

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 760**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2015 PCT/CN2015/072682**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16127320**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2015 E 15881482 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3258266**

54 Título: **Kit de reactivos utilizado para detectar gastrina-17 y método de preparación y aplicación para el kit de reactivos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2021

73 Titular/es:

**SHENZHEN NEW INDUSTRIES BIOMEDICAL
ENGINEERING CO. LTD. (100.0%)
No. 16 Jinhui Road Jinsha Community Pingshan
New District
Shenzhen, Guangdong 518122, CN**

72 Inventor/es:

**RAO, WEI;
SUN, PU;
LI, YUNXUAN;
LIU, WANG;
YANG, YALI;
YUAN, JINYUN y
LI, TINGHUA**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 810 760 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

Kit de reactivos utilizado para detectar gastrina-17 y método de preparación y aplicación para el kit de reactivos

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere al campo técnico de la detección de sustancias biológicas y más particularmente, a un kit para detectar gastrina-17 y un método de preparación de la misma y a un método para detectar gastrina-17 utilizando el kit. El alcance de protección se define por las reivindicaciones adjuntas, si bien todas las realizaciones mencionadas en esta memoria descriptiva abarcan que el marcador de seguimiento directamente marca el primer o segundo anticuerpo antigastrina-17 y en donde el primer o segundo anticuerpo antigastrina-17 se aplica como recubrimiento directamente sobre la esfera magnética.

15 **Antecedentes**

La gastrina es una hormona gastrointestinal importante, secretada por las células G (células que contienen gastrina) presentes sobre la mucosa pilórica gástrica en la sangre y que actúa sobre el estómago para promover la secreción gástrica. Las células G se distribuyen principalmente en el antro gástrico, se metabolizan en el riñón y se incrementan en el suero en el curso de la disfunción renal. La gastrina se secreta cuando el antro pilórico gástrico recibe estímulos mecánicos tales como comida y el pH pilórico se vuelve alcalino. Como resultado, la secreción de jugo gástrico, particularmente el ácido clorhídrico, se vuelve vigorosa. Cuando desciende el pH en el estómago, se detiene la secreción de ácido clorhídrico y de gastrina. Además, la gastrina también actúa promoviendo la secreción de pepsina, jugo pancreático, bilis, insulina y similares, aunque tales efectos no son fuertes.

Como con la traducción y maduración de progastrina en las células, las células G en el antro comienzan a liberar en la circulación sustancias mezcladas de diversos tipos de gastrina y otros precursores producidos bajo la estimulación ácida. Esta mezcla consiste en gastrina-71, -52, -34, -17, -14 y -6, de las cuales las formas principales en suero/plasma son gastrina-34 y gastrina-17. La gastrina-17 (G-17) es la forma eficaz predominante de gastrina en la mucosa del antro sana y se produce casi enteramente por células G. La gastrina-17 es un polipéptido que consiste en 17 restos de aminoácido de dos formas: restos de tirosina sustituidos por sulfato y restos de tirosina no sustituidos por sulfato (gastrina I y II), aunque estas dos formas no se diferencian en la actividad fisiológica. Solo se encontró actividad de gastrina en el tetrapéptido (Tyr-Met-Asp-Phe-NH₂) correspondiente con la porción del extremo C terminal, llamado tetrapéptido gastrina. Los estudios sobre la estructura primaria de la gastrina en diversos mamíferos han mostrado que toda la gastrina-17 está compuesta de 17 aminoácidos y que varía según el animal solo en aminoácidos en las posiciones 5 y 10 del extremo N terminal. Además, una de las características más importantes de la gastrina-17 es que todas las tirosinas en la posición 12 se unen a -SO₃H.

Los pacientes que sufren de gastritis atrófica secundaria de infección por helicobacter pylori generalmente tienen un nivel muy bajo de gastrina-17, correspondiente con un riesgo de cáncer gástrico y enfermedad de úlcera péptica incrementado de 18 a 25 veces respecto a una persona promedio. La gastrina-17 juega un papel fundamental o importante en la patogénesis de la úlcera gastroduodenal. Para estos pacientes, en el estado básico, la gastrina de suero es relativamente elevada con un nivel promedio de aproximadamente 160pg/ml y solapamiento potencial con el intervalo normal, pero se puede incrementar considerablemente durante la alimentación y otras situaciones que estimulan la secreción de gastrina. La gastrina elevada es una de las patogénesis importantes de la úlcera gástrica. Además, normalmente los niveles elevados de gastrina-17 se pueden observar como señales de deficiencia de ácido gástrico. Las pruebas de gastrina-17 se pueden utilizar también como un indicador de seguimiento postoperatorio para un paciente, mientras que el nivel de secreción de gastrina-17 es básicamente cercano a 0 tras una resección antral gástrica exitosa. En la sangre de pacientes con gastrinoma, es decir, síndrome de Zollinger-Ellison, la concentración de gastrina-17 es relativamente elevada. El gastrinoma es el tumor endocrino más común del páncreas, que es un resultado de la proliferación de células D que secretan gastrina en el islote pancreático. Las células D secretan una gran cantidad de gastrina, de modo que las células parietales aumentan drásticamente. Los siguientes lugares para que se produzca un gastrinoma son el estómago y el duodeno. El síndrome de Zollinger-Ellison muestra la siguiente trilogía: hipergastrinemia, hasta 1000pg/ml; excreción elevada de ácido gástrico, con ácido gástrico basal > 15 mmol/h, hasta 6 veces lo normal; y ataques repetidos de úlcera en el estómago y úlceras duodenales, mayormente refractarias con diarrea crónica.

En la actualidad, la detección de gastrina-17 se utiliza ampliamente en la clínica y el método de detección principal en el mercado es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay). El documento CN 101063684A desvela un kit que comprende 2 anticuerpos distintos de antigastrina-17, si bien uno se acopla a una nanopartícula y el segundo está marcado de forma detectable.

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es un método cualitativo y cuantitativo, que une un antígeno o anticuerpo soluble a un vehículo de fase sólida, tal como el poliestireno, para inmunorreacción debido a la especificidad de unión antígeno-anticuerpo. El principal mecanismo de detección es el método de sándwich

inmunitario: uno de los anticuerpos de captura específicos de gastrina-17 se adsorbe sobre una placa recubierta, mientras que otro anticuerpo de prueba se marca con peroxidasa de rábano rústico (HRP; del inglés, horseradish peroxidase). El anticuerpo monoclonal ligado a HRP y la gastrina-17 se unen al vehículo en fase sólida, se incuban, se lavan, se les añade un sustrato que sufre una reacción coloreada catalizada por la HRP y finalmente se determinan por la absorbancia mediante un lector de microplacas para calcular la concentración de gastrina-17 en la muestra.

Para completar la prueba el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas requiere un tiempo de detección largo, de al menos 6 horas o incluso una reacción durante la noche. Al mismo tiempo, habitualmente recae en la pura operación manual para la carga de muestras y similares, lo cual es de baja eficacia y tiende a incrementar la desviación en los resultados experimentales. La reacción enzimática puede no ser suficientemente exhaustiva, mientras que es susceptible de alteraciones externas, tales como la temperatura, tiempo y concentraciones de material, presenta baja especificidad y poca sensibilidad para la detección. Además, el vehículo de fase sólida del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas es sólido y se aplica como recubrimiento uniformemente sobre los pocillos de la placa de ELISA. Se requiere la dilución previa de la muestra de sujeto antes de la prueba, lo que incrementa la dificultad del experimento y reduce adicionalmente la sensibilidad y la precisión del reactivo.

Además, existen en el mercado métodos para detectar gastrina de fragmentos completos, principalmente, radioinmunoensayo (RIA; del inglés, radioimmunoassay) e inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA; del inglés, chemiluminescence immunoassay). Aunque la detección de gastrina de fragmentos completos puede evitar la detección perdida durante la detección clínica del contenido de gastrina, la gastrina es demasiado compleja en su composición como para utilizar cada uno de los componentes en la prueba y el diagnóstico clínicos de enfermedades, en tanto que los anticuerpos policlonales utilizados en la detección de gastrina de fragmentos completos pueden reducir seriamente la especificidad y sensibilidad de los reactivos, provocando resultados de pruebas imprecisos.

25 Sumario

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un kit para detectar gastrina-17 y un método para preparar el mismo. Utilizando la unión específica de la gastrina-17 con un anticuerpo antigastrina-17 junto con las propiedades luminiscentes de un marcador de seguimiento y del magnetismo de esferas magnéticas, el kit puede determinar de forma precisa el contenido de gastrina-17 de una muestra.

Es un objeto también de la presente invención proporcionar un método para detectar gastrina-17, que utiliza el kit proporcionado en el presente documento para determinar de forma precisa el contenido de gastrina-17 en una muestra de acuerdo con el mecanismo de sándwich de anticuerpos doble o con el mecanismo de competición. En particular, el uso del kit en la detección por quimioluminiscencia automática de gastrina-17 puede acortar el tiempo de operación y reducir los errores operacionales manuales.

