

(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2017-507320

(P2017-507320A)

(43) 公表日 平成29年3月16日(2017.3.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G O 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/574	Z N A A 2 G O 4 5
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 6 3
<b>C O 7 K 16/30 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	Z 4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/30	4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-538689 (P2016-538689)  
 (86) (22) 出願日 平成26年12月12日 (2014.12.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月25日 (2016.7.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2014/053694  
 (87) 国際公開番号 W02015/087088  
 (87) 国際公開日 平成27年6月18日 (2015.6.18)  
 (31) 優先権主張番号 1322034.8  
 (32) 優先日 平成25年12月12日 (2013.12.12)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 515149328  
 アルマック・ダイアグノスティクス・リミ  
 テッド  
 A l m a c D i a g n o s t i c s L  
 i m i t e d  
 英国ビーティ63・5キューディ、クレイ  
 ガボン、シーゴー・インダストリアル・エ  
 スタイト20番、アルマック・ハウス  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌分類

## (57) 【要約】

対象において前立腺癌を特徴付けるため、および／または予後決定するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定することを含む方法を提供する。当該方法は転移の可能性を予測するために使用され得る。前立腺癌に対する処置を診断および選択するための方法、対応する処置方法も記載する。当該方法を行うためのシステム、キットおよびコンピュータプログラムも提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象において前立腺癌を特徴付けるため、および／または予後決定するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定することを含み、決定された発現レベルを使用して、前立腺癌の特性化および／または予後を提供する、方法。

10

## 【請求項 2】

SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、F3、CENPF、MYBPC1、SELE、CEBPD、およびXBP1の少なくとも1つの発現レベルを決定することを含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前立腺癌の特性化および／または予後が、再発の可能性の増加を予測すること、および／または転移の可能性の増加を予測することを含むか、当該予測することから本質的になるか、または当該予測することからなる、請求項1または2に記載の方法。

20

## 【請求項 4】

前立腺癌の特性化および／または予後が、前立腺癌が予後不良を有するか否かを決定することを含むか、当該決定することから本質的になるか、または当該決定することからなる、請求項1または2に記載の方法。

## 【請求項 5】

発現レベルを参照値とまたは1つ以上のコントロールサンプルの発現レベルと比較することを含む、前記請求項に記載の方法。

## 【請求項 6】

発現レベルを1つ以上のコントロールサンプルにおいて同じ遺伝子の発現レベルと比較する、前記請求項に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

サンプルにおいて前立腺癌細胞におけるSRSF5、PDK4、PDRG1、TRPM3、PDE4D、およびF12の少なくとも1つの発現レベルを、同じサンプルにおいて正常細胞における同じ遺伝子の発現レベルと比較する、前記請求項に記載の方法。

## 【請求項 8】

参照遺伝子の発現レベルを決定することをさらに含む、前記請求項に記載の方法。

## 【請求項 9】

CREM、ERRFI1、HJURP、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを参照遺伝子の発現レベルと比較する、前記請求項に記載の方法。

40

## 【請求項 10】

参照遺伝子がTPT1、RPS14またはRPL37Aである、請求項8または請求項9に記載の方法。

## 【請求項 11】

HJURP、PDRG1、TRPM3、F12、CENPF、RNFT2、およびSS

50

TR 1 の少なくとも 1 つの発現レベルの増加が、再発および / または転移および / または予後不良の可能性の増加を示すか、または CREM、ERRFI 1、SRSF 5、PDK 4、PDE 4 D、ADAMTS 1、ADAMTS 9、B3GNT 5、CD 3 8、CEBPD、DKK 1、EMP 1、F 3、IL 1 R 1、IL 8、JUNB、KLF 1 0、KLF 4、LDLR、LGALS 3、LPAR 1、MALAT 1、MTUS 1、MYBPC 1、NFIL 3、NR 4 A 3、OAT、PI 1 5、PTGS 2、RHOBTB 3、RIN 2、SELE、SLC 1 5 A 2、SOCS 2、SOCS 3、ST 6 GAL 1、TSC 2 2 D 1、XBP 1 および ZFP 3 6 の少なくとも 1 つの発現レベルの減少が、再発および / または転移および / または予後不良の可能性の増加を示す、前記請求項に記載の方法。

【請求項 1 2】

発現レベルがタンパク質、RNA またはエピジェネティック修飾のレベルで決定される、前記請求項に記載の方法。

【請求項 1 3】

エピジェネティック修飾が DNA メチル化である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

発現レベルが免疫組織化学によって決定される、前記請求項に記載の方法。

【請求項 1 5】

発現レベルが標識にコンジュゲートされた抗体を使用して決定される、前記請求項に記載の方法。

【請求項 1 6】

発現レベルがマイクロアレイ、ノーザンブロット法、RNA - seq (RNA シーケンシング)、in situ RNA 検出または核酸増幅によって決定される、前記請求項に記載の方法。

【請求項 1 7】

サンプルから全 RNA を抽出することをさらに含む、前記請求項に記載の方法。

【請求項 1 8】

対象由来のサンプルを得ることをさらに含む、前記請求項に記載の方法。

【請求項 1 9】

サンプルが前立腺組織を含むか、当該組織から本質的になるか、または当該組織からなる、前記請求項に記載の方法。

【請求項 2 0】

サンプルがホルマリン固定パラフィン包埋生検サンプルを含むか、当該サンプルから本質的になるか、または当該サンプルからなる、前記請求項に記載の方法。

【請求項 2 1】

HJURP、PDRG 1、TRPM 3、F 1 2、CENPF、RNFT 2、および STR 1 の少なくとも 1 つ、および CREM、ERRFI 1、SRSF 5、PDK 4、PDE 4 D、ADAMTS 1、ADAMTS 9、B3GNT 5、CD 3 8、CEBPD、DKK 1、EMP 1、F 3、IL 1 R 1、IL 8、JUNB、KLF 1 0、KLF 4、LDLR、LGALS 3、LPAR 1、MALAT 1、MTUS 1、MYBPC 1、NFIL 3、NR 4 A 3、OAT、PI 1 5、PTGS 2、RHOBTB 3、RIN 2、SELE、SLC 1 5 A 2、SOCS 2、SOCS 3、ST 6 GAL 1、TSC 2 2 D 1、XBP 1 および ZFP 3 6 の少なくとも 1 つの発現レベルを決定することを含む、前記請求項に記載の方法。

【請求項 2 2】

対象において前立腺癌に対する処置を選択するための方法であって

(a) 当該対象由来のサンプルにおいて、CREM、ERRFI 1、SRSF 5、PDK 4、HJURP、PDRG 1、TRPM 3、PDE 4 D、F 1 2、ADAMTS 1、ADAMTS 9、B3GNT 5、CD 3 8、CEBPD、CENPF、DKK 1、EMP 1、F 3、IL 1 R 1、IL 8、JUNB、KLF 1 0、KLF 4、LDLR、LGALS 3、LPAR 1、MALAT 1、MTUS 1、MYBPC 1、NFIL 3、NR 4 A 3、O

10

20

30

40

50

A T、P I 1 5、P T G S 2、R H O B T B 3、R I N 2、R N F T 2、S E L E、S L C 1 5 A 2、S O C S 2、S O C S 3、S S T R 1、S T 6 G A L 1、T S C 2 2 D 1、X B P 1 および Z F P 3 6 の少なくとも 1 つの発現レベルを決定すること、ここで、決定された発現レベルを使用して、前立腺癌の特性化および / または予後を提供する、および ( b ) 前立腺癌の特性化および / または予後に適当な処置を選択することを含む方法。

#### 【請求項 2 3】

対象において前立腺癌に対する処置を選択するための方法であって

( a ) 当該対象由来のサンプルにおいて、C R E M、E R R F I 1、S R S F 5、P D K 4、H J U R P、P D R G 1、T R P M 3、P D E 4 D、F 1 2、A D A M T S 1、A D A M T S 9、B 3 G N T 5、C D 3 8、C E B P D、C E N P F、D K K 1、E M P 1、F 3、I L 1 R 1、I L 8、J U N B、K L F 1 0、K L F 4、L D L R、L G A L S 3、L P A R 1、M A L A T 1、M T U S 1、M Y B P C 1、N F I L 3、N R 4 A 3、O A T、P I 1 5、P T G S 2、R H O B T B 3、R I N 2、R N F T 2、S E L E、S L C 1 5 A 2、S O C S 2、S O C S 3、S S T R 1、S T 6 G A L 1、T S C 2 2 D 1、X B P 1 および Z F P 3 6 の少なくとも 1 つの発現レベルを決定すること、ここで、決定された発現レベルを使用して、前立腺癌の特性化および / または予後を提供する、( b ) 前立腺癌の特性化および / または予後に適当な処置を選択すること、および ( c ) 当該対象を選択された処置で処置することを含む方法。

10

20

#### 【請求項 2 4】

前立腺癌の特性化および / または予後が再発および / または転移および / または予後不良の可能性の増加であるとき、選択された処置が

- a ) 抗ホルモン処置、好ましくはピカルタミドおよび / またはアピラテロン
- b ) 細胞毒性剤
- c ) 生物学的製剤、好ましくは抗体および / またはワクチン、さらに好ましくは S i p u l e u c e l - T
- d ) 放射線治療、所望により拡大放射線治療、好ましくは広範囲放射線治療
- e ) 標的療法
- f ) 手術

30

の 1 つ以上である、請求項 2 2 または 2 3 に記載の方法。

#### 【請求項 2 5】

化学療法剤または放射線治療、所望により拡大放射線治療、好ましくは広範囲放射線治療を対象に投与するか、または手術を対象に行うことを含む前立腺癌を処置する方法であって、請求項 2 2 から 2 4 のいずれかに記載の方法に基づいて対象が処置を選択される、方法。

#### 【請求項 2 6】

対象において前立腺癌を処置することにおける使用のための化学療法剤であって、請求項 2 2 から 2 4 のいずれかに記載の方法に基づいて対象が処置を選択される、化学療法剤

40

#### 【請求項 2 7】

化学療法剤または放射線治療、所望により拡大放射線治療、好ましくは広範囲放射線治療を対象に投与するか、または手術を対象に行うことを含む前立腺癌を処置する方法であって、対象が H J U R P、P D R G 1、T R P M 3、F 1 2、C E N P F、R N F T 2、および S S T R 1 の少なくとも 1 つの発現レベルの増加、および / または C R E M、E R R F I 1、S R S F 5、P D K 4、P D E 4 D、A D A M T S 1、A D A M T S 9、B 3 G N T 5、C D 3 8、C E B P D、D K K 1、E M P 1、F 3、I L 1 R 1、I L 8、J U N B、K L F 1 0、K L F 4、L D L R、L G A L S 3、L P A R 1、M A L A T 1、M T U S 1、M Y B P C 1、N F I L 3、N R 4 A 3、O A T、P I 1 5、P T G S 2、R H O B T B 3、R I N 2、S E L E、S L C 1 5 A 2、S O C S 2、S O C S 3、S T

50

6 G A L 1、T S C 2 2 D 1、X B P 1 および Z F P 3 6 の少なくとも 1 つの発現レベルの減少を有する、方法。

【請求項 2 8】

対象において前立腺癌を処置することにおける使用のための化学療法剤であって、当該対象が、H J U R P、P D R G 1、T R P M 3、F 1 2、C E N P F、R N F T 2、および S S T R 1 の少なくとも 1 つの発現レベルの増加、および / または C R E M、E R R F I 1、S R S F 5、P D K 4、P D E 4 D、A D A M T S 1、A D A M T S 9、B 3 G N T 5、C D 3 8、C E B P D、D K K 1、E M P 1、F 3、I L 1 R 1、I L 8、J U N B、K L F 1 0、K L F 4、L D L R、L G A L S 3、L P A R 1、M A L A T 1、M T U S 1、M Y B P C 1、N F I L 3、N R 4 A 3、O A T、P I 1 5、P T G S 2、R H O B T B 3、R I N 2、S E L E、S L C 1 5 A 2、S O C S 2、S O C S 3、S T 6 G A L 1、T S C 2 2 D 1、X B P 1 および Z F P 3 6 の少なくとも 1 つの発現レベルの減少を有する、化学療法剤。

10

【請求項 2 9】

請求項 2 5 または 2 7 に記載の方法または請求項 2 6 または 2 8 に記載の使用のための化学療法剤であって、当該化学療法剤が

- a) 抗ホルモン処置、好ましくはビカルタミドおよび / またはアピラテロン
- b) 細胞毒性剤
- c) 生物学的製剤、好ましくは抗体および / またはワクチン、さらに好ましくは S i p u l e u c e l - T、および / または
- d) 標的治療剤

20

を含むか、当該物から本質的になるか、または当該物からなる、方法または化学療法剤。

【請求項 3 0】

細胞毒性剤が白金をベースとする薬剤および / またはタキサンである、請求項 2 4 または 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

白金をベースとする薬剤がシスプラチン、カルボプラチンおよびオキサリプラチンから選択される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

タキサンがパクリタキセルまたはドセタキセルである、請求項 3 0 に記載の方法。

30

【請求項 3 3】

C R E M、E R R F I 1、S R S F 5、P D K 4、H J U R P、P D R G 1、T R P M 3、P D E 4 D、F 1 2、A D A M T S 1、A D A M T S 9、B 3 G N T 5、C D 3 8、C E B P D、C E N P F、D K K 1、E M P 1、F 3、I L 1 R 1、I L 8、J U N B、K L F 1 0、K L F 4、L D L R、L G A L S 3、L P A R 1、M A L A T 1、M T U S 1、M Y B P C 1、N F I L 3、N R 4 A 3、O A T、P I 1 5、P T G S 2、R H O B T B 3、R I N 2、R N F T 2、S E L E、S L C 1 5 A 2、S O C S 2、S O C S 3、S S T R 1、S T 6 G A L 1、T S C 2 2 D 1、X B P 1 および Z F P 3 6 の少なくとも 1 つのタンパク質産物に特異的に結合する抗体。

【請求項 3 4】

40

標識にコンジュゲートされた請求項 3 3 に記載の抗体。

【請求項 3 5】

対象において前立腺癌を特徴付ける、および / または予後決定するための、請求項 3 3 または 3 4 に記載の抗体の使用。

【請求項 3 6】

対象において増加した転移能を有する前立腺癌を診断するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、C R E M、E R R F I 1、S R S F 5、P D K 4、H J U R P、P D R G 1、T R P M 3、P D E 4 D、F 1 2、A D A M T S 1、A D A M T S 9、B 3 G N T 5、C D 3 8、C E B P D、C E N P F、D K K 1、E M P 1、F 3、I L 1 R 1、I L 8、J U N B、K L F 1 0、K L F 4、L D L R、L G A L S 3、L P A R 1

50

、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定することを含み、決定された発現レベルを使用して、対象が増加した転移能を有する前立腺癌を有するか否かを同定する、方法。

【請求項37】

対象において増加した転移能を有する前立腺癌を診断するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、SRSF5、PDK4、TRPM3、PDRG1、PDE4D、およびF12の少なくとも1つの発現レベルを決定することを含み、決定された発現レベルを使用して、対象が増加した転移能を有する前立腺癌を有するか否かを同定する、方法。

10

【請求項38】

対象において前立腺癌を特徴付けるため、および/または予後決定するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定し、再発および/または転移の可能性の増加の細胞特性の存在または非存在を同定することを含み、前記細胞の決定された存在または非存在を使用して、前立腺癌の特性化および/または予後を提供する、方法。

20

【請求項39】

対象において前立腺癌を特徴付けるため、および/または予後決定するための方法であって、

a) 当該対象由来のサンプルを得ること

b) CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つのタンパク質産物に特異的な抗体を当該対象由来のサンプルに適用すること

30

c) 抗体-タンパク質複合体を検出する検出剤を適用すること

d) 検出剤を使用して、タンパク質のレベルを決定すること

d) タンパク質の決定されたレベルを使用して、前立腺癌の特性化および/または予後を提供することを含む方法。

40

【請求項40】

前の請求項に記載の方法を行うためのシステムまたは装置。

【請求項41】

対象において前立腺癌を特徴付ける、および/または予後決定するためのシステムまたは試験キットであって、

a) 当該対象由来のサンプルにおいて、CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F

50

3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定するための1つ以上の試験装置

b) 処理装置；および

c) 処理装置によって実行されるとき、

(i) 1つ以上の試験装置にて、当該サンプルにおいて、CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの決定された発現レベルにアクセスする、および/または当該発現レベルを計算する

(ii) 当該サンプルにおいて、CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つのレベルの増加または減少が存在するか否かを計算する；および

(iii) 前立腺癌の特性化および/または予後を処理装置から出力するように構成されるコンピューターのアプリケーションを含む、記憶媒体を含む、システムまたは試験キット。

【請求項42】

処理装置からの出力のためのディスプレイをさらに含む、請求項41に記載のシステムまたは試験キット。

【請求項43】

請求項41または42に記載のコンピューターのアプリケーションを含む、コンピューターのアプリケーションまたは記憶媒体。

【請求項44】

対象において前立腺癌を特徴付けるため、および/または予後決定するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、ADAMTS9、EMP1、F3、LDLR、LGALS3、MALAT1、MTUS1、NR4A3、PTGS2、RIN2、SLC15A2、SOCS3およびTSC22D1の少なくとも1つのメチル化状態を決定することを含み、決定されたメチル化状態を使用して、前立腺癌の特性化および/または予後を提供する、方法。

【請求項45】

ADAMTS9、EMP1、F3、LDLR、LGALS3、MALAT1、MTUS1、NR4A3、PTGS2、RIN2、SLC15A2、SOCS3およびTSC22D1の少なくとも1つが高メチル化されているとき、再発および/または転移の可能性が増加する、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

請求項33または34に記載の1つ以上の抗体を含む、対象において前立腺癌を特徴付ける、および/または予後決定するためのキット。

## 【請求項 47】

請求項 43 に記載のコンピューターのアプリケーションまたは記憶媒体をさらに含む、請求項 46 に記載のキット。

## 【請求項 48】

対象において前立腺癌を特徴付ける、および / または予後決定するためのコンピュータープログラム製品であって、コンピューターに、

( i ) 1 つ以上の試験装置にて、サンプルにおいて、CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1 および ZFP36 の少なくとも 1 つの決定された発現レベルにアクセスさせる、および / または当該発現レベルを計算させる；

( i i ) サンプルにおいて、CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1 および ZFP36 の少なくとも 1 つのレベルの増加または減少が存在するか否かを計算させる；および

( i i i ) 前立腺癌の特性化および / または予後に関して出力を提供させる  
具体化されたコンピューター可読のプログラム命令を有する持続性のコンピューター可読の記憶装置を含む、コンピュータープログラム製品。

## 【請求項 49】

対象において前立腺癌を特徴付ける、および / または予後決定するためのキットであって、

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1 および ZFP36 の少なくとも 1 つの RNA 産物に特異的な 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを含み、

