[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/74 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480008479.8

[43] 公开日 2006 年 5 月 31 日

[11] 公开号 CN 1781023A

[22] 申请日 2004.3.29
[21] 申请号 200480008479.8
[30] 优先权
[32] 2003.3.28 [33] US [31] 60/458,244
[86] 国际申请 PCT/US2004/009666 2004.3.29
[87] 国际公布 WO2004/088326 英 2004.10.14
[85] 进入国家阶段日期 2005.9.28
[71] 申请人 埃弗顿有限公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 S·格里姆斯 J·利特尔
L·麦克劳格林

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 陶家蓉

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 2 页

[54] 发明名称

胃泌素激素免疫测定

[57] 摘要

本发明提供了一种用于检测和定量胃泌素激素的测定方法，包括样品中的总胃泌素激素和游离的胃泌素激素。本发明提供了一种适用于如哺乳动物(尤其是人)的血液、血浆或其它体液等生物液样品的的异相酶联免疫测定法(ELISA - type heterogeneous phase assay)。本方法提供了一种对生物液样品中游离的和总的 G17 和 G34 量、以及游离的和总的甘氨酸 - G17 和甘氨酸 - G34 量的精确测定方法。本发明还提供了一种采用胃泌素激素免疫检测法、来决定对患有胃泌素激素引起的疾病或病况的患者的适合治疗方案的方法。

1. 一种用以测定生物液样品中的胃泌素激素总量的方法， 所述方法包含以下步骤：

(a)从患者身上获取含有胃泌素的生物液样品；

(b)提供一种能选择性地结合于胃泌素的C端表位的固定化抗体；

(c)在能使样品中的胃泌肽激素与所述抗体结合的适合条件下，将样品与带N端序列的胃泌素肽一起保温，从而产生该抗体与胃泌素结合的固定化复合物；

(d)洗涤固定化复合物，以去除未结合的抗体和带 N 端序列的胃泌素肽，将复合物与一个能选择性地结合于胃泌素激素N端表位的、合适的可检测标记物偶联抗体一起保温，以形成一种固定化的可检测标记物偶联的抗体复合物；

(e)洗涤该固定化的可检测标记物偶联的抗体复合物，并将其与显色剂一起保温；

(f)测量显色后的试剂，以确定在生物液样品中的胃泌素激素总量。

2. 一种用以测定生物液样品中游离胃泌素含量的方法，所述方法包括以下步骤：

(a)从患者身上获取含有胃泌素的生物液样品；

(b)提供一种能选择性地与胃泌素C端表位结合的固定化抗体；

(c)在能使样品中的胃泌素与所述抗体结合的合适条件下，保温样品，以产生所述抗体与胃泌素结合的固定化复合物；

(d)洗涤固定化复合物以去除未结合的抗体，将复合物与与合适可检测标记物偶联抗体进行反应，所述抗体能选择性地与结合于胃泌素激素N端的表位结合；

(e)洗涤该固定化的可检测标记物偶联的抗体复合物，并将其与显色剂一起保温；和

(f)测量显色后的试剂，以确定在生物液样品中的游离胃泌素激素的量。

3. 如权利要求1或2所述的方法，其特征在于，所述体液为血清

4. 如权利要求1－3中任一项所述的方法，其特征在于，所述C端选择性抗体和/或N端选择性抗体是一种单克隆抗体。

5. 如权利要求1－4中任一项所述的方法，其特征在于，所述胃泌素激素

是 G17 或 G17-Gly，所述 C 端选择性抗体和 N 端选择性抗体与 G17 结合。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述 C 端选择性抗体是具有杂交瘤 458-1 所产生的单克隆抗体特征的单克隆抗体；或是具有杂交瘤 445-1 (ATCC 登记号 #) 或杂交瘤 445-2 (ATCC 登记号 #) 所产生单克隆抗体特征的单克隆抗体；和/或所述 N 端选择性抗体是具有 400-1,400-2,400-3 或 400-4 中任一种杂交瘤所产生的单克隆抗体特征的单克隆抗体。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述 C 端选择性抗体是由杂交瘤 458-1 所产生的单克隆抗体;和/或所述 N 端选择性抗体是由 400-1,400-2,400-3 或 400-4 中任一种杂交瘤所产生的单克隆抗体。

8. 如权利要求 1－4 中任一项所述的方法，其特征在于，所述胃泌素激素为 G34 或 G34-Gly，所述 C 端选择性抗体和 N 端选择性抗体与 G34 或 G34-Gly 相结合。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述 C 端选择性抗体是是具有杂交瘤 458-1 所产生的单克隆抗体特征的单克隆抗体；或是具有杂交瘤 445-1 (ATCC 登记号 #)或杂交瘤 445-2 (ATCC 登记号 #)所产生的单克隆抗体特征的单克隆抗体；和/或所述 N 端选择性抗体是具有杂交瘤 401-2 所制单克隆抗体的特征的单克隆抗体。

10. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述 C 端选择性抗体是由杂交瘤 458-1 所产生的单克隆抗体；且/或 N 端选择性抗体是杂交瘤 401-2 所产生的单克隆抗体。

胃泌素激素免疫测定

相关专利

本申请要求享受名为“胃泌素激素免疫测定（Gastrin Hormone Immunoassays）”的美国临时申请60/458,244（申请日2003年3月28日）的优先权，该专利说明书在本文中被整体引用作为参考。同时，该项申请的名为“抗胃泌素激素的单克隆抗体(Monoclonal Antibodies to Gastrin Hormone)”的分案申请（申请日为2004年3月29日，美国临时申请序列号60/　　），其专利说明书也在本文中被整体引用作为参考。

技术领域

本发明涉及一种在生物液样品中检测和/或定量生物活性肽，尤其是胃泌素肽，的 ELISA 测定法。本发明特别涉及用于在生物液样品中检测和/或定量游离肽和总肽（包括与抗体结合的肽）的方法。

