



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 32 784 T2** 2007.11.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 224 466 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/574** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 32 784.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/27682**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 968 823.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/025791**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.10.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.04.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.07.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **03.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.11.2007**

(30) Unionspriorität:

158422 P 07.10.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, Calif., US;
Eastern Virginia Medical School, Norfolk, Va., US**

(72) Erfinder:

**YIP, Tai-Tung, Cupertino, CA 95014, US; YIP,
Christine, Cupertino, CA 95014, US; WRIGHT, L.,
George, Virginia Beach, VA 23455, US**

(74) Vertreter:

Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München

(54) Bezeichnung: **MARKERPROTEINE FÜR PROSTATAKREBS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Prostatakrebs ist die üblichste Form von Krebs bei Männern. Er befällt typischerweise alternde Männer, kann jedoch auch Männer jeden Alters befallen. Eine beträchtliche Anzahl von Männern stirbt jedes Jahr an Prostatakrebs; er ist die zweithöchste Krebstodesursache bei Männern. Eine frühe Diagnose von Prostatakrebs bei Männern verringert die Wahrscheinlichkeit des Todes.

[0002] Herkömmlicherweise wird Prostatakrebs unter Verwendung des prostataspezifischen Antigens (PSA) als Marker diagnostiziert. PSA ist ein 33 kDa Glycoprotein, das hauptsächlich von der Prostata synthetisiert und abgesondert wird. PSA ist auch eine Protease mit einer Serinproteaseaktivität und spaltet Proteine an dem Leucin- oder Tyrosinrest ab (siehe z.B. Christensson et al., Eur. J. Biochem. 194: 755-763 (1990)). Seine natürlichen Substrate sind Semenogelin I, Semenogelin II und Fibronectin im Samenplasma (siehe z.B. Lilja, J. Clin. Invest. 76: 1899 (1985); Lilja et al., J. Clin. Invest. 80: 281 (1987); McGee und Herr, Biol. Reprod. 39: 499 (1988)). Diese Proteine sind hauptsächlich für die unmittelbare Gelbildung von frisch ejakuliertem Sperma verantwortlich. Die PSA-vermittelte Proteolyse dieser gelbildenden Proteine führt zu der Verflüssigung des Spermas und der Freisetzung von progressiv beweglichen Spermatozoen.

[0003] PSA sickert in den Blutstrom, und Messungen der Konzentration von PSA im Blutserum werden inzwischen verbreitet bei der Nachweis von Prostatakrebs beim Menschen verwendet. Bei einem typischen Verfahren wird ein Immunoassay durchgeführt, um den Spiegel von PSA im Serum eines Patienten zu messen. Der Blutserumspiegel von PSA bei normalen Männern ist typischerweise sehr niedrig (z.B. weniger als 1 ng/ml). Im Allgemeinen lässt ein PSA-Spiegel von mehr als 4 ng/ml auf Prostatakrebs schließen, während ein Spiegel von mehr als 10 ng/ml stark auf Prostatakrebs schließen lässt.

[0004] Obgleich solche Verfahren in einigen Fällen wirksam sind, weisen herkömmliche Verfahren zum Nachweis von Prostatakrebs Einschränkungen auf. Beispielsweise weisen einige Patienten mit Prostatakrebs zum Zeitpunkt der Diagnose einen normalen PSA-Spiegel auf, wenn sich der Krebs noch im Frühstadium befindet. Da herkömmliche PSA-Tests einen anomalen PSA-Spiegel Nachweis, können herkömmliche PSA-Tests das Vorhandensein von Prostatakrebs eventuell nicht Nachweis, wenn er sich noch im Frühstadium befindet. Die Unfähigkeit von herkömmlichen PSA-Tests, in einigen Fällen (z.B. im Frühstadium der Erkrankung) das Vorliegen von Prostatakrebs zu diagnostizieren, kann für den Patienten schädlich sein. Des weiteren haben eventuell viele Personen mit einem erhöhten PSA-Spiegel im Blutserum keinen Prostatakrebs, sondern stattdessen eine gutartige Prostatahyperplasie (BPH) (d.h. einen gutartigen Tumor). Um zu bestimmen, ob eine Person Prostatakrebs statt BPH hat, werden zusätzliche Immunoassays unter Verwendung anderer Antikörper und/oder Biopsien des Prostatagewebes durchgeführt. Diese zusätzlichen Tests sind sowohl für Patienten als auch für die sie betreuenden Personen zeitraubend.

[0005] Grover und Resnick et al. (The Prostate, 26: 12-18 (1995) beschreiben, dass ein 22 kDa Protein bei Patienten mit Prostatakrebs vorhanden ist. Fernandez-Pol et al. (Anticancer Research 17: 1519-1530 (1997)) beschreiben das Vorhandensein von Metalloproteinstimulin im Blut von Patienten mit Prostatakrebs. WO99/12040 betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Identität von Polypeptiden unter Verwendung der Massenspektroskopie.

[0006] Dementsprechend wäre es wünschenswert, schnelle und genaue Verfahren und Kits zur Verfügung zu stellen, um zu bestimmen, ob eine Person Prostatakrebs hat.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die vorliegende Erfindung stellt zum ersten Mal sensible und schnelle Verfahren zur Verfügung, die als Hilfe bei der Diagnose von Prostatakrebs mittels des Messens von Markern verwendet werden können, die in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines Patienten, der keinen Prostatakrebs hat (BPH-Patient), differentiell vorhanden sind. So stellt die vorliegende Erfindung unter einem ersten Aspekt ein Verfahren zur Verfügung, das bei der Prostatakrebsdiagnose hilft, wobei das Verfahren umfasst:

- i. Bestimmen einer Testmenge einer Vielzahl von Proteinmarkern in einer Probe aus einem Patienten mittels Massenspektroskopie, wobei die Proteinmarker scheinbare Molekulargewichte von weniger als 10.000 Da aufweisen;
- ii. Vergleichen der Testmenge der Vielzahl von Proteinmarkern mit einem scheinbaren Molekulargewicht von weniger als 10.000 Da mit einer Menge einer Vielzahl von Proteinmarkern mit einem scheinbaren Mo-

lekulargewicht von weniger als 10.000 Da aus einer Kontrollprobe, wobei die Kontrollprobe aus einer gutartigen Prostatahyperplasie stammt; und

iii. Bestimmen, ob die Testmenge eine diagnostische Menge ist, die einer Diagnose von Prostatakrebs im Vergleich zu einer gutartigen Hyperplasie entspricht.

[0008] Durch Überwachen der Menge dieser Marker können die hier offenbarten Verfahren und Kits den pathologischen Status eines Patienten unter Verwendung von winzigen Mengen von Rohproben bestimmen. Insbesondere ist basisches Samenprotein ein positiver Marker, der Prostatakrebs und BPH unterscheidet.

[0009] So betrifft die Erfindung Verfahren zur Unterstützung der Prostatakrebsdiagnose, die umfassen: das Bestimmen einer Testmenge eines Markers in einer Probe von einem Patienten und Bestimmen, ob die Testmenge eine diagnostische Menge ist, die einer Diagnose von Prostatakrebs entspricht. Eine Testmenge einer Vielzahl von Markern wird bei der vorliegenden Erfindung bestimmt.

[0010] Die Marker können alle geeigneten Charakteristiken einschließlich des scheinbaren Molekulargewichts von weniger als 10.000 Da aufweisen. Auch sind hier Marker offenbart, die ein scheinbares Molekulargewicht von weniger als 27.000 Da, weniger als etwa 15.000 Da aufweisen. Bei einer Ausführungsform sind die Marker in Proben von Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu Proben von BPH-Patienten in einem erhöhten Niveau vorhanden. Beispielsweise umfassen diese Marker Polypeptide mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2776 Da, 4423 Da, 4480 Da, 5753 Da, 6098 Da, 6270 Da, 6998 Da, 7843 Da, 8030 Da, 8240 Da oder 8714 Da. Bei einer weiteren Ausführungsform sind die Marker in einem erhöhten Niveau in Proben von BPH-Patienten im Vergleich zu Proben von Patienten mit Prostatakrebs vorhanden. Beispielsweise umfassen diese Marker Polypeptide mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2276 Da, 2530 Da, 2095 Da, 3030 Da, 3038 Da, 3224 Da, 3600 Da, 3835 Da, 3915 Da, 3933 Da oder 4175 Da. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Marker, die nachgewiesen werden, basisches Samenprotein, das ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 5753 Da aufweist.

[0011] Bei einer weiteren Ausführungsform umfassen die Marker ein abgespaltetes Produkt, das mittels PSA-vermittelter Proteolyse erzeugt wird. Beispielsweise wird das abgespaltete Produkt durch die PSA-vermittelte Proteolyse von Semenogelin I erzeugt. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das abgespaltete Produkt ein basisches Samenprotein.

[0012] Bei einer weiteren Ausführungsform wird eine zu testende Probe aus dem Blut, Serum, Urin, Samen, Samenflüssigkeit, Samenplasma oder Gewebeextrakten genommen. Vorzugsweise ist die Probe Samenplasma.

[0013] Auch werden Verfahren für die Diagnose offenbart, die das Bestimmen einer Testmenge eines Markers in einer Probe unter Verwendung eines Immunoassays oder einer Gasphasenionenspektrometrie umfassen. Vorzugsweise wird eine Laserdesorptionsmassenspektrometrie verwendet.

[0014] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines Markers, wobei das Verfahren umfasst: das Kontaktieren einer Probe von einem Patienten mit einem Substrat, das darauf ein Adsorptionsmittel aufweist, unter Bedingungen, die das Binden zwischen einem Marker und dem Adsorptionsmittel zulassen, wobei der Marker ein Polypeptid ist, das in Proben eines Prostatakrebses und eines Patienten, der keinen Prostatakrebs hat (z.B. BPH-Patienten), differentiell vorhanden ist und den Nachweis des an das Adsorptionsmittel gebundenen Markers mittels Gasphasenionenspektrometrie. Es werden auch Marker offenbart, die ein scheinbares Molekulargewicht von weniger als 27.000 Da aufweisen.

[0015] Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst das Adsorptionsmittel eine hydrophobe Gruppe und eine anionische Gruppe. Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst das Substrat eine Polystyrolatexperle, die mit einer Sulfonatgruppe als Adsorptionsmittel funktionalisiert ist. Bei noch einer weiteren Ausführungsform umfasst das Adsorptionsmittel eine hydrophobe Gruppe. Bei noch einer weiteren Ausführungsform weist das Adsorptionsmittel eine mit einem Metallion komplexierte Metallchelate bildende Gruppe auf. Bei noch einer weiteren Ausführungsform weist das Adsorptionsmittel einen Antikörper auf, der sich spezifisch an einen Marker bindet. Bei noch einer weiteren Ausführungsform weist das Adsorptionsmittel einen Antikörper auf, der sich spezifisch an ein basisches Samenprotein bindet.

[0016] Bei noch einer weiteren Ausführungsform werden vor der Nachweis des Markers nichtgebundene Materialien auf dem Substrat mit einer Waschlösung entfernt. Vorzugsweise ist die Waschlösung eine wässrige Lösung wie ein HEPES-Puffer, eine mit Phosphat gepufferte, physiologische Kochsalzlösung oder Wasser.

[0017] Bei noch einer weiteren Ausführungsform umfassen die Marker ein abgespaltetes Produkt, das mittels einer PSA-vermittelten Proteolyse eines Proteinsubstrats wie Semenogelin I erzeugt wird. Bei noch einer weiteren Ausführungsform ist das mittels PSA-vermittelter Proteolyse erzeugte, abgespaltete Produkt basisches Samenprotein.

[0018] Bei noch einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren des weiteren das Bestimmen der Testmenge der Marker, die an dem Probensubstrat gebunden sind, und das Bestimmen, ob die Testmenge eine diagnostische Menge ist, die einer Diagnose von Prostatakrebs entspricht.

[0019] Hier ebenfalls offenbart ist ein Verfahren zum Nachweis eines Markers in einer Probe, wobei das Verfahren umfasst: Vorsehen eines Antikörpers, der sich spezifisch an den Marker bindet, wobei der Marker ein Polypeptid ist, das in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines Patienten, der keinen Prostatakrebs hat (beispielsweise eines BPH-Patienten) differentiell vorhanden ist, und Kontaktieren der Probe mit dem Antikörper und den Nachweis des Vorhandenseins eines Komplexes des an den Marker gebundenen Antikörpers. Bei einer solchen Offenbarung kann der Marker ein scheinbares Molekulargewicht von weniger als 27.000 Da haben.

[0020] Wie hier offenbart, kann der Marker, der nachgewiesen wird, ein abgespaltetes Produkt, das mittels der PSA-vermittelten Proteolyse eines Proteinsubstrats wie Semenogelin I erzeugt wird, oder ein basisches Samenprotein sein. Das Verfahren kann des weiteren das Bestimmen der Testmenge der an dem Sondensubstrat gebundenen Marker und Bestimmen, ob die Testmenge eine diagnostische Menge ist, die einer Diagnose von Prostatakrebs entspricht, umfassen.

[0021] Es wird auch ein Kit offenbart, um bei der Diagnose von Prostatakrebs zu helfen, wobei das Kit enthält: ein Substrat, das darauf ein Adsorptionsmittel aufweist, wobei das Adsorptionsmittel zum Binden eines Markers geeignet ist, und einr Waschlösung oder Anweisungen zur Herstellung einer Waschlösung, wobei die Kombination des Adsorptionsmittels und der Waschlösung die Nachweis des Markers unter Verwendung von Gasphasenionenspektrometrie ermöglicht. Das Kit kann die Bestimmung einer Testmenge eines Markers bestimmen, wobei der Marker ein Polypeptid ist, das differentiell in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines Patienten, der keinen Prostatakrebspatient ist (z.B. eines BPH-Patienten), vorhanden ist. Ein solches Kit kann einen Marker nachweisen, der ein scheinbares Molekulargewicht von weniger als 10.000 Da hat.

[0022] Das Substrat in dem Kit kann in der Form einer Sonde vorliegen, die entferntbar in ein Gasphasenionenspektrometer einsetzbar ist. Das Kit kann des weiteren ein weiteres Substrat umfassen, das zusammen mit dem Substrat verwendet werden kann, das das Adsorptionsmittel aufweist, um ein Sonde zu bilden, die entferntbar in einen Gasphasenionenspektrometer einsetzbar ist.

[0023] Das Kit kann des weiteren Anweisungen für geeignete Betriebsparameter umfassen.

[0024] Das Substrat kann eine hydrophobe Gruppe und eine anionische Gruppe als Adsorptionsmittel umfassen. Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst das Substrat eine hydrophobe Gruppe als Adsorptionsmittel. Bei noch einer weiteren Ausführungsform umfasst das Substrat eine Metallchelat bildende Gruppe. Bei noch einer weiteren Ausführungsform umfasst das Substrat eine Metallchelat bildende Gruppe, die mit einem Metallion als Adsorptionsmittel komplexiert ist. Bei noch einer weiteren Ausführungsform umfasst das Substrat einen Antikörper, der sich spezifisch an einen Marker, vorzugsweise ein basisches Samenprotein als Adsorptionsmittel bindet. Bei noch einer weiteren Ausführungsform ist die Waschlösung eine wässrige Lösung.

[0025] Das Kit kann einen Antikörper umfassen, der sich spezifisch an den Marker bindet, und ein Nachweissreagenz umfassen. Gegebenenfalls kann der Antikörper auf einem festen Träger immobilisiert sein.

[0026] Das Kit kann des weiteren einen Standard umfassen, der die diagnostische Menge des Markers angibt.

[0027] Während die absolute Identität von vielen Markern noch nicht bekannt ist, ist ein solches Wissen nicht notwendig, um sie in einer Patientenprobe zu messen, da sie beispielsweise durch die Masse und durch Affinitätscharakteristika ausreichend charakterisiert sind. Es ist ersichtlich, dass das Molekulargewicht und die Bindungseigenschaften charakteristische Eigenschaften dieser Marker sind und keine Beschränkungen der Mittel zum Nachweis oder zur Isolierung. Des weiteren kann die absolute Identität der Marker unter Verwendung der hier beschriebenen Verfahren oder anderer im Stand der Technik bekannten Verfahren bestimmt werden.

