

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチドマーカ-がマーカ- 1 ないし 4 4 および 5 2 ないし 7 8 (頻度マーカ-) から選択される、試料中の少なくとも 3 種類のポリペプチドマーカ-の存在または非存在を測定する段階を含み、またはマーカ- 4 5 ないし 5 1 および 7 9 ないし 1 1 5 (振幅マーカ-) から選択される少なくとも一つのポリペプチドマーカ-の振幅を測定する段階を含み、分子量および泳動時間について下記の値によって特徴づけられ、試料が尿試料または精液試料である、前立腺がんの診断のための方法：

番号	質量[Da]	CE時間	番号	質量[Da]	CE時間
1	1579.7	26.4	27	1180.5	33.9
2	1991.9	17.1	28	2421.1	32.5
3	1955.9	24.8	29	4345.9	30.6
4	1140.5	21.4	30	2077.1	16.9
5	1677.3	7.4	31	1134.6	19.4
6	10753.1	13.6	32	1444.8	13.5
7	1412.6	22.1	33	1046.5	21.9
8	1636.8	27.2	34	1992.2	16.8
9	1946.9	28.4	35	4069.6	21.3
10	5887.6	25.1	36	1191.5	34.5
11	12407.9	22.2	37	1239.5	32.5
12	1186.6	17.4	38	2191.9	17.2
13	1240.6	23.3	39	1865.8	30.0
14	1326.6	24.8	40	1265.6	23.4
15	3802.1	30.1	41	1936.1	10.5
16	1749.9	19.4	42	911.3	31.9
17	2216.1	31.0	43	1494.7	26.4
18	1069.5	22.7	44	1209.6	22.5
19	1341.6	26.6	45	1193.3	34.2
20	1353.7	21.8	46	1235.4	34.3
21	1716.8	24.6	47	1390.5	35.0
22	2939.1	31.1	48	2292.1	23.7
23	3002.0	19.2	49	2736.3	17.1
24	1110.4	31.5	50	3385.5	21.0
25	1496.7	26.5	51	3945.2	21.4
26	1825.8	28.4			

10

20

30

番号	質量(Da)	CE時間[分]	番号	質量(Da)	CE時間[分]
52	1636.8	27.2	66	1878.9	15.3
53	1412.6	22.1	67	3593.4	14.5
54	1579.7	26.4	68	1236.7	13.3
55	1390.5	35.0	69	2736.3	17.1
56	1196.6	15.8	70	2973.4	20.0
57	11041.4	16.6	71	1134.6	19.4
58	2971.4	17.9	72	2191.9	17.2
59	3136.6	20.0	73	2205.1	25.1
60	4409.9	14.2	74	3959.7	14.0
61	1494.7	26.4	75	1749.9	19.4
62	1833.9	24.2	76	4069.6	21.3
63	2752.4	14.0	77	2816.3	24.7
64	3515.8	15.3	78	3435.8	15.0
65	1082.5	17.7			

番号	質量(Da)	CE時間[分]
79	973.26	35.44
80	1128.54	25.66
81	1173.58	37.47
82	1184.6	26.43
83	1290.39	30.85
84	1338.66	23.96
85	1428.45	36.73
86	1450.6	37.47
87	1460.71	19.83
88	1498.46	35.31
89	1526.76	23.54
90	1588.77	30.24
91	1675.77	29.23
92	1703.91	33.67
93	1808.87	23.72
94	1863.96	44.01
95	1867.79	33.29
96	1925.9	23.2
97	2036.97	31.53
98	2114.05	31.59
99	2196.11	33.16
100	2212.06	33.36
101	2257.95	36.02
102	2544.06	26.14
103	2599.21	28.05
104	2761.38	21.47
105	3334.17	31.01
106	3361.41	24.32
107	3426.43	27.73
108	3765.51	20.18
109	3864.56	33.82
110	3870.8	33.47
111	4252.03	28.77
112	6211.93	20.27
113	6650.86	25.55
114	6820.37	21.03
115	16918.24	19.8

10

20

30

40

【請求項2】

マーカー1から44および52から78の測定された存在または非存在の評価が下記の参照値を用いて実施される、請求項1に記載の方法：

番号	PCA群での頻度	対照群での頻度	番号	PCA群での頻度	対照群での頻度
1	1	0.25	23	0.25	0.78
2	0.88	0.22	24	0.13	0.67
3	1	0.35	25	0.13	0.67
4	1	0.43	26	0.13	0.67
5	0.63	0.06	27	0	0.55
6	0.88	0.33	28	0	0.55
7	0.75	0.22	29	0	0.55
8	0.63	0.1	30	0.13	0.69
9	0.75	0.22	31	0.25	0.82
10	1	0.49	32	0.13	0.71
11	0.75	0.24	33	0	0.59
12	0.38	0.88	34	0	0.59
13	0.25	0.76	35	0	0.59
14	0.38	0.88	36	0	0.61
15	0.38	0.88	37	0	0.61
16	0.13	0.65	38	0.25	0.86
17	0.13	0.65	39	0.13	0.75
18	0	0.53	40	0.25	0.9
19	0	0.53	41	0	0.65
20	0.25	0.78	42	0	0.69
21	0.25	0.78	43	0.13	0.82
22	0.38	0.9	44	0	0.71

10

20

番号	質量(Da)	CE時間[分]	差	PCA群の係数	対照群の係数
52	1636.8	27.2	D:0.63	0.63	0
53	1412.6	22.1	D:0.57	0.75	0.18
54	1579.7	26.4	D:0.55	1	0.45
55	1390.5	35.0	D:0.53	0.63	0.09
56	1196.6	15.8	D:0.51	0.88	0.36
57	11041.4	16.6	D:0.51	0.88	0.36
58	2971.4	17.9	D:0.50	0.5	0
59	3136.6	20.0	D:-0.50	0.5	1
60	4409.9	14.2	D:-0.50	0.5	1
61	1494.7	26.4	D:-0.51	0.13	0.64
62	1833.9	24.2	D:-0.51	0.13	0.64
63	2752.4	14.0	D:-0.51	0.13	0.64
64	3515.8	15.3	D:-0.51	0.13	0.64
65	1082.5	17.7	D:-0.53	0.38	0.91
66	1878.9	15.3	D:-0.53	0.38	0.91
67	3593.4	14.5	D:-0.53	0.38	0.91
68	1236.7	13.3	D:-0.55	0	0.55
69	2736.3	17.1	D:-0.55	0	0.55
70	2973.4	20.0	D:-0.55	0	0.55
71	1134.6	19.4	D:-0.57	0.25	0.82
72	2191.9	17.2	D:-0.57	0.25	0.82
73	2205.1	25.1	D:-0.57	0.25	0.82
74	3959.7	14.0	D:-0.57	0.25	0.82
75	1749.9	19.4	D:-0.60	0.13	0.73
76	4069.6	21.3	D:-0.64	0	0.64
77	2816.3	24.7	D:-0.73	0	0.73
78	3435.8	15.0	D:-0.82	0	0.82

10

20

30

【請求項3】

マーカー45から51および79から115の振幅の評価が下記の参照値を用いて実施される、請求項1に記載の方法：

番号	質量(Da)	CE時間[分]	PCA試料での平均振幅[ppm]	対照試料での平均振幅[ppm]
45	1193.3	34.2	24000	11000
46	1235.4	34.3	160	370
47	1390.5	35.0	22000	12000
48	2292.1	23.7	2600	1600
49	2736.3	17.1	120	350
50	3385.5	21.0	2600	1700
51	3945.2	21.4	260	120

40

番号	質量(Da)	CE時間 [分]	PCA試料での平均振 幅[ppm]	対照試料での平均振幅 [ppm]
79	973.26	35.44	112.27	94.56
80	1128.54	25.66	104.1	135.92
81	1173.58	37.47	163.08	174.37
82	1184.6	26.43	61.33	53.82
83	1290.39	30.85	425.14	360.22
84	1338.66	23.96	116.85	223.77
85	1428.45	36.73	2325.09	1972.91
86	1450.6	37.47	348.86	350.46
87	1460.71	19.83	204.2	216.45
88	1498.46	35.31	115.26	94.66
89	1526.76	23.54	94.2	155.52
90	1588.77	30.24	504.83	565.2
91	1675.77	29.23	104.37	83.95
92	1703.91	33.67	326.26	495.27
93	1808.87	23.72	189.86	198.11
94	1863.96	44.01	989.35	1411.72
95	1867.79	33.29	117.97	108.75
96	1925.9	23.2	148.34	145.13
97	2036.97	31.53	74.45	77.29
98	2114.05	31.59	135.48	121.91
99	2196.11	33.16	479.36	390.89
100	2212.06	33.36	336.96	397.62
101	2257.95	36.02	365.38	567.62
102	2544.06	26.14	77.74	121.23
103	2599.21	28.05	797.34	915.08
104	2761.38	21.47	744.83	616.6
105	3334.17	31.01	105.87	127.64
106	3361.41	24.32	143.28	108.31
107	3426.43	27.73	149.46	116.27
108	3765.51	20.18	375.75	309.53
109	3864.56	33.82	271.44	162.02
110	3870.8	33.47	71.63	78.31
111	4252.03	28.77	388.07	447.93
112	6211.93	20.27	492.21	400.75
113	6650.86	25.55	233.38	232.51
114	6820.37	21.03	258.88	227.62
115	16918.24	19.8	605.64	324.52

10

20

30

40

【請求項4】

少なくとも4種類または5種類の、請求項1で定義されるポリペプチドマーカが用いられる、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

少なくとも10種類またはすべての、請求項1で定義されるポリペプチドマーカが用いられる、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