背景技术

虽然胃泌素激素早在一百年前就已被首次发现，在二十世纪 60 年代首次分离纯化，但是它在正常或患病组织的不同组织的功效仍未被完全认识。造成对胃泌素系统认识空白的一个主要原因是，对于多种胃泌素激素形式中的每一种进行分别检测和定量存在困难。

在哺乳动物中，胃泌素这一肽激素以多种形式存在，根据肽链中氨基酸残基的数量，可以被划分为两个主要的类别：“小”胃泌素和“大”胃泌素。“小”胃泌素包括成熟的胃泌素17（G17）和甘氨酸－G17（G17－Gly）；“大”胃泌素包括胃泌素 34（G34）和甘氨酸－G34(G34-Gly)。G17 的成熟形式是胃酸分泌中的一种主要效应因子，且据估计，其在这方面的功效要比G34强6倍。各类不同形式的胃泌素在体内通过一种叫“前胃泌素”的前体肽进行切割所产生的，在某些情况下还对切割后的肽进行了修饰。人 G34 的 C 端具有完整的 G17 的 17 氨基酸序列，由此可以推测其会与 G17 发生免疫交叉反应。

成熟的 G17 对氨基端和羧基端残基都进行修饰：N－端谷氨酸环化形成焦

谷氨酸（pGlu）；C 端苯丙氨酸的游离羧基被肽基甘氨酸α-酰胺化单加氧酶（PAM)酰胺化,形成了C端酰胺化苯丙氨酸Phe—NH_2。(参见Dockray等，Ann. Rev. Physiol.(2001)63:119-139）。

成熟 G17 是人体内“小”胃泌素的主要形式，具有氨基酸序列：pEGPWLEEEEEAYGWMDF-NH_2(SEQ ID NO:1)。G17—Gly 是胃泌素的一种不完全加工形式，是健康人体内“小”胃泌素的次要组份，，具有氨基酸序列：pEGPWLEEEEEAYGWMDFG(SEQ ID NO: 2)。

胃泌素 34 是人体内“大”胃泌素的主要形式，具有氨基酸序列 pEGPQGPPHLVADPSKKEGPWLEEEEEAYGWMDF-NH_2(SEQ ID NO:3)、谷氨酸—胃泌素 34（G34-Gly），带有一个附加的 C 端甘氨酸残基，其氨基酸序列为 pELGPQGPPHLVADPSKKEGPWLEEEEEAYGWMDFG(SEQ ID NO:4)。

胃泌素是由胃的幽门窦G细胞在胃泌素释放肽（GRP）的刺激下所分泌的。胃泌素的分泌，会被胃酸和多种多肽激素（尤其是促生长素抑制素）的旁分泌效应所抑制。长期以来，认为胃泌素肽的功能在于刺激健康个体的胃部酸分泌，直到最近，有研究表明这些肽还能控制肠胃系统（GI system）中不同细胞类型的增殖、分化和成熟。

除了它们在肠胃系统的区域性作用外，G17 和 G17-Gly（后者程度稍小）还被释放入血液；已经发现，在如胃癌、结肠癌和胰腺癌等肠胃紊乱和疾病的患者血清中，胃泌素浓度是升高的。最近还发现，这些胃泌素还同其它与肠胃道无关的疾病有关，包括小细胞肺癌（SCLC）和转移性的肝脏肿瘤。。参见以下文献中的实施例”*Gastrin and Colon Cancer: a unifying hypothesis*” S.N.Joshi 等，Digestive Diseases(1996) 14:334-344; 和”*Gastrin and colorectal cancer*” Smith, A.M.和 Watson, S.A. Alimentary Pharmacology and Therapeutics(2000)14(10): 1231-1247。

抗体是许多应用于医学、兽医学和其它领域的检测技术中的关键试剂。。这类测定包括许多常规使用的免疫测定技术，例如酶联免疫吸附测定法（ELISA）、放射免疫测定（RIA）、免疫组织化学（IHC）和免疫荧光(IF)测定。

当用于许多上述检测法时，单克隆抗体（MAb）具有在很多方面都优于多克隆抗血清、和从多克隆抗血清中纯化得到的抗体的独特特性。这些包括：对于靶抗原的单一抗原决定簇的特异性（即对于单个表位的特异性）；不同抗体

制备方法得到的抗体，都具有长时间不变的特异性、以及恒定亲和力和化学成分。此外，单克隆抗体可以用体外方法无限期、不限量的生产。这些特性同多克隆抗体的特性呈鲜明对比。后者需要采用体内免疫的方法，该方法不可避免地受到生物差异的影响、而且在免疫动物的生命周期内产生抗体的能力是有限的。

虽然具有这些优点，各个单克隆抗体之间仍存有差异，即使它们是特异性地针对同一抗原表位的。例如，通过用一个单抗原表位区段来进行免疫，其诱导获得的各种单克隆抗体之间会呈现出任一或所有下列特性的差异：1）对分子组成和表位三级结构的良好特异性；2）抗体独特型；3)抗体亲和力；4）抗体同种异型；和 5）抗体同种型。这些特性差异会影响单克隆抗体（Mab）在特定免疫检测中的功效，以至于在特定测定中抗同一抗原区段的不同 Mab 株表现出不同的功效。因此，在作为特定免疫测定中的试剂时，一些 MAb 要优于另一些与相同表位结合的 Mab。

免疫测定法可以是酶联免疫吸附测定法（ELISA）、放射免疫测定（RIA）、以及如 ELISPOT（酶联免疫斑点测定）、狭线印迹和 western 印迹等的免疫检测试验。这些技术的一般指导，参见 Ausubel 等(eds)（1987）的”*Current Protocols in Molecular Biology*” John Wiley and Sons, New York, N.Y.。另外，免疫测定也可是一种用来观测组织样品中的胃泌素激素的免疫组织化学（IHC）染色或免疫荧光(IF)方法。参见”*Principles and Practice of Immunoassay*”(1991) Christopher P. Price 和 David J.Neoman(eds), Stockton Press, New York, N.Y.。

