

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680012079.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/02 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月9日

[11] 公开号 CN 101160526A

[22] 申请日 2006.4.13

[21] 申请号 200680012079.3

[30] 优先权

[32] 2005.4.13 [33] JP [31] 115782/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2006/307808 2006.4.13

[87] 国际公布 WO2006/117994 日 2006.11.9

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.12

[71] 申请人 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

[74] 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限公司

代理人 薛俊英 王维玉

权利要求书 2 页 说明书 17 页 序列表 4 页
附图 2 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新的 ProGRP 测定方法。具体而言,是一种使用识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-75 位的部分氨基酸序列构成的肽的 2 种以上的不同抗体,测定胃泌素释放肽前体和/或其分解物的方法。此外,还提供一种使用识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-79 位的部分氨基酸序列构成的肽的 2 种以上的不同抗体,测定胃泌素释放肽前体和/或其分解物的方法。本发明的方法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容易处理、能获得再现性高的测定值等优点。

1. 一种使用识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-75 位的部分氨基酸序列构成的肽的 2 种以上的不同抗体，测定胃泌素释放肽前体和/或其分解物的方法。

2. 一种使用识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-79 位的部分氨基酸序列构成的肽的 2 种以上的不同抗体，测定胃泌素释放肽前体和/或其分解物的方法。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述方法为三明治免疫测定法。

4. 一种与序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-60 位的部分氨基酸序列构成的肽结合，且与序列编号 1 所示的氨基酸序列上的任意 8 个连续氨基酸序列构成的肽不结合的抗体。

5. 一种与序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-60 位的部分氨基酸序列构成的肽结合，与由第 31-53 位的部分氨基酸序列构成的肽不结合的抗体。

6. 如权利要求 4 或 5 所述的抗体，其中所述抗体由按照保藏编号 FERM BP-08669 保藏的杂交细胞瘤 3D6-2 产生。

7. 按照保藏编号 FERM BP-08669 保藏的杂交细胞瘤 3D6-2。

8. 如权利要求 1 或 2 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权利要求 4~6 的任一项中所述的抗体。

9. 如权利要求 1 或 2 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权利要求 4~6 中任一项所述的抗体，其它抗体为识别序列

编号 1 的氨基酸序列第 71-75 位的部分氨基酸序列构成的肽的抗体。

10. 一种含有权利要求 4~6 中任一项所述的抗体并用于测定胃泌素释放肽前体或其分解物的试剂盒。

11. 如权利要求 10 所述的试剂盒，其是用于癌诊断的试剂盒。

针对胃泌素释放肽前体的抗体及其应用

技术领域

本发明涉及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

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癌和小细胞肺癌、发生于肺野部的肺腺癌和大细胞肺癌。

尤其是小细胞肺癌，由于增殖快速，早期即发生远处转移，因此初诊发现时大多已经是转移至全身的进行性癌。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患者，其治愈率为约20%，对于已经转移至两肺或其它内脏的扩散型患者，可以说事实上难以治愈。

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，由于化学疗法的疗效差，因此外科疗法是首选的治疗方法。

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，对小细胞肺癌和非小细胞肺癌的鉴别诊断对于确定治疗方案极其重要。

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癌的检查，对小细胞肺癌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，但对于发生于肺门部的肺鳞状上皮癌和小细胞肺癌，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射线单纯摄影、CT扫描、支气管内窥镜等，也难以早期发现该类肺癌。

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视镜等，会对患者造成痛苦，且需要昂贵的仪器和熟练的技术等。

因此，正在进行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肿瘤标志物的研究。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。

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都有效的肿瘤标志物。因此，目前根据肺癌的组织类型选择和使用有效的标志物。

例如，对于肺腺癌，主要选择使用癌胚抗原（CEA）或唾液酸化 Lex-i 抗原；对于肺鳞状上皮癌，主要选择使用鳞状上皮癌相关抗原；对于小细胞肺癌，主要选择使用神经元特异性烯醇化酶（NSE）等。

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一过性上升，（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，NSE 对于小细胞肺癌来说未必是有效的肿瘤标志物。

胃泌素释放肽（GRP）是 McDonald 等在 1978 年从猪的胃组织中分离出的一种具有促胃泌素分泌作用的、由 27 个氨基酸组成的脑肠肽。已确认人类也存在 GRP，并于 1984 年克隆出编码人类 GRP 的基因。

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（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，建立了配合血中 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 在血中会快速分解，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。

根据此后的研究可知，在各种细胞中，通过选择性 RNA 剪切，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 剪切，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、分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。

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 的氨基酸序列相同。这 3 种前体均通过激素前体切断酶，分解为由第 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 分解物的 C 末端片段（ProGRP-Cfrag）。

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。此外，认为用这种由 11 个氨基酸残基构成的短链肽进行免疫时，未诱导出识别 ProGRP 的立体结构抗原表位的抗体。

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 位氨基酸序列对其它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））作为抗原获得的高效价抗血清，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。

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，无法进行临床应用。

此外，上述 Holst 等和三宅等的 RIA 法是抑制法，因此只要 ProGRP 片段的一部分具有抗原性，就能进行测定，但其灵敏度比三明治法低，因此需要高灵敏度的 ProGRP 测定法的临床应用难以实现。即：为了在临床上进行 ProGRP 检测，必须提高检测灵敏度，尤其需要能在三明治法中使用的抗体。

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（ELISA）为原理、使用三明治法的简便且高灵敏度 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），因此目前在临床上广泛应用，发现对于小细胞肺癌，该方法比 NSE 灵敏度高并具有特异性。

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、小细胞肺癌、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。

然而，虽然在血中 ProGRP 的稳定性比 GRP 高，但与其它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，即测定样品必须在采血后迅速冻干保存直至测定时为止（非专利文献 4）。

