

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 468**

21 Número de solicitud: 201300539

51 Int. Cl.:

**G01N 33/12** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**07.06.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**12.01.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/000038**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(100.0%)**

**Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**GONZALEZ JIMENEZ, Elena Guacimara y  
BAUTISTA SANTA CRUZ, José Manuel**

74 Agente/Representante:

**PLUMET ORTEGA, Joaquín**

54 Título: **Método de selección de anticuerpos específicos de merluza europea (Merluccius merluccius) para asignar individuos a sus poblaciones según sean de origen Atlántico o de origen Mediterráneo.**

57 Resumen:

Método de selección de anticuerpos específicos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) para asignar individuos a sus poblaciones según sean de origen Atlántico o de origen Mediterráneo.

La presente invención se refiere a un método para seleccionar péptidos a partir de proteínas de tejidos u órganos de merluza europea para producir anticuerpos específicos con los que identificar la procedencia de los individuos de merluza europea, asignándolos a la cuenca mediterránea o a la cuenca atlántica. Partiendo de cerebro, se han seleccionado péptidos localizados en las proteínas: ATP sintetasa, subunidad alfa; 14-3-3; y de canal de aniones dependiente de voltaje, respectivamente. Así mismo, la invención incluye la combinación de anticuerpos frente a los péptidos seleccionados, con los que se ha diseñado un método de inmunodetección para identificar las poblaciones de origen de la merluza europea. Con los anticuerpos producidos, la invención presenta también un kit de identificación del origen de las merluzas.

ES 2 526 468 A1

## DESCRIPCIÓN

Método de selección de anticuerpos específicos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) para asignar individuos a sus poblaciones según sean de origen Atlántico o de origen Mediterráneo

### Sector de la Técnica

La presente invención guarda relación con anticuerpos específicos frente a merluza (*Merluccius merluccius*) como herramientas de discriminación de sus poblaciones según su origen de procedencia (cuenca mediterránea o atlántica). La evaluación de dicha capacidad discriminante se basa en el análisis cuantitativo de los niveles de expresión de los antígenos de muestras de individuos de merluza capturados en ambas cuencas frente a dichos anticuerpos. La invención puede ser empleada en formato de análisis de diagnóstico basados en técnicas de inmunodetección.

### Estado de la técnica

En la actualidad, existe un aumento en la necesidad de desarrollar herramientas de trazabilidad, tanto de pescados como de productos de pescado procesado, para la protección del consumidor final y como marco legal de trabajo para la aplicación de normativas y leyes que reduzcan la pesca ilegal, incontrolada y no regulada (IUU). Estas herramientas de trazabilidad no sólo se enfocan en determinar la especie de pescado sino también el origen de la captura. Así pues, pescados o productos de pescado procesado que estén mal etiquetados, en los cuales se indique de forma incorrecta el origen de pesca, suponen un efecto negativo indirecto en la gestión de las poblaciones o stocks de pesca, cuya consecuencia final puede constituir el agotamiento de sus recursos (Stokstad, E. 2010, Science, 330:1468-1469). En este contexto, la lucha contra la pesca IUU es una prioridad para la Unión Europea (UE), debido a la grave amenaza que representa globalmente para los ecosistemas marinos y la sostenibilidad de la pesca mundial.

La merluza europea (*Merluccius merluccius*, Linnaeus, 1758) constituye una especie de alto interés pesquero dentro de la UE y se explota para la pesca a lo largo de toda su distribución. La merluza europea está distribuida geográficamente desde el Océano Atlántico occidental (aproximadamente desde los 62°N, cerca de las islas Shetland, incluyendo los fiordos Noruegos, hasta los 23°N en Mauritania) hasta el Mar Mediterráneo.

La gestión de la explotación de las poblaciones de merluza europea es llevada a cabo por el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM; en inglés, *International Council for the Exploration of the Seas*, ICES) y la Comisión General de Pesca del Mediterráneo (CGPM; en inglés, *General Fisheries Commission for the Mediterranean*, GFCM). Dentro de la UE, España es el mayor productor de merluza, con más de 23.000 toneladas de capturas (FAO, 2012, *FAO yearbook. Fisheries and Aquaculture Statistics 2010*). Se considera que las poblaciones de merluza del Noroeste Atlántico se encuentran sobreexplotadas (Murua, 2010, *Advances in Marine Biology*, 58: 97-154). Es por ello que estas organizaciones han expresado la necesidad de mantener la biomasa de dichas poblaciones a un nivel que permita su explotación sostenible de acuerdo con el máximo rendimiento sostenible (ICES, [www.ices.dk](http://www.ices.dk)). Para ello resulta necesaria una correcta determinación del origen de las capturas que permita controlar el tráfico ilegal de las poblaciones.

Los microsatélites constituyen las moléculas más utilizadas como herramientas de trazabilidad y para el análisis de diversidad genética y determinación de la estructuración de las poblaciones de merluza. Estudios basados en la utilización de estos marcadores han podido diferenciar a escala macro-geográfica dos stocks o poblaciones de merluza genéticamente diferentes, uno correspondiente al Océano Atlántico y otro al Mar Mediterráneo, con la zona de contacto situada en la costa cercana a Almería y Orán (Lundy et al., 1999, *Molecular Ecology* 8: 1889-1898). Sin embargo,

los microsatélites presentan limitaciones de calibración y reproducibilidad entre laboratorios y no suelen utilizarse como instrumento de control.

