



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 928**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/00 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03724409 .2**
96 Fecha de presentación : **02.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1549758**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Composición de lipasa pancreática felina y método de preparación y uso de dicha composición.**

30 Prioridad: **03.05.2002 US 377522 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **The Texas A&M University System
Mail Stop 3369
College Station, Texas 77843-3369, US**

72 Inventor/es: **Steiner, Jörg, M. y
Williams, David, A.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 307 928 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de lipasa pancreática felina y método de preparación y uso de dicha composición.

5 **Referencia cruzada con las aplicaciones relacionadas**

Esta aplicación no provisional reivindica la prioridad de la Aplicación de la Patente Provisional U.S. Serie No. 60/377,522, archivada el 3 de Mayo, 2002.

10 **Antecedentes de la invención**1. **Campo de la invención**

15 La presente invención se relaciona comúnmente con el campo de la biología y la medicina. Más particularmente, la presente invención se relaciona con las composiciones de lipasa pancreática felina, los métodos para la preparación de dichas composiciones, y los métodos para el uso de dichas composiciones, para detectar la concentración de lipasa pancreática en suero de gato para el diagnóstico y manejo de la pancreatitis.

2. **Descripción del oficio relacionado**

20 Las lipasas son enzimas solubles en agua que hidrolizan sustratos insolubles en agua en más productos de liposis polares (Petersen and Drabløs, 1994). En 1856 Claude Bernard identificó la primera lipasa (Petersen and Drabløs, 1994). Desde entonces una plétora de lipasas ha sido identificada en microorganismos, plantas, y animales (Lin *et al.*, 1986; Jaeger *et al.*, 1994; Petersen and Drabløs, 1994; Mukherjee and Hills, 1994; Lawson *et al.*, 1994). Las lipasas comparten una tríada común de los aminoácidos (serina, ácido aspártico o glutámico, e histidina) en el sitio activo, que también se comparte con las serina proteasas (Svendsen, 1994). Otra característica común de casi todas las lipasas son los motivos del sitio de glicosilación (Antonian, 1988). Se ha demostrado que muchas lipasas se relacionan filogenéticamente. La familia de genes de la lipasa pancreática es una gran familia de genes con 9 subfamilias (Petersen and Drabløs, 1994; Carrière *et al.*, 1997; Carrière *et al.*, 1998; Hirata *et al.*, 1999). Además, hay otros grupos de las lipasas relacionadas filogenéticamente, y sin embargo, otras lipasas que no pertenecen a una familia de genes definida (Anderson and Sando, 1991).

35 La principal función de las lipasas es la hidrólisis de los lípidos. Una lipasa se necesita cuantas veces un lípido apolar necesite cruzar una membrana biológica. Los triglicéridos son ejemplos de primera clase de los lípidos apolares. Así la lipasa se necesita con el fin de que los triglicéridos se absorban a partir del tracto intestinal. Hay dos lipasas digestivas en la mayoría de las especies vertebradas, i.e., una lipasa preduodenal y una lipasa pancreática clásica (Carrière *et al.*, 1994). Además, en los recién nacidos, la lipasa para la digestión de los triglicéridos también se suministra a través de la leche (Freed *et al.*, 1986; Freed *et al.*, 1987). Esta lipasa se conoce como la lipasa estimulada de la sal de la bilis (Freed *et al.*, 1986; Freed *et al.*, 1987). A pesar de que es crucial para la digestión de los triglicéridos en leche, la lipasa estimulada de la sal de la bilis, no se considera como una lipasa digestiva, ya que no se utiliza como una lipasa digestiva en el organismo, donde se sintetizó. La lipasa preduodenal se ha demostrado que se origina a partir de un solo tejido en todas las especies examinadas a la fecha (Moreau *et al.*, 1988). Una lipasa faríngea se identificó en vacas y ovejas, una lipasa lingual en ratas y ratones, y una lipasa gástrica en seres humanos, monos, caballos, cerdos, conejillos de indias, gatos, y perros (Moreau *et al.*, 1988). Ninguna lipasa preduodenal pudo ser identificada en pollos (Moreau *et al.*, 1988). En seres humanos y perros se ha demostrado que la lipasa gástrica contribuye significativamente a la digestión de los triglicéridos de la dieta (Carrière *et al.*, 1993a; Carrière *et al.*, 1993b). Sin embargo, la lipasa pancreática (también llamada lipasa pancreática clásica) es la enzima más importante en la digestión de los triglicéridos de la dieta (Carrière *et al.*, 1991; Carrière *et al.*, 1993a).

50 Se ha demostrado recientemente por inmunolocalización que la lipasa pancreática solo está presente en las células acinares pancreáticas en perros saludables clínicamente, lo que sugiere que la lipasa pancreática clásica puede ser un marcador ideal para la función y patología del páncreas exocrino (Steiner *et al.*, 2002). Esta hipótesis se ha confirmado en estudios clínicos que han demostrado que la medida de la inmunoreactividad de la lipasa pancreática en suero es un marcador específico para la función pancreática exocrina y también altamente sensible para la pancreatitis en el perro (Steiner *et al.*, 2001a; Steiner *et al.*, 2001b; Steiner *et al.*, 2001c). La purificación de la lipasa pancreática clásica se ha reportado en muchas especies (Vandermeers and Chroistophe, 1968; Rathelot *et al.*, 1981; Bosc-Bierne *et al.*, 1984; Gieseg *et al.*, 1992; Mejdoub *et al.*, 1994; Steiner and Williams, 2003). Sin embargo, la purificación de la lipasa pancreática felina clásica no se ha reportado previamente.

60 La pancreatitis es un desorden gastrointestinal común en los gatos y se caracteriza por la autodigestión del páncreas exocrino. Los síntomas clínicos de la pancreatitis felina no son específicos y se puede dificultar el diagnóstico de la enfermedad. La pancreatitis se asocia con un incremento de la cantidad de enzimas digestivas y zimógenos filtrándose en la corriente sanguínea. Una de estas enzimas es la lipasa pancreática. Un número de ensayos se ha desarrollado para detectar la presencia de la lipasa en suero, mediante el uso de pruebas catalíticas. Sin embargo, estas pruebas carecen de, tanto sensibilidad como especificidad para la pancreatitis en ambos seres humanos y perros. Adicionalmente, estas pruebas para la cuantificación de la actividad de la lipasa han demostrado que no tienen utilidad clínica en el diagnóstico de la pancreatitis felina.

Por consiguiente, existe una necesidad de mucho tiempo, de un método efectivo para preparar y purificar la lipasa pancreática felina, así como un método efectivo para diagnosticar la pancreatitis felina.