[0028] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung sind unter Bezugnahme auf die nachfolgende detaillierte Beschreibung und die beigelegten Zeichnungen ersichtlich.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0029] [Fig. 1](#) zeigt die Aminosäuresequenz des basischen Samenproteins (SEQ ID NO:1).

[0030] [Fig. 2](#) zeigt eine Sonde, die Tupfen der Adsorptionsmittel auf der Probenoberfläche enthält.

[0031] [Fig. 3](#) zeigt ein Beispiel davon, wie eine Testprobe mit einer Kontrolle als Teil einer Prostatakrebsdiagnose verglichen wird.

[0032] [Fig. 4](#) zeigt Proteine in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines Patienten mit einer gutartigen Prostatahyperplasie, die an eine Ni(II)ProteinChip® Anordnung gebunden sind. [Fig. 4](#) zeigt auch eine Differenzkarte, die durch Subtrahieren der aus der Probe des Patienten mit gutartiger Prostatahyperplasie erhaltenen Daten von den aus der Probe des Patienten mit Prostatakrebs erhaltenen Daten erhalten wird.

[0033] [Fig. 5](#) zeigt Proteine in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines Patienten mit gutartiger Prostatahyperplasie, die an eine H4ProteinChip® Anordnung gebunden sind. [Fig. 5](#) zeigt auch eine Differenzkarte, die durch Subtrahieren der aus der Probe des Patienten mit gutartiger Prostatahyperplasie erhaltenen Daten von den aus der Probe des Patienten mit Prostatakrebs erhaltenen Daten erhalten wird.

[0034] [Fig. 6](#) zeigt Proteine in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines Patienten mit gutartiger Prostatahyperplasie, die an eine SCX1 ProteinChip® Anordnung gebunden sind.

Definitionen

[0035] Alle hier verwendeten technischen und wissenschaftlichen Begriffe haben die Bedeutung, die allgemein von Fachleuten auf dem Gebiet, zu dem diese Erfindung gehört, verstanden wird, es sei denn, sie werden anderweitig definiert. Die folgenden Veröffentlichungen stellen einem Fachmann eine allgemeine Definition vieler der bei dieser Erfindung verwendeten Begriffe zur Verfügung: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2. Auflage 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker, Herausgeber, 1988); The Glossary of Genetics, 5. Auflage, R. Rieger et al. (Herausgeber), Springer Verlag (1991); und Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Wie hier verwendet, haben die folgenden Begriffe die ihnen zugeschriebene Bedeutung, es sei denn etwas anderes ist angegeben.

[0036] Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung bezieht sich "Marker" auf ein Polypeptid, das differentiell in einer Probe enthalten ist, die Patienten mit Prostatakrebs entnommen wurde, im Vergleich zu einer vergleichbaren Probe, die Patienten entnommen wurde, die nicht an Prostatakrebs leiden, nämlich im Zusammenhang der Erfindung Patienten mit gutartiger Prostatahyperplasie. Beispielsweise kann ein Marker ein Polypeptid (mit einem bestimmten scheinbaren Molekulargewicht) sein, das in einer erhöhten Menge in Proben von Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu Proben von BPH-Patienten vorhanden ist. In weiteren Beispielen kann ein Marker ein Polypeptid (mit einem bestimmten scheinbaren Molekulargewicht) sein, das in einem erhöhten Niveau in Proben von BPH-Patienten im Vergleich zu Proben von Patienten mit Prostatakrebs vorhanden ist.

[0037] Ein Proteinmarker wird mit einer Konfidenz von einer etwa 0,5%igen Abweichung mittels Gasphasenionenspektrometrie aufgelöst. So bezieht sich der Begriff "etwa" im Zusammenhang mit einem Molekulargewicht eines Markers, wie mittels Massenspektrometrie gemessen, auf eine 0,5%ige Abweichung des Molekulargewichts des Markers. Beispielsweise hat der Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von "etwa 2776 Da", wie mittels Massenspektrometrie gemessen, ein scheinbares Molekulargewicht im Bereich von 2776 ± 14 Da; der Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von "etwa 4423 Da", wie mittels Massenspektrometrie gemessen, weist einen Bereich des scheinbaren Molekulargewichts von 4423 ± 22 Da auf; usw.

[0038] Die Formulierung "differentiell vorhanden" bezieht sich auf eine Differenz in der Menge und/oder der Häufigkeit eines Polypeptids (mit einem bestimmten scheinbaren Molekulargewicht), das in einer Probe vorhanden ist, die Patienten mit Prostatakrebs entnommen wurde, im Vergleich zu einer vergleichbaren Probe, die Patienten entnommen wurde, die nicht an Prostatakrebs leiden (sondern eine gutartige Prostatahyperplasie haben). Ein Marker kann beispielsweise ein Polypeptid sein, das in einem erhöhten Niveau oder einem herabgesetzten Niveau in Proben von Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu Proben von Patienten vorhan-

den ist, die an einer gutartigen Prostatahyperplasie leiden. Alternativ kann ein Marker ein Polypeptid sein, das mit einer höheren Häufigkeit oder einer geringeren Häufigkeit in Proben von Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu Proben von Patienten vorhanden ist, die an gutartiger Prostatahyperplasie leiden. Ein Marker kann in Bezug auf Menge, Häufigkeit oder beidem unterschiedlich vorhanden sein.

[0039] Ein Polypeptid ist differentiell zwischen den zwei Sätzen von Proben vorhanden, wenn die Häufigkeit der Nachweis des Polypeptids in den Proben von Patienten mit Prostatakrebs statistisch signifikant höher oder niedriger ist als bei den Kontrollproben. Beispielsweise können zwei Sätze von Daten unter Verwendung des Student t-Tests verglichen werden, und $P < 0,05$ kann als statistisch signifikant betrachtet werden. Bei einem anderen Beispiel ist ein Polypeptid differentiell zwischen zwei Sätzen von Proben vorhanden, wenn nachgewiesen wird, dass es um mindestens etwa 120 %, mindestens etwa 130 %, mindestens etwa 150 %, mindestens etwa 180 %, mindestens etwa 200 %, mindestens etwa 300 %, mindestens etwa 500 %, mindestens etwa 700 %, mindestens etwa 900 % oder mindestens etwa 1000 % häufiger oder weniger häufig in einem Satz von Proben als in dem anderen Satz von Proben beobachtet wird.

[0040] Alternativ oder zusätzlich ist ein Polypeptid differentiell zwischen den zwei Proben vorhanden, wenn sich die Menge des Polypeptids in einer Probe statistisch signifikant von der Menge des Polypeptids in der anderen Probe unterscheidet. Beispielsweise ist ein Polypeptid differentiell zwischen den beiden Proben vorhanden, wenn es in einer Probe um mindestens etwa 120 %, mindestens etwa 130 %, mindestens etwa 150 %, mindestens etwa 180 %, mindestens etwa 200 %, mindestens etwa 300 %, mindestens etwa 500 %, mindestens etwa 700 %, mindestens etwa 900 % oder mindestens etwa 1000 % höher vorhanden ist als es in der anderen Probe vorhanden ist oder wenn es in einer Probe nachweisbar ist und in der anderen nicht nachweisbar ist.

[0041] "Basisches Samenprotein" bezieht sich auf ein Peptidfragment, das durch die prostataspezifische, antigenvermittelte Proteolyse eines Hauptproteins im Samenplasma, Semenogelin I, erzeugt wird. Das basische Samenprotein weist ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 5753 Da auf und etwa 52 Aminosäurereste (Peptidfragment 85-136 von Semenogelin I) auf. Das "basische Samenprotein" kann eine Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 wie in [Fig. 1](#) gezeigt oder eine abgeschnittene Version davon haben und kann auch andere basische Samenproteine umfassen, die polymorphe Varianten, Allele, Mutanten und Interspecies-Homologa von basischem Samenprotein mit einer Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 oder abgeschnittene Versionen davon sind (siehe auch Lilja und Jeppsson, Febs Lett. 182:181-184 (1985)).

[0042] "Abgespaltetes Produkt" im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Produkt, das durch PSA-vermittelte Proteolyse eines Proteinsubstrats wie Semenogelin I erzeugt wird.

[0043] "Prostataspezifische antigenvermittelte Proteolyse" oder "PSA-vermittelte Proteolyse" bezieht sich auf die Serinproteaseenzymaktivität des prostataspezifischen Antigens (PSA).

[0044] "Diagnostisch" bedeutet das Identifizieren des Vorhandenseins oder der Natur eines pathologischen Zustands. Diagnostische Verfahren unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit und Spezifität. Die "Sensibilität" eines diagnostischen Assays ist der Prozentsatz der erkrankten Personen, bei denen der Test positiv ist (Prozentsatz der "wahren Positiven"). Erkrankte Personen, die durch den Assay nicht ermittelt werden, sind "Falschnegativ". Patienten, die nicht erkrankt sind und deren Test bei dem Assay negativ ist, werden "echte Negative" genannt. Die "Spezifität" eines diagnostischen Assays ist 1 minus die Rate der Falschpositiven, wobei die Rate der "Falschpositiven" definiert ist als der Anteil derjenigen ohne die Erkrankung, deren Test positiv ist. Während ein bestimmtes diagnostisches Verfahren eventuell keine endgültige Diagnose eines Zustands liefert, reicht es aus, wenn das Verfahren eine positive Indikation liefert, die bei der Diagnose hilft.

[0045] Eine "Testmenge" eines Markers bezieht sich auf eine Menge eines Markers, die in einer Probe, die getestet wird, vorhanden ist. Eine Testmenge kann entweder eine absolute Menge (z.B. µg/ml) oder eine relative Menge (z.B. relative Intensität von Signalen) sein.

[0046] Eine "diagnostische Menge" eines Markers im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf eine Menge eines Markers in der Probe eines Patienten, die der Diagnose von Prostatakrebs entspricht. Eine diagnostische Menge kann entweder eine absolute Menge (z.B. µg/ml) oder eine relative Menge (z.B. relative Intensität von Signalen) sein.

[0047] Eine "Kontrollmenge" des Markers kann jede Menge oder ein Mengenbereich sein, die bzw. der mit einer Testmenge eines Markers zu vergleichen ist. Beispielsweise kann eine Kontrollmenge eines Markers die

Menge eines Markers (z.B. eines basischen Samenproteins) bei einem Patienten mit Prostatakrebs, einem BPH-Patienten oder einer Person ohne Prostatakrebs oder ohne BPH sein. Eine Kontrollmenge kann entweder eine absolute Menge (z.B. µg/ml) oder eine relative Menge (z.B. relative Intensität von Signalen) sein. Im Zusammenhang mit der Erfindung stammt die Kontrollprobe von Patienten mit gutartiger Prostatahyperplasie.

[0048] "Sonde" bezieht sich auf eine Vorrichtung, die entferntbar in ein Gasphasenspektrometer einsetzbar ist, und umfasst ein Substrat mit einer Oberfläche, um einen Marker zum Nachweis zu bieten. Eine Sonde kann ein einziges Substrat oder eine Vielzahl von Substraten aufweisen. Begriffe wie ProteinChip®, ProteinChip® Anordnung oder Chip werden hier ebenfalls verwendet, wenn Bezug auf eine Sonde genommen wird.

[0049] "Substrat" oder "Sondensubstrat" bezieht sich auf eine Festphase, auf der ein Adsorptionsmittel vorgesehen werden kann (z.B. mittels Befestigen, Abscheiden usw.).

[0050] "Adsorptionsmittel" bezieht sich auf jedes Material, das einen Marker adsorbieren kann. Der Begriff "Adsorptionsmittel" wird hier verwendet, um sowohl ein einziges Material ("monoplexes Adsorptionsmittel") (z.B. eine Verbindung oder eine funktionelle Gruppe), dem der Marker ausgesetzt ist, und eine Vielzahl von unterschiedlichen Materialien ("multiplexes Adsorptionsmittel") zu bezeichnen, der der Marker ausgesetzt ist. Die Adsorptionsmaterialien in einem multiplexen Adsorptionsmittel werden als "Adsorptionsspezies" bezeichnet. Beispielsweise kann eine ansprechbare Stelle an einem Sondensubstrat ein multiplexes Adsorptionsmittel aufweisen, das durch viele unterschiedliche Adsorptionsspezies gekennzeichnet ist (z.B. Anionenaustauschmaterialien, Metallchelatoren oder Antikörper) mit unterschiedlichen Bindungscharakteristiken. Das Substratmaterial selbst kann auch zum Adsorbieren eines Markers beitragen und kann als Teil eines "Adsorptionsmittels" angesehen werden.

[0051] "Adsorbieren" bezieht sich auf die nachweisbare Bindung zwischen einem Adsorptionsmittel und einem Marker entweder vor oder nach dem Waschen mit einem Eluierungsmittel (Selektivitätsschwellenmodifikator) oder einer Waschlösung.

[0052] "Eluierungsmittel" oder "Waschlösung" bezieht sich auf ein Mittel, das verwendet werden kann, um die Adsorption eines Markers an ein Adsorptionsmittel zu vermitteln. Eluierungsmittel und Waschlösungen werden auch als "Selektivitätsschwellenmodifikatoren" bezeichnet. Eluierungsmittel und Waschlösungen können verwendet werden, um ungebundene Materialien von der Sondensubstratoberfläche zu waschen und zu entfernen.

[0053] "Trennen", "Trennung" oder "Trennung eines Markers" bezieht sich auf die Nachweis von mindestens einem Marker in einer Probe. Die Trennung umfasst die Nachweis einer Vielzahl von Markern in einer Probe durch Abtrennen und anschließenden Differentialnachweis. Die Trennung erfordert kein vollständiges Abtrennen eines Markers von allen anderen Markern in einer Mischung. Vielmehr ist jede Abtrennung, die die Unterscheidung zwischen mindestens zwei Markern gestattet, ausreichend.

[0054] "Gasphasenionenspektrometer" bezieht sich auf eine Vorrichtung, die einen Parameter misst, der in Masse-Ladung-Verhältnisse von gebildeten Ionen übertragen werden kann, wenn eine Probe in die Gasphase ionisiert wird. Im Allgemeinen tragen Ionen, die von Interesse sind, eine einzige Ladung, und Masse-Ladung-Verhältnisse werden oft einfach als Masse bezeichnet.

[0055] "Massenspektrometer" bezieht sich auf ein Gasphasenionenspektrometer, das ein Einlasssystem, eine Ionisierungsquelle, eine optische Ionenanordnung, eine Massenanalyseeinrichtung und einen Detektor umfasst.

[0056] "Laserdesorptionsmassenspektrometer" bezieht sich auf ein Massenspektrometer, bei dem ein Laser als Ionisierungsquelle verwendet wird, um einen Marker zu desorbieren.

[0057] "Nachweis" bezieht sich auf das Identifizieren des Vorhandenseins, des Fehlens oder der Menge des nachzuweisenden Gegenstandes.

[0058] "Retention" bezieht sich auf eine Adsorption eines Markers oder durch ein Adsorptionsmittel nach Waschen mit dem Eluierungsmittel oder einer Waschlösung.

[0059] Die Begriffe "Polypeptid", "Peptid" und "Protein" werden hier austauschbar verwendet, um ein Polymer aus Aminosäureresten zu bezeichnen. Die Begriffe beziehen sich auf Aminosäurepolymere, bei denen ein oder

mehrere Aminosäurerest(e) ein Analogon oder Mimetikum einer entsprechenden natürlich vorkommenden Aminosäure sowie natürlich vorkommende Aminosäurepolymere ist bzw. sind. Polypeptide können z.B. durch die Zugabe von Kohlehydratresten zur Bildung von Glycoproteinen modifiziert werden. Die Begriffe "Polypeptid", "Peptid" und "Protein" umfassen Glycoproteine sowie Nichtglycoproteine.