5 Con la caracterización de anticuerpos específicos de merluza europea capaces de asignar muestras de merluza con suficiente precisión mediante análisis por inmunoensayo, se abre un posible marco legal de trabajo para la aplicación de normativas y leyes que reduzcan la pesca IUU. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la existencia de estos anticuerpos ni su capacidad discriminadora mediante una técnica de inmunoensayo.

10

#### **Descripción detallada de la invención**

Método de selección de anticuerpos específicos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) para asignar individuos a sus poblaciones según sean de origen Atlántico o de origen Mediterráneo

15

La presente invención se refiere a un método de selección y posterior aplicación de anticuerpos específicos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) como herramientas de discriminación de sus poblaciones según su origen de procedencia (cuenca mediterránea o atlántica), mediante técnicas de inmunodetección. En extractos crudos de tejidos u órganos de merluza europea se identifican proteínas con diferente nivel de expresión, utilizando anticuerpos policlonales específicos frente a péptidos presentes en las proteínas en cuestión de esta especie. Posteriormente, en base al análisis estadístico de los niveles de expresión, es posible clasificar una muestra de merluza como procedente de la región atlántica o de la región mediterránea.

20  
25

En un primer aspecto de la invención se presenta un método en el que se aplican distintos criterios de selección de péptidos que, posteriormente, se utilizan para la producción de anticuerpos específicos frente a *Merluccius merluccius*. La utilización de varios criterios en la selección de los péptidos que han servido como antígenos en esta invención ha llevado a obtener

30

resultados con un poder de discriminación muy superior a la utilización de esos mismos criterios por separado.

5 En primer lugar, el método incluye el análisis de la expresión de proteínas de tejidos u órganos de merluza europea en individuos procedentes del Océano Atlántico y en individuos procedentes del Mar Mediterráneo. A continuación, se han seleccionado aquellas proteínas cuyos niveles de expresión son diferentes en los individuos procedentes del Océano Atlántico con respecto a los individuos procedentes del Mar Mediterráneo y se han identificado dichas  
10 proteínas. En una realización preferida de la invención, el órgano utilizado ha sido el cerebro y las proteínas seleccionadas han sido: la proteína ATP sintetasa, subunidad alfa de 60 kDa, caracterizada por SEQ ID NO: 1; la proteína 14-3-3 de 28 kDa, caracterizada por SEQ ID NO: 2; y la proteína de canal de aniones dependiente de voltaje de 30 kDa, caracterizada por SEQ ID  
15 NO: 3. A partir de estas proteínas se han identificado las secuencias de aminoácidos que se predicen como constituyentes de segmentos en  $\alpha$ -hélice transmembrana expuestos a la matriz extracelular y se han producido anticuerpos específicos frente a las secuencias de aminoácidos de dichos segmentos extracelulares.

20

De esta forma, se han determinado tres péptidos que se han utilizado para la producción de anticuerpos con capacidad de discriminación de las poblaciones de merluza europea. Estos péptidos están caracterizados por SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

25

Así mismo, el método puede incluir la adición de 1 o 2 aminoácidos y/o moléculas a los péptidos seleccionados, con el objetivo de aumentar su capacidad inmunogénica.

30

La invención también incluye combinaciones de anticuerpos específicos de merluza europea para asignar individuos a sus poblaciones según sean de origen Atlántico o de origen Mediterráneo que incluyen uno o más anticuerpos

generados según el método que se acaba de describir. Estas combinaciones pueden incluir uno o varios de los anticuerpos específicos generados frente a los péptidos caracterizados por SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y/o SEQ ID NO: 6 que, además, pueden incluir 1 o 2 aminoácidos y/o moléculas, con el  
5 objetivo de aumentar su capacidad inmunogénica.

En otro aspecto de la invención, se presenta un método de clasificación de muestras de extracto proteico de merluza en poblaciones del Atlántico o del Mediterráneo que comprende la detección y cuantificación de antígenos  
10 correspondientes a proteínas de la especie *Merluccius merluccius*, mediante técnicas de inmunodetección a partir de los anticuerpos generados en la presente invención, y la cuantificación de los niveles de expresión de las correspondientes proteínas. Los análisis de los niveles de expresión para cada proteína resultan ser diferentes significativamente y característicos de  
15 poblaciones del Mediterráneo o del Atlántico.

Mediante la aplicación de técnicas de inmunodetección con los anticuerpos producidos frente a los péptidos caracterizados por SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y/o SEQ ID NO: 6 frente a los antígenos presentes en el cerebro de los  
20 individuos de merluza europea, se pueden asignar dichos individuos a sus poblaciones de origen según provengan del Atlántico o del Mediterráneo.

Las técnicas de inmunodetección que comprende la invención pueden ser técnicas inmunoenzimáticas (como la técnica ELISA), de inmunofluorescencia  
25 (como la técnica de FPIA), de inmunoblot (como la técnica de Westernblot) y de aglutinación (como la técnica de DAT o FAST) o cualquier otro método basado en la detección de antígenos.

Por otro lado, la invención incluye un kit para asignar individuos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) a sus poblaciones según sean de origen  
30 Atlántico o de origen Mediterráneo mediante un método de inmunodetección en el que se incluye al menos uno de los anticuerpos producidos frente a los

péptidos caracterizados por SEQ ID NO: 4, 5 y/o 6 o frente a estos péptidos que, además, incluyen 1 o 2 aminoácidos y/o moléculas, con el objetivo de aumentar su capacidad inmunogénica.

