

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580036710.9

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 10 月 3 日

[11] 公开号 CN 101048659A

[22] 申请日 2005.9.21
[21] 申请号 200580036710.9
[30] 优先权
 [32] 2004. 9. 22 [33] US [31] 60/612,224
[86] 国际申请 PCT/IB2005/002793 2005.9.21
[87] 国际公布 WO2006/032980 英 2006.3.30
[85] 进入国家阶段日期 2007.4.25
[71] 申请人 受体生物技术公司
 地址 美国加利福尼亚
[72] 发明人 斯蒂芬·格兰姆斯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
 代理人 林晓红

权利要求书 5 页 说明书 37 页 序列表 4 页

[54] 发明名称

抗前胃泌素单克隆抗体

[57] 摘要

本发明提供特异于前胃泌素的前胃泌素结合分子，其不结合胃泌素 - 17 (G17)、胃泌素 - 34 (G34)、甘氨酸延伸型胃泌素 - 17 (G17 - Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素 - 34 (G34 - Gly)。本发明还提供对胃泌素前体分子(前胃泌素)的 N 端和 C 端序列具有特异性的单克隆抗体 (MAb) 以及产生这些 MAb 的杂交瘤。还提供 MAb 组，其用于在免疫检测和定量测定法中对前胃泌素和胃泌素激素类型进行检测和定量。这些测定法可用于诊断和监测胃泌素促发的疾病或病症或用于监测治疗过程中的进展。本发明还提供固相测定法，包括免疫组织化学 (IHC) 和免疫荧光 (IF) 法，其适于检测和显示固体样品如活检样品或组织切片中的胃泌素类型。前胃泌素结合分子在治疗上可用于在前胃泌素促发的疾病或病症中针对前胃泌素进行被动免疫。还提供代

用参照标准品 (SRS) 分子，其是约 10 个至约 35 个氨基酸的肽链，所述 SRS 分子包含至少两个存在于超过约 50 个氨基酸的目的蛋白中的表位。此类 SRS 分子可用作标准品以替代真正的目的蛋白。

1. 一种前胃泌素结合分子，其选择性结合前胃泌素，其中所述分子不结合胃泌素-17(G17)、胃泌素-34(G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17(G17-Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素-34(G34-Gly)。
2. 权利要求 1 的前胃泌素结合分子，其中所述分子包含抗体结合区域。
3. 权利要求 1 或 2 中任一项的前胃泌素结合分子，其中所述分子是抗体。
4. 权利要求 1 至 3 中任一项的前胃泌素结合分子，其中所述分子是单克隆抗体。
5. 权利要求 1 至 3 中任一项的前胃泌素结合分子，其中所述分子是单链抗体。
6. 权利要求 1 至 5 中任一项的前胃泌素结合分子，其中所述抗体是哺乳动物的抗体。
7. 权利要求 1 至 6 中任一项的前胃泌素结合分子，其中所述哺乳动物的抗体是鼠抗体。
8. 权利要求 1 至 6 中任一项的前胃泌素结合分子，其中所述哺乳动物的抗体是嵌合型人/小鼠抗体、人抗体或者人源化抗体。
9. 一种单克隆抗体，其选择性结合氨基酸序列 SWKPRSQQP (SEQ ID NO: 6) 内的表位。
10. 权利要求 9 的单克隆抗体，其中所述抗体结合由杂交瘤 490-1 产生的单克隆抗体所结合的表位。
11. 一种单克隆抗体，其选择性结合氨基酸序列 SQQPDAPLG (SEQ ID NO: 7) 内的表位。
12. 权利要求 11 的单克隆抗体，其中所述抗体结合由杂交瘤 491-1 产生的单克隆抗体所结合的表位。

13. 一种单克隆抗体，其选择性结合氨基酸序列 GRRSAEDEN (SEQ ID NO: 8) 内的表位。

14. 权利要求 13 的单克隆抗体，其中所述抗体结合由杂交瘤 495-1 产生的单克隆抗体所结合的表位。

15. 单克隆抗体组，其包含两种或两种以上选自如下一组的抗体：与前胃泌素的 N 末端选择性结合于位于氨基酸序列 SEQ ID NO: 6 内的表位的抗体、与前胃泌素的 N 末端选择性结合于位于氨基酸序列 SEQ ID NO: 7 内的表位的抗体、和与前胃泌素的 C 末端选择性结合于位于氨基酸序列 SEQ ID NO: 8 内的表位的抗体。

16. 杂交瘤 490-1 (ATCC 保藏号 PTA-6189)。

17. 杂交瘤 491-1 (ATCC 保藏号 PTA-6190)。

18. 杂交瘤 495-1 (ATCC 保藏号 PTA-6191)。

19. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 14 中任一项的单克隆抗体和药用可接受的载体。

20. 权利要求 19 的药物组合物，其中所述单克隆抗体是嵌合型人/小鼠抗体、人抗体或者人源化抗体。

21. 前胃泌素免疫测定法，其包括：

a) 获得用于测定前胃泌素的样品；

b) 将所述样品与特异性结合前胃泌素、但不结合胃泌素-17(G17)、胃泌素-34(G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17(G17-Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素-34(G34-Gly)的单克隆抗体在如下条件下相接触，所述条件适合抗体发生结合并允许所存在的任何前胃泌素形成前胃泌素-单克隆抗体复合物；和

c) 通过免疫检测方法检测样品中是否存在前胃泌素-单克隆抗体复合物；和/或确定前胃泌素-单克隆抗体复合物的量。

22. 权利要求 21 的前胃泌素免疫测定法，其中所述单克隆抗体选择性结合位于氨基酸序列 SWKPRSQQP (SEQ ID NO: 6) 内的表位、位于氨

基酸序列 SQQPDAPLG (SEQ ID NO: 7) 内的表位、或位于氨基酸序列 GRRSAEDEN (SEQ ID NO: 8) 内的表位。

23. 权利要求 21 或 22 中任一项的前胃泌素免疫测定法，其中所述单克隆抗体结合由选自 490-1、491-1 和 495-1 中的杂交瘤产生的单克隆抗体所结合的表位。

24. 权利要求 21 至 23 中任一项的前胃泌素免疫测定法，其中所述免疫检测方法是酶联免疫吸附试验 (ELISA)、放射性免疫测定 (RIA)、免疫组织化学 (IHC) 测定、免疫荧光 (IF) 测定、凝集试验、蛋白质印迹测定、斑点印迹测定、狭线印迹测定或表面等离子体阻抗检测法。

25. 诊断患者的由胃泌素促发的疾病或病症的方法，其包括确定来自所述患者的生物学液体样品中的前胃泌素的水平，并将所述样品中的前胃泌素的水平与来自一或多个对照个体的生物学液体样品中的前胃泌素的水平或与参照标准品进行比较。

26. 预防或治疗由胃泌素促发的疾病或病症的方法，包括给有此需求的患者施用权利要求 19 的药物组合物。

27. 用于监测患者的由胃泌素促发的疾病或病症的方法，包括在第一时间点确定来自患有胃泌素促发的疾病或病症或有此危险的患者的生物学液体样品中的前胃泌素的水平；在不同时间点确定来自所述患者的一或多个生物学液体样品中的前胃泌素的水平；并由此监测由胃泌素促发的疾病或病症。

28. 用于进行免疫测定法的试剂盒，其包含选择性结合前胃泌素的单克隆抗体和合适的容器，其中所述分子不结合胃泌素-17(G17)、胃泌素-34(G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17(G17-Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素-34(G34-Gly)。

29. 代用参照标准品 (SRS) 分子，其基本上由大约 10 个至大约 35 个氨基酸的肽链组成，其中所述 SRS 分子包含存在于超过约 50 个氨基酸的目的蛋白质中的至少两个表位中的每一个的免疫模拟物。

30. 权利要求 29 的代用参照标准品 (SRS) 分子, 其中所述目的蛋白质是肽激素或肽激素前体。

31. 权利要求 29 或 30 中任一项的代用参照标准品 (SRS) 分子, 其是合成的肽。

32. 权利要求 29 至 31 中任一项的代用参照标准品 (SRS) 分子, 其是重组的肽。

33. 权利要求 29 至 32 中任一项的代用参照标准品 (SRS) 分子, 其中所述肽激素前体是前胃泌素。

34. 对用于超过约 50 个氨基酸的目的蛋白质的三明治免疫测定法进行标准化的方法, 所述蛋白质包含第一表位和第二表位, 所述方法包括检测并测定使用标准量的代用参照标准品 (SRS) 分子的免疫测定中产生的信号, 所述分子基本上由长度为大约 10 个至大约 35 个氨基酸的肽链组成, 所述肽链包含所述目的蛋白质的所述第一和第二表位的免疫模拟物。

35. 权利要求 34 的方法, 其中将使用标准量的代用参照标准品 (SRS) 分子的免疫测定中产生的信号与使用包含未知量的目的蛋白质的样品的免疫测定中产生的信号进行比较。

36. 权利要求 34 或 35 中任一项的方法, 其中将使用标准量的代用参照标准品 (SRS) 分子的免疫测定中产生的信号与使用包含已知量的目的蛋白质的样品的免疫测定中产生的信号进行比较。

37. 权利要求 34 至 36 中任一项的方法, 其中所述免疫检测是酶联免疫吸附试验 (ELISA)、放射性免疫测定 (RIA)、免疫组织化学 (IHC) 测定、免疫荧光 (IF) 测定、凝集试验、蛋白质印迹测定、斑点印迹测定、狭线印迹测定或表面等离子体阻抗检测法。

38. 权利要求 34 至 37 中任一项的方法, 其中所述目的蛋白质是肽激素或肽激素前体。

39. 权利要求 34 至 38 中任一项的方法, 其中所述肽激素前体是前

胃泌素。

40. 权利要求 34 至 39 中任一项的方法，其中所述 SRS 分子选自：

- | | |
|--|---|
| [前胃泌素 1-9]-[前胃泌素 72-80] | (SWKPRSQQPGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 10); |
| [前胃泌素 6-14]-[前胃泌素 72-80] | (SQQPDAPLGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 11); |
| [前胃泌素 1-9]-Gly-Gly-[前胃泌素 72-80] | (SWKPRSQQPGGGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 12); |
| [前胃泌素 1-9]-Pro-[前胃泌素 72-80] | (SWKPRSQQPPGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 13); |
| [前胃泌素 1-9]-Pro-Gly-Gly-Pro-Pro-[前胃泌素 72-80] | (SWKPRSQQPPGGPPGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 14); 和 |
| [前胃泌素 6-14]-Pro-Pro-Gly-Gly-Pro-Pro-[前胃泌素 72-80] | (SQQPDAPLGPPGGPPGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 15)。 |

抗前胃泌素单克隆抗体

技术领域

本发明涉及针对动物 (尤其是人) 体内的胃泌素激素前体 (即前胃泌素 (progastrin)) 的特定部位的抗体。本发明还进一步涉及这些单克隆抗体 (MAb) 在检测、诊断和监测胃泌素促发的疾病和病症方面的应用, 以及使用本发明中的 MAb 对胃泌素促发的疾病和病症进行预防和治疗的方法。本发明还涉及代用品分子及其作为参照标准品在免疫测定, 特别是用于肽激素的免疫测定中的用途。

发明背景

人的前胃泌素原 (preprogastrin) 是一种具有 101 个氨基酸的肽, 其是胃泌素基因的最初翻译产物, 具有以下结构:

```
MQRLCVYVLI FALALAAFSE ASWKPRSQQP DAPLGTGANR DLELPWLEQQ  
GPASHHRRQL GPQGPPHLVA DPSKKQGPWL EEEEEAYGWM DFGRRSAEDE N  
(SEQ ID NO: 1)。
```

前胃泌素是通过自前胃泌素原裂解掉最前面的 21 氨基酸 (构成信号肽) 而形成的。80 个氨基酸长的前胃泌素链经裂解和修饰酶的进一步加工而成为数个具有生物学活性的胃泌素激素形式, 包括胃泌素-17 (G17)、胃泌素-34 (G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17 (G17-Gly)、和甘氨酸延伸型胃泌素-34 (G34-Gly)。

成熟 G17 的氨基端和羧基端残基均经过修饰: N-末端的谷氨酸被环化形成焦谷氨酸(pGlu), 而 C-末端苯丙氨酸残基的游离羧基被肽基 α -酰胺化单氧化酶 (PAM) 酰胺化形成 C-末端 Phe-NH₂。成熟 G34 的 C-末端被同样酰胺化形成 C-末端 Phe-NH₂ (见 Dockray et al., Ann. Rev. Physiol.