以下の成分：

- a) ブロッキングプローブ
- b) Pre Amplifier
- c) Amplifier および / または
- d) 標識分子

の 1 つ以上をさらに含む、キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本願発明は前立腺癌に関する。バイオマーカーに頼る前立腺癌を特徴付ける、および前立腺癌を予後決定するための方法を提供する。当該方法において有用な抗体、キットおよびシステムも記載する。



## 【背景技術】

## 【0002】

前立腺癌は、生涯発生率15.3%の男性において最も一般的な悪性腫瘍である(Howlader 2012)。1999 - 2006年のデータによると、約80%の前立腺癌患者は、前立腺に臨床的に限定される早期疾患を示し(Altekruse et al 2010)、この約65%が外科的切除または放射線治療によって治療される(Kattan et al 1999、Pound et al 1999)。35%がPSA再発を発症し、この約35%が治療不可能である局所性再発または転移性再発を発生する。現在、早期前立腺癌を有するどの患者が再発を発症する可能性があるか、さらに集中治療から利益を受けるかは不明である。現在の予後因子、例えばGleasonスコアにより測定されるときに腫瘍悪性度は予後値を有するが、考えられる低い悪性度(7以下)のかなりの数は再発し、高い悪性度の腫瘍の一部は再発しない。さらに、Gleasonの7つの腫瘍の予後においてかなりの多様性が存在する(Makarov et al 2002、Rasiah et al 2003)。さらに、Gleasonスコアの等級付けが変化し、時間とともにGleasonスコアの分布において変化をもたらすことが明らかになっている(Albertsen et al 2005、Smith et al 2002)。

10

## 【0003】

現在、同じ解剖学的部位由来の多くの固形腫瘍が分子レベルで多くの異なるエンティティ(entities)を示すことが明らかである(Perou et al 2000)。DNAマイクロアレイプラットフォームは、保管されたパラフィン包埋組織からの何万もの転写産物の同時の分析を可能とし、分子サブグループ(subgroup)の同定に理想的に適している。この種のアプローチは、乳癌(van't Veer et al 2002)および大腸癌(Bertucci et al 2004)のような固形腫瘍において転移能を有する原発性癌を同定している。

20

## 【発明の概要】

## 【0004】

本願発明は、前立腺癌バイオマーカーの同定および確認に基づく。

## 【0005】

本願発明者らは、分子レベルで転移性疾患と類似である原発性前立腺癌のグループを同定した。これらの腫瘍は、いくつかの遺伝子の発現および定義される経路の喪失によって定義される；さらに、このグループは、有糸分裂に關与する遺伝子の発現の増加をもたらすプロトオンコジーン(proto-oncogene)FOX M1の活性化により定義される。多変量(multivariate)予後力(prognostic power)を有し、腫瘍が再発および/または転移発生の増加した可能性を有するか否かをあらかじめ評価するために使用することができる、このサブグループ内で腫瘍を同定することができる一連のバイオマーカーを、定義している。

30

## 【0006】

したがって、第1の局面において、本願発明は、対象において前立腺癌を特徴付けるため、および/または予後決定するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定することを含み、決定された発現レベルを使用して、前立腺癌の特性化および/または予後を提供する、方法を提供する。

40

## 【0007】

本願発明の全ての局面において、前立腺癌は原発性前立腺癌であり得る。

## 【0008】

本願発明のさらなる局面において、対象において増加した転移能を有する前立腺癌を診断するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、FOX M1、TRPM3

50

、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定することを含み、決定された発現レベルを使用して、対象が増加した転移能を有する前立腺癌を有するか否かを同定する、方法を提供する。

#### 【0009】

さらなる局面において、本願発明は、対象において増加した転移能を有する前立腺癌を診断するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12およびPDK4の少なくとも1つの発現レベルを決定することを含み、決定された発現レベルを使用して、対象が増加した転移能を有する前立腺癌を有するか否かを同定する、方法に関する。

#### 【0010】

本願発明はまた、対象において前立腺癌を特徴付けるため、および/または予後決定するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定し、再発および/または転移の可能性の増加の細胞特性の存在または非存在を同定することを含み、前記細胞の決定された存在または非存在を使用して、前立腺癌の特性化および/または予後を提供する、方法に関する。

#### 【0011】

さらなる局面において、本願発明は、対象において前立腺癌を特徴付けるため、および/または予後決定するための方法であって、

a) 当該対象由来のサンプルを得ること

b) FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つのタンパク質産物に特異的な抗体を当該対象由来のサンプルに適用すること

c) 抗体-タンパク質複合体を検出する検出剤を適用すること

d) 検出剤を使用して、タンパク質のレベルを決定すること

d) タンパク質の決定されたレベルを使用して、前立腺癌の特性化および/または予後を提供すること

を含む方法に関する。

#### 【0012】

前立腺癌の特性化、予後または診断をまた、処置を導くために使用することができる。

#### 【0013】

したがって、さらなる局面において、本願発明は、対象において前立腺癌に対する処置

を選択するための方法であって

(a) 当該対象由来のサンプルにおいて、FOX M1、TR P M3、PDR G1、SRS F5、PDE 4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定すること、ここで、決定された発現レベルを使用して、前立腺癌の特性化および/または予後を提供する、および

10

(b) 前立腺癌の特性化および/または予後に適当な処置を選択することを含む方法に関する。

【0014】

さらなる局面において、本願発明は、対象において前立腺癌に対する処置を選択するための方法であって

(a) 当該対象由来のサンプルにおいて、FOX M1、TR P M3、PDR G1、SRS F5、PDE 4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定すること、ここで、決定された発現レベルを使用して、前立腺癌の特性化および/または予後を提供する、

20

(b) 前立腺癌の特性化および/または予後に適当な処置を選択すること、および

(c) 当該対象を選択された処置で処置すること

を含む方法に関する。

【0015】

30

本願発明はまた、化学療法剤または放射線治療、所望により拡大放射線治療、好ましくは広範囲放射線治療を対象に投与するか、または手術を対象に行うことを含む前立腺癌を処置する方法であって、本願明細書に記載されている方法に基づいて対象が処置される、方法に関する。

【0016】

さらなる局面において、本願発明は、対象において前立腺癌を処置することにおける使用のための化学療法剤であって、本願明細書に記載されている方法に基づいて対象が処置を選択される、化学療法剤に関する。

【0017】

さらなる局面において、本願発明は、化学療法剤または放射線治療、所望により拡大放射線治療、好ましくは広範囲放射線治療を対象に投与するか、または手術を対象に行うことを含む前立腺癌を処置する方法であって、対象がHJURP、PDR G1、TR P M3、F12、CENPF、RNFT2、およびSSTR1の少なくとも1つの発現レベルの増加、および/またはCREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、PDE4D、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルの減少を有する、方法に関する。

40

50

## 【0018】

本願発明はまた、対象において前立腺癌を処置することにおける使用のための化学療法剤であって、当該対象が、HJURP、PDRG1、TRPM3、F12、CENPF、RNFT2、およびSSTR1の少なくとも1つの発現レベルの増加、および/またはCREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、PDE4D、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルの減少を有する、化学療法剤に関する。

10

## 【0019】

1つの態様において、化学療法剤が

- a) 抗ホルモン処置、好ましくはピカルタミドおよび/またはアピラテロン
- b) 細胞毒性剤
- c) 生物学的製剤、好ましくは抗体および/またはワクチン、さらに好ましくはSipuleucel-T、および/または
- d) 標的治療剤

を含むか、当該物から本質的になるか、または当該物からなる。

20

## 【0020】

適当な治療および治療剤は、以下にさらに詳細に議論される。

## 【0021】

遺伝子FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36ならびにそれらのタンパク質産物は、以下の表Aにさらに詳細に記載され、定義される。遺伝子はまた、バイオマーカーと互換的に見なされる。

30

## 【0022】

表 A

【表 A - 1】

遺伝子	以前の名称および記号および同義語 (HGNCデータベース)	Uniprot 番号	タンパク質
FOX M1	FKHL16、HFH-11、HNF-3、INS-1、「M期リンタンパク質2」、MPHOSPH2、MPP2、TGT3、トラIDENT	Q08050	フォークヘッドボックスM1
TRPM3	GON-2、KIAA1616、LTRPC3、「メラスタチン2」	Q9HCF6	一過性受容器電位陽イオンチャネルサブファミリーMメンバー3
PDRG1	C20orf126、「染色体20オープンリーディングフレーム126」、dJ310O13.3	Q9NUG6	p53およびDNA損傷制御タンパク質1
SRSF5	SFRS5、「スプライシング因子、アルギニン/セリン-リッチ5」、HRS、「SRスプライシング因子5」、SRP40	Q13243	セリン/アルギニン-リッチスプライシング因子5
PDE4D	DPDE3、「ホスホジエステラーゼ4D、cAMP-特異的 (ダンス (dunce) (ショウジョウバエ) -ホモログホスホジエステラーゼE3)」	Q08499	cAMP-特異的3', 5'-環状ホスホジエステラーゼ4D
F12	N/A	P00748	凝固因子XIII
PDK4	「ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ、アイソザイム4」	Q16654	「ピルビン酸デヒドロゲナーゼ [リボアミド]」キナーゼアイソザイム4、ミトコンドリアの
ADAMTS1	「トロンボスポンジンタイプ1モチーフ、1を有するジスインテグリン様およびメタロプロテアーゼ (レプロリシン (reprolysin) タイプ)」、C3-C5、KIAA1346、METH1	Q9UHI8	トロンボスポンジンモチーフ1を有するジスインテグリンおよびメタロプロテナーゼ
ADAMTS9	KIAA1312	Q9P2N4	トロンボスポンジンモチーフ9を有するジスインテグリンおよびメタロプロテナーゼ

10

20

30

40

【表 A - 2】

B3GNT5	B3GN-T5、ベータ3Gn-T5、「ラクトシルセラミド1, 3-N-アセチルーベータ-D-グルコサミニルトランスフェラーゼ」	Q9BYG0	ラクトシルセラミド1, 3-N-アセチルーベータ-D-グルコサミニルトランスフェラーゼ
CD38	「CD38抗原(p45)」、「ADP-リボシルシクラーゼ1」、「NAD(+)ヌクレオシダーゼ」	P28907	ADP-リボシルシクラーゼ1
CEBPD	C/EBP-デルタ、CELF、CRP3、NF-IL6-ベータ	P49716	CCAAT/エンハンサー結合タンパク質デルタ
CENPF	「セントロメアタンパク質F、350/400kDa(マイトシン)」、hcp-1、「マイトシン」	P49454	セントロメアタンパク質F
CREM	hCREM-2	Q03060	cAMP応答配列モジュレーター
DKK1	「dickkopf(アフリカツメガエル(Xenopus laevis))ホモログ1」、「dickkopf1ホモログ(アフリカツメガエル(Xenopus laevis))」、「DKK-1、SK	O94907	Dickkopf-関連タンパク質1
EMP1	CL-20、TMP	P54849	上皮性膜タンパク質1
ERRFI1	GENE-33、MIG-6、RALT	Q9UJM3	ERBB受容体フィードバックインヒビター1
F3	CD142	P13726	組織因子
HJURP	DKFZp762E1312、FAKTS、hFLEG1、URLC9	Q8NCD3	ホリデイ構造認識タンパク質
IL1R1	IL1R、IL1RA、CD121A、D2S1473	P14778	インターロイキン-1受容体タイプ1

10

20

30

【表 A - 3】

IL8	3-10C、「肺胞マクロファージ走化性因子I」、AMCF-I、b-ENAP、「ペータ内皮細胞由来好中球活性化ペプチド」、「ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド8」、CXCL8、GCP-1、GCP1、「顆粒球走化性タンパク質1」、IL-8、K60、LECT、LUCT、「肺巨細胞癌腫由来走化性タンパク質」、「リンパ球由来好中球活性化ペプチド」、LYNAP、MDNCF、MONAP、「単球由来好中球走化性因子」、「単球由来好中球活性化ペプチド」、NAF、NAP-1、NAP1、「好中球活性化ペプチド1」、SCYB8、TSG-1、「腫瘍壊死因子誘導遺伝子1」	P10145	インターロイキン-8
JUNB	N/A	P17275	転写因子jun-B
KLF10	「TGFB誘導性早期増殖応答」、TIEG、EGR A、TIEG1	Q13118	Krueppel様因子10
KLF4	EZF、GKLF	O43474	Krueppel様因子4
LDLR	「家族性高コレステロール血症」、LDLCQ2	P01130	低比重リポタンパク質受容体
LGALS3	LGALS2、「ガレクチン3」、GALIG、MAC-2	P17931	ガレクチン-3
LPAR1	EDG2、「内皮細胞の分化、リゾホスファチジン酸G-タンパク質-共役受容体、2」、edg-2、Gpcr26、GPR26、LPA1、Mrec1.3、rec.1.3、vzg-1	Q92633	リゾホスファチジン酸受容体1

10

20

30

40

【表 A - 4】

MALAT1	HCN、「hepcarin」、LINC00047、「長遺伝子間非タンパク質コードRNA47」、MALAT-1、「転移関連肺腺癌転写産物1」、NCRNA00047、NEAT2、「非タンパク質コードRNA47」、「核豊富転写産物2」、「核パラスペックル集合転写産物2（非タンパク質コード）」、PRO1073	Q9UHZ2	転移関連肺腺癌転写産物1
MTUS1	「ミトコンドリア腫瘍サブレッサー1」、「AT2受容体相互作用タンパク質」、「AT2R結合タンパク質」、ATBP、ATIP1、DKFZp586D1519、FLJ14295、ICIS、KIAA1288、「ミトコンドリア腫瘍抑制遺伝子1」、MP44、MTSG1	Q9ULD2	微小管関連腫瘍サブレッサー1
MYBPC1	「ミオシン結合タンパク質C、スロータイプ」	Q00872	ミオシン結合タンパク質C、スロータイプ
NFIL3	IL3BP1、E4BP4、NF-IL3A、NFIL3A	Q16649	核因子インターロイキン-3-制御タンパク質
NR4A3	CHN、CSMF、MINOR、NOR1	Q92570	核受容体サブファミリー4グループAメンバー3
OAT	「回転状萎縮」、HOGA、「オルニチンアミノトランスフェラーゼ」、「オルニチンアミノトランスフェラーゼ前駆体」	P04181	オルニチンアミノトランスフェラーゼ、ミトコンドリアの
PI15	「プロテアーゼインヒビター15」、P25TI	O43692	ペプチダーゼインヒビター15
PTGS2	COX2	P35354	プロスタグランジンG/Hシンターゼ2
RHOBTB3	KIAA0878	O94955	Rho関連BTBドメイン含有タンパク質3
RIN2	RASSF4	Q8WYP3	RasおよびRabインタラクター2
RNFT2	TMEM118、「膜貫通タンパク質118」、FLJ14627	Q96EX2	RINGフィンガーおよび膜貫通ドメイン含有タンパク質2

10

20

30

40



【表 A - 5】

SELE	ELAM、ELAM1、「 内皮接着分子1」、CD6 2E、ESEL	P16581	Eーセレクチン
SLC15 A2	「溶質キャリアファミリ ー15 (H+/ペプチド輸 送体)、メンバー2」、P EPT2	Q16348	溶質キャリアファミ リー15メンバー 2
SOCS2	CIS2、Cish2、S OCS-2、SSI-2、 SSI2、「STAT誘導 STATインヒビター-2 」、STATI2	O14508	サイトカインシグナ ル伝達2のサプレッ サー
SOCS3	CIS3、Cish3、S OCS-3、SSI-3	O14543	サイトカインシグナ ル伝達3のサプレッ サー
SSTR1	N/A	P30872	ソマトスタチン受容 体タイプ1
ST6GA L1	「シアリルトランスフェ ラーゼ1 (ベーターガラクト シドアルファー2、6ーシ アリルトランスフェラーゼ )」、SIAT1、「ST 6Gal I」	P15907	ベーターガラクトシ ドアルファー2、6 ーシアリルトランス フェラーゼ1
TSC22 D1	TGFB114、「形質転 換増殖因子ベータ1誘導転 写産物4」、MGC175 97、TSC22	Q15714	TSC22ドメイン ファミリータンパク 質1
XBP1	XBP2	P17861	Xーボックスー結合 タンパク質1
ZFP36	「ジンクフィンガータン パク質36、C3Hタイプ、 ホモログ (マウス)」、G OS24、NUP475、 RNF162A、TIS1 1、トリステトラプロリン 、TTP	P26651	トリステトラプロリ ン

10

20

30

## 【0023】

1つの態様において、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36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個の発現レベルを決定する。いくつかの態様において、FOX M1が当該パネルに加えられ得る。

40

## 【0024】

あるいは、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、

50

JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の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個の少なくとも1つのグループの発現レベルを決定する。いくつかの態様において、FOX M1が当該グループに含まれ得る。

#### 【0025】

10

1つの態様において、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、PDK4、F12、F3、HJURP、CENPF、MYBPC1、SELE、CEBPD、およびXBP1の少なくとも1つの発現レベルを決定する。

#### 【0026】

1つの態様において、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、PDK4、F12、F3、HJURP、CENPF、MYBPC1、SELE、CEBPD、およびXBP1の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13個の発現レベルを決定する。

#### 【0027】

特性化は、前立腺癌の分類および/または評価を意味する。予後は、対象に対する前立腺癌の起こりそうな結果を予測することを示す。診断は、前立腺癌の存在を同定することを意味する。

20

#### 【0028】

本願発明の全ての局面において、前立腺癌の特性化および/または予後が再発の可能性の増加を予測することを含んでよく、当該予測することから本質的になってよく、または当該予測することからなっておりよい。前立腺癌の特性化および/または予後が再発までの時間の短縮を予測することを含んでよく、当該予測することから本質的になってよく、または当該予測することからなっておりよい。再発は、臨床的再発または生化学的再発であり得る。生化学的再発は、前立腺癌に対する処置後の対象においてPSAレベルの上昇を意味する。生化学的再発は、前立腺癌が有効に処置されなかったか、または再発していることを示し得る。

30

#### 【0029】

前立腺癌の特性化および/または予後は転移の可能性の増加を予測することを含んでよく、当該予測することから本質的になってよく、または当該予測することからなっておりよい。転移または転移性疾患は、1つの臓器または器官から別の非隣接臓器または器官への癌の拡散である。したがって、産生される疾患の新規発生は転移と呼ばれる。

#### 【0030】

前立腺癌の特性化および/または予後はまた、前立腺癌が予後不良を有するか否かを決定することを含んでよく、当該決定することから本質的になってよく、または当該決定することからなっておりよい。予後不良は、原因特異的生存、すなわち癌特異的生存、または長期生存の可能性の低下であり得る。原因特異的生存または癌特異的生存は、死の他の原因の非存在下で癌生存を示す正味の生存尺度である。癌生存は、6、7、8、9、10、11、12月または1、2、3、4、5年などであり得る。長期生存は、診断後1年、5年、10年または20年の生存であり得る。予後不良の前立腺癌は、侵襲的な急成長であり得、および/または処置に対して抵抗性を示し得る。

40

#### 【0031】

1つの態様において、TRPM3、PDRG1、F12、CENPF、HJURP、RNFT2、およびSSTR1の、またはFOX M1の少なくとも1つの発現レベルの増加が、再発および/または転移および/または予後不良の可能性の増加を示す。さらなる態様において、SRSF5、PDE4D、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B

