

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 588**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2008 E 08841363 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 2214016**

54 Título: **Anticuerpo dirigido contra el péptido liberador de gastrina y uso del mismo**

30 Prioridad:

26.10.2007 JP 2007278843

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.11.2014

73 Titular/es:

**ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC.
(100.0%)
2-10-23, MARUYAMADAI
WAKO-SHI, SAITAMA 351-0112, JP**

72 Inventor/es:

**AOYAGI, KATSUMI y
IZAWA, YUKIJI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 523 588 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 el péptido liberador de gastrina y uso del mismo

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra el precursor del péptido liberador de gastrina (ProGRP) y al uso de los mismos, y se utiliza ampliamente en el descubrimiento temprano, el seguimiento del tratamiento, el seguimiento de la recurrencia, o similares, de diversas enfermedades, incluido carcinoma de pulmón de células pequeñas.

TÉCNICA DE ANTECEDENTES

La causa principal de muerte en Japón es la neoplasia maligna y, entre otros, la mortalidad por cáncer de pulmón supera a la del cáncer de estómago en el primer puesto en hombres, mientras que se encuentra en el tercer puesto en mujeres. La mortalidad por cáncer de pulmón tiende a aumentar cada año. El cáncer de pulmón se clasifica histo-patológicamente en los siguientes cuatro tipos de tejidos principales: carcinoma de pulmón de células escamosas y carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC - siglas en inglés) que se desarrolla en la zona hilar del pulmón, y adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón de células grandes que se desarrolla en el campo pulmonar.

En particular, el carcinoma de pulmón de células pequeñas prolifera rápidamente y causa la metástasis remota en la fase temprana y, por lo tanto, en muchos casos, se descubre que este carcinoma es un cáncer avanzado, que ya se metastatizado sistémicamente, incluso en el momento del diagnóstico inicial. En lo que respecta a la tasa de curación de este tipo de cáncer, la tasa de curación en pacientes con enfermedad limitada (LD - siglas en inglés) carcinoma de pulmón de células pequeñas en la que la lesión se limita sólo a un lado del campo pulmonar es de aproximadamente 20%; sin embargo, en pacientes con enfermedad extensa (ED - siglas en inglés) de carcinoma de pulmón de células pequeñas en las que la lesión se ha metastatizado a ambos pulmones o a otros órganos, se dice que la curación es difícil en la práctica.

Además, puesto que el carcinoma de pulmón de células pequeñas es muy sensible a fármacos contra el cáncer, la quimioterapia se considera como la primera opción de tratamiento. Por el contrario, el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (no SCLC) muestra una baja tasa de respuesta a la quimioterapia y, por lo tanto, la terapia quirúrgica se considera como la primera elección de la terapia.

Por lo tanto, el carcinoma de pulmón de células pequeñas es un cáncer que particularmente requiere el descubrimiento y el tratamiento tempranos, incluso entre los diversos tipos de cánceres de pulmón, y por esa razón un diagnóstico diferencial de carcinoma de pulmón de células pequeñas y de carcinoma de pulmón de células no pequeñas es extremadamente importante para la toma de decisiones sobre la estrategia terapéutica.

Uno de los métodos para detectar el cáncer de pulmón es el examen de esputo. Sin embargo, aunque el examen de esputo es adecuado principalmente para el examen de carcinoma de pulmón de células escamosas, existe el problema de que la tasa positiva contra el carcinoma de pulmón de células pequeñas es baja. La radiografía también es un método ampliamente utilizado en el descubrimiento del cáncer de pulmón, pero en relación con el carcinoma de pulmón de células escamosas o el carcinoma de pulmón de células pequeñas que se desarrolla en la zona hilar del pulmón, existe el problema de que la sombra del corazón cae en el área hilar, de modo que es muy difícil captar imágenes de la sombra de los tejidos cancerosos. Además, con respecto al carcinoma de pulmón de células pequeñas, se considera que, incluso si los pacientes que muestran una sombra anormal del campo pulmonar son diagnosticados utilizando el citodiagnóstico del esputo, una simple radiografía del tórax, tomografía computarizada, broncoscopia y similares, no es fácil el descubrimiento temprano de este tipo de cáncer de pulmón.

Además, algunos de los métodos de ensayo para el diagnóstico de cáncer tales como, por ejemplo, la exposición a la radiación, la biopsia y la broncoscopia, provocan dolor en los pacientes, y también requieren de equipos muy caros, una tecnología experta, y similares.

Por lo tanto, se está llevando a cabo una investigación para encontrar un marcador tumoral que haga posible, a través de un análisis de sangre más conveniente, diagnosticar el cáncer con una alta eficacia mientras que el cáncer sea curable. Hoy en día, se están utilizando 30 o más marcadores tumorales en el descubrimiento y el

diagnóstico de enfermedades de cáncer, en la indicación para el seguimiento de la evolución de la enfermedad, en el diagnóstico de recurrencia, y similares.

5 Dado que el cáncer de pulmón se clasifica en una diversidad de tipos de tejido, no se ha reseñado aún un marcador tumoral que sea eficaz para el descubrimiento o el diagnóstico de todos los tipos de cáncer de pulmón. Por lo tanto, en la actualidad se seleccionan marcadores eficaces y se utilizan de acuerdo con cada uno de los tipos de tejido de cáncer de pulmón.

10 Por ejemplo, el antígeno carcinoembrionario (CEA - siglas en inglés) o el antígeno sialil Lex-i se selecciona principalmente y se utiliza para el adenocarcinoma de pulmón, mientras que el antígeno relacionado con el carcinoma de células escamosas (SCC - siglas en inglés) se selecciona y se utiliza principalmente para el carcinoma de pulmón de células escamosas, y así la enolasa específica neuronal (NSE - siglas en inglés) o similar para el carcinoma de pulmón de células pequeñas.

15 Sin embargo, la NSE es desventajosa debido a que: (1) la tasa positiva contra el cáncer temprano curable es baja; (2) se reconoce un aumento transitorio en los valores medidos debido al tratamiento; (3) los valores medidos se incrementan debido a la hemólisis tras la recogida de sangre; y (4) la diferencia entre los valores medidos obtenidos de pacientes de carcinoma de pulmón de células pequeñas y los valores medidos obtenidos de personas normales es pequeño. Por lo tanto, podría decirse que la NSE no es necesariamente un marcador tumoral eficaz
20 para el carcinoma de pulmón de células pequeñas.

El péptido liberador de gastrina (GRP - siglas en inglés) es un péptido cerebro-intestinal compuesto por 27 aminoácidos, que fue aislado de tejidos de estómago porcino por McDonald et al. en 1978, y tiene una acción promotora de la secreción de gastrina. También se ha confirmado la existencia de GRP en seres humanos, y
25 también fue clonado en 1984 un gen que codifica GRP humano.

Yamaguchi et al. en el Centro Nacional del Cáncer en Japón ha llevado a cabo una investigación sobre las características biológicas del carcinoma de pulmón de células pequeñas, que se cree que se deriva de células neuroendocrinas, y en el curso de la investigación examinaron 15 o más clases de hormonas cerebro-intestinales, incluida la hormona adrenocorticotrópica (ACTH - siglas en inglés), calcitonina y similares, y se encontró que el
30 GRP es secretado activamente por parte de líneas de células de carcinoma de pulmón de células pequeñas cultivadas en la frecuencia más alta y en la más alta concentración (Documento No Patente 1). También establecieron un radioinmunoensayo (RIA) en combinación con un método para concentrar el GRP en la sangre, y reveló que pacientes con carcinoma de pulmón de células pequeñas exhibirían una mayor concentración de GRP
35 arterial en comparación con personas sanas. Sin embargo, dado que el GRP se digiere rápidamente en la sangre, la concentración del mismo en la sangre es baja, y puesto que el ensayo mencionado anteriormente requiere un complicado proceso de concentración, la aplicación clínica del ensayo es difícil.

Se reveló por investigaciones llevadas a cabo a partir de entonces que tres especies de precursores de GRP
40 (ProGRP) se producen en diversas células mediante corte y empalme alternativo de ARN (Documento No Patente 2). Estas tres especies de ProGRP tienen en común desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 98 de la secuencia de aminoácidos, mientras que la secuencia de aminoácidos varía entre unas y otras, desde el aminoácido 99 y el resto, a causa del corte y empalme de ARN alternativo. Esta parte común de la secuencia de aminoácidos que
45 consiste en el aminoácido 1 al aminoácido 98 se muestra en SEQ ID NO: 1. En lo que sigue, en la invención, a menos que se indique lo contrario, en particular la indicación del número de residuos aminoácidos en el ProGRP, secuencias parciales de los mismos, digestiones y similares, se basa en la indicación de número de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

La secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 1 al aminoácido 27 de las tres especies de ProGRP
50 es idéntica a la secuencia de aminoácidos del GRP maduro que tiene actividad promotora de la secreción de gastrina. Estas tres especies de precursores son todas digeridas por enzimas de escisión precursoras de hormonas en el GRP de tipo maduro que tienen una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 1 al aminoácido 27, y un fragmento C-terminal (ProGRP-Cfrag) que es un producto digerido de ProGRP que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 31 y el resto, y que no tiene actividad promotora de la
55 secreción de gastrina.

Holst et al. (Documento No Patente 3) reseñó que de acuerdo con el método del radioinmunoensayo (RIA), haciendo uso de un antisuero dirigido contra un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 42 al aminoácido 53 (al que se alude en lo que sigue como ProGRP (42-53)), el nivel de ProGRP o

ProGRP-Cfrag en el plasma sanguíneo de pacientes con carcinoma de pulmón de células pequeñas era alto. Sin embargo, en este método se requerían procesos de precipitación y extracción, y la sensibilidad no era suficiente.

5 Miyake et al. observó que ProGRP es más estable en la sangre que GRP, y que una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 31 al aminoácido 98, que es una parte común en las tres especies de ProGRP, no muestra homología con las secuencias de aminoácidos de otras proteínas y, por lo tanto, establecieron un método RIA altamente sensible que no requiere procesos de precipitación ni extracción, utilizando un antisuero con un título elevado obtenido al utilizar un péptido recombinante formado a partir de la misma secuencia de aminoácidos (al que se alude en lo que sigue como ProGRP (31-98)) como un antígeno (Documento No Patente 1). Se demostró por este método que el ProGRP sirve como un excelente marcador tumoral de la misma manera que lo es GRP.

15 Sin embargo, aunque este método es ventajoso en el aspecto de que no requiere un proceso de extracción, la medición requiere un período de 4 días, y la sensibilidad es insuficiente, siendo sólo de 10 pM (77,3 pg de antígeno/mL). Por consiguiente, el nivel de ProGRP en el suero sanguíneo de una persona normal no se puede medir, y este método todavía no es satisfactorio para la aplicación clínica.

20 Además, dado que los métodos RIA de Holst et al. y de Miyake et al., como se ha descrito anteriormente, son métodos de inhibición, la medición se puede hacer incluso si una parte de un fragmento de ProGRP tiene antigenicidad. Sin embargo, la sensibilidad es menor que la de los métodos de sándwich, y es difícil lograr una aplicación clínica de los métodos de medición del ProGRP en los casos en los que se requiere una mejora de la sensibilidad. Es decir, con el fin de conducir la detección de ProGRP a una aplicación clínica, es esencial aumentar la sensibilidad de detección y, en particular, se necesita un anticuerpo que se pueda utilizar en los métodos de sándwich.

