(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 286 T2** 2005.12.29

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 741 868 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 286.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/14902**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 906 713.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/018381**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.12.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **06.07.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.11.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **02.03.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **G01N 33/574**
G01N 33/573, G01N 33/577, A61K 39/395

(30) Unionspriorität:
174964 **29.12.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL

(73) Patentinhaber:
Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill., US

(74) Vertreter:
Schieber und Kollegen, 80469 München

(72) Erfinder:
DOWELL, L., Barry, Mundelein, US; KING, A., Carol, Highland Park, US; ALEXANDER, B., Debra, Gurnee, US; SMITH, H., Allan, Zion, US; O'MORCHOE, B., Susan, Woodbridge, US

(54) Bezeichnung: **IMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNGEN VON PROSTATA-SPEZIFISCHEM ANTIGEN**

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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet von Krebs-Immunoassays. Genauer wird ein neues Immunoassayverfahren für prostataspezifisches Antigen (PSA) präsentiert. Ebenfalls präsentiert wird ein PSA-anti-PSA-Komplex, welcher einem Komplex aus PSA und α_1-Antichymotrypsin (ACT) ähnelt, der als ein Kalibrator und/oder eine Kontrolle in einem Immunoassay für PSA verwendet werden kann.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Prostataspezifisches Antigen (PSA) wurde zuerst beschrieben durch Wang, M. C., et al., Invest. Urol, 17: 159 (1979). Es ist eine Absonderung des Prostataepitheliums und wird auch durch Prostatakrebszellen gebildet. PSA wurde bestimmt als ein Glykoproteinmonomer mit einem Molekulargewicht von 33–34,000 Dalton mit Proteaseaktivität (Wang, M. C., et al., siehe oben, und Ban, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 123: 482 (1984). In jüngerer Zeit ist die Aminosäuresequenz des Antigens berichtet worden (Watt, W. K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 3166 (1986)) und das Gen für PSA ist kloniert worden (Lundwall, A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 161: 1151 (1989)). Die Entwicklung eines Enzymimmunoassays durch Kuriyama, et al., machte es möglich, geringe Konzentrationen von PSA in dem Blut von Patienten mit maligner und benigner Prostataerkrankung und einem signifikanten Teil normaler Männer zu detektieren (Kuriyama, M., et al., Cancer Res., 40: 4658 (1980)).

[0003] Ein PSA-Test kann signifikanten Wert haben beim Detektieren einer metastasierenden oder persistierenden Erkrankung bei Patienten im Anschluss an eine operative oder medizinische Behandlung von Prostatakrebs (Lange, P. H., et al., Urology 33 (6 suppl): 13, (Juni 1989); und Killian, C. S. et al., Cancer Res. 45: 886 (1985)). Eine persistierende Erhöhung von PSA im Anschluss an eine Behandlung oder ein Anstieg des Nachbehandlungs-PSA-Basislinienspiegels zeigt eine rezidivierende oder restliche Krankheit an (Brawer, M. K., et al., Urology, 33 (5 Suppl): 11 (Mai, 1989); Siddal, J. K., et al., Eur. Urol. 12:1:3 (1986); Stamey, T. A., et al., N. Engl. J. Med. 317: 909 (1987); Lange, P. H., et al., J. Urol. 141: 873 (1989); Stamey, T. A., et al., J. Urol. 141: 1076 (1989); Stamey, T. A., et al., J. Urol. 141: 1084 (1989), Stamey, T. A., et al., J. Urol. 141: 1088 (1989); und Chan, D. W., et al., Clin. Chem. 33: 1916 (1987)).

[0004] Ein PSA-Test allein wird weder empfohlen als ein Screening-Verfahren in der allgemeinen Population, noch als ein Leitfaden bei der Krankheitseinstufung (Disease Staging). Statt dessen ist er weit verbreitet akzeptiert als ein beigeordneter Test bei der Versorgung von Prostatakrebspatienten (Kuriyama, M., et al., J. Natl. Cancer Inst. 68: 99 (1982); Stamey, T. A, et al., N. Engl. J. Med. 317: 909 (1987); Lange, P. H., et al., J. Urol. 141: 873 (1989); Stamey, T. A., et al., J. Urol. 141: 1076 (1989); Stamey, T. A., et al., J. Urol. 141: 1084 (1989); Stamey, T. A., et al., J. Urol. 141: 1088 (1989); Chan, D. W., et al., Clin. Chem. 33: 1916 (1987); und Oesterling, J. E., et al., J. Urol. 139: 766 (1988)).

[0005] Messungen der Serumkonzentration von PSA haben nun weit verbreitete Verwendung gefunden bei der Überwachung von Patienten mit Prostatakrebs, auch wenn erhöhte Serumkonzentrationen von PSA ebenfalls bei benigner Prostatahyperplasie und sekundär zu einem Operationstrauma der Prostata berichtet worden sind (Duffy, Ann. Clin. Biochem., (1989); Brawer, et al., Urology Suppl. (1989)).

[0006] PCT-Patentanmeldung WO 92/01936, "Assay of Free and Complexed Prostata Specific-Antigen (PSA)" von Lilja, H., et al., veröffentlicht am 6. Februar 1992, offenbart Immunoassays für freies PSA sowie PSA als ein Proteinasehemmer-Komplex. Das freie PSA und der PSA-Komplex werden durch einen nicht-kompetitiven Immunoassay gemessen, der mindestens zwei unterschiedliche monoklonale Antikörper verwendet. Die Erfindung ist weiter dadurch gekennzeichnet, dass der interessierende PSA-Proteinasehemmer-Komplex entweder mit α_1-Antichymotrypsin (ACT), α_1-Proteasehemmer (API) oder α_2-Makroglobulin gebildet wird. Weiter ist die Erfindung dadurch gekennzeichnet, dass freies PSA, der PSA-Proteinasehemmer-Komplex und deren Verhältnis zu Gesamt-PSA bei der Diagnose von Patienten mit Prostatakrebs angewendet werden.

[0007] Die Patentanmeldung offenbart drei monoklonale Antikörper ("MAB"). PSA komplexiert mit ACT ("PSA-ACT-Komplex") und freies PSA wurden identifiziert durch MAB 2E9 und 2H11. MAB 5A10 erkennt freies PSA, aber nicht den PSA-ACT-Komplex. MAB 2E9 ist der einzige Anti-PSA-MAB, der ohne weiteres freies PSA und PSA-ACT-Komplex auf Immunoblots identifizierte. Weder der Anti-PSA-MAB 2E9, noch 2H11 oder 5A10 blockierten signifikant die Bindung des jeweils anderen an Festphasen-gebundenes PSA.

[0008] Unter Verwendung unterschiedlicher Kombinationen des MAB in nicht-kompetitiven Immunoassays von Humanseren fand die Anmeldung heraus, dass eine erhöhte klinische Spezifität erreicht wird durch Messen sowohl des freien PSA als auch des PSA-ACT-Komplexes und dass die Verhältnisse zwischen freiem PSA/Gesamt-PSA und freiem PSA/PSA-ACT-Komplex sich signifikant unterscheiden zwischen benignen Prostatahyperplasie- und Prostatakrebspatienten.

[0009] MAB, die spezifisch sind für freies PSA, und solche, die reaktiv sind mit PSA-ACT-Komplex, sind kommerziell erhältlich, zum Beispiel von CanAg Diagnostics AB, Gothenburg, Schweden. Durch Inhibitionsstudien und Analysen der Dosis-Antwort von verschiedenen Kombinationen ihrer MAB fand CanAg Diagnostics AB mindestens 9 Hauptantigendeterminantengruppen auf dem PSA-Molekül. Eine Gruppe ihrer MAB-definierten Epitope war sowohl auf nicht komplexiertem PSA als auch auf PSA-ACT-Komplex exponiert, und eine andere Gruppe ihrer MAB-definierten Epitope war nur in freiem PSA exponiert. (CanAg Diagnostics AB, Nilsson et al., Epitope mapping of PSA, and development of assays for determination of different isoforms of PSA, und die Zusammenfassung des gleichen Titels, Abstract P 38, J. Tumor Marker Oncology, 10th. Int'l Conference on Human Tumor Markers, 8.–11. September 1993, Bonn, Deutschland.)

[0010] Kompetitive Radioimmunoassays für PSA sind kommerziell erhältlich (z.B. von PROS-CHECK PSA, Yang Laboratories, Inc., Bellevue, Washington). PROS-CHECK PSA verwendet polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen PSA, und PSA markiert mit Iod^{125}.

[0011] Aktuell gibt es zwei Typen von nicht-kompetitiven PSA-Sandwich-Immunoassays auf dem Markt. Der erste Typ sind Sandwich-Assays, welche zwei Sätze von MAB verwenden, die spezifisch sind für PSA: (1) ein Satz MAB ("Einfangantikörper") ist auf eine feste Phase gebunden, um PSA in einer Probe einzufangen, und (2) der andere Satz MAB ("Sondenantikörper") ist markiert und in freier Lösung, um das eingefangene PSA für seine Detektion zu binden. Diese Assays werden hierin als "MONO-Assays" bezeichnet. Im Allgemeinen wird die Bindung von diesen MAB an PSA nicht verhindert durch die Bindung von ACT an PSA. Das heißt, im Allgemeinen können diese MAB sowohl freies PSA als auch PSA-ACT-Komplex binden. Beispiele für solche Assays sind die Hybritech Tandem-E- und Tandem-R-PSA-Assays (Hybritech, La Jolla, CA).

