



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102084249 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 200880111723. 1

(22) 申请日 2008. 09. 29

(30) 优先权数据

2007-278843 2007. 10. 26 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 04. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2008/002716 2008. 09. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/054091 JA 2009. 04. 30

(83) 生物保藏信息

FERM BP-10991 2008. 08. 05

FERM P-21308 2007. 06. 22

FERM P-21309 2007. 06. 22

FERM BP-10992 2008. 08. 05

(73) 专利权人 株式会社先端生命科学研究所

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 青柳克己 井泽雪路

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

代理人 张淑珍 王维玉

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

C12N 15/09(2006. 01)

C12P 21/08(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2006117994 A1, 2006. 11. 09, 权利要求书, 说明书 30-32 页.

Katsumi Aoyagi 等. Enzyme Immunoassay of Immunoreactive Progastrin-Releasing Peptide(31 -98) as Tumor Marker for Small-Cell Lung Carcinoma: Development and Evaluation. 《CLIN. CHEM. 》. 1995, 第 41 卷 (第 1 期), 537-543.

审查员 田颖

权利要求书1页 说明书16页

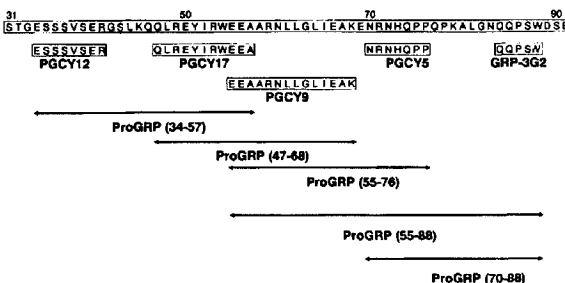
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

针对胃泌素释放肽前体的抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种不存在测定值分散和样品处理等操作上的制约等问题的、高灵敏度的新的 ProGRP 测定方法。特别是, 本发明提供一种使用 2 种以上的不同抗体测定胃泌素释放肽前体和 / 或其降解物的方法, 所述的抗体识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 47-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位。本发明的方法与现有的测定方法相比, 能够以冷藏保存的样品为对象, 在短时间内从更少量的样品试样中以更高的检测灵敏度检测 ProGRP 或其降解物。



1. 识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 47-68 位的氨基酸序列所呈现的抗原表位的 2 种以上的不同单克隆抗体在制造用于测定胃泌素释放肽前体和 / 或其降解物的试剂盒中的用途,

其中,所述 2 种以上的不同单克隆抗体中的至少一种为由按照保藏编号 FERM BP-10991 保藏的杂交瘤 GCY9 产生的单克隆抗体或由按照保藏编号 FERM BP-10992 保藏的杂交瘤 GCY17 产生的单克隆抗体;

所述胃泌素释放肽前体和 / 或其降解物含有胃泌素释放肽前体的第 47-68 位的氨基酸序列所呈现的抗原表位。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其中,利用夹心免疫测定法测定所述胃泌素释放肽前体和 / 或其降解物。

3. 用于权利要求 1 或 2 所述的用途的 2 种以上的不同单克隆抗体,所述单克隆抗体包含识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 47-68 位的氨基酸序列中的 N 末端部分所呈现的抗原表位的单克隆抗体和识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 47-68 位的氨基酸序列中的 C 末端部分所呈现的抗原表位的单克隆抗体,

其中,所述 2 种以上的不同单克隆抗体中的至少一种为由按照保藏编号 FERM BP-10991 保藏的杂交瘤 GCY9 产生的单克隆抗体或由按照保藏编号 FERM BP-10992 保藏的杂交瘤 GCY17 产生的单克隆抗体。

4. 由按照保藏编号 FERM BP-10991 保藏的杂交瘤 GCY9 产生的单克隆抗体。

5. 由按照保藏编号 FERM BP-10992 保藏的杂交瘤 GCY17 产生的单克隆抗体。

6. 按照保藏编号 FERM BP-10991 保藏的杂交瘤 GCY9。

7. 按照保藏编号 FERM BP-10992 保藏的杂交瘤 GCY17。

8. 一种含有权利要求 4 和 5 所述的单克隆抗体、并用于测定胃泌素释放肽前体或其降解物的试剂盒,

其中,所述胃泌素释放肽前体或其降解物含有胃泌素释放肽前体的第 47-68 位的氨基酸序列所呈现的抗原表位。

9. 如权利要求 8 所述的试剂盒,所述试剂盒是用于癌诊断或用于治疗效果监测的试剂盒。

针对胃泌素释放肽前体的抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种针对胃泌素释放肽前体的抗体及其应用,所述抗体广泛用于包括小细胞肺癌在内的各种疾病的早期发现和治疗监测、复发监测等。

背景技术

[0002] 在日本,死因的第1位是恶性肿瘤,其中肺癌死亡率呈逐年上升趋势,在男性中超过胃癌成为死因的第1位,在女性中也占第3位。肺癌在病理组织学上主要分为以下4种组织类型,即:发生于肺门部的肺鳞状上皮细胞癌(squamous-cell carcinoma)和小细胞肺癌(small-cell lungcarcinoma:SCLC)、发生于肺野部的肺腺癌(adenocarcinoma)和大细胞肺癌(Large-cell lung carcinoma)。

[0003] 尤其是小细胞肺癌,由于增殖快速,早期即发生远处转移,因此初诊时发现大多已是全身性转移的进行性癌。关于该类型癌的治愈率,对于病变局限于一侧肺野的小细胞肺癌的局限型(Limited disease:LD)患者,其治愈率为约20%;对于已经转移至两肺和其他脏器的扩散型(extensive disease:ED)患者,可以说事实上难以治愈。

[0004] 此外,由于小细胞肺癌对抗癌剂的敏感性高,因此,化学疗法是首选的治疗方法,相反,对于非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinoma:non-SCLC),由于化学疗法的疗效差,因此外科疗法是首选的治疗方法。

[0005] 因此,小细胞肺癌是肺癌中特别需要早期发现、早期治疗的癌症,所以,将小细胞肺癌和非小细胞肺癌进行鉴别诊断,对于确定治疗方案极其重要。

[0006] 发现肺癌的方法之一是痰液检查。然而,痰液检查主要适于肺鳞状上皮细胞癌的检查,对小细胞肺癌而言,存在阳性率低的问题。此外,X射线摄影法也是广泛使用的发现肺癌的方法,但是对于发生于肺门部的肺鳞状上皮细胞癌和小细胞肺癌,肺门部由于受到心脏的影响,存在癌组织的阴影非常难以拍到的问题。此外,关于小细胞肺癌,对肺野呈现异常阴影的患者,即使使用痰液细胞学诊断、胸部X射线普通摄影、CT扫描、支气管内窥镜等,也难以早期发现该类肺癌。

[0007] 此外,用于诊断癌症的一些检查方法,例如放射线照射、活组织检查或支气管内窥镜等,会对患者造成痛苦,且需要昂贵的仪器和熟练的技术等。

[0008] 因此,正在进行肿瘤标志物的研究,以便通过更简便的血液检查,在能够治愈的时期可高效诊断出癌症。目前,在癌症的发现、诊断、病情监测指标、复发诊断等中使用了30种以上的肿瘤标志物。

[0009] 由于肺癌组织类型多样,所以还没有报道过对所有类型肺癌的发现或诊断均有效的肿瘤标志物。因此,目前根据肺癌的组织类型来选择和使用有效的标志物。

[0010] 例如,对于肺腺癌,主要选择使用癌胚抗原(carcinoembryonic antigen:CEA)或唾液酸化Lex-i抗原;对于肺鳞状上皮细胞癌,主要选择使用鳞状上皮细胞癌相关抗原(squamous-cell carcinoma related antigen:SCC);对于小细胞肺癌,主要选择使用神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase:NSE)等。

[0011] 然而,NSE 存在如下缺点:(1) 针对可治愈的早期癌的阳性率低;(2) 治疗引起测定值出现暂时性上升;(3) 采血时的溶血引起测定值上升;(4) 小细胞肺癌患者与正常健康者的测定差值小等。因此,对于小细胞肺癌来说,NSE 未必是有效的肿瘤标志物。

[0012] 胃泌素释放肽 (Gastrin-Releasing Peptide:GRP) 是 McDonald 等在 1978 年从猪的胃组织中分离出的一种具有促进胃泌素分泌作用的、由 27 个氨基酸组成的脑肠肽 (brain-gut peptide)。已证实人类也存在 GRP,并于 1984 年克隆出编码人类 GRP 的基因。

[0013] 日本国立癌中心的山口等,在认为是来自神经内分泌细胞的小细胞肺癌的生物学特性的研究过程中,测定了包括促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone:ACTH) 和降钙素等 15 种以上的脑肠激素,发现在培养的小细胞肺癌株中,GRP 以最高频率且高浓度地得到积极分泌(非专利文献 1)。并且,建立了组合有血中 GRP 浓缩法的放射免疫测定法 (RIA),发现小细胞肺癌患者与健康人相比,呈现出高的血中 GRP 浓度。然而,由于 GRP 在血中会快速降解,因此血中浓度低,此外,由于上述测定需要复杂的浓缩操作,因此临床应用困难。

[0014] 根据此后的研究可知,在各种细胞中,通过选择性 RNA 剪接 (alternative RNA splicing),产生 3 种 GRP 前体 (ProGRP) (非专利文献 2)。这 3 种 ProGRP,其第 1-98 位氨基酸序列是相同的,而第 99 位以后,通过选择性 RNA 剪接,变成互不相同的氨基酸序列。该相同的第 1-98 位氨基酸序列在序列编号 1 中示出。下文只要没有特别说明,本发明中的 ProGRP、其部分序列、降解物等氨基酸残基的编号均用序列编号 1 的氨基酸序列的编号表示。

[0015] 3 种 ProGRP 的第 1-27 位氨基酸序列,与具有促胃泌素分泌活性的成熟 GRP 的该部分氨基酸序列相同。这 3 种前体均通过激素前体切断酶,降解为由第 1-27 位氨基酸序列构成的成熟型 GRP;以及由第 31 位以后的氨基酸序列构成的、不具有促胃泌素分泌活性的、作为 ProGRP 降解物的 C 末端片段 (ProGRP-Cfrag)。

[0016] Holst 等(非专利文献 3)报道:通过对由 ProGRP 的第 42-53 位氨基酸序列构成的肽(以下称为 ProGRP(42-53))使用抗血清进行放射免疫测定 (RIA),发现小细胞肺癌患者血浆中的 ProGRP 或 ProGRP-Cfrag 水平高。然而,该方法需要沉淀萃取操作,灵敏度也不足。

