



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106132993 A

(43)申请公布日 2016. 11. 16

(21)申请号 201580016890.8

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

(22)申请日 2015.03.27

代理人 余颖 陶家蓉

(30)优先权数据

BR102014007315-9 2014.03.27 BR

(51)Int. Cl.

G07K 16/30(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/53(2006.01)

2016.09.27

C07K 7/08(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/BR2015/050034 2015.03.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/143525 PT 2015.10.01

(71)申请人 兹耶尔生物科学研究,开发和诊断
有限公司

地址 巴西阿雷格里港

(72)发明人 D·B·考内里奥

权利要求书1页 说明书13页

C·B·德法利亚斯

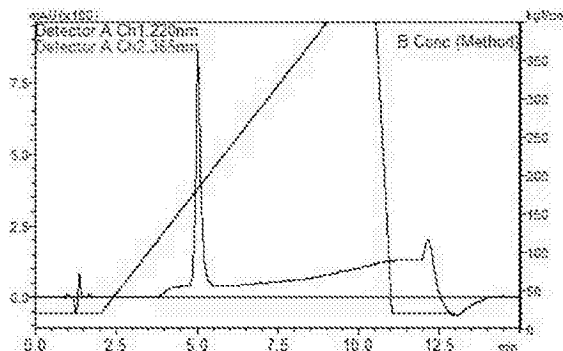
序列表4页 附图6页

(54)发明名称

抗胃泌素释放肽受体(GRPR)抗体,获得的过程,检测过程,抗体使用,试剂和基因构建

(57)摘要

本发明是关于通过至少由一只动物和序列 SEQ ID NO:1达到60%一致的肽接触而获得的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体。本发明还描述了获得抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的过程;异型增生和(或)子宫肿瘤病变的体外检测方法;抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的使用;定量检测和(或)异型增生肿瘤和(或)子宫病变的定量检测试剂;通过基因构建来对抗原肽表达或产生进行描述。本发明用于医药学、免疫学和分子学术领域。



1. 抗胃泌素释放肽受体抗体的特征为获得过程以以下步骤：
 - a) 通过将至少一只动物暴露到和序列SEQ ID NO:01达到60%一致的肽下；和
 - b) 当在a)过程中动物对所提及到的肽产生免疫反应后，对其获取抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GPRP)抗体。
2. 抗体特点根据要求1，以肽的序列达到和SEQ ID NO:1 90%的一致。
3. 抗体的特征根据要求1，以肽的序列为SEQ ID NO:1。
4. 抗体的获得过程的特征包含一下步骤：
 - a) 通过将至少一只动物暴露到和序列SEQ ID NO:01达到60%一致的肽下；和
 - b) 当在a)过程中动物对所提及到的肽产生免疫反应后，对其获取抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GPRP)抗体。
5. 异型发育和(或)子宫颈癌病变的体外检测的过程的特征包含以下步骤：
 - a) 按照要求1到3定义的至少一个的抗胃泌素释放肽受体抗体和至少一个子宫原生物材料样品接触；和
 - b) 检测上诉抗体在上述的生物材料中和一个或多个的胃泌素释放肽受体的结合情况。
6. 根据要求5过程以为通过免疫层析法，免疫组织化学法或免疫细胞化学法对步骤b)中的结合情况进行检测为特征。
7. 根据要求5或6的过程以步骤b)中包含至少一个用来定性和(或)定量对比的对照标记为特征。
8. 根据要求7中的过程的特征为用对照标记来区别抗胃泌素释放肽受体抗体和要求1到3中所定义的抗体。
9. 根据要求1到3中任何一条确定的抗胃泌素释放肽受体抗体的使用的特征为，用来准备用于检测和(或)定量在生物组织或细胞中的胃泌素释放肽受体的试剂，并用试剂来筛查和(或)诊断异型增生和(或)肿瘤的病变。
10. 用于定性和(或)定量检测异型增生和(或)子宫瘤病变的试剂的特征为，试剂包括根据要求1到3任何一条中的抗胃泌素释放肽受体抗体。和至少一个用于检测上述抗体和出现在组织，细胞，或生物体液中的胃泌素释放肽的融合的试剂。
11. 根据要求10中的试剂，包含以下特征，用于检测上述要求1到3中的任何一条中定义的抗体的结合是通过免疫层析法，免疫组织化学法或免疫细胞化学法。
12. 根据要求11中试剂，其特征为，包含捕获实验免疫层析法检测。
13. 用于抗原肽的表达或生产的基因构建的特征为，该基因构造包含以下：
 - a) 序列一致性大于或等于60%SEQ ID NO:1序列的编码一个多肽的核苷酸序列；
 - b) 上述核苷酸序列的催化剂；和
 - c) 下列中选出的核苷酸序列：核苷酸转录终止子序列；标记选择；分泌序列信号；促进输送和净化序列；编码另一个多肽抗原序列的核苷酸序列；或上述提到的核苷酸序列的异种质粒体包含序列的组合。

抗胃泌素释放肽受体(GRPR)抗体,获得的过程,检测过程,抗体使用,试剂和基因构建

技术领域

[0001] 本发明用于医药学、免疫学和分子生物学领域。更具体的阐明,本发明是关于通过至少由一只动物和序列SEQ ID NO:01达到60%一致的肽接触而获得的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体。本发明还描述了:获得抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的过程;异型增生和(或)子宫肿瘤病变的体外检测方法;抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的使用;定量检测和(或)异型增生肿瘤和(或)子宫病变的定量检测试剂;通过基因构建来对抗原肽表达或产生进行描述。

技术背景

[0002] 子宫颈癌是世界上第二大女性癌症,每年有近500,000的新病例。宫颈癌的发病率在作为主要女性致命癌症的发展中国家极高。根据美国癌症协会研究,“由于宫颈抹片检测的引进,宫颈癌的死亡率在最近的几十年内降低了70%。”宫颈癌,作为主要的女性致命癌症,在美国女性最致命肿瘤列表中位列第十三位。

[0003] 宫颈抹片检查是用形态分析法来对宫颈细胞的检查。筛查的目的不仅是对宫颈癌的检测,还包括对高度病变的检测,以达到防止浸润性癌症的扩大。由于通过宫颈细胞学的筛查的普遍运用,宫颈未浸润性病变的检测的使用更普遍于浸润性肿瘤的检测。通过对女性未浸润性病变的检测和治疗,在五年内的生存率几乎达到100%。即使是已经发展到浸润性肿瘤,那些在早期阶段就已经检测到的患者,在五年内的生存率也仍然达到92%。通过以上的的方式,所有宫颈癌中少数的一些肿瘤可以得到实质上的治愈。因此,寻求更精准的检测率(更少的伪阴性)是挽救生命的重点。

[0004] 虽然最近几十年的宫颈癌的发病率和死亡率的大量减少,但是由于宫颈抹片检查的低覆盖率或者检查方法的局限性,仍然有大量的女性无法得到适当的筛查。宫颈抹片检查的有效性受到了高频率的伪阳性和伪阴性的影响,而且单一的检查只有50%灵敏度能够检查到高度病变或浸润性肿瘤。

[0005] 每年有将近5千万宫颈抹片检查在美国完成。接近于7%(350万)的异常表现需要后续跟进。在这7%中,有200万个检查被诊断为“无明确诊断意义的鳞状上皮细胞病变”(ASCUS)或“不能排除高级别鳞状上皮内病变”(ASC-H),125万个低度病变,30万个高度病变和13,000个浸润性癌症。遗憾的是,伪阴性存在于数以百万计的被诊断为正常或无癌症的女性中。

[0006] 美国发现的宫颈癌中,有将近一半发生在那些未被筛查到的女性中,和10%在过去的五年内未被筛查到的女性中。还有,将近40%的病例发生在那些被误诊为无癌症的女性中。所有的伪阴性结果甚至发生在优化的筛查程序中而且无法被彻底的排除。

[0007] 美国乳腺癌和宫颈癌早期检测项目(NBCCEDP)报道称,在宫颈抹片检查中呈阴性的女性中,在一年内有5%的机率向损伤的方向发展;该风险的机率会在后续的一年翻倍。美国病理学会阐明:“宫颈抹片检查是一种涉及到细胞学家或病理学家对位于妇科细

胞标本中数以千计的细胞的主观解释的一种筛查检查”。研究表明伪阴性的不可复归机率大约有5%。虽然经常性的筛查可以减小伪阴性机率,但是在如今的技术手段还无法得到无错误的结果。

[0008] 1996年,美国国立卫生研究院(NIH)的宫颈癌共识会议显示,五个宫颈癌女患者中就有一个在癌症发生前的五年内都有阴性的宫颈抹片检查。这20%的伪阴性率被美国国立卫生研究院(NIH)认定为不可接受。并要求对检查进行重大的改进。美国已经对此方向进行巨大的投入。美国政府已经正式出台新政策来确保对宫颈抹片检查、授权供应商和授权辅助商的改进,专业团体已经颁布了指南和资格认证来保护该政策,医疗企业也开始发展新工具来改进宫颈抹片检查的质量。

[0009] 从1950至今以来致力于对宫颈抹片检查进行改进的专业协会—美国癌症协会,最近对癌症的早期检测指南进行修订。该文件认可了新技术对宫颈癌筛查的价值,并提到新的,更精确的方法的必要性。

[0010] 最近的几年,改进已经尝试涉及到宫颈抹片检查的技术当中,如浓基细胞学。但是这还是不能改进通过与常规细胞学的对比而检测得来的上皮内瘤病变的敏感性和特异性。还包括对分子生物学法来检测宫颈癌的评估,包括人乳头状瘤病毒(HPV)检测。