試料中の少なくとも3種類のポリペプチドマーカの存在または非存在を測定する段階

50

を含み、前記ポリペプチドマーカが分子量および泳動時間について下記の値によって特徴づけられるマーカー52ないし78から選択され、前記試料が尿試料または精液試料である、前立腺がんと良性前立腺過形成(BPH)の鑑別診断のための方法：

番号	質量 (Da)	CE時間 [分]	番号	質量 (Da)	CE時間 [分]
52	1636.8	27.2	66	1878.9	15.3
53	1412.6	22.1	67	3593.4	14.5
54	1579.7	26.4	68	1236.7	13.3
55	1390.5	35.0	69	2736.3	17.1
56	1196.6	15.8	70	2973.4	20.0
57	11041.4	16.6	71	1134.6	19.4
58	2971.4	17.9	72	2191.9	17.2
59	3136.6	20.0	73	2205.1	25.1
60	4409.9	14.2	74	3959.7	14.0
61	1494.7	26.4	75	1749.9	19.4
62	1833.9	24.2	76	4069.6	21.3
63	2752.4	14.0	77	2816.3	24.7
64	3515.8	15.3	78	3435.8	15.0
65	1082.5	17.7			

10

【請求項7】

測定された存在または非存在の評価が下記の参照値を用いることによって実施される、請求項6に記載の方法：

20

番号	PCA群での頻度	BP群での頻度	番号	PCA群での頻度	BP群での頻度
52	0.63	0	66	0.38	0.91
53	0.75	0.18	67	0.38	0.91
54	1	0.45	68	0	0.55
55	0.63	0.09	69	0	0.55
56	0.88	0.36	70	0	0.55
57	0.88	0.36	71	0.25	0.82
58	0.5	0	72	0.25	0.82
59	0.5	1	73	0.25	0.82
60	0.5	1	74	0.25	0.82
61	0.13	0.64	75	0.13	0.73
62	0.13	0.64	76	0	0.64
63	0.13	0.64	77	0	0.73
64	0.13	0.64	78	0	0.82
65	0.38	0.91			

30

【請求項8】

請求項6で定義される少なくとも3種類または少なくとも4種類または少なくとも5種類または少なくとも10種類またはすべてのポリペプチドマーカが使用される、請求項6に記載の方法。

40

【請求項9】

キャピラリー電気泳動、HPLC、気相イオンスペクトル法および/または質量分析が、一または複数のポリペプチドマーカの存在または非存在を検出するのに用いられる、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

キャピラリー電気泳動が、ポリペプチドマーカの分子量が測定される前に実施される、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

質量分析が、一または複数のポリペプチドマーカの存在または非存在を検出するのに

50

用いられる、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2】

前立腺がんの診断のための、マーカー番号 1 ないし 115 から選択されおよび分子量および泳動時間について下記の値によって特徴づけられる少なくとも一つのポリペプチドマーカーの使用：

番号	質量(Da)	CE時間[分]	番号	質量(Da)	CE時間[分]
1	1579.7	26.4	27	1180.5	33.9
2	1991.9	17.1	28	2421.1	32.5
3	1955.9	24.8	29	4345.9	30.6
4	1140.5	21.4	30	2077.1	16.9
5	1677.3	7.4	31	1134.6	19.4
6	10753.1	13.6	32	1444.8	13.5
7	1412.6	22.1	33	1046.5	21.9
8	1636.8	27.2	34	1992.2	16.8
9	1946.9	28.4	35	4069.6	21.3
10	5887.6	25.1	36	1191.5	34.5
11	12407.9	22.2	37	1239.5	32.5
12	1186.6	17.4	38	2191.9	17.2
13	1240.6	23.3	39	1865.8	30.0
14	1326.6	24.8	40	1265.6	23.4
15	3802.1	30.1	41	1936.1	10.5
16	1749.9	19.4	42	911.3	31.9
17	2216.1	31.0	43	1494.7	26.4
18	1069.5	22.7	44	1209.6	22.5
19	1341.6	26.6	45	1193.3	34.2
20	1353.7	21.8	46	1235.4	34.3
21	1716.8	24.6	47	1390.5	35.0
22	2939.1	31.1	48	2292.1	23.7
23	3002.0	19.2	49	2736.3	17.1
24	1110.4	31.5	50	3385.5	21.0
25	1496.7	26.5	51	3945.2	21.4
26	1825.8	28.4			

番号	質量(Da)	CE時間[分]	番号	質量(Da)	CE時間[分]
52	1636.8	27.2	66	1878.9	15.3
53	1412.6	22.1	67	3593.4	14.5
54	1579.7	26.4	68	1236.7	13.3
55	1390.5	35.0	69	2736.3	17.1
56	1196.6	15.8	70	2973.4	20.0
57	11041.4	16.6	71	1134.6	19.4
58	2971.4	17.9	72	2191.9	17.2
59	3136.6	20.0	73	2205.1	25.1
60	4409.9	14.2	74	3959.7	14.0
61	1494.7	26.4	75	1749.9	19.4
62	1833.9	24.2	76	4069.6	21.3
63	2752.4	14.0	77	2816.3	24.7
64	3515.8	15.3	78	3435.8	15.0
65	1082.5	17.7			

番号	質量(Da)	CE時間[分]
79	973.26	35.44
80	1128.54	25.66
81	1173.58	37.47
82	1184.6	26.43
83	1290.39	30.85
84	1338.66	23.96
85	1428.45	36.73
86	1450.6	37.47
87	1460.71	19.83
88	1498.46	35.31
89	1526.76	23.54
90	1588.77	30.24
91	1675.77	29.23
92	1703.91	33.67
93	1808.87	23.72
94	1863.96	44.01
95	1867.79	33.29
96	1925.9	23.2
97	2036.97	31.53
98	2114.05	31.59
99	2196.11	33.16
100	2212.06	33.36
101	2257.95	36.02
102	2544.06	26.14
103	2599.21	28.05
104	2761.38	21.47
105	3334.17	31.01
106	3361.41	24.32
107	3426.43	27.73
108	3765.51	20.18
109	3864.56	33.82
110	3870.8	33.47
111	4252.03	28.77
112	6211.93	20.27
113	6650.86	25.55
114	6820.37	21.03
115	16918.24	19.8

10

20

30

40

【請求項13】

前立腺がんと良性前立腺過形成(BPH)の鑑別診断のための、マーカー番号52ないし78から選択されおよび分子量および泳動時間について下記の値によって特徴づけられる少なくとも一つのポリペプチドマーカーの使用：

番号	質量(Da)	CE時間[分]	番号	質量(Da)	CE時間[分]
52	1636.8	27.2	66	1878.9	15.3
53	1412.6	22.1	67	3593.4	14.5
54	1579.7	26.4	68	1236.7	13.3
55	1390.5	35.0	69	2736.3	17.1
56	1196.6	15.8	70	2973.4	20.0
57	11041.4	16.6	71	1134.6	19.4
58	2971.4	17.9	72	2191.9	17.2
59	3136.6	20.0	73	2205.1	25.1
60	4409.9	14.2	74	3959.7	14.0
61	1494.7	26.4	75	1749.9	19.4
62	1833.9	24.2	76	4069.6	21.3
63	2752.4	14.0	77	2816.3	24.7
64	3515.8	15.3	78	3435.8	15.0
65	1082.5	17.7			

10

【請求項 1 4】

少なくとも 3 種類のマーカーが診断に用いられる、請求項 1 2 または 1 3 のいずれかに記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、前立腺がん（PCA）の診断のための被験者由来の試料中の一種類以上のペプチドマーカーの存在または非存在の使用および、一または複数のペプチドマーカーの存在または非存在が前立腺がんの存在を示す前立腺がんの診断のための方法に関する。

【0002】

前立腺のがんは男性において最も一般的ながんの一つである。愁訴は疾患の進行した段階でのみ起こるため、前立腺がんは早期段階では、早期発見のための定期スクリーニング検査（デジタル直腸検査および血中PSA（前立腺特異的抗原）値）によってのみ診断されうる。疑い診断を確認するために、組織標本が細針生検によって採取される。

【0003】

治療のためには、腫瘍の種類および段階に応じた、および患者の個別の必要性に応じたいくつかの可能性がある。初期段階では、小線源挿入（ヨウ素-125放射線源の前立腺内への、侵襲が最小限の導入）または腫瘍の外科的除去および体外からの照射が利用可能である。

30

【0004】

診断時に、他臓器への転移が患者の三分の一で既に起こっている；この時、本疾患はもはや治療困難である。しかし、放射線療法、化学療法またはホルモン療法（併用が可能である）は、がんのさらなる拡散を遅らせることができる。前立腺が単独で冒されている、すなわち、転移がまだ起こっていない場合、予後は良好である。

【0005】

前立腺の良性腫瘍（腺腫）である良性前立腺過形成（BPH）は、前立腺がんよりもはるかに高頻度で起こる。先行技術によると、PSA値を用いて悪性がんからBPHは非常に低い信頼性でしか識別できない。この場合にもまた、明確な診断を行うことができるためには生検を実施しなければならない。

40

【0006】

上記の通り、前立腺がんの非侵襲的なおよび信頼性の高い早期検出法は存在しない。現在まで、明確な診断は、生検のような侵襲的操作を伴っている。したがって、可能な限り侵襲性が低く、迅速でおよび安価な前立腺がんの診断のための過程および方法を見出す必要性がある。

