



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03811902.1

[43] 公开日 2005 年 8 月 17 日

[11] 公开号 CN 1656379A

[22] 申请日 2003.5.22 [21] 申请号 03811902.1

[30] 优先权

[32] 2002. 5. 24 [33] US [31] 10/154,715

[86] 国际申请 PCT/US2003/016148 2003. 5. 22

[87] 国际公布 WO2003/100079 英 2003. 12. 4

[85] 进入国家阶段日期 2004. 11. 24

[71] 申请人 海布里特克有限公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 史蒂芬·D·米科瓦伊奇克

哈里·G·里滕豪斯

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任  
公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 8 页

[54] 发明名称 分析血清中酶原形式的前列腺特异  
抗原以提高前列腺癌检测的方法

[57] 摘要

本发明提高了检测和确定前列腺癌存在的试验。所述试验能够检测游离 PSA 与总 PSA 的比例显著高的男人群体中的前列腺癌。所述试验能够检测低量总 PSA，即范围为 2 - 4ng/ml 的男人群体中的前列腺癌。根据本发明的一个实施方案，所述试验包括下列步骤：(a) 确定患者生物样品中所含的总 PSA 的量，(b) 确定同一样品中游离 PSA 的量，并且计算游离 PSA 与总 PSA 的比例，(c) 确定同一样品中 pPSA 的量，以及(d) 基于总 PSA 的水平和游离 PSA %，通过将 pPSA 的量与采用已知癌症和良性疾病诊断的对照样品所确立的预定值进行比较，使样品中所含的 pPSA 的量与患者中前列腺癌的存在相关。

1. 一种帮助检测或确定患者中前列腺癌的存在的方法，包括下列步骤：
- 5           a) 确定患者生物样品中所含的总 PSA 的量；
- b) 确定样品中游离 PSA 的量；以及计算游离 PSA 与总 PSA 的比例；
- c) 确定样品中 pPSA 的量；以及
- d) 基于总 PSA 的水平和游离 PSA%，通过将 pPSA 的量与用已知癌症和良性疾病诊断的对照样品所确立的预定值进行比较，使样品
- 10           中所含的 pPSA 的量与患者中前列腺癌的存在相关。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述样品为血清或血浆。
- 15           3. 权利要求 1 的方法，其中总 PSA 为 2.5-10 ng/ml，游离 PSA 与总 PSA 的比例大于 20%，以及 pPSA 的量高于预定值指示前列腺癌的存在。
4. 权利要求 3 的方法，其中总 PSA 为 4-10 ng/ml。
- 20           5. 权利要求 4 的方法，其中游离 PSA 与总 PSA 的比例大于 25%。
6. 权利要求 1 的方法，其中总 PSA 为 2.5-10 ng/ml，游离 PSA 与总 PSA 的比例选自 5%-25%，以及 pPSA 的量高于预定值指示前列腺癌的存在。
- 25           7. 权利要求 6 的方法，其中总 PSA 为 4-10 ng/ml。
8. 权利要求 1 的方法，其中 pPSA 选自[-2]pPSA， [-4]pPSA， [-5]pPSA 和[-7]pPSA。
- 30

- 
9. 权利要求 1 的方法，其中 pPSA 为选自[-2]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA 和[-7]pPSA 的任意组合。
- 5           10. 权利要求 8 的方法，其中 pPSA 为[-2]pPSA。
11. 权利要求 1 的方法，其中总血清 PSA 为 2.5-4 ng/ml。
12. 权利要求 11 的方法，其中游离 PSA 与总 PSA 的比例选自  
10           5%-25%。
12. 权利要求 11 的方法，其中游离 PSA 与总 PSA 的比例小于  
            15%。
- 15           13. 权利要求 1 的方法，其中总 PSA 选自增量从 2.0 到 10.0 ng/ml  
            的任意组合。

分析血清中酶原形式的前列腺  
特异抗原以提高前列腺癌检测的方法

5

发明领域

总的来说，本发明涉及检测和鉴定蛋白以及蛋白的各种形式和亚基，其作为诊断标记具有潜在的用途。具体而言，本发明涉及检测血清中失活前体形式的前列腺特异抗原以及前列腺癌检测改进的方法。

10

发明背景

血清前列腺特异抗原（PSA）的测量广泛用于筛选和早期诊断前列腺癌（1-3）。通过当今临床免疫分析可测量的血清 PSA 主要以游离“非复合的”形式（游离 PSA）存在或以与 $\alpha$ 1-抗胰凝乳蛋白酶（ACT）的复合物形式存在（4-5）。血清中游离 PSA 与总 PSA 的比例已表明可显著提高 PCa 与 BPH 的辨别，以较高的比例相关于较低风险的前列腺癌（6-7）。

游离 PSA 水平在血清中变化的生物学机理是未知的。已经变成复合的血清 PSA 可能是相对均一的，因为它代表了酶活性的完整的 PSA。从 PAS-ACT 复合物释放的 PSA 在前列腺癌（PCa）和良性前列腺增生（BPH）血清中发现与精浆 PSA 是不可区分的，正确认了这种假设（8）。由此得出结论，游离 PSA 可提供更好的生化指标（insight），以及表征游离 PSA 的分子形式可帮助阐明其前列腺起源和释放到血清中的机理。然而，在诊断相关的范围接近 10 ng/ml 时，利用目前技术努力从血清中纯化和表征低水平的 PSA 一般尚未被视为可行。迄今为止，研究主要集中在 PSA 水平非同寻常高，100s 或 1000s 的 ng/ml PSA 的男人血清上。本发明人报道了在收集的含有 63 ng/ml 总 PSA 的 PCa 血清中存在截短形式的 proPSA（pPSA）（9）。但是，其他组在含有更高水平的 PSA 的血清中没有鉴定到 pPSA。尽管建议采用高水平血

清 PSA 进行研究，但是共同缺点在于该 PSA 可能不反映的通常存在于疾病的早期阶段 PSA 的种类或百分比，其中 PSA 为 10 ng/ml 或更低。从大的原发性肿瘤损伤或转移性疾病中释放的 PSA 比从早期可能是低级疾病中释放的 PSA 具有不同的生化特性。因此，为了用作临床检测早期前列腺癌中的助手，截短的 pPSA 形式必须在诊断上相关水平的总 PSA 接近 10 ng/ml 的血清中，以显著水平存在。

当总 PSA 水平接近 10 ng/ml 时，游离 PSA 比例或百分比较高的男人更有可能患有良性疾病。研究已经表征了这些水平的游离 PSA，并且例如已经建议总 PSA 以游离 PSA 存在大于 25%的男人不必对癌症进行活检，因为癌症在这些病例中只有 8%的可能性。然而，没有已知的诊断方法可用于帮助在 8%癌症可能性的男人群体中进一步检测前列腺癌。此外，当总 PSA 为 2.5-4 ng/ml，许多癌症存在，但出现的概率低于总 PSA 为 4-10 ng/ml 的情形。目前，利用游离 PSA 的比例在 2.5-4 ng/ml 范围中提高癌症检测的努力还未建立诊断价值。

