



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I698639 B

(45) 公告日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 11 日

(21) 申請案號：105109602

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 25 日

(51) Int. Cl. : **G01N33/53 (2006.01)****G01N33/574 (2006.01)****G01N33/88 (2006.01)**

(30) 優先權：2015/03/27 美國

62/139,365

(71) 申請人：美商 O P K O 診斷法有限責任公司 (美國) OPKO DIAGNOSTICS, LLC (US)
美國(72) 發明人：林德 文森 LINDER, VINCENT (CH)；席金斯 克里斯堤納 HIGGINS, CHRISTINA
(US)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

WO 2012/170776A2

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：25 項 圖式數：2 共 41 頁

(54) 名稱

前列腺抗原標準品及其用途

(57) 摘要

本發明之態樣係關於用於預測獲自個體之前列腺組織生檢是否含有可檢測的前列腺癌之改良方法。在一些實施例中，本發明提供用於量化前列腺抗原含量之經改良之前列腺抗原標準品。

Aspects of the disclosure relate to improved methods for predicting whether a prostate tissue biopsy obtained from a subject will contain detectable prostate cancer. In some embodiments, the disclosure provides improved prostate antigen standards for quantifying levels of prostate antigens.

指定代表圖：

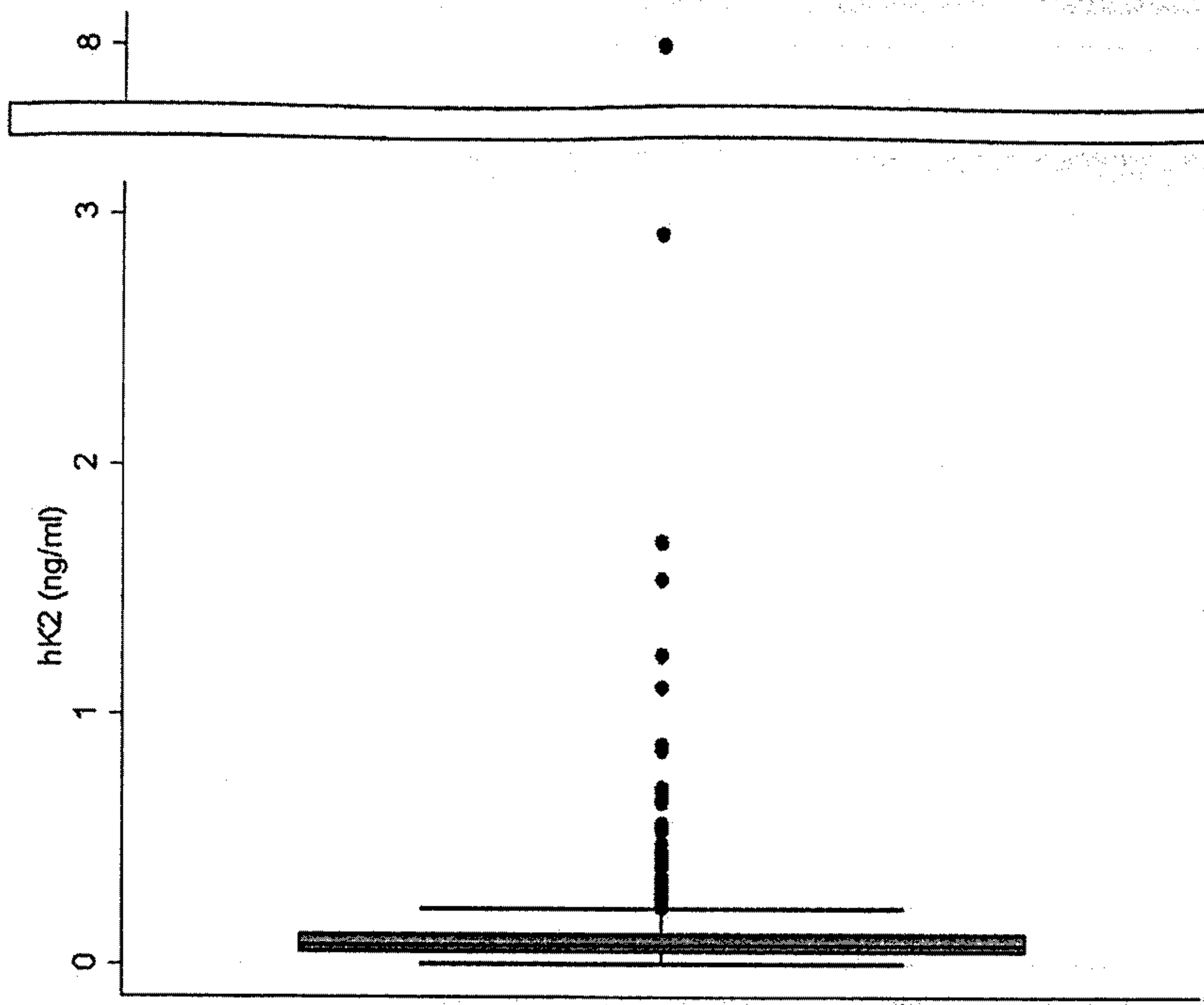


圖 1

發明摘要

I698639

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】

前列腺抗原標準品及其用途

PROSTATE ANTIGEN STANDARDS AND USES THEREOF

【中文】

本發明之態樣係關於用於預測獲自個體之前列腺組織生檢是否含有可檢測的前列腺癌之改良方法。在一些實施例中，本發明提供用於量化前列腺抗原含量之經改良之前列腺抗原標準品。

【英文】

Aspects of the disclosure relate to improved methods for predicting whether a prostate tissue biopsy obtained from a subject will contain detectable prostate cancer. In some embodiments, the disclosure provides improved prostate antigen standards for quantifying levels of prostate antigens.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

前列腺抗原標準品及其用途

PROSTATE ANTIGEN STANDARDS AND USES THEREOF

【先前技術】

升高之總前列腺特異性抗原(PSA)血液含量係與包括前列腺癌之前列腺相關病症相關。存在重要證據表明，單獨量測PSA同種型含量以及量測人類激肽釋放素2 (hK2)使得改良個體中存在前列腺癌相關之預測。通常，用以量測前列腺抗原(例如PSA同種型及hK2)升高之含量之分析利用抗原標準曲線來量化前列腺抗原含量。

【發明內容】

本發明之態樣係關於如下認識：目前用於前列腺分析之標準品要求使用大量前列腺抗原，此並不成本有效。此外，目前所用分析中之標準品所涵蓋之多種濃度可導致抗原濃度之不精確量化，此乃因標準品範圍並未與典型臨床試樣中存在之抗原量恰當比對。因此，已認識到需要成本有效且提高抗原含量量化之準確度之新標準品。

許多用以量化前列腺抗原含量之分析依賴於所檢測抗原信號與自一組標準抗原濃度所獲得之一組值之比較。然而，目前所用分析並不成本有效，此乃因其需要大量前列腺抗原標準品。舉例而言，一些前列腺抗原測試依賴於具有每分析最高350 ng/mL之iPSA或最高22 ng/mL之hK2之最大濃度之標準品。此外，目前所用抗原標準品所涵蓋之大的前列腺抗原範圍可導致試樣中之前列腺抗原含量之不精確量化且增加錯誤診斷之風險。本發明藉由提供用於前列腺抗原含量之經改良量化之成本有效的組合物及方法來解決該等問題。

因此，在一態樣中，本發明提供用於量化前列腺抗原含量之方法。在一些實施例中，該方法涉及實施免疫分析以檢測試樣中前列腺抗原之存在；及關於使用相同免疫分析檢測之資訊性前列腺抗原標準品之最小組量化試樣中所檢測之前列腺抗原含量。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組包含至少兩個含有預定量之前列腺抗原之效價，其中該組之最大效價係介於i)目標個體群體之上四分位數之血液前列腺抗原濃度與ii)該血液前列腺抗原濃度之75倍之間。在一些實施例中，該組之最小非零效價之量係低於免疫分析之量化極限。在一些實施例中，目標個體群體由中值年齡在60歲至70歲範圍內之男性組成。在一些實施例中，目標個體群體由下四分位數年齡在55歲至65歲範圍內之男性組成。在一些實施例中，目標個體群體由上四分位數年齡在65歲至75歲範圍內之男性組成。在一些實施例中，前列腺抗原選自由以下組成之群：總前列腺特異性抗原(tPSA)、游離前列腺特異性抗原(fPSA)、完整前列腺特異性抗原(iPSA)及人類激肽釋放素2 (hK2)。在一些實施例中，前列腺抗原係iPSA或hK2。在一些實施例中，前列腺抗原係完整前列腺特異性抗原(iPSA)。在一些實施例中，該組之最小非零效價係0.025 ng/mL。在一些實施例中，該組之最大效價係15 ng/mL。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.025 ng/mL、0.089 ng/mL、0.322 ng/mL、1.157 ng/mL、4.167 ng/mL及15 ng/mL。在一些實施例中，前列腺抗原係hK2。在一些實施例中，該組之最小非零效價係0.002 ng/mL。在一些實施例中，該組之最大效價係8 ng/mL。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.002 ng/mL、0.011 ng/mL、0.055 ng/mL、0.290 ng/mL、1.524 ng/mL及8 ng/mL。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組由前列腺抗原標準品之

7個效價組成。在一些實施例中，前列腺抗原標準品之每一中間效價在對數尺上均與其之上及之下之效價等距。在一些實施例中，免疫分析選自由以下組成之群：DELFI[®]A、酶聯免疫分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、夾心式分析、西方墨點分析及免疫沈澱分析(IPA)。在一些實施例中，免疫分析係DELFI[®]A。在一些實施例中，免疫分析係ELISA。在一些實施例中，試樣係自人類個體獲得。在一些實施例中，試樣係前列腺組織生檢。在一些實施例中，試樣係血液或血漿試樣。

