

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-527840

(P2019-527840A)

(43) 公表日 令和1年10月3日 (2019. 10. 3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574	A 4 H O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	D
CO 7 K 17/00 (2006. 01)	CO 7 K 17/00	
CO 7 K 16/18 (2006. 01)	CO 7 K 16/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-523172 (P2019-523172)	(71) 出願人	519011773
(86) (22) 出願日	平成29年7月11日 (2017. 7. 11)		プロテオメディックス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成31年3月8日 (2019. 3. 8)		スイス国 シュリーレン 8 9 5 2 ヴァーギシュトラーセ 2 3
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/067411	(74) 代理人	110002354
(87) 国際公開番号	W02018/011212		特許業務法人平和国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成30年1月18日 (2018. 1. 18)	(72) 発明者	ラルフ シース
(31) 優先権主張番号	16179607. 3		スイス国 チューリヒ 8 0 3 7 ランデンベルクシュトラーセ 1 1
(32) 優先日	平成28年7月15日 (2016. 7. 15)	(72) 発明者	カトリン エント
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ドイツ連邦共和国 ゲルメリング 8 2 1 1 0 ネベラー シュトラーセ 6 0
		(72) 発明者	アルキビアデ アタナジウ
			スイス国 バーデン 5 4 0 0 テートヴィラーシュトラーセ 1 3 b
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトサンプル中のタンパク質を検出する方法及びその方法の使用

(57) 【要約】

被験者の健康状態に関する情報を収集する方法が提案され、この方法は、好ましくは、C T S D、O L F M 4、I C A M 1 からなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質の濃度を含む、T H B S 1 の濃度、遊離型 P S A の割合 (% f P S A) の、被験者の血清、血漿、又は血液における定量的検出を含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者の健康状態に関する情報を収集する方法であって、前記被験者の血清、血漿、又は血液における T H B S 1 の濃度及び遊離型 P S A の割合 (% f P S A) の被験者定量的検出を含む、方法。

【請求項 2】

前記被験者の血清、血漿、又は血液における T H B S 1 の濃度、遊離型 P S A の割合 (% f P S A)、及び、C T S D、O L F M 4、I C A M 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つのタンパク質の濃度の被験者定量的検出を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記被験者の血清、血漿、又は血液を、好ましくは前記被験者の血清、血漿、又は血液の希釈後に、それぞれのタンパク質についての少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの親和性試薬に接触させること、及び、前記それぞれのタンパク質と前記少なくとも 1 つの親和性試薬との間で結合が起こるかどうかを検出すること、及び、前記それぞれのタンパク質の濃度の定量的読出しを使用し、元の血清、血漿、若しくは血液中のそれぞれの濃度、又は、遊離型 P S A の場合、遊離型 P S A の割合の計算を可能にすることによって実施される、第 1 のステップと、

前記第 1 のステップにて決定された前記全てのタンパク質濃度及び遊離型 P S A 割合に基づいて、組合せ式スコア値を計算する第 2 のステップと、
を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 2 のステップ後に、第 3 のステップにおいて、前記被験者の生検陽性及び / 又は前立腺癌陽性のリスクは、前記第 2 のステップにて決定された前記組合せ式スコア値に基づいて判定され、前記組合せ式スコア値の対応する閾値を超えることは、前立腺癌陽性の情報として及び / 又は生検が必要であると考えられる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記組合せ式スコア値は、以下の式：

【数 5】

$$\frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \dots + \beta_k \cdot x_k)}}$$

を使用して計算され、

ここで、 β_i は実験データを使用する最適化によって前もって決定される回帰係数であり、 β_0 は切片であり、 x_i は、元の血清、血漿、又は血液中のそれぞれのタンパク質の測定濃度、そして、遊離型 P S A の場合には、元の血清、血漿、又は血液におけるその割合 (% f P S A) である、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

T H B S 1 の濃度 (n g / m L で表される) 並びに遊離型 P S A の割合 (0 ~ 1 の数値範囲内で表される) (% f P S A) 及び好ましくはさらには C T S D の濃度 (n g / m L で表される) は前記第 1 のステップで測定され、好ましくは、前記組合せ式スコア値の計算について、T H B S 1 及び遊離型 P S A の割合 (% f P S A) を測定する場合、前記回帰係数は、次の通りに選択され：

β_0 、4 . 0 ~ 5 . 5 又は 4 . 5 ~ 5 . 0 の範囲内、好ましくは、4 . 5 ~ 5 . 0 又は 4 . 7 ~ 4 . 8 の範囲内；

$\beta_{T H B S 1}$ 、(- 0 . 0 0 0 1 2) ~ (- 0 . 0 0 0 0 3) 又は (- 0 . 0 0 0 0 9) ~ (- 0 . 0 0 0 0 3) の範囲内、好ましくは、(- 0 . 0 0 0 0 9) ~ (- 0 . 0 0 0 0 4) 又は (- 0 . 0 0 0 0 6) ~ (- 0 . 0 0 0 0 4) の範囲内；

$\beta_{\% f P S A}$ 、(- 7 . 5) ~ (- 2 . 5) の範囲内、好ましくは、(- 5 . 5) ~ (-

5.0)の範囲内；

さらに好ましくは、90%感度で、0.28～0.35、好ましくは、0.30～0.34又は0.30～0.33の前記組合せ式スコア値の閾値が選択されるか；

又は、好ましくは、

前記組合せ式スコア値の計算について、THBS1、遊離型PSAの割合(%fPSA)、及びCTSDを測定する場合、前記回帰係数は、次の通りに選択され；

β_0 、3～4.2又は3～3.4の範囲内、好ましくは、3.8～4.0又は3.1～3.3の範囲内；

β_{CTSD} 、0.003～0.05又は0.005～0.05の範囲内、好ましくは、0.004～0.006又は0.008～0.012の範囲内；

β_{THBS1} 、(-0.0002)～(-0.00005)又は(-0.00009)～(-0.00003)の範囲内、好ましくは、(-0.00012)～(-0.00008)又は(-0.00007)～(-0.00006)の範囲内；

$\beta_{\%fPSA}$ 、(-7.5)～(-2.5)の範囲内、好ましくは、(-5.2)～(-5.0)又は(-5.2)～(-2.5)の範囲内；

さらに好ましくは、90%感度で、0.28～0.40又は0.28～0.35、好ましくは、0.35～0.37又は0.33～0.34の前記組合せ式スコア値の閾値が選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

THBS1の濃度(ng/mLで表される)、遊離型PSAの割合(0～1の数値範囲内で表される)(%fPSA)、及びOLF M4の濃度(ng/mLで表される)は前記第1のステップで測定され、好ましくは、前記組合せ式スコア値の計算について、前記回帰係数は、次の通りに選択され；

β_0 、4.0～5.2の範囲内、好ましくは、4.4～4.8の範囲内；

$\beta_{OLF M4}$ 、0.001～0.01の範囲内、好ましくは、0.002～0.004の範囲内；

β_{THBS1} 、(-0.00009)～(-0.00002)の範囲内、好ましくは、(-0.00006)～(-0.00004)の範囲内；

$\beta_{\%fPSA}$ 、(-7.5)～(-2.5)の範囲内、好ましくは、(-5.9)～(-4.8)の範囲内；

さらに好ましくは、90%感度で、0.27～0.35、好ましくは、0.3～0.34の前記組合せ式スコア値の閾値が選択され；

及び/又は、

THBS1の濃度(ng/mLで表される)、遊離型PSAの割合(0～1の数値範囲内で表される)(%fPSA)、及びICAM1の濃度(ng/mLで表される)は前記第1のステップで測定され、

好ましくは、前記組合せ式スコア値の計算について、前記回帰係数は、次の通りに選択され；

β_0 、4.0～5.2の範囲内、好ましくは、4.6～4.9の範囲内；

β_{ICAM1} 、(-0.002)～(-0.0001)の範囲内、好ましくは、(-0.0010)～(-0.0005)の範囲内；

β_{THBS1} 、(-0.0001)～(-0.00001)の範囲内、好ましくは、(-0.00008)～(-0.00004)の範囲内；

$\beta_{\%fPSA}$ 、(-7.5)～(-2.5)の範囲内、好ましくは、(-5.8)～(-4.9)の範囲内；

さらに好ましくは、90%感度で、0.25～0.35、好ましくは、0.3～0.33の前記組合せ式スコア値の閾値が選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

THBS1の濃度(ng/mLで表される)、遊離型PSAの割合(0～1の数値範囲内で表される)(%fPSA)、並びにOLF M4、ICAM1、及びCTSDの濃度(

10

20

30

40

50

それぞれ ng/mL で表される) は前記第 1 のステップで測定され、好ましくは、前記組合せ式スコア値の計算について、前記回帰係数は、次の通りに選択され：

β_0 、 $3 \sim 3.8$ の範囲内、好ましくは、 $3.5 \sim 3.6$ の範囲内；

β_{OLFM4} 、 $0.001 \sim 0.003$ の範囲内、好ましくは、 $0.0015 \sim 0.0025$ の範囲内；

β_{ICAM1} 、 $(-0.004) \sim (-0.002)$ の範囲内、好ましくは、 $(-0.0035) \sim (-0.00025)$ の範囲内；

β_{CTSD} 、 $0.005 \sim 0.05$ の範囲内、好ましくは、 $0.008 \sim 0.012$ の範囲内；

β_{THBS1} 、 $(-0.00009) \sim (-0.00003)$ の範囲内、好ましくは、 $(-0.00007) \sim (-0.00006)$ の範囲内；

$\beta_{\% \text{FPSA}}$ 、 $(-7.5) \sim (-2.5)$ の範囲内、好ましくは、 $(-5.2) \sim (-4.8)$ の範囲内；

さらに好ましくは、 90% 感度で、 $0.3 \sim 0.35$ 、好ましくは、 $0.32 \sim 0.335$ の前記組合せ式スコア値の閾値が選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

測定される THBS1 及び / 又は CTSD 、 OLFM4 、 ICAM1 の少なくとも 1 つは、グリコシル化、リン酸化、脂質化を含む翻訳後修飾を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

THBS1 、 CTSD 、 OLFM4 、 ICAM1 の少なくとも 1 つの濃度の測定について、前記被験者の血清、血漿、又は血液は、 $7 \sim 7.4$ の範囲内の pH 値を有し、 pH 値を制御する試薬、好ましくは以下の系の少なくとも 1 つから選択される pH 値を制御する試薬、及び以下の少なくとも 1 つの系から選択される任意添加成分を含む緩衝液を用いて希釈され、

好ましくは、前記緩衝液は、 $50 \text{ mM} \sim 850 \text{ mM}$ の範囲内、好ましくは $200 \text{ mM} \sim 400 \text{ mM}$ の範囲内又は $250 \text{ mM} \sim 370 \text{ mM}$ の範囲内のイオン強度を有し、

前記 pH を制御する試薬の系が、

Tris (トリス (ヒドロキシメチル) - アミノメタン)、

Pipes (ピペラジン - 1, 4 - ビス - 2 - エタンスルホン酸)、

Mes (4 - モルホリノエタンスルホン酸)、

Hepes (4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジン - エタンスルホン酸)、

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) から選択され、

前記任意添加成分の系が、

好ましくは、 $0.01\% (\text{v/v}) \sim 0.1\% (\text{v/v})$ 、好ましくは、 $0.025\% (\text{v/v}) \sim 0.05\% (\text{v/v})$ の、ドデシルポリ (エチレングリコールエーテル) $_m$ (m は $5 \sim 40$ の整数)；1 - O - n - オクチル - β - D - グルコピラノシド (n - オクチルグリコシド)；アルキルフェノールポリ (エチレングリコール - エーテル) $_m$ (m は $5 \sim 40$ の整数、好ましくは $m = 11$)；1 - O - n - ドデシル - β - D - グルコピラノシル (1 - 4) α - D - グルコピラノシド；ドデシルポリ - (エチレングリコールエーテル) $_m$ (m は $5 \sim 40$ の整数、好ましくは $m = 23$)；ポリ (オキシエチレン) (20) - ソルビタンモノオレエート、ポリ (オキシエチレン) (20) - ソルビタンモノラウレート、ポリ (オキシエチレン) (20) - ソルビタンモノパルミテート、ポリ (オキシエチレン) (20) - ソルビタンモノステアレートから好ましくは選択されるポリ (オキシエチレン) (20) - ソルビタンモノ脂肪酸エステル；オクチルフェノールポリ (エチレングリコールエーテル) $_m$ (m は $5 \sim 40$ の整数、好ましくは $m = 10$) からなる群の少なくとも 1 つから選択される非イオン性界面活性剤 (non-ionic detergent)；ウシ血清アルブミン；マウス IgG ；ウシ γ グロブリン；ウシ胎児血清；ウマ血清から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

THBS1を測定するための希釈については、1:1000~1:20000の範囲内の希釈係数が選択され、好ましくは、酵素結合免疫吸着アッセイについては1:1000~1:3000又は1:2000~1:3000の範囲内の希釈係数が、また、ビーズベースアッセイについては1:5000~1:15000の範囲内の希釈係数が選択され、及び/又は、タンパク質CTSDを測定するための希釈については、1:5~1:70又は1:5~1:30の範囲内の希釈係数が選択され、好ましくは、酵素結合免疫吸着アッセイについては1:10~1:50又は1:10~1:30の範囲内の希釈係数が、また、ビーズベースアッセイについては1:10~1:20の範囲内の希釈係数が選択され、