50

3 GNT 5、CD 3 8、CEBPD、CREM、DKK 1、EMP 1、ERRFI 1、F 3、IL 1 R 1、IL 8、JUNB、KLF 1 0、KLF 4、LDLR、LGALS 3、LPAR 1、MALAT 1、MTUS 1、MYBPC 1、NFIL 3、NR 4 A 3、OAT、PI 1 5、PTGS 2、RHOBTB 3、RIN 2、SELE、SLC 1 5 A 2、SOCS 2、SOCS 3、ST 6 GAL 1、TSC 2 2 D 1、XBP 1 および ZFP 3 6 の少なくとも 1 つの発現レベルの減少は、再発および / または転移および / または予後不良の可能性の増加を示す。

#### 【 0 0 3 2 】

1 つの態様において、本願明細書に記載されている方法は、TRPM 3、PDRG 1、F 1 2、CENPF、HJURP、RNFT 2、および SSTR 1 または FOXM 1 の少なくとも 1 つ、および SRSF 5、PDE 4 D、PDK 4、ADAMTS 1、ADAMTS 9、B 3 GNT 5、CD 3 8、CEBPD、CREM、DKK 1、EMP 1、ERRFI 1、F 3、IL 1 R 1、IL 8、JUNB、KLF 1 0、KLF 4、LDLR、LGALS 3、LPAR 1、MALAT 1、MTUS 1、MYBPC 1、NFIL 3、NR 4 A 3、OAT、PI 1 5、PTGS 2、RHOBTB 3、RIN 2、SELE、SLC 1 5 A 2、SOCS 2、SOCS 3、ST 6 GAL 1、TSC 2 2 D 1、XBP 1 および ZFP 3 6 の少なくとも 1 つの発現レベルを決定することを含み得る。したがって、当該方法は、上方調節マーカーおよび下方調節マーカーの組合せに頼り得る。

10

#### 【 0 0 3 3 】

1 つの態様において、本願明細書に記載されている方法は、発現レベルを参照値と、または 1 つ以上のコントロールサンプルの発現レベルと、または同じサンプルにおいて 1 つ以上のコントロール細胞における発現レベルと比較することを含む。コントロール細胞は正常細胞（すなわち非癌性として独立した方法によって特徴付けられる細胞）であり得る。1 つ以上のコントロールサンプルは、非癌性細胞からなってもよい、または前立腺癌細胞および非癌性細胞の混合物を含んでもよい。発現レベルは、1 つ以上のコントロールサンプルまたはコントロール細胞における同じ遺伝子の発現レベルと比較してもよい。

20

#### 【 0 0 3 4 】

参照値は、前立腺癌を有する対象および前立腺癌を有さない対象由来の様々なサンプルにおいてレベルを決定することによって設定される少なくとも 1 つの遺伝子の発現の閾値レベルであり得る。前立腺癌は、再発および / または転移および / または予後不良の増加した可能性を有する、または当該可能性を有さない前立腺癌であり得る。閾値を設定するための適当な方法は当業者によく知られている。閾値は、患者データの訓練(training)セットから数学的に得てもよい。したがって、スコア閾値は特定の条件の存在または非存在にしたがって試験サンプルを分離する。この量の解釈、すなわちカットオフ閾値は、公知の結果での患者セットからの開発または訓練段階で得てもよい。したがって、閾値は、当業者に知られている方法によって訓練データから本願発明の方法の実行前に固定され得る。

30

#### 【 0 0 3 5 】

参照値はまた、最初の時点で対象由来のサンプルにおいて少なくとも 1 つの遺伝子の発現のレベルを決定することによる少なくとも 1 つの遺伝子セットの発現の閾値レベルであり得る。次に、同じ対象に対する後の時点で決定される発現レベルを閾値レベルと比較する。したがって、本願発明の方法は、対象において疾患の進行をモニタリングするために、すなわち対象において疾患の継続特性化および / または予後を提供するために使用され得る。例えば、当該方法は、さらに侵襲性の、または潜在的に転移性な形態に発達している前立腺癌を同定するために使用され得る。これは、以下でさらに詳細に議論されるように、処置決定を導くために使用され得る。

40

#### 【 0 0 3 6 】

発現レベルが正常細胞および再発および / または転移および / または予後不良の可能性の増加を有さない前立腺癌由来の細胞間で異なる遺伝子について、同じサンプルにおいて正常細胞における同じ遺伝子の発現レベルは、コントロールとして使用することがで

50

きる。

【0037】

したがって、特定の態様において、サンプルにおいて前立腺癌細胞におけるTRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、およびPDK4の少なくとも1つの発現レベルを、同じサンプルにおいて正常細胞における同じ遺伝子の発現レベルと比較する。

【0038】

特定の態様において、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、およびPDK4の少なくとも1つの決定された発現レベルが、サンプルにおいて正常細胞と比較して同じサンプルにおいて前立腺癌細胞にて異ならないとき、当該前立腺癌は再発および/または転移および/または予後不良の可能性の増加を有さない。

10

【0039】

異なるは、統計的に有意に異なるであり得る。統計的に有意なは、偶然のみに起こっている可能性は低いことを意味する。適当な統計的評価は、任意の適当な方法によって行つてよい。

【0040】

特定の態様において、遺伝子がTRPM3、PDRG1またはF12であり、発現レベルがサンプルにおいて正常細胞と比較して同じサンプルにおいて前立腺癌細胞にて増加しているとき、当該前立腺癌は再発および/または転移および/または予後不良の可能性の増加を有する。

20

【0041】

特定の態様において、遺伝子がSRSF5、PDE4DまたはPDK4であり、発現レベルがサンプルにおいて正常細胞と比較して当該サンプルにおいて前立腺癌細胞にて減少しているとき、当該前立腺癌は再発および/または転移および/または予後不良の可能性の増加を有する。

【0042】

本願明細書に記載されている方法は、参照遺伝子の発現レベルを決定することをさらに含み得る。参照遺伝子は、標的遺伝子発現レベルが正常細胞および再発および/または転移および/または予後不良の可能性の増加を有さない前立腺癌由来の細胞間で異なるとき、必要とされ得る。

30

【0043】

1つの態様において、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを参照遺伝子の発現レベルと比較する。

【0044】

参照遺伝子は、全ての前立腺癌サンプルにわたって最小の発現分散を有する遺伝子であり得る。したがって、参照遺伝子は、発現レベルが再発および/または転移および/または予後不良の可能性によって変化しない遺伝子であり得る。当業者は、これらの基準に基づいて適当な参照遺伝子を同定することが十分にできる。特に、参照遺伝子はTPT1、RPS14またはRPL37Aであり得る。参照遺伝子の発現レベルは、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、S

40

50

S T R 1、S T 6 G A L 1、T S C 2 2 D 1、X B P 1 および Z F P 3 6 の少なくとも 1 つの発現レベルと同じサンプルにおいて決定され得る。

【 0 0 4 5 】

参照遺伝子の発現レベルは異なるサンプルにおいて決定され得る。異なるサンプルは上記コントロールサンプルであり得る。参照遺伝子の発現レベルはサンプルにおいて正常細胞および / または前立腺癌細胞にて決定され得る。

【 0 0 4 6 】

対象由来のサンプルにおいて少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルは、統計的モデルを使用して分析され得る。特定の態様において、少なくとも 2 つの遺伝子の発現レベルを測定する場合、当該遺伝子を重くしてもよい。本願明細書において使用されるとき、用語「重くする」は、統計的計算において項目の相対的重要性を示す。それぞれの遺伝子の重くするは、当分野で知られている分析方法を使用して患者サンプルのデータセットに基づいて決定され得る。全体のスコアを計算し使用して、前立腺癌の特性化および / または予後を提供し得る。

【 0 0 4 7 】

マーカーの発現レベルを決定するための方法は本願明細書により詳細に記載されている。一般的に、当該方法は、対象から得られるサンプルをマーカーに対して特異的な検出剤、例えばプライマー / プロブ / 抗体 ( 本願明細書に詳細に議論されている ) と接触させ、発現産物を検出することを含み得る。比較は、コントロールサンプルにおいて決定される発現レベルに対して行われ、前立腺癌の特性化および / または予後を提供する。

【 0 0 4 8 】

本願発明の全ての局面において、遺伝子の発現レベルは、任意の適当な方法により測定され得る。1 つの態様において、発現レベルはタンパク質、RNA またはエピジェネティック修飾のレベルで決定される。エピジェネティック修飾は DNA メチル化であり得る。

【 0 0 4 9 】

発現レベルは免疫組織化学によって決定され得る。免疫組織化学は、タンパク質に特異的に結合する結合試薬、例えば抗体またはアプタマーを使用することによって、組織サンプルの細胞におけるタンパク質の検出を意味する。したがって、免疫組織化学によって測定されるとき発現レベルは、タンパク質レベルである。サンプルは、前立腺組織サンプルであり得、前立腺癌 ( 腫瘍 ) 細胞、前立腺上皮内腫瘍 ( P I N ) 細胞、正常前立腺上皮細胞、間質細胞、所望により浸潤免疫細胞を含み得る。いくつかの態様において、サンプルにおいて前立腺癌 ( 腫瘍 ) 細胞における少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、同じサンプルにおいて正常細胞における同じ遺伝子 ( および / または参照遺伝子 ) の発現レベルと比較する。いくつかの態様において、サンプルにおいて前立腺癌 ( 腫瘍 ) 細胞における少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、コントロールサンプルにおいて正常細胞における同じ遺伝子 ( および / または参照遺伝子 ) の発現レベルと比較する。正常細胞は、正常 ( 非癌性 ) 前立腺上皮細胞を含んでよく、当該細胞から本質的になってよく、または当該細胞からなってよい。1 つの態様において、正常細胞は、P I N 細胞および / または間質細胞を含まない。1 つの態様において、前立腺癌 ( 腫瘍 ) 細胞は、P I N 細胞および / または間質細胞を含まない。さらなる態様において、サンプルにおいて前立腺癌 ( 腫瘍 ) 細胞における少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、コントロールサンプルにおいて同じ細胞または前立腺癌細胞における参照遺伝子の発現レベルと ( さらに ) 比較する。参照遺伝子は T P T 1、R P S 1 4 または R P L 3 7 A であり得る。さらなる態様において、サンプルにおいて前立腺癌 ( 腫瘍 ) 細胞における少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルは、( 正常細胞との比較なしで ) 前立腺癌 ( 腫瘍 ) 細胞における発現の強度、割合および / または局在に基づく方法を使用してスコア化される。スコア化する方法は、公知の結果での患者セットからの開発または訓練段階で得てもよい。

【 0 0 5 0 】

したがって、さらなる局面において、本願発明は、F O X M 1、T R P M 3、P D R G 1、S R S F 5、P D E 4 D、F 1 2、P D K 4、A D A M T S 1、A D A M T S 9、B

10

20

30

40

50

3 G N T 5、C D 3 8、C E B P D、C E N P F、C R E M、D K K 1、E M P 1、E R R F I 1、F 3、H J U R P、I L 1 R 1、I L 8、J U N B、K L F 1 0、K L F 4、L D L R、L G A L S 3、L P A R 1、M A L A T 1、M T U S 1、M Y B P C 1、N F I L 3、N R 4 A 3、O A T、P I 1 5、P T G S 2、R H O B T B 3、R I N 2、R N F T 2、S E L E、S L C 1 5 A 2、S O C S 2、S O C S 3、S S T R 1、S T 6 G A L 1、T S C 2 2 D 1、X B P 1およびZ F P 3 6の少なくとも1つのタンパク質産物に特異的に結合する抗体またはアプタマーに関する。

#### 【0051】

抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル起源であり得る。フラグメントおよび誘導体抗体もまた利用することができ、限定はしないが、ペプチド特異的結合機能を保持するF a bフラグメント、S c F v、単ドメイン抗体、ナノ抗体、重鎖抗体、アプタマーなどを含み、これらは「抗体」の定義に含まれる。このような抗体は本願発明の方法において有用である。それらは、特定のタンパク質、または場合によってはタンパク質の1つ以上の特定のアイソフォームのレベルを測定するために使用され得る。当業者は、特定のアイソフォームが互いに区別するエピトープを同定することが十分にできる。

10

#### 【0052】

特異的抗体を産生するための方法は当業者に知られている。抗体は、ヒトまたは非ヒト起源（例えば齧歯動物、例えばラットまたはマウス）であり得、公知の技術にしたがってヒト化などされ得る（Jones et al., Nature (1986) May 29-Jun. 4;321(6069):522-5; Roguska et al., Protein Engineering, 1996, 9(10):895-904;およびStudnicka et al., Humanizing Mouse Antibody Frameworks While Preserving 3-D Structure. Protein Engineering, 1994, Vol.7, pg 805）。

20

#### 【0053】

1つの態様において、発現レベルは、標識にコンジュゲートされた抗体またはアプタマーを使用して決定される。標識は直接的または間接的に検出を可能にする成分を意味する。例えば、標識は酵素、所望によりペルオキシダーゼ、またはフルオロフォアであり得る。

#### 【0054】

標識は検出剤の例である。検出剤は抗体 - タンパク質複合体の検出を手助けするために使用され得る薬剤を意味する。抗体が酵素にコンジュゲートされる場合、検出剤は、酵素が化学反応を触媒して検出可能な産物を生産するような化学成分を含み得る。適当な酵素によって触媒される反応産物は、限定はしないが、蛍光、発光または放射性であり得、またはそれらは可視光線または紫外線を吸収し得る。かかる検出可能な標識を検出するために適当な検出剤の例は、限定はしないが、x線フィルム、放射線カウンター、シンチレーションカウンター、分光光度計、比色計、蛍光光度計、照度計、および濃度計を含む。1つの態様において、検出剤は二次抗体を含み得る。次に、発現レベルは、標的タンパク質に結合する非標識一次抗体および標識にコンジュゲートされた二次抗体（二次抗体は一次抗体に結合する）を使用して決定される。

30

#### 【0055】

本願発明はまた、対象において前立腺癌を特徴付ける、および/または予後決定するための上記抗体の使用に関する。

40

#### 【0056】

タンパク質レベルで発現レベルを決定するためのさらなる技術は、例えば、ウェスタンブロット、免疫沈降、免疫細胞化学、質量分析、E L I S Aおよび他のものを含む（ImmunoAssay: A Practical Guide, edited by Brian Law, published by Taylor & Francis, Ltd., 2005 edition参照）。免疫反応に基づくアッセイ方法の特異性および感受性を改善するために、モノクローナル抗体はしばしば特定のエピトープ認識のために使用される。ポリクローナル抗体はまた、モノクローナル抗体と比較して標的に対する親和性の増加のために、種々の免疫測定法において成功裏に使用されている。

#### 【0057】

50

本願発明の方法において使用され得る、または本願発明のキットにおいて含まれ得る適当な抗体は、以下の表Bに挙げられている：

【0058】

表B - 本願発明のマーカーに結合する抗体の例

【表B - 1】

Gene ID	抗体供給者	抗体参照番号
ADAMTS1	Source Bioscience	LS-A1643
	Source Bioscience	LS-A1642
	Source Bioscience	LS-A1649
ADAMTS9	Novus	NBP1-82915
	Novus	NBP1-82916
	Sigma	HPA028577
B3GNT5	Novus	NBP1-88954
CD38	Source Bioscience	LS-A9696
	Source Bioscience	LS-A9697
	Leica Novocastra	CD38-290-L-C E
CEBPD	適当な抗体なし	
CENPF	Source Bioscience	LS-B2992
	Source Bioscience	LS-B3157
	Novus	NB500-101
CREM	Sigma	HPA001818
DKK1	Source Bioscience	LS-A2867
	Source Bioscience	LS-A2865
	Source Bioscience	LS-A2868
	Novus	NBP1-95560
EMP1	Sigma	HPA056250
ERRFI1	Novus	NBP1-81835
	Sigma	HPA027206
F12	Source Bioscience	LS-B2649
	Source Bioscience	LS-B3044
	Sigma	HPA003825
F3	Novus	NBP2-15139
FOXM1	Source Bioscience	LS-B3073
	Sigma	HPA029974
	Novus	NBP1-84671
HJURP	Sigma	HPA008436
IL1R1	Source Bioscience	LS-B2859
	Novus	NBP1-30929
IL8	Source Bioscience	LS-B6427
JUNB	Source Bioscience	LS-C176087
	Novus	NBP1-89544
KLF10	Source Bioscience	LS-C119009
KLF4	Source Bioscience	LS-B5641
	Novus	NBP2-24749
LDLR	Source Bioscience	LS-B1598
	Source Bioscience	LS-B8088
	Sigma	HPA009647
LGALS3	Source Bioscience	LS-B5661
	Source Bioscience	LS-B1671
	Sigma	HPA003162

10

20

30

40

50

【表 B - 2】

L P A R 1	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - A 2 1 2
	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - A 2 1 1
M A L A T 1	N A	N A
M T U S 1	N o v u s	N B P 1 - 8 2 1 9 7
M Y B P C 1	N o v u s	N B P 1 - 8 6 4 2 7
N R 4 A 3	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - A 2 3 4 1
	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - A 2 3 2 8
	N o v u s	N B P 1 - 9 2 1 9 8
O A T	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 4 1 8 8
	N o v u s	N B P 1 - 8 3 2 3 9
P D E 4 D	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - C 1 8 5 6 4 0
	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 8 2 3 0
	N o v u s	N B P 1 - 3 1 1 3 1
P D K 4	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 3 4 5 9
P D R G 1	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - C 1 6 3 5 0 1
	N o v u s	N B P 2 - 0 1 8 5 4
P I 1 5	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - C 1 6 3 6 9 8
P T G S 2	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 3 2 9 6
	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 2 1 4 5
	N o v u s	N B 1 1 0 - 1 9 4 8
R H O B T B 3	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - C 1 2 0 3 3 7
	S o u r c e B i o s c i e n c e	N B P 1 - 8 2 9 5 4
R I N 2	S i g m a	H P A 0 3 4 6 4 1
S E L E	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 2 3 2 3
S O C S 2	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 1 2 5 7
S O C S 3	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 3 3 7 3
	S o u r c e B i o s c i e n c e	N B P 2 - 0 0 8 5 0
S R S F 5	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 3 0 9 1
	N o v u s	N B P 1 - 9 2 3 8 1
S S T R 1	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - A 9 9 4
S T 6 G A L 1	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 6 0 4 1
	N o v u s	N B P 1 - 6 8 4 4 7
T R P M 3	N o v u s	N B P 1 - 4 6 3 4 4
T S C 2 2 D 1	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 8 4 1 9
X B P 1	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 3 1 7 8
	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 1 8 8
	N o v u s	N B P 1 - 9 5 3 9 5
Z F P 3 6	S o u r c e B i o s c i e n c e	L S - B 5 6 0 6