De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un kit para detectar gastrina-17 que comprende un componente A y un componente B, en donde el componente A es un primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento o aplicado como recubrimiento sobre una esfera magnética, el componente B es un segundo anticuerpo antigastrina-17 o gastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento o aplicado como recubrimiento sobre una esfera magnética; en donde cualquiera de los componentes A y B se marca con un marcador de seguimiento y el otro se aplica como recubrimiento sobre una esfera magnética; y en donde el primer anticuerpo antigastrina-17 y el segundo anticuerpo antigastrina-17 tienen sitios de unión diferentes para unirse con la gastrina-17.

En la presente divulgación, la diferencia entre el primer anticuerpo antigastrina-17 y el segundo anticuerpo antigastrina-17 reside en sus sitios de unión sobre la gastrina-17. En el kit de la presente divulgación, por ejemplo, si el primer anticuerpo antigastrina-17 se aplica como recubrimiento sobre una esfera magnética para unirse a gastrina-17 en una muestra de sujeto, entonces el segundo anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento se utiliza para unirse con otra región sobre la gastrina-17 que es diferente de la región de unión del primer anticuerpo antigastrina-17 sobre la gastrina-17.

Debe apreciarse que en el kit proporcionado en el presente documento, el primer anticuerpo antigastrina-17 puede ser uno o más anticuerpos antigastrina-17 y el segundo anticuerpo antigastrina-17 puede ser uno o más anticuerpos antigastrina-17, siempre que dichos uno o más anticuerpos antigastrina-17 que constituyen los primeros anticuerpos antigastrina-17 y dichos uno o más anticuerpos antigastrina-17 que constituyen los segundos anticuerpos antigastrina-17 sean capaces de unirse a diferentes regiones de unión sobre la gastrina-17, respectivamente.

De acuerdo con la presente divulgación, el primer anticuerpo antigastrina-17 y el segundo anticuerpo antigastrina-17 pueden ser un anticuerpo monoclonal antigastrina-17 y/o un anticuerpo policlonal antigastrina-17.

En el cuerpo humano, más del 95 % de la gastrina biológicamente activa es gastrina d-amidada, de la cual el 80 % - 90 % es gastrina-17. La detección simple de gastrina-17 con el uso de anticuerpos monoclonales altamente

específicos puede proporcionar una especificidad y sensibilidad mejores con un método de detección simple. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un kit para medir el contenido de gastrina-17 *in vivo* y se puede medir el contenido de gastrina-17 mediante un kit para reflejar la aparición de diferentes afecciones clínicamente.

5 De acuerdo con la presente divulgación, el marcador de seguimiento se puede seleccionar de marcadores de seguimiento utilizados comúnmente en la técnica para marcar antígenos o anticuerpos, tales como adamantano, luminol y sus derivados, isoluminol y sus derivados, ésteres de acridinio, fosfatasa alcalina (ALP; del inglés, alkaline phosphatase) o peroxidasa de rábano rusticano (HRP) y se prefiere particularmente el N-(4-aminobutil)-N-etilisolueno (ABEI).

10 Las esferas magnéticas adecuadas para su uso en la presente divulgación se conocen también como perlas magnéticas y pueden ser microesferas magnéticas utilizadas comúnmente en la técnica. Es preferible que las esferas magnéticas utilizadas en la presente divulgación sean microesferas de fase sólida a microescala con superparamagnetismo y una capacidad extremadamente grande de adsorción de proteínas formadas mediante
15 combinación de partículas magnéticas de Fe₂O₃ o Fe₃O₄ a nanoescala y un material polimérico orgánico. Tales esferas magnéticas se pueden magnetizar rápidamente en un campo magnético aplicado mientras tienen una remanencia de cero después de eliminación del campo magnético. No existe una limitación particular en los tipos de material polimérico orgánico, que pueden seleccionarse según sea necesario.

20 Las microesferas magnéticas utilizadas en la presente divulgación deben tener un diámetro de 0,1 a 5 micras y las microesferas magnéticas se pueden modificar en superficie para llevar diversos grupos funcionales, incluyendo, pero no limitados a, -OH, -COOH, -NH₂.

25 En una realización específica, la esfera magnética es un complejo de partículas magnéticas de Fe₂O₃ o Fe₃O₄ y un material polimérico orgánico y tiene un tamaño de partícula de 0,1 a 5 micras; y las esferas magnéticas se modifican opcionalmente mediante modificación en superficie para llevar uno o más grupos funcionales activos.

30 De acuerdo con la presente divulgación, las concentraciones del primer anticuerpo antigastrina-17 son de 10 a 200 µg/ml y del segundo anticuerpo antigastrina-17 o gastrina-17 en el kit son de 10 a 200 µg/ml, respectivamente, la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml y la concentración de las esferas magnéticas es de 0,1 a 5 mg/ml. La concentración para cada componente anterior se basa en la cantidad de cada componente independiente que contiene tal componente.

35 De acuerdo con la presente divulgación, el kit contiene adicionalmente un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 y opcionalmente un tampón. El calibrador de punto bajo y el calibrador de punto alto en el presente documento se refieren el uno en relación al otro, en donde el "calibrador de punto bajo" se refiere a un calibrador hecho mediante la dilución de gastrina-17 hasta una concentración de 10 a 30 ng/ml utilizando un producto de suero bovino al 50 % y el "calibrador de punto alto" se refiere a un calibrador hecho diluyendo gastrina-17 hasta una concentración de 500 a 700 ng/ml utilizando un producto de suero bovino al 50 %. El calibrador de punto bajo y
40 el calibrador de punto alto contienen cada uno opcionalmente albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, bovine serum albumin) y/o conservante. La concentración de BSA preferentemente es de 0,01 a 0,5 g/ml.

45 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el componente B es el segundo anticuerpo antigastrina-17 aplicado como recubrimiento sobre una esfera magnética o marcado con un marcador de seguimiento.

50 En estas realizaciones, el marcador de seguimiento marca directa o indirectamente el primer anticuerpo antigastrina-17 o el segundo anticuerpo antigastrina-17. El marcaje indirecto comprende, pero no se limita a, marcaje indirecto mediante un isotiocianato de fluoresceína (FITC; del inglés, fluorescein isothiocyanate) y un sistema de anticuerpos anti-FITC o un sistema de estreptavidina (SA; del inglés, streptavidin) y biotina. El marcaje directo significa que el ABEI se une directamente al primer anticuerpo antigastrina-17 o al segundo anticuerpo antigastrina-17; el marcaje indirecto significa que el ABEI se une indirectamente al primer anticuerpo antigastrina-17 o al segundo anticuerpo antigastrina-17 a través de un sistema de unión de medios intermedios, que comprende, pero no limitados a, un FITC y un sistema de anticuerpos anti-FITC o un sistema de estreptavidina y biotina. El anticuerpo anti-FITC es preferentemente un anticuerpo policlonal anti-FITC de cabra.

55 En estas realizaciones, el primer anticuerpo antigastrina-17 o el segundo anticuerpo antigastrina-17 se aplica como recubrimiento directa o indirectamente sobre las esferas magnéticas. Las formas de recubrimiento indirectas de la esfera magnética incluyen, pero no se limitan a, recubrimiento indirecto mediante un FITC y un sistema de anticuerpos anti-FITC o un sistema de estreptavidina y biotina. El recubrimiento directo se refiere a recubrir esferas magnéticas directamente utilizando el primer anticuerpo antigastrina-17 el segundo anticuerpo antigastrina-17; y el recubrimiento
60 indirecto se refiere a recubrir las esferas magnéticas utilizando el primer anticuerpo antigastrina-17 o el segundo anticuerpo antigastrina-17 a través de un sistema de unión de medios intermedios que incluye, pero no limitados a, un FITC y un sistema de anticuerpos anti-FITC o un sistema de estreptavidina y biotina.