好ましくは、使用される緩衝液に、ポリ(オキシエチレン)(20)-ソルビタンモノラウレートとして選択される非イオン性界面活性剤をさらに補い、0.05%(v/v)のポリ(オキシエチレン)(20)-ソルビタンモノラウレートの更なる濃度をもたらす、

及び/又は、ICAM1を測定するための希釈については、1:50~1:200の範囲内、好ましくは、1:80~1:150の範囲内の希釈係数が選択され、好ましくは、使用される緩衝液に、250mMの更なる塩化ナトリウム含量になるように塩化ナトリウムをさらに補い、

及び/又は、OLFM4を測定するための希釈については、1:5~1:30の範囲内、好ましくは、1:5~1:20の範囲内の希釈係数が選択され、好ましくは、使用される緩衝液に、250mMの更なる塩化ナトリウム含量になるように塩化ナトリウム及びジチオトレイトールとして好ましくは選択される還元剤をさらに補い、ジチオトレイトールの5mMの濃度をもたらす、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記方法は、前記被験者の血清、血漿、又は血液を、好ましくは前記被験者の血清、血漿、又は血液の希釈後に、それぞれのタンパク質についての少なくとも1つの親和性試薬に接触させること、及び、前記それぞれのタンパク質と前記少なくとも1つの親和性試薬との間で結合が起こるかどうかを検出すること、及び、前記それぞれのタンパク質濃度又は遊離型PSAの場合にはその割合の定量的読出しを使用し、元の血清、血漿、又は血液中のそれぞれの濃度の計算を可能にすることによって実施される、第1のステップを含み、

前記ステップにおいて、好ましくは可視的読出しによる前記それぞれのタンパク質に特異的なサンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ及び/又は好ましくは蛍光読出しによる前記それぞれのタンパク質に対するサンドイッチビーズベース抗体アッセイが使用される、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

好ましくは可視的読出しによる前記それぞれのタンパク質に特異的な前記サンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ及び/又は好ましくは蛍光読出しによる前記それぞれのタンパク質に対する前記サンドイッチビーズベース抗体アッセイは、それぞれ、ヒトのTHBS1、CTSD、ICAM1、及びOLFM4の組換えタンパク質、並びに、抗体によるマウスの免疫化によって産生されるマウスのモノクローナル抗体を使用することによって得られるアッセイである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記それぞれの濃度の定量的検出は、外部タンパク質標準に対するバイオマーカーの濃度の測定を含み、前記測定は、前記サンプルと同一の測定セットにおいて測定されるタンパク質希釈物に用いるのと同じ緩衝液にて希釈された幾つかの、好ましくは5~7のタンパク質標準の規定された濃度を測定することによる参照標準曲線の作成を含む、請求項1~13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

癌、特に、限局性前立腺癌を含む前立腺癌の、モニタリング、診断、前立腺生検結果の予測、予後診断、リスク評価、治療選択、治療モニタリングのうちの少なくとも1つのス

10

20

30

40

50

テップ、又は、癌、特に、限局性前立腺癌を含む前立腺癌の、モニタリング、診断、前立腺生検結果の予測、予後診断、リスク評価、治療選択、治療モニタリングのうちの少なくとも1つのための請求項1～14のいずれか1項による方法の使用を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトサンプル中の、特に、ヒトの血清、血漿、又は血液中のタンパク質を測定する方法の分野に関し、同様に、特にリスク評価のためのアッセイ及びこうしたアッセイの使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ある人のヒトサンプル中のタンパク質の測定は、特に、その人の栄養及び健康状態に関して、その人の全身的状态の監視及びリスク評価のための有力なツールである。

【0003】

前立腺癌（P C a : Prostate Cancer）は、男性における最も頻繁に診断される癌であり、米国における男性の癌関連死の第2の主因である。

【0004】

20

前立腺癌の診断及び治療は、10年間の研究努力にもかかわらず、クリニックにおいて依然として主要な課題である。P C aの進行は、残念ながら無症候性（silent）であり、より急速な進行及び潜在的に危険な病変の早期検出は患者の健康にとって重要である。その理由は、疾病からの完全寛解及び治癒は、疾病の早期段階においてのみ可能だからである。

【0005】

P C aのために利用可能な最も非侵襲的な診断試験は、デジタル直腸検査（D R E : digital rectal examination）と組み合わせた血液中の前立腺特異抗原（P S A : Prostate Specific Antigen）の検出である。P S Aは前立腺の上皮細胞によって産生されるタンパク質である。P S Aは、カリクレイン I I I（kallikrein III）、セミニン（seminin）、セメノゲラーゼ（semenogelase）、 γ -セミノタンパク質（ γ -seminoprotein）、及びP-30抗原としても知られており、P S Aは、正常男性の血清中に少量で存在する34 k Dの糖タンパク質であり、P C aが存在する場合及び他の前立腺疾患においてしばしば上昇する。D R Eと組み合わせたP S Aを測定する血液検査は、P C aの早期検出のために現在のところ利用可能な最も有効な検査である。正常より高いレベルのP S Aは、限局性P C aと転移性P C aの両方に関連付けられる。

30

【0006】

P S A単独での診断精度は、約60%に過ぎず、その方法は、特異度において主要な欠点を有する（不必要な前立腺生検又は手術を受ける偽陽性事例があまりにも多い）。実際には、P S Aレベルは、前立腺感染症、炎症、良性前立腺肥大（増大）又は良性前立腺過形成（B P H）、及び、直近の射精（recent ejaculation）によっても増加し、偽陽性結果を生じ得る。

40

【0007】

そのため、P C a診断は、現在のところP S A評価の高い偽陽性率がネックになっており、高い偽陽性率は、その結果として、陰性診断所見を伴う多数の前立腺生検をもたらし、場合がある。さらに、これらの不必要な生検は、潜在的な副作用を有し得る。近年、P S Aを使用するP C aについての男性の普及したスクリーニングは推奨されておらず、そのためP C aについてスクリーニングする男性がより少数になり、検出される早期段階の事例がより少数になっている。

【0008】

50

従って、種々のパラメーター（例えば、遊離型及び総 P S A ）の同時測定に基づく新規な方法が、全体の診断精度を上げるツールとして出現しているものの、偽陽性及び偽陰性結果を回避する信頼性がありかつ非侵襲的な診断 / 予後診断法は依然として欠如している。血液中のほとんどの P S A は血清タンパク質と結合している。少量は、タンパク質と結合しておらず、遊離型 P S A と呼ばれる。前立腺癌を患う男性においては、遊離型（未結合）P S A の総 P S A に対する割合は減少する。癌のリスクは、遊離型 P S A の総 P S A に対する比（% f P S A ）が 2 5 % より小さい場合に増加する。この比が小さくなればなるほど、P C a の確率が大きくなる。しかし、総 P S A 及び遊離型 P S A は共に、射精直後に増加し、2 4 時間以内にベースラインレベルまでゆっくり戻り、P C a に関連しない他のメカニズムが遊離型 P S A の総 P S A に対する比に影響を及ぼすこともある。

10

【0009】

新しい診断ツール、理想的には非侵襲的な診断ツールは、P C a 診断を改善し、不必要な生検及び過剰な治療を減らすために緊急に必要とされている。血液のような容易にアクセス可能なサンプルタイプのより正確な診断により、医師及び患者は、P C a の考えられる事例及び前立腺生検が必要か否かに関するより多くの情報を得た上での決定（more informed decisions）を行うことが可能になる。

【0010】

診断と同様に、P C a の治療及び / 又は P C a の予後診断は、疾病の不均一性のために主要な課題のままである。P C a の複数のメカニズムが提案されてきているが、患者を分類することができる適切な特徴（signature）はなく、治療介入治療（therapeutic intervention cures）のために重要な目標タンパク質は依然として実現可能でない。

20

【0011】

前立腺癌のための適切な診断システムを見出す 1 つのアプローチは、特許文献 1 において提案されており、ヒト血液中に存在することが知られており、かつ、対応する患者の健康状態に応じて下方調節又は上方調節されると予想される 2 4 のタンパク質のリストのうちの少なくとも 2 つを測定することが提案されている。

【0012】

既知のアプローチの問題は、癌が実際に存在するかという観点での感度及び特に特異度が欠けていること、及び、偽陽性及び偽陰性結果を回避する観点での診断信頼性が欠けていることである。更なる問題は、対応するツールを学術研究目的のためだけでなく幅広い用途のためにも適するようにする、対応する検出プローブ（抗体ベースであろうが、任意の他のタイプの検出であろうが）の実際の利用可能性である。更なる問題は、対応する検出システムが、単純であり、多数の個々の測定を伴うべきでないことである。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献 1】国際公開第 2 0 0 9 / 1 3 8 3 9 2 号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

40

従って、被験者の健康状態に関する情報を収集するための、特に、ヒトサンプル中の、特にヒト血清、血漿、又は血液中のタンパク質を検出するための新しい方法を提案することが本発明の目的であり、本発明は、特に P C a に関連する、特にリスク評価のためのアッセイ及びこうしたアッセイの使用に関する。ヒトカタレプシン D（C T S D : cathepsin D）、ヒト細胞間接着分子 1（I C A M 1 : intercellular adhesion molecule 1）、ヒトオルファクトメジン 4（O L F M 4 : olfactomedin 4）、及びヒトトロンスポンジン 1（T H B S 1 : thrombospondin 1）についての 4 つの個々のイムノアッセイを開発し、技術的に検証した。これらの糖タンパク質のマウスホモログは、P t e n コンディショナルノックアウトマウスモデルを使用する質量分析法によって過去に同定された。ヒトホモログは、それ自体で又は P S A 値、特に % f P S A 値と組合せて、P C a から良性前立腺状

50

態を識別する能力を試験するために、臨床血清サンプル中で測定された。結果として、特許請求される組合せが、従来技術のアプローチの上記で述べた欠点を克服するために最適であることが確認された。

【課題を解決するための手段】

【0015】

より具体的には、本発明は、被験者の健康状態に関する情報を収集する方法に関する。この方法は、被験者の血清、血液、又は血漿中の特定のタンパク質の定量的検出を含む。被験者の血清、血液、又は血漿は貯蔵及び／又は前処理することもでき、例えば、被験者から採取された後でかつ本方法を実施する前に希釈することができる。具体的には、本方法は、THBS1の濃度の測定及び遊離型PSAの割合（% f PSA、[遊離型PSA] / [総PSA]）として与えられ、従って、0～1の数値範囲内にある）の測定／決定を含む。好ましくは、本方法は、CTSD、OLFM4、ICAM1からなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質の濃度の測定をさらに含む。換言すれば、少なくとも2つ又は好ましくは少なくとも3つのタンパク質含量が、情報を収集するためのサンプル中で測定／決定される。THBS1、CTSD、OLFM4、及び／又はICAM1については、その濃度は、直接的に又は間接的に測定され、通常、ng/mLで表され、一方、PSAについては、遊離型PSAの割合が、総PSA及び遊離型PSAの濃度を定量化することによって（又は代替的に、総PSA及び複合型PSAの濃度を定量化し、そこから遊離型PSAの割合を計算することによって）決定され、分析のために使用される。分析のために、好ましくは、元のサンプル中の、そのため元の血清、血液、又は血漿中の濃度値が使用され、測定する前に、元の血清、血液、又は血漿の希釈又は修飾ステップが存在する場合、元のサンプル中の濃度が逆算される。

10

20

【0016】

予想外に、遊離型PSAの割合（% f PSA）と組合せて、前立腺生検陽性、従って、PCa陽性であるときに高いことが見出された。予想外に、総PSAとの組合せではなく、特に% f PSA値と組合せたTHBS1は、対応する被験者の健康状態に関する陽性情報の判定を可能にすることが見出された。大規模コホート（large cohort）に関して実施された分析は、最適化されたロジスティック回帰モデルによって、受信者動作特性（ROC：receiver operating characteristic）表現における非常に大きな曲線下面積（AUC：area under the curve）を有すること、及び、90%感度において特に高い特異度を有するパラメーター化が見出され得ることを示す。それに加えて、追加的な系CTSD、OLFM4、ICAM1のいずれについても、このコホートに関して単独で、かつさらには% f PSAの割合と共に評価され最適化される場合、大きなAUCを全く得ることができないことが見出された。しかし、特に、群CTSD、OLFM4、ICAM1の群のうちの更なる1つが測定される場合、特に、CTSDが、THBS1と共にかつ% f PSAと連携して測定される場合、90%感度における有意の更なる特異度が得られ得る。

30

【0017】

対応する患者の年齢に関する等の情報を分析内にさらに含むことも可能であり、年齢等のこうした追加的な情報も、以下で与えられる式（1）において更なるパラメーターとして使用され得る。

40

【0018】

通常、本方法は、上昇したPSA（2.0 ng/mL及び10 ng/mL）値を有する、好ましくは、DRE陰性及び／又は増大した前立腺（35 mL）をさらに有する被験者に関して実施される。

【0019】

提案される方法の第1の好ましい実施形態によれば、方法は、

被験者の血清、血漿、又は血液、好ましくは血清を、好ましくは被験者の血清、血漿、又は血液の希釈後に、それぞれのタンパク質についての少なくとも1つ、好ましくは2つの（好ましくはサンドイッチアプローチを使用する）親和性試薬に接触させ、それぞれのタンパク質と少なくとも1つ（又は、2つ）の親和性試薬との間で結合が起こるかどうか