Resumen de la invención

5

La presente invención proporciona una lipasa novedosa, a saber la lipasa pancreática felina (fPL; también llamada lipasa pancreática felina clásica). Esta lipasa tiene una secuencia de aminoácido N-terminal como se muestra en la SEQ ID NO. 1 y se ha demostrado que tiene una masa molecular de aproximadamente 52.5 kDa, en la electroforesis en gel poliacrilamida sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) y una masa molecular exacta de 52.4 kDa por espectrometría de masas. La secuencia de aminoácido N-terminal de los primeros 25 residuos de aminoácidos de esta lipasa ha demostrado que tiene homología cercana con la secuencia de aminoácido de la lipasa pancreática clásica en otras especies.

10

La presente invención también proporciona un método para purificar la lipasa pancreática felina clásica a partir del tejido pancreático. Este método preferiblemente incluye la recolección del tejido pancreático a partir de gatos, delipidando el tejido pancreático para producir un extracto pancreático delipidado, que extrae la lipasa pancreática a partir del extracto pancreático delipidado, y eluyendo la lipasa pancreática extraída a través de varias columnas.

15

La presente invención además proporciona un método para utilizar esta nueva forma de lipasa. Este método preferiblemente comprende radioinmunoensayos y otros inmunoensayos (por ejemplo ELISA) para la medida de la inmunoreactividad de la lipasa en suero, proporcionando por consiguiente una herramienta de diagnóstico útil clínicamente, para la pancreatitis en gatos. Específicamente, este método ventajosamente incluye la preparación de antisuero contra la lipasa pancreática felina, y el desarrollo de inmunoensayos en muestras de suero utilizando este antisuero o una preparación de este. Al hacerlo, la inmunoreactividad de la lipasa pancreática felina se determina en el suero. En el evento que el incremento de la concentración de la inmunoreactividad de la lipasa pancreática por encima de un rango control, se detecte en el suero, el gato podría tener pancreatitis.

20

Lo anterior y otras ventajas de la presente invención serán aparentes para aquellos de habilidad en el oficio, en vista de la siguiente descripción detallada de la modalidad preferida de la presente invención, están relacionadas con los dibujos anexos.

30

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las modalidades específicas presentadas aquí.

35

Figura 1 muestra una cromatografía de intercambio aniónico del extracto pancreático felino acuoso después del cambio de solución reguladora utilizando una columna PD-10. La línea oscura muestra la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm durante la cromatografía. La línea más clara muestra la concentración de NaCl. Las líneas verticales punteadas antes de los números (1-20) muestran el inicio de cada fracción recolectada. La flecha marca la lipasa pancreática felina (fPL) apunta hacia el único pico que muestra la actividad lipolítica.

40

Figura 2 muestra cromatografía por tamaño de exclusión de la lipasa pancreática felina parcialmente purificada (fPL). La línea curva muestra la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm durante la cromatografía. Las líneas verticales punteadas antes de los números (1-19) muestran el inicio de cada fracción recolectada. La flecha apunta hacia el único pico con la actividad lipolítica.

45

Figura 3 muestra la cromatografía de intercambio catiónico de la lipasa pancreática felina parcialmente purificada (fPL). La línea oscura muestra la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm durante la cromatografía. La línea más clara muestra el gradiente lineal de NaCl que oscila de 0 a 200 mM de NaCl durante 120 min. Las líneas verticales punteadas antes de los números (1-25) muestran el inicio de cada fracción recolectada. La flecha marca un único pico que muestra la actividad lipolítica.

50

Figura 4 muestra el resultado de la SDS-PAGE de la lipasa pancreática felina clásica. Este gel de SDS-PAGE fue teñido con una tinta de azul de Coomassie. La lipasa pancreática felina clásica purificada (fPL) se cargó en la vía 1, mientras un estándar de peso molecular (marcador) se cargó en la vía 2.

55

Figura 5 muestra la secuencia de aminoácido N-terminal de la lipasa pancreática felina (fPL, SEQ ID NO. 1) en comparación con aquella de la lipasa pancreática de porcino (pPL, SEQ ID NO. 2), lipasa pancreática de canino (cPL, SEQ ID NO. 3), proteína relacionada de la lipasa pancreática de canino 1 (cPLRP 1, SEQ ID NO. 4), lipasa pancreática de equino (ePL, SEQ ID NO. 5), y la lipasa pancreática de humano (hPL, SEQ ID NO. 6). Las secuencias de aminoácido para ePL y hPL se dedujeron del análisis de la secuencia de cADN. Los residuos de aminoácidos que no pudieron ser identificados se describen por "?". Los residuos de aminoácidos que son no-homólogos con la lipasa pancreática felina se muestran en negrilla.

60

65

Descripción detallada de la invención

La presente invención revela una lipasa novedosa pancreática en gatos y un método para purificar dicha lipasa a partir del tejido pancreático en gatos. Esta proteína ha sido parcialmente caracterizada y muestra que tiene una masa molecular de aproximadamente 52.5 kDa por electroforesis en gel de poliacrilamida sodio dodecil sulfato, y una masa molecular exacta de 52.4 kDa por espectrometría de masas. La secuencia de aminoácido N-terminal de esta lipasa ha sido obtenida (véase la SEQ ID NO. 1) y la secuencia de aminoácido de los primeros 25 residuos de aminoácidos muestran que tienen homología cercana con la secuencia de aminoácido de la lipasa pancreática clásica en otras especies.

Para la purificación, el tejido pancreático se recolectó a partir de gatos (*Felis catus*) sacrificados para proyectos de investigación no relacionados. La grasa se retiró por recorte de la grasa visible burdamente y por la extracción en solventes orgánicos. El extracto pancreático delipidado además se purificó por la extracción de las enzimas en una solución reguladora-Tris que contiene dos diferentes inhibidores de proteasa, benzamidina y fenilmetilsulfonil fluoruro, seguido por cromatografía de intercambio aniónico, tamaño de exclusión, e intercambio catiónico.

La presente invención también proporciona los métodos de uso de la lipasa novedosa pancreática felina para el diagnóstico y manejo de la pancreatitis en gatos.

La presente invención se dirige a una lipasa novedosa, a saber lipasa pancreática felina (fPL; también llamada lipasa pancreática felina clásica), que tiene una secuencia de aminoácido N-terminal como se muestra en la SEQ ID NO. 1

La presente invención también se dirige a un método para purificar la lipasa pancreática felina clásica a partir del tejido pancreático. Este método preferiblemente incluye la recolección del tejido pancreático a partir de gatos, delipidando el tejido pancreático para producir un extracto pancreático delipidado, extrayendo la lipasa pancreática del extracto pancreático delipidado, y eluyendo la lipasa pancreática extraída a través de varias columnas.

Preferiblemente, la etapa de delipidación además incluye la eliminación de la grasa burda del tejido pancreático utilizando un objeto afilado; homogenizando el tejido pancreático remanente en solventes orgánicos; y filtrando el tejido pancreático homogenizado para obtener un extracto pancreático delipidado. Los ejemplos representativos de los solventes orgánicos incluyen acetona, una mezcla de cloroformo y 1-butanol, y éter etílico.

