

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-509934

(P2004-509934A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/18	CO7K 16/18	4H045
GO1N 33/531	GO1N 33/531	A
GO1N 33/543	GO1N 33/543	515D
GO1N 33/574	GO1N 33/574	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 84 頁)

(21) 出願番号	特願2002-530851 (P2002-530851)	(71) 出願人	500410617
(86) (22) 出願日	平成13年9月26日 (2001.9.26)		アーケティク パートナース オサケユイ
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月24日 (2003.3.24)		チア アクティエボラウグ
(86) 国際出願番号	PCT/FI2001/000834		フィンランド国, エフイーエン-2010
(87) 国際公開番号	W02002/027323		0 トゥルク, イリオピストンカツ 2
(87) 国際公開日	平成14年4月4日 (2002.4.4)		ホー 155
(31) 優先権主張番号	20002127	(74) 代理人	100065226
(32) 優先日	平成12年9月27日 (2000.9.27)		弁理士 朝日奈 宗太
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)	(74) 代理人	100098257
			弁理士 佐木 啓二
		(74) 代理人	100117112
			弁理士 秋山 文男
		(74) 代理人	100117123
			弁理士 田中 弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規抗体、イムノアッセイおよび前立腺癌検出方法

(57) 【要約】

本発明は、抗体であって、ヒトの1本鎖で完全な、すなわち内部で開裂していない、成熟型および/またはチモーゲン型前立腺特異抗原 (SCINT PSA) に高い親和性で結合する抗体に関する。非開裂型PSAでの免疫感作により得られ、そして完全型と内部開裂型との特異な反応性によって選択される該抗体は、ニックの入ったPSA (PSA-N) と結合しない (該PSA-NはSCINT PSAの内部ペプチド結合開裂により2本鎖または多重鎖のPSAとなることにより形成される)。本発明はさらに、イムノアッセイならびに、良性前立腺過形成 (BPH) 患者および/または前立腺癌 (Pca) でない健康な男性被験者からPca患者を、無痛性Pca患者から攻撃性Pca患者を、および/または前立腺外延長患者および/またはリンパ節もしくは骨髄への転移進展を有する患者から臨床的に局在化されたおよび/または場所的に限られたPcaの患者を、該抗体を用いて識別する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトの 1 本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、成熟型および/またはチモーゲン型の前立腺特異抗原 (SCINT PSA) と高い親和性で結合する抗体であって、非開裂型の PSA での免疫感作により得られ、そして完全な形態のものと内部で開裂した形態のものとの特異な反応性によって選択され、ニックの入った PSA (PSA-N) と結合しない抗体 (該 PSA-N は、SCINT PSA の内部でペプチド結合開裂して 2 本鎖または多重鎖の PSA となることにより形成される) であることを特徴とする抗体。

【請求項 2】

PSA-N の開裂が前立腺特異抗原 (PSA) のアミノ酸リジン 145 とリジン 146 とのあいだで生じたものであることを特徴とする請求項 1 記載の抗体。 10

【請求項 3】

ヒトの 1 本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、成熟型および/またはチモーゲン型のヒト前立腺特異抗原 (SCINT PSA)、またはニックの入った PSA 形態 (PSA-N) (該 PSA-N は、SCINT PSA の内部でペプチド結合開裂して 2 本鎖または多重鎖の前立腺特異抗原 (PSA) 形態となることにより形成されており、そして該 SCINT PSA または PSA-N は遊離型および/または複合体型で生じ得る) のサンプル中での量的決定のためのイムノアッセイであって、該 SCINT PSA に高親和性で結合するが、該 PSA-N とは結合しない抗体が使用されることを特徴とするイムノアッセイ。 20

【請求項 4】

PSA-N の開裂が PSA のアミノ酸リジン 145 とリジン 146 とのあいだで生じたものであることを特徴とする請求項 3 記載のイムノアッセイ。

【請求項 5】

PSA-N を決定するイムノアッセイであって、

a) 前記抗体、すなわち第 1 抗体は、サンプル中に存在する SCINT PSA と高親和性で結合し、そして

b) 追加の抗体、すなわち、第 2 抗体 (該第 2 抗体は成熟型および/またはチモーゲン型のヒト前立腺特異抗原 (PSA) と結合し、そして PSA-N とも結合するが、該第 1 抗体にすでに結合している PSA には結合できず、その結果、該第 2 抗体は、第 1 抗体によって遮断されていない PSA 形態、すなわち PSA-N にのみ結合する) ; 30

を特徴とし、

内部で開裂して 2 本鎖または多重鎖の PSA 形態となることにより形成された PSA-N の決定を可能にする請求項 3 記載のイムノアッセイ。

【請求項 6】

PSA-N を決定するイムノアッセイであって、

a) 前記抗体、すなわち第 1 抗体は、サンプル中に存在する SCINT PSA と高親和性で結合し、そして

b) 追加の抗体、すなわち、第 2 抗体 (該第 2 抗体は成熟型および/またはチモーゲン型のヒト前立腺特異抗原 (PSA) と高い親和性で結合し、また PSA-N にも結合するが、該第 1 抗体に既に結合している PSA には結合できず、その結果、該第 2 抗体は、第 1 抗体によって遮断されていない PSA 形態、すなわち PSA-N にのみ結合する) ; 40

を特徴とし、

内部で開裂して 2 本鎖または多重鎖の PSA 形態となることにより形成された PSA-N (PSA-N の開裂は PSA のリジン 145 とリジン 146 のあいだで起こったものである) の決定を可能にする請求項 3 記載のイムノアッセイ。

【請求項 7】

SCINT PSA を決定するイムノアッセイであって、遊離のすなわち複合体を形成していない SCINT PSA の決定を可能にするために、遊離のすなわち複合体を形成していない前立腺特異抗原 (PSA-F) に対して特異的な抗体の使用を追加的に含むサン 50

ドイツイムノアッセイであることを特徴とする請求項 3 または 4 記載のイムノアッセイ。

【請求項 8】

i) 良性前立腺過形成 (BPH) 患者および / または前立腺癌 (PCa) でない健康な男性被験者から前立腺癌 (PCa) 患者を、

ii) 無痛性 PCa 患者から攻撃性 PCa 患者を、および / または

iii) PCa の前立腺外延長患者および / またはリンパ節もしくは骨髄への転移進展を有する患者から臨床的に局在化されおよび / または場所的に限られた PCa の患者を、識別する方法であって、

a) ヒトの 1 本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、遊離のおよび / または複合体を形成している前立腺特異抗原 (SCINT PSA) を決定し、

b) 決定された SCINT PSA の関数であるマーカー値を確立し、そして

c) 確立されたマーカー値を患者の識別に使用する

工程からなることを特徴とする方法。

【請求項 9】

工程 a) が請求項 3 または 4 にしたがって SCINT PSA を決定することからなることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

工程 a) が請求項 7 にしたがって遊離の、すなわち複合体を形成していない SCINT PSA を決定することからなることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

i) 良性前立腺過形成 (BPH) 患者および / または前立腺癌 (PCa) でない健康な男性被験者から PCa 患者を、

ii) 無痛性 PCa 患者から攻撃性 PCa 患者を、および / または

iii) PCa の前立腺外延長患者および / またはリンパ節もしくは骨髄への転移進展を有する患者から臨床的に局在化されおよび / または場所的に限られた PCa の患者を、識別する方法であって、

a) 遊離および / または複合体を形成したニックの入った PSA (PSA-N) を決定し、

b) 決定された PSA-N の関数であるマーカー値を確立し、そして

c) 確立されたマーカー値を患者の識別に使用する

工程からなることを特徴とする方法。

【請求項 12】

工程 a) が請求項 5 または 6 にしたがって PSA-N を決定することからなることを特徴とする請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記マーカー値の関数が他の形態の PSA および / またはヒト腺カリクレイン 2 (hK2) の関数でもあることを特徴とする請求項 8、9、10、11 または 12 記載の方法。

【請求項 14】

前記他の形態の PSA および / または hK2 が、

総 PSA (PSA-T)、

非複合体型、すなわち遊離の PSA (PSA-F)、

ニックの入った PSA (PSA-N) および

ヒト腺カリクレイン 2 (hK2)

からなる群から選択されることを特徴とする請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

マーカー値を確立するための前記関数が、濃度それ自体；濃度の比率、積および組合せ；ロジスティック回帰を用いる様々なパラメーターの組合せ；または、ニューロネットワークのような人工知能を使用する様々なパラメーターの組合せであることを特徴とする請求項 13 または 14 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

[技術分野]

本発明は、1本鎖で、完全な(すなわち、内部で開裂していない)形態の前立腺特異抗原(PSAまたはhK3)に対して特異的である、高い親和性の免疫試薬に関する。本発明はまた、1本鎖で、完全な(内部で開裂していない)形態の遊離で複合体でないPSA(遊離SCINT PSA)の特異的決定のための、前記免疫試薬を使用する分析的に高感度な免疫アッセイによって、あるいは、他の形態の前立腺カリクレイン、PSAまたはhK2の種々の比率を形成するか、またはこれらとたとえばロジスティック回帰および/または人工的なニューロネットワークを用いるなどの他の手段とを組み合わせることにより他の形態の前立腺カリクレイン、PSAまたはhK2を測定する免疫アッセイを、前記免疫アッセイから得られる結果と組み合わせることによって、無症候性の健常な男性または良性の前立腺状態と前立腺癌とを区別することに関する。本発明は、臨床的症状(たとえば、下位尿路症状(lower urinary tract symptoms、LUTS))を呈している男性における良性状態と癌とを区別する際だけでなく、無症候性被験者のスクリーニングの際にも、前立腺癌の検出に使用される。さらに、本発明は、癌の再発を初期段階で検出するための改良された手段を提供したり、疾患の種々段階における治療応答性を監視するための改良された手段を提供するためだけでなく、前立腺癌の段階付けまたは等級付けを改良するためにも用いられる。免疫アッセイ決定のための適当な生物学的標本は、主として、血清、血漿または全血サンプルであるが、本発明は尿や精液サンプルなどの他の生物学的体液にも適用できる。

10

20

【0002】

[発明の背景]

本発明の背景、およびとくに、実施に関する追加的詳細を提供する事例を説明するために本明細書で使用される文献および他の資料は、参考文献により取り込まれる。

【0003】

前立腺特異抗原(PSA; hK3とも呼ばれる)およびヒト腺カリクレイン2(hK2)は、主に前立腺組織で高度に発現される、2つの密接に関連したセリンプロテアーゼである。(ワング(Wang)ら、Invest Urol 1979; 17:159-163、リルジャ(Lilja) J Clin Invest 1985; 76:1899-1903、チャプデライネ(Chapdelaine)ら、FEBE Lett 1988; 236:205-208)。PSA遺伝子は染色体19番の長腕に位置しており、hK2と84%より高いヌクレオチド配列同一性を有する。2つのタンパク質はまた、アミノ酸配列で高い類似性(79%)を示すが、発現率は全く異なっている(hK2 mRNAレベルはPSA mRNAレベルの~10~20%になる)(シェドリッヒ(Schedlich)ら、DNA 1987; 6:429-437)。PSAは261アミノ酸のプロペロ型として合成され、それから17~21アミノ酸シグナルペプチドが開裂して分泌過程で放出される。残留するPSAチモーゲン型は、3~7アミノ酸プロペプチドの開裂により活性化されて、活性型セリンプロテアーゼになる(レブグレン(Loevgren)ら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 1977; 238; 549-555)。最近、組換えhK2はインビトロで不活性な組換えプロPSAを活性な成熟PSAに変換することが示された(レブグレンら、Biochem Biophys Res Commun 1997; 238:549-555、タカヤマら、J Biol Chem 1997; 272:21582-21588、クマール(Kumar)ら、Cancer Res 1997; 57:3111-3114)。したがって、hK2はプロPSAの生理学的な活性化因子であると思われる。酵素的に活性なPSAは高濃度(0.2~5mg/mL)で精液中へ分泌される(クリステンソン(Christensson)ら、Eur J Biochem 1990; 194:755-763、アールグレン(Ahlgren)ら、1995 J Androl 16:491-498)。精液では、PSAは精液ベジクル由来ゲル形成タンパク質セメノゲリン(semenogel

30

40

50

in) IおよびIIを分解し、精液の液化化 (liquifaction) と漸次運動型精子の放出を引き起こす (リルジャ (Lilja), J Clin Invest 1985; 76:1899-1903)。PSAの作用により、セメノゲリンIおよびIIにおけるあるチロシン残基とグルタミン残基とのペプチド結合の、主にC末端の、加水分解が生じる (マルム (Malm) ら、The Prostate 2000; 印刷中)。対照的に、hK2は、PSAの作用により生じたものと比較して、セメノゲリンIおよびIIにおいて明らかに異なった開裂パターンを生じさせるが、ゲルタンパク質に対するhK2作用が生理学的な意味を有するかどうかは現在のところ不明である (レビグレンら、Eur. J. Biochem. 1999; 262:781-789)。

【0004】

酵素的に活性なPSAは、キモトリプシン様プロテアーゼと限られた類似性をもつ独特の基質特異性を現すことが示されている (リルジャら、J Biol Chem 1989; 264:1894-1900、クリステンソンら、Eur J Biochem 1990; 194:755-763、マルムら、The Prostate 2000; 印刷中)。PASの活性な1本鎖型は、₁-アンチキモトリプシン (ACT)、₂-マクログロブリン (AMG)、妊娠ゾーンタンパク質 (pregnancy-zone protein) (PZP)、プロテインC阻害剤 (PCI)、₁-アンチトリプシン (API) などのいくつかの細胞外プロテアーゼ阻害剤と安定な共有結合の複合体を形成する (クリステンソンら、Eur J Biochem 1990; 194:755-763、ステンマン (Stenman) ら、Cancer Res 1991; 51:222-226、エスパーナ (España) ら、Thromb Res 1991; 64:309-320、クリステンソンおよびリルジャ、Eur J Biochem 1994; 220:45-53、ザング (Zhang) ら、Prostate 1997; 33:87-96)。血液中では、PSAの主な免疫検出可能な形態は、ACTとの複合体で共有結合しており、マイナーな分画のみが遊離で、複合体でない形態 (PSA-F) にある (ステンマンら、Cancer Res 1991; 51:222-226、リルジャら、Clin Chem 1991; 37:1618-1625)。

【0005】

LNCaP (前立腺のリンパ節癌) は、確認された転移性前立腺癌患者の針吸引生検から1977年に単離された、ヒトの転移性前立腺癌細胞株である。様々な形態の遊離PSAが、LNCaP細胞の使用済み細胞培養培地で見出されている。コレイ (Corey) らおよびベイセイネン (Vaesisainen) らは、チモーゲン型PSA (プロPSA) および成熟した完全型PSAを産生するLNCaP細胞を報告した。しかし、主にLys₁₄₅とLys₁₄₆との間で内部開裂しているために酵素的に不活性な形態として部分的に存在している、精液由来のPSAとは対照的に、LNCaP細胞では、内部開裂した形態のPSAを産生しないようである (クリステンソンら、Eur J Biochem 1990; 194:755-763)。チモーゲン型のPSAは、前立腺癌患者の血清でも見出されている。チモーゲン型のPSAは、酵素的に不活性であるので、セルピン (serpin) と複合体を形成できず、循環系では遊離の形態のままであろう。また、血清に生じる遊離PSAの性質について他の正反対の報告があり、そこでは、該PSAは内部開裂により生じた開裂した不活性な形態であること、または、該PSAは切りつめられていない (uncleipped) 成熟した、しかし酵素的には不活性なPSA形態であることが述べられている。

【0006】

前立腺癌の発生頻度は、主に寿命の延びやスクリーニングの増加により、ここ十年の間に増大してきている。この事実は、改善された診断方法や新しい治療の必要性を表わしている。血清中PSAの分析は、前立腺癌 (Pca) 患者の診断や監視においてよく確立されている (オエステーリング (Oesterling) J Urol 1991; 145:907-923)。しかしながら、PSA血清濃度の上昇は、他の前立腺疾患、たとえば良性前立腺過形成 (BPH) 患者にも見出されている (ハドソン (Hudson) ら、J

10

20

30

40

50

Urology 1989; 142:1011-1017)。血清中で、いくつかの異なった分子形態のPSAが発見されたことにより、PCaに関する診断や監視の特異性が顕著に改良された。BPH患者は、PCa患者に比べて、血清中における遊離PSAの総PSA（すなわち、PSA-F + PSA-ACT + その他量的にそれほど重要でないPSA-セルピン複合体）に対する比率、または遊離PSAの複合体PSAに対する比率がより高い。これにより、血清中でほどほどに（moderately）上昇したPSAレベルの男性におけるBPHとPCaとを区別するために、遊離PSAの総PSAに対する比（遊離PSA百分率とも呼ばれる）が使用されることになる（ステンマン（Stenman）ら、Cancer Res 1991; 51:222-226、クリステンソンら、J Urology 1993; 150:100-105）。これによりPCaに対する特異性が改良されるが、男性の2つのグループ間にはなお相当な重複があり、したがって、正常な男性または良性の症状を有する男性と癌の男性とを区別するためのさらなる改良を提供するマーカーに対する大きな需要がある。

10

【0007】

精製したPSAによるマウスの免疫感作により、PSAおよびhK2に対するモノクローナル抗体が産生される。多くのモノクローナル抗体は、2つのタンパク質の一次構造がはなはだしく同一性を有するために、PSAおよびhK2と交差反応する。しかしながら、遊離PSA、複合体型PSAおよびhK2を選択的に測定する特異的イムノアッセイが、本発明者らその他により開発された。現在、遊離PSAの各種候補形態を特異的に認識する、利用可能なイムノアッセイはない。

20

【0008】

[目的および概要]

本発明の目的は、ヒトの1本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、成熟型および/またはチモーゲン型の前立腺特異抗原（SCINT PSA）を含有するサンプルを用いて、該抗原の決定を可能にすることである。

【0009】

本発明の他の目的は、SCINT PSAを含有するサンプル中の該抗原の量的決定のためのイムノアッセイを提供するものである。

【0010】

本発明のさらなる目的は、良性前立腺過形成（BPH）患者および/または前立腺癌（PCa）でない健康な男性被験者からPCa患者を、無痛性PCa患者から攻撃性PCa患者を、および/またはPCaの前立腺外延長（extraprostatic extension）患者および/またはリンパ節もしくは骨髄への転移進展（metastatic spread）を有する患者から臨床的に局在化されたおよび/または場所に限られたPCaの患者を、それぞれ識別する方法を提供することである。

30

【0011】

本発明はしたがって、抗体であって、ヒトの1本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、成熟型および/またはチモーゲン型の前立腺特異抗原（SCINT PSA）に高親和性で結合する抗体に関する。該抗体は、非開裂型PSAで免疫感作することにより得られ、そして完全な形態のものと内部開裂した形態のものとの特異な反応性（differential reactivity）により選択されるものであるが、ニックが入ったPSA（PSA-N）には結合しない。ここで該PSA-NはSCINT PSAの内部ペプチド結合開裂により形成され、その結果2本鎖または多重鎖PSAになる。

40

【0012】

本発明はまた、ヒトの1本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、成熟型および/またはチモーゲン型の前立腺特異抗原（SCINT PSA）の、あるいはニックが入ったPSA形態（PSA-N）（該PSA-NがSCINT PSAの内部開裂により形成されており、その結果2本鎖または多重鎖の前立腺特異抗原（PSA）形態であり、このSCINT PSAまたはPSA-Nが遊離および/または複合体型で生じ得る）のサンプル中での量的決定のためのイムノアッセイに関する。本イムノアッセイは、該SCINT PSA

50

N T P S A に高親和性で結合するが、P S A - N には結合しない抗体を使用する。

【0013】

本発明はさらに、

i) 良性前立腺過形成 (B P H) 患者および / または前立腺癌 (P C a) でない健康な男性被験者から P C a 患者を、

i i) 無痛性 P C a の患者から攻撃性 P C a の患者を、および / または、

i i i) P C a の前立腺外延長患者および / またはリンパ節もしくは骨髄への転移進展を有する患者から臨床的に局在化されたおよび / または場所的に限られた P C a の患者を、

識別する方法に関する。

10

【0014】

本発明は、

a) ヒトの 1 本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、遊離型および / または複合体型前立腺特異抗原 (S C I N T P S A) を決定し、

b) 決定された S C I N T P S A の関数であるマーカー値を確立し、ついで

c) 確立されたマーカー値を該患者の識別に使用する

工程からなる。

【0015】

表の簡単な説明

表 1 免疫感作および融合の結果のまとめ。

20

表 2 抗体特性のまとめ。

表 3 5 μ g / L より低い P S A - T 範囲における単一のまたは組み合わせたパラメータを用いる、癌および非癌の識別。統計分析はノンパラメトリックなマン - ウィットニー - U 検定法 (M a n n - W h i t n e y - U t e s t) を用いて実施した。

表 4 10 μ g / L より低い P S A - T 範囲における単一のまたは組み合わせたパラメータを用いる、癌および非癌の識別。統計分析はノンパラメトリックなマン - ウィットニー - U 検定法を用いて実施した。

表 5 P S A - T の濃度に関する制限なしで単一または組み合わせパラメータを用いる、癌および非癌の識別。統計分析はノンパラメトリックなマン - ウィットニー - U 検定法を用いて実施した。

30

【0016】

[発明の詳細な説明]

遊離 P S A の様々な形態の性質に向けた分析手法の設計および開発により、前立腺癌の診断に対する新たな特有の情報が増えられた。抗プロ P S A 抗体はチモーゲン型タンパク質の特異的かつ高感度の測定を可能にする。L N C a P P S A の高い免疫原性の性質にもかかわらず、本発明者らは、P S A - チモーゲンに対して特異的な、または強い優先性を有する抗体、たとえば、P S A - プロペプチド全体またはこのペプチドの一部を特異的に認識する抗体を産生することができなかった。このプロジェクトの目的は、転移性癌細胞株 L N C a P により生産される様々な P S A 形態に対する抗 P S A 抗体を開発することであり、また、酵素的に不活性なく（それゆえに、A C T、A M G または A P I などの様々なセルピンタイプの複合体リガンドと共有結合を形成できない、たとえば、P S A - チモーゲン型（すなわち、プロ P S A ）、酵素的に不活性な 1 本鎖の成熟型、様々な内部開裂型、またはまだ同定されていない理由で血清中に非複合体型で留まっているその他の不活性型）様々な P S A 分画の濃度の特異的検出および定量を提供するイムノアッセイにおいて、これらの抗体を採用することである。