50

を検出し、それぞれのタンパク質の濃度の定量的読出し、又は遊離型 P S A の場合にはその割合 % f P S A 値を使用し、元の血清、血漿、又は血液中のそれぞれの濃度の計算を可能にすることによって実施される、第 1 のステップと、

上記第 1 のステップにて決定された全てのタンパク質の濃度及び遊離型 P S A 割合に基づいて、組合せ式スコア値を計算する第 2 のステップと、を含む。

【 0 0 2 0 】

タンパク質濃度及び遊離型 P S A 割合は、通常、個々に測定される、例えば、それぞれイムノアッセイにおいて測定されるが、その後、測定された濃度 / 割合は、組合せ式スコア値を計算するために組合せ方式で使用される。そのため、測定された情報は、個々に使用されるのではなく、組合せ式スコア値の決定のために及び情報の更なる分析のために組合せ方式で使用される。

10

【 0 0 2 1 】

さらに好ましくは、第 2 のステップ後に、第 3 のステップにおいて、被験者の前立腺生検陽性、従って、P C a を有するリスクは、第 2 のステップにて決定された組合せ式スコア値に基づいて決定することができ、組合せ式スコア値の対応する閾値を超えることは、生検陽性の予測（疾病の存在又は程度を決定するための検査のためのサンプル組織の抽出を意味し、その組織は、例えば病理学者によって顕微鏡下で検査され、陽性は、検査する人が、癌が存在するという結論を出すことを意味する）として、従って、確認のための生検を必要とする P C a 陽性の情報と考えられる。

20

【 0 0 2 2 】

組合せ式スコア値は、好ましくは、以下の式：

【 数 1 】

$$\frac{1}{1+e^{-(\beta_0+\beta_1 \cdot x_1+\dots+\beta_k \cdot x_k)}} \quad (1)$$

を使用して計算される。ここで、 β_i は、実験データを使用して、最適化、通常は、R O C アプローチにおける A U C の最大化によって前もって決定される回帰係数であり、 β_0 は切片であり、 x_i は、元の血清、血漿、又は血液中のそれぞれのタンパク質の測定濃度（n g / m L）であり、% f P S A の場合、 x_i は、元の血清、血漿、又は血液中の総 P S A に対する遊離型 P S A の割合（0 ~ 1 の範囲内で表される）である。指数 i は、従って、本状況において、0 から少なくとも 2 まで延び、T H B S 1 及び % f P S A 値のみが使用される状況の場合、少なくとも 3 まで延び、そこで、上記で述べた群から更なるタンパク質濃度値が測定される。

30

【 0 0 2 3 】

例えば、T H B S 1、C T S D、及び % f P S A は、組合せ式スコア値の計算のために測定され、i は 3 まで延び、 β_1 は $\beta_{C T S D}$ であり、 x_1 は元の血清、血漿、又は血液中の C T S D の濃度であり、 β_2 は $\beta_{T H B S 1}$ であり、 x_2 は元の血清、血漿、又は血液中の T H B S 1 の濃度であり、 β_3 は $\beta_{\% f P S A}$ であり、 x_3 は元の血清、血漿、又は血液中の遊離型 P S A の割合である。

40

【 0 0 2 4 】

ロジスティック回帰の対応する最適化は、被験者からの血清、血漿、又は血液に関する測定値を使用して実施され、健康状態に関するより詳細な情報がもたらされ、陰性又は前立腺生検陽性、従って、P C a が存在するかがわかる。従って、このコホートは高い感度において考えられる最も高い特異度を見出すために、R O C 表現において最適モデルを見出し、最大 A U C を得るために使用される。回帰係数である対応するパラメーター β_i は、次に、健康状態に関する知識を持たない任意の個人に関して使用されて、被験者の健康状態に関する確率的記述を行い、このようにして、前立腺生検結果を予測し得る。

【 0 0 2 5 】

50

タンパク質の濃度 / 割合が、測定され、上記で述べた式に挿入されて、組合せ式スコア値が決定される。得られた対応する組合せ式スコア値は、その後、閾値と比較される。閾値は、所望の感度 / 特異度に従って選択され得る。この閾値を超える場合、前立腺生検陽性、従って、P C a 診断が、生検を受けに行くという提案と共に与えられる。所望の感度に対応する閾値は、R O C 表現において、所望の感度が存在する曲線上の対応するポイントを選択し、組合せ式スコア値を、そのポイントについて採取することで決定される。特定のパラメーター化について以下で与えられる閾値は、常に 90 % 感度で与えられる。所与の閾値を超える場合、これは、前立腺生検、従って、P C a の高い可能性を示し、詳細に調べるために生検が提案される。前立腺生検を受ける患者の 474 の血清サンプルに関する大規模コホートを使用して、以下の好ましいパラメーター化が、最適感度及び特異度について決定され、タンパク質、即ち、それぞれ、T H B S 1、C T S D、I C A M 1、及び O L F M 4 の濃度は、それぞれ、n g / m L として式に挿入され、元の血液、血清、又は血漿について決定 / 逆算され、遊離型 P S A の割合 (% f P S A) は 0 ~ 1 の範囲内の数字として使用される。

【 0 0 2 6 】

T H B S 1 の濃度及び遊離型 P S A の割合 (% f P S A) が第 1 のステップにて測定される事例の場合、好ましくは、組合せ式スコア値の計算について、回帰係数は次の通りに選択される：

β_0 、4.0 ~ 5.5 又は 4.5 ~ 5.0 の範囲内、好ましくは、4.5 ~ 5.0 又は 4.7 ~ 4.8 の範囲内；

$\beta_{T H B S 1}$ 、(- 0.00012) ~ (- 0.00003) 又は (- 0.00009) ~ (- 0.00003) の範囲内、好ましくは、(- 0.00009) ~ (- 0.00004) 又は (- 0.00006) ~ (- 0.00004) の範囲内；

$\beta_{\% f P S A}$ 、(- 7.5) ~ (- 2.5) の範囲内、好ましくは、(- 5.5) ~ (- 5.0) の範囲内。

【 0 0 2 7 】

この事例における 90 % 感度で、好ましくは、0.28 ~ 0.35、好ましくは、0.30 ~ 0.34 又は 0.30 ~ 0.33 の組合せ式スコア値の閾値が選択される。

【 0 0 2 8 】

T H B S 1 の濃度、遊離型 P S A の割合 (% f P S A)、及び C T S D の濃度が第 1 のステップにて測定される事例の場合、好ましくは、組合せ式スコア値の計算について、回帰係数は、次の通りに選択される：

β_0 、3 ~ 4.2 又は 3 ~ 3.4 の範囲内、好ましくは、3.8 ~ 4.0 又は 3.1 ~ 3.3 の範囲内；

$\beta_{C T S D}$ 、0.003 ~ 0.05 又は 0.005 ~ 0.05 の範囲内、好ましくは、0.004 ~ 0.006 又は 0.008 ~ 0.012 の範囲内；

$\beta_{T H B S 1}$ 、(- 0.0002) ~ (- 0.00005) 又は (- 0.00009) ~ (- 0.00003) の範囲内、好ましくは、(- 0.00012) ~ (- 0.00008) 又は (- 0.00007) ~ (- 0.00006) の範囲内；

$\beta_{\% f P S A}$ 、(- 7.5) ~ (- 2.5) の範囲内、好ましくは、(- 5.2) ~ (- 5.0) 又は (- 5.2) ~ (- 4.5) の範囲内。

【 0 0 2 9 】

この事例における 90 % 感度で、好ましくは、0.28 ~ 0.40 又は 0.28 ~ 0.35、好ましくは、0.35 ~ 0.37 又は 0.33 ~ 0.34 の組合せ式スコア値の閾値が選択される。

【 0 0 3 0 】

T H B S 1 の濃度、遊離型 P S A の割合 (% f P S A)、及び O L F M 4 の濃度が第 1 のステップで測定される事例の場合、好ましくは、組合せ式スコア値の計算について、回帰係数は、次の通りに選択される：

β_0 、4.0 ~ 5.2 の範囲内、好ましくは、4.4 ~ 4.8 の範囲内；

10

20

30

40

50

$\beta_{OLF M 4}$ 、 $0.001 \sim 0.01$ の範囲内、好ましくは、 $0.002 \sim 0.004$ の範囲内；

$\beta_{THBS 1}$ 、 $(-0.00009) \sim (-0.00002)$ の範囲内、好ましくは、 $(-0.00006) \sim (-0.00004)$ の範囲内；

$\beta_{\% f P S A}$ 、 $(-7.5) \sim (-2.5)$ の範囲内、好ましくは、 $(-5.9) \sim (-4.8)$ の範囲内。

【0031】

この事例における90%感度で、好ましくは、 $0.27 \sim 0.35$ 、好ましくは、 $0.3 \sim 0.34$ の組合せ式スコア値の閾値が選択される。

【0032】

$THBS 1$ の濃度、遊離型 PSA の割合($\% f P S A$)、及び $ICAM 1$ の濃度が第1のステップで測定される事例の場合、好ましくは、組合せ式スコア値の計算について、回帰係数は、次の通りに選択される：

β_0 、 $4.0 \sim 5.2$ の範囲内、好ましくは、 $4.6 \sim 4.9$ の範囲内；

$\beta_{ICAM 1}$ 、 $(-0.002) \sim (-0.0001)$ の範囲内、好ましくは、 $(-0.0010) \sim (-0.0005)$ の範囲内；

$\beta_{THBS 1}$ 、 $(-0.0001) \sim (-0.00001)$ の範囲内、好ましくは、 $(-0.00008) \sim (-0.00004)$ の範囲内；

$\beta_{\% f P S A}$ 、 $(-7.5) \sim (-2.5)$ の範囲内、好ましくは、 $(-5.8) \sim (-4.9)$ の範囲内。

【0033】

この事例における90%感度で、好ましくは、 $0.25 \sim 0.35$ 、好ましくは、 $0.3 \sim 0.33$ の組合せ式スコア値の閾値が選択される。

【0034】

$THBS 1$ の濃度、遊離型 PSA の割合($\% f P S A$)、並びに $OLF M 4$ 、 $ICAM 1$ 、及び $CTSD$ の濃度が第1のステップで測定される事例の場合、組合せ式スコア値の計算について、回帰係数は、次の通りに選択される：

β_0 、 $3 \sim 3.8$ の範囲内、好ましくは、 $3.5 \sim 3.6$ の範囲内；

$\beta_{OLF M 4}$ 、 $0.001 \sim 0.003$ の範囲内、好ましくは、 $0.0015 \sim 0.0025$ の範囲内；

$\beta_{ICAM 1}$ 、 $(-0.004) \sim (-0.002)$ の範囲内、好ましくは、 $(-0.0035) \sim (-0.00025)$ の範囲内；

β_{CTSD} 、 $0.005 \sim 0.05$ の範囲内、好ましくは、 $0.008 \sim 0.012$ の範囲内；

$\beta_{THBS 1}$ 、 $(-0.00009) \sim (-0.00003)$ の範囲内、好ましくは、 $(-0.00007) \sim (-0.00006)$ の範囲内；

$\beta_{\% f P S A}$ 、 $(-7.5) \sim (-2.5)$ の範囲内、好ましくは、 $(-5.2) \sim (-4.8)$ の範囲内。

【0035】

この事例における90%感度で、好ましくは、 $0.3 \sim 0.35$ 、好ましくは、 $0.32 \sim 0.335$ の組合せ式スコア値の閾値が選択される。

【0036】

測定された $THBS 1$ 及び/又は $CTSD$ 、 $OLF M 4$ 、 $ICAM 1$ の少なくとも1つは、グリコシル化、リン酸化、脂質化等を含む翻訳後修飾を含むことができる。 $THBS 1$ 、 $CTSD$ 、 $OLF M 4$ 、 $ICAM 1$ の少なくとも1つの濃度の測定について、被験者の血清、血漿、又は血液は、緩衝液を使用して希釈することができ、通常は緩衝液を使用して希釈することが好ましい。

【0037】

この緩衝液は、好ましくは $7 \sim 7.4$ の範囲内のpH値を有し、好ましくは、pH値を制御する試薬をさらに含む。pH値を制御するこの試薬は、以下の系の少なくとも1つか

10

20

30

40

50

ら選択される：T r i s（トリス（ヒドロキシメチル）- アミノメタン）、P i p e s（ピペラジン - 1, 4 - ビス - 2 - エタンスルホン酸）、M e s（4 - モルホリノエタンスルホン酸）、H e p e s（4 - （2 - ヒドロキシエチル） - 1 - ピペラジン - エタンスルホン酸）、リン酸緩衝生理食塩水（P B S）。