专利文献 1：第 3210994 号专利公报

专利文献 2：特开平 6-98794 号公报

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

非专利文献 2：Eliot 等，Mol. Endo., 1987 年，第 1 卷，224-232 页

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

非专利文献 4：临床检查，第 39 卷，981-986 页，1995 年

发明内容

本发明提供一种新的 ProGRP 的测定方法，该测定方法以 ProGRP 为测定对象，但不存在现有方法中测定值分散和样品冻干保存这种操作上的制约等问题。

本发明在 ProGRP 的分解物中发现能在血液样品中稳定保存的物质，基于此，通过以该分解物中存在的稳定的抗原表位为测定对象，解决了上述问题。具体地说，提供了以下各发明。

(1) 一种使用识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-75 位的部分氨基酸序列构成的肽的 2 种以上的不同抗体，测定胃泌素释放肽前体及/或其分解物的方法。

(2) 一种使用识别序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-79 位的部分氨基酸序列构成的肽的 2 种以上的不同抗体, 测定胃泌素释放肽前体及/或其分解物的方法。

(3) 如(1)或(2)所述的方法, 其中该方法为三明治免疫测定法。

(4) 一种与序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-60 位的部分氨基酸序列构成的肽结合、且与序列编号 1 中所示的氨基酸序列上的任意 8 个连续氨基酸序列构成的肽不结合的抗体。

(5) 一种与序列编号 1 所示的氨基酸序列的第 40-60 位的部分氨基酸序列构成的肽结合、与由第 31-53 位的部分氨基酸序列构成的肽不结合的抗体。

(6) 如(4)或(5)所述的抗体, 其中该抗体由按照保藏编号 FERM BP-08669 保藏的杂交细胞瘤 3D6-2 产生。

(7) 按照保藏编号 FERM BP-08669 保藏的杂交细胞瘤 3D6-2。

(8) 如(1)或(2)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)~(6)中任一项所述的抗体。

(9) 如(1)或(2)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)~(6)中任一项所述的抗体, 其它抗体为识别序列编号 1 的氨基酸序列第 71-75 位的部分氨基酸序列构成的肽的抗体。

(10) 一种含有(4)~(6)中任一项所述的抗体并用于测定胃泌素释放肽前体或其分解物的试剂盒。

(11) 如(10)所述的试剂盒, 其是用于癌诊断的试剂盒。

本发明的方法通过以新确认的、在样品中也能稳定保存的 ProGRP 的某种分解物上的抗原表位为测定对象, 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、能获得再现性高的测定值等效果。

附图说明

图 1 表示单克隆抗体对由用多肽合成的 8 个连续氨基酸序列构成的肽的反应性。横轴表示 ProGRP (31-98) 的 8 个连续氨基酸序列, 纵轴

表示吸光度。(A)表示 GRP-3D6-2 的反应性、(B)表示 GRP-3G2 的反应性、(C)表示 GRP-2B10 的反应性。

图 2 表示使用与氨基酸编号第 40-75 位的部分肽结合的抗体 3D6-2 与 2B10 的测定法的标准曲线。横轴表示 ProGRP 的浓度，纵轴表示吸光度。

具体实施方式

本发明以在样品中存在的、与 ProGRP 或 ProGRP-Cfrag 相比在血中的保存稳定性高的 ProGRP 分解物 (ProGRP-Cdel) 中残存的抗原表位为免疫学测定法的对象。

该 ProGRP-Cdel 是现有方法的测定对象 ProGRP-Cfrag 的 C 末端一些氨基酸残基缺失的、链长更短的肽，是含有 ProGRP 的第 40-75 位氨基酸残基上残存的抗原表位的肽。推测可能是通过血液中的蛋白酶将 ProGRP-Cfrag 的第 75-83 位氨基酸残基的某个残基的 C 末端切断，从而产生 ProGRP-Cdel。

关于该 ProGRP-Cdel，使用质量分析装置对其结构进行确认，确认在第 79 位 Lys 的 C 末端处被切断。因此，ProGRP-Cdel 是含有序列编号 1 的第 40-79 位氨基酸残基上残存的抗原表位的肽，所以，识别这些抗原表位的抗体也可以在本发明中使用。

ProGRP-Cdel 与 ProGRP-Cfrag 之间结构上的差异仅是 C 末端有无 20 个左右氨基酸残基，但是作为用于免疫学测定 ProGRP 或其分解物的对象蛋白质的意义却有很大不同。现有方法中，使用识别上述 C 末端 20 几个残基部分的抗体。因此，该抗体已经不能识别、捕捉缺失该部分的 ProGRP-Cdel。该 C 末端部分切断的进行受到样品自身或样品采取后的保存状态及时间的影响，推测这是现有方法中检测信号受到样品的保存状态或时间影响的原因。

另一方面，本发明中，使用识别 ProGRP-Cdel 上存在的抗原表位的抗体，即使样品中存在 ProGRP 及 ProGRP-Cfrag，或即使产生部分切断，也能稳定地识别 ProGRP 或其分解物，因此检测信号受到样品的保存状态或时间的影响小，可以进行再现性高的测定。

本发明是一种以 ProGRP-Cdel 上的抗原表位作为测定对象，使用从可以识别由 ProGRP 的第 40-75 位氨基酸序列构成的肽(ProGRP(40-75))上存在的抗原表位的抗体中选择的、能分别识别 ProGRP (40-75) 上存在的 2 种以上不同抗原表位的不同抗体，通过三明治免疫测定法检测 ProGRP 或其分解物的方法。此外，本发明还是一种使用从可以识别由 ProGRP 的第 40-79 位氨基酸序列构成的肽 (ProGRP (40-79)) 上存在的抗原表位的抗体中选择的、能分别识别 ProGRP (40-79) 上存在的 2 种以上的不同抗原表位的不同抗体，通过三明治免疫测定法检测 ProGRP 或其分解物的方法。

