

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 528296

(P2003 - 528296A)

(43)公表日 平成15年9月24日(2003.9.24)

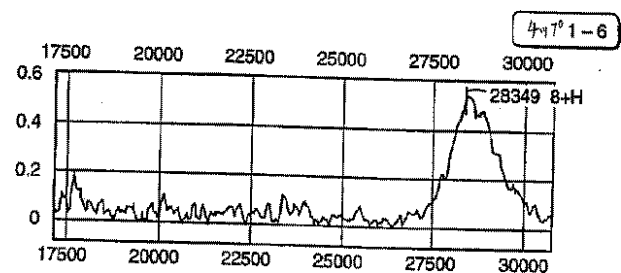
(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	A 2 G 0 4 5
B 0 1 D 15/08		B 0 1 D 15/08	4 D 0 1 7
G 0 1 N 27/62		G 0 1 N 27/62	K
			V
	30/72	30/72	C
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 59数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 538814(P2001 - 538814)	(71)出願人	マトリテック , インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0246 0, ニュートン, ネバダ ストリート 3 30
(86)(22)出願日	平成12年11月16日(2000.11.16)	(72)発明者	ワトキンス , ブラインモア エイ . アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0245 2, ウォルサム, サマー ストリート 9 9
(85)翻訳文提出日	平成14年5月15日(2002.5.15)	(72)発明者	スザロ , ロバート ピー . アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0203 8, フランクリン, アナベル レーン 1 4
(86)国際出願番号	PCT/US00/31492	(74)代理人	弁理士 山本 秀策 (外 2 名) 最終頁に続く
(87)国際公開番号	W001/036977		
(87)国際公開日	平成13年5月25日(2001.5.25)		
(31)優先権主張番号	60/165,673		
(32)優先日	平成11年11月16日(1999.11.16)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	60/172,170		
(32)優先日	平成11年12月17日(1999.12.17)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 質量に基づく分離を含む疾患マーカーの同定

(57)【要約】

本発明は、哺乳動物（例えば、ヒト）における疾患マーカー（例えば、癌マーカー）の迅速な検出および特徴付けのための方法および組成物を提供する。一旦同定されると、このマーカーは、疾患を検出するためのアッセイにおける標的として、疾患の処置のための標的として、またはその両方として使用され得る。好ましい実施形態において、このサンプルは、組織または体液サンプルのいずれかであり得る。好ましい体液としては、例えば、血液、血漿、血清、汗、涙、尿、腹膜液、リンパ、膣分泌液、精液、髄液、腹水、唾液、痰、または乳房分泌液が挙げられる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物における疾患を示すマーカー分子を同定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該疾患を有する哺乳動物から収集したサンプルから大量のタンパク質を除去する工程；

(b) 該工程(a)により生成したサンプルを画分化する工程であって、複数の画分を生成し、各画分が複数の分子を含む、工程；

(c) 該工程(b)によって生成した画分内に含まれる分子を、質量によって分離する工程；

(d) 該工程(a)～(c)を、該疾患を有さない哺乳動物から収集したサンプルを用いて繰り返す工程；および

(e) 該工程(c)により分離した分子と該工程(d)によって分離した分子とを比較して、該疾患を有さない哺乳動物由来のサンプルに対して該疾患を有する哺乳動物由来のサンプル中に高濃度で存在するマーカー分子を同定する工程であって、ここで該マーカー分子は該疾患を示す、工程、
を包含する、方法。

【請求項2】 前記工程(a)において、前記サンプルが体液である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記体液が、血液、血清、血漿、汗、涙、尿、腹膜水、リンパ液、腔分泌物、精液、髄液、腹水、唾液、痰、または乳房滲出液である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記体液が血清である、請求項2に記載の方法。

【請求項5】 前記大量のタンパク質が、前記サンプル中の総タンパク質の5%(w/w)より多くを構成する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記大量のタンパク質が、前記サンプル中の総タンパク質の20%(w/w)より多くを構成する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記大量のタンパク質が、免疫グロブリンまたはアルブミンである、請求項5に記載の方法。

【請求項8】 前記大量のタンパク質が、免疫グロブリンまたはアルブミン

である、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 前記工程(b)において、前記画分化が非電気泳動法による画分化である、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 前記工程(b)において、前記画分化がアフィニティークロマトグラフィーによる画分化である、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記アフィニティークロマトグラフィーがイオン交換クロマトグラフィーである、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記イオン交換クロマトグラフィーが陰イオン交換クロマトグラフィーである、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記アフィニティークロマトグラフィーが、固体支持体上に配置された炭水化物結合部分を有する固体支持体を用いる、請求項10に記載の方法。

【請求項14】 前記炭水化物結合部分がレシチンを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記工程(c)において、前記分子が、マトリクスアシスティッドレーザーデソーブション/イオン化-飛行時間型(MALDI-TOF)質量分光法、または表面増強レーザーデソーブション/イオン化-飛行時間型(SELDI-TOF)質量分光法によって分離される、請求項1に記載の方法。

【請求項16】 前記工程(e)において、前記マーカ分子が、前記疾患を有する哺乳動物由来のサンプルにおいて検出可能であるが、前記疾患を有さない哺乳動物由来のサンプルにおいて検出不可能である、請求項1に記載の方法。

【請求項17】 前記マーカ分子がタンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項18】 前記疾患が癌である、請求項1に記載の方法。

【請求項19】 前記癌が、乳癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、頸部癌、卵巣癌、結腸癌または結腸直腸癌である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記哺乳動物がヒトである、請求項1に記載の方法。

【請求項21】 哺乳動物における疾患を示すマーカ分子を同定するため

の方法であって、該方法は、以下：

(a) 該疾患を有する哺乳動物から収集した体液サンプルから大量のタンパク質を除去する工程；

(b) 該工程(a)により生成したサンプルを、イオン交換クロマトグラフィーによって画分化して、複数の画分を生成する工程であって、該画分の各々が複数の分子を含む、工程；

(c) 該工程(b)によって生成した画分内に含まれる分子を、表面増強レーザーデソープション/イオン化-飛行時間質量型分光法によって分離する工程；

(d) 該工程(a)～(c)を、該疾患を有さない哺乳動物から収集した体液サンプルを用いて繰り返す工程；および

(e) 該工程(c)により生成した分子と該工程(d)によって生成した分子とを比較して、該疾患を有さない哺乳動物由来のサンプルと比較して該疾患を有する哺乳動物由来のサンプル中により高濃度で存在するマーカー分子を同定する工程であって、ここで該マーカー分子は該疾患を示す、工程、を包含する、方法。

【請求項22】 前記工程(a)において、前記体液が、血液、血清、血漿、汗、涙、尿、腹膜水、リンパ液、腔分泌物、精液、髄液、腹水、唾液、痰、または乳房滲出液である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記工程(a)において、前記体液が血清である、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 前記大量のタンパク質が、前記サンプル中の総タンパク質の5%(w/w)より多くを構成する、請求項21に記載の方法。

【請求項25】 前記大量のタンパク質が、前記サンプル中の総タンパク質の20%(w/w)より多くを構成する、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 前記大量のタンパク質が、免疫グロブリンまたはアルブミンである、請求項24に記載の方法。

【請求項27】 前記イオン交換クロマトグラフィーが陰イオン交換クロマトグラフィーである、請求項20に記載の方法。

【請求項28】 前記工程(e)において、前記マーカー分子が、前記疾患

を有する哺乳動物由来の体液サンプルにおいて検出可能であるが、前記疾患を有さない哺乳動物由来の体液サンプルにおいて検出不可能である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】 前記マーカー分子がタンパク質である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 0】 前記疾患が癌である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】 前記癌が、乳癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、頸部癌、卵巣癌、結腸癌または結腸直腸癌である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】 前記哺乳動物がヒトである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】 請求項 1 に記載の方法によって同定される、単離されたマーカー分子。

【請求項 3 4】 請求項 3 2 に記載の方法によって同定される、単離されたマーカー分子。

【請求項 3 5】 哺乳動物における疾患を診断する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該哺乳動物由来のサンプルを、疾患関連タンパク質に特異的に結合する結合部分と接触させて、結合部分 - 疾患関連タンパク質複合体を生成する工程であって、ここで、該結合部分が請求項 1 7 に記載の方法によって同定されるマーカータンパク質に特異的に結合する、工程；および

(b) 該複合体の存在を検出する工程であって、存在する場合、該哺乳動物における疾患の存在を示す、工程、を包含する、方法。

【請求項 3 6】 前記結合部分が抗体である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】 前記抗体が、検出可能な部分で標識される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 40】 前記検出可能な部分が、放射性標識、ハプテン標識、蛍光標識および酵素標識からなる群から選択される標識を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】 前記疾患が癌である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 42】 前記哺乳動物がヒトである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 43】 哺乳動物における疾患を診断する方法であって、該方法は、以下：

(c) 該哺乳動物由来のサンプルを、疾患関連タンパク質に特異的に結合する結合部分と接触させて、結合部分 - 疾患関連タンパク質複合体を生成する工程であって、ここで、該結合部分が請求項 29 に記載の方法によって同定されるマーカータンパク質に特異的に結合する、工程；および

(d) 該複合体の存在を検出する工程であって、存在する場合、該哺乳動物における疾患の存在を示す、工程、
を包含する、方法。

【請求項 44】 前記結合部分が抗体である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 47】 前記抗体が、検出可能な部分で標識される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 48】 前記検出可能な部分が、放射性標識、ハプテン標識、蛍光標識および酵素標識からなる群から選択される標識を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】 前記疾患が癌である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 50】 前記哺乳動物がヒトである、請求項 43 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

（関連出願の参考文献）

本願は、代理人整理番号MTP - 026により同定される実用特許出願（表題「Methods and Compositions for Identifying Disease Markers」、2000年11月10日出願）、ならびに米国出願番号60/165,673（1999年11月16日出願）；米国出願番号60/172,170（1999年12月17日出願）；米国出願番号60/178,860（2000年1月27日出願）；および米国出願番号60/207,721（2000年5月3日出願）の優先権を主張し、これらの開示は本明細書中で参考として援用される。

【0002】

（発明の分野）

本発明は一般に、哺乳動物における疾患マーカー（例えば、癌マーカー）を同定するための方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、体液中のガンママーカーを同定するための質量分光法に基づく方法および組成物に関する。

【0003】

（発明の背景）

様々な哺乳動物の障害（例えば、癌）の検出および/または処置において有用な新しい生物学的マーカーを同定する継続した必要性が存在する。様々なマーカーは特定の疾患について同定されているが、現在利用可能なマーカーがない疾患に対するマーカー、ならびに現存のマーカーより高感度かつ確かなマーカーを同定する必要性がなお存在する。

【0004】

生化学的マーカーは、目的の疾患を有する哺乳動物由来の組織または身体サンプルを分析し、そしてその分析の結果を、その疾患を有さない哺乳動物から得られたサンプルと比較することによって同定され得る。二次元ゲル電気泳動を使用する1つの首尾良いアプローチにより、様々なマーカータンパク質が同定され、このマーカータンパク質は、疾患哺乳動物の組織または体液サンプル中に、正常

な哺乳動物と比較して高濃度で存在する。例えば、Partinら(1993) CANCER RES. 53: 744 - 746 (これは、前立腺癌マーカーの同定を記載する)およびGetzenbergら(1996) CANCER RES. 56: 1690 - 1694 (これは、膀胱癌マーカーの同定を記載する)を参照のこと。

【0005】

米国特許第5,858,683号は、個体における頸部癌を同定するための方法を開示する。この方法において、正常な頸部組織のサンプル由来のタンパク質抽出物は、二次元ゲル電気泳動によって画分化された。同様に、頸部癌生検組織のサンプル由来の第2のタンパク質抽出物もまた、二次元ゲル電気泳動によって画分化した。得られたゲルを比較し、そして癌サンプル中に高濃度で存在するタンパク質に対応するスポット 対 正常サンプルのスポットを同定した。タンパク質を二次元ゲルで目的のスポットから溶出し、そして従来のタンパク質微量配列決定に供して、目的のスポット内のタンパク質を同定した。このアプローチは、少なくとも2つの頸部癌マーカー(当該分野で、TDP-43およびIEF-SSP-9502と称される)の同定を導いた。このアプローチは首尾良いが、癌マーカーのより迅速な同定のためのプロトコルを開発する必要性、および他の場合においてゲル電気泳動アプローチを使用して検出され得ないマーカーを同定するための必要性がなお存在する。

【0006】

より最近では、ガンマーカーを同定するための代替の非電気泳動に基づく方法(すなわち、電気泳動工程を必要としない)は、Changら(1999)、RAPID COMMUN. MASS SPECTRUM. 13, 1808 - 1812に報告されている。培養細胞(正常な乳房細胞または悪性乳房細胞のいずれか)由来の溶解物を、非多孔性逆相高速液体クロマトグラフィーにより画分化して、タンパク質分離特性を得た。悪性細胞溶解物中に特異的に存在するより大量のタンパク質を収集し、そしてマトリクスアシスティッドレーザーデソープション/イオン化型(MALDI)質量分光法により分析して、この大量のタンパク質の質量を決定した。さらに、各タンパク質のサンプルをトリプシン処理し、そ

