

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/573
C07K 16/40 C12N 9/66

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99810646.1

[43] 公开日 2001 年 10 月 10 日

[11] 公开号 CN 1317088A

[22] 申请日 1999.9.3 [21] 申请号 99810646.1
[30] 优先权
[32] 1998.9.8 [33] DE [31] 19840900.1
[32] 1999.5.25 [33] DE [31] 19923892.8
[86] 国际申请 PCT/DE99/02816 1999.9.3
[87] 国际公布 WO00/14542 德 2000.3.16
[85] 进入国家阶段日期 2001.3.7
[71] 申请人 生化研究所有限公司
地址 德国罗斯托克市
[72] 发明人 汉斯-沃纳·海因里希 赖纳·克莱纳特
乌多·迈尔
海因茨-于尔根·瓦格纳

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司
代理人 咎美琪

权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 检测胰腺功能紊乱的诊断方法
[57] 摘要

描述了一种认定胰腺功能紊乱的方法。本发明通过使用部分胰腺 弹性蛋白酶异酶和合成的氨基酸序列及其在免疫化学测试过程中的应用,实现了该目的。

ISSN 1008-4274

1、胰腺功能紊乱的诊断方法，其特征是，在一个病人的血清、分泌物或外分泌物中测定所有胰腺弹性蛋白酶（异酶）的总含量。

2、如权利要求 1 所述的方法，其特征是，优选利用使用单或多
5 克隆抗体的免疫化学系统进行测定，该系统能够单独特异或者交叉反应地认定所有的弹性蛋白酶异酶，但 Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg 除外。

3、如权利要求 1 和 2 所述的方法，其特征是，所使用的抗体借助于抗原得到，该抗原为完整的弹性蛋白酶 1、2 和 3 或其下属单位，
10 但氨基酸序列 Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg 或其免疫学有效的部分序列除外。

4、如权利要求 3 所述的方法，其特征是，使用合成肽作为抗原，该合成肽在动物免疫后诱发抗体，并能认定交叉反应的多种弹性蛋白酶，但氨基酸序列 Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg 除外。

15 5、如权利要求 1-4 所述的方法，其特征是，优选使用下列合成肽：

NH₂-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH

NH₂-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH

NH₂-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH

20 NH₂-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH

NH₂-G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I-COOH

NH₂-H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V-COOH

NH₂-W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A-COOH

NH₂-V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T-COOH

25 NH₂-G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q-COOH

NH₂-S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N-COOH

NH₂-K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D-COOH

NH₂-G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W-COOH

NH₂-G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L-COOH

NH₂-S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y-COOH

5 NH₂-F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-Y-V-F-T-COOH

6、如权利要求 1-5 所述的方法，其特征是，在免疫化学认定系统中单独或者组合使用抗体。

7、利用大便或体液诊断和过程控制胰腺疾病的免疫测试盒 (Testkits)，含有权利要求 2-6 所述的抗体。

10 8、通过常见免疫方法获取单和/或多克隆抗体的方法，该抗体与人大便或体液中的弹性蛋白酶 1 发生特异性反应，其特征是，使用 A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N 和 G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q 或其免疫原分肽作为抗原来使脊椎动物门特别是小型哺乳动物和鸟类免疫。

15 9、如权利要求 8 所述的方法，其特征是，使游离的肽在免疫前结合到合适的载体物质上，尤其是血球或清蛋白上。

10、如权利要求 8 和 9 所述的方法，其特征是，使用鸡作为试验动物生产多克隆抗体。

11、如权利要求 8-10 制备的多克隆抗体。

20 12、如权利要求 8-10 制备的单克隆抗体。

13、肽 A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N。

14、肽 Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R。

15、肽 R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N。

16、肽 G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q。

25 17、人类弹性蛋白酶 1 的提纯和检测系统，其特征是，含有至少一种本发明的抗体。

18、利用蛋白和体液诊断和过程控制胰腺疾病和胰纤维性囊肿病的权利要求 17 所述的免疫测试盒。

19、如权利要求 16 和 17 所述的免疫测试盒，其特征是，使用两种不同的抗体（三明治 ELISA）。

检测胰腺功能紊乱的诊断方法

本发明涉及一种检测胰腺功能紊乱的诊断方法。应用领域为药品和制药工业。

胰腺功能紊乱可能是各种不同疾病的结果，其诊断应当通过确定功能的基准来论证。最常见的胰腺疾病是慢性复发和急性胰腺炎。

慢性胰腺炎是一种缓慢进育(progrediende)的疾病，其中作用良好的胰腺组织在一种硬化过程中逐渐失活。其标志是临床症状（腹部疼痛、脂肪痢、体重减少），胰腺典型的形态改变（钙化、不规则限制的胰腺管扩张(dilatierter)）以及进育性外分泌和内分泌功能损失（消化不良、糖尿病）。慢性胰腺炎在西欧的发病率是每年每 100000 的居民中有 6-8 个新病人。由于酒精消耗的不断增长，慢性胰腺炎的诊断越来越多。