Sin embargo, preferentemente, la etapa de extracción además incluye la suspensión del extracto pancreático delipidado en una solución reguladora-Tris que contiene inhibidores de la proteasa; y centrifugación de la suspensión para obtener el sobrenadante que contiene la lipasa pancreática. Los ejemplos representativos de los inhibidores de la proteasa incluyen benzamidina y fenilmetilsulfonil fluoruro.

Sin embargo, preferentemente, las columnas para eluir la lipasa pancreática extraída incluyen columnas de cromatografía de intercambio aniónico, columnas de cromatografía por tamaño de exclusión, y columnas de cromatografía de intercambio catiónico.

La presente invención además se dirige a un método de medición de la inmunoreactividad de la lipasa pancreática felina en suero por consiguiente diagnóstica la pancreatitis en gatos. Este método ventajosamente incluye una preparación antisuero contra la lipasa pancreática felina, y el desarrollo de inmunoensayos en muestras de suero utilizando el antisuero. Al hacerlo, la inmunoreactividad de la lipasa pancreática felina se determina en el suero. En el evento que el incremento de la concentración de la inmunoreactividad de la lipasa pancreática encima de un rango control se detecte en el suero, el gato podría tener pancreatitis.

Preferiblemente, la lipasa pancreática felina tiene una secuencia de aminoácido N-terminal como se muestra en la SEQ ID NO. 1, y se marca para la evaluación del antisuero preparado. Un ejemplo del marcador es el ¹²⁵I, y el inmunoensayo utilizado es un radioinmunoensayo. Sin embargo, preferentemente, el rango control para la inmunoreactividad de la lipasa pancreática felina en suero de gato se establece de una mezcla de gatos saludables clínicamente utilizando el percentil central 95 y es preferiblemente cerca de 2.0 µg/L a aproximadamente 6.7 µg/L.

Los siguientes ejemplos se dan con el propósito de ilustrar varias modalidades de la invención y no tienen la intención de limitar la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1***Purificación de la Lipasa Pancreática Felina (fPL) a partir de Tejido Pancreático***

Los pancreatas se recolectaron a partir de gatos sacrificados para proyectos de investigación no relacionados y se almacenaron congelados a -20°C hasta otro uso. Todo el equipo de laboratorio estándar incluyendo el embudo Buchner se compró de VWR Scientific, West Chester, PA. Todas las columnas, geles cromatográficos, bombas, colector de fracciones y monitor-UV se compraron de Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden. El sistema de titulación hasta estabilidad de pH (Metrohm 718 STAT Titrimo) y el molino de tejido (Polytron PT-MR 2100) se compraron de Brinkmann Instruments, Westbury, NY. Los suministros para electroforesis se compraron de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

ES 2 307 928 T3

Todos los agentes químicos se compraron de Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA. El kit de ensayo de proteínas BCA se adquirió de Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA. Las columnas desechables para cromatografía por tamaño de exclusión y los concentradores (Dispositivo de filtro de centrifugación ultralibre; 10K) se compraron de Bio Rad, Hercules, CA, USA y Waters Corporation, Milford, MA, USA, respectivamente.

5

Para la purificación, tejido pancreático congelado se descongeló a temperatura ambiente y la grasa burda se retira con una hoja de bisturí. El tejido pancreático luego se corta en piezas pequeñas, se homogeniza con un molino de tejido, y se delipida utilizando solventes orgánicos. Primero, el páncreas felino se homogenizó en acetona. El material se filtró a través de un embudo Buchner medio (tamaño de poro 10-15 μm) utilizando succión con vacío. El filtrado nuevamente se homogenizó con el molino de tejido en acetona y se filtró a través del embudo Buchner medio. Este procedimiento se repitió una vez más. El filtrado luego se homogenizó en una mezcla de 9 a 1 de cloroformo y 1-butanol y se filtró a través del embudo Buchner medio. Este procedimiento se repitió dos veces más, siguiendo el mismo procedimiento utilizando una mezcla de 4 a 1 de cloroformo y 1-butanol dos veces más. Finalmente, el filtrado se disolvió cuidadosamente en éter etílico y se filtró a sequedad a través del embudo Buchner medio. El filtrado se desintegró en un polvo fino por agitación cuidadosa con una espátula de metal y el extracto pancreático delipidado se mantuvo a -20°C hasta otra purificación.

10

La proteína se extrajo a partir del polvo de páncreas delipidado, mediante la suspensión aproximadamente de 2 g del polvo en 25 ml de Tris-HCl 20 mM, benzamidina 2 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 y adicionando 250 μl de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 100 mM en alcohol isopropílico. La benzamidina y el PMSF sirvieron como inhibidores de la proteasa. La suspensión se mezcló cuidadosamente por 1 min utilizando un molino de tejido y adicionalmente se mezcló por 20 min a 4°C utilizando una placa de balanceo. Se continuó con la centrifugación por 15 min a aproximadamente 10,000 g y 4°C . El sobrenadante se evaluó para la absorbancia a 280 nm y para la actividad lipolítica, y se conservó. Una columna de filtración por gel desechable se utilizó para cambiar la solución reguladora de la mezcla del sobrenadante a Tris-HCl 10 mM, benzamidina 2 mM, PMSF 1 mM, pH 8.0 (solución reguladora A) a 4°C siguiendo las instrucciones del fabricante.

25

La lipasa pancreática felina además se purificó por cromatografía de intercambio aniónico sobre una columna pre-empacada Mono Q[®]. La solución de la lipasa pancreática se aplicó a la columna en solución reguladora A y la columna se lavó hasta que el monitor de la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, haya regresado a la línea base. La lipasa pancreática felina se eluyó utilizando un gradiente continuo de NaCl de 0 a 80 mM NaCl durante 30 min en solución reguladora A una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las fracciones que contienen actividad de la lipasa se mezclaron, concentraron, se cambió la solución reguladora a MES 10 mM, benzamidina 2 mM, PMSF 1 mM, pH 6.0 utilizando un dispositivo de concentración con un tamaño de poro 10,000 MW, y se guardó para otra purificación.

35

Otra purificación de la fPL se logró por cromatografía por tamaño de exclusión sobre una columna Sephacryl S-300 HR[®] utilizando una fase móvil de MES 10 mM, benzamidina 2 mM, PMSF 1 mM, pH 6.0 a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las fracciones que contienen actividad de la lipasa se mezclaron, concentraron, y se cambió la solución reguladora a MES 10 mM, pH 6.0 utilizando un dispositivo de concentración con un tamaño de poro de 10,000 MW.

