



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03811904.8

[43] 公开日 2005 年 8 月 17 日

[11] 公开号 CN 1656231A

[22] 申请日 2003.5.22 [21] 申请号 03811904.8

[30] 优先权

[32] 2002.5.24 [33] US [31] 10/154,715

[32] 2002.9.18 [33] US [31] 10/246,582

[86] 国际申请 PCT/US2003/016155 2003.5.22

[87] 国际公布 WO2003/100006 英 2003.12.4

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.24

[71] 申请人 海布里特克有限公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 史蒂芬·D·米科瓦伊奇克

哈里·G·里滕豪斯

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 24 页 附图 16 页

[54] 发明名称 分析样品中非复合形式的前列腺特异抗原以改进前列腺癌检测的方法

[57] 摘要

本发明提供了用于检测和确定前列腺癌存在的试验方法。试验能够在游离 PSA 与总 PSA 的比例显著高的男人群体中检测前列腺癌。试验还能够在少量总 PSA，即范围为 2 - 4ng/ml 的男人群体中检测前列腺癌。根据本发明的一个实施方案，试验包括下列步骤：(a) 确定来自患者的生物样品中所含的总 PSA 的量，(b) 确定同一样品中游离 PSA 的量，并且计算游离 PSA 与总 PSA 的比例，(c) 确定同一样品中的 pPSA 的量，(d) 确定同一样品中 BP-SA 的量，(e) 确定同一样品中 inPSA 的量，以及(f) 基于总 PSA 的水平和游离 PSA，通过将 inPSA 的量与用已知癌症和良性疾病诊断的对照样品所建立的预定值进行比较，使样品中所含的 inPSA 的量与患者中前列腺癌的存在相关。

1. 一种帮助区分个体中前列腺癌与良性疾病的方法，包括下列步骤：

- 5 a) 确定个体生物样品中所含的总 PSA 的量；
- b) 确定同一样品中游离 PSA 的量；并且计算游离 PSA 与总 PSA 的比例；
- c) 确定同一样品中 inPSA 的量；以及
- d) 基于总 PSA 的水平以及游离 PSA 与总 PSA 的比例，通过将
- 10 inPSA 的量与用已知癌症和良性疾病诊断的对照样品所建立的预定值进行比较，使样品中所含的 inPSA 的量与个体中前列腺癌的存在相关。

2. 权利要求 1 的方法，其中步骤 c 进一步包括下列步骤：

- (a) 向生物样品中加入足够量的针对 BPSA 和 pPSA 的单克隆
- 15 抗体以封闭样品中所含的 BPSA 和 pPSA；以及
- (b) 确定样品中游离 PSA 的量，这就是样品中 inPSA 的量。

3. 权利要求 1 的方法，其中步骤 c 进一步包括下列步骤：

- (a) 确定 pPSA 的量；
- 20 (b) 确定 BPSA 的量；以及
- (c) 游离 PSA 减 pPSA 和 BPSA 的量确定 inPSA 的量。

4. 权利要求 3 的方法，其中相关步骤为基于总 PSA 的水平和游离 PSA 与总 PSA 的比例，通过比较样品中所含的 inPSA 和总 PSA，

25 游离 PSA，BPSA 或 pPSA 的数学组合与用已知癌症和良性疾病诊断的对照样品所确立的预定值，使所述数学组合与个体中前列腺癌的存在相关的步骤。

5. 权利要求 4 的方法，其中数学组合包括在 inPSA, BPSA, pPSA, 总 PSA 和游离 PSA 中的加法，减法和除法。

30

6. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 与 BPSA 或 pPSA 的数学组合。

5 7. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 与 pPSA 的比例。

8. 权利要求 4 的方法，其中 pPSA 选自[-2]pPSA，[-4]pPSA，[-5]pPSA，以及[-7]pPSA。

10 9. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 与总 PSA 的比例。

10. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 与游离 PSA 的比例。

15 11. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 减 pPSA。

12. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 减 pPSA 后与总 PSA 的比例。

20 13. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 减 pPSA 后与游离 PSA 的比例。

14. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 加 pPSA。

25 15. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 加 pPSA 后与总 PSA 的比例。

16. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 加 pPSA 后与游离 PSA 的比例。

17. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 减 BPSA。

18. 权利要求 4 的方法，其中数学组合为 inPSA 加 BPSA。

5 19. 权利要求 1 的方法，其中数学组合为 inPSA 加或减 BPSA 后与总 PSA 或游离 PSA 的比例。

 20. 权利要求 1 的方法，其中总 PSA 为 2.5-10 ng/ml，游离 PSA 与总 PSA 的比例大于 20%，以及 inPSA 的量高于预定值指示前列腺癌的存在。
10

 21. 权利要求 20 的方法，其中总 PSA 为 4-10 ng/ml。

 22. 权利要求 20 的方法，其中游离 PSA 与总 PSA 的比例大于
15 25%。

 23. 权利要求 1 的方法，其中总 PSA 为 2.5-10 ng/ml，游离 PSA 与总 PSA 的比例选自 5%-25%，以及 inPSA 的量高于或低于预定值指示前列腺癌的存在。
20

 24. 权利要求 23 的方法，其中总 PSA 为 4-10 ng/ml。

 25. 权利要求 23 的方法，其中总血清 PSA 为 2.5-4 ng/ml。

25 26. 权利要求 23 的方法，其中游离 PSA 与总 PSA 的比例选自 5%-25%。

 27. 权利要求 1 的方法，其中总 PSA 选自增量从 1.0 到 10.0 ng/ml 的任何组合。

-
28. 权利要求 1 的方法，其中总 PSA 低于约 20 ng/ml。
29. 权利要求 1 的方法，其中总 PSA 低于 10 ng/ml。
- 5 30. 权利要求 1 的方法，其中总 PSA 为约 2.5-10 ng/ml。
31. 权利要求 1 的方法，其中游离 PSA 与总 PSA 的比例为 1-50%。
32. 权利要求 1 的方法，其中游离 PSA 与总 PSA 的比例为大于
10 20%。
33. 权利要求 1 的方法，其中游离 PSA 与总 PAS 的比例为大于
25%。
- 15 34. 权利要求 1 的方法，其中个体为人。
35. 权利要求 1 的方法，其中样品为生理流体。
36. 权利要求 13 的方法，其中生理流体为血清，血液或血浆。
20
37. 权利要求 2 的方法，其中 pPSA 选自[-2]pPSA，[-4]pPSA，[-
5,-7]pPSA，其截短的形式，及其任何组合。
38. 权利要求 5 的方法，其中数学组合为 BPSA 减 pPSA。

分析样品中非复合形式的
前列腺特异抗原以改进前列腺癌检测的方法

5

相关发明

本申请是 2002 年 5 月 24 日提交的 U.S. 申请 No. 10/154,715, 1999 年 4 月 30 日提交的 U.S. 申请 No. 09/303,208, 以及 1999 年 4 月 30 日提交的 U.S. 申请 No. 09/303,339 的部分继续申请, 所述申请的内容在此以其全文引作参考。

10

发明背景

技术领域

总的来说, 本发明涉及检测和鉴定作为诊断标记、具有潜在用途的蛋白, 以及蛋白的各种形式和亚基。具体而言, 本发明涉及检测或确定前列腺特异抗原在人的生物流体中的失活形式, 以及涉及提高检测前列腺癌的方法。

15

现有技术描述

血清前列腺特异抗原 (PSA) 的测量广泛用于筛选和早期诊断前列腺癌[1-3]。通过当今临床免疫分析可测量的血清 PSA 主要以游离“非复合的”形式 (游离 PSA) 存在或以与 α -抗胰凝乳蛋白酶 (ACT) 的复合物形式存在[1-5]。血清中游离 PSA 与总 PSA 的比例已显示可显著提高 PCa 与 BPH 的辨别, 以更高的比例相关于较低风险的前列腺癌[1-7]。

20

25

游离 PSA 水平在血清中变化的生物学机理是未知的。已经变成复合的血清 PSA 可能是相对均一的, 因为它代表了酶活性的完整的 PSA。从 PAS-ACT 复合物释放的 PSA 在前列腺癌 (PCa) 和良性前列腺增生 (BPH) 血清中发现与精浆 PSA 是不可区分的, 正确认了这种

30

假设[8]。由此得出结论，游离 PSA 可提供更好的生化指标 (insight)，以及表征游离 PSA 的分子形式可帮助阐明其前列腺起源和释放到血清中的机理。

5 含有失活形式的 PSA 的各种 PSA 的混合物已经从前列腺组织和精浆中分离出来。BPH 组织的 PSA 已经以更普遍的方式被表征为内部更高度截短的形式[9]，尽管没有单个或多个形式的 PSA 分离自本发明所研究的截短和未截短的 PSA 形式的混合物。精浆中的 PSA 通过色谱法已经被分离成组分，显示含有截短和非截短的 PSA 的各种混
10 合物[10]。然而，在这些研究中没有一个研究表明，抗体被开发为任何单个形式的失活 PSA，或者这些 PSA 形式在血清中得到证实。

 在血清中，现在已知游离（未复合的）PSA 包含至少两种特异形式的失活 PSA。一种形式已被鉴定成酶原，或 PSA 的前体形式(pPSA)，
15 包括与癌症更相关的 pPSA 的截短形式[11-13]。第二特异形式的 PSA 称为 BPSA，其是内部切割或降解形式的 PSA，与 BPH 更高度相关[14; 15]。BPSA 被分离并且广泛表征为同源物种的 PSA。有关 BPSA 和 pPSA 的详细综述最近已经公布[16]。

20 另一描述和测量血清中游离形式的 PSA 的亚群的方法也已由 Nurmikko[17]报道。在此情况下，完整 PSA (PSA-I) 定义为在 Lys145 位点处未被截短的游离 PSA。该试验识别在 Lys145 位点处不被内部截短的游离 PSA 形式，Lys145 位点是 PSA 在精浆中降解的最常见的形式。通过该方法测量的 PSA 的性质还未完全明确，除了在 Lys145
25 位点处不被截短之外。照此，该试验测量的是 pPSA 形式与其他未表征的失活形式的 PSA 的混合物，所述失活形式的 PSA 在 Lys145 位点处不被截短。

 由于血清中存在的 PSA 在临床上有用浓度低于 10 ng/ml，因此必须开发免疫测定或其他非常灵敏的方法才能测量 PSA。利用当前市售
30

的游离 PSA 免疫测定方法测量的所有形式的游离 PSA，总和水平通常低于 2 ng/ml。pPSA，BPSA 和 PSA-I 的抗体和免疫测定保持仅有的被报道的研究免疫测定，用于测量血清中亚形式的游离 PSA。所以，仍需要开发测量不同形式的游离 PSA 的新方法，以及进一步研究其与不同前列腺病状态的联系。

发明概述

本发明的一个方面提供帮助区分个体中前列腺癌与良性疾病的方法。所述方法包括下列步骤：

- a) 确定个体生物样品中所含的总 PSA 的量，
- b) 确定同一样品中游离 PSA 的量，并且计算游离 PSA 与总 PSA 的比例，
- c) 确定同一样品中 inPSA 的量，以及
- d) 基于总 PSA 的水平以及游离 PSA 与总 PSA 的比例，通过将 inPSA 的量与用已知癌症和良性疾病诊断的对照样品所建立的预定值进行比较，使样品中所含的 inPSA 的量与个体中前列腺癌的存在相关。

优选地，免疫测定用于确定不同形式的 PSA。根据本发明的一个实施方案，通过利用特异于 pPSA 和 BPSA 的封闭抗体来封闭样品中所含的 pPSA 和 BPSA，然后以确定 inPSA 量的方式测量同一样品中所含的游离 PSA 的量，从而可以确定 inPSA 的量。此外，在不同的实施方案中，所述方法进一步包括确定 BPSA 和 pPSA 的量的步骤。从游离 PSA 的量中减去 BPSA 和 pPSA 的量，可以确定 inPSA 的量。