[0060] Der Begriff "Aminosäure" bezieht sich auf natürlich vorkommende und synthetische Aminosäuren sowie Aminosäureanaloga und Aminosäuremimetika, die in ähnlicher Weise wie die natürlich vorkommenden Aminosäuren funktionieren. Natürlich vorkommende Aminosäuren sind diejenigen, die durch den genetischen Code codiert sind, sowie diejenigen Aminosäuren, die später modifiziert werden, z.B. Hydroxyprolin, Carboxyglutamat und O-Phosphoserin. Aminosäureanaloga bezieht sich auf Verbindungen, die die gleiche grundlegende chemische Struktur wie eine natürlich vorkommende Aminosäure haben, d.h. einen Kohlenstoff, der an einen Wasserstoff gebunden ist, eine Carboxylgruppe, eine Aminogruppe und eine R-Gruppe, z.B. Homoserin, Norleucin, Methioninsulfoxid, Methioninmethylsulfonium. Solche Analoga weisen modifizierte R-Gruppen (z.B. Norleucin) oder modifizierte Peptidgerüste auf, behalten jedoch die gleiche grundlegende chemische Struktur bei wie eine natürlich vorkommende Aminosäure. Aminosäuremimetika bezieht sich auf chemische Verbindungen, die eine Struktur haben, die sich von der allgemeinen chemischen Struktur einer Aminosäure unterscheidet, die jedoch auf ähnliche Weise wie eine natürlich vorkommende Aminosäure funktionieren.

[0061] Aminosäuren können hier entweder mit ihren üblicherweise bekannten Symbolen mit drei Buchstaben oder durch die von der IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission empfohlenen, Symbole mit einem Buchstaben bezeichnet werden.

[0062] "Nachweisbare Komponente" oder eine "Markierung" bezeichnet eine Zusammensetzung, die mittels spektroskopischer, photochemischer, biochemischer, immunochemischer oder chemischer Mittel nachweisbar ist. Beispielsweise umfassen brauchbare Markierungen ^{32}P , ^{35}S , fluoreszierende Farbstoffe, elektronendichte Reagenzien, Enzyme (z.B. wie sie üblicherweise in einem ELISA verwendet werden), Biotin-Streptavidin, Dioxygenin, Haptene und Proteine, für die Antiseren oder monoklonale Antikörper verfügbar sind, oder Nucleinsäuremoleküle mit einer zu einem Ziel komplementären Sequenz. Die nachweisbare Komponente erzeugt oft ein messbares Signal wie ein radioaktives, chromogenes oder fluoreszierendes Signal, das verwendet werden kann, um die Menge der gebundenen nachweisbaren Komponente in einer Probe quantitativ zu bestimmen. Die nachweisbare Komponente kann entweder kovalent oder mittels ionischer, van der Waals oder Wasserstoffbindungen in einen Primer oder eine Sonde inkorporiert werden oder an diesem bzw. dieser angeheftet werden, z.B. durch Inkorporieren der radioaktiven Nucleotide oder biotinylierten Nucleotide, die von Streptavidin erkannt werden. Die nachweisbare Komponente kann direkt oder indirekt nachweisbar sein. Eine indirekte Nachweis kann das Binden einer zweiten direkt oder indirekt nachweisbaren Komponente an der nachweisbaren Komponente umfassen. Beispielsweise kann die nachweisbare Komponente der Ligand eines Bindungspartners wie Biotin sein, das ein Bindungspartner für Streptavidin ist, oder eine Nucleotidsequenz, die der Bindungspartner für eine komplementäre Sequenz ist, an der sie spezifisch hybridisieren kann. Der Bindungspartner kann selbst direkt beispielsweise nachweisbar sein, z.B. ein Antikörper kann selbst mit einem fluoreszierenden Molekül markiert werden. Der Bindungspartner kann auch indirekt nachweisbar sein; eine Nucleinsäure, die eine komplementäre Nucleotidsequenz aufweist, kann Teil beispielsweise eines verzweigten DNS-Moleküls sein, das seinerseits durch die Hybridisierung mit anderen markierten Nucleinsäuremolekülen nachweisbar ist (siehe z.B. P. D. Fahrlander und A. Klausner, Bio/Technology 6:1165 (1988)). Die Quantifizierung des Signals wird durch beispielsweise Szintillierungszählen, Densitometrie oder Strömungszytometrie erzielt.

[0063] "Antikörper" bezieht sich auf einen Polypeptidliganden, der im Wesentlichen durch ein Immunoglobulingen oder Immunoglobulingene oder Fragmente davon codiert ist, das bzw. die spezifisch ein Epitop (z.B. ein Antigen) bindet und erkennt bzw. binden und erkennen. Die erkannten Immunoglobulingene umfassen die Kappa- und Lambda-Leichtkettengene konstanter Region, die Alpha-, Gamma-, Delta-, Epsilon und Mu-Schwerkettengene konstanter Region und die Myriade von Immunoglobulingenen mit variabler Region. Antikörper existieren beispielsweise als intakte Immunoglobuline oder als Anzahl von gut charakterisierten Fragmenten, die durch Verdauung mit verschiedenen Peptidasen erzeugt werden. Dies umfasst beispielsweise Fab' und F(ab')₂ Fragmente. Der Begriff "Antikörper", wie hier verwendet, umfasst auch Antikörperfragmente, die entweder durch die Modifizierung von ganzen Antikörpern erzeugt werden, oder diejenigen, die de novo unter Verwendung von rekombinanten DNS-Methoden synthetisch hergestellt werden. Er umfasst auch polyclonale Antikörper, monoclonale Antikörper, Antikörper-Chimären, humanisierte Antikörper oder Einzelketten-Antikörper. Der "Fc"-Abschnitt eines Antikörpers bezieht sich auf denjenigen Abschnitt einer schweren Kette eines Immunoglobulins, der eine oder mehrere Domäne(n) konstanter Schwerkettenbereiche, CH₁, CH₂ und CH₃ umfasst, jedoch nicht den variablen Bereich der schweren Kette umfasst.

[0064] "Immunoassay" ist ein Assay, bei dem ein Antikörper verwendet wird, um ein Antigen spezifisch zu binden. Der Immunoassay ist durch die Verwendung von spezifischen Bindungseigenschaften eines bestimmten Antikörpers gekennzeichnet, um das Antigen zu isolieren, zielgerichtet anzuvisieren und/oder zu quantifizieren.

[0065] Der Ausdruck "bindet sich spezifisch (oder selektiv)" an einen Antikörper oder "ist spezifisch (oder selektiv) immunoreaktiv mit" bezieht sich, wenn man sich auf ein Protein oder Peptid bezieht, auf eine Bindungsreaktion, die für das Vorhandensein eines Proteins in einer heterogenen Population von Proteinen und anderen biologischen Präparaten bestimmend ist. So binden sich unter bezeichneten Immunoassay-Bedingungen die spezifizierten Antikörper an ein bestimmtes Protein an mindestens das zweifache des Hintergrunds und binden sich nicht in einer signifikanten Menge an andere in der Probe vorhandenen Proteine. Das spezifische Binden an einen Antikörper unter solchen Bedingungen kann einen Antikörper erfordern, der wegen seiner Spezifität für ein bestimmtes Protein ausgewählt wird. Beispielsweise können polyclonale Antikörper, die aus spezifischen Spezies wie Ratte, Maus oder Mensch zum basischen Samenprotein erhöht werden, ausgewählt werden, um nur diejenigen polyclonalen Antikörper zu erhalten, die mit dem basischen Samenprotein und nicht mit anderen Proteinen mit Ausnahme polymorpher Varianten und Allelen des basischen Samenprotein spezifisch immunoreaktiv sind. Diese Auswahl kann erzielt werden durch Heraussubtrahieren von Antikörpern, die mit dem basischen Samenproteinmolekül von anderen Spezies kreuzreagieren. Eine Vielzahl von Immunoassay-Formaten kann verwendet werden, um Antikörper auszuwählen, die mit einem bestimmten Protein spezifisch immunoreaktiv sind. Beispielsweise werden Festphasen-ELISA-Immunoassays routinemäßig verwendet, um Antikörper auszuwählen, die mit einem Protein spezifisch immunoreaktiv sind (siehe z.B. Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)) bezüglich der Beschreibung von Immunoassay-Formaten und -Bedingungen, die zur Bestimmung einer spezifischen Immunoreaktivität verwendet werden können). Typischerweise beträgt eine spezifische oder selektive Reaktion mindestens das zweifache Hintergrundsignal oder das zweifache Hintergrundsrauschen und typischerweise mehr als das 10- bis 100-fache des Hintergrunds.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0066] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung von Markern, die differentiell in Proben von Patienten mit Prostatakrebs und Patienten, die an gutartiger Prostatahyperplasie leiden, vorhanden sind, und der Verwendung dieser Entdeckung bei den Verfahren und Kits, die bei der Diagnose von Prostatakrebs helfen. Durch Überwachen der Menge von einem oder mehreren Markern in einer einem Patienten entnommenen Probe können die erfindungsgemäßen Verfahren den pathologischen Zustand des Patienten bestimmen. Beispielsweise kann bzw. können ein oder mehrere Marker überwacht werden, um zu bestimmen, ob ein Patient, bei dem ein hoher PSA-Blutserumspiegel diagnostiziert wird, an Prostatakrebs oder BPH leidet. Die Verfahren und Kits der Erfindung können auch zusätzlich zu herkömmlichen Prostatakrebstestmethoden verwendet werden, um das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Prostatakrebs zu bestätigen. Die erfindungsgemäßen Verfahren können in kurzer Zeit unter Verwendung von winzigen Mengen von leicht erhältlichen biologischen Proben wie Blut, Serum, Urin, Samen, Samenfluid, Samenplasma oder Gewebeextrakten durchgeführt werden.

[0067] Die erfindungsgemäßen Marker können alle geeigneten Charakteristika aufweisen, können jedoch ein scheinbares Molekulargewicht von weniger als 10,000 Da aufweisen. Bei einem Beispiel sind die Marker in einer erhöhten Menge in Proben von Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu Proben von BPH-Patienten vorhanden. Diese umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2776 Da, 4423 Da, 4480 Da, 5753 Da, 6098 Da, 6270 Da, 6998 Da, 7843 Da, 8030 Da, 8240 Da oder 8714 Da. Bei einem weiteren Beispiel sind die Marker mit einem erhöhten Spiegel in Proben von BPH-Patienten im Vergleich zu Proben von Patienten mit Prostatakrebs vorhanden. Diese umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2276 Da, 2530 Da, 2095 Da, 3030 Da, 3038 Da, 3224 Da, 3600 Da, 3835 Da, 3915 Da, 3933 Da und 4175 Da. Diese Marker sind in eine Reihe von biologischen Proben zu finden, und Marker, die in Samenplasma gefunden werden, werden bevorzugt bei den Verfahren der Erfindung überwacht.

[0068] Jeder der Marker kann bestimmte Bindungscharakteristika aufweisen, die es ermöglichen, dass diese Marker in einer einem Patienten entnommenen Probe unter Selektivitätsbedingungen angereichert und gemessen werden, die das Binden dieser Marker begünstigen. Beispielsweise binden sich Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2776 Da, 4423 Da, 4480 Da, 5753 Da, 6098 Da, 6270 Da, 6998 Da, 8030 Da und 8714 Da an Adsorptionsmittel, die Metallionen (z.B. Nickel) umfassen, was anzeigt, dass diese Marker Aminosäurereste wie Histidin aufweisen, die sich an Metallionen binden können. In ähnlicher Weise können sich Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2276 Da, 2905 Da, 3038 Da, 3600 Da,

3835 Da, 3933 Da und 4175 Da an den gleichen Typ von Adsorptionsmitteln binden.

[0069] Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2776 Da, 5753 Da, 6098 Da, 6270 Da, 6998 Da, 7843 Da, 8030 Da und 8240 Da binden sich an Adsorptionsmittel, die eine hydrophobe Gruppe (z.B. eine aliphatische C₁₆ Kohlenwasserstoffgruppe) umfassen, was anzeigt, dass diese Marker Aminosäurereste aufweisen können, die hydrophobe Komponenten umfassen. In ähnlicher Weise können sich Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2276 Da, 2530 Da, 2905 Da, 3030 Da, 3224 Da, 3600 Da und 3915 Da an den gleichen Typ von Adsorptionsmitteln binden.

[0070] Ein Marker mit einem Molekulargewicht von 5753 Da kann sich des weiteren an Adsorptionsmittel binden, die eine hydrophobe Gruppe und eine anionische Gruppe umfassen (z.B. Polystyrolatexperlen, die mit einer Sulfonatgruppe funktionalisiert sind), was anzeigt, dass dieser Marker basische Aminosäurereste und hydrophobe Komponenten aufweist. Unter diesen Markern wird der Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 5753 Da vorzugsweise mit den Verfahren der Erfindung überwacht, da er fast ausschließlich unter bestimmten Selektivitätsbedingungen angereichert werden kann und in hohen Mengen in Proben, die Patienten mit Prostatakrebs entnommen werden, jedoch nicht in Proben von anderen Patienten (z.B. denjenigen, die an einer gutartigen Prostatahyperplasie leiden) nachgewiesen werden kann.

[0071] Der Marker mit einem Molekulargewicht von etwa 5753 Da wird als basisches Samenprotein identifiziert, das ein Peptidfragment ist, das durch die PSA-vermittelte Proteolyse von Semenogelin I Protein (Aminosäureposition 85-136 des Semenogelins I; siehe, SEQ ID NO:1, gezeigt in [Fig. 1](#)) erzeugt wird. Das basische Samenprotein weist ein C-ständiges Tyrosin auf, und ein Peptidfragment von Semenogelin I unmittelbar vor dem basischen Samenprotein (d.h. ein Fragment an der N-ständigen Seite des basischen Samenproteins) weist eine C-ständige Sequenz von Leucin-Leucin auf. Es ist bekannt, dass beide dieser Aminosäuren spezifische hydrolytische Stellen von PSA sind, was anzeigt, dass das basische Samenprotein ein abgespaltenes Produkt ist, das durch die Serinproteaseenzymaktivität (z.B. chymotrypsinartige Aktivität) von PSA erzeugt wird.

[0072] Das basische Samenprotein ist in dem Samenplasma, das Patienten mit Prostatakrebs entnommen wird, reichlich vorhanden. Jedoch ist sein Vorhandensein in dem Samenplasma, das BPH-Patienten entnommen wird, fast vernachlässigbar. Dies zeigt an, dass PSA in dem Samenplasma eines Patienten mit Prostatakrebs viel aktiver ist als dasjenige in einem Patienten mit BPH, da die Menge an Samenprotein, die in einer Probe vorhanden ist, die proteolytische Aktivität von PSA widerspiegeln kann. Diese Schlussfolgerung entspricht einer früheren Erkenntnis, dass das meiste PSA in BPH-Knötchen wahrscheinlich mehrere innere Abspaltungen aufweist, die zu einer viel geringeren spezifischen Serinproteaseaktivität führen (siehe Chen et al., J. Urol. 167: 2166-2170 (1997)).

[0073] So können bei einigen Ausführungsformen die mittels der PSA-vermittelten Proteolyse in einer Probe eines Patienten erzeugten, abgespaltenen Produkte als Hilfe bei der Diagnose von Prostatakrebs überwacht werden, z.B. durch Messen der Menge des basischen Samenproteins. Das Überwachen der biologischen Aktivität von PSA in einer Probe statt des Messens der Menge an PSA in einer Probe hat mehrere Vorteile. Zunächst wird ein nachgewiesenes Signal verstärkt, wenn die Aktivität von PSA gemessen wird. Beispielsweise kann in Abhängigkeit von der Turnover-Rate des Enzyms ein PSA-Molekül viele nachweisbare abgespaltene Produkte erzeugen, wenn die Proteinsubstrate (z.B. Semenogelin I oder Semenogelin II) in ausreichenden Mengen vorhanden sind. Deshalb kann, wenn es einen Unterschied in der PSA-Aktivität in den zwei Proben gibt, dieser Unterschied unter Verwendung der Menge der abgespaltenen Produkte gemessen werden. Dieser Verstärkungseffekt kann dann brauchbar sein, wenn beispielsweise der Unterschied der Menge des PSA bei den Proben sehr gering ist und er mittels herkömmlicher Verfahren (z.B. in dem frühen Stadium von Prostatakrebs) schwierig zu bestimmen ist. Zweitens weist das PSA bei BPH-Patienten eine viel geringere Serinproteaseaktivität als das PSA bei Patienten mit Prostatakrebs auf. Die verringerte Serinproteaseaktivität kann zu geringeren Mengen an Markern führen, die abgespaltene Produkte von PSA (z.B. basischem Samenprotein) sind. Deshalb sind die nachweisbaren abgespaltenen Produkte bei Patienten mit Prostatakrebs wahrscheinlich größer als bei BPH-Patienten. Die erfindungsgemäßen Verfahren und Kits können durch Überwachen der Marker, die abgespalten, durch die PSA-vermittelte Proteolyse erzeugte Produkte sind, statt durch das Überwachen des PSA einen sensibleren Weg zur Bestimmung zur Verfügung stellen, ob ein Patient an BPH oder Prostatakrebs leidet.