40

【0017】

本発明者らは、本明細書でつぎの点を報告する。

1 . 1 本鎖の、完全な（すなわち、内部で開裂していない）成熟型および / またはチモーゲン型 P S A を特異的かつ高親和性で認識するが、内部で開裂した 2 本鎖または多重鎖型は認識しないモノクローナル抗体の開発および生産。

50

2. 1本鎖の、完全な(すなわち、内部で開裂していない)成熟型および/またはチモーゲン型のものを選択的に認識する抗体を用い、そして遊離の非複合体型PSAを認識した抗体と組み合わせて、1本鎖の、完全な(すなわち、内部で開裂していない)成熟型および/またはチモーゲン型の遊離で非複合体型のPSA(遊離の1本鎖INTact非複合型PSAまたは遊離SCINT-PSA)を測定する、高感度ツーサイトイムノアッセイ(two-site immunoassay)の最適化。このアッセイは血清、血漿、または全血だけでなくその他の生物学的体液にも適用できる。

3. 当初は3 μ g/Lまたはそれより大きい総PSA濃度を示した、50~66歳の自覚症状のない男性から採取した血清または血漿サンプルの研究母集団(N=281)に対する本アッセイの適用。PCの診断は、六分割生検(sextant biopsy)に基づいていた。PCから非癌を分離するための、本アッセイ単独の、または他の形態のカリクレイン(PSAまたはhK2)と組み合わせた実施を検討し、確立されているほかの診断方法と比較した。

4. 1本鎖の、完全な(すなわち、成熟型およびチモーゲン型)、遊離型でも複合体型でも生じるPSAを測定するための高感度ツーサイトイムノアッセイの設計。これは、1本鎖の、完全な(すなわち、内部で開裂していない)成熟型およびチモーゲン型を選択的に認識する抗体を用いて達成される。これらの抗体は、遊離型および複合体型PSAとともに等しい親和性で認識する、独立して結合する抗体と組み合わせられる。このアッセイは、血清、血漿または全血だけでなく、他の生物学的体液にも適用できる。

5. 遊離型PSAであるか複合体型PSAであるかにかかわらず、内部で開裂したPSA形態(すなわち、ニックの入ったPSAまたはPSA-N)を選択的に測定する高感度ツーサイトイムノアッセイの設計。このアッセイ設計は、まず、1本鎖の、完全な(すなわち、内部で開裂していない)成熟型およびチモーゲン型のものを選択的に認識する抗体を、大過剰使用する。これは、第一の遮断抗体により定義されるエピトープと重複するエピトープでPSAと結合する他の抗体による完全な1本鎖PSAの結合を、阻害または遮断するために実施される。そのような重複する抗体(検出または捕捉用に使用される)を添加したのち、第二抗体に対するサンドイッチパートナーとして適した、独立して結合する第三抗体が免疫反応を完結させるために添加される。本アッセイの設計により、遊離型または複合体型のいずれで生じるかにかかわらず、Lys145-Lys146の部位で内部開裂しているPSAのみがもっぱら測定される。

【0018】

本発明はSCINT-PSAに特異的な高親和性免疫試薬の開発に関する。本発明はまた、これらの高親和性抗体を使用することにより、健康な、自覚症状のない男性または良性の前立腺症状の男性と前立腺癌患者とを識別するために用いられる、遊離SCINT-PSAおよびSCINT-PSAの濃度測定に対して高い特異性のある非常に高感度のイムノアッセイの確立に関する。本発明は、自覚症状のない個体をスクリーニングする際にも、また臨床的な徴候(たとえば、下位尿路症状、LUTS)を呈している男性の良性症状と癌とを識別する際にも、PCa検出のために用いることができる。加えて、本発明は、癌の再発を初期段階で検出するための改良された手段を提供したり、疾患の種々段階における治療応答性を監視するための改良された手段を提供するばかりでなく、前立腺癌の段階付けまたは等級付けを改良するためにも用いられる。

【0019】

本発明によれば、1本鎖の、完全な(すなわち、内部で開裂していない)成熟型および/またはチモーゲン型PSAを高親和性で検出する、特異的なモノクローナル抗体を開発できる。このような抗体のより詳細な分析により、該抗体はLys145とLys146のあいだでの内部開裂を呈示する2本鎖型PSAを認識できないことが示されている。この形態は、循環系だけでなく精漿でも共通して生じる1つのニック型(すなわち、内部で開裂した)PSAを構成している。

【0020】

本発明によれば、遊離SCINT-PSAを特異的に検出するイムノアッセイは、血清、

10

20

30

40

50

血漿および全血サンプルばかりでなく、検討下にある個体から採取した尿または精漿などの他の生物学的体液でも実施することができる。さらに、遊離 S C I N T - P S A と P S A - F とのあいだでの計算された相違は、ニックの入った P S A (P S A - N) の別の重要なパラメーターを提供するであろう。

【 0 0 2 1 】

前記したように、S C I N T - P S A 特異的抗体の入手はまた、特許請求の範囲に記載の S C I N T - P S A 特異的抗体の助けにより S C I N T - P S A を完全に遮断することによってニックの入った P S A が特異的に定量され、ついで完全に遊離のまたは完全に複合体型の P S A とはもはや反応しない P S A 抗体の使用によりニックの入った P S A 形態の検出を進められるイムノアッセイを設計する機会（本発明で記載されている）をも提供する。このような設計により、ニックの入った P S A (遊離であるか複合体型であるかにかかわらず) を遊離 P S A 抗体を使用することなく測定することが可能になる。

10

【 0 0 2 2 】

本発明の中心的な知見によれば、効率的な腫瘍マーカーとしての遊離 S C I N T - P S A に特異的なイムノアッセイの使用は、遊離 S C I N T - P S A または計算された P S A - N だけを使用するか、またはこれらのパラメーターのいずれかを、遊離型、複合体型または総 P S A および / または h K 2 などの様々な形態のもの（たとえば、総 P S A または総 h K 2、複合体型 P S A または複合体型 h K 2、P S A と複合体を形成している特異的プロテアーゼ阻害剤または h K 2 と複合体を形成している特異的プロテアーゼ阻害剤、遊離 P S A の総濃度（すなわち、1本鎖の完全な成熟型およびチモーゲン型 + 様々な内部で開裂した2本鎖または多重鎖型）または遊離 h K 2 の総濃度、および / または様々な内部で開裂した2本鎖または多重鎖型の遊離 P S A または様々な内部で開裂した2本鎖または多重鎖型の遊離 h K 2）と組み合わせて使用することにより実現される。

20

【 0 0 2 3 】

本発明のさらなる側面によれば、遊離 S C I N T - P S A、S C I N T - P S A または P S A - N と他の測定される P S A 形態との組み合わせは、つぎのような測定されたパラメーターの様々な比率またはアルゴリズムをつくることによって実施される。

【 0 0 2 4 】

遊離 S C I N T - P S A または P S A - N の総遊離 P S A に対する比率
 遊離 S C I N T - P S A または P S A - N の総 P S A に対する比率
 遊離 P S A の総濃度で割って得られる遊離 S C I N T - P S A の比に遊離 P S A の総濃度
 で割って得られる総 P S A の比を乗じたもの
 遊離 P S A の総濃度で割って得られる遊離 S C I N T - P S A の比に総 P S A を乗じたもの

30

あるいは、

様々な測定されるパラメーターのロジスティック回帰分析のレシーバーオペレイティング
 チャラクタースティクス (receiver operating characteristics) (R O C) 分析への使用、
 人工ニューロネットワークなどの様々な人工知能アプローチの使用

【 0 0 2 5 】

本発明のさらなる側面によれば、総 P S A または複合体型 P S A の値がほどほどに上昇していること、すなわち総 P S A または複合体型 P S A のみでは癌と非癌状態の診断的識別がほとんど信頼できず、検出された癌が臓器限定的で治療的処置にふさわしいと思われるような P S A 濃度であること、によって主に特徴付けられる患者サンプルのサブセットに、本発明は優先的に適用される。このような領域は、しばしば、3または4から 20 μ g / L の総 P S A 範囲として定義されるが、それとは異なって、下限（たとえば、2.0または 2.5 μ g / L といったさらに低い値であり得る）または上限（さらに高い、またはさらに低い、たとえば、8.0、10、12または 15 μ g / L といった値であり得る）の両者に関して定義することもできる。

40

【 0 0 2 6 】

50

本発明のさらに別の側面によれば、SCINT-PSAまたはPSA-Nの濃度は、それぞれ単独で、または、たとえば、様々な比率、ロジスティック回帰分析、あるいは人工知能アプローチなどの使用による他の測定されるパラメーターとの組み合わせで、確認済み前立腺癌患者のサブグループを確認するために、より詳細には、より悪性に進展する可能性のある前立腺癌から、無痛性のままであるかまたはゆっくりとしか進展しないと思われる前立腺癌を確認するために、用いることができる。本発明の他の臨床的適用は、前立腺外進展した疾患段階、局所的に進行したまたは転移性の疾患と、病理学的に臓器限定的な疾患とを識別することに関する。本発明のさらに別の臨床的適用は、治療処置行為後の早期癌再発の検出、または疾患の様々な段階における治療応答性の監視における改良された手段を提供することに関する。

10

【0027】

異なった免疫原構造が、異なった遊離型PSAに対するモノクローナル抗体を開発するために用いられた；(i) LNCaP細胞からアフィニティー精製され、その半分のタンパク質は成熟した1本鎖型で回収され、残り半分は-5または-7チモーゲン型で回収されたPSA。第二の免疫原構造は、PSAのプロ配列、ならびにKLBおよびBSAにコンジュゲートする最初の7個のアミノ末端アミノ酸を含む14アミノ酸合成ペプチド(APLLISRIVGGWEC)からなっていた。様々なスクリーニング法が抗体を同定するのに用いられ、その抗体は、精漿由来のPSAとは異なったシグナル強度を有する、LNCaP細胞から単離されるPSAを検出する。

【0028】

線状ペプチド配列に結合する抗体を用いる3-Dモデル構造におけるPSAエピトープ群の特徴付けにより、新しい5H6 Mabは、以前に特徴付けられたMab E73のエピトープに非常に近いペプチド配列aa225~237にマップされることが明らかになった。Mab 4D4および5C3はペプチド配列136~144に結合した。これは、以前認識されていなかった、PSA上の抗原性エピトープであり、このエピトープはLys145とLys146のあいだの内部開裂部位にも、またMab 4D4およびMab 5C3エピトープの近辺にある触媒部位にも近接している。Mab 4D4、5C3および5H6は、遊離PSAおよびPSAを同様の親和性をもって認識したが、hK2を認識しなかった。

20

【0029】

Mab 4D4および5C3は、プロPSAおよび完全型PSAに対して、それぞれ 2.5×10^9 1/Mおよび 2.7×10^9 1/Mの親和定数を有していた。これらモノクローナル抗体は、プロPSAの認識よりも精漿PSAの認識の方が著しく低く、Lys145-Lys146で内部開裂したPSAを主として(95%)含む分画と結合したMab 4D4、5C3の量は、完全型PSAのみを含むプールに結合した抗体量に比べて、わずか5%に過ぎなかった。

30

【0030】

以下の実験の部により、本発明をより詳細に説明する。

【0031】

実験の部

方法および材料

試薬および器具

フロイントの完全および不完全アジュバンドはシグマケミカル社(Sigma Chemical Co.)(セントルイス、MO)から得た。細胞培養96ウェルプレートはヌンク(Nunc)(デンマーク)から、ローラーボトルはコーニング(Corning)(NY)から、またセリンバイオリアクター(Celline bioreactors)はインテグラ(Integra)(ドイツ)から得た。グルタマックス-1(Glutamax-1)を備えたオプチメモ1(Optimem 1)およびHATサプリメント(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)はライフ テクノロジーズ(Life Technologies)(ギブコ(Gibco)BRL, スコットランド)の製

40

50

品である。熱不活化ウシ胎仔血清 (FBS) はヒクロン (Hyclone) (ローガン (Logan)、UT) から得た。Sp2/0 マウスミエローマ細胞はATCC (ロックビル、MD) から得た。合成 -7~+7 プロPSA ペプチドはハンス リルジャ博士 (Lund 大学、マルモ (Malmö)、スウェーデン) から得た。1234 デルフィア プレート (Delfia Plate) 蛍光光度計、デルフィア Eu- 標識キット、ウサギ抗マウス IgG、抗PSA Mab H117、抗PSA Mab 2E9 またはストレプトアビジンをコートしたマイクロタイトレーションプレート、デルフィア アッセイ緩衝液、洗浄液および増強液は、パーキンエルマー ライフ サイエンス (PerkinElmer Life Sciences) (ツルク、フィンランド) からのものである。

10
 ハイトラップ プロテイン G (HiTrap Protein G) アフィニティーカラム、スペロース (Superose) 12HR 10/30 FPLC ゲルろ過用カラム、PBE94 ポリバッファー (Polybuffer) 交換器および等電点電気泳動用ポリバッファー (Polybuffer) 96 はアマシャム ファルマシア バイオテック (Amersham Pharmacia Biotech) AB (ウブサラ (Uppsala)、スウェーデン) から得た。アミノ末端配列分析は、オンライン アプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems) モデル 120A フェニルチオヒダントイン アミノ酸分析器 (パーキンエルマー、ノーウォーク (Norwalk)、CT) に接続したアプライド バイオシステムズ モデル 477A パルス液体シーケンサーで実施した。モノクローナル抗体 5A10、2E9、2H11、3C1、4H5 および 2C1 は以前に特徴付けされている。Mab 66 および 10 は O. ニルソン (Nilsson) 博士 (CanAg Diagnostics) (カナダ)、ゲテボルグ (Goeteborg)、スウェーデン) から贈呈された。Mab H117、H179、H164 および H50 はアボット (アボットラボラトリーズ (Abbott Laboratories)、アボットパーク、IL) から得た。抗体 E73 はエリザベス パウス (Elizabeth Paus) 博士 (ラジウム病院 (The Radium Hospital)、オスロ、ノルウェー) から贈呈された。

【0032】

免疫原

遊離型 PSA に対する抗体を開発するために、3種類の免疫原構造を使用した。LNCaP PSA は、使用済み細胞培養培地からアフィニティークロマトグラフィーにより以前に精製されていた。タンパク質の約半分は 1 本鎖の成熟 PSA で、半分は -5 または -7 チモゲン型であった。第二の免疫原構造は、PSA のプロ配列とそのアミノ末端配列の最初の 7 つのアミノ酸とを含む 14 アミノ酸合成ペプチド (APLILSRIVGGWEC) からなっていた。このペプチドは、イムジェクト イムノーゲン EDC コンジュゲーション キット (Imject Immunogen EDC Conjugation Kit) (ピアース (Pierce)、IL) を用いて、KLH および BSA とカップリングさせた。使用される第三の免疫原は、プロ配列から 2 つのアミノ酸が変更されている成熟型の hK2 (fxahK2) であった。プロ配列における点突然変異により、hK2 はプロ配列の自己活性化および開裂ができなくなる。第二および第三の免疫原構造は、抗プロPSA 抗体を産生させるために、免疫感作で使用した。該ペプチドおよび hK2 に関する免疫感作および融合は、LNCaP PSA のためにつぎに記載されているのと本質的に同様に実施した。

30
 40

【0033】

免疫感作

表 1 は、行った免疫感作をまとめてある。フロイント完全アジュバンド (シグマ) で乳化した種々の量の免疫原を用いる腹腔内注射により、Balb/c マウスを免疫感作した。ブースター量を 3~4 週間間隔で与えた。全免疫感作期間は 2~10 ヶ月にわたる。最終ブースターはマウスを死亡させる 3 日前に投与した。以前に記載されたように、脾臓のリンパ系細胞をミエローマ細胞 Sp2/0 と 1:1 の比で融合させた。融合細胞は、20% のウシ胎仔血清および HAT サプリメントを含む オプチメンの細胞培養 96 ウェルプレー

50

トにおいて回収した。

【0034】

【表1】

融合	免疫原	免疫原の量 (µg)	ブースターの数	全免疫感作期間 (月)	使用したスクリーニング方法	PSA陽性細胞株 (%)	さらに特徴づけた mAb
1	LNCaPPSA	30-60	3	3	1,4	7	5F12
2	LNCaPPSA	30-60	3	4	1,4	10	7C4,5F7
3	LNCaPPSA	60-100	3	4	1,4	10	
4	LNCaPPSA	60-100	4	7	2,4	1	
5	LNCaPPSA	60-100	4	7	2,4	16	4D4,5C3,5H6,7G1
6	LNCaPPSA	30-60	4	8	1,2,3,4	18	
7	LNCaPPSA	60-100	4	8	1,2,3,4	19	
8	LNCaPPSA	30-60	4	10	4		
9-16	ペプチド	10-130	2-4	2-4	3,4	0-1	
17-20	fXahK2	35-60	3	3	4	0-1	

表1. 免疫感作および融合からの結果のまとめ

【0035】

スクリーニング法

いくつかの異なるスクリーニング法を使用した。すべての方法に共通な点は、精漿から得られるPSAとは幾分異なって、LNCaP細胞により製造されるPSAを検出する抗体を認識するために設計されたということである。4つのスクリーニング法が図1a~1dに示されている。すべての方法において、ハイブリドーマ上清は、ウサギ抗マウス抗体でコートしたマイクロタイトレーションウェル(方法1、2および4)中、またはストレプトアビジンおよびビオチン化合物ペプチドでコートしたマイクロタイトレーションウェル(方法3)中、+4で一晩インキュベーションした。インキュベーションののち、プレートを4回洗浄した。結合した抗体の検出は図1a~1dに記載されているように実施した。シグナル発生のため、デルフィア増強液を200µl/ウェルで使用した。シグナルは1234デルフィア蛍光光度計で測定した。

【0036】

抗体の特徴付け

精製タンパク質。ベイセネン(Vaesisaenen)らにより記載されているように、LNCaP PSAを製造し、精製した。異なるpI値に基づいて分離する等電点電気泳動を用いて、LNCaPプロPSAおよび成熟型PSAを分離した。pH勾配は8.5~6であり、使用した緩衝液は0.025Mエタノールアミン-CH₃COOH pH8.5およびポリバッファー(Polybuffer) pH6(希釈、1:10)であった。等電点電気泳動はC10/40カラムに充填した30mlのポリバッファー交換ゲルおよびエクタエクスプローラー(AEKTAexplorer)100システム(アマシャムファルマシアバイオテクAB、ウプサラ、スウェーデン)を用いて実施した。流速は0.3ml/分であり、3.6ml分画を集めた。分画を集める前に、1/10量の2Mトリス-HCl pH8を各分画管に加えた。各分画について、プロステイタス(Prostat) PSA遊離/総(free/total)キット(パーキンエルマーライフサイエンス、ツルク、フィンランド)を用いて、PSA濃度を測定した。1つのピーク領域由来のPSA含有分画をプールし、アミノ末端配列決定に付した。

【0037】

精製精漿PSAの別プールは、U-Hステンマン(Stenman)博士の好意により寄贈されたものである。プールA、B、C、DおよびEは、ザングらにより記載されてい

10

20

30

40

50

るように、異なる量の内部開裂型 P S A を含有する。プール A および B は完全型 P S A のみを含有する。プール C および D は、完全型 P S A ならびに A r g 8 5 - P h e 8 6 および L y s 1 4 5 - L y s 1 4 6 で内部開裂した P S A を含有する。プール D は L y s 1 8 2 - L y s 1 8 3 で内部開裂した少量の P S A をも含有していた。プール E は、ほとんどが L y s 1 4 5 - L y s 1 4 6 で内部開裂した形態を主に含有していた。S D S - P A G E での染色強度から、プール C、D および E における完全型 P S A の量が、それぞれ、およそ 20%、10% および 5% 未満であることが示唆された。

【0038】

H K 2 をバキュロウィルス発現系で製造し、レブグレン (L o e v g r e n) らにより記載されているようにして精製した。インビトロでの P S A - A C T の調製および精製は、以前に記載されている。

10

【0039】

エピトープマッピング

P S A 分子上の結合部位を決定するために、以前に特徴付けられた M A b を、検討対象の M A b との考えられる全ての組み合わせで、サンドイッチ法で使用した。

【0040】

ペプチドマッピング

連続するエピトープを認識する抗体の特異的結合部位を決定するために、全 P S A 配列と重複している合成 15 マーペプチドを使用した。ユーロピウム標識化 M A b を、ピイロネン (P i r o n e n) らにより記載されているように、ストレプトアビジンプレートに結合させたビオチン化ペプチドと一緒にインキュベーションした。

20

【0041】

様々な P S A 形態に対する特異性と結合

適当なパートナー抗体を用い、P S A、h K 2 および P S A - A C T 複合体を用いて、新規 M A b の特異性を決定した。加えて、ザングラ記載の精漿から精製した P S A のプール A、B、C、D および E を用いて、かつベイセイネンら記載の L N C a P P S A から精製したプロ P S A を用いて、様々な P S A 形態との結合を決定した。

【0042】

M A b の親和性

2 E 9 または H 1 1 7 を捕捉抗体として用い、かつ精漿から精製した P S A または精製 h K 2 を用い、以前に記載されたようにして、E u 標識 M A b の親和定数を決定した。親和性はスキャッチャード法を用いて計算した。

30

【0043】

イムノアッセイ

ツーサイトイムノアッセイプロトコルは、遊離型 S C I N T - P S A の特異的決定のために開発されたものである。この設計は、(i) P S A におけるペプチド配列 a a 1 3 6 ~ 1 4 4 を含有するエピトープにマッピングされた M a b 5 C 3 と、(i i) ペプチド配列 a a 8 4 ~ 9 1 を含有するエピトープにマッピングされ、以前に特徴付けられた遊離の特異的 M a b (5 A 1 0) との組み合わせで用いた。M a b 5 C 3 のビオチン化調製物を、200 μ L アッセイバッファー (A s s a y B u f f e r) 中 M a b 200 n g を用い、室温で 60 分間インキュベーションすることより、ストレプトアビジンでコートしたプレートに固定した。結合しなかったビオチン化 M a b を除去する洗浄工程につづき、1 ウェルあたり、標準品またはサンプル 50 μ L を添加し、ついでデルフィア緩衝液 100 μ L を添加し、連続振とう下、室温で 60 分間インキュベーションした。2 回洗浄したのち、1 ウェルあたり、100 n g の E u 標識 M a b 5 A 1 0 を含有するデルフィアアッセイバッファー 100 μ L を添加し、連続振とう下、室温で 60 分間インキュベーションした。最終洗浄 (6 x) につづいて、1 ウェルあたり、200 μ L のデルフィア増強溶液 (D e l f i a E n h a n c e m e n t s o l u t i o n) を添加した。5 分間振とうしたのち、シグナルを 1 2 3 2 デルフィアプレート蛍光光度計で測定した。未知サンプルの濃度は、組換えバキュロウィルス産生プロ P S A の標準シリーズ (0 . 0 5 ~ 2 0 0