特别是本发明中，不包含识别从 ProGRP-Cfrag 切断除去的 C 末端部分序列上的抗原表位的抗体，优选采用只使用识别 ProGRP-Cdel 上的抗原表位的抗体的三明治免疫测定法。

三明治 ELISA 法的基本操作可以根据“超高灵敏度免疫测定法”(石川荣治，1993 年，学会出版中心)或其它各种实验方法的说明书中记载的方法进行，本发明的实施中不特别需要特殊的操作，可以按下述工序进行。

即：ProGRP 或其分解物可以通过包括如下工序的测定法检测：(1) 使与 ProGRP (40-75) 和/或 ProGRP (40-79) 结合的第一抗体与样品中的 ProGRP 或其分解物反应的工序，(2) 由该抗体捕捉的 ProGRP 或其分解物与和 (1) 的抗体不同的、与 ProGRP (40-75) 和/或 ProGRP (40-79) 结合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。

与 ProGRP 或其分解物结合的抗体，优选使用只选择与 ProGRP (40-75) 和/或 ProGRP (40-79) 结合的抗体，在可以重现再现性高的测定值的范围内，测定体系内也可以含有该抗体以外的抗体。

本发明中特别优选的抗体的组合，是识别 ProGRP 的第 40-60 位氨基酸序列的单克隆抗体 GRP-3D6-2 和识别第 71-75 位氨基酸序列的单克隆抗体 GRP-2B10 的组合。单克隆抗体 GRP-3D6-2 识别 ProGRP 的第 40-60 位氨基酸序列，同时不识别由该氨基酸序列中任意的 8 个连续氨基酸序

列构成的肽。由此认为,单克隆抗体 GRP-3D6-2 识别由 ProGRP 的第 40-60 位氨基酸序列构成的结构抗原表位。推测单克隆抗体 GRP-2B10 识别由 71-75 位氨基酸残基构成的序列抗原表位。

使用上述 2 种单克隆抗体的本发明的方法的检测灵敏度为 4.5pg/mL。这与现有的使用单克隆抗体与多克隆抗体测定 ProGRP(31-98)的方法具有基本相同的灵敏度,该灵敏度足以用于测定健康人的血中 ProGRP。

本发明中使用的抗体可以通过免疫小鼠、大鼠、豚鼠、兔子、鸡、山羊、绵羊、牛等实验动物获得。免疫中使用的抗原优选使用 ProGRP (40-75) 和/或 ProGRP (40-79),也可以使用 ProGRP (31-98) 的肽,免疫后使用 ProGRP (40-75) 和/或 ProGRP (40-79) 可以选择得到期望的抗体。

以小鼠为例,对免疫动物的方法进行说明。将 ProGRP (31-98) 等肽与弗氏完全佐剂、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,同样进行第二次免疫。以后同样继续免疫,直至抗体对血中的 ProGRP (31-98) 的抗体效价上升。

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 孔微量滴定板的各孔中,于 4 $^{\circ}$ C 吸附过夜。用含 0.05% Tween20 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 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添加 50 μ L。在室温下反应 30 分钟后,用 PBS-T 洗涤,在各孔中添加 50 μ L 使用 PBS-T 等适当稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗小鼠 IgG 溶液。再在室温下反应 30 分钟后,添加过氧化氢、邻苯二胺底物液,反应 30 分钟,添加 50 μ L 2N H₂SO₄, 停止反应,测定各孔的吸光度。

在免疫的小鼠中，确认对 ProGRP 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、氨基蝶呤和胸苷）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，获得产生目标抗体的杂交细胞瘤。通过上述方法获得的杂交细胞瘤克隆体例如有 3D6-2（保藏编号 FERM BP-8669）、ProGRP-2B10（保藏编号 FERM BP-4110）。

通过分析上述方法所得抗体的抗原表位，可以获得识别并结合 ProGRP（40-75）和/或 ProGRP（40-79）上存在的抗原表位的抗体。抗原表位分析可以通过研究抗体对 ProGRP（40-75）和/或 ProGRP（40-79）的反应来进行。通过在微量滴定板上涂覆重组体中发现的 ProGRP（31-98）、ProGRP（40-75）和/或 ProGRP（40-79）、或用 Fmoc 法或 Boc 法化学合成的 ProGRP（40-75）和/或 ProGRP（40-79），使用上述免疫测定法研究对各肽的反应来确定。此外，可以通过使用多肽法合成的肽确定在 ProGRP 的连续 8-12 个氨基酸左右的连续肽中存在的抗原表位。

本发明中，还可以将使用的抗体固相化或标记。各操作可以根据各种实验方法的说明书中记载的方法进行，本发明的实施中不特别需要特殊的操作。

本发明除了上述方法以外，还提供用于测定样品中的 ProGRP 或其分解物的试剂盒，尤其是通过测定 ProGRP 或其分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 ProGRP（40-75）和/或 ProGRP（40-79）上存在的抗原表位的抗体，其它还可以任意地含有反应缓冲液、二抗稀释液、ProGRP 标准物质、说明书等其它组成物。作为试剂盒中含有的抗体的优选例，为识别 ProGRP（40-75）和/或 ProGRP（40-79）上存在的抗原表位、且不识别由该肽上的 8 个连续氨基酸残基构成的肽的抗体，或识别 ProGRP 的第 71-75 位氨基酸序列的抗体，代表例为单克隆抗体 GRP-3D6-2 或单克隆抗体 GRP-2B10。