所以，仍需要开发用于改进检测和确定患者中早期前列腺癌的试验。

## 20 发明概述

本发明基于下列意料之外的发现：pPSA 异型，例如[-2]pPSA 形式，在游离 PSA 与总 PSA 的比例显著提高的特定亚群的男人，尤其在游离 PSA 大于 25%的男人中具有升高的癌症预测值。此外，本发明还发现，当患者样品中的总 PSA 为 2-4 ng/ml 范围时，pPSA 在鉴定高百分比的患有前列腺癌的男人中可能也是有效的，在所述范围中，存在许多癌症，但是出现率较低。因此，本发明提供了手段，以帮助在癌症更稀罕的男人的特别群体中，以及在当前利用免疫试验无法检测前列腺癌的地方检测前列腺癌。

30 因此，基于本发明的发现，本发明的一方面提供诊断方法，以帮

助检测和/或确定个体中前列腺癌的存在，或帮助区分个体中的前列腺癌和 BPH。根据本发明的实施方案，这种方法包括下列步骤：

a) 确定患者生物样品中所含的总 PSA 的量；

5 b) 确定样品中游离 PSA 的量；以及计算游离 PSA 与总 PSA 的比例；

c) 确定样品中 pPSA 的量；以及

d) 基于总 PSA 的水平 and 游离 PSA%，通过将 pPSA 的量与用已知癌症和良性疾病诊断的对照样品所确立的预定值进行比较，使样品中所含的 pPSA 的量与患者中前列腺癌的存在相关。

10

根据本发明的实施方案，总 PSA 的范围可以为 2-10。游离 PSA 与总 PSA 的比例大于 10%-25%。或者，总 PSA 的范围可以为 2.5-4 ng/ml，而游离 PSA 的比例小于 15%。pPSA 可以为[-2]pPSA，[-4]pPSA 或[-5/-7]pPSA。特别地，pPSA 为[-2]pPSA。样品为血清或血浆。

15

用于诊断或区分前列腺癌和 BPH 的试剂盒也包括在本发明的实施方案中。

#### 附图简述

20

图 1 示出了接受者操作特征（ROC）分析[2,4,5,7]pPSA/游离 PSA（%[2,4,5,7]pPSA，%[-2]+[-4]+[-5]+[-7]pPSA 的和），与患有癌症和 BPH 以及总 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中的游离 PSA/总 PSA（%F）比较。

25

图 2 示出了 ROC 分析[2]pPSA/游离 PSA（%[-2]pPSA），与患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中游离 PSA/总 PSA（%F）的比较。

图 3 示出了 ROC 分析[-2]pPSA，与患有癌症或 BPH 以及总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 的男人中游离 PSA/总 PSA（%F）的比较。

30

图 4 示出了 ROC 分析[-2]pPSA，与患有癌症或 BPH，总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 以及游离 PSA 大于 20%的男人中游离 PSA/总 PSA（%F）

的比较。

图 5 示出了 ROC 分析[-2]pPSA，与患有癌症或 BPH，总血清 PSA 为 4-10 ng/ml 以及游离 PSA 大于 25%的男人中游离 PSA/总 PSA (%F) 的比较。

5 图 6 为图 5 的[-2]pPSA 数据的点印迹，显示界限为 0.053 ng/ml。

图 7 示出了 ROC 分析[2,4,5,7]pPSA/游离 PSA (%[2,4,5,7]pPSA, %[-2]+[-4]+[-5]+[-7]pPSA 的和)，与患有癌症和 BPH 以及总血清 PSA 为 2.5-4 ng/ml 的男人中的游离 PSA/总 PSA (%F) 的比较。

10 图 8 示出了 ROC 分析[2,4,5,7]pPSA/游离 PSA (%[2,4,5,7]pPSA, %[-2]+[-4]+[-5]+[-7]pPSA 的和)，与患有癌症和 BPH，总血清 PSA 为 2.5-4 ng/ml 以及游离 PSA 小于 15%的男人中游离 PSA/总 PSA (%F) 的比较。

优选实施方案的详述

15 本发明的一个方面提供了诊断方法，以帮助检测和/或确定个体中前列腺癌的存在，或者帮助区分个体中前列腺癌和 BPH。根据本发明的实施方案，这种方法包括下列步骤：

a) 确定患者生物样品中所含的总 PSA 的量；

20 b) 确定样品中游离 PSA 的量；以及计算游离 PSA 与总 PSA 的比例；

c) 确定样品中 pPSA 的量；以及

d) 基于总 PSA 的水平和游离 PSA%，通过将 pPSA 的量与用已知癌症和良性疾病诊断的对照样品所确立的预定值进行比较，使样品中所含的 pPSA 的量与患者中前列腺癌的存在相关。

25

总 PSA 和游离 PSA 的测量方法是本领域众所周知的，在此不再赘述。对于本发明而言，术语“总 PSA”是指免疫学上可用的 PSA 形式，包括游离 PSA 和 PSA 与 ACT 的复合物。本发明所用的术语“游离 PSA”是指不与其他任何蛋白复合但在溶液中以 30kDa 蛋白形式存在的 PSA。

30

如本发明所用，术语“proPSA”，“pPSA”，“proPSA 多肽”，以及“pPSA 多肽”可以互换，并且优选包括所有失活前体形式的 PSA，包括但不限于[-2]proPSA，[-4]proPSA，[-7]proPSA 以及[-5]proPSA。

5

pPSA 的量可通过本发明所述，或本领域公知，或将来开发的任何方法测量，只要它们能够进行这种测量。根据本发明的一个实施方案，样品中所含的 pPSA 可通过包括下列步骤的方法进行测量：将特异性结合于 proPSA 的因子与样品在允许形成包含 proPSA 和因子的二元复合物的条件下接触，以及检测和确定复合物的量。

10

对于本发明而言，因子可以是能够以足够特异性结合于 pPSA 的任何分子种类。如果结合使得包含因子和 pPSA 的复合物形成并且确定复合物的量，则结合特异性就是足够的。潜在分子种类的例子包括但不限于抗体，衍生自抗体的抗原结合片段以及抗体等同物，诸如但不限于适体（aptamer）等。对于本发明而言，特异于 pPSA 的因子可通过本领域公知的方法加以选择。例如，任何已知的结合试验均可用于确定任何给定因子的特异结合活性。

15

根据本发明的实施方案，proPSA 可通过免疫测定方法进行测量。可用于确定本发明的 proPSA 的量的抗体和免疫测定描述在在审 U.S. 申请 No. 09/251,686, 09/302,965, 09,792,692; 和 09,792,534 中，内容在此以其全文引作参考。具体而言，在哺乳动物细胞中表达 PSA 以及制备特异于 PSA 的抗体的细节提供在在审 U.S. 专利申请 No. 09/251,686 和 09/302,965 中。如该在审申请所述，proPSA 多肽或对应于 proPSA 区的肽可表达和分离自哺乳动物细胞。一旦分离，proPSA 肽可用于制备抗 pPSA 抗体。