根据本发明的实施方案，相关步骤可以同是使单独 inPSA 的量，或者使 inPSA 与总 PSA，游离 PSA，BPSA 和 pPSA 进行数学组合后的量同预先确定的值相关的步骤。数学组合可以为加，减，除或其组合。

根据本发明的实施方案，总 PSA 可以在低于 20 ng/ml 的任意水

平，或更优选低于 10 ng/ml，或最优选处于 2.5-10 ng/ml 的范围内。游离 PSA 与总 PSA 的比例可以是通常在患者血清中发现的游离 PSA 的任意范围 1-50%，尽管在本发明的一个实施方案中，优选的范围大于 20%，而最优选大于 25%。pPSA 可以是[-2]pPSA，[-4]pPSA，[-5,-7]pPSA 或这三种形式的天然和截短的 pPSA 的总和，以 pPSA 表示。样品可以是任何生理流体，尽管血清或血浆是优选的。

附图描述

图 1 示出了 pPSA，BPSA 和 inPSA 在癌症血清中的常见比例。

图 2 示出了接受者操作特征 (ROC) 分析覆盖图，其中比较了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中游离 PSA (F)，总 PSA (T)，inPSA (i)，pPSA (P) 和 BPSA (B)。

图 3 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中游离 PSA/总 PSA，inPSA/总 PSA 以及 BPSA/总 PSA 的 ROC 分析。

图 4 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中 inPSA/游离 PSA 和 pPSA/游离 PSA 的 ROC 分析。

图 5 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中 inPSA，inPSA/pPSA 以及游离 PSA 的 ROC 分析。

图 6 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中 pPSA+inPSA，pPSA+BPSA 以及 BPSA+inPSA 的 ROC 分析。

图 7 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中 pPSA 减 BPSA，inPSA 减 BPSA 以及 inPSA 减 pPSA 的 ROC 分析。

图 8 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中 inPSA 减 pPSA，(inPSA 减 pPSA)/总 PSA，以及(inPSA 减 pPSA)/游离 PSA 的 ROC 分析。

图 9 示出了患有癌症或 BPH，总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 以及游离 PAS 大于 25%的男人中 inPSA/pPSA，以及 inPSA/[-2]pPSA 的 ROC 分析。

图 10 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 2.5-4 ng/ml 的男人中 inPSA/pPSA, inPSA 减 pPSA 以及游离 PSA/总 PSA 的 ROC 分析。

5 图 11 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 2.5-4 ng/ml 的男人中游离 PSA 以及 inPSA/[-2]pPSA 的 ROC 分析。

图 12 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 2.5-10 ng/ml 的男人中游离 PSA/总 PSA 以及 inPSA/pPSA 的 ROC 分析。

图 13 示出了患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 2.5-10 ng/ml 的男人中游离 PSA/总 PSA 以及 inPSA 减 pPSA 的 ROC 分析。

10 图 14 示出了所有形式的失活精浆 PSA 的阳离子交换色谱图。

图 15 示出了还原条件下的 SDS-PAGE 凝胶, 其中泳道 1 为含有所有形式的失活精浆 PSA 的原始出发材料, 以及泳道 2 为图 14 所示的 inPSA 的纯化峰, 含有纯化的完整的非天然的 PSA。

图 16 示出了成熟 PSA 的全长氨基酸序列。

15

发明详述

定义

20 如上所述, 血清前列腺特异抗原 (PSA) 有不同形式。对于本发明而言, 术语“总 PSA”是指所有可检测形式的 PSA, 包括游离 PSA 和复合有 ACT 的 PSA。如本发明所用的术语“游离 PSA”是指在溶液中不与其他任何蛋白复合, 分子量却有约 30kDa 的 PSA。

25 一种形式的游离 PSA 为 pPSA 或 proPSA。如本发明所用的 pPSA 和 proPSA 是指前体形式的 PSA。全长前体形式的 PSA 包括 7 个氨基酸的前肽, APLILSR, 其位于 237 个氨基酸的成熟 PSA 蛋白的前面。proPSA 的全长氨基酸序列在本领域是公知的, 并且被充分描述在参考文献[18]中, 相关内容在此以其全文引作参考。对本发明而言, 前肽序列的最后一个氨基酸“R”计成[-1]氨基酸。例如, [-7]proPSA 为其末端起始于前肽-7aa 处的 proPSA。它含有全长 proPSA。[-5]proPSA 表示 proPSA 的末端起始于前肽的-5aa 处, 并且含有 proPSA 的前肽序
30

列的最后 5 个氨基酸序列，依此类推。对于本发明而言，本发明的 proPSA 既包括全长形式的 proPSA 又包括其末端起始于 proPSA 前肽的任意氨基酸处的截短形式的 proPSA。本发明 proPSA 的例子包括但不限于[-1]pPSA，[-2]pPSA，[-4]pPSA，[-5]pPSA 以及[-7]pPSA。对本发明而言，不带任何前缀的术语“pPSA”总是表示[-2]pPSA，[-4]pPSA 和[-5,-7]pPSA 的总和。如本发明所用的[-5,-7]pPSA 是指[-5]与[-7]的总和，这是因为在某些情况下，识别[-5]形式的抗体也能识别[-7]形式。

proPSA 无活性，即其缺乏胰凝乳蛋白酶样酶活性，因而以游离 PSA 的形式而非以 PSA 抗胰凝乳蛋白酶复合物的形式存在于血清中。本发明的 proPSA 可采用本领域公知的方法制备，所述方法诸如蛋白纯化技术，重组蛋白技术以及蛋白合成技术，但不限于此。制备和检测本发明的 proPSA 的细节公开在下列在审 U.S.专利申请中：于 1997 年 4 月 30 日提交的发明名称为“前列腺特异抗原的形式及其检测方法”的 No. 08/846,408，以及于 2002 年 5 月 24 日提交的发明名称为“分析血清中前列腺特异抗原的酶原形式以提高前列腺癌检测的方法”的 No. 08/846,408，相关内容在此以其全文引作参考。

另一形式的游离 PSA 是 BPSA。如本发明所用的术语“BPSA”是指在成熟 PSA 的氨基酸序列的 Lys182 处含有至少一个截断（clip）的 PSA 形式。成熟形式的 PSA 具有 237 个氨基酸残基，其分子量为 28,400 道尔顿[19]，氨基酸序列充分描述在参考文献中[20]。成熟形式的 PSA 的序列示于图 16 中。本发明的 BPSA 在成熟 PSA 的氨基酸序列的 Lys182 处含有至少一个截断。换言之，本发明的 BPSA 与成熟形式的 PSA 具有相同的氨基酸序列，除了本发明的 PSA 的多肽链在残基 182 和 183 之间已被水解之外。本发明 BPSA 还可在成熟 PSA 的氨基酸序列的 Ile1，Lys145 和 Lys146 处另有一个或多个截断。在本发明的一个实施方案中，本发明的 BPSA 由 Lys145 和 Lys182 处的两个截断组成。

BPSA 无活性，即其缺乏胰凝乳蛋白酶样酶活性，并因此以游离 PSA 形式而非以 PSA 抗胰凝乳蛋白酶复合物的形式存在于血清中。BPSA 的详细描述以及制备和检测 BPSA 的方法公开在 1999 年 4 月 30 日提交的发明名称为“特异于良性前列腺增生（BPH）的新型前列腺特异抗原（PSA）及其应用方法”的在审 U.S. 专利申请 No. 09/303,208 中，相关内容在此以其全文引作参考。

如本发明所用的术语“inPSA”包括除了 pPSA 和 BPSA 之外所有形式的游离 PSA。inPSA 为酶法失活游离 PSA 的形式。它表示完整的分子量约 30 kDa 的非天然形式的 PSA。在天然条件下由于内部二硫键内部截短的 PSA 保持完整，这是指在诸如含有 2-巯基乙醇的 SDS-聚丙烯酰胺电泳的还原变性条件下，仍保留分子量约 30 kDa，并且不形成肽片段的 PSA。由于折叠错误，内部二硫键的畸形，侧基酰化，或影响其二级或三级结构的其他因素所导致的结构或构型差异，这种形式的 PSA 可包括酶法失活的 PSA。通过如本发明所述的公知免疫测定，本发明的 inPSA 可不包括任何可检测水平的 pPSA 或 BPSA 形式，但可包括低水平（<10%）的具有除 Lys182 位点之外的内肽键切割的 PSA，并且可包括任意百分比的 PSA，其 N-端或 C-端去除的氨基酸不超过 20 个。因此，本发明的 inPSA 基本上含有完整的非天然 PSA，但不包括 BPSA 和 pPSA。所以，对于本发明而言，inPSA 等于游离 PSA 减 BPSA 和 pPSA。

不带任何前缀的术语“pPSA”总是表示[-2]pPSA，[-4]pPSA 和[-5,-7]pPSA 的总和，其中“pPSA”在数学等式中以 BPSA 或 inPSA 表示。

本发明是基于下列意想不到的发现，血清中 inPSA 的测量改进了癌症预测的值。此外，inPSA 与总 PSA，游离 PSA 以及其他单个形式的游离 PSA，BPSA 和 pPSA 的各种数学组合相对于总 PSA 也改进了对前列腺癌的检测。这包括但不限于 inPSA 减 pPSA，或者 inPSA 除

以 pPSA 的值。pPSA 所示为所有天然和截短形式的 pPSA 的组合。然而，当具体说明时，也可指 inPSA 与单个天然或截短的 pPSA 形式，[-2]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA 和[-7]pPSA 的比例([-5]pPSA 加[-7]pPSA 可以[-5,-7]pPSA 表示，这是因为[-7]pPSA 的试验同样识别[-5]pPSA)。

5 除了 inPSA，这包括 BPSA 和 pPSA 之间的数学关系，诸如 BPSA 减 pPSA。本发明描述了 inPSA, BPSA 和 pPSA 之间非线性和非显而易见的相互作用关系，但是通过实验已经表明提高前列腺癌的检测。因此，通过确定 inPSA, pPSA 和 BPSA 的水平，以及尤其是 inPSA 与 BPSA 和 pPSA 的比例或减/加的差/和，本发明提供了手段帮助检测前列腺

10 癌。

因此，本发明的一个方面提供了帮助区分个体中前列腺癌与良性疾病的方法。所述方法包括下列步骤：

- a) 确定个体生物样品中所含的总 PSA 的量，
- 15 b) 确定同一样品中游离 PSA 的量，并且计算游离 PSA 与总 PSA 的比例，
- c) 确定同一样品中 inPSA 的量，以及
- d) 基于总 PSA 的水平以及游离 PSA 与总 PSA 的比例，通过将 inPSA 的量或者 inPAS 和 BPSA 或 pPSA 的数学组合与用已知癌症和
- 20 良性疾病诊断的对照样品所建立的预定值进行比较，使样品中所含的 inPSA 的量或者 inPAS 和 BPSA 或 pPSA 的数学组合与个体中存在的前列腺癌的存在相关。

测量总 PSA 和游离 PSA 的方法在本领域中是众所周知的，因此

25 在此不再赘述。

inPSA 量的确定可以采用本发明所述或本领域公知或将来开发的方法，只要能够确定除 BPSA 或 pPSA 之外的游离 PSA 的浓度就行。例如，inPSA 可直接或间接加以测量。根据本发明的一个实施方案，

30 inPSA 的测量可通过包括下列步骤的方法进行：向样品中加入足够量

的 BPSA 或 pPSA 的抗体以封闭样品中所含的 BPSA 和 pPSA，以及测量游离 PSA 的量，其等于 inPSA 的量。对于本发明而言，如果抗体可以结合全部样品中所含的相应 BPSA 或 pPSA，并且封闭 BPSA 和 pPSA 与游离 PSA 的抗体的结合，则抗体的量是足够的。如果 BPSA 或 pPSA 不可结合到游离 PSA 的抗体，则它们被封闭。

