

(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2016-519767
(P2016-519767A)

(43) 公表日 平成28年7月7日(2016.7.7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A	4 B O 2 9
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-505813 (P2016-505813)
 (86) (22) 出願日 平成26年4月2日 (2014.4.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月16日 (2015.11.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/056630
 (87) 国際公開番号 W02014/161910
 (87) 国際公開日 平成26年10月9日 (2014.10.9)
 (31) 優先権主張番号 1305940.7
 (32) 優先日 平成25年4月2日 (2013.4.2)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 510145945
 イムノヴィア・アクチエボラード
 スウェーデン国エスエー223 81ル
 ンド、メディコンヴィレッジ
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 カール アーネ クリステル・ボレバエッ
 ク
 スウェーデン国エスエー223 63ル
 ンド、ヘルゴナヴェーゲン21

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺がんに対するバイオマーカー検出における使用のための方法とアレイ

(57) 【要約】

本発明は、個体の前立腺がん関連疾患状態を決定するための方法であって (a) 個体からの試験されるべき試料を用意する工程 ; (b) 表 1 において定義した群から選択される 1 個またはそれ以上のバイオマーカーの試験試料中の発現を測定することによって、試験試料のバイオマーカーサインを決定する工程を含むか、またはそれからなり、表 1 において定義した群から選択される 1 個またはそれ以上のバイオマーカーの試験試料中の発現が、個体の 1 個またはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態の指標である方法を提供する。本方法はまた、そのような方法における使用のためのアレイおよびキットも提供する。

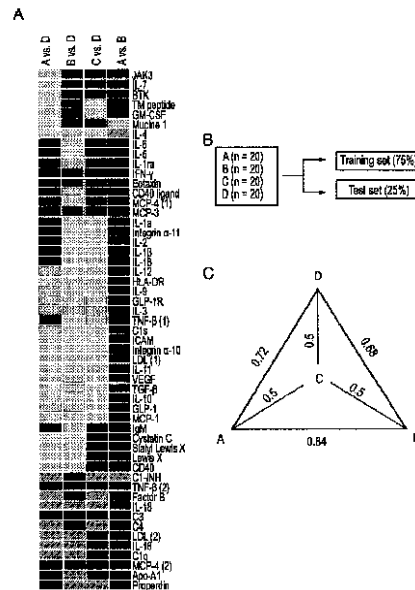


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体の前立腺がん関連疾患状態を決定するための方法であって、

a) 個体からの試験されるべき試料を用意する工程；

b) 表 1 において定義した群から選択される 1 個またはそれ以上のバイオマーカの試験試料中の発現を測定することによって、試験試料のバイオマーカースインを決定する工程

を含むか、またはからなる方法であって、

表 1 において定義した群から選択される 1 個またはそれ以上のバイオマーカの試験試料中の発現が、個体の 1 個またはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態の指標である、方法。

10

【請求項 2】

c) 前立腺がんを患っていない個体からの 1 つまたはそれ以上の対照試料を用意する工程；

d) 工程 (b) にて測定した 1 個またはそれ以上のバイオマーカの対照試料中の発現を測定することによって、対照試料のバイオマーカースインを決定する工程

をさらに含むか、またはからなり、

1 つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態が、工程 (b) にて測定された 1 個またはそれ以上のバイオマーカの試験試料中の発現が、工程 (d) にて測定された 1 個またはそれ以上のバイオマーカの対照試料中の発現と異なるという事象において同定される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

e) 前立腺がんを患っている個体からの対照試料を用意する工程；

f) 工程 (b) において測定された 1 個またはそれ以上のバイオマーカの対照試料中の発現を測定することによって、対照試料のバイオマーカースインを決定する工程；

をさらに含むか、またはからなり、

1 つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態が、工程 (b) にて測定された 1 個またはそれ以上のバイオマーカの試験試料中の発現が、工程 (f) にて測定された 1 個またはそれ以上のバイオマーカの対照試料中の発現に相当するという事象において同定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

工程 (b) は、表 1 (A) において列記したバイオマーカの 1 個またはそれ以上、例えば表 1 (A) において列記したバイオマーカの少なくとも 2、3 または 4 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1、2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (b) は、表 1 (A) において列記した各バイオマーカの発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (b) は、表 1 (B) において列記したバイオマーカの 1 個またはそれ以上、例えば表 1 (B) において列記したバイオマーカの少なくとも 2、3、4、5 または 6 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 7】

工程 (b) は、表 1 (B) において列記したバイオマーカの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (b) は、表 1 (C) において列記したバイオマーカからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカ、例えば表 1 (C) において列記したバイオマーカの少なくとも 1、2、3、4、5、6、7 または 8 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

50

工程 (b) は、表 1 (C) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

工程 (b) は、表 1 (D) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 1 (D) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

工程 (b) は、表 1 (D) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 12】

工程 (b) は、表 1 (E) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 1 (E) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7 または 8 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

工程 (b) は、表 1 (E) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

工程 (b) は、表 1 (F) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 1 (F) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7 または 8 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 15】

工程 (b) は、表 1 (F) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

工程 (b) は、表 1 (G) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 1 (G) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7 または 8 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 17】

工程 (b) は、表 1 (G) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

工程 (b) は、表 1 (H) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 1 (H) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4 または 5 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

工程 (b) は、表 1 (H) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 20】

工程 (b) は、表 1 (I) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 1 (I) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8 または 9 つの発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

工程 (b) は、表 1 (I) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 2 2】

工程 (b) は、表 2 (A) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (A) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37 または 38 個の発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

工程 (b) は、表 2 (A) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

工程 (b) は、表 2 (B) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (B) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41 または 42 個の発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

工程 (b) は、表 2 (B) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 2 6】

工程 (b) は、表 2 (C) において列記したバイオマーカーからの 1 つまたはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (C) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 または 29 個の発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

工程 (b) は、表 2 (C) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 2 8】

工程 (b) は、表 2 (D) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (D) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2 または 3 つの発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

工程 (b) は、表 2 (D) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

工程 (b) は、表 2 (E) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (E) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51 または 52 個の発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 3 1】

工程 (b) は、表 2 (E) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またははからなる、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

工程 (b) は、表 2 (F) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上

50

のバイオマーカー、例えば表 2 (F) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

工程 (b) は、表 2 (F) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 4】

工程 (b) は、表 2 (G) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (G) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 5】

工程 (b) は、表 2 (G) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

工程 (b) は、表 2 (H) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (H) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45 または 46 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

工程 (b) は、表 2 (H) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

工程 (b) は、表 2 (I) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (I) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 または 23 つの発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 3 9】

工程 (b) は、表 2 (I) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

工程 (b) は、表 2 (J) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (J) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 または 29 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 4 1】

工程 (b) は、表 2 (J) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

工程 (b) は、表 2 (K) において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2 (K) において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 または 13 個の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

50

工程 (b) は、表 2 (K) において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

1 つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態は、臨床的に意義のある前立腺がんの発生の可能性を決定すること (すなわち前立腺がんの予後) であるか、またはそれを含む、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

リスク群 A (低リスク)、リスク群 B (中程度リスク)、リスク群 C (増加リスク)、リスク亜群 C 1 (中程度増加リスク)、リスク亜群 C 2 (重度増加リスク) およびリスク群 D (高リスク) 間を区別するためである、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 4 6】

リスク群 A (低リスク) およびリスク群 D (高リスク) 間を区別するためである、請求項 2 2、2 3 または 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

リスク群 B (中程度リスク) およびリスク群 D (高リスク) 間を区別するためである、請求項 2 4、2 5、4 4 または 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 8】

リスク群 C (増加リスク) およびリスク群 D (高リスク) 間を区別するためである、請求項 2 6、2 7 または 4 4 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 4 9】

リスク群 A (低リスク) およびリスク群 B (中程度リスク) 間を区別するためである、請求項 2 8、2 9 または 4 4 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 0】

リスク亜群 C 1 (中程度増加リスク) およびリスク亜群 C 2 (重度増加リスク) 間を区別するためである、請求項 3 0、3 1 または 4 4 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

リスク亜群 C 1 (中程度増加リスク) およびリスク群 A (低リスク) 間を区別するためである、請求項 3 2、3 3 または 4 4 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

方法は、リスク亜群 C 1 (中程度増加リスク) およびリスク群 B (中程度リスク) 間を区別するためである、請求項 3 4、3 5 または 4 4 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 5 3】

リスク亜群 C 1 (中程度増加リスク) およびリスク群 D (高リスク) 間を区別するためである、請求項 3 6、3 7 または 4 4 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

リスク亜群 C 2 (重度増加リスク) およびリスク群 A (低リスク) 間を区別するためである、請求項 3 8、3 9 または 4 4 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

リスク亜群 C 2 (重度増加リスク) およびリスク群 B (中程度リスク) 間を区別するためである、請求項 4 0、4 1 または 4 4 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 5 6】

リスク亜群 C 2 (重度増加リスク) およびリスク群 D (高リスク) 間を区別するためである、請求項 4 2、4 3 または 4 4 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 7】

1 つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態は、前立腺がんの存在または不在を決定すること (すなわち、前立腺がんの診断) である、またはそれを含む、請求項 1 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 8】

1 つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態は、前立腺がんの存在または不在を決定

50

すること（すなわち、前立腺がんの診断）である、またはそれを含む、請求項 2 2 または 2 3 に記載の方法。

【請求項 5 9】

工程（b）は、表 1 および / もしくは表 2 に定義したバイオマーカーの全ての試験試料中の発現を測定することを含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前立腺がんを患っていない個体は、任意の他の前立腺関連障害を患っていない、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前立腺がんを患っていない個体は、任意の疾患または状態を患っていない、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前立腺がんを患っていない個体は、健康な個体である、請求項 2、6 0 または 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

工程（b）、（d）および / または工程（f）は、1 個またはそれ以上のバイオマーカーに結合可能な第 1 の結合剤を使用して実行される、請求項 1 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 4】

第 1 の結合剤は、抗体またはその抗原結合断片を含むか、またはからなる、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

抗体またはその抗原結合断片は、組換え抗体またはその抗原結合断片である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

抗体またはその抗原結合断片は、s c F v、F a b、免疫グロブリン分子の結合ドメインからなる群から選択される、請求項 6 3 または 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

第 1 の結合剤は、表面上に固定化される、請求項 6 3 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 8】

試験試料中の 1 個またはそれ以上のバイオマーカーは、検出可能部分で標識される、請求項 1 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 9】

対照試料中の 1 個またはそれ以上のバイオマーカーは、検出可能部分で標識される、請求項 2 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 0】

検出可能部分は、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射活性部分、酵素部分からなる群から選択される、請求項 6 8 または 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

検出可能部分は、ビオチンである、請求項 6 8、6 9 または 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 2】

工程（b）、（d）および / または工程（f）は、1 個またはそれ以上のバイオマーカーに結合可能な第 2 の結合剤を含むアッセイを使用して実行され、該第 2 の結合剤は検出可能部分を含む、請求項 6 3 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

第 2 の結合剤は、抗体またはその抗原結合断片を含むか、またはからなる、請求項 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 4】

抗体またはその抗原結合断片は、組換え抗体またはその抗原結合断片である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

抗体またはその抗原結合断片は、s c F v、F a b、免疫グロブリン分子の結合ドメインからなる群から選択される、請求項 7 2 または 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

1 つまたはそれ以上の第 2 の結合剤は、検出可能部分で標識される、請求項 7 2 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 7】

検出可能部分は、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射活性部分、酵素部分からなる群から選択される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

検出可能部分は、蛍光部分（例えば A l e x a F l u o r 色素、例えば A l e x a 6 4 7）である、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

E L I S A（酵素免疫吸着測定法）を含むか、またはからなる、請求項 1 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

工程（b）、（d）および/または工程（f）は、アレイを使用して実行される、請求項 1 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 1】

アレイは、ビーズに基づくアレイである、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

アレイは、表面に基づくアレイである、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 3】

アレイは、マクロアレイ、マイクロアレイ、ナノアレイからなる群から選択される、請求項 8 0 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】

（v）試料中に存在するバイオマーカーをビオチンで標識する工程；

（v i）ビオチン標識タンパク質を、その表面上の個別の位置で固定化された複数の s c F v を含むアレイと接触させる工程であって、該 s c F v が、表 1 中のタンパク質の 1 つまたはそれ以上に対して特異性を有する、工程；

（v i i）固定化 s c F v を、蛍光色素を含むストレプトアビジンコンジュゲートと接触させる工程；および

（v i i i）アレイ表面上の別個の位置での色素の存在を検出する工程を含み、アレイ表面上の色素の発現が、試料中の表 1 からのバイオマーカーの発現の指標である、請求項 1 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 5】

工程（b）、（d）および/または（f）は、1 個またはそれ以上のバイオマーカーをコードしている核酸分子の発現を測定することを含む、請求項 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 6】

核酸分子は、c D N A 分子または m R N A 分子である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

核酸分子は、m R N A 分子である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

工程（b）、（d）および/または（f）にて 1 個またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することは、サザンプロットハイブリダイゼーション、ノーザンプロットハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）、逆転写酵素 P C R（R T - P C

10

20

30

40

50

R)、定量リアルタイムPCR(qRT-PCR)、ナノアレイ、マイクロアレイ、マクロアレイ、オートラジオグラフィーおよびインサイチュハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法を使用して実行される、請求項85、86または87のいずれか1項に記載の方法。

【請求項89】

工程(b)において、1個またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することは、DNAマイクロアレイを使用して決定される、請求項85~88のいずれか1項に記載の方法。

【請求項90】

工程(b)、(d)および/または(f)において、1個またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することは、それぞれが個々に、表1にて同定されたバイオマーカーの1個をコードしている核酸分子に選択的に結合可能な、1つまたはそれ以上の結合部分を使用して実行される、請求項85~89のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項91】

1つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、核酸分子を含むか、またはからなる、請求項90に記載の方法。

【請求項92】

1つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、DNA、RNA、PNA、LNA、GNA、TNAまたはPMOを含むか、またはからなる、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

1つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、DNAを含むか、またはからなる、請求項91または92に記載の方法。

20

【請求項94】

1つまたはそれ以上の結合部分は、5~100ヌクレオチドの長さである、請求項91~93のいずれか1項に記載の方法。

【請求項95】

1つまたはそれ以上の核酸分子は、15~35ヌクレオチドの長さである、請求項91~94のいずれか1項に記載の方法。

【請求項96】

結合部分は、検出可能部分を含む、請求項91~95のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項97】

検出可能部分は、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射活性部分(例えば放射活性原子)または酵素部分からなる群から選択される、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

検出可能部分は、放射活性原子を含むか、またはからなる、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

放射活性原子は、テクネチウム-99m、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、リン-32、硫黄-35、重水素、トリチウム、レニウム-186、レニウム-188およびイットリウム-90からなる群から選択される、請求項98に記載の方法。

40

【請求項100】

結合部分の検出可能部分は、蛍光部分である、請求項97に記載の方法。

【請求項101】

工程(b)、(d)および/または(f)において用意される試料は、非画分化血液、血漿、血清、組織液、前立腺組織、前立腺液、胆汁および尿からなる群から選択される、請求項1~100のいずれか1項に記載の方法。

【請求項102】

工程(b)、(d)および/または(f)において用意される試料は、非画分化血液、血漿および血清からなる群から選択される、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

50

工程 (b)、(d) および / または (f) において用意される試料は、血漿である、請求項 101 または 102 に記載の方法。

【請求項 104】

請求項 63 ~ 78 または 91 ~ 100 のいずれか 1 項において定義された 1 つまたはそれ以上の結合剤を含む、個体の前立腺がんの存在を決定するためのアレイ。

【請求項 105】

1 つまたはそれ以上の結合剤は、表 1 において定義したタンパク質の全てに結合することが可能である、請求項 104 に記載のアレイ。

【請求項 106】

請求項 1 ~ 103 のいずれか 1 項において定義した、予後および / または診断マーカーとしての、請求項 1 ~ 103 のいずれか 1 項において定義した群から選択される 1 個またはそれ以上のバイオマーカーの使用。

10

【請求項 107】

表 1 において定義したバイオマーカーの全ては、予後および / または診断マーカーとして使用される、請求項 106 に記載の使用。

【請求項 108】

請求項 1 ~ 103 のいずれか 1 項において定義した、予後および / または診断マーカーとしての使用のための、請求項 63 ~ 78、または 91 ~ 100 のいずれか 1 項において定義した単離された結合剤。

【請求項 109】

A) 請求項 63 ~ 78 のいずれか 1 項において定義した 1 つまたはそれ以上の第 1 の結合剤、または請求項 80 ~ 83 または請求項 104 もしくは 105 のいずれか 1 項に記載のアレイ；