I. Verfahren zum Nachweis von Markern unter Verwendung der Gasphasenionenspektrometrie

[0074] Die Erfindung wie hier definiert umfasst das Vergleichen einer Vielzahl von Markern, die differentiell in

Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und einer Person, die ein BPH-Patient ist, vorhanden sind. Jede Kombination der beschriebenen Marker liegt im Rahmen dieses Aspekts der Erfindung und kann nachgewiesen werden. Die Verfahren zum Nachweis dieser Marker können viele Anwendungen haben. Erfindungsgemäß kann eine Kombination von Markern gemessen werden, um zwischen Prostatakrebs und BPH zu unterscheiden. Daher ist sie zur Unterstützung bei der Diagnose von Prostatakrebs bei einem Patienten brauchbar. Ebenfalls offenbart sind hier Verfahren zum Nachweis dieser Marker, die auf in vitro Prostatakrebszellen oder in vivo Tiermodelle mit Bezug auf Prostatakrebs angewandt werden können, um ein Assay mit Bezug auf Verbindungen durchzuführen, die die Exprimierung dieser Marker modulieren, und um diese zu identifizieren.

A. Nachweis mittels Gasphasenionenspektrometrie

[0075] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Massenspektrometrie, eine Art der Gasphasenionenspektrometrie, verwendet. Die nachfolgende Offenbarung erörtert die Gasphasenionenspektrometrie, für einen Fachmann ist es jedoch ersichtlich, dass dies auf die Massenspektrometrie anwendbar ist wie sie in den Ansprüchen bezeichnet ist.

[0076] Ein Gasphasenionenspektrometer kann verwendet werden. Dieses Verfahren umfasst: (a) das Kontaktieren einer Probe mit einem Substrat, das ein Adsorptionsmittel darauf umfasst, unter Bedingungen, die das Binden zwischen einem Marker und dem Adsorptionsmittel gestatten; und (b) den Nachweis des an das Adsorptionsmittel gebundenen Markers mittels Gasphasenionenspektrometrie.

[0077] Der Nachweis dieser Marker kann durch die Verwendung bestimmter Selektivitätsbedingungen (z.B. Arten der verwendeten Adsorptionsmittel oder Waschlösungen) verbessert werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform können die gleichen oder im Wesentlichen die gleichen Selektivitätsbedingungen, die verwendet wurden, um die Marker zu entdecken, bei den Verfahren zum Nachweis eines Markers in einer Probe verwendet werden. Beispielsweise kann ein Substrat, das ein Adsorptionsmittel mit einer hydrophoben Gruppe und einer anionischen Gruppe (z.B. Polystyrolatexperlen, die mit einer Sulfonatgruppe funktionalisiert sind) aufweist, verwendet werden. Bei einem weiteren Beispiel kann ein Substrat, das ein Adsorptionsmittel mit einer hydrophoben Gruppe (z.B. einer aliphatischen C₁₈ Kohlenwasserstoffgruppe) aufweist, verwendet werden. Bei noch einem weiteren Beispiel kann ein Substrat, das ein Adsorptionsmittel mit einem an einer Metallchelate bildende Gruppe gebundenen Metallion (z.B. Nickelmetallionen, die mit Nitriloessigsäuregruppen ein Chelat bilden) aufweist, als Adsorptionsmittel verwendet werden. Bei einigen Ausführungsformen kann ein Adsorptionsmittel Antikörper sein, die sich spezifisch an die Marker (z.B. basisches Samenprotein) binden. Vorzugsweise ist die Probe einem Patienten entnommenes Samenplasma.

[0078] Bei einer Ausführungsform kann ein ein Adsorptionsmittel umfassendes Substrat in der Form einer Sonde vorliegen, die entfernbar in einen Gasphasenionenspektrometer einsetzbar ist. Beispielsweise kann ein Substrat in der Form eines Streifens mit Adsorptionsmitteln auf seiner Oberfläche vorliegen. Bei einer weiteren Ausführungsform kann ein ein Adsorptionsmittel umfassendes Substrat zur Bildung einer Sonde auf einem weiteren Substrat angeordnet werden, die entfernbar in einen Gasphasenionenspektrometer einsetzbar ist. Beispielsweise kann ein Substrat, das ein Adsorptionsmittel umfasst, eine feste Phase wie eine polymere oder Glasperle mit einer funktionellen Gruppe zum Binden eines Markers sein, die anschließend zur Bildung einer Sonde auf einem zweiten Substrat angeordnet wird. Beispielsweise kann das zweite Substrat in der Form eines Streifens oder einer Platte mit einer Reihe von Vertiefungen an vorbestimmbaren, ansprechbaren Stellen, vorliegen. Ein Vorteil dieser Ausführungsform ist es, dass der Marker in einem physikalischen Zusammenhang an dem ersten Substrat adsorbiert und auf ein zweites Substrat übertragen werden kann, das dann der Analyse mittels Gasphasenionenspektrometrie unterzogen werden kann. Die Sonde kann in jeder Form vorliegen, solange sie entfernbar in ein Gasphasenionenspektrometer eingesetzt werden kann.

[0079] Die Sonde kann auch zur Verwendung mit Einlasssystemen und Detektoren eines Gasphasenionenspektrometers geeignet sein. Beispielsweise kann die Sonde zur Anbringung in einem horizontal und/oder vertikal bewegbaren Schlitten geeignet sein, der die Sonde horizontal und/oder vertikal zu einer nächsten Stellung bewegt, ohne ein erneutes Positionieren der Sonde per Hand zu erfordern.

[0080] Das Sondensubstrat besteht vorzugsweise aus einem Material, das Adsorptionsmittel tragen kann. Beispielsweise kann das Sondensubstratmaterial isolierende Materialien (z.B. Glas, Keramik), halbisolierende Materialien (z.B. Silicium-Wafer) oder elektrisch leitendee Materialien (z.B. Metalle wie Nickel, Messing, Stahl, Aluminium, Gold oder elektrisch leitfähige Polymere), organische Polymere, Biopolymere oder jede beliebige Kombinationen davon umfassen, ist jedoch nicht auf diese beschränkt.

[0081] Die Sondensubstratoberfläche kann konditioniert werden, um Marker zu binden. Beispielsweise kann bei einer Ausführungsform die Oberfläche des Sondensubstrats konditioniert werden (z.B. chemisch oder mechanisch wie Aufräumen), um Adsorptionsmittel auf der Oberfläche zu plazieren. Das Adsorptionsmittel weist funktionelle Gruppen zum Binden mit einem Marker auf. Bei einigen Ausführungsformen kann das Substratmaterial selbst auch zu den Adsorptionseigenschaften beitragen und kann als Teil eines "Adsorptionsmittels" angesehen werden.

[0082] Jede Anzahl von unterschiedlichen Adsorptionsmitteln kann verwendet werden, solange sie Bindungscharakteristika aufweisen, die für das Binden der erfindungsgemäßen Marker geeignet sind. Die Adsorptionsmittel können eine hydrophobe Gruppe, eine hydrophile Gruppe, eine kationische Gruppe, eine anionische Gruppe, eine Metallionenchelat bildende Gruppe oder Antikörper, die sich spezifisch an Antigene binden, oder eine Kombination davon (manchmal als Adsorptionsmittel "mit gemischtem Modus" bezeichnet) umfassen. Beispielhafte Adsorptionsmittel, die eine hydrophobe Gruppe aufweisen, umfassen Matrizen mit aliphatischen Kohlenwasserstoffen, z.B. C_1 - C_{18} aliphatische Kohlenwasserstoffe und Matrizen mit funktioneller aromatischer Kohlenwasserstoffgruppe wie Phenylgruppen. Beispielhafte Adsorptionsmittel, die eine hydrophile Gruppe umfassen, weisen Siliciumoxid (d.h. Glas) oder hydrophile Polymere wie Polyethylenglycol, Dextran, Agarose oder Cellulose auf. Beispielhafte Adsorptionsmittel, die eine kationische Gruppe umfassen, weisen Matrizen von sekundären, tertiären oder quaternären Aminen auf. Beispielhafte Adsorptionsmittel, die eine anionische Gruppe umfassen, weisen Matrizen von Sulfatanionen (SO_3^-) und Matrizen von Carboxylatanionen (d.h. COO^-) oder Phosphatanionen (OPO_3^-) auf. Beispielhafte Adsorptionsmittel, die Metallchelate bildende Gruppen umfassen, weisen organische Moleküle auf, die eine oder mehrere Elektronendonatorgruppen besitzen, die koordinativ gebundene, kovalente Bindungen mit Metallionen bilden wie Kupfer, Nickel, Kobalt, Zink, Eisen und andere Metallionen wie Aluminium und Calcium. Beispielhafte Adsorptionsmittel, die einen Antikörper aufweisen, umfassen Antikörper, die für einen der hier vorgesehenen Marker spezifisch sind. Bei bevorzugten Ausführungsformen sind die Adsorptionsmittel im Wesentlichen ähnlich oder gleich den Adsorptionsmitteln, die verwendet wurden, um die Marker anzureichern und zu identifizieren.

[0083] Adsorptionsmittel können auf dem Sondensubstrat in kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Mustern platziert werden. Falls es kontinuierlich ist, können ein oder mehrere Adsorptionsmittel auf der Substratoberfläche platziert werden. Wenn mehrere Arten von Adsorptionsmitteln verwendet werden, kann die Substratoberfläche derart beschichtet werden, dass ein oder mehrere Bindungscharakteristika in dem ein- oder zweidimensionalen Gradienten variieren können. Wenn es diskontinuierlich ist, können mehrere Adsorptionsmittel an vorbestimmten, ansprechbaren Stellen auf der Substratoberfläche platziert werden. Die ansprechbaren Stellen können in einem beliebigen Muster angeordnet werden, sie sind jedoch vorzugsweise in einem regelmäßigen Muster wie Linien, orthogonalen Anordnungen oder regelmäßigen Kurven (z.B. Kreisen) angeordnet. Jede ansprechbare Stelle kann das gleiche oder ein unterschiedliches Adsorptionsmittel aufweisen. In [Fig. 2](#) ist eine Sonde, die diskontinuierliche Tupfen von Adsorptionsmitteln aufweist, gezeigt.

[0084] Die Sonden können unter Verwendung aller geeigneten Verfahren in Abhängigkeit von der Auswahl der Substratmaterialien und/oder Adsorptionsmittel hergestellt werden. Die Oberfläche eines Metallsubstrats kann beispielsweise mit einem Material beschichtet werden, das eine Derivatisierung der Metalloberfläche gestattet. Insbesondere kann eine Metalloberfläche mit Siliciumoxid, Titanoxid oder Gold beschichtet werden. Dann kann die Oberfläche mit einem bifunktionellen Linker derivatisiert werden, dessen eines Ende kovalent an eine funktionelle Gruppe an der Oberfläche gebunden werden kann und dessen anderes Ende weiter mit Gruppen derivatisiert werden kann, die als Adsorptionsmittel fungieren. Bei einem weiteren Beispiel kann eine poröse Siliciumoberfläche, die aus kristallinem Silicium hergestellt wird, chemisch modifiziert werden, um Adsorptionsmittel zum Binden von Markern aufzuweisen. Bei einem weiteren Beispiel können Adsorptionsmittel mit einem Hydrogelgerüst direkt auf der Substratoberfläche durch das in situ Polymerisieren einer Monomerlösung gebildet werden, die beispielsweise substituierte Acrylamidmonomere, substituierte Acrylatmonomere oder deren Derivate umfasst, die eine funktionelle Gruppe der Wahl als Adsorptionsmittel umfassen.

[0085] Zur Verwendung bei der Erfindung geeignete Sonden sind beispielsweise auch beschrieben in WO98/59361, U.S.S.N. 60/131,652, eingereicht am 29. April 1999, und Wei et al., Nature 399: 243-246 (1999).

[0086] Das Sondensubstrat, das ein Adsorptionsmittel umfasst, kontaktiert eine Probe. Die Probe ist vorzugsweise eine biologische Fluidprobe. Beispiele von biologischen Fluidproben umfassen Blut, Serum, Urin, Samen, Samenfluid, Samenplasma oder Gewebeextrakte. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das biologische Fluid Samenplasma.

[0087] Die Probe kann in einem Eluierungsmittel löslich gemacht oder mit diesem gemischt werden. Das Son-

densubstrat, das ein Adsorptionsmittel umfasst, kontaktiert dann die Lösung unter Verwendung beliebiger Techniken, die Baden, Tränken, Eintauchen, Sprühen, Waschen oder Pipettieren usw. umfassen. Im Allgemeinen ist ein Volumen einer Probe, die einige Atommol bis 100 Pikomol des Markers in etwa 1 µl bis 500 µl enthält, für das Binden an das Adsorptionsmittel ausreichend.

[0088] Die Probe kann das Sondensubstrat, das ein Adsorptionsmittel umfasst, während eines Zeitraums kontaktieren, der ausreicht, damit sich der Marker an das Adsorptionsmittel binden kann. Typischerweise werden die Probe und das das Adsorptionsmittel aufweisende Substrat während eines Zeitraums von etwa 30 Sekunden bis etwa 12 Stunden, und vorzugsweise etwa 30 Sekunden bis etwa 15 Minuten, kontaktiert.

[0089] Die Temperatur, bei der die Probe das Sondensubstrat kontaktiert, das ein Adsorptionsmittel aufweist, kann eine Funktion der bestimmten Probe und der ausgewählten Sonde sein. Typischerweise wird die Probe mit dem Sondensubstrat bei Umgebungstemperatur- und Umgebungsdruckbedingungen kontaktiert. Für einige Proben können jedoch eine modifizierte Temperatur (typischerweise 4°C bis 37°C) und modifizierte Druckbedingungen erwünscht sein, wobei die Bedingungen von Fachleuten bestimmt werden können.

[0090] Nachdem das ein Adsorptionsmittel aufweisende Sondensubstrat die Probe oder Probenlösung kontaktiert hat, ist es bevorzugt, dass nichtgebundene Materialien auf der Sondensubstratoberfläche herausgewaschen werden, so dass nur die gebundenen Materialien auf der Substratoberfläche verbleiben. Das Waschen einer Sondensubstratoberfläche kann beispielsweise durch Baden, Tränken, Eintauchen, Spülen, Sprühen oder Waschen der Substratoberfläche mit einem Eluierungsmittel oder einer Waschlösung durchgeführt werden. Ein Mikrofluidik-Verfahren wird vorzugsweise verwendet, wenn eine Waschlösung wie ein Eluierungsmittel zu den kleinen Tupfen der Adsorptionsmittel auf der Sonde eingeführt wird. Typischerweise kann die Waschlösung eine Temperatur von 0°C bis 100°C, vorzugsweise 4°C bis 37°C, haben.

[0091] Alle geeigneten Waschlösungen oder Eluierungsmittel können verwendet werden, um die Sondensubstratoberfläche zu waschen. Beispielsweise können organische Lösungen oder wässrige Lösungen verwendet werden. Vorzugsweise wird eine wässrige Lösung verwendet. Beispielhafte wässrige Lösungen umfassen einen HEPES-Puffer, einen Tris-Puffer, eine mit Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung usw. Die Auswahl einer bestimmten Waschlösung oder eines bestimmten Eluierungsmittels hängt von anderen experimentellen Bedingungen (z.B. den Arten der verwendeten Adsorptionsmittel oder nachzuweisenden Marker) ab und kann von Fachleuten bestimmt werden. Beispielsweise kann dann, wenn eine Sonde, die eine hydrophobe Gruppe und eine Sulfonatgruppe als Adsorptionsmittel (z.B. eine SCX1 ProteinChip® Anordnung) enthält, verwendet wird, eine wässrige Lösung wie ein HEPES-Puffer bevorzugt werden. Bei einem weiteren Beispiel kann dann, wenn eine Sonde, die eine Metallbindungsgruppe als Adsorptionsmittel enthält (z.B. Ni(II) ProteinChip® Anordnung), verwendet wird, eine wässrige Lösung wie eine mit Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung bevorzugt werden. Bei einem weiteren Beispiel kann dann, wenn eine Sonde, die eine hydrophobe Gruppe (z.B. H4 ProteinChip®) enthält, verwendet wird, Wasser als Waschlösung bevorzugt werden.

