



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</p> <p><b>C12N 15/12, A61K 49/00</b> <b>G01N 33/577</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 91/16428</b></p> <p>(43) Date de publication internationale: 31 octobre 1991 (31.10.91)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00323</p> <p>(22) Date de dépôt international: 18 avril 1991 (18.04.91)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 90/05062 20 avril 1990 (20.04.90) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : IOVANNA, Juan-Lucio [IT/FR]; 151, traverse de la Gouffonne, Bât. D1, F-13009 Marseille (FR). KEIM, Volker [DE/DE]; Kirsch Blütenstrasse 33, D-6805 Heddesheim (DE). DA-GORN, Jean-Charles [FR/FR]; 77, bd du Redon, Bât. H., F-13009 Marseille (FR).</p>	<p>(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc. ; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 67, bd Haussmann, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: ACUTE PANCREATITIS ASSOCIATED PROTEIN AND MEANS FOR THE DIAGNOSIS OF ACUTE PANCREATITIS</p>		
<p>(54) Titre: PROTEINE ASSOCIEE A LA PANCREATITE AIGUE, MOYENS POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PANCREATITE AIGUE</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns the family of the protein (PAP) associated with acute pancreatitis in humans and rats. It involves nucleotide fragments coding for the above-mentioned proteins. Also included for the purposes of the invention are antibodies recognizing the PAP and capable of being used in the diagnosis of pancreatitis. The invention is further aimed at producing PAP, in particular by genetic engineering.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne la famille de la protéine (PAP) associée à la pancréatite aiguë chez l'homme et chez le rat. Elle vise aussi les fragments nucléotidiques codant pour les protéines ci-dessus. Entrent aussi dans le cadre de l'invention des anticorps reconnaissant la PAP et susceptibles d'être utilisés en vue du diagnostic de pancréatite. L'invention vise aussi la production de la PAP, notamment par génie génétique.</p>	<pre> AAAACCATCCAAATCGCCCGAAGACAGCTAAGGAGGAGCAGAAAGATGATG 52 AGAGTTAAT ATG TTG CAT CGC TTG GCC TTC CCA GTC ATG 91 Met Leu His Arg Leu Ala Phe Pro Val Met  TCC TGG ATG CTG CTC TCC TGC CTG ATG CTC TTA TCA CAG 130 Ser Trp Met Leu Leu Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln  GTG CAA GGA GAA GAC TCT CCG AAG AAA ATA CCC TCT GCA 169 Val Gln Gly Glu Asp Ser Pro Lys Lys Ile Pro Ser Ala  CGC ATT AGT TGC CCC AAA GGC TCC CAG GCA TAT GGC TCC 208 Arg Ile Ser Cys Pro Lys Gly Ser Gln Ala Tyr Gly Ser  TAC TGC TAT GCC CTG TTT CAG ATA CCA CAG ACC TGG TTT 247 Tyr Cys Tyr Ala Leu Phe Gln Ile Pro Gln Thr Trp Phe  GAT GCA GAA CTG GCC TGC CAG AAG AGA CCT GAA GGA CAC 286 Asp Ala Glu Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Glu Gly His  CTT GTA TCT GTG CTC AAT GTA GCT GAA GCT TCA TTC TTG 325 Leu Val Ser Val Leu Asn Val Ala Glu Ala Ser Phe Leu  GCA TCC ATG GTC AAG AAC ACT GGA AAC AGC TAC CAA TAT 364 Ala Ser Met Val Lys Asn Thr Gly Asn Ser Tyr Gln Tyr  ACC TGG ATT GGA CTC CAT GAC CCC ACT CTT GGT GGA GAA 403 Thr Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gly Glu  CCC AAT GGA GGT GGA TGG GAG TGG AGT AAC AAT GAC ATA 442 Pro Asn Gly Gly Gly Trp Glu Trp Ser Asn Asn Asp Ile  ATG AAT TAT CTC AAC TGG GAG AGG AAC CCA TCT ACT GCC 481 Met Asn Tyr Val Asn Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ala  TTA GAC CGC GGA TTC TGT GGC AGC TTG TCA AGA TCT TCT 520 Leu Asp Arg Gly Phe Cys Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser  GGA TTT CTA AGA TGG AGA GAT ACC ACA TGT GAA GTT GAA 559 Gly Phe Leu Arg Trp Arg Asp Thr Thr Cys Glu Val Glu  GTT GCC CTA CGT CTG CAA ATT TAC AGG TTA AAA TTA CCA 598 Val Ala Leu Arg Leu Gln Ile Tyr Arg Leu Lys Leu Pro  CAC AGC AAA CAG CTT T AGTTTCTCTGAAGCACATCTCTGCAAGGG 644 Asp Ser Lys Gln Leu  GC AAAATATGAAGACTTGGCTAGAAAAGTGTATCTTCTACAGTCCATAT 696  TGGAGCTCTAATCATTCTTTAGCCAAATTTGTATAAGTTGTGTCTCATGTC 748  TTGAAAGCAGTAATAAACCTCAGTCTCTCTTGGAAAAA 793 </pre>	

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Licchtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

**PROTEINE ASSOCIEE A LA PANCREATITE AIGUE. MOYENS POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PANCREATITE AIGUE.**

La présente invention concerne des protéines associées à la pancréatite aiguë et des moyens pour le diagnostic de cette maladie.

La pancréatite aiguë est une affection inflammatoire du pancréas qui, sur le plan anatomo-pathologique, va de la simple forme oedémateuse à la nécrose hémorragique totale de la glande. La pancréatite nécro-hémorragique est une affection très grave, puisque l'estimation de sa mortalité varie de 30 % à 70 % selon les auteurs. Il est dans certains cas, très difficile d'établir avec certitude le diagnostic de pancréatite aiguë (Sarner, M. et al, Gastroenterol. (1984), 13 : 865-870). Ce diagnostic repose avant tout sur l'examen clinique (douleur abdominale aiguë) sur le dosage d'un certain nombre de substances dans le plasma ou dans le liquide péritonéal (Bradley, J. et al, Br. J. Surg. (1981), 68 : 245-246 ; et Dubick, M. et al, Dig. Dis. Sci. (1987), 32 : 305-312). Parmi les dosages employés, on trouve ceux de l'amylase, de la lipase, de la trypsine, de l'élastase, de la ribonucléase, de la phospholipase A2, de l' $\alpha$ 2 macroglobuline, du calcium, de la LDH, des inhibiteurs de protéases et d'autres encore. Aucun d'entre eux ne s'avère pourtant spécifique, pratique, ni surtout discriminatif. On se contente donc en général de doser l'amylasémie. Récemment, l'échotomographie et la tomодensitométrie ont paru, dans certains cas, pouvoir faciliter le diagnostic de la pancréatite sans que le progrès ait été décisif (Silverstein, W. et al, Am.J. Roentgenol, (1981), 137 : 497-502).

Keim et al ont publié en 1984 (Digestion, (1984);, 29 : 242-249), des résultats sur les conséquences

d'une cannulation du canal pancréatique et de l'induction d'une pancréatite sur la composition protéique du suc pancréatique de rat, cet animal étant utilisé comme modèle expérimental. Après l'opération de cannulation (1 à 2 jours après), les auteurs ont observé une chute du taux d'amylase dans le suc pancréatique, puis 3 à 4 jours après l'opération, un retour au niveau normal d'amylase.

Une séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) des protéines du suc pancréatique pendant cette période de rémission, montrait une bande protéique supplémentaire, apparemment au plus tôt 12 heures après l'opération, et au plus tard, 3 à 4 jours après l'opération. Cette bande protéique n'existait pas chez le rat contrôle non traité. Cette protéine sécrétoire a été appelée PAP ("pancréatitis associated protein").

Par la suite, Keim et al ont effectué des mesures de la quantité de PAP présente dans le tissu pancréatique du rat après induction d'une pancréatite, au moyen de tests de détection de la fixation du complément.

Ces tests n'ont cependant pas permis jusqu'à présent de mettre en évidence l'existence de la PAP dans le sérum du rat chez lequel une pancréatite a été induite.

Les moyens proposés jusqu'à présent dans l'art antérieur n'avaient ainsi pas pu conduire à une identification suffisante de la protéine PAP chez le rat pour que le problème de l'intérêt d'une investigation chez l'homme, afin de rechercher si une telle protéine pouvait être détectée, soit posé.

De plus, les résultats disponibles jusqu'à présent, n'auraient pas permis d'envisager l'intérêt de la PAP pour réaliser un diagnostic d'une pancréatite.

