

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

G01N 33/49

G01N 33/493 G01N 33/577

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99107730. X

[43]公开日 1999年11月10日

[11]公开号 CN 1234504A

[22]申请日 99.3.30 [21]申请号 99107730. X

[30]优先权

[32]98.3.30 [33]JP [31]84333/98

[71]申请人 三井化学株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 桥本吉秀 河野直子

横野正 入江实

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

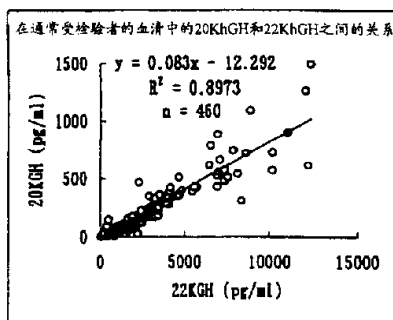
代理人 齐曾度

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 测量人体生长激素的方法

[57]摘要

根据分子量约为 22000 的人体生长激素(22K hGH)和分子量约为 20000 的人体生长激素(20K hGH)在血液或尿中的浓度的比率,测量已施用的 hGH 在血液中的浓度;或者根据 22K hGH 和 22K hGH 在血液或者尿中的浓度之间的比率判断是否已施用了 hGH。



ISSN 1008-4274

## 权 利 要 求 书

1、一种测定施用的人体生长激素（hGH）在血液中的浓度的方法，该方法是基于分子量约为 22000 的人体生长激素（22 K hGH）在血液中的浓度和分子  
5 子量约为 20000 的人体生长激素（20 K hGH）在血液中的浓度之间的比率进行测定的。

2、如权利要求 1 所述的方法，该方法包括如下步骤：

（1）测量在被检验者未施用人体生长激素时，所述分子量约为 22000 的人体生长激素（22 K hGH）和分子量约为 20000 的人体生长激素（20 K hGH）  
10 的浓度，然后确定测得的 20 K hGH 或 22 K hGH 浓度对于总的 hGH 浓度（22 K hGH 和 20 K hGH 浓度之和）的比率，该比率被定义为生理比率，

（2）在已施用人体生长激素之后或者当怀疑施用抽取被检验者的血液，然后，按与步骤（1）中相同的方式确定 20 K hGH 或 22 K hGH 浓度对于总的 hGH 浓度的比率，该比率被定义为测量比率，以及

15 （3）根据步骤（1）中确定的生理比率和步骤（2）中确定的测量比率之间的差值，确定施用的人体生长激素在血液中的浓度。

3、如权利要求 2 所述的方法，其中所述对分子量约为 22000 的人体生长激素和分子量约为 20000 的人体生长激素在血液中的浓度的测量是利用特异性针对每种所述生长激素的抗体进行的。

20 4、如权利要求 3 所述的方法，其中所述的抗体是单克隆抗体。

5、如权利要求 2 所述的方法，其中所施用的生长激素是分子量约为 22000 的人体生长激素。

6、如权利要求 2 所述的方法，其中所施用的生长激素是分子量约为 20000 的人体生长激素。

25 7、一种确认或判断是否已施用人体生长激素（hGH）的方法，该方法是基于分子量约为 22000 的人体生长激素（22K hGH）在血液中的浓度和分子量约为 20000 的人体生长激素（20 K hGH）在血液中的浓度的比率实现的。

8、如权利要求 7 所述的方法，该方法包括如下步骤：

（1）测量在被检验者未施用人体生长激素时的分子量约为 22000 的人体生  
30 长激素（22 K hGH）和分子量约为 20000 的人体生长激素（20 K hGH）各自

的浓度，然后确定测得的 20 K hGH 或者 22 K hGH 浓度对总的 hGH 浓度（22 K hGH 和 20 K hGH 浓度之和）的比率，该比率被定义为生理比率，

5 (2) 在已施用人体生长激素之后或当猜测施用抽取被检验者血液，然后按与步骤（1）中相同的方式确定 20 K hGH 或者 22 K hGH 对于总的 hGH 浓度的比率，该比率被定义为测量比率，以及

(3) 通过将步骤（1）中确定的生理比率和步骤（2）中确定的测量比率相比较，确定已施用的人体生长激素在血液中的浓度。

9、如权利要求 8 所述的方法，其中对分子量约为 22000 的人体生长激素和分子量约为 20000 的人体生长激素在血液中的浓度的测量是利用特异性针对所述生长激素的抗体完成的。

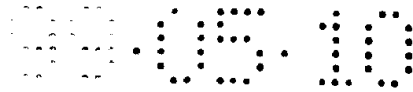
10、如权利要求 9 所述的方法，其中所述的抗体是单克隆抗体。

11、如权利要求 8 所述的方法，其中所施用的生长激素是分子量约为 22000 的人体生长激素。

12、如权利要求 8 所述的方法，其中所施用的生长激素是分子量约为 20000 的人体生长激素。

13、一种测定施用的人体生长激素在尿中的浓度的方法，该方法是基于分子量约为 22000 的人体生长激素（22 K hGH）和分子量约为 20000 的人体生长激素（20 K hGH）在尿中的浓度的比率进行测定的。

14、一种确认或者判断是否已经施用人体生长激素（hGH）的方法，该方法是基于分子量约为 22000 的人体生长激素（22 K hGH）和分子量约为 20000 的人体生长激素在尿中的浓度的比率实现的。



## 说明书

### 测量人体生长激素的方法

5 本发明涉及测定外部施用的人体生长激素在受检验者的血液或尿中的浓度的方法；以及确认人体生长激素的外部施用的方法。

更具体地说，上述方法包含的步骤有：

(a)对在外部施用至少一种人体生长激素的受检验者的血液或尿中的 2 种人体生长激素的各自浓度进行测量，

10 (b)计算它们的比率，以及

(c)测定外部施用的人体生长激素的浓度或者确认外部施用。

这些方法还可以包含的步骤有：

(i)对在没有施用人体生长激素的正常状态受检验者的血液或尿中两种类型的人体生长激素的各自浓度进行测量。

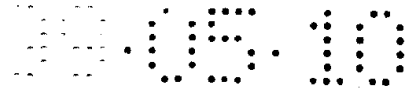
15 (ii)计算在步骤(i)中所测量的它们的浓度之和以及人体生长激素中的某一种或每一种的浓度对于经此得到的总浓度的比率，

(iii)在至少施用一种人体生长激素之后或者在怀疑施用了人体生长激素时，对受检验者的血液或尿中的两种类型人体生长激素的每种浓度进行测量，

20 (iv)计算在步骤(iii)中所测量的它们的浓度之和以及人体生长激素中的某一种或每一种的浓度对经此得到的总浓度的比率，

(v)通过比较在步骤(ii)中得到的比率和在步骤(iv)中得到的比率，测定外部施用的人体生长激素的浓度或者确认外部施用。

据知有两种人体生长激素（缩写 hGH），它们是通过根据相同基因可变剪接生成的，其中一种具有的分子量约 22000（缩写为 22K hGH），另一种具有  
25 的分子量约 20000（缩写为 20K hGH）。22K hGH 是一种包含 191 个氨基酸的蛋白质。还已知这种 22K hGH 占血液中 hGH 总量的约 90%。另一方面，20K hGH 是包含 176 个氨基酸的蛋白质。在血液中出现 20K hGH 与 22K hGH 相比数量较少，据推算约占血液中 hGH 总量的 10%。20K hGH 和 22K hGH 都是由原本相同的基因编码的蛋白质。因此，两种蛋白质的结构即它们的氨基酸序列是  
30 十分相似的。它们之间的差别仅在于，20K hGH 的结构中缺失了 15 个氨基酸



残基，它们对应于距离 22K hGH 中的 N 末端的第 32 到第 46 位氨基酸残基。

通过利用重组 DNA 技术，已大量地制取 22K hGH 十年以上，并已得到其特异性抗体。这就导致特异性针对 22K hGH 的免疫化学测定方法的发展。另一方面，难于利用重组 DNA 技术来表达 20K hGH，因此不可能得到具有与天然类型的 20K hGH 相同结构的高纯度的大量的重组 20K hGH。因此，没有提供特异性测量 20K hGH 的方法。

然而，通过利用大肠杆菌转化体，最近已研究出一种能够高纯度和大量地得到天然类型的 20 K hGH 的方法 (Uchida 等人., J. Biotechnology: 55:101-112(1997))。此外，已经制取单克隆抗体，其特异性地与天然类型的 20 K hGH 反应而基本上不与 22 K hGH 发生交叉反应，还研究出一种通过利用这样的特异性针对 20 K hGH 的抗体来测量 20 K hGH 在血液中的浓度的方法 (EP Publication No. 0814091)。

