

(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2004-536278

(P2004-536278A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62	GO 1 N 27/62	V 2 G O 4 5
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z 4 B O 6 3
GO 1 N 27/447	GO 1 N 30/00	A
GO 1 N 30/00	GO 1 N 30/26	A
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 140 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-548165 (P2002-548165)	(71) 出願人	503181853 イースタン・ヴァージニア・メディカル・ スクール アメリカ合衆国 ヴァージニア州 235 07 ノーフォーク ウェスト オルニー ロード 700
(86) (22) 出願日	平成13年11月16日 (2001.11.16)	(74) 代理人	100064355 弁理士 川原田 一穂
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月20日 (2003.5.20)	(72) 発明者	ジョージ・エル・ライト, ジュニア アメリカ合衆国 ヴァージニア州 234 55 ヴァージニア ビーチ モウルトリ ー コート 829
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/043424	Fターム(参考)	2G045 BB11 CA26 DA36 FB03 FB05 FB06
(87) 国際公開番号	W02002/046448		
(87) 国際公開日	平成14年6月13日 (2002.6.13)		
(31) 優先権主張番号	60/252, 452		
(32) 優先日	平成12年11月20日 (2000.11.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺特異的膜抗原、その他の前立腺マーカーの定量的検出方法及び装置

(57) 【要約】

本発明は前立腺癌、良性前立腺増殖、及び陰性診断の識別に使用される血清サンプル、その他の種類のサンプル中のPSMA（前立腺特異的膜抗原）、PSMA'（前立腺特異的膜抗原の切形種）、及びその他のマーカーの検出及び定量方法及び装置を提供する。細胞溶解物及びその他のサンプル源中の前立腺マーカーをコード化するmRNAのような核酸の診断的検出方法及び装置も提供する。これら蛋白質系及び核酸系マーカーの多様化検出/定量方法及び装置の他、本発明はバイオチップ、キット及び総合システムも含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) サンプルを、 P S M A 又は P S M A ' を捕獲する少なくとも 1 つの、基体に結合した吸着剤に曝し、これによりサンプル中の P S M A 又は P S M A ' を捕獲する工程、及び
(b) この捕獲した P S M A 又は P S M A ' をガス相イオン分光測定により定量する工程、
を含む、サンプル中の P S M A 又は P S M A ' の定量方法。

【請求項 2】

前記サンプルが血清である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記サンプルが、体液、細胞溶解物、精液、精液プラズマ、前立腺液、唾液、血液、リンパ液、肺 / 気管支洗浄物、粘液、糞、乳首分泌物、つば、涙、又は尿 ; の 1 つ以上を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞溶解物が、前立腺組織又は細胞から誘導される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞溶解物が、一次組織又は細胞、培養組織又は細胞、正常組織又は細胞、病的組織又は細胞、良性組織又は細胞、癌組織又は細胞、唾液腺組織又は細胞、腸組織又は細胞、神経組織又は細胞、腎臓組織又は細胞、リンパ組織又は細胞、ぼうこう組織又は細胞、尿生殖組織又は細胞、腫瘍組織又は細胞、又は腫瘍新生脈管構造組織又は細胞 ; の 1 つ以上から誘導される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (a) のサンプルとして使用される P S M A 又は P S M A ' 含有サンプル分画を採集するため、サンプル中のバイオ分子を分画する工程を更に含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記バイオ分子が、電気泳動、透析、ろ過、又は遠心 ; の 1 つ以上により分画される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記バイオ分子が、高性能液体クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、又は大きさ排除クロマトグラフィー ; の 1 つ以上により分画される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記バイオ分子が、

(i) サンプル中のバイオ分子を、各スポットが 1 つ以上のバイオ分子を含む一次元又は二次元のスポット配列に分離する工程、及び

(i i) P S M A 又は P S M A ' を含むと思われる配列からスポットを選択、除去する工程、

により分画される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

該方法が、前記選択されたスポットをガス相イオン分光測定により分析する前に該選択スポット中のバイオ分子を酵素で消化する工程を更に含む請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

検出された P S M A 又は P S M A ' の量を対照と比較する工程を更に含む請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記捕獲した P S M A 又は P S M A ' 以外の材料を除去する工程を更に含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記材料が、1 つ以上の洗浄により除去される請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

各洗浄が、少なくとも1つの前の洗浄に対し、同一又は異なる溶離条件を有する請求項13に記載の方法。

【請求項15】

溶離条件が、pH、緩衝能力、イオン強度、水構造特性、洗剤の種類、洗浄強度、疎水性、誘電率、又は少なくとも1つの溶質の濃度；に応じて異なる請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記少なくとも1つの基体結合吸着剤が、少なくとも1つのクロマトグラフィー吸着剤を含む請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記少なくとも1つのクロマトグラフィー吸着剤が、アニオン性吸着剤、カチオン性吸着剤、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤、又は金属キレート化性吸着剤；の1つ以上を含む請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記金属キレート化性吸着剤が、ニッケル又はコバルトを含む請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記親水性相互作用吸着剤が酸化珪素を含む請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記少なくとも1つの基体結合吸着剤が、少なくとも1つのバイオ分子相互作用吸着剤を含む請求項1に記載の方法。

【請求項21】

前記少なくとも1つのバイオ分子相互作用吸着剤が、親和性吸着剤、ポリペプチド、酵素、前立腺マーカー基体、受容体、又は抗体；の1つ以上を含む請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記少なくとも1つのバイオ分子相互作用吸着剤が、PSMA又はPSMA'を特異的に捕獲するモノクローナル抗体を含む請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記少なくとも1つの基体結合吸着剤が、基体に結合した該少なくとも1つの基体結合吸着剤を有する少なくとも1つの表面機構付きの基体を備えたバイオチップとして供給される請求項1に記載の方法。

【請求項24】

前記少なくとも1つの基体結合吸着剤が、PSMA又はPSMA'を特異的に捕獲する少なくとも1つのモノクローナル抗体を含む請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記少なくとも1つの基体結合吸着剤は、免疫グロブリンに特異的に結合する少なくとも1つの蛋白質を含み、また該方法は、サンプルを、PSMA又はPSMA'に特異的に結合し、これによりPSMA-又はPSMA'-錯体を形成する免疫グロブリンに曝す工程、及び該錯体を前記少なくとも1つの基体結合吸着剤に曝す工程を含む請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記少なくとも1つの基体結合吸着剤が、少なくとも1つの吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂を含む請求項1に記載の方法。

【請求項27】

定量したPSMA又はPSMA'の量を対照と比較する工程を更に含む請求項1に記載の方法。

【請求項28】

前記サンプル中のPSMA及びPSMA'の両方を定量する工程を更に含む請求項1に記載の方法。

【請求項29】

定量したPSMA及びPSMA'の量を互いに比較するか又は対照と比較する工程を更に含む請求項28に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

定量した P S M A 及び P S M A ' の量比を対照と比較する工程を更に含む請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記サンプル中の少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーを定量する工程を更に含み、工程 (a) が該サンプルを、該少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーを捕獲する少なくとも 1 つの基体結合吸着剤に曝す工程を更に含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

定量した P S M A 又は P S M A ' 及び前記少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーの量を互いに比較するか、又は対照と比較する工程を更に含む請求項 31 に記載の方法。

10

【請求項 33】

前記少なくとも 1 つの基体結合吸着剤が、基体に結合した該少なくとも 1 つの基体結合吸着剤を有する少なくとも 1 つの表面機構付きの基体を備えたバイオチップとして供給され、かつ前立腺マーカーが該少なくとも 1 つの表面機構上で捕獲される請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記少なくとも 1 つの基体結合吸着剤が複数の免疫グロブリンに特異的に結合し、また该方法がサンプルを、各々前記前立腺バイオマーカーの 1 つに特異的に結合する該複数の免疫グロブリンに曝し、これにより前立腺マーカーと錯体を形成する工程、及び該錯体を前記少なくとも 1 つの基体結合吸着剤に曝す工程を含む請求項 33 に記載の方法。

20

【請求項 35】

定量した P S M A 又は P S M A ' と前記少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーとの量比を対照と比較する工程を更に含む請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】

前記少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーが、P S M A、P S M A '、P S A、遊離 P S A、錯化 P S A、P A P、P S P 94、又は P S C A ; の 1 つ以上を含む請求項 31 に記載の方法。

【請求項 37】

前記ガス相イオン分光測定がレーザー脱着 / イオン化質量分析法である請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 38】

(i) 1 つ以上の質量 / 電荷比に対し信号の強度を表示する質量分析計により前記サンプルに関するデータを生成する工程、

(i i) 該データをコンピュータ読み取り可能なフォームに変形する工程、及び

(i i i) プログラム可能なデジタルコンピュータを操作して、P S M A 又は P S M A ' を表わす該コンピュータ読み取り可能なデータ中の信号を検出するアルゴリズムを実行する工程、

を含む請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記レーザー脱着 / イオン化質量分析法が、

40

(i) 吸着剤を付着させた質量分析計との併用に適合したプローブを供給する工程、

(i i) 前記サンプルを該吸着剤と接触させる工程、及び

(i i i) 該プローブから P S M A 又は P S M A ' を脱着、イオン化して、該脱着 / イオン化した P S M A 又は P S M A ' を質量分析計で検出する工程、

を含む請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記基体が、質量分析計との併用に適合したプローブ上に置くのに好適である請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記レーザー脱着 / イオン化質量分析法が、

50

(i) 吸着剤を付着させた基体を供給する工程、
 (i i) 前記サンプルを該基体と接触させる工程、
 (i i i) 前記基体を、吸着剤を付着させた質量分析計との併用に適合したプローブ上に置く工程、及び
 (i v) 該プローブから P S M A 又は P S M A ' を脱着、イオン化して、該脱着 / イオン化した P S M A 又は P S M A ' を質量分析計で検出する工程、
 を含む請求項 37 に記載の方法。

【請求項 42】

前記基体が、吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂を含む請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

(a) 被検者からのサンプル中の P S M A 又は P S M A ' を検出する工程、及び
 (b) この検出された P S M A 又は P S M A ' を前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断の蓋然的診断と関連させる工程、
 を含む、前立腺癌又は良性前立腺増殖の診断援助方法。

【請求項 44】

前記相関が、サンプル中の P S M A 又は P S M A ' の存在又は不存在と対照中の P S M A 又は P S M A ' 検出頻度とを考慮する請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記相関が、P S M A 又は P S M A ' の対照量に対するサンプル中の P S M A 又は P S M A ' の量を考慮する請求項 43 に記載の方法。

【請求項 46】

対照量を越える P S M A 又は P S M A ' 量が、前立腺癌の陽性診断と明確に相関され、一方、対照量未満の P S M A 又は P S M A ' 量が、良性前立腺増殖の陽性診断と明確に相関する請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記サンプル中の P S M A 又は P S M A ' の検出に、免疫アッセイが使用される請求項 43 に記載の方法。

【請求項 48】

前記サンプルが血清である請求項 43 に記載の方法。

【請求項 49】

前記サンプルが、体液、細胞溶解物、精液、精液プラズマ、前立腺液、唾液、血液、リンパ液、肺 / 気管支洗浄物、粘液、糞、乳首分泌物、つば、涙、及び尿よりなる群から選ばれる請求項 43 に記載の方法。

【請求項 50】

前記細胞溶解物が前立腺組織又は細胞から誘導される請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記細胞溶解物が、一次組織又は細胞、培養組織又は細胞、正常組織又は細胞、病的組織又は細胞、良性組織又は細胞、癌組織又は細胞、前立腺組織又は細胞、唾液腺組織又は細胞、腸組織又は細胞、神経組織又は細胞、腎臓組織又は細胞、リンパ組織又は細胞、腫瘍組織又は細胞、又は腫瘍新生脈管構造組織又は細胞；の 1 つ以上から誘導される請求項 49 に記載の方法。

【請求項 52】

前記 P S M A 又は P S M A ' をガス相イオン分光測定により検出する工程を含む請求項 43 に記載の方法。

【請求項 53】

前記ガス相イオン分光測定がレーザー脱着 / イオン化質量分析法である請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記レーザー脱着 / イオン化質量分析法が表面強化される請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

10

20

30

40

50

(i) 1つ以上の質量 / 電荷比に対し信号の強度を表示する質量分析計により前記サンプルに関するデータを生成する工程、

(i i) 該データをコンピュータ読み取り可能なフォームに変形する工程、及び

(i i i) プログラム可能なデジタルコンピュータを操作して、該コンピュータ読み取り可能なデータと前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断についての診断を示すデータとの間の適合近似性を決定するアルゴリズムを実行する工程、

を含む請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記アルゴリズムが人工知能アルゴリズム又は発見的学習アルゴリズムを含む請求項 5 5 に記載の方法。

10

【請求項 5 7】

前記人工知能アルゴリズムが、ファジィ論理命令セット、クラスタ分析命令セット、神経ネットワーク、又は総称アルゴリズム；の 1つ以上を含む請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記レーザー脱着 / イオン化質量分析法が、

(i) 少なくとも 1つの吸着剤を付着させた基体を供給する工程、

(i i) 前記サンプルを該少なくとも 1つの吸着剤と接触させる工程、及び

(i i i) 該基体から P S M A 又は P S M A ' を脱着、イオン化して、該脱着 / イオン化した P S M A 又は P S M A ' を質量分析計で検出する工程、

を含む請求項 5 3 に記載の方法。

20

【請求項 5 9】

前記基体が、質量分析計との併用に適合したプローブである請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記基体が、質量分析計との併用に適合したプローブ上に置くのに好適である請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記少なくとも 1つの吸着剤が、少なくとも 1つのクロマトグラフィー吸着剤を含む請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記少なくとも 1つのクロマトグラフィー吸着剤が、アニオン性吸着剤、カチオン性吸着剤、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤、又は金属キレート化性吸着剤；の 1つ以上を含む請求項 6 1 に記載の方法。

30

【請求項 6 3】

前記金属キレート化性吸着剤が、ニッケル又はコバルトを含む請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記親水性相互作用吸着剤が酸化珪素を含む請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記少なくとも 1つの吸着剤が、少なくとも 1つのバイオ分子相互作用吸着剤を含む請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記少なくとも 1つのバイオ分子相互作用吸着剤が、親和性吸着剤、ポリペプチド、酵素、前立腺マーカー基体、受容体、又は抗体；の 1つ以上を含む請求項 6 5 に記載の方法。

40

【請求項 6 7】

前記少なくとも 1つのバイオ分子相互作用吸着剤が、P S M A 又は P S M A ' を特異的に捕獲するモノクローナル抗体を含む請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

該方法が前記サンプル中の P S M A 又は P S M A ' の両方を検出し、相関させる工程を含む請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記 P S M A 又は P S M A ' の存在の検出が、前立腺癌又は良性前立腺増殖の陽性診断と

50

相関する請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

前記相関が、サンプル中の P S M A 又は P S M A ' の存在又は不存在と対照中の P S M A 又は P S M A ' 検出頻度とを考慮する請求項 68 に記載の方法。

【請求項 71】

前記相関が、P S M A の対照量及び P S M A ' の対照量、又はそれらの比率に対するサンプル中の P S M A 量及び P S M A ' の量、又はそれらの比率を更に考慮する請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

该方法が、サンプル中の少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーを検出し、相関させる工程を含む請求項 43 に記載の方法。 10

【請求項 73】

前記少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーが、P S M A、P S M A '、P S A、遊離 P S A、錯化 P S A、P A P、P S P 94、又は P S C A ; の 1 つ以上を含む請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記 P S M A 又は P S M A ' 及び少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーの存在の検出が、前立腺癌又は良性前立腺増殖の陽性診断と相関する請求項 72 に記載の方法。

【請求項 75】

前記相関が、サンプル中の P S M A 又は P S M A ' 及び少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーの存在又は不存在と、対照中の P S M A 又は P S M A ' 及び少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーの検出頻度とを考慮する請求項 72 に記載の方法。 20

【請求項 76】

前記相関が、P S M A 又は P S M A ' 及び少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーの対照量又は対照比率に対するサンプル中の P S M A 又は P S M A ' 及び少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーの量又は比率を更に考慮する請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

基体に結合した少なくとも 1 つの吸着剤を有する少なくとも 1 つの表面機構付きの基体を備えたガス相イオン分光計に脱着可能に挿入できるバイオチップ。

【請求項 78】

前記基体が、ガラス、セラミック、プラスチック、磁性材料、ポリマー、有機ポリマー、導電性ポリマー、天然バイオポリマー、金属、メタロイド、合金、又は有機ポリマー塗布金属；の 1 つ以上を含む請求項 77 に記載のバイオチップ。 30

【請求項 79】

前記少なくとも 1 つの吸着剤が、少なくとも 1 つの溶離条件下でサンプルから P S M A 又は P S M A ' を分離できる請求項 77 に記載のバイオチップ。

【請求項 80】

前記少なくとも 1 つの吸着剤が、少なくとも 1 つのクロマトグラフィー吸着剤を含む請求項 77 に記載のバイオチップ。

【請求項 81】

前記少なくとも 1 つのクロマトグラフィー吸着剤が、アニオン性吸着剤、カチオン性吸着剤、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤、又は金属キレート化性吸着剤；の 1 つ以上を含む請求項 80 に記載のバイオチップ。 40

【請求項 82】

前記金属キレート化性吸着剤が、ニッケル又はコバルトを含む請求項 81 に記載のバイオチップ。

【請求項 83】

前記親水性相互作用吸着剤が酸化珪素を含む請求項 81 に記載のバイオチップ。

【請求項 84】

前記少なくとも 1 つの基体結合吸着剤が、少なくとも 1 つのバイオ分子相互作用吸着剤を 50

含む請求項 77 に記載のバイオチップ。

【請求項 85】

前記少なくとも 1 つのバイオ分子相互作用吸着剤が、親和性吸着剤、ポリペプチド、酵素、前立腺マーカー基体、受容体、又は抗体；の 1 つ以上を含む請求項 84 に記載のバイオチップ。

【請求項 86】

前記少なくとも 1 つのバイオ分子相互作用吸着剤が、PSMA 又は PSMA' を特異的に捕獲するモノクローナル抗体を含む請求項 84 に記載のバイオチップ。

【請求項 87】

前記少なくとも 1 つの表面機構が、複数の表面機構を含む請求項 77 に記載のバイオチップ。 10

【請求項 88】

前記複数の表面機構が、一列、直交配列、円形、又は n 角形（但し、n は 3 以上）に配置される請求項 87 に記載のバイオチップ。

【請求項 89】

前記複数の表面機構が論理配列又は空間配列を含む請求項 87 に記載のバイオチップ。

【請求項 90】

前記複数の表面機構の各々が、同一又は異なる吸着剤もしくはそれらの 1 つ以上の組合せを含む請求項 87 に記載のバイオチップ。

【請求項 91】

前記複数の表面機構の中の少なくとも 2 つが、同一又は異なる吸着剤もしくはそれらの 1 つ以上の組合せを含む請求項 87 に記載のバイオチップ。 20

【請求項 92】

PSMA 又は PSMA' を捕獲できる前記少なくとも 1 つの吸着剤の他に、該複数の表面機構の 1 つ以上の所で基体に結合する少なくとも 1 つの他の吸着剤を更に含む請求項 87 に記載のバイオチップ。

【請求項 93】

前記少なくとも 1 つの他の吸着剤が、少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーを捕獲できる請求項 92 に記載のバイオチップ。

【請求項 94】

前記少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーが、PSMA、PSMA'、PSA、遊離 PSA、錯化 PSA、PAP、PSP94、又は PSCA；の 1 つ以上を含む請求項 93 に記載のバイオチップ。 30

【請求項 95】

(a) PSMA 又は PSMA' を捕獲する少なくとも 1 つの吸着剤、
(b) 該吸着剤にサンプルを曝すことによりサンプルから PSMA 又は PSMA' を捕獲し、この捕獲した PSMA 又は PSMA' をガス相イオン分光測定により定量するための命令セット、及び

(c) 前記吸着剤及び命令セットを収納するための少なくとも 1 つの容器、
を含むキット。 40

【請求項 96】

前記吸着剤を洗浄して前記捕獲した PSMA 又は PSMA' 以外の材料を除去するための少なくとも 1 つの溶離剤を更に含む請求項 95 に記載のキット。

【請求項 97】

前記少なくとも 1 つの吸着剤が、少なくとも 1 つの固体相吸着剤を含む請求項 95 に記載のキット。

【請求項 98】

前記少なくとも 1 つの固体相吸着剤が、基体に結合した該少なくとも 1 つの固体相吸着剤を有する少なくとも 1 つの表面機構付きの基体を備えたバイオチップとして供給される請求項 97 に記載のキット。 50

【請求項 99】

前記基体が、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブである請求項 98 に記載のキット。

【請求項 100】

該キットが、ガス相イオン分光計との併用に適合した前記プローブを更に含む請求項 99 に記載のキット。

【請求項 101】

前記プローブが、複数の表面機構付きの基体を含む請求項 100 に記載のキット。

【請求項 102】

前記複数の表面機構の各々が、前記基体に結合した 1 つ以上の吸着剤を含む請求項 101 に記載のキット。 10

【請求項 103】

前記複数の表面機構が、一列、直交配列、円形、又は n 角形（但し、n は 3 以上）に配置される請求項 101 に記載のキット。

【請求項 104】

前記複数の表面機構が論理配列又は空間配列を含む請求項 101 に記載のキット。

【請求項 105】

前記少なくとも 1 つの固体相吸着剤が、少なくとも 1 つの吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂を含む請求項 97 に記載のキット。

【請求項 106】

前記少なくとも 1 つの吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂が、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブ上に置くのに好適である請求項 105 に記載のキット。 20

【請求項 107】

該キットが、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブを更に含む請求項 106 に記載のキット。

【請求項 108】

該キットが、少なくとも 1 つの基準又は対照を更に含む請求項 95 に記載のキット。

【請求項 109】

前記少なくとも 1 つの吸着剤が少なくとも 1 つのクロマトグラフィー吸着剤を含む請求項 95 に記載のキット。 30

【請求項 110】

前記少なくとも 1 つのクロマトグラフィー吸着剤が、アニオン性吸着剤、カチオン性吸着剤、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤、又は金属キレート化性吸着剤；の 1 つ以上を含む請求項 109 に記載のキット。

【請求項 111】

前記金属キレート化性吸着剤が、ニッケル又はコバルトを含む請求項 110 に記載のキット。

【請求項 112】

前記親水性相互作用吸着剤が酸化珪素を含む請求項 110 に記載のキット。

【請求項 113】

前記少なくとも 1 つの吸着剤が、少なくとも 1 つのバイオ分子相互作用吸着剤を含む請求項 95 に記載のキット。 40

【請求項 114】

前記少なくとも 1 つのバイオ分子相互作用吸着剤が、親和性吸着剤、ポリペプチド、酵素、前立腺マーカー基体、受容体、又は抗体；の 1 つ以上を含む請求項 113 に記載のキット。

【請求項 115】

前記少なくとも 1 つのバイオ分子相互作用吸着剤が、PSMA 又は PSMA' を特異的に捕獲するモノクローナル抗体を含む請求項 113 に記載のキット。

【請求項 116】

該キットが、P S M A 又は P S M A ' を捕獲する前記少なくとも 1 つの吸着剤の他に、少なくとも 1 つの他の吸着剤を更に含む請求項 9 5 に記載のキット。

【請求項 1 1 7】

前記少なくとも 1 つの他の吸着剤が、少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーを捕獲できる請求項 1 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 1 8】

前記少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーが、P S M A、P S M A '、P S A、遊離 P S A、錯化 P S A、P A P、P S P 9 4、又は P S C A；の 1 つ以上を含む請求項 1 1 7 に記載のキット。

【請求項 1 1 9】

(1) 溶離剤で洗浄した時、前記 P S M A 又は P S M A 或いは少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーを前記少なくとも 1 つの吸着剤上に保持する溶離剤、又は (2) 前記少なくとも 1 つの吸着剤をサンプルと接触させた後、該吸着剤を溶離剤で洗浄するための命令を更に含む請求項 9 5 に記載のキット。

10

【請求項 1 2 0】

(a) 少なくとも 1 つのサンプル中の P S M A 又は P S M A ' を捕獲できる少なくとも 1 つの吸着剤、及び
(b) 前記少なくとも 1 つの吸着剤上に捕獲した P S M A 又は P S M A ' を定量するためのガス相イオン分光計、
を備えた、少なくとも 1 つのサンプル中の P S M A 又は P S M A ' を定量する装置又は総合システム。

20

【請求項 1 2 1】

前記ガス相イオン分光計がレーザー脱着 / イオン化質量分析計である請求項 1 2 0 に記載の装置又は総合システム。

【請求項 1 2 2】

前記ガス相イオン分光計に操作可能に接続したコンピュータ又はコンピュータ読み取り可能な媒体であって、

(i) 該ガス相イオン分光計により定量されたデータを分析又は処理するための少なくとも 1 つの命令セット、

(i i) データをデータベースに入れるための少なくとも 1 つの命令セット、又は
(i i i) 少なくとも 1 つの定量された前立腺マーカー又は定量された前立腺マーカーの組合せと、前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断、についての診断との相関を決めるための少なくとも 1 つの命令セット；

30

の 1 つ以上を有する少なくとも 1 つのコンピュータプログラムを含む該コンピュータ又はコンピュータ読み取り可能な媒体を更に備える請求項 1 2 0 に記載の装置又は総合システム。

【請求項 1 2 3】

前記少なくとも 1 つの吸着剤が少なくとも 1 つの固体相吸着剤を含む請求項 1 2 0 に記載の装置又は総合システム。

【請求項 1 2 4】

前記少なくとも 1 つの固体相吸着剤が、基体に結合した該少なくとも 1 つの固体相吸着剤を有する少なくとも 1 つの表面機構付きの基体を備えたバイオチップとして供給される請求項 1 2 3 に記載の装置又は総合システム。

40

【請求項 1 2 5】

前記基体が、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブである請求項 1 2 4 に記載の装置又は総合システム。

【請求項 1 2 6】

前記基体が複数の表面機構を有する請求項 1 2 4 に記載の装置又は総合システム。

【請求項 1 2 7】

前記複数の表面機構が、一列、直交配列、円形、又は n 角形 (但し、n は 3 以上) に配置

50

される請求項 1 2 6 に記載の装置又は総合システム。

【請求項 1 2 8】

前記複数の表面機構が論理配列又は空間配列を含む請求項 1 2 6 に記載の装置又は総合システム。

【請求項 1 2 9】

前記少なくとも 1 つの固体相吸着剤が、少なくとも 1 つの吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂を含む請求項 1 2 3 に記載の装置又は総合システム。

【請求項 1 3 0】

前記少なくとも 1 つの吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂が、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブ上に置くのに好適である請求項 1 2 9 に記載の装置又は総合システム。

10

【請求項 1 3 1】

(a) サンプルを、前立腺マーカー m R N A を捕獲する少なくとも 1 つの吸着剤に曝し、これによりサンプル中の前立腺マーカー m R N A を捕獲する工程、及び

(b) この捕獲した前立腺マーカー m R N A をガス相イオン分光測定により定量する工程、を含む、サンプル中の前立腺マーカー m R N A の定量方法。

【請求項 1 3 2】

前記サンプルが、前立腺組織又は細胞から誘導された細胞溶解物を含む請求項 1 3 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 3 3】

前記ガス相イオン分光測定がレーザー脱着 / イオン化質量分析法である請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記捕獲した前立腺マーカー m R N A の量を対照と比較する工程を更に含む請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

複数の異なる前立腺マーカー m R N を定量する工程を更に含む請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記少なくとも 1 つの吸着剤が少なくとも 1 つのバイオ分子相互作用吸着剤を含む請求項 1 3 1 に記載の方法。

30

【請求項 1 3 7】

前記少なくとも 1 つのバイオ分子相互作用吸着剤が少なくとも 1 つの前立腺マーカー c D N A を含む請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

(a) 被検者からのサンプル中の少なくとも 1 つの前立腺マーカー m R N A を検出する工程、及び

(b) この検出された前立腺マーカー m R N A を前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断の蓋然的診断と関連させる工程、を含む、前立腺癌又は良性前立腺増殖の診断援助方法。

40

【請求項 1 3 9】

基体に結合した少なくとも 1 つの吸着剤を有する少なくとも 1 つの表面機構付きの基体を備えたバイオチップであって、該少なくとも 1 つの吸着剤は 1 つ以上の前立腺マーカー m R N A を捕獲できる該バイオチップ。

【請求項 1 4 0】

(a) 前立腺マーカー m R N A を捕獲する少なくとも 1 つの吸着剤、

(b) 該吸着剤にサンプルを曝すことによりサンプルから前立腺マーカー m R N A を捕獲し、この捕獲した前立腺マーカー m R N A をガス相イオン分光測定により定量するための命令セット、及び

50

(c) 前記吸着剤及び命令セットを収納するための少なくとも1つの容器、を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

著作権通知

37 C. F. R. 1.71(e)に従って、出願人は、この開示の一部が著作権の保護を受ける資料を含むことを通知する。著作権所有者は、特許庁の特許ファイル又は記録にあるような該特許文書又は特許開示のファクシミリ複写する誰にも反対しないが、さもなければ、全ての著作権の権利を保有する。

【0002】

関連出願への相互参照

35 U. S. C. 119及び/又は120並びにその他の適用可能な法令又は規則に従って、本出願は2000年11月20日出願の米国特許出願No. 60/252,452による利益及び優先権を主張し、この出願の開示をここに援用する。

【0003】

連邦政府主催研究開発の下でなされた本発明に対する権利の声明

本発明は、National Cancer Institute (CA85067)及びVirginia Prostate Centerにより支持される。政府は、本発明における特定の権利を保有することができる。

【0004】

発明の背景

前立腺癌は、男性での最も普通の非皮膚性の癌である。非組織幽閉形(non-organ-confined)の病気とは異なる非転移形の前立腺癌に対しては、特に男性ホルモン欠乏治療ができない場合、一般に、有効な治療の選択が存在する(Crawford等,(1989年)“A controlled trial of leuproli de with and without flutamide in prostatic carcinoma”, N. Engl. J. Med. 321:419-424及びLepor等,(1982年)“The influence of hormonal therapy on survival of men with advanced prostatic cancer”, J. Urol. 128:335-340)。したがって、この病気の早期診断は必須である。

【0005】

現在使用されている特定の前立腺癌スクリーンは、正常組織に対し非常に侵襲的(invasive)で、一般に早期検出するのに十分な感度に欠けている。例えばデジタル直腸検査中、内科医は直腸壁を通して前立腺を感じ取ることにより、塊状又は肥大した前立腺のような前立腺の異常を発見しようと試みる。ぼうこう鏡検査は、他の普通の侵襲的前立腺癌診断法であり、この方法も通常、早期前立腺癌の検出に十分な感度に欠けている。

【0006】

侵襲の少ない前立腺癌診断法は、各種体液中で前立腺特異抗原(PSA)バイオマーカーのようなマーカーの存在差を検出するというものである。診断アッセイの有効性は一般に、その特異性及び選択性による。いかなる条件に対しても真の陽性診断率及び真の陰性診断率を向上する方法は、望ましい医療目的である。前立腺癌の場合、これらの診断試験は、かなり多くの誤った陽性結果及び陰性結果を与える点で充分満足するものではない。例えばPSAによるアッセイは、現在入手可能な最善のマーカーの一つと広く考えられているが、良性の前立腺疾患(例えば良性前立腺増殖(BPH))と悪性前立腺疾患とを必ずしも正確に識別しないので、幾つかの重大な前立腺癌について誤った陰性結果を生じる可能性がある(Osterling(1991年)“Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate”, J. Urol. 145:907-923及びP

10

20

30

40

50

annek and Partin (1998年) "The role of PSA and percent of free PSA for staging and prognosis prediction in clinically localized prostate cancer", Sem. Urol. Oncol. 16: 100-105)。実際に、検出、診断及び予後の向上に単一マーカーは有効ではないと、証拠は示唆している。

【0007】

例えば一次及び転移前立腺癌における前立腺特異的膜抗原 (PSMA) のような他のマーカーの存在差から、単独で又は他のマーカー (例えば PSA) と組合せて検出された前者のマーカーが前立腺癌の診断に利用できることを示している。PSMAは、100kDa膜貫通糖蛋白質である750-アミノ酸である (Israeli等, (1993年) "Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen", Cancer Res. 53: 227-30) である。例えば高度のPSMA発現は前立腺組織中で検出され、一方、弱い発現は例えば免疫組織化学、Westernブロット法、及びRT-PCRにより例えば脳、唾液腺、小腸、及び循環腫瘍細胞中に検出されている。例えばIsraeli等 (1994年) "Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays", Cancer Res. 54: 6306-6310及びWright等 (1995年) "Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign and malignant prostate tissues", Urologic Oncology 1: 18-28参照。PSMAは、各種サンプル中で酵素抗体法 (ELISA法) を用いても検出されている。Sokoloff等 (2000年) "A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine", Prostate 43: 150-157参照。更に、N-末端配列又は膜張り領域 (spanning area) を欠くPSMAの切形種、即ちPSMA' も同定されている (Su等 (1995年) "Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: ratio of expression as a potential measurement of progression", Cancer Res. 55: 1441-1443参照。しかし、これらの方法を用いて血清中のPSMA又はPSMA' を正確に定量するか、或いはPSMA又はPSMA' 水準と前立腺癌又はBPHとの相関を明確に規定するのに成功していない。

【0008】

診断又は予後のバイオマーカーとしてのPSMA及びPSMA' の臨床実用性を決めようとする努力は、体液中のPSMA及びPSMA' の定量に敏感な免疫アッセイができないため、阻止されてきた。本発明は、PSMA及び/又はPSMA' 蛋白質、或いはコード化用核酸を定量すると共に、これら蛋白質又は核酸の電位を前立腺癌及びBPH用の診断/予後マーカーとしてアドレスする信頼性のあるシステムを提供する。本発明は更に、PSMA及び/又はPSMA' の他、その他のマーカーを迅速かつ同時に検出する革新的プラットフォームを提供する。これら及び他の特徴は、以下の開示について充分検討することにより明らかとなる。

【0009】

発明の概要

10

20

30

40

50

P S M A 及び P S M A ' のような蛋白質及び / 又はこれら蛋白質をコード化する核酸 (例えば m R N A 類) は、陰性診断に対する前立腺癌 (C a P) 又は良性前立腺増殖においてマーカーとして機能することが発見された。陰性診断と比べてこれらマーカーは、多様に、一層頻度多く又は一層頻度少なく検出されるか、或いは示差的に検出される。患者サンプル中の単独又は組合せのこれらのマーカーを測定することにより、診断者は、前立腺癌、良性前立腺増殖又は陰性診断 (例えば正常又は病気なし) と相関可能な情報が得られる。更に詳しくは、正常範囲を越える P S M A / P S M A ' 量ならば、前立腺癌の診断と明確に相関され、一方、正常範囲未満の P S M A / P S M A ' 量ならば、良性前立腺増殖又は前立腺炎と明確に相関する。これらマーカーは、分子量を特徴とし、サンプルのその他の成分、例えば他の蛋白質から、例えば質量分析計と結合させたクロマトグラフィー分離により分離 (r e s o l v e) できる。好ましい実施態様では、この分離方法は、表面強化レーザー脱着 / イオン化 (S u r f a c e E n h a n c e d L a s e r D e s o r p t i o n / I o n i z a t i o n) (S E L D I) 質量分析法を含む。この分析法では、質量分析プローブの表面は、アナライトの脱着及びイオン化用エネルギー源にアナライトを提示する際、有効な役割を演ずる。親和性捕獲表面強化レーザー脱着 / イオン化による免疫アッセイは、P S M A、P S M A '、関連する核酸の他、その他の蛋白質系前立腺マーカーを定量する能力や、多様な P S M A イソフォーム (i s o f o r m) 及びその他の前立腺マーカーを同時に検出、測定する能力等、臨床診断アッセイの発展に大きな利益を与える。

10

【 0 0 1 0 】

20

一面では本発明は、サンプル中の P S M A 又は P S M A ' を定量する方法を提供する。この方法は、試験サンプルを分画して、P S M A / P S M A ' を含むサンプルを単離する工程、及びガス相イオン分光測定を用いてこのサンプルから P S M A / P S M A ' を検出する工程を含む。一実施態様では、この方法は、(a) サンプルを、サンプル中の P S M A 又は P S M A ' を捕獲する基体結合吸着剤 (基体に結合した吸着剤) に曝す工程、及び (b) この捕獲した P S M A 又は P S M A ' をガス相イオン分光測定により定量する工程を含む。多数の異種サンプルが任意に使用されるが、好ましいサンプルとしては、血清及び細胞溶解物 (例えば前立腺組織又は細胞から誘導したもの) が挙げられる。

【 0 0 1 1 】

一実施態様では、この方法は、工程 (a) でサンプルとして使用される P S M A 又は P S M A ' 含有サンプル分画を採集するため、サンプル中のバイオ分子を分画する工程を更に含む。例えばこれらのバイオ分子は、例えば電気泳動、透析、ろ過、又は遠心等により任意に分画する。他の実施態様では、これらのバイオ分子は、高性能液体クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、又は大きさ排除 (e x c l u s i o n) クロマトグラフィー等により分画する。別の実施態様ではバイオ分子は、(i) サンプル中のバイオ分子を、各スポットが 1 つ以上のバイオ分子を含む一次元又は二次元のスポット配列に分離する工程、及び (i i) P S M A 又は P S M A ' を含むと思われる配列からスポットを選択、除去する工程により分画する。任意にこの方法は、選択されたスポットをガス相イオン分光測定により分析する前に該選択スポット中のバイオ分子を酵素で消化する工程を更に含む。更にこの方法は通常、検出又は定量された P S M A 又は P S M A ' の量を対照と比較する工程を含む。

30

40

【 0 0 1 2 】

P S M A 又は P S M A ' の定量方法は、その他のサンプル調製又は予備分画技術も含む。例えば (a) サンプルを吸着剤に曝す前に、例えば前記捕獲した P S M A 又は P S M A ' 以外の材料を除去する工程を更に任意に含む。この実施態様では、材料は通常、1 つ以上の洗浄により除去される。各洗浄は、前の洗浄と同一又は異なる溶離条件を有する。例えば溶離条件は一般に、p H、緩衝能力、イオン強度、水構造特性、洗剤の種類、洗浄強度、疎水性、誘電率、又は溶質の濃度等に応じて異なる。

【 0 0 1 3 】

本発明は、P S M A 又は P S M A ' のような標的とする前立腺マーカーを捕獲するため、

50

各種の基体結合吸着剤を利用する。この基体結合吸着剤は、基体に結合した基体結合吸着剤を有する少なくとも1つの表面機構 (f e a t u r e) 付きの基体を備えたバイオチップとして任意に供給される。特定の実施態様では、基体結合吸着剤は、P S M A 又は P S M A ' を特異的に捕獲するモノクロナール抗体を含む。他の実施態様では、基体結合吸着剤は、免疫グロブリンに特異的に結合する少なくとも1つの蛋白質を含む。これらの実施態様では、この方法は、サンプルを、P S M A 又は P S M A ' に特異的に結合して P S M A - 又は P S M A ' - 錯体を形成する免疫グロブリンに曝す工程、及びこの錯体を基体結合吸着剤に曝す工程を含む。或いは基体結合吸着剤は、この吸着剤で誘導体化した (d e r i v a t i z e d) ビーズ又は樹脂を含む。

【0014】

特定の実施態様では、この方法は、サンプル中の P S M A 及び P S M A ' の両方を定量する工程を含む。P S M A 及び P S M A ' の両方をサンプル中で定量する際、この方法は通常、定量した P S M A 及び P S M A ' の量を互いに又は対照と比較する工程も含む。この方法は、定量した P S M A 及び P S M A ' の量比を対照と比較する工程を任意に含む。

【0015】

他の実施態様では、この方法は、サンプル中の少なくとも1つの他の前立腺マーカーを定量する工程を更に含み、この場合、工程 (a) も、該他の前立腺マーカーを捕獲する少なくとも1つの基体結合吸着剤にサンプルを曝す工程を含む。基体結合吸着剤は、基体に結合した該基体結合吸着剤を有する少なくとも1つの表面機構付きの基体を備えたバイオチップとして任意に供給される。ここで前立腺マーカーは、この少なくとも1つの表面機構上に捕獲される。別の実施態様では、基体結合吸着剤は、免疫グロブリンに特異的に結合する蛋白質を含む。これらの実施態様では、この方法は、サンプルを免疫グロブリンに曝す工程を含み、ここで各免疫グロブリンは前立腺マーカーの1つに特異的に結合して、前立腺マーカーと錯体を形成するものであり、更にこれらの錯体を基体結合吸着剤に曝す工程を含む。その他の前立腺マーカーとしては通常、例えば P S M A 、 P S M A ' 、 前立腺特異的抗原 (P S A) 、 遊離 P S A 、 錯化 P S A 、 前立腺酸ホスファターゼ (P A P) 、 前立腺特異的ペプチド94 (P S P 9 4) 、 又は前立腺幹細胞抗原 (P S C A) 等が挙げられる。この実施態様では、該方法は一般に、定量した P S M A 又は P S M A ' 及び他の前立腺マーカーの量を互いに又は対照と比較する工程を含む。或いはこの方法は、定量した P S M A 又は P S M A ' の量と他の前立腺マーカーの量との比を対照と比較する工程を更に含む。

【0016】

好ましい実施態様では、ガス相イオン分光測定は、レーザー脱着/イオン化質量分析法、例えば表面強化レーザー脱着/イオン化質量分析法である。例えばこの方法は、(i) 1 つ以上の質量/電荷比に対し信号の強度を表示する質量分析計により前記サンプルに関するデータを生成する工程、(i i) このデータをコンピュータ読み取り可能なフォームに変形する工程、及び(i i i) プログラム可能なデジタルコンピュータを操作して、P S M A 又は P S M A ' を表わすコンピュータ読み取り可能なデータ中の信号を検出するアルゴリズムを実行する工程を含む。

【0017】

一実施態様では、レーザー脱着/イオン化質量分析法は、(i) 吸着剤を付着させた質量分析計との併用に適合したプローブを供給する工程、(i i) サンプルをこの吸着剤と接触させる工程、及び(i i i) プローブから P S M A 又は P S M A ' を脱着、イオン化して、この脱着/イオン化した P S M A 又は P S M A ' を質量分析計で検出する工程を含む。基体は任意に、質量分析計との併用に適合したプローブを有するか、或いは質量分析計との併用に適合したプローブ上に置くのに好適である。