40

50

$\mu\text{g/L}$ のPSA)から計算した。

【0044】

その他に使用したイムノアッセイは、デルフィア プロステイタス (Delphia Prostatatus) F/T PSA (パーキン - エルマー、ワラック (Wallac)、ツルク、フィンランド) および hK2 用試験アッセイ (ベッカー (Becker) ら、Clin Chem 2000; 46: 198 - 206) であった。

【0045】

臨床試験母集団

研究母集団は、スウェーデン、ゴーゼンブルグ (Gothenburg) 地域で母集団ベースの前立腺癌スクリーニング研究に参加し、当初は $3\mu\text{g/L}$ より高い総 PSA 濃度を示した、51 ~ 66 歳の 291 人の男性からなっていた (ベッカー、Urology 2000; 55: 694 - 699)。DRE、TRUS および TRUS 誘導六分割生検 (TRUS guided sextant biopsy) を実施する前に、追加的な血清および EDTA 血漿サンプルを採取した。静脈穿刺後 3 時間以内に実施される (血清) 凝固と遠心分離ののち、サンプルを 70°C で凍結した。本研究のために、本発明者らは、イムノアッセイ実施直前に解凍した EDTA 血漿サンプルを用いた。六分割生検により、被験者 291 人中 79 人の男性に前立腺癌が認められた。

【0046】

統計分析

記述統計は中間、高いおよび低い 4 分位 (quartiles) (25 および 75 パーセントイル) として与えられた。PSA - T、PSA - F、遊離 SCINT - PSA、PSA - N、hK2、hK2 / PSA - F、PSA - F / PSA - T、遊離 SCINT - PSA / PSA - F、遊離 SCINT - PSA / PSA - T、PSA - N / PSA - T、(遊離 SCINT - PSA / PSA - F) \times PSA - T、(遊離 SCINT - PSA / PSA - F) \times PSA - T \times hK2、(遊離 SCINT - PSA / PSA - F) / (PSA - F / PSA - T) において統計的有意差 ($p < 0.05$) があるか否かを試験するために、2 つの患者群 (癌および非癌) のあいだで、マン - ウィットニーノンパラメトリック検定法を実施した。この解析は、PSA - T 範囲を基礎にして選択された様々なサブグループに対してだけでなく、全患者試料に対しても実施した。

【0047】

結果

免疫感作およびスクリーニング

本発明者らの目的は、癌に特異的に存在する PSA の様々な分子形態を認識する新規抗体を見出すことであった。非常に高い陽性のシグナルを与え、または精液由来の PSA に比べて LNCaP 由来の検討されるべき PSA 形態を特異的に認識する抗体を製造し、さらに特徴付けをした。表 1 では、実施された免疫感作、PSA 陽性の細胞株の数および各融合からさらに特徴付けられた MA b がまとめられている。最終的に特徴付けのなされた MA b はすべて、LNCaP PSA を免疫原として使用した融合に由来するものであった。ペプチド融合由来の細胞株のうちあるものは、合成ペプチドに対して陽性であったが、さらなるテストにより、抗体は PSA 分子全体を認識していないことが示された。また、抗 PSA 陽性細胞株のあるものは fXa hK2 融合から取得されが、これら抗体は LNCaP PSA と精漿由来の PSA とを区別できなかったため、それ以上特徴付けを行わなかった。

【0048】

抗体特性

エピトープマッピング。新規 MA b の PSA 分子上の結合部位を明らかにするため、様々な抗体組み合わせで該 MA b を試験した。その結果に基づき、2 - D エピトープマップを構築した (図 2)。新規抗 PSA MA b の結合部位を、以前特徴付けされた MA b に関連して提示する。

【0049】

10

20

30

40

50

83個の抗PSAモノクローナル抗体の様々な結合領域は、1～6の結合領域が2-Dおよび3-DモデルにおいてマッピングされているISOBM研究でパウス(Paus)らにより記載されている。新規抗PSA抗体の結合領域を、以前特徴付けられたMAbの結合部位と比較した。

【0050】

5F12は、ISOBM研究で以前特徴付けられたMAb 5A10(#25)と同じエピトープに結合する群Iの遊離PSA特異的抗体にマッピングされた。興味あることであるが、5F12はまた、群3aの抗体に属するMAb PSA10(#72)結合を遮断した。7G1は、群3aの抗体において、H50(#57)とPSA10に近いエピトープに結合した。7G1はまた、群5bの抗体に属する抗体2H11(#41)によって幾分阻害された。また、5F7および5H6は、MAb H50およびPSA10結合部位と重複している領域に結合した。さらに、7C4、4D4および5C3は、MAb H164、H50および2H11の結合部位近くの領域に結合し、該領域は群5bの抗体近くに位置する。

10

【0051】

ペプチドマッピング。テストした7つのMAbのうち3つが、全PSA配列と重複する線状のビオチン化15マーペプチドに結合した(表1)。

【0052】

4D4および5C3抗体は共に、15マーペプチド配列130ASGWGSIEPEEF LTP144および136SIEPEEF LTPKKLQC149に結合した。これら2つの重複する15マーペプチドに共通のアミノ酸配列は136SIEPEEF LTP144配列である。共通の内部PSA開裂部位は、PSAを不活性にするアミノ酸Lys145とLys146のあいだに位置している。

20

【0053】

5H6は、PSAのC末端ペプチド(225YRKWKDITVANP237)に結合した。別の抗体(E73)はPSA分子のC末端部分近くで結合するという特徴があった(データは示されていない)。MAb E73は、5H6により認識されるものと部分的に重複する15マーペプチド(215RPSLYTKVVHYRKWI229)に結合した。

【0054】

ペプチド結合研究から得た結果をパイロネンらにより提示されたデータと組み合わせて、PSA部分における独立した7つの抗原ドメインを示す3-Dエピトープマップを作成した(図3)。

30

【0055】

抗体の特異性。5F12は遊離PSA特異的抗体であった。7C4、4D4、5C3、5F7および5H6は、遊離PSAおよびPSAS-ACT複合体を同様の親和性で認識したが、hK2は認識しなかった。7G1は、遊離PSA、ACTと複合体を形成したPSAおよびhK2を同様の親和性で認識した。

【0056】

様々なPSA形態との結合。新規MAbの異なるPSA形態との結合は、以前に特徴付けられた異なる捕捉抗体および新規MAbをトレーサーとするサンドイッチアッセイ法を用いて試験した。結合は、成熟した完全型PSAについて検討し、成熟した内部開裂型PSAおよびプロPSAと比較した。様々なPSAアイソフォームとの結合での有意差は、MAb 4D4および5C3においてのみ見られた。

40

【0057】

クローン4D4および5C3は、スクリーニング法4を用いて、プロPSAよりも低いシグナル強度で、精漿PSAを認識した。これらの抗体は、様々な量の内部開裂したPSA、すなわち2本鎖または多重鎖型、を含有した精漿から分離したPSAの各種プールを用いてさらに試験した。完全な、1本鎖PSAのみを含有したプールAおよびBに結合した抗体量(100%とする)に比べて、Lys145とLys146のあいだで内部開裂し

50

ているPSAを主として(95%)含有するプールEに結合した抗体(4D4、5C3)はわずか5%であった。したがって、これらの抗体は、免疫原として使用されるLNCaP PSAにおけるような、Lys145-Lys146で内部開裂していないPSA形態のみを認識し得る。図4a~4cは、様々な抗体と精漿PSAのプールA~Eとの反応性を示している。抗体は、H117でコートしたプレート、または捕捉剤(capture)としてビオチン化5A10でコートしたストレプトアビジンプレートを用いたサンドイッチ法で試験した。抗体は、ISOBM研究で示されている様々な結合領域にしたがって設計される。

【0058】

Mabの親和性。Mabの親和定数を表2に列挙する。特徴付けられたMabはすべて、精漿PSAに対して高い親和性を示した($K_a > 1 \times 10^9$ 1/M)。7G1はPSAおよびhK2に対して非常に高い親和性を示した($K_a = 2 \times 10^{10}$ 1/M)。4D4および5C3は、プロPSAおよび完全型PSAに対して、それぞれ 2.5×10^9 1/Mおよび 2.7×10^9 1/Mの親和定数を有していた。加えて、4D4および5C3は、内部開裂型を含有する精漿PSAのプール(プールC、DおよびE)に対する親和性について試験された。これら2つのMabの親和定数は、内部開裂型PSAの量が上昇するにつれて減少した。4D4および5C3のプールE PSAに対する親和性は、親和性が非常に低いために(データは示されていない)、スキッチャード法を用いて決定することができなかった。

【0059】

【表2】

抗体	特異性*	親和性 Mab-Eu 1/M	ペプチド配列 との結合
5F12	PSA-F	n.d	陰性
5F7	PSA-T	6.4×10^9	陰性
7C4	PSA-T	1.8×10^9	陰性
4D4	PSA-T	2.5×10^9	135-144
5C3	PSA-T	2.7×10^9	135-144
5H6	PSA-T	4.4×10^9	225-237
7G1	PSA-T+hK2	2×10^9	陰性

* PSA-F=遊離PSA, PSA-T=遊離PSA および PSA-ACT 複合体

表2. 抗体特性のまとめ

【0060】

SCINT-PSAイムノアッセイ実施

典型的な標準曲線が図5に示されている。分析的検出限界(バックグラウンド+2SD)は $0.05 \mu\text{g/L}$ 以下であり、標準曲線は、使用した最高標準点($50 \mu\text{g/L}$)に至るまで直線的に上昇した。分析内および分析間での変動は、 $0.2 \sim 50 \mu\text{g/L}$ の濃度範囲にわたって、それぞれ6および8パーセント未満であった。

【0061】

研究母集団血清における遊離SCINT-PSA、PSA-F、PSA-TおよびhK2の測定

遊離SCINT-PSA、PSA-F、PSA-TおよびhK2の様々な測定パラメータの中間濃度(ならびに25および75パーセントイル)、ならびにそれらを組合せて様々な割合またはアルゴリズムとしたものが、全検討母集団、PSA-Tが10以下の患者およびPSAが5以下の患者について表1~3に示されている。癌と非癌とのあいだの統計解析は、マン-ホイットニーのノンパラメトリックU-検定法を用いて実施した。

【 0 0 6 2 】

【 表 3 】

パラメーター	非癌 中間 (25-,75-%iles)	癌 中間 (25-,75-%iles)	マン-ウィットニ- p-値
PSA-T	4.01 (3.01,5.71)	5.25 (3.79,11.8)	<0.0001
PSA-F	0.88 (0.57, 1.37)	0.94 (0.58,1.65)	0.435
遊離 SCINT-PSA	0.43 (0.29, 0.59)	0.48 (0.35,0.85)	0.0063
PSA-N (PSA-F-遊離 SCINT-PSA)	0.41 (0.23, 0.81)	0.34 (0.16, 0.61)	0.0271
hK2	0.044 (0.031,0.066)	0.060 (0.033,0.101)	0.0018
hK2/PSA-F	0.052 (0.032,0.077)	0.069 (0.043,0.115)	0.0027
PSA-F/PSA-T	0.20 (0.16,0.28)	0.15 (0.10,0.18)	<0.0001
遊離 SCINT-PSA/PSA-F	0.47 (0.39,0.59)	0.59 (0.48,0.78)	<0.0001
遊離 SCINT-PSA/PSA-T	0.10 (0.076,0.134)	0.084 (0.065,0.115)	0.0055
PSA-N /PSA-T	0.104 (0.067, 0.164)	0.055 (0.024, 0.095)	<0.0001
(遊離 SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T	2.03 (1.33,2.89)	2.80 (2.08,7.06)	<0.0001
(遊離 SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T x hK2	0.094 (0.055,0.167)	0.202 (0.115,0.457)	<0.0001
(遊離 SCINT-PSA/PSA-F)/(PSA-F/PSA-T)	2.31 (1.43,3.51)	4.23 (2.58,6.29)	<0.0001

表3. PSA-T濃度に関して制限なしで、単独または組合せパラメーターを用いた癌 (N=197) と非癌 (N=79) との識別。統計分析はノンパラメトリックなマン-ウィットニ-U検定を用いて実施した。統計的有意性 ($p < 0.05$) は太文字で示されており、ボーダーラインの統計的有意性 ($p = 0.05 \sim 0.1$) はイタリック体で示されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

【 表 4 】

パラメーター	非癌 中間 (25-,75-%iles)	癌 中間 (25-,75-%iles)	マン-ウィットニ- p-値
PSA-T	3.92 (2.98,5.47)	4.07 (3.48,5.28)	0.35
PSA-F	0.83 (0.56, 1.29)	0.66 (0.48,1.02)	0.058
遊離 SCINT-PSA	0.42 (0.28, 0.57)	0.38 (0.28,0.55)	0.023
PSA-N (PSA-F-遊離 SCINT-PSA)	0.39 (0.23, 0.73)	0.27 (0.14,0.49)	0.0043
hK2	0.043 (0.030,0.064)	0.048 (0.029,0.065)	0.448
hK2/PSA-F	0.054 (0.034,0.077)	0.067 (0.042,0.101)	0.024
PSA-F/PSA-T	0.21 (0.16,0.28)	0.16 (0.14,0.19)	0.0002
遊離 SCINT-PSA/PSA-F	0.47 (0.39,0.59)	0.58 (0.45,0.76)	0.0018
遊離 SCINT-PSA/PSA-T	0.10 (0.079,0.136)	0.096 (0.071,0.118)	0.253
PSA-N/PSA-T	0.103 (0.068, 0.167)	0.071 (0.039, 0.107)	0.0002
(遊離 SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T	1.94 (1.29, 2.70)	2.36 (1.90, 2.96)	0.0035
(遊離 SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T x hK2	0.092 (0.087, 0.158)	0.158 (0.087, 0.266)	0.0004
(遊離 SCINT-PSA/PSA-F) / (PSA-F/PSA-T)	2.32 (1.42, 3.50)	3.42 (2.22, 5.58)	< 0.0001

表4. 10 μ g/L以下のPSA-T範囲において、単独または組合せパラメーターを用いた癌 (N=54) と非癌 (N=187) との識別。統計分析はノンパラメトリックなマン-ウィットニ-U検定を用いて実施した。統計的有意性 ($p < 0.05$) は太文字で示されており、ボーダーラインの統計的有意性 ($p = 0.05 \sim 0.1$) はイタリック体で示されている。

【 0 0 6 4 】

【 表 5 】

パラメーター	非癌 中間 (25-,75-%iles)	癌 中間 (25-,75-%iles)	マン-ウィットニ- p-値
PSA-T	3.38 (2.58,3.99)	3.72 (3.18,4.12)	0.057
PSA-F	0.65 (0.48,0.92)	0.58 (0.42,0.72)	0.063
遊離 SCINT-PSA	0.33 (0.23,0.45)	0.35 (0.24,0.42)	0.063
PSA-N (PSA-F-遊離 SCINT-PSA)	0.32 (0.20,0.52)	0.20 (0.13,0.35)	0.0055
hK2	0.039 (0.025,0.051)	0.042 (0.029,0.060)	0.589
hK2/PSA-F	0.059 (0.036,0.082)	0.076 (0.047,0.117)	0.086
PSA-F/PSA-T	0.20 (0.16,0.28)	0.16 (0.13,0.19)	<0.0001
遊離 SCINT-PSA/PSA-F	0.49 (0.41,0.60)	0.59 (0.50,0.73)	0.0012
遊離 SCINT-PSA/PSA-T	0.10 (0.077,0.141)	0.094 (0.075,0.118)	0.1688
PSA-N/PSA-T	0.097 (0.067,0.159)	0.063 (0.039,0.095)	0.0001
(遊離 SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T	1.58 (1.11, 2.12)	2.12 (1.73, 2.59)	<0.0001
(遊離 SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T x hK2	0.078 (0.049,0.146)	0.158 (0.090,0.248)	0.0023
(遊離 SCINT-PSA/PSA-F)/(PSA-F/PSA-T)	2.40 (1.44, 3.57)	3.71 (2.62, 5.84)	<0.0001

表5. 5 $\mu\text{g/L}$ 以下のPSA-T範囲において、単独または組合せパラメーターを用いた癌 (N=38) と非癌 (N=128) との識別。統計分析はノンパラメトリックなマン-ウィットニ- U 検定を用いて実施した。統計的有意性 ($p < 0.05$) は太文字で示されており、ボ-ダーラインの統計的有意性 ($p = 0.05 \sim 0.1$) はイタリック体で示されている。

10

20

30

40

50

【0065】

全臨床試験材料 (すなわち、表3に示されているようなPSA-T制限なし) のイムノアッセイ測定の統計解析により、PSA-T ($p < 0.0001$)、遊離SCINT-PSA ($p = 0.0063$) およびhK2 ($p = 0.018$) のレベルは、単独パラメーターPSA-N ($p = 0.0271$) と同様、非癌グループと比べて癌で有意差があったが、PSA-F ($p = 0.435$) は2グループのあいだで区別できなかったことが明らかに

されている。2つのパラメーター比のすべて、とくにPSA-F/PSA-T、遊離SCINT-PSA/PSA-FおよびPSA-N/PSA-T(すべて $p < 0.0001$)は、2つのグループのあいだをよく識別した。遊離SCINT-PSAのPSA-Fに対する比率(中間値)は、癌では59パーセントであるのに比べて、非癌では47パーセントであった($p < 0.0001$)。3つまたは4つのパラメーターアルゴリズムも、高い統計的な有意差をもって癌と非癌とを識別した。

【0066】

単一パラメーターの $10 \mu\text{g/L}$ 以下のPSA-T範囲(表4)においては、遊離SCINT-PSAおよびPSA-Nのみが癌と非癌とを識別した。とくに注目に値するのは、PSA-Nの中間濃度が非癌では $0.39 \mu\text{g/L}$ であり、癌では $0.27 \mu\text{g/L}$ ($p = 0.0043$)であったという事実である。2つのパラメーター比のうち、PSA-F/PSA-T($p = 0.0002$)、PSA-N/PSA-T($p = 0.0002$)、遊離SCINT-PSA/PSA-F($p = 0.0018$)は、3つおよび4つのパラメーターアルゴリズムのすべてと同様、2つの臨床グループをよく識別した。遊離SCINT-PSAのPSA-Fに対する比(中間値)は、癌において58パーセントであったのに対し非癌で47パーセントであった($p = 0.0018$)。

10

【0067】

単独パラメーターの $5 \mu\text{g/L}$ 以下のPSA-T範囲(表5)においては、PSA-Nのみが癌と非癌とを識別した。PSA-Nの中間濃度は、非癌で $0.32 \mu\text{g/L}$ 、癌で $0.20 \mu\text{g/L}$ であった($p = 0.0055$)。2つのパラメーター比のうち、PSA-F/PSA-T($p < 0.0001$)、PSA-N/PSA-T($p = 0.0001$)、遊離SCINT-PSA/PSA-F($p = 0.0012$)は、3つおよび4つのパラメーターアルゴリズムのすべてと同様、2つの臨床グループをよく識別した。また、このPSA-T範囲においては、遊離SCINT-PSAのPSA-Fに対する比(中間値)はすべての試験材料のそれと非常に類似しており、すなわち、癌で59パーセントであるのに比べて非癌で49パーセントであった。

20

【0068】

議論および結論

本発明の1つの目的は、転移癌細胞株LNCaPにより産生される各種形態のPSAに対する抗PSA抗体を製造し、そしてこれらの抗体を、精漿PSAで免疫感作して得られる以前に特徴付けられた多数の抗体と比較することであった。本発明者らは、検出用の特異的イムノアッセイを開発するために、遊離PSAの様々なアイソフォームに対する新規な抗PSA抗体を取得することを望んだ。1つの目標は、抗プロPSA抗体を開発することであった。LNCaP PSAを免疫原として使用する免疫感作に加えて、アミノ酸-7~+7からなる合成ペプチドをキャリアタンパク質にコンジュゲートさせ、免疫感作に使用した。また、hK2、fXahK2の変異形態を免疫感作に使用した。この形態は、プロペプチドを失うことにより生じるチモーゲンタンパク質の自己活性化を阻害する変異型プロペプチドを含む。hK2とPSAとは79%のアミノ酸同一性を有するので、抗PSA特異的抗体はfXahK2融合から生じると期待された。

30

【0069】

精製LNCaP PSAの約50%は1本鎖の成熟型からなり、約50%まではチモーゲン型からなっていた。8つのLNCaP PSA融合物により、1000個より多くのウェルがPSAに対して陽性となった。125個の細胞株を選択し、成育させ、いくつかの異なる方法で試験した。ほとんどの抗体特性は、以前に特徴付けられた抗PSA抗体に非常に類似していた。しかしながら、以前には知られていなかったエピトープ特性を有する3つの新規抗体が取得された。2つの新規抗体(4D4および5C3)は、PSAにおける共通の内部ペプチド開裂部位(Lys₁₄₅-Lys₁₄₆)に隣接したエピトープに結合し、もう1つの抗体(5H6)は該タンパク質のC末端ペプチドに結合した。合成ペプチド融合物およびfXahK2融合物は新規な抗PSA抗体を産生しなかった。

40

【0070】

50

4 D 4 および 5 C 3 は、L y s 1 4 5 - L y s 1 4 6 開裂部位に隣接する線状ペプチド配列に結合した。これらの抗体は、異なるクローン由来のものであったとしても、P S A アイソフォーム特異性および親和性が非常に類似していた。これらは h K 2 を認識しなかった。4 D 4 および 5 C 3 は色素原ペプチド基質に対する P S A の活性を阻害した（データは示されていない）が、このことは、P S A の触媒活性部位が内部開裂部位 L y s 1 4 5 - L y s 1 4 6 の隣にマッピングされていたことから（図 3）、期待されていたことであった。これら抗体を様々な量の内部開裂型 P S A を含有する精漿 P S A プールを用いて試験したところ、これら抗体は L y s 1 4 5 と L y s 1 4 6 のあいだで内部開裂した P S A を認識しないことが判明した。L y s 1 4 5 - L y s 1 4 6 部位での P S A の内部開裂は、酵素活性の喪失を引き起こす。したがって、4 D 4 および 5 C 3 は、L y s 1 4 5 - L y s 1 4 6 での内部開裂のために不活性である P S A を認識しない。