【0007】

50

WO 03/072710は、前立腺がん細胞とBPHを識別するためのタンパク質バイオマーカーを記載する。該出願は高い不確実性(0.5%を上回る範囲の)を有するマーカーを記載する。不正確な情報のために、この範囲内の多数の分子から個々のマーカーへの割り当ては事実上不可能である。前立腺上皮細胞の細胞溶解物が好ましくは試料材料として用いられ、これは複雑な試料採取手順を必要とする。定義に含まれるタンパク質の数が多いことおよび試料採取の困難のため、その方法はほとんど適切でない。

【0008】

WO 01/25791は、マーカーを用いる前立腺がんの診断のための方法を記載する。前述のマーカーはタンパク質セミノジェリンIに由来する。示される質量は(0.5%だけの確実性で定義される。試験は上記のマーカー画布適当であることを示す。

10

【0009】

驚くべきことに、被験者に由来する試料中の特定のペプチドマーカーが、前立腺がんの診断に、および前立腺がんと良性前立腺過形成(BPH)を識別するための鑑別診断に使用されることが現在見出されている。特に、試料は、非侵襲的に採取される、尿または精液試料でありうる。

【0010】

そのため、本発明は、被験者に由来する試料中の少なくとも3種類のポリペプチドマーカーの存在または非存在の、前立腺がんの診断のための使用に関し、前記ポリペプチドマーカーは表1に示す通り分子量および泳動時間によって特徴づけられるポリペプチドマーカー1ないし115から選択される。

20

【表1】

表1：前立腺がん(PCA)の診断のためのポリペプチドマーカーおよびその分子量および泳動時間(CE時間(分))：

番号	質量[Da]	CE時間	番号	質量[Da]	CE時間
1	1579.7	26.4	27	1180.5	33.9
2	1991.9	17.1	28	2421.1	32.5
3	1955.9	24.8	29	4345.9	30.6
4	1140.5	21.4	30	2077.1	16.9
5	1677.3	7.4	31	1134.6	19.4
6	10753.1	13.6	32	1444.8	13.5
7	1412.6	22.1	33	1046.5	21.9
8	1636.8	27.2	34	1992.2	16.8
9	1946.9	28.4	35	4069.6	21.3
10	5887.6	25.1	36	1191.5	34.5
11	12407.9	22.2	37	1239.5	32.5
12	1186.6	17.4	38	2191.9	17.2
13	1240.6	23.3	39	1865.8	30.0
14	1326.6	24.8	40	1265.6	23.4
15	3802.1	30.1	41	1936.1	10.5
16	1749.9	19.4	42	911.3	31.9
17	2216.1	31.0	43	1494.7	26.4
18	1069.5	22.7	44	1209.6	22.5
19	1341.6	26.6	45	1193.3	34.2
20	1353.7	21.8	46	1235.4	34.3
21	1716.8	24.6	47	1390.5	35.0
22	2939.1	31.1	48	2292.1	23.7
23	3002.0	19.2	49	2736.3	17.1
24	1110.4	31.5	50	3385.5	21.0
25	1496.7	26.5	51	3945.2	21.4
26	1825.8	28.4			

10

20

番号	質量(Da)	CE時間[分]	番号	質量(Da)	CE時間[分]
52	1636.8	27.2	66	1878.9	15.3
53	1412.6	22.1	67	3593.4	14.5
54	1579.7	26.4	68	1236.7	13.3
55	1390.5	35.0	69	2736.3	17.1
56	1196.6	15.8	70	2973.4	20.0
57	11041.4	16.6	71	1134.6	19.4
58	2971.4	17.9	72	2191.9	17.2
59	3136.6	20.0	73	2205.1	25.1
60	4409.9	14.2	74	3959.7	14.0
61	1494.7	26.4	75	1749.9	19.4
62	1833.9	24.2	76	4069.6	21.3
63	2752.4	14.0	77	2816.3	24.7
64	3515.8	15.3	78	3435.8	15.0
65	1082.5	17.7			

30

40

番号	質量(Da)	CE時間[分]
79	973.26	35.44
80	1128.54	25.66
81	1173.58	37.47
82	1184.6	26.43
83	1290.39	30.85
84	1338.66	23.96
85	1428.45	36.73
86	1450.6	37.47
87	1460.71	19.83
88	1498.46	35.31
89	1526.76	23.54
90	1588.77	30.24
91	1675.77	29.23
92	1703.91	33.67
93	1808.87	23.72
94	1863.96	44.01
95	1867.79	33.29
96	1925.9	23.2
97	2036.97	31.53
98	2114.05	31.59
99	2196.11	33.16
100	2212.06	33.36
101	2257.95	36.02
102	2544.06	26.14
103	2599.21	28.05
104	2761.38	21.47
105	3334.17	31.01
106	3361.41	24.32
107	3426.43	27.73
108	3765.51	20.18
109	3864.56	33.82
110	3870.8	33.47
111	4252.03	28.77
112	6211.93	20.27
113	6650.86	25.55
114	6820.37	21.03
115	16918.24	19.8

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

本発明を用いて、前立腺がんを非常に早期に診断することが可能である。したがって、本疾患は公知の方法によって早期に治療されうる。本発明はさらに、一部非侵襲的な、または最小限に侵襲的な操作だけで、低い費用で迅速なおよび信頼性の高い診断を可能にする。

【 0 0 1 2 】

本発明はさらに、前立腺がんとBPHを識別するための鑑別診断に関する。鑑別診断は、被験者に由来する試料中の少なくとも3種類のポリペプチドマーカの存在または非存在を用いることによって達成でき、前記ポリペプチドマーカは表2に示す通り分子量および泳動時間によって特徴づけられるポリペプチドマーカ52ないし78から選択され

る。好ましくは、より多数のマーカ-が用いられる。

【表 2】

表 2：前立腺がんまたは BPH の鑑別診断のためのポリペプチドマーカ-、その分子量および泳動時間。

番号	質量(Da)	CE時間[分]	番号	質量(Da)	CE時間[分]
52	1636.8	27.2	66	1878.9	15.3
53	1412.6	22.1	67	3593.4	14.5
54	1579.7	26.4	68	1236.7	13.3
55	1390.5	35.0	69	2736.3	17.1
56	1196.6	15.8	70	2973.4	20.0
57	11041.4	16.6	71	1134.6	19.4
58	2971.4	17.9	72	2191.9	17.2
59	3136.6	20.0	73	2205.1	25.1
60	4409.9	14.2	74	3959.7	14.0
61	1494.7	26.4	75	1749.9	19.4
62	1833.9	24.2	76	4069.6	21.3
63	2752.4	14.0	77	2816.3	24.7
64	3515.8	15.3	78	3435.8	15.0
65	1082.5	17.7			

10

20

【0013】

泳動時間は、たとえば、実施例に項目 2 として示される通り、キャピラリー電気泳動 (CE) によって測定される。この実施例では、長さ 90 cm および内径 (ID) 50 μ m および外径 (OD) 360 μ m のガラスキャピラリーが付加電圧 30 kV にて操作される。移動相溶媒として 30% メタノール、0.5% ギ酸を含む水が使用される。

【0014】

CE 泳動時間は変動しうることが知られている。にもかかわらず、ポリペプチドマーカ-が溶出される順序は典型的には使用される任意の CE 系について記載の条件下で同一である。泳動時間にそれにもかかわらず起こりうる何らかの差のバランスを取るために、系は泳動時間が正確に知られている標準物質を用いて正規化されう。これらの標準物質は、たとえば、実施例に記載されるポリペプチドでありうる (実施例の項目 3 を参照)。

30

【0015】

表 1 から 2 に示されるポリペプチドの特徴づけは、たとえばノイホフ (Neuhoff) ら (Rapid communications in mass spectrometry, 2004, Vol. 20, pages 149 - 156) によって詳細に記載されている方法である、キャピラリー電気泳動 - 質量分析 (CE-MS) を用いて測定された。各測定間または異なる質量分析計間の分子量の変動は、較正が正確である場合には相対的に小さく、典型的には (0.03% の範囲内、好ましくは (0.01% の範囲内である。

【0016】

本発明に記載のポリペプチドマーカ-は、タンパク質またはペプチド、またはタンパク質またはペプチドの分解産物である。それらは、たとえば、グリコシル化、リン酸化、アルキル化またはジスルフィド架橋といった翻訳後修飾によって、または、たとえば分解の範囲内の他の反応によって、化学的に修飾されうる。加えて、ポリペプチドマーカ-はまた、試料の精製中に化学的に変化、たとえば、酸化されうる。

40

【0017】

ポリペプチドマーカ-を決定するパラメーター (分子量および泳動時間) から進んで、対応するポリペプチドの配列を同定することが先行技術で公知の方法によって可能である。

【0018】

50

本発明に記載のポリペプチド（表 1 から 5 を参照）が、前立腺がんを診断するのに用いられる。「診断」とは、症状または現象を疾患または傷害に割り当てることによって知識を得る過程を意味する。この場合には、前立腺がんの存在が特定のポリペプチドマーカの存在または非存在から結論される。このように、本発明に記載のポリペプチドマーカが被験者由来の試料において測定され、頻度マーカの場合にはその存在または非存在が、前立腺がんの存在を結論することを可能にする。ポリペプチドマーカの存在または非存在は、先行技術で公知である任意の方法によって測定されうる。使用されうる方法が下記に例示される。

【 0 0 1 9 】

ポリペプチドマーカは、その測定値が少なくともその閾値と同じ高さであるならば、存在するとみなされる。測定値がより低いならば、ポリペプチドマーカは存在しないとみなされる。閾値は測定法の感度（検出限界）によって決定されうるかまたは経験的に定義されうる。

10

【 0 0 2 0 】

本発明に関連して、好ましくはある分子量について試料の測定値がブランク試料（たとえば、緩衝液または溶媒のみ）の測定値より少なくとも 2 倍高いならば、閾値を超えるとみなされる。