【0018】

別の実施態様では、レーザー脱着/イオン化質量分析法は、(i) 吸着剤を付着させた基体を供給する工程、(i i) サンプルをこの吸着剤と接触させる工程、(i i i) この基体を、吸着剤を付着させた質量分析計との併用に適合したプローブ上に置く工程、及び(

10

20

30

40

50

i v) プローブから P S M A 又は P S M A ' を脱着、イオン化して、この脱着 / イオン化した P S M A 又は P S M A ' を質量分析計で検出する工程を含む。例えば基体は通常、吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂を含む。

【 0 0 1 9 】

本発明は、前立腺癌又は良性前立腺増殖の診断の際の援助方法にも関する。この方法は、(a) 被検者からのサンプル中の P S M A 又は P S M A ' を検出する工程、及び (b) この検出された P S M A 又は P S M A ' を前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断の蓋然的診断と関連させる工程を含む。この関連は一般に、サンプル中の P S M A 又は P S M A ' の存在又は不存在と対照中の P S M A 又は P S M A ' の検出頻度とを考慮する。更にこの関連は通常、P S M A 又は P S M A ' の対照量に対するサンプル中の P S M A 又は P S M A ' の量も考慮する。例えば対照量を越える P S M A 又は P S M A ' 量ならば、前立腺癌の陽性診断と明確に関連され、一方、対照量未満の P S M A 又は P S M A ' 量ならば、良性前立腺増殖の陽性診断と明確に関連する。他の実施態様では、サンプル中の P S M A 又は P S M A ' の検出に免疫アッセイが使用される。

10

【 0 0 2 0 】

特定の実施態様では、この方法は、P S M A 又は P S M A ' をガス相イオン分光測定により検出する工程を含む。好ましい実施態様では、ガス相イオン分光測定は、レーザー脱着 / イオン化質量分析法、例えば表面強化レーザー脱着 / イオン化質量分析法である。この方法は通常、(i) 1 つ以上の質量 / 電荷比に対し信号の強度を表示する質量分析計により前記サンプルに関するデータを生成する工程、(i i) このデータをコンピュータ読み取り可能なフォームに変形する工程、及び (i i i) プログラム可能なデジタルコンピュータを操作して、コンピュータ読み取り可能なデータと前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断についての診断を示すデータとの間の適合近似性を決定するアルゴリズムを実行する工程を含む。このアルゴリズムは、人工知能アルゴリズム又は発見的学習アルゴリズムを任意に含む。例えば人工知能アルゴリズムは通常、ファジィ論理命令セット、クラスタ分析命令セット、神経ネットワーク、又は総称アルゴリズム等を含む。

20

【 0 0 2 1 】

一面では、レーザー脱着 / イオン化質量分析法は、(i) 少なくとも 1 つの吸着剤を付着させた基体を供給する工程、(i i) サンプルをこの吸着剤と接触させる工程、及び (i i i) 基体から P S M A 又は P S M A ' を脱着、イオン化して、この脱着 / イオン化した P S M A 又は P S M A ' を質量分析計で検出する工程を含む。一実施態様では、基体は質量分析計との併用に適合したプローブである。別の実施態様では、基体は、質量分析計との併用に適合したプローブ、例えば吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂上に置くのに好適である。各種のクロマトグラフィー吸着剤又はバイオ分子相互作用吸着剤が任意に利用される。

30

【 0 0 2 2 】

一実施態様では、この方法は、サンプル中の P S M A 及び P S M A ' の両方を検出し、関連させる工程を含む。検出された P S M A 及び P S M A ' の存在は通常、例えば前立腺癌又は良性前立腺増殖の陽性診断と関連する。別の実施態様では、この関連は、サンプル中の P S M A 及び P S M A ' の存在又は不存在と対照中の P S M A 及び P S M A ' の検出頻度とを考慮する。この実施態様では、関連は、P S M A 及び P S M A ' の対照量又は量比に対するサンプル中の P S M A 及び P S M A ' の量又は量比を考慮する。

40

【 0 0 2 3 】

別の実施態様では、この方法は、サンプル中の少なくとも 1 つの他の前立腺マーカーを検出し、関連させる工程を含む。他の前立腺マーカーとしては通常、例えば P S M A 、 P S M A ' 、 P S A 、 遊離 P S A 、 錯化 P S A 、 P A P 、 P S P 9 4 、 又は P S C A 等が挙げられる。例えば検出された P S M A 又は P S M A ' 及び他の前立腺マーカーの存在は通常、例えば前立腺癌又は良性前立腺増殖の陽性診断と関連する。一面では、この関連は、サンプル中の P S M A 又は P S M A ' 及び他の前立腺マーカーの存在又は不存在と対照中の P S M A 又は P S M A ' 及び他の前立腺マーカーの検出頻度とを考慮する。この関連は任

50

意に、P S M A 又は P S M A ' 及び他の前立腺マーカーの対照量又は量比に対するサンプル中の P S M A 又は P S M A ' 及び他の前立腺マーカーの量又は量比も考慮する。

【 0 0 2 4 】

本発明は、基体に結合した少なくとも1つの吸着剤を有する少なくとも1つの表面機構付きの基体を備えたガス相イオン分光計に脱着可能に挿入できるバイオチップも提供する。この吸着剤は、P S M A 又は P S M A ' を捕獲可能である。吸着剤は通常、少なくとも1つの溶離条件下でサンプルから P S M A 又は P S M A ' を分離できる。各種のクロマトグラフィ吸着剤又はバイオ分子相互作用吸着剤が任意に利用される。一実施態様では、バイオチップの少なくとも1つの表面機構は、複数の表面機構を有する。例えば複数の表面機構は、一列、直交配列、円形、又は n 角形（但し、n は 3 以上）に配置される。複数の表面機構は通常、論理配列又は空間配列を有する。複数の表面機構の各々は、同一又は異なる吸着剤もしくはそれらの1つ以上の組合せを任意に含む。例えば複数の表面機構の中の少なくとも2つは、同一又は異なる吸着剤もしくはそれらの1つ以上の組合せを任意に有する。特定の実施態様では、バイオチップは、P S M A 又は P S M A ' を捕獲できる吸着剤の他に、少なくとも1つの他の吸着剤を更に有する。ここで他の吸着剤は、複数の表面機構の1つ以上の所で基体に結合している。他の吸着剤は通常、少なくとも1つの他の前立腺マーカー、例えば P S M A、P S M A '、P S A、遊離 P S A、錯化 P S A、P A P、P S P 9 4、又は P S C A 等を捕獲できる。

10

【 0 0 2 5 】

本発明は、(a) P S M A 又は P S M A ' を捕獲する少なくとも1つの吸着剤、(b) この吸着剤にサンプルを曝すことによりサンプルから P S M A 又は P S M A ' を捕獲し、この捕獲した P S M A 又は P S M A ' をガス相イオン分光測定により定量するための命令セット、及び(c) 前記吸着剤及び命令セットを収納するための少なくとも1つの容器を含むキットも提供する。このキットは、吸着剤を洗浄して前記捕獲した P S M A 又は P S M A ' 以外の材料を除去するための少なくとも1つの溶離剤も任意に含む。吸着剤は通常、少なくとも1つの固体相吸着剤を含む。一実施態様では、固体相吸着剤は、基体に結合した該固体相吸着剤を有する少なくとも1つの表面機構付きの基体を備えたバイオチップとして供給される。この基体は一般に、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブである。キットは、このプローブを任意に有する。特定の実施態様では、プローブは、複数の表面機構付きの基体を有する。例えば複数の表面機構の各々は、基体に結合した1つ以上の吸着剤を任意に有する。他の実施態様では、固体相吸着剤は、吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂を含む。例えば、吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂は通常、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブ上に置くのに好適である。キットは、このプローブも任意に含む。他の選択として、キットは少なくとも1つの基準又は対照を含む。

20

30

【 0 0 2 6 】

本発明は、(a) 少なくとも1つのサンプル中の P S M A 又は P S M A ' を捕獲できる少なくとも1つの吸着剤、及び(b) この吸着剤上に捕獲した P S M A 又は P S M A ' を定量するためのガス相イオン分光計を備えた、少なくとも1つのサンプル中の P S M A 又は P S M A ' を定量する装置又は総合システムも提供する。ガス相イオン分光計は任意に、レーザー脱着 / イオン化質量分析計である。この装置又は総合システムは通常、ガス相イオン分光計に操作可能に接続したコンピュータ又はコンピュータ読み取り可能な媒体であって、例えば(i) ガス相イオン分光計により定量されたデータを分析又は処理するための少なくとも1つの命令セット、(i i) データをデータベースに入れるための少なくとも1つの命令セット、又は(i i i) 少なくとも1つの定量された前立腺マーカー又は定量された前立腺マーカーの組合せと、前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断、についての診断との相関を決めるための少なくとも1つの命令セット；の1つ以上を有する少なくとも1つのコンピュータプログラムを含む該コンピュータ又はコンピュータ読み取り可能な媒体も備える。

40

【 0 0 2 7 】

本発明は、サンプル中の前立腺マーカー m R N A の定量方法も提供する。この方法は、(

50

a) サンプルを、前立腺マーカー mRNA を捕獲する少なくとも 1 つの吸着剤に曝し、これによりサンプル中の前立腺マーカー mRNA を捕獲する工程、及び (b) この捕獲した前立腺マーカー mRNA をガス相イオン分光測定により定量する工程を含む。サンプルとしては、例えば前立腺組織又は細胞から誘導された細胞溶解物があり、一方、吸着剤 (例えばバイオ分子相互作用吸着剤) としては一般に、例えば前立腺マーカー mRNA に対応する前立腺マーカー cRNA がある。好ましい実施態様では、ガス相イオン分光測定は、レーザー脱着 / イオン化質量分析法である。更にこの方法は通常、捕獲した前立腺マーカー mRNA の量を対照と比較する工程も含む。この方法は任意に、複数の異なる前立腺マーカー mRNA を定量する工程を含む。

【0028】

10

本発明は、前立腺マーカー mRNA の検出、定量に関連する別の方法、バイオチップ、及びキットにも関する。例えば (a) 被検者からのサンプル中の少なくとも 1 つの前立腺マーカー mRNA を検出する工程、及び (b) この検出された少なくとも 1 つの前立腺マーカー mRNA を前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断の蓋然的診断と関連させる工程を含む。バイオチップは、基体に結合した少なくとも 1 つの吸着剤を有する少なくとも 1 つの表面機構付きの基体を含むもので、この吸着剤は、1 つ以上の前立腺マーカー mRNA を捕獲できる。キットは、(a) 前立腺マーカー mRNA を捕獲する少なくとも 1 つの吸着剤、(b) この吸着剤にサンプルを曝すことによりサンプルから前立腺マーカー mRNA を捕獲し、この捕獲した前立腺マーカー mRNA をガス相イオン分光測定により定量するための命令セット、及び (c) 前記吸着剤及び命令セットを収納するための少なくとも 1 つの容器を含む。

20

【0029】

図面の簡単な説明

図 1 は、表面強化レーザー脱着 / イオン化用に構成した表面強化レーザー脱着 / イオン化飛行時間 (time-of-flight) 質量分析システムの概略図である。

【0030】

図 2 は、PSMA 表面強化レーザー脱着 / イオン化質量分析免疫アッセイを概略的に示す。

【0031】

図 3 は、表面強化レーザー脱着 / イオン化飛行時間質量分析技術の概略説明図である。

30

【0032】

図 4 A ~ C は、血清中の PSMA を定量するための表面強化レーザー脱着 / イオン化質量分析免疫アッセイを示す。結合した MoAb 7E11 を含む予め活性化した PS-1 Protein Chip (登録商標) 配列に各種濃度の rPSMA 又は血清を塗布 (apply) した後、これらのチップを洗浄し、表面強化レーザー脱着 / イオン化質量分析を行った。図 4 A は、強度及びピークの両面積の増大が蛋白質濃度の増大と相関したことを示す各種 rPSMA 濃度 (1 ~ 50 ng / μ l) でのスペクトル図である。図 4 B は、rPSMA の標準曲線を示す。図 4 A に示した各スペクトルの組換え PSMA 信号強度は、内標準 (α -ガラクトグロブリン、25 fmol / μ l) に正規化した。このピーク比 (rPSMA / 内標準) 対 rPSMA 蛋白質濃度をプロットすることにより、直線的な曲線が得られた。3 つの別個の質量スペクトルの平均及び標準偏差を示す。図 4 C は、前立腺癌 (PCA) と診断された患者からの血清サンプル中に検出された PSMA を示す。この分析法は、正規化のための内標準として 100 fmol / μ l の α -ガラクトグロブリンをスパイク (spike) した他は、rPSMA 標準曲線の形成に用いた方法と同じである。全血清蛋白の倍加 (doubling) 希釈 (即ち 10、20、40 μ g / μ l) は、直線的回帰 (regression) を示す。3 つの別個の質量スペクトルの平均及び標準偏差を示す。

40

【0033】

図 5 は、前立腺炎、前立腺癌 (PCA)、良性前立腺増殖 (BPH)、及び正常又は陰性診断のいずれかの患者から取ったサンプルについて、親和性捕獲表面強化レーザー脱着 /

50

イオン化免疫アッセイにより測定した血清 P S M A 水準を示す図である。陰性診断の患者は、50才未満 (< 50) の男性及び50才を越える男性 (> 50) という年齢を基準とした2つの下位グループに分けた。各患者グループについて示した棒線は、当該グループについての平均 P S M A 水準を表す。

【0034】

図6A、6Bは、ヒトの男性ホルモン依存前立腺癌細胞株 (L N C a P) からの全細胞溶解物における親和性捕獲表面強化レーザー脱着/イオン化免疫アッセイによる P S M A イソフォーム (i s o f o r m) の検出を示す質量スペクトル図である。図6Aは、L N C a P 全細胞溶解物 (A g) + : 添加した L N C a P 全細胞溶解物; - : 希釈緩衝液のみ (P B S 中 0.1% T r i t o n X - 100) 中の P S M A を捕獲するため、7 E 1 1 又は 1 0 7 抗体を用いて得られたスペクトルを示す。図6Bは、P S - 1 表面上と P S - 2 表面上との P S M A イソフォームの標準曲線の比較を示す。くさび形は、使用した L N C a P 全細胞溶解物 (6 n g / μ l、1 2 n g / μ l、2 5 n g / μ l から 5 0 n g / μ l まで) の相対量を表す。高い方の質量/電荷比での矢印は、1 0 0 k D の P S M A イソフォームを表し、一方、低い質量/電荷比での矢印は、8 9 k D の P S M A ' イソフォームを表す。

10

【0035】

図7A~Hは精液プラズマ中の P S M A 及び P S A を検出するための複合 (m u l t i p l e x) 免疫アッセイを示す。

【0036】

20

定義

特に定義しない限り、ここで使用した科学技術用語は、本発明の技術分野に属する当業者ならば普通に理解される意味を有する。以下の文献は、本発明で使用される多数の用語についての一般的な定義を当業者に与えるものである。S i n g l e t o n 等, D i c t i o n a r y o f M i c r o b i o l o g y a n d M o l e c u l a r B i o l o g y (第2編、1994年); T h e C a m b r i d g e D i c t i o n a r y o f S c i e n c e a n d T e c h n o l o g y (W a l k e r 編、1988年); T h e G l o s s a r y o f G e n e t i c s, 第5編、R. R i e g e r 等 (編), S p r i n g e r V e r l a g (1991年); 及び H a l e & M a r h a m, T h e H a r p e r C o l l i n s D i c t i o n a r y o f B i o l o g y (1991年)。ここで使用した以下の用語は、特に規定しない限り、これらの文献によるものである。

30

【0037】

“前立腺癌”とは、男性前立腺における細胞の制御不能(悪性)の成長を云う。前立腺は、ぼうこうの基部において尿道を囲み、排尿の制御を助けると共に、精液中の幾つかの成分を形成する責任がある。前立腺癌は通常、その攻撃性及び周囲の前立腺組織とは異なる程度を基準にして分類又は段階化 (s t a g e) される。腫瘍の病期分類 (s t a g e) には、W h i t m o r e - J e w e t t システム、T 分類、G l e a s o n スコア等の数種の異なる方法がある。例えば Z e g a r s 等 (1994年) “T h e T c l a s s i f i c a t i o n o f c l i n i c a l l y l o c a l i z e d p r o s t a t e c a n c e r . A n a p p r a i s a l b a s e d o n d i s e a s e o u t c o m e a f t e r r a d i a t i o n t h e r a p y”, C a n c e r 7 3 (7) : 1 9 0 4 - 1 9 1 2 参照。W h i t m o r e - J e w e t t システムに従って説明すると、前立腺癌は、A - B - C - D 病期システムを用いて病期分類される。この病期システムは、幾つかの下位病期分類を含むが、基本的には腫瘍を規模: (A) 触診できないが、顕微鏡生態組織検査で検出可能な腫瘍、(B) 前立腺に限定された触診可能な腫瘍、(C) 離れた転移はないが、前立腺を越えて広がった腫瘍、及び (D) 局部リンパ節まで広がった腫瘍を用いて分類される。前立腺癌は通常、精液小胞、ぼうこう、及び腹腔凹みに拡大することにより広がり、リンパ節、骨、肺、肝臓、及び腎臓に転移する。前立腺癌に対する治療の選択には一般に、放射線療法、外科手術、ホルモン療法、及び化

40

50

学療法がある。

【0038】

“良性前立腺増殖”又は“BPH”とは、前立腺の悪性ではない（癌性ではない）拡大をいう。前立腺肥大や、前立腺結節性過形成としても知られている。BPHでは、前立腺の正常エレメントは、大きさ及び数が増大する。癌の切り立った塊は、尿道を含み、ぼうこうからの尿の流れを邪魔する。これにより尿が残留し、瀕尿となる。ひどい場合は、完全な閉塞が起こる可能性がある。BPHの医学療法は、フィナステライド（finasteride）やテラゾシン（terazosin）のような薬剤を含む。BPHでの前立腺拡大は、前立腺中の主な男性ホルモンであるジヒドロテストステロン（DHT）に直接依存する。フィナステライド（PROSCAR（登録商標））は、DHTを作るのに必要な酵素を遮断して、血液及び組織のDHT水準を低下させると共に、前立腺の大きさ減少を助ける。テラゾシン（HYTRIN（登録商標））は、動脈、前立腺、及びぼうこう頸部の平滑筋を和らげるアルファ1遮断薬と呼ばれる投薬の部類に属する。ぼうこう頸部周囲の平滑筋を和らげると、BPHの拡大した前立腺による尿閉塞を軽減する働きがある。

10

【0039】

“血清”又は“血液血清”とは、凝固後に残る身体の液体（例えば血液から）の水部分を云う。例えば通常、プラズマから例えば凝血形成によりフィブリノゲン、プロトロンビン、及びその他の凝血因子を除去した後に残存する透明な淡黄色液体である。

【0040】

本発明で“マーカー”又は“バイオマーカー”とは、陰性診断又は検出不能の癌を持った人のような対照被験者（例えば正常又は健康な被験者）から取った比較用サンプルと比べて、前立腺癌又は良性前立腺増殖の患者から取ったサンプル中に示差的に存在する有機バイオ分子、例えばポリペプチド又は核酸（例えばmRNA等）を云う。例えばマーカーは、陰性診断の患者のサンプルに比べて、前立腺癌患者のサンプル中に高いか低い水準で存在するポリペプチド又は核酸（特定の明確な分子量を有する）であってよい。

20

【0041】

語句“示差的に存在する”とは、前立腺癌のない患者（例えば良性前立腺増殖又は陰性診断の患者）から取った比較用サンプルに比べて、前立腺癌の患者から取ったサンプル中に存在するマーカー、例えばポリペプチド又は核酸（例えば特定の明確な分子量のもの）の量及び/又は頻度についての相違を云う。例えばマーカーは、対照被験者からのサンプルに比べて、前立腺癌又はBPH患者からのサンプル中に高いか低い水準で存在するポリペプチド又は核酸（例えばmRNA等）であってよい。或いはマーカーは、対照被験者からのサンプルに比べて、前立腺癌又はBPH患者からのサンプル中に高い頻度又は低い頻度で検出されるポリペプチド又は核酸であってよい。マーカーは、量、頻度又はその両方に換算して示差的に存在してよい。

30

【0042】

2つのサンプル（例えば2セットのサンプル）の一方のサンプル中にバイオマーカー、例えばポリペプチド又は核酸の検出頻度が、他方のサンプル（又は他方のセットのサンプル）及び/又は対照サンプル中のポリペプチド又は核酸の検出頻度よりも充分、有意差がある（高いか低い）ならば、2つのサンプル間にマーカーが示差的に存在する。2セットのサンプルは、例えば学生のt-試験を用いて比較でき、 $P < 0.05$ では有意差ありとみなし得る。別の例では、一方のセットのサンプル中のポリペプチド又は核酸が、他方のセットのサンプルよりも少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約150%、少なくとも約180%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約500%、少なくとも約700%、少なくとも約900%、少なくとも約1000%、多い頻度又は少ない頻度で検出されれば、これら2セットのサンプル間にポリペプチド又は核酸が示差的に存在する。

40

【0043】

或いは又は更に、一方のサンプル中のポリペプチド又は核酸の量が、他方のサンプル中のポリペプチド又は核酸の量と充分、有意差があれば、これら2つのサンプル間にポリペ

50

チド又は核酸が示差的に存在する。例えば一方のサンプル中にポリペプチド又は核酸が、他方のサンプル中に存在するポリペプチド又は核酸よりも少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約150%、少なくとも約180%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約500%、少なくとも約700%、少なくとも約900%、少なくとも約1000%、多く存在するか、或いはポリペプチド又は核酸が一方のサンプル中に検出できるが、他方のサンプル中に検出できないならば、これら2つのサンプル間にポリペプチド又は核酸が示差的に存在する。前立腺癌のない被験者（例えば良性前立腺増殖患者）に比べて、前立腺癌の患者から取ったサンプル中に示差的に存在するいかなるポリペプチド又は核酸もマーカーとして使用できる。

【0044】

“診断”とは、病理学条件の存在又は性質を同定することを意味する。診断方法は、感度及び特異性が異なる。診断アッセイの“感度”は、陽性の試験を受ける疾病個人の百分率（“真陽性”の百分率）である。診断アッセイで検出されなかった疾病個人は、“偽陰性”である。疾病がなく、かつ診断アッセイで陰性の試験を受ける被験者は、“真陰性”と云う。診断アッセイの“特異性”は、1 - 偽陽性率である。ここで“偽陽性”率は、陽性の試験を受ける疾病のない被験者の割合と定義する。特定の診断方法は、条件の最終的な診断を与えないかも知れないが、診断の助けとなる明確な指示を与えるならば充分である。

【0045】

マーカーの“試験量”とは、試験するサンプル中に存在するマーカーの量を云う。試験量は、絶対量（例えば $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、相対量（例えば信号の相対強度）のいずれでもよい。

【0046】

マーカーの“診断量”とは、前立腺癌又は良性前立腺増殖の診断と一致する被験者サンプル中のマーカーの量である。診断量は、絶対量（例えば $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、相対量（例えば信号の相対強度）のいずれでもよい。

【0047】

マーカーの“対照量”は、マーカーの試験量に対して比較すべきいかなる量又は量範囲であってもよい。例えばマーカーの対照量は、前立腺癌患者、BPH患者或いは前立腺癌又はBPHのない者中のマーカー（例えばPSMA、PSMA'、又はPSMA mRNA等）の量であってよい。対照量は、絶対量（例えば $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、相対量（例えば信号の相対強度）のいずれでもよい。

【0048】

“プローブ”とは、ガス相イオン分光計に脱着可能に挿入できる装置であって、検出用のマーカーを提示（present）するための表面又は1つ以上の表面機構を有する基体を含む該装置を云う。プローブは、単一基体又は複数の基体を含むことができる。Protein Chip（登録商標）配列、バイオチップ、又はチップのような用語も特定種類のプローブと称して、ここで使用される。

【0049】

“基体”又は“プローブ基体”とは、（例えば付着（attachment）、又は堆積等により）相表面に吸着剤を付与できる固体相を云う。“表面機構”とは、基体表面に吸着剤を付与できる基体又はプローブ基体の特定の部分、区画（section）、又は領域（area）を云う。

【0050】

“吸着剤”とは、マーカーを吸着できるあらゆる材料を云う。用語“吸着剤”は、マーカーを曝す単一材料（“単独吸着剤”）（例えば1つの化合物又は官能基）と称し、またマーカーを曝す複数の異なる材料（“複合吸着剤”）と称して、ここで使用される。複合吸着剤での吸着材料は、“吸着剤種”と云う。例えばプローブ基体上の表面機構は、異なる結合特性を有する多数の異なる吸着剤種（例えばイオン交換材料、金属キレート化剤、抗体、又はcDNA等）を特徴とする複合吸着剤を含有してよい。基体材料自体もマーカーの吸着に寄与することができ、“吸着剤”の一部とみなしてよい。親和性吸着剤、ポリペ

10

20

30

40

50

プチド、酵素、前立腺マーカー基体、受容体、又は抗体（例えばモノクローナル抗体等）等のような“バイオ分子相互作用吸着剤”又は“バイオ特異的吸着剤”は通常、例えばアニオン性吸着剤、カチオン性吸着剤、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤、又は金属キレート化性吸着剤等を含む“クロマトグラフィー吸着剤”よりも、標的マーカーに対し高度の特異性を有する。

【0051】

“吸着”、“捕獲”、又は“保持（retention）”は、溶離剤（eluant）（選択率限界改質剤）又は洗浄溶液で洗浄する前又は後の吸着剤とマーカーとの検出可能な結合を云う。

【0052】

“溶離剤”又は“洗浄溶液”とは、マーカーの吸着剤への吸着を解消する（mediate）ために使用できる試剤を云う。溶離剤及び洗浄溶液は、“（選択率限界改質剤）”とも云う。溶離剤及び洗浄溶液は、プローブ基体表面から未結合の材料を洗浄、除去するために使用できる。

10

【0053】

“分離する”、“分離性（resolution）”、又は“マーカーの分離性”とは、サンプル中の少なくとも1つのマーカーの検出を云う。分離性は、分離及び引き続く示差検出によりサンプル中の複数のマーカーを検出することを含む。分離性は、混合物中の他の全てのマーカーから1つのマーカーを完全に分離することを必要としない。むしろ、少なくとも2つのマーカー間の識別が可能な分離ならばいかなる分離でも充分である。

20

【0054】

“ガス相イオン分光計”とは、サンプルを揮発させ、イオン化する時に形成されたイオンの質量対電荷比に翻訳可能なパラメーターを測定する装置を云う。一般に関連するイオンは、単一の電荷を持ち、質量対電荷比は、単に質量と云うことが多い。ガス相イオン分光計としては、例えば質量分析計、イオン易動度分光計、及び全イオン流測定装置が挙げられる。

【0055】

“質量分析計”とは、入口システム、イオン化源、イオン光学アッセンブリー、質量解析器、及び検出器を備えたガス相イオン分光計を云う。

【0056】

“レーザー脱着質量分析計”とは、アナライトを脱着し、揮発させ、イオン化する手段としてレーザーを用いる質量分析計を云う。

30

【0057】

“検出する”とは、検出すべき対象物の存在、不存在又は量を同定することを云う。

【0058】

用語“ポリペプチド”、“ペプチド”及び“蛋白質”は、アミノ酸残留物のポリマーと称して、ここでは交換可能に使用される。これらの用語は、天然産のポリマーに適用するばかりでなく、1つ以上のアミノ酸残留物が、相当する天然産のアミノ酸の類似体、誘導體又は模倣品（mimetic）であるアミノ酸ポリマーにも適用する。例えばポリペプチドは、例えば炭水化物残留物の付加により変性又は誘導して糖蛋白質を形成することができる。用語“ポリペプチド”、“ペプチド”及び“蛋白質”は、非糖蛋白質ばかりでなく、糖蛋白質も含む。

40

【0059】

“誘導體”とは、構造的に他の1つの物質に関連する化学物質、或いは例えば化学的又は酵素的変性により、他の1つの物質から作る（即ち、この物質から誘導する）ことができる化学物質を云う。

【0060】

用語“核酸”とは、DNA（例えばcDNA等）及びRNA（例えばmRNA等）を云う。これらは、それぞれデオキシリボ核酸及びリボヌクレオチド（又はそれらの誘導體）のポリマー又はオリゴマーである。2つの核酸配列は、同じ配列を持つか、或いは一方の核

50

酸配列が少なくとも他方の核酸配列に対し相補的な関係にあれば、“相当する (c o r r e s p o n d) ”。例えば P S M A をコード化する m R N A の R T - P C R により得られる c D N A は、この m R N A に相当する。

【 0 0 6 1 】

“前立腺マーカー c D N A ”とは、P S M A、P S M A'、P S A、前立腺酸ホスファターゼ (P A P)、前立腺特異的ペプチド 9 4 (P S P 9 4)、又は前立腺幹細胞抗原等の前立腺マーカーをコード化する m R N A に相当する c D N A を云う。本発明では前立腺マーカー c D N A は通常、選択されたサンプル源からガス相イオン分光測定 (例えば表面強化レーザー脱着 / イオン化) により、相当する m R N A を検出、定量するための吸着剤として使用する。前立腺マーカー c D N A は通常、R T - P C R 等を用いて生成させる。

10

【 0 0 6 2 】

“検出可能部分”又は“標識”とは、分光測定、光化学、生化学、免疫化学、又は化学手段により検出可能な組成を云う。例えば有用な標識としては、 ^{32}P 、 ^{35}S 、蛍光染料、高電子密度試薬、酵素 (例えば E L I S A に普通用いられているような酵素)、ピオチン - ストレプトアバジン (s t r e p t a v a d i n)、ジオキシゲニン (d i o x i g e n i n)、抗血清又はモノクローナル抗体が役立つハプテン及び蛋白質、又は標的に対し相補的配列を有する核酸分子が挙げられる。検出可能部分は、放射性、色原体、又は蛍光の信号のような測定可能又は検出可能な信号を発生することが多い。これらの信号は、サンプル中の結合した検出可能部分を定量するために使用される。検出可能部分は、共有結合により、或いはイオン結合、ファンデルワールス結合又は水素結合によりプライマー又はプローブに導入又は付着させることができる (例えば放射性ヌクレオチドの導入、又はストレプトアバジンにより認識されるピオチニル化ヌクレオチドの導入)。検出可能部分は、直接又は間接的に検出可能にしてよい。間接的検出は、検出可能部分への第二の直接又は間接的検出部分の結合を含む。例えば検出可能部分は、ストレプトアバジン用の結合パートナーであるピオチン、又は相補的配列用の結合パートナーであるヌクレオチド配列のような結合パートナーのリガンドであってよく、このような結合パートナーに特異的にハイブリダイズできる。結合パートナー自体、直接検出可能であってもよく、例えば抗体自体、蛍光分子で標識してよい。結合パートナーは、間接的に検出可能でもよく、例えば相補的配列を有する核酸は、分岐した D N A 分子の一部であってよく、他の標識した核酸分子とのハイブリダイズ化により同様に検出可能である。(例えば P . D . F a h r l a n d e r 及び A . K l a u s n e r , B i o / T e c h n o l o g y 6 : 1 1 6 5 (1 9 8 8 年) 参照。) 信号の定量は、例えばシンチレーションカウント、デンシトメトリー、又はフロー (f l o w) サイトメトリーにより実施される。

20

30

【 0 0 6 3 】

“抗体”とは、エピトープ (例えば抗原) に特異的に結合し、認識する 1 つ又は複数の免疫グロブリン遺伝子、或いはそれらの断片により実質的にコード化されたポリペプチドリガンドを云う。認識された免疫グロブリン遺伝子としては、カッパ及びラムダ軽鎖一定 (c o n s t a n t) 領域遺伝子 ; アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン及びミュー重鎖一定領域遺伝子 ; 及び無数の免疫グロブリン可変 (v a r i a b l e) 領域遺伝子が挙げられる。抗体は、例えば完全な免疫グロブリンとして存在するか、或いは各種ペプチダーゼの消化により得られる多数の適切に特徴化された断片として存在する。断片としては、例えば F a b' 及び F (a b)' ₂ 断片がある。ここで使用した用語“抗体”は、全抗体の変性により得られる抗体断片、又は組換え型 D N A 方法論を用いて新生合成した抗体断片も含む。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、人間化した抗体、又は単鎖抗体も含む。抗体の“F c”部分とは、1 つ以上の重鎖一定領域ドメイン、C H 1、C H 2 及び C H 3 を含むが、重鎖可変領域を含まない免疫グロブリン重鎖の部分を含む。

40

【 0 0 6 4 】

“免疫アッセイ”は、特異的に抗原に結合させるために抗体を用いるアッセイである。免疫アッセイの特徴は、抗原を単離し、標的とし、及び / 又は定量するため、特定抗体の特

50

異的結合特性を使用することである。

【0065】

蛋白質又はペプチドに言及する際、抗体に語句“特異的に（又は選択的に）結合する”又は“特異的に（又は選択的に）免疫反応する”とは、蛋白質及び他の生化学的薬剤（biological）の不均質なグループにおいて、蛋白質の存在に決定力がある結合反応を云う。したがって、指定された免疫アッセイ条件下では、特異抗体は、バックグラウンドの少なくとも約2倍、特定の蛋白質に結合し、サンプル中に存在する他の蛋白質には実質的に有意な量で結合しない。このような条件下での抗体への特異的結合には、特定の蛋白質に対する特異性のために選択された抗体が必要である。ラット、マウス、又はヒトのような特異種から、例えばPSMA、又はPSMA'等に対し提起されたポリクローナル抗体は、例えばPSMA、又はPSMA'等と特異的に免疫反応するが、精液塩基性蛋白質の多形変種及び対立遺伝子を除く、他の蛋白質とは特異的に免疫反応しないポリクローナル抗体だけを得るように選択できる。この選択は、他の種から、例えばPSMA、又はPSMA'等と相互（cross）反応する抗体を控除することにより実施できる。特定の蛋白質と特異的に免疫反応する抗体を選択するため、各種の免疫アッセイフォーマットが使用できる。例えば蛋白質と特異的に免疫反応する抗体を選択するため、固体相ELISA免疫アッセイが日常的に使用される（特異的免疫反応性の測定に使用できる免疫アッセイフォーマット及び条件の説明については、例えばHarlow & Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (1998年)参照）。通常、特異的又は選択的反応は、バックグラウンド信号又はノイズの少なくとも2倍、更には約10～約100倍を越える。

10

20

【0066】

“エネルギー吸収性分子”又は“EAM”とは、質量分析計のイオン化源からエネルギーを吸収し、これによりプローブ表面からマーカータのようなアナライトの吸着を助ける分子を云う。アナライトの大きさ及び性質に従って、エネルギー吸収性分子は、任意に使用できる。MALDI（母材援助レーザー脱着/イオン化）で使用されるエネルギー吸収性分子は、“母材”と云うことが多い。桂皮酸誘導体、シナピン酸（“SPA”）、シアノヒドロキシ桂皮酸（“CHCA”）及びジヒドロキシ安息香酸は、生物有機化学分子のレーザー脱着におけるエネルギー吸収性分子として使用することが多い。

30

【0067】

発明の詳細な説明

I. 序論

過去20年に亘る蛋白質化学の大きな技術的進歩は、蛋白質の研究に不可欠な手段として質量分析法を確立した（Carr等, (1991年) “Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology”, Anal. Chem. 63 (24): 2802-2824; Carr, “Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry”, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, unit 10.21, pp. 10.21.1-10.21, 27 (1998年); Patterson, “Protein Identification and Characterization by Mass Spectrometry”, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, unit 10.22, pp. 10.22.1-10.22, 24 (1998年); 及び Siuzdak, Mass Spectrometry for Biotechnology, Academic Press, San Diego (1996年)）。更に、質量分析法は、核酸の分析を容易にする（Krahnmer等, (2000年) “MS for identification of single nucleotide polymorphisms and MS/MS for discrimination”

40

50

n of isomeric PCR products", Anal. Chem. 72 (17): 4033 - 4040 及び Koomen 等, (2000年) "Improvement of resolution, mass accuracy, and reproducibility in reflected mode DE-MALDI-TOF analysis of DNA using fast evaporation-overlayer sample preparations", Anal. Chem. 72 (16): 3860 - 3866)。クロマトグラフィーや電気泳動による分離での分離力 (resolving power) は、分析的に有用であるが、質量分析法の高い感度、速度、及び再現性は、発見、同定 (例えばペプチド遺伝地図作成、配列分析等)、定量及び構造的特徴化等、蛋白質及び核酸の分析におけるあらゆる面で利用を増大させている。 10

【0068】

遺伝子発現プロファイルの研究を可能にするオリゴヌクレオチドチップ技術と同様に、蛋白質を質量分析法により分析用プローブの表面機構上に捕獲する蛋白質バイオチップ技術が発展して来た。このような技術は、複雑な生物学的混合物の蛋白質及び核酸の両プロファイルを容易にするため、表面強化レーザー脱着/イオン化飛行時間質量分析法を利用する。この技術、即ち親和性質量分析法の説明 (version) では、基体に結合した親和性試薬は、クロマトグラフィー試薬でもバイオ特異的試薬であってもサンプルからアナライトを捕獲する。次に、捕獲されたアナライトは、基体から脱着及び/又はイオン化され、質量分析法により検出される。(例えば Hutchens 及び Yip (1993年) "New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules", Rapid Commun. Mass Spectrom. 7: 576 - 580, Kuwata 等, (1998年) "Bactericidal domain of lactoferrin detection, quantitation, and characterization of lactoferricin in serum by SELDI Affinity Mass Spectrometry", Bioch. Bioph. Res. Comm. 245: 761 - 773, Hutchens 及び Yip の USP 5, 719, 060、及び WO 98/59360 (Hutchens 及び Yip) 参照。) この革新的な技術は、2D-PAGE のような他の技術に比べて多くの利点を有する。例えば高速であり、高スループットを有し、低いオーダーのサンプル量で済み、アナライトをピコモル~アトモルの範囲で検出する感度を有し、約 2 kDA ~ 約 20 kDA の範囲の質量を有する蛋白質、核酸及び他の成分を効果的に分離でき、また臨床アッセイの発展に直接利用できる。 20 30

【0069】

本発明者及び協力者は、特に、血清、血清プラズマ及び細胞抽出物中の前立腺癌蛋白質マーカーを発見し、定量するための表面強化レーザー脱着/イオン化技術及び親和性質量分析法についての効果を示すと共に、既知の前立腺癌マーカーを検出するための免疫アッセイを発展させた (Wright 等, (1999年) "ProteinChip^(R) - surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: A novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures", Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2: 264 - 276; Xiao 等, (2000年) "Generation of a baculovirus recombinant prostate-specific membrane antigen and its use in the development of a novel protein biochip quantitative immunoassay", Protein Expr. Purif., 19 (1): 12 - 21; 及び Pawele 40 50

tz等,(2000年)“Rapid protein display profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip”, Drug Development Research, 49:34-42)。本発明は、血清サンプル、その他の種類のサンプル中の、PSMA、PSMA'、及びその他の前立腺マーカーの検出及び定量、並びに前立腺癌又は良性前立腺増殖の診断のためのこれらバイオマーカーを評価する方法について説明する。また本発明は、細胞溶解物及びその他の供給源中の前立腺マーカーをコード化する核酸(例えばmRNA等)の検出及び定量を含む診断方法も提供する。これら蛋白質系及び核酸系マーカーの複合した検出/定量の他、本発明はバイオチップ、キット及び総合システムも包含する。

10

【0070】

II. マーカーの特徴化

本発明は、前立腺バイオマーカーであるPSMA及びPSMA'の検出/定量に関する。これら前立腺マーカーの2つの一般的な部類は、(1)蛋白質系マーカー、及び(2)核酸系マーカーである。更に本発明は、PSMA又はPSMA'の他、その他のバイオマーカーを検出及び/又は定量する複合アッセイを提供する。これら他の蛋白質系マーカーとしては、例えばPSA、前立腺酸ホスファターゼ(PAP)、前立腺特異的ペプチド94(PSP94)、又は前立腺幹細胞抗原(PSCA)等が挙げられる。核酸系マーカーは通常、蛋白質系マーカーをコード化するmRNAのような核酸配列を有する。アミノ酸配列、及びこれらマーカー及び他の関心のあるマーカーに関連するマーカーをコード化するmRNA配列は、GenBank(登録商標)及びEntrez(登録商標)Proteinデータベース等の各種公共のデータベースから容易に確認できる。以下、関心のあるバイオマーカーについて説明する。

20

【0071】

A. 蛋白質系マーカー

PSMAは最初、モノクローナル抗体7E11.C5を用いて同定され(Horoszewicz等,(1987年)“Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial cells and serum of prostatic cancer patients”, Anticancer Res. 7:927-936)、Westernブロット法により細胞溶解物及び精液プラズマ中に100kDaとして検出された(Feng等,(1991年)“Purification and biochemical characterization of the 7E11-C5 prostate carcinoma-associated antigen”, Proc. AACR 32(abs.1418):239; Troyer等,(1993年)“Molecular characterization of the 7E11-C5 prostate tumor-associated antigen”, J. Urol. 147(abs.482):333A;及びTroyer等,(1995年)“Biochemical characterization and mapping of the 7E11-C5.3 epitope of the prostate-specific membrane antigen”, Urologic Oncology 1:29-37)。PSMAは、750-アミノ酸である、約80~85kDaの非グリコシル化分子量を有するタイプII膜貫通糖蛋白質として同定された(Israeli等(1993年)“Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen”, Cancer Res. 53:227-230及びIsraeli等のUSP 5,538,866“PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN”)。更に、PSMAをコード化する遺伝子は、染色体11にマップされた(Rinker-Schaeffer等,(1995年)“Localization and mapping of the prostate speci

30

40

50

f i c m e m b r a n e a n t i g e n (P S M) g e n e t o h u m a n c h r o m o s o m e 1 1 ” , G e n o m i c s 3 0 : 1 0 5) 。 P S M A は、グ ル タ メ ー ト 優 先 ニ ュ ー ロ カ ル ボ キ シ ペ プ チ ダ ー ゼ / 新 規 葉 酸 ヒ ド ロ ラ ー ゼ で も あ る (P i n t o 等 , (1 9 9 6 年) “ P r o s t a t e - s p e c i f i c a n t i g e n : a n o v e l f o l a t e h y d r o l a s e i n h u m a n p r o s t a t i c c a r c i n o m a c e l l s ” , C l i n . C a n c e r R e s . 2 : 1 1 4 4 5 - 1 1 4 5 1) 。