特异性针对 G17 的 N 端区域和 C 端区域的单克隆抗体也已有报道。。参见 Azuma 等，*Gastroenterologica Japnica* (1986)21(4):319-324; Ohning 等，*Peptides*(1994)15(3):417-423;Fuerle 等，Pancreas(1995)10(3):281-286; Kovacs 等，*Peptides*(1996)17(4):583-587;Ohning 等，*Am J. Physiol.*(1996)271(3 Pt 1):G470-476; Sipponen 等，(2002)Scand. J. Gastroenterol.37(7):785-791。然而，所述的这些抗体，无论以单独或以组合形式，都不具备对正常或病理状态生物液中每种形式的胃泌素进行区分和定量的能力。

抗胃泌素多克隆抗体已被报道能有效地抑制胃泌素活性(” Inhibition of gastrin activity by incubation with antibodies to the C-terminal

tetrapeptide of gastrin" Jaffe 等, *Surgery*(1969)65(4):633-639); 非人源抗胃泌素多克隆抗体已被用于治疗患有卓艾二氏综合症（混合型非胰岛细胞分泌腺瘤)的患者，该病理条件中未经摄食刺激即产生过量胃泌素。参考 Hughes 等,"Therapy with Gastrin Antibody in the Zollinger-Ellison Syndrome"; Hughes 等,Digestive Diseases(1976)21(3):201-204。但这些兔源的抗胃泌素抗体" 最多只在患者身上取得了短期疗效"(Hugh at p.204)。

近来认为，血清中酰化/非酰化胃泌素激素的比例能提供一个用作个体患十二指肠溃疡或胃萎缩的风险预测的指标。参考已公开的美国专利申请 2003/0049689, 名为"Diagnosis and Treatment of gastrointestinal Disease"，发明人 T.C.Wang。

至今为止，未能得到能够灵敏检测并准确区分 G17、G17-Gly、G34 和 G34-Gly 等各个形式的胃泌素激素的 MAb 。此外，直至本发明前，还无法精确测量生物液样品中每一种形式的胃泌素的量。仍未能精确测量生物液样品中的每种胃泌素形式。在临床试验的测定中使用本发明的单克隆抗体（Mab），能更精确地确定了胃泌素在正常或病理情况下的生物活性，并提供了用于制药的 MAb 组合物以及预防和治疗胃泌素相关疾病和病况的方法。

发明内容

本发明提供了一种用以测定生物液样品中的胃泌素激素（包括结合抗体的和游离的）总量的方法。所述方法包含以下步骤：(a)从患者身上获取含有胃泌素的生物液样品；(b)提供一种能选择性地结合于胃泌素的 C 端表位的固定化抗体；(c)在能使样品中的胃泌肽激素与所述抗体结合的适合条件下，将样品与带 N 端序列的胃泌素肽一起保温，从而产生一种该抗体与胃泌素结合的固定化复合物；(d)洗涤固定化复合物，以去除带 N 端序列的胃泌素肽，将复合物与一个能选择性地结合于胃泌素激素 N 端表位的、合适的可检测标记物偶联抗体一起保温，以形成一种固定化的可检测标记物偶联的抗体复合物；(e)洗涤该固定化的可检测标记物偶联的抗体复合物，并将其与显色剂一起保温；和(f)测量显色后的试剂，以确定在生物液样品中的胃泌素激素总量。

本发明还提供了一种用以测定生物液样品中游离胃泌素含量的方法。所述方法包括以下步骤：(a)从患者身上获取含有胃泌素的生物液样品；(b)提供一种能选择性地与胃泌素 N 端表位结合的固定化抗体；(c)在能使样品中的胃泌

素与所述抗体相结合的合适条件下，保温样品，以产生所述抗体与胃泌素结合的固定化复合物；(d)洗涤固定化复合物以去除未结合的成分，将复合物与一个能选择性地结合于胃泌素激素 C 端表位的、合适的可检测标记物偶联抗体进行反应；(e)洗涤该固定化的可检测标记物偶联的抗体复合物，并将其与显色剂一起保温；和(f)测量显色后的试剂，以确定在生物液样品中的游离胃泌素激素的量。

本发明还提供了一种用以测定生物液中结合的以及游离的多肽的总量的方法，其特征在于，所述多肽至少有一部分能与第一结合序列发生可逆地结合。所述方法包括以下步骤：（a）从患者身上获取含有该多肽的生物液样品；(b)提供一种包被有一种抗体的固相基质，所述抗体能选择性地结合于多肽首要表位，这个首要表位是在第一结合序列中没有出现的；(c)在能使多肽与所述抗体结合的适合条件下，将样品与带第一结合序列、而不带首要表位的肽段一起保温，从而产生一种所述抗体与多肽的复合物；(d)洗涤反应孔，以去除未结合的抗体和肽段，将复合物与一个能选择性地结合于多肽次要表位的、合适的可检测标记物偶联抗体进行反应；(e) 洗涤反应孔，向孔中加入显色剂；和(f)测量显色后的试剂，以确定在生物液样品中结合的以及游离的多肽的总量。

