



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 142**

51 Int. Cl.:
C12N 9/20 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05807726 .4**
96 Fecha de presentación : **15.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1745129**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2007**

54 Título: **Anticuerpos contra la lipasa pancreática canina.**

30 Prioridad: **16.04.2004 US 562836 P**
22.04.2004 US 564333 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.07.2009

73 Titular/es: **IDEXX LABORATORIES, Inc.**
One Idexx Drive
Westbrook, Maine 04092, US

72 Inventor/es: **Beall, Melissa;**
Huth, Stacey, Pazar y
Krah, Eugene, Regis

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 323 142 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

Anticuerpos contra la lipasa pancreática canina.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La invención se refiere a la detección de la lipasa pancreática. Más específicamente, la invención se refiere a los polipéptidos de la lipasa pancreática, a los polinucleótidos que codifican los polipéptidos; a anticuerpos específicos para los polipéptidos y al procedimiento para usar los polipéptidos y anticuerpos para detectar la lipasa pancreática en muestras biológicas.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las citas completas a las referencias descritas en este documento por autor y fecha se proporcionan en la sección Bibliografía al final de la memoria descriptiva.

20 Las lipasas son enzimas solubles en agua que hidrolizan sustratos insolubles en agua en más productos de lipólisis polares (Petersen y Drablos, 1994). Se han identificado una plétora de lipasas en microorganismos, plantas y animales (Lin y col., 1986; Jaeger y col., 1994; Petersen y Drablos, 1994; Mukherjee y Hills, 1994; Lawson y col., 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 mostrado que muchas lipasas
25 están relacionadas filogenéticamente. La familia de genes de la lipasa pancreática es una gran familia de genes con 9 subfamilias (Petersen y Drablos, 1994; Carriere y col., 1997; Carriere y col., 1998; Hirata y col., 1999). Además, hay otros grupos de lipasas relacionadas filogenéticamente, y aún otras lipasas que no pertenecen a una familia de genes definida (Anderson y Sando, 1991).

30 La principal función de las lipasas es la hidrólisis de los lípidos. Es necesaria una lipasa cada vez que un lípido apolar necesita cruzar una membrana biológica. Los triglicéridos son ejemplos de primera clase de los lípidos apolares. Por consiguiente la lipasa es necesaria para que los triglicéridos se absorban desde del tracto intestinal. Hay dos lipasas digestivas en la mayoría de las especies de vertebrados, es decir, una lipasa preduodenal y una lipasa pancreática clásica (Carriere y col., 1994). Se ha mostrado que la lipasa preduodenal se origina a partir de un único tejido en todas las
35 especies examinadas hasta la fecha (Moreau y col., 1988). Se identificó una lipasa faríngea en vacas y ovejas, una lipasa lingual en ratas y ratones, y una lipasa gástrica en seres humanos, monos, caballos, cerdos, cobayas, gatos y perros (Moreau y col., 1988). No se ha podido identificar ninguna lipasa preduodenal en pollos (Moreau y col., 1988). En los seres humanos y en los perros se ha demostrado que la lipasa gástrica contribuye significativamente a la digestión de los triglicéridos de la dieta (Carriere y col., 1993a; Carriere y col., 1993b). Sin embargo, la lipasa pancreática (también
40 llamada lipasa pancreática clásica) es la enzima más importante en la digestión de los triglicéridos de la dieta (Carriere y col., 1991; Carriere y col., 1993a).

Se ha mostrado recientemente por inmunolocalización que la lipasa pancreática está presente sólo en las células acinares pancreáticas en perros clínicamente saludables, lo que sugiere que la lipasa pancreática clásica puede ser un
45 marcador ideal para la función y patología del páncreas exocrino (Steiner y col., 2002). Esta hipótesis se ha confirmado en estudios clínicos que han demostrado que la medida de la inmunorreactividad de la lipasa pancreática en suero es un marcador específico para la función pancreática exocrina y también muy sensible para la pancreatitis en el perro (Steiner y col., 2001a; Steiner y col., 2001b; Steiner y col., 2001c). Steiner y col., Can. J. Vet. Res. (2003) 67:175-182 divulga un antisuero contra la lipasa pancreática canina y el uso del mismo en ELISA para la detección de la lipasa
50 pancreática canina.

La lipasa pancreática tiene un peso molecular aproximado de 50 kilodaltons. La purificación de la lipasa pancreática clásica se ha informado en muchas especies (Vandermeers y Chroistophe, 1968; Rathelot y col., 1981; Bosc-Bierne y col., 1984; Gieseg y col., 1992; Mejdoub y col., 1994; Steiner y Williams, 2003).

55 Los síntomas clínicos de la pancreatitis no son específicos y la enfermedad puede ser difícil de diagnosticar. La pancreatitis está asociada con una cantidad aumentada de enzimas digestivas y zimógenos que pasan al torrente sanguíneo. Una de estas enzimas es la lipasa pancreática. Se ha desarrollado una serie de ensayos para detectar la presencia de la lipasa en suero por medio del uso de ensayos catalíticos. Sin embargo, estos ensayos carecen tanto
60 de sensibilidad como de especificidad para la pancreatitis en seres humanos y en perros. Por consiguiente, existe una necesidad de un procedimiento y un dispositivo, simple y rápido, para detectar de manera sensible y específica la lipasa pancreática.

Resumen de la invención

65 La descripción divulga una molécula aislada de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos de la lipasa pancreática canina, variantes alélicas o fragmentos de la misma. También se divulgan vectores y células huésped que contienen las secuencias, y procedimientos para expresar los polipéptidos.

ES 2 323 142 T3

La invención está dirigida a anticuerpos monoclonales secretados por líneas celulares que tienen número de depósito ATCC PTA-6652 o PTA-6653 que se unen específicamente a los polipéptidos de la lipasa pancreática canina. La invención proporciona además una línea celular que secreta los anticuerpos monoclonales.

- 5 Otro aspecto de la invención está dirigido a los procedimientos para determinar la presencia o la cantidad de lipasa pancreática canina en una muestra biológica. El procedimiento incluye usar los anticuerpos monoclonales de la invención para unir específicamente a los polipéptidos de la lipasa pancreática canina en la muestra. El procedimiento incluye usar patrones de la lipasa pancreática canina recombinante.
- 10 Otros aspectos de la invención están dirigidos a los dispositivos y kits que comprenden los anticuerpos de la invención para llevar a cabo los procedimientos para detectar la lipasa pancreática canina en muestras biológicas.

Breve descripción de las figuras

- 15 La Figura 1 representa el diseño del cebador para la identificación y la amplificación de la lipasa pancreática canina. Se muestra una serie de cebadores redundantes (1, 2, 3, 5) para PCR de amplificación rápida de los extremos 3' (3'RACE) (UPM - mezcla de cebadores universales, Clontech) y PCR anidada, así como los cebadores usados para la amplificación rápida de los extremos 5' (5'RACE) (4, 6). Se muestra la región de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal previamente publicada.

20 La Figura 2 muestra el gen de la lipasa pancreática canina de 1,429 Kb, denominado cPL1 (SEC. ID N° 2).

La Figura 3 muestra la proteína de la lipasa pancreática canina traducida, denominada cPLP1 (SEC. ID N° 3). La secuencia de aminoácidos se dedujo a partir del análisis de la secuencia del ADNc.

25 La Figura 4 muestra una serie de péptidos de la lipasa pancreática canina [SEC. ID N° 10-52] que es por lo general una serie de péptidos 20 meros que abarcan la SEC. ID N° 3 en solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 La Figura 5 muestra la lipasa pancreática canina purificada, recombinante, que contiene una etiqueta 6xHis. La proteína puede identificarse en su forma purificada en aproximadamente 55 kDa en un gel teñido con Coomassie o teñido con His (A) o en una transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal anti-His o el anticuerpo monoclonal 7E11 (B).

35 La Figura 6 representa los valores de anticuerpos para cPLP1 en ratones inmunizados con ADN (A) usando un ELISA convencional de competición con los sueros inmunes o en pollos (B) usando la proteína recombinante expresada como inmunógeno.

40 La Figura 7 demuestra la capacidad de los dos anticuerpos monoclonales, 4G11 y 7E11, para reaccionar con la lipasa pancreática canina en suero canino.

La Figura 8 representa la capacidad del anticuerpo monoclonal 4G11 para inhibir la actividad enzimática de cPLP1.

45 La Figura 9 contiene los datos del ELISA que demuestran que los anticuerpos monoclonales 4G11 y 7E11 no compiten uno con el otro para unirse a cPLP1.

La Figura 10 demuestra la capacidad del anticuerpo monoclonal 7E11 para competir con un anticuerpo anti-lipasa pancreática humana para unirse a cPLP1.

50 La Figura 11 muestra los resultados de un ensayo ELISA sándwich para la lipasa pancreática canina usando los anticuerpos monoclonales 7E11 y 4G11.

Descripción detallada

55 Como se usa en este documento, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto lo establezca claramente de otra manera.

Se ha informado la secuencia de aminoácidos del extremo N terminal de la lipasa pancreática canina purificada (Steiner y Williams, Biochimie, 2002):

60

KEVCFPRLGCFSDSPWAGIVERPL

[SEC. ID N°: 1]

65 Basándose en esta secuencia de aminoácidos publicada y en similitudes de secuencia entre las lipasas pancreáticas de otras especies, se diseñaron y usaron una serie de cebadores redundantes para 3' RACE (amplificación rápida de los extremos del ADNc) y PCR anidada (Figura 1) de los que se obtuvo el extremo 3' completo del gen. La secuencia completa del gen (ADNc) y la secuencia de aminoácidos traducida se muestra en las Figuras 2 y 3.

Por consiguiente, en un aspecto la solicitud divulga moléculas de ADNc canino (por ejemplo, denominada en este documento cPL1, SEC. ID N° 2), que codifican las proteínas de las lipasas caninas tales como la proteína de la lipasa pancreática canina (por ejemplo, denominada en este documento cPLP1, SEC. ID N° 3). También se divulgan la proteína de cPLP1, sus fragmentos, sus derivados, y sus variantes.

Por consiguiente, en un aspecto, la solicitud divulga las moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos descritos en este documento o porciones biológicamente activas de los mismos. La presente solicitud divulga las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas de proteínas que se han identificado como miembros de la familia de proteínas de la lipasa y están relacionadas con la subfamilia de la lipasa pancreática (las secuencias de la proteína se proporcionan en la Fig. 3, la transcripción/secuencias del ADNc se proporcionan en la Fig. 2). En este documento se divulgan las secuencias del péptido proporcionado en la Fig. 3, así como las variantes obvias descritas en este documento, en particular las variantes alélicas según se identifican en este documento y usando la información en la Fig. 3.

La presente solicitud divulga las moléculas aisladas de péptidos y proteínas que están constituidas por, están constituidas esencialmente por, o comprenden las secuencias de aminoácidos de los péptidos de la lipasa divulgados en la Fig. 3, (codificados por la molécula del ácido nucleico mostrada en la Fig. 2), así como todas las variantes obvias de estos péptidos que están dentro de la técnica para hacer y utilizar. Algunas de estas variantes se describen detalladamente a continuación.

Según se usa en este documento, se dice que un péptido está “aislado” o “purificado” cuando está sustancialmente libre de material celular o libre de precursores químicos o de otros productos químicos. Los péptidos pueden purificarse hasta homogeneidad o hasta otros grados de pureza. El nivel de purificación se basará en el uso previsto. La característica crítica es que la preparación permita la función deseada del péptido, aún en presencia de cantidades considerables de otros componentes (las características de una molécula aislada de ácido nucleico se analizan a continuación).

En algunos usos, “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones del péptido que tienen menos que aproximadamente 30% (en peso seco) de otras proteínas (es decir, proteína contaminante), menos que aproximadamente 20% de otras proteínas, menos que aproximadamente 10% de otras proteínas, o menos que aproximadamente 5% de otras proteínas. Cuando el péptido se produce de manera recombinante, puede también estar sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos que aproximadamente 20% del volumen de la preparación de la proteína.

El lenguaje “sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos” incluye las preparaciones del péptido en las que está separado de los precursores químicos o de otros productos químicos que están implicados en su síntesis. En una forma de realización, el lenguaje “sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos” incluye las preparaciones del péptido de la lipasa que tienen menos que aproximadamente 30% (en peso seco) de precursores químicos u otros productos químicos, menos que aproximadamente 20% de los precursores químicos u otros productos químicos, menos que aproximadamente 10% de los precursores químicos u otros productos químicos, o menos que aproximadamente 5% de los precursores químicos u otros productos químicos.

El péptido aislado de la lipasa puede purificarse de las células que naturalmente lo expresan, puede purificarse de las células que se han alterado para que lo expresen (recombinante), o puede sintetizarse usando procedimientos conocidos de síntesis de proteínas. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de la lipasa se clona en un vector de expresión, el vector de expresión se introduce en una célula huésped y la proteína se expresa en la célula huésped. A continuación puede aislarse la proteína de las células por medio de un esquema de purificación adecuado usando técnicas convencionales de purificación de proteínas. Muchas de estas técnicas se describen en detalle a continuación.

Por consiguiente, la presente solicitud divulga las proteínas que están constituidas por las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la Fig. 3 (SEC. ID N°: 3), por ejemplo, las proteínas codificadas por la transcripción/secuencias del ácido nucleico ADNc mostradas en la Fig. 2 (SEC. ID N°: 2). La secuencia de aminoácidos de tal proteína se proporciona en la Fig. 3. Una proteína está constituida por una secuencia de aminoácidos cuando la secuencia de aminoácidos es la secuencia final de aminoácidos de la proteína.

La presente solicitud además divulga las proteínas que están constituidas esencialmente por las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la Fig. 3 (SEC. ID N°: 3), por ejemplo, las proteínas codificadas por la transcripción/secuencias del ácido nucleico ADNc mostradas en la Fig. 2 (SEC. ID N°: 2). Una proteína está constituida esencialmente por una secuencia de aminoácidos cuando tal secuencia de aminoácidos está presente con solamente unos pocos residuos adicionales de aminoácidos, por ejemplo desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 o similar residuos adicionales, típicamente desde 1 hasta aproximadamente 20 residuos adicionales en la proteína final.

La presente solicitud además divulga las proteínas que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la Fig. 3 (SEC. ID N°: 3), por ejemplo, las proteínas codificadas por la transcripción/secuencias del ácido nucleico ADNc mostradas en la Fig. 2 (SEC. ID N°: 2). Una proteína comprende una secuencia de aminoácidos cuando la secuencia de aminoácidos es al menos parte de la secuencia final de aminoácidos de la proteína. En tal manera, la proteína puede ser solamente el péptido o puede tener moléculas de aminoácidos adicionales, tales como residuos de

aminoácidos (secuencia codificada contigua) que están asociados con el mismo naturalmente o secuencias de péptidos/residuos de aminoácidos heterólogos. Tal proteína puede tener unos pocos residuos de aminoácidos adicionales o puede comprender varios cientos o más aminoácidos adicionales. Las clases de preferencia de proteínas que están comprendidas de los péptidos de la lipasa de la presente solicitud son las proteínas maduras que se presentan en la naturaleza. A continuación se proporciona una breve descripción de cómo pueden producirse/aislarse varios tipos de estas proteínas.

Los péptidos de la lipasa de la presente solicitud pueden unirse a las secuencias heterólogas para formar proteínas quiméricas o de fusión. Tales proteínas quiméricas y de fusión comprenden un péptido de lipasa ligado de manera operativa a una proteína heteróloga que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente no homóloga al péptido de la lipasa. "Ligado de manera operativa" indica que el péptido de lipasa y la proteína heteróloga están fusionados en marco. La proteína heteróloga puede fusionarse al extremo N terminal o al extremo C terminal del péptido de la lipasa.

En algunos usos, la proteína de fusión no afecta la actividad del péptido de la lipasa *per se*. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir, pero no se limita a, proteínas de fusión enzimáticas, por ejemplo fusiones de beta-galactosidasa, fusiones GAL de doble híbrido de levadura, fusiones de poli-His, fusiones de Ig, etiquetadas con MYC y etiquetadas con HI. Tales proteínas de fusión, particularmente las fusiones de poli-His, pueden facilitar la purificación del péptido de la lipasa recombinante. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o secreción de una proteína pueden aumentarse usando una secuencia de señal heteróloga.

Puede producirse una proteína quimérica o de fusión por técnicas convencionales de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de la proteína se unen juntos en marco de acuerdo con técnicas convencionales. En otra forma de realización, el gen de fusión puede sintetizarse por medio de técnicas convencionales, incluidos los sintetizadores automatizados de ADN. Como alternativa, puede llevarse a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos del gen usando cebadores ancla que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos consecutivos del gen que pueden posteriormente hibridarse y amplificarse nuevamente para generar una secuencia quimérica del gen (véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1992). Además, en el comercio están disponibles muchos vectores de expresión que codifican ya un resto de fusión (por ejemplo, una proteína GST). Puede clonarse un ácido nucleico que codifica un péptido de lipasa en un vector de expresión tal que el resto de fusión se une en marco al péptido de la lipasa.

Según se mencionó anteriormente, la presente solicitud también divulga y permite las variantes obvias de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de la presente invención, tales como las formas maduras del péptido que se presentan en la naturaleza, variantes alélicas/de secuencia de los péptidos, variantes de los péptidos derivadas de manera recombinante que no se presentan en la naturaleza, y parálogos de los péptidos. Tales variantes pueden generarse fácilmente usando técnicas conocidas en la técnica de los campos de la tecnología de ácidos nucleicos recombinantes y de bioquímica de las proteínas. Se entiende, sin embargo, que las variantes excluyen cualquier secuencia de aminoácidos divulgada antes de la invención.

Tales variantes pueden identificarse/producirse fácilmente usando técnicas moleculares y la información de las secuencias divulgadas en este documento. Además, tales variantes pueden distinguirse fácilmente de otros péptidos en base a la secuencia y/o la homología estructural con los péptidos de la lipasa de la presente invención. El grado de homología/similitud presentes se basará principalmente en si el péptido es una variante funcional o una variante no funcional, y en la cantidad de divergencia presente en la familia del parálogo.