【 0 0 7 2 】

P S M A の 発 現 は、進 行 及 び ホ ル モ ン - 難 治 性 前 立 腺 癌 と 関 連 し て 増 加 す る (I s r a e l i 等 , (1 9 9 4 年) “ E x p r e s s i o n o f t h e p r o s t a t e - s p e c i f i c m e m b r a n e a n t i g e n ” , C a n c e r R e s . 5 4 : 1 8 0 7 - 1 8 1 1) 。 前 立 腺 組 織 中 で の 高 度 の P S M A 発 現 は、脳、唾 液 腺、小 腸 で の 弱 い 発 現 と 共 に、免 疫 組 織 化 学、W e s t e r n ブ ロ ッ ト 法 及 び R T - P C R 分 析 を 用 い て 検 出 さ れ た (W r i g h t 等 (1 9 9 5 年) “ E x p r e s s i o n o f p r o s t a t e - s p e c i f i c m e m b r a n e a n t i g e n i n n o r m a l , b e n i g n a n d m a l i g n a n t p r o s t a t e t i s s u e s ” , U r o l o g i c O n c o l o g y 1 : 1 8 - 2 8 及 び 上 記 の I s r a e l i 等 , (1 9 9 4 年) C a n c e r R e s . 5 4 : 1 8 0 7 - 1 8 1 1) 。 他 の 幾 つ か の 組 織 は、こ の P S M A m R N A を 発 現 す る が、こ の 蛋 白 質 を 発 現 し な い。P S M A は、ヒ ト の 各 種 癌 の 新 生 脈 管 構 造 上 で も 発 現 す る (L i u 等 , (1 9 9 7 年) “ M o n o c l o n a l a n t i b o d i e s t o t h e e x t r a c e l l u l a r d o m a i n o f p r o s t a t e - s p e c i f i c m e m b r a n e a n t i g e n a l s o r e a c t w i t h t u m o r v a s c u l a r e n d o t h e l i u m ” , C a n c e r R e s . 5 7 : 3 6 2 9 - 3 6 3 4) 。

【 0 0 7 3 】

P S M A ' は、N - 末 端 配 列 (即 ち、膜 張 り 領 域) を 欠 く P S M A の 切 形 種 で あ る。S u 等 (1 9 9 5 年) “ A l t e r n a t i v e l y s p l i c e d v a r i a n t s o r p r o s t a t e - s p e c i f i c m e m b r a n e a n t i g e n R N A : r a t i o o f e x p r e s s i o n a s a p o t e n t i a l m e a s u r e m e n t o r p r o g r e s s i o n ” , C a n c e r R e s . 5 5 : 1 4 4 1 - 1 4 4 3 参 照。P S M A ' 中 の ア ミ ノ 酸 の 配 列 は、P S M A 中 の ア ミ ノ 酸 5 7 - 7 5 0 を 含 み、し た が っ て 細 胞 質 ゾ ル で あ り、7 E 1 1 - C 5 抗 体 で 検 出 さ れ な い。全 長 の P S M A は、R N a z e 保 護 ア ッ セ イ を 用 い て 腫 瘍 か ら 抽 出 し た R N A 中 の 切 形 P S M A ' よ り も 1 0 倍 多 く 発 現 し、B P H 組 織 か ら 抽 出 し た R N A 中 の 両 形 態 と ほ ぼ 同 等 の 発 現、及 び 正 常 な 前 立 腺 組 織 か ら 抽 出 し た R N A 中 の P S M A ' と 同 程 度 の P S M A の 1 / 1 0 倍 発 現 す る こ と が 判 っ た (上 記 の S u 等 (1 9 9 5 年) C a n c e r R e s . 5 5 : 1 4 4 1 - 1 4 4 3 参 照) 。 2 つ の 蛋 白 質 は、L N C a P 細 胞 溶 解 物 及 び 血 清 中 に 見 い 出 さ れ た。一 方 の 蛋 白 質 は、全 長 1 0 0 k D A P S M A で あ り、他 方 の 小 さ い 方 の 8 9 k D a 蛋 白 質 は、P S M A ' で あ る と 思 わ れ る。

【 0 0 7 4 】

P S M A、P S M A ' 及 び そ の 他 の 前 立 腺 マ ー カ ー の 臨 床 有 用 性 を 診 断 又 は 予 後 の バ イ オ マ ー カ ー と し て 決 め る 努 力 は、こ れ ら マ ー カ ー を 体 液 中 で 定 量 す る た め の 免 疫 ア ッ セ イ 感 度 が 欠 け る こ と に よ り、阻 止 さ れ て き た。本 発 明 は、新 規 の P r o t e i n C h i p (登 録 商 標) 表 面 強 化 レ ー ザ ー 脱 着 / イ オ ン 化 (S E L D I) 質 量 分 析 シ ス テ ム (C i p h e r g e n B i o s y s t e m , I n c . , C A) を 用 い て P S M A 及 び そ の 他 の マ ー カ ー を 定 量 す る 免 疫 ア ッ セ イ を 包 含 す る。一 実 施 態 様 で は、説 明 の た め、ネ ズ ミ 科 の 抗 P S M A モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 7 E 1 1 - C 5 を 蛋 白 質 G 塗 布 P r o t e i n C h i p (登 録 商 標) 配 列 上 に 固 定 化 し、例 え ば E L I S A、そ の 他 の 免 疫 ア ッ セ イ フ ォ ー マ ッ ト 用 に 通 常 使 用 さ れ て い る よ う な 第 二 の P S M A 抗 体 又 は 標 識 を 使 用 す る こ と な く、表 面 強 化 レ ー ザ ー 脱 着 / イ オ ン 化 (S E L D I) 質 量 分 析 法 を 用 い て、サ ッ プ ル 中 の 1 0 0 k D a P S

MAを直接、同定し、定量する。本発明は、例えば血清中のPSMA定量に成功する技術を提供する。

【0075】

PSMA及びPSMA'の他、本発明は、その他の前立腺バイオマーカーの複合アッセイも提供する。これらは、以下のマーカーを含むが、限定されるものではない。

【0076】

前立腺特異抗原は、ここに記載した診断アッセイに従って任意に定量される別の前立腺マーカーの一例である。これは、前立腺癌用に充分、特徴化したマーカーである。PSAは、生化学的には、前立腺の上皮細胞により分泌される33-kDaセリンプロテアーゼである。PSAに関する他の詳細は、種々の刊行物、例えばCarducci等、(1999年) "Prostate-specific antigen and other markers of therapeutic response", *Urol. Clin. North Am.* 26(2): 291-302; Henkel, (1998年) "Prostate cancer", *FDA Consum.* 32(5): 22-27; Henry及びO'Mahony (1999年) "Treatment of prostate cancer", *J. Clin. Pharm. Ther.* 24(2): 93-102; 及びChu (1997年) "Prostate-specific antigen and early detection of prostate cancer", *Tumour Biol.* 18(2): 123-134等に記載される。

【0077】

前立腺酸ホスファターゼは、ここに記載した方法に従って任意に検出、定量される別の前立腺マーカーである。男性ホルモンは、ヒトのPAP及びPSAの両方の発現を調節する。これらは両方とも主な前立腺上皮-特異的識別抗原である。PAPに関する詳細な論文としては、例えばAhmann及びSchifman (1987年) "Prospective comparison between serum monoclonal prostate specific antigen and acid phosphatase measurements in metastatic prostatic cancer", *J. Urol.* 137: 431-434; Ercole等、(1987年) "Prostate specific antigen and prostatic acid phosphatase in the monitoring and staging of patients with prostatic cancer", *J. Urol.* 138: 1181-1184; Gittes (1991年) "Carcinoma of the prostate", *N. Eng. J. Med.* 324: 236-245; Hetherington等 (1988年) "Contribution of bone scintigraphy, prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen to the monitoring of prostatic cancer", *Eur. Urol.* 14: 1-5; 及びMeyers及びGrizzle (1997年) "Changes in biomarker expression in the development of prostatic adenocarcinoma", *Biotech Histochem.* 72(2) 86-95がある。

【0078】

94アミノ酸の前立腺分泌蛋白質も、例えば本発明の複合実施態様での前立腺マーカーとして任意に利用される。ベータ-ミクロセミノ蛋白質とも云われるPSP94は、ヒト前立腺により分泌される主な蛋白質の一つである。これは、ヒトの精液プラズマから主な蛋白質として、最初に単離された、システイン残留物に富む小さい非グリコシル化蛋白質である。続いて、その同族蛋白質が同定され、またそれらのcDNA又は遺伝子が霊長動物、ブタ、及びげっし動物中でクローン化された。PSP94についての更なる情報は、例えばKwong等 (2000年) "PSP94 (or beta-microseminoprotein) is a secretory protein specific

ally expressed and synthesized in the lateral lobe of the rat prostate)”, Prostate 42(3):219-29及びChan(1999年)“In situ hybridization study of PSP94(prostatic secretory protein of 94 amino acids) expression in human prostates”, Prostate 41(2):99-109に見られる。

【0079】

前立腺幹細胞抗原は、ガス相イオン分光測定によりサンプル中に任意に検出/定量される他のマーカー例である。PSCAは、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI) 10
定着細胞表面抗原のThy-1/Ly-6ファミリーの同族体である。この抗原をコード化する遺伝子は、染色体領域8q24.2にマップする。PSCA mRNAは、正常な前立腺及び80%を越える前立腺癌中に発現する。PSCAについての他の詳細は、例えばDannull等、(2000年)“Prostate stem cell antigen is a promising candidate for immunotherapy of advanced prostate cancer”, Cancer Res. 60(19):5522-5528; Gu等、(2000年)“Prostate stem cell antigen(PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate 20
cancer”, Oncogene 9(10):1288-1296; 及びReiter等、(2000年)“Coamplification of prostate stem cell antigen(PSCA) and MYC in locally advanced prostate cancer”, Genes Chromosomes Cancer 27(1):95-103に記載される。

【0080】

本質的にいかなるマーカーも、ここに記載した方法に従って任意に検出、定量される。特に上記の他、その他、多数の前立腺マーカーも知られている。これらマーカーの他の特性を以下の例示項で説明する。

【0081】

B. 核酸系マーカー

前立腺癌の実質的にいかなる核酸マーカーもここに記載した分析に好適である。従って、既知の全ての核酸を同定する計画は行っていない。関心のある特定の好ましい核酸マーカーとしては、例えばPSMA、PSMA'、PAP、PSP94、又はPSCA等をコード化するmRNA類がある。これらのmRNAに相当する核酸、又はこれらのmRNAを確認できる核酸は、GenBankのような公共のデータベースから得ることができる。PSMA及びPSMA'をコード化するRNA類は、例えば上記のSu等、(1995) Cancer Res. 55:1441-1443に記載される。その他のmRNAについての更なる情報は、各種取り揃えた有用な刊行物、例えばZelivianski等、 40
(1998年)“Cloning and analysis of the promoter activity of the human prostate acid phosphatase gene”, Biochem. Biophys. Res. Commun. 245(1):108-12; Magklara等、(2000年)“Expression of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in the thyroid gland”, Clin. Chim. Acta 300(1-2):171-80; Xuan等、(1995年)“Alternative splicing of PSP94(prostatic secretory protein of 94 amino acids)mRNA in prostate tissue”, Oncogene 11(6):1041-1047; 及びReiter等、(1998年 50

) "Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95(4): 1735-40がある。

【0082】

特定の実施態様では、PSMA又はPSMA' mRNAは、例えば細胞溶解物由来のサンプル中で個々に定量される。他の実施態様では、サンプル中のこれらmRNA及び/又はその他のmRNAの選択された組合せは、この選択されたmRNAの組合せに相当するように選択されたcDNAを用いて、複合化フォーマット中で同時に検出、定量できる。

【0083】

III. マーカーの検出及び定量

本発明は、ガス相イオン分光測定、特にレーザー脱着/イオン化質量分析法によるPSMA及びPSMA'の検出及び/又は定量方法を提供する。この方法は、PSMA/PSMA'の存在について試験するサンプルを分画して、サンプルから他の成分を少なくとも部分的に除去する工程、及びこの分画したPSMA/PSMA'をガス相イオン分光測定により分析する工程を含む。LDI-MSは、慣用のMALDIであってよいし、或いはアナライトをエネルギー源に提示する際、プローブのサンプル提示表面が積極的に関与する(actively involve)プローブを使用して表面強化できる。

【0084】

一実施態様では、LDI(レーザー脱着/イオン化)-MS(質量分析)法は、サンプルからアナライトを捕獲し、次いで固体相からアナライトを検出/イオン化する、固体相に結合した吸着剤を使用することにより表面強化される。この方法の一実施態様では、固体相結合吸着剤は、特異的にPSMA/PSMA'に結合する抗体である。他の実施態様では、固体相結合吸着剤は、免疫グロブリン、例えばFc部分に特異的に結合する蛋白質Gのような蛋白質である。この実施態様では、サンプルは、特異的にPSMA'/PSMA'に結合する抗体と接触させる。次いで固体相結合吸着剤を使用して、この抗原に結合した抗体によりサンプルからPSMA/PSMA'を捕獲する。複合アッセイでは、サンプルは、捕獲を望む全てのバイオマーカーに特異的に結合する抗体と接触させることができる。一実施態様では、固体相結合吸着剤は、ガス相イオン分光計への挿入に適合したバイオチップの形で供給される。このようなチップは、表面機構付き表面を有する金属のような基体を備える。各機構は吸着剤を有する。この実施態様では、サンプルは、所望のサンプル成分を捕獲するため、表面機構に塗布し、結合していない成分は洗浄する。次いでバイオチップは、ガス相イオン分光計中に挿入し、アナライトは、エネルギー源により脱着/イオン化され、検出される。

【0085】

マーカーは、多数の生物学的サンプル中で検出できる。サンプルは、好ましくは生物学的液体サンプルである。本発明に有用な生物学的液体サンプルは、体液、細胞溶解物、精液、精液プラズマ、前立腺液、唾液、血液、リンパ液、肺/気管支洗浄物、粘液、糞、乳首分泌物、つば、涙、又は尿等である。血清は、本発明の特定の実施態様に好ましいサンプル源である。細胞溶解物は、一次組織又は細胞、培養組織又は細胞、正常組織又は細胞、病的組織又は細胞、良性組織又は細胞、癌組織又は細胞、唾液腺組織又は細胞、腸組織又は細胞、神経組織又は細胞、腎臓組織又は細胞、リンパ組織又は細胞、ぼうこう組織又は細胞、尿生殖組織又は細胞、腫瘍組織又は細胞、又は腫瘍新生脈管構造組織又は細胞等から任意に誘導される。生物学的サンプルは、静脈穿刺、又は生体組織検査のようなあらゆる公知技術に従って任意に採集される。組織又は細胞の培養方法は、各種刊行物、例えばAusubel等編, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Inc. とJohn Wiley & Sons, Inc., New York(1999年補足)との合弁; Freshney, Culture of animal cells, a Manual of Basic Techniques, 第3編, Wiley-L

10

20

30

40

50

iss, New York (1994年); 及び Humason, Animal Tissue Techniques, 第4編, W. H. Freeman and Company, New York (1979年), 及びそこで引用された文献等に記載される。

【0086】

ここに記載したマーカーの1つ以上を検出し、定量するため、いかなる好適な方法も使用できる。例えばガス相イオン分光測定が使用できる。この技術は、例えばレーザー脱着/イオン化質量分析法を含む。幾つかの実施態様では、サンプルは、マーカーの検出を助けるため、ガス相イオン分光測定、例えば予備分画、二次元ゲルクロマトグラフィー、又は高性能液体クロマトグラフィー等を行う前に調製できる。マーカーの検出は、ガス相イオン分光測定以外の方法を用いて実施できる。サンプル中のマーカーを検出するため、例えば慣用の免疫アッセイ(例えばELISA、Westernプロット法等)が使用できる。これらの検出方法を以下に詳細に説明する。

10

【0087】

A. ガス相イオン分光測定

好ましい実施態様では、サンプル中に存在するマーカーは、ガス相イオン分光測定を用いて、更に好ましくは質量分析法を用いて検出する。一実施態様では、母材援助レーザー脱着/イオン化("MALDI")質量分析法が使用できる。MALDIでは、サンプルは通常、例えば二次元ゲルクロマトグラフィー又は高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)のような蛋白質分離方法を用いて本質的に1つ又は複数のマーカーからなる分画を得るため、準精製する。MALDIについての他の詳細は、例えば Skoog 等, Principles of Instrumental Analysis, 第5編, Harcourt Brace & Co. Philadelphia (1998年) 及び上記の Siuzdak, Mass Spectroscopy for Biotechnology に記載される。

20

【0088】

他の実施態様では、表面強化レーザー脱着/イオン化質量分析法("SELDI")が使用できる。表面強化レーザー脱着/イオン化には、マーカーを捕獲するため吸着剤含有基体を使用する。質量分析中、マーカーは直接、基体表面から脱着、イオン化される。表面強化レーザー脱着/イオン化では基体表面がマーカーを捕獲するので、サンプルは、MALDIの場合のように準精製する必要はない。しかし、サンプルの複雑性及び使用する吸着剤の種類によっては、表面強化レーザー脱着/イオン化分析の前に、その複雑性を低減するようにサンプルを調製することが望ましいことがある。

30

【0089】

図1は、表面強化レーザー脱着/イオン化TOF-MS総合システム100の概略図である。図示のように、レーザー光源102で生成した光子エネルギーは、表面機構106の所でバイオチップ104に衝突する。表面機構は、捕獲したマーカーを有する選択された吸着剤を含む。光子エネルギーは、表面機構106で捕獲したマーカーを脱着し、イオン化する。次いで脱着されたイオンは、飛行管/質量分析計108を通過して加速される。図示のように、複数のイオンは、質量/電荷比(各イオンは荷電しているだけなので、単にイオン種の中の質量だけである)に従って分離される。更に図示するように、小さいイオンは、大きいイオンよりも速く移行し、これにより質量に従ってこのイオン種を分離する。イオンは、検出器110の所で検出可能な信号を生成し、この信号は、データ分析ワークステーション112によって処理され、質量スペクトル114を発生する。以下、総合システムについて更に説明する。

40

【0090】

図2は、バイオチップ202上に、200で示した固定化蛋白質Gを有するPSMA表面強化レーザー脱着/イオン化免疫アッセイを概略的に示す。更に図示するように、捕獲されたPSMA204は、固定化蛋白質G200に結合した抗体吸着剤206により保持されている。レーザー208からの入射光子エネルギーは、吸着剤及びPSMAを脱着、イオン化し、PSMAは、TOF質量分析計で検出され、質量スペクトル210を生成する

50

。図3も、表面強化レーザー脱着/イオン化TOF-MS技術の特定面についての概略説明図である。図示のように、サンプル300は、表面機構306に結合した吸着剤304を有するバイオチップ302に塗布される。吸着剤304によって吸着されないサンプル300の成分は、質量分析の前に、バイオチップ302から任意に洗浄除去(例えば溶離等)する。他の実施態様では、サンプル300は、洗浄することなく、直接、分析する。サンプル300中のマーカー308の捕獲(例えば親和性捕獲等)に続いて、バイオチップ302にエネルギー吸収性分子310を添加して、イオン化源312(即ち、レーザー)からのエネルギーを吸収させ、こうしてバイオチップ302の表面からのマーカー308の脱着を助ける。質量スペクトル314は、脱着/イオン化したマーカー308の質量スペクトル分析により得られる。

10

【0091】

サンプル中のマーカーの検出を助ける各種のサンプル調製方法及びガス相イオン分光測定方法を以下に詳細に説明する。

【0092】

1. ガス相イオン分光測定前のサンプル調製

サンプル中のマーカーの検出及び特徴化を更に助けるため、サンプルの調製には、以下に記載の方法又は当業界に公知の他の方法の1つ又は組合せが任意に使用できる。幾つかの実施態様では、サンプルは、ガス相イオン分光測定分析の前に、複雑なサンプルを簡素化するため、予備分画できる。例えば血清サンプルは、サンプル中の蛋白質の複雑性を低下させるため、蛋白質の大きさに従って予備分画できる。更に、予備分画プロトコールは、マーカーの物理的及び化学的特性に関する別の情報を付与できる。例えばサンプルがアニオン交換スピンカラムを用いて予備分画されたものであり、またマーカーが特定のpHで溶離されれば、この溶離特性により、マーカーの結合特性に関する情報が得られる。別の例では、サンプル中に多量に存在するか又はサンプル中のマーカーの検出を妨害する可能性がある蛋白質、その他の分子を除去することにより予備処理できる。他の好適なサンプル調製プロトコールは、当業者ならば明白であろうし、また本発明の実施態様に従って適用できよう。

20

【0093】

a) 大きさ排除(size exclusion)クロマトグラフィー

一実施態様では、サンプルは、大きさ排除クロマトグラフィーを用いてサンプル中の例えば蛋白質の大きさに従って予備分画できる。使用可能なサンプル量が少ないサンプルでは、大きさ選択スピンカラムを用いることが好ましい。例えばK-30スピンカラム(CiphaGen Biosystems, Inc.)が使用できる。一般に、カラムから溶離される最初のフラクション("フラクション1"と呼ばれる)は、最高%割合の高分子量蛋白質を有し、フラクション2は、%割合の低い高分子量蛋白質を有し、フラクション3は更に%割合の低い高分子量蛋白質を有し、フラクション4は最低量の大きい蛋白質を有する等である。次に各フラクションは、マーカー検出のため、ガス相イオン分光測定により分析できる。

30

【0094】

b) ゲル電気泳動によるバイオ分子の分離

別の実施態様では、サンプル中のバイオ分子(例えば蛋白質、核酸等)は、高分離性電気泳動、例えば一次又は二次元ゲル電気泳動、又はNorthernプロット法等により分離できる。マーカー含有フラクションは、単離して、ガス相イオン分光測定により更に分析できる。1つ以上のマーカーを含むバイオ分子スポットの二次元配列を生成させるため、二次元ゲル電気泳動を用いることが好ましい。例えばJungblut及びThiede, Mass Spectr. Rev. 16:145-162(1997年)参照。

40

【0095】

二次元ゲル電気泳動は、当業界に公知の方法を用いて実施できる。例えばDeutscher編, Methods In Enzymology第182巻参照。通常、サンプル中のバイオ分子は、例えば等電集束(focusing)により分離される。集束中、サ

50

ンプル中のバイオ分子は、該分子の正味電荷がゼロ（即ち、等電点）のスポットに達するまでpH勾配に従って分離される。この第一分離工程により、バイオ分子の一次元配列が得られる。この一次元配列のバイオ分子は、第一分離工程で用いた技術とは一般に異なる技術を用いて更に分離される。等電集束で分離されたバイオ分子は、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS-PAGE）の存在下にポリアクリルアミドゲル電気泳動のようなポリアクリルアミドゲルを用いて二次元で更に分離される。SDS-PAGEゲルは、バイオ分子の分子質量により更に分離される。通常、二次元ゲル電気泳動は、複雑な混合物内の分子質量範囲1000~200,000Daの化学的に異なるバイオ分子を分離できる。

【0096】

二次元配列のバイオ分子は、当業界で公知の好適ないかなる方法を用いても検出できる。例えばゲル中のバイオ分子は、標識又は着色（例えばCoomassie blue又は銀着色）できる。ゲル電気泳動が本発明における1つ以上のマーカの分子量（例えば100kDa PSMA）に相当するスポットを発生すれば、このスポットは、更にガス相イオン分光測定により分析できる。例えばスポットは、ゲルから切り取ってガス相イオン分光測定により分析できる。或いはバイオ分子含有ゲルは電場を印加することにより不活性膜に移行できる。マーカの分子量にほぼ相当する膜上のスポットは、ガス相イオン分光測定により分析できる。ガス相イオン分光測定では、これらのスポットは、以下に詳細に説明するMALDI又は表面強化レーザー脱着/イオン化のような好適ないかなる技術（例えばProteinChip（登録商標）配列）を用いても分析できる。

【0097】

ガス相イオン分光測定分析の前に、スポット中のバイオ分子をプロテアーゼ（例えばトリプシン）又はヌクレアーゼのような切断試薬を用いて小さな断片に切断することが望ましい。バイオ分子を小断片に消化することにより、スポット中のバイオ分子の質量の指紋又は特徴が得られ、所望ならばこれを用いてマーカの同一性を決定することができる。

【0098】

c) 高性能液体クロマトグラフィー

更に別の実施態様では、極性、電荷及び大きさのような異なる物性によりサンプル中のバイオ分子混合物を分離するために、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用できる。HPLC機器は通常、移動相のリザーバー、ポンプ、注入器、分離カラム、及び検出器で構成される。サンプル中のバイオ分子は、サンプルのアリコートのカラムに注入することにより分離される。混合物中の各種バイオ分子は、移動液相と定常相とを区分けする（partitioning）挙動の相違により、異なる速度でカラムを通過する。1つ以上のマーカの分子量及び/又は物性に相当するフラクションは収集できる。次にこのフラクションをガス相イオン分光測定により分析して、マーカを検出できる。例えばこれらのスポットは、以下に詳細に説明するようなMALDI又は表面強化レーザー脱着/イオン化（例えばProteinChip（登録商標）配列）を用いて分析できる。

【0099】

d) 分析前のマーカの変性

マーカは、分離性を改善するか又は同一性を決定するため、分析前に任意に変性できる。例えば、分析前にマーカに蛋白質分解消化を行ってもよい。いかなるプロテアーゼも使用できる。複数のマーカを別個の多数の断片に切断し易いトリプシンのようなプロテアーゼは、特に有用である。消化により生じた断片は、マーカ用の指紋として機能し、これにより間接的にマーカの検出を可能にする。これは、問題のマーカと混同する恐れのある類似の分子質量を有するマーカがある場合、特に有用である。また、低分子量のマーカは質量分析により容易に分離されるので、蛋白質分解断片化は、特に高分子量のマーカに対し有用である。標的マーカがmRNAのような核酸であれば、質量分光分析の前にマーカを変性するため、ヌクレアーゼが任意に使用できる。別の実施例では、バイオ分子は、検出分離性を改善するために変性できる。例えばニューラミニダーゼ（neuraminidase）は、糖蛋白質（例えばPSMA、又はPSMA'等）から末端シアル（sialic）酸残部を除去して、アニオン吸着剤（例えばカチオン交換P

10

20

30

40

50

protein chip (登録商標) 配列) への結合を改善すると共に、検出分離性を改善するために使用できる。別の例では、分子マーカーに特異的に結合し、更にこれらマーカーを識別する特定分子量のタグ (tag) を付着させることにより変性できる。このような変性マーカーを検出後は任意に、蛋白質データベース (例えば SWISS-PRO) に変性マーカーの物理的及び化学的特性を合わせることにより、更にマーカーの同一性を決定できる。

【0100】

2. ガス相イオン分光測定分析のためのサンプルと基体との接触

前述のようにして作製したサンプル又はサンプル (例えば予備分画したサンプル) は、基体と接触できる。基体は、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブ (例えばバイオチップ) であってよい。本発明では、バイオチップは通常、基体に結合した少なくとも1つの吸着剤を有する少なくとも1つの表面機構付きの基体を有する。ここで吸着剤は、例えば PSMA 又は PSMA'、前立腺マーカー mRNA、及び/又はその他のマーカーを捕獲することができる。或いは基体は、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブ上に置くことができる別個の材料であってもよい。例えば基体は、例えばマーカー結合用の官能基を有する、高分子常磁性の、ラテックス又はガラスビーズもしくは樹脂であってよい。次に基体はプローブ上に置くことができる。

10

【0101】

プローブ (例えばバイオチップ) は、ガス相イオン分光計との併用に適合する (例えばガス相イオン分光計に脱着可能に挿入できる) 限り、いかなる好適な形状でもよい。例えばプローブは、所定のアドレス可能な位置に一連の壁を持った、細片、板、又は皿の形状であってもよいし、或いはその他の表面機能を持っていてもよい。またプローブは、ガス相イオン分光計の入口システム及び検出器と併用するような形状であってもよい。例えばプローブは、人手で再配置する必要なく、プローブを次の位置に水平又は垂直に移動させる水平及び/又は垂直に移動可能なカートリッジ内に載荷するように適合させてもよい。

20

【0102】

プローブ又はバイオチップの表面機構には種々の実施態様がある。例えばバイオチップは、複数の表面機構を任意に有する。複数の表面機構は、例えば一列、直交配列、円形、又は n 角形 (但し、n は 3 以上) に配置される。複数の表面機構は通常、論理配列又は空間配列を含む。複数の表面機構の各々は、同一又は異なる吸着剤もしくはそれらの 1 つ以上の組合せを任意に有する。例えば複数の表面機構の中の少なくとも 2 つは、同一又は異なる吸着剤もしくはそれらの 1 つ以上の組合せを有する。特定の実施態様では、PSMA 又は PSMA' を捕獲できる少なくとも 1 つの吸着剤の他に、複数の表面機構の 1 つ以上の所で基体に結合する少なくとも 1 つの他の吸着剤を更に有する。他の吸着剤は通常、PSMA、PSMA'、PSA、遊離 PSA、錯化 PSA、PAP、PSP94、又は PSCA 等の 1 つ以上の他の前立腺マーカーを捕獲できる。以下、好適な吸着剤について詳細に説明する。

30

【0103】

プローブの基体は、いかなる好適な材料からも作ることができる。例えばプローブの基体材料としては、限定されるものではないが、絶縁材料 (例えば二酸化珪素のようなガラス、プラスチック、セラミック)、磁性材料、半導体材料 (例えばシリコンウエーハ) 又は導電材料 (例えばニッケルのような金属、黄銅、鋼、アルミニウム、金、メタロイド、合金又は導電性ポリマー)、ポリマー、有機ポリマー、導電性ポリマー、バイオポリマー、天然バイオポリマー、有機ポリマー塗布金属、又はそれらのいずれかの組合せが挙げられる。プローブ基体材料は、固定であっても多孔質であってもよい。本発明の実施態様に好適なプローブは、例えば USP 5, 617, 060 (Hutchens 及び Yip) や WO 98/59360 (Hutchens 及び Yip) に記載される。

40

【0104】

a) 不活性基体上のサンプルの分析

サンプルの複雑性が上記調製法を用いてほぼ低下したならば、サンプルは、ガス相イオン

50

分光測定に好適ないかなる基体とも接触できる。マーカからの他のバイオ分子の分離は必要ないので、例えば基体表面は不活性であってよく、またマーカ結合用の吸着剤を含む必要はない。幾つかの実施態様では、マーカ含有フラクションを基体と接触させる前に、マーカ含有フラクションを得るため、サンプルは、2次元ゲル電気泳動又はHPLCにより調製することが好ましい。次にスポット又はフラクション中のマーカは、更に分画することなく、ガス相イオン分光測定(例えば慣用のMALDI)を用いるか、又は当業界に公知の方法を用いて分離できる。

【0105】

ガス相イオン分光測定分析の前に、エネルギー吸収性分子(“EAM”)又は母材材料を通常、基体表面上のマーカに塗布する。エネルギー吸収性分子は、ガス相イオン分光計のエネルギー源からのエネルギーの吸収を助けると共に、プローブ表面からのマーカの脱着を助けることができる。好例のエネルギー吸収性分子としては、桂皮酸誘導体、シナピン酸(“SPA”)、シアノヒドロキシ桂皮酸(“CHCA”)及びジヒドロキシ安息香酸が挙げられる。他の好適なエネルギー吸収性分子は、当業者に公知である。エネルギー吸収性分子の更なる説明については、例えばUSP5,719,060(Hutchens及びYip)参照。

【0106】

エネルギー吸収性分子及びマーカ含有サンプルは、いかなる好適な方法で接触させてもよい。例えばエネルギー吸収性分子は、マーカ含有サンプルと混合し、混合物は、慣用のMALDI法と同様、基体表面上に置く。別の例では、エネルギー吸収性分子は、基体表面をサンプルと接触させる前に、基体表面上に置くことができる。他の例では、サンプルは、基体表面をエネルギー吸収性分子と接触させる前に、基体表面に置くことができる。次にマーカは、以下に詳細に説明するように、脱着し、イオン化し、検出することができる。

【0107】

b) 吸着剤を含有する基体表面上のサンプルの分析

幾つかの実施態様では、サンプルの複雑性は、1つ以上のマーカに結合可能な吸着剤を含有する基体を用いて更に低下させることができる。吸着剤は、マーカの結合に好適な結合特性を備える限り、マーカ(例えば特異的にマーカに結合する抗体)に対しバイオ特異的(例えばバイオ分子相互作用吸着剤)である必要はない。例えば吸着剤は、疎水性相互作用吸着剤又は基、親水性相互作用吸着剤又は基、カチオン性吸着剤又は基、アニオン性吸着剤又は基、金属キレート化性吸着剤又は基(例えばニッケル、コバルト等)、レクチン、ヘパリン、又はそれらのいずれかの組合せのようなクロマトグラフィー吸着剤を含むことができる。他の実施態様では、吸着剤としては、親和性吸着剤、ポリペプチド、酵素、前立腺マーカ基体、受容体、又は抗体等のバイオ分子相互作用吸着剤が挙げられる。好ましい実施態様では、バイオ分子相互作用吸着剤としては、例えばPSMA又はPSMA'及び任意にその他の前立腺マーカ(例えばPSMA、PSMA'、PSA、遊離PSA、錯化PSA、PAP、PSP94、PSCA、又はこれらもしくは他の前立腺マーカをコード化するmRNA)を特異的に捕獲するモノクローナル抗体が挙げられる。

【0108】

各種タイプの吸着剤の例は、当業界に周知である。例えば疎水性基を含む吸着剤としては、脂肪族炭化水素、例えばC₁ ~ C₁₈脂肪族炭化水素を有する母材及びフェニル基のような芳香族炭化水素官能基を有する母材が挙げられる。親水性基を含む吸着剤としては、ガラス(例えば二酸化珪素)、又はポリエチレングリコール、デキストラン、アガロース、又はセルロースのような親水性ポリマーが挙げられる。カチオン基を含む吸着剤としては、例えば硫酸塩アニオン(SO₄⁻)の母材及びカルボン酸アニオン(COO⁻)又はリン酸塩アニオン(PO₄⁻)の母材が挙げられる。金属キレート基を含む吸着剤としては、例えば銅、ニッケル、コバルト、亜鉛、鉄のような金属イオンやアルミニウム及びカルシウムのようなその他の金属イオンと配位共有結合を形成する1つ以上の電子

10

20

30

40

50

供与体基を有する有機分子が挙げられる。抗体を含む吸着剤としては、例えば前述したマーカーのいずれか1つに特異的に結合する抗体が挙げられる。これら吸着剤の幾つかを持ったプローブは、市販品としても入手し得る（例えばNormal Phase Protein Chip（登録商標）配列、SAX2 Protein Chip（登録商標）配列、IMAC3 Protein Chip（登録商標）配列等は全て、Ciphergen Biosystems, Inc.（Fremont, CA）から入手可能）。好ましい実施態様では、吸着剤は、尿サンプルのマーカーを富化し同定するために初期に使用した吸着剤とほぼ同様か又は同じである（例えばSAX2 Protein Chip（登録商標）配列）。

【0109】

サンプル中のmRNAの検出及び/又は定量を含む本発明の実施態様では、選択された吸着剤は通常、標的の前立腺マーカーmRNAに相当するDNA（例えばcDNA）を含む。核酸吸着剤は、市販の源から任意に合成又は購入される。例えば吸着剤として使用されるオリゴ-又はポリ-ヌクレオチド配列は、当業者に周知の技術により容易に合成できる。更に本質的には、いかなる核酸もThe Midland Certified Reagent Company（merc@oligos.com）、The Great American Gene Company（www.genco.com）、Express Gen, Inc.（www.expressgen.com）、Operon Technologies, Inc.（www.operon.com）、その他、多数の市販の各種供給源のいずれかから任意に顧客注文される。

【0110】

調査可能な配列情報は、例えばGenBankのような各種公共の核酸データベースから入手できる。例えばPSMA及び/又はPSMA'吸着剤は、NM-006102, AF119386, AF007544, AF061571, S76978, AF254358, AF254357, AW620338, AW473087, AF107214, NM-004476, AW278819, AW277437, AW168915, AW000926, AI872104, AI791154, AI768508, AI766427, AJ007318, AI690667, AI672408, AI648702, AI478207, AI474492, AI424589, AI356718, AI094658, AI050871, AF016832, AF016830, AF016829, AF016828, AF016827, AF016826, AF011896, AF007413, AF007412, AF00741, AF006604, AA897668, AA879028, AF044684, AA652917, AA435800, AA631303, AF008934, AA371450, AA370337, N75691, N64840, 64840, I23813, I23812, I23811, I23810, I23809, I23808, I23807, I23806, I23805, I23804, I23803, I23802, I23801, I23800, I23799, I23798, I23797, I23796, I23795, I23794及び/又はM99487のようなアクセス（accession）番号に相当する配列に基づいて設計できる。これらの配列は一般に、PSMA又はPSMA'吸着剤としての使用に適切な配列を確認するために単独で又は組合せて使用できるPSMA及びPSMA'に関する一部長さ又は全長の核酸配列（例えばmRNA、cDNA、遺伝子等）に相当する。同様な配列情報は、例えばPSA、PAP、PSP94、又はPSCA等の他の前立腺マーカーについても入手できる。

【0111】

プローブは、基体材料及び/又は吸着剤の選択に応じた、いかなる好適な方法を用いても製造できる。例えば金属表面には、酸化珪素、酸化チタン又は金を塗布でき、またこの塗布表面は、例えば吸着剤を結合、付着させる二官能性結合剤（linker）で誘導体化できる。例えば二官能性結合剤の一端は、塗布表面上の官能基と共有結合でき、他端は、吸着剤として機能する基で更に誘導体化できる。別の例では、結晶性シリコンから生成し

10

20

30

40

50

た多孔質シリコン表面は、マーカー結合用吸着剤を含有するように化学的に変性できる。別の例では、現場でモノマー溶液を重合することにより、基体表面上に直接、吸着剤を形成できる。このモノマー溶液は、例えば吸着剤として選り抜きの官能基を有する、置換アクリルアミドモノマー、置換アクリレートモノマー、又はそれらの誘導体含有する。モノマー溶液の重合により、バイオ分子の結合に一層大きな能力を持ったヒドロゲル吸着剤が得られる。核酸系吸着剤（例えばDNA、cDNA等）の沈着については、更に例えばBrown等のUSP5,807,522“METHODS FOR FABRICATING MICROARRAYS OF BIOLOGICAL SAMPLES”及びPease等,(1994年)“Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis”, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:5022-5026に記載される。

【0112】

マーカーに結合する吸着剤は、いかなる好適なパターン（例えば連続又は不連続）でも基体に塗布できる。例えば基体表面上に1つ以上の吸着剤が存在し得る。各種タイプの吸着剤を使用する場合は、基体表面は、1つ以上の結合特性が一次元又は二次元勾配で変化するように塗布できる。不連続の場合は、複数の吸着剤は、基体表面上の所定のアドレス可能な位置に配置できる。アドレス可能な位置は、いかなるパターンで配置してもよいが、好ましくは列、直交配列、又は規則的な曲線（例えば円）のような規則的なパターンであることが好ましい。プローブは、例えば不連続な吸着剤スポットを含むことができる。各アドレス可能な位置は、同一又は異なる吸着剤を含んでいてよい。これらのスポットは、質量分析中、レーザーのようなエネルギー源がマーカーを脱着、イオン化するために各スポットに向けられるか又は“アドレスする”点で“アドレス可能”である。

【0113】

サンプルは、浴漬け、浸透(soaking)、浸漬、噴霧、洗い流し(washing over)、又はピペット滴下(pipetting)等、いずれかの好適な方法で吸着剤含有基体と接触させる。一般に吸着剤の結合には、約1 μ l~500 μ l中にマーカーを数アトモル~100ピコモル含むサンプル量で充分である。サンプルは、マーカーを吸着剤に結合させるのに十分な時間、吸着剤含有プローブ基体と接触できる。サンプルと吸着剤含有基体とは通常、約30秒~約12時間、好ましくは約30秒~約15分の間、接触させる。サンプルは通常、周囲の温度及び圧力条件下でプローブ基体に接触させる。しかし、幾つかのサンプルに対しては、変更した温度(通常、4~37)及び圧力条件が望ましいことがあり、これらの条件は当業者ならば決定できる。

【0114】

基体がサンプル又はサンプル溶液と接触した後、基体表面上に結合した材料だけが残るように、基体表面上の解放された材料は洗浄する。基体表面の洗浄は、例えば溶離剤による基体表面の、浴漬け、浸透、浸漬、すすぎ、噴霧、又は洗浄により実施できる。溶離剤をプローブ上の吸着剤の小スポットに導入する際は、マイクロフルイディクス法を使用することが好ましい。溶離剤の温度は通常、0~100、好ましくは4~37でよい。幾つかの実施態様では、プローブ表面に結合したマーカーが洗浄なしでガス相イオン分光測定により分離可能であれば、プローブ表面から解放された材料の洗浄は、必要ないかも知れない。

【0115】

基体表面の洗浄には、いかなる好適な溶離剤（例えば有機又は水性）も使用できる。水溶液を使用することが好ましい。好例の水溶液としては、HEPES緩衝液、Tris緩衝液、又はホスフェート緩衝塩水等が挙げられる。これら緩衝液の洗浄力(stringency)を増大させるため、緩衝液には添加剤を導入できる。添加剤としては、限定されるものではないが、イオン相互作用改質剤（イオン強度及びpHの両方）、水構造改質剤、疎水性相互作用改質剤、チャオトロピック(chaotropic)試薬、親水性相互作用置換剤(displacer)が挙げられる。これら添加剤の特定例は、例えばPC

T公開WO98/59360 (Hutchens及びYip)に見られる。特定溶離剤又はその添加剤の選択は、他の実験条件(例えば、使用される吸着剤又は検出すべきマーカの種類)によるもので、当業者ならば決定できる。