【0071】

別の新規抗体である 5 H 6 は、P S A 分子上の最後 15 個のアミノ酸からなる C 末端に結合した。このペプチドは天然形態（n a t i v e f o r m）ではらせん状であり、P S A 分子の表面に位置する。P S A 分子のアミノ酸 2 3 4 はバリンであるが、h K 2 ではアラニンである。この 1 つのアミノ酸の相違により、この抗体は h K 2 を認識しない。E . パウス博士から入手したもう 1 つの抗体 E 7 3 も、P S A の C 末端部分にマッピングされたが、ペプチド配列は 5 H 6 結合部位と部分的にのみ重複している。

【0072】

5 H 6 をトレーサー抗体として用いるイムノアッセイを構築した。このアッセイの意図は、P S A の C 末端部分での変化を検討することであった。5 H 6 は P S A の C 末端ペプチドに結合するので、C 末端でのアミノ酸開裂は P S A に対する 5 H 6 結合の減少を引き起こすと考えられた。ベイセイネンらは、血清を用いて増大させた成熟型 L N C a P P S A は理由不明であるが不活性であることを報告した。また、コレイらは、同様の結果を報告し、P S A の不活性分画の一部はトリプシンで活性化されるが、一部は不活性状態のままであることを示した。P S A の C 末端におけるアミノ酸開裂は当該タンパク質のコンホメーションを変化させることができ、おそらく P S A を不活性にするであろう。血清と共にまたは血清なしで増殖させた L N C a P 細胞の使用済み細胞培養培地由来の L N C a P P S A 形態を、等電点クロマトグラフィーを使用するアフィニティー精製ののちに、当該タンパク質のプロ型と成熟型に分離した。異なる L N C a P P S A 形態を、H 1 1 7 を捕捉抗体として、また 5 H 6 をトレーサー抗体として用いるイムノアッセイで試験した。本発明者らは、これらの異なる L N C a P P S A 形態は C 末端アミノ酸配列が異なっているか否かを調べてみたいと考えた。5 H 6 を用いるイムノアッセイは、これらの異なる P S A 形態のあいだで相違を示さなかった（データは示されていない）。

【0073】

血清 P S A 濃度の上昇は、前立腺癌以外の様々な泌尿器障害から生じている可能性があり、このため P S A は癌特異的ではない。しかしながら、血清中での P S A - F の P S A - A C T 複合体に対する比率は、前立腺癌におけるよりも B P H において有意に高いことが示されている（ステンマンら、C a n c e r R e s 1 9 9 1 ; 5 1 : 2 2 2 - 2 2 6、クリステンソンら、J U r o l 1 9 9 3 ; 1 5 0 : 1 0 0 - 5）。B P H における血清遊離 P S A の画分増大を引き起こすメカニズムは知られていない。ブジェルク（B j o e r k）ら（ブジェルクラ、U r o l o g y 1 9 9 4 ; 4 3 : 4 2 7 - 3 4）は、P S A と A C T の両者の産生が検出できる癌組織とは対照的に、P S A 含有 B P H 結節での A C T 産生の欠如を報告した。このことは、癌においてはより多くの P S A - A C T 複合体形成を生じ、したがって前立腺癌と B P H との遊離 P S A 量の差を説明できることになる。しかしながら、ジュング（J u n g）ら（ジュングら、C l i n C h e m 2 0 0 0 ; 4 6 : 4 7 - 5 4）は、前立腺組織における各種形態の P S A の量または比率が、血清中の各種形態の P S A の量または比率と相関しないことを立証した。したがって、血清中で見られるアイソフォームのパターンは、組織における P S A アイソフォームのパターンの単なる反映でないと思われる。それよりむしろ、新生良性腫瘍細胞由来の遊離 P S A の酵

素的に活性なまたは不活性な形態のものが様々な比率で放出することは、P C a や B P H における遊離 P S A 対総 P S A 比の相違を生じ得るであろう。

【0074】

血清中の遊離 P S A の性質については議論を呼ぶ報告があった。前立腺癌患者の血清中のアミノ酸 - 4 から始まるチモーゲン型 P S A が、ミコラジュクジク (M i k o l a j c z y k) らにより報告されている (ミコラジュクジクら、U r o l o g y 1997 ; 50 : 710 - 4)。L N C a P 細胞は、アミノ酸 - 7 または - 5 から始まるプロ型 P S A を産生することが示されている。これらプロ型は高い等電点 p I 値を有し、これはベイセイネンらによれば、h K 2 と共にインキュベーションしたのちに消失した。これらの高い p I 点はまた、進行した前立腺癌の患者の血清に見出されたが、B P H の患者では見出されなかった (フバー (H u b e r) ら、P r o s t a t e 1995 ; 27 : 212 - 9)。しかしながら、ノルダス (N o l d u s) らは、グレードの高い前立腺癌患者の血清中にチモーゲン型のものを検出しなかった (ノルダスら、J U r o l 1997 ; 158 : 1606 - 9)。彼らの精製法は、精製工程でおそらくプロ P S A を開裂して成熟型にすることができる h K 2 を除いていなかった。

10

【0075】

遊離 P S A の様々な形態に関する解決により、前立腺癌の診断に対する新たな識別情報が加わるであろう。抗プロ P S A 抗体はチモーゲン型タンパク質の特異的かつ高感度な測定を可能にするであろう。L N C a P P S A の高い免疫原性にもかかわらず、本発明者らは、チモーゲン型 P S A に対して特異的なまたはより強い優先性をもつ抗体を見出すことができなかった。

20

【0076】

抗プロ P S A 抗体を取得できなかったことについてはいくつかの理由があった。マウスカリクレインの P S A プロ配列はヒトカリクレインの P S A プロ配列に類似することが示されている (フクシマら、B i o c h e m i s t r y 1985 ; 24 : 8037 - 43)。このことは、プロペプチドがマウスにおいては免疫原性がないことを意味し得るであろう。また、この相同性のため、マウスカリクレインはおそらくヒトプロ P S A を開裂して成熟型 P S A とすることができ、その結果、プロ配列を喪失することになる。加えて、P S A 分子のプロ配列の配向 (o r i e n t a t i o n) は知られておらず、またそれが部分的に埋もれていることもありうる。

30

【0077】

精漿および前立腺組織由来の様々な形態の遊離 P S A の特徴付けは、遊離 P S A の様々な分子形態および様々な前立腺疾患におけるそれらの関連性を理解するうえでの1つの研究方法であった。不活性な遊離型 P S A の1つの説明は、内部開裂型 P S A であるということである。精漿 P S A は30%までの内部開裂型 P S A (最も共通した内部開裂部位は L y s 145 - L y s 146 である) を含有していることが示されている (クリステンソンら、E u r J B i o c h e m 1990 ; 194 : 755 - 63)。ノルダスらは、グレードの高い前立腺癌患者の血清中にこの内部開裂型 P S A を検出した (ノルダスら、J U r o l 1977 ; 158 : 1606 - 9)。チャリアー (C h a r r i e r) らは、B P H 血清と P C a 血清における P S A 形態のパターンを比較するのに二次元電気泳動を使用した (チャリアーら、E l e c t r o p h o r e s i s 1999 ; 20 : 1075 - 81)。彼らは、B P H 血清は P C a 血清に比べてより多くの開裂型遊離 P S A を含有していることを立証した。内部開裂部位は A r g 85 - P h e 86 および L y s 182 - S e r 183 でも確認された (ザングら、C l i n C h e m 1995 ; 41 : 1567 - 73、ワット (W a t t)、P r o c N a t l A c a d S c i U S A 1986 ; 83 : 3166 - 70)。B P H 患者の良性転移ゾーン (b e n i g n t r a n s i t i o n z o n e) から単離されたものであって、最近特徴付けられた新規な P S A 形態「B - P S A」は、L y s 182 - S e r 183 の個所に内部開裂部位を有している (ミコラジュクら、U r o l o g y 2000 ; 55 : 41 - 5)。チェン (C h e n) らは、B P H 結節液において、H i s 54 - S e r 55、P h e 57 - H i s 58、L y s

40

50

145 - Lys 146 および Lys 146 - Leu 147 に内部開裂部位をもつ PSA 形態を報告している (チェンら、J Urol 1997; 157: 2166 - 70)。Lys 145 - Lys 146 を除く他の部位における開裂が PSA を不活化するか否かは知られていない。

【0078】

ザングらは、ACT と複合体を形成できない、不活性で、成熟型で、切りつめられていない、精漿中の PSA 形態を報告した (ザングら、Clin Chem 1995; 41: 1567 - 73)。この完全で不活性な PSA は、血清中 (ミコラジユクジクら、Urology 1997; 50: 710 - 4、ノルダスら、J Urol 1997; 158: 1606 - 9、キアン (Qian) ら、Clin Chem 1997; 43: 352 - 9) および LNCaP 細胞の使用済み培地中 (ベイセイネンら、Prostate Cancer and Prostatic Diseases 1999; 6: 1 - 7、コレイら、Prostate 1998; 35: 135 - 43) にも見出されている。現時点では、この不活性な PSA 型に対する説明はない。

【0079】

PSA 分子には別々の抗原性領域がある (図3)。これら領域の存在は、免疫原性の少ない領域に対する抗体を取得しうる可能性を低下させるであろう。しかしながら、本研究では、以前に認識されていなかった2つの新規なエピトープに対する抗体を見出した。

【0080】

前に記載した新規でかつユニークな高親和性の 5C3 または 4D4 Mab を使用して、本発明者らは、遊離 SCINT - PSA に対する簡単で非常に感度のよいアッセイを構築することができた。これらは、一次的には、遊離 PSA 特異的捕捉 Mab 5A10 と一緒に、検出抗体として使用された。本発明者らが所有している2つのトレーサー Mab は同じように作用するので、それらのうちの一方、Mab 5C3 のみを継続的に使用した。エピトープマップ (図2) から明らかのように、Mab 5C3 と 4D4 は、他の総 PSA 特異的抗体と容易に組み合わせることができ、したがって、複合体型および遊離型 SCINT - PSA に対するアッセイを提供する。

【0081】

本発明者らの定義による遊離 SCINT - PSA は、PSA - F のサブフラクションを構成するので、本発明者らは、遊離 PSA アッセイにより測定した値から遊離 SCINT - PSA の値を引き算することにより、遊離のニックが入った PSA (PSA - N) 濃度を容易に得ることができた。この計算されたパラメーターは、とくに癌と非癌とを区別するための PSA - N / PSA - T (またはその逆) 比率を形成するのに、重要なパラメーターであることが示された。前遮断工程 (preblocking step) を使用することにより、たとえば Mab 5C3 および / または 4D4 により、ニックの入った PSA の直接測定を構築することができ、それにより、完全型 PSA、すなわち SCINT PSA が免疫検出においてさらに関与することを避ける、すなわち遮断することが、2-D エピトープマップ (図2) から明らかである。選択されたサンドイッチ用の一対の抗体のうち、一方の抗体 (たとえば、2C1) は 5C3 および 4D4 特異的エピトープと重複するエピトープを認識することに基づき、他方は良好なサンドイッチ形成可能な他の PSA 抗体である。

【0082】

臨床サンプル、すなわちスクリーニングコホートの分析から明らかのように、遊離 SCINT - PSA および PSA - N は、それぞれ単独であるいは様々な組み合わせで、全コホート (whole cohort) のためのみならず、診断的に困難な、PSA - T 濃度が低い ($5 \mu\text{g} / \text{L}$ 以下) または中程度 ($10 \mu\text{g} / \text{L}$ 以下) のいわゆる灰色ゾーン領域においても、癌と非癌とを非常に有意に識別することを可能にした。

【0083】

遊離 SCINT - PSA および PSA - N と他の形態の PSA または hK2 の測定との組み合わせは、比率あるいは他の数学的アルゴリズム以外の方法でも当然遂行できるが、口

10

20

30

40

50

ジスティック回帰による組み合わせによっても遂行できる。ロジスティック回帰による組み合わせは、しばしば、各患者から得られる個々の測定値から計算される比率よりもいっそう良好な識別を提供する。比率の形成により得られる組み合わせと異なって、ロジスティック回帰による組み合わせは、連続変数を与えないので、カットオフ限界 (cut-off limits) はこれらのケースでは定義できない。ロジスティック回帰分析は、様々な“医学的決定サポートを提供しうるリスク分析システム”のための基礎を提供する際の手段となる。このようなデータ取り扱いシステムの他の例は、つぎのものがある：人工ニューロネットワーク (ANN)、ニューロファジーネットワーク (neuro fuzzy networks) (NFN)、多層パーセプトロン (MLP)、学習ベクトル量子化 (LVQ) (フリーマン (Freemann) JAら、In: Neural Networks: Algorithms, Applications and Programming Techniques, アディソン-ウェスレイ出版社 (Addison-Wesley Publishing Company) 1991; ザデー (Zadeh) LA、Information and Control, 1965, 8: 338-353; ザデー LA、IEEE Trans. on System, Man and Cybernetics 1973, 3: 28-44; ゲルシヨー (Gersho) Aら、In: Vector Quantization and Signal Compression, クルイワー アカデミック出版 (Kluwer Academic Publishers)、ボストン、ドルドレヒト (Dordrecht)、ロンドン 1992; ハッソウン (Hassoun) M.H., Fundamentals of Artificial Neural Networks, The MIT Press, ケンブリッジ、マサチューセッツ、ロンドン 1995)

10

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

新規抗 P S A 抗体のための研究に使用した 4 つのスクリーニング方法。

【図 2】

新規 M a b および以前に特徴付けられた M a b の、P S A の 2 - D モデルにおける相互に関するエピトープマッピング。重複する円は M a b が互いに挟み込めないことを示す。接触している円は P S A との結合で検出可能な干渉 (競合) を示し、重複していない円は M a b が独立したエピトープを検出しかつ他の重複していない円における他の抗体を挟み込むことが可能であることを示す。白色の円に位置する抗体は P S A に対して特異的であり、黒色の円における抗体は h K 2 と交差反応する。抗体の円 (クロス模様) は本研究で開発された新規抗体を示す。

30

【図 3】

3 - D モデル構造における P S A のエピトープ群。直線ペプチド配列に結合する抗体はこのモデルにマッピングされている。7 つの独立した抗原ドメインが示されている。M a b 5 A 1 0 はアミノ酸 8 4 ~ 9 1 からなるペプチド配列に結合し、M a b 2 E 9 は a a 8 0 ~ 8 3、M a b 1 0 は a a 1 5 0 ~ 1 6 4、M a b 3 C 1 および M a b 4 H 5 は a a 1 ~ 1 1 (すなわち、a a 3、5 ~ 6 および 8 ~ 1 1)、ならびに M a b H 1 6 4 および M a b 2 C 1 は a a 5 0 ~ 6 4 からなるペプチド配列に結合し、これらは以前報告されている (パイロネンら、Protein Science 1998; 7: 259-69)。E 7 3 はペプチド配列 a a 2 1 5 ~ 2 2 9 に結合する。新規な 5 H 6 M a b が隣接ペプチド配列 a a 2 2 5 ~ 2 3 7 に結合したので、5 H 6 は M a b E 7 3 のエピトープに非常に近いところに位置するエピトープにマッピングされる。M a b 4 D 4 および 5 C 3 は、P S A 上の以前に認識されていなかった抗原エピトープであるペプチド配列 1 3 6 ~ 1 4 4 に結合した。M a b 4 D 4 および M a b 5 C 3 のエピトープの近辺における触媒活性部位と同様、L y s 1 4 5 と L y s 1 4 6 のあいだの内部開裂部位も、図に示されている。

40

【図 4】

イソ酵素との P S A 反応性を有する各抗体の反応性は、全ての抗体のイソ酵素との反応性

50

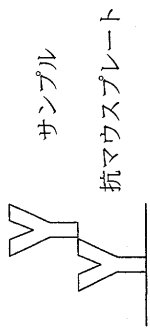
の中間値と比較された。完全型アイソフォーム A との反応性を 100% とした。抗体群は、ISOBM エピトープ命名法にしたがって、抗体結合領域に基づいて 1 ~ 5 に番号をつけられている。プール A ~ E は 1 ng / ウェルで、Eu - Mab は 50 ng / ウェルで使用した。

【図 5】

遊離 SCINT - PSA アッセイ標準曲線。

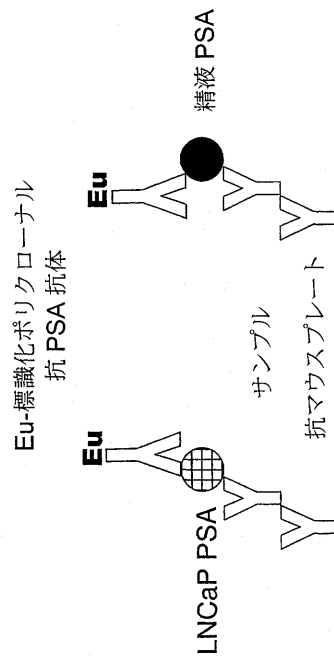
【図 1】

Eu-標識化 LNCaP PSA
Sm-標識化精液 PSA



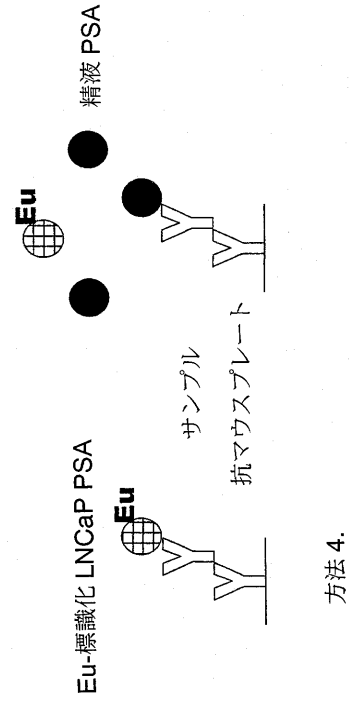
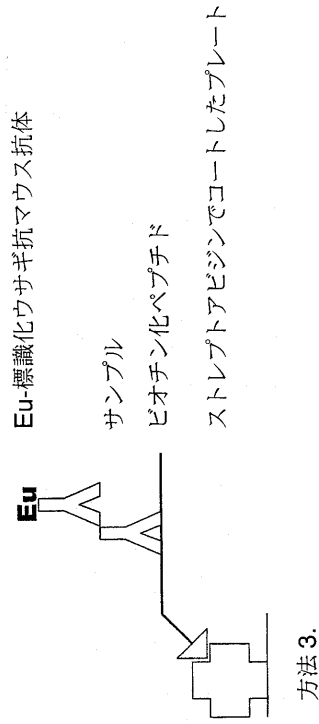
方法 1.

a



方法 2.

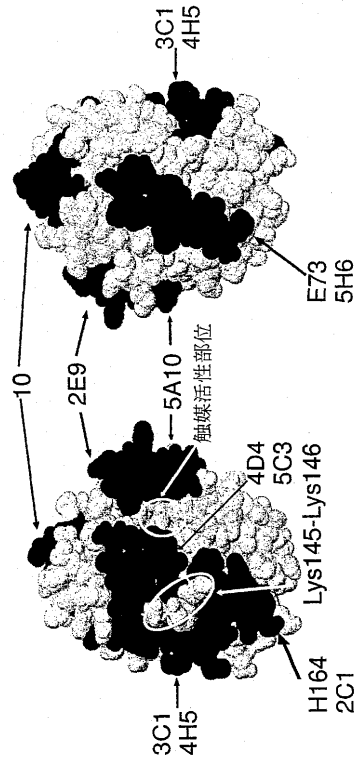
b



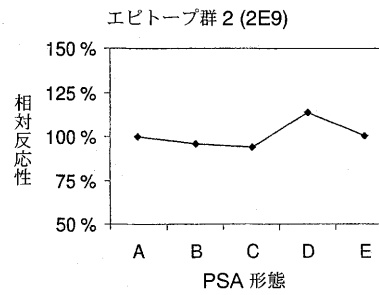
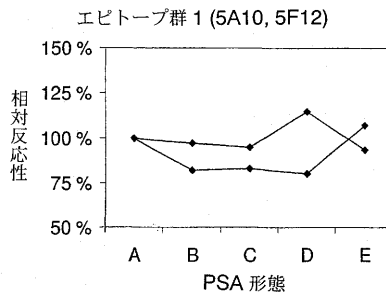
c

d

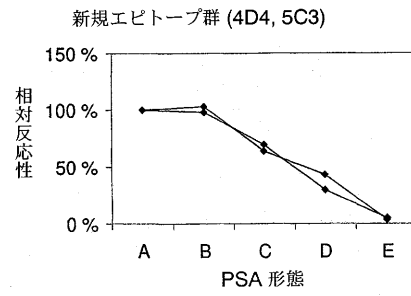
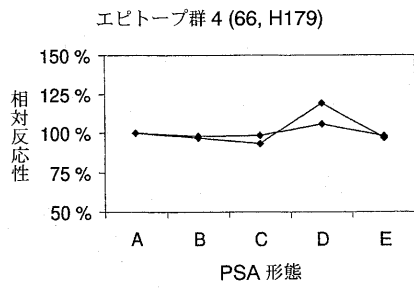
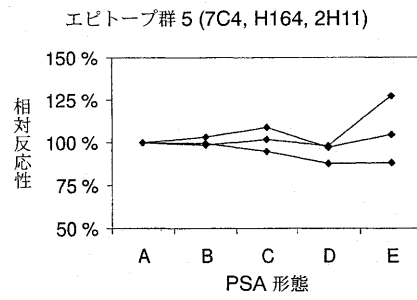
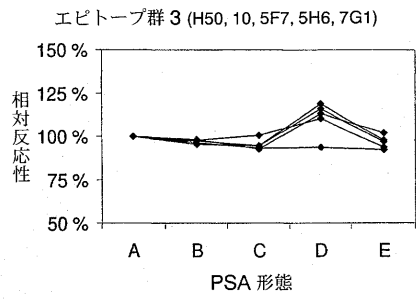
【 図 3 】



【 図 4 】



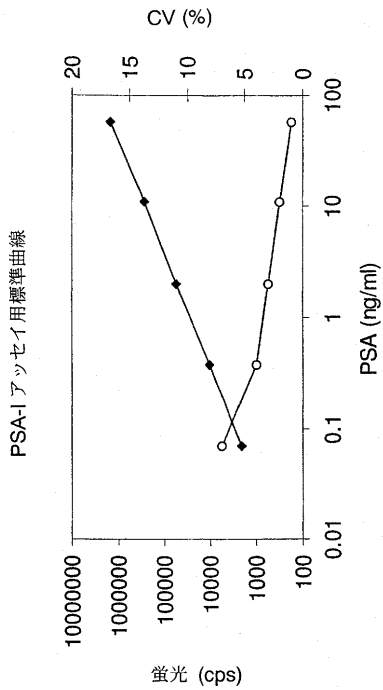
a



b

c

【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 April 2002 (04.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/27323 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/574, 33/573, C07K 16/40, C12N 9/64
- (21) International Application Number: PCT/FI01/00834
- (22) International Filing Date: 26 September 2001 (26.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 20002127 27 September 2000 (27.09.2000) FI
- (71) Applicant (for all designated States except US): ARCTIC PARTNERS OY AB [FI/FI], Yhopistonkatu 2 H 155, FIN-20100 Turku (FI).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): PETERSSON, Kim [FI/FI], Tiihentekijänkatu 14 E 20, FIN-20810 Turku (FI), LILJA, Hans [SE/DE], Mittelweg 30, 20148 Hamburg (DE), LÖVGREN, Timo [FI/FI], Yhopistonkatu 2 H 155, FIN-20100 Turku (FI), NIEMELÄ, Pauliina [FI/FI], Luolavuorenkatu 46 A 21, FIN-20720 Turku (FI).
- (74) Agent: TURUN PATENTTI-TOIMISTO OY; P.O. Box 99, FIN-20521 Turku (FI).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/27323 A1

(54) Title: NOVEL ANTIBODY, IMMUNOASSAY AND METHOD FOR PROSTATE CANCER DETECTION

(57) Abstract: This invention concerns an antibody wherein said antibody does bind with high affinity to human single-chain intact, i.e. not internally cleaved, mature and/or zymogen forms of prostate specific antigen (SCINT PSA). The antibody, obtainable through immunization with an uncleaved form of PSA and selected by its differential reactivity with the intact and internally cleaved forms, does not bind to a nicked PSA (PSA-N), wherein said PSA-N has been formed by internal peptide bond cleavage(s) of SCINT PSA resulting in two-chain or multi-chain PSA. This invention further concerns an immunoassay and a method for differentiating patients with cancer of the prostate (PCa) from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and/or healthy male subjects without PCa, patients with aggressive PCa from patients with indolent PCa and/or patients with clinically localized and/or organ confined PCa from patients with extraprostatic extension of PCa and/or PCa with metastatic spread to lymph nodes or bone marrow using said antibody.

