



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 185**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**C07K 16/26** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06731744 .6**

96 Fecha de presentación : **13.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1876445**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54

Título: **Anticuerpo dirigido contra un precursor de un péptido liberador de gastrina y su uso.**

30

Prioridad: **13.04.2005 JP 2005-115782**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.08.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.08.2011**

73

Titular/es:  
**ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, Inc.**  
**2-10-23, Maruyamadai**  
**Wako-shi, Saitama, 351-0112, JP**

72

Inventor/es: **Aoyagi, Katsumi**

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 364 185 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo dirigido contra un precursor de un péptido liberador de gastrina y su uso

Campo técnico

5 El presente invento se refiere a un anticuerpo dirigido contra un precursor de un péptido liberador de gastrina y a su uso y se usa ampliamente en diagnósticos precoces, en la vigilancia del tratamiento, en la vigilancia de la recurrencia, o similares, de diversas enfermedades, incluyendo un cáncer de pulmón de células pequeñas.

Técnica de antecedentes

10 La causa de muerte más frecuente en nuestro país es un neoplasma maligno y, en particular, la mortalidad del cáncer de pulmón en varones es la más elevada, superando a la del cáncer de estómago, mientras que esta mortalidad es la tercera más alta en mujeres y tiende a crecer cada año. El cáncer de pulmón es clasificado desde el punto de vista histopatológico en los siguientes cuatro subtipos principales, a saber, un carcinoma de pulmón de células escamosas y un carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC = acrónimo de small-cell lung carcinoma) que aparece en la región hiliar, un adenocarcinoma y un carcinoma de pulmón de células grandes, que se presenta en la zona de los pulmones.

15 En particular, puesto que un carcinoma de pulmón de células pequeñas prolifera con rapidez y causa metástasis remotas en una etapa precoz, se ha descubierto frecuentemente, incluso en el diagnóstico inicial, que es un cáncer progresivo en el que una metástasis ya se ha producido sistémicamente. La tasa de curaciones de este tipo de cáncer es de aproximadamente un 20 % para los pacientes con el tipo de enfermedad limitada (LD = acrónimo de limited disease) de carcinoma de células pequeñas, en el que una lesión patológica está limitada solo por un lado del pulmón; sin embargo, para los pacientes con el tipo de enfermedad extensa (ED = acrónimo de extensive disease) en el que el  
20 cáncer se ha metastatizado tanto a los pulmones como a otros órganos, se afirma que una curación completa es prácticamente difícil.

25 Además, puesto que un carcinoma de pulmón de células pequeñas es altamente sensible a los fármacos anticancerosos, se considera que una quimioterapia es la mejor opción para el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, la tasa de éxito con una quimioterapia es baja con un carcinoma de pulmón de células no pequeñas (non-SCLC), y por lo tanto se sabe que un tratamiento quirúrgico es la mejor opción para el tratamiento.

Por lo tanto, un carcinoma de pulmón de células pequeñas es un cáncer que particularmente necesita un descubrimiento precoz y un tratamiento precoz entre los cánceres de pulmón, y por esta razón, un diagnóstico diferencial de un carcinoma de pulmón de células pequeñas y de un carcinoma de pulmón de células no pequeñas es extremadamente importante para tomar una decisión acerca del curso de tratamiento.

30 Uno de los métodos para descubrir un cáncer de pulmón es un examen de los esputos. Sin embargo, aunque un examen de los esputos es apropiado predominantemente para el examen de un carcinoma de células escamosas, existe un problema que consiste en que es baja la tasa de positivos para un carcinoma de pulmón de células pequeñas. También, la reproducción en imágenes con rayos X es otro método ampliamente usado en el descubrimiento de un  
35 cáncer de pulmón; sin embargo, con respecto a un carcinoma de células escamosas o a un carcinoma de pulmón de células pequeñas que se presenta en la región hiliar, existe el problema de que la reproducción en imágenes de la sombra de tejidos cancerosos es muy difícil, puesto que la sombra del corazón cae en la región hiliar. Además, con respecto a un carcinoma de pulmón de células pequeñas, se cree que incluso aunque los pacientes que muestran una sombra anómala de la zona de los pulmones se diagnostican usando un citodiagnóstico de los esputos, la simple reproducción en imágenes por rayos X del pecho, la exploración por CT (tomografía computerizada), la broncoscopia y  
40 similares, nunca es fácil un descubrimiento precoz de este tipo de cáncer de pulmón.

Además, varios exámenes destinados a diagnosticar un cáncer, tales como los de irradiación, biopsia y broncoscopia, causan dolor en los pacientes y requieren costosos instrumentos o un profesional experto.

45 Por lo tanto, se está realizando una investigación para encontrar un marcador de tumores que haga posible un diagnóstico altamente eficiente de un cáncer en un estadio curable por medio de un método más conveniente de examen de la sangre. Actualmente, se están usando 30 o más marcadores de tumores en el descubrimiento y el diagnóstico de pacientes de cáncer, en una indicación para vigilar el curso de una enfermedad, en el diagnóstico de la recurrencia o similares.

50 Puesto que los cánceres de pulmón tienen diversos subtipos, no hay ningún informe acerca de un marcador de tumores que sea eficaz en el descubrimiento o en el diagnóstico de todos los subtipos de cánceres de pulmón. Por lo tanto, actualmente unos efectivos marcadores de tumores se seleccionan y usan de acuerdo con cada subtipo de cáncer de pulmón.

Por ejemplo, un antígeno carcinoembrionario (CEA) o un antígeno sialil Lex-i se escoge y se usa principalmente para un adenocarcinoma pulmonar, un antígeno relacionado con un carcinoma de células escamosas (SCC) se usa para un carcinoma de células escamosas, y una enolasa específica de neuronas (NSE) se usa para un carcinoma de pulmón de células pequeñas.

5 Sin embargo, una NSE es ventajosa por el hecho de que la tasa de positivos es baja en una etapa temprana curable en un SCLC; (2) un aumento transitorio en los valores medidos es reconocido después de un tratamiento; (3) los valores medidos aumentan debido a una hemólisis durante una recogida de sangre; (4) es pequeña la diferencia en los valores medidos entre pacientes de carcinoma de pulmón de células pequeñas y personas normales; y hechos similares. Por lo tanto, no se podría afirmar necesariamente que la NSE sea un marcador efectivo de tumores para un carcinoma de  
10 pulmón de células pequeñas.

Un péptido liberador de gastrina (GRP) es un péptido de intestino y cerebro que comprende 27 aminoácidos, que fue aislado a partir de tejidos de estómago de animal porcino por McDonald y colaboradores en 1978 y que tiene un efecto favorecedor de la secreción de gastrina. La presencia de un GRP en seres humanos ha sido confirmada también y el gen que codifica el GRP humano ha sido clonado también en 1984.

15 Yamaguchi y colaboradores en el Centro Nacional del Cáncer en Japón midieron 15 o más tipos de hormonas de intestino y cerebro, que incluyen la hormona adenocorticotrópica (ACTH), calcitonina y similares, en el curso de la investigación de las características biológicas de un carcinoma de pulmón de células pequeñas, que se concibe que se deriva de células endocrinas, y explicaron que un GRP es secretado activamente a partir de linajes de células cultivadas de carcinoma de pulmón de células pequeñas, con la más alta frecuencia y la más alta concentración (documento 1 que  
20 no es de patente). Además, ellos establecieron también un inmunoensayo radiológico (RIA) combinado con un método para concentrar un GRP en sangre, y encontraron que los pacientes con un carcinoma de pulmón de células pequeñas podrían mostrar una concentración en sangre del GRP más alta en comparación con personas normales. Sin embargo, puesto que un GRP es digerido rápidamente en la sangre, su concentración en sangre es baja, y puesto que el ensayo antes mencionado requiere complicados procesos de concentración, su aplicación clínica es difícil.