20

25

怎样制备抗-pPSA 抗体的详细方法还描述在在审 U.S. 申请 No. 09,792,692 中。简而言之，根据本发明，用于生成抗体的 proPSA 多肽

30

包括但不限于-7, -5, -4 和-2proPSA。对应于 proPSA 区域的肽也可用于生成抗 pPSA 抗体, 并且包括所有含有任何部分的 pPSA 多肽前区的肽。这些肽优选含有约 8-15 个氨基酸, 并且包括免疫原性表位。根据本发明的实施方案, 通过本发明产生的抗体优选与本发明的 proPSA 特异性免疫反应和结合。如本发明所用的“特异性免疫反应或特异性结合”表示本发明的抗体识别和结合 proPSA 的交叉反应性, 与识别和结合其他形式的 PSA, 诸如其他截短或非截短的成熟形式的 PSA 相比低 10%。特异性结合 proPSA 的单克隆抗体的例子包括但不限于 PSIZ134, PSIZ120, PSIZ125, PSIZ80, PS2P206, PS2P309, PS2P446, PS2X094, PS2X373, PS2V411 和 PS2V476。例如, 单克隆抗体 PS2P446 特异于[-7]/[-4]pPSA。PS2X373 特异于[-2]pPSA。PS2V476 特异于[-4]pPSA。

本发明的抗体可用于检测和确定样品中 proPSA 的存在及其量, 还可用于检测和确定样品中不同形式的 proPSA 的存在及其量。用于检测和确定 proPSA 或不同形式的 proPSA 的量的免疫测定的详细描述提供在在审 U.S.专利申请 No. 09,792,534 中, 在此不再赘述。

本发明用于确定生物样品中所含的任何目的 PSA 的量的典型免疫测定包括下列步骤: 将特异性与目的 PSA 结合的抗体与样品在允许形成含有 PSA 和抗体的二元复合物的条件下接触; 以及 (b) 检测和确定复合物的量。对于本发明而言, 任何能够与 proPSA 形成可检测复合物的因子可视为抗体的等同物。

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

别其他免疫测定方式而无需过多的实验。

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

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

15 根据本发明的实施方案，免疫测定包括特异于[-2]pPSA，[-4]pPSA 和[-5/-7]pPSA 的试验。在患有已知前列腺癌或 BPH 的男人的血清中测量特异形式的 pPSA，以及这些分析物的水平用来开发算法以区分前列腺癌和良性前列腺病。本发明免疫测定可用来检测人生理样品，诸如血清和组织中的 pPSA，其目的是帮助诊断和监测前列腺癌。本  
20 发明的试验也可用来帮助区分前列腺癌和良性前列腺增生。

25 本发明令人惊奇的发现，当分析总 PSA 为 4-10 ng/ml 以及游离 PSA%大于 20%，或尤其大于 25%的血清样本时，pPSA，例如[-2]pPSA，或[-2]，[-4]和[-5/-7]pPSA 的和具有显著升高的癌症预测值。此外，在总 PSA 介于 2.5-4 ng/ml 以及游离 PSA 低于 15%的血清样本中，pPSA 显示增加的癌症预测值。因此，在特定亚群的总 PSA 和游离 PSA%内，pPSA 异型具有显著升高的癌症预测值。在系列样品的整个游离 PSA%的范围中，pPSA 异型也可显示增加的癌症区分。当选择选定的游离 PSA%范围或界限时，这种效果得以显著增强。下述实施例显示在游  
30 离 PSA 大于 25%的血清中，一定界限以上的%[-2]pPSA 能够从 13 个

错失的癌症中检测出 11 个。

因此，根据本发明的实施方案，样品中总 PSA 约 2-10 ng/ml。当总 PSA 的量介于 2-4 ng/ml 的范围时，样品中游离 PSA 与总 PSA 的比例可大于 10-25%，或小于 15%。在特殊的实施方案中，总 PSA 为 4-10 ng/ml，而游离 PSA 的比例为大于 20%，或 25%。

对于本发明而言，在患者样品中检测的 pPSA 的量可以以任何生成诊断值用于确定前列腺癌存在的方式与前列腺癌的存在相关。根据本发明的实施方案，将 pPSA 的量与预定值比较用于确定前列腺癌的存在。鉴于本发明的教导，本领域专业技术人员通过常规实验可容易地确定“预定的界限值”（或阈值）或其他对 pPSA 的水平用于确定前列腺癌存在所必需的分析参数。例如，可在诊断有前列腺癌的个体与没患有前列腺癌或 BPH 的个体中比较上述 pPSA 的比例，以确定界限值。接受者操作特征（ROC）分析可以以要求的特异性和灵敏度用来确定界限值。ROC 分析在本领域中是公知的，并且详细描述在参考文献 13（13）中，相关内容在此以其全文引作参考。然后，样品中 pPSA 的量可与预定的界限值进行比较，以确定个体中前列腺癌的存在，其中较高水平的 pPSA 可以指示前列腺癌。以要求的特异性和灵敏度确定界限值的这种方法和其他方法在本领域是众所周知的，无需在此重复（14-21）。

参照下列实施例进一步对本发明加以描述。

#### 25 实施例 I

分析患有癌症和良性疾病的总 PSA 为 4-10 ng/ml 的血清材料和方法

开发针对 pPSA 的单克隆抗体（mAbs）

通过小鼠免疫有附着于匙孔血蓝蛋白（Pierce Chemical Co. Rockford, IL）的肽开发针对[-2]和[-4]pPSA 的 mAbs。对于[-2]pPSA

而言，前肽为 SRIVGGWECEK，而对于 [-4]pPSA 而言，肽为 ILSRIVGGWECEK。通过常用方法学 19 生产杂交瘤，而由与上述各自肽的反应性挑选抗体克隆，与对照肽成熟 PSA，IVGGWECEK，没有反应性。依据在 Western 印迹上识别纯化的 [-2]和 [-4]pPSA 蛋白的能力，进一步筛选克隆。当在还原条件下进行 SDS-PAGE 电泳时，通过 Western 印迹，PS2X373 与成熟 PSA 蛋白显示出约 20% 的交叉反应性。然而，在非还原条件下，交叉反应性降低至 5% 或更少，因此这些条件用于检测结果中的 [-2]pPSA。通过标准免疫测定技术在微滴定板中利用肽免疫原生成的克隆没有一个能够识别溶液中的天然 [-2]或 [-4]pPSA 蛋白。

