

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003－532055

(P2003－532055A)

(43)公表日 平成15年10月28日(2003.10.28)

(51)Int.Cl⁷

識別記号

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/68

27/62

27/62

V

30/02

30/02

B

33/53

33/53

D

33/574

33/574

A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 81数)

(21)出願番号 特願2001－569496(P2001－569496)

(86)(22)出願日 平成13年3月19日(2001.3.19)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月20日(2002.9.20)

(86)国際出願番号 PCT/US01/08797

(87)国際公開番号 W001/071360

(87)国際公開日 平成13年9月27日(2001.9.27)

(31)優先権主張番号 60/190,725

(32)優先日 平成12年3月20日(2000.3.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 イースタン バージニア メディカル ス
クル

アメリカ合衆国 バージニア 23507, ノ
ーフォーク, ウェスト オルネイ ロード
700

(72)発明者 ライト, ジョージ エル. ジュニア
アメリカ合衆国 バージニア 23455, バ
ージニア ビーチ, モウルトリー コート
829

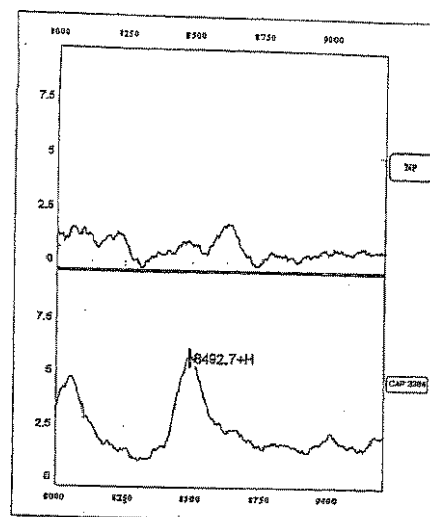
(74)代理人 弁理士 山本 秀策 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 前立腺癌マーカー

(57)【要約】

本発明は、前立腺癌、良性前立腺肥大、および陰性の診断を識別するために有用な有機生体分子マーカー（例えば、タンパク質）を提供する。本発明はまた、前立腺癌または良性前立腺肥大の診断における補助のための方法であって、以下：a) 被験体由来のサンプルにおいて少なくとも1つのタンパク質マーカーを検出する工程；b) 該マーカーの検出と、前立腺癌、良性前立腺肥大の可能性のある診断、または陰性診断とを相関させる工程であって、ここでこの相関は、各診断における該マーカーの相対的検出性を考慮する工程、を包含する、方法を提供する。



同一の前立腺切除試料由来の正常 (NPA) 細胞溶解物と比較した前立腺癌 (CAP) 細胞溶解物中の5kDaタンパク質の過剰発現を示す代表的な例。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 前立腺癌または良性前立腺肥大の診断における補助のための方法であって、以下：

a) 被験体由来のサンプルにおいて少なくとも1つのタンパク質マーカを検出する工程であって、ここで該タンパク質マーカが以下：

マーカSP1：9402.68±8.97Da、

マーカSP2：26155.30±202.01Da、

マーカSP3：54979.27±408.78Da、

マーカSP4：9752.30±15.08Da、

マーカSP5：8766.93±14.44Da、

マーカSP6：6277.97±12.36Da、および

マーカSP7：2781.72±4.41Da、

から選択される、工程；ならびに

b) 該マーカの検出と、前立腺癌、良性前立腺肥大の可能性のある診断、または陰性診断とを相関させる工程であって、ここでこの相関は、各診断における該マーカの相対的検出性を考慮する、工程、を包含する、方法。

【請求項2】 前記サンプルが精漿である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記サンプルが、血液、血清、尿、前立腺液、精液（seminal fluid）、精液（semen）、および前立腺組織からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 気相イオン分光分析によって前記マーカを検出する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 気相イオン分光分析が、レーザー脱離質量分析である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 イムノアッセイによって前記マーカを検出する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 複数の前記マーカを検出する工程を包含する、請求項1または4に記載の方法。

【請求項8】 少なくともタンパク質2を検出する工程を包含する、請求項1または4に記載の方法。

【請求項9】 請求項8に記載の方法であって、タンパク質1、ならびにタンパク質4、タンパク質5、タンパク質6、およびタンパク質7から選択される第3のマーカの少なくともいずれかまたは両方を検出する工程をさらに包含する、方法。

【請求項10】 前記第3のマーカがタンパク質5である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 請求項5に記載の方法であって、以下：

i) 質量分析を用いて前記サンプル上でデータを生成し、質量／荷電比に関するシグナルの強度を示す工程、

i i) コンピューター読み取り可能な形式にデータを変換する工程、

i i i) プログラム可能なデジタルコンピューターを用いてアルゴリズムを実行する工程であって、ここで該アルゴリズムは、該コンピューター読み取り可能なデータと、CaP、BPHまたは陰性診断の診断を示すデータとの間の適合緊密性を決定する、工程、
を包含する、方法。

【請求項12】 サンプルにおいて少なくとも1つのタンパク質マーカを検出する方法であって、ここで該タンパク質マーカが以下：

マーカSP1：9402.68±8.97Da、

マーカSP2：26155.30±202.01Da、

マーカSP3：54979.27±408.78Da、

マーカSP4：9752.30±15.08Da、

マーカSP5：8766.93±14.44Da、

マーカSP6：6277.97±12.36Da、および

マーカSP7：2781.72±4.41Da、

から選択され、

ここで該方法は、気相イオン分光分析によって該マーカを検出する工程を包含する、方法。

【請求項13】 前記気相イオン分光分析が、レーザー脱離／イオン化質量分析である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 請求項13に記載の方法であって、以下：

i) 質量分析を用いて前記サンプル上でデータを生成し、質量／荷電比に関するシグナルの強度を示す工程、

i i) コンピューター読み取り可能な形式にデータを変換する工程、および

i i i) プログラム可能なデジタルコンピューターを用いてアルゴリズムを実行する工程であって、ここで該アルゴリズムは、前記マーカを提示する該コンピューター読み取り可能なデータにおけるシグナルを検出する工程、を包含する、方法。

【請求項15】 請求項12に記載の方法であって、さらに、前記マーカの検出前に、サイズ排除クロマトグラフィーによって前記サンプルを分画する工程、および該マーカを含む画分を収集する工程、を包含する、方法。

【請求項16】 請求項12に記載の方法であって、該方法はさらに、前記マーカの検出前に、陰イオン交換クロマトグラフィーによって前記サンプルを分画する工程、および該マーカを含む画分を収集する工程、を包含する、方法。

【請求項17】 請求項13に記載の方法であって、ここで、レーザー脱離／イオン化質量分析が、以下：

i) 質量分析を用いた使用に適したプローブであって、これに結合した吸着剤を含むプローブを準備する工程；

i i) 前記マーカを該吸着剤と接触させる工程；および

i i i) 該プローブからの該マーカを脱離およびイオン化し、そして質量分析を用いて該脱離／イオン化されたマーカを検出する工程、を包含する、方法。

【請求項18】 請求項13に記載の方法であって、ここで、レーザー脱離／イオン化質量分析が、以下：

i) 基質であって、これに付着した吸着剤を含む基質を準備する工程；

i i) 前記マーカ―を該吸着剤と接触させる工程；

i i i) 質量分析での使用に適したプローブ上の基質であって、これに付着した吸着剤を含む基質を配置する工程；および

i v) 該プローブからの該マーカ―を脱離およびイオン化し、そして質量分析を用いて該脱離／イオン化されたマーカ―を検出する工程、を包含する、方法。

【請求項19】 前記吸着剤が、親水性吸着剤または金属キレート吸着剤である、請求項17に記載の方法。

【請求項20】 前記吸着剤が、酸化シリコンを含む親水性吸着剤である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記吸着剤が、ニッケルを含む、金属キレート吸着剤である、請求項19に記載の方法。

【請求項22】 前記吸着剤が前記マーカ―に特異的に結合する抗体を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項23】 精製されたタンパク質であって、以下：

マーカ―SP1：9402.68±8.97Da、

マーカ―SP2：26155.30±202.01Da、

マーカ―SP3：54979.27±408.78Da、

マーカ―SP4：9752.30±15.08Da、

マーカ―SP5：8766.93±14.44Da、

マーカ―SP6：6277.97±12.36Da、および

マーカ―SP7：2781.72±4.41Da、

から選択される、精製されたタンパク質。

【請求項24】 請求項23に記載の精製されたタンパク質であって、以下：サイズ排除クロマトグラフィーによって前記マーカ―を含むサンプルを分画する工程、および該マーカ―を含む画分を収集する工程、ならびに／または陰イオン交換クロマトグラフィーによって該マーカ―を含むサンプルを分画する工程、および該マーカ―を含む画分を収集する工程、を包含する、プロセスによって生成された、タンパク質。

【請求項25】 キットであって、以下：

(1) 基質に結合した吸着剤であって、該吸着剤が、以下：

マーカーSP1：9402.68±8.97Da、

マーカーSP2：26155.30±202.01Da、

マーカーSP3：54979.27±408.78Da、

マーカーSP4：9752.30±15.08Da、

マーカーSP5：8766.93±14.44Da、

マーカーSP6：6277.97±12.36Da、および

マーカーSP7：2781.72±4.41Da、

から選択される、タンパク質マーカーを保持する、吸着剤；ならびに

(2) サンプルを該吸着剤と接触させること、および該吸着剤によって保持されるマーカーを検出することによって該マーカーを検出するための、説明書、を備える、キット。

【請求項26】 請求項25に記載のキットであって、前記基質は、前記吸着剤が結合した表面を有する気相イオン分光分析のためのプローブである、キット。

【請求項27】 前記吸着剤が、親水性吸着剤を含む、請求項26に記載のキット。

【請求項28】 前記親水性吸着剤が、酸化ケイ素を含む、請求項27に記載のキット。

【請求項29】 請求項25に記載のキットであって、さらに、以下(1) 溶出液であって、該溶出液で洗浄されるとき、前記マーカーが、前記吸着剤上に保持されている、溶出液、または(2) 該吸着剤とマーカーとの接触後に該溶出液を用いて該吸着剤を洗浄するための説明書、を備えるキット。

【請求項30】 前立腺癌または良性前立腺肥大の診断における補助のための方法であって、以下：

a) 被験体由来のサンプルにおいて少なくとも1つのタンパク質マーカーを検出する工程であって、ここで該タンパク質マーカーが以下：

マーカーCL1：8,494.30±10.24Da、

マーカーCL2：9, 614. 62±52. 19Da、
マーカーCL3：28, 472±127. 40Da、および
マーカーCL4：33, 386. 85±160. 47Da、
から選択される、工程；ならびに

b) 該マーカーの検出と、前立腺癌、良性前立腺肥大の可能性のある診断、または陰性診断とを相関させる工程であって、ここでこの相関は、各診断における該マーカーの相対的検出性を考慮する、工程、
を包含する、方法。

【請求項31】 前記サンプルが前立腺組織抽出物である、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 前記サンプルが、血液、血清、尿、前立腺液、精液 (seminal fluid)、精液 (semen)、精漿および前立腺組織からなる群より選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項33】 気相イオン分光分析によって前記マーカーの存在または非存在を検出する工程を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項34】 気相イオン分光分析が、レーザー脱離質量分析である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 イムノアッセイによって前記マーカーの存在または非存在を検出する工程を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項36】 複数のマーカーを検出する工程を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項37】 少なくともマーカーCL1またはマーカーCL2を検出する工程を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項38】 請求項30に記載の方法であって、マーカーCL3およびマーカーCL4の量を測定する工程、ならびにマーカーCL3に対するマーカーCL4の量の比を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項39】 請求項30に記載の方法であって、以下：

i) 質量分析を用いて前記サンプル上でデータを生成し、質量／荷電比に関するシグナルの強度を示す工程、

i i) コンピューター読み取り可能な形式にデータを変換する工程、

i i i) プログラム可能なデジタルコンピューターを用いてアルゴリズムを実行する工程であって、ここで該アルゴリズムは、該コンピューター読み取り可能なデータと、C a P、B P Hまたは陰性診断の診断を示すデータとの間の適合緊密性を決定する、工程、
を包含する、方法。

【請求項40】 タンパク質マーカを検出する方法であって、ここで該タンパク質マーカが以下：

マーカCL1：8, 494.30±10.24Da、

マーカCL2：9, 614.62±52.19Da、

マーカCL3：28, 472±127.40Da、および

マーカCL4：33, 386.85±160.47Da、

から選択され、

ここで該方法は、気相イオン分光分析によって該マーカを検出する工程を包含する、方法。

【請求項41】 前記気相イオン分光分析が、レーザー脱離／イオン化質量分析である、請求項40に記載の方法。

【請求項42】 請求項41に記載の方法であって、以下：

i) 質量分析を用いて前記サンプル上でデータを生成し、質量／荷電比に関するシグナルの強度を示す工程、

i i) コンピューター読み取り可能な形式にデータを変換する工程、および

i i i) プログラム可能なデジタルコンピューターを用いてアルゴリズムを実行する工程であって、ここで該アルゴリズムは、前記マーカを提示する該コンピューター読み取り可能なデータにおけるシグナルを検出する工程、
を包含する、方法。

【請求項43】 請求項40に記載の方法であって、さらに、以下：

i) 前記マーカの検出前に、前記サンプルと、該マーカを保持する吸着剤を含む基質とを接触させて、保持されていないサンプルを取り除くことによって、該マーカを含むサンプルを分画する工程；および

i i) 質量分析の間に該吸着剤から保持されたマーカを脱離およびイオン化する工程、
を包含する、方法。

【請求項44】 請求項44に記載の方法であって、前記基質は、プローブ表面上の前記吸着剤を含む質量分析プローブである、方法。

【請求項45】 請求項44に記載の方法であって、前記基質が、樹脂であり、そして前記サンプルの分画後に、該樹脂が、前記吸着剤によって保持されるマーカとともに、質量分析による脱離およびイオン化のための質量分析プローブ上に配置されている、方法。

【請求項46】 前記吸着剤が、親水性吸着剤または金属キレート吸着剤から選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項47】 前記吸着剤が、強力な陰イオン交換吸着剤またはニッケルキレート吸着剤である、請求項43に記載の方法。

【請求項48】 精製されたタンパク質であって、以下：
マーカCL1：8, 494.30±10.24Da、
マーカCL2：9, 614.62±52.19Da、
マーカCL3：28, 472±127.40Da、および
マーカCL4：33, 386.85±160.47Da、
から選択される、精製されたタンパク質。

【請求項49】 キットであって、以下：
(1) 基質に結合した吸着剤であって、該吸着剤が、以下：
マーカCL1：8, 494.30±10.24Da、
マーカCL2：9, 614.62±52.19Da、
マーカCL3：28, 472±127.40Da、および
マーカCL4：33, 386.85±160.47Da、
から選択される、タンパク質マーカを保持する、吸着剤；ならびに

(2) サンプルを該吸着剤と接触させること、および該吸着剤によって保持されるマーカを検出することによって該マーカを検出するための、説明書、
を備える、キット。

【請求項50】 請求項49に記載のキットであって、前記基質は、前記吸着剤が結合した表面を有する気相イオン分光分析のためのプローブである、キット。

【請求項51】 前記吸着剤が、親水性吸着剤または金属キレート吸着剤を含む、請求項50に記載のキット。

【請求項52】 前記吸着剤が、陰イオン性交換吸着剤を含む、請求項50に記載のキット。

【請求項53】 前記吸着剤が、ニッケル金属キレート吸着剤を含む、請求項50に記載のキット。

【請求項54】 請求項49に記載のキットであって、さらに、以下（1）溶出液であって、該溶出液で洗浄されるとき、前記マーカが、前記吸着剤上に保持されている、溶出液、または（2）該吸着剤と該マーカとの接触後に該溶出液を用いて該吸着剤を洗浄するための説明書、を備えるキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願に対する相互参照)

本願は、2000年3月20日に出願された仮出願U. S. S. N. 60/190, 725に対する優先権を主張し、この開示は、本明細書中にその全体が参考として援用される。

【0002】

(連邦政府によって支持された研究および開発の元で行なわれた発明に対する権利に関する声明)

本発明は、国立癌研究所(National Cancer Institute)によって与えられる助成金番号1 UO1 CA85067-1の元で政府の支持によって行なわれた。政府は、この発明において特定の権利を有し得る。

【0003】

(発明の背景)

前立腺癌は、男性における最も共通した癌の形態である。これは、代表的に高齢の男性を苦しめるが、全ての年齢の男性を苦しめ得る。毎年多数の男性が、前立腺癌で死亡し、そしてこれは、男性における癌の死亡の第2の主要原因である。患者における前立腺癌の初期の診断は、死亡の可能性を減少させる。

【0004】

診断試験の効果は、その特異性および選択性に依存する。すなわち、真の陽性診断、真の陰性診断、偽の陽性診断および偽の陰性診断の相対的な比率は、どのくらいであろうか。任意の状態についての真の陽性および真の陰性の比率を増加する方法は、所望の医学的目的である。前立腺癌の場合、本発明の診断試験は、これらが、多数の偽の陽性結果および偽の陰性結果を提供するという点で、完全に満足いくものではない。

【0005】

慣用的に、前立腺癌は、マーカーとして前立腺特異的抗原(PSA)を使用して診断される。一般的には、4 ng/mlを超えるPSAレベルが、前立腺癌を

示唆し、これに対して、 10 ng/ml を超えるレベルは、前立腺癌を高度に示唆するものである。しかし、癌が、その初期段階にある場合、いくつかの前立腺癌患者は、診断の時点で正常なPSAレベルを示す。従来のPSA試験は、異常なPSAのレベルを検出するが、従来のPSA試験は、前立腺癌がその初期段階にある場合、前立腺癌の存在を検出し得ない。この結果は、偽の陰性診断を生じる。従来のPSA試験が、いくつかの場合において（例えば、疾患の初期段階において）前立腺癌の存在を診断し得ないことは、患者に対して有害であり得る。さらに、血清において上昇したレベルのPSAを有する多数の患者は、前立腺癌を有さないが、その代わりに良性前立腺肥大（BPH）（すなわち、良性腫瘍）を有する。この結果は、偽の陽性診断を生じる。ヒトが、前立腺癌を有するか否かを決定するために、BPHではなく、他の抗体および／または前立腺組織の生検を使用するさらなる免疫アッセイが行なわれる。これらのさらなる試験は、患者およびそれらの医療提供者にとって時間がかかりそして高価である。

【0006】

より優れた診断が、診断試験の特異性および選択性を増加するように、単独でかまたは組み合わせて使用され得るより多くの診断マーカーの発見に由来するといういくつかのコンセンサスが医学会に存在する。

【0007】

（発明の要旨）

いくつかの有機生体分子（例えば、タンパク質）は、陰性の診断に対する前立腺癌（「CaP」）または良性前立腺肥大（「BPH」）におけるマーカーとして機能することが発見されている。陰性の診断と比較して、マーカーは、多様に、より頻繁に検出されるか、より頻繁に検出されないか、または差次的に検出される。患者のサンプル中での単独でかまたは組み合わせたこれらのマーカーの測定は、診断者が、前立腺癌、良性前立腺癌肥大、または陰性の診断（例えば、正常または無疾患）のありうる診断と相関し得るという情報を提供する。全てのマーカーは、分子量によって特徴付けられる。これらは、例えば、質量分析と結合させたクロマトグラフィー分離によって、サンプル中の他のタンパク質および他の有機生体分子から分析され得る。好ましい実施形態において、分析する方法は