20

B) 請求項 1 ~ 103 のいずれか 1 項において定義した方法を実行するための説明書を含む、前立腺がんの存在を決定するためのキット。

【請求項 110】

請求項 91 ~ 100 のいずれか 1 項において定義した第 2 の結合剤をさらに含む、請求項 109 に記載のキット。

【請求項 111】

実質的に本明細書に記載されている、個体の前立腺がんの存在を決定するための方法または使用。

30

【請求項 112】

実質的に本明細書に記載されている、個体の前立腺がんの存在を決定するためのアレイまたはキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前立腺がん関連疾患状態を決定するための方法、ならびにそのような方法における使用のためのアレイおよびキットを提供する。

【背景技術】

40

【0002】

血液における前立腺特異的抗原 (PSA) を使用した前立腺がん (PC) の早期検出により、スクリーニングされていない男性において PC 死亡が減少する。しかしながら、一般に使用されるカットオフでの PSA 特異性が適度であるため、穏やかに上昇する PSA を有する男性間で、増強したリスク分類に寄与しているさらなるバイオマーカーに対する差し迫った必要性が存在する。

【0003】

前立腺がん (PC) は、西洋の国々における、がん関連死の第二位の原因であり [1]、PC 患者の予後を改善するために、早期かつ特異的な診断が極めて重要である。血液に基づくバイオマーカー前立腺特異的抗原 (PSA) が、1980 年代後期に臨床に導入さ

50

れ、今日、PCに対するリスクの指標として、そして患者生検のさらなる試験のための1つのパラメータとして使用されている[2、3]。PSAの導入は、早期診断PC症例数の増加をもたらしたが、悪性疾患に対するPSAの適度の特異性が、不要な生検のコストと、潜在的な副作用に関する、ならびに過剰診断および過剰処置のリスクに関する鍵となる心配を引き起こした[2~4]。実際、総血清PSAレベル(tPSA)に基づいた生検に対して選択された男性の65~75%(>4ng/ml)が、PCを有しない(www.cancer.org)。したがって、臨床医が、生検試験に対して、適切な患者を選択することを可能にするリスク分類を改善するために、さらなるおよび/またはより特異的なバイオマーカーが同定されることが必要である。

【0004】

PCに対して試験する時に、特異性を改善するために、tPSA値を、経時的PSA変化(PSA速度)、前立腺体積に対するPSA(PSA密度)、またはPSAの年齢特異的範囲のような、他のパラメータと組み合わせることに対して種々の試みが行われてきた[2、3]。しかしながら、tPSAアッセイの診断パワーの改善は全く、またはわずかの改善しか、ここまで観察されてきていない[2]。反対に、tPSAと遊離(未結合)PSA間を区別することが、特に、tPSAの中程度範囲(4~10ng/ml)レベルに対して、アッセイ性能を増強することが証明された。事実、18~25%より下の遊離PSAのtPSAに対する比(%fPSA)を有する男性が、PCを有するより有意に高いリスクと関連することが示された[5~7]。また、25~50%のこの特定の患者群はPCを有さないが、それら全てが、生検試験に対して選択される[7、8]。最近、4つのカリクレインマーカーのパネルが、生検出力の潜在的予測子として示唆されており[9、10]、tPSA、遊離PSAの、2proPSAと呼ばれる遊離PSA垂画分との組合せがまた、診断正確性を改善するであろうことが示唆された[11]。

【0005】

しかしながら、とりわけ生検試験および/または治療の前に、リスクにしたがって前立腺がんを検出し、および/または前立腺がんを層別化するために使用することができるさらなるより特異的なバイオマーカーに対する大きなアンメットクリニカルニーズが依然としてある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

まず種々の古典的生物化学的技術を用いて、PCと関連したさらなる新規の血清バイオマーカーを定義するために、主要な努力が実施されてもきた。今日までに、ヒトカリクレイン2[12、13]、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター[14][11]トランスフォーミング増殖因子1(TGF-1)[3、15、16]およびインターロイキン-6(IL-6)[16~18]が、潜在的血清マーカーとして特に示唆されてきた。前途有望であるが、これらのマーカーの予後の能力を探索および確認するために、さらなる検証試験が必要であろう[2~4]。さらに、追加の潜在的PCマーカーが、従来のプロテオーム技術を使用して示唆されてもきた[19、20]が、これらの観察は、独立した患者コホートを使用して実証されるべきままである[21]。さらに、深刻な技術的問題がまた、アッセイ感度、ダイナミックレンジ、および/またはスループットに関して上がってきた[22、23]。この目的を達するために、アフィニティプロテオミクスが、多重、感度および迅速様式において、非画分化プロテオーム、例えば血漿および血清を標的化可能なハイスループット代替案として確立されてきた[24~27]。

【0007】

本文脈において、本発明者らはすでに、複合体プロテオームのタンパク質発現プロファイリングのための、組換え一本鎖断片可変(scFv)抗体マイクロアレイプラットフォームを先に設計した[26、28、29]。本アフィニティプロテオーム技術プラットフォームを使用し、本発明者らは、迅速、感度および再現可能様式にて、血清、血漿、尿、無傷細胞、細胞溶解物および組織抽出物を含む広範囲の未精製、直接標識プロテオーム[

10

20

30

40

50

28、30、31]をプロファイルすることができた。本発明者らは、プラットフォームが、例えば診断、予後、分類のため、および証拠に基づく治療選別のために、候補バイオマーカーサインを同定するために使用可能であることを示した[32~37]。

【0008】

本発明者らは、アフィニティプロテオミクスが、現在確立された臨床実施にしたがった4つの生化学的に定義されたリスク群に層別化されている患者試料でのルーチンPSA測定から血漿試料を標的とするリスク群分類を検証し、さらには改良するために使用可能であるかどうかを調査した[38~41]。データは、血漿タンパク質サインが、PC(「悪性バイオマーカーサイン」)を正確に同定し、PCリスクに関連した現在の、そして新規の亜群に患者を層別化することが可能であり、長期において、PCのより個別化した処置に寄与する潜在力を有することを示した。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

したがって、本発明の第1の態様は、個体の前立腺がん関連疾患状態を決定するための方法であって、

a) 個体からの試験されるべき試料を用意する工程；

b) 表1において定義した群から選択される1個またはそれ以上のバイオマーカーの試験試料中の発現を測定することによって、試験試料のバイオマーカーサインを決定する工程

を含むか、またはからなり、

20

表1において定義した群から選択される1個またはそれ以上のバイオマーカーの試験試料中の発現が、個体の1つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態の指標である、方法を提供する。

【0010】

「前立腺がん関連疾患状態」は、前立腺がんの存在、または不在、前立腺がん群または亜群(以下で定義した、A、B、C、C1、C2またはD)および/または(好ましくは既定時間フレーム内で)個体にて発生している前立腺がんの可能性を意味する。

【0011】

「バイオマーカー」は、その測定が前立腺がん関連疾患状態、例えば前立腺がんの予後を決定することにおいて有用な情報を提供可能である、天然に存在する生物学的分子、またはその成分または断片を意味する。例えば、バイオマーカーは、天然に存在しているタンパク質または糖質部分、またはその抗原成分または断片であってよい。

30

【0012】

好ましくは、試験されるべき試料は、哺乳動物から得られる。哺乳動物は、任意の家畜(domestic animal)または家畜(farm animal)であってよい。好ましくは、哺乳動物はラット、マウス、モルモット、ネコ、イヌ、ウマまたは霊長類である。最も好ましくは、哺乳動物はヒトである。好ましくは、試料は、未精製血液、前画分化血液、血漿、血漿細胞、前立腺細胞または等しく好ましく、血漿、血漿細胞または前立腺細胞を含むか、またはからなる細胞または組織試料に由来するタンパク質または核酸を含むか、またはからなる、細胞または組織試料(またはその派生物)である。好ましくは、試験および対照試料が、同一の種に由来する。

40

【0013】

1つの実施形態において、本発明の第1の態様による方法は、

c) 前立腺がんを患っていない個体からの1個またはそれ以上の対照試料を用意する工程；

d) 工程(b)にて測定した1個またはそれ以上のバイオマーカーの対照試料中の発現を測定することによって、対照試料のバイオマーカーサインを決定する工程

をさらに含むか、またはからなり、

1つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態が、工程(b)にて測定された1個またはそれ以上のバイオマーカーの試験試料中の発現が、工程(d)にて測定された1個または

50

それ以上のバイオマーカーの対照試料中の発現と異なるという事象において同定される。

【0014】

さらなる、または追加の実施形態において、方法は、

e) 前立腺がんを患っている個体からの対照試料を用意する工程；

f) 工程 (b) において測定された1個またはそれ以上のバイオマーカーの対照試料中の発現を測定することによって、対照試料のバイオマーカーサインを決定する工程を含むか、またはからなり、

1つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態が、工程 (b) にて測定した1個またはそれ以上のバイオマーカーの試験試料中の発現が、工程 (f) にて測定した1個またはそれ以上のバイオマーカーの対照試料中の発現に相当するという事象において同定される。

10

【0015】

「対照試料中の存在および/または量に相当する」は、存在および量が、工程 (c) にて用意される対照試料 (例えば陰性対照試料) に対して、(または同一のものを提示している先に定義した参照値に対して) よりも、工程 (e) にて用意される対照試料のものと同じであるか、または工程 (e) にて用意される対照試料 (例えば陽性対照試料) のものと近いことを意味する。好ましくは、存在および/または量は、工程 (e) にて用意される対照試料のもの少なくとも60%、例えば、少なくとも65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%である。

20

【0016】

「対照試料中の存在および/または量と異なる」は、存在または量が、工程 (c) にて用意される対照試料のものから (もしくは同一のものを提示している先に定義した参照値に対して) 異なることを意味する。好ましくは、存在および/または量は、前立腺がんを含むか、またはからなる対照試料のものわずか40%、例えば、わずか39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%または0%である。

30

【0017】

好ましくは、1つまたはそれ以上の対照試料は、試験されるべき個体に対して、年齢適合および/または性別適合する。言い換えれば、健康な個体はおおよそ同一の年齢 (例えば5年以内) であり、試験されるべき個体と同一の性別である。

【0018】

好ましくは、工程 (b) にて測定した1個またはそれ以上のバイオマーカーの試験試料中の存在および/または量を、既定の参照値に対して比較する。

【0019】

したがって、工程 (b) に測定した1個またはそれ以上のバイオマーカーの試験試料内の存在および/または量が、工程 (d) にて測定した1個またはそれ以上のバイオマーカーの存在および/もしくは量、または既定の参照値から、有意に異なる (すなわち統計学的に異なる) ことが好ましい。したがって、工程 (b) で測定した1個またはそれ以上のバイオマーカーの試験試料中の存在および/または量が、工程 (f) で測定した1個またはそれ以上のバイオマーカーの存在および/もしくは量、または既定参照値に有意に相当する (すなわち統計学的に類似である) ことが好ましい。例えば、付随している実施例にて議論するように、試験および対照試料中の特定のバイオマーカーの存在および/または量の間の有意な差が、 $p < 0.05$ (例えば $p < 0.04$ 、 $p < 0.03$ 、 $p < 0.02$ または $p < 0.01$) と分類される。

40

【0020】

好ましくは、工程 (b) は、表1において定義した群から選択される1個またはそれ以

50

上のバイオマーカー、例えば表 1 において定義された群から選択される少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66 もしくは 67 のバイオマーカーの試験試料中の存在および/または量を測定することを含むか、またはからなる。

【0021】

工程 (b) は、IL - 4 の発現を測定することを含むか、またはからなってよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 12 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 9 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 1a の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、HLA - DR の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 3 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、ICAM の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、CD 40 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 18 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 1b の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、GLP - 1 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 11 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、VEGF の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、シスタチン C の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、C1 - INH の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、MCP - 3 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 13 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、TNF - の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、C1s の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、インテグリン - 10 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、C3 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、GLP - 1R の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IgM の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 16 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、TMペプチドの発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、ムチン - 1 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 2 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IFN - の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、CD 40 リガンドの発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 10 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、GM - CSF の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、ファクター B の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、C4 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、インテグリン - 11 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、IL - 8 の発現を測定することを含むか、またはからなる。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、MCP - 4 の発現を測定することを含むか、また

10

20

30

40

50

ンジオモチンの発現を測定することを含まなくてよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、 M C P - 1 の発現を測定することを含まなくてよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、 I L - 6 の発現を測定することを含まなくてよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、ルイス X の発現を測定することを含まなくてよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、 C 1 q の発現を測定することを含まなくてよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、シアリル・ルイス X の発現を測定することを含まなくてよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、 T G F - の発現を測定することを含まなくてよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、 I L - 1 r a の発現を測定することを含まなくてよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、 T G F - 1 の発現を測定することを含まなくてよい。あるいは、またはさらに、工程 (b) は、 P S A の発現を測定することを含まなくてよい。

10

【 0 0 2 3 】

「発現」は、 m R N A もしくはタンパク質のような遺伝子産物のレベルまたは量を意味する。

【 0 0 2 4 】

「 T M ペプチド」は、以下の配列番号 1 (C D R 配列に下線を引く) の s c F v 抗体構造物が特異性を有する、 1 0 T M タンパク質から誘導されるペプチドを意味する。

【化 1】

MAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTWFDPWGQGTLVTVSSGGGGSG
 GGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIGNNAVWVYQQLPGTAPKLLIYRNN
QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSWVFGGGTKLTVLG

20

【配列番号1】

【 0 0 2 5 】

したがって、本 s c F v を使用し、または任意の抗体もしくはその抗原結合断片は 1 0 T M タンパク質に結合することに関して、本 s c F v と競合する。例えば、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 1 に示したのと同じの C D R を含んでよい。

【 0 0 2 6 】

そのような抗体が、精製目的のために、アフィニティタグ (例えば C 末端) で生成できることが当業者によって理解されるであろう。例えば、配列番号 2 のアフィニティタグを利用する。

30

【化 2】

DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKAAAHHHHHH

【配列番号2】

【 0 0 2 7 】

タンパク質および / または核酸の濃度を検出するおよび / または測定する方法は、当業者に周知であり、例えば Sambrook and Russell、2001、Cold Spring Harbor Laboratory Press を参照のこと。

40

【 0 0 2 8 】

タンパク質の検出および / または測定のための好ましい方法としては、ウエスタンブロット、ノザンブロット、ウエスタンブロット、免疫吸着アッセイ (E L I S A)、抗体マイクロアレイ、組織マイクロアレイ (T M A)、免疫沈降、インサイチューハイブリッド形成および他の免疫組織化学技術、放射免疫測定法 (R I A)、モノクローナルおよび / またはポリクローナル抗体を使用するサンドイッチアッセイを含む免疫放射定量測定法 (I R M A) および免疫酵素測定法 (I E M A) が挙げられる。例示サンドイッチアッセイは、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第 4, 376, 110 号および同 4, 486, 530 号にて、Davidらによって記述される。スライド上の細胞の抗体染色

50

が、当業者に周知のように、細胞学研究室診断試験にて周知の方法にて使用される。

【0029】

典型的に、ELISAは、通常固相アッセイにて、着色した反応産物を与える、酵素の使用を含む。ホスラディッシュペルオキシダーゼおよびホスファターゼのような酵素が広く用いられてきた。ホスファターゼ反応を増幅する方法は、ここで第2の酵素システムのための共酵素として働く、NADを発生させるために、基質としてNADPを使用することである。大腸菌(*Escherichia coli*)からのピロホスファターゼが、該酵素が組織内に存在しないので、良好なコンジュゲートを生成し、安定であり、良好な反応色を提供する。ルシフェラーゼのような酵素に基づく化学発光系も使用される。

【0030】

ビタミンビオチンとのコンジュゲーションが、それに大きな特異性とアフィニティにて結合するその酵素連結アビジンまたはストレプトアビジンとのその反応によって簡単に検出可能であることから、しばしば使用される。

【0031】

したがって、1つの実施形態において、工程(b)は、表1(A)において列記したバイオマーカーの1個またはそれ以上、例えば表1(A)において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3または4つの発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程(b)において、表1(A)において列記した各バイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなるとよい。

【0032】

1つの実施形態において、工程(b)は、表1(B)において列記したバイオマーカーの1個またはそれ以上、例えば表1(B)において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5または6個の発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程(b)において、表1(B)において列記した各バイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなるとよい。

【0033】

代替のまたは追加の実施形態において、工程(b)にて、方法は表1(C)において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表1(C)において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7または8つの発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程(b)にて、表1(C)において列記した各バイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなる。

【0034】

代替のまたは追加の実施形態において、工程(b)にて、方法は、表1(D)において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表1(D)において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個の発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程(b)にて、表1(D)において列記した各バイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなる。

【0035】

代替のまたは追加の実施形態において、工程(b)にて、方法は、表1(E)において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表1(E)において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7または8つの発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程(b)にて、表1(E)において列記した各バイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなる。

