



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 29 156 T2** 2005.05.25

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 838 680 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 29 156.1**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 117 672.2**

(96) Europäischer Anmeldetag: **13.10.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.04.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **19.05.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.05.2005**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/574**
G01N 33/573

(30) Unionspriorität:

738383 **25.10.1996** **US**

834969 **07.04.1997** **US**

903750 **31.07.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

Bayer Corp., Pittsburgh, Pa., US

(74) Vertreter:

**Köhler, F., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 40723
Hilden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Allard, William Jeffrey, Poughquag, New York
12570, US; Yeung, Kwok K., Ridgefield,
Connecticut 06877, US; Zhou, Zeqi, New City, New
York 10956, US**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Nachweis von Komplex-gebundenem Prostata-spezifischem Antigen (kPSA)**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Bestimmung der komplexierten Formen von immunologisch bestimmtem prostataspezifischem Antigen (PSA) in einer Blutprobe. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf die Bestimmung von komplexiertem PSA durch einen immunometrischen "Two-Site"-Assay und die klinische Bedeutung von Assaywerten für komplexiertes PSA.

[0002] Humanes prostataspezifisches Antigen (PSA) ist ein Glycoprotein von ungefähr 33.000 Dalton mit hoher Aminosäurehomologie zur Human-Kallikrein-Familie (1, 2), und es wurde gezeigt, dass es sich um eine Serin-Protease mit trypsin- und chymotrypsinartiger Aktivität handelt (3, 4, 5). PSA wird von Epithelzellen der Prostata sezerniert und ist eines der Hauptproteine, die man in Samenflüssigkeit findet (6). Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Konzentration an PSA im Serum von Patienten mit Prostatakrebs zunimmt, haben zahlreiche Berichte dieses Protein als wichtigen und klinisch nützlichen Biomarker für den Umgang mit Prostatakrebspatienten etabliert (7, 8, 9, 10). Die Anstrengungen konzentrierten sich in letzter Zeit auf die Verwendung von Serum-PSA-Tests für den frühen Nachweis von Prostatakrebs bei asymptomatischen Männern. Tatsächlich haben die American Cancer Society und die American Urological Society vor kurzem empfohlen, dass alle Männer im Alter von über 50 jährlich unter Verwendung von Serum-PSA in Verbindung mit digitaler Rektaluntersuchung (DRE) gemustert werden sollten (11).

[0003] Der klinische Wert für den frühen Nachweis von Prostatakrebs bleibt aus mehreren Gründen kontrovers. Erstens ist unklar, ob eine Behandlung von Prostatakrebs in frühen Stadien die Überlebenschance bei der betroffenen Population verbessert. Klinische Versuche, die diese Frage klären sollen, sind zur Zeit im Gange. Zweitens wurde vor kurzem in einem klinischen Versuch die Wirksamkeit von Serum-PSA-Messungen in Verbindung mit digitaler Rektaluntersuchung (DRE) beim frühen Nachweis von Prostatakrebs bei Männern im Alter von über 50 Jahren gemessen (12). Von den 1060 Patienten, die entweder ein abnormes DRE oder einen erhöhten PSA-Test zeigten, hatten nur 22% Prostatakrebs. Diese Daten zeigen, dass 70–80% aller Prostatabiopsien bei Männern durchgeführt werden, die keinen Krebs haben. Da 30–50% der Männer im Alter von über 50 bei der Autopsie Hinweise auf Prostatakrebs zeigen, könnte die Zahl der unnötigen Prostatabiopsien, die durch erhöhte PSA-Assays ausgelöst werden, sehr hoch sein. Dies hat Folgen sowohl in Bezug auf medizinische Kosten als auch auf eine erhöhte Morbidität, die mit dem Biopsieverfahren verbunden

ist.

[0004] Mehrere Labors haben unabhängig voneinander gezeigt, dass PSA Komplexe mit Protease-Inhibitoren, wie α_1 -Antichymotrypsin (ACT), α_2 -Macroglobulin und α_1 -Antitrypsin, bildet (13–19). PSA im Komplex mit ACT oder α_1 -Antitrypsin oder in freier, unkomplexierter Form ist durch Immunoassaytechniken im Serum nachweisbar. Tatsächlich ist der größte Teil des immunreaktiven PSA im Serum mit ACT komplexiert, und es wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil des an ACT gebundenen PSA und der Gesamtserum-PSA-Konzentration festgestellt (13). An α_2 -Macroglobulin gebundenes PSA ist jedoch aufgrund einer sterischen Hinderung von Antikörper, der an PSA bindet, nach der Komplexbildung mit dieser Protease im Serum nicht messbar. In frühen Arbeiten wurde vorgeschlagen, dass die PSA-ACT-Konzentrationen und der Anteil von PSA-ACT am Gesamt-PSA bei der Diagnose von Prostatakrebs nützlich sein könnten (13, 15, 16, 17), doch aus einer Vielzahl von Gründen (von denen einige im Folgenden diskutiert werden) ist es schwierig, Schlüsse auf den klinischen Nutzen einer Serummessung von PSA-ACT zu ziehen.

[0005] Lilja, Stenman und Mitarbeiter veröffentlichten im Jahre 1991, dass Serum-PSA in freier Form und in Komplexen mit ACT und α_1 -Antitrypsin vorliegt (13, 18). In anschließenden Arbeiten zeigten Stenman et al., dass die Messung von PSA-ACT in Verbindung mit einer Messung von freiem plus komplexiertem PSA ("Gesamt-PSA" genannt, obwohl mit α_2 -Macroglobulin komplexiertes PSA mit herkömmlichen PSA-Assays nicht gemessen wird) die Unterscheidung zwischen Männern mit Prostatakrebs und solchen mit einer gutartigen Prostatakrankheit, wie gutartiger Prostatavergrößerung (BPH), verbessern kann. Die genaue Messung von PSA-ACT-Komplexen ist jedoch aufgrund von technischen Problemen bei der genauen Messung des Komplexes nicht erreichbar. Stenman et al. fanden heraus, dass die Korrelation der PSA-ACT-Werte mit der Gesamt-PSA-Messung am niedrigen Ende nicht gut war und der γ -Achsenabschnitt erhöht war, was auf eine Überrepräsentierung von komplexiertem PSA hinweist (13 und US-Patent Nr. 5,501,983). Tatsächlich fanden sie heraus, dass die Konzentration von PSA-ACT bei den meisten getesteten Patienten höher war als die von Gesamt-PSA (US-Patent Nr. 5,501,983). Eine anschließende Korrelationsanalyse bezüglich komplexiertem und freiem PSA zeigte eine Steigung von 1,12, was auf eine Überrepräsentierung des PSA-ACT-Komplexes hinweist (16). Patterson et al. wandten sich dieser Überrepräsentierung zu, als sie erhöhte PSA-ACT-Werte in weiblichen Seren fanden (20). Während die Zugabe von Heparin die Häufigkeit von falschen positiven Werten in weiblichem Serum reduzierte, zeigen jüngere Versuche zur Messung von PSA-ACT-Komplexen bei Patienten

ten mit Prostatakrebs und BPH weiterhin eine signifikante Überrepräsentierung von Komplexen (21).

[0006] Wegen der Schwierigkeiten, die bei der Messung von PSA-ACT-Komplexen auftreten, richtete sich die Aufmerksamkeit in der Literatur auf die Messung von freiem, unkomplexiertem PSA in Verbindung mit der Messung von Gesamt-PSA. Es ist jetzt klar, dass eine verbesserte Spezifität benötigt wird, wenn die Gesamt-PSA-Werte im Bereich von etwa 4–10 ng/ml liegen. Wenn das Serum-Gesamt-PSA < 4,0 ng/ml ist, ist das Risiko von Prostatakrebs gering; wenn das Gesamt-PSA > 10 ng/ml beträgt, ist das Risiko von Prostatakrebs umgekehrt > 50%, und eine Prostatabiopsie ist angezeigt. Innerhalb der diagnostischen Grauzone (im Allgemeinen zwischen 2 und 20 ng/ml, häufiger zwischen 4 und 10 ng/ml) ist das Krebsrisiko hoch, aber die Häufigkeit von falschen positiven Ergebnissen ist ebenfalls hoch. Die retrospektive Anwendung eines Verhältnisses von freiem PSA/Gesamt-PSA hat gezeigt, dass die Spezifität von Gesamt-PSA in der Grauzone von 4–10 ng/ml von ungefähr 50–60% auf 70–80% verbessert werden könnte (22–26). Diese verbesserte Spezifität könnte zu einer Abnahme der unnötigen Biopsien von 20–30% führen. PCT WO 96-26441 und WO 97-12245 beschreiben ähnlich die Verwendung des Verhältnisses von freiem PSA/Gesamt-PSA zur Verbesserung der Diskriminierung zwischen BPH und Krebs bei Patienten mit Gesamt-PSA-Werten zwischen 2,5 und 20 ng/ml.

[0007] Die Messung von freiem PSA hat jedoch ihre eigenen technischen Schwierigkeiten. Erstens ist der Anteil an freiem PSA innerhalb der Grauzone typischerweise sehr gering, im Bereich von 5–30%. Ein erfolgreicher Assay für freies PSA muss daher im Bereich von 0,2–3,0 ng/ml genau messen. Außerdem ist die Konzentration an freiem PSA bei Patienten mit BPH und solchen mit Krebs nicht signifikant verschieden, und das Verhältnis von freiem PSA/Gesamt-PSA nimmt aufgrund einer Erhöhung des Anteils von PSA, das mit ACT komplexiert ist, ab. Außerdem ist freies PSA im Serum nicht stabil, und es ist bekannt, dass die Konzentrationen an freiem PSA mit der Zeit abnehmen, vermutlich aufgrund einer Komplexierung mit α_2 -Makroglobulin.

[0008] In der Zwischenzeit wurden weitere Probleme anerkannt, die mit der genauen Messung von PSA-ACT in Blut verbunden sind, gekoppelt mit Versuchen, diese Probleme zu lösen. Im Jahre 1994 berichteten Mitarbeiter bei Hybritech von der Entwicklung eines Sandwich-Immunoassays für PSA-ACT unter Verwendung von Anti-PSA- und Anti-ACT-Antikörpern. Sie kamen zu dem Schluss, dass die gemessenen PSA-ACT-Werte bei der Diagnose von Prostatakrebs keine verbesserte klinische Spezifität zeigten (27). Später berichtete diese Gruppe zusammen mit Mitarbeitern der Johns Hopkins Medical In-

stitutions von dem Ergebnis, dass das Anti-PSA/Anti-ACT-Sandwich-Immunoassayverfahren an einer erheblichen unspezifischen Bindung und Überrepräsentierung von PSA-ACT leidet. Sie kamen zu dem Schluss, dass diese Probleme, wenn sie nicht gelöst werden, die Messung von PSA-ACT klinisch bedeutungslos machen (28). Anschließend berichtete diese zusammengeschlossene Gruppe, dass sie das Problem der unspezifischen Bindung durch die Entwicklung eines Sandwich-Immunoassays für PSA-ACT auf der Basis eines für den PSA-ACT-Komplex spezifischen monoklonalen Antikörpers gelöst habe (29, 30). Ihre klinischen Studien zeigten jedoch keine Verbesserung der Spezifität für Prostatakrebs durch Messung von PSA-ACT-Komplex allein im Vergleich zur Messung von Gesamt-PSA oder mit einem berechneten Verhältnis von PSA-ACT zu Gesamt-PSA (29). Weitere Ansätze zur Lösung der mit der PSA-ACT-Messung verbundenen Probleme wurden vorgeschlagen, einschließlich der Verwendung von Blockierungsmitteln (31).

[0009] Es bleibt unklar, warum der Anteil von PSA, das an ACT komplexiert ist, bei Patienten mit Prostatakrebs zunimmt, aber dies kann mit der Beobachtung zusammenhängen, dass Prostataepithel von BPH-Patienten durch Antikörper gegen ACT nicht angefärbt wird und man in solchem Gewebe keine mRNA-Transcripte findet. Dagegen werden in Prostataepithel von Patienten mit Prostatakrebs eine Anti-ACT-Immunreaktivität und mRNA-Synthese nachgewiesen (32). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PSA in Prostatatumoren möglicherweise vor der Freisetzung ins Serum in situ mit ACT komplexiert. Ein alternativer Mechanismus kann den Zugang von aktivem PSA zum Blutstrom beinhalten. Freies PSA, das im Serum von gesunden Männern gefunden wird, ist proteolytisch gespalten und enzymatisch inaktiv. Tumoren synthetisieren jedoch angiogene Faktoren, die zu einer erhöhten Gefäßversorgung von Tumorgeweben führen. Es kann sein, dass in Tumoren ein größerer Anteil an enzymatisch aktivem PSA Zugang zum Blutstrom gewinnt. Man würde erwarten, dass dieses aktive PSA mit Protease-Inhibitoren, wie ACT, komplexiert, was zu einem höheren Anteil von PSA-ACT-Komplex im Serum von Prostatakrebepatienten führt.

[0010] Dementsprechend besteht ein Bedürfnis nach einem genauen Verfahren zur Bestimmung von komplexiertem PSA und nach einer Bewertung der klinischen Bedeutung von Blutspiegeln von komplexiertem PSA bezüglich der Musterung von männlichen Patienten auf Prostatakrebs.

[0011] EP 635,575 beschreibt die Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die an freies PSA, aber nicht an PSA-ACT binden.

[0012] PCT WO 95/18381 bezieht sich auf ein im-

munometrisches Assayverfahren mit monoklonalen/polyklonalen Antikörpern für die Bestimmung von PSA, das durch die Zugabe von Antikörper, der an freies PSA, aber nicht an komplexiertes PSA bindet, eine äquimolare Reaktion auf freies und komplexiertes PSA liefern kann.

[0013] EP 789 032 und Z. Zhou, P. C. Ng, D. L. Very, W. J. Allard, K. K. Yeung, J. Clin. Lab. Anal. (1996), 10: 155–159, beschreiben ein Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers, der in einem immunometrischen Assay mit monoklonalen/polyklonalen Antikörpern eine äquimolare Reaktion auf freies und komplexiertes PSA liefert. Der beschriebene monoklonale Antikörper hat die einzigartige Eigenschaft, an PSA zu binden und PSA im Wesentlichen unfähig zu machen, an Antikörper zu binden, die freies PSA, aber kein komplexiertes PSA binden.

[0014] Das veröffentlichte japanische Patentdokument 62-46263 beschreibt ein Sandwich-Immunoassayverfahren für die Bestimmung von PSA im Komplex mit einem Protease-Inhibitor.

[0015] Die Deutsche Offenlegungsschrift 4,322,342 beschreibt ein Verfahren zum Messen sowohl von Gesamt-PSA als auch von PSA-ACT in einem einzigen Assay, um Werte für die Berechnung des Verhältnisses von PSA-ACT zu Gesamt-PSA zu erhalten.