【 0 0 2 1 】

—または複数のポリペプチドマーカが、その存在または非存在が測定される方法で用いられ、存在または非存在が前立腺がんを示す（頻度マーカ）。このように、ポリペプチドマーカ番号 1 から 1 1 といった、典型的には前立腺がんを有する患者（疾患）に存在するが、前立腺がんの無い被験者（対照）には存在しないポリペプチドマーカがある。加えて、前立腺がんの無い被験者に存在するが、前立腺がんを有する被験者にはより低頻度に存在するかまたは全く存在しない、たとえば、番号 1 2 から 4 4（表 3）のようなポリペプチドマーカがある。

20

【表 3】

表 3：前立腺がん（PCA）の診断のためのポリペプチドマーカー（頻度マーカー）、分子量および泳動時間、および前立腺がん罹患した患者の群および対照群における係数として存在および非存在（1 = 100%、0 = 0%；実施例に記載の通り試料処理および測定）。

番号	質量(Da)	CE時間[分]	差	PCA群の係数	対照群の係数
1	1579.7	26.4	D:0.75	1	0.25
2	1991.9	17.1	D:0.66	0.88	0.22
3	1955.9	24.8	D:0.65	1	0.35
4	1140.5	21.4	D:0.57	1	0.43
5	1677.3	7.4	D:0.57	0.63	0.06
6	10753.1	13.6	D:0.54	0.88	0.33
7	1412.6	22.1	D:0.53	0.75	0.22
8	1636.8	27.2	D:0.53	0.63	0.1
9	1946.9	28.4	D:0.53	0.75	0.22
10	5887.6	25.1	D:0.51	1	0.49
11	12407.9	22.2	D:0.51	0.75	0.24
12	1186.6	17.4	D:-0.51	0.38	0.88
13	1240.6	23.3	D:-0.51	0.25	0.76
14	1326.6	24.8	D:-0.51	0.38	0.88
15	3802.1	30.1	D:-0.51	0.38	0.88
16	1749.9	19.4	D:-0.52	0.13	0.65
17	2216.1	31.0	D:-0.52	0.13	0.65
18	1069.5	22.7	D:-0.53	0	0.53
19	1341.6	26.6	D:-0.53	0	0.53
20	1353.7	21.8	D:-0.53	0.25	0.78
21	1716.8	24.6	D:-0.53	0.25	0.78
22	2939.1	31.1	D:-0.53	0.38	0.9
23	3002.0	19.2	D:-0.53	0.25	0.78
24	1110.4	31.5	D:-0.54	0.13	0.67
25	1496.7	26.5	D:-0.54	0.13	0.67
26	1825.8	28.4	D:-0.54	0.13	0.67
27	1180.5	33.9	D:-0.55	0	0.55
28	2421.1	32.5	D:-0.55	0	0.55
29	4345.9	30.6	D:-0.55	0	0.55
30	2077.1	16.9	D:-0.56	0.13	0.69
31	1134.6	19.4	D:-0.57	0.25	0.82
32	1444.8	13.5	D:-0.58	0.13	0.71
33	1046.5	21.9	D:-0.59	0	0.59
34	1992.2	16.8	D:-0.59	0	0.59
35	4069.6	21.3	D:-0.59	0	0.59
36	1191.5	34.5	D:-0.61	0	0.61
37	1239.5	32.5	D:-0.61	0	0.61
38	2191.9	17.2	D:-0.61	0.25	0.86
39	1865.8	30.0	D:-0.62	0.13	0.75
40	1265.6	23.4	D:-0.65	0.25	0.9
41	1936.1	10.5	D:-0.65	0	0.65
42	911.3	31.9	D:-0.69	0	0.69
43	1494.7	26.4	D:-0.70	0.13	0.82
44	1209.6	22.5	D:-0.71	0	0.71

【0022】

頻度マーカー（存在または非存在の測定）に加えてまたは代替的に、表 4 に記載の振幅マーカーもまた前立腺がんの診断に使用されうる（番号 45 - 51、79 - 115）。振幅マーカーは、存在または非存在が決定的でなく、シグナルの高さ（振幅）がそのシグナルが両方の群で存在するかどうかを決定するような方法で使用される。表 5 では、対応す

10

20

30

40

50

るシグナル（質量および泳動時間によって特徴づけられる）の、測定されたすべての試料にわたって平均された平均振幅が示される。別々に濃縮された試料または異なる測定方法間の適合性を達成するために、試料のすべてのペプチドシグナルは総振幅100万カウントに対して正規化される。したがって、各マーカーそれぞれの平均振幅は百万分率（ppm）として示される。使用したすべての群は、信頼性のある平均振幅を得るために、少なくとも20の個別の患者または対照試料から成る。診断についての決定（PCAまたはそうでない）は、PCA群の対照群における平均振幅と比較して患者試料中の各ポリペプチドマーカーの振幅がどのくらい高いかの関数として行われる。振幅がPCA群の平均振幅により対応すれば、PCAの存在が考慮されるべきであり、および振幅が対照群の平均振幅により対応すれば、PCAの非存在が考慮されるべきである。より正確な定義は、マーカー番号48（表4）によって与えられる。本マーカーの平均振幅はPCAにおいて顕著に上昇する（2600 ppmに対し対照群では1600 ppm）。ここで、患者試料中のこのマーカーについての値が0ないし1600 ppmであるかまたはこの範囲を最大20%超える、すなわち、0ないし1920 ppmであるならば、この試料は対照群に属する。その値が2600 ppmまたは最大20%下回るまたはより高い、すなわち、2080ないし非常に高値であるならば、PCAの存在が考慮されるべきである。

10

【0023】

対照群とPCA群の振幅間の隔たりが小さいほど、その二つの参照値の間にある値は参照値のうち的一方に近くなければならない。

20

【0024】

一つの可能性は、平均振幅間の範囲を3つの部分へさらに分割することである。値が下側3分の1内にあるならば、これは低値を示す；値が上側3分の1内にあるならば、これは高値を示す。値が中央3分の1内にあるならば、このマーカーについて明確な陳述は不可能である。

【表4】

表4：振幅マーカー

番号	質量(Da)	CE時間 [分]	PCA試料での平均 振幅[ppm]	対照試料での平均振 幅[ppm]
45	1193.3	34.2	24000	11000
46	1235.4	34.3	160	370
47	1390.5	35.0	22000	12000
48	2292.1	23.7	2600	1600
49	2736.3	17.1	120	350
50	3385.5	21.0	2600	1700
51	3945.2	21.4	260	120

30

番号	質量(Da)	CE時間 [分]	PCA試料での平均振 幅[ppm]	対照試料での平均振幅 [ppm]
79	973.26	35.44	112.27	94.56
80	1128.54	25.66	104.1	135.92
81	1173.58	37.47	163.08	174.37
82	1184.6	26.43	61.33	53.82
83	1290.39	30.85	425.14	360.22
84	1338.66	23.96	116.85	223.77
85	1428.45	36.73	2325.09	1972.91
86	1450.6	37.47	348.86	350.46
87	1460.71	19.83	204.2	216.45
88	1498.46	35.31	115.26	94.66
89	1526.76	23.54	94.2	155.52
90	1588.77	30.24	504.83	565.2
91	1675.77	29.23	104.37	83.95
92	1703.91	33.67	326.26	495.27
93	1808.87	23.72	189.86	198.11
94	1863.96	44.01	989.35	1411.72
95	1867.79	33.29	117.97	108.75
96	1925.9	23.2	148.34	145.13
97	2036.97	31.53	74.45	77.29
98	2114.05	31.59	135.48	121.91
99	2196.11	33.16	479.36	390.89
100	2212.06	33.36	336.96	397.62
101	2257.95	36.02	365.38	567.62
102	2544.06	26.14	77.74	121.23
103	2599.21	28.05	797.34	915.08
104	2761.38	21.47	744.83	616.6
105	3334.17	31.01	105.87	127.64
106	3361.41	24.32	143.28	108.31
107	3426.43	27.73	149.46	116.27
108	3765.51	20.18	375.75	309.53
109	3864.56	33.82	271.44	162.02
110	3870.8	33.47	71.63	78.31
111	4252.03	28.77	388.07	447.93
112	6211.93	20.27	492.21	400.75
113	6650.86	25.55	233.38	232.51
114	6820.37	21.03	258.88	227.62
115	16918.24	19.8	605.64	324.52

10

20

30

40

【 0 0 2 5 】

PCAとBPHの鑑別診断について、表5はマーカー番号52から58といった、前立腺がんを有する患者に典型的には存在するがBPHを有する被験者には存在しないかまたはほとんど存在しないポリペプチドマーカーを示す。さらに、たとえばポリペプチドマーカー番号59から78のような、BPHを有する被験者に存在するがPCAを有する被験者ではより低頻度に存在するかまたは全く存在しないポリペプチドマーカーがある。

【表5】

表5：前立腺がん（PCA）とBPHの鑑別診断のためのポリペプチドマーカー（頻度マーカー）、分子量および泳動時間、および前立腺がん罹患した患者の群およびBPH群における係数として存在および非存在（1 = 100%、0 = 0%；実施例に記載の通り試料処理および測定）。

