

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/00

G01N 27/26 G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01821657.9

[43] 公开日 2004 年 10 月 13 日

[11] 公开号 CN 1537170A

[22] 申请日 2001.11.16 [21] 申请号 01821657.9

[30] 优先权

[32] 2000.11.20 [33] US [31] 60/252,452

[86] 国际申请 PCT/US2001/043424 2001.11.16

[87] 国际公布 WO2002/046448 英 2002.6.13

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.30

[71] 申请人 东弗吉尼亚医学院

地址 美国弗吉尼亚州

[72] 发明人 G·L·小赖特

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 周承泽

权利要求书 11 页 说明书 41 页 附图 8 页

[54] 发明名称 定量检测前列腺特异性膜抗原和其它前列腺标记的方法和装置

[57] 摘要

本发明提供检测和量化血清样品及其它类型样品中的 PSMA、PSMA' 和其它前列腺标记物用于区别前列腺癌、良性前列腺增生和阴性诊断。还提供了诊断性检测编码细胞溶解产物和其它样品来源中的前列腺标记物核酸(如 mRNA)。除多重检测/定量这些基于蛋白质和核酸的标记外,本发明还包括生物芯片、试剂盒和整合系统。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种量化样品中 PSMA 或 PSMA'的方法, 其特征在于, 所述方法包括:
 - (a) 使样品与至少一种能捕获 PSMA 或 PSMA'的基质结合的吸附剂接触, 从而
- 5 捕获样品中的 PSMA 或 PSMA'; 和
 - (b) 用气相离子光谱法量化捕获的 PSMA 或 PSMA'。
2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述样品是血清。
3. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述样品包括一种或多种体液、细胞溶解产物、精液、精浆、前列腺液、唾液、血液、淋巴、肺/支气管洗液、粘液、粪
- 10 便、乳头分泌物、痰、眼泪或尿。
4. 如权利要求 3 所述的方法, 其中, 所述的细胞溶解产物衍生自前列腺组织或细胞。
5. 如权利要求 3 所述的方法, 其中, 所述的细胞溶解产物衍生自一种或多种原代组织或细胞、培养的组织或细胞、正常的组织或细胞、患病的组织或细胞、良
- 15 性组织或细胞、癌性组织或细胞、唾液腺组织或细胞、小肠组织或细胞、神经组织或细胞、肾组织或细胞、淋巴组织或细胞、膀胱组织或细胞、泌尿生殖组织或细胞、肿瘤组织或细胞、或肿瘤新生脉管组织或细胞。
6. 如权利要求 1 所述的方法, 它还包括分级分离样品中的生物分子以收集包括 PSMA 或 PSMA'的样品组分, 其中所述样品组分被用作(a)中的样品。
- 20 7. 如权利要求 6 所述的方法, 其中, 生物分子被一种或多种电泳、透析、过滤或离心方法分级分离。
8. 如权利要求 6 所述的方法, 其中, 生物分子被一种或多种高效液相层析、亲和层析、离子交换层析或大小排阻层析方法分级分离。
9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 生物分子被以下方法分级分离:
 - (i) 将样品中的生物分子分离到一维或二维斑点阵列中, 其中各斑点包含一
- 25 种或多种生物分子; 和
 - (ii) 从阵列中选择并除去怀疑含有 PSMA 或 PSMA'的斑点。
10. 如权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述方法还包括在用气相离子光谱法分析所选斑点之前, 用酶消化所选斑点中的生物分子。
- 30 11. 如权利要求 9 所述的方法, 它还包括将检测到的 PSMA 或 PSMA'的量与对照相比。

12. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, (a) 还包括除去被捕获的 PSMA 或 PSMA' 以外的物质。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述物质通过一种或多种洗涤除去。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其中, 一种或多种洗涤各包括相对于至少一种前面的洗涤相同或不同的洗脱条件。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中, 洗脱条件随 pH、缓冲容量、离子强度、水结构特征、去污剂类型、去污剂强度、疏水性、介电常数或至少一种溶质的浓度而不同。

16. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述至少一种基质结合的吸附剂包括至少一种层析吸附剂。

17. 如权利要求 16 所述的方法, 其中, 所述至少一种层析吸附剂包含一种或多种阴离子吸附剂、阳离子吸附剂、疏水作用吸附剂、亲水作用吸附剂或金属螯合吸附剂。

18. 如权利要求 17 所述的方法, 其中, 所述金属螯合吸附剂包括镍或钴。

19. 如权利要求 17 所述的方法, 其中, 所述亲水作用吸附剂包括氧化硅。

20. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述至少一种基质结合的吸附剂包括至少一种生物分子相互作用吸附剂。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其中, 所述至少一种生物分子相互作用吸附剂包括一种或多种亲和吸附剂、多肽、酶、前列腺标记物基质、受体或抗体。

22. 如权利要求 21 所述的方法, 其中, 所述至少一种生物分子相互作用吸附剂包括特异性捕获 PSMA 或 PSMA' 的单克隆抗体。

23. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述至少一种基质结合的吸附剂以包含具有至少一种特征表面的基质的生物芯片提供, 此特征表面包含至少一种结合于该基质的基质结合的吸附剂。

24. 如权利要求 23 所述的方法, 其中, 所述至少一种基质结合的吸附剂包括至少一种特异性捕获 PSMA 或 PSMA' 的单克隆抗体。

25. 如权利要求 23 所述的方法, 其中, 所述至少一种基质结合的吸附剂包括至少一种特异性结合免疫球蛋白的蛋白, 且此方法包括使样品暴露于此免疫球蛋白, 其中所述的免疫球蛋白特异性结合 PSMA 或 PSMA', 从而形成 PSMA-或 PSMA'-复合物, 并使该复合物暴露于至少一种基质结合的吸附剂。

26. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述至少一种基质结合的吸附剂包括与

至少一种吸附剂衍生的珠或树脂。

27. 如权利要求 1 所述的方法, 它还包括将量化的 PSMA 或 PSMA' 的量与对照比较。

28. 如权利要求 1 所述的方法, 它还包括量化样品中的 PSMA 和 PSMA'。

5 29. 如权利要求 28 所述的方法, 它还包括将量化的 PSMA 和 PSMA' 的量相互比较或与对照比较。

30. 如权利要求 28 所述的方法, 它还包括将量化的 PSMA 和 PSMA' 的量的比例与对照比较。

31. 如权利要求 1 所述的方法, 它还包括量化样品中的至少一种其它的前列腺
10 标记物, 其中 (a) 还包括将样品暴露于能捕获至少一种其它前列腺标记物的至少一种基质结合的吸附剂。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 它还包括将量化的 PSMA 或 PSMA' 和至少一种其它的前列腺标记物的量相互比较或与对照比较。

33. 如权利要求 31 所述的方法, 其中, 所述至少一种基质结合的吸附剂以包
15 含具有至少一种特征表面的基质的生物芯片提供, 此特征表面包含至少一种结合于该基质的基质结合的吸附剂, 且其中的前列腺标记物被捕获到至少一个特征表面上。

34. 如权利要求 33 所述的方法, 其中, 所述至少一种基质结合的吸附剂包含
20 特异性结合免疫球蛋白的蛋白质, 且此方法包括使样品暴露于此免疫球蛋白, 每种免疫球蛋白特异性结合一种前列腺生物标记物, 从而形成具有前列腺标记物的复合物, 以及使此复合物暴露于至少一种基质结合的吸附剂。

35. 如权利要求 31 所述的方法, 它还包括将量化的 PSMA 或 PSMA' 和至少一种其它的前列腺标记的量的比例与对照比较。

36. 如权利要求 31 所述的方法, 其中, 所述至少一种其它的前列腺标记物包
25 括一种或多种 PSMA、PSMA'、PSA、游离的 PSA、复合 PSA、PAP、PSP94 或 PSCA。

37. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述气相离子光谱法是激光解吸/电离质谱。

38. 如权利要求 37 所述的方法, 它包括:

(i) 用质谱仪在样品上产生表示一种或多种质/荷比信号强度的数据;

30 (ii) 将此数据转变成计算机可读形式; 以及

(iii) 操作可编程的数字计算机并执行在代表 PSMA 或 PSMA' 的计算机可读数据

中检测信号的算法。

39. 如权利要求 37 所述的方法，其中，激光解吸/电离质谱包括：

(i) 提供适合质谱仪使用其上附有吸附剂的探针；

(ii) 使样品与吸附剂接触；以及

5 (iii) 使 PSMA 或 PSMA' 从探针中解吸并电离，并用质谱仪检测解吸/电离的 PSMA 或 PSMA'。

40. 如权利要求 39 所述的方法，其中，所述基质适于放置在适合质谱仪使用的探针上。

41. 如权利要求 37 所述的方法，其中，激光解吸/电离质谱包括：

10 (i) 提供其上附有吸附剂的基质；

(ii) 使样品与吸附剂接触；

(iii) 将基质置于适合质谱仪使用的其上附有吸附剂的探针上；以及

(iv) 使 PSMA 或 PSMA' 从探针中解吸并电离，并用质谱仪检测解吸/电离的 PSMA 或 PSMA'。

42. 如权利要求 41 所述的方法，其中，所述基质包括用吸附剂衍生的珠或树脂。

43. 一种有助于诊断前列腺癌或良性前列腺增生的方法，其特征在于，所述方法包括：

(a) 检测受试者样品中的 PSMA 或 PSMA'；以及

20 (b) 将测得的 PSMA 或 PSMA' 与前列腺癌、良性前列腺增生的可能诊断或阴性诊断相关连。

44. 如权利要求 43 所述的方法，其中，所述相关性考虑到了样品中 PSMA 或 PSMA' 的存在或缺失以及对照中 PSMA 或 PSMA' 检测的频率。

45. 如权利要求 43 所述的方法，其中，所述相关性考虑到了相对于 PSMA 或
25 PSMA' 的对照量样品中 PSMA 或 PSMA' 的量。

46. 如权利要求 45 所述的方法，其中，高于对照量的 PSMA 或 PSMA' 的量与前列腺癌阳性诊断正相关，低于对照量的 PSMA 或 PSMA' 的量与良性前列腺增生阳性诊断正相关。

47. 如权利要求 43 所述的方法，其中，采用免疫测定法检测样品中的 PSMA 或
30 PSMA'。

48. 如权利要求 43 所述的方法，其中，所述样品是血清。

49. 如权利要求 43 所述的方法, 其中, 所述样品选自体液、细胞溶解产物、精液、精浆、前列腺、唾液、血液、淋巴、肺/支气管洗液、粘液、粪便、乳头分泌物、痰、眼泪和尿。

50. 如权利要求 49 所述的方法, 其中, 所述细胞溶解产物衍生自前列腺组织
5 或细胞。

51. 如权利要求 49 所述的方法, 其中, 所述细胞溶解产物衍生自一种或多种原
代组织或细胞、培养的组织细胞、正常的组织或细胞、患病的组织或细胞、良性
组织或细胞、癌性组织或细胞、前列腺组织或细胞、唾液腺组织或细胞、小肠组织或
10 细胞、神经组织或细胞、肾组织或细胞、淋巴组织或细胞、肿瘤组织或细胞、或肿
瘤新生脉管组织或细胞。

52. 如权利要求 43 所述的方法, 它包括用气相离子光谱法检测 PSMA 或 PSMA'。

53. 如权利要求 53 所述的方法, 其中, 所述气相离子光谱法是激光解吸/电离
质谱。

54. 如权利要求 53 所述的方法, 其中, 所述激光解吸/电离光谱是表面增强的。

15 55. 如权利要求 53 所述的方法, 它包括:

(i) 用质谱仪在样品上产生表示一种或多种质/荷比信号强度的数据;

(ii) 将此数据转变成计算机可读形式; 以及

(iii) 操作可编程的数字计算和执行一种算法, 此算法可确定计算机可读数
据与表明前列腺癌、良性前列腺增生诊断或阴性诊断的数据之间的配合紧密度。

20 56. 如权利要求 55 所述的方法, 其中, 所述算法包括人工智能算法或启发式
学习算法。

57. 如权利要求 56 所述的方法, 其中, 所述人工智能算法包括一种或多种模
糊逻辑指令系统、簇分析指令系统、神经网络或遗传算法。

58. 如权利要求 53 所述的方法, 其中, 激光解吸/电离质谱包括:

25 (i) 提供其上附有至少一种吸附剂的基质;

(ii) 使样品与此至少一种吸附剂接触; 以及

(iii) 使 PSMA 或 PSMA' 从基质中解吸并电离, 并用质谱仪检测解吸/电离的 PSMA
或 PSMA'。

59. 如权利要求 58 所述的方法, 其中, 所述基质是适合光谱仪使用的探针。

30 60. 如权利要求 58 所述的方法, 其中, 所述基质适于放置在适合质谱仪使用的
的探针上。

61. 如权利要求 58 所述的方法, 其中, 所述至少一种吸附剂包含至少一种层析吸附剂。

62. 如权利要求 61 所述的方法, 其中, 所述至少一种层析吸附剂包含一种或多种阴离子吸附剂、阳离子吸附剂、疏水作用吸附剂、亲水作用吸附剂或金属螯合
5 吸附剂。

63. 如权利要求 62 所述的方法, 其中, 所述金属螯合吸附剂包括镍或钴。

64. 如权利要求 62 所述的方法, 其中, 所述亲水作用吸附剂包括氧化硅。

65. 如权利要求 58 所述的方法, 其中, 所述至少一种吸附剂包含至少一种生物分子相互作用吸附剂。

10 66. 如权利要求 65 所述的方法, 其中, 所述至少一种生物分子相互作用吸附剂包含一种或多种亲和吸附剂、多肽、酶、前列腺标记物基质、受体或抗体。

67. 如权利要求 65 所述的方法, 其中, 所述至少一种生物分子相互作用吸附剂包含特异性捕获 PSMA 或 PSMA' 的单克隆抗体。

68. 如权利要求 43 所述的方法, 其中, 此方法包括检测样品中的 PSMA 和 PSMA'
15 并将其关连。

69. 如权利要求 68 所述的方法, 其中, 所述 PSMA 和 PSMA' 存在情况的检测与前列腺癌或良性前列腺增生的阳性诊断相关连。

70. 如权利要求 43 所述的方法, 其中, 所述相关性考虑到了样品中 PSMA 和 PSMA' 的存在或缺失以及对照中 PSMA 和 PSMA' 检测的频率。

20 71. 如权利要求 70 所述的方法, 其中, 所述相关性考虑到样品 PSMA 和 PSMA' 的量或其比率, PSMA 和 PSMA' 的相对对照量或其比率。

72. 如权利要求 43 所述的方法, 其中, 所述方法包括检测样品中至少一种其它的前列腺标记物并将其相关连。

73. 如权利要求 72 所述的方法, 其中, 所述至少一种其它前列腺标记物包括
25 一种或多种 PSMA、PSMA'、PSA、游离的 PSA、复合的 PSA、PAP、PSP94 或 PSCA。

74. 如权利要求 72 所述的方法, 其中, 所述 PSMA 或 PSMA' 和至少一种其它前列腺标记物存在情况的检测与前列腺癌或良性前列腺增生的阳性诊断相关连。

75. 如权利要求 72 所述的方法, 其中, 所述相关性考虑到样品中 PSMA 或 PSMA' 和至少一种其它前列腺标记物的存在和缺失情况以及对照中 PSMA 或 PSMA' 和至少
30 一种其它前列腺标记物检测的频率。

76. 如权利要求 75 所述的方法, 其中, 所述相关性考虑到相对于 PSMA 或 PSMA'

和至少一种其它前列腺标记物的对照量或量的比率，样品中 PSMA 或 PSMA' 和至少一种其它前列腺标记物的量或量的比率。

5 77. 一种可移动插入气相离子分光计的生物芯片，其特征在于，所述芯片包含具有至少一个特征表面的基质，此特征表面包含至少一种结合到该基质的吸附剂，其中至少一种吸附剂能够捕获 PSMA 或 PSMA'。

78. 如权利要求 77 所述的芯片，其中，所述基质包含一种或多种玻璃、陶瓷、塑料、磁性材料、聚合物、有机聚合物、导电聚合物、天然生物聚合物、金属、合金或涂有有机聚合物的金属。

10 79. 如权利要求 77 所述的生物芯片，其中，所述至少一种吸附剂在至少一种洗脱条件下能分辨样品中的 PSMA 或 PSMA'。

80. 如权利要求 77 所述的生物芯片，其中，所述至少一种吸附剂包含至少一种层析吸附剂。

15 81. 如权利要求 80 所述的生物芯片，其中，所述至少一种层析吸附剂包含一种或多种阴离子吸附剂、阳离子吸附剂、疏水作用吸附剂、亲水作用吸附剂或金属螯合吸附剂。

82. 如权利要求 81 所述的生物芯片，其中，所述金属螯合吸附剂包含镍或钴。

83. 如权利要求 81 所述的生物芯片，其中，所述亲水作用吸附剂包含氧化硅。

84. 如权利要求 77 所述的生物芯片，其中，所述至少一种吸附剂包含至少一种生物分子相互作用吸附剂。

20 85. 如权利要求 84 所述的生物芯片，其中，所述至少一种生物分子相互作用吸附剂包含一种或多种亲和吸附剂、多肽、酶、前列腺标记物基质、受体或抗体。

86. 如权利要求 84 所述的生物芯片，其中，所述至少一种生物分子相互作用吸附剂能包含特异性捕获 PSMA 或 PSMA' 的单克隆抗体。

25 87. 如权利要求 77 所述的生物芯片，其中，所述至少一种特征表面包含多个特征表面。

88. 如权利要求 87 所述的生物芯片，其中，所述多个特征表面排列成行、正交阵列、环形或 n-边多边形排列，其中 n 是 3 或更大。

89. 如权利要求 87 所述的生物芯片，其中，所述多个特征表面包含逻辑或空间阵列。

30 90. 如权利要求 87 所述的生物芯片，其中，多个特征特征包含相同或不同的吸附剂或其一种或多种组合。

91. 如权利要求 87 所述的生物芯片, 其中, 多个特征表面中至少有两个包含相同或不同的吸附剂或其一种或多种组合。

92. 如权利要求 87 所述的生物芯片, 除含有至少一种能够捕获 PSMA 或 PSMA' 的吸附剂外, 它还包含至少一种其它的吸附剂, 其中所述至少一种其它的吸附剂在
5 多个特征表面中的一个或多个与基质结合。

93. 如权利要求 92 所述的生物芯片, 其中, 所述至少一种其它的吸附剂能够捕获至少一种其它的前列腺标记物。

94. 如权利要求 93 所述的生物芯片, 其中, 所述至少一种前列腺标记物包括 PSMA、PSMA'、PSA、游离的 PSA、复合的 PSA、PAP、PSP94 或 PSCA 中一种或多种。

10 95. 一种试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包含:

(a) 至少一种能捕获 PSMA 或 PSMA' 的吸附剂;

(b) 一套通过将样品暴露于吸附剂以从样品中捕获 PSMA 或 PSMA' 并用气相离子光谱法量化捕获的 PSMA 或 PSMA' 的说明书; 以及

(c) 至少一个用于包装吸附剂和此套说明书的容器。

15 96. 如权利要求 95 所述的试剂盒, 它还包含至少一种用于洗涤吸附剂以除去被捕获的 PSMA 或 PSMA' 以外的物质的洗脱剂。

97. 如权利要求 95 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种吸附剂包含至少一种固相吸附剂。

98. 如权利要求 97 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种固相吸附剂作为包含
20 具有至少一个特征表面的基质的生物芯片提供, 此特征表面包含至少一种结合于该基质的固相吸附剂。

99. 如权利要求 98 所述的试剂盒, 其中, 所述基质是适合气相离子分光计使用的探针。

100. 如权利要求 99 所述的试剂盒, 其中, 所述试剂盒还包含适合气相离子分
25 光计使用的探针。

101. 如权利要求 100 所述的试剂盒, 其中, 所述探针包含具有多个特征表面的基质。

102. 如权利要求 101 所述的试剂盒, 其中, 所述多个特征表面的各个面均包含一种或多种结合于该基质的吸附剂。

30 103. 如权利要求 101 所述的试剂盒, 其中, 所述多个特征表面排列成行、正交阵列、环形或 n-边多边形排列, 其中 n 是 3 或更大。

104. 如权利要求 101 所述的试剂盒, 其中, 所述多个特征表面包含逻辑或空间阵列。

105. 如权利要求 97 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种固相吸附剂包含用至少一种吸附剂衍生的珠或树脂。

5 106. 如权利要求 105 所述的试剂盒, 其中, 用至少一种吸附剂衍生的珠或树脂适合放置在适合气相离子分光计使用的探针上。

107. 如权利要求 106 所述的试剂盒, 其中, 所述试剂盒还包含适合气相离子分光计使用的探针。

10 108. 如权利要求 95 所述的试剂盒, 其中, 所述试剂盒还包含至少一种参照品或对照品。

109. 如权利要求 95 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种吸附剂包含至少一种层析吸附剂。