[0016] Chichibu et al. beschreiben im Journal of Medicine and Pharmaceutical Science (Japan, 1996), 36 (3): 477–483, einen Sandwich-Immunoassay für PSA-ACT, der an Kügelchen gebundenes Anti-PSA sowie enzymmarkiertes Anti-ACT einsetzt. Es fehlen Daten, die die Fähigkeit zur genauen Messung von PSA-ACT in einer Blutprobe feststellen.

[0017] J. T. Wu et al., Journal of Clinical Laboratory Analysis (1995), 9: 25–31 (34), bezieht sich auf chromatographische Verfahren, wie die Chromatofokussierungstechnik, die DEAE-Sephacel-, Con-A-Sephacel- und 5–200-Gelfiltrationschromatographieverfahren, zur Isolierung und Reinigung des PSA-ACT-Komplexes für die Herstellung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern mit hoher Affinität. Es wird ein Assay für PSA-ACT erwähnt, bei dem eine Kombination von Anti-PSA- und Anti-ACT-Antikörpern verwendet wird. Ein solcher Assay würde cPSA nicht messen, da cPSA neben PSA-ACT noch andere komplexierte Formen von PSA umfasst.

[0018] J. T. Wu schlägt im Journal of Clinical Laboratory Analysis (1994), 8: 51–62 (35), ebenfalls ein Verfahren zum Messen von PSA-ACT unter Verwendung einer Kombination von Anti-PSA- und Anti-ACT-Antikörpern vor.

[0019] C. R. Tillyer et al. beschreiben in Ann. Clin.

Biochem. (1994), 31: 501–505 (36), eine vergleichende Studie von zwei Immunoassays für die Messung von tPSA. Es wird hervorgehoben, dass sich einige tPSA-Assays hinsichtlich ihres Ansprechens auf fPSA gegenüber cPSA unterscheiden.

Kurzbeschreibung der Erfindung

[0020] Die vorliegende Erfindung stellt Folgendes bereit: ein Verfahren zur Bestimmung von komplexiertem PSA (hier als cPSA bezeichnet) in einer Blutprobe durch Behandeln der Blutprobe in einer Weise, dass unkomplexiertes, d. h. freies, PSA (fPSA) durch einen Immunoassay nicht nachweisbar ist, und dann Bestimmen von PSA in der behandelten Blutprobe durch Immunoassay, wobei nur cPSA nachweisbar ist. Der Immunoassay kann in irgendeiner herkömmlichen Weise durchgeführt werden, aber gewöhnlich handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay oder einen immunometrischen "Two-Site"-Assay. Das vorliegende Verfahren kann auf vielerlei Weise realisiert werden, was im Folgenden ausführlicher beschrieben ist.

[0021] Ein besonders vorteilhaftes immunometrisches "Two-Site"-Assayverfahren wurde auf der Basis eines Reagenssystems mit drei Antikörpern entwickelt:

- (a) ein erster Anti-PSA-Antikörper (monoklonal oder polyklonal), der an tPSA bindet und an dem immunometrischen Assay beteiligt ist;
- (b) ein zweiter Anti-PSA-Antikörper (vorzugsweise monoklonal), der ebenfalls an tPSA bindet und der ebenfalls an dem immunometrischen Assay beteiligt ist, der aber so ausgewählt wird, dass er die Eigenschaft hat, im Wesentlichen nicht in der Lage zu sein, an PSA zu binden, wenn PSA an einen fPSA-spezifischen Antikörper gebunden ist (dieser zweite Antikörper wird hier zuweilen als "MM1" bezeichnet); und
- (c) ein dritter Anti-PSA-Antikörper, der fPSA-spezifisch und vorzugsweise monoklonal ist.

[0022] Als Beteiligte in dem immunometrischen Assay ist entweder der erste oder der zweite Anti-PSA-Antikörper für Nachweiszwecke markiert (und kann als "markierter" oder "Nachweis"-Antikörper bezeichnet werden), und der andere ist zu Zwecken der Abtrennung aus dem Testgemisch immobilisiert oder kann immobilisiert werden ("Abfangantikörper"). Dementsprechend können Assaybedingungen festgelegt werden, bei denen fPSA in einer Blutprobe an den fPSA-spezifischen (dritten) Antikörper bindet, so dass fPSA aus der Probe nicht mehr in der Lage ist, an den oben genannten MM1-Antikörper (zweiten Antikörper) zu binden. Da der immunometrische "Two-Site"-Assay von der Bindung sowohl des oben genannten ersten als auch des zweiten Antikörpers (des "markierten" und des "Abfang"-Antikörpers) an PSA abhängt, kann die fPSA-Form folglich durch die

Bindung des fPSA-spezifischen Antikörpers nicht mehr durch den immunometrischen "Two-Site"-Assay nachgewiesen werden. Es sei angemerkt, dass die drei Antikörper, die in diesem besonders einzigartigen Assaysystem verwendet werden, zwar alle spezifisch für eine oder mehrere Formen von PSA sind (d. h. keiner ist gegen einen der in cPSA enthaltenen Protease-Inhibitoren gerichtet), dass aber die besonderen Eigenschaften der Antikörper eine spezifische Bestimmung von cPSA erlauben.

[0023] Es hat sich gezeigt, dass die Messung von cPSA-Blutspiegeln ein hochempfindliches und spezifisches Verfahren zum Nachweis von Prostatakrebs (CaP) liefert. cPSA-Assays haben auch den Vorteil einer erhöhten analytischen Genauigkeit im Vergleich zu Assays, die die Messung von fPSA beinhalten, da cPSA die vorherrschende Form von PSA ist und Umgebungs- und Analysefaktoren (z. B. das Probenalter), die die Verteilung von PSA zwischen der fPSA- und der cPSA-Form beeinflussen, eine viel geringere Wirkung auf die Genauigkeit von cPSA-Messungen haben als im Falle von Messungen von fPSA.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0024] [Fig. 1A](#) ist eine Graphik, die die Hemmung der fPSA-Immunreaktivität in einem immunometrischen "Two-Site"-Assay für tPSA in Gegenwart von drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen das E-Epitop von PSA zeigt. Proben, die fPSA in einer Menge von 50 ng/ml enthalten, wurden mit jedem Anti-fPSA-mAb 30–60 Minuten lang vorinkubiert und dem Bayer-Immuno-1™-tPSA-Assay unterzogen. [Fig. 1B](#) zeigt ein ähnliches Experiment, bei dem zwei Anti-E-Antikörper, PSA 20 und ME2, eine konzentrationsabhängige Hemmung der Immunreaktivität von fPSA im tPSA-Assay zeigten. Proben, die 10 ng/ml fPSA enthielten, wurden 30–60-Minuten lang entweder mit dem PSA 20 oder mit ME2-mAb vorinkubiert und dem Bayer-Immuno-1-tPSA-Assay unterzogen.

[0025] [Fig. 2A](#) ist eine Graphik, die zeigt, dass die Zugabe des Anti-E-Antikörpers PSA 20 zu dem tPSA-Assay ein Immunoassayformat für die Messung von cPSA ergibt. Proben, die ungefähr 11 ng/ml Gesamt-PSA mit verschiedenen Anteilen an freiem und komplexiertem PSA enthielten, wurden in Gegenwart von 300 µg/ml mAb PSA 20 unter Verwendung des Bayer-Immuno-1-Analyzers gemessen. [Fig. 2B](#) ist eine ähnliche Graphik, die zeigt, dass ME2-mAb ebenfalls verwendet werden kann, um ein Immunoassayformat für die quantitative Messung von cPSA zu erhalten. Proben, die ungefähr 11 ng/ml Gesamt-PSA mit variierenden Anteilen an freiem und komplexiertem PSA enthielten, wurden in Gegenwart von 25 µg/ml mAb ME2 unter Verwendung des Bayer-Immuno-1-Analyzers gemessen.

[0026] [Fig. 3](#) ist eine Tabelle, die zeigt, dass PSA 20

verwendet werden kann, um den cPSA-Assay auf einem automatischen Immunoanalyzer zu automatisieren. Beim Assayformat 1 wurde mAb PSA 20 verwendet, der mit einer Gesamtinkubationszeit von 38 Minuten zu dem MM1-Fluorescein-Konjugat (R1) gegeben wurde. Beim Assayformat 2 wurde eine on-board-Vorinkubierung von PSA-mAb 20 mit den Proben und eine Gesamtinkubationszeit von 78 Minuten verwendet. Alle Ergebnisse sind als Geschwindigkeit der Farbbildung dargestellt.

[0027] Die [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) sind Tabellen, die Messergebnisse von Gesamt-, freiem und komplexiertem PSA im Serum von Männern mit Prostatakrebs, BPH oder bei gesunden altersangepassten Kontrollen zusammenfassen. Die unselektierte Patientenpopulation, die mit "All" bezeichnet ist, umfasst Patientenproben, die von Männern mit CaP, BPH oder gesunden altersangepassten Kontrollen ohne Ansehen der tPSA-Werte stammen. Wenn Patientengruppen gemäß dem tPSA-Wert stratifiziert wurden, wurden zusätzliche Patientenproben in die in [Fig. 4A](#) gezeigte Analyse und in den cPSA-Teil der in [Fig. 4B](#) gezeigten Analyse mit aufgenommen, wobei diese zusätzlichen Proben anhand von tPSA-Werten für einen Einschluss in die diagnostische Grauzone selektiert wurden, wie es in der folgenden Beschreibung beschrieben ist.

[0028] [Fig. 4C](#) ist eine Graphik einer Regressionsanalyse von Ergebnissen, die unter Verwendung eines kommerziellen Assays für Gesamt-PSA erhalten wurden, im Vergleich zu Ergebnissen, die unter Verwendung des bevorzugten cPSA-Assays für Patientenproben, die von Männern mit Prostatakrebs und gutartiger Prostatakrankheit gesammelt wurden, erhalten wurden.

[0029] Die [Fig. 5A–Fig. 5F](#) sind Graphiken, die die Korrelation zwischen cPSA-Assaywerten und PSA-ACT-Assaywerten zeigen, die von Tests der Serien von Männern mit Krebs, BPH und in der normalen Population erhalten wurden.

[0030] [Fig. 6](#) ist eine Tabelle, die Ergebnisse der Messung von cPSA und PSA-ACT im Serum von Männern mit Prostatakrebs, BPH oder bei gesunden altersangepassten Kontrollen zusammenfasst. Die unselektierte Population (mit "All" bezeichnet) und die gemäß dem tPSA-Spiegel stratifizierten Patientengruppen waren identisch zu denjenigen, die in den in [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) zusammengefassten Studien verwendet wurden.

[0031] [Fig. 7](#) ist eine Tabelle, die Korrelationen von Schwellenwerten (d. h. Obergrenzen der Normalwerte) und Spezifität bei ausgesuchten Empfindlichkeiten unter Assaywerten, die durch einen kommerziellen tPSA-Assay, durch einen bevorzugten cPSA-Assay und durch Berechnung der fPSA/tPSA-Verhält-

nisse erhalten wurden, zeigen.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0032] Die folgenden Ausdrücke, die hier verwendet werden, haben die angegebenen Bedeutungen:

[0033] "PSA" soll prostataspezifisches Antigen bedeuten.

[0034] "tPSA" oder "Gesamt-PSA" soll die Gesamtmenge des immunologisch bestimmbaren PSA in einer Blutprobe bedeuten, d. h. PSA in komplexierter oder freier Form, das auf eine Messung durch herkömmliche Immunoassays ansprechen kann. Auf der Grundlage des derzeitigen Wissens wird davon ausgegangen, dass Blut-PSA, das mit bestimmten Protease-Inhibitoren (einschließlich ACT, α_1 -Antitrypsin und Inter- α -Trypsin-Inhibitor) komplexiert ist, immunologisch bestimmbar ist, während PSA nicht bestimmbar ist, wenn es mit solchen anderen Protease-Inhibitoren wie α_2 -Macroglobulin komplexiert ist.

[0035] "fPSA" oder "freies PSA" soll PSA in seiner freien, unkomplexierten Form bedeuten.

[0036] "cPSA" oder "komplexiertes PSA" soll tPSA bedeuten, das kein fPSA ist.

[0037] "E-Epitop" soll die Sammlung von Epitopen auf PSA bedeuten, die Bindungsstellen für Antikörper sind, welche an fPSA, aber nicht an cPSA binden.

[0038] "Anti-E-Antikörper" soll Antikörper bedeuten, die an E-Epitop binden und die somit spezifisch für die Bindung von fPSA sind.

[0039] "Antikörper" soll Vollimmunglobulin, z. B. IgG oder IgM, oder ein Immunglobulinfragment, das eine Antikörperbindungsstelle umfasst, z. B. Fab-, Fab'- und F(ab')₂-Fragmente, oder Aggregate davon bedeuten.

[0040] Die vorliegende Erfindung stellt Methoden für die Bestimmung von cPSA in einer Blutprobe durch Messen von tPSA durch Immunoassay, nachdem man fPSA in der Blutprobe nichtnachweisbar gemacht hat, bereit. Für den Fachmann wird offensichtlich sein, dass für die Messung von tPSA eine Vielzahl von Immunoassayverfahren verwendet werden können und dass eine Vielzahl von Methoden eingesetzt werden kann, um fPSA in der Blutprobe nichtnachweisbar zu machen.

[0041] Im Allgemeinen sind tPSA-Immunoassayverfahren entweder kompetitiv oder nichtkompetitiv. Bei den ersteren Verfahren werden typischerweise ein immobilisierter oder immobilisierbarer Antikörper gegen PSA (Anti-PSA) und eine markierte Form von PSA eingesetzt. Proben-PSA und markiertes PSA

konkurrieren um die Bindung an Anti-PSA. Nach der Abtrennung des resultierenden markierten PSA, das an Anti-PSA gebunden hat (gebundene Fraktion), von demjenigen, das ungebunden geblieben ist (ungebundene Fraktion), wird die Menge des Markers entweder in der gebundenen oder in der ungebundenen Fraktion gemessen und kann in irgendeiner herkömmlichen Weise, z. B. durch Vergleich mit einer Eichkurve, mit der Menge an PSA in der Testprobe in Beziehung gesetzt werden.