25 Yamaguchi, Aoyagi et al. desarrollaron, con el propósito de lograr la aplicación clínica de ProGRP como un marcador tumoral para el carcinoma de pulmón de células pequeñas, un reactivo conveniente y altamente sensible para la medición del ProGRP que se basa en el principio de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y hace uso de un método sándwich (Documento de Patente 1). Este método proporciona resultados en aproximadamente 2 horas y tiene una alta sensibilidad (2 pg/mL). Por lo tanto, el método es en la actualidad ampliamente utilizado en aplicaciones clínicas, y está claro que el ProGRP tiene mayor sensibilidad y especificidad para el carcinoma de pulmón de células pequeñas en comparación con la NSE.

35 También se encontró utilizando este método de medición que los niveles de ProGRP en suero también aumentaron en tumores neuroendocrinos (cáncer medular de tiroides, y similares) y en cánceres que presentan características similares a tumores neuroendocrinos (carcinoma de células pequeñas esofágico, carcinoma de células pequeñas pancreático, carcinoma de células pequeña de próstata, y similares), así como en el carcinoma de pulmón de células pequeñas. Por lo tanto, se concibe que este método se aplicará a la detección temprana de estos tumores o a un control del tratamiento en el futuro.

40 Sin embargo, aunque la estabilidad del ProGRP en la sangre es mayor que la de GRP, se reconoce más fluctuación en los valores medidos en comparación con otros marcadores tumorales comunes. Por lo tanto, en aquellos métodos que utilizan ProGRP como el objeto de detección, hay una restricción de que la muestra de ensayo para la medición debe ser congelada inmediatamente después de la recogida de sangre hasta el momento de la medición y almacenamiento (Documento No Patente 4).

45 Aoyagi desarrolló un método de medición sándwich haciendo uso de dos o más especies de anticuerpos que reconocen desde el residuo aminoácido 40 al residuo aminoácido 75 de ProGRP o desde el residuo aminoácido 40 al residuo aminoácido 79 de ProGRP, que son ambas regiones internas de ProGRP (31 a 98) (Documento de Patente 3). Este método da resultados relativamente estables mediante la medición de una muestra de ensayo que se ha almacenado a 4°C, y exhibe una sensibilidad de detección que es casi igual a la del método descrito en el Documento de Patente 2. Sin embargo, este método requiere, como se muestra en el Ejemplo 4 del Documento de Patente 3, una cantidad de muestra de ensayo que es más que la de métodos de inmunoensayo comunes, que utilizan una cantidad de 100 µL.

55 Documento de Patente 1: Patente Japonesa N° 3210994

Documento de Patente 2: Solicitud de Patente japonesa abierta a inspección pública (JP-A) N° 6-98794

Documento de Patente 3: WO 2006/117994

Documento No Patente 1: Cancer Research, vol. 54, págs. 2136-2140 (1994)

5 Documento No Patente 2: Spindel, et al., Mol. Endocrinol., Vol. 1, págs. 224-232 (1987)

Documento No Patente 3: Holst, et al, J. Clin. Oncol., Vol. 7, 1831-1838 (1989)

Documento No Patente 4: Rinsho Kensa, Vol. 39, págs. 981-986 (1995)

10 Documento Aoyagi, K. et al., "Enzyme immunoassay of Immunoreactive Prograstin-Releasing Peptide (31-98) as Tumor Marker for Small-Cell Lung Carcinoma: Development and Evaluation", Clinical Chemistry, abril de 1995, vol. 41, Nº 4, páginas 537 a 543 informan sobre el desarrollo de un ELISA para ProGRP del suero (31-98) utilizando dos anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítomos en la molécula de ProGRP (31-98). Sin embargo, no se proporciona especificación adicional de los epítomos reconocidos.

15 El documento EP 0 811 683 A1 describe anticuerpos contra ProGRP (31-98) y su uso como un agente de diagnóstico para el cáncer, en particular cáncer de pulmón de células pequeñas.

20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN
PROBLEMA A RESOLVER POR LA INVENCIÓN

En relación con el método descrito en el Documento de Patente 3, si la cantidad requerida de muestra de ensayo puede ser disminuida a una cantidad más pequeña mientras que se mantiene la sensibilidad de detección, es posible lograr un recorte de los costes necesarios para la medición o la reducción de la carga del paciente en la práctica clínica. Además, un método de medición en el que la disminución en la sensibilidad de medición debido al almacenamiento de la muestra de ensayo es más pequeña, puede hacer la manipulación de la muestra de ensayo más conveniente. La presente invención pretende proporcionar un nuevo método para la medición del ProGRP que exhiba una menor reducción de la sensibilidad de detección a pesar de almacenamiento de la muestra de ensayo, y que permita la medición con una cantidad más pequeña de muestra de ensayo.

30 MEDIOS PARA RESOLVER EL PROBLEMA

La presente invención se basa en el descubrimiento de que un método de inmunoensayo que haga uso de un anticuerpo contra una región específica de ProGRP puede resolver los problemas descritos anteriormente y, por lo tanto, se completaron las siguientes invenciones respectivas.

(1) Un método para la medición de un precursor del péptido liberador de gastrina y/o un producto digerido del mismo, utilizando dos o más anticuerpos diferentes que reconocen un epítomo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 1.

(2) El método de acuerdo con (1), que es un método de inmunoensayo sándwich.

45 (3) El método de acuerdo con (1) o (2), en el que dichos dos o más anticuerpos diferentes comprenden al menos un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítomo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 47 a 57 de la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 1, y un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítomo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 55 a 68 de la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 1

(4) Un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítomo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 47 a 57 de la secuencia de aminoácidos recogida en la SEQ ID NO: 1.

55 (5) Un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítomo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 55 a 68 de la secuencia de aminoácidos recogida en la SEQ ID NO: 1.

(6) El anticuerpo monoclonal de acuerdo con (5), que es producido por el hibridoma GCY9 depositado bajo el Nº de Acceso FERM BP-10991.

(7) El anticuerpo monoclonal de acuerdo con (4), que es producido por el hibridoma GCY17 depositado bajo el N° de Acceso FERM BP-10992.

5 (8) El hibridoma GCY9 depositado bajo el N° de Acceso FERM BP-10991.

(9) El hibridoma GCY17 depositado bajo el N° de Acceso FERM BP-10992.

10 (10) El método de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en el que los dos o más anticuerpos diferentes comprenden anticuerpos de acuerdo con (6) y (7).

(11) Un kit para medir un precursor del péptido liberador de gastrina o un producto digerido del mismo, que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de (4) a (7).

15 (12) Uso del kit de acuerdo con (11), para realizar un diagnóstico de cáncer o vigilar los efectos del tratamiento del cáncer.

EFECTO DE LA INVENCION

20 El método de la presente invención ofrece efectos tales como que se puede obtener una sensibilidad de detección equivalente a la de los métodos de medición convencionales, así como que el método apenas se ve afectado en términos de manipulación de la muestra de ensayo después de la recogida, y que se pueden obtener valores medidos altamente reproducibles, tomando como objeto de medición un producto digerido de ProGRP que ha sido almacenado de forma estable incluso en una muestra de ensayo. Con ello, en un sitio clínico de recogida de una muestra de ensayo de sangre para el diagnóstico de enfermedades tales como carcinoma de pulmón de células pequeñas, se vuelve más fácil la manipulación de la muestra de ensayo después de la recogida de sangre, y los valores medidos para el ProGRP ya no están sujetos a fluctuación, por lo que se obtienen unos resultados más estables, y la fiabilidad de los valores de medición se incrementa. Además, en el caso en el que se produce una petición de ensayos adicionales o una necesidad de un nuevo examen basado en las manifestaciones clínicas, o similares, se hace posible la medición que hace uso no de una muestra de ensayo que ha sido almacenada en estado congelado, sino de una muestra de ensayo que ha sido almacenada en refrigeración, por lo que se puede recortar el coste necesario para la medición. El método de la presente invención también hace que sea posible reducir la cantidad de muestra de ensayo a medir y acortar el tiempo de medición, al tiempo que se mantiene una alta sensibilidad de detección, y puede recortar los costes recurrentes en situaciones clínicas y reducir la carga del paciente.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

40 La Fig. 1 es un gráfico que muestra la capacidad de unión del anticuerpo monoclonal PGCY9 a diversos polipéptidos, cada uno de los cuales tiene una secuencia contigua de 8 aminoácidos preparados mediante síntesis de péptidos en multipines. El eje horizontal representa los diversos polipéptidos y los números de residuos aminoácidos en SEQ ID NO: 1, mientras que el eje vertical representa la absorbancia.

45 La Fig. 2 es un gráfico que muestra la capacidad de unión del anticuerpo monoclonal PGCY17 a diversos polipéptidos cada uno de los cuales tiene una secuencia contigua de 8 aminoácidos preparados mediante síntesis de péptidos en multipines. El eje horizontal representa los diversos polipéptidos y los números de residuos aminoácidos en SEQ ID NO: 1, mientras que el eje vertical representa la absorbancia.

50 La Fig. 3 es un gráfico que muestra la capacidad de unión del anticuerpo monoclonal PGCY24 a diversos polipéptidos cada uno de los cuales tiene una secuencia contigua de 8 aminoácidos preparados mediante síntesis de péptidos en multipines. El eje horizontal representa los diversos polipéptidos y los números de residuos aminoácidos en SEQ ID NO: 1, mientras que el eje vertical representa la absorbancia.

55 La Fig. 4 es un gráfico que muestra la capacidad de unión del anticuerpo monoclonal PGCY12 a diversos polipéptidos cada uno de los cuales tiene una secuencia contigua de 8 aminoácidos preparados mediante síntesis de péptidos en multipines. El eje horizontal representa los diversos polipéptidos y los números de residuos aminoácidos en SEQ ID NO: 1, mientras que el eje vertical representa la absorbancia.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra la capacidad de unión del anticuerpo monoclonal PGCY5 a diversos polipéptidos cada uno de los cuales tiene una secuencia contigua de 8 aminoácidos preparados mediante síntesis

de péptidos en multipines. El eje horizontal representa los diversos polipéptidos y los números de residuos aminoácidos en SEQ ID NO: 1, mientras que el eje vertical representa la absorbancia.

5 La Fig. 6 es un diagrama esquemático que muestra el ProGRP (31-98) y la relación posicional de los epítomos reconocidos por diversos anticuerpos monoclonales.

10 La Fig. 7 es una curva estándar para el método de medición haciendo uso de PGCY9 y PGCY17, que son anticuerpos que se unen a un péptido parcial que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68. El eje horizontal representa la concentración de ProGRP, mientras que el eje vertical representa la absorbancia.

15 La Fig. 8 es un gráfico que muestra la reactividad de ProGRP biotinilado con diversos anticuerpos monoclonales dirigidos contra ProGRP, que están unidos a una fase sólida de una microplaca a través de un anticuerpo de IgG anti-ratón (Fc). El eje horizontal representa los diversos anticuerpos monoclonales, mientras que el eje vertical representa la absorbancia.