15 110. 如权利要求 109 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种层析吸附剂包含一种或多种阴离子吸附剂、阳离子吸附剂、疏水作用吸附剂、亲水作用吸附剂或金属螯合吸附剂。

111. 如权利要求 110 所述的试剂盒, 其中, 所述金属螯合吸附剂包含镍或钴。

112. 如权利要求 110 所述的试剂盒, 其中, 所述亲水作用吸附剂包含氧化硅。

113. 如权利要求 95 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种吸附剂包含至少一种生物分子相互作用吸附剂。

20 114. 如权利要求 113 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种生物分子相互作用吸附剂包含一种或多种亲和吸附剂、多肽、酶、前列腺标记物基质、受体或抗体。

115. 如权利要求 113 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种生物分子相互作用吸附剂包含特异性捕获 PSMA 或 PSMA' 的单克隆抗体。

25 116. 如权利要求 95 所述的试剂盒, 其中, 除含有至少一种能够捕获 PSMA 或 PSMA' 的吸附剂外, 所述试剂盒还包含至少一种其它的吸附剂。

117. 如权利要求 116 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种其它的吸附剂能捕获至少一种其它的前列腺标记物。

30 118. 如权利要求 117 所述的试剂盒, 其中, 所述至少一种其它的前列腺标记物包括一种或多种 PSMA、PSMA'、PSA、游离的 PSA、复合的 PSA、PAP、PSP94 或 PSCA。

119. 如权利要求 95 所述的试剂盒, 它还包含(1)一种洗脱剂, 其中当用洗脱

剂洗涤时, PSMA 或 PSMA'或至少一种其它的前列腺标记物被保留在至少一种吸附剂上, 或(2)在吸附剂与样品接触后用洗脱剂洗涤至少一种吸附剂的说明书。

120. 一种量化至少一个样品中 PSMA 或 PSMA'的装置或整合系统, 其特征在于, 所述装置或整合系统包括:

- 5 (a) 至少一种能够捕获至少一个样品中 PSMA 或 PSMA'的吸附剂; 以及
 (b) 用于量化被捕获到至少一种吸附剂上的 PSMA 或 PSMA'的气相离子分光计。

121. 如权利要求 120 所述的装置或整合系统, 其中, 所述气相离子分光计是激光解吸/电离质谱仪。

122. 如权利要求 120 所述的装置或整合系统, 它还包括可操作连接到气相离子分光计、包含至少一种计算机程序的计算机或计算机可读媒体, 所述程序有以下一种或多种:

- (i) 至少一个分析或处理被气相离子分光计量化的数据的指令系统;
 (ii) 至少一个将数据输入数据库的指令系统; 或
 (iii) 至少一个用于确定至少一种量化的前列腺标记物或量化的前列腺标记
15 物的组合与前列腺癌、良性前列腺增生诊断或阴性诊断之间相关性的指令系统。

123. 如权利要求 120 所述的装置或整合系统, 其中, 所述至少一种吸附剂包含至少一种固相吸附剂。

124. 如权利要求 123 所述的装置或整合系统, 其中, 所述至少一种固相吸附剂以包含具有一个特征表面的基质的生物芯片提供, 此特征表面包含至少一种结合
20 于该基质的固相吸附剂。

125. 如权利要求 124 所述的装置或整合系统, 其中, 所述基质是适合气相离子分光计使用的探针。

126. 如权利要求 124 所述的装置或整合系统, 其中, 所述基质包含多个特征表面。

25 127. 如权利要求 126 所述的装置或整合系统, 其中, 所述多个特征表面排列成行、正交阵列、环形或 n-边多边形排列, 其中 n 是 3 或更大。

128. 如权利要求 126 所述的装置或整合系统, 其中, 所述多个特征表面包含逻辑或空间阵列。

30 129. 如权利要求 123 所述的装置或整合系统, 其中, 所述至少一种固相吸附剂包含用至少一种吸附剂衍生的珠或树脂。

130. 如权利要求 129 所述的装置或整合系统, 其中, 所述用至少一种吸附剂

衍生的珠或树脂适合置于适合气相离子分光计使用的探针上。

131. 一种量化样品中前列腺标记物 mRNA 的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

(a) 使样品暴露于至少一种捕获前列腺标记物 mRNA 的吸附剂, 从而捕获样品中的前列腺标记物 mRNA; 以及

5 (b) 用气相离子分光法量化捕获的前列腺标记物 mRNA。

132. 如权利要求 131 所述的方法, 其中, 所述样品包括前列腺组织或细胞衍生的细胞溶解产物。

133. 如权利要求 131 所述的方法, 其中, 所述气相离子分光法是激光解吸/电离质谱法。

10 134. 如权利要求 131 所述的方法, 它还包括将捕获的前列腺标记物 mRNA 的量与对照相比较。

135. 如权利要求 131 所述的方法, 它还包括量化多种不同的前列腺标记物 mRNA。

15 136. 如权利要求 131 所述的方法, 其中, 所述至少一种吸附剂包含至少一种生物分子相互作用吸附剂。

137. 如权利要求 136 所述的方法, 其中, 所述至少一种生物分子相互作用吸附剂包含至少一种前列腺标记物 cDNA。

138. 一种有助于诊断前列腺癌或良性前列腺增生的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

20 (a) 在受试者样品中检测至少一种前列腺标记物 mRNA; 和

(b) 使至少一种所测前列腺标记物 mRNA 与前列腺癌、良性前列腺增生的可能诊断或阴性诊断相关连。

25 139. 一种生物芯片, 其特征在于, 所述生物芯片包含具有至少一个特征表面的基质, 所述特征表面包含至少一种结合于该基质的吸附剂, 其中所述至少一种吸附剂能够捕获一种或多种前列腺标记物 mRNA。

140. 一种试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括:

(a) 至少一种捕获前列腺标记物 mRNA 的吸附剂;

(b) 一套通过将样品暴露于吸附剂以从样品中捕获前列腺标记物 mRNA 并用气相离子分光法量化捕获的前列腺标记物 mRNA 的说明书; 以及

30 (c) 至少一个用于所述包装吸附剂和此套说明书的容器。

定量检测前列腺特异性膜抗原和其它前列腺标记的方法和装置

5 版权通知

按照 37C.F.R. § 1.71(e), 申请人指出本公开的一部分包含受版权保护的材料。版权所有人反对任何人传真复制本专利文件或专利公开, 因为它已出现在专利和商标局专利档案或记录中, 然而在别的方面却无论怎样都保留所有的版权。

10 与相关申请的相互参照

按照 35U.S.C. §§ 119 和/或 120, 及任何其它适用的法规或规则, 本申请要求 2000 年 11 月 20 日提交的 USSN 60/252, 452 的利益和优先权, 其内容纳入本公开作为参考文献。

15 关于联邦政府资助的研究和开发对发明权的声明

本发明得到国家癌症研究所 CA85067 和弗吉尼亚前列腺中心的支持。政府对本发明拥有一定的权利。

发明的背景

20 前列腺癌是人类最常见的非皮肤癌。对于非转移型前列腺癌, 不象非器官局限型疾病, 尤其是如果雄激素剥夺治疗失败, 一般尚有有效的治疗方案(Crawford 等, (1989) “在前列腺癌中用和不用氟他胺的亮丙瑞林的控制试验”, N. Engl. J. Med. 321: 419-424 和 Lepor 等, (1982) “激素治疗对男性晚期前列腺癌患者生存的影响” J. Urol. 128:335-340)。因此该病的早期诊断是绝对必要的。

25 目前使用的某些前列腺癌筛查方法是高度侵袭性的, 且对早期检测通常缺乏足够的敏感性。例如, 在直肠指诊期间, 医生们试图通过直肠壁触摸前列腺来发现前列腺异常, 如肿块或前列腺肿大。膀胱镜检查是另一种常用的侵袭性前列腺癌诊断技术, 该技术对检测早期前列腺癌一般也缺乏足够的敏感性。

30 侵袭性较低的前列腺癌诊断方法包括检测其标记的差异性存在, 如各种体液中的前列腺特异性抗原(PSA)生物标记。诊断试验的效果一般取决于其特异性和选

择性。对任何条件提高真阳性和真阴性诊断百分率的方法是医学目的所需的。就前列腺癌而论，目前的诊断试验不完全令人满意，因为它们提供了显著数量的假阳性和假阴性结果。例如，虽然目前所有的以 PSA 为基础的试验广泛认为是一种最佳癌标记，它常常不能正确地区别良性(如良性前列腺增生，BPH)和恶性前列腺疾病，而且可能对一些明显的前列腺癌作出假阴性诊断(Osterling(1991)“前列腺特异性抗原：前列腺腺癌的最有用肿瘤标记的批判性评价”，J.Urol. 145:907-923 和 Pannek 和 Partin(1998)“在临床确定的前列腺癌中 PSA 对分期和预后预测的作用及游离 PSA 的百分率，Sem.Urol.Oncol. 16:100-105)。事实上，证据表明改进检测、诊断和预后中没有一种标记是有效的在。

其它标记，如前列腺特异性膜抗原(PSMA)例如在原发性和转移性前列腺癌中的差异存在，表明单检测此标记或与其它标记(如 PSA)联合可用来诊断前列腺癌。PSMA 是一种 750 个氨基酸，100Kda 跨膜糖蛋白(Israeli 等，(1993)“编码前列腺特异性膜抗原的互补 DNA 的分子克隆”，Cancer Res. 53:227-30)。例如，通过免疫组织化学，Western 印迹和 RT-PCR 在前列腺组织中检测到高的 PSA 表达，在如脑、唾液腺、小肠和循环的瘤细胞中检测到较弱的表达，参见例如，Israeli 等，(1994)“前列腺特异性膜抗原的表达”，Cancer Res. 54:1807-1811，Israeli 等(1994)“灵敏的嵌套式逆转录聚合酶链反应检测循环性前列腺瘤细胞：前列腺特异性膜抗原和基于前列腺特异性抗原试验的比较”，Cancer Res. 54:6306-6310，和 Wright 等(1995)“前列腺特异性膜抗原在正常、良性和恶性前列腺组织中的表达”，Urologic Oncology 1:18-28。使用酶联免疫吸附试验(ELISA)还检测了各种样品中的 PSMA。参见 SOKOLOFF 等，(2000)“前列腺特异性膜抗原的单克隆双夹心试验：在组织、精液和尿中的水平”，Prostate 43:150-157。此外，还鉴定到一种截短的 PSMA，即 PSMA'缺乏 N-末端序列或跨膜区(Su 等，(1995)“交替剪接的变体或前列腺特异性膜抗原 RNA：作为潜在性测量或进展的表达率”，Cancer Res. 55:1441-1443)。然而，这些技术中没有一种已成功地用来可靠地量化血清中 PSMA 或 PSMA'的量，或者用来确定 PSMA 或 PSMA'水平和前列腺癌或 BPH 之间的清楚相关性。

由于缺乏灵敏的量化体液中 PSMA 和 PSMA'的免疫测定方法，阻碍了确定 PSMA 和 PSMA'作为临床或预后性生物标记的临床用途的努力。本发明提供了一种可靠的系统以量化 PSMA 和/或 PSMA'蛋白质或其编码核酸以及说明它们作为前列腺癌和 BPH 的诊断/预后标记的潜在用途。本发明还提供了一个创新性平台以快速和同时

检测和测量除 PSMA 和/或 PSMA'以外的其它标记。在完全阅读了以下公开内容后，这些和其它特点将变得显而易见。

发明概述

5 已发现蛋白质，如 PSMA 和 PSMA'和/或编码这些蛋白质核酸(如 mRNA)可作为前列腺癌(CAP)或良性前列腺增生中的标记与阴性诊断进行比较的功能。与阴性诊断相比，这些标记可在各方面、更经常地检测到，不太经常地检测到或有差别地检测到。在患者样品中，单独或联合测定这些标记提供了信息，即诊断医师可相
10 其与可能诊断为前列腺癌、良性前列腺增生或与阴性诊断(如正常或无疾病)相关连。更具体地，PSMA 和 PSMA'的量高于正常范围与前列腺癌诊断正相关，而 PSMA 和 PSMA'的量低于正常范围与良性前列腺增生或前列腺炎正相关性。这些标记的特征在于其分子量通过层析分离结合质谱可与其它样品组分(如其它蛋白质)相分辨。在较佳实施例中，分辨的方法包括表面增强的激光解吸/电离(SELDI)质谱，其中在向分析物提供其解吸和电离的能源中，质谱探针的表面起着积极的作用，
15 基于亲和力捕获表面增强的 LDI 免疫测定提供了开发临床诊断试验的明显优点，包括量化除相关核酸以外的 PSMA 和 PSMA'，其它基于蛋白质的前列腺标记的能力，以及同时检测和测量多种 PSMA 同种型和其它前列腺标记的能力。

在一个方面，本发明提供了量化样品中 PSMA 或 PSMA'的方法。此方法包括分级分离测试样品，分离含有 PSMA/PSMA'的样品和使用气相离子光谱法测定样品中的 PSMA/PSMA'。在一个实施例中，此方法包括(a)使样品与基质结合的吸附剂接触，
20 此吸附剂能捕获样品中的 PSMA 或 PSMA'，和(b)用气相离子光谱法量化捕获的 PSMA 或 PSMA'。虽然可任选使用许多不同类型的样品，但优选的样品包括血清和细胞裂解物(如衍生自前列腺组织或细胞)。

在一个实施例中，此方法还包括分级分离样品中的生物分子以收集包括 PSMA
25 或 PSMA'的样品组分，其中该样品组分用作(a)中的样品。例如，使用电泳、透析、过滤、离心等任选地分级分离生物分子。在另一个实施例中，使用高效液相层析、亲和层析、离子交换层析、大小排阻层析等分级分离生物分子。在又一实施例中，使用(i)将样品中的生物分子，分离成一维或二维的点阵列，其中各点含有一个或多个生物分子和(ii)从阵列中选择和取出怀疑含有 PSMA 或 PSMA'的点。任选地，
30 该方法还包括用酶消化所选点中的生物分子然后用气相离子光谱法分析所选点。此外，该方法通常包括与对照比较检测的或定量的 PSMA 或 PSMA'的量。

定量检测 PSMA 或 PSMA'的方法还包括其它样品制备或预分级分离技术。例如，(a) 任选地还包括除去被捕获的 PSMA 或 PSMA'以外的物质，如在样品与吸附剂接触之前。在此实施例中，通常经一次或多次洗涤除去该物质，其中每次洗涤包括采用相同或不同于前面洗涤的洗脱条件，例如，洗脱条件根据 PH、缓冲容量、离子强度、水结构特点、去污剂类型、去污剂强度、疏水性、介电常数、溶质的浓度等而不同。

本发明利用各种类型的基质结合的吸附剂以捕获靶向前列腺标记，如 PSMA 或 PSMA'。任选地，该基质结合的吸附剂作为生物芯片提供，包括具有至少一个特征表面(surface feature)的基质，该特征表面是具有结合于该基质的基质结合吸附剂。在某些实施例中，该基质结合的吸附剂包括特异性捕获 PSMA 或 PSMA'的单克隆抗体。在其它实施例中，该基质结合的吸附剂包括特异性结合免疫球蛋白的一种蛋白质。在这些实施例中，该方法包括使样品与免疫球蛋白接触，其中的免疫球蛋白能特异性结合 PSMA 或 PSMA'以形成 PSMA-或 PSMA'复合物，并使该复合物与基质结合的吸附剂接触。或者，该基质结合的吸附剂包括用吸附剂衍生的珠或树脂。

在某些实施例中，该方法包括量化样品中的 PSMA 和 PSMA'。当量化样品中的 PSMA 和 PSMA'时，该方法一般还包括相互比较或与对照比较量化的 PSMA 和 PSMA'的量。任选地，该方法包括比较 PSMA 和 PSMA' 的量与对照的比率。

在其它实施例中，该方法也包括量化样品中至少一种其它的前列腺标记，其中(a) 还包括使样品与至少一种能捕获其它前列腺标记的基质结合的吸附剂接触。任选地，该基质结合的吸附剂作为生物芯片提供，包括具有至少一个特征表面的基质，此特征表面包括结合于该基质的基质结合吸附剂，在至少一个特征表面上捕获前列腺标记。在其它实施例中，基质结合的吸附剂包括特异性结合免疫球蛋白的一种蛋白质。在这些实施例中，该方法包括使样品与免疫球蛋白接触，每种免疫球蛋白特异性结合一种前列腺生物标记，以形成具有前列腺标记的复合物，并使该复合物与基质结合的吸附剂接触。其它前列腺标记通常包括，例如 PSMA、PSMA'、前列腺特异性抗原(PSA)、游离的 PSA、复合的 PSA、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性肽 94(PSP94)、前列腺干细胞抗原(PSCA)等。在此实施例中，该方法一般还包括相互比较或与对照比较量化的 PSMA 或 PSMA'和其它前列腺标记的量或者该方法还包括比较 PSMA 或 PSMA' 和其它前列腺标记的量与对照的比率。

在较佳实施例中，气相离子光谱法是激光解吸/电离质谱，例如表面增强的激

光解吸/电离质谱。例如，该方法一般包括(i)用质谱仪对样品产生的数据表明对一种或多种质荷比的信号强度，(ii)将此数据转换成计算机可读形式，和(iii)操作可编程序的数字计算机和执行一种算法，该算法检测代表 PSMA 或 PSMA'的计算机可读数据中的信号。

- 5 在一个实施例中，激光解吸/电离质谱包括(i)提供适合质谱仪使用的探针包括与其连接的吸附剂，(ii)使样品与该吸附剂接触，和(iii)从探针中解吸和电离 PSMA 或 PSMA'，并用质谱仪检测解吸/电离的 PSMA 或 PSMA'。任选地该基质包括适合质谱仪使用的探针，或该基质适合放置于适宜质谱仪使用的探针上。

10 在另一实施例中，激光解吸/电离质谱包括(i)提供包括与其连接的吸附剂的底物，(ii)使样品与该吸附剂接触，(iii)将该基质放置于适合质谱仪使用的探针上，该质谱仪包含与其连接的吸附剂和(iv)从探针中解吸和电离 PSMA 或 PSMA'并用质谱仪检测解吸/电离的 PSMA 或 PSMA'。例如，该基质一般包括用吸附剂衍生的珠或树脂。

15 本发明还涉及辅助诊断前列腺癌或良性前列腺增生的方法。该方法包括(a)检测受试者样品中的 PSMA 或 PSMA'，和(b)将检测的 PSMA 或 PSMA'与可能诊断的前列腺癌、良性前列腺增生或阴性诊断相关连。此相关性通常考虑到样品中 PSMA 或 PSMA'在存在或缺失，和对照中 PSMA 或 PSMA'检测的频率。此外，此相关性还通常考虑到样品中的 PSMA 或 PSMA'的量相对于 PSMA 或 PSMA'的对照量。例如，高于对照量的 PSMA 或 PSMA'的量与前列腺癌的阳性诊断正相关，低于对照量的 PSMA 或 PSMA'的量与良性前列腺增生的阳性诊断正相关。在其它实施例中，使用免疫测定检测样品中的 PSMA 或 PSMA'。

25 在某些实施例中，该方法包括使用气相离子光谱法检测 PSMA 或 PSMA'。在较佳实施例中，该气相离子光谱法是激光解吸/电离质谱，例如表面增强的激光解吸/电离质谱。该方法一般包括(i)用质谱仪对样品产生的数据表明对一种或多种质/荷比的信号强度，(ii)将数据转换成计算机可读形式，和(iii)操作可编程序的数字计算机和执行一种算法，该算法确定计算机可读数据和表明前列腺癌、良性前列腺增生的诊断或阴性诊断的数据之间的配合紧密度(Closeness-of-fit)。该算法任选地包括人工智能算法或启发式学习算法。例如，人工智能算法一般包括模糊逻辑指令设定、簇分析指令设定、神经网络、遗传算法等。

30 在一个方面，激光解吸/电离质谱包括(i)提供包含至少一种与其连接的吸附剂的基质，(ii)使样品与该吸附剂接触，和(iii)从基质中解吸和电离 PSMA 或 PSMA'

和用质谱仪检测解吸/电离的 PSMA 或 PSMA'。在一个实施例中,该基质是适合使用质谱仪的探针。在另一实施例中,该基质适合放置于适宜质谱仪使用的探针上,例如用吸附剂衍生的珠或树脂上。可任选地采用各种层析性或生物分子相互作用性吸附剂。

5 在一个实施例中,该方法包括检测样品中的 PSMA 和 PSMA'及相关性,检测到 PSMA 和 PSMA'的存在通常与前列腺癌或良性前列腺增生的阳性诊断相关。在另一实施例中,此相关性考虑到样品中 PSMA 或 PSMA'的存在或缺失,和对照中 PSMA 和 PSMA'检测的频率。在此实施例中,此相关性通常还考虑到样品中 PSMA 和 PSMA'的量或比率相对于 PSMA 和 PSMA'的对照量或比率。