25 A partir de las investigaciones realizadas después de esto, se encontró que tres especies de precursores de GRP (ProGRP) se producen empalmado ARN alternativos en diversas células (documento 2 que no es de patente). Estas tres especies de ProGRP muestran que los aminoácidos desde 1<sup>o</sup> hasta 98<sup>o</sup> en la secuencia de aminoácidos son comunes, mientras que las secuencias de aminoácidos en y después del 99<sup>o</sup> aminoácido son diferentes unas de otras, debido a un empalme alternativo de ARN. Esta parte común en la secuencia de aminoácidos desde los aminoácidos 1<sup>o</sup>  
30 hasta 98<sup>o</sup> se muestra en SEQ ID NO:1. Aquí seguidamente, a menos que se señale otra cosa distinta en particular, la numeración de los residuos de aminoácidos en los ProGRP de acuerdo con el presente invento, las secuencias parciales de aminoácidos de los mismos, los materiales digeridos y similares, se basan en la numeración de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

35 La secuencia de aminoácidos de los aminoácidos desde 1<sup>o</sup> hasta 27<sup>o</sup> en las tres especies de ProGRP es idéntica a la secuencia de aminoácidos de un GRP maduro que tiene una actividad favorecedora de la secreción de gastrina. Estas tres especies de precursores son digeridas todas ellas por enzimas de disociación de precursores de hormonas, para dar un GRP de tipo maduro que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 1-27, y un fragmento terminal de C (ProGRP-Cfrag) que es un material digerido de ProGRP que tiene una secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 31<sup>o</sup> y el resto, y que no tiene ninguna actividad favorecedora de la secreción de  
40 gastrina.

Holst y colaboradores (documento 3 que no es de patente) informaron que en un método de inmunoensayo radiológico (RIA) que usa un antisuero dirigido contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 42-53 de la secuencia de aminoácidos de un ProGRP (en lo sucesivo citado como ProGRP (42-53)), era alto el nivel de ProGRP o ProGRP-Cfrag en el plasma de los pacientes con carcinomas de pulmón de células pequeñas.  
45 Sin embargo, en este método se necesitaban unos procesos de precipitación y extracción, y la sensibilidad era insuficiente. Además, se concibe que cuando una inmunización se lleva a cabo con dicho péptido de cadena corta que comprende 11 residuos de aminoácidos, no se induce ningún anticuerpo que reconozca al epítipo conformacional de ProGRP.

Miyake y colaboradores observaron que un ProGRP es más estable en la sangre que un GRP, y que una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 31-98, que es una parte común en las tres especies de ProGRP, no muestra ninguna homología con la secuencia de aminoácidos de otras proteínas y establecieron un método de RIA altamente sensible, que no necesita ningún proceso de precipitación ni de extracción, usando un antisuero de alto título obtenido usando un péptido recombinante que comprende la misma secuencia de aminoácidos (en lo sucesivo citada como ProGRP (31-98)) como un antígeno (documento 1 que no es de patente). En este método, se mostró que un  
50 ProGRP servía como un excelente marcador de tumores de la misma manera que lo hace un GRP.

Sin embargo, aunque este método es ventajoso por no necesitar procesos de extracción, la medición requiere 4 días, y la sensibilidad es solamente de 10 pM (77,3 pg de antígeno/ml), lo cual es insuficiente. Por lo tanto, es imposible medir

el nivel de un ProGRP en el suero de una persona normal, y este método no ha sido desarrollado todavía para poder ser aplicado clínicamente.

5 Además, puesto que los métodos de RIA de Holst y colaboradores, y de Miyake y colaboradores, que antes se describen, son métodos de inhibición, sería posible una medición si solamente una fracción de un fragmento de ProGRP tiene antigenicidad. Sin embargo, la sensibilidad es más baja que la de los métodos de emparejado, y es difícil la aplicación clínica de cualquier método de medición de ProGRP que requiera una alta sensibilidad. Por lo tanto, con el fin de desarrollar a escala clínica la detección de un ProGRP es esencial aumentar la sensibilidad, y, particularmente, se necesita un anticuerpo que se pueda usar en métodos de emparejado.

10 Yamaguchi, Aoyagi y colaboradores desarrollaron, con la finalidad de aplicar clínicamente un ProGRP como un marcador de tumores para carcinomas de pulmón de células pequeñas, un reactivo conveniente y altamente sensible para medir un ProGRP usando un método de emparejado, cuyo reactivo está basado en los principios del ensayo de inmunsorbente enlazado con enzimas (ELISA, acrónimo de enzyme-linked immunosorbent assay), (documento 1 de patente). Este ensayo proporciona resultados en alrededor de 2 horas, y muestra una alta sensibilidad (de 2 pg/ml). Por lo tanto, el ensayo se usa ampliamente en el momento actual en aplicaciones clínicas, y es evidente que este ensayo muestra una sensibilidad y una especificidad más altas en comparación con el ensayo que usa la NSE con respecto al carcinoma de pulmón de células pequeñas.

20 Se encontró también que usando este ensayo, los valores de ProGRP en suero aumentaron en tumores neuroendocrinos (carcinoma medular de tiroides, etc), y en cánceres que exhiben características de un tumor neuroendocrino (carcinoma de células pequeñas del esófago, carcinoma de células pequeñas del páncreas, carcinoma de células pequeñas de la próstata, etc) así como un carcinoma de células pequeñas de pulmón. Por lo tanto se cree que el ensayo de ProGRP se puede aplicar al descubrimiento precoz del mismo o a la vigilancia de un tratamiento de pacientes con estos tumores.

25 Sin embargo, aunque la estabilidad de un ProGRP en sangre es más alta que la de un GRP, se observa más fluctuación en los valores medidos en comparación con otros marcadores de tumores corrientes. Por esta razón, hay una restricción en el método de usar un ProGRP como el objeto de detección, que consiste en que la muestra de ensayo para la medición debe de ser congelada inmediatamente después de la recogida de la sangre, y almacenada hasta el momento de la medición (documento 4 que no es de patente).

[documento 1 de patente] patente japonesa nº 3210994

[documento de patente 2] solicitud de patente japonesa abierta a examen por el público nº 6-98794

30 [documento 1 que no es de patente] Cancer Research, volumen 54, páginas 2136-2140 (1994)

[documento 2 que no es de patente] Spindel y colaboradores, Mol. Endocrinol., volumen 1, páginas 224-232 (1987)

[documento 3 que no es de patente] Holst, J. Clin. Oncol., volumen 7, páginas 1831-1838 (1989)

[documento 4 que no es de patente] Rinsho Kensa, volumen 39, páginas 981-986 (1995).

35 El documento de solicitud de patente europea EP 0811683.11 describe anticuerpos para GRP y métodos para detectarlos.

Descripción del invento

Problemas que han de ser resueltos por el invento

40 La presente divulgación ha de proporcionar un nuevo método para determinar un ProGRP, que esté libre de los problemas observados en los métodos convencionales, tales como una fluctuación en los valores medidos y restricciones operativas que implican un almacenamiento de muestras de ensayo congeladas, aunque el ProGRP sea un objeto de medición.