(2001) 63: 119-139)。

人类“小”胃泌素的主要形式--成熟 G17 的氨基酸序列为: pEGPWLEEEEEAYGWMDNF-NH₂ (SEQ ID NO: 2)。在健康人体中发现的次要形式的“小”胃泌素 G17-Gly 是一种未加工完全的胃泌素, 其氨基酸序列为: pEGPWLEEEEEAYGWMDNF (SEQ ID NO: 3)。

人类“大”胃泌素的主要形式--胃泌素-34 的氨基酸序列为: pELGPQGPPHLVADPSKKEGPWLEEEEEAYGWMDNF-NH₂ (SEQ ID NO: 4)。甘氨酸延伸型胃泌素 34 (G34-Gly) 具有 C-末端甘氨酸残基, 且其氨基酸序列为: pELGPQGPPHLVADPSKKEGPWLEEEEEAYGWMDNF (SEQ ID NO: 5)。

胃泌素由胃幽门窦-G 细胞在胃泌素释放肽 (GRP) 的作用下分泌, 受胃酸和几种多肽类激素 (最主要的是生长激素抑制素) 的旁分泌作用的抑制。人们很早已发现胃泌素肽能刺激健康人体胃的胃酸分泌, 但是, 直到最近才发现这些肽还控制着胃肠 (GI) 系统不同类型细胞的增殖、分化和成熟。

前胃泌素通常被完全加工成胃泌素激素形式。当过量产生时, 前胃泌素至少部分被加工成一或多种胃泌素激素, 它们作用于胃肠道系统并可能促进形成胃泌素促发的肿瘤。在某些情况下, 前胃泌素循环于血液中, 并可在患有前胃泌素促发的疾病或病症的患者的尿中检测到。

除在胃肠 (GI) 系统的局部作用外, G17、G17-Gly (更少些), 还被释放入血液中, 并被发现在罹患胃肠道疾病 (如胃癌、结肠直肠癌和胰腺癌) 的患者的血清中有所增加。最近还发现这几种类型的胃泌素与其它与胃肠道无关的疾病相关, 包括小细胞肺癌(SCLC)和肝转移瘤。实例参见“Gastrin and Colon Cancer: a unifying hypothesis” S. N. Joshi et al., *Digestive Diseases* (1996) 14: 334-344; 和 “Gastrin and Colorectal Cancer” Smith, A. M. and Watson, S.A. (2000) *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 14(10): 1231-1247。

抗体是医学、兽医学和其它领域所用的许多测定技术中的关键试剂。这类测试包括许多常规使用的免疫测定技术，例如：酶联免疫吸附试验 (ELISA)、放射性免疫测定 (RIA)、免疫组织化学 (IHC) 和免疫荧光 (IF) 测定法。

抗胃泌素多克隆抗体已被证明可抑制胃泌素的活性 (“Inhibition of gastrin activity by incubation with antibodies to the C-terminal tetrapeptide of gastrin” Jaffe et al., *Surgery* (1969) 65(4):633-639)，而且非人类抗胃泌素多克隆抗体已被用于治疗罹患 Zollinger-Ellison 综合征 (在无进食刺激的情况下胃泌素过度分泌) 的患者。见 Hughes et al., “Therapy with Gastrin Antibody in the Zollinger-Ellison Syndrome” Hughes et al., *Digestive Diseases* (1976) 21(3):201-204。但是，这些兔抗胃泌素抗体“最多能对患者起到短期治疗作用。” (Hughes, 204 页)。美国专利 5,886,128 和 5,785,970 揭示了一种通过使用胃泌素激素肽缀合物免疫对生长依赖于胃泌素激素或受胃泌素激素刺激的溃疡或肿瘤进行治疗的方法。

直到现在，还未能获得能够自加工形式的胃泌素激素中灵敏检测出和准确分辨出前胃泌素的单克隆抗体 (MAb)。而且，直至本发明为止，还无法准确测量生物学液体样品 (例如生物学液体样品) 中前胃泌素的含量。本发明的 Mab 可用于进行临床检验测定以准确地说明正常和患病情况下的前胃泌素的生物学。本发明中的单克隆抗体还能提供药学单克隆抗体成分以及预防和治疗胃泌素相关疾病和病症的方法。本发明还提供 MAb 组合物的制药用途以及用于预防和治疗前胃泌素促发的疾病和病症的方法。

发明内容

本发明提供前胃泌素结合分子，其选择性结合前胃泌素，其中所述分子不结合胃泌素-17(G17)、胃泌素-34(G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17(G17-Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素-34(G34-Gly)。所述前胃泌素结合

分子可以是抗体分子，例如单克隆抗体、抗体结合区域、或单链抗体。

在一个方面，本发明提供单克隆抗体 (MAb)，其选择性地与前胃泌素结合于前胃泌素的氨基酸序列的 1-9 位内的表位，即 SWKPRSQQP (SEQ ID NO: 6)。本发明还提供产生 MAb 的杂交瘤，所述 MAb 选择性地与前胃泌素结合于前胃泌素的氨基酸序列的 1-9 位内的表位，即 SWKPRSQQP (SEQ ID NO: 6)。

在另一个方面，本发明提供 MAb，其选择性地与前胃泌素结合于氨基酸序列的 6-14 位内的表位，即 SQQPDAPLG (SEQ ID NO: 7)。本发明还提供产生 MAb 的杂交瘤，所述 MAb 选择性地与前胃泌素结合于氨基酸序列的 6-14 位内的表位，即 SQQPDAPLG (SEQ ID NO: 7)。

在另一个方面，本发明提供 MAb，其选择性地与前胃泌素结合于前胃泌素的氨基酸序列的 72-80 位内的表位，即 GRRSAEDEN (SEQ ID NO: 8)。本发明还提供产生 MAb 的杂交瘤，所述 MAb 选择性地与前胃泌素结合于氨基酸序列的 72-80 位内的表位，即 GRRSAEDEN (SEQ ID NO: 8)。

根据本发明，可在一组前胃泌素结合分子中组合使用两种或两种以上的前胃泌素结合分子，其中所述分子不结合胃泌素-17(G17)、胃泌素-34(G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17(G17-Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素-34(G34-Gly)。

本发明还提供前胃泌素结合分子以及药用可接受的载体的药物组合物，其中所述分子不结合胃泌素-17(G17)、胃泌素-34(G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17(G17-Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素-34(G34-Gly)。在一个具体的方面，本发明提供 MAb 以及药用可接受的载体的药物组合物，所述 MAb 选择性地 (1) 与前胃泌素结合于相当于前胃泌素的 1-9 位氨基酸的氨基酸序列内的表位，SWKPRSQQP (SEQ ID NO: 6)；(2) 与前胃泌素结合于氨基酸序列的 6-14 位内的表位，SQQPDAPLG (SEQ ID NO: 7)；或 (3) 与前胃泌素结合于氨基酸序列的 72-80 位内的表位，

GRRSAEDEN (SEQ ID NO: 8)。

本发明还提供前胃泌素免疫测定法。所述方法包括：首先，获得用于测定前胃泌素的样品，并将所述样品与前胃泌素结合分子相接触，所述结合分子不结合胃泌素-17(G17)、胃泌素-34(G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17(G17-Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素-34(G34-Gly)，接触的条件适合发生结合并使得所存在的任何前胃泌素形成前胃泌素-前胃泌素结合分子复合物；然后检测是否存在前胃泌素-前胃泌素结合分子复合物；和/或通过免疫测定方法确定样品中的前胃泌素-前胃泌素结合分子复合物的量。

本发明还提供诊断患者的由胃泌素促发的疾病或病症的方法，包括确定来自患者的生物学液体样品中的前胃泌素的水平，并将所述样品中的前胃泌素的水平与来自一或多个对照个体的生物学液体样品中的前胃泌素的水平或与一种参照标准进行比较。可通过给有需要的患者施用包括前胃泌素结合分子的药物组合物来预防或治疗此类胃泌素促发的疾病或病症，所述前胃泌素结合分子选择性地：(1) 与前胃泌素结合于相当于前胃泌素的 1-9 位氨基酸的氨基酸序列内的表位，SWKPRSQQP (SEQ ID NO: 6)；(2) 与前胃泌素结合于前胃泌素的氨基酸序列的 6-14 位内的表位，SQQPDAPLG (SEQ ID NO: 7)；或 (3) 与前胃泌素结合于前胃泌素的氨基酸序列的 72-80 位内的表位，GRRSAEDEN (SEQ ID NO: 8)。

本发明还提供用于监测患者的由胃泌素促发的疾病或病症的方法。所述方法包括在第一时间点确定来自患有胃泌素促发的疾病或病症或有此危险的患者的生物学液体样品中的前胃泌素的水平；在一或多个不同的时间点确定来自所述患者的生物学液体的一或多个样品中的前胃泌素的水平；比较在不同时间点所确定的前胃泌素的水平，并由此监测所述由胃泌素促发的疾病或病症。

本发明还提供用于进行免疫测定法的试剂盒，包括抗前胃泌素结合分子和合适的容器。所述前胃泌素结合分子选择性结合前胃泌素，但不

结合胃泌素-17 (G17)、胃泌素-34 (G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17 (G17-Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素-34 (G34-Gly)。

本发明还提供代用参照标准品 (SRS) 分子，其基本上由大约 10 个至大约 35 个氨基酸的肽链组成。所述 SRS 分子包括位于超过约 50 个氨基酸的目的蛋白质内的至少两种表位的免疫模拟物。

本发明还进一步提供对用于超过约 50 个氨基酸的目的蛋白质的三明治免疫测定法进行标准化的方法，所述蛋白质包含第一表位和第二表位，所述方法包含检测或测量使用标准量的代用参照标准品 (SRS) 分子的免疫测定中产生的信号。所述 SRS 分子基本上由 10 个至大约 35 个氨基酸的肽链组成，所述肽链包括所述目的蛋白质的第一和第二表位的免疫模拟物。

发明详述

以下提供了本说明书中使用的术语和短语的定义：

在本文中，“前胃泌素原”具有 101 个氨基酸，是胃泌素基因的最初翻译产物，包括 N 末端 21 氨基酸的信号序列、前肽序列和胃泌素激素序列。

在本文中，“前胃泌素”是自前胃泌素原裂解掉 21 个氨基酸的信号序列之后形成的 80 个氨基酸的产物。“前胃泌素”所有生物学活性形式的胃泌素激素的最初前体。

在本文中，“前胃泌素-免疫模拟物”是可引发产生结合前胃泌素的抗体并被抗前胃泌素抗体结合的部分 (moiety)。在本文中，前胃泌素免疫模拟物部分不结合以下各项：胃泌素-17 (G17)，无论后者是 C 末端酰胺化的还是具有游离的 C 末端；甘氨酸延伸型胃泌素-17 (G17-Gly)；胃泌素-34 (G34)，包括 C 末端酰胺化的形式和具有游离 C 末端的形式；或甘氨酸延伸型胃泌素-34 (G34-Gly)。

此处交替使用的“胃泌素激素”或“胃泌素激素形式”指的是任何具有

生物活性和/或交叉免疫反应的胃泌素激素肽。胃泌素激素的主要形式包括但不限于：胃泌素-17(G17)，无论其带有酰胺化羧基端或带有游离羧基端；甘氨酸延伸型胃泌素-17(G17-Gly)；胃泌素-34(G34)，包括羧基端酰胺化形式和带游离羧基端的形式；甘氨酸延伸型胃泌素-34 (G34-Gly)。

此处使用的“生物学液体”指的是任何含有生物学来源的物质的液体。用于本发明的优选生物学液体包括动物（例如哺乳动物，优选人类对象）的体液。体液可以是任何体液，包括但不限于血液、血浆、血清、淋巴液、脑脊液 (CSF)、唾液、汗液和尿液。