[0017] 三宅等着眼于 ProGRP 与 GRP 相比在血中的稳定性高、以及作为 3 种 ProGRP 共同部分的第 31-98 位氨基酸序列对其他蛋白质的氨基酸序列没有显示出相同性,使用由该氨基酸序列构成的重组肽(以下称为 ProGRP(31-98))作为抗原得到的高效价抗血清,建立了无需沉淀萃取操作的高灵敏度 RIA 法(非专利文献 1)。通过该方法,使 ProGRP 成为与 GRP 同样优异的肿瘤标志物。

[0018] 该方法在无需萃取操作方面是有利的,但是测定需要 4 天时间,且灵敏度不足,为 10pM(77.3pg 抗原 /mL),因此不能测定健康人血清中的 ProGRP 值,尚未得到临床应用。

[0019] 此外,上述 Holst 等和三宅等的 RIA 法是抑制法,因此,虽然只要 ProGRP 片段的一部分具有抗原性就能进行测定,但是其灵敏度比夹心 (sandwich) 法低,因此难以实现需要高灵敏度的 ProGRP 测定法的临床应用。即:为了在临床上进行 ProGRP 检测,必须提高检测灵敏度,尤其需要能在夹心法中使用的抗体。

[0020] 山口、青柳等以 ProGRP 的小细胞肺癌用肿瘤标志物的临床应用为目的,开发了以

酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay :ELISA) 为原理、使用夹心法的简便且高灵敏度的 ProGRP 测定试剂 (专利文献 1)。该方法在约 2 小时内获得结果,并且具有高灵敏度 (2pg/mL),因此目前在临床上得到广泛应用,发现与 NSE 相比,该方法对于小细胞肺癌的灵敏度高并具有特异性。

[0021] 此外,发现使用该测定法,除了小细胞肺癌以外,在神经内分泌肿瘤 (甲状腺髓样癌等)、显示神经内分泌肿瘤特征的癌 (小细胞食道癌、小细胞胰腺癌、小细胞前列腺癌等) 中,血清 ProGRP 值也上升,认为今后也可以应用于这些肿瘤的早期发现和治疗监测等中。

[0022] 然而,虽然 ProGRP 比 GRP 在血中的稳定性高,但是与其他通常的肿瘤标志物相比,却发现测定值分散。因此,以 ProGRP 为检测对象的方法,存在下述制约,即测定用样品必须在采血后迅速冷冻保存直至测定时为止 (非专利文献 4)。

[0023] 青柳开发了使用识别作为 ProGRP (31-98) 内部区域的 ProGRP 的第 40-75 位的氨基酸残基或 ProGRP 的第 40-79 位的氨基酸残基的 2 种以上的抗体的夹心测定法 (专利文献 3)。该方法在测定于 4℃ 保存的样品时获得比较稳定的结果,并且显示与专利文献 2 记载的方法大致相同的检测灵敏度。然而,该方法如专利文献 3 的实施例 4 所示的那样,需要 100 μ L 样品量,该量比通常的免疫测定法多。

[0024] 专利文献 1 :专利第 3210994 号公报

[0025] 专利文献 2 :特开平 6-98794 号

[0026] 专利文献 3 :国际专利公开 W02006/117994 号小册子

[0027] 非专利文献 1 :Cancer Research, 1994 年,第 54 卷,第 2136-2140 页

[0028] 非专利文献 2 :Spindel 等, Mol. Endocrinol. , 1987 年,第 1 卷,第 224-232 页

[0029] 非专利文献 3 :Holst 等, J. Clin. Oncol. , 1989 年,第 7 卷,第 1831-1838 页

[0030] 非专利文献 4 :临床检查 (日文原文 :臨床検査), 1995 年,第 39 卷,第 981-986 页

发明内容

[0031] 在专利文献 3 记载的方法中,如果在维持检测灵敏度的同时,能够进一步减少所需要的样品量,则在临床上能够削减测定所需的成本,减轻患者的负担。此外,由样品保存引起的测定灵敏度下降更小的测定方法,能够更加简便地进行样品的处理。本发明提供一种新的 ProGRP 的测定方法,该测定方法中,由样品保存引起的检测灵敏度下降小,能够用更少量的样品量进行测定。

[0032] 本发明发现,使用针对 ProGRP 的特定区域的抗体的免疫测定法能够解决上述课题,从而完成了以下各发明。

[0033] (1) 一种测定胃泌素释放肽前体和 / 或其降解物的方法,所述方法使用 2 种以上的不同抗体,所述的抗体识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 47-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位。

[0034] (2) 如 (1) 所述的方法,其中,该方法为夹心免疫测定法。

[0035] (3) 一种识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 47-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的单克隆抗体。

[0036] (4) 如 (3) 所述的单克隆抗体,其中,该抗体由按照保藏编号 FERMP-21308 保藏的杂交瘤 (hybridoma) GCY9 产生。

[0037] (5) 如 (3) 所述的单克隆抗体, 其中, 该抗体由按照保藏编号 FERMP-21309 保藏的杂交瘤 GCY17 产生。

[0038] (6) 按照保藏编号 FERM P-21308 保藏的杂交瘤 GCY9。

[0039] (7) 按照保藏编号 FERM P-21309 保藏的杂交瘤 GCY17。

[0040] (8) 如 (1) 所述的方法, 其中, 所述的 2 种以上的不同抗体的至少一种是 (4) 或 (5) 中任一项所述的抗体。

[0041] (9) 一种用于测定胃泌素释放肽前体或其降解物的试剂盒, 所述试剂盒含有 (3) ~ (5) 中任一项所述的抗体。

[0042] (10) 如 (9) 所述的试剂盒, 所述试剂盒是用于癌诊断或用于治疗效果监测的试剂盒。

[0043] 本发明的方法以在样品中也能稳定保存的 ProGRP 的降解物为测定对象, 除了能获得与现有的测定方法相同的检测灵敏度, 还具有采取后的样品的处理方法不易受到影响、能够获得再现性高的测定值等效果。据此, 为了诊断小细胞肺癌等疾病, 在采血样品的临床现场, 采血后的样品的处理变得更加容易, ProGRP 的测定值没有因样品的处理而分散, 能够获得更稳定的结果, 测定值的可靠性提高。此外, 根据临床表现, 在要求追加试验或需要再检查等时, 可以使用冷藏保存的样品而不是冷冻保存的样品进行测定, 从而可削减测定所需的成本。而且, 本发明的方法在维持高检测灵敏度的同时, 能够减少测定样品量及缩短测定时间, 在临床上能够削减成本, 减轻患者的负担。

附图说明

[0044] 图 1 是表示单克隆抗体 PGCY9 对由用多中心肽合成法 (multipinpeptide) 合成的 8 个连续氨基酸序列构成的各多肽的结合性的图。横轴表示各多肽及其序列编号 1 中的氨基酸残基的编号, 纵轴表示吸光度。

[0045] 图 2 是表示单克隆抗体 PGCY17 对由用多中心肽合成法合成的 8 个连续氨基酸序列构成的各多肽的结合性的图。横轴表示各多肽及其序列编号 1 中的氨基酸残基的编号, 纵轴表示吸光度。

[0046] 图 3 是表示单克隆抗体 PGCY24 对由用多中心肽合成法合成的 8 个连续氨基酸序列构成的各多肽的结合性的图。横轴表示各多肽及其序列编号 1 中的氨基酸残基的编号, 纵轴表示吸光度。

[0047] 图 4 是表示单克隆抗体 PGCY12 对由用多中心肽合成法合成的 8 个连续氨基酸序列构成的各多肽的结合性的图。横轴表示各多肽及其序列编号 1 中的氨基酸残基的编号, 纵轴表示吸光度。

[0048] 图 5 是表示单克隆抗体 PGCY5 对由用多中心肽合成法合成的 8 个连续氨基酸序列构成的各多肽的结合性的图。横轴表示各多肽及其序列编号 1 中的氨基酸残基的编号, 纵轴表示吸光度。

[0049] 图 6 是表示 ProGRP (31-98) 与各种单克隆抗体所识别的抗原表位的位置关系的模式图。

[0050] 图 7 是表示使用与氨基酸编号第 47-68 位的部分肽结合的抗体 PGCY9 与 PGCY17 的测定法的标准曲线图。横轴表示 ProGRP 的浓度, 纵轴表示吸光度。

[0051] 图 8 是表示针对在微量板 (microplate) 的固相上通过抗小鼠 IgG (Fc) 抗体结合的 ProGRP 的各单克隆抗体与生物素化 ProGRP 的反应性的图。横轴表示各单克隆抗体,纵轴表示吸光度。

具体实施方式

[0052] 本发明是一种使用能够识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的 2 种以上的不同抗体,通过夹心免疫测定法检测 ProGRP 或 ProGRP 的降解物的方法,所述 ProGRP 的降解物具有 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸残基。该免疫测定法具有如下特征:即使在将采取的样品进行冷藏保存的情况下,其检测灵敏度也不下降。由此推测:这意味着具有 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸残基的 ProGRP 的降解物对样品中含有的蛋白酶或其他原因引起的样品保存中的进一步降解反应比较稳定。

[0053] 本发明的方法中可以使用的抗体为能够识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的抗体,据此能够与具有 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸残基的 ProGRP 的降解物结合。这种抗体优选为单克隆抗体。

[0054] 本发明的方法中可以使用的抗体,优选为能够识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸序列中的 N 末端部分所显示的抗原表位和 C 末端部分所显示的抗原表位的 2 种以上的不同单克隆抗体。特别优选使用单克隆抗体 PGCY9 和 PGCY17,所述的单克隆抗体分别由杂交瘤 GCY9 和杂交瘤 GCY17 产生,所述杂交瘤 GCY9 和杂交瘤 GCY17 分别以保藏编号 FERM P-21308 和 FERM P-21309 保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心。这 2 种杂交瘤细胞是以利用大肠杆菌生产的重组 ProGRP 的第 31-98 位的氨基酸序列构成的多肽(以下表示为 ProGRP (31-98))作为抗原,由免疫小鼠的抗体产生细胞 (antibody-producing cell) 按通常的方法制备的杂交瘤细胞。这 2 种杂交瘤细胞是通过使用 ProGRP (31-98) 内部的肽的筛选而进行挑选的、产生识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸所显示的抗原表位的抗体的细胞。

[0055] 这样,本发明中可以使用的抗体可以通过下述方法得到:以 ProGRP (31-98) 作为抗原,由将小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、鸡、山羊、绵羊、牛等实验动物免疫后回收的抗体产生细胞,按通常的方法制备产生单克隆抗体的杂交瘤细胞,使用 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸残基构成的多肽(以下表示为 ProGRP (47-68))可以筛选产生所需抗体的杂交瘤细胞。此外,也可以将 ProGRP (47-68) 作为抗原使用。另外,上述多肽也可以与甲状腺球蛋白或匙孔血蓝蛋白 (Keyhole Limpet Hemocyanin) 等载体结合后使用。