してトリプシンのフラグメントをMALDIに供し、このフラグメントの質量を得、次いで、この質量をタンパク質データベースと比較して、癌細胞ベースのサンプル中の大量のタンパク質を同定した。この方法の実施によって、様々なタンパク質（例えば、リンタンパク質p53、プロトオンコジーンチロシンキナーゼSRC(C-SRC)、c-mycプロモータータンパク質、および乳房上皮抗原AB46（これら全ては乳癌溶解物中に大量に存在する））の同定が可能となる。細胞溶解物より複雑なサンプルを分析するためのこのタイプのアプローチの有用性は、さらに評価される必要がある。

【0007】

従って、実際の組織または体液サンプル中に存在する疾患マーカーを迅速に同定するために使用され得る新しい方法および組成物を開発する必要性が、当該分野においてなお存在する。このような新しい方法は、疾患マーカーを同定するためのすでに存在する方法を補足し得、その結果さらなる疾患マーカーが同定され得ることが企図される。

【0008】

（発明の要旨）

本発明は、哺乳動物（例えば、ヒト）における疾患マーカー（例えば、癌マーカー）の迅速な検出および特徴付けのための方法および組成物を提供する。一旦同定されると、このマーカーは、疾患を検出するためのアッセイにおける標的として、疾患の処置のための標的として、またはその両方として使用され得る。

【0009】

1つの局面において、本発明は、哺乳動物における疾患を示すマーカー分子を同定するための方法を提供する。この方法は、以下の工程を包含する：（a）疾患を有する哺乳動物から収集したサンプルから少なくとも1つの大量のタンパク質を除去する工程；大量のタンパク質が枯渇した得られたサンプルを画分化して、複数の画分を生成する工程であって、ここで各画分は複数の分子を含有する、工程；（c）次いで、予め選択した画分に含まれる分子を質量によって分離する工程；工程（a）～（c）を、疾患を有さない哺乳動物から収集したサンプルを用いて繰り返す工程；および（e）疾患を有する哺乳動物由来のサンプルから分

離した分子を、疾患を有さない哺乳動物由来のサンプルから分離した分子と比較する工程。結果として、疾患を有する哺乳動物由来のサンプル中に、疾患を有さない哺乳動物由来のサンプルと比較して高濃度で存在する1つ以上のマーカー分子を迅速に同定することが可能であり、個々で、マーカー分子の存在は疾患の存在を示す。

【0010】

好ましい実施形態において、このサンプルは、組織または体液サンプルのいずれかであり得る。好ましい体液としては、例えば、血液、血漿、血清、汗、涙、尿、腹膜液、リンパ、腔分泌物、精液、髄液、腹水、唾液、痰、または乳房滲出液が挙げられる。しかし、血清が現在のところ最も好ましい。

【0011】

サンプルから1つ以上の大量のタンパク質を除去することによって、潜在的な疾患マーカーとしてより少ない多量のタンパク質を評価することが容易になることが発見された。本明細書中で使用する場合、大量のタンパク質は、サンプル中の総タンパク質の約5% (w/w) 以上、より好ましくは20% (w/w) 以上を構成する。サンプルが血清である場合、この大量のタンパク質は、典型的には、免疫グロブリンまたはアルブミンである。好ましい実施形態において、免疫グロブリンおよびアルブミンの両方は、血清から除去されて、さらなる処理のために適切な免疫グロブリンおよびアルブミンの枯渇した血清を生成する。

【0012】

サンプルの少なくとも1つの大量のタンパク質を枯渇した後、次いで、得られたサンプルを画分化して複数の画分を得、ここで、各画分は複数の分子を含有する。好ましい実施形態において、初めの画分化は、非電気泳動法（例えば、クロマトグラフィー、より詳細には、アフィニティークロマトグラフィー）によって行われる。より好ましい実施形態において、このアフィニティークロマトグラフィーは、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー）である。イオン交換クロマトグラフィーの間、目的のサンプルは、適切なマトリクス（例えば、陰イオン交換マトリクスもしくは陽イオン交換マトリクス）と合わされ、そして分子はこのマトリクスと結合される。未結合の物質を除去する

ために洗浄した後、次いで、結合した分子を異なる溶出緩衝液に選択的に溶出し、各緩衝液は、好ましくは、異なる分子の集団を溶出する。イオン交換クロマトグラフィーにおいて、例えば、溶出緩衝液は、異なるタイプの分子の優先的な溶出を可能にするために、異なる塩濃度を含み得る。適切な緩衝液を選択することによって、複数の画分（この各々は、複数の分子を含有する）を生成することが可能となる。あるいは、アフィニティクロマトグラフィーは、固体支持体上に沈着した炭水化物結合部分（例えば、レクチン）を有する支持体を使用することによって実施され得る。結果として、炭水化物含有分子（例えば、非グリコシル化分子からのグリコシル化分子）を分離することが可能となる。

【0013】

1つ以上の得られた画分は、次いで、特定の画分内に含まれる分子の質量を得るために、質量分光計によって分析され得る。例えば、各画分は、マトリクスアシスティッドレーザーデソーブション/イオン化-飛行時間(MALDI-TOF)型質量分光法によって、より好ましくは、表面増強レーザーデソーブション/イオン化-飛行時間(SELDI-TOF)型質量分光法によって分析され得る。このプロトコルの間に、分子は質量によって分離される。結果として、サンプル内の質量のプロフィールを生成することが可能となる。疾患を有する哺乳動物由来のサンプル中に高濃度で存在する分子と、疾患を有さない哺乳動物由来のサンプル中に存在する分子を比較することによって、疾患哺乳動物において高レベルで見出される分子を同定することが可能となる。

【0014】

必要ならば、マーカー分子をさらに同定することが可能である。さらなる分析は、分子を単離する工程を包含し、例えば、分子がタンパク質である場合、そのタンパク質は、従来のトリプシンマッピングおよび/またはアミノ酸配列決定方法によってさらに同定され得る。

【0015】

本発明の方法は、疾患が癌である場合、マーカーの同定において特に有用であることが企図される。従って、この方法は、乳癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、頸部癌、卵巣癌、結腸癌または結腸直腸癌に対するマーカーを同定するために使用

され得ることが企図される。本明細書中以下の実施例は、乳癌マーカーの同定を開示する。

【0016】

別の局面において、マーカータンパク質は、一旦同定されると、哺乳動物における疾患を診断するためのアッセイにおいて使用され得る。好ましい実施形態において、この方法は、以下の工程を包含する：(a)哺乳動物由来のサンプルを、疾患関連タンパク質に特異的に結合する結合部分と接触させて、結合部分-疾患関連タンパク質複合体を生成する工程であって、ここで、この結合部分は、本発明の方法によって同定されるマーカータンパク質に特異的に結合する、工程；および(b)この複合体の存在を検出する工程であって、存在する場合、これは、哺乳動物における疾患の存在を示す、工程。

【0017】

好ましい実施形態において、この結合部分は、抗体（例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはそれらのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、(Fab')₂）、または生合成抗体結合部位（例えば、sFv））である。結合部分は、好ましくは、検出可能な部分（例えば、放射性標識、ハプテン標識、蛍光標識、または酵素標識）で標識される。

【0018】

マーカータンパク質の存在または量は、従って、個体における疾患の存在を示し得る。例えば、サンプル中のマーカータンパク質の量は、以前に較正された閾値と比較されて、疾患の存在または非存在を示し得、ここで、閾値に対するサンプル中の複合体の量は、個体における疾患の存在または非存在を示し得る。このような方法は、組織（例えば、乳房組織）または体液（例えば、血清）のいずれかについて行われ得る。

【0019】

本発明のこれらおよび他の多数のさらなる局面および利点は、以下の図面、詳細な説明および上記の特許請求の範囲の考察によって明らかになる。

【0020】

（発明の詳細な説明）

本発明は、疾患の検出のためのアッセイまたは疾患の処置のいずれかにおいて標的として有用である疾患マーカーを同定するための方法および組成物を提供する。マーカーが、例えば、タンパク質である場合、固体における疾患の存在は、マーカータンパク質、および/あるいはマーカータンパク質またはマーカータンパク質をコードする核酸配列にハイブリダイズする核酸プローブに結合する結合部分（例えば、抗体）を使用して検出され得ることが企図される。さらに、当業者が、疾患を処置するための以下のような新規の治療薬を生成し得ることが企図される：例えば、個体に投与され得るかまたはインビボで標的タンパク質に結合し、そしてその生物学的活性を減少または排除する抗体；標的タンパク質をコードする遺伝子または遺伝子転写物にハイブリダイズし、それによりインビボで標的タンパク質の発現を減少する核酸またはペプチジル核酸配列；または低分子（例えば、標的タンパク質または他の細胞部分（例えば、標的タンパク質に対するレセプター）と相互作用して、標的タンパク質の生物学的活性を減少または排除する有機分子）。

【0021】

疾患マーカーを同定するための方法およびこのマーカータンパク質を標的として使用することによって疾患を検出するための方法が、以下に記載される。

【0022】

（1．疾患マーカーを同定するための方法）

一般的には、疾患マーカーは、疾患を有すると診断された哺乳動物の組織または体液のサンプルの組成を、疾患を有さない個体由来の同様に処理されたサンプルの組成と比較することによって同定される。従って、得られたマーカーは、哺乳動物における疾患の存在または非存在を検出するためのアッセイにおいて使用され得る。さらに、同じ方法は、別の疾患状態（例えば、進行性の癌対静止状態の癌）と比較して1つの疾患状態で高濃度で存在するマーカーを同定するために用いられ得る。

【0023】

本明細書中で使用する場合、用語「マーカー」は、任意の生物学的マーカー（例えば、タンパク質または核酸）を意味すると理解され、ここで、生物学的マ-

カーは、疾患を有さない個体の組織または体液サンプルと比較して、疾患を有すると診断されたかまたは疾患を有するとして診断された個体の組織または体液サンプル中に高濃度で検出され得、これは種、ならびにその対立遺伝子改変体およびそのフラグメントを含む。用語「マーカー」および「標的」は、本明細書中で交替可能に使用される。マーカーが疾患状態に対して特有である必要はない；むしろ、マーカーは疾患個体由来のサンプルと疾患を有さない個体由来のサンプルとを区別するのに十分高いシグナル対ノイズ比を有するべきである。

【0024】

一実施形態において、本発明の方法は、以下の工程を包含する：(a) 疾患を有する哺乳動物から収集したサンプルから少なくとも1つの大量のタンパク質を除去する工程；(b) 大量のタンパク質を枯渇した得られたサンプルを画分化して、複数の画分を生成する工程であって、各画分は複数の分子を含有する、工程；(c) 次いで、予め選択した画分に含まれる分子を質量によって分離する工程；(d) 疾患を有さない哺乳動物から収集したサンプルを用いて、工程(a)～(c)を繰り返す工程；および(d) 疾患を有する哺乳動物由来のサンプルから分離した分子を、疾患を有さない哺乳動物由来のサンプルから分離した分子と比較する工程。結果として、疾患を有さない哺乳動物由来のサンプルと比較して、疾患を有する哺乳動物由来のサンプル中に高濃度で存在する1つ以上のマーカー分子を迅速に同定することが可能となる。得られたマーカーは、一旦同定されると、疾患の存在または状態を検出するためのアッセイ、または治療の標的として使用され得る。

【0025】

この方法は、組織または体液サンプル中のマーカーを同定するために使用され得ることが企図される。しかし、この方法は、体液（例えば、血液、血清、血漿、汗、涙、尿、腹膜液、リンパ、腔分泌物、精液、髄液、腹水、唾液、痰または乳房滲出液）中の疾患マーカーの同定において特に有用である。しかし、血清が最も好ましい。

【0026】

サンプルから1つ以上の大量のタンパク質を除去することによって、より少な

い大量のタンパク質を潜在的な疾患マーカーとして評価することがより容易になる。本明細書中で使用する場合、大量のタンパク質は、サンプル中の総タンパク質の約5% (w/w) 以上、より好ましくは、約20% (w/w) 以上を構成する。サンプルが血清である場合、大量のタンパク質は、典型的に、免疫グロブリンまたはアルブミンである。血清において、アルブミンは、総血清タンパク質の約57~71%を構成し、そして免疫グロブリンは、総血清タンパク質の8~26%を構成することが報告されている (Lolloら (1999)、ELECTROPHORESIS 20:854-869)。従って、これらのタンパク質のみの除去によって、疾患マーカーとして少ない大量のタンパク質を評価することが容易になり得る。従って、血清から免疫グロブリンおよびアルブミンの両方を除去して、さらなる処理のために適切な免疫グロブリンおよびアルブミンを枯渇した血清を生成することが好ましい。