此处使用的“防腐剂”指的是任何可减少生物学液体样品或含有生物学成分的液体样品中的胃泌素随时间的降解的药剂、补充物或添加剂。能用于实施本发明的防腐剂包括本领域熟知的众多防腐剂中的任一种，包括但不限于：普通化学防腐剂，如叠氮化钠、EDTA 和蛋白酶抑制剂，如苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) 和胰蛋白酶抑制剂（如：特斯乐 (TrasyloI)），或生物学防腐剂，如肝素。

在本文中，“前胃泌素结合分子”可以是任何结合前胃泌素，但不结合胃泌素-17(G17)、胃泌素-34(G34)、甘氨酸延伸型胃泌素-17(G17-Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素-34(G34-Gly) 的分子。

在本文中，“胃泌素促发的疾病或病症”是指胃泌素和/或前胃泌素在其中具有刺激作用的任何疾病或病症。例如，已知胃泌素刺激多种肿瘤的生长和增殖，特别是胃肠道肿瘤，例如结直肠肿瘤。见 Michaeli et al 的美国专利 6,548,066。

本发明的前胃泌素结合分子可以是任何前胃泌素结合分子，例如抗体分子或受体分子。抗体分子可以是任何抗体分子，如单克隆抗体。抗前胃泌素抗体分子可以是单链抗体分子或者抗体片段，如 Fab 片段，或者任何包括前胃泌素结合区域的其他抗体片段。优选地，本发明的抗前胃泌素抗体分子是哺乳动物抗体分子，例如兔、小鼠或者人的抗体分

子。本发明的抗前胃泌素抗体分子可以是嵌合型人/非人抗体 (如人/小鼠嵌合体)、人源化抗体的或者完全是人的抗体。

单克隆抗体 (MAb) 具有独特的特性, 使得它们在被用于多种这类测定时, 在许多方面均优于多克隆抗血清和自多克隆抗血清中提纯所得抗体。这些特性包括: 对靶抗原的单抗原决定簇特异性 (即, 对单一表位的特异性)、在不同抗体制备物中不变的特异性、以及长时间不变的亲和力和化学组成。而且, MAb 可通过体外方法无限期地并不受数量限制地进行生产。这些特性与多克隆抗体的特性形成了鲜明对比, 后者需要用到体内免疫法, 不可避免地具有生物变异性和免疫动物寿命所决定的有限的抗体生产能力。

尽管有这些优点, 即使是对同一表位具特异性的各个单克隆抗体之间也存在差异。例如: 由单一抗原表位部位免疫诱导的单克隆抗体之间可能在以下任一种或所有特性方面出现差异: 1) 对表位分子组成和三级结构的精确特异性; 2) 抗体独特型 (idiotype); 3) 抗体亲和力; 4) 抗体同种异型 (allotype); 和 5) 抗体同种型 (isotype)。这些特性上的差异能影响单克隆抗体在特定免疫测定中的表现, 使得针对同一抗原部位的不同单克隆抗体分离物在一给定的测定中具有不同的表现。作为结果, 在被作为试剂用于特定的免疫测定中时, 一些单克隆抗体将优于其它与同样表位结合的抗体。

本发明的抗前胃泌素结合分子, 特别是抗前胃泌素 MAb, 特别适合用于免疫测定法中。免疫测定法可以是酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射性免疫测定 (RIA)、免疫扩散测定或免疫检测测定, 如表面等离子体阻抗测定 (surface plasmon resistance assay) (如 Biacore® 测定)、ELISPOT、狭线印迹 (slot-blot)、或蛋白质印迹。作为这些技术的一个总的指导, 参见例如 Ausubel et al. (eds) (1987) in “*Current Protocols in Molecular Biology*” John Wiley and Sons, New York, N.Y.

免疫测定法也可以是为使组织样品中的某种胃泌素激素形式显像所

用的免疫组织化学 (IHC) 染色法或免疫荧光 (IF) 操作。例子参见 "Principles and Practice of Immunoassay" (1991) Christopher P. Price and David J. Neoman (eds), Stockton Press, New York, N. Y.

在一个特别有用的实施方式中, 本发明的前胃泌素结合分子的可用于以下的免疫测定法中, 例如用于对组织样品中的某种胃泌素激素形式进行显像所用的免疫组织化学 (IHC) 染色法或免疫荧光 (IF) 操作。例如参见 "Principles and Practice of Immunoassay" (1991) Christopher P. Price and David J. Neoman (eds), Stockton Press, New York, N.Y.

免疫组织化学染色法在肿瘤的检测和诊断中具有很高的价值, 见例如 Bodey, B. "The significance of Immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms" (2002) *Expert Opin Biol Ther.* 2(4):371-93, 另见 Osin PP, Lakhani SR. (1999) The Pathology of Familial Breast Cancer: Immunohistochemistry and Molecular Analysis. *Breast Cancer Res.* 1(1):36-40。

抗前胃泌素单克隆抗体

优选地可以通过测试各个候选单克隆抗体 (MAb) 在意欲使用的具体用途中的表现而选择最佳的 MAb 用于具体的用途中。为此, 选择过程的一部分便是测试候选 MAb 在意欲使用的用途中的最佳功能性, 以便得到对于所述用途而言是最佳的 MAb。这一选择步骤是在产生 MAb 所常规采取的选择步骤的基础上进行的, 所述常规步骤包括结合靶抗原并对产生 MAb 的杂交瘤进行连续克隆, 以确保杂交瘤细胞系的关键特性的稳定性, 包括永久性生长、无限期地持续无限制地产生抗体。

在本文中, 抗体对前胃泌素的特定靶表位具有“选择性”是指所述抗体与前胃泌素的特定靶表位相结合的 K_a 比任何其他的胃泌素表位高至少 10 倍, 优选地比任何其他的胃泌素表位高至少 100 倍, 且最优选地比任何其他的胃泌素表位高至少 1000 倍。

在一个方面，本发明提供用于鉴别与前胃泌素的 N 末端和 C 末端具有选择性的 MAb 的方法，其中所述 MAb 具有更好的特性。这些 MAb 特别适合用于为测量液体中、特别是生物学液体中特定形式胃泌素激素而设计的免疫酶学测定法 (通常称为“ELISA”或酶联免疫吸附分析)。

本发明的单克隆抗体也适合被用于免疫检测 (如 ELISPOT、放射性免疫测定、抗体三明治捕捉试验、表面等离子体阻抗检测系统 (如 Biacore® 型系统)、斑点印迹法、狭线印迹法和蛋白质印迹法、以及免疫荧光和免疫组化法) 中对胃泌素激素进行检测和/或定量测定。

在另一个方面，本发明提供 MAb，其选择性地与前胃泌素结合于前胃泌素的氨基酸序列的 1-9 位内的表位 (SWKPRSQQP, SEQ ID NO: 6)，即自前胃泌素原 (胃泌素基因的最初的翻译产物) 裂解掉 21 个氨基酸的信号序列之后形成的产物。

在另一个方面，本发明提供 MAb，其选择性地与前胃泌素结合于前胃泌素的氨基酸序列的 6-14 位内的表位 (SQQPDAPLG, SEQ ID NO: 7)，即自前胃泌素原 (胃泌素基因的最初的翻译产物) 裂解掉 21 个氨基酸的信号序列之后，随后再去除前胃泌素的 1-5 位氨基酸而形成的产物。

在另一个方面，本发明提供 MAb，其选择性地与前胃泌素结合于前胃泌素 C 端区域氨基酸序列的 72-80 位内的表位 (GRRSAEDEN, SEQ ID NO: 8)，即自前胃泌素原 (胃泌素基因的最初的翻译产物) 裂解掉 21 个氨基酸的信号序列之后形成的产物。

在另一个方面，本发明提供 MAb，其选择性结合前胃泌素。这些 MAb 结合前胃泌素，但不结合加工过的胃泌素激素形式: G17、G34、G17-Gly 或 G34-Gly。本发明的对前胃泌素具有选择性的 MAb 包括结合人前胃泌素的 C 端区域的 MAb。这些结合人前胃泌素的 C 端区域的 MAb 也结合前胃泌素原，其由 101 个氨基酸的肽链组成，可先后自其加工出前胃泌素和胃泌素。但是，对前胃泌素原的加工很快并且发生在合

成其的内质网 (ER) 中。本发明中与前胃泌素相结合的单克隆抗体可用于此处所述的测定中，对样品中的前胃泌素进行检测和定量测定。

本发明的单克隆抗体可根据已有的熟知技术进行嵌合化或人源化。例如见 Cabilly 的美国专利 4,816,567，名称为“Recombinant immunoglobulin preparations”和 Waldman et al 的美国专利 6,689,869，名称为“Labeled humanized anti-CD-18 antibodies and fragments and kits”，以及 Carter et al 的美国专利 6,639,055，名为“Method for making humanized antibodies”。人源化抗体可被调整为与原始小鼠单克隆抗体的亲和力更加吻合。例如见，Ono et al 的美国专利 6,699,974，名为“Re-shaped human anti-HM1.24 antibody”。

本发明还提供用于检测前胃泌素样品的方法，特别是生物学样品例如生物学液体和细胞、组织、活检样品以及器官切片等等。本发明还提供通过测定患病的或者正常的组织和细胞中前胃泌素的存在情况而诊断患者的由胃泌素促发的疾病或病症的方法。所述方法包括确定来自患者的生物学液体样品中的前胃泌素的水平，并将所述患者样品中的前胃泌素的水平与来自一或多个对照个体的生物学液体样品中的前胃泌素的水平进行比较。来自对照个体的样品可以是来自健康个体的混合生物学液体。或者，可将患者样品中的前胃泌素的水平与参照标准进行比较。参照标准可以是经校准的属于健康个体的前胃泌素正常范围内标准品。本领域普通技术人员能够容易地制备此类对照样品而无需进行过度的实验。关于代用参照标准品请参见下文。

这些检测和诊断方法可使用本发明的抗前胃泌素 MAb 对活检标本进行免疫组织化学染色。可使用免疫组织化学方法对抗前胃泌素 MAb 与组织样品的结合进行显像，例如通过荧光染色、免疫金染色或酶促染色。关于诊断方法中的免疫组织化学方面的综述请参见 Miller et al., Fixation and epitope retrieval in diagnostic immunohistochemistry: a concise review with practical considerations. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*

(2000) 8(3): 228-235。

通过此类方法，本领域普通技术人员能够利用本发明的抗前胃泌素 MAb 来评估组织中，包括疾病组织、癌组织或者癌前病变组织中，是否存在前胃泌素及其分布。这些信息有助于诊断由胃泌素促发的或由前胃泌素促发的疾病和病症，并有助于为其选择合适的治疗方法。

代用参照标准品

在基于抗体的抗原测定法中，抗原是在一种测定体系中被检测和测定的，该体系依赖于针对抗原所表达的两种不同表位的抗体的结合情况，这些测定法在某些情况下在实际使用中会有局限性。测试样品中的抗原药对照用于测定法中的参照抗原进行定量，当用于测定法中的参照抗原不容易获得或合成时，便属于这种情况。例如，在本申请所述的前胃泌素三明治 ELISA 中，通过已知浓度的参照抗原溶液的系列稀释液产生标准曲线。

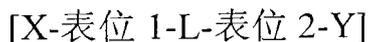
因此，可使用前胃泌素的系列稀释液建立标准曲线以便定量测定前胃泌素。有了以前胃泌素浓度对所产生的信号而建立的这种标准曲线，便能够通过比较以测试样品得到的信号并自标准曲线读出前胃泌素的浓度而定量测试样品中的前胃泌素。这一方法的局限性在于，对有些抗原而言，要得到其纯化的形式且数量足以在临床上进行实际测定，可能很困难或者费用过于昂贵。例如，纯化的前胃泌素(一种 80 个氨基酸的激素原)的制备费用昂贵且难以准确合成。这些限制因素可严重限制前胃泌素捕获 ELISA 的实际用途，因为其依赖于抗体与该分子两个末端的结合。

对此，一种解决方案是以代用参照标准品 (SRS) 替代天然分子。SRS 同时含有天然分子所表达的、免疫测定所需的两个表位，因此使得捕获抗体和检测抗体均能够结合 SRS。不过，SRS 去除、取代或者缩短了天然分子的干扰区域 (和/或从各个表位到末端的区域)，这样 SRS 便