## 【 0 0 5 9 】

生物学的サンプルにおいて mRNA を測定することは、生物学的サンプルにおいて対応するタンパク質レベルの検出の代わりとして使用され得る。したがって、本願明細書に記載されている遺伝子のいずれかの発現レベルもまた、適当な RNA を検出することによって検出することができる。

## 【 0 0 6 0 】

したがって、特定の態様において、発現レベルは、マイクロアレイ、ノーザンブロット法、RNA-seq (RNAシーケンシング)、in situ RNA 検出または核酸増幅によって決定される。核酸増幅は、PCR およびその全ての变形、例えばリアルタイムおよびエンドポイント方法および qPCR を含む。他の核酸増幅技術は、当分野でよく知られており、NASBA、3SR および転写媒介増幅 (Transcription Mediated Amplification) (TMA) のような方法を含む。他の適当な増幅方法は、リガーゼ連鎖反応 (L



C R)、標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅(U S特許第6,410,276号)、コンセンサス配列プライマーポリメラーゼ連鎖反応(consensus sequence primed polymerase chain reaction)(U S特許第4,437,975号)、任意プライムポリメラーゼ連鎖反応(W O 90/06995)、invader技術、鎖置換技術(strand displacement technology)、およびニック置換増幅(nick displacement amplification)(W O 2004/067726)を含む。このリストは完全であることを意図しない;適当な核酸産物が特異的に増幅されるとき、任意の核酸増幅技術が使用され得る。適当なプライマーおよび/またはプローブの設計は当業者の能力の範囲内である。種々のプライマー設計ツール、例えばNCBI Primer-BLASTツールを、このプロセスにおいて手助けするために自由に利用できる。プライマーおよび/またはプローブは、少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25(またはそれ以上)ヌクレオチド長であり得る。mRNA発現レベルは、逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR、次にqPCR)により測定され得る。RT-PCRを使用して、mRNAからcDNAを作る。DNA増幅が進行を処理するとき蛍光を生産するように、cDNAはqPCRアッセイにおいて使用され得る。標準曲線との比較によって、qPCRは、絶対測定、例えば細胞あたりのmRNAのコピー数を示すことができる。毛细管電気泳動法と組み合わせられたノーザンブロット、マイクロアレイ、Invaderアッセイ、およびRT-PCRは全て、サンプルにおいてmRNAの発現レベルを測定するために使用されている。Gene Expression Profiling: Methods and Protocols, Richard A. Shinkets, editor, Humana Press, 2004参照。

10

20

#### 【0061】

RNA-seqは、遺伝子発現における変化を測定するための次世代シーケンシングを使用する。RNAは、cDNAに変換され得るか、または直接的にシーケンシングされ得る。次世代シーケンシング技術は、パイロシーケンシング(pyrosequencing)、SOLIDシーケンシング、Ion Torrent半導体シーケンシング(semiconductor sequencing)、Illumina色素シーケンシング(dye sequencing)、単一分子リアルタイムシーケンシング(single-molecule real-time sequencing)またはDNAナノボールシーケンシング(DNA nanoball sequencing)を含む。

#### 【0062】

In situ RNA検出は、組織および細胞からの抽出なしでRNAを検出することを含む。In situ RNA検出は、組織の部分または切片、または全組織(全載ISH)、または細胞において特定のRNA配列を特定するために、標識(例えば、放射性標識、抗原標識または蛍光標識)プローブ(相補的DNAまたはRNA鎖)を使用するインサイチュハイブリダイゼーション(ISH)を含む。放射性標識、蛍光標識または抗原標識ベース(例えば、ジゴキシゲニン)のいずれかで標識されたプローブはそれぞれ、オートラジオグラフィー、蛍光顕微鏡または免疫組織化学のいずれかを使用して組織において特定および定量され得る。ISHはまた、2つ以上の転写産物を同時に検出するために2つ以上のプローブを使用することができる。分岐DNAアッセイもまた、単一の分子感受性でのin situ ハイブリダイゼーションアッセイにてRNAのために使用することができる。このアプローチはViewRNAアッセイを含む。サンプル(細胞、組織)を固定し、次にRNA標的接近性を可能にするように処理する(RNA脱マスクング)。標的特異的プローブは、それぞれの標的RNAにハイブリダイズする。後のシグナル増幅は、隣接プローブ(RNA標的上に並んで結合する個々のオリゴヌクレオチド)の特異的ハイブリダイゼーションを前提とする。典型的な標的特異的プローブは40オリゴヌクレオチドを含む。シグナル増幅は、一連の連続したハイブリダイゼーション工程を介してなし遂げられる。pre-amplifier分子は、標的特異的RNA上のそれぞれのオリゴ対にハイブリダイズし、次に複数の増幅分子はそれぞれのpre-amplifierにハイブリダイズする。次に、(アルカリホスファターゼのような酵素に、またはフルオロフォアに直接的にコンジュゲートされた)複数の標識プローブオリゴヌクレオチドは、それぞれの増幅分子にハイブリダイズする。別々であるが適合性のシグナル増幅シ

30

40

50

システムはマルチプレックス(multiplex)アッセイを可能にする。シグナルは、使用される検出システムに依存して放出される蛍光または光を測定することによって視覚化することができる。検出は、ハイコンテントイメージングシステム(high content imaging system)、またはいくつかの態様において蛍光もしくは明視野顕微鏡を使用することを含み得る。

#### 【0063】

したがって、さらなる局面において、本願発明は、FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERF1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つのRNA産物に特異的な1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを含む、対象において前立腺癌を(in situ)特徴付ける、および/または予後決定するためのキットに関する。

10

#### 【0064】

キットは、以下の成分：

- a) ブロッキングプローブ
  - b) Pre Amplifier
  - c) Amplifier および/または
  - d) 標識分子
- の1つ以上をさらに含み得る。

20

#### 【0065】

キットの成分は、view RNAアッセイを行うために適当であり得る(<https://www.panomics.com/products/rna-in-situ-analysis/view-rna-overview>)。

#### 【0066】

キットの成分は、核酸ベースの分子、所望によりDNA(またはRNA)であり得る。ブロッキングプローブは、標的特異的プローブ(本願発明の少なくとも1つの遺伝子のRNA産物に特異的なプローブ)によって結合されない標的上の部位に結合することによって、バックグラウンドシグナルを低下させるように作用する分子である。Pre Amplifierは、標的が結合するとき、標的特異的プローブ(の対)に結合することができる分子である。Amplifierは、Pre Amplifierに結合することができる分子である。あるいは、Amplifierは、標的が結合するとき、標的特異的プローブ(の対)に直接的に結合することもよい。Amplifierは、(標識プローブであり得る)複数の標識分子に対する結合部位を有する。

30

#### 【0067】

本願発明はまた、前立腺癌を特徴付ける、および/または予後決定するためのキットの使用に関する。

#### 【0068】

RNA発現は、プローブのセットへのRNAのハイブリダイゼーションによって決定され得る。プローブは、アレイにおいて配置され得る。マイクロアレイプラットフォームは、Affymetrix、IlluminaおよびAgilentのような会社によって製造されるものを含む。Affymetrixによって製造されるマイクロアレイプラットフォームの例は、U133 Plus2 array、Almac proprietary Xcel(登録商標) arrayおよびAlmac proprietary Cancer DSAs(登録商標)、例えばProstate Cancer DSA(登録商標)を含む。

40

#### 【0069】

特定の態様において、少なくとも1つの遺伝子の発現は、以下の表C中のものから選択

50

される 1 つ以上のプローブを使用して決定され得る：

【 0 0 7 0 】

表 C - アレイ上の遺伝子の発現レベルを測定するために使用されるプローブのリスト

【表 C - 1】

遺伝子	Probe set ID	配列番号
ADAMTS1	PC3P. 3828. C1__s__a t	30
	PCHP. 1595__s__a t	75
ADAMTS9	PC3P. 17014. C1__s__a t	24
	PC3SNGnh. 5879__a t	53
	PCADA. 974__s__a t	62
B3GNT5	PCRS2. 398__s__a t	81
CD38	3Snip. 8317-94a__s__a t	6
	PC3P. 16779. C1__s__a t	23
CEBPD	>PCHP. 407__s__a t__1160	89
	>PC3P. 4961. C1__s__a t__156	90
CENPF	PC3P. 14957. C1__s__a t	19
	PCADA. 11788__a t	55
CREM	PC3P. 8627. C1__a t	48
	PC3P. 8627. C1__s__a t	49
DKK1	3Snip. 431-44a__s__a t	4
EMP1	PC3P. 10147. C1__a t	9
ERRFI1	PC3P. 3363. C1-522a__s__a t	29
	PCADA. 5865__a t	58
	PCADA. 5865__x__a t	59
	PCRS2. 6810__s__a t	83
F12	PCADNP. 16711__a t	63
F3	3Snip. 8552-9072a__s__a t	7
	PC3P. 8519. C1__s__a t	46
	PC3P. 8519. C2__s__a t	47
	PCHP. 1022__s__a t	70
FOXM1	PCHP. 1211__s__a t	87
HJURP	PCADA. 12835__s__a t	56
IL1R1	PCADA. 9303__s__a t	61
IL8	PCHP. 274__s__a t	76
KLF10	PCRS2. 574__s__a t	82
KLF4	PC3P. 14562. C1__s__a t	18
LDLR	PCHP. 101__s__a t	69
LGALS3	3Snip. 6331-2a__s__a t	5
LPAR1	PC3P. 4497. C1__a t	34
	PCADA. 11416__s__a t	54
	PCADA. 5036__s__a t	57
	PCRS2. 2781__s__a t	80
MALAT1	3Snip. 3677-484a__s__a t	3
	PC3P. 2436. C1__s__a t	25
MTUS1	PCRS2. 6884__s__a t	84
MYBPC1	PC3P. 13654. C1__a t	16
	PC3P. 13654. C1__x__a t	17
	PC3P. 3003. C1__s__a t	27
	PC3P. 7685. C1__a t	40
	PC3P. 7685. C1__x__a t	41
	PC3P. 7685. C1-693a__s__a t	42
NFIL3	>PC3P. 9419. C1-398a__s__a t__365	88

10

20

30

40

【表 C - 2】

NR4A3	PC3P. 11087. C1__x__a t	11
	PC3P. 13257. C1__a t	15
OAT	PC3P. 2802. C1__s__a t	26
PDE4D	PC3P. 11285. C1__a t	12
	PCADNP. 1679__s__a t	64
PDK4	PC3P. 16300. C1__a t	20
	PC3P. 16300. C1__x__a t	21
	PC3P. 8159. C1__s__a t	43
	PC3P. 8159. C1-773a__s__a t	44
	PC3SNGnh. 4912__a t	50
	PC3SNGnh. 4912__x__a t	51
	PC3SNGnh. 5369__x__a t	52
	PCADNP. 18913__s__a t	66
	PCEM. 2221__a t	68
	PCPD. 29484. C1__a t	78
PDRG1	>PC3P. 15830. C1__s__a t__35 3	93
PI15	3Snip. 2873-1277a__a t	2
	PC3P. 7245. C1__a t	38
	PC3P. 7245. C1__x__a t	39
	PC3P. 8311. C1-482a__s__a t	45
	PCADNP. 17332__s__a t	65
PTGS2	3Snip. 950-71a__x__a t	8
	PC3P. 16654. C1__s__a t	22
RHOBTB3	PC3P. 12138. C1__a t	13
	PC3P. 12138. C1__x__a t	14
	PC3P. 5195. C1__s__a t	35
RIN2	PC3P. 7127. C1__s__a t	37
RNFT2	PCADNP. 401__s__a t	67
SELE	PCHP. 1458__s__a t	74
SLC15A2	3Snip. 1826-385a__s__a t	1
	PC3P. 10260. C1__a t	10
	PC3P. 3316. C1__a t	28
	PCRS2. 7997__s__a t	86
SOCS2	PC3P. 5499. C1__a t	36
	PCHP. 128__s__a t	73
SOCS3	PCHP. 491__s__a t	77
SRSF5	PC3P. 394. CB1__s__a t	32
SSTR1	>PCHP. 841__s__a t__4070	91
	>PC3P. 12563. C1__s__a t__32 7	92
ST6GAL1	PCRS2. 699__s__a t	85
TRPM3	PCADA. 7751__s__a t	60
TSC22D1	PC3P. 41. CB2__s__a t	33
	PCHP. 112__s__a t	71
XBP1	PC3P. 3909. C1-403a__s__a t	31
	PCPD. 59444. C1__a t	79
ZFP36	PCHP. 1147__s__a t	72

【0071】

これらのプローブはまた、本願発明のキットに組み込まれ得る。プローブ配列はまた、

10

20

30

40

50

例えば R T - P C R によって、発現の検出のためのプライマーを設計するために使用され得る。このようなプライマーはまた、本願発明のキットにおいて含まれ得る。

#### 【 0 0 7 2 】

プロモーターでの、またはプロモーター付近での D N A メチル化の割合の増加は、遺伝子発現レベルの低下と相関することが示されている。D N A メチル化は、ヒトにおいて主なエピジェネティック修飾である。それは、メチル基 ( m ) を D N A における特定のシトシン ( C ) 残基に加えるメチルトランスフェラーゼと称される酵素によって行われる D N A の化学修飾である。哺乳動物において、メチル化は、グアノシン残基に隣接したシトシン残基、すなわち配列 C G または C p G ジヌクレオチドのみで起こる。

#### 【 0 0 7 3 】

したがって、さらなる局面において、本願発明は、対象において前立腺癌を特徴付けるため、および / または予後決定するための方法であって、当該対象由来のサンプルにおいて、A D A M T S 9、E M P 1、F 3、L D L R、L G A L S 3、M A L A T 1、M T U S 1、N R 4 A 3、P T G S 2、R I N 2、S L C 1 5 A 2、S O C S 3 および T S C 2 2 D 1 の少なくとも 1 つのメチル化状態を決定することを含み、決定されたメチル化状態を使用して、前立腺癌の特性化および / または予後を提供する、方法に関する。

#### 【 0 0 7 4 】

1 つの態様において、A D A M T S 9、E M P 1、F 3、L D L R、L G A L S 3、M A L A T 1、M T U S 1、N R 4 A 3、P T G S 2、R I N 2、S L C 1 5 A 2、S O C S 3 および T S C 2 2 D 1 の少なくとも 1 つが高メチル化されているとき、再発および / または転移の可能性が増加する。

#### 【 0 0 7 5 】

メチル化状態の決定は、適当な手段を介してなし遂げられ得る。適当な例は、バイサルファイト (bisulphite) ゲノムシーケンシングおよび / またはメチル化特異的 P C R を含む。メチル化状態を評価するための種々の技術は、当分野で知られており、本願発明と共に使用することができる：シーケンシング、メチル化特異的 P C R ( M S - P C R )、融解曲線メチル化特異的 P C R ( M c M S - P C R )、バイサルファイト処理有り、またはバイサルファイト処理無しの M L P A、Q A M A ( Zeschnigk et al, 2004 )、M S R E - P C R ( Melnikov et al, 2005 )、M e t h y l i g h t ( Eads et al., 2000 )、C o n L i g h t - M S P ( Rand et al., 2002 )、バイサルファイト変換特異的メチル化特異的 P C R ( B S - M S P ) ( Sasaki et al., 2003 )、C O B R A ( これはバイサルファイトナトリウム - 処理 D N A の P C R 産物においてメチル化依存性配列の違いを示すために制限酵素の使用に頼る )、メチル化感受性単一ヌクレオチドプライマー伸長構造 ( M S - S N u P E )、メチル化感受性一本鎖構造分析 ( M S - S S C A )、融解曲線と組み合わせたバイサルファイト制限分析 ( Melting curve combined bisulphite restriction analysis ) ( M c C O B R A ) ( Akey et al., 2002 )、P y r o M e t h A、H e a v y M e t h y l ( Cottrell et al. 2004 )、M A L D I - T O F、M a s s A R R A Y、メチル化対立遺伝子の定量分析 ( Q A M A )、酵素的局所メチル化アッセイ ( E R M A )、Q B S U P T、M e t h y l Q u a n t、定量 P C R シーケンシングおよびオリゴヌクレオチドベースのマイクロアレイシステム、パイロシーケンシング、M e t h - D O P - P C R。D N A メチル化分析のためにいくつかの有用な技術のレビューは、Nucleic acids research, 1998, Vol. 26, No. 10, 2255-2264, Nature Reviews, 2003, Vol. 3, 253-266 ; Oral Oncology, 2006, Vol. 42, 5-13 において提供される。

#### 【 0 0 7 6 】

メチル化状態を評価するための技術は別個のアプローチに基づく。いくつかは、エンドヌクレアーゼの使用を含む。かかるエンドヌクレアーゼは、非メチル化認識部位と比較してメチル化認識部位を優先的に開裂してもよく、またはメチル化認識部位と比較して非メチル化を優先的に開裂してもよい。前者のいくつかの例は、A c c I I I、B a n I、B s t N I、M s p I、および X m a I である。後者のいくつかの例は、A c c I I、A v a I、B s s H I I、B s t U I、H p a I I、および N o t I

10

20

30

40

50

である。開裂パターンの違いは、メチル化 C p G ジヌクレオチドの存在または非存在を示す。開裂パターンは、直接的に、または容易に区別することができる産物を作るさらなる反応後に、検出することができる。改変されたサイズおよび / または電荷を検出する手段は、修飾産物を検出するために使用することができ、限定はしないが、電気泳動法、クロマトグラフィー、および質量分析を含む

#### 【 0 0 7 7 】

あるいは、メチル化 C p G ジヌクレオチドの同定は、M e C P 2 タンパク質のメチル結合ドメイン ( M B D ) がメチル化 D N A 配列に選択的に結合する能力を利用し得る ( C r o s s e t a l , 1994; S h i r a i s h i e t a l , 1999 ) 。 M B D はまた、M B P 、 M B P 2 、 M B P 4 、ポリ - M B D から ( J o r g e n s e n e t a l . , 2006 ) またはメチル化核酸に結合する試薬、例えば抗体から得ることができる。M B D は、固体マトリックスに固定化され、調製カラムクロマトグラフィーのために使用され、高度にメチル化された D N A 配列を単離し得る。変異体形態、例えば発現される H i s - タグ メチル - C p G 結合ドメインは、メチル化 D N A 配列に選択的に結合するように使用され得る。結局は、制限エンドヌクレアーゼで消化されたゲノム D N A を、発現される H i s - タグ メチル - C p G 結合ドメインと接触させる。他の方法は、当分野でよく知られており、とりわけメチル化 - C p G アイランド リカバリーアッセイ ( M I R A ) を含む。別の方法である M B - P C R は、メチル化 D N A を捕捉するために P C R 容器壁上に固定される組み換え二価メチル - C p G 結合ポリペプチドおよび P C R による結合されたメチル化 D N A の後の検出を使用する。