[0056] 以小鼠为例来说明对动物进行免疫的方法。将 ProGRP (31-98) 等多肽与弗氏完全佐剂、TiterMax Gold (CytRx 公司) 等佐剂以 1 : 1 混合,使用互相流通的接头连接的两个注射器,使其反复通过接头,或通过超声波处理等方法制备乳剂。在皮下、皮内、肌肉内、腹腔内的任一部位或多个部位注入制备的含有抗原的乳剂。第一次免疫结束后,间隔 1 ~ 4 周,以同样的方式进行第二次免疫。然后,同样继续免疫,直至抗体对血中的 ProGRP 的抗体效价上升。

[0057] 抗体效价的测定可以按照以下方式进行。以 1 μ g/mL 的浓度在 PBS 中溶解 ProGRP (31-98),以每孔 50 μ L 的容量添加到 96 孔微量滴定板 (micro-titer plate) 的各孔中,于 4 $^{\circ}$ C 下吸附过夜。用含 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBS-T) 将各孔洗涤后,用于测

定。测定前,也可以用含 1% BSA 的 PBS 等进行封闭。从眼窝静脉丛、尾静脉或尾动脉等处采血,用 PBS-T 稀释到 30 倍后进行离心。将所得上清液用 PBS-T 进行系列稀释,涂覆 ProGRP (31-98),在微量滴定板的各孔中分别添加 50 μ L。在室温下反应 30 分钟后,用 PBS-T 洗涤,在各孔中分别添加 50 μ L 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗小鼠 IgG 溶液,该溶液使用 PBS-T 等进行适当稀释。再在室温下反应 30 分钟后,添加过氧化氢、邻苯二胺底物溶液进行反应 30 分钟,添加 50 μ L 2N H_2SO_4 ,使反应停止,测定各孔的吸光度。

[0058] 在免疫过的小鼠中,证实对所给予的抗原的抗体效价充分上升后,取出脾脏,分离脾脏细胞。使用另外培养的小鼠骨髓瘤(例如 SP2/0-Ag14 等)和聚乙二醇等进行融合。将融合成功的细胞用 HAT(次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷)培养基进行选择培养。7~14 天左右,每隔几天半量交换培养基并继续培养后,测定培养上清液的抗体效价。通过有限稀释法克隆阳性孔的细胞,得到产生目标抗体的杂交瘤。

[0059] 通过分析上述方法所得抗体的抗原表位,可以获得识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的抗体。抗原表位分析可以通过研究抗体对使用多中心肽合成法合成的 ProGRP (31-98) 的连续 8-12 个氨基酸序列构成的多肽或 ProGRP (47-68) 的反应来进行。例如,可以通过在微量滴定板上涂覆用重组体表达的 ProGRP (47-68)、或用 Fmoc 法或 Boc 法进行化学合成的 ProGRP (47-68),使用上述免疫测定法研究抗体对各肽的反应性来确定。

[0060] 根据使用多中心肽合成法合成的 ProGRP (31-98) 的连续 8-12 个氨基酸序列构成的多肽的抗原表位的分析结果,证实本发明特别优选的抗体之一 PGCY9 为识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸所显示的抗原表位中第 55-66 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的单克隆抗体。此外,证实本发明特别优选的另一抗体 PGCY17 为至少识别第 45-57 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的单克隆抗体。

[0061] 本发明中使用的抗体还可以在载体或微量板(microplate)上固相化、或用生物素等适当的标记试剂进行标记。可以根据各实验方法的说明书中记载的方法进行固相化或标记的各种操作,本发明中使用的抗体并不特别需要特殊的操作。

[0062] 本发明的方法为使用上述抗体的夹心免疫测定法,具体地说,是夹心 ELISA 法。夹心 ELISA 法的基本操作可以根据《超高灵敏度免疫测定法》(日文原文:超高感度免疫测定法)(石川荣治,1993 年,学会出版 センター)或其它各种实验方法的说明书中记载的方法进行,本发明的实施中并不特别需要特殊的操作,可以按下述工序进行。

[0063] 即,ProGRP 和 / 或其降解物可以通过包括如下工序的测定法检测:(1) 使识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的第一抗体与样品中的 ProGRP 和 / 或其降解物反应的工序;(2) 由该抗体捕捉的 ProGRP 和 / 或其降解物与不同于(1)的抗体的、识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的第二抗体反应的工序;以及(3) 检测由(2)产生的免疫复合物的工序。

[0064] 本发明方法的操作法的例子可以表示如下。将以 1~10 μ g/mL 的浓度溶解于缓冲液(例如,0.1M 碳酸缓冲液(pH 9.6))中的第一抗体的溶液等量添加到微量滴定板的各孔中,于 4℃ 下培养过夜。用 PBS 等洗涤用缓冲液将各孔洗涤后,将没有结合第一抗体的各孔的内壁用含有酪蛋白酸钠等适当的蛋白质的缓冲溶液培养数小时后进行封闭。除去封闭液后,在各孔中添加含有吐温 20 等表面活性剂的反应液和样品。样品的添加量根据其测定

法的灵敏度进行适当变更。在 37℃左右的温度下反应约 1 小时后,用含有表面活性剂的缓冲液(例如,含吐温 20 的 PBS-T)将各孔洗涤,在各孔中添加使用适当的标记试剂标记的第二抗体,反应几十分钟后,将各孔洗涤,使用与标记试剂相适应的方法检测第二抗体。另外,上述操作法只不过是例子,各步骤的具体操作,例如缓冲液、标记试剂、添加量等可以适当调节。

[0065] 本发明使用单克隆抗体 PGCY9 和 PGCY17 这 2 种单克隆抗体的方法的检测灵敏度为 2.5pg/mL,样品量可以使用 25 μL 左右。该检测灵敏度几乎能够测定所有健康人血中的 ProGRP,这在临床上有助于削减检查成本,减轻患者的负担。

[0066] 本发明除了上述方法以外,还提供用于测定样品中的 ProGRP 或其降解物的试剂盒,尤其是通过测定 ProGRP 和 / 或其降解物进行小细胞肺癌诊断或化学疗法监测的诊断药试剂盒。该试剂盒含有至少 2 种识别上述 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸所显示的抗原表位的抗体,其他还可以任意地含有反应缓冲液、二抗稀释液、ProGRP 标准物质、说明书及其他组成物。作为试剂盒中含有的抗体的优选例,为识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸所显示的抗原表位的 2 种以上的不同抗体,代表例为单克隆抗体 PGCY9 和单克隆抗体 PGCY17。

[0067] 与 ProGRP 和 / 或其降解物结合的抗体,虽然优选使用只选择识别 ProGRP 的第 47-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的抗体,但是,在可以得到再现性高的测定值的范围内,测定体系内也可以含有这些抗体以外的抗体。

[0068] 实施例

[0069] 以下列举实施例对本发明作进一步的说明。

[0070] 实施例 1

[0071] 根据专利第 3210994 号的实施例 1 记载的方法制备重组体,提纯由大肠杆菌表达的序列编号 1 所示的氨基酸序列构成的多肽。专利第 3210994 号的实施例 1 中,该重组体记载为 GRP(31-98),正确的是 GRP 前体(ProGRP)的(31-98)部分,因此本文记载为 ProGRP(31-98)。

[0072] 将 ProGRP(31-98):猪甲状腺球蛋白(TG)以重量比为 1 : 3 结合的抗原蛋白质(表示为 ProGRP-TG)使用含 0.15M NaCl 的 100mM 磷酸缓冲液(pH 6.0)稀释,与等量的 TiterMax 混合,制成 ProGRP-TG 悬浮液。将配制的 ProGRP(31-98)浓度达 0.05mg/0.1mL 的该悬浮液按约 20 天的间隔、在 4 ~ 6 周龄的 BALB/c 系小鼠的腹腔内给药 4 ~ 6 次。再于约 4 周后,作为加强免疫,用配制的 ProGRP(31-98)的浓度达 0.1mg/0.1mL 的生理盐水给药 2 天。最终加强免疫后第 3 天,从该免疫动物中无菌性摘除脾脏,用手术剪剪成切片,再用筛孔将脾脏弄成一个个细胞,用 RPMI-1640 培养基洗涤 3 次后,用含 8-氮鸟嘌呤的相同培养基培养数天。将完全去除回复突变体的对数增殖期的小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0-Ag14 用 RPMI-1640 培养基洗涤后,将该细胞 2.4×10^7 个和上述脾脏细胞 2.0×10^8 个加入离心管中混合。将混合的 2 种细胞以 $200 \times g$ 离心分离 5 分钟,除去上清液后,采用 HVJ Envelope Cell Fusion Kit(GenomONE-CF,石原产业株式会社)进行细胞融合。将融合的细胞用含有次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸苷(以下将 3 种化合物合起来表示为 HAT)、10%胎牛血清(FCS)及小鼠白介素-6(R&D Systems)的 RPMI-1640 培养基稀释,添加到 96 孔培养板上培养 1 ~ 2 周。在培养约 1 ~ 2 周后,进行使用 ProGRP(31-98)作为抗原的 ELISA 法,得到杂交瘤,该杂交瘤产生对 ProGRP(31-98)具有反应特异性的本发明的单克隆抗体。

[0073] 关于得到的杂交瘤,通过常用的有限稀释法,使用 ProGRP (31-98) 进行目标抗体的产生株的检索和单一克隆化,最终得到 5 株杂交瘤细胞,分别命名为 GCY9、GCY17、GCY12、GCY24 及 GCY5。GCY9 和 GCY17 于 2007 年 6 月 22 日在位于日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 的独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心保藏 (GCY9 的保藏编号:FERM P-21308;GCY17 的保藏编号:FERM P-21309)。另外,GCY9 和 GCY17 于 2008 年 8 月 5 日分别获得国际保藏 (GCY9 的国际保藏编号:FERM BP-10991、GCY17 的国际保藏编号:FERMBP-10992)。

[0074] 实施例 2

[0075] (1) 将通过实施例 1 记载的方法得到的杂交瘤在含有小鼠白介素-6 的无血清培养基 (Hybridoma-SFM, Invitrogen 公司) 中培养,将产生的单克隆抗体用结合了蛋白质 A 的琼脂糖凝胶柱 (Amersham) 提纯回收。将由各杂交瘤 GCY9、GCY17、GCY12、GCY24 及 GCY5 产生的单克隆抗体分别命名为 PGCY9、PGCY17、PGCY12、PGCY24 及 PGCY5。对于 PGCY9、PGCY17、PGCY12、PGCY24 及 PGCY5 的亚型 (subtype),根据使用兔抗小鼠 Ig 各亚型试剂盒 (Zymed 公司) 的实验,表明 PGCY9、PGCY12、PGCY24 和 PGCY5 为 IgG1,PGCY17 为 IgG2a。