MEJORES MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

20 La presente invención es un método para medir ProGRP o un producto digerido de ProGRP que tiene del residuo aminoácido 47 al residuo aminoácido 68 de ProGRP, de acuerdo con un método de inmunoensayo de tipo sándwich, utilizando dos o más anticuerpos diferentes que reconocen un epítomo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP. Este método de inmunoensayo se caracteriza por que, incluso cuando una muestra de ensayo recogida se almacena en refrigeración, la sensibilidad de detección no disminuye. Se especula que esto significa que el producto digerido de ProGRP que tiene del residuo aminoácido 47 al residuo aminoácido 68 de ProGRP es relativamente estable a nuevas reacciones digestivas que ocurren durante el almacenamiento de la muestra de ensayo debido a las proteasas contenidas en la muestra de ensayo o a otras causas.

30 El anticuerpo que se puede utilizar en el método de la presente invención es un anticuerpo que puede reconocer un epítomo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP, y se puede unir así a un producto digerido de ProGRP que tiene del residuo aminoácido 47 al residuo aminoácido 68 de ProGRP. Dicho anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

35 El anticuerpo que se puede utilizar en el método de la presente invención es preferiblemente dos o más anticuerpos monoclonales diferentes que son capaces de reconocer un epítomo presente en la región N-terminal y un epítomo presente en la región C-terminal en la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP. En particular, es particularmente preferible utilizar PGCY9 y PGCY17, que son anticuerpos monoclonales producidos por el hibridoma GCY9 depositado bajo el N° de Acceso FERM P-21308 y el hibridoma GCY17 depositado bajo el N° de Acceso FERM P-21309, ambos depositados ante el Depositario del Organismo de Patente Internacional en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada. Estos dos tipos de células de hibridoma son células de hibridoma preparadas por un método convencional a partir de células productoras de anticuerpos de ratones que han sido inmunizados con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 31 al aminoácido 98 de un ProGRP recombinante producida utilizando Escherichia coli (aquí en lo que sigue indicado como ProGRP (31-98)) como un antígeno, y son células que producen un anticuerpo que reconoce un epítomo representado por el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP, que ha sido seleccionado por tamizado utilizando péptidos dentro de ProGRP (31-98).

45 Como tal, el anticuerpo utilizado en la presente invención se puede obtener mediante la preparación de células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal por un método convencional, a partir de células productoras de anticuerpos que son recuperadas después de la inmunización de un animal experimental tal como ratón, rata, cobaya, conejo, pollo, cabra, oveja o ganado utilizando ProGRP (31-98) como un antígeno, y rastreando células de hibridoma que producen un anticuerpo deseado, utilizando un polipéptido que consiste en residuo aminoácido 47 al residuo aminoácido 68 de ProGRP (aquí en lo que sigue indicado como ProGRP (47-68)). ProGRP (47-68) también se puede utilizar como un antígeno. El polipéptido mencionado anteriormente también puede ser utilizado mientras esté unido a un soporte tal como cicloglobulina o hemocianina de lapa bocallave.

55 Se describirá el método para inmunizar un animal tomando un ejemplo de ratón. Un polipéptido tal como ProGRP (31-98) se mezcla con un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund o TiterMax Gold (CytRx Corp.) en una relación de 1:1, y la mezcla se hace pasar repetidamente a través de la junta de dos jeringas unidas por una unión de flujo transversal, o se somete a ultrasonidos para preparar con ello una emulsión. La emulsión con

5 contenido en antígeno preparada se inyecta en cualquiera de los sitios subcutáneo, intradérmico, intramuscular e intraperitoneal, o en múltiples sitios. Después de completarse la inmunización inicial, la inmunización de refuerzo se lleva a cabo de manera similar a un intervalo de 1 a 4 semanas. Después de ello, la inmunización se continúa de la misma manera, hasta que aumente el título de anticuerpos del anticuerpo dirigido contra ProGRP (31-98) en la sangre.

10 La medición de la titulación de anticuerpos se puede llevar a cabo como sigue. ProGRP (31-98) se disuelve en PBS a una concentración de 1 µg/mL, y la disolución se añade a cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos en un volumen de aproximadamente 50 µL por pocillo, de modo que el péptido se adsorbe durante una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lava con PBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (PBS-T), y luego se utiliza para el ensayo. Antes del ensayo, el bloqueo puede llevarse a cabo con PBS que contiene BSA al 1%, o similares. La sangre se recoge del plexo venoso orbital, de la vena caudal, de la arteria caudal o similar, y la sangre se diluye 30 veces con PBS-T y luego se centrifuga. El sobrenadante resultante se utiliza para preparar una serie de diluciones con PBS-T, y 50 µL de cada una de ellas se añade a cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación revestida con ProGRP (31-98). Se permite que el péptido reaccione durante 15 30 minutos a temperatura ambiente, y luego la placa se lava con PBS-T. 50 µL de cada uno de una disolución de IgG anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP), que se ha diluido apropiadamente con PBS-T, se añade a cada uno de los pocillos. La placa se incuba adicionalmente durante 30 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se añade peróxido de hidrógeno y una disolución de sustrato de orto-fenilendiamina para que reaccione durante 30 minutos. 20 se añaden µL de H₂SO₄ 2N para terminar la reacción, y se mide la absorbancia de cada uno de los pocillos.

25 Después de haber confirmado que el título de anticuerpos contra el antígeno administrado ha aumentado lo suficiente en el ratón inmunizado, se extrae el bazo, y las células del bazo se aíslan. Estas células se fusionan con células de mieloma de ratón (por ejemplo, SP2/0-Ag14, o similares) que han sido cultivadas por separado, utilizando polietilenglicol o similar. Esas células fusionadas con éxito se cultivan selectivamente en medio HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina). Cultivo se continúa durante aproximadamente 7 a 14 días, mientras que la mitad del volumen del medio se intercambia cada varios días, y luego se mide el título de anticuerpos del sobrenadante cultivado. Las células de los pocillos positivos se clonan mediante un método de dilución limitante y, así, se obtiene un hibridoma que produce el anticuerpo diana. 30

35 Cuando se determina el epítipo del anticuerpo obtenido por el método descrito anteriormente, se puede obtener un anticuerpo que reconoce el epítipo representado por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP. El análisis del epítipo puede llevarse a cabo examinando la reacción del anticuerpo dirigido contra un polipéptido que tiene una secuencia contigua de 8 a 12 aminoácidos de ProGRP (31-98) que ha sido preparado por el método de síntesis de péptidos en multipines, o ProGRP (47-68). El epítipo puede ser determinado por, por ejemplo, revistiendo una placa de microtitulación con ProGRP (47-68) que ha sido expresado de forma recombinante, o con ProGRP (47-68) que ha sido sintetizado químicamente mediante el método Fmoc o el método Boc, y examinando la reactividad del anticuerpo a los péptidos respectivos mediante el método de inmunoensayo descrito anteriormente. 40

45 Como resultado del análisis del epítipo utilizando el polipéptido que tiene una secuencia contigua de 8 a 12 aminoácidos de ProGRP (31-98) preparado por el método de síntesis de péptidos en multipines, se confirmó que PGCY9, que es uno de los anticuerpos particularmente preferidos en la presente invención, es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 55 al aminoácido 66, entre los epítopos representados por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP. También se confirmó que PGCY17, que es otro anticuerpo particularmente preferido en la presente invención, es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer al menos un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 45 al aminoácido 57. 50

55 También es posible inmovilizar el anticuerpo utilizado en la presente invención sobre un soporte o una microplaca, o marcar el anticuerpo con un reactivo de marcaje apropiado tal como biotina. Los respectivos procesos de inmovilización y marcaje pueden llevarse a cabo de acuerdo con los métodos descritos en diversos manuales de técnicas experimentales, y no se considera particularmente necesaria una característica de operación para el anticuerpo utilizado en la presente invención.

El método de la presente invención es un método de inmunoensayo de tipo sándwich que hace uso del anticuerpo mencionado anteriormente, y más específicamente, un método ELISA tipo sándwich. La operación fundamental del método ELISA tipo sándwich se puede llevar a cabo de acuerdo con los métodos descritos en "Ultrasensitive

Immunoassay" (Ishikawa Eiji, Japan Scientific Societies Press, 1993) u otros diversos manuales para técnicas experimentales, y ninguna operación especial se considera particularmente necesaria en la implementación de la presente invención. Sin embargo, el método puede llevarse a cabo mediante un procedimiento tal como se muestra a continuación.

5 A saber, ProGRP y/o un producto digerido del mismo se puede detectar de acuerdo con un método de medición que incluye (1) un procedimiento para hacer reaccionar un primer anticuerpo que reconoce el epítipo representado por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP, con ProGRP y/o un producto digerido del mismo en una muestra de ensayo; (2) un procedimiento para hacer reaccionar el ProGRP y/o un producto digerido del mismo capturado por el anticuerpo, con un segundo anticuerpo que es diferente del anticuerpo de (1), pero que reconoce el epítipo representado por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP; y (3) un procedimiento para detectar un inmunocomplejo desarrollado por (2).

15 Un ejemplo del proceso del método de la presente invención se puede describir como sigue. Una disolución preparada al disolver un primer anticuerpo en una disolución tampón, por ejemplo, una disolución de tampón carbonato 0,1 M (pH 9,6), a una concentración de aproximadamente 1 a 10 µg/mL, se dispone en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación en cantidades iguales, y la placa de microtitulación se incuba durante una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lava con una disolución tampón para lavar tal como PBS, y luego la pared interior de cada uno de los pocillos que no está unida por el primer anticuerpo, es bloqueada por incubación durante varias horas utilizando una disolución tampón que contiene una proteína apropiada tal como caseína sódica. Después haber retirado la disolución de bloqueo, se añade a cada uno de los pocillos una disolución de reacción que contiene un tensioactivo tal como Tween 20 y una muestra de ensayo. La cantidad de adición de la muestra de ensayo se varía apropiadamente de acuerdo con la sensibilidad del método de medición. La reacción se realiza durante aproximadamente una hora a una temperatura de aproximadamente 37°C, y después cada uno de los pocillos se lava con una disolución tampón que contiene un tensioactivo (por ejemplo, Tween 20 que contiene PBS-T). Un segundo anticuerpo que ha sido marcado con un reactivo de marcaje adecuado se añade a cada uno de los pocillos y se deja reaccionar durante varios diez minutos. Posteriormente, cada uno de los pocillos se lava, y el segundo anticuerpo se detecta mediante un método apropiado de acuerdo con el reactivo de marcaje. Aquí, este proceso descrito anteriormente es sólo un ejemplo, después de todo, y los detalles de la operación de cada una de las etapas, por ejemplo, la disolución tampón, el reactivo de marcaje, la cantidad de adición y similares, se puede ajustar adecuadamente.

35 La sensibilidad de detección del método de la presente invención que utiliza dos tipos de anticuerpos monoclonales, es decir, los anticuerpos monoclonales PGCY9 y PGCY17, es de 2,5 pg/mL, y se puede utilizar una cantidad de la muestra de ensayo de aproximadamente 25 µL. Esta sensibilidad de detección hace posible medir el nivel de ProGRP en la sangre en casi cada una de las personas normales, y contribuye al recorte de los costes para el examen y la reducción de la carga para el paciente en la práctica clínica.