【0036】

代替のまたは追加の実施形態において、工程(b)にて、方法は、表1(F)において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表1(F)において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7または8つの発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程(b)にて、表1(F)において列記したバイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）にて、方法は、表1（G）において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表1（G）において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7または8つの発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程（b）にて、表1（G）において列記した各バイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなる。

【 0 0 3 8 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）にて、方法は、表1（H）において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表1（H）において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4または5つの発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程（b）にて、表1（H）において列記した各バイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなる。

10

【 0 0 3 9 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）にて、方法は、表1（I）において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表1（I）において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8または9つの発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程（b）にて、表1（I）において列記した各バイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなる。

【 0 0 4 0 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）にて、方法は、表2（A）において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表2（A）において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37または38個の発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表2（A）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

20

【 0 0 4 1 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表2（B）において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表2（B）において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41または42個の発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表2（B）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

30

【 0 0 4 2 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表2（C）において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表2（C）において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29つの発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表2（C）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

40

【 0 0 4 3 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表2（D）において列記したバイオマーカーからの1個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表2（D）において列記したバイオマーカーの少なくとも2または3つの発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表2（D）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

50

【 0 0 4 4 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表 2（E）において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2（E）において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51 または 52 個の発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表 2（E）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

【 0 0 4 5 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表 2（F）において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2（F）において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 個の発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表 2（F）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

【 0 0 4 6 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表 2（G）において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2（G）において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 個の発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表 2（G）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

【 0 0 4 7 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表 2（H）において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2（H）において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45 または 46 個の発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表 2（H）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

【 0 0 4 8 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表 2（I）において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2（I）において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 または 23 個の発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表 2（I）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

【 0 0 4 9 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表 2（J）において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2（J）において列記したバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 または 29 個の発現を測定することを含むか、またはからなる。工程（b）は、表 2（J）において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

【 0 0 5 0 】

代替のまたは追加の実施形態において、工程（b）は、表 2（K）において列記したバイオマーカーからの 1 個またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 2（K）において列

10

20

30

40

50

記したバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13個の発現を測定することを含むか、またはからなる。工程(b)は、表2(K)において列記したバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むか、またはからなる。

【0051】

代替のまたは追加の実施形態において、1つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態は、臨床的に意義のある前立腺がんの発生の可能性を決定することであるか、またはそれを含む。好ましくは、特定のタイムフレーム内の臨床的に意義のある前立腺がんの発生の可能性は、例えば、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、15年、20年、25年、30年、35年、40年、55年、60年、75年、80年以内、または試験されている個体の天然のライフスパン内で決定される。

10

【0052】

代替のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク群A(低リスク)、リスク群B(中程度リスク)、リスク群C(増加リスク)、リスク亜群C1(中程度増加リスク)、リスク亜群C2(重度増加リスク)およびリスク群D(高リスク)間を区別するためである。

【0053】

1つの実施形態において、「低リスク」は、特定のタイムフレーム内で、臨床的に意義のある前立腺がんを有する、または発症している、2%以下機会、例えば1.5%、以下1.0%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%または0.001%(もしくはそれらの点の任意の2つの間)を意味する。1つの実施形態において、「中程度リスク」は、特定のタイムフレーム内で、臨床的に意義のある前立腺がんを有する、または発症している、>2%および10%の機会、例えば9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%または2.5%(もしくはそれらの点の任意の2つの間)を意味する。1つの実施形態において、「増加リスク」は、特定のタイムフレーム内で、臨床的に意義のある前立腺がんを有する、または発症している、>10%および50%の機会、例えば45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、12.5%、11.0%または10.5%(もしくはそれらの点の任意の2つの間)を意味する。1つの実施形態において、「重度増加リスク」は、特定のタイムフレーム内で、臨床的に意義のある前立腺がんを有する、または発症している、>50%および85%の機会、例えば80%、75%、70%、65%、60%、55%、52.5%、51.0%または50.5%(もしくはそれらの点の任意の2つの間)を意味する。1つの実施形態において、「高リスク」は、特定のタイムフレーム内で、臨床的に意義のある前立腺がんを有する、または発症している、>90%および100%の機会、例えば100%、100%、99%、98%、97%、96%、95%、92.5%、90%、87.5%、86%、85.5%、または85.1%(もしくはそれらの点の任意の2つの間)を意味する。好ましくは、「低」、「中程度」、「増加」、「重度増加」および「高」リスク群は連続し、したがって1つのリスク群に対する中間値を使用する場合、隣接するリスク群が適切に調節される。例えば、1.0%の低リスクが使用される場合、中程度リスク群が、>1.0%から広がるであろう。好ましくは、特定のタイムフレームは、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、15年、20年、25年、30年、35年、40年、55年、60年、75年、80年以内、または試験されている個体の天然のライフスパン内である。最も好ましくは5年である。

20

30

40

【0054】

これらの群は、%遊離および総PSAのレベルに基づいて定義される。群Aは、tPSA 0.70 ng/mlを有する。群Bは、%tPSA 27.9%での2.1~8.0 ng/mlのtPSAを有する。群Cは、%tPSA 12.6%での5.0~10.3

50

ng/mlのtPSAを有する。および群Dは、24.6~724ng/mlを有する。群AおよびB患者は、処置を必要としない。群Cは様々な群であって、亜群C1およびC2に分けることが可能である。群C1はより群AおよびBに類似であり、すなわち前立腺がんに対するリスクが少なく、したがって、生検および処置の必要性が少ない/ない一方で、群C2はより群D、すなわちがん群に類似であり、したがって生検および処置の必要性を示唆する。

【0055】

1つの実施形態において、方法は、リスク群A（低リスク）およびリスク群D（高リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク群B（中程度リスク）およびリスク群D（高リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク群C（増加リスク）およびリスク群D（高リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク群A（低リスク）およびリスク群B（中程度リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク亜群C1（中程度増加リスク）およびリスク亜群C2（重度増加リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク亜群C1（中程度増加リスク）およびリスク群A（低リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク亜群C1（中程度増加リスク）およびリスク群B（中程度リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク亜群C1（中程度増加リスク）およびリスク群D（高リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク亜群C2（重度増加リスク）およびリスク群A（低リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク亜群C2（重度増加リスク）およびリスク群B（中程度リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。他のまたは追加の実施形態において、方法は、リスク亜群C2（重度増加リスク）およびリスク群D（高リスク）間を区別するためであるか、または区別することを含む。

10

20

30

【0056】

しかしながら、他のまたは追加の実施形態において、1つまたはそれ以上の前立腺がん関連疾患状態は、前立腺がんの存在または不在を決定すること（すなわち、前立腺がんの診断）であるか、または含む。好ましくは、前立腺がんの診断は、工程（b）において、表1（A）において列記したバイオマーカーの1個またはそれ以上、例えば表1（A）において列記したバイオマーカーの少なくとも2、3または4個の発現を測定することを含むか、またはからなる。方法は、工程（b）において、表1（A）において列記した各バイオマーカーの発現を測定することを含むか、またはからなってよい。1つの実施形態において、前立腺がんの存在は、リスク亜群C2またはDでの分類によって示唆される。1つの実施形態において、前立腺がんの存在は、リスク亜群C2での分類によって示唆される。1つの実施形態において、前立腺がんの存在は、リスク亜群Dでの分類によって示唆される。前立腺がんの存在が示唆される1つの実施形態において、方法には、現在の推奨にしたがった前立腺がんに対する患者の生検および/または処置（例えばがん細胞の外科的除去、放射線療法および/または化学療法）が含まれる。

40

【0057】

本発明の第1の態様の1つの実施形態において、工程（b）は、表1および/または表2において定義した全てのバイオマーカーの試験試料中の発現を測定することが含まれるか、またはからなる。

【0058】

さらなる、または追加の実施形態において、（工程（c）の）前立腺がんを患っていない個体は、任意の他の前立腺関連障害を患っていない。好ましくは、前立腺がんを患って

50

いない個体は、任意の疾患または状態を患っていない。最も好ましくは、前立腺がんを患っていない個体は、健康な個体である。

【0059】

さらなる、または追加の実施形態において、(工程(e)の)前立腺がんを患っている個体は、任意の他の前立腺関連障害を患っていない。好ましくは、前立腺がんを患っている個体は、任意の他の疾患または状態を患っていない。最も好ましくは、前立腺がんを患っている個体は、そうでなければ健康な個体である。1つの実施形態において、前立腺がんを患っている個体は、群A、群B、群C、群C1、亜群C1、亜群C2または亜群Dを患っている。好ましくは、工程(e)は、これらの群のそれぞれから、またはこれらの任意の組合せからの、1つまたはそれ以上の個体からの対照試料を用意することを含む。

10

【0060】

さらなる、または追加の実施形態において、工程(b)、(d)および/または工程(f)は、1個またはそれ以上のバイオマーカーに結合可能な、第1の結合剤を用いて実施する。

【0061】

好ましくは第1の結合剤は、抗体またはその抗原結合断片を含むか、またはからなる。

【0062】

用語「抗体」には、免疫グロブリン軽および/もしくは重鎖可変ならびに/もしくは正常領域のファージディスプレイによって生成された一本鎖抗体分子、または当業者に公知である免疫アッセイフォーマットにて、抗体に結合可能な他の免疫相互作用分子のような、しかし限定はされない、任意の合成抗体、組換え抗体または抗体ハイブリッドが含まれる。

20

【0063】

本発明者らはまた、アフィボディおよびアプタマーのような、抗体様結合剤の使用も含む。

【0064】

それらの特異的結合部位を維持する、抗体断片の合成に關与する技術の一般概説は、Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293~299に見い出させる。

【0065】

さらに、またはあるいは、1つまたはそれ以上の第1の結合分子は、アプタマーである(Collettら、2005、Methods 37:4~15頁を参照のこと)。

30

【0066】

抗体ライブラリー(Clacksonら、1991、Nature 352、624~628頁; Marksら、1991、J Mol Biol 222(3):581~97頁)、ペプチドライブラリー(Smith、1985、Science 228(4705):1315~7頁)、発現cDNAライブラリー(Santiら(2000) J Mol Biol 296(2):497~508頁)、アフィボディのような、抗体フレームワーク以外の足場上のライブラリー(Gunneriussonら、1999、Appl Environ Microbiol 65(9):4134~40頁)またはアプタマーに基づいたライブラリー(Kenanら、1999、Methods Mol Biol 118、217~31頁)が、そこからの所与のモチーフに対して特異的な結合分子が、本発明の方法における使用のために選択される供給源として使用される。

40

【0067】

分子ライブラリーは、原核細胞(Clacksonら、1991、op.cit.; Marksら、1991、op.cit.)もしくは真核細胞(Kiekerら、1999、Proc Natl Acad Sci USA、96(10):5651~6頁)中、インピボにて発現され、または細胞の關与なしに、インピトロで発現される(Hanes & Pluckthun、1997、Proc Natl Acad Sci USA 94(10):4937~42頁; He & Tauszig、1997、Nucle

50

ic Acids Res 25 (24) : 5132 ~ 4 頁 ; Nemotoら、1997、FEBS Lett、414 (2) : 405 ~ 8 頁)。

【0068】

タンパク質に基づくライブラリーが使用される場合、潜在的結合分子のライブラリーをコードしている遺伝子が、しばしばウイルス内にパッケージされ、潜在的結合分子が、ウイルスの表面に提示される (Clacksonら、1991、上記 ; Marksら、1991、上記 ; Smith、1985、上記)。

【0069】

おそらく、最も一般的に使用されるディスプレイシステムは、それらの表面に抗体断片を提示しているフィラメント状バクテリオファージであり、抗体断片は、バクテリオファージのマイナーコートタンパク質への融合として発現される (Clacksonら、1991、上記 ; Marksら、1991、上記)。しかしながら、提示のための他の好適なシステムとしては、他のウイルス (EP39578)、細菌 (Gunneriussonら、1999、上記 ; Daughertyら、1998、Protein Eng 11 (9) : 825 ~ 32 頁 ; Daughertyら、1999、Protein Eng 12 (7) : 613 ~ 21 頁) および酵母 (Shustaraら、1999、J Mol Biol 292 (5) : 949 ~ 56 頁) が挙げられる。

【0070】

さらに、提示システムは、リボソームディスプレイシステムと呼ばれるなかで、そのコードしている mRNA に対するポリペプチド産物の連結 (Hanes & Pluckthun、1997、上記 ; He & Tauszig、1997、上記 ; Nemotoら、1997、上記)、またはコード DNA に対する代替的なポリペプチド産物の連結 (米国特許第 5,856,090 号および WO98/37186 を参照のこと) を利用して開発されてきた。

【0071】

抗体の可変重 (V_H) および可変軽 (V_L) ドメインが、抗原認識に関与し、事実はず、早期プロテアーゼ消化実験によって認識された。さらなる確認が、齧歯類抗体の「ヒト化」で見られた。齧歯類由来の可変ドメインは、得られた抗体が、齧歯類親抗体の抗原特異性を維持するように、ヒト由来の定常ドメインに融合される (Morrissonら (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 ~ 6855 頁)。

【0072】

抗原特異性は、可変ドメインによって付与され、定常ドメインから独立しており、全て1つまたはそれ以上の可変ドメインを含む、抗体断片の細菌発現を含む実験より公知である。これらの分子には、Fab 様分子 (Betterら (1988) Science 240, 1041 頁) ; Fv 分子 (Skerraら (1988) Science 240, 1038 頁) ; V_H および V_L パートナードメインが、可変オリゴペプチドを介して連結する、一本鎖 Fv (scFv) 分子 (Birdら (1988) Science 242, 423 頁 ; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879 頁) および単離 V ドメインを含む単一ドメイン抗体 (dAbs) (Wardら (1989) Nature 341, 544 頁) が含まれる。それらの特異的結合部位を維持する抗体断片の合成に関与する技術の一般概説は、Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293 ~ 299 頁に見出させる。

【0073】

抗体または抗原結合断片は、無傷抗体、Fv 断片 (例えば一本鎖 Fv およびジスルフィド結合 Fv)、Fab 様断片 (例えば Fab 断片、Fab' 断片および $F(ab)_2$ 断片)、単一可変ドメイン (例えば V_H および V_L ドメイン) およびドメイン抗体 (dAb、一本および二本フォーマットを含む [すなわち dAb-リンカー-dAb]) からなる群から選択される。好ましくは、抗体または抗原結合断片は、一本鎖 Fv (scFv) である

10

20

30

40

50

。

【0074】

1つまたはそれ以上の結合部分は代替的に抗体様結合剤、例えばアフィボディまたはアプタマーを含むか、またはからなってよい。

【0075】

「scFv分子」は、 V_H および V_L パートナードメインが、可動性オリゴペプチドを介して連結される分子を意味する。

【0076】

抗体全体ではなく、抗体断片を使用する利点は、数倍である。断片のより小さなサイズが、より良好な固体組織の浸潤のような、改善された薬理学的性質を導いて良い。補体結合のような、全体抗体のエフェクター機能が除去される。Fab、Fv、ScFvおよびdAb抗体断片は全て、大腸菌(E. coli)中で発現し、大腸菌から分泌され、したがって大量の前記断片の容易な生成が許容される。

10

【0077】

全体抗体、および $F(ab')_2$ 断片は、「二価」である。「二価」は、前記抗体と $F(ab')_2$ 断片が、2つの抗原結合部位を有することを意味する。一方、Fab、Fv、ScFvおよびdAb断片は一価であり、ただ1つの抗原結合部位を有する。

【0078】

抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよい。好適なモノクローナル抗体は、公知の技術、例えば、どちらも参照によって本明細書に組み入れる、「Monoclonal Antibodies: A manual of techniques」、H Zola (CRC Press, 1988)および「Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and applications」、J G R Hurrell (CRC Press, 1982)にて開示されるもの、によって調製される。

20

【0079】

潜在的結合分子をライブラリーから選択する場合、定義されたモチーフを有する1つまたはそれ以上のセクタペプチドを通常用いる。ペプチド中の可撓性を減少させる構造、または荷電した、結合分子との相互作用を許容する極性もしくは疎水性側鎖を提供するアミノ酸残基を、セクタペプチドのためのモチーフのデザインにて使用する。例えば、

30

(i) プロリンは、その側鎖が炭素ならびに窒素の両方に結合するので、ペプチド構造を安定化させて良い；

(ii) フェニルアラニン、チロシンおよびトリプロファンは、芳香族側鎖を有し、非常に疎水性である、一方でロイシンおよびイソロイシンは、脂肪族側鎖を有し、また疎水性である；

(iii) リシン、アルギニンおよびヒスチジンは塩基性側鎖を有し、中性pHにて正に帯電し、一方でアスパラギン酸およびグルタミン酸は、酸性側鎖を有し、中性pHにて負に帯電する；