Medios para resolver el problema

45 El presente invento está basado en el descubrimiento de que la digestión de un ProGRP en la muestra de ensayo de sangre es mantenida establemente, y resuelve el problema arriba descrito usando un epítipo que está presente en dicho material digerido estable, como un objeto de medición. Específicamente, la divulgación proporciona lo siguiente:

- (1) Un método para determinar un precursor de un péptido liberador de gastrina y/o un material digerido del mismo, usando dos o más diferentes anticuerpos que reconocen a un péptido que comprende una secuencia parcial de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 40 hasta 75 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2.
- 5 (2) Un método para determinar un precursor de un péptido liberador de gastrina y/o un material digerido del mismo, usando dos o más diferentes anticuerpos que reconocen a un péptido que comprende una secuencia parcial de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 40 hasta 79 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2.
- (3) El método de acuerdo con (1) o (2), que es un método de ensayo inmunológico de emparejado;
- 10 (4) Un anticuerpo que se fija a un péptido que tiene una secuencia parcial que consiste en los aminoácidos 40 hasta 60 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, y no se fija a un péptido que comprende una secuencia contigua de cualesquiera 8 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2;
- (5) Un anticuerpo que se fija a un péptido que comprende una secuencia parcial que consiste en los aminoácidos 40 hasta 60 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, y no se fija a un péptido que comprende una secuencia parcial de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 31 hasta 53;
- 15 (6) El anticuerpo de acuerdo con (4) o (5), que es producido por el hibridoma 3D6-2 depositado bajo el el nº de acceso FERM BP-08669.
- (7) El hibridoma 3D6-2 depositado bajo el nº de acceso FERM BP-08669.
- (8) El método de acuerdo con (1) o (2), en el que por lo menos uno de los dos o más diferentes anticuerpos es el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (4) hasta (6).
- 20 (9) El método de acuerdo con (1) o (2), en el que por lo menos uno de los dos o más diferentes anticuerpos en el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (4) hasta (6), y el otro es un anticuerpo que reconoce a un péptido que comprende una secuencia parcial de los aminoácidos 71 hasta 75 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1.
- 25 (10) Un estuche para medir un precursor de un péptido liberador de gastrina o un material digerido del mismo, comprendiendo el estuche el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (4) hasta (6).
- (11) El estuche de acuerdo con (1) que es un estuche para diagnosticar un cáncer.

El alcance de protección está definido por las reivindicaciones

#### Efectos del invento

- 30 El método de la presente divulgación proporciona unos efectos tales que se puede obtener una sensibilidad equivalente a la de los métodos convencionales de medición, así como que es escasamente afectado al manipular la muestra de ensayo después de su recogida, y se pueden obtener unos valores medidos altamente reproducibles, y similares, tomando un epitopo identificado de nuevas en el material digerido de ProGRP que es mantenido estable incluso en una muestra de ensayo, como un objeto de medición.

#### 35 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal dirigido contra un péptido que comprende una secuencia contigua de 8 aminoácidos, que había sido sintetizado por el método de síntesis de péptidos multipin. El eje horizontal indica la secuencia contigua de 8 aminoácidos de ProGRP (31-98), mientras que el eje vertical indica la absorbencia. (A), (B) y (C) indican la reactividad de GRP-3D6-2, GRP-3G2 y GRP-2B10, respectivamente.

- 40 La Fig. 2 muestra una curva patrón para el método de medición, obtenida usando GRP-3D6-2 y GRP-2B10, que son unos anticuerpos que se fijan a un péptido parcial que consiste en los aminoácidos 40 hasta 75. El eje horizontal indica la concentración de ProGRP mientras que el eje vertical indica la absorbencia.

Mejor método para llevar a cabo el invento

La presente divulgación se dirige al uso de un epítipo presente en un material digerido de ProGRP (ProGRP-Cdel) en una muestra de ensayo, que tiene una estabilidad en almacenamiento en la sangre más alta en comparación con un ProGRP o ProGRP-Cfrag, como un objeto de un método inmunológico de medición.

- 5 Este ProGRP-Cdel es un péptido que tiene una longitud de cadena más corta, que resulta de la deleción de varios residuos de aminoácidos desde el terminal de C de ProGRP-Cfrag, que es el objeto de medición en métodos convencionales, y es un péptido que contiene un epítipo que reside dentro de los aminoácidos 40 hasta 75 de un ProGRP. Se sospecha que el ProGRP-Cdel se genera cuando el lado terminal de cualesquiera residuos entre los residuos de aminoácidos 75 hasta 83 de ProGRP ha sido disociado por una proteasa presente en la sangre.
- 10 Con respecto a este ProGRP-Cdel, su estructura se examinó usando un aparato de análisis de masas y se confirmó que el Lys 79<sup>o</sup> había sido disociado en el lado terminal de C. Por lo tanto, el ProGRP-Cdel es también un péptido que contiene un epítipo que reside dentro de los residuos de aminoácidos 40 hasta 79 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, y por lo tanto se puede usar también en los presentes métodos un anticuerpo que reconoce a dicho epítipo.
- 15 La diferencia en cuanto a la estructura entre el ProGRP-Cdel y el ProGRP-Cfrag es meramente la presencia o ausencia de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos en el lado terminal de C, pero la importancia de estos fragmentos como una proteína objetivo para determinar inmunológicamente un ProGRP o un material digerido del mismo, es grandemente diferente. En métodos convencionales, se usa un anticuerpo que reconoce a la parte antes mencionada, de aproximadamente 20 residuos en el lado terminal de C. Por lo tanto, este anticuerpo no puede reconocer ahora ni
- 20 capturar un ProGRP-Cdel que ha perdido esa parte. El proceso de disociación de esta parte en el lado terminal de C es afectado por la muestra de ensayo propiamente dicha, o por la condición de almacenamiento o el período de almacenamiento después de la recogida de la muestra de ensayo, y se sospecha que ésta es la causa por la que las señales de detección son afectadas por la condición de almacenamiento de una muestra de ensayo o el período de almacenamiento en métodos convencionales.
- 25 Mientras tanto, la presente divulgación ha de usar un anticuerpo que reconoce al epítipo que reside en un ProGRP-Cdel; por lo tanto incluso si un ProGRP o ProGRP-Cfrag está presente en la muestra de ensayo o incluso si se realiza una disociación de esa parte, el anticuerpo puede reconocer establemente a un ProGRP o a un material digerido del mismo. Correspondientemente, la señal de detección es menos afectada por la condición de almacenamiento de la muestra de ensayo o el período de almacenamiento y se hace posible una medición altamente reproducible.
- 30 La presente divulgación comprende un método para detectar un ProGRP o un material digerido del mismo de acuerdo con un método de análisis inmunológico de emparedado, usando diferentes anticuerpos, que se seleccionan entre los anticuerpos que pueden reconocer al epítipo presente en el péptido que tiene una secuencia de los aminoácidos 40 hasta 75 de ProGRP (ProGRP(40-75)) y que independientemente reconoce a dos o más diferentes epítipos que están presentes en un ProGRP(40-75), de manera tal que se emplea un epítipo de ProGRP-Cdel como el objeto de
- 35 determinación.

También se divulga un método para detectar un ProGRP o un material digerido del mismo de acuerdo con un método de análisis inmunológico de emparedado, usando diferentes anticuerpos que se seleccionan entre los anticuerpos que pueden reconocer el epítipo presente en el péptido que tiene una secuencia de los aminoácidos 40 hasta 79 de ProGRP (ProGRP(49-79)) y que independientemente reconocen a dos o más diferentes epítipos que están presentes

40 en un ProGRP(40-79).

En particular, es preferible usar un método de análisis inmunológico de emparedado, que no implica al anticuerpo para reconocer al epítipo en la secuencia parcial del terminal de C que ha sido eliminado por disociación a partir de un ProGRP-Cfrag pero implica solamente el anticuerpo para reconocer el epítipo situado en un ProGRP-Cdel.

45 La operación fundamental de un ELISA de emparedado se puede realizar de acuerdo con un método descrito en "Ultrasensitive Immunoassay" [ensayo inmunológico ultrasensible] (Eiji ISHIKAWA, Japan Scientific Societies Press (1993)) o otros diversos manuales para técnicas experimentales. Se concibe que la implementación del presente invento no contiene ninguna operación especial, pero el presente invento se puede llevar a cabo por el siguiente proceso.

Específicamente, un ProGRP o un material digerido del mismo puede ser detectado de acuerdo con un método para determinación, que comprende las etapas de: (1) hacer reaccionar un primer anticuerpo que se fija a un ProGRP(40-75) y/o ProGRP(0-79), con un ProGRP o un material digerido del mismo en una muestra de ensayo; (2) hacer reaccionar el ProGRP o un material digerido del mismo que ha sido capturado por el anticuerpo, con un segundo anticuerpo que es diferente del anticuerpo de la etapa (1) pero que se fija a un ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79); y (3) detectar el complejo inmunitario generado en la etapa (2).