【0027】

免疫グロブリンおよび/またはアルブミンタンパク質は、当該分野において公知であり使用される、従来の方法論 (例えば、親和性に基づく方法論) を使用して、抽出され得る。例えば、免疫グロブリンは、固体支持体上に固定された結合タンパク質 (例えば、抗体またはそのフラグメント、プロテインA、またはプロテインG) を使用して、サンプルから選択的に除去され得る。例えば、目的の溶液は、このような固体支持体を充填したクロマトグラフィーカラムに、免疫グロブリン分子がマトリクスに優先的に結合する条件下で通過され得る。従って、流した後の (flow through) 得られるカラムは、免疫グロブリンが除去されている。好ましいマトリクスは、アガロース粒子に結合したプロテインGを含み、これは、Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJから、Hitrap Protein Gの商品名で市販されている。同様に、アルブミンは、目的のサンプルに関して、例えば、シバクロンブルーに結合したセファロース (Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJから市販されている) を使用するアフィニティークロマトグラフィーによって、選択的に除去され得る。あるいは、アルブミンと免疫グロブリンGとの両方が、ProtoClear™ (Lolloら (1999) ELECTROPHORESIS 20:854-869) を使用して、サンプルから選択的に除去され得る。

OPHORESIS 20:854-859)を使用して、血清から同時に除去され得る。この著者らは、95%より多くのヒト血清アルブミンおよび97%より多くのヒト免疫グロブリンが、ProtoClear™を使用して除去され得ることを報告する。

【0028】

少なくとも1つの過剰のタンパク質をサンプルから除去した後に、次いで、得られるサンプルを分画して、複数の画分を得、各画分が、複数の分子を含む。最初の分画は、好ましくは、電気泳動ではない方法(例えば、クロマトグラフィー、より具体的には、アフィニティークロマトグラフィー)による。より好ましい実施形態において、アフィニティークロマトグラフィーは、イオン交換クロマトグラフィー(例えば、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー)である。血清を用いて、この工程は、好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィーによって実施される。イオン交換クロマトグラフィーの間に、目的のサンプルを適切なマトリクス(例えば、陰イオン性交換マトリクス)と混合し、そして分子をこのマトリクスと結合させる。洗浄して、結合していない材料を除去した後に、次いで、結合した分子を異なる溶出緩衝液中に選択的に溶出し、各緩衝液は、分子の異なる集団を優先的に溶出する。適切な緩衝液を選択することによって、各々が複数の分子を含む複数の画分を生じることが可能であることが、考慮される。実施例1に詳細に記載される手順において、免疫グロブリンおよびアルブミンを実質的に含まない血清が、陰イオン交換クロマトグラフィーによって、おおよそ等量のタンパク質を含む12の画分に副分割された。「実質的に含まない」とは、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも95%の特定の分子を含むことを意味すると理解される。陰イオン交換クロマトグラフィーは、異なる集団のサンプルを生成し、各サンプルが、多数であるが最初の出発物質より数が有意に少ない分子を含む。次いで、これらの分子は、質量の関数としてより容易に特徴付けられ得る。例示的なプロトコルにおいて、血清は、Manno Q (Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ)陰イオン交換カラムに、リン酸緩衝液中で適用される。一旦結合したタンパク質は、塩(例えば、塩

化ナトリウム)の濃度を一連の溶出緩衝液において増加させることによって、溶出され得る。適切な塩濃度の選択は、当該分野の技術のレベル内であるとみなされ、そして出発物質の型、ならびに各集団において所望のタンパク質の型および数のような変数に依存する。

【0029】

あるいは、アフィニティークロマトグラフィーは、炭水化物結合部分(例えば、レクチン)が上に配置された固体支持体を使用して実施される。その結果、非グリコシル化分子からグリコシル化分子を分離することが可能である。

【0030】

次いで、得られる画分の1つ以上を、例えば質量分析によって、質量によって分析し得る。例えば、各画分は、マトリクスアシスティッドレーザーデソープシオン/イオン化-飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析によって、または表面増強レーザーデソープシオン/イオン化-飛行時間型(SELDI-TOF)質量分析によって、分析され得る。米国特許第5,719,060号を参照のこと。

【0031】

一般に、質量分析法による分析は、高エネルギー源(例えば、レーザー)を使用しての材料のサンプルの蒸発およびイオン化を包含する。通常、この材料は、プローブチップの表面から気体または蒸気相へと、レーザービームによって蒸発し、これによって、個々の分子のいくつかは、イオン化される。次いで、正に荷電した分子は、高電圧場を使用して加速され、そして高真空チャンバ内(この端部は、検出表面である)に飛ばされる。飛行時間は、イオン化された分子の質量の関数であるので、イオン化と衝突との間の経過時間を使用して、分子の質量を決定し得る。その結果、この型の質量分析法を使用して、サンプル内の質量のプロフィールを作成することが可能である。疾患を有する哺乳動物由来のサンプル中により高い濃度で存在する分子を、疾患を有しない哺乳動物由来のサンプルに存在する分子に対して比較することによって、疾患した哺乳動物において上昇したレベルで見出される分子(すなわち、マーカー)を同定することが可能である。

【0032】

質量分析法を使用して、さらに、マーカーを、これらの特定の表面に対する結合親和性によって特徴付けることが可能である。例えば、SELDI-TOF質量分析法において、いくつかの異なる表面が、Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CAから市販されている。表面の各々が、異なる表面特性を有し、従って、マーカーの異なる集団を結合する。利用可能な表面としては、銅処理した表面およびニッケル処理した表面が挙げられ、これらは、銅またはニッケルの塩溶液を、エチレンジアミン三酢酸を含むチップに添加することによって、生成し得る。他のSELDIチップ表面としては、以下が挙げられる：カルボキシレート部分を含むWCX-2、および四級アンモニウム部分を含むSAX-2。従って、これらのマーカーは、さらに、これらの特定のSELDIチップに対する親和性によって特徴付けられ得る。例えば、本明細書中において使用される場合に、特定のSELDIチップに対する「親和性」との用語は、マーカーが、本明細書中に開示される他のSELDIチップ（例えば、ニッケル、SAX-2およびWCX-2チップ）の1つ以上に対して、1つの型のSELDIチップ（例えば、銅SELDIチップ）に優先的に結合することを意味することが理解される。実施例1に詳細に議論されるように、疾患した個体由来の血清と健常な個体由来の血清との比較は、疾患した個体の血清中に検出可能なレベルで頻繁に存在するが健常な個体の血清においては匹敵するレベルで頻繁には存在しない、多数のタンパク質を明らかにした。

【0033】

一旦、マーカー（例えば、タンパク質マーカー）が質量分析法によって同定されると、この同定されたタンパク質を、標準的なタンパク質単離方法論によって単離し得、そして、当該分野において公知でありかつ使用されているタンパク質配列決定方法論を使用して配列決定し得る。例えば、マーカーの各々は、一旦同定されると、先の工程においてそのマーカーから誘導された方法論および情報を使用して、均一にまで精製され得る。例えば、マーカーは、質量分析法によって決定されたその質量、ならびにその他の物理的性質および化学的性質（例えば、アフィニティーカラム（例えば、イオン交換カラム）に結合する能力）に基づい

て、単離され得る。これらのタンパク質は、さらに、従来のアミノ酸配列決定（例えば、タンパク質分解フラグメントの、Edman分解および/または質量分析に基づくミクロ配列決定）によって、特徴付けられ得る。

【0034】

本発明の方法が、特に、疾患が癌である場合にマーカーを同定する際に有効であることが、考慮される。従って、この方法を使用して、乳癌、肺癌、前立腺癌、膀胱癌、頸部癌、卵巣癌、結腸癌または結腸直腸癌に対するマーカーを同定し得ることが考慮される。本明細書中以下の実施例は、乳癌マーカーの同定を開示する。

【0035】

（2．疾患の検出）

一旦、疾患マーカーが同定されると、このマーカー（例えば、タンパク質またはこのタンパク質をコードする核酸）を使用して、個体が疾患を有するか否かを決定し得、そしてそうである場合には、適切な検出方法を使用して、この疾患の状態をモニタリングし得る。

【0036】

タンパク質またはこのタンパク質をコードする核酸をマーカーとして使用することによって、当業者は、ヒトにおいて疾患を検出するための種々の検出方法を作製し得る。これらの方法は、代表的に、何らかの手段によって、ヒトの組織または体液のサンプルにおける1つ以上のマーカーの存在を検出する工程を包含する。ヒトにおいてマーカーを検出するための方法の、正確さおよび/または信頼性は、予め選択された組織または体液のサンプルにおいて、複数のマーカータンパク質または核酸の存在を検出することによって、さらに増強され得る。検出アッセイは、本明細書中以下に記載されるプロトコルの1つ以上を包含し得る。

【0037】

（2．A．タンパク質に基づくアッセイ）

マーカーがタンパク質である場合には、このタンパク質は、例えば、このマーカータンパク質を、このマーカータンパク質を特異的に結合し得る結合部分と組み合わせることによって、検出され得る。この結合部分は、例えば、リガンド-

レセプター対（すなわち、特異的な結合相互作用を有し得る分子の対）のメンバーを含み得る。結合部分は、例えば、特異的な結合対（例えば、抗体 - 抗原、酵素 - 基質、核酸 - 核酸、タンパク質 - 核酸、タンパク質 - タンパク質、または当該分野で耕地の他の特異的な結合対）のメンバーを含み得る。標的タンパク質に対する親和性が増強された結合タンパク質が、設計され得る。必要に応じて、結合部分は、検出可能な標識（例えば、酵素標識、蛍光標識、放射性標識、リン光標識、または有色粒子標識）と連結され得る。標識された複合体は、例えば、視覚的にかまたは分光計もしくは他の検出器の補助によって、検出され得る。

【0038】

マーカートンパク質はまた、当該分野において利用可能なゲル電気泳動技術を使用して、検出され得る。二次元ゲル電気泳動において、タンパク質は、最初に、それらの等電点に従って、pH勾配ゲルにおいて分離される。次いで、得られるゲルは、第2のポリアクリルアミドゲルに置かれ、そしてタンパク質は、分子量によって分離される（例えば、O'Farrell (1975) J. Biol. Chem. 250:4007-4021を参照のこと）。

【0039】

1つ以上のマーカートンパク質が、最初に疾患を有すると疑われる個体から得たサンプルからタンパク質を単離し、次いでこのタンパク質を二次元ゲル電気泳動で分離して、特徴的な二次元ゲル電気泳動パターンを作成することによって、検出され得る。次いで、このパターンを、正常細胞または既知の癌細胞から単離されたタンパク質を同一かまたは類似の条件下で分離することによって作成された標準ゲルパターンと比較し得る。標準ゲルパターンは、電気泳動パターンの電子データベースに格納され得、そしてこのデータベースから検索され得る。二次元ゲルにおけるマーカートンパク質の存在は、試験されているサンプルが疾患を有する人物から採取されたことの指標を提供する。本明細書中において記載される他の検出アッセイを用いてと同様に、2つ以上のタンパク質の検出（例えば、二次元ゲル電気泳動パターンにおいて）は、アッセイの正確さをさらに増強する。二次元ゲル上での複数（例えば、2～5）のマーカートンパク質の存在は、個体における疾患の存在のなお強力な指標を提供する。従って、このアッセイは、

疾患の初期の検出および処置を可能にする。

【0040】

マーカートンパク質はまた、当該分野において利用可能な広範にわたる免疫アッセイ技術のいずれか1つを使用して、検出され得る。例えば、当業者は、サンドイッチ免疫アッセイ形式を使用して、体液サンプル中の疾患マーカーを検出し得る。あるいは、当業者は、1つ以上の標識された結合タンパク質を使用して、組織サンプルにおけるマーカーの存在を検出するために、従来の免疫組織化学的手順を使用し得る。

【0041】

サンドイッチ免疫アッセイにおいては、マーカートンパク質を結合し得る2つの抗体が、一般的に使用される。例えば、1つは固体支持体上に固定され、そして1つは、溶液中でフリーであり、そして検出可能な化学化合物で標識されている。第2の抗体に対して使用され得る化学的標識の例としては、放射性同位体、蛍光性化合物、および酵素、または反応物もしくは酵素基質に曝露させる場合に有色かまたは電気化学的に活性な生成物を生成する他の分子が挙げられる。マーカートンパク質を含むサンプルがこの系に配置される場合に、このマーカートンパク質は、免疫された抗体と標識された抗体との両方に結合して、「サンドイッチ」免疫複合体を支持体表面上で形成する。次いで、複合体形成したタンパク質が、結合していないサンプル化合物および過剰の標識抗体を洗浄除去し、そして支持体の表面上でタンパク質と複合体形成した標識抗体の量を測定することによって、検出される。あるいは、化学的部分（例えば、ハプテン）で標識され得る、溶液中でフリーの抗体は、フリーな抗体かまたは例えばそこに結合したハプテンを結合する検出可能な部分で標識された、第3の抗体によって、検出され得る。

【0042】

サンドイッチ免疫アッセイと組織免疫組織化学的手順との両方が、良好な検出限界を有する標識が使用されると仮定すれば、高度に特異的かつ非常に感受性である。免疫学的アッセイの設計、理論およびプロトコルの詳細な概説は、当該分野における多数の教科書（「Practical Immunology」, B

utt, W. R. 編、(1984) Marcel Dekker, New York および「Antibodies, A Laboratory Approach」, Harlowら編(1988) Cold Spring Harbor Laboratory が挙げられる)において見出され得る。