(iv) アスパラギン酸およびグルタミン酸は中性pHでニュートラルであるが、水素結合に参加してよいアミド基を含む；

40

(v) セリン、スレオニンおよびチロシン側鎖は、ヒドロキシル基を含み、これは水素結合に参加してよい。

【0080】

典型的に、結合分子の選択は、結合分子の型に相当するスポットに対する結合を解析するために、アレイ技術とシステムの使用を含んでよい。

【0081】

したがって、第1の結合剤は例えば、組換え抗体またはその抗原結合断片であってよい。好ましくは、抗体またはその抗原結合断片は、scFv、Fab、免疫グロブリン分子の結合ドメインからなる群から選択される。

【0082】

50

第1の結合剤は、表面上に固定される。

【0083】

場合により、試験試料中の1個またはそれ以上のバイオマーカーは、検出可能部分で標識される。対照試料中の1個またはそれ以上のバイオマーカーは、あるいはまたはさらに、検出可能部分で標識されてよい。

【0084】

「検出可能部分」は、その存在および/または相対量および/または位置(例えば、アレイ上の位置)を直接的または間接的いずれかで決定可能とする部分を含む。

【0085】

好適な検出可能部分は、本技術分野で周知である。

10

【0086】

例えば、検出可能部分は、特定の条件に曝露した時に、検出される、蛍光および/または発光および/または化学発光部分であってよい。そのような蛍光部分は、蛍光部分の励起を引き起こすために、特定の波長および強度で、放射線(すなわち光)に曝露する必要があつてよく、これによって、検出される特定の波長にて、検出可能な蛍光を発することが可能となる。

【0087】

あるいは、(好ましくは検出されていない)基質を、検出可能部分は、可視化および/または検出可能である検出可能製品に変換可能である酵素である。好適な酵素の例は、例えばELISAアッセイに関して、以下でより詳細に議論される。

20

【0088】

好ましくは、検出可能部分は、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射活性部分、酵素部分からなる群から選択される。最も好ましくは、検出可能部分はビオチンである。

【0089】

明確に、(例えば、本明細書で記述した試験試料および/または対照試料中の1個またはそれ以上のバイオマーカー、および/または選択されたタンパク質を検出することにおける使用のための抗体分子のような)検出されるべき薬剤は、検出可能部分を、簡単に検出可能にするために、適切な原子アイソトープを十分に有しなければならない。

【0090】

さらなる、または追加の実施形態において、工程(b)、(d)および/または工程(f)を、1個またはそれ以上のバイオマーカーに結合可能な第2の結合剤を含むアッセイを使用して実施し、第2の結合剤は、検出可能部分を含む。

30

【0091】

放射または他の標識を、公知の手段にて、本発明の方法の試料中に存在するバイオマーカー、および/または本発明の結合部分に組み入れる。例えば、結合剤がポリペプチドである場合、生合成されるか、または例えば水素の代わりにフッ素-19を含む、適切なアミノ酸前駆体を使用する化学アミノ酸合成によって合成される。 ^{99m}Tc 、 ^{123}I 、 ^{186}Rh 、 ^{188}Rh および ^{111}In のような標識が例えば、結合部分中のシステイン残基を介して結合される。イットリウム-90は、リシン残基を介して結合される。IODOGEN法(Frakerら(1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 80、49~57頁)を使用して ^{123}I を組み込むことが可能である。参照(「*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*」、J-F Chatral、CRC Press、1989)が、詳細に他の方法を記述する。(酵素、蛍光、発光、化学発光または放射活性部分のような)他の検出可能部分をタンパク質にコンジュゲートするための方法が、本技術分野で周知である。

40

【0092】

試験されるべき試料中のバイオマーカーが、前記タンパク質の存在、量および/または位置を決定することを間接的に補助する部分で標識されることは当業者に理解されよう。したがって、部分は、多成分検出可能部分の1つの成分を構築してよい。例えば、試験す

50

べき試料中のバイオマーカーは、ビオチンで標識され、これにより、検出可能な標識に融合、またはさもなければ接合したストレプトアビジンを使用して、それらの続く検出を可能にする。

【0093】

好ましくは、第2の結合剤は、抗体またはその抗原結合断片、例えば組換え抗体またはその抗原結合断片を含むか、またはからなる。好ましくは、抗体またはその抗原結合断片は、s c F v、F a b、免疫グロブリン分子の結合ドメインからなる群から選択される。

【0094】

1つまたはそれ以上の第2の結合剤を、検出可能部分で標識し、例えば検出可能部分は、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射活性部分、酵素部分からなる群から選択される。好ましくは、検出可能部分は蛍光部分（例えばA l e x a F l u o r色素、例えばA l e x a 6 4 7）である。

10

【0095】

本発明の第1の態様の1つの実施形態において、方法は、E L I S A（酵素免疫吸着測定法）を含むか、またはからなる。

【0096】

血清または血漿タンパク質を検出するための好ましいアッセイとしては、モノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体を使用するサンドイッチアッセイを含む、酵素免疫吸着測定法（E L I S A）、放射免疫測定法（R I A）、免疫放射定量測定法（I R M A）および免疫酵素測定法（I E M A）が挙げられる。例示サンドイッチアッセイは、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第4,376,110号および同4,486,530号にて、D a v i dらによって記述される。スライド上の細胞の抗体染色が、当業者に周知のように、細胞学研究室診断試験にて周知の方法にて使用される。

20

【0097】

したがって1つの実施形態において、アッセイは、典型的に、通常固相アッセイにて、着色した反応産物を与える、酵素の使用を含むE L I S A（酵素免疫吸着測定法）である。ホースラディッシュペルオキシダーゼおよびホスファターゼのような酵素が広く用いられてきた。ホスファターゼ反応を増幅する方法は、ここで第2の酵素システムのための共酵素として働く、N A Dを発生させるために、基質としてN A D Pを使用することである。大腸菌由来のピロホスファターゼが、該酵素が組織内に存在しないので、良好なコンジュゲートを生成し、安定であり、良好な反応色を提供する。ルシフェラーゼのような酵素に基づく化学発光系も使用される。

30

【0098】

ビタミンビオチンとのコンジュゲーションが、それに大きな特異性とアフィニティにて結合するその酵素連結アビジンまたはストレプトアビジンとのその反応によって簡単に検出可能であることから、しばしば使用される。

【0099】

代替実施形態において、タンパク質検出のために使用するアッセイは、従来通り、蛍光アッセイである。したがって、第2の結合剤の検出可能部分は、A l e x a蛍光色素分子（例えばA l e x a - 6 4 7）のような、蛍光部分であってよい。

40

【0100】

好ましくは、R O C A U C値によって決定されるような、方法の叙述的正確さは、少なくとも0.50、例えば少なくとも0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、0.96、0.97、0.98または少なくとも0.99である。より好ましくは、R O C A U C値によって決定されるような、方法の叙述的正確さは、少なくとも0.80（最も好ましくは1）である。

【0101】

本発明の第1の態様の方法において、工程（b）は、ビーズに基づくアレイ、または表面に基づくアレイのようなアレイを使用して実施される。好ましくは、アレイは、マクロアレイ、マイクロアレイ、ナノアレイからなる群から選択される。

50

【0102】

前立腺がん関連疾患状態を決定するための方法は、<http://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html>から入手可能なもの（例えばe1071 1.5~2.4）のような、サポートベクターマシン（SVM）を使用して実施する。しかしながら、任意の他の適切な手段も使用する。SVMはまた、本明細書で定義した1個またはそれ以上の表1バイオマーカーを含むか、またはからなる、バイオマーカーサインのROC AUCを決定するために使用する。

【0103】

サポートベクターマシン（SVM）は、分類および回帰のために使用される、一組の関連した、教師あり学習法である。一組のトレーニング例を考慮すると、2つのカテゴリーの内の1つに属しているとして各々マークすると、SVMトレーニングアルゴリズムが、新規の例が1つのカテゴリーに入るのか、他なのかを予測するモデルを構築する。直感的にSVMモデルは、別のカテゴリーの例が、可能な限り広い明確なギャップによって分けられるようにマップされた、空間中の点としての例の代表である。新しい例について、その同一の空間にマップし、どちらのギャップの側にそれらが入るのかに基づいて、カテゴリーに属することを予測する。

10

【0104】

より正式に、サポートベクターマシンは、高または無限次元空間にて、超平面または超平面の組を構築し、分類、回帰または他のタスクのために使用される。一般に、マージンが大きいほど、分類子の一般化エラーは小さいので、直感的に、良好な分離が、（機能的マージンと呼ばれる）任意のクラスの最も近いトレーニングデータポイントに対する最も大きな距離を有する超平面によって達成される。SVMにおける更なる情報は、例えば、Burgess、1998、Data Mining and Knowledge Discovery 2: 121~167頁を参照のこと。

20

【0105】

本発明の1つの実施形態において、SVMは、公知の薬剤（すなわち、公知の組織学的グレードの前立腺がん細胞、または公知の遠隔転移なしの生存を有する前立腺がん患者からの前立腺がん細胞）のバイオマーカープロファイルを使用して、本発明の方法を実施する前に、「トレーニング」する。そのようなトレーニング試料を走らせることによって、SVMは、何のバイオマーカープロファイルが、特定の性質に関連するかを学習することができる。トレーニングプロセスが完了すると、SVMは、試験したバイオマーカー試料が、特定の前立腺がん試料型（すなわち特定の前立腺がん関連疾患状態）からのものであるかを可能にする。

30

【0106】

しかしながら、このトレーニング手順は、必要なトレーニングパラメータで、SVMを前プログラムすることによって、迂回することが可能である。例えば、特定の前立腺がん関連疾患状態に属している細胞を、以上の例にて詳述した値および/または制御パターンを使用して、表1および/または表2において列記したバイオマーカーの測定を使用して、公知のSVMパラメータにしたがって同定可能である。

【0107】

適したデータの選択（すなわち公知の前立腺がん状態の細胞、前立腺がんサブタイプ状態および/または公知の前立腺がんリスク群からのバイオマーカーの測定）でSVM機械を訓練することによって、表1および/または表2において列記したバイオマーカーの任意の組合せに対して、適切なSVMパラメータを決定可能であることが当業者によって理解されるであろう。

40

【0108】

あるいは、表1および/または表2データを、本技術分野で公知の任意の他の適切な統計学的方法にしたがって、特定の前立腺がん関連疾患状態を決定するために使用する。

【0109】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも65%の正確さ、例えば66%、67%、6

50

8 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %正確さを有する。

【0110】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも65 %の感度、例えば66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %感度を有する。

10

【0111】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも65 %の特異性、例えば66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %特異性を有する。

【0112】

「正確さ」は、方法の正確な結果の割合を意味し、「感度」は、陽性として正確に分類される全ての陽性化学物質の割合を意味し、「特異性」は、陰性として正確に分類される全ての陰性化学物質の割合を意味する。

20

【0113】

あるいは、またはさらに、工程(b)、(d)および/または工程(f)を、アレイを用いて実施する。

【0114】

アレイは本質的に本技術分野で周知である。典型的に、これらは、固体支持体の表面上に形成された、それぞれが有限な面積を有する、空間的に離れた(すなわち異なる)領域(「スポット」)を有する直線または二次元構造から形成される。アレイはまた、各ビーズが、分子コードもしくはカラーコードによって同定可能であるか、または連続フロー中で同定可能である、ビーズ構造でもあり得る。解析はまた、試料を、それぞれ溶液から分子のクラスを吸着する、一連のスポット上を通過させて、連続して実施可能である。固体支持体は典型的に、ガラスまたはポリマーであり、最も一般的に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニルまたはポリプロピレンである。固体支持体は、チューブ、ビーズ、ディスク、シリコンチップ、マイクロプレート、ポリビニリデン、ジフルオライド(PVDF)膜、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、他の多孔性膜、非多孔性膜(例えばプラスチック、ポリマー、パースペック、シリコンなど)、複数の重合性ピン、または複数のマイクロタイターウェル、またはタンパク質、ポリヌクレオチドおよび他の適切な分子を固定化するために、および/または免疫アッセイを実施するために適切な任意の他の表面の形体であってよい。結合方法は、本技術分野で周知であり、一般に、タンパク質分子、ポリヌクレオチドなどを、固体支持体に、架橋、共有結合または物理的に吸着することからなる。あるいは、アフィニティタグまたは同様の構造物を介したプローブのアフィニティ結合が利用される。接触または非接触印刷、マスキングまたはフォトリソグラフィのような、よく公知の技術を使用することによって、各スポットの位置が定義可能である。概説のために、Jenkins, R. E., Pennington, S. R. (2001, Proteomics, 2, 13 ~ 29頁)およびLalら(2002, Drug Discov Today 15; 7(18 Suppl): S143 ~ 9頁)を参照のこと。

30

40

【0115】

典型的に、アレイはマイクロアレイである。「マイクロアレイ」は、少なくとも約100 / cm²、好ましくは少なくとも約1000 / cm²の、別個の領域の密度を有する領域のアレイの意味を含める。マイクロアレイ中の領域は、典型的な寸法、例えば約10 ~

50

250 μmの範囲内の直径を有し、およそ同一の距離によって、アレイ中の他の領域から離れている。アレイはあるいは、マクロアレイまたはナノアレイである。

【0116】

一旦（以上で議論した）適切な結合分子が同定され、単離されたならば、当業者は、分子生物学の技術分野でよく公知の方法を使用してアレイを製造可能である。以下の実施例を参照のこと。

【0117】

アレイは、ビーズに基づくアレイでもよいが、好ましくは表面に基づいたアレイ、例えばマクロアレイ、マイクロアレイおよびナノアレイからなる群から選択されるアレイである。

10

【0118】

しかしながら、本方法は、

(i) 試料中に存在するバイオマーカーをビオチンで標識する工程；

(ii) ビオチン標識タンパク質を、その表面上の個別の位置で固定化された複数の s c F v を含むアレイと接触させる工程であって、s c F v が、表 1 中のタンパク質の 1 つまたはそれ以上に対して特異性を有する、工程；

(iii) 固定化 s c F v を、蛍光色素を含むストレプトアビジンコンジュゲートと接触させる工程；および

(iv) アレイ表面上の別個の位置での色素の存在を検出する工程

を含んでもよく、アレイ表面上の色素の発現が、試料中の表 1 からのバイオマーカーの発現の指標である。

20

【0119】

本発明の第 1 の態様の方法は、工程 (b)、(d) および / または (f) にて、1 個またはそれ以上のバイオマーカーをコードしている核酸分子の発現を測定することを含んでもよい。

【0120】

好ましくは、核酸分子は、cDNA 分子または mRNA 分子（最も好ましくは mRNA 分子）である。

【0121】

工程 (b)、(d) および / または (f) での 1 個またはそれ以上のバイオマーカーの発現は、サザンブロットハイブリダイゼーション、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、逆転写酵素 PCR (RT-PCR)、定量リアルタイム PCR (qRT-PCR)、ナノアレイ、マイクロアレイ、マクロアレイ、オートラジオグラフィおよびインサイチュハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法を使用して実行される。好ましくは、工程 (b) において、1 個またはそれ以上のバイオマーカーの発現は、DNA マイクロアレイを使用して決定される。

30

【0122】

したがって、工程 (b)、(d) および / または (f) において、1 個またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することは、それぞれが個々に、表 1 にて同定されたバイオマーカーの 1 つをコードしている核酸分子に選択的に結合可能である、1 つまたはそれ以上の結合部分を使用して実施される。1 つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、核酸分子を含むか、またはからなる。

40

【0123】

1 つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、DNA、RNA、PNA、LNA、GNA、TNA または PMO（好ましくは DNA）を含むか、またはからなる。好ましくは、1 つまたはそれ以上の結合部分は、5 ~ 100 ヌクレオチドの長さである（例えば 15 ~ 35 ヌクレオチドの長さである）。

【0124】

1 つの実施形態において、結合部分は、検出可能部分、例えば、蛍光部分、発光部分、化学発光部分、放射活性部分（例えば放射活性原子）または酵素部分からなる群から選択

50

される検出可能部分を含む。好ましくは、検出可能部分は、放射活性原子を含むか、またはからなり、例えば放射活性原子は、テクネチウム - 99m、ヨウ素 - 123、ヨウ素 - 125、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、リン - 32、硫黄 - 35、重水素、トリチウム、レニウム - 186、レニウム - 188 およびイットリウム - 90 からなる群から選択される。

【0125】

しかしながら、部分は、蛍光部分であってよい。

【0126】

1つの実施形態において、工程(b)、(d)および/または(f)において用意される試料は、非画分化血液、血漿、血清、組織液、前立腺組織、前立腺液、胆汁および尿からなる群から選択され、好ましくは、非画分化血液、血漿、血清からなる群から選択される。最も好ましくは、工程(b)、(d)および/または(f)において用意される試料は、血漿である。