Para determinar el porcentaje de similitud de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, se alinean las secuencias para una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden ignorarse para el objeto de la comparación). En una forma de realización de preferencia, al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% o más de la longitud de una secuencia de referencia se alinea para el objeto de la comparación. A continuación se comparan los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones correspondientes de los aminoácidos o las posiciones de los nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en este documento "similitud" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de similitud entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, considerando el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad y similitud entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático. (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). En una forma de realización de preferencia, la similitud por ciento entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48): 444-453 (1970)) algoritmo que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un

ES 2 323 142 T3

peso de hueco 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En otra forma de realización de preferencia, la similitud por ciento entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (Devereux, J., y col., Nucleic Acids Res. 12 (1):387 (1984)) (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. También de preferencia, la similitud por ciento entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se determina usando el algoritmo de E. Myers y W. Molinero (CABIOS, 4: 11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de la presente solicitud pueden utilizarse además como una “secuencia incógnita” para realizar una búsqueda contra bases de datos de secuencias para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y col. (J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). Las búsquedas de nucleótidos de BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener las secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas de BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las proteínas de la invención. Para obtener alineaciones con huecos para el objeto de la comparación, puede utilizarse Gapped BLAST según se describe en Altschul y col. (Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402 (1997)). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

Las formas de longitud total preprocesadas, así como las formas maduras procesadas, de proteínas que comprenden uno de los péptidos de la presente solicitud pueden identificarse fácilmente por tener similitud de la secuencia completa con uno de los péptidos de la lipasa de la presente solicitud así como por ser codificadas por el mismo locus genético que el péptido de la lipasa divulgado en este documento.

Las variantes alélicas de un péptido de lipasa pueden identificarse fácilmente por ser una proteína canina que tiene un alto grado (significativo) de homología/similitud de secuencia con al menos una porción del péptido de la lipasa así como por ser codificadas por el mismo locus genético que el péptido de la lipasa divulgado en este documento. Según se utiliza en este documento, dos proteínas (o una región de las proteínas) tienen homología significativa cuando las secuencias de aminoácidos son típicamente homólogas en al menos aproximadamente 70-80%, 80-90%, y más típicamente al menos aproximadamente 90-95% o más. Una secuencia de aminoácidos significativamente homóloga, según la presente invención, será codificada por una secuencia de ácido nucleico que hibridará a una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de la lipasa bajo condiciones rigurosas como más se describe más completamente a continuación.

Los parálogos de un péptido de la lipasa pueden identificarse fácilmente por tener cierto grado de homología/similitud de secuencia significativa al menos a una porción del péptido de la lipasa, por ser codificado por un gen de caninos, y por tener actividad o función similar. Dos proteínas serán consideradas típicamente parálogos cuando las secuencias de aminoácidos tengan típicamente al menos aproximadamente 60%, o más, y más típicamente al menos aproximadamente 70% o más homología con una región o un dominio dado. Tales parálogos serán codificados por una secuencia de ácido nucleico que hibridará a una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de la lipasa bajo condiciones moderadas a rigurosas como se describe más completamente a continuación.

Las variantes que no se presentan en la naturaleza de los péptidos de la lipasa de la presente solicitud pueden generarse fácilmente usando técnicas recombinantes. Tales variantes incluyen, pero no se limitan a delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos del péptido de la lipasa. Por ejemplo, una clase de sustituciones son las sustituciones de aminoácidos conservadas. Tales sustituciones son las que sustituyen un aminoácido dado en un péptido de lipasa por otro aminoácido de características iguales. Se consideran típicamente como sustituciones conservadoras los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; el intercambio de los residuos de hidroxilo Ser y Thr; el intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu; la sustitución entre los residuos amida Asn y Gln; el intercambio de los residuos básicos Lys y Arg; y los reemplazos entre los residuos aromáticos Phe y Tyr. Las pautas con respecto a qué cambios de aminoácidos son probablemente silenciosas desde el punto de vista fenotípico se encuentran en Bowie y col., Science 247: 1306-1310 (1990).

Los péptidos variantes de la lipasa pueden ser completamente funcionales o pueden carecer de función en una o más actividades, por ejemplo la capacidad de unir el sustrato, la capacidad de hidrolizar el sustrato, etc. Las variantes completamente funcionales contienen típicamente sólo la variación conservadora o la variación en residuos no críticos o en regiones no críticas. Las variantes funcionales pueden también contener la sustitución de aminoácidos similares que no dan lugar a ningún cambio o que dan lugar a un cambio insignificante en la función. Como alternativa, tales sustituciones pueden afectar positivamente o negativamente la función hasta cierto grado.

Los aminoácidos que son esenciales para la función pueden identificarse por medio de procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida a sitios o la mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y col., Science 244: 1081-1085 (1989)), particularmente usando los resultados proporcionados en la Fig. 2. El último procedimiento introduce mutaciones únicas de alanina en cada residuo en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se prueban posteriormente para la actividad biológica tal como la actividad de lipasa o en ensayos tales como una actividad proliferativa *in vitro*. Los sitios que son críticos para la pareja de unión/unión del sustrato pueden

también determinarse por análisis estructural tal como la cristalización, la resonancia magnética nuclear o el marcado por fotoafinidad (Smith y col., J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992); de Vos y col. Science 255: 306-312 (1992)).

5 La presente solicitud divulga además fragmentos de los péptidos de la lipasa, además de las proteínas y los péptidos que comprenden y están constituidos por tales fragmentos. En un aspecto, la solicitud divulga los residuos identificados en la Fig. 4. Sin embargo, no debe interpretarse que los fragmentos divulgados en este documento abarquen fragmentos que puedan haberse divulgado públicamente antes de la presente invención.

10 Según se usa en este documento, un fragmento comprende al menos 8, 10, 12, 14, 16 o más residuos de aminoácidos contiguos del péptido de la lipasa. Tales fragmentos pueden elegirse en base a la capacidad para conservar una o más de las actividades biológicas del péptido de la lipasa o podrían elegirse por la capacidad para realizar una función, por ejemplo unir un sustrato o actuar como un inmunógeno. Los fragmentos particularmente importantes son los fragmentos biológicamente activos, los péptidos que tienen, por ejemplo, aproximadamente 8 o más aminoácidos de longitud. Tales fragmentos comprenderán típicamente un dominio o un motivo del péptido de la lipasa, por ejemplo, un sitio activo, un dominio transmembranario o un dominio de unión al sustrato. Además, los fragmentos posibles incluyen, pero no se limitan a, fragmentos que contienen dominios o motivos, fragmentos de péptidos solubles, y fragmentos que contienen estructuras inmunogénicas. Los dominios y los sitios funcionales predichos son fácilmente identificables por medio de los programas informáticos bien conocidos y fácilmente disponibles para los expertos en la técnica (por ejemplo, análisis PROSITE).

20 Los polipéptidos contienen frecuentemente aminoácidos con diferentes de los 20 aminoácidos denominados comúnmente como los 20 aminoácidos que se presentan en la naturaleza. Además, muchos aminoácidos, incluidos los aminoácidos terminales, pueden modificarse por procesos naturales, tales como procesamientos y otras modificaciones postraduccionales, o por medio de técnicas químicas de modificación bien conocidas en la técnica. Las modificaciones comunes que se presentan naturalmente en los péptidos de la lipasa están descritas en textos básicos, monografías detalladas, y en la bibliografía de investigación, y son bien conocidas por los expertos en la técnica (algunas de estas características se identifican en la Fig. 3).

30 Las modificaciones conocidas incluyen, pero no se limitan a, acetilación, acilación, ADP ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o de un derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o de un derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclización, formación de enlaces disulfuro, demetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia tal como arginilación y ubiquitinación.

40 Tales modificaciones son muy conocidas por los expertos en la técnica y se han descrito en gran detalle en la bibliografía científica. Varias modificaciones particularmente comunes, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, carboxilación gamma de los residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP ribosilación, por ejemplo, se describen en la mayoría de los textos básicos, tales como Proteins-Structure and Molecular Properties, 2^o Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993). Muchas revisiones detalladas sobre este tema están disponibles, tales como, por Wold, F., Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York 1-12 (1983); Seifter y col. (Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)) y Rattan y col. (Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)).

50 Por consiguiente, los péptidos de la lipasa de la presente solicitud también abarcan los derivados o los análogos en los que un residuo de aminoácido sustituido no es uno codificado por el código genético, en los que está incluido un grupo sustituyente, en los que el péptido maduro de la lipasa está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del péptido de la lipasa (por ejemplo, polietilenglicol), o en los que los aminoácidos adicionales están fusionados al péptido maduro de la lipasa, tal como una secuencia líder o una secuencia secretora o una secuencia para la purificación del péptido maduro de la lipasa o una secuencia de pro-proteína.

Anticuerpos

55 La invención proporciona anticuerpos secretados por las líneas celulares que tienen número de depósito ATCC PTA-6652 o PTA-6653 que se unen de manera selectiva a uno de los péptidos de la presente invención, a una proteína que comprende tal péptido, así como a variantes y fragmentos de los mismos. Según se usa en este documento, un anticuerpo se une selectivamente a un péptido diana cuando se une al péptido diana y no se une significativamente a proteínas no relacionadas. Un anticuerpo aún se considera que se une selectivamente a un péptido incluso si se une también a otras proteínas que no son sustancialmente homólogas con el péptido diana a condición de que tales proteínas compartan homología con un fragmento o dominio del péptido diana del anticuerpo. En este caso, se entenderá que el anticuerpo que se une al péptido es aún selectivo a pesar de cierto grado de reactividad cruzada.

65 Según se usa en este documento, se define a un anticuerpo en términos coherentes con los reconocidos dentro de la técnica: son proteínas de subunidades múltiples producidas por un organismo mamífero en respuesta a un desafío antigénico. Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, así como fragmentos de tales anticuerpos, incluidos, pero no limitados a, fragmentos Fab o F(ab')₂ y Fv.

ES 2 323 142 T3

Se conocen muchos procedimientos para generar y/o identificar anticuerpos para un péptido diana dado. Varios de tales procedimientos están descritos por Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, (1989).

5 En general, para generar anticuerpos, se usa un péptido aislado como un inmunógeno y se administra a un organismo mamífero, tal como una rata, conejo o ratón. Puede usarse la proteína de longitud total, un fragmento del péptido antigénico o una proteína de fusión. Los fragmentos particularmente importantes son los que abarcan dominios funcionales, y dominios de homología o divergencia de secuencia entre la familia, tales como los que pueden identificarse fácilmente usando procedimientos de alineación de proteínas y como se presenta en las Figuras.

10 Los anticuerpos se preparan de preferencia a partir de regiones o fragmentos discretos de las proteínas de la lipasa. Pueden prepararse anticuerpos a partir de cualquier región del péptido como se describe en este documento. Sin embargo, las regiones de preferencia incluirán las implicadas en la función/actividad y/o en la interacción lipasa/pareja de unión.

15 Un fragmento antigénico comprenderá típicamente al menos 8 residuos de aminoácidos contiguos. El péptido antigénico puede comprender, sin embargo, al menos 10, 12, 14, 16 o más residuos de aminoácidos. Tales fragmentos pueden seleccionarse según una propiedad física, tales como fragmentos que corresponden a regiones que están localizadas en la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrófilas o pueden seleccionarse según la condición de secuencia única.

20 En un aspecto, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales producidos por una línea celular de mieloma de ratón. Esta línea celular puede producirse fusionando una línea celular de mieloma de ratón con las células del bazo de ratón a las que se les ha inyectado proteína de lipasa pancreática canina completa, o una porción antigénica de la misma. Como se describe más completamente en los Ejemplos a continuación, dos de tales líneas celulares se han depositado con la Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 31 de marzo de 2005. A estas líneas celulares se les asignó los Números de Depósito de Patente PTA-6652 y PTA-6653. Los depósitos se mantendrán bajo los términos del Tratado de Budapest en el International Recognition del Depósito de Microorganismos. Los depósitos se proporcionan por conveniencia para los expertos en la técnica y no son una admisión de que se requiera el depósito a tenor del 35 U.S.C. § 112. Los anticuerpos secretados a partir de las
30 líneas celulares se han denominado 4G11 y 7E11.

Ambos anticuerpos se unen tanto a la lipasa pancreática canina nativa, purificadas como a la cPL1 recombinante. Los anticuerpos no compiten por el mismo epítipo en cPLP1 y pueden usarse en un ELISA sándwich. Ambos anticuerpos se unen a la lipasa pancreática canina nativa en el suero canino. El anticuerpo 4G11 inhibe parcialmente la actividad enzimática de cPLP1, mientras que 7E11 no lo hace. El anticuerpo 7E11 detecta la proteína cPLP1 en transferencias Western, mientras que 4G11 no lo hace. 7E11 compete con un anticuerpo anti lipasa pancreática humana por la unión a cPLP1, mientras que 4G11 no lo hace. El anticuerpo 4G11 parece tener una mayor afinidad por la CPL1 que 7E11 en base a las DO obtenidas de un ELISA sándwich.

40 Los anticuerpos pueden usarse para aislar una de las proteínas de la presente solicitud por medio de técnicas convencionales, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Los anticuerpos pueden facilitar la purificación de la proteína natural a partir de células y proteínas producidas de manera recombinante expresadas en células huésped. Además, tales anticuerpos son útiles para detectar la presencia de una de las proteínas de la presente solicitud en células, tejidos o líquidos para determinar el patrón de expresión de la proteína entre diversos tejidos en un organismo y durante el transcurso del desarrollo normal. Además, tales anticuerpos pueden usarse para detectar la proteína *in situ*, *in vitro*, o en un lisado celular o sobrenadante para evaluar la abundancia y el patrón de expresión. También, tales anticuerpos pueden usarse para evaluar la distribución anormal de tejidos o la expresión anormal durante el desarrollo o progresión de una afección biológica. Puede usarse la detección de fragmentos circulantes de la proteína de longitud total con anticuerpos para identificar el recambio.

50 Además, los anticuerpos pueden usarse para evaluar la expresión en estados de enfermedad tales como en estados activos de la enfermedad o en un individuo con una predisposición hacia una enfermedad relacionada con la función de la proteína. Cuando un trastorno es causado por una distribución tisular inadecuada, expresión del desarrollo, nivel de expresión de la proteína, o forma expresada/procesada, puede prepararse el anticuerpo contra la proteína normal. Si un trastorno está caracterizado por una mutación específica en la proteína, pueden usarse anticuerpos específicos para esta proteína mutante para ensayar la presencia de la proteína mutante específica.

Polinucleótidos

60 La solicitud divulga polinucleótidos aislados que codifican la lipasa pancreática canina. El término “polinucleótido de lipasa” o “ácido nucleico de lipasa” se refiere a la secuencia en SEC. ID N°: 2. El término “polinucleótido de lipasa” o “ácido nucleico de lipasa” incluye también variantes y fragmentos del polinucleótido de lipasa.

65 Un ácido nucleico de lipasa “aislado” es uno que está separado de otro ácido nucleico presente en la fuente natural del ácido nucleico de lipasa. De preferencia, un ácido nucleico “aislado” está libre de secuencias que naturalmente son vecinas al ácido nucleico de la lipasa (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que deriva el ácido nucleico. Sin embargo, puede haber algunas secuencias de nucleótidos vecinas, por ejemplo hasta aproximadamente 5 KB. El punto importante es que el ácido nucleico de la

ES 2 323 142 T3

lipasa está aislado de secuencias vecinas de manera que puede someterse a las manipulaciones específicas descritas en este documento, tales como la expresión recombinante, la preparación de sondas y cebadores, y otros usos específicos para las secuencias del ácido nucleico de la lipasa.

5 Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de ADNc o ARN, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por medio de técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Sin embargo, la molécula de ácido nucleico puede estar fusionada a otras secuencias codificadoras o reguladoras y aún puede considerarse aislada.

10 En algunos casos, el material aislado formará parte de una composición (por ejemplo, un extracto bruto que contiene otras sustancias), un sistema de tampón o una mezcla de reactivos. En otras circunstancias, el material puede purificarse hasta homogeneidad esencial, por ejemplo como se determina por medio de cromatografía PAGE o en columna tal como HPLC. De preferencia, un ácido nucleico aislado comprende al menos aproximadamente 50, 80 ó 90% (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

15 Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen las moléculas de ADN recombinante mantenidas en células huésped heterólogas o las moléculas de ADN purificadas (de manera parcial o sustancial) en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ADN aisladas de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas según la presente solicitud incluyen además moléculas producidas sintéticamente.

20 En algunos casos, el material aislado formará parte de una composición (por ejemplo, un extracto bruto que contiene otras sustancias), un sistema de tampón o una mezcla de reactivos. En otras circunstancias, el material puede purificarse hasta homogeneidad esencial, por ejemplo como se determina por medio de cromatografía PAGE o en columna tal como HPLC. De preferencia, un ácido nucleico aislado comprende al menos aproximadamente 50, 80 ó 90% (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

25 Los polinucleótidos de lipasa pueden codificar la proteína madura más otros aminoácidos amino o carboxi terminales, o aminoácidos interiores al polipéptido maduro (cuando la forma madura tiene más de una cadena polipeptídica, por ejemplo). Tales secuencias pueden desempeñar una función en el procesamiento de una proteína a partir de un precursor hasta una forma madura, pueden facilitar el tráfico de la proteína, prolongar o acortar la semivida de la proteína o pueden facilitar la manipulación de una proteína para ensayo o producción, entre otras cosas. Como es por lo general el caso *in situ*, los aminoácidos adicionales pueden procesarse fuera de la proteína madura por enzimas celulares.

30 Los polinucleótido de lipasa incluyen, pero no se limitan a, la secuencia que codifica el polipéptido maduro solo, la secuencia que codifica el polipéptido maduro y secuencias codificadoras adicionales, tales como una secuencia líder o secretora (por ejemplo, una secuencia de pre-pro o pro-proteína), la secuencia que codifica el polipéptido maduro, con o sin las secuencias codificadoras adicionales, más otras secuencias no codificadoras, por ejemplo intrones y secuencias 5' y 3' no codificadoras tales como secuencias transcritas pero no traducidas que desempeñan una función en la transcripción, procesamiento de ARNm (incluidas señales de corte y empalme y poliadenilación), unión a ribosomas y estabilidad del ARNm. Además, el polinucleótido puede estar fusionado a una secuencia codificadora de marcador, por ejemplo un péptido que facilita la purificación.