10 在另一实施例中,该方法包括检测样品中至少一种其它的前列腺标记及相关性。其它前列腺标记一般包括如 PSMA、PSMA'、游离的 PSA、复合的 PSA、PAP、PSP94、PSCA 等。例如,检测到 PSMA 或 PSMA'和其它前列腺标记的存在一般与前列腺癌或良性前列腺增生的阳性诊断相关。在一个方面,此相关性考虑到样品中 PSMA 或 PSMA'和其它前列腺标记的存在与缺失,和对照中 PSMA 或 PSMA'及其它前列腺标记
15 的检测频率。此相关性还任选地考虑到样品中 PSMA 或 PSMA'和其它前列腺标记的量或相对于对照量的比率,或 PSMA 或 PSMA'和其它前列腺标记的量的比率。

 本发明还提供了可移动、可插入气相离子分光计的一种芯片,该芯片包括具有至少一个特征表面的基质,此特征表面是具有结合于该基质的至少一种吸附剂,其中吸附剂能捕获 PSMA 或 PSMA'。在至少一种洗脱条件下,该吸附剂一般能分辨
20 样品中的 PSMA 或 PSMA'。可任选地采用各种层析性或生物分子相互作用性吸附剂。在一个实施例中,该芯片的至少一种特征表面包括多个表面。例如,多个表面的特点是排列成行、正交阵列、环形或 n-边多边形阵列,其中 n 是 3 或更大。多个特征的表面一般包括逻辑或空间阵列。任选地,该多个表面的每一面包含相同或不同的吸附剂,或其一种或多种组合。例如,多个表面的至少两面任选地包括相同
25 或不同的吸附剂,其一种或多种组合。在某些实施例中,芯片还包括除能捕获 PSMA 或 PSMA'的吸附剂以外的至少一种其它的吸附剂,芯片中其它吸附剂与该多个表面的一个或多个表面上的基质结合。其它吸附剂一般能捕获至少一种其它的前列腺标记,如 PSMA、PSMA'、PSA、游离的 PSA、复合的 PSA、PAP、PSP94、PSCA 等。

30 本发明还提供一种试剂盒,它包括(a)能捕获 PSMA 或 PSMA'的至少一种吸附剂,(b)一套通过将样品暴露于吸附剂以从样品中捕获 PSMA 或 PSMA'并用气相离子

光谱法量化捕获的 PSMA 或 PSMA'的说明书,和(c)至少一种包装吸附剂的容器和一套说明书。任选地,该试剂盒还包括至少一种洗涤该吸附剂的洗脱剂,以除去被捕获的 PSMA 或 PSMA'之外的物质。此吸附剂一般包括一种固相吸附剂。在一个实施例中,该固相吸附剂作为一种芯片提供,该芯片包括具有至少一个特征表面的
5 基质,此特征表面是具有结合于该基质的固相吸附剂。该基质通常是适合气相离子分光计使用的一种探针。该试剂盒任选地包括该探针。在某些实施例中,该探针包括具有多个表面的一种基质。例如,该多个表面的每一面任选地包括一种或多种结合于该基质的吸附剂。在其它实施例中,该固相吸附剂包括用吸附剂衍生的珠或树脂。例如,用至少一种附剂衍生的珠或树脂一般适合放置于适宜气相离子分光计使用的探针上。该试剂盒还任选地包括该探针。作为又一种选择方案,
10 该试剂盒还包括至少一种参照品或对照品。

本发明还涉及量化至少一种样品中的 PSMA 或 PSMA'的装置或集成系统,其包括(a)至少一种能捕获样品中的 PSMA 或 PSMA'的吸附剂,和(b)用于量化吸附剂上捕获的 PSMA 或 PSMA'的气相离子分光计。该气相离子分光计任选地是激光解吸/
15 电离质谱仪。此装置或集成系统一般还包括计算机或计算可读媒体,操作性连接于气相离子分光计,包括计算机程序,该程序具有一种或多种如(i)至少一个用于分析或处理气相离子分光计量化的数据的指令系统,(ii)至少一个将数据输入数据库的指令系统,或(iii)至少一个用于确定至少一种定量的前列腺标记或定量的前列腺标记的组合和前列腺癌、良性前列腺增生或阴性诊断之间相关性的指令
20 系统。

本发明还提供一种量化样品中的前列腺标记 mRNA 的方法。该方法包括(a)使样品与能捕获前列腺标记 mRNA 的至少一种吸附剂接触,以捕获样品中的前列腺标记 mRNA,和(b)用气相离子光谱法量化捕获的前列腺标记 mRNA。样品包括如衍生自前列腺组织或细胞的细胞裂解物,而该吸附剂(如生物分子相互作用性吸附剂)
25 一般包括与前列腺标记 mRNA 相对应的前列腺标记 cDNA。在较佳实施例中,气相离子光谱法是激光解吸/电离质谱。另外,该方法一般还包括用与照相比较捕获的前列腺标记 mRNA 的量。任选地,该方法包括量化多种不同的前列腺标记 mRNA。

本发明还涉及一种附加的方法、芯片和涉及检测和量化前列腺 mRNA 的试剂盒。例如,辅助诊断前列腺癌或良性前列腺增生的方法包片(a)检测受试者样品中的
30 至少一种前列腺标记 mRNA,和(b)将至少一种检测到的前列腺标记 mRNA 与可能的前列腺癌、良性前列腺增生或阴性诊断相关连。芯片包括具有至少一个特征表

面的基质，此特征表面是包含结合于该基质的至少一种吸附剂，其中该吸附剂能捕获一种或多种前列腺标记 mRNA。此试剂盒包括(a)至少一种能捕获前列腺标记 mRNA 的吸附剂，(b)一套通过将样品暴露于吸附剂以从样品中捕获前列腺标记物 mRNA 并用气相离子分光法量化捕获的前列腺标记物 mRNA 的说明书，和(c)至少一个包装吸附剂的容器和一套说明书。

附图的简要说明

图 1 用示意图描述为表面增强的激光解吸/电离而配置的一种表面增强的激光解吸/电离飞行时间(TOF)质谱(MS)系统。

10 图 2 用示意图显示 PSMA 表面增强的激光解吸/电离 MS 免疫测定。

图 3 用示意图说明表面增强的激光解吸/电离-TOF-MS 技术。

图 4A-C 显示用于定量测血清 PSMA 的表面增强的激光解吸/电离 MS 免疫测定。将不同浓度的 rPSMA 或血清应用于含有结合的单抗 7E11 的预活化的 PS-1 蛋白芯片(proteinChip®)阵列，洗涤该芯片并经表面增强的激光解吸/电离质谱分析。图 4A 显示不同 rPSMA 浓度(以 1-50ng/ μ l)的光谱，表明强度和峰面积二者的增加与渐增的蛋白质浓度相关。图 4B 显示 rPSMA 的标准曲线。图 4A 中显示的各光谱的重组 PSMA 信号强度按内部标准品(β -半乳糖球蛋白，25fmol/ μ l)归一化。绘制峰比率(rPSMA/内部标准品)对 rPSMA 蛋白质浓度的图谱产生一线性曲线。显示了三次分开质谱的平均值和标准偏差。图 4C 显示从诊断为前列腺癌(PCA)的患者血清样品中检测到的 PSMA。此分析与用于产生 rPSMA 标准曲线的分析相同，除了 100fmol/ μ l β -半乳糖球蛋白作为标准化的内部标准品形成峰值。总血清蛋白的二倍稀释液(即 10、20 和 40 μ g/ μ l)显示了一种线性回归。显示了三次分开质谱的平均值和标准偏差。

图 5 是一图表，显示用亲和力捕获表面增强的激光解吸/电离免疫测定确定取自各位前列腺炎、前列腺癌、良性前列腺增生和正常或阴性诊断患者的样品中血清 PSMA 水平。阴性诊断患者进一步分为男性两个年令亚群：小于 50 岁(<50)和大于 50 岁(>50)。直方图显示各患者群的群体平均 PSMA 水平。

图 6A 和 B 是使用亲和力捕获表面增强的激光解吸/电离免疫测定检测人雄激素依赖的前列腺癌细胞系(LNCaP)的全细胞裂解物中 PSMA 同种型的质谱痕量。图 6A 显示采用 7E11 或 107 抗体，捕捉加有 LNCaP 全细胞裂解物(Ag)+: LNCaP 全细胞裂解物；-: 仅有稀释缓冲液(含 PBS 的 0.1%Triton X-100)中的 PSMA 得到的光

谱。图 6B 显示在 PS-1 和 PS-2 表面上 PSMA 同种型的标准曲线的比较。楔形表明所用的 LNCaP 全细胞裂解物(从 6ng/ μ l、12ng/ μ l、25ng/ μ l 到 50ng/ μ l)的相对量。在较高质/荷比的箭头显示 100KD PSMA 同种型,而在低质/荷比的箭头显示 89KD PSMA'同种型。

5 图 7A-H 显示检测精浆中 PSMA 和 PSA 的多重免疫测定。

定义

除非另有规定,本文采用的所有技术和科学术语具有本领域技术人员通常了解的意义。以下参考文献为技术人员提供了本发明所用的许多术语的一般定义:
10 Singleton 等,《微生物学和分子生物学词典》(第 2 版,1994);《剑桥科学技术词典》(Walker 编,1998);《遗传学词汇》(第 5 版),R、Rieger 等编, Springer Verlag(1991);和 Hale 和 Marham 编《哈珀柯林斯生物学词典》(1991)。如本文可用,除非另有指明以下术语具有赋与它们的意义。

“前列腺癌”指男性前列腺中细胞的失控性(恶性)生长。前列腺包围膀胱基底处的尿道,它负责帮助控制排尿以及形成精液的一些组分。通常根据侵袭性和它们区别于周围前列腺组织的程度,对前列腺癌进行分类或分期。有几种不同的肿瘤分期方法,包括惠特莫尔-朱伊特系统、T 分类和格利桑评分。参见如 Zagars
15 等(1994)“临床确定的前列腺癌的 T 分类。基于放射治疗后疾病结局的评估”, Cancer73(7):1904-1912。为了说明起见,根据惠特莫尔-朱伊特系统采用 A-B-C-D 分期系统对前列腺癌分期。此分期系统包括几个亚期,但基本上采用下列评分对
20 肿瘤分类:(A)肿瘤不可触知,但在显微镜活检中可检测到,(B)可触知的肿瘤限于前列腺,(C)肿瘤扩散超出前列腺,但无远处转移和(D)癌扩散到局部淋巴结、前列腺癌已扩散一般扩散到精囊、膀胱和腹腔并转移到淋巴结、骨、肺、肝和肾。前列腺癌的治疗方案一般包括放射治疗、手术、激素疗法和化学疗法。

“良性前列腺增生”或“BPH”指前列腺的非恶性(非癌性的)增大。它还称为
25 良性前列腺肥大和前列腺结节性增生。在 BPH 中,前列腺的正常成分大小和数量都增长。它们的极大数量可能压迫尿道并阻碍尿液从膀胱流出。这导致尿滞留,并需要频繁导尿。在重症病例中,可出现完全阻塞。BPH 的医学治疗包括药物如非那司提和特拉唑嗪。BPH 中前列腺增大直接依赖于前列腺中的主要雄激素双氢睾酮(DHT)。非那司提(PROSCAR®)阻断产生 DHT 所需的酶,因而降低血液和组织 DHT
30 水平,帮助减少前列腺的大小。特拉唑嗪(HYTRIN®)属于称为 α 1 阻断剂的一类药物,它松弛动脉、前列腺和膀胱颈的平滑肌。松弛膀胱颈周围的平滑肌有助于减

轻 BPH 时前列腺增大引起的尿道阻塞。

“血清(Serum)”或“血清(blood serum)”指凝血后留下的体液(来自血液)的含水部分。例如,通过凝血块形成除去血纤蛋白原、凝血酶原和其它凝血因子后,通常从血浆中留下一一种清亮微黄色液体。

5 本发明中的“标记”或“生物标记”指有机生物分子,如多肽或核酸(如 mRNA 等),与取自对照受试者如诊断阴性或未检测到癌症的人员(如正常或健康受试者)的可比较样品相比,该生物分子有差异地存在于取自前列腺癌或良性前列腺增生的患者的样品中。例如,此标记可以是多肽或核酸(如具有特别明显的分子量),与诊断阴性的患者样品相比,它在前列腺癌患者样品中的水平升高或降低。

10 词组“有差异地存在”指一种标记如多肽或核酸(如分子量特别明显的)的量和/或频率的差异,与取自无前列腺癌(如良性前列腺增生或诊断阴性)患者的可比较样品相比,该标记存在于前列腺癌患者的样品中。例如,此标记可以是多肽或核酸(如 mRNA 等),与对照受试者的样品相比,它在前列腺癌或 BPH 患者样品中的水平升高或降低。另外,此标记可以是多肽或核酸,与对照受试者的样品相比,
15 它在前列腺癌或 BPH 患者的样品中以较高或较低频率检测到。此标记可能在量、频率或两者上有差异地存在。

如果一个样品中检测到的某多肽或核酸的频率在统计学上明显不同(高于或低于)于其它样品(或其它几组样品)和/或对照样品中检测到的该多肽或核酸的频率时,就说一种生物标记如某多肽或核酸在两个样品(如两组样品)之间是有差异
20 地存在。例如,采用斯图顿特 t-检验可以比较两组数据,且 $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。在另一实施例中,如果在一组样品中检测到某多肽或核酸至少约 120%、至少约 130%、至少约 150%、至少约 180%、至少约 200%、至少约 300%、至少约 500%、至少约 700%、至少约 900%、或至少约 1000%比其它几组样品中更频繁或更少,则说该多肽或核酸在两组样品之间是有差异地存在。

25 另外,如果一个样品中的某多肽或核酸的量在统计学上明显不同于其它样品中该多肽或核酸的量,就说该多肽或核酸在两个样品之间是有差异地存在。例如,如果某多肽或核酸至少约 120%、至少约 130%、至少约 150%、至少约 180%、至少约 200%、至少约 300%、至少约 500%、至少约 700%、至少约 900%,或至少约 1000%高于其在其它样品的中存在,或如果在一个样品中可检测到和在另一样品中不能
30 检测到,那么该多肽或核酸在两个样品之间有差异地存在。与无前列腺癌的受试者(如良性前列腺增生患者)相比,某多肽或核酸在取自前列腺癌患者的样品中有

差异性存在的话，可用作标记。

“诊断”指鉴定某病理状况条件的存在或性质。诸诊断方法在敏感性和特异性方面有所不同。诊断试验的“敏感性”是测试阳性的患者的百比率（“真阳性”的百比率）。该试验不能检测出的患者是“假阴性”。未患病的受试者和试验中测试阴性的受试者称为“真阴性”。诊断试验的“特异性”是1减去假阳性率，此处“假阳性”率定义为测试阳性的未患病受试者的比例。而一种具体的诊断方法可能不能提供一种病状的明确诊断，如果该方法能提供有助于诊断的阳性指标，那么它就足够了。

某标记的“测试量”指在测试样品中存在的该标记的量。测试量可以是绝对量(如 $\mu\text{g/ml}$)或相对量(如信号的相对强度)。

某标记的“诊断量”指受试者样品中该标记的量，和前列腺癌或良性前列腺增生的诊断相一致。诊断量可以是绝对量(如 $\mu\text{g/ml}$)或相对量(如信号的相对强度)。

某标记的“对照量”，与该标记的测试量相比，可以是任何数量或数量范围。例如，在前列腺癌患者、BPH患者或没有前列腺癌或BPH的人中，某标记的对照量可以是该标记(如PSMA、PSMA'、PSMA mRNA等)的量。对照量可以是绝对量(如 $\mu\text{g/ml}$)或以相对量(如信号的相对强度)。

“探针”指可移动插入到气相离子光谱仪中的一种装置，包括具有一个表面、或一种或多种特征表面的基质，用于检测存在的标记。探针可包含一个基质或多个基质。本文还使用的术语如蛋白质芯片(ProteinChip®)列阵、生物芯片或芯片指特殊类型的探针。

“基质”或“探针基质”指在其上可提供吸附剂(如通过吸附、沉积等)的一种固相。“特征表面”指基质或探针基质上的特定部分、区段或面积其可提供吸附剂。

“吸附剂”是能吸附某标记的任何物质。本文所用的术语“吸附剂”，指与标记接触的单一物质(“单吸附剂”)(如一种化合物或功能基团)，和与标记接触的多个不同的物质(“多重吸附剂”)。多重吸附剂中的吸附剂物质称为“吸附剂种类”。例如，探针基质上的特征表面可包含特征为具有不同结合特性的许多不同种类的吸附剂(如离子交换材料、金属螯合剂、抗体、cDNA等)的多重吸附剂。

基质材料本身也可能有助于吸附某标记，可认为是“吸附剂”的一部分。“生物分子相互作用性吸附剂”或“生物特异性吸附剂”，如亲和吸附剂、多肽、酶、

前列腺标记基质、受体、抗体(如单克隆抗体等)等,一般对靶标记的特异性高于“层析吸附剂”,后者包括阴离子吸附剂、阳离子吸附剂、疏水作用吸附剂、亲水作用吸附剂、金属螯合吸附剂等。

“吸附”、“捕获”或“保留”指用洗脱剂(选择性阈值调节剂)或洗涤溶液洗涤之前或之后,吸附剂和标记之间的可检测的结合。

“洗脱剂”或“洗涤溶液”指用来介导某标记吸附于吸附剂的一种试剂。洗脱剂和洗涤溶液也称为“选择性阈值调节剂”。洗脱剂和洗涤溶液可用来洗涤和除去探针基质表面上的未结合物质。

“分解”、“分辨”或“标记的分辨”指检测样品中的至少一种标记。分辨包括通过分离和随后的示差检测来检测样品中的多种标记。分辨不要求将混合物中的某标记与所有其它标记完全分离。而分离能允许在至少两个标记之间进行区别就够了。

“气相离子分光计”指一种装置,当样品被挥发和离子化时,其能测量可转换成所形成的离子质荷比的参数。感兴趣的离子通常带有单一电符,质荷比通常简称为质量。气相离子分光计包括例如质谱仪、离子迁移分光仪和总离子电流测量装置。

“质谱仪”指包括入口系统、电离源、离子光学部件、质量分析仪和检测器的气相离子分光计。

“激光解吸质谱仪”指使用激光作为吸附、挥发和使分析物离子化的方法的质谱仪。

“检测”指鉴定欲检测的对象的存在、缺失或数量。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可交换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语用于氨基酸聚合物,其中一种或多种氨基酸残基是相应的天然产生的氨基酸以及天然产生的氨基酸聚合物的类似物、衍生物或模拟物,。例如,通过加入糖类残基形成糖蛋白可修饰或衍生多肽。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”包括糖蛋白及非糖蛋白。

“衍生物”指结构上与另一种物质或化学物质有关的化学物质,通过化学或酶修饰可从另一种物质(即衍生的物质)制备此化学物质。

术语“核酸”指DNA(如cDNA等)和RNA(如mRNA等),它们分别是脱氧核苷酸和核糖核苷酸(或其衍生物)的聚合物或寡聚体。当它们具有相同序列或当一个核酸序列互补于至少另一核酸的部分序列时,这两个核酸序列“相对应”。例如,通过

编码 PSMA 的 mRNA 的 RT-PCR, 产生的 cDNA 与该 mRNA 相对应。

“前列腺标记 cDNA”指与编码前列腺标记如 PSMA、PSMA'、PSA、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性肽 94 (PSP94)、前列腺干细胞抗原(PSCA)等相对应合的 cDNA。通常将用于本发明的前列腺标记 cDNA 作为吸附剂, 通过气相离子光谱法
5 (如表面增强的激光解吸/电离)检测/定量所选的样品源中相应的 mRNA。采用 RT-PCR 等通常产生前列腺标记 cDNA。

“可检测的组成成分”或“标记物”指用光谱、光化学、生物化学、免疫化学或化学方法可检测一种组合物。例如, 有用的标记物包括 32p、35s、荧光染料、电子致密试剂、酶(如 ELISA 中常用的)、生物素-链霉亲和素蛋白、dioxigenin、
10 半抗原和蛋白质(其抗血清或单克隆抗体是可得到的), 或者具有序列互补于靶子的核酸分子。可检测的组成成分常产生可测量的或可检测的信号, 如放射性、生色或荧光信号, 用来量化样品中结合的可检测组成成分的量。可将该可检测组成成分通过共价键, 或通过离子键、范德华或氢键掺入, 如掺入放射性核苷酸或链霉亲和素识别的生物素化的核苷酸, 与引物或探针结合。该可检测组成成分可
15 直接或间接地检测。间接检测可能包括第二种直接或间接可检测的组成成分与该可检测组成成分结合。例如, 可将该可检测组成成分连接于一结合伴侣, 如生物素, 它是链霉亲和素的结合伴侣或一核苷酸序列, 它是互补序列的结合伴侣, 可特异性杂交。结合伴侣本身可直接检测, 例如抗体本身可用荧光分子标记。结合伴侣还可间接检测, 例如具有互补核苷酸序列的核酸可以是分支 DNA 分子的一部分,
20 通过与其它标记的核酸分子杂交该分支的 DNA 分子可检测。(参见如 P、D、Fahrdander 和 A、Klausner, Bio/Technology 6: 1165(1988)。通过闪烁计数、密度法或流式细胞术取得对该信号的量化。