为了进行临床诊断和形态学诊断，可以确定各种功能基准。最敏感的分析方法是分泌素-雨蛙肽或分泌素-缩胆囊素试验，但病人承担的负担太重，且用时太长。作为间接的方法可以使用 Landh-、NBT-PABA-和 Pancreoaury-试验。测定血清中的胰蛋白酶和大便中的胰凝乳蛋白酶也有一定的实际意义。所有这些间接试验方法的缺点是特异性不够。

在所有可供使用的间接功能试验中，弹性蛋白酶的测定具有最高的敏感性和特异性（Loeser,C., Therapie&Erfolg 1997; 1:411-413）。在近几年的日常实践中，这种方法被用作为外分泌胰腺功能诊断的标准。这种试验的基础是弹性蛋白酶 1 的多克隆抗体（Elastase 1-RIA, Abbott）或单和/或多克隆抗弹性蛋白酶 1 抗体，该抗体通过用含有氨基酸序列 Thr-Met-Val-Ala-Gly-Gly-Asp-Ile-Arg 或者其具有免疫活性的部分序列的抗原免疫而得到（EP 0 547 059 B1）。

胰腺弹性蛋白酶是一种蛋白分解消化酶。与胰腺诊断的常规参数（例如大便的胰凝乳蛋白酶活性）相比，定量弹性蛋白酶测定具有突出的优点。该酶仅仅在胰腺中形成，在肠道中具有超常的稳定性，也就是说，弹性蛋白酶的浓度反映了胰腺的分泌功能。

5 虽然优于其它外分泌参数，但是，传统的弹性蛋白酶 1 - ELISA 在许多情况下并不能测出胰腺弹性蛋白酶，尽管其以明显的浓度存在。

因此，本发明的目的是开发一种在证明胰腺弹性蛋白酶的基础上认定胰腺功能紊乱的敏感的方法。

10 通过系统地检测用传统的 ELISA（酶标记免疫吸附测定法）对弹性蛋白酶 1 不反应的大便样品，电泳分离后可以得到含有弹性蛋白酶的样品。进一步的特征分析得出，该蛋白质是用传统的试验抗体根本无法测出的不同的异酶。很明显，这种酶具有突出的遗传多晶型，这已经在专业文献和胰腺弹性蛋白酶 1、2 和 3 的说明书中有所反映。

15 通过本人的试验也可以证明，至少同时存在两种异酶。也可以看到，这种弹性蛋白酶浓度对胰腺损害的依赖关系与弹性蛋白酶 1 完全相同。

与限定于特别证明胰腺弹性蛋白酶 1 的已知方案相反，本发明出人意料地发现，通过证明尽可能所有的胰腺弹性蛋白酶的同种型（目前已知的是胰腺弹性蛋白酶 1、2 和 3），可以决定性地改进胰腺功能的可预测性。因此，本发明涉及一种以常规方式制备抗弹性蛋白酶抗体的方法，但其特征在于，所使用的抗原单独或组合体现所有已知的弹性蛋白酶异酶或其部分片段或者交叉反应的合成序列。

20 部分片段优选通过肽合成得到，其中氨基酸序列事先借助于结构分析方法由全长序列得出或者在蛋白质测序后得到。虽然肽本身即可引起抗体感应，但本发明证明，这些肽结合在常见的载体物质如血球

上是有利的。用本发明的肽有可能像多克隆抗体那样制备单克隆抗体。

为了制备本发明的多克隆抗肽抗体，需要用这些肽对试验动物如家兔、海豚、山羊、鸡或鱼以已知方式进行免疫。为了制备单克隆抗体，用肽对特定的 B 细胞进行诱发，该细胞与骨髓瘤细胞融合后产生杂交瘤，以已知的克隆方法在细胞线中培养，产生 (Sezernieren) 特定的单克隆抗体。本发明的单克隆或多克隆抗体只与所使用的抗原决定基或者与所有已知的弹性蛋白酶异酶反应。

可以证明，抗 A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N, G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q, G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I, H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V, W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A, V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T, G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q, S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N, K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D, G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W, G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L, S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y, F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T, 肽的抗体与优选弹性蛋白酶的同种型发生高特异性反应，与大便的其它成分不发生特异反应。