Les inventeurs ont constaté que des anticorps polyclonaux de rat, reconnaissant la protéine PAP de rat, ne reconnaissaient pas de façon significative une protéine du sérum humain.

Après cette constatation, les inventeurs ont donc recherché une identification plus adéquate de la protéine PAP de rat, en vue de définir des outils d'investigation chez l'homme : les inventeurs ont maintenant clairement identifié la protéine PAP chez le rat et ils ont établi sa séquence en acides aminés. A partir de ces connaissances, ils ont élaboré des moyens qui pourraient permettre de détecter et d'identifier s'il existe une protéine correspondant à la PAP du rat, chez l'homme.

Le clonage et le séquençage de l'ARN messenger PAP à partir d'une bibliothèque cDNA pancréatique de rat a aussi permis de démontrer sans ambiguïté que la PAP est bien synthétisée par le pancréas. Les inventeurs ont aussi montré que la protéine était très faiblement exprimée en l'absence d'inflammation pancréatique et fortement exprimée au cours de la pancréatite.

Compte tenu de la fragilité des malades atteints de pancréatite, il n'était pas concevable d'envisager de recueillir le suc pancréatique de ces malades, pour y rechercher la présence éventuelle d'une protéine PAP humaine (PAP-H).

Les inventeurs ont criblé une banque de cDNA pancréatique humaine, à l'aide d'un clone cDNA préalablement obtenu et correspondant à la PAP du rat.

Les inventeurs sont parvenus à isoler différents clones contenant des fragments d'ADNc susceptibles de

s'hybrider avec l'ADNc de la PAP de rat, ainsi qu'il est décrit ci-dessous.

La présente invention concerne donc des fragments d'ADNc capables de coder pour la protéine PAP de rat, ainsi que des fragments d'ADNc susceptibles de coder pour les protéines de la famille de la PAP humaine. L'invention vise aussi les protéines codées par ces fragments d'ADNc.

Elle se rapporte aussi à des vecteurs modifiés par intégration des susdits fragments d'ADNc, notamment pour l'expression de ces fragments.

L'invention vise aussi des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre la protéine PAP notamment la PAP humaine, ainsi que leur utilisation dans des procédés faisant appel à l'imagerie médicale, ou comme moyen pour le diagnostic de la pancréatite aiguë dans des kits et des procédés de diagnostic in vitro.

Une première famille de fragments d'ADN selon l'invention comprend donc les fragments d'ADNc codant pour la PAP de rat.

Appartiennent à cette famille, des fragments d'ADNc caractérisés en ce qu'ils répondent à la séquence nucléotidique S1 suivante codant pour la protéine PAP de rat, à une partie ou à une variante de cette séquence dès lors que cette partie ou variante code pour une protéine ou un peptide reconnu par des anticorps dirigés contre la protéine PAP de rat, ou qu'elle hybride avec la séquence S1 dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C et après un rinçage dans les conditions suivantes : 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois 15 minutes à 65°.

Séquence S1 :

10	20	30	40	50	60
AAAACCATCC	AAATCGCCCG	CAAGACAGCT	AAGGAGGAGC	AGAAAGATGA	TGAGAGTTAA
70	80	90	100	110	120
TATGTTGCAT	CGCTTGGCCT	TCCCAGTCAT	GTCCTGGATG	CTGCTCTCCT	GCCTGATGCT
130	140	150	160	170	180
CTTATCACAG	GTGCAAGGAG	AAGACTCTCC	GAAGAAAATA	CCCTCTGCAC	GCATTAGTTG
190	200	210	220	230	240
CCCCAAAGGC	TCCCAGGCAT	ATGGCTCCTA	CTGCTATGCC	CTGTTTCAGA	TACCACAGAC
250	260	270	280	290	300
CTGGTTTGAT	GCAGAACTGG	CCTGCCAGAA	GAGACCTGAA	GGACACCTTG	TATCTGTGCT
310	320	330	340	350	360
CAATGTAGCT	GAAGCTTCAT	TCTTGGCATC	CATGGTCAAG	AACACTGGAA	ACAGCTACCA
370	380	390	400	410	420
ATATACCTGG	ATTGGACTCC	ATGACCCAC	TCTTGGTGA	GAACCCAATG	GAGGTGGATG
430	440	450	460	470	480
GGAGTGGAGT	AACAA TGACA	TAATGAATTA	TGTCAACTGG	GAGAGGAACC	CATCTACTGC
490	500	510	520	530	540
CTTAGACCGC	GGATTCTGTG	GCAGCTTGTG	AAGATCTTCT	GGATTCTTAA	GATGGAGAGA
550	560	570	580	590	600
TACCACATGT	GAAGTTGAAG	TTGCCCTACG	TCTGCCAAATT	TACAGGTTAA	AATTACCAGA
610	620	630	640	650	660
CAGCAAACAG	CTTTAGTTTG	TCCTGAAGCA	CATCCTGTCA	AGGGGCAAAA	TATGAAGACT
670	680	690	700	710	720
TGCGTAGAAA	AAGTGATTC	TATCTACAGT	CCATATTGGA	GCTCTAATCA	TTCTTTAGCC
730	740	750	760	770	780
AATTTTGAT	AAGTTGTGTC	CTCATGTCTT	GGAAAGCAGT	AATAAACCTC	AGTCTCTCTT
790	800	810	820	830	840
CGAAAAAAA	AAA				

Il est précisé que les abréviations ci-dessus ont les significations suivantes : 1 x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium ; 50 x Denhart = 5g Ficoll, 5g polyvinylpyrrolidone, 5g sérum albumine bovine dans 500 ml d'eau ; SDS : dodecylsulfate de sodium ; EDTA ; éthylène diamine tétraacétate de sodium.

Des anticorps polyclonaux dirigés contre la PAP de rat sont produits selon les techniques classiques ; de tels anticorps ont par exemple été décrits par Keim et al (Clin. Physiol. Biochem., 4 : 136-142 (1986)).

Un fragment d'ADNc appartenant à la première famille d'acides nucléiques de l'invention, est encore caractérisé en ce qu'il code pour une protéine répondant à une des séquences d'acides aminés A1 (séquence d'acides aminés de la protéine comprenant le peptide signal) ou A2 (séquence d'acides aminés de la protéine mature) suivantes ou pour une séquence d'acides aminés ayant une homologie de 40 à 80 % de préférence de 50 à 60 % avec au moins un enchaînement d'environ 25 acides aminés des séquences A1 ou A2.

Séquence A1 :

7

MetLeuHisArgLeuAlaPheProValMetSerTrpMetLeuLeuSerCysLeuMetLeuLeuSerGlnValGln  
 GlyGluAspSerProLysLysIleProSerAlaArgIleSerCysProLysGlySerGlnAlaTyrGlySerTyr  
 CysTyrAlaLeuPheGlnIleProGlnThrTrpPheAspAlaGluLeuAlaCysGlnLysArgProGluGlyHis  
 LeuValSerValLeuAsnValAlaGluAlaSerPheLeuAlaSerMetValLysAsnThrGlyAsnSerTyrGln  
 TyrThrTrpIleGlyLeuHisAspProThrLeuGlyGlyGluProAsnGlyGlyTrpGluTrpSerAsnAsn  
 AspIleMetAsnTyrValAsnTrpGluArgAsnProSerThrAlaLeuAspArgGlyPheCysGlySerLeuSer  
 ArgSerSerGlyPheLeuArgTrpArgAspThrThrCysGluValGluValAlaLeuArgLeuGlnIleTyrArg  
 LeuLysLeuProaspSerLysGlnLeu

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Séquence A2 :

8

GluAspSerProLysLysIleProSerAlaArgIleSerCysProLysGlySerGlnAlaTyrGlySerTyr

CysTyrAlaLeuPheGlnIleProGlnThrTrpPheAspAlaGluLeuAlaCysGlnLysArgProGluGlyHis

LeuValSerValLeuAsnValAlaGluAlaSerPheLeuAlaSerMetValLysAsnThrGlyAsnSerTyrGln

TyrThrTrpIleGlyLeuHisAspProThrLeuGlyGlyGluProAsnGlyGlyTyrTrpGluTrpSerAsnAsn

AspIleMetAsnTyrValAsnTrpGluArgAsnProSerThrAlaLeuAspArgGlyPheCysGlySerLeuSer

ArgSerSerGlyPheLeuArgTrpArgAspThrThrCysGluValGluValAlaLeuArgLeuGlnIleTyrArg

LeuLysLeuProAspSerLysGlnLeu

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Une seconde famille de fragments d'ADN selon l'invention comprend des fragments d'ADNc d'une protéine PAP humaine, tels qu'obtenus par la mise en oeuvre des étapes suivantes :

- un premier criblage d'une bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine, ledit ADNc humain étant inséré dans un vecteur de clonage approprié, comprenant l'hybridation avec des sondes constituées par l'ADNc de la protéine PAP du rat, dans une solution constituée par : 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C suivie d'un rinçage dans les conditions suivantes : 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois 15 minutes à 65°C,
- la sélection des clones positifs d'ADNc humain ayant hybridé lors du criblage avec l'ADNc de la protéine PAP de rat, ces clones étant dits positifs,
- un deuxième criblage avec une séquence d'ADNc d'une protéine PSP dans les conditions d'hybridation ci-dessus avec un rinçage en présence de 0,1 x SSC, 0,1 % SDS, pendant 2 heures à 65°C, afin d'éliminer les clones non spécifiques de l'ADNc de PAP humaine ayant cependant hybridé avec l'ADNc de PAP de rat et
- la récupération des clones n'ayant pas hybridé avec l'ADNc PSP,
- la récupération des fragments d'ADNc des clones positifs obtenus.