[0076] (2) 基于 ProGRP (31-98) 的氨基酸序列,用多中心肽合成法合成每个氨基酸进行错位制备的连续 8 个氨基酸构成的共 61 种多肽。再在各肽的 N 末端结合生物素。将各生物素化多肽溶解于二甲基甲酰胺中,并用 PBS 稀释成 $1 \mu\text{g/mL}$ 的浓度。在抗生物素蛋白 (avidin) 固相化的 96 孔微量滴定板的各孔中分别添加 $100 \mu\text{L}$ 稀释过的各生物素化多肽溶液,于 4°C 培养过夜。用含 0.05% 吐温 20 的 PBS 缓冲液 (PBS-T) 将各孔洗涤后,在各孔中分别添加 $100 \mu\text{L}$ 将各单克隆抗体稀释成 $1 \mu\text{g/mL}$ 的溶液。在室温下反应 30 分钟后,用 PBS-T 将各孔洗涤 5 次,在各孔中分别添加 $100 \mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗小鼠 IgG 抗体溶液。再在室温下反应 30 分钟后,用 PBS-T 将各孔洗涤 5 次,在各孔中分别添加 $100 \mu\text{L}$ 底物溶液 (含 2mg/mL 邻苯二胺、 $0.9 \mu\text{L/mL}$ 30% 过氧化氢溶液的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液、pH 5.0),在室温下反应 30 分钟后,分别添加 $100 \mu\text{L}$ 2N 硫酸,立即测定 492nm 处的吸光度。单克隆抗体 PGCY9、PGCY17、PGCY24、PGCY12 及 PGCY5 对 ProGRP (31-98) 内部各肽的反应如图 1 ~ 图 5 所示。

[0077] 如图 1 所示,证实单克隆抗体 PGCY9 与 ProGRP (57-64) 的结合非常弱。此外,如图 2 和图 3 所示,证实单克隆抗体 PGCY17 及 PGCY24 与 ProGRP (31-98) 的氨基酸序列中的 8 个连续氨基酸构成的多肽不结合。由此推测,PGCY17 及 PGCY24 不能识别 8 个连续氨基酸序列,而能识别比 8 个长的氨基酸序列构成的多肽所显示的抗原表位。另一方面,如图 4 所示,证实单克隆抗体 PGCY12 与 ProGRP (34-41) 结合强,与其前后的 ProGRP (33-40) 及 ProGRP (35-42) 结合弱。因此推测,PGCY12 能识别 ProGRP 的第 34-41 位的氨基酸序列所显示的抗原表位。此外,证实单克隆抗体 PGCY5 与 ProGRP (69-76) 和 ProGRP (70-77) 结合强,与 ProGRP (71-78) 结合,与 ProGRP (68-75) 结合非常弱。因此推测,单克隆抗体 PGCY5 能识别 ProGRP 的第 69-76 位的氨基酸序列和第 70-77 位的氨基酸序列所显示的共同的抗原表位。

[0078] (3) 通过 Fmoc 法合成表 1 所示的 ProGRP (31-98) 的部分氨基酸序列构成的多肽,进行提纯。在溶解 6M 尿素的 PBS 中,以 $20 \mu\text{g/mL}$ 的浓度溶解 BSA,在 96 孔微量滴定板 (NUNC、Maxisorp) 的各孔中分别添加 $100 \mu\text{L}$,在室温下培养 3 小时。用 PBS 将各孔分别洗

涤 5 次,在各孔中分别添加 100 μ L 用 PBS 将 N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 分别以 1mg/mL 溶解后的溶液,在室温下培养 2 小时,将在孔中固定的 BSA 的羧基活化。用 PBS 将各孔洗涤 3 次,将各多肽用 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 稀释成 5 μ g/mL 的浓度,在 96 孔微量滴定板的各孔中分别添加 100 μ L,于 4℃ 培养过夜。据此,各多肽通过氨基与固定化的 BSA 结合。

[0079] 用 PBS 将各孔洗涤 2 次后,在各孔中分别添加 350 μ L 含 1% BSA、2% 蔗糖的 PBS,在室温下培养 3 小时,然后吸除。在各孔中分别添加 100 μ L 稀释成 1 μ g/mL 浓度的各单克隆抗体,在室温下反应 60 分钟后,用含 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBS-T) 洗涤 5 次后,在各孔中分别添加 100 μ L 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗小鼠 IgG 抗体溶液,在室温下反应 20 分钟。用 PBS-T 洗涤 5 次后,在各孔中分别添加 100 μ L 底物溶液 (含 2mg/mL 邻苯二胺、0.9 μ L/mL 30% 过氧化氢溶液的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液、pH 5.0),在室温下反应 20 分钟后,在各孔中分别添加 100 μ L 2N 硫酸,使反应停止,立即测定 492nm 处的吸光度。除了本发明的各单克隆抗体外,同时还研究了专利文献 3 中所示的、识别 ProGRP 的 40-60 位的氨基酸序列构成的多肽、且与 8 个连续氨基酸序列构成的多肽不发生反应的单克隆抗体 GRP-3D6-2 的抗原表位。其结果如表 1 所示。

[0080] 表 1

[0081]

肽 aa No.	单克隆抗体 (OD492/620)			
	PGCY9	PGCY17	PGCY24	GRP-3D6-2
31-52	0.008	0.008	0.008	0.008
42-53	0.009	0.008	0.008	0.009
44-55	0.005	0.004	0.003	0.004
45-57	0.004	0.004	0.004	0.003
46-59	0.004	0.017	0.010	0.006
47-61	0.004	0.074	0.057	0.082
55-66	0.134	0.003	0.005	0.002
57-68	0.239	0.004	0.002	0.003
40-60	0.003	0.160	0.156	0.097
44-62	0.040	0.297	0.269	0.243
54-78	0.376	0.004	0.003	0.004
54-90	0.399	0.004	0.004	0.003
70-90	0.008	0.006	0.008	0.007
31-98	3.304	1.391	1.041	1.624

[0082] aa No. :氨基酸编号

[0083] 如表 1 所示,可以证实研究的 4 种单克隆抗体特异性识别 ProGRP 的部分氨基酸序列构成的多肽,且所有单克隆抗体与 ProGRP (42-53) 不结合。而且,单克隆抗体 GCY9 与 ProGRP (55-66)、ProGRP (57-68)、ProGRP (54-78) 及 ProGRP (54-90) 结合较强。此外,单克隆抗体 GCY17 及 GCY24 与 ProGRP (47-61)、ProGRP (40-60) 及 ProGRP (44-62) 结合较强,与 ProGRP (46-59) 结合非常弱。单克隆抗体 GRP-3D6-2 与 ProGRP (47-61)、ProGRP (40-60) 及 ProGRP (44-62) 结合较强。

[0084] (4) 将实施例 1 制备的重组 ProGRP (31-98) 用 PBS 稀释成 1 μ g/mL 的浓度,在 96

孔微量滴定板 (NUNC、Maxisorp) 的各孔中分别添加 50 μ L, 于 4℃ 培养过夜。用 PBS 将各孔洗涤 2 次, 在各孔中分别添加 350 μ L 含 0.5% 酪蛋白酸钠和 2% 蔗糖的 PBS (pH 7.1), 在室温下培养 3 小时, 然后吸除。在各孔中分别添加 50 μ L 利用反应液将各肽稀释成 2 μ g/mL 浓度的溶液, 所述的反应液为含 1% BSA、0.05% 酪蛋白酸钠、1% 聚乙烯吡咯烷酮、10mM EDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05% 吐温 20 的 0.1M 磷酸钠缓冲液、pH 7.2。然后, 在各孔中分别添加 50 μ L 稀释成 1 μ g/mL 浓度的各单克隆抗体, 在室温下培养 60 分钟。该工序中, 固相化的 ProGRP (31-98) 与溶液中的各肽发生竞争, 与各单克隆抗体进行结合反应。然后, 用含 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBS-T) 将各孔洗涤 5 次后, 在各孔中分别添加 100 μ L 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗小鼠 IgG 抗体溶液, 在室温下反应 20 分钟。用 PBS-T 洗涤 5 次后, 在各孔中分别添加 100 μ L 底物溶液 (含 2mg/mL 邻苯二胺、0.9 μ L/mL 30% 过氧化氢溶液的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液、pH 5.0), 在室温下反应 20 分钟后, 在各孔中分别添加 100 μ L 2N 硫酸, 使反应停止, 测定 492nm 处的吸光度。将不添加肽的孔 (对照) 设为 100%, 其阻断率 (%) 如表 2 所示。

[0085] 表 2

[0086]

肽 aa No.	单克隆抗体 (阻断率%)			
	PGCY9	PGCY17	PGCY24	GRP-3D6-2
31-52	0.0	0.0	0.0	0.0
42-53	0.0	0.0	0.0	2.3
44-55	0.0	15.8	14.0	18.7
45-57	0.0	89.8	86.0	38.8
46-59	0.0	98.5	97.6	88.6
47-61	0.0	96.6	81.6	93.1
55-66	91.1	6.5	0.0	15.3
57-68	25.3	0.0	0.0	9.6
40-60	0.0	97.0	96.2	92.4
44-62	17.3	99.2	99.5	99.4
54-78	96.3	17.7	0.0	19.5
54-90	89.2	0.0	0.0	11.9
70-90	0.0	0.0	0.0	0.0
82-96	0.0	0.0	0.0	0.0
31-98	96.0	96.7	93.4	94.8

[0087] aa No. : 氨基酸编号

[0088] 如表 2 所示, 证实各单克隆抗体与固相多肽的结合, 在 ProGRP (31-98) 存在下全部被阻断 90% 以上, 而在 ProGRP (42-53) 存在下全部不被阻断。单克隆抗体 PGCY9 中, 证实结合被阻断 80% 以上的多肽为 ProGRP (55-66)、ProGRP (54-78) 及 ProGRP (54-90)。单克隆抗体 PGCY17 及 PGCY24 中, 证实结合被阻断 80% 以上的多肽为 ProGRP (45-57)、ProGRP (46-59)、ProGRP (47-61)、ProGRP (40-60) 及 ProGRP (44-62)。另外, 单克隆抗体 GRP-3D6-2 中, 证实结合被阻断 80% 以上的多肽为 ProGRP (46-59)、ProGRP (47-61)、ProGRP (40-60) 及 ProGRP (44-62); 单克隆抗体 GRP-3D6-2 对 ProGRP (45-57) 结合被弱阻断, 而 PGCY17 和 PGCY24 对 ProGRP (45-57) 阻断活性已得到证实。

[0089] 如上述 (3) 所述,单克隆抗体 PGCY9 与 ProGRP (55-66) 及 ProGRP (57-68) 结合,且与 ProGRP (57-68) 结合比与 ProGRP (55-66) 强。此外在 (4) 中,发现 ProGRP (55-66) 被充分阻断,ProGRP (57-68) 显示弱的阻断反应。因此,认为单克隆抗体 PGCY9 识别 ProGRP 的第 55-68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位。