## 5 Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** Gel de poliacrilamida-SDS al 10% correspondiente a los anticuerpos purificados obtenidos frente a SEQ ID NO: 4, 5 y 6 (carriles 2-4, respectivamente) y a los anticuerpos sin purificar obtenidos frente a SEQ ID  
10 NO: 4, 5 y 6 (carriles 6-8, respectivamente). El carril 1 corresponde al tamaño estándar de proteínas (Bio-Rad. N° Ref 161-0318). Se cargaron en cada carril aproximadamente 40 µg de cada anticuerpo.

**Figura 2:** Separación de los extractos de proteína mediante gel de  
15 poliacrilamida-SDS al 10% e inmunodetección mediante los antiseros generados. Se muestran bandas representativas que corresponden con el tamaño de migración de la proteína de la que se ha seleccionado el péptido usado como antígeno. Todas las bandas fueron analizadas, pero solo se muestran algunas representativas para cada una de las cinco poblaciones  
20 muestreadas. ATL: individuos de las poblaciones del Océano Atlántico. MED: individuos de las poblaciones del Mar Mediterráneo. Líneas 1, 2 y 3 corresponde a los tres diferentes anticuerpos testados.

**Figura 3:** Gráfica "box plot" del análisis estadístico de los valores  
25 cuantitativos de proteínas detectados en inmunotransferencias "Western". El valor estadístico medio de la señal analítica (representada por una línea negra), los cuartiles superiores e inferiores y los "outliers" también están indicados. A, C y E corresponden a individuos de las poblaciones del Océano Atlántico. B, D y F corresponden a individuos de las poblaciones del Mar  
30 Mediterráneo. Líneas 1, 2 y 3 corresponden a los tres tipos de anticuerpos testados.

**Modo de realización de la invención**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

**5 Ejemplo 1***Selección de las secuencias de aminoácidos*

Se siguieron dos criterios distintos de selección de las secuencias de aminoácidos utilizados para la producción de los anticuerpos. Por un lado, se seleccionaron las proteínas que presentaban mayor capacidad de  
10 discriminación entre poblaciones (es decir, aquellas que presentaban mayores niveles de expresión diferencial a nivel estadístico). Posteriormente, de estas proteínas se seleccionaron aquellos péptidos o secuencias de aminoácidos que mediante análisis predictivo presentaban exposición en la matriz extracelular. Así, 35 bandas o manchas ("spots") de proteínas  
15 procedentes de cerebro de merluza fueron seleccionadas mediante análisis de la variación en su expresión comparando muestras procedentes de distintas poblaciones geográficas y analizándolas mediante 2D/DIGE y espectrometría de masas, de un total de 145 proteínas (Gonzalez et al. 2010, Journal of Proteome Research, 9: 6392-6404). Una vez seleccionadas estas  
20 35 proteínas, se identificaron mediante análisis de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Los análisis de MALDI-TOF MS se realizaron en un espectrómetro de masas tipo 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA), operando en modo reflector de ión positivo con un voltaje de aceleración de 20000 V. MALDI-TOF/TOF generó  
25 péptidos o huella peptídica ("mass fingerprint"), y los péptidos o secuencias de aminoácidos (con una carga +1) con una relación señal-ruido mayor de 10 se recogieron y se agruparon en una lista de pesos moleculares monoisotópicos, filtrando el resto de los picos mediante el programa GPS Explorer v3.6 (Applied Biosystems, Framingham, MA). A fin de identificar las  
30 proteínas, la huella peptídica resultante se comparó con las masas peptídicas esperadas para cada entrada disponible en la base de datos del NCBI específica de secuencias proteínicas de peces (constituida por 257.377



secuencias y 83.362.140 residuos a fecha de 25 de Septiembre de 2009), utilizando el programa MASCOT v2.1 (Matrix Science). De las 35 proteínas con niveles significativos de expresión se seleccionaron estadísticamente mediante la Función Discriminante de Fisher, aquellas tres proteínas con capacidad discriminante de más del 90%. De esta forma, se seleccionaron: la proteína ATP sintetasa, subunidad alfa de 60 kDa (número de acceso del NCBI: gi|223648354; SEQ ID NO: 1, secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína ATP sintetasa subunidad alfa de la especie *Salmo salar*); la proteína 14-3-3 de 28 kDa (número de acceso del NCBI: gi|50844461; SEQ ID NO: 2, secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína 14-3-3 de la especie *Oreochromis mossambicus*) y proteína de canal de aniones dependiente de voltaje de 30 kDa (número de acceso del NCBI: gi|169642540; SEQ ID NO: 3, secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína de canal de aniones dependiente de voltaje de la especie *Salmo salar*).

Como segundo criterio de selección, a partir de las proteínas antes identificadas, se escogieron las secuencias de aminoácidos que presentaban mayor exposición a la matriz extracelular. Para ello se utilizó el programa HMMTOP v2.0, que es capaz de predecir la topología transmembrana de las proteínas a partir de su secuencia completa de aminoácidos (Tusnady y Simon, 2001, *Bioinformatics*, 17 (9): 849-850).

Como resultado, se seleccionaron tres regiones de secuencia de aminoácidos o péptidos:

- 1) EAYPGDVFYLSHR, caracterizado por SEQ ID NO: 4, fragmento interno (334-347) de SEQ ID NO: 1,
- 2) AVTEQGAELSNEER, caracterizado por SEQ ID NO: 5, fragmento interno (27-41) de SEQ ID NO: 2,
- 3) VNSSLVGLGYTQTLKPGIK, caracterizado por SEQ ID NO: 6, fragmento interno (236-256) de SEQ ID NO: 3.