40 La presente invención también proporciona, además del método descrito anteriormente, un kit para la medición de ProGRP o un producto digerido del mismo en una muestra de ensayo y, en particular, un kit de diagnóstico para realizar un diagnóstico de carcinoma de pulmón de células pequeñas o el seguimiento de la quimioterapia mediante la medición de ProGRP y/o un producto digerido del mismo. Un kit de este tipo incluye al menos dos anticuerpos que reconocen el epítipo representado por el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP, y también puede incluir, además, cualquiera de una disolución tampón de reacción o una dilución de un anticuerpo secundario, una sustancia estándar de ProGRP, instrucciones y otros constituyentes. Ejemplos preferidos del anticuerpo incluido en el kit incluyen dos o más anticuerpos diferentes que reconocen el epítipo representado por el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP, y ejemplos representativos incluyen el anticuerpo monoclonal PGCY9 y el anticuerpo monoclonal PGCY17.

50 En lo que se refiere al anticuerpo que se une a ProGRP y/o un producto digerido del mismo, es preferible seleccionar y utilizar sólo aquellos anticuerpos que reconocen el epítipo representado por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP, pero un anticuerpo distinto de tales anticuerpos también puede incluirse en el sistema de medición en la medida en que puedan obtenerse con alta reproducibilidad valores medidos.

55

En lo que sigue se describirá adicionalmente la presente invención por medio de Ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

5 Un recombinante fue producido por el método descrito en el Ejemplo 1 de la Patente Japonesa N° 3210994, y se purificó un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en la SEQ ID NO: 1, que fue expresado por Escherichia coli. En el Ejemplo 1 de la Patente Japonesa N° 3210994 esta proteína recombinante se describe como GRP (31-98); Sin embargo, para ser exactos, ya que es la porción (31-98) del precursor de GRP (ProGRP), la proteína recombinante se describirá aquí en lo que sigue como ProGRP (31-98).

10 Una proteína antigénica, preparada al acoplar ProGRP (31-98): tiroglobulina porcina (TG) en una relación ponderal de 1:3 (indicado como ProGRP-TG), se diluyó con una disolución de tampón fosfato 100 mM (pH 6,0) que contiene NaCl 0,15 M, y se mezcló con una cantidad igual de TiterMax para obtener una suspensión de ProGRP-TG. La suspensión, preparada para alcanzar una concentración de ProGRP (31-98) de 0,05 mg/0,1 mL, se administró por
 15 vía intraperitoneal 4 a 6 veces en un intervalo de aproximadamente 20 días, a un ratón BALB/c de 4 a 6 semanas de edad. Después de aproximadamente 4 semanas más, una solución salina fisiológica preparada a una concentración de ProGRP (31-98) de 0,1 mg/0,1 mL se administró durante dos días como inmunización de refuerzo. Tres días después de la inmunización de refuerzo final, el bazo se extrajo asépticamente de este animal inmunizado y se preparó en rodajas con unas tijeras, y las rodajas de bazo se resolvieron adicionalmente en
 20 células individuales utilizando una malla, y las células se lavaron tres veces con medio RPMI-1640 y después se cultivaron durante varios días en el mismo medio que contenía 8-azaguanidina. La línea de células de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 en su fase de crecimiento logarítmico, de la que se habían eliminado por completo los revertientes, se lavó con medio RPMI-1640, y luego se colocaron en un tubo de centrifuga y se mezclaron $2,4 \times 10^7$ células de la línea celular y $2,0 \times 10^8$ células de la muestra de células de bazo mencionada anteriormente. Los dos
 25 tipos de células mezcladas se sometieron a centrifugación durante 5 minutos a 200xg para separar el sobrenadante y, a continuación, se sometieron a fusión celular utilizando el kit HVJ Envelop Cell Fusion Kit (GenomONE-CF, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.). Las células fusionadas se diluyeron con medio RPMI-1640 que contenía hipoxantina, aminopterina, timidina (de aquí en adelante, los 3 tipos de compuestos se indican colectivamente como HAT), suero de ternera fetal (FCS) al 10% e interleucina 6 de ratón (R&D Systems), y la dilución se añadió a una placa de 96 pocillos y se cultivó durante 1 a 2 semanas. Después de aproximadamente 1
 30 a 2 semanas de cultivo, se llevó a cabo un método de ELISA utilizando ProGRP (31-98) como un antígeno y, con ello, se obtuvo un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la presente invención que tiene reacción específica a ProGRP (31-98).

35 El hibridoma obtenido se sometió a rastreo de una línea celular que produce el anticuerpo deseado utilizando ProGRP (31-98) y monoclonización de acuerdo con un método de dilución limitante convencional, y se obtuvieron así, finalmente, cinco líneas celulares de hibridoma, que se designaron GCY9, GCY17, GCY12, GCY24 y GCY5, respectivamente. GCY9 y GCY17 están depositadas ante el Depositario del Organismo de Patente Internacional en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-city, Ibaraki, Japón,
 40 desde el 22 de junio de 2007 (N° de Acceso de GCY9: FERM AP-21308, N° de Acceso de GCY17: FERM AP-21309). Además, GCY9 y GCY17 están depositados a nivel internacional, respectivamente, desde el 5 de agosto de 2008 (N° de Acceso Internacional de GCY9: FERM BP-10991, N° de Acceso Internacional de GCY17: FERM BP-10992).

Ejemplo 2

(1) Los hibridomas obtenidos por el método descrito en el Ejemplo 1 se cultivaron en un medio libre de suero (Hybridoma-SFM, Invitrogen, Inc.) que contiene interleucina 6 de ratón, y los anticuerpos monoclonales producidos de este modo se purificaron y recuperaron utilizando una columna Sepharose unida a proteína A (Amersham). Los anticuerpos monoclonales producidos a partir de los respectivos hibridomas GCY9, GCY17, GCY12, GCY24 y GCY5 fueron designados PGCY9, PGCY17, PGCY12, PGCY24 y PGCY5, respectivamente. En lo que respecta a los subtipos de PGCY9, PGCY17, PGCY12, PGCY24 y PGCY5 se encontró mediante un experimento que utiliza un kit de diversos subtipos de Ig anti-ratón de conejo (Zymed Laboratories, Inc.) que PGCY9, PGCY12, PGCY24 y PGCY5 eran del subtipo IgG1, mientras que PGCY17 era del subtipo IgG2a.

55 (2) Sesenta y una especies en total de polipéptidos que incluyen 8 aminoácidos contiguos, que habían sido preparados con un aminoácido que había sido desplazado en cada uno de los polipéptidos, se prepararon por el método de síntesis de péptidos en multipines, basado en la secuencia de aminoácidos de ProGRP (31-98). Cada uno de los péptidos se conjugó con biotina en el extremo N. Cada uno de los polipéptidos biotinilados se disolvió

en dimetilformamida, y la disolución se diluyó con PBS a una concentración de 1 µg/mL. La disolución diluida de cada uno de los polipéptido biotinilados se añadió a cada uno de los pocillos inmovilizados con avidina de una placa de microtitulación de 96 pocillos en una cantidad de 100 µL, y la placa se incubó durante una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lavó con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBS-T), y luego se añadió a cada uno de los pocillos una disolución preparada al diluir cada uno de los anticuerpos monoclonales a 1 µg/mL en una cantidad de 100 µL. Después se dejó que la placa reaccionara durante 30 minutos a la temperatura ambiente, cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con PBS-T, y se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de una disolución de anticuerpo de IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se dejó, además, que la placa reaccionara durante 30 minutos a temperatura ambiente, y después cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con PBS-T. Se añadió a cada uno de los pocillos una disolución de sustrato (una disolución de tampón citrato fosfato 0,1 M que contiene 2 mg/mL de orto-fenilendiamina y 0,9 µL/mL de una disolución acuosa al 30% de peróxido de hidrógeno, pH 5,0) en una cantidad de 100 µL, y se dejó que la placa reaccionara durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 100 µL de ácido sulfúrico 2 N a cada uno de los pocillos, e inmediatamente, se midió la absorbancia a 492 nm. Las respectivas reacciones de los anticuerpos monoclonales PGCY9, PGCY17, PGCY24, PGCY12 y PGCY5 contra diversos péptidos dentro ProGRP (31-98) se presentan en las FIG. 1 a FIG. 5.

Como se muestra en la FIG. 1, se confirmó que el anticuerpo monoclonal PGCY9 se une muy débilmente a ProGRP (57-64). Además, como se muestra en la FIG. 2 y la FIG. 3, se confirmó que los anticuerpos monoclonales PGCY17 y PGCY24 no se unen a un polipéptido que tiene 8 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de ProGRP (31-98). A partir de esto, se especula que PGCY17 y PGCY24 no reconocen una secuencia contigua de 8 aminoácidos, sino un epítipo representado por un polipéptido que tiene una secuencia de más de 8 aminoácidos. Por otro lado, tal como se muestra en la FIG. 4, se confirmó que el anticuerpo monoclonal PGCY12 se unía fuertemente a ProGRP (34-41) y se unía débilmente a ProGRP (33-40) y a ProGRP (35-42). Por lo tanto, se especula que PGCY12 reconoce el epítipo representado por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 34 al aminoácido 41 de ProGRP. Además, se confirmó que el anticuerpo monoclonal PGCY5 se unía fuertemente a ProGRP (69-76) y a ProGRP (70-77), se unía a ProGRP (71-78), y se unía muy débilmente a ProGRP (68-75). Por lo tanto, se especula que el anticuerpo monoclonal PGCY5 reconoce un epítipo común representada por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 69 al aminoácido 76, y la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 70 al aminoácido 77 de ProGRP.

(3) Los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos parciales de ProGRP (31-98) como se indica en la Tabla 1 se sintetizaron mediante un método Fmoc y se purificaron. BSA se disolvió a una concentración de 20 µg/mL en PBS que contenía urea 6 M disuelta en la misma, y 100 µL de la disolución se añadieron a cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (NUNC, Maxisorp). La placa se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con PBS, y a cada uno de los pocillos se añadió una disolución preparada al disolver N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) en PBS a una concentración de 1 mg/mL, respectivamente, en una cantidad de 100 µL. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente para activar con ello el grupo carboxilo de BSA inmovilizado en el pocillo. Cada uno de los pocillos se lavó tres veces con PBS, y los respectivos polipéptidos se diluyeron con una disolución de tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0) a una concentración de 5 µg/mL. 100 µL de cada una de las diluciones se añadieron a cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos, y la placa se incubó durante una noche a 4°C. De este modo, los respectivos polipéptidos se unieron a través de un grupo amino al BSA inmovilizado.