番号	質量(Da)	CE時間[分]	差	PCA群の係数	対照群の係数
52	1636.8	27.2	D:0.63	0.63	0
53	1412.6	22.1	D:0.57	0.75	0.18
54	1579.7	26.4	D:0.55	1	0.45
55	1390.5	35.0	D:0.53	0.63	0.09
56	1196.6	15.8	D:0.51	0.88	0.36
57	11041.4	16.6	D:0.51	0.88	0.36
58	2971.4	17.9	D:0.50	0.5	0
59	3136.6	20.0	D:-0.50	0.5	1
60	4409.9	14.2	D:-0.50	0.5	1
61	1494.7	26.4	D:-0.51	0.13	0.64
62	1833.9	24.2	D:-0.51	0.13	0.64
63	2752.4	14.0	D:-0.51	0.13	0.64
64	3515.8	15.3	D:-0.51	0.13	0.64
65	1082.5	17.7	D:-0.53	0.38	0.91
66	1878.9	15.3	D:-0.53	0.38	0.91
67	3593.4	14.5	D:-0.53	0.38	0.91
68	1236.7	13.3	D:-0.55	0	0.55
69	2736.3	17.1	D:-0.55	0	0.55
70	2973.4	20.0	D:-0.55	0	0.55
71	1134.6	19.4	D:-0.57	0.25	0.82
72	2191.9	17.2	D:-0.57	0.25	0.82
73	2205.1	25.1	D:-0.57	0.25	0.82
74	3959.7	14.0	D:-0.57	0.25	0.82
75	1749.9	19.4	D:-0.60	0.13	0.73
76	4069.6	21.3	D:-0.64	0	0.64
77	2816.3	24.7	D:-0.73	0	0.73
78	3435.8	15.0	D:-0.82	0	0.82

【0026】

一種類以上のポリペプチドマーカーの存在または非存在または振幅が測定される試料が由来する被験者は、前立腺がんにかかることのできる任意の対象、たとえば、動物またはヒトでありうる。好ましくは、被験者はイヌまたはウマといった哺乳類であり、および非常に好ましくは、被験者はヒトである。

【0027】

本発明の適用のために、一つのポリペプチドマーカーだけでなく、マーカーの組み合わせが前立腺がんを診断するのに用いられ、前立腺がんの存在がそれらの存在または非存在および/または振幅の高さから結論される。複数のポリペプチドマーカーを比較することによって、患者または対照における典型的な存在確率からのいくつかの個別の変動から生じる全体結果の偏りが低減または回避されうる。

【0028】

本発明に記載の一または複数のポリペプチドマーカの存在または非存在が測定される試料は、被験者の体から得られる任意の試料でありうる。試料は、被験者の状態についての情報（前立腺がんまたはそうでない）を提供するのに適したポリペプチド組成を有する試料である。たとえば、試料は尿、精子、精液（精虫を含まない精液）でありうる。好ましくは、試料は液体試料である。

【0029】

好ましい一実施形態では、試料は尿試料である。

【0030】

尿試料は先行技術で公知の通り採取されうる。好ましくは、中間尿試料が本発明に関連して用いられる。たとえば、尿試料はカテーテルによって、またはWO 01/74275に記載の排尿器具によってもまた、採取されうる。

10

【0031】

試料中のポリペプチドマーカの存在または非存在は、ポリペプチドマーカの測定に適した先行技術で公知の任意の方法によって測定されうる。そのような方法は当業者に公知である。原則的に、ポリペプチドマーカの存在または非存在は、質量分析のような直接的方法、または、たとえばリガンドを用いるような間接的方法によって測定されうる。

【0032】

必要であればまたは望ましければ、被験者由来の試料、たとえば尿試料は、任意の適当な方法で前処理することができ、および、一または複数のポリペプチドマーカの存在または非存在が測定される前にたとえば精製または分離されうる。処理は、たとえば、精製、分離、希釈または濃縮を含みうる。方法は、たとえば、遠心分離、ろ過、限外ろ過、透析、沈澱、または、アフィニティ分離またはイオン交換クロマトグラフィーによる分離といったクロマトグラフィー法、または電気泳動分離でありうる。その具体例は、ゲル電気泳動、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（2D-PAGE）、キャピラリー電気泳動、金属アフィニティクロマトグラフィー、固定化金属アフィニティクロマトグラフィー（IMAC）、レクチンを用いるアフィニティクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、順相および逆相HPLC、陽イオン交換クロマトグラフィーおよび表面への選択的結合である。これらの方法のすべてが当業者に公知であり、および当業者はその方法を、使用する試料および一または複数のポリペプチドマーカの存在または非存在を測定するための方法の関数として選択することができる。

20

30

【0033】

本発明の一実施形態では、試料は、測定される前に、キャピラリー電気泳動によって分離され、超遠心分離によって精製されおよび/または限外ろ過によって特定の分子サイズのポリペプチドマーカを含む画分へと分割される。

【0034】

好ましくは、ポリペプチドマーカの存在または非存在を測定するために質量分析法が用いられ、試料の精製または分離がその方法の上流で実施されうる。現在用いられている方法と比較して、質量分析は、試料の多数の（>100）ポリペプチドが単一の分析によって測定されうるという長所を有する。任意の種類、質量分析計が使用されうる。質量分析によって、10 fmolのポリペプチドマーカ、すなわち、0.1 ngの10 kDaタンパク質を、複雑な混合物中で約（0.01%の測定精度でルーチンとして測定することが可能である。質量分析計では、イオン生成部が適当な分析装置と連結されている。たとえば、エレクトロスプレーイオン化（ESI）インターフェイスは主に液体試料中のイオンを測定するのに用いられ、一方、マトリクス支援レーザー脱離/イオン化（MALDI）法はマトリクスと結晶化した試料由来のイオンを測定するのに用いられる。生成したイオンを分析するためには、四重極、イオントラップまたは飛行時間（TOF）分析器が使用されうる。

40

【0035】

エレクトロスプレーイオン化（ESI）では、溶液中に存在する分子は、特に高電圧（

50

たとえば、1～8 kV)の影響下で噴霧され、荷電した小滴を形成し、小滴は溶媒の蒸発からさらに小さくなる。最後に、いわゆるクーロン爆発が遊離イオンの形成を引き起こし、遊離イオンはその後分析および検出されうる。

【0036】

TOFによるイオンの分析では、イオンに等量の運動エネルギーを与える一定の加速電圧が加えられる。その後、各イオンが肥厚チューブを通じて特定の漂流距離を移動するのに要する時間が非常に正確に測定される。等量の運動エネルギーでは、イオンの速度は質量に依存するため、したがって質量が測定されうる。TOF分析器は非常に高いスキャン速度を有し、およびしたがって非常に高い分解能に達する。

【0037】

ポリペプチドマーカの存在および非存在の測定のための好ましい方法は、気相イオンスペクトル法、たとえばレーザー脱離/イオン化質量分析、MALDI-TOF MS、SELDI-TOF MS(表面増強レーザー脱離/イオン化)、LC-MS(液体クロマトグラフィー/質量分析)、2D-PAGE/MSおよびキャピラリー電気泳動-質量分析(CE-MS)を含む。上記のすべての方法が当業者に公知である。

【0038】

特に好ましい方法が、キャピラリー電気泳動が質量分析と組み合わせられるCE-MSである。この方法は、たとえば、独国特許出願DE 10021737に、Kaiserら(J Chromatogr A, 2003, Vol. 1013: 157-171, および Electrophoresis, 2004, 25: 2044-2055)に、およびウイトケ(Wittke)ら(Journal of Chromatography A, 2003, 1013: 173-181)にある程度詳細に記載されている。CE-MS技術は、試料の数百のポリペプチドマーカの存在を同時に短時間内におよび少量で高感度で測定することを可能にする。試料が測定された後、測定されたポリペプチドマーカのパターンが作成される。このパターンは、患者または健常者の参照パターンと比較されうる。大部分の場合で、限られた数のポリペプチドマーカを使用するのが前立腺がんの診断および前立腺がんとBPHの鑑別診断には十分である。ESI-TOF MS装置にオンラインで連結されたCEを含むCE-MS法がさらに好ましい。

【0039】

CE-MSのためには、揮発性溶媒の使用が好ましく、および本質的に塩を含まない条件下で最も良く働く。適した溶媒の例は、アセトニトリル、メタノールなどを含む。溶媒は、水で希釈されうるかまたは、分析物、好ましくはポリペプチドをプロトン化するために弱酸(たとえば、0.1%ないし1%ギ酸)と混合されうる。

【0040】

キャピラリー電気泳動を用いて、分子を電荷およびサイズによって分離することが可能である。中性粒子は電流を加える際に電気浸透流動の速度で泳動し、一方で陽イオンは正極に向かって加速し、および陰イオンは遅延する。電気泳動におけるキャピラリーの長所は、体積に対する表面の比が有利なことにあり、これは電流フローの間に生じるジュール熱の良好な損失を可能にする。これは今度は高電圧(通常は最大30 kV)の適用を可能にし、およびそのようにして高い分離性能および短い分析時間を可能にする。

【0041】

キャピラリー電気泳動では、典型的には50ないし75 μmの内径を有するシリカガラスキャピラリーが通常用いられる。使用される長さは30ないし100 cmである。加えて、キャピラリーは通常はプラスチック被覆シリカガラス製である。キャピラリーは、未処理、すなわち内表面上の親水基を曝露しているか、または内表面が被覆されているかの両方でありうる。疎水性コーティングは分解能を改善するために使用されうる。電圧に加えて、圧力もまた加えることができ、圧力は典型的には0ないし1 psiの範囲内である。圧力もまた、実施中にのみ加えることができるか、または途中で変化させることができる。

【0042】

10

20

30

40

50

ポリペプチドマーカの測定のための好ましい方法では、試料のマーカはキャピラリー電気泳動を用いて分離され、次いで直接にイオン化され、および検出のために連結された質量分析計へオンラインで移送される。