- En una realización específica, el kit de detección de gastrina-17 comprende los siguientes componentes: 1) una solución de un primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento, en donde la concentración del primer anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml; 2) una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con un segundo anticuerpo antigastrina-17, en donde la concentración del segundo anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml; (3) un calibrador de punto bajo que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 2 a 50 ng/ml; y 4) un calibrador de punto alto que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 200 a 1000ng/ml.
- En una realización específica, el kit de detección de gastrina-17 comprende los siguientes componentes: 1) una solución de un primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento, en donde la concentración del primer anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml; 2) una solución de un primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con FITC, en donde la concentración del segundo anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de FITC es de 0,1 a 1 mg/ml; (3) una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo anti-FITC de cabra, en donde la concentración del anticuerpo anti-FITC de cabra es de 0,1 a 1/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml; (4) un calibrador de punto bajo que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 2 a 50 ng/ml; y (5) un calibrador de punto alto que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 200 a 1000ng/ml.
- En una realización específica, el kit de detección de gastrina-17 comprende los siguientes componentes: (1) una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina, en donde la concentración de estreptavidina es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml; (2) una solución de un primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento, en donde la concentración del primer anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml; (3) una solución biotilada de un segundo anticuerpo antigastrina-17, en donde la concentración del segundo anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de biotina es de 0,1 a 1 mg/ml; (4) un calibrador de punto bajo que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 2 a 50 ng/ml; y (5) un calibrador de punto alto que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 200 a 1000ng/ml.
- En una realización específica, el kit de detección de gastrina-17 comprende los siguientes componentes: (1) una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con un segundo anticuerpo antigastrina-17, la concentración del segundo anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml; (2) una solución biotilada de un primer anticuerpo antigastrina-17, en donde la concentración del primer anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de biotina es de 0,1 a 1 mg/ml;; (3) una solución de estreptavidina marcada con un marcador de seguimiento, en donde la concentración de estreptavidina es de 10 a 200 µg/ml y la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml; (4) un calibrador de punto bajo que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 2 a 50 ng/ml; y (5) un calibrador de punto alto que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 200 a 1000ng/ml.
- En cada una de las realizaciones específicas anteriores, cada uno de los componentes del kit contienen preferentemente BSA y un conservante; la concentración de BSA preferentemente es de 0,01 a 0,5 g/ml; el conservante es uno cualquiera o una mezcla de dos cualesquiera o más seleccionados del grupo que consiste en sorbato potásico, benzoato de sodio, azida de sodio, nitrato sódico y la serie Proclin (uno de los conservantes más usados habitualmente para inmunodiagnóstico, siendo los ingredientes activos principales el 2-metil-4-isotiazolin-3-ona y el 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona). El anticuerpo gastrina-17 puede ser monoclonal o policlonal y el marcador de seguimiento puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ésteres de acridinio, isoluminol y sus derivados, luminol y sus derivados, ALP o HRP.
- En algunas otras realizaciones, el componente B es gastrina-17 aplicada como recubrimiento sobre una esfera magnética o está marcada con un marcador de seguimiento.
- En estas realizaciones, el marcador de seguimiento marca directa o indirectamente el primer anticuerpo antigastrina-17 o gastrina-17. El marcaje indirecto incluye, pero no se limita a, marcaje indirecto con un isotiocianato de fluoresceína (FITC) y un sistema de anticuerpos anti-FITC o un sistema de estreptavidina y biotina. El marcaje directo significa que el ABEI se une directamente al primer anticuerpo antigastrina-17 o gastrina-17, mientras que el marcaje indirecto significa que el ABEI marca el primer anticuerpo antigastrina-17 o gastrina 17 a través de un sistema de unión de medios intermedios, lo que incluye, pero no se limita a, un FITC y un sistema de anticuerpos anti-FITC o un sistema de estreptavidina y biotina.
- En estas realizaciones, el primer anticuerpo antigastrina-17 o gastrina-17 se aplica como recubrimiento directa o indirectamente sobre una esfera magnética. Las formas de recubrimiento indirecto de las esferas magnéticas comprenden, pero no se limitan a, recubrimiento indirecto a través de un FITC y un sistema de anticuerpos anti-FITC o un sistema de estreptavidina y biotina. El recubrimiento directo se refiere al recubrimiento directo de esferas magnéticas utilizando el primer anticuerpo antigastrina-17 o gastrina-17, mientras que el recubrimiento indirecto se

refiere al uso de un sistema de unión de medios intermedios para aplicar como recubrimiento el primer anticuerpo antigastrina-17 o gastrina-17 sobre las esferas magnéticas, el sistema de unión de medios intermedios incluye, pero no se limita a, un FITC y un sistema de anticuerpos anti-FITC o un sistema de estreptavidina y biotina.

- 5 En algunas realizaciones, el componente A es dicho (uno o más) primer(os) anticuerpo(s) antigastrina-17 marcado(s) con un marcador de seguimiento y el componente B es gastrina-17 aplicado como recubrimiento sobre esferas magnéticas.

- 10 En una realización específica, el kit de detección de gastrina-17 comprende los siguientes componentes: 1) una solución de un anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento, en donde la concentración del primer anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml; (2) una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con un antígeno gastrina-17, en donde la concentración del antígeno gastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml; (3) un calibrador de punto bajo que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 2 a 50 ng/ml; y 4) un calibrador de punto alto que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 200 a 1000ng/ml.

- 20 En una realización específica, el kit de detección de gastrina-17 comprende los siguientes componentes: 1) una solución de un anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento, en donde la concentración del anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml; (2) una solución de antígeno gastrina-17 marcado con FITC, en donde la concentración del antígeno gastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de FITC es de 0,1 a 1 mg/ml; (3) una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo anti-FITC de cabra, en donde la concentración del anticuerpo anti-FITC de cabra es de 0,1 a 1/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml; (4) un calibrador de punto bajo que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 2 a 50 ng/ml; y (5) un calibrador de punto alto que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 200 a 1000ng/ml.

- 30 En una realización específica, el kit de detección de gastrina-17 comprende los siguientes componentes: (1) una solución de un anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento, en donde la concentración del anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml; (2) una solución de antígeno gastrina-17 marcado con biotina, en donde la concentración del antígeno gastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de biotina es de 0,1 a 1 mg/ml; (3) una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina, en donde la concentración de estreptavidina es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml; (4) un calibrador de punto bajo que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 2 a 50 ng/ml; y (5) un calibrador de punto alto que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 200 a 1000ng/ml.

- 40 En una realización específica, el kit de detección de gastrina-17 comprende los siguientes componentes: (1) una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo antigastrina-17, la concentración del segundo anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml; (2) una solución de un antígeno gastrina-17 marcado con biotina, en donde la concentración del primer anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 µg/ml y la concentración de biotina es de 0,1 a 1 mg/ml;; (3) una solución de estreptavidina marcada con un marcador de seguimiento, en donde la concentración de estreptavidina es de 10 a 200 µg/ml y la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml; (4) un calibrador de punto bajo que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 2 a 50 ng/ml; y (5) un calibrador de punto alto que contiene gastrina-17 con una concentración de gastrina-17 de 200 a 1000ng/ml.

- 50 En cada una de las realizaciones específicas anteriores, cada uno de los componentes del kit contienen preferentemente BSA y un conservante; la concentración de BSA preferentemente es de 0,01 a 0,5 g/ml; el conservante es uno cualquiera o una mezcla de dos cualesquiera o más seleccionados del grupo que consiste en sorbato potásico, benzoato de sodio, azida de sodio, nitrito sódico y la serie Proclin. El anticuerpo gastrina-17 puede ser monoclonal o policlonal y el marcador de seguimiento puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ésteres de acridinio, isoluminol y sus derivados, luminol y sus derivados, ALP o HRP.

- 55 La presente divulgación proporciona un método para preparar un kit con el componente B como un anticuerpo antigastrina-17 como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el método: marcar directa o indirectamente uno cualquiera de un primer anticuerpo antigastrina-17 y un segundo anticuerpo antigastrina-17 con un marcador de seguimiento y aplicar como recubrimiento directa o indirectamente el otro sobre una esfera magnética. El marcaje indirecto comprende, pero no se limita a, marcar el primer o segundo anticuerpo antigastrina-17 con el marcador de seguimiento a través de un isotiocianato de fluoresceína y un sistema de anticuerpos antiisotiocianato de fluoresceína o un sistema de estreptavidina y biotina; y el recubrimiento indirecto comprende, pero no se limita a, recubrir la esfera magnética con el primer o segundo anticuerpo antigastrina-17 a través de un isotiocianato de fluoresceína y un sistema de anticuerpos antiisotiocianato de fluoresceína o un sistema de estreptavidina y biotina.

La presente divulgación proporciona un método para preparar un kit con el componente B como una gastrina-17 como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el método: marcar directa o indirectamente uno cualquiera de un primer anticuerpo antigastrina-17 y gastrina-17 con un marcador de seguimiento y aplicar como recubrimiento directa o indirectamente el otro sobre una esfera magnética. El marcaje indirecto comprende, marcar el primer anticuerpo antigastrina-17 o gastrina-17 con el marcador de seguimiento a través de un isotiocianato de fluoresceína y un sistema de anticuerpos antiisotiocianato de fluoresceína o un sistema de estreptavidina y biotina; y el recubrimiento indirecto comprende, pero no se limita a, revestir la esfera magnética con el primer anticuerpo antigastrina-17 o gastrina-17 a través de un isotiocianato de fluoresceína y un sistema de anticuerpos antiisotiocianato de fluoresceína o un sistema de estreptavidina y biotina.

El método para preparar el kit de acuerdo con la presente divulgación puede comprender adicionalmente preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto y puede comprender adicionalmente el montaje del kit.

De acuerdo con la presente divulgación, también se proporciona un método para detectar gastrina-17, que comprende detectar la concentración de gastrina-17 en una muestra de sujeto mediante inmunoensayo de quimioluminiscencia utilizando un kit como se ha descrito anteriormente.

En particular, el método puede comprender: mezclar los componentes A y B del kit con la muestra de sujeto, incubar, separar magnéticamente y añadir un sustrato luminiscente a un precipitado resultante para detectar una intensidad de señal óptica; medir una intensidad de señal óptica del calibrador de punto bajo y el calibrador de punto alto de la gastrina-17 de la misma manera para obtener una curva estándar entre la concentración de gastrina-17 y la intensidad de señal óptica; y comparar la intensidad de señal óptica de la muestra de sujeto con la curva estándar para obtener la concentración de gastrina-17 en la muestra de sujeto.