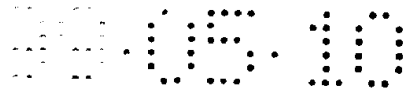
最近，由于已相对大量地提供 22 K hGH，22 K hGH 的各种生理活性已被进一步揭示出来。首先，hGH 被用于治疗生长激素不足的儿童疾病，然而，hGH 治疗已表明对于这种疾病正像成年人生长激素不足一样是费用很高的。目前，hGH 治疗已进一步针对不是由于 hGH 分泌缺乏引起的侏儒症，以及针对烧伤和/或受伤、手术后状态不良、骨质疏松等。如果在这些疾病治疗的临床研究中采用 hGH，就必须掌握外部施用的 hGH 的状态。然而，倘若病人并不完全缺乏 hGH，由于病人产生的 hGH 保留在血液中，仅通过测量血液中的 hGH 浓度来确定血液中 hGH 浓度值与在病人内源性生成的 hGH (称之为生理性 hGH) 有关还是与外部施用的 hGH 有关是困难的。迄今不知道在这种情况下的测量方法。

另一方面，hGH 已被用作药物。作为近些年来运动禁服药物之一，人们还公知 hGH 是药物测试的对象。

然而，简单地根据通过测量得到的血液中 hGH 浓度的高低，仍难以确定受检验者是否已经施用 hGH，原因如下：

(1) 对 hGH 检测是困难的，这是因为它在血液中的浓度非常低，即使对于与 20K hGH 相比，在血液中的量比较高的 22 K hGH，也只有几纳克/毫升到几十纳克/毫升。

(2) 即使能够检测 hGH，它在血液中的浓度随个体、性别和年纪也是明显不同的。



(3) 由于 hGH 是由垂体间歇性地分泌的，即使对同一受检验者，在不同时间抽出的血液中的 hGH 浓度也是不同的。

此外，由于 hGH 诱发的次级生理反应对不同个体、性别和年纪是极为不同的，还由于次级生理反应和外部施用的 hGH 之间的相互关系被认为是复杂的，血液中的 hGH 浓度自身并不能作为药物测试的适当指标。

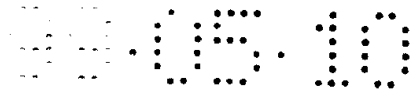
目前，22K hGH 已是药物测试的测试目标。然而，据信 22 K hGH 占有人体总 hGH 中的最大部分，因此，仅针对 22 K hGH 的特异性测量不能提供药物测试的正确结果。

根据对总 hGH 和 22 K hGH 的血液浓度的分别测量，推算 20 K hGH 约占血液中的总 hGH 中的约 10%。然而，如上所述，由于最近才研究出特异性测量 20 K hGH 的方法，因此还没有测量出 22 K hGH 和 20 K hGH 之间的严格的存在比率。因此，当然没有它们之间存在比率的日常变化或者由于如下因素引起的变化的资料：

- (a) 个体、性别和年纪的差别，以及
- (b) 在耐量测试中由于 hGH 加速分泌所引起的血液中 hGH 浓度的升高。

本发明的主题是提供一种测定或者判断是否外部施用了 hGH 的方法，以及一种测量血液或尿中的不包括生理性 hGH 的外部施用的 hGH 的浓度的方法，所述方法以血液或尿中的 22 K hGH 和 20 K hGH 浓度之比作为指数；或者利用了分别在正常状态（即没有施用任何 hGH 时）以及在已经施用激素之后所测量的 22 K hGH 和 20 K hGH 中的某一种或每一种的浓度与总的 hGH 浓度的比值。

本发明人利用不同种类的人血浆和血清，分别用特异性针对 22 K hGH 和 20 K hGH 的测量方法，对 22 K hGH 和 20 K hGH 的血液浓度进行了测量，然后计算了它们的比率。此外，对于 22 K hGH 和 20 K hGH 的血液浓度之间的比率怎样随着各种因素变化进行了调查研究。结果表明，22 K hGH 和 20 K hGH 各自的浓度随个体、性别和年纪有极大变化，它的日常变化也是很大的。还已发现，在某些情况下，按耐量测试得到的浓度明显地高。然而，还已首次发现，20 K hGH（或 22 K hGH）的浓度对于总的 hGH 的浓度（22 K hGH 和 20 K hGH 的浓度和）的比率对不同的个体、性别和年纪都几乎相同。我们惊讶地发现，虽然总的 hGH 浓度全天之中有很大变化，但上述比率几乎恒定，即使血液中的总的 hGH 浓度通过耐量测试而变化，所述比率并不因此受到很大影响。



这些新的发现和结果还揭示，当对被检验者单独外部施用 22 K hGH 或者 20 K hGH 时，22 K hGH 和 20 K hGH 的血液浓度之间的比率在施用前后发生变化。这就使人相信，通过测量 22 K hGH 和 20 K hGH 的血液浓度和监测它们的比率，就能够测定或者判断是否已外部施用了 hGH，并计算已经施用的 hGH 在血液中的浓度。此外，即使不用血液中 hGH 浓度而使用尿中 hGH 浓度作为测量的对象，预计也能得出相同的结论。

因此，在本发明人的上述新认识的基础上完成本发明。

即，本发明提供一种根据 22 K hGH 和 20 K hGH 在血液或尿中的浓度的比率测定 hGH 浓度的方法。本发明还提供一种根据 22 K hGH 和 20 K hGH 在血液或尿中的浓度的比率测定或者确认受检验者是否已经外部施用了 hGH 的方法。

根据本发明，测定外部施用 hGH 的浓度或确认外部施用 hGH 还可以通过将在正常状态下在血液或者尿中的 22 K hGH 浓度和 20 K hGH 浓度中的某一种或每一种对总 hGH 浓度的比率，与在施用它们之中某一种之后或者在怀疑施用它们之中某一种之时的对应比率相比较来实现。

根据本发明，可以测定外部施用 hGH 所形成的血液或尿中 hGH 浓度。即，本发明能够简易和严格地测量由于外部施用所形成的血液或尿中的 hGH 浓度。

本发明的测量方法对于在 20 K hGH 或 22 K hGH 的临床应用中监测外部施用的 hGH 的体内状态是十分有用的。此外，本发明能够确认或判断是否已外部施用了 hGH。因此，本发明的方法对于运动类药物测试是有用的。

图 1 是表示在 20 K hGH 的免疫测量中的标准曲线的曲线图。

图 2 是表示在 22 K hGH 的免疫测量中的标准曲线的曲线图。

图 3 是表示 20 K hGH 分泌和年龄之间关系的曲线图。

图 4 是表示 22 K hGH 分泌和年龄之间关系的曲线图。

图 5 是表示 20 K hGH 的生理比率和年龄之间关系的曲线图。

图 6 是表示在通常受检验者的血清中的 22 K hGH 和 20 K hGH 数值之间相互关系的曲线图。

图 7 是表示在 20 K hGH 的生理比率和身高之间关系的曲线图。

图 8 是表示在 20 K hGH 的生理比率和体重之间的关系的曲线图。

图 9 是表示 20 K hGH 的生理比率和人体脂肪之间的关系的曲线图。

图 10 是表示当儿童睡眠时观测的血液中的 hGH 状态的曲线图。

图 11 是表示对成年人持续约一个月观测的血液中的 hGH 的状态的曲线图。

图 12 是表示通常胰岛素耐量测试已增加的血液中的 hGH 状态的曲线图。

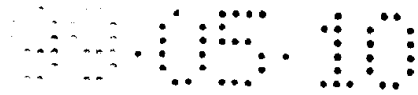
图 13 是表示通过可乐定 (clonidine) 耐量测试增加的血液中的 hGH 状态的曲线图。

5 下文将详细介绍本发明。

本发明所测量的人体生长激素一般是指包含 22 K hGH 和 20 K hGH 的激素。20 K hGH 是存在于人体血液或尿中的一种包含 176 个氨基酸的 hGH。已知两种 20 K hGH，一种在 N-末端第 14 位具有蛋氨酸，另一种在相应位置具有丝氨酸，它们中的任一种都可在本发明中使用。在本发明中使用的 20 K hGH  
10 可以根据例如在 EP Publication No.0587427 中所公开的一般重组方法得到。所使用的 22 K hGH 是一种出现在人体血液或尿中的由 191 个氨基酸组成的蛋白质。22 K hGH 是例如按商品名“Genetropin” (Pharmacia Upjohn) 市售的。为了测量在人体血液或尿中的 22 K hGH 和 20 K hGH 的浓度，可以采用使用抗体的免疫测定法。可以进行高灵敏度测量，特别是如果使单克隆抗体作为用于  
15 检测的抗体时。倘若免疫测定使用抗体，测量灵敏度最好为 10pg/ml (微微克/毫升) 或者小于 10pg/ml。