【0043】

本発明に記載の方法では、前立腺がんの診断のためにいくつかのポリペプチドマーカを使用することが有利である。特に、たとえば、マーカ1、2および3；1、2および4；などといった、少なくとも3種類のポリペプチドマーカが使用される。

【0044】

より好ましいのは、少なくとも4、5または6種類のマーカの使用である。

【0045】

さらにより好ましいのは、少なくとも11種類のマーカ、たとえば、マーカ1から11の使用である。

【0046】

非常に好ましいのは、表1または3に列記されたすべてのマーカの使用である。

【0047】

いくつかのマーカはまた、PCAとBPHの鑑別診断に使用される。特に、たとえば、マーカ45、46および47；45、46および48；などといった、少なくとも3種類のポリペプチドマーカが使用される。

【0048】

より好ましいのは、少なくとも4、5または6種類のマーカの使用である。

【0049】

さらにより好ましいのは、少なくとも7種類のマーカ、たとえば、マーカ1から7の使用である。

【0050】

非常に好ましいのは、表2または4に列記された27マーカすべての使用である。

【0051】

いくつかのマーカが用いられる場合に前立腺がんの存在の確率を測定するためには、当業者に公知である統計的手法が使用される。たとえば、ワイシinger (Weissinger) らによって記載されたランダムフォレスト法 (Kidney Int., 2004, 65: 2426-2434) が、S-プラスといったコンピュータープログラムを用いることによって使用される。

【実施例】

【0052】

1. 試料調製

前立腺がんに関するポリペプチドマーカを検出するために、尿を用いた。尿は健常者 (対照群) から、および前立腺がんまたはBPHに罹患した患者から採取された。

【0053】

以降のCE-MS測定のために、アルブミンおよび免疫グロブリンといった、より高濃度で患者の尿に含まれるタンパク質は限外ろ過によって分離除去されなければならなかった。したがって、尿500 μ lを取り、および2mlのろ過緩衝液 (4M尿素、0.1M NaCl、0.01%アンモニア) と混合した。この2.5mlの試料量を限外ろ過した (アミコン (Amicon) 30kDa、ミリポア社 (Millipore) 米国ベッドフォード (Bedford))。限外ろ過は3000rpmにて遠心分離機中で、限外ろ液2mlが得られるまで実施された。

【0054】

得られたろ液2mlを、尿素、塩類および他の妨害成分を除去するためにファルマシアC-2カラム (ファルマシア社 (Pharmacia)、スウェーデン、ウプサラ) に加えた。結合したポリペプチドを次いでC-2カラムから、50%アセトニトリル、0.5%ギ酸を含む水で溶出し、および凍結乾燥した。CE-MS測定のために、ポリペプチドを次いで水20 μ lの水 (HPLCグレード、メルク社 (Merck)) に再懸濁した。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

2 . C E - M S 測定

C E - M S 測定は、ベックマン・コールター社のキャピラリー電気泳動システム (P / A C E M D Q システム ; B e c k m a n C o u l t e r I n c . , 米 国 フ ラ ー ト ン (F u l l e r t o n)) およびブルカー・ESI - T O F 質量分析計 (m i c r o - T O F M S 、 ブ ル カ ー ・ ダ ル ト ニ ク ス 社 (B r u k e r D a l t o n i k) 、 ド イ ツ 、 プ レ ー メ ン) を用いて実施された。

【 0 0 5 6 】

C E キャピラリーはベックマン・コールター社から調達され、および I D / O D 5 0 / 3 6 0 μ m および長さ 9 0 c m であった。C E 分離のための移動相は、3 0 % メタノールおよび 0 . 5 % ギ酸を含む水から成った。M S での「シース流」用には、0 . 5 % ギ酸を含む 3 0 % イソプロパノールが流速 2 μ l / 分にて用いられた。C E および M S の連結は C E - E S I - M S スプレイヤー・キット (アジレント・テクノロジーズ社 (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s) 、 ド イ ツ 、 ワ ル ド ブ ロ ン (W a l d b r o n n)) に よ っ て 実 現 さ れ た 。

10

【 0 0 5 7 】

試料を注入するには、1 ないし最大 6 p s i の圧力が加えられ、および注入の持続時間は 9 9 秒であった。これらのパラメーターを用いて、試料約 1 5 0 n l がキャピラリーに注入され、これは、キャピラリー体積の約 1 0 % に相当する。キャピラリー中の試料を濃縮するためにスタッピング法が用いられた。このように、試料が注入される前に、1 M N H ₃ 溶液が 7 秒間 (1 p s i にて) 注入され、および試料が注入された後に、2 M ギ酸溶液が 5 秒間注入された。分離電圧 (3 0 k V) が加えられた後、分析物はこれらの溶液の間で自動的に濃縮された。

20

【 0 0 5 8 】

以降の C E 分離は圧力法を用いて実施された : 0 p s i にて 4 0 分、次いで 0 . 1 p s i にて 2 分、0 . 2 p s i にて 2 分、0 . 3 p s i にて 2 分、0 . 4 p s i にて 2 分、および最後に 0 . 5 p s i にて 3 2 分。分離実行の合計時間はしたがって 8 0 分であった。

【 0 0 5 9 】

M S の側で可能な限り良好なシグナル強度を得るために、ネブライザーガスは可能な最低値に設定された。エレクトロスプレーを生じるためにスプレーノードルに加えられた電圧は 3 7 0 0 ~ 4 1 0 0 V であった。質量分析計でのその他の設定は、取扱説明書に従ってペプチド検出用に最適化された。スペクトルは質量範囲 m / z 4 0 0 から m / z 3 0 0 0 に渡って記録され、および 3 秒毎に蓄積された。

30

【 0 0 6 0 】

3 . C E 測定用標準

C E 測定を点検および較正するために、選択された条件下での記載の C E 泳動時間によって特徴づけられる下記のタンパク質またはポリペプチドが用いられた :

タンパク質 / ポリペプチド 泳動時間

アプロチニン (シグマ社 (S I G M A) 、 ド イ ツ ・ タ ウ フ キ ル ヒ エ ン (T a u f k i r c h e n) 、 品 番 A 1 1 5 3)	9 . 2 分
リボヌクレアーゼ (シグマ社、ドイツ・タウフキルヒエン、品番 R 4 8 7 5)	1 0 . 9 分
リゾチーム (シグマ社、ドイツ・タウフキルヒエン、品番 L 7 6 5 1)	8 . 9 分
"REV"、配列 : R E V Q S K I G Y G R Q I I S	1 5 . 6 分
"ELM"、配列 : E L M T G E L P Y S H I N N R D Q I I F M V G R	2 3 . 4 分
"KINCON"、配列 : T G S L P Y S H I G S R D Q I I F M V G R	2 0 . 0 分
"GIVLY"配列 : G I V L Y E L M T G E L P Y S H I N	3 6 . 8 分

40

50

【 0 0 6 1 】

タンパク質 / ポリペプチドはそれぞれ 1 0 p m o l / μ l 水の濃度にて使用された。" R E V"、" E L M"、" K I N C O N"および" G I V L Y"は合成ペプチドである。

【 0 0 6 2 】

ペプチドの分子量およびMSで見られる各荷電状態の m / z 比を下記の表に列記する：
ペプチドの分子量およびMSで見られる各荷電状態の m / z 比を下記の表に列記する：

H(単)	1.0079	1.0079	1.0079	1.0079	1.0079	1.0079	1.0079
m/z	アプロチニン	リボヌクレアーゼ	リゾチーム	REV	KINCON	ELM	GIVLY
	単質量	単質量	単質量	単質量	単質量	単質量	単質量
0	6513.09	13681.32	14303.88	1732.96	2333.19	2832.41	2048.03
1	6514.0979	13682.328	14304.888	1733.9679	2334.1979	2833.4179	2049.0379
2	3257.5529	6841.6679	7152.9479	867.4879	1167.6029	1417.2129	1025.0229
3	2172.0379	4561.4479	4768.9679	578.6612	778.7379	945.1446	683.6846
4	1629.2804	3421.3379	3576.9779	434.2479	584.3054	709.1104	513.0154
5	1303.6259	2737.2719	2861.7839	347.5999	467.6459	567.4899	410.6139
6	1086.5229	2281.2279	2384.9879	289.8346	389.8729	473.0762	342.3462
7	931.4494	1955.4822	2044.4193	248.5736	334.3208	405.6379	293.5836
8	815.1442	1711.1729	1788.9929	217.6279	292.6567	355.0592	257.0117
9	724.6846	1521.1546	1590.3279	193.559	260.2512	315.7201	228.5668
10	652.3169	1369.1399	1431.3959	174.3039	234.3269	284.2489	205.8109
11	593.107	1244.7643	1301.3606	158.5497	213.1161	258.4997	187.1924
12	543.7654	1141.1179	1192.9979	145.4212	195.4404	237.0421	171.6771
13	502.0148	1053.4171	1101.3063	134.3125	180.4841	218.8856	158.5486

10

20

【 0 0 6 3 】

実施例 4 . W O 0 1 / 2 5 7 9 1 に記載のマーカの性能

W O 0 1 / 2 5 7 9 1 は 1 1 種類のマーカに言及し (その請求項 2 を参照) 、 および質量測定の精度は 0 . 5 % と述べられている。これらがセミノジェリン I の断片だけと考えるならば、セミノジェリンの可能な断片の下記の数が得られる：

前立腺がんについてのバイオマーカーポリペプチドの分子量[g/mol]	セミノジェリンI由来の可能な断片の数	
	質量偏差0.5%	質量偏差0.03%
<u>2776</u>	100	8
<u>4423</u>	182	16
<u>4480</u>	173	8
<u>5753</u>	212	11
<u>6098</u>	214	7
<u>6270</u>	217	19
<u>6998</u>	248	12
<u>7843</u>	270	11
<u>8030</u>	265	23
<u>8240</u>	281	12
<u>8714</u>	299	23