40

La purificación final de la lipasa pancreática felina se logró por cromatografía de intercambio catiónico sobre una columna auto-empacada Source S[®]. La mezcla de la lipasa pancreática se aplicó en MES 10 mM, pH 6.0 a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Después del regreso del monitor de la absorbancia a 280 nm a la línea base, un gradiente lineal de NaCl de 0 a 200 mM durante 120 min se aplicó a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La fracción con la más alta actividad de la lipasa específica se recolectó, concentró, y se cambió la solución reguladora a una solución reguladora salina de fosfato (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2) utilizando un dispositivo de concentración con un tamaño de poro de 10,000 MW. La concentración de la fPL purificada se ajustó a una absorbancia de $A_{280}=0.55$, se dividió en alícuotas, y se congeló a -80°C .

45

50 Ejemplo 2

Medición de la Actividad Lipolítica durante la Purificación de la Lipasa Pancreática Felina (fPL)

La actividad lipolítica durante la purificación se midió por un método de estabilidad de pH utilizando tributirina como un sustrato, en la presencia de colipasa. Para este propósito una preparación de colipasa ácida de la colipasa felina ha sido preparada previamente. Brevemente, 1 g del extracto pancreático felino delipidado se suspendió en 50 ml de Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 3.3 mM, benzamidina 2 mM, 3-fenil propionato 5 mM, PMSF 1 mM (adicionado en alcohol isopropílico), pH 8.0 y mezclado a 4°C por 2 hr. La mezcla se centrifugó a aproximadamente 12,000 g y 4°C por 30 min y el precipitado se descartó. La actividad de la lipasa se midió y el pH se ajustó a pH 2.0 utilizando HCl 6 N. La solución se centrifugó, una vez más bajo las condiciones mencionadas anteriormente y el sobrenadante se conservó. Después de medir la actividad de la lipasa, la solución se ajustó a pH 5.0 utilizando NaOH 2N. Después de otra centrifugación bajo las condiciones mencionadas anteriormente, las alícuotas del sobrenadante se congelaron a -20°C . Para la detección de la actividad de la lipasa un volumen de 0.5 ml de tributirina se adicionó a 14.5 ml de Tris-HCl 0.28 mM, 1 CaCl_2 4 mM, taurodeoxicolato 4.0 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0 en un recipiente de reacción mantenido a 37°C . 50 microlitros de la preparación de la colipasa felina ácida se estiman como resultado en al menos un exceso del 2 al 1 molar de la colipasa felina a la lipasa pancreática felina se adicionaron a la mezcla y el pH se vuelve a ajustar a 8.0. 10 microlitros de la muestra se adicionaron al recipiente de reacción y el pH se mantuvo a 8.0 por la adición controlada de NaOH 100 mM. Después de un periodo de espera de 1 min. Se utiliza una solución

65

ES 2 307 928 T3

de NaOH para mantener constante el pH a 8.0 medido por 3 minutos y la actividad lipolítica se expresó en unidades internacionales, siendo 1 unidad la cantidad de la actividad lipolítica que libera 1 μmol de ácido graso valorable por minuto bajo las condiciones descritas.

5 Ejemplo 3

Caracterización de la Lipasa Pancreática Felina Purificada (fPL)

10 La masa molecular de la lipasa pancreática felina purificada se estimó por SDS-PAGE siguiendo las instrucciones del fabricante. El gel fue teñido con un tinte del tipo azul de Coomassie. Una determinación más exacta de la masa molecular se logró utilizando espectrometría de masas realizada por el Mass Spectrometry Laboratory, Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, TX.

15 La absorbancia específica de la fPL se determinó, mediante la medición de la concentración de la proteína de una dilución en serie de la lipasa pancreática felina en PBS, pH 7.2 con una absorbancia conocida a una longitud de onda de 280 nm, utilizando un ensayo de proteínas BCA (Smith *et al.*, 1985).

20 La secuencia de aminoácidos N-terminal para los primeros 25 residuos de aminoácidos, se determinó, mediante la degradación de Edman utilizando un analizador automatizado de secuencia de aminoácido en el Departamento de Bioquímica, Purdue University, West-Lafayette, IN.

Ejemplo 4

Características de la Lipasa Pancreática Felina (fPL)

25 La lipasa pancreática felina se purificó exitosamente a partir del tejido pancreático de felino por delipidación del tejido pancreático, extracción de proteínas, cromatografía de intercambio aniónico (Figura 1), cromatografía por tamaño de exclusión (Figura 2), y cromatografía de intercambio catiónico (Figura 3; Tabla 1). La Tabla 1 muestra la purificación secuencial de la lipasa pancreática felina clásica a partir del tejido pancreático. El rendimiento completo del protocolo de purificación fue 18.6% (Tabla 1). El producto purificado mostró una banda única en la electroforesis en gel poliacrilamida sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) con una masa molecular de aproximadamente 52.5 kDa (Figura 4). La masa molecular exacta se determinó por espectrometría de masas y fue 52.4 kDa. La absorbancia específica aproximada a 280 nm de la fPL fue 1.18 para una solución de 1 mg/ml (Tabla 2). La Tabla 2 muestra los resultados para la estimación de la absorbancia específica para fPL. Una solución de fPL en PBS, pH 7.2 con una absorbancia de $A_{280}=0.55$ se utilizó como la solución inicial y se analizó en un ensayo de proteínas BCA no diluida, en una dilución 1 en 2, y en una dilución 1 en 4.

TABLA 1

Purificación de fPL						
Etapa de Purificación	Volumen (ml)	A_{280}	Contenido Proteína ¹ (mg)	Actividad Lipolítica Específica (U/mg)	Actividad Lipolítica Total (U)	Producción (%)
Extracto pancreático acuoso	136.5	6.821	789.0	126	99,474	100.0
Después del cambio de la solución reguladora	228.0	2.746	530.5	147	77,963	78.4
Después cromatografía de intercambio aniónica	32.5	0.798	22.0	2,732	60,105	60.4
Después de la cromatografía gel-filtración	10.0	0.582	4.9	6,001	29,405	29.6
Después cromatografía de intercambio catiónica ²	3.85	0.550	1.8	10,261	18,470	18.6

65 ¹ El contenido de la proteína se estimó utilizando una absorbancia específica de $A_{280}=1.18$ para la lipasa pancreática felina
² después del concentración, cambio de solución reguladora, y ajuste de la absorbancia a $A_{280}=0.550$

ES 2 307 928 T3

TABLA 2

Absorbancia específica del fPL					
Factor de Dilución	A ₂₈₀	Resultado del ensayo (µg/ml)	Resultado Ajustado (µg/ml)	Absorbancia Específica	
1	0.550	472.86	472.86	1.163	
2	0.275	227.67	455.34	1.208	
4	0.1375	118.30	473.20	1.162	
Promedio				1.178	

La secuencia de aminoácido N-terminal de los primeros 25 residuos de aminoácidos mostró la secuencia Lys-Glu-Ile-?-Phe-Pro-Arg-Leu-Gly-?-Phe-Ser-Asp-Asp-Ala-Pro-Trp-Ala-Gly-Ile-Ala-Gln-Arg-Pro-Leu (Figura 5; ? = desconocido). Como se muestra en la Figura 5, esta secuencia tiene homología cercana con la secuencia del aminoácido N-terminal de la lipasa pancreática clásica en otras especies.