[0011] 人乳头状瘤病毒(HPV)是一种在人类生命过程中感染了50%人口的性传播疾病,而它的延长感染也和宫颈癌有联系。人乳头状瘤病毒(HPV)有90多种,但只有其中的一部分会引起宫颈癌。人乳头状瘤病毒(HPV)疫苗已经得到开发,但是疫苗对于减少癌症的效果还无法被预计。虽然疫苗对与预防宫颈癌有一定的潜在效果,但至少在未来的几十年内不能用来作为修改筛查的方案。人乳头状瘤病毒(HPV)检测已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准作为宫颈抹片检查的辅助手段,尤其是在有疑虑的病例中,如“无明确诊断意义的鳞状上皮细胞病变”(ASCUS)中,最近的时期也被作为初级的筛查检测。

[0012] 10%的宫颈抹片检查被归类为ASCUS(无明确诊断意义的鳞状上皮细胞病变),这也表明,你们无法明确无瘤的种类,稳定性或者恶性病变,肿瘤等。但是,在经验上指出10%的ASCUS患者有高度病变,而这类人群有可能被忽略掉。根据美国阴道镜和宫颈病理学会的共识指南,建议对ASCUS的细胞异常,进行反复的筛查检测、阴道镜或是人乳头状瘤病毒(HPV)的检测。

[0013] 另一个被研究到的分子标志物是Ki-67和p16INK4a(p16)(例如,在美国专利7,455,973)。细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶的抑制剂—p16,作为HPV在宫颈细胞中致癌性活动的标记,而且它的过度表达是建立在宫颈上皮内瘤病变和浸润性癌症中。Ki-67是细胞增生的标记。这两种检测已经使用于可疑性宫颈抹片检查中,但不建议在宫颈癌筛查中作为常规使用。

[0014] 因此,基于前文所涉及的内容,阐明了技术多元化对宫颈癌的筛查和诊断的重要性,对此方面,此发明直接满足这个方向。

[0015] 胃泌素释放肽(GRP)是一种对很多种类的癌症有刺激作用的神经内分泌肽。胃泌素释放肽受体(GRPR)属于G蛋白(调节蛋白)家族,并激活多信号传导途径,促使细胞的增殖和生长。胃泌素释放肽受体(GRPR)在种类繁多的人类肿瘤中过度表达,包括前列腺癌,乳腺癌,卵巢癌,肺癌,头颈癌,胃癌,结肠癌,食道癌和肾癌。

我们的团队最近记述了宫颈非典型增生浸润癌中的胃泌素释放肽受体(GRPR)的异常

表达。基于现存99%的不属于恶性子宫颈组织受体的分析样本中,显示出胃泌素释放肽受体(GRPR)在子宫颈肿瘤的形成起到关键性作用。

[0016] 在专利文献的搜索中指出了一些相关的专利档案,于以下列出。

[0017] 专利文献WO 2003/097666描述的是胃泌素释放肽和其受体的使用,常见于胃细胞,以及结肠癌,前列腺癌,胃癌和胰腺癌的诊断中。该文献还援引了一个含抗胃泌素释放肽受体(GRPR)的诊断试剂以及用于对癌症潜在性患者的胃泌素释放肽受体(GRPR)进行扩增和杂交的引物。本发明有区别于该专利文献,在其他的因素之中,文献涉及到对胃泌素释放肽受体(GRPR)检测的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的使用和子宫颈病变的诊断试剂使用,实例中无提及到其先进性。该文献根据其表述,根据技术人员的预计可以假设,可以识别存在于胃部病变有关的癌症中和无子宫颈病变的胃泌素释放肽受体(GRPR)。

[0018] 专利文献US 7,455,973披露的是一个通过免疫细胞化学技术来对子宫颈病变的检测的方法。本发明有区别于该专利文献,在其他的因素之中,该文献并无提及或示意对胃泌素释放肽受体(GRPR)的检测。

[0019] 专利KR 20060064049,WO 2009/143101,PI 0412824和PI 0317987公开了一个由胃泌素释放肽受体(GRPR)和修改过的胃泌素释放肽混合物组成的合成药品。本发明有区别于这些专利文献,在其他的因素之中,介绍了一个抗胃泌素释放肽受体(GRPR)抗体的新运用以及上述专利文献未涉及到的对于子宫颈损伤的检测和诊断的试剂与方法。上面所提及的4项专利文献是有关于针对胃泌素释放肽受体(GRPR)的放射性药物制剂,但是和免疫细胞化学技术或免疫组织化学技术没有关系。

[0020] 专利文献CN 101368966 A涉及到一个胃泌素释放肽和化学发光免疫测定的试剂,以及准备方式。该试剂使用于对小型肺癌细胞的早期诊断。本发明有区别于该专利文献,在其他的因素之中,提供了一个免疫分析诊断试剂来诊断肿瘤和(或)异型增生病变,包括子宫颈上皮内瘤病变既子宫颈癌。

[0021] 文章《胃泌素释放肽受体GRPR和脑源性神经营养因子BDNF/TrkB在乳腺癌妇产科医学的细胞中生存能力的信令指标的影响》(Influence of GRPR and BDNF/TrkB signaling on the viability of breast cancer and gynecologic cells作者CORNELIO et al,2003),本发明的发明者正是此文章的作者之一,该文章表露了,胃泌素释放肽受体的活化削弱了乳腺癌卵巢癌和子宫颈癌等的特定细胞系的生存能力,而胃泌素释放肽受体的阻断加强了这些特地细胞系的生存能力。然而,文章并没有对本发明抗体的公开和建议,也没有提供信息以指导技术人员在利用试剂或免疫分析程序来对肿瘤病变和(或)异型发育病变包括子宫颈癌的诊断。

[0022] 因此,根据现有的专利或非专利文献,明确的表明了现有的检测肿瘤和异型增生病变方法的基础上需要寻求更多的方法,尤其是本专利申请公开的,如何在检测子宫颈上皮内瘤病变和在子宫颈癌上使用抗胃泌素释放肽受体的抗体。

[0023] 值得注意的是在现有的技术中,分子标记法没有用于筛查中。病理学家只使用这些标记来诊断,而改进细胞病理学和病理学诊断,却与现有的发明有所不同。本发明,胃泌素释放肽受体不仅仅用于针对于病理学实验室诊断,且可以通过快速检验(例如:在试剂中)使用于筛查中,即时提供一个患者可能出现病变的检验结果。

[0024] 通过对文献的搜索,没有发现任何文献对现有的发明提出建议或期望。根据发明

者们的观点,本发明相对其他现有的发明,更具有新颖性和创造性。

发明内容

[0025] 本发明有一个特有发明构思,和他其它的主题相同,通过用抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体来准备试剂使用,或者由包含了结,检测和(或)定量在生物组织或细胞中的胃泌素释放肽受体等的一个进程,来诊断肿瘤和(或)子宫颈肿瘤的病变,包括子宫颈上皮内瘤病变和子宫颈癌。

[0026] 本发明在多方面都对现有的其他发明占有优势,例如,对筛查提出一个有帮助的快速检测。本发明还可以辅助病例学家的诊断;假设在对胃泌素释放肽受体的表达呈阳性的生物样本,病理学家需要更关注细胞病理学和(或)病理学的检验。

[0027] 本发明的中的一个目的为抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的获取过程包含如下:

[0028] a)通过将至少一只动物暴露到和序列SEQ ID NO:01达到60%一致的肽下和:

[0029] b)当在a)过程中动物对所提及到的肽产生免疫反应后,对其获取抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GPRP)抗体。

[0030] 本发明的中的一个目的为抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的获取过程包含如下:

[0031] a)通过将至少一只动物暴露到和序列SEQ ID NO:01达到60%一致的肽下

[0032] b)当在a)过程中动物对所提及到的肽产生免疫反应后,对其获取抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GPRP)抗体。

[0033] 本发明的另一个目的:异型增生和(或)子宫肿瘤病变的体外检测过程或方法,过程如下:

[0034] a)使最少一个本发明介绍的一个抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体和子宫原中的生物材料样本相接触。和

[0035] b)检测上述使用的针对一个或多个胃泌素释放肽受体的抗体在上述的生物材料的结合情况。

[0035] 本发明的另一个目的:介绍通过使用抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体来准备试剂,并用于检测和(或)定量在生物组织或细胞中的胃泌素释放肽受体,并作为试剂来诊断肿瘤和(或)肿瘤的病变。

[0037] 本发明的另一个目的:用于对异型增生和(或)子宫颈病变的定性和(或)定量检测的试剂,该试剂由本发明公布的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体和至少一个用于检测在组织,细胞或生物体液中该受体抗体结合的额外化学试剂而构成。

[0038] 本发明的另一个目的:用于表达或产生抗原肽的基因的结构,既基因结构包括:

[0039] a)编码一个多肽的核苷酸序列大于或等于60%的SEQ ID NO:1

[0040] b)上述的核苷酸序列的助催化剂和:

[0041] c)下列中选出的核苷酸序列:核苷酸转录终止子序列;标记选择;分泌序列信号;促进输送和净化序列;编码另一个多肽抗原序列的核苷酸序列;或上述提到的核苷酸序列的异种质粒体包含序列的组合。

[0042] 本发明的另一个目的:以一下途径获取抗体的过程和方法:

[0043] a)把本发明公布的基因构建接种到至少一种动物中;和

[0044] b)在上述动物产生免疫反应后从动物的血浆中获取抗体。

[0045] 本发明在此还有一个目的就是本发明将被精通本技术的技术人员和对本领域有兴趣的公司立即接受,我们将在下文对本发明相关的繁衍物进行足够详细的描述。

附图说明:

[0046] 图1为运用高效液相色谱法(HPLC)分析的本发明中用于合成抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的具体化抗原肽(SEQ ID NO:1)。

[0047] 图2为运用质谱法分析的本发明中用于合成抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的具体化抗原肽(SEQ ID NO:1)。

[0048] 图3为免疫于图一和二描述的肽的兔子的血清的斑点印迹,被融合到血蓝蛋白(KLH)和对融合到白蛋白的肽的测试的结果。图A)血清稀释到1:200;图B)血清稀释到1:2000。