在一些態樣中，本發明提供用於量化前列腺抗原含量之前列腺抗原檢測套組，該套組包含用於使用免疫分析來量化試樣中之前列腺抗原含量之資訊性前列腺抗原標準品之最小組，其中各前列腺抗原標準品以溶液形式存在於容器中。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組包含至少兩個含有預定量前列腺抗原之效價，其中該組之最大效價係介於i)目標個體群體之上四分位數之血液前列腺抗原濃度與ii)該血液前列腺抗原濃度之75倍之間。在一些實施例中，該組之最小非零效價之量係低於免疫分析之量化極限。在一些實施例中，前列腺抗原選自由以下組成之群：總前列腺特異性抗原(tPSA)、游離前列腺特異性抗原(fPSA)、完整前列腺特異性抗原(iPSA)及人類激肽釋放素2 (hK2)。在一些實施例中，前列腺抗原係iPSA或hK2。在一些實施例中，前列腺抗原係完整前列腺特異性抗原(iPSA)。在一些實施例中，該組之最小非零效價係0.025 ng/mL。在一些實施例中，該組之最大效價係15 ng/mL。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.025 ng/mL、0.089 ng/mL、0.322 ng/mL、1.157 ng/mL、4.167 ng/mL及15 ng/mL。在一些實施例中，前列腺抗原係hK2。在一些實施例中，該組之最小非零效價係0.002 ng/mL。在一些實施例中，該組之最大效

價係8 ng/mL。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.002 ng/mL、0.011 ng/mL、0.055 ng/mL、0.290 ng/mL、1.524 ng/mL及8 ng/mL。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組由前列腺抗原標準品之7個效價組成。在一些實施例中，前列腺抗原標準品之每一中間效價在對數尺上均與其之上及之下之效價等距。

在一些態樣中，本發明係關於製備用於量化試樣中前列腺抗原含量之前列腺抗原標準品之方法，該方法包含：(i)獲得與前列腺癌相關之抗原；(ii)在適宜緩衝液中製備抗原之儲備溶液，其中儲備溶液之效價在i)目標個體群體之上四分位數之血液前列腺抗原濃度與ii)該血液前列腺抗原濃度之75倍之間；及(iii)藉由連續稀釋儲備溶液來製備前列腺抗原標準品之最小組，使得前列腺抗原標準品之每一中間效價在對數尺上均與其之上及之下之效價等距。在一些實施例中，目標個體群體由中值年齡在60歲至70歲範圍內之男性組成。在一些實施例中，目標個體群體由下四分位數年齡在55歲至65歲範圍內之男性組成。在一些實施例中，目標個體群體由上四分位數年齡在65歲至75歲範圍內之男性組成。在一些實施例中，前列腺抗原選自由以下組成之群：總前列腺特異性抗原(tPSA)、游離前列腺特異性抗原(fPSA)、完整前列腺特異性抗原(iPSA)及人類激肽釋放素2(hK2)。在一些實施例中，前列腺抗原係iPSA或hK2。在一些實施例中，前列腺抗原係完整前列腺特異性抗原(iPSA)。在一些實施例中，該組之最小非零效價係0.025 ng/mL。在一些實施例中，該組之最大效價係15 ng/mL。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.025 ng/mL、0.089 ng/mL、0.322 ng/mL、1.157 ng/mL、4.167 ng/mL及15 ng/mL。在一些實施例中，前列腺抗原係hK2。在一些實施例中，該組之最小非零效價係0.002

ng/mL。在一些實施例中，該組之最大效價係8 ng/mL。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.002 ng/mL、0.011 ng/mL、0.055 ng/mL、0.290 ng/mL、1.524 ng/mL及8 ng/mL。在一些實施例中，資訊性前列腺抗原標準品之最小組由前列腺抗原標準品之7個效價組成。在一些實施例中，前列腺抗原標準品之每一中間效價在對數尺上均與其之上及之下之效價等距。

【圖式簡單說明】

圖1顯示個體群體(N=1012)之hK2含量(ng/mL)之非限制性盒鬚圖。

圖2顯示個體群體(N=1012)之iPSA含量(ng/mL)之非限制性盒鬚圖。

【實施方式】

本發明之態樣提供用於量化試樣中前列腺抗原含量之標準品。本發明中所述標準品表示優於目前所用標準品之改良，此乃因所述標準品成本有效(例如，需要較低量之前列腺抗原)且提供與臨床相關範圍之前列腺抗原更緊密比對之值之組。本發明部分係關於如下認識：針對資訊性前列腺抗原標準品之最小組校準效價範圍可顯著降低成本，同時提供前列腺含量量化之增加之準確度。因此，在一些態樣中，本發明提供用於量化前列腺抗原含量之經改良方法。該等方法通常涉及實施免疫分析以檢測試樣中前列腺抗原之存在及關於使用相同免疫分析所檢測之資訊性前列腺抗原標準品之最小組量化試樣中所檢測之前列腺抗原含量。

如本文所用，「資訊性前列腺抗原標準品之最小組」係用於特定免疫分析之一組前列腺抗原標準品，其包括至少兩個含有預定量之前列腺抗原之效價，其中該組之最小效價之量係低於免疫分析之量化極

限且其中該組之最大效價之量係介於i) 目標個體群體(例如，懷疑患有前列腺癌或需要生檢之男性)之上四分位數之血液前列腺抗原濃度與ii)該血液前列腺抗原濃度之100倍之間。在一些實施例中，該組之最大效價係介於i) 目標個體群體之上四分位數之血液前列腺抗原濃度與ii)該血液前列腺抗原濃度之75倍之間。在一些實施例中，該組之最大效價係介於i) 目標個體群體之上四分位數之血液前列腺抗原濃度與ii)該血液前列腺抗原濃度之50倍之間。在一些實施例中，該組之最大效價係介於i) 目標個體群體之上四分位數之血液前列腺抗原濃度與ii)該血液前列腺抗原濃度之25倍之間。

在一些實施例中，該組之最小非零效價之量低於免疫分析之量化極限。如本文所用術語「量化極限」係指藉由使用免疫分析可檢測及可量化之材料之最小量。在一些實施例中，量化極限係藉由使用免疫分析以小於25%、小於15%、小於5%或小於1%之變異係數可檢測及可量化之材料之最小量。

在一些實施例中，該組之最小非零效價之量低於免疫分析檢測極限。如本文所用術語「檢測極限」係指藉由使用免疫分析可檢測但不一定可量化之材料之最小量。

前列腺抗原標準品

在一些態樣中，本發明提供用於量化試樣中前列腺抗原含量之前列腺抗原標準品。如本文所用，「前列腺抗原標準品」係適於確立參照之前列腺抗原之實質上均勻製劑，根據該參照，可量測前列腺抗原之未知量。在一些實施例中，前列腺抗原標準品包含至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%純之前列腺抗原製劑。然而，在一些實施例中，標準品包含類似於欲測試之試樣(例如，血液、血清、尿液或血漿試樣)之介質(例如，呈溶液形式)之前列腺抗原之均勻製劑。舉例而言，可將前列腺抗原標準品添加至原本不含前

列腺抗原之血液、血清、尿液或血漿試樣中。以此方式，前列腺抗原標準品與未知試樣之背景類似或相同，此可改良檢測及量化之準確度。

在一些實施例中，使用濃度曲線測定試樣中特定抗原之濃度。舉例而言，濃度曲線可藉由繪製相對螢光單位(RFU)對複數個已知抗原濃度(例如一組抗原濃度)的圖來產生。然後，可比較自具有未知抗原濃度之試樣所獲得之RFU值與濃度曲線以測定試樣之抗原濃度。

在一些實施例中，標準材料包含一組抗原效價。如本文所用術語「抗原組」係指複數個離散抗原效價。在一些實施例中，一組之每一抗原效價容納於不同容器中。在一些實施例中，一組抗原標準品係自具有高於該組之最大抗原濃度之抗原效價之主儲備液產生。在一些實施例中，一組抗原標準品係自主儲備液藉由連續稀釋該儲備液產生。在一些實施例中，一組抗原係自抗原濃度為該組最大抗原濃度之主儲備液產生。在一些實施例中，一組抗原係介於1個與20個抗原效價、5個與15個抗原效價或8個與12個抗原效價之間。在一些實施例中，一組抗原係1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個或20個抗原效價。

在一些態樣中，本發明係關於如下發現：確立前列腺抗原標準品之最小組可顯著降低成本，同時提供前列腺抗原含量量化之增加之準確度。如本文所用術語「資訊性」係指抗原或抗原組提供具有未知抗原量或濃度之試樣中抗原之臨床相關量化之特性。舉例而言，具有大範圍之抗原濃度之標準品可產生一組值(例如，濃度曲線)，其中臨床相關抗原濃度超出該等值之可用範圍。此可降低所提供值之預測能力且因此往往資訊性較差。另一方面，具有與目標群體中之可能抗原量或濃度一致之抗原濃度範圍之標準品之使用係有資訊性的，此乃因