Ejemplo 5

Desarrollo y Validación de un Radioinmunoensayo para la Medición de la Inmunoreactividad de la Lipasa Pancreática Felina (fPLI) en Suero

La actividad de la lipasa en suero, clásicamente ha sido utilizada para el diagnóstico de desórdenes del páncreas exocrino en seres humanos y perros. Sin embargo, se acepta que la actividad de la lipasa en suero no es específica para la función pancreática exocrina, y que muchos tipos de células diferentes de las células acinares pancreáticas sintetizan las lipasas. Recientemente un ensayo para la medida de la inmunoreactividad de la lipasa pancreática en caninos (cPLI) ha sido desarrollado y validado. Se ha demostrado que este ensayo es específico para la función pancreática exocrina y sensible para el diagnóstico de la pancreatitis en perros. El presente estudio desarrolló y validó un radioinmunoensayo para la inmunoreactividad de la lipasa pancreática felina (fPLI).

La lipasa pancreática se purificó a partir del tejido pancreático de felino por delipidación, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía por tamaño de exclusión, y cromatografía de intercambio catiónico como se describe anteriormente en el Ejemplo 1. El antisuero contra la lipasa pancreática felina (fPL) se construyó en conejos. El marcador se produjo por iodización (¹²⁵I) de la lipasa pancreática felina utilizando el método de cloramina T. Un radioinmunoensayo se estableció y validó por la determinación de la sensibilidad, paralelismo por dilución, recuperación de adición, variabilidad intra-ensayo, y variabilidad inter-ensayo. Un rango control para la fPLI en suero de gato se estableció a partir de 30 gatos saludables clínicamente utilizando el percentil central 95.

La sensibilidad del ensayo fPLI fue 1.2 µg/L. Lo observado para los radios esperados para la diluciones en serie oscila de 58.0 a 164.3% para 4 diferentes muestras de suero en las diluciones de 1 en 2, 1 en 4, y 1 en 8. Se observa que las relaciones esperadas para la recuperación de adición variaron entre 76.0 y 156.5% para 4 diferentes muestras de suero y 6 diferentes concentraciones enriquecidas. Los coeficientes de variación para la variabilidad intra-ensayo para las 4 muestras de suero diferentes fueron 10.1, 4.5, 2.2, y 3.9%. Los coeficientes de variación para la variabilidad inter-ensayo para las 4 muestras de suero diferentes fueron 24.4, 15.8, 16.6, y 21.3%. El rango referencia (rango control) se estableció como 2.0 a 6.7 µg/L.

Este radioinmunoensayo es suficientemente sensible, lineal, exacto, preciso, y reproducible para uso clínico. Tales pruebas son fácilmente adaptables a dispositivos microtitador del tipo de pozo y SNAP® (véase por ejemplo, Patente U.S. No. 6,007,999; Patente U.S. No. 5,750,333; Patente U.S. No. 5,726,013; y Patente U.S. No. 5,726,010; y similares).

Ejemplo 6

Discusión

El presente estudio proporciona el primer reporte detallado de la purificación de la lipasa pancreática felina. La lipasa pancreática clásica, un miembro de la familia de genes de la lipasa pancreática, ha sido identificada en varias especies vertebradas (Vandermeers and Chroistophe, 1968; Rathelot *et al.*, 1981; Bosc-Bierne *et al.*, 1984; Gieseg *et al.*, 1992; Mejdoub *et al.*, 1994; Steiner and Williams, 2003). En muchos casos la lipasa pancreática ha sido purificada del jugo pancreático. Este método inicialmente se desarrolló debido a que las extracciones acuosas del tejido pancreático condujeron a la formación de una forma macromolecular de la lipasa pancreática, así llamada lipasa rápida. La lipasa rápida es un agregado macromolecular de la lipasa pancreática, colipasa, y lípidos (Leger and Charles, 1980). Sin embargo, la recolección del jugo pancreático requiere la canulación del conducto pancreático y el aumento del uso de animales preocupa, sobretodo cuando se dispone de una alternativa no-invasiva, tal como la purificación del tejido pancreático recolectado a partir de gatos sacrificados para proyectos de investigación no relacionados. Los procedi-

mientos de delipidación, utilizando solventes orgánicos, permiten la purificación de la lipasa pancreática a partir del tejido pancreático sin la formación de la lipasa rápida.

Los reportes de la absorbancia específica de la lipasa pancreática en cualquier especie no se pueden encontrar. Un ensayo de proteínas basado en BCA se utilizó para estimar el contenido de la proteína en una solución de lipasa pancreática felina pura con una absorbancia conocida a una longitud de onda de 280 nm (Smith *et al.*, 1985). Se utilizó albúmina de suero de bovino, como un estándar en este ensayo. Sin embargo, diferentes proteínas pueden tener una respuesta relativa diferente en el ensayo BCA y la determinación de la absorbancia específica de la lipasa pancreática felina, mediante el uso de este ensayo puede por consiguiente ser inexacto (Smith *et al.*, 1985). La estimada absorbancia específica de la lipasa pancreática felina puede servir como un punto de referencia reproducible para el uso de la lipasa pancreática felina durante otros estudios.

El material purificado mostró una banda única en la SDS-PAGE cuando se tiñó con una tinta de azul de Coomassie. La masa molecular de la lipasa pancreática felina determinada por espectrometría de masas de 52.4 kDa comparada con 50.7 kDa reportada para la lipasa pancreática de canino, 52 kDa reportada para la lipasa pancreática de porcino, 48 kDa para la lipasa pancreática humana y de pollos, y 45 kDa para la lipasa pancreática de dromedario (De Caro *et al.*, 1981; Bosc-Bierne *et al.*, 1984; Bousset-Risso *et al.*, 1985; Mejdoub *et al.*, 1994; Steiner and Williams, 2003).

Un total de 23 residuos de aminoácido de los primeros 25 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácido N-terminal fueron identificados. Una comparación de la secuencia para estos 23 aminoácidos de la lipasa pancreática felina clásica mostró una homología de la secuencia del 87% con la lipasa pancreática de porcino clásica, 83% con la lipasa pancreática de canino clásica, 61% con la lipasa pancreática de canino proteína relacionada 1,74% con la lipasa pancreática de equino clásica, y 70% con la lipasa pancreática de humano clásica (Figura 5) (Bianchetta *et al.*, 1979; Winkler *et al.*, 1990; Kerfelec *et al.*, 1992; De Caro *et al.*, 1998; Steiner and Williams, 2003). Dos residuos de aminoácido no se pudieron determinar, i.e., los residuos en las posiciones 4 y 10. La Cisteína ha sido identificada como el residuo de aminoácido para ambas de estas dos posiciones en cerdos, perros, caballos, y seres humanos. Dado que las cisteínas pueden formar enlaces disulfuro para formar la cistina lo que las hace más difíciles de ser identificadas, se tiene la hipótesis de que los residuos de aminoácido en las posiciones 4 y 10 de la fPL también son cisteínas. Sin embargo, esta hipótesis aún no se ha demostrado por la secuenciación repetida de aminoácidos después de la reducción de la muestra.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de Patentes citadas en la descripción

- US 37752202 P [0001]
- US 6007999 A [0044]
- US 5750333 A [0044]
- US 5726013 A [0044]
- US 5726010 A [0044].