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

1

NOVEL ANTIBODY, IMMUNOASSAY AND METHOD FOR PROSTATE
CANCER DETECTION

FIELD OF INVENTION

This invention relates to high affinity immunoreagents which are specific for the
5 single-chain, intact (i.e. not internally-cleaved) form(s) of prostate specific antigen
(PSA or hK3). It also relates to the discrimination of prostate cancer from healthy
asymptomatic men or benign prostatic conditions by an analytically sensitive
immunoassay, employing the aforementioned immunoreagents, for the specific
10 determination of the single-chain, intact (not internally cleaved) form(s) of free,
noncomplexed PSA (free SCINT PSA), or by combining the result from this
immunoassay with immunoassays measuring any other forms of the prostatic
kallikreins, PSA or hK2, either by forming various ratios of these or by combining
them with other means, e.g. using logistic regression and/or artificial neural
15 networks. The invention may be used for detection of prostate cancer both in
screening of asymptomatic individuals as well as in distinguishing cancer from
benign conditions in men presenting with clinical symptoms (e.g. lower urinary
tract symptoms, LUTS). Further, the invention may be used to improve the staging
and grading of prostate cancer as well as to provide improved means to detect
20 recurrency of cancer at early stage and provide improved means to monitor
therapeutic response at various stages of disease. Suitable biological specimens for
the immunoassay determinations are mainly serum, plasma or whole blood samples,
but the invention may also be applied to other biological fluids such as urine and
seminal fluid samples.

BACKGROUND

The publications and other materials used herein to illuminate the background of the invention, and in particular, cases to provide additional details respecting the practice, are incorporated by reference.

- 5 Prostate-specific antigen (PSA; also designated hK3) and human glandular kallikrein 2 (hK2) are two closely related serine proteases highly expressed, predominantly in prostatic tissue. [Wang et al. *Invest Urol* 1979; 17:159-163, Lilja *J Clin Invest* 1985; 76:1899-1903, Chapdelaine et al. *FEBS Lett* 1988; 236:205-208]. The PSA gene is located on the long arm of chromosome 19 and has >84%
- 10 nucleotide sequence identity with hK2. The two proteins also show extensive similarity in amino-acid sequence (79%) but the expression rates are quite different (hK2 mRNA levels amount to ~10-20% of PSA mRNA levels) [Schedlich et al. *DNA* 1987; 6:429-437]. PSA is synthesized as a 261 amino acid preproform from which the 17-21 amino acid signal peptide is cleaved and released in the secretion
- 15 process. The remaining zymogen form of PSA is activated to an active serine protease by cleavage of 3-7 amino acid propeptide [Lövgren et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997; 238; 549-555]. Recently, recombinant hK2 was shown to convert *in vitro* inactive recombinant proPSA into active mature PSA [Lövgren et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238:549-555, Takayama et al. *J Biol*
- 20 *Chem* 1997; 272:21582-21588, Kumar et al. *Cancer Res* 1997; 57:3111-3114]. Therefore, hK2 is likely a physiological activator of proPSA. Enzymatically active PSA is secreted into seminal fluid at high concentrations (0.2-5 mg/mL) [Christensson et al. *Eur J Biochem* 1990; 194:755-763, Ahlgren et al. 1995 *J Androl* 16:491-498]. In semen, PSA degrades the seminal vesicle derived gel-
- 25 forming proteins semenogelin I and II, causing liquefaction of semen and release of progressively motile spermatozoa [Lilja *J Clin Invest* 1985; 76:1899-1903]. The action of PSA generates hydrolysis of peptide bonds, mainly C-terminal, of certain tyrosine- and glutamine residues in semenogelin I and II [Malm et al. *The Prostate* 2000; *In press*]. By contrast, hK2 generates distinctly different cleavage patterns in

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

3

semenogelin I and II compared to those generated by the action of PSA, though it is presently unclear whether the hK2 action on the gel proteins has physiological significance [Lövgrén *et al. Eur. J. Biochem.* 1999; 262; 781-789].

Enzymatically active PSA has been shown to manifest unique substrate specificity with limited similarity to chymotrypsin-like proteases [Lilja *et al. J Biol Chem* 1989; 264:1894-1900 Christensson *et al. Eur J Biochem* 1990; 194:755-763, Malm *et al. The Prostate* 2000; *In press*]. The active single-chain form of PSA forms stable covalent complexes with several extracellular protease inhibitors, such as α_1 -antichymotrypsin (ACT), α_2 -macroglobulin (AMG), pregnancy-zone protein (PZP), protein C inhibitor (PCI), and α_1 -antitrypsin (API) [Christensson *et al. Eur J Biochem* 1990; 194:755-763, Stenman *et al. Cancer Res* 1991; 51:222-226, España *et al. Thromb Res* 1991; 64:309-320, Christensson and Lilja *Eur J Biochem* 1994; 220:45-53, Zhang *et al. Prostate* 1997; 33:87-96]. In blood, the predominant immunodetectable form of PSA is covalently linked in complex with ACT and only a minor fraction is in a free, noncomplexed form (PSA-F) [Stenman *et al. Cancer Res* 1991; 51:222-226, Lilja *et al. Clin Chem* 1991; 37:1618-1625].

LNCaP (lymph node cancer of the prostate) is a human metastatic prostate adenocarcinoma cell line that was isolated in 1977 from a needle aspiration biopsy of a patient with confirmed metastatic prostate cancer. Various forms of free PSA have been found in spent cell culture medium of LNCaP cells. Corey *et al.* and Väisänen *et al.* reported LNCaP cells to produce zymogen forms of PSA (proPSA) and a mature intact form of PSA. However, the LNCaP cells do not appear to produce any internally cleaved forms of PSA, by contrast to PSA from seminal fluid which partially occurs as enzymatically inactive forms due to internally cleavage(s) mainly between Lys₁₄₅ and Lys₁₄₆ [Christensson *et al. Eur J Biochem* 1990; 194:755-763]. The zymogen form of PSA has been found also in serum of patients with prostate cancer. Since the zymogen form of PSA is enzymatically inactive, it cannot form complexes with serpins and is likely to remain in a free form in the circulation. There are also other, contradictory reports on the nature of the free PSA

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

4

form occurring in serum, stating that it is a cleaved, inactive form resulting from internal cleavage(s) or that it represents an unclipped mature but enzymatically inactive form of PSA.

The incidence of prostate cancer has increased during the last decade mainly due to
5 prolonged lifetime and increased screening. This fact underlines the need of
improved diagnostic approaches and new treatments. Analysis of PSA in serum is
well established in the diagnosis and monitoring of prostate-cancer (PCa) patients
[Oesterling *J Urol* 1991; 145:907-923]. However, raised serum concentrations of
10 PSA are also found in patients with other prostatic diseases, for instance benign
hyperplasia of the prostate (BPH) [Hudson *et al. J Urol* 1989; 142:1011-1017]. The
discovery of several different molecular forms of PSA in serum have significantly
improved the specificity of diagnosis and monitoring for PCa. Patients with BPH
have higher proportions of free-to-total PSA (i.e. PSA-F + PSA-ACT + other
15 quantitatively less important PSA-serpin complexes), or free-to-complexed PSA in
serum than patients with PCa. This has resulted in the use of free-to-total PSA (also
called percent free PSA) to distinguish between BPH and PCa in men with
moderately elevated PSA levels in serum [Stenman *et al. Cancer Res* 1991; 51:222-
226, Christensson *et al. J Urol* 1993; 150:100-105]. Although this has improved
20 the specificity for PCa, there is still considerable overlap between the two groups of
men and therefore a great need for markers, which provide further improved
discrimination of men with cancer from normal men and men with benign
conditions.

Immunizations of mice with purified PSA have resulted in generation of
monoclonal antibodies against PSA and hK2. Many monoclonal antibodies cross
25 react with PSA and hK2 due to the extensive identity in primary structure of the two
proteins. However, specific immunoassays that selectively measure free PSA,
complexed PSA and hK2 have been developed by us and others. At present, there
are no immunoassays available that specifically recognize various candidate forms
of free PSA.

OBJECTIVE AND SUMMARY

The object of the present invention is to enable the determination of human single-chain intact, i.e. not internally cleaved, mature and/or zymogen forms of prostate specific antigen (SCINT PSA) from a sample containing such antigen.

- 5 Another objective of the present invention is to provide an immunoassay for the quantitative determination of SCINT PSA in a sample containing such antigen.

- A further objective of the present invention is to provide a method for differentiating patients with cancer of the prostate (PCa) from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and/or healthy male subjects without PCa, patients with aggressive PCa from patients with indolent PCa, and/or patients with clinically localized and/or confined PCa from patients with extraprostatic extension of PCa and/or PCa with metastatic spread to lymph nodes or bone marrow.

- The present invention thus concerns an antibody, wherein said antibody does bind with high affinity to human single-chain intact, i.e. not internally cleaved, mature and/or zymogen forms of prostate specific antigen (SCINT PSA). The antibody, obtainable through immunization with an uncleaved form of PSA and selected by its differential reactivity with the intact and internally cleaved forms, does not bind to a nicked PSA (PSA-N), wherein said PSA-N has been formed by internal peptide bond cleavage(s) of SCINT PSA resulting in two-chain or multi-chain PSA.

- 20 The present invention also concerns an immunoassay for quantitative determination, in a sample, of a human single-chain intact, i.e. not internally cleaved, mature and/or zymogen forms of prostate specific antigen (SCINT PSA), or alternatively nicked PSA forms (PSA-N), wherein said PSA-N has been formed by internal cleavage(s) of SCINT PSA resulting in two-chain or multi-chain prostate specific antigen (PSA) forms, which SCINT PSA or PSA-N may occur both free and/or complexed. The immunoassay uses an antibody, which does bind with high affinity to said SCINT PSA, but does not bind to PSA-N.

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

6

The present invention further concerns a method for differentiating

- i) patients with cancer of the prostate (PCa) from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and/or healthy male subjects without PCa,
- ii) patients with aggressive PCa from patients with indolent PCa and/or
- 5 iii) patients with clinically localized and/or organ confined PCa from patients with extraprostatic extension of PCa and/or PCa with metastatic spread to lymph nodes or bone marrow.

The method comprises the following steps

- a) human single-chain intact, i.e. not internally cleaved, prostate specific antigen (SCINT PSA) free and/or complexed is determined,
- 10 b) a marker value, which is a function of determined SCINT PSA is established, and
- c) the established marker value is used for differentiation of said patients.

15 BRIEF DESCRIPTION OF TABLES AND DRAWINGS

FIGURES 1a–1d. Four screening methods used in the search for novel anti-PSA antibodies.

- FIGURE 2. Epitope mapping of novel and previously characterized Mabs in relation to each other in a 2-D model of PSA. Overlapping circles indicate that the Mabs cannot sandwich each other. Touching circles indicate detectable interference (competition) in binding to PSA, whereas nonoverlapping circles indicate that the Mabs detect independent epitopes and can sandwich other antibodies in the other nonoverlapping circles. Antibodies located in white circles are specific for PSA whereas antibodies in black circles cross react with hK2. Antibody circles (cross pattern) denote the novel antibodies developed in this study.
- 20
- 25

FIGURE 3. Epitope groups of PSA in a 3-D model structure. Antibodies that bind to linear peptide sequences are mapped to this model. Seven independent antigenic

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

7

domains are shown. Mab 5A10 binds to the peptide sequence consisting of amino acids 84-91, Mab 2E9 aa 80-83, Mab 10 aa 150-164, Mab 3C1 and Mab 4H5 aa 1-11 (*i.e.* aa 3,5-6, and 8-11), and Mab H164 and Mab 2C1 aa 50-64 as reported previously [Piironen *et al Protein Science* 1998;7:259-69]. E73 binds to peptide sequence aa 215-229. The new 5H6 Mab is mapped to an epitope located very close to the epitope of Mab E73, as 5H6 was bound to the adjacent peptide sequence aa 225-237. Mabs 4D4 and 5C3 were bound to peptide sequence 136-144 which is a previously unrecognized antigenic epitope on PSA. The internal cleavage site between Lys145 and Lys146 is also indicated in the figure, as well as the catalytically active site in the vicinity of the Mab 4D4 and Mab 5C3 epitopes.

FIGURES 4a-4c. Reactivity of antibodies with PSA reactivity of each antibody with an isoenzyme was compared to the median reactivity of all antibodies with that isoenzyme. Reactivity with intact isoform A was set as 100%. Antibody groups are numbered 1-5 based on antibody binding regions according to the ISOBM epitope nomenclature. Pools A-E were used 1 ng/well and Eu-Mabs 50 ng/well.

FIGURE 5. The free SCINT-PSA assay standard curve.

TABLE 1. Summary of the results from immunizations and fusions.

TABLE 2. Summary of antibody characteristics.

TABLE 3. Discrimination of cancers and noncancers using single or combined parameters in the PSA-T range below 5 $\mu\text{g/L}$. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney-U test.

TABLE 4. Discrimination of cancers and noncancers using single or combined parameters in the PSA-T range below 10 $\mu\text{g/L}$. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney-U test.

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

8

TABLE 5. Discrimination of cancers and noncancers using single or combined parameters without restrictions as to the concentrations of PSA-T. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney-U test.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 Design and development of analytical procedures to address the nature of the different forms of free PSA could add new discriminatory information to the diagnostics of prostate cancer. An anti-proPSA antibody would enable specific and sensitive measurement of the zymogen forms of the protein. Despite the high immunogenic nature of the LNCaP PSA, we were unable to generate antibodies
10 specific for or with strong preference for the PSA-zymogen, e.g. antibodies which specifically recognizes the entire PSA-propeptide or parts of this propeptide. The aim of this project was to develop anti-PSA antibodies against various PSA forms produced by the metastatic cancer cell line LNCaP and to employ these antibodies in immunoassays to provide specific detection and quantitative measurements of
15 the concentrations of different PSA fractions that may be enzymatically inactive (and therefore unable to form the covalent linkages with the different serpin-type complexing ligands such as ACT, AMG, or API e.g. PSA-zymogen forms {i.e. proPSA}, enzymatically inactive single-chain mature forms, various internally cleaved forms or other inactive forms remaining in noncomplexed form in serum due to as yet unidentified reasons).
20

We here report:

1. The development and production of monoclonal antibodies that specifically and with high affinity recognize the single-chain, intact (i.e. not internally cleaved) mature and/or zymogen PSA-form(s) but which do not recognize internally cleaved
25 two- or multi-chain forms.
2. Optimization of a highly sensitive two-site immunoassay, using antibodies, which selectively recognize the single-chain, intact (i.e. not internally cleaved)

mature or zymogen form(s) and combined with antibodies which recognized free, noncomplexed PSA to measure the single-chain, intact (i.e. not internally cleaved) mature or zymogen form(s) of free, noncomplexed PSA (free Single-Chain INTact noncomplexed PSA or free **SCINT-PSA**). This assay is applicable for samples of serum, plasma or whole blood as well as other biological fluids.

3. Application of this assay to a study population (N= 281) of serum or plasma samples obtained from asymptomatic men aged 50 to 66 years old initially presenting with a concentration of total PSA of 3 µg/L or more. The diagnosis of PC was based on sextant biopsy. The performance of this assay alone or in combination with other forms of kallikreins (PSA or hK2) to separate noncancers from PC were studied and compared to other established diagnostic procedures.

4. Design of a highly sensitive two-site immunoassay for the measurement of the single-chain intact (i.e. both mature- and zymogen-forms) occurring as both free and complexed PSA-forms. This is accomplished using antibodies which selectively recognize the single-chain, intact (i.e. not internally cleaved) mature and zymogen form(s). These antibodies are combined with independently binding antibodies which recognize both free and complexed PSA-forms with equal affinity (SCINT-PSA). This assay is applicable for samples of serum, plasma or whole blood as well as other biological fluids.

5. Design of a highly sensitive two-site immunoassay which selectively measures internally cleaved PSA-forms independent on whether they occur as free or complexed PSA-forms (i.e. nicked PSA or PSA-N). This assay design first uses a large excess of antibodies which selectively recognize the single-chain, intact (i.e. not internally cleaved) mature and zymogen form(s). This is carried out in order to inhibit or block the binding of the intact single-chain PSA by another antibody which bind PSA at an epitope overlapping with that defined by the first blocking antibody. After addition of such an overlapping antibody (used for detection or capture), a third independently binding antibody suitable as a sandwiching partner to the second antibody is added to complete the immunoreaction. Due to the design

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

10

of the assay, solely PSA which is internally cleaved at Lys145-Lys146 will be measured independently on whether it occurs in free or complexed forms.

This invention relates to the development of high affinity immunoreagents specific for **SCINT-PSA**. By employing these high affinity antibodies, the invention also
5 relates to the establishment of very sensitive immunoassays, highly specific for the measurements of the concentration of **free SCINT-PSA** and **SCINT-PSA** to be used to discriminate men with prostate cancer from healthy asymptomatic men or those with benign prostatic conditions. The invention may be used for PCa detection both in screening of asymptomatic individuals as well as in distinguishing cancer
10 from benign conditions in men presenting with clinical symptoms (e.g. lower urinary tract symptoms, LUTS). In addition, the invention may be used to improve the staging and grading of prostate cancer as well as to provide improved means to detect recurrence of cancer at early stage and provide improved means to monitor therapeutic response at various stages of disease.

15 According to the invention, specific monoclonal antibodies can be developed which detect the single-chain, intact (i.e. not internally cleaved) mature and/or zymogen form(s) of PSA with high affinity. More detailed analysis of such antibodies show that they are unable to recognize a two-chain form of PSA presenting with an internal cleavage between Lys145 and Lys146. This form constitutes one commonly
20 occurring nicked (i.e. internally cleaved) form of PSA in seminal plasma as well as in the circulation.

According to the invention, immunoassays which specifically detect **free SCINT-PSA** can be performed on serum, plasma and whole blood samples as well as on
25 other biological fluids such as urine or seminal plasma obtained from the individuals under investigation. Furthermore the calculated difference between **free SCINT-PSA** and **PSA-F** will yet provide another important parameter that of nicked PSA (**PSA-N**).

As aforementioned, the access to the SCINT-PSA specific monoclonal antibodies also provides an opportunity, described in this invention, to design an immunoassay whereby the nicked PSA can specifically be quantified by completely blocking SCINT-PSA with the help of the SCINT-PSA specific antibodies claimed in this invention, then proceed with detection of the nicked PSA forms through the use of
5 PSA antibodies no longer reactive with the intact free or intact complexed PSA forms. Such a design enables nicked PSA (whether free or complexed) to be measured without the use of free-PSA antibodies.

According to the central findings of this invention, the use of the immunoassay specific for **free SCINT-PSA** as an efficient tumor marker can be either realized by
10 using **free SCINT-PSA** or the calculated PSA-N alone or using either of these parameters in combination with any of the different forms of free, complexed, and total PSA and/or hK2 (e.g. total PSA or total hK2, complexed PSA or complexed hK2, any specific protease inhibitor in complex with PSA or any specific protease
15 inhibitor in complex with hK2, total concentrations of free PSA [i.e. single-chain intact mature and zymogen forms + various internally cleaved two- or multi-chain forms] or total concentration of free hK2, and/or various internally cleaved two- or multi-chain forms of free PSA or various internally cleaved two- or multi-chain forms of free hK2).

20 According to a further aspect of the invention the combination of **free SCINT-PSA, SCINT-PSA or PSA-N** with other measured forms of PSA can be performed by forming various ratios or algorithms of the measured parameters such as:

the ratio of **free SCINT-PSA or PSA-N** to total free PSA

the ratio of **free SCINT-PSA or PSA-N** to total PSA

25 the ratio of **free SCINT-PSA** divided by the total concentration of free PSA multiplied by the ratio of total PSA divided by the total concentration of free PSA

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

12

the ratio of free SCINT-PSA divided by the total concentration of free PSA multiplied by total PSA

or alternatively by :

5 the use of logistic regression analysis of the various measured parameters into receiver operating characteristics (ROC) analyses.

the use of various artificial intelligence approaches such as artificial neural networks.