所得值(例如，濃度曲線)具有更高數目之臨床相關抗原濃度在該等值(曲線)之可用範圍中。

在一些態樣中，本發明係關於一組資訊性前列腺抗原濃度中之前列腺抗原濃度之分佈。在一些實施例中，一組之每一資訊性前列腺抗原濃度與其之上及/或之下之資訊性前列腺抗原濃度等距。如本文所用術語「等距」係指前列腺抗原濃度之間之單位之數目。舉例而言，濃度1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL及4 ng/mL在線性標度上各自與之上及/或之下之濃度等距(即1 ng/mL)。該等單位可以任何適當標度來量測，例如線性標度或對數尺(例如， \log_{10} 、自然對數(LN)等)。在一些實施例中，一組之每一資訊性前列腺抗原濃度在對數尺上與其之上及/或之下之資訊性前列腺抗原濃度等距。舉例而言，iPSA抗原之資訊性組可係0 ng/mL、0.025 ng/mL、0.089 ng/mL、0.322 ng/mL、1.157 ng/mL、4.167 ng/mL及15 ng/mL。作為另一實例，hK2抗原之資訊性組可係0 ng/mL、0.002 ng/mL、0.011 ng/mL、0.055 ng/mL、0.290 ng/mL、1.524 ng/mL及8 ng/mL。等距濃度之抗原可藉由任何適宜方法來製備，例如連續稀釋，或將一定量之抗原溶解於適當緩衝液中以獲得具有資訊性抗原濃度之溶液。

本發明涵蓋各種類型之抗原。抗原之實例包括(但不限於)肽、蛋白質、脂蛋白、醣蛋白及小分子(例如半抗原)。抗原之其他非限制性實例包括核酸，例如DNA、RNA及寡核苷酸。在一些實施例中，本發明提供包含前列腺抗原之標準品。如本文所用，術語「前列腺抗原」係指在個體前列腺中產生或表現之抗原。前列腺抗原之實例包括(但不限於)總前列腺特異性抗原(tPSA)、游離前列腺特異性抗原(fPSA)、完整前列腺特異性抗原(iPSA)及人類激肽釋放素2 (hK2)。在一些實施例中，標準材料包含iPSA濃度之資訊組。在一些實施例中，標準材料包含hK2濃度之資訊組。

如本文所用，術語「個體」係指患有或懷疑患有癌症或測試癌症之哺乳動物。個體之實例包括人類、非人類靈長類動物(例如狨猴及猴)、豬、馬、貓、狗、大鼠及小鼠。在一些實施例中，個體係人類個體。在一些實施例中，個體係患有或懷疑患有前列腺癌之人類。在一些實施例中，個體係測試前列腺癌之人類。人類個體可顯示或可不顯示前列腺癌之體徵或症狀，包括需要頻繁排尿(尤其在夜間)、開始排尿困難或憋尿困難、尿流弱或間斷、排尿疼痛或有灼燒感、勃起困難、射精疼痛及/或尿液或精液中有血液。

本發明亦涵蓋用於標準材料之容器。如本文所述之標準材料可包含於任何適宜容器中。適宜容器之非限制性實例包括小瓶(例如玻璃小瓶或塑膠小瓶)、試管、泡罩包(blister packs)、瓶、小囊及分析板。在一些實施例中，一組抗原濃度(例如一組資訊性前列腺抗原濃度)可容納於複數個容器中。舉例而言，一組7個資訊性前列腺抗原標準品可儲存於7個密封管中，每一管容納單一資訊性前列腺抗原標準品。通常，標準材料係以液相包含於容器中。然而，熟習此項技術者認知，標準材料(例如蛋白抗原)可以粉末形式(例如以凍乾型)包含且用適當量之溶劑(例如水或緩衝溶液)復原成資訊性抗原濃度。

在一些實施例中，本發明係關於包含標準材料之套組。套組可包括標準材料、用於實施分析之相關設備(例如分析板、適當緩衝液、試樣收集儀器及裝置等)及使用標準材料實施分析之說明書。在一些實施例中，本發明提供具有複數個容器之套組，各容器容納標準材料。在一些實施例中，各容器包含一組資訊性前列腺抗原濃度之一種資訊性前列腺抗原濃度。在一些實施例中，本文所述套組進一步包含用於量化試樣之前列腺抗原含量之說明書。

本發明亦涵蓋製備前列腺抗原標準品之方法。在一些實施例中，本發明提供用於製備用於量化前列腺抗原含量之前列腺抗原標準

品之方法，該方法包含(i)獲得與前列腺癌相關之抗原；(ii)在適宜緩衝液或溶劑中製備抗原之儲備溶液；及(iii)自儲備溶液製備一組資訊性濃度，其中該組之每一資訊性濃度具有在對數尺上與其之上及/或之下之濃度等距之濃度。在一些實施例中，與前列腺癌相關之抗原係前列腺抗原。在一些實施例中，前列腺抗原選自由以下組成之群：tPSA、fPSA、iPSA及hK2。在一些實施例中，前列腺抗原係iPSA或hK2。適宜緩衝液及/或溶劑之非限制性實例包括水，磷酸緩衝鹽水(PBS)及tris緩衝鹽水(TBS)。可自儲備溶液製備一組資訊性抗原濃度，例如藉由連續稀釋儲備溶液至達到複數個資訊性抗原濃度。

用於量化前列腺抗原含量之分析

在一些態樣中，本發明係關於用於量化前列腺抗原含量之方法。本發明部分基於如下發現：由本發明闡述之前列腺抗原標準品可較目前所用前列腺抗原標準品更成本有效及精確地量化前列腺抗原。

因此，在一些態樣中，本發明提供用於量化前列腺抗原含量之方法，該方法包含實施免疫分析以檢測試樣中前列腺抗原之存在及基於源自藉由免疫分析之一組資訊性前列腺抗原濃度之檢測的值來量化試樣中所檢測之前列腺抗原含量。舉例而言，在一些實施例中，資訊性抗原濃度組係資訊性iPSA濃度組。在一些實施例中，資訊性之抗原濃度組係資訊性hK2濃度組。

用於檢測前列腺抗原之存在之其他方法係揭示於(例如)於2014年3月28日申請之USSN 61/972,099中，其內容以引用方式全部併入本文中。

免疫分析

前列腺特異性抗原(例如，tPSA、iPSA、fPSA及hK2)之含量可藉由任何適當方法來評價。在一些實施例中，提供適用於免疫分析中之

抗體或抗原結合片段。利用此等抗體或抗原結合片段之免疫分析可係直接或非直接型式之競爭性及非競爭性免疫分析。此等免疫分析之非限制性實例係解離增強之鐳系元素螢光免疫分析(DELFLIA[®])、酶聯免疫分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、夾心式分析(免疫量測分析)、流式細胞術、西方墨點分析、免疫沈澱分析、免疫組織化學、免疫顯微術、側流免疫層析分析及蛋白質體學分析。

在一些實施例中，免疫分析係DELFLIA[®]。DELFLIA[®] (解離增強之鐳系元素螢光免疫分析)係經設計以使用鐳系元素螯合物標記之試劑來檢測化合物或生物分子存在之時間解析螢光(TRF)強度技術。DELFLIA[®]分析係靈活的，與多種板讀數器相容，且作為基於洗滌之技術與多種試樣類型(例如，血液、血清、血漿、細胞等)相容。該技術係基於鐳系元素螯合物(銻、釷及錒)之螢光。該等鐳系元素螯合物標記之螢光衰減時間較傳統螢光團顯著更長，從而容許有效使用時間解析度用於減少自體螢光背景。較大斯托克斯位移(Stokes' shift) (激發波長與發射波長間之差)及較窄發射峰促進增加信雜比。靈敏度進一步增加，此乃因解離增強原理：鐳系元素螯合物經解離且新高度螢光螯合物形成為保護性膠束溶液。有別於傳統ELISA，DELFLIA[®]不涉及產生可檢測信號之酶(例如，辣根過氧化酶，HRP)之使用。

抗原或抗體或抗原結合片段可藉由(例如)結合至固體載體(例如，載劑、膜、管柱、蛋白質體學陣列等)來固定。固體載體材料之實例包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚偏二氟乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、耐綸(nylon)、直鏈澱粉、天然及經改質纖維素(例如硝基纖維素)、聚丙烯醯胺、瓊脂糖及磁鐵礦。載體之性質可係經固定或懸浮於溶液中(例如，珠)。

在一些實施例中，經標記之抗體或抗原結合片段可用作示蹤物以檢測抗原結合抗體複合物。可用於產生示蹤物之標記類型之實例包

括酶、放射性同位素、膠態金屬、螢光化合物、磁性、化學發光化合物及生物發光化合物。放射標記之抗體係以已知方式藉由偶合諸如 ^{153}Eu 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{59}Fe 或 ^{125}I 等放射性同位素來製備，然後該同位素可藉由 γ 計數器、閃爍計數器或藉由放射自顯影術檢測到。如本文所討論，抗體及抗原結合片段可選擇性地經酶(例如酵母乙醇去氫酶、辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶及諸如此類)來標記，然後經顯影並以分光光度法或目視檢測。適宜螢光標記包括螢光黃異硫氰酸鹽、螢哢明(fluorescamine)、玫瑰紅(rhodamine)及諸如此類。適宜化學發光標記包括發光胺、咪唑、草酸酯、螢光素及其他標記。