[0042] Nichtkompetitive Verfahren werden häufiger für die Bestimmung von tPSA verwendet, wobei das häufigste Verfahren das immunometrische "Two-Site"-Assayverfahren ist (zuweilen auch als "Sandwich"-Verfahren bezeichnet). In immunometrischen Assays werden zwei Anti-PSA-Antikörper eingesetzt. Einer der Anti-PSA-Antikörper ist markiert (zuweilen als "Nachweisantikörper" bezeichnet), und der andere ist immobilisiert oder immobilisierbar (zuweilen als "Abfangantikörper" bezeichnet). Wie in der Technik bekannt ist, können der Abfang- und der Nachweisantikörper gleichzeitig oder nacheinander mit der Testprobe in Kontakt gebracht werden. Sequentielle Verfahren können durchgeführt werden, indem man den Abfangantikörper mit der Probe inkubiert und den markierten Antikörper zu einem vorbestimmten Zeitpunkt danach hinzufügt (zuweilen als "Vorwärts"-Verfahren bezeichnet); oder der Nachweisantikörper kann zuerst mit der Probe inkubiert und dann der markierte Antikörper hinzugefügt werden (zuweilen als "umgekehrtes" Verfahren bezeichnet). Nachdem die notwendigen Inkubationen stattgefunden haben, wird zur Beendigung des Assays der Abfangantikörper aus dem flüssigen Testgemisch abgetrennt, und der Marker wird wenigstens in einem Teil von wenigstens entweder der abgetrennten Abfangantikörperphase oder dem Rest des flüssigen Testgemischs gemessen, normalerweise ersteres, da die abgetrennte Phase PSA umfasst, das vom Abfang- und vom Nachweisantikörper gebunden ("sandwichartig" dazwischen eingeschlossen) ist.

[0043] In typischen immunometrischen "Two-Site"-Assays für PSA sind entweder der Abfang- oder der Nachweisantikörper oder beide monoklonale Antikörper. Der im Nachweisantikörper verwendete Marker kann aus irgendwelchen in der Technik herkömmlicherweise bekannten ausgewählt werden. Gewöhnlich ist der Marker ein Enzym oder eine chemilumineszente Struktureinheit, aber er kann auch ein radioaktives Isotop, ein Fluorophor, ein nachweisbarer Ligand (z. B. nachweisbar durch eine sekundäre Bindung durch einen markierten Bindungspartner für den Liganden) und dergleichen sein. Die wichtige Eigenschaft des Abfangantikörpers besteht darin, dass er ein Mittel zur Abtrennung vom Rest des Testgemischs liefert. Wie in der Technik bekannt ist, kann der Abfangantikörper dementsprechend in einer bereits immobilisierten oder unlöslichen Form in den

Assay eingeführt werden, oder er kann in einer immobilisierbaren Form eingeführt werden, d. h. in einer Form, die die Durchführung der Immobilisierung anschließend an die Einführung des Abfangantikörpers in den Assay ermöglicht. Beispiele für immobilisierte Abfangantikörper sind Antikörper, die kovalent oder nichtkovalent an eine feste Phase, wie ein magnetisches Teilchen, ein Latexteilchen, einen Mikrotiterplattennapf, ein Kügelchen, eine Küvette oder ein anderes Reaktionsgefäß, gebunden sind. Ein Beispiel für einen immobilisierbaren Abfangantikörper ist ein Antikörper, der mit einer Liganden-Struktureinheit, z. B. einem Hapten, Biotin oder dergleichen, chemisch modifiziert wurde und der daher anschließend durch Kontakt mit einer immobilisierten Form (wie es oben für den direkt immobilisierten Abfangantikörper beschrieben ist) eines Bindungspartners für den Liganden, z. B. eines Antikörpers, Avidin oder dergleichen, immobilisiert werden kann.

[0044] Die oben beschriebenen Immunoassayverfahren und -formate sollen beispielhaft und nicht einschränkend sein, da man sich im Allgemeinen darüber im Klaren sein wird, dass in der vorliegenden Erfindung jedes Immunoassayverfahren oder -format verwendet werden kann.

[0045] Ein besonders einzigartiges Verfahren zur Bestimmung von cPSA, das von der vorliegenden Erfindung bereitgestellt wird, beinhaltet eine raffinierte Modifikation eines herkömmlichen immunometrischen "Two-Site"-Assays. Bei diesem neuen Verfahren wird entweder der Abfang- oder der Nachweisantikörper ausgewählt, um zur Bindung von tPSA befähigt zu sein (d. h. er bindet an ein Epitop, das sowohl auf fPSA als auch cPSA verfügbar ist), aber im Wesentlichen unfähig zu sein, PSA zu binden, wenn PSA von einem fPSA-spezifischen Antikörper (d. h. einem Anti-E-Antikörper) gebunden wird. Dieser einzigartige Antikörper wird hier als MM1 bezeichnet. Bei Zugabe von Anti-E als dritter Antikörper ist also fPSA, das von Anti-E gebunden wird, im Wesentlichen nicht mehr in der Lage, an MM1 zu binden, und kann somit in einem immunometrischen "Two-Site"-Assay auf der Basis von MM1 im Wesentlichen nicht mehr nachgewiesen werden.

[0046] Bei diesem besonders bevorzugten Verfahren sind der zweite Antikörper (der MM1-Antikörper) und der dritte Antikörper (der Anti-E-Antikörper) jeweils unabhängig vorzugsweise ein monospezifischer Antikörper (z. B. ein monoklonaler Antikörper oder ein polyklonaler Antikörper, der mit einem herkömmlichen Antiserumverfahren erhalten wird und der so präpariert wurde, dass die Antikörperfraktion im Wesentlichen nur aus Antikörpern besteht, die an das spezielle interessierende Epitop binden), und am meisten bevorzugt ist es ein monoklonaler Antikörper. Überdies kann der Anti-E-Antikörper, falls gewünscht, auch mehr als einen Antikörper, z. B. mehr

als einen monoklonalen Antikörper, umfassen, um die gewünschte Hemmung von MM1 zu erhalten. Man wird sich weiterhin darüber im Klaren sein, dass der gewünschte Grad der Hemmung der Bindung des MM1-Antikörpers an fPSA, die durch die Bindung des oder der Anti-E-Antikörper verursacht wird, normalerweise größer als etwa 90%, gewöhnlich größer als etwa 95% und am meisten bevorzugt größer als etwa 99% sein wird.

[0047] Besonders bevorzugte monoklonale MM1-Antikörper können mit mehreren Methoden hergestellt werden. Hauptsächlich wird der monoklonale Antikörper hergestellt, indem man herkömmliche Hybridisierungstechniken für somatische Zellen anwendet, wobei man ein Screening-Verfahren für die Selektion von Hybridomzelllinien verwendet, das zur Isolierung von Hybridomen führt, die einen monoklonalen Antikörper mit den definierten MM1-Bindungseigenschaften erzeugen. Die Strategie für ein solches Screening besteht darin, Antikörper auszuwählen, die die Bindung anderer Antikörper, die gegen Epitope gerichtet sind, die auf fPSA, aber nicht auf cPSA zugänglich sind, z. B. E-Epitope, blockieren, aber selbst eine im Wesentlichen äquivalente Bindung an fPSA und cPSA aufweisen.

[0048] Die Hybridisierung somatischer Zellen ist jetzt eine wohlbekannte Methode und kann in allen ihren Varianten, die geeignet und gewünscht sind, auf die vorliegende Erfindung angewendet werden. Im Allgemeinen stellt man durch Fusion von Myelomzellen mit Lymphocytenzellen, die aus einem Tier entnommen wurden, das gegen den Analyten immunisiert wurde, eine Population von Hybridomen her. Der Ausdruck "Immunisierung des Wirtstiers", wie er hier verwendet wird, impliziert, dass das Immunsystem des Tiers gereizt wurde, so dass es Antikörper erzeugt, die an ein oder mehrere Epitope des interessierenden Analyten binden. Der Fachmann wird sich darüber im Klaren sein, dass ein solches Ergebnis in beliebiger Weise erhalten werden kann; dazu gehören ohne Einschränkung die Verabreichung des nativen Analyten, eines synthetischen Peptid-Immogens, von transfektanten Zellen, die auf ihrer Oberfläche Epitope des Analyten exprimieren, oder dergleichen in den Blutstrom des Wirtstiers. Ähnlich unterliegen auch die Erzeugung und Ernte von monoklonalen Antikörpern aus klonierten Hybridomzelllinien dem Geschick des Fachmanns, und im Allgemeinen kann bei der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung jedes bekannte Verfahren verwendet werden.

[0049] Wie oben beschrieben, sind die Hauptkriterien für das Screening von Hybridomen, die einen monoklonalen Antikörper mit MM1-Eigenschaften erzeugen sollen, dass sie einen monoklonalen Antikörper erzeugen, der (i) im Wesentlichen äquivalent an fPSA und cPSA bindet, aber (ii) im Wesentlichen

nicht in der Lage ist, an PSA zu binden, wenn PSA von einem fPSA-spezifischen Antikörper (einem E-Antikörper) gebunden wird. Alternativ dazu, aber weniger bevorzugt, können die Screeningkriterien auch sein, dass sie einen monoklonalen Antikörper erzeugen, der (i) im Wesentlichen äquivalent an fPSA und cPSA bindet, aber (ii), wenn er an PSA gebunden wird, das PSA im Wesentlichen unfähig zur Bindung an Antikörper macht, die für fPSA spezifisch sind, d. h. Antikörper, die fPSA, aber nicht cPSA binden können. Der Mechanismus, mit dem der monoklonale MM1-Antikörper der vorliegenden Erfindung arbeitet, um das obige Ergebnis zu liefern, wird nicht völlig verstanden; es wird jedoch spekuliert, dass die Bindung des monoklonalen Antikörpers an fPSA (d. h. Anti-E-Antikörper) die Epitope, die sowohl an fPSA als auch an cPSA verfügbar sind, bezüglich der Bindung durch einen oder mehrere Antikörper, die gegen solche Epitope gerichtet sind, blockiert, maskiert, verdeckt oder verändert. Repräsentativ für den monoklonalen MM1-Antikörper, der in der vorliegenden Erfindung eingesetzt wird, sind der MM1-Antikörper, der im Bayer-Immuno-1™-PSA-Assay (Bayer Corporation, Tarrytown, New York, USA) verwendet wird; die monoklonalen Antikörper, die von den Hybridomzelllinien 346.7.4 und 346.7.26 erzeugt werden, die von der Anmelderin der vorliegenden Erfindung (Bayer Corporation) am 10. April 1997 bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, hinterlegt wurden und die Hinterlegungsnummern HB-12338 bzw. HB-12337 erhielten; und monoklonale Antikörper, die im Wesentlichen an dasselbe Epitop binden wie irgendeiner der oben genannten Antikörper.

[0050] Die Reagentien und anderen Assaykomponenten, die für die praktische Durchführung des oben beschriebenen besonders bevorzugten Verfahrens zur Bestimmung von cPSA notwendig sind, werden zweckmäßigerweise in Form eines Testkits bereitgestellt, d. h. einer verpackten Sammlung oder Kombination, wie sie für die Bedürfnisse des Anwenders geeignet ist, und aller beteiligten Analysegeräte. Mindestens umfasst der Testkit die besonders charakterisierten Abfang- und Nachweisantikörper sowie einen oder mehrere Anti-E-Antikörper.

[0051] Es hat sich jetzt gezeigt, dass cPSA-Blutwerte bei männlichen Patienten im Vergleich zu den tPSA-Werten und fPSA/tPSA-Verhältniswerten des Standes der Technik eine erhebliche klinische Signifikanz ergeben. Insbesondere wurde eine Anfangsstudie unter Verwendung von Serumproben von 216 Patienten einschließlich 53 Patienten mit CaP, 75 Patienten mit BPH und 88 gesunden männlichen Kontrollen im Alter von über 50 Jahren durchgeführt (siehe unten, die in [Fig. 4A](#) angegebenen Daten). In dieser Anfangsstudie wurde festgestellt, dass die Obergrenze der Normalwerte des cPSA-Assays eine äquivalente Empfindlichkeit für den Nachweis von CaP im

Vergleich zur Messung von tPSA (85% gegenüber 88%) ergibt. Bei allen getesteten Patienten war die Spezifität in der normalen und der BPH-Population bezüglich cPSA ebenfalls vergleichbar im Vergleich zum fPSA/tPSA-Verhältnis. Diese Ergebnisse wurden in einer anschließenden Studie unter Verwendung von Serumproben von 300 einer Biopsie unterzogenen Patienten aus einer Urologie-Bezugspopulation einschließlich 75 Patienten mit CaP und 225 Patienten, die sich bei der Biopsie als frei von CaP erwiesen, bestätigt (siehe unten, die in [Fig. 3B](#) angegebenen Daten). Das Ergebnis, dass die Empfindlichkeit und Spezifität des tPSA-Assays, der in Verbindung mit einem fPSA/tPSA-Verhältnis verwendet wird, äquivalent ist zu dem des cPSA allein, erwies sich auch noch als gültig, wenn die Patientenpopulation in die diagnostische Grauzone hinein stratifiziert wurde. Der genaue Bereich der diagnostischen Grauzone wurde nicht definiert, aber in allen Bereichen, die in dieser Studie miteinander verglichen wurden, waren die Empfindlichkeit und Spezifität des cPSA-Assays mit denjenigen vergleichbar, der unter Verwendung von Assays sowohl für Gesamt- als auch für freies PSA erhalten wurden. Diese Daten zeigen, dass mit einem einzigen Test, cPSA, Prostatakrebs genauso effizient nachgewiesen werden kann wie mit Gesamt-PSA, und dass der cPSA-Assay außerdem die verbesserte Spezifität aufweist, von der sich gezeigt hat, dass sie bei Verwendung von zwei Assays, fPSA und tPSA, erhalten werden kann.

[0052] In den Studien, auf die oben Bezug genommen wird, betrug die Obergrenze des Normalwerts (zuweilen als Schwellenwert bezeichnet), die für die cPSA-Assay-Daten gewählt wurde, 3,75 ng/ml (ausgedrückt als äquivalente PSA-Konzentration). Diese Obergrenze des Normalwerts wurde ausgewählt, um in der Gruppe von Männern mit histologisch bestätigtem Krebs eine Empfindlichkeit für den CaP-Nachweis zu erreichen, die im Wesentlichen gleich ist wie die Empfindlichkeit, die man mit dem tPSA-Assay unter Verwendung eines Schwellenwerts von 4,0 ng/ml erhält (85% im Vergleich zu 88% in der Anfangsstudie und 81% im Vergleich zu 83% in der anschließenden Studie). Der Fachmann wird sich selbstverständlich darüber im Klaren sein, dass sich beim Testen von größeren Stichprobenpopulationen die optimale Obergrenze des Normalwerts für cPSA-Werte bis zu einem gewissen Grad verschieben kann, doch würde man erwarten, dass eine solche optimale Obergrenze des Normalwerts jedenfalls ungefähr zwischen 3 und 4 ng/ml fallen wird (äquivalent zu ungefähr 9–12 ng/ml PSA-ACT). Man würde im Allgemeinen davon ausgehen, dass die Wahl einer Obergrenze des Normalwerts von über 4 ng/ml zu einem klinisch unannehmbaren Niveau der Empfindlichkeit führt, während einige Kliniker der Meinung sein könnten, dass die Wahl einer Obergrenze des Normalwerts von unter 3 ng/ml eine erhöhte Empfindlichkeit mit einem

annehmbaren Verlust der Spezifität liefert. Man wird sich jedoch darüber im Klaren sein, dass das cPSA-Verfahren der vorliegenden Erfindung bei jedem gegebenen Niveau der Empfindlichkeit mit einem einzigen Assayergebnis im Vergleich zu herkömmlichen tPSA-Verfahren ein erheblich verbessertes Niveau der Spezifität und im Vergleich zu kürzlich veröffentlichten Verfahren auf der Basis des Verhältnisses zwischen zwei Assaywerten, z. B. fPSA/tPSA, ein äquivalentes oder verbessertes Niveau der Spezifität liefert. Es wird weiterhin in Betracht gezogen, dass der Nachweis von Prostatakrebs bei einem asymptomatischen männlichen Patienten durch serielle Messung von cPSA über die Zeit verstärkt wird, wie für serielle tPSA-Messungen gezeigt wurde (29).