50

Con respecto al anticuerpo que se fija a un ProGRP o a un material digerido del mismo, es preferible seleccionar el uso de solamente un anticuerpo que se fija a un ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79) pero otros anticuerpos distintos de dichos anticuerpos pueden estar contenidos en el sistema de determinación, dentro del intervalo en el que se pueden reproducir en alto grado los valores medidos.

5 Una combinación particularmente preferida de anticuerpos es una combinación de un anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 que reconoce a la secuencia de los aminoácidos 40 hasta 60 de ProGRP, y un anticuerpo monoclonal GRP-2B10 que reconoce a la secuencia de los aminoácidos 71 hasta 75 de ProGRP. El anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 reconoce a la secuencia de los aminoácidos 40 hasta 60 de la secuencia de aminoácidos de un ProGRP, pero no reconoce al mismo tiempo a un péptido que comprende una secuencia contigua de cualesquiera 8 aminoácidos en la misma  
10 secuencia de aminoácidos. A la vista de esto, se concibe que el anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 es un anticuerpo que reconoce al epítipo conformacional que tiene una secuencia de los aminoácidos 40 hasta 60 de la secuencia de aminoácidos de un ProGRP. Se supone que el anticuerpo monoclonal GRP-2B10 reconoce al epítipo de secuencia que se compone de los residuos de aminoácidos 71 hasta 75.

15 El ensayo que usa dos tipos de anticuerpos monoclonales, como antes se han descrito, puede detectar 4,5 pg de un ProGRP/ml. Este valor es casi igual a las sensibilidades de los métodos convencionales que usan anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales para determinar un ProGRP(31-98), e indica una sensibilidad que se puede usar de manera suficiente en la determinación de la concentración de un ProGRP en la sangre procedente de una persona normal.

20 Los anticuerpos usados se pueden obtener inmunizando animales de laboratorio tales como ratones, ratas, cobayas, conejos, pollos, cabras, ovejas y animales bovinos. Para el antígeno usado en una inmunización, aunque es preferible usar un ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79), se puede usar también el péptido de ProGRP(31-98), y se pueden obtener unos deseados anticuerpos efectuando la selección con el uso de un ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79) después de una inmunización.

25 El método de inmunizar a un animal será descrito tomando el ejemplo de un ratón. El péptido de ProGRP(31-98) o similar se mezcla con un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund o TiterMax Gold (CytRx Corp.), en una relación de 1:1, y se hace pasar repetidamente a través de una junta que comprende dos jeringas unidas en una junta de flujo cruzado o se somete a ultrasonidos para formar una emulsión. La emulsión que contiene un antígeno, preparada de esta manera, es inyectada por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal, o en sitios múltiples. Después de la compleción de la primera inmunización, se puede realizar una inmunización de refuerzo de la  
30 misma manera en un intervalo de 1 hasta 4 semanas. Después de esto, se continúa la inmunización de la misma manera, hasta que aumente el título de anticuerpo del anticuerpo dirigido contra ProGRP(31-98) en la sangre.

El título de anticuerpo se puede determinar de la siguiente manera.

35 Un ProGRP(31-98) se disuelve en una PBS (solución salina tamponada con fosfato) en una concentración de 1 µg/ml, y se añaden 50 µl de la solución a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos, y este péptido se adsorbe durante una noche a 4°C. Cada pocillo se usa para un ensayo después de haber sido lavado con una PBS que contiene 0,05 % de Tween 20 (PBS-T). Antes del ensayo, se puede realizar un bloqueo con una PBS que contiene 1 % de BSA (albúmina de suero bovino) o similar. Se recoge en la sangre a partir del plexo venoso orbital, de la vena caudal, de la arteria caudal o similares, diluida a 30 veces con una PBS-T y luego centrifugada. El material sobrenadante obtenido es  
40 preparado como una serie de diluciones con una PBS-T, y se añaden 50 µl de cada una de ellas a cada pocillo de una placa de microtitulación que está revestida con una ProGRP(31-98). Cada pocillo se incuba adicionalmente a la temperatura ambiente durante 30 minutos, y luego la placa se lava con una PBS-T, se añaden a cada pocillo 50 µl de una solución de IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP), que se ha diluido apropiadamente con una PBS-T. Cada uno de los pocillos se incuba adicionalmente a la temperatura ambiente durante 30 minutos, subsiguientemente se añade a cada pocillo una solución de sustrato que contiene peróxido de hidrógeno y orto-  
45 fenilendiamina, y luego se incuba durante 30 minutos. Se añaden 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N para detener la reacción, y se mide la absorbencia de cada pocillo.

Después de haber confirmado que el título de anticuerpo contra un ProGRP ha aumentado suficientemente en el ratón inmunizado, se extrae el bazo y se aíslan las células del bazo. Estas células son fusionadas con células de mieloma de ratón, cultivadas por separado (por ejemplo, SP2/0-Ag14, etc.) usando un poli(etilenglicol) o similares. Las células fusionadas con éxito se cultivan selectivamente en un medio HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina). Se continúa la  
50 cultivación mientras que se intercambia la mitad de la cantidad del medio cada cierto tiempo durante aproximadamente 7 a 14 días, y luego se mide el título de anticuerpo del material sobrenadante de cultivo. Las células de pocillos positivos son clonadas por el método de dilución limitadora, para obtener hibridomas que producen el deseado anticuerpo. Como un hibridoma obtenido por el método antes descrito, se pueden mencionar el 3D6-2 (número de acceso FERM BP8669) y el ProGRP-2B10 (número de acceso FERM-BP4110).  
55

Analizando el epítipo del anticuerpo obtenido por el método antes descrito, se puede adquirir un anticuerpo que reconoce y se fija al epítipo presente en un ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79). El análisis de los epítopos se puede llevar a cabo examinando la reacción del anticuerpo dirigido contra un ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79). Esto se

determina revistiendo una placa de microtitulación con un ProGRP(31-98) o ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79) que ha sido expresado por vía recombinante, o con un ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79) que ha sido sintetizado por vía química por el método de Fmoc o por el método de Boc, y examinando la reacción concerniente a cada péptido por el método de ensayo inmunológico que antes se ha descrito. Además, el epítipo presente en un péptido que comprende aproximadamente 8 hasta 12 aminoácidos consecutivos de un ProGRP se puede determinar usando un péptido sintetizado por el método de síntesis de péptidos multipin.

También es posible inmovilizar el anticuerpo dentro de la fase sólida, o marcar el anticuerpo. Los respectivos procesos se pueden realizar de acuerdo con los métodos descritos en diversos manuales para técnicas experimentales, y no se necesitaría particularmente ninguna operación especial al implementar el presente invento.

Además del método antes descrito, la presente divulgación proporciona también un estuche para determinar un ProGRP o un material digerido del mismo en una muestra de ensayo, y particularmente un estuche con un agente de diagnóstico para diagnosticar un carcinoma de pulmón de células pequeñas o para vigilar la quimioterapia por determinación de un ProGRP o de un material digerido del mismo. Dicho estucha comprende por lo menos dos anticuerpos que reconocen al epítipo presente en los ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79) antes descritos, y puede comprender también uno cualquiera entre una solución de reacción, un diluyente de un segundo anticuerpo, una sustancia patrón de ProGRP, instrucciones y otros constituyentes. Ejemplos preferidos del anticuerpo contenido en el estuche incluyen un anticuerpo que reconoce al epítipo presente en un ProGRP(40-75) y/o ProGRP(40-79), pero no reconoce a un péptido que comprende cualesquiera 8 residuos de aminoácidos consecutivos presentes en el mismo péptido, y un anticuerpo que reconoce a la secuencia de los aminoácidos 71 hasta 75 de un ProGRP y unos ejemplos representativos incluyen el anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 y el anticuerpo monoclonal GRP-2B10.

Seguidamente, el presente invento será explicado por medio de Ejemplos.

#### EJEMPLO 1

##### Preparación de un hibridoma

Se preparó un recombinante por el método descrito en el Ejemplo 1 de la patente japonesa nº 3210994. y se purificó un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4, que era expresada por Escherichia coli. En el Ejemplo 1 de esta patente japonesa nº 3210994, se describió que esta proteína recombinante era un GRP(31-98), pero realmente es la parte (31-98) de un precursor de GRP (ProGRP), y por lo tanto será descrita aquí como ProGRP(31-98). Subsiguientemente, el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal del presente invento se obtuvo por el método descrito en el Ejemplo 6 de esta patente japonesa 3210994.