10 According to a further aspect of the invention, it is preferentially applied to a subset of patient samples mainly characterized by moderately elevated levels of total or complexed PSA, i.e. concentrations of PSA where the diagnostic discrimination of cancer and noncancer conditions by total or complexed PSA alone is less reliable and in which the cancers detected are more likely to be organ-confined and eligible for curative treatments. Such an area is frequently defined as total PSA ranges from 3 or 4 to 20 $\mu\text{g/L}$ but can be defined differently as regards both the lower limit 15 (which can be even lower, e.g. 2.0 or 2.5 $\mu\text{g/L}$) or the higher limit (which can be even higher or lower, e.g. 8.0, 10, 12 or 15 $\mu\text{g/L}$).

20 According to still another aspect of the invention, the concentrations of SCINT-PSA or PSA-N alone or in combination with other measured parameters e.g. by using various ratios, logistic regression analysis or artificial intelligence approaches can also be used to identify sub-groups of the identified prostate cancer patients, more specifically those prostate cancers that are likely to remain indolent or progress slowly from those cancers that are likely to progress more aggressively. Other clinical applications of the invention may relate to the discrimination of pathologically organ-confined disease from disease stages with extraprostatic 25 extension, either locally advanced or metastatic disease. Yet another clinical application of the invention may relate to the detection of early recurrence of cancer

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

13

after curative treatment procedures, or to provide improved means in monitoring of therapeutic response at various stages of disease.

Different immunogen structures were used to develop monoclonal antibodies against different free PSA-forms; (i) affinity-purified PSA from LNCaP cells of
5 which half the protein was recovered in mature single-chain form, and half was recovered in the -5 or -7 zymogen form. The second immunogen structure consisted of a 14 amino acid synthetic peptide including the pro-sequence of PSA and the seven first amino-terminal amino acids (APLILSRIVGGWEC) conjugated to KLH and BSA. Various screening methods were used to identify antibodies,
10 which detect PSA isolated from LNCaP cells with different signal intensity than PSA from seminal plasma.

Characterization of the epitope groups of PSA in a 3-D model structure using antibodies binding to linear peptide sequences showed that the new 5H6 Mab mapped to the peptide sequence aa 225-237 which is very close to the previously
15 characterized epitope of Mab E73. Mabs 4D4 and 5C3 were bound to peptide sequence 136-144. This is a previously unrecognized antigenic epitope on PSA which neighbors the internal cleavage site between Lys145 and Lys146, as well as the catalytically active site in the vicinity of the Mab 4D4 and Mab 5C3 epitopes. Mabs 4D4, 5C3, and 5H6 recognized free PSA and PSA-ACT complex with similar
20 affinity, but did not recognize hK2.

Mabs 4D4 and 5C3 had affinity constants of 2.5×10^9 1/M and 2.7×10^9 1/M respectively for proPSA and intact forms of PSA. They recognized seminal plasma PSA significantly less than proPSA, and the amount of Mabs 4D4, 5C3 bound to fractions that predominantly (95%) contains internally cleaved PSA at Lys145-
25 Lys146 was only 5% compared to the amount of antibody bound to pools which contained only intact PSA.

The invention will be described in more detail by the following experimental section.

Experimental sectionMethods and materials***Reagents and Instrumentation***

Freund's complete and incomplete adjuvants were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Cell culture 96-well plates were obtained from Nunc (Denmark), Roller bottles from Corning (NY) and Celline bioreactors from Integra (Germany). Optimem 1 with Glutamax-1 and HAT supplement (hypoxanthine, aminopterin and thymidine) are products of Life Technologies (Gibco BRL, Scotland). Heat inactivated fetal bovine serum (FBS) was from Hyclone (Logan, UT). Sp 2/0 mouse myeloma cells were obtained from ATCC (Rockville, MD). The synthetic -7 to +7 proPSA peptide was from Dr. Hans Lilja (University of Lund, Malmö, Sweden). The 1234 Delfia Plate fluorometer, Delfia Eu-labelling kit, microtitration plates coated with rabbit anti-mouse IgG, anti-PSA Mab HI17, anti-PSA Mab 2E9 or streptavidin, Delfia Assay buffer, wash solution and enhancement solution were from PerkinElmer Life Sciences (Turku, Finland). HiTrap Protein G affinity column, Superose 12 HR 10/30 FPLC column for gelfiltration, PBE 94 Polybuffer exchanger and Polybuffer 96 for chromatofocusing were from Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden). Amino-terminal sequence analysis were done with an Applied Biosystems model 477A pulsed liquid sequencer connected to an online Applied Biosystems model 120A phenylthiohydantoin amino acid analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Monoclonal antibodies 5A10, 2E9, 2H11, 3C1, 4H5 and 2C1 have previously been characterized. MAbs 66 and 10 were a kind gift of from Dr. O. Nilsson (CanAg Diagnostics, Göteborg, Sweden). MAbs HI17, HI79, HI64 and H50 were obtained from Abbott (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Antibody E73 was a kind gift from Dr. Elisabeth Paus (The Radium Hospital, Oslo, Norway).

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

15

Immunogens.

Three different immunogen structures were used in order to develop antibodies against free forms of PSA. LNCaP PSA had previously been purified with affinity chromatography from spent cell culture medium. About half of the protein was in
5 mature one-chain form of PSA, and half was in the -5 or -7 zymogen form. The second immunogen structure consisted of a 14 amino acid synthetic peptide including the pro-sequence of PSA and the seven first amino acids from the aminoterminal sequence (APLILSRIVGGWEC). This peptide was coupled to KLH and BSA using the Inject Immunogen EDC Conjugation Kit (Pierce, IL). A third
10 immunogen used was a mutated form of hK2, (fXahK2), in which two amino acids from the prosequence were changed. The point mutations in the prosequence render hK2 incapable of autoactivation and cleavage of the prosequence. Second and third immunogen structures were used in immunizations in order to raise anti-proPSA antibodies. The immunizations and fusions with the peptide and hK2 were done
15 essentially as described below for LNCaP PSA.

Immunizations.

Table 1 summarizes the immunizations that were made. Balb/c mice were immunized by intraperitoneal injection with varying amounts of the immunogen emulsified with Freund's complete adjuvant (Sigma). Booster doses were given at
20 3-4 week intervals. The total immunization times varied from 2 to 10 months. A final booster was given three days before the mice were killed. The splenic lymphoid cells were fused with myeloma cells Sp2/0 at a 1:1 ratio as described previously. The fused cells were harvested in cell culture 96-well plates in Optimem containing 20% fetal calf serum and HAT supplement.

25

Fusion	Immunogen	Amount of immunogen (μ g)	Number of boosters	Total immunisation time (months)	Used screening methods	PSA positive cell lines (%)	mAbs further characterised
1	LNCaPPSA	30-60	3	3	1, 4	7	5F12
2	LNCaPPSA	30-60	3	4	1, 4	10	7C4, 5F7
3	LNCaPPSA	60-100	3	4	1, 4	10	
4	LNCaPPSA	60-100	4	7	2, 4	1	
5	LNCaPPSA	60-100	4	7	2, 4	16	4D4, 5C3, 5H6, 7G1
6	LNCaPPSA	30-60	4	8	1, 2, 3, 4	18	
7	LNCaPPSA	60-100	4	8	1, 2, 3, 4	19	
8	LNCaPPSA	30-60	4	10	4		
9-16	Peptide	10-130	2-4	2-4	3, 4	0 - 1	
17-20	FXahK2	35 - 60	3	3	4	0 - 1	

Table 1. Summary of immunizations and results from fusions.

Screening methods.

Several different screening methods were used. Common for all the methods was that they were designed to recognize antibodies, which detect PSA produced by LNCaP cells somewhat differently than PSA obtained from seminal plasma. Four screening methods are presented in Fig. 1a-d. In all the methods hybridoma supernatants were incubated overnight at +4 °C either in microtitration wells coated with rabbit anti-mouse antibody (methods 1, 2 and 4 or in microtitration wells coated with streptavidin and biotinylated synthetic peptide (method 3). After incubation, plates were washed four times. Detection of bound antibody was performed as described in Fig. 1a-d. For signal development, Delfia enhancement solution was used 200 μ l/well. The signals were measured with a 1234 Delfia fluorometer.

Characterisation of antibodies.

Purified proteins. LNCaP PSA was produced and purified as described by Väisänen et al. LNCaP proPSA and mature PSA forms were separated using chromatofocusing, which separates these forms based on their different pI values. The pH gradient was from 8.5 to 6 and buffers used were 0.025M ethanolamine-CH₃COOH

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

17

pH 8.5 and Polybuffer pH 6 (diluted 1:10). Chromatofocusing was done using 30 ml Polybuffer exchanger gel packed into C 10/40 column and ÄKTAexplorer 100 system (Amersham Pharmacia Biotech AB Uppsala, Sweden). The flow rate was 0.3 ml/min and 3.6 ml fractions were collected. Prior to fraction collecting 1/10
5 volume of 2M Tris-HCl pH 8 was added to each fraction tube. Each fraction was measured for PSA concentration using the Prostatus PSA free/total kit (PerkinElmer Life Sciences, Turku, Finland). Fractions containing PSA from one peak area were pooled and subjected to aminoterminal sequencing.

Separate pools of purified seminal plasma PSA were a generous gift from Dr. U-H
10 Stenman. Pools A, B, C, D and E contain different amounts of internally cleaved PSA as described by Zhang et al. . Pools A and B contain only intact PSA. Pools C and D contain intact form of PSA and PSA forms that have been internally cleaved at Arg85-Phe86 and Lys145-Lys146. Pool D contained also a minor part of PSA
15 cleaved between Lys182-Ser183. Pool E contained mostly internally cleaved form Lys145-Lys146. The staining intensities in SDS-PAGE suggested that the amount of intact PSA in pools C, D and E was roughly 20%, 10% and less than 5%, respectively.

HK2 was produced with the baculovirus expression system and purified as described by Lövgren et al. . Preparation and purification of PSA-ACT *in vitro* has
20 been described earlier

Epitope mapping.

Previously characterized MAbs were used in sandwich assays in all possible combinations with the investigated MAbs to determine the binding sites on the PSA molecule.

Peptide mapping.

Synthetic 15 mer peptides overlapping the whole PSA sequence were used for the determination of specific binding sites of antibodies that recognize continuous epitopes. Europium-labeled MAbs were incubated with biotinylated peptides
5 attached to streptavidin plates as described by Piironen et al. .

Specificity and binding to various PSA forms.

Using a suitable partner antibody, the specificity of the new MAbs was determined using PSA, hK2 and PSA-ACT complex. In addition, binding to various PSA forms was determined using pools A, B, C, D and E of PSA purified from seminal plasma
10 as described by Zhang et al. , and using proPSA purified from LNCaP PSA as described by Väisänen et al. .

Affinity of Mabs.

The affinity constants of Eu-labeled MAbs were determined as described previously earlier using 2E9 or H117 as capture antibodies and PSA purified from seminal
15 plasma or purified hK2. The affinities were calculated using the Scatchard method .

Immunoassays.

A two-site immunoassay protocol was developed for the specific determination of free SCINT-PSA. This design used (i) Mab 5C3 that mapped to an epitope containing the peptide sequence aa 136-144 in PSA, which (ii) was combined with a
20 previously characterized free-specific Mab (5A10) which was mapped to an epitope containing peptide sequence aa 84-91. Biotinylated preparations of Mab 5C3 were immobilised to streptavidin coated plates using 200 ng Mab in 200 µL Assay Buffer in a 60 min incubation at room temperature. Following a wash step to remove unbound biotinylated Mab, 50 µL standard or sample was added per well followed
25 by 100 µL Delfia buffer and incubated at room temperature for 60 min under

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

19

continuous shaking. After washing twice, 100 μ L Delfia assay buffer containing 100 ng Eu-labelled Mab 5A10 was added per well and incubated for 60 min at room temperature under continuous shaking. Following a final wash (6x), 200 μ L per well of Delfia Enhancement solution was added. After shaking for 5 min the signal
5 was measured in a 1232 Delfia Plate fluorimeter. The concentrations of the unknown samples were calculated from a standard series (0.05 to 200 μ g/L PSA) of recombinant baculovirus produced proPSA.

Other immunoassays used were: Delfia ProStatus F/T PSA (from Perkin-Elmer, Wallac, Turku, Finland), and an investigational assay for hK2 [Becker *et al. Clin Chem* 2000;46:198-206].
10

Clinical Study population.

The study population consisted of two hundred and ninetyone (291) men, aged 51-66 years, participating in a population based prostate cancer screening study in the area of Gothenburg, Sweden, and initially presenting with a concentration of total
15 PSA > 3 μ g/L [Becker *et al. Urology* 2000; 55:694-699]. Prior to performing DRE, TRUS and a TRUS guided sextant biopsy, additional serum and EDTA plasma samples were obtained. After clotting (serum) and centrifugation performed within 3 hours after venipuncture, the samples were frozen at 70 $^{\circ}$ C. For this study we used the EDTA plasma sample which was thawed immediately before
20 performing the immunoassays. The sextant biopsies revealed prostate cancer in 79 men out of the 291 tested.

Statistical analyses.

Descriptive statistics were given as medians, upper and lower quartiles (25 and 75 percentiles). Mann-Whitney nonparametric tests were performed to test whether
25 there were statistically significant differences ($p < 0.05$) in PSA-T, PSA-F, free SCINT-PSA, PSA-N, hK2, hK2/PSA-F, PSA-F/PSA-T, free SCINT-PSA/PSA-F,

free SCINT-PSA / PSA-T, PSA-N /PSA-T, (free SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T,
(free SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T x hK2, (free SCINT-PSA/PSA-F)/
(PSA-F/PSA-T) between the two groups of patients (cancers and noncancers). This
analysis was performed both on the total patient material as well as for various sub-
5 groups selected on the basis of the PSA-T range.

Results

Immunizations and screenings

Our aim was to find novel antibodies that would recognize various molecular forms
of PSA specifically present in cancer. Antibodies that gave very high positive signal
10 or recognized the tested PSA forms from LNCaP differently compared to PSA from
seminal fluid were produced and characterized further. Table I summarizes
immunizations that were made, number of PSA positive cell lines and MABs that
were further characterized from each fusion. All finally characterized MABs were
from fusions where LNCaP PSA was used as an immunogen. Some cell lines from
15 peptide fusions were positive for the synthetic peptide, but further testing showed,
that antibodies did not recognize the entire PSA molecule. Also, some anti-PSA
positive cell lines were obtained from fXahK2 fusions, but these antibodies could
not distinguish LNCaP PSA from seminal plasma PSA, and were therefore not
characterized further.

20 *Antibody characteristics*

Epitope mapping. Novel MABs were tested with various antibody combinations to
define their binding site on the PSA molecule. Based on the results, a 2-D epitope
map was constructed (Fig. 2). The binding sites of novel anti-PSA MABs are
presented in relation to previously characterized MABs.

25 Different binding regions of 83 anti-PSA monoclonal antibodies have been
described by Paus et al. in the ISOBM study, where binding regions from 1 to 6 are

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

21

mapped in a 2-D and 3-D model. The binding regions of novel anti-PSA antibodies were compared to binding sites of previously characterized MAbs.

5F12 mapped to group I free-PSA specific antibodies that bound to same epitope as previously characterized MAb 5A10 (#25) in the ISOBM study. Interestingly, 5F12 also blocked MAb PSA10 (#72) binding, which belongs to antibody group 3a. 7G1 was bound to an epitope close to H50 (#57) and PSA10 in antibody group 3a. 7G1 was also somewhat inhibited by antibody 2H11 (#41), which belongs to group 5b antibodies. Also 5F7 and 5H6 were bound to an area overlapping with MAbs H50 and PSA10 binding sites. Further, 7C4, 4D4 and 5C3 bound to an area close to the binding site(s) of MAbs H164, H50 and 2H11, which is located near antibody group 5b.

Peptide mapping. Three of seven tested MAbs bound to linear biotinylated 15 mer peptides overlapping the entire PSA sequence (table 1).

4D4 and 5C3 antibodies were both bound to 15 mer peptide sequences 130 ASGWGSIEPEEFLTP 144 and 136 SIEPEEFTLTPKQLQC 149. The common amino acid sequence for these two overlapping 15 mer peptides is sequence 136 SIEPEEFLTP 144. A common internal PSA cleavage site is located between amino acids Lys145 and Lys146 which renders PSA inactive .

5H6 was bound to the C-terminal peptide of PSA (225 YRKWIKDTIVANP 237). Another antibody (E73) has been characterized to bind close to the C-terminal part of PSA molecule (data not shown). MAb E73 was bound to the 15 mer peptide (215 RPSLYTKVVHYRKWI 229) which is partially overlapping to that recognized by 5H6.

Results from peptide binding studies were combined with the data presented by Piironen et al. to create a 3-D epitope map showing seven independent antigenic domains on the PSA moiety (Fig. 3).

Specificity of the Mabs. 5F12 was a free PSA specific antibody. 7C4, 4D4, 5C3, 5F7 and 5H6 recognized free PSA and PSA-ACT complex with similar affinity, but did not recognize hK2. 7G1 recognized free PSA, PSA complexed with ACT, and hK2 with similar affinity.

- 5 *Binding to various PSA forms.* Binding of new MAbs to different PSA forms was tested using sandwich assay formats with different previously characterized capture antibodies and new MAbs as tracers. Binding was studied to mature intact PSA, compared to mature internally cleaved PSA forms, and to proPSA. Significant differences in binding to various PSA isoforms was found only for MAbs 4D4 and
- 10 5C3.

Clones 4D4 and 5C3 recognized seminal plasma PSA with lower signal intensity than proPSA using screening method 4. These antibodies were further tested with different pools of PSA isolated from seminal plasma that contained various amounts of internally cleaved PSA, *i.e.* two- or multi-chain forms. There was only 5 % of

15 antibody (4D4, 5C3) bound to pool E that predominantly ($\approx 95\%$) contains PSA that is internally cleaved between Lys145-Lys146 compared to the amount of antibody (set at 100%) bound to pools A and B, which contained only intact single-chain PSA. Therefore, these antibodies may only recognize PSA forms where there is no internal cleavage at Lys145-Lys146, such as in LNCaP PSA, which was used as an

20 immunogen. Fig. 4a-4c illustrate the reactivity of different antibodies with pools A-E of seminal plasma PSA. Antibodies were tested in sandwich assay format that used HI17 coated plates or streptavidin plates coated with biotinylated 5A10 as capture. Antibodies are designated according to different binding regions illustrated in the ISOBM study.

- 25 *Affinity of Mabs.* Affinity constants of MAbs are listed in table 2. All the characterized MAbs showed high affinity for seminal plasma PSA ($K_a > 1 \times 10^9$ 1/M). 7G1 had very high affinity for both PSA and hK2 ($K_a = 2 \times 10^{10}$ 1/M). 4D4 and 5C3 had affinity constants of 2.5×10^9 1/M and 2.7×10^9 1/M respectively for proPSA and intact PSA forms. In addition, 4D4 and 5C3 were tested for their affinity for

pools of seminal plasma PSA that contain internally cleaved forms (pools C, D and E). The affinity constants of these two MAbs decreased with increasing amounts of internally cleaved PSA forms. Affinity of 4D4 and 5C3 for pool E PSA could not be determined using the Scatchard method due to very low affinity (data not shown).

Antibody	Specificity*	Affinity Mab-Eu 1/M	Binding to peptide sequence
5F12	PSA-F	n.d	negative
5F7	PSA-T	6.4×10^9	negative
7C4	PSA-T	1.8×10^9	negative
4D4	PSA-T	2.5×10^9	135-144
5C3	PSA-T	2.7×10^9	135-144
5H6	PSA-T	4.4×10^9	225-237
7G1	PSA-T+hK2	2×10^{10}	negative

*PSA-F= free PSA, PSA-T= free PSA and PSA-ACT complex

5 Table 2. Summary of antibody characteristics.

SCINT-PSA immunoassay performance

A typical standard curve is shown in Fig. 5. The analytical detection limit (background + 2 SD) was $\leq 0.05 \mu\text{g/L}$ and the standard curve was linear up to the highest standard point used ($50 \mu\text{g/L}$). Within and between assay variation were below 6 and 8 percent respectively over the concentration range from 0.2 to $50 \mu\text{g/L}$.

Measurement of free SCINT-PSA, PSA-F, PSA-T and hK2 in study population sera

The median concentrations (and 25- and 75-percentiles) of the different measured parameters free SCINT-PSA, PSA-F, PSA-T and hK2 as well as combinations of these into various ratios or algorithms are given in Table 1 to 3 for the whole study

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

Parameter	Non-cancers Median (25-75-%iles)	Cancers Median (25-75-%iles)	Mann-Whitney-U p-value
PSA-T	4.01 (3.01,5.71)	5.25 (3.79,11.8)	<0.0001
PSA-F	0.88 (0.57, 1.37)	0.94 (0.58,1.65)	0.435
free SCINT-PSA	0.43 (0.29, 0.59)	0.48 (0.35,0.85)	0.0063
PSA-N (PSA-F - free SCINT-PSA)	0.41 (0.23, 0.81)	0.34 (0.16, 0.61)	0.0271
hK2	0.044 (0.031,0.066)	0.060 (0.033,0.101)	0.0018
hK2/PSA-F	0.052 (0.032,0.077)	0.069 (0.043,0.115)	0.0027
PSA-F/PSA-T	0.20 (0.16,0.28)	0.15 (0.10,0.18)	<0.0001
free SCINT-PSA/PSA-F	0.47 (0.39,0.59)	0.59 (0.48,0.78)	<0.0001
free SCINT-PSA / PSA-T	0.10 (0.076,0.134)	0.084 (0.065,0.115)	0.0055
PSA-N/PSA-T	0.104 (0.067, 0.164)	0.055 (0.024, 0.095)	<0.0001
(free SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T	2.05 (1.33,2.89)	2.80 (2.08,7.06)	<0.0001
(free SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T x hK2	0.094 (0.055,0.167)	0.202 (0.115,0.457)	<0.0001
(free SCINT-PSA/PSA-F) / (PSA-F/PSA-T)	2.31 (1.43,3.51)	4.23 (2.58,6.29)	<0.0001

TABLE 3. Discrimination of cancers (N=197) and non-cancers (N=79) using single or combined parameters without restrictions as to the concentrations of PSA-T. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney-U test. Statistical significance ($p < 0.05$) is shown in bold characters, borderline statistical significance ($p 0.05-0.1$) in italics.