[0012] Der zweite Typ von Sandwichassays verwendet MAB, die spezifisch sind für PSA, auf der festen Phase, und polyklonale Antikörper gegen PSA als Sondenantikörper. Im Allgemeinen kann der MAB in diesen Assays sowohl freies PSA als auch den PSA-ACT-Komplex binden. Im Gegensatz dazu enthält der Pool von polyklonalen Antikörpern Antikörper, die sowohl freies PSA als auch PSA-ACT-Komplex binden können, und Antikörper, welche freies PSA binden können, aber nicht den PSA-ACT-Komplex. In dem letzteren Fall sind die Epitope, die durch diese Antikörper gebunden werden, blockiert durch die Bindung des ACT an PSA. Beispiele für diese Assays sind der Abbott IMx® PSA-Assay (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) und der ACS™ PSA-Assay (Ciba-Corning Diagnostics Corporation, East Walpole, MA).

[0013] Es ist herausgefunden worden, dass der zweite Typ von Sandwichassays bevorzugt freies PSA gegenüber dem PSA des PSA-ACT-Komplexes detektiert (dieses Phänomen wird hierin als "systematischer Fehler (bias)" bezeichnet). Andererseits zeigen einige MONO-Assays keinen derartigen systematischen Fehler. Siehe Bluestein, B., et al., J. Tumor Marker Oncology, 7 (4) 41 (1992).

[0014] Es ist herausgefunden worden, dass es in dem Serum von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) mehr freies PSA als PSA-ACT-Komplexe gibt. Andererseits gibt es in dem Serum von Prostatakrebspatienten mehr PSA-ACT-Komplexe als freies PSA. (Lilja, H., et al., Clin. Chem., 37: 1618 (1991); Stenman, U., et al., Cancer Res., 51: 222 (1991); Lilja, H., et al., Cancer Suppl., 70: 230 (1992); Christensson, A., et al., J. Urology, 150: 100 (1993)).

[0015] US-Patent Nr. 5.223.441 offenbart Rezeptoren, die Antikörper sind, die eine Bindungsaffinität für einen Immunkomplex aus einem Monoepitopantigen und einem Antikörper für ein solches Antigen zeigen, die wesentlich größer ist als die Bindungsaffinität für das Monoepitopantigen oder den Antikörper für das Monoepitopantigen, abgesehen von dem Immunkomplex.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0016] Gemäß Anspruch 1 stellt ein Gesichtspunkt der Erfindung neue MOLY- und MONO-Assays bereit zum Detektieren und Quantifizieren von PSA in einer Probe, worin die Probe mit HE_{PSA}-Antikörpern behandelt wird, welche freies PSA binden, jedoch keinen Komplex aus PSA und ACT ("PSA-ACT-Komplex"). Die Zugabe von HE_{PSA}-Antikörpern zu den Assays verringert oder beseitigt den systematischen Fehler in diesen Assays. Au-

ßerdem werden Kits zum Ausführen dieser Assays gemäß Anspruch 10 bereitgestellt.

[0017] Gemäß Anspruch 13 stellt ein anderer Gesichtspunkt der Erfindung einen Komplex bereit aus PSA und HE_{PSA}-Antikörpern ("PSA-HE_{PSA}-Antikörper-Komplex"), welcher dem PSA-ACT-Komplex ähneln. Dieser Komplex ist nützlich als ein Kalibrator und/oder eine Kontrolle für PSA-Immunoassays.

[0018] Die obigen Gesichtspunkte der Erfindung können im Allgemeinen auf jeden Analyten angewendet werden, welcher in einem freien Zustand oder komplexiert mit einem Bindungsmolekül vorliegen kann.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0019] **Fig.** 1 vergleicht das herkömmliche Verfahren (Teil A) und das Verfahren der vorliegenden Erfindung (Teil B) zum Analysieren von PSA und zeigt, wie HE_{PSA}-Antikörper die Assayspezifität für freies PSA und PSA-ACT-Komplex modifizieren.

[0020] Fig. 2 veranschaulicht das Verfahren zum Erhalten polyklonaler Antikörper gegen verborgene und nicht verborgene Epitope auf PSA.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0021] Wie hierin verwendet umfasst der Ausdruck "Antikörper" sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper, Vollimmunglobuline und Antigenbindungsfragmente der Immunglobuline. Beispiele für diese Fragmente sind Fab, $F(ab')_2$ und Fv. Solche Fragmente können hergestellt werden durch Verfahren, die im Fachgebiet bekannt sind.

[0022] Wie hierin verwendet bezeichnet der Ausdruck "HE-Antikörper" oder "αHE" Antikörper, deren Bindung an ihr Target-Antigen ("Analyt") verhindert werden würde durch die Bindung eines anderen Moleküls ("Bindungsmolekül") an den Analyten. Der Ausdruck "Nicht-HE-Antikörper" oder "αnHE" bezeichnet Antikörper, deren Bindung an den Analyten nicht verhindert wird durch die Bindung des Bindungsmoleküls an den Analyten. Das Epitop auf dem Analyten, welches durch die Bindung des Bindungsmoleküls an dem Analyten maskiert wird, wird als "verborgenes Epitop" (hidden epitope, "HE") bezeichnet. Ähnlich wird das Epitop auf dem Analyten, welches durch die Bindung des Bindungsmoleküls an dem Analyten nicht maskiert wird, als "nicht verborgenes Epitop" ("nHE") bezeichnet. Der Ausdruck "αAnalyt" oder "αA" bezeichnet jeden beliebigen Antikörper, welcher gegen den Analyten gerichtet ist, egal ob es ein αHE oder αnHE ist.

[0023] Analyt ist vorzugsweise ein Antigen, das in einer biologischen Probe gefunden wird, und ist vorzugsweise endogen für die Probe. Das Bindungsmolekül ist vorzugsweise endogen für die Probe und steht häufig in Verbindung mit dem Analyten. Vorzugsweise sind das Bindungsmolekül und der Analyt Proteine. Beispiele für Analyte sind Serumproteasen, und deren Bindungsmoleküle sind Serumproteasehemmer. Einige der Serumproteasen und deren Hemmer (in Klammern) sind: Protein C (Protein-C-Hemmer); Elastase (Anti-Trypsin); Cathepsin G (ACT); PSA (ACT); PSA (α_2-Makroglobulin); Thrombin (Anti-Thrombin III); C_1-Esterase (C_1-Hemmer); t-PA (PAI-1); uPA (PAI-1); Plasmin (α_2-Antiplasmin); PSA (α_1-Proteasehemmer); und PSA (Protein-C-Hemmer). "PAI-1" bezeichnet Plasminogenaktivatorhemmer Typ 1. "t-PA" bezeichnet Gewebeplasminogenaktivator. "uPA" bezeichnet Urinplasminogenaktivator. Ein Fachmann würde realisieren, dass das Bindungsmolekül Serumproteasen sein könnten und der Analyt Serumproteasehemmer sein könnten.

[0024] Der Ausdruck "MOLY-Assay" beschreibt einen Immunoassay, in welchem die Einfangantikörper MAB sind und die Sondenantikörper polyklonale Antikörper sind oder umgekehrt.

[0025] Die vorliegende Erfindung offenbart einen Immunoassay für einen Analyten in einer Testprobe. Die Probe ist im Allgemeinen eine biologische Probe. Die biologische Probe können biologische Flüssigkeiten sein wie zum Beispiel Blut, Serum, Plasma, Prostataflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Urin, Lymphe und Spinalflüssigkeit.

[0026] Falls eine Probe Analyte enthält, welche nicht an das Bindungsmolekül gebunden sind (diese ungebundenen Analyte werden hierin auch als "freie Analyte" bezeichnet), und Analyte, welche Komplexe mit den Bindungsmolekülen bilden ("komplexierte Analyte" oder "Analyt-Bindungsmolekül-Komplexe"), würden ein MOLY-Assay und einige MONO-Assays für die Analyten einen systematischen Fehler zeigen insofern, als dass eine Probe ohne komplexierte Analyte einen höheren Ablesewert haben würde als eine Probe mit komplexiertem Analyt. Das kann vorkommen, wenn z.B. einige Glieder der polyklonalen Antikörper, die verwendet wer-

den, um den Analyten zu detektieren, freien Analyt binden können, aber keinen komplexierten Analyten.

[0027] Die vorliegende Erfindung offenbart, dass der systematische Fehler, der in MOLY und einigen MONO-Assays für Analyte gefunden wird, korrigiert werden kann durch Zugabe von freien HE-Antikörpern zu dem Reaktionsgemisch. Abgesehen von der Zugabe der freien HE-Antikörper können die MOLY- und MONO-Assays für einen bestimmten Analyten ausgeführt werden gemäß Verfahren, die auf dem Gebiet für solche Assays bekannt sind. Zusätzlich ist, falls der Analyt in einer Probe in der Lage ist, direkt an eine feste Phase gebunden zu werden, wenn die Probe mit der festen Phase inkubiert wird, ein Einfangantikörper dann nicht erforderlich. Sonden- und Einfangantikörper können hergestellt werden gemäß Verfahren, die auf dem Gebiet bekannt sind. Der Sondenantikörper kann gemäß Verfahren, die auf dem Gebiet bekannt sind, markiert werden mit Markern wie chemilumineszenten, fluoreszenten, enzymatischen und radioaktiven Markern, und die Assays können auf die beteiligten Marker entsprechend zugeschnitten werden. Ein Beispiel für lumineszent markierte immunometrische Assays ist Wood, W. G., et al., Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 29: 787 (1991). Die HE- und Nicht-HE-Antikörper können hergestellt werden unter Verwendung von bekannten Verfahren wie jene, die zur Herstellung von HE_{PSA}- und Nicht-HE_{PSA}-Antikörpern verwendet werden, die unten besprochen werden. Die HE-Antikörper sind vorzugsweise monoklonale Antikörper oder spezifische polyklonale HE-Antikörper, wie unten beschrieben.