此外，除了上述免疫测定之外，可以将电泳例如 SDS 电泳、各种类型的柱层析法、高效液相层析法 (HPLC) 等用于测量在血液或尿中的 22K hGH 和 20 K hGH 的浓度，也可以用将层析法和免疫测定法相结合的方法。为了测量 22 K hGH  
20 在人体血液中的浓度，可以采用如在日本专利公告 (公开) 号 273496/88 中所公开的使用特异性与 22 K hGH 反应的单克隆抗体的免疫化学测量法。这里使用的单克隆抗体可以由产生抗 22 K hGH 抗体的细胞与骨髓瘤细胞株融合产生的杂交瘤得到。A36020047P (BiosPacific) 就是这种类型的单克隆抗体的一个实例。

另一方面，为了测量 20 K hGH 在人体血液中的浓度，可以采用该利用特异性  
25 性与 20 K hGH 反应和基本上不与 22 K hGH 反应的单克隆抗体的免疫化学测量法，如在 EP Publication No. 0814091 中所公开的。这里使用的单克隆抗体可以由产生抗 20 K hGH 抗体的细胞与骨髓瘤细胞株融合产生的杂交瘤得到。MTC6A 细胞株 (FERM BP-5913) 就是这种杂交瘤的一个实例。这种 MTC6A 杂交瘤已经按照布达佩斯条约保藏在 National Institute of Bioscience and Human-  
30 technology, Agency of Industrial Science and Technology of the Ministry of



International Trade and Industry (Higashi 1-1-3 Tsukuba-City Ibaragi Prefecture, Japan), 保藏号为 FERMBP-5913。

5 为了利用该产生抗单克隆抗体的杂交瘤生成所需的特异性与 20 K hGH 反应的单克隆抗体，可以根据包括细胞培养法或腹水形成法的常规方法来培养杂交瘤。然后将生成的单克隆抗体由所形成的培养液的上清液或者腹水提纯。利用常规方法可以实现对该培养物的上清液或者腹水的单克隆抗体的提纯。一种适当综合例如硫酸铵分级、凝胶过滤、离子交换层析法、亲和层析法等方法也是可采用的。

10 利用单克隆抗体的免疫测量 22 K hGH 和 20 K hGH 的方法是指利用由上述方法得到的单克隆抗体的方法。根据本发明，这里所采用的免疫测量法例如包括：酶免疫测定法，放射免疫测定法、荧光免疫测定法、发光免疫测定法等，在这些方法之中优先使用酶免疫测定法。更为优选采用利用了与单克隆抗体结合的不溶性载体的夹心式酶免疫测定法。

15 下面介绍用于根据夹心式酶免疫测定法测量 20 K hGH 的方法。除了用 22 K hGH 替换 20 K hGH 之外，测量 22 K hGH 的方法与测量 20 K hGH 的方法相同。

作为第一步，使单克隆抗体固着在不溶性载体上，使固着的单克隆抗体与包含人体生长激素的测试溶液反应，由此形成一种具有 20 K hGH 的结合产物，其中 20 K hGH 与不溶性载体上的固着的单克隆抗体特异性结合。

20 不溶性的载体包含微板、塑料珠、玻璃珠、细微磁性颗粒等。为了使单克隆抗体结合到这些不溶性载体上，可使用已知的化学结合法，以及物理吸附方法。即，将本发明中使用的单克隆抗体溶解在碳酸缓冲液、磷酸盐缓冲液等中，以及将不溶性载体添加到溶液中。在将所形成的混合物放在 0°C 到室温的环境持续不小于 1 小时后，利用 Tween 20（聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯）、包含叠氮化钠等的 Tris 盐酸缓冲液、磷酸盐缓冲液等，以便除去非结合的抗体。然  
25 后，可以将所得到的固着抗体的不溶性载体在上述第一步骤中使用。

作为第二步，使在第一步骤中得到的在不溶性载体上的结合产物与以酶标记的抗 hGH 的抗体（下文称为之抗 hGH 的酶标记的抗体）反应，由此，在不溶性载体上形成夹心式复合物，其具有下列结构：抗 20 K hGH 单克隆抗体-20 K hGH-抗 hGH 的酶标记的抗体。

30 由于该抗 hGH 的抗体被用作为抗 hGH 的酶标记的抗体的材料，因此或者

可以使用仅与 20 K hGH 反应且识别与抗 20 K hGH 单克隆抗体所识别的不相同的抗原决定部位的抗体；或者可以使用与 20 K hGH 和 22 K hGH 两者反应的抗体。这些抗体可以是单克隆或者是多克隆的抗体。利用已知的方法可以得到这些抗体。单克隆抗体 D14 是利用已知方法可以得到的一个实例。

5 用于标记抗-hGH 抗体的酶包括：辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶等。

利用已知的方法可以用酶对抗 hGH 的抗体或者抗体中的 F(ab')<sub>2</sub> 和 Fab' 片段进行标记，其中酶中的糖链用高碘酸氧化，并使所形成的醛基与抗-hGH 的抗体中的氨基酸反应；或者其中将马来酰亚氨基或者吡啶硫基引入到酶中，且使  
10 该基团与抗 hGH 抗体的 Fab' 片段中的巯基反应。

作为第三步，测量用于标记在第二步骤中得到的夹心复合物的酶的活性。即，由于酶的活性取决于 20 K hGH 的数量，所测量的活性只对应于在测试溶液中包含的 20 K hGH 的数量或浓度。通过添加用于测量酶活性的底物可以测量酶的活性。

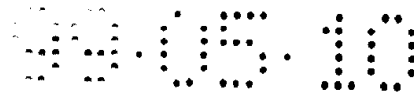
15 另外，通过利用抗 hGH 的生物素标记的抗体即利用生物素标记的抗 hGH 的抗体，取代抗 hGH 的酶标记的抗体也可以改进该方法。在这种情况下，在不溶性载体上形成一种具有“抗 20 K hGH 单克隆抗体—20 K hGH—抗 hGH 的生物素标记的抗体”结构的夹心复合物，使该复合物与酶标记的抗生物素蛋白或者酶标记的链酶抗生物素蛋白反应，导致形成一种具有抗 20 K hGH 单克  
20 隆抗体-20 K hGH-抗 hGH 的生物素标记的抗体-酶标记的抗生物素蛋白或者酶标记的链酶抗生物蛋白结构的夹心复合物。在此之后，测量结合到夹心复合物上的酶的活性。

此外，在上述夹心式酶免疫测量法中，可以另外采用抗-20 K hGH 的单克隆抗体（或者抗 22 K hGH 的单克隆抗体）取代抗 hGH 的酶标记的抗体。

25 利用免疫测量法测量的试样包括：人体血液、尿、其它人体体液以及它们的稀释溶液，它们的经提纯的溶液或者经 pH 调节处理的溶液等。

利用一般的重组方法制取的 20 K hGH 和 22 K hGH 可以用作标准 20 K hGH 和 22 K hGH，用于形成在免疫测量中使用的标准曲线。

30 通过利用上述方法测量血液或者尿中 hGH 浓度来测定外部施用的 hGH 在血液或尿中的浓度的方法可以包括的步骤有：根据 20 K hGH 和 22 K hGH 在



血液或尿中的浓度与总 hGH 浓度（22 K hGH 和 20 K hGH 在血液中的浓度的和；或者 22 K hGH 和 20 K hGH 在尿中的浓度的和）的比率，计算外部施用的 hGH 浓度。

5 根据 20 K hGH 和 22 K hGH 在血液或尿中浓度之间的比率所进行的计算可以按如下步骤实施：

首先，测量在明显还未施用人体生长激素时由病人取得的血液或尿中的 22 K hGH 和 20 K hGH 的浓度。测定所得到的 22 K hGH（或 20 K hGH）在血液或尿中的浓度和总的 hGH 浓度的比率，并将其定义为生理比率（例如， $[20 \text{ K hGH} / (20 \text{ K hGH} + 22 \text{ K hGH})] \times 100$ ；或者  $[22 \text{ K hGH} / (20 \text{ K hGH} + 22 \text{ K hGH})] \times 100$ 。

10 这一生理比率对所有人都是几乎稳定的，并且呈现恒定的数值，不受时间和/或总的 hGH 浓度值的影响。最好通过改变测量时间和日期几次进行测量，并将得到的数值平均，以便更精确地测定生理比率。

其次，利用与上述相同的方式，在由已经测量生理比率的同一病人的血液或尿中所取的（在已明显施用人体生长激素之后的一个时间或者当怀疑施用  
15 时）的比较试样中测量 20 K hGH（或 22 K hGH）的实际浓度。

