993			
			FI 931581 A	25-05-1993			
			WO 9303365 A1	18-02-1993			
			JP 3154724 B2	09-04-2001			
			US 5525476 A	11-06-1996			
			EP 0857972	A	12-08-1998	CA 2224920 A1	03-05-1998
						EP 0857972 A1	12-08-1998
WO 9841869	A	24-09-1998	AU 6571598 A	12-10-1998			
			EP 0975969 A1	02-02-2000			
			WO 9841869 A1	24-09-1998			

Form PCT-CA210 (patent) issued July 1992

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577 G 0 1 N 33/577 B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4H045 AA11 BA72 CA50 CA52 DA83 EA01 EA50 FA71 GA01 HA06

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004502937A5	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2002508072	申请日	2001-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	盐湖悉德油脂饱和老爹Ė摩德纳雷焦艾米利亚		
申请(专利权)人(译)	Yunivashita'德利阿布鲁Suteyudi摩德纳Ė雷焦艾米利亚		
[标]发明人	ロッシニジャンパオロ		
发明人	ロッシニ・ジャン・パオロ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/435 C12Q1/02 G01N33/02 G01N33/48 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/68 G01N2333/405 G01N2333/43504 G01N2333/4603		
FI分类号	G01N33/53.S C07K14/435 C12Q1/02 G01N33/02 G01N33/48.A G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB41 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/GC10 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ16 4B063/QQ96 4B063/QR02 4B063/QR66 4B063/QS33 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/BA72 4H045/CA50 4H045/CA52 4H045/DA83 4H045/EA01 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA01 4H045/HA06		
优先权	102000900858498 2000-06-30 IT		
其他公开文献	JP2004502937A		

摘要(译)

本发明涉及基于体外细胞培养用途检测，鉴定和测量属于ginophyse毒素和Yesoxin的毒素的方法。