通过小鼠免疫有附着到人激肽释放酶 2 的由 PSA prepro 前导肽组成的纯化的重组嵌合蛋白，获得针对全长 [-7]pPSA 的 mAbs 16, 20。依据识别天然重组 pPSA，以及不识别天然成熟 PSA，筛选克隆。通过免疫测定，发现这些 mAbs 识别 [-7]pPSA 和 [-5]pPSA，并因此这些抗体在试验形式中可交替的称为 [-7]pPSA 或 [-5,-7]pPSA 的试验。

#### 从哺乳动物细胞中分离重组 pPSA

如前所述，重组 PSA 表达在哺乳动物 AV12 细胞中。用尽的培养基传递到 PSA 特异 mAb, PSM773 上。PSM773 先前已经显示对成熟 PSA，截短形式的 PSA 和前体形式的 PSA 具有特异性(10-12)。用 40 倍体积的含有 0.1% 还原 Triton-X 100 的 PBS 冲洗柱子，结合蛋白用含有 200 mM 氯化钠的 100 mM 甘氨酸 pH 2.5 洗脱。洗脱液立即用 10% vol/vol IM Tris pH 8.0 中和。纯化的 PSA 不含有成熟的 PSA，但含有通过 HIC-HPLC 纯化(12)的 [-5/-7]，[-4]和 [-2]pPSA 分子异型的 pPSA。

#### 免疫测定 PSA

PSA 在血清和纯化的制剂中的浓度通过 Tandem®-MP PSA 和 Tandem®-MP 游离 PSA 试验 (Hybritech Incorporated, San Diego, CA;

Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) 确定。

#### 免疫测定[-2], [-4]和[-5/-7]pPSA

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

15

#### 接受者操作特征 (ROC) 曲线分析

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

#### 结果

25 在 303 个血清样品上, 对总 PSA, 游离 PSA 和[-2]pPSA, [-4]pPSA  
和[-5/-7]pPSA 免疫试验进行测量, 所述样品含有已知诊断为 107 个癌  
症和 196 个良性疾病。计算各个组分的值, 并且表示成 ng/ml 的血清。  
为了生成 ROC 曲线分析, 将各个 PSA 异型的血清值输入 MedCalc 程  
序。ROC 是统计学方法, 其对一群中的各个样品赋予癌症的阳性和阴  
性预测值, 并且是最广泛使用的方法以评价作为癌症预测器的 PSA 以  
30 及游离 PSA 试验的值和性能。以最简单的术语, 对于各个 ROC 分析

曲线下面积 AUC 用于评价试验预测值。较高的 AUC 值指示更好的总预测值。ROC 值范围从 0.5（随机机会上没有改进）到 1.0（100%预测值的完全试验）。

5           在大多数情况下，ROC 分析的目的是使辨别患有癌症的男人的最大化，以及使对那些没患有癌症，即假阳性的男人活检最小化。当分析诸如血清中 PSA 的生物样品时，在真阳性和假阳性的检测之间存在平衡。例如，取决于所需的结果，最期望的是检测 95%的癌症，而对那些患有良性疾病的男人，这不可避免地伴随着高的假阳性率。在  
10           游离 PSA%的情形下，例如，为了检测 95%的癌症，它要求游离 PSA 小于 25%的所有男人进行活检。然而，这却伴随着 80%的假阳性率。在不同情形下，最期望的是使假阳性率最小化，在此仅有小百分比的真正癌症会得以检测。当用癌症发生率相对小的大群体处理时，这第二  
15           种范例可能是期望的。对整个群体进行活检不是可行的，因此人们确立了平衡并且检测如对给定数目的活检可行的一样多的癌症。这些假设的例子表示 ROC 分析的评价和价值不是绝对的，并且在本发明采用 pPSA 的情形下，将需要试验以建立有待在实践中使用的真正参数。但是，鉴于本发明的教导，本领域技术人员应该能够容易地确定必要的参数，而无需过多的试验。下文给出的实施例表明 pPSA 在检测  
20           给定群体中以及在给定组的标准下的癌症的值和功效，但是 pPSA 的用途和界限不限于这些实施例。

          在 PSA 测试领域，已知游离 PSA%与只有总 PSA 比较在早期癌症检测范围为 4-10 ng/ml 的总 PSA 中提高了癌症检测。在图 1 所示的  
25           样品组中，游离 PSA%比 PSA 也具有较高的预测值，因此在这些样品中的 pPSA 测量与游离 PSA%比较对提高癌症预测值的能力加以评价。图 1 示出了 %F（游离 PSA%，或游离/总 PSA）和 %[2,4,5,7]pPSA（所有 pPSA 形式的和除以游离 PSA，即由所有 pPSA 形式组成的游离 PSA 的百分比）的比较。在这种情形下， %[2,4,5,7]pPSA 比 %F 示出了  
30           适度的提高，正如所见，相对 %F，其 AUC 较高，为 0.698 对 0.631。

图 2 使用稍微不同的范例，并且比较了单个 pPSA 组分%[-2]pPSA 与%F。这种比较的 AUC 显示两种分析物均具有几乎同等的检测癌症的能力。图 3 示出[-2]pPSA 与%F 的比较。在此种情形下，[-2]pPSA 表示了这种前体形式在血清中的 ng/ml，而非游离 PSA%。AUC 分析表明[-2]pPSA 本身比游离 PSA%预测癌症的能力较小。

然而，图 4 中，对 303 个全部样品群中的子集进行了分析。只有那些游离 PSA 大于 20%的男人才筛选出来用于 ROC 分析。这代表了 303 个样品中的 120 个。尽管整个群含有 35%癌症，但这 120 个样品亚组仅含有 23%癌症，这与随着%F 增加癌症相对百分比降低的总趋势一致。图 4 中，在游离 PSA 大于 20%的男人中，测量%F 几乎没有预测癌症的能力，AUC 为 0.504。相比之下，在同样范围内，[-2]pPSA 显示了显著提高的预测癌症的能力，如 AUC 为 0.674 所示。因此，在游离 PSA%升高的群体中，[-2]pPSA 显示了癌症检测的更高的特异性，其中癌症更少和更难以检测。

更迅速和实际应用这种现象可见于图 5 中。在该图中，只对游离 PSA 大于 25%的男人进行了分析。在真正随机筛选群中，建议游离 PSA 大于 25%的男人不对癌症进行活检，这是因为癌症发现的可能性仅约有 8%。由于在该组中没有常规血检预测癌症，因此该组男人中的癌症在正常情形下往往保持不被检测。图 5 显示[-2]pPSA 对该组中癌症具有高度增强的预测值，AUC 为 0.743。游离 PSA 大于 25%处比在游离 PSA 界限大于 20%中，[-2]pPSA 的 AUC 甚至更高，该事实证实了下列全部观察结果：随着游离 PSA%升高，[-2]pPSA 变成癌症的更好的预测器。难以预料的是 pPSA 形式会在特定范围或界限的游离 PSA%中，显示选择性癌症预测。