#### 【 0 0 7 8 】

メチル化 C p G ジヌクレオチドモチーフを検出するためのさらなるアプローチは、C p G ジヌクレオチドモチーフのメチル化形態または非メチル化形態のいずれかを選択的に修飾する化学試薬を使用する。適当な化学試薬はヒドラジンおよびバイサルファイトイオンを含む。1つの態様において、本願発明の方法はバイサルファイトイオンを使用してもよい。バイサルファイト変換は、非メチル化シトシンをウラシルに変換するが、メチル化シトシンは維持されるバイサルファイトナトリウムでの D N A サンプルの処理に頼る ( F u r u i c h i e t a l . , 1970 ) 。この変換は、最後に、元の D N A の配列において変化をもたらす。得られるウラシルがシトシン塩基対合挙動と異なるチミジン塩基対合挙動を有することは一般知識である。これは、メチル化シトシンおよび非メチル化シトシンの区別を可能にさせる。配列の違いを評価するための分子生物学および核酸化学の有用な慣用の技術は、当分野でよく知られており、文献において説明されている。例えば、Sambrook, J., et al., Molecular cloning: A laboratory Manual, (2001) 3rd edition, Cold Spring Harbor, NY; Gait, M.J.(ed.), Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach, IRL Press (1984); Hames B.D., and Higgins, S.J. (eds.), Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press (1985);およびthe series, Methods in Enzymology, Academic Press, Inc. 参照。

#### 【 0 0 7 9 】

いくつかの技術は、C p G ジヌクレオチドでのメチル化状態を評価するためのプライマーを使用する。プライマー設計のために2つのアプローチが可能である。第1に、D N A メチル化の可能性のある部位を覆わないプライマーが設計され得る。異なるメチル化部位での配列変異は2つのプライマー間に位置され、配列変異の視覚化はさらなるアッセイ工程を必要とする。このようなプライマーは、バイサルファイトゲノムシーケンシング、C O B R A 、 M s - S n u P E およびいくつかの他の技術において使用される。第2に、最初の処理される配列のメチル化バージョンおよび非メチル化バージョンのいずれかと特異的にハイブリダイズするプライマーが設計され得る。ハイブリダイゼーション後、増幅反応を行い、当分野で知られている検出システムを使用して増幅産物をアッセイすることができる。増幅産物の存在は、サンプルがプライマーにハイブリダイズしたことを示す。プライマーの特異性は、D N A が修飾されていたか否かを示し、次に、D N A がメチル化されていたか否かを示す。標的に対して相補性の十分な領域、例えば、12、15、18または20ヌクレオチドがあるとき、プライマーはまた、ハイブリダイゼーションを妨げな

いが他の操作のために有用であり得る追加のヌクレオチド残基を含み得る。かかる他の残基の例は、制限エンドヌクレアーゼ開裂のための、リガンド結合のための、または因子結合またはリンカーまたはリピートのための部位であり得る。オリゴヌクレオチドプライマーは、修飾メチル化残基に特異的であるように、あってもよく、なくてもよい。

#### 【0080】

修飾核酸および非修飾核酸間を区別するためのさらなる方法は、オリゴヌクレオチドプローブを使用することである。かかるプローブは、修飾核酸と直接的に、または修飾核酸のさらなる産物、例えば増幅によって得られる産物とハイブリダイズし得る。プローブベースのアッセイは、特異的配列へのオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションおよびハイブリットの後の検出を利用する。増幅産物が検出される前にさらなる精製工程、例えば沈殿工程がまたあってもよい。オリゴヌクレオチドプローブは、当分野で知られている任意の検出システムを使用して標識化され得る。これらは、限定はしないが、蛍光部分、放射性同位体標識部分、生物発光部分、発光部分、化学発光部分、酵素、基質、受容体、またはリガンドを含む。

#### 【0081】

MSPアプローチにおいて、DNAは、バイサルファイトナトリウム処理の結果として配列の違いによって、メチル化DNAと非メチル化DNAを区別するように設計されるプライマー対を使用して増幅され得る(WO 97/46705)。例えば、バイサルファイトイオンは、非メチル化シトシン塩基を修飾してウラシル塩基に変化させる。ウラシル塩基は、ハイブリダイゼーション条件下でアデニン塩基とハイブリダイズする。したがって、グアニン塩基の代わりにアデニン塩基を含むオリゴヌクレオチドプライマーは、バイサルファイト修飾DNAとハイブリダイズするが、グアニン塩基を含むオリゴヌクレオチドプライマーは、DNAにおいて非修飾(メチル化)シトシン残基とハイブリダイズする。DNAポリメラーゼおよび第2のプライマーを使用する増幅は、容易に観察することができる増幅産物を生じ、次に、DNAがメチル化されていたか否かを示す。PCRが好ましい増幅方法であるが、この基礎技術の変形、例えば、ネステッド(nested)PCRおよびマルチプレックスPCRもまた本願発明の範囲内である。

#### 【0082】

上記のとおり、関連遺伝子のメチル化状態を評価するための1つの態様は、増幅産物を生じる増幅を必要とする。増幅産物の存在は、当分野でよく知られている方法を使用して直接的に評価され得る。それらは簡単に、適当なゲル、例えばアガロースまたはポリアクリルアミドゲル上で視覚化され得る。検出は、二本鎖DNAに挿入する特異的色素、例えば臭化エチジウムの結合、および例えばUV照明器下でのDNAバンドの視覚化を含み得る。増幅産物を検出するための別の手段は、オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションを含む。あるいは、蛍光またはエネルギー移動を、メチル化DNAの存在を決定するために測定することができる。

#### 【0083】

MSP技術の特定の例は、リアルタイム定量MSP(QMSP)を示し、リアルタイムまたはエンドポイントでのメチル化DNAの信頼できる定量化を可能にする。リアルタイム方法は、増幅処理の連続的な光学モニタリングに一般的に基づき、産物における取り込みを定量することができ、定量化が鋳型において配列のコピー数を示す蛍光的標識試薬を利用する。かかる試薬の1つは、二本鎖DNAに優先的に結合し、蛍光が二本鎖DNAの結合によって大きく増強されるSYBR Green Iと称される蛍光色素である。あるいは、標識プライマーおよび/または標識プローブを定量化のために使用することができる。それらは、よく知られており、市販されているリアルタイム増幅技術、例えばTaqMan(登録商標)、MOLECULAR BEACONS(登録商標)、AMPLIFLOR(登録商標)およびSCORPION(登録商標)、DzyNA(登録商標)、PlexorTMなどの特定の適用を示す。リアルタイムPCRシステムにおいて、PCR産物の量における第1の有意な増加が標的鋳型の最初の量と相互関係がある、対数期においてPCR反応をモニタリングすることができる。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 8 4 】

リアルタイムPCRは、反応中のアンプリコンの蓄積を検出する。しかしながら、リアルタイム方法は利用する必要はない。多くの適用は定量化を必要とせず、リアルタイムPCRは、便利な結果、提示および保存を得て、同時にPCR後の処理を回避するためのツールとしてのみ使用される。したがって、分析は、標的DNAがサンプルに存在するか否かを確認するためのみに行うことができる。かかるエンドポイント確認は、増幅反応が終わった後に行われる。

## 【 0 0 8 5 】

本願発明の全ての局面において、FOX M 1、TR P M 3、P D R G 1、S R S F 5、P D E 4 D、F 1 2、P D K 4、A D A M T S 1、A D A M T S 9、B 3 G N T 5、C D 3 8、C E B P D、C E N P F、C R E M、D K K 1、E M P 1、E R R F I 1、F 3、H J U R P、I L 1 R 1、I L 8、J U N B、K L F 1 0、K L F 4、L D L R、L G A L S 3、L P A R 1、M A L A T 1、M T U S 1、M Y B P C 1、N F I L 3、N R 4 A 3、O A T、P I 1 5、P T G S 2、R H O B T B 3、R I N 2、R N F T 2、S E L E、S L C 1 5 A 2、S O C S 2、S O C S 3、S S T R 1、S T 6 G A L 1、T S C 2 2 D 1、X B P 1およびZ F P 3 6の少なくとも1つの発現レベルを決定することは、遺伝子から生じる転写産物および/またはタンパク質アイソフォームの全てのレベルまたは選択物のレベルを決定することを含み得る。

10

## 【 0 0 8 6 】

それぞれの遺伝子に対して検出され得る転写産物および対応するタンパク質アイソフォームの例は、以下の表Dに示される：

20

## 【 0 0 8 7 】

表D - 本願発明において検出され得る典型的な転写産物および対応するタンパク質アイソフォーム

【表 D - 1】

遺伝子ID	Almacプローブセットにより 検出されるEnsembl転写産 物ID	Ensemblタンパク質ID
TRPM3	ENST00000377111	ENSP00000366315
	ENST00000423814	ENSP00000389542
	ENST00000357533	ENSP00000350140
	ENST00000354500	非タンパク質コード
	ENST00000377110	ENSP00000366314
PDRG1	ENST00000202017	ENSP00000202017
SRSF5	ENST00000553635	ENSP00000451391
	ENST00000554465	非タンパク質コード
	ENST00000556184	非タンパク質コード
	ENST00000557154	ENSP00000451088
	ENST00000394366	ENSP00000377892
	ENST00000557460	非タンパク質コード
	ENST00000556587	非タンパク質コード
	ENST00000555547	非タンパク質コード
	ENST00000556330	非タンパク質コード
	ENST00000554929	非タンパク質コード
	ENST00000553521	ENSP00000452123
PDE4D	ENST00000507116	ENSP00000424852
	ENST00000502575	ENSP00000425917
	ENST00000502484	ENSP00000423094
	ENST00000340635	ENSP00000345502
	ENST00000546160	ENSP00000442734
	ENST00000505453	ENSP00000421013
	ENST00000360047	ENSP00000353152
	ENST00000405053	非タンパク質コード
	ENST00000405755	ENSP00000384806
	ENST00000309641	非タンパク質コード
	ENST00000514231	非タンパク質コード
PDK4	ENST00000473796	非タンパク質コード
	ENST00000005178	ENSP00000005178
ADAMTS 1	ENST00000284984	ENSP00000284984
	ENST00000464589	非タンパク質コード
ADAMTS 9	ENST00000482490	非タンパク質コード
	ENST00000295903	ENSP00000295903
	ENST00000481060	ENSP00000417521
	ENST00000498707	ENSP00000418735
B3GNT5	ENST00000460419	ENSP00000420778
	ENST00000326505	ENSP00000316173
CEBPD	ENST00000408965	ENSP00000386165
CENPF	ENST00000366955	ENSP00000355922

10

20

30

40

【表 D - 2】

CREM	ENST000000464475	ENSP000000418450
	ENST000000488328	ENSP000000417460
	ENST000000490460	非タンパク質コード
	ENST000000479070	ENSP000000420511
	ENST000000463314	ENSP000000418336
	ENST000000374734	ENSP000000363866
	ENST000000484283	ENSP000000417165
	ENST000000463960	ENSP000000419684
	ENST000000460270	ENSP000000420437
	ENST000000473940	ENSP000000420681
	ENST000000469517	非タンパク質コード
	ENST000000342105	ENSP000000341875
	ENST000000461968	非タンパク質コード
	ENST000000374728	ENSP000000363860
	ENST000000395887	ENSP000000379225
	ENST000000495960	非タンパク質コード
	ENST000000429130	ENSP000000393538
	ENST000000348787	ENSP000000345384
	ENST000000337656	ENSP000000337138
	ENST000000333809	ENSP000000333055
	ENST000000487132	ENSP000000418798
	ENST000000374721	ENSP000000363853
	ENST000000439705	ENSP000000409220
	ENST000000344351	ENSP000000344365
	ENST000000345491	ENSP000000265372
	ENST000000474362	ENSP000000419018
	ENST000000361599	ENSP000000354593
	ENST000000395895	ENSP000000379232
	ENST000000354759	ENSP000000346804
	ENST000000487763	ENSP000000417807
	ENST000000356917	ENSP000000349387
DKK1	ENST000000476752	非タンパク質コード
	ENST000000373970	ENSP000000363081
EMP1	ENST000000256951	ENSP000000256951
	ENST000000537612	ENSP000000445319
ERRFI1	ENST000000487559	ENSP000000467030
	ENST000000474874	ENSP000000466958
	ENST000000377482	ENSP000000366702
	ENST000000467067	ENSP000000465100
	ENST000000469499	ENSP000000466454
HJURP	ENST000000441687	ENSP000000401944
	ENST000000411486	ENSP000000414109
	ENST000000432087	ENSP000000407208
	ENST000000433484	非タンパク質コード

10

20

30

40

【表 D - 3】

I L 1 R 1	ENST000000422532	非タンパク質コード
	ENST000000409929	ENSP000000386776
	ENST000000233946	ENSP000000233946
	ENST000000409288	ENSP000000386478
	ENST000000413623	非タンパク質コード
	ENST000000409589	ENSP000000386555
	ENST000000424272	ENSP000000415366
	ENST000000409329	ENSP000000387131
	ENST000000428279	ENSP000000410461
	ENST000000410023	ENSP000000386380
J U N B	ENST000000302754	ENSP000000303315
K L F 1 0	ENST000000285407	ENSP000000285407
	ENST000000395884	ENSP000000379222
K L F 4	ENST000000497048	非タンパク質コード
	ENST000000493306	非タンパク質コード
	ENST000000374672	ENSP000000363804
L D L R	ENST000000252444	ENSP000000252444
	ENST000000560628	非タンパク質コード
L G A L S 3	ENST000000254301	ENSP000000254301
	ENST000000556438	非タンパク質コード
L P A R 1	ENST000000358883	ENSP000000351755
	ENST000000541779	ENSP000000445697
	ENST000000374430	ENSP000000363552
	ENST000000374431	ENSP000000363553
M A L A T 1	ENST000000534336	非タンパク質コード
M T U S 1	ENST000000517413	非タンパク質コード
	ENST000000381861	ENSP000000371285
	ENST000000520196	非タンパク質コード
	ENST000000381869	ENSP000000371293
	ENST000000262102	ENSP000000262102
	ENST000000400046	ENSP000000382921
	ENST000000544260	ENSP000000445738
	ENST000000297488	ENSP000000297488

10

20

30

【表 D - 4】

MYBPC1	ENST000000541119	ENSP000000442847
	ENST000000551300	ENSP000000447116
	ENST000000361466	ENSP000000354849
	ENST000000547509	ENSP000000447362
	ENST000000552198	非タンパク質コード
	ENST000000547405	ENSP000000448175
	ENST000000441232	ENSP000000388989
	ENST000000452455	ENSP000000400908
	ENST000000550270	ENSP000000449702
	ENST000000392934	ENSP000000376665
	ENST000000545503	ENSP000000440034
	ENST000000550514	ENSP000000447404
	ENST000000550501	非タンパク質コード
	ENST000000553190	ENSP000000447900
	ENST000000360610	ENSP000000353822
	ENST000000361685	ENSP000000354845
	ENST000000549145	ENSP000000447660
	ENST000000536007	ENSP000000446128
NFIL3	ENST000000534336	ENSP000000297689
NR4A3	ENST000000395097	ENSP000000378531
	ENST000000330847	ENSP000000333122
PI15	ENST000000260113	ENSP000000260113
	ENST000000523773	ENSP000000428567
PTGS2	ENST000000490885	非タンパク質コード
	ENST000000559627	非タンパク質コード
	ENST000000367468	ENSP000000356438
	ENST000000466691	非タンパク質コード
RHOBTB 3	ENST000000510313	ENSP000000424844
	ENST000000379982	ENSP000000369318
	ENST000000504179	ENSP000000422360
RIN2	ENST000000484638	非タンパク質コード
	ENST000000255006	ENSP000000255006
RNFT2	ENST000000319176	ENSP000000321405
	ENST000000547718	非タンパク質コード
	ENST000000551251	非タンパク質コード
	ENST000000407967	ENSP000000385669
	ENST000000392549	ENSP000000376332
	ENST000000257575	ENSP000000257575
SELE	ENST000000367777	ENSP000000356751
	ENST000000367775	ENSP000000356749
	ENST000000367781	ENSP000000356755
	ENST000000333360	ENSP000000331736
	ENST000000367776	ENSP000000356750
	ENST000000367779	ENSP000000356753
	ENST000000367780	ENSP000000356754
	ENST000000367782	ENSP000000356756

10

20

30

40

【表 D - 5】

SLC15A 2	ENST000000469422	非タンパク質コード
	ENST000000295605	ENSP000000295605
	ENST000000489711	ENSP000000417085
SOCS2	ENST000000549206	ENSP000000448815
	ENST000000549122	ENSP000000447161
	ENST000000548537	ENSP000000448709
	ENST000000551883	ENSP000000474805
	ENST000000340600	ENSP000000339428
SOCS3	ENST000000330871	ENSP000000330341
SSTR1	ENST000000267377	ENSP000000267377
ST6GAL 1	ENST000000470633	非タンパク質コード
	ENST000000457772	ENSP000000412221
	ENST000000169298	ENSP000000169298
	ENST000000448044	ENSP000000389337
TSC22D 1	ENST000000261489	ENSP000000261489
	ENST000000458659	ENSP000000397435
	ENST000000501704	ENSP000000437414
XBP1	ENST000000216037	ENSP000000216037
	ENST000000405219	ENSP000000384295
	ENST000000344347	ENSP000000343155
	ENST000000403532	ENSP000000385162
	ENST000000482720	非タンパク質コード
ZFP36	ENST000000594442	ENSP000000471239
	ENST000000248673	ENSP000000248673
	ENST000000597629	ENSP000000469647
F12	ENST000000510358	非タンパク質コード
	ENST000000514943	非タンパク質コード
	ENST000000502854	非タンパク質コード
	ENST000000504406	非タンパク質コード
	ENST000000253496	ENSP000000253496
CD38	ENST000000226279	ENST000000226279
	ENST000000502843	非タンパク質コード
F3	ENST000000370207	ENSP000000359226
	ENST000000334047	ENSP000000334145
	ENST000000480356	非タンパク質コード
IL8	ENST000000307407	ENSP000000306512
OAT	ENST000000471127	非タンパク質コード
	ENST000000368845	ENSP000000357838
	ENST000000539214	ENSP000000439042
FOXMI	ENST000000342628	ENSP000000342307
	ENST000000536066	非タンパク質コード
	ENST000000361953	ENSP000000354492
	ENST000000359843	ENSP000000352901

10

20

30

40

## 【0088】

本願明細書に記載されている方法は、サンプルから総核酸またはRNAを抽出することをさらに含み得る。適当な方法は、当分野で知られており、市販されているキット、例えばRneasyおよびGeneJET RNA精製キットの使用を含む。

## 【0089】

1つの態様において、当該方法は、対象からサンプルを得ることをさらに含み得る。一

50

般的に、当該方法は、単離されたサンプルで行われるインビトロ方法である。

【0090】

本願発明の全ての局面において、サンプルは適当な形態であり得る。サンプルは、前立腺細胞、しばしば前立腺組織サンプルを含んでよく、当該物から本質的になってよく、または当該物からなつてよい。前立腺細胞または前立腺組織は前立腺癌細胞を含み得る。特定の態様において、サンプルは、ホルマリン固定パラフィン包埋生検サンプルを含むか、当該サンプルから本質的になるか、または当該サンプルからなる。組織サンプルは任意の適当な技術によって得ることができる。例は、生検処理、所望により微細針吸引生検処理を含む。体液サンプルもまた利用され得る。適当なサンプル型は、全血、血清および血漿サンプルを含む血液、尿および精液を含む。