[0053] Neben der oben diskutierten Verwendung beim Nachweis von Prostatakrebs wird die Messung von cPSA auch geeignet sein, um den Verlauf der Krankheit bei Patienten, bei denen Prostatakrebs diagnostiziert wurde, zu überwachen, insbesondere nachdem sie eine First-Line-Therapie für Prostatakrebs erhalten haben. Die Längsüberwachung solcher Patienten durch Messung von tPSA hat sich beim frühen Nachweis von rezidivierendem Prostatakrebs als nützlich erwiesen. cPSA gilt als krebsspezifische Form von PSA und ist die Form, von der man erwarten würde, dass sie im Serum zunimmt, wenn kryptische Krebszellen entfernte Metastasen etablieren und wachsen. Dementsprechend werden Änderungen der cPSA-Blutwerte über die Zeit mit Änderungen des Krankheitsstatus korrelieren, und insbesondere werden steigende cPSA-Blutwerte nach einer Therapie ein Rezidiv der Krankheit anzeigen.

[0054] Da man weiterhin davon ausgeht, dass cPSA in erster Linie aus PSA-ACT besteht, erstrecken sich die klinische Bedeutung und die Vorteile von cPSA auch auf PSA-ACT-Messungen (wie in der Studie, die die in [Fig. 6](#) angegebenen Daten hervorbrachte, gezeigt wird). Im Prinzip wären Immunoassayverfahren für die Bestimmung von PSA-ACT, die für die Durchführung mit zur Zeit erhältlichen Geräten am besten geeignet wären, immunometrische "Two-Site"-Assays, bei denen Anti-PSA-Antikörper in Kombination mit einem Anti-ACT-Antikörper oder einem Antikörper, der spezifisch für den PSA-ACT-Komplex ist, verwendet werden. Ein Verfahren zum Erreichen eines solchen letzteren Antikörpers besteht in der monoklonalen Selektion eines Antikörpers, der gegen ein konformatorisches Epitop auf dem PSA-ACT-Komplex gerichtet ist, z. B. am Punkt auf der Oberfläche des Komplexes, wo die ACT- und die PSA-Komponenten zusammentreffen, oder in dessen Nähe. Zur Zeit sind solche Verfahren jedoch nicht gut entwickelt und/oder leiden unter Problemen bei der Durchführung der Analyse, und dementsprechend erfordert die Messung von PSA-ACT so lange, bis weitere Verbesserungen erreicht werden, aufwändigere Techniken. Wie von Leinonen et al. ge-

zeigt wird, können PSA-ACT-Komplexe zum Beispiel durch Gelfiltrationschromatographie (Molekularsiebchromatographie) getrennt und in Assays, die entweder tPSA nachweisen oder spezifisch für PSA-ACT sind, gemessen werden (15).

[0055] Die vorliegende Erfindung wird jetzt anhand der folgenden Beispiele erläutert, soll jedoch nicht durch diese eingeschränkt werden.

Beispiele

[0056] Materialien. Zu den Anti-PSA-Antikörpern, die in diesen Studien verwendet werden, gehören MM1, ein monoklonalen Antikörper, der ein auf freiem PSA und auf mit Proteinase-Inhibitoren komplexiertem PSA exprimiertes Epitop erkennt. Der Antikörper wurde in Maus-Ascitesflüssigkeit erzeugt und durch Protein-A-Affinitätschromatographie unter Verwendung von Standardverfahren gereinigt. MP2 ist ein polyklonaler Anti-PSA-Antikörper, der in Ziegen erzeugt und durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem PSA gereinigt wurde. PSA 19, PSA 20, PSA 30 (CanAG Diagnostics AB, Gothenburg, Schweden) und ME2 (Biospacific, Emeryville, CA, USA) sind monoklonale Antikörper, die das E-Epitop von PSA erkennen. ACT 53 (CanAG Diagnostics) ist ein ACT-spezifischer monoklonaler Antikörper. Freies prostataspezifisches Antigen (Scripps Laboratories, San Diego, CA, USA) wurde mit 98% Reinheit durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aus humaner Samenflüssigkeit gereinigt und in einem Puffer aufbewahrt, der 10 mM Tris, 0,1% Natriumazid, pH 8,0, enthält. PSA-ACT (Scripps Laboratories, San Diego, CA, USA) zeigte bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese > 96% Reinheit und wurde in einem Puffer, der 10 mM Natriumacetat, 150 mM Natriumchlorid und 0,1% Natriumazid enthielt, pH 5,6, aufbewahrt.

[0057] Der Bayer-Immuno-1TM-PSA-Assay. Der Bayer-Immuno-1-Gesamt-PSA-(tPSA)-Assay ist ein Sandwichassay, der einen monoklonalen Antikörper zum Abfangen und einen polyklonalen Antikörper für den Nachweis von PSA verwendet. Der monoklonale Anti-PSA-Antikörper (MM1) ist mit Fluorescein (R1) konjugiert, und der affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper (MP2) ist mit Alkalischer Phosphatase (R2) konjugiert. Die Antikörper werden in einem Puffer, der 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, und 5% hitzeinaktiviertes normales Ziegenserum enthält (Biocell Laboratories, Carson, CA, USA), auf 1,5 µg/ml für R1 und 6,15 µg/ml für R2 verdünnt. Ein 65-µl-Volumen von jedem der beiden Antikörper wird 20 min lang in einer Reaktionsküvette bei 37°C mit 20 µl der Testprobe inkubiert, und der resultierende Immunkomplex (R1-PSA-R2) wird durch die Zugabe von Magneteilchen, die mit monoklonalen Anti-Fluorescein-Antikörpern beschichtet sind (20 µl), abgefangen. Nach ei-

nem Waschschrift zur Entfernung von überschüssigen Reagentien und Probenkomponenten werden 300 µl 23 mM p-Nitrophenylphosphat hinzugefügt. Die Geschwindigkeit der Farbbildung wird durch Extinktionsmessungen bei 405 oder 450 nm überwacht, und die Geschwindigkeit der Farbbildung ist direkt proportional zur Konzentration von PSA in der Testprobe. Weitere Einzelheiten findet man in J. Clin. Lab. Anal. (1996), 10: 155–159. Die Eichung des Bayer-Immuno-1-Analyzers wird unter Verwendung von Bayer-Immuno-1-SET-Point®-PSA-Eichsubstanzen durchgeführt, die aus freiem PSA in Konzentrationen von 0, 2, 10; 25, 50 und 100 ng/ml hergestellt werden. Ein kubischer Durch-Null-Anpassungsalgorithmus wird verwendet, um eine Standard Eichkurve zu erzeugen.

[0058] Bayer-Immuno-1-fPSA-Assay. Die Vorschrift, die für den oben beschriebenen Bayer-Immuno-1-Gesamt-PSA-Assay verwendet wurde, wurde für die Messung von freiem PSA angepasst, indem man als R1-Abfangantikörper einen an Fluorescein konjugierten, für freies PSA spezifischen monoklonalen Antikörper (PSA 19, CanAG) verwendete. Der monoklonale Anti-fPSA-R1 wurde mit demselben Konjugat von polyklonalem Anti-PSA und Alkalischer Phosphatase (R2) verwendet, wie es im Gesamt-PSA-Assay verwendet wurde. Das R1-Konjugat wurde auf 2,5 µg/ml verdünnt, und der R2 wurde in einer Konzentration von 6,15 µg/ml verwendet. Die anderen Bedingungen waren ähnlich denen, die im tPSA-Assay verwendet wurden, außer dass das Probenvolumen 35 µl pro Test betrug und das Volumen der zugefügten magnetischen Teilchen 15 µl pro Test betrug.

[0059] Bayer-Immuno-1-PSA-ACT-Verfahren. Das Bayer-Immuno-1-PSA-ACT-Assayformat ist dasselbe wie das des Bayer-Immuno-1-tPSA-Assays, abgesehen von den folgenden Änderungen: (1) ein für ACT spezifischer monoklonaler Antikörper, ACT 53, wird mit Alkalischer Phosphatase konjugiert und für den Nachweis bei 2 µg/ml verwendet; (2) PSA-ACT wird als Eichsubstanz und Kontroll-Antigen mit dem 50 mM MES-Puffer, 6% BSA, pH 5,8, verwendet; und (3) eine Vorschrift mit zwei Waschschriften wird verwendet, so dass das Antigen zuerst mit Abfangantikörper inkubiert wird, der resultierende Komplex gewaschen wird, um ungebundenes Antigen und andere Serumkomponenten zu entfernen, und dann der Nachweisantikörper hinzugefügt wird.

Ergebnisse

[0060] Auswahl und Optimierung von spezifischen Antikörpern für die Hemmung der fPSA-Immunreaktivität im Gesamt-PSA-Assay. Die vorliegende Erfindung beruht auf der Beobachtung, dass der Gesamt-PSA-Assay spezifisch für PSA-Protease-Inhibitor-Komplexe gemacht werden kann, indem man ei-

nen Antikörper gegen das E-Epitop von PSA hinzugefügt. Vier monoklonale Antikörper, PSA 19, PSA 20, PSA 30 und ME2, die für das E-Epitop auf dem PSA-Molekül spezifisch sind, wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Reaktivität von freiem PSA im Gesamt-PSA-Assay zu senken. Die im Gesamt-PSA-Assay verwendeten Eichsubstanzen wurden unter Verwendung von 100% freiem PSA hergestellt, das aus Samenflüssigkeit gereinigt wurde. Die Anti-E-Antikörper PSA 19, PSA 20 und PSA 30 wurden in Konzentrationen von 0, 10, 25, 50, 100 und 200 µg/ml zu der 50 ng/ml PSA-Eichsubstanz gegeben. Nach 30 bis 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden diese Gemische als unbekannte Proben im Gesamt-PSA-Assay laufen gelassen, und die Ausbeute an PSA wurde bestimmt. Wie in [Fig. 1A](#) gezeigt ist, zeigte jeder der drei monoklonalen Antikörper PSA 19, PSA 20 und PSA 30 im Gesamt-PSA-Assay eine signifikante Hemmung der Reaktivität von freiem PSA. Diese reduzierte Immunreaktivität von freiem PSA war für jeden der Antikörper konzentrationsabhängig, aber nur PSA 20 näherte sich der Sättigung an. Von diesen drei Anti-E-Antikörpern ergab PSA 20 die größte Reduktion des Signals von freiem PSA. In einem getrennten Experiment wurden PSA 20 und ME2 auf ihre Fähigkeit hin, die Bindung von freiem PSA im tPSA-Assay zu hemmen, miteinander verglichen. Monoklonale Antikörper wurden in Konzentrationen im Bereich von 0 bis 400 µg/ml zu der 10 ng/ml Eichsubstanz gegeben. Wie in [Fig. 1B](#) zu erkennen ist, hemmt der ME2-mAb die Bindung von freiem PSA im Gesamt-PSA Assay quantitativ und erreicht eine Sättigung bei einer Konzentration von weniger als 6,125 µg/ml. Diese Daten zeigen, dass mehrere E-Epitop-Antikörper die Fähigkeit haben, die Bindung des MM1-Antikörpers an freies PSA zu hemmen. Der ME2-mAb hemmt jedoch die Bindung von freiem PSA im Gesamt-PSA-Assay bei einer viel niedrigeren Konzentration und in einem größeren Ausmaß als andere E-Epitop-Antikörper. Diese Hemmung könnte auf eine höhere Affinität des ME2-Antikörpers zum E-Epitop zurückzuführen sein. Alternativ dazu kann das E-Epitop auch eine Sammlung von Epitopen mit verschiedenen Feinepitopspezifitäten repräsentieren.

[0061] Messung von komplexiertem PSA mit dem Bayer-Immuno-1-Analyser. Die Zugabe der mAbs PSA 20 und ME2 zu dem Gesamt-PSA Assay beseitigt den größten Teil der Immunreaktivität, die mit freiem PSA verbunden ist. Um die quantitative Messung von komplexiertem PSA zu demonstrieren, wurden Gemische mit verschiedenen Anteilen an freiem und ACT-komplexiertem PSA bei einer Gesamt-PSA-Konzentration von ungefähr 11 ng/ml hergestellt. Die Gemische enthielten Verhältnisse von freiem zu komplexiertem PSA von 100 : 0, 80 : 20, 50 : 50, 20 : 80 und 0 : 100. Diese Gemische wurden unter Verwendung von drei Immunoassayformaten auf dem Bayer-Immuno-1-Analyser gemessen: dem

kommerziellen Assay für Gesamt-PSA (tPSA), dem Bayer-Immuno-1-fPSA-Assay für freies PSA und dem Bayer-Immuno-1-cPSA-Assay für komplexiertes PSA. Der Bayer-Immuno-1-cPSA-Assay war identisch mit dem tPSA-Assay, außer dass für die in [Fig. 2A](#) gezeigten Ergebnisse der mAb PSA 20 in einer Endkonzentration von 300 µg/ml zu jeder Probe gegeben wurde und das MM1-Fluorescein-Konjugat von 1,5 µg/ml auf 0,5 µg/ml reduziert wurde. Für das in [Fig. 2B](#) gezeigte Experiment wurde der mAb ME2 in einer Endkonzentration von 25 µg/ml zu jeder Probe gegeben, und das MM1-Fluorescein-Konjugat wurde wiederum bei 0,5 µg/ml verwendet. Für die Messung von Gesamt-PSA und freiem PSA wurde der Bayer-Immuno-1-Analyser mit dem Bayer-Immuno-1-SET-Point-PSA-Eichsubstanzsatz geeicht, welcher kommerziell für den Bayer-Immuno-1-Gesamt-PSA-Assay verwendet wird. Zur Messung von komplexiertem PSA (cPSA) wurden Eichsubstanzen im Bereich von 0–100 ng/ml hergestellt, wobei man mit ACT komplexiertes PSA in 50 mM MES, 6% BSA, pH 5,8, verwendete.