[0092] Gegebenenfalls kann ein energieabsorbierendes Molekül (z.B. in Lösung) auf Marker oder andere Substanzen, die an der Sondensubstratoberfläche gebunden sind, aufgebracht werden. Sprühen, Pipettieren oder Eintauchen können verwendet werden. Dies kann erfolgen, nachdem ungebundene Materialien von der Sondensubstratoberfläche abgewaschen worden sind. Ein energieabsorbierendes Molekül bezeichnet ein Molekül, das Energie aus einer Energiequelle in einem Gasphasenionenspektrometer absorbiert, wodurch es die Desorption von Markern oder anderen Substanzen von einer Sondenoberfläche unterstützt. Beispielhafte energieabsorbierende Moleküle umfassen Zimtsäurederivate, Sinapinsäure und Dihydroxybenzoesäure.

[0093] Nachdem der Marker an der Probe gebunden ist, wird er unter Verwendung der Gasphasenionenspektrometrie nachgewiesen. Marker oder andere an die Adsorptionsmittel auf den Sonden gebundene Substanzen können unter Verwendung eines Gasphasenionenspektrometers analysiert werden. Dies umfasst z.B. Massenspektrometer, Ionenmobilitätsspektrometer oder den gesamten Ionenstrom messende Vorrichtungen. Die Menge und die Charakteristika des Markers können unter Verwendung der Gasphasenionenspektrometrie bestimmt werden. Andere Substanzen abgesehen von dem Marker, der von Interesse ist, können auch mittels Gasphasenionenspektrometrie nachgewiesen werden.

[0094] Erfindungsgemäß wird ein Massenspektrometer verwendet. Bei einem typischen Massenspektrometer wird eine Sonde mit einem Marker in das Einlasssystem des Massenspektrometers eingeführt. Der Marker wird dann mit einer Ionisierungsquelle wie einem Laser, einem Fast-Atom-Bombardment oder Plasma ionisiert. Die erzeugten Ionen werden mittels einer Ionenoptikanordnung gesammelt, und dann dispersiert und analy-

siert ein Massenanalysator die hindurchtretenden Ionen. Die Ionen, die den Massenanalysator verlassen, werden durch einen Detektor nachgewiesen. Der Detektor überträgt dann die Informationen der nachgewiesenen Ionen in Masse-Ladung-Verhältnisse. Der Nachweis des Vorhandenseins eines Markers oder anderer Substanzen umfasst typischerweise den Nachweis der Signalintensität. Dies kann wiederum die Menge und den Charakter eines an der Sonde gebundenen Markers widerspiegeln.

[0095] Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Laserdesorptions-Flugzeit-Massenspektrometer mit der Sonde der vorliegenden Erfindung verwendet. Bei der Laserdesorptionsmassenspektrometrie wird eine Sonde mit einem gebundenen Marker in ein Einlasssystem eingeführt. Der Marker wird mittels eines Lasers aus der Ionisierungsquelle in die Gasphase desorbiert und ionisiert. Die erzeugten Ionen werden durch eine Ionenoptikanordnung gesammelt, und dann werden die Ionen in einem Flugzeit-Massen-Analysator durch ein kurzes Hochspannungsfeld beschleunigt und dann in eine Hochvakuumkammer treiben gelassen. An dem entfernten Ende der Hochvakuumkammer treffen die beschleunigten Ionen zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt auf eine empfindliche Detektoroberfläche auf. Da die Flugzeit eine Funktion der Masse der Ionen ist, kann die zwischen der Ionisierung und dem Aufprall verstrichene Zeit verwendet werden, um das Vorhandensein oder das Fehlen von Molekülen spezifischer Masse zu identifizieren. Wie für jeden Fachmann ersichtlich ist, kann jede dieser Komponenten des Laserdesorptions-Flugzeit-Massenspektrometers mit hier beschriebenen anderen Komponenten in der Anordnung des Massenspektrometers kombiniert werden, bei dem verschiedene Mittel der Desorption, Beschleunigung, Nachweis, Messung der Zeit usw. verwendet werden.

[0096] Bei einer weiteren Ausführungsform kann ein Ionenmobilitätsspektrometer verwendet werden, um einen Marker nachzuweisen und zu kennzeichnen. Das Prinzip der Ionenmobilitätsspektrometrie beruht auf der unterschiedlichen Mobilität von Ionen. Insbesondere bewegen sich die Ionen einer Probe, die mittels Ionisierung erzeugt werden, aufgrund ihres Unterschieds von z.B. der Masse, der Ladung oder der Gestalt mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch ein Rohr unter dem Einfluss eines elektrischen Felds. Die Ionen (typischerweise in der Form eines Stroms) werden an dem Detektor registriert, was dann verwendet werden kann, um einen Marker oder andere Substanzen in der Probe zu identifizieren. Ein Vorteil der Ionenmobilitätsspektrometrie ist es, dass sie bei Atmosphärendruck betrieben werden kann.

[0097] Bei einer weiteren Ausführungsform kann eine den gesamten Ionenstrom messende Vorrichtung verwendet werden, um die Marker nachzuweisen und zu kennzeichnen. Diese Vorrichtung kann verwendet werden, wenn die Sonde eine Oberflächenchemie hat, die es gestattet, dass nur ein einziger Typ von Marker gebunden wird. Wenn ein einziger Typ von Marker an der Sonde gebunden wird, spiegelt der gesamte Strom, der von dem ionisierten Marker erzeugt wird, die Natur des Markers wider. Der gesamte Ionenstrom, der durch den Marker erzeugt wird, kann dann mit dem gespeicherten gesamten Ionenstrom von bekannten Verbindungen verglichen werden. Die Charakteristika des Markers können dann bestimmt werden.

[0098] Durch Desorption und Nachweis von Markern erzeugte Daten können unter Verwendung eines programmierbaren digitalen Computers analysiert werden. Das Computerprogramm enthält im Allgemeinen ein lesbares Medium, das Codes speichert. Ein bestimmter Code kann dem Speicher gewidmet sein, der eine Speicherstelle jedes Merkmals auf einer Sonde, die Identität des Adsorptionsmittels bei diesem Merkmal und die Eluierungsbedingungen, die verwendet werden, um das Adsorptionsmittel zu waschen, umfasst. Unter Verwendung dieser Informationen kann das Programm dann den Satz von Merkmalen auf der Sonde identifizieren, die bestimmte Selektivitätscharakteristika definieren (z.B. die verwendeten Arten des Adsorptionsmittels und der Eluierungsmittel). Der Computer enthält auch einen Code, der als Eingabe Daten über die Stärke des Signals bei verschiedenen Molekularmassen, die von einer bestimmten adressierbaren Stelle auf der Sonde erhalten werden, empfängt. Diese Daten können die Anzahl der nachgewiesenen Marker, gegebenenfalls einschließlich der Stärke des Signals und der bestimmten Molekularmasse für jeden nachgewiesenen Marker angeben.

[0099] Die Datenanalyse kann die Schritte des Bestimmens der Signalstärke (z.B. die Höhe der Spitzen) eines nachgewiesenen Markers und Entfernen von "Ausreißern" (Daten, die von einer vorbestimmten statistischen Verteilung abweichen) umfassen. Beispielsweise können die beobachteten Spitzen normalisiert werden, ein Verfahren, durch das die Höhe jeder Spitze Bezug auf eine Referenz berechnet wird. Beispielsweise kann eine Referenz das durch das Instrument und Chemikalien erzeugte Hintergrundrauschen (z.B. ein energieabsorbierendes Molekül) sein, das mit Null auf der Skala eingestellt ist. Dann kann die Signalstärke, die für jeden Marker oder andere Substanzen nachgewiesen wird, in der Form von relativen Intensitäten auf der gewünschten Skala (z.B. 100) angezeigt werden. Alternativ kann ein Standard mit der Probe zugelassen werden, so dass eine Spitze vom Standard als Referenz verwendet werden kann, um die relativen Intensitäten der für jeden Marker oder andere nachgewiesene Marker, die beobachteten Signale, zu berechnen.

[0100] Der Computer kann die sich ergebenden Daten in verschiedene Formate zur Anzeige umwandeln. Bei einem Format, das als "Spektrumsansicht oder Retentatkarte" bezeichnet wird, kann eine spektrale Standardansicht angezeigt werden, wobei die Ansicht die Menge des Markers darstellt, die den Detektor bei jedem bestimmten Molekulargewicht erreicht. Bei einem anderen Format, das als "Spitzenkarte" bezeichnet wird, werden nur die Spitzenhöhe und die Masseinformationen von der Spektrumsansicht bewahrt, was ein saubereres Bild ergibt und es ermöglicht, dass Marker mit fast identischen Molekulargewichten leichter zu sehen sind. Bei einem weiteren Format, das als "Gelansicht" bezeichnet wird, kann jede Masse von der Spitzenansicht in ein Grauskalabild, bezogen auf die Höhe jeder Spitze, umgewandelt werden, was zu einem Erscheinungsbild ähnlich den Banden auf elektrophoretischen Gelen führt. Bei einem weiteren Format, das als "3-D-Überlagerung" bezeichnet wird, können mehrere Spektren überlagert werden, um feine Änderungen der relativen Spitzenhöhen zu untersuchen. Bei einem weiteren Format, das als "Differenzkartenansicht" bezeichnet wird, können zwei oder mehr Spektren verglichen werden, wobei einzigartige Marker und Marker, die zwischen Proben hoch- oder heruntergeregt werden, praktischerweise hervorgehoben werden. Markerprofile (Spektren) von beliebigen zwei Proben können visuell verglichen werden.

[0101] Unter Verwendung von einem beliebigen der vorstehend angegebenen Anzeigeformate kann leicht aus der Signalanzeige bestimmt werden, ob ein Marker mit einem bestimmten Molekulargewicht (z.B. etwa 2776 Da, 4423 Da, 4480 Da, 5753 Da, 6098 Da, 6270 Da, 6998 Da, 7843 Da, 8030 Da, 8240 Da oder 8714 Da) aus einer Probe nachgewiesen wird. Des weiteren kann die Menge an Markern, die an der Sondenoberfläche gebunden sind, aus der Stärke des Signals bestimmt werden.

B. Immunoassay-Nachweis

[0102] Es wird auch ein Nachweisverfahren offenbart, bei dem ein Immunoassay verwendet werden kann, um Marker in einer Probe qualitativ oder quantitativ nachzuweisen und zu analysieren. Dieses Verfahren umfasst: (a) Vorsehen eines Antikörpers, der sich spezifisch an einen Marker bindet, wobei der Marker ein Polypeptid ist, das differentiell in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines Patienten, der nicht an Prostatakrebs leidet (z.B. eines BPH-Patienten) vorhanden ist; (b) Kontaktieren einer Probe mit dem Antikörper; und (c) Nachweis des Vorhandenseins eines Komplexes des Antikörpers, der an den Marker in der Probe gebunden ist.

[0103] Um einen Antikörper herzustellen, der sich spezifisch an einen Marker bindet, können gereinigte Marker oder ihre Nucleinsäuresequenzen verwendet werden. Für den Marker mit einem Molekulargewicht von etwa 5753 Da, ein basisches Samenprotein, sind Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen verfügbar. Siehe z.B. [Fig. 1](#) und Lilja und Jeppsson, Febs. Lett. 182: 181 – 184 (1985). Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen für andere Marker können durch die weitere Charakterisierung dieser Marker erhalten werden. Beispielsweise kann jeder Marker mit einer Anzahl von Enzymen (z.B. Trypsin, V8 Protease usw.) peptidkartierte sein. Die Molekulargewichte von Verdauungsfragmenten von jedem Marker können verwendet werden, um Datenbanken wie die SwissProt-Datenbank nach Sequenzen zu durchsuchen, die zu den Molekulargewichten der Verdauungsfragmente passen, die von den verschiedenen Enzymen erzeugt werden. Unter Verwendung dieses Verfahrens können die Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen von anderen Marken identifiziert werden, wenn diese Marker bekannte Proteine in den Datenbanken sind.

[0104] Alternativ können die Proteine unter Verwendung der Proteinleitersequenzierung sequenziert werden. Proteinleiter können beispielsweise durch Fragmentieren der Moleküle und Unterziehen der Fragmente einer enzymatischen Verdauung oder anderen Verfahren erzeugt werden, die eine einzige Aminosäure vom Ende des Fragments sequentiell entfernen. Verfahren zur Herstellung von Proteinleitern werden beispielsweise in der internationalen Veröffentlichung WO 93/24834 (Chait et al.) und dem US-Patent 5,792,664 (Chait et al.) beschrieben. Die Leiter wird dann mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Differenz der Massen der Leiterfragmente identifiziert die aus dem Ende des Moleküls entfernte Aminosäure.

[0105] Wenn die Marker keine bekannten Proteine in den Datenbanken sind, können Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen mit der Kenntnis von selbst einem Teil der Aminosäuresequenz des Markers bestimmt werden. Beispielsweise können degenerierte Sonden auf der Grundlage der N-ständigen Aminosäuresequenz des Markers hergestellt werden. Diese Sonden können dann verwendet werden, um eine genomische oder -cDNS-Bibliothek zu screenen, die aus einer Probe geschaffen wurde, aus der ein Marker ursprünglich nachgewiesen wurde. Die positiven Klone können identifiziert und amplifiziert werden, und ihre rekombinanten DNS-Sequenzen können unter Verwendung von Techniken, die bekannt sind, subkloniert werden (siehe z.B. "Current Protocols for Molecular Biology" (Ausbel et al., Green Publishing Assoc. & Wiley-Interscience, 1989) und "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. Aufl. (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, NY,

1989).

[0106] Unter Verwendung der gereinigten Marker oder ihrer Nucleinsäuresequenzen können Antikörper, die sich spezifisch an einen Marker binden, unter Verwendung aller geeigneten, im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden (siehe z.B. Coligan, "Current Protocols in Immunology" (1991); Harlow & Lane, "Antibodies. A Laboratory Manual" (1988); Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice" (2. Aufl. 1986); und Kohler & Milstein, Nature 256: 495-497 (1975). Solche Techniken umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf die Antikörperherstellung durch die Auswahl von Antikörpern aus Bibliotheken von rekombinanten Antikörpern in Phagen- oder ähnlichen Vektoren sowie die Herstellung von polyclonalen und monoclonalen Antikörpern durch das Immunisieren von Kaninchen oder Mäusen (siehe z.B. Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989); Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989)).

[0107] Nachdem der Antikörper zur Verfügung gestellt worden ist, kann ein Marker unter Verwendung eines einer Anzahl von anerkannten immunologischen Bindungsassays nachgewiesen und/oder quantifiziert werden (siehe z.B. US-Patente 4,366,241, 4,376,110, 4,517,288 und 4,837,168). Brauchbare Assays umfassen beispielsweise einen Enzymimmuno-Assay (EIA) wie einen Festphasen-Enzymimmuno-Assay (ELISA), einen Radioimmuno-Assay (RIA), einen Western Blot Assay oder einen Slot-Blot-Assay. Für eine Übersicht über die allgemeinen Immunoassays wird auch auf "Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology", Band 37 (Asai, Herausgeber 1993); Basic and Clinical Immunology (Stits & Terr, Herausgeber, 7. Auflage 1991); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), verwiesen.

[0108] Im Allgemeinen kann eine von einem Patienten erhaltene Probe mit dem Antikörper kontaktiert werden, der sich spezifisch an den Marker bindet. Gegebenenfalls kann der Antikörper an einem festen Träger befestigt werden, um das Waschen und anschließende Isolieren des Komplexes vor dem Kontaktieren des Antikörpers mit einer Probe zu erleichtern. Beispiele von festen Trägern umfassen Glas oder Kunststoff in der Form von beispielsweise einer Mikrotiterplatte, eines Stifts, einer Perle oder einer Mikroperle. Antikörper können auch an einem Sondensubstrat oder einer ProteinChip[®]-Anordnung, die vorstehend beschrieben sind, angeheftet werden. Die Probe ist vorzugsweise eine biologische Fluidprobe, die einem Patienten entnommen wird. Beispiele von biologischen Fluidproben umfassen Blut, Serum, Urin, Samen, Samenfluid, Samenplasma oder Gewebeextrakte. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das biologische Fluid Samenplasma. Die Probe kann vor dem Kontaktieren der Probe mit dem Antikörper mit einem geeigneten Eluierungsmittel verdünnt werden.