[0090] 此外,根据 (3)、(4) 的抗原表位分析结果,推测单克隆抗体 PGCY17 及 PGCY24 识别 ProGRP 的第 47-57 位的氨基酸序列所显示的抗原表位。另外,认为单克隆抗体 GRP-3D6-2 与 PGCY17 及 PGCY24 相比,识别的是 C 末端的 ProGRP 的第 47-59 位的氨基酸序列所显示的抗原表位。此外,单克隆抗体 PGCY5 与单克隆抗体 PGCY12 识别的抗原表位为由 8 个连续氨基酸序列构成的连续抗原表位。进一步推断,单克隆抗体 PGCY17 及 PGCY24 与 ProGRP (31-98) 内部的 8 个连续氨基酸序列构成的多肽不结合,识别 ProGRP (47-57) 的 11 个连续氨基酸序列所显示的抗原表位。推断各单克隆抗体识别的抗原表位如表 3 所示。

[0091] 表 3

[0092]

单克隆抗体	抗原表位 (氨基酸编号)
PGCY9	55-68
PGCY17	47-57
PGCY24	47-57
PGCY12	34-41
PGCY5	70-76
GRP-3D6-2	47-59

[0093] 实施例 3

[0094] 使用本发明的各单克隆抗体与专利第 3210994 号的实施例 6 及 7 所示的单克隆抗体 GRP-3G2,尝试对在血清等样品保存中稳定的 ProGRP 部分肽进行鉴定。另外,如专利文献 3 所示,单克隆抗体 GRP-3G2 为识别 ProGRP 的第 84-88 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的抗体。

[0095] 将冷冻及在 4℃ 下分别保存 1、4、7 天的 8 个样品 A ~ H 进行下述测定。在 96 孔微量板的各孔中,以 4 μg/mL 的浓度添加 100 μL 各单克隆抗体 (PGCY17、PGCY9、GRP-3G2),于 4℃ 培养过夜。用含 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH 7.3) 洗涤 2 次后,加入 350 μL 封闭液 (含 0.5% 酪蛋白酸钠和 2% 蔗糖的 10mM 磷酸缓冲液、pH 7.1),静置 2 小时。除去封闭液后,在各孔中加入 100 μL 反应液 (含 1% BSA、0.05% 酪蛋白酸钠、1% 聚乙烯吡咯烷酮、10mM EDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05% 吐温 20 的 0.1M 磷酸钠缓冲液、pH 7.2) 和 50 μL 测定样品,在 37℃ 下反应 1 小时。用洗涤液 (含 0.05% 吐温 20 的 10mM 磷酸钠缓冲液、pH 7.3) 洗涤 5 次,添加 100 μL HRP 标记的各单克隆抗体 (PGCY12、PGCY17、PGCY9、PGCY5) 溶液,在室温下反应 30 分钟。用洗涤液洗涤 5 次,加入 100 μL 底物溶液 (含 2mg/mL 邻苯二胺、0.9 μL/mL 30% 过氧化氢溶液的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液、pH 5.0),培养 30 分钟,添加 100 μL 2N 硫酸,使酶反应停止,用微量板阅读仪 (Microplate Reader) 测定 492nm 处 (参比波长 620nm) 的吸光度。

[0096] 通过使固相化抗体与标记抗体组合识别部位不同的抗体,可以推断样品中存在的 ProGRP 的部分降解物所具有的部分氨基酸序列。这次使用的抗体的组合如图 6 所示。如

果单克隆抗体 PGCY12 与 PGCY17 组合,可以测定样品中的 ProGRP 的降解物中具有 ProGRP 的第 34-57 位的氨基酸序列的降解物。同样,如果 PGCY17 与 PGCY9 组合,可以测定具有第 47-68 位的氨基酸序列的降解物;如果 PGCY9 与 PGCY5 组合,可以测定具有第 55-76 位的氨基酸序列的降解物;如果 PGCY9 与 GRP-3G2 组合,可以测定具有第 55-88 位的氨基酸序列的降解物;如果 PGCY5 与 GRP-3G2 组合,可以测定具有第 70-88 位的氨基酸序列的降解物。

[0097] 将冷冻保存的样品的 ProGRP 测定值设为 100%,在 4℃ 下保存 1、4、7 天的样品的 ProGRP 测定值如表 4 所示。

[0098] 表 4

[0099]

	标记抗体	PGCY12	PGCY 17	PGCY 5	PGCY 9	PGCY 5
	固相抗体	PGCY 17	PGCY 9	PGCY 9	GRP-3G2	GRP-3G2
样品	4℃ 保存时间	通过抗体的组合可以识别的肽区域				
		34-57	47-68	55-76	55-88	70-88
A	0 天	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 天	105.2	100.5	100.2	88.6	85.4
	4 天	102.6	101.0	99.6	74.6	73.4
	7 天	99.1	96.9	95.5	67.0	63.1
B	0 天	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 天	103.7	98.1	99.3	96.0	88.8
	4 天	109.4	92.3	94.5	79.3	75.7
	7 天	118.7	90.4	90.6	66.2	66.8
C	0 天	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 天	109.3	97.3	96.8	88.9	86.1
	4 天	101.4	93.6	91.0	66.7	59.4
	7 天	92.0	83.0	81.3	49.9	45.3
D	0 天	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 天	105.0	96.3	98.8	86.0	92.5
	4 天	101.6	90.1	92.1	68.5	75.0
	7 天	107.4	89.2	85.2	60.5	74.5
E	0 天	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 天	97.4	100.8	95.2	82.7	78.6
	4 天	82.4	92.3	85.3	63.1	55.6
	7 天	85.6	87.4	81.9	51.0	48.5
F	0 天	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 天	101.2	98.2	96.5	89.7	88.5
	4 天	100.7	89.6	85.6	75.6	75.0
	7 天	95.4	82.1	78.0	62.0	69.4
G	0 天	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 天	99.3	99.5	98.5	79.8	89.4
	4 天	90.8	94.5	93.3	64.7	62.1
	7 天	77.7	85.8	82.8	45.9	50.0
H	0 天	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	1 天	105.7	104.0	103.7	96.8	98.1
	4 天	109.9	96.6	96.3	85.0	85.4
	7 天	114.4	90.5	85.2	72.5	79.3

[0100] 单克隆抗体 PGCY9 与 GRP-3G2 的组合、以及单克隆抗体 PGCY5 与 GRP-3G2 的组合中,大部分样品保存 1 天时 85% 以上的免疫活性得以保持,保存 4 天时降为 55 ~ 85%,保存 7 天时所有样品的免疫活性降为 80% 以下。这如专利文献 3 所示的那样,认为可能是保存期间血液中的蛋白酶等将 ProGRP 在序列编号 1 的 Lys-79 的 C 末端切断,从而引起免疫

活性消失。

[0101] 单克隆抗体 PGCY12 与 PGCY17 的组合、单克隆抗体 PGCY17 与 PGCY9 的组合以及单克隆抗体 PGCY5 与 PGCY9 的组合中保持比较稳定的免疫活性,在 PGCY12 与 PGCY17 的组合中,8 个样品中有 2 个样品 (B 和 H) 通过保存而免疫活性上升,保存 7 天时超过 110%。

[0102] 此外,单克隆抗体 PGCY17 与 PGCY9 的组合与单克隆抗体 PGCY5 与 PGCY9 的组合相比,保存 7 天时,后者 4 个样品的免疫活性降为 85% 以下。而前者保存 7 天时,全部保持 80% 以上的免疫活性,8 个样品中有 6 个样品保持 85% 以上的免疫活性。这表明与通过专利文献 3 记载的方法测定的 ProGRP 的降解物相比,通过将单克隆抗体 PGCY17 和 PGCY9 进行组合测定的降解物在将样品在 4℃ 下保存时劣化更少,作为测定对象有利。

[0103] 实施例 4

[0104] 专利文献 3 的实施例 4 记载的方法中,将抗体变更为单克隆抗体 PGCY17 与 PGCY9 的组合,研究了采用使用该单克隆抗体的组合的方法所需要的测定时间、测定样品量及测定灵敏度。

[0105] 在 96 孔微量板的各孔中,添加 120 μ L 将单克隆抗体 PGCY9 以 5 μ g/mL 的浓度溶解于抗体固定液 (含 0.6M NaCl 的 0.1M 碳酸缓冲液、pH9.6) 中的溶液,于 4℃ 培养过夜。用含 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH 7.3) 洗涤 2 次后,加入 350 μ L 封闭液 (含 0.5% 酪蛋白酸钠和 5% 蔗糖的 10mM 磷酸缓冲液、pH 7.1),静置 2 小时,进行封闭。除去封闭液后,将微量板干燥。干燥后,在各孔中加入 100 μ L 反应液 (含 1% BSA、1% 聚乙烯吡咯烷酮、0.05% 酪蛋白酸钠、0.05% 吐温 20、0.1% TritonX100、0.15M NaCl、10mM EDTA-2Na、40 μ g/mL 小鼠 IgG 的 0.1M 磷酸钾缓冲液、pH 7.0) 和 25 μ L 测定样品,在 37℃ 下反应 1 小时。用洗涤液 (含 0.05% 吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液、pH 7.3) 洗涤 5 次,添加 200 μ L 用标识抗体稀释液 (含 2% BSA、0.25% 聚乙烯吡咯烷酮、0.05% 吐温 20、0.05% 酪蛋白酸钠、0.15M NaCl、1% 蔗糖、25 μ g/mL 小鼠 IgG 的 0.1M 磷酸钾缓冲液、pH 6.5) 溶解 HRP 标记的 PGCY17 的 Fab' 的溶液,在室温下反应 20 分钟。用洗涤液洗涤 5 次,加入 100 μ L 底物溶液 (含 2mg/mL 邻苯二胺、0.9 μ L/mL30% 过氧化氢溶液的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液、pH 5.0),培养 20 分钟,加入 100 μ L 2N 硫酸,使酶反应停止,用微量板阅读仪测定 492nm 处 (参比波长 620nm) 的吸光度。其标准曲线如图 7 所示。

[0106] 其结果是,本发明的方法总反应时间为 100 分钟,样品量为 25 μ L,虽然样品量为少量,但是证实可以检测约 2.5pg/mL 的 ProGRP。该灵敏度是在检测健康人样品中的 ProGRP 浓度方面需要的足够的灵敏度。此外,与专利文献 3 的实施例 4 记载的方法相比,测定时间由 120 分钟缩短为 100 分钟,测定用样品量减少到 1/4,且检测灵敏度上升为约 1.7 倍。