、質量分析プローブの表面が、分析物の脱離およびイオン化において能動的な役割を果たす、表面強化レーザー脱離／イオン化 (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) 質量分析を含む。

【0008】

第1のセットのマーカーは、精漿において同定された。マーカーセット1は、以下を含む：マーカーSP1：9,402.68±8.97Da、pI約5；マーカーSP2：26,155.30±202.01Da、pI約5；マーカーSP3：54,979.27±408.78Da；pI約9；マーカーSP4：9,752.30±15.08Da；マーカーSP5：87,66.93±14.44Da；マーカーSP6：62,77.97±12.36DaおよびマーカーSP7：2,781.72±4.41Da、pI約9。陰性の診断と比較して、SP1は、CaPにおいてより頻繁に検出され、そしてBPHにおいてより頻繁に検出されない（例えば、未検出）。SP2は、CaPおよびBPHにおいてより頻繁に検出される。SP3は、CaPにおいてより頻繁に検出され、そしてBPHにおいてより頻繁に検出されない。SP4は、CaPおよびBPHの両方においてより頻繁に検出されない。SP5、SP6およびSP7は、CaPにおいてより頻繁に検出されず（例えば、未検出）、そしてPHBにおいてより頻繁に検出されない。

【0009】

第2のセットのマーカーは、レーザー捕獲顕微解剖に由来する前立腺上皮細胞溶解物において同定された。マーカーセット2は、以下を含む：マーカーCL1：8,494.30±10.24Da、Marker CL2：9,614.62±52.19Da；マーカーCL3：28,472±127.40Da、およびマーカーCL4：33,386.85±160.47Da。これらのマーカーは、中性のpHでの溶出液を用いて洗浄される陰イオン交換または金属キレート吸着体に結合する能力、培地濃度における塩、および低濃度での非イオン性界面活性剤によってさらに特徴付けられる。これは、これらが中性のpHにおいて負に荷電していることを示す。陰性の診断と比較して、マーカーCL1およびマ-

カーCL2は、CaPおよびBPHの両方においてより頻繁に検出される（CL2は、陰性の診断において検出されない）。マーカーCL3およびCL4は、全ての3つの状態において検出される。しかし、約0.4を超えるマーカーCL4：CL3の比率は、CaPと強力に相関する。

【0010】

これらのマーカーの絶対的な同一性は、現在のところ知られていないが、このような知識は、患者サンプル中においてそれらを測定するために必要ではない。なぜなら、これらは、質量および親和性特徴によって十分に特徴付けられるためである。分子量および相対的なpIは、これらのマーカーの特徴的な性質であるが、検出または単離の手段に対する制限ではないことを指摘する。さらに、一旦部分的なアミノ酸配列が得られると、これらの絶対的な同一性は、タンパク質データベースにおける配列を適合することによって決定され得る。

【0011】

1つの局面において、本発明は、前立腺癌または良性前立腺肥大の診断における補助のための方法を提供する。この方法は、以下の方法を包含する：a) 被験体からのサンプル中のマーカーセット1またはマーカーセット2（本明細書中に定義されるような）から選択される少なくとも1つのタンパク質マーカーを検出する工程；およびb) マーカーの検出を、前立腺癌、良性前立腺肥大または陰性の診断のありうる診断と相関させる工程であって、ここで、この相関は、各診断におけるマーカーの相対的な検出性を考慮する工程。

【0012】

特定の実施形態において、サンプルは、精漿、血液、血清、尿、前立腺液、精液、および前立腺組織から選択され得る。他の実施形態において、マーカーは、気相イオン分光分析、またはより詳細には、レーザー脱離質量分析によって、検出される。別の実施形態において、マーカーは、免疫アッセイによって検出される。他の実施形態において、この方法は、複数のマーカーを検出する工程を包含する。他の実施形態において、この方法は、少なくともマーカーSP2を検出する工程、またはSP1ならびにSP4、SP5、SP6およびSP7から選択される第3のマーカーの少なくともいずれかもしくは両方をさらに検出する工程を

包含する。別の実施形態において、この方法は、マーカーCL1および／またはCL2を検出する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、マーカーCL3およびマーカーCL4の量を測定する工程、およびマーカーCL3に対するマーカーCL4の量の比率を決定する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、以下の工程を包含する：i) 質量／電荷の比率についてのシグナルの強度を示す質量分析を用いてサンプルに関するデータを作成する工程；ii) コンピューター読み出し可能な形態にデータを変換する工程；およびiii) プログラム可能なデジタルコンピューターを用いてアルゴリズムを実行する工程であって、このアルゴリズムは、このコンピューター読み出し可能なデータとCaP、BPHまたは陰性の診断の診断を示すデータとの間の適合の密接性を決定する。

【0013】

1つの局面において、この発明は、サンプル中のマーカーセット1またはマーカーセット2から少なくとも1つのタンパク質マーカーを検出するための方法を提供し、ここで、この方法は、気相イオン分光分析によってマーカーを検出する工程を包含する。

【0014】

別の実施形態において、この方法は、以下の工程を包含する：i) 質量／電荷の比率についてのシグナルの強度を示す質量分析を用いてサンプルに関するデータを作成する工程；ii) コンピューター読み出し可能な形態にデータを変換する工程；およびiii) プログラム可能なデジタルコンピューターを用いてアルゴリズムを実行する工程であって、このアルゴリズムは、コンピューター読み出し可能なデータにおけるマーカーを示すシグナルを検出する。

【0015】

別の実施形態において、この方法は、マーカーを検出する前に、サイズ除外クロマトグラフィーによってサンプルを分画する工程およびマーカーを含む画分を収集する工程をさらに包含する。別の実施形態において、この方法は、マーカーを検出する前に、陰イオン交換クロマトグラフィーによってサンプルを分画する工程およびマーカーを含む画分を収集する工程をさらに包含する。

【0016】

別の実施形態において、この方法は、以下の工程をさらに包含する：i) マーカーを検出する前に、マーカーを保持する吸着体を含む基質とサンプルを接触させそして保持していないサンプルを除去することによってマーカーを含むサンプルを分画する工程；ならびにii) 質量分析の間に、吸着体から保持されたマーカーを脱離およびイオン化する工程。この方法の特定の実施形態において、この基質は、プローブ表面に吸着体を含む質量分析プローブである。別の実施形態において、この基質は樹脂であり、そしてサンプルを分画した後、マーカーが吸着体によって保持される樹脂は、質量分析による脱着およびイオン化のための質量分析プローブ上に配置される。別の実施形態において、この吸着体は、親水性吸着体（例えば、陰イオン吸着体）および金属キレート吸着体（例えば、ニッケルキレート吸着体）から選択される。

【0017】

レーザー脱離／イオン化質量分析に関する1つの実施形態において、この方法は、以下の方法を包含する：i) プローブに付着された吸着体を含む、質量分析を用いる使用に適合されたプローブを提供する工程；ii) マーカーをこの吸着体と接触させる工程；ならびにiii) プローブからマーカーを脱離およびイオン化させる工程および質量分析を用いて脱着／イオン化されたマーカーを検出する工程。別の実施形態において、この方法は、以下の工程を包含する：i) 基質に付着された吸着体を含む基質を提供する工程；ii) マーカーをこの吸着体と接触させる工程；iii) 基質に接着された吸着体を含む、質量分析を用いた使用に適合されたプローブ上に基質を配置する工程；そしてiv) プローブからマーカーを脱着およびイオン化する工程ならびに質量分析を用いて脱着／イオン化したマーカーを検出する工程。他の実施形態において、吸着体は、親水性吸着体（例えば、酸化ケイ素）または金属キレート吸着体（例えば、ニッケルキレート）である。別の実施形態において、吸着体は、マーカーに特異的に結合する抗体を含む。

【0018】

別の局面において、本発明は、マーカーセット1またはマーカーセット2のタ

ンパク質マーカーから選択される精製されたタンパク質を提供する。1つの実施形態において、精製されたタンパク質は、サイズ除外クロマトグラフィーによってマーカーを含むサンプルを分画する工程およびマーカーを含む画分を収集する工程；ならびに／または陰イオン交換クロマトグラフィーによってマーカーを含むサンプルを分画する工程およびマーカーを含む画分を収集する工程を包含するプロセスによって産生される。

【0019】

別の局面において、本発明は、以下を含むキットを提供する：（1）基質に付着した吸着体であって、ここで、吸着体は、マーカーセット1またはマーカーセット2から選択されるタンパク質マーカーを保持する；および（2）サンプルを吸着体と接触させることによってマーカーを検出し、そして吸着体によって保持されたマーカーを検出するための説明書。本発明の1つの実施形態において、基質は、吸着体が付着する表面を有する気相イオン分光分析のためのプローブである。この吸着体は、例えば、親水性吸着体（例えば、酸化ケイ素）であり得る。別の実施形態において、このキットは、（1）溶出液（ここで、マーカーは、溶出液を用いて洗浄される場合に、吸着体に保持される）、または（2）マーカーを用いて吸着体を収集した後に、溶出液を用いて吸着体を洗浄するための説明書、を備える。

【0020】

（特定の実施形態の説明）

（I. 定義）

他に定義されない限り、本明細書中に使用される全ての技術用語および科学用語は、この発明が所属する当業者によって一般に理解される意味を有する。以下の参考文献は、当業者にこの発明において使用される多数の用語の一般的な定義を提供する：Sigletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology（第2版、1994年）；The Cambridge Dictionary of Science and Technology（Walker編、1988年）；The Glossary of Genetics、第5版、P. Riegerら

(編)、Springer Verlag (1991) ; および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書中で使用される場合、以下の用語は、他に特定されない限り、それらに帰する意味を有する。

【0021】

本発明の文脈における「マーカー」とは、有機生体分子（特に、ポリペプチド）であって、前立腺癌を有さない被験体（例えば、陰性診断、正常な被験体または健常な被験体）から採取した同等のサンプルと比較した場合に、前立腺癌または良性前立腺肥大を有する患者から採取したサンプル中に差次的に存在する、有機生体分子をいう。例えば、マーカーは、陰性診断を有する患者のサンプルと比較して、前立腺癌患者のサンプル中に増加したレベルまたは減少したレベルで存在する、（特定の見かけの分子量を有する）ポリペプチドであり得る；。

【0022】

「有機生体分子」とは、生物学的起源の有機分子（例えば、ステロイド、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、複合糖質または脂質）をいう。

【0023】

句「差次的に存在する」とは、前立腺癌を有さない（例えば、良性前立腺肥大を有する）患者から採取した同等のサンプルと比較した場合に、前立腺癌を有する患者から採取したサンプル中に存在する（特定の見かけの分子量の）ポリペプチドの量の差異をいう。ポリペプチドは、一方のサンプル中のそのポリペプチドの量がもう一方のサンプル中のそのポリペプチドの量と有意に異なる場合に、その2つのサンプル間で差次的に存在する。例えば、ポリペプチドは、そのポリペプチドがもう一方のサンプル中の存在するより少なくとも約150%多く、少なくとも約200%多く、少なくとも約500%多く、または少なくとも約1000%多く存在する場合か、あるいはそのポリペプチドが一方のサンプル中で検出可能であるがもう一方では検出可能ではない場合に、その2つのサンプル間で差次的に存在する。前立腺癌を有さない被験体（例えば、良性前立腺肥大の患者）と比較した場合に、前立腺癌患者から採取したサンプル中に差次的に存在する任

意のポリペプチドが、マーカーとして使用され得る。

【0024】

「診断（の）」とは、病状の存在または性質を同定することを意味する。診断法は、その感度および特異性が異なる。診断アッセイの「感度」は、試験陽性である罹患個体のパーセンテージ（「真の陽性」のパーセント）である。このアッセイにより検出されない罹患個体は、「偽陰性」である。このアッセイにおいて罹患していない被験体および試験陰性である被験体は、「真の陰性」と呼ばれる。診断アッセイの「特異性」は、 $1 - \text{偽陽性率}$ であり、この「偽陽性」率は、試験陽性であるその疾患を有さないものの比率として規定される。特定の診断法は、決定的な状態診断を提供しないかもしれないが、診断を補助する陽性の指標をその方法が提供する場合、その方法は十分である。

【0025】

マーカーの「試験量」とは、試験されるサンプル中に存在するマーカーの量をいう。試験量は、絶対量（例えば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（例えば、シグナルの相対強度）のいずれかであり得る。

【0026】

マーカーの「診断量」とは、前立腺癌の診断と一致する被験体サンプル中のマーカーの量をいう。診断量は、絶対量（例えば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（例えば、シグナルの相対強度）のいずれかであり得る。

【0027】

マーカーの「コントロール量」は、マーカーの試験量に対して比較されるべき任意の量または量の範囲であり得る。例えば、マーカーのコントロール量は、前立腺癌患者、BPH患者、または前立腺癌でもBPHでもないヒトにおけるマーカー（例えば、精液塩基性（*seminal basic*）タンパク質）の量であり得る。コントロール量は、絶対量（例えば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（例えば、シグナルの相対強度）のいずれかであり得る。

【0028】

「プローブ」とは、イオン化供給源（例えば、レーザー脱離／イオン化供給源）に対して問い合わせ可能な（*interrogatable*）関係で、かつ気

相イオン分光光度計の検出器と周囲圧力または周囲より低い圧力にて同時係合して、位置的に連動している場合に、分析物由来のイオンをその分光光度計中に導入するために使用され得る、デバイスをいう。本明細書中で使用される場合、この「プローブ」は、代表的には、プローブインターフェースと可逆的に係合可能（例えば、取り外し可能に挿入可能）であり、このプローブインターフェースは、このプローブを、イオン化供給源と問い合わせ可能な関係でかつ検出器と連絡して、配置する。プローブは、一般的に、分析物がイオン化供給源に提示される、サンプル提示表面を含む基材を備える。

【0029】

「基材」または「プローブ基材」は、（例えば、付着、沈着などにより）吸着剤が備えられ得る、固相をいう。

【0030】

「イオン化供給源」とは、イオン化エネルギーをプローブのサンプル提示表面に向けて、分析物を脱離し、そしてプローブ表面から気相へと分析物をイオン化する、デバイスをいう。好ましいイオン化供給源は、（レーザー脱離／イオン化にて使用される）レーザーであり、特に、窒素レーザー、Nd-Yagレーザーおよび他のパルスレーザー供給源である。他のイオン化供給源としては、（高速原子ボンバードメントにて使用される）高速原子、（プラズマ脱離にて使用される）プラズマエネルギー、および（二次イオン質量分析法にて使用される）二次イオンを生成する一次イオンが挙げられる。

【0031】

「気相イオン分光光度計」とは、気相イオンを検出する装置をいう。本発明の文脈において、気相イオン分光光度計は、気相イオンを生成するために使用されるイオン化供給源を備える。気相イオン分光光度計としては、例えば、質量分析計、イオン移動度分光光度計、および総イオン流測定デバイスが挙げられる。

【0032】

「気相イオン分光法」とは、プローブのサンプル提示表面上に提示された分析物から気相イオンを生成するためにイオン化供給源を使用する工程、および気相イオン分光光度計を用いてその気相イオンを検出する工程を包含する、方法をい

う。

【0033】

「質量分析計」とは、気相イオンの質量対電荷比へと翻訳され得るパラメータを測定する、気相イオン分光光度計をいう。質量分析計は、一般に、入口システム、イオン化供給源、イオン光学アセンブリ、質量分析計、および検出器を備える。質量分析計の例は、飛行時間質量分析計、磁気セクター質量分析計、四極フィルター質量分析計、イオン捕捉質量分析計、イオンサイクロトン共鳴質量分析計、静電セクター分析計質量分析計およびこれらの混成物である。

【0034】

「質量分析法」とは、プローブのサンプル提示表面上に提示された分析物から気相イオンを生成するためにイオン化供給源を使用する工程、および質量分析計を用いてその気相イオンを検出する工程を包含する、方法をいう。

【0035】

「レーザー脱離質量分析計」とは、分析物を脱離、揮発およびイオン化するための手段としてレーザーを使用する、質量分析計をいう。

【0036】

「吸着剤」とは、マーカを吸着することができる任意の物質をいう。用語「吸着剤」は、本明細書において、マーカが曝露される単一の物質（「一重吸着剤」）（例えば、化合物または官能基）、およびマーカが曝露される複数の異なる物質（「多重吸着剤」）の両方をいうために使用される。多重吸着剤中の吸着物質は、「吸着種」と呼ばれる。例えば、プローブ基材上の位置付け可能な位置が、異なる結合特徴を有する多くの異なる吸着種（例えば、アニオン交換物質、金属キレート剤、または抗体）により特徴付けられる、多重吸着剤を含み得る。基材物質自体もまた、マーカを吸着することに寄与し得、そして「吸着剤」の一部と見なされ得る。

【0037】

「吸着」または「保持」とは、溶離剤（選択性閾値改変剤）または洗浄溶液を用いての洗浄の前または後のいずれかの、吸着剤とマーカとの間の検出可能な結合をいう。

【0038】

「溶離剤」または「洗浄溶液」とは、吸着剤へのマーカの吸着を媒介するために使用され得る、薬剤をいう。溶離剤および洗浄溶液はまた、「選択性閾値改変剤」とも呼ばれる。溶離剤および洗浄溶液は、未結合物質をプローブ基材表面から洗浄および除去するために使用され得る。

【0039】

「分解する」、「分解」、または「マーカの分解」とは、サンプル中の少なくとも1つのマーカの検出をいう。分解は、分離およびその後の差次的検出によるサンプル中の複数のマーカの検出を含む。分解は、混合物中の他のすべてのマーカからのマーカの完全分離を必要とはしない。むしろ、少なくとも2つのマーカ間の区別を可能にする任意の分離が、十分である。

【0040】

「検出する」とは、検出されるべき対象物の存在、非存在、または量を同定することをいう。

【0041】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」が、アミノ酸残基のポリマーをいうために、本明細書中で互換可能に使用される。これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸のアナログまたは模倣物である、アミノ酸ポリマーに適用され、そして天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドは、例えば、糖タンパク質を形成するための糖質残基の付加によって、改変され得る。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、糖タンパク質および非糖タンパク質を含む。

【0042】

「検出可能部分」または「標識」とは、分光光度的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、または化学的手段によって検出可能である、組成物をいう。例えば、有用な標識としては、 ^{32}P 、 ^{35}S 、蛍光色素、電子濃密 (electron-dense) 試薬、(例えば、ELISAにおいて一般的に使用されるような) 酵素、ビオチン-ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ハプテン、および抗血清またはモノクローナル抗体が入手可能であるタンパク質、