Un vecteur de clonage particulièrement avantageux pouvant être modifié par l'ADNc humain pour la réalisation de la bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine, est le vecteur λgt10.

La PSP est une protéine qui présente certaines analogies structurales avec la PAP de rat. Cette protéine a été décrite par Giorgi et al, J. Clin. Invest. (1989), 84, 100-106.

Les fragments d'ADNc ainsi définis sont caractéristiques de la famille de protéines comprenant la protéine PAP humaine.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, des fragments préférés d'ADNc sont tels qu'obtenus par la mise en oeuvre des étapes précédentes auxquelles est ajoutée l'étape suivante, avant la récupération des fragments d'ADNc des clones positifs obtenus : criblage avec l'ADNc de PAP de rat dans des conditions d'hybridation telles que celles décrites ci-dessus, avec un rinçage pendant 2 heures à 65°C.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, un fragment d'ADNc codant pour la PAP humaine répond à l'enchaînement S3 suivant :

ATG CTG

CCT CCC ATG GCC CTG CCC AGT GTA TCT TGG ATG CTG CTT  
TCC TGC CTC ATG CTG CTG TCT CAG GTT CAA GGT GAA GAA  
CCC CAG AGG GAA CTG CCC TCT GCA CGG ATC CGC TGT CCC  
AAA GGC TCC AAG GCC TAT GGC TCC CAC TGC TAT GCC TTG  
TTT TTG TCA CCA AAA TCC TGG ACA GAT GCA GAT CTG GCC  
TGC CAG AAG CGG CCC TCT GGA AAC CTG GTG TCT GTG CTC  
AGT GGG GCT GAG GGA TCC TTC GTG TCC TCC CTG GTG AAG  
AGC ATT GGT AAC AGC TAC TCA TAC GTC TGG ATT GGG CTC  
CAT GAC CCC ACA CAG GGC ACC GAG CCC AAT GGA GAA GGT  
TGG GAG TGG AGT AGC AGT GAT GTG ATG AAT TAC TTT GCA  
TGG GAG AGA AAT CCC TCC ACC ATC TCA AGC CCC GGC CAC  
TGT GCG AGC CTG TCG AGA AGC ACA GCA TTT CTG AGG TGG  
AAA GAT TAT AAC TGT AAT GTG AGG TTA CCC TAT GTC TGC  
AAA GTT CAC

L'invention vise aussi le fragment d'ADNc S4 qui comprend la séquence S3 ainsi que les enchaînements d'ADN suivants respectivement à ses extrémités NH<sub>2</sub> - et COOH - terminales :

cgggagagtgactcctgattgcctcctcaagtcgcagacact



Séquence S2 :

10	GAAGACT	CTCCGAAGAA	AATACCCTCT	GCACGCATTA	GTTGCCCCAA	AGGCTCCCAG
70	70	80	90	100	110	120
130	GCATATGGCT	CCTACTGCTA	TGCCCTGTTT	CAGATACCAC	AGACCTGGTT	TGATGCAGAA
130	140	150	160	170	180	180
190	CTGGCCTGCC	AGAAGAGACC	TGAAGGACAC	CTTGTATCTG	TGCTCAATGT	AGCTGAAGCT
190	200	210	220	230	240	240
250	TCATTCTTGG	CATCCATGGT	CAAGAACAAC	GGAACAAGCT	ACCAATATAC	CTGGATTGGA
250	260	270	280	290	300	300
310	CTCCATGACC	CCACTCTTGG	TGGAGAACC	AATGGAGGTG	GATGGGAGTG	GAGTAACAAT
310	320	330	340	350	360	360
370	GACATAATGA	ATTATGTCAA	CTGGGAGAGG	AACCCATCTA	CTGCCCTTAGA	CCGCGGATTC
370	380	390	400	410	420	420
430	TGTGGCAGCT	TGTCAAGATC	TTCCTGGATTT	CTAAGATGGA	GAGATACCAC	ATGTGAAGTT
430	440	450	460	470	480	480
GAAGTTGCC	TACGTCTGCA	AATTACAGG	TAAATAATTAC	CAGACAGCAA	ACAGCTTT	

L'invention vise aussi des fragments d'ADNc codant pour la PAP humaine caractérisés par leur capacité d'hybridation avec la séquence nucléotidique S1 caractéristique de l'ADNc de la PAP de rat, et/ou avec la séquence nucléotidique S2 caractéristique de l'ADNc de la PAP mature de rat, dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C et avec un rinçage dans une solution comprenant 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois pendant 15 minutes à 65°C.

Un fragment d'ADNc de la PAP humaine particulièrement préféré dans le cadre de la présente demande, est caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique suivante:

10	20	30	40	50	60
TTTGTAAGG	ATCCCTTGA	GAATTATGTA	AAAGTTTAC	AAGAGTCCAT	CTCATTCTCT
70	80	90	100	110	120
TTGTCCCCT	CAAAGCTGGC	TGCCAGAAG	CGGCCCTCTG	GAAACTGGT	GTCTGTGCTC
130	140	150	160	170	180
AGTGGGGCTG	AGGGATCCTT	CGTGTCTCC	CTGGTGAGGA	GCATTAGTAA	CAGCTACTCA
190	200	210	220	230	240
TACATCTGGA	TTGGGCTCCA	TGACCCACA	CAGGTGCGAG	TATATCCTCC	CCTCTCTGTT
250	260	270	280	290	300
ACCTCTCAAG	GTA CTGTTGT	TGCCAGGCG	CACTCCCTGT	CCCCAGTCCC	TGCCAGGAA

GTACTT

Les inventeurs ont constaté que la séquence protéique déduite de cette séquence nucléotidique humaine présente certaines homologies avec la séquence codant pour la protéine PAP de rat, bien que la seule connaissance jusqu'à présent des anticorps dirigés contre la PAP de rat ne permettait pas de détecter la protéine PAP humaine dans un échantillon biologique donné.

L'identification d'un fragment d'ADNc codant pour la protéine PAP humaine permet maintenant d'envisager la production de cette protéine, notamment par voie de génie génétique, ainsi que l'obtention d'anticorps, utilisables en tant que moyens de diagnostic d'une pancréatite aiguë.

L'invention concerne également un fragment d'acide nucléique caractérisé en ce qu'il s'agit du fragment d'ADN complémentaire des fragments d'ADNc ci-dessus définis, ou encore en ce qu'il s'agit du fragment d'ARN correspondant à ces ADNc.

L'invention vise aussi tout fragment de séquence nucléotidique codant pour la PAP humaine, susceptible d'être utilisé comme sonde, après un marquage approprié dudit fragment, en vue de réaliser la détection l'acide nucléique caractéristique de la PAP humaine dans un échantillon biologique.

L'invention concerne également la protéine PAP humaine telle qu'obtenue par l'expression d'un fragment d'ADNc de la PAP humaine, tel que défini ci-dessus, au moyen d'un système d'expression adapté, par exemple un hôte cellulaire transformé par un vecteur d'expression, lui-même modifié par l'insertion du susdit fragment d'ADNc de la PAP humaine.

Une protéine PAP humaine particulière selon l'invention est une protéine telle qu'obtenue par

l'expression d'un fragment d'ADNc de la PAP humaine, inséré en phase dans un vecteur pEX, dans E.coli, notamment dans E.coli souche pop2136.