明显短于天然分子，且因此能够以合理的费用容易地进行合成。

现有的肽合成方法能够容易地且经济地合成长度高达大约 35 个氨基酸的肽。因此，添加长度为 1 个至多达大约 20 个氨基酸的接头来连接 SRS 的两个表位是可行的。在具体的实施方式中，接头的长度可以是大约 4 个至大约 15 个氨基酸，或者大约 8 个至大约 12 个氨基酸。通过选择具有合适长度和特性 (例如刚性或柔性、亲水性或疏水性等等) 的接头可将接头设计为能够改善测定的表现，特别是在以 SRS 作为参照标准品的免疫测定中达到最佳表现。

代用参照标准品的构思广泛适用于各种测定法，在这些测定法中简单的合成化合物可用作更加复杂的天然化合物的代用品。因此，对于其中抗原被具有一种特异性的抗体捕获并被具有第二种特异性的抗体检测的三明治 ELISA，SRS 具有以下通式：



其中表位 1 和表位 2 是所述天然分子的不同表位的免疫模拟物，因此结合表位 1 或表位 2 的抗体也结合天然分子的相应表位。SRS 分子的长度在大约 10 至大约 35 个氨基酸之间。表位 1 和表位 2 通过接头 L 连接在一起，L 可以是肽或非肽接头，或者 L 可以是共价键。X 和 Y 可各自是氨基酸、肽序列或封闭基团 (blocking group)。或者，X 或者 Y，或者两者可以分别是 SRS 的 N 末端或 C 末端的氢原子。

可用于实施本发明的接头包括任何接头部分 (moieties)。此类部分是本领域已知的。例如，有用的肽接头部分包括 gly-gly，见 Ladd et al 的美国专利 5,759,551，col. 9, line 64；无活性肽，见 Wienhues et al 的美国专利 6,613,530，col. 3, lines 38-47；以及富含脯氨酸的柔性铰链间隔物，见 Shen et al 的美国专利 5,683,695。此外，也可使用非肽间隔物部分，且它们具有额外的特性，即一般来说它们具有蛋白酶抗性。此类部分包括，例如，-O-R-CO-、-NH-R-CO-、-NH-R-NH-、-O-R-NH-、或-NH-R-CH₂-，其中 R 是饱和的或非饱和的烃链，其任选地被一或多个芳

基或杂原子(如氮原子、氧原子或硫原子)取代和/或中断,见 Cohen et al 的美国专利 5,736,146 和 5,869,058。也可使用 Wang 的美国专利 6,780,969 中公开的非肽化学接头来实施本发明。

前胃泌素是具有 80 个氨基酸的大肽,其难于大量纯化且价格昂贵。SRS 的组成为前胃泌素 N 末端表位(如,前胃泌素的 1-9 位氨基酸)、任选地其后是短接头、连接于前胃泌素 C 末端表位(如 72-80 位氨基酸),其可通过常规方法合成,例如固相肽合成法。接头可以是任何接头,例如氨基酸、肽或非肽接头。SRS 可用于对前胃泌素免疫测定法进行标准化。

在一个具体的实施方式中,前胃泌素 SRS 包括两个含表位的肽,各 9 个氨基酸,任选地通过这两个肽之间的接头序列相连接。可以长度更短的或者更长的含表位的肽序列进行替换,条件是 SRS 的总长度不超过大约 35 个氨基酸残基的长度,且保留了抗体与它们相应的同源表位的充分结合性,以便测定法具有足够好的表现。

如果按如上所述再两个前胃泌素表位之间加入肽接头,则前胃泌素 SRS 肽的长度会因接头的长度而增加。例如,接头-Pro-Pro-或-Gly-Gly-会将肽的总长度由 18 个氨基酸增加至 20 个氨基酸 氨基酸。可以更长的氨基酸接头进行替换;选择的最佳序列要适合用作前胃泌素 SRS。再优选的实施方式中,接头是包括脯氨酸和甘氨酸的组的肽,例如-Pro-Pro-Gly-Gly-Pro-Pro- (SEQ ID NO: 9)。此类肽的长度最多为 35 个氨基酸,可通过标准方法以高纯度大量合成,且费用合理。见例如 Merrifield, *Methods in Enzymology* (1997), 289: 3-13; Also, Wade & Tragear, *Solid Phase Peptide Synthesis, Australas. Biotechnol.* (1993) 3(6):332-6。

可按如下方式以前胃泌素 SRS 替代真正的前胃泌素参照标准品。可按照与使用前胃泌素作为参照标准品时所使用的相同的肽摩尔浓度制备前胃泌素 SRS 溶液。制备该溶液的系列稀释物,然后用于测定法中以建立参照曲线(摩尔浓度对信号(例如吸光度))。

可以摩尔为基础制备前胃泌素 SRS 溶液，以产生与前胃泌素本身的溶液相同的免疫测定应答；如同使用真正的前胃泌素一样，以前胃泌素 SRS 获得相似的或者相同的标准曲线。然后可将来自含有前胃泌素的实际测试样品如人血浆的吸光度值与 SRS 标准曲线进行比较，以确定测试样品中的前胃泌素浓度。仅需要将前胃泌素 SRS 标准品与前胃泌素标准品进行一次比较且随后仅需核对准确性。

或者，可使用 SRS 来产生根本不需要根据真正的参照标准分子进行校准的任意标准曲线 (arbitrary standard curve)。基于与简便的 SRS 标准浓度进行比较，将所有结果表示为任意单位。

根据使用 SRS 的具体测定方法对 SRS 特性的要求，可以需要或者不需要接头元件。适合用于前胃泌素 ELISA 的前胃泌素 SRS 肽的实例包括：

[前胃泌素 1-9]-[前胃泌素 72-80]	(SWKPRSQQPGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 10);
[前胃泌素 6-14]-[前胃泌素 72-80]	(SQQPDAPLGGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 11);
[前胃泌素 1-9]-Gly-Gly-[前胃泌素 72-80]	(SWKPRSQQPGGGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 12);
[前胃泌素 1-9]-Pro-[前胃泌素 72-80]	(SWKPRSQQPPGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 13);
[前胃泌素 1-9]-Pro-Gly-Gly-Pro-Pro-[前胃泌素 72-80]	(SWKPRSQQPPGGPPGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 14); 和
[前胃泌素 6-14]-Pro-Pro-Gly-Gly-Pro-Pro-[前胃泌素 72-80]	(SQQPDAPLGPPGGPPGRRSAEDEN, SEQ ID NO: 15)。

本领域人员无需进行过度的实验便能够容易地确定其他可能的前胃泌素 SRS 肽序列。可通过以下方式选择用于任何具体免疫测定法的最佳的前胃泌素 SRS 肽，即在免疫测定体系中测试候选 SRS 肽并选择出在

测定条件(如温度和离子强度, 和二价阳离子浓度等等)下、在所需浓度范围内模拟真正的前胃泌素的 SRS 肽。

抗前胃泌素单克隆抗体组

本发明提供首次提供了抗前胃泌素 MAb 组和抗胃泌素 MAb 组, 它们能够准确地鉴定并定量样品中的前胃泌素和胃泌素。可使用本发明的 MAb 的常规免疫测定法包括但不限于酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射性免疫测定 (RIA)、表面等离子体阻抗测定 (如 Biacore® 型测定)、免疫荧光测定 (IF)、免疫组织化学测定 (IHC)、免疫扩散测定, 等等。常规诊断测定方法的实例见例如 Dillner et al 的美国专利 5,932,412, 名称为“Synthetic peptides in human papilloma virus 1, 5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 33 and 56 useful in immunoassay for diagnostic purposes”。

可给 MAb 组添加一或多种额外的选择性结合特定胃泌素激素类型的 MAb, 这样, 除了样品中的前胃泌素以外, 还能够对一种以上的 (通过前胃泌素加工而产生的) 胃泌素激素类型进行鉴定和定量。例如, 在上述抗体组中加入对成熟 G17 形式的 N 末端具有选择性的 MAb, 进一步使得在以本发明的抗前胃泌素 MAb 鉴定和定量前胃泌素之外, 还可对样品中的成熟 G17 激素进行特异性的鉴定和定量。类似地, 包括本发明的抗前胃泌素 MAb 以及对 G34 的 N 末端具有特异性的 MAb 的 MAb 组还能够对样品中的 G34 进行鉴定和定量。因此, 如上所述, 可以在所述组中加入对任何特定胃泌素激素形式具有选择性的 MAb, 以便在以本发明的抗前胃泌素 MAb 所获得的有关前胃泌素的信息之外, 进一步提供与样品中的特定胃泌素激素形式的性质和量有关的信息。

可用于鉴定、定量和监测其他形式的胃泌素激素的其他 MAb 组合对于本领域技术人员来说将是显而易见的。本发明涵盖所有此类本发明的 MAb 对和本发明的 MAb 的两种或两种以上的组合。

本发明的 MAb 提供了准确确定前胃泌素/胃泌素激素形式的量和比

率的手段，可用于评估患胃泌素激素促发的疾病和病症的易感性，并用于对患有此类疾病和病症的患者进行检测和诊断。例如，本发明的抗胃泌素 MAb 可用于 ELISA 测定法，用于对患者的血清或其他生物学液体中的前胃泌素以及 G17、G34、G17-Gly 和 G34-Gly 胃泌素激素等形式中的任一或者全部进行大规模筛查。

本发明的 MAb、选自本发明的 MAb 的 MAb 对的组合、以及本发明的 MAb 组特别适合用于高通量筛选方法。此类方法包括胃泌素激素抗原检测的微芯片和微阵列方法，这样可以在微板或者载片上，或者其他测定基质如具有虚拟孔的板（例如见 Garyantes et al 的美国专利 6,565,813）上，测试大量样品。可采用现有技术中已有的多种检测体系中的任一种对结合进行检测。例如，可通过由生物分子反应例如抗原抗体的结合所引起的表面等离子体阻抗 (SPR) 改变而对结合进行检测。见例如，Taremi et al 的美国专利 5,981,167 将这一技术用于酶学测定法。此技术可用于连续流模式，且同样可用于检测结合于固定于表面的肽或者蛋白质如胃泌素激素的抗体，或者用于检测胃泌素抗体复合物。可通过与固定化于表面的、对胃泌素激素形式 (G17, G34, G17-Gly or G34-Gly) 的表位具有特性的抗体相结合而检测所述复合物，复合物中的抗体不会在空间上妨碍其结合。此外，这一技术具有高产实用、高度敏感且无需放射性标记等优点。

本发明的 MAb 还可用于对样品如活检材料进行免疫组织化学 (IHC) 和免疫荧光 (IF) 测定。此类分析可用于检测个体胃泌素激素形式的水平异常且因此可用于诊断胃泌素激素促发的疾病和病症。

本发明的 MAb 还可用于预防、诊断和治疗前胃泌素激素促发的疾病和病症。本发明的抗前胃泌素 MAb 可配制为药物组合物，用于针对特定的胃泌素激素形式进行被动免疫。见例如，Blackburn et al 的美国专利 6,391,299（下文中称 '299 专利），名称为“Anti-factor IX/IXa antibodies”。也可将本发明的 MAb 的功能性片段，例如 Fab 片段、

F(ab')₂ 片段和任何保留了与它们所针对的胃泌素激素形式相结合的能力的片段 (见 '299 专利中关于片段的描述), 加入到药物组合物中并用于治疗。有用的药物组合物见例如 '299 专利。本发明的药物组合物的优选的施用途径包括胃肠外施用途径, 例如皮下、肌肉内和静脉施用。此外, 某些疾病可采用口服途径进行治疗, 特别是胃肠道疾病, 例如食道或胃的溃疡性疾病。

或者, 可通过鼻内施用本发明的药物组合物。当施用有效量的此类药物组合物用于预防或者治疗那些以后高度可能患上胃泌素激素促发的疾病或病症的患者的此类疾病或病症、或用于治疗那些已经患有此类疾病或病症的患者时, 此类药物组合物是特别适用的。本发明的药物组合物还可用于减轻前胃泌素促发的疾病和病症的症状或者使之停止进一步发展。