[0028] Ein Gesichtspunkt dieser Erfindung stellt somit einen nicht kompetitiven Sandwich-Immunoassay bereit für einen Analyten in einer biologischen Probe. Ein Einfangantikörper ("αnHE"), welcher gegen ein nicht verborgenes Epitop des Analyten gerichtet ist, wird an eine feste Phase angelagert, um jeden Analyten einzufangen, der in der biologischen Probe vorhanden sein kann. Der Einfangantikörper wird mit HE-Antikörpern ("αHE") gleichzeitig mit der biologischen Probe oder nach deren Zugabe inkubiert. Alternativ kann αHE auch mit der Probe inkubiert werden, bevor sie dem Einfangantikörper gegenüber ausgesetzt werden. Vorzugsweise ist das αHE ein MAB. Die Inkubation dauert eine ausreichende Zeit lang, um zu ermöglichen, dass sich der Komplex {(αnHE)(Analyt)(αHE)} bildet. Als nächstes werden alle Reagenzien, die nicht an die feste Phase gebunden sind, aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Das kann durch einen Waschschritt erfolgen, der dem Fachmann bekannt sein wird. Zum Beispiel werden die ungebundenen Reagenzien in einem wässerigen Medium gelöst und von der festen Phase weggewaschen, wobei der Komplex {(αnHE)(Analyt)(αHE)} auf der festen Phase zurückbleibt.

[0029] Als nächstes werden polyklonale Anti-Analyt-Antikörper ("αAnalyt*") hinzugegeben. αAnalyt* wird bevorzugt für die Detektion markiert, z.B. mit enzymatischen, radioaktiven, fluoreszenten oder chemilumineszenten Markern.

[0030] Das Reaktionsgemisch wird eine ausreichende Zeit lang für die Bildung des {(αnHE)(Analyt)(αHE)(aAnalyt*)}-Komplexes und des {(αnHE)(Analyt)(Bindungsmolekül)(αAnalyt*)}-Komplexes inkubiert. Beachten Sie, dass in dem Komplex {(αnHE)(Analyt)(αHE)(αAnalyt*)} sowohl αHE als auch αAnalyt* an den Analyten in dem Komplex gebunden sind. Beachten Sie, dass falls ein Bindungsmolekül in der Probe vorhanden ist, auch ein anderer Komplex gebildet werden kann, nämlich der Komplex {(αnHE)(Analyt)(Bindungsmolekül)(αAnalyt*)}.

[0031] Als nächstes werden die ungebundenen Reagenzien abgetrennt. Die Bildung der Komplexe {(αnHE)(Analyt)(αHE)(aAnalyt*)} und {(αnHE)(Analyt)(Bindungsmolekül)(αAnalyt*)} an der festen Phase wird detektiert, indem der markierte αAnalyt* detektiert wird. Falls kein Analyt in der Probe vorhanden ist, werden diese Komplexe nicht vorhanden sein. Die Anwesenheit dieser Komplexe ist direkt proportional zu der Analytkonzentration in der Probe. Alternativ kann man auf die Anwesenheit des restlichen ungebundenen markierten αAnalyt* untersuchen, dessen Menge umgekehrt proportional zu der Anwesenheit des Analyten in der Probe ist.

[0032] Das obige Assayformat kann auch in MONO-Assays verwendet werden, welche einen systematischen Fehler zeigen. In einem MONO-Assay wird die obige Besprechung gelten, außer dass der αAnalyt* markiertes αnHE (d.h. "αnHE*") ist.

[0033] In dem Fall, dass der Einfangantikörper ein polyklonaler Antikörper und der Sondenantikörper ein MAB ist, wird die obige Besprechung gelten, außer dass der Einfangantikörper αAnalyt oder αnHE ist (αnHE kann aus polyklonalen Antikörpern fraktioniert werden, z.B. durch die Fraktionsverfahren, die unten beschrieben werden), und der Sondenantikörper αnHE* ist. Falls die Einfangantikörper, αAnalyt, eine Subpopulation von αHE enthalten, wird es außerdem einen zusätzlichen Komplex {(αHE)(Analyt)(αnHE*)} geben, der aus den obigen Assayschritten resultiert.

[0034] Die obige Besprechung setzt voraus, dass es nur ein HE auf dem Analyten gibt. Es sollte jedoch beachtet werden, dass falls ein bestimmtes αHE nicht das gesamte HE auf dem Analyten maskiert, dass dann zusätzliche HE-Antikörper zu verwenden sind, die gegen andere HE-Stellen auf dem Analyten gerichtet sind.

[0035] Ein Fachmann auf dem Gebiet würde erkennen, dass ein Sondenantikörper nicht markiert sein braucht, wenn er durch ein anderes Molekül spezifisch gebunden werden kann, das markiert ist. Weiter braucht dann, wenn der Analyt direkt auf der festen Phase gebunden werden kann, kein Einfangantikörper verwendet zu werden.

[0036] Ebenfalls präsentiert in dieser Anmeldung werden Assaykits zum Durchführen der obigen Assays. Vorzugsweise hat der Assaykit einen Behälter, der unmarkierte HE-Antikörper enthält; und einen anderen Behälter, der Einfangantikörper enthält, die gegen den Analyten gerichtet sind, vorzugsweise sind diese Antikörper gegen nicht-HE gerichtet, besser sind sie MAB, am besten sind sie an eine feste Phase gebunden. Die unmarkierten HE-Antikörper können in einem getrennten Behälter oder in dem gleichen Behälter wie die Einfangantikörper oder die Sondenantikörper sein. Für einen MOLY-Assay kann der Kit zusätzlich folgendes aufweisen: einen Behälter, der polyklonale Sondenantikörper gegen den Analyten enthält, und vorzugsweise sind die Antikörper für die Detektion markiert; und einen anderen Behälter, der Reagenzien enthält, welche mit den Markern auf den Antikörpern reagieren würden, um ein Signal zu emittieren. Zum Beispiel können die polyklonalen Antikörper mit einem Enzym wie alkalische Phosphatase markiert sein, und das Reagens, das damit reagieren würde, wird das Enzymsubstrat sein. In dem Fall von alkalischer Phosphatase ist für 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) herausgefunden worden, dass es geeignet ist, und die Reaktion ist in Beispiel II unten beschrieben. Alternativ können die Sondenantikörper monoklonale Antikörper sein, und die Einfangantikörper können polyklonale Antikörper sein. In einem derartigen Fall sind die monoklonalen Sondenantikörper vorzugsweise Nicht-HE-Antikörper. Für einen MONO-Assay sind die Sonden- und Einfangantikörper MAB, die auf den Analyten gerichtet sind. Vorzugsweise sind der Sonden- und Einfang-MAB Nicht-HE-Antikörper. In den obigen Kits sind die Antikörper vorzugsweise in einer Lösung wie einem Puffer, welcher keine nachteiligen Auswirkungen auf den Immunoassay aufweist. Die obigen Kits können zusätzlich Behälter haben, die Kalibrator(en) enthalten, und/oder Behälter, die Kontrolle(n) enthalten. Für einen Analytassay enthält der bevorzugte Kalibrator und die bevorzugte Kontrolle freien Analyt, den Komplex aus Analyt-HE-Antikörpern, oder den Komplex aus Analyt-Bindungsmolekül, der unten beschrieben wird.

[0037] In der bevorzugten Erfindung ist der Analyt PSA und das Bindungsmolekül ist ACT. Die HE-Antikörper gegen PSA sind jene, welche freies PSA binden, aber nicht den PSA-ACT-Komplex. Diese Antikörper werden hierin als "HE_{PSA}-Antikörper" bezeichnet. Die entsprechenden Nicht-HE-Antikörper werden außerdem als "Nicht-HE_{PSA}-Antikörper" bezeichnet.

[0038] Die Verfahren zum Erhalten von HE_{PSA}-Antikörpern (und Nicht-HE_{PSA}-Antikörpern) sind auf dem Gebiet bekannt. Zum Beispiel sind sie beschrieben in PCT-Patentanmeldung WO 92/01936 für H. Lilja et al., siehe oben, und CanAg Diagnostics AB, Nilsson et al., Epitope mapping of PSA, and development of assays for determination of different isoforms of PSA (1993), und in der Zusammenfassung des gleichen Titels, siehe oben. Beispiele für HE_{PSA}-Antikörper sind: (1) MAB 5A10 wie beschrieben in WO 92/01936; (2) MAB 9B10, was offenbart ist in K. Pettersson et al., Development of Immunofluorometric Methods for PSA to Improve the Discrimination Between Early Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia, XV International Congress of Clinical Chemistry, Melbourne, Australien, 14.–19. November (1993), worin ebenfalls MAB H117 und H50 offenbart sind; und (3) MAB PSA6, PSA30, PSA17, PSA19, PSA20 und PSA25, welche kommerziell erhältlich sind von CanAg Diagnostics AB, Götheborg, Schweden.

[0039] US-Patentanmeldung mit der Serien-Nr. 08/094.901, eingereicht am 22. Juli 1993 für Matikainen, M, et al., offenbart sowohl MAB 5A10 als auch 9B10, deren Produktion und Charakteristika; die Hybridome, die diese MABs sekretieren, werden darin bezeichnet als SA10E7F11H4 bzw. 5B10A9H3. Diese Hybridome wurden bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Großbritanien, am 12. März 1993 hinterlegt und es wurden ihnen die ECACC-Zugriffsnummern 93031201 bzw. 93031202 zugewiesen.