または標的に対して相補的な配列を有する核酸分子が挙げられる。この検出可能部分は、しばしば、サンプル中の結合した検出可能部分の量を定量するために使用され得る、測定可能なシグナル（例えば、放射性シグナル、発色シグナル、または蛍光シグナル）を発生する。この検出可能部分は、共有結合によってか、またはイオン結合、ファンデルワールス結合もしくは水素結合のいずれかを介して、プライマーもしくはプローブ中に組込まれ得るか、またはプライマーもしくはプローブに結合され得る（例えば、放射性ヌクレオチドの組み込み、またはストレプトアビジンにより認識されるビオチン化ヌクレオチドの組み込み）。この検出可能部分は、直接検出可能であっても、または間接的に検出可能であってもよい。間接検出は、その検出可能部分に、第2の直接検出可能部分または第2の間接検出可能部分を結合することを包含し得る。例えば、この検出可能部分は、結合パートナー（例えば、ビオチン（ストレプトアビジンの結合パートナーである）、またはヌクレオチド配列（それが特異的にハイブリダイズし得る相補的配列の結合パートナーである））のリガンドであり得る。この結合パートナーは、それ自体が直接検出可能であり得、例えば、抗体は、それ自体が、蛍光分子により標識され得る。この結合パートナーはまた、間接的に検出可能であってもよく、例えば、相補的ヌクレオチド配列を有する核酸は、その後他の標識核酸分子を用いたハイブリダイゼーションを介して検出可能である、分枝型DNA分枝の一部であり得る。（例えば、P. D. FahrlanderおよびA. Klausner, Bio/Technology 6:1165 (1988)を参照のこと）。このシグナルの定量は、例えば、シンチレーション計数、デンストメトリー、またはフローサイトメトリーによって、達成される。

【0043】

「抗体」とは、エピトープ（例えば、抗原）に特異的に結合しそしてエピトープを認識する、免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントによって実質的にコードされた、ポリペプチドリガンドをいう。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 軽鎖定常領域遺伝子、および λ 軽鎖定常領域遺伝子、 α 重鎖定常領域遺伝子、 γ 重鎖定常領域遺伝子、 δ 重鎖定常領域遺伝子、 ϵ 重鎖定常領域遺伝子、および μ 重鎖定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子

子が挙げられる。抗体は、例えば、インタクトな免疫グロブリンとしてか、または種々のペプチダーゼによる消化によって生成された多数の十分に特徴付けられたフラグメントとして、存在する。これとしては、例えば、F a b ' フラグメントおよびF (a b) ' ₂フラグメントが挙げられる。用語「抗体」は、本明細書中で使用される場合、抗体全体の改変により生成されたかまたは組換えDNA方法を使用して新規に合成されたかのいずれかである、抗体フラグメントもまた包含する。この用語はまた、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または単鎖抗体もまた包含する。抗体の「F c」部分は、1つ以上の重鎖定常領域ドメイン、C H 1、C H 2およびC H 3を含むが重鎖可変領域は含まない、免疫グロブリン重鎖の一部をいう。

【0044】

「免疫アッセイ」は、抗原を特異的に結合するために抗体を使用する、アッセイである。この免疫アッセイは、その抗原を単離、標的化、および／または定量するために特定の抗体の特異的結合特性を使用することによって特徴付けられる。タンパク質またはペプチドをいう場合、句、抗体に「特異的に（もしくは選択的に）結合する」または抗体と「特異的（もしくは選択的に）免疫反応性である」とは、タンパク質および他の生物物質の不均質集団中のそのタンパク質の存在を決定する、結合反応をいう。従って、指定の免疫アッセイ条件下で、特定の抗体は、バックグラウンドの少なくとも2倍、特定のタンパク質に結合するが、そのサンプル中に存在する他のタンパク質に十分な量では実質的には結合しない。そのような条件下での抗体への特異的結合は、特定のタンパク質についてのその特異性について選択された抗体を必要とし得る。例えば、特定の種（例えば、ラット、マウス、またはヒト）由来の精液塩基性タンパク質に対して惹起されたポリクローナル抗体が、精液塩基性タンパク質と特異的に免疫反応性であるが他のタンパク質（精液塩基性タンパク質の多型改変体および対立遺伝子を除く）とは特異的に免疫反応性ではないポリクローナル抗体のみを得るために選択され得る。この選択は、他の種由来の精液塩基性タンパク質分子と交差反応する抗体を差引くことによって達成され得る。種々の免疫アッセイ形式が、特定のタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するために使用され得る。例えば、固相E

L I S A免疫アッセイが、タンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するために慣用的に使用される（例えば、特異的免疫反応性を決定するために使用され得る免疫アッセイの形式および条件の説明に関して、HarlowおよびLane、Antibodies, A Laboratory Manual（1988）を参照のこと）。代表的には、特異的反応または選択的反応は、バックグラウンドのシグナルまたはノイズの少なくとも2倍であり、より代表的には、バックグラウンドの10倍を超えて100倍までである。

【0045】

（I I．気相イオン分光光度法）

1つの局面において、本発明は、前立腺癌を有する患者、良性前立腺肥大を有する患者および負の診断を有する患者に由来するサンプル中に差次的に存在する、マーカーを検出するための方法を提供する。記載されたマーカーのうちの任意の1つまたは組み合わせが、本発明のこの局面の範囲内にあり、そして検出され得る。これらのマーカーを検出するための方法は、多くの適用を有する。例えば、1つのマーカーまたはマーカーの組み合わせが、前立腺癌とBPHとの間を区別するために測定され得、従って、患者における前立腺癌の診断における補助物質として有用である。別の実施例において、これらのマーカーを検出するための本発明の方法は、これらのマーカーの発現を調節する化合物についてアッセイするためおよびこの化合物を同定するために、インビトロで前立腺癌細胞に適用され得るか、または前立腺癌についてのインビボ動物モデルに適用され得る。この検出法の1つの実施形態において、それらのマーカーは、気相イオン分光光度計によって検出される。好ましい実施形態において、それらのマーカーは、質量分析法によって検出され、そして特に、レーザー脱離質量分析法によって検出される。

【0046】

本発明における使用に適切なプローブが、例えば、米国特許第5,617,060号（HutchensおよびYip）およびWO 98/59360（HutchensおよびYip）に記載される。1つの実施形態において、吸着剤を含む基材が、プローブの形態であり得、このプローブは、気相イオン分光光度計

に取り外し可能に挿入可能である。例えば、基材は、その表面上に吸着剤を備えた小片の形態であり得る。別の実施形態において、吸着剤を含む基材は、プローブを形成するように別の基材上に配置され得、このプローブは、気相イオン分光光度計に取り外し可能に挿入可能である。例えば、吸着剤を含む基材は、固相（例えば、マーカを結合するための官能基を備えた、ポリマー性またはガラスビーズ）であり得、この固相は、その後、プローブを形成するように第2の基材上に配置され得る。例えば、その第2の基材は、小片の形態、または位置付け可能な所定の位置で一連のウェルを有するプレートの形態であり得る。この実施形態の1つの利点は、このマーカが、1つの物理的状況で第1の基材に吸着され得、そして第2の基材へと移され得、その後それが、気相イオン分光光度計による分析のために提示され得ることである。そのプローブは、それが気相イオン分光光度計に取り外し可能に挿入可能である限り、任意の形状であり得る。

【0047】

プローブはまた、気相イオン分光光度計の入口システムおよび検出器との使用に適応され得る。例えば、プローブは、水平に、垂直にそして／または回転的に移動可能なカートリッジにマウントするために適応され得、このカートリッジは、そのプローブの手動による再ポジショニングを必要とすることなく、このプローブを首尾よい位置に移動させる。

【0048】

プローブ基板は、好ましくは、吸着剤を支持し得る材料から作製される。例えば、プローブ基板材料としては、絶縁材料（例えば、ガラス、セラミック）、半絶縁材料（例えば、シリコンウェーハ）、または電気伝導性の材料（例えば、金属（例えば、ニッケル、黄銅、銅、アルミニウム、金、または電気伝導性ポリマー）、有機ポリマー、生体ポリマー、あるいはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

プローブ基板表面は、マーカを結合するような状態にされ得る。例えば、1つの実施形態において、プローブ基板の表面は、その表面上に吸着剤を配置するような状態にされ得る（例えば、化学的または物理的に（例えば、粗雑化））。

吸着剤は、マーカースと結合するための官能基を含む。いくつかの実施形態において、基板材料自体もまた、吸着特性に寄与し得、そして「吸着剤」の部分とみなされ得る。

【0050】

多くの異なる吸着剤は、それらが、本発明のマーカースを結合するために適切な結合特性を有する限り、使用され得る。これらの吸着剤は、疎水性基、親水性基、カチオン性基、アニオン性基、金属イオンキレート化基、または抗原に特異的に結合する抗体、あるいはそれらの組み合わせ（時折、「混合様式の」吸着剤と呼ばれる）を含み得る。疎水性基を含む例示的な吸着剤としては、脂肪族炭化水素（例えば、 $C_1 \sim C_{18}$ 脂肪族炭化水素）を有するマトリクスおよび芳香族炭化水素官能基（他といえ、フェニル基）を有するマトリクスが挙げられる。親水性基を含む例示的な吸着剤としては、酸化ケイ素（すなわち、ガラス）、または親水性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、デキストラン、アガロースまたはセルロース）が挙げられる。カチオン性基を含む例示的な吸着剤としては、二級アミン、三級アミンまたは四級アミンのマトリクスが挙げられる。アニオン性基を含む例示的な吸着剤としては、スルフェートアニオン（ SO_3^- ）のマトリクス、およびカルボキシレートアニオン（すなわち、 COO^- ）またはホスフェートアニオン（ OPO_3^- ）のマトリクスが挙げられる。金属キレート基を含む例示的な吸着剤としては、金属イオン（例えば、銅、ニッケル、コバルト、亜鉛、鉄、および他の金属イオン（例えば、アルミニウムおよびカルシウム）と配位共有結合を形成する1以上の電子ドナー基を有する有機分子が挙げられる。抗体を含む例示的な吸着剤は、本明細書中に提供されるマーカースの任意の1つに特異的である抗体を含む。好ましい実施形態において、吸着剤は、マーカースを富化および同定するために使用された吸着剤と、実質的に類似するかまたは同じである。

【0051】

1つの有用なチップは、Normal Phaseチップであり、これは、CiphaGen Biosystems, Inc. (Palo Alto, CA) から入手可能である。このNormal Phaseチップは、基板表面上

に酸化ケイ素 (SiO_2) を含む親水性吸着剤を有する。酸化ケイ素は、多くの周知の方法のいずれかによってその表面に適用され得る。これらの方法としては、例えば、蒸着（例えば、スパッターコーティング）が挙げられる、このようなプローブのための好ましい厚さは、約9000オングストロームである。

【0052】

別の有用なチップは、Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto, CA) 製のSAX1 ProteinChipTMである。このSAX1 ProteinChipは、 SiO_2 をコートしたアルミニウム基板から製造される。このプロセスにおいて、蒸留水中の第四アンモニウムポリスチレンミクロスフェアの懸濁液を、このチップの表面上に沈着させる（1 mL／スポット、2回）。風乾（室温、5分）後、このチップを、脱イオン水でリンスし、そして再度風乾する（室温、5分）。

【0053】

別の有用なチップは、IMAC3 (Immobilized Metal Affinity Capture、表面上のニトリロ三酢酸) チップ（これもまた、Ciphergen Biosystems, Inc. から入手可能である）。このチップは、以下のように製造される：5-メタクリルアミド-2-（N, N-ビスカルボキシメチルアミノ (biscarboxymethylamino)）ペンタン酸（7.5重量%）、アクリロイルトリ-（ヒドロキシメチル）メチルアミン（7.5重量%）、およびN, N'-メチレンビスアクリルアミド（0.4重量%）を、光開始剤として-（-）リボフラビン（0.02重量%）を使用して、光重合化する。このモノマー溶液を、粗いエッチングしたガラスコート基板上に沈着させ（0.4 mL、2回）、そして近UV露光システム（Hgショートアークランプ、365 nmで20 mW/cm²）で5分間照射する。この表面を、塩化ナトリウム（1 M）溶液で洗浄し、次いで脱イオン水で2回洗浄する。

【0054】

Ni (II) を含むIMAC3は、以下のように活性化される。表面を、 NiSO_4 の溶液で処理し（50 mM、10 mL／スポット）、そして高振動数ミキ

サー上で10分間混合する。 NiSO_4 溶液を除去した後、この処置プロセスを繰り返す。最後に、この表面を、脱イオン水流（15秒／チップ）で洗浄する。

【0055】

吸着剤を、連続パターンまたは不連続ターンでプローブ基板上に配置し得る。連続性の場合、1以上の吸着剤が、基板表面上に配置され得る。複数の型の吸着剤を使用する場合、基板表面は、1以上の結合特性が一次元または二次元の勾配において変化するように、コートされ得る。不連続性である場合、複数の吸着剤が、基板表面上の所定のアドレス可能な位置に配置され得る。これらのアドレス可能な位置は、任意のパターンで配列され得るが、好ましくは、規則的なパターン（例えば、線、直交アレイ、または規則的な曲線（例えば、円））にある。各々のアドレス可能な位置は、同じかまたは異なる吸着剤を含み得る。図6において、吸着剤の不連続性のスポットを含むプローブが示される。これらのスポットは、質量分析法の間に、エネルギー源（例えば、レーザー）が、各スポットに差次的に指向されて（すなわち、「アドレスする」）分析物を脱着されるという点で、「アドレス可能」である。

【0056】

プローブは、基板材料および／または吸着剤の選択に依存して、任意の適切な方法を使用して製造され得る。例えば、金属基板の表面は、金属表面の誘導体化を可能にする材料でコートされ得る。より詳細には、金属表面は、酸化ケイ素、酸化チタンまたは金でコートされ得る。次いで、表面を、二官能性リンカーで誘導体化され得、そのリンカーの一端は、表面上の官能基と共有結合し得、他端は、吸着剤として機能する基でさらに誘導体化され得る。別の例において、結晶シリコンから精製される多孔性シリコン表面が、マーカを結合するための吸着剤を含むように化学的に改変され得る。なお別の例において、ヒドロゲル骨格を有する吸着剤が、モノマー溶液のインサイチュ重合化によって基板表面上に直接形成され得、このモノマー溶液は、例えば、吸着剤として選択した官能基を含む、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、またはそれらの誘導体を含む。

【0057】

吸着剤を含むプローブ基板は、サンプルと接触する。サンプルは、好ましくは、生物学的流体サンプルである。生物学的流体サンプルの例としては、血液、血清、尿、前立腺液、精液 (seminal fluid)、精液 (semen)、精漿、および前立腺組織 (例えば、上皮組織 (その抽出物を含む)) が挙げられる。

【0058】

サンプルは、溶離液中に可溶化され得るかまたは溶離液と混合され得る。次いで、吸着剤を含むプローブ基板は、任意の技術を使用して溶液と接触し、これらの技術としては、液浴 (bathing)、浸漬 (soaking)、液浸 (dipping)、スプレー、洗浄またはピペティングなどが挙げられる。一般に、約 $1\ \mu\text{l}$ ~ $500\ \mu\text{l}$ 中に数アットモル ~ 100 ピコモルのマーカーを含むサンプルの容量が、吸着剤に結合するために十分である。

【0059】

サンプルは、吸着剤を含むプローブ基板と、その吸着剤にマーカーが結合するのを可能にするのに十分な期間接触し得る。代表的には、サンプルと吸着剤を含む基板とは、約 30 秒 ~ 約 12 時間、そして好ましくは約 30 秒 ~ 約 15 分の期間接触される。

【0060】

サンプルが吸着剤を含むプローブ基板と接触する温度は、特定のサンプルおよび選択されたプローブの関数であり得る。代表的に、サンプルは、周囲温度および圧力条件下でプローブ基板に接触される。しかし、いくつかのサンプルについて、変更された温度 (代表的には、 4°C ~ 37°C) および圧力条件が、望ましくあり得、これらの条件は、当業者によって決定可能である。

【0061】

吸着剤を含むプローブ基板が、サンプルまたはサンプル溶液と接触した後、プローブ基板表面上の結合されていない材料を洗い流し、結合された材料のみが基板表面上に残ることが好ましい。プローブ基板表面の洗浄は、例えば、基板表面を溶離液または洗浄溶液で液浴、浸漬、液浸、リンス、スプレーまたは洗浄することによって達成され得る。微量流体プロセスが、好ましくは、洗浄液 (例えば

、溶離液)がプローブ上の吸着剤の小さいスポットに導入される場合に使用される。代表的に、洗浄溶液は、0℃～100℃の間、好ましくは4℃～37℃の間の温度であり得る。

【0062】

任意の適切な洗浄溶液または溶離剤が、プローブ基板表面を洗浄するために使用され得る。例えば、有機溶液または水溶液が使用され得る。好ましくは、水溶液が使用される。例示的な水溶液は、H E P E S緩衝液、T r i s緩衝液、リン酸緩衝化生理食塩水などが挙げられる。特定の洗浄溶液または溶離剤の選択は、他の実験条件（例えば、使用する吸着剤または検出されるマーカの型）に依存し、そして当業者によって決定され得る。例えば、吸着剤として親水性基およびスルホン酸基を含むプローブ（例えば、S A X 1 P r o t e i n C h i pTMアレイ）を使用する場合、次いで、H E P E S緩衝液のような水溶液が、好ましくあり得る。別の例において、吸着剤として金属結合基を有するプローブ（例えば、N i (I I) P r o t e i n C h i pTMアレイ）を使用する場合、次いで、リン酸緩衝化生理食塩水のような水溶液が、好ましくあり得る。なお別の例において、疎水性基を含むプローブ（例えば、H 4 P r o t e i n C h i pTM）を使用する場合、次いで、水が、洗浄溶液として好ましくあり得る。

【0063】

エネルギー吸収分子（例えば、溶液中の）が、プローブ基板表面上に結合されたマーカまたは他の分子に適用され得る。スプレー、ピペッティングまたは液浸が使用され得る。これは、結合されていない材料がプローブ基板表面から洗い流された後に行われ得る。エネルギー吸収分子とは、気相イオン質量分析計におけるエネルギー源からのエネルギーを吸収し、それによって、プローブ表面からのマーカまたは他の物質の脱離を補助する分子である。例示的なエネルギー吸収分子としては、ケイ皮酸誘導体、シナピン酸およびジヒドロキシ安息香酸が挙げられる。

【0064】

マーカがプローブに結合された後、これは、気相イオン質量分析計を使用して検出される。プローブ上の吸着剤に結合されたマーカまたは他の物質は、気

相イオン質量分析計を使用して分析され得る。マーカの量および特徴は、気相イオン質量分析計を使用して決定され得る。目的のマーカに加えて、他の物質もまた、気相イオン質量分析計によって検出され得る。

【0065】

1つの実施形態において、質量分析計が、プローブ上のマーカを検出するために使用され得る。代表的な質量分析計において、マーカを有するプローブは、この質量分析計の入口システムに導入される。次いで、分析物は、レーザー、高速原子ボンバードメントまたは高エネルギープラズマのような脱離源によって脱離される。この生成された、脱離され揮発された種は、使用したイオンまたはこの脱離事象の直接的な結果としてイオン化される中性物質 (neutral) からなる。発生したイオンは、イオン光学アセンブリによって収集され、次いで、質量分析計が、この通過するイオンを分散させそして分析する。質量分析計を出たイオンは、検出器によって検出される。次いで、この検出器は、その検出されたイオンの情報を、質量電荷比に変換する。マーカまたは他の物質の存在の検出は、代表的に、シグナル強度の検出を含む。次いで、これは、プローブに結合されたマーカの量および特徴を反映し得る。