免疫分析可包含在能夠在抗體或抗原結合片段與抗原之間形成結合複合物之條件下，使含有抗原之試樣(例如血漿試樣)與抗體或抗原結合片段(例如 F(ab) 、 F(ab)_2)接觸。在一些實施例中，在適於將抗體或抗原結合片段結合至目標抗原之條件下(若試樣中存在抗原)，使血漿試樣與抗體或抗原結合片段接觸。此可在適宜反應室(例如管、板孔、膜浴、細胞培養皿、顯微鏡載玻片及其他室)中實施。在一些實施例中，將抗體或抗原結合片段固定於固體載體上。結合至試樣中抗原之抗體或抗原結合片段可稱為捕獲抗體。在一些實施例中，捕獲抗體包含標籤(例如，生物素標記)，該標籤藉由涉及該標籤之相互作用(例如，生物素-鏈黴抗生物素相互作用，其中鏈黴抗生物素固定至固體載體)來促進該抗體固定至固體載體。在一些實施例中，固體載體係反應室表面。在一些實施例中，固體載體係聚合膜(例如，硝基纖維素帶、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜等)。在其他實施例中，固體載體係生物結構(例如，細菌細胞表面)。本文揭示其他實例性固體載體且熟習此項技術者將顯而易見。

在一些實施例中，將抗體及抗原結合片段固定於固體載體上，然後與抗原接觸。在其他實施例中，在結合複合物形成後，實施抗體

及抗原結合片段之固定。在其他實施例中，抗原固定於固體載體上，然後形成結合複合物。在一些實施例中，可將示蹤物添加至反應室中以檢測經固定之結合複合物。在一些實施例中，示蹤物包含可檢測經標記之針對抗原之二級抗體。在一些實施例中，示蹤物包含可檢測經標記之針對捕獲抗體之二級抗體。在一些實施例中，一級抗體或抗原結合片段自身經可檢測標記。

在一實施例中，本文所揭示之免疫分析方法包含將抗體或抗原結合片段固定至固體載體；在允許抗原結合至抗體或抗原結合片段(若試樣中存在)之條件下，將試樣(例如，血漿試樣)施加至固體載體；自固體載體移除過量試樣；在允許示蹤物結合至抗原結合經固定之抗體或抗原結合片段之條件下施加示蹤物(例如，可檢測經標記抗體或抗原結合片段)；洗滌固體載體並分析示蹤物之存在。

在一些實施例中，在於反應室中與抗原接觸之後將抗體及抗原結合片段固定於固體載體上。在一些實施例中，將抗體及抗原結合片段固定於固體載體上，然後於反應室中與抗原接觸。在任一情形下，可將示蹤物添加至反應室中以檢測經固定之結合複合物。在一些實施例中，示蹤物包含可檢測經標記之針對抗原之二級抗體。在一些實施例中，示蹤物包含針對一級抗體或抗原結合片段之可檢測經標記之二級抗體。如本文所揭示，可檢測標記可係(例如)放射性同位素、螢光團、發光分子、酶、生物素部分、表位標籤或染料分子。本文闡述適宜可檢測標記。

在一些實施例中，已發現，在低pH緩衝液中實施某些免疫分析使得抗原檢測更靈敏。因此，在一些實施例中，在具有pH在6.5至小於7.75範圍內之緩衝液中，使示蹤物抗體與捕獲抗體接觸，使得示蹤物結合至捕獲抗體-抗原複合物。在一些實施例中，緩衝液pH係約6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5或7.6。

應瞭解，在本文所揭示之分析之任一者之中，捕獲抗體可與示蹤抗體交換。

在一些實施例中，量測fPSA含量之免疫分析涉及在第一捕獲抗體結合至fPSA之條件下使血漿血樣中存在之fPSA與對fPSA具有特異性之捕獲抗體接觸，藉此產生捕獲抗體-fPSA複合物；及使用示蹤物來檢測捕獲抗體-fPSA複合物。捕獲抗體可係H117抗體。在一些實施例中，示蹤物包含5A10抗體或其片段(例如，F(ab)片段)。在一些實施例中，示蹤物包含與5A10抗體具有至少80%、至少85%、至少90%或至少99%胺基酸序列一致性之抗體或其片段(例如，F(ab)片段)。在一些實施例中，示蹤物包含具有與5A10抗體至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%胺基酸序列一致性之抗體或其片段(例如，F(ab)片段)。

可併入片段中之5A10抗體之重鏈及輕鏈序列在下文中顯示：

5A10重鏈

EVQLVESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTTGMGVSWIRQPSGK
GLEWLAHLYWDEDKRYNPSLKSRLTISEDSSRNQVFLKITSVGPADSA
TYYCARKGYGYFDYWGQGTALTVSS (SEQ ID NO: 1)

5A10輕鏈

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNTDVAWYQQKPGQ
SPKALIFSTSYRSSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYFCQQY
SNYPLTFGAGTKVDLN (SEQ ID NO: 2)

在一些實施例中，量測iPSA含量之免疫分析涉及在第二捕獲抗體至少結合至iPSA之條件下使血漿血樣中存在之iPSA與對游離PSA(其包括iPSA及缺陷PSA)具有特異性之捕獲抗體接觸，藉此產生捕獲

抗體-iPSA複合物；及使用第二示蹤物來檢測捕獲抗體-iPSA複合物。在一些實施例中，示蹤物包含4D4抗體。在一些實施例中，捕獲抗體係5A10抗體或其片段(例如，F(ab)片段)。

在一些實施例中，量測tPSA含量之免疫分析涉及在第三捕獲抗體結合至tPSA之條件下使血漿血樣中存在之tPSA與對tPSA具有特異性之捕獲抗體接觸，藉此產生捕獲抗體-tPSA複合物；及使用第三示蹤物來檢測捕獲抗體-tPSA複合物。在一些實施例中，示蹤物包含H50抗體。在一些實施例中，捕獲抗體係H117抗體。

在一些實施例中，量測hK2含量之免疫分析涉及將血漿血樣中之PSA與對PSA具有特異性之阻斷抗體接觸；在第四捕獲抗體結合至hK2之條件下將血漿血樣中存在之hK2與對hK2具有特異性之第四捕獲抗體接觸，藉此產生捕獲抗體-hK2複合物；及使用第四示蹤物來檢測捕獲抗體-hK2複合物。在一些實施例中，示蹤物包含7G1抗體。在一些實施例中，捕獲抗體係6H10 F(ab)₂。在一些實施例中，阻斷抗體包含5H7抗體、5H6抗體及2E9抗體。

下表1列示可用於本文所揭示方法中之抗體及抗原結合片段及其相應表位。

表1：抗體及抗體之表位/來源

抗體名稱	表位	參考文獻或來源
F(ab) ₂ 6H10		Becker等人，2000. Sensitive and Specific Immunodetection of Human Glandular Kallikrein 2 in Serum. Clin Chem. 46(2), 198-206。
2E9	PSA蛋白(SEQ ID NO: 3)	Lilja等人，1991.

	之胺基酸79-93及/或80-91	Prostate-Specific Antigen in Serum Occurs Predominantly in Complex with alpha-1-Antichymotrypsin. Clin Chem. 37(9), 1618-1625。Piironen等人，Determination and analysis of antigenic epitopes of prostate specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) using synthetic peptides and computer modeling. Protein Science (1998), 7:259-269
5F7		Nurmikko等人，2000. Production and Characterization of Novel Anti-Prostate-specific Antigen (PSA) Monoclonal Antibodies That Do Not Detect Internally Cleaved Lys145-Lys146 Inactive PSA. Clin Chem. 46(10):1610-1618。
5H6	PSA蛋白(SEQ ID NO: 3)之胺基酸225-237	Nurmikko等人，2000.見上文
7G1		Nurmikko等人，2000.見上文

		上文
Fab 5A10	PSA蛋白(SEQ ID NO: 3) 之胺基酸75-89、80-94 及/或82-39	Eriksson等人，2000. Dual-label time-resolved immunofluorometric assay of free and total Prostate-specific Antigen Based on Recombinant Fab Fragments. Clin Chem 46(5), 658-666. Piironen等人，見上文
4D4	PSA蛋白(SEQ ID NO: 3) 之胺基酸130-144	美國專利第7872104號
H117		美國專利第5672480號
H50		美國專利第5672480號
5A10	PSA蛋白(SEQ ID NO: 3) 之胺基酸75-89、80-94 及/或82-39	美國專利第5939533號， European Collection of Animal Cell Cultures，登 錄號93091201. Piironen等人，見上文

在一些態樣中，本發明係關於用於量化試樣中抗原含量之免疫分析之用途。如本文所用術語「量化」係指基於具有一組資訊性濃度之抗原之前列腺抗原標準品之試樣中抗原量或濃度之測定。舉例而言，iPSA含量可藉由以下來量化：將一組資訊性iPSA濃度與可檢測抗體接觸；基於每一抗體結合資訊性iPSA濃度之可檢測輸出產生一組值(例如，濃度曲線)；將具有未知iPSA濃度之試樣與可檢測抗體接觸；量測試樣之抗體結合iPSA之可檢測輸出；並基於與藉由檢測資訊性濃度而產生之一組值的比較來量化試樣之iPSA含量。

在一些實施例中，藉由獲得抗體之可檢測輸出來產生一組值。在一些實施例中，可檢測輸出係藉由螢光讀數器(例如螢光顯微鏡)、

微板讀數器及/或UV分光光度計來獲得。在一些實施例中，螢光讀數器係連接至電腦。在一些實施例中，電腦包含用於自可檢測輸出來計算濃度曲線之軟體(例如，SoftMax Pro™或Gen5數據分析)。

本發明之態樣可使用電腦來實施。舉例而言，試樣中前列腺抗原量可藉由獲得試樣中前列腺抗原之免疫分析量測並藉助使用電腦來將彼等與前列腺抗原標準品之最小組中之前列腺抗原量比較關於前列腺抗原標準品來測定。舉例而言，本發明所述電腦系統可用於檢測抗體-抗原結合之輸出或使用自一組資訊性抗原濃度所獲得之輸出值來產生標準品曲線。電腦系統可包括一或多個處理器及一或多個電腦可讀非暫時性儲存媒體(例如，記憶體及一或多個永久儲存媒體)。該(等)處理器可控制以任何適宜方式向記憶體及永久儲存器件寫入數據及自其讀取數據，因本文所述本發明之態樣於此方面並無限制。