[0049] 图4为两个一级抗体(由SEQ ID NO:1肽获得的一级抗体X对照抗体(仅限使用于研究)关于非子宫颈肿瘤样品中胃泌素释放肽受体免疫组织化学的表达的对比。图A)本发明中抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体(1:200)和图B)抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)对照抗体(1:50)。两个图片都放大20倍。

[0050] 图5到图7为本发明中的抗体和对照抗体(仅限使用于研究)的一级抗体关于子宫颈上表皮内病变2级和3级(CIN II and III)样品中胃泌素释放肽受体免疫组织化学的表达的对比鉴定。图A)本发明中的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体(1:200)和图B)抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)对照抗体(1:50)。图五,图六:放大20倍,图七:放大四十倍。

[0051] 图8举例说明免疫组织化学检测试条的示意图。上图为试条的侧面图,图片显示:1的位置为样品部分;2为吸收部分;3为硝酸纤维膜;4测试线;5控制线。下图为试条的俯视图;箭头显示流动方向。关于硝酸纤维膜的被吸收:起始部分接受样品(样品垫),最后部分吸取样品(吸取垫),经过测试线和控制线。

[0052] 图9为使用FUSION5™膜的免疫组织化学测流检测试条的示意图。红箭头指示的是胶体金和抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的融合的应用位置(T,检测线),黑箭头指示的是羊抗兔免疫球蛋白G二级抗体与胶体金的融合的位置(C,控制线)。

[0053] 图10展现的是使用本发明中的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的免疫组织化学测流检测的示例。a:控制线,仅放入电泳脉冲液。b和c:检测线,在1分钟和5分钟之后分别放入含有胃泌素释放肽受体阳性样品的溶液。

[0054] 图11a和图11b为本发明基因构建的实体示例图。图11a为用抗原指数分析出的肽的完整排序。曲线顶峰显示的就是最具有免疫性源区域。图11b直观显示了由本发明选择用于基因构建的ESTNQTIFISCAPYPHSN(GIu-Ser-GIn-Asn-Thr-Phe-Thr-Ser-Ile-Cys-Ala-Pro-Tyr-Pro-Ser-His-Asn)序列组成的最具有免疫性源区域。

[0055] 图12展示的是蛋白质印迹法来证明抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的存在,位于箭头指示的带段。

[0056] 图13a和图13b为通过免疫组织化学法来评估抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)纯化抗体与苏木精-伊红的对比。

[0057] 图14为通过免疫组织化学法来评估a)苏木精-伊红b)本发明中的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)纯化抗体和c)商用抗胃泌素释放肽受体抗体之间的对比。箭头指示的是高级瘤区中高密度的核染色体。

[0058] 图15为通过免疫组织化学法来评估本发明中的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)纯化抗体。箭头指示的是裸核的存在,暗示着高级病变,并明显的标识。

发明具体实施方式

[0059] 本发明的不同的目的都是基于一个共同发明构思:利用抗胃泌素释放肽受体抗体来准备试剂,或包括胃泌素释放肽受体在生物组织或细胞的整合,检测和(或)定量过程,并用于诊断异型增生和(或)肿瘤性病变,包括子宫颈上皮内肿瘤病变和子宫颈癌病变。

[0060] 为了更好的理解本发明,下面对在本专利申请中一些术语和短语的解释。

GRPR

[0061] 此术语在本专利申请中作为Gastrin-Releasing Peptide Receptor。(胃泌素释放肽受体)的缩写

抗胃泌素释放肽受体Anti-GRPR

抗体antibodies

[0062] 在本专利申请上下文的该表达,指的是任何抗胃泌素释放肽受体抗体,包括了多株抗体和单株抗体。抗胃泌素释放肽受体抗体通过在本发明中的非天然肽的使用来获得,是用来对胃泌素释放肽受体在生物组织或细胞的检测和(或)定量,用来对异型增生病变和(或)不仅限于子宫的多种类型的肿瘤病变的检测的试剂的制作的特别有用的体现。

对照抗体(control antibody)

[0063] 对照抗体指的是仅限用于研究的多克隆抗胃泌素释放肽受体抗体,专属于免疫组织化学,它的运用无法与一些免疫沉淀反应技术如蛋白质印迹法相兼容。也就是说,现有技术中可行的对照抗体和在上面提到的一些存在问题,已经被本发明所推荐的抗胃泌素释放肽受体抗体解决。

筛查(Screening)

[0064] 在本专利申请术语中的“筛查”的理解应该和术语中的“诊断”区分开。应当理解为对特定疾病(例如,人类疾病)的可能携带者的初步鉴定的筛查模式,这种情况将由健康专家通过诊断阶段来确认。不管如何,在此要澄清,在本专利申请的上下文,筛查是用来帮助对状况的诊断而不是对上述病理的诊断。

材料或生物体液,生物样品

[0065] 本专利申请上下文中的该表述,包括的生物体液包含但不仅限于如下:血液,唾液,汗液,脑脊髓液。同时还包括细胞样本或,瘤或癌前病变的活组织检查,例如,子宫颈上皮内瘤样病变和子宫颈癌。根据本专利的上下文,生物材料可能包括的元素有:全部或部分发现在细胞和(或)组织和(或)真核和(或)原核细胞生物器官中,或通过合成以达到于体内发现一致而获得的cDNA(互补脱氧核糖核酸),RNAs(核糖核酸)和(或)蛋白质。

异型增生病变

[0066] 本专利申请上下文中的该表述,指的是细胞和组织的增殖异常,而导致的动物和人类的细胞,组织和(或)器官的增殖失控。异型增生病变包含子宫颈内上皮瘤病变(CIN1级,2级和3级,包括“无明确诊断意义的鳞状上皮细胞病变”(ASCUS)或“不能排除高级别鳞

状上皮内病变”(ASC-H)。

肿瘤病变

[0067] 本专利申请上下文中的该表述,指的是任何细胞增殖和(或)细胞分裂和包含良性肿瘤和恶性肿瘤的异常。在本专利申请上下文应该理解为肿瘤病变同时可以叫做肿瘤,包括良性的或恶性的。肿瘤病变也可能由多种癌症引起或有关联。

免疫层析法技术

[0068] 本专利申请上下文中的该表述,指的是任何分离和识别可溶性抗原的技术。其中的方法包括:通过抗体溶液的抗原体扩散的薄层色谱法。

抗原体的接触和(或)检测方法

[0069] 本专利申请上下文中的该表述,指的是用于接触和(或)检测样品中的抗原体的存在的任何一种媒介(材料),例如,用于侧流免疫层析法测试的膜和制备这种材料和样品的试剂,等等。

动物

[0070] 本专利申请上下文中的该表述,指的是拥有生物组织如神经和肌肉组织的真核生物,异养生物,和多细胞动物,等等。动物的参考例子有哺乳类和禽类动物(包含但不限于)。

哺乳类动物

[0071] 本专利申请上下文中的该表述,指的是女性动物拥有乳腺的脊椎动物,例如,兔子,老鼠,马,牛和羊,等等。

禽类

[0072] 本专利申请上下文中的该表述,指的是卵生的脊椎动物,例如,鸡。

[0073] 本发明的一个目的为,抗胃泌素释放肽受体抗体的获得过程包括以下步骤:

[0074] a)通过将至少一只动物暴露到和序列SEQ ID NO:01达到60%一致的肽下;和

[0075] 当在a)过程中动物对所提及到的肽产生免疫反应后,对其获取抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GPRP)抗体。

[0076] 在本发明的一具体化中,肽和序列SEQ ID NO:1到达至少70%一致

[0077] 在本发明的一具体化中,肽和序列SEQ ID NO:1到达至少80%一致

[0078] 在本发明的一具体化中,肽和序列SEQ ID NO:1到达至少90%一致

[0079] 在本发明的一具体化中,肽是SEQ ID NO:1.的序列。

[0080] 本发明的另一个目的为,抗胃泌素释放肽受体抗体的获得过程包括一下步骤:

[0081] a)通过将至少一只动物暴露到和序列SEQ ID NO:01达到60%一致的肽下;和

[0082] 当在a)过程中动物对所提及到的肽产生免疫反应后,对其获取抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GPRP)抗体。

[0083] 在本发明的一具体化中,肽和序列SEQ ID NO:1到达至少70%一致。

[0084] 在本发明的一具体化中,肽和序列SEQ ID NO:1到达至少80%一致。

[0085] 在本发明的一具体化中,用SEQ ID NO:2.序列来编码肽。

[0086] 在本发明的一具体化中,肽和序列SEQ ID NO:1到达至少90%一致。

[0087] 本发明的另一个目的:异型增生和(或)子宫肿瘤病变的体外检测过程或方法过程如下:

[0088] a)使最少一个本发明介绍的一个抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体和子宫原

中的生物材料样本相接触。和

[0089] b)检测上述使用的针对一个或多个胃泌素释放肽受体的抗体在上述的生物材料的结合情况

[0090] 在本发明的一具体化中,步骤b)结合是通过免疫层析法,免疫组织化学和免疫细胞化学。

[0091] 在本发明的一具体化中,步骤b)中至少有一个用于定性和(或)定量比较的对照标记。

[0092] 在本发明的一具体化中,步骤b)中至少有一个定量比较的对照标记。

[0093] 在本发明的一具体化中,对照标记是一个不同于在本发明中获得的抗胃泌素释放肽受体多克隆抗体。

[0094] 本发明的另一个目的为通过使用本发明公示的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体来准备试剂,并用于检测和(或)定量在生物组织或细胞中的胃泌素释放肽受体,并用试剂来诊断异型增生和(或)肿瘤的病变。