35 Los polinucleótidos de lipasa pueden estar en la forma de ARN, tal como ARNm, o en la forma de ADN, incluidos ADNc y ADN genómico obtenidos por clonación o producidos por técnicas sintéticas químicas o por una combinación de las mismas. El ácido nucleico, en especial el ADN, puede ser de doble hebra o de hebra única. El ácido nucleico puede ser la hebra codificante (hebra sentido) o la hebra no codificante (hebra antisentido u opuesta).

40 El ácido nucleico de la lipasa puede comprender la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID N°: 2, que corresponde al ADNc canino. En una forma de realización, el ácido nucleico de la lipasa comprende sólo la región codificadora.

45 La solicitud divulga además variantes de polinucleótidos de lipasa y sus fragmentos, que difieren de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID N°: 2 por redundancia del código genético y por consiguiente codifican la misma proteína que la codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID N°: 2.

50 La solicitud también divulga moléculas de ácido nucleico de lipasa que codifican los polipéptidos variantes descritos en este documento. Tales nucleótidos pueden presentarse en la naturaleza, tales como variantes alélicas (mismo locus), homólogos (diferente locus) o pueden construirse por medio de procedimientos de ADN recombinante o por síntesis química. Tales variantes que no se presentan en la naturaleza pueden producirse por medio de técnicas de mutagénesis, incluidas las aplicadas a polinucleótidos, células u organismos. Por consiguiente, como se analizó anteriormente, las variantes pueden contener sustituciones, deleciones, inversiones e inserciones de nucleótidos.

55 Típicamente, las variantes tienen una similitud sustancial con una molécula de ácido nucleico de SEC. ID N°: 2 y sus complementos. Puede presentarse variación en cualquiera o ambas regiones, codificadora y no codificadora. Las variaciones pueden producir sustituciones de aminoácidos tanto conservadoras como no conservadoras. Pueden identificarse homólogos y variantes alélicas usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Estas variantes compren-

ES 2 323 142 T3

den una secuencia de nucleótidos que codifica una lipasa que tiene al menos aproximadamente 60-65%, 65-70%, típicamente al menos aproximadamente 70-75%, más típicamente al menos aproximadamente 80-85%, y más típicamente al menos aproximadamente 90-95% o más homología con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID N°: 2. Tales moléculas de ácido nucleico pueden identificarse fácilmente por ser capaces de hibridar bajo condiciones rigurosas, a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID N°: 2 o a un fragmento de la secuencia. Se entiende que la hibridación rigurosa no indica homología sustancial donde es por homología general, tal como las secuencias de poli A, o secuencias comunes a todas o a la mayoría de las proteínas o todas la enzimas lipasas. Además, se entiende que las variantes no incluyen ninguna de las secuencias de ácido nucleico que puedan haberse divulgado antes de la invención.

Según se usa en este documento, el término “hibrida bajo condiciones rigurosas” pretende describir las condiciones para hibridación y lavado bajo las que las secuencias de nucleótidos, que codifican un polipéptido con al menos aproximadamente 60-65% de homología una con la otra, permanecen típicamente hibridadas una a la otra. Las condiciones pueden ser tales que las secuencias con similitud una a la otra de al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o más permanezcan hibridadas una a la otra. Tales condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la técnica y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguida por uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1% a 50-65°C. En otro ejemplo no limitante, se deja hibridar las moléculas de ácido nucleico en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguida por uno o más lavados de baja rigurosidad en 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a temperatura ambiente, o por uno o más lavados de baja rigurosidad en 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a 42°C, lavado en 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a 65°C para rigurosidad alta. En una forma de realización, una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida bajo condiciones rigurosas a la secuencia de SEC. ID N°: 2 corresponde a una molécula de ácido nucleico que se presenta en la naturaleza. Según se usa en este documento, una molécula de ácido nucleico “que se presenta en la naturaleza” se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se presenta en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

Como entienden los expertos en la técnica, las condiciones exactas pueden determinarse de manera empírica y dependen de la fuerza iónica, la temperatura y la concentración de los agentes desestabilizantes tales como la formamida o de los agentes desnaturalizantes tales como el SDS. Otros factores considerados para determinar las condiciones e hibridación deseadas incluyen la longitud de las secuencias de ácido nucleico, la composición de bases, el porcentaje de acoplamiento erróneo entre las secuencias a hibridar y la frecuencia de presentación de subseries de las secuencias dentro de otras secuencias no idénticas. Por consiguiente, pueden determinarse condiciones equivalentes variando uno o más de estos parámetros y manteniendo un grado similar de identidad o similitud entre las dos moléculas de ácido nucleico.

La presente solicitud también divulga ácidos nucleicos aislados que contienen un fragmento o porción de hebra única o doble que hibrida bajo condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de SEC. ID N°: 2 o al complemento de SEC. ID N°: 2. En un aspecto, el ácido nucleico está constituido por una porción de la secuencia de nucleótidos de SEC. ID N°: 2 o el complemento de SEC. ID N°: 2.

Se entiende que los fragmentos aislados incluyen cualquier secuencia contigua no divulgada antes de la invención así como las secuencias que son sustancialmente las mismas y que están divulgadas. Por consiguiente, si un fragmento se ha divulgado antes de la presente invención, esta solicitud no pretende incluir ese fragmento. Cuando una secuencia no se ha divulgado antes de la presente invención, un fragmento de ácido nucleico aislado tiene al menos aproximadamente 6, de preferencia al menos aproximadamente 10, 13, 18, 20, 23 o 25 nucleótidos, y puede tener 30, 40, 50, 100, 200, 500 o más nucleótidos de longitud. Los fragmentos más largos, por ejemplo, con una longitud de 30 o más nucleótidos, que codifican proteínas o polipéptidos antigénicos descritos en este documento son útiles.

Además, la invención proporciona polinucleótidos que comprenden un fragmento de los polinucleótidos de lipasa de longitud total. El fragmento puede ser de hebra única o doble y puede comprender ADN o ARN. El fragmento puede derivar tanto de la secuencia codificadora como de la no codificadora.

En otra forma de realización, un ácido nucleico de lipasa aislado codifica la región codificadora completa. Otros fragmentos incluyen secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos de aminoácidos mostrados en la Fig. 4.

Por consiguiente, los fragmentos de ácido nucleico de lipasa incluyen además secuencias que corresponden a los dominios descritos en este documento, a las subregiones también descritas, y a sitios funcionales específicos. Los fragmentos de ácido nucleico de lipasa también incluyen combinaciones de los dominios, segmentos, y otros sitios funcionales descritos anteriormente. Un experto en la técnica será consciente de las muchas permutaciones posibles.

Donde la localización de los dominios o sitios se ha predicho por medio de análisis computarizados, un experto apreciará que los residuos de aminoácidos que constituyen estos dominios pueden variar según los criterios usados para definir los dominios. Sin embargo, se entiende que un fragmento de lipasa incluye cualquier secuencia de ácido nucleico que no incluye el gen completo. La solicitud también divulga fragmentos de ácido nucleico de lipasa que codifican regiones que llevan epítopos de las proteínas de lipasa descritas en este documento. No debe considerarse que los fragmentos de ácido nucleico, según la presente solicitud, abarquen los fragmentos que puedan haberse divulgado antes de la invención.

ES 2 323 142 T3

Los fragmentos de ácido nucleico de la solicitud proporcionan sondas o cebadores en ensayos tales como los que se describen a continuación. Las “sondas” son oligonucleótidos que hibridan de una manera específica de bases a una hebra de ácido nucleico complementaria. Tales sondas incluyen ácidos nucleicos de polipéptidos, como se describe en Nielsen y col. (1991) Science 254:1497-1500. Típicamente, una sonda comprende una región de secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones altamente rigurosas con al menos aproximadamente 15, típicamente aproximadamente 20-25, y más típicamente aproximadamente 40, 50 ó 75 nucleótidos consecutivos de la secuencia del ácido nucleico mostrada en SEC. ID N°: 2 y los complementos de la misma. Más típicamente, la sonda comprende además una etiqueta, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor de enzima.

Según se usa en este documento, el término “cebador” se refiere a un oligonucleótido de hebra única que actúa como un punto de iniciación de la síntesis de ADN dirigida por un molde usando procedimientos bien conocidos (por ejemplo, PCR, LCR) incluidos, pero no limitados a los que se describen en este documento. La longitud adecuada del cebador depende del uso particular, pero varía típicamente desde aproximadamente 15 hasta 30 nucleótidos. El término “sitio del cebador” se refiere al área del ADN diana al que se hibrida el cebador. El término “par de cebadores” se refiere a una serie de cebadores incluidos un cebador 5’ (secuencia arriba) que hibrida con el extremo 5’ de la secuencia del ácido nucleico a amplificar y un cebador 3’ (secuencia abajo) que hibrida con el complemento de la secuencia a amplificar.

Donde se usan polinucleótidos para evaluar propiedades o funciones de lipasas, tal como en los ensayos descritos en este documento, puede ser útil el total o menos que el total del ADNc completo. Los ensayos dirigidos específicamente a las funciones de lipasa, tal como evaluar la actividad agonista o antagonista, abarcan el uso de fragmentos conocidos. Además, pueden practicarse procedimientos de diagnóstico para evaluar la función de lipasa con cualquier fragmento, incluidos los fragmentos que puedan haberse conocido antes de la invención. De manera similar, en los procedimientos que implican tratamiento de disfunción de la lipasa, están abarcados todos los fragmentos, incluidos aquellos que pudieran haber sido conocidos en la técnica.

Los polinucleótidos de lipasa son útiles como sonda de hibridación para ADNc y ADN genómico para aislar un ADNc de longitud total y clones genómicos que codifican el polipéptido descrito en SEC. ID N°: 3 y para aislar ADNc y clones genómicos que corresponden a variantes que producen el mismo polipéptido mostrado en SEC. ID N°: 3 o las otras variantes descritas en este documento. Las variantes pueden aislarse del mismo tejido y organismo del que se aisló el polipéptido mostrado en SEC. ID N°: 3, de diferentes tejidos del mismo organismo, o de diferentes organismos. El procedimiento es útil para aislar genes y ADNc que están controlados por medio del desarrollo y por consiguiente pueden expresarse en el mismo tejido o en tejidos diferentes en puntos diferentes en el desarrollo de un organismo.

La sonda puede corresponder a cualquier secuencia a lo largo de la longitud total del gen que codifica la lipasa. Por consiguiente, podría derivar de regiones 5’ no codificadoras, de la región codificadora, y de regiones 3’ no codificadoras. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, el ADNc de longitud total de SEC. ID N°: 2 o uno de sus fragmentos que sea suficiente para hibridar específicamente bajo condiciones rigurosas al ARNm o ADN.

Los polinucleótidos de lipasa también son útiles para construir vectores recombinantes. Tales vectores incluyen vectores de expresión que expresan una porción, o todos, los polipéptidos de la lipasa. Los vectores también incluyen vectores de inserción, usados para integrar dentro de otra secuencia de polinucleótidos tal como dentro del genoma celular, para alterar la expresión *in situ* de los genes de la lipasa y los productos genéticos. Por ejemplo, puede reemplazarse una secuencia que codifica una lipasa endógena por medio de recombinación homóloga con toda o parte de la región codificadora que contiene una o más mutaciones introducidas específicamente. Los polinucleótidos de lipasa son también útiles para expresar porciones antigénicas de las proteínas de lipasa. Los polinucleótidos de lipasa son también útiles para producir vectores que expresan parte, o todos los polipéptidos de lipasa. Los polinucleótidos de lipasa son también útiles como sondas de hibridación para determinar el nivel de expresión del ácido nucleico de lipasa. Por consiguiente, las sondas pueden usarse para detectar la presencia, o para determinar niveles, del ácido nucleico de lipasa en células, tejidos y en organismos. El ácido nucleico cuyo nivel se determina puede ser ADN o ARN. Por consiguiente, las sondas que corresponden a los polipéptidos descritos en este documento pueden usarse para evaluar el número de copias de genes en una célula, tejido u organismo dado. Esto es particularmente importante en casos en los que ha habido una amplificación de los genes de lipasa.

Vectores/Células huésped

En este documento también se divulgan vectores que contienen los polinucleótidos de lipasa. El término “vector” se refiere a un vehículo, de preferencia una molécula de ácido nucleico que puede transportar los polinucleótidos de lipasa. Cuando el vector es una molécula de ácido nucleico, los polinucleótidos de lipasa se unen covalentemente al ácido nucleico del vector. Con este aspecto de la invención, el vector incluye un plásmido, un fago de hebra única o doble, un vector viral de ARN o ADN de hebra única o doble, o un cromosoma artificial, tal como BAC, PAC, YAC o MAC.

Un vector puede mantenerse en la célula huésped como un elemento extracromosómico donde se replica y produce copias adicionales de los polinucleótidos de lipasa. Como alternativa, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped y producir copias adicionales de los polinucleótidos de lipasa cuando la célula huésped se replica.

ES 2 323 142 T3

En este documento se divulgan vectores para el mantenimiento (vectores de clonación) o vectores para la expresión (vectores de expresión) de los polinucleótidos de lipasa. Los vectores pueden funcionar en células procariotas o eucariotas o en ambas (vectores lanzadera).

5 Los vectores de expresión contienen regiones reguladoras que actúan en cis que están unidas de manera operativa en el vector a los polinucleótidos de lipasa para permitir la transcripción de los polinucleótidos en una célula huésped. Los polinucleótidos pueden introducirse en una célula huésped con un polinucleótido separado capaz de afectar la transcripción. Por consiguiente, el segundo polinucleótido puede proporcionar un factor que actúa en trans que interactúa con la región de control regulador en cis para permitir la transcripción de los polinucleótidos de lipasa del vector. Como alternativa, puede suministrarse un factor que actúa en trans por la célula huésped. Finalmente, puede producirse un factor que actúa en trans a partir del vector mismo.

10 Se entiende, sin embargo, que en algunos aspectos la transcripción y/o traducción de los polinucleótidos de lipasa pueden tener lugar en un sistema libre de células.

15 La secuencia reguladora a la que pueden unirse de manera operativa los polinucleótidos descritos en este documento incluye promotores para dirigir la transcripción del ARNm. Estos incluyen, pero no se limitan a, el promotor izquierdo del bacteriófago lambda, los promotores lac, TRP, y TAC de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor inmediato temprano de CMV, los promotores temprano y tardío del adenovirus, y las repeticiones terminales largas del retrovirus.

20 Además de las regiones de control que promueven la transcripción, los vectores de expresión pueden incluir también regiones que modulan la transcripción, tales como sitios de unión de represores y potenciadores. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40, el potenciador inmediato temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, potenciadores de adenovirus, y potenciadores del retrovirus LTR.

25 Además de contener sitios para la iniciación y el control de la transcripción, los vectores de expresión pueden contener también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y, en la región transcrita un sitio de unión de ribosomas para la traducción. Otros elementos de control reguladores para la expresión incluyen codones de iniciación y terminación así como señales de poliadenilación. La persona experta en la técnica será consciente de las numerosas secuencias reguladoras que son útiles en los vectores de expresión. Tales secuencias reguladoras están descritas, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2º ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

30 Puede usarse una diversidad de vectores de expresión para expresar un polinucleótido de lipasa. Tales vectores incluyen vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de episomas de levaduras, de elementos cromosómicos de levaduras, incluidos cromosomas artificiales de levadura, de virus tales como baculovirus, papovavirus tales como SV40, virus Vaccinia, adenovirus, poxvirus, virus pseudorabies y retrovirus. Los vectores pueden también derivar de combinaciones de estas fuentes tales como los derivados de plásmidos y elementos genéticos de bacteriófagos, por ejemplo cósmidos y fagémidos. Los vectores de expresión y clonación adecuados para huéspedes procariotas y eucariotas están descritos en Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2º ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

35 La secuencia reguladora puede proporcionar expresión constitutiva en una o más células huésped (es decir específico de tejido) o puede proporcionar expresión inducible en uno o más tipos celulares por temperatura, aditivo nutricional, o factores exógenos tales como una hormona u otro ligando. Los expertos en la técnica conocen bien una diversidad de vectores que proporcionan expresión constitutiva e inducible en huéspedes procariotas y eucariotas.

40 Los polinucleótidos de lipasa pueden insertarse en el ácido nucleico del vector por medio de procedimientos bien conocidos. Por lo general, la secuencia de ADN que se expresará finalmente se une a un vector de expresión escindiendo la secuencia de ADN y el vector de expresión con una o más enzimas de restricción y a continuación uniendo los fragmentos juntos. Los procedimientos para digestión con enzimas de restricción y unión son bien conocidos por los expertos en la técnica.

45 El vector que contiene el polinucleótido adecuado puede introducirse en una célula huésped adecuada para usar técnicas bien conocidas de propagación o expresión. Las células bacterianas incluyen, pero no se limitan a, *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*. Las células eucariotas incluyen, pero no se limitan a, levaduras, células de insecto tales como *Drosophila*, células de animales tales como células COS y CHO, y células de plantas.

50 Según se describe en este documento, puede ser deseable expresar el polipéptido como una proteína de fusión. Por consiguiente, en este documento se divulgan vectores de fusión que permiten la producción de los polipéptidos de lipasa. Los vectores de fusión pueden aumentar la expresión de una proteína recombinante, aumentar la solubilidad de la proteína recombinante, y ayudar en la purificación de la proteína al actuar por ejemplo como un ligando para la purificación por afinidad. Puede introducirse un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión para que el polipéptido deseado pueda separarse finalmente del resto de fusión. Las enzimas proteolíticas incluyen, pero no se limitan a, factor Xa, trombina, y enterocinas. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Smith y col. (1988) *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que

ES 2 323 142 T3

fusionan glutationa S-transferasa (GST), proteína E de unión de maltosa, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana. Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* inducibles no de fusión adecuados incluyen pTrc (Amann y col. (1988) Gene 69: 301-315) y pET 11d (Studier y col. (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185: 60-89).

5 La expresión de proteínas recombinantes puede aumentarse al máximo en una bacteria huésped proporcionando una base genética en la que la célula huésped tenga una capacidad disminuida para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. (Gottesman, S: (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. 119-128). Como alternativa, la secuencia del polinucleótido de interés puede alterarse para
10 proporcionar el uso de preferencia de codones para una célula huésped específica, por ejemplo, *E. coli*. (Wada y col. (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118).

Los polinucleótidos de lipasa también pueden expresarse por medio de vectores de expresión que son operativos en levaduras. Los ejemplos de vectores para expresión en levaduras por ejemplo, *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1
15 (Baldari y col. (1987) EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kujan y col. (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz y col. (1987) Gene 54: 113-123), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.).