[0107] 实施例 5

[0108] 在 96 孔微量板的各孔中,加入 50 μ L 将山羊抗小鼠 IgG (Fc) (JacksonImmuno Research) 抗体以 2.5 μ g/mL 的浓度溶解于含 0.5M NaCl 的 0.1M 碳酸缓冲液 (pH 9.6) 中的溶液,于 4℃ 培养过夜。用含 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH 7.3) 洗涤 2 次后,加入 350 μ L 封闭液 (含 0.5% 酪蛋白酸钠和 2% 蔗糖的 10mM 磷酸缓冲液、pH 7.1),静置 2 小时。除去封闭液后,在室温下干燥。在各孔中加入 100 μ L 将各单克隆抗体以 5 μ g/mL 的浓度稀释于反应液 (含 1% BSA、0.05% 酪蛋白酸钠、1% 聚乙烯吡咯烷酮、10mM EDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05% 吐温 20 的 0.1M 磷酸钠缓冲液、pH 7.2) 中的溶液,在 37℃ 下反应 2 小时。该

反应中,各单克隆抗体的 Fc 部分与固相的山羊抗小鼠 IgG(Fc) 结合。

[0109] 然后,用洗涤液(含 0.05%吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液、pH 7.3) 将各孔洗涤 5 次,在各孔中添加 100 μ L 反应液(含 1% BSA、0.05%酪蛋白酸钠、1%聚乙烯吡咯烷酮、10mM EDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05%吐温 20 的 0.1M 磷酸钠缓冲液、pH 7.2) 和 50 μ L 生物素化重组 ProGRP(31-98) (0pg/mL、200pg/mL、1000pg/mL) 溶液,在 37°C 下反应 1 小时。该反应中,各单克隆抗体与生物素化重组 ProGRP(31-98) 结合。

[0110] 用洗涤液(含 0.05%吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液、pH 7.3) 洗涤 4 次,添加 100 μ L 利用反应液(含 1% BSA、0.05%酪蛋白酸钠、1%聚乙烯吡咯烷酮、10mM EDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05%吐温 20 的 0.1M 磷酸钠缓冲液、pH 7.2) 稀释的 HRP 标记的抗生物素蛋白 D(Vector) 溶液,在室温下反应 30 分钟。用洗涤液洗涤 4 次,加入 100 μ L 底物溶液(含 2mg/mL 邻苯二胺、0.9 μ L/mL 30%过氧化氢溶液的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液、pH 5.0),培养 30 分钟,加入 100 μ L 2N 硫酸,使酶反应停止。用微量板阅读仪测定 492nm 处(参比波长 630nm) 的吸光度。其结果如图 8 所示。

[0111] 这些单克隆抗体中,与 ProGRP(55-68) 结合的单克隆抗体 PGCY9 显示最高反应性,与专利文献 3 的实施例 4 中固相使用的单克隆抗体 GRP-3D6-2 相比,也显示高约 3.3 倍的值。与 ProGRP(47-57) 结合的 PGCY17 及 PGCY24 显示大致相同的反应性,与 PGCY17 相比,识别略靠近 C 末端的 ProGRP(47-59) 的 GRP-3D6-2 比 PGCY17 显示高反应性。此外,识别 ProGRP(70-76) 附近的 PGCY5 及 GRP-2B10 在这些单克隆抗体中显示低反应性,识别比它们更靠近 C 末端的 ProGRP(84-88) 的 GRP-3G2 显示较高反应性。根据这些单克隆抗体的识别部位和反应性,通过使用识别第 55 位至第 68 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的单克隆抗体,认为能够以高灵敏度捕捉测定样品中的 ProGRP 或其降解物。此外,由于 PGCY5 及 GRP-2B10 的反应性低,因此认为识别 70 位以后的氨基酸序列所显示的抗原表位的单克隆抗体的反应性低,通过使用识别第 55 位至第 69 位的氨基酸序列所显示的抗原表位的单克隆抗体,认为也能够以高灵敏度捕捉 ProGRP 或其降解物。

[0112] 实施例 6

[0113] (1) 各单克隆抗体的生物素化

[0114] 在 1mL 0.1M 磷酸钠缓冲液(pH 8.0) 中添加各单克隆抗体 0.5mg,添加已溶解于二甲基甲酰胺中的 Sulfo-NHS-Biotin(PIERCE) 以使得 IgG : 生物素(Biotin) 的摩尔比 = 1 : 20,在室温下缓慢搅拌 60 分钟。添加 100 μ L 1.5M 甘氨酸溶液(pH 8.9),在室温下缓慢搅拌 10 分钟。以 PBS 作为流动相进行凝胶过滤,得到生物素化单克隆抗体。

[0115] (2) 各单克隆抗体的组合的研究

[0116] 在 96 孔微量板的各孔中,加入 100 μ L 将各单克隆抗体以 5 μ g/mL 的浓度溶解于抗体固定液(含 0.5M NaCl 的 0.1M 碳酸缓冲液、pH 9.6) 中的溶液,于 4°C 培养过夜。用含 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液(pH 7.3) 洗涤 2 次后,加入 350 μ L 封闭液(含 0.5%酪蛋白酸钠和 2%蔗糖的 10mM 磷酸缓冲液、pH 7.1),静置 2 小时,进行封闭。除去封闭液后,在各孔中分别加入 100 μ L 反应液(含 1% BSA、0.05%酪蛋白酸钠、1%聚乙烯吡咯烷酮、10mM EDTA-2Na、0.15M NaCl、0.05%吐温 20 的 0.1M 磷酸钠缓冲液、pH 7.2) 和 50 μ L 重组 ProGRP(0、100、500、2000pg/mL),在 37°C 下反应 1 小时。用洗涤液(含 0.05%吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液、pH 7.3) 洗涤 5 次,添加 100 μ L 将生物素化的各单克隆抗体以 1 μ g/mL 的

浓度溶解于反应液中的溶液,在室温下反应 30 分钟。添加 100 μ L 用反应液稀释的 HRP 标记的抗生物素蛋白 D(Vector) 溶液,在室温下反应 30 分钟。用洗涤液洗涤 5 次,加入 100 μ L 底物溶液(含 2mg/mL 邻苯二胺、0.9 μ L/mL30%过氧化氢溶液的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液、pH 5.0),培养 20 分钟,加入 100 μ L 2N 硫酸,使酶反应停止。用微量板阅读仪测定 492nm 处(参比波长 600nm)的吸光度。将其反应性分为 5 个等级(按从高到低的顺序,☆:非常高的反应性、◎:高反应性、○:中度反应性、△:略微的反应性、×:不反应),如表 5 所示。

[0117] 表 5

[0118]

生物素化抗体		PGCY12	PGCY17	PGCY24	GRP-3D6-2	PGCY9	PGCY5	GRP-2B10	GRP-3G2
固相抗体		34-41	47-57	47-57	47-59	55-68	70-76	71-75	84-88
PGCY12	34-41	×	○	○	×	×	×	×	△
PGCY17	47-57	○	×	×	×	☆	○	○	○
PGCY24	47-57	△	×	×	×	○	×	×	×
GRP-3D6-2	47-59	○	×	×	×	△	○	△	○
PGCY9	55-68	○	☆	☆	×	×	◎	○	◎
PGCY5	70-76	△	×	×	×	○	×	×	△
GRP-2B10	71-75	×	△	×	×	△	×	×	△
GRP-3G2	84-88	○	○	△	○	◎	○	△	×

[0119] ☆:非常高的反应性

[0120] ◎:高反应性

[0121] ○:中度反应性

[0122] △:略微的反应性

[0123] ×:不反应

[0124] 如表 5 所示,首先,不能证实相同单克隆抗体之间、以及认为识别的抗原表位相同或呈示该抗原表位的氨基酸序列重叠大的抗体之间的反应性。将 PGCY9 固相化时,作为生物素化抗体,PGCY17 及 PGCY24 反应性最高,其次为 GRP-3G2 及 PGCY5,再其次为 GRP-2B10 及 PGCY12;不能证实 GRP-3D6-2 的反应性。

[0125] 将 PGCY17 固相化时,作为生物素化抗体,PGCY9 反应性最高,其次为 GRP-3G2、PGCY5、GRP-2B10 及 PGCY12,不能证实 PGCY24 及 GRP-3D6-2 的反应性。

[0126] 将 PGCY24 固相化时,作为生物素化抗体,PGCY9 显示中度反应性,几乎不能证实其他抗体的反应性。

[0127] 将 GRP-3D6-2 固相化时,作为生物素化抗体,与 GRP-2B10 相比,GRP-3G2、PGCY5 及 PGCY12 显示稍高的反应性。

[0128] 将 PGCY9 作为生物素化抗体使用时,作为固相抗体,PGCY17 显示最高反应性,其次为 GRP-3G2,再其次为 PGCY24 及 PGCY5。

[0129] 因此,固相抗体使用与 ProGRP(55-68)结合的 PGCY9、作为检测方抗体的标记抗体使用与 ProGRP(47-57)结合的 PGCY17 和 PGCY24,或者相反,固相抗体使用 PGCY17 和 PGCY24、作为检测方抗体的标记抗体使用 PGCY9,由此可以高灵敏度测定 ProGRP 或其降解物。

[0130] 工业实用性

[0131] 本发明的方法,通过以新证实的、在样品中也能稳定保存的 ProGRP 的某种降解物

上的抗原表位作为测定对象,除了能获得与现有的测定方法相同的检测灵敏度,而且采取后的样品的处理方法不易受到影响,能获得再现性高的测定值等,对血中 ProGRP 的检测有效。

SEQUENCE LISTING 序列表

<110>Advanced Life Science Institute, Inc. 株式会社先端生命科学研究所

<120>Monoclonal antibody against pro-gastrin rereasing peptide and use thereof

针对胃泌素释放肽前体的抗体及其应用

<130>XJU9947544W0

<150>JP2007-278843

<151>2007-10-26

<160>2

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>98

<212>PRT

<213>Human 人类

<400>1

Val Pro Leu Pro Ala Gly Gly Gly Thr Val Leu Thr Lys Met Tyr Pro
1 5 10 15
Arg Gly Asn His Trp Ala Val Gly His Leu Met Gly Lys Lys Ser Thr
 20 25 30
Gly Glu Ser Ser Ser Val Ser Glu Arg Gly Ser Leu Lys Gln Gln Leu
 35 40 45
Arg Glu Tyr Ile Arg Trp Glu Glu Ala Ala Arg Asn Leu Leu Gly Leu
 50 55 60
Ile Glu Ala Lys Glu Asn Arg Asn His Gln Pro Pro Gln Pro Lys Ala
65 70 75 80
Leu Gly Asn Gln Gln Pro Ser Trp Asp Ser Glu Asp Ser Ser Asn Phe
 85 90 95
Lys Asp

<210>2

<211>294

<212>DNA

<213>Human 人类

<220>

<221>CDS

<222>(1).. (294)