【0038】

さらに、緩衝液は更なる成分を含むことができる。例えば、緩衝液は、少なくとも1つの非イオン性界面活性剤を、好ましくは、0.01% (v/v) ~ 0.1% (v/v)、好ましくは、0.025% (v/v) ~ 0.05% (v/v) の濃度で含むことができる。この非イオン性界面活性剤は、以下からなる群の少なくとも1つから選択することができる：ドデシルポリ（エチレングリコールエーテル）_m（mは5 ~ 40の整数）；1 - O - n - オクチル - β - D - グルコピラノシド（n - オクチルグルコシド）；アルキルフェノールポリ（エチレングリコール - エーテル）_m（mは5 ~ 40の整数、好ましくはm = 11）；1 - O - n - ドデシル - β - D - グルコピラノシル（1 - 4）α - D - グリコピラノシド；ドデシルポリ - （エチレングリコールエーテル）_m（mは5 ~ 40の整数、好ましくはm = 23）好ましくはポリ（オキシエチレン）（20） - ソルビタンモノオレエート、ポリ（オキシエチレン）（20） - ソルビタンモノラウレート、ポリ（オキシエチレン）（20） - ソルビタンモノパルミテート、ポリ（オキシエチレン）（20） - ソルビタンモノステアレートから好ましくは選択されるポリ（オキシエチレン）（20） - ソルビタンモノ脂肪酸エステル；オクチルフェノールポリ（エチレングリコールエーテル）_m（mは5 ~ 40の整数、好ましくはm = 10）。

10

20

【0039】

さらに、緩衝液は、ウシ血清アルブミン、トレハロース、スクロース、ウシ胎児血清、ウマ血清、マウス I g G、ウシγグロブリンのうちの少なくとも1つ等の成分を含むことができる。

【0040】

好ましくは、緩衝液は、特定のタンパク質の事例について、ジチオトレイトール（D T T : dithiothreitol）又は任意の他の還元剤を含まない。しかし、D T T を、特別に添加することもできる（以下の注記参照）。

【0041】

好ましくは、緩衝液は、50 mM ~ 850 mM の範囲内、好ましくは200 mM ~ 400 mM の範囲内又は250 mM ~ 370 mM の範囲内のイオン強度を有する。

30

【0042】

T H B S 1 を測定するための希釈について、1 : 1000 ~ 1 : 20000 の範囲内の希釈係数が選択でき、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）については1 : 1000 ~ 1 : 3000 又は1 : 2000 ~ 1 : 3000 の範囲内が好ましく、また、ビーズベースアッセイについては1 : 5000 ~ 1 : 15000 の範囲内が好ましい。

【0043】

タンパク質 C T S D を測定するための希釈について、1 : 5 ~ 1 : 70 又は1 : 5 ~ 1 : 30 の範囲内の希釈係数が選択でき、酵素結合免疫吸着アッセイについては1 : 10 ~ 1 : 50 又は1 : 10 ~ 1 : 30 の範囲内で、また、ビーズベースアッセイについて1 : 10 ~ 1 : 20 の範囲内が好ましい。好ましくは、使用される上述した緩衝液に、ポリ（オキシエチレン）（20） - ソルビタンモノラウレートとして好ましくは選択される非イオン性界面活性剤をさらに追加で特別に補い、0.05% (v/v) のポリ（オキシエチレン）（20） - ソルビタンモノラウレートの追加的な濃度をもたらす。

40

【0044】

I C A M 1 を測定するための希釈について、1 : 50 ~ 1 : 200 の範囲内の希釈係数が選択でき、1 : 80 ~ 1 : 150 の範囲内が好ましい。好ましくは、使用される緩衝液に、イオン強度を増すように、250 mM の追加的な塩化ナトリウム含量になるように塩化ナトリウムをさらに補う。

【0045】

50

OLF M 4 を測定するための希釈について、1 : 5 ~ 1 : 30 の範囲内の希釈係数が選択でき、1 : 5 ~ 1 : 20 の範囲内が好ましい。好ましくは、使用される緩衝液に、250 m M の追加的な塩化ナトリウム含量になるように塩化ナトリウム及びジチオトレイトール (D T T) として好ましくは選択される還元剤をさらに補い、ジチオトレイトールの 5 m M の濃度をもたらす。

【0046】

さらに別の好ましい実施形態によれば、上記方法は、被験者の血清、血漿、又は血液を、好ましくは被験者の血清、血漿、又は血液の希釈後に、それぞれのタンパク質についての少なくとも1つの、好ましくはサンドイッチする2つの親和性試薬に接触させる、それぞれのタンパク質と少なくとも1つ（又は2つ）の親和性試薬との間で結合が起こるかどう

10

【0047】

好ましくは可視的読出しによるそれぞれのタンパク質に特異的なサンドイッチ E L I S A 及び / 又は好ましくは蛍光読出しによるそれぞれのタンパク質に対するサンドイッチビーズベース抗体アッセイは、それぞれ、ヒト T H B S 1、C T S D、I C A M 1、及び O

20

【0048】

さらに別の好ましい実施形態によれば、それぞれの濃度の定量的検出は、外部タンパク質標準に対するかかるバイオマーカーの濃度の決定を含み、その決定は、サンプルの同じ測定セットにおいて測定されるタンパク質希釈物について、同じ緩衝液にて希釈される幾つかの、好ましくは5~7のタンパク質標準の規定された濃度を既知の濃度とともに測定することによる参照標準曲線の作成を含む。

【0049】

本方法は、癌、特に、限局性前立腺癌を含む前立腺癌の、モニタリング、診断、予後診断、リスク評価、治療選択、治療モニタリングのうちの少なくとも1つのステップをさらに含んでもよいし、又は、癌、特に、限局性前立腺癌を含む前立腺癌の、モニタリング、診断、予後診断、リスク評価、治療選択、治療モニタリングのうちの少なくとも1つに関連してさらに利用してもよい。

30

【0050】

本発明の更なる実施形態は、従属請求項に記載される。

【0051】

本発明の好ましい実施形態は、図面を参照して以下で述べられる。図面は、本発明の現在の好ましい実施形態を示すためのものであって、本発明を限定するためのものではない。

【図面の簡単な説明】

40

【0052】

【図1】図1は、2ステップサンドイッチイムノアッセイの略図を示し、L u m i n e x システムの場合、検出は、検出抗体のビオチン (B) に付着する蛍光ストレプトアビジン - フィコエリスリンコンジュゲート (S t r e p - P E : Streptavidin-phycoerythrin c onjugate) による蛍光を使用して実現され、一方、E L I S A の場合、ストレプトアビジン - 酵素コンジュゲート及び当該酵素用の色原性基質 (chromogenic substrate)、好ましくは、S t r e p - P E の代替りのストレプトアビジン - ホースラディッシュペロオキシダーゼ (H R P : horseradish peroxidase) コンジュゲート及びH R P 色原性基質T M B を用いて得られる可視範囲内の色変化を使用して実現される。

【図2】図2は、組合せ式スコア値の評価のために、T H B S 1 が単独で測定されるとき

50

、総 P S A が単独で測定されるとき、% f P S A が単独で測定されるとき、及び、T H B S 1 の濃度が % f P S A の割合と共に使用されるとき、前立腺生検陽性、従って、P C a の個々の予測子の精度を示す最適化された受信者動作特性 (R O C) の訓練曲線を示す。

【図 3】図 3 は、組合せ式スコア値の評価のために、C T S D が単独で測定されるとき、% f P S A が単独で測定されるとき、及び、C T S D の濃度が % f P S A の割合と共に使用されるとき、最適化された R O C 曲線を示す。

【図 4】図 4 は、組合せ式スコア値の評価のために、I C A M 1 が単独で測定されるとき、% f P S A が単独で測定されるとき、及び、I C A M 1 の濃度が % f P S A の割合と共に使用されるとき、最適化された R O C 曲線を示す。

【図 5】図 5 は、組合せ式スコア値の評価のために、O L F M 4 が単独で測定されるとき、% f P S A が単独で測定されるとき、及び、O L F M 4 の濃度が % f P S A の割合と共に使用されるとき、最適化された R O C 曲線を示す。

【図 6】図 6 は、前立腺生検陽性、従って、P C a の個々の予測子の精度を示す受信者動作特性 (R O C) の訓練曲線を示す。% f P S A 単独、C T S D 及び T H B S 1、並びに、% f P S A、C T S D、及び T H B S 1 の組合せについての最適化されたモデルの R O C 曲線が示されている。

【図 7】図 7 は、前立腺生検陽性、従って、P C a の個々の予測子の精度を示す受信者動作特性 (R O C) の訓練曲線を示す。% f P S A 単独、I C A M 1 及び T H B S 1、並びに、% f P S A、I C A M 1、及び T H B S 1 の組合せについての最適化されたモデルの R O C 曲線が示されている。

【図 8】図 8 は、前立腺生検陽性、従って、P C a の個々の予測子の精度を示す受信者動作特性 (R O C) の訓練曲線を示す。% f P S A 単独、O L F M 4 及び T H B S 1、並びに、% f P S A、O L F M 4、及び T H B S 1 の組合せについての最適化されたモデルの R O C 曲線が示されている。

【図 9】図 9 は、前立腺生検陽性、従って、P C a の個々の予測子の精度を示す受信者動作特性 (R O C) の訓練曲線を示す。% f P S A 単独、I C A M 1 及び C T S D、並びに、% f P S A、I C A M 1、及び C T S D の組合せについての最適化されたモデルの R O C 曲線が示されている。

【図 10】図 10 は、前立腺生検陽性、従って、P C a の個々の予測子の精度を示す受信者動作特性 (R O C) 訓練曲線を示す図である。% f P S A 単独、O L F M 4 及び C T S D、並びに、% f P S A、O L F M 4、及び C T S D の組合せについての最適化されたモデルの R O C 曲線が示される。

【図 11】図 11 は、前立腺生検陽性、従って、P C a の個々の予測子の精度を示す受信者動作特性 (R O C) の訓練曲線を示す。% f P S A 単独、I C A M 1 及び O L F M 4、並びに、% f P S A、I C A M 1、及び O L F M 4 の組合せについての最適化されたモデルの R O C 曲線が示されている。

【図 12】図 12 は、90% 感度における生検陰性の減少率を示す。パーセンテージは、% f P S A 単独、C T S D 及び T H B S 1、並びに、% f P S A、C T S D、及び T H B S 1 の組合せについて与えられている。

【図 13】図 13 は、前立腺生検陽性、従って、P C a の個々の予測子の精度を示す受信者動作特性 (R O C) の訓練曲線を示す。% f P S A 単独、C T S D、T H B S 1、O L F M 4、I C A M 1、並びに、% f P S A、C T S D、T H B S 1、O L F M 4、及び I C A M 1 の組合せについての最適化されたモデルの R O C 曲線が示されている。

【図 14】図 14 は、90% 感度における生検陰性の減少率を示す。パーセンテージは、% f P S A 単独、C T S D、T H B S 1、O L F M 4、及び I C A M 1、並びに、% f P S A、C T S D、T H B S 1、O L F M 4、及び I C A M 1 の組合せについて与えられている。

【図 15】図 15 は、組合せ式スコア値の評価のために、T H B S 1 が E L I S A を使用して単独で測定されるとき、総 P S A が単独で測定されるとき、% f P S A が単独で測定

10

20

30

40

50

されるとき、及び、E L I S Aを使用して測定されるT H B S 1の濃度が% f P S Aの割合と共に使用されるとき、前立腺生検陽性、従って、P C aの個々の予測子の精度を示す最適化された受信者動作特性（R O C）の訓練曲線を示す。

【図16】図16は、組合せ式スコア値の評価のために、C T S DがE L I S Aを使用して単独で測定されるとき、% f P S Aが単独で測定されるとき、及び、E L I S Aを使用して測定されるC T S Dの濃度が% f P S Aの割合と共に使用されるとき、最適化されたR O C曲線を示す。

【図17】図17は、前立腺生検陽性、従って、P C aの個々の予測子の精度を示す受信者動作特性（R O C）の訓練曲線を示す。% f P S A単独、共にE L I S Aを使用して測定されるC T S D及びT H B S 1、並びに、% f P S A、共にE L I S Aを使用して測定されるC T S D及びT H B S 1の組合せについての最適化されたモデルのR O C曲線が示されている。

【図18】図18は、90%感度における生検陰性の減少率を示す。パーセンテージは、% f P S A単独、共にE L I S Aを使用して測定されるC T S D及びT H B S 1、並びに、% f P S A、共にE L I S Aを使用して測定されるC T S D及びT H B S 1の組合せについて与えられている。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本発明者らは、P I 3 K / P T E N癌経路に焦点を当てた2段階遺伝子誘導発見アプローチ（two staged genetics-guided discovery approach）を使用してP C a診断のための多数のタンパク質バイオマーカーを過去に同定してきた。第1段階において、糖タンパク質は、野生型の血清及び前立腺組織並びにP t e n - ノル癌マウスモデルから同定された。タンパク質の優先順序付けに続いて、プロテオミックプロファイルが、第2段階検証ステップにおいて、P C a患者及び対照個人の血清において同定された。その目的は、個々のタンパク質バイオマーカーについて高い感度でかつ高い特異度のイムノアッセイを同定し、及び開発し、及び検証することであった。質量分析法からイムノアッセイ技術への移行は、大規模サンプルコホートにおける高スループット臨床検証を可能にするために重要なステップである。さらに、その移行は、ルーチン診断検査室における試験の臨床適用を促進する。マイクロ粒子ベースL u m i n e xプラットフォームは、マイクロタイタープレート又はマイクロタイターチューブと比較したときの、マイクロ粒子の高い表面積に起因する改善された反応速度（kinetics）の故に最初に選択された。さらに、磁気マイクロ粒子ベースアッセイは、チューブ又はマイクロタイタープレートベースアッセイよりも自動化し易く、従って、ランダムアクセスイムノアッセイ系において広く普及している。最後に、L u m i n e xシステムの多重化能力は、イムノアッセイ開発のために、特に、より一般的で単純でかつよりユーザフレンドリーなE L I S Aのその後の開発のために抗体選択プロセスを促進した。