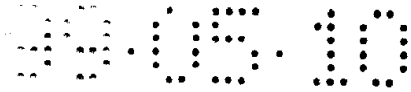
根据测量的数值，计算 22 K hGH（或 20 K hGH）的浓度对总的 hGH 浓度的比率。这一用于进行比较的根据实际测量值得到比率被称为测量比率。

最后根据生理比率和由上述步骤得到的测量比率之间差值，计算外部施用的 hGH 的量。

20 如果显然已施用 22 K hGH 或 20 K hGH，将不同于所施用的 hGH 的 hGH（例如，如施用 22 K hGH 则为 20 K hGH）选择作为标准 hGH。根据在比较试样中的在血液或尿中的标准 hGH 浓度，可以测定在该比较试样中的生理 hGH 的浓度。根据在比较试样中的生理 hGH 浓度和在该比较试样中实际测量的 hGH 浓度之间的差值测定由施用增加的 hGH 在血液或尿中的浓度。

25 例如，如果显然施用的是 22 K hGH，与 20 K hGH 相关的生理比率则被用作标准比率。当利用比较试样计算测量比率时，生理性 22 K hGH 的浓度对生理性 20 K hGH 的浓度的比率或者对它们的总浓度的比率也维持恒定。这意味着，利用在比较试样中的实际测量的 20 K hGH 浓度和 20 K hGH 和 22 K hGH 之间的生理比率，可以测定在该比较试样中的生理性 22 K hGH 的浓度。

30 在比较试样中的生理性 22 K hGH 的浓度和在比较试样中的实际测量的浓度



之间的差值对应于通过施用引起的 22 K hGH 的浓度增量。

不是总得必须在测定测量比率之前进行生理比率的测量，即对生理比率的测量可以在完成对测量比率的测定之后进行，如果受检验者的血液或尿中的 hGH 值返回到正常值的话。

5 本发明的方法可优选用于单纯施用 20 K hGH 或者 22 K hGH 的情况。本发明的方法也可以应用于它们的混合施用，不过当它们的混合比率对应或接近于生理比率时，可以采用其它测定方法。

利用尿中的 20 K hGH 和 22 K hGH 的浓度来测量所施用的 hGH 在尿中的浓度的方法包括这样一种方法，其中根据 20 K hGH 或 22 K hGH 的浓度对于  
10 所得到的总的 hGH 的浓度（22 K hGH 和 20 K hGH 在尿中的浓度之和）的比率计算所施用的 hGH。

下面介绍用于判断是否已经施用了 hGH 的确认方法。

根据本发明，为了确认或判断是否已经施用了 hGH，如同在利用生理比率和测量比率测量所施用的 hGH 的情况一样，在已测量 20 K hGH 和 22 K hGH  
15 各自在血液（或尿中）的浓度之后，分别测定生理比率和测量比率。

在确认或者判断是否已经施用了 hGH 的方法中，与在测量施用的 hGH 浓度的情况不同之处，是只需确认生理比率不同于测量比率。例如，如果与 22 K hGH 相关的测量比率已变得大于其生理比率，就可判断已施用了 22 K hGH，而如果已变得小于 22 K hGH，就可判断已施用了 20 K hGH。

20 本发明的一个方面，包括一种用于测量所施用的 hGH 在血液或尿中的浓度的测量仪器或者用于判断是否已经外部施用了 hGH 的判别仪器。这些仪器包括：试剂、抗体、溶剂、清洗剂、医疗器械等，是为对 22 K hGH 和 20 K hGH 在血液或尿中的浓度进行免疫测量所需要的，意在适于较方便地实施本发明的测量和判断方法。

25 本发明的另一个方面，包括一种机器或者设备，其自动实施用于测量已施用的 hGH 在血液或尿中浓度的方法或者判断是否已外部施用 hGH 的方法。在该机器或设备中，自动实施操作程序，以便易于实施本发明的测量方法和判断方法。置有这种自动操作程序的设备也包含在本发明的范围内。

### 实施例 1

30 测量 22 K hGH 和 20 K hGH 在人体血液中的浓度

(1) 20 K hGH 的免疫测量法

(1) -1 制备单克隆抗体

根据在 EP Publication No. 0814091 中公开的方法将特异性针对 20 K hGH 的单克隆抗体由杂交瘤 MTC6A 株 (FERM BP-5913) 中分离。由 BiosPacific 购买特异性针对 22 K hGH 的单克隆抗体 A36020047P。根据用于制取上述 MTC6A 的方法制备作为不与 MTC6A 和 A36020047P 竞争的和与 20 K hGH 和 22 K hGH 两者反应的单克隆抗体 D14。

通过利用 BIAcore (Pharmacia) 得到关于 3 种单克隆抗体, MTC6A、A36020047P 和 D14 的 22 K hGH 和 20 K hGH 的离解常数, 其结果表示在表 1 中。在表 1 中的符号 “ND” 代表在利用 BIAcore 的反应中未发现结合特性。

表 1: 抗 hGH 的单克隆抗体的离解常数

单克隆 抗体	离解常数	
	20 K hGH	22 K hGH
MTC6A	$4.4 \times 10^{-10}$	ND
A36020047P	ND	$2.8 \times 10^{-10}$
D14	$4.6 \times 10^{-10}$	$5.7 \times 10^{-10}$

(1) -2 制备酶标记的抗体

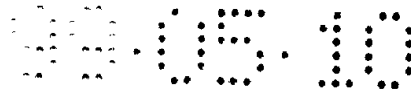
根据由 Ishikawa 等人提出的方法 (Nonisotopic Immunoassay; NgO, T. T; Plenum Press; P27-55 (1988)) 实现对抗体的酶标记。

通过利用 S-乙酰羟基琥珀酐将 SH 基加入到提纯的单克隆抗体 D14, 使得形成的单克隆抗体能与苹果酰胺化的辣根过氧化物酶 (下文称 POD) 能够反应以及得到以 POD 标的 D14。

(1) -3 测量 20 K hGH 在血液中的浓度。

20 K hGH 的血液浓度测量如下。

利用 PBS 稀释特异性与 20 K hGH 结合的单克隆抗体, 以便提供浓度为  $40 \mu\text{g/ml}$  的溶液, 以及将  $60 \mu\text{l}$  的稀释溶液散布到 96 孔的微板 (Greiner) 中的每个孔中并且置于  $4^\circ\text{C}$  下持续 2 夜。利用清洗剂 (包含 0.05% Tween 20 的 10mM Tris 盐酸缓冲液, pH8.0) 冲洗, 然后用 Blockace (Dainippon Pharmaceutical) 封闭。在将 Blockace 除去之后, 添加  $100 \mu\text{l}$  的反应缓冲液 (包含 1% BSA 的 PBS、



10  $\mu$  g/ml Heterophilic Blocking Reagent [Scantibodies]和 1M NaCl) 和 25  $\mu$  l 的待测试的标准 20 K hGH 或者试样溶液并摇动 2 小时。在使用清洗剂冲洗之后，将 100  $\mu$  l 经稀释的以 POP 标的抗 hGH 的单克隆抗体 D14 (按 0.5  $\mu$  g/ml 的浓度) 和利用包含 0.5% BSA、0.15M NaCl、0.05%酪蛋白、1%兔血清以及 0.02%  
5 8 抗体-1 萘磺酸盐 (pH6.5) 的磷酸盐缓冲液 (下文称为经标记的抗体稀释溶液) 调节的 D14 添加并摇动 2 小时。在利用清洗剂冲洗该 D14 之后，添加通过利用 100mM 的柠檬酸盐缓冲液 (pH3.8) 稀释的 3,3',5,5'-四甲联苯胺制备的 100  $\mu$  l POD 底物溶液 (65  $\mu$  g/ml)，并放置持续 30 分。将 100ml 的 1N 硫酸添加到反应溶液中，并且按照利用在 620nm 下的吸收率作为对照物的  
10 Immunoreader(Intermed)测量在 450nm 下的溶液的吸收率。根据形成的数值，利用在图 1 所示的标准曲线计算 20 K hGH 浓度。与 22 K hGH 交叉反应的比率不大于 0.1%。

### (2) 22 K hGH 的免疫测量法

在测量 22 K hGH 在血液中的浓度的方法中，在市售的 hGH 单克隆抗体中  
15 选择 A36020047P (BiosPacific) 作为特异性针对 22 K hGH 的单克隆抗体。利用 PBS 稀释 22 K hGH 特异性抗体 A36020047P，以便提供浓度为 10  $\mu$  g/ml 的溶液，将经稀释的 60  $\mu$  l 的该溶液散布到 96 孔的微板中的每一孔中并置在 4°C 下持续 2 夜。在这一微板已用清洗剂冲洗后，利用 Blockace 在该片上实现封闭。在除去 Blockace 之后，添加 100  $\mu$  l 的反应缓冲液溶液，以及或者标准 22 K hGH  
20 或者 25  $\mu$  l 的测试溶液，并摇动 2 小时。在利用清洗剂冲洗该片之后，添加利用经标记的抗体溶液稀释的 100  $\mu$  l 以 POD 标记的抗 hGH 的单克隆抗体 D14 和利用其调节的 D14，摇动 2 小时。在利用清洗剂冲洗之后，添加 100  $\mu$  l 的 POD 底物溶液并放置 30 分。将 100ml 的 1N 硫酸添加到反应溶液中，按照利用在 620nm 下测定的吸收率作为对照物的 Immunoreader 测定在 450nm 下的溶液的  
25 吸收率。根据形成的数值，利用在图 2 所示的校准曲线计算 22 K hGH 浓度。与 20 K hGH 交叉反应的比率不大于 0.1%。