【0066】

好ましい実施形態において、レーザー脱離飛行時間型質量分析計が、本発明のプローブと共に使用される。レーザー脱離質量分析計において、結合した分析物を有するプローブが、入口システムに導入される。この分析物は、イオン化源からのレーザーによって、脱離されそして気相にイオン化される。この発生したイオンは、イオン光学アセンブリによって収集され、次いで、飛行時間型質量分析計において、イオンは、短い高電圧場を通して加速され、そして高真空チャンバに押し流される。高真空チャンバの遠位端で、加速されたイオンは、異なる時間で高感度の検出器表面に衝突する。飛行時間はイオンの質量の関数であるので、イオン形成とイオン検出器の衝撃との間の経過時間を使用して、特定の質量電荷比の分子の存在または非存在を同定し得る。当業者が理解するように、レーザー脱離飛行時間型質量分析計の任意のこれらの構成要素は、脱離、加速、検出、時間の測定などの種々の手段を使用する質量分析計のアセンブリにおいて、本明細

書中に記載の他の構成要素と組み合わせられ得る。

【0067】

別の実施形態において、イオン移動度分光計を使用して、マーカを検出および特徴付け得る。イオン移動度分光計の原理は、イオンの異なる移動度に基づく。詳細には、イオン化によって生じたサンプルのイオンは、例えば、質量、電荷または形状におけるそれらの差異に起因して、異なる速度で、電場の影響下にある管を通して移動する。イオン（代表的には、電流の形態にある）は、検出器に登録され、次いで、この検出器を使用して、サンプル中のマーカまたは他の物質を同定し得る。イオン移動度分光計の1つの利点は、それが、大気圧下で動作し得ることである。

【0068】

なお別の実施形態において、総イオン電流測定デバイスを使用して、マーカを検出および特徴付け得る。プローブが、単一の型のマーカのみが結合されるのを可能にする表面化学を有する場合に、このデバイスが、使用され得る。単一の型のマーカがプローブに結合される場合、イオン化されたマーカから発生した総電流は、マーカの性質を反映する。次いで、マーカによって生じた総イオン電流は、保存された既知の化合物の総イオン電流と比較され得る。次いで、マーカの特性が、決定され得る。

【0069】

マーカの脱離および検出によって得られたデータは、プログラム可能なデジタルコンピューターの使用によって分析され得る。コンピュータープログラムは、一般に、コードを保存する読み取り可能な媒体を備える。特定のコードは、メモリーに充填され、メモリーは、プローブ上の各特徴の位置、その特徴にある吸着剤の同定、および吸着剤を洗浄するために使用された溶出条件を含む。この情報を使用して、次いで、プログラムは、特定の選択的特性（例えば、使用した吸着剤および溶離剤の型）を規定する、プローブ上の特徴のセットを同定し得る。コンピューターはまた、プローブ上の特定のアドレス可能な位置から受け取られた種々の分子量でのシグナルの強度についてのデータを、インプットとして受け取るコードを備える。このデータは、検出されたマーカの数（必要に応じて、

検出された各々のマーカーについてのシグナルの強度および決定された分子量を含む)を示し得る。

【0070】

データ分析は、検出されたマーカーのシグナル強度(例えば、ピークの高さ)を検出する工程、および「外れているもの(outlier)」(所定の統計的分布から偏向するデータ)を除去する工程を包含し得る。例えば、観察されたピークは、正規化され得、このプロセスによって、いくつかの参照に対する各々のピークの高さが計算される。例えば、参照は、装置および化学物質(例えば、エネルギー吸収分子)によって発生されたバックグラウンドノイズであり得、これを、目盛りゼロに設定する。次いで、各マーカーまたは他の物質について検出されたシグナル強度は、所望の尺度にある相対強度(例えば、100)の形態で提示される。あるいは、標準をサンプルに共に容認し、その結果、標準由来のピークが、検出された各マーカーまたは他のマーカーについて観察されたシグナルの相対強度を計算するための参照として使用され得る。

【0071】

コンピューターによって、得られたデータを、表示のために種々の形式へと変換し得る。「スペクトルビューまたは保持マップ(spectrum view or retentate map)」として言及される1つの形式では、標準的なスペクトルビューが表示され得、ここではこのビューが、各々の特定の分子量で検出器に到達するマーカーの量を示す。「ピークマップ」として言及される別の形式では、ピーク高および質量の情報のみがスペクトルビューから保持され、より明瞭な画像を生じ、そしてほぼ同一の分子量を有するマーカーが、より容易に観察されることを可能とする。「ゲルビュー」として言及される、さらに別の形式では、ピークビューからの各々の質量が、各ピーク高に基づいてグレースケール画像へと変換され得、電気泳動ゲルにおけるバンドと類似した外観を生じる。「3-Dオーバーレイ」として言及される、さらに別の形式では、相対するピーク高における僅かな変化を研究するために、いくつかのスペクトルが重ね合わせられ得る。「差異マップビュー」として言及される、さらに別の形式では、2つ以上のスペクトルが比較され得、固有のマーカーおよびサンプル間でアッ

プレギュレートまたはダウンレギュレートされるマーカーを都合良く強調表示する。任意の2つのサンプルからのマーカープロフィール（スペクトル）が、視覚的に比較され得る。

【0072】

（I I I．マーカーを検出する方法）

（A．マーカーの特徴付け）

前立腺癌と、良性前立腺肥大と、陰性の診断とを識別するにおいて有用な、2セットのマーカーが同定された。第1セットは、精漿において同定された。第2セットは、前立腺上皮組織由来の細胞溶解産物において同定された。

【0073】

（1．マーカーセット：1 精漿）

前立腺癌または良性前立腺肥大を診断するために有用な第1セットのマーカーは、質量分析法によって決定される場合に、以下の分子量を有する：マーカーSP1：9,402.68±8.97Da, マーカーSP2：26,155.30±202.01Da, マーカーSP3：54,979.27±408.78Da, マーカーSP4：9,752.30±15.08Da, マーカーSP5：87,66.93±14.44Da, マーカーSP6：62,77.97±12.36DaおよびマーカーSP7：2,781.72±4.41Da。

【0074】

これらのマーカーはさらに、以下のように特徴付けられる。精漿をまず、約30kDより大きな分子量を有するタンパク質を排除するマトリクスを使用するサイズ排除スピンクロマトグラフィーによって分画した。SP4およびSP5は、それらが順相吸着チップを用いるSELDI質量分析法によってさらに分画されなくとも検出され得るに十分な程、富化されている。サイジングカラムからの画分を、強アニオン交換アフィニティースピンカラムに適用し、そしてpH9.0～pH4.0の範囲のpH勾配を使用して、20mM Tris、0.4M NaCl、0.1% Triton X 100の溶出剤で溶出することによるさらなる分画にこの画分を供した。マーカーSP1およびSP2は、低pI（約5）を示す後期画分に溶出された。マーカーSP3およびSP7は、約9のpIを示す

初期画分に溶出された。これらのマーカーは、順相吸着チップを用いる SELDI 質量分析法によって検出された。

【0075】

(2. マーカーセット：2 細胞溶解産物)

前立腺癌、良性前立腺肥大および陰性の診断を診断するために有用な第2セットのマーカーは、質量分析法によって決定される場合に、以下の分子量を有する：マーカーCL1：8, 494.30±10.24 Da, マーカーCL2：9, 614.62±52.19 Da, マーカーCL3：28, 472±127.40 Da, およびマーカーCL4：33, 386.85±160.47 Da。

【0076】

これらのマーカーはさらに、以下のように特徴付けられる。レーザー捕捉顕微解剖 (laser capture microdissection) によって単離された前立腺上皮細胞からの細胞溶解産物を分画し、そして保持クロマトグラフィー (retentate chromatography) によって分析した。この方法では、試験サンプルを、付着される2つの吸着剤 (強アニオン交換吸着剤またはニッケルキレート吸着剤) のうちの1つを含む基材に適用した。この吸着剤を、20mM Tris (pH7.5), 0.1% Triton X 100, 0.5M NaCl の第1溶出剤で洗浄して、チップへのタンパク質の結合を可能にし、そして水の第2溶出剤で洗浄して、結合していない物質を除去した。吸着剤上に保持されたマーカーを、SELDI 質量分析法によって検出した。4つのマーカーは、この2つの吸着剤のいずれかによって分解され得る。しかし、マーカーCL1およびCL2は、アニオン交換吸着剤においてより良好に分解され、そしてマーカーCL3およびCL4は、金属キレート吸着剤においてより良好に分解された。これらのマーカーは、中性pHでアニオン交換吸着剤に結合したので、このことは、これらのマーカーが中性pHで負に荷電されていることを意味する。

【0077】

(B. マーカーについてのサンプル供給源)

これらのマーカーは、患者または被験体に由来する多くの異なるサンプルにお

いて検出され得る。これらのサンプルは、好ましくは、生物学的液体サンプルである。本発明において有用な生物学的液体サンプルの例としては、血液、血清、尿、前立腺液、精液 (seminal fluid)、精液 (semen)、精漿、および前立腺組織 (例えば、上皮組織 (その抽出物を含む)) が挙げられる。

【0078】

マーカーセット1のマーカーは精漿において発見されたので、精漿は、本発明の方法のために好ましいサンプル供給源である。さらに、精漿サンプルを試験することは、侵襲性手順 (例えば、患者に針を挿入すること) を必要としない。

【0079】

マーカーセット2のマーカーは、前立腺上皮由来の細胞溶解産物において発見されたので、この組織は、本発明の方法のために好ましいサンプル供給源である。より詳細には、このサンプルは、この組織のレーザー捕捉顕微解剖によって収集された。従って、これは、本発明の方法のためのサンプルを得るための好ましい方法である。

【0080】

(C. マーカーの検出)

サンプルを得た後に、任意の適切な方法を使用して、試験される被験体由来のサンプル中においてマーカーを検出し得る。例えば、気相イオン分光法またはイムノアッセイが使用され得る。

【0081】

(1. 気相イオン分光法)

好ましい実施形態では、本発明のマーカーは、気相イオン分光法を使用して、そしてより好ましくは、質量分析法を使用して、そしてさらにより好ましくは、表面増強レーザー脱離/イオン化質量分析法 (surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry; 「SELDI」) を使用して検出される。SELDIは、生体分子についての気相イオン分光法の改善された方法である。SELDIでは、分析物を適用する表面が、分析物の捕捉、脱離および/または脱離におい

て活性な役割を果たす。生体分子についての気相イオン分光法の1つの一般的な方法は、MALDI（マトリクス補助レーザー脱離／イオン化（matrix-assisted laser desorption/ionization））質量分析法である。MALDIでは、分析物は代表的にマトリクス材料と混合され、このマトリクス材料は乾燥に際して、この分析物を捕捉する結晶を形成する。マトリクス材料は、エネルギー源からのエネルギー（これは、さもなくば、二分子分析物を断片化する）を吸収する。

【0082】

（a）サンプルの調製）

（（i）前分画）

1つの実施形態では、気相イオン分光法に供する前に、サンプルを前分画し得る。前分画は、複雑性の低い分析用サンプルを提供するという利点を有する。他方で、これは、分析プロセスにおいて余分な工程を導入する。このことは、例えば、臨床設定において非魅力的であり得る。サンプルは、当該分野において公知の任意の手段（サイズ分画およびクロマトグラフィー分画が挙げられるが、これらに限定されない）によって、前分画され得る。

【0083】

1つの実施形態では、気相イオン分光法による分析の前に、精漿サンプルを前分画し得る。好ましい分画方法としては、ゲル排除クロマトグラフィーによる最初の分画が挙げられる。分子量が30kDより大きい分子を排除するサイジングカラムは、このために特に有用である。次いで、種々のサイズの画分を、直接的に試験し得るか、またはアニオン交換クロマトグラフィーに基づく第2分画工程に供し得る。アニオン交換Qスピンカラムを使用することにより、マーカーSP1、SP2、SP3およびSP7は、培地濃度（例えば、約0.1M～0.6M）に対して低い塩を有する低強度緩衝液（例えば、約10mM～50mM Tris, HEPESまたはPBS）および低濃度の非イオン性界面活性剤（例えば、約0.05～0.2%のTritonX 100）を用いて溶出され得る。特に有用な緩衝液は、20mM Tris、0.5M NaClおよび0.1% TritonX 100である。マーカーSP1およびSP2は、約pH5で溶

出し、そしてマーカーSP3およびSP7は、約pH9で溶出する。1つの実施形態では、これらのマーカーは、pH勾配を使用して溶出される。

【0084】

((i i) 保持クロマトグラフィー)

別の実施形態では、サンプルを、気相イオン分光法の前に保持クロマトグラフィーによって生体クロマトグラフィーチップ (b i o - c h r o m a t o g r a p h i c c h i p) 上で分画する。好ましいチップは、Protein ChipTM (Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto, CA) から入手可能) である。上記のように、チップまたはプローブは、質量分析計において使用するために適合される。チップは、その表面に付着した吸着剤を含む。この吸着剤は、特定の適用において、インサイチュクロマトグラフィー樹脂として機能し得る。基本操作では、サンプルを、溶出剤溶液中において吸着剤に適用する。洗浄条件下において吸着剤が親和性を有する分子が、この吸着剤に結合する。吸着剤に結合しない分子は、洗浄で取り除かれる。吸着剤はさらに、種々のレベルのストリンジェンシーのもとで洗浄され得、その結果分析物は、分析のために適切なレベルまで保持または溶出される。次いで、エネルギー吸収分子が、吸着剤スポットに対して添加されて、脱離およびイオン化をさらに容易にし得る。分析物は、吸着剤からの脱離、イオン化、および検出器による直接的な検出によって検出される。従って、保持クロマトグラフィーは、伝統的なクロマトグラフィーでは親和性物質から溶出される物質を検出するのに対して、この親和性物質によって保持される分析物を検出するという点で、伝統的なクロマトグラフィーとは異なる。

【0085】

マーカーセット1のマーカーを分解するために有用な吸着剤は、親水性吸着剤であり、そして特に、酸化シリコン (順相) 吸着剤である。サイジングと、次ぐアニオン交換クロマトグラフィーとによって前分画された精漿は、洗浄される必要なく、順相吸着剤の表面に直接的に適用され得る。代わりに、このサンプルを、この表面上において乾燥させる。これは、前分画工程によって、マーカーがさらなる分画を伴わずに分解され得るに十分な数のタンパク質が取り除かれること

が理由である。次いで、エネルギー吸収分子を適用し得る。

【0086】

少なくともマーカーSP1およびSP2について有用な別の吸着剤は、アニオン交換吸着剤である。これは、これらのタンパク質が約5のpIを有することが理由である。従って、これらは、中性pHの溶出剤で洗浄される場合に、アニオン交換吸着剤に結合することが予期される。マーカーSP3およびSP7は、約9のpIを有する。従って、これらは、中性pHで正に荷電されることが予期される。従って、これらのマーカーはまた、中性pHの緩衝液で洗浄されるカチオン性吸着剤において分解され得る。

【0087】

マーカーセット2のマーカーを分解するために有用な吸着剤は、アニオン交換吸着剤である。この表面は、培地に対して低い塩および低濃度の非イオン性界面活性剤を含む、中性pHの緩衝液で有益に洗浄される。好ましい表面は、Ciphergen Biosystems, Inc. からのSAX-1である。この表面は、四級アンモニウムイオンを含む強アニオン交換樹脂である。

【0088】

マーカーセット2のマーカーについて有用な別の吸着剤は、金属キレート吸着剤であり、そして特にニッケルである。この表面もまた、培地に対して低い塩および低濃度の非イオン性界面活性剤を含む、中性pHの緩衝液で有益に洗浄される。好ましい表面は、Ciphergen Biosystems, Inc. からのIMAC3である。IMAC3は、ニッケルキレート吸着剤を含む。

【0089】

本発明の任意のマーカーについて有用な別の吸着剤は、マーカーを特異的に結合する抗体である。1つ以上のマーカーに結合する抗体を含むチップは、マーカーではないもの（これは、この抗体に結合せず、かつ検出プロセスにおいて「ノイズ」として機能する）を取り除くために、特に有用である。

【0090】

当業者に明らかであるように、異なるマーカーは、吸着剤および溶出剤の異なる組み合わせを使用して、容易に分解され得る。

【0091】

((i i i) MALDI)

別の実施形態では、サンプルを、マトリクス材料と混合し得、そして伝統的なMALDIによって分析し得る。この場合、サンプル／マトリクス混合物を、不活性な質量分析計プローブの表面に塗布する。MALDI方法は、ほぼ確実に、使用前の精製を必要とする—MALDIの分解力は、サンプル中の分析物の複雑度によって制限される。

【0092】

((i v) 分析前のマーカー改変)

別の実施形態では、検出前にマーカーを改変して、その分子量を変更する。これらの方法は、検出のあいまい性を減少させ得る。例えば、分析前にマーカーを、タンパク質分解性消化に供し得る。任意のプロテアーゼが使用され得る。マーカーを、多数の別個のフラグメントへと切断する可能性が高いプロテアーゼ（例えば、トリプシン）が、特に有用である。消化から生じるフラグメントは、マーカーについてのフィンガープリントとして機能することによって、その間接的な検出を可能にする。これは特に、問題のマーカーと混乱され得る類似の分子量を有するマーカーが存在する場合に、特に有用である。また、タンパク質分解性の断片化は、高分子量マーカーについて有用である。なぜなら、より小さなマーカーは、質量分析法によって、より容易に分解されるからである。

【0093】

別の実施形態では、マーカーは、分子マーカーに特異的に結合する特定の分子量のタグ（これは、それらをさらに識別する）を付着させることによって改変され得る。

【0094】

(b) レーザー脱離／イオン化質量分析法の性能)

マーカーが、気相イオン分光法によって決定された後に、マーカーの試験量を決定し得る。例えば、目的のマーカーの分子量で、シグナルが提示される。提示されたシグナルの強度または大きさに基づいて、試験されるサンプル中のマーカーの量を決定し得る。サンプル中のマーカーの試験量は、絶対単位で測定される

必要はないが、それがマーカのコントロール量と定性的または定量的に比較され得る限りにおいて相対的単位であり得る、ということに留意のこと。例えば、検出されるマーカの量は、バックグラウンドノイズに基づいて、相対強度で提示され得る。好ましくは、マーカの試験量およびコントロール量は、同一条件下で測定される。

【0095】

所望される場合には、マーカの絶対量を、キャリブレーションによって決定し得る。例えば、精製された既知のマーカを、プローブ表面上の異なる吸着剤スポットに対して漸増量で添加し得る。次いで、各スポットからのピークを獲得し得、そして各スポットにおける精子の塩基性タンパク質の濃度に対するグラフにプロットし得る。濃度に対するピーク強度のプロットから、試験される任意のサンプル中におけるマーカの絶対量が決定され得る。

【0096】

(2. イムノアッセイ検出)

検出方法の別の実施形態では、イムノアッセイを使用して、サンプル中のマーカを定性的または定量的に検出および分析し得る。この方法は、以下の工程を包含する：(a) マーカに特異的に結合する抗体を提供する工程；(b) この抗体とサンプルを接触させる工程；および(c) サンプル中のマーカに結合した抗体の複合体の存在を検出する工程。