En el caso de que el componente B del kit es un segundo anticuerpo antigastrina-17, cuando se determina la gastrina-17 utilizando el kit, los componentes A y B forman un modo de sándwich de anticuerpos doble del primer anticuerpo antigastrina-17/gastrina-17/el segundo anticuerpo antigastrina-17 con gastrina-17 en la muestra de sujeto, es decir, formando un complejo inmunitario de un anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento, para que detecte gastrina-17 y anticuerpo gastrina-17 aplicado como recubrimiento sobre las esferas magnéticas. El campo magnético externo se aplica para la precipitación, tras la cual se retira el sobrenadante y el complejo precipitado se lava con tampón de lavado y se añade excitador luminoso para la determinación de la intensidad luminosa relativa. La concentración de gastrina-17 en la muestra de sujeto se puede obtener en referencia a la curva estándar de concentración de gastrina-17 e intensidad luminosa.

En una realización específica, la determinación se realiza con un ensayo de sándwich de anticuerpos doble y el procedimiento de carga de la muestra específica es: a. añadir de 15 a 100 µl de una muestra de sujeto (muestra de suero/plasma), el calibrador de punto alto y el calibrador de punto bajo a diferentes pocillos de ensayo; b. añadir de 10 a 50 µl de la suspensión de esferas magnéticas revestidas con anticuerpo antigastrina-17; c. añadir de 40 a 200 µl de la solución de otro anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento; d. incubar por debajo de 37 °C durante 15 a 40 minutos y limpiar en un entorno magnético al menos 2 veces; e. añadir sustrato luminiscente y detectar la intensidad de señal óptica; y f. calcular la concentración de gastrina-17 en la muestra de sujeto utilizando la intensidad de señal óptica detectada en la muestra de sujeto en referencia a la curva de trabajo calibrada con el calibrador.

En el caso de que el componente B del kit es gastrina-17, cuando se determina la gastrina-17 utilizando el kit, la gastrina-17 en el componente B compite con la gastrina-17 en la muestra de sujeto para unirse al primer anticuerpo antigastrina-17 en el componente A, formando un complejo inmunitario. El campo magnético externo se aplica para la precipitación, tras la cual se retira el sobrenadante y el complejo precipitado se lava con tampón de lavado y se añade excitador luminoso para la determinación de la intensidad luminosa relativa. La concentración de gastrina-17 en la muestra de sujeto se puede obtener en referencia a la curva estándar de concentración de gastrina-17 e intensidad luminosa.

En una realización específica, la determinación se realiza con un ensayo de competición y el procedimiento de carga de la muestra específica es: a. añadir de 15 a 100 µl de una muestra de sujeto (muestra de suero/plasma), el calibrador de punto alto y el calibrador de punto bajo a diferentes pocillos de ensayo; b. añadir de 10 a 50 µl de la suspensión de esferas magnéticas revestidas con antígeno gastrina-17; c. añadir de 40 a 200 µl de la solución de anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento; d. incubar por debajo de 37 °C durante 15 a 40 minutos y limpiar en un entorno magnético al menos 2 veces; e. añadir sustrato luminiscente y detectar la intensidad de señal óptica; y f. calcular la concentración de gastrina-17 en la muestra de sujeto utilizando la intensidad de señal óptica detectada en la muestra de sujeto en referencia a la curva de trabajo calibrada con el calibrador.

En una realización, el método para detectar la concentración de gastrina-17 comprende detectar la concentración de gastrina-17 mediante un analizador de inmunoensayo de quimioluminiscencia utilizando un kit como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida de la presente divulgación, el método se realiza íntegramente

automatizado. De acuerdo con la presente divulgación, el analizador de inmunoensayo de quimioluminiscencia preferentemente es un analizador de inmunoensayo de quimioluminiscencia de la serie Maglumi (fabricado por Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd.). Cuando se usa un analizador de inmunoensayo de quimioluminiscencia, el analizador puede añadir muestras automáticamente, detectar y calcular resultados según las configuraciones, acelerar el proceso de detección y reducir los errores humanos.

El kit de detección de gastrina-17 proporcionado en el presente documento comprende gastrina-17 o anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento en diversas formas de marcaje o aplicado como recubrimiento sobre microesferas magnéticas en diversas formas de recubrimiento y es capaz de determinar de forma precisa, sensible y rápida la concentración de gastrina-17 en una muestra mediante el método de sándwich de anticuerpos doble o el método de competición.

El uso del kit proporcionado en el presente documento para la determinación de gastrina-17 no requiere dilución de la muestra de sujeto, la cual puede utilizarse directamente para la detección, facilitando de este modo la sensibilidad de la detección de una muestra de bajo nivel. La muestra de sujeto puede ser una cualquiera de un suero de tubo de blanco, suero de tubo de gel de separación, suero de tubo de coagulante, plasma EDTA y plasma de heparina.

El método para detectar gastrina-17 proporcionado en el presente documento ha mejorado considerablemente la especificidad y la sensibilidad de un kit mediante el uso de un método más avanzado de inmunoensayo de quimioluminiscencia para un diagnóstico clínico mejor.

El método para detectar gastrina-17 proporcionado en el presente documento utiliza el kit de acuerdo con la presente divulgación y el inmunoensayo de quimioluminiscencia y realiza la carga de muestra con total automatización del instrumento, lo que reduce la interferencia causada por factores humanos en los resultados experimentales y acorta considerablemente el tiempo de prueba, facilitando resultados rápidos para el diagnóstico clínico.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se describirá ahora mediante realizaciones específicas y ejemplos específicos y se entiende que el alcance de la divulgación no se limita a los mismos.

Los siguientes ejemplos emplearon un analizador de inmunoensayo de quimioluminiscencia Maglumi 2000 plus (fabricado por Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd.) para la detección.

Fuente del kit de inmunodetección ligado a enzimas de gastrina-17: Biohit (Finlandia), N.º de catálogo: 18GC1404.

Fuente de anticuerpo antigastrina-17: ambos anticuerpos (el primer anticuerpo antigastrina-17 y el segundo anticuerpo antigastrina-17) se adquirieron de Biohit (Finlandia), incluyendo el primer anticuerpo antigastrina-17 de número de clon G52C7.1 y el segundo anticuerpo antigastrina-17 de número de clon G55D4.

Fuente de anticuerpo policlonal anti-FITC de cabra: adquirido de Beijing Biohao Biological Technology Co., Ltd.

Fuente de FITC: adquirido de Shanghai Jining Shiye Co., Ltd.

Fuente de ABEI: fabricado por Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd.

Fuente de microesfera magnética: fabricado por Shenzhen New Industries Biomedical Co., Ltd., con una concentración de 0,6 a 1,2 mg/ml, el 80 % de la distribución de tamaño de partículas de 1 a 5 µm, tiempo de precipitación de 10 a 15 segundos a una intensidad magnética de 4000 gauss y una concentración de adsorción de proteínas de 0,8 mg a 1,2 mg en 30 mg de BSA.

Fuente de biotina y estreptavidina: adquirido de Shanghai Yuanye Biotechnology Co., Ltd.

Estándares de gastrina-17: adquiridos de Shanghai Science Peptide Biological Technology Co., Ltd.

Los métodos para preparar los componentes del kit son como sigue:

Ejemplo de preparación 1: Preparación de una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con un primer anticuerpo antigastrina-17

Las esferas inmunomagnéticas utilizadas en este procedimiento de preparación fueron una suspensión de microesferas nanomagnéticas en una concentración de 100 mg/ml con grupo hidroxilo de 95 mg de KOH/g, fabricadas por Merck Co., Ltd.

(1) Preparación de tampón:

se pesaron 2,55 g de trihidrato de acetato de sodio, se disolvieron en 4500 ml de agua purificada, se añadieron 14 ml de ácido acético y se mezclaron bien para producir un tampón de ácido acético de pH 3,6.

(2) Unión de las microesferas magnéticas (método CMC para la unión de microesferas magnéticas):

Se suspendieron las microesferas magnéticas en el tampón de ácido acético (pH 3,6) por encima de 5x el volumen de recubrimiento para proporcionar una concentración de esferas magnéticas de 20 mg/ml y se añadió 1-ciclohexil-2-morfolinoetil-carbodiimida meto-p-toluenosulfonato (CMC) hasta una concentración de 10 mg/ml. Los primeros anticuerpos anti-gastrina-17 se añadieron mediante una proporción en peso de la solución resultante respecto a los primeros anticuerpos anti-gastrina-17 de 1 mg: 12 µg y se sometieron a reacción en un incubador de baño de agitación a temperatura constante a 37 °C durante 24 horas.

(3) Limpieza de microesferas magnéticas:

Preparación de la solución de limpieza para esferas magnéticas: se formularon 500 ml de tampón PBS (pH 7,4) con 0,1 mol/l de tampón PBS y agua purificada en una proporción volumétrica de 1: 9, en la que se añadieron 2,5 g de BSA, se mezclaron bien y se disolvieron para preparar la solución de limpieza para esferas magnéticas. Limpieza: después del baño caliente de la etapa (2), las esferas magnéticas se vertieron en un vaso de precipitados, se colocaron sobre un imán para la precipitación, se retiró el sobrenadante, se lavaron bajo agitación con 5x el volumen de solución de limpieza para esferas magnéticas, se colocaron sobre un imán y se eliminó el sobrenadante libre. El procedimiento de lavado se repitió cuatro veces.