“抗体”指一种免疫球蛋白基因或几种免疫球蛋白基因或其片段实质编码的多肽配体, 它特异性结合并识别一个表位(如抗原)。已知的免疫球蛋白基因包括 K
25 和λ轻链恒定区基因、α、r、δ、ε和μ重链恒定区基因和无数的免疫球蛋白可变区基因。抗体存在方式有, 例如作为完整的免疫球蛋白或作为经各种肽酶消化产生的特性清楚的片段。这包括 Fab'和 F(ab)₂片段。本文使用的术语“抗体”还包括采用重组 DNA 技术对完整抗体的修饰产生的抗体片段或从头合成的抗体片段。它还包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或单链抗体。抗体的“Fc”
30 部分指包括一种或多种重链恒定区结构域 CH1、CH2、CH3 的免疫球蛋白重链部分, 但不包括重链可变区。

“免疫测定”是采用抗体特异地结合抗原的试验。免疫测定的特征是利用特定抗体的特异性结合特性分离、靶向和/或量化抗原。

词组“特异性(或选择性)结合”于抗体或“与抗体特异性(或选择性)免疫反应”，当涉及某蛋白质或某肽时，指能确定在蛋白质和其它生物物质的不均一群体中存在该蛋白质的结合反应。因此，在指定的免疫测定条件下，与特定蛋白质结合的特异抗体至少是背景的两倍，并且实质上不以明显的数量与样品中存在的其它蛋白质结合。在这种条件下，与抗体的特异性结合可能需要所选抗体某特定蛋白质具有特异性。例如，从专门品种的大鼠、小鼠产生针对 PSMA、PSMA'等的多克隆抗体，或可选择人仅获得与 PSMA、PSMA'等起特异免疫反应且不与其它蛋白质起反应的多克隆抗体(除了多态性变体和精液碱性蛋白的等位基因外)。通过采用其它种类动物的分子(吸附)，去掉与 PSMA、PSMA'等交叉反应的抗体可获得这种选择。各种免疫测定方法可用来选择与某特定蛋白质起特异性免疫反应的抗体。例如，固相 ELISA 免疫测定常规地用来选择与蛋白质起特异性免疫反应的抗体(参见如 Harlow 和 Lane,《使用抗体：实验室手册》(1998)，对免疫测定方法和条件的描述可用来确定特异性免疫反应性)。特异性或选择性反应一般至少是背景信号或噪声的两倍，通常为背景的大约 10 到大约 100 倍。

“能量吸收分子”或“EAM”指在质谱仪中吸收电离源能量的分子，从而有助于从探针表面解吸分析物如标记。取决于分析物的大小和性质，可任选地采用能源吸收分子。MALDI 中所用的能源吸收分子通常指“基质”。肉桂酸衍生物、芥子酸(“SPA”)、氰羟基肉桂酸(“CHCA”)和二羟苯甲酸通常在生物有机分子的激光解吸中用作能源吸附分子。

发明详述

引言

在最近二十年中蛋白质化学显著的技术进展建立了质谱法作为蛋白质研究不可缺少的工具(Carr 等, (1991)“分析生物技术中的质谱整合”, Anal. Chem. 63(24):2802-2824;Carr 等,“质谱分析肽和蛋白质的综述”,《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley & Sons, Inc, 纽约, 单元 10.21, 10.21.1-10.21.27 页(1998); Patterson “蛋白质的质谱鉴定和特征分析”, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc, 纽约单元 10.22.10.22.1-10.22.24 页(1998):和 Siuzdak,《用于

生物技术的质谱》(mass Spectrometry for Biotechnology), Academic Press, 圣迭戈(1996)。另外, 质谱有利于分析核酸(Krahmer 等, (2000) “用于鉴定单一核苷酸多态性的 MS 和用于区分异构的 PCR 产物的 MS/MS”, Anal. Chem. 72(17): 4033-4044 和 Koomen 等, (2000) “采用快速蒸发重叠层样品制备, 改进 DNA 的反射模式 DE-MALDI-TOF 分析中的分辨、质量准确度和重现性”, Anal. Chem. 72(16): 3860-3866)。虽然许多基于层析和电泳分离的分辨力在分析上仍是有用的, 但质谱的高灵敏度、速度和重现性促进了其在蛋白质和核酸分析的各方面的用途, 包括发现, 鉴定(如肽图、测序等)、定量和结构鉴定。

与研究基因表达分布图的寡核苷酸芯片技术类似, 蛋白质生物芯片技术已在用质谱分析捕获于探针特征表面上的蛋白质方面取得进展。这种技术利用表面增强的激光解吸/电离飞行时间质谱法有利于制作复杂的生物混合物的蛋白质和核酸分布图。在此技术方案中, 亲和力质谱、基质结合的亲和力试剂、层析或生物特异性、可捕获样品中的分析物。然后从基质中解吸/电离下捕获的分析物并用质谱检测。(参见如 Hutchens 和 Yip(1993) “用于大分子质谱分析的新解吸方法”, Rapid Commun. Mass Spectrom. 7:576-580, Kuwata 等, (1998) “乳铁蛋白的杀菌结构域: 用 SELDI 亲和质谱检测、定量和鉴定血清中的乳铁蛋白”, Hutchens 和 Yip 的, Bioch. Biophys. Res. Comm. 245:761-773、美国专利号 5, 719, 060, 和 W098/59360(Hutchens 和 Yip)。这一创新技术比其它技术如 2D-PAGE 有许多优点。例如, 它快得多、较高的通量、需要数量级较低量的样品, 检测分析物的灵敏度达到微微摩尔到微微微摩尔范围, 能有效地分辨蛋白质、核酸和质量范围约 2Kda 到约 20Kda 的其它组分, 并可直接用于临床试验的开发。

本发明人和同事证明了表面增强的解吸/电离技术和亲和质谱具体用于发现和量化血清、精浆和细胞提取物中的前列腺癌蛋白质标记, 及开发检测已知的前列腺癌标记的免疫测定的效果(Wright 等, (1999) “ProteinChip®-表面增强的激光解吸/电离(SELDI)质谱: 一种检测复杂蛋白质混合物中前列腺癌生物标记的新颖蛋白质芯片技术”, Prostate Cancer and Prostatic Disease, 2:264-276; Xiao 等, (2000) “杆状病毒重组前列腺特异性膜抗原的产生及其在开发一种新颖蛋白质生物芯片量化免疫测定中的用途”, Protein Expr. Purif., 19(1):12-21; 和 Pawletz 等, (2000) “采蛋白质芯片直接对人体组织的癌症进展作快速蛋白质显示分布图”, Drug Development Research, 49:34-42。本发明描述在血清样品检测和量化及其它类型样品中 PSMA、PSMA'和其它前列腺标记, 以及为诊断前列腺

癌或良性前列腺增生而评价这些生物标记的材料和方法。本发明还提供诊断方法，包括检测和量化编码细胞裂解和其它来源中的前列腺标记的核酸(如 mRNA 等)。除多重检测/量化这些基于蛋白质和核酸的标记以外，本发明还包括生物芯片、试剂盒和整合系统。

5

二、标记的特征鉴定

本发明涉及检测/量化前列腺生物标记、PSMA 和 PSMA'。这些前列腺标记的两大类是：(1) 基于蛋白质的标记，和(2) 基于核酸的标记。此外，除 PSMA 或 PSMA' 以外，本发明提供检测和/或量化其它生物标记的多重试验。这些其它基于蛋白质的标记包括如 PSA、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性肽 94(PSP94)、前列腺干细胞抗原(PSCA)等。基于核酸的标记一般包括编码基于蛋白质标记的核酸序列，如 mRNA。不难从各种公众数据库包括 GenBank®t Entrez®蛋白质数据库查明与编码这些和其它感兴趣标记有关的氨基酸序列和 mRNA 序列。感兴趣的生物标记的描述如下。

15

1. 基于蛋白质的标记

采用单克隆 7E1. C5 抗体最初鉴定了 PSMA(Horoszewicz 等，(1987) “针对前列腺癌患者的上皮细胞和血清一种新抗原标记的单克隆抗体”，*Anticancer Res.* 7:927-936)和采用 Western 印迹法在细胞裂解物和精浆中检测为 100Kda 条带。(Feng 等，1991) “7E11-C5 前列腺癌相关抗原的纯化和生化特性鉴定”，*Proc. AACR 32*(摘要 1418): 239; Troyer 等，(1993) “7E11-C5 前列腺瘤相关抗原的分子特性鉴定”，*J. Urol.* 147(摘要 482): 333A; 和 Troyer 等，(1995) “前列腺特异性膜抗原的 7E11-C5.3 表位的生化特征鉴定和作图” *Urologic Oncology* 1:29-37)。它已鉴定为具有非糖基化的分子量约 80-85Kda 的 750-氨基酸、II 型跨膜糖蛋白(Israel; 等，(1993) “(编码前列腺特异性膜抗原的互补 DNA 的分子克隆”，*Cancer Res.* 53:227-230 和 Israel: 等美国专利号 5, 538, 866 “前列腺特异性膜抗原”)。此外，已将编码 PSMA 的基因作图位于染色体 11(Rinker. Schaeffer 等，(1995) “前列腺特异性膜抗原(PSM)基因的定位和作图于人染色体 11”，*Genomics* 30:105)。PSMA 还是一种谷氨酸偏爱的神经羧肽酶/新叶酸水解酶(Pinto 等，(1996) “前列腺特异性抗原：人前列腺癌细胞中的一种新叶酸水解酶”，*Clin. Cancer Res.* 2:11445-11451)。

30

PSMA 表达的增加与进行性和激素难治性前列腺癌有关 (Israel 等, (1994)“前列腺特异性膜抗原的表达”, *Cancer Res.* 54:1807-1811)。采用免疫组织化学, Western 印迹法和 RT-PCR 分析检测了在脑、唾液腺和小肠内弱表达但在前列腺组织中高表达的 PSMA (wright 等, (1995)“正常、良性和恶性前列腺组织中前列腺特异性膜抗原的表达”, *Urologic Oncology* 1:18-28 和 Israel 等, (1994) *Cancer Res.* 54:1807-1811, 同上)。几种其它组织表达 PSMA mRNA, 但不表达该蛋白质。PSMA 还在各种人癌症的新生脉管上表达 (Liu 等, (1997)“针对前列腺特异性膜抗原的胞外域的单克隆抗体也与肿瘤血管内皮反应”, *Cancer Res.* 57:3629-3634)。

PSMA' 是缺乏 N-末端序列 (即跨膜区) 的 PSMA 的截短种类。参见 Su 等, (1995)“前列腺特异性膜抗原 RNA 的另一种剪接变体: 其表达率可作为肿瘤进展的潜在性度量”, *Cancer Res.* 55:1441-1443。PSMA' 中的氨基酸序列包括 PSMA 中的氨基酸 57-750。因此是胞质性的不能用 7E11-C5 抗体检测。采用 RNA 酶保护试验发现全长 PSMA 的表达比从肿瘤提取的 RNA 中的截短 PSMA' 约高 10 倍, 与从 BPH 组织提取的 RNA 中两种形式的表达大约相等, 以及从正常前列腺组织提取的 RNA 中 PSMA 比 PSMA' 多 1/10 (Su 等, (1995) *Cancer Res.* 55:1441-1443, 同上)。在 LNCap 细胞裂解物和血清中已发现两种蛋白质。一种蛋白质是全长 100Kda PSMA, 而另一种较小的 89Kda 蛋白蛋白质怀疑是 PSMA'。

由于缺乏灵敏的免疫测定来量化体液中的这些标记, 因而阻碍了确定 PSMA、PSMA' 和其它前列腺标记作为诊断性或预后性生物标记的临床用途所作的努力。本发明包括使用一种新颖 Proteinchip® 表面增强的激光解吸/电离 (SELDI) 质谱系统 (Ciphergen Biosystems, Inc., CA) 量化 PSMA 和其它标记的免疫测定。为了说明起见, 在一个实施例中, 将小鼠抗-PSMA 单克隆抗体 7W11-C5 固定在 G 蛋白包被的 Protein Chip® 阵列上, 用表面增强的激光解吸/离子化质谱直接鉴定和量化样品中的 100Kda PSMA, 而不使用第二种 PSMA 抗体或标记, 因为它通常用于 ELISA 和其它免疫测定方法。本发明提供了量化血清中 PSMA 的首次成功的技术。

除 PSMA 和 PSMA' 以外, 本发明还提供其它前列腺生物标记的多重试验。这些包括以下标记, 但不受限制。

前列腺特异性抗原是根据本文所述的诊断试验可任选量化的其它前列腺标记的一个例子。它是前列腺癌的一种特性已清楚的标记。PSA 在生物化学上是一种前列腺上皮细胞分泌的 33Kda 丝氨酸蛋白酶。在多种出版物中描述了有关 PSA 的其它细节, 包括如 Carducci 等, (1999)“前列腺特异性抗原和治疗反应的其它标记”,

Urol.Clin, North Am. 26(2):291-302; Henkel(1998), “前列腺癌”, Consum. 32(5):22-27; Henry 和 O'Mahony(1999) “前列腺癌的治疗”, J.Clin Pharm. Ther. 24(2):93-102; 和 Chu(1997) “前列腺特异性抗原和前列腺癌的早期检测”, Tumour Biol. 18(2):123-134。

5 前列腺酸性磷酸酶是任选的根据本文所述方法检测和量化的另一种前列腺标记。雄激素调节人 PAP 和 PSA 的表达, PAP 和 PSA 是两种主要的前列腺上皮特异性分化抗原。有关 PAP 的专门文章包括如 Ahmann 和 Schifman(1987) “在转移性前列腺癌中血清单克隆前列腺特异性抗原和酸性磷酸酶测定之间的预期比较”, J.Urol. 137:431-434; Ercole 等, (1987) “前列腺癌患者的监测和分期中的前列腺特异性抗原和前列腺酸性磷酸酶”, J.Urol. 138:1181-1184; Gittes(1991) “前列腺癌”, N. Eng. J. Med. 324:236-245; Hetherington 等, (1998) “骨内闪烁影法、前列腺酸性磷酸和前列腺特异性抗原对前列腺癌监测的作用”, Eur. Urol. 14:1-5; 和 Myers 和 Grizzle(1997) “前列腺腺癌的发展中生化标记表达的变化”, Biotech Histochem. 72(2):86-95。

15 94 个氨基酸的前列腺分泌性蛋白也可任选地用作前列腺标记, 如在本发明的多个实施例中。PSP94(也叫 β -微精液蛋白)是人前列腺分泌的主要蛋白之一。它是一种小的非糖基化蛋白, 富含半胱氨酸残基, 首先分离作为人精浆的主要蛋白。其后鉴定了它的同源性蛋白及在灵长类、猪和啮齿动物中克隆了它们的 cDNA 或基因。在以下参考文献中可找到与 PSP94 有关的其他信息, 如 Kwong 等, (2000)
20 “PSP94(或 β -微精液蛋白)是大鼠前列腺外侧叶中特异性表达和合成的一种分泌性蛋白”, Prostate 42(3):219-29 和 Chan(1999) “人前列腺中 PSP94(94 个氨基酸的前列腺分泌性蛋白)表达的原位杂交研究”, Prostate 41(2):99-109。

前列腺干细胞抗原是任选的过气相离子光谱法检测/量化样品中的标记的另一例子。PSCA 是糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定的细胞表面抗原 Thy-1/Ly-6 家族的一种同系物。将编码该抗原的基因作图为染色体区域 8q24. 2. PSCA mRNA 在正常前列腺的基底细胞中和在 80%以上的前列腺癌中表达。以下参考文献中描述了有关 PSCA 的其它细节, 如 Dannull 等, (2000) “前列腺干细胞抗原是晚期前列腺癌免疫治疗的有希望的候选者”, Cancer Res. 60(19):5522-5528; Gu 等, (2000) “前列腺干细胞抗原(PSCA)表达随着前列腺癌中的高格利桑评分、晚期阶段和骨转移而增加”, Oncogene 9(10): 1288-1296; 和 Reiter 等, (200) “局部晚期前列腺癌中
30 前列腺干细胞抗原(PSCA)和 MYC 的共扩增”, Genes Chromosomes Cancer

27(10):95-103。

根据本文描述的方法，基本上是任选地检测和量化任何标记。尤其是除上述的标记外，许多其它的前列腺标记也是已知的。在以下章节中进一步描述这些标记的其它特征。

5

2. 基于核酸的标记

实际上前列腺癌的任何核酸标记都适合本文描述的分析。因此没有试图鉴定所有的已知核酸。某些感兴趣的较佳核酸标记包括编码 PSMA、PSMA'、PAP、PSP94、PSCA 等的 mRNA。从公众数据库如 Gen Bank 可得到与这些 mRNA 相对应的核酸。在
10 如 Su 等，(1995)Cancer Res. 55:1441-443(同上)中描述了编码 PSMA 和 PSMA'的 RNA。在相配的出版物中可得到其它 mRNA 的附加信息，包括 Zelivianski 等，(1998) “人前列腺酸性磷酸酶基因的克隆和启动了活性的分析”，Biochem, Biophys, Res. Commun, 245(1):108-12; Magklara 等，(2000) “前列腺特异性抗原和人腺体激肽释放酶 2 在甲状腺中的表达”，Clin. Chim. Acta 300(1-2):171-80; Xuan
15 等，(1995) “PSP94(94 个氨基酸的前列腺分泌性蛋白)mRNA 在前列腺组织中的交替剪接”，Oncogene 11(6):1041-1047; 和 Reiter 等，(1998) “前列腺干细胞抗原：一种在前列腺癌中过度表达的细胞表面标记”，Proc, Natl, Acad, Sci. USA 95(4):1735-40。

在某些实施例中分别量化了，细胞裂解物衍生的样品中的 PSMA 或 PSMA' mRNA。
20 在其它实施例中，采用与所选 mRNA 组合物相对应的选择的 cDNA，可以多种方式同时检测和量化样品中这些和/或其它 mRNA 的选择的组合物。

三、标记的检测和量化

本发明提供了采用气相离子光谱测定，尤其是采用激光解吸/电离质谱检测和
25 /或量化 PSMA 和 PSMA'的方法。此方法包括对待测试是否存在 PSMA/PSMA'的样品进行分级分离，至少从样品中部分除去其它组分，并用气相离子光谱分析分级分离的 PSMA/PSMA'。LDI-MS 可以是传统的 MALDI 或可以通过使用操作增强表面，其样品提供的表面积积极地参与将分析物提供给能源。

在一个实施例中，LDI-MS 方法通过使用一种固相结合的吸附剂增强表面，此
30 吸附剂捕获样品中的分析物，接着从固相中解吸/电离该分析物。在本方法的一个实施例中，固相结合的吸附剂是一种特异性结合 PSMA/PSMA'的抗体。在另一实施

例中，固相结合吸附剂是一种蛋白质，如 G 蛋白，它特异地与免疫球蛋白 Fc 部分结合。在此实施例中，样品与特异性结合 PSMA/PSMA' 的抗体接触。然后，通过与其结合的抗体用该固相结合吸附剂来捕获样品中的 PSMA/PSMA'。在多重试验中，可使样品与特异性结合于所需捕获的所有生物标记的抗体接触。在一个实施例中，固相结合吸附剂以适合插入气相离子分光计的芯片形式提供。这种芯片可包含基质如金属，具有特征表面的表面。各特点可包含吸附剂。在此实施例中，将样品施加到该特征性表面以捕获所需的样品组分，并洗掉未结合组分。然后将该生物芯片插入气相离子分光计，用能源解吸/电离分析物并进行检测。

可检测许多生物样品中的标记。样品优选是生物液体样品。用于本发明的生物液体样品的例子包括：体液、细胞溶解产物、精液、精浆、前列腺液、唾液、血液、淋巴、肺/支气管洗液、粘液、粪便、乳头分泌物、痰、眼泪、尿等。血清是本发明某些实施例的优选样品来源。细胞溶解产物样品任选地衍生自源代组织或细胞、培养的组织或细胞、正常的组织或细胞、患病的组织或细胞、良性组织或细胞、癌性组织或细胞、唾液腺组织或细胞、小肠组织或细胞、神经组织或细胞、肾组织或细胞、淋巴组织或细胞、膀胱组织或细胞、泌尿生殖组织或细胞、肿瘤组织或细胞、肿瘤新生脉管组织或细胞等。在较佳实施例中，细胞溶解产物样品衍生自前列腺组织或细胞。可根据任何已知技术如静脉穿刺、活检等任选地收集生物样品。在各种出版物中描述了培养组织或细胞的方法，包括如 Ausubel 等编《精编分子生物学实验指南》，由 Greene Publishing Associates, Inc, 和 John Wiley & Sons, Inc., 纽约(1999 年增补)；Freshney, 《动物细胞培养-基本技术手册》(Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technigue), 第 3 版, Wiley-Liss, 纽约(1994), 和 Humason, 《动物组织技术》(Animal Tissue Technigues)第 4 版, W.H.Freeman and company, 纽约(1979), 本文列为参考文献。