[0109] Nach Inkubieren der Probe mit Antikörpern, wird die Mischung gewaschen, und der gebildete Antikörper-Marker-Komplex kann nachgewiesen werden. Dies kann durch Inkubieren der gewaschenen Mischung mit einem Nachweisreagenz bewirkt werden. Dieses Nachweisreagenz kann z.B. ein zweiter Antikörper sein, der mit einer nachweisbaren Markierung markiert ist. Beispielhafte nachweisbare Markierungen umfassen Magnetperlen (z.B. DYNABEADS[™]), fluoreszierende Farbstoffe, radioaktive Markierungen, Enzyme (z.B. Meerrettichperoxid, alkalische Phosphatase und andere, die allgemein bei einem ELISA verwendet werden) und kolorimetrische Markierungen wie kolloidales Gold oder gefärbte Glas- oder Kunststoffperlen. Alternativ kann der Marker in der Probe unter Verwendung eines indirekten Assays nachgewiesen werden, bei dem beispielsweise ein zweiter markierter Antikörper verwendet wird, um den für den gebundenen Marker spezifischen Antikörper nachzuweisen und/oder in einem Konkurrenz- oder Inhibierungs-Assay, bei dem beispielsweise ein monoclonaler Antikörper, der sich an ein bestimmtes Epitop des Markers bindet, gleichzeitig mit der Mischung inkubiert wird.

[0110] Während der Assays können Inkubierungs- und/oder Waschschrte nach jeder Kombination von Reagenzien erforderlich sein. Die Inkubierungsschritte können von 5 Sekunden bis zu mehreren Stunden, vorzugsweise von 5 Minuten bis zu etwa 24 Stunden, schwanken. Die Inkubierungszeit hängt jedoch von dem Assay-Format, dem Marker, dem Volumen der Lösung, den Konzentrationen und dergleichen ab. Üblicherweise werden die Assays bei Umgebungstemperatur durchgeführt, obgleich sie in einem Bereich von Temperaturen wie 10°C bis 40°C durchgeführt werden können.

[0111] Immunoassays können verwendet werden, um das Vorhandensein oder Fehlen eines Markers in einer Probe sowie die Menge eines Markers in einer Probe zu bestimmen. Zunächst kann eine Testmenge eines Markers in einer Probe unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Immunoassay-Verfahren nachgewiesen werden. Wenn ein Marker in der Probe vorhanden ist, bildet er einen Antikörper-Marker-Komplex mit einem Antikörper, der sich unter geeigneten, vorstehend beschriebenen Inkubierungsbedingungen spezifisch mit dem Marker bindet. Die Menge eines Antikörper-Marker-Komplexes kann durch einen Vergleich mit einem Standard bestimmt werden. Ein Standard kann z.B. eine bekannte Verbindung oder ein anderes Protein sein,

von dem bekannt ist, dass es in einer Probe vorhanden ist. Wie vorstehend angegeben, muss die Testmenge des Markers nicht in absoluten Einheiten gemessen werden, so lange die Einheit der Messung mit einer Kontrolle verglichen werden kann.

[0112] Die Verfahren zur Nachweis dieser Marker in einer Probe haben viele Anwendungen. Beispielsweise kann bzw. können ein oder mehrere Marker gemessen werden, um bei der Diagnose oder Prognose von Prostatakrebs zu helfen. Bei einem anderen Beispiel können die Verfahren für die Nachweis von Markern verwendet werden, um das Ansprechen eines Patienten auf die Krebsbehandlung zu überwachen. Bei einem weiteren Beispiel können die Verfahren für die Nachweis von Markern für die Durchführung von Assays mit Bezug auf Verbindungen und zur Identifizierung derselben verwendet werden, die die Exprimierung dieser Marker in vivo oder in vitro modulieren.

II. Verfahren zur Diagnose von Prostatakrebs unter Verwendung von Testmengen von Markern

[0113] Die Erfindung, wie hier definiert, stellt Verfahren zur Unterstützung einer Prostatakrebsdiagnose unter Verwendung einer Vielzahl von Markern zur Verfügung, die differentiell in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines Patienten, der ein BPH-Patient ist, vorhanden sind. Jede Kombination von Markern, die vorstehend beschrieben ist, kann verwendet werden, um bei der Diagnose von Prostatakrebs zu helfen. Im Vergleich zu den gegenwärtig verfügbaren Prostatakrebstests stellen die vorliegenden Verfahren einen schnellen und einfachen Weg zur Verfügung, um zu unterscheiden, ob ein Patient an Prostatakrebs oder BPH leidet und hilft so bei der Diagnose von Prostatakrebs. Die Verfahren umfassen: (a) das Bestimmen einer Testmenge eines Markers in einer Probe eines Patienten; und (b) das Bestimmen, ob die Testmenge eine diagnostische Menge ist, die einer Prostatakrebsdiagnose entspricht.

[0114] In Schritt (a) wird eine Testmenge eines Markers in einer Probe von einem Patienten bestimmt. Alle geeigneten Proben können von einem Patienten erhalten werden. Vorzugsweise ist eine Probe eine biologische Fluidprobe, die einem Patienten, der getestet wird, entnommen wird. Beispiele biologischer Fluidproben umfassen Blut, Serum, Urin, Samen, Samenfluid, Samenplasma oder Gewebeextrakte. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das biologische Fluid Samenplasma, da Samenplasma ein Körperfluid ist, das physisch der Prostata und anderem Gewebe nahe ist, das zuerst durch Krebszellen angegriffen wird. So enthält Samenplasma wahrscheinlich Proteine, die für Prostatakrebs charakteristisch sind, oder Proteine, die aufwärts geregelt oder abwärts geregelt sind. Des weiteren erfordert das Testen einer Samenplasmaprobe kein invasives Verfahren wie das Einführen einer Nadel in einen Patienten.

[0115] Nachdem eine Probe erhalten worden ist, kann jedes geeignete Verfahren zur Bestimmung einer Testmenge eines Markers in einer Probe von einem Patienten, der getestet wird, verwendet werden. Beispielsweise kann eine Gasphasenionenspektrometrie oder ein Immunoassay verwendet werden.

[0116] Massenspektrometrie wird verwendet, um die Testmenge von Markern in einer Probe eines Patienten zu bestimmen. Zunächst kann bzw. können ein oder mehrere Marker mittels Gasphasenionenspektrometrie unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Verfahren nachgewiesen werden. Nachdem der Marker mittels eines Gasphasenionenspektrometers nachgewiesen worden ist, kann die Testmenge des Markers bestimmt werden. Beispielsweise wird ein Signal bei dem Molekulargewicht des Markers, der von Interesse ist, angezeigt. Die Menge des Markers in einer Probe, die getestet wird, kann auf der Grundlage der Stärke oder Größe des angezeigten Signals bestimmt werden. Es liegt auf der Hand, dass die Testmenge des Markers in einer Probe nicht in absoluten Einheiten gemessen werden muss, sondern in relativen Einheiten gemessen werden kann, so lange sie qualitativ oder quantitativ mit einer Kontrollmenge eines Markers verglichen werden kann. Beispielsweise kann wie vorstehend beschrieben die Menge des nachgewiesenen Markers als relative Intensität auf der Grundlage des Hintergrundrauschens angezeigt werden. Vorzugsweise werden die Testmenge und die Kontrollmenge der Marker unter den gleichen Bedingungen gemessen.

[0117] Falls gewünscht, kann die absolute Menge eines Markers mittels Kalibrierung bestimmt werden. Beispielsweise kann ein gereinigter Marker wie basisches Samenprotein in sich erhöhenden Mengen unterschiedlichen Tupfen der Adsorptionsmittel auf der Probenoberfläche zugegeben werden. Dann können Spitzen von jedem Tupfen erhalten werden und auf einer graphischen Darstellung gegenüber der Konzentration des basischen Samenproteins an jedem Tupfen aufgetragen werden. Aus dem Auftragen der Spitzenintensität gegenüber der Konzentration kann die absolute Menge eines Markers in jeder Probe, die getestet wird, bestimmt werden.

[0118] Ebenfalls offenbart wird ein Immunoassay, der zur Bestimmung einer Testmenge eines Markers in ei-

ner Probe von einem Patienten verwendet werden kann. Zunächst kann eine Testmenge eines Markers in einer Probe unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Immuno-Assay-Verfahren nachgewiesen werden. Falls ein Marker in der Probe vorhanden ist, bildet er einen Antikörper-Marker-Komplex mit einem Antikörper, der sich spezifisch an den Marker unter den vorstehend beschriebenen geeigneten Inkubierungsbedingungen bindet. Die Menge eines Antikörper-Marker-Komplexes kann durch Vergleichen mit einem Standard bestimmt werden. Wie vorstehend angegeben, muss die Testmenge des Markers nicht in absoluten Einheiten gemessen werden so lange die Einheit der Messung mit einer Kontrollmenge verglichen werden kann.

[0119] Nachdem eine Testmenge des Markers unter Verwendung eines der beiden Verfahren bestimmt worden ist, kann basierend auf der Testmenge dann bestimmt werden, ob ein Patient an Prostatakrebs leidet. Diese Bestimmung kann mittels geeigneter Verfahren durchgeführt werden. Beispielsweise kann die Testmenge mit einer Kontrollmenge verglichen werden, die ein Wert oder ein Bereich von Werten sein kann, der wie folgt bestimmt wird.

[0120] Die Kontrollmenge ist eine Menge von Markern, die in vergleichbaren Proben aus BPH-Patienten vorhanden ist. Die Kontrollmenge wird unter den gleichen oder im Wesentlichen gleichen experimentellen Bedingungen wie beim Messen der Testmenge gemessen. Beispielsweise wird dann, wenn eine Testprobe aus dem Samenplasma eines Patienten erhalten wird und ein Marker unter Verwendung einer bestimmten Sonde nachgewiesen wird, die Kontrollmenge der Marker vorzugsweise aus einer Samenplasmaprobe eines BPH-Patienten unter Verwendung der gleichen Sonde bestimmt. Es wird bevorzugt, dass die Kontrollmenge der Marker auf der Grundlage einer beträchtlichen Anzahl von Proben von Patienten bestimmt wird, die nicht an Prostatakrebs leiden (BPH-Patienten), so dass sie Änderungen der Markermengen in dieser Population widerspiegelt. Wenn die Testmenge der Marker im Vergleich zur Kontrollmenge des Markers beträchtlich erhöht ist, von der bekannt ist, dass sie bei Proben von Prostatapatienten beträchtlich erhöht ist (z.B. 5753 Da), dann kann dies ein positives Anzeichen dafür sein, dass ein Patient, der getestet wird, an Prostatakrebs leidet. Wenn die Testmenge beispielsweise um das 1,5-fache, vorzugsweise das 2-fache, stärker bevorzugt das 5-fache, am stärksten bevorzugt das 10-fache im Vergleich zur Kontrollmenge erhöht ist, dann ist die Testmenge eine diagnostische Menge, die einer Diagnose von Prostatakrebs entspricht. Das Gegenteil würde auf Marker zutreffen, von denen bekannt ist, dass sie in Proben von BPH-Patienten höher als bei Patienten mit Prostatakrebs sind (z.B. 3600 Da).

[0121] Eine Kontrollmenge kann eine Menge eines Markers sein, die in vergleichbaren Proben von einem Patienten mit Prostatakrebs vorhanden ist. Wiederum ist es bevorzugt, dass die Kontrollmenge eines Markers auf der Grundlage einer beträchtlichen Anzahl von Proben bestimmt wird, die Patienten mit Prostatakrebs entnommen wird, so dass sie Änderungen der Markermengen in dieser Population widerspiegelt. Wenn die Testmenge des Markers etwa gleich der Kontrollmenge des Markers ist, dann kann dies ein positives Anzeichen dafür sein, dass ein Patient, der getestet wird, an Prostatakrebs leidet.

[0122] Eine Kontrollmenge kann eine Menge eines Markers sein, der in vergleichbaren Proben einer normalen Person vorhanden ist (d.h. von der bekannt ist, dass sie weder an Prostatakrebs noch an BPH leidet). Es ist bevorzugt, dass die Kontrollmenge des Markers auf der Grundlage einer beträchtlichen Anzahl von Proben, die normalen Personen entnommen wurden, bestimmt wird, so dass sie Änderungen der Markermengen in dieser Population widerspiegelt. Wenn die Kontrollmenge eines bestimmten Markers (z.B. 5753 Da) beträchtlich geringer ist als die Menge des gleichen Markers, der in vergleichbaren Proben von Patienten, die an Prostatakrebs leiden, vorhanden ist, dann kann dieser Marker verwendet werden, um in einem einzigen Test Prostatakrebs zu diagnostizieren und BPH auszuschließen. In einem solchen Fall kann es, wenn die Testmenge des Markers im Vergleich zur Kontrollmenge des Markers beträchtlich erhöht ist, ein positives Anzeichen dafür sein, dass ein Patient, der getestet wird, an Prostatakrebs leidet. Beispielsweise ist dann, wenn die Testmenge um das 1,5-fache, vorzugsweise das 2-fache, stärker bevorzugt das 5-fache, am stärksten bevorzugt das 10-fache im Vergleich zur Kontrollmenge erhöht ist, die Testmenge eine diagnostische Menge, die einer Diagnose von Prostatakrebs entspricht. Das Gegenteil würde auf Marker zutreffen, von denen bekannt ist, dass sie in Proben von BPH-Patienten höher als bei Patienten mit Prostatakrebs sind (z.B. 3600 Da).

[0123] Eine Veranschaulichung eines Schritts zur Bestimmung, ob die Testmenge eine diagnostische Menge für Prostatakrebs ist, kann unter Bezugnahme auf **Fig. 3(a)** und **3(b)** beschrieben werden. **Fig. 3(a)** ist ein beispielhaftes Massenspektrum einer Kontrolle, die Markermengen in Proben von BPH-Patienten darstellt, die unter Verwendung von SCX1 ProteinChip[®] gemessen werden, die einen Marker mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 5753 Da (basisches Samenprotein) nachweisen kann. Wie in **Fig. 3(a)** gezeigt, hat die Spitze A' einen Wert von weniger als etwa 0,1 bei einem Molekulargewicht von 5753 Da und entspricht der Menge des basischen Samenproteins bei einem Patienten mit BPH. **Fig. 3(b)** ist ein Massenspektrum einer Testprobe,

die einem Patienten entnommen wurde. Wie in **Fig. 3(b)** gezeigt, ist die Spitze A" bei dem gleichen Molekulargewicht wie die Spitze A' in **Fig. 3(a)** und entspricht der Testmenge des basischen Samenproteins in der Testprobe. Im Vergleich zu der in **Fig. 3(a)** gezeigten Spitze A', die die Kontrollmenge des Markers bei BPH-Patienten darstellt, ist die in **Fig. 3(b)** gezeigte Spitze A" beträchtlich höher und hat einen Wert von etwa 52. Da die Spitze A", die die Testmenge des Markers in der Probe des Patienten darstellt, beträchtlich höher ist als die Spitze A', die den Kontrollwert darstellt, der aus der Probe eines BPH-Patienten erhalten wurde, kann bestimmt werden, dass die Probe, die zur Erzeugung eines Massenspektrums in **Fig. 3(b)** verwendet wurde, einem Patienten mit Prostatakrebs entnommen wurde.

[0124] Durch Massenspektrometrie erzeugte Daten können dann mittels einer Computersoftware analysiert werden. Die Software kann einen Code umfassen, der Signale von dem Massenspektrometer in eine computerlesbare Form umwandelt. Die Software kann auch einen Code umfassen, der einen Algorithmus auf die Analyse des Signals anwendet, um zu bestimmen, ob das Signal einer "Spitze" in dem Signal einem erfindungsgemäßen Marker oder anderen brauchbaren Markern entspricht. Die Software kann auch einen Code umfassen, der einen Algorithmus durchführt, der das Signal von einer Testprobe mit einer typischen Signalcharakteristik von "normal" und Prostatakrebs vergleicht und die enge Übereinstimmung zwischen den zwei Signalen bestimmt. Die Software kann auch einen Code umfassen, der anzeigt, welche Testprobe am nächsten ist, um dadurch eine wahrscheinliche Diagnose zur Verfügung zu stellen.