Parameter	Non-cancers Median (25-,75-%iles)	Cancers Median (25-,75-%iles)	Mann-Whitney-U p-value
PSA-T	3.92 (2.98,5.47)	4.07 (3.48,5.28)	0.35
PSA-F	0.83 (0.36, 1.29)	0.66 (0.48,1.02)	<i>0.038</i>
free SCINT-PSA	0.42 (0.28, 0.57)	0.38 (0.28,0.55)	0.023
PSA-N (PSA-F - free SCINT-PSA)	0.39 (0.23, 0.73)	0.27 (0.14, 0.49)	0.0043
hK2/PSA-F	0.043 (0.030,0.064)	0.048 (0.029,0.065)	0.448
PSA-F/PSA-T	0.21 (0.16,0.28)	0.16 (0.14,0.19)	0.024
free SCINT-PSA/PSA-F	0.47 (0.39,0.59)	0.38 (0.45,0.76)	0.0018
PSA-N/PSA-T	0.103 (0.068, 0.167)	0.071 (0.039, 0.107)	0.0002
(free SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T	1.94 (1.29,2.70)	2.36 (1.90,2.96)	0.0035
(free SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T x hK2	0.092 (0.087,0.158)	0.158 (0.087,0.266)	0.0004
(free SCINT-PSA/PSA-F) / (PSA-F/PSA-T)	2.32 (1.42,3.50)	3.42 (2.22,5.58)	<0.0001

TABLE 4. Discrimination of cancers (N=54) and non-cancers (N=187) using single or combined parameters in the PSA-T range below or equal to 10 µg/l. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney-U test. Statistical significance (p < 0.05) is shown in bold characters, borderline statistical significance (p 0.05-0.1) in italics.

Parameter	Non-cancers Median (25-, 75-%iles)	Cancers Median (25-, 75-%iles)	Mann-Whitney-U p-value
PSA-T	3.38 (2.58, 3.99)	3.72 (3.18, 4.12)	0.057
PSA-F	0.65 (0.48, 0.92)	0.58 (0.42, 0.72)	0.063
free SCINT-PSA	0.33 (0.23, 0.45)	0.35 (0.24, 0.42)	0.063
PSA-N (PSA-F - free SCINT-PSA) hK2	0.32 (0.20, 0.52)	0.20 (0.13, 0.35)	0.0055
hK2/PSA-F	0.039 (0.025, 0.051)	0.042 (0.029, 0.060)	0.589
PSA-F/PSA-T	0.20 (0.16, 0.28)	0.16 (0.13, 0.19)	0.086
free SCINT-PSA/PSA-F	0.49 (0.41, 0.60)	0.59 (0.50, 0.73)	< 0.0001
PSA-N/PSA-T	0.10 (0.077, 0.141)	0.094 (0.075, 0.118)	0.0012
(free SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T	0.097 (0.067, 0.159)	0.063 (0.039, 0.095)	0.0001
(free SCINT-PSA/PSA-F) x PSA-T x hK2	1.58 (1.11, 2.12)	2.12 (1.73, 2.59)	< 0.0001
(free SCINT-PSA/PSA-F) / (PSA-F/PSA-T)	0.078 (0.049, 0.146)	0.158 (0.090, 0.248)	0.0023
(free SCINT-PSA/PSA-F) / (PSA-F/PSA-T)	2.40 (1.44, 3.57)	3.71 (2.62, 5.84)	< 0.0001

TABLE 5. Discrimination of cancers (N=38) and non-cancers (N=128) using single or combined parameters in the PSA-T range below or equal to 5 µg/L. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney-U test. Statistical significance (p < 0.05) is shown in bold characters, borderline statistical significance (p 0.05-0.1) in italics.

population, for patients with $\text{PSA-T} \leq 10$ and for $\text{PSA-T} \leq 5$. Statistical analysis between cancers and noncancers were performed using the nonparametric Mann-Whitney U-test.

Statistical analysis of the immunoassay measurements of the whole clinical study material (i.e. no PSA-T restrictions as shown in Table 3), reveals that the levels of both PSA-T ($p < 0.0001$), free SCINT-PSA ($p = 0.0063$) and of hK2 ($p = 0.018$) as well as the single parameter PSA-N ($p = 0.0271$) were significantly different for the cancer compared to the noncancer group whereas PSA-F ($p = 0.435$) could not differentiate between the two groups. All two-parameters ratios, most notably PSA-F/PSA-T, free SCINT-PSA/PSA-F and PSA-N/PSA-T (all $p < 0.0001$), discriminated well between the two groups. The proportion (medians) of free SCINT-PSA relative to PSA-F was 47 percent in noncancers compared to 59 percent in cancers ($p < 0.0001$). The three- or four-parameter algorithms also separated cancers and noncancers with high statistical significance.

In the PSA-T range $\leq 10 \mu\text{g/L}$ (Table 4) of the single parameters only free SCINT-PSA and PSA-N discriminated between cancers and noncancers. Especially noteworthy is the fact that median concentrations of PSA-N was $0.39 \mu\text{g/L}$ in noncancers and $0.27 \mu\text{g/L}$ in cancers ($p = 0.0043$). Of the two-parameter ratios, PSA-F/PSA-T ($p = 0.0002$), PSA-N/PSA-T ($p = 0.0002$), free SCINT-PSA/PSA-F ($p = 0.0018$) discriminated well between the two clinical groups as did all the three- and four parameter algorithms. The proportion (medians) of free SCINT-PSA relative to PSA-F was 47 percent in noncancers compared to 58 percent in cancers ($p = 0.0018$).

In the PSA-T range $\leq 5 \mu\text{g/L}$ (Table 5) of the single parameters only PSA-N discriminated between cancers and noncancers. Median concentrations of PSA-N was $0.32 \mu\text{g/L}$ in noncancers and $0.20 \mu\text{g/L}$ in cancers ($p = 0.0055$). Of the two-parameter ratios, PSA-F/PSA-T ($p < 0.0001$), PSA-N/PSA-T ($p = 0.0001$), free SCINT-PSA/PSA-F ($p = 0.0012$) discriminated well between the two clinical groups as did all the three- and four parameter algorithms. Also in this PSA-T range the

proportion (medians) of free SCINT-PSA relative to PSA-F was very similar to that of the whole study material i.e. 49 percent in noncancers compared to 59 percent in cancers.

Discussion and conclusions

5 One objective of the present study was to produce anti-PSA antibodies against PSA forms produced by metastatic cancer cell line, LNCaP, and to compare these antibodies to a large set of previously characterized antibodies obtained from immunizations with seminal plasma PSA. We wanted to obtain novel anti-PSA antibodies against different isoforms of free PSA in order to develop specific
10 immunoassays for their detection. One aim was to develop anti-proPSA antibodies. In addition to immunizations using LNCaP PSA as an immunogen, a synthetic peptide consisting of amino acids -7 to +7 was conjugated to carrier protein and used in immunizations. Also a mutated form of hK2, fXahK2, was used in immunizations. This form contains a mutated propeptide that prevents the
15 autoactivation of the zymogen-protein which results from the loss of the propeptid. Since hK2 and PSA have 79% amino acid identity, anti-PSA specific antibodies were expected to be generated from fXahK2 fusions.

About 50 percent of the purified LNCaP PSA consisted of single-chain mature form and to about 50 percent of zymogen form. Eight LNCaP PSA fusions generated
20 more than thousand wells that were positive for PSA. 125 cell lines were selected, grown and tested with several different methods. Most of the antibody characteristics were very similar to the previously characterized anti-PSA antibodies. However, three novel antibodies with previously unknown epitope characteristics were obtained. Two novel antibodies (4D4 and 5C3) were bound to
25 an epitope adjacent to the most common internal peptide cleavage site in PSA (Lys₁₄₅-Lys₁₄₆) and one antibody (5H6) was bound to the C-terminal peptide of the protein. Synthetic peptide fusions and fXahK2 fusions did not produce any novel anti-PSA antibodies.

4D4 and 5C3 bound to linear peptide sequence adjacent to Lys145-Lys146 cleavage site. These antibodies were very similar in their PSA isoform specificity and affinity even though they were from different clones. They did not recognize hK2. 4D4 and 5C3 inhibited the activity of PSA towards chromogenic peptide substrate (data not shown), which was expected since the catalytically active site of PSA has been mapped next to the internal cleavage site Lys145-Lys146 (Fig. 3). When these antibodies were tested with seminal plasma PSA pools that contained different amounts of internally cleaved PSA forms, it could be seen that these antibodies did not recognize PSA that was internally cleaved between Lys145 and Lys146. Internal cleavage of PSA at Lys145-Lys146 site results in the loss of enzymatic activity. Thus, 4D4 and 5C3 do not recognize PSA that is inactive due to internal cleavage at Lys145-Lys146.

5H6, another novel antibody was bound to the C-terminal peptide of lasts 15 amino acids on the PSA molecule. This peptide is helical in native form and is located on the surface of the molecule. Amino acid 234 in PSA molecule is valine, but in hK2 it is alanine. Due to this difference in one amino acid, this antibody does not recognize hK2. Another antibody, E73 from Dr. E. Paus was also mapped to the C-terminal part of PSA, but the peptide sequence is only partly overlapping with the 5H6 binding site.

An immunoassay was constructed that used 5H6 as a tracer antibody. The idea of this assay was to study changes in the C-terminal part of PSA. Since 5H6 binds to the C-terminal peptide of PSA, it was thought that cleavage of amino acids at C-terminus might result in decrease of 5H6 binding to PSA. Väisänen et al. reported that mature LNCaP PSA grown with serum is inactive for unknown reason. Also Corey et al. reported similar results, showing that part of the inactive fraction of PSA could be activated with trypsin, but part remained in inactive form. Cleavage of amino acids at the C-terminus of PSA could change the conformation of the protein and possible render PSA inactive. LNCaP PSA forms from spent cell culture medium of LNCaP cells grown with serum or without serum were separated after

affinity purification using chromatofocusing into proform and mature form of the protein. Different LNCaP PSA forms were tested with an immunoassay that used H117 as capture antibody and 5H6 as tracer antibody. We wanted to see whether these different LNCaP PSA forms differ in their C-terminal amino acid sequence.

5 Immunoassay with 5H6 did not shown difference between these different PSA forms (data not shown).

Elevated serum PSA concentration may result from various urological problems other than prostate cancer and thus PSA is not cancer specific. However, the proportion of PSA-F to PSA-ACT complex in serum has been shown to be significantly higher in BPH than in prostate cancer [Stenman *et al. Cancer Res* 1991; 51:222-226, Christensson *et al. J Urol* 1993;150:100-5]. The mechanisms that result into the increased fraction of serum free PSA in BPH are not known. Björk *et al. [Björk et al. Urology* 1994;43:427-34] reported lack of ACT production in PSA-containing BPH nodules in contrast to cancerous tissues, where production of both PSA and ACT could be detected. This could lead to more PSA-ACT complex formation in cancer, and thus explain the difference in the amount of free PSA in BPH and prostate cancer. However, Jung *et al. [Jung et al. Clin Chem* 2000;46:47-54] demonstrated, that the amounts of different forms of PSA in prostatic tissue do not correlate with amounts or ratios of different PSA forms in serum. Thus, the isoform patterns seen in serum might not be a simple reflection of PSA isoform patterns in tissue. Instead, release of different proportions of enzymatically active or inactive forms of free PSA from neoplastic and benign cells might result in the difference of free-to-total PSA ratio in PCa and BPH.

There have been controversial reports about the nature of free PSA in serum. Zymogen form of PSA starting at amino acid -4 in serum of prostate cancer patients was reported by Mikolajczyk *et al. [Mikolajczyk et al. Urology* 1997;50:710-4]. LNCaP cells have been shown to produce proforms of PSA starting at amino acid -7 or -5. These proforms have high isoelectric pI values that according to Väisänen *et al.* disappeared after incubation with hK2. These high pI points have also been

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

31

found in serum of patients with advanced prostate cancer, but not with patients with BPH [Huber et al. *Prostate* 1995;27:212-9] Noldus et al. [Noldus et al. *J Urol* 1997;158:1606-9] however, did not detect any zymogen forms in high-grade prostate cancer patient's sera. Their purification methods did not exclude hK2,
5 which could possibly cleave proPSA into the mature form during purification steps.

Answers to the different forms of free PSA could add new discriminatory information to the diagnostics of prostate cancer. An anti-proPSA antibody would enable specific and sensitive measurement of the zymogen forms of the protein. Despite the high immunogenic nature of the LNCaP PSA, we could not find
10 antibodies specific or even with a stronger preference for the zymogen form of PSA.

There could be many reasons for not obtaining anti-proPSA antibodies. It has been shown that the PSA prosequence of mouse kallikreins is similar to kallikrein prosequences in human [Fukushima et al. *Biochemistry* 1985;24:8037-43]. This
15 could mean, that the propeptide is not immunogenic in mice. Also, due to the homology, mouse kallikreins might be able to conceivably cleave the human proPSA to mature PSA, resulting in the loss of prosequence. Additionally, the orientation of the prosequence in the PSA molecule is not known and it could be partly buried.

20 Characterization of various forms of free PSA from seminal plasma and prostate tissue has been one approach in understanding different molecular forms of free PSA and their relevance in different prostatic diseases. One explanation for the inactive free PSA forms are internally cleaved forms of PSA. Seminal plasma PSA has been shown to contain ~30% internally cleaved PSA, where the most common
25 internal cleavage site is at Lys145-Lys146 [Christensson et al. *Eur J Biochem* 1990;194:755-63] Noldus et al [Noldus et al. *J Urol* 1997;158:1606-9] detected this internally cleaved PSA form in high-grade prostate cancer patient's sera. Charrier et al. [Charrier et al. *Electrophoresis* 1999;20:1075-81] used two-dimensional electrophoresis in comparing pattern of PSA forms in BPH and PCa

sera. They demonstrated that BPH sera contain more cleaved forms of free PSA than PCa sera. Internal cleavage sites have also been identified between Arg85-Phe86 and Lys182-Ser183 [Zhang et al. *Clin Chem* 1995;41:1567-73, Watt et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3166-70]. A recently characterized novel form of PSA, "B-PSA", that was isolated from benign transition zone tissue of BPH patients contains the internal cleavage site at Lys182-Ser183 [Mikolajczyk et al. *Urology* 2000;55:41-5] In BPH nodule fluids Chen et al. [Chen et al. *J Urol* 1997;157:2166-70] reported PSA forms with internal cleavage sites at His54-Ser55, Phe57-His58, Lys145-Lys146 and Lys146-Leu147. It is not known, whether cleavages at these other sites except Lys145-Lys146 inactivate PSA.

Zhang et al. [Zhang et al. *Clin Chem* 1995;41:1567-73] reported an inactive mature unclipped form of PSA in seminal fluid that could not form complex with ACT. This intact, inactive PSA has been found also in serum [Mikolajczyk et al. *Urology* 1997;50:710-4, Noldus et al. *J Urol* 1997:158-1606-9, Qian et al. *Clin Chem* 1997;43:352-9] and in spent medium of LNCaP cells [Väisänen et al. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 1999;6:1-7, Corey et al. *Prostate* 1998;35:135-43]. At present there is no explanation for this inactive form of PSA.

There are separate antigenic areas on the PSA molecule (Fig. 3). The presence of these areas might lower the possibility of obtaining antibodies against less immunogenic areas. In this study, however, antibodies against two new previously unrecognized epitopes were found

Employing the novel and unique high affinity 5C3 or 4D4 Mabs described we were able to construct a simple and highly sensitive assay for free SCINT-PSA. These were used primarily as the detector antibodies with the free-PSA specific capture Mab 5A10. Since the two tracer Mabs in our hands behaved similarly we continued with only one of them, Mab 5C3. As evident from the epitope map (Fig. 2) Mabs 5C3 and 4D4 can easily be combined with other total PSA specific antibodies thus providing assays for complexed and free forms of SCINT-PSA.

Since free SCINT PSA by our definition constitute a subfraction of PSA-F, we could easily obtain the free nicked PSA (PSA-N) concentration by subtracting the free SCINT PSA level from that measured by a free PSA assay. This calculated parameter was shown to be a valuable parameter especially in forming the ratio
5 PSA-N/PSA-T (or vice versa) to discriminate cancers from noncancers. It is evident from the 2-D epitope map (Fig. 2) that a direct measurement of nicked PSA can be constructed by using a preblocking step e.g. by Mab 5C3 and/or 4D4 whereby intact PSA, i.e. SCINT PSA is prevented, i.e. blocked, from further participation in the immunodetection. Of the selected sandwiching pair of
10 antibodies one antibody (e.g. 2C1) would be on the basis that it recognizes an epitope overlapping the 5C3 and 4D4 specific epitope, and the other any other PSA antibody capable of good sandwich formation.

As seen from analyzing the clinical samples, a screening cohort, both free SCINT-PSA and PSA-N were both able alone or in a number of different combinations to
15 discriminate in a highly significant manner between cancers and noncancers both for the whole cohort but also in the diagnostically difficult so called gray zone area of low ($\leq 5 \mu\text{g/L}$) or intermediate ($\leq 10 \mu\text{g/L}$) concentrations of PSA-T.

The combination of free SCINT-PSA and PSA-N with measurement of other forms of PSA or hK2 can naturally also be accomplished in other ways than forming ratios
20 or other mathematical algorithms but also through combination by logistic regression. Combinations by logistic regression frequently provide even better discrimination than ratios calculated from the individual measurements from each patient. As combination through logistic regression, unlike the combination obtained through formation of ratios, does not provide a continuous variable, cut-off
25 limits are not possible to define in these cases. Logistic regression analysis is instrumental in providing the basis for various "risk analysis systems that can provide medical decision support". Other examples of such data handling systems are also: artificial neural networks (ANN), neuro fuzzy networks (NFN), multilayer perceptron (MLP), learning vector quantization (LVQ) [Freeman JA et al., In:

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

34

Neural Networks: Algorithms, Applications and Programming Techniques,
Addison-Wesley Publishing Company 1991 ; Zadeh LA Information and
Control, 1965, 8:338-353 ; Zadeh LA , IEEE Trans. on Systems, Man and
Cybernetics 1973, 3:28-44 ; Gersho A et al., In: Vector Quantization and Signal
5 Compression, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London 1992;
Hassoun M.H., Fundamentals of Artificial Neural Networks, The MIT Press,
Cambridge, Massachusetts, London 1995]

CLAIMS

1. An antibody, wherein said antibody does bind with high affinity to human single-chain intact, i.e. not internally cleaved, mature and/or zymogen forms of prostate specific antigen (SCINT PSA), **characterized** in that said antibody,
5 obtainable through immunization with an uncleaved form of PSA and selected by its differential reactivity with the intact and internally cleaved forms, does not bind to a nicked PSA (PSA-N), wherein said PSA-N has been formed by internal peptide bond cleavage(s) of SCINT PSA resulting in two-chain or multi-chain PSA.
2. An antibody according to claim 1, **characterized** in that cleavage of PSA-N
10 has occurred between amino acids lysine 145 and lysine 146 of prostate specific antigen (PSA).
3. An immunoassay for quantitative determination in a sample of a human single-chain intact, i.e. not internally cleaved, mature and/or zymogen forms of prostate specific antigen (SCINT PSA), or alternatively nicked PSA forms
15 (PSA-N), wherein said PSA-N has been formed by internal cleavage(s) of SCINT PSA resulting in two-chain or multi-chain prostate specific antigen (PSA) forms, which SCINT PSA or PSA-N may occur both free and/or complexed and said immunoassay is **characterized** in that an antibody is used, wherein said antibody does bind with high affinity to said SCINT PSA, but does not bind to said PSA-N.
- 20 4. An immunoassay according to claim 3, **characterized** in that cleavage of PSA-N has occurred between amino acids lysine 145 and lysine 146 of PSA.
5. An immunoassay according to claim 3 for determining PSA-N, **characterized** in that
 - a) said antibody, i.e. a first antibody, does bind with high affinity to SCINT
25 PSA present in the sample; and

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

36

b) an additional antibody, i.e. a second antibody; wherein said second antibody does bind with high affinity to mature and/or zymogen forms of human prostate specific antigen (PSA) and does also bind to PSA-N, but is unable to bind to PSA already bound to said first antibody; whereby second antibody is bound only to PSA forms not blocked by the first antibody, i.e. PSA-N;

enabling the determination of PSA-N, which has been formed by internal cleavage(s) resulting in two-chain or multi-chain of PSA forms.

6. An immunoassay according to claim 3 for determining PSA-N, **characterized** in that

a) said antibody, i.e. a first antibody, does bind with high affinity to SCINT PSA present in the sample; and

b) an additional antibody, i.e. a second antibody; wherein said second antibody does bind with high affinity to mature and/or zymogen forms of human prostate specific antigen (PSA) and does also bind to PSA-N, but is unable to bind to PSA already bound to said first antibody; whereby the second antibody is bound only to PSA forms not blocked by the first antibody, i.e. PSA-N;

enabling the determination of a PSA-N, which has been formed by internal cleavage(s) resulting in two-chain or multi-chain of PSA forms, wherein cleavage of PSA-N has occurred between amino acids lysine 145 and lysine 146 of PSA.

7. An immunoassay according to claims 3 or 4 for determining SCINT PSA, **characterized** in that said immunoassay is a sandwich immunoassay additionally involving the use of an antibody specific for free, i.e. noncomplexed, prostate specific antigen (PSA-F) to enable specific determination of free, i.e. noncomplexed, SCINT PSA.

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

37

8. A method for differentiating
- i) patients with cancer of the prostate (PCa) from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and/or healthy male subjects without PCa,
 - ii) patients with aggressive PCa from patients with indolent PCa and/or
- 5 iii) patients with clinically localized and/or organ confined PCa from patients with extraprostatic extension of PCa and/or PCa with metastatic spread to lymph nodes or bone marrow
- characterized** in that the method comprises the following steps
- a) human single-chain intact, i.e. not internally cleaved, prostate specific antigen (SCINT PSA) free and/or complexed is determined,
- 10 b) a marker value, which is a function of determined SCINT PSA is established, and
- c) the established marker value is used for differentiation of said patients.
- 15 9. A method according to claim 8, **characterized** in that step a) comprises determining SCINT PSA according to claim 3 or 4.
10. A method according to claim 8, **characterized** in that step a) comprises determining free, i.e. noncomplexed, SCINT PSA according to claim 7.
11. A method for differentiating
- 20 i) patients with cancer of the prostate (PCa) from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and/or healthy male subjects without PCa,
 - ii) patients with aggressive PCa from patients with indolent PCa and/or
 - iii) patients with clinically localized and/or organ confined PCa from patients with extraprostatic extension of PCa and/or PCa with metastatic
- 25 spread to lymph nodes or bone marrow

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

38

characterized in that the method comprises the following steps

- a) nicked PSA (PSA-N) free and/or complexed is determined,
- b) a marker value, which is a function of determined PSA-N is established, and
- 5 c) the established marker value is used for differentiation of said patients.