如何使用 pPSA 试验的实际例子可见于图 6 中，显示了在图 5 中单个值的点阵图，从生成图 5 的同一程序中绘制。在游离 PSA 大于 25%

的群体中，有 13 个癌症和 51 个非癌症，假设主要是 BPH。使用界限 0.053 ng/ml [-2]pPSA，人们可检测 13 个癌症中的 11 个（85%灵敏度），而活检仅在该组中测出 51 个非癌症中的含 17 个（67%特异性）。再者，给出这作为 pPSA 如何可用于检测前列腺癌的例子，但不暗含 0.053 ng/ml [-2]pPSA 为用于这些类型的样品的最终界限。对患有已知癌症和 BPH 的较大对照群体进行更广泛分析，会用于确定适当的界限值。如早先所述，这不是采用不同群体患者的可以期望的唯一方法。

虽然未示出游离 PSA 大于 25%的样品，其他 pPSA 形式诸如% [-2]pPSA，[-2]pPSA/总 PSA，% [2,4,5,7]pPSA 和其他形式与%F 比较示出了改进的 ROC AUCs。

#### 实施例 II

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

如实施例 1 一样，在这群总 PSA 值为 2.5-4 ng/ml 的患者中对同样系列的 PSA 试验进行测量。在总共 286 个样品中有 109 个癌症和 177 个良性疾病样品。范围 2.5-4 ng/ml 为一区域，其中存在许多癌症，但在随机筛选群体中比 4-10 ng/ml 患者的发生率较低。目前试图使用%F 提高该范围中的癌症检测尚未建立诊断值。

图 7 示出了%[2,4,5,7]pPSA 与%F 的 ROC 比较。%[2,4,5,7]pPSA 对癌症示出了显著提高的预测值。在图 8 中，只有游离 PSA 低于 15%的样品进行 ROC 分析。%[2,4,5,7]pPSA 比%F 显示甚至更显著的 AUC 增加，指示改进的癌症预测值。这是下列情形的一个例子，其中存在癌症概率低的大群体，并且在此情形下通过设定参数以仅挑选癌症概率非常高，即特异性高的那些样品，使假阳性最小化是最期望的。

#### 讨论

这些例子表明，总体上 pPSA 异型的游离 PSA 与游离 PSA 比较

充当癌症检测的独立标记。这在当今诊断目的 PSA 为 2.5-10 ng/ml 的整个范围中是真实的。所有 pPSA 异型或单个异型的 pPSA 的和提高了患者群体中的癌症检测，如早先在下列申请中提出的一样：1999 年 4 月 30 日提交的申请 No. 09/302,965 (其是 1999 年 2 月 17 日提交的申请 No. 09/251,686 的部分继续申请，而这又是 1997 年 4 月 30 日提交的申请 No. 08/846,408 的继续申请)。

然而，不可预料的是，迅速增加的预测值在由其 %F 分层抽样的样品中将是如此显著。这是新的发现，并且暗示 pPSA 和游离 PSA 在血清中的总百分比之间的复杂关系。为了提高癌症检测和减少不必要的活检，pPSA 的测量可应用在早期诊断为 2-10 ng/ml PSA 的整个范围中。结果中所给出的例子表明 pPSA 异型对前列腺癌检测的实用性，并且暗示一些相关例子，但是这些例子并不表示采用不同范围的 PSA，游离 PSA%或 pPSA 界限来限制其他潜在的应用。

15

#### 参考文献：

1. Catalona, W.J., Smith, D.S., Ratliff, T.L., Dodds, K.M., Coplen, D.E., Yuan. J.J., Tetros. J.A,和 andriole. G.L. 血清中前列腺特异抗原的测量作为前列腺癌的筛选测试 (Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer), N. Engl. J. Med., 324: 1156-1161, 1991。

20

2. Oesterling, J.E. 前列腺特异抗原：对前列腺腺癌最有用的肿瘤标记的临界评价 (Prostate-specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate), J. Urol., 145: 907-923,1991。

25

3. Labrie, F., Dupont, A., Suburu, R., Cusan. L., Trembla. M., Gomez, J.L.,和 Emond, J. 血清前列腺特异抗原作为前列腺癌的预先筛选测试 (Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate

30

cancer) , J. Urol., 147: 846-851,1992。

4. Lilja, H., Christensson, A., Dahlen, U., Matikainen, M.T., Nilsson, O., Pettersson, K.,和 Lovgren, T. 血清中的前列腺特异抗原主要以与  $\alpha$  1-抗胰凝乳蛋白酶的复合物的形式出现 (Prostate-Specific Antigen in Serum Occurs Predominantly in Complex with  $\alpha$  1-Antichymotrypsin) , Clin. Chem, 37: 1618-1625,1991。

5. Stenman, U.H., Leinonen, J., Alfthan, H., Rannikko, S., Tuhkanen, K.和 Alfthan, O. 前列腺特异抗原与  $\alpha$  1-抗胰凝乳蛋白酶之间的复合物是患有前列腺癌的患者血清中主要形式的前列腺特异抗原: 复合物的试验提高了癌症的临床灵敏度 (A complex between prostate-specific antigen and  $\alpha$  1-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., 51: 222-226, 1991。

6. Catalona, W.J., Partin, A.W., Slawin, K.M., Brawer, M.K., Flanigan, R.C., Patel, A., Richie, J.P., Dekernion, J.B., Walsh, P.C., Scardino, P.T., Lange, P.H., Subong, E.N., Parson, R.E., Gasior, G.H., Loveland, K.G.,和 Southwick, P.C. 采用游离前列腺特异抗原的百分比增加前列腺癌与良性前列腺疾病的区分: 未来多中心临床试验 (Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial) , JAMA, 279: 1542-1547, 1998。

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

8. Peter, J., Unverzagt, C.和 Hoesel, W. 游离前列腺特异抗原(PSA) 在从与  $\alpha$  1-抗胰凝乳蛋白酶的复合物(PSA-ACT)中通过化学释放后的 分析 (Analysis of free prostate-specific antigen (PSA) after chemical 5 release from the complex with alpha (1)- antichymotrypsin (PSA-ACT)) , Clin. Chem., 46: 474-482, 2000。

9. Mikolajczyk, S.D., Grauer, L.S., Millar, L.S., Hill, T.M., Kumar, A., Rittenhouse, H.G., Wolfert, R.L.,和 Saedi, M.S. 前体形式的 10 PSA(pPSA)为游离 PSA 在前列腺癌血清中的组分 (A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum) , Urology, 50: 710-714, 1997。

10. Wang, T.J., Linton, H.J., Sokoloff, R.L., Grauer, L.S., 15 Rittenhouse. H.G.和 wolfert, R.L. 通过 SDS-PAGE Western 印迹分析 PSA 和 PSA 片段的抗体特异性 (Antibody specificities for PSA and PSA fragments by SDS-PAGE Western blot analysis) , Tumor Biology, 20: 75-78, 1997。