Los polinucleótidos de lipasa pueden también expresarse en células de insecto usando, por ejemplo vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto
20 cultivadas (por ejemplo, células Sf9 y Sf21) incluyen la serie pAc (Smith y col. (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y col. (1989) Virology 170: 31-39).

En cierto aspecto, los polinucleótidos descritos en este documento se expresan en células de mamífero usando vectores de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, B.
25 (1987) Nature 329: 840), pMT2PC (Kauffman y col. (1987) EMBO J. 6: 187-195).

Los vectores de expresión presentados en este documento se proporcionan solo a manera de ejemplo de los vectores bien conocidos disponibles por los expertos en la técnica que serán útiles para expresar los polinucleótidos de lipasa. El experto en la técnica será consciente de otros vectores adecuados para mantenimiento, propagación o expresión de los
30 polinucleótidos descritos en este documento. Estos se encuentran por ejemplo en Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2º, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

En este documento se divulgan vectores en los que las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento se clonan en el vector en orientación inversa, pero unidas de manera operativa a una secuencia reguladora que permite
35 la transcripción del ARN antisentido. Por consiguiente, puede producirse un transcrito antisentido para toda, o para una porción, de las secuencias de polinucleótidos descritas en este documento, incluidas las regiones codificadora y no codificadora. La expresión de este ARN antisentido está sometida a cada uno de los parámetros descritos anteriormente con relación a la expresión del ARN sentido (secuencias reguladoras, expresión constitutiva o inducible, expresión
40 específica de tejido).

En este documento también se divulgan células huésped recombinantes que contienen los vectores descritos en este documento. Las células huésped incluyen por consiguiente células procariotas, células eucariotas inferiores tales como levaduras, otras células eucariotas tales como células de insecto, y células eucariotas superiores, tales como
45 células de mamífero.

Las células huésped recombinantes se preparan introduciendo las construcciones del vector descritas en este documento en las células por medio de técnicas fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Éstas incluyen pero no se limitan a, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada
50 por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, lipofección y otras técnicas tales como las que se encuentran en Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2º, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory = Press Cold Spring Harbor, N.Y.).

Las células huésped pueden contener más de un vector. Por consiguiente, pueden introducirse diferentes secuencias de nucleótidos en diferentes vectores de la misma célula. De manera similar, pueden introducirse los polinucleótidos de lipasa solos o con otros polinucleótidos que no están relacionados con los polinucleótidos de lipasa tales como los
55 que proporcionan factores que actúan en trans para los vectores de expresión. Cuando se introduce más de un vector en una célula, los vectores pueden introducirse independientemente, pueden introducirse conjuntamente o pueden unirse al vector de polinucleótidos de lipasa.

En el caso de bacteriófagos y vectores virales, estos pueden introducirse en las células como virus empaquetados o encapsulados por procedimientos convencionales para infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes para replicación o defectuosos para replicación. En el caso en que la replicación viral es defectuosa, la replicación tendrá lugar en células huésped que proporcionen funciones que complementen los defectos.
65

Los vectores incluyen generalmente marcadores seleccionables que permiten la selección de la subpoblación de células que contienen las construcciones del vector recombinante. El marcador puede estar contenido en el mismo vec-

tor que contiene los polinucleótidos descritos en este documento o puede estar en un vector separado. Los marcadores incluyen genes de resistencia a la tetraciclina o a la ampicilina para células huésped procariontas y genes de dihidrofolato reductasa o resistencia a la neomicina para las células huésped eucariotas. Sin embargo, será eficaz cualquier marcador que proporcione la selección para una característica fenotípica.

Mientras que las proteínas maduras pueden producirse en bacterias, levaduras, células de mamíferos y otras células bajo el control de las secuencias reguladoras adecuadas, también pueden usarse sistemas de transcripción y traducción libres de células para producir estas proteínas usando ARN derivado de las construcciones de ADN descritas en este documento.

Donde se desea la secreción del polipéptido, se incorporan en el vector señales de secreción adecuadas. La secuencia señal puede ser endógena a los polipéptidos de lipasa o heteróloga a estos polipéptidos.

Donde el polipéptido no se secreta en el medio, la proteína puede aislarse de la célula huésped por medio de procedimientos convencionales de alteración irreversible, incluidos descongelación, sonicación, alteración mecánica, uso de agentes lisantes y similares. Posteriormente puede recuperarse y purificarse el polipéptido por medio de procedimientos de purificación bien conocidos incluidos la precipitación con sulfato de amonio, la extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxiapatita, cromatografía en lectina o cromatografía líquida de alto rendimiento.

Se entiende también que dependiendo de la célula huésped en la producción recombinante de los polipéptidos descritos en este documento, los polipéptidos pueden tener diversos patrones de glicosilación, dependiendo de la célula, o pueden no estar glicosilados como cuando se producen en bacterias. Además, los polipéptidos pueden incluir una metionina modificada inicial en algunos casos como resultado de un proceso mediado por el huésped.

Se entiende que “células huésped” y “células huésped recombinantes” se refieren no solo a la célula sujeto particular sino también a la progenie o potencial progenie de tal célula. Como pueden presentarse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas por mutación o por influencias medioambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula original, pero aún se incluyen dentro del alcance del término como se usa en este documento.

Las características antigénicas y enzimáticas ejemplares de cPLP1 que se exhiben por medio de tales polipéptidos incluyen la actividad lipasa, la capacidad para unirse con moléculas con las que cPLP1 es capaz de unirse, y la capacidad para inducir la producción de sustancias anticuerpo que se unen específicamente con un epítipo que se presenta en o cerca de la superficie de la proteína cPLP1. Los polipéptidos divulgados en este documento, o porciones biológicamente activas de los mismos, pueden unirse de manera operativa con una secuencia de aminoácidos heteróloga para formar proteínas de fusión. Además, pueden incorporarse uno o más polipéptido o porciones biológicamente activas de los mismos en composiciones farmacéuticas, que pueden incluir opcionalmente vehículos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones farmacéuticas pueden usarse para tratar o prevenir uno o más de los trastornos identificados en este documento. También se divulgan sustancias anticuerpo que se unen específicamente con un polipéptido descrito en este documento incluidas, por ejemplo, la proteína cPLP1 y fragmentos de la misma. Las sustancias anticuerpo ejemplares son anticuerpos monoclonales y policlonales, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos libres y unidos a la superficie celular, y receptores de células T. Estas sustancias anticuerpo pueden producirse, por ejemplo, proporcionando el polipéptido de la invención a un vertebrado inmunocompetente y a continuación recogiendo sangre o suero del vertebrado. Las sustancias anticuerpo pueden, como alternativa, generarse seleccionando una biblioteca de fagos para identificar partículas de fagos que exhiben una subunidad que se une con cPLP1 o uno de sus epítipos.

En este documento también se divulgan procedimientos para detectar la actividad o expresión de un polipéptido divulgado en este documento en una muestra biológica poniendo en contacto la muestra biológica con un agente capaz de detectar tal actividad (por ejemplo, un sustrato marcado u otro compuesto puede detectarse tras reaccionar con un polipéptido activo divulgado en este documento), con un agente que se une específicamente con un polipéptido divulgado en este documento (por ejemplo, una sustancia anticuerpo de la invención), o con un agente para detectar la producción de un ARN que codifica un polipéptido divulgado en este documento (por ejemplo, un cebador de transcriptasa inversa complementario a una porción de un ARNm que codifica el polipéptido).

Detección de Lipasa Pancreática Canina

En un aspecto, la invención está dirigida a un procedimiento inmunológico para detectar la presencia de una cantidad de lipasa pancreática canina en una muestra biológica. La invención proporciona un procedimiento, un dispositivo y un kit que usa uno o más anticuerpos monoclonales de lipasa canina de la invención. En otro aspecto, el procedimiento incluye calibradores y patrones que comprenden uno o más polipéptidos de lipasa pancreática canina.

“Especificidad de unión” o “unión específica” se refiere al reconocimiento sustancial de una primera molécula para una segunda molécula, por ejemplo un polipéptido y un anticuerpo policlonal o monoclonal, o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmente FV, FV de cadena única, Fab’, o F(ab’)2) específico para el polipéptido.

Un “par de unión específico” es una serie de dos moléculas diferentes, donde una molécula tiene un área en su superficie o en una cavidad que se une específicamente a, y por consiguiente es complementaria a, un área en la otra molécula. “Pareja de unión específica” se refiere a una de estas dos moléculas de unión complementarias. “Par de unión específico” puede referirse a un ligando y a un receptor, por ejemplo. En otro ejemplo, el par de unión específico puede referirse a un par inmunológico, por ejemplo un antígeno y un anticuerpo.

“Unión sustancial” o “unido sustancialmente” se refieren a una cantidad de unión o reconocimiento específico entre moléculas en una mezcla de ensayo bajo condiciones de ensayo particulares. En su aspecto más amplio, unión sustancial se refiere a la diferencia entre la incapacidad de una primera molécula para unirse o reconocer una segunda molécula, y la capacidad de las primeras moléculas para unirse o reconocer una tercer molécula, de manera que la diferencia sea suficiente para permitir que se lleve a cabo un ensayo significativo que distinga la unión específica bajo una serie de condiciones de ensayo particulares, que incluye las concentraciones relativas de las moléculas y el tiempo y temperatura de una incubación. En otro aspecto, una molécula es sustancialmente incapaz de unirse o reconocer otra molécula en un sentido de reactividad cruzada donde la primera molécula exhibe una reactividad para una segunda molécula que es inferior al 25%, de preferencia inferior al 10%, de más preferencia inferior al 5% de la reactividad exhibida hacia una tercer molécula bajo una serie de condiciones de ensayo particulares, que incluyen la concentración relativa y la incubación de las moléculas. La unión específica puede probarse usando una serie de procedimientos muy conocidos, por ejemplo, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de transferencia Western.

Una “muestra biológica” se refiere a una muestra de un sujeto animal incluidos sangre entera, suero, plasma, tejido, líquido abdominal (ascitis), orina u otra muestra conocida o que se sospecha que contiene lipasa pancreática canina.

Un “marcador” es cualquier molécula que se une (a través de medios covalentes o no covalentes, sola o encapsulada) a otra molécula o soporte sólido y que se elige por características específicas que permiten la detección de la molécula marcada. Por lo general, los marcadores comprenden, pero no se limitan a, los siguientes tipos: metal particulado y derivados de metales, radioisótopos, reactivos catalíticos o basados en enzimas, sustratos cromogénicos y cromóforos, moléculas fluorescentes y quimioluminiscentes, y fósforos. La utilización de un marcador produce una señal que puede detectarse por medios tales como la detección de radiación electromagnética o la visualización directa, y que opcionalmente pueden medirse.

El marcador usado en la presente invención puede ser, pero no se limita a: fosfatasa alcalina; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (“G6PDH”); peroxidasa del rábano picante (HRP); agentes quimioluminiscentes tales como isoluminol, fluorescentes tales como compuestos de fluoresceína y rodamina; ribozimas; y colorantes.

El marcador puede producir una señal directamente, y por consiguiente no son necesarios otros componentes para producir una señal. Como alternativa, un marcador puede necesitar otros componentes, tales como sustratos o coenzimas, para producir una señal. La adaptabilidad y el uso de tales marcadores útiles para producir una señal se analizan en la Patente de EEUU N° 6.489.309 y en la Patente de EEUU N° 5.185.243. Por ejemplo, un marcador puede conjugarse a la pareja de unión específica de un modo no covalente. Como alternativa, el marcador puede conjugarse a la pareja de unión específica de manera covalente. La Patente de EEUU N° 3.817.837 y la Patente de EEUU N° 3.996.345 describen en detalle ejemplos de diversas maneras en que un marcador puede conjugarse de manera no covalente o covalente a la pareja de unión específica.

Fase sólida significa un material insoluble en agua poroso o no poroso. Tales materiales incluyen un soporte o una superficie tal como la pared de un recipiente de reacción. El soporte puede ser hidrófilo o capaz de volverse hidrófilo e incluye polvos inorgánicos tales como sílice, sulfato de magnesio y alúmina; materiales poliméricos naturales, en particular materiales celulósicos y materiales derivados de la celulosa, tales como papeles que contienen fibras, por ejemplo papel de filtro, papel cromatográfico, etc.; polímeros sintéticos o que se presentan en la naturaleza modificados, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli (cloruro de vinilo), poli(acrilamida), dextrano reticulado, agarosa, poli(acrilato), polietileno, plipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), etc.; usados por sí mismos o en combinación con otros materiales; vidrio disponible como Bioglass, cerámicas, metales, y similares. También pueden usarse organizaciones naturales o sintéticas tales como liposomas, vesículas de fosfolípidos y células.

La unión de miembros sbp a un soporte o superficie puede realizarse por medio de técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la bibliografía. Véase, por ejemplo, “Immobilized Enzymes,” Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245: 3059 (1970). La superficie puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como una tira, varilla, incluidas perlas y similares. En un aspecto, los polipéptidos de la invención incluyen un residuo cisteína N terminal para ayudar en la unión de los polipéptidos a la fase sólida.

El procedimiento de la invención puede optimizarse de muchas maneras y un experto en la técnica podrá ajustar simultáneamente las diluciones de las muestras, las concentraciones de los reactivos, las temperaturas y tiempos de incubación usados en el procedimiento para llevar a cabo la detección de la lipasa pancreática canina.

Para ser útiles en los procedimientos de detección de la presente invención, los polipéptidos se obtienen en una forma sustancialmente pura, típicamente desde aproximadamente 50% p/p o más pureza, sustancialmente libres de proteínas de interferencia y contaminantes. De preferencia, los polipéptidos se aíslan o sintetizan en una pureza de

ES 2 323 142 T3

al menos 80% p/p, y de más preferencia, en al menos aproximadamente 95% p/p de pureza. Usando técnicas convencionales de purificación de proteínas pueden obtenerse composiciones de polipéptidos homogéneas de al menos aproximadamente 99% p/p de pureza. Por ejemplo, las proteínas pueden purificarse por medio del uso de anticuerpos que se describen a continuación en este documento usando columnas de afinidad por inmunoabsorción que se describen a continuación en este documento.

El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo usando técnicas de inmunoensayo bien conocidas por los expertos en la técnica, incluidas, pero no limitadas a, el uso de microplacas y dispositivos de flujo lateral. En una forma de realización, se inmoviliza un anticuerpo específico para la proteína de la lipasa pancreática canina en un soporte sólido en una localización discreta. Tras la adición de la muestra, puede realizarse la detección de complejos proteína-anticuerpo en el soporte sólido por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la Patente de EEUU N° 5.726.010 describe un ejemplo de dispositivo de flujo lateral, el dispositivo de inmunoensayo SNAP® (IDEXX Laboratories), útil en la presente invención. En otro aspecto, el soporte sólido es un pocillo de una placa de microvaloración.

La inmovilización de uno o más reactivos de captura de analitos, por ejemplo, anticuerpos para la lipasa pancreática canina, sobre un dispositivo o soporte sólido se realiza de manera que el reactivo de captura del analito no se eliminará por la muestra, el diluyente y/o procedimientos de lavado. Pueden unirse uno o más reactivos de captura de analitos a una superficie por medio de adsorción física (es decir, sin el uso de conectores químicos) o por unión química (es decir, con el uso de conectores químicos). La unión química puede generar una unión más fuerte de las sustancias de unión específica en una superficie y puede proporcionar orientación y conformación definidas de las moléculas unidas a la superficie.

En otro aspecto, la invención incluye uno o más reactivos de unión específica marcados que pueden mezclarse con una muestra de prueba antes de la aplicación a un dispositivo de la invención. En este caso no es necesario tener reactivos de unión específica marcados depositados y secados en una almohadilla de reactivos de unión específica en el dispositivo. Un reactivo de unión específica marcado, añadido a una muestra de prueba o depositado previamente en el dispositivo, puede ser por ejemplo, un anticuerpo monoclonal para lipasa pancreática canina marcado.

Cuando el reactivo de captura de analitos y el reactivo de unión específica marcado son anticuerpos que se unen específicamente a la lipasa pancreática canina, los anticuerpos pueden ser iguales o diferentes. En un aspecto, los anticuerpos se eligen de los anticuerpos 4G11 y 7E11.

El procedimiento de detección puede incluir el uso de un patrón tal como un polipéptido de lipasa pancreática canina recombinante. El patrón puede mezclarse con el anticuerpo o anticuerpos monoclonales de la misma manera que la muestra. La cantidad de unión entre el anticuerpo o los anticuerpos monoclonales y el patrón puede compararse con la cantidad de unión de los anticuerpos a la proteína en la muestra. Por consiguiente, como se conoce la cantidad de lipasa pancreática canina en el patrón, puede determinarse la cantidad de proteína en la muestra.

Cualquiera o todas las formas de realización anteriores pueden proporcionarse como un kit. En un ejemplo particular, tal kit incluirá un dispositivo completo con reactivos de unión específica (por ejemplo, un reactivo de unión específica marcado no inmovilizado y un reactivo de captura de analitos inmovilizado) y reactivo de lavado, así como un reactivo detector y reactivos de control positivo y negativo, si se desea o es adecuado. Además, pueden incluirse otros aditivos, tales como estabilizadores, tampones y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse, para proporcionar concentraciones de los reactivos en disolución que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, usualmente liofilizados, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo con las concentraciones adecuadas para combinar con la muestra.

El dispositivo puede también incluir un reactivo líquido que transporte el material no unido (por ejemplo, muestra líquida sin reaccionar y reactivos de unión específica no unidos) fuera de la zona de reacción (fase sólida). Un reactivo líquido puede ser un reactivo de lavado y puede servir solamente para eliminar el material no unido de la zona de reacción, o puede incluir un reactivo detector y servir tanto para eliminar el material no unido como para facilitar la detección del analito. Por ejemplo, en el caso de un reactivo de unión específica conjugado a una enzima, el reactivo detector incluye un sustrato que produce una señal detectable tras la reacción con el conjugado enzima-anticuerpo en la zona reactiva. En el caso de un reactivo de unión específica marcado conjugado a una molécula radiactiva, fluorescente, o a una molécula que absorbe luz, el reactivo detector actúa simplemente como una disolución de lavado que facilita la detección de la formación del complejo en la zona reactiva eliminando el reactivo marcado no unido.