10

【0127】

本発明の第2の態様は、本発明の第1の態様またはその任意の実施形態もしくは実施形態の組合せにおいて定義された1つまたはそれ以上の結合剤を含む、個体の前立腺がんの存在を決定するためのアレイを提供する。

【0128】

好ましくは、アレイは、表1において定義したタンパク質それぞれに対する、1つまたはそれ以上の結合剤を含む。

20

【0129】

本発明の第3の態様は、予後および/または診断マーカーとしての、本発明の第1の態様、またはその任意の実施形態もしくは実施形態の組合せにおいて定義した群から選択される1個またはそれ以上のバイオマーカーの使用を提供する。

【0130】

好ましくは、表1において定義したバイオマーカーの全ては、予後および/または診断マーカーとして使用される。

【0131】

本発明の第4の態様は、本発明の第1の態様において定義した、予後および/または診断マーカーとしての使用のための、本発明の第1の態様、またはその任意の実施形態もしくは実施形態の組合せにおいて定義した単離された結合剤を提供する。

30

【0132】

本発明の第5の態様は、

A) 本発明の第1の態様、もしくはその任意の実施形態もしくは実施形態の組合せにおいて定義した1つまたはそれ以上の第1の結合剤、または本発明の第2の態様、もしくは任意の実施形態またはその実施形態の組合せによるアレイ；

B) 本発明の第1の態様、または任意の実施形態もしくはその実施形態の組合せにおいて定義した方法を実行するための説明書

を含む、前立腺がんの存在を決定するためのキットを提供する。

【0133】

1つの実施形態において、キットは、本発明の第1の態様、または任意の実施形態もしくはその実施形態の組合せにおいて定義した第2の結合剤を含む。

40

【0134】

本発明の第6の態様は、実質的に本明細書に記載されている、個体の前立腺がん関連疾患状態の存在を決定するための方法または使用を提供する。

【0135】

実質的に本明細書に記載されている、個体の前立腺がん関連疾患状態の存在を決定するためのアレイまたはキット。

【0136】

本発明の特定の態様を具体化する、好ましい非限定例をここで、以下の図面および表を

50

参照して記述する。

【図面の簡単な説明】

【0137】

【図1-1】組換え s c F v 抗体マイクロアレイの評価を表す図である。A) 1440 データ点 (対照を含む 180 プローブ × 8 複製) を含む、代表的マイクロアレイのスキャンイメージ。本イメージは、80% レーザー出力および 80% P M T - ゲインにてスキャンした。B) アッセイ間の再現性、すなわちスポット対スポット変化。162 の異なる抗体と 8 スポット複製に基づくデータ。C) アッセイ間の再現性、すなわちアレイ対アレイ変化。それぞれ 162 の異なる抗体を含む、2 つの独立したアレイ上で解析した 1 つの試料に基づくデータ。

10

【図1-2】図1-1の続き。

【図2】P C を有する増加リスクのある患者群のタンパク質発現プロファイリングを表す図である。A (最低リスク) ~ D (最高リスク) と記した 4 つのリスク群を、t P A S と % 遊離 P S A に基づいて推測的に定義した。A) 有意に示差的に発現した解析物 ($p < 0.05$) を、ウイルコクソンの符号付き検定を使用して同定し、ヒートマップにて提示する; 緑 - ダウンレギュレート、赤 - アップレギュレートおよび黒 - 等レベル。B) 各患者コホートを、トレーニング組 (試料の 75%) と試験組 (試料の 25%) に分けた。C) 全ての 162 抗体を使用した S V M に基づくアプローチを使用した、患者コホート A ~ D の分類、すなわちフィルター処理なしのデータ。S V M モデルを、トレーニング組でトレーニングし、独立した試験組上で試験し、R O C A U C 値に関して表現する。

20

【図3-1】図3は、リスク群 C (中程度範囲 t P S A および低 % 遊離 P S A) の統計学を示す図である。A) すなわち編集なしデータを使用した、全ての 162 抗体に基づく教師なし階層的クラスタリングは、C 1 (黄色) および C 2 (青色) と記した、2 つの亜群への分離をもたらした。B) 編集なしデータに基づく主要コンポーネント解析 (P C A) は、亜群 C 1 (黄色) と C 2 (青色) への層別化を確認した。C) 有意に示差的に発現した解析物 ($p < 0.05$) を、ウイルコクソンの符号付き検定を使用して同定し、ヒートマップにて提示する; 緑 - ダウンレギュレート、赤 - アップレギュレートおよび黒 - 等レベル。D ~ E) 10 - p l e x サイトカインサンドイッチ抗体アッセイ (M S D) を使用した、選択した分子の抗体マイクロアレイデータの検証。データは、観察されたシグナルの主要部が、M S D アッセイに対する検出の下限よりも上である、2 つの解析物、T N F - a (D) と I L - 8 (E) に対してのみ示す。M S D データを、これらの 2 つの解析物が、示差的に発現していることが示唆される、これらの場合 (C 1 対 C 2) における相当するマイクロアレイデータと比較する。

30

【図3-2】図3-1の続き。

【図4-1】亜群 C 1 および C 2 対本来のリスク群 A、B および D のタンパク質発現プロファイリングの図である。試料を、S V M - L O O 交差検証を使用して分類し、R O C A U C - 値を決定した。有意に示差的に発現したバイオマーカー ($p < 0.05$) を、ウイルコクソンの符号付き検定を使用して同定し、ヒートマップにて提示する; 赤 - アップレギュレート、緑 - ダウンレギュレートおよび黒 - 等レベル。A) それぞれ C 1 対 A、B、および D の S V M - L O O 交差検証。B) それぞれ C 1 対 A、B および D に対する、有意に示差的に発現した解析物 ($p < 0.05$) を表しているヒートマップ。C) それぞれ C 2 対 A、B、および D の S V M - L O O 交差検証。D) それぞれ C 2 対 A、B および D に対する、有意に示差的に発現した解析物 ($p < 0.05$) を表しているヒートマップ。E) A 対 D を区別している悪性サインの、C 1 対 C 2、C 1 対 D、A 対 C 2 および B 対 C 2 に対応するマーカーの発現レベルとの比較。

40

【図4-2】図4-1の続き。

【図4-3】図4-2の続き。

【発明を実施するための形態】

【0138】

【表 1】

表1:前立腺がん関連疾患状態を決定するためのバイオマーカー

番号	バイオマーカー	信託番号
1	IL-4	P05112
2	IL-12	O60595
3	IL-9	P15248
4	IL-1a	P01583
5	HLA-DR	HLA-DRは、クモソーム6領域6p21.31上のヒト白血球抗原複合体によってコードされたMHCクラスII細胞表面受容体である。
6	IL-3	P08700
7	ICAM	CAA41977.1, P05362
8	CD40	Q6P2H9
9	IL-18	Q14116
10	IL-1b	P01584
11	GLP-1	
12	IL-11	P20809
13	VEGF	P15692, P49765, P49767, =43915
14	シスタチンC	P01034
15	C1-INH	P05155
16	MCP-3	BC112258, BC112260, BC092436, BC070240
17	IL-13	P35225
18	TNF- β	P01374
19	C1s	P09871
20	インテグリン α -10	Hs158237
21	C3	BC150179, BC150200; P01024
22	GLP-1R	P43220
23	IgM	例えばP01871(補体タンパク質ではない);Ramos B細胞上IgMに 対してイソタイプ特異的
24	IL-16	Q05BE6, Q8IUU6, B5TY35

【表 2】

番号	バイオマーカー	信託番号
25	TMペプチド	NA
26	ムチン-1	P15941
27	IL-2	P60568
28	IFN- γ	P01579
29	CD40リガンド	P29965
30	IL-10	P22301
31	GM-CSF	P04141
32	ファクター-B	P00751
33	C4	BC151204, BC146673, AY379959, AL645922, AY379927, AY379926, AY379925
34	インテグリン α -11	Q9UKX5
35	IL-8	CR623827, CR623683, DQ893727, DQ890564, P10145
36	MCP-4	Q99616
37	LDL(1)	
38	TNF- β (1)	P01374
39	IL-7	AK226000, AB102893, AB102885, P13232
40	エオタキシン	P51671
41	Rantes	P13501
42	β -ガラクトシダーゼ	P16278
43	レプチン	P41159
44	ムチン-1	P15941
45	LDL(2)	
46	JAK3	P52333
47	IL-1 β	P01584
48	プロペルジン	P27918
49	IL-5	BC066282, CH471062, P05113
50	Apo-A1	P02647
51	LDL	
52	TNF- α	P01375

E-好ましいバイオマーカー

F-好ましいバイオマーカー

G-好ましいバイオマーカー

【表 3】

番号	バイオマーカー	信託番号
53	BTK	Q06187
54	TNF- β (2)	P01374
55	MCP-4 (1)	Q99616
56	MCP-4 (2)	Q99616
57	GLP	GLP-1R P43220
58	アンジオモチン	AAG01851; Q4VCS5
59	MCP-1	P13500
60	IL-6	P05231
61	ルイスX	
62	C1q	IPR001073, PR00007
63	シアリル・ルイスX	
64	TGF- β	P01137
65	IL-1ra	P18510
66	TGF- β 1	P01137
67	PSA	P07288

10

20

30

40

【表 4】

表2:前立腺がん関連疾患状態を決定するためのバイオマーカーサブセット

NB-「D」=ダウンレギュレート;「U」=アップレギュレート

	兆候										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
	AVD	BVD	CvD	AvB	C1VC2	C1VA	C1vB	C1vD	C2vA	C2vB	C2vD
1	IL-4	D	D	U	D	D		D	D		
2	IL-12	D	D		D	D	D	D		U	
3	IL-9	D	D		D	D	D	D		U	
4	IL-1a		D		D	D		D	U	U	U
5	HLA-DR	D	D		D	D	D	D			
6	IL-3	D	D		D	D	D	D			
7	ICAM	D	D		D		D	D		U	
8	MCP-1	D	D		D			D	U	U	
9	CD40	D			D	D		D	U	U	U
10	IL-18	U	D		D		D	D	U	U	U
11	IL-6				D	D	D	D	U	U	U
12	IL-1b				D	D	D	D			
13	GLP-1	D	D	D	D	D	D	D			
14	IL-11	D	D		D		D	D			
15	VEGF	D	D		D			D		U	
16	シスタチンC	D	D		D			D	U	U	
17	ルイスX	D			D			D	U	U	
18	C1-INH	U		U	D			U	U		
19	MCP-3		D		D	D	D	D		U	
20	IL-13				D	D	D	D	U	U	
21	TNF-β				D	D	D	D	U	U	
22	C1s	D	D	D	D			D			

10

20

30

40

【表5】

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
	兆候										
	AVD	BVD	CvD	AvB	C1VC2	C1VA	C1VB	C1VD	C2VA	C2VB	C2vD
23	インテグリン α -10	D	D		D			D			
24	C3	U	U		U			U			
25	GLP-1R	D	D		D		D	D			
26	C1q	U	U		U			U	D		U
27	IgM	D	D		D			D			U
28	IL-16	U	U		D				U		U
29	シアリル・ルイスX	D	D		D				U		U
30	TMペプチド	D	D		D			D	U		U
31	ムチン-1	D		D	D				D		D
32	IL-2		D	D	D	D		D			
33	IFN- γ		D		D	D		D			U
34	CD40リガンド		D		D			D	U		U
35	IL-1ra		D		D			D	U		U
36	TGF- β	D	D	D	D						
37	IL-10	D	D	D				D			
38	GM-CSF	D	D	D	D			D			
39	ファクター-B	U	U	U	U			U			
40	C4	U	U	U	U			U			
41	TGF- β 1	D			D			D	U		
42	インテグリン α -11		D	D	D			D			
43	IL-8				D	D		D	D		
44	MCP-4				D				U	U	U
45	LDL(1)	D	D	D							
46	TNF- β (1)	D	D	D							
47	IL-7	D			D			D			
48	エオタキシン		D		D			D			
49	Rantes				D			D			U
50	β -ガラクトシダーゼ				D			D			U

【0143】

10

20

30

40

【表 6】

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
	兆候										
	AvD	BvD	CvD	AvB	C1vC2	C1vA	C1vB	C1vD	C2vA	C2vB	C2vD
51					D				U	U	
52									U	U	U
53	U	U									
54	D								U		
55		D	D								
56		U	U								
57		D						D			
58		U								U	
59					D			D			
60					D			D			
61	D										
62	U										
63		D									
64		U									
65					D						
66					D						
67										U	

10

20

30

40

【表 7】

表 3 - 研究に含まれた患者試料の臨床研究室パラメータ

群	試料数	tPSA (ng/ml)	%f PSA (遊離/総)
A	20	< 0.70	n/a ^{a)}
B	20	2.1 - 8.0	≥ 27.9 %
C	20	4 - 10	≤ 12.6 %
D	20	24.6 - 724	n/a ^{a)}

^{a)} n/a = 適用なし

10

【 0 1 4 5 】

【表 8】

表 4 - マイクロアレイによって解析した血漿バイオマーカーの要約

抗原 (クローン数)	抗原 (クローン数)
アンジオモチン (2)	IL-6 (4)**
アポリポタンパク質 A1 (3)	IL-7 (2)
β-ガラクトシダーゼ (1)	IL-8 (3)*/**
バートン・チロシン・キナーゼ BTK (1)	IL-9 (3)
C1 エステラーゼ阻害剤 (4)	IL-10 (3)**
C1q (1)**	IL-11 (3)
C1s (1)	IL-12 (4)**
C3 (6)**	IL-13 (3)**
C4 (4)**	IL-16 (3)
C5 (3)**	IL-18 (3)
CD40 (4)	インテグリン α-10 (1)
CD40 リガンド (1)	インテグリン α-11 (1)
コレラ毒素サブユニット B (対照) (1)	LDL (2)
シスタチン C (4)	レプチン (1)
ジゴキシシン (1)	ルイス ^x (2)
エオタキシシン (3)	ルイス ^y (1)
ファクター B (4)**	MCP-1 (8)**
GLP-1 (1)	MCP-3 (3)
GLP-1-R (1)	MCP-4 (3)
GM-CSF (3)	ムチン-1 (6)
HLA-DR (1)	プロカセプシン W (1)
ICAM (1)	プロペルジン (1)**
IFN-γ (3)	PSA (1)
IgM (4)	Rantes (3)
IL-1α (3)**	シアリル・ルイス ^x (1)
IL-1β (3)	TGF-β1 (3)
IL-1-ra (3)	Tm ペプチド (1)
IL-2 (3)	TNF-α (3)*
IL-3 (3)	TNF-β (4)**
IL-4 (4)**	チロシン-タンパク質キナーゼ JAK3 (1)
IL-5 (3)**	VEGF (4)**

* MSD によって決定した抗体特異性。

** ELISA、MSD、タンパク質アッセイ、ブロッッキング/スパイクング実験
および/または質量分析によって先に検証した抗体特異性。

20

30

40

【実施例】

【 0 1 4 6 】

イントロダクション

血中の前立腺特異的抗原 (PSA) を使用した前立腺がん (PC) の早期検出が、スク

50

リンされていない男性間で、PC - 死を減少させる。しかしながら、一般に使用されるカットオフでの、PSAの特異性が適度であるため、穏やかに上昇するPSAを有する男性間で、増強したリスク分類に寄与しているさらなるバイオマーカーに対する差し迫った必要性が存在する。本研究では、組換え抗体マイクロアレイを、ルーチンのPSA - 測定からの80個の血漿試料のタンパク質発現プロファイリングのために適用し、総および%遊離PSAのレベルに基づいて、推測的に4つのリスク群に分けた。結果は、血漿タンパク質プロファイルが、PC (悪性バイオマーカーサイン) を正確に示すこと、および最も重要なことに、生化学的に定義されたPCリスク群と、中～高相関を示したことを、同定可能であることを実証した。とりわけ、データはまた、推測的に異質であると公知の、中程度範囲PSAと低%遊離PSAを有するリスク群がさらに、それぞれ最も低いおよび最も高いリスク群とより共通点のある、2つの亜群に層別化可能であったことを暗示した。結論として、この概念実証研究において、本発明者らはしたがって、PCのリスク群に関連した、血漿タンパク質バイオマーカーサインが、アフィニティプロテオミクスを使用して、未精製血漿試料から同定可能であったことを示した。本アプローチは、より長期の視点において、PC患者の改善されたリスク分類のための新規の機会を提供可能であった。