以下列举实施例对本发明作进一步说明。

实施例 1

杂交细胞瘤的制备

根据专利第 3210994 号的实施例 1 记载的方法制备重组体，精制大肠菌中发现的序列编号 4 所示的肽。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)。然后，根据专利第 3210994 号的实施例 6 中记载的方法，得到产生本发明单克隆抗体的杂交细胞瘤。

得到的杂交细胞瘤 3D6-2 (FERM BP-8669) 于 2004 年 3 月 23 日在日本独立行政法人产业技术综合研究所专利微生物保藏中心保藏，ProGRP-2B10 (FERM BP-4110) 和 ProGRP-3G2 (FERM BP-4109) 于 1992 年 12 月 9 日在日本工业技术院微生物工业技术研究所 (现为日本独立行政法人产业技术综合研究所专利微生物保藏中心) 保藏。

将所得杂交细胞瘤移植入使用姥鲛烷等处理的小鼠腹腔中，回收腹水，使用结合蛋白质 A 的琼脂糖凝胶 (Sephrose) 柱，从腹水中精制各单克隆抗体。将从杂交细胞瘤 3D6-2 (FERM BP-8669) 获得的单克隆抗体命名为 GRP-3D6-2。

实施例 2

单克隆抗体的抗原表位分析

(1) 肽的合成与抗原表位的确定

序列编号 3 中表示 ProGRP (31-98) 的核酸序列和氨基酸序列。根据该氨基酸序列，通过 Fmoc 法合成 ProGRP (31-98) 的部分肽。Pep1 是 ProGRP 的第 31-52 位肽，Pep70 是第 40-60 位肽，Pep3 是第 54-78 位肽，Epi2 是第 82-96 位肽，Pep5 是第 82-96 位肽。合成的肽通过反相色谱法或反相色谱法和凝胶过滤联用进行精制。精制纯度为 80% 以上。

将各个肽用 PBS 稀释成 1 μ g/mL 的浓度，在 96 孔微量滴定板的各孔中添加 100 μ L，于 4 $^{\circ}$ C 吸附过夜。用 PBS 将各孔洗涤 2 次后，在各孔中添加含 1%BSA 的 PBS，室温下培养 2 小时，吸除。在各孔中添加 100 μ L 稀释成 1 μ g/mL 浓度的单克隆抗体 GRP-3D6-2，室温下反应 60 分钟后，

用含 0.05% Tween20 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, 室温下反应 30 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 (2mg/mL 邻苯二胺、含 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), 室温下反应 30 分钟后, 在各孔中分别添加 100 μ L 2N 硫酸, 停止反应。立即测定 492nm 处的吸光度, 结果如表 1 所示。

表 1

肽	氨基酸编号	OD492/630
Pep1	31-52	0.003
Pep70	40-60	0.822
Pep3	54-78	0.003
Epi2	70-90	0.004
Pep5	82-96	0.002
ProGRP	31-98	2.236

单克隆抗体 GRP-3D6-2 与作为阳性对照的重组体 ProGRP (31-98) 和 ProGRP 的第 40-60 位氨基酸序列 Pep70 反应。由此可知, GRP-3D6-2 识别 ProGRP 的第 40-60 位氨基酸序列。此外, 通过同样的方法, 发现 GRP-2B10 与 Pep3 和 Epi2 的肽反应, GRP-3G2 与 Epi2 和 Pep5 的肽反应。

(2) 多肽的合成和抗原表位的确定

基于 ProGRP (31-98) 的氨基酸序列, 用多肽法合成每个氨基酸重叠的 8 个连续氨基酸序列构成的 61 个肽。各肽末端结合生物素, 委托和光纯药株式会社 (大阪) 合成。

将用多肽法合成的各生物素化肽在二甲基甲酰胺中溶解, 用 PBS 稀释成 1 μ g/mL 的浓度。在抗生物素蛋白固相的 96 孔微量滴定板的各孔中分别添加 100 μ L 该稀释的各生物素化肽溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 结合过夜。用含 0.05% Tween20 的 PBS (PBS-T) 将各孔洗涤后, 在各孔中添加 100 μ L 将各单克隆抗体 GRP-3D6-2、GRP-3G2、GRP-2B10 稀释成 1 μ g/mL 的溶液。室温下反应 30 分钟后, 用 PBS-T 洗涤 5 次, 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, 再在室温下反应 30 分钟后, 用 PBS-T 洗涤 5 次, 在各孔中分别添加 100 μ L 底物溶液 (2mg/mL 邻苯二胺、含 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), 室温下反应 30 分钟后, 分别添加 100 μ L 2N 硫酸, 立即测定 492nm

处的吸光度。各单克隆抗体 GRP-3D6-2、GRP-3G2、GRP-2B10 对 ProGRP (31-98) 内部的各肽的反应如图 1 (A)、(B)、(C) 所示。

如图 1 (A) 所示, 单克隆抗体 GRP-3D6-2 与 ProGRP (31-98) 内部的各 8 个连续氨基酸序列构成的肽均不结合。认为这是由于 GRP-3D6-2 不能识别 ProGRP (31-98) 的 8 个连续氨基酸序列构成的肽, 而能识别比 8 个连续氨基酸序列长的肽形成的结构抗原表位。另一方面, 单克隆抗体 GRP-3G2 与 81-88、82-89、83-90、84-91 这 4 段 8 个连续氨基酸序列构成的肽结合。认为单克隆抗体 GRP-3G2 的抗体能识别在该 4 段肽中存在的序列 84-88 的肽 (图 1 (B))。此外, 单克隆抗体 GRP-2B10 的抗体与 68-75、69-76、70-77、71-78 这 4 段 8 个连续氨基酸序列构成的肽结合。因此认为单克隆抗体 GRP-2B10 能识别在该 4 段肽中存在的序列 71-75 位的肽 (图 1 (C))。