[0062] Die Zugabe des mAb PSA 20 zu dem Gesamt-PSA-Assay ergibt ein Verfahren mit fast quantitativer Reaktivität gegenüber komplexiertem PSA ([Fig. 2A](#)). Das Ansprechverhalten auf die verschiedenen Gemische im cPSA-Assay war linear, und die gemessene Konzentration an Gesamt-PSA und komplexiertem PSA ergab konsistente Ausbeuten von ungefähr 10 ng/ml für alle getesteten Proben, wie erwartet. Ähnlich liefert der mAb ME2 ein Verfahren mit quantitativer Reaktivität gegenüber komplexiertem PSA über den vollständigen Bereich der Anteile an freiem und komplexiertem PSA ([Fig. 2B](#)). Außerdem verwendet der cPSA-Assay mit dem mAb ME2 eine erheblich geringere Konzentration des mAb ME2 (25 µg/ml), als sie für den mAb PSA 20 erforderlich ist (300 µg/ml). Diese Daten zeigen, dass drei Antikörper, die mit verschiedenen Epitopen auf dem PSA-Molekül reagieren (MM1, MP2 und entweder PSA 20 oder ME2) in Kombination verwendet werden können, um ein Verfahren zu ergeben, mit dem sich komplexiertes PSA genau messen lässt.

[0063] Automatisierung des cPSA-Assays. Eine Vorbehandlung von Patientenproben mit mAb gegen das E-Epitop ist für die Anwendung in der klinischen Laborumgebung nicht durchführbar. Eine genaue Abgabe von mAb in die Probe ist schwierig und zeitraubend und führt zu einer unannehmbar hohen Wahrscheinlichkeit einer Ungenauigkeit des Ergebnisses. Daher wurden Verfahren für eine volle Automatisierung des cPSA-Assays entwickelt.

[0064] Automatisierte mAb-PSA-20-Verfahren. Im Assayformat 1 wurde der mAb PSA 20 in einer Konzentration von 500 µg/ml zu dem MM1-Fluorescein-Reagens R1 gegeben, und der Assay wurde wie beim tPSA-Verfahren durchgeführt, wobei man

PSA-ACT zur Eichung verwendete. Dieser Assay dauert bis zum Ende 38 Minuten. Im Assayformat 2 wird die Probe mit dem mAb PSA 20 on-board vorbehandelt. In diesem Format wurde der PSA-20-Antikörper zusammen mit der Patientenprobe zu der Reaktionsküvette gegeben und 50 Minuten lang inkubiert. Dann wurden MM1-Fluorescein in einer Konzentration von 0,5 µg/ml, MP2-ALP in einer Konzentration von 6,15 µg/ml und mit Anti-Fluorescein-Antikörpern beschichtete magnetische Teilchen hinzugefügt und weitere 28 Minuten lang inkubiert. Nach dem Wegwaschen von überschüssigen Reagentien und nicht umgesetztem Serum wurde Substrat hinzugefügt, und die Farbbildung wurde in derselben Weise wie für den tPSA-Assay überwacht. Proben, die freies PSA über einen Konzentrationsbereich von 2 ng/ml bis 25 ng/ml enthielten, wurden verwendet. Die Ergebnisse in [Fig. 3](#) zeigen, dass das Signal mit freiem PSA effektiv auf sehr niedrige Niveaus reduziert werden kann, indem man einen dieser Ansätze verwendet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass dieses Verfahren auf dem Bayer-Immuno-1-Analyser voll automatisiert werden kann.

[0065] Automatisiertes mAb-ME2-Verfahren. Der mAb ME2 hemmt die Bindung des mAb MM1 an fPSA im tPSA-Assay in einer erheblich niedrigeren Konzentration und in größerem Ausmaß als der mAb PSA 20. Zusätzlich dauert das Assayformat 2 länger und benötigt zwei Reagentienkassetten. Daher wurde der mAb ME2 zur Verwendung als dritter Antikörper für die Automatisierung des cPSA-Assays durch Zugabe zum tPSA-Assay in zwei Methoden ausgewählt: ME2 mit einer Konzentration von 50 bzw. 100 ng/ml wurde entweder zum Reagens 1 (R1) oder zum Reagens 2 (R2) gegeben. Die Ergebnisse zeigten, dass die fPSA-Reaktivität zu 97% bzw. 98% gehemmt wurde, wenn ME2 zu R1 bzw. R2 gegeben wurde. Auf der Grundlage dieser Daten wurde bestimmt, dass man den cPSA-Assay unter Verwendung des mAb ME2 im R2-Reagens in einer Endkonzentration von 100 µg/ml formulieren würde.

[0066] Messung von komplexiertem PSA im Serum.

[0067] Pilotstudie. – Serumproben von 53 Patienten mit Prostatakrebs, 75 Patienten mit BPH und 88 Proben von gesunden altersangepassten Kontrollpatienten wurden unter Verwendung der drei Assay tPSA, fPSA und cPSA analysiert. Im cPSA-Assay getestete Proben wurden mit 25 µg/ml ME2-Antikörper vorbehandelt, und im fPSA- und tPSA-Assay getestete Proben waren unbehandelt. Die Assays wurden geeicht, wobei man entweder freies PSA oder PSA-ACT-Komplexe verwendete, wie es oben beschrieben ist. Die Ergebnisse dieser Tests sind in [Fig. 4A](#) gezeigt. Die Obergrenze des Normalwerts von 3,75 ng/ml (ausgedrückt als äquivalente PSA-Konzentration) wurde ausgewählt, um eine Empfindlichkeit des CaP-Nachweises in der Gruppen

von Männern mit histologisch bestätigtem Krebs zu erreichen, die im Wesentlichen gleich der Empfindlichkeit ist, die man unter Verwendung eines Schwellenwerts von 4,0 ng/ml im tPSA-Assay erhält (85% im Vergleich zu 88%). Mit dieser Obergrenze des Normalwerts war die Spezifität in den in dieser Studie getesteten normalen und BPH-Populationen auch vergleichbar hinsichtlich cPSA im Vergleich zu einem zweistufigen Test, bei dem man nach einem positiven tPSA-Ergebnis einen fPSA-Assay durchführte und das fPSA/tPSA-Verhältnis berechnete. Das Ergebnis, dass die Empfindlichkeit und Spezifität des tPSA-Assays, der in Verbindung mit einem fPSA/tPSA-Verhältnis verwendet wird, äquivalent zu der des cPSA allein ist, galt auch noch, wenn die Patientenpopulation in die diagnostische Grauzone hinein stratifiziert wurde. Der genaue Bereich der diagnostischen Grauzone wurde nicht definiert, aber in allen Bereichen, die in dieser Studie verglichen wurden, waren die Empfindlichkeit und Spezifität des cPSA-Assays mit denjenigen vergleichbar, die man unter Verwendung sowohl von tPSA- als auch fPSA-Assay erhält. Diese Daten zeigen, dass ein einziger Test, ein cPSA-Assay, Prostatakrebs genauso effizient wie ein Gesamt-PSA-Assay nachweisen kann und außerdem die verbesserte Spezifität hat, von der gezeigt wurde, dass sie erhältlich ist, wenn man zwei Assays, fPSA- und tPSA-Assay, verwendet.

[0068] Klinische Studie. – Serumproben von 300 einer Biopsie unterzogenen Patienten (75 mit bestätigtem Prostatakrebs) wurden im Seattle VA Hospital, Seattle, Washington, USA, analysiert, wobei man die folgenden drei Assays verwendete: tPSA (unter Verwendung des Hybritech-Tandem[®]-PSA-Assays, San Diego, Kalifornien, USA), fPSA (unter Verwendung des Hybritech-Tandem[®]-fPSA-Assays) und cPSA (unter Verwendung des oben beschriebenen automatisierten mAb-ME2-Verfahrens). Die Assays wurden unter Verwendung von entweder freiem PSA oder von PSA-ACT-Komplexen geeicht, wie es oben beschrieben ist. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabellenform in [Fig. 4B](#) und als Regressionsanalyse in [Fig. 4C](#) gezeigt. Die Obergrenze des Normalwerts von 3,75 ng/ml (ausgedrückt als äquivalente PSA-Konzentration) wurde wiederum gewählt, um eine Empfindlichkeit für den CaP-Nachweis in der Gruppe von Männern mit histologisch bestätigtem Krebs zu erreichen, die ähnlich ist wie die Empfindlichkeit, die man unter Verwendung eines Schwellenwerts von 4,0 ng/ml im tPSA-Assay erhält (81% im Vergleich zu 83%). Mit dieser Obergrenze des Normalwerts war die Spezifität in den in dieser Studie getesteten normalen und BPH-Populationen auch vergleichbar hinsichtlich cPSA im Vergleich zum zweistufigen Test (siehe oben, tPSA + fPSA/tPSA). In [Fig. 4C](#) stellen Datenpunkte in Form von kleinen Kreisen, die im unteren rechten Quadranten der Graphik erscheinen, diejenigen Nicht-Krebs-Patienten (34 von 117 oder 29%) dar, die das Risiko, die Unan-

nehmlichkeiten und die Kosten einer Biopsie hätten vermeiden können, wenn ihr cPSA-Wert anstelle ihres tPSA-Werts als Basis für diese medizinische Entscheidung verwendet worden wäre. Außerdem galt wie in der Pilotstudie das Ergebnis, dass die Empfindlichkeit und Spezifität des tPSA-Assays, der in Verbindung mit einem fPSA/tPSA-Verhältnis verwendet wird, äquivalent zu der des cPSA allein ist, auch noch, wenn die Patientenpopulation in die diagnostische Grauzone hinein stratifiziert wurde (siehe oben).

[0069] Die Daten aus den unabhängigen Studien, der Pilot- und der klinischen Studie, zeigen, dass ein einziger Test, ein cPSA-Assay, Prostatakrebs so effizient wie ein tPSA-Assay nachweisen kann und außerdem die verbesserte Spezifität hat, von der sich gezeigt hat, dass sie bei Verwendung von zwei Assays, fPSA und tPSA, erhalten werden kann.

[0070] Korrelation zwischen cPSA und PSA-ACT. Um zu bestimmen, welche Spezies von komplexiertem PSA im cPSA-Assay gemessen werden, wurde ein Assay entwickelt, um mit ACT komplexiertes PSA zu messen. Es wurde berichtet, dass diese Spezies von komplexiertem PSA die vorherrschende Form von komplexiertem PSA in Serum darstellt. Frühere Versuche, PSA-ACT unter Verwendung von manuellen Verfahren zu messen, waren mit technischen Schwierigkeiten verbunden, wie oben diskutiert wurde. Dementsprechend wurde ein automatisierter Immunoassay für die Messung von PSA-ACT-Komplexen auf dem Bayer-Immuno-1TM-System entwickelt. Dieselbe Population von Patienten, die oben in der Pilotstudie beschrieben wurde, wurde unter Verwendung des automatisierten Assays für PSA-ACT getestet. Die Ergebnisse sind in den [Fig. 6A–6F](#) gezeigt, wo die unter Verwendung des automatisierten PSA-ACT-Assays erhaltenen Ergebnisse einer Regressionsanalyse gegenüber den unter Verwendung des automatisierten cPSA-Assays erhaltenen Ergebnissen unterzogen wurden. Für jede Patientenpopulation, d. h. normale, solche mit Prostatakrebs und solche mit gutartiger Prostatakrankheit (BPH), wurde eine Regressionsanalyse für alle Patientenproben und über den Bereich, der den größten Teil der Patiententestergebnisse enthält, durchgeführt. Dies geschah, um systematische Fehler in der Regressionsanalyse aufgrund einer kleinen Zahl von hohen Werten zu beseitigen. In jedem Fall lagen die Steigungen der Regressionsgeraden im Bereich von 0,93–0,98. Diese Daten lassen vermuten, dass es sich bei ungefähr 93–98% der im cPSA-Assay gemessenen Substanzen um PSA-ACT handelt. Die biochemische Natur der übrigen 2–7% cPSA ist zur Zeit nicht bekannt.

[0071] Spezifität von PSA-Assays bei ausgewählten Empfindlichkeiten. Die Obergrenze des Normalwerts, die für den cPSA-Assay verwendet wurde, wurde so

bestimmt, dass sie die gleiche Empfindlichkeit wie im tPSA-Assay ergab. Unter Verwendung dieses Schwellenwerts wurde gezeigt, dass der cPSA-Assay eine verbesserte Spezifität gegenüber Verfahren, die zur Zeit in der medizinischen Praxis verwendet werden, d. h. tPSA-Assays, liefert. Die Spezifität des cPSA-Assays wurde auch unter Verwendung von verschiedenen Werten für die Obergrenze des Normalwerts gemessen. Alle Ergebnisse, die aus der oben beschriebenen klinische Studie stammten, wurden in einer ROC-Analyse verwendet (ROC: receiver-operator characteristic). Dann wurde aus der ROC-Analyse die Spezifität bei verschiedenen Niveaus der Empfindlichkeit im Bereich von 80–100% bestimmt. Empfindlichkeiten von weniger als 80% haben wenig medizinischen Wert, da diagnostische Verfahren in der derzeitigen Praxis wenigstens dieses Empfindlichkeitsniveau liefern. Die in [Fig. 7](#) gezeigten Ergebnisse zeigen, dass der cPSA-Assay bei allen Empfindlichkeitsniveaus eine gegenüber dem tPSA-Assay zusätzliche Empfindlichkeit und eine ungefähr äquivalente oder geringfügig bessere Spezifität als bei Verwendung der zwei Assays, tPSA- und fPSA-Assay, liefert. Außerdem gilt die Verbesserung der Spezifität auch dann, wenn die Patientenproben in die diagnostische Grauzone hinein stratifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Obergrenze des Normalwerts für den cPSA-Assay je nach dem gewünschten Niveau der Empfindlichkeit und Spezifität über einen weiten Bereich gewählt werden kann, dass der cPSA-Assay aber bei allen Werten für die Obergrenze des Normalwerts im Bereich zwischen etwa 3 und 4 ng/ml eine gegenüber dem tPSA-Assay verbesserte Spezifität und eine ungefähr äquivalente Spezifität wie das fPSA/tPSA-Verhältnis ergibt.