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para medir la inmunoreactividad de la lipasa pancreática felina en suero, que por consiguiente diagnostica la pancreatitis en los gatos, que comprende las etapas de:

preparación de antisuero contra la lipasa pancreática felina; y

10 desarrollo de inmunoensayos en muestras de suero utilizando el antisuero, midiendo por consiguiente la inmunoreactividad de la lipasa pancreática felina en suero de gato, en donde el incremento de la concentración de la inmunoreactividad de la lipasa pancreática encima de un rango control indica un diagnóstico posible de la pancreatitis en gatos.

15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la lipasa pancreática felina tiene una secuencia de aminoácido N-terminal que comprende la SEQ ID NO. 1.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la lipasa pancreática felina se marca para la evaluación del antisuero durante la preparación.

20 4. El método de la reivindicación 3, en donde la lipasa pancreática felina es radio-iodada (¹²⁵I).

5. El método de la reivindicación 4, en donde los inmunoensayos son radioinmunoensayos.

25 6. El método de la reivindicación 1, en donde el rango control para la inmunoreactividad de la lipasa pancreática felina en suero de gato se establece a partir de una mezcla de gatos saludables clínicamente utilizando el percentil central 95.

30 7. El método de la reivindicación 6, en donde el rango control es de alrededor de 2.0 $\mu\text{g/L}$ a aproximadamente 6.7 $\mu\text{g/L}$.