### (3) hGH 分泌和性别差别之间的关系

对 275 个健康男性和 263 个健康女性抽血，根据上述方法 (1) 和 (2) 测定他们的血液中的 22 K hGH 和 20 K hGH 的浓度。根据测量的数值，计算生  
30 理比率，以便测定男性和女性之间的数值的比率。结果表示在表 2 中。表中的

数值代表平均值±标准偏差的数值。因此，22 K hGH 和 20 K hGH（如在表列 2 中左列和中间列所示）的血液浓度对于不同的人在十分宽的范围内变化，标准偏差接近 2 倍的平均值。此外，得出男性和女性之间的数值差，以及女性的 22 K hGH 和 20 K hGH 的浓度约高于男性 50%。另一方面，与 hGH 浓度的生理比率相比该生理比率的数值（在表 2 中的右列）维持恒定，它们的标准偏差为平均值的三分之一，男性和女性之间的比率没有差别。。

表 2

	测量的测试试样的数目	22 K hGH 浓度 (pg/ml)	20 K hGH 浓度 (pg/ml)	20K hGH × 100/(22k hGH+20k hGH)
健康男性	275	1070±1890	82±189	6.33±2.61
健康女性	263	1680±2120	127±162	6.31±2.14
男性和女性之间的比率		0.64	0.65	1.00

(4) hGH 分泌和年龄之间的关系

10 利用由年龄 0 到 79 的健康受检验者 460 名抽取的血清制备的试样，根据在上述的方法 (1) 和 (2) 中所述的方法，测量 20 K hGH 和 22 K hGH 在血液中的浓度，以便得到 20 K hGH 的生理比率。在图 3 到 6 中表示该结果。如在 15 这些图中所示，20 K hGH 和 22 K hGH 浓度对于不同的人在很宽的范围内变化（图 3 和 4），以及求出在两种 hGH 的浓度之间的高度相关性 ( $r=0.947$ ) (图 6)，不管年龄如何，生理比率维持恒定（约 6%）(图 5)。

(5) 对于不同人的浓度变化

利用由各受检验者 (A 到 F) 几次抽取的血液，根据上述在方法 (1) 和 (2) 中所述的方法测量 20 K hGH 和 22 K hGH 在血液中的浓度，以便将 hGH 的血液浓度的分布和 20 K hGH 的生理比率比较。如在表 3 和 4 中所表示的，hGH 20 在血液中的浓度对于不同人在很宽范围内变化，然而，20 K hGH 的生理比率几乎维持恒定。

表 3

不同人 22 K hGH 和 20 K hGH 的浓度差别以及 20 K hGH 浓度对于总 hGH

(22 K hGH+20 K hGH) 的浓度的比例。

单个受检验者	采集血液的次数	22k hGH 浓度 (pg/ml)	20k hGH 浓度 (pg/ml)	20k hGH×100/(22k hGH+20k hGH)
A	1	140	8.7	5.7
	2	920	33.9	3.6
	3	19860	1061	5.1
B	1	1490	99.6	6.3
	2	2530	155.7	5.8
	3	12400	768.8	6.0
C	1	34200	3877	10.2
	2	150000	15983	9.6
	3	77500	10362	11.8
D	1	600	72.2	10.7
	2	2360	332	12.3
	3	1290	174	11.9
E	1	4670	327	7.4
	2	5450	471	8.0
	3	680	43.9	6.1
	4	4090	335	7.6
	5	2890	161	5.3
	6	2800	195	6.5
	7	7420	486	6.1
	8	3350	264	7.3
	9	4990	356	6.7
F	1	2990	217	6.8
	2	1930	140	6.8
	3	190	10.7	5.2
	4	440	23.6	5.1
	5	2220	150	6.3
	6	5720	441	7.2
	7	4980	377	7.0
	8	5640	301	5.1

### (6) hGH 生理比率、身高、体重和人体脂肪之间的关系

利用由 70 个健康成年人采集、制备的血清试样、根据在上述方法 (1) 和方法 (2) 中所述的方法测量 20 K hGH 和 22 K hGH 在血液中的浓度, 以便得到 20 K hGH 浓度的生理比率。得出两种 hGH 的生理比率、身高、体重和人体脂肪之间的关系表示在图 7 到 9。

### (7) 血液中的 hGH 随时间 (1) 的变化特性

利用由儿童在开始睡着以后的每 20 分钟采集制备的血清试样, 根据上述在方法 (1) 和 (2) 中所述的方法测量 20 K hGH 和 22 K hGH 的浓度, 以得到 20 K hGH 的生理比率。如在图 10 中所示, 当在夜间加速分泌两种 hGH 时, 发现在两种 hGH 中几乎同时出现分泌的峰值, 同时观察到在两种 hGH 的浓度比率方面没有明显的变化。

### (8) 血液中的 hGH 随时间 (2) 的变化特性

利用由同一健康成年人按照每四天以上采集制备的血清试样, 根据在上述方法 (1) 和 (2) 中所述的方法测量 20 K hGH 和 22 K hGH 的浓度, 以便得到 20 K hGH 的生理比率。如在图 11 中所示, 应注意在大约一个月的时期内在两种 hGH 的浓度比率方面没有明显的变化。

### (9) 测量在受到刺激分泌 hGH 时的 hGH 在血液中的浓度

利用由同一儿童当利用胰岛素或可乐定刺激 hGH 分泌时按照上述采集制备的血清试样, 根据在上述方法 (1) 和 (2) 中所述的方法测量 20 K hGH 和 22 K hGH 的浓度, 以便得出 20 K hGH 的测量比率。如在图 12 和 13 中所示, 当在两种耐量测试期间刺激分泌时在这两种异构重整产物方面发现几乎同时出现分泌峰值, 并应注意, 在两种 hGH 的浓度的比率方面没有明显变化。

### 实施例 2

#### 25 测量施用的 hGH

使儿童通过皮下施用 22 K hGH (2.75U) (1mg) 并制备血清试样。根据在方法 (1) 和 (2) 中所述的方法测量在血清试样中的 20 K hGH 和 22 K hGH 的浓度, 以便计算生理比率和测量比率。如在表 4 中所示, 由在施用前的为 4.8% 的 20 K hGH 的比率大为降低到施用之后 4 小时时的 0.4%。

表 4: 在施用 22 K hGH 后的 22 K hGH 的比率变化

被检 验者	施用前			施用后		
	22k hGH (pg/ml)	20k hGH (pg/ml)	生理 (%)	22k hGH (pg/ml)	20k hGH (pg/ml)	测量比率 (%)
A	210	10.7	4.8	36200	141	0.4