本发明的另一个主题是本发明的弹性蛋白酶抗体在检定和定量测定体液和大便中所有已知弹性蛋白酶异酶中的应用。因此，本发明还涉及检定系统，特别是用来确定胰腺功能以协助认定该器官功能紊乱的免疫化学检定系统。为此，将特定的抗体吸附或用已知的耦合方法化学结合到合适的载体上。膜和颗粒适合作为载体。利用本发明的三明治 ELISA 并使用杂交活性或一种不同组合的抗原决定基抗体，可以快速而准确地检定和定量测定大便和血清或血浆中的胰腺弹性蛋白酶。

其用处是在腹部疼痛和外分泌胰腺不足时诊断或者排除胰腺的参

与。

在某些情况下，找到弹性蛋白酶即可肯定地诊断胰腺功能紊乱。在这些情况下，本发明的方法可以如下进行：

将人类弹性蛋白酶的 DNA 序列 (JP 198700276 - A/6) 转移到氨基酸序列中。利用常见的蛋白质结构程序可以确定多种具有原始抗原决定基结构的氨基酸序列。可以证明，抗 A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N 和 G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q 肽的抗体高度特异性地结合在弹性蛋白酶 1 上，并且与大便的其它成分不发生非特异性反应。

10 本发明涉及一种以常见方式制备抗弹性蛋白酶抗体的方法，但其特征在于，所使用的特异性抗原事先已借助于结构分析方法由氨基酸序列得出或化学合成。本发明也可以使用部分合成肽来制备抗体。虽然肽本身即可引起抗体感应，但本发明证明，这些肽结合在常见的载体物质如血球上是有利的。用本发明的肽有可能像多克隆抗体那样制
15 备单克隆抗体。

为了制备本发明的多克隆抗肽抗体，需要用这些肽对试验动物如家兔、海豚、山羊、鸡或鱼以已知方式进行免疫。为了制备单克隆抗体，用肽对特定的 B 细胞进行诱发，该细胞与骨髓瘤细胞融合后产生杂交瘤，以已知的克隆方法在细胞线中培养，产生 (Sezernieren) 特定
20 的单克隆抗体。本发明的单克隆或多克隆抗体只与所使用的抗原决定基或者与成熟的弹性蛋白酶 1 反应。

本发明的另一个主题是本发明的弹性蛋白酶 1 - 抗原决定基特异抗体在检定和定量测定体液和大便中弹性蛋白酶 1 中的应用。因此，本发明还涉及检定系统，特别是用来确定胰腺功能以协助认定该器官
25 功能紊乱的免疫化学检定系统。为此，将特定的抗体吸附或用已知的耦合方法化学结合到合适的载体上。膜和颗粒适合作为载体。利用本

发明的三明治 ELISA 并使用各两种不同的抗原决定基抗体，可以快速而准确地检定和定量测定大便和血清或血浆中的弹性蛋白酶 1。

实施例 1 - 制备针对成熟的人类弹性蛋白酶 1 确定片段的特异的抗肽抗体。

5 借助于 Merrifield 的固相法合成具有氨基酸序列 $\text{NH}_2\text{-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH}$ 和 $\text{NH}_2\text{-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH}$ 的肽。用已知的方法将肽连接在 Napfschnecken 血球 (KLH) (1mg 肽/mg KLH) 上。在添加
10 Freundschien 辅剂的条件各用 300 μg 该共轭物对家兔或鸡进行免疫。三次接种后使动物放血。得到血浆后以 ELISA 测试抗血清的特异性。为此，将游离的肽吸附到微滴定玻璃板空腔的表面上。用抗血清对空腔孵化后彻底洗涤。用抗家兔或抗鸡 POD 共轭物和 TMB 作为基质，以常见的方式检测抗原 - 抗体反应。每种抗血清只与同系的肽
15 反应。

实施例 2 - 检测本发明抗体的特异性

弹性蛋白酶 1 的特异性可以在蛋白质印迹中检测。为此，借助于聚丙烯酰胺凝胶电泳将大便中粗略提纯或高度提纯的弹性蛋白酶 1 按照其与伴随杂质的相对分子量分离出来。借助于一个“半干印迹”设
20 备将凝胶的蛋白质区转移到硝基纤维素中。膜上空余的结合位置被再悬浮的无水贫乳饱和后，用 1:500 稀释的抗肽抗血清孵化膜。剧烈洗涤膜，以去除所有未特异性结合的抗体后，用磷酸酶标记的抗家兔抗体孵化膜。洗涤后留在膜上的特异性结合的二次抗体在添加基质后明显可见。由此表明，在使用的样品中仅仅检测到弹性蛋白酶。