根据本发明的另一实施方案，样品中所含的 inPSA 可通过从样品中所含的游离 PSA 的量减去 BPSA 和 pPSA 的量而进行计算。该方法要求分别测量样品中所含的游离 PSA，pPSA 和 BPSA 的量。然后，从游离 PSA 中减去 BPSA 和 pPSA 的值以确定 inPSA 的量。

根据本发明的实施方案，pPSA 或 BPSA 或游离 PSA 的测量可通过免疫测定方法进行，并且用于计算 inPSA。游离 PSA 试验可从市场上获得，并且在本领域是众所周知的。可用于测量 pPSA 的量的抗体和免疫测定描述在在审 U.S. 申请 No. 09/251,686，09/302,965，09,792,692；和 09,792,534 中，内容在此以其全文引作参考。可用于测量 BPSA 的量的抗体和免疫测定描述在最近授权的专利，U.S. 申请 No. 09/303,208 中，内容在此以其全文引作参考。可用于测量 BPSA 和 pPSA 的量的抗体和免疫测定以及利用这些测量因子以相互之间的比例检测前列腺癌的方法描述在最近授权的专利，U.S. 申请 No. 09/303,339 中，内容在此以其全文引作参考。

根据本发明的一个实施方案，生物样品中所含的 inPSA 的量的计算方法可包括下列步骤：将特异性与目的 PSA 结合的抗体与样品在允许形成含有 PSA 和抗体的二元复合物的条件下接触；(b) 检测和确定复合物的量，以及 (c) 从游离 PSA 的量中减去 pPSA 和 BPSA 的量确定 inPSA 的量。

对于本发明而言，能够与 pPSA，BPSA 或游离 PSA 形成可检测的复合物的任何因子可视为抗体的等同物。潜在的分子种类的例子包

括但不限于抗体，衍生自抗体的抗原结合片段，以及抗体的等同物，诸如但不限于适体（aptamer）等。对于本发明而言，采用本领域公知的方法，可选择特异于 pPSA 或 BPSA 或游离 PSA 的因子。例如，任何公知结合试验可用来确定任何给定因子的特异性结合活性。

5

通常，样品中要求计算本发明 inPSA 的任何形式的 PSA 的定性和/或定量确定都可通过竞争或非竞争性免疫测定步骤以直接或间接方式完成。这种免疫测定的例子有放射性免疫测定（RIA）和夹心（免疫测定（immunometric assay））试验。利用本发明的单克隆抗体检测抗原可以通过以正向，反向或双向的方式运行的免疫测定，包括对生理学样品进行的免疫组织化学试验来实施。本领域的专业技术人员会知道，或者可容易地辨别其他免疫测定方式而无需过多的实验。

术语“免疫测定试验”或“夹心免疫测定”包括双向夹心，正向夹心以及反向夹心的免疫测定。这些术语为本领域专业技术人员所熟知。本领域的专业人员还会意识到，本发明的抗体在试验的其他变体和形式中将是有用的，这些变体和形式无论是当今公知的还是将来有待开发的，都欲包括在本发明的范围内。

对于本发明而言，生物样品可以是含有本发明的 inPSA 的人生理流体样品。人生理流体样品的例子包括但不限于血清，精液，尿和血浆，尽管血清和血浆是优选的。此外，单克隆和多克隆抗体均可使用，只要这种抗体对本发明所提供的抗原具有必要的特异性。优选的是采用单克隆抗体。

25

根据本发明的实施方案，免疫测定包括特异于[-2]pPSA，[-4]pPSA 和[-5,-7]pPSA 的试验。例如，在患有已知前列腺癌或 BPH 的男人的血清中测量特异形式的 pPSA，以及这些分析物的水平与 inPSA 一起用来开发算法以区分前列腺癌和良性前列腺病。本发明的试验可用来帮助区分前列腺癌和良性前列腺增生。

30

本发明令人惊奇地发现，当分析含有 2-10 ng/ml 总 PSA 的血清样本时，inPSA 具有显著升高的癌症指示值。此外，inPSA 与其他形式的总 PSA，游离 PSA，BPSA 和 pPSA 一起的各种数学算法也改进了前列腺癌的检测。对于本发明而言，术语“数学组合”是指但不限于加，减，除及其组合。例如，数学组合可包括 inPSA 减 pPSA，或 inPSA 除以 pPSA 的值。在此情形下，pPSA 可以是所有天然和截短形式的 pPSA 或单个[-2]，[-4]和[-5,-7]pPSA 形式的组合。除了 inPSA，这还包括 BPSA 和 pPSA 之间的数学关系，诸如 BPSA 减 pPSA。本发明描述了非线性和非显而易见的 3 种单个形式的游离 PSA 之间的关系，所述 3 种单个形式的游离 PSA，即 inPSA，BPSA 和 pPSA，构成了总游离 PSA。这种关系是通过实验发现的。因此，通过确定 inPSA，pPSA 和 BPSA 的水平，尤其通过 inPSA 与 BPSA 和 pPSA 的比例或其差值，本发明提供了手段帮助检测前列腺癌。

在游离 PSA%高度升高的特定亚群的总 PSA 中，inPSA 除以 pPSA 以及 inPSA 减 pPSA 也具有显著提高的癌症指示值。inPSA 和 pPSA 之间的关系在游离 PSA%大于 20%，尤其大于 25%的男人中提高了癌症的检测。

根据本发明的实施方案，总 PSA 可以是低于 20 ng/ml 的任意浓度，或更优选低于 10 ng/ml，或最优选在 2.5-10 ng/ml 的范围。在一个优选的实施方案中，总 PSA 介于 2.5-4 ng/ml。在另一优选的实施方案中，总 PSA 介于 4-10 ng/ml。游离 PSA 与总 PSA 的比例可以是通常在患者血清中发现的游离 PSA 的任意范围 1-50%，尽管在本发明的一个实施方案中，游离 PSA 优选的范围大于 20%，而最优选地大于 25%。在特殊的实施方案中，总 PSA 介于 4-10 ng/ml，而游离 PSA 的比例大于 20%，或 25%的范围。pPSA 可以是[-2]pPSA，[-4]pPSA，[-5,-7]pPSA 或这三种形式的天然和截短的 pPSA 的总和，以 pPSA 表示。inPSA 可以优选表示成血清中 ng/ml 的 inPSA，inPSA 除以 pPSA，或

inPSA 减 pPSA。样品可以是任何生理流体，尽管血清或血浆是优选的。

5 对于本发明而言，在患者样品中检测的单独 inPSA 的量及其与总 PSA 和游离 PSA，pPSA 和 BPSA 的组合可以以任何生成诊断值用于确定前列腺癌存在的方式与前列腺癌的存在相关。根据本发明的实施方案，将 inPSA 的量或其与总 PSA，游离 PSA，BPSA 或 pPSA 数学组合与预定值比较用于确定前列腺癌的存在。鉴于本发明的教导，本领域专业技术人员通过常规实验可容易地确定“预定的界限值”（或
10 阈值）或其他对在确定前列腺癌的存在中使用 inPSA 的水平所必需的分析参数。例如，可在诊断有前列腺癌的个体与没患有前列腺癌或 BPH 的个体中比较上述 inPSA 的比例，以确定界限值。接受者操作特征（ROC）分析可以以要求的特异性和灵敏度用来确定界限值。ROC 分析在本领域中是公知的，并且详细描述在参考文献 22（22）中，相关内容在此以其全文引作参考。然后，样品中 inPSA 的量或其数学组合
15 可与预定的界限值进行比较，以确定个体中前列腺癌的存在，如同从 ROC 分析中确定的一样，其中较高或较低水平的 inPSA 或其与其他 PSA 形式的数学组合可以指示前列腺癌。根据本发明的教导，本领域技术人员基于 ROC 分析能够确定，较高或较低水平是否指示前列腺癌。以要求的特异性和灵敏度确定界限值的这种方法和其他方法在本
20 领域是众所周知的，无需在此重复（23-29）。

参照下列实施例进一步对本发明加以描述。

实施例 1

25 分析患有癌症和良性疾病的男人的含有总 PSA 为 4-10 ng/ml 的血清

材料和方法

开发针对 BPSA 和 pPSA 的单克隆抗体（mAbs）

30 针对[-2]pPSA，[-4]pPSA，[-5,-7]pPSA 和 BPSA 的单克隆抗体在先已经描述[12-16]。[-7]pPSA mAb 也识别[-5]pPSA 形式的 pPSA。对

于这些实施例而言，无论什么情况下，术语[-7]pPSA 表示[-5]加[-7]pPSA。术语 pPSA 表示[-2]加[-4]加[-5]加[-7]pPSA。

免疫测定 PSA

5 PSA 在血清和纯化的制剂中的浓度通过 Tandem®-MP PSA 和 Tandem®-MP 游离 PSA 试验（Hybritech Incorporated, San Diego, CA; Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA）确定。

免疫测定[-2]，[-4]和[-5,-7]pPSA

10 本发明人已经开发了如下用于测量 pPSA 形式的免疫测定。将 50 ul 生物素酰化的抗 PSA Ab PSM 773 的 Tandem® PSA 零 cal 稀释剂（5 ug/ml）加入 EG&G Wallac 链亲和素包被的微滴定板，并且在室温下振荡反应 1 小时。然后，用 Tandem® E 洗涤液洗涤板 5 次。接着将 50 ul 的 Tandem® PSA 零 cal 稀释剂加入板中，随后加入 50 ul 的待测血清或抗原。如上让混合物室温下反应 2 小时。用 Tandem® E 洗涤液洗涤板 5 次。向板中加入 100 ul 合适的钬标记的检测 mAb 的 ImA 溶液，用于测量各种形式的 pPSA。对于[-2]pPSA，检测 mAb 为 PS2X373；对于[-4]pPSA，为 PS2V 411；以及对于[-5,-7]pPSA，为 PS2P309。如上使混合物室温下反应 1 小时。然后用 Tandem® E 洗涤液洗涤板 5 次，
15 并且在 EG&G Wallac Victor 仪上读数。
20

免疫测定 BPSA

 BPSA 试验方案如下。将生物素酰化的捕获抗 PSA mAb, PSM773（100 uL, 0.25 mg/L）振荡下在链亲和素微滴定板中温育 1 小时。板
25 用封闭缓冲液（50 uL）洗涤，接着加入 50 uL 校准品或样品，并且振荡下温育 2 小时。洗涤板，加入碱性磷酸酶标记的抗 BPSA mAb PS2E290（100 uL, 2 ug/ml），并且振荡下温育 1 小时。洗涤板，加入 100 uL 的 4-甲基伞形酮酰磷酸盐，并且振荡下温育 5 分钟。然后，在 5, 60 和 120 分钟对板进行读数。采用 1234 Delfia 研究荧光计（Wallac, EG&G）测量相对荧光。
30

接受者操作特征（ROC）曲线分析

采用 MedCalc 软件程序（MedCalc Software, Belgium, (info@medcalc.be)）生成 ROC 分析和图。理论和实践描述在：Zwieg 和 Campbell, 接受者操作特征（ROC）：临床医学中的基本评价工具（a fundamental evaluation tool in clinical medicine），Clinical Chemistry, 39, 561-577, 1993。

结果

单个游离 PSA 形式, BPSA, pPSA 和 inPSA 在总 PSA 为 4-10 ng/ml 的癌症血清中的典型平均比例示于图 1 中。单个 pPSA 和 BPSA 样品的范围为从 0 到大于 70% 的游离 PSA。这表明单个游离 PSA 形式可分别表示显著和可变百分比的游离 PSA，并且支持的数据显示 inPSA 单独及其与 BPSA 和 pPSA 组合代表了独特的血清图，所述血清图可改进癌症血清的检测。采用近 1100 个诊断有癌症或良性疾病、总 PSA 范围为 2-10 ng/ml 的血清样品，进行 ROC 曲线和分析。对各个样品测量游离 PSA 值。测量各个样品中的 BPSA 以及单个 pPSA 形式，[-2]pPSA，[-4]pPSA，和[-5,-7]pPSA。除非另有所指，pPSA 表示所有 3 种 pPSA 形式的总和。inPSA 计算成游离 PSA 减 BPSA 和 pPSA。