El hibridoma 3D6-2 (FERM BP-8669) obtenido se ha depositado en el Depositario de Organismos de Patentes Internacionales en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas el 23 de Marzo de 2004 y los proGRP-2B10 (FERM BP-4110) y proGRP-3G2 (FERM BP-4109) se han depositado en el Instituto de Investigación de Fermentación (actualmente el Depositario de Organismos de Patentes Internacionales en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas) el 9 de Diciembre de 1992.

El hibridoma obtenido fue trasplantado dentro de la cavidad peritoneal de un ratón que había sido tratado con pristane o compuestos similares, se recuperó el ascites, y los respectivos anticuerpos monoclonales se recuperaron a partir de este ascites usando una columna con Sepharose fijado a la Proteína A. El anticuerpo monoclonal obtenido a partir del hibridoma 3D6-2 (FERM BP-8669) fue designado como GRP-3D6-2.

#### EJEMPLO 2

##### Análisis de epítipos de un anticuerpo monoclonal

##### (1) Síntesis de un péptido y determinación de un epítipo

La secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos de ProGRP(31-98) se muestran en SEQ ID NO: 3. De acuerdo con esta secuencia de aminoácidos, se sintetizó un péptido parcial de ProGRP(31-98) por el método de Fmoc. El Pep1 es un péptido que tiene la secuencia de los aminoácidos 31 hasta 52 de ProGRP, el Pep 70 es un péptido que tiene la secuencia de los aminoácidos 40 hasta 60, el Pep3 es un péptido que tiene la secuencia de los aminoácidos 54 hasta 78, el Epi2 es un péptido que tiene la secuencia de los aminoácidos 70 hasta 90, y el Pep5 es un péptido que tiene la secuencia de los aminoácidos 82 hasta 96. Los péptidos sintetizados fueron purificados por una cromatografía de fase inversa o por una combinación de una cromatografía de fase interna y una filtración en gel. La pureza después de la purificación era de 80 % o más alta.

Cada uno de los péptidos fue diluido en una PBS a una concentración de 1 µg/ml, y se añadieron 200 µl de cada una de las soluciones de péptido a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos, y cada pocillo se incubó durante una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lavó dos veces con una PBS y se añadió a cada pocillo una PBS que contenía 1% de BSA. La placa se incubó a la temperatura ambiente durante 2 horas, y la PBS que contenía 1 % de BSA se retiró por aspiración. El anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 diluido a una concentración 1 µg/ml se añadió a cada

pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l en cada caso, y cada pocillo se incubó a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Subsiguientemente, la placa se lavó 5 veces con una PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (PBS-T), se añadieron luego a cada pocillo 100  $\mu$ l de una solución del anticuerpo IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP), y cada uno de los pocillos se incubó a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con PBS-T, y luego se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de una solución de sustrato (solución del tampón de fosfato con citrato 0,1 M, que contenía 2 mg/ml de orto-fenilendiamina y 0,9  $\mu$ l/ml de una solución acuosa al 30 % de peróxido de hidrógeno, pH 5,0). Cada uno de los pocillos se incubó a la temperatura ambiente durante 30 minutos, y luego se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de cada una de las soluciones de ácido sulfúrico 2 N para detener la reacción. Inmediatamente se midió la absorbencia a 492 nm, y los resultados se muestran en la Tabla 1.

10 Tabla 1

Péptido	a.a. nº	OD <sub>492/630</sub>
Pep 1	31-52	0,003
Pep 70	40-60	0,822
Pep 3	54-78	0,003
Epi 2	70-90	0,004
Pep 5	82-96	0,002
ProGRP	31-98	2,236

\* a.a. = abreviatura de aminoácidos

OD = abreviatura de densidad óptica

15

El anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 reaccionó para formar un ProGRP(31-98) recombinante, que era un testigo positivo, y Pep70, que era la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 40 hasta 60 de un ProGRP. A la vista de esto, se encontró que el GRP-3D6-2 reconoce a la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 40 hasta 60 de ProGRP. Además, de una manera similar, se encontró que el GRP-2B10 reacciona para formar los péptidos Pep3 y Epi2, y el GRP-3G2 reacciona para formar los péptidos Epi2 y Pep5.

20

(2) Síntesis de péptidos multipin y determinación de un epítipo.

Basándose en la secuencia de aminoácidos de un ProGRP(31-98), 61 péptidos que comprendían 8 aminoácidos consecutivos con un aminoácido solapado en cada péptido, se sintetizaron por el método de síntesis de péptidos multipin. Cada péptido se conjugó con biotina en los extremos terminales y la síntesis fue realizada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japón, Osaka) a petición.

25

Cada uno de los péptidos biotinilados que se sintetizaron por el método de síntesis de péptidos multipin fue disuelto en dimetilformamida, y la solución se diluyó con una PBS a una concentración de 1  $\mu$ g/ml. 100  $\mu$ l de esta solución diluida de un péptido biotinilado se añadió a la avidina que revestía a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos, y cada uno de los pocillos se incubó durante una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lavó con una PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (PBS-T), y luego se añadieron a cada uno de los pocillos 100  $\mu$ l de cada una de las soluciones de los anticuerpos monoclonales GRP-3D6-2, GRP-3G2 y GRP-2B10, diluidos respectivamente a 1  $\mu$ g/ml. Después de una incubación a la temperatura ambiente durante 30 minutos, cada uno de los pocillos se lavó 5 veces con una PBS-T, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de una solución de anticuerpo IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Cada pocillo se incubó adicionalmente durante 30 minutos a la temperatura ambiente, y luego cada uno de los pocillos se lavó 5 veces con una PBS-T. Se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de una solución de sustrato (solución de tampón de fosfato con citrato 0,1 M, que contenía 2 mg/ml de orto-fenilendiamina y 0,9  $\mu$ l/ml de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %, de pH 5,0). Cada uno de los pocillos se incubó a la temperatura ambiente durante 30 minutos, y luego se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de cada una de las soluciones de ácido sulfúrico 2 N para detener la reacción. Inmediatamente, la absorbencia se midió a 492 nm. Las respectivas reacciones de los anticuerpos monoclonales GRP-3D6-2, GRP-3G2 y GRP-2B10 contra los respectivos péptidos situados dentro de ProGRP(31-98) se muestran en las Figs. 1(A), 1(B) y 1(C).

30

35

40

Como se muestra en la Fig. 1 (A), el anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 no se fija a los péptidos que comprenden 8 aminoácidos consecutivos dentro de ProGRP(31-98). Se cree que esto es debido a que el GPR-3D6-2 no reconoce a los péptidos que comprenden 8 aminoácidos consecutivos de ProGRP, y reconoce a un epítipo conformacional preparado a partir de un péptido que comprende un tramo más largo que 8 aminoácidos. Por otro lado, el anticuerpo monoclonal GRP-3G2 se fijó a cuatro péptidos que comprenden 8 aminoácidos consecutivos, tales como los aminoácidos 81 hasta 88, 82 hasta 89, 83 hasta 90 y 84 hasta 91. Se concibe que el anticuerpo monoclonal GRP-3G2 reconoce al péptido de los aminoácidos 84 hasta 88, que es una secuencia presente en estos cuatro péptidos (Fig. 1(B)). Además el anticuerpo monoclonal GRP-2B10 se fijaba a cuatro péptidos que comprendían 8 aminoácidos consecutivos, tales como los aminoácidos 68 hasta 75, 69 hasta 76, 70 hasta 77 y 71 hasta 78. Por esta razón se concibe que el anticuerpo monoclonal GRP-2B10 reconoce al péptido de los aminoácidos 71 hasta 75, que es una secuencia presente en estos cuatro péptidos (Fig. 1(C)).