说明书附图

图 1

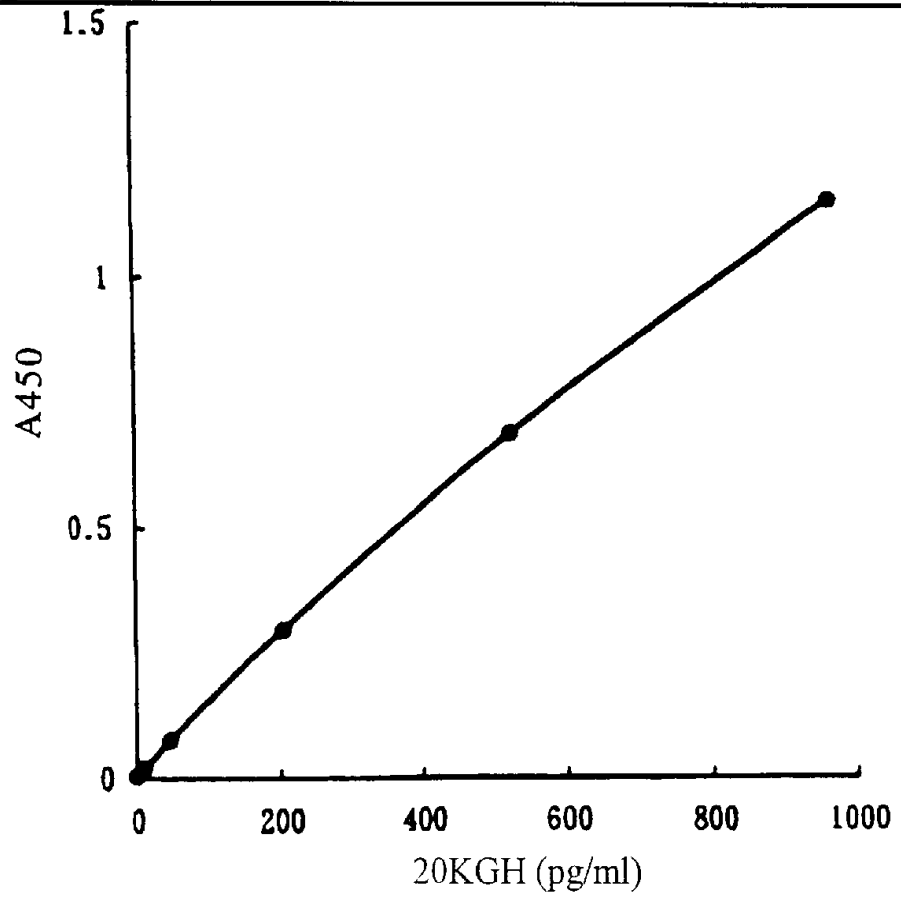
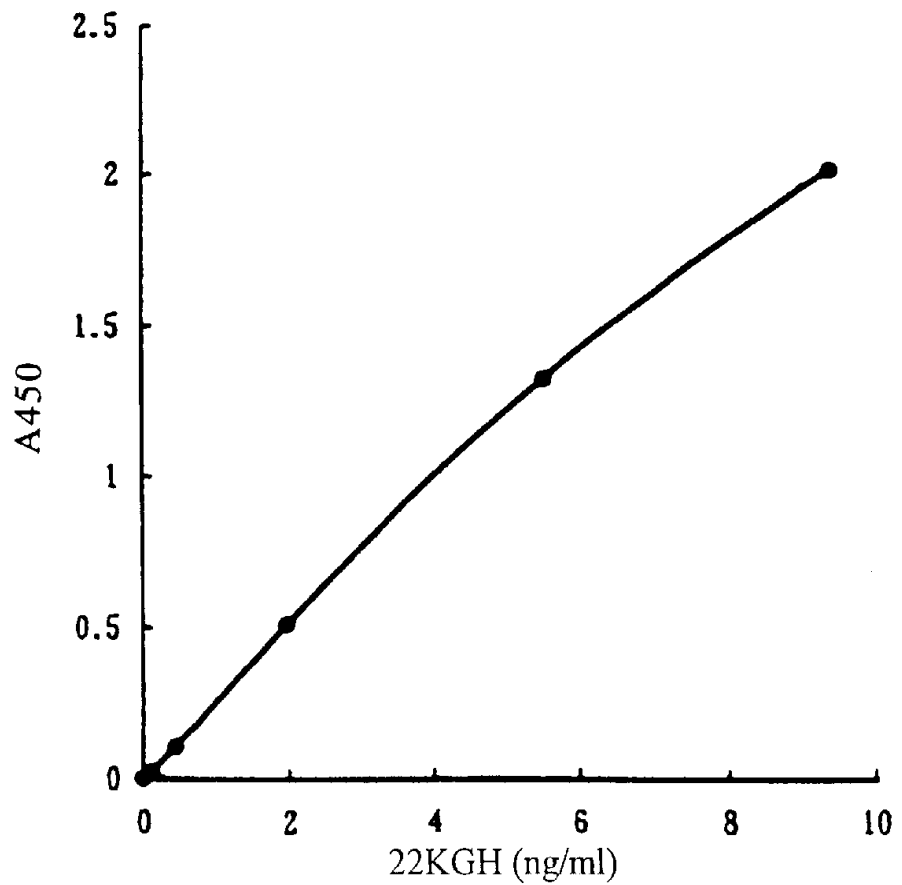