【0054】

このセクションにおいて、医薬品評価研究センター（C D E R : Center for Drug Evaluation and Research）からのガイドラインによる同定、開発、及び技術的検証は、ヒトカテプシンD（C T S D）、ヒト細胞間接着分子1（I C A M 1）、ヒトオルファクトメジン4（O L F M 4）、及びヒトトロポスポンジン1（T H B S 1）についての4つの個々のイムノアッセイについて述べられている。これらのヒト糖タンパク質のマウスホモログは、P t e nコンディショナルノックアウトマウスモデルを使用する質量分析法によって過去に同定された。ヒトホモログは、P C aから良性前立腺状態を識別する能力を試験するために、臨床血清サンプルで測定された。その結果、特許請求される組合せが、従来技術のアプローチの上記で述べた欠点を克服するために最適であり、最も高い感度及び最も高い特異度を示すことが確認された。

【0055】

開発は、分析物の希釈に関してインターバリアビリティ及びイントラバリアビリティ（C V）< 15%及びリニアリティを有する複数の個々のイムノアッセイをもたらした。血

10

20

30

40

50

清中で、ex vivoタンパク質安定性（分析物の15%未満の喪失）は、室温で少なくとも24時間及び4で2日間で達成された。

【0056】

材料及び方法

本明細書で一般に使用される遺伝子名、エントリー名、タンパク質名（短縮名）、及び受託番号は、UniProtコンソーシアム（www.uniprot.org）に従って規定される。UniProtコンソーシアムは、欧州バイオインフォマティクス研究所（EBI: European Bioinformatics Institute）、スイスバイオインフォマティクス研究所（SIB: Swiss Institute of Bioinformatics）、及びタンパク質情報リソース（PIR: Protein Information Resource）からなる。注記される又は予測される細胞局在化は、Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nat Protoc. 2, 953-71による。

【0057】

【表1】

遺伝子名	エントリー名	タンパク質名	受託番号	注記される又は予測される細胞局在化
THBS1	TSP1_ヒト	トロンボスポンジン1	P07996	分泌
OLFM4	OLFM4_ヒト	オルファクトジン4	Q6UX06	分泌
CTSD	CATD_ヒト	カテプシンD	P07339	リソソーム
ICAM1	ICAM1_ヒト	細胞間接着分子1	P05362	原形質膜
KLK3	KLK3_ヒト	前立腺特異抗原 (PSA)	P07288	分泌

【0058】

タンパク質標準 / キャリブレーター

発現

組換えヒトCTSD（残基1～412、6Hisタグが続く）、ICAM1（残基1～480、8Hisタグが続く）、THBS1（残基19から1170、シグナルペプチドが先行し、11Hisタグが続く）、及びOLFM4（残基1～510）がそれぞれ発現され、トランスフェクションされたHEK293細胞の細胞培養上清から精製した。CTSD、ICAM1、THBS1は、His Trapカラム（GE Healthcare）を使用して精製された。

【0059】

精製

ICAM1の場合、硫酸アンモニウム沈殿を最初に実施した。35%でのタンパク質沈殿を、遠心分離によって除いた。上清を、清浄なチューブに移し、硫酸アンモニウムを、75%飽和に達するまで徐々に添加した。遠心分離後、上清を削除し、ペレットを、His Trapカラム上で精製するために緩衝液中に溶解した。

【0060】

OLFM4は、30%の硫酸アンモニウム沈殿によって精製した。

【0061】

ヒト血小板から精製された天然のTHBS1を、Creative Biomartから購入し、免疫化のために使用した。組換えTHBS1タンパク質は、R&D Systemsから最初に購入し、後

に発現され、トランスフェクションされた自家製 H E K 2 9 3 細胞の細胞培養上清から精製した。

【 0 0 6 2 】

抗体

捕捉抗体及び検出抗体は、それぞれ、ヒト C T S D、I C A M 1、O L F M 4、及び天然の T H B S 1 の組換えタンパク質を用いた B A L B / c マウスの免疫化によって生成されたマウスモノクローナル抗体であった。それぞれのタンパク質の異なるエピトープを認識する多数の抗体は、単離され、抗体対が、それぞれ、サンドイッチビーズベースイムノアッセイ及び E L I S A イムノアッセイのその後の開発及び最適化のために選択された。

【 0 0 6 3 】

使用されるマイクロ粒子ベース L u m i n e x 技術は、新しく開発されるイムノアッセイのために抗体を選択する汎用性の高いプラットフォームを提供した。多重化技術は、幾つかの捕捉抗体候補を異なる微小球セットに結合させることによって、抗体サンドイッチ対の同定を促進した。これらのセットは、一緒に混合されると、別個の検出抗体の同時試験を可能にし、試薬、サンプル、及び時間を節約することを可能にした（例えば、Baker HN, Murphy R, Lopez E, Garcia C. Conversion of a capture ELISA to a Luminex xMAP assay using a multiplex antibody screening method. J Vis Exp. 2012参照）。最適な抗体対が選択されると、緩衝液組成及び抗体濃度が、個々のイムノアッセイについて最適な条件（シグナル対バックグラウンド比、希釈リニアリティ、標準曲線のダイナミックレンジ、アッセイ感度）をもたらすために相応して最適化された。

【 0 0 6 4 】

ビーズベースイムノアッセイ

ビーズベースサンドイッチイムノアッセイは、次の通りに L u m i n e x システム上で確立された。捕捉抗体は、カルボキシル化された L u m i n e x マイクロ粒子に共有結合され、検出抗体は、標準法に従ってビオチン（B）で標識された。96 ウェルハーフエリアマイクロタイタープレート（Corning Inc.）は、E L I S A 用の 1 × ブロッキング剤（Roche Diagnostics）を用いて最低 15 分間、ブロッキングされた。捕捉抗体でコーティング済みのマイクロ粒子とビオチン化済みの検出抗体との適切な濃度の混合物が、調製され、96 ウェルプレート中のアッセイ緩衝液にて希釈されたタンパク質（サンプル又は標準）に添加された。アッセイに依存する E p p e n d o r f T h e r m o M i x e r C 中での 21 又は 37 での 60 分又は 120 分のインキュベーション及び 650 r p m での振盪に続いて、プレートは、磁気プレートセパレーター（Luminex Corporation）を使用して P B S + 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を用いて洗浄された。アッセイ緩衝液にて希釈されたストレプトアビジン - フィコエリスリンコンジュゲート（S t r e p - P E、Moss Inc.）が添加され、E p p e n d o r f T h e r m o M i x e r C 中で、30 分間、21 で、650 r p m でインキュベートされた。洗浄後、ビーズコンジュゲートは、ブロッキング剤中で再懸濁された。読出しは、4 パラメーター曲線当てはめ（curve fit）を使用して濃度を計算するために同様に使用された x P O N E N T 4 . 1 又は 4 . 2 ソフトウェアによって操作される L u m i n e x F l e x M a p 3 D 又は L u m i n e x M A G P I X 機器を用いて実施された。全てのサンプルは、同じプレート上での独立した 2 重測定（duplicates）で測定された。規定されたタンパク質濃度を有する品質管理サンプルは、それぞれのプレート上に含まれた。

【 0 0 6 5 】

抗体の種々のエピトープについて、それぞれの捕捉抗体ビーズ及びビオチン化済み検出抗体が、生成され、試験され、捕捉抗体と検出抗体の最適対が、最適読出し強度に基づいて実験的に決定された（図 1 も参照）。

【 0 0 6 6 】

酵素結合免疫吸着アッセイ

サンドイッチ E L I S A は次の通りに確立された。上記章に記載されたビーズベースイムノアッセイを使用して決定され選択された捕捉抗体は、50 m M リン酸ナトリウム緩衝

10

20

30

40

50

液、pH 8.0 (代替法: 50 mM 炭酸塩緩衝液、pH 9.6) にて希釈され、4 で一晩 (代替法: 30 で75分間又は室温で1時間~6時間の間) 96 ウェル Maxi sorp プレート (Nunc) にコーティングされた。溶液を取除き、PBS / 0.05% Tween 20 で一回洗浄した後、プレートは、1.5 時間の間、BSA ブロック (Candor Bioscience) (代替法: 1% BSA を有する PBS) でブロッキングされた。プレートは、その後、3 回洗浄された。標準又は血清サンプルは、Low Cross Buffer (LCB; Candor Bioscience) (代替法: PBS ベース又は 10 mM Tris、0.9% 塩化ナトリウムベース緩衝液、共に、1% BSA、0.1% ウシγグロブリン、0.1% マウス IgG が補われた) にて希釈され、LCB 緩衝液にて希釈された上記章に記載されたビーズベースイムノアッセイを使用して決定され選択された等容積のビオチン化された検出抗体とウェル中で混合された。Eppendorf ThermoMixer C 中での 37 での 60 分のインキュベーション及び 650 rpm での振盪に続いて、プレートは、PBS / 0.05% Tween 20 を用いて 3 回洗浄された。ストレプトアビジン - HRP コンジュゲート (Jackson ImmuneResearch) は、LCB (代替法: 等容積の PBS にて希釈された BSA ブロック) にて希釈され、Eppendorf ThermoMixer C 中に添加され、37 で 30 分間インキュベートし、650 rpm で振盪した。PBS / 0.05% Tween 20 を用いて 3 回洗浄した後、TMB 基質 (Sigma) 溶液 (30 mM クエン酸、pH 4.1 中で、 H_2O_2 を用いて希釈された) (代替法: TMB、すぐに使用できる Enhanced K-Blue TMB 基質、Neogen) を添加し、Eppendorf ThermoMixer C 中で、37 で 30 分間インキュベートし、650 rpm で振盪した。反応を、等容積の 0.25 M H_2SO_4 (代替法: 1.0 M HCl) の添加によってブロッキングした。吸光度は、450 nm で読取り、620 nm の読みを減算する FLUOStar Optima ELISA リーダー (BMG LabTech) で測定した。濃度は、FLUOStar OPTIMA ソフトウェア又は Tecan からの Magellan を用いて 5 パラメーター曲線当てはめ (代替法: 4 パラメーター曲線当てはめを使用する) を使用して計算した。

【0067】

PSA 測定

血清総 PSA (tPSA) 及び遊離型 PSA (fPSA) は、ADVIA Centaur イムノアッセイシステム (Siemens Healthcare) を使用して分析された。遊離型 PSA のパーセント (% fPSA) は、下記式 $\% fPSA = fPSA / tPSA$ を用いて、tPSA 及び fPSA の測定値を使用して計算された。代替的に、総 PSA (tPSA) 及び複合型 PSA (cPSA) が測定され、遊離型 PSA の割合は、次の通りに計算することができる。 $\% fPSA = (tPSA - cPSA) / tPSA$ 。割合 fPSA / tPSA は評価のために使用した。

【0068】

特異的ビーズベースアッセイ

THBS1 アッセイの場合、サンプル血清 (1:10000 の最終希釈の) 又は組換え標準は、37 で 60 分間、Low Cross Buffer (Candor Bioscience) (LCB、pH 7.2) 中で捕捉抗体コーティング済みマイクロ粒子及びビオチン化済み検出抗体と共にインキュベートした。全てのサンプルは、アッセイのリニアな検出範囲内で定量したところ、測定された濃度 (それぞれのサンプルについて CV < 20%、5.1% の 1 つのプレート上のサンプルについての平均 CV) は $14.2 \mu g / mL$ と $209 \mu g / mL$ との間の範囲であった。

【0069】

THBS1 アッセイの希釈の場合、下記の系: LCB、pH 7.2 を使用した。

【0070】

CTSD アッセイの場合、サンプル血清 (1:15 の最終希釈の) 又は組換え標準を、37 で 120 分間、LCB (pH 7.2) + 0.05% Tween 中で捕捉抗体コーティング済みマイクロ粒子及びビオチン化済み検出抗体と共にインキュベートされた。全て

のサンプルは、アッセイのリニアな検出範囲内で定量したところ、測定された濃度（それぞれのサンプルについて $CV < 20\%$ 、 2.8% の1つのプレート上のサンプルについての平均 CV ）は 40 ng/mL と 453 ng/mL との間の範囲であった。

【0071】

CTSD アッセイの希釈の場合、下記の系： $\text{LCB (pH } 7.2) + 0.05\% \text{ Tween}$ を使用した。

【0072】

ICAM1 アッセイの場合、サンプル血清（ $1:100$ の最終希釈の）又は組換え標準を、 37°C で60分間、 $\text{LCB (pH } 7.2) + 250 \text{ mM NaCl}$ 中で捕捉抗体コーティング済みマイクロ粒子及びビオチン化済み検出抗体と共にインキュベートした。全てのサンプルを、アッセイのリニアな検出範囲内で定量したところ、測定された濃度（それぞれのサンプルについて $CV < 15\%$ 、 2.2% の1つのプレート上のサンプルについての平均 CV ）は 44 ng/mL と 287 ng/mL との間の範囲であった。