En un dispositivo pueden estar presentes dos o más reactivo líquidos, por ejemplo, un dispositivo puede comprender un reactivo líquido que actúe como un reactivo de lavado y un reactivo líquido que actúe como reactivo detector y facilite la detección del analito.

Un reactivo líquido puede incluir además una cantidad limitada de un “inhibidor”, es decir, una sustancia que bloquea el desarrollo del producto final detectable. Una cantidad limitada es una cantidad de inhibidor suficiente para bloquear el desarrollo del producto final hasta la mayor parte o todo el exceso, el material no unido se transporta fuera de la segunda región, momento en el que se produce el producto final detectable.

En otro aspecto, la invención está dirigida a un kit para detectar la lipasa pancreática canina. Por ejemplo el kit puede incluir el dispositivo descrito anteriormente, junto con los anticuerpos de la invención. Uno o más de los péptidos descritos en la invención pueden incluirse como un calibrador y control. Tal kit puede suministrarse para detectar una proteína o epítipo único o puede configurarse para detectar una multiplicidad de epítipos, tal como en una matriz de detección de anticuerpos. En un aspecto, el kit incluye una fase sólida, tal como una placa de microvaloración o un dispositivo de flujo lateral, teniendo un anticuerpo inmovilizado específico para la lipasa pancreática canina, un reactivo que comprende un segundo anticuerpo marcado específico para la lipasa pancreática canina, y los reactivos para uso en la detección del marcador. El kit también incluye el embalaje y las instrucciones adecuadas.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los siguientes Ejemplos. Los siguientes se proporcionan sólo con objeto de ejemplificación y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Clonación y caracterización del gen de la lipasa pancreática canina (cPLI) a partir de tejido pancreático

Basándose en la secuencia de aminoácidos N terminal de la lipasa pancreática canina publicada (Steiner y Williams, Biochimie 2002) (SEC. ID N° 1) y las similitudes de secuencia entre las lipasas pancreáticas de otras especies, se diseñó una serie de cebadores redundantes y se usaron para amplificación 3' RACE y PCR anidada (Figura 1). Estos cebadores estaban dirigidos a regiones específicas de las secuencias de aminoácidos de la lipasa pancreática que la diferencias de otros miembros de la familia de lipasas pancreáticas, a saber las proteínas relacionadas de la lipasa pancreática. Se purificó el ARN total del páncreas canino usando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen) y a continuación se realizó la transcripción inversa a ADNc usando un kit comercialmente disponible (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit, Clontech). La reacción 3' RACE y la PCR anidada resultaron satisfactorias para obtener un segmento de 1,4 kb del gen de la lipasa pancreática canina que se extendía hasta el codón de terminación adecuado. Para completar la secuencia del gen, se generó ADNc para 5' RACE y se diseñaron cebadores específicos dentro del gen canino para la reacción de amplificación RACE como se muestra en la Fig. 1. Esta amplificación fue satisfactoria para obtener el extremo 5' completo del gen. La secuencia completa del gen (ADNc, SEC. ID N°: 2) y la secuencia de aminoácido traducida (SEC. ID N° 3) se muestran en las Figuras 2 y 3.

Ejemplo 2

Expresión de la lipasa pancreática canina

El gen de la lipasa pancreática canina se amplificó por PCR a partir de ADNc pancreático canino usando un Taq de Alta Fidelidad según las instrucciones del fabricante (Roche) y se unió en un vector de expresión de baculovirus (pBlueBac4.5, Invitrogen). El cebador inverso para la PCR contenía la secuencia de nucleótidos para una etiqueta 6 x His inmediatamente después del codón para el aminoácido final de la proteína. El vector purificado se usó para cotransfección con ADN de transferencia en células de insecto Sf9 (Invitrogen) usando técnicas convencionales con fosfato de calcio. Se siguieron protocolos convencionales para baculovirus para generar una población de valores elevados del virus recombinante para la infección células de insecto Sf21 y la producción de proteínas (Invitrogen). Se cultivaron las células de insecto Sf21 en aproximadamente 500 ml de medio de cultivo EX-CELL™ 420 libre de suero (JRH Biosciences) hasta una concentración de $7-8 \times 10^8$ células y se infectaron con 10 ml de la población de virus, dando como resultado una multiplicidad de infección (MOI) de entre 1,0 y 2,0. Tras cuatro días de cultivo, se midió la actividad de la proteína cPLP1 recombinante en el sobrenadante del cultivo usando un ensayo enzimático de lipasa convencional (VITROS®, Chemistry System, Ortho-Clinical Diagnostics).

La proteína cPLP1 recombinante se purificó del sobrenadante del cultivo de células de insecto siguiendo cualquiera de los protocolos convencionales informados en la bibliografía (Thirstrup, K. y col. FEBS, 1993), o por medio de la cromatografía de afinidad con quelatos metálicos y la etiqueta de fusión 6 x His (columna de afinidad HISTRAP™ HP, Amersham Biosciences). Se intercambió el tampón de la proteína purificada por disolución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 usando una columna de desalación convencional (PD-10, Amersham Biosciences). Se mostró que la proteína cPLP1 recombinante tiene actividad lipasa usando un ensayo enzimático convencional (Vitros® Chemistry System).

Como se muestra en la Fig. 6A, también se caracterizó la proteína cPLP1 purificada en geles de SDS-PAGE usando una tinción de proteínas con Coomassie y en una tinción de etiqueta His en gel (Pierce) (Figura 6A, carril 1). Las fracciones previo a la purificación se muestran en los carriles 2-4 con los marcadores de peso molecular mostrados en el carril 5. Como se muestra en la Fig. 6B, la proteína cPLP1 purificada podría identificarse también en transferencias Western usando un anticuerpo monoclonal anti His (1:200, peroxidasa anti 6His, Roche), o el anticuerpo monoclonal 7E11 (1:250, IDEXX Laboratories, Inc.).

Ejemplo 3

Uso del ADN y secuencias de polipéptidos de lipasa pancreática canina para inmunización y producción de anticuerpos

5 Se amplificó el gen para la lipasa pancreática canina por medio de PCR (Taq Alta Fidelidad, Roche) a partir de ADNc pancreático canino y se unió en un vector de expresión de mamífero (pCMV-Tag4a, Stratagene) en el sitio de clonación múltiple. Este vector puede construirse con o sin una etiqueta C terminal. El vector resultante se transfectó de manera transitoria en células COS7L usando el reactivo de transfección LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen) para
10 confirmar la expresión de la proteína de la lipasa pancreática canina.

Se usó el ADN purificado del vector (MaxiPrep Kit, Qiagen) para la inmunización con ADN de ratones según los protocolos publicados (Ulmer, J.B. y col. Science, 1993). Los valores de anticuerpo de cada ratón individual se evaluaron dos semanas después de la segunda inmunización. Se recubrió una placa de microvaloración de 96 pocillos
15 (Immulon 2HB, Dynatech) durante la noche a 4°C con 10 µg/ml de un anticuerpo anti lipasa pancreática humana (Fitzgerald #M410139a) en disolución salina tamponada de fosfato (PBS, pH 7,4). A continuación se bloqueó la placa con SAB al 3% en Tris 50 mM (pH 7,5) durante 1 hora y se lavó 4 veces en PBS-T (PBS 0,01 M con Tween-20 al 0,05% (Sigma)). Se preincubaron los sueros de un ratón no inmunizado (control negativo), un ratón inmune (control positivo), y dos ratones vacunados con ADN con una dilución 1:2000 de la proteína cPLP1 recombinante, purificada en diluyente de anticuerpo (Tris 50 mM (pH 7,2), Tween-20 al 0,05%, con suero bovino fetal al 50% y suero de ratón al 10%) durante cinco minutos antes de añadirlo al ELISA sándwich, creando de esta manera un formato de competición. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora seguido por 4 lavados en PBS-T. La cPLP1 capturada se detectó usando una dilución 1:1000 de un anticuerpo policlonal de conejo (Texas A&M University, College Station, TX) y una dilución 1:2500 de anticuerpo de cabra anti conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO)
20 (Jackson ImmunoResearch), en diluyente de anticuerpo cada uno durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa 6 veces con PBS-T y se desarrolló con un sustrato TMB (Moss, Inc.). Como se muestra en la Fig. 6A, la reducción en la señal (D.O.) con relación al control negativo indica una respuesta de anticuerpo para el antígeno cPLP1 (Figura 6A).

30 La proteína cPLP1 recombinante, purificada se usó también como un inmunógeno para la producción de anticuerpos en pollos. Se inmunizaron dos gallinas según los protocolos convencionales familiares para los expertos en la técnica. Tras una serie de cuatro inyecciones, se midieron los valores de anticuerpos usando un ELISA sándwich con un anticuerpo anti pollo conjugado con HRP (1:2500, Jackson ImmunoResearch) y la cPLP1 recombinante, similar al ELISA descrito anteriormente. Como se muestra en la Fig. 6B, ambas gallinas desarrollaron valores razonables para cPLP1.
35

Ejemplo 4

40 *Uso de lipasa pancreática canina nativa, purificada para inmunización y producción de anticuerpos*

Se usó lipasa pancreática canina nativa, purificada (Steiner and Williams, Biochimie, diciembre de 2002; 84 (12): 1245-1253) para inmunizar ratones Balb/C usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase Antibodies, a Laboratory Manual, por Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, pág. 53-135).
45 Se inmunizaron dos ratones cada uno con 63 µg de cPL usando adyuvante completo de Freund, por vía intraperitoneal (I.P.) en el día 0. En el día 25, usando adyuvante incompleto de Freund, se estimularon los ratones usando el mismo procedimiento. En el día 50, usando adyuvante Ribi, se estimularon los ratones usando el mismo procedimiento.

En el día 69, se tomaron muestras de sangre del rabo y se determinó el valor de anti-cPL usando un ensayo ELISA anti-cPL como se describe en el Ejemplo 5, a continuación.
50

En el día 98 se estimularon los ratones por vía subcutánea (S.C.) con 30 µg de cPL nativa usando adyuvante Ribi. En el día 114 se estimularon los ratones usando un protocolo idéntico. En el día 123, se tomaron muestras de sangre del rabo y se determinó el valor de anti-cPL usando un ensayo ELISA anti-cPL. En el día 143 se estimularon los
55 ratones por vía intramuscular en la pata trasera con 10 µg de cPL nativa. En el día 147 se recogieron los bazo y se fusionaron con línea celular de mieloma FO usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase Antibodies, a Laboratory Manual, por Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, pág. 139-238).

Ejemplo 5

ELISA para lipasa pancreática canina

65 El procedimiento usado para la selección inicial de las muestras de sangre de rabo de ratón está descrito por Steiner y col. (Can. J. Vet. Res. 67: 175-82). Brevemente, se recubrió con lipasa pancreática canina las placas de microvaloración de 96 pocillos a una concentración de 0,3 µg/ml durante 1 hora a 37°C. Las placas se bloquearon con Super Block (Pierce) durante 1 hora y se lavaron con PBS. Se diluyeron las muestras de suero de los ratones

ES 2 323 142 T3

1:10 en PBS con SAB al 1% y se diluyó en serie a través de la placa. Se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C, seguido por 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0,05%. Se usó anticuerpo de cabra anti ratón conjugado con HRP (Jackson Immuno Research) diluido 1:3000 para detectar los anticuerpos unidos. Las placas se desarrollaron con reactivo TMB (Pierce).

5

Ejemplo 6

Selección y aislamiento de anticuerpos monoclonales CaPI

10

Se cultivaron líneas celulares de hibridoma como se describe en el Ejemplo 4, y se aislaron clones individuales productores de anticuerpos monoclonales usando el proceso de dilución limitada. Se desarrolló un ELISA sándwich para seleccionar los hibridomas que secretan anticuerpos específicos para cPL.

15

Se capturaron anticuerpos monoclonales de ratón de los sobrenadantes celulares en placas Immulon 2 HB recubiertas con anticuerpos de burro anti ratón (Jackson ImmunoResearch) recubiertas a una concentración de 10 µg/ml. Se incubaron los sobrenadantes en placas durante 2 horas a temperatura ambiente (o durante la noche a 4°C) para permitir que tuviera lugar la captura. A continuación se lavaron las placas 6 veces con PBS/ Tween20 al 0,1% y se incubaron con lipasa pancreática canina (0,5 µg/ml, 50 µl/pocillo) durante 1 hora y se lavaron nuevamente. Se añadió el anticuerpo policlonal de conejo anti-cPL (Texas A&M University, College Station, TX) diluido 1:1000 en diluyente de conjugado (Tris 50 mM (pH 7,2), Tween-20 al 0,05%, suero bovino fetal al 50%) a los pocillos y se incubó durante 1 hora. El anticuerpo unido se detectó usando un conjugado de anticuerpo de burro anti conejo:HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido 1:2500 en diluyente de conjugado. Las placas se lavaron 8 veces antes de desarrollar el color con el reactivo TMB. Se dejó desarrollar el color durante 5 minutos.

25

Este procedimiento se usó para identificar anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a cPL. Por ejemplo, se aislaron dos anticuerpos monoclonales murinos usando este procedimiento, 4G11 y 7E11. Estos anticuerpos monoclonales se unen a cPL con afinidad adecuada para el desarrollo de un ensayo ELISA para cPL. Las líneas celulares que secretan estos anticuerpos se han depositado con el ATCC, Manassas Virginia el 30 de marzo de 2005. Las denominaciones de las cepas son CPL 7E11 clon 2/A5 y CPL 4G11/14D, que llevan los Números de Depósito de Patente ATCC PTA-6653 y PTA 6652, respectivamente.

30

Ejemplo 7

35

Caracterización de anticuerpos monoclonales

Ambos anticuerpos monoclonales identificados, 7E11 y 4G11, reaccionan con cPL en suero canino. La reactividad se demostró usando el formato de ELISA descrito en este ejemplo y sustituyendo dos muestras de suero canino (dilución 1:2 ó 1:10 en SAB al 3%, Tris 50 mM (pH 7,5)) para la cPLP1. Los resultados se muestran en la Figura 7.

40

Se evaluó la capacidad de ambos anticuerpos monoclonales identificados, 4G11 y 7E11, para interferir con la actividad enzimática de la cPLP1 en un ensayo de lipasa (VITROS[®], Chemistry System, Ortho-Clinical Diagnostics). Se mezcló el sobrenadante de hibridoma tanto de 4G11 como de 7E11 con sobrenadante de cultivo de células de insecto filtrado que contenía la cPLP1 para dar una dilución 1:10. Se comparó la actividad lipasa con un control de PBS y un sobrenadante de hibridoma irrelevante. Sólo la adición del sobrenadante del hibridoma de 4G11 produjo una reducción en la actividad enzimática en el ensayo de lipasa (Figura 8).

45

Ambos anticuerpos monoclonales identificados, 4G11 y 7E11, no compiten uno con el otro para unirse a cPLP1. Usando el protocolo de ELISA descrito en este ejemplo, tanto los anticuerpos 4G11 como 7E11 fueron capturados en la placa del sobrenadante de hibridoma. Se diluyó cPLP1 recombinante (1:250 para 7E11 o 1:1000 para 4G11) en el diluyente de anticuerpo (véase Ejemplo3) en presencia de 10 µl de SAB al 3%, 10 µl de sobrenadante de hibridoma para 4G11 o 10 µl de sobrenadante de hibridoma para 7E11, antes de añadirlo a la placa de microvaloración. No se observó una reducción en la señal (D.O.) para ninguno de los anticuerpos monoclonales cuando se preincubó el antígeno con el monoclonal alternado (Figura 9).

55

Se probó la capacidad de ambos anticuerpos monoclonales identificados, 4G11 y 7E11, para competir con un anticuerpo monoclonal para lipasa pancreática humana comercialmente disponible que se encontró que reacciona con la cPLP1. Se realizó un ELISA como se describe en el Ejemplo 3 donde se recubrió un anticuerpo anti lipasa pancreática humana (Fitzgerald M410139a) sobre las placas de microvaloración. Se bloquearon los pocillos con Superblock basado en Tris (Pierce) + Tween-20 al 0,1%. Tras cuatro lavados en PBS-T, se pre incubó la cPLP1 a una dilución de 1:500 ó 1:1000 en diluyente de anticuerpo (Ejemplo 3) durante 10 minutos con una dilución 1:2, 1:5 ó 1:10 de 7E11 ó 4G11, respectivamente antes de la adición a los pocillos. Las muestras se incubaron durante 1 hora seguido por 5 lavados en PBS-T. La detección con el anticuerpo policlonal para cPL se realizó como se describe en el Ejemplo 6. Como se muestra en la Figura 10, el anticuerpo anti lipasa pancreática humana se une a cPLP1, y el anticuerpo monoclonal 7E11 compite con este anticuerpo para unirse a cPLP1, pero el anticuerpo monoclonal 4G11 no lo hace.

65

5 Cuando se compara la reactividad de los anticuerpos monoclonales purificados, 4G11 y 7E11, bajo concentraciones equivalente, el anticuerpo 4G11 da una lectura de D.O. (650 nm) mayor para una concentración equivalente de cPLP1 que el anticuerpo 7E11. Por ejemplo, en un ELISA donde se recubre con cada anticuerpo las placas Immulon 2HB en PBS a una concentración de 10 µg/ml durante la noche a 4°C y se procesa con una dilución 1:500 de cPLP1 como se describe en el Ejemplo 3, 4G11 da una lectura de D.O. de 1,747 frente a 7E11 que da una lectura de D.O. de 1,383. De manera similar, si se capturan los monoclonales purificados en un ELISA como se describe en el Ejemplo 6, una dilución 1:4000 de cPLP1 da una lectura de D.O. para 4G11 de 1,010 frente a una dilución 1:400 de cPLP1 que da una lectura de D.O. para 7E11 de 1,140. Este dato sugiere que estos dos anticuerpos monoclonales tienen diferentes afinidades de unión para el antígeno cPLP1.

10 Cuando se compara bioquímicamente, los dos anticuerpos monoclonales, 4G11 y 7E11, tienen diferentes puntos de enfoque isoeléctrico. El pI para 4G11 es 6,7 y el pI para 7E11 es 6,1.