Los números entre paréntesis se refieren a los residuos de la secuencia deducida a partir del cDNA, tal y como aparecen en las secuencias correspondientes.

## 5 **Ejemplo 2**

### *Producción y purificación de los anticuerpos policlonales*

Los péptidos seleccionados según el ejemplo 1 se encargaron para sintetizar a la compañía Mimotopes (Mimotopes Pty. Ltd., Clayton, Victoria, Australia). Los péptidos resultantes se purificaron por HPLC. Para obtener una  
10 respuesta inmune más fuerte, se añadió durante la síntesis un residuo de cisteína (C) en el extremo N-terminal de los péptidos, que fue utilizado para conjugarlos con una molécula de hemocianina de lapa (KLH) mediante la unión con maleimida. Estos péptidos así preparados fueron usados como antígenos en el proceso de inmunización y producción de anticuerpos  
15 policlonales que se describe a continuación.

El experimento al completo se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), y se siguieron las directrices del Consejo Científico Internacional de Animales de Laboratorio. Seis conejos  
20 hembra de la raza New Zeland White (NZW) se compraron con un peso medio de 2.5-3.5 kilogramos a la granja San Bernardo (Navarra, España), libres de enfermedades. Se mantuvieron en los animalarios de la UCM con acceso libre y continuado a comida y agua. Para la primera inmunización, se hizo una mezcla (dilución 1:1) con el péptido (disuelto en tampón fosfato  
25 salino -PBS- a una concentración de 1 mg) y el adyuvante de Freund completo (Sigma). Cada péptido se inoculó en dos animales para obtener dos réplicas de un mismo anticuerpo. El adyuvante de Freund completo (AFC) se utilizó únicamente en la primera inmunización, donde 300 ng de la emulsión antes preparada fueron administrados de forma intradérmica a cada conejo  
30 hembra. En las siguientes inmunizaciones, el AFC fue sustituido por el adyuvante incompleto de Freund (AIF). Así pues, tres semanas después de la primera inmunización, se realizaron otras tres administraciones cada dos

semanas a una concentración menor (200 ng). Las muestras de sangre se recogieron antes y después de las inmunizaciones. La sangre extraída se dejó a temperatura ambiente durante 3-4 horas, transcurridas las cuales se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C para separar los sueros. De esta forma, se aislaron seis sueros heterólogos (que contenían los anticuerpos) del resto de las fracciones de sangre, y, posteriormente, se conservaron a -20°C.

Con el fin de evitar interacciones inespecíficas en los análisis inmunoquímicos posteriores, los anticuerpos así obtenidos fueron purificados utilizando el kit Spin Nab (Pierce Biotechnology, Inc.), siguiendo el protocolo del proveedor. La fracción purificada de inmunoglobulinas-G (IgG) se analizó mediante separación por electroforesis en geles de SDS-PAGE. Los resultados indicaron una fuerte producción de anticuerpos al final del proceso de inmunización.

Este proceso de purificación puede verse resumido en la Figura 1.

### **Ejemplo 3**

#### *20 Detección de los anticuerpos por "western blot"*

Se analizaron un total de 72 muestras de cerebro de merluza para determinar la capacidad del método para asignar de forma significativa individuos a cada cuenca de origen (atlántica o mediterránea), utilizando los anticuerpos generados según el ejemplo 2. La extracción de proteínas de tejido de cerebro se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos previamente (Gonzalez et al. 2010, Journal of Proteome Research, 9: 6392-6404). Se utilizaron muestras de cerebro de merluza europea de regiones alejadas geográficamente, concretamente de dos regiones en el Océano Atlántico: el Golfo de Vizcaya, (área FAO correspondiente: 27.VIII.C) y la costa de Portugal, (área FAO: 27.IX.a); y otras tres en el Mar Mediterráneo: Mar Egeo, (área FAO: 37.1.1), Mar Adriático, (área FAO: 37.2.1) y costa de Cerdeña,

(área FAO: 37.1.3). Todas las muestras fueron capturadas en el mismo período del año 2008.

Se utilizaron 80 µg de proteína total extraída de cada uno de los 72 individuos  
5 que se mezclaron con tampón de carga para geles SDS-PAGE y se calentaron a 100°C durante 5 minutos. La composición del tampón de carga utilizado fue: Tris-HCl 50 mM, SDS 5%, glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,042% y 2'-mercaptoetanol 5%, pH 6.8. Las muestras se cargaron en geles SDS-PAGE (a una concentración del 10%) y se separaron primero a 70 mA  
10 durante 30 minutos y, después, a 90 mA durante una hora y veinte minutos, utilizando un aparato de transferencia Bio-Rad (1 mA/cm<sup>2</sup> por cada gel). Posteriormente, las proteínas así separadas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF-Amersham Biosciences). Para ello, el gel de poliacrilamida y la membrana se equilibraron previamente en tampón de  
15 transferencia, con agitación orbital durante 15 minutos. La composición del tampón de transferencia utilizado fue: 50 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.4.

La transferencia de las proteínas del gel a la membrana se llevó a cabo a 150  
20 mA durante una hora y veinte minutos con un aparato de transferencia Bio-Rad (1 mA/cm<sup>2</sup> por cada gel). Este proceso se realizó de forma refrigerada (a 4°C) y empleando tampón de transferencia. Posteriormente, las membranas (con las proteínas transferidas) fueron bloqueadas mediante incubación con agitación orbital durante una hora a temperatura ambiente en tampón fosfato salino (PBS) que contenía 5% de leche en polvo desnatada (Central Lechera  
25 Asturiana).