(4) Suspensión de las esferas magnéticas:

Las esferas magnéticas limpiadas en la etapa (3) se añadieron a una solución mezclada (composición primaria de la solución mezclada: KH_2PO_4 0,2 g/ml, NaHPO_4 2,9 g/ml, NaCl 8 g/ml, NaN_3 2 g/ml, BSA 5 g/ml, Twain T-20 2 ml/ml, equilibrada con agua purificada) de 1x el volumen de recubrimiento, para obtener una suspensión de esferas magnéticas de 1x el volumen de recubrimiento con una concentración de suspensión de 20 mg/ml, es decir, la suspensión de esferas magnéticas recubiertas con los primeros anticuerpos anti-gastrina-17.

Los primeros anticuerpos anti-gastrina-17 anteriores se pueden reemplazar por los segundos anticuerpos anti-gastrina-17.

Ejemplo de preparación 2: Preparación de una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina

Las esferas inmunomagnéticas utilizadas en este procedimiento de preparación fueron una suspensión de microesferas nanomagnéticas en una concentración de 100 mg/ml con grupo hidroxilo de 95 mg de KOH/g, fabricadas por Merck Co., Ltd.

(1) Preparación de tampón:

se pesaron 2,55 g de trihidrato de acetato de sodio, se disolvieron en 4500 ml de agua purificada, se añadieron 14 ml de ácido acético y se mezclaron bien para producir un tampón de ácido acético de pH 3,6.

(2) Unión de las microesferas magnéticas (método CMC para la unión de microesferas magnéticas):

Se suspendieron las microesferas magnéticas en el tampón de ácido acético (pH 3,6) por encima de 5x el volumen de recubrimiento para proporcionar una concentración de esferas magnéticas de 20 mg/ml y se añadió CMC (1-ciclohexil-2-morfolinoetil-carbodiimida meto-p-toluenosulfonato) hasta una concentración de 10 mg/ml. Se añadió estreptavidina mediante una proporción en peso de la solución resultante respecto a estreptavidina de 1 mg: 12 µg y se sometieron a reacción en un incubador de baño de agitación a temperatura constante a 37 °C durante 24 horas.

(3) Limpieza de microesferas magnéticas:

Preparación de la solución de limpieza para esferas magnéticas: se formularon 500 ml de tampón PBS (pH 7,4) con 0,1 mol/l de tampón PBS y agua purificada en una proporción volumétrica de 1: 9, en la que se añadieron 2,5 g de BSA, se mezclaron bien y se disolvieron para preparar la solución de limpieza para esferas magnéticas. Limpieza: después del baño caliente de la etapa (2), las esferas magnéticas se vertieron en un vaso de precipitados, se colocaron sobre un imán para la precipitación, se retiró el sobrenadante, se lavaron bajo agitación con 5x el volumen de solución de limpieza para esferas magnéticas, se colocaron sobre un imán y se eliminó el sobrenadante libre. El procedimiento de lavado se repitió cuatro veces.

(4) Suspensión de las esferas magnéticas: Las esferas magnéticas limpiadas en la etapa (3) se añadieron a una solución mezclada (composición primaria de la solución mezclada: KH_2PO_4 0,2 g/ml, NaHPO_4 2,9 g/ml, NaCl 8 g/ml, NaN_3 2 g/ml, BSA 5 g/ml, Twain T-20 2 ml/ml, equilibrada con agua purificada) de 1x el volumen de recubrimiento, para obtener una suspensión de esferas magnéticas de 1x el volumen de recubrimiento con una concentración de suspensión de 20 mg/ml, es decir, la suspensión de esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina.

Ejemplo de preparación 3: Preparación de una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo policlonal anti-FITC de cabra

Las esferas inmunomagnéticas utilizadas en este procedimiento de preparación fueron una suspensión de

microesferas nanomagnéticas en una concentración de 100 mg/ml con grupo hidroxilo de 95 mg de KOH/g, fabricadas por Merck Co., Ltd.

(1) Preparación de tampón:

5 se pesaron 2,55 g de trihidrato de acetato de sodio, se disolvieron en 4500 ml de agua purificada, se añadieron 14 ml de ácido acético y se mezclaron bien para producir un tampón de ácido acético de pH 3,6.

(2) Unión de las microesferas magnéticas (método CMC para la unión de microesferas magnéticas):

10 Se suspendieron las microesferas magnéticas en el tampón de ácido acético (pH 3,6) por encima de 5x el volumen de recubrimiento para proporcionar una concentración de esferas magnéticas de 20 mg/ml y se añadió CMC (1-ciclohexil-2-morfolinoetil-carbodiimida meto-p-toluenosulfonato) hasta una concentración de 10 mg/ml. El anticuerpo policlonal anti-FITC de cabra se añadió mediante una proporción en peso de la solución resultante respecto al anticuerpo policlonal anti-FITC de cabra de 1 mg: 12 µg y se sometieron a reacción en un incubador de baño de agitación a temperatura constante a 37 °C durante 24 horas.

(3) Limpieza de microesferas magnéticas:

15 Preparación de la solución de limpieza para esferas magnéticas: se formularon 500 ml de tampón PBS (pH 7,4) con 0,1 mol/l de tampón PBS y agua purificada en una proporción volumétrica de 1: 9, en la que se añadieron 2,5 g de BSA, se mezclaron bien y se disolvieron para preparar la solución de limpieza para esferas magnéticas. Limpieza: después del baño caliente de la etapa (2), las esferas magnéticas se vertieron en un vaso de precipitados, se colocaron sobre un imán para la precipitación, se retiró el sobrenadante, se lavaron bajo 20 agitación con 5x el volumen de solución de limpieza para esferas magnéticas, se colocaron sobre un imán y se eliminó el sobrenadante libre. El procedimiento de lavado se repitió cuatro veces.

(4) Suspensión de las esferas magnéticas:

25 Las esferas magnéticas limpiadas en la etapa (3) se añadieron a una solución mezclada (composición primaria de la solución mezclada: KH_2PO_4 0,2 g/ml, NaHPO_4 2,9 g/ml, NaCl 8 g/ml, NaN_3 2 g/ml, BSA 5 g/ml, Twain T-20 2 ml/ml, equilibrada con agua purificada) de 1x el volumen de recubrimiento, para obtener una suspensión de esferas magnéticas de 1x el volumen de recubrimiento con una concentración de suspensión de 20 mg/ml, es decir, la suspensión de esferas magnéticas recubiertas con el anticuerpo policlonal anti-FITC de cabra.

30 **Ejemplo de preparación 4: Preparación de una solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con ABEI**

(1) Preparación de la solución de diálisis de pH 9,5: en un vaso de precipitados de 5000 ml, se añadieron 14,31 g de Na_2CO_3 y 26,46 g de NaHCO_3 y se llenó hasta los 4500 ml con agua. El dializado formulado se colocó en un agitador magnético para su uso posterior.

35 (2) Se eligió una bolsa de diálisis con una capacidad de interceptación de 14000, de la que se preparó para su uso posterior una porción con el tamaño adecuado. Se disolvió 1 mg de anticuerpos monoclonales o policlonales antigastrina-17 y se ajustaron a 1 ml con la solución de diálisis formulada anteriormente y se colocaron en la bolsa de diálisis. La diálisis se realizó bajo agitación durante 2 horas y se añadieron 300 µg de ABEI-hemisuccinimida-N-hidroxisuccinimida a la solución dializada para la reacción a 37 °C durante 2 horas para producir la solución de los primeros anticuerpos antigastrina-17 marcados con ABEI.

40 (3) La purificación de la solución de los primeros anticuerpos antigastrina-17 marcados con ABEI obtenidos en la reacción anterior se realizó sobre una columna de gel G-25.

(4) Se añadió un volumen igual de 5 g/ml de solución protectora de BSA a la solución purificada de los primeros anticuerpos antigastrina-17 marcados con ABEI para obtener la solución final.

45 Los primeros anticuerpos antigastrina-17 anteriores se pueden reemplazar por los segundos anticuerpos antigastrina-17.

50 **Ejemplo de preparación 5: Preparación de una solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con biotina**

(1) Preparación de la solución de diálisis de pH 9,5: en un vaso de precipitados de 5000 ml, se añadieron 14,31 g de Na_2CO_3 y 26,46 g de NaHCO_3 y se llenó hasta los 4500 ml con agua. El dializado formulado se colocó en un agitador magnético para su uso posterior.

55 (2) Se eligió una bolsa de diálisis con una capacidad de interceptación de 14000, de la que se preparó para su uso posterior una porción con el tamaño adecuado. Se disolvió 1 mg de los primeros anticuerpos antigastrina-17 y se ajustaron a 1 ml con la solución de diálisis formulada anteriormente y se colocaron en la bolsa de diálisis. La diálisis se realizó bajo agitación durante 2 horas y se añadieron 300 µg de biotina a la solución dializada para la reacción a 37 °C durante 2 horas para producir la solución biotinilada de los primeros anticuerpos antigastrina-17.

60 (3) La purificación de la solución biotinilada de los primeros anticuerpos antigastrina-17 obtenidos en la reacción anterior se realizó sobre una columna de gel G-25.

(4) Se añadió un volumen igual de 5 g/ml de solución protectora de BSA a la solución purificada biotinilada de los primeros anticuerpos antigastrina-17 para obtener la solución final.