[0040] Folglich stellt die vorliegende Erfindung zwei Erfindungen dar, die nützlich sind für PSA-Assays: neue PSA-Assays unter Verwendung von HE_{PSA}-Antikörpern, und PSA-HE_{PSA}-Antikörperkomplex, welcher dem PSA-ACT-Komplex ähnelt. Die erste Erfindung vermeidet oder reduziert den systematischen Fehler, der in den MOLY-Assays nach dem Stand der Technik vorhanden ist. Die letzte Erfindung ist nützlich als Kalibrator und/oder Kontrolle sowohl für die MONO- als auch die MOLY-PSA-Assays. Die spezifischen polyklonalen

Nicht-HE_{PSA}-Antikörper, die durch das offenbarte Verfahren ausgewählt wurden, können außerdem sowohl in MOLY-Immunoassays für PSA (entweder als Sonden- oder Einfangantikörper oder beides) als auch kompetitiven Immunoassays für PSA (als Einfangantikörper) verwendet werden. Andererseits könnten HE_{PSA}-Antikörper in Assays verwendet werden, die spezifisch sind für freies PSA, oder sie könnten verwendet werden in PSA-Immunoassays (egal ob MOLY oder MONO), die unter einem systematischen Fehler leiden, um einen solchen systematischen Fehler zu vermindern oder zu beseitigen, wie oben beschrieben.

[0041] Die vorliegende Anmeldung verwendet PSA, ACT und HE_{PSA}-Antikörper und Nicht-HE_{PSA}-Antikörper, um die Erfindung zu veranschaulichen. Jedoch wird ein Fachmann verstehen, dass die Erfindung auf jeden Analyten, jedes Bindungsmolekül und alle HE-Antikörper bzw. Nicht-HE-Antikörper angewendet werden kann.

I. NEUES PSA-IMMUNOASSAYVERFAHREN

[0042] **Fig.** 1 vergleicht den herkömmlichen PSA-MOLY-Assay (Teil A) mit dem PSA MOLY-Assay der vorliegenden Erfindung (Teil B), um zu veranschaulichen, wie HE_{PSA}-Antikörper die Assayspezifität für freies PSA und PSA-ACT-Komplex modifiziert.

[0043] Teil A stellt den herkömmlichen MOLY-Assay dar, welcher unter einem systematischen Fehler leidet. Die Verfahrensschritte in Teil A sind die gleichen wie in Teil B, außer dass Teil B den zusätzlichen Schritt B1 hat.

[0044] Die Schritte in Teil A sind folgendermaßen:
Schritt A1: Ein Nicht-HE-Antikörper (αnHE1), welcher für ein nicht verborgenes Epitop (bezeichnet als nHE1) auf dem PSA-Molekül spezifisch ist, wird an eine feste Phase geknüpft. Wenn eine Probe, die entweder freies PSA oder PSA-ACT-Komplex enthält, mit dem Festphasen-gebundenen αnHE1 reagieren gelassen wird, können sowohl freies PSA als auch PSA-ACT-Komplex ausschließlich durch das nHE1-Epitop gebunden werden. Andererseits ist das HE immer noch auf freiem PSA verfügbar für eine spätere Reaktion mit anderen Antikörpern.
Schritt A2: Die nachfolgende Zugabe von markierten polyklonalen Antikörpern gegen PSA ("markierte polyklonale Antikörper"), welche sowohl markierte Antikörper enthalten, die spezifisch sind für HE (αHE*), als auch Antikörper, die spezifisch sind für Nicht-HE2 (αnHE2*), wird zu der Bindung von beiden Typen von Antikörpern an das freie PSA führen. Im Gegensatz dazu können, da HE durch ACT in dem PSA-ACT-Komplex maskiert ist, die gleichen markierten polyklonalen Antikörper nur an das nicht verborgene Epitop nHE2 binden. Diese markierten polyklonalen Antikörper sind konjugiert mit einem Marker zum Zweck der Detektion. Beispiele für Marker sind: chemilumineszente Marker, radioaktive Marker und Enzymmarker, welche auf dem Gebiet bekannt sind. In diesem Beispiel ist der Marker ein Enzym. Die ungebundenen Reagenzien werden von der festen Phase entfernt, z.B. durch Waschen der festen Phase unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Gebiet bekannt sind.
Schritt A3: Dann wird das Enzymsubstrat zu der festen Phase hinzugegeben und das enzymatische Produkt erzeugt ein Signal, welches überwacht wird. Das freie PSA, welches zwei markierte polyklonale Antikörper gebunden hat, erzeugt das doppelte Signal wie der PSA-ACT-Komplex, der nur einen markierten polyklonalen Antikörper gebunden hat, was zu einem positiven systematischen Fehler für die freie Form von PSA führt.

[0045] Teil B stellt den Assay der vorliegenden Erfindung dar, in welchem unmarkierte HE_{PSA}-Antikörper (in Schritt B1) zu dem Assay, der in Teil A beschrieben ist, hinzugegeben werden, und dies führt zu einem Assay ohne systematischen Fehler.

[0046] Die Schritte in Teil B sind folgendermaßen:
Schritt B1: Die Probe wird vorbehandelt mit unmarkiertem HE_{PSA}-Antikörper (αHE). Dieser Antikörper reagiert mit HE auf dem freien PSA, bindet aber nicht an den PSA-ACT-Komplex. Alternativ kann das unmarkierte αHE in Schritt B2 bzw. Schritt B3 hinzugegeben werden.
Schritt B2: Die Probe wird zu Festphasen-gebundenem αnHE1-Antikörper hinzugegeben, wie in Teil A.
Schritt B3: Die nachfolgende Zugabe von markierten polyklonalen Antikörpern, die markierte Antikörper enthalten, welche HE (αHE*) erkennen, und Antikörper, die Nicht-HE (αnHE2*) erkennen, wird zu der Bindung von αnHE2* sowohl an freies PSA als auch an PSA-ACT-Komplex führen. αHE* kann freies PSA oder PSA-ACT-Komplex nicht binden, da HE durch unmarkiertes αHE in dem freien PSA und durch ACT in dem PSA-ACT-Komplex maskiert ist.
Schritt B4: Das Substrat wird hinzugegeben und das Signal überwacht. Sowohl freies PSA als auch PSA-ACT-Komplex erzeugen gleichwertige Signale, da beide nur das αnHE2* gebunden haben. Das führt zu einem Assay ohne systematischen Fehler für freies PSA im Vergleich zu dem PSA-ACT-Komplex.

[0047] Materialien für die feste Phase können alle beliebigen von solchen Materialien sein, die für Immunoassays verwendet werden. Natürliche, synthetische oder natürlich vorkommende Materialien, die synthetisch modifiziert sind, können verwendet werden. Sie schließen ein: Polysaccharide, z.B. Cellulosematerialien einschließlich Papier, Cellulose und Cellulosederivate wie Celluloseacetat und Nitrocellulose; Kieselerde; Glasfaser; anorganische Materialien wie desaktiviertes Aluminium, Diatomeenerde oder ein anderes anorganisches fein verteiltes Material, das gleichmäßig dispergiert ist in einer porösen Polymermatrix, hergestellt aus Polymeren wie Vinylchlorid, Vinylchlorid-Propylencopolymer und Vinylchlorid-Vinylacetat-Copolymer; Stoff, sowohl natürlich vorkommender (z.B. Baumwolle) als auch synthetischer (z.B. Nylon); poröse Gele wie Silicagel, Agarose, Dextran und Gelatine; Polymerfolien wie Polyacrylamid; magnetische Partikel; Mikrotiterplatten; Polystyrolröhrchen; Proteinbindungsmembranen; Agarose, Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Piscataway, N. J.); Trisacryl (Pointet-Girard, Frankreich); Siliziumpartikel; poröse Fasermatrizen usw. Die feste Phase sind vorzugsweise synthetische Mikropartikel, vorzugsweise hergestellt aus Polystyrol, Vinylchlorid oder Latex von 0,1 bis 10 Mikron Durchmesser.

II. VERFAHREN ZUM FRAKTIONIEREN VON POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN ANALYTE

[0048] Verfahren zum Fraktionieren von polyklonalen Antikörpern gegen Analyte, um Fraktionen zu erbringen, die HE-Antikörper bzw. Nicht-HE-Antikörper enthalten, werden hierin offenbart. Polyklonale Antikörper gegen Analyte können hergestellt werden unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Gebiet bekannt sind. Zum Beispiel können die Antikörper hergestellt werden, indem einem Wirtstier wie einem Kaninchen, einer Ratte, einer Ziege, einer Maus usw. der Analyt oder Fragmente davon injiziert werden, allein oder, falls erforderlich, konjugiert an einen geeigneten Träger, um eine Antikörperreaktion hervorzurufen.

[0049] Dieses Verfahren umfasst Aussetzen der polyklonalen Antikörper gegenüber einem Analyten, dessen HE-Stelle entweder durch ein Bindungsmolekül oder einen HE-Antikörper maskiert ist ("maskierter Analyt"). Die Antikörper, die den maskierten Analyten binden und welche eluiert werden können, sind Nicht-HE-Antikörper, die sowohl freien Analyten als auch einen Komplex aus Analyt-Bindungsmolekül binden. Somit werden Immunoassays, die Nicht-HE-Antikörper verwenden, um den Analyten zu detektieren, welcher in freier oder komplexer Form vorhanden sein kann, keinen systematischen Fehler zeigen. Die so erhaltenen Nicht-HE-Antikörper können sowohl in MOLY-Immunoassays (entweder als Sonden- oder als Einfangantikörper oder beides) als auch in kompetitiven Immunoassays (als Einfangantikörper) verwendet werden. Andererseits sind die polyklonalen Antikörper, die den maskierten Analyten nicht binden, HE-Antikörper. HE-Antikörper könnten verwendet werden in Assays, die spezifisch sind für freien Analyten, oder wie oben beschrieben für die Zugabe in Analytassays (entweder MOLY- oder MONO-Immunoassays), die unter einem systematischen Fehler leiden, um einen solchen systematischen Fehler zu vermindern oder zu beseitigen.