本发明还提供了一种对患有胃泌素激素引起的疾病或病况的患者的胃泌素激素封闭治疗情况进行评估的方法。所述方法包括以下步骤：(a)在治疗前或治疗的早期阶段，从患者身上获取第一份含有胃泌素的生物液样品；(b)用免疫测定法测定第一份样品中的胃泌素激素水平；(c)根据所要治疗的疾病或病况、以及第一份样品中的胃泌素激素水平，进行诊断；(d) 对患者实施治疗，包括：第一试剂或能产生第一试剂的物质，所述第一试剂能与胃泌素激素结合、从而能在体内调控胃泌素与其靶受体的结合；(e) 在一段适当的时间之后（在此期间治疗已应产生了一定效果），从患者身上提取第二份生物液样品；(f)用免疫测定法，测定第二份样品的第一部分样本中的总胃泌素水平（包括结合的和游离的胃泌素），其中，所述第二份样品中的第一部分样本是与以下物质一起保温的：(i)一种能取代任何被第一试剂结合的胃泌素的第二试剂；和(ii)一种固定化的抗胃泌素激素抗体，其中，所述固定化抗体不结合第二试剂；洗涤以除去第二试剂，并加入能同胃泌素激素结合、且不与固定化抗体竞争的可检测抗体，以形成一种免疫复合物，所述免疫复合物中固定化抗体结合到胃泌素激素上、该胃泌素激素接着又被可检测抗体所结合；(g)检测免疫复合物中

可检测抗体的量，从而可以测定第二份样品中总胃泌素激素的量；(h)通过重复进行步骤(f) 和(g)，来测定第二份样品的第二部分样本中游离胃泌素激素水平，其中(f)步骤的保温是在没有第二试剂的条件下进行的；和(j)比较所测定的第一份样品中的游离胃泌素激素量和第二份样品中的游离胃泌素和总胃泌素量，从而确定胃泌素激素封闭治疗对于患者的疗效。

附图说明

图 1 显示了在经过以 N－四甲联苯胺磺酸盐（TMBS）为发色底物的酶促显色反应后，以胃泌素浓度（皮摩尔，10^{-12}摩尔）对 450 纳米（A_{450}）吸光度作图所得的总胃泌素 17 的校正曲线示意图。

图 2 显示了同上法，以胃泌素浓度（皮摩尔，10^{-12}摩尔）对 450 纳米（A_{450}）吸光度作图所得的游离胃泌素 17 的校正曲线示意图。。

具体实施方式

下面提供了本发明中所用术语和词组的定义：

如本文中所互换使用的“胃泌素激素”或“胃泌素激素形式”，是指任何有生物活性的和/或有免疫交叉反应活性的胃泌素激素肽。胃泌素激素的主要形式包括、但不局限于：胃泌素 17（G17），无论是 C 端酰胺化的或具有游离 C 端的；甘氨酸—胃泌素 17(G17-Gly)；胃泌素 34(G34)，包括 C 端酰胺化形式或具有游离 C 端的形式；和甘氨酸—胃泌素 34(G34-Gly)。

如本文所用，对于某一特定形式的胃泌素激素的“选择性”，是指该抗体对某一特定形式的胃泌素上的某一特定靶抗原决定簇具有特异性，并能与含有该靶抗原决定簇的任何一种胃泌素形式相结合。例如，成熟的（酰胺化的）G17 的 C 端，与成熟的 G17 和 G34 相同。所以，特异性针对成熟 G17 C 端上的 C 端靶抗原决定簇的 MAb，也能选择性的识别 G17（和 G34）。

如本文所用，样品中一种胃泌素形式的“总量”，是指游离的（未结合的）胃泌素激素形式量加上复合的（结合的）胃泌素激素形式量的总和。复合的胃泌素，可以是被抗体所结合的、或是被样品中其它胃泌素结合的组分所结合的。

如本文所用，“生物液”是指任何含有生物来源的材料的液体。本发明使用的优选生物液，包括动物（尤其是哺乳动物）体液，，优选为人。所述体液可以是任何体液，包括但不局限于，血浆、血清、淋巴液、脑脊液（CSF）和

其它类似物质。

如本文所用，“防腐剂”是指能够减少生物液样品或带有生物成分的液体样品中胃泌素的时间依赖性降解作用的任何反应剂、补充剂或添加剂。在本发明实践中所使用的防腐剂包括本领域所熟知的众多众多防腐剂中的中任一种，包括但不局限于，如叠氮化钠、EDTA 等普通化学防腐剂，和如 PMSF（苯甲基磺酰基氟）、抑蛋白酶肽（如抑肽酶）等蛋白酶类抑制剂，或如肝素等生物防腐剂。

如本文所用，“试验平板”是指能用本发明的方法在其上对多个液体样品进行分别检验的任何固体基质。如本文所用，试验平板的“反应孔”是指试验板上作为平板样品接受区的范围。典型的试验平板的反应孔，是通过在平板表面形成凹陷来得到的，该凹陷足够接收并容纳样品体积和检测过程中任一步中所加入的缓冲液或洗涤液的体积。

如本文所用，对于靶分子的“测量”，是指检测、定量或者测定某一分析物或靶分子的量。

本发明详细公布了特别适用于免疫酶分析法（通常称为“ELISA”或酶联免疫吸附测定法）的 MAb，所述测定旨在测量生物液中特定形式的胃泌素。

在本发明试验中所使用的 Mab，包括选择性地在氨基酸序列 pEGPWLE (SEQID NO : 5)的表位、同胃泌素 17（G17）N 端相结合的 MAb。

在本发明试验中所使用的 Mab，还包括选择性地在氨基酸序列 EEAYGWMDF-NH2 (SEQ ID NO: 6)的表位、同胃泌素 17（G17）或胃泌素 34（G34）相结合的 MAb。

另一方面，在本发明试验中所使用的 Mab，包括选择性地在氨基酸序列 pELGPQG（SEQ ID NO: 7）的表位、同人胃泌素 34（G34）N 端相结合的 MAb。

另一方面，本发明试验中所使用的 Mab，包括选择性地在氨基酸序列 YGWMDFG (SEQID NO:8)的表位、同甘氨酸—胃泌素 17（G17-Gly）和甘氨酸—胃泌素 34 (G34-Gly) 相结合的 MAb。