20

为了生成 ROC 曲线分析，将各个 PSA 异型的值输入 MedCalc 程序。ROC 是统计学方法，其对一群中的各个样品赋予癌症的阳性和阴性预测值，并且是最广泛使用的方法以评价作为癌症预测器的 PSA 以及游离 PSA 试验的值和性能。以最简单的术语，对于各个 ROC 分析曲线下面积 AUC 用于评价试验预测值。较高的 AUC 值指示更好的总预测值。ROC 值范围从 0.5（随机机会上没有改进）到 1.0（100% 预测值的完全试验）。ROC 曲线的内标如下：T=总 PSA，F=游离 PSA，i=inPSA，B=BPSA，P=pPSA，2p=[-2]pPSA。例如，在等式中，(i-P)/T 等于 inPSA 减 pPSA 后除以总 PSA。

25

在大多数情况下，ROC 分析的目的是使辨别患有癌症的男人的最大化，以及使那些没患有癌症，即假阳性的男人的活检最小化。当分析诸如血清中 PSA 的生物样品时，在真阳性和假阳性的检测之间存在平衡。例如，取决于所需的结果，最期望的是检测 95% 的癌症，而对那些患有良性疾病的男人，这不可避免地伴随着较高的假阳性率。在游离 PSA% 的情形下，例如，为了检测 95% 的癌症，它要求对游离 PSA 小于 25% 的所有男人进行活检。然而，这却伴随着 80% 的假阳性率。这些假设的例子表示 ROC 分析的评价和值不是绝对的，并且在本发明采用 inPSA 的情形下，将需要常规试验以建立有待在实践中使用的真正参数。但是，鉴于本发明的教导，本领域技术人员应该能够容易地确定必要的参数，而无需过多的试验。下文给出的实施例表明在以给定组的标准检测给定群体中癌症的情形下，inPSA，inPSA 与 pPSA 和 BPSA 的组合以及 pPSA 与 BPSA 的组合的值和功效，但是这些参数的用途和界限不限于这些实施例。

图 2 示出了总 PSA，inPSA，BPSA 和游离 PSA 在血清中的 ROC 曲线的覆盖图，以 ng/ml 表示。inPSA 具有最高的曲线下面积 (AUC)，这表明 inPSA 比其他参数更好地地区分癌症和良性疾病。在 PSA 测试的领域中，已知游离 PSA% 在总 PSA 为 4-10 ng/ml 的早期癌症检测范围中，与单独总 PSA 比较，改进癌症检测。游离 PSA%，即 F/T 已表明是癌症测试的最好的诊断用 PSA，并可被视为判断新测试的标准。图 3 示出了 %inPSA (inPSA/总 PSA) 优于游离 PSA%。图 4 示出了以与游离 PSA 的比例表示的 inPSA 可比得上以与总 PSA 的比例表示的游离 PSA。这些例子示出了 inPSA 和以与游离或总 PSA 的比例表示的 inPSA 同单独总 PSA 或游离 PSA 相比，给出的癌症检测是优良的。

图 5-8 示出了 inPSA 与其他游离形式的 PSA 的各种数学组合甚至比单独 inPSA 可提高癌症检测。图 5 示出了 inPSA/pPSA 可比得上单独 inPSA，但是好于游离 PSA。图 6 示出了 inPSA，pPSA 和 BPSA 相互之间的各种可能的组合。BPSA 加 inPSA 给出了最好的 AUC，因

而是最好的癌症检测。在这些组合中，pPSA 加 inPSA 效果稍差，而 pPSA 加 BPSA 效果最差。图 7 示出了 pPSA，BPSA 和 inPSA 之间相减的各种可能的组合。由这些数学组合获得的值通过任何试验方法本身不能被推知或测量。所有组合都给出了显著的 AUC，从而相对于游离或总 PSA 提高了癌症检测。图 8 示出了 inPSA 减 pPSA 后与游离和总 PSA 各种更多的比例。利用以与总 PSA 的比例表示的 inPSA 减 pPSA，相对于仅仅是 inPSA 减 pPSA 提高了 ROC。图 5-8 中各个 ROC 实施例表明，inPSA，pPSA 和 BPSA 的多种组合和比例在 ROC 分析中提供了显著的 AUC，并且相对于单独的游离和总 PSA 可提高癌症的检测。

图 9 示出了利用 inPSA 提高癌症检测的另一实施例。在这种情形下，本发明人对患有前列腺癌和游离 PSA%升高的男人进行了检查。在该图中，只分析了游离 PSA%大于 25%的男人。在真正随机筛选的群体中，游离 PSA 大于 25%的男人建议不对癌症进行活检，这是因为癌症发现的可能性只有大约 8%。因此，在正常环境下，由于在该组中常规血检不能预测癌症，这组男人中的癌症往往保持不被检测。图 9 示出了在这组中 inPSA/总 PSA 和 inPSA/[-2]pPSA 对癌症具有高度增强的预测值。在特定范围或界限的游离 PSA%中，inPSA 会显示出选择的癌症预测，这是未预料到的。

实施例 II

分析患有癌症和良性疾病的男人的含有总 PSA 为 2.5-4 ng/ml 的血清

如实施例 1 一样，在这群总 PSA 值为 2.5-4 ng/ml 的患者中，测量了同样系列的 PSA 试验。2.5-4 g/ml 的范围为一区域，其中在随机筛选的群体中存在许多癌症，但出现机会低于 4-10 ng/ml 的患者。总 PSA 在此范围不会区分癌症，目前试图用 %F 来提高该范围中的癌症检测尚未显示出诊断价值。

图 10 和 11 示出了在范围为 2.5-4 ng/ml 中，inPSA 比游离形式的

PSA 是更好的前列腺癌的预测器。在图 10 中, inPSA/pPSA 和 inPSA 减 pPSA 给出了相似的 AUC, 得到癌症的阳性区分, 而 F/T 几乎没有给出癌症的区分。在图 11 中, inPSA/[-2]pPSA 也给出了阳性癌症区分, 但游离 PSA 给出很小或没有癌症区分。

5

这些实施例示出, 当总 PSA 低于 4 ng/ml 时, inPSA 也给出了阳性前列腺癌区分, 而正常参数的游离和总 PSA 不能区分癌症和良性疾病。

10 实施例 III

分析患有癌症和良性疾病的男人的含有总 PSA 为 2.5-10 ng/ml 的血清

目前用于早期诊断前列腺癌的 PSA 范围为 4-10 ng/ml。PSA 在此范围内的男人建议接受活检以确定是否存在癌症。对是否将 PSA 界限降低至 4 ng/ml 以下, 有可能低至 2.5 ng/ml, 在临床文献中还有争论。在这种情形下, 目前的诊断 PSA 和游离 PSA 会用于推荐活检, 除非有其他改进的测试可用。

图 12 和 13 示出了在 2.5-10 ng/ml 的整个范围, 相对于当前的试验, inPSA 可用于提高癌症检测。在图 12 中, 相对于 F/T PSA, inPSA/pPSA 提高了癌症检测。在图 13 中, 与 F/T PSA 比较, inPSA 减 pPSA 给出了甚至更好的改进。由于 F/T PSA 是如今所用的最好的 PSA 诊断标记, 因此这说明 inPSA 对癌症辨别具有显著的潜力。

25 实施例 IV

纯化 inPSA 以及制备 inPSA 抗体的方法

方法 1: 在用血清体外温育精浆后纯化 inPSA

10 ml 精浆与 50 ml 雌性血清混合, 并在 37°C 下温育 3 小时。用 PBS (磷酸盐缓冲液, pH 7) 以 1:2 稀释此混合物, 0.2 μ m 滤膜过滤, 并施加到含有单克隆抗体 mAb PSM773 的免疫亲和柱上。PSM773 先

30

前已经证明可结合所有形式的游离 PSA 以及与 ACT 复合的 PSA。然后将洗脱自免疫亲和柱的 PSA 施加到 S12 大小排阻层析柱，收集以约 33kDa 洗脱的游离 PSA。纯化的失活 PSA 透析到组成为 25 mM Mes (2-[N-吗啉]乙烷磺酸) 和 40%乙腈 pH 5.6 (缓冲液 A) 的缓冲液中，并且施加到平衡在缓冲液 A 中的 0.8×5 cm MA7S 阳离子交换柱 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。PSA 形式采用图 14 所示的梯度以组成为 400 mM 乙酸钠，40%乙腈，pH 7.0 的缓冲液 B 洗脱。收集图 14 中的峰，对 PBS 透析，浓缩，并在 2-巯基乙醇的还原条件下施加到 4-18%梯度聚丙烯酰胺凝胶上。蛋白在标准条件下用考马斯亮兰染色。

方法 II: 在用血清体外温育精浆后免疫亲和纯化 inPSA

10 ml 精浆与 50 ml 雌性血清混合，并在 37°C 下温育 3 小时。用 PBS (磷酸盐缓冲液，pH 7) 以 1:2 稀释此混合物，0.2 μm 滤膜过滤，并施加到含有单克隆抗体 mAb PSM773 的免疫亲和柱上。PSM773 先前已经证明可结合所有形式的游离 PSA 以及与 ACT 复合的 PSA。然后将洗脱自免疫亲和柱的 PSA 施加到 S12 大小排阻层析柱，和收集以约 33kDa 洗脱的游离 PSA。纯化的失活 PSA 对 PBS 透析，并且施加到含有选自下列抗体的组合的免疫亲和柱：PS2P309，PS2P446，PS2X094，PS2X373，PS2V411 和 PS2V476 以去除这些 pPSA 形式的 PSA。穿过峰施加到含有 mAbs PS2E290 和/或 PS2E055 的免疫亲和柱上以去除溶液中的 BPSA。此时的穿过峰含有 inPSA，即为不含 BPSA 和 pPSA 的游离 PSA。

针对 inPSA 的单克隆抗体的制备

可将纯化的 inPSA 注射到小鼠中，腹水中产生的抗体采用组织培养和筛选的标准技术[21]测试其对 inPSA 的反应性。这包括抗原免疫耐受作用 (tolerization) 和在 inPSA 上采用抗 PSA 封闭抗体以使对显性 PSA 表位的反应最小化的技术。对于筛选而言，抗体可对释放自 PSA-ACT 的 PSA 加以筛选。已知活性天然的 PSA 经温和化学处理可

释放自 PSA-ACT 复合物，以及这种 PSA 与精浆 PSA 在所有方面都显示正常[8]。用于筛选 inPSA 的活性 PSA 将挑选识别 inPSA 特性的抗体，所述特性不同于活性 PSA 的特性。

5 讨论

这些实施例表明，inPSA 异型的游离 PSA 与游离 PSA 相比担当独立的癌症检测用标记。这在如今诊断用 PSA 的整个目的范围 2.5-10 ng/ml 是真实的。采用 inPSA 的这些发现延伸了目前对游离 PSA 形式的理解。本发明人先前于 1999 年 4 月 30 日提交的在审 U.S.专利申请 No. 09/302,965(其是 1999 年 2 月 17 日提交的 U.S.申请 No. 09/251,686 的部分继续申请，后者又是 1997 年 4 月 30 日提交的 U.S.申请 No. 08/846,408 的继续申请)中已经显示 pPSA 形式提高了患者群体中的癌症检测。本发明人的下列主题已被授予专利权：BPSA (U.S.申请 No. 09/303,208) 以及 BPSA 与 pPSA 的比例以提高癌症检测 (U.S.申请 No. 15 09/303,339)，内容在此以其全文引作参考。