[0050] Die obige Fraktionierung wird vorzugsweise durchgeführt unter Verwendung von Affinitätschromatographie. Vorzugsweise wird der maskierte Analyt mit dem Bindungsmolekül, den HE-Antikörpern oder den Nicht-HE-Antikörpern quervernetzt. Die Quervernetzung kann erreicht werden durch Verfahren, die auf dem Gebiet bekannt sind, oder Modifikationen von solchen Verfahren, welche innerhalb des Wissens eines Fachmanns liegen. Beispiele für Publikationen, welche Verfahren zur Quervernetzung von Molekülen offenbaren, sind folgende: Ji, T. H., Methods in Enzymology, 91: 580 (1983); Wong, S. S., et al., in Kapitel 22, 266–282 von Biocatalyst Design for Stability and Specificity, Herausgeber M. E. Himmel und G. Georgiou, American Chemical Society, Washington, DC (1993); M. N. Gupta in Kapitel 26, 307–326 von Biocatalyst Design for Stability and Specificity, Herausgeber M. E. Himmel und G. Georgiou, siehe oben; Chemical Reagents for Protein Modification, 2. Ausgabe, R. L. Lundblad, CRC Press, Boston.

[0051] Vorzugsweise wird der resultierende Komplex gebunden an einen Feststoff, direkt oder mittels eines Bindungsmittels wie einem HE-Antikörper, welcher auf der festen Phase immobilisiert ist, und in Affinitätschromatographie verwendet, um die HE-Antikörper auszuwählen. Die allgemeinen Verfahren für die Affinitätschromatographie, wie die Herstellung der Antikörper und der festen Phase, und die Verfahren sind auf dem Gebiet bekannt, siehe z.B. Bio-Rad Bulletin 1099, Immunoaffinity Chromatography with Affinity Supports (1990); Pharmacia LKB Biotechnology, Affinity Chromatography, Principles & Methods (1993); und Methods in Molecular Biology, Vol. 10, "Immunochemical Protocols", Herausgeber M. M. Manson, Seite 89–91 (1992); Immunochemistry in Practice, A. Johnstone, et al., Kapitel 10, 202–232, Scientific Publications, Oxford (1982); und Current Opinion in Biotechnology, Vol. 2, "Affinity Chromatography for Protein Isolation", W. H. Scouten, 37–43 (1991).

[0052] Fig. 2 veranschaulicht die drei Verfahren zum Fraktionieren von polyklonalen Antikörpern in HE-Antikörper und Nicht-HE-Antikörper unter Verwendung von PSA, ACT und HE_{PSA}-Antikörpern als Beispiele. Die Verfahren sind wie folgt:

Teil A: Verwendung von ACT, um PSA zu binden.

[0053] ACT wird an eine feste Phase konjugiert, wie Cyanbromidaktiviertes Sepharose-4B (kommerziell erhältlich von Pharmacia LKB Biotechnology, Schweden). Gereinigtes PSA wird mit dem ACT reagieren gelassen, um einen PSA-ACT-Komplex zu bilden, der die verborgenen Epitope (HE) maskiert. Der Komplex kann weiter stabilisiert werden durch chemische Quervernetzung. Wenn polyklonale Antikörper gegen PSA mit der PSA-ACT-Festphase inkubiert werden, werden HE_{PSA}-Antikörper ungebunden bleiben. Nicht-HE_{PSA}-Antikörper, die für nicht verborgene Epitope spezifisch sind, wie nHE1 und nHE2, werden gebunden werden und können mit Standardverfahren, wie zum Beispiel einem niedrigen pH eluiert werden. Somit werden die polyklonalen Anti-PSA-Antikörper getrennt in HE_{PSA}- und Nicht-HE_{PSA}-Antikörper.

Teil B: Verwendung von HE_{PSA}-Antikörpern (αHE), um PSA zu binden.

[0054] HE_{PSA}-Antikörper (αHE) werden an eine feste Phase wie Cyanbromidaktiviertes Sepharose-4B konjugiert. Gereinigtes PSA wird mit dem αHE reagieren gelassen, um einen PSA-αHE-Komplex zu bilden, der die verborgenen Epitope (HE) maskiert. Der Komplex kann weiter stabilisiert werden durch chemische Quervernetzung. Wenn polyklonale Antikörper gegen PSA mit der PSA-αHE-Festphase inkubiert werden, werden polyklonale HE_{PSA}-Antikörper nicht an die feste Phase gebunden werden. Andererseits werden polyklonale Nicht-HE_{PSA}-Antikörper gebunden werden und können mit Standardverfahren wie einem niedrigen pH eluiert werden. Es sollte beachtet werden, dass falls ein bestimmtes αHE nicht alle HE auf dem PSA maskiert, dass dann zusätzliche HE-Antikörper, die gegen andere HE-Stellen gerichtet sind, gleichzeitig oder vorzugsweise in aufeinanderfolgenden Fraktionssäulen verwendet werden können.

Teil C: Verwendung von Nicht-HE_{PSA}-Antikörpern (αnHE1), um PSA zu binden, gefolgt von Verwendung von HE_{PSA}-Antikörpern (αHE), um HE zu blockieren.

[0055] Nicht-HE_{PSA}-Antikörper (αnHE1), die gegen nicht verborgenes Epitop 1 (nHE1) gerichtet sind, werden an eine feste Phase wie Cyanbromid-aktiviertes Sepharose-4B konjugiert. Gereinigtes PSA wird mit dem αnHE1 reagieren gelassen, um einen PSA-αnHE1-Komplex zu bilden. Ein HE_{PSA}-Antikörper (αHE) wird mit dem PSA-αnHE1 reagieren gelassen, um einen Komplex zu bilden, der die verborgenen Epitope (HE) maskiert. Der Komplex kann weiter stabilisiert werden durch chemische Quervernetzung. Wenn polyklonale Antikörper gegen PSA mit dem Festphasen-αnHE1-PSA-αHE inkubiert werden, werden Antikörper gegen HE und nHE1 nicht an die feste Phase binden. Nicht-HE_{PSA}-Antikörper gegen andere nicht verborgene Epitope als nHE1 werden an die feste Phase gebunden werden und können mit Standardverfahren wie niedriger pH eluiert werden. Die Antikörper, die nicht an die feste Phase gebunden werden, können weiter getrennt werden durch Verfahren A oder B. Somit werden die polyklonalen Anti-PSA-Antikörper getrennt in HE_{PSA}-Antikörper, Antikörper gegen nHE1 und andere nHE als nHE1. Es sollte beachtet werden, dass falls ein bestimmtes αHE nicht alle HE auf dem PSA maskiert, dass dann zusätzliche HE-Antikörper, die gegen andere HE-Stellen gerichtet sind, gleichzeitig oder vorzugsweise in aufeinanderfolgenden Fraktionssäulen verwendet werden können.

III. KOMPLEXE VON ANALYT-ANTIKÖRPERN, DIE NÜTZLICH SIND ALS KALIBRATOREN UND KONTROLLEN FÜR PSA-ASSAYS

[0056] Ein anderer Gesichtspunkt der Erfindung stellt einen Komplex aus Analyt-HE-Antikörper dar, welcher als ein Kalibrator oder als eine Kontrolle in einem Assay für Analyte dienen kann. Der Komplex kann gebildet werden durch Zugabe eines Überschusses an HE-Antikörpern zu dem Analyten. Die HE-Antikörper sind vorzugsweise in einem 2-fachen bis 100-fachen, und besser in einem 10-fachen Überschuss gegenüber dem Analyten vorhanden. Alternativ kann der Analyt mit den HE-Antikörpern quervernetzt werden. Das oben beschriebene Verfahren zum Quervernetzen von Analyt und Bindungsmolekül ist ähnlich anwendbar zum Quervernetzen von Analyt und HE-Antikörpern. Der Komplex wird vorzugsweise in einem inerten Puffer wie Phosphat-gepufferter Salzlösung, Tris-HCl oder HEPES gelagert. Die Lagerungstemperatur liegt vorzugsweise im Bereich von 2°C bis 25°C. Der pH ist vorzugsweise zwischen 5 und 9. Ein quervernetzter Komplex aus dem Analyten und seinem Bindungsmolekül, der nützlich ist als ein Kalibrator oder eine Kontrolle in einem Assay für den Analyten, kann ebenfalls in ähnlicher Weise hergestellt werden.

[0057] Die folgenden Beispiele I und II veranschaulichen die vorliegende Erfindung und sind nicht so aufzufassen, dass sie diese beschränken. Beispiel III stellt keine Ausführungsform der Erfindung dar, sondern ist nützlich zum Verständnis der polyklonalen Antikörperauswahltechnik.

Beispiele

Beispiel I. Neues PSA-Assayverfahren

[0058] Das folgende Experiment wurde durchgeführt unter Verwendung der Reagenzien für IMx® PSA-Assays und auf dem IMx® Messgerät (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) durchgeführt unter Befolgung des Protokolls in der den IMx® PSA-Assay begleitenden Packungsbeilage, außer dass in dieser Erfindung das Assay-Verdünnungsmittel zusätzlich 0 bis 20 µg/ml MAB 9B10 oder 5A10 (oben besprochen) enthielt, welche freies PSA binden, aber nicht den PSA-ACT-Komplex. Die IMx® PSA-Assay-Reagenzien schließen das Folgende ein: (1) Mikropartikel beschichtet mit Einfangantikörper MAB H50 ("anti-PSA-beschichtete Mikropartikel"), welche sowohl freies PSA als auch komplexiertes PSA (d.h. PSA, das mit ACT einen Komplex bildet) an den Mikropartikeln binden und einfangen; und (2) polyklonale Ziegenantikörper gegen PSA (welche als Sondenantikörper dienen), welche mit alkalischer Phosphatase markiert sind für die Detektion ("polyklonales Ziegen-anti-PSA:alkalische Phosphatase-Konjugat" oder "polyklonale Sondenantikörper").