25 实施例 3 - 使用本发明的抗体以一种 ELISA 测定弹性蛋白酶 1

以基于三明治技术的固相酶免疫分析测定血清样品或大便样品中

的弹性蛋白酶 1。针对弹性蛋白酶 1 抗原决定基的一种多克隆抗体被溶解在 pH9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐混合缓冲液中，并放入微滴定玻璃板的孔中。在 4℃ 孵化 12 小时后，通过用 PBS 洗涤除去未结合的抗体。载体材料上仍然空余的位置由一种含有乙醇胺和 Tween 20 的 PBS 缓冲液封闭。封闭在室温下进行 90 分钟。洗涤后，将 PBS 稀释的血清或大便样品滴定在孔中。通过洗涤结束在室温下进行的 60 分钟的孵化。向结合在第一种抗体上的弹性蛋白酶添加一种与生物素共轭的特异多克隆抗体的第二种弹性蛋白酶。

孵化 30 分钟并洗涤后，用与过氧化物酶共轭的链酶亲和素检定生物素标记的抗体。由最后的洗涤步骤清除未结合的链酶亲和素。接着将 TMB 作为基质添加到过氧化物酶中，在一定时间后通过添加 HCl 终止显色反应。测定光学密度的变化。显色反应的强度与样品中弹性蛋白酶 1 的浓度成正比。

实施例 4 - 制备针对胰腺弹性蛋白酶同种型确定片段的特异的抗肽抗体。

借助于 Merrifield 的固相法合成具有氨基酸序列 A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N, G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q, G-T-E-A-G-R-N-S-W-P-S-Q-I, H-N-L-S-Q-N-D-G-T-E-Q-Y-V, W-G-K-T-K-T-N-G-Q-L-A, V-S-S-R-G-C-N-V-S-R-K-P-T, G-G-E-E-A-R-P-N-S-W-P-W-Q, S-S-S-R-T-Y-R-V-G-L-G-R-H-N, K-D-W-N-S-N-Q-I-S-K-G-N-D, G-P-L-N-C-Q-A-S-D-G-R-W, G-A-L-P-D-D-L-K-Q-G-R-L, S-L-Q-Y-E-K-S-G-S-F-Y, F-G-C-N-T-R-R-K-P-T-V-F-T 的肽。用已知的方法将肽连接在 Napfschnecken 血球 (KLH) (1mg 肽/mg KLH) 上。在添加 Freundschén 辅剂的条件
下各用 300 μg 该共轭物对家兔或鸡进行免疫。三次接种后，使动物放血。得到血浆后（通过蛋白质 A 柱或者分馏沉淀提纯）用 ELISA

测试其特异性。为此，将游离的肽吸附到微滴定玻璃板空腔的表面上。用同系或异种的抗体对空腔孵化后彻底洗涤。用抗家兔或抗鸡 POD 共轭物和 TMB 作为基质，以常见的方式检测抗原 - 抗体反应。每种抗血清只与同系的肽反应。

5 实施例 5 - 检测本发明抗体的特异性

胰腺弹性蛋白酶不同种型抗体的特异性可以在蛋白质印迹中检测。为此，借助于聚丙烯酰胺凝胶电泳将大便中粗略提纯或高度提纯的弹性蛋白酶 1，按照其与伴随杂质的相对摩尔量分离出来。借助于一个“半干印迹”设备，将凝胶的蛋白质区转移到硝基纤维素中。膜上空余的结合位置被再悬浮的无水贫乳饱和后，用稀释的抗肽抗体本身或其组合物孵化膜。剧烈洗涤膜以去除所有未特异性结合的抗体后，用碱性磷酸酶 - 标记的抗家兔抗体孵化膜。洗涤后留在膜上的特异性结合的二次抗体在添加基质后明显可见。由此表明，在所有含有单一抗体或抗体混合物的样品中都可以检测到弹性蛋白酶，但并未检测到每种抗体的所有同种型。

15 实施例 6 - 使用本发明的抗体测定大便和血清中的胰腺弹性蛋白酶。

以基于三明治技术的固相 ELISA 测定血清、血浆或大便中的弹性蛋白酶。为此，一种或多种本发明的抗体混合物被溶解在 pH9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐混合缓冲液中，并放入微滴定玻璃板的孔中。在 4℃ 孵化后，通过用 PBS 洗涤，除去未结合的抗体。载体材料上仍然空余的位置由一种含有乙醇胺和 Tween 20 的 PBS 缓冲液封闭。封闭在室温下进行 90 分钟。洗涤后，将 PBS 稀释的血清或大便样品滴定在孔中。通过洗涤结束在室温下进行的 60 分钟的孵化。使用与生物素共轭的一或多种本发明的抗体混合物作为检测抗体。孵化 30 分钟并洗涤后，用与过氧化物酶共轭的链酶亲和素检定生物素标记的抗体。

由最后的洗涤步骤清除未结合的链酶亲和素。接着用 TMB 作为基质测定过氧化物酶的浓度。添加 HCl 以终止酶反应后，测定光学密度的变化。显色反应的强度与样品中弹性蛋白酶的浓度成正比。