Cada uno de los pocillos se lavó dos veces con PBS, y luego se añadió a cada uno de los pocillos PBS que contenía BSA al 1% y sacarosa al 2% en una cantidad de 350 µL. La placa se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente, y después de ello, PBS se separó mediante succión. Los respectivos anticuerpos monoclonales diluidos a una concentración de 1 µg/mL se añadieron a cada uno de los pocillos en una cantidad de 100 µL, y se dejó que la placa reaccionara durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBS-T), y luego se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de una disolución de anticuerpo de IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para permitir una reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con PBS-T, y luego se añadió a cada uno de los pocillos una disolución de sustrato (disolución de tampón citrato fosfato 0,1 M que contiene 2 mg/mL de orto-fenilendiamina y 0,9 µL/mL de una disolución acuosa al 30% de peróxido de hidrógeno, pH 5,0), en una cantidad de 100 µL. Se dejó que la placa reaccionara durante 20 minutos a temperatura ambiente, y luego se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de ácido sulfúrico 2 N para terminar la reacción. Inmediatamente, se midió la absorbancia a 492 nm. Además de los respectivos

5 anticuerpos monoclonales de la presente invención, se reconoció el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 40 al aminoácido 60 de ProGRP tal como se muestra en el Documento de Patente 3, y también se investigó al mismo tiempo el epítipo de GRP-3D6-2, que es un anticuerpo monoclonal que no responde a un polipéptido que tiene una secuencia contigua de 8 aminoácidos. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Nº de aa del péptido	Anticuerpo monoclonal (DO492/620)			
	PGCY9	PGCY17	PGCY24	GRP-3D6-2
31 – 52	0,008	0,008	0,008	0,009
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

10 N° de aa: numero de aminoácidos

Se pudo verificar, tal como se muestra en la Tabla 1, que las 4 especies examinadas de anticuerpos monoclonales reconocen específicamente a los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos parciales de ProGRP, y que no todos los anticuerpos monoclonales se unen a ProGRP (42-53). Además de ello, el anticuerpo monoclonal PGCY9 estaba unido con relativa fuerza a ProGRP (55-66), ProGRP (57-68), ProGRP (54-78) y ProGRP (54-90). Además de ello, los anticuerpos monoclonales PGCY17 y PGCY24 estaban unidos con relativa fuerza a ProGRP (47-61), ProGRP (40-60) y ProGRP (44-62), pero estaban muy débilmente unidos a ProGRP (46-59). El anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 estaba unido con relativa fuerza a ProGRP (47-61), ProGRP (40-60) y ProGRP (44-62).

20 (4) El ProGRP recombinante (31-98) producido en el Ejemplo 1 se diluyó en PBS a una concentración de 1 µg/ mL, y se añadieron 50 µL de la dilución a cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (NUNC, Maxiorp). La placa se incubó durante una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lavó dos veces con PBS, y PBS que contenía caseína sódica al 0,5% y sacarosa al 2% (pH 7,1) se añadió a cada uno de los pocillos en una cantidad de 350 µL. La placa se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente, y después la disolución tampón se separó mediante succión. Una disolución preparada al diluir cada uno de los péptidos con una disolución de reacción (disolución tampón fosfato de sodio 0,1 M que contiene BSA al 1%, caseína sódica al 0,5%, polivinilpirrolidona al 1%, EDTA-2Na 10 mM, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05%, pH 7,2) a una concentración de 2 µg/mL, se añadió a cada uno de los pocillos en una cantidad de 50 µL. Posteriormente, cada uno de los anticuerpos monoclonales diluidos a una concentración de 1 µg/mL se añadió a cada uno de los pocillos en una cantidad de 50 µL, y la placa se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. En este proceso, ProGRP (31-98) inmovilizado y cada uno de los péptidos en la disolución compiten entre sí, y luego se llevó a cabo una reacción de unión con cada uno de los anticuerpos monoclonales. Después de ello, cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con PBS que contenía al 0,05% de Tween 20 (PBS-T), y luego se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de una disolución de anticuerpo de IgG anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para permitir una reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con PBS-T, y luego se añadió a cada uno de los pocillos una disolución de sustrato (disolución de tampón citrato fosfato 0,1 M que contiene 2 mg/mL de orto-fenilendiamina y 0,9 µL/mL de una disolución acuosa al 30% de peróxido de hidrógeno, pH 5,0), en una cantidad de 100 µL. Se dejó que la placa reaccionara durante 20 minutos a temperatura ambiente, y luego se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de ácido sulfúrico 2 N para terminar la reacción. Se midió la absorbancia a 492 nm. Las tasas de inhibición (%) calculadas al considerar como 100% la absorbancia de un pocillo que no contenía el péptido (control) se presentan en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Nº de aa del péptido	Anticuerpo monoclonal (% de la tasa de inhibición)			
	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

Nº de aa: numero de aminoácidos

5

Como se muestra en la Tabla 2, se verificó que la unión de cada uno de los anticuerpos monoclonales a los polipéptidos inmovilizados era totalmente inhibida a un nivel de 90% o mayor en presencia de ProGRP (31-98), y que no era totalmente inhibida en presencia de ProGRP (42-53). Para el anticuerpo monoclonal PGCY9, se verificó que los polipéptidos que tenían una inhibición de la unión a un nivel de 80% o mayor eran ProGRP (55-66), ProGRP (54-78) y ProGRP (54-90). Para los anticuerpos monoclonales PGCY17 y PGCY24, se verificó que los polipéptidos que tenían una inhibición de la unión a un nivel de 80% o mayor eran ProGRP (45-57), ProGRP (46-59), ProGRP (47-61), ProGRP (40-60) y ProGRP (44-62). Además, se verificó que los polipéptidos que tenían una inhibición de la unión a un nivel de 80% o mayor con el anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 eran ProGRP (46-59), ProGRP (47-61), ProGRP (40-60) y ProGRP (44-62), y la unión a ProGRP (45-57) para la cual se verificó la actividad inhibidora de PGCY17 o PGCY24, fue débilmente inhibida.

10

15

El anticuerpo monoclonal PGCY9 se unió a ProGRP (55-66) y ProGRP (57-68) como se describe en el apartado (3) anterior, y fue más fuertemente unido a ProGRP (57-68) que a ProGRP (55-66). Además, en el apartado (4) se ejerció una inhibición suficiente con ProGRP (55-66), y se reconoció una reacción de inhibición débil con ProGRP (57-68). Por lo tanto, se piensa que el anticuerpo monoclonal PGCY9 reconoce el epítipo representado por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 55 al aminoácido 68 de ProGRP.

20

A partir de los resultados del análisis de epítipo en los apartados (3) y (4), se especula con que los anticuerpos monoclonales PGCY17 y PGCY24 reconocen el epítipo representado por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 57 de ProGRP. También se concibe que el anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 se relaciona con un epítipo que está representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 59 de ProGRP situado más cerca del lado C-terminal que el epítipo para PGCY17 o PGCY24. Además, el epítipo que reconoce el anticuerpo monoclonal PGCY5 y el anticuerpo monoclonal PGCY12 es un epítipo contiguo formada a partir de una secuencia contigua de 8 aminoácidos. También se especuló con que los anticuerpos monoclonales PGCY17 y PGCY24 no se unen a un polipéptido que tiene una secuencia contigua de 8 aminoácidos dentro de ProGRP (31-98), sino que reconocen un epítipo representado por una secuencia contigua de 11 aminoácidos de ProGRP (47 -57). Los epítipos sospechosos de ser reconocidos por los respectivos anticuerpos monoclonales se presentan en la Tabla 3.

25

30

35

[Tabla 3]

Anticuerpo monoclonal	Epítipo (N° de aa)
PGCY9	55 – 68
PGCY17	47 – 57
PGCY24	47 – 57
PGCY12	34 – 41
PGCY5	70 – 76
GRP-3D6-2	47 – 59

5 Ejemplo 3

Los diversos anticuerpos monoclonales de la presente invención y el anticuerpo monoclonal GRP-3G2 mostrados en los Ejemplos 6 y 7 de la patente japonesa N° 3210994 se utilizaron para intentar la identificación de péptidos parciales de ProGRP que eran estables durante el almacenamiento de muestras de ensayo tales como suero. Aquí, el anticuerpo monoclonal GRP-3G2 es un anticuerpo que reconoce un epítipo representado por la secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 84 al aminoácido 88 de ProGRP, como se muestra en el Documento de Patente 3.

Ocho muestras de ensayo A a H, que habían sido almacenadas congeladas y a 4°C durante 1, 4 y 7 días, respectivamente, se sometieron a análisis como se describe a continuación. Cada uno de los anticuerpos monoclonales (PGCY17, PGCY9 y GRP-3G2) se añadió a cada uno de los pocillos de una microplaca de 96 pocillos en una cantidad de 100 µL a una concentración de 4 µg/mL, y la placa se incubó durante una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lavó dos veces con una disolución de tampón fosfato 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M, y luego se añadieron 350 µL de una disolución de bloqueo (disolución de tampón fosfato 10 mM que contenía caseína sódica al 0,5% y sacarosa al 2%, pH 7,1). La placa se mantuvo todavía en reposo durante 2 horas. Después haber separado la disolución de bloqueo, se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de una disolución de reacción (disolución de tampón fosfato de sodio 0,1 M que contiene BSA al 1%, caseína sódica al 0,5%, polivinilpirrolidona al 1%, EDTA-2Na 10 mM, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05%, pH 7,2) y 50 µL de una muestra de ensayo, y se dejó que la placa reaccionara durante una hora a 37°C. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con una disolución de lavado (disolución de tampón fosfato 10 mM que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,3), y 100 µL de una disolución de cada uno de los anticuerpos monoclonales (PGCY12, PGCY17, PGCY9 y PGCY5) marcado con HRP se añadió a la misma para que reaccionara durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con la disolución de lavado, y se añadieron 100 µL de una disolución de sustrato (disolución de tampón citrato fosfato 0,1 M que contiene 2 mg/mL de orto-fenilendiamina y 0,9 µL/mL de una disolución acuosa al 30% de peróxido de hidrógeno, pH 5,0). La placa se incubó durante 30 minutos, y se añadieron 100 µL de ácido sulfúrico 2 N para terminar la reacción enzimática. La absorbancia a 492 nm (longitud de onda de referencia 620 nm) en cada uno de los pocillos se midió con un lector de microplacas.

Se puede estimar la secuencia de aminoácidos parcial de un producto digerido parcial de ProGRP existente en una muestra de ensayo cuando los anticuerpos que tienen un sitio de reconocimiento distinto se combinan como el anticuerpo para la fase sólida y el anticuerpo marcado. Las combinaciones de los anticuerpos utilizados en esta ocasión se presentan en la FIG. 6. Cuando se combinan los anticuerpos monoclonales PGCY12 y PGCY17, se puede medir un producto digerido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 34 al aminoácido 57 de ProGRP entre los digeridos de ProGRP en la muestra de ensayo. De manera similar, un producto digerido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de ProGRP se puede medir con una combinación de PGCY17 y PGCY9, y un producto digerido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 55 al aminoácido 76 de ProGRP se puede medir con una combinación de PGCY9 y PGCY5. Un producto digerido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 55 al aminoácido 88 de ProGRP se puede medir con una combinación de PGCY9 y GRP-3G2, y un producto digerido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 70 al aminoácido 88 de ProGRP se puede medir con una combinación de PGCY5 y GRP-3G2.

Los valores medidos para ProGRP en las muestras de ensayo almacenadas a 4°C durante 1, 4 y 7 días, según se calcula tomando como 100% los valores medidos para ProGRP en las muestras de ensayo almacenadas congeladas, se presentan en la Tabla 4.