尽管本发明人最初考虑 BPSA 和 pPSA 对提供癌症检测具有特异性，但是预料之外的是血清中剩余的游离 PSA——inPSA 显示了独立的诊断特性。利用 BPSA, pPSA 和 inPSA 的各种算法提高了癌症检测，20 这一发现只是在本发明人已经用 BPSA 和 pPSA 试验测量了足够的癌症和良性样品并且分析数据后才变成明显的。因此，在最终的分析中，单个形式的 pPSA, BPSA 和 inPSA, 无论是单个还是彼此之间的组合，与总 PSA 和游离 PSA 比较都显示前列腺癌检测显著提高。

25 这些新的发现暗示了血清中 pPSA, BPSA 和 inPSA 之间的复杂关系。为了提高癌症检测和减少不必要的活检，在早期诊断范围为 2-10 ng/ml PSA 时，可应用 inPSA 的确定。结果中给出的实施例表明 inPSA 以及 inPSA 与 pPSA 和 BPSA 的组合对前列腺癌检测的实用性，并且提示除了这些实施例以外的某些相关实施例并不意味着限制其他潜在的30 不同范围的 PSA, 游离 PSA%或者 pPSA, BPSA 和 inPSA 的组合的

应用。

参考文献

1. Catalona, W.J., Smith, D.S., Ratliff, T.L., Dodds, K.M., Coplen, D.E., Yuan, J.J.等, 测量血清中的前列腺特异抗原作为前列腺癌的筛选测试 (Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer), *N Engl J Med*, 1991; 324: 1156-61。
5
2. Labrie, F., Dupont, A., Suburu, R., Cusan, L., Tremblay, Ai., Gomez, J.L., Emond, J.血清前列腺特异抗原作为前列腺癌的筛选前测试 (Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate cancer), *J Urol*, 1992; 147: 846-51。
10
3. Oesterling, J.E.前列腺特异抗原: 临界评价最有用的针对前列腺腺癌的肿瘤标记 (Prostate-specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate), *J Urol*, 1991; 145: 907-23。
15
4. Lilja, H., Christensson, A., Dahlen, U., Matikainen, M.T., Nilsson, O., Pettersson, K., Lovgren, T.血清中的前列腺特异抗原主要以与 α 1-抗胰凝乳蛋白酶的复合物出现 (Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α 1-antichymotrypsin), *Clin Chem*, 1991; 37: 1618-25。
20
5. Stenman, U.H., Leinonen, J., Alfthan, H., Rannikko, S., Tuhkanen, K., Alfthan, O.前列腺特异抗原与 α 1-抗胰凝乳蛋白酶的复合物是患有前列腺癌的患者血清中主要形式的前列腺特异抗原: 复合物的试验提高了癌症的临床灵敏度 (A complex between prostate specific antigen and A.L- antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer), *Cancer Res*, 1991; 51: 222-6。
25
6. Catalona, W.J., Partin, A.W., Slawin, K.M., Brawer, M.K., Flanigan, R.C., Patel, A.等, 利用游离前列腺特异抗原的百分比以增强前列腺癌与良性前列腺疾病的区分: 未来的多中心临床试验 (Use of the
30

percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial), JAMA, 1998 ; 279: 1542-7。

5 7. Woodrum, D.L., Brawer, M.K., Partin, A.W., Catalona, W.J., Southwick, P.C.游离前列腺特异抗原临床研究对检测前列腺癌的解释 (Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer), J Urol, 1998; 159: 5-12。

10 8. Peter, J., Unverzagt, C., Hoesel, W.化学释放自与 α 1-抗胰凝乳蛋白酶的复合物 (PSA-ACT) 后的游离前列腺特异抗原 (PSA) 的分析 (Analysis of free prostate-specific antigen (psa) after chemical release from the complex with alpha (1)- antichymotrypsin (PSA-ACT)), Clin Chem, 2000 ; 46: 474-82。

15 9. Chen, Z., Chen, H., Stamey, T.A.良性前列腺增生中的前列腺特异抗原: 纯化和表征 (Prostate specific antigen in benign prostatic hyperplasia: purification and characterization), J Urol, 1997; 157: 2166-70。

20 10. Zhang, W.M., Leinonen, J., Kalkkinen, N., Dowell, B., Stenman, U.H.人精液中不同分子形式的前列腺特异抗原的纯化和表征 (Purification and characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid), Clin Chem, 1995; 41: 1567-73。

25 11. Mikolajczyk, S.D., Grauer, L.S., Millar, L.S., Hill, T.A., Kumar, A. Rittenhouse, H.G.等, 前体形式的 PSA (pPSA) 是游离 PSA 在前列腺癌血清中的组分 (A precursor form OF PSA (PPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum), Urol, 1997; 50: 710-4。

30 12. Mikolajczyk, S.D., Millar, L.S., Wang, T.J., Rittenhouse, H.G., Marks, L.S., Song, W.等, 前体形式的前列腺特异抗原与良性过渡区前列腺组织比较在前列腺癌中是更高度升高的 (A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue), Cancer Res, 2000;

60 : 756-9。

13. Mikolajczyk, S.D., Marker, K.M., Millar, L.S., Kumar, A., Saedi, Ni.S., Payne, J.K.等, 截短的前体形式的前列腺特异抗原是前列腺癌更特异的血清标记 (A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer), Cancer Res, 2001; 61: 6958-63。

14. Mikolajczyk, S.D., Millar, L.S., Wang, T.J., Rittenhouse, H.G., Wolfert, R.L., Marks, L.S.等, 一种特异分子形式的游离前列腺特异抗原 "BPSA" 主要发现在患有结节状良性前列腺增生的患者的过渡区中 ("BPSA," a specific molecular form of free prostate-specific antigen, is found predominantly in the transition zone of patients with nodular benign prostatic hyperplasia), Urol, 2000; 55: 41-5。

15. Mikolajczyk, S.D., Millar, L.S., Marker, K.M., Wang, T.J., Rittenhouse, H.G., Marks, L.S., Slawin, K.M.精浆含有 "BPSA", 一种与良性前列腺增生相关的分子形式的前列腺特异抗原 (Seminal plasma contains "bpsa", a molecular form of prostate specific antigen that is associated with benign prostatic hyperplasia), Prostate, 2000; 45: 271-6。

16. Mikolajczyk, S.D., Marks, L.S., Partin, A.W., Rittenhouse, H.G. 血清中的游离前列腺特异抗原正变得更为复杂 (Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex), Urol, 2002; 59: 797-802。

17. Nurmikko, P., Vaisanen, V., Piironen, T., Lindgren, S., Lilja, H., Pettersson, K.生产和表征不检测内部切割的 Lys145-Lys146 失活 PSA 的新型抗前列腺特异抗原(PSA)单克隆抗体[在方法引用中](Production and characterization of novel anti-prostate-specific antigen (PSA) monoclonal antibodies that do not detect internally cleaved Lys145-Lys146 inactive PSA [In Process Citation]), Clin Chem, 2000; 46: 1610-8。

18. Kumar, A., Mikolajczyk, S.D., Goel, A.S., Millar, L.S., Saedi, M.S.通过哺乳动物细胞表达前体形式的前列腺特异抗原并且由人激肽释放酶 2 转化为成熟的活性形式 (Expression of pro form of Prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active

form by human kallikrein 2), *Cancer Res*, 1997; 57: 3111-4。

19. Stamey, T.A., Teplow, D.B., Graves, H.C.B.采用不同方法识别自精液中纯化的 PSA: 通过氨基酸分析和分配的消光系数进行比较 (Identity of psa purified from seminal fluid by different methods: comparison by amino acid analysis and assigned extinction coefficients), *Prostate*, 1995; 27: 198- 203。

20. Bridon, D, Dowell, B.利用分子模型对前列腺特异抗原和人腺状激肽释放酶进行结构比较 (Structural comparison of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein using molecular modeling), *Urol*, 1995; 45: 801-6。

21. Knott, C.L., Kuus-Reichel, K., Liu, R.S., 和 Wolfert, R.L.诊断试验用抗体的开发 (DEVELOPMENT of antibodies for diagnostic assays), 免疫试验的原理和实践 (Principles and Practice of Inimunoassay), Price, C. P.和 Newman, D.J. 37-64. 1997. New York. NY, Stockton Press. Ref Type : Serial (书, 专论)。

22. Dawson, J.M. 1999.临床试验: 分析和呈递。在第 26 届医学诊断制造商协会年会上的发言 (Clinical Trials: Analysis and Presentation, Presented at the 26TH Annual Meeting of the Association of Medical Diagnostics Manufacturers), 可获自 <http://WWW.amdm.or/AMDM/NewsletterV12-2-2.html>。

23. Linnet, K. 1999.对基于回归分析的方法比较研究所必需的样品大小 (Necessary sample size for method comparison studies based on regression analysis), *Clin. Chem.*, 45: 882-94。

24. Bland, J.M., Altman, D.G. 1986.用于评价两种临床测量方法之间一致性的统计学方法 (Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement), *Lancet*, i: 307-10。

25. Reid, M.C., Lachs, M.S., Feinstein A.R. 1995.方法学标准在诊断测试研究中的应用正变得更好但仍然不是最好 (Use of methodologic standards in diagnostic test research. Getting better but still not good), *JAMA*, 274: 645-51。

26. Krouwer, J.S. 累积分布分析图——ROC 曲线的替代
(Cumulative distribution analysis graphs-an alternative to ROC curves
[Tech Brief]), Clin. Chem., 33: 2305-6。

5 27. Albert, A. 1982.有关使用和计算临床化学中的可能性比例 (On
the use and computation of likelihood ratios in clinical chemistry), Clin.
Chem., 28: 1113-9。

28. Solberg, H.E. 1978.判别式分析 (Discriminant analysis), Crit.
Rev. Clin. Lab. Sci., 9: 209-42。

10 29. Matthews, J.N.S., Altman, D.G., Campbell, M.J., Royston, P.
1990. 医学研究中系列测量的分析 (Analysis of serial measurements in
medical research), Br. Med. J., 300: 230-5。