20 11. Finlay, J.A., Day, J.R.和 Rittenhouse, H.G. 前列腺特异抗原的 多克隆抗体和单克隆抗体可与人激肽释放酶 2 和人激肽释放酶 1 交叉 反应 (Polyclonal and Monoclonal Antibodies to Prostate-Specific Antigen can Cross-React with Human Kallikrein 2 and Human Kallikrein 1) , Urology, 53: 746-751, 1999。

25 12. Kumar, A., Mikolajczyk, S.D., Goel, A.S., Millar, L.S.和 saedi. M.S. 由哺乳动物细胞表达前体形式的前列腺特异抗原并通过人激肽 释放酶 2 将其转化为成熟的活性形式 (Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, 30 active form by human kallikrein 2) , Cancer Res., 57: 3111-3114, 1997。

13. Dawson, J.M. 1999. 临床试验：分析和呈递。在第 26 届医学诊断制造商协会年会上的发言 (Clinical Trials: Analysis and Presentation, Presented at the 26TH Annual Meeting of the Association of Medical Diagnostics Manufacturers ) , 可获自 <http://www.amdm.or/AMDM/NewsletterV12-2-2.html>。
14. Linnet, K. 1999. 对基于回归分析的方法比较研究所必需的样品大小 (Necessary sample size for method comparison studies based on regression analysis) , Clin. Chem., 45: 882-94。
15. Linnet, K. 1993. 回归程序对比较方法研究的评价 (Evaluation of regression procedures for methods comparison studies), Clin. Chem., 39: 424-32。
16. Bland, J.M., Altman, D.G. 1986. 用于评价两种临床测量方法之间一致性的统计学方法 (Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement) , Lancet, i: 307-10。
17. Reid, M.C., Lachs, M.S., Feinstein A.R. 1995. 方法学标准在诊断测试研究中的应用正变得更好但仍然不是最好 (Use of methodologic standards in diagnostic test research. Getting better but still not good) , JAMA, 274: 645-51。
18. Krouwer, J.S. 累积分布分析图——ROC 曲线的替代 (Cumulative distribution analysis graphs-an alternative to ROC curves [Tech Brief]) , Clin. Chem., 33: 2305-6。
19. Albert, A. 1982. 有关使用和计算临床化学中的可能性比例 (On the use and computation of likelihood ratios in clinical chemistry) , Clin.