Des protéines PAP humaines selon l'invention sont aussi caractérisées en ce que leurs séquences d'acides aminés présentent une homologie d'au moins 50%, de préférence d'au moins 60% et de façon très préférée d'au moins 70 % avec au moins un enchaînement d'environ 25 acides aminés, compris dans la séquence A2 de la protéine PAP de rat mature, ou dans la séquence A3 de la protéine PAP humaine ci-dessus décrite.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la protéine PAP humaine répond à la séquence A3 donnée dans les pages précédentes.

L'invention vise aussi tout fragment de la séquence A3 dès lors qu'il est reconnu par des anticorps reconnaissant cette séquence, notamment des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la séquence A3.

La protéine PAP humaine peut être produite par les techniques du génie génétique ou encore par purification, par exemple par chromatographie, à partir d'un échantillon biologique la contenant .

Selon une définition particulière de l'invention, la protéine PAP humaine répondant aux définitions précédentes, comprend la séquence d'acides aminés suivante :

	16	39
Phe Val Lys Asp Ser Leu Glu Asn Tyr Val Lys Val Leu		13
		78
Gln Glu Ser Ile Ser Phe Ser Leu Ser Pro Ser Lys Leu		26
		117
Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Val		39
		156
Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val		52
		195
Arg Ser Ile Ser Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly		65
		234
Leu His Asp Pro Thr Gln Val Arg Val Tyr Pro Pro Leu		78
		273
Ser Val Thr Ser Gln Gly Thr Val Val Ala Gln Ala His		91
		306
Ser Leu Ser Pro Val Pro Ala Gln Glu Val Leu		102

Entre également dans le champ de la présente invention, la protéine PAP de rat caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement d'acides aminés A2 ci-dessus, ou une variante ou une partie de cette séquence dès lors que cette partie ou cette variante est reconnue par des anticorps dirigés contre la protéine PAP de rat ou qu'elle présente une homologie d'au moins 50 %, de préférence d'au moins 60 % avec la séquence A2 de PAP de rat ci-dessus, ou avec la séquence A3 de la PAP humaine.

L'invention vise aussi la protéine PAP de rat, répondant à la séquence A1 ou à une variante de A1 présentant les caractéristiques définies ci-dessus vis-à-vis de la séquence d'acides aminés A2.

Chez le rat la PAP est présente en très faible quantité au niveau d'un pancréas humain normal, et sa synthèse peut être considérablement augmentée en cas de pancréatite aiguë jusqu'à un niveau d'environ 50 à 100 fois supérieur à celui qui existe dans le pancréas normal.

La protéine PAP de rat subit une augmentation de son taux dans le suc pancréatique lors d'une pancréatite aiguë, alors que le taux des autres enzymes diminue.

De plus, dans la pancréatite, toutes les protéines sécrétées pancréatiques passent dans le sang. Par conséquent, la mise en oeuvre dans le sang ou dans un autre échantillon biologique d'un patient humain (par exemple l'urine ou le liquide péritonéal), du dosage de la protéine PAP dont la synthèse est considérablement augmentée en cas de pancréatite, laisse supposer que l'on aura un différentiel normal/pathologique, beaucoup plus important que lors des tests habituellement utilisés pour la détection, et donc beaucoup plus facilement décelable.

L'invention se rapporte aussi dans ce but à des anticorps caractérisés en ce qu'ils reconnaissent la protéine PAP humaine précédemment définie, ces anticorps pouvant être soit polyclonaux soit monoclonaux.

Des anticorps monoclonaux sont par exemple des anticorps tels que produits par un hybridome préalablement formé par fusion d'une cellule de myélome avec une cellule splénique d'un animal préalablement immunisé avec une protéine PAP humaine.

L'invention concerne aussi les hybridomes formés par fusion de cellules de myélome et de cellules spléniques d'animal préalablement immunisé avec la protéine PAP humaine, notamment avec la protéine correspondant à l'enchaînement d'acides aminés A3.

Des anticorps monoclonaux particulièrement avantageux dans le cadre de l'invention, sont ceux qui reconnaissent de façon spécifique la partie NH<sub>2</sub> - terminale de la PAP humaine. Des anticorps particuliers

sont également définis en ce qu'ils reconnaissent la PAP humaine et ce qu'ils sont dépourvus de réaction immunologique avec les autres lectines.

A titre d'exemple, un anticorps monoclonal intéressant notamment pour la détection de la PAP humaine est un anticorps monoclonal dirigé contre le peptide suivant de la PAP humaine : Glu Glu Pro Gln Arg. Pour suivre ce peptide dans des tests de détection de la PAP humaine on a par exemple ajouté un résidu tyrosine sur l'arginine de façon à rendre possible le marquage à l'Iode selon les techniques habituelles de marquage.

L'invention concerne aussi des anticorps anti-idiotypiques dirigés contre les déterminants antigéniques des anticorps de l'invention reconnaissant la PAP humaine.

D'autres anticorps selon l'invention sont des anticorps monoclonaux qui reconnaissent la protéine PAP de rat.

Un protocole d'immunisation d'animaux choisis, notamment de souris ou de lapins, pour la mise en oeuvre de l'invention, est le protocole décrit par Kohler et Milstein, Nature (1975), 256, 495-497.

Entre également dans le cadre de l'invention, un vecteur d'expression et/ou de clonage, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'ADN choisi parmi les fragments précédemment définis.

Des vecteurs d'expression et/ou de clonage particulièrement avantageux pour la mise en oeuvre de l'invention comprennent le plasmide d'expression pEX capable d'exprimer l'ADNc de la protéine PAP humaine dans une bactérie, par exemple E.coli.

D'autres vecteurs sont choisis en fonction de l'hôte chez lequel on recherche l'expression. A cet

égard, il peut s'agir pour les cellules de mammifères, d'un vecteur de type baculovirus.

L'invention se rapporte également à un hôte cellulaire transformé par un vecteur d'expression tel que précédemment défini, dans des conditions permettant l'obtention de la protéine ou du peptide codé par le fragment d'ADN de l'invention, inséré dans ce vecteur.

A titre d'exemple, des hôtes cellulaires formant un système d'expression adéquat pour les fragments d'ADN de l'invention, sont des bactéries telles que E.coli, notamment la souche pop2136.

L'invention concerne également le produit d'expression de l'hôte cellulaire transformé selon ce qui précède.

Avantageusement on choisira d'exprimer le fragment d'ADN selon l'invention dans un hôte procaryote ou eucaryote en fonction du produit que l'on souhaite avoir s'agissant notamment de sa glycosylation.

A titre d'exemple, des hôtes cellulaires intéressants pour la mise en oeuvre de l'invention, sont des bactéries, par exemple E.coli, des levures, des cellules d'insectes ou de mammifères, par exemple des cellules CHO.

La présente invention concerne également des compositions, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un anticorps choisi parmi ceux qui ont été précédemment définis, dirigés contre la protéine PAP humaine. Une telle composition peut être une composition pour le diagnostic in vitro, pour la mise en oeuvre sur un échantillon biologique tel que le sang, l'urine ou le liquide péritonéal d'un patient manifestant des symptômes de la pancréatite aiguë.

Les anticorps utilisés seront le cas échéant marqués par des marqueurs chimiques adaptés.

L'invention vise aussi un kit pour le diagnostic in vitro de la pancréatite aiguë à partir d'un échantillon biologique déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend:

- au moins un anticorps choisi parmi les précédents capable de détecter la présence d'un antigène de type PAP humaine dans ledit échantillon biologique, lesdits anticorps étant marqués,
- selon la nature du marquage, un réactif pour détecter la présence d'un complexe du type antigène-anticorps spécifique,
- un témoin négatif.

De préférence les anticorps mis en oeuvre sont spécifiques de la PAP humaine dès lors qu'ils sont dépourvus de réaction avec les autres lectines connues.

Pour effectuer le marquage des anticorps selon l'invention, on pourra avoir recours par exemple à des radioisotopes, à des marqueurs chimiques ou enzymatiques, à des marqueurs chimioluminescents.

L'invention se rapporte par ailleurs à un procédé pour détecter in vitro une pancréatite aiguë à partir d'un échantillon biologique comprenant les étapes de:

- mise en contact de l'échantillon biologique susceptible de contenir la PAP humaine avec des anticorps dirigés contre la PAP humaine,
- détection de la réaction antigène-anticorps entre les susdits anticorps et la PAP humaine.