15 Ejemplo 8

Uso de anticuerpos reactivos para lipasa pancreática canina

20 Pueden usarse anticuerpos que reconocen la lipasa pancreática canina en ensayos cuantitativos y no cuantitativos para la detección de lipasa pancreática canina en suero u otras muestras biológicas. En un ejemplo, en ensayo de lipasa pancreática canina está constituido por un ELISAQ que usa el formato sándwich. En este formato, se recubre con Anti-cPL monoclonal (clon 7E11) los pocillos de las placas de microvaloración (placas Immulon 4 HBX; Thermo Electron Corp.; número de catálogo S25-343-04) a una concentración de aproximadamente 5 µg/ml. El procedimiento de recubrimiento es el siguiente: se diluye el anticuerpo monoclonal 7E11 hasta 5 µg/ml en disolución salina tamponada de fosfato (PBS) 10 mM, pH 7,4. Se cargan 100 µl de esta disolución de recubrimiento en cada pocillo y se incuba a 4°C durante 8 horas. A continuación se aspira la disolución de recubrimiento y se lavan las placas por triplicado usando PBS 0,1 M/ Tween-20 al 0,05%. A continuación se cargan las placas con 200 µl por pocillo de disolución de bloqueo basada en SAB; se incuban las placas a 25°C durante 4 horas. Se aspiran las placas y se lavan tres veces con PBS 0,1 M/ Tween-20 al 0,05%. La lipasa pancreática contenida en la muestra de suero o el calibrador se capturan por medio del anticuerpo en fase sólida. La preparación del calibrador está constituida por la dilución del antígeno cPL recombinante en un diluyente basado en SAB para dar calibradores en el nivel de µg/l. A continuación, se añade anti-cPL monoclonal (clon 4G11) conjugado con HRPO para completar el sándwich. El conjugado HRPO-anticuerpo se prepara usando HRPO-SMCC y una forma reducida de disulfuros del anticuerpo.

35 Para este ensayo, se premezclan los calibradores que contienen lipasa pancreática canina y muestras del paciente en tubos individuales junto con ACm 4G11 conjugado con HRPO. La proporción de muestra o calibrador a conjugado es 1:3 v/v. En este ensayo se usa un factor de dilución de conjugado de 1:3000. No es necesario tiempo de incubación de premezcla. A continuación se cargan las premezclas de calibradores y muestras en pocillos de placas de microvaloración recubiertas con anticuerpos (100 µl), y se incuban durante una hora a 25°C. Al final del tiempo de incubación, la placa se lava para eliminar los componentes no unidos. Se añade el sustrato TMB a los pocillos y se incuba la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción de color se detiene con la adición de disolución de SDS al 1% y se leen los valores de absorbancia a 650 nm usando un lector de placas de microvaloración. Los resultados usando un protocolo de premezcla y sándwich con ACm 7E11 y ACm 4G11 se muestran en la Figura 11.

45 Como alternativa, puede seguirse un protocolo sin premezcla. Se carga el calibrador o la muestra en los pocillos de las placas de microvaloración recubiertos con anticuerpos, y se incuba durante una hora a 25°C. La placa se lava para eliminar los materiales no unidos. A continuación se cargan los pocillos con ACm 4G11 conjugado con HRPO y se incuba durante una hora a 25°C. Al final del tiempo de incubación, la placa se lava para eliminar los componentes no unidos. Se añade el sustrato TMB a los pocillos y se incuba la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción de color se detiene con la adición de disolución de SDS al 1% y se leen los valores de absorbancia a 650 nm usando un lector de placas de microvaloración.

55 Aunque en este documento se ha descrito diversas formas de realización específicas de la invención, debe entenderse que la invención no está limitada a las formas de realización precisas y que los expertos en la técnica pueden efectuar diversos cambios o modificaciones sin apartarse del ámbito de la invención.

Bibliografía

60 1. **Petersen, S.B., Drablos, F., 1994.** A sequence analysis of lipases, esterases, and related proteins. En: Woolley, P., Petersen, S.B. (Eds.), *Lipases-their structure, biochemistry, and application*, Cambridge University Press, Cambridge, pág. 23-48.

65 2. **Lin, Y.H., Yu, C., Huang, A.H., 1986.** Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 244, 346-356.

3. **Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O., 1994.** Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 29-63.

4. **Mukherjee, K.D., Hills, M.J., 1994.** Lipases from plants. En: Woolley, P., Petersen, S.B. (Eds.), Lipases-their structure, biochemistry and application, Cambridge University Press, Cambridge, pág. 49-75.
5. **Lawson, D.M., Brzozowski, A.M., Dodson, G.G., Hubbard, R.E., Huge-Jensen, B., Boel, E., Derewenda, Z.S., 1994.** Three-dimensional structures of two lipases from filamentous fungi. En: Woolley, P., Petersen, S.B. (Eds.), Lipases-their structure, biochemistry and application, Cambridge University Press, Cambridge, pág. 77-94.
6. **Svendsen, A., 1994.** Sequence comparisons within the lipase family. En: Woolley, P., Petersen, S.B. (Eds.), Lipases-their structure, biochemistry, and application, Cambridge University Press, Cambridge, pág. 1-21.
10. **Antonian, E., 1988.** Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. *Lipids* 23, 1101-1106.
8. **Carriere, F., Bezzine, S., Verger, R., 1997.** Molecular evolution of the pancreatic lipase and two related enzymes towards different substrate selectivities. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 3, 55-64.
9. **Carriere, F., Withers-Martinez, C., Van Tilbeurgh, H., Roussel, A., Cambillau, C., Verger, R., 1998.** Structural basis of the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* 1376, 417-432.
20. **Hirata, K., Dichek, H.L., Cioffi, J.A., Choi, S.Y., Leeper, N.J., Quintana, L., Kronmal, G.S., Cooper, A.D., Quertermous, T., 1999.** Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J. Biol. Chem.* 274, 14170-14175.
25. **Anderson, R.A., Sando, G.N., 1991.** Cloning and expression of cDNA encoding human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase. Similarities to gastric and lingual lipases. *J. Biol. Chem.* 266, 22479-22484.
12. **Carriere, F., Gargouri, Y., Moreau, H., Ransac, S., Rogalska, E., Verger, R., 1994.** Gastric lipases: cellular, biochemical and kinetic aspects. En: Woolley, P., Peterson, S.B. (Eds.), Lipases-their structure, biochemistry, and application, Cambridge University Press, Cambridge, pág. 181-205.
30. **Moreau, H., Gargouri, Y., Lecat, D., Junien, J.L., Verger, R., 1988.** Screening of preduodenal lipases in several mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 959, 247-252.
35. **Carriere, F., Barrowman, J.A., Verger, R., Laugier, R., 1993a.** Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterol.* 105, 876-888.
15. **Carriere, F., Laugier, R., Barrowman, J.A., Douchet, I., Priymenko, N., Verger, R., 1993b.** Gastric and pancreatic lipase levels during a test meal in dogs. *Scand. J. Gastroenterol.* 28, 443-454.
40. **Carriere, F., Moreau, H., Raphel, V., Laugier, R., Benicourt, C., Junien, J.-L., Verger, R., 1991.** Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. *Eur. J. Biochem.* 202, 75-83.
17. **Steiner, J.M., Berridge, B.R., Wojcieszyn, J., Williams, D.A., 2002.** Cellular immunolocalization of gastric and pancreatic lipase in various tissues obtained from dogs. *Am. J. Vet. Res.* 63, 722-727.
45. **Steiner, J.M., Broussard, J., Mansfield, C.S., Gumminger, S.R., Williams, D.A. 2001a.** Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity (cPLI) concentrations in dogs with spontaneous pancreatitis. *J. Vet. Int. Med.* 15, 274.
18. **Steiner, J.M., Gumminger, S.R., Rutz, G.M., Williams, D.A. 2000b.** Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity (cPLI) concentrations in dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *J. Vet. Int. Med.* 15, 274.
50. **Steiner, J.M., Gumminger, S.R., Williams, D.A. 2000 c.** Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine pancreatic lipase immunoreactivity (cPLI) in serum. *J. Vet. Int. Med.* 15, 311.
55. **Vandermeers, A., Christophe, J., 1968.** Alpha-amylase and lipase of rat pancreas. Chromatographic purification and research on molecular weight and amino acid composition. *Biochim. Biophys. Acta* 154, 110-129.
21. **Rathelot, J., Julien, R., Bosc-Bierne, I., Gargouri, Y., Canioni, P., Sarda, L., 1981.** Horse pancreatic lipase. Interaction with colipase from various species. *Biochimie* 63, 227-234.
60. **Bosc-Bierne, I., Rathelot, J., Perrot, C., Sarda, L., 1984.** Studies on chicken pancreatic lipase and colipase. *Biochim. Biophys. Acta* 794, 65-71.
65. **Gieseg, S.P., Forrester, I.T., Came, A., 1992.** The purification of ovine pancreatic lipase that is free of colipase using an improved delipidation method. *Pancreas* 7, 45-51.

ES 2 323 142 T3

25. **Mejdoub, H., Reinbolt, J., Gargouri, Y.**, 1994. Dromedary pancreatic lipase: Purification and structural properties. *Biochem. Biophys. Acta. Lipids Lipid Metab.* 1213, 119-126.
- 5 26. **Ausubel** y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1992.
27. Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988 *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*.
28. Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of sequence Data, Part 1*.
- 10 29. Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., *Humana Press*, New Jersey, 1994, *Sequence Analysis in Molecular Biology*.
30. von **Heinje**, G., *Academic Press*, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., *M Stockton Press*, Nueva York, 1991.
- 15 31. Gribskov, M. and Devereux, J., eds., *M Stockton Press*, Nueva York, 1991.
32. **Needleman** and **Wunsch** (*J. Mol. Biol.* (48):444-453) (1970).
- 20 33. **Devereux**, J., et al, *Nucleic Acids Res.* 12 (1): 387 (1984).
34. E. **Myers** and W. **Miller** (*CABIOS*, 4: 11-17 (1989)).
- 35 35. **Altschul**, y col. (*J. Mol. Biol.* 215: 403-10 (1990)).
36. **Altschul** y col. (*Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389-3402 (1997)).
37. **Bowie** y col., *Science* 247: 1306-1310 (1990).
- 30 38. **Cunningham** y col., *Science* 244: 1081-1085 (1989).
39. **Smith** y col., *J. Mol. Biol.* 224: 899-904 (1992).
40. de **Vos** y col. *Science* 255: 306-312 (1992).
- 35 41. *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. *Freeman and Company*, Nueva York (1993).
42. **Wold**, F., *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., *Academic Press*, Nueva York 40 1-12 (1983).
43. **Seifter** y col. (*Meth. Enzymol.* 182: 626-646 (1990)).
44. **Rattan** y col. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 48-62 (1992)).
- 45 45. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989).
46. **Nielsen**, y col., *Science* 254: 1497-1500 (1991).
- 50 47. **Sambrook** y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989).
48. **Smith** y col., *Gene* 67: 31-40 (1988)), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.)
- 55 49. **Amann** y col., *Gene* 69: 301-315 (1988).
50. **Studier** y col., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185: 60-89 (1990).
- 60 51. **Gottesman**, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, *Academic Press*, San Diego, Calif. (1990) 119-128).
52. **Wada** y col., *Nucleic Acids Res.* 20: 2111-2118 (1992).
- 65 53. **Baldari**, y col., *EMBO J.* 6: 229-234 (1987).
54. **Kurjan** y col., *Cell* 30: 933-943 (1982).

ES 2 323 142 T3

55. **Schultz** y col., *Gene* 54: 113-123 (1987).

56. **Smith** y col., *Mol. Cell Biol.* 3: 2156-2165 (1983).

5 57. **Lucklow** y col., *Virology* 170: 31-39 (1989).

58. **Seed**, B. *Nature* 329: 840 (1987).

10 59. **Kaufman** y col., *EMBO J.* 6: 187-195 (1987).

60. **Chibata**, Ichiro, *Halsted Press*, NY (1978) Immobilized Enzymes.

61. **Cuatrecasas**, *J. Biol. Chem.*, 245: 3059 (1970).

15 62. **Steiner**, J.M., **Williams**, D.A., 2002. Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochimie*
84 (2002) 1243-1251.

63. **Thirstrup**, K., y col. *FEBS*, 1993.

20 64. **Ulmer**, J.B., y col. *Science*, 1993.

65. **Harlow**, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, (1988) pág. 53-135.

25 66. **Harlow**, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, (1988) pág. 139-238.

67. **Steiner**, y col. *Can. J. Vet Res.* 67: 175-182.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 323 142 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular que tiene número de depósito ATCC de PTA-6652 o PTA-6653.
2. Una línea celular que secreta el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1.
3. La línea celular de la reivindicación 2, en la que la línea celular se ha depositado en ATCC y tiene número de depósito ATCC seleccionado del grupo constituido por PTA-6652 y PTA-6653.
- 10 4. Un procedimiento para determinar la presencia o cantidad de lipasa pancreática canina en una muestra biológica que comprende:
- 15 (a) poner la muestra en contacto con un primer anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que se une específicamente a la lipasa pancreática canina;
- (b) detectar la unión de la lipasa pancreática canina en la muestra de suero al primer anticuerpo monoclonal.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 4, que además comprende poner en contacto un patrón que comprende lipasa pancreática canina recombinante con el primer anticuerpo monoclonal, detectar la unión del patrón al primer anticuerpo monoclonal, y comparar la cantidad de unión del primer anticuerpo monoclonal a la lipasa pancreática canina en la muestra con la cantidad de unión del primer anticuerpo monoclonal al patrón.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el primer anticuerpo monoclonal está conjugado a un marcador.
7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el primer anticuerpo monoclonal está inmovilizado en una fase sólida.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la detección comprende poner en contacto la fase sólida con un segundo anticuerpo específico para la lipasa pancreática canina, en el que el segundo anticuerpo está conjugado a un marcador, y detectar el marcador unido a la fase sólida.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 8, que además comprende poner en contacto un patrón que comprende lipasa pancreática canina recombinante con el primer anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo, y comparar una señal del marcador del segundo anticuerpo que está unido a la lipasa pancreática canina en la muestra con la señal del marcador del segundo anticuerpo que está unido al patrón.
- 40 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el segundo anticuerpo es un segundo anticuerpo monoclonal.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el segundo anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal secretado por una línea celular que tiene número de depósito ATCC de PTA-6652 o PTA-6653.
- 45 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el primer anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo monoclonal son diferentes.
13. El procedimiento de las reivindicaciones 4 ó 12, que comprende las siguientes etapas:
- 50 (a) formar una mezcla de la muestra con un primer anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que se une específicamente a la lipasa pancreática canina, en el que el primer anticuerpo monoclonal está conjugado a un marcador;
- (b) dejar que la lipasa pancreática canina en la muestra y el primer anticuerpo monoclonal formen un complejo;
- 55 (c) poner en contacto la mezcla con un segundo anticuerpo monoclonal que se une a la lipasa pancreática canina en el que el segundo anticuerpo monoclonal está inmovilizado en una fase sólida;
- (d) detectar la presencia o cantidad del marcador en la fase sólida.
- 60 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que al menos uno del primer anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular que tiene un número de depósito ATCC de PTA-6652 o PTA-6653.
- 65 15. El procedimiento de la reivindicación 13, que además comprende poner en contacto el primer y segundo anticuerpo monoclonal con un patrón que comprende lipasa pancreática canina recombinante y comparar la cantidad de una señal del marcador del primer anticuerpo monoclonal unido a la lipasa pancreática canina en la muestra con la señal del marcador del primer anticuerpo monoclonal unido al patrón.

ES 2 323 142 T3

16. El procedimiento de las reivindicaciones 4 ó 12, que comprende las siguientes etapas:

(a) formar una mezcla de la muestra con un primer anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que se une específicamente a la lipasa pancreática canina, en el que el primer anticuerpo monoclonal está conjugado a un primer marcador;

(b) dejar que la lipasa pancreática canina en la muestra y el primer anticuerpo monoclonal formen un complejo;

(c) poner en contacto la mezcla con un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la lipasa pancreática canina, en el que el segundo anticuerpo monoclonal está conjugado a un segundo marcador;

(d) detectar la asociación de los marcadores, detectando de esta manera la presencia de lipasa pancreática canina en la muestra.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el marcador en el segundo anticuerpo monoclonal es una fase sólida.

18. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que al menos uno del primer anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular que tiene un número de depósito ATCC de PTA-6652 o PTA-6653.

19. El procedimiento de la reivindicación 17, que además comprende poner en contacto el primer y el segundo anticuerpo monoclonal con un patrón que comprende lipasa pancreática canina recombinante y comparar la cantidad de una señal del marcador del primer anticuerpo monoclonal unido a la lipasa pancreática canina en la muestra con la señal del marcador del primer anticuerpo monoclonal unido al patrón.

20. Un dispositivo para detectar la presencia o cantidad de lipasa pancreática canina en una muestra que comprende una fase sólida que tiene inmovilizado en la misma un primer anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que se une específicamente a la lipasa pancreática canina.

21. El dispositivo de la reivindicación 20, que además comprende lipasa pancreática canina recombinante como un patrón, en el que el primer anticuerpo monoclonal se une específicamente a la lipasa pancreática recombinante.

22. Un kit para detectar la presencia o cantidad de lipasa pancreática canina en una muestra, que comprende:

(a) el dispositivo de la reivindicación 20, y

(b) un reactivo que comprende un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la lipasa pancreática canina en el que el segundo anticuerpo monoclonal está conjugado a un segundo marcador.

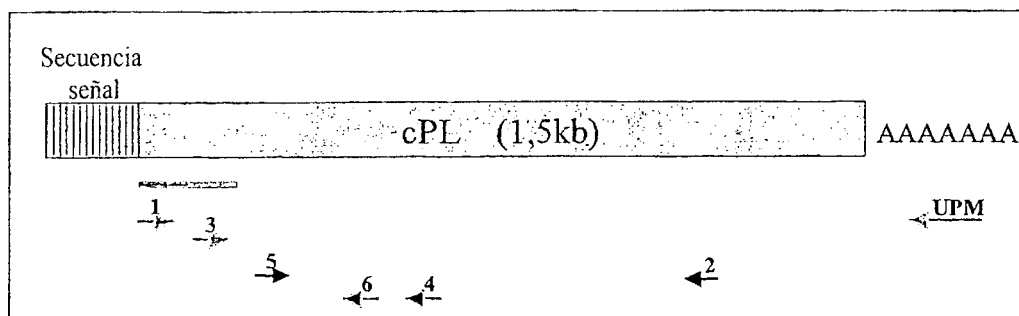
23. El kit de la reivindicación 22, en el que al menos uno del primer anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular que tiene un número de depósito ATCC de PTA-6652 o PTA-6653.