【0043】

一般に、免疫アッセイの設計の考慮は、非特異的相互作用の生成物から容易に区別され得る複合体を形成するため十分に高い、標的タンパク質に対する結合特異性を有する抗体(例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体)の調製を包含する。本明細書中において使用される場合に、用語「抗体」とは、免疫グロブリン可変領域様結合ドメインを含み、標的タンパク質に対する適切な結合親和性および特異性を有する、結合タンパク質(例えば、抗体または他のタンパク質)を意味すると理解される。抗体結合特性が高いほど、検出され得る標的タンパク質濃度は低くなる。本明細書中において使用される場合に、用語「特異的な結合」または「特異的に結合する」とは、結合部分(例えば、結合タンパク質)が、標的タンパク質に対して約 10^5 M^{-1} より大きい、より好ましくは約 10^7 M^{-1} より大きい結合親和性を有することを意味することが、理解される。

【0044】

個体における乳癌を検出するためのアッセイにおいて有用な単離されたマーカーまたは標的タンパク質に対する抗体は、当該分野において周知でありかつ十分に記載されている標準的な免疫学的手順を使用して、生成され得る。例えば、Practical Immunology, Butt, N. R. 編、Marcel Dekker, NY, 1984を参照のこと。簡単に言えば、単離された標的タンパク質を使用して、異種の宿主(例えば、マウス、ヤギまたは他の適切な哺乳動物)において、抗体を惹起する。マーカータンパク質は、宿主における抗体産生を増強し得る適切なアジュバントと合わせられ、そして例えば、腹腔内投与によって、宿主に注射される。宿主の免疫応答を刺激するために適した任意のアジュバントが、使用され得る。通常使用されるアジュバントは、フロイント完全アジュバント(殺傷されそして乾燥された微生物細胞を含むエマルジョンであり、そして例えば、Calbiochem Corp., San Diego、

またはGibco, Grand Island, NYから入手可能である)である。複数の抗原注射が所望である場合には、引き続く注射は、不完全アジュバント(例えば、無細胞エマルジョン)との組み合わせで抗原を含み得る。ポリクローナル抗体は、抗体産生宿主から、目的のタンパク質に対する抗体を含む血清を抽出することによって、単離され得る。モノクローナル抗体は、所望の抗体を産生する宿主細胞を単離し、これらの細胞を免疫学の分野において公知の標準的な手順を使用して骨髄腫細胞と融合し、そして標的タンパク質と特異的に反応し、かつ所望の結合親和性を有するハイブリッド細胞(ハイブリドーマ)についてスクリーニングすることによって、生成され得る。

【0045】

抗体結合ドメインはまた、生合成的に生成され得、そしてこの結合ドメインのアミノ酸配列は、標的タンパク質上の好ましいエピトープとの結合親和性を増強するよう操作され得る。特定の抗体方法論は、十分に理解されており、そして文献に記載されている。これらの調製のより詳細な記載は、例えば、Butt(1984)「Practical Immunology」(前出)に見出され得る。

【0046】

さらに、遺伝的に操作された生合成抗体結合部位(当該分野においてはBABSまたはsFvとしてもまた公知である)を、本発明の実施において使用し得る。(i)非共有結合したかまたはジスルフィド結合した合成 V_H および V_L 二量体、(ii)共有結合した V_H - V_L 単鎖結合部位、(iii)個々の V_H ドメインまたは V_L ドメイン、あるいは(iv)単鎖抗体結合部位を含むBABSを作製および使用するための方法は、例えば、米国特許第5,091,513号;同第5,132,405号;同第4,704,692号;および同第4,946,778号に開示されている。さらに、マーカータンパク質に対する必須の特異性を有するBABSは、コンビナトリアル遺伝子ライブラリーからのファージ抗体クローニングによって誘導され得る(例えば、Clacksonら(1991)Nature 352:624-628を参照のこと)。簡単に言えば、単離されたマーカータンパク質またはそのフラグメントで予備免疫されたマウス由来の可

変領域遺伝子配列によってコードされる免疫グロブリン可変領域を有するB A B Sを、各々がコート表面において発現するファージは、免疫された乳癌関連タンパク質に対する結合活性に関して、スクリーニングされる。免疫されたマーカータンパク質に結合するファージが採取され、そしてB A B Sをコードする遺伝子が配列決定される。次いで、目的のB A B Sをコードする得られる核酸配列は、従来の発現系において発現されて、B A B Sタンパク質を生成し得る。

【0047】

単離されたマーカータンパク質はまた、診断キットおよび他の組織評価キット、ならびに組織または流体のサンプルにおけるタンパク質のレベルをモニタリングするためのアッセイを開発するために、使用され得る。例えば、このキットは、マーカータンパク質に特異的に結合し、そしてマーカータンパク質の存在および/または濃度が組織または流体のサンプルにおいて検出および/または定量されることを可能にする、抗体または他の特異的な結合タンパク質を含み得る。

【0048】

マーカータンパク質を検出するための適切なキットは、例えば、評価されるべきサンプルを捕獲するためのレセプタクルまたは他の手段、ならびに本明細書中に記載される1つ以上のマーカータンパク質の存在および/または量をサンプル中で検出するための手段を含むと考えられる。本明細書中において使用される場合に、「検出するための手段」とは、1つの実施形態において、これらのタンパク質に対して特異的な1つ以上の抗体、およびこれらのタンパク質に対する抗体の結合を、例えば本明細書中に記載されるような標準的なサンドイッチ免疫アッセイによって検出するための手段を含む。細胞（例えば、組織サンプル由来のような）におけるタンパク質の存在が検出されるべきである場合には、このキットはまた、細胞内タンパク質を露出するために、細胞構造を破壊するための手段を含み得る。

【0049】

（2．B．核酸に基づくアッセイ）

個体における疾患の存在はまた、組織または体液のサンプルにおいて、マーカータンパク質をコードする核酸分子を検出することによって、決定され得る。当

業者に周知の方法を使用して、マーカートンパク質は配列決定され得、次いで、決定された配列に基づいて、cDNAライブラリーをスクリーニングするのためのオリゴヌクレオチドプローブが設計され得る（例えば、Sambrookら（1989）前出を参照のこと）。

【0050】

マーカートンパク質をコードする標的核酸分子は、この標的核酸を特異的に結合し得る標識された結合部位を使用して、検出され得る。この結合部位としては、例えば、タンパク質、核酸またはペプチジル核酸が挙げられ得る。さらに、標的核酸（例えば、マーカートンパク質をコードするmRNA）は、例えば、標識されたオリゴヌクレオチド（例えば、標的核酸の少なくとも一部と相補的であり、かつこの部分と特異的にハイブリダイズし得る核酸フラグメント）を使用するノーザンブロット分析を実施することによって、検出され得る。

【0051】

より具体的には、相補的RNA、または好ましくは、疾患関連核酸配列に対するDNA、またはマーカートンパク質をコードするmRNA配列を含む遺伝子プローブは、確立された組換え技術またはオリゴヌクレオチド合成を使用して、生成され得る。このプローブは、試験標本において提示される相補的核酸配列とハイブリダイズし、そして必須の特異性を提供し得る。単一の独自の配列をコードする、短い、十分に規定されたプローブは、最も適切であり、かつ好ましい。より大きなプローブは、一般に、特異性が低い。任意の長さのオリゴヌクレオチドが、mRNA転写物とハイブリダイズし得るが、代表的に8～100ヌクレオチドの範囲内、好ましくは15～50ヌクレオチドの範囲内であるオリゴヌクレオチドは、標準的なハイブリダイゼーションアッセイにおいて最も有用であることが、予測される。プローブの長さおよび配列の選択は、所望の特異性の程度を選択することを可能にする。ハイブリダイゼーションは、50～65℃で、高塩緩衝溶液、ホルムアミドまたは必要とされる相補性の程度を設定する他の薬剤中で、実施される。技術水準は、プローブが本質的に任意のDNAまたはRNAの配列を認識するように、作製され得るような技術水準である。さらなる詳細については、例えば、Guide to Molecular Technique

s, Bergerら、Methods of Enzymology, 第152巻, 1987を参照のこと。

【0052】

プローブまたは抗体に結合される広範な種々の異なる標識が、アッセイにおいて使用され得る。標識された試薬は、アッセイの設計に依存して、溶液中に提供されても不溶性支持体に結合されてもよい。種々の結合体が、共有的にかまたは非共有的に、直接的にかまたは間接的に、結合され得る。共有結合される場合には、特定の連結基は、結合される2つの部分の性質に依存する。多数の連結基および連結の方法が、文献において教示されている。広義には、標識は、以下の分類に分割され得る：色原体；触媒された反応；化学発光；放射性標識；およびコロイドの大きさの有色粒子。色原体としては、色が観察され得るように異なる範囲の光を吸収する化合物、または特定の波長もしくは波長範囲の光で照射する場合に発光する化合物（例えば、蛍光剤）が挙げられる。酵素的触媒と非酵素的触媒との両方が、利用され得る。酵素を選択する際に、その酵素の安定性、アッセイが設計された型のサンプル中にその酵素が通常存在するか否か、基質の性質、およびその酵素の特性に対する結合の効果（存在する場合）を含む、多くの考慮が存在する。潜在的に有用な酵素標識としては、オキシヨードレダクターゼ（oxiodoreductase）、トランスフェラーゼ、加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、またはシンテターゼが挙げられる。相互に関係する酵素系もまた、使用され得る。化学発光標識は、化学反応によって電子的に励起され、次いで光（これが、検出可能なシグナルとして働くか、または蛍光アクセプターにエネルギーを供与する）を放出し得る化合物を包含する。放射性標識としては、通常の使用において見出される種々の放射性同位体が挙げられ、例えば、不安定な形態の水素、ヨウ素、リンなどである。コロイドの大きさの有色粒子は、攪拌の際に、検出されるべき物質の部位に対応する視覚的に検出可能な別個のスポットを形成する、コロイド金のような材料を包含する。標識技術に関するさらなる情報は、例えば、米国特許第4,366,241号に開示されている。

【0053】

ヌクレオチドプローブのインビトロ標識の通常の方法は、標識されていないDNAプローブがエンドヌクレアーゼで切れ目を入れられて、二本鎖フラグメントのいずれかの鎖において遊離3'ヒドロキシル末端を生じる、ニックトランスレーションを包含する。同時に、エキソヌクレアーゼは、この切れ目の5'ホスホリル側から、ヌクレオチド残基を除去する。置換ヌクレオチドの配列は、二重鎖の反対側の鎖の配列によって決定される。従って、標識ヌクレオチドが供給される場合に、DNAポリメラーゼは、この標識ヌクレオチドでこの切れ目を充填する。この周知の技術を使用して、分子の50%までが標識され得る。より小さなプローブに対しては、3'末端標識を包含する公知の方法が使用され得る。さらに、蛍光分子、触媒、酵素、または化学発光材料でDNAを標識する、現在市販されている方法が存在する。ビオチン標識キットは、Bio-Probeの商品名で市販されている(Enzo Biochem Inc.)。この型の系は、プローブが、アビジン(これは次に、例えば、蛍光分子、酵素、抗体などで標識される)と結合することを可能にする。プローブの構築および技術に関するさらなる開示に関しては、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y., 1982)を参照のこと。

【0054】

標的核酸にハイブリダイズするために選択されるオリゴヌクレオチドは、化学的に合成されようと組換えDNA方法論によって合成されようと、標準的な技術を使用して単離および精製され、次いで好ましくは、標準的な標識プロトコルを使用して、(例えば、 ^{35}S または ^{32}P で)標識される。次いで、標的核酸を含むサンプルが電気泳動ゲル上で泳動され、分布した核酸をニトロセルロースフィルターに移し、そして標識オリゴヌクレオチドを、Sambrookら(1989)前出に記載のようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下(例えば、42℃で50%ホルムアミド、5×SSPE、2×Denhardt溶液、0.1% SDS)でこのフィルターに曝露する。次いで、このフィルターを、2×SSPE、0.1% SDSを使用して68℃で、より好ましくは、0.1×SSPE、0.1% SDSを使用して68℃で、洗浄し得る。当該分野にお

いて公知の他の有用な手順としては、溶液ハイブリダイゼーション、ならびにドットおよびスロットRNAハイブリダイゼーションが挙げられる。必要に応じて、次いで、サンプル中に存在する標的核酸の量が、当該分野において公知の標準的な手順を使用して、ハイブリダイズされたフラグメントの放射性を測定することによって、定量される。

【0055】

さらに、オリゴヌクレオチドはまた、標的タンパク質ファミリーのメンバーをコードする他の配列を同定するために使用され得る。この方法論はまた、例えば、タンパク質コード領域の上流または下流に位置する非コード配列を同定するために、本明細書中に記載されるタンパク質をコードする核酸配列に関連する遺伝配列、およびこれらの遺伝子の発現において機能的役割を果たし得る遺伝配列を同定するために、使用され得る。さらに、結合アッセイは、例えば、タンパク質の遺伝調節または遺伝発現に関与し得る乳癌関連タンパク質をコードする核酸と特異的に結合相互作用し得るタンパク質を同定および検出するために実施され得る。さらなる実施形態において、本明細書中に記載されるアッセイは、マーカータンパク質を認識し、そして特異的に結合され得る配列を含む、核酸分子を同定および検出するために、使用され得る。