L'invention vise aussi l'utilisation des anticorps dirigés contre la PAP le cas échéant sous forme de composition comprenant plusieurs anticorps marqués, pour la visualisation en imagerie médicale de la glande pancréatique, l'anticorps étant au préalable marqué à l'aide d'un radioisotope ou d'un marqueur chimique ou enzymatique.

La visualisation peut permettre de déceler la présence de PAP humaine.

A cet égard, l'invention vise un procédé d'observation de la glande pancréatique caractérisé par :

- l'injection à un patient d'une composition ci-dessus, dans des conditions physiologiquement acceptables,
- l'observation d'une réaction entre les anticorps contenus dans la susdite composition et la PAP humaine lorsqu'elle est présente.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples et les figures qui suivent :

- figure 1 : Expression de la PAP et de l'amylase au cours de la pancréatite aiguë expérimentale du rat. Analyse par "Northern blot" - charge par piste : 30  $\mu$ g ARN total, le même filtre a été utilisé successivement pour PAP et Amylase. Sondes : cDNA PAP (environ 800 bp) et Amylase (environ 1100 bp), marquées au  $^{32}$ P avec une activité spécifique d'environ  $2 \times 10^9$  cpm/mg.
- on a observé les phénomènes suivants : induction de l'expression du gène pap (12 heures -48 heures) (phase aiguë) ; suppression de l'induction durant la récupération (5-10 jours) ; au contraire, l'amylase baisse durant la phase aiguë.
- figure 2 : Séquence nucléotidique codant pour la PAP de rat, et la séquence d'acides aminés correspondante.
- figure 3 : Fragment de la séquence nucléotidique codant pour la PAP humaine, et la séquence d'acides aminés correspondante.
- figure 4 : Séquence nucléotidique (S4) caractéristique de la PAP humaine dont la séquence codante S4, et la séquence d'acides aminés (A3) qui lui correspond.

**1. Construction d'une bibliothèque DNAc pancréatique de rat dans le vecteur  $\lambda$ gt11.**

Préparation de l'ARN pancréatique de rat : la préparation a été réalisée en suivant exactement la technique de Chirgwin, J.M., et al, Biochemistry (WASH) (1979), 19, 5294-5299. La fraction des ARN messagers de cet ARN total a été séparée par chromatographie sur colonne d'oligo-dT cellulose selon la technique de Aviv, H. et Leder, P., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, (1972), 69, 1408-1412.

Préparation du cDNA : l'ADNc pancréatique a été synthétisé à l'aide du kit commercialisé par Amersham France S.A. (code RPN 1256), en suivant exactement les recommandations du fabricant.

Construction de la bibliothèque : la bibliothèque a été construite dans le vecteur d'expression  $\lambda$ gt11 à l'aide du kit commercialisé par Amersham France S.A. (code RPN 1280), en suivant exactement les recommandations du fabricant.

**2. Construction d'une bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine dans le vecteur  $\lambda$ gt10.**

Préparation d'ARN pancréatique humain et synthèse de l'ADNc correspondant aux ARN messagers : des fragments de pancréas normal provenant de donneurs d'organe en coma dépassé ont été traités comme décrit ci-dessus pour le pancréas de rat.

Construction de la bibliothèque : la bibliothèque a été construite dans le vecteur de clonage  $\lambda$ gt10 à l'aide du kit commercialisé par Amersham France S.A. (code RPN 1257), en suivant les recommandations du fabricant.

**3. Criblage de la bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine avec un clone exprimant la PAP de rat.**

A partir de la bibliothèque d'ADNc pancréatique de rat construite selon la méthode ci-dessus, on a sélectionné un clone reconnu par des anticorps polyclonaux dirigés contre la PAP de rat.

L'ADNc de ce clone de PAP de rat a été isolé et utilisé en tant que sonde pour cribler la banque d'ADNc pancréatique humaine obtenue dans  $\lambda$ gt10, telle que décrite ci-dessus.

Dans un premier temps, le criblage a été réalisé dans les conditions de stringence suivantes 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200  $\mu$ g ADN de sperme de saumon, 18 heures à 68°C avec un rinçage dans 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois pendant 15 minutes à 65°C. Ceci permet d'obtenir environ 80 clones d'ADNc humain.

Ensuite on a réalisé un criblage avec l'ADNc PSP, dans le but d'éliminer les clones non caractéristiques de la PAP humaine, qui étaient cependant capable d'hybrider avec l'ADNc de la PAP de rat dans les conditions ci-dessus: on a récupéré environ 50 clones qui comportent donc un fragment d'ADNc codant pour une protéine ou un polypeptide appartenant à la famille de la protéine PAP humaine.

Parmi ces clones on a sélectionné ceux dont l'ADNc présente la plus forte homologie avec la protéine PAP de rat, en réalisant un second criblage au moyen de l'ADNc de PAP de rat dans des conditions de stringence suivantes 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200  $\mu$ g ADN de sperme de saumon, 18 heures à 68° avec un rinçage dans 6 x SSC, 0,1 % SDS, pendant 2 heures à 65°C. On a ainsi sélectionné 9 clones positifs.

#### 4. Séquençage des clones sélectionnés

Les insertions des clones intéressants ont été sous-clonées dans les phages M13mp18-M13mp19 comme décrit dans "Molecular Cloning, a laboratory manual"

Sambrook , J., Fritsch, E.F., et Maniatis T. eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990). Le séquençage des phages M13 recombinants a été réalisé par la technique décrite par Sanger F. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1977), 74, 5463-5467, en utilisant l'amorce universelle commercialisée par Amersham (code N4511).

**5. Expression d'un fragment de PAP dans E.coli à l'aide du plasmide d'expression pEX et préparation d'anticorps contre la protéine hybride.**

Un kit d'expression faisant appel au plasmide pEX dans E. coli, commercialisé par la société Genofit sous la référence G2104, a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant. Des fragments de restriction correspondant à la séquence codante de la protéine ont été insérés dans le plasmide pEX. Les plasmides recombinants ont servi à transformer des bactéries (E. coli souche pop 2136). Les protéines des bactéries recombinantes ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 %. La bande protéique correspondant à la PAP hybride a été découpée, homogénéisée dans de l'adjuvant de Freund et injectée à des lapins à raison de 3 injections par lapin à 3 semaines d'intervalle, chaque injection contenant environ 20 µg de protéine hybride. Le sang des lapins a ensuite été prélevé et les immunoglobulines G purifiées sur colonne de protéine A-Sepharose (Pharmacia-France).

R E V E N D I C A T I O N S

1. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine, tel qu'obtenu par la mise en oeuvre des étapes suivantes :

- un premier criblage d'une bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine, ledit ADNc humain étant inséré dans un vecteur de clonage approprié, comprenant l'hybridation avec des sondes constituées par l'ADNc de la protéine PAP du rat, dans une solution constituée par : 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C, suivie d'un rinçage dans les conditions suivantes : 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois 15 minutes à 65°C,
- la sélection des clones positifs d'ADNc humain ayant hybridé lors du criblage avec l'ADNc de la protéine PAP de rat, ces clones étant dits positifs,
- un deuxième criblage avec une séquence d'ADNc d'une protéine PSP dans les conditions d'hybridation ci-dessus avec un rinçage en présence de 0,1 x SSC, 0,1 % SDS, pendant 2 heures à 65°C afin d'éliminer les clones non spécifiques de l'ADNc de PAP humaine ayant cependant hybridé avec l'ADNc de PAP de rat et
- la récupération des clones n'ayant pas hybridé avec l'ADNc PSP,
- la récupération des fragments ADNc des clones positifs obtenus.

2. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de criblage avec l'ADNc PSP est suivie d'une étape de criblage avec l'ADNc de PAP de rat, dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhardt, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg d'ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C, suivi d'un rinçage pendant 2 heures à 65°C.