<223>

<400>2

gtc ccg ctg cct gcg ggc gga ggg acc gtg ctg acc aag atg tac ccg	48
Val Pro Leu Pro Ala Gly Gly Gly Thr Val Leu Thr Lys Met Tyr Pro	
1 5 10 15	
cgc ggc aac cac tgg gcg gtg ggg cac tta atg ggg aaa aag agc aca	96
Arg Gly Asn His Trp Ala Val Gly His Leu Met Gly Lys Lys Ser Thr	
20 25 30	
ggg gag tct tct tct gtt tct gag aga ggg agc ctg aag cag cag ctg	144
Gly Glu Ser Ser Ser Val Ser Glu Arg Gly Ser Leu Lys Gln Gln Leu	
35 40 45	
aga gag tac atc agg tgg gaa gaa gct gca agg aat ttg ctg ggt ctc	192
Arg Glu Tyr Ile Arg Trp Glu Glu Ala Ala Arg Asn Leu Leu Gly Leu	
50 55 60	
ata gaa gca aag gag aac aga aac cac cag cca cct caa ccc aag gcc	240
Ile Glu Ala Lys Glu Asn Arg Asn His Gln Pro Pro Gln Pro Lys Ala	
65 70 75 80	
ctg ggc aat cag cag cct tcg tgg gat tca gag gat agc agc aac ttc	288
Leu Gly Asn Gln Gln Pro Ser Trp Asp Ser Glu Asp Ser Ser Asn Phe	
85 90 95	
aaa gat	294
Lys Asp	