在本发明的试验中所使用的 Mab，优选能与胃泌素激素形式结合、且其选择性结合的结合常数(Ka)为约 10^{6}-10^{7} LM^{-1} 的 Mab；优选能与胃泌素激素形式结合、且 Ka 为约 10^{7}-10^{8} LM^{-1} 的 Mab，而更优选 Ka 为约 10^{9}-10^{10} LM^{-1} 的，且进一步优选 Ka 为 10^{10}-10^{11} LM^{-1}，最优选的是 Ka 为 10^{11}-10^{12} LM^{-1}。

按照本发明的方法，用于分析的样品优选来自哺乳动物生物液的样品。所

述样品包含、或怀疑含有一定量的待检测、定量或测定的肽。优选地是，样品含有以至少一种胃泌素形式存在的胃泌素激素。更优地是，样品中已被加入防腐剂以形成一种样品混合物，且该样品混合物在从哺乳动物体取样后的约 1-15 分钟以内就进行了冷冻处理。

如本文所用，用于结合的“适合条件”，是一种温度、pH 和离子强度的条件，所述条件允许抗体与其同源抗原结合、并允许进行将酶标记物偶联到抗体上来作为侦测剂的酶标记反应的进行。这种适合于抗体-抗原结合和各种标记酶反应的条件是为本领域的技术人员所熟知的，并且无需多余实验、通过常规手段即可来确定对于每个反应的特定合适条件。

如本文所用，“可检测标记物偶联抗体”是指任何标记抗体，其中，所述标记物提供了一种如酶标记物的可检测信号；或是可被另一种试剂（如标记的二抗）所检测，标记的二抗本身，可通过提供如放射性标记、酶标记、荧光或发光标记物、或者如可被偶联了亲和素的组分检测到的生物素标记等可被单独检测的组分等这些检测信号而被探测到。

如本文所用，“可检测标记物偶联的抗体复合物”是指一种复合物，所述复合物具有一种偶联了可检测标记物的抗体，所述抗体结合至其同源抗原上，该抗原可以是胃泌素激素。这种胃泌素激素-抗体复合物提供了一种能被测量的、且与所测的抗体浓度直接相关的可检测信号。在优选浓度范围中，信号与可检测标记物偶联的抗体复合物的浓度呈正比。

如本文所用，“显色剂”是指一种能被抗体偶联酶显色的试剂。例如碱性磷酸酯酶的显色剂可以是对硝基苯磷酸（pNPP）。

本发明提出一种用于测量总胃泌素（结合的和游离的）量的测定方法和一种用于评价胃泌素封闭治疗情况的方法。该测定方法如下所述。评价患者的胃泌素封闭治疗情况的方法在临床实践中特别有价值，确定何时着手进行一个或是另一个治疗方案，对于患者的治疗效果起到了关键作用。本发明的方法提供了作出这些关键决定所依据的信息。本方法提供了一种在治疗前或治疗早期（如在美国专利 5622702 中所述，在用胃泌素激素肽偶联的疫苗免疫患者后不久）的胃泌素测量方法，并提供一种或一种以上，在一段根据预期治疗已经开始产生效果的时期之后，对于总的和/或游离的胃泌素量的测量方法。

分析方法

以下是对本发明的分析方法（免疫酶分析法）的详细说明，所述分析方法通过使用针对待测的特定分子形式的胃泌素激素的C端或N端有特异性的单克隆和/或多克隆抗体，来测定如人血浆等的生物液中总的（非复合的加上与抗体复合的）或游离的（非复合的）人胃泌素激素（G17,G17-Gly,G34 或 G34－Gly）量。另外，针对分子 C 端或针对分子 N 端的多克隆抗体组合物也可分别同针对分子N端或针对分子C端的单克隆抗体组合使用。

在下述的检测中，使用了 NUNC Maxisorp, F 96 ELISA plate（目录号439454)试验平板，抗体包被溶液为硼酸缓冲溶液(20mM, pH 8.0, 含有 0. 1%叠氮化钠)。

1.平板包被： 用选择性地识别特定的待测人胃泌素分子形式的抗体，以最佳浓度包被于试验平板的反应孔的表面。

最佳抗体浓度是通过用已知浓度的待测胃泌素形式绘制一条标准曲线来确定的，该曲线在所要求的有效浓度范围中具有所要求的灵敏度和精确度。对于G17，检测的有效G17浓度范围一般是从背景浓度（约4pM或更低）至25pM，或至50pM。然而，患有胃泌素瘤的患者中，血浆胃泌素的水平可以高达800pM或甚至1000pM（1.0微摩）。本领域的普通技术人员，可以方便地确定在所要求范围内是否具有合适灵敏度和精确度，而无须进行多余的实验。

2.平板洗涤：将包被溶液倒去，加入洗涤缓冲液（每孔大约400微升）然后倒去。按要求将这个洗涤循环重复多次。洗涤缓冲液为 0.010M 磷酸缓冲液（0.0027M氯化钾，0.137M氯化钠，pH7.4，含有0.01%w/v Triton X－100）。平板洗涤可以是自动化的(下述测定中所使用的仪器为 Labsystems Wellwash 4 Mk 2, Life Sciences International (UK) Ltd, Basingstoke, UK)。

3.平板封闭：将含有蛋白质和去垢剂封闭缓冲液（含 1%BSA/0.1%Triton X-100 的包被缓冲溶液）加入反应孔。平板可以此形式储存。

4.样品和标准品的加入： 平板按上述方式进行洗涤。将含有兔 IgG(400微克/毫升)和 EDTA (3.4 mM)的检测缓冲剂(在洗涤缓冲液中加入 1% BSA, 0.1%牛丙种球蛋白和 200 KIU/毫升抑蛋白酶肽制成) 加入每个孔(100 微升/孔)。将检验标准品（如在去除了胃泌素的血浆中加入了递增量的胃泌素激素）和测试血浆样品加入反应孔内（20 微升/孔）。该反应在 4℃下过夜进行。可以通过将样品在室温下放置过夜，来方便地达到去除血清样品中胃泌素的目的。