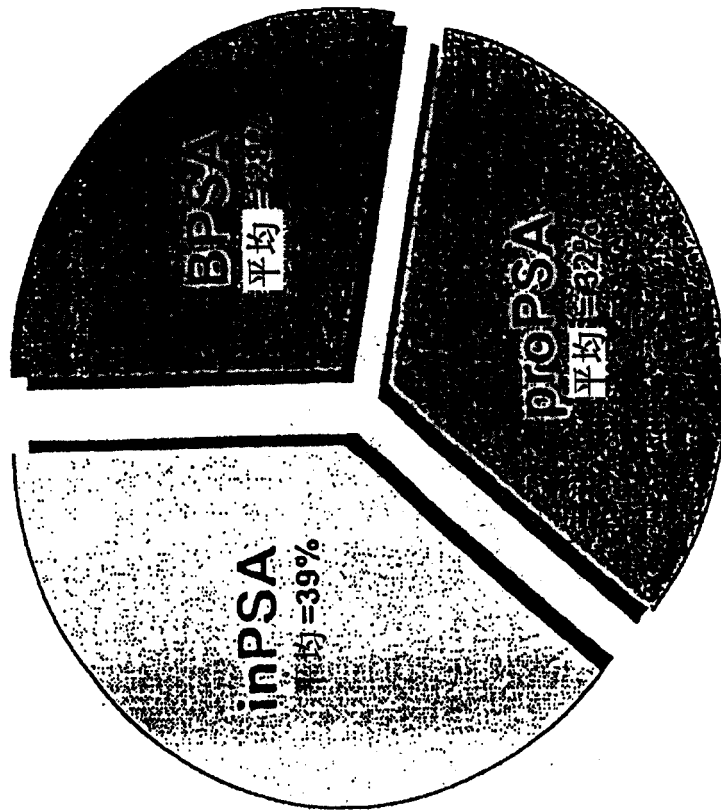


图1

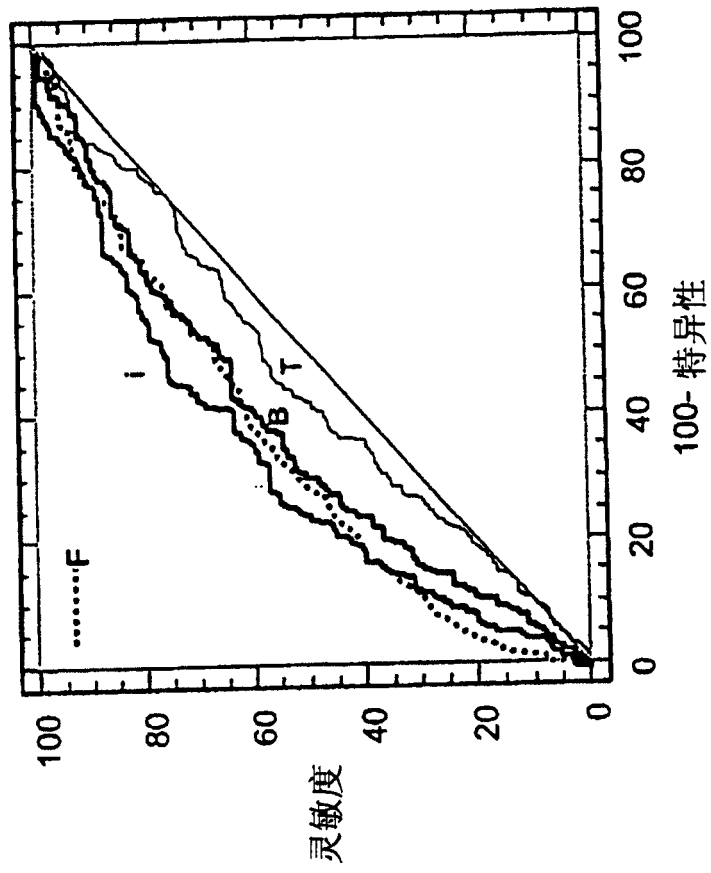
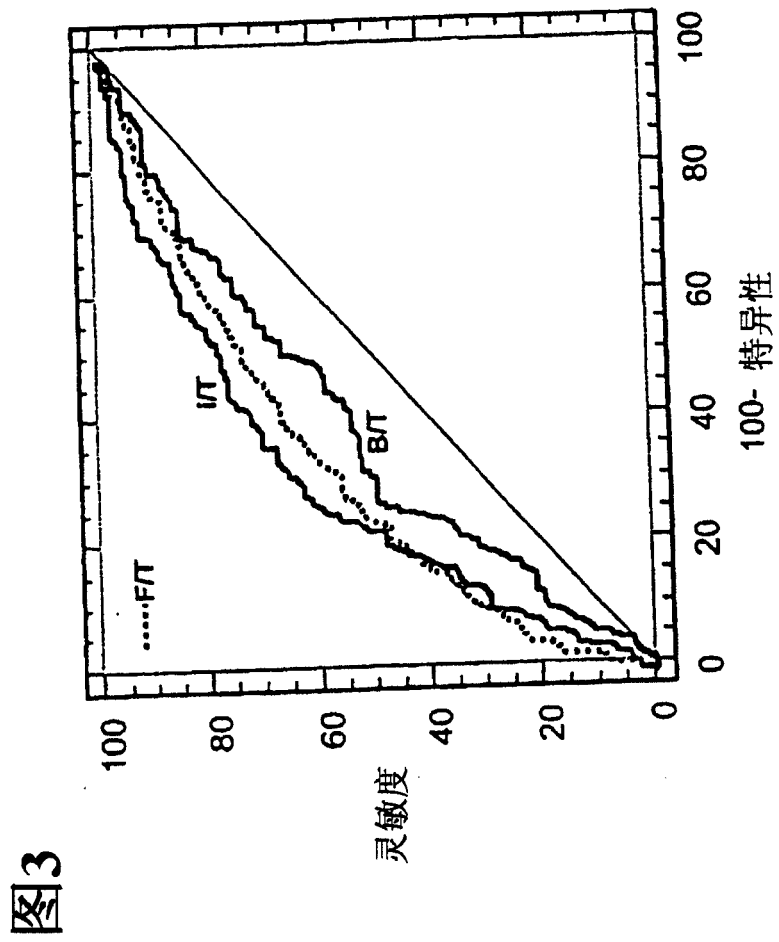
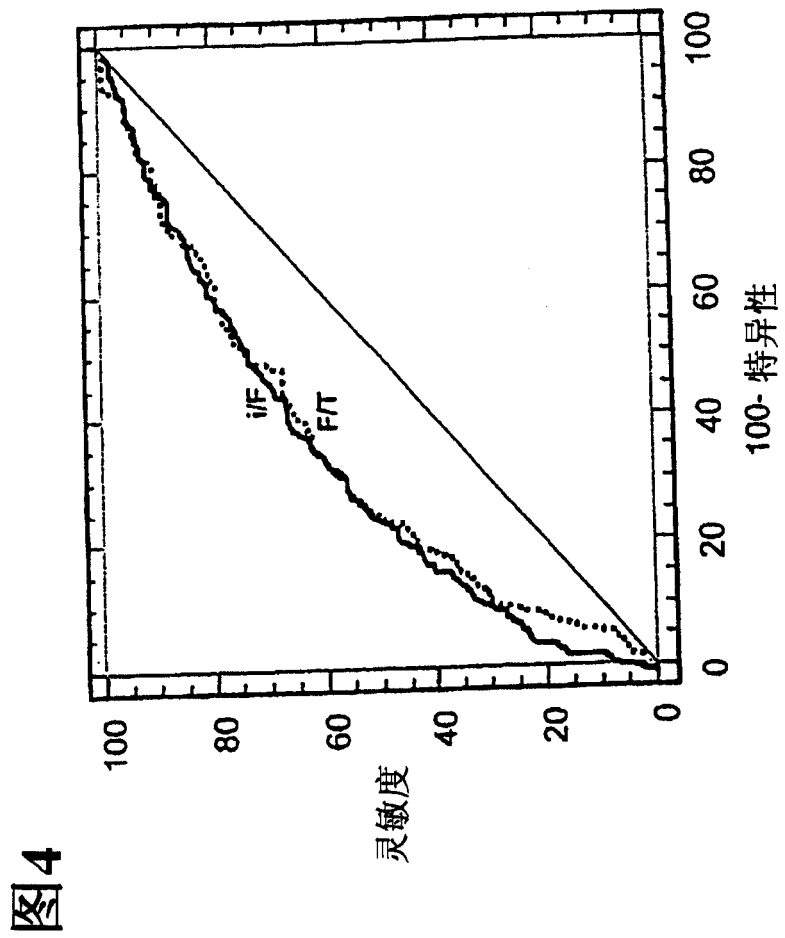
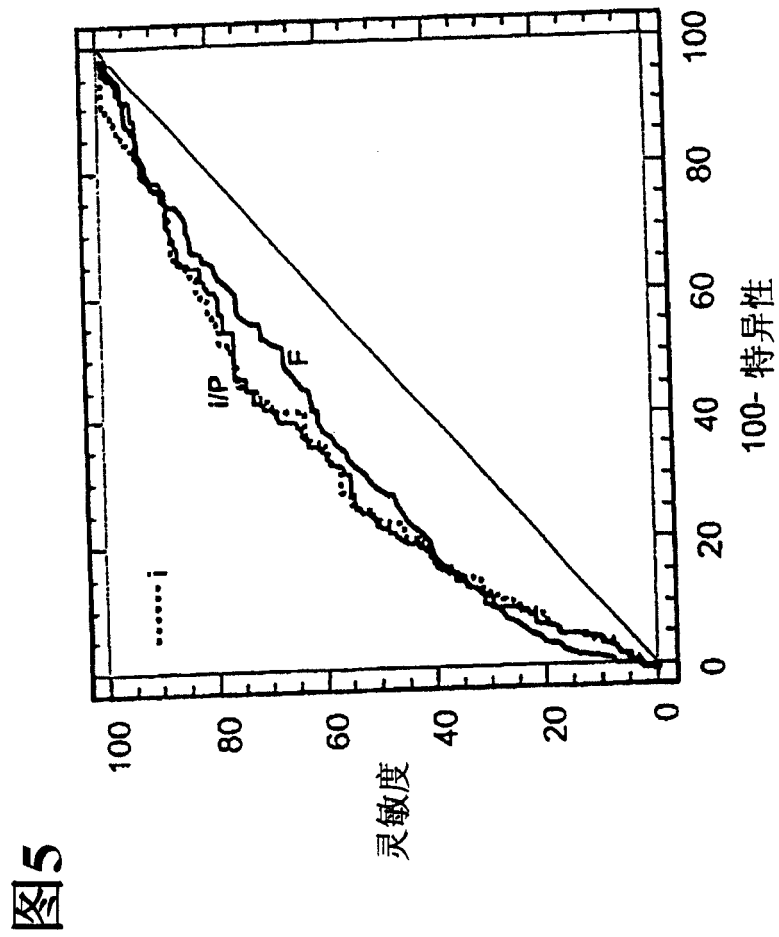
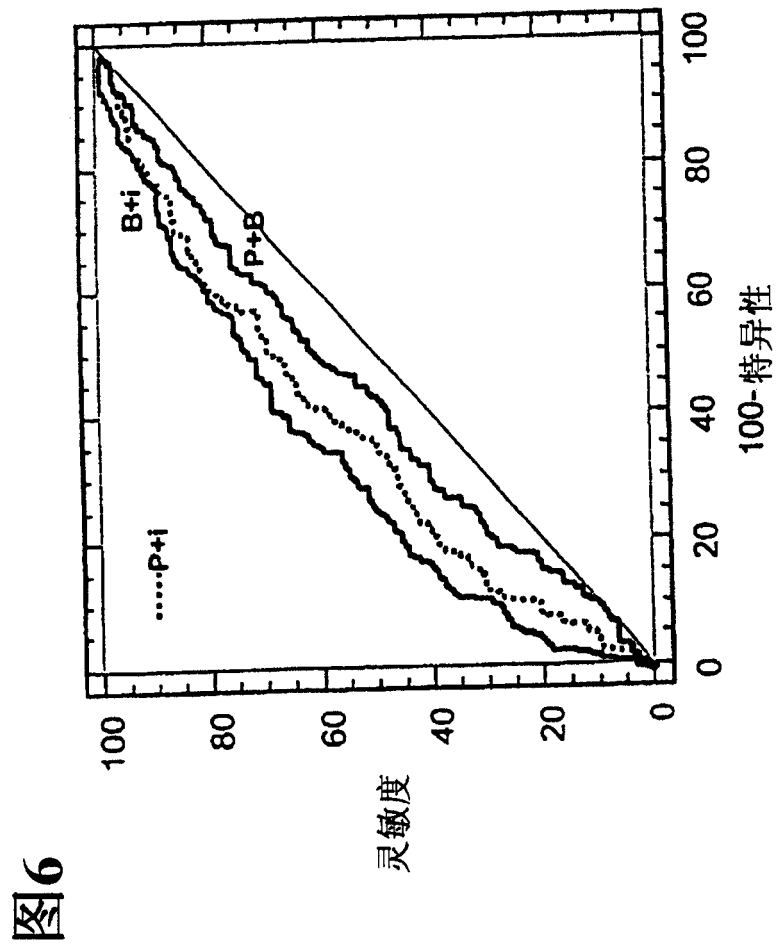