由使用这些肽的抗原表位的确定结果可知, 单克隆抗体 GRP-3G2 或单克隆抗体 GRP-2B10 识别的抗原表位是由 5 个残基的氨基酸形成的连续抗原表位。

此外, 单克隆抗体 GRP-3D6-2 是能识别 ProGRP(31-98)的至少 40-60 部分的肽、且与 ProGRP (31-98) 内部的 8 个连续氨基酸序列构成的肽不发生反应的抗体。换句话说, 认为被 GRP-3D6-2 识别的抗原表位由 ProGRP (31-98) 的至少 40-60 位氨基酸序列形成, 该抗原表位是无法用各 8 个连续氨基酸序列构成的肽形成的结构抗原表位。

总结以上单克隆抗体识别的抗原表位的关系, 如表 2 所示。

表 2

单克隆抗体	抗原表位 (ProGRP 的氨基酸编号)
GRP-3G2	84-88
GRP-2B10	71-75
GRP-3D6-2	40-60

实施例 3

通过组合单克隆抗体研究样品的保存稳定性

在 96 孔微量培养板的各孔中, 以 4 μ g/mL 的浓度添加 100 μ L 1 种或 2 种单克隆抗体 (2 种时为等量混合), 于 4 $^{\circ}$ C 培养过夜, 进行固相化。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% 酪蛋白钠的 10mM 磷酸缓冲液, pH 7.1), 静置 2 小时, 进行封闭。除去封闭液后, 在各孔中加入 100 μ L 反应液和 50 μ L 测定样品, 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时。用洗涤液 (含 0.05% Tween20 的 10mM 磷酸缓冲液, pH 7.3) 洗涤 5 次, 添加 100 μ L HRP 标记的 1 种或 2 种单克隆抗体 (2 种时为等量混合) 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 (2mg/mL 邻苯二胺、含 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, 添加 100 μ L 2N 硫酸, 停止酶反应。用酶标仪 (Microplate Reader) 测定 492nm 处 (参比波长 630nm) 的吸光度。

使用该测定法, 将 3 个样品分为分别在 -20 $^{\circ}$ C 下冻干保存的样品和在室温下保存 17 小时的样品进行测定。将冻干保存的样品的 ProGRP 值设为 100%, 室温下保存 17 小时时的测定值用百分比表示 (表 3)。固相化抗体与标记抗体的组合分别是 GRP-3G2 与 GRP-2B10、GRP-3G2 与 GRP-3D6-2、GRP-3G2 与 GRP-2B10/GRP-3D6-2 时, 保存 17 小时的样品的 ProGRP 免疫活性分别平均降为 69.6%、70.6%、69.2%。此外, 现有方法的固相化抗体与标记抗体的组合为 GRP-3G2/GRP-2B10 与多克隆抗体时, 也减少至 71.8%。另一方面, 固相化抗体使用 GRP-3D6-2、标记抗体使用 GRP-2B10 时, 即使在室温下保存 17 小时, 测定值也平均为 89.3%, 与其它抗体的组合相比, 约 20% 的 ProGRP 的免疫活性得以保持 (表 3)。另外, 多克隆抗体是使用专利第 3210994 号的实施例 8 中记载的方法获得的抗体。

表 3

样品 编号	固相	GRP-3G2	GRP-3G2	GRP-3G2	GRP-3D6-2	GRP-3G2 GRP-2B10
	组合	GRP-2B10	GRP-3D6-2	GRP-2B10/GRP-3D6-2	GRP-2B10	多克隆抗体
729		66.3	66.8	66.5	82.1	71.6
857		71.6	73.7	70.0	92.5	72.9
815		70.7	71.1	71.0	93.3	70.9
	平均回 复率%	69.6	70.6	69.2	89.3	71.8

实施例 4

使用与 ProGRP (40-75) 结合的抗体的测定法

在 96 孔微量培养板的各孔中，以 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度添加 200 μL GRP-3D6-2，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜，进行固相化。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% 酪蛋白钠的 10mM 磷酸缓冲液，pH 7.1)，静置 2 小时，进行封闭。除去封闭液后，在各孔中加入 100 μL 反应液和 100 μL 测定样品，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 小时。用洗涤液 (含 0.05% Tween20 的 10mM 磷酸缓冲液，pH 7.3) 洗涤 5 次，添加 200 μL HRP 标记的 GRP-2B10 溶液，在室温下反应 30 分钟。用洗涤液洗涤 5 次，加入 200 μL 底物溶液 (2mg/mL 邻苯二胺，含 0.9 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 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 50 μL 5N 硫酸，停止酶反应。用酶标仪测定 492nm 处 (参比波长 630nm) 的吸光度。其标准曲线如图 2 所示。

根据该标准曲线，认为可以检测约为 4.5pg/mL 的 ProGRP。该灵敏度在检测健康人样品中的 ProGRP 量方面具有足够的灵敏度。

试验例 1

使用现有方法和本发明实施例 4 的测定法，将 5 个样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 1 天、3 天、7 天后，测定样品中 ProGRP 免疫活性，与保存前的测定值进行比较。现有方法按如下步骤进行：在 96 孔微量培养板的各孔中，以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度添加 100 μL GRP-3G2 和 GRP-2B10 (等量混合)，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜，进行固相化。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% 酪蛋白钠的 10mM 磷酸缓冲液，pH 7.1)，静置 2 小时，进行封闭。除去封闭液后，在各孔中加入 100 μL 反应液和 50 μL 测定样品，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 小时。用洗涤液 (含 0.05% Tween20 的 10mM 磷酸缓冲液，pH 7.3) 洗涤 5 次，添加 100 μL HRP 标记的多克隆抗体溶液，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 (2mg/mL 邻苯二胺、含 0.9 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 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 μL 2N 硫酸，停止酶反应。用酶标仪测定 492nm 处 (参比波长 630nm) 的吸光度。