【0056】

さらに、適切なオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせ（すなわち、1つより多いプライマー）を使用して、当業者は、標準的なポリメラーゼ連鎖反応（PCR）手順（例えば、定量PCR）によって、インビボでの標的遺伝子の発現レベルを決定し得ることが、予測される。従来のPCRに基づくアッセイは、例えば、Innesら（1990）「PCR Protocols; A guide to methods and Applications」, Academic PressおよびInnesら（1995）「PCR Strategies」Academic Press, San Diego, CAにおいて議論されている。

【0057】

組換えマーカー分子は、本明細書中以下に記載されるように、生成され得る。

例えば、マーカー分子をコードするDNAは、当該分野において十分に記載されている従来の技術（例えば、Sambrook（1989）前出を参照のこと）を使用して、種々の発現ベクターのいずれかに挿入され、そして適切な宿主細胞にトランスフェクトされて、全長形態と短縮形態との両方を含む組換えタンパク質を生成し得る。有用な宿主細胞としては、E. coli、Saccharomyces cerevisiae、Pichia pastoris、昆虫/バキュロウイルス細胞系、骨髄腫細胞、および種々の他の哺乳動物細胞が挙げられる。このようなタンパク質の全長形態は、好ましくは、本明細書中に開示されるように、哺乳動物細胞において発現される。ベクターは、さらに、組換えタンパク質の正しい発現を促進するための、種々の配列（転写プロモーターおよび終止配列、エンハンサー配列、好ましいリボソーム結合部位配列、好ましいmRNAリーダ配列、好ましいタンパク質プロセッシング配列、タンパク質分泌のための好ましいシグナル配列などが挙げられる）を含み得る。目的の遺伝子をコードするDNA配列もまた、潜在的に阻害性の配列を除去するため、または所望でない二次構造形成を最小にするために、操作され得る。当業者によって理解されるように、組換えタンパク質はまた、融合タンパク質として発現され得る。

【0058】

翻訳後、タンパク質は、細胞自体から精製され得るかまたは培養培地から収集され得る。DNAはまた、組換えタンパク質の発現および/または精製を補助する配列を含み得る。DNAは、直接発現され得るか、または容易に切断可能な融合接合部を有する融合タンパク質の一部として発現され得る。

【0059】

1つの好ましい実施形態において、DNAは、適切な哺乳動物宿主において発現される。有用な宿主としては、線維芽細胞3T3細胞（例えば、CRL 1658からのNIH 3T3）、COS（サル腎臓ATCC、CRL-1650）またはCHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞（例えば、Chasin（1980）Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 77:4216-4222からのCHO-DXB11）、ミンク肺上皮細胞（MV1Lu）、ヒト包皮線維芽細胞、ヒト神経膠芽腫細胞、および奇形癌細胞が挙げられる。他の有

用な真核生物細胞系としては、酵母細胞、昆虫／バキュロウイルス系または骨髄腫細胞が挙げられる。

【0060】

マーカートンパク質分子を発現するために、DNAを適切なプロモーター／エンハンサー配列および3'停止配列と共に、適切な市販のベクターの挿入部位にサブクローニングする。有用なプロモーター／エンハンサー配列の組合せは、例えば、pCDM8に存在するCMVプロモーター（ヒトサイトメガロウイルス（MIE）プロモーター）、ならびにラウス肉腫ウイルスLTRエンハンサー配列（例えば、Clontech, Inc., Palo Alto製）によりブーストされる乳腺癌ウイルスプロモーター（MMTV）を含む。有用な誘導性プロモーターとしては、例えば、 Zn^{2+} 誘導性プロモーター（例えば、 Zn^{2+} メタロチオネインプロモーター（Wranaら、(1992) Cell 71:1003-1014））が挙げられる。他の誘導性プロモーターは当該分野で周知であり、そして同様に首尾良く用いられ得る。発現をまた、トランス活性エンハンサー配列を用いて、さらに、増大し得る。プラスミドはまた、好ましくは、増幅可能なマーカー（例えば、適切なプロモーター例えば、SV40初期プロモーター（ATCC#37148）制御下の（DHFR）を含む。トランスフェクション、細胞培養、遺伝子増幅、およびタンパク質発現条件は、例えば、Ausbelら編（1989）「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley & Sons, NYに記載されるような、当該分野で周知の標準的な条件である。簡単には、トランスフェクトした細胞を、5-10%の透析した胎児ウシ血清（dFCS）を含む培地中で培養し、そして安定にトランスフェクトした高発現細胞株を、増幅およびサブクローニングにより得、そしてウェスタンブロット分析およびノーザンブロット分析により評価した。サザンブロットをまた用いて、統合された配列の状態およびこれらのコピー数の程度を評価し得る。

【0061】

次いで、発現された候補タンパク質は、標準的な手順を用いて精製される。現在好ましい方法論は、アフィニティーカラム（例えば、リガンドアフィニティー

カラムまたは抗体アフィニティークラム)を用いる。次いで、このカラムを洗浄し、そして候補分子を、イオン強度の漸増勾配、pHの変化、または界面活性剤の添加で選択的に溶出させる。乳癌関連タンパク質に結合する候補分子に加えて、乳癌関連タンパク質自身を、同様に、このような組換えDNA技術を用いて生成し得ることを認識する。

【0062】

以下に、非制限の実施例は、乳癌の検出のためのマーカーを使用する方法と共に、乳癌マーカーの単離および特徴付けのための詳細を提供する。同一または類似のプロトコルを用いて、他の疾患(例えば、他の癌)についてのマーカーを同定し得ることが意図される。

【0063】

(実施例1 - 乳癌マーカーの同定)

乳癌についてのマーカーを同定するために、乳癌を有する個体の血清を、以下のプロトコルを用いて正常な個体の血清と比較した。簡単には、個体から収集した血清の0.5mLのアリコートを解凍した。次いで、1μLの1mg/mL溶液のダイズトリプシンインヒビター(SBTI)およびロイペプチンの1mg/mL溶液を各アリコートに添加した。脂質を取り除くために、350μLの1,1,2-トリフルオロトリクロロエタンを各サンプルに添加した。次いで、サンプルを5分間ボルテックスし、そして4℃にて5分間マイクロ遠心分離器中で遠心分離した。得られた上清を、プロテインGと結合したアガロース(Hitrap Protein Gカラム、Pharmacia and Upjohn、Peapack, NJ)の1mLカラムにアプライして免疫グロブリンタンパク質を取り除いた。次いで、カラムを3mLの50mMリン酸ナトリウム(pH7.0、SBTIおよびロイペプチン(「結合緩衝液」)を有する)を用いてリンスし、そして得られた貫流液をCibacronブルーと結合した6%Sepharose(Hitrapブルーカラム、Pharmacia and Upjohn、Peapack, NJ)の5mLカラムに直接アプライして、アルブミンタンパク質を取り除いた。Hitrapブルーカラムを20mLの結合緩衝液を用いてリンスした。得られた貫流液を10kDのカットオフを有する4つの遠

心分離ベースの濃縮器 (Centricon 10, Millipore Corporation, Bedford, MA) を用いて濃縮して、約0.7 mLの最終容量を得た。

【0064】

得られた血清 (実質的に免疫グロブリンおよびアルブミンを含まない) を、アニオン交換クロマトグラフィーによるほぼ等量のタンパク質を含む12の画分に細分画した。詳細には、血清を、50 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0中で、Mono Q (Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ) アニオン交換カラム (四級アンモニウム基を有する強力なアニオン交換体) にアプライし、そしてタンパク質を段階的な様式で、塩化ナトリウムの濃度を増加させることによりカラムから溶出させた。このプロトコルでは、血清を溶出に用いた塩化ナトリウムの濃度に基づき12個の画分に分割した。従って、これらの画分を、貫流25 mM塩化ナトリウム、貫流50 mM塩化ナトリウム、貫流75 mM塩化ナトリウム、貫流100 mM塩化ナトリウム、貫流125 mM塩化ナトリウム、貫流150 mM塩化ナトリウム、貫流200 mM塩化ナトリウム、貫流250 mM塩化ナトリウム、貫流300 mM塩化ナトリウム、貫流400 mM塩化ナトリウム、および貫流2 M塩化ナトリウムと命名した。溶出の後、各画分を約100 µg/mLに濃縮し、そして結合緩衝液と緩衝液交換した。

【0065】

次いで、12個の画分の各々からの4~10 µLをアプライし、そして4つのSELDIチップ表面の各々に結合させた (各表面は8つまでのサンプルを保持する)。チップ上の各サンプルの意図した配置を、Papスメア (smear) に用いたような疎水性マーカーを用いて、サークルドローン (circle drawn) とはっきりと区別した。本明細書中で用いたSELDIチップをCiphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, Californiaから購入し、そして以下に記載されるように用いた。

【0066】

銅またはニッケル表面について、エチレンジアミニトリ酢酸部分を含むチップ (IMAC, Ciphergen Biosystems, Inc., Pal

o A l t o , C A) を 5 μ L の銅塩溶液またはニッケル塩溶液の2回の5分間のアブライで前処理をし、そして脱イオン水で洗浄した。5 μ L の結合緩衝液を用いる5分間の処理の後、2 ~ 3 μ L のサンプルを、30 ~ 60分間表面にアブライした。次いで、別の2 ~ 3 μ L のサンプルを、さらに、30 ~ 60分間アブライした。次いで、チップを結合緩衝液を用いて2回洗浄して、未結合のタンパク質を取り除いた。0 . 5 μ L のシナピン酸 (12 . 5 m g / m L) を2回添加し、そして毎回乾燥させた。シナピン酸の存在は、質量分析の際の結合タンパク質の気化およびイオン化を増強する。

【0067】

カルボキシル部分を含むチップ表面 (W C X - 2 , C h i p h e r g e n B i o s y s t e m s , I n c . , P a l o A l t o , C A) について、疎水性ペン (p e n) の使用の後に、この表面を10mM H C l を用いて洗浄し、そして脱イオン水を用いて5回リンスした。このペンの使用後、表面を5 μ L の結合緩衝液を用いて5回および脱イオン水を用いて1回洗浄した。2 ~ 3 μ L のサンプルを各々30 ~ 60分間の2つの適用でアブライした。表面を、5 μ L の結合緩衝液を用いて2回洗浄し、そして0 . 5 μ L のシナピン酸を二回アブライした。

【0068】

四級アンモニウム部分を含むチップ表面 (S A X - 2 , C h i p h e r g e n B i o s y s t e m s , I n c . , P a l o A l t o , C A) について、ペンの使用の前に、表面を5 μ L の結合緩衝液を用いて5回および脱イオン水を用いて1回洗浄した。サンプルの適用、洗浄、そしてシナピン酸の適用を上記のように行った。

【0069】

次いで、チップを、ソフトウェアプログラム「S E L D I v . 2 . 0」で実行するC h i p h e r g e n S E L D I P B S O n e (C h i p h e r g e n B i o s y s t e m s , I n c . , P a l o A l t o , C A) を利用する質量分析に供した。全てのチップについて、「h i g h m a s s」を、200,000ダルトンに設定し、「s t a r t i n g d e t e c t o r s e n

sensitivity」を、9 (1~10の範囲、10は最も高い感度) に設定し、NDF (neutral density filter) を「OUT」に設定し、データ取得法を「Seldi Quantitation」に設定し、SELDI取得パラメーターを20 (5の増分を有する) に設定し、そして (100のうち) 50の強度で2つのショット (shot) を暖めることを含んだ。IMACチップについて、質量を3000ダルトン~3001ダルトンに最適化し、開始レーザー強度 (starting laser intensity) を (100のうち) 80に設定し、そしてトランジアント (transient) を5 (1つの部位あたり5レーザー照射) に設定した。ピークをコンピューターにより自動的に同定した。WCX-2チップについて、質量を3,000ダルトン~50,000ダルトンに最適化し、開始レーザー強度を80に設定し、そしてトランジアントを8に設定した。ピークをコンピューターにより自動的に同定した。SAX-2チップについて、質量を3,000ダルトン~50,000ダルトンに最適化し、開始レーザー強度を85に設定し、そしてトランジアントを8に設定した。ピークをコンピューターにより自動的に同定した。

【0070】

10個の血清サンプル (正常な個体由来の5個、および乳癌を有する個体由来の5個) を質量分析により分析して、上記の60個の画分に存在するタンパク質を同定した。質量分析トレースにおいて得られたピークを比較して、乳癌を有する個体由来の血清サンプルに存在するが、正常なサンプルには存在しないピークを同定した。異なるサンプルにおけるピークが、1%を超えない質量の差異を有した場合、このピークを同一と推定した。約11,000Da~103,000Daのサイズ範囲の11個の質量分析ピークを、乳癌を有する個体由来の5つの血清サンプルの全てに存在すると同定した。このピークは、正常な個体由来のサンプルには存在しなかった。次いで、これらのピークの存在または非存在を、さらなる30個の血清サンプル (正常な個体由来の15個、および乳癌を有する個体由来の15個) について決定した。本来の5つの乳癌血清サンプルの4つに存在するが、正常なサンプルのいずれにも存在しない、7つの他のピークをまた分析した。なぜならば、これらは、既に評価の下にある11個のピークの1個以上

と、同一の画分中および同一のSELDI表面上に存在したからである。研究した18個のピークの15個は、20個のうち15個以上の乳癌血清サンプル中に存在したが、15個以上の正常な血清サンプルには存在しなかった。

【0071】

上記の分析の結果を、表1に要約する。表に列挙される質量は、1%以内の正確さと推測される。

【0072】

【表1】

表 1.