Los anticuerpos usados en las inmunotransferencias Western, obtenidos según el ejemplo 2, se prepararon a una dilución de 1:1000, mientras que el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo, Amersham Biosciences) se utilizó a  
30 una dilución de 1:5000. Así pues, las membranas bloqueadas se incubaron primero con cada anticuerpo del ejemplo 2 en tampón PBS que contenía 10% de leche en polvo desnatada, durante toda la noche, con agitación orbital a

8°C. A continuación, las membranas se lavaron mediante tres incubaciones seriadadas en tampón PBS que contenía 0,05% Tween, con agitación orbital, a temperatura ambiente durante cinco minutos, y una última incubación en tampón PBS que contenía 0,05% Tween y 5% de leche en polvo desnatada, con agitación orbital a temperatura ambiente, durante cinco minutos. Después de los lavados, se añadió el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo) y se incubaron las membranas con el mismo durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron dos veces con agitación orbital a temperatura ambiente, durante cinco minutos, con cada uno de los siguientes tampones consecutivamente: 1º) tampón PBS que contenía 0,05 % Tween y 5% de leche en polvo desnatada, 2º) tampón PBS que contenía 0,05% Tween; y 3º) tampón PBS.

Las membranas así preparadas se revelaron usando el kit de detección SuperSignal West Pico Rabbit IgG Detection (Thermo Scientific) mediante la exposición de películas fotográficas sensibles que, posteriormente, se escanearon a alta resolución.

Los resultados indicaron la existencia de bandas de reacción de anticuerpos de tamaño correspondiente al peso molecular de la proteína de origen, es decir, que los anticuerpos obtenidos presentaban una reactividad específica a los antígenos correspondientes. Además, el patrón de expresión resultó ser diferente según la población geográfica muestreada.

El resultado de este proceso puede verse resumido en la Figura 2.

#### **Ejemplo 4**

##### *Cuantificación de la señal para cada anticuerpo*

Cada película fotográfica fue escaneada (escáner modelo EPSON PERFECTION V750 PRO) a una resolución de 300 d.p.i. La señal de expresión de cada proteína para cada inmunoensayo (medido como el área para cada banda detectada) se cuantificó utilizando el software ImageJ

- (versión 1.44). El valor absoluto de cada medida se expresó en porcentaje respecto a la medida de valor más alto dentro de cada "Western". Los valores de expresión para cada anticuerpo fueron estadísticamente analizados para determinar posibles correlaciones entre niveles de expresión y regiones geográficas de procedencia de las muestras. Para los análisis de T de Student se agruparon las muestras pertenecientes a cuencas del Atlántico, por un lado, y del Mediterráneo, por otro, y se estableció un nivel de significación ("*p*-value") inferior a 0,05.
- 10 Según los resultados, la proteína ATP sintetasa subunidad alfa presentó niveles de expresión significativamente diferentes entre individuos capturados en el Océano Atlántico o en el Mar Mediterráneo (T de Student,  $t = 5.70$ ,  $p = 0.023$ ,  $df = 66$ ), siendo las poblaciones del Atlántico las que mostraron mayor sobreexpresión de dicha proteína. En cambio, la proteína 14-3-3 resultó ser
- 15 una proteína de expresión única para los individuos de las poblaciones del Mediterráneo, los cuales presentaron valores de expresión, mientras que en los del Atlántico dicha proteína bien no se expresó o bien lo hizo a niveles no detectables por su correspondiente anticuerpo. Finalmente, la proteína de canal de aniones dependiente de voltaje presentó niveles de expresión
- 20 significativamente diferentes entre individuos capturados en el Océano Atlántico o en el Mar Mediterráneo (T de Student,  $t = 7.06$ ,  $p = 0.000$ ,  $df = 55$ ), siendo en este caso las poblaciones del Mediterráneo las que mostraron mayor sobreexpresión de dicha proteína.
- 25 Los resultados indican que los valores de cuantificación obtenidos con los anticuerpos permiten discriminar individuos de merluza por su cuenca de origen de forma significativa. La Figura 3 resume de forma gráfica estos resultados.

## REIVINDICACIONES

1. Método de selección de anticuerpos específicos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) para asignar individuos a sus poblaciones según sean de origen Atlántico o de origen Mediterráneo que incluye:
- 5 a) analizar la expresión de proteínas de merluza europea en tejidos u órganos de individuos procedentes del Océano Atlántico y de individuos procedentes del Mar Mediterráneo,
- b) seleccionar las proteínas del paso a) cuyos niveles de expresión son diferentes en los individuos procedentes del Océano Atlántico con respecto a los individuos procedentes del Mar Mediterráneo,
- 10 c) identificar las proteínas seleccionadas en el paso b),
- d) en las proteínas identificadas en c), identificar las secuencias de aminoácidos que constituyen segmentos en  $\alpha$ -hélice transmembrana expuestos a la matriz extracelular;
- 15 e) producir anticuerpos específicos frente a las secuencias de aminoácidos identificadas en d), utilizando péptidos sintéticos.
2. Método según la reivindicación 1 en el que el órganos seleccionado para realizar el paso a) es el cerebro.
- 20
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en el que los péptidos del paso e) incluyen 1 o 2 aminoácidos y/o moléculas que aumentan su capacidad inmunogénica.
- 25
4. Anticuerpo de merluza europea (*Merluccius merluccius*) caracterizado porque se une específicamente a un péptido cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 4.
- 30
5. Anticuerpo de merluza europea (*Merluccius merluccius*) caracterizado porque se une específicamente a un péptido cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 5.