【0116】

プローブ表面からマーカ含有バイオ分子を脱着、イオン化する前に、エネルギー吸収性分子("EAM")又は母材材料を通常、この基体表面上のマーカに塗布する。EAMの種類及び塗布方法は、前述の通りであり、ここでは繰り返さない。

【0117】

3. 脱着/イオン化及び検出

基体表面上のマーカは、ガス相イオン分光測定を用いて脱着、イオン化できる。基体上のマーカを分離できる限り、いかなる好適なガス相イオン分光計も使用できる。ガス相イオン分光計は、マーカを定量できることが好ましい。

【0118】

一実施態様では、ガス相イオン分光計は、質量分析計である。通常の質量分析計には、その入口システムに基体、又は基体表面上にマーカを含有するプローブが導入されている。次にこれらのマーカは、レーザー、高速原子衝撃、高エネルギープラズマ、電子噴射イオン化、熱噴射イオン化、液体二次イオンMS、フィールド脱着等の脱着源により脱着される。発生する脱着、揮発した種は、脱着の直接の結果としてイオン化される、プレフォーム化イオン又は中性点(neutral)で構成される。発生したイオンは、イオン光学アッセンブリーにより収集され、次いで質量分析計は、通過するイオンを分散し、分析する。質量分析計を励起するイオンは、検出器により検出される。次いで検出器は、検出されたイオンの情報を質量対電荷比に翻訳する。マーカ又はその他の物質の存在の検出には、通常、信号強度の検出が含まれる。これにより、今度は基体に結合したマーカの量及び特性を反映できる。質量分析計構成成分のいずれか(例えば脱着源、質量分析部、検出器等)は、ここで説明したその他の好適な構成成分又は本発明の実施態様における当業界に公知のその他の構成成分と組合せることができる。

【0119】

本発明の実施態様では、レーザー脱着飛行時間質量分析計を用いることが好ましい。レーザー脱着質量分析法では、基体又はマーカ含有プローブは、入口システムに導入される。イオン化源からのレーザーによりマーカは、ガス相中に脱着、イオン化される。発生したイオンは、イオン光学アッセンブリーにより収集され、次いで飛行時間質量分析部中でイオンは、短い高電圧場を通過して加速され、高真空室中に吹き流される。高真空室の遙かな端部において、複数の加速イオンは、異なる時間で敏感な検出器表面に当たる。この飛行時間は、イオンの質量の関数なので、イオンの形成からイオンの検出器衝突までの経過時間は、特定の質量対電荷比を持ったマーカの存在又は不存在の確認に使用できる。

【0120】

別の実施態様では、マーカの検出にイオン移動度分光計が使用できる。イオン移動度分光測定の実理は、イオンの異なる移動度に基づくものである。詳しくは、イオン化により生成したサンプルの複数のイオンは、電場の影響を受けて管内を、例えば質量、電荷、又は形状の相違により、異なる速度で移動する。これらのイオン(通常は電流(current)の形態)は、検出器で表示され(register)、次に検出器はサンプル中のマーカ又はその他の物質の同定に使用できる。イオン移動度分光測定の一つの利点は、大気圧で操作できることである。

【0121】

更に別の実施態様では、マーカの検出及び特徴化に全イオン測定装置が使用できる。この装置は、基体が単一種のマーカしか持たない場合に使用できる。単一種のマーカが基体上にある場合、イオン化マーカから発生した全イオン流は、このマーカの量及びその他の特性を反映する。次にこのマーカで発生した全イオン流は、対照(例えば既知化合物の全イオン流)と比較できる。次に、マーカの量及び特性を測定できる。

【0122】

10

20

30

40

50

4. データの分析

マーカの脱着及び検出により生じたデータは、いかなる好適な手段を用いても分析できる。一実施態様では、例えば総合システムの一部としてのプログラム可能なデジタルコンピュータを用いて分析できる。コンピュータプログラムは一般に、コードを記憶する読み取り可能な媒体を有する。プローブ上の各機構の位置、該機構における吸着剤の同一性、及び該吸着剤の洗浄に使用される溶離条件を含むメモリーに特定のコードを充てることができる。コンピュータは、プローブ上の特定のアドレス可能な位置から受けた各種分子の質量での信号強度に関するデータを入力として受けるコードも含有する。このデータは、検出したマーカの数を表示し、各マーカにより発生した信号の強度を含むことができる。

10

【0123】

本発明は特に、選択したサンプル中のPSMA又はPSMA'及び任意に他の前立腺マーカを定量する装置又は総合システムを含む。この装置又はシステムは通常、サンプル中の例えばPSMA又はPSMA'を捕獲できる吸着剤(例えばバイオチップのような固体相吸着剤)と、例えば吸着剤上に捕獲したPSMA又はPSMA'を定量するためのガス相イオン分光計とを備える。この装置又はシステムは通常、ガス相イオン分光計に操作可能に接続したコンピュータ又はコンピュータ読み取り可能な媒体であって、例えば(i)ガス相イオン分光計により定量されたデータを分析又は処理するための命令セット、(ii)データをデータベースに入れるための命令セット、又は(iii)少なくとも1つの定量された前立腺マーカ又は定量された前立腺マーカの組合せと、前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断、についての診断との相関を決めるための命令セット;の1つ以上を有するコンピュータプログラムを含む該コンピュータ又はコンピュータ読み取り可能な媒体も備える。

20

【0124】

データの分析は通常、検出したマーカの信号強度(例えばピークの高さ)を測定する工程及び“孤立値”(所定の統計的分布から外れたデータ)を除去する工程を含む。観察されたピークは、正規化でき、この方法により或る対照に対する各ピークの高さが計算される。例えば対照は、計器及び薬品(例えばエネルギー吸収性分子)によって生じたバックグラウンドノイズであってよく、これは目盛でゼロと設定される。次に、各マーカ又はその他のバイオ分子について検出された信号強度は、所望の目盛(例えば100)に相対強度の形態で表示できる。或いは、検出した各マーカ又はその他のマーカについて観察された信号の相対強度を計算するため、標準(例えばウシ血清アルブミン)のピークが基準として使用できるように、サンプルによって標準が認められる。

30

【0125】

コンピュータは、得られたデータを表示用の各種フォーマットに変形できる。“スペクトル図(view)又は保存(retentate)マップ”と云われる或るフォーマットでは、標準スペクトル図が表示できる。このスペクトル図は、検出器を各特定の分子量の所に到達させるマーカの量を描写する。“ピークマップ”と云われる別のフォーマットでは、このスペクトル図からピークの高さ及び質量の情報だけが保存され、更に明瞭な画像が得られる上、殆ど同じ分子量を持ったマーカを一層容易に見ることができる。“ゲル図”と云われる更に別のフォーマットでは、ピーク図の各質量が、各ピークの高さに基づいて無彩色スケール画像に変換でき、電気泳動ゲル上のバンドと同様な外観が得られる。“3-Dオーバレイ”と云われる更に別のフォーマットでは、相対ピーク高さの微妙な変化を研究するため、数個のスペクトルを重ねることができる。“差異マップ図”と云われる更に別のフォーマットでは、2つ以上のスペクトルが比較でき、特有のマーカや、サンプル間で上下に調節されるマーカを目立たせるのに便利である。いずれか2つのサンプルからのマーカの輪郭(スペクトル)を視覚的に比較してもよい。更に別のフォーマットでは、スポットファイアー・スカッター図(Spotfire Scatter Plot)が使用できる。この図は、検出したマーカを点(dot)としてプロットしたもので、一方の軸は、検出したマーカの見掛けの(apparent)分子を表し、

40

50

他方の軸は、検出したマーカーの信号強度を表す。コンピュータ読み取り可能な媒体には、各サンプルについて、検出するマーカー及びこのサンプル中に存在するマーカーの量が保管できる。このデータは、次に対照（例えば、前立腺癌又はBPHが検出できない被験者のような対照中に検出したマーカーの輪郭又は量）と比較できる。

【0126】

B. 免疫アッセイによる検出

別の実施態様では、サンプル中のマーカー（例えばPSMA又はPSMA'等）を検出し、分析するため、免疫アッセイが使用できる。この方法は、(a)マーカーに特異的に結合する抗体を供給する工程、(b)サンプルをこの抗体と接触させる工程、及び(c)サンプル中のマーカーに結合した抗体の錯体の存在を検出する工程を含む。

10

【0127】

マーカーに特異的に結合する抗体を調製するには、精製マーカー又はその核酸配列が使用できる。マーカー用の核酸及びアミノ酸配列は、更にこれらのマーカーを特徴化することにより得られる。例えば各マーカーは、多数の酵素（例えばトリプシン、V8プロテアーゼ等）とペプチドマップできる。各種酵素によって生じた消化断片の分子量に合う配列用のデータベース、例えばSWISS-PROデータベースを探索するため、各マーカーからの消化断片の分子量が使用できる。他のマーカーがデータベース中の既知の蛋白質であれば、この方法を用いて、他のマーカーの核酸及びアミノ酸配列が同定できる。

【0128】

或いはこれらの蛋白質は、蛋白質梯子配列を用いて順番に配列できる。蛋白質梯子は、例えば分子をばらばらに切断し、これらの断片を酵素消化する方法、或いはその他、断片の末端から連続的に単一アミノ酸を除去する方法により生成できる。蛋白質梯子の調製方法については、例えば国際公開WO93/24834（Chait等）及びUSP5,792,664（Chait等）に記載される。次いで蛋白質梯子は、質量分析法により分析される。これら梯子断片の質量差により、分子末端から除去されたアミノ酸が同定される。

20

【0129】

マーカーがデータベース中の既知蛋白質でなくても、このマーカーのアミノ酸配列の一部さえ認識されれば、核酸及びアミノ酸配列は決定できる。例えばこのマーカーのN-末端アミノ酸配列に基づいて、退化（degenerate）プローブを作ることができる。次にこれらのプローブは、最初にマーカーが検出されたサンプルから作ったゲノム又はcDNAライブラリーをスクリーンするために使用できる。陽性クローンは、同定、増幅し、それらの組み換え配列は、周知の技術を用いて分割（sub）クローン化できる。例えばCurrent Protocols for Molecular Biology（Ausubel等，Green Publishing Assoc. and Wiley-Interscience（1999年補足））及びMolecular Cloning: A Laboratory Manual，第2編（Sambrook等，Cold Spring Harbor Laboratory，N.Y.（1989年））参照。

30

【0130】

マーカーに特異的に結合する抗体は、精製マーカー又はその核酸配列を用いることにより、当業界に好適ないかなる方法を用いても調製できる。例えばColigan, Current Protocols in Immunology（1991年）；Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual（1988年）；Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice（第2編1986年）；及びKohler & Milstein, Nature 256: 495-497（1975年）参照。このような技術には、限定されるものではないが、ファージ又は同様なベクター中の組み換え抗体のライブラリーから抗体を選択することによる抗体の調製や、ウサギ又はネズミを免疫化することによるポリクローナル及びモノクローナル抗体の調製が含まれる（例えばH

40

50

use等, Science 246:1275-1281(1989年); Ward等, Nature 341:544-546(1989年)参照)。

【0131】

抗体を供給後、マーカーは、当業界に公知の好適な免疫学的結合アッセイのいずれを用いても検出及び/又は定量できる(例えばUSP4,366,241、同4,376,110、同4,517,288及び同4,837,168参照)。有用なアッセイとしては、例えば酵素結合免疫溶剤アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、Westernブロットアッセイ、又はスロットブロットアッセイのような酵素免疫アッセイ(EIA)が挙げられる。これらの方法は、例えばMethods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, 37巻(Asai編, 1993年); Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr編, 第7編1991年; 及び上記Harlow & Laneにも記載される。 10

【0132】

一般に被験者から得られたサンプルは、マーカーに特異的に結合する抗体と接触できる。抗体は、洗浄及び次の錯体単離を容易にするため、サンプルとの接触前に固形支持体に任意に固定できる。固形支持体の例としては、例えばマイクロタイタープレート、棒、ビーズ、又はマイクロビーズの形態のガラス又はプラスチックが挙げられる。抗体は、プローブ基体又はProtein Chip(登録商標)配列に付着させることも可能であり、また前述のようにガス相イオン分光測定により分析可能である。サンプルは、被験者から取った 20
生物学的液体サンプルであることが好ましい。生物学的サンプルの例としては、尿、血液、血清、プラズマ、涙、唾液、組織等が挙げられる。好ましい実施態様では、生物学的液体は血清を含む。サンプルは、抗体と接触させる前に好適な溶離剤で希釈できる。

【0133】

サンプルを抗体と温置後、この混合物を洗浄すると、形成された抗体-マーカー錯体を検出できる。検出は、洗浄した混合物を検出試薬と温置することにより実施できる。この検出試薬は、例えば検出可能な標識で標識した第二抗体であってよい。好例の検出可能な標識としては、磁性ビーズ(例えばDYNABEADS(商標))、蛍光染料、放射性標識、酵素(例えばセイヨウワサビ過酸化物質、アルカリ性ホスフェート、及びその他、ELISAで普通に使用されているもの)、及びコロイド状金、着色ガラス又はプラスチックビーズのような比色標識が挙げられる。或いは、サンプル中のマーカーは、例えば第二の標識した抗体を用いて、マーカー-特異的抗体結合を検出する間接アッセイを用い、及び/又は例えばマーカーの明瞭なエピトープに結合するモノクローナル抗体を同時に混合物と温置する競争又は抑制アッセイで検出できる。 30

【0134】

アッセイ中、試薬の各組合せ後に温置及び/又は洗浄工程を必要とするかも知れない。温置工程は、約5秒~数時間、好ましくは約5分~約24時間であってよい。しかし温置時間は、アッセイフォーマット、マーカー、溶液量、及び濃度等に依存する。アッセイは通常、周囲温度で行われるが、10~40のような温度範囲を越えて行うこともできる。 40

【0135】

免疫アッセイは、サンプル中のPSMA又はPSMA'のようなマーカーの存在又は不存在やサンプル中のマーカーの量を測定するために使用できる。まず、サンプル中のマーカーの試験量は、上記免疫アッセイを用いて検出できる。サンプル中にマーカーが存在すれば、上記好適な温置条件下でマーカーに特異的に結合する抗体と抗体-マーカー錯体を形成する。抗体-マーカー錯体の量は、標準と比べることにより測定できる。標準は、例えば既知の化合物、又はサンプル中に存在することが知られている他の蛋白質であってよい。前述のように、マーカーの試験量は、測定の単位が対照と比較できる限り、絶対単位で測定する必要はない。

【0136】

サンプル中のこれらマーカーを検出する方法は、多くの用途を持っている。例えば1つ以上のマーカーを測定して、前立腺癌又はBPHの診断又は予後を援助できる。別の例では、これらのマーカー検出法は、癌治療に対する被験者の応答をモニターするために使用できる。別の例では、マーカー検出法は、生体内又は試験管内でこれらマーカーの発現を調節する化合物及び該化合物についてアッセイし、同定するために使用できる。

【0137】

IV. 前立腺癌又は良性前立腺増殖の診断

実験では、正常な被験者（例えば前立腺癌又は良性前立腺増殖に対し陰性診断の被験者）と比較すると、PSMA又はPSMA'は、前立腺癌では正常者に比べて上方（up-）調節され、良性前立腺増殖では下方（down-）調節されることを示している。したがって本発明は、ここで説明した前立腺マーカーを用いて前立腺癌又は良性前立腺増殖の診断を援助する方法も提供する。これらのマーカーは、単独で又は他のマーカーと組合せて使用できる。例えばPSMAは、通常、サンプル（例えば血清サンプル）中に前立腺癌又はBPHの患者や前立腺癌又はBPHを検出できない正常被験者とは示差的に存在する。したがって、ここで説明したマーカーの1つ以上を人で検出すれば、その人が前立腺癌又はBPHである蓋然性に関する有効な情報となる。以下の実施例で更に説明するように、前立腺癌の患者は、正常な患者よりも血清PSMAの濃度が高い可能性がある。

10

【0138】

特に本発明は、被検者からのサンプル中のPSMA又はPSMA'を（例えばガス相イオン分光測定により）検出する工程、及びこの検出されたPSMA又はPSMA'を前立腺癌、良性前立腺増殖、又は陰性診断の蓋然的診断と関連させる工程を含む、前立腺癌又は良性前立腺増殖の診断援助方法に関する。この関連は一般に、サンプル中のPSMA又はPSMA'の存在又は不存在と対照中のPSMA又はPSMA'検出頻度とを考慮する。更にこの関連は通常、PSMA又はPSMA'の対照量に対するサンプル中のPSMA又はPSMA'の量も考慮する。特定の実施態様では、サンプル中のPSMA又はPSMA'の検出に、免疫アッセイが使用される。幾つかの実施態様では、PSMA及びPSMA'の両方が検出、関連され、一方、他の実施態様では、PSMAをコード化する核酸又はその他の前立腺マーカーのような他のマーカーが使用される。更に詳しくは、正常範囲を越えるPSMA/PSMA'の量は、前立腺癌の診断と明確に相関し、一方、正常範囲未満のPSMA/PSMA'量は、良性前立腺増殖の診断と明確に相関する。

20

30

【0139】

マーカーを検出するため、患者からはいかなる好適なサンプルも得られる。好ましくはサンプルは、患者からの血清である。所望ならば、マーカーの検出性を高めるため、前述のようにサンプルを調製することができる。例えばPSMAのようなマーカーの検出性を増大させるため、例えば被験者からの血清サンプルは、大きさ排除クロマトグラフィーにより任意に分画できる。予備分画プロトコールのようなサンプル調製は任意であり、使用する検出方法によっては、マーカーの検出性を高める必要はないかも知れない。例えばサンプル中のマーカーの存在を検出するためマーカーに特異的に結合する抗体を使用すれば、サンプル調製は不必要かも知れない。

【0140】

サンプル中のマーカーの検出には、いずれかの好適な検出法が任意に使用される。例えば前述のように、又は当業界で知られているように、ガス相イオン分光測定又は慣用の免疫アッセイ（例えばELISA、Westernブロット）が使用できる。これらの方法を用いて、1つ以上のマーカーが検出できる。好ましくはサンプルは、複数のマーカーの存在について試験する。単一のマーカーだけよりも複数のマーカーの存在を検出する方が、診断医に多くの情報を与える。即ち、サンプル中の複数のマーカーを検出すると、真の陽性及び陰性診断率（%）が向上し、偽の陽性及び陰性診断率が減少する。

40

【0141】

次に1つ又は複数のマーカーの検出を前立腺癌又はBPHの蓋然的診断と関連させる。幾つかの実施態様では、マーカーを定量することなく、単にマーカーの存在又は不存在を検

50

出することだけが有用で、前立腺癌又はBPHの蓋然的診断と相関できる。例えば試験された被験者中の1つ以上のマーカーの検出だけで被験者が前立腺癌又はBPHであるか一層高い蓋然性で判る可能性がある。他の実施態様では、マーカーの検出を前立腺癌又はBPHの蓋然的診断と相関させるため、マーカーを定量する工程を含むことができる。例えば前立腺癌又はBPH被験者の血清サンプル中には、幾つか又は全部のマーカーが、正常被験者の血清サンプル中よりも多量に存在するかも知れない。したがって被験者で検出されたマーカー量が対照量よりも多ければ、試験された被験者は、前立腺癌又はBPHである蓋然性が高い可能性がある。

【0142】

マーカーを定量すると、対照と比較できる。対照は、例えば前立腺癌又はBPHを検出できない正常被験者の同等のサンプル中に存在するマーカーの平均又は中間量であってよい。この対照量は、試験量の測定条件と同じか又は実質的に同様な実験条件下で測定する。例えば試験サンプルが被験者の尿サンプルから得られ、またマーカーが特定のプローブを用いて検出された場合は、このマーカーの対照量は、好ましくは同じプローブを用いて患者の血清サンプルから決定する。マーカーの対照量は、そのグループ中のマーカー量の変化を反映しないように、前立腺癌又はBPHのない正常被験者から有意数のサンプルを基準にして決定することが好ましい。

【0143】

次に質量分析で得られたデータは、コンピュータソフトウェアで分析できる。このソフトウェアは、質量分析計からの信号をコンピュータ読み取り可能なフォームに変換するコードを含んでよい。ソフトウェアは、信号が本発明のマーカーに対応する信号の“ピーク”又は他の有用なマーカーを表すかどうかを決定するため、アルゴリズムを信号の分析に適用するコードも含んでよい。ソフトウェアは、試験サンプルからの信号を“正常”及び前立腺癌又はBPHの信号の通常の特徴と比較し、これら2つの信号間の適合近似性(closeness of fit)を決定するアルゴリズムを実行するコードも含んでよい。例えば人工知能アルゴリズム又は発見的学習アルゴリズム等のようないかなる好適なアルゴリズムも使用できる。例えばファジィ論理命令セット、クラスタ分析命令セット、神経ネットワーク、又は総称アルゴリズム等を含む人工知能アルゴリズムが使用できる。例えばQureshi等、J. Urol., 163:630-633(2000年); Snow等、J. Urol., 152:1923(1994年)参照。ソフトウェアは、試験サンプルが最も近似し、これにより蓋然的診断を与えることを示すコードを含んでもよい。

【0144】

V. キット

別の面では、本発明は、本発明のマーカーの検出に使用できる、前立腺癌又はBPHの診断援助用キットを提供する。例えばキットは、前述のようなマーカーのいずれか1つ以上を検出するため使用できる。これらのマーカーは、前立腺癌又はBPH患者及び正常被験者のサンプル中に示差的に存在する。本発明のキットは、多くの用途を持っている。例えばこれらのキットは、被験者が前立腺癌又はBPHか、或いは陰性診断かどうかを識別し、これにより前立腺癌又はBPH診断を援助するために使用できる。別の例では、これらのキットは、前立腺癌又はBPH用の生体内又は試験管内動物標本中のマーカーの1つ以上の発現を調節する化合物を同定するために使用できる。

【0145】

一実施態様では、キットは(a)PSMA又はPSMA'を捕獲する少なくとも1つの吸着剤、(b)該吸着剤にサンプルを曝すことによりサンプルからPSMA又はPSMA'を捕獲し、この捕獲したPSMA又はPSMA'をガス相イオン分光測定により定量するための命令セット、及び(c)前記吸着剤及び命令セットを収納するための少なくとも1つの容器を含む。このキットは、捕獲したPSMA又はPSMA'以外の材料を除去するため、吸着剤を洗浄するための少なくとも1つの溶離剤も任意に含む。吸着剤は通常、固体相吸着剤を含む。一実施態様では、固体相吸着剤は、基体に結合した固体相吸着剤を有

する少なくとも1つの表面機構付きの基体を備えたバイオチップとして供給される。この基体は一般に、ガス相イオン分光計との併用に適合したプローブである。キットは、このプローブを任意に含む。

【0146】

特定の実施態様では、プローブは、複数の表面機構を付けた基体を有する。例えば複数の表面機構の各々は、基体に結合した1つ以上の吸着剤を任意に有する。複数の表面機構は、一列、直交配列、円形、又はn角形（但し、nは3以上）に配置される。複数の表面機構は、論理配列又は空間配列を任意に有する。他の実施態様では、固体相吸着剤は、少なくとも1つの吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂を有する。この吸着剤で誘導体化したビーズ又は樹脂は、例えばガス相イオン分光計との併用に適合したプローブ上に置くのに通常、好適である。キットは、任意にこのプローブも含む。別の選択として、キットは少なくとも1つの基準又は対照も含む。更に別の実施態様では、キットは更に予備分画スピнкаラム（例えばK-30大きさ排除カラム）を含んでよい。

10

【0147】

本発明のキットは、各種タイプの吸着剤を含有する。例えば幾つかの実施態様では、吸着剤は、アニオン性吸着剤、カチオン性吸着剤、疎水性相互作用吸着剤、親水性相互作用吸着剤（例えば二酸化珪素等）、又は金属キレート化性吸着剤（例えばニッケル、コバルト等）等のクロマトグラフィー吸着剤を含む。他の実施態様では、吸着剤は、親和性吸着剤、ポリペプチド、酵素、前立腺マーカー基体、受容体、又は抗体等のバイオ分子相互作用吸着剤を含む。好ましい実施態様では、バイオ分子相互作用吸着剤は、PSMA又はPSMA'を特異的に捕獲するモノクローナル抗体を含む。更に別の実施態様では、キットは、PSMA又はPSMA'を捕獲する吸着剤の他に、少なくとも1つの他の吸着剤を更に含む。他の吸着剤は一般に、PSMA、PSMA'、PSA、遊離PSA、錯化PSA、PAP、PSP94、又はPSCA等の少なくとも1つの他の前立腺マーカーを捕獲できる。別の選択として、キットは、(1)溶離剤で洗浄した時、PSMA又はPSMA'或いは少なくとも1つの他の前立腺マーカーを吸着剤上に保持する溶離剤、又は(2)吸着剤をサンプルと接触させた後、該吸着剤を溶離剤で洗浄するための命令も更に含む。

20

【0148】

本発明の他の実施態様では、キットは(a)前立腺マーカーmRNAを捕獲する少なくとも1つの吸着剤、(b)サンプルをこの吸着剤に曝すことによりサンプルから前立腺マーカーmRNAを捕獲し、この捕獲した前立腺マーカーmRNAをガス相イオン分光測定により定量するための命令セット、及び(c)'この吸着剤及び命令セットを収納するための少なくとも1つの容器を含む。

30

【0149】

キットは、標識又は別個のインサートの形態で好適な操作パラメーターのための命令を更に任意に含むことができる。例えばキットは、例えば血清サンプルがプローブ上に接触した後、プローブを洗浄する方法を消費者に知らせる標準命令を持っていてよい。別の例では、キットは、サンプルを予備分画して、サンプル中の蛋白質又は核酸の複雑さを低減するための命令を持っていてよい。

【0150】

別の実施態様では、キットは、(a)マーカーに特異的に結合する抗体、及び(b)検出試薬を含む。このようなキットは、上記説明した材料から製造できる。これらの材料（例えば抗体、検出試薬、固定化支持体等）に関する前記説明は、ここでも充分適用できるので繰り返さない。キットは、更に任意に予備分画スピнкаラムを含んでよい。幾つかの実施態様では、キットは、標識又は別個のインサートの形態で好適な操作パラメーターのための命令を更に含んでよい。

40

【0151】

キットは、試験サンプルを対照情報標準と比較して、サンプル中に検出されたマーカーの試験量が前立腺癌又はBPHの診断と一致した診断量であるかどうかを決定できるように、標準又は対照情報を更に任意に含んでいてよい。例えば標準は、ウシインスリン、ウシ

50

血清アルブミン等であってよい。

【0152】

VI. 実施例

以下に、単なる説明のため、非限定的実施例を提供する。

【0153】

A. 概説

P S M A の臨床利用性を診断又は前立腺バイオマーカーとして決める努力は、体液中の P S M A の定量に対する免疫アッセイの感度に欠けることにより阻害されてきた。これら研究の目的は、C i p h e r g e n B i o s y s t e m s , I n c . (F r e m o n t , C A) の新規な P r o t e i n C h i p (登録商標) 技術を用いた P S M A 免疫アッセイ (表面強化レーザー脱着 / イオン化飛行時間質量分析法を使用) を発展させることであつた。一面では、ネズミ科の抗 P S M A モノクローナル抗体 (M o A b) 7 E 1 1 - C 5 . 3 を蛋白質 G 塗布バイオチップ配列上に固定化し、サンプルを添加し、次にこれらのチップに表面強化レーザー脱着 / イオン化質量分析を行った。E L I S A やその他の免疫アッセイフォーマットでは必要とした第二 P S M A 抗体又は標識を必要とせず、直接、1 0 0 k D a P S M A が正確に同定された。濃度を変化させた (0 . 5 - 5 0 n g / μ l) 精製組み換え P S M A (r P S M A) を用いて直線的標準曲線 ($R^2 = 0 . 9 8 5$) が得られた。図 4 参照。血清及び血清プラズマ中の P S M A のナノモル水準での定量は、正規化質量信号積分 (i n t e g r a l) により決定した。2 つの M o A b (一方は P S M A に、他方は P S A に) を同じバイオチップ配列に結合した表面強化レーザー脱着 / イオン化免疫アッセイの複合バージョンは、両前立腺癌マーカーの迅速同時定量用システムの多才性を示した。予備表面強化レーザー脱着 / イオン化免疫アッセイの結果、正常なドナーと前立腺癌患者との間、次に例えば W e s t e r n 分析により癌と良性前立腺状態との間が一層良好に識別され、両者は統計的に有意 ($p < 0 . 0 0 1$) であることが示された。これらの研究前に、免疫プロット及びサンドイッチ免疫アッセイを用いて体液中の P S M A 、特に血清中の P S M A の場合はあやふやな信頼性で検出した。表面強化レーザー脱着 / イオン化免疫アッセイは、P S M A 又は P S M A ' を定量するため、及びそれらの生存能力を前立腺癌用の診断 / 予後バイオマーカーとしてアドレスするために、信頼性のあるシステムを提供する。更に表面強化レーザー脱着 / イオン化免疫アッセイは、多数のバイオマーカーを迅速、かつ同時に測定するために、革新的なプラットフォームを提供する。

【0154】

B. 組み換え前立腺特異的膜抗原蛋白質

組み換え前立腺特異的膜抗原蛋白質の発生及び精製方法については、X i a o 等 , (2 0 0 0 年) “ G e n e r a t i o n o f a b a c u l o v i r u s r e c o m b i n a n t p r o s t a t e - s p e c i f i c m e m b r a n e a n t i g e n a n d i t s u s e i n t h e d e v e l o p m e n t o f a n o v e l p r o t e i n b i o c h i p q u a n t i t a t i v e i m m u n o a s s a y ” , P r o t e i n E x p r e s s i o n a n d P u r i f i c a t i o n 1 9 : 1 2 - 2 1 に詳細に説明されている。精製 r P S M A 蛋白質は、B C A 蛋白質アッセイ (P i e c e C h e m i c a l , R o c k f o r d , I L) により定量され、使用するまで - 2 0 で保存される。

【0155】

C. 患者及び血清サンプル

これらの研究で使用した血清サンプルは全て、E a s t e r n V i r g i n i a M e d i c a l の S c h o o l V i r g i n i a P r o s t a t e C e n t e r から入手し、W e s t e r n プロット法により予め P S M A の血清水準を分析するために使用した同じグループのサンプルである (B e c k e t t 等 , (1 9 9 9 年) “ P r o s t a t e - s p e c i f i c m e m b r a n e a n t i g e n (P S M A) l e v e l s i n s e r a f r o m h e a l t h y m e n a n d p a t i e n t s w i t h b e n i g n p r o s t a t e h y p e r p l a s i a o r p r o s t a

te cancer”, Clin. Cancer Res. 5: 4034 - 4040)。正常な男性グループは、陰性デジタル検査及びPSA < 4.0 ng/mlにより規定される。50才未満の正常男性の年齢範囲は、25~39才で平均は34才であるのに対し、50才を越える正常男性の年齢範囲は、51~73才で平均は60才であった。良性前立腺増殖患者は、ぼうこう出口障害の症状を有し、PSA水準が増加(> 4 ng/ml)し、また直腸横断(transrectal)超音波生検でBPHを現わした患者である。血清採集時には、これらの患者は治療を受けなかった。前立腺炎のグループは、前立腺源による慢性症状複合体を持った患者を構成し、閉塞、尿培養による感染、膿瘍、又は癌等、その他の前立腺異常はなかった。T1及びT2の治療段階の患者から前立腺癌(PCA)の血清を採集した。

10

【0156】

D. PSMAへの表面強化レーザー脱着/イオン化免疫アッセイ
表面強化レーザー脱着/イオン化Protein Chip(登録商標)技術を用いて血清中のPSMA検出及び定量に免疫アッセイを展開した。以下の改良法は、前述のXiao等,(2000年)Protein Expression and Purification 19: 12-21に基づいて行った。スポットに1µgの蛋白質Gを塗布後、バイオチップ全体をpH8.0の1Mエタノールアミン中に攪拌しながら30分間温置することにより残部の活性部位を閉鎖した。次いでこのバイオチップを0.5% Triton X-100(Sigma)のPBSで2×5分、更にPBSで2×5分洗浄した。これらのスポットにMoAb 7E11又は107-1A4(1.5µg)を加え、室温で3時間温置した。このバイオチップを0.1% Triton X-100のPBSに2×5分、更にPBSに2×5分温置することにより、未結合の抗体を洗浄した。これらのバイオチップ上に96-ウエルプロセッサを組み立て、96-ウエルプレートのフォーマット中に多数のサンプルホルダーを作った。標準曲線を得るため、30µlの希釈rPSMA(0.1% Triton X-100のPBSに0.5、1、3 ng/µl)をこれらのスポットに塗布した。図4参照。血清中のPSMAを検出するため、これらのスポットに400µlの血清サンプル(0.1% Triton X-100のPBSで1:1に希釈)を塗布した。これらのサンプルを激しく攪拌しながら4で一夜温置した。次にバイオチップは、0.1% Triton X-100のPBSで2×5分、PBSで2×5分、更に簡単にHPLC H₂Oで洗浄した。50%(v/v)アセトニトリル、0.5%(v/v)トリフルオロ酢酸及び0.05% Triton X-100中に飽和させたシナピン酸(Sigma)を母材溶液として使用し、また正規化のため内部標準(IS)としてγ-ガラクトグロブリン(分子量18,363.3Da)を添加した。これらのスポットに母材溶液(2×0.5µl)を塗布し、チップは室温で空気乾燥した。血清PSMAの検出は、レーザー強度60のPBS質量分析計(Ciphergen Biosystems, Inc., CA)を用いて行った。各スペクトルでのデータは、120のレーザースポットから平均化し、1つのサンプルにつき総計3つのスペクトルを集めた。PSMAの正規化ピーク面積比及び内標準を血清PSMA及びrPSMAの両方について計算した。図4参照。血清PSMAの水準は、血清PSMA/ISピーク面積比を標準曲線のrPSMA/IS面積比と比較することにより求めた。

20

30

40

【0157】

E. 結果

1. 血清PSMA水準の測定

血清PSMAの定量に表面強化レーザー脱着/イオン化免疫アッセイの使用可能性を試験するため、合計60のサンプルについて予備研究を行った。これらのサンプルは、正常男性24(50才未満12、50才超12)、BPH10、PCA(段階T1及びT2)10、及び前立腺炎9を含む。研究の結果を図5及び表1に纏めた。PSMAの水準は、BPHの患者及び前立腺炎の患者では低く(それぞれ平均117.1 ng/ml、平均119.9 ng/ml)、正常な男性では中間(50才未満のグループ及び50才超のグループではそれぞれ平均272.9 ng/ml、平均359.4 ng/ml)、PCAの患者

50

では高かった（平均 623.1 ng/ml ）。変動率（CV%）は、 $1.2 \sim 20.1$ の範囲、平均 10.1 を含んでいた。

統計的分析（即ち、学生の特異性検定）から、50才未満の正常男性の平均血清PSMA水準は、50才超の正常男性で得られた値と有意差がなかった（ $p = 0.16$ ）のに対し、正常グループ対PCA、正常グループ対BPH、及びBPH対PCAのいずれの平均PSMA水準を比較しても、有意差がある（それぞれ $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ ）ことが判った。更に、前立腺炎患者の血清PSMAの平均水準は、正常グループ及びPCAグループの平均水準と差があった（ $p < 0.001$ ）が、BPHグループとは差がなかった（ $p = 0.95$ ）。同様に差がある傾向は、正常、BPH及びPCAのグループ間にも先のWesternブロット分析（前述のBeckett等、（1999年）Clin. Cancer Res. 5: 4034 - 4040）で観察されたので、この予備研究は、血清中のPSMAの検出及び相対定量に表面強化レーザー脱着/イオン化免疫アッセイが特異的かつ実行可能であることを示した。

10

【0158】

【表1】

表1

	正常男性 <50	正常男性 >50	BPH	PCA	前立腺炎
サンプル数	12	12	10	17	9
範囲 (ng/ml)	106.4-576.9	159.8-611.5	35.6-193.8	349.5-946.6	73.4-168.2
平均 (ng/ml)	272.85	359.39	117.09	623.11	119.91
p値 (正常<50)*	--	0.16	<0.001	<0.001	<0.01
p値 (正常>50)**	--	--	<0.001	<0.001	<0.001
p値 (BPH)***	--	--	--	<0.001	0.95
p値 (CaP)****	--	--	--	--	<0.001

* p値：正常男性<50対その他の各グループ

** p値：正常男性>50対その他の各グループ

*** p値：BPH対その他の各グループ

**** p値：PCA対その他の各グループ

10

20

30

40

50

【0159】

2. 推定PSMAイソフォームの検出

先の研究では、LNCaP細胞溶解物中にPSMA蛋白質イソフォーム(即ち、PSMA'又はPSM')が存在することを報告したが、このイソフォームはPSMAの細胞外ドメインに特異的な抗体でのみ検出でき、7E11のような細胞間ドメインへの抗体では検出できない(Grauer等,(1998年)“Identification, purification, subcellular localization of prostate-specific membrane antigen PSM' protein in the LNCaP prostatic carcinoma cell line”, Cancer Res. 58:4787-4789)。PSMAの細

胞外ドメインを認識するMoAbであるMoAb 107-1A4を使用した。図6Aに示すように、このMoAbを使用して100kDa全長PSMAと89kDaでの余分のピークをLNCaP細胞溶解物中で観察した。この小さい方の蛋白質は、7E11では検出されなかった。89kDa蛋白質は、PSMA'イソフォームである可能性がある。しかし、PSMA'は、先にWesternブロット法により95kDaの質量と同定された(前述のGrauer等,(1998年)Cancer Res. 58:4787-4789)ので、89kDaのピークは、実際にPSMAのイソフォームであるかどうか決定するために単離したり、順番に配列する必要はない。

【0160】

PSMA表面強化レーザー脱着/イオン化免疫アッセイに最良の予備活性化チップ化学を決定するため、両蛋白質の標準曲線を得るための抗体源としてLNCaP溶解物を用いた。2つの異なる予備活性化チップ表面であるPS-1及びPS-2(Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA)をMoAb、7E11及び107を用いて比較した。図6Bに示すように、PS-1表面は、PS-2表面よりも全体に良好なPSMA蛋白質捕獲性能を持っていた。MoAb 7E11の場合、100kDaのPSMA(矢印で示す)は、LNCaP細胞溶解物の濃度に関係なく、PS-2の表面上に殆ど捕獲されなかった。これに対し、PS-1の表面上のPS-1により捕獲されたPSMAのピーク領域及び強度は、LNCaP細胞溶解物の濃度と相関し、抗原回収で特異性及び効率が向上したことが示唆された。MoAb 107を用いると、89kDa(2箇所の質量/電荷位置の低い方の矢印)及び100kDa(2箇所の質量/電荷位置の高い方の矢印)の蛋白質は、両表面で捕獲された。図示しなかったが、両蛋白質の標準曲線は、抗原供給源としてLNCaP溶解物をMoAb 107と併用して得るのに成功した。アッセイの最適化は、MoAb 107とPBS-II(Ciphergen Biosystems, Inc., CA)及び質量分析グレードSPAとの併用を含んでよい。この最適化アッセイは、血清中のPSMA及び89kDaの両方を定量し、その結果を血清PSA水準と比較するために使用される。最初の結果は、血清及び血清プラズマ中に100kDa及び89kDaの蛋白質が異なる量(データは示さない)で存在することを示す。血清プラズマ及び尿中のPSMAを定量するため別途の研究も行なう。

【0161】

3. PSMA及びPSA用複合表面強化レーザー脱着/イオン化免疫アッセイ
表面強化レーザー脱着/イオン化免疫アッセイシステムを用いて複合アッセイを発展させるのは比較的容易である。例えば図7のA~Hは、血清プラズマ中のPSMA及びPSAを検出するための複合アッセイを示す。PSA及びPSMAに対するMoAb又は2つの抗体の組合せは、蛋白質Gの結合後、予備活性化(PS-1)表面に結合した。パネルAは、PSMAに相当するピーク(99, 920.8)が抗PSA(7E11-C5.3)抗体単独を用いて同定されたことを示す。パネルBは、抗PSA抗体単独を用いた、遊離PSA(28, 430Da)の検出を示す。パネルCは、PSA及びPSMAの両方に対するMoAbを含む単一チップ配列を用いた表面強化レーザー脱着/イオン化免疫アッセイによる遊離PSA及びPSMAの両方の検出を示す。パネルDは、バイオマーカー特異的MoAbの代わりにイソ型適合対照免疫グロブリンを使用すると、遊離PSA及びPSMAが検出されなかったことを示す。特異的MoAb又は対照IgGのいずれかを用いると(パネルA~D)2重荷電免疫グロブリン(73.1~73.4kDa)が観察される。複合アッセイを用いた場合、パネルA~Dに示すPSMAについて得られた幅広のピークは、パネルE~Hに示すように、PSMA用の最適強度を選択し、更に質量軸を調節することにより、強化できることに注目されたい。この分析については、更にWright等,(1999年)“ProteinChip surface enhanced laser desorption/ionization(SELDI) mass spectrometry: a novel protein chip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures”, Pro

state Cancer and Prostatic Diseases, 2: 264 - 276 に記載される。マーカーのいかなる組合せも、例えば遊離 - 及び錯化 - P S A 並びに P S M A の同時検出 / 定量等のこれら複合免疫アッセイフォーマットに従って本質的に任意に検出される。

【 0 1 6 2 】

本発明は、前立腺癌患者及び前立腺癌を持たない正常被験者のサンプル中に示差的に存在するマーカーを用いて前立腺癌の診断を援助する新規な材料及び方法を提供する。特定の実施例を提供したが、上記説明は概略であり、限定されるものではない。先に説明した実施態様の 1 つ以上の特徴は、本発明のその他の実施態様の 1 つ以上の特徴とどのようにして組合せてもよい。更に本発明は、本明細書の検討により多数変化することは当業者ならば明白であろう。したがって本発明の範囲は、上記説明に対して決定すべきではなく、代りに付属の特許請求の範囲に対し、均等物の全範囲に沿って決定すべきである。

10

【 0 1 6 3 】

この出願で引用した全ての刊行物、特許、特許出願、又はその他の文献は、各々の刊行物、特許、特許出願、又はその他の文献をあらゆる目的のため援用するため個々に指定したのと同程度に、ここにその全体をあらゆる目的のため援用した。この文献に各種参考資料を引用しても、出願人は、特定の参考資料のいずれも本発明の“従来技術”であるとは認めない。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 表面強化レーザー脱着 / イオン化用に構成した表面強化レーザー脱着 / イオン化飛行時間質量分析システムの概略図。