3. Fragment d'ADNc de la PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il répond à la séquence S3 suivante :

ATG CTG

CCT CCC ATG GCC CTG CCC AGT GTA TCT TGG ATG CTG CTT  
TCC TGC CTC ATG CTG CTG TCT CAG GTT CAA GGT GAA GAA  
CCC CAG AGG GAA CTG CCC TCT GCA CGG ATC CGC TGT CCC  
AAA GGC TCC AAG GCC TAT GGC TCC CAC TGC TAT GCC TTG  
TTT TTG TCA CCA AAA TCC TGG ACA GAT GCA GAT CTG GCC  
TGC CAG AAG CGG CCC TCT GGA AAC CTG GTG TCT GTG CTC  
AGT GGG GCT GAG GGA TCC TTC GTG TCC TCC CTG GTG AAG  
AGC ATT GGT AAC AGC TAC TCA TAC GTC TGG ATT GGG CTC  
CAT GAC CCC ACA CAG GGC ACC GAG CCC AAT GGA GAA GGT  
TGG GAG TGG AGT AGC AGT GAT GTG ATG AAT TAC TTT GCA  
TGG GAG AGA AAT CCC TCC ACC ATC TCA AGC CCC GGC CAC  
TGT GCG AGC CTG TCG AGA AGC ACA GCA TTT CTG AGG TGG  
AAA GAT TAT AAC TGT AAT GTG AGG TTA CCC TAT GTC TGC  
AAA GTT CAC

4. Fragment d'ADNc de la PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il code pour l'enchaînement d'acides aminés A3 suivant :

Met Leu

Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu  
 Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu  
 Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro  
 Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu  
 Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala  
 Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu  
 Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys  
 Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu  
 His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly  
 Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala  
 Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His  
 Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp  
 Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val Cys  
 Lys Val His

5. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant une homologie d'au moins 60 %, de préférence d'au moins 70 % avec au moins un enchaînement d'environ 100 nucléotides, compris dans la séquence S2 suivante caractéristique de l'ADNc de la PAP mature de rat, ou dans la séquence S3 caractéristique d'un fragment d'ADNc de PAP humaine.

Séquence 52 :

10	GAAGACT	30	GCACGCATTA	40	GTTGCCCCAA	50	AGGCTCCCAG	60
70	CCTCCGAGAA	80	AATACCCCTCT	90	TGCCCCCTTT	100	CAGATACCAC	110
130	CCTACTGCTA	140	TGCCCTGTTT	150	TGAAGGACAC	160	CTTGATCTG	170
190	AGAAGAGACC	200	TGAAGGACAC	210	CAAGAACACT	220	GGAAACAGCT	230
250	CATCCATGGT	260	CAAGAACACT	270	TGGAGAACCC	280	AATGGAGGTG	290
310	CCACTCTTGG	320	TGGAGAACCC	330	CTGGGAGAGG	340	AATGGAGGTG	350
370	ATTATGTCAA	380	CTGGGAGAGG	390	CTGGGAGAGG	400	CTGCCCTTAGA	410
430	TGTC AAGATC	440	TTCTGGATTT	450	CTAAGATGGA	460	GAGATACCAC	470
	TACGTC TGCA		AATTACAGG		TTAAAATTAC		CAGACAGCAA	480
							ACAGCTT	

6. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est capable d'hybrider avec la séquence nucléotidique S1 suivante caractéristique de l'ADNc de la PAP de rat, et/ou avec la séquence nucléotidique S2 caractéristique de l'ADNc de la PAP de rat mature dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C et avec un rinçage dans une solution comprenant 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois pendant 15 minutes à 65°C.

Séquence 61 :

10	20	30	40	50	60
AAAACCATCC	AAATCGCCCG	CAAGACAGCT	AAGGAGGAGC	AGAAAGATGA	TGAGAGTTAA
70	80	90	100	110	120
TATGTTGCAT	CGCTTGGCCT	TCCCAGTCAT	GTCCTGGATG	CTGCTCTCCT	GCCTGATGCT
130	140	150	160	170	180
CTTATCACAG	GTGCAAGGAG	AAGACTCTCC	GAAGAAAATA	CCCTCTGCAC	GCATTAGTTG
190	200	210	220	230	240
CCCCAAAGGC	TCCCAGGCAT	ATGGCTCCTA	CTGCTATGCC	CTGTTTCAGA	TACCACAGAC
250	260	270	280	290	300
CTGGTTTGAT	GCAGAACTGG	CCTGCCAGAA	GAGACCTGAA	GGACACCTTG	TATCTGTGCT
310	320	330	340	350	360
CAATGTAGCT	GAAGCTTCAT	TCTTGGCATC	CATGGTCAAG	AACACTGGAA	ACAGCTACCA
370	380	390	400	410	420
ATATACCTGG	ATTGGACTCC	ATGACCCAC	TCTTGGTGGG	GAACCCAATG	GAGGTGGATG
430	440	450	460	470	480
GGAGTGGAGT	AACAATGACA	TAATGAATTA	TGTCAACTGG	GAGAGGAACC	CATCTACTGC
490	500	510	520	530	540
CTTAGACCGC	GGATTCTGTG	GCAGCTTGTG	AAGATCTTCT	GGATTTCATA	GATGGAGAGA
550	560	570	580	590	600
TACCACATGT	GAAGTTGAAG	TTGCCCTACG	TCTGCAAATT	TACAGGTAA	AATTACCAGA
610	620	630	640	650	660
CAGCAACAG	CTTAGTTTG	TCCCTGAAGCA	CATCCTGTCA	AGGGCAGAAA	TATGAAGACT
670	680	690	700	710	720
TGCGTAGAAA	AAGTGATTC	TATCTACAGT	CCATATTGGA	GCTCTAATCA	TTCTTTAGCC
730	740	750	760	770	780
AATTTTGAT	AAGTTGTGTC	CTCATGTCTT	GGAAGCAGT	AATAAACCTC	AGTCTCTCTT
790	800	810	820	830	840
CGAAAAAAA	AAA				

7. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique suivante:

10 20 30 40 50 60  
TTTGTAAAGG ATTCCCTTGA GAATTATGTA AAAGTTTAC AAGAGTCCAT CTCATTCTCT

70 80 90 100 110 120  
TTGTCCCCCT CAAAGCTGGC TTGCCAGAAG CGGCCCTCTG GAAAACTGGT GTCTGTGCTC

130 140 150 160 170 180  
AGTGGGGCTG AGGGATCCTT CGTGTCCCTCC CTGGTGAGGA GCATTAGTAA CAGCTACTCA

190 200 210 220 230 240  
TACATCTGGA TTGGGCTCCA TGACCCACCA CAGGTGCGAG TATATCCTCC CCTCTCTGTT

250 260 270 280 290 300  
ACCTCTCAAG GTACTGTGTGT TGCCCAGGCG CACTCCCTGT CCCCAGTCCC TGCCCAGGAA

GTACTT

8. Fragment d'ADNc caractérisé en ce qu'il répond à la séquence nucléotidique S1 codant pour la protéine PAP de rat, à une partie ou à une variante de cette séquence dès lors que cette partie ou variante code pour une protéine ou un peptide reconnu par des anticorps dirigés contre la protéine PAP de rat ou qu'elle hybride avec la séquence S1 dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, 18 heures à 68°C et après un rinçage dans les conditions suivantes : 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois 15 minutes à 65°C.

9. Fragment d'ADNc caractérisé en ce qu'il code pour une protéine répondant à l'une des séquences d'acides aminés A1 ou A2 suivantes, ou pour une séquence d'acides aminés ayant une homologie de 40 à 80 % de préférence de 50 à 60 % avec au moins un enchaînement d'environ 25 acides aminés des séquences A1 ou A2, ou dans la séquence A3 de la protéine PAP humaine.

A1

MetLeuHisArgLeuAlaPheProValMetSerTrpMetLeuLeuSerCysLeuMetLeuSerGlnValGln  
GlyGluAspSerProLysLysIleProSerAlaArgIleSerCysProLysGlySerGlnAlaTyrGlySerTyr  
CysTyrAlaLeuPheGlnIleProGlnThrTrpPheAspAlaGluLeuAlaCysGlnLysArgProGluGlyHis  
LeuValSerValLeuAsnValAlaGluAlaSerPheLeuAlaSerMetValLysAsnThrGlyAsnSerTyrGln  
TyrThrTrpIleGlyLeuHisAspProThrLeuGlyGlyGluProAsnGlyGlyGlyTrpGluTrpSerAsnAsn  
AspIleMetAsnTyrValAsnTrpGluArgAsnProSerThrAlaLeuAspArgGlyPheCysGlySerLeuSer  
ArgSerSerGlyPheLeuArgTrpArgAspThrThrCysGluValGluValAlaLeuArgLeuGlnIleTyrArg  
LeuLysLeuProaspSerLysGlnLeu

A2

GluAspSerProLysLysIleProSerAlaArgIleSerCysProLysGlySerGlnAlaTyrGlySerTyr

CysTyrAlaLeuPheGlnIleProGlnThrTrpPheAspAlaGluLeuAlaCysGlnLysArgProGluGlyHis

LeuValSerValLeuAsnValAlaGluAlaSerPheLeuAlaSerMetValLysAsnThrGlyAsnSerTyrGln

35

TyrThrTrpIleGlyLeuHisAspProThrLeuGlyGlyGluProAsnGlyGlyTrpGluTrpSerAsnAsn

AspIleMetAsnTyrValAsnTrpGluArgAsnProSerThrAlaLeuAspArgGlyPheCysGlySerLeuSer

ArgSerSerGlyPheLeuArgTrpArgAspThrThrCysGluValGluValAlaLeuArgLeuGlnIleTyrArg

LeuLysLeuProAspSerLysGlnLeu

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10. Fragment d'acide nucléique caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment d'ADN complémentaire du fragment d'ADNc selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou encore en ce qu'il s'agit du fragment d'ARN correspondant à cet ADNc.