6. Anticuerpo de merluza europea (*Merluccius merluccius*) caracterizado porque se une específicamente a un péptido cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 6.

5

7. Anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 4-6 en los que las secuencias de aminoácidos de los péptidos incluyen una cisteína en el extremo N-terminal y una molécula de hemocianina de lapa (KLH) conjugada mediante unión con maleimida.

10

8. Combinación de anticuerpos específicos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) para asignar individuos a sus poblaciones según sean de origen Atlántico o de origen Mediterráneo en la que los anticuerpos se seleccionan del grupo formado por los anticuerpos de las reivindicaciones 4-7.

15

9. Método de inmunodetección para asignar individuos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) a sus poblaciones según sean de origen Atlántico o de origen Mediterráneo, que se basa en una técnica seleccionada del grupo que comprende: técnicas inmunoenzimáticas (como la técnica ELISA), de inmunofluorescencia (como la técnica de FPIA), de inmunoblot (como la técnica de Westernblot) y de aglutinación (como la técnica de DAT o FAST) o cualquier otro método basado en la detección de antígenos y que incluye la utilización de combinaciones de anticuerpos según se definen en la reivindicación 8 frente a antígenos presentes en el cerebro de los individuos de merluza europea.

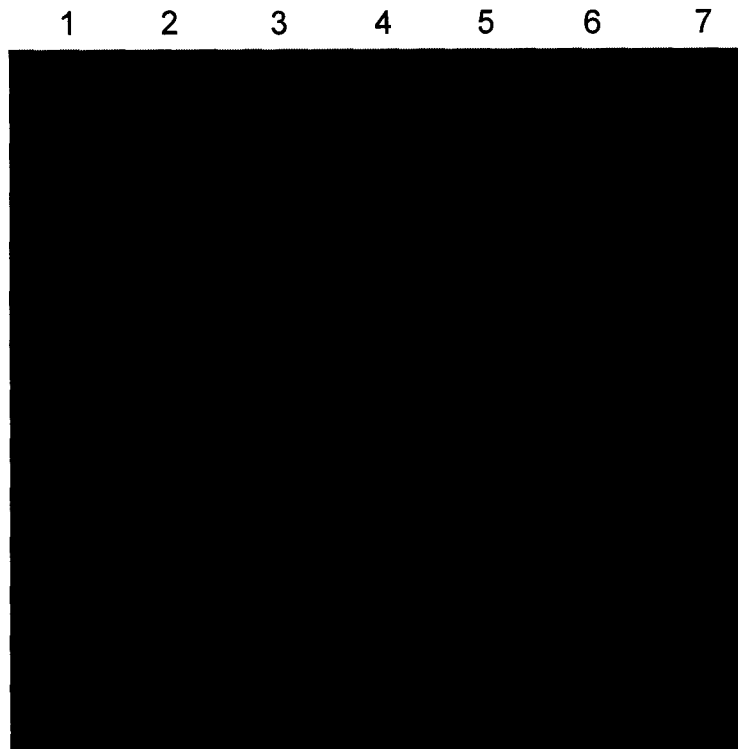
20

25

10. Kit para asignar individuos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) a sus poblaciones según sean de origen Atlántico o de origen Mediterráneo mediante un método según se define en la reivindicación 9, que incluye una combinación de anticuerpos según se definen en la reivindicación 8.



**Figura 1**



**Figura 2**

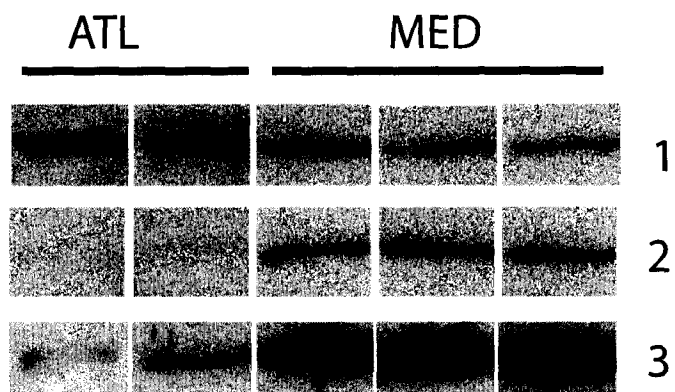
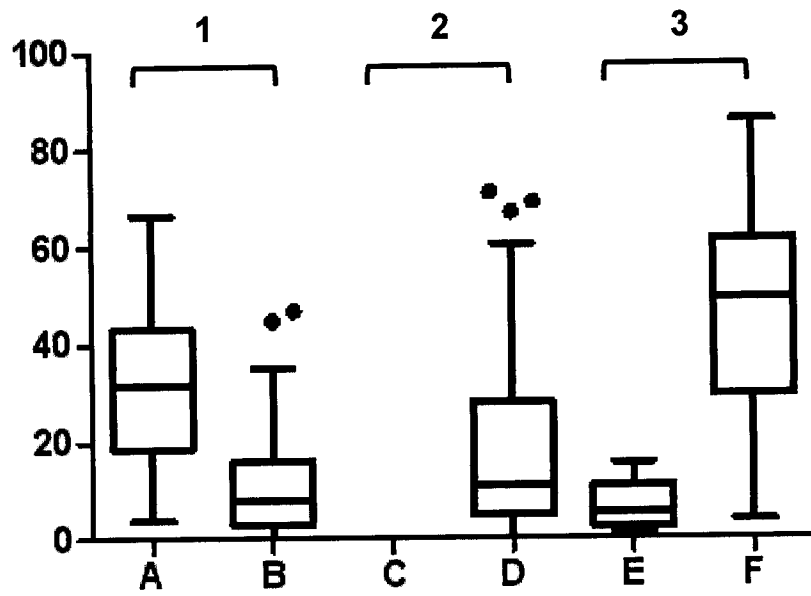