[Tabla 4]

	Anticuerpo marcado	PGCY12	PGCY17	PGCY5	PGCY9	PGCY5
	Anticuerpo inmovilizado	PGCY17	PGCY9	PGCY9	GRP-3G2	GRP-3G2
Muestra	Periodo almacenamiento 4°C	Región del péptido reconocible por anticuerpos combinados				
		34 – 57	47 - 68	55 - 76	55 - 88	70 – 88
A	tiempo 0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	1 día	105,2	100,5	100,2	88,6	85,4
	4 días	102,6	101,0	99,6	74,6	73,4
	7 días	99,1	96,9	95,5	67,0	63,1
B	tiempo 0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	1 día	103,7	98,1	99,3	96,0	88,8
	4 días	109,4	92,3	94,5	79,3	75,7
	7 días	118,7	90,4	90,6	66,2	66,8
C	tiempo 0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	1 día	109,3	97,3	96,8	88,9	86,1
	4 días	101,4	93,6	91,0	66,7	59,4
	7 días	92,0	83,0	81,3	49,9	45,3
D	tiempo 0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	1 día	105,0	96,3	98,8	86,0	92,5
	4 días	101,6	90,1	92,1	68,5	75,0
	7 días	107,4	89,2	85,2	60,5	74,5
E	tiempo 0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	1 día	97,4	100,8	95,2	82,7	78,6
	4 días	82,6	92,3	85,3	63,1	55,6
	7 días	85,6	87,4	81,9	51,0	48,5
F	tiempo 0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	1 día	101,2	98,2	96,5	89,7	88,5
	4 días	100,7	89,6	85,6	75,6	75,0
	7 días	95,4	82,1	78,0	62,0	69,4
G	tiempo 0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	1 día	99,3	99,5	98,5	79,8	89,4
	4 días	90,8	94,5	93,3	64,7	62,1
	7 días	77,7	85,8	82,8	45,9	50,0
H	tiempo 0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	1 día	105,7	104,0	103,7	96,0	98,1
	4 días	109,9	96,6	96,3	85,0	85,4
	7 días	114,4	90,5	85,2	72,5	79,3

- 5 En lo que se refiere a la combinación de los anticuerpos monoclonales PGCY9 y GRP-3G2 y la combinación de anticuerpos monoclonales PGCY5 y GRP-3G2, se conservó una actividad inmunológica del 85% o mayor después de almacenamiento durante 1 día en la mayoría de las muestras de ensayo, pero la actividad inmunológica de todas las muestras de ensayo se redujo a 55 hasta 85% después de almacenamiento durante 4 días, y a 80% o menos después de almacenamiento durante 7 días. Se piensa que esto es una pérdida de actividad inmunológica debido a la escisión de ProGRP en el lado C-terminal en Lys-79 de la SEQ ID NO: 1 por las proteasas en la sangre durante el período de almacenamiento o similares, como se describe en el Documento de Patente 3.

10 En relación a la combinación de los anticuerpos monoclonales PGCY12 y PGCY17, la combinación de los anticuerpos monoclonales PGCY17 y PGCY9 y la combinación de los anticuerpos monoclonales PGCY5 y PGCY9, la actividad inmunológica se mantuvo de forma relativamente estable; sin embargo, en la combinación de

PGCY12 y PGCY17, la actividad inmunológica se aumentó por el almacenamiento en dos muestras de ensayo (B y H) entre las 8 muestras de ensayo, y la actividad inmunológica superó el 110% después de almacenamiento durante 7 días.

5 Cuando la combinación de los anticuerpos monoclonales PGCY17 y PGCY9 se compara con la combinación de los anticuerpos monoclonales PGCY5 y PGCY9, la actividad inmunológica de 4 muestras de ensayo en la última combinación se redujo a 85% o menos después de almacenamiento durante 7 días. Por otro lado, en la primera combinación, se mantuvo una actividad inmunológica del 80% o mayor en todas las muestras de ensayo después de almacenamiento durante 7 días, y 6 de las 8 muestras de ensayo conservó una actividad inmunológica de 85%
10 o mayor. Esto implica que una digestión de ProGRP determinada por la combinación de los anticuerpos monoclonales PGCY17 y PGCY9 sufre un menor deterioro cuando la muestra de ensayo se almacena a 4°C y es más ventajosa como un objeto de análisis, en comparación con una digestión de ProGRP medida de acuerdo con el método descrito en el Documento de Patente 3.

15 Ejemplo 4

En el método descrito en el Ejemplo 4 del Documento de Patente 3, los anticuerpos se cambiaron a una combinación de los anticuerpos monoclonales PGCY17 y PGCY9, y se examinaron el tiempo para la medición, la cantidad de muestra de ensayo a medir y la sensibilidad medible necesarias por el método que utiliza la misma
20 combinación de anticuerpos monoclonales.

A cada uno de los pocillos de una microplaca de 96 pocillos, se añadieron 120 µL de una disolución preparada al disolver el anticuerpo monoclonal PGCY9 en una disolución de fijación de anticuerpo (disolución de tampón carbonato 0,1 M que contiene NaCl 0,6 M, pH 9,6) a una concentración de 5 µg/mL, y la placa se incubó durante
25 una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lavó dos veces con una disolución de tampón fosfato 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M, y luego se añadieron a ello 350 µL de una disolución de bloqueo (disolución de tampón fosfato 10 mM que contiene caseína sódica al 0,5% y sacarosa al 5%, pH 7,1). La placa se mantuvo todavía en reposo durante 2 horas para lograr el bloqueo. La disolución de bloqueo se separó, y luego la placa se secó. Después del secado, se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de una disolución de reacción
30 (disolución de tampón fosfato de sodio 0,1 M que contiene BSA al 1%, polivinilpirrolidona al 1%, caseína sódica al 0,05%, Tween 20 al 0,05%, Triton X100, NaCl 0,15 M, EDTA-2Na 10 mM y 40 µg/mL de IgG de ratón, pH 7,0) y 25 µL de una muestra de ensayo, y se dejó que la placa reaccionara durante una hora a 37°C. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con una disolución de lavado (disolución de tampón fosfato 10 mM que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,3), y se añadieron 200 µL de una disolución preparada al disolver Fab' de PGCY17
35 marcado con HRP en una disolución de dilución de anticuerpos marcados (disolución de tampón fosfato de sodio 0,1 M que contiene BSA al 2%, polivinilpirrolidona al 0,25%, Tween 20 al 0,05%, caseína sódica al 0,05%, NaCl 0,15 M, sacarosa al 1% y 25 µg/mL de IgG de ratón, pH 6,5) para que reaccionara durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con la disolución de lavado, y se añadieron 100 µL de una disolución de sustrato (disolución acuosa al 30% de peróxido de hidrógeno, pH 5,0). La placa se incubó durante 20 minutos, y se añadieron 100 µL de ácido sulfúrico 2 N para terminar la reacción enzimática. La absorbancia a 492 nm (longitud de onda de referencia 620 nm) se midió con un lector de microplacas. Una curva patrón para el mismo se presenta en la FIG. 7.

45 Como resultado, se verificó que el método de la presente invención puede detectar aproximadamente 2,5 pg/mL de ProGRP, a pesar de un tiempo de reacción total de 100 minutos y siendo la cantidad de muestra tan pequeña como 25 µL. Esta sensibilidad es suficiente para detectar la concentración de ProGRP en una muestra de ensayo obtenida de una persona normal. Además de ello, cuando el método se compara con el método descrito en el Ejemplo 4 del Documento de Patente 3, el tiempo de medición se redujo de 120 minutos a 100 minutos, y la
50 cantidad de muestra de ensayo para la medición se reduce a 1/4, mientras que la sensibilidad detectada aumenta aproximadamente 1,7 veces.

Ejemplo 5

55 50 µL de una disolución preparada al disolver un anticuerpo de IgG anti-ratón de cabra (Fc) (Jackson Immuno Research) en una disolución de tampón carbonato 0,1 M (pH 9,6) que contenía NaCl 0,5 M, a una concentración de 2,5 µg/mL, se añadió a cada uno de los pocillos una microplaca de 96 pocillos, y la placa se incubó durante una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lavó dos veces con una disolución de tampón fosfato 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M, y luego se añadieron a ello 350 µL de una disolución de bloqueo (disolución de tampón

fosfato 10 mM que contiene caseína sódica al 0,5% y sacarosa al 2%, pH 7,1). La placa se mantuvo todavía en reposo durante 2 horas. La disolución de bloqueo se separó, y luego la placa se secó a temperatura ambiente. 100 μ L de una disolución, preparada al diluir cada uno de los anticuerpos monoclonales en una disolución de reacción (disolución de tampón fosfato de sodio 0,1 M que contiene BSA al 1%, caseína sódica al 0,05%, polivinilpirrolidona al 1%, EDTA-2Na 10 mM, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05 %, pH 7,2) a una concentración de 5 μ g/mL, se añadió a cada uno de los pocillos para que reaccionara durante 2 horas a 37°C. Esta reacción permite que la porción Fc de cada uno de los anticuerpos monoclonales se una a la IgG anti-ratón de cabra (Fc) en una fase sólida.

Subsiguientemente, cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con una disolución de lavado (disolución de tampón fosfato 10 mM que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,3), y a cada uno de los pocillos se añadieron 100 μ L de una disolución de reacción (disolución de tampón fosfato de sodio 0,1 M que contiene BSA al 1%, caseína sódica al 0,05%, polivinilpirrolidona al 1%, EDTA-2Na 10 mM, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05%, pH 7,2) y 50 μ L de una disolución de ProGRP biotinilado recombinante (31-98) (0 pg/mL , 200 pg/mL o 1000 pg/mL) para que reaccionara durante una hora a 37°C. Esta reacción permite que cada anticuerpo monoclonal se una al ProGRP recombinante biotinilado (31-98).

Cada pocillo se lavó cuatro veces con una disolución de lavado (disolución de tampón fosfato 10 mM que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,3), y se añadieron 100 μ L de una disolución de avidina D marcada con HRP (Vector) diluida con una disolución de reacción (disolución de tampón fosfato de sodio 0,1 M que contiene BSA al 1%, caseína sódica al 0,05%, polivinilpirrolidona al 1%, EDTA-2Na 10 mM, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05%, pH 7,2) para que reaccionara durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cada uno de los pocillos se lavó cuatro veces con la disolución de lavado, y a ello se añadieron 100 μ L de una disolución de sustrato (disolución de tampón citrato fosfato 0,1 M que contiene 2 mg/mL de orto-fenilendiamina y 0,9 μ L/ml de una disolución acuosa al 30% de peróxido de hidrógeno, pH 5,0). La placa se incubó durante 30 minutos, y se añadieron 100 μ L de ácido sulfúrico 2 N para terminar la reacción enzimática. La absorbancia a 492 nm (longitud de onda de referencia 630 nm) se midió con un lector de microplacas. Los resultados se presentan en la FIG. 8.