这些用于检测总胃泌素激素的测定法中，所使用的检测缓冲液、兔 IgG 和

EDTA 混合液里含有解离肽 G17（1－9）（100 微克/毫升）。

5.偶联物的加入

洗涤后，每孔中加入检测缓冲液，所述检测缓冲液含有对待测的胃泌素激素形式N端有特异性的、偶联了酶标记物的单克隆或多克隆抗体以及兔 IgG(100 微克/毫升）。反应在室温下进行（＋22℃），用微板摇床进行振荡。用于侦测复合物显色的合适酶底物的例子有：用于碱性磷酸酯酶的硝基-苯磷酸，或用于辣根过氧化物的四甲基联苯胺磺酸盐（TMBS）。显色的程度可通过吸光度单位（AU, 如果是对硝基酚，读取 405nm 的吸光度；如果是 TMBS，读取 450nm 的吸光度）读出，可以作为测试样品中 G17 的含量的指标，其确切浓度可以通过读取测试样品的吸光度、再参考由已知浓度胃泌素激素所作出的标准曲线来换算得出。

7.读数 当得到足够检测信号时，使用如全波长酶标仪或荧光酶标仪等仪器对信号进行测量。

8.数据处理 用已知浓度的胃泌素的标准溶液所获得的检测信号，来建立一条校正曲线（信号－浓度）。该校正曲线用于换算出试验样品中胃泌素形式的浓度。

用于测定总的和游离的胃泌素激素形式的量的详细检测方法描述如下：

总 G17 的测定

在本检测中，把对人胃泌素 17 C 端具特异性的抗体，包被于试验平板反应孔的表面。平板洗涤和平板封闭按照上述常规方法进行。用所述方法洗涤平板。每孔加入含有兔 IgG（400 微克/毫升）、解离肽 $G17_{(1-9)}$（100 微克/毫升）和 EDTA（3.4mM）的检测缓冲剂（100 微升/孔）。再将检测标准品(在去除了胃泌素的血浆中加入 0-4.1-10.2-26.6-64-160-400-1000pM 的 G17)和测试血浆样品加入孔内(20 微升/孔)。反应在冰箱内 4℃过夜进行。洗涤后，在每孔中加入检测缓冲液，该检测缓冲液含有对 G17 的 N 端有特异性的、偶联了碱性磷酸酯酶的单克隆抗体以及兔 IgG（100 微克/毫升）。洗涤后，加入发色底物 pNPP，保温平板并使其进行显色，用上述酶标仪读取吸光度。用已知浓度的标准 G17 溶液所获得的检测信号，来建立一条校正曲线（信号－浓度）。该校正曲线用于换算出测试样品中 G17 的浓度。图 1 显示了一条校正曲线的示意图。

游离 G17 的测定

把对人胃泌素 17 的 N 端具特异性的抗体，包被于试验平板反应孔的表面。

平板洗涤和平板封闭按照上述常规方法进行。用所述方法洗涤平板。每孔加入含有兔 IgG（400 微克/毫升）的检测缓冲剂（在洗涤缓冲液中加入 1%BSA，0.1%牛丙种球蛋白和 200 KIU/毫升的抑蛋白酶肽配成），反应在室温下（＋22℃）进行，用微板摇床进行振荡。洗涤后，在每孔中加入检测缓冲液，该检测缓冲液含有对 G17 的 C 端有特异性的、偶联了碱性磷酸酯酶作为酶标记物的单克隆抗体以及兔 IgG（100 微克/毫升）。反应在室温下（＋22℃）进行，用微板摇床进行振荡。洗涤后，加入发色底物 pNPP，保温平板并使其进行显色，用上述酶标仪读取吸光度。用已知浓度的标准 G17 溶液所获得的检测信号，来建立一条如总 G17 测定中所述的校正曲线（信号－浓度）。该校正曲线用于换算出测试样品中 G17 的浓度。图 2 显示了一条校正曲线的示意图。

总 G17－Gly 的测定

把对人甘氨酸—胃泌素 17 分子的 C 端具特异性的抗体，按上述方法包被于试验平板反应孔的表面。平板洗涤和平板封闭按照上述常规方法进行。用所述方法洗涤平板。每孔加入含有兔 IgG（400 微克/毫升）、解离肽 $G17_{(1-9)}$（100 微克/毫升）和 EDTA（3.4mM）的检测缓冲剂（在洗涤缓冲液中加入 1%BSA，0.1%牛丙种球蛋白和 200 KIU/毫升的抑蛋白酶肽配成）（100 微升/孔）。再将检测标准品（在去除了胃泌素的血浆中加入 0-4.1-10.2-26.6-64-160-400-1000pM 的 G17-Gly)和测试血浆样品加入孔内(如，20 微升/孔)。反应在 4℃过夜进行。后续步骤同前面总 G17 的测定中所述。

游离 G17－Gly 的测定

把对 G17－Gly 分子 N 端具特异性的抗体，包被于试验平板反应孔的表面。平板洗涤和平板封闭按照上述常规方法进行。用所述方法洗涤平板。每孔加入含有兔 IgG（400 微克/毫升）的检测缓冲剂（在洗涤缓冲液中加入 1%BSA，0.1%牛丙种球蛋白和 200 KIU/毫升的抑蛋白酶肽配成）（如，100 微升/孔），接着加入样品和标准品（如，50 微升/孔），反应在室温下（＋22℃）进行，用微板摇床进行振荡。洗涤后，在每孔中加入检测缓冲液，该检测缓冲液含有对 G17-Gly 的 C 端有特异性的、偶联了碱性磷酸酯酶的单克隆抗体和兔 IgG(100 微克/毫升）。反应在室温下（＋22℃）进行，用微板摇床进行振荡。后续步骤同前面游离 G17 的测定中所述。