用于治疗胃泌素促发的疾病或病症的、包括本发明的完整的抗胃泌素 MAb 或其功能性片段、且特别是人源化的抗胃泌素 MAb 的药物组合物的有效量被定义为是能够预防所述疾病或病症的发生或降低其进展速度的量; 更优选地, 有效量是能够稳定所述疾病或病症的量; 更加优选地, 有效量是能够引起所述疾病或病症消退的量。最优选地, 有效量是完全治愈所述疾病或病症的量。

此外, 本发明的 MAb 可用于免疫测定方法中以监测所述胃泌素激素促发的疾病和病症的进展, 其中前胃泌素的水平或量可作为代表治疗成功与否或者疾病或病症进展情况的指标。

此外, 本发明的 MAb 可用于对患有胃泌素激素促发的疾病或病症的患者的前胃泌素激素阻断治疗进行评价的方法中。所述方法包括以下步骤:

- a) 在治疗之前或治疗早期自患者取得第一个生物学液体样品;
- b) 通过免疫测定方法测定第一个样品中的前胃泌素的水平;
- c) 在治疗起效所需的适当时间之后, 自患者取得第二个生物学液体

样品；

d) 通过免疫测定方法测定第二个样品中的前胃泌素的水平；

e) 比较在第一个样品中测定的前胃泌素的量和第二个样品中的前胃泌素的量，以确定对患者进行前胃泌素结合治疗或阻断治疗的效果。

上述用于评价患者的前胃泌素结合治疗或阻断治疗的方法在临床上特别有价值，因为作出采用一种治疗方案还是另一种方案这一决定所需的时间对于患者的结局可能至关重要。本发明的方法可为作出这些至关重要的决定基础提供信息。所述方法在治疗之前或治疗早期提供前胃泌素量的测定值，并在开始治疗后的一或多个时段，特别是在预期治疗已经开始起效的时候，提供前胃泌素的一或多个测定值。

前胃泌素阻断治疗可以是给患者被动施用抗前胃泌素抗体。前胃泌素阻断物可以是任何前胃泌素阻断物，包括但不限于抗前胃泌素抗体，特别是嵌合型人/非人抗体、人源化的或者完全的人单克隆抗前胃泌素抗体，或者是任何具有结合前胃泌素的功能的分子。

本发明还提供用于筛查疑似含有前胃泌素的样品的组合物、方法和试剂盒。这种筛查可以在患者的样品上、或者疑似含有或疑似产生此类多肽的实验室样品上进行。试剂盒可含有本发明的抗体。试剂盒可含有用于检测样品与本发明的抗体之间的相互作用的合适的缓冲剂和试剂。所提供的试剂可以是放射性标记的、荧光标记的或者酶标记的、能够与本发明的抗体相结合或者相互作用的试剂。

试剂盒的试剂可以是液体溶液、附着于固相支持物、或者是干粉。如果试剂是液体溶液，优选地，所述液体溶液是水性溶液。优选地，如果所述试剂附着于固相支持物，所述固相支持物可以是层析介质、具有多个孔的测试板、或者显微镜载片。如果所述试剂是干粉，则可以通过添加合适的溶剂来重新配制所述干粉，所述溶剂也可提供。

本发明的试剂盒可置于容器中提供，所述容器通常包括放置抗体、抗原或检测试剂的药瓶，优选地适当分装)。本发明的试剂盒典型地还包

括一种容纳抗体、抗原和试剂的用于商业销售的装置。这些容器可以包括放置所需药瓶和一种或多种必需化学品(如层析材料、溶剂和洗脱剂、试管、去污剂、抗体和检测反应用的化学物质)的塑料容器。

在进一步的实施方式中,本发明还涉及免疫检测法及相关试剂盒。建议可采用此处的前胃泌素或肽片段来检测与之具有反应性的抗体;或者,可采用根据本发明所制备的抗体来检测前胃泌素、前胃泌素模拟分子或含前胃泌素表位的肽。总的来说,这些方法将包括首先获取疑似含有这类前体、肽或抗体的样品,在可有效形成免疫复合物的条件下,将样品与本发明的抗体或肽相接触,然后检测是否存在的免疫复合物。

现有技术中已知多种检测免疫复合物的形成的方法,例如,ELISA、RIA、免疫印迹(如斑点印迹法、狭线印迹法、蛋白质印迹等)、间接免疫荧光技术以及基于检测物理参数改变的方法,例如表面等离子体阻抗,等等。在一种广泛采用的方法中,使用标记物,如放射性标记或酶标记(如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶等)来检测免疫复合物的形成。根据本领域熟知的方法,通过使用第二结合配体如第二抗体或者用于结合生物素酰化的配体的抗生物素蛋白偶联的分子,优势可进一步增加。

实施例

实施例 1: 产生针对人前胃泌素的 N 末端的 MAb

通过标准的固相肽合成方法商品化合成了肽 SWKPRSQQPPC (“hProGastrin(1-9)-PC”, SEQ ID NO: 16), 其含有人前胃泌素的 1-9 位的氨基酸序列: SWKPRSQQP (SEQ ID NO: 17), 后者形成人前胃泌素的 N 末端表位, 其后是接头序列-Pro-Cys-。

将肽按以下步骤加入免疫原中以诱导产生针对人前胃泌素的 N 末端的抗体: 首先将肽与白喉类毒素 (“DT”) 进行共价连接生成肽-载体缀合物。确定每个 DT 载体上置换的肽单位的数量, 最终将缀合物配制成免

疫原。使用的技术见 Gevas et al 的美国专利 5,622,702。

简言之，通过异双功能交联剂 ϵ -马来酰亚胺羧酸 N-羟基琥珀酰亚胺 (epsilon-maleimidocaproic acid N-hydroxysuccinimide, ϵ -MCS) 将肽化学缀合于载体。通过在 0.1M pH7.3 的磷酸钠缓冲盐溶液 (PBS) 中透析纯化缀合物，并通过 Lowry 测定法测定蛋白质浓度。通过缀合物氨基酸分析确定了以摩尔为基础的 DT 上的肽置换水平(14.7 个肽/100,000 Da 分子量的 DT)。通过将缀合物溶液与 Montanide ISA 703 油 (SEPPIC, France) 按 30/70 的比率 (缀合物溶液：佐剂重量比) 混合，将溶解的缀合物以 Montanide ISA703 作为佐剂配制成免疫原。通过将适当体积的每种液体吸取到注射器中，然后通过一个联锁件将溶液在这个注射器和第二个注射器间快速来回推动，完成混合。

通过腹腔注射体积为 0.1mL 的 0.1mg 肽-DT 缀合物免疫原/Montanide ISA 703 对小鼠进行首次免疫。首次注射 3 个星期后进行相同剂量的二次注射。

为制备产生对人前胃泌素的 N 末端具选择性的单克隆抗体的杂交瘤，使用本领域熟知的标准技术将被免疫的小鼠的脾细胞与标准小鼠骨髓瘤融合配体细胞系进行融合。见例如 Kaprowski et al 的美国专利 4,196,265 *Method of producing antibodies*; “Selected Methods in Cellular Immunology” (Chapter 17: *Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines*, B. Mishell and S. Shiigi, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1980); Harlowe and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 ; Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1987。在收集用于细胞融合的小鼠脾细胞的四天前，通过腹腔注射 0.1 mg 溶于 PBS 的上述肽-DT 缀合物对被免疫的小鼠进行加强免疫。按 Mishell 和 Shiig 所描述那样，使用补充了次黄嘌呤-氨喋呤-脱氧胸腺嘧啶核苷的培养基进行杂交细胞的初步筛选。这种融合体被命名为 F490。

分离产生针对人前胃泌素的 N 末端的单克隆抗体的杂交瘤的初步筛选步骤是筛选能产生针对靶肽的抗体，并能保持杂交细胞系稳定性的细胞。通过筛查来自含有单一克隆的组织培养孔的细胞培养基是否含有针对人前胃泌素的 N 末端的抗体，选择出能产生抗体的细胞。这种筛选通过使用合成肽 hProGastrin(1-9)-PC 的缀合物作为靶抗原的 ELISA 方法进行，该合成肽通过末端半胱氨酸-11 与作为免疫学载体的牛血清白蛋白 (BSA) 连接。本领域技术人员知道合适的 ELISA 技术，下文中给出了其中的几个实例。通过对每种能产生在 ELISA 试验中与 hProGastrin(1-9)-PC-BSA 缀合物相结合的抗体的杂交细胞进行二次克隆而获得稳定的细胞系。通过这些方法，获得了 8 种能产生抗人前胃泌素的 N 末端的单克隆抗体的杂交细胞系。这些细胞系被命名为：490-1；490-2；490-3；490-4；490-5；490-6；490-7；和 490-8。

实施例 2：产生人前胃泌素的 N 端区域的 MAb

通过标准的固相肽合成方法商品化合成了肽 SQQPDAPLGPPC (“hProGastrin(6-14)-PPC”. SEQ ID NO: 18)，其含有人前胃泌素的 6-14 位的氨基酸序列：SQQPDAPLG (SEQ ID NO: 19)，后者形成人前胃泌素的 N 端区域表位，其后是接头序列-PPC。

按照以上实施例 1 所述将 SQQPDAPLGPPC 肽 (SEQ ID NO: 18) 加入免疫原中以诱导产生针对人前胃泌素的 N 端区域的抗体。同样如上所述进行免疫并分离到融合体，命名为 F491。

通过筛查来自含有单一克隆的组织培养孔的细胞培养基是否含有针对人前胃泌素的 N 端区域的抗体，选择出能产生针对人前胃泌素的 N 端区域的单克隆抗体的杂交瘤。这种筛选通过使用包含合成肽 hProGastrin(6-14)-PPC 的缀合物作为靶抗原的 ELISA 方法进行，该合成肽通过半胱氨酸-12 与作为免疫学载体的牛血清白蛋白 (BSA) 连接。通过对每种能产生在 ELISA 试验中与 hProGastrin(6-14)-PPC-BSA 缀合物

相结合的抗体的杂交体进行二次克隆而获得稳定的细胞系。获得了 3 种能产生抗人前胃泌素的 N 端区域的单克隆抗体的杂交细胞系。这些杂交细胞系被命名为: 491-1、491-2 和 491-3。

实施例 3: 产生针对人前胃泌素的 C 末端的 MAb

通过标准的固相肽合成方法商品化合成了肽 CPPGRRSAEDEN (“hProGastrin(72-80)-PPC”. SEQ ID NO: 20), 其含有人前胃泌素 C 末端的 72-80 位的氨基酸序列: GRRSAEDEN (SEQ ID NO: 21), 其前面是接头序列 CPP-。按照以上实施例 1 和 2 所述将肽加入到免疫原中以诱导产生针对人前胃泌素的 C 末端的抗体。

通过腹腔注射体积为 0.1mL 的 0.1mg 肽-DT 缀合物免疫原/Montanide ISA 703 对小鼠进行首次免疫。首次注射 3 个星期后进行相同剂量的二次注射。

为制备产生对人前胃泌素的 C 末端具选择性的单克隆抗体的杂交瘤, 使用如上所述的标准技术将被免疫的小鼠的脾细胞与标准小鼠骨髓瘤融合配体细胞系进行融合, 产生的融合体命名为 F495。

分离产生针对人前胃泌素的 C 末端的单克隆抗体的杂交瘤的初步筛选步骤是筛选能产生针对靶肽的抗体, 并能保持杂交细胞系稳定性的细胞。通过筛查来自含有单一克隆的组织培养孔的细胞培养基是否含有针对人前胃泌素的 C 末端的抗体, 选择出能产生抗体的细胞。这种筛选通过使用包含合成肽 hProGastrin(72-80)-PPC 的缀合物作为靶抗原的 ELISA 方法进行, 该合成肽通过半胱氨酸-1 与作为免疫学载体的牛血清白蛋白 (BSA) 连接。通过对每种能产生在 ELISA 试验中与 hProGastrin(72-80)-PPC-BSA 缀合物相结合的抗体的杂交体进行二次克隆而获得稳定的细胞系。通过这些方法, 获得了 4 种能产生抗人前胃泌素的 C 末端的单克隆抗体的杂交细胞系。这些细胞系被命名为: 495-1; 495-2; 495-3; 和 495-4。