10

【0091】

本願発明の方法は、対象において前立腺癌に対する処置を選択すること、および所望により処置を行うことを含み得る。1つの態様において、前立腺癌の特性化および/または予後が再発および/または転移および/または予後不良の可能性の増加であるとき、選択された処置が

- a) 抗ホルモン処置
- b) 細胞毒性剤
- c) 生物学的製剤
- d) 放射線治療
- e) 標的療法
- f) 手術

の1つ以上である。

20

【0092】

抗ホルモン処置(またはホルモン療法)は、選択されるホルモン、特にテストステロンのレベルおよび/または活性を低下させる処置の形態を意味する。ホルモンは、腫瘍増殖および/または転移を促進し得る。抗ホルモン処置は、黄体形成ホルモンプロッカー、例えばゴセレリン(Zoladexとも呼ばれる)、プセレリン、リュープロレリン(Prostapとも呼ばれる)、ヒストレリン(Vantas)およびトリプトレリン(Decapeptylとも呼ばれる)を含み得る。抗ホルモン処置は、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)プロロッカー、例えばデガレリクス(Firmagon)または抗アンドロゲン、例えばフルタミド(Drogenilとも呼ばれる)およびピカルタミド(Casodexとも呼ばれる)を含み得る。特定の態様において、抗ホルモン処置はピカルタミドおよび/またはアピラテロンであり得る。

30

【0093】

細胞毒性剤は、白金をベースとする薬剤および/またはタキサンであり得る。特定の態様において、白金をベースとする薬剤は、シスプラチン、カルボプラチンおよびオキサリプラチンから選択される。タキサンは、パクリタキセル、カバジタキセルまたはドセタキセルであり得る。細胞毒性剤はまた、ビンカアルカロイド、例えばビンORELビンまたはビンプラスチンであり得る。細胞毒性剤は、トポイソメラーゼインヒビター、例えばエトボシドまたはアントラサイクリン(抗生物質)、例えばドキソルビシンであり得る。細胞毒性剤は、アルキル化剤、例えばエストラムスチンであり得る。

40

【0094】

生物学的製剤は、生物学的処理によって作られる医薬品を意味する。生物学的製剤は、例えば、ワクチン、血液または血液成分、細胞、遺伝子治療、組織、または組み換え治療タンパク質であり得る。所望により、生物学的製剤は抗体および/またはワクチンである。生物学的製剤はSipuleucel-Tであり得る。

【0095】

1つの態様において、放射線治療は拡大放射線治療、好ましくは広範囲放射線治療である。

【0096】

50

手術は前立腺全摘出術を含み得る。前立腺全摘出術は、全前立腺、精嚢および精管の除去を意味する。さらなる態様において、手術は、腫瘍切除、すなわち腫瘍の全ての除去または腫瘍の一部の除去を含む。

#### 【0097】

標的療法は、前立腺癌の処置に特異的な薬物標的に対して標的治療剤を使用する処置を意味する。特定の態様において、これは標的に対するインヒビター、例えばPARP、AKT、MET、VEGFRなどを意味し得る。PARPインヒビターは、酵素ポリADPリボースポリメラーゼ(PARP)の薬理的インヒビターのグループである。癌のいくつかの形態は、正常細胞よりもPARPに依存しており、PARPを癌治療に対する魅力的な標的にさせる。(臨床試験において)例は、イニパリブ(iniparib)、オラパリブ(olaparib)、ルカパリブ(rucaparib)、ベリパリブ(veliparib)、CEP 9722、MK 4827、BMN-673および3-アミノベンズアミドを含む。タンパク質キナーゼB(PKB)としても知られているAKTは、多数の細胞過程、例えばグルコース代謝、アポトーシス、細胞増殖、転写および細胞移動において重要な役割を果たすセリン/スレオニン-特異的タンパク質キナーゼである。AKTは、腫瘍細胞の生存、増殖、および侵襲性に関連する。AKTインヒビターの例は、VQD-002、ペリホシン、ミルテホシンおよびAZD5363を含む。METは、肝細胞増殖因子受容体(HGFR)をコードするプロトオンコジーンである。肝細胞増殖因子受容体タンパク質は、チロシン-キナーゼ活性を有する。METの阻害のためのキナーゼインヒビターの例は、K252a、SU11274、PHA-66752、ARQ197、フォレチニブ(Foretinib)、SGX523およびMP470を含む。MET活性はまた、HGFとの相互作用を阻害することによりブロックすることができる。切断されたHGF、抗HGF抗体および開裂不可能なHGFを含む多くの適当なアンタゴニストが知られている。VEGF受容体は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に対する受容体である。種々のインヒビター、例えばレンバチニブ、モテサニブ、パゾパニブおよびレゴラフェニブが知られている。

#### 【0098】

本願発明の方法は、治療選択ならびに新規治療の臨床試験評価中の強化戦略のための患者グループを選択することを導くことができる。例えば、推定抗癌剤または処置レジメンを評価するとき、本願明細書に記載されている方法は、再発および/または転移および/または予後不良の可能性の増加を有するとして特徴付けられる前立腺癌を有する臨床試験のための個体を選択するために使用され得る。

#### 【0099】

本願発明はまた、本願明細書に記載されている方法を実施するためのシステムまたは装置に関する。

#### 【0100】

さらなる局面において、本願発明は、対象において前立腺癌を特徴付ける、および/または予後決定するためのシステムまたは試験キットであって、

a) 当該対象由来のサンプルにおいて、FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルを決定するための1つ以上の試験装置

b) 処理装置; および

c) 処理装置によって実行されるとき、

(i) 1つ以上の試験装置にて、当該サンプルにおいて、FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9



、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの決定された発現レベルにアクセスする、および/または当該発現レベルを計算する

(ii) 当該サンプルにおいて、FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つのレベルの増加または減少が存在するかどうかを計算する；および

(iii) 前立腺癌の特性化および/または予後を処理装置から出力するように構成されるコンピューターのアプリケーションを含む、記憶媒体を含む、キットに関する。

#### 【0101】

試験装置は、遺伝子の発現レベルが決定される成分の組合せを意味する。当該成分は、タンパク質、RNAまたはエピジェネティック修飾のレベルでの発現レベルを決定するための方法に関して上記のいずれかのものを含み得る。例えば、当該成分は抗体、プライマー、検出剤などであり得る。成分はまた、1つ以上の以下のもの：顕微鏡、顕微鏡スライド、x線フィルム、放射線カウンター、シンチレーションカウンター、分光光度計、比色計、蛍光光度計、照度計、および濃度計を含み得る。

#### 【0102】

1つの態様において、システムまたは試験キットは、処理装置からの出力のためのディスプレイをさらに含む。

#### 【0103】

本願発明はまた、上記定義のコンピューターのアプリケーションを含むコンピューターのアプリケーションまたは記憶媒体に関する。

#### 【0104】

1つの態様において、本願明細書に記載されている方法にしたがって、対象において前立腺癌を特徴付ける、および/または予後決定するための、コンピューター実行方法、システム、およびコンピュータープログラム製品を提供する。例えば、コンピュータープログラム製品は、コンピューターによって実行されるとき、コンピューターが本願明細書に記載されている対象において前立腺癌を特性化および/または予後決定させる、具体化されたコンピューター可読のプログラム命令を有する持続性のコンピューター可読の記憶装置を含み得る。例えば、コンピューターの実行可能な命令は、コンピューターに、

(i) 1つ以上の試験装置にて、サンプルにおいて、FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの決定された発現レベルにアクセスさせる、および/または当該発現レベルを計算させ得る；

(ii) サンプルにおいて、FOX M1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE

10

20

30

40

50

4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つのレベルの増加または減少が存在するか否かを計算させ得る；および

(iii) 前立腺癌の特性化および/または予後に関して出力を提供させ得る。

【0105】

1つの態様において、コンピューター実行方法、システム、およびコンピュータープログラム製品は、例えばコンピューターおよびモジュールを操作および実行する、コンピューターのアプリケーションにおいて具体化され得る。実行されるとき、アプリケーションは、本願明細書に記載されている実施例態様にしたがって、対象において前立腺癌を特徴付け得る、および/または予後決定し得る。

【0106】

本願明細書において使用されるとき、コンピューターは、あらゆるコンピューター、サーバー、組み込みシステム、またはコンピューターシステムに対応し得る。モジュールは、種々の方法を行うこと、および本願明細書に示される機能进行处理することにおいてコンピューターを促進するように構成される1つ以上のハードウェアまたはソフトウェアエレメントを含み得る。コンピューターは、種々の内部または付属部品、例えば処理装置、システムバス、システム記憶装置、記憶媒体、入出力インターフェース、およびネットワークとやりとりするためのネットワークインターフェースを含み得る。コンピューターは、慣用のコンピューターシステム、組み込みコントローラー、ラップトップ型コンピューター、サーバー、カスタマイズされた機械、任意の他のハードウェアプラットフォーム、例えば研究所コンピューターまたは装置、例えば、またはそれらの任意の組合せとして実行され得る。コンピューターは、例えばデータネットワークまたはバスシステムを介して、相互接続された複数のコンピューターを使用して機能するように構成される分散システムであり得る。

【0107】

処理装置は、本願明細書に記載されている操作および機能を行い、リクエストフロー(request flow)を管理し、マッピングに取り組むように、および、計算を行い、コマンドを生成するようにコードまたは命令を実行するように構成され得る。処理装置は、コンピューターにおいてコンポーネントの操作をモニタリングおよびコントロールするように構成され得る。処理装置は、汎用処理装置、処理装置コア、多重処理装置、再構成可能な処理装置、マイクロコントローラー、デジタルシグナル処理装置(「DSP」)、特定用途向け集積回路(「ASIC」)、グラフィックス・プロセッシング・ユニット(「GPU」)、フィールド・プログラマブル・ゲート・アレイ(「FPGA」)、プログラム可能論理回路(「PLD」)、コントローラー、ステートマシン(state machine)、ゲーテッドロジック(gated logic)、別々のハードウェアコンポーネント、任意の他のプロセッシング・ユニット、またはそれらの任意の組合せもしくは多数であり得る。処理装置は、シングル・プロセッシング・ユニット、マルチプロセッシング・ユニット、シングル処理コア、マルチ処理コア、専用処理コア、コプロセッサ、またはそれらの任意の組合せであり得る。1つの実施例態様において、処理装置は、コンピューターの他のコンポーネントと一緒に、1つ以上の他のコンピューター内で実行するバーチャル化コンピューターであり得る。

【0108】

システム記憶装置は、非揮発性メモリー、例えば読取専用メモリー(「ROM」)、プログラム可能型読取専用メモリー(「PROM」)、消去可能型読取専用メモリー(「EPROM」)、フラッシュメモリー、または適用される電源有り、または無しで、プログ

10

20

30

40

50

ラム命令またはデータを保存することができる他の任意の装置を含み得る。システム記憶装置はまた、揮発性メモリー、例えばランダムアクセスメモリー（「RAM」）、スタティックランダムアクセスメモリー（「SRAM」）、ダイナミックランダムアクセスメモリー（「DRAM」）、および同期型ダイナミックランダムアクセスメモリー（「SDRAM」）を含み得る。RAMの他のタイプはまた、システム記憶装置を実行するために使用され得る。システム記憶装置は、シングルメモリーモジュールまたはマルチメモリーモジュールを使用して実行され得る。システム記憶装置はコンピューターの一部であり得るが、当業者は、対象技術の範囲から逸脱することなく、システム記憶装置がコンピューターから分離され得ることを認識する。システム記憶装置は、非揮発性記憶装置、例えば記憶媒体を含んでよく、または共に操作してもよいことも理解すべきである。記憶媒体は、ハードディスク、フロッピーディスク、コンパクトディスク読取専用メモリー（「CD-ROM」）、デジタル多用途ディスク（「DVD」）、ブルーレイディスク、磁気テープ、フラッシュメモリー、他の非揮発性記憶装置、半導体ドライブ（「SSD」）、任意の磁気記憶装置、任意の光学記憶装置、任意の蓄電装置、任意の半導体記憶装置、任意の物理ベースの記憶装置、任意の他のデータ記憶装置、またはそれらの任意の組合せもしくは多数を含み得る。記憶媒体は、1つ以上のオペレーティングシステム、アプリケーションプログラムおよびプログラムモジュール、例えばモジュール、データ、または任意の他の情報を保存し得る。記憶媒体は、コンピューターの一部であってよく、またはコンピューターと接続されていてもよい。記憶媒体はまた、コンピューター、例えばサーバー、データベースサーバー、クラウド保存、ネットワーク接続保存などと通信して、1つ以上の他のコンピューターの一部であり得る。

10

20

#### 【0109】

モジュールは、種々の方法を行う、および本願明細書に示される機能処理するコンピューターを促進するように構成される1つ以上のハードウェアまたはソフトウェアエレメントを含み得る。モジュールは、システム記憶装置、記憶媒体、またはその両方と一緒に、ソフトウェアまたはファームウェアとして記憶される1つ以上の一連の命令を含み得る。したがって、記憶媒体は、命令またはコードが処理装置による実行のために保存され得る機械またはコンピューター可読媒体の例を示し得る。機械またはコンピューター可読媒体は、一般的に、処理装置に命令を提供するために使用される任意の媒体を示し得る。モジュールと関連するかかる機械またはコンピューター可読媒体は、コンピューターソフトウェア製品を含み得る。モジュールを含むコンピューターソフトウェア製品が、ネットワークを介してコンピューターにモジュールを送達するための1つ以上の処理または方法、任意のシグナル含有媒体、または任意の他の通信または送達技術と関連してもよいことも理解すべきである。モジュールはまた、ハードウェア回路またはハードウェア回路を構成するための情報、例えばマイクロコードまたはFPGAまたは他のPLDのための構成情報を含み得る。

30

#### 【0110】

入出力（「I/O」）インターフェースは、1つ以上の外部装置と連結し、1つ以上の外部装置からデータを受け取り、1つ以上の外部装置にデータを送るように構成され得る。かかる外部装置はまた、種々の内部装置と共に、周辺装置として知られていてもよい。I/Oインターフェースは、種々の周辺装置とコンピューターまたは処理装置を作動可能に連結するために、電気的および物理的接続の両方を含み得る。I/Oインターフェースは、データ、アドレス、および周辺装置、コンピューター、または処理装置間の調節シグナルを伝えるように構成され得る。I/Oインターフェースは、あらゆる標準インターフェース、例えばスモールコンピューターシステムインターフェース（「SCSI」）、シリアル接続SCSI（「SAS」）、ファイバーチャネル、ペリフェラルコンポーネントインターコネクト（「PCI」）、PCIエクスプレス（「PCIe」）、シリアルバス、パラレルバス、アドバンスドテクノロジーアタッチメント（advanced technology attached）（「ATA」）、シリアルATA（「SATA」）、ユニバーサルシリアルバス（「USB」）、サンダーボルト（Thunderbolt）、ファイヤーワイヤー（Fir

40

50

e Wire)、種々のビデオバス(video buses)などを実行するように構成され得る。I/Oインターフェースは、1つのインターフェースまたはバステクノロジーのみを実行するように構成され得る。

【0111】

あるいは、I/Oインターフェースは、マルチインターフェースまたはバステクノロジーを実行するように構成され得る。I/Oインターフェースは、システムバスの一環として、システムバスの全てとして、またはシステムバスと共に操作するように構成され得る。I/Oインターフェースは、1つ以上の外部装置、内部装置、コンピューター、または処理装置間の伝送をバッファーするための1つ以上のバッファーを含み得る。

【0112】

I/Oインターフェースは、コンピューターと、マウス、タッチスクリーン、スキャナー、エレクトロニックデジタイザー、センサー、レシーバー、タッチパッド、トラックボール、カメラ、マイクロホン、バステクノロジー、任意の他のポインティングデバイス、またはそれらの任意の組合せを含む種々の入力装置を連結し得る。I/Oインターフェースは、コンピューターと、ビデオディスプレイ、スピーカー、プリンター、プロジェクター、触感フィードバック装置(tactile feedback devices)、オートメーションコントロール(automation control)、ロボットコンポーネント(robotic components)、アクチュエータ、モーター、ファン、ソレノイド、バルブ(valves)、ポンプ(pumps)、トランスミッター、シグナルエミッター、ライトなどを含む種々の出力装置を連結し得る。

【0113】

コンピューターは、ネットワークを介して1つ以上の他のシステムまたはコンピューターへのネットワークインターフェースを介して論理的接続を使用するネットワーク環境において操作し得る。ネットワークは、広域ネットワーク(WAN)、ローカルエリアネットワーク(LAN)、イントラネット、インターネット、ワイヤレスアクセスネットワーク、有線ネットワーク、携帯電話ネットワーク、電話ネットワーク、光ネットワーク、またはそれらの組合せを含み得る。ネットワークは、任意のトポロジーのパケット交換、回路交換であり得、任意の通信プロトコルを使用し得る。ネットワーク内の通信リンクは、種々のデジタルまたはアナログ通信媒体、例えば光ファイバーケーブル、自由空間光通信、導波管、導体、無線リンク、アンテナ、無線通信周波数などを含み得る。

【0114】

処理装置は、システムバスを介する本願明細書に記載のコンピューターまたは種々の周辺装置の他のエレメントに連結され得る。システムバスは、処理装置内、処理装置外、または両方であり得ること理解されるべきである。いくつかの態様において、任意の処理装置、コンピューターの他のエレメント、または本願明細書に記載の種々の周辺装置は、単一装置、例えばシステムオンチップ(「SOC」)、システムオンパッケージ(「SOP」)、またはASIC装置に組み込まれ得る。

【0115】

態様は、本願明細書に記載および説明される機能を具体化するコンピュータープログラムであって、該コンピュータープログラムは命令を実行する機械可読媒体および処理装置に保存される命令を含むコンピューターシステムにおいて実行するコンピュータープログラムを含み得る。しかしながら、コンピュータープログラミングにおいて態様を実行する多数の異なる方法が存在し得ることを理解すべきであり、該態様は、コンピュータープログラム命令の1つのセットに限定されると解釈されるべきでない。さらに、熟練したプログラマーは、本願明細書に記載されている1つ以上の記載の態様を実行するように、かかるコンピュータープログラムを書くことができる。したがって、プログラムコード命令の特定のセットの記載を、態様を作る方法および態様を使用する方法の十分な理解のために必要であると考えない。さらに、当業者は、本願明細書に記載されている態様の1つ以上の局面は、1つ以上のコンピューターシステムにおいて具体化させ得るとき、ハードウェア、ソフトウェア、またはそれらの組合せによって行われ得ると理解することができる。さらに、コンピューターによって行われる行為への言及は、2つ以上のコンピューターが