将在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存前的 ProGRP 值设为 100%，各保存期后的测定值用百分比表示。结果如表 4 所示。

使用现有方法时,样品中的 ProGRP 测定值在 4℃ 下保存 1 天时平均为 94.5%, 保存 3 天时平均为 85.8%, 保存 7 天时平均为 67.8%, 存在 1 天平均降低约 4.93% 的倾向。另一方面,本发明的测定方法中,样品中的 ProGRP 测定值在 4℃ 下保存 1 天时平均为 96.9%, 保存 3 天时平均为 94.3%, 保存 7 天时平均为 86.9%, 存在 1 天平均降低约 2.29% 的倾向。即:本发明的测定方法与现有方法相比,显示高 2.15 倍的保存稳定性,尤其是在保存 7 天时,与现有方法相比,约 19% 的 ProGRP 免疫活性得以保持。

表 4

固相 组合		现有方法			本发明		
		GRP-2B10&GRP-3G2			GRP-3D6-2		
保存时间		/多克隆抗体			/GRP-2B10		
		1 天	3 天	7 天	1 天	3 天	7 天
样品 编号	115	92.3	84.0	63.4	97.8	94.2	85.7
	822	92.9	85.1	65.6	98.6	95.6	91.3
	215	95.8	78.8	66.0	100.0	95.5	91.0
	1029	93.3	92.0	66.7	86.6	86.7	76.5
	857	98.4	89.0	77.4	101.5	99.6	89.8
平均%		94.5	85.8	67.8	96.9	94.3	86.9

试验例 2

对本发明中可使用的单克隆抗体 GRP-3G2、GRP-2B10、GRP-3D6-2 分别识别的抗原表位进行分析。

通过 Fmoc 法合成 ProGRP 的第 31-53 位肽。合成的肽通过反相色谱法或反相色谱法和凝胶过滤联用进行精制。将包括实施例 2 中使用的各个肽在 0.1%TFA 中溶解,用 PBS 稀释至 10 μ g/mL 的浓度。96 孔微量滴定板的各孔中以每孔 100 μ L 的容量,添加到 96 孔 ELISA 板的各孔中,于 4℃ 吸附过夜。用 PBS 将各孔洗涤 2 次后,在各孔中添加含 1%BSA 的 PBS,在室温下培养 2 小时,吸除。在各孔中分别添加 100 μ L 稀释成 5 μ g/mL 浓度的单克隆抗体 GRP-3G2、GRP-2B10、GRP-3D6-2,在室温下反应 85 分钟后,用含 0.05% Tween20 的 PBS (PBS-T) 洗涤 5 次。在各孔中分别添加 100 μ L 用 PBS-T 适当稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗小鼠 IgG 抗体溶液,再在室温下反应 30 分钟。用 PBS-T 洗涤 5

次后,在各孔中分别添加 100 μ L 底物溶液(2mg/mL 邻苯二胺、含 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), 室温下反应 20 分钟后, 在各孔中分别添加 100 μ L 2N 硫酸, 停止反应。立即测定 492nm 处的吸光度。结果如表 5 所示。

表 5

肽	GRP-3D6-2	GRP-3G2	GRP-2B10
31-53	0.003	0.006	0.006
40-60	1.477	0.005	0.004
54-78	0.005	0.027	2.052
70-90	0.004	1.953	1.830
82-96	0.005	1.425	0.060
31-98	2.063	2.146	2.145

由表 5 可知, GRP-3G2、GRP-2B10、GRP-3D6-2 的反应的抗原表位显示与实施例 2 基本相同的结果, GRP-3D6-2 与 31-53 位的肽完全不反应, 因此确认与 42-53 位的肽也不反应。

试验例 3

使用质量分析装置 (LC-MS/MS) 进行 ProGRP-Cdel 的鉴定。将对 ProGRP (31-98) 范围的各种肽显示反应性的兔子多克隆抗体在 PBS (pH 7.35) 中溶解, 使达到 12.7mg/mL, 根据用户手册结合 3mL NHS-琼脂糖凝胶 (Amersham 公司)。

在 2 例 1.5mL 人血清样品中, 添加 20 μ g 重组 ProGRP (31-98), 在室温下保存 24 小时。然后, 添加 0.4mL 上述兔子多克隆抗体结合琼脂糖凝胶, 在室温下搅拌 60 分钟。用洗涤液 (含 0.05% Tween20 的 10mM 磷酸缓冲液 pH 7.3) 洗涤该兔子多克隆抗体结合琼脂糖凝胶, 添加 0.5mL 9.5M 尿素溶液, 溶出结合在兔子多克隆抗体结合琼脂糖凝胶上的物质。回收溶出液, 取其一部分, 使用 LC-MS/MS 研究人血清样品中保存的保存后的 ProGRP (31-98) 范围的肽。

在 100 μ L 溶出液中添加 1 μ L 250mM 甲基-PEO₄-NHS 酯 (Pierce) 溶液/DMSO, 在室温下培养 1 小时。添加 5 μ L 1M Tris-HCl (pH 8), 在室温下培养 30 分钟, 停止反应后, 添加 800 μ L 丙酮, 沉淀蛋白质。离心后, 干燥沉淀, 向其中添加 15 μ L Promega 公司的修饰胰蛋白酶溶液