图 2



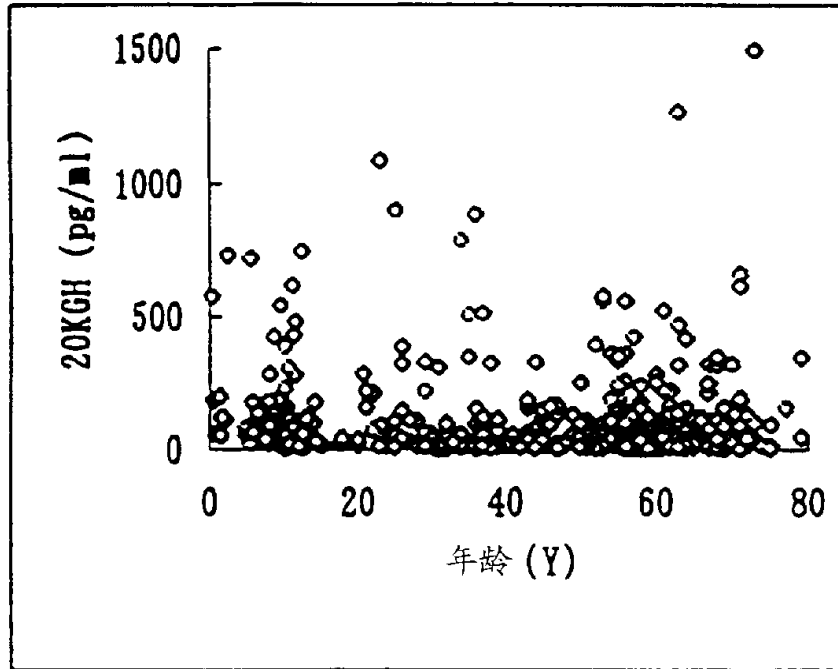


图 3

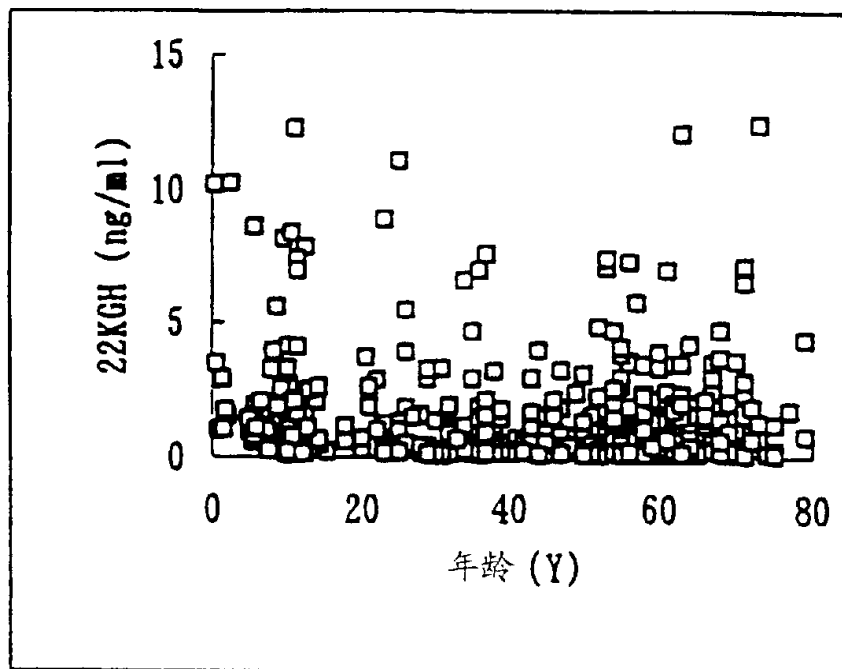


图 4

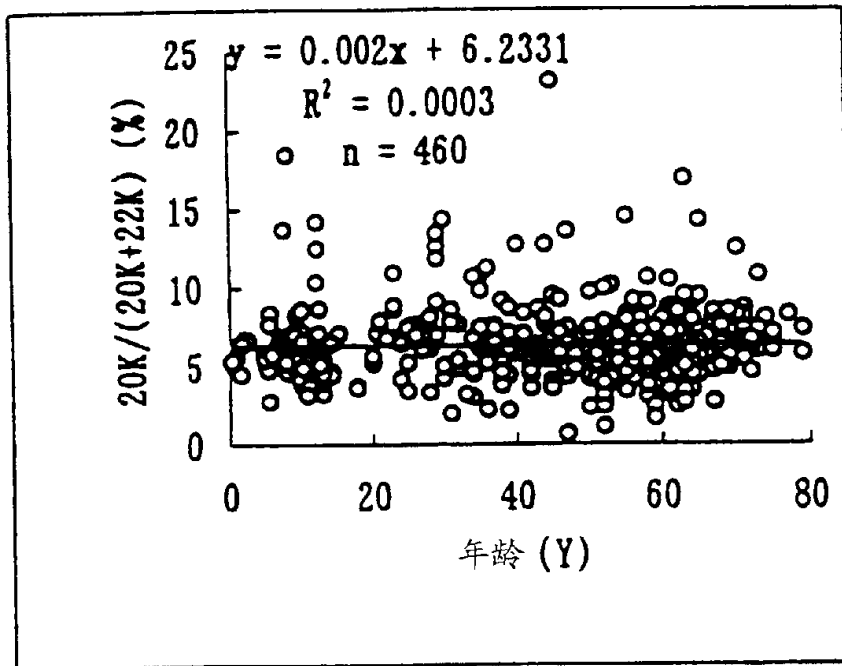


图 5

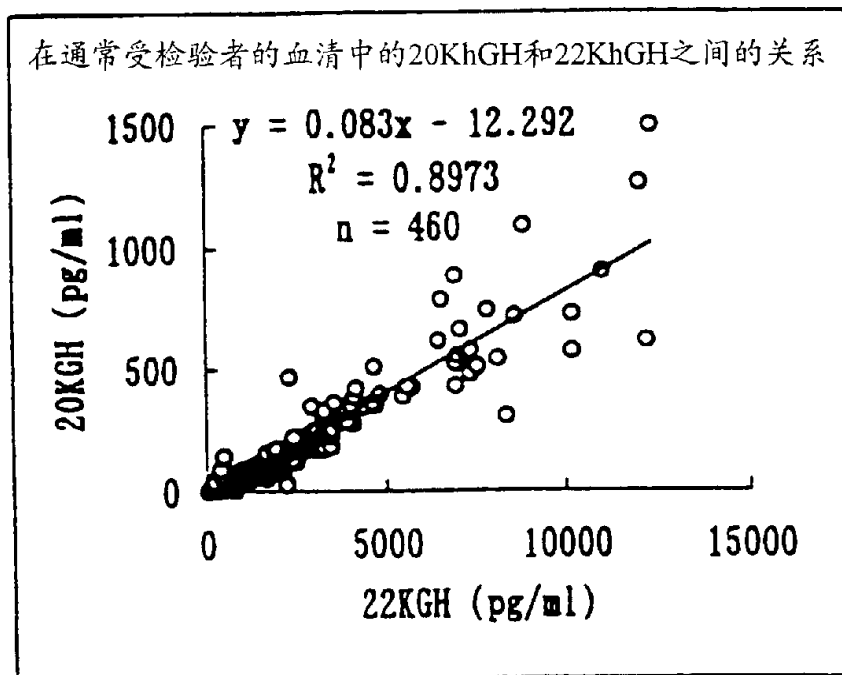


图 6

图 7

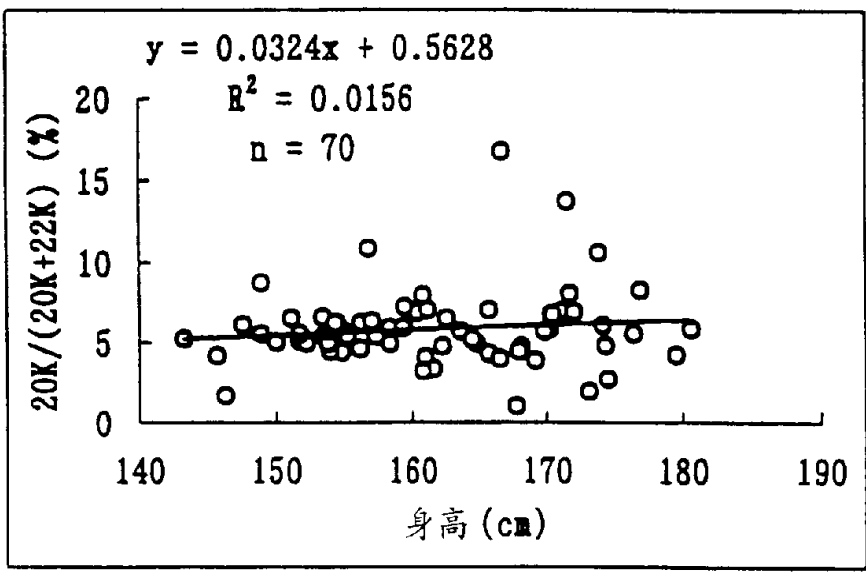


图 8

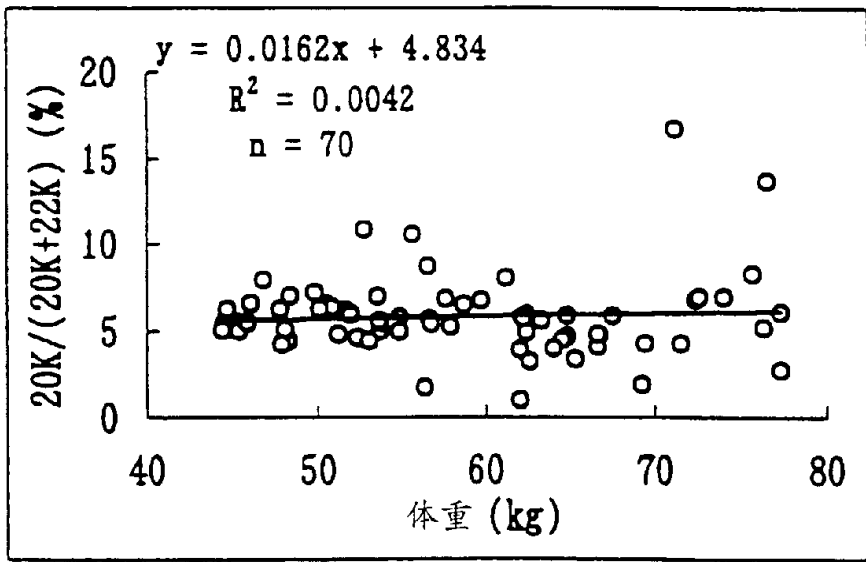
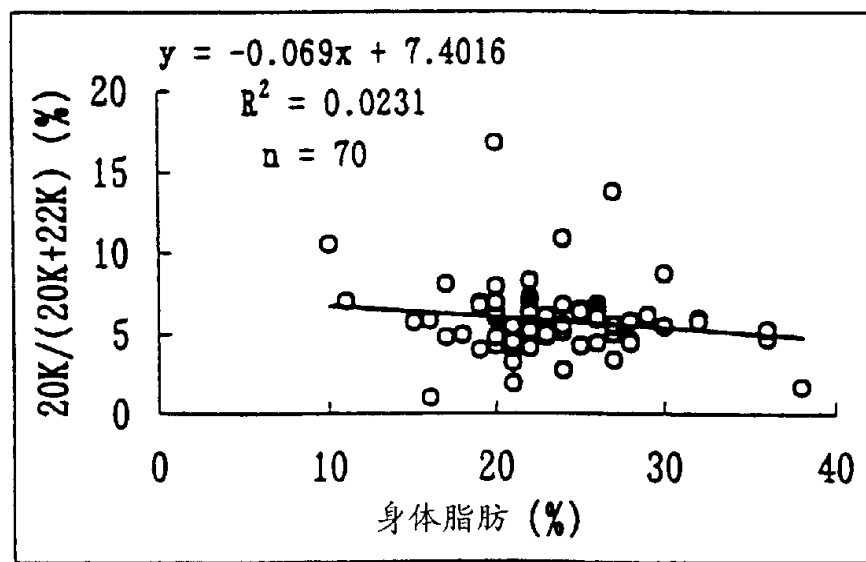