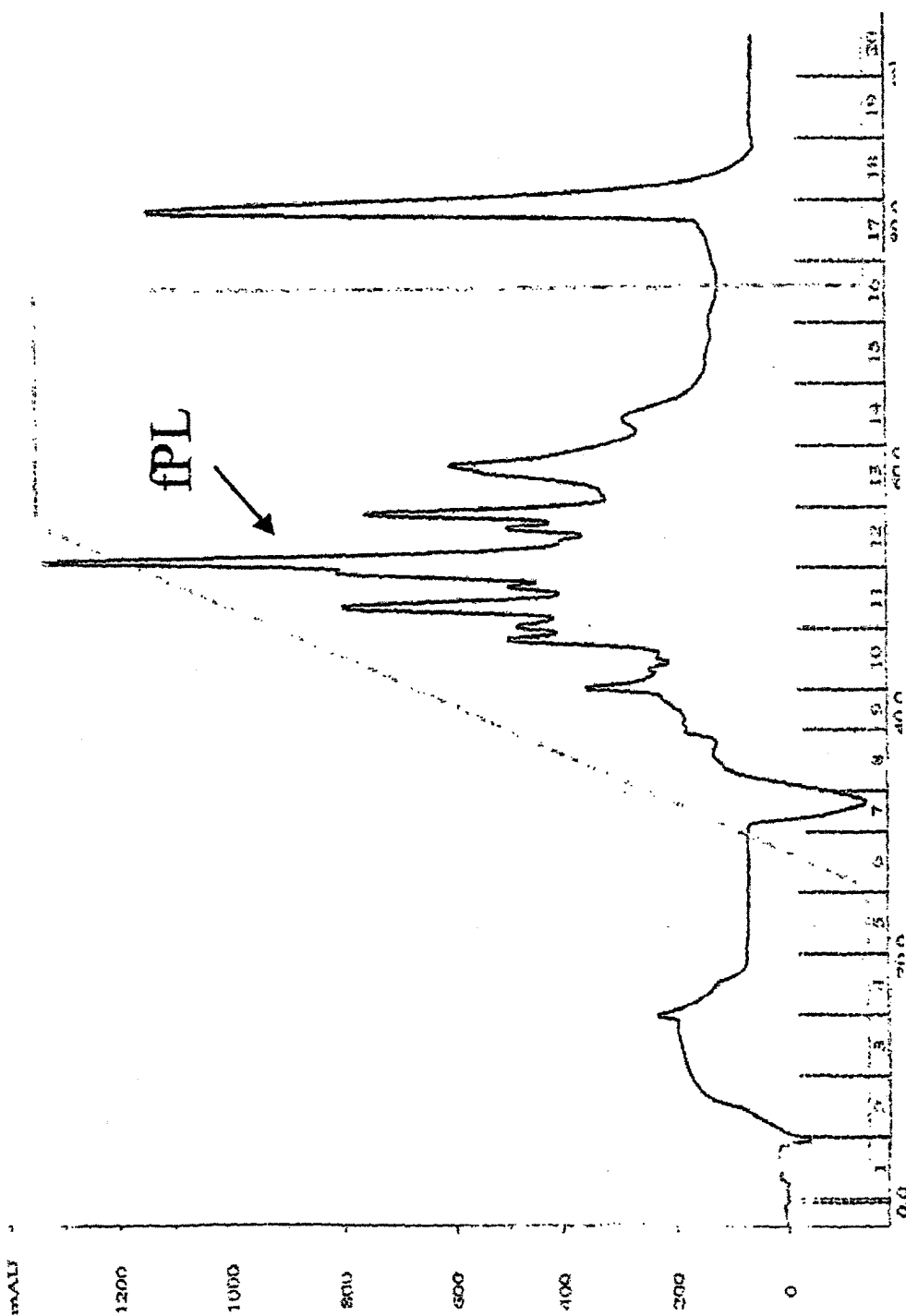


Figura 1

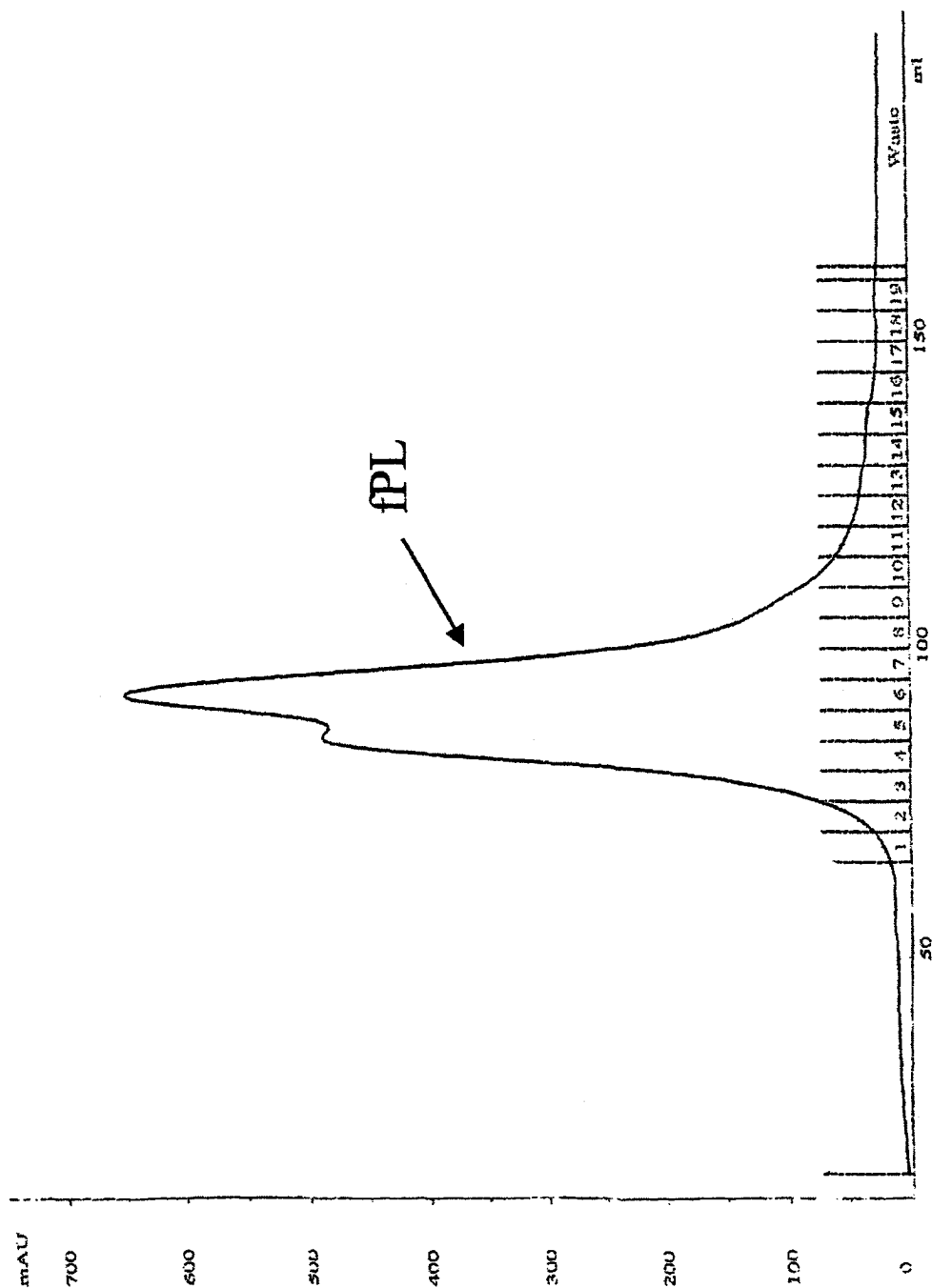


Figura 2

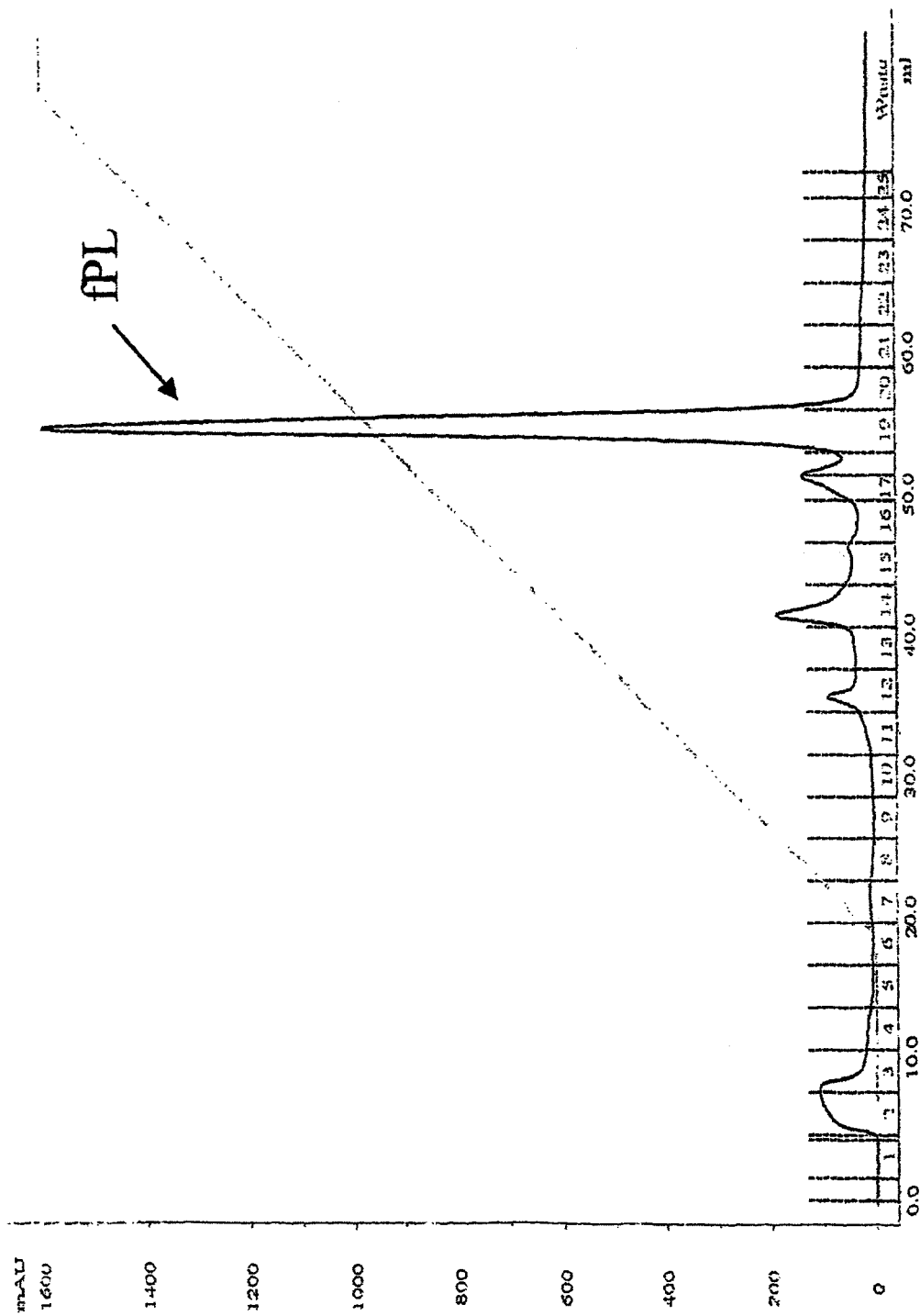


Figura 3

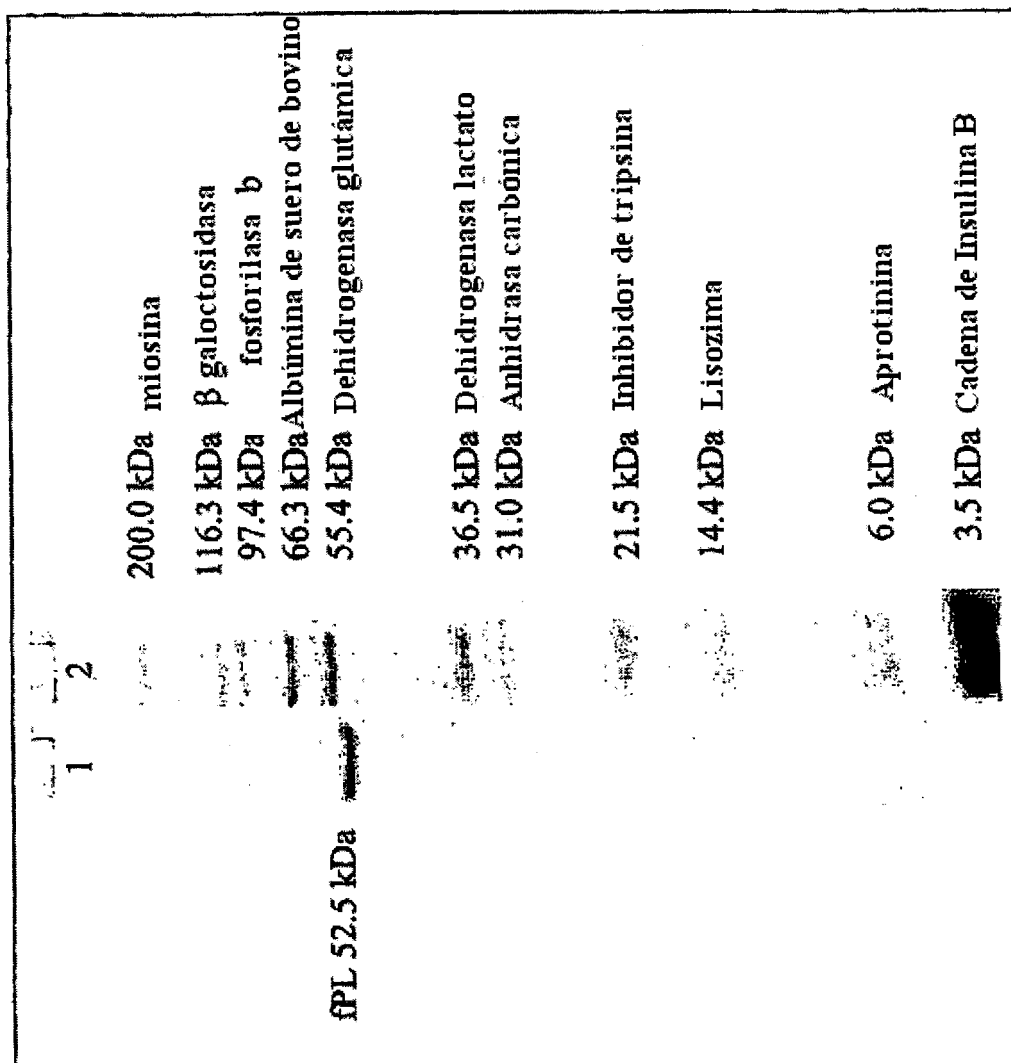


Figura 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
fPL	Lys-Glu-Ile-?	-Phe-Pro-Arg-Leu-Gly-	-Phe-Ser-Asp-Asp-Ala-Pro-Trp-Ala-Gly-Ile-Ala-Gln-Arg-Pro-Leu																						
	(SEQ ID NO. 1)																								
pPL	Ser-Glu-Val-Cys-Phe-Pro-Arg-Leu-Gly-Cys-Phe-Ser-Asp-Ala-Pro-Trp-Ala-Gly-Ile-Val-Gln-Arg-Pro-Leu																								
	(SEQ ID NO. 2)																								
cPL	Lys-Glu-Val-Cys-Phe-Pro-Arg-Leu-Gly-Cys-Phe-Ser-Asp-Ser-Pro-Trp-Ala-Gly-Ile-Val-Glu-Arg-Pro-Leu																								
	(SEQ ID NO. 3)																								
cPLRP1	Lys-Glu-Val-Cys-Tyr-Glu-Gln-Ile-Gly-Cys-Phe-Ser-Asp-Ala-Glu-Pro-Trp-Ala-Gly-Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Leu																								
	(SEQ ID NO. 4)																								
ePL	Asn-Glu-Val-Cys-Tyr-Glu-Arg-Leu-Gly-Cys-Phe-Ser-Asp-Ser-Pro-Trp-Ala-Gly-Ile-Val-Glu-Arg-Pro-Leu																								
	(SEQ ID NO. 5)																								
hPL	Lys-Glu-Val-Cys-Tyr-Glu-Arg-Leu-Gly-Cys-Phe-Ser-Asp-Ser-Pro-Trp-Ser-Gly-Ile-Thr-Glu-Arg-Pro-Leu																								