(20ng/ μ L/50mM 碳酸氢铵), 在 30 $^{\circ}$ C 下消化过夜。在消化后的样品中添加 15 μ L 0.1%甲酸, 取以 15000rpm 离心 5 分钟的上清液 5 μ L, 进行 LC-MS/MS 分析{(LC 部分) Agilent 1100 系列毛细管 LC 系统, (柱) Agilent Zorbax SB-C18, 5 μ m, 150 \times 0.5mm, (MS/MS) BrukerDaltonics HCT-plus}。在 0.1%甲酸存在下进行分离, 流量为 15 μ L/分钟, 乙腈梯度为 0-35%线性/0-120min、35-95%线性/120-125min。将柱溶出液导入 ESI 部分, 获得 MS/MS 数据, 通过数据分析软件制作峰列表, 通过 Matrix Science 公司的 MASCOT server 进行分析。

甲基-PEO₄-NHS 具有修饰蛋白质分子内的 N 末端氨基和赖氨酸的侧链氨基的性质。因此, 在发现的肽片段内只要 N 末端存在被标记的物质, 则其在消化前处于 N 末端游离的状态。此外, 在侧链氨基修饰的赖氨酸部位没有通过胰蛋白酶引起消化, 因此只要 C 末端赖氨酸的侧链被修饰, 则其在消化前已经在该部分被切断。在两血清样品中, 发现了 C 末端赖氨酸被标记的片段 NHQPPQPK (72-79)。因此认为, 至少 Lys-79 的 C 末端被切断的片段是通过血清处理产生的。而且, 虽然 N 末端没有被标记, 但两血清样品中观察到 SVSER (37-41) 这样的片段, 表明在 Ser-36 的 C 末端有被切断的可能性。

工业实用性

本发明的方法通过以新确认的、在样品中也能稳定保存的 ProGRP 的某种分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难以受到影响, 能获得再现性高的测定值等, 对血中 ProGRP 的检测有效。

- <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 releasing peptide and use thereof
针对胃泌素释放肽前体的单克隆抗体及其应用
- <130> JA995072
- <150> JP2005-115782
<151> 2005-04-13
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
<211> 294
<212> DNA
<213> Human
人类
- <220>
<221> CDS
<222> (1)..(294)
<223>
- <400> 1
- | | |
|--|-----|
| 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

<210> 2
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Human
 人类

<400> 2

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> 3

<211> 204
 <212> DNA
 <213> synthesized DNA
 合成的DNA

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(204)
 <223>

<400> 3

agt act ggt gag agc tct tct gtt tct gaa cgt gga tcc ctt aag cag 48
 Ser Thr Gly Glu Ser Ser Ser Val Ser Glu Arg Gly Ser Leu Lys Gln
 1 5 10 15

cag ctt cgc gaa tac atc cgt tgg gaa gaa gct gct cgt aac ctg cta 96
 Gln Leu Arg Glu Tyr Ile Arg Trp Glu Glu Ala Ala Arg Asn Leu Leu
 20 25 30

ggc ctg atc gaa gct aaa gaa aac cgt aac cac cag ccg ccg cag ccg 144
 Gly Leu Ile Glu Ala Lys Glu Asn Arg Asn His Gln Pro Pro Gln Pro
 35 40 45

aaa gct tta ggt aac cag cag ccg tct tgg gac tct gaa gac tct tcg 192
 Lys Ala Leu Gly Asn Gln Gln Pro Ser Trp Asp Ser Glu Asp Ser Ser
 50 55 60

aac ttt aaa gac 204
 Asn Phe Lys Asp
 65

<210> 4
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> synthesized DNA
 合成的DNA

<400> 4

Ser Thr Gly Glu Ser Ser Ser Val Ser Glu Arg Gly Ser Leu Lys Gln
 1 5 10 15

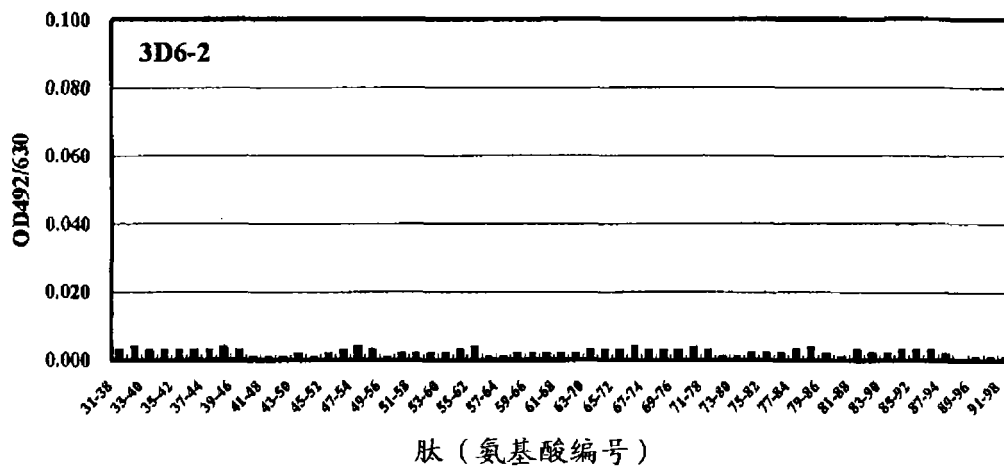
Gln Leu Arg Glu Tyr Ile Arg Trp Glu Glu Ala Ala Arg Asn Leu Leu
 20 25 30