20

【 図 2 】 P S M A 表面強化レーザー脱着 / イオン化質量分析免疫アッセイの概略図。

【 図 3 】 表面強化レーザー脱着 / イオン化飛行時間質量分析技術の概略説明図。

【 図 4 】 図 4 A ~ C は各々、血清中の P S M A を定量するための表面強化レーザー脱着 / イオン化質量分析免疫アッセイの説明図。

【 図 5 】 前立腺炎、前立腺癌 (P C A)、良性前立腺増殖 (B P H)、及び正常又は陰性診断のいずれかの患者から取ったサンプルについて、親和性捕獲表面強化レーザー脱着 / イオン化免疫アッセイにより測定した血清 P S M A 水準を示す図。

【 図 6 】 図 6 A、6 B は各々、ヒトの男性ホルモン依存前立腺癌細胞株 (L N C a P) からの全細胞溶解物における親和性捕獲表面強化レーザー脱着 / イオン化免疫アッセイによる P S M A イソフォームの検出を示す質量スペクトル図。

30

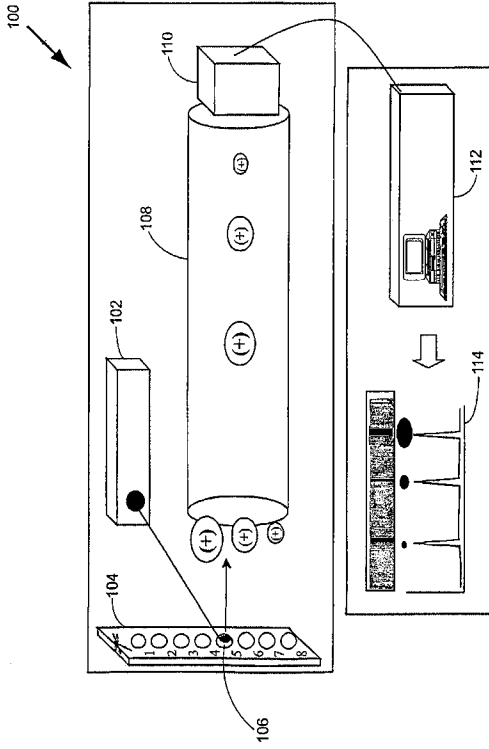
【 図 7 】 図 7 の A ~ H は各々、精液プラズマ中の P S M A 及び P S A を検出するための複合免疫アッセイの説明図。

【 符号の説明 】

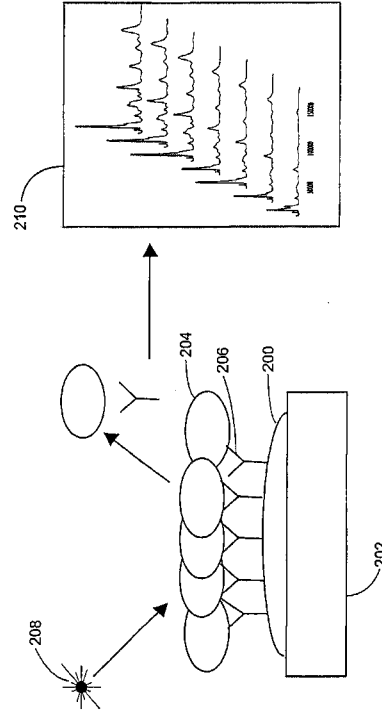
1 0 0 表面強化レーザー脱着 / イオン化 T O F - M S 総合システム
 1 0 2、2 0 8、3 1 2 レーザー光源又はイオン化源
 1 0 4、2 0 2、3 0 2 バイオチップ
 1 0 6、3 0 6 表面機構
 1 0 8 飛行管 / 質量分析計
 1 1 0 検出器
 1 1 2 データ分析ワークステーション
 1 1 4、2 1 0、3 1 4 質量スペクトル
 2 0 0 固定化蛋白質 G
 2 0 4 捕獲された P S M A
 2 0 6、3 0 4 抗体吸着剤
 3 0 0 サンプル
 3 0 8 マーカー

40

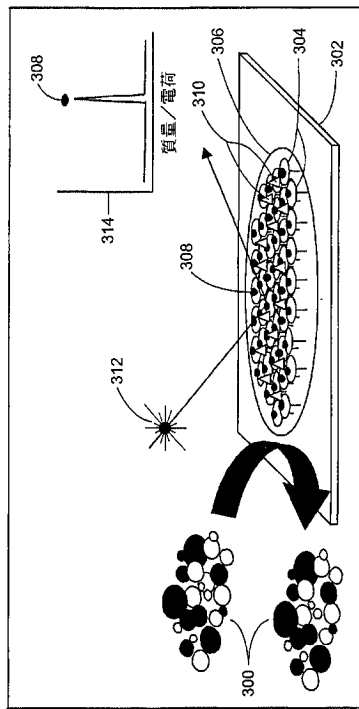
【図1】



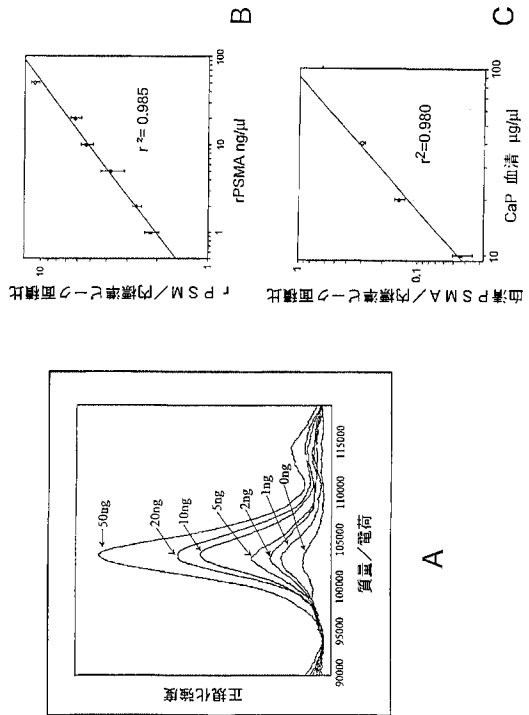
【図2】



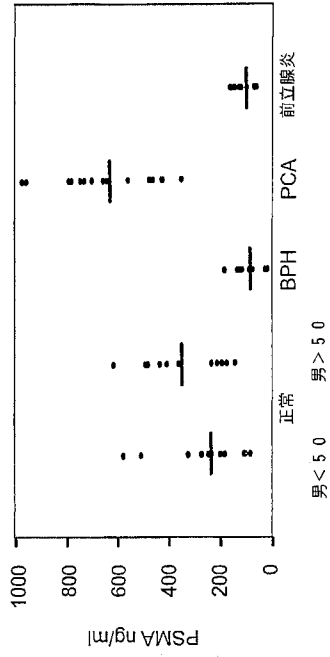
【図3】



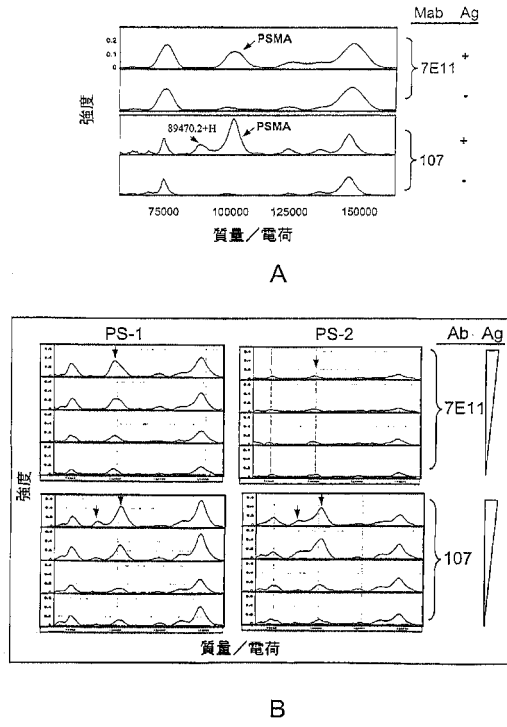
【図4】



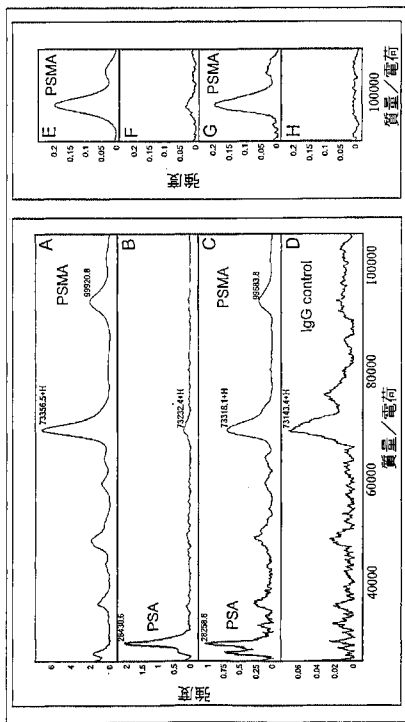
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【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
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/46448 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q
- (21) International Application Number: PCT/US01/43424
- (22) International Filing Date: 16 November 2001 (16.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/252,452 20 November 2000 (20.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL [US/US]; 700 West Olney Road, Norfolk, VA 23507 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): WRIGHT, George, L., Jr. [US/US]; 829 Moultrie Court, Virginia Beach, VA 23455 (US).
- (74) Agents: QUINE, Jonathan, Alan et al.; Quine Intellectual Property Law Group, P.C., P.O. Box 458, Alameda, CA 94501 (US).
- (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, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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 (BE, BI, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- 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 02/46448 A2

(54) Title: METHODS AND DEVICES FOR THE QUANTITATIVE DETECTION OF PROSTATE SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN AND OTHER PROSTATIC MARKERS

(57) Abstract: The invention provides for the detection and quantification of PSMA, P5MA', and other prostatic markers in serum samples as well as in other types of samples for use in differentiating prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, and negative diagnoses. The diagnostic detection of nucleic acids, such as mRNAs, which encode prostatic markers in cell lysates and other sample sources is also provided. In addition to the multiplexed detection/quantification of these protein- and nucleic acid-based markers, the invention also includes biochips, kits and integrated systems.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

5 **METHODS AND DEVICES FOR THE QUANTITATIVE DETECTION
OF PROSTATE SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN AND OTHER
PROSTATIC MARKERS**

COPYRIGHT NOTIFICATION

[0001] Pursuant to 37 C.F.R. § 1.71(e), Applicants note that a portion of
this disclosure contains material which is subject to copyright protection. The
10 copyright owner has no objection to the facsimile reproduction by anyone of the patent
document or patent disclosure, as it appears in the Patent and Trademark Office patent
file or records, but otherwise reserves all copyright rights whatsoever.

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

[0002] Pursuant to 35 U.S.C. §§ 119 and/or 120, and any other
15 applicable statute or rule, this application claims the benefit of and priority to USSN
60/252,452, filed on November 20, 2000, the disclosure of which is incorporated by
reference.

**STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER
FEDERALLY SPONSORED RESEARCH AND DEVELOPMENT**

20 [0003] This invention is supported by the National Cancer Institute
(CA85067) and the Virginia Prostate Center. The government may have certain rights
in this invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] Prostate carcinoma is the most common noncutaneous cancer in
25 men. Effective treatment options generally exist for non-metastatic forms of prostate
cancer, unlike non-organ-confined forms of the disease, especially if androgen
deprivation therapy fails (Crawford *et al.*, (1989) "A controlled trial of leuprolide with
and without flutamide in prostatic carcinoma," *N. Engl. J. Med.* 321:419-424 and Lepor
et al., (1982) "The influence of hormonal therapy on survival of men with advanced
30 prostatic cancer," *J. Urol.* 128:335-340). Early diagnosis of the disease is therefore
imperative.

[0005] Certain prostate cancer screens in current use are highly invasive
and generally lack sufficient sensitivity to yield early detection. For example, during
digital rectal examinations, physicians attempt to discover prostate gland abnormalities,

WO 02/46448

PCT/US01/43424

such as lumpy or enlarged prostate glands, by feeling the gland through the wall of the rectum. Cystoscopy is another common invasive prostate cancer diagnostic technique that also typically lacks adequate sensitivity to detect early prostatic cancers.

[0006] Less invasive prostate cancer diagnostic approaches include
5 detecting the differential presence of markers, such as the prostate specific antigen (PSA) biomarker in various body fluids. The effectiveness of a diagnostic assay generally depends upon its specificity and selectivity. Methods of increasing the percentage of true positive and true negative diagnoses for any condition are desirable
10 medical objectives. In the case of prostate cancer, the present diagnostic tests are not completely satisfactory, in that they provide significant numbers of false positive and false negative results. For example, although widely considered to be one of the best cancer markers presently available, PSA-based assays do not always correctly
15 differentiate benign (*e.g.*, benign prostate hyperplasia (BPH)) from malignant prostate disease, and can yield false negative diagnoses of some significant prostate cancers (Osterling (1991) "Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate," *J. Urol.* 145:907-923 and Pannek and Partin (1998) "The role of PSA and percent of free PSA for staging and prognosis prediction in clinically localized prostate cancer," *Sem. Urol. Oncol.* 16:100-105). In fact, evidence suggests that no single marker will be effective in improving detection,
20 diagnosis and prognosis.

[0007] The differential presence of other markers, such as the prostate specific membrane antigen (PSMA), *e.g.*, in primary and metastatic prostate carcinomas indicates that this marker, detected either alone or in combination with other markers (*e.g.*, PSA) can be utilized to diagnosis prostate cancer. PSMA is a 750-
25 amino acid, 100 kDa transmembrane glycoprotein (Israeli *et al.*, (1993) "Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen," *Cancer Res.* 53:227-30). For example, high PSMA expression has been detected in prostate tissues, with weaker expression detected in, *e.g.*, the brain, salivary glands, small intestine, and circulating tumor cells via, *e.g.*, immunohistochemistry, Western blotting, and RT-PCR. *See, e.g.*, Israeli *et al.*, (1994) "Expression of the prostate-specific membrane antigen," *Cancer Res.* 54:1807-1811, Israeli *et al.*, (1994) "Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and
30

WO 02/46448

PCT/US01/43424

prostate specific antigen-based assays," *Cancer Res.* 54:6306-6310, and Wright *et al.*, (1995) "Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign and malignant prostate tissues," *Urologic Oncology* 1:18-28. PSMA has also been detected in various samples using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). See, 5 Sokoloff *et al.*, (2000) "A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine," *Prostate* 43:150-157. Furthermore, a truncated species of PSMA, namely, PSMA', which lacks the N-terminal sequence or membrane spanning region has also been identified (Su *et al.*, (1995) "Alternatively spliced variants or prostate-specific membrane antigen RNA: 10 ratio of expression as a potential measurement or progression" *Cancer Res.* 55:1441-1443). However, none of these techniques have been successfully used to reliably quantify PSMA or PSMA' in serum, or to define a clear correlation between PSMA or PSMA' levels and prostate cancer or BPH.

[0008] Efforts to determine the clinical utility of PSMA and PSMA' as 15 diagnostic or prognostic biomarkers have been hampered by the lack of a sensitive immunoassay for quantification of PSMA and PSMA' in body fluids. The present invention offers a reliable system to quantify PSMA and/or PSMA' proteins or encoding nucleic acids and to address their potential as a diagnostic/prognostic marker for prostate cancer and BPH. The invention further provides an innovative platform to 20 rapidly and simultaneously detect and measure other markers in addition to PSMA and/or PSMA'. These and other features will become apparent upon complete review of the following disclosure.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] Proteins, such as PSMA and PSMA', and/or nucleic acids 25 encoding those proteins (*e.g.*, mRNAs) have been discovered to function as markers in prostate cancer (CaP) or benign prostate hyperplasia versus a negative diagnosis. Compared to a negative diagnosis, the markers are, variously, more frequently detected, less frequently detected, or differentially detected. The measurement of these markers, alone or in combination, in patient samples, provides information that the diagnostician 30 can correlate with probable diagnoses of prostate cancer, benign prostate hyperplasia or with a negative diagnosis (*e.g.*, normal or disease-free). More specifically, an amount of PSMA/PSMA' above the normal range is positively correlated with a diagnosis of prostate cancer, and an amount of PSMA/PSMA' below the normal range is positively

WO 02/46448

PCT/US01/43424

correlated with benign prostate hyperplasia or prostatitis. The markers are characterized by molecular weight and can be resolved from other sample components, such as other proteins by, *e.g.*, chromatographic separation coupled with mass spectrometry. In preferred embodiments, the method of resolution involves Surface
5 Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI) mass spectrometry, in which the surface of the mass spectrometry probe plays an active role in the presentation of the analyte to an energy source for desorption and ionization of the analyte. Affinity capture surface enhanced LDI-based immunoassays provide significant advantages to the development of clinical diagnostic assays, including the capacity to quantify
10 PSMA, PSMA', other protein-based prostatic markers in addition to associated nucleic acids, and the ability to simultaneously detect and measure multiple PSMA isoforms and other prostatic markers.

[0010] In one aspect, the present invention provides a method for quantifying PSMA or PSMA' in a sample. The method includes fractionating a test
15 sample and isolating a sample comprising PSMA/PSMA' and detecting the PSMA/PSMA' from the sample using gas phase ion spectrometry. In one embodiment, the method comprises (a) exposing the sample to a substrate-bound adsorbent that captures the PSMA or PSMA' in the sample, and (b) quantifying the captured PSMA or PSMA' by gas phase ion spectrometry. Although many different types of samples are
20 optionally used, preferred samples include serum and cell lysate (*e.g.*, derived from prostatic tissue or cells).

[0011] In one embodiment, the method further includes fractionating biomolecules in the sample to collect a sample fraction that includes the PSMA or PSMA' in which the sample fraction is used as the sample in (a). For example, the
25 biomolecules are optionally fractionated by, *e.g.*, electrophoresis, dialysis, filtration, centrifugation, or the like. In other embodiments, the biomolecules are fractionated by, *e.g.*, high performance liquid chromatography, affinity chromatography, ion exchange chromatography, size exclusion chromatography, or the like. In another embodiment, the biomolecules are fractionated by (i) separating biomolecules in the sample into a
30 one- or two-dimensional array of spots, wherein each spot comprises one or more of the biomolecules, and (ii) selecting and removing a spot from the array which is suspected of comprising the PSMA or PSMA'. Optionally, the method additionally includes digesting the biomolecules in the selected spot with an enzyme prior to analyzing the

WO 02/46448

PCT/US01/43424

selected spot by the gas phase ion spectrometry. Moreover, the method typically includes comparing an amount of detected or quantified PSMA or PSMA' with a control.

[0012] The method for quantifying PSMA or PSMA' also includes other sample preparation or pre-fractionation techniques. For example, (a) optionally further includes removing material other than the captured PSMA or PSMA', *e.g.*, prior to exposing the sample to the adsorbent. In this embodiment, the material is typically removed by one or more washes in which each of the washes includes an identical or a different elution condition relative to a preceding wash. For example, elution conditions generally differ according to pH, buffering capacity, ionic strength, a water structure characteristic, detergent type, detergent strength, hydrophobicity, dielectric constant, concentration of a solute, or the like.

[0013] The invention utilizes various types of substrate-bound adsorbents to capture targeted prostatic markers, such as PSMA or PSMA'. Optionally, the substrate-bound adsorbent is provided as a biochip that includes a substrate with at least one surface feature having the substrate-bound adsorbent bound to the substrate. In certain embodiments, the substrate-bound adsorbent includes a monoclonal antibody that specifically captures the PSMA or PSMA'. In other embodiments, the substrate-bound adsorbent includes a protein that specifically binds an immunoglobulin. In these embodiments, the method includes exposing the sample to the immunoglobulin in which the immunoglobulin specifically binds PSMA or PSMA' to form a PSMA- or PSMA'-complex, and exposing the complex to the substrate-bound adsorbent. Alternatively, the substrate-bound adsorbent includes a bead or resin derivatized with the adsorbent.

[0014] In certain embodiments, the method includes quantifying both the PSMA and the PSMA' in the sample. When both PSMA and PSMA' are quantified in a sample, the method also typically includes comparing amounts of quantified PSMA and PSMA' with one another or with a control. Optionally, the method includes comparing a ratio of amounts of quantified PSMA and PSMA' with a control.

[0015] In other embodiments, the method additionally includes quantifying at least one other prostatic marker in the sample in which (a) also includes exposing the sample to at least one substrate-bound adsorbent that captures the other prostatic marker. Optionally, the substrate-bound adsorbent is provided as a biochip

WO 02/46448

PCT/US01/43424

that includes a substrate with at least one surface feature including the substrate-bound adsorbent bound to the substrate and in which prostatic markers are captured on the at least one surface feature. In other embodiments, the substrate-bound adsorbent includes a protein that specifically binds immunoglobulins. In these embodiments, the method includes exposing the sample to the immunoglobulins, each of which specifically binds one of the prostatic biomarkers to form complexes with the prostatic markers, and exposing the complexes to the substrate-bound adsorbent. The other prostatic marker typically includes, *e.g.*, PSMA, PSMA', prostate-specific antigen (PSA), free-PSA, complexed-PSA, prostatic acid phosphatase (PAP), prostate specific peptide 94 (PSP94), prostate stem cell antigen (PSCA), or the like. In this embodiment, the method also generally includes comparing amounts of quantified PSMA or PSMA' and the other prostatic marker with one another or with a control. Alternatively, the method further includes comparing a ratio of amounts of quantified PSMA or PSMA' and the other prostatic marker with a control.

[0016] In preferred embodiments, the gas phase ion spectrometry is laser desorption/ionization mass spectrometry, *e.g.*, surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. For example, the method typically includes (i) generating data on the sample with a mass spectrometer indicating intensity of signal for one or more mass/charge ratios, (ii) transforming the data into computer-readable form, and (iii) operating a programmable digital computer and executing an algorithm that detects signal in the computer-readable data representing the PSMA or PSMA'.

[0017] In one embodiment, the laser desorption/ionization mass spectrometry includes (i) providing a probe adapted for use with a mass spectrometer comprising an adsorbent attached thereto, (ii) contacting the sample with the adsorbent, and (iii) desorbing and ionizing the PSMA or PSMA' from the probe and detecting the desorbed/ionized PSMA or PSMA' with the mass spectrometer. Optionally, the substrate includes a probe adapted for use with the mass spectrometer, or the substrate is suitable for being placed on a probe which is adapted for use with the mass spectrometer.

[0018] In another embodiment, the laser desorption/ionization mass spectrometry includes (i) providing a substrate comprising an adsorbent attached thereto, (ii) contacting the sample with the adsorbent, (iii) placing the substrate on a probe adapted for use with a mass spectrometer comprising an adsorbent attached

WO 02/46448

PCT/US01/43424

thereto, and (iv) desorbing and ionizing the PSMA or PSMA' from the probe and detecting the desorbed/ionized PSMA or PSMA' with the mass spectrometer. For example, the substrate typically includes a bead or resin derivatized with the adsorbent.

[0019] The present invention also relates to a method for aiding in a
5 diagnosis of prostate cancer or benign prostate hyperplasia. The method includes (a) detecting PSMA or PSMA' in a sample from a subject, and (b) correlating the detected PSMA or PSMA' with a probable diagnosis of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, or a negative diagnosis. The correlation generally takes into account a presence or absence of the PSMA or PSMA' in the sample and a frequency of PSMA
10 or PSMA' detection in a control. In addition, the correlation also typically takes into account a quantity of the PSMA or PSMA' in the sample relative to a control quantity of the PSMA or PSMA'. For example, an amount of PSMA or PSMA' above a control amount is positively correlated with a positive diagnosis of prostate cancer and an amount of PSMA or PSMA' below a control amount is positively correlated with a
15 positive diagnosis of benign prostate hyperplasia. In other embodiments, an immunoassay is used for detecting the PSMA or PSMA' in the sample.

[0020] In certain embodiments, the method includes detecting the PSMA or PSMA' by gas phase ion spectrometry. In preferred embodiments, the gas phase ion spectrometry is laser desorption/ionization mass spectrometry, *e.g.*, surface
20 enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. The method typically includes (i) generating data on the sample with a mass spectrometer indicating intensity of signal for one or more mass/charge ratios, (ii) transforming the data into computer-readable form, and (iii) operating a programmable digital computer and executing an algorithm that determines closeness-of-fit between the computer-readable data and data
25 indicating a diagnosis of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, or a negative diagnosis. The algorithm optionally includes an artificial intelligence algorithm or a heuristic learning algorithm. For example, the artificial intelligence algorithm typically includes a fuzzy logic instruction set, a cluster analysis instruction set, a neural network, a genetic algorithm, or the like.

[0021] In one aspect, the laser desorption/ionization mass spectrometry
30 includes (i) providing a substrate comprising at least one adsorbent attached thereto, (ii) contacting the sample with the adsorbent, and (iii) desorbing and ionizing the PSMA or PSMA' from the substrate and detecting the desorbed/ionized PSMA or PSMA' with

WO 02/46448

PCT/US01/43424

the mass spectrometer. In one embodiment, the substrate is a probe adapted for use with the mass spectrometer. In another embodiment, the substrate is suitable for being placed on a probe which is adapted for use with the mass spectrometer, *e.g.*, a bead or resin derivatized with the adsorbent. Various chromatographic or biomolecular interaction adsorbents are optionally utilized.

5 [0022] In one embodiment, the method includes detecting and correlating both the PSMA and the PSMA' in the sample. A detected presence of the PSMA and the PSMA' is typically correlated with, *e.g.*, a positive diagnosis of prostate cancer or benign prostate hyperplasia. In another embodiment, the correlation takes
10 into account a presence or absence of the PSMA and the PSMA' in the sample and a frequency of PSMA and PSMA' detection in a control. In this embodiment, the correlation generally also takes into account quantities of the PSMA and the PSMA', or a ratio thereof, in the sample relative control quantities of the PSMA and the PSMA', or a ratio thereof.

15 [0023] In another embodiment, the method includes detecting and correlating at least one other prostatic marker in the sample. The other prostatic marker typically includes, *e.g.*, PSMA, PSMA', PSA, free-PSA, complexed-PSA, PAP, PSP94, PSCA, or the like. For example, a detected presence of the PSMA or PSMA' and the other prostatic marker is typically correlated with, *e.g.*, a positive diagnosis of prostate
20 cancer or benign prostate hyperplasia. In one aspect, the correlation takes into account a presence or absence of the PSMA or PSMA' and the other prostatic marker in the sample and a frequency of detection of the PSMA or PSMA' and the other prostatic marker in a control. The correlation also optionally takes into account quantities or ratios of quantities of the PSMA or PSMA' and the other prostatic marker in the sample
25 relative to control quantities or ratios of quantities of the PSMA or PSMA' and the other prostatic marker.

[0024] The present invention also provides a biochip that is removably insertable into a gas phase ion spectrometer that includes a substrate with at least one surface feature having at least one adsorbent bound to the substrate in which the
30 adsorbent is capable of capturing PSMA or PSMA'. The adsorbent is typically capable of resolving PSMA or PSMA' from a sample under at least one elution condition. Various chromatographic or biomolecular interaction adsorbents are optionally utilized. In one embodiment, the at least one surface feature of the biochip includes a plurality of

WO 02/46448

PCT/US01/43424

surface features. For example, the plurality of surface features is arranged in a line, an orthogonal array, a circle, or an n-sided polygon, wherein n is three or greater. The plurality of surface features typically includes a logical or spatial array. Optionally, each of the plurality of surface features comprises identical or different adsorbents, or one or more combinations thereof. For example, at least two of the plurality of surface features optionally include identical or different adsorbents, or one or more combinations thereof. In certain embodiments, the biochip further includes at least one other adsorbent in addition to the adsorbent capable of capturing PSMA or PSMA' in which the other adsorbent is bound to the substrate at one or more of the plurality of surface features. The other adsorbent is typically capable of capturing at least one other prostatic marker, such as PSMA, PSMA', PSA, free-PSA, complexed-PSA, PAP, PSP94, PSCA, or the like.

[0025] The invention also provides a kit that includes (a) at least one adsorbent that captures PSMA or PSMA', (b) a set of instructions for capturing PSMA or PSMA' from a sample by exposing the sample to the adsorbent and quantifying the captured PSMA or PSMA' by gas phase ion spectrometry, and (c) at least one container for packaging the adsorbent and the set of instructions. Optionally, the kit also includes at least one eluant for washing the adsorbent to remove material other than the captured PSMA or PSMA'. The adsorbent typically includes a solid phase adsorbent. In one embodiment, the solid phase adsorbent is provided as a biochip that includes a substrate with at least one surface feature having the solid phase adsorbent bound to the substrate. The substrate is generally a probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer. The kit optionally includes the probe. In certain embodiments, the probe includes a substrate with a plurality of surface features. For example, each of the plurality of surface features optionally includes one or more adsorbents bound to the substrate. In other embodiments, the solid phase adsorbent includes a bead or resin derivatized with the adsorbent. For example, the bead or resin derivatized with the at least one adsorbent is typically suitable for being placed on a probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer. The kit also optionally includes the probe. As an additional option, the kit also includes at least one reference or control.

[0026] The present invention also relates to a device or integrated system for quantifying PSMA or PSMA' in at least one sample that includes (a) at least one adsorbent capable of capturing the PSMA or PSMA' in the sample, and (b) a gas

WO 02/46448

PCT/US01/43424

phase ion spectrometer for quantifying the PSMA or PSMA' captured on the adsorbent. The gas phase ion spectrometer is optionally a laser desorption/ionization mass spectrometer. The device or integrated system also typically includes a computer or a computer readable medium, operably connected to the gas phase ion spectrometer, that
5 includes a computer program having one or more of, *e.g.*, (i) at least one instruction set for analyzing or processing data quantified by the gas phase ion spectrometer, (ii) at least one instruction set for entering data into a database, or, (iii) at least one instruction set for determining correlations between at least one quantified prostatic marker, or combinations of quantified prostatic markers, and a diagnosis of prostate cancer, benign
10 prostate hyperplasia, or a negative diagnosis.

[0027] The present invention also provides a method for quantifying prostatic marker mRNA in a sample. The method includes (a) exposing the sample to at least one adsorbent that captures the prostatic marker mRNA to capture the prostatic marker mRNA in the sample, and (b) quantifying the captured prostatic marker mRNA
15 by gas phase ion spectrometry. The sample includes, *e.g.*, cell lysate derived from prostatic tissue or cells, while the adsorbent (*e.g.*, a biomolecular interaction adsorbent) generally includes, *e.g.*, prostatic marker cDNA that corresponds to the prostatic marker mRNA. In preferred embodiments, the gas phase ion spectrometry is laser desorption/ionization mass spectrometry. Additionally, the method also typically
20 includes comparing a quantity of the captured prostatic marker mRNA with a control. Optionally, the method includes quantifying a plurality of different prostatic marker mRNAs.

[0028] The invention also relates to an additional method, biochip, and kit relating to the detection and quantification of prostatic marker mRNAs. For
25 example, the method for aiding in a diagnosis of prostate cancer or benign prostate hyperplasia includes (a) detecting at least one prostatic marker mRNA in a sample from a subject, and (b) correlating the at least one detected prostatic marker mRNA with a probable diagnosis of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, or a negative diagnosis. The biochip includes a substrate with at least one surface feature comprising
30 at least one adsorbent bound to the substrate in which the adsorbent is capable of capturing one or more prostatic marker mRNAs. The kit includes (a) at least one adsorbent that captures a prostatic marker mRNA, (b) a set of instructions for capturing the prostatic marker mRNA from a sample by exposing the sample to the adsorbent and

WO 02/46448

PCT/US01/43424

quantifying the captured prostatic marker mRNA by gas phase ion spectrometry, and
(c) at least one container for packaging the adsorbent and the set of instructions.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- [0029] Figure 1 schematically depicts a surface enhanced laser
5 desorption/ionization time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) system configured
for surface enhanced laser desorption/ionization.
- [0030] Figure 2 schematically shows a PSMA surface enhanced laser
desorption/ionization MS immunoassay.
- [0031] Figure 3 schematically illustrates the surface enhanced laser
10 desorption/ionization-TOF-MS technology.
- [0032] Figures 4A-C show a surface enhanced laser
desorption/ionization MS immunoassay for quantification of PSMA in serum.
Different concentrations of rPSMA or serum were applied to preactivated PS-1
ProteinChip® arrays containing bound MoAb 7E11, and the chips were washed and
15 subjected to surface enhanced laser desorption/ionization mass analysis. Figure 4A
show the spectra of the different rPSMA concentrations (at 1-50ng/μl) showing that the
increases in both intensity and peak areas correlated with increasing protein
concentrations. Figure 4B shows an rPSMA standard curve. Recombinant PSMA
signal intensity of each spectrum shown in Figure 4A was normalized to the internal
20 standard (β-galactoglobulin, 25 fmol/μl). A linear curve was generated by plotting the
peak ratio (rPSMA/internal standard) versus rPSMA protein concentration. The mean
and standard deviation of three separate mass spectra are shown. Figure 4C shows
PSMA detected in a serum sample from a patient diagnosed with prostate cancer
(PCA). The analysis was the same as used for generating the rPSMA standard curve,
25 except that 100 fmol/μl β-galactoglobulin was spiked as the internal standard for
normalization. Doubling dilutions (i.e., 10, 20, and 40 μg/μl) of total serum proteins
show a linear regression. The mean and standard deviation of three separate mass
spectra are shown.
- [0033] Figure 5 is a chart showing the levels of serum PSMA
30 determined by affinity capture surface enhanced laser desorption/ionization
immunoassay in samples taken from patients with each of prostatitis, prostate cancer
(PCA), benign prostate hyperplasia (BPH), and a normal or negative diagnosis. The
patients with negative diagnoses are further divided into two age-based sub-populations

WO 02/46448

PCT/US01/43424

of males less than age 50 (<50) and males greater than age 50 (>50). The bar shown for each patient population indicates the mean PSMA level for that population.

[0034] Figures 6A and B are mass spectral traces showing the detection of PSMA isoforms by affinity capture surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay in whole cell lysate from the human androgen-dependent prostate carcinoma cell line (LNCaP). Figure 6A shows the spectra obtained using 7E11 or 107 antibodies to capture PSMA in LNCaP whole cell lysate (Ag) +: LNCaP whole cell lysate added; -: dilution buffer only (0.1% Triton X-100 in PBS). Figure 6B shows a comparison of the standard curves of PSMA isoforms on PS-1 and PS-2 surfaces. The wedges indicate the relative amount of LNCaP whole cell lysate used (from 6 ng/ μ l, 12 ng/ μ l, 25 ng/ μ l to 50 ng/ μ l). The arrows at the higher mass/charge ratios show the 100kD PSMA isoform, while the arrows at the low mass/charge ratios show the 89kD PSMA' isoform.

[0035] Figures 7A-H show a multiplex immunoassay for detection of PSMA and PSA in seminal plasma.

DEFINITIONS

[0036] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the meaning commonly understood by a person skilled in the art to which this invention belongs. The following references provide one of skill with a general definition of many of the terms used in this invention: Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (2nd ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *The Glossary of Genetics*, 5th Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). As used herein, the following terms have the meanings ascribed to them unless specified otherwise.

[0037] "Prostate cancer" refers to an uncontrolled (malignant) growth of cells in the male prostate gland. The prostate gland surrounds the urethra at the base of the urinary bladder and is responsible for helping to control urination as well as forming some of the components of seminal fluid. Prostate cancers are typically classified or staged based on their aggressiveness and the degree that they are differentiated from the surrounding prostate tissue. There are several different ways to stage tumors, including the Whitmore-Jewett system, the T classification and the Gleason score. See, e.g., Zagars *et al.*, (1994) "The T classification of clinically

WO 02/46448

PCT/US01/43424

localized prostate cancer. An appraisal based on disease outcome after radiation therapy," *Cancer* 73(7):1904-1912. To illustrate, according to the Whitmore-Jewett system, prostate cancers are staged using an A-B-C-D staging system. This staging system contains several substages, but it basically categorizes tumors using the following scale: (A) tumor not palpable but is detectable in microscopic biopsy, (B) palpable tumor confined to prostate, (C) extension of tumor beyond prostate with no distant metastasis, and (D) cancer has spread to regional lymph nodes. Prostate cancers typically spread by extending into the seminal vesicles, bladder, and peritoneal cavity and metastasize to the lymph nodes, bones, lungs, liver, and kidneys. Treatment options for prostate cancer generally include radiation therapy, surgery, hormonal therapy and chemotherapy

[0038] "Benign prostate hyperplasia" or "BPH" refers to a nonmalignant (noncancerous) enlargement of the prostate gland. It is also known as benign prostatic hypertrophy and as nodular hyperplasia of the prostate. In BPH the normal elements of the prostate gland grow in size and number. Their sheer bulk may compress the urethra and impede the flow of urine from the bladder. This leads to urine retention and the need for frequent urination. In severe cases, complete blockage can occur. Medical therapy of BPH includes drugs such as finasteride and terazosin. Prostate enlargement in BPH is directly dependent on dihydrotestosterone (DHT), the principal androgen hormone in the prostate. Finasteride (PROSCAR®) blocks the enzyme needed to make DHT and so lowers blood and tissue DHT levels and helps reduce the size of the prostate. Terazosin (HYTRIN®) belongs to a class of medications called alpha 1 blockers which relaxes the smooth muscles of the arteries, the prostate, and the bladder neck. Relaxing the smooth muscles around the bladder neck helps to relieve urinary obstruction caused by an enlarged prostate in BPH.

[0039] "Serum" or "blood serum" refers to the watery portion of a bodily fluid (*e.g.*, from blood) that remains after coagulation. For example, it is typically a clear yellowish fluid that remains from blood plasma after fibrinogen, prothrombin, and other clotting factors have been removed by, *e.g.*, clot formation.

[0040] "Marker" or "biomarker" in the context of the present invention refers to an organic biomolecule, *e.g.*, a polypeptide or a nucleic acid (*e.g.*, an mRNA or the like) which is differentially present in a sample taken from patients having prostate cancer or benign prostate hyperplasia as compared to a comparable sample

WO 02/46448

PCT/US01/43424

taken from control subjects, such as persons with negative diagnoses or undetectable cancer (*e.g.*, normal or healthy subjects). For example, a marker can be a polypeptide or a nucleic acid (*e.g.*, having a particular apparent molecular weight) which is present at an elevated or decreased level in samples of prostate cancer patients compared to samples of patients with negative diagnoses.

[0041] The phrase "differentially present" refers to differences in the quantity and/or the frequency of a marker, *e.g.*, a polypeptide or a nucleic acid (*e.g.*, of a particular apparent molecular weight), present in a sample taken from a patient having prostate cancer as compared to a comparable sample taken from a patient that does not have prostate cancer (*e.g.*, has benign prostate hyperplasia or a negative diagnosis). For example, a marker can be a polypeptide or a nucleic acid (*e.g.*, an mRNA or the like), which is present at an elevated level or at a decreased level in samples from prostate cancer or BPH patients compared to samples from control subjects. Alternatively, a marker can be a polypeptide or a nucleic acid that is detected at a higher frequency or at a lower frequency in samples from prostate cancer or BPH patients compared to samples from control subjects. A marker can be differentially present in terms of quantity, frequency or both.

[0042] A biomarker, *e.g.*, a polypeptide or nucleic acid is differentially present between two samples (*e.g.*, two sets of samples) if the frequency of detecting the polypeptide or the nucleic acid in one sample is statistically significantly different (higher or lower) than the frequency of detection of the polypeptide or the nucleic acid in the other sample (or other set of samples) and/or a control sample. For example, two sets of data can be compared using student's t-test, and $P < 0.05$ can be considered statistically significant. In another example, a polypeptide or a nucleic acid is differentially present between the two sets of samples if it is detected at least about 120%, at least about 130%, at least about 150%, at least about 180%, at least about 200%, at least about 300%, at least about 500%, at least about 700%, at least about 900%, or at least about 1000% more frequently, or less frequently, in one set of samples than the other set of samples.

[0043] Alternatively or additionally, a polypeptide or nucleic acid is differentially present between the two samples if the amount of the polypeptide or nucleic acid in one sample is statistically significantly different from the amount of the polypeptide or nucleic acid in the other sample. For example, a polypeptide or nucleic

WO 02/46448

PCT/US01/43424

acid is differentially present between the two samples if it is present at least about 120%, at least about 130%, at least about 150%, at least about 180%, at least about 200%, at least about 300%, at least about 500%, at least about 700%, at least about 900%, or at least about 1000% greater than it is present in the other sample, or if it is
5 detectable in one sample and not detectable in the other. Any polypeptides or nucleic acids that are differentially present in samples taken from prostate cancer patients as compared to subjects who do not have prostate cancer (*e.g.*, benign prostate hyperplasia patients) can be used as markers.

[0044] "Diagnostic" means identifying the presence or nature of a
10 pathologic condition. Diagnostic methods differ in their sensitivity and specificity. The "sensitivity" of a diagnostic assay is the percentage of diseased individuals who test positive (percent of "true positives"). Diseased individuals not detected by the assay are "false negatives." Subjects who are not diseased and who test negative in the
15 assay, are termed "true negatives." The "specificity" of a diagnostic assay is 1 minus the false positive rate, where the "false positive" rate is defined as the proportion of those without the disease who test positive. While a particular diagnostic method may not provide a definitive diagnosis of a condition, it suffices if the method provides a positive indication that aids in diagnosis.

[0045] A "test amount" of a marker refers to an amount of a marker
20 present in a sample being tested. A test amount can be either in absolute amount (*e.g.*, $\mu\text{g/ml}$) or a relative amount (*e.g.*, relative intensity of signals).

[0046] A "diagnostic amount" of a marker refers to an amount of a
marker in a subject's sample that is consistent with a diagnosis of prostate cancer or
benign prostate hyperplasia. A diagnostic amount can be either in absolute amount
25 (*e.g.*, $\mu\text{g/ml}$) or a relative amount (*e.g.*, relative intensity of signals).

[0047] A "control amount" of a marker can be any amount or a range of
amount which is to be compared against a test amount of a marker. For example, a
control amount of a marker can be the amount of a marker (*e.g.*, PSMA, PSMA',
PSMA mRNA, or the like) in a prostate cancer patient, a BPH patient or a person
30 without prostate cancer or BPH. A control amount can be either in absolute amount
(*e.g.*, $\mu\text{g/ml}$) or a relative amount (*e.g.*, relative intensity of signals).