[0059] Die getesteten Proben waren gepoolte Serumproben von Patienten mit Prostatakrebs.

[0060] Die Beschreibungen des IMx® Messgerätes, seines Betriebs und des allgemeinen Protokolls sind zu finden in Barnes et al., J. Clin. Imm., 14 (2): 115–119 (1991) und EP-A-288.793; Ludington et al., Clin. Chem., 34 (9), 1726–1732 (1988)). Die Komponenten der Reaktionszellen sind gezeigt in **Fig.** 2(a) von Clin. Chem., 34 (9) auf Seite 1727. In diesem Fall ist das Reaktionsschema das Schema eines Mikropartikel-Enzym-Immunoassays (MEIA) wie folgt:

(1) Die Sonden-/Elektrodenbaugruppe des IMx® Messgerätes führt die Probe, die anti-PSA-beschichteten Mikropartikel und das Assay-Verdünnungsmittel zu der Inkubationsvertiefung der Reaktionszelle. Während der Inkubation dieses Reaktionsgemischs binden das freie PSA und das komplexierte PSA in der Probe an die anti-PSA-beschichteten Mikropartikel und bilden einen Antikörper-Antigen-Komplex. MAB 9B10 wiederum bindet das PSA (welches keinen Komplex mit ACT bildet), das an die anti-PSA-beschichteten Mikropartikel gebunden ist, um einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex zu bilden.

2.) Ein Aliquot des Reaktionsgemischs wird auf die Glasfasermatrix des IMx® Messgerätes überführt. Die Mikropartikel binden irreversibel an die Glasfasermatrix.

3.) Die Matrix wird gewaschen, um ungebundene Materialien zu entfernen, z.B. Serumproteine, Assay-Verdünnungsmittel und MAB 9B10, die nicht an die Mikropartikel gebunden sind.

4.) Das poklonale Ziegen-anti-PSA:alkalische Phosphatase-Konjugat wird auf die Matrix gegeben und bindet den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex.

5.) Die Matrix wird gewaschen, um ungebundene Materialien zu entfernen.

6.) Das Substrat, 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP), wird zu der Matrix hinzugegeben und die oberflächengebundene alkalische Phosphatase wandelt das nichtfluorogene MUP zu 4-Methylumbelliferon (MU) um, dessen Fluoreszenz durch die optische MEIA-Baugruppe des IMx® Messgerätes gemessen wird.

[0061] Die obigen Assayschritte wurden getrennt durchgeführt, aber unter gleichzeitiger Verwendung von Kalibratoren und Kontrollen, die freies PSA enthielten anstatt Proben. Die Ablesewerte für die Proben (d.h. Probeplatten) wurden von den Kalibratoren abgelesen (von Tabelle 1 unten), um zu den PSA-Werten zu gelangen, die in Tabelle 2 und Tabelle 3 unten angegeben sind.

Tabelle 1

Kalibratoren (freies PSA) (ng/ml)	MAB 9B10-Konzentration in Assay-Verdünnungsmittel (µg/ml)			
	0	5	10	20
0	7,0	6,3	6,4	6,1
2	90,9	58,0	58,3	57,4
10	373,6	248,6	248,8	247,1
30	877,3	640,1	623,4	606,3
60	1394,8	1084,8	1084,8	1053,7
100	1834,3	1486,1	1520,8	1493,8

[0062] Die Ablesewerte wurden genommen in c/s/s (counts = Zählungen/s/s).

Tabelle 2

Kontrollen (freies PSA)	MAB 9B10-Konzentration in Assay-Verdünnungsmittel (µg/ml)			
	0	5	10	20
gering (3-5 ng/ml)	3,98	4,14	4,17	3,86
mittel (12-18 ng/ml)	15,18	15,02	15,12	14,95
viel (36-54 ng/ml)	46,90	42,85	45,87	48,20

[0063] Die Ablesewerte sind angegeben in ng/ml.

Tabelle 3

Probeplatten (gepoolte Seren von Prostatakrebs-patienten)	MAB 9B10-Konzentration in Assay-Verdünnungsmittel (µg/ml)			
	0	5	10	20
JP1	50,49	77,88	83,71	85,72
C8	1,37	2,01	2,02	2,08
C9	3,25	5,06	4,97	5,16
C10	13,02	18,99	19,21	19,69
C11	36,65	60,88	62,62	64,93
92-297-0384	26,59	48,15	47,71	50,13

[0064] Die Ablesewerte sind angegeben in ng/ml.

[0065] Die obigen Tabellen zeigen, dass zunehmende Mengen an freiem MAB 9B10 in dem Assay die Kalibrierkurvensignale verringerten und Probenplattenwerte erhöhten. Die Wirkung von MAB 9B10 auf Probeplattenwerte scheint bei etwa 10 µg/ml ein Plateau zu erreichen. Die obigen Experimente wurden wiederholt unter Verwendung von MAB 5A10 anstelle von MAB 9B10 und die Ergebnisse waren ähnlich.

[0066] In dem folgenden Experiment wurde der obige Plateaugehalt von 10 µg/ml MAB 9B10 in Assay-Verdünnungsmittel verwendet, um den systematischen Fehler zwischen freiem und komplexiertem PSA zu zeigen. Eine Probe, die freies PSA enthielt, wurde gemischt mit gereinigtem ACT und es wurden Komplexe bilden gelassen. Gereinigtes PSA und ACT wurden erhalten von Dr. Hans Lilja, Universität Malmö. Reinigung vo PSA und ACT und Bildung von Komplexen aus PSR und ACT sind zuvor beschrieben worden (A. Christensson, et al., Eur. J. Biochem., 194: 755–763, 1990). Gereinigtes Samenflüssigkeits-PSA in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, der 7,5% Rinderserumalbumin und 0,05 Natriumazid enthielt, wurde mit einem 100-Mol-Überschuss von gereinigtem ACT gemischt. Eine Kontrollprobe von PSA wurde mit Puffer anstatt mit ACT gemischt. Diese Proben wurden über Nacht bei 35°C inkubieren gelassen.

[0067] Im Anschluss an die Inkubation wurden diese Proben in dem IMx® PSA-Assay mit den folgenden Modifikationen untersucht:

a. Abbott IMx® PSA-Assay (keine Modifikationen)

b. Abbott IMx® PSA-Assay mit 9B10 in Assay-Verdünnungsmittel (d.h. mit dem Zusatz von 10 µl/ml 9B10 zu dem Assay-Verdünnungsmittel)

c. Abbott IMx® PSA-Assay mit Sondenantikörpern MAB H50 und Einfangantikörpern MAB H117 (d.h. unter der Verwendung von mit H117 beschichteten Mikropartikeln und markiertem H50)

[0068] Der Assay wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Tabelle 4 zeigt die Mengen von PSA, die für die freien PSA-Proben erhalten wurden und für die PSA-Proben, welche ACT zugesetzt hatten. Ein systematischer Fehler wird angezeigt durch die Reduktion der Menge an PSA, die in der Probe detektiert wird, die ACT enthält, im Vergleich zu der PSA-Kontrolle.

Tabelle 4

untersuchter Assay	freies PSA	PSA + ACT	% systematischer Fehler (Bias)
Abbott IMx® PSA-Assay	64,7	40,9	36,8
Abbott IMx® PSA-Assay mit 9B10 in Assay-Verdünnungsmittel	67,2	61,3	8,8
Abbott IMx® PSA-Assay mit Sondenantikörpern MAB H50 und Einfangantikörpern MAB H117	68,8	70,1	-1,8

[0069] Die Ablesewerte wurden genommen in ng/ml.

[0070] Die Daten in Tabelle 4 zeigen, dass der MONO-Assay (mit MAB H50 als Sondenantikörper und MAB H117 als Einfangantikörper) keinen systematischen Fehler hat. Im Gegensatz dazu hat der MOLY-Assay (Abbott IMx® PSA-Assay) einen systematischen Fehler von 36,8, welcher drastisch verringert wird durch die Zugabe von freiem MAB 9B10 zu dem Assay.

[0071] Das obige Experiment wurde wiederholt, wobei der MONO-Assay MAB H50 als Einfangantikörper und MAB H117 als Sondenantikörper verwendete. Es wurde beobachtet, dass ein solcher MONO-Assay ebenfalls an einem systematischen Fehler leidet, welcher durch die Zugabe von freiem 9B10 zu dem Assay-Verdünnungsmittel beseitigt werden kann.

Beispiel II

PSA-HE-Antikörper-Komplexe, die nützlich sind als Kalibratoren und Kontrollen

[0072] Die Mischung von HE_{PSA}-Antikörpern mit PSA führt zu der Bildung eines PSA-HE_{PSA}-Antikörper-Komplexes, in welchem die verborgenen Epitope ähnlich wie im PSA-ACT-Komplex blockiert sind. Dieses Material kann als ein Kalibrator oder als eine Kontrolle in PSA-Assays verwendet werden.

[0073] Samenflüssigkeits-PSA in 0,01 M Phosphat-gepufferter Salzlösung, pH 7,4, wird gemischt mit 9B10 bei einem 10-fachen Überschuss und über Nacht bei 2–8 Grad C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wird der PSA-HE_{PSA}-Antikörper-Komplex verdünnt in IMx® PSA-Kalibrator-Verdünnungsmittel auf Gehalte von 0, 2, 10, 30, 60 und 100 ng/ml. Diese Kalibratoren können verwendet werden in dem IMx® PSA-Assay und ahmen PSA-ACT-Komplexe nach, indem sie das HE auf PSA maskieren.