【0097】

マーカに特異的に結合する抗体を調製するために、精製されたマーカまたはその核酸配列が使用され得る。マーカについての核酸配列およびアミノ酸配列は、これらのマーカのさらなる特徴付けによって得られ得る。例えば、各マーカは、多くの酵素（例えば、トリプシン、V8プロテアーゼなど）でマッピングされるペプチドであり得る。各マーカからの消化フラグメントの分子量を使用して、種々の酵素によって生成される消化フラグメントの分子量と一致する配列についてデータベース（例えば、SwissProtデータベース）を検索し得る。この方法を使用して、他のマーカの核酸配列およびアミノ酸配列は、これらのマーカがデータベース中の既知のタンパク質である場合に同定され得

る。

【0098】

あるいは、タンパク質は、タンパク質ラダー配列決定を使用して配列決定され得る。タンパク質ラダーは、例えば、分子を断片化し、そして酵素学的消化またはフラグメントの末端から単一のアミノ酸を連続的に取り除く他の方法にフラグメントを供することによって、生成され得る。タンパク質ラダーを調製する方法は、例えば、国際公開WO 93/24834 (Chaitら) および米国特許第5,792,664号 (Chaitら) に記載される。次いで、このラダーを、質量分析法によって分析する。ラダーフラグメントの質量における差異によって、この分子の末端から取り除かれたアミノ酸を同定する。

【0099】

マーカーが、データベース中の既知のタンパク質ではない場合、核酸配列およびアミノ酸配列は、このマーカーのアミノ酸配列の一部であるとしても、その見識を使用して決定され得る。例えば、縮重プローブを、マーカーのN末端アミノ酸配列に基づいて作製し得る。次いで、これらのプローブを使用して、マーカーが初めに検出されたサンプルから作製された、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーをスクリーニングし得る。陽性クローンを同定し得、増幅し得、そしてこれらの組換えDNA配列を、周知技術を使用してサブクローン化し得る。例えば、Current Protocols for Molecular Biology (Ausubelら, Green Publishing Assoc. and Wiley-Interscience 1989) および Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版 (Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 1989) を参照のこと。

【0100】

精製されたマーカーまたはその核酸配列を用いることにより、当該分野において公知の任意の適切な方法を使用して、マーカーに特異的に結合する抗体を調製し得る。例えば、Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibo

dies: A Laboratory Manual (1988); Godin
g, Monoclonal Antibodies: Principles a
nd Practice (第2版、1986); および Kohler & Mil
stein, Nature 256: 495-497 (1975) を参照のこと。
このような技術としては、ファージまたは類似のベクター中における組換え抗体
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、ならびに、ウサギま
たはマウスを免疫することによるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体
の調製が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Huse ら, Scie
nce 246: 1275-1281 (1989); Ward ら, Nature
341: 544-546 (1989) を参照のこと）。

【0101】

抗体を提供した後、マーカーを、多数の任意の十分認知された免疫学的結合ア
ッセイを使用して検出および／または定量し得る（例えば、米国特許第4, 36
6, 241号；同第4, 376, 110号；同第4, 517, 288号；および
同第4, 837, 168号を参照のこと）。有用なアッセイとしては、例えば、
酵素免疫アッセイ（EIA）（例えば、酵素結合イムノソルベント検定法（EL
ISA））、放射免疫アッセイ（RIA）、ウェスタンブロットアッセイ、また
はスロットブロットアッセイ（slot blot assay）が挙げられる
。一般的なイムノアッセイの概説については、Methods in Cell
Biology: Antibodies in Cell Biology,
第37巻（Asai編, 1993）；Basic and Clinical
Immunology（Stites & Terr編, 第7版, 1991）もまた
参照のこと。

【0102】

一般的に、被験体から得られたサンプルを、マーカーに特異的に結合する抗体
と接触させ得る。必要に応じて、抗体とサンプルとの接触の前に、抗体を固体支
持体に固定して、洗浄および引き続く複合体の単離を容易にし得る。固体支持体
の例としては、例えば、マイクロタイタープレート、スティック、ビーズ、また
はマイクロビーズの形態のガラスまたはプラスチックが挙げられる。抗体はまた

、プローブ基材または上記のProteinChipTMアレイに付着され得る。サンプルは、好ましくは、被験体から採取された生物学的液体サンプルである。生物学的液体サンプルの例としては、血液、血清、尿、前立腺液、精液（seminal fluid）、精液（semen）、精漿、および前立腺組織（例えば、上皮組織（その抽出物を含む））が挙げられる。好ましい実施形態では、生物学的液体は精漿を含む。サンプルは、抗体にサンプルを接触させる前に、適切な溶出剤で希釈され得る。

【0103】

サンプルと抗体とをインキュベートした後、この混合物を洗浄し、そして形成された抗体-マーカー複合体を検出し得る。これは、洗浄された混合物と検出試薬とをインキュベートすることによって達成され得る。この検出試薬は、例えば、検出可能な標識で標識された二次抗体であり得る。例示的な検出可能な標識としては、磁器ビーズ（例えば、DYNABEADSTM）、蛍光色素、放射性標識、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（horse radish peroxide）、アルカリホスファターゼ、およびELISAにおいて通常使用される他の酵素）、および比色定量標識（例えば、金コロイド、または着色されたガラスもしくはプラスチックのビーズ）が挙げられる。あるいは、サンプル中のマーカーは、間接的なアッセイ（ここでは、例えば、標識された二次抗体を使用して、結合されたマーカー特異的な抗体を検出する）を使用して、および／または競合アッセイもしくは阻害アッセイ（ここでは、例えば、マーカーの別個のエピトープに結合するモノクローナル抗体を、混合物と、同時にインキュベートする）を使用して、検出され得る。

【0104】

アッセイ全体を通して、インキュベーション工程および／または洗浄工程が、試薬の各組み合わせの後に必要とされ得る。インキュベーション工程は、約5秒間から数時間まで変動し得、好ましくは、約5分間から約24時間まで変動し得る。しかし、インキュベーション時間は、アッセイの形式、マーカー、溶液の容量、濃度などに依存する。通常、アッセイは周囲温度で実施されるが、アッセイは、一定範囲の温度（例えば、10℃～40℃）にわたって実施され得る。

【0105】

イムノアッセイ技術は、当該分野において周知であり、そしてこの適用可能な技術の一般的概説が、前出のHarlow & Laneにおいて見出され得る。

【0106】

イムノアッセイを使用して、被験体由来のサンプル中におけるマーカーの試験量を決定し得る。第1に、サンプル中のマーカーの試験量は、上記のイムノアッセイ方法を使用して検出され得る。マーカーがサンプル中に存在する場合、これは、上記の適切なインキュベーション条件下でマーカーに特異的に結合する抗体と抗体-マーカー複合体を形成する。抗体-マーカー複合体の量は、標準に対して比較することによって決定され得る。上記のように、マーカーの試験量は、測定単位がコントロール量と比較され得る限りにおいて、絶対単位で測定される必要はない。

【0107】

(IV. マーカーを使用する診断方法)

マーカーセット1またはマーカーセット2のマーカーは、単独でか、このセット中の他のマーカーとの組み合わせにおいてか、このセットのいずれかにおけるマーカーとの組み合わせにおいてか、または全く他のマーカー（例えば、PSA、または前立腺特異的膜抗原）と共に使用されて、前立腺癌、良性前立腺肥大、または陰性の診断の診断を補助し得る。合わせて使用されると、それらは、単一のマーカー単独よりも多くの情報を診断医に対して提供する傾向にあり、真の陽性および真の陰性の診断の割合を増加させ、そして偽陽性または偽陰性の診断の割合を減少させる。

【0108】

特定の実施形態において、マーカーの量を定量することなく、マーカーの存在または非存在を検出することは有用である。この情報は、マーカーが、CaPと、BPHと、陰性診断との間の検出の頻度における差違を示すので有用である。他の実施形態において、マーカーの存在または非存在を検出することはまた、マーカーを定量することを包含する。この情報は、いくつかの目的に関して有用である。第1に、個々のマーカーは、弱いピークに基づく特定の状態においてわず

かに検出可能であり得るが、強いピークに基づく他の状態において容易に検出可能であり得る。第2に、特定のマーカー（例えば、CL3およびCL4）は、全ての状態において頻繁に検出されるが、それらの相対比は、CaPとBPHまたは正常のいずれかとの間で劇的に異なる。

【0109】

当然のことながら、診断医により、診断試験が、特異性および感受性の程度により測定されることが理解される。大部分の診断試験は、あらゆる真の陽性診断のための、陽性の結果を提供する能力におけるある欠陥、ならびにあらゆる真の陰性診断のための、陰性の結果を提供する能力におけるある欠陥を欠点としてもつ。しかし、完全には特異的でもなく、感受性でもない試験は、診断において有用である。なぜなら、それらは、特定の診断をより可能性の高いものにするからである。例えば、マーカーSP1は、CaPが陽性の全サンプル中の89%、および陰性のサンプルのわずか22%において検出される。従って、SP1の検出は、これが可能なCaPの診断を提供する点で有用である。SP1の検出の失敗はまた、これが可能な陰性診断を提供するという点で有用である。さらに、他のマーカーと組み合わせて用いると、診断医はCaPまたは陰性診断における信頼性を増大させる。このことを考慮して、マーカーは、以下のように出現率分布を有する。

【0110】

(A. マーカーSet: 1 精漿)

図1は、CaP、BPHおよび陰性診断におけるマーカーSP1からSP7の検出のチャートである。このチャートを用いて、診断医は、1以上のマーカーの検出と、種々のレベルの信頼性を有する種々の診断とを相関させ得る。陰性診断と比較して、SP1は、CaPにおいてより頻繁に検出され、BPHにおいてはそれほど頻繁に検出されない（例えば、検出されない）。SP2は、CaPおよびBPHにおいてより頻繁に検出される。SP3は、CaPにおいてより頻繁に検出され、BPHにおいてはあまり頻繁に検出されない。SP4は、CaPおよびBPH両方においてあまり頻繁に検出されない。SP5、SP6およびSP7はCaPにおいてあまり頻繁に検出されず（例えば、検出されない）、BPHに

においてあまり頻繁に検出されない。

【0111】

SP2は、最も識別力のある単一のマーカーであり、CaPサンプルの100%、BPHサンプルの0%、および正常サンプルの11%において検出される。SP1およびSP3は、BPHにおいて検出されなかったが、それらの検出は、この状態の可能性を排除するために有用である。従って、SP1、SP2およびSP3の3つ全ての検出は、CaPと非常に相関しており、BPHとは負に相関する。SP5、SP6およびSP7は、CaPにおいて検出されなかった。従って、それらの検出は、この診断の可能性を排除する傾向にある。良性の前立腺肥大は、陽性に診断することがより困難である。しかし、この状態は、SP2、SP4、SP5、SP6およびSP7の検出と、ならびにSP1およびSP3の検出の欠如と最も強く相関する。

【0112】

(B. マーカーSet：2 細胞溶解物)

図3は、CaP、BPHおよび陰性診断におけるマーカーCL1からCL4の検出のチャートである。陰性診断と比較して、マーカーCL1およびマーカーCL2は、CaPおよびBPHの両方においてより頻繁に検出される（CL2は、陰性診断において検出されない）。従って、これらのマーカーのいずれかまたは両方の検出は、病理的診断と正に相関する。

【0113】

マーカーCL3およびCL4は、3つの状態全てにおいて検出される。図5Aおよび5Bは、試験される種々の組織サンプルにおけるCL3およびCL4のチャートおよび比のグラフを示す（平均の比を含む）。このグラフを、図5Bの棒グラフにおいて示す。相対量を、ピーク高またはピーク面積のいずれかにより気相イオン分光計（gas phase ion spectrometry）において決定し得る。好ましくは、この決定は、内部標準（例えば、全てのサンプルに存在する11400Dのピーク）に対して正規化される。理解され得るように、0.4より大きいCL4：CL3の比は、CaPと正に相関する。この診断の信頼性は、この比が少なくとも0.75および少なくとも1.0である場合に

増大する。

【0114】

(C. マーカーの検出：コントロールとの比較)

マーカーの検出は、通常、試験データとコントロールとを比較することを包含する。このコントロールは、「正常」量の較正のため、および正常量もしくはコントロール量に対してマーカーの量を定量するために有用であり得る。例えば、正常状態および病的状態の両方において存在するマーカーが、コントロール量と比較して、1.5倍、2倍、5倍、または10倍増大するか否かを知るために有用であり得る。

【0115】

1つの実施形態において、このコントロール量は、正常患者由来の匹敵するサンプルに存在するマーカーの量であり得る。このコントロール量は、試験量を測定することにおける実験条件と同じまたは実質的に同様な実験条件下で測定される。例えば、試験サンプルが被験体の精漿から得られ、マーカーが特定のプローブを用いて検出される場合、マーカーのコントロール量は、好ましくは、同じプローブを用いて患者の精漿サンプルから決定される。マーカーのコントロール量は前立腺癌を有さない被験体（例えば、BPHまたは陰性診断患者）に由来する多くのサンプルに基づいて決定されることが好ましく、その結果、この量は、その集団におけるマーカー量の変動を反映する。

【0116】

(D. コンピューターによる相関)

質量分析により生成されるデータは、通常、コンピューターソフトウェアにより分析される。このソフトウェアは、質量分析器からのシグナルをコンピューター読み取り可能な形態に変換するコードを含み得る。このソフトウェアはまた、シグナルが、本発明のマーカーまたは他の有用なマーカーに対応するシグナルにおけるピークを示すか否かを決定するために、シグナルの分析にアルゴリズムを適用するコードを含み得る。このソフトウェアはまた、試験サンプル由来のシグナルと、「正常」、「BPH」、および「CaP」に特徴的な代表的シグナルとを比較するアルゴリズムを実行し、2つのシグナル間の適合の近似を決定するコ

ードを含み得る。このソフトウェアはまた、試験サンプルが、最も近似し、それにより、有望な診断を提供することを示すコードを含み得る。

【0117】

(V. キット)

なお別の実施形態において、本発明は、前立腺癌の診断を補助するためのキットを提供する。ここで、このキットは、本発明のマーカを検出するために用いられ得る。例えば、このキットは、上記のマーカのいずれか1つまたはその組み合わせを検出するために用いられ得る。これらのマーカは、前立腺癌患者、BPH患者および正常患者のサンプルに示差的に存在する。本発明のキットは、多くの適用を有する。例えば、このキットは、被験体が前立腺癌、BPHを有するか否か、または陰性診断を有するか否かを区別し、従って前立腺癌診断を補助するために用いられ得る。別の例において、このキットは、前立腺癌について、インビトロでの前立腺細胞、またはインビボでの動物モデルにおけるマーカの発現を調節する化合物を同定するために用いられ得る。

【0118】

1つの実施形態において、キットは、(a) 基材（その上に吸着剤を含む）であって、ここで、この吸着剤は、マーカを結合させるために適切である基材；および(b) 洗浄溶液または洗浄溶液を作製するための説明書であって、ここで、吸着剤と洗浄溶液との組み合わせは、気相イオン分光計を用いたマーカの検出を可能にする。このようなキットは、上記の物質から調製され得、そしてこれらの物質（例えば、プローブ基質、吸着剤、洗浄溶液など）の先の議論は、この節に対して十分に適用可能であり、繰り返す必要はない。

【0119】

いくつかの実施形態において、このキットは、第1の基材（その上に吸着剤を含む）（例えば、吸着剤で官能化された粒子）および第2の基材（その上に第1の基材が、気相イオン分光計に取り外し可能に挿入され得るプローブを形成するように配置され得る）を含む。他の実施形態において、このキットは、基材の上に吸着剤を有する、取り外し可能に挿入され得るプローブの形態にある単一の基材を含み得る。

【0120】

必要に応じて、このキットは、標識または別個の挿入物の形態で、適切な操作パラメーターについての説明書をさらに含み得る。例えば、キットは、精漿サンプルをプローブ上で接触させた後に、このプローブを洗浄する方法を消費者に知らせる標準的な説明書を有し得る。

【0121】

別の実施形態において、キットは、(a) マーカーに特異的に結合する抗体；および(b) 検出試薬を含む。このようなキットは、上記の物質から調製され得、そしてこの物質(例えば、抗体、検出試薬、固定化支持体など)に関する先の議論はこの節に十分適用可能であり、繰り返す必要はない。

【0122】

いずれの実施形態においても、このキットは、試験サンプルを標準的なコントロール情報と比較して、サンプルにおいて検出されるマーカーの試験量が前立腺癌の診断と矛盾がない診断量であるか否かを決定し得るように、標準的な情報またはコントロール情報を必要に応じてさらに含む。

【0123】

(実施例)

以下の実施例は、前立腺癌または良性前立腺肥大との正の相関または負の相関を有する2セットのマーカーの同定を示す。第1のセットを、精漿のサンプルから決定した。第2のセットのマーカーを、レーザー捕捉顕微解剖により、単離した細胞溶解物のサンプルから決定した。

【0124】

(組織および精液標本)

組織および精子標本を、バージニア前立腺癌組織および体液バンク(Virginia Prostate Cancer tissue and biological fluid bank)から得た。前立腺組織標本を、手術時に獲得し、液体窒素中で迅速に凍結し、そして -80°C で保存した。精子を、インフォームドコンセントの後にDepartment of Urologyに来院した患者から収集した。精子サンプルを、以前に記載されたように処理し、 -80

℃で保存した。精子サンプルを収集後にすぐに処理するか、または処理するまで－80℃で保存した。処理のために、精子サンプルを、123mM NaCl、5mM KCl、1mM MgSO₄、37mM Tris、1mM EDTA および2.5mMのセリンプロテアーゼインヒビターカクテル（PMSFまたはPEFABLOC）を含む希釈緩衝液（pH8.0）1/2容積と混合した。次いで、このサンプルを、確実に完全に混合するためにボルテックスにかけ、25,000×Gで5分間遠心分離し、そして上清を、100μlから500μlのアリコートに分け、そして－80℃で保存した。

【0125】

（II. レーザー捕捉顕微解剖）

正常細胞および前立腺癌細胞の集団を、本質的に、Emmert-Buckら、「Laser Capture microdissection」, Science 1996; 274: 998-1001に記載されるように、PixCellTM Laser Capture Microdissection Microscope (Arcturus Engineering, Inc., Mountain View, CA) を用いて凍結組織切片から獲得した。米国特許第5,843,644号 (Liottaら) および米国特許第5,843,657号 (Liottaら) もまた参照のこと。

【0126】

（III. レーザー脱着／イオン化質量分析）

サンプルを、レーザー脱着／イオン化質量分析により分析した。用いたシステムは、Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto, CA) から得たPBSIまたはPBSIIであった。これらのシステムは、337.1nmの窒素レーザーを用いる。パルス幅は、4ナノ秒である。このシステムの最大エネルギー出力は、約150μJ／パルスである。しかし、これらの研究において、約1～25μJ／パルスの光エネルギーを用いた。

【0127】

（IV. 精漿におけるマーカー）

（A. 精漿を処理するためのプロトコル）

(1. 精子および精漿)

精子サンプル (20 μ l) を (PBS中の8M尿素、1% CHAPS 30 μ l中に) 希釈し、シバクロンブルースピンカラム (c i b r a c o n b l u e s p i n c o l u m n) を用いることによりアルブミンを枯渇させた。精漿 (SP) サンプル (20 μ l SP) を (9.5M尿素、2% CHAPS、50mM Tris pH9.5を含む緩衝液30 μ lを用いて) 希釈し、続いて、50mM HEPES中、1:9でさらに希釈した。各サンプル型について、5 μ lをSAX, Cu-IMACまたはMixed Mode (陰イオン性表面および疎水性表面) ProteinChipTMアレイ上にスポットし、そしてマトリクスとしてシナピン酸を用いて質量分析を行った。