---

Chem., 28: 1113-9。

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

5

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

图1

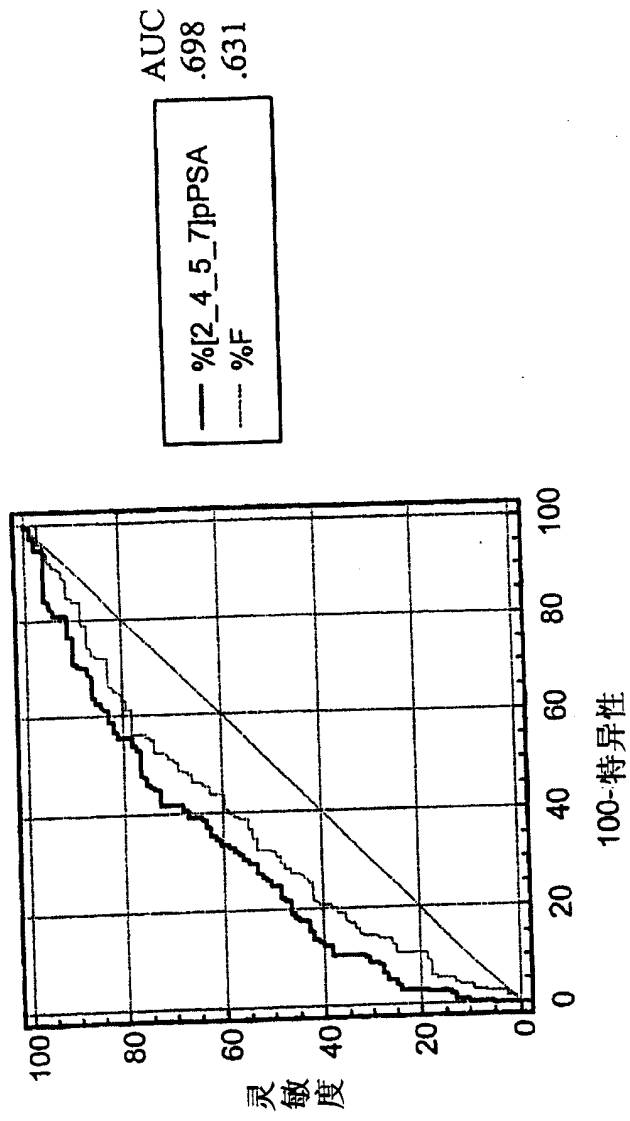


图2

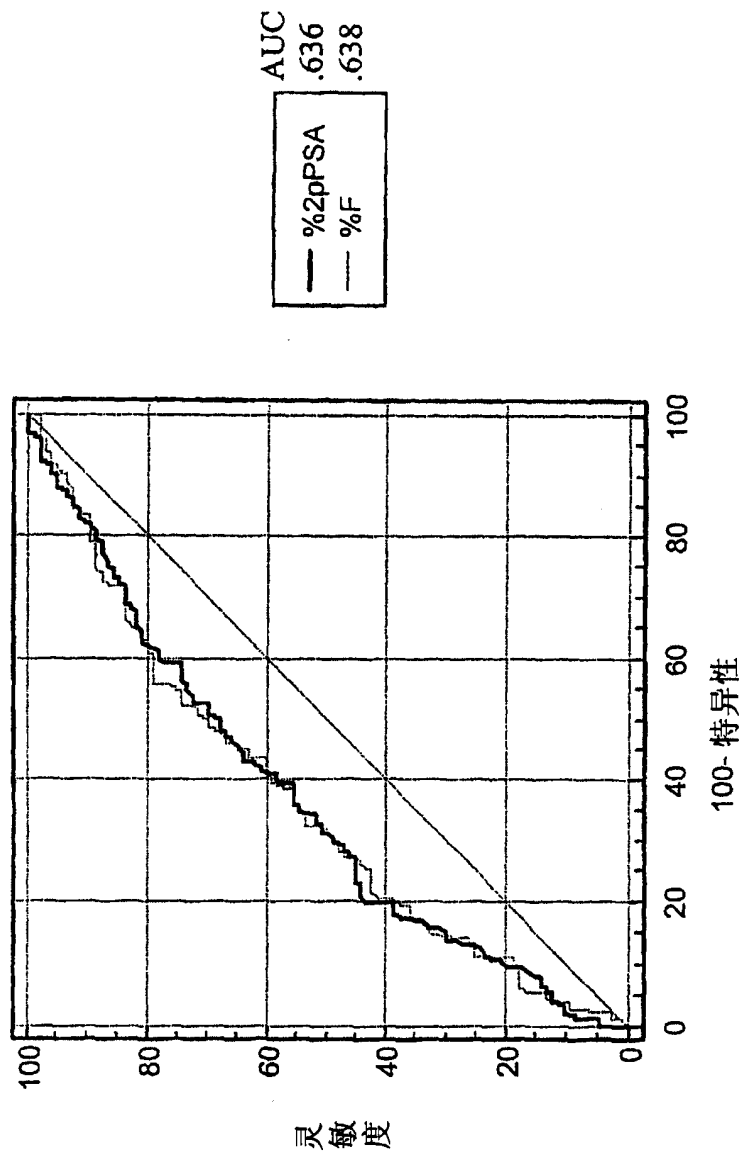


图3