图 9



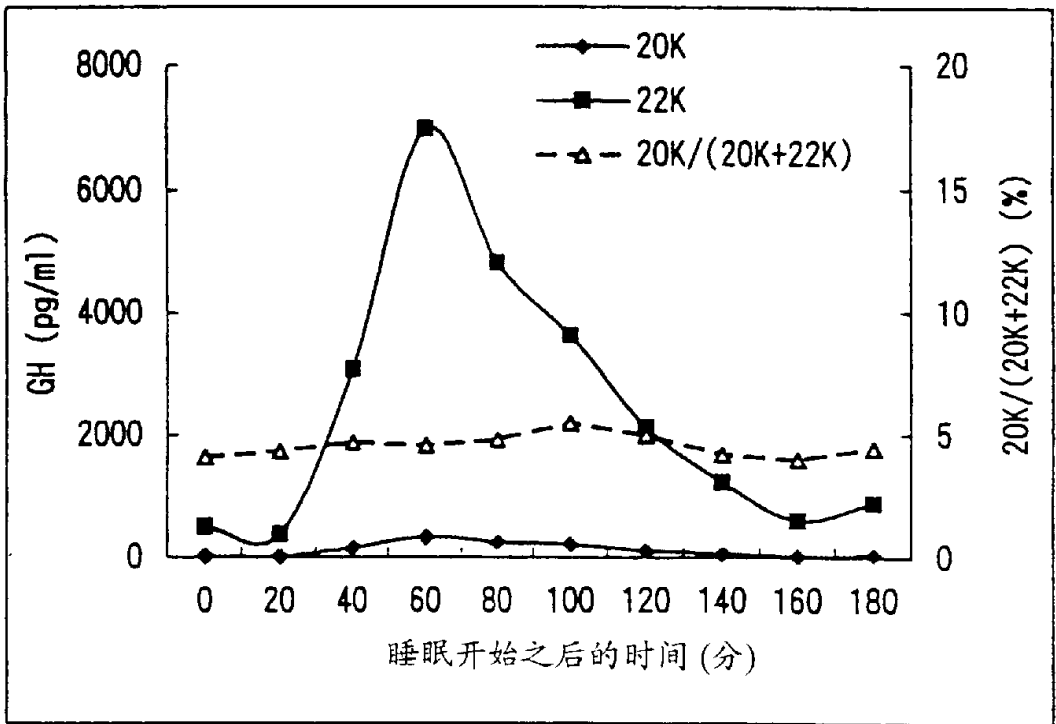


图 10

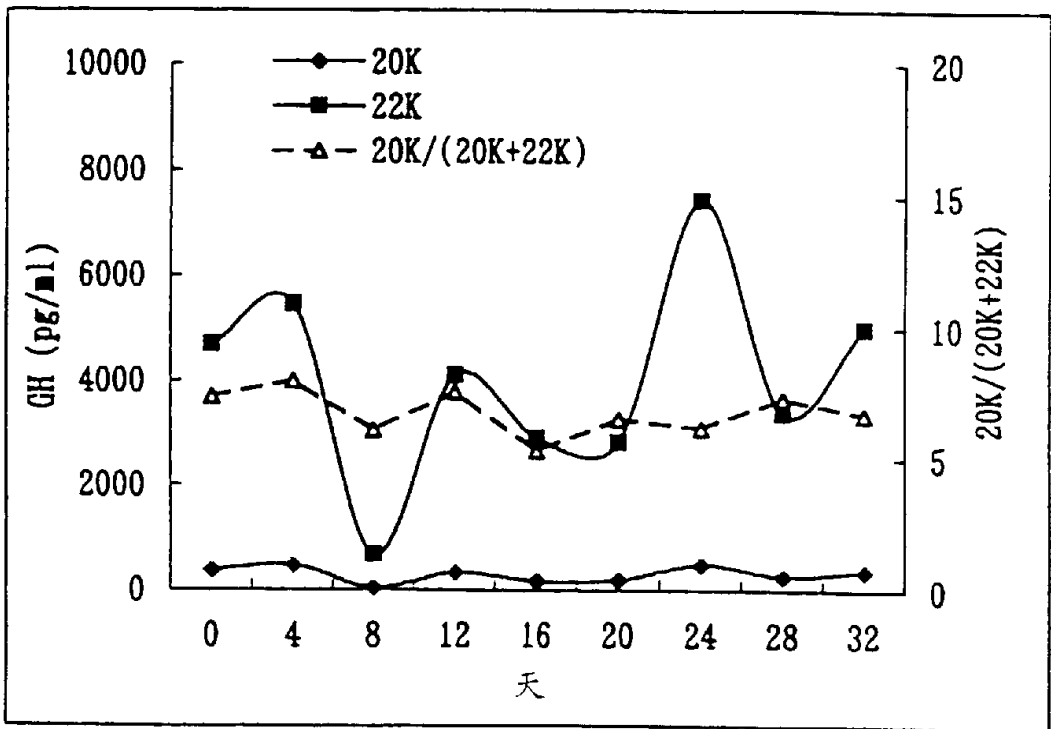


图 11

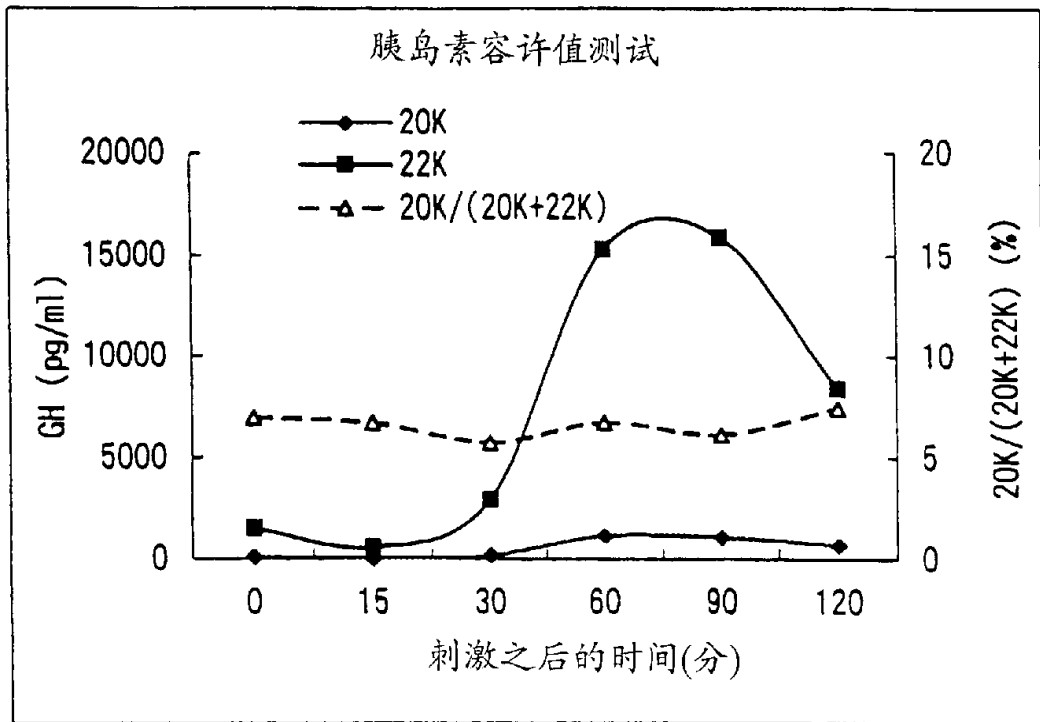


图 12

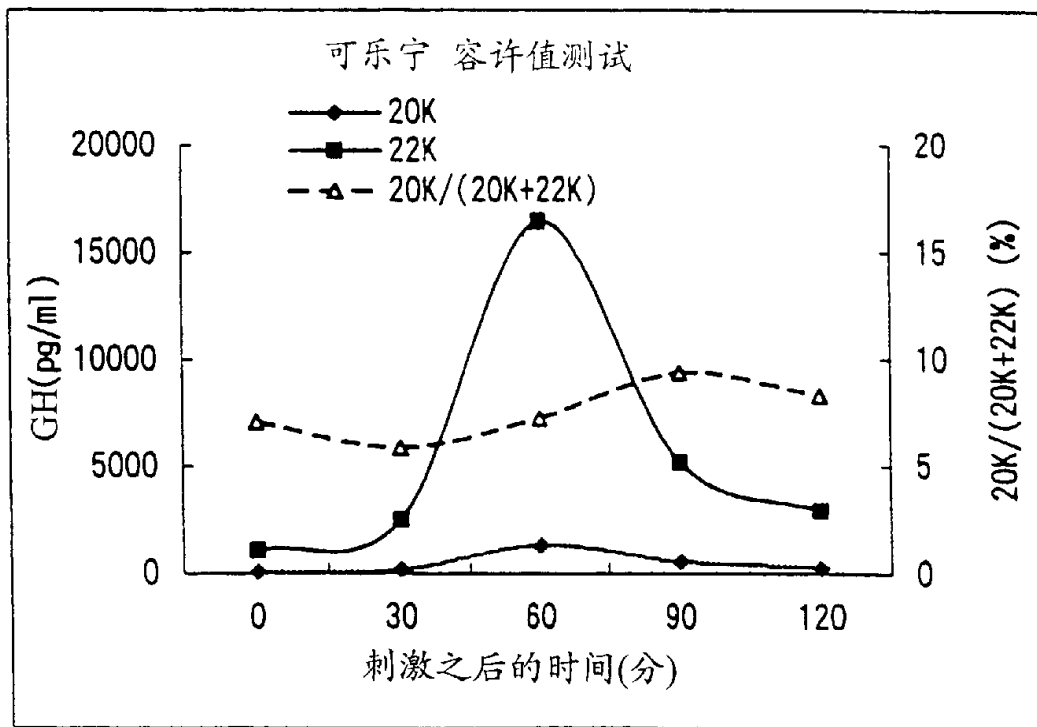


图 13