实施例 4：抗前胃泌素的特定区域的抗体的 ELISA 滴度

本分析方法的目的是通过 ELISA 检测并确定测试样品中抗前胃泌素抗体的滴度。本发明的抗前胃泌素抗体 ELISA 基于抗体 (其可以是多克隆抗体或单克隆抗体) 与前胃泌素肽-BSA 缀合物的特异性结合。在 ELISA 中, 肽的结合证实抗体特异性结合位于缀合物的前胃泌素肽序列内的前胃泌素表位。

所测试的前胃泌素-BSA 缀合物包括实施例 1、2 和 3 中分别所列的 3 种缀合物: hProGastrin(1-9)-PC-BSA; hProGastrin(6-14)-PPC-BSA、和 hProGastrin(72-80)-PPC-BSA。如上所述, 使用交联剂 ϵ -MCS, 使用与制备 DT 连接的免疫原时所用的相同的前胃泌素肽来制备缀合物。

在 ELISA 的第一步, 将缀合物结合于 96 孔 ELISA 板的孔中。使用 96 孔板清洗装置, 通过洗涤步骤去除游离的缀合物。然后加入测试 (或对照) 抗血清。测试血清中的抗前胃泌素 Ab 通过存在于抗原上的前胃泌素肽表位结合于缀合物。通过加入对被检测的抗前胃泌素抗体具有特异性的抗 IgG-碱性磷酸酶试剂而检测结合的抗体。例如, 使用结合小鼠抗前胃泌素抗体的兔抗小鼠 IgG-碱性磷酸酶缀合物 (“RAM-AP”) 作为抗体检测试剂来检测小鼠的抗前胃泌素抗体。抗 Ig-AP 缀合物的 AP 部分随后催化底物转化为有颜色的产物 (p-硝基酚)。使用 ELISA 板阅读器在 405 nm 的吸光度测定产生的颜色。

以混合小鼠抗前胃泌素血清 (自用于产生抗前胃泌素杂交瘤的免疫小鼠收集而来) 或含有小鼠抗前胃泌素 MAbs 的腹水作为 ELISA 的阳性对照, 器针对的是用于产生这些抗体的前胃泌素表位。使用与测试样品来自相同动物物种的血清作为阴性对照 (如正常血清或者免疫前血清等等)。

线性范围内的显色程度与结合于靶抗原的抗前胃泌素 Ab 的量直接成比例。将阳性标准 (抗前胃泌素) 血清系列稀释物相对于吸光度值进行

作图以产生结合曲线。然后自最大稀释度确定测试样品中的抗前胃泌素 Ab 滴度，所述最大稀释度所产生的吸光度能够与以相同稀释度的阴性对照所得到的吸光度区别开 (极限稀释分析法)。

试剂溶液: 所选择的具体用于本分析方法的试剂和溶液的量仅是为方便起见，且是示例性的，其不能被视为是限制性的。实际的量可根据需要而定。

1. 制备含 0.02 % NaN_3 的碳酸盐缓冲液 (“碳酸盐缓冲液”)，将 1.59 g Na_2CO_3 和 2.93 g NaHCO_3 溶解于大约 750 ml 蒸馏水并以磁力搅拌器搅拌，加入 4 ml 的 5% NaN_3 溶液并搅拌。用水将溶液调至 1 升。测定 pH (应该为 9.6 ± 0.2)，必要时以 1.0 M NaOH 或 1.0 M HCl 进行调整。将缓冲液存放于冰箱中备用。

2. 制备含有 0.05% Tween-20 和 0.02 % NaN_3 的 FTA (PBS) (“FTA/Tween”)，将 9.23 g FTA 溶解于大约 750 ml 纯水中，加入 0.5 ml Tween-20 和 4 ml 5% NaN_3 并用水调整至 1 升。

3. 通过将 10 g BSA 溶解于 1000 ml FTA/Tween 而制备 1% BSA in FTA/Tween (“BSA/FTA/Tween”)。

4. 底物缓冲液: 将 50 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 448 ml 纯水中，加入 50 ml 的 DEA 和 2 ml 5% NaN_3 并以浓 HCl 调整 pH 至 9.8。该缓冲液存在于室温，避光。

5. PBS, pH 7.2: 制备于固体 FTA (FTA 血细胞凝集缓冲液 (“FTA”) (Becton Dickenson Microbiology Systems, Cockeysville, MD))。

ELISA 方法: 抗原包被: 在碳酸盐缓冲液中制备 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前胃泌素-BSA 缀合物靶抗原 (如前述) 溶液。每个待包被的板需要最少 5.2 ml 抗原溶液。使用碳酸盐缓冲液对 1 mg/ml 的缀合物储备液进行 1:1000 的稀释制备抗原溶液。板可以是任何适用于 ELISA 测定的板，例如: Microtiter[®] 免疫测定板、硬苯乙烯板 (如 Immulon[®] 2 “U” 底 96 孔板, Dynatech Laboratories, Inc., VA; 或平底 96 孔板, 聚苯乙烯: 如微孔

板, NUNC, vendor VWR)。往每孔中加入 50 μ l 抗原溶液对 Immulon[®] 2“U”底板进行包被。将板储存于保湿盒 (如, 带湿巾的封闭容器) 中防止水份流失, 并置于冰箱(2-8 $^{\circ}$ C)中孵育过夜。

制备血清稀释液: 可使用任何方便的系列稀释度。例如。如表 1 所示使用 1/10^{0.5} 的阳性标准、阴性对照及测试血清的系列稀释液。在平底 96 孔板 (12-道加液器可同时进行最多 12 种血清的稀释) 使用 BSA/FTA/Tween 溶液对血清进行稀释。

表 1: 如表所示制备从 1: 1000 开始的系列稀释液

96 孔板	血清	滴度 ¹
行#	稀释度	(= 1/稀释度)
A	1:1,000 = 10 ⁻³	10 ³
B	1:3,162 = 3.16 x 10 ⁻⁴ = 10 ^{-3.5}	3.16 x 10 ³
C	1:10,000 = 10 ⁻⁴	10 ⁴
D	1:31,623 = 3.16 x 10 ⁻⁵ = 10 ^{-4.5}	3.16 x 10 ⁴
E	1:100,000 = 10 ⁻⁵	10 ⁵
F	1:316,230 = 3.16 x 10 ⁻⁶ = 10 ^{-5.5}	3.16 x 10 ⁵
G	1:1,000,000 = 10 ⁻⁶	10 ⁶
H	1:3,163,300 = 3.16 x 10 ⁻⁷ = 10 ^{-6.5}	3.16 x 10 ⁶

¹. 通过稀释度的倒数计算每次稀释的滴度。

制备足够量的各样品的稀释液以提供 200 μ l 的最小工作体积。根据样品滴度, 从 1/100 (对于低滴度样品) 或 1/1000 (对于高滴度样品) 开始对 A 行中的各样品进行稀释, 然后向下对每行进行系列稀释直至 H 行 (见表 9), 生成各样品的共计 8 种稀释液。阴性对照品的稀释系列从 1/100 开始。阳性标准抗体和免疫前采血/阴性对照抗体的系列稀释液样品在每板上设置双份。

洗涤板: 使用板洗涤器 (如: Ultrawash Plus; 或 DynaWasher II

(Dynatech Laboratories, Inc., VA) 或等同物), 以 FTA/Tween 将每块包被板洗涤四次, 然后将板在纸巾上“拍击”除去残留溶液。

抗体结合: 按照下表 2 所示的样品板系列稀释度, 将稀释样品转移至抗原包被“U”板的对应的孔中 (50 μ l/孔)。将板置于保湿盒中室温孵育 1 小时。

表 2: 96 孔板 ELISA 测定方案示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	样品稀释度
A	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 ⁻³
B	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 ^{-3.5}
C	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 ⁻⁴
D	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 ^{-4.5}
E	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 ⁻⁵
F	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 ^{-5.5}
G	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 ⁻⁶
H	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 ^{-6.5}

缩写:

Pos. = 阳性标准样品;

Neg. = 免疫前采血/阴性对照样品;

TS 1-TS 8 = 测试样品

抗体检测试剂: 在 FTA/Tween 中制备合适的抗-Ig-碱性磷酸酶缀合物稀释液。本测定中每张板需要最少 5.2 ml。按上述说明对板进行洗涤。往“U”板的每个孔中加入 50 μ l/孔的 RAM-AP 溶液 (抗-Ig-碱性磷酸酶缀合物, 如, 测试小鼠抗前胃泌素抗体用的兔抗-小鼠 IgG (H+L)-碱性磷酸酶 (Zymed)), 并置于保湿盒中室温孵育 1 小时。

要检测取自小鼠以外的动物的血清中的抗前胃泌素抗体, 必须使用对产生测试血清的物种具特异性的抗-Ig-AP 缀合物进行检测 (例如: 人抗前胃泌素抗体需使用抗-人 IgG-AP 试剂 (在每批试剂规定的稀释度下使用) 进行检测)。阳性标准血清和阴性对照血清应取自与测试血清相同的物种。

底物溶液：将 p-NPP 片剂 (p-对硝基苯酚磷酸盐，以磷酸酶底物片剂的形式提供，Sigma 104 ("p-NPP") (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)) 从冷冻柜中取出并使其恢复至室温。在即将使用前，往 5ml DEA 底物缓冲液中加入 1 片 p-NPP 片剂以制备 1 mg/ml 的 p-NPP 溶液 (室温)。每 1 测试板用 5-ml 底物溶液即足够。将底物溶液避光存放待用。

底物添加：按上述说明对板进行洗涤。从 1 列 A 行开始，使用 8 (或 12) 道加液器往所有孔中同时加入 p-NPP 溶液 50 μ l /孔。

监测反应：在 10-15 分钟后终止底物溶液的反应。

终止反应：使用 8 (或 12) 道加液器往每个孔中加入 50 μ l 1.0 M NaOH 终止反应。往孔中添加 NaOH 溶液的顺序及时间与添加底物溶液时的情况相同。小心摇动计数器顶上的板，轻轻对试剂进行混合。

测量吸光度：使用 ELISA 阅读器对整张板进行阅读。将 ELISA 阅读器设定至测定 A405 nm 的 p-硝基酚。

数据分析：按以下所述对每种血清的抗体滴度进行确定：以各样品的吸光度为纵轴 (线性值)，(1/稀释度) 为横坐标 (log 值)，对每种血清 (包括阳性标准) 进行半对数作图。通过标绘稀释度的倒数，滴度可直接在 X-轴上读取。有的时候，吸光度值明显在某特定血清的结合曲线以外 (溢出点)；这类值不被纳入曲线。基于吸光度值，每种血清的滴度被确定为测试抗体的最终稀释度，该最终稀释度能够与相同稀释度的阴性对照样品区分开。产生与阳性标准参考滴度相同吸光度值的稀释度的倒数 (例如，兔抗-hG17 阳性标准的稀释度 1: 200,000)。图 1 提供了一个数据分析的例子。通常，两个结果之间差别的限度是 0.25 或者更高吸光度单位的吸光度 (根据测定中样品与样品的可变性)。

实施例 5：通过抑制性 ELISA 确定抗体特异性

除以下描述外，按与前面实施例相同的方法进行肽抑制 ELISA 测定：

制备抑制物：将合适的靶激素肽（在此为表达前胃泌素表位的肽）制备为 $1\mu\text{mol/ml}$ ($1000\mu\text{M}$) 工作储备溶液。使用工作储备溶液制备抑制稀释液系列，稀释率为 1: 2 至 1: 10，根据板的布局，生成共计 8 种或 12 种稀释液。

制备样品稀释液：在抑制测定前对样品进行系列滴定以确立最大结合率为 50% 的抗体样品稀释度。然后将样品制备为 2 倍 50% 结合浓度，用于与等体积的肽抑制物及缓冲液相混合，作为抑制测定中的对照品。将样品混合物置于保湿盒中孵育约 30 分钟，然后加入洗涤过的包被的 ELISA 板中，在保湿盒中孵育约 1 小时。根据吸光度读数（减去本底之后的）确定结合百分率：用使用抑制物的样品的吸光度值除以不使用抑制物的对照样品的吸光度值，并将得到的值乘以 100。最后，用 100% 减去结合百分率得到抑制百分率。