為實施本文所述功能中之任一者(例如為基於最小組之資訊性前列腺抗原來計算前列腺含量)，該(等)處理器可執行儲存於一或多個電腦可讀儲存媒體(例如記憶體)中之一或多個指令，例如程式模組，該媒體可用作儲存處理器執行之指令之非暫時性電腦可讀儲存媒體。通常，程式模組包括實施特定任務或執行特定抽象數據類型之常式(routines)、程式、對象、組件、數據結構等。實施例亦可在藉由通信網路連接之遠程處理器件來實施任務之分散式計算環境中實施。在分散式計算環境中，程式模組可位於區域及遠程電腦儲存媒體(包括記憶體儲存器件)二者中。數據輸入及程式命令可經由輸入介面由電腦接受。輸入介面可包含鍵盤、觸控式螢幕、USB埠、CD驅動器、DVD驅動器或其他輸入介面。

應瞭解，各實施例可使用一或多種上述特徵形成。上文態樣及特徵可以任何適宜組合使用，因本發明於此方面並無限制。亦應瞭解，圖式圖解說明各種組件及特徵，其可併入各實施例中。為簡化，

一些圖式可圖解說明一種以上可選特徵或組件。然而，本發明並不限於圖式中所揭示之特定實施例。應認知，本發明涵蓋可包括任一圖式中所圖解說明之僅一部分組件之實施例及/或亦可涵蓋組合多個不同圖式中所圖解說明之組件之實施例。

實例

實例1：PSA及人類激肽釋放素2之序列

PSA蛋白(SEQ ID NO: 3)

IVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCI
RNKSVILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPPLYDMSLLKNRFLRPGD
DSSHDLMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPE
EFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTC
SGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDT
IVANP

hK2蛋白(SEQ ID NO: 4)

IVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHC
LKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPPLYNMSLLKHQSLRP
DEDSSHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIE
PEEFLRPRSLQCVSLHLLSNDMCCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKD
TCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIK
DTIAANP

實例2：用於檢測前列腺抗原之經改良標準材料

先前iPSA標準品具有在166 ng/mL至350 ng/mL範圍內之最大濃度。此實例闡述藉由連續稀釋15 ng/mL之最大濃度來再調配iPSA標準品，如表2中所示。下文所示資訊性組提供優於先前標準品組之若干益處。首先，最大iPSA濃度之減少將成本降低至約1/23至1/11，此乃因需要較少抗原。第二，分析範圍降低使得校準曲線之更多點(例如

值)落入診斷前列腺癌之iPSA濃度之臨床相關範圍內。最後，7個連續稀釋之濃度(例如，等距濃度)之使用容許規範化自該組檢測之原始信號值，此改良標準品批次間及分析運行間之品質控制。

表2：iPSA標準品組(ng/mL)之比較

先前標準品組 1	先前標準品組 2	先前標準品組 3	資訊性標準 品組
0	0	0	0
0.002	0.016	0.023	0.025
0.095	0.033	0.084	0.089
0.330	0.22	0.209	0.322
3.70	2.2	2.06	1.157
37.0	23.3	19.8	4.167
350	237	166	15

人類激肽釋放素2 (hK2)標準品係以類似方式再調配。先前可得hK2標準品具有13.1 ng/mL至22.7 ng/mL之最大濃度，如表3中所示。下文所示資訊性組提供優於先前標準品組之若干益處。首先，最大hK2濃度之減少將成本降低至約1/2.8至1/1.6，此乃因需要較少抗原。第二，分析範圍降低使得校準曲線之更多點(例如值)落入診斷前列腺癌之hK2濃度之臨床相關範圍內。最後，7個連續稀釋之濃度(例如，等距濃度)之使用容許規範化自該組所檢測之原始信號值，此改良標準品批次間及分析運行間之品質控制。

表3：hK2標準品組(ng/mL)之比較

先前標準品組 1	先前標準品組 2	資訊性標準品組
0	0	0
0.001	0.002	0.002
0.011	0.023	0.011
0.047	0.055	0.055

0.12	0.211	0.290
1.3	2.01	1.524
13.1	22.7	8.0

實例3：iPSA及hK2標準品在4Kscore分析中之使用

此實例闡述上述 iPSA 及 hK2 標準品在 4Kscore 測試中之使用。4Kscore 測試係經校準之多變量個別化風險評分，其源自包括以下之算法：血樣中與前列腺相關之 4 種激肽釋放素蛋白 (即總前列腺特異性抗原 (tPSA)、游離 PSA (fPSA)、完整 PSA (iPSA) 及人類激肽釋放素 2 (hK2)) 之量測加上以下臨床資訊：先前陰性生檢之存在 (或不存在)、患者之年齡及根據直腸指檢 (DRE) 狀態觀察到 (或未觀察到) 結節。若欲實施前列腺生檢，則該算法計算發現高等級癌症 (格裡森 (Gleason) 7 分) 之風險機率。該測試意欲用於幫助臨床決定是否繼續進行前列腺生檢。

使用由 FDA 批准用於人類診斷學中之商業分析 (Roche™ Cobas® 儀器及 Elecsys® 分析) 來測定 tPSA 及 fPSA 之濃度。使用經研發於 PerkinElmer® AutoDELFIA® 儀器上運行之測試來測定 iPSA 及 hK2 之濃度。

將靜脈血樣收集於 K₂EDTA 管中。管大小必須足夠大至容許收集約 7.5 mL 血液 (至少 5 mL 血液)。為確保與 EDTA 充分混合，試樣收集後必須將血液管立刻顛倒 8 次。該等量之血液確保可獲得足夠血漿。4 種激肽釋放素標記之單一測定需要約 1 mL 血漿。若需要，2 毫升 (2 mL) 血漿容許分析重新運行。

藉由夾心式 (非競爭性) 免疫分析檢測 iPSA 及 hK2 之存在。iPSA 分析採用兩種不同小鼠單株抗體產品。捕獲探針係對 fPSA (其中 iPSA 係一組份) 具有特異性之單株抗體 5A10 之生物素化之重組 His₆-Cys 標記之 Fab 片段。示蹤物係鎘標記之單株抗體 4D4，其對 iPSA 及複合之 PSA

(PSA-ACT)具有特異性。呈組合之試劑對iPSA具有特異性。hK2分析採用5種不同小鼠單株抗體產品。捕獲探針係對hK2及tPSA具有特異性之6H10單株抗體之生物素化之F(ab)2片段。示蹤物係鎊標記之單株抗體7G1，其對hK2及tPSA具有特異性。分析要求使用針對tPSA之阻斷抗體。將試樣使用三種tPSA單株抗體(純系2E9、5F7及5H6)之混合物稀釋且示蹤物調配物亦含有5H6。呈組合之試劑對hK2具有特異性。

該等分析係如下校準。針對DELFI[®] ProStatus[™] PSA游離/總套組校準iPSA分析，該套組又係針對WHO 96/670 (tPSA)及96/668 (fPSA)校準。ProStatus分析容許tPSA及fPSA之定量測定，其中iPSA係子集分子。iPSA校準溶液之分配係源自針對tPSA及fPSA分析所獲得之平均回收率。針對DELFI[®] ProStatus[™] PSA游離/總套組校準hK2分析，該套組又係針對WHO 96/670 (tPSA)及96/668 (fPSA)校準。ProStatus分析容許tPSA及fPSA之定量測定，且tPSA組份與hK2具有等莫耳交叉反應性。hK2校準溶液之分配係源自針對tPSA分析所獲得之回收率。

然後，將自免疫分析中檢測iPSA及hK2所獲得之信號與自使用相同iPSA及hK2抗體檢測一組標準品(例如，校準品溶液)所獲得之信號比較。iPSA及hK2分析各自利用7個標準品(例如，校準物溶液)。標準品(例如，校準物溶液)之量測用於測定分析之報告範圍。報告範圍係藉由低端之量化極限(LoQ)及高端之最高校準物所界定。對於iPSA及hK2分析，LoQ係使用CLSI EP-17A來測定。分析之報告範圍顯示於下表4中。

表4：iPSA及hK2之4Kscore報告範圍

	iPSA	hK2
分析範圍	0.014 - 15 ng/mL	0.022 - 8 ng/mL

iPSA及hK2之預期值係藉由分析自用於4Kscore測試之美國臨床試驗(其包括1012個參與者)之數據而獲得。參與者基於患者進行生檢後組織之病理學檢查分為三組。數據顯示於下表5及6中，且以盒鬚直方圖形式顯示於圖1及圖2中。結果指示99.9%之hK2值(1011/1012)及99.6%之iPSA值(1008/1012)落入分析之報告範圍中。

表5：iPSA及hK2值

	N	iPSA (ng/mL)		hK2 (ng/mL)	
		中值	四分位距	中值	四分位距
生檢陰性	542	0.416	(0.268, 0.636)	0.069	(0.042, 0.107)
低等級疾病 (格裡森6分)	239	0.469	(0.311, 0.654)	0.081	(0.055, 0.120)
高等級疾病 (格裡森>7分)	231	0.511	(0.360, 0.783)	0.107	(0.063, 0.176)

表6：iPSA及hk2百分位數數據(所有個體，N=1012)