Entre estos anticuerpos monoclonales, el anticuerpo monoclonal PGCY9 que se une a ProGRP (55-68) exhibe la más alta reactividad, e incluso cuando se compara con el anticuerpo monoclonal GRP-3D6-2 utilizado para la fase sólida en el Ejemplo 4 del Documento de Patente 3, el anticuerpo monoclonal mostró valores que eran aproximadamente 3,3 veces mayores. PGCY17 y PGCY24, que se unen a ProGRP (47-57), exhibían casi la misma reactividad, y GRP-3D6-2, que es capaz de reconocer ProGRP (47-59) que se encuentra ligeramente más cerca del lado C-terminal que PGCY17, exhibía una mayor reactividad en comparación con PGCY17. Además de ello, PGCY5 y GRP-2B10, que son capaces de reconocer la vecindad de ProGRP (70-76), exhibían una menor reactividad entre estos anticuerpos monoclonales, y GRP-3G2, que es capaz de reconocer ProGRP (84-88), que se encuentra más cerca del lado C-terminal que aquellos, exhibía una reactividad relativamente mayor. Basado en el sitio de reconocimiento y en la reactividad de estos anticuerpos monoclonales, se piensa que cuando se hace uso de un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 55 al aminoácido 68 de ProGRP, ProGRP o un producto digerido del mismo en una muestra de ensayo puede ser capturado con alta sensibilidad. Además de ello, puesto que la reactividad de PGCY5 y GRP-2B10 es baja, se piensa que un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 70 y el resto, tiene una baja reactividad. Por lo tanto, se concibe que ProGRP o un producto digerido del mismo puede ser capturado con una alta sensibilidad, también utilizando un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 55 al aminoácido 69 de ProGRP.

Ejemplo 6

(1) Biotinilación de cada uno de los anticuerpos monoclonales

0,5 mg de cada uno de los anticuerpos monoclonales se añadieron a 1 mL de una disolución de tampón fosfato de sodio 0,1 M (pH 8,0), y a ello se añadió Sulfo-NHS-Biotina (Pierce) disuelta en dimetilformamida en una relación molar de IgG:Biotina = 1:20. La mezcla se agitó suavemente durante 60 minutos a temperatura ambiente. se añadieron 100 μ L de una disolución 1,5 M de glicina (pH 8,9), y la mezcla se agitó suavemente durante 10 minutos a temperatura ambiente. La filtración en gel se realizó utilizando PBS como disolvente, y de este modo se obtuvo un anticuerpo monoclonal biotinilado.

(2) Examen de la combinación de diversos anticuerpos monoclonales

100 μ L de una disolución preparada al disolver cada uno de los anticuerpos monoclonales en una solución de fijación de anticuerpos (disolución de tampón carbonato 0,1 M que contiene NaCl 0,5 M, pH 9,6) a una concentración de 5 μ g/mL, se añadieron a cada uno de los pocillos de una microplaca de 96 pocillos, y la placa se incubó durante una noche a 4°C. Cada uno de los pocillos se lavó dos veces con una disolución de tampón fosfato 10 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M, y luego se añadieron a ello 350 μ L de una disolución de bloqueo (disolución de tampón fosfato 10 mM que contiene caseína sódica al 0,5% y sacarosa al 2%, pH 7,1). La placa se mantuvo todavía en reposo durante 2 horas para lograr el bloqueo. La disolución de bloqueo se separó, y luego se añadieron a cada uno de los pocillos 100 μ L de una disolución de reacción (disolución de tampón fosfato de sodio 0,1 M que contiene BSA al 1%, caseína sódica al 0,05%, polivinilpirrolidona al 1%, EDTA-2Na 10 mM, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05%, pH 7,2) y 50 μ L de ProGRP recombinante (0, 100, 500 ó 2000 pg/mL) para que reaccionara durante una hora a 37°C. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con una disolución de lavado (disolución de tampón fosfato 10 mM que contiene Tween 20 al 0,05%, pH 7,3), y se añadieron 100 μ L de una disolución preparada al disolver cada uno de los anticuerpos monoclonales biotinilados en la disolución de reacción a una concentración de 1 μ g/mL para que reaccionara durante 30 minutos a temperatura ambiente. A ello se añadieron 100 μ L de una disolución de avidina D marcada con HRP (Vector) diluida con la disolución de reacción, para que reaccionara durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cada uno de los pocillos se lavó cinco veces con la disolución de lavado, y a ello se añadieron 100 μ L de una disolución de sustrato (disolución de tampón citrato fosfato 0,1 M que contiene 2 mg/mL de orto-fenilendiamina y 0,9 μ L/mL de una disolución acuosa al 30% de peróxido de hidrógeno, pH 5,0). La placa se incubó durante 20 minutos, y se añadieron 100 μ L de ácido sulfúrico 2 N para terminar la reacción enzimática. La absorbancia a 492 nm (longitud de onda de referencia 600 nm) se midió con un lector de microplacas. La reactividad se clasificó en 5 grados (en un orden decreciente, ☆ : muy altamente reactivo, ⊙ : altamente reactivo, ○ : moderadamente reactivo, △ : Ligeramente reactivo, × : no reactivo), y los resultados se presentan en la Tabla 5.

[Tabla 5]

Anticuerpo biotinilado		PGCY12	PGCY17	PGCY24	GRP-3D6-2	PGCY9	PGCY5	GRP-2B10	GRP-3G2
Anticuerpo en fase sólida		34 - 41	47 - 57	47 - 57	47 - 59	55 - 68	70 - 76	71 - 75	84 - 88
PGCY12	34 - 41	x	O	O	x	x	x	x	Δ
PGCY 17	47 - 57	O	x	x	x	☆	O	O	O
PGCY24	47 - 57	Δ	x	x	x	O	x	x	x
GRP-3D6-2	47 - 59	O	x	x	x	Δ	O	Δ	O
PGCY9	55 - 68	O	☆	☆	x	x	⊙	O	⊙
PGCY5	70 - 76	Δ	x	x	x	O	x	x	Δ
GRP-2B10	71 - 75	x	Δ	x	x	Δ	x	x	Δ
GRP-3G2	84 - 88	O	O	Δ	O	⊙	O	Δ	x

☆: Muy altamente reactivo
 ⊙: Altamente reactivo
 O: Moderadamente reactivo
 Δ: Ligeramente reactivo
 x: No reactivo

5 Tal como se muestra en la Tabla 5, la reactividad no pudo comprobarse, en primer lugar, por una combinación de anticuerpos monoclonales idénticos, y por una combinación de anticuerpos que se pensó que reconocerían el mismo epítipo, o que tenían las secuencias de aminoácidos que representan el epítipo ampliamente solapado uno con el otro. Cuando PGCY9 fue inmovilizado, PGCY17 y PGCY24 entre los anticuerpos biotinilados tenían la mayor reactividad; GRP-3G2 y PGCY5 tenían la siguiente alta reactividad, y GRP-2B10 y PGCY12 tenían la próxima reactividad alta. La reactividad de GRP-3D6-2 no se pudo detectar.

10 Cuando PGCY17 se inmovilizó, PGCY9 entre los anticuerpos biotinilados tenía la mayor reactividad; y GRP-3G2, PGCY5, GRP-2B10 y PGCY12 tenían la siguiente alta reactividad. La reactividad de PGCY24 y GRP-3D6-2 no se pudo detectar.

15 Cuando PGCY24 se inmovilizó, PGCY9 entre los anticuerpos biotinilados exhibía una reactividad moderada, pero para otros anticuerpos apenas se pudo detectar la reactividad.

20 Cuando GRP-3D6-2 se inmovilizó, GRP-3G2, PGCY5 y PGCY12 entre los anticuerpos biotinilados exhibían una reactividad ligeramente mayor que GRP-2B10.

25 Cuando se utilizó PGCY9 como un anticuerpo biotinilado, PGCY17 exhibía la más alta reactividad como un anticuerpo en fase sólida, mientras que GRP-3G2 exhibía la siguiente reactividad más alta y PGCY24 y PGCY5 la siguiente alta reactividad.

30 Por lo tanto, cuando PGCY9, que se une a ProGRP (55-68), se utiliza como un anticuerpo en fase sólida, y PGCY17 o PGCY24 que se une a ProGRP (47-57) se utiliza como un anticuerpo marcado que es el anticuerpo en el lado de detección o, por otra parte, cuando se utiliza PGCY17 o PGCY24 como un anticuerpo en fase sólida, y PGCY9 se utiliza como un anticuerpo marcado, que es el anticuerpo en el lado de detección, se puede llevar a cabo una determinación de alta sensibilidad de ProGRP o de un producto digerido del mismo.

35 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

De acuerdo con el método de la presente invención, ya que un epítipo recientemente identificado en un producto digerido de ProGRP que se almacena de forma estable en una muestra de ensayo, se utiliza como un objeto de medición, se puede obtener una sensibilidad detectiva que es equivalente a la de los métodos de medición convencionales, la muestra de ensayo apenas se ve afectada tras la manipulación de la muestra de ensayo después de la recogida, se obtienen valores medidos altamente reproducibles, y similares. Por lo tanto, el método de la presente invención es eficaz en la detección de ProGRP en la sangre.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Advanced Life Science Institute, Inc.

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

<130> 21099EP

<140> EP 08 841 363.8

10 <141> 29-09-2008

<150> JP 2007-278843

<151> 26-10-2007

15 <160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 <211> 294

<212> ADN

<213> Ser humano

<220>

25 <221> CDS

<222> (1) ... (294)

<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	ggt	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															

30

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

35 <213> Ser humano

ES 2 523 588 T3

<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

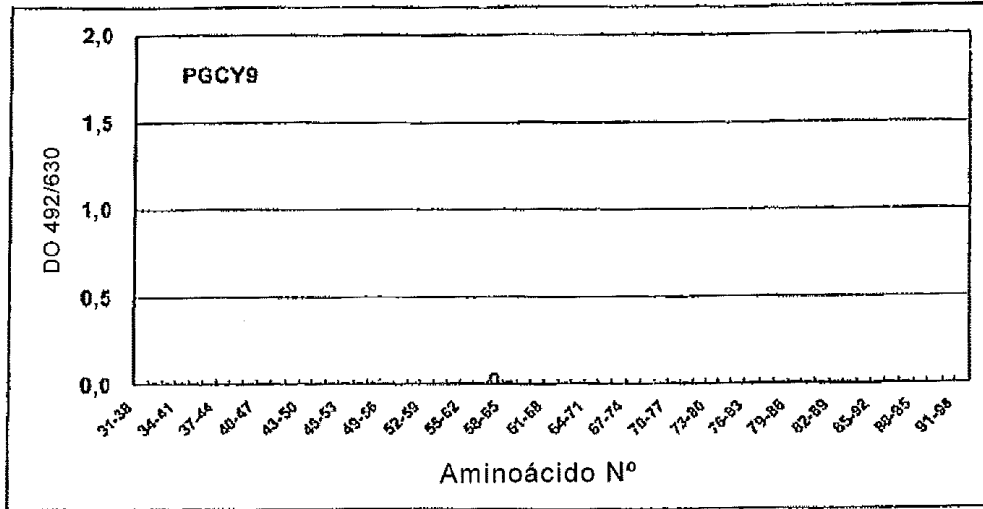
Leu Gly Asn Gln Gln Pro Ser Trp Asp Ser Glu Asp Ser Ser Asn Phe
85 90 95