任何合适的方法可用来检测和量化本文所述的一种或多种标记。例如，可采用气相离子光谱。此技术包括激光解吸/电离质谱。在一些实施例中，可在气相离子光谱之前制备样品，如预分级分离、双向凝胶电泳、高效液相层析等以帮助检测记。采用除气相离子光谱以外的一些方法可获得对标记的检测。例如，传统的免疫测定(如 ELISA, Western 印迹法等)可用来检测样品中的标记。这些检测方法在下面详述。

A、用气相离子光谱检测

在较佳实施例中，采用气相离子光谱，更佳是采用质谱检测样品中存在的标记。在一个实施例中，可使用基质辅助的激光解吸/电离(“MALDI”)质谱。在 MALDI 中，采用蛋白质分离方法如双向凝胶电泳或高效液相层析(HPLC)，样品一般宜纯
5 化以得到基本上由一个标记或几个标记组成的组分。有关 MALDI 的其它细节包括在如 Skoog 等，《仪器分析的原理》(Principles of Instrumental Analysis)，第 5 版，Harcourt Brace of Co.，费城(1998)和 Siuzdak，《生物技术用质谱》同上。

在另一实施例中，可采用表面增强的激光解吸/电离质谱(“SELDI”)。表面增强的激光解吸/电离采用包含吸附剂的基质以捕获标记，然后在质谱测定期间从
10 基质表面直接解吸附和电离这些标记。由于表面增强的激光解吸/电离中的基质表面能捕获标记，所以样品不需要象在 MALDI 中那样拟纯化。但是，取决于样品的复杂性和所用的吸附剂类型，在表面增强的激光解吸/电离分析之前需要制备样品以减少其复杂性。

图 1 用示意图描述整合的表面增强的激光解吸/电离-TOF-MS 系统 100。如图
15 所示，由激光源 102 产生的光子能量撞击特征表面 106 上的生物芯片 104，该表面包括一种具有捕获的标记的所选吸附剂。光子能量导致在特征表面 106 上捕获的标记解吸和电离。然后，解吸的离子加速通过飞行管/质量分析仪 108。根据质/荷比分离离子，如所述那样仅仅是离子种类的质量，因为各离子是带单电荷。又如说明的那样，较小离子比较大离子转移得快，由此可按照质量分辨种类。离子
20 在检测器 100 上产生可检测的信号，通过数据分析工作站 112 加工这些信号产生质谱 114。以下进一步描述整合系统。

图 2 用示意图显示 PSMA 表面增强的激光解吸/电离免疫测定包括芯片 202 上固定的 G 蛋白 200。另如所示，捕获的 PSMA204 被结合于固定化蛋白质 G204 的抗体吸附剂所保留。来自激光 208 的入射光子能量导致吸附剂和 PSMA 解吸和电离，
25 然后在 TOF-质谱仪中检测 PSMA 产生的质谱 210。图 3 也用示意图说明了表面增强的激光解吸/电离-TOF-MS 技术的某些方面。如所述那样，将样品 300 施加于芯片 302 上，该芯片上包括与特征表面 306 结合的吸附剂 304。在质量分析之前，将未被吸附剂 304 捕获的样品 300 的组分任选地从芯片 304 中洗去(如洗脱等)。在其它实施例中，样品 300 不洗涤直接分析。样品 300 中的标记 308 被捕获(如亲和捕获等)
30 以后，能量吸收分子 310 加到生物芯片 302 中以吸收电离源 312(即激光)的能量帮助从生物芯片 302 表面解吸标记 308。质谱 314 是由解吸/电离的标记 308

的质谱分析产生的。

以下详细描述了有助于检测样品中标记的各种样品制备方法和气相离子光谱方法。

5 1. 在气相离子光谱之前制备样品

任选地，以下描述的一种方法或组合方法或本领域已知的其它方法可用来制备样品进一步帮助检测和鉴定样品中的标记。在一些实施例中，在气相离子光谱分析之前可将样品预分级分离以提供不太复杂的样品。例如，根据蛋白质大小可预分级分离血清样品以减少样品中蛋白质的复杂性。此外，预分级分离方案可提供有关标记的物理和化学特征的其他信息。例如，如果采用阴离子交换自旋柱进行样品的预分级分离，如果在某一 PH 洗脱某标记，此洗脱特征提供了有关该标记的结合特性的信息。在另一实施例中，可通过除去样品中大量存在或者可能干扰样品中标记的检测的蛋白质或其它分子，对样品分级分离。其它合适的样品制备方案本领域技术人员显然是懂得的，它们也可用于本发明的实施例中。

15

a) 大小排阻层析

在一个实施例中，可根据样品中蛋白质的大小，采用大小排阻层析对样品预分级分离。对生物样品，其中得到的样品量小，可优选采用大小选择自旋柱。例如，可采用 K-30 自旋柱(Ciphergen Biosystems, Inc.)。一般从柱上洗脱的第一个组分(“组分 1”)具有高分子量蛋白的最高百分率；组分 2 具有高分子量蛋白的较低百分率；组分 3 甚至具有高分子量蛋白的较低百分率；组合 4 具有最低量的大蛋白质，等等。可以用气相离子光谱分析各组分以检测标记。

20

b) 用凝胶电泳分离生物分子

在另一实施例中，可以用高分辨电泳如单相或双相凝胶电泳、Northern 印迹法等分离样品中的生物分子(如蛋白质、核酸等)。可用气相离子光谱分离和进一步分析含有标记的组分。优选地，双向凝胶电泳用来产生生物分子的双向排列的包含一种或多种标记的点阵列。参见 Jungblut 和 Thiede, Mass Spectr, Rev. 16:145-162(1997)。

25

可采用本领域已知的方法进行双向凝胶电泳。参见如 Dutscher 等, Methods In Engymology 182 卷。一般采用等电聚焦分离样品中的生物分子，在 PH 梯度中分离

30

样品中的生物分子直到它们达到净电荷为零(即等电点)的斑点。此第一次分离步骤产生单向排列的生物分子阵列。一般采用与第一次分离步骤所用的不同技术进一步分离一维阵列中的生物分子。例如,在十二烷基硫酸钠(SDS-PAGE)存在时,采用聚丙烯凝胶(如聚丙烯凝胶电泳)以二维方式进一步分离经等电聚焦所分离的生物分子。SDS-PAGE 允许根据生物分子的分子量作进一步分离。双向凝胶电泳通常可分离化学性质不同的生物分子(在复杂混合物内分子量范围从 1000 到 200,000Da)。

采用本领域已知的任何合适方法,可以检测二维阵列中的生物分子。例如,可以标记或染色(如考马斯蓝或银染)凝胶中的生物分子。如果凝胶电泳产生的斑点与本发明的一种或多种标记的分子量相符(如 100Kda PSMA),那么可以用气相离子光谱进一步分析该斑点。例如,可从凝胶中切下斑点并用气相离子光谱分析。或者,施加一种电场将含有生物分子的凝胶转移到一种惰性膜上。然后可用气相离子光谱分析膜上与某标记的分子量大致相符的斑点。在气相离子光谱中,可以采用以下详述的任何合适技术如 MALDI 或表面增强的激光解吸/电离(如采用 Protein Chip®阵列)分析这些斑点。在气相离子光谱分析之前可能需要采用切割试剂如蛋白酶(如胰蛋白酶)或核酸酶将斑点中的生物分子切成较小片段。生物分子消化为小片段提供了斑点中生物分子的质量指纹,如需要可用来确定标记的身份。

20 c) 高效液相层析

在又一实施例中,根据不同的物理性质(如极性、电荷和大小),可用高效液相层析(HPLC)来分离样品中的生物分子的混合物。HPLC 仪器一般由流动相的储液槽、泵、注射器、分离柱和检测器组成。通过将等分样品注射在柱上分离样品中的生物分子。由于生物分子在流动液相和固定相之间的分配行为有差异,所以混合物中的不同生物分子以不同的流速通过柱。可以收集与一种或多种标记的分子量和/或物理性质相对应的组分。可用气相离子光谱分析组分检测标记。例如,可采用以下详述的 MALDI 或表面增强的激光解吸/电离(如采用 Protein Chip®阵列)分析这些斑点。

30 d) 分析前标记的修饰

任选地,可在分析前修饰某标记以提高其分辨率和确定其身份。例如,分析

前可使该标记经蛋白酶消化。可使用任何蛋白酶。特别有用的是可能将标记须经蛋白酶解消化。可使用任何蛋白酶。特别有用的是可能将标记切成分散数目的片段的蛋白酶(如胰蛋白酶)。消化作用产生的片段可作为该标记的指纹,从而能对它们进行间接检测。当具有相似分子量的标记可能混淆所述的标记时,这是特别有用的。蛋白酶解片断对于高分子量标记是有用的,因为用质谱更容易分辨较小的标记。如果靶标记是核酸(如 mRNA),在质谱分析之前可任选地采用核酸酶来修饰该标记。在另一例子中,可修饰生物分子以提高检测分辨率。例如,神经氨酸酶可用来去除糖蛋白(如 PSMA、PSMA'等)中的末端唾液酸残基,以促进与阴离子吸附剂(如阳离子交换 Protein Chip®阵列)的结合和提高检测分辨率。在中一例子中,可通过附着—个特异性结合于分子标记的特定分子量尾来修饰这些标记,进一步分辨它们。任选地,检测这种修饰的标记后,可通过与蛋白质数据库(如 SWISS-PRO)中修饰的标记的物理和化学特征相匹配进一步确定该标记的身份。

2. 使样品与气相离子光谱分析的基质接触

一种样品或如上述制备的样品(如预分级分离的)可与基质接触。基质可以是适合气相离子分光计使用的探针(如生物芯片)。在本发明中,生物芯片一般包含具有至少一个特征表面的基质,此特征表面具有至少一种结合于该基质的吸附剂,其中该吸附剂能捕获 PSMA、SPMA'、前列腺标记 mRNA,和/或其它标记。或者,基质可以是一种分离材料,该材料可放置于适合气相离子分光计使用的探针上。例如,基质可以是固相如聚合性、顺磁性的乳胶或玻璃珠或树脂,含有能结合标记的功能基团。该基质可置于探针上。

探针(如生物芯片)可以呈任何合适的形状,只要它适合用于气相离子分光计(如可移动插入气相离子分光计中)。例如,该探针可以以条,平板形式或在预定的可寻址位置上具有一系列孔的平器形式或具有其它特征表面。该探针远也可以制成用于隋性系统和气相离子分光计的检测器的形状。例如,该探针可适合水平和/或垂直安装能翻译的滑架,此滑架可水平和/或垂直地将探针移到连续的位置,而不需要用手重新放置探针。

探针或生物芯片的特征表面包括在不同的重新放置探针。生物芯片任选地包括许多特征表面。例如,多个特征表面排列成行阵列、正交阵列、环形或 n 边的多边阵列,其中 n 是 3 或更大。多个特征表面一般包括逻辑或空间阵列。任选地,多个特征表面的每一面,或其一种或多种其组合。例如,多个特征表面的至少两

面。任选地，包括相同或不同的吸附剂，或其一种或多种其组合。在某些实施例中，该生物芯片还包括除能捕获 PSMA 或 PSMA' 的吸附剂以外的至少一种其它的吸附剂，其中其它吸附剂与基质在多个特征表面的一面或多面上结合。其它吸附剂一般能捕获至少一种其它的前列腺标记，如 PSMA、PSMA'、PSA、游离的 PSA、复合的 PSA、PAP、PSP94、PSCA 等。以下更详细描述了合适的吸附剂。

可用任何合适的材料制备探针基质。例如，该探针基质材料可包括组不限于绝缘材料(如玻璃、氧化硅、塑料、陶瓷)、磁性材料、半导体材料(如硅片)，或导电材料(如金属镍、黄铜、钢、铝、金、非金属、合金或导电的聚合物)、聚合物、有机聚合物、导电聚合物、生物聚合物、天然生物聚合物、包被有机聚合物的金属或其任何组合。探针基质材料还可以是固体或多孔。在如美国专利号 5,617,060(Hutchens 和 Yip)和 W098/59360(Hutchens 和 Yap)中描述了适合用于本发明实施例的探针。

a) 分析惰性基质上的样品

如果采用上述制备方法大大减少了样品的复杂性，那么可使样品与气相离子光谱用的任何合适的基质接触。例如，该基质特征表面可以是惰性的不需要包含结合标记的吸附剂，因为不需要将标记与其它生物分子进一步分离。在一些实施例中，在使用其组分与基质接触之前优选双向凝胶电泳或 HPLC 制备样品以得到含有标记的该组分。然后可采用气相离子光谱(如传统的 MALDI)不进一步分级分离或采用本领域其它已知方法分辨组分或斑点中的标记。

在气相离子光谱分析之前，通常将能量吸收分子(“EAM”)或基质材料施加于基质表面上的标记。能量吸收分子可帮助吸收气相离子分光计能源的能量，且能帮助从探针表面解吸标记。示范性的能量吸收分子包括肉桂酸衍生物、芥子酸(“SPA”)、氰羟基肉桂酸和二羟苯甲酸。其它合适的能量吸收分子是本领域技术人员已知的。参见美国专利 5,719,060(Hutchens 和 Yip)对能量吸附分子的其它描述。

能量吸收分子和含有标记的样品可以任何合适的方式接触。例如，将能量吸收分子与含有标记的样品混合，将此混合物置于基质表面，如传统的 MALDI 方法那样。在另一实例中，在基质表面与样品接触之前可将能量吸收分子置于基质表面上。在另一实施例中，在基质表面与能量吸收分子接触之前可将样品置于基质表面上。然后如以下详述可解吸、电离和检测这些标记。

b) 分析包含吸附剂的基质表面上的样品

5 在一些实施例中，可采用包含能结合一种或多种标记的质进一步减少样品的复杂性。吸附剂不需要对标记(如特异地结合标记的抗体)的生物特异性(如生物分子相互作用吸附剂)，只要吸附剂具有适合结合标记的结合特征。例如，吸附剂可包括层析吸附剂如疏水性相互作用吸附剂或基团、亲水性相互作用吸附剂或基团、阳离子吸附剂或基团、阴离子吸附剂或基团、金属螯合吸附剂或基团(如镍、钴等)、凝集素、肝素或其任何组合。在其它实施例中，吸附剂包括生物分子相互作用吸附剂，如亲和吸附剂、多肽、酶、前列腺标记基质、受体、抗体等。例如，在较
10 佳实施例中，生物分子相互作用吸附剂包括特异性捕获 PSMA 或 PSMA'和任选地，其它前列腺标记的单克隆抗体(如 PSMA、PSMA'、PSA、游离的 PSA、复合的 PSA、PAP、PSP94、PSCA 或编码这些或其它前列腺标记的 mRNA)。

各种类型的吸附剂例子在本领域是众所周知的。例如，包含疏水基团的吸附剂包括具有脂肪族碳氢化合物，如 C1-C18 脂肪族碳氢化合物和具有芳香族碳氢化合物功能基团(如苯基)的基质。包含亲水基团的吸附剂包括玻璃(如氧化硅)或亲水的聚合物如聚乙二醇、葡聚糖、琼脂糖或纤维素。包含阳离子基团的吸附剂包括仲胺、叔胺或季胺的基质。包含阴离子的吸附剂包括硫酸盐阴离子(SO₃⁻)的基质和羧酸盐阴离子(COO⁻)或磷酸盐阴离子(OPO₃⁻)的基质。包含金属螯合基团的
15 吸附剂包括具有一种或多种电子供体基团的有机分子，该电子供体基团形成具有金属离子的或多个电子供体基团的有机分子，该电子供电基团与金属离子如铜、镍、锌、铁和其它金属离子，如铝和钙形成配位共价键。包含抗体的吸附剂包括能与本文提供的任何一种标记特异性结合的抗体。具有这些吸附剂的探针也是市场上买得到的(如正相 Protein Chip®阵列、SXA2 Protein Chip®阵列、IMAC3 Protein Chip®阵列等，均购自 Ciphergen Biosystems, Inc. (Fremont CA))。在
20 较佳实施例中，吸附剂基本类似于或相同于最初用于富集和鉴定尿样品中的标记的吸附剂(如 SAX2 Protein Chip®阵列)。

在包括检测/量化样品中的 mRNA 的本发明的实施例中，选择的吸附剂一般包括对应于靶前列腺标记 mRNA 的 DNA(如 cDNA)。任选地合成或从商业来源购得核酸吸附剂。例如，可采用技术人员熟知的技术容易地合成用作吸附剂的寡核苷酸或多核苷酸序列。此外，基本上可任选地从各种商源来源之一定购任何核酸，如
30 Midland Certified Reagent Company(mcrc® oligos.com)、Great American Gene

Conysany (www.genco.com)、Express Gen Inc. (www.xpressgen.com)、Operon Technologies Inc. (www.operon.com), 和许多其它公司。

可从许多公众核酸数据库(如 Gen Bank)获得可检索的序列信息。例如, 可根据与以下示范性登记号相应的序列如 NM_006102、AF119386、AF007544、AF061571、
5 S76978、AF254385、AF254357、AW620338、AW473087、AF107214、NM_004476、
AW278819、AW277437、AW168915、AW000926、AI872104、AI791154、AI768508、
AI766427、AJ007318、AI690667、AI672408、AI648702、AI478207、AI474492、
AI424589、AI356718、AF016827、AF016826、AF011896、AF007413、AF007412、
AF00741、AF006604、AA897668、AA879028、AF044684、AA652917、AA435800、
10 AA631303、AF008934、AA371450、AA370337、N75691、N64840、N64840、I23813、
I23812、I23811、I23810、I23809、I23808、I23807、I23806、I23805、I23804、
I23803、I23802、I23801、I23800、I23799、I23798、I23797、I23796、I23795、
I23794, 和/或 M99487 设计 PSMA 和 PSMA' 吸附剂。这些序列一般与有关于 PSMA 和
PSMA' 的部分或全长核酸序列(如 mRNA、cDNA、基因等)相对应, PSMA 和 PSMA' 可单
15 独使用, 或联合使用以确定用作 PSMA 和 PSMA' 吸附剂的合适序列。对于其它前列
腺标记, 包括如 PSA、PAP、PSP94、PSCA 等。也可得到类似的序列信息。

可采用任何合适的方法生产此探针, 取决于基质材料和/或吸附剂的选择。例如, 一种金属表面可包被氧化硅、氧化钛或金, 可用能结合和附着吸附剂的双功能接头衍生该包被表面。例如, 可将双功能接头的一端与该表面上的某功能基团
20 共价结合, 另一端可用起吸附剂功能的基团进一步衍生。在另一实施例中, 从结晶硅产生的多孔硅表面可用化学方法修饰以包含结合标记的吸附剂。在另一实施例中, 通过原位聚合一种单体溶液可以在该基质表面上直接形成吸附剂, 此单体溶液包含取代的丙烯酰胺单体、取代的丙烯酸盐单体或其衍生物, 包括所选的功能基团作为吸附剂。此单体溶液的聚合可提供具有更大结合生物分子能力的水凝胶吸附剂。在 Brown 等美国专利号 5, 807, 522 “构建生物样品微阵列的方法” 和 Pease 等, (1994) “用于快速 DNA 序列分析的光产生的寡核苷酸阵列”, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91:5022-5026 中进一步描述了基于核酸的吸附剂
25 (如 DNA、cDNA 等) 的沉积。

可将结合标记的吸附剂以任何合适的形式(如连续性或间断性)施加于该基质上。例如, 一种或多种吸附剂可存在于该基质表面上。如果采用多种类型的吸附剂, 可包被该基质表面这样形成单向或双向梯度不同的一种或多种结合特征。
30

如果是向断性，可将多种吸附剂以预定的可寻址位置置于该基质表面上。可寻址位置可以任何形状排列，但优选以规则形式，如行阵列、正交阵列或规则曲线(如环形)排列。例如，一种探针可包含吸附剂的间断斑点。各可寻址位置可包含相同或不同的吸附剂。在质谱测定期间这些斑点是“可寻址的”，将能源(如激光)对准或“寻址”各斑点以解吸和电离标记。