Gly Leu Ile Glu Ala Lys Glu Asn Arg Asn His Gln Pro Pro Gln Pro
35 40 45

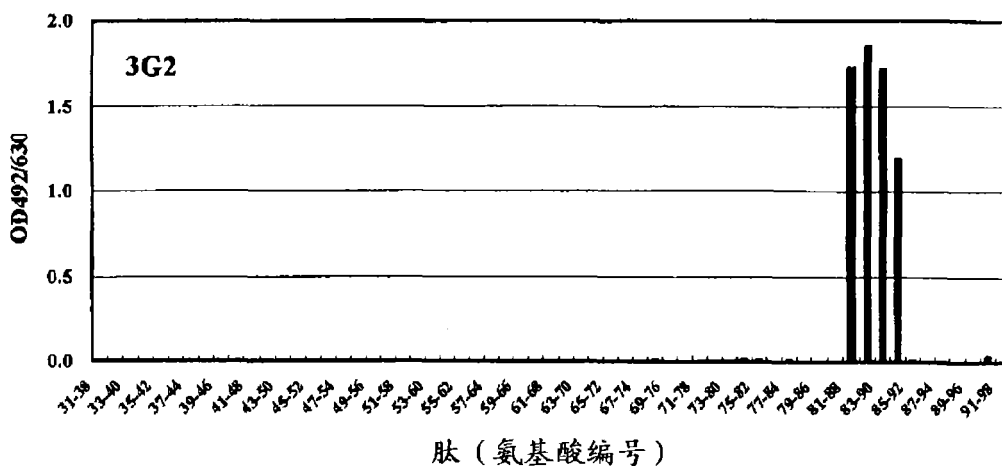
Lys Ala Leu Gly Asn Gln Gln Pro Ser Trp Asp Ser Glu Asp Ser Ser
50 55 60

Asn Phe Lys Asp
65

(A)



(B)



(C)

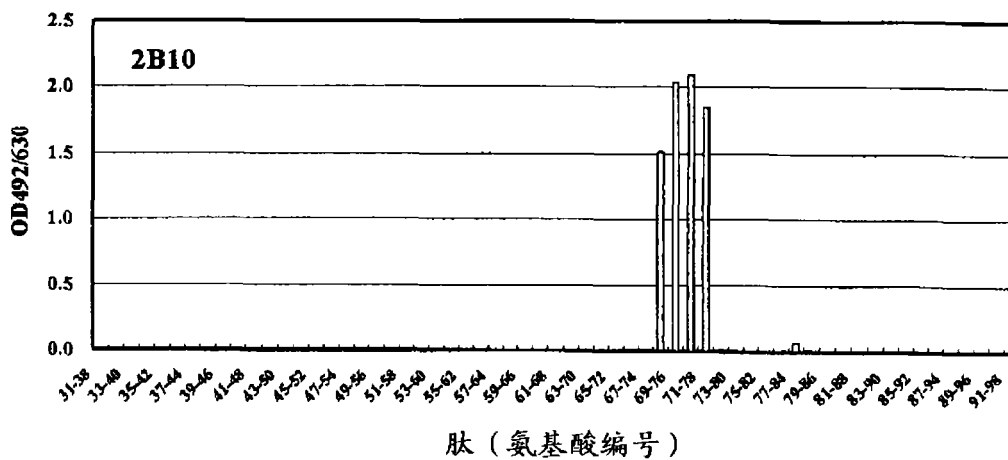


图 1

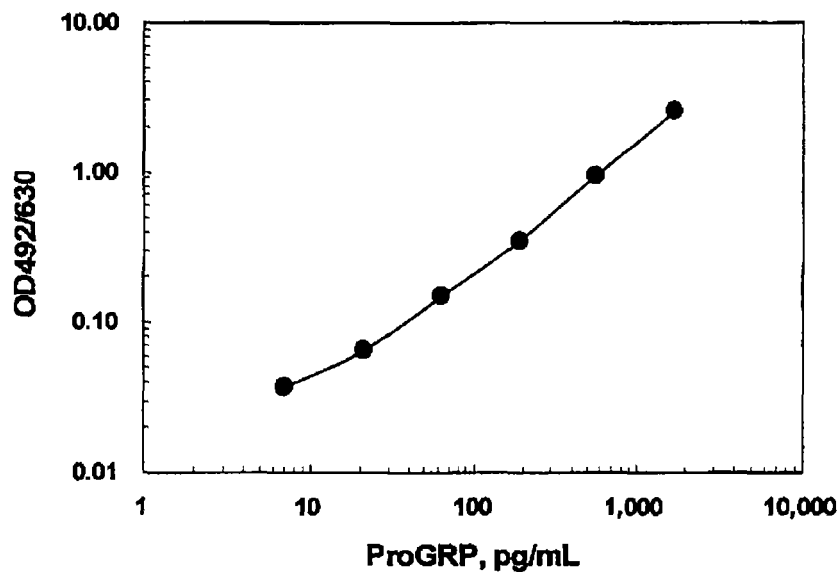


图2

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	CN101160526A	公开(公告)日	2008-04-09
申请号	CN200680012079.3	申请日	2006-04-13
[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		
发明人	青柳克己		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/26 C12N5/10 C12N15/02		
CPC分类号	C07K14/57572 G01N33/57423 C07K2317/34 C07K16/26 G01N2333/5758		
代理人(译)	王维玉		
优先权	2005115782 2005-04-13 JP		
其他公开文献	CN101160526B		
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新的ProGRP测定方法。具体而言，是一种使用识别序列编号1所示的氨基酸序列的第40 - 75位的部分氨基酸序列构成的肽的2种以上的不同抗体，测定胃泌素释放肽前体和/或其分解物的方法。此外，还提供一种使用识别序列编号1所示的氨基酸序列的第40 - 79位的部分氨基酸序列构成的肽的2种以上的不同抗体，测定胃泌素释放肽前体和/或其分解物的方法。本发明的方法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容易处理、能获得再现性高的测定值等优点。

肽	氨基酸编号	OD492/630
Pep1	31-52	0.003
Pep70	40-60	0.822
Pep3	54-78	0.003
Epi2	70-90	0.004
Pep5	82-96	0.002
ProGRP	31-98	2.236