Figura 3



Lista de secuencias

<110> Universidad Complutense de Madrid

<120> Anticuerpos específicos de merluza europea (*Merluccius merluccius*) y método para asignar individuos a sus poblaciones de origen

<160> 6

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 552

<212> PRT

<213> *Salmo salar*

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..552

<223> /mol\_type="protein"  
/organism="Salmo salar"

<400> 1

```

Met Leu Ser Val Arg Val Ala Ala Ala Leu Val Arg Thr Leu Pro Arg
1      5      10      15
Arg Ala Gly Phe Val Ser Lys Asn Val Ser Ala Ala Ala Cys Val Gly
      20      25      30
Ala Arg His Leu His Thr Thr Lys Pro Trp Met Ala Lys Thr Gly Thr
      35      40      45
Ala Glu Val Ser Ser Ile Leu Glu Glu Lys Ile Leu Gly Ala Asp Thr
      50      55      60
Ser Ala Asp Leu Glu Glu Thr Gly Arg Val Leu Ser Ile Gly Asp Gly
65      70      75      80
Ile Ala Arg Val Tyr Gly Leu Arg Asn Val Gln Ala Glu Glu Met Val
      85      90      95
Glu Phe Ser Ser Gly Leu Lys Gly Met Ser Leu Asn Leu Glu Pro Asp
      100      105      110
Asn Val Gly Val Val Val Phe Gly Asn Asp Lys Leu Ile Lys Glu Gly
      115      120      125
Asp Ile Val Lys Arg Thr Gly Ala Ile Val Asp Val Pro Val Gly Glu
130      135      140
Gln Leu Leu Gly Arg Val Val Asp Ala Leu Gly Asn Ala Ile Asp Gly
145      150      155      160
Lys Gly Pro Leu Gly Ser Ser Ile Arg Arg Arg Val Gly Leu Lys Ala
      165      170      175
Pro Gly Ile Ile Pro Arg Ile Ser Val Arg Glu Pro Met Gln Thr Gly
      180      185      190
Ile Lys Ala Val Asp Ser Leu Val Pro Ile Gly Arg Gly Gln Arg Glu
      195      200      205
Leu Ile Ile Gly Asp Arg Gln Thr Gly Lys Thr Ala Ile Ala Ile Asp
      210      215      220
Thr Ile Ile Asn Gln Lys Arg Phe Asn Asp Gly Thr Asp Glu Lys Lys
225      230      235      240
Lys Leu Tyr Cys Ile Tyr Val Ala Ile Gly Gln Lys Arg Ser Thr Val
      245      250      255
Ala Gln Leu Val Lys Arg Leu Thr Asp Ala Asp Ala Met Lys Tyr Thr
      260      265      270
Ile Val Val Ser Ala Thr Ala Ser Asp Ala Ala Pro Leu Gln Tyr Leu
      275      280      285
Ala Pro Tyr Ser Gly Cys Ser Met Gly Glu Phe Phe Arg Asp Asn Gly
      290      295      300
Lys His Ala Leu Ile Ile Tyr Asp Asp Leu Ser Lys Gln Ala Val Ala
305      310      315      320
Tyr Arg Gln Met Ser Leu Leu Leu Arg Arg Pro Pro Gly Arg Glu Ala
      325      330      335
Tyr Pro Gly Asp Val Phe Tyr Leu His Ser Arg Leu Leu Glu Arg Ala
      340      345      350
Ala Lys Met Asn Glu Asn Phe Gly Gly Gly Ser Leu Thr Ala Leu Pro

```

ES 2 526 468 A1

```

Val Ile Glu Thr Gln Ala Gly Asp Val Ser Ala Tyr Ile Pro Thr Asn
355 360 365
Val Ile Ser Ile Thr Asp Gly Gln Ile Phe Leu Glu Thr Glu Leu Phe
370 375 380
385 Tyr Lys Gly Ile Arg Pro Ala Ile Asn Val Gly Leu Ser Val Ser Arg
390 395 400
Val Gly Ser Ala Ala Gln Thr Lys Ala Met Lys Gln Val Ala Gly Thr
405 410 415
Met Lys Leu Glu Leu Ala Gln Tyr Arg Glu Val Ala Ala Phe Ala Gln
420 425 430
Phe Gly Ser Asp Leu Asp Ala Ala Thr Gln Gln Leu Leu Asn Arg Gly
435 440 445
Val Arg Leu Thr Glu Leu Leu Lys Gln Gly Gln Tyr Cys Pro Met Ala
450 455 460
465 Ile Glu Glu Gln Val Thr Val Ile Tyr Ala Gly Val Arg Gly His Leu
470 475 480
Asp Lys Met Asp Pro Thr Lys Ile Thr Lys Phe Glu Lys Ala Phe Leu
485 490 495
Gln His Val Leu Ser Gln His Gln Asp Leu Leu Ala Gln Ile Arg Ala
500 505 510
Asp Gly Lys Ile Ser Glu Thr Ala Asp Ala Gln Leu Lys Gln Ile Val
515 520 525
Leu Thr Phe Leu Ala Ser Phe Asp
530 535 540
545 550