以任何合适方式，如浴洗、浸泡、浸渍、喷雾、冲刷或吸移等使样品与包含吸附的基质接触。在约 $1\mu\text{l}$ - $500\mu\text{l}$ 中，通常含有几个微微微尔到 100 微微摩尔标记物的 1 体积样品足够与该吸附剂结合。可使样品接触含有某吸附剂的探针基质一段足够的时间以允许标记与吸附剂结合。一般地，使样品和包含吸附剂的基质接触大约 30 秒至 12 小时之间，优选大约 30 秒至 15 分钟之间。样品一般在环境温度和压力条件下与探针基质接触。但对于一些样品，可能需要改变温度(一般 4°C - 37°C)和压力条件，这可由本领域技术人员决定。

基质接触样品或样品溶液后，最好将基质表面上未结合物质洗掉，这样只有结合的物质留在基质表面上。通过如浴洗、浸泡、浸渍、漂洗、喷雾或用洗脱剂洗涤基质表面来完成基质表面的洗涤。当将洗脱液引入探针上吸附剂的小斑点时，优选采用显微射流学方法。洗脱液的温度一般在 0°C - 100°C 之间，优选 4°C - 37°C 。在一些实施例中，如果用气相离子光谱而不洗涤可以分辨结合于探针表面上的标记，就不需要从探针表面洗去未结合的物质。

任何合适的洗脱剂(如有机或含水的)可用来洗涤基质表面，优选采用水溶液。示范性的水溶液液包括 HEPES 缓冲液，Tris 缓冲液或磷酸盐缓冲盐水等。为了提高缓冲液的洗涤严谨性，可将添加剂加入缓冲液中。这些添加剂包括但不限于离子相互作用调节剂(离子强度和 PH)、水结构调节剂、疏水相互作用调节剂、离液剂、亲和作用置换剂。可以在如 PCT 出版物 W098/59360(Hutchens 和 Yip)中找到这些添加剂的具体例子。具体洗脱剂和洗脱添加剂的选择取决于其它实验条件(如使用的吸附剂类型或欲检测的标记)，可由本领域技术人员决定。

在生物分子(包括探针表面的标记)的解吸和电离之前，通常将能量吸收分子(EAM)或基质材料施加于基质表面上的标记物。以上讨论了 EAM 的类型和应用 EAM 的方法，在此节中不再重复。

30 3. 解吸/电离和检测

采用气相离子光谱可以解吸和电离基质表面上的标记物。可采用任何合适的

气相离子分光计，只要能分辨基质上的标记物。优选可量化标记物的气相离子分光计。

5 在一个实施例中，气相离子分光计是一种质谱仪。在典型的质谱仪中，将表面上含有标记物的基质或探针引入质谱仪的入口系统。然后通过解吸源如激光、快速原子轰击、高能等离子、电喷射离子化、热喷射离子化、液相二级离子质谱、场解吸等解离这些标记物。对由预先形成的离子或中性粒子组成的解吸、挥发的物质进行离子化作为解吸作用的直接后果。用离子光学部件收集产生的离子，然后质量分析仪分散并分析通过的离子。用检测器检测退出质量分析仪的离子。检测器将检测的离子信息转换为质/荷比。检测标记物或其它物质的存在一般包括检测信号强度。这进而可反映结合于该基质的标记物的数量和性质。可将质谱仪的任何组成部分(如解吸源、质量分析仪、检测器等)与本文描述本领域已知的其它合适的组成部分联合应用。

15 激光解吸飞行时间质谱仪优选地用于本发明的实施例。在激光解吸质谱中，将包含标记物的基质或探针引入入口系统。通过电离源发出的激光将标记物解吸和电离到气相中。用离子光学部件收集产生的离子，然后在飞行时间质谱仪中，离子加速通过短的高压场并漂移入高真空室。在高真空室的远端，加速的离子在不同的时间撞击敏感的检测器表面。由于飞行时间是离子质量的函数，所以离子形成和离子检测器冲击之间的消逝时间，可用来鉴定特定质/荷比的标记物的存在或缺失。

20 在另一实施例中，可用离子迁移分光仪来检测标记物。离子迁移光谱法的原理是根据离子的不同迁移率。具体地说，由于质量、电荷或形状、通过受电场影响下的管道时有差异，所以样品中电离产生的离子以不同的速率移动。在检测器上记录到离子(一般以电流形式)，然后可用来鉴定样品中的标记物或其它物质。离子迁移光谱法的一个优点是能在大气压中操作。

25 在又一个实施例中，可用总离子电流测量装置来检测和特征鉴定标记物。当基质只含有一种类型的标记物时可采用此装置。当一种类型的标记物在基质上时，电离的标记物产生的总电流反映了该标记物的量和其它特征。可将该标记物产生的总离子电流与对照(如已知化合物的总离子电流)比较。然后可以确定该标记物的量或其它特征。

30

4. 数据的分析

可采用任何合适的方法分析标记物解吸和检测产生的数据。在一个实施例中，使用可编程的数字计算机作为整合系统的一部分来分析数据。计算机程序通常包括贮存密码的可读媒体。某些密码可用来记忆包括探针上各特征位置，在该特征位置上吸附剂的身份，以及用于洗涤吸附剂的洗脱条件。计算机还包括接受输入的密码、从探针上一个特定的可寻址位置接收的各种分子量信号强度的数据。此数据可能表明检测的标记物数量，包括各标记物产生的信号强度。

本发明具体包括量化所选样品中 PSMA 或 PSMA' 和任选的其它前列腺标记物的装置或整合系统。此装置或系统一般包括能捕获样品中的 PSMA 或 PSMA' 的吸附剂(如固相吸附剂，如生物芯片)和量化吸附剂上捕获的 PSMA 或 PSMA' 的气相离子分光计。此装置或整合系统还一般包括计算机或计算机可读媒体，其操作性连接于气相离子分光计还包括计算机程序，该计算机程序具有一种或多种(i)通过气相离子分光计定量分析或处理数据而设置的指令，(ii)为将数据输入数据库而设置的指令，或(iii)为确定至少一种定量的前列腺标记物或定量的前列腺标记物的组合和前列腺癌、良性前列腺增生的诊断或阴性诊断之间的相关性而设置的指令。

数据分析一般包括确定所检测标记物的信号强度(如峰高度)和除去“异常值”(与预定的统计学分布有区别的数据)的步骤。观察的峰值可以归一化，计算和与某些参照相关的峰高度。例如，参照物可以是仪器和化学品(如能量吸收分子)产生的背景噪声，此参照物在评分中设定为零。然后可以在所需的评分(如 100)中以相度强对的形式显示各标记物或其它生物分子的检测信号强度。或者，样品可容许有一种标准品(如牛血清白蛋白)，可用标准品产生的峰作为参照来计算所检测的各标记物或其它标记物的观察到的相对信号强度。

计算机可将得到的数据转变成各种格式供显示。在称为“光谱图滞留物图”的一种格式中，可显示标准的光谱图，其中该图描述以了各特定分子量到达检测器的标记物的量。在称为“峰图”的另一格式中，仅保留了光谱图中的峰高度和质量信息，产生较清晰的图象和使标记物具有更易看到的几乎相同的分子量。在称为“凝胶图”的又一个格式中，根据各个峰的高度，可斜峰图的各质量转变成一种灰度图象，产生与电泳凝胶上的条带相似的外观。在称为“3-d 重叠”的又一个格式中，可以覆盖几种图谱以研究相对峰高度中的微妙变化，在称为“差异图”的又一个格式中，可比较两个或多个图谱，方便地突出独特的标记物和样品之间上调或下调的标记物。可用肉眼比较任何两个样品的标记物分布图(谱)。在又一个格式中，可采用斑点火焰散射图表(Spotfire Scatter Plot)，其中一个轴代表

所检测的标记物的表观分子量，另一个轴代表所检测标记物的信号强度。对于各个样品，可将样品中存在的被检测标记物和标数量可贮存在计算机可读媒体中。然后可产针此数据与对照比较(如对照中所检测标记物的分布图或量，如前列腺癌或 BPH 患者是不可检测的)。

5

B、用免疫测定检测

在另一实施例中，可用免疫测定来检测和分析样品中的标记物(如 PSMA、PSMA' 等)。此方法包括：(a) 提供能与某标记物特异地结合的抗体；(b) 使样品与该抗体接触；和(c) 检测样品中是否存在与该标记物结合的抗体的复合物。

10 为了制备与某标记物特异性结合的抗体，可使用纯化的标记物或它们的核酸序列。进一步特征鉴定这些标记物可获得标记物的核酸和氨基酸序列。例如，各标记物可以是受许多酶(如胰蛋白酶、V8 蛋白酶等)作用的肽。各标记物消化片段的分子量可用来检索数据库如 SWISS-PRO 数据库，有无与各种酶产生的消化片段的分子量匹配的序列。采用此方法，如果这些标记物是数据库中已知的蛋白质，
15 那么可鉴定其它标记物的核酸和氨基酸序列。

或者，可采用蛋白质梯序列测定来测序蛋白质。采用通过断裂分子成片段并使这些片段经受酶消化或从片段的末端依次除去一个个氨基酸的其它方法可以产生蛋白质梯。例如国际出版物 W093/24834(Chait 等)和美国专利 5,792,664(Chait 等)描述了制备蛋白质梯的方法。然后用质谱分析此蛋白质梯。梯片段的质量差异
20 可鉴定从该分子末端除去的氨基酸。

如果标记物是数据库中未知的蛋白质，用该标记物的甚至一部分氨基酸序列的知识也能确定其核酸和氨基酸序列。例如，可根据标记物的 N-末端氨基酸序列制备简并探针。然后可用这些探针筛选从最初检测到某标记物的样品中产生的基因组或 cDNA 文库。可鉴定、扩增阳性克隆，和可采用熟知的技术亚克隆它们的重
25 组 DNA 序列。参见如《当代分子生物学实验指南》(Ausubel 等, Green Publishing Assoc 和 Wiley-Interscience(从 1999 年增补)和《分子克隆：实验室手册》，第 2 版(Sambrook 等., Cold Spring Harbor Laboratory, 纽约(1989))。

采用纯化的标记物或它们的核酸序列，采用本领域已知的任何合适方法可制备与某标记物特异性结合的抗体。参见如 Coligan《当代免疫学实验指南》(Current
30 Protocols in Immunology)(1991)；Harlow 和 Lane，《抗体：实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Mauual)(1988)；Goding，《单克隆抗体：原理和实践》

(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)(第2版,1986);和 Kohler 和 Milstein, Nature 256:495-497(1975)。这些技术包括但不限于从噬菌体或类似载体的重组抗体文库中选择抗体来制备抗体,及通过免疫家兔或小鼠来制备多克隆和单克隆抗体(参见如 Huse 等, Science 246:1275-1281(1989); Ward 等, 5 Nature 341: 544-546(1989))。

抗体提供后,可采用本领域已知的任何一种合适的免疫结合试验检测/或量化某标记物(参见美国专利号 4, 366, 241、4, 376, 110、4, 517, 288 和 4, 837, 168)。有用的试验包括酶免疫测定(EIA)如酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、Western 印迹试验或狭缝印迹试验。在《细胞生物学方法:细胞生物 10 学中的抗体》(Methods in Cell Biology:Antibodies in cell Biology),第37卷(Asai 编,1993);《基础和临床免疫学》(Basic and Clinical Immunology)(Stites 和 Terr 编,第7版,1991)和 Harlow 和 Lane(同上)中也描述了这些方法。

一般可使受试者获得的样品与特异性结合该标记的抗体接触。任选地,在抗 15 体与样品接触之前,可将抗体固定于固相支持物以便于洗涤和随后分离复合物。固相支持体的例子包括微量滴定板、棍(Stick)、珠、或微珠形式。还可使抗体结合于探针基质或 Protein Chip®阵列,可用上述的气相离子光谱法分析。样品优选取自受试者的液体生物样品,例子包括尿、血液、血清、血浆、眼泪、唾液、组织等。在一较佳实施例中,生物液体包括血清。在样品与抗体接触前样品可用 20 合适的洗脱液稀释样品。

样品与抗体培育后,洗涤混合物并可检测形成的抗体-标记物复合物。这可能 25 通过培育洗涤的混合物与检测试剂来完成。此种检测试剂可以用可检测标记标记的第二抗体。示范性的可检测标记包括磁珠(如 DYNABEADS™)、荧光染料、放射性标记、酶(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 ELISA 中常用的酶)和比色标记物如胶体金或彩色玻璃或塑料珠。或者,可用间接试验来检测样品中的标记物,例如可用标记的第二抗体检测结合的标记物特异性抗体,和/或在竞争或抑制试验中,例如与该标记物的不同表位结合的单克隆抗体与该混合物同时培育。

在整个试验期间,每次混合试剂后可能需要培育和/或洗涤步骤。培育步骤可 30 从大约5秒到几小时不等,优选大约5分钟到24小时。但是,培育时间将取决于试验形式、标记物、溶液的体积、浓度等。通常试验在环境温度下进行,尽管可在10°C-40°C的温度范围内进行。

免疫测定可用来确定样品中标记物(如 PSMA 或 PSMA')的存在或缺失以及样品中的标记物量。首先,采用上述的免疫测定可检测样品中标记的试验量。如果样品中存在某标记物,在上述合适的培育条件下,会形成具有特异性结合该标记物的抗体的抗体-标记物复合物。通过与标准品比较可确定抗体-标记物复合物的量。标准品可以是样品中存在的已知化合物或另一蛋白质。如上所述,不需要以绝对单位测定标记物的试验量,只要测定的单位可与对照作比较。

检测样品中这些标记物的方法有许多用途。例如,可测定一种或多种标记物以帮助前列腺癌或 BPH 的诊断或预后。在另一例子中,检测标记物的方法可用来监测患者对癌症治疗的反应。在另一例子中,检测标记物的方法可用来测定和鉴定体外或体内调节这些标记物表达的化合物。

四、前列腺癌或良性前列腺增生的诊断

实验证明与正常受试者(如前列腺癌或良性前列腺增生诊断阴性)相比,与前列腺癌中的正常值相比 PSMA 和或 PSMA 上调,与良性前列腺增生中的正常值相比为下调。因此,本发明还提供采用本文描述的前列腺标记物帮助前列腺癌或良性前列腺增生诊断的方法。这些标记物可单独使用或与其它标记物合用。例如,PSMA 一般差异地存在于前列腺癌或 BPH 患者和正常受试者的样品(如血清样品)中,在正常受试者中前列腺癌或 BPH 是不可检测的。因此检测病人中本文所述的一种或多种标记物可能提供该病人可能患前列腺癌或 BPH 的有用信息。如以下实施例所述,前列腺癌患者可能具有比正常病人更高的血清 PSMA 浓度。

本发明具体涉及到有助于诊断前列腺癌或良性前列腺增生的方法,包括(如用气相离子光谱)检测受试者样品中的 PSMA 或 PSMA',和检测的 PSMA 或 PSMA'与前列腺癌、良性前列腺增生的可能的诊断或阴性诊断的相关性。此相关性通常考虑到样品中 PSMA 或 PSMA'的存在或缺失和对照中 PSMA 或 PSMA'检测的频率。此外,此相关性通常还考虑到相对于 PSMA 或 PSMA'的对照量的样品中 PSMA 或 PSMA'的量。在某些实施例中,用免疫测定检测样品中的 PSMA 或 PSMA'。在一些实施例中,检测 PSMA 和 PSMA'并相关,而在其它实施例中,采用了其它标记物,如编码 PSMA 或其它前列腺标记物的核酸。更具体地,检测到高于正常范围的 PSMA/PSMA'的量与前列腺癌诊断正相关,检测到低于正常范围的 PSMA/PSMA'的量与良性前列腺诊断正相关。

可从检测到标记物的受试者得到合适的样品,优选地,样品是受试者的血清

样品。如需要，可如上所述制备样品以提高标记物的可检测性。例如，提高标记物如 PSMA 的可检测性，受试者的血清样品可任选地用大小排阻层析进行分级分离。样品制备如预分级分离方案是任选的，可能不需要提高标记物的可检测性，这取决于所使用的检测方法。例如，如果用特异性结合标记物的抗体来检测样品中存在的标记物，样品制备可能是不必要的。

任何合适的方法任选地用来检测样品中的一种标记物或几种标记物。例如可采用上述或本领域已知的气相离子光谱或传统的免疫测定(如 ELISA, Western 印迹法)。采用这些方法可检测一种或多种标记物。优选地，测试样品中的多个标记物的存在。检测多种标记物的存在而非一种标记物或许可为诊断提供更多信息。尤其是检测到样品中多种标记物会提高真阳性和真阴性诊断的百分率和减少假阳性或假阴性诊断的百分率。

将标记物的检测与前列腺癌或 BPH 的可能诊断相关连。在一些实施例中，只检测标记物的存在或缺失而不测定标记物的量是有用的，可以与前列腺癌或 BPH 的可能诊断相关连。例如，只检测到被测试的受试者一种或多种标记物表明受试者患前列腺癌或 BPH 的概率较高。在其它实施例中，标记物的检测可包括定量与前列腺癌或 BPH 的可能诊断相关的标记物的检测，例如，在前列腺癌或 BPH 患者的血清样品中存在的某些或所有的标记物的量比正常受试者血清样品中的高。如果被测试的受试者中检测到的标记物的量比对照高，那么被测试的受试者可能具有前列腺癌或 BPH 的较高概率。

当量化标记物时，可与对照作比较。对照可以是正常受试者的可比较样品中存在的标记物的平均值或中位数，在正常受试者中前列腺癌或 BPH 是不可检测到的。如在测定试验量中那样，在相同或基本上相似的实施条件下测定对照的量。例如，如果从受试者的尿样中得到测试样品，使用特定的探针检测标记物，然后宜采用相同的探针测定患者血清样品中该标记物的对照量。最好是根据设有前列腺癌或 BPH 的正常受试者的大量样品来确定标记物的对照量，这样它反映了在那个人群中该标记物量的变化。

可用计算机软件分析质谱产生的数据。软件可包括将质谱仪的信号转变成计算机可读形式的密码。软件还可包括应用一种算法分析信号的密码以确定信号是否代表与本发明的标记物或其它有用的标记物对应的信号中的“峰值”。软件还包括执行算法的密码，该算法将试验样品的信号与“正常”和前列腺癌或 BPH 的典型信号特征相比较并确定两个信号之间的配合紧密度。可采用任何合适的算法，

如人工智能程序，启发式学习算法等。例如，人工智能程序可使用包括模糊逻辑指令系统、簇分析指令系统、神经网络、遗传算法等。参见如 Qureshi 等，J.Urol. 163:630-633(2000)；Snow J.Urol; 152:1923(1994)。软件还可包括表明与试验样品最密切的密码，从而提供一种可能的诊断。

5

五、试剂盒

在另一方面，本发明提供了帮助诊断前列腺癌或 BPH 的试剂盒，其中该试剂盒合用来检测本发明的标记物。例如，此试剂盒合用来检测本文所述的一种或多种标记物，这些标记物差异地存在于前列腺癌或 BPH 和正常受试者的样品中。本
10 发明的试剂盒有许多用途。例如，此试剂盒合用来区分受试者是否是前列腺癌或 BPH 或是阴性诊断，因此有助于前列腺癌或 BPH 的诊断。在另一实施例中，此试剂盒合用来鉴定化合物，这些化合物能调节前列腺癌或 BPH 的一种或多种标记物在体外或体内动模型中的表达。

在一个实施例中，此试剂盒包括 (a) 至少一种捕获 PSMA 或 PSMA' 的吸附剂，(b)
15 一套通过将样品暴露于吸附剂以从样品中捕获 PSMA 或 PSMA' 并用气相离子光谱法量化捕获的 PSMA 或 PSMA' 的说明书，和 (c) 至少一种包装吸附剂和一套说明书的容器。任选地，此试剂盒还包括至少一种洗涤吸附剂除去捕获的 PSMA 或 PSMA' 以外物质的洗脱剂。吸附剂一般包括一种固相吸附剂。在一个实施例中，固相吸附剂以生物芯片提供，包括具有至少一个特征表面的基质，此特征表面具有结合于该
20 基质的固相吸附剂。基质一般是适合气相离子分光计使用的探针。此试剂盒任选地包括探针。

在某些实施例中，探针包括具有多个特征表面的基质。例如，各特征表面的每一面任选地包括结合于该基质的一种或多种吸附剂。多个特征表面一般以行阵列、正交阵列、环形或 n-边多边形排列，其中 n 是 3 或更大。任选地，多个特征
25 表面包括逻辑或空间阵列。在其它实施例中，固相吸附剂包括用吸附剂衍生的珠或树脂。例如，用至少一种吸附剂衍生的珠或树脂一般适合放置于适宜气相离子分光计使用的探针上。此试剂盒还任选地包括探针。作为另一选择方案，此试剂盒包括至少一种参照品或对照品。在又一个实施例中，此试剂盒还可包括预分级分离的自旋柱(如 k-30 大小排阻柱)。