10

【0147】

材料と方法

臨床試料

本発明者らは、Dept. of Clinical Chemistry, Skane University Hospital, Malmö, Swedenでの、日常的に実施されたPSA試験を参照して、50～70歳の80人の男性からの、非特定化EDTA抗凝固血液試料を使用した。臨床情報または患者同定子は、これらの試料に対して保持されておらず、試料を使用まで-80℃にて保存した(表3)。遊離およびtPSAのレベルを、WHO96/670 (PSA - WHO) およびWHO68/668 (遊離PSA - WHO) 較正器に対して較正した、二重標識DELFLIA Prostatatus (C) 総/遊離PSA - アッセイ (Perkin - Elmer, Turku, Finland) を使用して決定した。検出可能範囲は、tPSAに対して0.10～250 ng/ml、遊離PSAに対して0.04～250 ng/mlであった。tPSAを測定することに対する変化係数(CV)は、tPSAに対して10.6%、遊離PSAに対して7.3%であった。試料を、%遊離および総PSAのレベルに基づいて4つの群に分けた。A (n=20) はtPSA 0.70 ng/mlを有した; B (n=20) は、%fPSA 27.9%で2.1～8.0 ng/mlのtPSAを有した; C (n=20) は、%fPSA 12.6%で5.0～10.3 ng/mlのtPSAを有した; およびD (n=20) は、24.6～72.4 ng/mlのtPSAを有した。非特定化試料のこれらの4群は、非常に異なったPC診断または結果のリスクのカテゴリーを反映し、群Aは、意義のあるPCの非常に低い長期リスクを有し、群Bは、前立腺疾患の中程度増加リスクを有するが、臨床的に意義のあるPCの可能性は低く、群Cは、PCの重度の増加リスクを有し、群Dは、臨床的に意義のあるまたは進行ステージのPCの非常に高リスクを有する[38～41]。従った手順は、1975のHelsinki Declarationによった。

20

30

40

【0148】

血漿試料の標識

EDTA抗凝固血漿試料を、1つのマイナーな調整を加えて、血清プロテオームに対して、先に最適化されたプロトコル[28、29]にしたがって標識した。血漿試料を、凝固することからの防ぐために、EDTAを、プロトコルを通して使用したPBS緩衝液に、4 mMの最終濃度まで加えた。簡単には、試料を、16000 × gにて20分間、4にて遠心し、5 μlの試料をついで、45回、4 mM EDTA PBS中に希釈し、約2 mg/mlの総タンパク質濃度を得た。希釈試料を、0.6 mM EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) とともに、2時間氷上でインキュベートし、その後未反応ビオチンを、4 mM ED

50

TA - PBS に対して、72時間4 にて透析することによって除去した。最後に、試料を分液し、マイクロアレイ実験での使用の前に -20 で保存した。

【0149】

scFvの生成と精製

主に免疫制御に關与する62つの異なる解析物に対して指向する162個のヒト組換えscFv抗体断片を、n-CoDeRライブラリー[42]から選択し、Bioinvent International AB(157個のscFvクローン; Lund, Sweden)およびM. Ohlin博士(5つのムチン-1特異的クローン、Dept. of Immunotechnology, Lund University, Lund, Sweden)より好意に提供された(サポート情報表3)。これらのファージディスプレイ誘導scFv抗体の特異性、アフィニティ(1~10nM範囲内)およびオンチップ機能性を、(i)嚴重ファージディスプレイ選別プロトコル[42]、(ii)多重クローン(4)/標的解析物および(iii)マイクロアレイ適用に対して適合した分子デザイン[26、27]を使用して確かにした。さらに、種々の抗体の特異性/反応性パターンは、十分に特徴付けられた血漿試料と、ELISA、Meso Scale Discovery(MSD)、サイトメトリビーズアレイ(CBA)および質量分析(MS)のような直交法を用いて、ならびにスパイクングおよびブロッキング実験を使用しすでに確認されてきた(サポート情報表3)[31、33、34、36]。全てのscFvを、100ml大腸菌培養液中で生成し、Ni²⁺-NTAアガロース(Qiagen, Hilden, Germany)上のアフィニティークロマトグラフィーを使用して、発現上清から精製した。結合した分子を、250mMイミダゾール(Saveen Werner, Malmo, Sweden)にて溶出し、PBSに対して透析し、ついで、マイクロアレイ実験にて、使用の前に4 にて保存した。scFvの完全性と純度を、10% SDS-PAGE(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)によって評価した。タンパク質濃度を、280nmでの吸収を測定することによって決定した。

【0150】

抗体マイクロアレイの生成と処理

簡単に、scFvマイクロアレイを、被接触ディスプレイ(SciFlex arrayer S11, Sciencion, Berlin, Germany)を使用して生成し、先に最適化されたセットアップにしたがって処理した[28、29]。合計において、180個のscFvと対照を、8複製にて、Blank Polymer Maxisorpスライド(NUNC A/S, Roskilde, Denmark)上に、0.05~0.4mg/mlのscFv濃度にて、各位置に一滴(300pL)で、アレイした。180個のプローブを、それぞれ60列を含む3つのカラム内にアレイした(図1A)。AlexaFlour-647標識ストレプトアビジン(10ug/ml)を陽性対照としてプリントし、プリンティング緩衝液(PBS)を陰性対照として含んだ。プリンティングの後、スライドを乾燥させ、PBS中5%(w/v)無脂肪牛乳(Semper AB, Sundbyberg, Sweden)中で、o/nでブロックした。スライドをついで、Protein Array Workstation(Perkin Elmer Life & Analytical Sciences, Wellesley, MA, USA)中に配置し、PBS中0.5%(w/v)Tween-20(PBS-T)で、4分間洗浄した。次に、1%(w/v)無脂肪牛乳粉末と1%(v/v)Tween-20(PBS-MT)中1:2希釈した70μlの標識試料を注射し、60分間攪拌しながらインキュベートした。第2の洗浄後、アレイを、PBS-MT中350μlの1μg/ml Alexa-647コンジュゲートストレプトアビジンとともに60分間インキュベートした。洗浄後、アレイを、窒素気体流下乾燥させ、5つの異なるスキャナ設定(50%PMTゲインおよび70%レーザー出力(50/70)、70/70、80/80、80/90および90/90)を使用して、共焦点マイクロアレイスキャナ(ScanArray Express, Perkin Elmer Life & Analytical Sciences)にて、5μm解析度でスキャンした。シグナル強度を、Sc

anArray Expressソフトウェア・バージョン4.0 (Perkin Elmer Life & Analytical Sciences) を使用して定量化した。局所バックグラウンドを差し引き、任意の潜在的局所欠陥に対して補償するために、2つの最も高い、および最も低い複製を自動的に除外した。提示したシグナル強度は、残りの4つの複製スポットに対する平均値を提示している。不飽和スポットのみが、解析のために考慮された。

【0151】

マイクロアレイデータ標準化

データ組のチップ間標準化を、DNAマイクロアレイに対して開発された標準化と類似の、半グローバル標準化アプローチ [32、33] を使用して実施した。変化係数 (CV) をまず、各解析物に対して計算し、ランク付けした。全ての試料にわたり、最も低いCV - 値を表示した15パーセントの解析物を同定し、24個の解析物が相当し、各試料に対して、チップ間標準化因子を計算するために使用した。標準化因子 N_i を、式 $N_i = S_i / \mu$ によって計算し、式中 S_i は各試料に対して、24個の解析物に対するシグナル強度の合計であり、 i は、全ての試料にわたり平均化した、24個の解析物に対するシグナル強度の合計である。1つの試料から生成した各データ組を、標準化因子 N_i で割った。シグナル強度の \log_2 値をさらなる解析のために使用した。

【0152】

データ解析

80個の患者試料を、tPSAと%fPSAの値に基づいて、4つの群 ($n = 20$) に分けた。初期分類解析のために、各4つのリスク群を、トレーニング組 ($n = 15$) および試験組 ($n = 5$) に分けた。試料を分類するために、本発明者らは、サポートベクターマシン (SVM)、Rにおける教師あり学習法を使用した [43]。教師付き分類を、直線カーネルを使用して実施し、制約のコストを1に設定し、R機能SVMにおけるデフォルト値であり、オーバーフィッティングを避けるために、それを調節するための試みは実施しなかった。SVMモデルを、トレーニング組を使用してトレーニングし、ついで凍結し、試験組に適用した。データのフィルター処理は、SVMのトレーニングの前に実施せず、すなわちアレイ上の全ての抗体からのデータを、解析に含めた。さらに、受信者動作特性 (ROC) 曲線を、SVM決定値を使用して構築し、曲線下面積 (AUC) を計算した。Cluster and Treeview [44] 中の教師なし階層的クラスタリングを使用して、C群を、C1 ($n = 10$) とC2 ($n = 10$) と記される2つの亜群に分けることができた。より小さな試料数のために、トレーニングと試験組への分離は、この場合不可能であり、SVMをしたがって、リーブ・ワン・アウト交差検証手順を用いてトレーニングした。有意にアップまたはダウンレギュレートされた血漿タンパク質 ($p < 0.05$) を、相対タンパク質レベルに基づいて定義し、ウイルコクソンの符号付き検定を使用して同定した。試料を、主要成分解析 (PC) ソフトウェアプログラム (Qlucore Omics Explorer, Lund, Sweden) および/またはCluster and Treeviewを使用して可視化した。

【0153】

検証実験

抗体マイクロアレイ結果を検証することの試みにおいて、ヒトTh1/Th2 10-plex MSA (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) アッセイを、全ての80個のEDTA - 血漿試料に対して実行した。MSD 96 - プレートの各ウェルを、空間的に異なる電極スポットにて、IFN - α 、IL - 1 α 、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 8、IL - 10、IL - 12 p70、IL - 13 およびTNF - α に対する抗体で、前機能化した。アッセイを、製造業者によって提供されたプロトコルにしたがって実行し、電気化学発光に基づくリードアウトを、MSD SECTOR (登録商標) 器具にて実施した。検出の制限を、標準曲線中のゼロポイントにわたる、標準偏差の2.5倍シグナルとして定義した。

【0154】

結果

本研究において、本発明者らは、本発明者らの組織内で開発した組換え抗体マイクロアッセイを使用して、PCを有する種々のレベルのリスクでの、80人の患者からの非画分化、ピオチン化EDTA-血漿試料の、タンパク質発現プロファイリングを実施した。試料を推論的に、異なるカテゴリーのPC診断または結果のリスクを反映している、tPSAおよび%fPSAに基づいた、4つのリスク群に分けた(表3)。

【0155】

scFvマイクロアレイの評価

代表的マイクロアレイイメージを、図1Aにて示し、これは、同質スポット形態学、高シグナル対ノイズ比、および動的シグナル強度を得たことを示している。全ての80個の試料を首尾良くプロファイルし、したがって、全ての80個の試料からのアレイデータを、続く統計学的解析に使用可能であった。アッセイ内再現性を、スポット対スポット検証を解析することによって査定し、0.95の決定の平均係数(R²)をもたらした(図1B)。アッセイ内再現性、すなわちアレイ対アレイ変化を、独立したアレイ上の単一試料を解析することによって評価し、0.96のR²-値が得られた(図1C)。

10

【0156】

リスク群の分類

まず、本発明者らは、A~Dと記した4つの前立腺がんリスク群の、焦点をあてた(62個の解析物)血漿プロテオームプロファイルを決して(表3)、群Aは最も低いリスクを提示し、群Dは最も高いリスクを提示する。ウイルコクソンの符号付き検定を使用して、3~44個の示差的に発現した(p<0.05)血漿解析物を同定し、図2A中のヒートマップとして示す。データは、3つの解析物のみが、2つの最も低いリスク群AおよびBの間で示差的に発現したことを示した。したがって、臨床的観点から推定可能であるように、データは、2つの最も低いリスク群間で小さな差違のみを暗示した。対照的に、37個、44個および30個の脱制御解析物が、最も高いリスク群Dに対して、群A、BまたはCに関して観察され、これは、大きい(より大きい)差にて示唆している。より詳細には、種々の補体タンパク質(例えばC3、C4、C1q、ファクターBおよびプロペルジン)が、高リスク群Dにてダウンレギュレートされることが見い出され、一方でアップレギュレートされた解析物は、TH1(例えばIL-2、IL-3およびINF-a)とTH2(例えばIL-4、IL-10)サイトカイン両方の複雑なパターンを提示した。最も重要なことに、群A(非常に低いPC-リスク)対群D(PCの臨床的に意義のあるまたは進行したステージの非常に高いリスク)を区別しているバイオマーカーサインが、PCを特定している悪性バイオマーカーサインとして見ることができた。

20

30

【0157】

次に、本発明者らは、観察されたタンパク質発現プロファイルに基づいた、4つのリスク群(A~D)を分類するための、アレイプラットフォームの能力を評価した。本目的を達成するために、各患者群を、トレーニング組(試料の75%)と試験組(試料の25%)に分けた(図2B)。したがって、SVMモデルを、トレーニング組でトレーニングし、次いで独立した試験組に適用した。結果は、リスク群が、異なる正確さで区別可能であることを示し、群BおよびDは、0.68のAUCを提示し、群AおよびBは、0.84のAUCを提示し(3つの解析物のみに基づく)、群AおよびDは、0.72のAUCを提示した(図2C)。したがって、データは、悪性サインが、群A(非常に低リスク)対群D(PCの臨床的に意義のあるまたは進行ステージの非常に高リスク)をよく区別するために使用可能であることを示した(図2Aおよび2C参照)。対照的に、C群は、3つの他のリスク群のいずれかからも区別できなかった(全ての場合でAUC=0.5)。この文脈において、全てが生検試験に対して選別されるけれども、C群が、その25~50%のみが実際にPCを有した、異種患者群(中程度範囲tPSA、低%遊離PSA)を表すことに留意すべきである。したがって、この異種患者群の層別化は実質的に、PCを発症しているより高い、またはより低い患者を同定するための、鍵となる手段でありうる。

40

【0158】

50

リスク群Cの層別化

Cリスク群をさらに層別化可能であったかどうか調査するために、本発明者らは、フィルター処理なしのデータに基づいて、すなわち、アレイ上に含まれたすべての抗体からのデータを使用して、教師なし階層的クラスタリングを実施した。結果は、Cリスク群が実際に、C1およびC2と記す、2つの異なる亜群に層別化可能であったことを示した(図3A)。同様に、主要要素解析(PCA)を使用して、Cコホートの明確な亜分割も観察された(図3B)。さらに、49個の有意に示差的に($p < 0.05$)発現した血漿解析物を、C1対C2に対して観察した(図3C)。より詳細には、3つの補体タンパク質が、C1にてアップレギュレートされ(C1q、ファクターBおよびC4)、一方でC1において、示差的に発現したタンパク質がダウンレギュレートされたままである。解析物の後者群には、多数のサイトカイン(例えばIL-6およびIL-4)、補体タンパク質(例えばC1-INHおよびC1s)、ならびに細胞表面タンパク質(例えばICAM、HLA-DR、ムチン-1およびCD-40)が含まれた。合わせると、データは、異質リスク群Cが、多数の脱制御解析物にて、2つの異なる亜群、C1およびC2に層別化可能であったことを示した。

10

【0159】

アレイデータを検証するために、独立した10-plexサイトカインサンドイッチ抗体マイクロアレイ(MSD)を適用した(図3Dおよび3E)。C1対C2にてTNF-(図3D)およびIL-8(IL-8)(図3E)の観察されたダウンレギュレーションを、MSDデータによって検証可能であった。

20

【0160】

亜群C1およびC2のリスク分類

リスク群Cの層別化された再分割の生物学的インパクトを査定するために、亜群C1およびC2のタンパク質発現プロファイルを、他の3つの本来のリスク群A、BおよびDのものと比較した。C1の場合、結果は、C1が、リスク群Dとよく区別される($AUC = 0.82$)が、リスク群AおよびBからは区別されない(両方の場合で $AUC = 0.5$)ことを示した(図4A)。さらに、47個の示差的に発現した解析物が、C1対Dに対して観察されたが、C1対AおよびBではそれぞれ、16個および15個のみであった(図4B)。前者の場合、アップレギュレートされた補体タンパク質(例えばC1q、C3およびファクターB)と、ダウンレギュレートされたサイトカイン(例えばTGF- α 1、IL-1ra、IL-6およびMCP-1)および細胞表面マーカー(例えばICAM、CD40およびルイスX)のパターンが、C1対Dにて観察された。

30

【0161】

対照的に、結果は、C2が、リスク群A($AUC = 0.72$)およびB($AUC = 0.75$)両方からからよく区別されるが、リスク群D($AUC = 0.57$)からは区別されないことを示した(図4C)。この場合、22個および28個の脱制御解析物が、C2対AおよびBでそれぞれ観察されたが、C2対Dに対してはたった5個であった(図4D)。2つのダウンレギュレートされた解析物のみ(C1qおよびIL-4)が、C2対Aで観察される一方で、アップレギュレートされたサイトカイン(例えばIL-1ra、MCP-1およびIL-6)と細胞表面マーカー(例えばCD40、ルイスXおよびシアリル・ルイスX)のパターンが、C2対AおよびB両方で観察された。一緒にすると、結果は、C1が、最も低リスク群AおよびBにより類似であり、一方でC2は、最も高いリスク群Dにより高い類似性を提示し、これは、C1群が、低リスク患者を表し、C2群が高リスク患者を表すことを示唆する。