10

20

30

40

50

行為を行ってもよく、単一のコンピュータによって行われると解釈すべきでない。

【0116】

本願明細書に記載されている例の態様は、以前に記載の方法および処理機能を行うコンピュータハードウェアおよびソフトウェアと共に使用することができる。本願明細書に記載されているシステム、方法、および処理は、プログラム可能型コンピュータ、コンピュータ実行可能なソフトウェア、またはデジタル回路において具体化することができる。ソフトウェアは、コンピュータ可読媒体に保存することができる。例えば、コンピュータ可読媒体は、フロッピーディスク、RAM、ROM、ハードディスク、リムーバブルメディア、フラッシュメモリ、メモリスティック、光媒体、光磁気メディア、CD-ROMなどを含むことができる。デジタル回路は、集積回路、ゲートアレイ、ビルディングブロックロジック(building block logic)、フィールド・プログラマブル・ゲート・アレイ(FPGA)などを含むことができる。

10

【0117】

本願明細書に記載されている方法を行うための試薬、ツール、および/または指示は、キットにおいて提供することができる。かかるキットは、例えば生検による、患者から組織サンプルを回収するための試薬、および組織を処理するための試薬を含むことができる。キットはまた、発現レベル分析を行うための1つ以上の試薬、例えば、患者サンプルにおいてバイオマーカーの発現レベルを決定するための、RT-PCRおよびqPCRを含む核酸増幅、NGS、ノーザンブロット、プロテオーム分析、または免疫組織化学を行うための試薬を含むことができる。例えば、RT-PCRを行うためのプライマー、ノーザンブロット分析を行うためのプローブ、および/またはプロテオーム分析、例えばウェスタンブロット、免疫組織化学およびELISA分析を行うための本願明細書に記載の抗体またはアプタマーを、かかるキットに含むことができる。アッセイのための適当なバッファもまた含むことができる。任意のこれらのアッセイのために必要とされる検出試薬もまた含むことができる。キットは、例えばアレイまたはPCRをベースとするキットであってよく、例えばさらなる試薬、例えばポリメラーゼおよび/またはdNTPを含み得る。本願明細書に記載のキットはまた、発現レベルを測定するためのアッセイを行う方法を記載している指示書を含むことができる。

20

【0118】

キットは、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOC2、SOC3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つに相補的な1つ以上のプライマー対を含み得る。

30

【0119】

キットはまた、参照遺伝子に相補的な1つ以上のプライマー対、例えばTPT1、RPS14またはRPL37Aの少なくとも1つに相補的なプライマーを含み得る。

40

【0120】

かかるキットはまた、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOC2、SOC3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36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、

50

28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45または46個に相補的なプライマー対を含み得る。

【0121】

キットは、TRPM3、PDRG1、F12、CENPF、HJURP、RNFT2、およびSSTR1の少なくとも1つに相補的な1つ以上のプライマー対およびSRSF5、PDE4D、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つに相補的な1つ以上のプライマー対を含み得る。

10

【0122】

対象において前立腺癌を特徴付ける、および/または予後決定するためのキットは、ADAMTS9、EMP1、F3、LDLR、LGALS3、MALAT1、MTUS1、NR4A3、PTGS2、RIN2、SLC15A2、SOC S3およびTSC22D1の少なくとも1つのメチル化状態を決定することを可能にし得る。高メチル化であってもよい決定されたメチル化状態は、前立腺癌の特性化および/または予後を提供するために使用される。かかるキットは、遺伝子のメチル化状態を直接的に決定するためのプライマーおよび/またはプローブを含み得る。したがって、それらは、ハイブリダイゼーションによってDNAのメチル化および非メチル化形態を区別するメチル化特異的プライマーおよび/またはプローブを含み得る。かかるキットはまた、一般的に、CpGジヌクレオチドモチーフのメチル化または非メチル化形態のいずれかを選択的に修飾する試薬を含む。適当な化学試薬は、ヒドラジンおよびバイサルファイトイオンを含む。例は、ナトリウムバイサルファイトである。しかしながら、キットは、メチル化状態を決定するための上記と他の試薬、例えば制限エンドヌクレアーゼを含み得る。

20

【0123】

したがって、本願発明はまた、上記1つ以上の抗体またはアプタマーを含む対象において前立腺癌を特徴付ける、および/または予後決定するためのキットに関する。

【0124】

上記のとおり、1つの態様において、TRPM3、PDRG1、F12、CENPF、HJURP、RNFT2、およびSSTR1、またはFOX M1の少なくとも1つの発現レベルの増加が、再発および/または転移および/または予後不良の可能性の増加を示す。さらなる態様において、SRSF5、PDE4D、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の少なくとも1つの発現レベルの減少が、再発および/または転移および/または予後不良の可能性の増加を示す。

30

40

【0125】

したがって、本願明細書に記載されているキットは、TRPM3、PDRG1、F12、CENPF、HJURP、RNFT2、およびSSTR1またはFOX M1の少なくとも1つおよびSRSF5、PDE4D、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOC S2、SOC S3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1およびZFP36の

50

少なくとも1つの発現レベルを決定するための、(本願明細書に記載の)プライマー、プローブまたは抗体/アプタマーを含み得る。したがって、キットは、上方調節マーカおよび下方調節マーカの組合せの発現レベルを決定するために試薬を包含し得る。適当な抗体および/またはプライマー/プローブは、本願明細書の表B、CおよびDから得ることができる。

【0126】

キットに含まれる情報材料は、本願明細書に記載されている方法および/または本願明細書に記載されている方法のための試薬の使用に関する記述的材料、教育的材料、マーケティング材料または他の材料であり得る。例えば、キットの情報材料は、連絡先情報、例えば、物理アドレス、電子メールアドレス、ウェブサイト、または電話番号を含むことができ、キットのユーザーは、遺伝子発現分析を行うことについて、および結果を解釈することについて実質的な情報を得ることができる。

10

【0127】

キットは、上記コンピューターのアプリケーションまたは記憶媒体をさらに含み得る。

【0128】

種々の態様の範囲および精神から逸脱することなく、以前に示されている態様に記載されている例のシステム、方法、および行為は説明のためであり、代替態様において、特定の行為を、異なる順序で、お互いに並行して行う、完全に省略する、および/または異なる例の態様間で組み合わせることができ、および/または特定のさらなる行為を行うことができる。したがって、かかる代替態様は本願明細書に記載されている例に含まれる。

20

【0129】

特定の態様は詳細に上記されているが、記載は単に説明の目的のためである。したがって、上記の多くの局面は、特に明白に指定のない限り、必要な要素または必須の要素として意図されないと理解すべきである。

【0130】

特許請求の範囲に定義の態様の範囲および精神から逸脱することなく、上記のものに加えて、例の態様の記載の局面の修飾、および対応する同等の成分または行為は、本願の利益を有する当業者によって作ることができ、該範囲は、かかる修飾および同等の構造を含むように最大限広範な解釈を与えられる。

【図面の簡単な説明】

30

【0131】

【図1】70の原発性前立腺癌、20の転移性疾患を伴っての原発性癌、11の転移性疾患および25の正常前立腺サンプルFFPEを含むFFPE前立腺癌サンプルセットの監視されていない階層的クラスター分析。A. データセットにわたって非常にバリエーション(variable)遺伝子を使用して、転移性疾患適用とクラスター化する原発性腫瘍のサブセットを同定した(カイ二乗  $2.77 \times 10^{-10}$ )。B. Taylor および仲間によって公開されたデータセットの内部データセットから同定された1083個の特異的に発現される遺伝子を使用する半監視(Semi-supervised)階層的クラスター分析は、転移性疾患適用とクラスター化する原発性腫瘍の同様のサブクラスターを同定した(カイ二乗  $2.78 \times 10^{-6}$ )。C. 患者が転移生物学グループの一部であったまたは一部でなかったとき、患者が手術後に無病のままである確率のKaplan-Meier分析、危険率はロジック検定によって決定された。

40

【0132】

【図2】A. 開示由来のFOX M1 CHIP - Seq ヒットと83個の過剰発現遺伝子の重複、重複の超幾何学的試験  $p$ -値  $9.269 \times 10^{-5}$ 。B. FOX M1 CHIP - seq ヒットと重複し、過剰発現標的のままである39個の過剰発現標的のピアソン相関関係スコアのボックスプロット。T-検定( $p$ -値  $< 0.0001$ )。

【0133】

【図3】A. Greatの(<http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/>)機能分析、高メチル化プローブが位置しているゲノム領域の分子機能。B. EZH2 および H3

50

K 2 7 m e 3 の C H I P - S E Q 同定標的と過小発現遺伝子の重複を証明するベン図 (Venn diagram)、重複の超幾何学的試験。C . 高メチル化および H 3 K 2 7 m e 3 修飾と過小発現遺伝子の重複を証明するベン図。

【 0 1 3 4 】

【 図 4 】 転移生物学サブグループおよび非転移生物学サブグループ ( 「 L i s t 1 および 2 」 ) 間で低く相関されるものならびに非転移生物学サブグループおよび良性グループ ( 「 L i s t 3 」 ) 間で高く相関されるものを含む上位 1 0 , 0 0 0 位のプローブセット間の重複を示すベン図。

【 0 1 3 5 】

【 図 5 】 内部データセットにおいて同定されるサンプルクラスターの G A P 分析。

10

【 0 1 3 6 】

【 図 6 】 T o p p f u n を使用して (<http://toppgene.cchmc.org/>) 1 1 8 2 個のユニークな特異的に発現される遺伝子の機能分析 A . 過小発現遺伝子の有意な分子プロセス (molecular process) B . 過剰発現遺伝子の有意な分子プロセス

【 0 1 3 7 】

【 図 7 】 可能な I H C 抗体をスクリーニングするための試験アウトライン

【 発明を実施するための形態 】

【 0 1 3 8 】

本願発明は、以下の実験例を参照することによりさらに理解される。

【 0 1 3 9 】

20

結果

監視されていない階層的クラスター分析は、転移生物学により定義される前立腺癌において異なる分子サブグループを同定する

本願発明者らは、転移能を有する原発性前立腺癌が、転移性疾患および公知の随伴性転移を有する原発性疾患と転写的に類似であると仮説を立てた。この転移サブグループを同定するために、本願発明者らは、70 個の前立腺に臨床的に限定される切除された原発性前立腺癌サンプル、20 個の公知の随伴性転移性疾患を有する原発性前立腺癌サンプル、11 個の転移性疾患を有するリンパ節サンプル、および 25 個の正常前立腺サンプルを使用して、監視されていない階層的クラスター分析アプローチを行った。全体のデータセットにわたって非常にバリエーションなプローブセットを使用して、クラスター分析を行った。G A P 統計的試験 (Tibshirani et al 2001) は、統計的有意性を有する 2 つの主なサンプルクラスターを同定した ( 図 1 A、図 5 ) 。

30

【 0 1 4 0 】

これらの分子サブグループの 1 つは、転移性疾患および公知の随伴性転移を有する原発性腫瘍に対して有意な富化 (enrichment) を有した ( カイ二乗  $p = 2.77 \times 10^{-10}$  ) 。重要なことには、29 個の原発性前立腺サンプルがまた、このグループにおいて見出され、これは転移性疾患を示さなかったが、類似の転写生物学を共有した。腫瘍のこのグループは、本願明細書において「転移生物学サブグループ」および第 2 のサブグループ「非転移サブグループ」と称される。

【 0 1 4 1 】

40

次に、本願発明者らは、転移および非転移サブグループにおいて原発性腫瘍間の遺伝子発現分析を行い、1182 個の特異的に発現される転写産物を同定した。大多数のこれらの転写産物は転移サブグループにおいて過小発現された ( 1099 個の過小発現 対 83 個の過剰発現 ) 。

【 0 1 4 2 】

1182 個の特異的に発現される遺伝子が第 2 のデータセットにおいて予後 (prognostic) であるか否かを同定するために、本願発明者らは、T a y l o r および仲間によって公開された前立腺癌データセット (Taylor et al 2010) をクラスターするように当該遺伝子を使用した。このデータセットは、P S A 追跡が利用できる手術によって管理される前立腺癌を示す。本願発明者らの内部訓練セットと一致して、本願発明者らは 2 つの強力な

50



サンプルクラスターを見出し、その1つは転移サンプルに対して富化を証明した(カイニ乗  $p = 2.78 \times 10^{-6}$  (図1B)。重要なことには、このグループはまた、提示期間時に公知の転移性疾患を有さない63個の原発性腫瘍サンプルを含んだ。Kaplan Meier 分析は、転移生物学グループ内の原発性腫瘍が手術後の疾患再発までの時間がより短かったことを証明した(図1C)(危険率(HR) 2.377および  $p$ -値 0.0351)。サンプルクラスターの臨床的および病理学的特性は表1に詳しく述べられている。重要なことには、他の予後臨床的因子、例えば処置前のステージ(stage)、グレード(grade)またはPSAレベルにおいて違いを有さなかった。

#### 【0143】

転移生物学グループの基礎となる分子経路

どの分子経路が転移表現型および予後不良を引き起こすかを確立するために、本願発明者らは、転移および非転移サブグループ間の1182個の特異的に発現される遺伝子を使用して経路分析を行った。これは、転移サブグループにおいて10個の有意な過剰発現経路および20個の過小発現経路を同定した(表2iおよび2ii)。興味深いことに、転移サブグループにおいて大多数の過剰発現経路は細胞分裂進行と関連し(表2i)、過小発現分子経路は細胞接着、形態、ATF2およびp53転写に關与した。

#### 【0144】

これらの分子経路のどれが予後不良に關与するかを確立するために、本願発明者らはTaylorデータセットおよびSunおよび仲間によって公開された第2のデータセット(Sun et al 2009)をクラスターするためにそれぞれの経路を示す遺伝子を使用した。この後者のデータセットは、PSA追跡を有する手術で管理される原発性前立腺癌を示す。再発までの時間のKaplan Meier 分析を、観察されるクラスターのそれぞれに対して使用した(表2iおよび2ii)。

#### 【0145】

過剰発現分子経路のうち、FOX M1転写因子ネットワークのみがTaylorデータセットにおいて有意に予後であった(HR 2.755  $p = 0.0134$ )。さらに、FOX M1それ自体は、本願発明者らの内部訓練データセットにて転移生物学サブグループにおいて過剰発現した(FC 2.13)。増加したFOX M1が転移生物学グループにおいて有糸分裂遺伝子の過剰発現に關与するか否かを確立するために、本願発明者らは、Sanderおよび仲間およびChenおよび仲間により公開された2つの公のFox M1 CHIP - Seqデータ(Chen et al 2013、Sanders et al 2013)を取り出した。本願発明者らは、転移生物学グループにおいて過剰発現される遺伝子と、同定されるFOX M1 CHIP - Seq標的を重複した。意義深く、転移サブグループにおいて83個の過剰発現遺伝子のうち39が、データセットのいずれかにおいてFOX M1によって制限され、20個は両方に共通していた。この重複は高度に有意であった( $9.269 \times 10^{-5}$ )。さらに、本願発明者らは、内部データセットにおいてFOX M1レベルに対する全ての過剰発現転写産物の相関関係分析を行った(補足表3)。非CHIP標的に対するCHIP - Seqデータの分析を介して同定される39個のFOX M1標的の相関関係の比較は、CHIP - Seq標的のFOX M1標的 対 FOX M1によって制限されないものに対する相関関係スコアにおいて高度に有意な増加を証明した( $t$ 検定  $p$ -値  $< 0.0001$ ) (図2B)。総合すれば、このデータは、Fox M1過剰発現が転移サブグループにおいて過剰発現として検出される83個の遺伝子の大型サブセットの転写活性化に關与するということを強く示唆する。

#### 【0146】

TaylorおよびSunデータセットの両方において有意に予後である過小発現分子経路は、筋収縮、脂質生成およびATF2転写標的であった。ジルチアゼム経路は、Taylorデータセットにおいて有意に予後であったが、インテグリンシグナル伝達およびp53に対する転写標的は、Taylorデータセットにおいて失ったが、Sunデータセットにおいて予後有意性に達した。

#### 【0147】

10

20

30

40

50

遺伝子発現のエピジェネティックサイレンシングは転移生物学サブグループにおいて起こる

転移生物学サブグループにおいて特異的に発現される遺伝子の大多数は下方調節された。次に、本願発明者らは、何の起こり得るメカニズムが転移生物学グループにおいて遺伝子発現のこの顕著な喪失を説明することができるかを求めた。分子プロセスの分析は、クロマチン結合に関与する遺伝子が過剰発現されることを同定し（図6）、重要なことには、本願発明者らは、エピジェネティック遺伝子制御に関与することが知られているいくつかの遺伝子（AR、EZH2、HELLSおよびUHRF1を含む）が上方調節されたことに注目した（表3）。

【0148】

UHRF1は、転移生物学サブグループにおいて過剰発現された（2.375倍）。このタンパク質は最近、前立腺癌においてエピジェネティックサイレンシングに寄与すること、および該サイレンシングを維持することが示された（Babbio et al 2012）。UHRF1は、ヘミメチル化CpGに結合することができ、DNMT1をリクルートし（recruit）、DNAメチル化パターンを維持することができる（Bostick et al 2007、Sharif et al 2007）。プロモーターでの、またはプロモーター付近でのDNAメチル化の割合の増加は、遺伝子発現の低下と相互関係があることが示されており、これは遺伝子プロモーターへの転写因子の接近性にほぼ確実に関連している。

【0149】

したがって、本願発明者らは、高含量DNAメチル化アレイを使用して、本願発明者らの暫定的(interim)訓練セットからの22個の腫瘍のサブセット（それぞれのサブグループから11個）においてDNAメチル化レベルを測定した（サンプルは補足表3に詳細に記載されている）。転移サブグループにおいて1098個の過小発現遺伝子のグローバル分析は、418個がDNAメチル化の割合を増加させたことを証明した（重複のp値  $1.546 \times 10^{-34}$ ）（表4）。さらに、過剰発現遺伝子セットの分析は、有意な高または低メチル化状態を示さず、それにより、改変されたメチル化状態が過剰発現遺伝子セットにおいて重要ではないことを示唆した。

【0150】

高メチル化ゲノム領域のGREAT (<http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/>) 分析は、多くの豊富な分子プロセス（図3A）、特にDNA結合および転写因子機能を証明した。これは、メチル化が転移生物学グループにおいて遺伝子を直接的にサイレンシングすることだけでなく、遺伝子発現においてさらなる喪失を引き起こす転写に関与する遺伝子の喪失に関与することもできることを示唆した。

【0151】

エピジェネティックサイレンシングに関与する別の遺伝子であるEZH2は、転移生物学グループにおいて2倍を超えて過剰発現された（表3）。EZH2は、ポリコームグループタンパク質または（PCG）の2つのクラスの1つであるPRC2（ポリコーム抑制複合体2）の成分である。この複合体はヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有し、EZH2は触媒サブユニットである。実際には、EZH2発現は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性の重要な決定因子である。PRC2複合体は、ヒストンH3のリジン27をトリメチル化し（すなわちH3K27me3）、この部位は、転写的にサイレントなクロマチンの特徴である。EZH2機能が転移サブグループにおいて遺伝子発現の喪失の少なくとも一部を説明し得るか否かを確立するために、本願発明者らは、公のCHIP-Seq（Wu et al 2012）前立腺癌細胞系データセットを使用した。具体的には、本願発明者らは、EZH2およびH3K27me3に結合することが知られている遺伝子と転移生物学サブグループにおいて抑制されるものを比較した（図3B）。過小発現遺伝子のかなりの数がEZH2、H3K27me3または両方によって制限され（p値  $2.597 \times 10^{-12}$ ）、それにより、転移サブグループ内で遺伝子のサブセットのサイレンシングのための重要なメカニズムとして、EZH2介在ヒストン修飾を介するクロマチンサイレンシングを強く暗示した。