Literatur

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979; 17: 159–63.
2. Watt WK, Lee PT, Timkulu TM, Chan WP, Loo R. Human prostate-specific antigen: structure and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 3166–70.
3. Akiyama K, Nakamura T, Iwanaga S, Hara M. The chymotrypsin-like activity of human prostate-specific antigen, r-seminoprotein. *FEBS Letters* 1987; 225: 168–72.
4. Christensson A, Laurel CB, Lilja H. Enzymatic activity of prostatic-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem* 1990; 194: 755–763.
5. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 1985; 76: 1899–903.
6. Lilja H, Abrahamsson PA. Three predominant proteins secreted by the human prostate gland. *Prostate* 1980; 12: 29–38.
7. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela IA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostate cancer patients. *Cancer Res* 1980; 40: 2428–2432.
8. Lange PH. Prostate specific antigen in diagnosis and management of prostate cancer. *Supplement to Urology* 1990; XXXI: 25–29.
9. Oesterling JE. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1991; 145: 907–923.
10. Armbruster DA. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods and clinical application. *Clin Chem* 1993; 39: 181–195.
11. American Cancer Society: *Cancer facts & figures – 1995*. American Cancer Society, Inc., Atlanta, GA. Page 11.
12. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, Waters, WB, MacFarlane MT and Southwick PC. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6, 630 men. *J Urol* 1994; 151: 1283–1290.
13. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and α 121-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: 222–226.
14. Zhou AM, Tewari PC, Bluestein BL, Caldwell, GW, Larsen FL. Multiple forms of prostate-specific antigen in serum: differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assays. *Clin Chem* 1993; 39: 2483–91.
15. Leinonen J, Lovgren T, Vornanen J, Stenman UH. Double-label time-resolved immunofluorometric of prostate-specific antigen and its complex with α ₁-antichymotrypsin. *Clin Chem* 1993; 39: 2098–2103.
16. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, Nilsson O, Dahlen U, Matikainen MT, Cockett AT, Abrahamsson PA. Serum prostate specific antigen complexed with α ₁-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol* 1993; 150: 100–105.
17. Lilja H. Significance of different molecular forms of serum PSA. The free, noncomplexed forms of PSA versus that complexed to α ₁-antichymotrypsin. *Urol Clin North Am* 1993; 20 (4): 681–686.
18. Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen M-T, Nilsson O, Pettersson K and Lovgren T: Prostate-specific antigen in human serum occurs predominantly in complex with alpha-antichymotrypsin. *Clin Chem* 1991; 37: 1618–1625.
19. Bjork T, Hulkko S, Bjartell A, Santagnese AD, Abrahamsson P-A, Lilja H. Alpha₁-antichymotrypsin production in PSA-producing cells is common in prostate cancer but rare in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 1994; 43: 427–434.
20. Pettersson K, Piironen T, Seppala M, Liukkonen

- L, Christensson A, Matikainen M-T, Suonpaa M, Lovgren T, Lilja H. Free and complexed prostate-specific antigen (PSA): in vitro stability, epitope map, and development of immunofluorometric assays for specific and sensitive detection of free PSA and PSA- α_1 -antichymotrypsin complex. *Clin Chem* 1995; 41: 1480–1488.
21. Wu JT, Wilson L, Zhang P, Meikle AW, Stephenson R. Correlation of serum concentrations of PSA-ACT complex with total PSA in random and serial specimens from patients with BPH and prostate cancer. *J Clin Lab Anal* 1995 9: 15–24.
22. Mitrinen K, Pettersson K, Piironen T, Bjork T, Lilja H, Lovgren T. (1995) Dual label one-step immunoassay for simultaneous measurement of free and total prostate specific antigen concentrations and ratios in serum. *Clin Chem* 1995 41 (8): 1115–1120.
23. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhouse HG, Ratliff TL, Nadler RB. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA* 1995 274 (15): 1214–1220.
24. Prestigiacomo AF, Stamey TA. Clinical usefulness of free and complexed PSA. *Scan J Clin. Lab Invest* 1995 55 Supple 221: 32–34.
25. Wang TJ, Hill TM, Sokoloff RL, Frankenne F, Rittenhouse HG, Wolfert RL. Dual monoclonal antibody immunoassay for free prostate-specific antigen. *Prostate* 1996 28: 10–16.
26. Jung K, Stephan C, Lein M, Henkne FV, Schnorr D, Brux B, Schurenkamper P, Loening SA. Analytical performance and clinical validity of two free prostate-specific antigen assays compared. *Clin Chem* 1996 42 (7): 1026–1033.
27. Wang TJ, Hill T, Sokoloff R, Frankenne F, Wolfert R, and Rittenhouse H. Monoclonal antibody sandwich immunoassay to quantitate free PSA in benign hyperplasia and prostate cancer. Poster presentation at 1994 ISOBM meeting.
28. Chan D, Kelley CA, Partin AW, Linton J, Wang TJ, Sokoloff RL, Rittenhouse HG, and Wolfert RL. *Clin Chem* (1996) 42 (6): S 255.
29. Wang TJ, Linton J, Payne J, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Chan DW, Kelley CA and Partin AW. Clinical utility of a complexed PSA immunoassay with a specific monoclonal antibody to PSA-ACT. *J Urology* (1997) 157 (4) Suppl: 147.
30. Wang TJ, Linton HJ, Payne J, Liu R-S, Kuus-Reichel K, Rittenhouse HG, Kelley C, Coa J, Chan DW, and Wolfert RL. Development of monoclonal antibodies specific for the PSA-ACT complex and their incorporation into an immunoassay. *Clin Chem* (1997) 43 (6): S 225.
31. Zhang P and Wu, JT. Development of an immunoassay for the PSA ACT complex in serum without interference of non-specific adsorption. *Clin Chem* (1997) 43 (6): S 236.
33. Bjork T, Bjartell A, Abrahamsson P-A, Hulkko S, Di Sant'agnese A, Lilja H. Alpha₁-antichymotrypsin production in PSA-producing cells is common in prostate cancer but rare in benign prostatic hyperplasia. *Urol* 1994 43 (4): 427–434.
33. Carter HB, Pearson JD, Metter J, Brant LJ, Chan DW, Andres R, Fozard JL and Walsh PC. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 1992 267 (16): 2215.
34. Wu JT, Zhang P, Bandhauer ME, Wilson L, Astill ME, and Colemere JT. Purification of PSA-ACT Complex; Characterization of PSA-ACT Complex by Various Chromatographic Procedures. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1995 9: 25–31
35. Wu JT. Assay for Prostate Specific Antigen (PSA): Problems and Possible Solutions. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1994 8: 51–62
36. Tillyer CR, Konings M, Gobin PT, and Iqbal J. Disagreement between the Roche Cobas Core and Hybritech TANDEM®-E PSA assays when measuring free, complexed and total serum prostate specific antigen. *Ann Clin Biochem* 1994 31: 501–505

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von komplexiertem prostataspezifischem Antigen (cPSA) in einer Blutprobe, die folgenden Schritte umfassend:
 - (a) Behandeln von Gesamt-PSA (tPSA) in der Blutprobe mit einem Antikörper, der an freies PSA (fPSA), aber nicht an cPSA bindet, so dass wenigstens 90% des freien PSA (fPSA) im Wesentlichen nicht durch einen Immunoassay nachweisbar ist; und
 - (b) Bestimmen von PSA in der behandelten Blutprobe durch Immunoassay, wobei in dem Assay im Wesentlichen nur cPSA nachweisbar ist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei Schritt (a) bewerkstelligt wird, indem man fPSA vom Rest der Blutprobe abtrennt, und wobei Schritt (b) mit diesem Rest der Blutprobe durchgeführt wird.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–2, wobei der Immunoassay ein immunometrischer "Two-Site"-Assay ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei die zwei Antikörper, die in dem immunometrischen "Two-Site"-Assay eingesetzt werden, beide monoklonal sind.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, die folgenden Schritte umfassend:
 - (a) In-Kontakt-Bringen der Blutprobe mit drei Anti-PSA-Antikörpern unter Bildung eines flüssigen Testgemischs:
 - (i) einem ersten Anti-PSA-Antikörper, der an Gesamt-PSA (tPSA) bindet;
 - (ii) einem dritten Anti-PSA-Antikörper, wobei der dritte Antikörper an fPSA, aber nicht an cPSA bindet, wobei das fPSA durch die Bindung des dritten Antikörpers an das fPSA in dem Verfahren im Wesentlichen nicht nachgewiesen werden kann; und

(iii) einem zweiten Anti-PSA-Antikörper, der an tPSA bindet, der aber im Wesentlichen nicht in der Lage ist, an PSA zu binden, wenn PSA an einen Antikörper gebunden ist, der an freies PSA (fPSA), aber nicht an cPSA bindet, wobei entweder der erste oder der zweite Antikörper markiert ist ("markierter Antikörper") und der andere zu Zwecken der Abtrennung aus dem flüssigen Testgemisch immobilisiert ist oder immobilisiert werden kann ("Abfangantikörper");
 (b) Abtrennen des Abfangantikörpers aus dem flüssigen Testgemisch; und
 (c) Messen der Markierung in der abgetrennten Abfangantikörperphase oder im Rest des flüssigen Testgemischs.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei der zweite Anti-PSA-Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei der dritte Anti-PSA-Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei der monoklonale dritte Anti-PSA-Antikörper im Wesentlichen an dasselbe Epitop bindet wie der von der Zelllinie ATCC HB-12337 oder HB-12338 produzierte monoklonale Antikörper.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5–8, wobei der erste Anti-PSA-Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

10. Verfahren zur Unterstützung des Nachweises von Prostatakrebs bei männlichen humanen Patienten, die folgenden Schritte umfassend:

(a) Messen der Menge an komplexiertem prostataspezifischem Antigen (cPSA) in einer von einem solchen Patienten erhaltenen Blutprobe durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1–9; und
 (b) Bestimmen, ob der cPSA-Blutspiegel des Patienten größer ist als eine Obergrenze des Normalbereichs von etwa 3–4 ng/ml.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei die Obergrenze des Normalbereichs etwa 3,75 ng/ml beträgt.

12. Verfahren zur Überwachung des Verlaufs einer Krankheit bei einem männlichen Patienten, bei dem Prostatakrebs diagnostiziert wurde, umfassend die Durchführung einer Reihe von Immunoassays im Laufe der Zeit nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–9 zur Bestimmung von Veränderungen der Menge an komplexiertem prostataspezifischem Antigen (cPSA) in von einem solchen Patienten erhaltenen Blutproben, wobei Änderungen im cPSA-Blutspiegel mit Änderungen des Krankheitsstatus korrelieren.

13. Verfahren zur Überwachung des Verlaufs ei-

ner Krankheit bei einem Patienten, der wegen Prostatakrebs behandelt wurde, umfassend die Durchführung einer Reihe von Immunoassays im Laufe der Zeit nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–9 zur Bestimmung von Veränderungen der Menge an komplexiertem prostataspezifischem Antigen (cPSA) in von einem solchen Patienten erhaltenen Blutproben, wobei Erhöhungen im cPSA-Blutspiegel ein Rezidiv der Krankheit anzeigen.

14. Testkit zur Verwendung bei der Bestimmung von komplexiertem prostataspezifischem Antigen (cPSA) in einer Blutprobe, umfassend:

(1) einen ersten Anti-PSA-Antikörper, der an Gesamt-PSA (tPSA) bindet;
 (2) einen zweiten Anti-PSA-Antikörper, der an tPSA bindet, der aber im Wesentlichen nicht in der Lage ist, an PSA zu binden, wenn PSA an einen Antikörper gebunden ist, der an freies PSA (fPSA), aber nicht an cPSA bindet, wobei entweder der erste oder der zweite Antikörper markiert ist und der andere zu Zwecken der Abtrennung aus einem wässrigen flüssigen Testgemisch immobilisiert ist oder immobilisiert werden kann; und
 (3) einen dritten Anti-PSA-Antikörper, wobei der dritte Antikörper an fPSA, aber nicht an cPSA bindet.

15. Testkit gemäß Anspruch 14, wobei der zweite Anti-PSA-Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

16. Testkit gemäß Anspruch 15, wobei der dritte Anti-PSA-Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei der monoklonale dritte Anti-PSA-Antikörper im Wesentlichen an dasselbe Epitop bindet wie der von der Zelllinie ATCC HB-12337 oder HB-12338 produzierte monoklonale Antikörper.

18. Testkit gemäß einem der Ansprüche 14–17, wobei der erste Anti-PSA-Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