11. Protéine PAP humaine, telle qu'obtenue par l'expression d'un fragment d'ADNc de la PAP humaine, tel qu'obtenu selon la revendication 1 ou la revendication 2, au moyen d'un système d'expression adapté, par exemple un hôte cellulaire transformé par un vecteur d'expression, lui-même modifié par l'insertion du susdit fragment d'ADNc de la PAP humaine.

12. Protéine PAP humaine selon la revendication 11, telle qu'obtenue par l'expression d'un fragment d'ADNc de la PAP humaine, inséré en phase dans un vecteur pEX, dans E.coli, notamment dans E.coli souche pop2136.

13. Protéine PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement d'acides aminés A3.

14. Protéine PAP humaine selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement d'acides aminés suivant :

	39
Phe Val Lys Asp Ser Leu Glu Asn Tyr Val Lys Val Leu	13
	78
Gln Glu Ser Ile Ser Phe Ser Leu Ser Pro Ser Lys Leu	26
	117
Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Val	39
	156
Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val	52
	195
Arg Ser Ile Ser Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly	65
	234
Leu His Asp Pro Thr Gln Val Arg Val Tyr Pro Pro Leu	78
	273
Ser Val Thr Ser Gln Gly Thr Val Val Ala Gln Ala His	91
	306
Ser Leu Ser Pro Val Pro Ala Gln Glu Val Leu	102

15. Protéine PAP humaine caractérisée en ce que sa séquence d'acides aminés présente une homologie d'au moins 50%, de préférence d'au moins 60% et de façon très préférée d'au moins 70 % avec au moins un enchaînement d'environ 25 acides aminés, compris dans la séquence A2 de la protéine PAP de rat mature ou avec la séquence A3 de la protéine PAP humaine.

16. Protéine PAP de rat caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement d'acides aminés suivant, ou une variante ou une partie de cet enchaînement dès lors que cette partie ou cette variante est reconnue par des anticorps dirigés contre la protéine PAP de rat ou qu'elle présente une homologie d'au moins 50 %, de préférence d'au moins 60% avec la séquence A2 de PAP de rat.

17. Anticorps caractérisés en ce qu'ils reconnaissent la protéine PAP humaine selon l'une

quelconque des revendications 11 à 15 et en ce qu'il s'agit d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

18. Anticorps monoclonaux tels qu'obtenus à partir d'un hybridome, précédemment formé par fusion d'une cellule de myélome et d'une cellule splénique d'un animal préalablement immunisé avec une protéine selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

19. Anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement la partie NH<sub>2</sub> - terminale de l'enchaînement d'acides aminés A3.

20. Anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre le peptide Glu Glu Pro Gln Arg.

21. Hybridome tel qu'obtenu à partir de la fusion d'une cellule de myélome avec une cellule splénique d'un animal préalablement immunisé avec une protéine PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

22. Vecteur d'expression et/ou de clonage caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

23. Hôte cellulaire transformé par un vecteur d'expression selon la revendication 22, dans des conditions permettant l'obtention de la protéine ou du peptide codé par le fragment d'ADN inséré dans le vecteur, ledit hôte cellulaire étant par exemple choisi parmi les bactéries, notamment en ce qu'il s'agit de E.coli, parmi les levures, les cellules d'insectes ou de mammifères.

24. Produit d'expression de l'hôte cellulaire transformé selon la revendication 23.

25. Composition pour le diagnostic in vitro de la pancréatite aiguë ou pour l'observation de la glande

pancréatique en imagerie médicale, dans un échantillon biologique tel que le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps selon l'une quelconque des revendications 17 à 19 le cas échéant marqué, capable de former un complexe du type anticorps-antigène avec la protéine PAP humaine.

26. Kit pour le diagnostic in vitro de la pancréatite aiguë, à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend:

- au moins un anticorps selon l'une quelconque des revendications 17 à 20 capable de détecter la présence de la PAP humaine dans ledit échantillon biologique, lesdits anticorps étant le cas échéant marqués,
- selon la nature du marquage, un réactif pour détecter la présence d'un complexe du type antigène-anticorps spécifique,
- un témoin négatif.

27. Procédé pour détecter in vitro une pancréatite aiguë, à partir d'un échantillon biologique comprenant les étapes de:

- mise en contact de l'échantillon biologique susceptible de contenir la PAP humaine, avec des anticorps selon l'une quelconque des revendications 17 à 20,
- détection de la réaction antigène-anticorps entre les susdits anticorps et la PAP humaine.

28. Procédé d'observation de la glande pancréatique caractérisé par :

- l'injection à un patient d'une composition selon la revendication 25, dans des conditions physiologiquement acceptables,
- l'observation notamment par les techniques d'imagerie médicale d'une réaction entre les anticorps contenus

dans la susdite composition et la PAP humaine  
lorsqu'elle est présente.

EXPRESSION DES ARNm AMYLASE ET PAP AU COURS  
DE LA PANCREATITE AIGUE EXPERIMENTALE DU RAT

PAP



A

AM



B

0 0.5 1 2 5 10

↑  
INDUCTION

JOURS

FIGURE 1

2/4

AAAACCATCCAAATCGCCCGCAAGACAGCTAAGGAGGAGCAGAAAGATGATG	52
AGAGTTAAT ATG TTG CAT CGC TTG GCC TTC CCA GTC ATG Met Leu His Arg Leu Ala Phe Pro Val Met	91
TCC TGG ATG CTG CTC TCC TGC CTG ATG CTC TTA TCA CAG Ser Trp Met Leu Leu Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln	130
GTG CAA GGA GAA GAC TCT CCG AAG AAA ATA CCC TCT GCA Val Gln Gly Glu Asp Ser Pro Lys Lys Ile Pro Ser Ala	169
CGC ATT AGT TGC CCC AAA GGC TCC CAG GCA TAT GGC TCC Arg Ile Ser Cys Pro Lys Gly Ser Gln Ala Tyr Gly Ser	208
TAC TGC TAT GCC CTG TTT CAG ATA CCA CAG ACC TGG TTT Tyr Cys Tyr Ala Leu Phe Gln Ile Pro Gln Thr Trp Phe	247
GAT GCA GAA CTG GCC TGC CAG AAG AGA CCT GAA GGA CAC Asp Ala Glu Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Glu Gly His	286
CTT GTA TCT GTG CTC AAT GTA GCT GAA GCT TCA TTC TTG Leu Val Ser Val Leu Asn Val Ala Glu Ala Ser Phe Leu	325
GCA TCC ATG GTC AAG AAC ACT GGA AAC AGC TAC CAA TAT Ala Ser Met Val Lys Asn Thr Gly Asn Ser Tyr Gln Tyr	364
ACC TGG ATT GGA CTC CAT GAC CCC ACT CTT GGT GGA GAA Thr Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gly Glu	403
CCC AAT GGA GGT GGA TGG GAG TGG AGT AAC AAT GAC ATA Pro Asn Gly Gly Gly Trp Glu Trp Ser Asn Asn Asp Ile	442
ATG AAT TAT GTC AAC TGG GAG AGG AAC CCA TCT ACT GCC Met Asn Tyr Val Asn Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ala	481
TTA GAC CGC GGA TTC TGT GGC AGC TTG TCA AGA TCT TCT Leu Asp Arg Gly Phe Cys Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser	520
GGA TTT CTA AGA TGG AGA GAT ACC ACA TGT GAA GTT GAA Gly Phe Leu Arg Trp Arg Asp Thr Thr Cys Glu Val Glu	559
GTT GCC CTA CGT CTG CAA ATT TAC AGG TTA AAA TTA CCA Val Ala Leu Arg Leu Gln Ile Tyr Arg Leu Lys Leu Pro	598
GAC AGC AAA CAG CTT T AGTTTGTCTGAAGCACATCCTGTCAAGGG Asp Ser Lys Gln Leu	644
GCAAAATATGAAGACTTGCCTAGAAAAAGTGTATTCTATCTACAGTCCATAT	696
TGGAGCTCTAATCATTCTTTAGCCAATTTTGTATAAGTTGTGTCCTCATGTC	748
TTGGAAAGCAGTAATAAACCTCAGTCTCTCTTCGAAAAAAAAAAAA	793