Beispiel III

Quervernetzen von HE-Antikörpern mit freiem PSA zum Auswählen polyklonaler Antikörper gegen PSA-HE und PSA-Nicht-HE

[0074] Dieses Beispiel beschreibt die Implementierung des Fraktionierungsverfahrens, das in Teil B von Fig. 2 gezeigt ist und das oben besprochen wurde. MAB 5A10 wird verwendet, um das Verfahren zu veranschaulichen, obwohl jeder HE_{PSA}-Antikörper an seiner Stelle verwendet werden kann, wie zum Beispiel MAB 9B10.

[0075] In dem Anfangsschritt wird 5A10 mit Cyanbromid-aktiviertem Sepharose-4B beruhend auf den Empfehlungen des Herstellers quervernetzt (Affinity Chromatography Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Schweden, 23–30 (1993)).

[0076] Das Verfahren ist wie folgt:

Das 5A10 für die Affinitätssäule wird gemischt mit 0,1 M dibasischem Natriumphosphat (Na_2HPO_4) und der pH wird auf 9,0 eingestellt. 5A10 wird dann mit Cyanbromid-aktiviertem Sepharose-4B-Gel bei einem Verhältnis von 2 mg 5A10 pro ml Gel gemischt. Die Mischung wird bei 2°–8°C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert.

[0077] Im Anschluss an die Kopplung von 5A10 an das Sepharosegel wird das Gel mit 0,1 M Na_2HPO_4, pH 8,0, gewaschen, um alle ungebundenen Liganden zu entfernen, und dann mit 1 M Ethanolamin, pH 8,0, bei 2°–8°C gemischt, um alle aktiven Gruppen zu blockieren, die in dem Gel übrig sind. Das Gel wird mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gewaschen, gefolgt von zwei sich abwechselnden Zyklen aus 0,1 M Natriumacetatpuffer mit 1 M NaCl, pH 4,0, und 0,1 M Na_2HPO_4 mit 1 M NaCl, pH 8,0. Eine Säule wird gegossen, mit PBS-Lösung (0,01 M $NaHPO_4$, 0,15 M NaCl, pH 7,2) gewaschen und dann mit 0,1 M Glycin, 0,1 M NaCl, pH 2,5, eluiert. Die Säule wird dann gewaschen mit PBS bei pH 7,2, das 0,1% Natriumazid enthält. Die 5A10-Affinitätssäule wird dann bei 2°–8°C gelagert.

[0078] Der nächste Schritt in dem Verfahren schließt die Bindung von PSA an das Sepharose 4B-5A10 ein, gefolgt von chemischer Quervernetzung, um den 5A10-PSA-Komplex zu stabilisieren. Bindung von PSA an 5A10 blockiert das HE auf dem PSA, so dass das HE keine anderen HE_{PSA}-Antikörper binden kann. Das Verfahren zum Quervernetzen unlöslicher Proteine mit dem Quervernetzungsmittel, Dimethylpalemidat (DMP), ist bereits zuvor beschrieben worden. (C. Schneider, et al., J. Biol. Chem. 25, 10766–10769 (1982)).

[0079] Das nächste Verfahren ist wie folgt:
Das Sepahrose-4B-5A10-Gel von der Säule entfernen und es in einen Messzylinder bringen. Nachdem sich das Gel gesetzt hat, den restlichen Puffer entfernen. Für jeden ml gepacktes Gel 10 mg gereinigtes PSA bei einer Anfangskonzentration von 2 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4, hinzugeben. In einen Erlenmeyerkolben überführen und bei 2–8°C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubieren.

[0080] Im Anschluss an die Inkubation über Nacht das Gel zwei Mal in 10 Volumina 0,2 M Triethanolamin, pH 9,0 (TEA) auf einem Büchner-Trichter waschen. Das Gel in ein Becherglas überführen und 5 Teile 40 mM DMP in TEA, pH 9,0, hinzugeben. Unter Schütteln 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubieren. Unter Verwendung eines Büchner-Trichters waschen mit 10–20 Volumen TEA, pH 9,0, und 10–20 Volumina 0,01 M Phosphat-gepufferter Salzlösung, pH 7,4, mit 0,02 Natriumazid. Das Gel auf die Säule überführen.

[0081] Der letzte Schritt des Verfahrens ist, polyklonale Antikörper gegen PSA über der Sepharose-4B-5A10-PSA-Säule durch Standardaffinitätsverfahren zu reinigen wie folgt:
Die polyklonalen Anti-PSA-Antikörper 1:1 mit Säulenpuffer (0,01 M Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4) verdünnen. (Beispiele für polyklonale Antikörper sind polyklonale Ziegen-, Kaninchen-, Schaf-, Maus- und Rattenantikörper.) Probe langsam auf die Säule aufgeben. Das Protein sammeln, das nicht an die Säule bindet. Diese Fraktion enthält die HE-Antikörper. Die Säule mit Säulenpuffer waschen und den OD-Wert bei 280 nm überwachen. Wenn die Extinktion auf die Grundlinie abfällt, die gebundenen Nicht-HE-Antikörper mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5, schnell eluieren. Fraktionen in einem gleichen Volumen 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, sammeln, um den pH schnell auf Neutralität einzustellen. Sowohl die gereinigten HE- als auch die Nicht-HE-Antikörper können in den gewünschten Puffer hinein dialysiert werden und bei 2–8°C gelagert werden im Anschluss an eine Filtration durch einen sterilen 0,2-Mikron-Filter. Alternativ können die Antikörper eingefroren werden.

Patentansprüche

1. Ein Immunoassayverfahren zum Detektieren oder Quantifizieren eines Analyten ("A") in einer biologischen Probe, wobei der Analyt in der Lage ist, in der Probe in einer freien Form ("freier Analyt") zu existieren, oder an ein Bindungsmolekül gebunden, um einen Komplex aus dem Analyten und dem Bindungsmolekül ("{(A)(Bindungsmolekül)}") zu bilden, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:
(a) In-Kontakt-bringen des Analyten mit einem Antikörper ("αHE"), welcher den freien Analyten, aber nicht {(A)(Bindungsmolekül)} binden kann, einem Einfangantikörper ("αnHE"), welcher sowohl den freien Analyten als auch {(A) (Bindungsmolekül)} binden kann, und einem Sondenantikörper ("αA*"), der für den Analyten spezifisch ist, vorausgesetzt, dass falls der Sondenantikörper ein polyklonaler Antikörper ist, der Analyt dann mit dem Einfangantikörper vor dem Sondenantikörper in Kontakt gebracht wird;
(b) Korrelieren der Anwesenheit oder der Menge von αA*, welcher an den Analyten gebunden ist, mit der Anwesenheit oder der Menge des Analyten in der Probe, oder Korrelieren der Menge von ungebundenem αA* mit der Abwesenheit oder Menge des Analyten in der Probe.

2. Das Immunoassayverfahren von Anspruch 1, worin der Sondenantikörper ein polyklonaler Antikörper

ist.

3. Das Immunoassayverfahren von Anspruch 1, worin der Einfangantikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

4. Das Immunoassayverfahren von Anspruch 1, das weiter den Schritt Abtrennen der Probe und des ungebundenen αHE von der festen Phase umfasst, bevor αA* zu der festen Phase hinzugegeben wird, und dann Abtrennen des ungebundenen αA* und Detektieren des an die feste Phase gebundenen αA*.

5. Das Immunoassayverfahren von Anspruch 2, worin der Sondenantikörper eine Population von polyklonalen Antikörpern ist, die Antikörper umfasst, welche den freien Analyten und nicht {(A)(Bindungsmolekül)} binden, und Antikörper, welche sowohl den freien Analyten als auch {(A)(Bindungsmolekül)} binden.

6. Das Immunoassayverfahren von Anspruch 1, worin αHE ein monoklonaler Antikörper ist.

7. Das Immunoassayverfahren von Anspruch 1, worin der Analyt PSA ist und das Bindungsmolekül ACT ist.

8. Das Immunoassayverfahren von Anspruch 7, worin der αHE gewählt ist aus der Gruppe von monoklonalen Antikörpern bestehend aus: 9B10, 5A10, PSA6, PSA30, PSA17, PSA19, PSA20 und PSA25.

9. Das Immunoassayverfahren von Anspruch 7, worin der Sondenantikörper der monoklonale Antikörper H50 ist und der Einfangantikörper der monoklonale Antikörper H117 ist.

10. Ein Kit zum Durchführen eines Assays für Analyt in einer biologischen Probe, worin der Analyt in der Probe als ein freier Analyt existieren kann, oder gebunden an ein Bindungsmolekül, um einen Komplex aus Analyt-Bindungsmolekül-Komplex zu bilden, wobei der Kit das folgende umfasst:
(a) einen Antikörper (αHE), welcher an den freien Analyten binden kann, aber nicht an den Analyt-Bindungsmolekül-Komplex;
(b) einen Einfangantikörper (αnHE), welcher sowohl den freien Analyten als auch den Analyt-Bindungsmolekül-Komplex binden kann; und
(c) einen Sondenantikörper (αA), der für den Analyten spezifisch ist.

11. Der Kit von Anspruch 10, worin der Analyt PSA ist, das Bindungsmolekül ACT ist, der Einfangantikörper und αHE monoklonale Antikörper sind, und der Sondenantikörper ein polyklonaler Antikörper ist.