本测定法中的测试样品可以是血清、细胞培养液上清中的单克隆抗体、腹水或亲和纯化的抗体(Ab)。对于针对不同于前胃泌素氨基端的其他靶抗原的抗体，使用了合适的靶激素抗原和抑制物。将无关的肽作为阴性对照。

实施例 6：通过 ELISA 测定抗前胃泌素 MAbs 的同种型和特异性

通过 ELISA 来表征实施例 1 (F490)、实施例 2 (F491) 和实施例 3 (F495) 所述的抗前胃泌素 MAbs。各种 MAbs 的靶抗原与实施例 1 至 3 中所述的相同。因此，针对 hProGastrin(1-9)-PC-BSA 测试来自融合体 490 的 MAbs；针对 hProGastrin(6-14)-PPC-BSA 测试来自融合体 491 的 MAbs；以及针对 hProGastrin(72-80)-PPC-BSA 测试来自融合体 495 的 MAbs。通过实施例 4 的方法确定同种型，其中二抗兔抗小鼠 Ig 试剂对小鼠抗体同种型具有特异性。通过实施例 5 的方法确定特异性，使用以下所述的肽作为抑制剂：hProGastrin(1-9)-PC、hProGastrin(6-14)-PPC、hProGastrin(72-80)-PPC、人 G17、人 G34、人 G17-甘氨酸延伸型，并以

黄体生成激素释放激素 (LHSH) 作为阴性对照。

这些测试结果见表 3。如表所示,除了抗体 491-2 和 495-2 为 IgG2a 亚型以外,所有的 MAb 均为 IgG1 亚型。该表还显示各个 MAb 均对用于免疫的表位具有特异性。因此所有 490 系列的 MAb 均对前胃泌素表位序列 1-9 具有特异性;所有 491 系列的 MAb 均对前胃泌素表位序列 6-14 具有特异性;而所有 495 系列的 MAb 均对前胃泌素表位序列 72-80 具有特异性。因此认为这些 MAb 适合于那些设计用来检测和测定生物学测试样品中的前胃泌素的测试方法,所述样品可以是液体(如血浆、淋巴液、腹水、唾液等)和组织标本(如来自正常组织或肿瘤的活检标本或来自此类组织的脱落细胞等)。

表 3: 表征来自融合体 490、491 和 495 的 MAb

特异性	MAb	终点滴度	抗体亚型	25 微摩尔的肽的抑制百分数						
				ProG 1-9	ProG 6-14	ProG 72-80	G17	G17- gly	G34	LHRH
前胃泌素 1-9 (N 末端)	490-1	30,000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-2	30,000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-3	30,000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-4	30,000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-5	10,000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-6	10,000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-7	10,000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-8	10,000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
前胃泌素 6-1 (N 端区域)	491-1	>30,000	IgG1	0	100	0	0	0	0	0
	491-2	10,000	IgG2a	0	100	0	0	0	0	0
	491-3	1,000	IgG1	0	100	0	0	0	0	0
前胃泌素 72-80 (C 末端)	490-1	30,000	IgG1	0	0	100	0	0	0	0
	490-2	30,000	IgG2a	0	0	100	0	0	0	0
	490-3	30,000	IgG1	0	0	100	0	0	0	0
	490-4	10,000	IgG1	0	0	100	0	0	0	0

实施例 7: 合成用于通过免疫测定来测定前胃泌素的前胃泌素代用参照

标准品(SRS)

为证实 SRS 的效用，通过固相肽合成方法合成了两种前胃泌素 SRS 肽。合成方法是商业化使用的一般方法并且是本领域技术人员所熟知的。

合成前胃泌素 SRS 1 用于检测并定量人前胃泌素 1-80。前胃泌素 SRS 1 肽的结构如下：[前胃泌素 1-9-(PGGPP)-前胃泌素 72-80]。该肽的氨基酸序列为：SWKPRSQQPPGGPPGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 14)。该肽的分子量是 2535.1，采用 HPLC 测得该肽的纯度大于 90%。

合成前胃泌素 SRS 2 用于检测并定量人前胃泌素 6-80。前胃泌素 SRS 2 肽的结构如下：[前胃泌素 6-14-(PPGGPP)-前胃泌素 72-80]。该肽的氨基酸序列为：SQQPDAPLGPPGGPPGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 15)。该肽的分子量是 2432.4，采用 HPLC 测得该肽的纯度大于 90%。

实施例 8：使用抗前胃泌素 MAbs 和前胃泌素 SRS 肽测定前胃泌素的免疫酶学测定法

采用以下分析方法 (免疫酶学测定法) 测定存在于生物学液体如人血浆中的游离 (非符合物型) 人前胃泌素 1-80 或人前胃泌素 6-80，使用抗待测定的特定分子形式的前胃泌素的 N 末端或 C 末端的单克隆和/或多克隆抗体。或者，可将分别抗所述分子的 N 末端或 C 末端的多克隆抗体与抗所述分子的 C 末端或 N 末端的单克隆抗体组合使用。

1. 包被板：以最佳浓度将对待测定的特定人前胃泌素分子形式的 N 末端具有选择性的抗体包被于检测用板的微孔表面。使用的是 NUNC Maxisorp, F 96 ELISA 板 (cat. No. 439454) 检测用板，并以硼酸钠缓冲液 (20mM, pH 8.0, 含 0.1%叠氮钠) 制备抗体包被溶液。包被溶液中的亲和纯化的 MAbs 的浓度优选地为大约 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每孔加入 100 μL 的 MAbs 溶液，并在湿化的密闭盒中 4°C 包被过夜。以亲和纯化的 490-1 MAbs 包被板用于检测前胃泌素 1-80，使用 SRS 1 建立测定用标准曲线。以亲和纯

化的 491-1 MAb 包被板用于检测前胃泌素 6-80，使用 SRS 2 建立测定用标准曲线。

2. 洗涤板：去除包被溶液，加入洗涤缓冲液 (大约每孔 400 μl)，然后去除。需要的话洗涤可重复多次；一般共计洗涤 3 或 4 次。洗涤缓冲液是 0.010 M 磷酸盐缓冲液；0.0027M 氯化钾和 0.137M 氯化钠，pH 7.4，含 0.01% w/v Triton X-100。洗涤板可自动进行。

3. 封闭板：封闭缓冲液含有蛋白质和去垢剂 (1% BSA/0.1% Triton X-100，溶于包被缓冲液)，将其加入到微孔中 (200 μL /孔)，将板在湿盒中室温孵育 1 小时。将板以这种形式存在于约 4°C 的冰箱中。

4. 加入样品和标准品：如上所述洗涤板。将参照标准 (例如 SRS 1、SRS 2、或真正的前胃泌素形式；或阴性对照肽如胃泌素 17) 制备为系列稀释液以产生标准曲线。在本实施例的测定中，制备浓度为 10 μM 的 SRS 1 和 2，并按照 1:10 系列稀释至 100 fM。在测定缓冲液 (1% BSA，0.1% 牛 γ -球蛋白，以洗涤缓冲液制备) 中制备标准品和测试样品。然后将溶液加入到各孔中 (100 μL /孔)。反应在湿盒中进行 2 小时，室温。

使用已知浓度的待测定形式的前胃泌素 SRS 产生标准曲线，以确定最佳抗原浓度，标准曲线在所需的有用浓度范围内具有所需的敏感性和精确度。对于前胃泌素 (1-80 或者 6-80)，测定法的有用的前胃泌素浓度范围一般是自背景浓度 (约 1 pM 或者更低) 至大约 100 nM。可使用更小的参照标准系列稀释度，例如 1:2 系列稀释，以获得更高的精确性。

本领域普通技术人员能够立即认识到可通过改变其他测定参数而容易地变更或改进测定的敏感性和精确度，例如通过选择具有良好包被性或用于酶标记的特定 MAb、试剂的浓度、缓冲液的组成、选择酶底物体系、孵育时间、以及其他为满足测定需求而可以改变的参数。本领域普通技术人员无需进行过度的实验即可容易地确定出所需浓度范围内的适当的敏感性和精确度。

5. 加入缀合物：洗涤后，向各孔加入含有对待测定的前胃泌素形式

的 C 末端具有特异性的单克隆或多克隆抗体 (缀合于酶标记物)。在本实施例中, 抗前胃泌素 C 末端的 MAb 经亲和纯化后偶联于辣根过氧化物酶 (HRP)。所述 MAb 显示出保留了前胃泌素的 C 末端的结合性并具有 HRP 活性。以 MAb 458-1 至 458-4 这 4 种中的每一种制备单独的缀合物。根据本测试的目的, 缀合物是分开使用的而没有混合。使用的缀合物为 630 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储存液按 1:2000 稀释后的稀释液, 每孔加入 100 μL 。反应在室温 (通常+22 $^{\circ}\text{C}$) 进行至少 1 小时。

6. 加入底物: 如上所述洗涤各孔, 并向各孔中加入 100 μL 的 TMB 溶液 (Pierce) 底物溶液。反应进行 30 分钟, 然后各孔加入 100 μL 的终止溶液, 即 0.2M H_2SO_4 。用于对检测化合物进行显色的合适的酶底物的实例包括: 对于碱性磷酸酶为硝基苯酚磷酸盐, 或者对于辣根过氧化物酶为四甲基联苯胺硫酸盐 (TMBS)。以吸光度单位 (AU, TNBS 在 450 nm 读取, 对硝基酚在 405 nm 读取) 读出的显色的程度代表测试样品中存在的前胃泌素的量, 通过将测试样品的吸光度与使用已知浓度的 SRS 产生的标准曲线或者与使用真正的前胃泌素产生的标准曲线进行对照而确定真实的浓度。

7. 读数: 获得充分的测定信号后, 使用微孔板阅读器/分光光度计来测定信号。

8. 数据处理: 使用通过已知的 SRS (前胃泌素) 形式的标准溶液获得的测定信号构建校准曲线 (信号相对于浓度)。使用校准曲线推算测试样品中的胃泌素激素形式的浓度。

实施例 9: 设计用于测定前胃泌素 1-80 的免疫酶学测定法

表 4 给出了对前胃泌素 1-80 的测定结果。实施例 8 介绍了进行该测定的一般方法。在本测试中, 使用对前胃泌素的 N 末端具有特异性的亲和纯化的 MAb 490-1 包被孔。使用的检测缀合物为 MAb 495-1-HRP 缀合物。结果显示, 检测到浓度低达 100 pM 的 SRS 1; 而与之密切相关的

SRS 2 则只能在 100 nM 检测到。因此，本测定对于前胃泌素 1-80 的工作范围可以是 100 nM 以下和 10 pM 以上。没有检测到阴性对照肽胃泌素 17。这一实施例证实，前胃泌素 MAb 可用于测定前胃泌素 1-80。这一实施例还证实 SRS 1 可用作标准品分子，用于测定前胃泌素 1-80 的 ELISA 方法中。

表 4: 测定前胃泌素 1-80

肽浓度	吸光度值(已经减去背景)		
	SRS 1	SRS 2	胃泌素 17
10 μ M	NT	0.942	NT
1 μ M	NT	0.955	NT
100 nM	0.951	0.109	0.001
10 nM	1.079	0	0.001
1 nM	0.923	0	0.002
100 pM	0.094	0.002	0
10 pM	0.005	0.002	0
1 pM	0	NT	0.001
100 fM	0	NT	0.015

实施例 10: 设计用于测定前胃泌素 6-80 的免疫酶学测定法

表 5 给出了对前胃泌素 6-80 的测定结果。实施例 8 介绍了进行该测定的一般方法。在本测试中，使用对前胃泌素的 N 端区域 (6-14 位氨基酸) 具有特异性的亲和纯化的 MAb 491-1 包被孔。使用的检测缀合物为 MAb 495-1-HRP 缀合物。结果显示，检测到浓度低至 100 pM 的 SRS 2 (由于这一浓度的吸光度在基线之上，因此该测定应该能够检测低于 100 pM 的浓度)；而与之密切相关的 SRS 1 则只能在 100 μ M 检测到。因此，本测定对于前胃泌素 6-80 的工作范围可以是 100 μ M 以下和 10 pM 以上。没有检测到阴性对照肽胃泌素 17。这一实施例证实，前胃泌素 MAb 可用于测定前胃泌素 6-80。这一实施例还证实 SRS 2 可用作标准品分子，用于测定前胃泌素 6-80 的 ELISA 方法中。