百分位數	hK2 (ng/mL)	iPSA (ng/mL)
1	0.010	0.068
5	0.021	0.135
10	0.029	0.189
20	0.045	0.263
25	0.051	0.301
30	0.055	0.324
40	0.065	0.384
50	0.078	0.451
60	0.094	0.520
70	0.112	0.614
75	0.121	0.670
80	0.136	0.759
90	0.183	0.984

95	0.249	1.345
99	0.659	3.315

使用CLSI EP5-A2及CLSI EP6-A來評估iPSA及hK2之分析性能。結果顯示於下表7中。應注意，在各分析(例如，iPSA或hK2)內，變異係數(CV)值跨越報告範圍保持較低(<15%)。另外，各分析之R²值係1。該等數據一起指示跨越分析之報告範圍之高準確度及精密度。

表7：分析性能

	iPSA	hK2
精密度	0.01 - 0.10 ng/mL CV ≤ 15% 0.11 - 1.0 ng/mL CV ≤ 8% 1.1 - 15 ng/mL CV ≤ 5%	0.01 - 0.10 ng/mL CV ≤ 10% 0.11 - 1.0 ng/mL CV ≤ 8% 1.1 - 8 ng/mL CV ≤ 10%
線性度	R ² =1，斜率1.05	R ² =1.00，斜率=1.02
藉由加標及回收之準確度	101.5%	93.3%
高劑量效應(其缺乏)	≥ 100 ng/mL	≥ 90.2 ng/mL

評估4Kscore測試之臨床性能。在美國26個泌尿中心，在盲化前瞻性臨床研究中募集總共1,012名患者。為獲得代表目前生檢選擇實踐之性隊列，不管年齡、PSA、DRE或先前生檢如何，募集對排定前列腺生檢之所有男性開放。每一參與者均經歷至少10個中心之經直腸超音波引導之前列腺生檢，且在各中心根據確立之實踐來實施組織病理學檢查。排除具有已知影響PSA含量之治療史之患者。收集盲化血樣，然後進行生檢且送至Nashville TN之OPKO實驗室用於測試4種激肽釋放素標記(tPSA、fPSA、iPSA及hK2)。將4種激肽釋放素標記、組織病理學、年齡、DRE及先前生檢狀態數據之結果去盲化並藉由獨立生物統計學家分析，並顯示於表8中。再次注意，iPSA及hK2之中值及四分位距含量係在分析之報告範圍內且具有高度顯著p值。

表8：患者數據表

	陰性生檢	低等級PCa	高等級PCa	p值
	(N=542 ; 54%)	(N=239 ; 24%)	(N=231 ; 23%)	
採血時之年齡， 歲	63 (57, 68)	64 (59, 69)	66 (61, 72)	<0.0001
<50	30 (5.5%)	6 (2.5%)	3 (1.3%)	
50-75	481 (89%)	220 (92%)	197 (85%)	
>75	31 (5.7%)	13 (5.4%)	31 (13%)	
種族				0.014
非裔美國人	44 (8.1%)	14 (5.9%)	27 (12%)	
高加索人	458 (85%)	218 (91%)	193 (84%)	
西班牙人	28 (5.2%)	4 (1.7%)	4 (1.7%)	
其他	10 (1.8%)	3 (1.3%)	4 (1.7%)	
未知	2 (0.4%)	0 (0%)	3 (1.3%)	
異常DRE	127 (23%)	50 (21%)	70 (30%)	0.045
先前前列腺生檢	139 (26%)	38 (16%)	22 (10%)	<0.0001
總PSA，ng/ml	4.38 (2.88, 6.25)	4.62 (3.60, 6.12)	6.07 (4.37, 9.66)	<0.0001
<4	232 (43%)	79 (33%)	37 (16%)	<0.0001
4 - 10	274 (51%)	146 (61%)	140 (61%)	
10 - 25	36 (6.6%)	11 (4.6%)	39 (17%)	
>25	0 (0%)	3 (1.3%)	15 (6.5%)	
游離PSA，ng/ml	0.77 (0.51, 1.20)	0.80 (0.54, 1.15)	0.81 (0.61, 1.27)	0.038
游離對總PSA比 率	21 (15, 26)	17 (13, 25)	13 (10, 19)	<0.0001
完整PSA，pg/ml	416 (268, 636)	469 (311, 654)	511 (360, 783)	<0.0001
hK2，pg/ml	69 (42, 107)	81 (55, 120)	107 (63, 176)	<0.0001
4Kscore	7 (3, 15)	14 (6, 25)	34 (17, 66)	<0.0001
<5%	206 (38%)	44 (18%)	12 (5.2%)	<0.0001
5% - 10%	130 (24%)	57 (24%)	13 (5.6%)	
10% - 15%	77 (14%)	29 (12%)	23 (10%)	

15% - 20%	46 (8.5%)	27 (11%)	22 (10%)	
>20%	83 (15%)	82 (34%)	161 (70%)	
臨床T期				
T1A/B		2 (0.8%)	1 (0.4%)	
T1C		177 (74%)	135 (58%)	
T2A		40 (17%)	36 (16%)	
T2B		14 (5.9%)	23 (10%)	
T2C		6 (2.5%)	31 (13%)	
T3A		0 (0%)	3 (1.3%)	
T4		0 (0%)	1 (0.4%)	
TX		0 (0%)	1 (0.4%)	
生檢格裡森等級				
6		239 (100%)	0 (0%)	
3+4		0 (0%)	108 (47%)	
4+3		0 (0%)	59 (26%)	
8		0 (0%)	35 (15%)	
9		0 (0%)	26 (11%)	
10		0 (0%)	3 (1.3%)	

儘管本文已闡述並說明本發明之若干實施例，但彼等熟習此項技術者將容易想像用於實施本文所述之功能及/或獲得本文所述結果及/或優點中之一或多者之各種其他構件及/或結構，且此等變化形式及/或修改形式中之每一者均被認為係在本發明範圍內。更一般而言，彼等熟習此項技術者將容易瞭解，本文所述所有參數、尺寸、材料及構形意指具有實例性且實際參數、尺寸、材料及/或構形將取決於具體應用或使用本發明教示內容之應用。彼等熟習此項技術者僅使用常規實驗將認識到或能確定本文所述本發明之具體實施例的許多等效形式。因此，應理解，前述實施例僅作為實例呈現，且在隨附申請專利範圍及其等效內容之範圍內，可以不同於如特定闡述且主張之方

式來實踐本發明。本發明係關於本文所述之每一個別特徵、系統、物件、材料及/或方法。另外，若此等特徵、系統、物件、材料及/或方法不相互矛盾，則兩個或更多個此等特徵、系統、物件、材料及/或方法之任何組合均包括在本發明之範圍內。

除非明確指示相反情形，否則如本文在說明書中及在申請專利範圍中所用之不定冠詞「一(a及an)」應理解為意指「至少一」。

如本文在說明書中及在申請專利範圍中所用，片語「及/或」應理解為意指如此結合之要素中之「任一者或兩者」，例如，在一些情形下以結合方式存在及在其他情形下以分離形式存在之要素。除非明確指示相反情形，否則除由「及/或」從句所特定識別之要素之外的其他要素可視情況存在，無論與所特定識別之彼等要素相關或不相關。因此，作為非限制性實例，當結合諸如「包含」等開放式語言使用時，對「A及/或B」之引用可在一實施例中，係指有A無B（視情況包括除B之外之要素）；在另一實施例中，係指有B無A（視情況包括除A之外之要素）；在又一實施例中，係指A及B二者（視情況包括其他要素）；等。

如本文中在說明書中及在申請專利範圍中所用，「或」應理解為具有與如上文所定義之「及/或」相同之含義。舉例而言，當分離清單中之項目時，「或」或「及/或」應解釋為係包括性的，例如，包括多個要素或要素清單中之至少一者以及包括一者以上且視情況包括其他未列出項目。只有術語明確指示相反情形，例如「……之僅一者」或「……之恰好一者」或當用於申請專利範圍中時，「由……組成」將係指包括多個要素或要素清單中之恰好一個要素。一般而言，當前面有排他性術語（例如，「或」、「……中之一者」、「……中之僅一者」或「……中之恰好一者」）時，如本文所用術語「或」應僅將其解釋為指示排他選擇（例如，「一者或另一者但非兩者」）。當在申請專利

範圍中使用時，「基本上由……組成」應具有如其用於專利法律領域中之普通含義。

如本文在說明書中及在申請專利範圍中所用，關於一或多個要素之清單之片語「至少一」應理解為意指至少一個選自要素清單中之任一或多個要素之要素，但未必包括要素清單內特定列出之各自及每一要素中之至少一者，且不排除要素清單中要素之任何組合。此定義亦容許可視情況存在除片語「至少一」所指之要素清單內特定識別之要素之外之要素，無論與特定識別之彼等要素相關還是不相關。因此，作為非限制性實例，「A及B中之至少一者」(或等效地，「A或B中之至少一者」，或等效地，「A及/或B中之至少一者」)可在一實施例中，係指至少一個(視情況包括一個以上) A而不存在B (且視情況包括除B以外之要素)；在另一實施例中，係指至少一個(視情況包括一個以上) B而不存在A (且視情況包括除A之外之要素)；在又一實施例中，係指至少一個(視情況包括一個以上) A及至少一個(視情況包括一個以上) B (且視情況包括其他要素)；等。

在申請專利範圍中以及在上文說明書中，諸如「包含」、「包括」、「載有」、「具有」、「含有」、「涉及」、「持有」及諸如此類等所有過渡性片語應理解為開放式的，例如意指包括但不限於。如美國專利局專利審查程序手冊(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)第2111.03節中所述，僅過渡性片語「由……組成」及「基本上由……組成」應分別係封閉式或半封閉式過渡性片語。