質量 (Da)	Mono Q 画分 (mM 塩化ナトリウム)	使用した SELDIチップ 表面	乳癌を有する 個体由来の 陽性サンプル の数	乳癌を有さない 個体由来の 陽性サンプル の数
16210	0 (flow- through)	ニッテル	17	1
17188	25 mM	WCX-2	17	2
30183	25 mM	WCX-2	15	3
34664	25 mM	WCX-2	16	4
20050	50 mM	ニッテル	19	0
28258	50 mM	ニッテル	20	0
24170	50 mM	ニッテル	17	0
35393	50 mM	ニッテル	17	3
34908	50 mM	WCX-2	16	2
70908	100 mM	WCX-2	20	0
17840	100 mM	WCX-2	18	2
11709	150 mM	SAX-2	20	0
42354	200 mM	ニッテル	17	0
56280	200 mM	ニッテル	16	0
34517	400 mM	金同	18	1

【0073】

(実施例2-28. 3 k D乳癌タンパク質の精製および特徴付け)

上記で提供される生化学的および質量分析データに基づく乳癌関連タンパク質は、周知の技術を用いて特徴づけされ得る。例えば、血清のサンプルを、例えば、カラムクロマトグラフィーおよび/または電気泳動を用いて分画して、表1で同定されるタンパク質の各々に対応する生成タンパク質サンプルを生成し得る。次いで、単離したタンパク質の配列を、従来のペプチド配列決定方法論を用いて決定し得る。上記の開示を鑑みれば、本明細書中に記載される方法により同定した任意の乳癌関連タンパク質に対する抗体を作製し得ることは当業者に明かである。さらに、当業者は、上記の開示を鑑みれば、上記のフラグメントをコードする核酸配列、ならびにこれらに相補的な核酸配列を生成し得る。さらに、当業者は、従来の組換えDNA方法論を用いて(例えば、本発明の核酸配列を有するcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより)、標的乳癌関連タンパク質をコードする全長核酸配列を単離し得る。このような全長核酸配列またはこのフラグメントを用いて、核酸ベースの検出システムおよび治療薬を開発し得る。

【0074】

実施例1で同定した28.3 k Dの乳癌タンパク質を単離し、そしてさらに以下のように特徴づけした。約30 mLの血清(複数の乳癌患者から組合せた)を、実施例1に記載したような標準的な方法論を用いる、プロテインGクロマトグラフィーおよびCibacron Blueアガロースクロマトグラフィーを使用して、それぞれ、免疫グロブリンGおよび血清アルブミンを枯渇させた。次いで、アルブミンおよび免疫グロブリン枯渇血清を、Mono Qイオン交換アフィニティークロマトグラフィーにより分画した。簡単には、血清タンパク質を、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)中で、5 mLのMono Qカラム(Pharmacia and Upjohn, Peapack, NJ)にアプライし、そして貫流画分を収集した。その後、血清タンパク質を、漸増濃度の塩化ナトリウムを含む、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を用いて、カラムから段階的に溶出させた。この様式で、12個の血清画分(各々、異なる量の塩化ナトリウムを含む)を得た。この画分は、貫流、ならびに25 m

M、50 mM、75 mM、100 mM、125 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、400 mM、および2 Mの塩化ナトリウムを含む、50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) の溶出緩衝液を含んだ。

【0075】

目的のタンパク質を含む50 mM塩化ナトリウム画分を、引き続いて、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) へと再び緩衝液交換して、製造業者の指示に従ってCentricon 10 (Millipore) により濃縮した。次いで、得られたサンプルを、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl (pH 7.4) を含む無勾配緩衝液を用いてSephacryl S-200カラムのサイズ排除カラムクロマトグラフィーにより分画した。カラムから溶出した画分を、実施例1に記載されるようなCiphergen SELDI質量分析を用いて28.3 kDタンパク質の存在について評価した。28.3 kDタンパク質を含む画分を、プールしそしてIMACカラム (Sigma) (これは、50 mM NiCl_2 を用いる事前のインキュベーションにより、 Ni^{2+} を充填している) にアプライした。次いで、IMACカラムを6ベッド容量の100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaClを含む溶液 (pH 7.4) を用いて洗浄し、そして結合したタンパク質画分を100 mMイミダゾールを含む同一溶液を用いて溶出させた。次いで、溶出した画分をMinicon 10 (Millipore) により濃縮し、次いで12% TrisグリシンSDS-PAGEゲルのドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分画した。タンパク質画分のサンプルをゲルの2つの別々のレーンにアプライした。電気泳動後、次いで得られたゲルをCoomassie Brilliant Blue色素を用いて染色し、そして脱色して、タンパク質の存在を示した。約28.3 kDの3つのバンド (最も高い分子量のタンパク質、中程度の分子量のタンパク質、および最も低い分子量のタンパク質として特徴づけられる) を、2つのレーンのうち1つから切り出し、そしてアクリルアミド切片から溶出させた。

【0076】

タンパク質を以下のようにゲルから溶出させた。簡単には、ゲル切片を激しい

ボルテックスと共にHPLCグレードの水を用いて5回洗浄した。次いで、洗浄した切片を、の120 μ Lの100mM酢酸ナトリウム(pH8.5)、0.1%SDS中で、小片に切断し、そして37 にて一晩インキュベートした。上清を新しいチューブにデカントし、そして高速真空(speed vac)中で乾燥させた。次いで、得られたペレットを37 μ LのHPLCグレードの水の中で再構成した。次いで、約1480 μ Lの冷エタノールを添加し、そして得られた混合物を-20で一晩インキュベートした。その後、サンプルを4 にて15分間11,000 rpmで遠心分離した。上清を、取り除き、そして得られたペレットを5 μ Lの水中で再構成した。得られたタンパク質溶液に、SELDIを実施し、そして28.3 kDのタンパク質を、3つの調製物の1つにおいて同定した(図1A(これは最も重い28 kDタンパク質に対応する)を参照のこと)。次いで、対応するバンドをゲルの2つのレーンの第2の部分から切り出した。トリプシンを用いるタンパク質分解の後、トリプシン処理フラグメントを、ゲルから溶出し、そして質量分析を通じてマイクロ配列分析に供した。

【0077】

4つの個々の質量を質量分析により決定した。4つの質量を用いてSwiss Proteinデータベースを検索した場合、4つの質量の全ては、U2小核リボヌクレオタンパク質B''(U2snRNPB'')(Habetsら(1987)前出、Swiss Proteinデータベース登録番号4507123)と当該分野で呼ばれるタンパク質に存在するアミノ酸配列と一致することを見出した。結果を表2に要約する。

【0078】

【表2】

表 2.

ペプチド	配列	配列番号	タンパク質
1	RQLQGFPFYGKPMRI	1	U2 snRNP B''
2	RHDIAFVEFENDGQAGAARD	2	U2 snRNP B''
3	RLVPGRHDIAFVEFENDGQAGAARD	3	U2 snRNP B''
4	TVEQTATTNK	4	U2 snRNP B''

【0079】

単一アミノ酸コードのU2 snRNP B''タンパク質のN末端からC末端方向におけるアミノ酸配列は、以下である：

【0080】

【化1】

MDIRPNHTTY INNMNDKIKK EELKRSLYAL FSQFGHVVDI VALKTMKMRG QAFVIFKELG
 SSTNALRQLQ GFFPYGKPMR IQYAKTDSDI ISKMRGTFAD KKKKKKKKA KTVEQTATT
 NKKPGQGTPN SANTQGNSTP NPQVPDYPPN YILFLNNLPE ETNEMMLSML FNQFPGFKEV
 RLVPGRHDIA FVEFENDGQA GAARDALQGF KITPSHAMKI TYAKK (配列番号 5).

【0081】

28.3 kDは、U2 snRNP B''であると同定され、従って、これは、このタンパク質またはこのタンパク質をコードする核酸を、個体における乳癌の存在を検出するためのアッセイにおける標的としての使用が可能であることを意図する。このようなアッセイの開発は、一旦マーカーが同定されると、当該分野の範囲（レベル）内にあると考えられる。

【0082】

(実施例3 - 乳癌関連タンパク質に特異的に結合する抗体の産生)

一旦同定されると、乳癌関連タンパク質は、当業者に周知である多数の結合アッセイを用いる組織または体液サンプルにおいて検出され得る。例えば、上記のように、乳癌関連タンパク質を、組織サンプルまたは体液サンプルのいずれかに

いおて、乳癌関連タンパク質に対するエピトープに特異的に結合する抗体（例えば、モノクローナル抗体）を用いて検出し得る。このような検出システムにおいて、抗体は、好ましくは、検出可能な部分を用いて標識される。

【0083】

以下に提供されるものは、抗乳癌関連モノクローナル抗体の産生についての例示的プロトコルである。他のプロトコルもまた、想定される。従って、標的タンパク質に対する抗体を産生する特定の方法が、本発明の1つの局面になることを想定していない。

【0084】

Jマウス (Jackson Laboratory , Bar Harbor , ME) による Balb / c に、免疫したマウスから適切な血清力価が得られるまで、標的タンパク質を2週間ごとに腹腔内に注射する。その後、このマウスに3回の連続した静脈ブースト注射を行う。フロイント完全アジュバント (Gibco , Grand Island) を、1回目の注射に用い、フロイント不完全アジュバントを2回目の注射に用いる；そして生理食塩水を引き続く静脈注射のために用いる。次いで、動物を屠殺し、そしてその脾臓を取り出す。次いで、脾細胞（またはリンパ節細胞）を、例えば、Kohlerら (1975) Nature 256 : 495の方法を用いて、マウスミエローマ細胞株と融合する。標的タンパク質と反応する抗体を生成するハイブリドーマをクローニングし、そして腹水として増殖させる。ハイブリドーマを任意の望ましいアッセイにおいて免疫原に対する反応性によりスクリーニングする。スクリーニングプロトコル、腹水生成およびイムノアッセイの詳細な説明は、PCT / US 92 / 09220 (1993年5月13日公開) に開示される。

【0085】

(実施例4 : 個体における乳癌を検出するための抗体ベースのアッセイ)

以下のアッセイを、組織サンプルのために開発した；しかし、体液サンプルを試験するための類似のアッセイが過度の実験なく開発されうることが意図される。代表的なアッセイは、市販の免疫検出キット（例えば、Vector Laboratories , Inc . の ABC Elite Kit ）を用いる。

【0086】

生検サンプルを、適切な医療ガイドラインに従って、研究の下で患者から取り出す。次いで、サンプルを、ガラス顕微鏡スライドに塗布し、そしてこのサンプルを、冷アセトンで10分間固定する。次いで、このスライドを、蒸留水でリンスし、そして過酸化水素含有溶液(2mL 30% H_2O_2 および30mL 冷エタノール)で前処理する。次いで、このスライドを、0.1% Tweenおよび0.1% Brijを含有するTris緩衝化生理食塩水(TBS)を含む緩衝液Aでリンスする。緩衝液A中のマウス抗乳癌関連タンパク質モノクローナル抗体をスライドに添加し、次いで、このスライドを室温で1時間インキュベートする。次いで、このスライドを緩衝液Aで洗浄し、次いで、緩衝液A中の二次抗体(ABC Elite Kit, Vector Labs, Inc.)をスライドに添加する。次いで、このスライドを、加湿チャンバ中で37℃で15分間インキュベートする。このスライドを再び緩衝液Aで洗浄し、次いでABC試薬(ABC Elite Kit, Vector Labs, Inc.)をシグナルを増幅するためにスライドに添加する。次いで、このスライドを、加湿チャンバ中で37℃でさらに15分間インキュベートする。

【0087】

次いで、このスライドを、蒸留水で洗浄し、そしてジアミノベンジジン(DAB)基質をスライドに4～5分間添加する。次いで、このスライドを、蒸留水でリンスし、ヘマトキシリンで対比染色し、95%エタノールでリンスし、100%エタノールでリンスし、次いで、キシレンでリンスする。次いで、カバースリップをスライドに載せ、そして光学顕微鏡により結果を観察する。

【0088】

(等価物)

本発明は、その趣旨または本質的な特徴から逸脱することなく他の特定の形態において具現化されうる。従って、前述の実施形態は、全ての点で、本明細書中に記載された本発明を限定するのではなく、例示として解釈されるべきである。従って、本発明の範囲は、前述の説明ではなく添付の特許請求の範囲により示され、そして特許請求の範囲の意味および均等の範囲内に入る全ての変更は、特許

請求の範囲を参照することにより含まれることが意図される。

【0089】

(参考文献の援用)

前述の特許および本明細書中上記に引用した科学文献の各々の開示全体は、明らかに本明細書中に参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