12. A method according to claim 11, **characterized** in that step a) comprises determining PSA-N according to claim 5 or 6.

13. A method according to of claims 8 to 12, **characterized** in that the function of
10 said marker value is also a function of other forms of PSA and/or human glandular kallikrein 2 (hK2).

14. A method according to claim 13, **characterized** in that said other forms of PSA and/or hK2 are selected from the group consisting of
15 total PSA (PSA-T),
noncomplexed, i.e. free, PSA (PSA-F),
nicked PSA (PSA-N) and
human glandular kallikrein 2 (hK2).

15. A method according to claims 13 or 14, **characterized** in that said function for
20 establishing the marker value is a concentration as such; ratios, products and combinations of a concentration or concentrations; combinations of various parameters using logistic regression; or combinations of various parameters using artificial intelligence, such as neural networks.

SUMMARY

This invention concerns an antibody wherein said antibody does bind with high affinity to human single-chain intact, i.e. not internally cleaved, mature and/or zymogen forms of prostate specific antigen (SCINT PSA). The antibody, obtainable
5 through immunization with an uncleaved form of PSA and selected by its differential reactivity with the intact and internally cleaved forms, does not bind to a nicked PSA (PSA-N), wherein said PSA-N has been formed by internal peptide bond cleavage(s) of SCINT PSA resulting in two-chain or multi-chain PSA. This invention further concerns an immunoassay and a method for differentiating
10 patients with cancer of the prostate (PCa) from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and/or healthy male subjects without PCa, patients with aggressive PCa from patients with indolent PCa and/or patients with clinically localized and/or organ confined PCa from patients with extraprostatic extension of PCa and/or PCa with metastatic spread to lymph nodes or bone marrow using said
15 antibody.

1/10

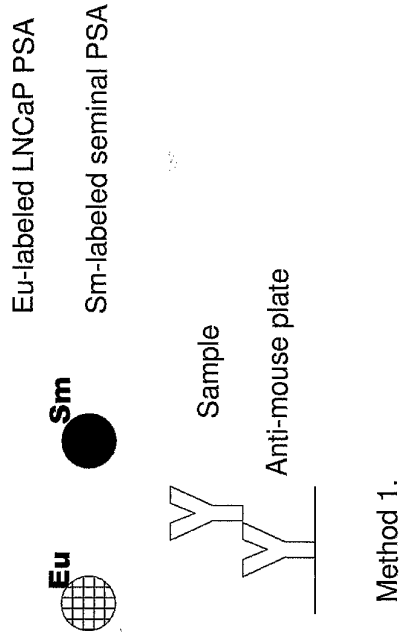
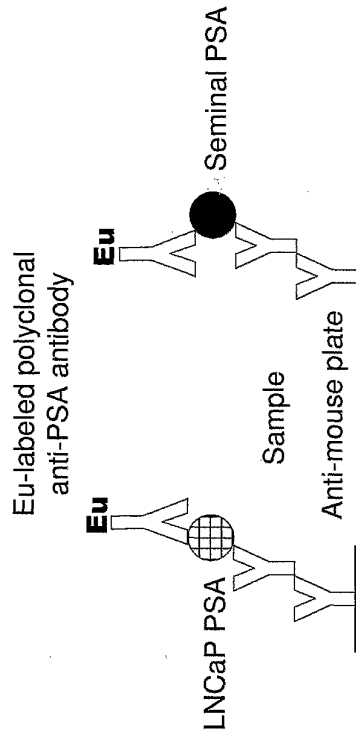


Fig. 1a



Method 2.

Fig. 1b

3/10

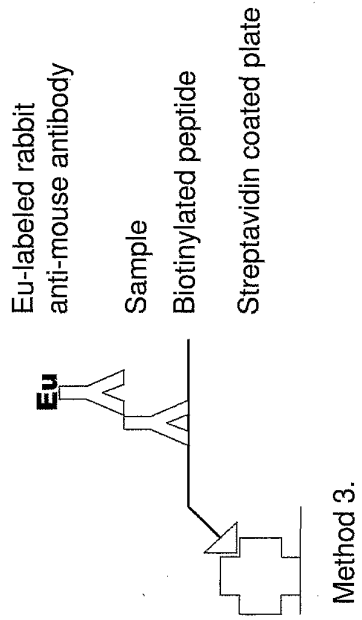
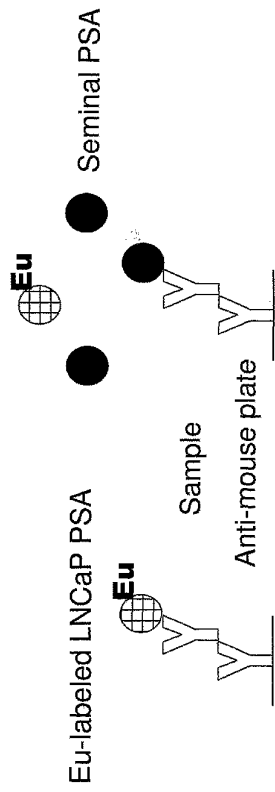


Fig. 1c

4/10



Method 4.

Fig. 1d

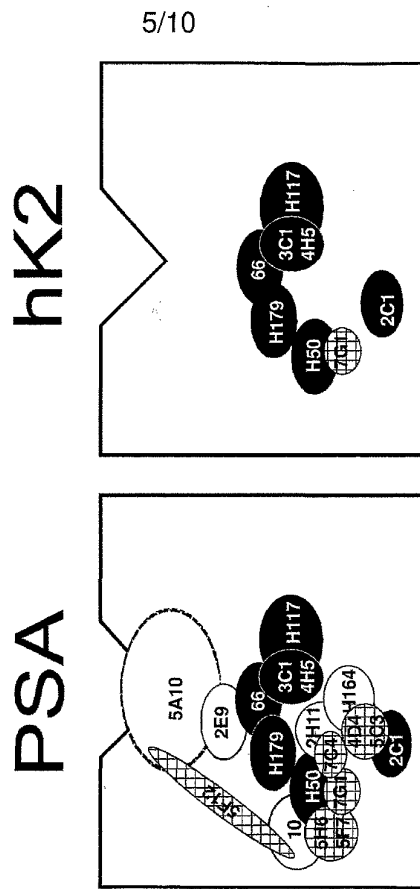


Fig. 2

6/10

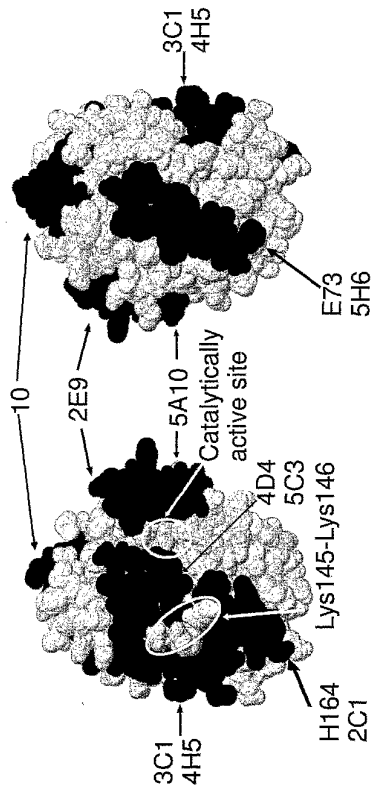


Fig. 3

7/10

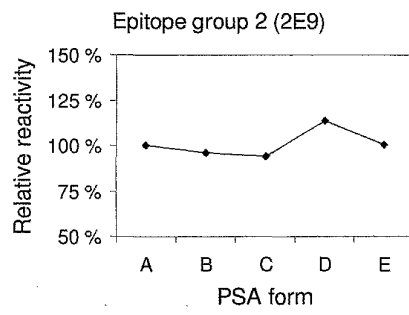
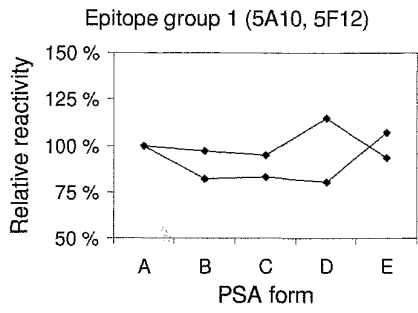


Fig. 4a

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

8/10

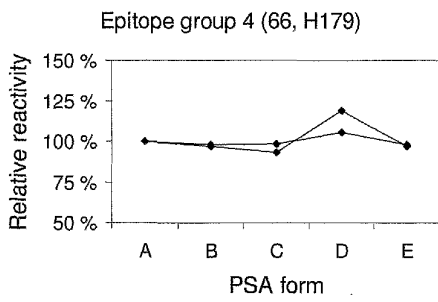
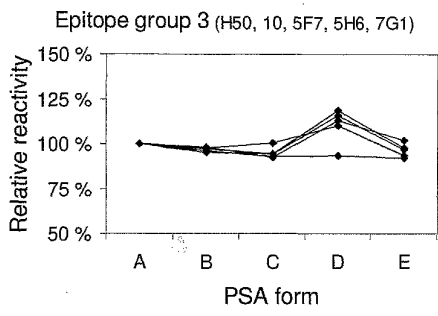


Fig. 4b

9/10

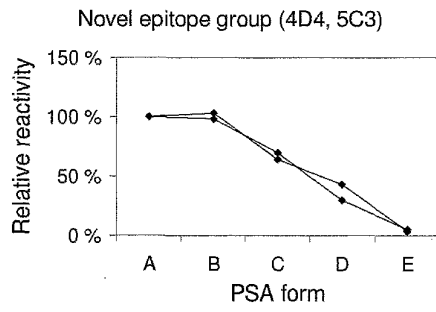
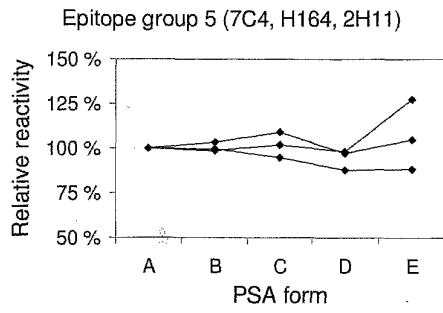


Fig. 4c

WO 02/27323

PCT/FI01/00834

10/10

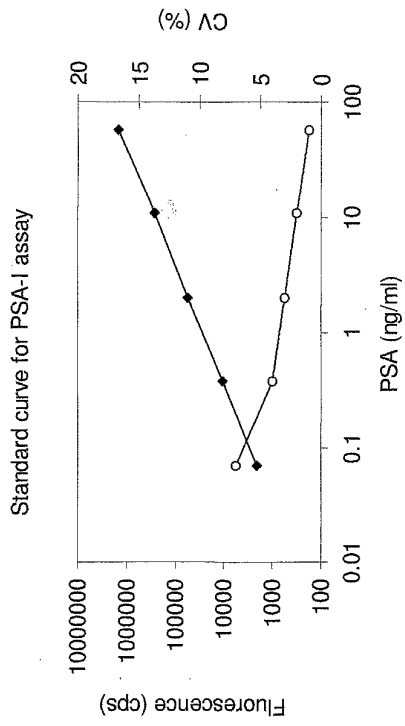


Fig. 5

【手続補正書】

【提出日】平成14年12月11日(2002.12.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトの1本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、成熟型および/またはチモーゲン型の前立腺特異抗原(SCINT PSA)と高い親和性で結合する抗体であって、非開裂型のPSAでの免疫感作により得られ、そして完全な形態のものと内部で開裂した形態のものとの特異な反応性によって選択され、ニックの入ったPSA(PSA-N)と結合しない抗体(該PSA-Nは、SCINT PSAの内部でペプチド結合開裂して2本鎖または多重鎖のPSAとなることにより形成される)であることを特徴とする抗体。

【請求項2】

PSA-Nの開裂が前立腺特異抗原(PSA)のアミノ酸リジン145とリジン146とのあいだで生じたものであることを特徴とする請求項1記載の抗体。

【請求項3】

ヒトの1本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、成熟型および/またはチモーゲン型のヒト前立腺特異抗原(SCINT PSA)、またはニックの入ったPSA形態(PSA-N)(該PSA-Nは、SCINT PSAの内部でペプチド結合開裂して2本鎖または多重鎖の前立腺特異抗原(PSA)形態となることにより形成されており、そして該SCINT PSAまたはPSA-Nは遊離型および/または複合体型で生じ得る)のサンプル中での量的決定のためのイムノアッセイであって、該SCINT PSAに高親和性で結合するが、該PSA-Nとは結合しない抗体が使用されることを特徴とするイムノアッセイ。

【請求項4】

PSA-Nの開裂がPSAのアミノ酸リジン145とリジン146とのあいだで生じたものであることを特徴とする請求項3記載のイムノアッセイ。

【請求項5】

PSA-Nを決定するイムノアッセイであって、

a) 前記抗体、すなわち第1抗体は、サンプル中に存在するSCINT PSAと高親和性で結合し、そして

b) 追加の抗体、すなわち、第2抗体(該第2抗体は成熟型および/またはチモーゲン型のヒト前立腺特異抗体(PSA)と結合し、そしてPSN-Nとも結合するが、該第1抗体にすでに結合しているPSAには結合できず、その結果、該第2抗体は、第1抗体によって遮断されていないPSA形態、すなわちPSA-Nにのみ結合する)；

を特徴とし、

内部で開裂して2本鎖または多重鎖のPSA形態となることにより形成されたPSA-Nの決定を可能にする請求項3記載のイムノアッセイ。

【請求項6】

PSA-Nを決定するイムノアッセイであって、

a) 前記抗体、すなわち第1抗体は、サンプル中に存在するSCINT PSAと高親和性で結合し、そして

b) 追加の抗体、すなわち、第2抗体(該第2抗体は成熟型および/またはチモーゲン型のヒト前立腺特異抗体(PSA)と高い親和性で結合し、またPSA-Nにも結合するが、該第1抗体に既に結合しているPSAには結合できず、その結果、該第2抗体は、第1抗体によって遮断されていないPSA形態、すなわちPSA-Nにのみ結合する)；

を特徴とし、

内部で開裂して2本鎖または多重鎖のPSA形態となることにより形成されたPSA-N (PSA-Nの開裂はPSAのリジン145とリジン146のあいだで起こったものである)の決定を可能にする請求項3記載のイムノアッセイ。

【請求項7】

SCINT PSAを決定するイムノアッセイであって、遊離のすなわち複合体を形成していないSCINT PSAの決定を可能にするために、遊離のすなわち複合体を形成していない前立腺特異抗原(PSA-F)に対して特異的な抗体の使用を追加的に含むサンドイッチイムノアッセイであることを特徴とする請求項3または4記載のイムノアッセイ。

【請求項8】

i) 良性前立腺過形成(BPH)患者および/または前立腺癌(PCa)でない健康な男性被験者から前立腺癌(PCa)患者を、

ii) 無痛性PCa患者から攻撃性PCa患者を、および/または

iii) PCaの前立腺外延長患者および/またはリンパ節もしくは骨髄への転移進展を有する患者から臨床的に局在化されおよび/または場所的に限られたPCaの患者を、識別するために有用なマーカーを取得する方法であって、

a) ヒトの1本鎖で、完全な、すなわち内部で開裂していない、遊離のおよび/または複合体を形成している前立腺特異抗原(SCINT PSA)を決定し、そして

b) 決定されたSCINT PSAの関数であるマーカー値を確立する

工程からなることを特徴とする方法。

【請求項9】

工程a)が請求項3または4にしたがってSCINT PSAを決定することからなることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項10】

工程a)が請求項7にしたがって遊離の、すなわち複合体を形成していないSCINT PSAを決定することからなることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項11】

i) 良性前立腺過形成(BPH)患者および/または前立腺癌(PCa)でない健康な男性被験者からPCa患者を、

ii) 無痛性PCa患者から攻撃性PCa患者を、および/または

iii) PCaの前立腺外延長患者および/またはリンパ節もしくは骨髄への転移進展を有する患者から臨床的に局在化されおよび/または場所的に限られたPCa患者を、識別するために有用なマーカーを取得する方法であって、

a) 遊離および/または複合体を形成したニックの入ったPSA(PSA-N)を決定し、そして

b) 決定されたPSA-Nの関数であるマーカー値を確立する

工程からなることを特徴とする方法。

【請求項12】

工程a)が請求項5または6にしたがってPSA-Nを決定することからなることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】

前記マーカー値の関数が他の形態のPSAおよび/またはヒト腺カリクレイン2(hK2)の関数でもあることを特徴とする請求項8、9、10、11または12記載の方法。

【請求項14】

前記他の形態のPSAおよび/またはhK2が、

総PSA(PSA-T)、

非複合体型、すなわち遊離のPSA(PSA-F)、

ニックの入ったPSA(PSA-N)および

ヒト腺カリクレイン2(hK2)

からなる群から選択されることを特徴とする請求項13記載の方法。

【請求項 15】

マーカー値を確立するための前記関数が、濃度それ自体；濃度の比率、積および組合せ；ロジスティック回帰を用いる様々なパラメーターの組合せ；または、ニューロネットワークのような人工知能を使用する様々なパラメーターの組合せであることを特徴とする請求項 13 または 14 記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 01/00834
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G01N 33/574, G01N 33/573, C07K 16/40, C12N 9/64 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: G01N, C12N, C07K, C12Q, A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI DATA, EPO-INTERNAL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EUR.J. BIOCHEM., Volume 267, 2000, Tang J. Wang et al. "Benign prostatic hyperplasia-associated prostate-specific antigen (BPSA) shows unique immunoreactivity with anti-PSA monoclonal antibodies", page 4040 - page 4045, see page 4044, column 1, line 8 - column 2, line 46, abstract --	1-15
P,X	WO 0066718 A1 (HYBRITECH INCORPORATED ET AL), 9 November 2000 (09.11.00), abstract --	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 January 2002		05-03-2002
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 666 02 86		Authorized officer Lars Wallentin/ELY Telephone No. + 46 8 782 25 00

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI 01/00834
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Clinical Chemistry, Volume 46, No 10, October 2000, Pauliina Nurmi et al, "Production and Characterization of Novel Anti-Prostate-specific Antigen (PSA) Monoclonal Antibodies That Do Not Detect Internally Cleaved Lys145-Lys146 Inactive PSA" page 1610 - page 1618 --	1-15
A	US 5858685 A (THOMAS A. STAMEY ET AL), 12 January 1999 (12.01.99), column 4, line 6 - line 8, abstract --	1-15
A	WO 9849323 A1 (HYBRITECH INCORPORATED), 5 November 1998 (05.11.98), abstract -- -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No. 27/12/02 PCT/FI 01/00834			
Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date	
WO	0066718	A1	09/11/00	AU	4218700 A	17/11/00	
US	5858685	A	12/01/99	AU	6570998 A	20/10/98	
				WO	9843084 A	01/10/98	
WO	9849323	A1	05/11/98	AU	739546 B	18/10/01	
				AU	7166898 A	24/11/98	
				EP	0981629 A	01/03/00	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ベッテルソン、キム
フィンランド共和国、フィン - 20810 ツルク、チーレンテキエンカツ 14 エー 20

(72)発明者 リーヤ、ハンス
ドイツ連邦共和国、20148 ハンブルク、ミッテルヴェーク 30

(72)発明者 レブグレン、チモ
フィンランド共和国、フィン - 20100 ツルク、イリオピストンカツ 2 ホー 155

(72)発明者 ニエメレ、パウリーナ
フィンランド共和国、フィン - 20720 ツルク、ルオラブオレンカツ 46 アー 21

Fターム(参考) 4H045 AA11 CA40 DA76 EA51

专利名称(译)	新型抗体，免疫测定和检测前列腺癌的方法		
公开(公告)号	JP2004509934A	公开(公告)日	2004-04-02
申请号	JP2002530851	申请日	2001-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	北极合作伙伴Osake唯嘉动埃沃LARG		
申请(专利权)人(译)	北极合作伙伴Osakeyuichia动埃沃LARG		
[标]发明人	ペッテルソンキム リーヤハンス レブグレンチモ ニエメレパウリーナ		
发明人	ペッテルソン、キム リーヤ、ハンス レブグレン、チモ ニエメレ、パウリーナ		
IPC分类号	G01N33/531 C07K16/18 C07K16/40 C12N9/64 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	C12N9/6445 C07K16/40 G01N33/57434		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/531.A G01N33/543.515.D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51		
代理人(译)	秋山文雄 田中 弘		
优先权	2000002127 2000-09-27 FI		
其他公开文献	JP5254517B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及以高亲和力结合人单链完整，即不内切割，成熟和/或酶原形式的前列腺特异性抗原 (SCINT PSA) 的抗体。抗体不结合切口的PSA (PSA-N) ，其中所述PSA-N通过SCINT PSA的内部肽键裂解形成，导致双链或多链PSA。本发明还涉及用于从患有良性前列腺增生 (BPH) 的患者和/或没有PCa的健康男性受试者中区分患有前列腺癌 (PCa) 的患者的免疫测定和方法，具有惰性PCa的患者的侵略性PCa患者和/或来自患有PCa和/或PCa的前列腺外延伸的患者的临床定位和/或器官限制性PCa的患者，其使用所述抗体转移性扩散到淋巴结或骨髓。

		特表2004-509 (P2004-509) (43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)	
(51) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード (参考) 4H045	
C07K 16/18 G01N 33/531 G01N 33/543 G01N 33/574	C07K 16/18 G01N 33/531 G01N 33/543 G01N 33/574	A 515D A	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 84)			
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2002-530851 (P2002-530851) 平成13年9月26日 (2001. 9. 26) 平成15年3月24日 (2003. 3. 24) PCT/FI2001/000834 W02002/027323 平成14年4月4日 (2002. 4. 4) 20002127 平成12年9月27日 (2000. 9. 27) フィンランド (FI)	(71) 出願人 アークティク パートナース オサケニ チア アクティエボラウグ フィンランド国、エフイーエンサー-201 O トゥルク、イリオピストンカツ ホー 155 (74) 代理人 弁理士 朝日奈 宗太 100065226 (74) 代理人 弁理士 佐木 啓二 100117112 (74) 代理人 弁理士 秋山 文男 100117123 (74) 代理人 弁理士 田中 弘	最終頁に続く