12. Der Kit von Anspruch 10, der weiter einen Behälter umfasst, der einen Kalibrator oder eine Kontrolle enthält, umfassend einen Komplex aus Analyt gebunden an αHE.

13. Ein Kalibrator oder eine Kontrolle zur Verwendung in einem Immunoassay, umfassend einen Komplex, der einen Analyten aus einer biologischen Probe quervernetzt mit einem Antikörper αHE umfasst, worin der Analyt in der Lage ist, als ein freier Analyt zu existieren, oder gebunden an ein Bindungsmolekül, um einen Analyt-Bindungsmolekül-Komplex zu bilden, und worin der Analyt mindestens ein verborgenes Epitop und ein nicht verborgenes Epitop aufweist, und worin der αHE-Antikörper den freien Analyten, aber nicht den Analyt-Bindungsmolekül-Komplex bindet.

14. Der Kalibrator oder die Kontrolle von Anspruch 13, worin der Analyt PSA ist.

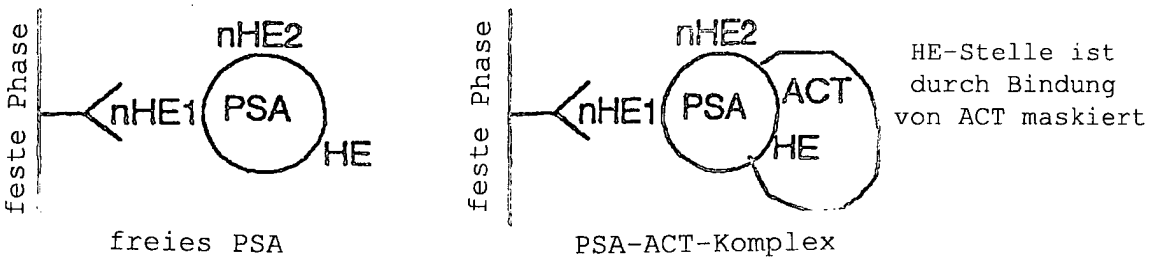
15. Verwendung eines Komplexes gemäß Anspruch 14 als ein Kalibrator und eine Kontrolle in einem Assay für Analyten gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 9.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

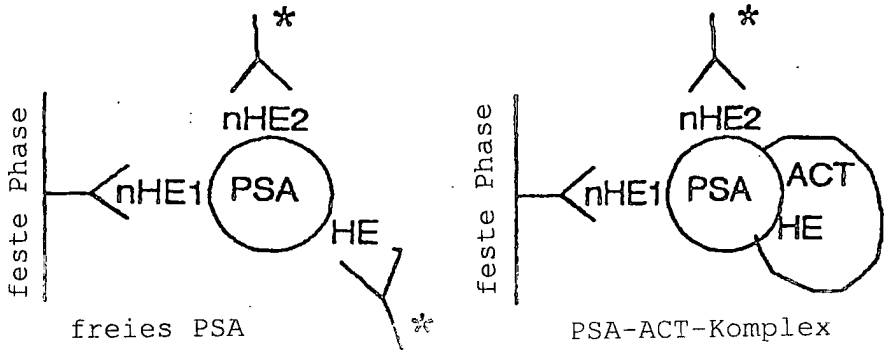
Anhängende Zeichnungen

Teil A: Herkömmliches Verfahren

Schritt A1: Einfang mit Nicht-HE-Antikörpern gegen Epitop 1 (αnHE1)



Schritt A2: Reaktion mit polyklonalem Konjugat enthaltenden Antikörpern gegen nicht verborgenes Epitop 2 (αnHE2*) und gegen verborgenes Epitop (αHE*)



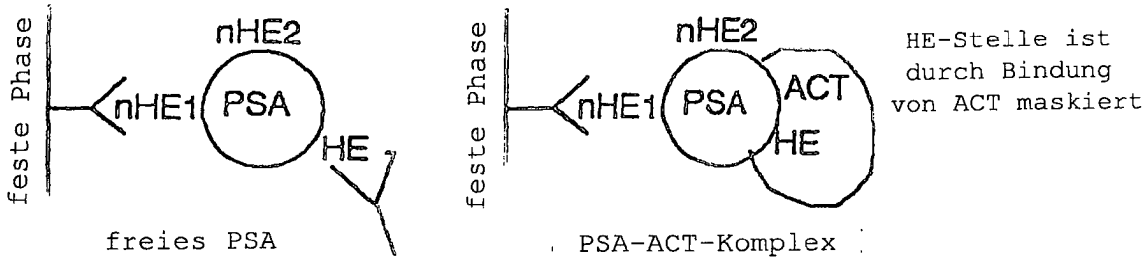
Schritt A3: Substrat hinzugeben und Reaktion ablesen.

Ergebnis:	
Form von PSA	relative Reaktion
freies PSA	2
PSA-ACT-Komplex	1

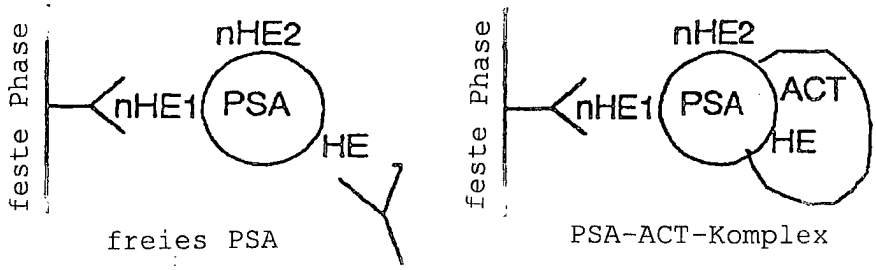
FIGUR 1A

Teil B: Verfahren der Verwendung von Antikörpern gegen verborgene Epitope

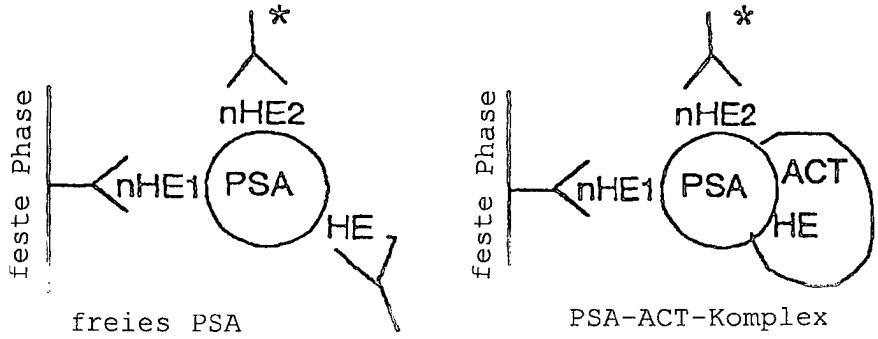
Schritt B1: Vorbehandlung der Probe mit unmarkierten Antikörpern gegen verborgene Epitopde (αHE)



Schritt B2: Einfang mit Nicht-HE-Antikörpern gegen Epitop 1 (αnHE1)



Schritt B3: Reaktion mit polyklonalen Konjugat enthaltenden Antikörpern gegen nicht verborgenes Epitop 2 (αnHE2*) und gegen verborgenes Epitop (αHE*)



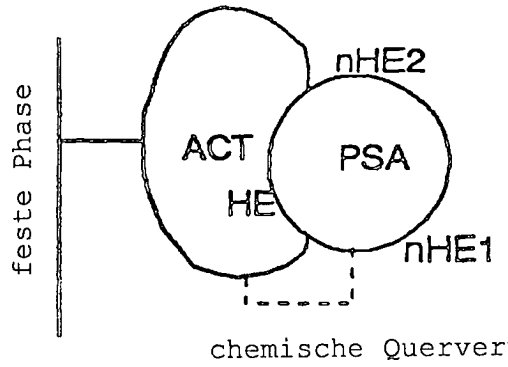
Bindung des αHE*-Konjugats wird blockiert durch unmarkiertes αHE

Schritt B4: Substrat hinzugeben und Reaktion ablesen.

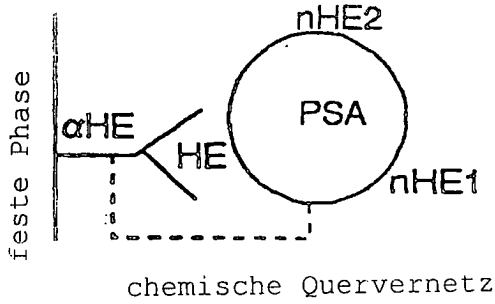
Ergebnis: Form von PSA	relative Reaktion
freies PSA	1
PSA-ACT-Komplex	1

Figur 1B

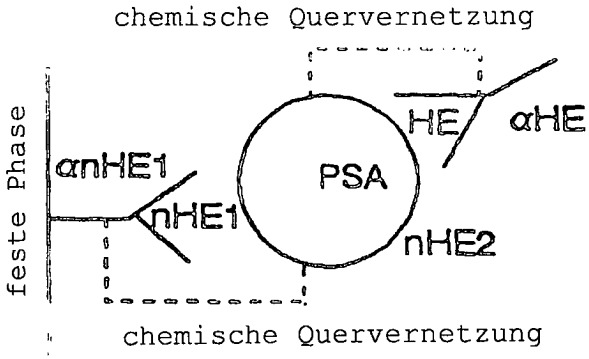
Teil A: Verwendung von ACT, um PSA zu binden



Teil B: Verwendung von Antikörpern gegen verborgene Epitope (αHE), um PSA zu binden



Teil C: Verwendung von Antikörper gegen nicht verborgenes Epitop (αnHE1), um PSA zu binden, gefolgt von der Verwendung von Antikörper gegen verborgene Epitope (αHE), um HE zu blockieren



FIGUR 2