50

A la vista de los resultados de los análisis de epítomos usando estos péptidos, el epítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal GRP-3G2 o por el anticuerpo monoclonal GRP-2B10 está formado por 5 residuos de aminoácidos consecutivos.

- 5 Además, el anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 reconoce a un péptido de por lo menos la parte que comprende los aminoácidos 40 hasta 60 de un ProGRP(31-98), y no se fija a un péptido que comprende 8 aminoácidos consecutivos dentro de la secuencia de aminoácidos de un ProGRP(31-98). En otras palabras, se concibe que el GPR-3D6-2 reconoce a un epítomo conformacional que está formado en la secuencia de aminoácidos de por lo menos los aminoácidos 40 hasta 60 de ProGRP(31-98), pero no está formado en péptidos que comprenden cada uno 8 aminoácidos consecutivos.
- 10 Un resumen de las relaciones de los epítomos reconocidos por los anticuerpo monoclonales que antes se ha descrito se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Anticuerpo monoclonal	Epítomo (aminoácido nº...de ProGRP)
GRP-3G2	84-88
GRP-2B10	71-75
GRP-3D6-2	40-60

## EJEMPLO 3

- 15 Examen de la estabilidad en almacenamiento de una muestra de ensayo, conseguida por combinación de anticuerpos monoclonales.

A cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos se le añadieron uno o dos anticuerpos monoclonales (en el caso de dos especies, una mezcla de iguales cantidades) en unos volúmenes de 100 µl en una concentración de 4 µg/ml, y se inmovilizaron por incubación durante una noche a 4°C. La microplaca se lavó dos veces con una solución tamponadora de fosfato 10 mM que contenía 0,15 M de NaCl (de pH 7,3), y luego se bloqueó añadiendo 350 µl de una solución de bloqueo (una solución tamponadora de fosfato 10 mM que contenía 0,5 % de caseína sódica, de pH 7,1) y dejando reposar durante 2 horas. Después de haber retirado la solución de bloqueo, se añadieron a cada pocillo 100 µl de la solución de reacción y 50 µl de la muestra de ensayo que se había de determinar, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de haber lavado 5 veces con una solución de lavado (una solución de tampón fosfato 10 mM que contenía 0,05 % de Tween 20, de pH 7,3); se añadieron 100 µl de una solución de uno o dos tipos de anticuerpos monoclonales marcados con HRP (en el caso de dos especies, una mezcla de cantidades iguales) y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Después de haber lavado 5 veces con la solución de lavado, se añadieron 100 µl de una solución de sustrato (una solución de tampón fosfato con citrato 0,1 M que contenía 2 mg/ml de orto-fenilendiamina y 0,9 µl/ml de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30 %, pH al 5,0). Cada uno de los pocillos se incubó durante 30 minutos, y luego se añadieron 100 µl de cada una de las soluciones de ácido sulfúrico 2 N para detener la reacción enzimática. Inmediatamente, se midió la absorbencia a 492 nm (longitud de onda de referencia: 630 nm) con un lector de microplacas.

Usando este método de medición, tres muestras de ensayo se dividieron respectivamente en una muestra almacenada en estado congelado a -20°C y una muestra almacenada a la temperatura ambiente durante 17 horas, para la medición. El valor de ProGRP de la muestra almacenada en estado congelado se ajustó como testigo (100 %), y los valores medidos de las muestras almacenadas a la temperatura ambiente durante 17 horas se indicaron en porcentaje (Tabla 3). Cuando las combinaciones de un anticuerpo inmovilizado y de un anticuerpo marcado fueron las de GRP-3G2 y GRP-2B10, GRP-3G2 y GRP-3D6-2, GRP-3G2 y GRP-2B10/GRP-3D6-2, respectivamente, las actividades inmunológicas de ProGRP en las muestras de ensayo almacenadas durante 17 horas fueron disminuidas en un promedio a 69,6 %, 70,6 % y 69,2 %, respectivamente. También, en el caso de GRP-3G2/GRP-2B10 y de un anticuerpo monoclonal, que es una combinación de un anticuerpo inmovilizado y de un anticuerpo marcado de acuerdo con métodos convencionales, el valor disminuyó a 71,8 %. Por otro lado, en el caso de usar GRP-3D6-2 para el anticuerpo inmovilizado y GRP-2B10 para el anticuerpo marcado, incluso después de haber almacenado a la temperatura ambiente durante 17 horas, el valor medido fue de 89,3 % en promedio, y se mantuvo la actividad inmunológica de ProGRP que era aproximadamente 20 % más alta que las otras combinaciones de anticuerpos (Tabla 3). Además, el anticuerpo monoclonal usado fue uno que se había adquirido en el método descrito en el Ejemplo 8 de la patente japonesa nº 3210994.

Tabla 3

Muestra nº	Fase sólida	GRP-3G2	GRP-3G2	GRP-3G2	GRP-3D6-2	GRP-3G2 GRP-2B10
	Conjugado	GRP-2B10	GRP-3D6-2	GRP-2B10 /GRP-3D6-2	GRP-2B10	Anticuerpo monoclonal
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
	Recuperación media %	69,6	70,6	69,2	89,3	71,8

## EJEMPLO 4

Método de determinación usando un anticuerpo que se fija a ProGRP(40-75)

- 5 A cada uno de los pocillos de una microplaca de 96 pocillos, se añadió el GRP-3D6-2 en un volumen de 200 µl en una concentración de 4 µg/ml, y la microplaca se incubó durante una noche a 4°C. La microplaca se lavó dos veces con una solución de tampón fosfato 10 mM que contenía 0,15 M de NaCl (de pH 7,3), y luego se bloqueó añadiendo 350 µl de una solución de bloqueo (una solución de tampón fosfato 10 mM que contenía 0,5 % de caseína sódica, de pH 7,1) y luego dejándola reposar durante 2 horas. Después de haber retirado la solución de bloqueo, se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µl de la solución de reacción y 100 µl de la muestra de ensayo que se había de determinar, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de haber lavado 5 veces con una solución de lavado (una solución de tampón fosfato 10 mM que contiene 0,05 % de Tween 20, de pH 7,3), se añadieron 200 µl de una solución de GRP-2B10 marcado con HRP y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Después de haber lavado 5 veces con la solución de lavado, se añadieron 200 µl de una solución de sustrato (solución de tampón fosfato con citrato 0,1 M que contenía 2 mg/ml de orto-fenilendiamina y 0,9 µl/ml de una solución acuosa al 30 % de peróxido de hidrógeno, de pH 5,0). Cada uno de los pocillos se incubó durante 30 minutos, y luego se añadieron 50 µl de ácido sulfúrico 5 N para detener la reacción enzimática. Inmediatamente, se midió la absorbencia a 492 nm (longitud de onda de referencia: 630 nm) con un lector de microplacas. La curva patrón se muestra en la Fig. 2.

- 20 A la vista de esta curva patrón, se cree que se pueden detectar aproximadamente 4,5 pg/ml de un ProGRP. La sensibilidad en este ensayo es suficiente para detectar la cantidad del ProGRP en la muestra procedente de una persona sana.

## EJEMPLO DE ENSAYO 1

- 25 Usando un método convencional y el método de ensayo del Ejemplo 4, cinco muestras de ensayo se almacenaron durante 1, 3 y 7 días a 4°C, y luego se midieron las reactividades inmunológicas de ProGRP en las muestras de ensayo y se compararon con los valores medidos en las mismas muestras antes del almacenamiento. El método convencional se llevó a cabo de la siguiente manera. A cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos se le añadieron 100 µl de GRP-3G2 y de GRP-2B10 (una mezcla de cantidades iguales) en una concentración de 10 µg/ml, y se inmovilizaron por incubación durante una noche a 4°C. La microplaca se lavó dos veces con una solución de tampón fosfato 10 mM que contenía 0,15 M de NaCl (de pH 7,3), y luego se bloqueó añadiendo 350 µl de una solución de bloqueo (solución de tampón fosfato 10 mM que contiene 0,5% de caseína sódica, de pH 7,1) y dejando reposar durante 2 horas. Después de haber retirado la solución de bloqueo, se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µl de la solución de reacción y 50 µl de la muestra de ensayo, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de haber lavado 5 veces con una solución de lavado (solución de tampón fosfato 10 mM que contenía 0,05 % de Tween 20, de pH 7,3), se añadieron 100 µl de una solución de anticuerpo monoclonal marcado con HRP y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Después de haber lavado 5 veces con la solución de lavado, se añadieron 100 µl de una solución de sustrato (solución de tampón fosfato y citrato 0,1 M que contenía 2 mg/ml de orto-fenilendiamina y 0,9 µl/ml de una solución acuosa al 30 % de peróxido de hidrógeno, de pH 5,0), cada uno de los pocillos se incubó durante 30 minutos, y luego se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico 2 N para detener la reacción enzimática. Inmediatamente, se midió la absorbencia a 492 nm (longitud de onda de referencia: 630 nm) con un lector de microplacas.