40

【 0 0 6 4 】

50

さらに、W O 0 1 / 2 5 7 9 1 は前立腺がんの存在を否定するマーカーを開示する。
可能な断片の数が下記の表に含まれる：

前立腺がんについてのバイオマーカーポリペプチドの分子量[g/mol]	セミノジェリンI由来の可能な断片の数	
	質量偏差0.5%	質量偏差0.03%
<u>2095</u>	83	2
<u>2276</u>	84	5
<u>2530</u>	99	6
<u>3030</u>	106	4
<u>3038</u>	116	10
<u>3224</u>	127	7
<u>3600</u>	139	6
<u>3835</u>	146	9
<u>3915</u>	150	16
<u>3933</u>	153	23
<u>4175</u>	161	14

10

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1A】図1は、例証的に一つの質量について、この重量範囲で可能な多数の配列を示す。次の段階で、前立腺がんまたはBPHを有する患者に由来する尿試料中の対応するタンパク質を分析することが試みられた。6種類のマーカーだけを見つけることができた。

20

【図1B】図1は、例証的に一つの質量について、この重量範囲で可能な多数の配列を示す。次の段階で、前立腺がんまたはBPHを有する患者に由来する尿試料中の対応するタンパク質を分析することが試みられた。6種類のマーカーだけを見つけることができた。

【図2】図2はこの方法で見出された6種類のマーカーの振幅の測定を示す。前立腺がん患者と対照群との間に有意差は無いことが見出された。その後、バイオマーカーの識別値はROC（受診者動作特性曲線）分析によって試験された。

30

【図3A】図3AはW O 0 1 / 2 5 7 9 1 に記載されおよび尿試料中に見出すことのできた6種類のマーカーについて対応する分析を示す。

【図3B】図3Bは本特許明細書の番号1から78の本発明に記載のバイオマーカーの対応するROC試験を示す。

【図3C】図3Cは本発明に記載のマーカーの部分群（16マーカー）のROC分析を示す。

【図3D】図3Dはその有意性は本発明に記載の3種類のバイオマーカーすなわちマーカー24、41および46のみが使用された場合でさえW O 0 1 / 2 5 7 9 1 の有意性よりも明らかに高いことを示す。

【図1A】

分子番号 [ID]	デジタル [Da]	割合 %	終点	終点
8714.23	0.23	26	103	
8714.31	0.31	306	381	
8713.28	-0.72	209	283	
8713.27	-0.73	145	223	
8713.25	-0.75	23	99	
8713.24	-0.76	209	279	
8715.24	1.24	229	303	
8715.25	1.25	143	221	
8715.26	1.26	39	114	
8715.32	1.32	103	181	
8715.37	1.37	69	143	
8715.39	1.39	162	238	
8712.27	-1.63	912	368	
8712.34	-1.68	153	229	
8712.34	-1.63	181	257	
8712.30	-1.73	134	213	
8712.21	-1.73	383	460	
8716.31	2.31	193	267	
8716.35	2.35	160	236	
8716.35	2.35	161	237	
8716.45	2.46	76	155	
8711.30	-2.70	350	438	
8711.23	-2.77	249	324	
8717.23	3.23	288	361	
8717.25	3.25	37	112	
8717.27	3.27	243	317	
8717.35	3.35	153	239	
8710.31	-3.69	217	285	
8710.27	-3.73	241	315	
8718.40	4.40	77	154	
8709.42	-4.58	319	395	
8709.42	-4.58	320	396	
8709.32	-4.68	174	251	
8709.32	-4.68	173	250	
8709.32	-4.68	172	249	
8709.31	-4.69	216	290	
8709.24	-4.76	370	447	
8719.27	5.27	274	349	
8708.36	-5.64	85	140	
8708.33	-5.67	58	132	
8708.23	-5.77	347	423	
8720.23	6.23	247	321	
8720.30	6.30	396	433	
8707.32	-6.66	32	126	
8707.28	-6.72	289	343	
8707.25	-6.75	256	387	
8707.23	-6.77	23	98	
8721.24	7.24	20	97	
8721.27	7.27	133	214	
8721.28	7.28	351	427	
8721.31	7.31	154	230	

【図1B】

8736.26	22.26	35	110
8736.31	22.31	51	125
8736.35	22.35	86	164
8736.37	22.37	105	243
8995.35	-22.64	96	113
8991.36	-22.64	95	112
8991.28	-22.74	295	370
8737.40	23.40	314	390
8990.28	-23.72	297	372
8990.26	-23.74	204	277
8990.25	-23.75	244	318
8738.24	24.24	334	411
8738.26	24.26	276	352
8738.32	24.32	167	244
8738.33	24.33	113	193
8689.37	-24.63	7	84
8689.30	-24.70	191	265
8689.29	-24.71	256	330
8689.29	-24.71	257	331
8739.28	25.28	284	359
8739.31	25.31	132	212
8688.27	-25.73	115	194
8688.27	-25.73	282	357
8740.25	25.25	47	122
8740.33	25.33	342	419
8740.34	25.34	148	228
8987.32	-25.68	233	307
8987.24	-25.78	378	456
8987.24	-25.78	378	455
8987.24	-25.78	378	456
8741.30	27.30	353	429
8741.33	27.33	188	262
8695.43	-27.57	4	81
8695.32	-27.68	310	389
8742.26	28.26	144	222
8742.28	28.28	218	293
8742.29	28.29	230	305
8742.30	28.30	184	260
8742.37	28.37	71	147
8742.38	28.38	69	144
8742.39	28.39	260	335
8696.36	-28.64	164	242
8695.35	-28.65	170	247
8695.35	-28.65	106	184
8695.34	-28.66	71	146
8695.32	-28.68	307	382
8695.28	-28.72	306	384
8743.28	29.28	303	379
8743.26	29.26	302	378
8743.32	29.32	55	129
8743.38	29.38	108	186
8743.38	29.38	258	334
8694.30	-29.70	270	345
8694.28	-29.78	353	428
8694.38	-29.74	298	344

図1

【図2】

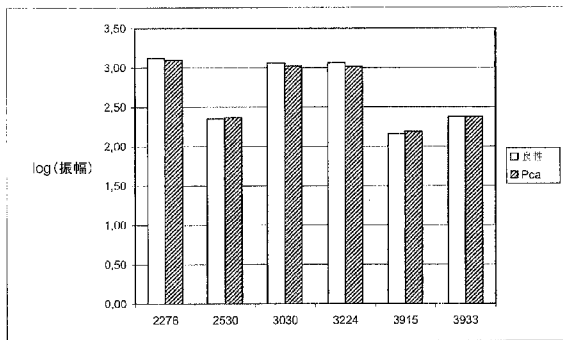


図2

【図3B】

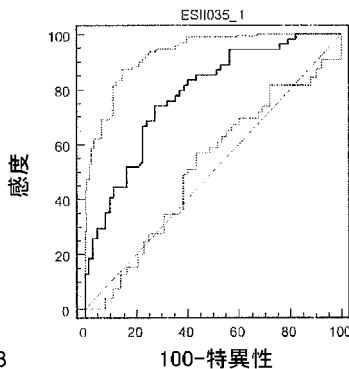


図3B

【図3A】

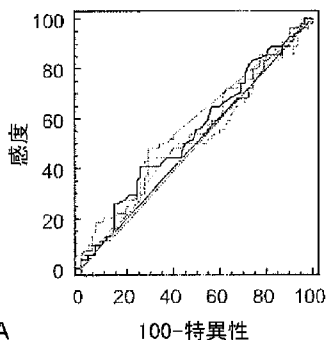


図3A

【図3C】

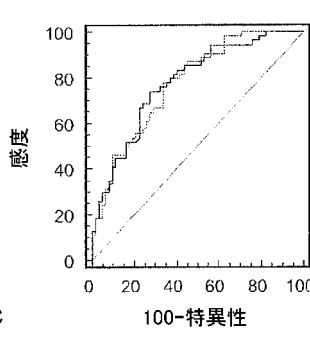


図3C

【 図 3 D 】

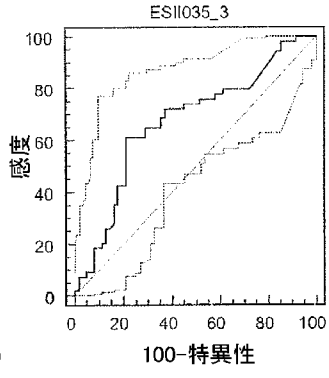


図3D

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2006/061374
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	THEODORESCU D ET AL: "PILOT STUDY OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS COUPLED TO MASS SPECTROMETRY AS A TOOL TO DEFINE POTENTIAL PROSTATE CANCER BIOMARKERS IN URINE" ELECTROPHORESIS, WILEY-VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 26, 2005, pages 2797-2808, XP000962767 ISSN: 0173-0835 the whole document	1-5,9-12
A	WO 03/072710 A (EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL; WRIGHT, GEORGE, L.,_JR; CAZARES, LISA) 4 September 2003 (2003-09-04) page 22, line 20 - page 23, line 6; claims 1-6,10,21-23	1-5,9-12
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 January 2007		Date of mailing of the international search report 20/07/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer VON EGELKRAUT, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/061374

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/25791 A (CIPHERGEN BIOSYSTEMS, INC; EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL; YIP, TAI-T) 12 April 2001 (2001-04-12) claims 1-12	1-5,9-12
A	CAZARES, L. H. ET AL.: "Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry" CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 8, 2002, pages 2541-2552, XP002344816 the whole document	1-5,9-12
A	REHMAN I ET AL: "Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study." UROLOGY. DEC 2004, vol. 64, no. 6, December 2004 (2004-12), pages 1238-1243, XP002413220 ISSN: 1527-9995 the whole document	1-5,9-12
A	FERNANDEZ C ET AL: "A preliminary study of urinary transferrin as a marker for prostatic cancer" CLINICA CHIMICA ACTA 1986 NETHERLANDS, vol. 161, no. 3, 1986, pages 335-339, XP002413221 the whole document	1-5,9-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2006/061374

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-5, 9-12 (partially)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP2006/061374
--

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

Invention 1: Claims 1-5, 9-12 (in part)

Use of the polypeptide marker No. 1 (see table in claim 1) in a method for the diagnosis of prostate cancer in samples obtained in a non-invasive manner.