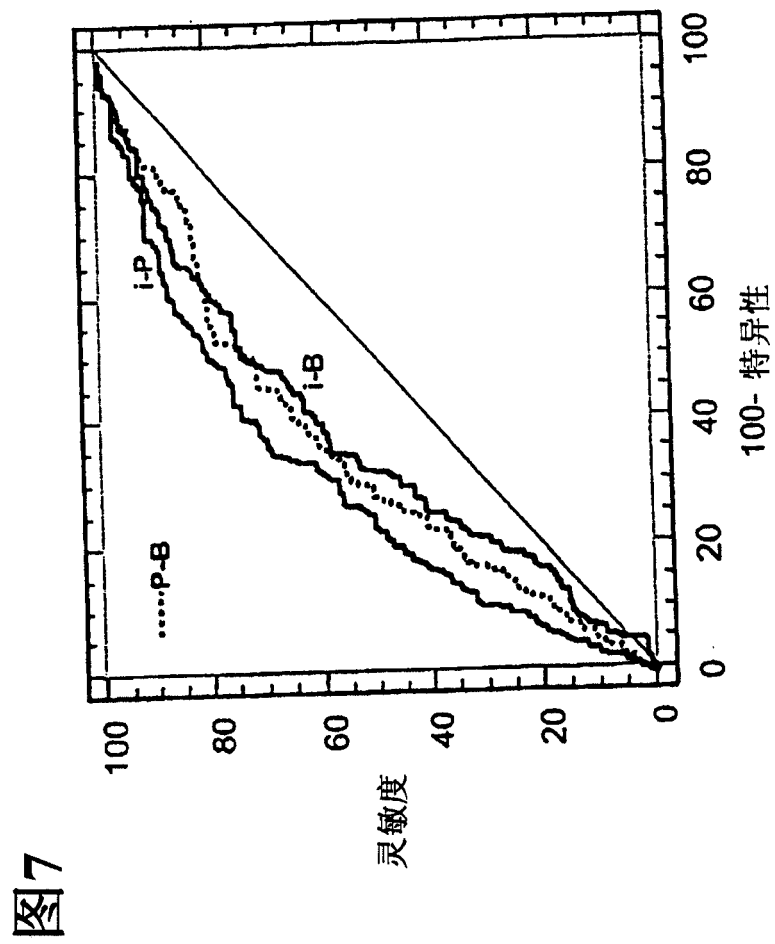
图2











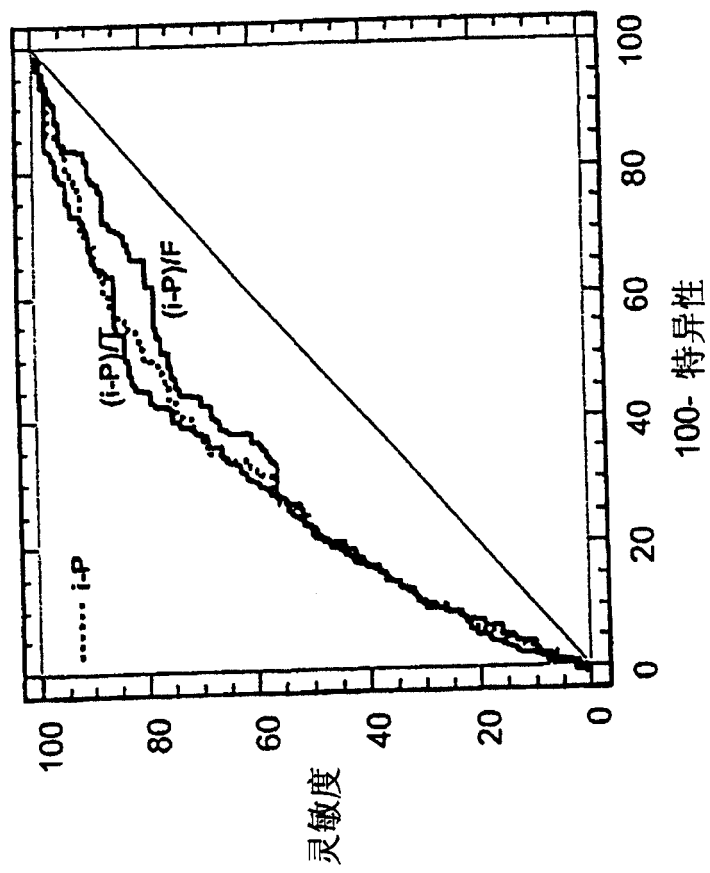
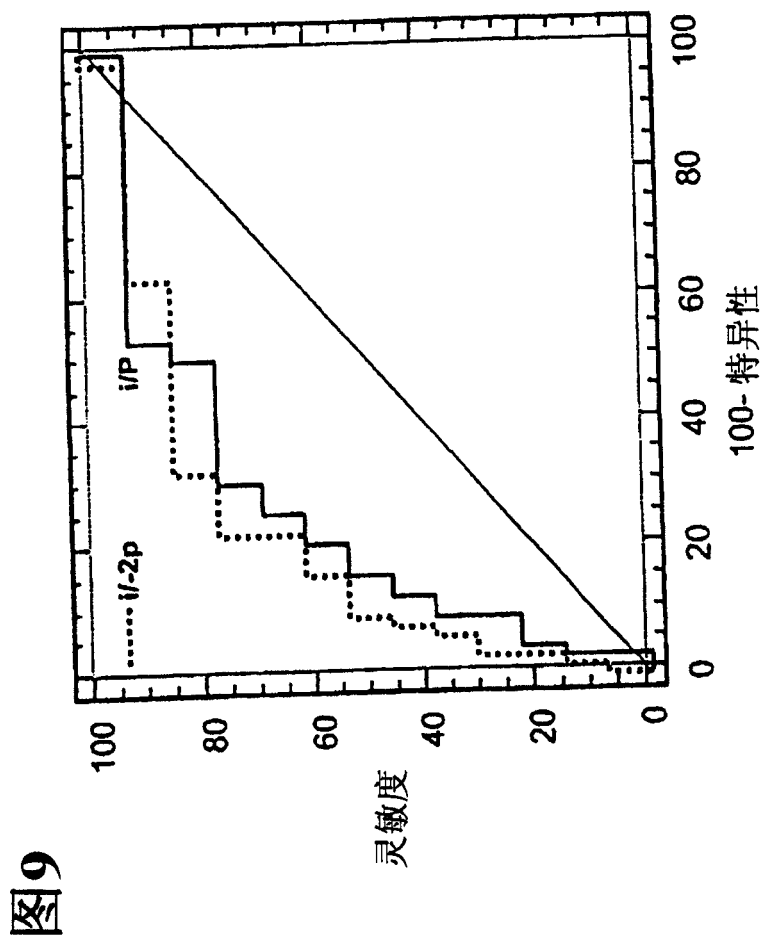