- 40 El valor de ProGRP medido antes de almacenar a 4°C fue ajustado como 100 %, y los valores medidos después de los respectivos periodos de almacenamiento se indicaron en porcentaje. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

- 45 En el caso del método convencional, los valores medidos para un ProGRP en las muestras de ensayo fueron de 94,5 % en promedio después de un período de almacenamiento de 1 día a 4°C, de 85,8 % en promedio después de un período de almacenamiento de 3 días, y de 67,8 % en promedio después de un período de almacenamiento de 7 días, y por lo tanto la actividad tendía a disminuir en aproximadamente 4,93 % en promedio por día. Por el otro lado, en el método de ensayo del presente invento, los valores medidos para un ProGRP en las muestras de ensayo fueron de 96,9 % en promedio después de un período de almacenamiento de 1 día a 4°C, de 94,3 % en promedio después de un período de

almacenamiento de 3 días, y de 86,9 % en promedio después de un período de almacenamiento de 7 días, y por lo tanto la actividad tendía a disminuir en aproximadamente 2,29 % en promedio por día. Esto quiere decir que el método de ensayo del presente invento mostró una estabilidad en almacenamiento que era 2,15 veces más alta que la del método convencional, y particularmente después de un período de almacenamiento de 7 días, la reactividad inmunológica de ProGRP se mantuvo como aproximadamente 19 % más alta que la del método convencional.

Tabla 4

		Método convencional			El presente invento		
Fase sólida		GRP-2B10&GRP-3G2			GRP-3D6-2		
Conjugado		/Anticuerpo policlonal			/GRP-2B10		
Período de almacenamiento		1 día	3 días	7 días	1 día	3 días	7 días
Muestra nº	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
	1.029	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
Promedio, %		94,5	85,8	67,8	96,9	94,3	86,9

## EJEMPLO DE ENSAYO 2

Se realizó un análisis de los epítomos que son reconocidos respectivamente por los anticuerpos monoclonales GRP-3G2, GRP-2B10 y GRP-3D6-2 que se pueden usar en el presente invento.

Un péptido que tenía una secuencia de los aminoácidos 31 hasta 53 de un ProGRP fue sintetizado por el método de Fmoc. El péptido sintetizado se purificó por una cromatografía de fase inversa, o por una combinación de una cromatografía de fase inversa y una filtración en gel. Los respectivos péptidos, que incluían el péptido usado en el Ejemplo 2, se disolvieron en 0,1 % de TFA y se diluyeron con una PBS hasta llegar a una concentración de 10 µg/ml. A cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos se le añadieron 100 µl de cada una de las diluciones en cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos, y se dejaron durante una noche a 4°C para realizar una adsorción. Cada pocillo se lavó dos veces con una PBS, se añadió a cada pocillo una PBS que contenía 1 % de BSA, la placa se incubó a la temperatura ambiente durante 2 horas, y luego la solución tampón se retiró por aspiración. Se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µl de los anticuerpos monoclonales GRP-3G2, GRP-2B10 y GRP-3D6-2, diluidos respectivamente a una concentración de 5 µg/ml. Cada uno de los pocillos se incubó a la temperatura ambiente durante 85 minutos, y luego la placa se lavó 5 veces con una PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (PBS-T). Se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µl de una solución de IgG anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP), apropiadamente diluida con una PBS-T, y cada pocillo se incubó adicionalmente a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de haber lavado la placa 5 veces con una PBS-T, se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µl de una solución de sustrato (una solución de tampón de fosfato con citrato 0,1 M que contenía 2 mg/ml de orto-fenilen diamina y 0,9 µl/ml de una solución acuosa al 30 % de peróxido de hidrógeno, de pH 5,0), cada pocillo se incubó a la temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se añadieron 100 µl de cada una de las soluciones de ácido sulfúrico 2 N para detener la reacción. Inmediatamente se midió la absorbencia a 402 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Péptido	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

A la vista de la Tabla 5, los epítomos que son reactivos con GRP-3G2, GRP-2B10 y GRP-3D6-2 muestran casi los mismos resultados que los mostrados en el Ejemplo 2, y se confirmó que puesto que el GRP-3D6-2 no se fija completamente a la secuencia de los aminoácidos 31 hasta 53, tampoco se fija al péptido con las secuencias de aminoácidos 42 hasta 53.

## EJEMPLO DE ENSAYO 3

La identificación de ProGRP-Cdel se realizó usando un aparato de análisis de masas (LC-MS/MS). Un anticuerpo policlonal de conejo que exhibía actividad para diversos péptidos en la región de un ProGRP(31-98) se disolvió en una PBS en una concentración de 12,7 mg/ml, y se fijó a 3 ml de NHS-Sepharose (Amersham PLC.) de acuerdo con el manual de los usuarios.

5 A 1,5 ml de dos sueros humanos se les añadieron 20 µg de un ProGRP(31-98) recombinante y se mantuvieron a la temperatura ambiente durante 24 horas. Después de esto, se añadieron 0,4 ml de la Sepharose fijada a un anticuerpo policlonal de conejo, que antes se ha mencionado, y la mezcla se agitó durante 60 minutos a la temperatura ambiente. Esta Sepharose fijada a un anticuerpo policlonal de conejo se separó por lavado con una solución de lavado (solución de tampón fosfato 10 mM que contenía 0,05 % de Tween 20, de pH 7,3), y se añadieron 0,5 ml de una solución de urea 9,5 M, y la sustancia fijada al Sepharose fijado al anticuerpo policlonal de conejo se separó por elución. El material eluido se recuperó y, luego, el péptido mantenido de la región de ProGRP(31-98) en este material eluido se examinó usando un LC-MS/MS.

10 Se añadió 1 µl de 250 mM del éster de metil-PEO<sub>4</sub>-NHS (Pierce LLC) /DMSO a 100 µl del material eluido, y la mezcla se incubó a la temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron 5 µl de Tris-HCl 1 M (de pH 8) y la mezcla se incubó a la temperatura ambiente durante 30 minutos para detener la reacción. Subsiguientemente, se añadieron 800 µl de acetona para precipitar la proteína. Después de haber centrifugado, los sedimentos fueron secados, y se les añadieron 15 µl de una solución de tripsina modificada procedente de Promega Corp. (20 ng/µl/hidrógeno carbonato de amonio 50 mM) para digerir la proteína durante una noche a 30°C. Después de la digestión, se añadieron a la muestra 15 µl de ácido fórmico al 0,1 %, y la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 15.000 rpm. 5 µl del material sobrenadante  
15 obtenido de esta manera se sometieron a un análisis por LC-MS/MS {(parte de LC) sistema capilar LC serie Agilent 1100, (columna) Agilent Zorbax SB-C18, 5 µm, 150 x 0,5 mm, (MS/MS) Bruker Daltonics HCT-plus}. La separación se realizó en la presencia de ácido fórmico al 0,1 %, el caudal era de 15 µl/min, y se realizó el gradiente de acetonitrilo con 0-35 % lineal/0-120 min, 35-95 % lineal/120-125 min. El material eluido de la columna fue introducido en la parte de ESI, y se consiguieron los datos de MS/MS. Una lista de picos fue preparada con un sistema lógico software de análisis de  
20 datos, y el análisis se realizó usando un servidor MASCOT de Matrix Science, Ltd.