[0048] "Probe" refers to a device that is removably insertable into a gas
phase ion spectrometer and comprises a substrate having a surface, or one or more

WO 02/46448

PCT/US01/43424

surface features, for presenting markers for detection. A probe can comprise a single substrate or a plurality of substrates. Terms such as ProteinChip® array, biochip, or chip are also used herein to refer to specific kinds of probes.

[0049] "Substrate" or "probe substrate" refers to a solid phase onto which an adsorbent can be provided (*e.g.*, by attachment, deposition, or the like). "Surface feature" refers to a particular portion, section, or area of a substrate or probe substrate onto which adsorbent can be provided.

[0050] "Adsorbent" refers to any material capable of adsorbing a marker. The term "adsorbent" is used herein to refer both to a single material ("monoplex adsorbent") (*e.g.*, a compound or functional group) to which the marker is exposed, and to a plurality of different materials ("multiplex adsorbent") to which the marker is exposed. The adsorbent materials in a multiplex adsorbent are referred to as "adsorbent species." For example, a surface feature on a probe substrate can comprise a multiplex adsorbent characterized by many different adsorbent species (*e.g.*, ion exchange materials, metal chelators, antibodies, cDNAs, or the like), having different binding characteristics. Substrate material itself can also contribute to adsorbing a marker and may be considered part of an "adsorbent." A "biomolecular interaction adsorbent" or "biospecific adsorbent," such as an affinity adsorbent, a polypeptide, an enzyme, a prostatic marker substrate, a receptor, an antibody (*e.g.*, a monoclonal antibody, *etc.*), or the like, typically has higher specificity for a target marker than a "chromatographic adsorbent," which includes, *e.g.*, an anionic adsorbent, a cationic adsorbent, a hydrophobic interaction adsorbent, a hydrophilic interaction adsorbent, a metal-chelating adsorbent, or the like.

[0051] "Adsorption," "capture" or "retention" refers to the detectable binding between an adsorbent and a marker either before or after washing with an eluant (selectivity threshold modifier) or a washing solution.

[0052] "Eluant" or "washing solution" refers to an agent that can be used to mediate adsorption of a marker to an adsorbent. Eluants and washing solutions also are referred to as "selectivity threshold modifiers." Eluants and washing solutions can be used to wash and remove unbound materials from the probe substrate surface.

[0053] "Resolve," "resolution," or "resolution of marker" refers to the detection of at least one marker in a sample. Resolution includes the detection of a plurality of markers in a sample by separation and subsequent differential detection.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

Resolution does not require the complete separation of a marker from all other markers in a mixture. Rather, any separation that allows the distinction between at least two markers suffices.

5 [0054] "Gas phase ion spectrometer" refers to an apparatus that measures a parameter which can be translated into mass-to-charge ratios of ions formed when a sample is volatilized and ionized. Generally ions of interest bear a single charge, and mass-to-charge ratios are often simply referred to as mass. Gas phase ion spectrometers include, for example, mass spectrometers, ion mobility spectrometers, and total ion current measuring devices.

10 [0055] "Mass spectrometer" refers to a gas phase ion spectrometer that includes an inlet system, an ionization source, an ion optic assembly, a mass analyzer, and a detector.

[0056] "Laser desorption mass spectrometer" refers to a mass spectrometer which uses laser as a means to desorb, volatilize, and ionize an analyte.

15 [0057] "Detect" refers to identifying the presence, absence or amount of the object to be detected.

[0058] The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residues are analogs, derivatives or mimetics of corresponding naturally occurring amino acids, as well as to naturally occurring amino acid polymers. For example, polypeptides can be modified or derivatized, *e.g.*, by the addition of carbohydrate residues to form glycoproteins. The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" include glycoproteins, as well as non-glycoproteins.

25 [0059] "Derivative" refers to a chemical substance related structurally to another substance, or a chemical substance that can be made from another substance (*i.e.*, the substance it is derived from), *e.g.*, through chemical or enzymatic modification.

[0060] The term "nucleic acid" refers to DNA (*e.g.*, cDNA or the like) and RNA (*e.g.*, mRNA or the like), which are polymers or oligomers of deoxyribonucleotides and ribonucleotides (or derivatives thereof), respectively. Two nucleic acid sequences "correspond" when they have the same sequence, or when one nucleic acid sequence is a complementary to at least a subsequence of the other. For

WO 02/46448

PCT/US01/43424

example, the cDNA produced by, *e.g.*, RT-PCR of the mRNA encoding PSMA, corresponds to that mRNA.

[0061] A "prostatic marker cDNA" refers to cDNA that corresponds to an mRNA encoding a prostatic marker, such as PSMA, PSMA', PSA, prostatic acid phosphatase (PAP), prostate specific peptide 94 (PSP94), prostate stem cell antigen (PSCA), or the like. Prostatic marker cDNAs are typically used in the present invention as adsorbents for the detection/quantification of corresponding mRNAs from selected sample sources via gas phase ion spectrometry (*e.g.*, surface enhanced laser desorption/ionization). Prostatic marker cDNAs are typically generated using RT-PCR or the like.

[0062] "Detectable moiety" or a "label" refers to a composition detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, or chemical means. For example, useful labels include ^{32}P , ^{35}S , fluorescent dyes, electron-dense reagents, enzymes (*e.g.*, as commonly used in an ELISA), biotin-streptavidin, dioxigenin, haptens and proteins for which antisera or monoclonal antibodies are available, or nucleic acid molecules with a sequence complementary to a target. The detectable moiety often generates a measurable or detectable signal, such as a radioactive, chromogenic, or fluorescent signal, that can be used to quantify the amount of bound detectable moiety in a sample. The detectable moiety can be incorporated in or attached to a primer or probe either covalently, or through ionic, van der Waals or hydrogen bonds, *e.g.*, incorporation of radioactive nucleotides, or biotinylated nucleotides that are recognized by streptavidin. The detectable moiety may be directly or indirectly detectable. Indirect detection can involve the binding of a second directly or indirectly detectable moiety to the detectable moiety. For example, the detectable moiety can be the ligand of a binding partner, such as biotin, which is a binding partner for streptavidin, or a nucleotide sequence, which is the binding partner for a complementary sequence, to which it can specifically hybridize. The binding partner may itself be directly detectable, for example, an antibody may be itself labeled with a fluorescent molecule. The binding partner also may be indirectly detectable, for example, a nucleic acid having a complementary nucleotide sequence can be a part of a branched DNA molecule that is in turn detectable through hybridization with other labeled nucleic acid molecules. (*See, e.g.*, P. D. Fahrlander and A. Klausner,

WO 02/46448

PCT/US01/43424

BioTechnology 6:1165 (1988)). Quantification of the signal is achieved by, *e.g.*, scintillation counting, densitometry, or flow cytometry.

[0063] "Antibody" refers to a polypeptide ligand substantially encoded by an immunoglobulin gene or immunoglobulin genes, or fragments thereof, which specifically binds and recognizes an epitope (*e.g.*, an antigen). The recognized immunoglobulin genes include the kappa and lambda light chain constant region genes, the alpha, gamma, delta, epsilon and mu heavy chain constant region genes, and the myriad immunoglobulin variable region genes. Antibodies exist, *e.g.*, as intact immunoglobulins or as a number of well characterized fragments produced by digestion with various peptidases. This includes, *e.g.*, Fab' and F(ab')₂ fragments. The term "antibody," as used herein, also includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies or those synthesized *de novo* using recombinant DNA methodologies. It also includes polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, or single chain antibodies. The "Fc" portion of an antibody refers to that portion of an immunoglobulin heavy chain that comprises one or more heavy chain constant region domains, CH1, CH2 and CH3, but does not include the heavy chain variable region.

[0064] "Immunoassay" is an assay that uses an antibody to specifically bind an antigen. The immunoassay is characterized by the use of specific binding properties of a particular antibody to isolate, target, and/or quantify the antigen.

[0065] The phrase "specifically (or selectively) binds" to an antibody or "specifically (or selectively) immunoreactive with," when referring to a protein or peptide, refers to a binding reaction that is determinative of the presence of the protein in a heterogeneous population of proteins and other biologics. Thus, under designated immunoassay conditions, the specified antibodies bind to a particular protein at least about two times the background and do not substantially bind in a significant amount to other proteins present in the sample. Specific binding to an antibody under such conditions may require an antibody that is selected for its specificity for a particular protein. For example, polyclonal antibodies raised to, *e.g.*, PSMA, PSMA', or the like, from specific species such as rat, mouse, or human can be selected to obtain only those polyclonal antibodies that are specifically immunoreactive with, *e.g.*, PSMA, PSMA', or the like, and not with other proteins, except for polymorphic variants and alleles of seminal basic protein. This selection may be achieved by subtracting out antibodies

WO 02/46448

PCT/US01/43424

that cross-react with, e.g., PSMA, PSMA', or the like, molecules from other species. A variety of immunoassay formats may be used to select antibodies specifically immunoreactive with a particular protein. For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select antibodies specifically immunoreactive with a protein (see, e.g., Harlow & Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (1998), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity). Typically a specific or selective reaction will be at least about twice background signal or noise and more typically more than about 10 to about 100 times background.

[0066] "Energy absorbing molecule" or "EAM" refers to a molecule that absorbs energy from an ionization source in a mass spectrometer thereby aiding desorption of analyte, such as a marker, from a probe surface. Depending on the size and nature of the analyte, the energy absorbing molecule can optionally be used. Energy absorbing molecules used in MALDI are frequently referred to as "matrix." Cinnamic acid derivatives, sinapinic acid ("SPA"), cyano hydroxy cinnamic acid ("CHCA") and dihydroxybenzoic acid are frequently used as energy absorbing molecules in laser desorption of bioorganic molecules.

DETAILED DISCUSSION OF THE INVENTION

I. INTRODUCTION

[0067] Significant technological advances in protein chemistry in the last two decades have established mass spectrometry as an indispensable tool for protein study (Carr *et al.*, (1991) "Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology," *Anal. Chem.* 63(24):2802-2824; Carr *et al.*, "Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry," *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, unit 10.21, pp. 10.21.1-10.21.27 (1998); Patterson, "Protein Identification and Characterization by Mass Spectrometry," *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, unit 10.22, pp. 10.22.1-10.22.24 (1998); and Siuzdak, *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic Press, San Diego (1996)). Mass spectrometry is additionally facilitating the analysis of nucleic acids (Krahmer *et al.*, (2000) "MS for identification of single nucleotide polymorphisms and MS/MS for discrimination of isomeric PCR products," *Anal. Chem.* 72(17):4033-4040 and Koomen *et al.*, (2000) "Improvement of resolution, mass accuracy, and reproducibility in reflected mode DE-MALDI-TOF analysis of

WO 02/46448

PCT/US01/43424

DNA using fast evaporation--overlay sample preparations," *Anal. Chem.* 72(16):3860-3866). Although the resolving power of many chromatographic- and electrophoretic-based separations remains analytically useful, the high sensitivity, speed, and reproducibility of mass spectrometry have boosted its application in all aspects of protein and nucleic acid analysis, including discovery, identification (e.g., peptide mapping, sequencing, etc.), quantification and structural characterization.

[0068] Analogous to the oligonucleotide chip technologies that allow the study of gene expression profiles, protein biochip technologies have been developed in which proteins are captured on surface features of probes for analysis by mass spectrometry. One such technology takes advantage of surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry to facilitate both protein and nucleic acid profiling of complex biologic mixtures. In a version of this technology, affinity mass spectrometry, substrate-bound affinity reagents, either chromatographic or biospecific, capture analytes from a sample. The captured analytes are then desorbed/ionized from the substrate and detected by mass spectrometry. (See, e.g., Hutchens and Yip (1993) "New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules," *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7:576-580, Kuwata *et al.*, (1998) "Bactericidal domain of lactoferrin: detection, quantitation, and characterization of lactoferrin in serum by SELDI Affinity Mass Spectrometry," *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 245:761-773, U.S. Patent No. 5,719,060 to Hutchens and Yip, and WO 98/59360 (Hutchens and Yip)). This innovative technology has numerous advantages over other techniques, such as 2D-PAGE. For example, it is much faster, has higher throughput, requires orders of magnitude lower amounts of sample, has a sensitivity for detecting analyte in the picomole to attomole range, can effectively resolve proteins, nucleic acids and other components having masses in the range of about 2 kDa to about 20 kDa, and is directly applicable to clinical assay development.

[0069] The efficacy of the surface enhanced laser desorption/ionization technology, and affinity mass spectrometry, in particular, for discovery and quantification of prostate cancer protein markers in serum, seminal plasma and cell extracts, as well as the development of immunoassays for the detection of known prostate cancer markers has been demonstrated by the inventor and co-workers (Wright *et al.*, (1999) "ProteinChip®-surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI)

WO 02/46448

PCT/US01/43424

mass spectrometry: A novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures," *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2:264-276; Xiao *et al.*, (2000) "Generation of a baculovirus recombinant prostate-specific membrane antigen and its use in the development of a novel protein biochip quantitative immunoassay," *Protein Expr. Purif.*, 19(1):12-21; and Paweletz *et al.*, (2000) "Rapid protein display profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip," *Drug Development Research*, 49:34-42). The present invention describes the detection and quantification of PSMA, PSMA', and other prostatic markers in serum samples as well as in other types of samples, and materials and methods for assessing these biomarkers for the diagnosis of prostate cancer or benign prostatic hyperplasia. The invention also provides diagnostic methods involving the detection and quantification of nucleic acids (*e.g.*, mRNA, *etc.*) that encode prostatic markers in cell lysates and other sources. In addition to multiplexed detection/quantification of these protein- and nucleic acid-based markers, the invention also includes biochips, kits, and integrated systems.

II. CHARACTERIZATION OF MARKERS

[0070] The present invention relates to the detection/quantification of the prostatic biomarkers, PSMA and PSMA'. Two general classes of these prostatic markers: (1) protein-based markers, and (2) nucleic acid-based markers. Furthermore, this invention provides multiplex assays in which other biomarkers are detected and/or quantified in addition to PSMA or PSMA'. These other protein-based markers include, *e.g.*, PSA, prostatic acid phosphatase (PAP), prostate specific peptide 94 (PSP94), prostate stem cell antigen (PSCA), or the like. Nucleic acid-based markers typically include nucleic acid sequences, such as mRNAs, which encode the protein-based markers. Amino acid sequences and the mRNA sequences that encode them which relate to these and other markers of interest are readily ascertainable from various public databases including GenBank® and Entrez® Protein database. A description of the biomarkers of interest follows.

A. Protein-Based Markers

[0071] PSMA was initially identified using monoclonal antibody 7E11.C5 (Horoszewicz *et al.*, (1987) "Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial cells and serum of prostatic cancer patients," *Anticancer Res.*

WO 02/46448

PCT/US01/43424

7:927-936) and detected as a 100kDa band in cell lysates and seminal plasma by Western blotting (Feng *et al.*, (1991) "Purification and biochemical characterization of the 7E11-C5 prostate carcinoma-associated antigen," *Proc. AACR* 32 (abs. 1418):239; Troyer *et al.*, (1993) "Molecular characterization of the 7E11-C5 prostate tumor-associated antigen," *J. Urol.* 147 (abs. 482):333A; and Troyer *et al.*, (1995) "Biochemical characterization and mapping of the 7E11-C5.3 epitope of the prostate-specific membrane antigen," *Urologic Oncology* 1:29-37). It has been identified as a 750-amino acid, type II transmembrane glycoprotein that has an unglycosylated molecular weight of about 80-85 kDa (Israeli *et al.*, (1993) "Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen," *Cancer Res.* 53:227-230 and Israeli *et al.*, U.S. Pat. No. 5,538,866 "PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN"). Additionally, the gene encoding PSMA has been mapped to chromosome 11 (Rinker-Schaeffer *et al.*, (1995) "Localization and mapping of the prostate specific membrane antigen (PSM) gene to human chromosome 11," *Genomics* 30:105). PSMA is also a glutamate-preferring neurocarboxypeptidase/novel folate hydrolase (Pinto *et al.*, (1996) "Prostate-specific antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells," *Clin. Cancer Res.* 2:11445-11451).

[0072] PSMA's expression is increased in association with progression and hormone-refractory prostate cancer (Israeli *et al.*, (1994) "Expression of the prostate-specific membrane antigen," *Cancer Res.* 54:1807-1811). High PSMA expression in prostate tissues with weak expression in brain, salivary glands, and small intestines has been detected using immunohistochemistry, Western blotting and RT-PCR analyses (Wright *et al.*, (1995) "Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign and malignant prostate tissues," *Urologic Oncology* 1:18-28 and Israeli *et al.*, (1994) *Cancer Res.* 54:1807-1811, *supra*). Several other tissues express the PSMA mRNA but not the protein. PSMA is also expressed on the neovasculature of a variety of human cancers (Liu *et al.*, (1997) "Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium," *Cancer Res.* 57:3629-3634).

[0073] PSMA' is a truncated species of PSMA that lacks the N-terminal sequence (*i.e.*, the membrane spanning region). See, Su *et al.*, (1995) "Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: ratio of expression as a potential measurement of progression," *Cancer Res.* 55:1441-1443. The sequence of

WO 02/46448

PCT/US01/43424

amino acids in PSMA' includes amino acids 57-750 in PSMA, and is therefore cytosolic and not detected with the 7E11-C5 antibody. Full-length PSMA was found to be expressed about 10 times higher than the truncated PSMA' in RNA extracted from tumors using an RNase protection assay, about equal expression of both forms in RNA
5 extracted from BPH tissue, and one tenth as much PSMA as PSMA' in RNA extracted from normal prostate tissue (Su *et al.*, (1995) *Cancer Res.* 55:1441-1443, *supra*). Two proteins have been found in LNCaP cell lysates and sera. One protein is full length 100 kDa PSMA, while the other smaller 89 kDa protein is suspected of being PSMA'.

[0074] Efforts to determine the clinical utility of PSMA, PSMA' and
10 other prostatic markers as a diagnostic or prognostic biomarkers have been hampered by the lack of a sensitive immunoassay for quantification of those markers in body fluids. The present invention includes an immunoassay to quantify PSMA and other markers that uses a novel ProteinChip® Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI) mass spectrometry system (Ciphergen Biosystems, Inc., CA). To illustrate, in
15 one embodiment, murine anti-PSMA monoclonal antibody 7E11-C5 is immobilized on proteinG coated ProteinChip® arrays to directly identify and quantify the 100 kDa PSMA in samples using surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry without the use of a second PSMA antibody or label as is typically used for, *e.g.*, ELISA and other immunoassay formats. The present invention provides the
20 first successful technique for quantifying PSMA in, *e.g.*, serum.

[0075] In addition to PSMA and PSMA', this invention provides for multiplex assays of other prostatic biomarkers as well. These include the following markers, without limitation.

[0076] The prostate specific antigen is an example of an additional
25 prostatic marker that is optionally quantified according to the diagnostic assays described herein. It is a well-characterized marker for prostate cancer. PSA is biochemically a 33-kDa serine protease that is secreted by the epithelial cells of the prostate. Additional details regarding PSA are described in various publications, including, *e.g.*, Carducci, *et al.*, (1999) "Prostate-specific antigen and other markers of
30 therapeutic response," *Urol. Clin. North Am.* 26(2):291-302; Henkel, (1998) "Prostate cancer," *FDA Consum.* 32(5):22-27; Henry and O'Mahony (1999) "Treatment of prostate cancer," *J. Clin. Pharm. Ther.* 24(2):93-102; and Chu (1997) "Prostate-specific antigen and early detection of prostate cancer," *Tumour Biol.* 18(2):123-134.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

- [0077] Prostatic acid phosphatase is another prostatic marker that is optionally detected and quantified according to the methods described herein. Androgens regulate the expression of both human PAP and PSA, which are both major prostate epithelium-specific differentiation antigens. Specific articles relating to PAP include, *e.g.*, Ahmann and Schiffman (1987) "Prospective comparison between serum monoclonal prostate specific antigen and acid phosphatase measurements in metastatic prostatic cancer," *J. Urol.* 137:431-434; Ercole *et al.*, (1987) "Prostate specific antigen and prostatic acid phosphatase in the monitoring and staging of patients with prostatic cancer," *J. Urol.* 138:1181-1184; Gittes (1991) "Carcinoma of the prostate," *N. Eng. J. Med.* 324:236-245; Hetherington *et al.*, (1988) "Contribution of bone scintigraphy, prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen to the monitoring of prostatic cancer," *Eur. Urol.* 14:1-5; and Myers and Grizzle (1997) "Changes in biomarker expression in the development of prostatic adenocarcinoma," *Biotech Histochem.* 72(2):86-95.
- 15 [0078] The prostatic secretory protein of 94 amino acids is also optionally utilized as a prostatic marker, *e.g.*, in the multiplex embodiments of the present invention. PSP94, also named beta-microseminoprotein, is one of the major proteins secreted by the human prostate. It is a small, nonglycosylated protein, rich in cysteine residues, that was first isolated as a major protein from human seminal plasma. Subsequently, its homologous proteins have been identified, and their cDNAs or genes have been cloned in primates, pigs, and rodents. Additional information pertaining to PSP94 can be found in, *e.g.*, Kwong *et al.*, (2000) "PSP94 (or beta-microseminoprotein) is a secretory protein specifically expressed and synthesized in the lateral lobe of the rat prostate," *Prostate* 42(3):219-29 and Chan (1999) "In situ hybridization study of PSP94 (prostatic secretory protein of 94 amino acids) expression in human prostates," *Prostate* 41(2):99-109.
- 20 [0079] The prostate stem cell antigen is another example of a marker that is optionally detected/quantified in samples via gas phase ion spectrometry. PSCA is a homologue of the Thy-1/Ly-6 family of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell surface antigens. The gene encoding the antigen maps to chromosome region 8q24.2. PSCA mRNA is expressed in the basal cells of normal prostate and in more than 80% of prostate cancers. Additional details regarding PSCA are described in, *e.g.*, Dannull *et al.*, (2000) "Prostate stem cell antigen is a promising candidate for
- 25

WO 02/46448

PCT/US01/43424

immunotherapy of advanced prostate cancer," *Cancer Res.* 60(19):5522-5528; Gu *et al.*, (2000) "Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer," *Oncogene* 9(10):1288-1296; and Reiter *et al.*, (2000) "Coamplification of prostate stem cell antigen (PSCA) and MYC in locally advanced prostate cancer," *Genes Chromosomes Cancer* 27(1):95-103.

[0080] Essentially any marker is optionally detected and quantified according to the methods described herein. In particular, many other prostatic markers in addition to those described above are also known. Other characteristics of these markers are further described in the example section below.

B. Nucleic Acid-Based Markers

[0081] Virtually any nucleic acid marker of prostate cancer is suitable for analysis as described herein. As such, no attempt is made to identify all of the known nucleic acids. Certain preferred nucleic acid markers of interest include, *e.g.*, mRNAs encoding PSMA, PSMA', PAP, PSP94, PSCA, or the like. Nucleic acids corresponding to these mRNAs, or from which these mRNAs are ascertainable, can be obtained from public databases, such as GenBank. RNAs encoding PSMA and PSMA' are described in, *e.g.*, Su *et al.*, (1995) *Cancer Res.* 55:1441-1443, *supra*. Additional information about the other mRNAs is available assorted publications including, *e.g.*, Zelivianski *et al.*, (1998) "Cloning and analysis of the promoter activity of the human prostatic acid phosphatase gene," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245(1):108-12; Magklara *et al.*, (2000) "Expression of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in the thyroid gland," *Clin. Chim. Acta* 300(1-2):171-80; Xuan *et al.*, (1995) "Alternative splicing of PSP94 (prostatic secretory protein of 94 amino acids) mRNA in prostate tissue," *Oncogene* 11(6):1041-1047; and Reiter *et al.*, (1998) "Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(4):1735-40.

[0082] In certain embodiments, PSMA or PSMA' mRNAs are quantified individually in, *e.g.*, cell lysate derived samples. In other embodiments, selected combinations of these and/or other mRNAs in a sample can be detected and quantified simultaneously in a multiplexed format using selected cDNAs which correspond to the selected mRNA combination.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

III. DETECTION AND QUANTIFICATION OF MARKERS

[0083] The present invention provides methods for the detection and/or quantification of PSMA and PSMA' by gas phase ion spectrometry and, in particular, by laser desorption/ionization mass spectrometry. The method involves fractionating a sample that is being tested for the presence of PSMA/PSMA' to at least partially remove other components from the sample, and analyzing the fractionated PSMA/PSMA' by gas phase ion spectrometry. LDI-MS can be traditional MALDI or it can be surface enhanced through the use of a probe whose sample-presenting surface is actively involved in the presentation of the analyte to the energy source.

[0084] In one embodiment, the LDI-MS method is surface enhanced through the use of a solid phase-bound adsorbent that captures the analyte from the sample, followed by desorption/ionization of the analyte from the solid phase. In one embodiment this method, the solid-phase bound adsorbent is an antibody that specifically binds PSMA/PSMA'. In another embodiment, the solid phase bound adsorbent is a protein, such as protein G, that specifically binds to an immunoglobulin, e.g., the Fc portion. In this embodiment, the sample is contacted with an antibody that specifically binds PSMA/PSMA'. Then, the solid phase bound adsorbent is used to capture the PSMA/PSMA' from the sample through the antibody to which it is bound. In multiplex assays, the sample can be contacted with antibodies that specifically bind to all of the biomarkers desired for capture. In one embodiment, the solid phase bound adsorbent is provided in the form of a biochip adapted for insertion into the gas phase ion spectrometer. Such a chip can comprise a substrate, such as metal, having a surface that has surface features. Each feature can comprise the adsorbent. In this embodiment, the sample is applied to the surface feature for capture of the desired sample components and unbound components are washed away. Then the biochip is inserted into the gas phase ion spectrometer and the analyte is desorbed/ionized with the energy source and detected.

[0085] The markers can be detected in a number of biological samples. The sample is preferably a biological fluid sample. Examples of a biological fluid sample useful in the invention include body fluid, cell lysate, seminal fluid, seminal plasma, prostatic fluid, saliva, blood, lymph, lung/bronchial washes, mucus, feces, nipple secretions, sputum, tears, urine, or the like. Serum is a preferred sample source for certain embodiments of the invention. Cell lysate samples are optionally derived

WO 02/46448

PCT/US01/43424

from, *e.g.*, primary tissue or cells, cultured tissue or cells, normal tissue or cells, diseased tissue or cells, benign tissue or cells, cancerous tissue or cells, salivary glandular tissue or cells, intestinal tissue or cells, neural tissue or cells, renal tissue or cells, lymphatic tissue or cells, bladder tissue or cells, urogenital tissues or cells, 5 tumoral tissue or cells, tumoral neovasculature tissue or cells, or the like. In preferred embodiments, a cell lysate sample is derived from prostatic tissue or cells. Biological samples are optionally collected according to any known technique, such as venipuncture, biopsy, or the like. Methods of culturing tissues or cells are described in various publications including, *e.g.*, Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and 10 John Wiley & Sons, Inc., New York (supplemented through 1999); Freshney, *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3rd Ed., Wiley-Liss, New York (1994); and Humason, *Animal Tissue Techniques*, 4th Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1979), and the references cited therein.

15 [0086] Any suitable method can be used to detect and quantify one or more of the markers described herein. For example, gas phase ion spectrometry can be used. This technique includes, *e.g.*, laser desorption/ionization mass spectrometry. In some embodiments, the sample can be prepared prior to gas phase ion spectrometry, *e.g.*, pre-fractionation, two-dimensional gel chromatography, high performance liquid 20 chromatography, or the like to assist detection of markers. Detection of markers can be achieved using methods other than gas phase ion spectrometry. For example, traditional immunoassays (*e.g.*, ELISA, Western blotting, *etc.*) can be used to detect the markers in a sample. These detection methods are described in detail below.

A. Detection by Gas Phase Ion Spectrometry

25 [0087] In a preferred embodiment, markers present in a sample are detected using gas phase ion spectrometry, and more preferably, using mass spectrometry. In one embodiment, matrix-assisted laser desorption/ionization ("MALDI") mass spectrometry can be used. In MALDI, the sample is typically quasi-purified to obtain a fraction that essentially consists of a marker or markers using, *e.g.*, 30 protein separation methods such as two-dimensional gel electrophoresis or high performance liquid chromatography (HPLC). Additional details relating to MALDI are included in, *e.g.*, Skoog *et al.*, *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Ed., Harcourt

WO 02/46448

PCT/US01/43424

Brace & Co., Philadelphia (1998) and Siuzdak, *Mass Spectrometry for Biotechnology*, *supra*.

[0088] In another embodiment, surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry ("SELDI") can be used. Surface enhanced laser desorption/ionization uses a substrate comprising adsorbents to capture markers, which can then be directly desorbed and ionized from the substrate surface during mass spectrometry. Since the substrate surface in surface enhanced laser desorption/ionization captures markers, a sample need not be quasi-purified as in MALDI. However, depending on the complexity of a sample and the type of adsorbents used, it may be desirable to prepare a sample to reduce its complexity prior to surface enhanced laser desorption/ionization analysis.

[0089] Figure 1 schematically depicts integrated surface enhanced laser desorption/ionization-TOF-MS system 100. As shown, photon energy produced by laser source 102 impacts biochip 104 at surface feature 106, which includes a selected adsorbent with captured markers. The photon energy causes captured markers at surface feature 106 to desorb and ionize. The desorbed ions are then accelerated through flight tube/mass analyzer 108. Ions are separated according to mass/charge ratios, which as depicted is simply the mass of the ionic species, because each ion is singly charged. As further illustrated, smaller ions travel faster than larger ions, thereby resolving the species according to mass. Ions produce a detectable signal at detector 110 which signal is processed by data analysis workstation 112 to generate mass spectrum 114. Integrated systems are described further below.

[0090] Figure 2 schematically shows a PSMA surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay which includes immobilized protein G 200 on biochip 202. As additionally shown, captured PSMA 204 is retained by antibody adsorbent 206 which is bound to immobilized protein G 200. Incident photon energy from laser 208 causes the desorption and ionization of adsorbent and PSMA, which is then detected in a TOF-mass spectrometer to produce mass spectra 210. Figure 3 also schematically illustrates certain aspects of the surface enhanced laser desorption/ionization-TOF-MS technology. As depicted, sample 300 is applied to biochip 302 which includes adsorbent 304 bound to surface feature 306. Components of sample 300 that are not captured by adsorbent 304 are optionally washed away (*e.g.*, eluted or the like) from biochip 304 prior to mass analysis. In other embodiments,

WO 02/46448

PCT/US01/43424

sample 300 is analyzed directly without being washed. Following capture (*e.g.*, affinity capture or the like) of markers 308 in sample 300, energy absorbing molecules 310 are added to biochip 302 to absorb energy from ionization source 312 (*i.e.*, a laser) to aid desorption of markers 308 from the surface of biochip 302. Mass spectrum 314 is produced by mass spectral analysis of desorbed/ionized markers 308.

[0091] Various sample preparation methods to assist detection of markers in a sample and gas phase ion spectrometry methods are described in detail below.

1. Preparation of a Sample Prior to Gas Phase Ion Spectrometry

[0092] Optionally, one or combination of methods described below or other methods known in the art can be used to prepare a sample to further assist detection and characterization of markers in a sample. In some embodiments, a sample can be pre-fractionated to provide a less complex sample prior to gas phase ion spectrometry analysis. For example, a serum sample can be pre-fractionated according to size of proteins to reduce complexity of proteins in the sample. Moreover, pre-fractionation protocols can provide additional information regarding physical and chemical characteristics of markers. For example, if a sample was pre-fractionated using an anion-exchange spin column, and if a marker is eluted at a certain pH, this elution characteristic provides information regarding binding properties of the marker. In another example, a sample can be pre-fractionated by removing proteins or other molecules in the sample that are present in a high quantity or that may interfere with the detection of markers in a sample. Other suitable sample preparation protocols will be apparent to one of skill in the art, and they can also be applied in embodiments of the present invention.

a) Size Exclusion Chromatography

[0093] In one embodiment, a sample can be pre-fractionated according to size of, *e.g.*, proteins in a sample using size exclusion chromatography. For a biological sample wherein the amount of sample available is small, preferably a size selection spin column is used. For example, K-30 spin column (Ciphergen Biosystems, Inc.) can be used. In general, the first fraction that is eluted from the column ("fraction 1") has the highest percentage of high molecular weight proteins; fraction 2 has a lower

WO 02/46448

PCT/US01/43424

percentage of high molecular weight proteins; fraction 3 has even a lower percentage of high molecular weight proteins; fraction 4 has the lowest amount of large proteins; and so on. Each fraction can then be analyzed by gas phase ion spectrometry for the detection of markers.

5 **b) Separation of Biomolecules by Gel Electrophoresis**

[0094] In another embodiment, biomolecules (*e.g.*, proteins, nucleic acids, *etc.*) in a sample can be separated by high-resolution electrophoresis, *e.g.*, one or two-dimensional gel electrophoresis, Northern blotting, or the like. A fraction containing a marker can be isolated and further analyzed by gas phase ion spectrometry. Preferably, two-dimensional gel electrophoresis is used to generate two-dimensional array of spots of biomolecules, including one or more markers. *See, e.g.*, Jungblut and Thiede, *Mass Spectr. Rev.* 16:145-162 (1997).

[0095] The two-dimensional gel electrophoresis can be performed using methods known in the art. *See, e.g.*, Deutscher ed., *Methods In Enzymology* vol. 182. Typically, biomolecules in a sample are separated by, *e.g.*, isoelectric focusing, during which biomolecules in a sample are separated in a pH gradient until they reach a spot where their net charge is zero (*i.e.*, isoelectric point). This first separation step results in one-dimensional array of biomolecules. The biomolecules in one dimensional array is further separated using a technique generally distinct from that used in the first separation step. For example, in the second dimension, biomolecules separated by isoelectric focusing are further separated using a polyacrylamide gel, such as polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). SDS-PAGE gel allows further separation based on molecular mass of biomolecules. Typically, two-dimensional gel electrophoresis can separate chemically different biomolecules in the molecular mass range from 1000-200,000 Da within complex mixtures.

[0096] Biomolecules in the two-dimensional array can be detected using any suitable methods known in the art. For example, biomolecules in a gel can be labeled or stained (*e.g.*, with Coomassie blue or silver staining). If gel electrophoresis generates spots that correspond to the molecular weight of one or more markers of the invention (*e.g.*, 100 kDa PSMA), the spot can be is further analyzed by gas phase ion spectrometry. For example, spots can be excised from the gel and analyzed by gas phase ion spectrometry. Alternatively, the gel containing biomolecules can be

WO 02/46448

PCT/US01/43424

transferred to an inert membrane by applying an electric field. Then a spot on the membrane that approximately corresponds to the molecular weight of a marker can be analyzed by gas phase ion spectrometry. In gas phase ion spectrometry, the spots can be analyzed using any suitable techniques, such as MALDI or surface enhanced laser desorption/ionization (*e.g.*, using ProteinChip[®] array) as described in detail below.

5 [0097] Prior to gas phase ion spectrometry analysis, it may be desirable to cleave biomolecules in the spot into smaller fragments using cleaving reagents, such as proteases (*e.g.*, trypsin) or nucleases. The digestion of biomolecules into small fragments provides a mass fingerprint of the biomolecules in the spot, which can be used to determine the identity of markers if desired.

10 **c) High Performance Liquid Chromatography**

[0098] In yet another embodiment, high performance liquid chromatography (HPLC) can be used to separate a mixture of biomolecules in a sample based on their different physical properties, such as polarity, charge and size. HPLC instruments typically consist of a reservoir of mobile phase, a pump, an injector, a separation column, and a detector. Biomolecules in a sample are separated by injecting an aliquot of the sample onto the column. Different biomolecules in the mixture pass through the column at different rates due to differences in their partitioning behavior between the mobile liquid phase and the stationary phase. A fraction that corresponds to the molecular weight and/or physical properties of one or more markers can be collected. The fraction can then be analyzed by gas phase ion spectrometry to detect markers. For example, the spots can be analyzed using either MALDI or surface enhanced laser desorption/ionization (*e.g.*, using ProteinChip[®] array) as described in detail below.

25 **d) Modification of Marker Before Analysis**

[0099] Optionally, a marker can be modified before analysis to improve its resolution or to determine its identity. For example, the markers may be subject to proteolytic digestion before analysis. Any protease can be used. Proteases, such as trypsin, that are likely to cleave the markers into a discrete number of fragments are particularly useful. The fragments that result from digestion function as a fingerprint for the markers, thereby enabling their detection indirectly. This is particularly useful where there are markers with similar molecular masses that might be confused for the

WO 02/46448

PCT/US01/43424

marker in question. Also, proteolytic fragmentation is useful for high molecular weight markers because smaller markers are more easily resolved by mass spectrometry. If the target marker is a nucleic acid, such as an mRNA, nucleases are optionally used to modify the marker prior to mass spectral analysis. In another example, biomolecules
5 can be modified to improve detection resolution. For instance, neuraminidase can be used to remove terminal sialic acid residues from glycoproteins (*e.g.*, PSMA, PSMA',
etc.) to improve binding to an anionic adsorbent (*e.g.*, cationic exchange ProteinChip® arrays) and to improve detection resolution. In another example, the markers can be
10 modified by the attachment of a tag of particular molecular weight that specifically bind to molecular markers, further distinguishing them. Optionally, after detecting
such modified markers, the identity of the markers can be further determined by matching the physical and chemical characteristics of the modified markers in a protein
database (*e.g.*, SWISS-PRO).

15 **2. Contacting a Sample with a Substrate for Gas Phase Ion Spectrometry Analysis**

[0100] A sample or a sample (*e.g.*, pre-fractionated) that is prepared as described above can be contacted with a substrate. A substrate can be a probe (*e.g.*, a biochip) that is adapted for use with a gas phase ion spectrometer. In the present
20 invention, biochips typically include a substrate with at least one surface feature having at least one adsorbent bound to the substrate in which the adsorbent is capable of
capturing, *e.g.*, PSMA or PSMA', prostatic marker mRNAs, and/or other markers. Alternatively, a substrate can be a separate material that can be placed onto a probe that
is adapted for use with a gas phase ion spectrometer. For example, a substrate can be a solid phase, such as a polymeric, paramagnetic, latex or glass bead or resin comprising,
25 *e.g.*, a functional group for binding markers. The substrate can then be positioned onto a probe.

[0101] A probe (*e.g.*, a biochip) can be in any suitable shape as long as it is adapted for use with a gas phase ion spectrometer (*e.g.*, removably insertable into a
30 gas phase ion spectrometer). For example, the probe can be in the form of a strip, a plate, or a dish with a series of wells at predetermined addressable locations or have
other surfaces features. The probe can also be shaped for use with inlet systems and detectors of a gas phase ion spectrometer. For example, the probe can be adapted for

WO 02/46448

PCT/US01/43424

mounting in a horizontally and/or vertically translatable carriage that horizontally and/or vertically moves the probe to a successive position without requiring repositioning of the probe by hand.

[0102] The surface features of probes or biochips include various 5
embodiments. For example, a biochip optionally includes a plurality of surface features. For example, the plurality of surface features is arranged in a line, an orthogonal array, a circle, or an n-sided polygon, wherein n is three or greater. The plurality of surface features typically includes a logical or spatial array. Optionally, each of the plurality of surface features comprises identical or different adsorbents, or 10
one or more combinations thereof. For example, at least two of the plurality of surface features optionally include identical or different adsorbents, or one or more combinations thereof. In certain embodiments, the biochip further includes at least one other adsorbent in addition to the adsorbent capable of capturing PSMA or PSMA' in which the other adsorbent is bound to the substrate at one or more of the plurality of 15
surface features. The other adsorbent is typically capable of capturing at least one other prostatic marker, such as PSMA, PSMA', PSA, free-PSA, complexed-PSA, PAP, PSP94, PSCA, or the like. Suitable adsorbents are described in greater detail below.

[0103] The probe substrate can be made of any suitable material. For example, the probe substrate material can include, but is not limited to, insulating 20
materials (e.g., glass such as silicon oxide, plastic, ceramic), a magnetic material, semi-conducting materials (e.g., silicon wafers), or electrically conducting materials (e.g., metals, such as nickel, brass, steel, aluminum, gold, metalloids, alloys or electrically conductive polymers), polymers, organic polymers, conductive polymers, biopolymers, native biopolymers, metal coated with organic polymers, or any combinations thereof. 25
The probe substrate material can also be solid or porous. Probes suitable for use in embodiments of the invention are described in, e.g., U.S. Patent No. 5,617,060 (Hutchens and Yip) and WO 98/59360 (Hutchens and Yip).

a) Analysis of Samples on an Inert Substrate

[0104] If complexity of a sample has been substantially reduced using 30
the preparation methods described above, the sample can be contacted with any suitable substrate for gas phase ion spectrometry. For example, the substrate surface can be inert and need not comprise adsorbents for binding markers, since further separation of

WO 02/46448

PCT/US01/43424

other biomolecules from markers is not necessary. In some embodiments, preferably a sample is prepared by two-dimensional gel electrophoresis or HPLC to obtain a fraction that contains markers prior to contacting the fraction with a substrate. Then the markers in the spot or fraction can be resolved using gas phase ion spectrometry (*e.g.*, traditional MALDI) without further fractionation, or using other known methods in the art.

[0105] Prior to gas phase ions spectrometry analysis, an energy absorbing molecule ("EAM") or a matrix material is typically applied to markers on the substrate surface. The energy absorbing molecules can assist absorption of energy from an energy source from a gas phase ion spectrometer, and can assist desorption of markers from the probe surface. Exemplary energy absorbing molecules include cinnamic acid derivatives, sinapinic acid ("SPA"), cyano hydroxy cinnamic acid ("CHCA") and dihydroxybenzoic acid. Other suitable energy absorbing molecules are known to those skilled in the art. *See, e.g.*, U.S. Patent 5,719,060 (Hutchens & Yip) for additional description of energy absorbing molecules.

[0106] The energy absorbing molecule and the sample containing markers can be contacted in any suitable manner. For example, an energy absorbing molecule is mixed with a sample containing markers, and the mixture is placed on the substrate surface, as in traditional MALDI process. In another example, an energy absorbing molecule can be placed on the substrate surface prior to contacting the substrate surface with a sample. In another example, a sample can be placed on the substrate surface prior to contacting the substrate surface with an energy absorbing molecule. Then the markers can be desorbed, ionized and detected as described in detail below.