本発明は、以下の図面を参照してより完全に理解され得る。

【図1A】

図1Aは、ポリアクリルアミドゲルから溶離され、そしてニッケルSELDIチップに塗布された、28kDのタンパク質の質量分光法による特徴付けから得られるスペクトルである。図1Aは、ゲルから単離した最も大きい28kDタンパク質のスペクトルである。

【図1B】

図1Bは、ポリアクリルアミドゲルから溶離され、そしてニッケルSELDIチップに塗布された、28kDのタンパク質の質量分光法による特徴付けから得られるスペクトルである。図1Bは、ゲルから単離した中間の28kDタンパク質のスペクトルである。

【図1C】

図1Cは、ポリアクリルアミドゲルから溶離され、そしてニッケルSELDIチップに塗布された、28kDのタンパク質の質量分光法による特徴付けから得られるスペクトルである。図1Cは、ゲルから単離した最も小さい28kDタンパク質のスペクトルである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Watkins, Brynmor
 <120> Methods and Compositions for Identifying Disease Markers
 <130> MTP-026PC
 <140>
 <141>
 <150> US 60/165,173
 <151> 1999-11-16
 <150> US 60/172,170
 <151> 1999-12-17
 <150> US 60/178,860
 <151> 2000-01-27
 <150> US 60/201,721
 <151> 2000-05-03
 <160> 23
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Tryptic peptide
 <400> 1
 Gln Leu Gln Gly Phe Pro Phe Tyr Gly Lys Pro Met Arg
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Tryptic peptide
 <400> 2
 His Asp Ile Ala Phe Val Glu Phe Glu Asn Asp Gly Gln Ala Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Arg
 <210> 3
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Tryptic peptide

<400> 3

Leu Val Pro Gly Arg His Asp Ile Ala Phe Val Glu Phe Glu Asn Asp
 1 5 10 15

Gly Gln Ala Gly Ala Ala Arg
 20

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Tryptic peptide

<400> 4

Thr Val Glu Gln Thr Ala Thr Thr Thr Asn Lys
 1 5 10

<210> 5

<211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Asp Ile Arg Pro Asn His Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Asn Asp
 1 5 10 15

Lys Ile Lys Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ser Leu Tyr Ala Leu Phe Ser
 20 25 30

Gln Phe Gly His Val Val Asp Ile Val Ala Leu Lys Thr Met Lys Met
 35 40 45

Arg Gly Gln Ala Phe Val Ile Phe Lys Glu Leu Gly Ser Ser Thr Asn
 50 55 60

Ala Leu Arg Gln Leu Gln Gly Phe Pro Phe Tyr Gly Lys Pro Met Arg
 65 70 75 80

Ile Gln Tyr Ala Lys Thr Asp Ser Asp Ile Ile Ser Lys Met Arg Gly
 85 90 95

Thr Phe Ala Asp Lys Glu Lys Lys Lys Glu Lys Lys Lys Ala Lys Thr
 100 105 110

Val Glu Gln Thr Ala Thr Thr Thr Asn Lys Lys Pro Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Pro Asn Ser Ala Asn Thr Gln Gly Asn Ser Thr Pro Asn Pro Gln Val
 130 135 140

Pro Asp Tyr Pro Pro Asn Tyr Ile Leu Phe Leu Asn Asn Leu Pro Glu
 145 150 155 160

```

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 6
Gly Gln Val Pro Met Gln Asp Pro Arg
 1               5

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 7
Gly Ser Leu Pro Ala Asn Val Pro Thr Pro Arg
 1               5               10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 8
Gly Leu Leu Gly Asp Ala Pro Asn Asp Pro Arg
 1               5               10

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 9
 Ala Gly Leu Thr Val Arg Asp Pro Ala Val Asp Arg
 1 5 10

<210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 10
 Ala Leu Arg Val Asp Asn Ala Ala Ser Glu Lys Asn Lys
 1 5 10

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 11
 Gly Gly Thr Leu Leu Ser Val Thr Gly Glu Val Glu Pro Arg
 1 5 10

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 12
 Asp Ile Phe Ser Glu Val Gly Pro Val Val Ser Phe Arg
 1 5 10

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 13
 Gly Ile Asp Ala Arg Gly Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 14
 Gly Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Gly Leu Asp Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 15
 Ala Val Ala Ser Leu Pro Pro Glu Gln Met Phe Glu Leu Met Lys
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 16
 Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Val Arg Gly Met Glu Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

<400> 17
 Gly Tyr Leu Gly Pro Pro His Gln Gly Pro Pro Met His His Val Pro
 1 5 10 15

Gly His Glu Ser Arg
 20

<210> 18
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

 <400> 18
 Gly Pro Ile Pro Ser Gly Met Gln Gly Pro Ser Pro Ile Asn Met Gly
 1 5 10 15

 Ala Val Val Pro Gln Gly Ser Arg
 20

 <210> 19
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

 <400> 19
 Asn Met Leu Leu Gln Asn Pro Gln Leu Ala Tyr Ala Leu Leu Gln Ala
 1 5 10 15

 Gln Val Val Met Arg
 20

 <210> 20
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

 <400> 20
 Gly Gly Pro Leu Pro Glu Pro Arg Pro Leu Met Ala Glu Pro Arg Gly
 1 5 10 15

 Pro Met Leu Asp Gln Arg
 20

 <210> 21
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:tryptic peptide

 <400> 21
 Ser Leu Gly Thr Gly Ala Pro Val Ile Glu Ser Pro Tyr Gly Glu Thr
 1 5 10 15

 Ile Ser Pro Glu Asp Ala Pro Glu Ser Ile Ser Lys
 20 25

<210> 22
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

```

Met Ala Gly Leu Thr Val Arg Asp Pro Ala Val Asp Arg Ser Leu Arg
 1           5           10           15

Ser Val Phe Val Gly Asn Ile Pro Tyr Glu Ala Thr Glu Glu Gln Leu
      20           25           30

Lys Asp Ile Phe Ser Glu Val Gly Pro Val Val Ser Phe Arg Leu Val
      35           40           45

Tyr Asp Arg Glu Thr Gly Lys Pro Lys Gly Tyr Gly Phe Cys Glu Tyr
      50           55           60

Gln Asp Gln Glu Thr Ala Leu Ser Ala Met Arg Asn Leu Asn Gly Arg
      65           70           75           80

Glu Phe Ser Gly Arg Ala Leu Arg Val Asp Asn Ala Ala Ser Glu Lys
      85           90           95

Asn Lys Glu Glu Leu Lys Ser Leu Gly Thr Gly Ala Pro Val Ile Glu
      100          105          110

Ser Pro Tyr Gly Glu Thr Ile Ser Pro Glu Asp Ala Pro Glu Ser Ile
      115          120          125

Ser Lys Ala Val Ala Ser Leu Pro Pro Glu Gln Met Phe Glu Leu Met
      130          135          140

Lys Gln Met Lys Leu Cys Val Gln Asn Ser Pro Gln Glu Ala Arg Asn
      145          150          155          160

Met Leu Leu Gln Asn Pro Gln Leu Ala Tyr Ala Leu Leu Gln Ala Gln
      165          170          175

Val Val Met Arg Ile Val Asp Pro Glu Ile Ala Leu Lys Ile Leu His
      180          185          190

Arg Gln Thr Asn Ile Pro Thr Leu Ile Ala Gly Asn Pro Gln Pro Val
      195          200          205

His Gly Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Asn Val Ser Met Asn Gln Gln
      210          215          220

Asn Pro Gln Ala Pro Gln Ala Gln Ser Leu Gly Gly Met His Val Asn
      225          230          235          240

Gly Ala Pro Pro Leu Met Gln Ala Ser Met Gln Gly Gly Val Pro Ala
      245          250          255

Pro Gly Gln Met Pro Ala Ala Val Thr Gly Pro Gly Pro Gly Ser Leu
      260          265          270