在申請專利範圍中使用諸如「第一」、「第二」、「第三」等序數術語來修飾申請專利範圍要素本身並不暗示一申請專利範圍要素具有優於另一申請專利範圍要素之任何優先性、在先性或順序或執行方法之動作之時間順序，而僅用作區分具有某一名稱之一申請專利範圍要

素與具有同一名稱(除了序數術語之使用)之另一要素以區分申請專利範圍要素之標誌。

亦應理解，除非明確指示相反情形，否則在本文所主張之包括多於一個步驟或動作之任何方法中，該方法之步驟或動作之順序不必受限於該方法所列舉之步驟或動作之順序。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商 OPKO 診斷法有限責任公司

<120> 前列腺抗原標準品及其用途

<130> C1256.70015TW000

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/139,365

<151> 2015-03-27

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Thr
20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Leu Tyr Trp Asp Glu Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Glu Asp Ser Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Gly Pro Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Lys Gly Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ala Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Thr Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Phe Ser Thr Ser Tyr Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Asp Leu Asn
 100 105

<210> 3

<211> 237

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala Val Cys Gly Gly Val Leu Val His
 20 25 30

Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val
 35 40 45

Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln
 50 55 60

Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser
 65 70 75 80

Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp
 85 90 95

Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val
 100 105 110

Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys

	115		120		125														
Tyr	Ala	Ser	Gly	Trp	Gly	Ser	Ile	Glu	Pro	Glu	Glu	Phe	Leu	Thr	Pro				
	130					135					140								
Lys	Lys	Leu	Gln	Cys	Val	Asp	Leu	His	Val	Ile	Ser	Asn	Asp	Val	Cys				
145					150					155					160				
Ala	Gln	Val	His	Pro	Gln	Lys	Val	Thr	Lys	Phe	Met	Leu	Cys	Ala	Gly				
				165					170					175					
Arg	Trp	Thr	Gly	Gly	Lys	Ser	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro				
			180					185					190						
Leu	Val	Cys	Asn	Gly	Val	Leu	Gln	Gly	Ile	Thr	Ser	Trp	Gly	Ser	Glu				
		195					200					205							
Pro	Cys	Ala	Leu	Pro	Glu	Arg	Pro	Ser	Leu	Tyr	Thr	Lys	Val	Val	His				
	210					215					220								
Tyr	Arg	Lys	Trp	Ile	Lys	Asp	Thr	Ile	Val	Ala	Asn	Pro							
225					230					235									
<210>	4																		
<211>	237																		
<212>	PRT																		
<213>	智人																		
<400>	4																		
Ile	Val	Gly	Gly	Trp	Glu	Cys	Glu	Lys	His	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Val				
1				5					10					15					
Ala	Val	Tyr	Ser	His	Gly	Trp	Ala	His	Cys	Gly	Gly	Val	Leu	Val	His				
			20					25					30						
Pro	Gln	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Lys	Lys	Asn	Ser	Gln				
		35					40					45							
Val	Trp	Leu	Gly	Arg	His	Asn	Leu	Phe	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	Gln				
	50					55					60								
Arg	Val	Pro	Val	Ser	His	Ser	Phe	Pro	His	Pro	Leu	Tyr	Asn	Met	Ser				
65					70					75					80				
Leu	Leu	Lys	His	Gln	Ser	Leu	Arg	Pro	Asp	Glu	Asp	Ser	Ser	His	Asp				
				85					90					95					
Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Leu	Ser	Glu	Pro	Ala	Lys	Ile	Thr	Asp	Val	Val				
		100						105					110						
Lys	Val	Leu	Gly	Leu	Pro	Thr	Gln	Glu	Pro	Ala	Leu	Gly	Thr	Thr	Cys				

	115		120			125									
Tyr	Ala	Ser	Gly	Trp	Gly	Ser	Ile	Glu	Pro	Glu	Glu	Phe	Leu	Arg	Pro
	130					135					140				
Arg	Ser	Leu	Gln	Cys	Val	Ser	Leu	His	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Met	Cys
145					150					155					160
Ala	Arg	Ala	Tyr	Ser	Glu	Lys	Val	Thr	Glu	Phe	Met	Leu	Cys	Ala	Gly
				165					170					175	
Leu	Trp	Thr	Gly	Gly	Lys	Asp	Thr	Cys	Gly	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro
			180					185					190		
Leu	Val	Cys	Asn	Gly	Val	Leu	Gln	Gly	Ile	Thr	Ser	Trp	Gly	Pro	Glu
		195					200					205			
Pro	Cys	Ala	Leu	Pro	Glu	Lys	Pro	Ala	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Val	His
	210					215					220				
Tyr	Arg	Lys	Trp	Ile	Lys	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Asn	Pro			
225					230					235					

申請專利範圍

1. 一種用於量化前列腺抗原含量之方法，該方法包含：

實施免疫分析以量測試樣中前列腺抗原之含量，其中該前列腺抗原包含總前列腺特異性抗原(tPSA)、游離前列腺特異性抗原(fPSA)、完整前列腺特異性抗原(iPSA)及/或人類激肽釋放素(human kallikrein) 2 (hK2)；

實施該相同的免疫分析以量測一前列腺抗原標準品組中每一效價中該前列腺抗原之該含量，其中該前列腺抗原標準品組包含至少兩個含有預定量前列腺抗原之效價，其中該前列腺抗原之每一中間效價在對數尺上與其上及下之效價等距，其中該前列腺抗原標準品組之最小非零效價之量係低於該免疫分析之量化極限，且其中該前列腺抗原標準品組中該最大效價中之該前列腺抗原之該含量係介於i)男性個體之目標群體之上四分位數之前列腺抗原血液含量與ii)較該男性個體之目標群體之上四分位數之前列腺抗原血液含量高100倍之前列腺抗原含量；及

根據該前列腺抗原標準品組中所量測前列腺抗原之含量來測定該試樣中該前列腺抗原之含量。

2. 如請求項1之方法，其中該前列腺抗原標準品組中之最大效價係介於i)該男性個體之目標群體之上四分位數之該前列腺抗原血液含量與ii)較該男性個體之目標群體之上四分位數之該前列腺抗原血液含量高75倍之前列腺抗原含量。
3. 如請求項1至2中任一項之方法，其中該前列腺抗原係完整前列腺特異性抗原(iPSA)。
4. 如請求項3之方法，其中該前列腺抗原標準品組之最小非零效價係0.025 ng/mL。

5. 如請求項3之方法，其中該前列腺抗原標準品組之最大效價係15 ng/mL。
6. 如請求項3之方法，其中該前列腺抗原標準品組係由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.025 ng/mL、0.089 ng/mL、0.322 ng/mL、1.157 ng/mL、4.167 ng/mL及15 ng/mL。
7. 如請求項1至2中任一項之方法，其中該前列腺抗原係hK2。
8. 如請求項7之方法，其中該前列腺抗原標準品組之最小非零效價係0.002 ng/mL。
9. 如請求項7之方法，其中該前列腺抗原標準品組之最大效價係8 ng/mL。
10. 如請求項7之方法，其中該前列腺抗原標準品組係由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.002 ng/mL、0.011 ng/mL、0.055 ng/mL、0.290 ng/mL、1.524 ng/mL及8 ng/mL。
11. 一種用於量化前列腺抗原含量之前列腺抗原檢測套組，該套組包含一前列腺抗原標準品組，其用於以免疫分析量化試樣中之該前列腺抗原含量，其中各前列腺抗原標準品以溶液存在於容器中，其中該前列腺抗原包含總前列腺特異性抗原(tPSA)、游離前列腺特異性抗原(fPSA)、完整前列腺特異性抗原(iPSA)及/或人類激肽釋放素(human kallikrein) 2 (hK2)，其中該前列腺抗原標準品組包含至少兩個含有預定量前列腺抗原之效價，其中該前列腺抗原之每一中間效價在對數尺上與其上及下之效價等距，其中該前列腺抗原標準品組之最小非零效價之量係低於該免疫分析之量化極限，且其中該前列腺抗原標準品組中該最大效價中之該前列腺抗原之該含量係介於i)男性個體之目標群體之上四分位數之前列腺抗原血液含量與ii)較該男性個體之目標群體之上

四分位數之前列腺抗原血液含量高100倍之前列腺抗原含量。

12. 如請求項11之套組，其中該前列腺抗原標準品組中之最大效價係介於i)該男性個體之目標群體之上四分位數之該前列腺抗原血液含量與ii)較該男性個體之目標群體之上四分位數之該前列腺抗原血液含量高75倍之前列腺抗原含量。
13. 如請求項11至12中任一項之套組，其中該前列腺抗原係完整前列腺特異性抗原(iPSA)。
14. 如請求項13之套組，其中該前列腺抗原標準品組之最小非零效價係0.025 ng/mL。
15. 如請求項13之套組，其中該前列腺抗原標準品組之最大效價係15 ng/mL。
16. 如請求項13之套組，其中該前列腺抗原標準品組係由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.025 ng/mL、0.089 ng/mL、0.322 ng/mL、1.157 ng/mL、4.167 ng/mL及15 ng/mL。
17. 如請求項11至12中任一項之套組，其中該前列腺抗原係hK2。
18. 如請求項17之套組，其中該前列腺抗原標準品組之最小非零效價係0.002 ng/mL。
19. 如請求項17之套組，其中該前列腺抗原標準品組之最大效價係8 ng/mL。
20. 如請求項17之套組，其中該前列腺抗原標準品組係由前列腺抗原標準品之以下效價組成：0 ng/mL、0.002 ng/mL、0.011 ng/mL、0.055 ng/mL、0.290 ng/mL、1.524 ng/mL及8 ng/mL。
21. 如請求項11至12中任一項之套組，其進一步包含針對tPSA之阻斷抗體。
22. 如請求項11至12中任一項之套組，其進一步包含對該前列腺抗原