[0095] 本发明的另一个目的:用于对异型增生和(或)子宫颈病变的定性和(或)定量检测的试剂,该试剂由本发明公布的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体和至少一个用于检测位于组织,细胞或生物体液中该多个受体抗体和胃泌素释放肽受体的结合的额外化学试剂所构成。

[0096] 在本发明的一具体化中,本发明公布的抗胃泌素释放肽受体抗体的结合的检测,是(通过)免疫组织化学、免疫细胞化学或免疫层析法。

[0097] 在本发明的一具体化中,本发明公布的抗胃泌素释放肽受体抗体的结合的检测,是(通过)包含捕捉试验的免疫层析法。

[0098] 本发明的另一个目的:用于表达或产生抗原肽的基因的结构,既基因结构包括:

[0099] a)编码一个多肽的核苷酸序列大于或等于60%的SEQ ID NO:1

[0100] b)上述的核苷酸序列的助催化剂和

[0101] c)下列中选出的核苷酸序列:核苷酸转录终止子序列;标记选择;分泌序列信号;促进输送和净化序列;编码另一个多肽抗原序列核苷酸序列;或上述提到的核苷酸序列的异种质粒体包含序列的组合。

[0102] 在本发明的一具体化中,编码一个多肽核苷酸序列和序列SEQ ID NO:1达到70%一致。

[0103] 在本发明的一具体化中,编码一个多肽核苷酸序列和序列SEQ ID NO:1达到80%一致。

[0104] 在本发明的一具体化中,编码一个多肽核苷酸序列和序列SEQ ID NO:1达到90%一致。

[0105] 在本发明的一具体化中,编码一个多肽的核苷酸序列为SEQ ID NO:1

[0106] 在本发明的一具体化中,编码抗原肽的核苷酸序列包含45到60个核苷酸。

[0107] 在本发明的一具体化中,编码抗原肽的核苷酸序列是一个与SEQ ID NO:2同族或一致性大于60%核苷酸序列。

[0108] 在本发明的一具体化中,编码抗原肽的核苷酸序列是一个由SEQ ID NO:2所表示的核苷酸序列。

[0109] 本发明的另一个目的:以一下途径获取抗体的过程和方法:

[0110] a)把本发明公布的基因构建接种到至少一种动物中;和

[0111] b)在上述动物产生免疫反应后从动物的血浆中获取抗体。

[0112] 下面所示的实例仅用于对落实本发明许多方法中的一些的举例,然而,没有仅限于此相同范围。

实例1. 抗原肽的开发和获得

[0113] 胃泌素释放肽受体的大多数免疫原序列的识别,主要用一个抗原指数。是常用于创建蛋白线性表面轮廓的一种算法,主要通过电脑程序来生成数值组并将这些数值组与通过聚合物链的灵活性和二级结构区域预测得来的数值相结合来获得。这是因为,大多数的抗原体区域不仅仅存在于蛋白质的表面接触区域。因此,可以用来识别作为大多数免疫原性的第二细胞外环接着ESTNQTIFISCAPYPHSN(GIu-Ser-Thr-Asn-GIn-Thr-Phe-Ile-Ser-Cys-Ala-Pro-Tyr-Pro-His-Ser-Asn)的区域,这可以在图11a和图11b中看到。胃泌素释放肽受体的自然肽的主要差异是,该自然肽的氨基酸数量被减少到最优化数量(不存在于自然界中)以用于产生免疫(13到18氨基酸)。

[0114] 肽ESTNQTIFISCAPYPHSN(GIu-Ser-Thr-Asn-GIn-Thr-Phe-Ile-Ser-Cys-Ala-Pro-Tyr-Pro-His-Ser-Asn)的序列,在本申请中理解为SEQ ID NO:1序列,是通过由Hirata et al(1994)中所描述的和以在反向阶段使用C18 Econosil column(5 μ m, 4.6 \times 150mm)耦合 pump LC-8 type a的高压液相色谱法(HPLC)(岛津,京都,日本)为特征的茚甲氧羰基法(9-茚甲氧羰基)在固相载体中被合成,并在两个溶酶系统中配有紫外可见检测器:

1(A)TFA/H₂O(1:1000)and(B)TFA/ACN/H₂O(1:900:100)

2(A)H₃PO₄/H₂O(1:1000)and(B)H₃PO₄/H₂O/ACN(1:100:900)

[0115] 然后,肽由反向阶段使用C18 Econosil column(5 μ m, 22.5 \times 250mm)耦合 pump LC-8 type a的半制备高压液相色谱法净化,并在两个溶酶系统中配有紫外可见检测器:

(A)TFA/H₂O(1:1000)and(B)TFA/ACN/H₂O(1:900:100)

结果可见于图1。

[0116] 合成肽是由利用MALDI-TOF(基质辅助激光解吸电离飞行时间)技术(图2)的LT Microflex型号(美国布鲁克道尔顿公司)利用离子飞行时间质谱分析法来分析的。在分析中,使用的辅助基质为 α -cyano-4-hydroxycyanamino酸,氨基酸分析,如果有必要,可使用埃德曼降解。

实例2. 抗体的开发和获取。

[0117] 合成肽在ESTNQTIFISCAPYPHSN序列中产生之后,并携带有通过兔免疫的多克隆抗体显影。

[0118] 在第一天,对兔子进行皮下接种200 μ g乳化到同体积的油乳剂中的抗原。在十天的间隔内再进行两次上文提到的乳化到油乳剂的抗原的接种。最后一次接种五天后,对血浆进行收集并使用斑点印迹法来检测相应抗原的特殊抗体。

斑点印迹法

[0119] 为了通过斑点印迹法对抗体的免疫检测和定量,将蛋白质(接近0.5 μ g)添加到0.45微米的硝酸纤维膜中。在常温下晾干30分钟,硝酸纤维膜用阻断剂阻断1小时然后和稀释到5%印迹的连续稀释血清培育2小时。接下来,用5%的印迹用对硝酸纤维膜进行十分钟

内三次的清洗然后在5%印迹中稀释到1/5000的鼠-磷酸酶共轭抗免疫球蛋白g抗体在常温下孵育90分钟,然后再用硝酸盐缓冲液(PBS)清洗三次后浸染10分钟.结果见图3

实例3.试剂的开发和对异型发育和(或)宫颈肿瘤病变-免疫组织化学的定性和(或)定量检测的方法。

[0120] 在获得兔多克隆抗体后,使用免疫组织化学技术来实现实验室检测。子宫颈组织石蜡块和子宫颈的肿瘤和非肿瘤组织经过选择后进行免疫组织化学技术检测。所有的样品要用本发明中的抗体和仅限于实验用的多克隆抗兔胃泌素释放肽受体的对照抗体来检测(Affinity BioReagents,GoIden,CO,USA公司目录号:OPA1-15619)。

[0121] 简单地说,脱蜡,内源性过氧化物酶的失活后,与常规阻断血清进行交叉反应,4微米部分和稀释后的一级抗体(1:200本发明中的抗体和1:50对照抗体)在4℃中孵育一夜。一级抗体的定位由随后的抗体的生物素化和抗生蛋白链菌素-过氧化物酶的共轭效应来实现(LSAB,Dako,和盐酸盐/双氧水二氨基联苯胺;DAB试剂,Dako)。癌样品在已知的对胃泌素释放肽受体呈阳性的胰腺中作为阳性对照和阴性对照,是通过对一级抗体的遗漏来获得。在免疫组织化学分析法中,当超过10%细胞被胃泌素释放肽受体中度或强烈的染色的情况下,病变被视为阳性。当少于10%细胞被胃泌素释放肽受体轻度染色的情况下,病变被视为阴性。对两个抗体比较包括染色的强度,细胞核或细胞质染色标记和不同细胞群的存在。所有样品的分析,由独立的两个病理学家对之前的诊断进行“盲检”。一旦出现分歧,将会加入第三位病理学家来一起达成共识。

[0122] 免疫组织化学的结果

[0123] 起初,我们用的是和使用的对照抗体相似的本发明的抗体的浓缩物,或说1:50。然而,在此浓缩物中,本发明的抗体显示的颜色比对照抗体的颜色更强。因此,对于本发明的抗体和对照抗体的等值比较,我们用达到相同颜色强度,稀释度为1:200的本发明的抗体和1:50的对照抗体。结果显示本发明的抗体更为优越,它相对于对照抗体,有能力对更稀浓度细胞的胃泌素释放肽受体的标记。这对成本效益有很大的冲击力,而且本发明的抗体比对照抗体多4倍检测性能。灵敏性能与可检测到的最低数量的抗原的固有特性方法密切相关。因此,根据建议,本发明的抗体在对胃泌素释放肽受体的检测上比对照抗体有更高的灵敏性。

[0124] 值得注意的是获得的多克隆抗体与抗胃泌素释放肽受体对照抗体的不同,主要是因为抗胃泌素释放肽受体对照抗体仅限用于实验和免疫组织化学技术,而不能用于免疫沉淀反应技术,例如蛋白质印迹法。

[0125] 关于非子宫颈肿瘤样品,子宫颈上皮内瘤样病变二级(CIN II)样品中通过免疫组织化学法对一级抗体(本发明抗体和对照抗体)之间进行胃泌素释放肽受体表达的比较,子宫颈上皮内瘤样病变三级(CIN III)和子宫颈上皮内瘤样病变二级(CIN II)可分别在图4到图7中观察到。它也可以看到本发明的抗体展现有细胞质染色和细胞核染色,反之对照抗体(先前技术)主要染色在细胞质中。这也赋予了本发明抗体更大的优势,使它在诊断异型发育和肿瘤病变中具有优越性。