```

```

<210> 2
<211> 244
<212> PRT
<213> Oreochromis mossambicus

```

```

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..244
<223> /mol_type="protein"
/organism="Oreochromis mossambicus"

```

```

<400> 2
Met Asp Lys Ser Asp Leu Val Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala
1 5 10 15
Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Ala Met Lys Ala Val Thr Glu Gln
20 25 30
Gly Ala Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr
35 40 45
Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser Ser
50 55 60
Ile Glu Gln Lys Thr Glu Gly Asn Glu Lys Lys Gln Gln Met Ala Arg
65 70 75 80
Asp Tyr Arg Val Lys Ile Glu Gly Glu Leu Gln Glu Ile Cys Asn Asp
85 90 95
Val Leu Ser Leu Leu Asp Lys Phe Leu Ile Pro Asn Ala Ser Gln Ala
100 105 110
Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe Arg Tyr
115 120 125
Leu Ser Glu Val Ala Ser Gly Asp Ser Lys Lys Asn Thr Val Glu Asn
130 135 140
Ser Gln Met Ala Tyr Gln Asp Ala Phe Asp Ile Ser Lys Lys Glu Met
145 150 155 160
Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe Ser Val
165 170 175
Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Glu Gln Ala Cys Ser Leu Ala
180 185 190
Lys Gln Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu Asn Glu
195 200 205
Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn
210 215 220
Leu Thr Leu Trp Thr Ser Glu Asn Gln Gly Asp Glu Gly Glu Ala Gly
225 230 235 240

```

Asp Gly Glu Asn

<210> 3  
 <211> 283  
 <212> PRT  
 <213> Salmo salar

<220>  
 <221> SOURCE  
 <222> 1..283  
 <223> /mol\_type="protein"  
 /organism="Salmo salar"

<400> 3  
 Met Ala Val Pro Pro Thr Tyr Val Asp Leu Gly Lys Ser Ala Lys Asp  
 1 5 10 15  
 Val Phe Thr Lys Gly Tyr Gly Phe Gly Leu Ile Lys Leu Asp Leu Lys  
 20 25 30  
 Thr Lys Ser Glu Asn Gly Leu Glu Phe Thr Ser Thr Gly Ser Ala Asn  
 35 40 45  
 Thr Glu Thr Ser Lys Val Ala Gly Thr Leu Glu Thr Lys Tyr Lys Trp  
 50 55 60  
 Ala Glu His Gly Leu Thr Phe Thr Glu Lys Trp Asn Thr Asp Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Thr Glu Ile Thr Leu Glu Asp Gln Leu Ala Lys Gly Leu Lys  
 85 90 95  
 Leu Thr Phe Asp Ser Ser Phe Ser Pro Asn Thr Gly Lys Lys Ser Gly  
 100 105 110  
 Lys Ile Lys Thr Gly Tyr Lys Arg Glu His Ile Asn Leu Gly Cys Asp  
 115 120 125  
 Val Asp Tyr Asp Ile Asn Gly Thr Ala Val His Gly Met Ala Val Val  
 130 135 140  
 Gly Tyr Glu Gly Trp Leu Ala Gly Tyr Gln Met Thr Phe Glu Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Asn Arg Val Thr Gln Ser Asn Phe Ala Val Gly Tyr Lys Thr Asp  
 165 170 175  
 Glu Phe Gln Leu His Thr Asn Val Asn Asp Gly Thr Glu Phe Gly Gly  
 180 185 190  
 Ser Ile Tyr Gln Lys Val Asn Asp Gln Leu Glu Thr Ala Val Asn Leu  
 195 200 205  
 Ala Trp Thr Ala Gly Asn Ser Asn Thr His Phe Gly Ile Ala Ala Lys  
 210 215 220  
 Tyr Gln Ile Asp Ala Asp Ala Ser Phe Ser Ala Arg Val Asn Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Val Gly Leu Gly Tyr Thr Gln Thr Leu Lys Pro Gly Ile Lys  
 245 250 255  
 Leu Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asp Gly Lys Asn Ile Asn Thr Gly Gly  
 260 265 270  
 His Lys Leu Gly Leu Gly Leu Glu Phe Glu Ala  
 275 280

<210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Salmo salar

<220>  
 <221> SOURCE  
 <222> 1..13  
 <223> /mol\_type="protein"  
 /organism="Salmo salar"

<400> 4  
 Glu Ala Tyr Pro Gly Asp Val Phe Tyr Leu His Ser Arg  
 1 5 10

<210> 5

<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Oreochromis mossambicus

<220>  
 <221> SOURCE  
 <222> 1..14  
 <223> /mol\_type="protein"  
 /organism="Oreochromis mossambicus"

<400> 5  
 Ala Val Thr Glu Gln Gly Ala Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Salmo salar

<220>  
 <221> SOURCE  
 <222> 1..20  
 <223> /mol\_type="protein"  
 /organism="Salmo salar"

<400> 6  
 Val Asn Asn Ser Ser Leu Val Gly Leu Gly Tyr Thr Gln Thr Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Ile Lys  
 20