	(SEQ ID NO. 6)																								

Figura 5

ES 2 307 928 T3

<400> 3
 Lys Glu Val Cys Phe Pro Arg Leu Gly Cys Phe Ser Asp Asp Ser
 5 10 15
 5 Pro Trp Ala Gly Ile Val Glu Arg Pro Leu
 20 25

<210> 4
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Caninus*
 <220>
 15 <221> Dominio
 <222> 1...25
 <223> secuencia de aminoácido N-terminal de la lipasa pancreática de canino proteína relacionada 1(cPLRP 1)

20 <400> 4
 Lys Glu Val Cys Tyr Glu Gln Ile Gly Cys Phe Ser Asp Ala Glu
 5 10 15
 25 Pro Trp Ala Gly Thr Ala Ile Arg Pro Leu
 20 25

<210> 5
 <211> 25
 30 <212> PRT
 <213> *Equinus*
 <220>
 <221> Dominio
 35 <222> 1...25
 <223> secuencia de aminoácido N-terminal de la lipasa pancreática de equino (ePL)

40 <400> 5
 Asn Glu Val Cys Tyr Glu Arg Leu Gly Cys Phe Ser Asp Asp Ser
 5 10 15
 45 Pro Trp Ala Gly Ile Val Glu Arg Pro Leu
 20 25

<210> 6
 <211> 25
 50 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> Dominio
 55 <222> 1...25
 <223> secuencia de aminoácido N-terminal de la lipasa pancreática de humano (hPL)

<400> 6
 60 Lys Glu Val Cys Tyr Glu Arg Leu Gly Cys Phe Ser Asp Asp Ser
 5 10 15
 Pro Trp Ser Gly Ile Thr Glu Arg Pro Leu
 20 25

65