Inventions 2-51: Claims 1-5, 9-12 (in part)

Use of each of the polypeptide markers Nos. 2-51 (see table in claim 1) in a method for the diagnosis of prostate cancer in samples obtained in a non-invasive manner.

Invention 52: Claims 1-14 (in part)

Use of the polypeptide marker No. 52 (see table in claim 1) in a method for the diagnosis of prostate cancer in samples obtained in a non-invasive manner.

Inventions 53-78: Claims 1-14 (in part)

Use of each of the polypeptide markers Nos. 53-78 (see table in claim 1) in a method for the diagnosis of prostate cancer in samples obtained in a non-invasive manner.

Invention 79: Claims 1-5, 9-12 (in part)

Use of the polypeptide marker No. 79 (see table in claim 1) in a method for the diagnosis of prostate cancer in samples obtained in a non-invasive manner.

Inventions 80-115: Claims 1-5, 9-12 (in part)

Use of each of the polypeptide markers Nos. 80-115 (see table in claim 1) in a method for the diagnosis of prostate cancer in samples obtained in a non-invasive manner.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/061374

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03072710 A	04-09-2003	AU 2003211157 A1	09-09-2003
		CA 2477035 A1	04-09-2003
		EP 1485461 A2	15-12-2004
WO 0125791 A	12-04-2001	AT 350662 T	15-01-2007
		AU 7868300 A	10-05-2001
		CA 2386669 A1	12-04-2001
		EP 1224466 A2	24-07-2002
		JP 2004500553 T	08-01-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/061374

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 01/25791 A (CIPHERGEN BIOSYSTEMS, INC; EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL; YIP, TAI-T) 12. April 2001 (2001-04-12) Ansprüche 1-12	1-5,9-12
A	CAZARES, L. H. ET AL.: "Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry" CLINICAL CANCER RESEARCH, Bd. 8, 2002, Seiten 2541-2552, XP002344816 das ganze Dokument	1-5,9-12
A	REHMAN I ET AL: "Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study." UROLOGY. DEC 2004, Bd. 64, Nr. 6, Dezember 2004 (2004-12), Seiten 1238-1243, XP002413220 ISSN: 1527-9995 das ganze Dokument	1-5,9-12
A	FERNANDEZ C ET AL: "A preliminary study of urinary transferrin as a marker for prostatic cancer" CLINICA CHIMICA ACTA 1986 NETHERLANDS, Bd. 161, Nr. 3, 1986, Seiten 335-339, XP002413221 das ganze Dokument	1-5,9-12

Formblatt PCT/ISA210 (Fortsetzung von Blatt 2) (April 2005)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2006/061374

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
1-5, 9-12 (teilweise)
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

 Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2006 /061374

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p>	
<p>Erfindung 1: Ansprüche 1-5, 9-12 (teilweise)</p>	
<p>Verwendung des Polypeptidmarkers Nr. 1 (siehe Tabelle Anspruch 1) in einem Verfahren zur Diagnose von Prostatakrebs in nicht-invasiv gewonnenen Proben.</p>	
<p>Erfindung 2-51: Ansprüche 1-5, 9-12 (teilweise)</p>	
<p>Verwendung jeweils der Polypeptidmarker Nr. 2-51 (siehe Tabelle Anspruch 1) in einem Verfahren zur Diagnose von Prostatakrebs in nicht-invasiv gewonnenen Proben.</p>	
<p>Erfindung 52: Ansprüche 1-14 (teilweise)</p>	
<p>Verwendung des Polypeptidmarkers Nr. 52 (siehe Tabelle Anspruch 1) in einem Verfahren zur Diagnose von Prostatakrebs in nicht-invasiv gewonnenen Proben.</p>	
<p>Erfindung 53-78: Ansprüche 1-14 (teilweise)</p>	
<p>Verwendung jeweils der Polypeptidmarker Nr. 53-78 (siehe Tabelle Anspruch 1) in einem Verfahren zur Diagnose von Prostatakrebs in nicht-invasiv gewonnenen Proben.</p>	
<p>Erfindung 79: Ansprüche 1-5, 9-12 (teilweise)</p>	
<p>Verwendung des Polypeptidmarkers Nr. 79 (siehe Tabelle Anspruch 1) in einem Verfahren zur Diagnose von Prostatakrebs in nicht-invasiv gewonnenen Proben.</p>	
<p>Erfindung 80-115: Ansprüche 1-5, 9-12 (teilweise)</p>	
<p>Verwendung jeweils der Polypeptidmarker Nr. 80-115 (siehe Tabelle Anspruch 1) in einem Verfahren zur Diagnose von Prostatakrebs in nicht-invasiv gewonnenen Proben.</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/061374

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03072710	A	04-09-2003	AU 2003211157 A1	09-09-2003
			CA 2477035 A1	04-09-2003
			EP 1485461 A2	15-12-2004
WO 0125791	A	12-04-2001	AT 350662 T	15-01-2007
			AU 7868300 A	10-05-2001
			CA 2386669 A1	12-04-2001
			EP 1224466 A2	24-07-2002
			JP 2004500553 T	08-01-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/493 (2006.01)		G 0 1 N 30/88		J
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/493		Z
G 0 1 N 33/483 (2006.01)		G 0 1 N 33/50		U
C 0 7 K 7/08 (2006.01)		G 0 1 N 33/483		F
C 0 7 K 14/00 (2006.01)		C 0 7 K 7/08		
		C 0 7 K 14/00		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

【要約の続き】

番号	質量[Da]	CE時間	番号	質量[Da]	CE時間
1	1579.7	26.4	27	1180.5	33.9
2	1991.9	17.1	28	2421.1	32.5
3	1955.9	24.8	29	4345.9	30.6
4	1140.5	21.4	30	2077.1	16.9
5	1677.3	7.4	31	1134.6	19.4
6	10753.1	13.6	32	1444.8	13.5
7	1412.6	22.1	33	1046.5	21.9
8	1636.8	27.2	34	1992.2	16.8
9	1946.9	28.4	35	4069.6	21.3
10	5887.6	25.1	36	1191.5	34.5
11	12407.9	22.2	37	1239.5	32.5
12	1186.6	17.4	38	2191.9	17.2
13	1240.6	23.3	39	1865.8	30.0
14	1326.6	24.8	40	1265.6	23.4
15	3802.1	30.1	41	1936.1	10.5
16	1749.9	19.4	42	911.3	31.9
17	2216.1	31.0	43	1494.7	26.4
18	1069.5	22.7	44	1209.6	22.5
19	1341.6	26.6	45	1193.3	34.2
20	1353.7	21.8	46	1235.4	34.3
21	1716.8	24.6	47	1390.5	35.0
22	2939.1	31.1	48	2292.1	23.7
23	3002.0	19.2	49	2736.3	17.1
24	1110.4	31.5	50	3385.5	21.0
25	1496.7	26.5	51	3945.2	21.4
26	1825.8	28.4			

番号	質量(Da)	CE時間[分]	番号	質量(Da)	CE時間[分]
52	1636.8	27.2	66	1878.9	15.3
53	1412.6	22.1	67	3593.4	14.5
54	1579.7	26.4	68	1236.7	13.3
55	1390.5	35.0	69	2736.3	17.1
56	1196.6	15.8	70	2973.4	20.0
57	11041.4	16.6	71	1134.6	19.4
58	2971.4	17.9	72	2191.9	17.2
59	3136.6	20.0	73	2205.1	25.1
60	4409.9	14.2	74	3959.7	14.0
61	1494.7	26.4	75	1749.9	19.4
62	1833.9	24.2	76	4069.6	21.3
63	2752.4	14.0	77	2816.3	24.7
64	3515.8	15.3	78	3435.8	15.0
65	1082.5	17.7			

番号	質量(Da)	CE時間[分]
79	973.26	35.44
80	1128.54	25.66
81	1173.58	37.47
82	1184.6	26.43
83	1290.39	30.85
84	1338.66	23.96
85	1428.45	36.73
86	1450.6	37.47
87	1460.71	19.83
88	1498.46	35.31
89	1526.76	23.54
90	1588.77	30.24
91	1675.77	29.23
92	1703.91	33.67
93	1808.87	23.72
94	1863.96	44.01
95	1867.79	33.29
96	1925.9	23.2
97	2036.97	31.53
98	2114.05	31.59
99	2196.11	33.16
100	2212.06	33.36
101	2257.95	36.02
102	2544.06	26.14
103	2599.21	28.05
104	2761.38	21.47
105	3334.17	31.01
106	3361.41	24.32
107	3426.43	27.73
108	3765.51	20.18
109	3864.56	33.82
110	3870.8	33.47
111	4252.03	28.77
112	6211.93	20.27
113	6650.86	25.55
114	6820.37	21.03
115	16918.24	19.8