III. Kits

[0125] Es werden auch Kits beschrieben, die die Diagnose von Prostatakrebs unterstützen sollen, wobei die Kits verwendet werden können, um die erfindungsgemäßen Marker nachzuweisen. Beispielsweise können die Kits verwendet werden, um einen beliebigen oder eine Kombination von Markern, die vorstehend beschrieben sind, nachzuweisen, wobei die Marker differentiell in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines BPH-Patienten vorhanden sind. Die beschriebenen Kits haben viele Anwendungen. Beispielsweise können die Kits verwendet werden, um zu unterscheiden, ob ein Patient an Prostatakrebs oder BPH leidet, was somit bei der Diagnose von Prostatakrebs hilft. Bei einem weiteren Beispiel können die Kits verwendet werden, um Verbindungen zu identifizieren, die die Expression der Marker in in vitro Prostatazellen oder in vivo Tiermodellen mit Bezug auf Prostatakrebs modulieren.

[0126] Ein Kit kann umfassen: (a) ein Substrat, das darauf ein Adsorptionsmittel aufweist, wobei das Adsorptionsmittel zum Binden eines Markers geeignet ist, und (b) eine Waschlösung oder Anweisungen zur Herstellung einer Waschlösung, wobei die Kombination aus Adsorptionsmittel und der Waschlösung den Nachweis des Markers unter Verwendung von Gasphasenionenspektrometrie gestattet. Solche Kits können aus den vorstehend beschriebenen Materialien hergestellt werden, und die vorstehend angegebene Erörterung dieser Materialien (z.B. Sondensubstrate, Adsorptionsmittel, Waschlösungen usw.) ist in ihrer Gesamtheit auf diesen Abschnitt anwendbar und braucht nicht wiederholt zu werden.

[0127] Das Kit kann ein erstes Substrat, das ein Adsorptionsmittel darauf aufweist (z.B. ein mit einem Adsorptionsmittel funktionalisiertes Teilchen) und ein zweites Substrat umfassen, auf dem das erste Substrat angeordnet werden kann, um eine Sonde zu bilden, die entferntbar in einen Gasphasenionenspektrometer einsetzbar ist. Bei anderen Ausführungsformen kann das Kit ein einziges Substrat umfassen, das die Form einer entferntbar einsetzbaren Sonde mit Adsorptionsmitteln auf dem Substrat aufweist.

[0128] Gegebenenfalls kann das Kit des weiteren Anweisungen für geeignete Betriebsparameter in der Form eines Etiketts oder einer separaten Einlage aufweisen. Beispielsweise kann das Kit Standardanweisungen aufweisen, die einen Verbraucher darüber informieren, wie die Sonde zu waschen ist, nachdem eine Probe des Samenplasmas auf der Sonde kontaktiert wurde.

[0129] Ein Kit kann umfassen (a) einen Antikörper, der sich spezifisch an einen Marker bindet; und (b) ein Nachweisreagenz. Solche Kits können aus den vorstehend beschriebenen Materialien hergestellt werden, und die vorstehend angegebene Erörterung bezüglich der Materialien (z.B. Antikörper, Nachweisreagentien, immobilisierte Träger usw.) ist in ihrer Gesamtheit auf diesen Abschnitt anwendbar und braucht nicht wiederholt zu werden.

[0130] Das Kit kann gegebenenfalls des weiteren Standard- oder Kontrollinformationen umfassen, so dass die Testprobe mit dem Kontrollinformationsstandard verglichen werden kann, um zu bestimmen, ob die Testmenge eines in einer Probe nachgewiesenen Markers eine diagnostische Menge ist, die einer Diagnose von Prostatakrebs entspricht.

[0131] Die folgenden Beispiele werden zur Veranschaulichung und nicht als Einschränkung angegeben.

A. Identifizierung von Markern unter Verwendung der Ni(II) ProteinChip®-Anordnung

[0132] Die Ni(II) ProteinChip®-Anordnung wurde wie folgt hergestellt: Die Oberfläche eines Metallsubstrats wurde durch Ätzen mittels eines Lasers (z.B. Quantred Company, Galaxy Model, ND-YAG Laser, unter Verwendung einer Emissionslinie von 1,064 nm, einer Energie von 30-35 Watt, bei einer Laserpunktgröße von 0,005 Zoll und einem Abstand von der Laserquelle zur Oberfläche von 12-14 Zoll; mit einer Abtastrate von etwa 25 pro mm pro Sekunde) konditioniert. Dann wurde die geätzte Oberfläche des Metallsubstrats mit einer Glasbeschichtung versehen. 5-Methacylamido-2-(N,N-biscarboxymethylamino)-pentansäure (7,5 Gew.-%), Acryloyltri(hydroxymethyl)methylamin (7,5 Gew.-%) und N,N'-Methylenbisacrylamid (0,4 Gew.-%) wurden unter Verwendung von (-)-Riboflavin (0,02 Gew.-%) als Photoinitiator photopolymerisiert. Die Monomerlösung wurde auf ein rau geätztes, mit Glas beschichtetes Substrat (0,4 µl, zweimal) abgeschieden und wurde 5 Minuten mit einem Belichtungssystem im nahe UV-Bereich (Hg Kurzlichtbogen, 20 mW/cm² bei 365 nm) bestrahlt. Die Oberfläche wurde mit einer Lösung aus Natriumchlorid (1 M) gewaschen und dann zweimal mit entionisiertem Wasser gewaschen. Die Oberfläche wurde mit einer Lösung aus NiSO₄ (50 mM, 10 ml/Tupfen) behandelt und in einem Hochfrequenzmischer 10 Minuten gemischt. Nach Entfernen der NiSO₄ Lösung wurde der Behandlungsprozess wiederholt. Schließlich wurde die Oberfläche mit einem Strom von entionisiertem Wasser (15 Sek./Chip) gewaschen, wodurch die Ni(II) ProteinChip®-Anordnung geschaffen wurde.

[0133] Samenplasmaproben wurden einem Patienten mit Prostatakrebs und einem Patienten mit BPH entnommen. Von jeder Probe werden 2 µl Samenplasma, 3 µl 9,5 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 100 mM TrisHCl, pH 9,0, zugegeben. Die Mischung wurde 5 Minuten in der Kälte verwirbelt. Diese Mischung wurde weiter 1/10 in 50 mM HEPES, pH 7,4, verdünnt. Die verdünnte Probenlösung wurde einem Tupfen Adsorptionsmittel auf der Ni(II)Protein Chip®-Anordnung (CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, CA) zugegeben. Die Ni(II) ProteinChip®-Anordnung umfasst als Adsorptionsmittel ein mittels Nitrolotriessigsäuregruppen, die mit dem Hydrogelgerüst kovalent verbunden sind, cheliertes Nickelmetallion. Die Probenlösung wurde 15 Minuten unter Schütteln in einer feuchten Kammer inkubiert. Die ProteinChip®-Anordnung wurde mit einer mit Phosphat gepufferten, physiologischen Kochsalzlösung, pH 7,2, gewaschen. 0,3 µl CHCA (gesättigte Lösung in Acetonitril, Trifluoressigsäure) wurde dem die Probe enthaltenden Tupfen zugeben und die ProteinChip®-Anordnung wurde in das Protein Biology System II Massenspektrometer (CIPHERGEN Biosystems, Inc.) eingelesen.

[0134] [Fig. 4](#) veranschaulicht die Ergebnisse. Das obere Feld zeigt die Proteine aus der Probe des BPH-Patienten, die von der Ni(II) Protein Chip®-Anordnung in dem Gelansichtsformat desorbiert werden, in dem jedes nachgewiesene Protein als Bande dargestellt ist, das einem bestimmten Molekulargewicht entspricht. Das mittlere Feld zeigt die Proteine aus der Probe des Patienten mit Prostatakrebs, die von der Ni(II) ProteinChip®-Anordnung in dem Gelansichtsformat desorbiert werden. Das untere Feld zeigt eine Differenzkarte zwischen den zwei Proben. Die vertikalen Linien oberhalb von Null stellen Proteine dar, die in einem erhöhten Niveau in der Probe von dem Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu der Probe von dem BPH-Patienten vorhanden sind. Im Gegensatz hierzu stellen die vertikalen Linien unterhalb von Null Proteine dar, die in einem erhöhten Niveau in der Probe von dem BPH-Patienten im Vergleich zu der Probe von dem Patienten mit Prostatakrebs vorhanden sind. Je höher die vertikale Linie ist, desto größer ist die Differenz in der Menge des Proteins, die zwischen den zwei Proben gefunden wird.

[0135] Wie in [Fig. 4](#) gezeigt, wurde gefunden, dass in der Probe von dem Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu der Probe von dem BPH-Patienten eine Reihe von Proteinen in reichlichen Mengen gefunden wurde. Beispielsweise wurde festgestellt, dass Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2776 Da, 4423 Da, 4480 Da, 5753 Da, 6098 Da, 6270 Da, 6998 Da, 8030 Da und 8714 Da in einer Probe von einem Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu einer Probe von einem BPH-Patienten sehr reichlich vorhanden waren. Des weiteren wurde festgestellt, dass eine Reihe von Proteinen in den Proben von dem BPH-Patienten im Vergleich zu der Probe von dem Patienten mit Prostatakrebs sehr reichlich vorhanden waren. Beispielsweise wurde festgestellt, dass Proteine mit einem scheinbare Molekulargewicht von etwa 2276 Da, 2905 Da, 3038 Da, 3600 Da, 3835 Da, 3933 Da und 4175 Da in einer Probe von dem BPH-Patienten im Vergleich zu einer Probe von einem Patienten mit Prostatakrebs sehr reichlich vorhanden waren.

B. Identifizierung von Markern unter Verwendung einer H4 ProteinChip®-Anordnung

[0136] Die H4 ProteinChip®-Anordnung wurde aus mit SiO₂ beschichteten Aluminiumsubstraten hergestellt.

Bei diesem Verfahren wurden die Aluminiumsubstrate einer 2%igen (Vol./Vol.) Lösung von 3-A-Aminopropyltriethoxysilan in Ethylalkohol eine Stunde ausgesetzt. Nach dem Spülen der Substratoberfläche mit Ethanol wurden die Substrate getrocknet (120°C, 20 Min.). Die aminosilanierten Aluminiumsubstrate wurden dann mit einer Lösung aus Poly(octadecen-alt-maleinsäureanhydrid) in Ethylenglycoldimethylether und Triethylamin 4 Stunden umgesetzt. Die aktivierten Aluminiumsubstrate wurden dann mit Ethylenglycoldimethylether gespült und luftgetrocknet, wodurch eine H4 ProteinChip®-Anordnung geschaffen wurde.

[0137] Samenplasma Proben wurden unter Verwendung von im Wesentlichen den gleichen Lösungen und Verfahren, die vorstehend beschrieben sind, hergestellt. Die verdünnte Probenlösung wurde einem Tupfen des Adsorptionsmittels auf der H4 ProteinChip®-Anordnung (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA) zugegeben. Die H4 ProteinChip®-Anordnung umfasst als Adsorptionsmittel eine aliphatische hydrophobe (C₁₆) Kohlenwasserstoffoberfläche. Die Mischung wurde 15 Minuten unter Schütteln in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Probenlösung wurde an Ort und Stelle luftgetrocknet. Die ProteinChip®-Anordnung wurde mit Wasser gewaschen. 0,3 µl CHCA (gesättigte Lösung in Acetonitril, Trifluoressigsäure) wurde dem Tupfen, der die Probe enthielt, zugegeben und die ProteinChip®-Anordnung wurde in ein Protein Biology System II™ Massenspektrometer (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA) eingelesen.

[0138] [Fig. 5](#) veranschaulicht die Ergebnisse. Das obere Feld zeigt die Proteine von der Probe des BPH-Patienten, die von der H4 ProteinChip®-Anordnung in dem Gelansichtsformat desorbiert wurden, in der jedes nachgewiesene Protein als Bande dargestellt wird, entsprechend einem bestimmten Molekulargewicht. Das mittlere Feld zeigt die Proteine von der Probe des Patienten mit Prostatakrebs, die von der H4 ProteinChip®-Anordnung in dem Gelansichtsformat desorbiert wurden. Das untere Feld zeigt eine Differenzkarte zwischen zwei Proben. Die vertikalen Linien oberhalb von Null stellen Proteine dar, die in einem hohen Niveau in der Probe von dem Patienten mit Prostatakrebs vorhanden sind, im Vergleich zu der Probe von dem BPH-Patienten.

[0139] Wie in [Fig. 5](#) gezeigt, wurde festgestellt, dass eine Reihe von Proteinen in der Probe von dem Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu der Probe von dem BPH-Patienten sehr reichlich vorhanden war. Beispielsweise wurde festgestellt, dass Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2776 Da, 5753 Da, 6098 Da, 6270 Da, 6998 Da, 7843 Da, 8030 Da und 8240 Da in der Probe von dem Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu der Probe von dem BPH-Patienten sehr reichlich vorhanden waren. Es wurde festgestellt, dass Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2776 Da, 6098 Da, 6270 Da, 6998 Da und 8030 Da ebenfalls gebunden wurden und unter Verwendung der Ni(II) ProteinChip®-Anordnung nachgewiesen wurden.

[0140] Des weiteren wurde festgestellt, dass eine Reihe von Proteinen in der Probe von BPH-Patienten im Vergleich zu der Probe des Patienten mit Prostatakrebs sehr reichlich vorhanden war. Beispielsweise wurde festgestellt, dass Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2276 Da, 2530 Da, 2905 Da, 3030 Da, 3224 Da, 3600 Da und 3915 Da in der Probe von dem Patienten mit Prostatakrebs im Vergleich zu der Probe von dem BPH-Patienten sehr reichlich vorhanden waren. Es ist ersichtlich, dass Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 2276 Da, 2905 Da und 3600 Da ebenfalls gebunden wurden und unter Verwendung der Ni(II) ProteinChip®-Anordnung nachgewiesen wurden.

C. Marker, die unter Verwendung der SCX1 ProteinChip®-Anordnung identifiziert werden

[0141] Die SCX1 ProteinChip®-Anordnung wurde aus mit SiO₂ beschichteten Aluminiumsubstraten hergestellt. Bei dem Verfahren wurde eine Suspension aus sulfonierten Polystyrolmikrokügelchen in destilliertem Wasser auf die Oberfläche des Chips (2 ml/Tupfen, zweimal) abgeschieden. Nach Lufttrocknen (Raumtemperatur, 5 Minuten), wurde die Oberfläche einmal mit 100 mM Ammoniumcitrat (pH 4,5), einmal mit 100 mM Ammoniumbicarbonat (pH 8,0) und einmal mit entionisiertem Wasser gewaschen. Der Chip wurde luftgetrocknet.

[0142] Samenplasma Proben wurden von einem Patienten mit Prostatakrebs und einem Patienten mit BPH erhalten. Von jeder Probe wurden 2 µl Samenplasma, 3 µl 9,5 M Harnstoff, 2% CHAPS, 100 mM TrisHCl, pH 9,0, zugegeben. Die Mischung wurde in der Kälte 5 Minuten verwirbelt. Diese Mischung wurde weiter 1/10 in 50 mM HEPES, pH 7,4 verdünnt. 4 µl aliquote Teile dieser verdünnten Lösung wurden einem Tupfen SCX1 ProteinChip®-Anordnung (Ciphergen Biosystems, Inc.) zugegeben und 15 Minuten unter Schütteln in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Probe wurde entfernt, und die ProteinChip®-Anordnung wurde mit 4 µl 50 mM HEPES zweimal gewaschen. 0,3 µl CHCA (gesättigte Lösung in Acetonitril, Trifluoressigsäure) wurden zugegeben und die ProteinChip®-Anordnung wurde in ein Protein Biology System II® Massenspektrometer (Ciphergen Biosystems, Inc.) eingelesen.

[0143] Die Ergebnisse sind in [Fig. 6](#) gezeigt. Das obere Feld zeigt die Proteine von der Probe des BPH-Patienten, die von dem SCX1 ProteinChip® desorbiert werden, in dem spektralen Ansichtsformat. Wie in [Fig. 6](#) gezeigt, wurde nur eine vernachlässigbare Menge (relative Intensität weniger als 0,1) von desorbiertem Protein bei einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 5753 Da beobachtet. Das untere Feld zeigt die Proteine von der Probe des Patienten mit Prostatakrebs, die von dem SCX1 ProteinChip® desorbiert wurden, in dem spektralen Ansichtsformat. Wie in [Fig. 6](#) gezeigt, war ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 5753 Da in einem hohen Niveau (relative Intensität etwa 52) in der Probe des Patienten mit Prostatakrebs vorhanden.