[0126] 本发明中获得的抗体和对照抗体的另一个显著区别是抗体滴度。本发明抗体对比于对照抗体,可以被稀释4次,而且任然对检测变异的细胞或组织有足够的强度。

[0127] 因此,本专利申请呈现的结果和实验检验清晰的指示出,获得的多克隆抗体相对

先前技术中现有的抗胃泌素释放肽受体的对照抗体的优越性,该优越性也在实例4中的快速免疫分析法中证明了。

实例4.对异型发育和(或)子宫颈上表皮内瘤病变的定性和定量检测的试剂和开发过程-免疫层析法快速检测

[0128] 子宫颈病变的女性子宫颈抹片样品获得后。该样品利用细胞刷收集后,储存在0.9%的生理盐水的小瓶子里并冷藏到-200°C的温度中。与此同时对收集到的子宫颈抹片样品通过胃泌素释放肽受体进行常规的细胞分析和免疫细胞化学分析。免疫层析法仅用于呈阳性的样品中,根据细胞学检查(CIN I,II and III)和胃泌素释放肽受体(每个载玻片超过5个染色细胞)的存在。在对溶液进行解冻之后,进行侧流免疫层析法检测。

[0129] 免疫层析法检测我们用的是Whatman,GE的FUSION5™膜。大体上,侧流免疫层析法检测是根据图8来构建的。然而,FUSION5™膜为单股结构,包含有两个着入点,样品的接收部分和吸收部分。

测试线共轭的准备:

[0130] 一级多克隆抗胃泌素释放肽受体和胶体金(62R-GC010,Fitzgerald)的共轭连接我们使用的是直接法。对10nM胶体金和10g/mI的一级抗体进行单一孵育一个小时,然后放入10mM pH值为7.2的磷酸盐缓存液中。利用滴管把溶液放入试条起始点2.5cm的捕获区。

控制线的准备:

[0132] 控制线用的是在含有:pH值为8.2的TBS,1%的BSA,15mM NaN₃和20%的甘油的溶液中被共轭到15nM胶体金的二级羊抗兔IgG抗体(43R-IG085GD,Fitzgerald)。该液体用滴管在试条起始处2.7cm处涂入膜里。在涂上两条线后,材料需要在37°C的温度下至少晾干3小时。然后材料用刀片切成5mm的小条。示意图可以见于图9。

[0133] 为了进行检测,样品需要在室温中解冻。含有样品的溶液被转移到锥形试管然后用2mI的生理盐水对刷子再清洗一次。最后的容积被离心分离十分钟到2,700g。然后,上层清液被移除,并加入100mL的电泳缓冲液(Tris三甲醇氨基甲烷,氯化钠(NaCl),氯化钾(KCl),乙二胺四乙酸(EDTA),曲拉通X-100(Triton X-100),吐温20(Tween 20)和叠氮化钠BSA(sodium azide BSA))。100uL的溶液被放入预先准备好的试条的起始位置,作为对照,一些试条的电泳缓冲液的涂入并不加入子宫颈抹片样品。10分钟后,进行视觉解读。

结果:

[0134] 可以注意到,样品一直流动到试条的尾端。图10显示了在放入溶液后,检测线和控制线在第一时间出现了染色,但是在检测开始后5分钟,染色的达到更高的强度。在控制条中,只有控制线显示阳性染色,指示出二级抗体的释放。

[0135] 在本专利申请中可以清楚的看到,自主研发的试剂是一个对子宫颈病变,包括子宫颈上表皮内瘤病变和子宫颈癌的筛查和诊断的重要工具。

实例5.抗原肽表达的基因构建

[0136] 本发明的基因构建对于抗原肽的表达和生产有作用,构建包括了核苷酸序列SEQ ID NO:2。图11阐明了该构建。核苷酸序列SEQ ID NO:3,相应的,只有完整的序列包含有核苷酸序列SEQ ID NO:2。

实例6.通过蛋白质印迹法技术对抗胃泌素释放肽受体抗体进行免疫分析法评估

[0137] 蛋白质印迹法免疫分析技术按照前面文献描述的方法来实施。细胞的溶解在两个

已知的胃泌素释放肽受体的阳性样品中实施：市场上可购得的结肠直肠癌的衍生细胞质，HT-29，和子宫颈病变样品。简单的说，样品被移液器吸取到浓度为1 μ g/ml聚丙烯酰胺凝胶中然后再利用电泳转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜中，然后再利用MTTBS奶粉对膜进行阻断。抗胃泌素释放肽受体抗体在一夜间激活。之后在TTBS溶液中对膜进行清洗，之后加入二级抗兔IgG抗体1小时20分钟。显示过程是通过化学发光检测器Image Quant LAS500中的HRP化学发光试剂(Millipore)来实现。

[0138] 正如图12可见，抗胃泌素释放肽受体抗体对两个样品显阳性，通过蛋白质印迹法来显示其活动。结果可以见于出现的接近55kDa的带条。蛋白质印迹法技术的实施也伴随着对照抗体，并无显示任何阳性结果。对照抗体缺少阳性结果是意料之中的事，作为研究用的抗体并不适用于免疫沉淀反应技术。因此，本发明的抗体比较于对照抗体(先前技术)有明显的优势，因为它可以实现在其他技术中，例如，蛋白质印迹法。

[0139] 本发明的抗胃泌素释放肽受体抗体利用亲和色谱法通过蛋白质G来纯化。吸附缓冲液用的是20mM pH值为7的磷酸二胺钠缓冲液和洗脱抗体，0.1M pH值为2.7的甘氨酸缓冲液。然后，利用pH值为7.2的硝酸盐缓冲液来透析样品。

[0140] 在本发明抗体的纯化后，和对照抗体进行新一次的对比分析。我们评估了25个高级别和低级别的子宫颈上表皮内瘤病变，包括浸润性癌症。所有对本发明的抗体表达显阳性的样品，都可以见于苏木精-伊红(HE)染色对比(图13a和13b)。而这些都不能在对照抗体中观察到，一些病变都显示无染色。

[0141] 通过对本发明公布的抗体观察，可发现细胞质和细胞核染色，而对照抗体仅显示细胞质的低密度染色。

[0142] 图14可以观察到苏木精-伊红(HE)染色(a)，通过本发明抗体的高密度细胞质和细胞核染色(b)，和通过对照抗体低密度的细胞质染色(c)。另一个重要的观察就是本发明公布的抗体通过高密度的细胞核染色来显示病变的恶化，也就是说胃泌素释放肽受体的表达在高级别的CIN3(子宫颈上表皮内瘤病变3级)病变中更密集，这些无法在对照抗体中观察到。

[0143] 此外，免疫细胞化学法分析将实施在子宫颈上表皮内瘤病变病人的子宫颈抹片的分析中。抹片细胞高密度的细胞质和细胞核染色显示的变化暗示着高级别的病变(图15)。

[0144] 下面的表格是对本发明抗体和对照抗体的对比总结：

抗体使用	研究用的普通抗胃泌素释放肽受体抗体	本发明的抗胃泌素释放肽受体抗体
研究	可	可
诊断	不	可
免疫细胞化学	不	可
免疫组织化学	可	可
蛋白质印迹	不	可
快速检测	不	可

表1. 先前技术下的常规抗胃泌素释放肽受体抗体和本发明中的抗体的对比。

[0145] 那些所属领域的技术人员将会对此处提供的知识进行评价，和可能在附加权利要

求书范围内的具体化和其他具体化中对产品的再制造。

序列列表

<110>Ziel Biosciences Ltda.

<120>抗胃泌素释放肽受体(GRPR)抗体, 获得的过程, 检测过程, 抗体使用, 试剂和基因构建

<130>GRPR PCT

<160>3

<170>专利版本 3.5 (Patent Inversion 3.5)

<210>1

<211>17

<212>PRT

[0001]

<213>人造序列

<220>

<223>GRPR plus(来源于 GRPR 基因),功能: 抗原肽

<400>1

GluSerThrAsnGlnThrPheIleSerCysAlaProTyrProHisSer

1 5 10 15

Asn

<210>2

<211>51

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

<223>抗原肽编码

<400>2

gaaagcacca accagacctt cattagctgt gccccatacc cacactctaa t 51

<210>3

<211>2681

<212>DNA

<213>人造序列

<220>

[0002]

<223>编码抗原肽

<400>3

```

aaaggatctt gttaaactag gtaggaactg cagtcggctg gttgcttctc atctggagaa 60
agcaggcaac tgggcagtga ttgaagtgtc cagcaggggg ctggcattct ctgtctataa 12
gtaaacctgg ttctcttcca gaccctcagc tcagcggagc tgccgtttgc tgggtaagcc 180
cgtgacgtgc aaagcctcct gcctatagga tttgaggatt totcagtcca gtttttttct 240
accacttta aacctccaga ttctaaatat caggaaagac gctgtgggaa aatagcaggc 300
caaaagttct tagtaaacctg cagccagggg gactcagact agaatggagg tagaaagaac 360
tgatgcagag tgggtttaat tctaagcctt tttgtggeta agttttgttg ttgttaactt 420
attgaattta gagttgtatt gcaactgtca tgtgaaagcc agagcagcac cagtgtcaaa 480
atagtgacag agagttttga ataccatagt tagtatatat gtactcagag tatttttatt 540