表 5: 测定前胃泌素 6-80

肽浓度	吸光度值 (已经减去背景)		
	SRS 1	SRS 2	胃泌素 17
100 μ M	0.191	3.407	0.002
10 μ M	0.015	2.324	0.002
1 μ M	0.010	2.721	0.002
100 nM	0.010	1.856	0.002
10 nM	0.008	1.431	0.001
1 nM	0.009	0.462	0.013
100 pM	0.004	0.053	0
10 pM	0	NT	0.001
1 pM	0	NT	0.015

NT: 未测定

实施例 11: 选择用于特定用途的最佳 MAb

尽管不同的 MAb 对特定表位均具有特异性,但在具体的用途中,针对特定表位不同的 MAb 具有不同的表现。因此,必须就它们在各种环境中的活性对 MAb 进行比较,以便选择具有最佳表现的 MAb 用于具体的用途。本实施例证实,在对前胃泌素进行免疫酶学测定的方法中,特异于前胃泌素的 C 末端的 MAb 作为前胃泌素检测抗体的能力有怎样的不同,并提供最佳的配制品。

用于定量测定前胃泌素 (见实施例 8) 的检测抗体试剂是连接于 HRP 的针对前胃泌素的 C 末端表位的 MAb。自前述融合体 495 克隆了四种对前胃泌素的 C 末端表位具有特异性的 MAb。它们是 MAb 495-1、495-2、495-3、和 495-4。为了制备这些 MAb 的 HRP 缀合物,本发明人采用了本领域普通技术人员熟悉的方法,在关键步骤上利用了本发明人的独特成分以及商品化的试剂盒。因此,MAb 495-1 至-4 的每一种都是作为小鼠腹水 MAb 而分开制备的 (见 Mishell and Shiigi, chapter 17)。通过针对靶抗原 hProGastrin(72-80)-PPC-BSA 的直接结合 ELISA (如上所述) 确认了腹水中存在的 MAb。

按照 Pierce Sulfolink 试剂盒提供的说明,通过柱层析法在连接于

Sulfolink 胶 (Pierce) 的 hProGastrin(72-80)-PPC 上自腹水中亲和纯化出 MAb，并以甘氨酸缓冲液洗脱。使用 Amicon 过滤装置通过渗滤 (diafiltration) 进一步纯化 MAb，并通过 A280 测定值确定最终的蛋白质浓度。使用 Pierce EZ-Link™ Plus 试剂盒，将四种纯化 MAb 制备物的每一种缀合于 HRP。纯化后，通过针对 hProGastrin(72-80)-PPC-BSA 靶抗原的直接结合 ELISA 来核实每一 MAb-HRP 缀合物的 HRP 和抗原结合活性。将四种缀合物的终浓度调至 0.63 至 0.68 mg/mL。

为了比较四种 MAb-HRP 缀合物在前胃泌素免疫酶学测定中的表现，使用 SRS 1 按实施例 9 所述以及使用 SRS 2 按实施例 10 进行测定。将每一种 495 MAb-HRP 缀合物作为所捕获的 SRS 1 和 2 的检测试剂，在各个单独测定法中对其分开进行测试。所用的 MAb-HRP 缀合物是储存液 1:2000 稀释液。在检测 SRS 2 (前胃泌素 6-80) 的测定中，板包被了 MAb 491-1 且因此捕获的是 SRS 2，因此检测捕获的 SRS 2 的最佳缀合物是 495-1-HRP。对此可参见表 6，其中 458-1-HRP 检测到浓度为 100 pM 的 SRS 2。其他三种缀合物效果稍差，检测到的 SRS 2 为 1 nM。因此，在本实施例的条件下，495-1-HRP 缀合物可在使用 SRS 2 的前胃泌素 6-80 免疫酶学测定中用作检测试剂。

表 6: 比较在前胃泌素 6-80 免疫酶学测定中用作检测试剂的各种 MAb 495-HRP 缀合物

SRS 2 肽浓度	吸光度值 (已经减去背景)			
	495-1-HRP	495-2-HRP	495-3-HRP	495-4-HRP
100 μ M	3.407	0.788	3.220	0.809
10 μ M	2.324	0.855	1.437	0.671
1 μ M	2.721	0.977	1.117	0.582
100 nM	1.856	0.814	0.857	0.571
10 nM	1.431	0.359	0.470	0.254
1 nM	0.462	0.012	0.096	0.029
100 pM	0.053	0	0.007	0.003

在前胃泌素 1-80 的 SRS 1 测定中测试四种 495-HRP MAb 缀合物时得到了类似的结果，说明 495-1-HRP 缀合物在这些测定法中具有优势。

杂交瘤细胞系的保藏

以下杂交瘤于 2004 年 9 月 1 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA):

1. 产生 MAb 490-1 的杂交瘤 490-1，保藏号为 PTA-6189;
2. 产生 MAb 491-1 的杂交瘤 491-1，保藏号为 PTA-6190;
3. 产生 MAb 495-1 的杂交瘤 495-1，保藏号为 PTA-6191。

参考文献

通过引用将本文中所提到的美国专利说明书和各文献的全部内容并入本文。

Organization Applicant

```

-----
Street : 1628 JFK Boulevard
City : Philadelphia
State :
Country : Philadelphia, USA
PostalCode : PA 19103
PhoneNumber :
FaxNumber :
EmailAddress :
<110> OrganizationName : Aphton Corporation

```

Application Project

```

-----
<120> Title : Monoclonal antibodies to progastrin
<130> AppFileReference : Aphton 0083
<140> CurrentAppNumber :
<141> CurrentFilingDate : ____-__-__

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : human
<400> PreSequenceString :
MQRLCVYVLI FALALAAFSE ASWKPRSQQP DAPLGTGANR DLELPWLEQQ GPASHHRRQL      60
GPQGPPHLVA DPSKKQGPWL EEEEEAYGWM DFGRRSAEDE N                          101
<212> Type : PRT
<211> Length : 101
SequenceName : Human preprogastrin (SEQ ID No 1)
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
EGPWLEEEEE AYGWMDF      17
<212> Type : PRT
<211> Length : 17
SequenceName : Human mature gastrin G17 (SEQ ID No 2)
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
EGPWLEEEEE AYGWMDFG      18
<212> Type : PRT
<211> Length : 18
SequenceName : Human G17-gly (SEQ ID No 3)
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
ELGPQGPPHL VADPSKKEGP WLEEEEEAYG WMDF      34
<212> Type : PRT
<211> Length : 34
SequenceName : Human gastrin G-34 (SEQ ID No 4)
SequenceDescription :

```

Sequence

<213> OrganismName : Human
 <400> PreSequenceString :
 ELGPGQPPHL VADPSKKEGP WLEEEEEAYG WMDFG 35
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 35
 SequenceName : Human gastrin G34-gly (SEQ ID No 5)
 SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Human
 <400> PreSequenceString :
 SWKPRSQQP 9
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 9
 SequenceName : progastrin (SEQ ID NO 6)
 SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Human
 <400> PreSequenceString :
 SQQPDAPLG 9
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 9
 SequenceName : progastrin (SEQ ID NO. 7)
 SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Human
 <400> PreSequenceString :
 GRRSAEDEN 9
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 9
 SequenceName : progastrin (SEQ ID NO 8)
 SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Completely Artificial
 <400> PreSequenceString :
 PPGGPP 6
 <212> Type : PRT
 <211> Length : 6
 SequenceName : linker peptide (SEQ ID NO 9)
 SequenceDescription :

Feature

Sequence: linker peptide (SEQ ID No 9):
 <221> FeatureKey : PEPTIDE
 <222> LocationFrom : 1
 <222> LocationTo : 6
 Other Information :
 CDSJoin : No

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SWKPRSQQPG RRSAEDEN
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 18
SequenceName : progastirin (SEQ ID NO 10)
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SQQPDAPLGG RRSAEDEN
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 18
SequenceName : progastirin (SEQ ID No 11)
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SWKPRSQQPG GRRSAEDEN
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 20
SequenceName : progastirin (SEQ ID No 12)
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SWKPRSQQPP GRRSAEDEN
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 19
SequenceName : progastirin (SEQ ID No 13)
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SWKPRSQQPP GGPPGRRSAE DEN
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 23
SequenceName : progastirin (SEQ ID NO 14)
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SQQPDAPLGP PGGPPGRRSA EDEN
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 24
SequenceName : progastirin (SEQ ID NO 15)
SequenceDescription :

```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SWKPRSQQPP C
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 11
SequenceName : progastarin (SEQ ID NO 16)
SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SWKPRSQQP
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 9
SequenceName : progastarin (SEQ ID NO 17)
SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SQQPDAPLGP PC
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 12
SequenceName : progastarin (SEQ ID NO 18)
SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
SQQPDAPLG
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 9
SequenceName : progastarin (SEQ ID No 19)
SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
CPPGRRSAED EN
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 12
SequenceName : progastarin (SEQ ID No 20)
SequenceDescription :

Sequence
-----
<213> OrganismName : Human
<400> PreSequenceString :
GRRSAEDEN
-----
<212> Type : PRT
<211> Length : 9
SequenceName : progastarin (SEQ ID No 21)
SequenceDescription :

```

专利名称(译)	抗前胃泌素单克隆抗体		
公开(公告)号	CN101048659A	公开(公告)日	2007-10-03
申请号	CN200580036710.9	申请日	2005-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	受体生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	受体生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	受体生物技术公司		
[标]发明人	斯蒂芬格兰姆斯		
发明人	斯蒂芬·格兰姆斯		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 C07K16/26		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2333/595 C07K2317/34 C07K16/26 G01N2800/06 G01N33/6893 A61K2039/505 A61P1/02 A61P1/04 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/00 A61P43/00		
代理人(译)	林晓红		
优先权	60/612224 2004-09-22 US		
其他公开文献	CN101048659B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供特异于前胃泌素的前胃泌素结合分子，其不结合胃泌素 - 17 (G17)、胃泌素 - 34(G34)、甘氨酸延伸型胃泌素 - 17(G17 - Gly)、或甘氨酸延伸型胃泌素 - 34(G34 - Gly)。本发明还提供对胃泌素前体分子(前胃泌素)的N端和C端序列具有特异性的单克隆抗体(MAb)以及产生这些MAb的杂交瘤。还提供MAb组，其用于在免疫检测和定量测定法中对前胃泌素和胃泌素激素类型进行检测和定量。这些测定法可用于诊断和监测胃泌素促发的疾病或病症或用于监测治疗过程中的进展。本发明还提供固相测定法，包括免疫组织化学(IHC)和免疫荧光(IF)法，其适于检测和显示固体样品如活检样品或组织切片中的胃泌素类型。前胃泌素结合分子在治疗上可用于在前胃泌素促发的疾病或病症中针对前胃泌素进行被动免疫。还提供代用参照标准品(SRS)分子，其是约10个至约35个氨基酸的肽链，所述SRS分子包含至少两个存在于超过约50个氨基酸的目的蛋白中的表位。此类SRS分子可用作标准品以替代真正的目的蛋白。

表 1: 如表所示制备从 1: 1000 开始的系列稀释液

96孔板	血清	滴度 ¹
行#	稀释度	(= 1/稀释度)
A	1:1,000 = 10 ⁻³	10 ³
B	1:3,162 = 3.16 x 10 ⁻⁴ = 10 ^{-3.5}	3.16 x 10 ³
C	1:10,000 = 10 ⁻⁴	10 ⁴
D	1:31,623 = 3.16 x 10 ⁻⁵ = 10 ^{-4.5}	3.16 x 10 ⁴
E	1:100,000 = 10 ⁻⁵	10 ⁵
F	1:316,230 = 3.16 x 10 ⁻⁶ = 10 ^{-5.5}	3.16 x 10 ⁵
G	1:1,000,000 = 10 ⁻⁶	10 ⁶
H	1:3,163,300 = 3.16 x 10 ⁻⁷ = 10 ^{-6.5}	3.16 x 10 ⁶