25 b) **Analysis of Samples on a Substrate Surface
 Comprising Adsorbents**

[0107] In some embodiments, complexity of a sample can be further reduced using a substrate that comprises adsorbents capable of binding one or more markers. Adsorbents need not be biospecific (*e.g.*, biomolecular interaction adsorbents) for markers (*e.g.*, antibodies that specifically bind markers) as long as adsorbents have binding characteristics suitable for binding markers. For example, adsorbents can comprise chromatographic adsorbent, such as a hydrophobic interaction adsorbent or group, a hydrophilic interaction adsorbent or group, a cationic adsorbent or group, an

WO 02/46448

PCT/US01/43424

anionic adsorbent or group, a metal-chelating adsorbent or group (*e.g.*, nickel, cobalt, *etc.*), lectin, heparin, or any combination thereof. In other embodiments, the adsorbent includes a biomolecular interaction adsorbent, such as an affinity adsorbent, a polypeptide, an enzyme, a prostatic marker substrate, a receptor, an antibody, or the like. For example, in preferred embodiments, the biomolecular interaction adsorbent includes a monoclonal antibody that specifically captures the PSMA or PSMA' and optionally, other prostatic markers (*e.g.*, PSMA, PSMA', PSA, free-PSA, complexed-PSA, PAP, PSP94, PSCA, or mRNAs encoding these or other prostatic markers).

[0108] Examples of various types of adsorbents are well-known in the art. For instance, adsorbents comprising a hydrophobic group include matrices having aliphatic hydrocarbons, *e.g.*, C₁-C₁₈ aliphatic hydrocarbons and matrices having aromatic hydrocarbon functional group such as phenyl groups. Adsorbents comprising a hydrophilic group include, *e.g.*, glass (*e.g.*, silicon oxide), or hydrophilic polymers such as polyethylene glycol, dextran, agarose, or cellulose. Adsorbents comprising a cationic group include, *e.g.*, matrices of secondary, tertiary or quaternary amines. Adsorbents comprising an anionic group include, *e.g.*, matrices of sulfate anions (SO₃⁻) and matrices of carboxylate anions (COO⁻) or phosphate anions (OPO₃⁻). Adsorbents comprising metal chelating groups include, *e.g.*, organic molecules that have one or more electron donor groups which form coordinate covalent bonds with metal ions, such as copper, nickel, cobalt, zinc, iron, and other metal ions such as aluminum and calcium. Adsorbents comprising an antibody include, *e.g.*, an antibody that specifically binds to any one of the markers provided herein. Probes with some of these adsorbents are also commercially available (*e.g.*, Normal Phase ProteinChip[®] array, SAX2 ProteinChip[®] array, IMAC3 ProteinChip[®] array, *etc.*, all available from CIPHERGEN Biosystems, Inc. (Fremont, CA)). In preferred embodiments, adsorbents are substantially similar to or the same as the adsorbents which were initially used to enrich and identify the markers from a urine sample (*e.g.*, SAX2 ProteinChip[®] array).

[0109] In embodiments of the invention that include the detection/quantification of mRNAs in a sample, the selected adsorbents typically include DNAs (*e.g.*, cDNAs) corresponding to the targeted prostatic marker mRNAs. Nucleic acid adsorbents are optionally synthesized or purchased from commercial sources. For example, oligo- or polynucleotide sequences for use as adsorbents can readily be synthesized by techniques well-known to those of skill. Furthermore,

WO 02/46448

PCT/US01/43424

essentially any nucleic acid is optionally custom ordered from any of a variety of commercial sources, such as The Midland Certified Reagent Company (merc@oligos.com), The Great American Gene Company (www.genco.com), ExpressGen, Inc. (www.expressgen.com), Operon Technologies, Inc.

5 (www.operon.com), and many others.

[0110] Searchable sequence information is available, e.g., from various public nucleic acid databases, such as GenBank. For example, PSMA and/or PSMA' adsorbents can be designed based upon sequences corresponding to exemplary accession numbers, such as NM_006102, AF119386, AF007544, AF061571, S76978, 10 AF254358, AF254357, AW620338, AW473087, AF107214, NM_004476, AW278819, AW277437, AW168915, AW000926, AI872104, AI791154, AI768508, AI766427, AI007318, AI690667, AI672408, AI648702, AI478207, AI474492, AI424589, AI356718, AI094658, AI050871, AF016832, AF016830, AF016829, AF016828, AF016827, AF016826, AF011896, AF007413, AF007412, AF00741, AF006604, 15 AA897668, AA879028 AF044684, AA652917, AA435800, 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, and/or M99487. These sequences generally correspond to partial or full-length nucleic acid sequences (e.g., mRNAs, 20 cDNAs, genes, etc.) relating to PSMA and PSMA' which can be used alone, or in combination, to ascertain appropriate sequences for use as PSMA or PSMA' adsorbents. Similar sequence information is also available for other prostatic markers including, e.g., PSA, PAP, PSP94, PSCA, or the like.

[0111] The probes can be produced using any suitable methods 25 depending on the selection of substrate materials and/or adsorbents. For example, a metal surface can be coated with silicon oxide, titanium oxide or gold, and the coated surface can be derivatized with, e.g., a bifunctional linker to bind and attach an adsorbent. For example, one end of a bifunctional linker can covalently bind with a functional group on the surface and the other end can be further derivatized with groups 30 that function as an adsorbent. In another example, a porous silicon surface generated from crystalline silicon can be chemically modified to include adsorbents for binding markers. In another example, adsorbents can be formed directly on the substrate surface by *in situ* polymerizing a monomer solution which comprises, e.g., substituted

WO 02/46448

PCT/US01/43424

acrylamide monomers, substituted acrylate monomers, or derivatives thereof comprising a functional group of choice as an adsorbent. The polymerization of the monomer solution can provide hydrogel adsorbents with a greater capacity for binding biomolecules. The deposition of nucleic acid-based adsorbents (*e.g.*, DNA, cDNAs, *etc.*) is described further in, *e.g.*, U.S. Pat. No. 5,807,522 "METHODS FOR FABRICATING MICROARRAYS OF BIOLOGICAL SAMPLES," to Brown *et al.*, and Pease *et al.*, (1994) "Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:5022-5026.

[0112] Adsorbents that bind the markers can be applied to the substrate in any suitable pattern (*e.g.*, continuous or discontinuous). For example, one or more adsorbents can be present on the substrate surface. If multiple types of adsorbents are used, the substrate surface can be coated such that one or more binding characteristics vary in one or two-dimensional gradient. If discontinuous, plural adsorbents can be on the substrate surface in predetermined addressable locations. The addressable locations can be arranged in any pattern, but are preferably in a regular pattern, such as lines, orthogonal arrays, or regular curves (*e.g.*, circles). For example, a probe can comprise discontinuous spots of adsorbents. Each addressable location may comprise the same or different adsorbent. The spots are "addressable" in that during mass spectrometry, an energy source, such as a laser, is directed to, or "addresses" each spot to desorb and ionize markers.

[0113] A sample is contacted with a substrate comprising an adsorbent in any suitable manner, *e.g.*, bathing, soaking, dipping, spraying, washing over, or pipetting, *etc.* Generally, a volume of sample containing from a few attomoles to 100 picomoles of marker in about 1 μ l to 500 μ l is sufficient for binding to the adsorbent. The sample can contact the probe substrate comprising an adsorbent for a period of time sufficient to allow the marker to bind to the adsorbent. Typically, the sample and the substrate comprising the adsorbent are contacted for a period of between about 30 seconds and about 12 hours, and preferably, between about 30 seconds and about 15 minutes. Typically, the sample is contacted to the probe substrate under ambient temperature and pressure conditions. For some samples, however, modified temperature (typically 4°C through 37°C) and pressure conditions can be desirable, which conditions are determinable by those skilled in the art.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

[0114] After the substrate contacts the sample or sample solution, it is preferred that unbound materials on the substrate surface are washed out so that only the bound materials remain on the substrate surface. Washing a substrate surface can be accomplished by, *e.g.*, bathing, soaking, dipping, rinsing, spraying, or washing the substrate surface with an eluant. A microfluidics process is preferably used when an eluant is introduced to small spots of adsorbents on the probe. Typically, the eluant can be at a temperature of between 0°C and 100°C, preferably between 4°C and 37°C. In some embodiments, washing unbound materials from the probe surface may not be necessary if markers bound on the probe surface can be resolved by gas phase ion spectrometry without a wash.

[0115] Any suitable eluants (*e.g.*, organic or aqueous) can be used to wash the substrate surface. Preferably, an aqueous solution is used. Exemplary aqueous solutions include a HEPES buffer, a Tris buffer, or a phosphate buffered saline, *etc.* To increase the wash stringency of the buffers, additives can be incorporated into the buffers. These include, but are limited to, ionic interaction modifier (both ionic strength and pH), water structure modifier, hydrophobic interaction modifier, chaotropic reagents, affinity interaction displacers. Specific examples of these additives can be found in, *e.g.*, PCT publication WO98/59360 (Hutchens and Yip). The selection of a particular eluant or eluant additives is dependent on other experimental conditions (*e.g.*, types of adsorbents used or markers to be detected), and can be determined by those of skill in the art.

[0116] Prior to desorption and ionization of biomolecules including markers from the probe surface, an energy absorbing molecule ("EAM") or a matrix material is typically applied to markers on the substrate surface. The types of EAM and the methods for applying EAM is discussed above, and will not repeated in this section.

3. Desorption/Ionization and Detection

[0117] Markers on the substrate surface can be desorbed and ionized using gas phase ion spectrometry. Any suitable gas phase ion spectrometers can be used as long as it allows markers on the substrate to be resolved. Preferably, gas phase ion spectrometers allow quantification of markers.

[0118] In one embodiment, a gas phase ion spectrometer is a mass spectrometer. In a typical mass spectrometer, a substrate or a probe comprising

WO 02/46448

PCT/US01/43424

markers on its surface is introduced into an inlet system of the mass spectrometer. The markers are then desorbed by a desorption source such as a laser, fast atom bombardment, high energy plasma, electrospray ionization, thermospray ionization, liquid secondary ion MS, field desorption, *etc.* The generated desorbed, volatilized species consist of preformed ions or neutrals which are ionized as a direct consequence of the desorption event. Generated ions are collected by an ion optic assembly, and then a mass analyzer disperses and analyzes the passing ions. The ions exiting the mass analyzer are detected by a detector. The detector then translates information of the detected ions into mass-to-charge ratios. Detection of the presence of markers or other substances will typically involve detection of signal intensity. This, in turn, can reflect the quantity and character of markers bound to the substrate. Any of the components of a mass spectrometer (*e.g.*, a desorption source, a mass analyzer, a detector, *etc.*) can be combined with other suitable components described herein or others known in the art in embodiments of the invention.

15 [0119] Preferably, a laser desorption time-of-flight mass spectrometer is used in embodiments of the invention. In laser desorption mass spectrometry, a substrate or a probe comprising markers is introduced into an inlet system. The markers are desorbed and ionized into the gas phase by laser from the ionization source. The ions generated are collected by an ion optic assembly, and then in a time-
20 of-flight mass analyzer, ions are accelerated through a short high voltage field and let drift into a high vacuum chamber. At the far end of the high vacuum chamber, the accelerated ions strike a sensitive detector surface at a different time. Since the time-of-flight is a function of the mass of the ions, the elapsed time between ion formation and ion detector impact can be used to identify the presence or absence of markers of
25 specific mass to charge ratio.

[0120] In another embodiment, an ion mobility spectrometer can be used to detect markers. The principle of ion mobility spectrometry is based on different mobility of ions. Specifically, ions of a sample produced by ionization move at different rates, due to their difference in, *e.g.*, mass, charge, or shape, through a tube
30 under the influence of an electric field. The ions (typically in the form of a current) are registered at the detector which can then be used to identify a marker or other substances in a sample. One advantage of ion mobility spectrometry is that it can operate at atmospheric pressure.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

[0121] In yet another embodiment, a total ion current measuring device can be used to detect and characterize markers. This device can be used when the substrate has a only a single type of marker. When a single type of marker is on the substrate, the total current generated from the ionized marker reflects the quantity and other characteristics of the marker. The total ion current produced by the marker can then be compared to a control (*e.g.*, a total ion current of a known compound). The quantity or other characteristics of the marker can then be determined.

4. Analysis of Data

[0122] Data generated by desorption and detection of markers can be analyzed using any suitable means. In one embodiment, data is analyzed with the use of a programmable digital computer, *e.g.*, as part of an integrated system. The computer program generally contains a readable medium that stores codes. Certain code can be devoted to memory that includes the location of each feature on a probe, the identity of the adsorbent at that feature and the elution conditions used to wash the adsorbent. The computer also contains code that receives as input, data on the strength of the signal at various molecular masses received from a particular addressable location on the probe. This data can indicate the number of markers detected, including the strength of the signal generated by each marker.

[0123] In particular, the invention includes a device or integrated system for quantifying PSMA or PSMA' and optionally, other prostatic markers in selected samples. The device or system typically includes an adsorbent (*e.g.*, a solid phase adsorbent, such as a biochip) capable of capturing, *e.g.*, the PSMA or PSMA' in the sample and a gas phase ion spectrometer for quantifying, *e.g.*, the PSMA or PSMA' captured on the adsorbent. The device or integrated system also typically includes a computer or a computer readable medium, operably connected to the gas phase ion spectrometer, that includes a computer program having one or more of, *e.g.*, (i) an instruction set for analyzing or processing data quantified by the gas phase ion spectrometer, (ii) an instruction set for entering data into a database, or, (iii) an instruction set for determining correlations between at least one quantified prostatic marker, or combinations of quantified prostatic markers, and a diagnosis of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, or a negative diagnosis.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

[0124] Data analysis typically includes the steps of determining signal strength (*e.g.*, height of peaks) of a marker detected and removing "outliers" (data deviating from a predetermined statistical distribution). The observed peaks can be normalized, a process whereby the height of each peak relative to some reference is calculated. For example, a reference can be background noise generated by instrument and chemicals (*e.g.*, energy absorbing molecule) which is set as zero in the scale. Then the signal strength detected for each marker or other biomolecules can be displayed in the form of relative intensities in the scale desired (*e.g.*, 100). Alternatively, a standard (*e.g.*, bovine serum albumin) may be admitted with the sample so that a peak from the standard can be used as a reference to calculate relative intensities of the signals observed for each marker or other markers detected.

[0125] The computer can transform the resulting data into various formats for displaying. In one format, referred to as "spectrum view or retentate map," a standard spectral view can be displayed, wherein the view depicts the quantity of marker reaching the detector at each particular molecular weight. In another format, referred to as "peak map," only the peak height and mass information are retained from the spectrum view, yielding a cleaner image and enabling markers with nearly identical molecular weights to be more easily seen. In yet another format, referred to as "gel view," each mass from the peak view can be converted into a grayscale image based on the height of each peak, resulting in an appearance similar to bands on electrophoretic gels. In yet another format, referred to as "3-D overlays," several spectra can be overlaid to study subtle changes in relative peak heights. In yet another format, referred to as "difference map view," two or more spectra can be compared, conveniently highlighting unique markers and markers which are up- or down-regulated between samples. Marker profiles (spectra) from any two samples may be compared visually. In yet another format, Spotfire Scatter Plot can be used, wherein markers that are detected are plotted as a dot in a plot, wherein one axis of the plot represents the apparent molecular of the markers detected and another axis represents the signal intensity of markers detected. For each sample, markers that are detected and the amount of markers present in the sample can be saved in a computer readable medium. This data can then be compared to a control (*e.g.*, a profile or quantity of markers detected in control, *e.g.*, subjects in whom prostate cancer or BPH is undetectable).

WO 02/46448

PCT/US01/43424

B. Detection by Immunoassay

[0126] In another embodiment, an immunoassay can be used to detect and analyze markers (e.g., PSMA, PSMA', or the like) in a sample. This method comprises: (a) providing an antibody that specifically binds to a marker; (b) contacting a sample with the antibody; and (c) detecting the presence of a complex of the antibody bound to the marker in the sample.

[0127] To prepare an antibody that specifically binds to a marker, purified markers or their nucleic acid sequences can be used. Nucleic acid and amino acid sequences for markers can be obtained by further characterization of these markers. For example, each marker can be peptide mapped with a number of enzymes (e.g., trypsin, V8 protease, etc.). The molecular weights of digestion fragments from each marker can be used to search the databases, such as SWISS-PRO database, for sequences that will match the molecular weights of digestion fragments generated by various enzymes. Using this method, the nucleic acid and amino acid sequences of other markers can be identified if these markers are known proteins in the databases.

[0128] Alternatively, the proteins can be sequenced using protein ladder sequencing. Protein ladders can be generated by, for example, fragmenting the molecules and subjecting fragments to enzymatic digestion or other methods that sequentially remove a single amino acid from the end of the fragment. Methods of preparing protein ladders are described, for example, in International Publication WO 93/24834 (Chait *et al.*) and United States Patent 5,792,664 (Chait *et al.*). The ladder is then analyzed by mass spectrometry. The difference in the masses of the ladder fragments identify the amino acid removed from the end of the molecule.

[0129] If the markers are not known proteins in the databases, nucleic acid and amino acid sequences can be determined with knowledge of even a portion of the amino acid sequence of the marker. For example, degenerate probes can be made based on the N-terminal amino acid sequence of the marker. These probes can then be used to screen a genomic or cDNA library created from a sample from which a marker was initially detected. The positive clones can be identified, amplified, and their recombinant DNA sequences can be subcloned using techniques which are well known. See, e.g., *Current Protocols for Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, Green Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (supplemented through 1999)) and *Molecular Cloning:*

WO 02/46448

PCT/US01/43424

A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)).

[0130] Using the purified markers or their nucleic acid sequences, antibodies that specifically bind to a marker can be prepared using any suitable methods known in the art. *See, e.g.*, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986); and Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975). Such techniques include, but are not limited to, antibody preparation by selection of antibodies from libraries of recombinant antibodies in phage or similar vectors, as well as preparation of polyclonal and monoclonal antibodies by immunizing rabbits or mice (*see, e.g.*, Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989)).

[0131] After the antibody is provided, a marker can be detected and/or quantified using any of suitable immunological binding assays known in the art (*see, e.g.*, U.S. Patent Nos. 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; and 4,837,168). Useful assays include, for example, an enzyme immune assay (EIA) such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), a radioimmune assay (RIA), a Western blot assay, or a slot blot assay. These methods are also described in, *e.g.*, *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volume 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr, eds., 7th ed. 1991); and Harlow & Lane, *supra*.

[0132] Generally, a sample obtained from a subject can be contacted with the antibody that specifically binds the marker. Optionally, the antibody can be fixed to a solid support to facilitate washing and subsequent isolation of the complex, prior to contacting the antibody with a sample. Examples of solid supports include glass or plastic in the form of, *e.g.*, a microtiter plate, a stick, a bead, or a microbead. Antibodies can also be attached to a probe substrate or ProteinChip[®] array and can be analyzed by gas phase ion spectrometry as described above. The sample is preferably a biological fluid sample taken from a subject. Examples of biological samples include urine, blood, serum, plasma, tears, saliva, tissue, *etc.* In a preferred embodiment, the biological fluid comprises serum. The sample can be diluted with a suitable eluant before contacting the sample to the antibody.

[0133] After incubating the sample with antibodies, the mixture is washed and the antibody-marker complex formed can be detected. This can be

WO 02/46448

PCT/US01/43424

accomplished by incubating the washed mixture with a detection reagent. This detection reagent may be, *e.g.*, a second antibody which is labeled with a detectable label. Exemplary detectable labels include magnetic beads (*e.g.*, DYNABEADS™), fluorescent dyes, radiolabels, enzymes (*e.g.*, horse radish peroxidase, alkaline phosphatase and others commonly used in an ELISA), and colorimetric labels such as colloidal gold or colored glass or plastic beads. Alternatively, the marker in the sample can be detected using an indirect assay, wherein, for example, a second, labeled antibody is used to detect bound marker-specific antibody, and/or in a competition or inhibition assay wherein, for example, a monoclonal antibody which binds to a distinct epitope of the marker is incubated simultaneously with the mixture.

[0134] Throughout the assays, incubation and/or washing steps may be required after each combination of reagents. Incubation steps can vary from about 5 seconds to several hours, preferably from about 5 minutes to about 24 hours. However, the incubation time will depend upon the assay format, marker, volume of solution, concentrations and the like. Usually the assays will be carried out at ambient temperature, although they can be conducted over a range of temperatures, such as 10°C to 40°C.

[0135] Immunoassays can be used to determine the presence or absence of a marker, such as PSMA or PSMA' in a sample as well as the quantity of a marker in a sample. First, a test amount of a marker in a sample can be detected using the immunoassay methods described above. If a marker is present in the sample, it will form an antibody-marker complex with an antibody that specifically binds the marker under suitable incubation conditions described above. The amount of an antibody-marker complex can be determined by comparing to a standard. A standard can be, *e.g.*, a known compound or another protein known to be present in a sample. As noted above, the test amount of marker need not be measured in absolute units, as long as the unit of measurement can be compared to a control.

[0136] The methods for detecting these markers in a sample have many applications. For example, one or more markers can be measured to aid prostate cancer or BPH diagnosis or prognosis. In another example, the methods for detection of the markers can be used to monitor responses in a subject to cancer treatment. In another example, the methods for detecting markers can be used to assay for and to identify compounds that modulate expression of these markers *in vivo* or *in vitro*.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

IV. DIAGNOSIS OF PROSTATE CANCER OR BENIGN PROSTATE HYPERPLASIA

[0137] Experiments demonstrate that compared to normal subjects (*e.g.*, having a negative diagnosis for prostate cancer or benign prostate hyperplasia), PSMA and/or PSMA' is up-regulated compared to normal in prostate cancer and down-regulated, compared to normal, in benign prostate hyperplasia. Therefore, this invention also provides methods for aiding a prostate cancer or benign prostate hyperplasia diagnosis using the prostatic markers described herein. These markers can be used alone or in combination with other markers. For example, PSMA is typically differentially present in samples (*e.g.*, serum samples) from prostate cancer or BPH patients and normal subjects in whom prostate cancer or BPH is undetectable. Therefore, detection of one or more of the markers described herein in a person would provide useful information regarding the probability that the person has prostate cancer or BPH. As illustrated further in the examples described below, prostate cancer patients may have higher concentrations of serum PSMA than normal patients.

[0138] In particular, the invention relates to a method for aiding in a diagnosis of prostate cancer or benign prostate hyperplasia that includes detecting (*e.g.*, by gas phase ion spectrometry) PSMA or PSMA' in a sample from a subject, and correlating the detected PSMA or PSMA' with a probable diagnosis of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, or a negative diagnosis. The correlation generally takes into account a presence or absence of the PSMA or PSMA' in the sample and a frequency of PSMA or PSMA' detection in a control. In addition, the correlation also typically takes into account a quantity of the PSMA or PSMA' in the sample relative to a control quantity of the PSMA or PSMA'. In certain embodiments, an immunoassay is used for detecting the PSMA or PSMA' in the sample. In some embodiments, both PSMA and PSMA' are detected and correlated, while in other embodiments, other markers, such as nucleic acids encoding PSMA or other prostatic markers are used. More specifically, detecting an amount of PSMA/PSMA' above the normal range is positively correlated with a diagnosis of prostate cancer and detecting an amount of PSMA/PSMA' below the normal range is positively correlated with a diagnosis of benign prostate hyperplasia.

[0139] Any suitable samples can be obtained from a subject to detect markers. Preferably, a sample is a serum sample from the subject. If desired, the

WO 02/46448

PCT/US01/43424

sample can be prepared as described above to enhance detectability of the markers. For example, to increase the detectability of markers, such as PSMA, a serum sample from the subject can be optionally fractionated by, *e.g.*, size exclusion chromatography.

5 Sample preparations, such as pre-fractionation protocols, are optional and may not be necessary to enhance detectability of markers depending on the methods of detection used. For example, sample preparation may be unnecessary if antibodies that specifically bind markers are used to detect the presence of markers in a sample.

[0140] Any suitable method is optionally used to detect a marker or markers in a sample. For example, gas phase ion spectrometry or a traditional
10 immunoassay (*e.g.*, ELISA, Western blotting) can be used as described above or as known in the art. Using these methods, one or more markers can be detected. Preferably, a sample is tested for the presence of a plurality of markers. Detecting the presence of a plurality of markers, rather than a single marker alone, would provide more information for the diagnostician. Specifically, the detection of a plurality of
15 markers in a sample would increase the percentage of true positive and true negative diagnoses and would decrease the percentage of false positive or false negative diagnoses.

[0141] The detection of the marker or markers is then correlated with a probable diagnosis of prostate cancer or BPH. In some embodiments, the detection of
20 the mere presence or absence of a marker, without quantifying the amount of marker, is useful and can be correlated with a probable diagnosis of prostate cancer or BPH. For example, the mere detection of one or more of markers in a subject being tested may indicate that the subject has a higher probability of having a prostate cancer or BPH. In other embodiments, the detection of markers can involve quantifying the markers to
25 correlate the detection of markers with a probable diagnosis of prostate cancer or BPH. For example, some or all of the markers may be present at a higher quantity in serum samples of prostate cancer or BPH patients than in serum samples of normal subjects. Thus, if the amount of the markers detected in a subject being tested is higher compared to a control amount, then the subject being tested may have a higher probability of
30 having a prostate cancer or BPH.

[0142] When the markers are quantified, it can be compared to a control. A control can be, *e.g.*, the average or median amount of marker present in comparable samples of normal subjects in whom prostate cancer or BPH is undetectable. The

WO 02/46448

PCT/US01/43424

control amount is measured under the same or substantially similar experimental conditions as in measuring the test amount. For example, if a test sample is obtained from a subject's urine sample and a marker is detected using a particular probe, then a control amount of the marker is preferably determined from a serum sample of a patient using the same probe. It is preferred that the control amount of marker is determined based upon a significant number of samples from normal subjects who do not have prostate cancer or BPH so that it reflects variations of the marker amounts in that population.

[0143] Data generated by mass spectrometry can then be analyzed by a computer software. The software can comprise code that converts signal from the mass spectrometer into computer readable form. The software also can include code that applies an algorithm to the analysis of the signal to determine whether the signal represents a "peak" in the signal corresponding to a marker of this invention, or other useful markers. The software also can include code that executes an algorithm that compares signal from a test sample to a typical signal characteristic of "normal" and prostate cancer or BPH and determines the closeness of fit between the two signals. Any suitable algorithm can be used, *e.g.*, an artificial intelligence program, a heuristic learning algorithm, or the like. For example, an artificial intelligence program that includes a fuzzy logic instruction set, a cluster analysis instruction set, a neural network, a genetic algorithm, or the like, can be used. *See, e.g.*, Qureshi *et al.*, *J. Urol.*, 163: 630-633 (2000); Snow, *et al.*, *J. Urol.*, 152:1923 (1994). The software can also include code indicating which the test sample is closest to, thereby providing a probable diagnosis.

V. KITS

[0144] In another aspect, the invention provides kits for aiding a diagnosis of prostate cancer or BPH, wherein the kits can be used to detect the markers of the present invention. For example, the kits can be used to detect any one or more of the markers described herein, which markers are differentially present in samples of a prostate cancer or BPH patient and normal subjects. The kits of the invention have many applications. For example, the kits can be used to differentiate if a subject has prostate cancer or BPH or has a negative diagnosis, thus aiding a prostate cancer or BPH diagnosis. In another example, the kits can be used to identify compounds that

WO 02/46448

PCT/US01/43424

modulate expression of one or more of the markers in *in vitro* or *in vivo* animal models for prostate cancer or BPH.

[0145] In one embodiment, a kit includes (a) at least one adsorbent that captures PSMA or PSMA', (b) a set of instructions for capturing PSMA or PSMA' from a sample by exposing the sample to the adsorbent and quantifying the captured PSMA or PSMA' by gas phase ion spectrometry, and (c) at least one container for packaging the adsorbent and the set of instructions. Optionally, the kit also includes at least one eluant for washing the adsorbent to remove material other than the captured PSMA or PSMA'. The adsorbent typically includes a solid phase adsorbent. In one embodiment, the solid phase adsorbent is provided as a biochip that includes a substrate with at least one surface feature having the solid phase adsorbent bound to the substrate. The substrate is generally a probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer. The kit optionally includes the probe.

[0146] In certain embodiments, the probe includes a substrate with a plurality of surface features. For example, each of the plurality of surface features optionally includes one or more adsorbents bound to the substrate. The plurality of surface features is generally arranged in a line, an orthogonal array, a circle, or an n-sided polygon, wherein n is three or greater. Optionally, the plurality of surface features includes a logical or spatial array. In other embodiments, the solid phase adsorbent includes a bead or resin derivatized with the adsorbent. For example, the bead or resin derivatized with the at least one adsorbent is typically suitable for being placed on a probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer. The kit also optionally includes the probe. As an additional option, the kit also includes at least one reference or control. In yet another embodiment, the kit may further comprise a pre-fractionation spin column (*e.g.*, K-30 size exclusion column).

[0147] The kits of the present invention include various types of adsorbents. For example, in some embodiments, the adsorbent includes a chromatographic adsorbent, such as an anionic adsorbent, a cationic adsorbent, a hydrophobic interaction adsorbent, a hydrophilic interaction adsorbent (*e.g.*, silicon oxide, *etc.*), a metal-chelating adsorbent (*e.g.*, nickel, cobalt, *etc.*) or the like. In other embodiments, the adsorbent includes a biomolecular interaction adsorbent, such as an affinity adsorbent, a polypeptide, an enzyme, a prostatic marker substrate, a receptor, an antibody, or the like. In preferred embodiments, the biomolecular interaction

WO 02/46448

PCT/US01/43424

adsorbent includes a monoclonal antibody that specifically captures the PSMA or PSMA'. In still other embodiments, the kit further includes at least one other adsorbent in addition to the adsorbent that captures PSMA or PSMA'. The other adsorbent is generally capable of capturing at least one other prostatic marker, such as PSMA, PSMA', PSA, free-PSA, complexed-PSA, PAP, PSP94, PSCA, or the like. As an additional option, the kit also includes (1) an eluant in which the PSMA or PSMA' or at least one other prostatic marker is retained on the adsorbent when washed with the eluant, or (2) instructions to wash the adsorbent with the eluant after contacting the adsorbent with a sample.

10 [0148] In other embodiments of the invention, the kit includes (a) at least one adsorbent that captures a prostatic marker mRNA, (b) a set of instructions for capturing the prostatic marker mRNA from a sample by exposing the sample to the adsorbent and quantifying the captured prostatic marker mRNA by gas phase ion spectrometry, and (c) at least one container for packaging the adsorbent and the set of
15 instructions.

[0149] Optionally, the kit can further comprise instructions for suitable operational parameters in the form of a label or a separate insert. For example, the kit may have standard instructions informing a consumer how to wash the probe after, *e.g.*, a serum sample is contacted on the probe. In another example, the kit may have
20 instructions for pre-fractionating a sample to reduce complexity of proteins or nucleic acids in the sample.

[0150] In another embodiment, a kit comprises (a) an antibody that specifically binds to a marker; and (b) a detection reagent. Such kits can be prepared from the materials described above, and the previous discussion regarding the materials
25 (*e.g.*, antibodies, detection reagents, immobilized supports, *etc.*) is fully applicable to this section and will not be repeated. Optionally, the kit may further comprise pre-fractionation spin columns. In some embodiments, the kit may further comprise instructions for suitable operation parameters in the form of a label or a separate insert.

[0151] Optionally, the kit may further comprise a standard or control
30 information so that the test sample can be compared with the control information standard to determine if the test amount of a marker detected in a sample is a diagnostic amount consistent with a diagnosis of prostate cancer or BPH. For example, a standard can be bovine insulin, bovine serum albumin, *etc.*

WO 02/46448

PCT/US01/43424

VI. EXAMPLES

[0152] The following non-limiting examples are offered only by way of illustration.

A. Overview

5 [0153] Efforts to determine the clinical utility of PSMA as a diagnostic or prognostic biomarker have been hampered by the lack of a sensitive immunoassay for quantification of PSMA in body fluids. An objective of these studies was to develop a PSMA immunoassay using a novel ProteinChip® technology from CIPHERGEN Biosystems, Inc. (Fremont, CA), which employs surface enhanced laser
10 desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. In one aspect, murine anti-PSMA monoclonal antibody (MoAb) 7E11-C5.3 was immobilized on protein G coated biochip arrays, samples added, and the chips subjected to surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. The 100kDa PSMA was correctly identified directly without the need for a second PSMA antibody or labels as required for ELISA
15 and other immunoassay formats. A linear standard curve ($R^2=0.985$) was generated using increasing concentration (0.5-50ng/ μ l) of purified recombinant PSMA (rPSMA). See, Figure 4. Quantification of PSMA in serum and seminal plasma at nanomolar levels was determined by normalized mass signal integral. A multiplex version of the surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay, where two MoAbs (one to
20 PSMA and the other to PSA) were bound to the same biochip array, demonstrated the versatility of the system for rapid and simultaneous quantification of both prostate cancer markers. Preliminary surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay results have shown better discrimination between normal donors and prostate cancer patients than by, *e.g.*, Western analyses, and between cancer and benign
25 prostate conditions; both being statistically significant ($p<0.001$). Prior to these studies, immunoblot and sandwich immunoassay had been used to detect PSMA in body fluids, with uncertain reliability, especially in serum. The surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay offers a reliable system to quantify PSMA or PSMA' and to address their viability as a diagnostic/prognostic biomarker for prostate
30 cancer. Furthermore, the surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay provides an innovative platform to rapidly and simultaneously measure multiple biomarkers.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

B. Recombinant Prostate Specific Membrane Antigen Protein

[0154] The procedure for the generation and purification of a recombinant prostate specific membrane antigen protein was described in detail in Xiao *et al.*, (2000) "Generation of a baculovirus recombinant prostate-specific membrane antigen and its use in the development of a novel protein biochip quantitative immunoassay," *Protein Expression and Purification* 19:12-21. The purified rPSMA protein was quantified by the BCA protein assay (Pierce Chemical, Rockford, IL), and stored at -20°C until use.

C. Patients and Serum Samples

10 [0155] All the serum samples used in these studies were obtained from the serum bank of the Virginia Prostate Center at Eastern Virginia Medical School, and were the same group of samples that had been used previously to analyze the serum level of PSMA by Western blotting (Beckett *et al.*, (1999) "Prostate-specific membrane antigen (PSMA) levels in sera from healthy men and patients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer," *Clin. Cancer Res.* 5:4034-4040). The normal male population was defined by negative digital rectal examination and PSA <4.0ng/ml. The range of age for normal males under the age of 50 was from 25-39 with an average of 34, whereas the range for the normal males over 50 was from 51-73 with an average of 60. Benign prostate hyperplasia patients were those who had bladder outlet obstructive symptoms, increased PSA levels (>4ng/ml) and revealed BPH upon transrectal ultrasound biopsy. No treatment had been received by these patients at the time of serum collection. The prostatitis population constituted patients with chronic symptom complex attributed to prostatic source and were absent of other prostatic pathology including obstruction, infection by urine culture, abscess, or carcinoma. Sera of 15 20 25 prostate carcinoma (PCA) were collected from patients with clinical stages of T1 and T2.

D. Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Immunoassay for PSMA

[0156] An immunoassay was developed for the detection and 30 quantification of PSMA in serum using the surface enhanced laser desorption/ionization ProteinChip® technology. The following modification was made based on the method described in Xiao *et al.*, (2000) *Protein Expression and*

WO 02/46448

PCT/US01/43424

Purification 19:12-21, *supra*. After coating spots with 1 μ g of protein G, residual active sites were blocked by incubating the entire biochip in 1M ethanolamine pH 8.0 for 30 minutes (min) with agitation. The biochip was subsequently washed 2x5min with 0.5% Triton X-100 (Sigma) in PBS, and 2x5min with PBS. MoAb 7E11 or 107-1A4 (1.5 μ g) 5 was added to the spots and incubated at room temperature for 3 hours. Unbound antibodies were washed off by incubating the biochip 2x5min in 0.1% Triton X-100 in PBS, and 2x5min in PBS. A 96-well bioprocessor was assembled over the biochips, creating multiple sample holders in a format of 96-well plate. To generate a standard curve, 30 μ l of diluted rPSMA (at 0.5, 1 and 3ng/ μ l in 0.1% Triton X-100 in PBS) was 10 applied to the spots. *See*, Figure 4. To detect PSMA in serum, 400 μ l of serum samples (diluted 1:1 with 0.5% Triton X-100 in PBS) were applied to the spots. The samples were incubated overnight at 4°C with vigorous agitation. The biochip was subsequently washed 2x5min with 0.1% Triton X-100 in PBS, 2x5min with PBS, and briefly with HPLC H₂O. Sinapinic acid (Sigma) saturated in 50% (v/v) acetonitrile, 15 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid and 0.05% Triton X-100 was used as the matrix solution, along with β -galactoglobulin (MW 18,363.3 Da) added as an internal standard (IS) for normalization. The matrix solution (2x0.5 μ l) was applied to the spots, and the chip was air dried at room temperature. The detection of serum PSMA was performed using a PBS-1 mass spectrometer (Ciphergen Biosystems, Inc., CA) with a laser intensity of 20 60. The data in each spectrum was averaged from 120 laser shots and a total of three spectra were collected per sample. The normalized peak area ratios of PSMA and the internal standard were calculated for both serum PSMA and rPSMA. *See*, Figure 4. The levels of serum PSMA were determined by comparing the serum PSMA/IS peak area ratios to rPSMA/IS area ratios of the standard curve.

25 E. Results

I. The Determination of Serum PSMA Levels

[0157] To test the feasibility of using surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay for quantifying serum PSMA, a preliminary study 30 was performed on a total of 60 serum samples. These included 24 normal males (12 with age <50; 12 with age >50), 10 BPH, 17 PCA (stage T1 and T2), and 9 prostatitis. The results of these studies are summarized in Figure 5 and Table 1. The level of

WO 02/46448

PCT/US01/43424

serum PSMA was found to be low in patients with BPH (mean 117.1ng/ml) and prostatitis (mean 119.9ng/ml), medium in normal males (mean 272.9ng/ml and 359.4ng/ml in age <50 and >50 populations, respectively), and high in patients with PCA (mean 623.1ng/ml). Coefficient of variation (CV%) values included a range of

5 1.2-20.1 and an average of 10.1.

[0158] Statistical analysis (*i.e.*, Student T-test) showed that the average serum PSMA level of normal males under 50 years of age did not differ significantly from the values obtained for normal males >50 ($p=0.16$), whereas the differences were significant when comparing the average PSMA levels of either normal population

10 versus PCA ($p<0.001$), normal versus BPH ($p<0.001$), and BPH versus PCA ($p<0.001$). In addition, the mean level of serum PSMA in prostatitis patients differed from that of normal and PCA groups ($p<0.001$), but not from BPH group ($p=0.95$). Since a similar trend of differences were observed among normal, BPH and PCA populations in previous Western blot analysis (Beckett *et al.*, (1999) *Clin. Cancer Res.* 5:4034-4040,

15 *supra*), this preliminary study indicated the specificity and feasibility of the surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay for detection and relative quantification of PSMA in sera.

TABLE 1

	Normal Male <50	Normal Male >50	BPH	PCA	Prostatitis
Number of samples	12	12	10	17	9
range (ng/ml)	106.4-576.9	159.8-611.5	35.6-193.8	349.5-946.6	73.4-168.2
mean (ng/ml)	272.85	359.39	117.09	623.11	119.91
p value (normal <50)*	--	0.16	< 0.001	< 0.001	< 0.01
p value (normal >50)**	--	--	< 0.001	< 0.001	< 0.001
p value (BPH)***	--	--	--	< 0.001	0.95
p value (CaP)****	--	--	--	--	< 0.001

* p value: normal male <50 v.s. each of the other groups

** p value: normal male >50 v.s. each of the other groups

*** p value: BPH v.s. each of the other groups

**** p value: PCA v.s. each of the other groups

WO 02/46448

PCT/US01/43424

2. The Detection of Putative PSMA Isoforms

[0159] Previous studies have reported the existence of a PSMA protein isoform (i.e., PSMA' or PSM') in LNCaP cell lysate, and this isoform can only be detected by antibodies specific to the extracellular domain of PSMA, but not by antibodies to the intracellular domain, such as 7E11 (Grauer *et al.*, (1998) "Identification, purification, subcellular localization of prostate-specific membrane antigen PSM' protein in the LNCaP prostatic carcinoma cell line," *Cancer Res.* 58:4787-4789). MoAb 107-1A4, a MoAb recognizing the extracellular domain of PSMA, was used. Using this MoAb, the 100 kDa full-length PSMA plus an extra peak at 89 kDa was detected in LNCaP cell lysates, as shown in Figure 6A. This smaller protein was not detected by 7E11. The 89 kDa protein is potentially the PSMA' isoform. However, since PSMA' was previously identified with a mass of 95 kDa by Western blot (Grauer *et al.*, (1998) *Cancer Res.* 58:4787-47893, *supra*), the 89 kDa peak will need to be isolated and sequenced to determine if in fact it is a PSMA isoform.

[0160] To determine the best preactivated chip chemistry for the PSMA surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay, LNCaP lysates were used as the antigen source to generate a standard curve for both proteins. Two different preactivated chip surfaces, PS-1 and PS-2 (CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, CA), were compared using MoAbs, 7E11 and 107. As shown in Figure 6B, the PS-1 surface had an overall better performance in capturing the PSMA protein than the PS-2 surface. In case of MoAb 7E11, little of the 100 kDa PSMA (indicated by the arrow) was captured on the PS-2 surface, regardless of the concentration of LNCaP cell lysate. On the other hand, the peak area and intensity of PSMA captured by 7E11 on PS-1 surface was correlated with the concentration of LNCaP cell lysate, suggesting an enhanced specificity and efficiency in antigen recovery. When MoAb 107 was used, both the 89 kDa (arrow at lower of the two indicated mass/charge positions) and the 100 kDa (arrow at higher of the two indicated mass/charge positions) proteins were captured on both surfaces. However, the PS-1 surface showed a better separation and linearity of the two closely existing peaks than the PS-2 surface. Although not shown, a standard curve for both proteins was generated successfully using LNCaP lysate as the antigen source in combination with MoAb 107. Assay optimization may include the use of MoAb 107 with a PBS-II (CIPHERGEN Biosystems, Inc., CA) and a mass spectrometry grade SPA. The optimized assay will be used to quantify both PSMA and the 89 kDa

WO 02/46448

PCT/US01/43424

protein in serum and compare the results with serum PSA levels. Initial results indicate the 100 kDa and 89 kDa proteins are present in serum and seminal plasma in differing amounts (data not shown). Additional studies will also be conducted to quantify PSMA in seminal plasma and urine.