```

	aaagaaggca	aagagcccg	catagatc	atcttcatct	tcactcgggt	gcaaaatcaa	600
	tagttaagaa	atagcatcta	agggaaacttt	taggtgggaa	aaaaaatcta	gagatggctc	660
	taaatagactg	tttccttctg	aacttggagg	tggaccattt	catgcactgc	aacatctcca	720
	gtcacagtgc	ggatctcccc	gtgaacgatg	actggtccca	cccggggatc	ctctatgtca	780
	tccctgcagt	ttatgggggt	atcattctga	taggcctcat	tggcaacatc	actttgatca	840
	agatcttctg	tacagtcaag	tccatgcgaa	acgttccaaa	cctgttcatt	tccagtctgg	900
	ctttgggaga	cctgctcctc	ctaataacgt	gtgctccagt	ggatgccagc	aggtacctgg	960
	ctgacagatg	gctatattggc	aggattggct	gcaaactgat	cccctttata	cagcttacct	1020
	ctgttgggggt	gtctgtcttc	acactcacgg	cgtctcggc	agacagatac	aaagccattg	1080
	tccggccaat	ggatatccag	gcctctcatg	cctgatgaa	gatctgctc	aaagccgct	1140
	ttatctggat	catctccatg	ctgctggcca	ttccagaggc	cgtgtttct	gacctccatc	1200
[0003]	ccttccatga	ggaaagcacc	aaccagacct	tcattagctg	tgccccatac	ccacactcta	1260
	atgagcttca	ccccaaaatc	cattctatgg	cttcctttct	ggtctttctac	gtcattccac	1320
	tgtcgatcat	ctctgtttac	tactacttca	ttgctaaaaa	tctgatccag	agtgtttaca	1380
	atcttcccgt	ggaagggaa	atacatgtca	agaagcagat	tgaatcccgg	aagcgacttg	1440
	ccaagacagt	gctgggtgtt	gtgggcctgt	tcgccttctg	ctggtcccc	aatcatgtca	1500
	tctacctgta	ccgctcctac	cactactctg	aggtggacac	ctccatgctc	cactttgtca	1560
	ccagcatctg	tgccccctc	ctggccttca	ccaactoctg	cgtgaacccc	tttgcctct	1620
	acctgetgag	caagagtttc	aggaaacagt	tcaaacactca	gctgctctgt	tgccagcctg	1680
	gcctgatcat	ccggtctcac	agcactggaa	ggagtacaac	ctgcatgacc	tccctcaaga	1740
	gtaccaaccc	ctccgtggcc	acctttagcc	tcatcaatgg	aaacatctgt	cacgagcgg	1800
	atgtctagat	tgacccttga	ttttgcccc	tgagggacgg	ttttgcttta	tggctagaca	1860
	ggaacccttg	catccattgt	tgtgtctgtg	ccctccaaag	agccttcaga	atgctcctga	1920

	gtggtgtagg tgggggtggg gaggcccaaa tgatggatca ccattatatt ttgaaagaag	1980
	ccatcaagtc ttaagttttt catttcaact tgtgaacggt tcttctgatg tgaagcaaac	2040
	cttccctttt cagaaaaggg aacaagtaga aaattatttt ttaagcctca agccctgtta	2100
	aatggtcgtg gcccaattatg tcatagaaac tgtatgaaca accagattta catagcagag	2160
	aaatcataca ttgaatgctt actttgtgaa agacttcacc ttgtcatttc ttttaagcaga	2220
	cgctagtact ttagaaatat aacttgactc tgttttcagg aatatctgta atacacaaac	2280
[0004]	caaggaacaa cttttattta cactcctaata atgaaaagtc aatcctgtga gagagctoca	2340
	tgatagaggg acaactctcca agttgataac aatggaagcg agtttaatat aaaacaattc	2400
	cctaagcatt tatttttttt ttaaaaagat gttactgagg acctagaaga aatgctcaat	2460
	acatactttg aaagcaaaaa tacaatcaaa cacattgaca cgtatataaa gatccacgcg	2520
	tggtctgtcg tgatatctca cactctgaat tcttacttga tggaggtttt gtttctgtct	2580
	acggttttta tcatccaggg tgccattcca ccatagaaga gcaatccttt taggaaaaaa	2640
	aaaatcatgc tattaattaa tcaaatatct ataatgcat a	2681