30 本发明的试剂盒包括各种类型的吸附剂。例如，在一些实施例中，吸附剂包括层析吸附剂如阴离子吸附剂、阳离子吸附剂、疏水作用吸附剂、亲水作用吸附

剂(如氧化硅等)、金属螯合吸附剂(如镍、钴等)。在其它实施例中,吸附剂包括生物分子相互作用吸附剂如亲和吸附剂、多肽、酶、前列腺标记物基质、受体、抗体等。在较佳实施例中,生物分子相互作用吸附剂包括能特性捕获 PSMA 或 PSMA' 的单克隆抗体。还在其它实施例中,除捕获 PSMA 或 PSMA' 的吸附剂外,此试剂盒
5 还包括至少另一个吸附剂。另一个吸附剂一般能捕获至少另一种前列腺标记物如 PSMA、PSMA'、PSA、游离的 PSA、复合的 PSA、PAP、PSP94、PSCA 等。作为另一种选择方案,此试剂盒还包括(1)当用洗脱剂洗涤时,洗脱液中的 PSMA 或 PSMA' 或至少另一种前列腺标记物保留在吸附剂上,或(2)吸附剂与样品接触后,用洗脱剂洗涤吸附剂的说明书。

10 在本发明的其它实施例中,此试剂盒包括(a)至少一种能捕获前列腺标记物 mRNA 的吸附剂,(b)一套通过将样品暴露于吸附剂以从样品中捕获前列腺标记物 mRNA 并用气相离子分光法量化捕获的前列腺标记物 mRNA 的说明书,和(c)至少一种包装吸附剂和一套说明书的容器。

15 任选地,此试剂盒还可包括以标记形式或分离的插入物的适当操作参数的说明书。例如,此试剂盒可有标准的说明书告诉用户在血清样品接触探针后如何洗涤探针。在另一实施例中,此试剂盒可有预分级分离样品以减少样品中蛋白质或核酸的复杂性的说明书。

20 在另一实施例中,此试剂盒包括(1)特异性结合于某标记物的抗体,和(b)一种检测试剂。这种试剂盒可由上述材料制备,前面对有关材料(如抗体、检测试剂、固定化载体等)的讨论完全适用于本节,将不再重复。任选地,此试剂盒还包括预分级分离自旋柱。在一些实施例中,此试剂盒还可包括以标记形式或分离的插入物的适当操作参数的说明书。

25 任选地,此试剂盒还包括标准品或对照品信息,这样试验样品可与对照品信息标准作比较以确定样品中检测的某标记物的测试量是否是前列腺癌或 BPH 的诊断量相一致。例如,标准品可以是牛胰岛素、牛血清白蛋白等。

六、实施例

以下提供的非限制性实施例仅仅是为了说明。

30 一、概述

由于缺乏灵敏的免疫测定方法来量化体液中的 PSMA,因而阻碍了确定 PSMA

作为诊断性或预后性生物标记的临床用途所作的努力。这些研究的一个目标是使用 CIPHERGEN Biosystems 公司 (Fremont, CA) 的一种新颖的 Protein Chip® 技术开发 PSMA 的免疫测定, 此技术利用了表面增强的激光解吸/电离飞行时间质谱法。在一个方面, 将小鼠抗-PSMA 单克隆抗体 7E11-C5, 3 固定在包被有 G 蛋白的生物芯片阵列上, 加入样品, 将芯片进行表面增强的激光解吸/电离质谱。直接正确地鉴定 100Kda 的 PSMA, 而不需要 ELISA 和其它免疫测定方法所需的第二种 PSMA 抗体或标记物。采用纯化的重组 PSMA (rPSMA) 的渐增浓度 (0.5-50ng/ μ l) 产生线性标准曲线 ($R^2=0.985$)。参见图 4。通过归一化的质量信号积分确定血清和精浆中的 PSMA 量在毫微摩尔水平。在表面增强的激光解吸/电离免疫测定的多重形式中, 使两种单克隆抗体 (一种针对 PSMA 另一种对 PSA) 与同一生物芯片阵列结合, 证明了快速和同时量化两种前列腺癌标记物的系统的多功能性。表面增强的激光解吸/电离免疫测定的初步结果显示正常供体和前列腺癌患者之间, 然后通过 Western 分析, 显示癌症和良性前列腺病况之间有较明显的差, 两者均具统计学意义 ($P<0.001$)。在这些研究之前, 已采用过免疫印迹和夹心免疫测定来检测体液中的 PSMA, 但可靠性不确定, 尤其是血清。表面增强的激光解吸/电离免疫测定为量化 PSMA 或 PSA 提供了可靠的系统并说明了它们作为前列腺癌的诊断性/预后性生物标记物的生机。此外, 表面增强的激光解吸/电离免疫测定为快速、同时测定多种生物标记物提供了一个创新的平台。

二、重组前列腺特异性膜抗原蛋白

在 Xiao 等, (2000) “杆状病毒重组前列腺特异性膜抗原的产生及其在开发一种新的蛋白质生物芯片定量性免疫测定中的用途”, *Protein Expression and Purification* 19:12-21 中详细描述了重组前列腺特异性膜抗原的产生和纯化的步骤。通过 BCA 蛋白质试验 (Pierce Chemical, Rockford, IL) 量化了纯化的 rPSMA 蛋白, 使用前贮存于 -20°C 。

三、患者和血清样品

从东弗吉尼亚医学院的弗吉尼亚前列腺中心的血清库中获得用于研究的所有血清样品, 是以前用 Western 印迹分析 PSMA 的血清水平所用的同组样品 (Beckett 等, (1999) “健康人和良性前列腺增生或前列腺癌患者血清中的前列腺特异膜抗原 (PSMA) 水平”, *Clin. Cancer Res.* 5:4034-4040)。通过阴性直肠指检和

PSA<4.0g/ml 确定了正常的男性人群。50 岁以下正常男性年龄范围从 25-39 岁平均 34 岁，而 50 岁以上正常男性年龄范围 51-73 岁平均 60 岁。良性前列腺增生有膀胱排尿阻塞症状的患者 PSA 水平升高(>4ng/ml)，直肠超声活检时显示 BPH。这些患者在血清收集时没有接受治疗。构成前列腺炎的人群具有复杂的慢性症状起

5 因于前列腺和缺乏其它前列腺病理征状包括阻塞、尿培养有感染、脓肿或癌。收集临床 T1 和 T2 期前列腺癌(PCA)患者的血清。

四、测定 PSMA 的表面增强的激光解吸/电离免疫测定

采用表面增强的激光解吸/电离 Protein Chip®技术开发了检测和量化血清

10 PSMA 的免疫测定方法。根据 Xiao 等, (2000)Protein Expression and Purification 1:12-21(同上)描述的方法作了以下修改。用 1 μ g 蛋白质包被斑点后，以 1M 乙醇胺 PH8.0 摇培增殖整个芯片 30 分钟以封闭残留的活性位点，接着用含 0.5% Triton X-100(Sigma)的 PBS 洗涤芯片 2X5 分钟，再用 PBS 洗涤 2X5 分钟。斑点中加入单抗 7E11 或 107-1A4(1.5 μ g)。室温培育 3 小时。用含 0.1%Triton X-100 的 PBS 培

15 育芯片 2X5 分钟洗掉未结合的抗体，再以 PBS 洗 2X5 分钟。在生物芯片上装配 96 孔生物处理器，制成 96 孔平板形式的多样品盒。为了产生标准曲线。将 30 μ l 稀释的 rPSMA(用含 0.1%Triton X-100 的 PBS 配成 0.5、1 和 3ng/ μ l 浓度)施加于斑点。参见图 4。为了检测血清 PSMA，将 400 μ l 血清样品(用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 稀释 1:1)施加于斑点上。剧烈振荡 4 $^{\circ}$ C 培育样品过夜。接着用含 0.1% Triton

20 X-100 的 PBS 洗涤芯片 2X5 分钟，再用 PBS 洗涤 2 \times 5 分钟，再用 HPLC 水简单洗涤。用溶于 5%(v/v)乙腈、0.5%(v/v)三氟乙酸和 0.05% Triton X-100 中的饱和芥子酸(Sigma)作为基质溶液，与 β -半乳糖球蛋白(分子量 18,363.3 Da)一起加入作为归一化的内部标准品(IS)。将基质溶液(2X0.5 μ l)施加于斑点，室温空气干燥芯片。采用具有激光强度为 60 的 PBS-1 质谱仪(Ciphergen Biosystems, Inc., CA)进行

25 血清 PSMA 的检测。从 120 个激光射程求出各光谱数据的平均值，每个样品共收集 3 个光谱。对血清 PSMA 和 rPSMA。计算了 PSMA 和内部标准品的归一化峰面积比值 A。参见图 4。通过将血清 PSMA/IS 峰面积比值与标准曲线的 rPSMA/IS 面积比值相比较确定了血清 PSMA 的水平。

30 五、结果

1. 血清 PSMA 水平的测定

为了测试使用表面增强的激光解吸/电离免疫测定量化血清 PSMA 的可行性，对总数为 60 个血清样品进行了初步研究。这些血清包括 24 名正常男性（12 名 >50 岁；12 名 <50 岁）、10 名 BPH、17 名 PCA (T1 和 T2 期) 和 9 名前列腺炎。这些研究的结果小结于图 5 和表 1 中。发现 BPH 患者血清 PSMA 水平低下（平均 117.1 ng/ml）和前列腺炎患者也低下（平均 119.9 ng/ml），正常男性为中等水平（在 <50 岁和 >50 岁中分别为平均 272.9 ng/ml 和 359.4 ng/ml），PCA 患者为高水平（平均 623.1 ng/ml）。变异系数 (CV%) 值包括 1.2-20.1 范围，平均 10.1。

统计学分析（即斯图顿特 T-检验）表明 50 岁以下正常男性的平均血清 PSMA 水平与 >50 岁正常男性得到的值 ($P=0.16$) 无明显的不同，当比较正常群体对 PCA ($P<0.001$)、正常对 BPH ($P<0.001$)，和 BPH 对 PCA ($P<0.001$) 的平均值时有明显的差异。此外，前列腺炎患者血清 PSMA 平均水平不同于正常和 PCA 组 ($P<0.001$) 的水平，但与 BPH 组无不同 ($P=0.95$)。因为在以前的 Western 印迹分析中，在正常人 BPH 和 PCA 人群中观察到相似的差异趋向 (Becketl 等, (1999) Clin. Cancer Res. 5:4034-4040, 同上)，故此初步研究表明，表面增强的激光解吸/电离免疫测定对检测和相对定量血清 PSMA 具有特异性和可行性。

表 1

	正常男性 <50	正常男性 >50	BPH	PCA	前列腺炎
样品数	12	12	10	17	9
范围(ng/ml)	106.4-576.9	159.8-611.5	35.6-193.8	349.5-946.6	73.4-168.2
平均值(ng/ml)	272.85	359.39	117.09	623.11	119.91
P 值(正常<50)*	—	0.16	<0.001	<0.001	<0.01
P(正常<50)**	—	—	<0.001	<0.001	<0.001
P 值(BPH)***	—	—	—	<0.001	0.95
P 值(CaP)****	—	—	—	—	<0.001

*P 值：正常男性 <50 对其它组的每个人

**P 值：正常男性 >50 对其它组的每个人

20 ***P 值：BPH 对其它组的每个人

****P 值：PCA 对其它组的每个人

2. 推定的 PSMA 同种型的检测

以前的研究报道了 LNCaP 细胞溶解产物中存在 PSMA 蛋白同种型 (即 PSMA' 或

PSM’), 可采用只针对 PSMA 的胞外域特异性的抗体检测此同种型, 而采用针对胞内域的抗体(如 7E11)则不能检测(Grauer 等(1998)“在 LNCap 前列腺癌细胞系中前列腺特异性膜抗原 PSM’蛋白的鉴定, 纯化、亚细胞定位,” Cancer Res. 58:4787-4789。采用了一种识别 PSMA 胞外结构域的单克隆抗体 MoAb 107-1A4。

5 使用此单抗, 如图 6a 所示在 LNCap 细胞溶解产物中检测到 100Kda 的全长 PSMA 加上一个额外的峰(在 89Kda)。用 7E11 没有检测到此较小蛋白质。89Kda 蛋白可能是 PSMA’的同种型。然而, 因为以前 PSMA’采用 Western 印迹鉴定为 95KDa 分子量的(Grauer 等, (1998)Cancer Res. 58:4787-4789, 同上述)。需要分离和测序 89KDa 峰以确定事实上它是否是 PSMA 同种型。

10 为了确定 PSMA 表面增强的激光解吸/电离免疫测定所用的最佳的预活化的芯片化学, 将 LNCap 裂解液用作抗原以产生两种蛋白的标准曲线。采用单抗 7E11 和 107 比较了两种不同的预活化的芯片表面 PS-1 和 PS-2(Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA)。如图 6B 所示, PS-1 表面捕获 PSMA 蛋白的性能总体上比 PS-2 好。以单抗 7E11 为例, 在 PS-2 表面上捕获到少量 100Kda PSMA(以箭头表示), 与

15 LNCap 细胞溶解产物的浓度无关。另一方面, 用 PS-1 表面上的 7E11 捕获到的 PSMA 的峰面积和强度与 LNCap 细胞溶解产物的浓度有相关性, 提示增强了抗原回收中的特异性和效率。当采用单抗 107 时, 在两个表面上均捕获到 89KDa(在两个表示质/荷位置的下面箭头)和 100KDa(在两个表示质/荷位置的上面箭头)蛋白。但是, PS-1 表面显示两个密切存在的峰比 PS-2 表面有较好的分离和线性。虽然没有显示

20 采用 LNCaP 裂解液作为抗原与单抗 107 合用成功地产生了两种蛋白的标准曲线。试验的最优化可包括使用具有 PBS-II(Ciphergen Biosystems, Inc., CA)和质谱级 SPA 的单抗 107。将采用此最佳化试验来量化血清 PSMA 和 89KDa 蛋白, 并比较血清 PSA 水平的结果。最初的结果表明 100KDa 和 89KDa 蛋白以不同的量存在于血清或精浆中(数据未显示)。还进行了其它研究来定量精浆和尿中的 PSMA。

25

3. 测定 PSMA 和 PSA 的多重表面增强的激光解吸/电离免疫测定

采用表面增强的激光解吸/电离免疫测定系统相对容易开发多重试验方法。例如, 图 7A-H 显示检测精浆 PSMA 和 PSA 的多重免疫测定。在 G 蛋白结合后, 针对 PSA 和 PSMA 的单抗或两种抗体的组合物结合于预活化的(PS-1)表面。A 图显示单

30 用抗 PSMA(7E11-C5.3)单抗鉴定到对应于 PSMA(99, 920.8)的一个峰。B 图显示单用抗-PSA 抗体检测到游离的 PSA(28, 430 Da)。C 图显示用含针对 PSA 和 PSMA 的单抗

的单一芯片阵列，作表面增强的激光解吸/电离免疫测定检测到游离的 PSA 和 PSMA。D 图显示当使用同种型匹配的对照免疫球蛋白代替生物标记物特异性单抗时，没有检测到游离的 PSA 和 PSMA。当使用特异性单抗或对照 IgG 时(A-D 图)，观察到双重带电的免疫球蛋白(73.1-73.4 KDa)。注意到当采用多重试验时，通过
5 选择 PSMA 的最佳强度和调节质量轴，可增加 A-d 图所示得到的 PSMA 的峰宽度，如 E-H 图中所示，在 Wright 等，“Protein Chip®表面增强的激光解吸/电离(SELDI)质谱：一种检测复杂蛋白质混合物中前列腺癌生物标记物的新型蛋白质芯片技术”，Prostate Cancer and Prostatic Disease, 2:264-276 中进一步描述了此分析。根据这些多重免疫测定方式包括同时检测/量化游离和复合的 PSA 和 PSAMA，
10 可任选地检测标记物的任何组合。

本发明使用前列腺癌和无前列腺癌的正常受试者的样品中差异性存在的标记物，帮助前列腺癌诊断提供了新的材料和方法。尽管已提供了具体的实施例，上述说明书是解说性的并非限制性的。以前描述的任何一种或多种特点的实施例可以任何形式合并在本发明的具一种或多种特点的任何其它实施例中。此外，在
15 审阅本说明书后本发明的许多变动对本领域的熟练技术人员是显而易见的。因此，不应该用上述参考文献来确定本发明的范围，而应该以范围完全相等的权利要求为基准来确定。

本申请中列出的所有出版物、专利、专利申请或其它文件在相同程度上作为一个整体的纳入供参考，好象各单独的出版物、专利、专利申请或其它文件单独
20 地指明欲纳入供所有目的参考。通过本文中列出的各种参考文献，申请人不容许任何特别的参考文献是他们发明的“先有技术”。