25 El metil-PEO<sub>4</sub>-NHS tenía la propiedad de modificar al grupo amino terminal de N y al grupo amino de cadena lateral de la lisina en la molécula de proteína. Por lo tanto, si hay algún fragmento de péptido descubierto que tenga un grupo amino terminal de N marcado, éste se puede considerar como que ha estado en un estado libre en el terminal de N antes de la digestión con tripsina. Por lo tanto, puesto que la digestión con tripsina no se realiza en el sitio de lisina con un grupo amino de cadena lateral marcado, si está marcada una cadena lateral de lisina en el terminal de C, esta proteína ya ha sido disociada en esta parte antes de la digestión con tripsina. En ambas muestras de sueros humanos se encontró el NHQPPQPK (72-79) como el fragmento con lisina terminal de C marcada. Correspondientemente, se concibe que un fragmento disociado a partir de por lo menos el lado terminal de C de Lys-79 se había generado por el  
30 tratamiento con suero. Además, aunque el lado terminal de N de no estaba marcado, se observó un fragmento SVSER (37-41) en ambas muestras de sueros humanos. Por lo tanto, se sugirió la posibilidad de la disociación en el lado terminal de C de Ser-36.

#### Aplicabilidad industrial

35 El método de la presente divulgación selecciona un epítipo de un material digerido de un ProGRP que es almacenado establemente en la muestra de ensayo, como el objeto de medición. Por lo tanto, el método es igualmente sensible al ensayo convencional y tiene algunas ventajas, tales como la de que la muestra de ensayo es afectada escasamente por una manipulación después de un muestreo, y de que es posible obtener unos valores medidos altamente reproducibles. Por lo tanto, el método es efectivo en la detección de ProGRP en la sangre.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Advanced Life Science Institute, Inc.

5 <120> Anticuerpo dirigido contra un precursor de un péptido liberador de gastrina y uso del mismo

<130> 18002EP

<140> EP 06 731 744.6

10 <141> 2006-04-13

<150> JP2005 – 115782

<151> 2005-04 – 13

15 <160> 4

<170> Patentin versión 3.1

<210> 1

<211> 294

<212> ADN

20 <213> Humano

<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	

25

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> Humano

30 <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> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<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  
 Asn Phe Lys Asp 204  
 65

10

<210> 4  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

15

<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

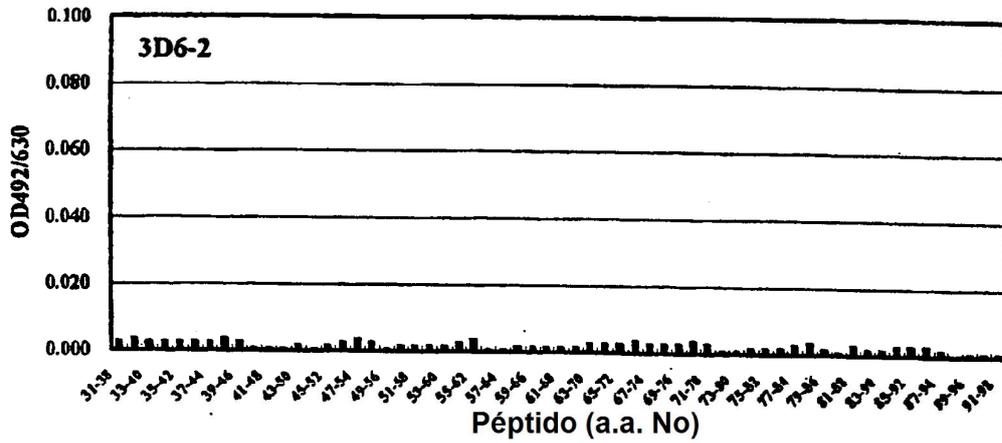
Asn Phe Lys Asp  
65

**REIVINDICACIONES**

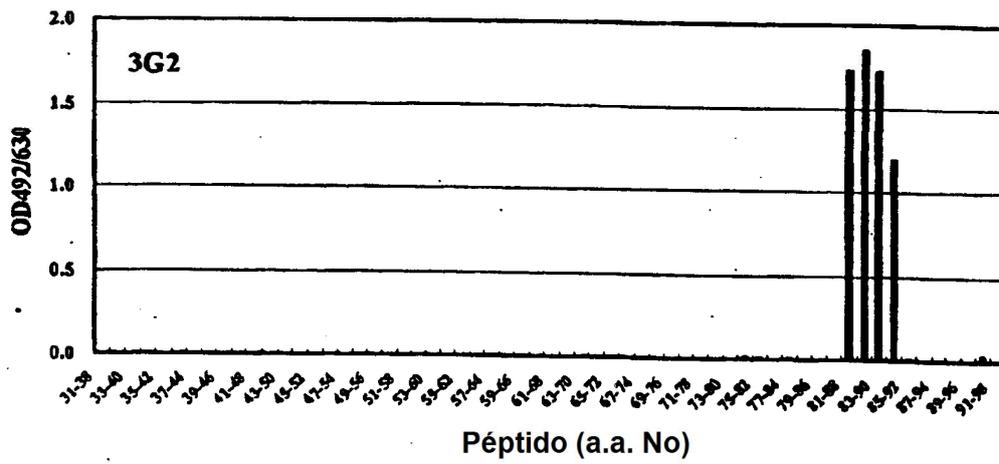
- 5 1. Un anticuerpo que se fija a un péptido que comprende una secuencia parcial de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 40 hasta 60 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, y no se fija a un péptido que comprende una secuencia contigua de cualesquiera 8 aminoácidos situados en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que es producido por el hibridoma 3D6-2 depositado bajo el número de acceso FERM BP-08669.
3. Hibridoma 3D6-2 depositado bajo el número de acceso nº FERM BP-08669.
- 10 4. Un método para determinar un precursor de un péptido liberador de gastrina y/o un material digerido del mismo, usando dos o más anticuerpos diferentes que reconocen a un péptido que comprende una secuencia parcial de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 40 hasta 75 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, en que por lo menos uno de los dos o más diferentes anticuerpos es el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 15 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además usar un anticuerpo que reconoce a un péptido que comprende la secuencia parcial de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 71 hasta 75 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que el método para la determinación es un método de análisis inmunológico de emparejado.
- 20 7. Un estuche para la determinación de un precursor de un péptido liberador de gastrina o un material digerido del mismo, comprendiendo el estuche el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.

Figura 1

(A)



(B)



(C)

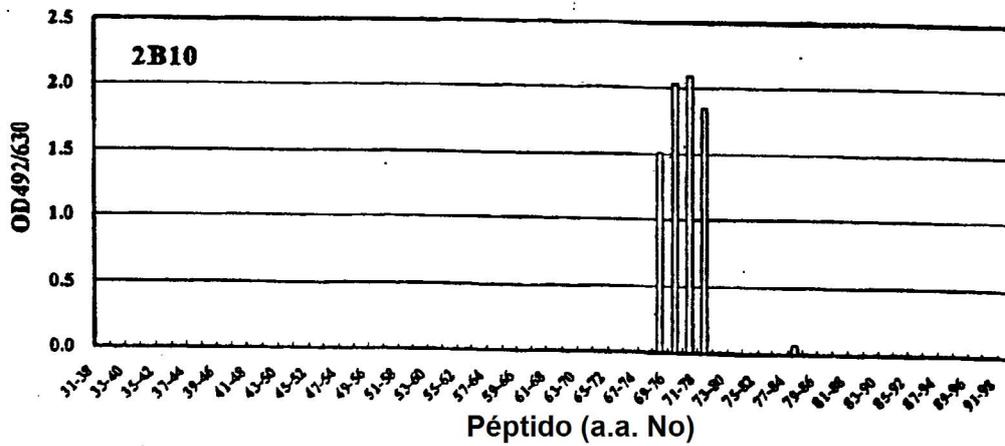


Figura 2