【0128】

(2. 精漿の調製)

1. 精漿サンプルを回収し、細胞を遠心分離し、そしてプロテアーゼインヒビターを添加した。サンプルをアリコートにわけ、 -70°C で保存した。
2. タンパク質濃度をBCA法により決定し、そして結合緩衝液中で23mg/mlの濃度に希釈することにより各サンプルについて標準化した (以下を参照のこと)。
3. サンプルを素早く14Kで2分間遠心分離した後、上清を結合緩衝液 (100 μ lの容量中、20mM Tris (pH9.0)、0.4M NaCl、および0.1% Triton X100を含む) において希釈した。(90 μ lの濃縮した精漿、10 μ lの5M NaCl、1 μ lの10% Tx100) 次いで、サンプルを、氷上に30分間静置した。

【0129】

(3. サイズ選択カラムの調製およびサイズ分画)

1. K30スピнкаラムの出口キャップを取り外す。カラムを2mlのスクリーキャップ試験管に挿入する。
2. スピнкаラムの頂部キャップを開ける。カラムを3000rpm (720g) で3分間室温で遠心分離する。カラムマトリクスは、下側に充填され、そして半乾燥であるが、ひび割れはないはずである。

3. スピncラムを新しい2mlの試験管に移す。希釈した精漿30 μ lをカラムマトリクスの中心にゆっくりとアプライする。サンプルはマトリクスの側方に流れ落ちないようにする。
4. 3000rpmで3分間カラムを遠心分離する。分画したタンパク質は、収集チューブ中にある。これは、画分1である。
5. スピncラムを新しい試験管に移す。30 μ lの結合緩衝液(20mM TRIS pH9、0.4M NaCl、0.1% Tx)をカラムに添加し、上記のように遠心分離する。これは、画分2である。
6. 工程5を繰り返し、2以上の画分を収集する。
7. 合計で4画分を収集する。画分を氷上に保存する。

【0130】

(4. タンパク質分画のための陰イオン交換カラムの調製)

1. 上記のサイズ選択からの画分1と2を合わせ、そして画分3と4を合わせる。総容量を結合緩衝液で120 μ lに合わせる(すなわち、合計約50~60 μ l容量を有し、60~70 μ lの結合緩衝液を添加する)。これは、UN(非分画)とラベルをつける。
2. アニオン交換Qカラムの出口キャップを取り外す。2mlの試験管に挿入し、頂部のキャップを開ける。
3. カラムを1000rpm(80g)で1分間遠心分離する。カラムマトリクスは充填されるが、ひび割れはないはずである。
4. カラムを新しい2ml試験管に移す。合わせた画分サンプル(合計2つ、すなわち画分1と2、および画分3と4を有する)の90 μ lをアプライする。サンプルをマトリクスの中心にゆっくりとアプライする。室温で5分間インキュベートする。
5. カラムを1000rpmで1分間遠心分離する。収集カラム中のタンパク質は、フロースルー画分である。これらのタンパク質は、カラムに結合しない。なぜなら、それらは、結合緩衝液中で中性または正の正味の電荷を有するからである。あるいは、それらは通り抜け得る。なぜなら、樹脂の受容力が満たされているからである。

6. タンパク質の捕捉を最大にするために、溶出液をカラムに再びアプライし、室温で3分間インキュベートし、上記のように遠心分離する。このフロースルーは、画分Q1である。

7. カラムを新しい試験管に移す。カラムを100 μ lの結合緩衝液で洗浄し、室温で3分間インキュベートし、上記のように遠心分離する。この工程を繰り返す。合計200 μ lを収集し、画分Q2とする。

8. カラムを第3の試験管に移す。100 μ lの溶出緩衝液A (pH 8.0) をアプライし、室温で3分間インキュベートし、上記のように遠心分離する。これは画分Q3である。

9. 引き続く画分のためにこの過程を溶出緩衝液 (緩衝液B~E、pH 7~4) を用いて続ける。

10. 各サンプルについて、16の画分をサイズカラムおよび陰イオンカラムの後に採取する。UN (1+2)、n1 (1+2)、Q2 (1+2)、Q4 (1+2)、Q5 (1+2)、Q6 (1+2)、Q7 (1+2)、UN (3+4)、Q1 (3+4)、Q2 (3+4)、Q3 (3+4)、Q4 (3+4)、Q5 (3+4)、Q6 (3+4)、Q7 (3+4)。

(5. 精漿画分のSELDI処理)

1. 各画分2 μ lを順相チップ (normal phase chip) にスポットする。スポットする前に、各アレイの周りに疎水性の輪を書く。これを完全に乾燥させた後、0.5% TFA、および0.6% Triton X100を含有する50%アセトニトリルを溶媒として用いて、2回、0.5 μ lマトリクスをスポットする。

2. このチップを、低分子読み取りのためのフィルターを用いてレーザー強度15、感度10で、および高分子収集のためのフィルターを用いてレーザー強度50で読み取る。組み合わせた平均スペクトルについて70ショットを収集する (7領域に対して10ショット。すなわち、20~80)。

【0131】

(6. 結果)

各読み取りについてのスペクトルを検討し、フィルターを用いる (50および

150が、それぞれL-15およびL50について適切である)。5×ノイズの設定を用いて自動ピーク同定モードを用いる。

【0132】

データを9つのCAP（前立腺癌腫）、9つのBPH（良性前立腺肥大）、および9つのNR（正常前立腺）から収集した。データを、1回に1画分、分析した。7つの潜在的な生体マーカーを観察した。図2A～2Gは、陰性、BPHおよびCaPサンプルからの代表的なトレースを示す。これは、以下のマーカーを示す：マーカーSP1：9,402.68±8.97Da、マーカーSP2：26,155.30±202.01Da、マーカーSP3：54,979.27±408.78Da、マーカーSP4：9,752.30±15.08Da、マーカーSP5：87,66.93±14.44Da、マーカーSP6：62,77.97±12.36DaおよびマーカーSP7：2,781.72±4.41Da。

（V. 前立腺上皮組織からの細胞溶解物におけるマーカー）

前立腺上皮組織細胞溶解物からのマーカーを、金属キレート吸着剤または疎水性吸着剤を用いて、SELDIにより同定した。合計2000～3000の顕微解剖した細胞を、緩衝液中5M グアニジウムイソチオシアネートまたは0.1% TritonX100を含有する20mM HEPESの5～10μlに溶解した。次いで、溶解物全体を、IMAC3（ニッケル金属キレート）またはSAX2（強力なアニオン交換物質：4級アンモニウム）ProteinChipTMアレイにスポットし、洗浄した。質量分析は、エネルギー吸収分子についてα-シアノー-4-ヒドロキシシナミン酸を用いてSELDI PBS-Iにおいて行った。チップおよび質量分析計を、Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto, California) から得た。

【0133】

（A. IMAC3 ProteinChip）

（1. プロトコル）

1. チップ上の各吸着スポットの周りに疎水性の輪を書く。
2. 10μlの50mM NiSO₄をロードする。チップを、振盪しながら5

分間湿潤チャンバ中でインキュベートする。繰り返す。

3. チップをDI H₂Oでスポットの周りを10秒洗浄し、過剰な水を除去する。
4. 5 µlの結合緩衝液(20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX100、0.5M NaCl)をロードする。チップを、振盪しながら5分間湿潤チャンバ中でインキュベートする。
5. キムワイプ(登録商標)で注意深く結合緩衝液を除去する。
6. 顕微解剖した細胞(500~1000ショット)を5 µlの20mM HEPES+0.1% NP-40中に、キャップの上で直接溶解する。溶解緩衝液を、溶解が生じるまで細胞の上部で上下にピペティングする。細胞溶解物を1分間ボルテックスし、遠心分離する。
7. 溶解物全体(5 µl)をスポットの上にスポットし、湿潤チャンバ中で30分~1時間インキュベートする。
8. 各スポットを、5 µlの結合緩衝液で5回またはバルクで洗浄する。
9. 5 µlの水で2回洗浄する。
10. スポットがまだ湿潤である間に、0.06% Txを含有する50% ACN、0.5% TFA中のSPAまたはCHCAを0.5 µl、2回スポットする。
11. 風乾する。

【0134】

(2. SELDIリーダーデータ収集)

1. レーザー強度15、30および50(フィルターなし)においてCiphen Biosystems PBSIでピークを収集し、PBSIIについては、レーザー強度230および260、検出感度10でピークを収集した。70ショットを収集し、平均をとった。
 2. ピーク強度の正規化を、内部標準を用いて行った：すなわち、全ての標本において同じレベルにか、または同じレベルあたりに存在するピークを試験した。
- 注：LCMサンプルは、100ショットを平均し、これは、2000~3000細胞に等しい。

【0135】

(B. SAX-1 ProteinChip)

(1. プロトコル)

1. アレイ上の各吸着スポットの周りに疎水性の輪を書く。
2. 5 μ l の 20mM Tris pH7.5 + 0.1% TritonX100 (結合緩衝液) をロードする。チップを、30分間湿潤チャンバ中でインキュベートする。もう一度繰り返す。
3. 顕微解剖した細胞を 5 μ l の 5M GITC 緩衝液中に、キャップの上で直接溶解する。溶解緩衝液を、溶解が生じるまで細胞の上部で上下にピペッティングする。
4. 溶解物を、計 10 μ l に、結合緩衝液で 1:10 に希釈する。4 μ l の溶解物をスポットし、湿潤チャンバ中で 30分～1時間インキュベートする。過剰なサンプルを除去し、別の 4 μ l の溶解物を用いて繰り返す。
5. 各スポットを、5 μ l の結合緩衝液 (20mM TRIS pH7.5、0.1% TX100) で 5回洗浄する。5 μ l の水で 2回洗浄する。
6. スポットがまだ湿潤である間に、50% ACN、0.5% TFA 中の CHCA を 0.5 μ l、2回スポットする。
7. 風乾する。

【0136】

(2. SELDIリーダー収集データおよび結果)

1. ピークを、フィルターおよび検出器感度 10 を用いて PBSI についてはレーザー強度 10 および 15 で収集した。60ショットを収集した。

【0137】

(C. 結果)

図4A～4Cは、陰性、BPHおよびCaPサンプルにおける代表的な形跡を示す。これは、以下の有用なマーカーを示す：マーカーCL1:8, 494.30 $\pm$ 10.24 Da、マーカーCL2:9, 614.62 $\pm$ 52.19 Da、マーカーCL3:28, 472 $\pm$ 127.40 Da、およびマーカーCL4:33, 386.85 $\pm$ 160.47 Da。図5Aは、種々のサンプルにおけるCL4

：C L 3の相対比を示すチャートを示す。図5 Bは、統計学的なエラーバーとともに、これらの比を示す棒グラフである。

【0138】

本発明は、前立腺癌患者および前立腺癌を有さない被験体（例えば、良性前立腺肥大患者）のサンプルに示差的に存在するマーカーを用いて、前立腺癌診断を補助するための新規な物質および方法を提供する。特定の例が提供されてきたが、上記の説明は、例示であって限定ではない。上記の実施形態の任意の1以上の特徴は、本発明における任意の他の実施形態の1以上の特徴と任意の様式で組合され得る。さらに、本発明の多くのバリエーションは、本明細書に鑑みて当業者に明らかになる。従って、本発明の範囲は、上記の説明を参照しなくとも決定されるべきであるが、代わりに、均等物の全範囲とともに、添付の特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。

【0139】

本出願に引用される全ての刊行物および特許文献は、個々の刊行物または特許文献各々が個々に示されているのと同様に、全ての目的のためにその全体が本明細書中に参考として援用される。本明細書中の種々の参考文献の引用により、本出願人は、特定の文献が本発明の先行技術であるとは認めない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、前立腺癌（CAP）、良性前立腺肥大（BPH）および正常、または異常な診断（NR）の各々を有する患者からのサンプル中の精漿におけるマーカーセット1（SP1-SP7）の7つのマーカーのセットの検出のためのチャートを示す。質量分析による見かけの分子量もまた、信頼性のある間隔を有して与えられる。

【図2A】

図2Aは、前立腺癌（CAP）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NP）を比較するマーカーSP1の正常な相表面由来の代表的な質量分析トレースを示す。

【図2B】

図2 Bは、前立腺癌（CAP）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NP）を比較するマーカーSP2の正常な相表面由来の代表的な質量分析トレースを示す。

【図2 C】

図2 Cは、前立腺癌（CAP）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NP）を比較するマーカーSP3の正常な相表面由来の代表的な質量分析トレースを示す。

【図2 D】

図2 Dは、前立腺癌（CAP）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NP）を比較するマーカーSP4の正常な相表面由来の代表的な質量分析トレースを示す。

【図2 E】

図2 Eは、前立腺癌（CAP）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NP）を比較するマーカーSP5の正常な相表面由来の代表的な質量分析トレースを示す。

【図2 F】

図2 Fは、前立腺癌（CAP）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NP）を比較するマーカーSP6の正常な相表面由来の代表的な質量分析トレースを示す。

【図2 G】

図2 Gは、前立腺癌（CAP）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NP）を比較するマーカーSP7の正常な相表面由来の代表的な質量分析トレースを示す。

【図3】

図3は、前立腺癌（CAP）、良性前立腺肥大（BPH）および正常、または陰性診断（NP r）の各々を有する患者由来のサンプルにおけるレーザー捕獲顕微解剖によって単離された前立腺上皮細胞溶解物におけるマーカーセット1（CL1～CL4）の4つのマーカーのセットの検出を示すチャートである。質量分析による見かけの分子量もまた、信頼性のある間隔を有して与えられる。

【図4 A】

図4 Aは、前立腺癌（CAPまたはCPA）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NR）におけるマーカーCL1の陰イオン交換またはニッケルキレート表面からの代表的な質量分析トレースを示す。図4 Aは、マーカーCL1を示す。

【図4 B】

図4 Bは、前立腺癌（CAPまたはCPA）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NR）におけるマーカーCL2の陰イオン交換またはニッケルキレート表面からの代表的な質量分析トレースを示す。図4 Bは、マーカーCL2を示す。

【図4 C】

図4 Cは、前立腺癌（CAPまたはCPA）、良性前立腺肥大（BPH）および正常（NR）におけるマーカーCL3およびCL4の陰イオン交換またはニッケルキレート表面からの代表的な質量分析トレースを示す。図4 Cは、マーカーCL3およびCL4を示す。

【図5 A】

図5 Aは、個々のCaP、BPHおよび正常なサンプル中のマーカーCL3およびマーカーCL4の相対量のチャートである。

【図5 B】

図5 Bは、正常（NP）、BPHおよびCaPにおけるCL4：CL3の平均比率の棒グラフである。

【図6】

図6は、基質101および吸着体102の非連続的なスポットを含むプローブを示す。このプローブは、気相イオン分光分析に分離可能に挿入可能である。各スポットは、分析物を脱離するためのエネルギー供給源によって、アドレス可能である。

【図1】

精製において検出された前立腺癌関連タンパク質

タンパク質番号	洗淨	質量 (Da) (平均 $\pm$ SD)	CAP (N=9)	CAPにお ける陽性率%	BPH (N=9)	BPHにお ける陽性率%	NR (N=9)	NRにお ける陽性率%
SP1	1+2,Q6-L15	9402.68 $\pm$ 8.97	8/9	89%	0/9	0%	2/9	22%
SP2	1+2,Q6-L15	26155.30 $\pm$ 202.01	9/9	100%	2/9	22%	1/9	11%
SP3	3+4,Q1-L50	54979.27 $\pm$ 408.78	6/9	67%	0/9	0%	1/9	11%
SP4	1+2,UN-L15	9752.30 $\pm$ 15.08	2/9	22%	3/9	33%	7/9	78%
SP5	1+2,UN-L15	8766.93 $\pm$ 14.44	0/9	0%	3/9	33%	8/9	89%
SP6	1+2,UN-L15	6277.97 $\pm$ 12.36	0/9	0%	2/9	22%	7/9	78%
SP7	1+2,Q2-L15	2781.72 $\pm$ 4.41	0/9	0%	3/9	33%	7/9	78%

- すべてのサンプルは正常な相対ゲル上で試験された。
- *1+2, Q6-L15 $\rightarrow$ 溶出緩衝液 (20mM Tris-HCl, 5mM NaCl, pH 5.0) 中で、レーザー強度15において
- *3+4, Q1-L50 $\rightarrow$ 結合緩衝液 (20mM Tris-HCl, 5mM NaCl, pH 9.0) 中で、レーザー強度50において
- *1+2, UN-L15 $\rightarrow$ 結合緩衝液 (20mM Tris-HCl, 5mM NaCl, pH 9.0) 中で、レーザー強度15において
- *1+2, Q2-L15 $\rightarrow$ 結合緩衝液 (20mM Tris-HCl, 5mM NaCl, pH 9.0) 中で、レーザー強度15において