[0144] Dieses Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 5753 Da wurde anschließend mit zwei proteolytischen Enzymen, Trypsin und V8 Protease, peptidkartiert. Durch Abstimmen mit Proteinen in der SwissProt Datenbank wurde der Marker als basisches Samenprotein identifiziert, das ein proteolytisches Fragment ist, das durch die PSA-vermittelte Proteolyse von Semenogelin I erzeugt wird. Siehe [Fig. 1](#) mit Bezug auf die Aminosäuresequenz des basischen Samenproteins.

[0145] Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren zur Unterstützung der Prostatakrebsdiagnose unter Verwendung von Markern zur Verfügung, die differentiell in Proben eines Patienten mit Prostatakrebs und eines Patienten, der nicht an Prostatakrebs leidet (z.B. eines Patienten mit gutartiger Prostatahyperplasie) vorhanden sind. Es wurden zwar spezifische Beispiele angegeben, doch die vorstehend angegebene Beschreibung ist veranschaulichend und nicht einschränkend.

SEQUENZAUFLISTUNG

<110> Yip, Tai-Tung
Yip, Christine
Wright Jr., George L.
Ciphergen Biosystems, Inc.
Eastern Virginia Medical School

<120> Prostatakrebs-Markerproteine

<130> 016866-003810PC

<140> WO PCT/US00/27682

<141> 2000-10-06

<150> US 60/158,422

<151> 1999-10-07

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220> Basisches Samenprotein, Peptidfragment Amino-

<223> säurepositionen 85-136 von Semenogelin I

<400> 1

His Asn Lys Gln Glu Gly Arg Asp His Asp Lys Ser Lys Gly His Phe
1 5 10 15

His Arg Val Val Ile His His Lys Gly Gly Lys Ala His Arg Gly Thr
20 25 30

Gln Asn Pro Ser Gln Asp Gln Gly Asn Ser Pro Ser Gly Lys Gly Ile
35 40 45

Ser Ser Gln Tyr
50

Patentansprüche

1. Verfahren zur Unterstützung einer Prostatakrebsdiagnose, wobei das Verfahren umfasst:
 - (i) Bestimmen einer Testmenge einer Vielzahl von Proteinmarkern in einer Probe aus einem Patienten durch Massenspektroskopie, wobei die Proteinmarker scheinbare Molekulargewichte von weniger als 10.000 Da aufweisen;
 - (ii) Vergleichen der Testmenge der Vielzahl von Proteinmarkern mit einem scheinbaren Molekulargewicht von weniger als 10.000 Da mit einer Menge einer Vielzahl von Proteinmarkern mit einem scheinbaren Molekulargewicht von weniger als 10.000 Da aus einer Kontrollprobe, wobei die Kontrollprobe aus einer gutartigen Prostatahyperplasie stammt; und
 - (iii) Bestimmen, ob die Testmenge eine diagnostische Menge ist, die einer Diagnose von Prostatakrebs gegenüber einer gutartigen Prostatahyperplasie entspricht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Probe ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus Blut, Serum, Urin, Samen, Samenflüssigkeit, Samenplasma und Gewebeextrakten.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren außerdem umfasst:
 - (a) Erzeugen von Daten auf der Probe mit dem Massenspektrometer, die die Intensität des Signals für Massen/Ladungs-Verhältnisse anzeigen;
 - (b) Umwandeln der Daten in eine computerlesbare Form; und
 - (c) Einsetzen eines Computers, um einen Algorithmus durchzuführen, wobei der Algorithmus die Passgenauigkeit zwischen den computerlesbaren Daten und den die Diagnose eines Prostatakrebses oder eine negative Diagnose anzeigenden Daten bestimmt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Probe Samenplasma ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Proteinmarker auf eine Sonde adsorbiert werden, die ein Adsorptionsmittel aus einem hydrophilen Polymer umfasst.
6. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Proteinmarker auf eine Sonde adsorbiert werden, die eine metallbindende Gruppe umfasst.
7. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem das Adsorptionsmittel eine hydrophobe Gruppe umfasst.
8. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem das Adsorptionsmittel eine kationische Gruppe umfasst.
9. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem das Adsorptionsmittel eine Metallionchelatbildende Gruppe umfasst.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

HNKQEGRDHDKSKGHHFHRVVIHHKGGKAHRTQNPSQDQGNPSGKGISSQY

FIG. 1.

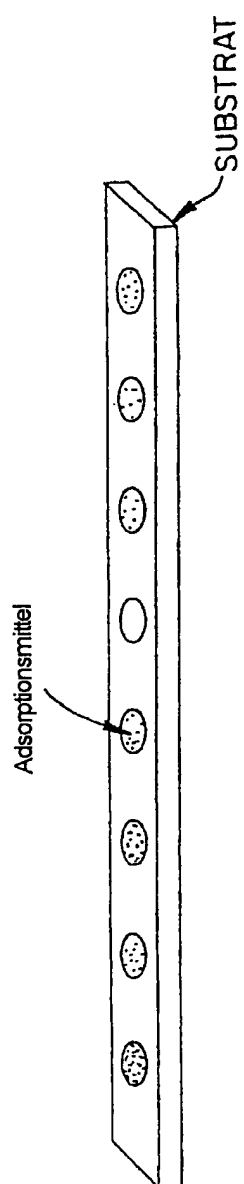


FIG. 2.

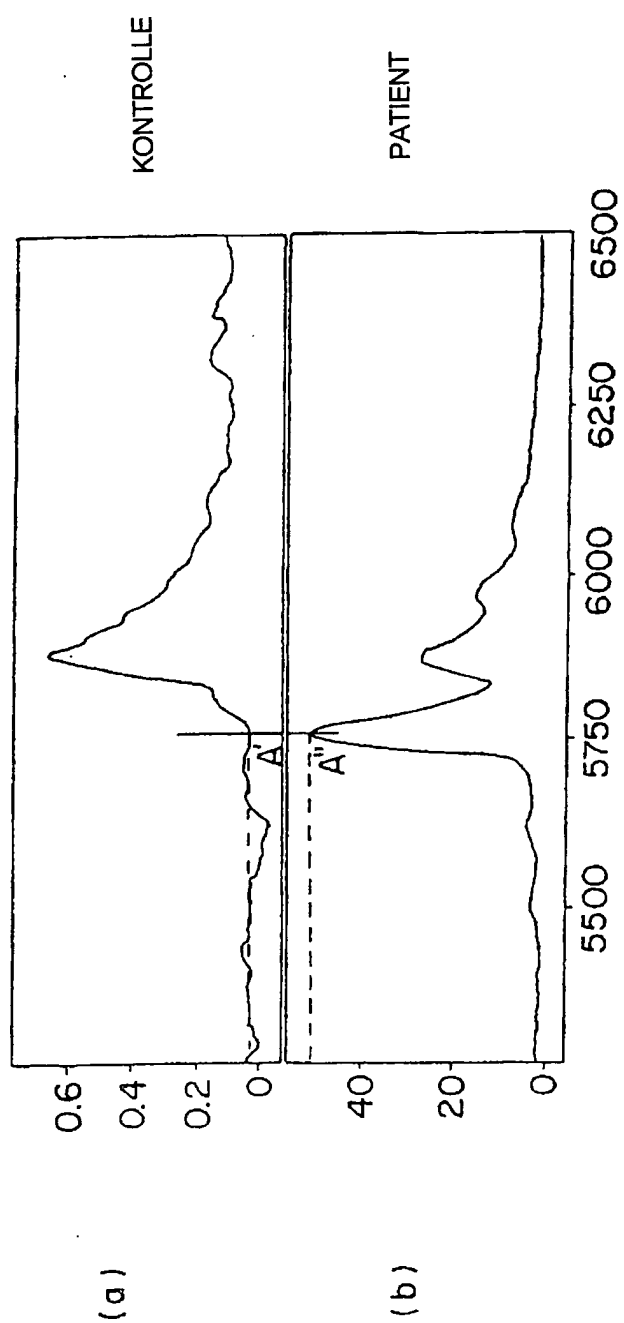


FIG. 3.

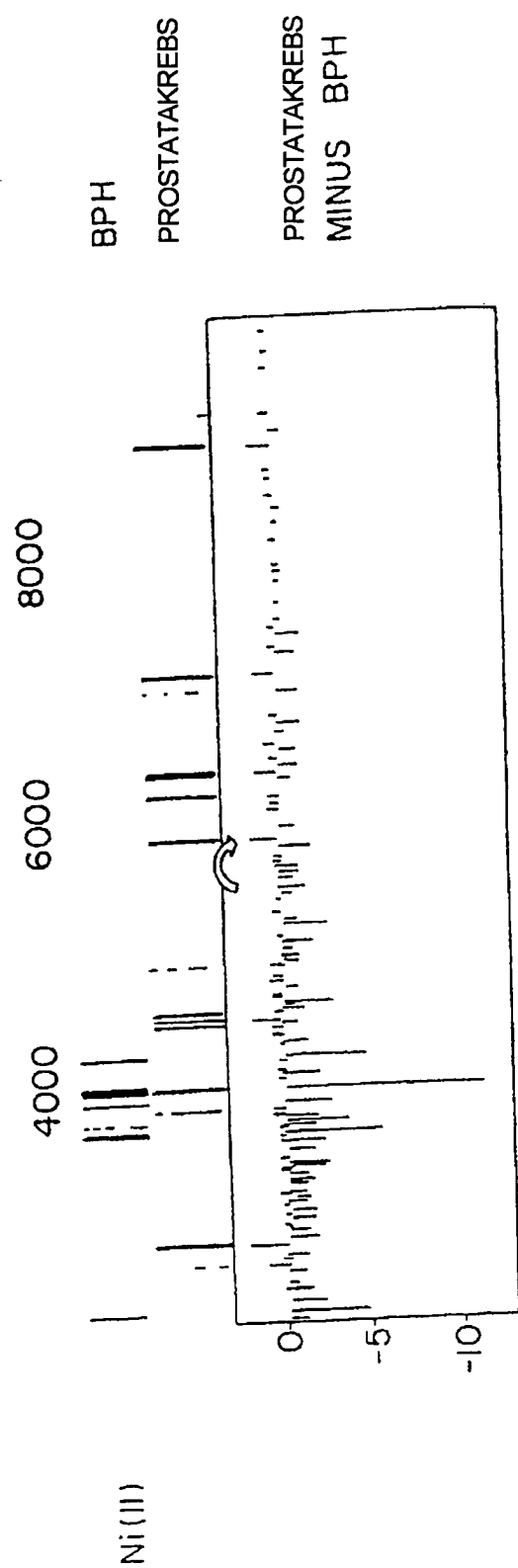


FIG. 4.

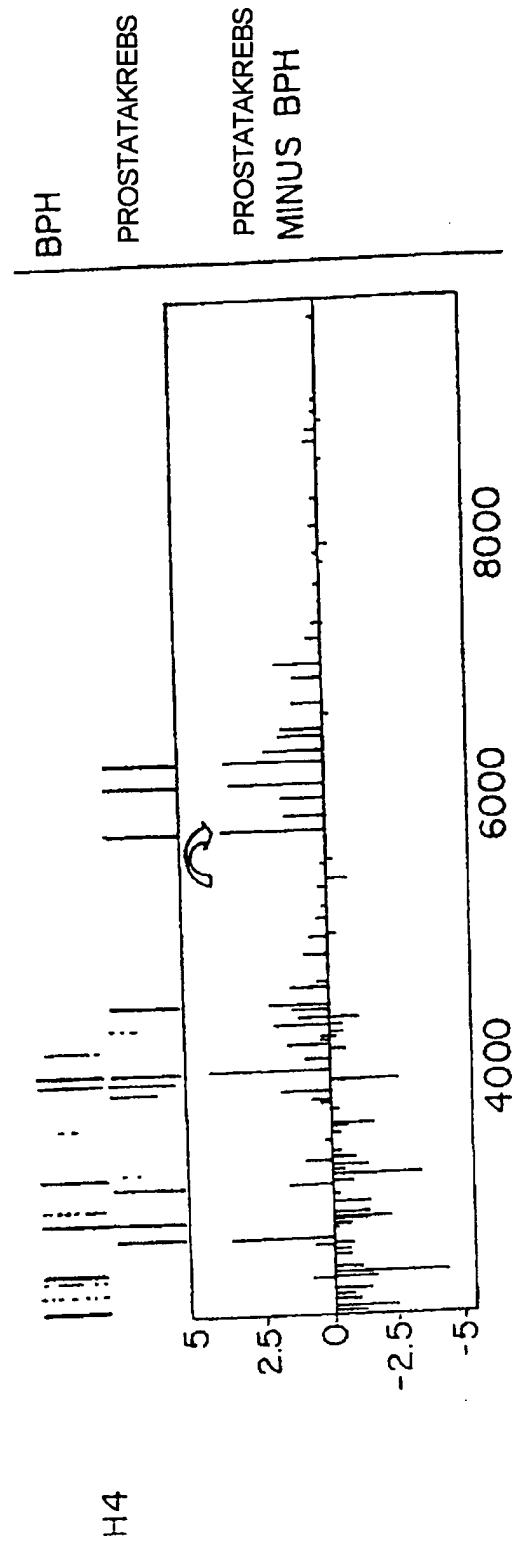


FIG. 5.

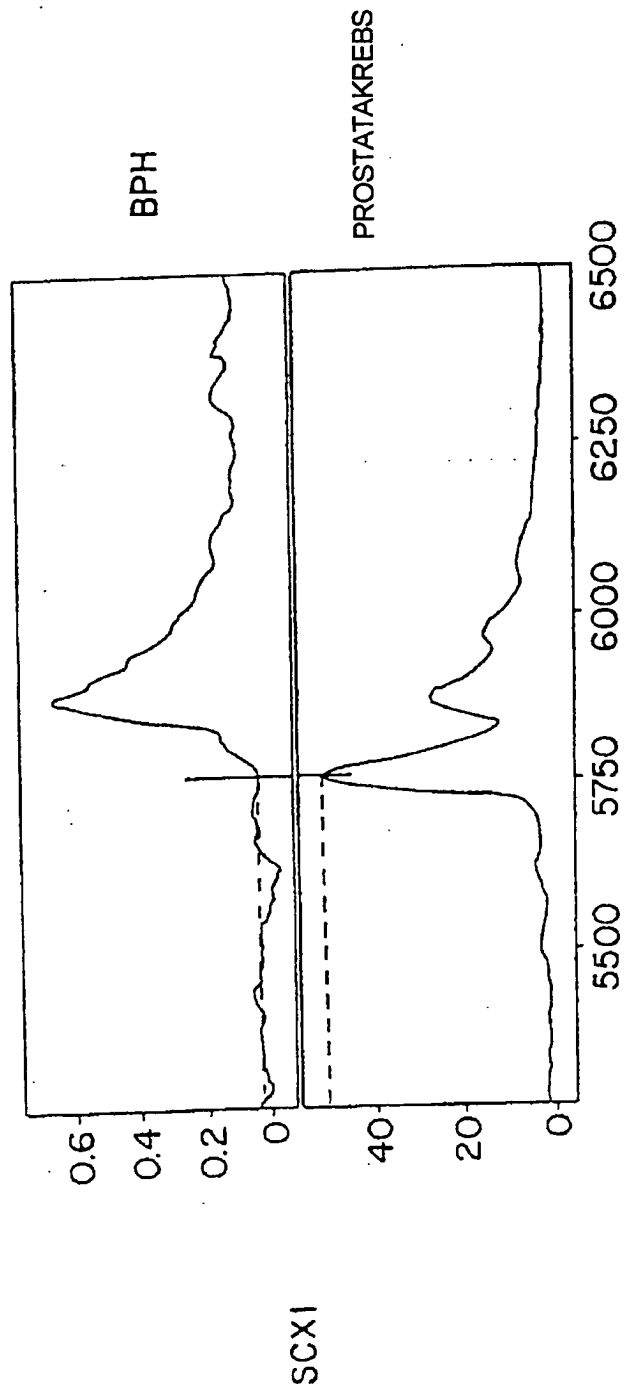


FIG. 6.