图8



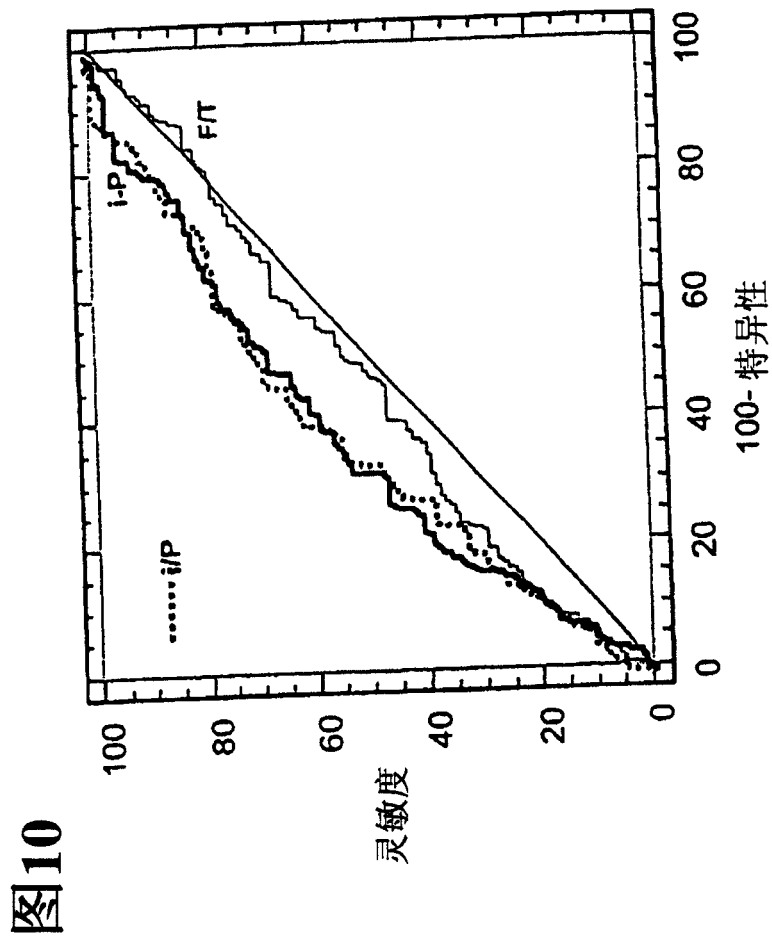


图10

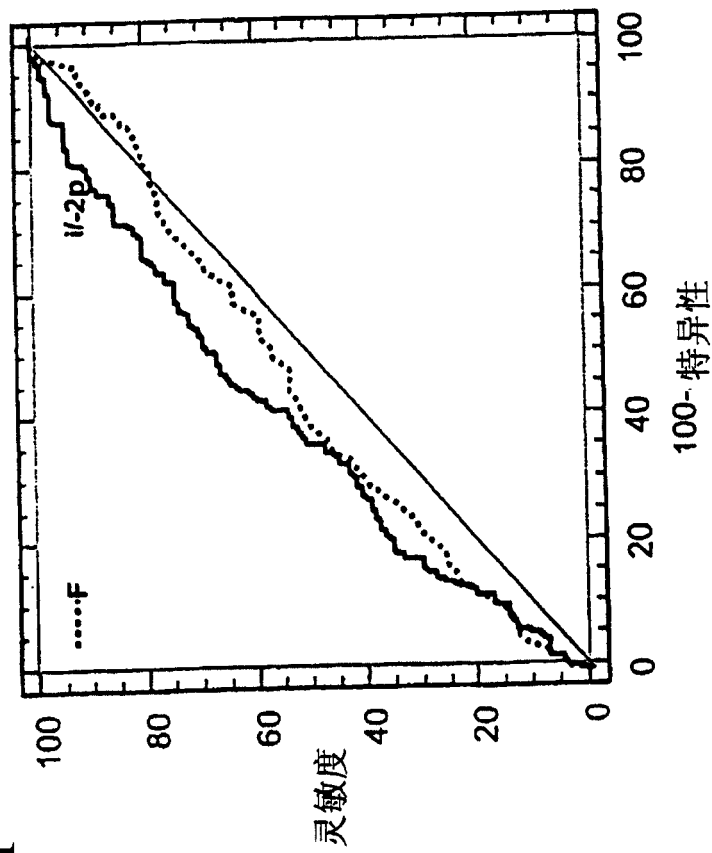


图11

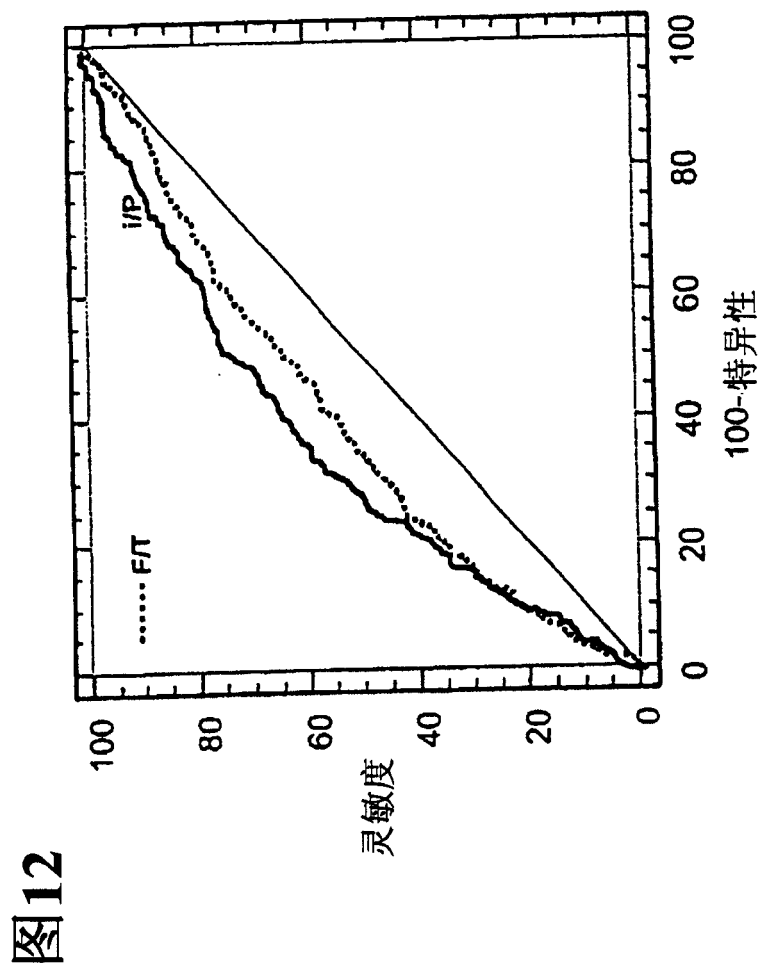


图12

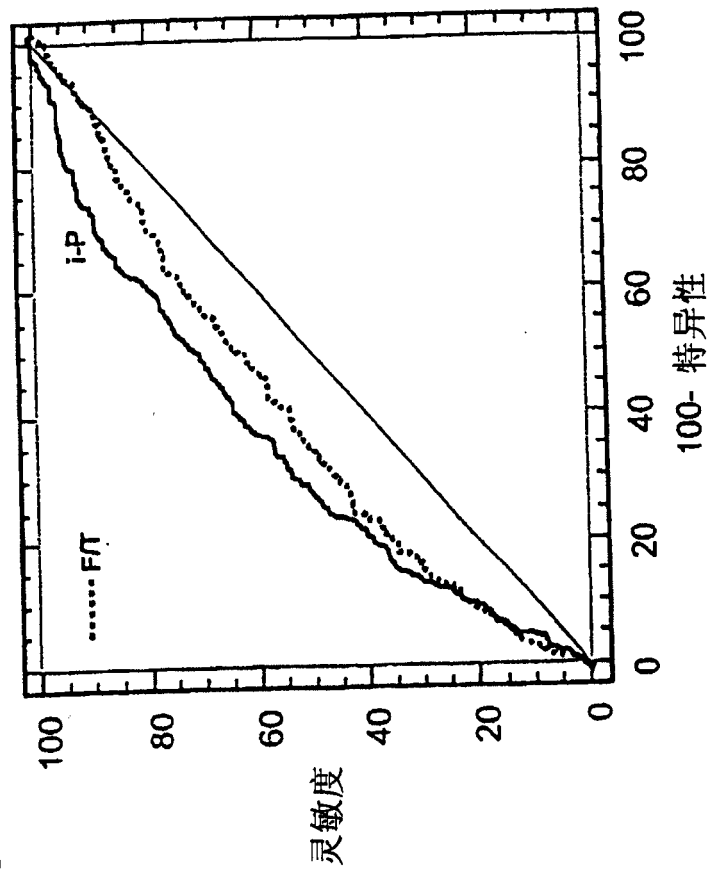


图13

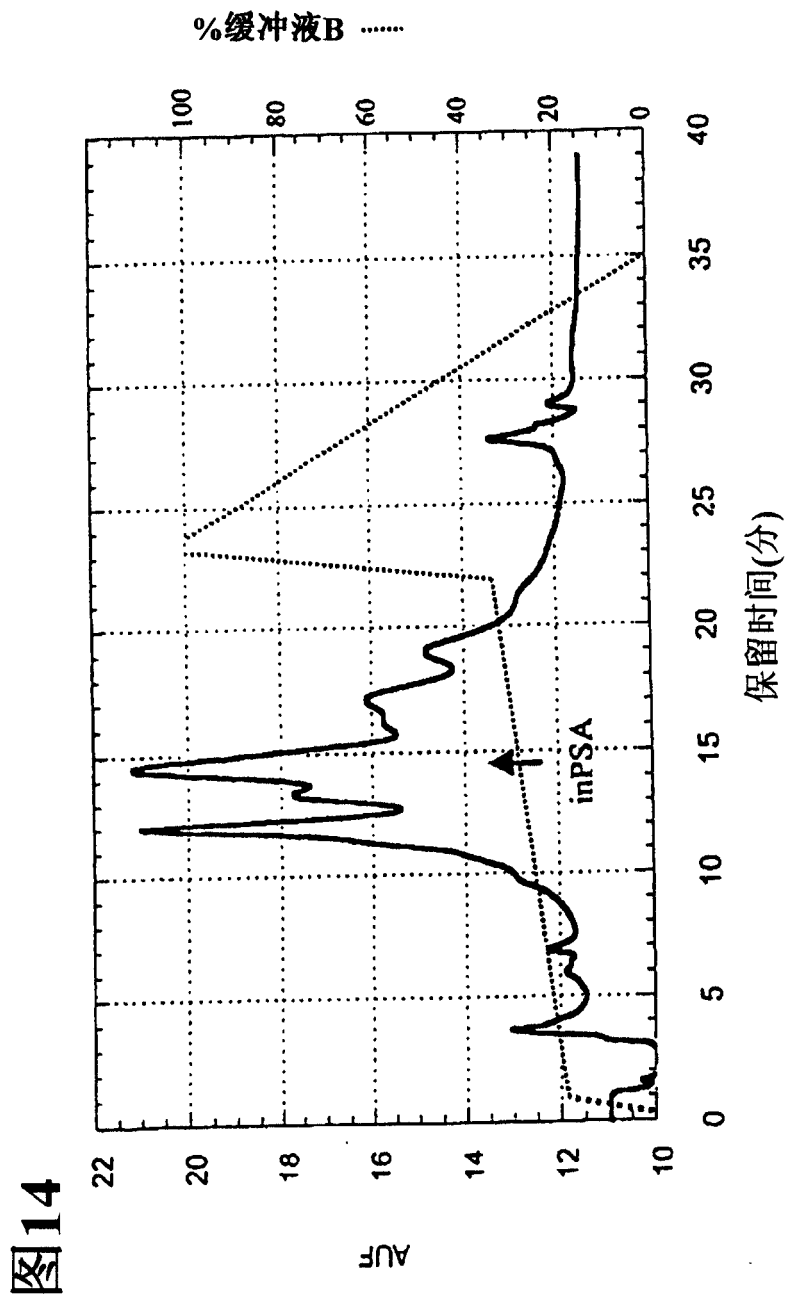


图14

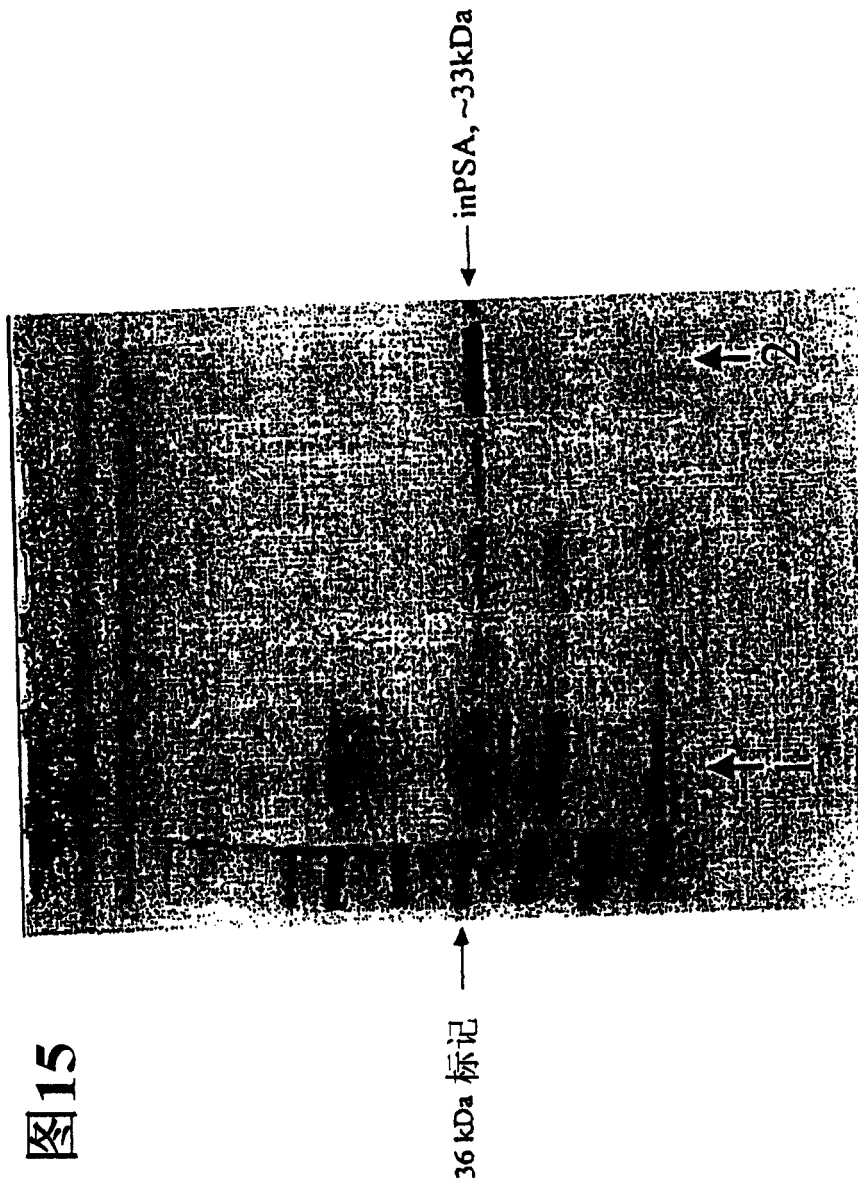


图15

图16

PSA序列

↓
↓

IVGGWECEKH SQPWQVLVAS RGRAVCGGVL VHPQWVLTAA 40

HCIRNKSVIL LGRHSLFHIPE DTGQVFQVSH SFPHPLYDMS 80

LLKNRFLRPG DDSSHDLMLL RLSEPAELTD AVKVMIDLPTQ 120

EPALGTTCYA SGWGSIEPEE FLTPKKLQCV DLHVISNDVC 160

AQVHPQKVTK FMLCAGRWTG GKSTCSGDSG GPLVCNGVLQ 200

GITSWGSEPC ALPERPSLYT KVVHYRKKWIK DTIVANP 237

145 ↓

182 ↓

专利名称(译)	分析样品中非复合形式的前列腺特异抗原以改进前列腺癌检测的方法		
公开(公告)号	CN1656231A	公开(公告)日	2005-08-17
申请号	CN03811904.8	申请日	2003-05-22
发明人	史蒂芬·D·米科瓦伊奇克 哈里·G·里滕豪斯		
IPC分类号	A61K35/12 A61K48/00 C07K16/32 C12N9/64 G01N33/574 C12Q1/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K35/12 A61K48/00 G01N33/57434 C12N9/6445		
代理人(译)	杨青		
优先权	10/154715 2002-05-24 US 10/246582 2002-09-18 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于检测和确定前列腺癌存在的试验方法。试验能够在游离PSA与总PSA的比例显著高的男人群体中检测前列腺癌。试验还能够在少量总PSA，即范围为2 - 4ng/ml的男人群体中检测前列腺癌。根据本发明的一个实施方案，试验包括下列步骤：(a)确定来自患者的生物样品中所含的总PSA的量，(b)确定同一样品中游离PSA的量，并且计算游离PSA与总PSA的比例，(c)确定同一样品中的pPSA的量，(d)确定同一样品中BPSA的量，(e)确定同一样品中inPSA的量，以及(f)基于总PSA的水平和游离PSA，通过将inPSA的量与用已知癌症和良性疾病诊断的对照样品所建立的预定值进行比较，使样品中所含的inPSA的量与患者中前列腺癌的存在相关。