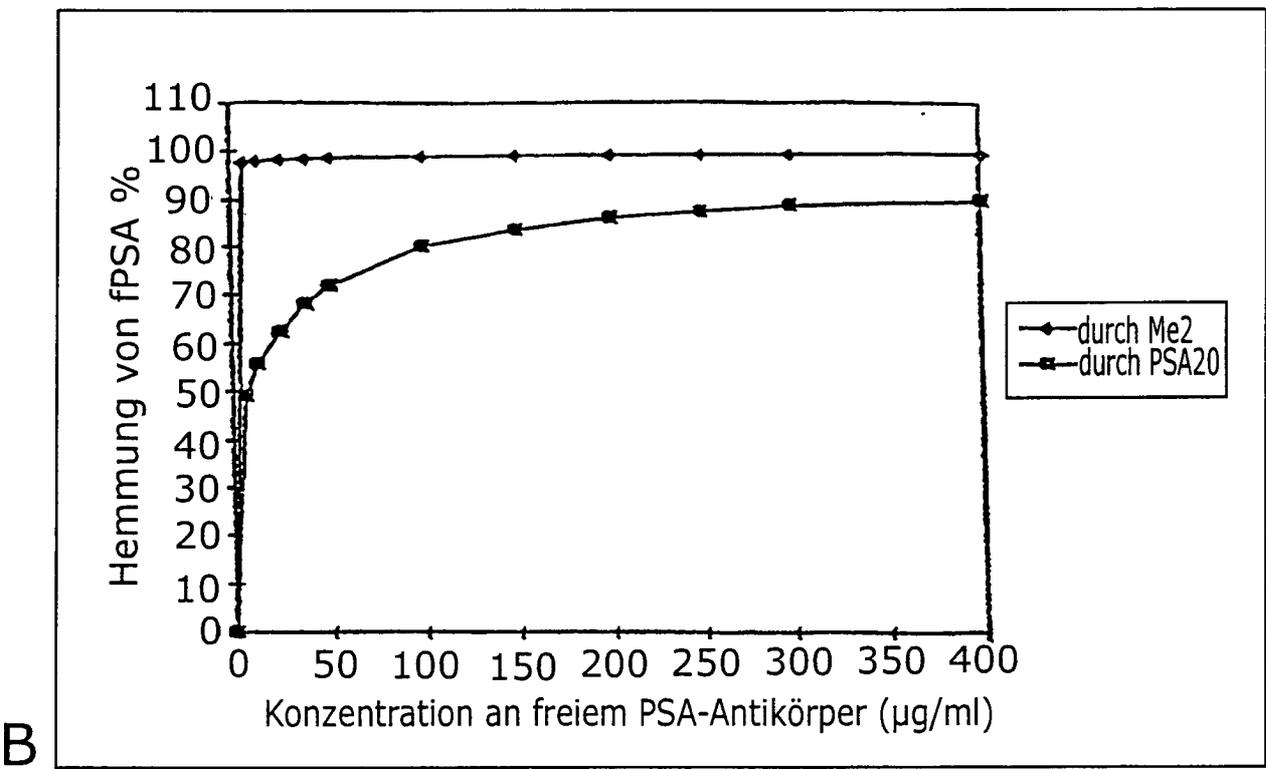
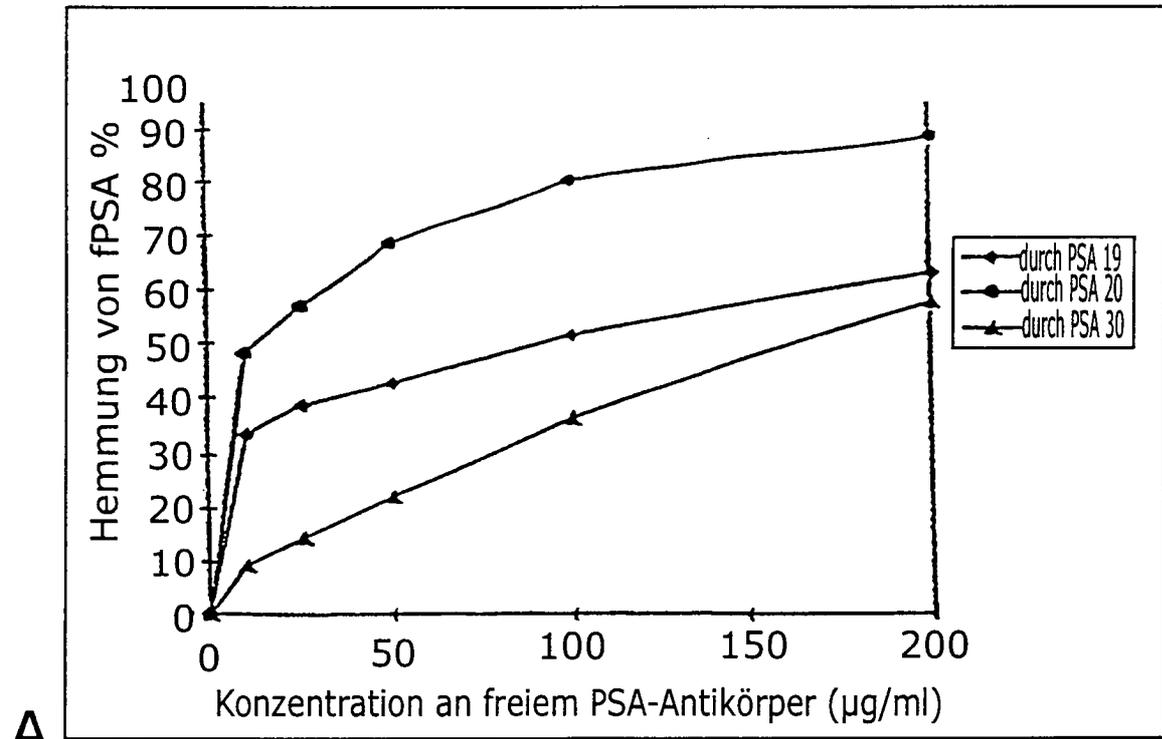


Fig.1

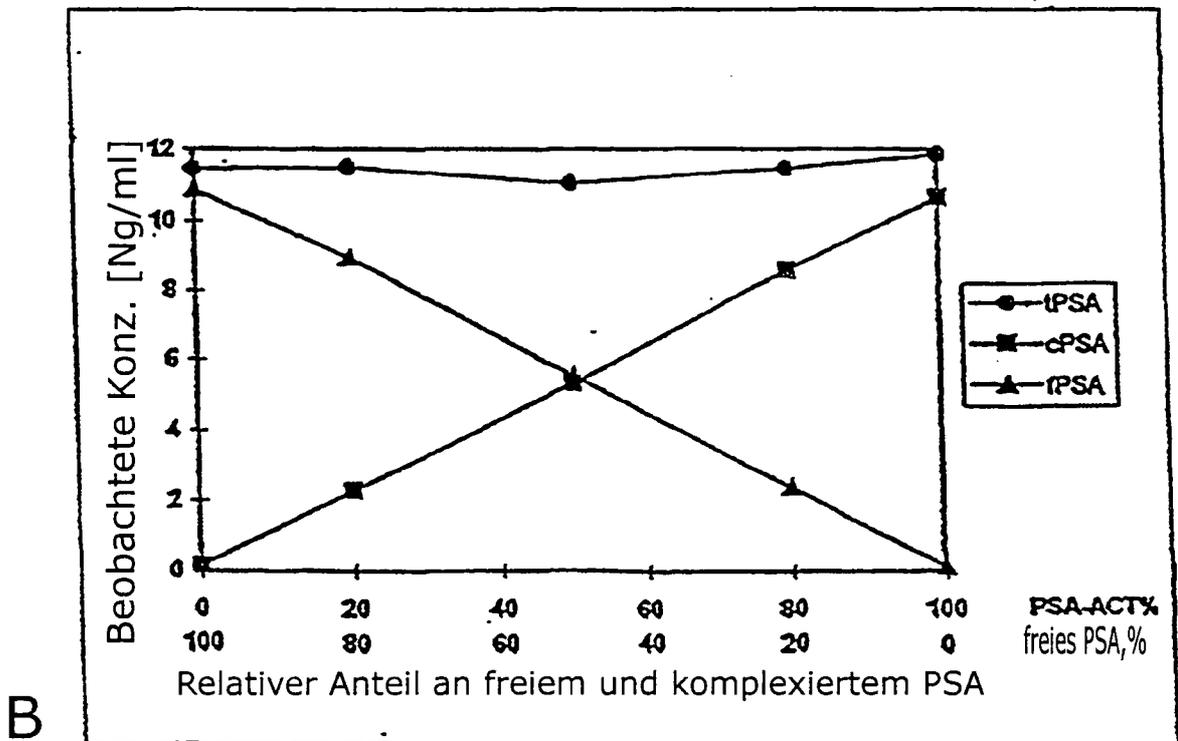
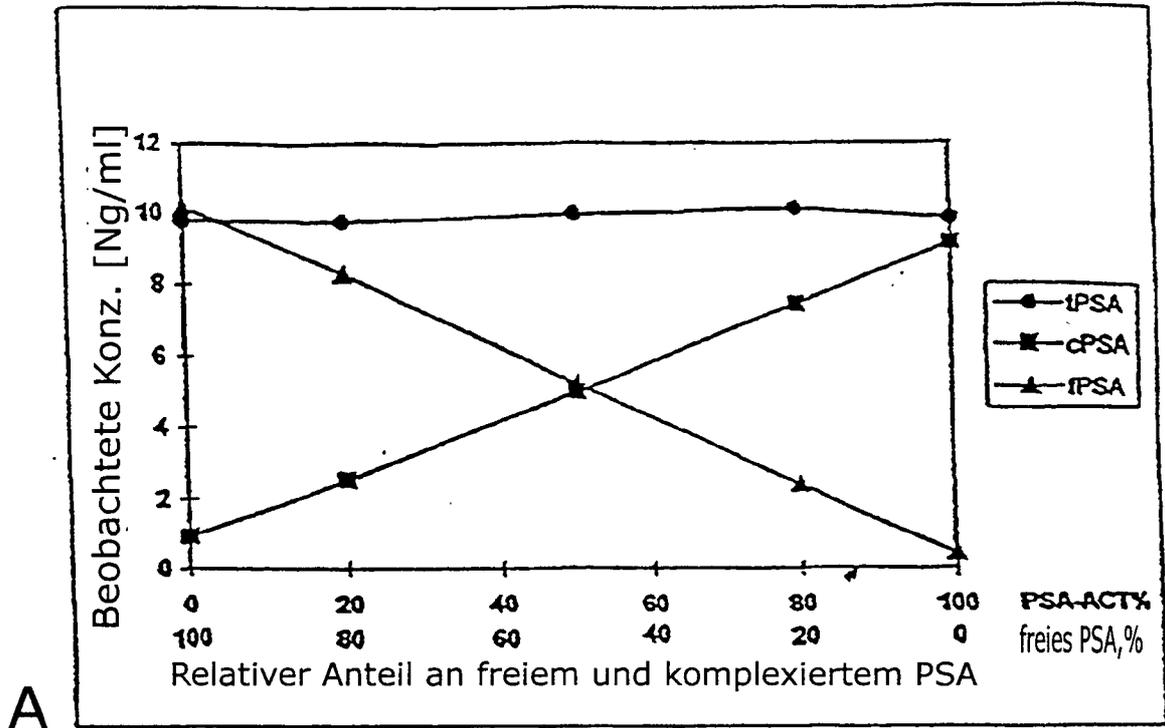


Fig.2

Probe	Format 1			Assayformat 2		
	Reaktionsgeschwindigkeit [mA/min]		% Hemmung	Reaktionsgeschwindigkeit [mA/min]		% Hemmung
	-PSA20	+PSA20		-PSA20	+PSA20	
1	40,6	2,2	95	36,5	1,1	97
2	229,7	11	95	168	10,7	94
3	447	27	94	395	24,6	94

Fig.3

POPULATION*	Empfindlichkeit				Spezifität			
	n	tPSA** %	t + f/t## %	cPSA# %	n	tPSA %	t + f/t %	cPSA %
Alle	53	88	83	85	163	75	82	80
0 - 20*	74	85	85	81	190	70	79	76
0 - 10*	46	76	74	70	178	76	82	81
4 - 10*	35	100	97	91	43	0	26	23

* auf der Basis der Gesamt-PSA-Werte

** Empfindlichkeit und Spezifität auf der Basis einer Obergrenze des Normalwerts von 4,0 ng/ml

Empfindlichkeit und Spezifität auf der Basis einer Obergrenze des Normalwerts von 3,75 ng/ml

Empfindlichkeit und Spezifität für tPSA auf der Basis einer Obergrenze des Normalwerts von 4,0 und einer Obergrenze des Normalwerts für das f/t-Verhältnis von 25%

+ beinhaltet Patienten, die anhand von Werten im Bereich von 0-20 ng/ml ausgewählt wurden

Fig. 4A

POPULATION*	Empfindlichkeit				Spezifität			
	n	tPSA** %	t + f/t## %	cPSA# %	n	tPSA %	t + f/t %	cPSA %
Alle	75	83	77	81	225	33	44	48
0 - 20	72	82	76	81	223	34	44	49
0 - 10	49	73	69	71	192	39	49	57
4 - 10	38	100	94	97	117	0	17	29

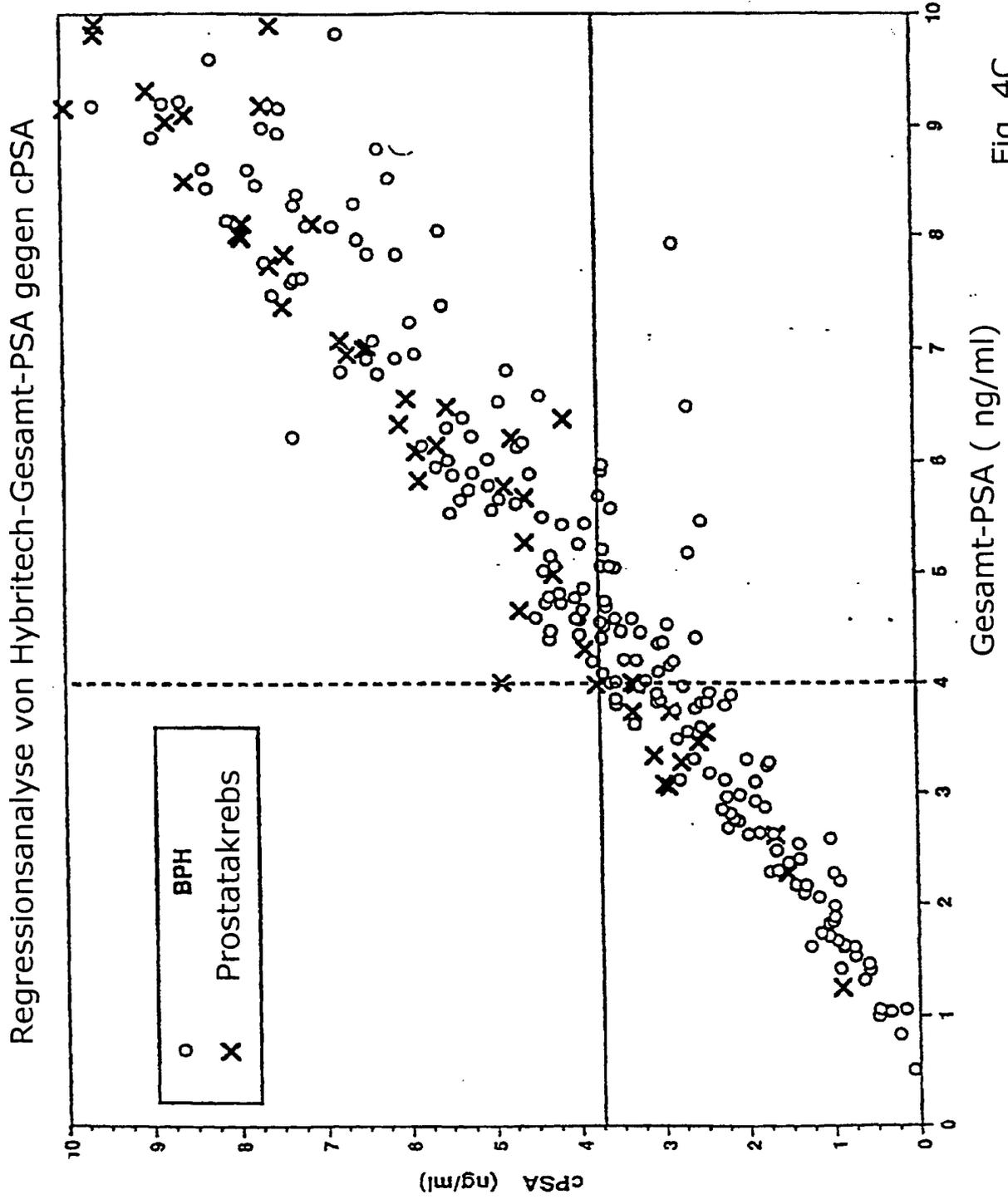
* auf der Basis der Gesamt-PSA-Werte

** Empfindlichkeit und Spezifität auf der Basis einer Obergrenze des Normalwerts von 4,0 ng/ml

Empfindlichkeit und Spezifität auf der Basis einer Obergrenze des Normalwerts von 3,75 ng/ml

Empfindlichkeit und Spezifität für tPSA auf der Basis einer Obergrenze des Normalwerts von 4,0 und einer Obergrenze des Normalwerts für das f/t-Verhältnis von 25%