G34 的测定

把对人胃泌素 34 的 N 端具特异性的抗体，包被于试验平板反应孔的表面。平板洗涤和平板封闭按照上述常规方法进行。用所述方法洗涤平板。每孔加入含有兔 IgG（400 微克/毫升）的检测缓冲剂（在洗涤缓冲液中加入 1%BSA，0.1%牛丙种球蛋白和 200 KIU/毫升的抑蛋白酶肽配成）（如，100 微升/孔），接着加入样品和标准品（如，50 微升/孔），反应在室温下（＋22℃）进行，用微板摇床进行振荡。洗涤后，在每孔中加入检测缓冲液，该检测缓冲液含有对 G34 的 C 端有特异性的、偶联了碱性磷酸酯酶的单克隆抗体和兔 IgG（100 微克/毫升），反应在室温下（＋22℃）进行，用微板摇床进行振荡。加入发色底物 pNPP，用酶标仪读取平板反应孔中的样品信号，后续的数据处理同上所述。用已知浓度的标准 G34 溶液所获得的检测信号，来建立一条校正曲线（信号－浓度）。该校正曲线用于换算出测试样品中 G34 的浓度

实施例

实施例 1：去除了胃泌素的血清样品（其中已加入已知量的胃泌素 17）中总胃泌素 17 的测定。

通过将血清在室温下放置过夜，使内源性蛋白酶能彻底降解现存的胃泌素，从而去除血清中的胃泌素激素。

为了确定批内分析的精密度和准确性，在去除了胃泌素的血清样品的重复抽取样本中加入已知量的胃泌素 17（G17），以达到表 1 所示的额定浓度。采取与检测含抗胃泌素激素抗体的血清样品同样的方法，使用 N 端胃泌素肽进行总 G17 的测定。在上述样品/标准品加入的步骤中，N 端胃泌素肽 G17(1-9)以 100 微克/毫升的浓度进行添加。表 1 中所给出的结果表明，在 ELISA 法的公认限度内，该检测法准确地定量了 G17，所述 ELISA 限度相对误差为±20%。更为重要的是，在 G17 浓度等于和小于 100pM（上述浓度即为通常在患者中所测得的浓度）时，该测定法及其准确。

表 1

总胃泌素 17 测定

胃泌素 17 浓度（pM）					
	7.50	15.00	100.0	600.0	720.0
均值	7.5	14.3	99.3	717.1	814.1
sd	0.8	0.9	1.7	16.2	7.7
CB（%）	11.2	6.5	1.7	2.3	0.9
RE（%）	0.0	-4.7	-0.7	19.5	13.1

n＝6 测定 6 个重复抽取样本

sd 标准差

CV变异系数（四舍五入前计算）

RE相对误差（四舍五入后计算）

实施例 2：去除了胃泌素的血清样品（其中已加入已知量的胃泌素 17）中游离胃泌素 17 的测定。

本测定是按照前面“测定方法”中所描述的游离胃泌素 17（G17）测定的方法进行操作。表 2 中所给出的结果表明，在 ELISA 法的公认限度内，该检测法准确地定量了游离的 G17。更为重要的是，在 G17 浓度等于和小于 100pM（上述浓度即为通常在患者中所测得的浓度）时，该测定法及其准确。

表 2

游离胃泌素 17 的测定

批内分析的精密度和准确度数据

	胃泌素 17 浓度（pM）				
	7.50	15.00	100.0	600.0	720.0
均值	7.55	13.41	94.01	556.6	892.8
sd	1.67	1.26	5.47	43.01	112.1
CB（%）	22.2	9.4	5.8	7.7	12.6
RE（%）	0.7	-10.6	-6.0	－7.2	－0.8

n＝9 测定 9 个重复抽取样本

sd 标准差

CV变异系数（四舍五入前计算）

RE相对误差（四舍五入后计算）

实施例 3：胃泌素 17 的稳定性

室温下（约 22℃）胃泌素的稳定性，可以通过用上述的总胃泌素的测定法来评估，即在样品刚准备好时（0 小时样品）和室温下在实验台上放置 2 小时后两个时段，测量已知 G17 浓度为 15，100 和 600pM 的样品中的总 G17 量。结果如下方表 3 所示，表明每个样品中的 G17 浓度都大幅度降低。这证明了在使用本发明的检测方法来测定样品的胃泌素激素量时，正确的样品处理技术对于获得准确的胃泌素数值是很重要的，所述正确的样品处理技术包括从病人血液样品中制备血浆时要尽可能少地暴露于较高的温度。

表 3

总胃泌素 17 的测定

室温下的胃泌素 17 稳定性（ca 22℃）

		胃泌素 G17 浓度的测量值（pM）		
		15	100	600
0[a] 小时	均值	11.6	89.4	605.5
	sd	2.8	4.3	25.0
	CB（%）	23.8	4.8	4.1
	RE（%）	-22.7	-10.6	0.9
2 小时	均值	5.5	59.1	400.5
	sd	3.1	2.0	19.7
	CB（%）	55.2	3.5	4.9
	RE（%）	-63.3	-40.9	-33.3

A 以均值结果作为基准

sd 标准差

CV变异系数（四舍五入前计算）

RE相对误差（四舍五入后计算）

参考

在本发明中提及的所有专利和出版物都在此被整体引用作为参考。

杂交瘤细胞系的保存

用于产生本发明中特定 MAb 的下列杂交瘤，自 2004 年 3 月 25 日起被保存于美国模式培养物收集中心（ATCC，Manassas，VA）。

1. 产生 MAb 400-1 的杂交瘤 400-1 指定登记号为_____。
2. 产生 MAb 400-2 的杂交瘤 400-2 指定登记号为_____。
3. 产生 MAb 400-3 的杂交瘤 400-3 指定登记号为_____。
4. 产生 MAb 400-4 的杂交瘤 400-4 指定登记号为_____。
5. 产生 MAb 401-2 的杂交瘤 401-2 指定登记号为_____。
6. 产生 MAb 445-1 的杂交瘤 445-1 指定登记号为_____。
7. 产生 MAb 445-2 的杂交瘤 445-2 指定登记号为_____。
8. 产生 MAb 458-1 的杂交瘤 458-1 指定登记号为_____。