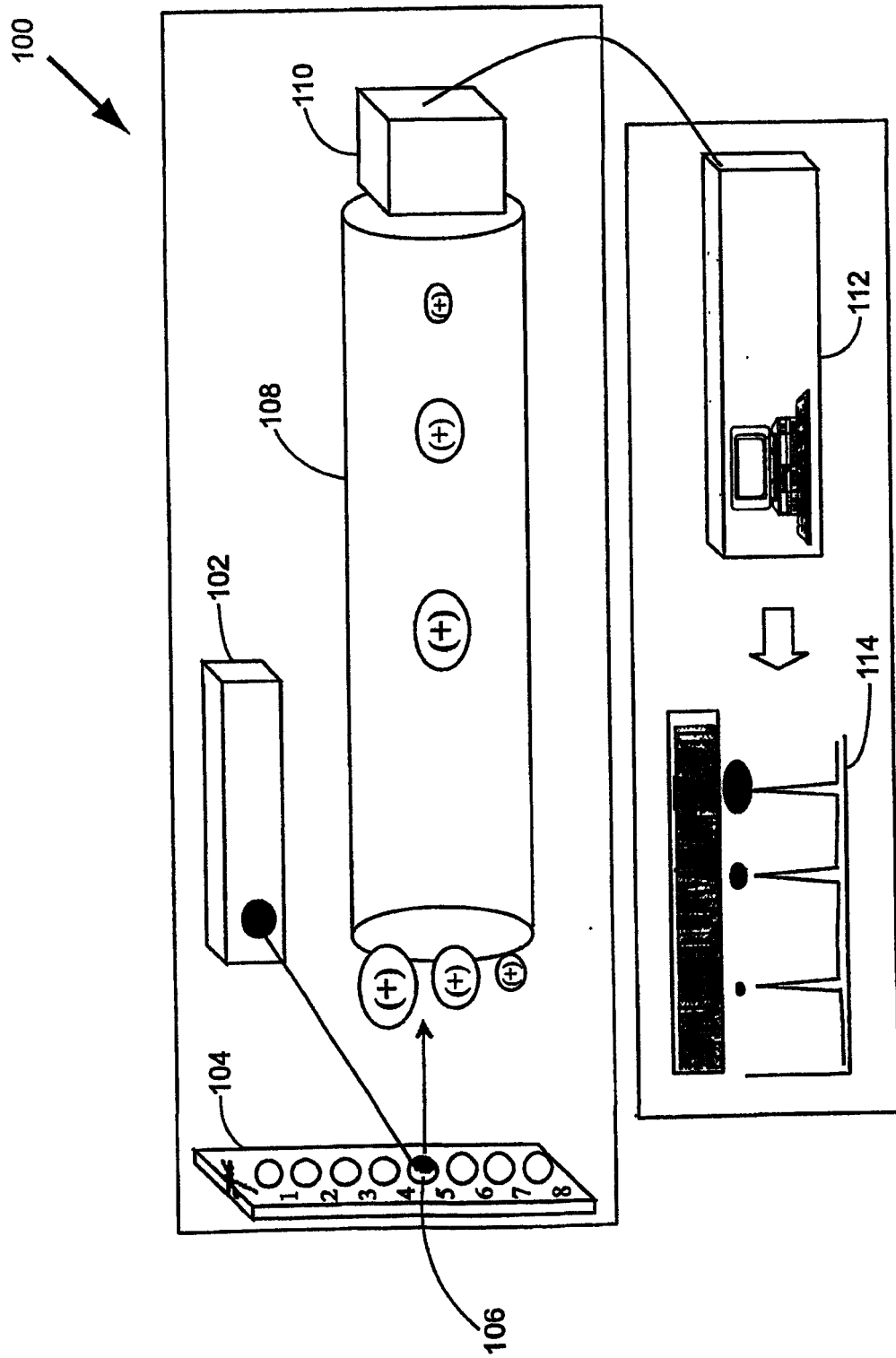


图 1

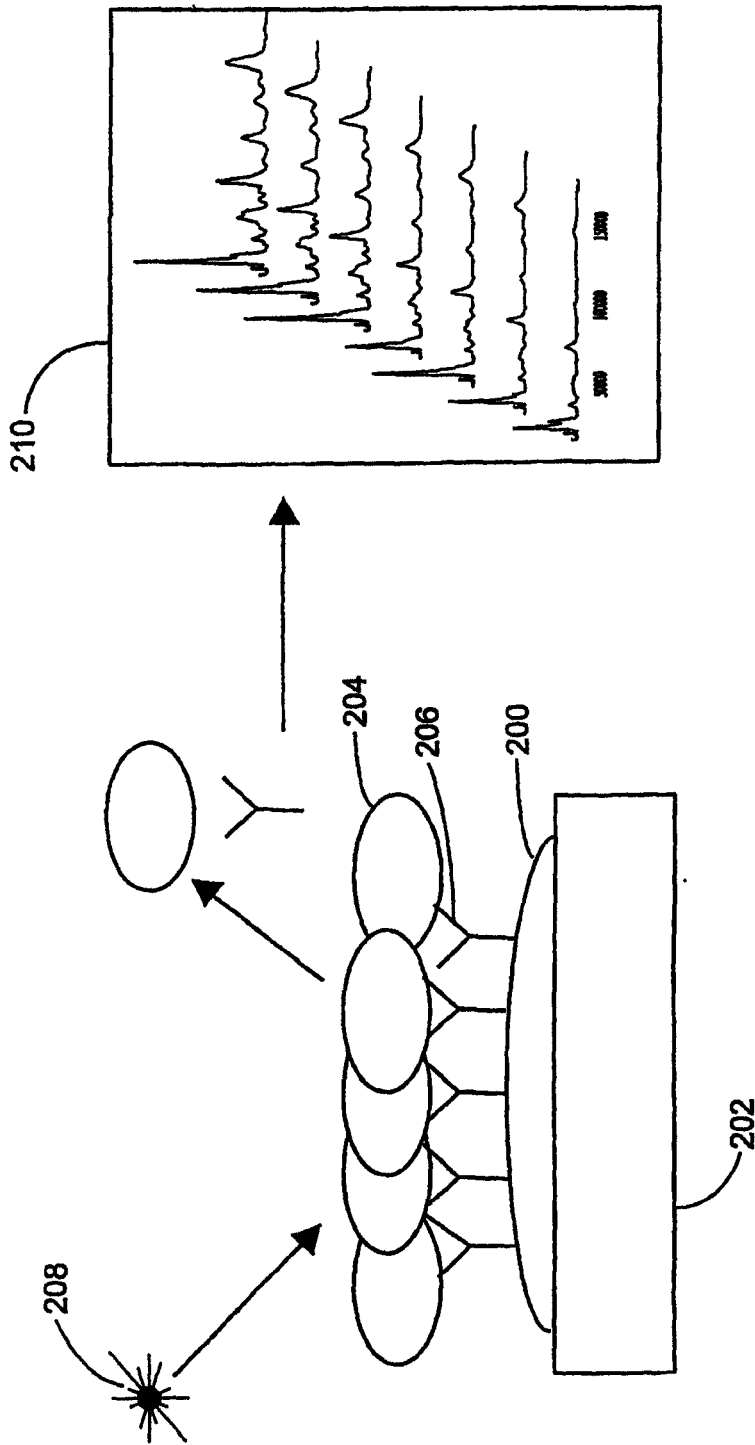


图 2

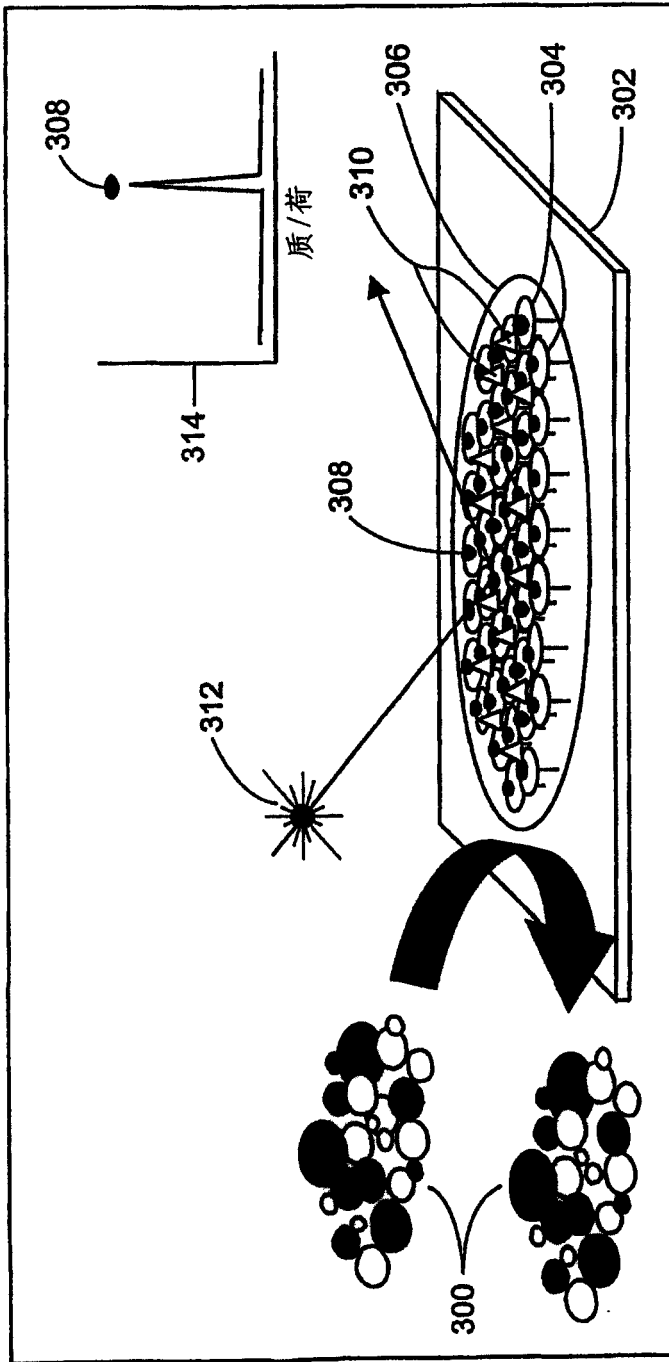


图 3

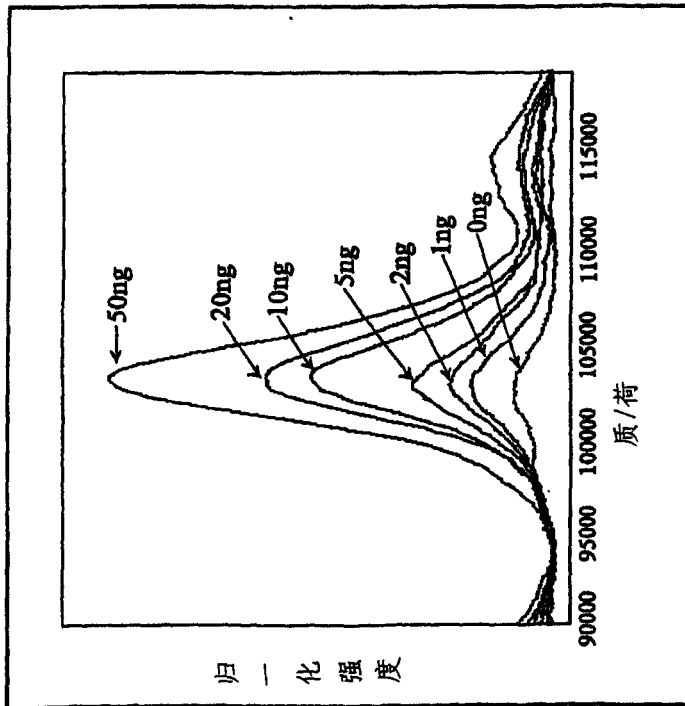


图 4A

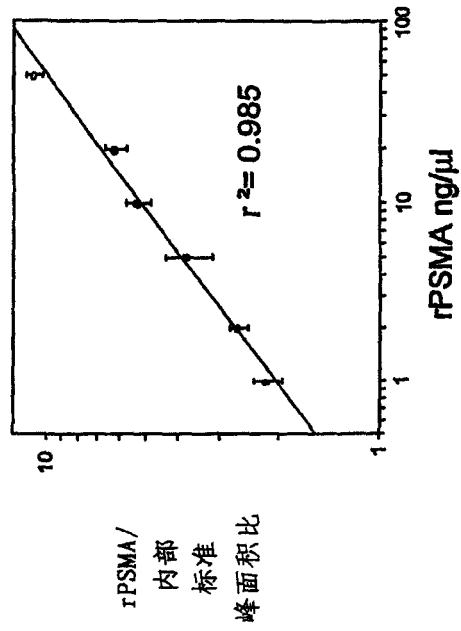


图 4B

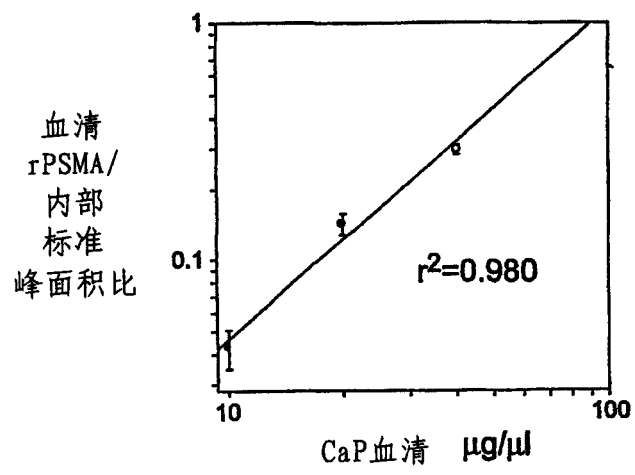


图 4C

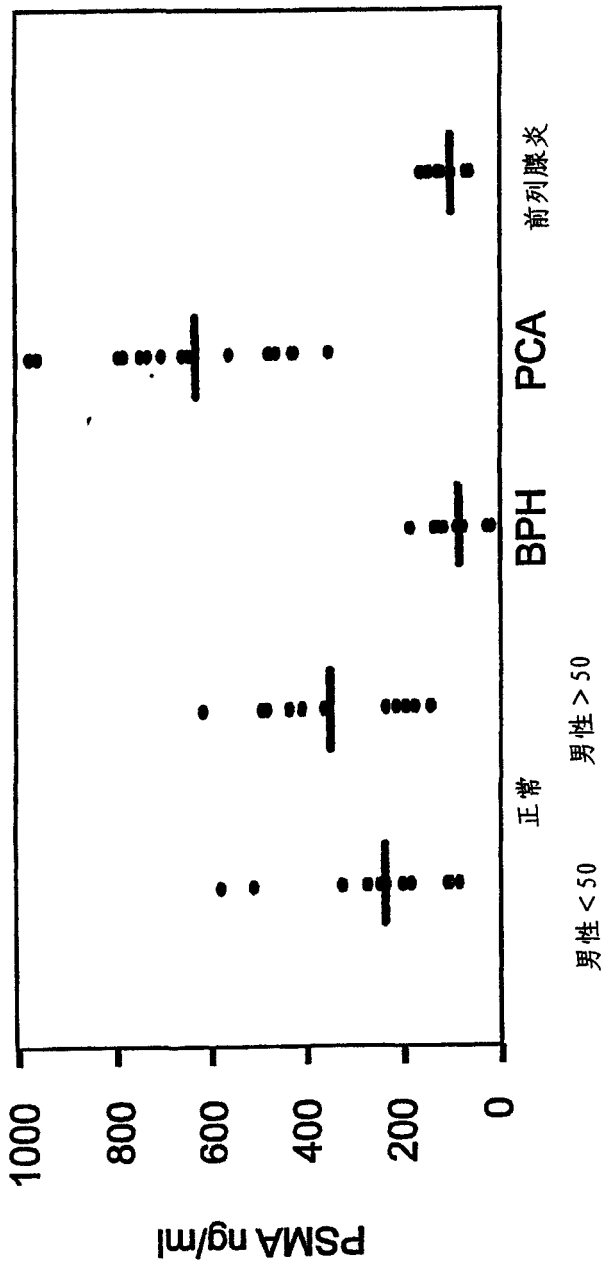


图 5

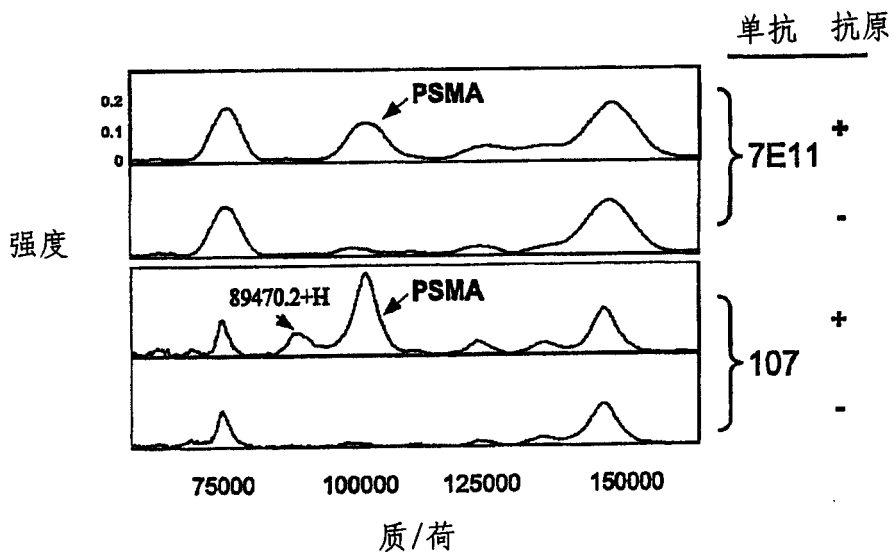


图 6A

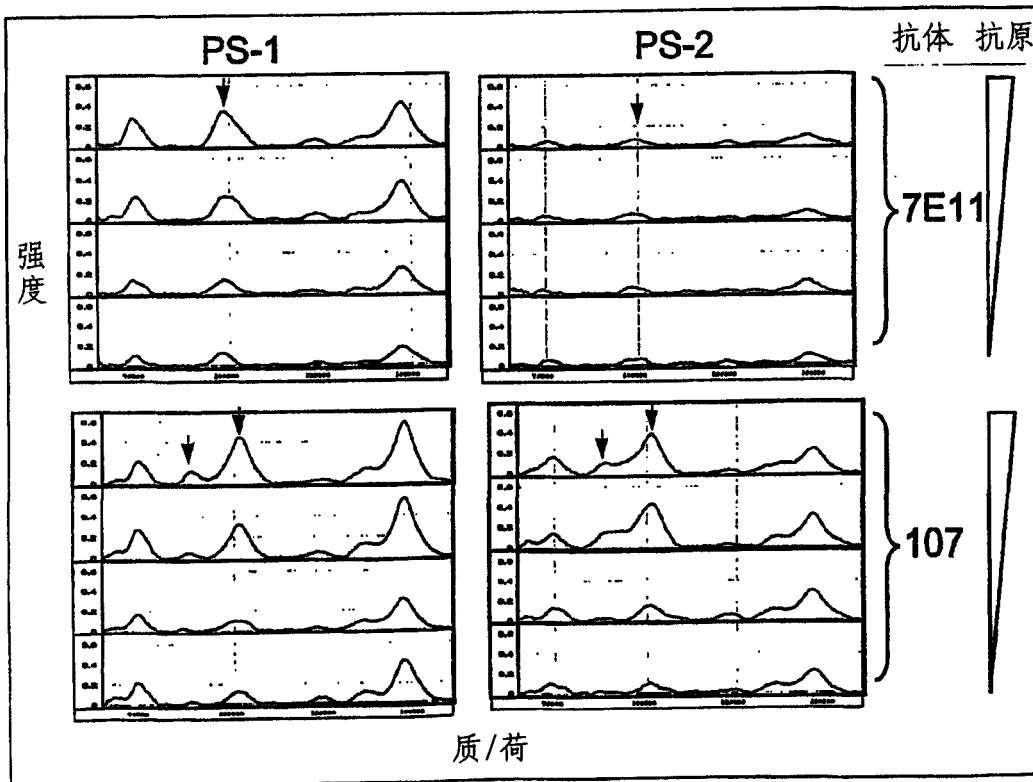


图 6B

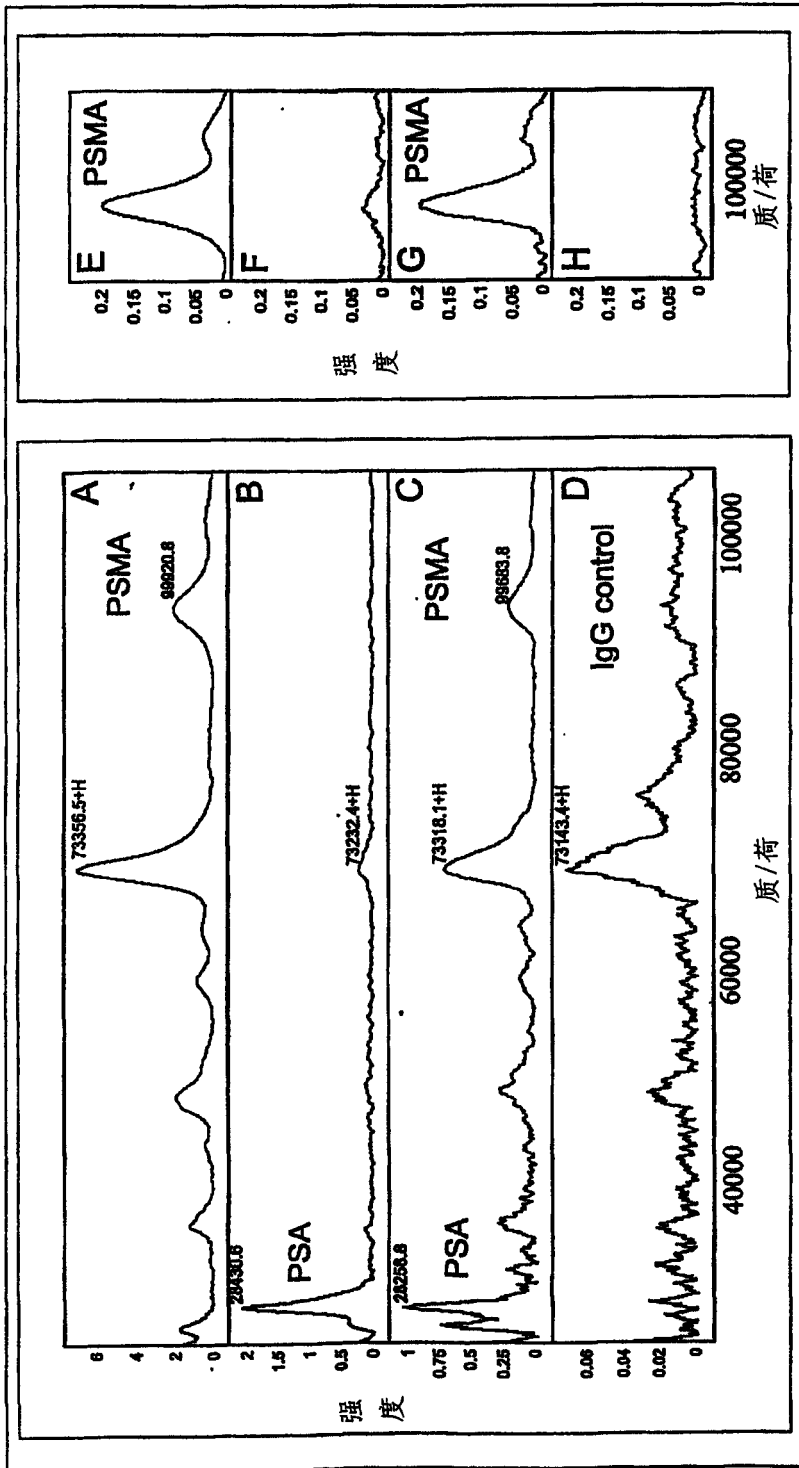


图 7

专利名称(译)	定量检测前列腺特异性膜抗原和其它前列腺标记的方法和装置		
公开(公告)号	CN1537170A	公开(公告)日	2004-10-13
申请号	CN01821657.9	申请日	2001-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
当前申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
[标]发明人	GL小赖特		
发明人	G·L·小赖特		
IPC分类号	G01N27/62 B01J20/281 B01J20/283 C12M1/00 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N27/447 G01N30/00 G01N30/26 G01N30/88 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577 G06F19/00 C12Q1/00 G01N27/26		
CPC分类号	G01N33/6851 G01N33/57434 G01N33/6848 C12Q1/6886		
代理人(译)	周承泽		
优先权	60/252452 2000-11-20 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供检测和量化血清样品及其它类型样品中的PSMA、PSMA'和其它前列腺标记物用于区别前列腺癌、良性前列腺增生和阴性诊断。还提供了诊断性检测编码细胞溶解产物和其它样品来源中的前列腺标记物核酸(如mRNA)。除多重检测/定量这些基于蛋白质和核酸的标记外,本发明还包括生物芯片、试剂盒和整合系统。