10

【0073】

ICAM1 アッセイの希釈の場合、下記の系： $\text{LCB (pH } 7.2) + 250 \text{ mM NaCl}$ を使用した。

【0074】

OLFM4 アッセイの場合、サンプル血清（ $1:10$ の最終希釈の）又は組換え標準を、 37°C で60分間、 $\text{LCB (pH } 7.2) + 250 \text{ mM NaCl} + 5 \text{ mM DTT}$ 中で捕捉抗体コーティング済みマイクロ粒子及びビオチン化済み検出抗体と共にインキュベートした。3つを除いた全てのサンプルを、アッセイのリニアな検出範囲内で定量したところ、測定された濃度（それぞれのサンプルについて $CV < 15\%$ 、 5.5% の1つのプレート上のサンプルについての平均 CV ）は 1 ng/mL と 291 ng/mL との間の範囲であった。

20

【0075】

OLFM4 アッセイの希釈の場合、下記の系： $\text{LCB (pH } 7.2) + 250 \text{ mM NaCl} + 5 \text{ mM DTT}$ を使用した。

【0076】

定量的読出しを可能にするための濃度校正のために、それぞれのタンパク質の標準溶液を、以下の手順で使用した：

30

タンパク質バイオマーカーの測定は、外部タンパク質標準に対する当該バイオマーカーの濃度の定量を意味する。即ち、参照標準曲線は、同じサンプルの測定セット中で、アッセイ緩衝液にて希釈された5～7のタンパク質標準の規定された濃度を測定することによって作成される。

【0077】

個々の標準の以下の濃度が、ビーズベースアッセイのために使用された：

- ・THBS1 (ng/mL) : 50.00 、 20.00 、 8.00 、 3.20 、 1.28 、 0.51 、 0.20
- ・CTSD (ng/mL) : 75.0 、 2.0 、 8.33 、 2.78 、 0.93 、 0.31 、 0.10
- ・ICAM1 (ng/mL) : 12.6 、 5.04 、 2.02 、 0.81 、 0.32 、 0.13 、 0.05
- ・OLFM4 (ng/mL) : 120 、 34.29 、 9.79 、 2.79 、 0.80 、 0.23 、 0.07

40

【0078】

個々の標準の以下の濃度が、ELISA アッセイのために使用された：

- ・THBS1 (ng/mL) : 200 又は 250 、 100 、 50 又は 40 、 25 又は 16 、 12.50 又は 6.4 、 6.25 又は 2.6 、 3.125 又は 1.0
- ・CTSD (ng/mL) : 15.00 、 10.00 、 6.25 又は 6.7 、 3.91 又は 4.4 、 2.44 又は 3.0 、 1.53 又は 2.0 、 0.95 又は 1.3

50

【0079】

標準曲線は、より高度な多項式曲線当てはめを可能にするコンピュータプログラムを使用して計算した。血清サンプルは、それらの測定値が標準によってカバーされる範囲内に入るようにアッセイ緩衝液にて希釈した。それらの濃度は、血清サンプルの濃度を決定するための、希釈係数で乗算して、標準の曲線に基づいて計算した。

【0080】

特異的酵素結合免疫吸着アッセイ

サンプル血清を、THBS1アッセイについては1:2500の最終希釈で、CTSDアッセイについては1:20の最終希釈で測定した。同様に、CTSDについては1:50の希釈を用いた測定が可能である。

10

【0081】

結果

最も低い測定費用で最も高い感度と最も高い特異度を可能にする最適測定戦略を決定するために、カテプシンD (CTSD)、トロンボスポンジン1 (THBS1)、オルファクトメジン4 (OLFM4)、及び細胞間接着分子1 (ICAM1)を含む複数の癌特異的タンパク質を個々に及び種々の組合せで測定する試験が提案される。試験結果は、%fPSA割合 (fPSAとtPSAとの比)をさらに含む。組合せ式スコアは、上記で述べた式(1)を使用して計算され、式(1)は、%fPSAと、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1のそれぞれの系との数学的組合せ、並びに、%fPSAと、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1の対の系との考えられる全ての組合せから得られる。同様に、%fPSAは、CTSD及びTHBS1、オプションで、OLFM4及びICAM1を用いて見られる。試験は、PCa診断の改善における、%fPSA等の確立された臨床パラメーターに対してその付加価値を示す検証研究において評価した。

20

【0082】

目的：研究の目的は、提案されたタンパク質バイオマーカーのどの組合せが、高いtPSA (2 ng/mL ~ 10 ng/mL)を有する男性の生検陰性の数を、最も効率的にかつ最も確実に減らすことができるかを試験することであった。さらに、研究に含まれる男性は、陰性 (癌の存在についての疑いの欠如) デジタル直腸検査 (DRE) 及び増大した前立腺を有していた。この患者のサブグループは、多くの男性が良状態を有し、その範囲内でのtPSA値の増加をもたらし、多数の偽陽性事例をもたらすため、前立腺生検を実施されるべきかどうかを決めることが最も難しいと考えらる。研究のゴールは、PCaについて少なくとも90%感度及び高悪性度PCa (グリーソンスコア (Gleason score) 7) について高い (90 ~ 95%) 陰性予測値 (NPV: negative predictive value) を有しながら、生検陰性の数を少なくとも50%減らすことであった。NPVは、陰性結果が真に陰性であるという確率を示す泌尿器科医にとって重要な尺度である。

30

【0083】

設計、設定、及び参加者：前立腺生検を受けた、tPSA 2 ng/mL ~ 10 ng/mL 癌陰性DRE及び増大した前立腺 (容積 35 mL) を有する男性の後方視的研究 (retrospective study) を行った。前立腺癌陽性及び陰性の男性の全血サンプルを、北欧の主要な癌センターにて前立腺生検を受ける前に収集した。全てのサンプルは、書面による患者同意に従って2011年~2016年の間に採取した。

40

【0084】

測定：血清tPSA及びfPSAは、ADVIA Centaurイムノアッセイシステム (Siemens Healthcare) を使用して全てのサンプルについて分析された。CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1の濃度レベルは、上記で詳述した、開発されたビーズベースイムノアッセイを使用して測定された。さらに、CTSD及びTHBS1の濃度レベルは、開発されたELISAイムノアッセイを使用して測定された。

【0085】

結果：この研究に含まれた474名の男性の中で、236名の男性は生検陰性を有し、

50

238名は、生検に基づいてPCaを有すると診断された。これらの中で、130名は、前立腺生検に従って、低悪性度PCa（グリーソンスコア 6）を有し、106名は高悪性度PCa（グリーソンスコア 7）を有していた。サンプルの測定された濃度／割合の値を、曲線下最大面積についてロジスティック回帰式を最適化する組合せ式スコア値についての上記で述べた式を使用して本研究に含まれる男性の実際の生検結果との最適な相関は、最適な感度及び特異度を決定するために使用した。

【0086】

図2～図11、図13、及び図15～図17に示すROC曲線は、訓練曲線、即ち、%fPSAの測定された割合及びタンパク質のそれぞれの濃度を、前立腺生検に基づく真の診断に最適に相関させるモデルの最適化後に得られる曲線である。

10

【0087】

CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1についての個々のモデル

第1のステップにて、分析される4つのタンパク質が、個々に調査され、最適化された組合せ式スコア値が、それぞれのタンパク質について単独及び%fPSAとの組合せで決定された。

【0088】

図2～図5は、組合せ式スコア値の評価のために、THBS1、CTSD、ICAM1、及びOLFM4のグループのそれぞれのタンパク質が単独で測定されるとき、%fPSAが単独で測定されるとき、及び、それぞれのタンパク質の濃度が%fPSAの割合と共に使用されるとき、前立腺生検陽性、従って、PCaの個々の予測子の精度を示す最適化された受信者動作特性（ROC）訓練曲線を示す。

20

【0089】

図15及び図16は、組合せ式スコア値の評価のために、THBS1及びCTSDがELISAを使用して単独で測定されるとき、%fPSAが単独で測定されるとき、及び、ELISAによって測定されるそれぞれのタンパク質の濃度が%fPSAの割合と共に使用されるとき、前立腺生検陽性、従って、PCaの個々の予測子の精度を示す最適化されたROC訓練曲線を示す。

【0090】

ROC曲線からわかるように、間違いなく（by far）、最良の感度及び特異度が、THBS1によって利用可能になる。THBS1は、何らかの指示値を有することがこれまで知られていたが、こうした強くかつ信頼性のある相関子であることはこれまで同定されてこなかった。同様に認識され得ることは、個々に調査されるCTSD、ICAM1、及びOLFM4が、%fPSA単独と比較すると、ほとんど何も利益を与えないことである。特に、CTSDが、本質的に無相関であり、個々に又は%fPSAと組合せて見ると、診断価値を全く持たないように見える。

30

【0091】

総PSA濃度値は、総PSAが高感度であるため、PCaの陰性予測のために従来使用される。しかし、図2からわかるように、総PSA濃度値は、総PSAが低特異度であるため、陽性予測のために全く役立たない。実際のところ、%fPSA値が使用される場合にのみ、合理的なAUC値を得ることができ、さらに、%fPSA値がTHBS1と組合せて使用される場合にのみ、高感度が得られ得る。同様に、総PSA値がTHBS1と組合せて評価される場合、50%より著しく低い90%感度における特異度のみが得られ、AUC値は0.83より著しく小さい。

40

【0092】

%fPSAと組合せた、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1から選択される対についてのモデル

第2のステップにて、分析される4つのタンパク質が、対で調査され、最適化された組合せ式スコア値が、それぞれのタンパク質対について単独で及び%fPSAと組合せて決定された。

【0093】

50

図6～図11は、組合せ式スコア値の評価のために、THBS1、CTSD、ICAM1、及びOLF M4のグループのタンパク質の考えられる全てのペアが単独で測定されるとき、%fPSAが単独で測定されるとき、及び、それぞれのタンパク質の対合の濃度が% f P S Aの割合と共に使用されるとき、の事例について、前立腺生検陽性、従って、P C aの個々の予測子の精度を示す最適化された受信者動作特性（R O C）訓練曲線を示す。

【0094】

R O C曲線からわかるように、間違いなく、最良の感度及び特異度が、CTSDと組合せたTHBS1によって利用可能にされ、それは、CTSD単独では識別を全く与えないので（図3参照）、非常に驚くべきことである。これは、E L I S Aを使用してTHBS1及びCTSDを測定するときに確認された（図17参照）。同様に、THBS1は、ICAM1及びOLF M4と共に、CTSDと組合せたTHBS1と同じ程度ではないが、或る程度の更なる利益をもたらし、それは、CTSD単独（図3参照）と比較して、単独で採用されるICAM1及びOLF M4（図4及び図5参照）の優れた挙動を考慮すると完全に予想外である。これまで知られていなかった、血液、血清、及び血漿中のTHBS1レベルとCTSDレベルとの間の高い相関の程度があるように思われる。

10

【0095】

対照的に、THBS1を含まないペアは、図9～図11からわかるように、更なる利益を全く与えない。これは、同様に予想外である。その理由は、同様にこれらの事例において、R O C分析における更なる利益をもたらす高い相関が存在している可能性があったからである。しかし、そのような利益は、試験されたコホートに関して同定することができなかった。

20

【0096】

特異的モデル：% f P S A、CTSD、THBS1

図6は、このアプローチについての受信者動作特性（R O C）曲線を示す。% f P S Aは $AUC = 0.6498$ （ $P < 0.001$ ； $95\%CI = 0.6004 \sim 0.6992$ ）をもたらした。CTSD及びTHBS1は共に、前立腺生検陰性の男性と前立腺生検陽性の男性とを識別し、 $AUC = 0.8343$ （ $P < 0.001$ ； $95\%CI = 0.7974 \sim 0.8712$ ）であった。% f P S A、CTSD、THBS1の組合せは、 $AUC = 0.8448$ （ $P < 0.001$ ； $95\%CI = 0.8097 \sim 0.8798$ ）をもたらした。これらの結果は、E L I S Aを使用してTHBS1及びCTSDを測定することで確認された（図17参照）。CTSD及びTHBS1は共に、前立腺生検陰性の男性と前立腺生検陽性の男性とを識別し、 $AUC = 0.8376$ （ $P < 0.001$ ； $95\%CI = 0.8010 \sim 0.8742$ ）であった。% f P S A、CTSD、THBS1の組合せは、 $AUC = 0.8508$ （ $P < 0.001$ ； $95\%CI = 0.8161 \sim 0.8855$ ）をもたらした。前立腺生検陽性、従って、P C aについての90%以上の感度において、% f P S A、CTSD、及びTHBS1の組合せの特異度は60%であった。比較すると、臨床診療において一般に使用される% f P S A試験は、同じ感度において21%の特異度を有していた。これは、% f P S Aと組合せたCTSD及びTHBS1が、236名のうちの141名（60%）の生検陰性を回避し、P C aの10%の診断を遅延させたであろうことを示す（図12）。さらに、高悪性度P C a（グリーソンスコア 7）について94%の高いNPVが達成された。これらの結果は、% f P S A、CTSD、及びTHBS1の組合せが有意の改善をもたらすことを示す。

30

40

【0097】

図12は、前立腺生検陽性、従って、P C aについての90%感度における生検陰性の減少率を示す。パーセンテージは、% f P S A単独、CTSD及びTHBS1、並びに、% f P S A、CTSD、及びTHBS1の組合せについて与えられる。これらの結果は、E L I S Aを使用してTHBS1及びCTSDを測定することで確認された（図18参照）。