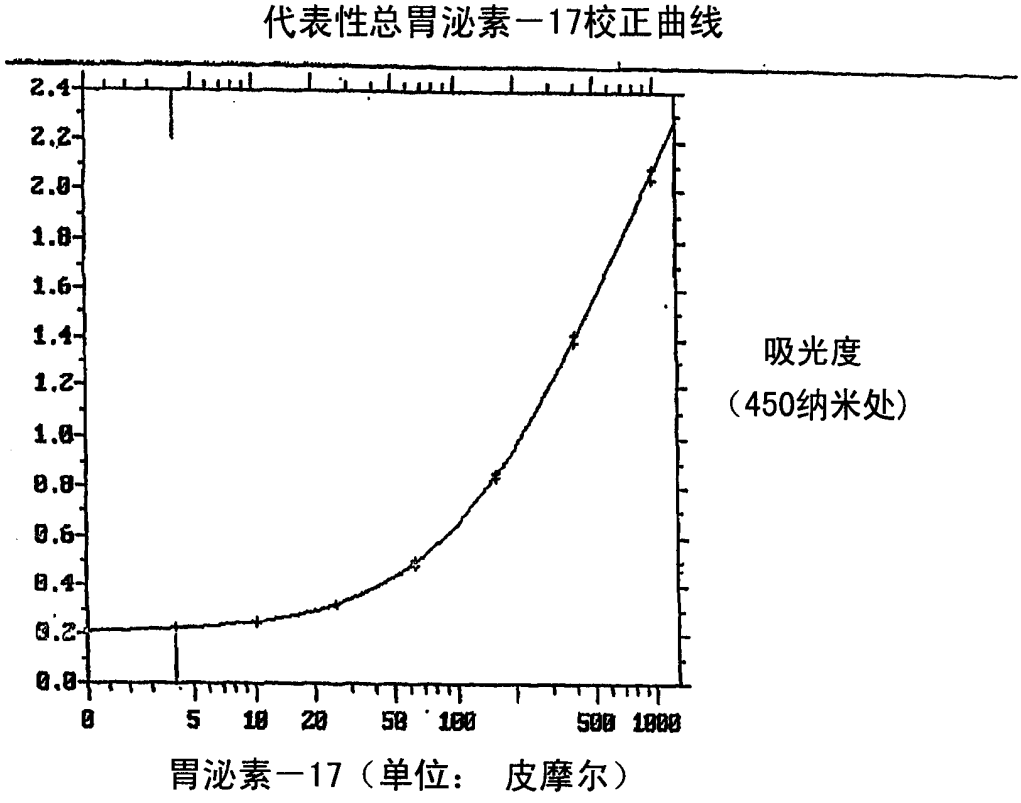

代表性总胃泌素－17校正曲线
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
20
50
100
500
1000
吸光度
（450纳米处）
胃泌素－17（单位： 皮摩尔）

图 1

代表性游离胃泌素－17校正曲线

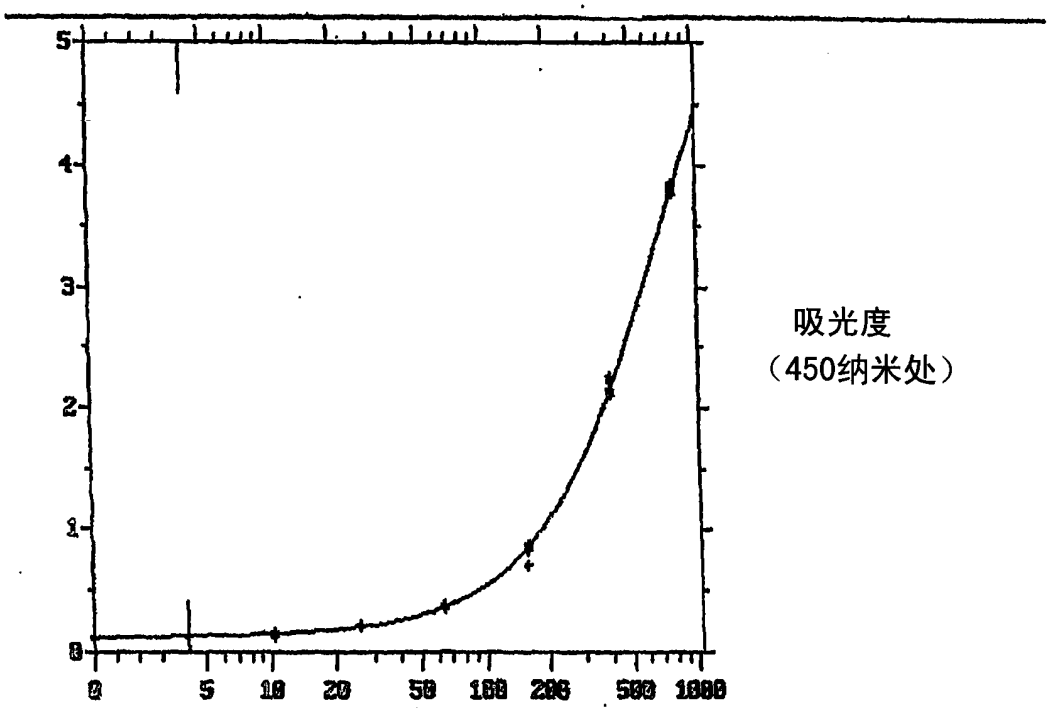


图 2