40

【0162】

最後に、生物学的関連性をさらに強調するために、本発明者らは、リスク群A(非常に低リスク)対リスク群D(PCの臨床的に意義のあるまたは進行したステージの非常に高リスク)を区別している悪性サイン(33個のバイオマーカー)(図2A)の、以上のサインの相当するマーカーの発現レベル(図4E)との重なりを比較した。データは、悪性バイオマーカーサインの有意な部分がまた、C1対C2(33個の内27バイオマーカー

50

)、およびC 1対D (3 3個の内2 9バイオマーカー) の場合に示差的に発現された一方で、A対C 2およびB対C 2を区別しているサインとの重なりが、有意により小さいことを示した。したがって、データはさらに、悪性バイオマーカーサインの生物学的関連性が、PCを特定していることをさらに示唆した。

【0163】

議論

血液血漿は最小限に侵襲的であり、PCの早期検出とリスク分離のためのバイオマーカーの理想的な供給源であろう臨床的によく確立された試料フォーマットである。その結果として、多数の大規模プロテオミクス効果において、本目的のために査定されてもきた[1 9、2 0]。しかしながら、タンパク質数およびダイナミックレンジに関して、血漿試料の固有の複雑性により、非画分化試料の古典的プロテオミクス解析は、PCを分類するために有用でありそうにないということが議論されてきた[2 1]。前画分化が、試料の複雑性を減少させるけれども、同時に、湾曲されたタンパク質収率/回収、ならびに再現性および感度に関する重大な問題に関連する[2 2、2 3]。この文脈において、本発明者らは最近、組換え抗体マイクロアレイによって表される、アフィニティプロテオミクスが、未精製プロテオーム中の、高くおよび低く不足している解析物をプロファイルするために使用可能であることを示した[2 6、2 7]。先に、単一血清マーカートロンボスポンジン- 1 (T S P - 1) が、抗体マイクロアレイを使用して、良性および悪性前立腺疾患間を区別することが可能であることを示した[4 5]。本概念実証試験において、本発明者らは、PCのリスク群に関連した、第1の多重化候補血漿タンパク質バイオマーカーサインを解釈するために、未精製血漿試料を標的としているアフィニティプロテオミクスを使用した。したがって、PCの組換え抗体マイクロアレイに基づく解析が、次世代のPC- 関連バイオマーカーを定義することに対する、潜在的経路を実証した。

【0164】

血液血漿プロテオームは、古典的血漿タンパク質と、組織漏出タンパク質両方からなる。ヒト免疫系の、細菌感染から腫瘍の増殖までの範囲の、体のホメオスタシスにおける微小な変化でさえ感知する、ヒト免疫系の固有の能力が、疾患の遠隔および早期センサとして、免疫系を使用する特有の可能性を提供する[4 6]。実際、とりわけ、腫瘍発達における重要な因子として免疫学的監視を示している最近の研究[4 8]により、イムノシグネチャリングは、明らかな興味を獲得してきた[4 7]。この目的を達成するために、本発明者らは、主として免疫調節解析物を標的としている組換え抗体マイクロアレイを設計し、適用した[2 6、2 7]。先に、本発明者らは、がん診断に対する本発明者らのアレイデザイン[3 2、3 3]、証拠に基づく治療選択[3 5]、ならびに乳がん再発に対するリスクの予測[3 7]の潜在力を明示した。本探索研究において、本発明者らは、適用の範囲を拡張し、2つの最も低い対最も高いリスク群を明確に区別する、PCにおけるリスク群層別化のためのその潜在的使用を示唆した。

【0165】

潜在的PC患者のリスク分類は、血清PSAアッセイ(t P S Aおよび%遊離P S A) [4 9]、2、3のリスク分類モデルの1つ[3、5 0、5 1]を使用して、臨床にて現在実施可能である。本アプローチが、多くの腫瘍の検出を可能にする一方で、悪性疾患に対する低い特異性が、不必要な生検試験にかけられている一部の患者をもたらす[3]。この数は、臨床家が、リスク分類のためのより適正なツールを利用可能になった場合に、有意に減少可能であった。特に、中程度範囲t P S A (4 ~ 1 0 n g / m l) と低% f P S Aを有する患者群が、PCと良性前立腺過形成の混合を含む、異種であると知られている[7、4 9]。4つの先に決定されたリスク群を分類する本発明者らの取り組みにおいて、結果は、実際に、中程度範囲t P S Aと低% f P S Aを有する患者群(群C) が、他の3つのリスク群のいずれかから区別不可能であったことを示した。したがって、本発明者らのデータはさらに、非常に異種の患者群である、群Cの現在の見解を支持した。

【0166】

しかしながら、本発明者らのデータは、C群が、現在の文献から予測され[2、3、5

10

20

30

40

50

、49]、それぞれ2つの最も低いおよび最も高い本来のリスク群とより共通点があるような、2つの異なる亜群C1およびC2に分けることができたことをむしろ暗示した。がん患者の個別化処置を目的とする時に、異種患者群を、より高い、およびより低い、特定のがんを有している(発症している)リスクの、より正確な亜群に層別化する能力が、有益であろう。結局、これは、PCがん患者を管理するための新規の機会を提供し得た。しかしながら、本探索研究は、含まれる患者の完全な臨床文書が入手されておらず、観察された候補バイオマーカーサインは、十分に特徴付けられた患者のより多くの、独立したコホートを対象とした、フォローアップ研究にて適切に検証されるであろう。とりわけ、初期実証のために使用された直交方法(MSD)にて検出可能であった2つのサイトカイン、IL-6とTNF-aが、C1対C2の本発明者らの区別化を支持した。

10

【0167】

より詳細に候補バイオマーカーサインを試験する時に、PCの高および低リスクを反映するとすでに公知の新規ならびに多数の生物学的に関連した解析物が観察された。簡単に、TGF-a1は、PCに関連すると示されてきており、例えばPCモデルにおける細胞増殖、より高い腫瘍グレードおよび転移を促進し、結果、暫定的なバイオマーカーとして提案された[3、4、52]。したがって、本発明者らは、TGF-a1が、2つの最も低リスク群AおよびB、対最も高いリスク群Dにおいてダウンレギュレートされると発見した。加えて、AおよびB対C2(高リスク)、C1(低リスク)対D、ならびにC1対C2においてもダウンレギュレートされた。IL-6の場合、このサイトカインはまた、PCに対する潜在的バイオマーカーとして示唆された[3、4]。本発明者らのデータは、IL-6が、それぞれ、低リスク群(A、BまたはC1)対高リスク群(DまたはC2)の種々の比較においてダウンレギュレートされたことを示した。さらに、IL-1raおよびMCP-1のような、低リスク群にてダウンレギュレートされる[53、54]と公知の他のサイトカインがまた、低リスク群(A、BまたはC1)対高リスク群(DまたはC2)の異なる比較において、ダウンレギュレートされると発見され、これはさらに、本発明者らの報告した観察を支持している。さらに、ルイスXが、低リスク群においてダウンレギュレートされるという観察が、先の結果と一致し、これは、前立腺がんでの予後パラメータとしてルイスXを示している[55]。これらの観察がまた、PCを特定するために観察された、候補悪性バイオマーカーサインを支持したことに留意されたい。今日まで、補体タンパク質が、PCの文脈において明らかに報告されてこなかった。本発明者らのデータは、C1q、C3、C4、プロベルジンおよび/またはC1-INHのような種々の補体タンパク質の異なる組合せが、それぞれ種々の低リスク群対高リスク群においてアップレギュレートされたことを示した。臨床試験において先には報告されなかったが、C1qが、前立腺がん細胞株において、保護的な役割を提示することが示された[56]。

20

30

【0168】

まとめると、本発明者らは、アフィニティプロテオミクスを使用して、PCリスク群ならびにPCに関連した候補血漿バイオマーカーサインを説明した。独立した患者コホートを標的として、結果は、臨床パラメータに基づいて推論的に定義された従来のリスク群が、層別化、またさらに再層別化可能であることを示し、潜在的に、新規の改善されたPCリスク群を概説している。

40

【0169】

参考文献

[1] Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., et al., Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010, 127, 2893-2917.

[2] Parekh, D. J., Ankerst, D. P., Troyer, D., Srivastava, S., Thompson, I. M., Biomarkers for prostate cancer detection. *J Urol* 2007, 178, 2252-2259.

[3] Shariat, S. F., Semjonow, A., Lilja, H., Savage, C., et al., Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol* 2011, 50 Suppl 1, 61-75

50

- [4] Steuber, T., O'Brien, M. F., Lilja, H., Serum markers for prostate cancer: a rational approach to the literature. *Eur Urol* 2008, 54, 31-40.
- [5] Catalona, W. J., Partin, A. W., Slawin, K. M., Brawer, M. K., et al., Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *Jama* 1998, 279, 1542-1547.
- [6] Bjork, T., Lilja, H., Christensson, A., The prognostic value of different forms of prostate specific antigen and their ratios in patients with prostate cancer. *BJU Int* 1999, 84, 1021-1027. 10
- [7] Gann, P. H., Ma, J., Catalona, W. J., Stampfer, M. J., Strategies combining total and percent free prostate specific antigen for detecting prostate cancer: a prospective evaluation. *J Urol* 2002, 167, 2427-2434.
- [8] Cancer Diagnostic Testing World Markets, TriMark Publications, LLC 2008.
- [9] Vickers, A. J., Cronin, A. M., Aus, G., Pihl, C. G., et al., A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Goteborg, Sweden. *BMC Med* 2008, 6, 19.
- [10] Vickers, A. J., Gupta, A., Savage, C. J., Pettersson, K., et al., A panel of kallikrein marker predicts prostate cancer in a large, population-based cohort followed for 15 years without screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011, 20, 255-261. 20
- [11] Jansen, F. H., van Schaik, R. H., Kurstjens, J., Horninger, W., et al., Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection. *Eur Urol* 2010, 57, 921-927.
- [12] Stephan, C., Jung, K., Lein, M., Sinha, P., et al., Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9, 1133-1147.
- [13] Becker, C., Piironen, T., Pettersson, K., Bjork, T., et al., Discrimination of men with prostate cancer from those with benign disease by measurements of human glandular kallikrein 2 (HK2) in serum. *J Urol* 2000, 163, 311-316. 30
- [14] Piironen, T., Haese, A., Huland, H., Steuber, T., et al., Enhanced discrimination of benign from malignant prostatic disease by selective measurements of cleaved forms of urokinase receptor in serum. *Clin Chem* 2006, 52, 838-844.
- [15] Thompson, T. C., Truong, L. D., Timme, T. L., Kadmon, D., et al., Transforming growth factor beta 1 as a biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem Suppl* 1992, 16H, 54-61.
- [16] Shariat, S. F., Kattan, M. W., Traxel, E., Andrews, B., et al., Association of pre- and postoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 2004, 10, 1992-1999. 40
- [17] Hobisch, A., Eder, I. E., Putz, T., Horninger, W., et al., Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res* 1998, 58, 4640-4645.
- [18] Nakashima, J., Tachibana, M., Horiguchi, Y., Oya, M., et al., Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 2702-2706.
- [19] Matharoo-Ball, B., Ball, G., Rees, R., Clinical proteomics: discovery of cancer biomarkers using mass spectrometry and bioinformatics approaches--a pro 50

state cancer perspective. *Vaccine* 2007, 25 Suppl 2, B110-121.

[20] McLerran, D., Grizzle, W. E., Feng, Z., Thompson, I. M., et al., SELDI-TOF MS whole serum proteomic profiling with IMAC surface does not reliably detect prostate cancer. *Clin Chem* 2008, 54, 53-60.

[21] Goo, Y. A., Goodlett, D. R., Advances in proteomic prostate cancer biomarker discovery. *J Proteomics* 2010, 73, 1839-1850.

[22] Hanash, S., Disease proteomics. *Nature* 2003, 422, 226-232.

[23] Hu, S., Loo, J. A., Wong, D. T., Human body fluid proteome analysis. *Proteomics* 2006, 6, 6326-6353.

[24] Ramachandran, N., Srivastava, S., Labaer, J., Applications of protein microarrays for biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl* 2008, 2, 1444-1459. 10

[25] Haab, B. B., Applications of antibody array platforms. *Curr Opin Biotechnol* 2006, 17, 415-421.

[26] Borrebaeck, C. A., Wingren, C., Design of high-density antibody microarrays for disease proteomics: key technological issues. *J Proteomics* 2009, 72, 928-935.

[27] Borrebaeck, C. A., Wingren, C., Recombinant antibodies for the generation of antibody arrays. *Methods Mol Biol* 2011, 785, 247-262.

[28] Ingvarsson, J., Larsson, A., Sjöholm, A. G., Truedsson, L., et al., Design of recombinant antibody microarrays for serum protein profiling: targeting of complement proteins. *J Proteome Res* 2007, 6, 3527-3536. 20

[29] Wingren, C., Ingvarsson, J., Dexlin, L., Szul, D., Borrebaeck, C. A., Design of recombinant antibody microarrays for complex proteome analysis: choice of sample labeling-tag and solid support. *Proteomics* 2007, 7, 3055-3065.

[30] Dexlin-Mellby, L., Sandstrom, A., Antberg, L., Gunnarsson, J., et al., Design of recombinant antibody microarrays for membrane protein profiling of cell lysates and tissue extracts. *Proteomics* 2011, 11, 1550-1554.

[31] Kristensson, M., Olsson K., Carlson J., Wullt B., Sturfelt G., Borrebaeck C.A. and Wingren C., Design of Recombinant Antibody Microarrays for Urinary Proteomics. *Proteomics - Clinical Applications* 2012, In press. 30

[32] Carlsson, A., Wingren, C., Ingvarsson, J., Ellmark, P., et al., Serum proteome profiling of metastatic breast cancer using recombinant antibody microarrays. *Eur J Cancer* 2008, 44, 472-480.

[33] Ingvarsson, J., Wingren, C., Carlsson, A., Ellmark, P., et al., Detection of pancreatic cancer using antibody microarray-based serum protein profiling. *Proteomics* 2008, 8, 2211-2219.

[34] Dexlin-Mellby, L., Sandstrom, A., Centlow, M., Nygren, S., et al., Tissue proteome profiling of preeclamptic placenta using recombinant antibody microarrays. *Proteomics Clin Appl* 2010, 4, 794-807.

[35] Carlsson, A., Persson, O., Ingvarsson, J., Widegren, B., et al., Plasma proteome profiling reveals biomarker patterns associated with prognosis and therapy selection in glioblastoma multiforme patients. *Proteomics Clin Appl* 2010, 4, 591-602. 40

[36] Carlsson, A., Wuttge, D. M., Ingvarsson, J., Bengtsson, A. A., et al., Serum protein profiling of systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis using recombinant antibody microarrays. *Mol Cell Proteomics* 2011, 10, M110 005033.