具有特異性的可檢測抗體。

23. 如請求項22之套組，其該可檢測抗體係經由下列標記：酶、放射性同位素、膠態金屬、螢光化合物、磁性化合物、化學發光化合物、生物發光化合物或其組合。
24. 如請求項11至12中任一項之套組，其進一步包含對該前列腺抗原具有特異性的生物素化捕獲抗體。
25. 一種製備用於量化試樣中前列腺抗原含量之前列腺抗原標準品之方法，該方法包含：
 - (i) 獲得與前列腺癌相關之抗原，其中該抗原包含總前列腺特異性抗原(tPSA)、游離前列腺特異性抗原(fPSA)、完整前列腺特異性抗原(iPSA)及/或人類激肽釋放素(human kallikrein) 2 (hK2)；
 - (ii) 製備該前列腺抗原於適宜緩衝液中之儲備溶液，其中該儲備溶液之效價介於i)男性個體之目標群體之上四分位數之該前列腺抗原血液含量與ii)較該男性個體之目標群體之上四分位數之該前列腺抗原血液含量高75倍之前列腺抗原含量；及
 - (iii) 藉由連續稀釋該儲備溶液來製備前列腺抗原標準品組，使得前列腺抗原標準品之每一中間效價在對數尺上與其上及下之效價等距，且使得該前列腺抗原標準品組之最小非零效價之量係低於該免疫分析之量化極限。

圖式

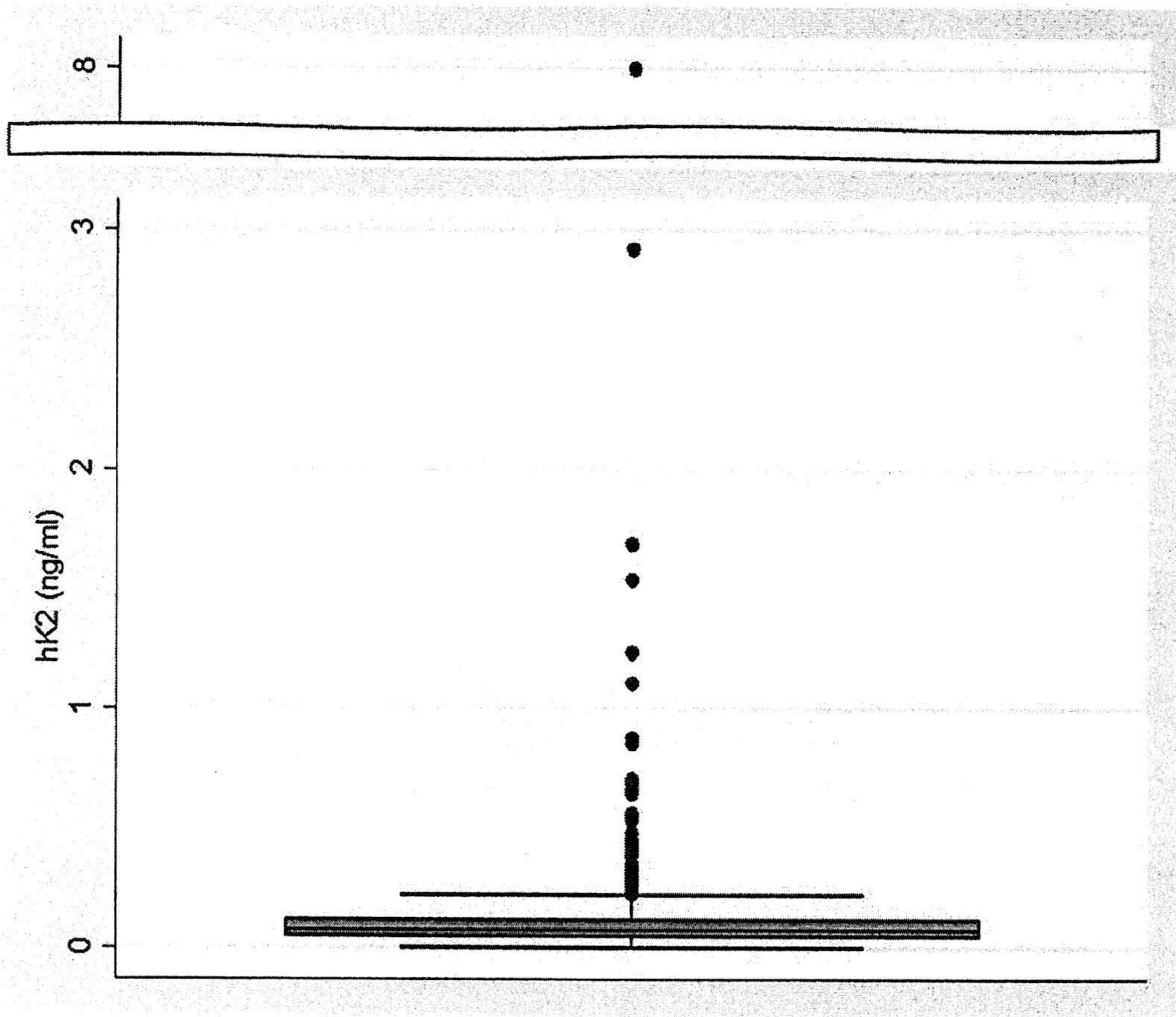


圖 1

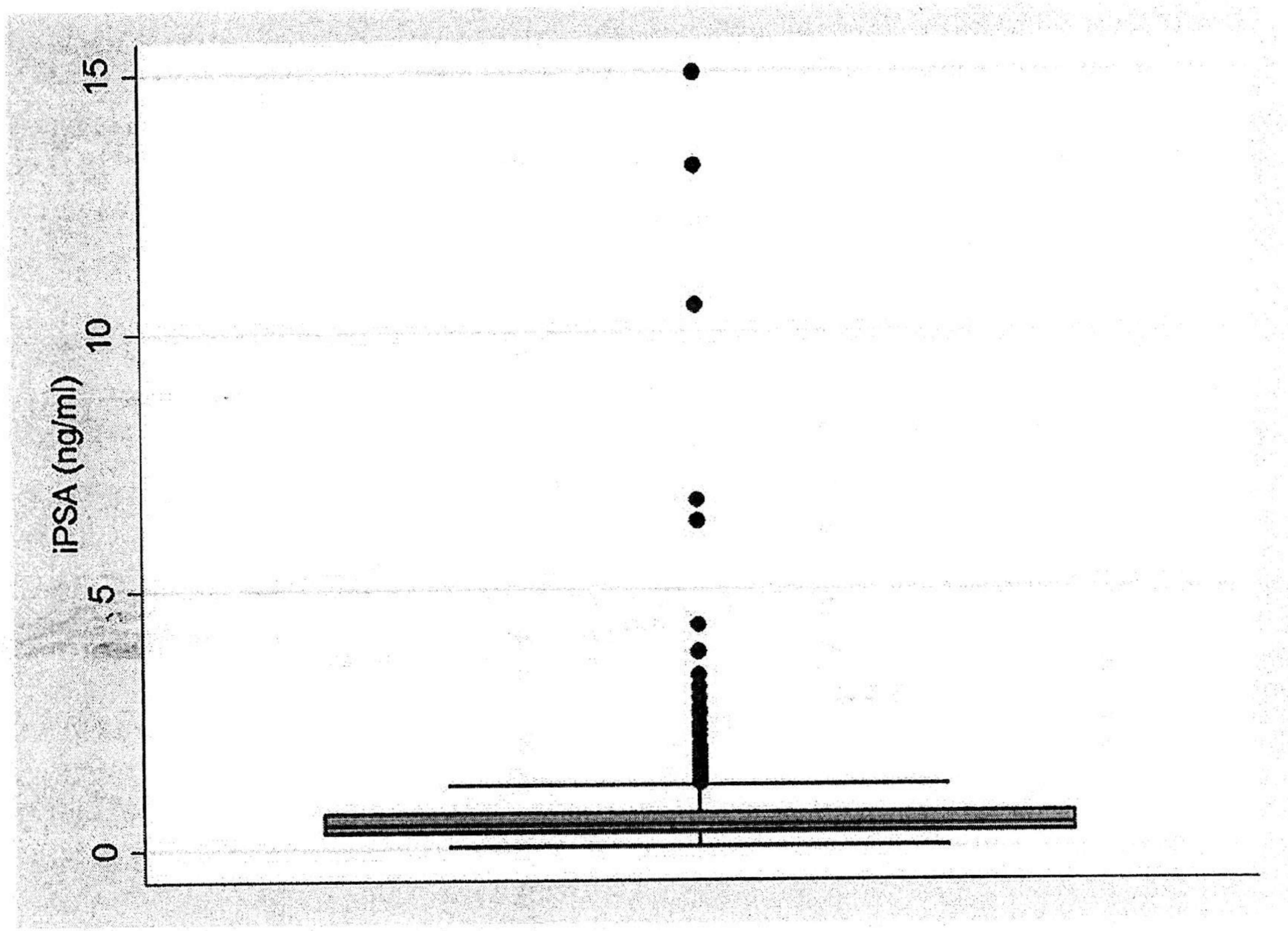


圖 2