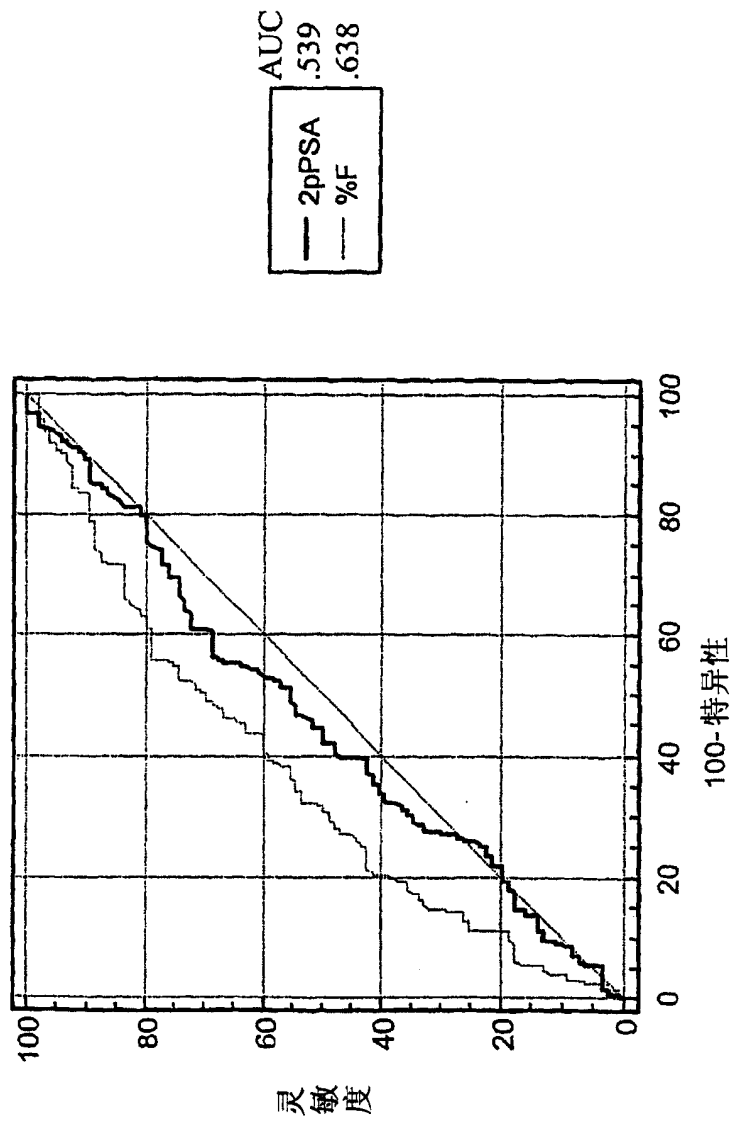


图4

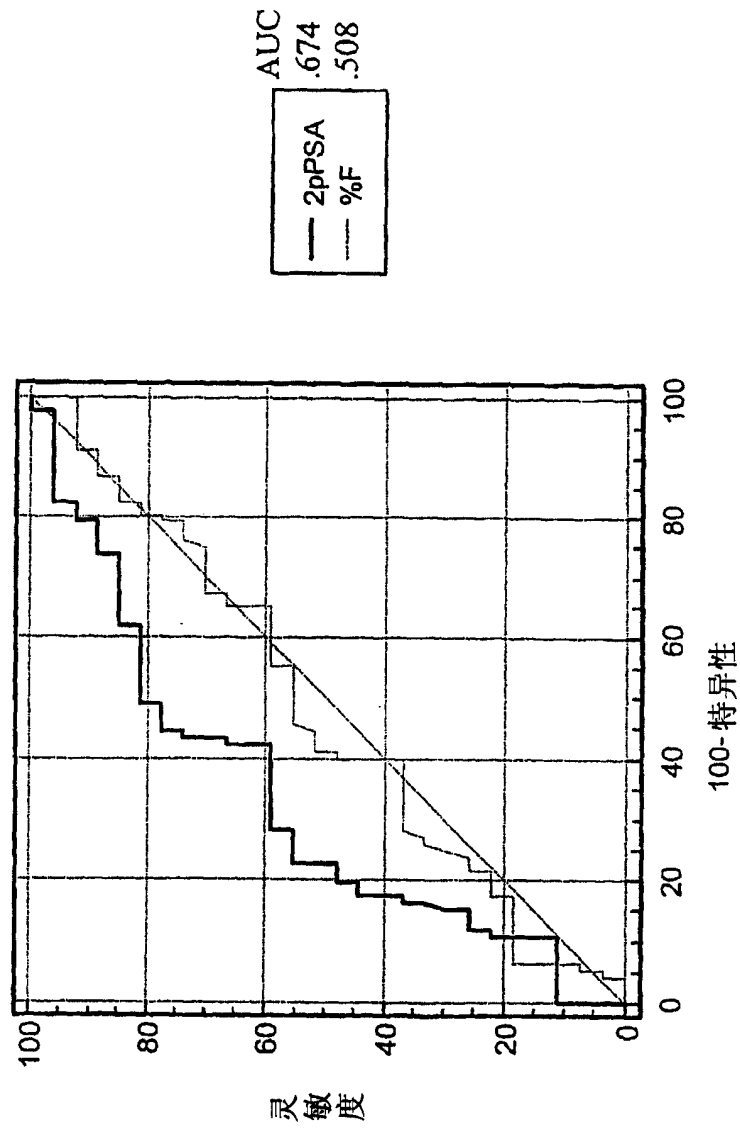


图5

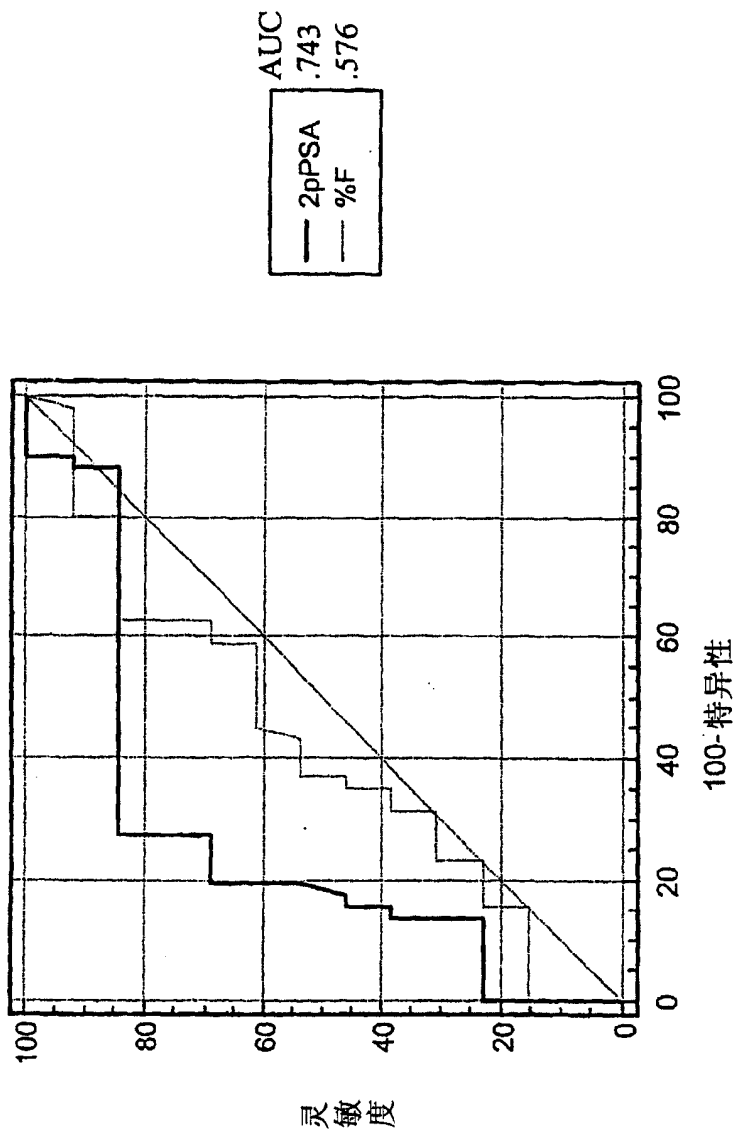


图6

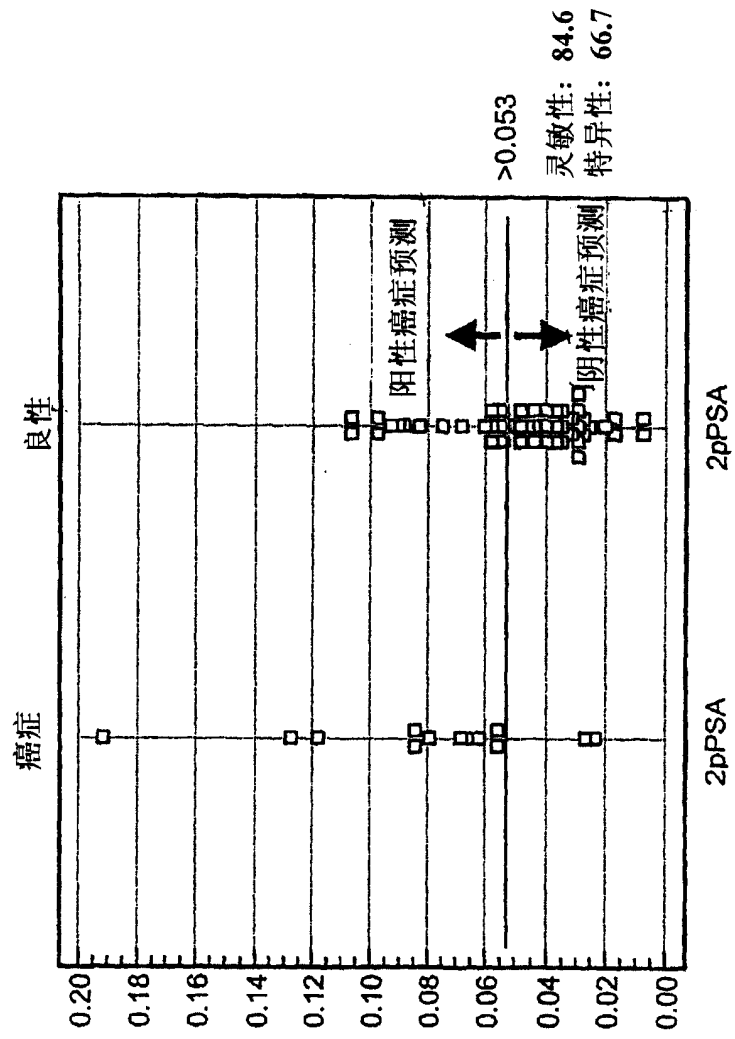


图7

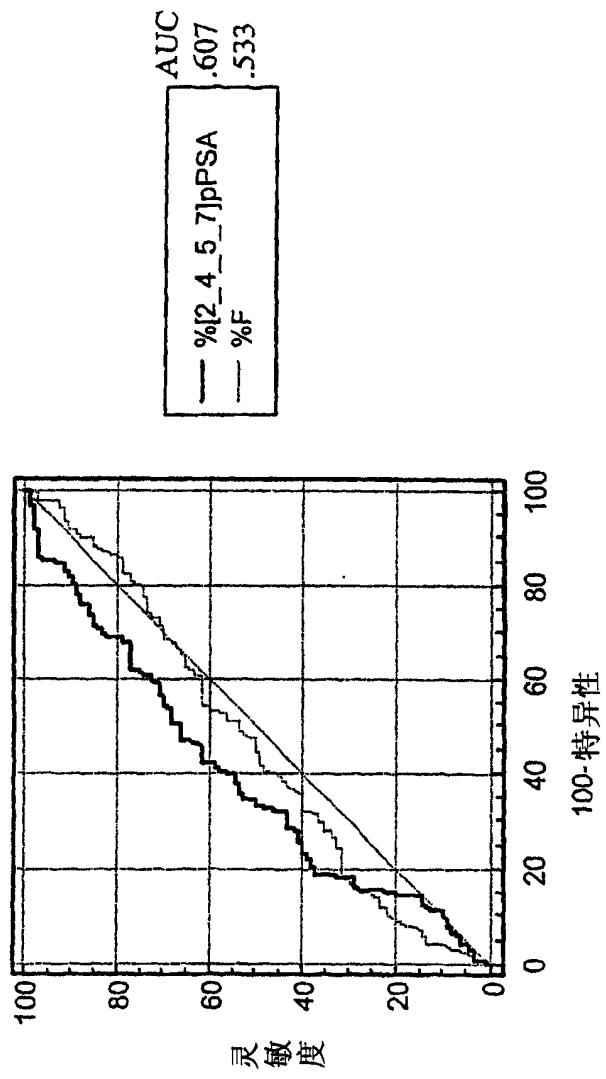


图 8