Fig. 4B



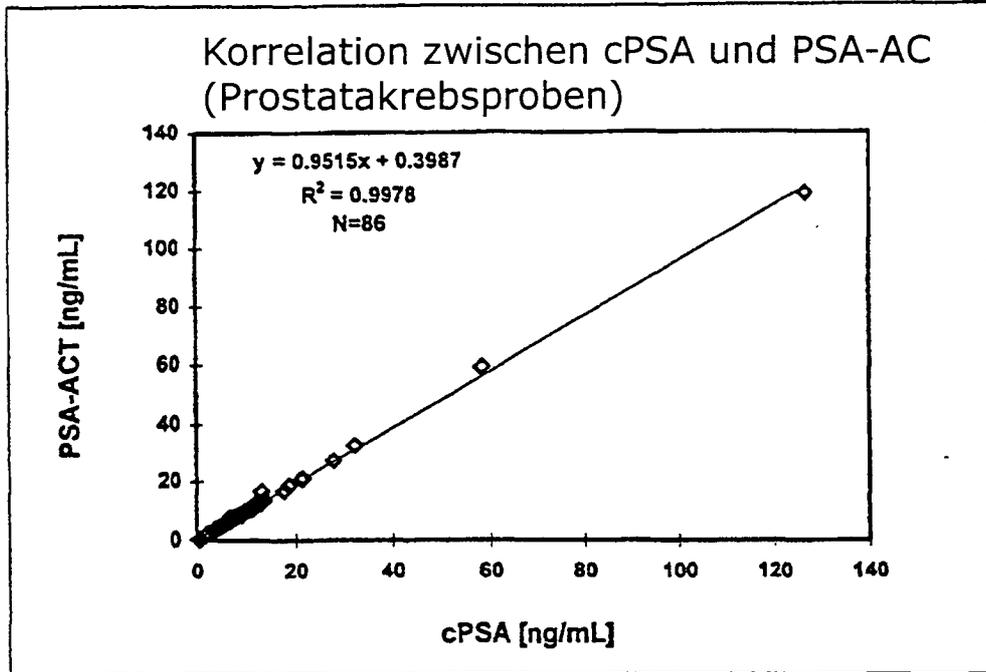


Fig. 5A

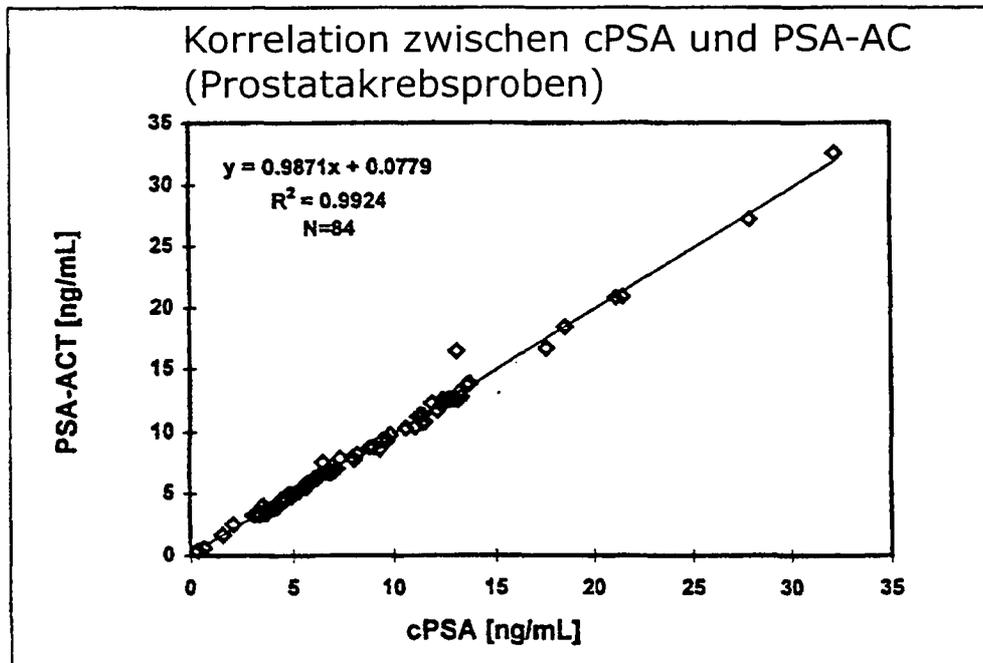


Fig. 5B

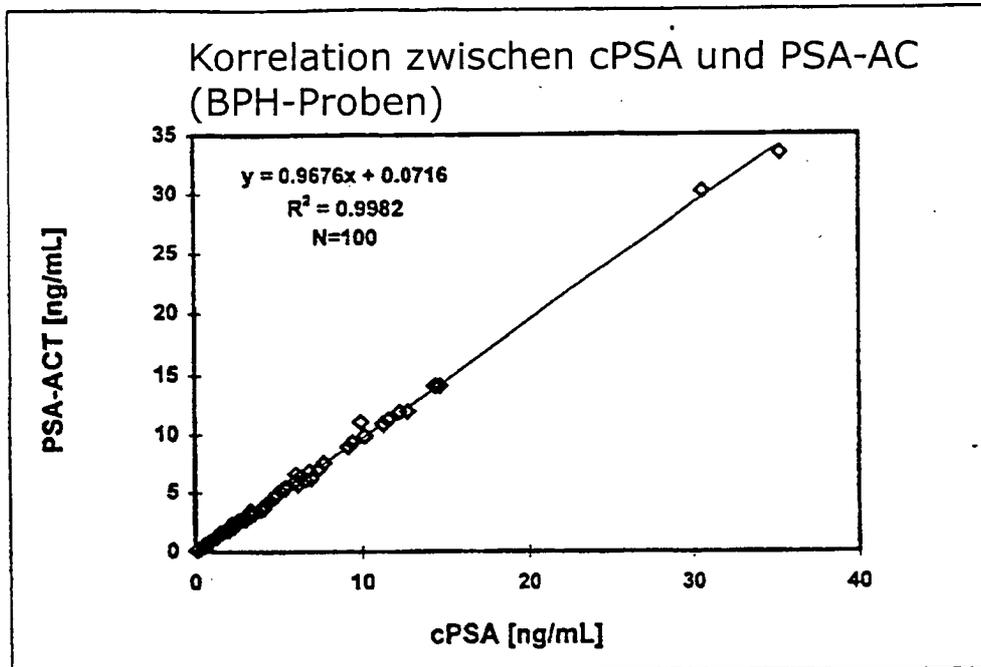


Fig. 5C

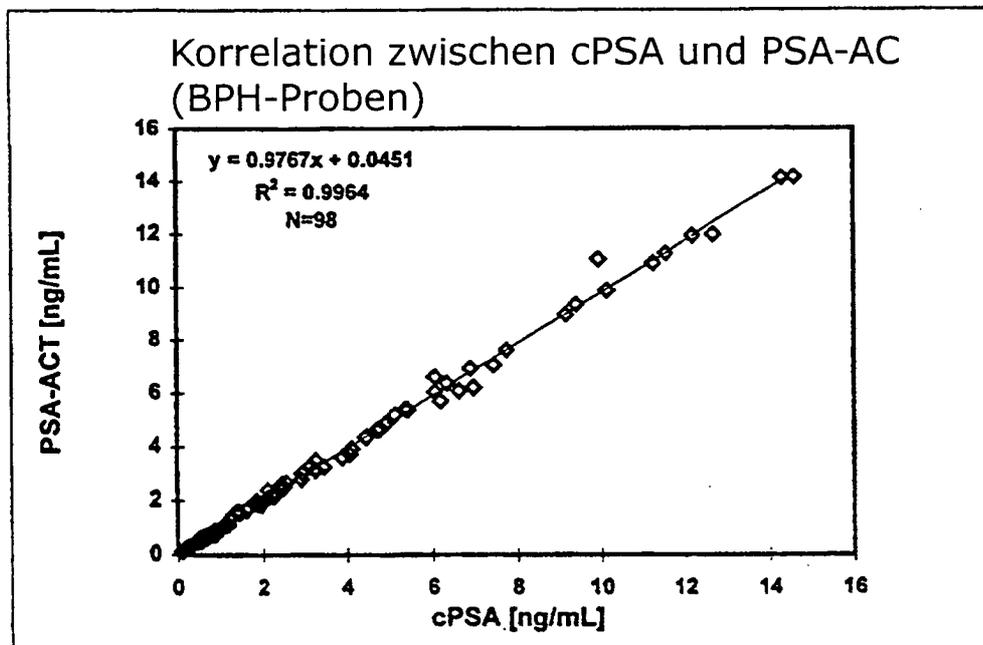


Fig. 5D

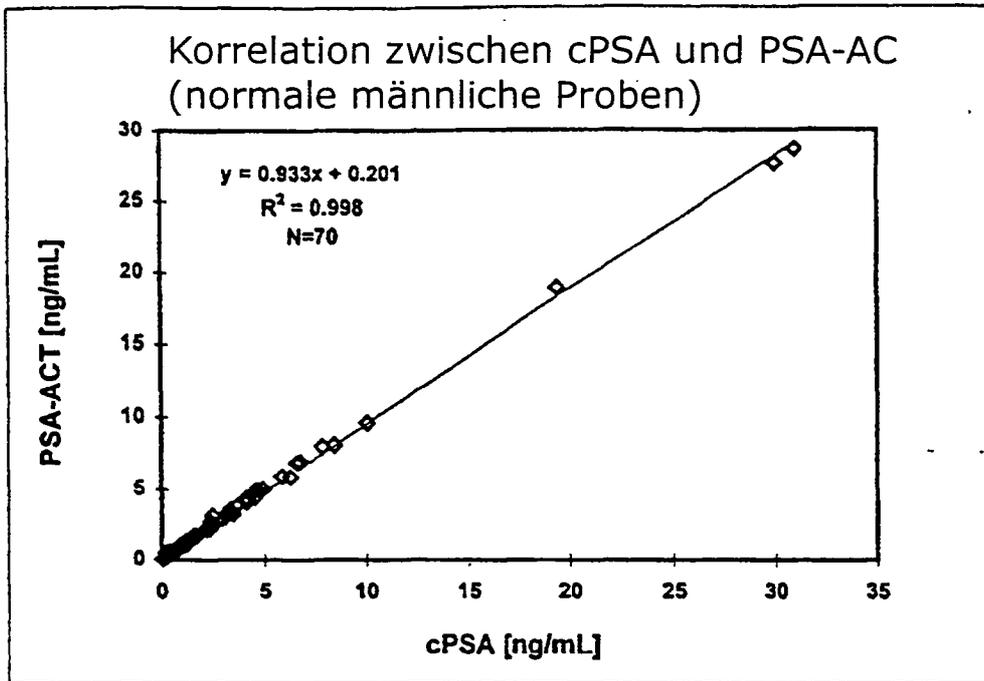


Fig. 5E

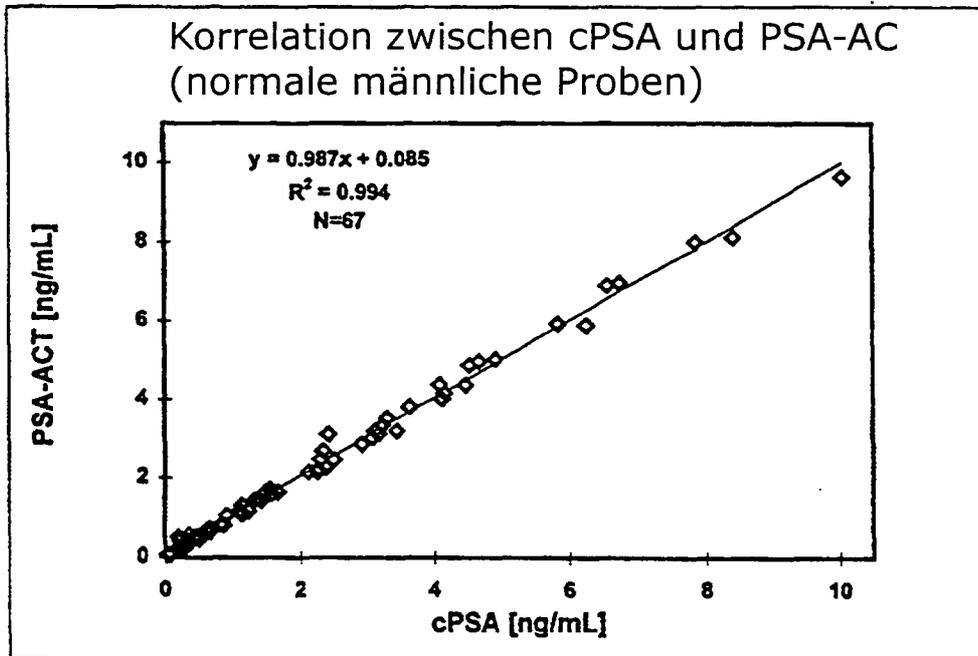


Fig. 5F

POPULATION*	Empfindlichkeit			Spezifität		
	cPSA# n	%	PSA-ACT# n	cPSA n	%	PSA-ACT n
Alle	53	85	86	163	80	165
0 - 20*	74	81	79	190	76	159
0 - 10*	46	70	53	178	81	150
4 - 10*	35	91	40	43	23	40

* auf der Basis der Gesamt-PSA-Werte

Empfindlichkeit und Spezifität auf der Basis einer Obergrenze des Normalwerts von 3,75 ng/ml

+ beinhaltet Patienten, die anhand von Werten im Bereich von 0-20 ng/ml ausgewählt wurden

Fig.6

Spezifität von PSA-Assays bei ausgewählten Empfindlichkeiten - alle Proben

% Empfindlichkeit	tPSA		Spezifität cPSA		F/t-PSA-Verhältnis	
	Schwelle	% Spezifität	Schwelle	% Spezifität	Schwelle	% Spezifität
80	4.11	35.6	3.98	51.6	19	46.2
85	3.86	31.1	3.34	38.7	22	32.4
90	3.4	25.3	2.94	33.8	24	26.2
95	3.06	21.8	2.52	26.7	28	15.6
97.5	2.28	12.9	1.67	14.7	32	8.9
100	1	3.1	0.89	6.2	67	0

Spezifität von PSA-Assays bei ausgewählten Empfindlichkeiten - nur 4 bis 10 ng/ml tPSA

% Empfindlichkeit	tPSA		Spezifität cPSA		F/t-PSA-Verhältnis	
	Schwelle	% Spezifität	Schwelle	% Spezifität	Schwelle	% Spezifität
80	5.27	38.1	4.55	43.9	20	29.8
85	4.66	22.9	4.21	34.2	22	25.4
90	4.01	0.8	3.92	25.4	24	19.3
95	3.99	0	3.36	7.9	29	11.4
100	4	0	3.26	7	34	4.4

Fig.7