【0098】

他の事例の場合と同様にこのモデルにおいて、それぞれ、% f P S A単独、CTSD及

50

び THBS 1、並びに、% f P S A、C T S D、及び THBS 1 の組合せの測定濃度に基づいて、それぞれの事例において、組合せ式スコア値は、最適化後に得られた定数を有する上記で述べた式 (1) を使用して計算される：

【 0 0 9 9 】

ロジスティック回帰式：

これら全ての結果において使用されるロジスティック回帰モデルは、式 (1) において使用される係数の推定値を提供する：

【 数 2 】

$$\frac{1}{1+e^{-(\beta_0+\beta_1 \cdot x_1+\dots+\beta_k \cdot x_k)}} \quad (1)$$

10

ここで、 β_s は回帰係数であり、 β_0 は切片であり、 x_i は整合独立変数の値である。結果 (p_i) は、独立変数の値の所与のパターンを有する観測が事象を有する確率である。

【 0 1 0 0 】

これらの p_i は R O C 曲線を構築するために使用されるスコアである。

【 0 1 0 1 】

特定のモデル：% f P S A、THBS 1 の状況についてのこの式における変数は次の通りである：

【 表 2 】

20

パラメーター	DF	B	標準誤差	Wald カイ2乗	Pr>カイ2乗	Exp(B)
切片	1	4.663205	0.486095	92.029501	8.54E-22	105.975153
THBS1	1	-0.000053	0.000005	95.644963	1.37E-22	0.999947
%fPSA	1	-5.381332	1.372877	15.364416	0.000089	0.004602

【 0 1 0 2 】

THBS 1 の濃度及び % f P S A 割合が第 1 のステップにて測定される状況の場合の、組合せ式スコア値の計算について、回帰係数は次の通りである：

30

$$\beta_0 = 4.663 ; \beta_{THBS1} = -0.000053 ; \beta_{\%fPSA} = -5.381$$

【 0 1 0 3 】

90% 感度で、0.316 より大きい組合せ式スコア値の閾値が与えられる。

【 0 1 0 4 】

特異的モデル：% f P S A、THBS 1 (THBS 1 は E L I S A を使用して測定される) の状況についてのこの式における変数は次の通りである：

【 表 3 】

40

パラメーター	DF	B	標準誤差	Wald カイ2乗	Pr>カイ2乗	Exp(B)
切片	1	4.902422	0.504822	94.307202	2.70E-22	134.615457
THBS1	1	-0.000086	0.000009	96.648592	8.28E-23	0.999914
%fPSA	1	-5.145655	1.410257	13.313279	0.000264	0.005825

【 0 1 0 5 】

THBS 1 の濃度 (E L I S A を使用する) 及び % f P S A 割合が第 1 のステップにて測定される状況の場合の、組合せ式スコア値の計算について、回帰係数は次の通りである

50

:

$$\beta_0 = 4.902; \beta_{THBS1} = -0.000086; \beta_{\%fPSA} = -5.146$$

。

【0106】

90%感度で、0.335より大きい組合せ式スコア値の閾値が与えられる。

【0107】

特異的モデル：%fPSA、CTSD、THBS1の状況についてのこの式の変数は次の通りである：

【表4】

パラメーター	DF	B	標準誤差	Wald カイ2乗	Pr>カイ2乗	Exp(B)
切片	1	3.233	0.561	33.248	8.113E-9	25.367
CTSD	1	0.010	0.002	19.340	0.000011	1.010
THBS1	1	-0.000063	0.000006	102.843	3.6272E-24	1.000
%fPSA	1	-4.946	1.393	12.612	0.00383	0.007

10

【0108】

90%感度で、0.330より大きい組合せ式スコア値の閾値が与えられる。

【0109】

そのため、例えば、以下の濃度/割合が特定のサンプルにおいて測定/決定されるとき

:

【表5】

UPN	CTSD (ng/mL)	THBS1 (ng/mL)	%fPSA (0~1)
HH0106	227	78501	0.27

20

30

以下が評価される：

【数3】

$$p_i = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 \cdot x_{1,i} + \dots + \beta_k \cdot x_{k,i})}}$$

$$p_{HH0106} = \frac{1}{1 + e^{-(\text{Intercept} + \text{CTSD} + \text{THBS1} + \%fPSA)}} =$$

40

$$p_{HH0106} = \frac{1}{1 + e^{-(3.233 + 0.010 \cdot 227 - 0.000063 \cdot 78501 - 4.946 \cdot 0.27)}} =$$

$$p_{HH0106} = 0.31644$$

【0110】

前立腺生検陽性、従って、PCaについての90%感度で、組合せ式スコア値 p_i の閾値は0.330であるため、サンプルHH0106について、対応する濃度値が、前立腺

50

生検陽性、従って、PCaの存在を示さないため、前立腺生検は提案されないことになる。

【0111】

特異的モデル：CTSD及びTHBS1がELISAを用いて測定される% fPSA、CTSD、THBS1の状況についてのこの式の変数は次の通りである：

【表6】

パラメーター	DF	B	標準誤差	Wald χ ² 乗	Pr>χ ² 乗	Exp(B)
切片	1	3.892	.567	47.116	6.69E-12	49.022
CTSD	1	0.004	0.001	11.997	.000533	1.004
THBS1	1	-0.000100	0.000010	99.352	2.11E-23	1.000
%fPSA	1	-4.843	1.435	11.391	.000738	0.008

10

【0112】

90%感度で、0.362より大きい組合せ式スコア値の閾値が与えられる。

【0113】

THBS1の濃度、遊離型PSAの割合(% fPSA)、及びOLFM4の濃度が第1のステップにて測定される状況の場合、組合せ式スコア値の計算について、回帰係数は次の通りである：

20

$\beta_0 = 4.606$; $\beta_{OLFM4} = 0.00271$; $\beta_{THBS1} = -0.000054$; $\beta_{\%fPSA} = -5.423$ 。

【0114】

90%感度で、0.323より大きい組合せ式スコア値の閾値が与えられる。

【0115】

THBS1の濃度、遊離型PSAの割合(% fPSA)、及びICAM1の濃度が第1のステップにて測定される状況の場合、組合せ式スコア値の計算について、回帰係数は次の通りである：

30

$\beta_0 = 4.769$; $\beta_{ICAM1} = -0.00084$; $\beta_{THBS1} = -0.000053$; $\beta_{\%fPSA} = -5.395$ 。

【0116】

90%感度で、0.318より大きい組合せ式スコア値の閾値が与えられる。

【0117】

モデル：%fPSA、CTSD、THBS1、OLFM4、ICAM1

図13は、このアプローチについての受信者動作特性(ROC)曲線を示す。% fPSAはAUC = 0.6498 (P < 0.001 ; 95%CI = 0.6004 ~ 0.6992)をもたらした。CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1は共に、前立腺生検陰性の男性と前立腺生検陽性の男性を識別し、AUC = 0.8345 (P < 0.001 ; 95%CI = 0.7978 ~ 0.8713)であった。% fPSA、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1の組合せは、AUC = 0.8463 (P < 0.001 ; 95%CI = 0.8122 ~ 0.8817)をもたらした。

40

【0118】

図13は、前立腺生検陽性、従って、PCaの個々の予測子の精度を示す受信者動作特性(ROC)曲線を示す。% fPSA単独、CTSD、THBS1、OLFM4、ICAM1、並びに、% fPSA、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1の組合せについてのROC曲線が示される。

【0119】

前立腺生検陽性、従って、PCaについての90%以上の感度において、% fPSA、

50

CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1の組合せの特異度は58%であった。比較すると、臨床診療において一般に使用される% f PSA試験は、同じ感度において21%の特異度を有した。これは、% f PSAと組合せたマーカーの提案されるセットが、236名のうちの136名(58%)の生検陰性を回避し、PCaの10%の診断を遅延させたであろうことを示す(図13)。さらに、高悪性度PCa(グリーンスコア7)について93%の高いNPVが達成された。これらの結果は、% f PSA、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1の組合せが、% f PSA単独に対する有意の改善をもたらすが、% f PSA、CTSD、THBS1に対して更なる有意な改善をもたらさないことを示す。

【0120】

10

図14は、90%感度における生検陰性の減少率を示す。パーセンテージは、% f PSA、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1、並びに、% f PSA、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1の組合せについて与えられる。

【0121】

同様にここで、図13に示すROC曲線は、訓練曲線、即ち測定濃度を、生検に基づく真の診断に、最適に相関させるモデルの最適化後に得られる曲線である。

【0122】

同様に、このモデルにおいて、それぞれの事例において、それぞれ、% f PSA単独、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1、並びに、% f PSA、CTSD、THBS1、OLFM4、及びICAM1の組合せの測定濃度に基づいて、識別子(discriminator)は、最適化後に得られる定数を有する以下の式を使用して計算される：

$\beta_0 = 3.567$; $\beta_{OLFM4} = 0.002$; $\beta_{THBS1} = -0.000063$; $\beta_{CTSD} = 0.01$; $\beta_{ICAM1} = -0.003$; $\beta_{\% f PSA} = -5.033$ 。

【0123】

90%感度で、0.329より大きい組合せ式スコア値の閾値が与えられる。

【0124】

pについての式によって、これは以下を意味する：

【数4】

$$p_i = \frac{1}{1 + e^{-(3.567 + 0.01[CTSD] - 0.000063[THBS1] + 0.002[OLFM4] - 0.003[ICAM1] - 5.033 \cdot (\frac{fPSA}{tPSA}))}}$$

30

カットオフ $p_i = 90\% \text{ 感度} = 0.329$ (0.329超 = 陽性)。

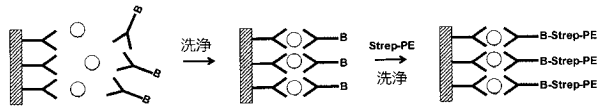
【0125】

結論

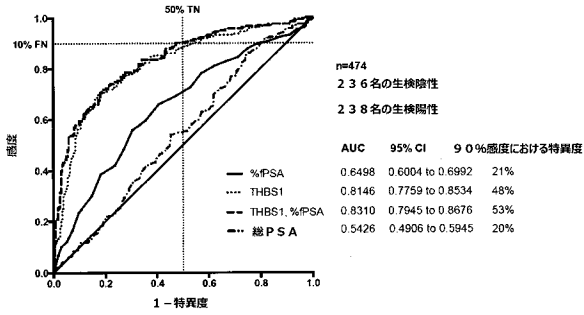
予想外に、THBS1及び% f PSAの組合せ、さらに、CTSD、THBS1、及び% f PSAの組合せが、高いtPSA(2 ng/mL ~ 10 ng/mL)、増大した前立腺(35 mL)、及び陰性DREを有する男性におけるPCaの非存在を判定するとき、tPSA又は% f PSA単独より有意に正確である。臨床診療におけるこれらの3つのパラメーターを含む試験の実施は、不必要な生検率を最大60%だけ大幅に下げる可能性を有する。