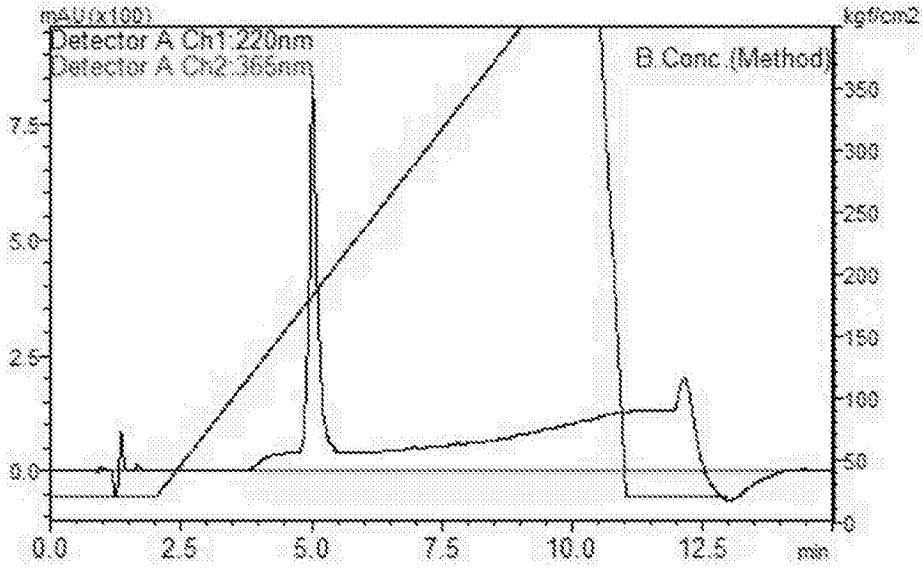


图1

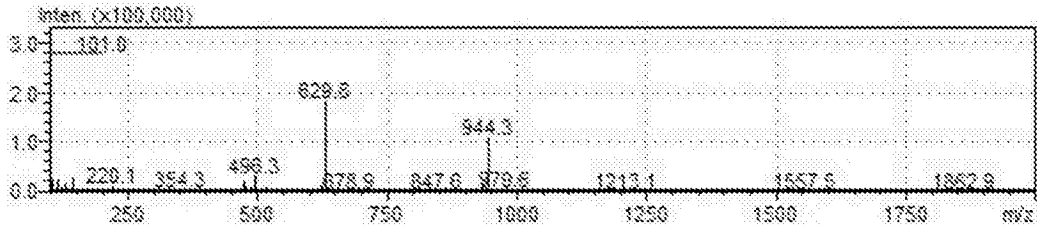


图2

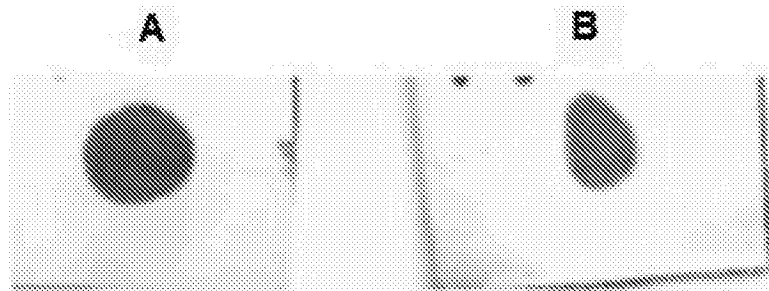


图3

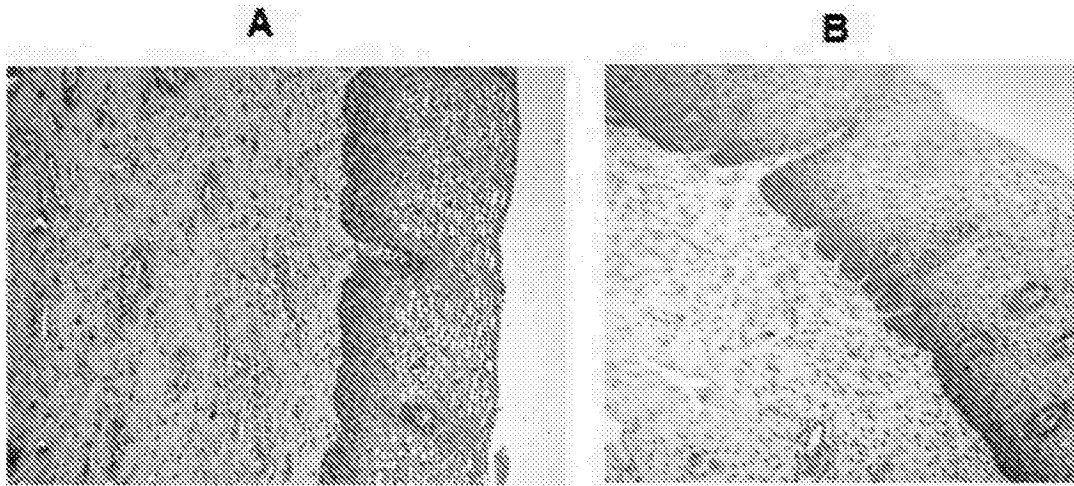


图4

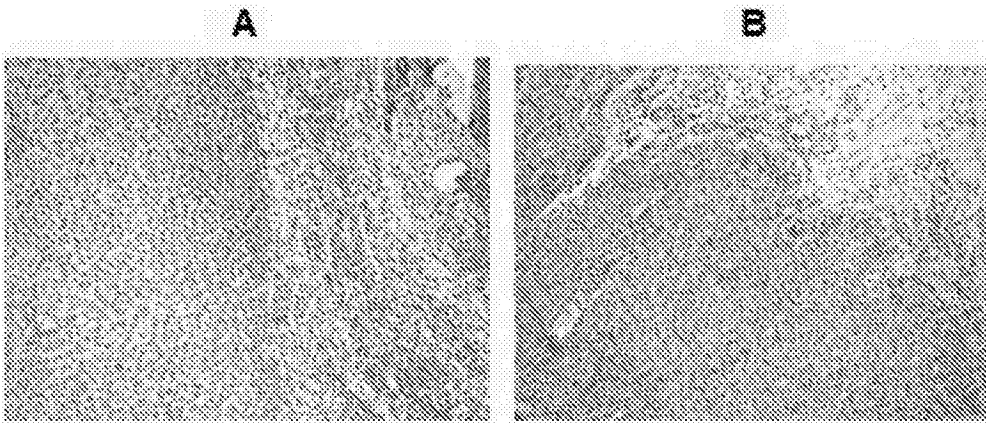


图5

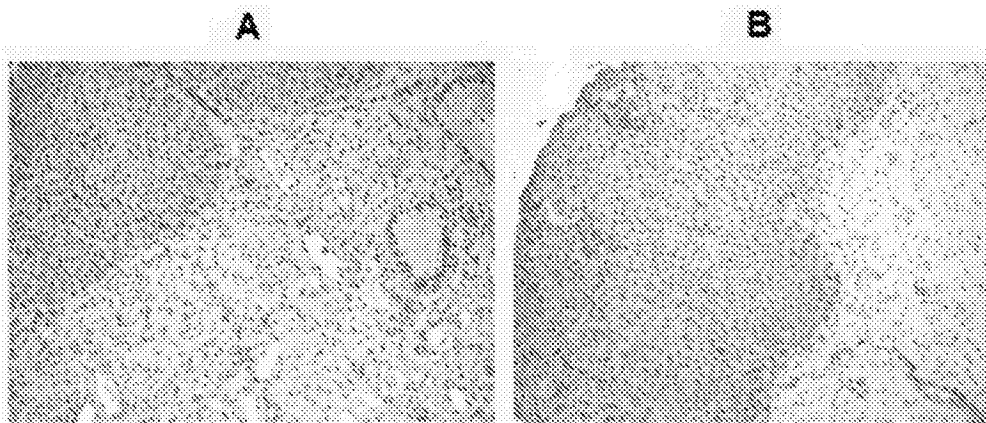


图6

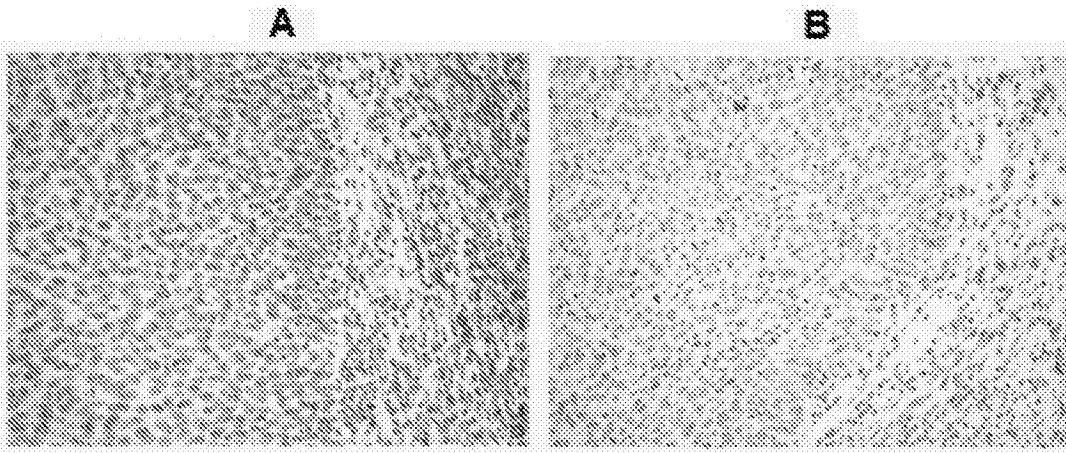


图7

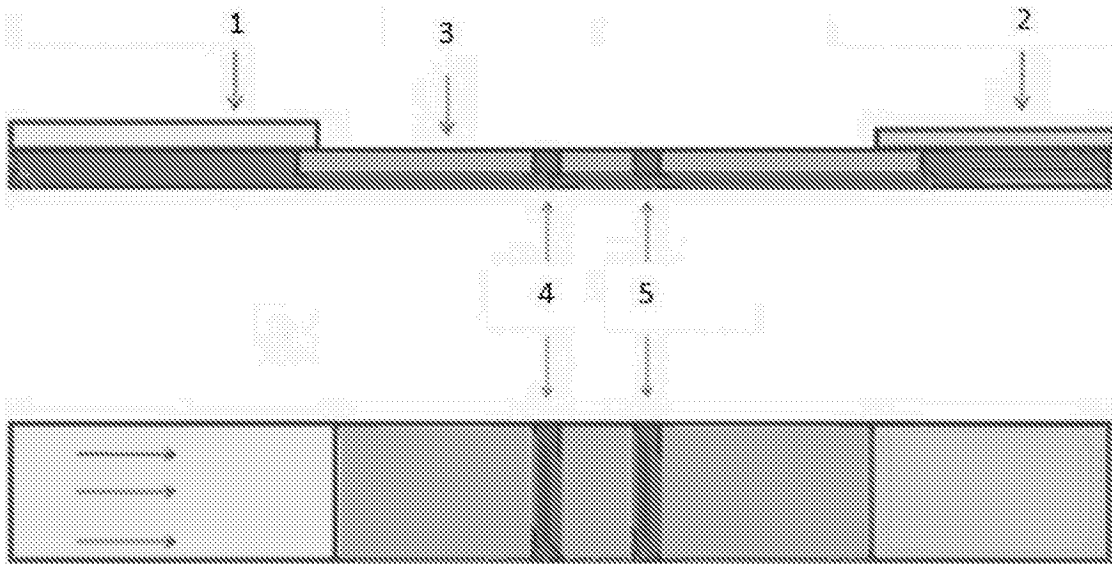


图8

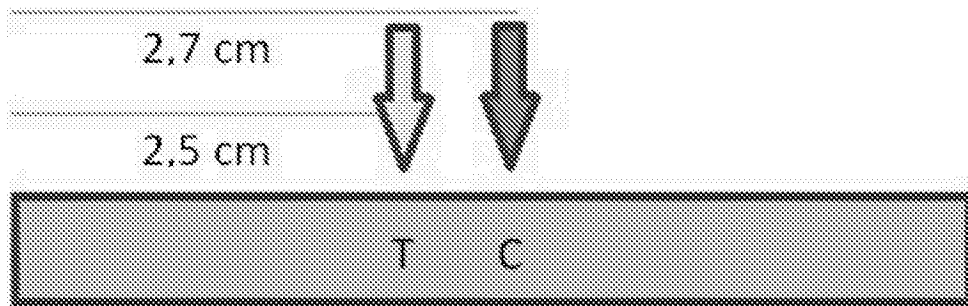


图9

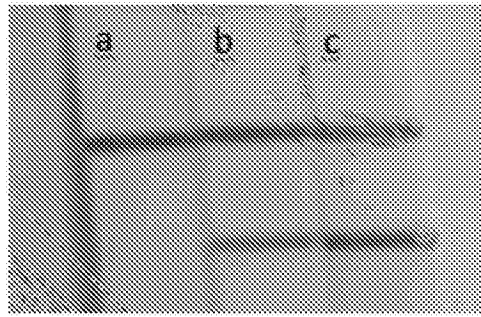


图10

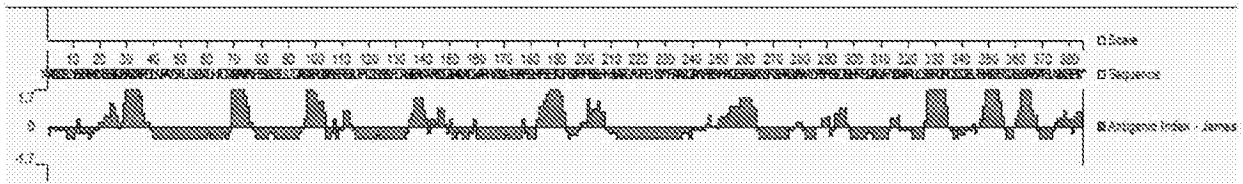


图11a

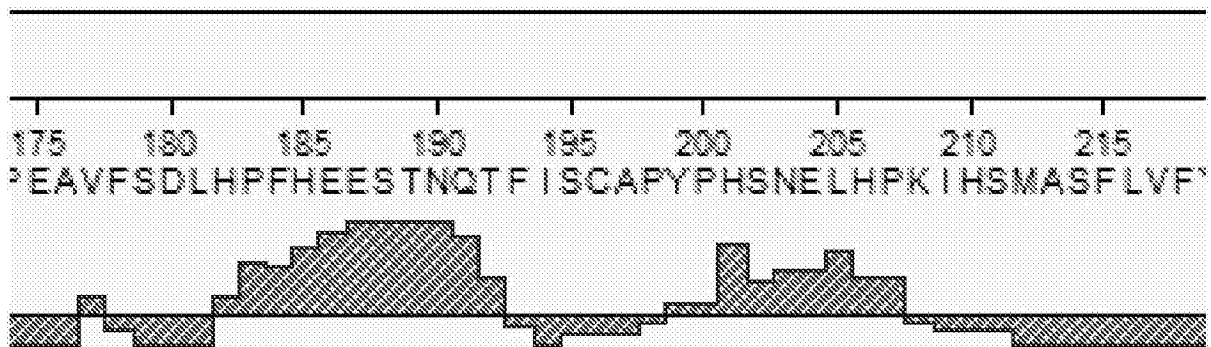


图11b

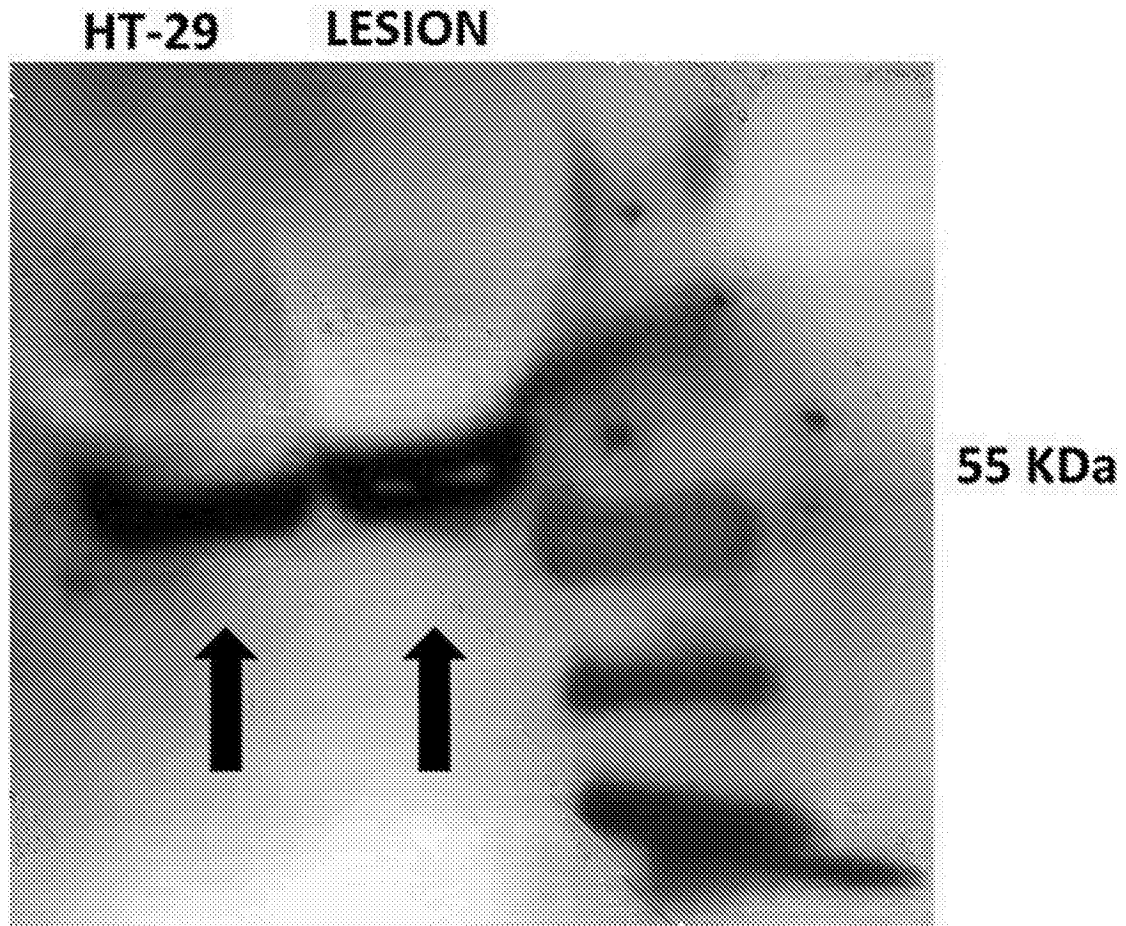


图12

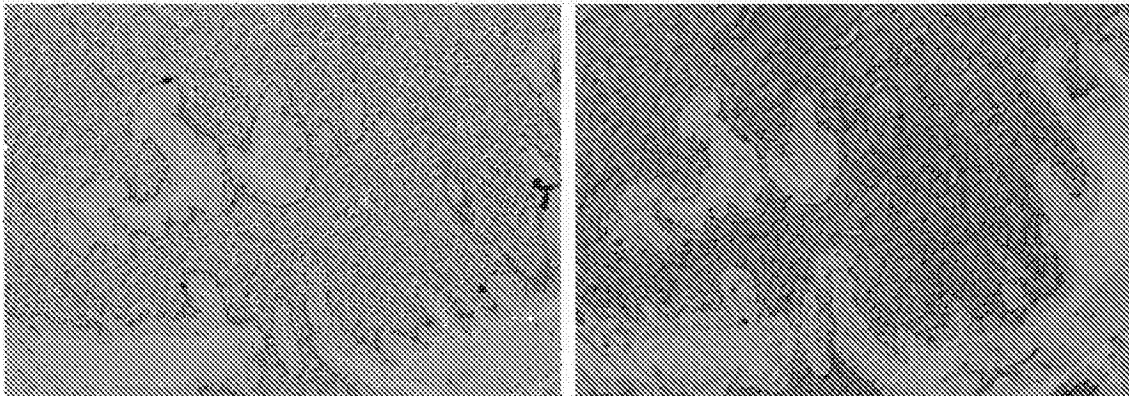


图13a

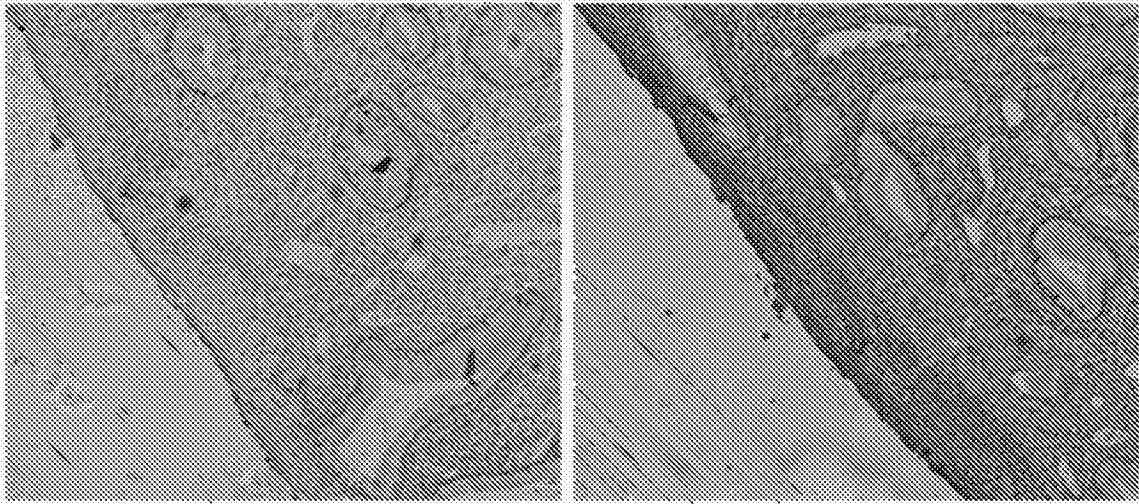


图13b

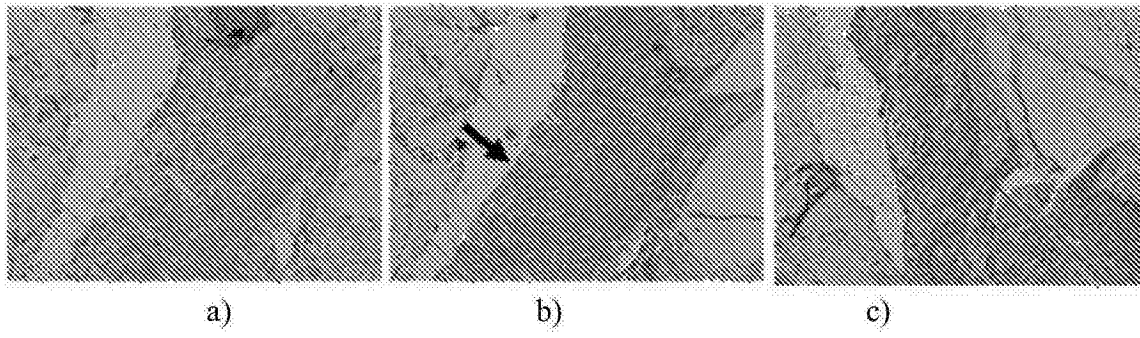


图14

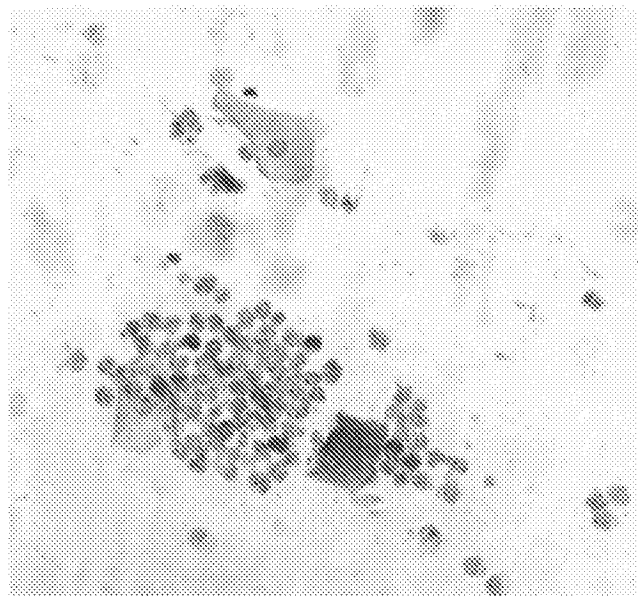


图15

专利名称(译)	抗胃泌素释放肽受体(GRPR)抗体,获得的过程,检测过程, 抗体使用,试剂和基因构建		
公开(公告)号	CN106132993A	公开(公告)日	2016-11-16
申请号	CN201580016890.8	申请日	2015-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	兹耶尔生物科学研究,开发和诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	兹耶尔生物科学研究,开发和诊断有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	兹耶尔生物科学研究,开发和诊断有限公司		
[标]发明人	DB考内里奥 CB德法利亚斯		
发明人	D·B·考内里奥 C·B·德法利亚斯		
IPC分类号	C07K16/30 G01N33/53 C07K7/08		
代理人(译)	余颖		
优先权	102014007315 2014-03-27 BR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是关于通过至少由一只动物和序列SEQ ID NO:1达到60%一致的肽接触而获得的抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体。本发明还描述了获得抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的过程；异型增生和(或)子宫肿瘤病变的体外检测方法；抗胃泌素释放肽受体(ANTI-GRPR)抗体的使用；定量检测和(或)异型增生肿瘤和(或)子宫病变的定量检测试剂；通过基因构建来对抗原肽表达或产生进行描述。本发明用于医药学、免疫学和分子学术领域。