Figure 2

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

3/4

TTT	GTT	AAG	GAT	TCC	CTT	GAG	AAT	TAT	GTA	AAA	GTT	TTA	39
Phe	Val	Lys	Asp	Ser	Leu	Glu	Asn	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	13
CAA	GAG	TCC	ATC	TCA	TTC	TCT	TTG	TCC	CCC	TCA	AAG	CTG	78
Gln	Glu	Ser	Ile	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Pro	Ser	Lys	Leu	26
GCT	TGC	CAG	AAG	CGG	CCC	TCT	GGA	AAA	CTG	GTG	TCT	GTG	117
Ala	Cys	Gln	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Lys	Leu	Val	Ser	Val	39
CTC	AGT	GGG	GCT	GAG	GGA	TCC	TTC	GTG	TCC	TCC	CTG	GTG	156
Leu	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Ser	Phe	Val	Ser	Ser	Leu	Val	52
AGG	AGC	ATT	AGT	AAC	AGC	TAC	TCA	TAC	ATC	TGG	ATT	GGG	195
Arg	Ser	Ile	Ser	Asn	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Ile	Trp	Ile	Gly	65
CTC	CAT	GAC	CCC	ACA	CAG	GTG	CGA	GTA	TAT	CCT	CCC	CTC	234
Leu	His	Asp	Pro	Thr	Gln	Val	Arg	Val	Tyr	Pro	Pro	Leu	78
TCT	GTT	ACC	TCT	CAA	GGT	ACT	GTT	GTT	GCC	CAG	GCG	CAC	273
Ser	Val	Thr	Ser	Gln	Gly	Thr	Val	Val	Ala	Gln	Ala	His	91
TCC	CTG	TCC	CCA	GTC	CCT	GCC	CAG	GAA	GTA	CTT			306
Ser	Leu	Ser	Pro	Val	Pro	Ala	Gln	Glu	Val	Leu			102

Figure 3

4/4

cgggagagtgactcctgattgcctcctcaagtcgcagacact	ATG CTG	48
	Met Leu	2
CCT CCC ATG GCC CTG CCC AGT GTA TCT TGG ATG CTG CTT		87
Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu		15
TCC TGC CTC ATG CTG CTG TCT CAG GTT CAA GGT GAA GAA		126
Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu		28
CCC CAG AGG GAA CTG CCC TCT GCA CGG ATC CGC TGT CCC		165
Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro		41
AAA GGC TCC AAG GCC TAT GGC TCC CAC TGC TAT GCC TTG		204
Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu		54
TTT TTG TCA CCA AAA TCC TGG ACA GAT GCA GAT CTG GCC		243
Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala		67
TGC CAG AAG CGG CCC TCT GGA AAC CTG GTG TCT GTG CTC		282
Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu		80
AGT GGG GCT GAG GGA TCC TTC GTG TCC TCC CTG GTG AAG		321
Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys		93
AGC ATT GGT AAC AGC TAC TCA TAC GTC TGG ATT GGG CTC		360
Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu		106
CAT GAC CCC ACA CAG GGC ACC GAG CCC AAT GGA GAA GGT		399
His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly		119
TGG GAG TGG AGT AGC AGT GAT GTG ATG AAT TAC TTT GCA		438
Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala		132
TGG GAG AGA AAT CCC TCC ACC ATC TCA AGC CCC GGC CAC		477
Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His		145
TGT GCG AGC CTG TCG AGA AGC ACA GCA TTT CTG AGG TGG		516
Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp		158
AAA GAT TAT AAC TGT AAT GTG AGG TTA CCC TAT GTC TGC		555
Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val Cys		171
AAA GTT CAC tgactagtgaggaggaagtcagcagcctgtgtttggt		603
Lys Val His		174
gtgcaactcatcatgggcatgagaccagtgaggactcaccctggaagaga		655
atattcgcttaattcccccaacctgaccacctcattcttatctttcttctgt		707
ttcttcctccccgctagtcatttcagtcctcttcattttgtcatcggcctaa		759
ggctttaagagcaataaaaatttttagtctgcaaaaaa		798

FIGURE 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00323

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>5</sup> C12N15/12; A61K49/00; G01N33/577		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>5</sup>	C12N; C07N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>*</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
P, X	GASTROENTEROLOGY Vol. 100 No. 3, March 1991 pages 755 - 782; KEIM, V. et al.: "Characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis" see the whole document  --	16
P, X	GASTROENTEROLOGY Vol. 98, No. 5pt2, May 1990, page A220 IOVANNA, J. et al.: "Rat Pancreatitis-Associated Protein (PAP) messenger RNA, nucleotide sequence and expression during acute experimental pancreatitis" see abstract  --  ./.	8, 16
<p><sup>*</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
22 July 1991 (22.07.91)		14 August 1991 (14.08.91)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	<p><b>DIGESTION</b> Vol. 31, No. 3, 25 September 1985, page 191 KEIM, V. et al.: "Pancreatitis-Associated Protein (PAP) in cerulein and bile acid induced ex" see abstract 74</p> <p style="text-align: center;">--</p>	16
X	<p><b>DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES</b> Vol. 30, No. 10, October 1985 page 977 KEIM, V. &amp; ROHR, G.: "Pancreatitis-Associated Protein (PAP) in cerulein- and bile acid-induced p" see abstract</p> <p style="text-align: center;">--</p>	16
X	<p><b>DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES</b> Vol. 30, No. 10, October 1985, page 988 ROHR, G. et al.: "Appearance of Pancreatitis Associated Protein (PAP) in taurocholate pancreatitis in the rat demonstrate by immuno-histology and immuno- electronmicroscopy" see abstract</p> <p style="text-align: center;">--</p>	16
X	<p><b>DIGESTION</b> Vol. 29, 1984 pages 242 - 249; KEIM, V. et al.: "An additional secretory protein in the rate pancreas" see the whole document (cited in the application)</p> <p style="text-align: center;">--</p>	16
X	<p><b>CLIN. PHYSIOL. BIOCHEM.</b> Vol. 4, 1986 pages 136 - 142; KEIM, V.: "Pancreatitis-associated protein in bile acid-induced pancreatitis of the rat" see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	16

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00323

**I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>**

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5                      C12N15/12 ;    A61K49/00 ;    G01N33/577

**II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification

Symboles de classification

CIB 5

C12N ;                      C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté

**III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS<sup>10</sup>**

Catégorie <sup>9</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
P, X	<p>GASTROENTEROLOGY vol. 100, no. 3, mars 1991, pages 775 - 782; KEIM, V. et al.: "Characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis" voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	16
P, X	<p>GASTROENTEROLOGY vol. 98, no. 5pt2, mai 1990, page A220 IOVANNA, J. et al.: "Rat Pancreatitis-Associated Protein (PAP) messenger RNA, nucleotide sequence and expression during acute experimental pancreatitis" voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	8, 16

<sup>9</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup>

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "L" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

**IV CERTIFICATION**

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 JUILLET 1991

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14. 08. 91

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

CHAMBONNET F. J.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
X	DIGESTION vol. 32, no. 3, 25 septembre 1985, page 191 KEIM, V et al.: "Pancreatitis-Associated Protein (PAP) in cerulein and bile acid induced ex" voir abrégé 74 ---	16
X	DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES vol. 30, no. 10, octobre 1985, page 977 KEIM, V. & ROHR,, G.: "Pancreatitis-Associated Protein (PAP) in cerulein- and bile acid-induced p" voir abrégé ---	16
X	DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES vol. 30, no. 10, octobre 1985, page 988 ROHR, G. et al.: "Appearance of Pancreatitis Associated Protein (PAP) in taurocholate pancreatitis in the rat demonstrated by immuno-histology and immuno-elec tronmicroscopy" voir abrégé ---	16
X	DIGESTION vol. 29, 1984, pages 242 - 249; KEIM, V. et al.: "An additional secretory protein in the rate pancreas" voir le document en entier (cité dans la demande) ---	16
X	CLIN. PHYSIOL. BIOCHEM. vol. 4, 1986, pages 136 - 142; KEIM, V.: "Pancreatitis-associated protein in bile acid-induced pancreatitis of the rat" voir le document en entier ---	16