Los primeros anticuerpos antigastrina-17 anteriores se pueden reemplazar por los segundos anticuerpos antigastrina-17.

Ejemplo de preparación 6: Preparación de una solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con FITC

(1) Preparación de la solución de diálisis de pH 9,5: en un vaso de precipitados de 5000 ml, se añadieron 14,31 g de Na₂CO₃ y 26,46 g de NaHCO₃ y se llenó hasta los 4500 ml con agua. El dializado formulado se colocó en un agitador magnético para su uso posterior.

(2) Se eligió una bolsa de diálisis con una capacidad de interceptación de 14000, de la que se preparó para su uso posterior una porción con el tamaño adecuado. Se disolvió 1 mg del primer anticuerpo antigastrina-17 y se ajustó a 1 ml con la solución de diálisis formulada anteriormente y se colocaron en la bolsa de diálisis. La diálisis se realizó bajo agitación durante 2 horas y se añadieron 100 µg de FITC a la solución dializada para la reacción a 37 °C durante 2 horas para producir la solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con FITC.

(3) La purificación de la solución de los primeros anticuerpos antigastrina-17 marcados con FITC obtenido en la reacción anterior se realizó sobre una columna de gel G-25.

(4) Se añadió un volumen igual de 5 g/ml de solución protectora de BSA a la solución purificada de los primeros anticuerpo antigastrina-17 marcado con FITC para obtener la solución final.

Los primeros anticuerpos antigastrina-17 anteriores se pueden reemplazar por los segundos anticuerpos antigastrina-17.

Ejemplo de preparación 7: Preparación de una solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con estreptavidina

(1) Preparación de la solución de diálisis de pH 9,5: en un vaso de precipitados de 5000 ml, se añadieron 14,31 g de Na₂CO₃ y 26,46 g de NaHCO₃ y se llenó hasta los 4500 ml con agua. El dializado formulado se colocó en un agitador magnético para su uso posterior.

(2) Se eligió una bolsa de diálisis con una capacidad de interceptación de 14000, de la que se preparó para su uso posterior una porción con el tamaño adecuado. Se disolvió 1 mg de los primeros anticuerpos antigastrina-17 y se ajustaron a 1 ml con la solución de diálisis formulada anteriormente y se colocaron en la bolsa de diálisis. La diálisis se realizó bajo agitación durante 2 horas y se añadieron 50 µg de estreptavidina a la solución dializada para la reacción a 37 °C durante 2 horas para producir los primeros anticuerpos antigastrina-17 marcados con estreptavidina.

(3) La purificación de la solución de los primeros anticuerpos antigastrina-17 marcados con estreptavidina obtenidos en la reacción anterior se realizó sobre una columna de gel G-25.

(4) Se añadió un volumen igual de 5 g/ml de solución protectora de BSA a la solución purificada de los primeros anticuerpos antigastrina-17 marcados con estreptavidina para obtener la solución final.

Los primeros anticuerpos antigastrina-17 anteriores se pueden reemplazar por los segundos anticuerpos antigastrina-17.

Ejemplo de preparación 8: Preparación de una solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con un anticuerpo policlonal anti-FITC de cabra

(1) Preparación de la solución de diálisis de pH 9,5: en un vaso de precipitados de 5000 ml, se añadieron 14,31 g de Na₂CO₃ y 26,46 g de NaHCO₃ y se llenó hasta los 4500 ml con agua. El dializado formulado se colocó en un agitador magnético para su uso posterior.

(2) Se eligió una bolsa de diálisis con una capacidad de interceptación de 14000, de la que se preparó para su uso posterior una porción con el tamaño adecuado. Se disolvió 1 mg de los primeros anticuerpos antigastrina-17 y se ajustaron a 1 ml con la solución de diálisis formulada anteriormente y se colocaron en la bolsa de diálisis. La diálisis se realizó bajo agitación durante 2 horas y se añadieron 50 µg de anticuerpos policlonales anti-FITC de cabra a la solución dializada para la reacción a 37 °C durante 2 horas para producir la solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con anticuerpos policlonales anti-FITC de cabra.

(3) La purificación de la solución de los primeros anticuerpos antigastrina-17 marcados con anticuerpos policlonales anti-FITC de cabra obtenidos en la reacción anterior se realizó sobre una columna de gel G-25.

(4) Se añadió un volumen igual de 5 g/ml de solución protectora de BSA a la solución purificada de los primeros anticuerpos antigastrina-17 marcados con anticuerpos policlonales anti-FITC de cabra para obtener la solución final.

Los primeros anticuerpos antigastrina-17 anteriores se pueden reemplazar por los segundos anticuerpos antigastrina-17.

Ejemplo de preparación 9: Preparación de una solución de ABEI biotinilado

(1) Preparación de la solución de diálisis de pH 9,5: en un vaso de precipitados de 5000 ml, se añadieron 14,31 g de Na₂CO₃ y 26,46 g de NaHCO₃ y se llenó hasta los 4500 ml con agua. El dializado formulado se colocó en un agitador magnético para su uso posterior.

(2) Se eligió una bolsa de diálisis con una capacidad de interceptación de 14000, de la que se preparó para su uso posterior una porción con el tamaño adecuado. Se disolvió 1 mg de biotina y se ajustó a 1 ml con la solución de diálisis formulada anteriormente y se colocaron en la bolsa de diálisis. La diálisis se realizó bajo agitación durante 2 horas y se añadieron 300 µg de ABEI-hemisuccinimida-N-hidroxisuccinimida a la solución dializada para la reacción a 37 °C durante 2 horas para producir la solución de ABEI biotinilado.

(3) La purificación de la solución biotinilada de ABEI obtenidos en la reacción anterior se realizó sobre una columna de gel G-25.

(4) Se añadió un volumen igual de 5 g/ml de solución protectora de BSA a la solución de ABEI biotinilado purificada para obtener la solución final.

Ejemplo de preparación 10: Preparación de una solución de ABEI marcado con estreptavidina

(1) Preparación de la solución de diálisis de pH 9,5: en un vaso de precipitados de 5000 ml, se añadieron 14,31 g de Na₂CO₃ y 26,46 g de NaHCO₃ y se llenó hasta los 4500 ml con agua. El dializado formulado se colocó en un agitador magnético para su uso posterior.

(2) Se eligió una bolsa de diálisis con una capacidad de interceptación de 14000, de la que se preparó para su uso posterior una porción con el tamaño adecuado. Se disolvió 1 mg de estreptavidina y se ajustó a 1 ml con la solución de diálisis formulada anteriormente y se colocaron en la bolsa de diálisis. La diálisis se realizó bajo agitación durante 2 horas y se añadieron 50 µg de ABEI-hemisuccinimida-N-hidroxisuccinimida a la solución dializada para la reacción a 37 °C durante 2 horas para producir la solución de ABEI marcada con estreptavidina.

(3) La purificación de la solución de ABEI marcado con estreptavidina obtenida en la reacción anterior se realizó sobre una columna de gel G-25.

(4) Se añadió un volumen igual de 5 g/ml de solución protectora de BSA a la solución de ABEI marcado con estreptavidina para obtener la solución final.

Ejemplo de preparación 11: Preparación de una solución de ABEI marcado con FITC

(1) Preparación de la solución de diálisis de pH 9,5: en un vaso de precipitados de 5000 ml, se añadieron 14,31 g de Na₂CO₃ y 26,46 g de NaHCO₃ y se llenó hasta los 4500 ml con agua. El dializado formulado se colocó en un agitador magnético para su uso posterior.

(2) Se eligió una bolsa de diálisis con una capacidad de interceptación de 14000, de la que se preparó para su uso posterior una porción con el tamaño adecuado. Se disolvió 1 mg de FITC y se ajustó a 1 ml con la solución de diálisis formulada anteriormente y se colocaron en la bolsa de diálisis. La diálisis se realizó bajo agitación durante 2 horas y se añadieron 50 µg de ABEI-hemisuccinimida-N-hidroxisuccinimida a la solución dializada para la reacción a 37 °C durante 2 horas para producir la solución de ABEI marcada con FITC.

(3) La purificación de la solución de ABEI marcado con FITC obtenida en la reacción anterior se realizó sobre una columna de gel G-25.

(4) Se añadió un volumen igual de 5 g/ml de solución protectora de BSA a la solución de ABEI marcado con FITC para obtener la solución final.

Ejemplo de preparación 12: Preparación de un calibrador de punto bajo y de un calibrador de punto alto de gastrina-17

Utilizando la gastrina-17 estándar y suero bovino como un disolvente, se prepararon un calibrador de punto alto y un calibrador de punto bajo de gastrina-17 en las concentraciones de 229,932 pmol/l y 4,729 pmol/l, respectivamente.

Ejemplo 1

Preparación de los componentes del kit:

preparar una solución del primer anticuerpo antigestrina-17 marcado con ABEI de acuerdo con el Ejemplo de preparación 4 anterior;

preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con un segundo anticuerpo antigestrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 1 anterior; y

preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

Se utilizó gastrina-17 estándar para preparar soluciones estándar de diez concentraciones diferentes, con suero bovino como disolvente.