Ala Pro Gly Gly Gly Met Gln Ala Gln Val Gly Met Pro Gly Ser Gly
      275          280          285

```

Pro Val Ser Met Glu Arg Gly Gln Val Pro Met Gln Asp Pro Arg Ala
 290 295 300
 Ala Met Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ala Asn Val Pro Thr Pro Arg Gly
 305 310 315 320
 Leu Leu Gly Asp Ala Pro Asn Asp Pro Arg Gly Gly Thr Leu Leu Ser
 325 330 335
 Val Thr Gly Glu Val Glu Pro Arg Gly Tyr Leu Gly Pro Pro His Gln
 340 345 350
 Gly Pro Pro Met His His Val Pro Gly His Glu Ser Arg Gly Pro Pro
 355 360 365
 Pro His Glu Leu Arg Gly Gly Pro Leu Pro Glu Pro Arg Pro Leu Met
 370 375 380
 Ala Glu Pro Arg Gly Pro Met Leu Asp Gln Arg Gly Pro Pro Leu Asp
 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Gly Arg Asp Pro Arg Gly Ile Asp Ala Arg Gly Met Glu
 405 410 415
 Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Gly Leu Asp Ala Arg Gly Leu Glu Ala
 420 425 430
 Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg
 435 440 445
 Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Val Arg Gly Met Glu Ala Arg Gly
 450 455 460
 Met Asp Thr Arg Gly Pro Val Pro Gly Pro Arg Gly Pro Ile Pro Ser
 465 470 475 480
 Gly Met Gln Gly Pro Ser Pro Ile Asn Met Gly Ala Val Val Pro Gln
 485 490 495
 Gly Ser Arg Gln
 500

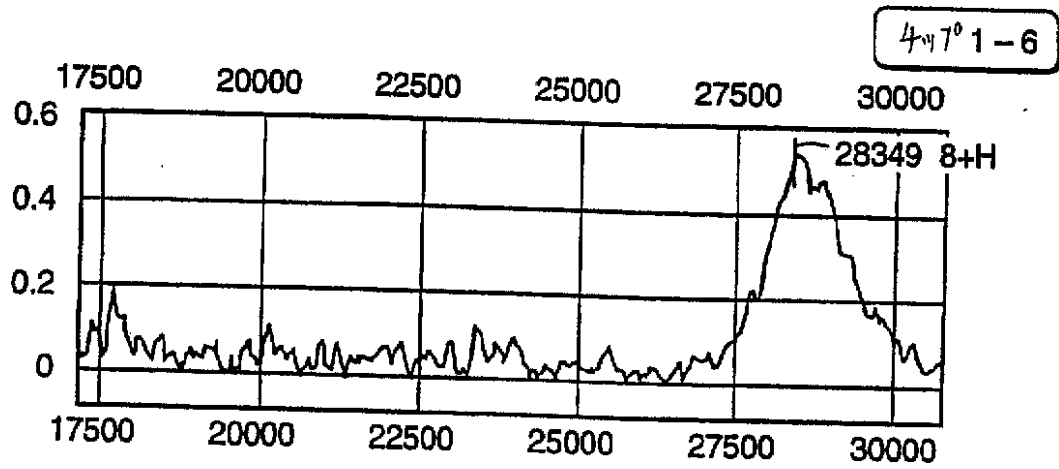
<210> 23
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Met Ala Gly Leu Thr Val Arg Asp Pro Ala Val Asp Arg Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Val Gly Asn Ile Pro Tyr Glu Ala Thr Glu Glu Gln Leu
 20 25 30
 Lys Asp Ile Phe Ser Glu Val Gly Pro Val Val Ser Phe Arg Leu Val
 35 40 45
 Tyr Asp Arg Glu Thr Gly Lys Pro Lys Gly Tyr Gly Phe Cys Glu Tyr
 50 55 60

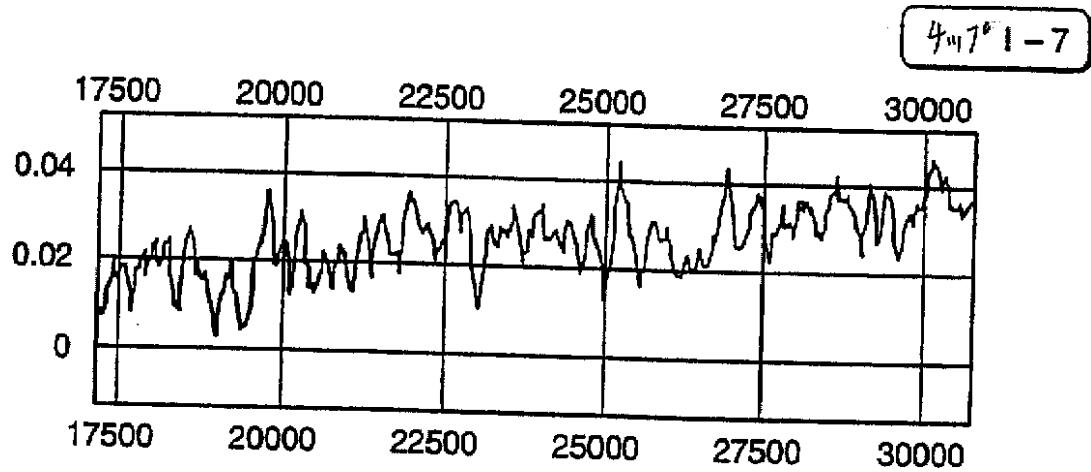
Gln Asp Gln Glu Thr Ala Leu Ser Ala Met Arg Asn Leu Asn Gly Arg
 65 70 75 80
 Glu Phe Ser Gly Arg Ala Leu Arg Val Asp Asn Ala Ala Ser Glu Lys
 85 90 95
 Asn Lys Glu Glu Leu Lys Ser Leu Gly Thr Gly Ala Pro Val Ile Glu
 100 105 110
 Ser Pro Tyr Gly Glu Thr Ile Ser Pro Glu Asp Ala Pro Glu Ser Ile
 115 120 125
 Ser Lys Ala Val Ala Ser Leu Pro Pro Glu Gln Met Phe Glu Leu Met
 130 135 140
 Lys Gln Met Lys Leu Cys Val Gln Asn Ser Pro Gln Glu Ala Arg Asn
 145 150 155 160
 Met Leu Leu Gln Asn Pro Gln Leu Ala Tyr Ala Leu Leu Gln Ala Gln
 165 170 175
 Val Val Met Arg Ile Val Asp Pro Glu Ile Ala Leu Lys Ile Leu His
 180 185 190
 Arg Gln Thr Asn Ile Pro Thr Leu Ile Ala Gly Asn Pro Gln Pro Val
 195 200 205
 His Gly Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Asn Val Ser Met Asn Gln Gln
 210 215 220
 Asn Pro Gln Ala Pro Gln Ala Gln Ser Leu Gly Gly Met His Val Asn
 225 230 235 240
 Gly Ala Pro Pro Leu Met Gln Ala Ser Met Gln Gly Gly Val Pro Ala
 245 250 255
 Pro Gly Gln Met Pro Ala Ala Val Thr Gly Pro Gly Pro Gly Ser Leu
 260 265 270
 Ala Pro Gly Gly Gly Met Gln Ala Gln Val Gly Met Pro Gly Ser Gly
 275 280 285
 Pro Val Ser Met Glu Arg Gly Gln Val Pro Met Gln Asp Pro Arg Ala
 290 295 300
 Ala Met Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ala Asn Val Pro Thr Pro Arg Gly
 305 310 315 320
 Leu Leu Gly Asp Ala Pro Asn Asp Pro Arg Gly Gly Thr Leu Leu Ser
 325 330 335
 Val Thr Gly Glu Val Glu Pro Arg Gly Tyr Leu Gly Pro Pro His Gln
 340 345 350
 Gly Pro Pro Met His His Val Pro Gly His Glu Ser Arg Gly Pro Pro
 355 360 365
 Pro His Glu Leu Arg Gly Gly Pro Leu Pro Glu Pro Arg Pro Leu Met
 370 375 380

Ala Glu Pro Arg Gly Pro Met Leu Asp Gln Arg Gly Pro Pro Leu Asp
 385 390 395 400
 Gly Arg Gly Gly Arg Asp Pro Arg Gly Ile Asp Ala Arg Gly Met Glu
 405 410 415
 Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Gly Leu Asp Ala Arg Gly Leu Glu Ala
 420 425 430
 Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg
 435 440 445
 Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Val Arg Gly Met Glu Ala Arg Gly
 450 455 460
 Met Asp Thr Arg Gly Pro Val Pro Gly Pro Arg Gly Pro Ile Pro Ser
 465 470 475 480
 Gly Met Gln Gly Pro Ser Pro Ile Asn Met Gly Ala Val Val Pro Gln
 485 490 495
 Gly Ser Arg Gln Val Pro Val Met Gln Gly Thr Gly Met Gln Gly Ala
 500 505 510
 Ser Ile Gln Gly Gly Ser Gln Pro Gly Gly Phe Ser Pro Gly Gln Asn
 515 520 525
 Gln Val Thr Pro Gln Asp His Glu Lys Ala Ala Leu Ile Met Gln Val
 530 535 540
 Leu Gln Leu Thr Ala Asp Gln Ile Ala Met Leu Pro Pro Glu Gln Arg
 545 550 555 560
 Gln Ser Ile Leu Ile Leu Lys Glu Gln Ile Gln Lys Ser Thr Gly Ala
 565 570 575
 Pro

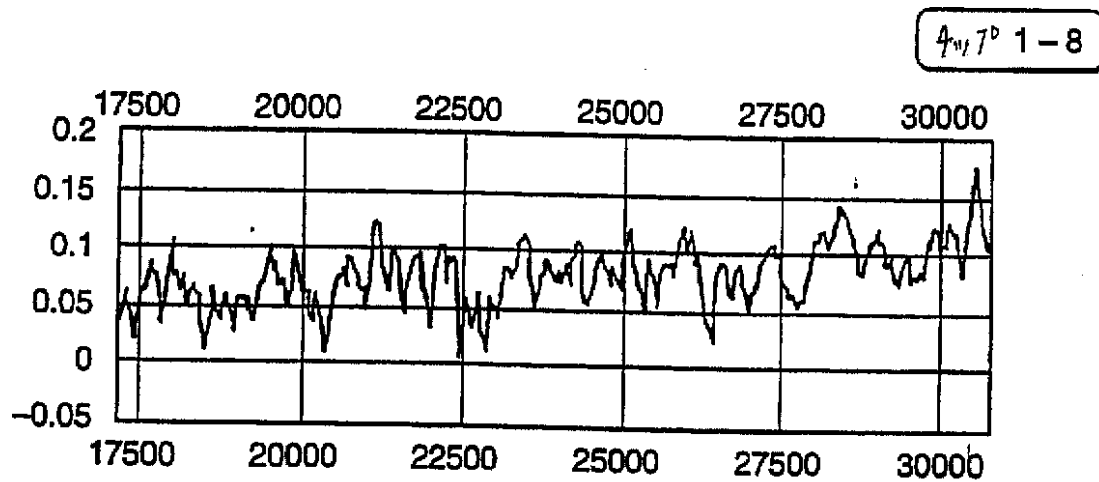
【図1A】



【図1B】



【図1C】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574		International Application No. PCT/US 00/31492
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHONG BATHSHEBA E ET AL: "Rapid screening of protein profiles of human breast cancer cell lines using non-porous reversed-phase high performance liquid chromatography separation with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectral analysis." RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, vol. 13, no. 18, 1999, pages 1808-1812, XP001006015 ISSN: 0951-4198 cited in the application the whole document ----- -/-	1,9, 15-20
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "8" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 June 2001		Date of mailing of the international search report 09/07/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tuynman, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC/US 00/31492

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 07036 A (SCHULZ KNAPPE PETER ;FORSSMANN WOLF GEORG (DE); OPITZ HANS GEORG () 19 February 1998 (1998-02-19) abstract page 6, line 4 - line 25 page 7, line 14 -page 8, line 15 claims 1-3,6-10	1-4, 9-11,15, 17, 21-23,29
X	& DE 196 32 521 A 19 February 1998 (1998-02-19) abstract page 2, line 25 - line 31 claims 1-7	1-4, 9-12,15, 17-23, 27, 29-32, 35-50
X	RASMUSSEN HANNE H ET AL: "Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer." JOURNAL OF UROLOGY, vol. 155, no. 6, 1996, pages 2113-2119, XP001006003 ISSN: 0022-5347 abstract page 2113, right-hand column, line 13 -page 2114, left-hand column, line 16 figures 2,3 table 1	1-8, 17-20
A		21-26, 28-32
X	JUNGBLUT P R ET AL: "PROTEOMICS IN HUMAN DISEASE: CANCER, HEART AND INFECTIOUS DISEASES" ELECTROPHORESIS,DE WEINHEIM, vol. 20, no. 10, July 1999 (1999-07), pages 2100-2110, XP000870393 ISSN: 0173-0835	1-4, 15-20
A	page 2102, left-hand column, line 1 -right-hand column, line 4 abstract page 2101, left-hand column, line 14 - line 41; figure 1 -/--	21-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC1/US 00/31492

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HABETS W J ET AL: "ANALYSIS OF A COMPLEMENTARY DNA CLONE EXPRESSING A HUMAN AUTOIMMUNE ANTIGEN FULL-LENGTH SEQUENCE OF THE U2 SMALL NUCLEAR RNA-ASSOCIATED B ANTIGEN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 84, no. 8, 1987, pages 2421-2425, XP002169270 1987 ISSN: 0027-8424 abstract	33,34
P,X	WATKINS B ET AL: "Identification of serum nuclear matrix protein markers of breast cancer using surface enhanced laser desorption-ionization (SELDI) mass spectroscopy." BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 64, no. 1, November 2000 (2000-11), page 98 XP001001191 23rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium;San antonio, Texas, USA; December 06-09, 2000 ISSN: 0167-6806 the whole document	1-50
P,X	WATKINS B ET AL: "Surface enhanced laser desorption-ionization (SELDI) mass spectroscopy in the discovery of serum markers for breast cancer." TUMOR BIOLOGY, vol. 21, no. Supplement 1, September 2000 (2000-09), page 35 XP001001193 28th Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine;Munich, Germany; September 08-13, 2000 ISSN: 1010-4283 the whole document	1-50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 33 and 34 relate to products defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being identifiable by the methods of claim 1 and 32, respectively.

The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the products prepared in example 2, mentioned in the description at page 25, line 27 to page 26, line 11.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

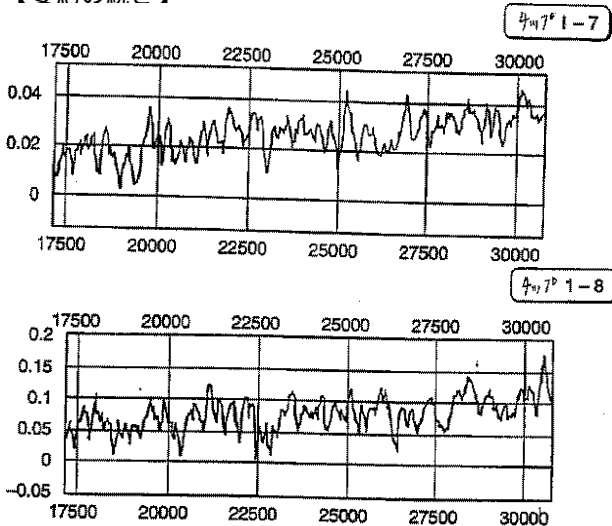
PC1/US 00/31492

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9807036 A	19-02-1998	DE 19632521 A	19-02-1998
		AU 720625 B	08-06-2000
		AU 4298897 A	06-03-1998
		CN 1233326 A	27-10-1999
		EP 0922226 A	16-06-1999
		PL 331612 A	02-08-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
G 0 1 N 30/88		G 0 1 N 30/88	J
33/53		33/53	D
33/543	5 0 1	33/543	5 0 1 A
33/574		33/574	A
33/577		33/577	B
33/68		33/68	
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 7 8 , 8 6 0		
(32)優先日	平成12年1月27日(2000.1.27)		
(33)優先権主張国	米国(U S)		
(31)優先権主張番号	6 0 / 2 0 1 , 7 2 1		
(32)優先日	平成12年5月3日(2000.5.3)		
(33)優先権主張国	米国(U S)		
(31)優先権主張番号	0 9 / 7 0 9 , 9 5 4		
(32)優先日	平成12年11月10日(2000.11.10)		
(33)優先権主張国	米国(U S)		
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , A U , C A , J P		
Fターム(参考)	2G045 AA01 AA15 CA25 CA26 CB03 CB07 CB08 CB11 CB12 CB14 CB15 CB30 DA36 FB05 FB06 FB07 4D017 AA11 BA07 CA17 DA03 EB03		

【要約の続き】



专利名称(译)	鉴定疾病标志物包括基于质量的分离		
公开(公告)号	JP2003528296A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	JP2001538814	申请日	2000-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	基底膜科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	基底膜科技有限公司		
[标]发明人	ワトキンスブラインモアエイ スザロロパートピー		
发明人	ワトキンス, ブラインモア エイ. スザロ, ロパート ピー.		
IPC分类号	G01N27/62 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 B01D15/04 B01D15/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/00 C12Q1/68 G01N30/72 G01N30 /88 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/567 G01N33/574 G01N33/577 G01N33 /58 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P35/00 C07K14/4702 G01N33/57415 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/48.A B01D15/08 G01N27/62.K G01N27/62.V G01N30/72.C G01N30/88.J G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/574.A G01N33/577.B G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA15 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045 /CB11 2G045/CB12 2G045/CB14 2G045/CB15 2G045/CB30 2G045/DA36 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB07 4D017/AA11 4D017/BA07 4D017/CA17 4D017/DA03 4D017/EB03		
优先权	60/165673 1999-11-16 US 60/172170 1999-12-17 US 60/178860 2000-01-27 US 60/201721 2000-05-03 US 09/709954 2000-11-10 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于快速检测和表征哺乳动物（例如人）中的疾病标志物（例如癌症标志物）的方法和组合物。一旦被识别，该标志物就可以用作检测疾病的靶标，治疗疾病的靶标或两者。在一个优选的实施方案中，样品可以是组织或体液样品。优选的体液包括例如血液，血浆，血清，汗液，眼泪，尿液，腹膜液，淋巴液，阴道分泌物，精液，脊髓液，腹水，唾液，痰或乳腺分泌物。