5 3. **Multiplex Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization
Immunoassay for PSMA and PSA**

[0161] Multiplex assays are relatively easy to develop using the surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay system. For example, Figures 7A-H show a multiplex immunoassay for detection of PSMA and PSA in seminal plasma. 10 MoAbs to PSA and PSMA or combinations of two antibodies were bound to the preactivated (PS-1) surface after protein G binding. Panel A shows a peak corresponding to PSMA (99,920.8) was identified using the anti-PSMA (7E11-C5.3) MoAb alone. Panel B shows the detection of free PSA (28,430 Da) using the anti-PSA antibody alone. Panel C shows the detection of both free PSA and PSMA with a 15 surface enhanced laser desorption/ionization immunoassay using a single chip array containing MoAbs to both PSA and PSMA. Panel D shows that free PSA and PSMA were not detected when using the isotype-matched control immunoglobulin in place of the biomarker specific MoAbs. The doubly charged immunoglobulin (73.1-73.4 kDa) is observed when either the specific MoAb or control IgG was used (panels A-D). Note 20 that broad peak obtained for PSMA shown in panels A-D, when using the multiplex assay, could be enhanced by selecting the optimal intensity for PSMA and adjusting the mass axis, as shown in panels E-H. This analysis is described further in Wright *et al.*, ProteinChip® surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein chip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures," *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2:264-276. Essentially any combination of markers is optionally detected according to these multiplex immunoassay formats including, *e.g.*, the simultaneous detection/quantification of free- and complexed-PSA and PSMA.

[0162] The present invention provides novel materials and methods for 30 aiding prostate cancer diagnosis using markers that are differentially present in samples of a prostate cancer patient and a normal subject who does not have prostate cancer. While specific examples have been provided, the above description is illustrative and not restrictive. Any one or more of the features of the previously described

WO 02/46448

PCT/US01/43424

embodiments can be combined in any manner with one or more features of any other embodiments in the present invention. Furthermore, many variations of the invention will become apparent to those skilled in the art upon review of the specification. The scope of the invention should, therefore, be determined not with reference to the above description, but instead should be determined with reference to the appended claims
5 along with their full scope of equivalents.

[0163] All publications, patents, patent applications, or other documents cited in this application are incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent, patent application, or other
10 document were individually indicated to be incorporated by reference for all purposes. By their citation of various references in this document, Applicants do not admit any particular reference is "prior art" to their invention.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for quantifying PSMA or PSMA' in a sample, the method comprising:
 - 5 (a) exposing the sample to at least one substrate-bound adsorbent that captures the PSMA or PSMA', thereby capturing the PSMA or PSMA' in the sample; and
 - (b) quantifying the captured PSMA or PSMA' by gas phase ion spectrometry.
2. The method of claim 1, wherein the sample is serum.
3. The method of claim 1, wherein the sample comprises one or more of:
 - 10 body fluid, cell lysate, seminal fluid, seminal plasma, prostatic fluid, saliva, blood, lymph, lung/bronchial washes, mucus, feces, nipple secretions, sputum, tears, or urine.
4. The method of claim 3, wherein the cell lysate is derived from prostatic tissue or cells.
5. The method of claim 3, wherein the cell lysate is derived from one or more of:
 - 15 primary tissue or cells, cultured tissue or cells, normal tissue or cells, diseased tissue or cells, benign tissue or cells, cancerous tissue or cells, salivary glandular tissue or cells, intestinal tissue or cells, neural tissue or cells, renal tissue or cells, lymphatic tissue or cells, bladder tissue or cells, urogenital tissues or cells, tumoral tissue or cells, or tumoral neovasculature tissue or cells.
6. The method of claim 1, further comprising fractionating biomolecules in the sample to collect a sample fraction that includes the PSMA or PSMA', wherein the sample fraction is used as the sample in (a).
 - 20
7. The method of claim 6, wherein the biomolecules are fractionated by one or more of: electrophoresis, dialysis, filtration, or centrifugation.
8. The method of claim 6, wherein the biomolecules are fractionated by one or more of: high performance liquid chromatography, affinity chromatography, ion exchange chromatography, or size exclusion chromatography.
 - 25

WO 02/46448

PCT/US01/43424

9. The method of claim 1, wherein the biomolecules are fractionated by:
(i) separating biomolecules in the sample into a one- or two-dimensional array of spots, wherein each spot comprises one or more of the biomolecules; and
(ii) selecting and removing a spot from the array which is suspected of
5 comprising the PSMA or PSMA'.
10. The method of claim 9, wherein the method further comprises digesting the biomolecules in the selected spot with an enzyme prior to analyzing the selected spot by the gas phase ion spectrometry.
11. The method of claim 9, further comprising comparing an amount of
10 detected PSMA or PSMA' with a control.
12. The method of claim 1, wherein (a) further comprises removing material other than the captured PSMA or PSMA'.
13. The method of claim 12, wherein the material is removed by one or more washes.
14. The method of claim 13, wherein each of the one or more washes
15 comprises an identical or a different elution condition relative to at least one preceding wash.
15. The method of claim 14, wherein elution conditions differ according to
20 pH, buffering capacity, ionic strength, a water structure characteristic, detergent type, detergent strength, hydrophobicity, dielectric constant, or concentration of at least one solute.
16. The method of claim 1, wherein the at least one substrate-bound adsorbent comprises at least one chromatographic adsorbent.
17. The method of claim 16, wherein the at least one chromatographic
25 adsorbent comprises one or more of: an anionic adsorbent, a cationic adsorbent, a hydrophobic interaction adsorbent, a hydrophilic interaction adsorbent, or a metal-chelating adsorbent.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

18. The method of claim 17, wherein the metal-chelating adsorbent comprises nickel or cobalt.
19. The method of claim 17, wherein the hydrophilic interaction adsorbent comprises silicon oxide.
- 5 20. The method of claim 1, wherein the at least one substrate-bound adsorbent comprises at least one biomolecular interaction adsorbent.
21. The method of claim 20, wherein the at least one biomolecular interaction adsorbent comprises one or more of: an affinity adsorbent, a polypeptide, an enzyme, a prostatic marker substrate, a receptor, or an antibody.
- 10 22. The method of claim 21, wherein the at least one biomolecular interaction adsorbent comprises a monoclonal antibody that specifically captures the PSMA or PSMA'.
- 15 23. The method of claim 1, wherein the at least one substrate-bound adsorbent is provided as a biochip comprising a substrate with at least one surface feature comprising the at least one substrate-bound adsorbent bound to the substrate.
24. The method of claim 23, wherein the at least one substrate-bound adsorbent comprises at least one monoclonal antibody that specifically captures the PSMA or PSMA'.
- 20 25. The method of claim 23, wherein the at least one substrate-bound adsorbent comprises at least one protein that specifically binds an immunoglobulin and the method comprises exposing the sample to the immunoglobulin, wherein the immunoglobulin specifically binds PSMA or PSMA', thereby forming a PSMA- or PSMA'-complex, and exposing the complex to the at least one substrate-bound adsorbent.
- 25 26. The method of claim 1, wherein the at least one substrate-bound adsorbent comprises a bead or resin derivatized with the at least one adsorbent.
27. The method of claim 1, further comprising comparing an amount of quantified PSMA or PSMA' with a control.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

28. The method of claim 1, further comprising quantifying both the PSMA and the PSMA' in the sample.
29. The method of claim 28, further comprising comparing amounts of quantified PSMA and PSMA' with one another or with a control.
- 5 30. The method of claim 28, further comprising comparing a ratio of amounts of quantified PSMA and PSMA' with a control.
31. The method of claim 1, further comprising quantifying at least one other prostatic marker in the sample, wherein (a) further comprises exposing the sample to at least one substrate-bound adsorbent that captures the at least one other prostatic marker.
- 10 32. The method of claim 31, further comprising comparing amounts of quantified PSMA or PSMA' and the at least one other prostatic marker with one another or with a control.
33. The method of claim 31, wherein the at least one substrate-bound adsorbent is provided as a biochip comprising a substrate with at least one surface
15 feature comprising the at least one substrate-bound adsorbent bound to the substrate, and wherein prostatic markers are captured on the at least one surface feature.
34. The method of claim 33, wherein the at least one substrate-bound adsorbent comprises a protein that specifically binds immunoglobulins and the method
20 comprises exposing the sample to the immunoglobulins, each of which specifically binds one of the prostatic biomarkers, thereby forming complexes with the prostatic markers, and exposing the complexes to the at least one substrate-bound adsorbent.
35. The method of claim 31, further comprising comparing a ratio of amounts of quantified PSMA or PSMA' and the at least one other prostatic marker with a control.
- 25 36. The method of claim 31, wherein the at least one other prostatic marker comprises one or more of: PSMA, PSMA', PSA, free-PSA, complexed-PSA, PAP, PSP94, or PSCA.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

37. The method of claim 1, wherein the gas phase ion spectrometry is laser desorption/ionization mass spectrometry.

38. The method of claim 37, comprising:

- 5 of signal for one or more mass/charge ratios;
- (i) generating data on the sample with a mass spectrometer indicating intensity
 - (ii) transforming the data into computer-readable form; and
 - (iii) operating a programmable digital computer and executing an algorithm that
- 15 detects signal in the computer-readable data representing the PSMA or PSMA'.

39. The method of claim 37, wherein the laser desorption/ionization mass spectrometry comprises:

- (i) providing a probe adapted for use with a mass spectrometer comprising an adsorbent attached thereto;
 - (ii) contacting the sample with the adsorbent; and
 - (iii) desorbing and ionizing the PSMA or PSMA' from the probe and detecting
- 20 the desorbed/ionized PSMA or PSMA' with the mass spectrometer.

40. The method of claim 39, wherein the substrate is suitable for being placed on a probe which is adapted for use with the mass spectrometer.

41. The method of claim 37, wherein the laser desorption/ionization mass spectrometry comprises:

- (i) providing a substrate comprising an adsorbent attached thereto;
 - (ii) contacting the sample with the adsorbent;
 - (iii) placing the substrate on a probe adapted for use with a mass spectrometer
- 25 comprising an adsorbent attached thereto; and
- (iv) desorbing and ionizing the PSMA or PSMA' from the probe and detecting
- the desorbed/ionized PSMA or PSMA' with the mass spectrometer.

42. The method of claim 41, wherein the substrate comprises a bead or resin derivatized with the adsorbent.

43. A method for aiding in a diagnosis of prostate cancer or benign prostate hyperplasia comprising:

WO 02/46448

PCT/US01/43424

- (a) detecting PSMA or PSMA' in a sample from a subject; and
(b) correlating the detected PSMA or PSMA' with a probable diagnosis of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, or a negative diagnosis.
44. The method of claim 43, wherein the correlation takes into account a
5 presence or absence of the PSMA or PSMA' in the sample and a frequency of PSMA
or PSMA' detection in a control.
45. The method of claim 43, wherein the correlation takes into account a
quantity of the PSMA or PSMA' in the sample relative to a control quantity of the
PSMA or PSMA'.
- 10 46. The method of claim 45, wherein an amount of PSMA or PSMA' above a
control amount is positively correlated with a positive diagnosis of prostate cancer and
an amount of PSMA or PSMA' below a control amount is positively correlated with a
positive diagnosis of benign prostate hyperplasia.
47. The method of claim 43, wherein an immunoassay is used for detecting the
15 PSMA or PSMA' in the sample.
48. The method of claim 43, wherein the sample is serum.
49. The method of claim 43, wherein the sample is selected from the group
consisting of: body fluid, cell lysate, seminal fluid, seminal plasma, prostatic fluid,
saliva, blood, lymph, lung/bronchial washes, mucus, feces, nipple secretions, sputum,
20 tears, and urine.
50. The method of claim 49, wherein the cell lysate is derived from prostatic
tissue or cells.
51. The method of claim 49, wherein the cell lysate is derived from one or
more of: primary tissue or cells, cultured tissue or cells, normal tissue or cells, diseased
25 tissue or cells, benign tissue or cells, cancerous tissue or cells, prostatic tissue or cells,
salivary glandular tissue or cells, intestinal tissue or cells, neural tissue or cells, renal
tissue or cells, lymphatic tissue or cells, tumoral tissue or cells, or tumoral
neovasculature tissue or cells.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

52. The method of claim 43, comprising detecting the PSMA or PSMA' by gas phase ion spectrometry.
53. The method of claim 52, wherein the gas phase ion spectrometry is laser desorption/ionization mass spectrometry.
- 5 54. The method of claim 53, wherein the laser desorption/ionization mass spectrometry is surface enhanced.
55. The method of claim 53, comprising:
- (i) generating data on the sample with a mass spectrometer indicating intensity of signal for one or more mass/charge ratios;
- 10 (ii) transforming the data into computer-readable form; and
- (iii) operating a programmable digital computer and executing an algorithm that determines closeness-of-fit between the computer-readable data and data indicating a diagnosis of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, or a negative diagnosis.
56. The method of claim 55, wherein the algorithm comprises an artificial intelligence algorithm or a heuristic learning algorithm.
- 15 57. The method of claim 56, wherein the artificial intelligence algorithm comprises one or more of: a fuzzy logic instruction set, a cluster analysis instruction set, a neural network, or a genetic algorithm.
58. The method of claim 53, wherein the laser desorption/ionization mass spectrometry comprises:
- 20 (i) providing a substrate comprising at least one adsorbent attached thereto;
- (ii) contacting the sample with the at least one adsorbent; and
- (iii) desorbing and ionizing the PSMA or PSMA' from the substrate and detecting the desorbed/ionized PSMA or PSMA' with the mass spectrometer.
- 25 59. The method of claim 58, wherein the substrate is a probe adapted for use with the mass spectrometer.
60. The method of claim 58, wherein the substrate is suitable for being placed on a probe which is adapted for use with the mass spectrometer.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

61. The method of claim 58, wherein the at least one adsorbent comprises at least one chromatographic adsorbent.
62. The method of claim 61, wherein the at least one chromatographic adsorbent comprises one or more of: an anionic adsorbent, a cationic adsorbent, a hydrophobic interaction adsorbent, a hydrophilic interaction adsorbent, or a metal-chelating adsorbent.
63. The method of claim 62, wherein the metal-chelating adsorbent comprises nickel or cobalt.
64. The method of claim 62, wherein the hydrophilic interaction adsorbent comprises silicon oxide.
65. The method of claim 58, wherein the at least one adsorbent comprises at least one biomolecular interaction adsorbent.
66. The method of claim 65, wherein the at least one biomolecular interaction adsorbent comprises one or more of: an affinity adsorbent, a polypeptide, an enzyme, a prostatic marker substrate, a receptor, or an antibody.
67. The method of claim 65, wherein the at least one biomolecular interaction adsorbent comprises a monoclonal antibody that specifically captures the PSMA or PSMA'.
68. The method of claim 43, wherein the method comprises detecting and correlating both the PSMA and the PSMA' in the sample.
69. The method of claim 68, wherein detecting a presence of the PSMA and the PSMA' is correlated with a positive diagnosis of prostate cancer or benign prostate hyperplasia.
70. The method of claim 68, wherein the correlation takes into account presence or absence of the PSMA and the PSMA' in the sample and a frequency of PSMA and PSMA' detection in a control.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

71. The method of claim 70, wherein the correlation further takes into account quantities of the PSMA and the PSMA', or a ratio thereof, in the sample relative control quantities of the PSMA and the PSMA', or a ratio thereof.
72. The method of claims 43, wherein the method comprises detecting and
5 correlating at least one other prostatic marker in the sample.
73. The method of claim 72, wherein the at least one other prostatic marker comprises one or more of: PSMA, PSMA', PSA, free-PSA, complexed-PSA, PAP, PSP94, or PSCA.
74. The method of claim 72, wherein detecting a presence of the PSMA or
10 PSMA' and the at least one other prostatic marker is correlated with a positive diagnosis of prostate cancer or benign prostate hyperplasia.
75. The method of claim 72, wherein the correlation takes into account a presence or absence of the PSMA or PSMA' and the at least one other prostatic marker in the sample and a frequency of detection of the PSMA or PSMA' and the at least one
15 other prostatic marker in a control.
76. The method of claim 75, wherein the correlation further takes into account quantities or ratios of quantities of the PSMA or PSMA' and the at least one other prostatic marker in the sample relative to control quantities or ratios of quantities of the PSMA or PSMA' and the at least one other prostatic marker.
- 20 77. A biochip that is removably insertable into a gas phase ion spectrometer comprising a substrate with at least one surface feature comprising at least one adsorbent bound to the substrate, wherein the at least one adsorbent is capable of capturing PSMA or PSMA'.
78. The biochip of claim 77, wherein the substrate comprises one or more of:
25 glass, ceramic, plastic, a magnetic material, a polymer, an organic polymer, a conductive polymer, a native biopolymer, a metal, a metalloid, an alloy, or a metal coated with an organic polymer.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

79. The biochip of claim 77, wherein the at least one adsorbent is capable of resolving PSMA or PSMA' from a sample under at least one elution condition.
80. The biochip of claim 77, wherein the at least one adsorbent comprises at least one chromatographic adsorbent.
- 5 81. The biochip of claim 80, wherein the at least one chromatographic adsorbent comprises one or more of: an anionic adsorbent, a cationic adsorbent, a hydrophobic interaction adsorbent, a hydrophilic interaction adsorbent, or a metal-chelating adsorbent.
82. The biochip of claim 81, wherein the metal-chelating adsorbent comprises nickel or cobalt.
- 10 83. The biochip of claim 81, wherein the hydrophilic interaction adsorbent comprises silicon oxide.
84. The biochip of claim 77, wherein the at least one adsorbent comprises at least one biomolecular interaction adsorbent.
- 15 85. The biochip of claim 84, wherein the at least one biomolecular interaction adsorbent comprises one or more of: an affinity adsorbent, a polypeptide, an enzyme, a prostatic marker substrate, a receptor, or an antibody.
86. The biochip of claim 84, wherein the at least one biomolecular interaction adsorbent comprises a monoclonal antibody that specifically captures the PSMA or
- 20 PSMA'.
87. The biochip of claim 77, wherein the at least one surface feature comprises a plurality of surface features.
88. The biochip of claim 87, wherein the plurality of surface features is arranged in a line, an orthogonal array, a circle, or an n-sided polygon, wherein n is
- 25 three or greater.
89. The biochip of claim 87, wherein the plurality of surface features comprises a logical or spatial array.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

90. The biochip of claim 87, wherein each of the plurality of surface features comprises identical or different adsorbents, or one or more combinations thereof.
91. The biochip of claim 87, wherein at least two of the plurality of surface features comprise identical or different adsorbents, or one or more combinations thereof.
92. The biochip of claim 87, further comprising at least one other adsorbent in addition to the at least one adsorbent capable of capturing PSMA or PSMA', wherein the at least one other adsorbent is bound to the substrate at one or more of the plurality of surface features.
93. The biochip of claim 92, wherein the at least one other adsorbent is capable of capturing at least one other prostatic marker.
94. The biochip of claim 93, wherein the at least one other prostatic marker comprises one or more of: PSMA, PSMA', PSA, free-PSA, complexed-PSA, PAP, PSP94, or PSCA.
95. A kit comprising:
- (a) at least one adsorbent that captures PSMA or PSMA';
 - (b) a set of instructions for capturing PSMA or PSMA' from a sample by exposing the sample to the adsorbent and quantifying the captured PSMA or PSMA' by gas phase ion spectrometry; and
 - (c) at least one container for packaging the adsorbent and the set of instructions.
96. The kit of claim 95, further comprising at least one eluant for washing the adsorbent to remove material other than the captured PSMA or PSMA'.
97. The kit of claim 95, wherein the at least one adsorbent comprises at least one solid phase adsorbent.
98. The kit of claim 97, wherein the at least one solid phase adsorbent is provided as a biochip comprising a substrate with at least one surface feature comprising the at least one solid phase adsorbent bound to the substrate.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

99. The kit of claim 98, wherein the substrate is a probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer.
100. The kit of claim 99, wherein the kit further comprises the probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer.
- 5 101. The kit of claim 100, wherein the probe comprises a substrate with a plurality of surface features.
102. The kit of claim 101, wherein each of the plurality of surface features comprises one or more adsorbents bound to the substrate.
- 10 103. The kit of claim 101, wherein the plurality of surface features is arranged in a line, an orthogonal array, a circle, or an n-sided polygon, wherein n is three or greater.
104. The kit of claim 101, wherein the plurality of surface features comprises a logical or spatial array.
- 15 105. The kit of claim 97, wherein the at least one solid phase adsorbent comprises a bead or resin derivatized with the at least one adsorbent.
106. The kit of claim 105, wherein the bead or resin derivatized with the at least one adsorbent is suitable for being placed on a probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer.
- 20 107. The kit of claim 106, wherein the kit further comprises the probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer.
108. The kit of claim 95, wherein the kit further comprises at least one reference or control.
109. The kit of claim 95, wherein the at least one adsorbent comprises at least one chromatographic adsorbent.
- 25 110. The kit of claim 109, wherein the at least one chromatographic adsorbent comprises one or more of: an anionic adsorbent, a cationic adsorbent, a hydrophobic

WO 02/46448

PCT/US01/43424

interaction adsorbent, a hydrophilic interaction adsorbent, or a metal-chelating adsorbent.

111. The kit of claim 110, wherein the metal-chelating adsorbent comprises nickel or cobalt.

5 112. The kit of claim 110, wherein the hydrophilic interaction adsorbent comprises silicon oxide.

113. The kit of claim 95, wherein the at least one adsorbent comprises at least one biomolecular interaction adsorbent.

10 114. The kit of claim 113, wherein the at least one biomolecular interaction adsorbent comprises one or more of: an affinity adsorbent, a polypeptide, an enzyme, a prostatic marker substrate, a receptor, or an antibody.

115. The kit of claim 113, wherein the at least one biomolecular interaction adsorbent comprises a monoclonal antibody that specifically captures the PSMA or PSMA'.

15 116. The kit of claim 95, wherein the kit further comprises at least one other adsorbent in addition to the at least one adsorbent that captures PSMA or PSMA'.

117. The kit of claim 116, wherein the at least one other adsorbent is capable of capturing at least one other prostatic marker.

20 118. The kit of claim 117, wherein the at least one other prostatic marker comprises one or more of: PSMA, PSMA', PSA, free-PSA, complexed-PSA, PAP, PSP94, or PSCA.

25 119. The kit of claim 95, further comprising (1) an eluant wherein the PSMA or PSMA' or at least one other prostatic marker is retained on the at least one adsorbent when washed with the eluant, or (2) instructions to wash the at least one adsorbent with the eluant after contacting the adsorbent with a sample.

120. A device or integrated system for quantifying PSMA or PSMA' in at least one sample, comprising:

WO 02/46448

PCT/US01/43424

- (a) at least one adsorbent capable of capturing the PSMA or PSMA' in the at least one sample; and
- (b) a gas phase ion spectrometer for quantifying the PSMA or PSMA' captured on the at least one adsorbent.
- 5 121. The device or integrated system of claim 120, wherein the gas phase ion spectrometer is a laser desorption/ionization mass spectrometer.
122. The device or integrated system of claim 120, further comprising a computer or a computer readable medium, operably connected to the gas phase ion spectrometer, comprising at least one computer program having one or more of:
- 10 (i) at least one instruction set for analyzing or processing data quantified by the gas phase ion spectrometer;
- (ii) at least one instruction set for entering data into a database; or,
- (iii) at least one instruction set for determining correlations between at least one quantified prostatic marker, or combinations of quantified prostatic markers, and a
- 15 diagnosis of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, or a negative diagnosis.
123. The device or integrated system of claim 120, wherein the at least one adsorbent comprises at least one solid phase adsorbent.
124. The device or integrated system of claim 123, wherein the at least one solid phase adsorbent is provided as a biochip comprising a substrate with at least one
- 20 surface feature comprising the at least one solid phase adsorbent bound to the substrate.
125. The device or integrated system of claim 124, wherein the substrate is a probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer.
126. The device or integrated system of claim 124, wherein the substrate comprises a plurality of surface features.
- 25 127. The device or integrated system of claim 126, wherein the plurality of surface features is arranged in a line, an orthogonal array, a circle, or an n-sided polygon, wherein n is three or greater.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

128. The device or integrated system of claim 126, wherein the plurality of surface features comprises a logical or spatial array.

129. The device or integrated system of claim 123, wherein the at least one solid phase adsorbent comprises a bead or resin derivatized with the at least one
5 adsorbent.

130. The device or integrated system of claim 129, wherein the bead or resin derivatized with the at least one adsorbent is suitable for being placed on a probe adapted for use with a gas phase ion spectrometer.

131. A method for quantifying prostatic marker mRNA in a sample, the method
10 comprising:

(a) exposing the sample to at least one adsorbent that captures the prostatic marker mRNA, thereby capturing the prostatic marker mRNA in the sample; and

(b) quantifying the captured prostatic marker mRNA by gas phase ion spectrometry.

15 132. The method of claim 131, wherein the sample comprises cell lysate derived from prostatic tissue or cells.

133. The method of claim 131, wherein the gas phase ion spectrometry is laser desorption/ionization mass spectrometry.

134. The method of claim 131, further comprising comparing a quantity of the
20 captured prostatic marker mRNA with a control.

135. The method of claim 131, further comprising quantifying a plurality of different prostatic marker mRNAs.

136. The method of claim 131, wherein the at least one adsorbent comprises at least one biomolecular interaction adsorbent.

25 137. The method of claim 136, wherein the at least one biomolecular interaction adsorbent comprises at least one prostatic marker cDNA.

WO 02/46448

PCT/US01/43424

138. A method for aiding in a diagnosis of prostate cancer or benign prostate hyperplasia comprising:

- (a) detecting at least one prostatic marker mRNA in a sample from a subject;
- and
- 5 (b) correlating the at least one detected prostatic marker mRNA with a probable diagnosis of prostate cancer, benign prostate hyperplasia, or a negative diagnosis.

139. A biochip comprising a substrate with at least one surface feature comprising at least one adsorbent bound to the substrate, wherein the at least one adsorbent is capable of capturing one or more prostatic marker mRNAs.

10 140. A kit comprising:

- (b) at least one adsorbent that captures a prostatic marker mRNA;
- (b) a set of instructions for capturing the prostatic marker mRNA from a sample by exposing the sample to the adsorbent and quantifying the captured prostatic marker mRNA by gas phase ion spectrometry; and
- 15 (c) at least one container for packaging the adsorbent and the set of instructions.

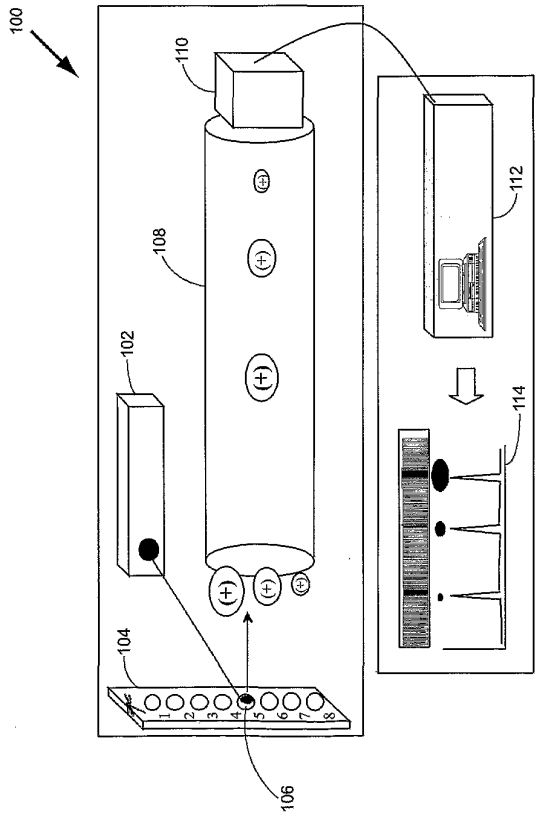


Fig. 1

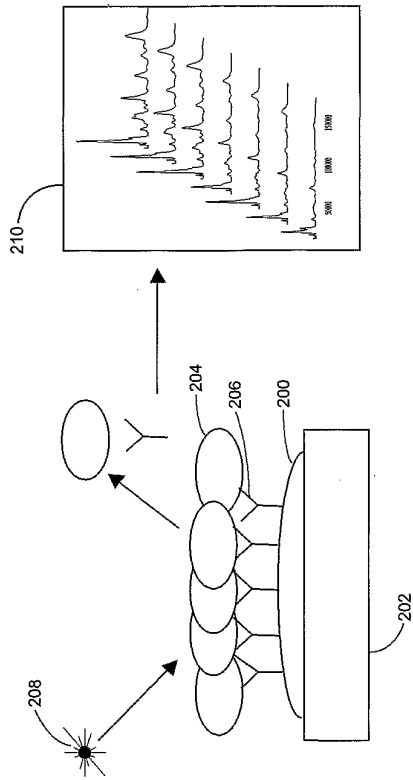


Fig. 2

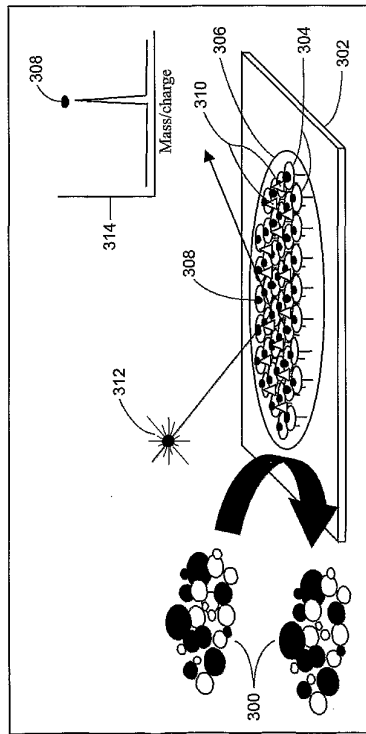


Fig. 3

4/8

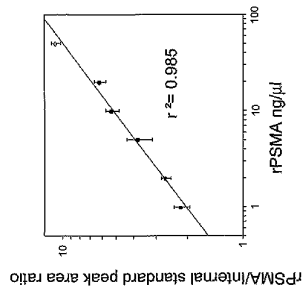


Fig. 4B

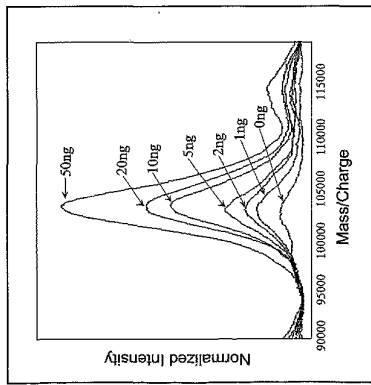


Fig. 4A

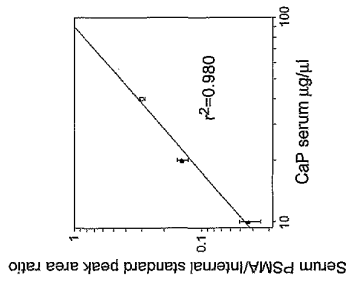


Fig. 4C

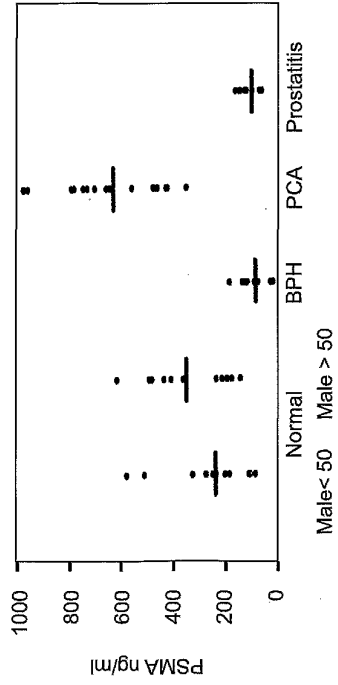


Fig. 5

7/8

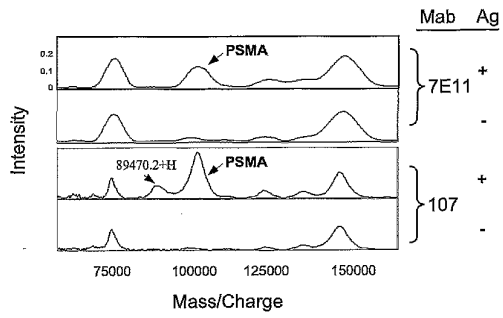


Fig. 6A

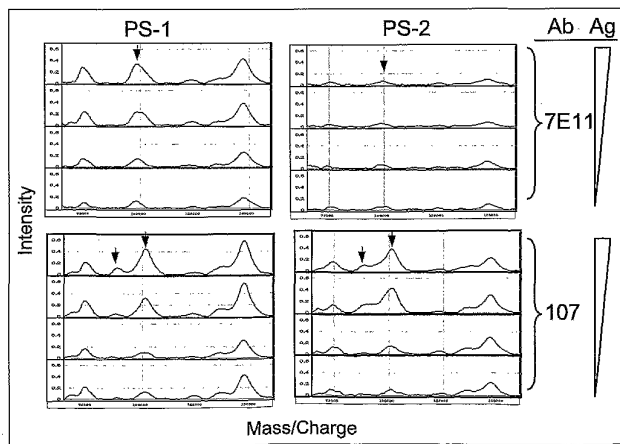


Fig. 6B

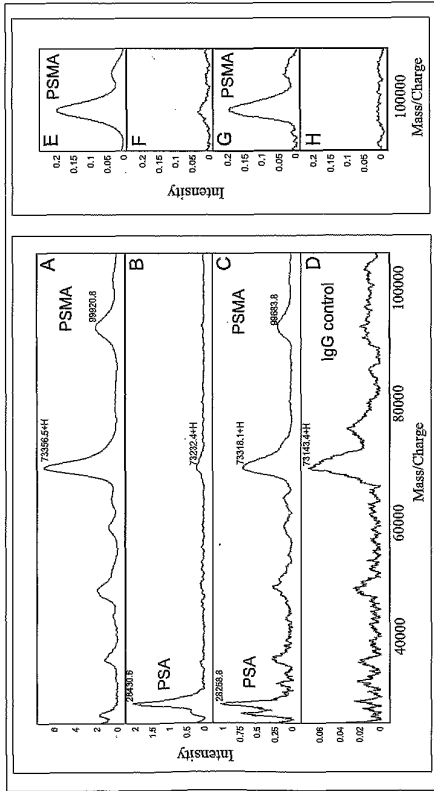


Fig. 7

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/046448 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/00, G01N 27/26, 33/53
- (21) International Application Number: PCT/US01/43424
- (22) International Filing Date: 16 November 2001 (16.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/252,452 20 November 2000 (20.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL [US/US]; 700 West Olney Road, Norfolk, VA 23507 (US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): WRIGHT, George, L., Jr. [US/US]; 829 Moultrie Court, Virginia Beach, VA 23455 (US).
- (74) Agents: QUINE, Jonathan, Alan et al.; Quine Intellectual Property Law Group, P.C., P.O. Box 458, Alameda, CA 94501 (US).
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, HU, IT, LU, MC, NL, PE, 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
- (88) Date of publication of the international search report: 11 December 2003
- 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 02/046448 A3

(54) Title: METHODS AND DEVICES FOR THE QUANTITATIVE DETECTION OF PROSTATE SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN AND OTHER PROSTATIC MARKERS

(57) Abstract: The invention provides for the detection and quantification of PSMA, PSMA', and other prostatic markers in serum samples as well as in other types of samples for use in differentiating prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, and negative diagnoses. The diagnostic detection of nucleic acids, such as mRNAs, which encode prostatic markers in cell lysates and other sample sources is also provided. In addition to the multiplexed detection/quantification of these protein- and nucleic acid-based markers, the invention also includes biochips, kits and integrated systems.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application ? PCT/US01/43464
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(Cl.) : C12Q 1/00, G01N 47/26, 53/53 US Cl. : 204/450; 485/4, 7.1 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) U.S. : 204/450; 485/4, 7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in it, searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms) BIOSIS, USPATFUL, CAPLUS, TOXCENTER, WPIDS, WPINDEX search terms: assay, quantify, psm, gas phase ion spectrometry, ion, antibody		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to
Y	WO 94/09820 A1 (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 11 May 1994, see especially page 18, lines 5-21 and Figures 1-4 and 17.	1-30 and 3
Y	NELSON et al. Mass Spectrometric Immunoassay. Analytical Chemistry, 1995, Vol 67, pages 1153-1158.	1-30 and 37
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "B" Earlier document 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 "M" Document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 JANUARY 2003	Date of mailing of the international search report 22 JAN 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 505-3930	Authorized officer SUSAN UNGER Telephone No. (703) 308-0166 <i>Janice Ford for</i>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/43424**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos. _____
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos. _____
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos. _____
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 64(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos. _____
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. _____
1-80 and 37-42

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/48425

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

- Group I, claim(s) 1-30 and 37-42, drawn to a method for quantifying PSMA or PSMA'.
- Group II, claim(s) 31-36, drawn to a method for quantifying PSMA or PSMA' and at least one other prostatic marker.
- Group III, claim(s) 43-67, drawn to a method for distinguishing BPH from Prostate CA and normal prostate tissue comprising assaying for PSMA or PSMA'.
- Group IV, claim(s) 68-71, drawn to a method for distinguishing BPH from Prostate CA and normal prostate tissue comprising assaying for PSMA and PSMA'.
- Group V, claim(s) 72-76, drawn to a method for distinguishing BPH from Prostate CA and normal prostate tissue comprising assaying for PSMA or PSMA' and at least one other prostatic marker.
- Group VI, claim(s) 77-92 and 95-115, drawn to a biochip capable of adsorbing PSMA or PSMA'.
- Group VII, claim(s) 93-95 and 116-119, drawn to a biochip capable of adsorbing PSMA or PSMA' and at least one other prostatic marker.
- Group VIII, claim(s) 98 and 103-112 drawn to a kit comprising a biochip capable of adsorbing PSMA or PSMA' and at least one reference or control.
- Group IX, claim(s) 120-180, drawn to a device or integrated system.
- Group X, claim(s) 181-184 and 186-187, drawn to a method of quantifying a prostatic marker mRNA.
- Group XI, claim(s) 181 and 186-187, drawn to a method of quantifying a plurality of prostatic markers.
- Group XII, claim(s) 188, drawn to
- Group XIII, claim 189-140, drawn to a kit and biochip which adsorbs a prostatic marker mRNA.

The inventions listed as Groups do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The technical feature linking Groups I-XIII appears to be that they are all related to a method for quantifying PSMA or PSMA' comprising capturing PSMA or PSMA' and quantifying by gas phase ion spectrometry, wherein the ion spectrometry is laser desorption/ionization mass spectrometry.

However, WO94/09820 specifically teaches an immunoassay method for quantifying PSMA in a sample (p. 18, lines 5-21 and see Figures 1-4, 17). Although the reference does not teach quantifying by gas phase ion spectrometry, Nelson et al. (Anal. Chem., 1995, 67: 1153-1158) specifically teach an immunoassay method for quantifying an analyte of interest using laser desorption/ionization mass spectrometry (see pages 1154-1160). Given that both an immunoassay for quantification of PSMA was known in the art and immunoassay for quantification by gas phase ion spectrometry were known in the art, it would have been prima facie obvious to one of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have substituted the PSMA sample/antibody of WO94/09820 into the method of Nelson et al with a reasonable expectation of success.

Therefore, the technical feature linking the inventions of groups I-XIII does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art.

Unity of invention is fulfilled only when there is a technical relationship among the inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features which define a contribution over the prior art. If there is no special technical feature, if multiple products, processes of manufacture or uses are claimed, the first invention of the category first mentioned in the claims of the application will be considered as the main invention in the claims, see PCT article 17(3) (a) and 1.476 (c), 37 C.F.R. 1.475(d). Group I is the main invention. After that, all other products and methods will be broken out as separate groups (see 37 C.F.R. 1.476(d).)

The invention of Group I is a method for quantifying PSMA or PSMA' in a sample comprising capturing PSMA or PSMA' and quantifying by gas phase ion spectrometry, wherein the ion spectrometry is laser desorption/ionization

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/48424

mass spectrometry.

All of the other groups are drawn to different methods and products.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 30/26	G 0 1 N 30/48	E
G 0 1 N 30/48	G 0 1 N 30/48	K
G 0 1 N 30/88	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/483	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 33/577	B
	G 0 1 N 27/26	3 0 1 A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, OM, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB15 BB17 CC03 FA15
4B063 QA18 QQ03 QQ08 QQ43 QR82 QS33 QS39 QX01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004536278A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002548165	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		
[标]发明人	ジョージエルライトジュニア		
发明人	ジョージ・エル・ライト,ジュニア		
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 G01N30/48		
CPC分类号	G01N33/57434 C12Q1/6886 G01N33/6848 G01N33/6851		
FI分类号	G01N27/62.V C12M1/00.A C12Q1/68.Z G01N30/00.A G01N30/26.A G01N30/48.E G01N30/48.K G01N30/88.J G01N33/483.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B G01N27/26.301.A		
F-TERM分类号	2G045/BB11 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR82 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX01		
优先权	60/252452 2000-11-20 US		
其他公开文献	JP2004536278A		

摘要(译)

本发明是前列腺癌，良性前列腺增生，和血清样品被用于识别在其他类型的样品（前列腺特异性膜抗原），PSMA“（前列腺特异性膜抗原的截短种阴性诊断，PSMA），以及它提供了其他标记物的检测和定量的方法和装置。还提供了用于诊断检测核酸的方法和装置，例如在细胞裂解物和其他样品来源中编码前列腺标记的mRNA。除了用于这些基于蛋白质和基于核酸的标记物的多样化检测/定量的方法和装置之外，本发明还包括生物芯片，试剂盒和集成系统。