5 Se sometieron a prueba las diez soluciones utilizando los componentes del kit preparados en la presente realización, siendo el procedimiento de detección como sigue a continuación:

- 1) añadir 40 µl de una solución a prueba, el calibrador de punto alto y el calibrador de punto bajo a diferentes pocillos de ensayo;
- 10 2) añadir 100 µl de la solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con ABEI a cada pocillo;
- 3) añadir de a 20 µl de la suspensión de esferas magnéticas revestidas con el segundo anticuerpo antigastrina-17 a cada pocillo;
- 4) incubar por debajo de 37 °C durante 30 minutos y limpiar en un entorno magnético al menos 3 veces para cada pocillo;
- 15 5) añadir sustrato luminiscente a cada pocillo y detectar la intensidad de señal óptica; y
- 6) calcular la concentración de gastrina-17 en la muestra de sujeto utilizando la intensidad de señal óptica detectada en la muestra de sujeto en referencia a la curva de trabajo calibrada con el calibrador.

Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 1.

20 Además, se utilizaron muestras de suero en ayunas de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal de Hospital Nanshan (Shenzhen, China) como muestras de sujetos. Estas cinco muestras se sometieron a determinación utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización de acuerdo con el método de detección anterior. Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 2.

25 **Ejemplo 2**

Preparación de los componentes del kit:

- 30 preparar una solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con ABEI de acuerdo con el Ejemplo de preparación 4 anterior;
- preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con anticuerpo policlonal anti-FITC de cabra de acuerdo con el Ejemplo de preparación 3 anterior;
- preparar una solución del segundo anticuerpo antigastrina-17 marcado con FITC de acuerdo con el Ejemplo de preparación 6 anterior; y
- 35 preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

40 Además, las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a determinación para la gastrina-17, utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización mediante inmunoensayo quimioluminiscente con el método de detección de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Ejemplo 3

45 Preparación de los componentes del kit:

- preparar una solución del primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con ABEI de acuerdo con el Ejemplo de preparación 4 anterior;
- 50 preparar una solución biotinilada del segundo anticuerpo antigastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 5 anterior;
- preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina de acuerdo con el Ejemplo de preparación 2 anterior; y
- preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

55 Además, las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a determinación para la gastrina-17, utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización mediante inmunoensayo quimioluminiscente con el método de detección de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

60 **Ejemplo 4**

Preparación de los componentes del kit:

preparar una solución biotilada del primer anticuerpo antigastri-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 5 anterior;

preparar una solución de estreptavidina marcada con ABEI de acuerdo con el Ejemplo de preparación 10 anterior;

5 preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con el segundo anticuerpo antigastri-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 1 anterior; y

preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

10 Además, las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a determinación para la gastrina-17, utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización mediante inmunoensayo quimioluminiscente con el método de detección de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

15 **Ejemplo 5**

Preparación de los componentes del kit:

preparar una solución del primer anticuerpo antigastri-17 marcado con ABEI de acuerdo con el Ejemplo de preparación 4 anterior;

20 preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con el antígeno gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 1 anterior; y

preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

25 Además, las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a determinación para la gastrina-17, utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización mediante inmunoensayo quimioluminiscente con el método de detección de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

30 **Ejemplo 6**

Preparación de los componentes del kit:

preparar una solución del primer anticuerpo antigastri-17 marcado con ABEI de acuerdo con el Ejemplo de preparación 4 anterior;

35 preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con anticuerpo policlonal anti-FITC de cabra de acuerdo con el Ejemplo de preparación 3 anterior;

preparar una solución del antígeno gastrina-17 marcado con FITC de acuerdo con el Ejemplo de preparación 6 anterior; y

40 preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

45 Además, las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a determinación para la gastrina-17, utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización mediante inmunoensayo quimioluminiscente con el método de detección de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Ejemplo 7

50 Preparación de los componentes del kit:

preparar una solución del primer anticuerpo antigastri-17 marcado con ABEI de acuerdo con el Ejemplo de preparación 4 anterior

preparar una solución biotilada del antígeno gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 5 anterior;

55 preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina de acuerdo con el Ejemplo de preparación 2 anterior; y

preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

60 Además, las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a determinación para la gastrina-17, utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización mediante inmunoensayo quimioluminiscente con el método de detección de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Ejemplo 8

Preparación de los componentes del kit:

- 5 preparar una solución biotinilada del primer anticuerpo antigastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 5 anterior;
preparar una solución de estreptavidina marcada con ABEI de acuerdo con el Ejemplo de preparación 10 anterior;
preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con antígeno gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 1 anterior; y
- 10 preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

Además, las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a determinación para la gastrina-17, utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización mediante inmunoensayo quimioluminiscente con el método de detección de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Ejemplo 9

20 Preparación de los componentes del kit:

- preparar una solución del segundo anticuerpo antigastrina-17 marcado con estreptavidina de acuerdo con el Ejemplo de preparación 7 anterior;
preparar una solución de ABEI biotinilado de acuerdo con el Ejemplo de preparación 9 anterior;
- 25 preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con antígeno gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 1 anterior; y
preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

30 Además, las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a determinación para la gastrina-17, utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización mediante inmunoensayo quimioluminiscente con el método de detección de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

35 Ejemplo 10

Preparación de los componentes del kit:

- 40 preparar una solución del segundo anticuerpo antigastrina-17 marcado con el anticuerpo policlonal anti-FITC de acuerdo con el Ejemplo de preparación 8 anterior;
preparar una solución de FITC marcada con ABEI de acuerdo con el Ejemplo de preparación 11 anterior;
preparar una suspensión de esferas magnéticas recubiertas con el antígeno gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 1 anterior; y
preparar un calibrador de punto bajo y un calibrador de punto alto de gastrina-17 de acuerdo con el Ejemplo de preparación 12 descrito anteriormente.

Además, las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a determinación para la gastrina-17, utilizando los componentes del kit proporcionados en la presente realización mediante inmunoensayo quimioluminiscente con el método de detección de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Ejemplo Comparativo 1

55 Las diez soluciones estándar del Ejemplo 1 y las muestras de suero de 5 pacientes diagnosticados de úlcera duodenal se sometieron a prueba utilizando el kit de inmunodetección ligado a enzimas de gastrina-17 de Biohit (Finlandia). Los resultados se compararon con aquellos de los Ejemplos 1-10 y se enumeran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1

Concentración de preparación (pmol/l)	Ejemplo 1 (pmol/l)	Ejemplo 2 (pmol/l)	Ejemplo 3 (pmol/l)	Ejemplo 4 (pmol/l)	Ejemplo 5 (pmol/l)	Ejemplo 6 (pmol/l)	Ejemplo 7 (pmol/l)	Ejemplo 8 (pmol/l)	Ejemplo 9 (pmol/l)	Ejemplo 10 (pmol/l)	Ejemplo comparativo 1 (pmol/l)
0	0,165	0,341	0,352	0,349	0,331	0,465	0,478	0,452	0,589	0,612	0,756
5	4,963	5,561	5,564	5,574	5,561	5,817	5,874	5,963	6,189	6,209	6,75
10	10,09	11,52	10,98	11,06	10,86	11,56	11,49	11,60	12,19	12,79	13,54
20	19,94	19,86	19,62	20,54	20,64	19,72	19,63	19,87	19,80	19,65	19,86
40	40,27	41,89	42,03	38,87	39,47	38,12	41,69	41,87	40,87	41,52	37,61
80	79,24	77,23	82,48	78,36	79,04	82,69	83,47	83,97	80,79	85,87	72,86
100	100,58	96,47	96,12	96,47	97,7	93,4	92,4	92,1	91,65	90,87	86,97
200	198,5	193,4	193,7	192,8	193,7	189,2	187,3	188,7	176,9	174,7	138,9
300	295,7	290,6	290,7	289,7	290,4	267,4	266,3	260,7	207,8	201,6	197,6
500	493,7	483,5	481,7	484,7	483,7	456,8	455,7	432,1	359,7	349,7	286,4