24. El kit de la reivindicación 22, que además comprende un patrón que comprende un polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por (a) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3, (b) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica de SEC. ID N°: 3, en el que la variante alélica está codificada por un ácido nucleico que hibrida bajo condiciones rigurosas a la hebra opuesta de la molécula de ácido nucleico de SEC. ID N°: 2, (c) un fragmento antigénico de una secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3, en el que el fragmento comprende al menos 16 aminoácidos contiguos y en el que el fragmento se une específicamente a un anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular que tiene un N° de depósito ATCC de PTA-6652 o PTA-6653.

25. El kit de la reivindicación 22, que además comprende lipasa pancreática canina recombinante como un patrón.

FIG. 1

Diseño de cebador para 3' RACE



— Secuencia de aminoácidos N-terminal (25) de la proteína purificada

Cebador 1: 5' gtggccggcaaggaggtstgyttycchmg 3'
[SEC. ID N°: 4]

Cebador 2: 5' ggtgttcaggtagaacacytgbccsacbyc 3'
[SEC. ID N°: 5]

Cebador 3: 5' gacgacagcccctgggcyggvatygtsga 3'
[SEC. ID N°: 6]

Cebador 4: 5' ctgccccacgatccggatggttctgcg 3'
[SEC. ID N°: 7]

Cebador 5: 5' gatcctgccttgagccchraggaygtsra 3'
[SEC. ID N°: 8]

Cebador 6: 5' ctggagcttgtgataattgatggatctgc 3'
[SEC. ID N°: 9]

FIG. 2

Secuencia de ADN de la lipasa pancreática canina (SEC. ID N°: 2)

GGTGCGTGGAACCCAACGGAAGTCCACGATGCTGCTAATCTGGACACTA
TCACTGCTGCTGGGAGCAGTAGTAGGAAAAGAAGTCTGCTTCCCAAGACT
TGGCTGTTTTAGTGATGACTCCCCATGGGCAGGAATTGTGGAGAGACCCC
TCAAAATATTGCCCTGGGCTCCAAAAGATGTCAATACCCGCTTACTCCTAT
ACACTAACGAGAACCCAGATAACTTTCAAGAAGTACTGCAGATCCATCA
ATTATCACAAGCTCCAGTTTCAAACAGATAGAAAACCCGCTTTATTATT
CATGGATTCATAGACAAGGGAGAAGAAAGCTGGTTGGCCAACATGTGCA
AGAAAATGTTTGTAGTGGAAGTGTGAACTGCATCTGTGTGGACTGGAAG
AGTGGCTCCCGAACTGGTTACTCAGGCCTCGCAGAACATCCGGATCGT
GGGGGCAGAAGTGGCATATTTGTTGAAGTTCTTCAGTCAGCATTGGGTA
CTCGCCTCCGACGTCCACATCATTGGCCACAGCCTGGGAGCCCACGCAG
CTGGGGAGGCAGGAAGGAGGCTCAATGGCACTGCAGGACGAATCACAGG
GTTGGATCCAGCTGAACCTTGCTTTGAGGGCACACCCGAATTAGTCCGATT
GGACCCAGCGATGCCAGTTTGTGGATGTAATTCACACAGATGCTGCC
CTATAATCCCCAACATGGGGTTTGAATGAGTCAAAGTGTAGGCCACCTA
GATTTCTTTCAAATGGAGGAAAAGAAATGCCTGGATGTCAGAAGAATAT
TCTCTCTCAGATTGTTGACATAGATGGGATCTGGGAAGGGACTCGTGACTT
TGTGGCCTGTAATCACTTAAGAAGTTACAAGTATTACTCTGATAGCATCCT
CAACCCTGACGGCTTTGCTGGATTCCCTTGTGCCTCTTACAATGTTTTCACT
GCAAACAAGTGCTTCCCCTGCCAAGCGAAGGCTGCCACAGATGGGTCA
TTATGCTGACAGATTTCCCTGGAAAACTGACAAAGTGAACCAGATATTCT
ATCTAGACACTGGTGTATGCCAGCAATTTGCCCCTGGAGGTATAAGGTA
GCTGTCACACTGTCTGGGAAGAAGGTTACAGGACACGTGCTAGTTTCTCT
GTTTGGAAATAAAGGAAATTCTAAACAGTATGAAATTTCAAGGGCACTC
TCCAACCAGAGAGCACTCATTCCAATGAATTTGACTCTGATGTGGAAGTT
GGAGATGTGCAGAAGGTTAAATTTGTTTGGTACAACAATGTGATCAACCC
AACTCTACCCAGAGTGGGAGCATCCAAGATCACAGTGGAAAGAAATGAT
GGGAAAATATTCAACTTCTGTAGTAAAGAAACCGTGAGGGAAGATATTT
ACTTACTCTTACCCCATGTTAAGA

FIG. 3

Secuencia de aminoácidos de la lipasa pancreática canina (SEC. ID N°: 3)

MLLIWTL SLLL GAVVGKEVCF PRLGCF SDDSPWAGIVERPLKILPWAPKDVNTRLLL
YTNENPDN FQELTADPSIITSSSFKTDRKTRFI IHGFIDKGEESWLANMCKKMFVVE
SVNCICVDWKSGSRTGYTQASQNIRIVGAEVAYFVEVLQSAFGYSPSDVHIIGHSLG
AHAAGEAGRRLNGTAGRITGLDPAEPCFEGTPELVRLDPSDAQFVDVIHTDAAPIIP
NMGFGMSQTVGHLDFFPNGGKEMPGCQKNILSQIVDIDGIWEGTRDFVACNHLRSYK
YYSDSILNPDGFAGFPCASYNVFTANKCFPCPSEGCPQMGHYADRFPGKTDKVNQIF
YLDTGDA SNFARWRYKVAVTL SGKKVTGHV LVSLFGNKGNSKQYEIFKGT LQPESTH
SNEFDS DVEVGDVQKVKFVWYNNVINPTLPRVGASKITVERNDGKIFNFCSKETVRE
DILLTLTPC

FIG. 4**Péptidos de la lipasa pancreática canina**

[SEC. ID N°: 10] FSDDSPWAGIVERPLKILPW
 [SEC. ID N°: 11] VERPLKILPWAPKDVNTRLL
 [SEC. ID N°: 12] APKDVNTRLLLLYTNENPDNF
 [SEC. ID N°: 13] LYTENPDNFDQELTADPSII
 [SEC. ID N°: 14] QELTADPSIITSSSFKTDRK
 [SEC. ID N°: 15] TSSSFKTDRKTRFIIHGFD
 [SEC. ID N°: 16] TRFIIHGFDKGEESWLANM
 [SEC. ID N°: 17] KGEESWLANMCKKMFVVESV
 [SEC. ID N°: 18] CKKMFVVESVNCICVDWKS
 [SEC. ID N°: 19] NCICVDWKSRTGYTQASQ
 [SEC. ID N°: 20] SRTGYTQASQNRIVGAEVA
 [SEC. ID N°: 21] NRIVGAEVAYFVEVLQSAF
 [SEC. ID N°: 22] YFVEVLQSAFGYSPSDVHII
 [SEC. ID N°: 23] GYSPSDVHIIHSLGAHAAG
 [SEC. ID N°: 24] GHSLGAHAAGEAGRRLNGTA
 [SEC. ID N°: 25] EAGRRLNGTAGRITGLDPAE
 [SEC. ID N°: 26] GRITGLDPAEPCFEGTPELV
 [SEC. ID N°: 27] PCFEGTPELVRLDPSDAQFV
 [SEC. ID N°: 28] RLDPSDAQFVDVIHTDAAPI
 [SEC. ID N°: 29] DVIHTDAAPIIPNMFGMSQ
 [SEC. ID N°: 30] IPNMFGMSQTVGHLDFFPN
 [SEC. ID N°: 31] TVGHLDFFPNGGKEMPGCQK
 [SEC. ID N°: 32] GGKEMPGCQKNILSQIVDID
 [SEC. ID N°: 33] NILSQIVDIDGIWEGTRDFV
 [SEC. ID N°: 34] GIWEGTRDFVACNHLRSYKY
 [SEC. ID N°: 35] ACNHLRSYKYSDSILNPDG
 [SEC. ID N°: 36] YSDSILNPDGFAGFPCASYN
 [SEC. ID N°: 37] FAGFPCASYNVFTANKCFPC
 [SEC. ID N°: 38] VFTANKCFPCPSEGCPQMGH
 [SEC. ID N°: 39] PSEGCPQMGHYADRFPGKTD
 [SEC. ID N°: 40] YADRFPGKTDKVNQIFYLDT
 [SEC. ID N°: 41] KVNQIFYLDTGDASNFRWR
 [SEC. ID N°: 42] GDASNFRWRKYKAVTLGSK
 [SEC. ID N°: 43] YKAVTLGSKKVTGHVLSL
 [SEC. ID N°: 44] KVTGHVLSLFGNKGNSKQY
 [SEC. ID N°: 45] FGNKGNSKQYEIFKGTLOPE
 [SEC. ID N°: 46] EIFKGTLOPESTHSNEFDSD
 [SEC. ID N°: 47] STHSNEFDSDVEVGDVQKVK
 [SEC. ID N°: 48] VEVGDVQKVKFVWYNNVINP
 [SEC. ID N°: 49] FVWYNNVINPTLPRVGASKI
 [SEC. ID N°: 50] TLPVVGASKITVERNDGKIF
 [SEC. ID N°: 51] TVERNDGKIFNFCSKETVRE
 [SEC. ID N°: 52] NFCSKETVREDILLTLTPC

FIG. 5

Purificación y caracterización de la lipasa pancreática canina recombinante (cPLP1)

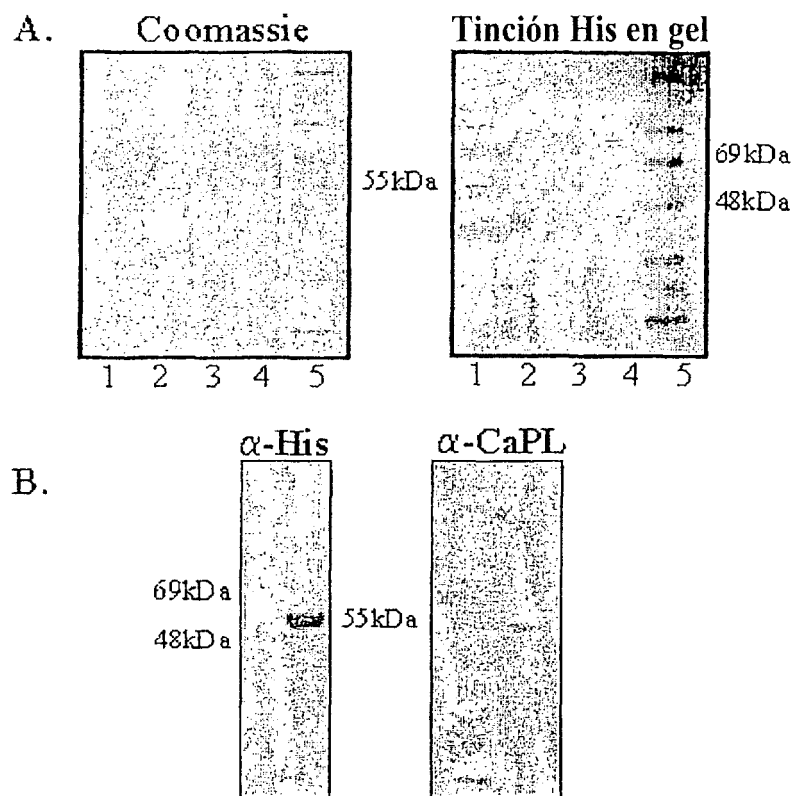
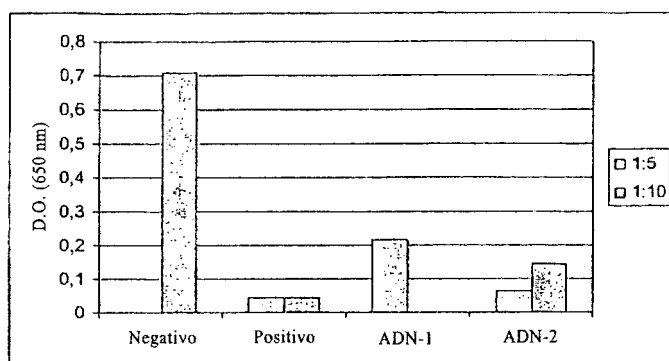


FIG. 6

Valores de anticuerpos para la proteína de la lipasa pancreática canina (cPLP1) de animales inmunizados.

A.



B.

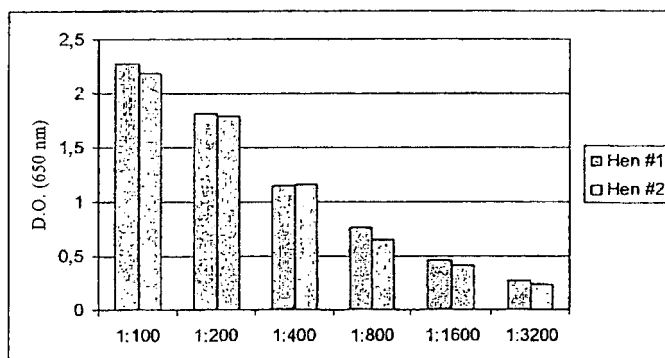


FIG. 7

Reactividad de los anticuerpos monoclonales 7E11 y 4G22 para cPL en suero canino.

	Lipasa (Vitros)	cPLI (D.O.)		
		1:2	1:10*	
Perro 1	1276	0,203	0,111	7E11
		1,431	0,612	4G11
Perro 2	2085	0,965	0,235	7E11
		2,195	1,51	4G11

FIG. 8

El anticuerpo monoclonal 4G11 inhibe la actividad enzimática de cPLP1.

Muestra	Lipasa (U/L)
cPLP1 1:10 + PBS	736
cPLP1 1:10 + 7E11	717
cPLP1 1:10 + 4G11	346

FIG. 9

Los anticuerpos monoclonales 4G11 y 7E11 no compiten uno con el otro para unirse a cPLP1.

Acm capturado	D.O. (650)	
	rcPL + SAB	rcPL + Acm
7E11	0,541	1,059
4G11	0,689	0,603

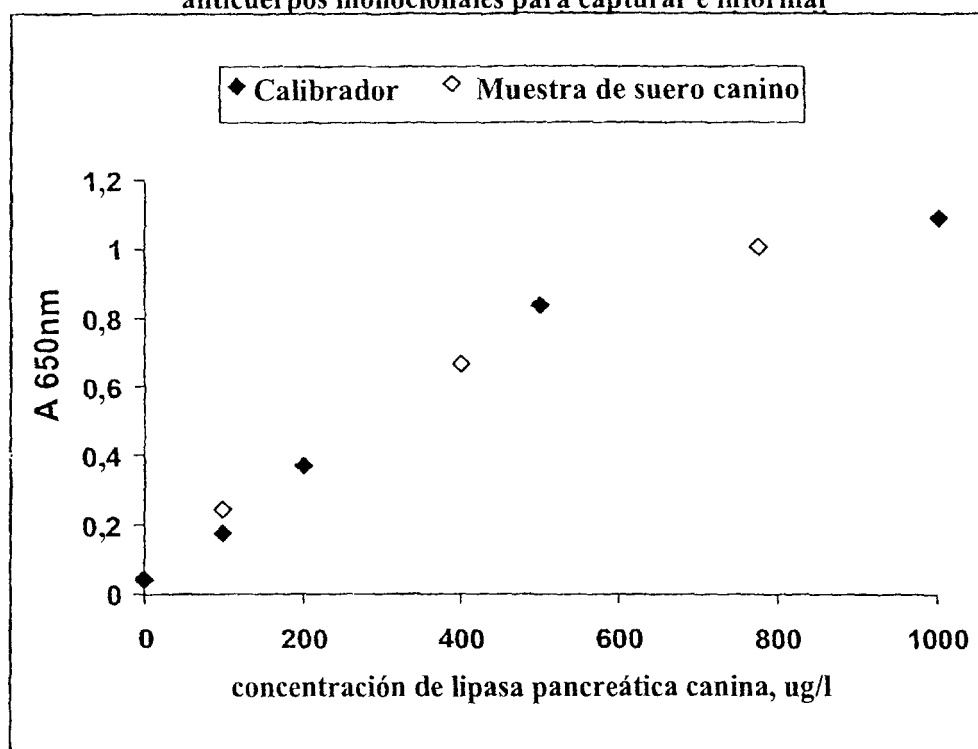
FIG. 10

El anticuerpo monoclonal 7E11 compite con un anticuerpo anti lipasa pancreática humana para unirse a cPLP1.

		D.O. (650 nm)			
	rcPL	No comp	1:2	1:5	1:10
7E11	1:500	1,56	0,336	0,628	0,899
	1:1000	0,885	0,160	0,322	0,445
4G11	1:500	1,48	1,42	1,37	1,51
	1:1000	0,897	0,776	0,778	0,866

FIG. 11

Ensayo de lipasa pancreática canina usando anticuerpos monoclonales para capturar e informar



ES 2 323 142 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> IDEXX Laboratories, Inc.
Beall, Melissa
5 Huth, Stacey J.
Krah, Regis J.

<120> Lipasa pancreática canina

10 <130> MBHB-04-380-C

<160> 52

15 <170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 25
20 <212> PRT
<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> La secuencia de aminoácidos N terminal de la lipasa pancreática canina purificada.

<400> 1

30 Lys Glu Val Cys Phe Pro Arg Leu Gly Cys Phe Ser Asp Asp Ser Pro
1 5 10 15

35 Trp Ala Gly Ile Val Glu Arg Pro Leu
20 25

40 <210> 2
<211> 1429
<212> ADN
45 <213> *Canis sp.*

<220>

<221> característica miscelánea

50 <223> El gen de lipasa pancreática canina de 1,429 Kb denominado cPL1.