Lys Asp

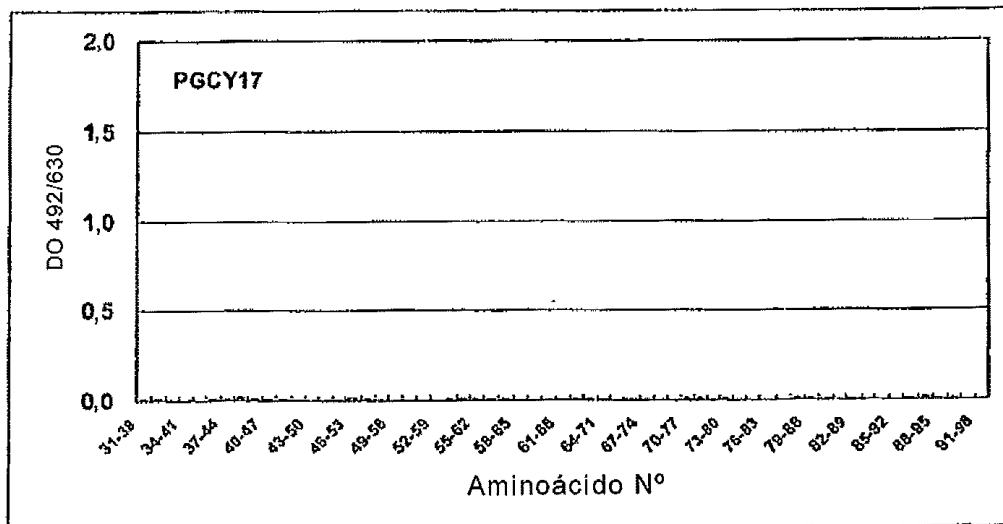
REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para medir un precursor del péptido liberador de gastrina y/o un producto digerido del mismo, utilizando dos o más anticuerpos diferentes que reconocen un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en el aminoácido 47 al aminoácido 68 de la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 1.
- 10 2.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, que es un método de inmunoensayo sándwich.
- 15 3.- El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dichos dos o más anticuerpos diferentes incluyen al menos un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 47 a 57 de la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 1, y un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 55 a 68 de la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 1
- 20 4.- Un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 47 a 57 de la secuencia de aminoácidos recogida en la SEQ ID NO: 1.
- 25 5.- Un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo representado por una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 55 a 68 de la secuencia de aminoácidos recogida en la SEQ ID NO: 1.
- 6.- El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 5, que es producido por el hibridoma GCY9 depositado bajo el N° de Acceso FERM BP-10991.
- 7.- El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 4, que es producido por el hibridoma GCY17 depositado bajo el N° de Acceso FERM BP-10992.
- 30 8.- Hibridoma GCY9 depositado bajo el N° de Acceso FERM BP-10991.
- 9.- Hibridoma GCY17 depositado bajo el N° de Acceso FERM BP-10992.
- 35 10.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los dos o más anticuerpos diferentes comprenden anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7.
- 40 11.- Un kit para medir un precursor del péptido liberador de gastrina o un producto digerido del mismo, que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
- 12.- Uso del kit de acuerdo con la reivindicación 11, para realizar un diagnóstico de cáncer o vigilar los efectos del tratamiento del cáncer.

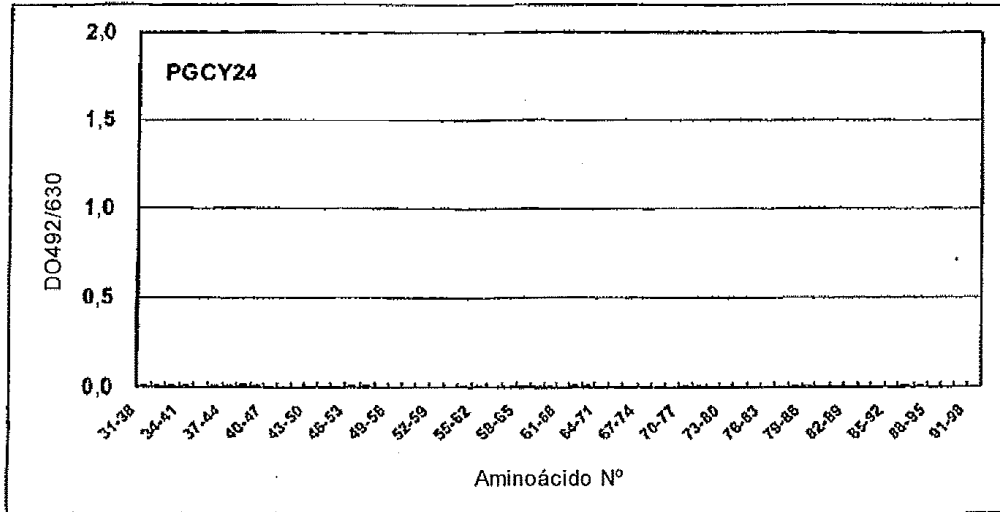
[Fig. 1]



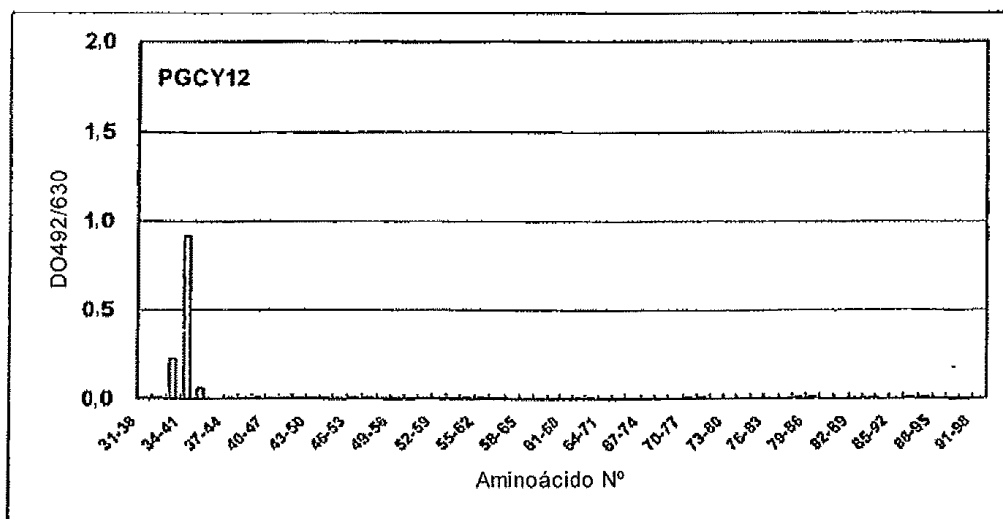
[Fig. 2]



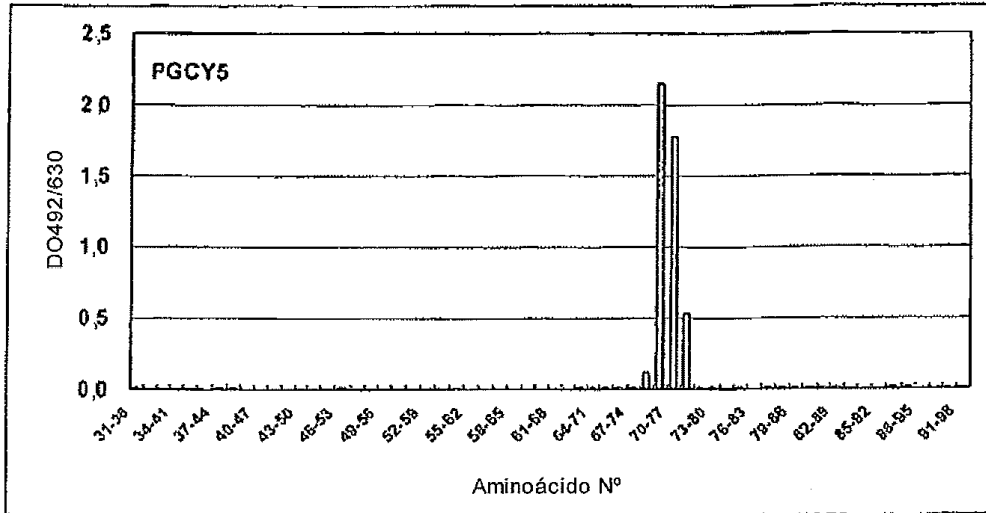
[Fig. 3]



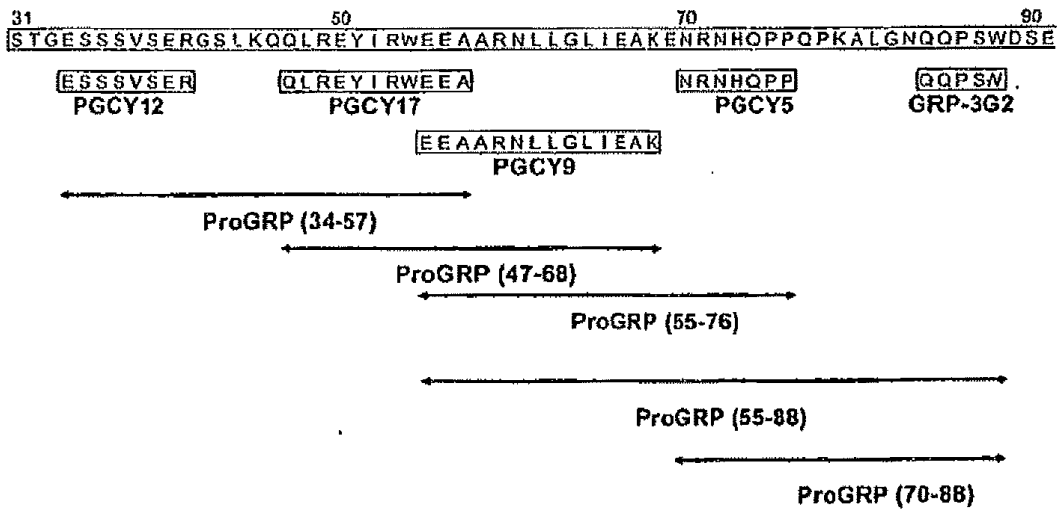
[Fig. 4]



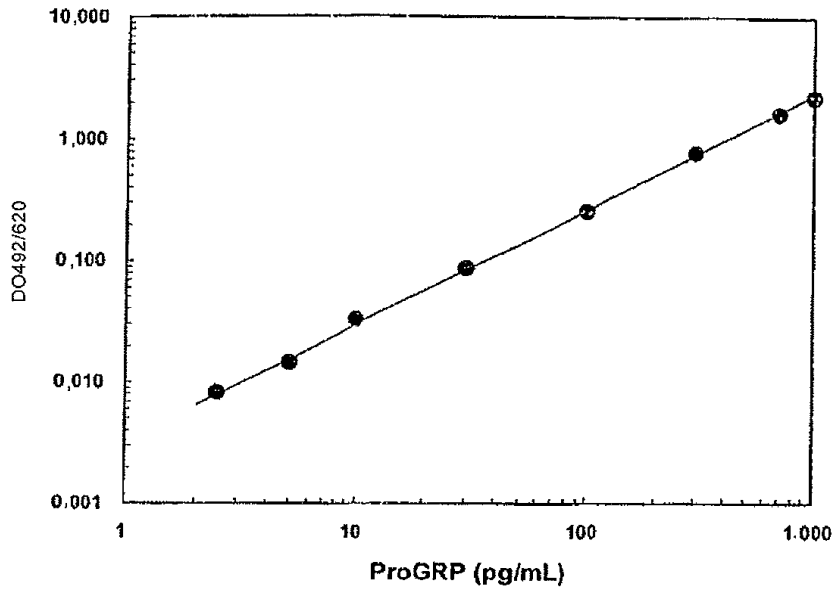
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