- Como puede observarse en la Tabla 1, los resultados de la determinación de las soluciones estándar de gastrina-17 utilizando el kit proporcionado en la presente divulgación (Ejemplos 1-10) fueron más precisos que el kit ELISA comercial. Los resultados en el intervalo de valores bajos (5 pmol/l o menos) y en el intervalo de valores elevados (300 pmol/l o más) fueron considerablemente mejores que los resultados inmunosupresores ligados a enzimas. Es decir,
- 5 que los resultados de la determinación utilizando el kit de la presente divulgación están más próximos a los valores teóricos de las muestras preparadas utilizando los calibradores de gastrina-17 en comparación con los resultados del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, especialmente en el intervalo de valores bajos y en el intervalo de valores elevados.
- 10 Como puede observarse a partir de los resultados de la detección de los Ejemplos 1 a 4, los resultados de la detección en el Ejemplo 1 son particularmente buenos (reflejados principalmente en que los resultados de la detección en los intervalos de valores bajos y elevados estuvieron más cerca de los valores teóricos). De forma análoga, entre los Ejemplos 5 a 10, los resultados de la detección del Ejemplo 5 fueron mucho mejores, indicando que, en los kit de
- 15 detección de la gastrina-17 de la presente divulgación, los kits con antígeno y con anticuerpo marcados directamente con un marcador de seguimiento o aplicados como recubrimiento sobre una esfera magnética tuvieron mayor precisión y sensibilidad en comparación con el marcaje o el recubrimiento de esferas magnéticas a través de un sistema de FITC o un sistema de estreptavidina. Comparando los Ejemplos 8 y 9, se halló que el uso del primer anticuerpo antigastrina-17 tuvo un mejor rendimiento que el uso del segundo anticuerpo antigastrina-17 en la detección mediante el método de competición, indicando que, de los dos anticuerpos, el primer anticuerpo tuvo mayor afinidad por el
- 20 antígeno gastrina-17. Comparando los Ejemplos 4 y 8, se observó que los resultados de la detección del método de sándwich de anticuerpos doble y el método de competición mostraron diferencias cuanto se utilizó el método de marcaje indirecto. Además, los resultados de la detección del Ejemplo 5 fueron similares a aquellos de los Ejemplos 2 a 4, pero ligeramente más débiles que los del Ejemplo 1, indicando que el método de sándwich de anticuerpos doble como en el Ejemplo 1 tiene una especificidad y sensibilidad mejores que el uso del método de competición como en el Ejemplo 5. Sin embargo, el método de competición solo requiere un anticuerpo, mientras que el método de sándwich de anticuerpos doble requiere dos anticuerpos. Por tanto, el método de competición es más eficaz en términos de
- 25 materiales.

Tabla 2*

ID de la muestra	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10	Ejemplo Comparativo 1
1	34,62	32,14	32,01	32,64	33,34	31,69	31,41	31,87	31,53	31,77	28,64
2	12,97	12,14	11,97	12,03	12,04	10,87	10,93	10,78	10,81	10,72	8,891
3	45,87	43,14	43,57	43,17	43,89	42,17	42,67	42,07	42,45	42,01	37,56
4	27,61	25,74	25,41	24,69	25,03	24,58	23,96	24,09	24,21	23,89	15,86
5	65,97	63,14	64,01	62,41	63,78	60,12	59,33	60,14	59,88	59,77	54,98

*: La unidad para una concentración determinada: pmol/l; Intervalos de valores normales para un examen en ayunas: 2 a 10pmol/l.

- Como puede observarse en la Tabla 2, entre los cinco pacientes que padecen de secreción de gastrina-17 masiva debido a una úlcera duodenal, solo se detectaron 4 casos como anormales mediante el kit de detección inmunoabsorbente ligado a enzimas. Sin embargo, los 5 casos se detectaron como anormales utilizando los kits de los Ejemplos 1 a 10 de la presente divulgación. Por tanto, el kit proporcionado en el presente documento tiene una
- 5 precisión mayor. Se puede observar que la predilución de la muestra tiene una influencia considerable sobre la sensibilidad de la detección de un kit, que puede interferir fácilmente con el diagnóstico clínico y prolongar el tiempo experimental. Por tanto, la presente divulgación proporciona un kit de gastrina-17 y un método para la detección de gastrina-17 que satisface mejor la necesidad de resultados más rápidos y eficaces en los ensayos clínicos modernos.
- 10 Aunque la divulgación se ha descrito en detalle, las modificaciones comprendidas en el espíritu y el alcance de la divulgación serán evidentes para los expertos en la materia. Además, se deberá entender que los diversos aspectos de la divulgación, las diversas partes de las diversas realizaciones y las diversas características relatadas se pueden combinar o intercambiar en su totalidad o en parte. En cada una de las realizaciones específicas anteriores, aquellas realizaciones que se refieren a otra realización pueden ser adecuadas en combinación con otras realizaciones, como
- 15 entenderán los expertos en la materia. Asimismo, se entenderá por los expertos en la materia que la descripción precedente tiene el propósito solo de ilustrar a modo de ejemplo y no tiene intención de limitar la divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Un kit para detectar gastrina-17, **caracterizado porque** comprende un componente A y un componente B, en donde el componente A es un primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento o aplicado como recubrimiento sobre una esfera magnética, el componente B es un segundo anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento o aplicado como recubrimiento sobre una esfera magnética; en donde cualquiera de los componentes A y B se marca con un marcador de seguimiento y el otro se aplica como recubrimiento sobre una esfera magnética; en donde el primer anticuerpo antigastrina-17 y el segundo anticuerpo antigastrina-17 tienen sitios de unión diferentes para unirse con la gastrina-17; y en donde el marcador de seguimiento es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en luminol y derivados del mismo, isoluminol y derivados del mismo, ésteres de acridinio; en donde el marcador de seguimiento directamente marca el primer o segundo anticuerpo antigastrina-17 y en donde el primer o segundo anticuerpo antigastrina-17 se aplica como recubrimiento directamente sobre la esfera magnética.
2. El kit según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el marcador de seguimiento es N-(4-aminobutil)-N-etilisoluminol.
3. El kit según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la esfera magnética es un complejo de partículas magnéticas de Fe_2O_3 o Fe_3O_4 y un material polimérico orgánico y tiene un tamaño de partícula de 0,1 a 5 μm ; y, la esfera magnética se modifica opcionalmente mediante modificación en superficie para llevar uno o más grupos funcionales activos.
4. El kit según la reivindicación 1, **caracterizado porque**, en el kit, la concentración del primer anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 $\mu\text{g/ml}$, la concentración del segundo anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 $\mu\text{g/ml}$, la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml .
5. Un método para preparar un kit para detectar gastrina-17, **caracterizado porque** este comprende: marcar directamente uno cualquiera de un primer anticuerpo antigastrina-17 y un segundo anticuerpo antigastrina-17 con un marcador de seguimiento y aplicar como recubrimiento directamente el otro sobre una esfera magnética, para obtener un kit que incluye el primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con el marcador de seguimiento o aplicado como recubrimiento sobre la esfera magnética y el segundo anticuerpo antigastrina-17 aplicado como recubrimiento sobre la esfera magnética o marcado con el marcador de seguimiento, en donde el primer anticuerpo antigastrina-17 y el segundo anticuerpo antigastrina-17 tienen sitios de unión diferentes para unirse con la gastrina-17.
6. El método según la reivindicación 5, **caracterizado porque** el marcador de seguimiento es N-(4-aminobutil)-N-etilisoluminol.
7. El método según la reivindicación 5, **caracterizado porque** la esfera magnética es un complejo de partículas magnéticas de Fe_2O_3 o Fe_3O_4 y un material polimérico orgánico y tiene un tamaño de partícula de 0,1 a 5 μm .
8. El método según la reivindicación 5, **caracterizado porque** en el kit preparado, la concentración del primer anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 $\mu\text{g/ml}$, la concentración del segundo anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 $\mu\text{g/ml}$, la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml .
9. Un método para detectar gastrina-17, **caracterizado porque** el método comprende utilizar un kit de detección de gastrina-17 para detectar la concentración de gastrina-17 en una muestra de sujeto mediante inmunoensayo quimioluminiscente, el kit que incluye un componente A y un componente B, en donde el componente A es un primer anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento o aplicado como recubrimiento sobre una esfera magnética, el componente B es un segundo anticuerpo antigastrina-17 marcado con un marcador de seguimiento o aplicado como recubrimiento sobre una esfera magnética; en donde cualquiera de los componentes A y B se marca con un marcador de seguimiento y el otro se aplica como recubrimiento sobre una esfera magnética; y, en donde el primer anticuerpo antigastrina-17 y el segundo anticuerpo antigastrina-17 tienen sitios de unión diferentes para unirse con la gastrina-17; en donde el marcador de seguimiento directamente marca el primer o segundo anticuerpo antigastrina-17 y en donde el primer o segundo anticuerpo antigastrina-17 se aplica como recubrimiento directamente sobre la esfera magnética.
10. El método de la reivindicación 9, **caracterizado porque** el método comprende: mezclar los componentes A y B del kit con la muestra de sujeto, incubar, separar magnéticamente y añadir un sustrato luminiscente a un precipitado resultante para detectar una intensidad de señal óptica; medir la intensidad de señal óptica del calibrador de punto bajo y el calibrador de punto alto de la gastrina-17 de la misma manera para obtener una curva estándar entre la concentración de gastrina -17 y la intensidad de señal óptica; y, comparar la intensidad de señal óptica de la muestra de sujeto con la curva estándar para obtener la concentración de gastrina-17 en la muestra de sujeto.
11. El método según la reivindicación 9 **caracterizado porque** el marcador de seguimiento es N-(4-aminobutil)-N-

etilisoluminol.

- 5
12. El método según la reivindicación 9, **caracterizado porque** la esfera magnética es un complejo de partículas magnéticas de Fe_2O_3 o Fe_3O_4 y un material polimérico orgánico y tiene un tamaño de partícula de 0,1 a 5 μm .
 13. El método según la reivindicación 9, **caracterizado porque** en el kit preparado, la concentración del primer anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 $\mu\text{g/ml}$, la concentración del segundo anticuerpo antigastrina-17 es de 10 a 200 $\mu\text{g/ml}$, la concentración del marcador de seguimiento es de 0,1 a 1 mg/ml y la concentración de la esfera magnética es de 0,1 a 5 mg/ml .