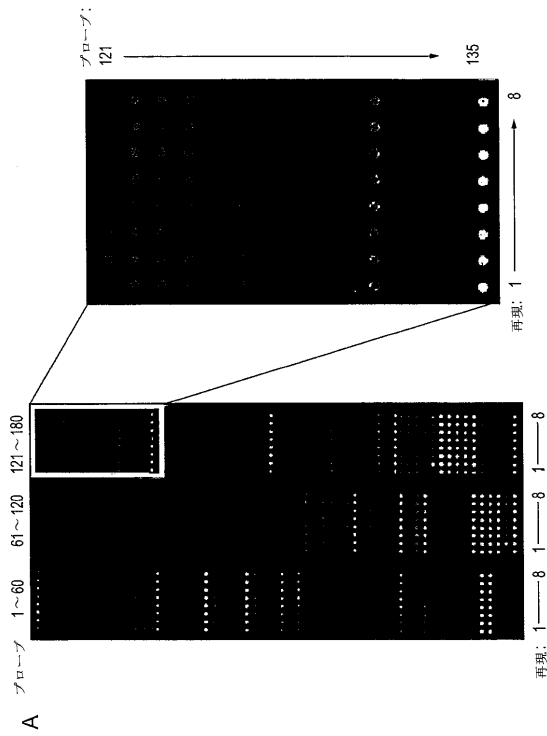
[37] Carlsson, A., Wingren, C., Kristensson, M., Rose, C., et al., Molecular serum portraits in patients with primary breast cancer predict the development of distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108, 14252-14257. 40

- [38] Lilja, H., Cronin, A. M., Dahlin, A., Manjer, J., et al., Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen at or before age 50. *Cancer* 2011, 117, 1210-1219.
- [39] Lilja, H., Ulmert, D., Vickers, A. J., Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 2008, 8, 268-278.
- [40] Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., et al., Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004, 350, 2239-2246.
- [41] Vickers, A. J., Cronin, A. M., Bjork, T., Manjer, J., et al., Prostate specific antigen concentration at age 60 and death or metastasis from prostate cancer: case-control study. *BMJ* 2010, 341, c4521. 10
- [42] Soderlind, E., Strandberg, L., Jirholt, P., Kobayashi, N., et al., Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat Biotechnol* 2000, 18, 852-856.
- [43] Ihaka R., R. G., R: A language for data analysis and graphics. *J Computational and Graphical Statistics* 1996, 5, 299-314.
- [44] Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., Botstein, D., Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95, 14863-14868. 20
- [45] Shafer, M. W., Mangold, L., Partin, A. W., Haab, B. B., Antibody array profiling reveals serum TSP-1 as a marker to distinguish benign from malignant prostatic disease. *Prostate* 2007, 67, 255-267.
- [46] Tan, E. M., Zhang, J., Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunol Rev* 2008, 222, 328-340.
- [47] Chaudhuri, D., Suriano, R., Mittelman, A., Tiwari, R. K., Targeting the immune system in cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2009, 10, 166-184.
- [48] Chow, M. T., Moller, A., Smyth, M. J., Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol* 2011.
- [49] Shariat, S. F., Karam, J. A., Margulis, V., Karakiewicz, P. I., New blood-based biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer. *BJU Int* 2008, 101, 675-683. 30
- [50] Bastian, P. J., Carter, B. H., Bjartell, A., Seitz, M., et al., Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. *Eur Urol* 2009, 55, 1321-1330.
- [51] D'Amico, A. V., Whittington, R., Malkowicz, S. B., Schultz, D., et al., Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 1998, 280, 969-974.
- [52] Reis, S. T., Pontes-Junior, J., Antunes, A. A., Sousa-Canavez, J. M., et al., Tgf-beta1 expression as a biomarker of poor prognosis in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo)* 2011, 66, 1143-1147. 40
- [53] Ricote, M., Garcia-Tunon, I., Bethencourt, F. R., Fraile, B., et al., Interleukin-1 (IL-1alpha and IL-1beta) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. *Cancer* 2004, 100, 1388-1396.
- [54] van Golen, K. L., Ying, C., Sequeira, L., Dubyk, C. W., et al., CCL2 induces prostate cancer transendothelial cell migration via activation of the small GTPase Rac. *J Cell Biochem* 2008, 104, 1587-1597.
- [55] Jorgensen, T., Berner, A., Kaalhus, O., Tveter, K. J., et al., Up-regulation of the oligosaccharide sialyl LewisX: a new prognostic parameter in metast 50

atic prostate cancer. Cancer Res 1995, 55, 1817-1819.

[56] Hong, Q., Sze, C. I., Lin, S. R., Lee, M. H., et al., Complement C1q activates tumor suppressor WWOX to induce apoptosis in prostate cancer cells. PLoS One 2009, 4, e5755.

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】

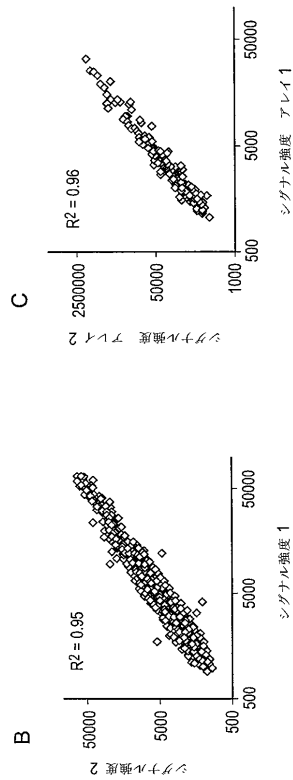
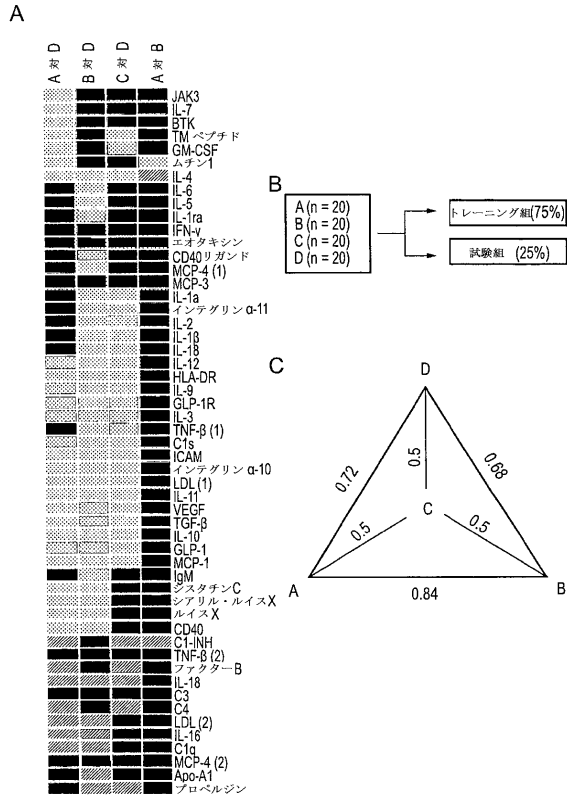
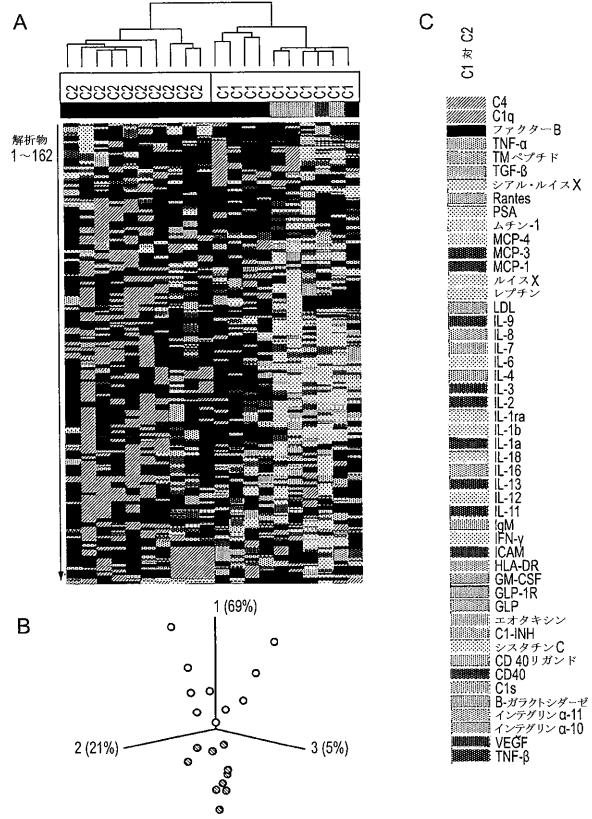


図 1 (続き)

【 図 2 】



【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】

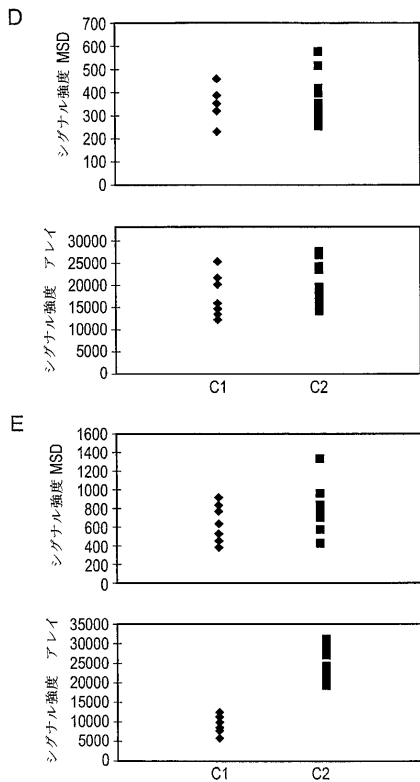
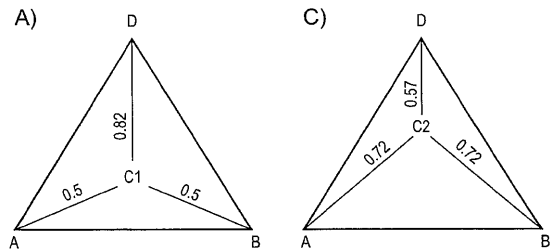


図 3 (続き)

【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】

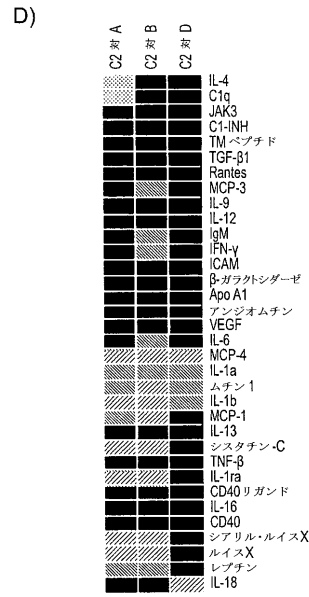
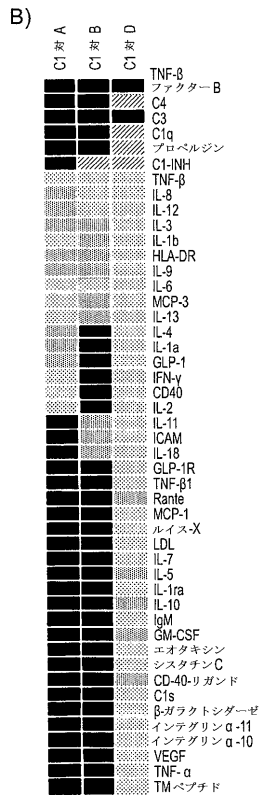


図 4 (続き)

【 図 4 - 3 】

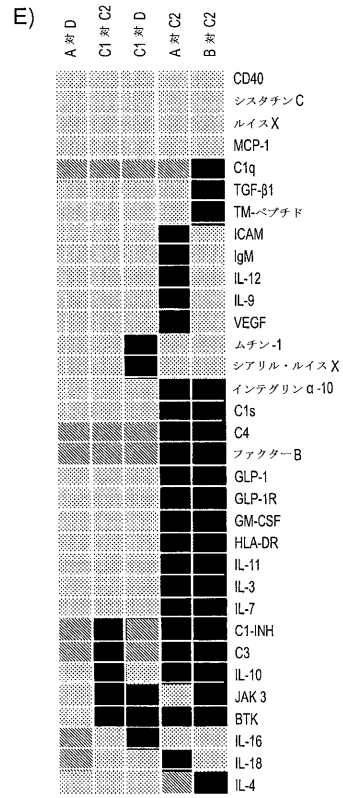


図 4 (続き)

【 配列表 】

2016519767000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/056630

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 G01N33/68 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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D. W. LIN ET AL: "Genetic Variants in the LEPR, CRY1, RNA5EL, IL4, and ARVCF Genes Are Prognostic Markers of Prostate Cancer-Specific Mortality", CANCER EPIDEMIOLOGY, BIOMARKERS & PREVENTION, vol. 20, no. 9, 16 August 2011 (2011-08-16), pages 1928-1936, XP055130156, ISSN: 1055-9965, DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0236 abstract ----- -/--	1-103, 106,107, 111
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 July 2014		Date of mailing of the international search report 17/11/2014
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 Behrens, Ralf

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/056630

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Ueda Takeshi ET AL: "Interleukin-4 in patients with prostate cancer", Anticancer research, 1 November 2005 (2005-11-01), page 4595, XP055130167, Greece Retrieved from the Internet: URL:http://ar.iiarjournals.org/content/25/6C/4595.abstract [retrieved on 2014-07-18] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-103, 106,107, 111
X	<p>WISE ET AL: "CYTOKINE VARIATIONS IN PATIENTS WITH HORMONE TREATED PROSTATE CANCER", JOURNAL OF UROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 164, no. 3, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 722-725, XP005553659, ISSN: 0022-5347, DOI: 10.1016/S0022-5347(05)67289-8 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-103, 106,107, 111
A	<p>NAKASHIMA J ET AL: "Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 6, no. 7, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 2702-2706, XP002205136, ISSN: 1078-0432 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-103, 106,107, 111
A	<p>CHRISTER WINGREN ET AL: "Design of recombinant antibody microarrays for complex proteome analysis: Choice of sample labeling-tag and solid support", PROTEOMICS, vol. 7, no. 17, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 3055-3065, XP055015544, ISSN: 1615-9853, DOI: 10.1002/pmic.200700025 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-103, 106,107, 111

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/056630

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MILLER J C ET AL: "ANTIBODY MICROARRAY PROFILING OF HUMAN PROSTATE CANCER SERA: ANTIBODY SCREENING AND IDENTIFICATION OF POTENTIAL BIOMARKERS", PROTEOMICS, WILEY - VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 3, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01) , pages 56-63, XP009018800, ISSN: 1615-9853, DOI: 10.1002/PMIC.200390009 cited in the application -----	1-103, 106,107, 111

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2014/056630**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- 1-103, 106, 107, 111(all partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2014/ 056630

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-103, 106, 107, 111(all partially)

Method of claim 1, wherein the biomarker is interleukin-4 (IL-4). Use of this biomarker according to claim 106.

2-67. claims: 1-103, 106, 107, 111(all partially)

Method of claim 1, wherein the biomarker is another biomarker selected from the list given in table 1. Use of this biomarker according to claim 106.

68-135. claims: 104, 105, 108-110, 112(all partially)

Binding agent directed towards a biomarker selected from table 1 (claim 106). Array / Kit comprising such binding agent according to claims 104, 109, 112.

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 M 1/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
	G 0 1 N 37/00 1 0 2	
	C 1 2 Q 1/68 A	
	C 1 2 M 1/00 A	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 クリステル ラーシュ ベルティル・ヴィングレン
 スウェーデン国エスエー - 2 4 7 3 2 サンドビー . セードラ . エストクラヴェーゲン 2 3
 Fターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB20 FA12
 4B063 QA13 QA19 QQ42 QQ53 QS25 QX02

专利名称(译)	用于前列腺癌的生物标志物检测的方法和阵列		
公开(公告)号	JP2016519767A	公开(公告)日	2016-07-07
申请号	JP2016505813	申请日	2014-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	伊缪诺维亚公司		
申请(专利权)人(译)	Imunovia-Akuchieboragu		
[标]发明人	カールアーネクリステルボレバエック クリステルラーシュベルティルヴィングレン		
发明人	カール アーネ クリステル・ボレバエック クリステル ラーシュ ベルティル・ヴィングレン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 C12Q1/68 C12M1/00		
CPC分类号	G01N33/57434 C07K16/18 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/243 C07K16/244 C07K16/245 C07K16/246 C07K16/249 C07K16/26 C07K16/2821 C07K16/2833 C07K16/2839 C07K16/2878 C07K16/38 C07K16/40 C07K2317/622 G01N2570/00		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/543.541.B G01N33/543.545.A G01N33/543.575 G01N33/53.U G01N33/53.M G01N37/00.102 C12Q1/68.A C12M1/00.A		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QS25 4B063/QX02		
优先权	2013005940 2013-04-02 GB		
其他公开文献	JP6674889B2 JP2016519767A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是一种用于确定个体中与前列腺癌相关的疾病状态的方法，其包括：(a) 从该个体提供待测试的样品；(b) 选自表1中所定义的组。从表1中定义的组中选择一种，包括或由其组成，通过测量一种或多种生物标志物在测试样品中的表达来确定测试样品的生物标志物签名。提供了一种方法，其中测试样品中一种或多种生物标志物的表达指示个体中一种或多种前列腺癌相关疾病状态。该方法还提供用于此类方法的阵列和试剂盒。

決定するべき試料のバイオマーカーの発現が疾患状態そのようにも提供

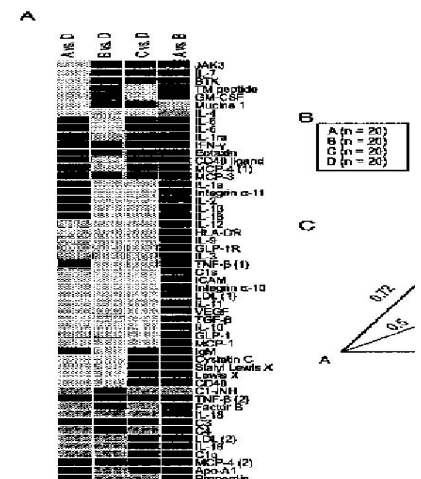


FIG. 2