【図2A】

Figure 2A. SP1: 9,402 Da

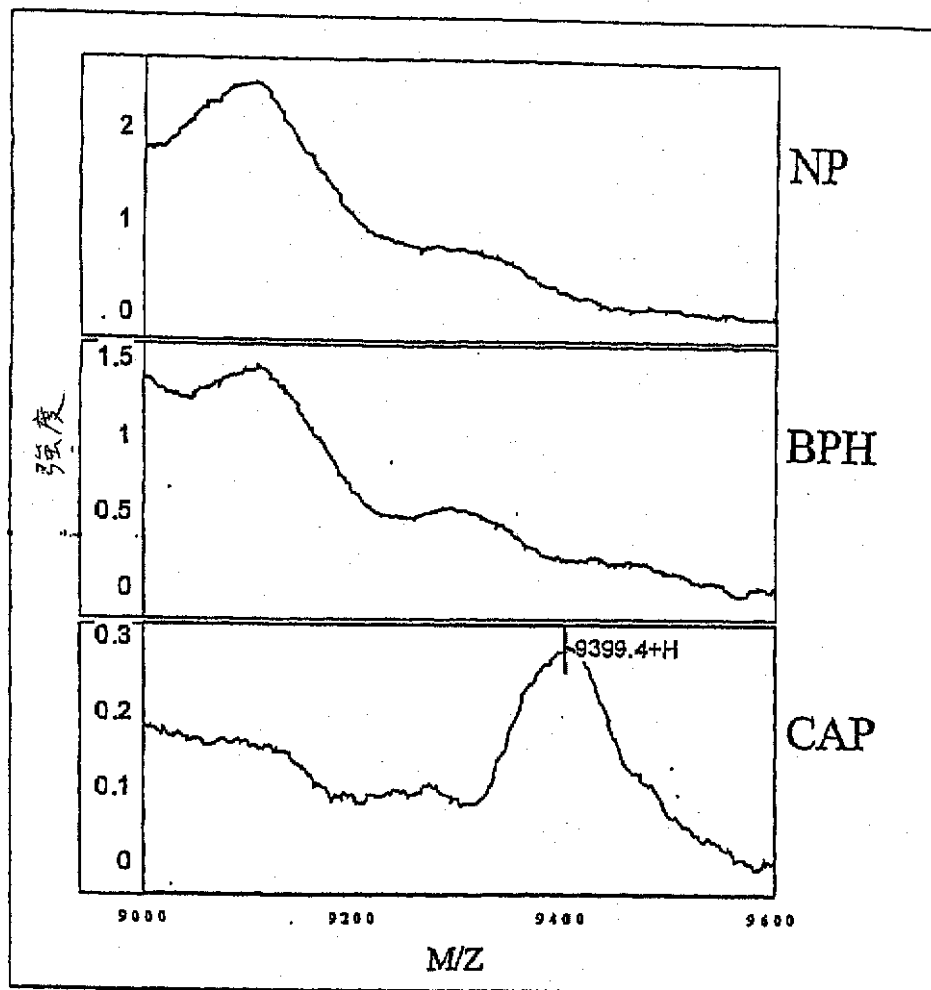
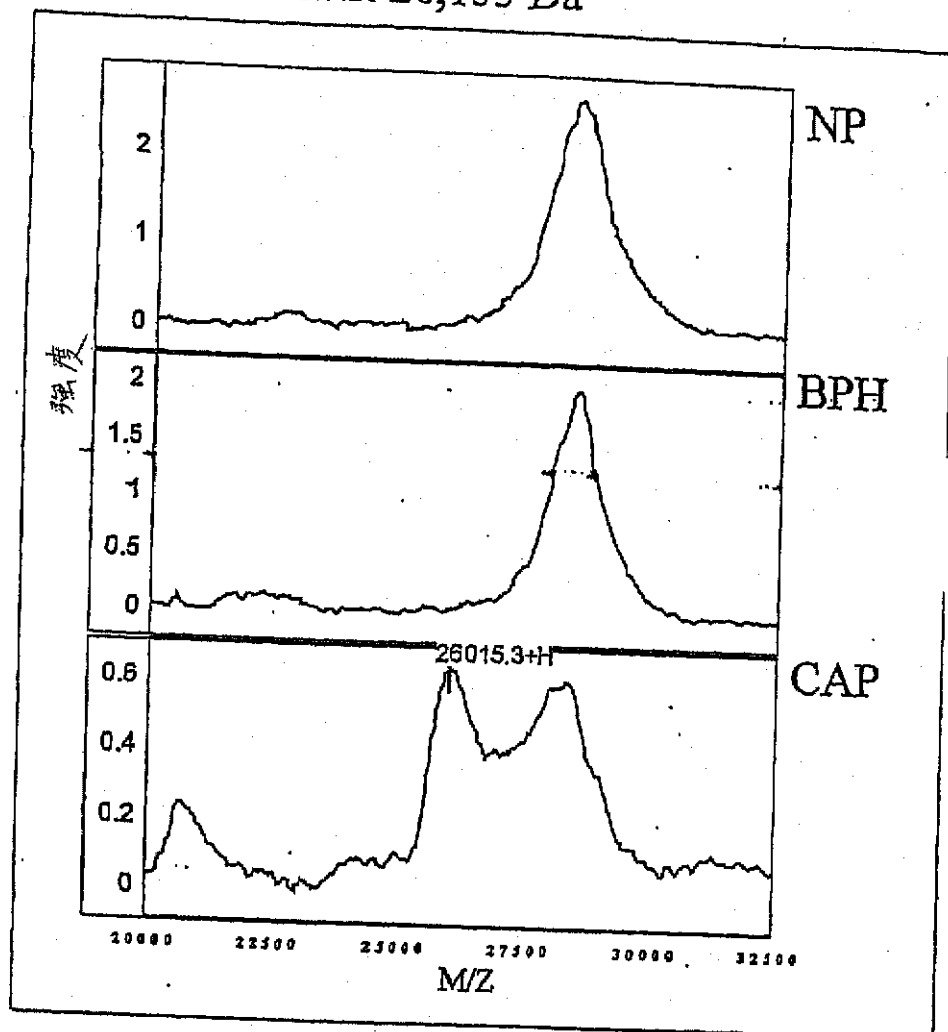


Figure 2. CAP、BPH、正常(NR)精漿における
SPマーカーの代表的な質量スペクトル。

A. SP1, B. SP2, C. SP3, D.
SP4, E. SP5, F. SP6, および G. SP7.

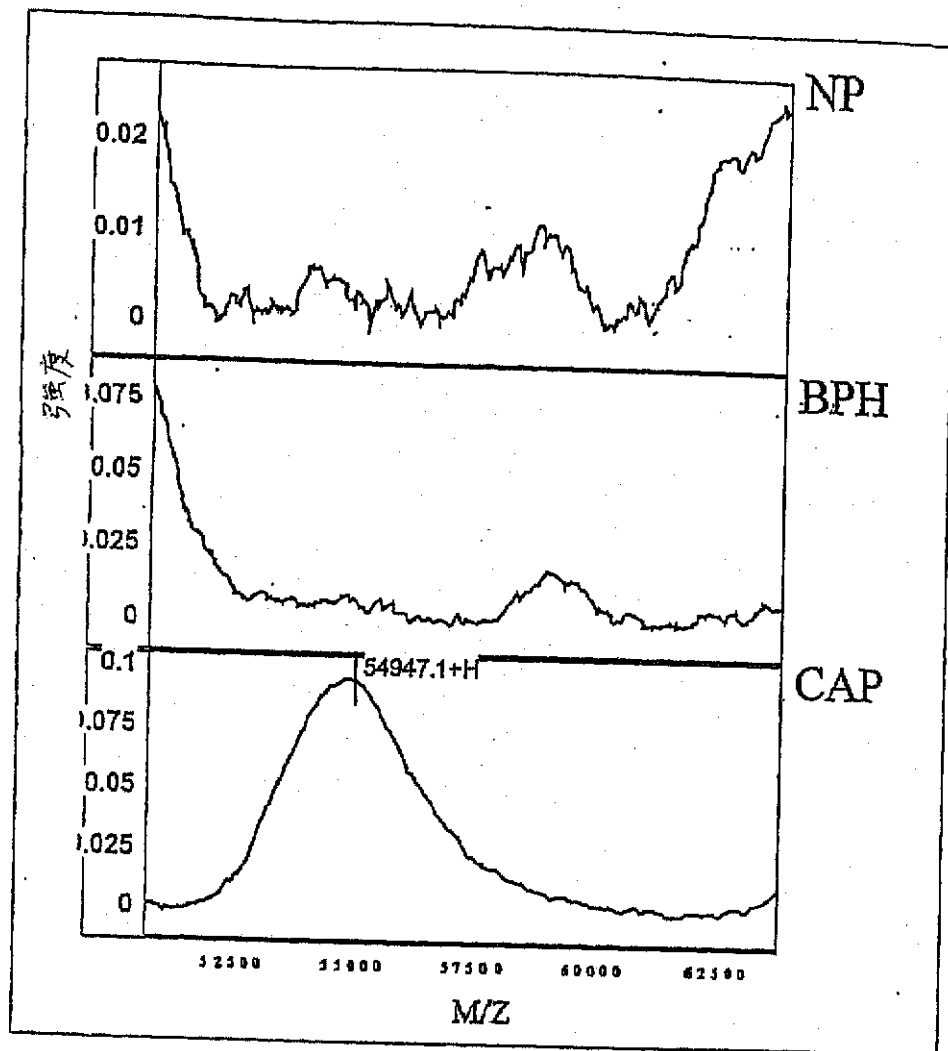
【図2B】

Figure 2 B. SP2: 26,155 Da



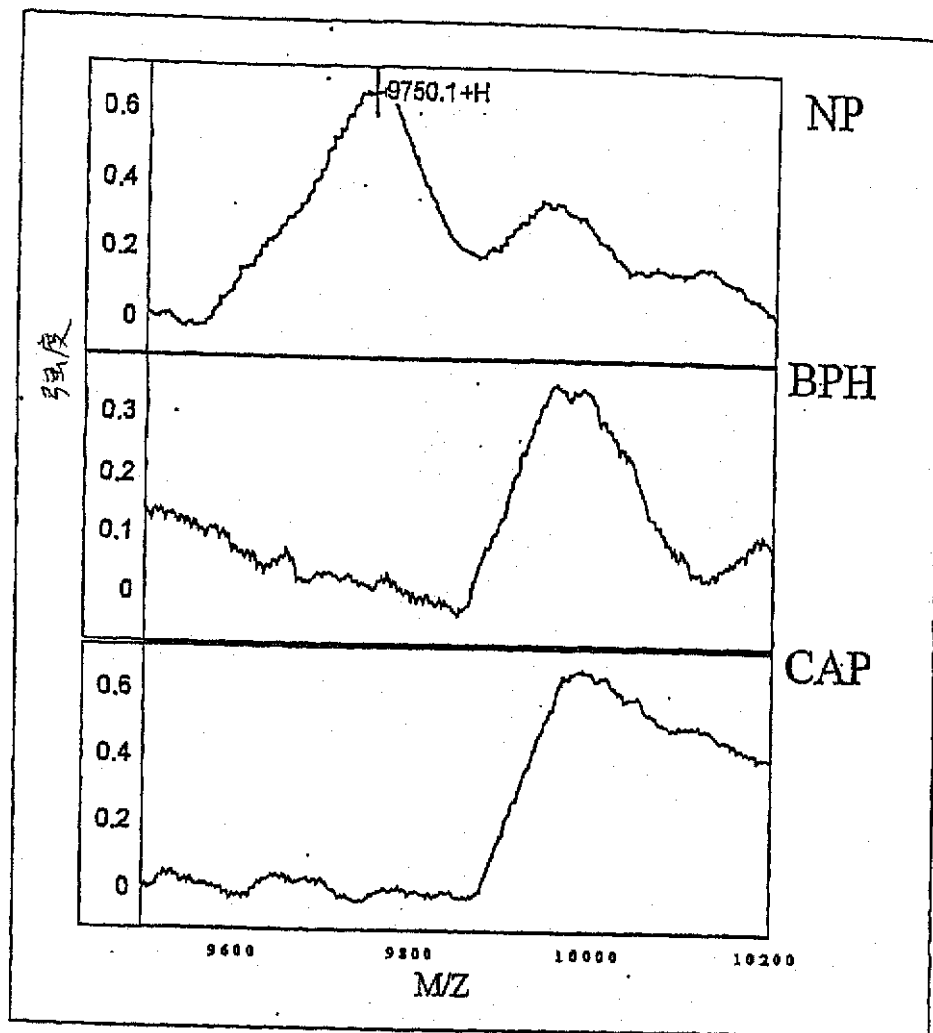
【図2C】

Figure 2C. SP3: 54,979 Da



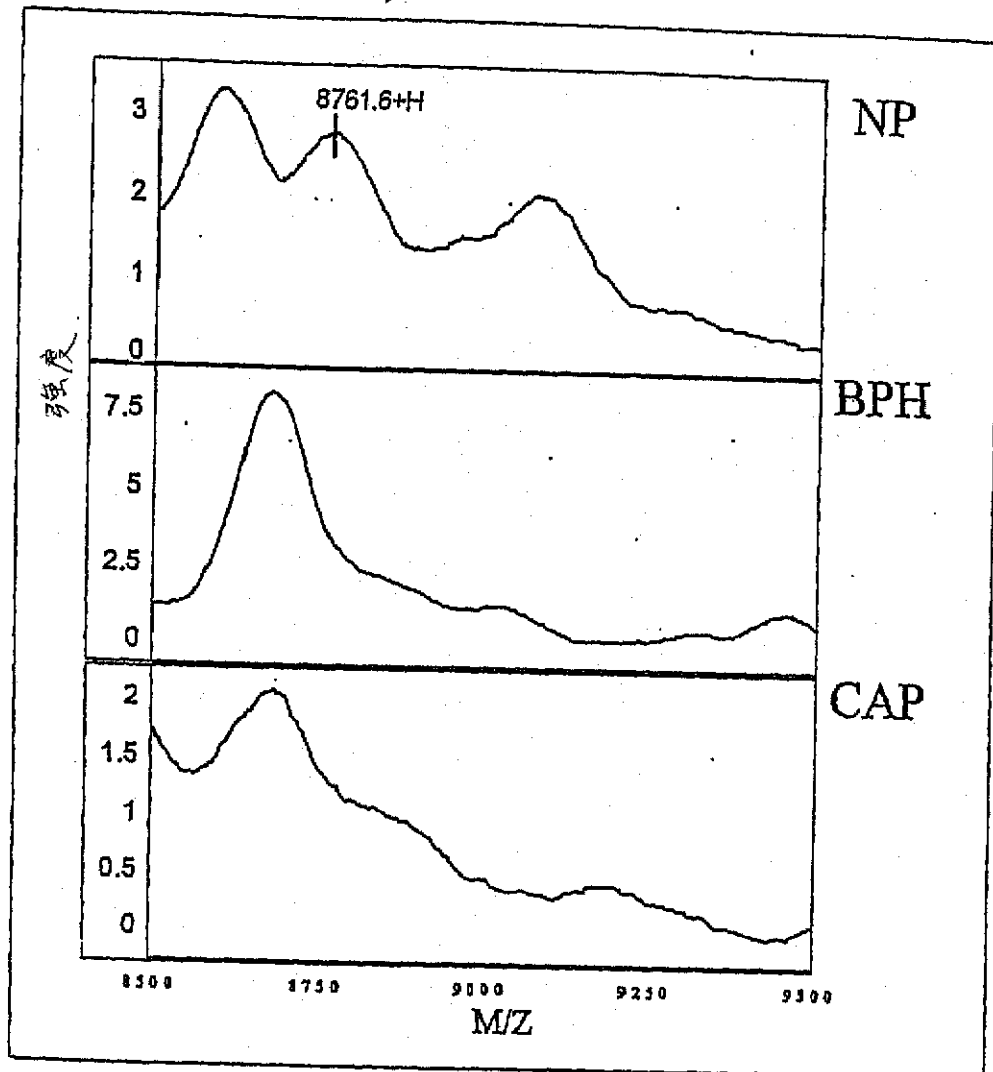
【図2D】

Figure 2D. SP4: 9,752 Da



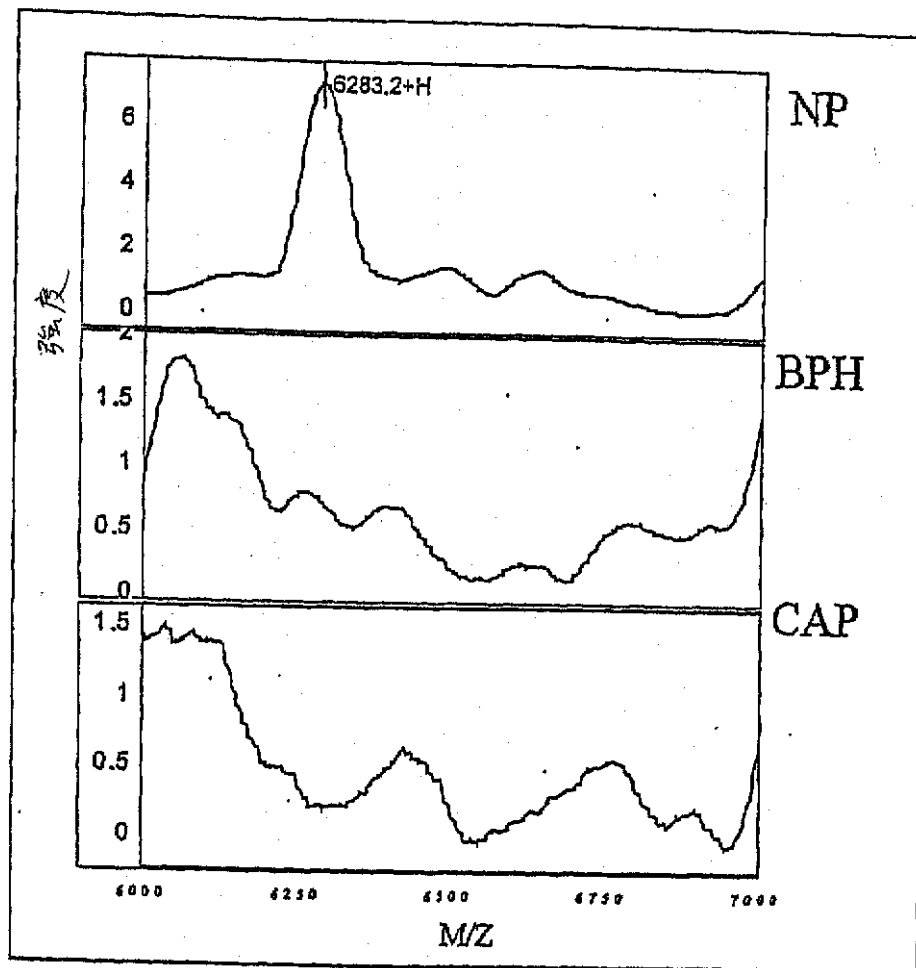
【図2E】

Figure 2E. SP5: 8,766 Da



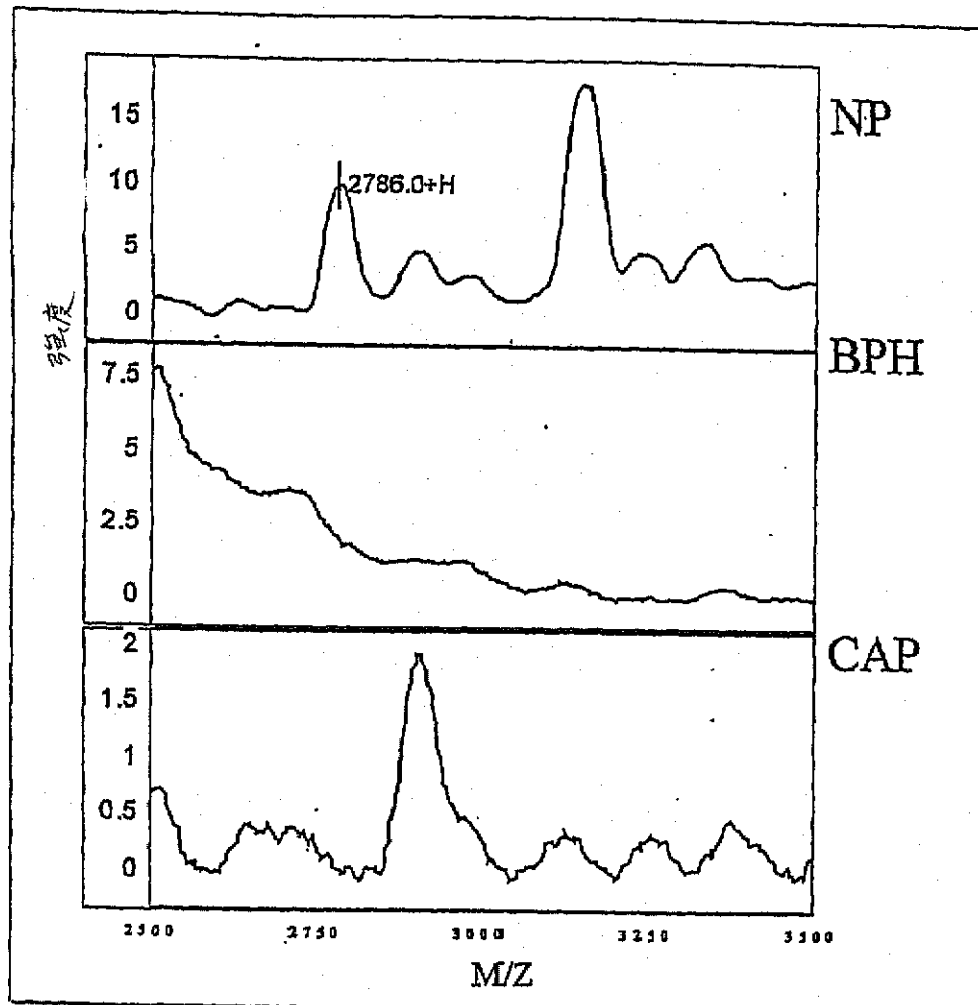
【図2F】

Figure 2F: SP6: 6,277 Da



【図2G】

Figure 2G. SP7: 2,781 Da



【図3】

Figure 3. LCM顕微解剖した細胞溶解物中において検出される前立腺癌関連タンパク質

タンパク質番号	質量 ±	陽性数 / 試験数			陽性%		
		NPr	BPH	CAP	NPr	BPH	CAP
CL1	8,494.30 ± 10.24 Da	4/18	4/8	12/15	25%	50%	80%
CL2	9,614.62 ± 52.19 Da	0/18	2/8	9/15	0%	25%	60%
CL3	28,472.15 ± 127.40 Da	14/15	9/9	16/18	93%	100%	100%
CL4	33,386.85 ± 180.47 Da	9/15	6/9	14/18	60%	67%	93%