<400> 2

55 ggtgctgga acccaacgga actgccacga tgctgctaact ctggacacta tcactgctgc 60
tgggagcagt agtaggaaaa gaagtctgct tcccaagact tggctgtttt agtgatgact 120
60 ccccatgggc aggaattgtg gagagacccc tcaaaatatt gccctgggct ccaaaagatg 180
tcaatacccg cttactccta tacactaacg agaaccaga taactttcaa gaacttactg 240
65 cagatccatc aattatcaca agctccagtt tcaaaacaga tagaaaaacc cgctttatta 300

ES 2 323 142 T3

```

ttcatggatt catagacaag ggagaagaaa gctgggtggc caacatgtgc aagaaaatgt 360
ttgtagtgga aagtgtgaac tgcacatctgtg tggactggaa gagtggctcc cgaactggtt 420
5  acactcaggc ctgcagaaac atccggatcg tgggggcaga agtggcatat tttgttgaag 480
ttcttcagtc agcatttggg tactcgcctt ccgacgtcca catcattggc cacagcctgg 540
gagcccacgc agctggggag gcaggaagga ggctcaatgg cactgcagga cgaatcacag 600
10  ggttggatcc agctgaacct tgctttgagg gcacacccga attagtccga ttggacccca 660
gcgatgccca gtttgtggat gtaattcaca cagatgctgc ccctataatc cccaacatgg 720
15  ggtttggaaat gagtcaaact gtaggccacc tagatttctt tccaaatgga ggaaaagaaa 780
tgcttggatg tcagaagaat attctctctc agattgttga catagatggg atctgggaag 840
ggactcgtga ctttgtggcc tgtaatcact taagaagtta caagtattac tctgatagca 900
20  tcctcaaccc tgacggcttt gctggattcc ctgtgcctc ttacaatggt ttcactgcaa 960
acaagtgctt ccctgccca agcgaaggct gccacagat gggtcattat gctgacagat 1020
25  ttcttgaaa aactgacaaa gtgaaccaga tattctatct agacactggt gatgccagca 1080
atthtgcccg ttggagggat aaggtagctg tcacactgtc tgggaagaag gttacaggac 1140
acgtgctagt ttctctgttt ggaaataaag gaaattctaa acagtatgaa atthtcaagg 1200
30  gcactctcca accagagagc actcattcca atgaatttga ctctgatgtg gaagttggag 1260
atgtgcagaa ggtaaattt gtttggatca acaatgtgat caaccaact ctaccagag 1320
35  tgggagcatc caagatcaca gtggaagaa atgatgggaa aatattcaac ttctgtagta 1380
aagaaaccgt gaggaagat atthtactta ctcttaccoc atgttaaga 1429

```

40 <210> 3

<211> 465

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> La proteína de la lipasa pancreática canina traducida denominada cPLP1 deducida a partir de la secuencia del ADNc.

<400> 3

55 Met Leu Leu Ile Trp Thr Leu Ser Leu Leu Leu Gly Ala Val Val Gly
1 5 10 15

60 Lys Glu Val Cys Phe Pro Arg Leu Gly Cys Phe Ser Asp Asp Ser Pro

65

ES 2 323 142 T3

	20	25	30	
5	Trp Ala Gly Ile Val Glu Arg Pro Leu Lys Ile Leu Pro Trp Ala Pro	35	40	45
10	Lys Asp Val Asn Thr Arg Leu Leu Leu Tyr Thr Asn Glu Asn Pro Asp	50	55	60
15	Asn Phe Gln Glu Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ile Ile Thr Ser Ser Ser	65	70	75
20	Phe Lys Thr Asp Arg Lys Thr Arg Phe Ile Ile His Gly Phe Ile Asp	85	90	95
25	Lys Gly Glu Glu Ser Trp Leu Ala Asn Met Cys Lys Lys Met Phe Val	100	105	110
30	Val Glu Ser Val Asn Cys Ile Cys Val Asp Trp Lys Ser Gly Ser Arg	115	120	125
35	Thr Gly Tyr Thr Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Val Gly Ala Glu	130	135	140
40	Val Ala Tyr Phe Val Glu Val Leu Gln Ser Ala Phe Gly Tyr Ser Pro	145	150	155
45	Ser Asp Val His Ile Ile Gly His Ser Leu Gly Ala His Ala Ala Gly	165	170	175
50	Glu Ala Gly Arg Arg Leu Asn Gly Thr Ala Gly Arg Ile Thr Gly Leu	180	185	190
55	Asp Pro Ala Glu Pro Cys Phe Glu Gly Thr Pro Glu Leu Val Arg Leu	195	200	205
60	Asp Pro Ser Asp Ala Gln Phe Val Asp Val Ile His Thr Asp Ala Ala	210	215	220
65	Pro Ile Ile Pro Asn Met Gly Phe Gly Met Ser Gln Thr Val Gly His	225	230	235
70	Leu Asp Phe Phe Pro Asn Gly Gly Lys Glu Met Pro Gly Cys Gln Lys	245	250	255

ES 2 323 142 T3

Asn Ile Leu Ser Gln Ile Val Asp Ile Asp Gly Ile Trp Glu Gly Thr
 260 265 270

5

Arg Asp Phe Val Ala Cys Asn His Leu Arg Ser Tyr Lys Tyr Tyr Ser
 275 280 285

10

Asp Ser Ile Leu Asn Pro Asp Gly Phe Ala Gly Phe Pro Cys Ala Ser
 290 295 300

15

Tyr Asn Val Phe Thr Ala Asn Lys Cys Phe Pro Cys Pro Ser Glu Gly
 305 310 315 320

20

Cys Pro Gln Met Gly His Tyr Ala Asp Arg Phe Pro Gly Lys Thr Asp
 325 330 335

25

Lys Val Asn Gln Ile Phe Tyr Leu Asp Thr Gly Asp Ala Ser Asn Phe
 340 345 350

30

Ala Arg Trp Arg Tyr Lys Val Ala Val Thr Leu Ser Gly Lys Lys Val
 355 360 365

35

Thr Gly His Val Leu Val Ser Leu Phe Gly Asn Lys Gly Asn Ser Lys
 370 375 380

40

Gln Tyr Glu Ile Phe Lys Gly Thr Leu Gln Pro Glu Ser Thr His Ser
 385 390 395 400

45

Asn Glu Phe Asp Ser Asp Val Glu Val Gly Asp Val Gln Lys Val Lys
 405 410 415

50

Phe Val Trp Tyr Asn Asn Val Ile Asn Pro Thr Leu Pro Arg Val Gly
 420 425 430

55

Ala Ser Lys Ile Thr Val Glu Arg Asn Asp Gly Lys Ile Phe Asn Phe
 435 440 445

60

Cys Ser Lys Glu Thr Val Arg Glu Asp Ile Leu Leu Thr Leu Thr Pro
 450 455 460

65

Cys
 465

ES 2 323 142 T3

<210> 4
<211> 29
<212> ADN
5 <213> *Canis sp.*

<220>
<221> característica miscelánea
10 <223> Un cebador redundante para amplificación 3' RACE (mezcla de cebadores universales UPM, Clontech) y PCR anidada.

<220>
15 <221> característica miscelánea
<223> El símbolo s es g o c; y es t/u o c; h es a o c o t/u; y m es a o c.

<400> 4
20
gtggccggca aggaggtstg yttycchmg 29

<210> 5
25 <211> 30
<212> ADN
<213> *Canis sp.*

30 <220>
<221> característica miscelánea
<223> Un cebador redundante para amplificación 3' RACE (mezcla de cebadores universales UPM, Clontech) y PCR anidada.
35

<220>
<221> característica miscelánea
40 <223> El símbolo s es g o c; y es t/u o c; y b es g o c o t/u.

<400> 5
45
ggtgttcagg tagaacacyt gbccsacbyc 30

<210> 6
<211> 29
<212> ADN
50 <213> *Canis sp.*

<220>
55 <221> característica miscelánea
<223> Un cebador redundante para amplificación 3' RACE (mezcla de cebadores universales UPM, Clontech) y PCR anidada.

<220>
60 <221> característica miscelánea
<223> El símbolo s es g o c; y es t/u o c; y v es a o g o c.

<400> 6
65
gacgacagcc cctgggcygg vatygtsga 29

ES 2 323 142 T3

- <210> 7
<211> 27
<212> ADN
5 <213> *Canis sp.*
- <220>
<221> característica miscelánea
10 <223> Un cebador redundante para amplificación 5' RACE (mezcla de cebadores universales UPM, Clontech) y PCR anidada.
- <400> 7
15
ctgccccac gatccggatg ttctgcg 27
- <210> 8
20 <211> 30
<212> ADN
<213> *Canis sp.*
- 25 <220>
<221> característica miscelánea
<223> Un cebador redundante para amplificación 3' RACE (mezcla de cebadores universales UPM, Clontech) y PCR anidada.
- 30 <220>
<221> característica miscelánea
<223> El símbolo s es g o c; y es t/u o c; r es g o a; y h es a o c o t/u.
- 35 <400> 8
40
gatcctgccc tggagccchr aggaygtsra 30
- <210> 9
<211> 29
<212> ADN
45 <213> *Canis sp.*
- <220>
<221> característica miscelánea
50 <223> Un cebador redundante para amplificación 5' RACE (mezcla de cebadores universales UPM, Clontech) y PCR anidada.
- <400> 9
55
ctggagcttg tgataattga tggatctgc 29
- <210> 10
60 <211> 20
<212> PRT
<213> *Canis sp.*
- 65 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

ES 2 323 142 T3

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

5 <400> 10

Phe Ser Asp Asp Ser Pro Trp Ala Gly Ile Val Glu Arg Pro Leu Lys
1 5 10 15

10

Ile Leu Pro Trp
20

15 <210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

20

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

25 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 11

30

Val Glu Arg Pro Leu Lys Ile Leu Pro Trp Ala Pro Lys Asp Val Asn
1 5 10 15

35

Thr Arg Leu Leu
20

<210> 12

40 <211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

50

<400> 12

55

Ala Pro Lys Asp Val Asn Thr Arg Leu Leu Leu Tyr Thr Asn Glu Asn
1 5 10 15

60

Pro Asp Asn Phe
20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

65

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 13

10 Leu Tyr Thr Asn Glu Asn Pro Asp Asn Phe Gln Glu Leu Thr Ala Asp
1 5 10 15
15 Pro Ser Ile Ile
20

<210> 14

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencia de 10 aminoácidos.

30 <400> 14

Gln Glu Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ile Ile Thr Ser Ser Ser Phe Lys
1 5 10 15
35 Thr Asp Arg Lys
20

40 <210> 15

<211> 20

<212> PRT

45 <213> *Canis sp.*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 15

55 Thr Ser Ser Ser Phe Lys Thr Asp Arg Lys Thr Arg Phe Ile Ile His
1 5 10 15
60 Gly Phe Ile Asp
20

<210> 16

65 <211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 16

10 Thr Arg Phe Ile Ile His Gly Phe Ile Asp Lys Gly Glu Glu Ser Trp
1 5 10 15
15 Leu Ala Asn Met
20

<210> 17

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 17

Lys Gly Glu Glu Ser Trp Leu Ala Asn Met Cys Lys Lys Met Phe Val
1 5 10 15
35 Val Glu Ser Val
20

40 <210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 18

55 Cys Lys Lys Met Phe Val Val Glu Ser Val Asn Cys Ile Cys Val Asp
1 5 10 15
60 Trp Lys Ser Gly
20

<210> 19

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 19

10 Asn Cys Ile Cys Val Asp Trp Lys Ser Gly Ser Arg Thr Gly Tyr Thr
1 5 10 15

15 Gln Ala Ser Gln
20

<210> 20

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 20

Ser Arg Thr Gly Tyr Thr Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Val Gly
1 5 10 15

35 Ala Glu Val Ala
20

40 <210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 21

55 Asn Ile Arg Ile Val Gly Ala Glu Val Ala Tyr Phe Val Glu Val Leu
1 5 10 15

60 Gln Ser Ala Phe
20

<210> 22

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 22

10 Tyr Phe Val Glu Val Leu Gln Ser Ala Phe Gly Tyr Ser Pro Ser Asp
1 5 10 15
15 Val His Ile Ile
20

<210> 23

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 23

Gly Tyr Ser Pro Ser Asp Val His Ile Ile Gly His Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
35 His Ala Ala Gly
20

40 <210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 24

55 Gly His Ser Leu Gly Ala His Ala Ala Gly Glu Ala Gly Arg Arg Leu
1 5 10 15
60 Asn Gly Thr Ala
20

<210> 25

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 25

10 Glu Ala Gly Arg Arg Leu Asn Gly Thr Ala Gly Arg Ile Thr Gly Leu
 1 5 10 15

15 Asp Pro Ala Glu
 20

<210> 26

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 26

 Gly Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Glu Pro Cys Phe Glu Gly Thr
 1 5 10 15

35 Pro Glu Leu Val
 20

<210> 27

40 <211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 27

55 Pro Cys Phe Glu Gly Thr Pro Glu Leu Val Arg Leu Asp Pro Ser Asp
 1 5 10 15

60 Ala Gln Phe Val
 20

<210> 28

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 28

10 Arg Leu Asp Pro Ser Asp Ala Gln Phe Val Asp Val Ile His Thr Asp
1 5 10 15
15 Ala Ala Pro Ile
20

<210> 29

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 29

Asp Val Ile His Thr Asp Ala Ala Pro Ile Ile Pro Asn Met Gly Phe
1 5 10 15
35 Gly Met Ser Gln
20

<210> 30

40 <211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 30

55 Ile Pro Asn Met Gly Phe Gly Met Ser Gln Thr Val Gly His Leu Asp
1 5 10 15
60 Phe Phe Pro Asn
20

<210> 31

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 31

10 Thr Val Gly His Leu Asp Phe Phe Pro Asn Gly Gly Lys Glu Met Pro
1 5 10 15
15 Gly Cys Gln Lys
20

<210> 32

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 32

Gly Gly Lys Glu Met Pro Gly Cys Gln Lys Asn Ile Leu Ser Gln Ile
1 5 10 15
35 Val Asp Ile Asp
20

40 <210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 33

55 Asn Ile Leu Ser Gln Ile Val Asp Ile Asp Gly Ile Trp Glu Gly Thr
1 5 10 15
60 Arg Asp Phe Val
20

<210> 34

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 34

10 Gly Ile Trp Glu Gly Thr Arg Asp Phe Val Ala Cys Asn His Leu Arg
1 5 10 15
15 Ser Tyr Lys Tyr
20

<210> 35

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 35

Ala Cys Asn His Leu Arg Ser Tyr Lys Tyr Tyr Ser Asp Ser Ile Leu
1 5 10 15
35 Asn Pro Asp Gly
20

<210> 36

40 <211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 36

55 Tyr Ser Asp Ser Ile Leu Asn Pro Asp Gly Phe Ala Gly Phe Pro Cys
1 5 10 15
60 Ala Ser Tyr Asn
20

<210> 37

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 37

10 Phe Ala Gly Phe Pro Cys Ala Ser Tyr Asn Val Phe Thr Ala Asn Lys
1 5 10 15
15 Cys Phe Pro Cys
20

<210> 38

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 38

Val Phe Thr Ala Asn Lys Cys Phe Pro Cys Pro Ser Glu Gly Cys Pro
1 5 10 15
35 Gln Met Gly His
20

40 <210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 39

55 Pro Ser Glu Gly Cys Pro Gln Met Gly His Tyr Ala Asp Arg Phe Pro
1 5 10 15
60 Gly Lys Thr Asp
20

<210> 40

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 40

10 Tyr Ala Asp Arg Phe Pro Gly Lys Thr Asp Lys Val Asn Gln Ile Phe
1 5 10 15

15 Tyr Leu Asp Thr
20

<210> 41

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 41

Lys Val Asn Gln Ile Phe Tyr Leu Asp Thr Gly Asp Ala Ser Asn Phe
1 5 10 15

35

Ala Arg Trp Arg
20

40 <210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 42

55 Gly Asp Ala Ser Asn Phe Ala Arg Trp Arg Tyr Lys Val Ala Val Thr
1 5 10 15

60 Leu Ser Gly Lys
20

<210> 43

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 43

10 Tyr Lys Val Ala Val Thr Leu Ser Gly Lys Lys Val Thr Gly His Val
1 5 10 15

15 Leu Val Ser Leu
20

<210> 44

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 44

Lys Val Thr Gly His Val Leu Val Ser Leu Phe Gly Asn Lys Gly Asn
1 5 10 15

35 Ser Lys Gln Tyr
20

40 <210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 45

55 Phe Gly Asn Lys Gly Asn Ser Lys Gln Tyr Glu Ile Phe Lys Gly Thr
1 5 10 15

60 Leu Gln Pro Glu
20

<210> 46

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 46

```

10      Glu Ile Phe Lys Gly Thr Leu Gln Pro Glu Ser Thr His Ser Asn Glu
        1           5           10           15

15      Phe Asp Ser Asp
        20
    
```

<210> 47

20 <211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

25 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

30 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 47

```

35      Ser Thr His Ser Asn Glu Phe Asp Ser Asp Val Glu Val Gly Asp Val
        1           5           10           15

40      Gln Lys Val Lys
        20
    
```

40 <210> 48

<211> 20

<212> PRT

45 <213> *Canis sp.*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 48

```

55      Val Glu Val Gly Asp Val Gln Lys Val Lys Phe Val Trp Tyr Asn Asn
        1           5           10           15

60      Val Ile Asn Pro
        20
    
```

<210> 49

65 <211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 49

10 Phe Val Trp Tyr Asn Asn Val Ile Asn Pro Thr Leu Pro Arg Val Gly
1 5 10 15

15 Ala Ser Lys Ile
20

<210> 50

<211> 20

20 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

30 <400> 50

Thr Leu Pro Arg Val Gly Ala Ser Lys Ile Thr Val Glu Arg Asn Asp
1 5 10 15

35 Gly Lys Ile Phe
20

40 <210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> *Canis sp.*

45

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

50 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 51

55 Thr Val Glu Arg Asn Asp Gly Lys Ile Phe Asn Phe Cys Ser Lys Glu
1 5 10 15

60 Thr Val Arg Glu
20

<210> 52

<211> 20

65 <212> PRT

<213> *Canis sp.*

ES 2 323 142 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <223> Péptido de la lipasa pancreática canina que es un péptido 20 mero que se extiende sobre la proteína de la lipasa pancreática canina cPLP1 en un solapamiento de secuencias de 10 aminoácidos.

<400> 52

10 Asn Phe Cys Ser Lys Glu Thr Val Arg Glu Asp Ile Leu Leu Thr Leu
 1 5 10 15

15 Thr Pro Cys

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65