40

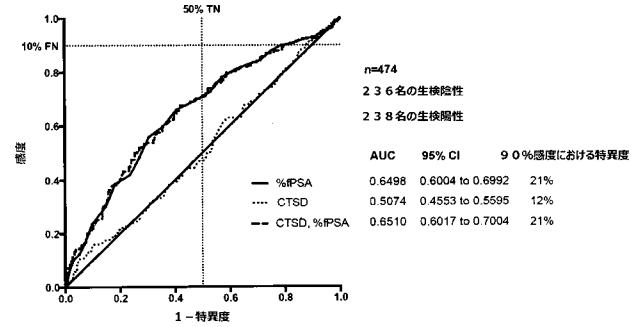
【図 1】



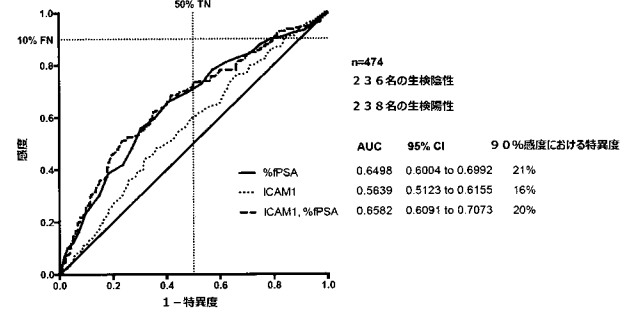
【図 2】



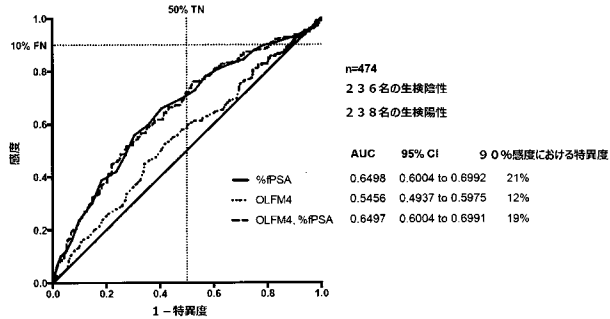
【図 3】



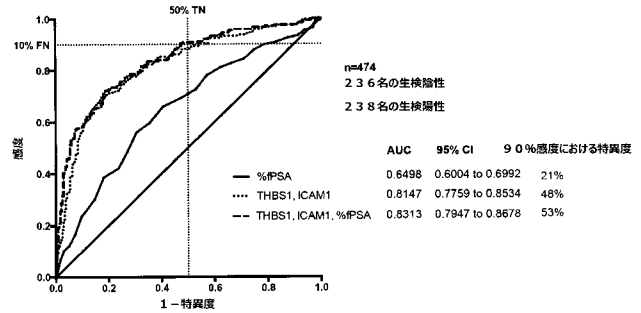
【図 4】



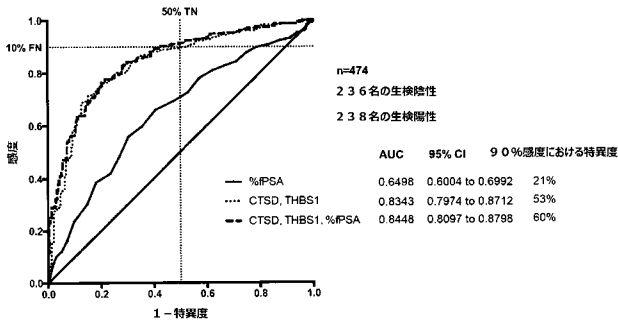
【図 5】



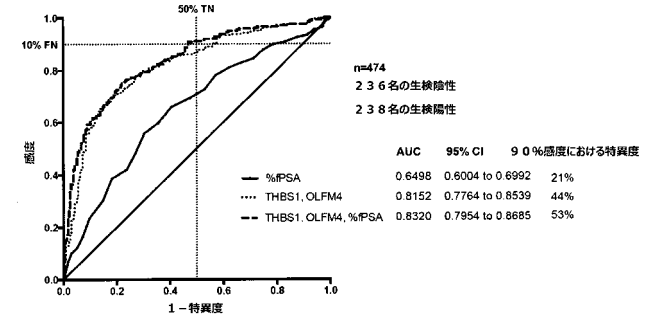
【図 7】



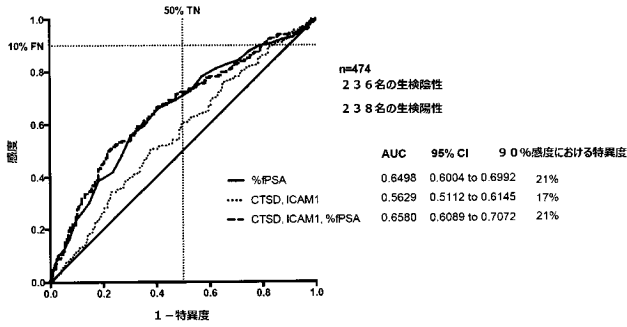
【図 6】



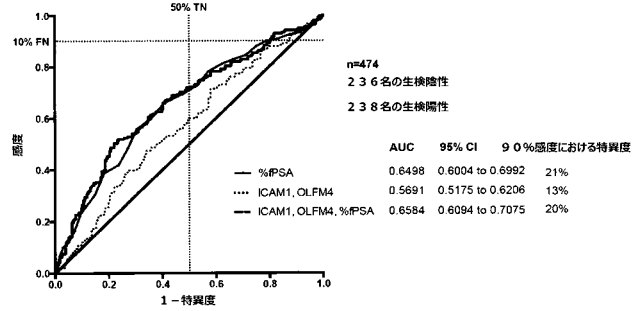
【図 8】



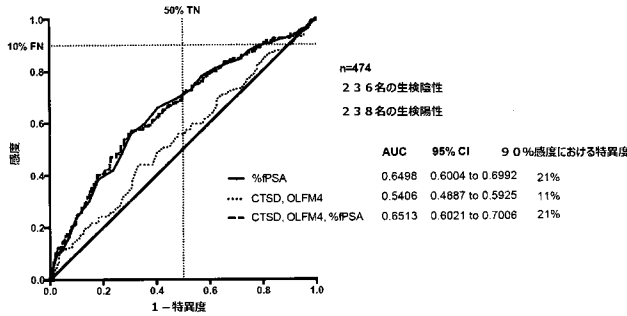
【図 9】



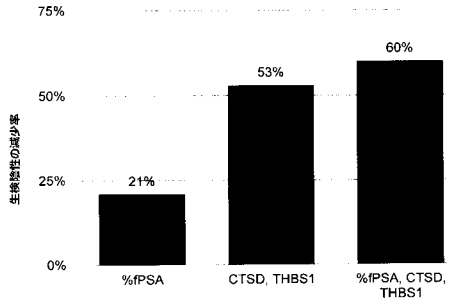
【図 11】



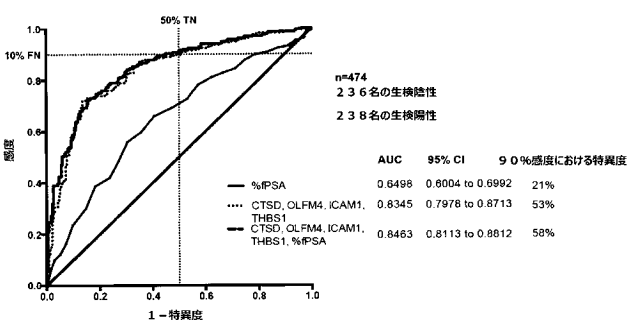
【図 10】



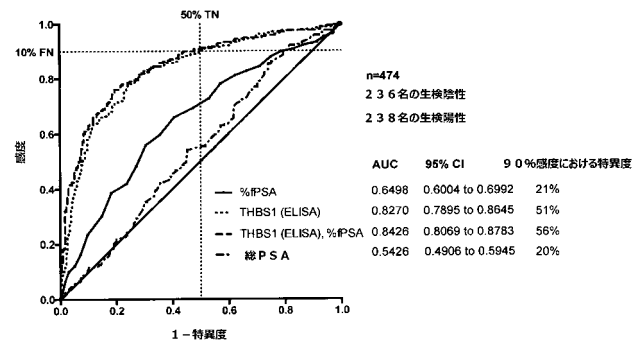
【図 12】



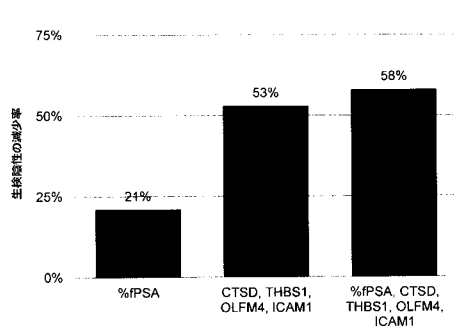
【図 13】



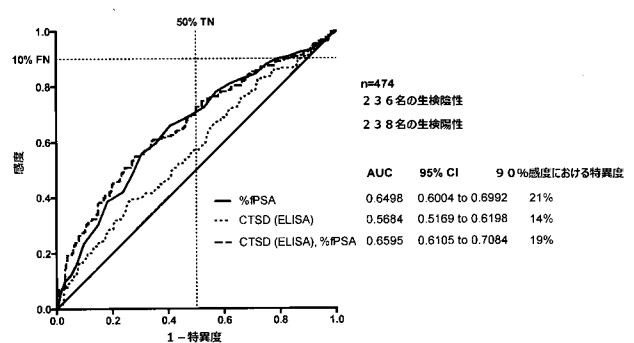
【図 15】



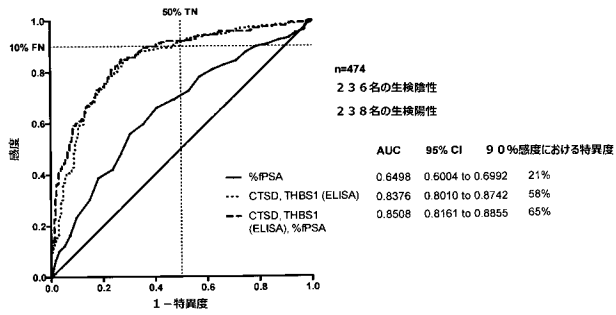
【図 14】



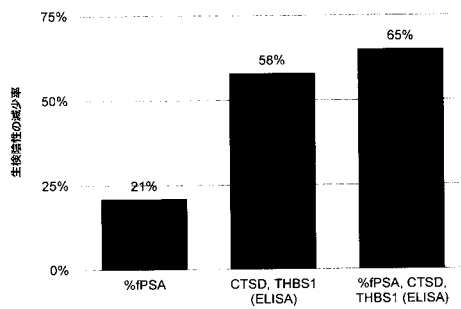
【図 16】



【図 17】



【図 18】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/067411

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/574
ADD.

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRIAN M. NOLEN ET AL: "An Extensive Targeted Proteomic Analysis of Disease-Related Protein Biomarkers in Urine from Healthy Donors", PLOS ONE, vol. 8, no. 5, 1 January 2013 (2013-01-01), page e63368, XP55407720, DOI: 10.1371/journal.pone.0063368 abstract; tables 2-3	1-15
A	WO 96/26441 A1 (CARLSON G D) 29 August 1996 (1996-08-29) claim 1; example 2	1-15
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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 application or patent 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

21 September 2017

Date of mailing of the international search report

04/10/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot-Van Geldre, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/067411

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MICHAEL W. SHAFER ET AL: "Antibody array profiling reveals serum TSP-1 as a marker to distinguish benign from malignant prostatic disease", PROSTATE., vol. 67, no. 3, 15 February 2007 (2007-02-15), pages 255-267, XP055333168, US ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/pros.20514 abstract; figures 1-3; table 1 -----	1-15
A	Klaus Jung ET AL: "Ratio of Free or Complexed Prostate-specific Antigen (PSA) to Total PSA: Which Ratio Improves Differentiation between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer?", Clinical Chemistry, 1 January 2000 (2000-01-01), page 55, XP055333260, UNITED STATES Retrieved from the Internet: URL:http://clinchem.aaccjnl.org/content/46/1/55.full.pdf abstract; figure 2; table 2 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/067411

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9626441	A1	29-08-1996	AT 223051 T 15-09-2002
			CA 2213709 A1 29-08-1996
			DE 69623264 D1 02-10-2002
			DE 69623264 T2 22-01-2004
			EP 0811162 A1 10-12-1997
			EP 1221619 A2 10-07-2002
			JP 2001503129 A 06-03-2001
			US 5698402 A 16-12-1997
			US 5912135 A 15-06-1999
			US 6100049 A 08-08-2000
			WO 9626441 A1 29-08-1996

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01) C 1 2 N 15/13

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72) 発明者 アンナリサ マッカーノ
 スイス国 シュリーレン 8 9 5 2 シュタインヴィーゼンシュトラッセ 2 2

(72) 発明者 トーマス シュトイバー
 ドイツ連邦共和国 ハンブルク 2 2 3 3 9 ローシュテュッケン 1

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA36
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 DA86 EA50

专利名称(译)	用于检测人类样品中蛋白质的方法和该方法的用途		
公开(公告)号	JP2019527840A	公开(公告)日	2019-10-03
申请号	JP2019523172	申请日	2017-07-11
[标]发明人	ラルフ シース		
发明人	ラルフ シース カトリン エント アルキピアデ アタナジウ アンナリサ マッカーノ トーマス シュトイバー		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/53 C07K17/00 C07K16/18 C12N15/13		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/574.A G01N33/53.D C07K17/00 C07K16/18 C12N15/13		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50		
优先权	2016179607 2016-07-15 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提出了一种用于收集关于受试者的健康状况的信息的方法，该方法优选地包括THBS1，游离PSA的浓度，包括选自CTSD，OLFM4，ICAM1组成的组中的至少一种蛋白质的浓度。包括定量检测受试者血清，血浆或血液中的百分比（%fPSA）。[选择图]无

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 公 表 特 許 公 報 (A)		(11) 特許出願公表番号 特表2019-527840 (P2019-527840A) (令和1年10月3日(2019.10.3))	
(43) 公表日					
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
GO 1 N 33/68 (2006.01)		GO 1 N 33/68		2 G 0 4 5	
GO 1 N 33/574 (2006.01)		GO 1 N 33/574		A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/53		D	
CO 7 K 17/00 (2006.01)		CO 7 K 17/00			
CO 7 K 16/18 (2006.01)		CO 7 K 16/18			
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く					
(21) 出願番号		特願2019-523172 (P2019-523172)		(71) 出願人	
(86) (22) 出願日		平成29年7月11日 (2017.7.11)		519011773	
(86) 翻訳文提出日		平成31年3月8日 (2019.3.8)		プロテオメディックス アーゲー	
(86) 国際出願番号		PCT/EP2017/067411		スイス国 シュリーレン 8952 ヴァーギシュラーセ 23	
(87) 国際公開番号		W02018/011212		(74) 代理人	
(87) 国際公開日		平成30年1月18日 (2018.1.18)		110002354	
(31) 優先権主張番号		16179607.3		特許業務法人平和国際特許事務所	
(32) 優先日		平成28年7月15日 (2016.7.15)		ラルフ シース	
(33) 優先権主張国・地域又は機関		欧州特許庁 (EP)		スイス国 チューリヒ 8037 ランゲンベルクシュトラーセ 11	
				(72) 発明者	
				カトリン エント	
				ドイツ連邦共和国 ゲルメリング 82110 ネベラーシュトラーセ 60	
				(72) 発明者	
				アルキピアデ アタナジウ	
				スイス国 バーザン 5400 テートヴィラーシュトラーセ 13b	
最終頁に続く					
(54) 【発明の名称】 ヒトサンプル中のタンパク質を検出する方法及びその方法の使用					