データは、CHCAまたはSPAを用いて、IMAC3またはSAXIIチップに関して集収した。

いずれかの表面を使用して、これらのマーケットを模出し得るが、SAXIIは、CHCAを使用して、低分子量について優れた結果を与え、そしてIMAC3は、SPAを使用した28 KDaおよび33 KDaマーカーの検出のための好ましい表面であった。

【図4A】

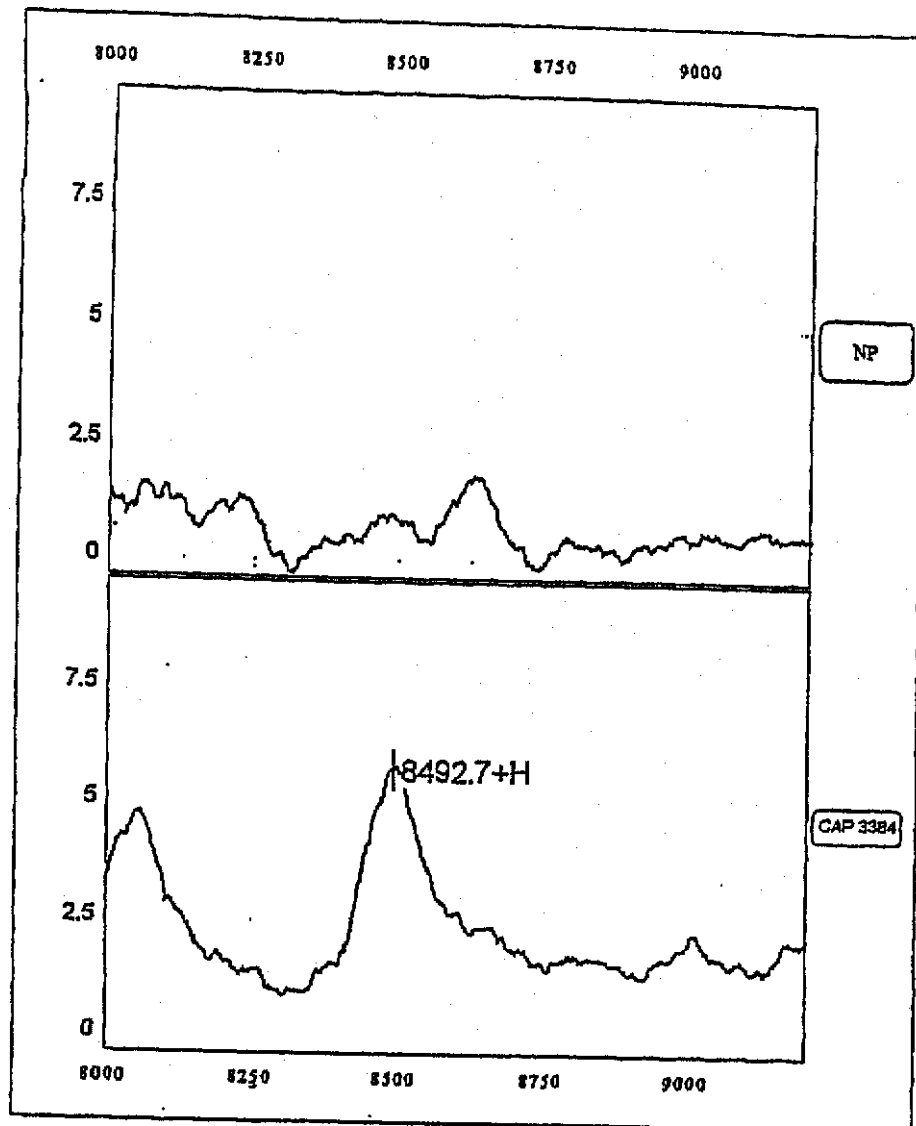


Figure 4A. 同一の前立腺切除試料由来の正常 (NP) 細胞溶解物と比較した前立腺癌 (CAP) 細胞溶解物中の8.5 kDaタンパク質の過剰発現を示す代表的な例。

【図4B】

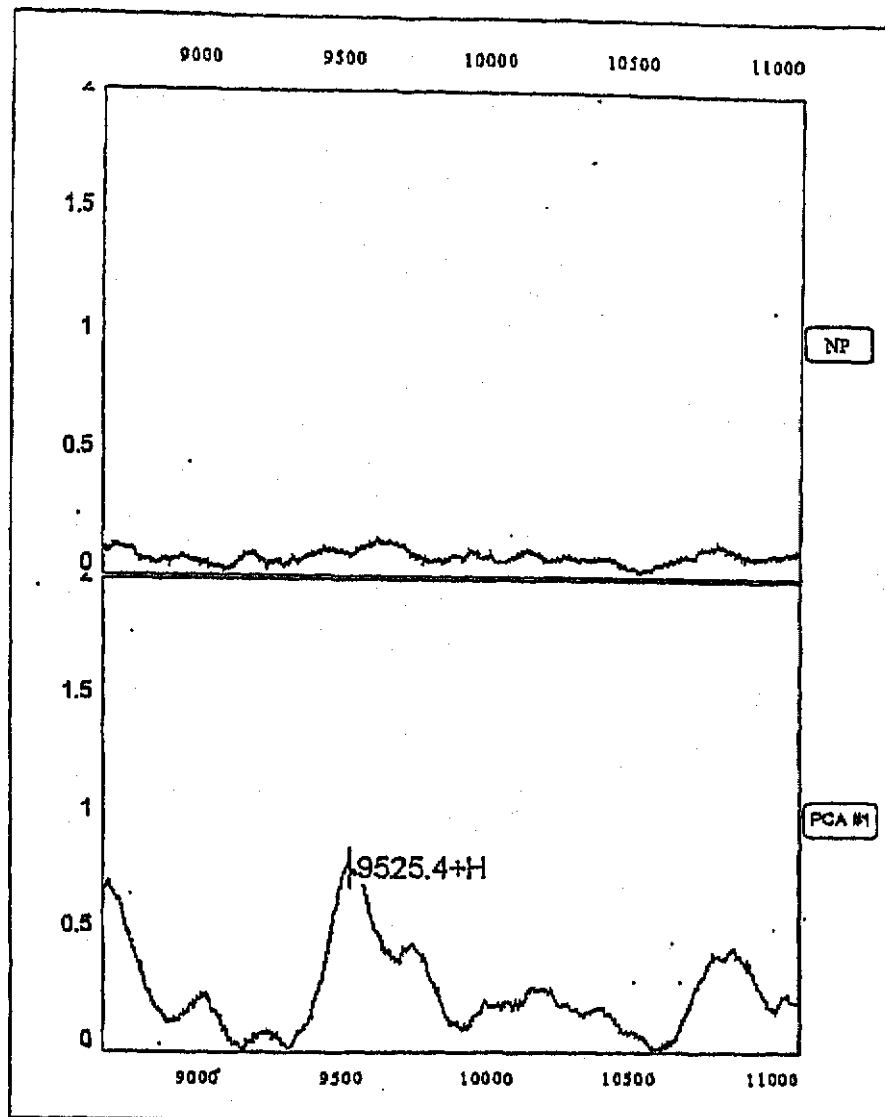


Figure 4B. 同一の前立腺切除試料由来の正常(NPr)前立腺細胞溶解物と比較した前立腺癌(CAP)細胞溶解物中の9.5kDaタンパク質の過剰発現を示す代表的なゲル。

【図4C】

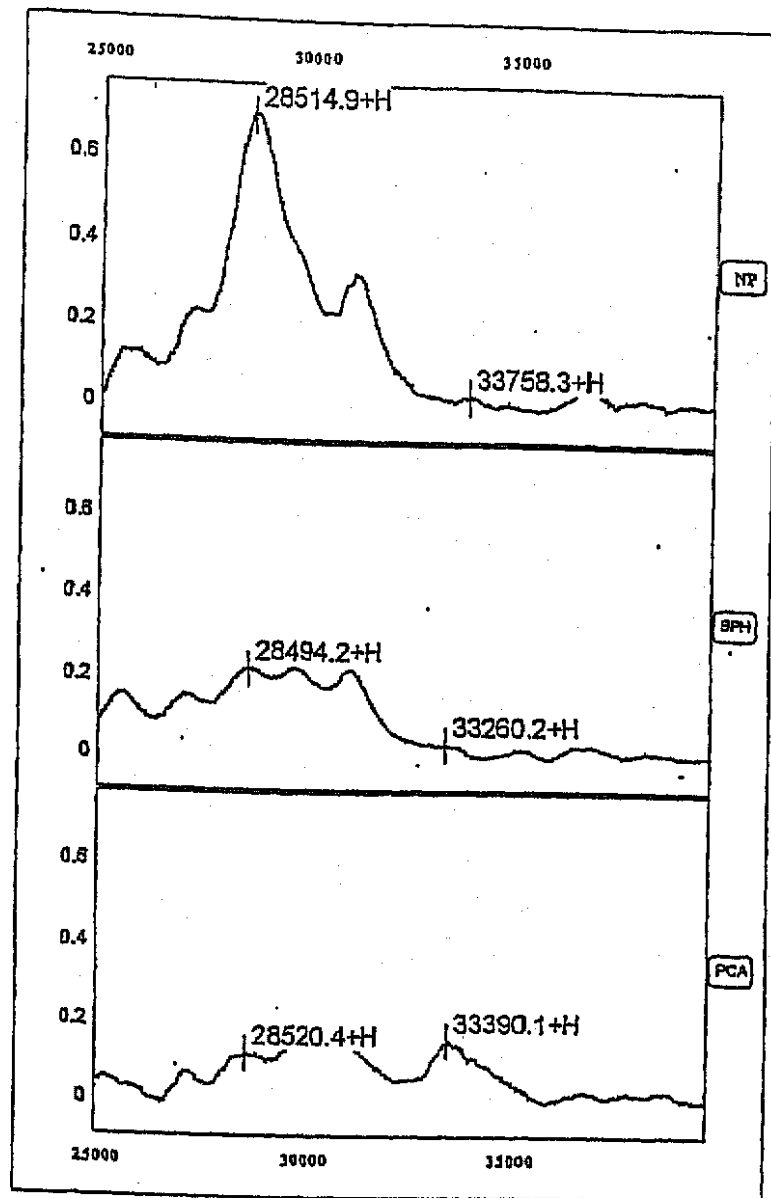


Figure 4C. 良性前立腺肥大(BPH)および正常(NP)頭微解剖細胞由来の溶解物と比較した、前立腺癌における28kDaおよび33kDaタンパク質の差別的な発現を示す代表的なトレース。

【図5A】

Figure 5A. 33 kDa タンパク質に対する 28 kDa タンパク質の比

組織*	NP	BPH	CAP
CA3408	0.042		1.320
CA3409	0.214	0.264	
CA3411	1.049		4.139
CA3412	0.425		0.200
CA3413	0.297	0.416	1.270
CA3414	0.206	0.020	
CA3420	0.050	0.154	0.412
CA3422	0.131	0.266	0.676
CA3424	0.122	0.142	0.752
CA3435	0.204		1.073
CA3432	0.444	0.395	1.256
CA3442	0.416		0.568
平均	0.300	0.237	1.167
標準誤差	0.079	0.054	0.352
+ 標準誤差	0.379	0.291	1.519
- 標準誤差	0.221	0.183	0.814

CAP 対 NP = <0.017; CAP 対 BPH = p <0.045

* 一致したサンプル

【図5B】

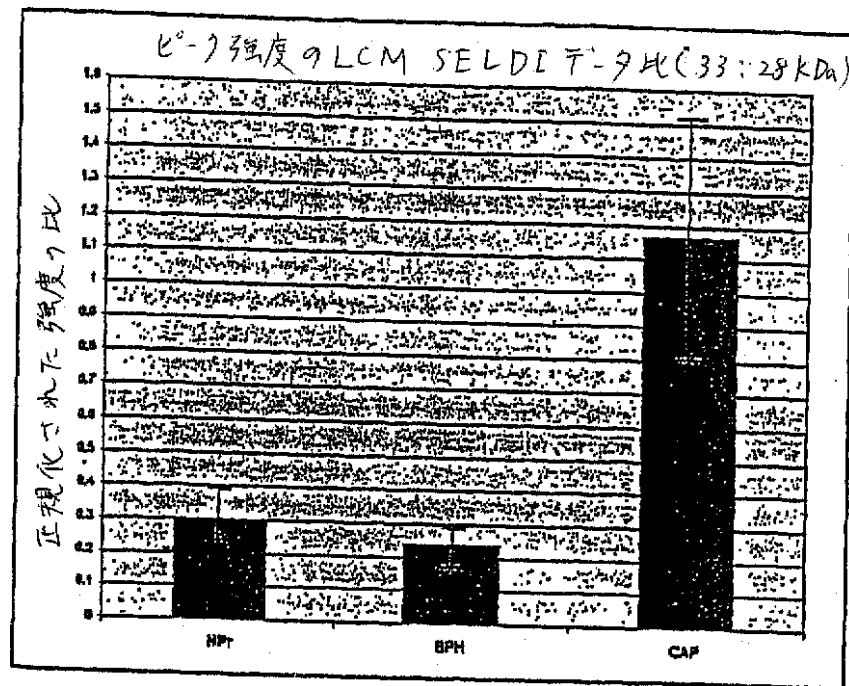
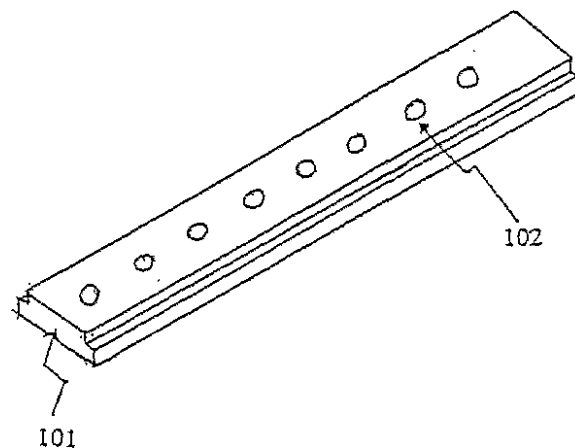


Figure 5B. 28:33kDa タンパク質の平均比
(CAPの8/9すなわち88.9%は、0.40の
カットオフ比以上の比を有した)。

【図6】

Figure 6



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.
PLT/US 01/08797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574 G01N33/68 G06F19/00 C07K14/82 C07K14/47		
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) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEPERTHES DAVID ET AL: "Isolation of prostatic kallikrein hK2, also known as hGK-1, in human seminal plasma." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1245, no. 3, 1995, pages 311-316, XP001066231 ISSN: 0006-3002 abstract --- -/--	1-22, 30-47
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March 2002		Date of mailing of the international search report 08/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/08797

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WRIGHT G.L. JR. ET AL: "ProteinChip.RTM. 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, (1999) 2/5-6 (264-276). , XP008001602 the whole document	1-22, 30-47
X	BEDZYK W.D. ET AL: "Molecular mass determination for prostate -specific antigen and.alpha.1- antichymotrypsin complexed in vitro." BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, (1998) 27/3 (249-257). , XP008001618 the whole document	1-22, 30-47
X	PAWELETZ, CLOUD P. ET AL: "Rapid protein display profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip" DRUG DEV. RES., 49(1), 34-42 , January 2000 (2000-01), XP002162317 the whole document	1-22, 30-47
X	EMMERT-BUCK M R ET AL: "PROTEIN FINGERPRINTING OF LCM-DISSECTED HUMAN ESOPHAGEAL PROSTATE CANCER BY 2D-PAGE" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 40, no. 526, 1999, page 526 XP000929253 ISSN: 0197-016X abstract	1-22, 30-47
X	BANKS R E ET AL: "THE POTENTIAL USE OF LASER CAPTURE MICRODISSECTION TO SELECTIVELY OBTAIN DISTINCT POPULATIONS OF CELLS FOR PROTEOMIC ANALYSIS - PRELIMINARY FINDINGS" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, vol. 20, no. 4/5, April 1999 (1999-04), pages 689-700, XP000925546 ISSN: 0173-0835 abstract	1-22, 30-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/08797

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 49410 A (EMMERT BUCK MICHAEL ;SIMONE NICOLE (US); US HEALTH (US); LIOTTA LA) 24 August 2000 (2000-08-24) abstract claims 1-12 -----	1-22, 30-47

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-54

Present claims

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/08797

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0049410 A	24-08-2000	AU 3367100 A	04-09-2000
		EP 1153300 A2	14-11-2001
		WO 0049410 A2	24-08-2000

フロントページの続き

(81)指定国 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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 アダム, パオーリン
アメリカ合衆国 バージニア 23508,
ノーフォーク, ダブリュー. 52エヌデ
ィー ストリート 769

(72)発明者 カザレス, ライザ エイチ.
アメリカ合衆国 バージニア 23322,
チェサピーク, イクイノックス ランデ
ィング 1302

专利名称(译)	前列腺癌标志物		
公开(公告)号	JP2003532055A	公开(公告)日	2003-10-28
申请号	JP2001569496	申请日	2001-03-19
[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	ライトジョージエルジュニア アダムバオリン カザレスライザエイチ		
发明人	ライト, ジョージ エル. ジュニア アダム, バオ-リン カザレス, ライザ エイチ.		
IPC分类号	G01N27/62 G01N30/02 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57434		
FI分类号	G01N33/68 G01N27/62.V G01N30/02.B G01N33/53.D G01N33/574.A		
优先权	60/190725 2000-03-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于区分前列腺癌，良性前列腺肥大和阴性诊断的有机生物分子标记物（例如蛋白质）。本发明还提供了用于辅助诊断前列腺癌或良性前列腺肥大的方法，其包括：a）检测来自受试者的样品中的至少一种蛋白质标记物；b）检测标记物。，前列腺癌，潜在的良性前列腺增生诊断或阴性诊断，其中相关性考虑了每次诊断中标志物的相对可检测性。，提供一种方法。