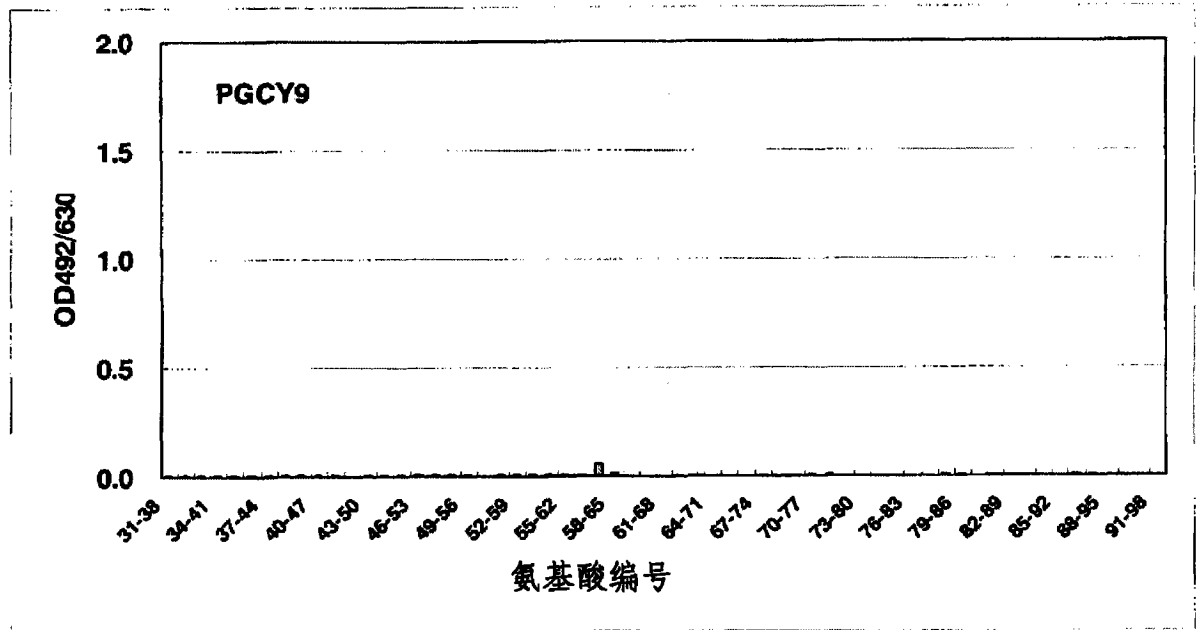


图 1

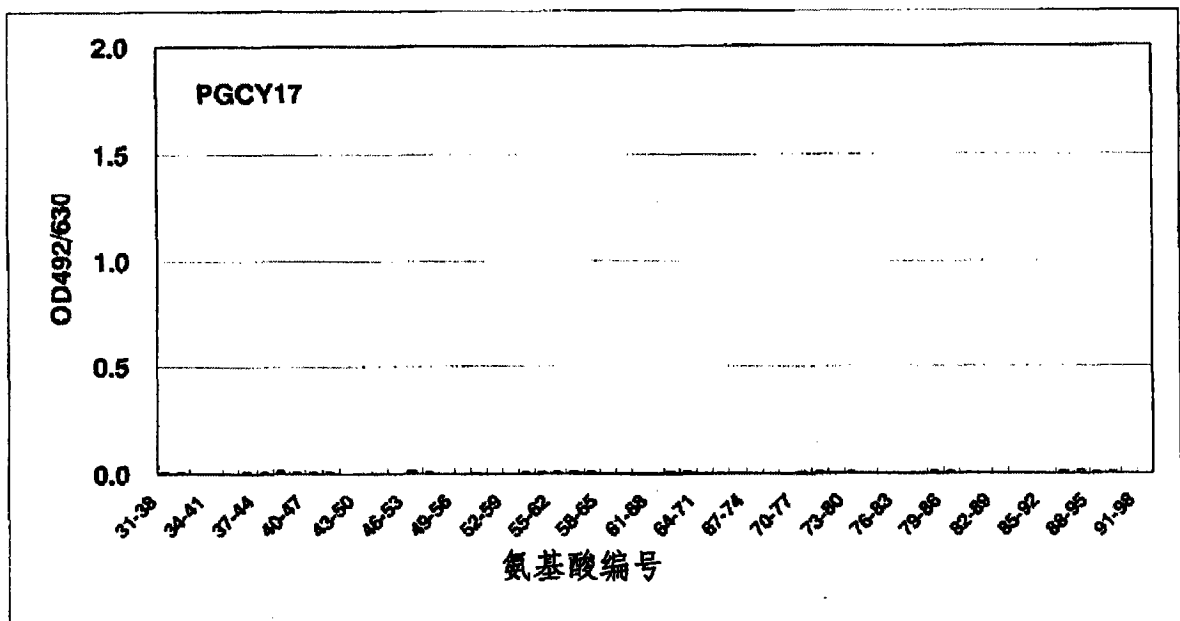


图 2

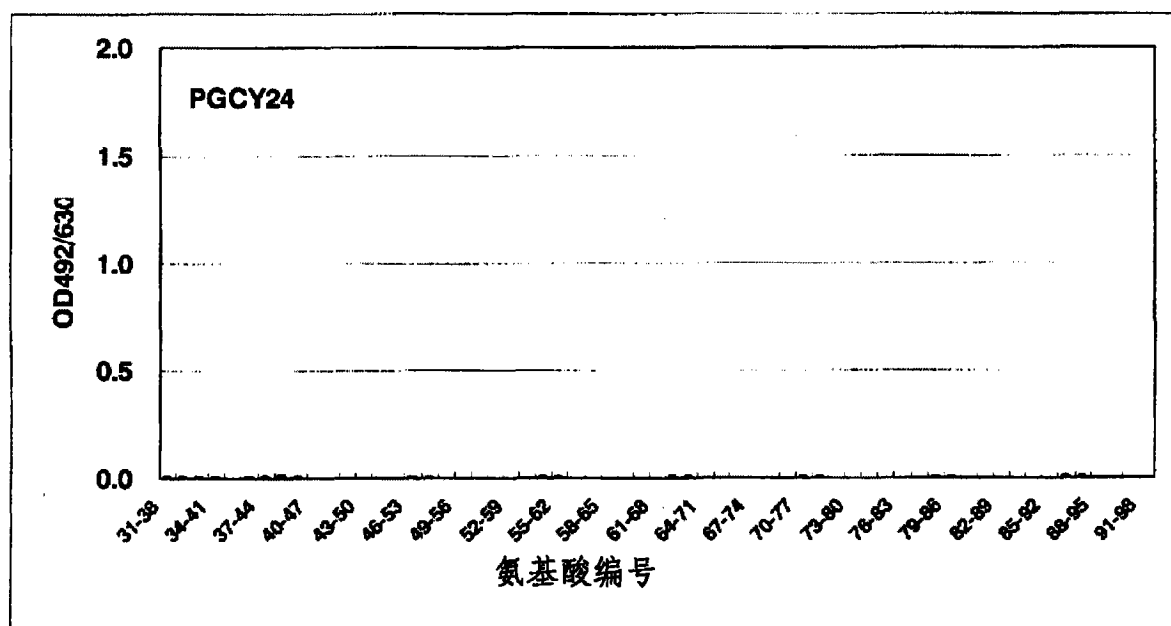


图 3

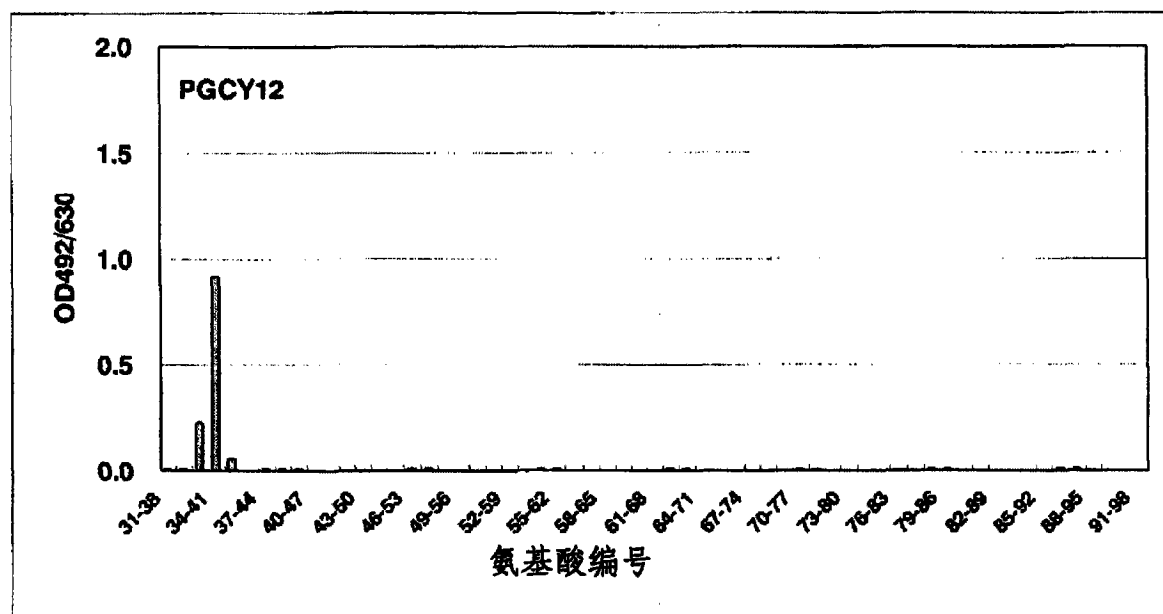


图 4

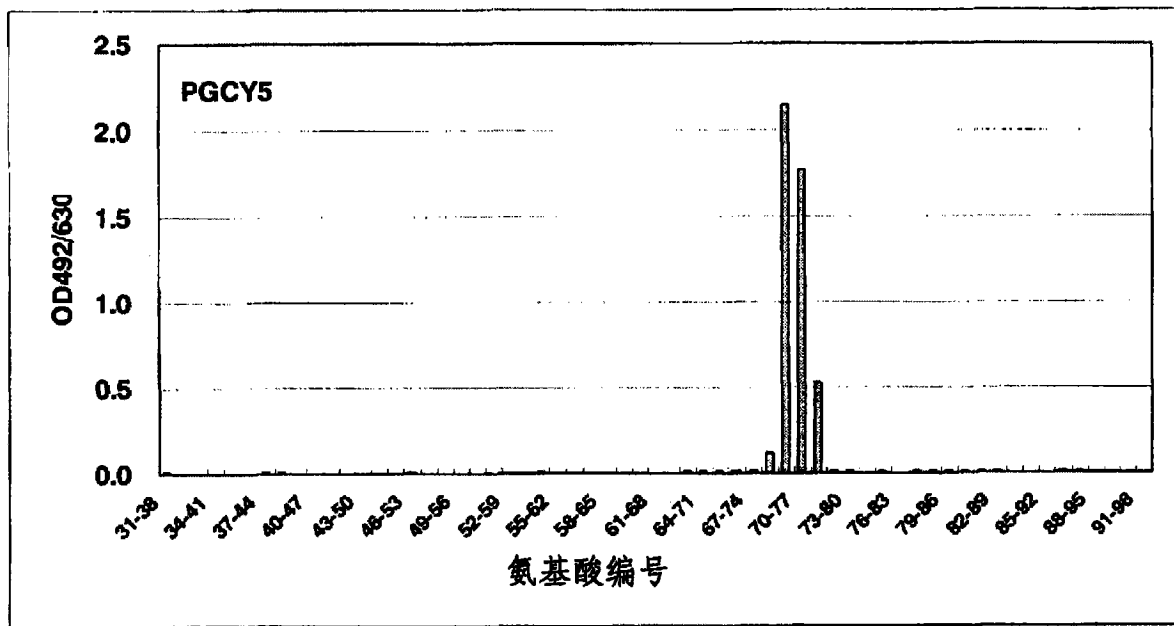


图 5

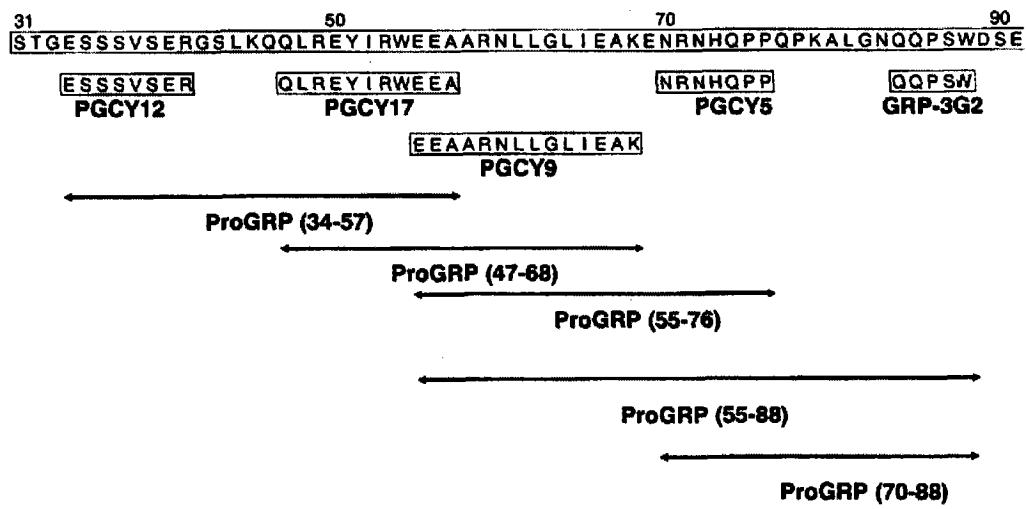


图 6

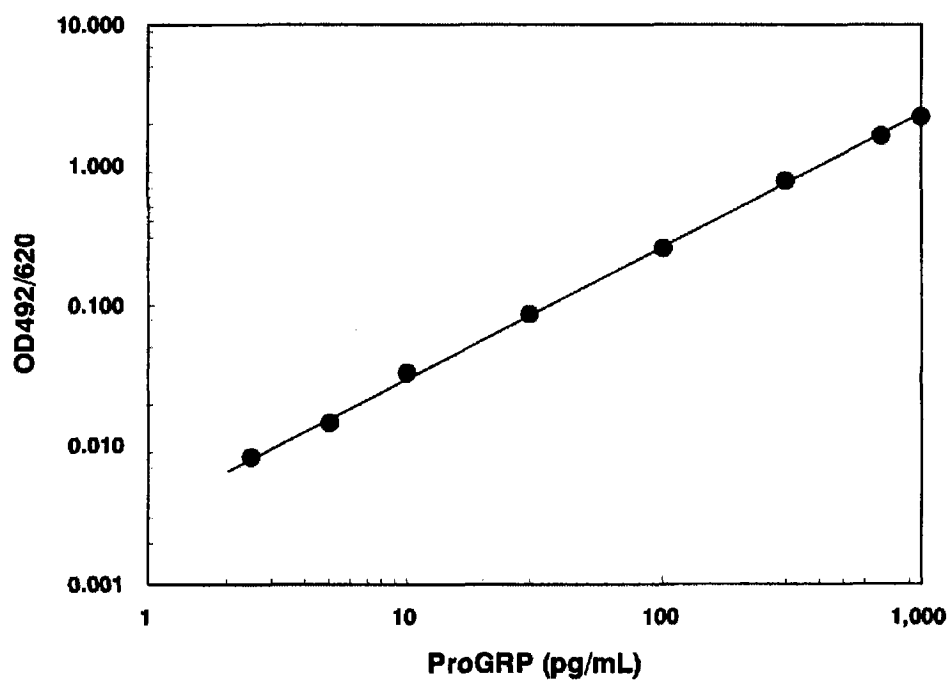


图 7

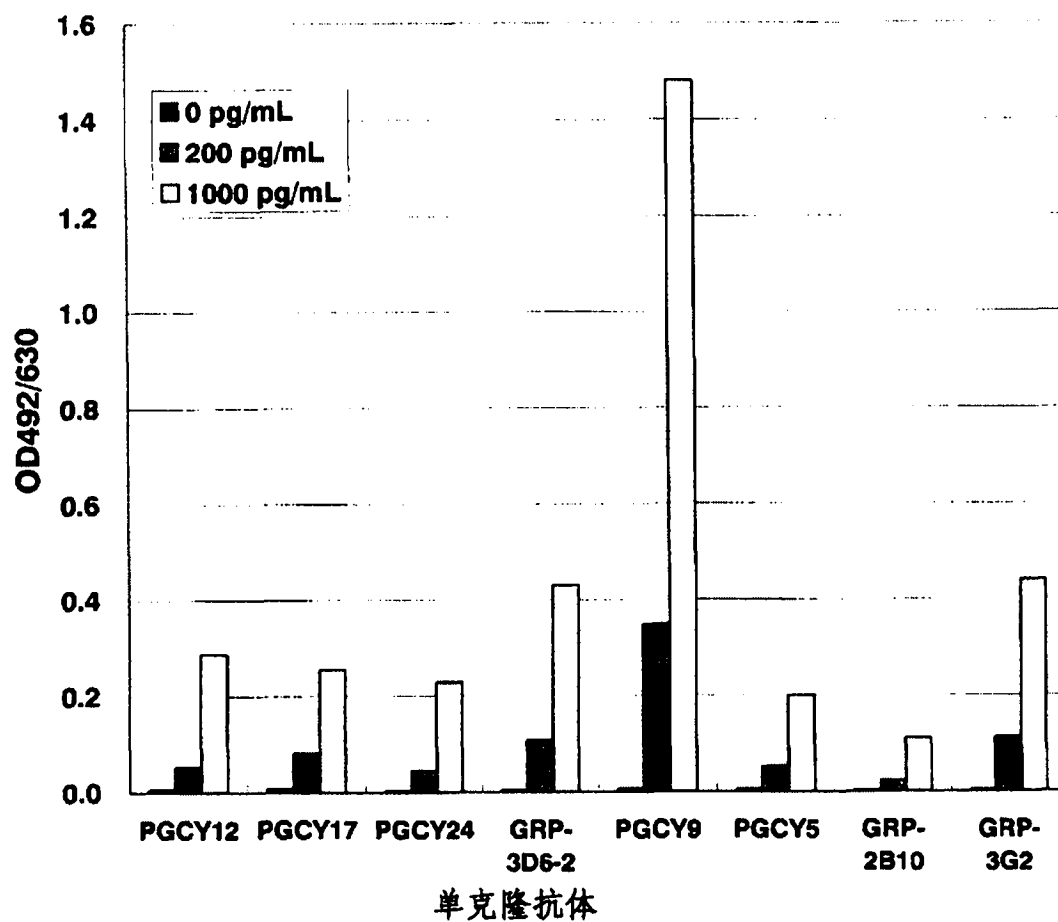


图 8

专利名称(译)	针对胃泌素释放肽前体的抗体及其应用		
公开(公告)号	CN102084249B	公开(公告)日	2014-10-29
申请号	CN200880111723.1	申请日	2008-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	青柳克己 井泽雪路		
发明人	青柳克己 井泽雪路		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 G01N33/574 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/74 C07K2317/34 G01N2800/56 G01N33/57484 C07K16/26 G01N2333/5758		
代理人(译)	张淑珍 王维玉		
审查员(译)	田颖		
优先权	2007278843 2007-10-26 JP		
其他公开文献	CN102084249A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种不存在测定值分散和样品处理等操作上的制约等问题的、高灵敏度的新的ProGRP测定方法。特别是，本发明提供一种使用2种以上的不同抗体测定胃泌素释放肽前体和/或其降解物的方法，所述的抗体识别序列编号1所示的氨基酸序列的第47-68位的氨基酸序列所显示的抗原表位。本发明的方法与现有的测定方法相比，能够以冷藏保存的样品为对象，在短时间内从更少量的样品试样中以更高的检测灵敏度检测ProGRP或其降解物。