10

20

30

40

50

## 【0152】

興味深いことに、エピジェネティックサイレンシングの標的の一部のみが(123/602)高メチル化の割合を増加させ(図3C)、H3K27me3関連ヒストン修飾を有することが予測され、それにより2つのメカニズムが遺伝子発現をサイレンシングするように主に独立して働き得ることを示唆した。

## 【0153】

転移生物学サブグループの検出のための方法

階層的クラスター分析は、多くのサンプルからの遺伝子発現データの有用な分析方法である、しかしながら、それは、個々の腫瘍をあらかじめ分類するために使用することができない。さらに、以前の試験において、本願発明者らは、前立腺癌において腫瘍不均一性が同じ患者由来の腫瘍生検および切除された腫瘍プロファイル間の有意な不一致を引き起こすことを証明した。したがって、本願発明者らは、腫瘍が転移生物学サブグループと類似であるか否かをあらかじめ分類する免疫組織化学(IHC)に適当なマーカーを開発することを決定した。

10

## 【0154】

これをなし遂げるために、本願発明者らは2つの方法を使用し、本願発明者らは第1に、転移生物学サブグループおよび非転移生物学サブグループ間で特異的に発現されるが、非転移生物学サブグループおよび正常間でほとんど発現の違いを有さない転写産物を同定した。このプロセスは、2つのサンプルのt-検定方法を使用して393個のプローブセットを同定し、これらのプローブセットの~75%は転移生物学サブグループと比較して非転移生物学サブグループにおいて過剰発現した。テストケース内で正常前立腺を参照として使用することができるとき、本願発明者らは、このアプローチを標的型(targeted)と称した。

20

## 【0155】

第2のアプローチについて、本願発明者らは、転移生物学サブグループおよび非転移生物学サブグループ間で特異的に発現される1182個を評価し、この場合には、非転移生物学サブグループおよび良性/正常間で発現の違いが存在し得るとき、参照標的の必要条件が存在し、適当な参照を同定するために、本願発明者らはサブグループにかかわらず全ての前立腺癌サンプル内で最小の発現分散を有する遺伝子を同定した(上位3つの遺伝子が表7に要約される)。

30

## 【0156】

IHC標的の予後有用性

第1のアプローチについて、外部データセットにおいて独自評価を手助けするために、393個のプローブセットを遺伝子レベルにマップした、Taylor et al 2010。このデータセットにおいて、計349個の遺伝子を検出した。本願発明者らは、年齢、グレードおよびステージに対して補正されたCox比例ハザードと生化学的再発までの時間を使用してTaylorにおいてこれらの349個の遺伝子の多変量分析を行い、これは有意な多変量予後機能を有する7つの遺伝子をもたらした(p-値<0.05)、これらはTRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、CNPY4、F12およびPDK4であった(表5)。一変量生存分析もまた行い、52個の遺伝子がp-値<0.05で有意であった。これらの一流の(top ranked)プローブセットにおいて3つの遺伝子の重複が存在した；これらはSRSF5、PDE4DおよびPDK4であった。393個のプローブセットもまた、臨床的因子、すなわち病理学的Gleasonスコア(およびGleasonスコア1および2)と有意に関連しているか否かを決定するためにanova試験を使用して評価した。

40

## 【0157】

第2のアプローチについて、1182個の特異的に発現される遺伝子を同じ多変量分析において試験し、これは有意な多変量予後機能を有する56個の遺伝子を同定した(p-値<0.05)(表6)。一変量生存分析もまた行い、304個のユニークな(unique)遺伝子はp-値<0.05で有意であった。これらの一流のプローブセットにおいて41

50

個の遺伝子の重複が存在した。有意な多変量予後機能を有する標的の数は、検証の範囲外であり、したがって、本願発明者らは、予後経路（表 2 i および 2 i i ）、FOX M 1 CHIP - Seq ヒットおよび選択された文献レビューと相互参照することによってリストをさらに精密化した。集中的な経路および文献比較からの上位 14 個の遺伝子は表 7 に要約されている。有意な多変量予後力を証明した FOX M 1 それ自体および特異的に発現される FOX M 1 CHIP - Seq 標的は表 9 において要約されている。

【0158】

議論

早期前立腺癌を発症する大多数の男性は該疾患が原因で死なないため、生物学を原因とする転移拡散をより良く理解するための明確な必要条件が存在する。これは、さらなる侵襲性の原発性治療に対して高リスクな患者の適当な選択を可能にし、低リスクな患者を不必要な副作用から救い得る。

【0159】

この試験において、本願発明者らは、分子レベルで転移性疾患と類似である原発性前立腺癌のグループを同定した。これらの腫瘍は、いくつかの遺伝子の発現および定義された経路の喪失によって定義される；さらに、このグループは、有糸分裂に關与する遺伝子の発現の増加を引き起こすプロトオンコジーン FOX M 1 の活性化により定義される。

【0160】

本願発明者らは、腫瘍が再発および転移発生の可能性が増加しているか否かをあらかじめ評価するために、多変量予後力を有し、IHC 開発のために高度に適当である一連のマーカーを定義した。

【0161】

表 1

【表 1】

	転移生物学グループ	他のもの	p-値
平均 Gleason スコア	6.952	6.714	0.0730
平均ステージ	2.429	2.381	0.648
平均 PSA	9.677	7.788	0.1984
患者年齢	57.9	57.7	0.8633
再発までの時間	40.29	56.95	0.0014**

【0162】

Taylor データセットにおいて転移生物学腫瘍および非転移生物学グループの臨床的および病理学的基準。

【0163】

表 2 i

10

20

30

【表 2 i】

経路	経路 p- 値	Taylor HR	Taylor p-値	Sun H R	Sun p -値
細胞周期、 有糸分裂に 関与する遺 伝子	1. 78 E - 10	2. 118	0. 061 4	2. 061	0. 060 2
PLK1シ グナル伝達 事象	4. 42 E - 07	1. 843	0. 130 6	1. 54	0. 277 4
有糸分裂M -M/G1 期に関与す る遺伝子	1. 10 E - 06	1. 988	0. 099 7	0. 841	0. 682 3
有糸分裂前 中期に関与 する遺伝子	3. 92 E - 06	2. 062 28088 3	0. 077 9	0. 928 9	0. 828 4
Aurora Bシグナル 伝達	8. 51 E - 06	1. 823	0. 135 2	1. 031	0. 926 8
FOXM1 転写因子ネ ットワーク	4. 19 E - 04	2. 755	0. 013 4	1. 737	0. 106 4
G2/M移 行中のサイ クリンA1 関連事象に 関与する遺 伝子	1. 21 E - 02	1. 871	0. 127 4	0. 777 3	0. 477 7
APC/C のリン酸化 に関与する 遺伝子	1. 79 E - 02	1. 995	0. 092 2	0. 952 1	0. 883 8
細胞周期	3. 35 E - 02	1. 837	0. 139 7	0. 806 3	0. 532 4
G1/Sで E2F転写 標的に関与 する遺伝子	3. 98 E - 02	0. 462	0. 069 9	0. 421 4	0. 07

10

20

30

## 【0164】

TaylorおよびSunデータセットにおいてクラス標識をクラスターし、定義するために、Toppfun、知られている経路p-値、経路を使用するKaplan meier生存分析結果を使用して検出されるとき、有意な過剰発現経路。

40

## 【0165】

表 2 ii

【表 2 i i - 1】

経路	経路 p- 値	T a y l o r H R	T a y l o r p-値	S u n H R	S u n p -値
筋収縮に関 与する遺伝 子	2. 2 6 E - 1 0	2. 4 9 5	0. 0 3 3 9	2. 3 6 1	0. 0 1 9 6
平滑筋収縮 に関与する 遺伝子	1. 6 1 E - 0 7	2. 1 5 5	0. 0 6 4 8	2. 8 0 8	0. 0 0 9 4
脂質生成	4. 0 5 E - 0 7	2. 3 7 8	0. 0 3 9 1	2. 3 3 6	0. 0 1 1 7
接着斑	4. 7 9 E - 0 7	1. 7 2 6	0. 1 8 1 4	1. 0 1	0. 9 8 0 7
横紋筋収縮	4. 0 8 E - 0 6	2. 6 0 0 1	0. 0 1 8 9	2. 2 4	0. 0 1 6 3
止血に関与 する遺伝子	1. 1 4 E - 0 4	1. 1	0. 8 2 3 5	1. 3 2 2	0. 4 4 0 4
ジルチアゼ ム経路	5. 2 1 E - 0 4	2. 2 8 9	0. 0 4 3 1	1. 5 6 8	0. 1 9 9 3
細胞膜エス トロゲン受 容体シグナ ル伝達	6. 2 4 E - 0 4	2. 1 7 9	0. 0 9 1 4	1. 3 8 4	0. 3 4 1 1
血小板血栓 の形成に関 与する遺伝 子	7. 8 1 E - 0 4	1. 8 7 2	0. 1 2 2 6	1. 1 9	0. 6 2 8 3
血小板脱顆 粒に関与す る遺伝子	9. 6 0 E - 0 4	1. 1 2 9	0. 7 6 9	1. 5 0 2	0. 2 2 6 3
子宮筋弛緩 および収縮 経路	1. 0 4 E - 0 3	2. 6 1 1	0. 0 1 8 8	2. 0 6	0. 0 3 4 2
血管形成に おいてイン テグリン	1. 7 4 E - 0 3	1. 6 3 9	0. 2 2 3 4	0. 8 9 3 7	0. 7 8 2 9
A T F - 2 転写因子ネ ットワーク	1. 7 4 E - 0 3	4. 0 0 6	0. 0 0 3 7	4. 0 2 6	0. 0 0 0 4
血小板活性 化に関与す る遺伝子	1. 7 5 E - 0 3	2. 0 4 7	0. 0 7 8 8	1. 3 4 7	0. 4 2 2
シンデカン - 4 - 介在 シグナル伝 達事象	2. 6 1 E - 0 3	3. 6 8 6	0. 0 1 0 5	1. 6 6 7	0. 1 2 6 8
L P A 受容 体介在事象	5. 0 1 E - 0 3	2. 1 5 8	0. 1 4 9	1. 3 3 2	0. 3 7 9 1

10

20

30

40

【表 2 i i - 2】

インテグリンシグナル伝達経路	1. 41 E - 0 2	1. 8 9 3	0. 1 2 0 2	2. 0 6 9	0. 0 3 0 6
インテグリン細胞表面相互作用に 関与する遺 伝子	2. 4 4 E - 0 2	1. 5 8 4	0. 2 5 6 7	1. 5 4 9	0. 1 9 0 5
直接的 p 5 3 エフェク ター	2. 5 3 E - 0 2	2. 1 5 1	0. 0 6 7 6	3. 8 3 6	0. 0 0 0 3
インテグリン介在細胞 接着	3. 7 8 E - 0 2	1. 9 4 1	0. 1 0 8 4	0. 7 6 5	0. 4 9 9 7

10

【 0 1 6 6 】

Taylor および Sund ータセットにおいてクラス標識をクラスターし、定義するために、Toppfun、知られている経路 p - 値、経路を使用する Kaplan meier 生存分析結果を使用して検出されるとき、有意な過小発現経路。

20

【 0 1 6 7 】

表 3

【表 3】

	倍数変化	FDR 補正 p - 値	転写抑制における役割
AR	2. 41796	4. 86 E - 10	あり
CENPA	2. 87805	3. 23 E - 09	なし
CENPF	3. 00853	4. 19 E - 09	なし
DLX1	3. 22068	8. 49 E - 08	なし
EZH2	2. 7026	2. 45 E - 12	あり
HELLS	2. 10418	6. 92 E - 05	あり
TOP2A	2. 90041	3. 84 E - 09	なし
UBE2T	2. 36638	3. 65 E - 07	なし
UHRF1	2. 37542	2. 32 E - 09	あり
ZIC2	2. 08528	6. 52 E - 05	あり

30

【 0 1 6 8 】

クロマチン結合として注釈される遺伝子、転移生物学グループ 対 非転移生物学グループの倍数変化発現および FDR 補正 p - 値。転写抑制における公開された役割を言及する。

【 0 1 6 9 】

表 4

【表 4】

遺伝子セット名	高メチル化遺伝子	超幾何学的試験 p - 値
過小発現遺伝子	418 / 1098	1. 546 x 10 <sup>-34</sup>
過剰発現遺伝子	13 / 83	0. 947

40

【 0 1 7 0 】

転移生物学グループにおいて高メチル化の増加での過剰または過小発現遺伝子、重複の有意性を試験するための超幾何学的試験。

【 0 1 7 1 】

表 5

50

【表 5】

遺伝子	多変量		一変量		独立性 (pvals)			発現
	HR	pval	HR	pval	PathGG S	PathGG 1	PathGG 2	
TRPM3	6.64	0.01	5.763	0.055	0.02	0.437	0.677	過剰発現
PDRG1	4.8835	0.027	2.416	0.256	0.046	0.035	0.351	過剰発現
SRSF5	0.378	0.029	0.398	0.031	0.11	0.382	0.165	過小発現
PDE4D	0.425	0.035	0.268	0	0	0.004	0	過小発現
F12	5.523	0.042	2.789	0.263	0.895	0.845	0.844	過剰発現
PDK4	0.641	0.048	0.52	0.01	0.09	0.069	0.018	過小発現

10

【0172】

Taylorデータセットにおいて多変量生存分析に基づく一流の予後マーカー。

【0173】

20

表 6



【表 6 - 1】

	多変量		一変量		転移生物学 グループに おける発現
	HR	p v a l	HR	p v a l	
ADAMT S 1	0. 553 383	0. 034 8589	0. 540 21	0. 019 4342	過小発現
ADAMT S 9	0. 458 5803	0. 028 8481	0. 371 399	0. 008 48	過小発現
B3GNT 5	0. 513 7102	0. 029 9695	0. 395 6727	0. 001 7219	過小発現
CD38	0. 609 1854	0. 013 8355	0. 514 3886	0. 000 4166	過小発現
CEBPD	0. 327 1493	0. 009 7009	0. 181 3086	8. 15E -06	過小発現
CENPF	3. 593 3385	0. 041 6512	9. 194 3228	0. 000 1128	過剰発現
CREM	0. 233 0916	0. 044 8842	0. 194 7922	0. 015 95	過小発現
DKK1	0. 287 1025	0. 048 2413	0. 342 8314	0. 047 3753	過小発現
EMP1	0. 434 7836	0. 007 1015	0. 376 8645	0. 000 6745	過小発現
ERRFI 1	0. 554 2049	0. 030 0146	0. 526 3541	0. 007 8253	過小発現
F3	0. 579 862	0. 017 0842	0. 613 3141	0. 041 8215	過小発現
HJURP	13. 57 8677	0. 042 8399	46. 05 557	0. 002 649	過剰発現
IL1R1	0. 480 0943	0. 010 8723	0. 357 0689	0. 000 2425	過小発現
IL8	0. 315 8031	0. 034 8507	0. 470 06	0. 072 4264	過小発現
JUNB	0. 548 4282	0. 034 7493	0. 446 0346	0. 000 8361	過小発現
KLF10	0. 501 7168	0. 030 925	0. 439 4025	0. 006 6195	過小発現
KLF4	0. 397 9693	0. 027 4113	0. 271 1992	0. 000 817	過小発現
LDLR	0. 454 0006	0. 029 9326	0. 284 5191	0. 000 1791	過小発現
LGALS 3	0. 242 5137	0. 016 3003	0. 136 3453	0. 000 5586	過小発現
LPAR1	0. 408 5325	0. 039 8731	0. 292 4915	0. 004 3957	過小発現
MALAT 1	0. 144 4922	0. 026 4399	0. 273 2161	0. 117 4596	過小発現
MTUS1	0. 446 1261	0. 043 8701	0. 293 677	0. 000 1736	過小発現

10

20

30

40

【表 6 - 2】

MYBPC 1	0. 582 9982	0. 002 379	0. 565 7745	0. 000 3248	過小発現
NFIL3	0. 494 893	0. 027 1456	0. 385 3505	0. 000 6228	過小発現
NR4A3	0. 349 8147	0. 005 8837	0. 328 7529	0. 001 3712	過小発現
OAT	0. 645 5529	0. 045 1212	0. 627 2926	0. 053 1972	過小発現
PDE4D	0. 440 4056	0. 038 9414	0. 274 4262	0. 000 4312	過小発現
PDK4	0. 617 3687	0. 030 2305	0. 500 4434	0. 000 8031	過小発現
PI15	0. 609 224	0. 006 8663	0. 494 0706	7. 96E -06	過小発現
PTGS2	0. 591 9948	0. 020 6793	0. 562 1402	0. 007 7942	過小発現
RHOBT B3	0. 545 7431	0. 045 5287	0. 449 8483	0. 011 7462	過小発現
RIN2	0. 423 2609	0. 042 2486	0. 377 7279	0. 029 0502	過小発現
RNFT2	38. 72 4825	0. 016 8421	52. 63 3909	0. 007 0457	過剰発現
SELE	0. 478 4527	0. 013 9667	0. 472 4994	0. 003 6146	過小発現
SLC15 A2	0. 596 8128	0. 036 09	0. 442 4453	0. 000 5391	過小発現
SOCS2	0. 295 5096	0. 003 396	0. 239 1982	0. 000 5038	過小発現
SOCS3	0. 442 3332	0. 042 005	0. 315 5164	0. 001 4183	過小発現
SSTR1	9. 041 0923	0. 018 2887	15. 14 7803	0. 003 3901	過剰発現
ST6GA L1	0. 604 2365	0. 008 8117	0. 530 5465	0. 001 6829	過小発現
TSC22 D1	0. 452 536	0. 030 1503	0. 320 9002	0. 001 1309	過小発現
XBP1	0. 227 1852	0. 000 8373	0. 274 7813	0. 000 6004	過小発現
ZFP36	0. 517 509	0. 010 8194	0. 438 5203	0. 000 1823	過小発現

10

20

30

【0174】

転移生物学サブグループおよび非転移生物学サブグループ間の特異的に発現される遺伝子のTaylorデータセットにおいて多変量生存分析に基づく一流の予後マーカー。

40

【0175】

表 7

【表 7】

遺伝子	多変量H R	p v a l	一変量H R	p v a l	源	転移生物 学グルー プにおけ る発現
TRPM 3	6. 64 06	0. 01 05	5. 76 36	0. 05 51	標的型	過剰発現
PDRG 1	4. 88 35	0. 02 72	2. 41 6	0. 25 66	標的型	過剰発現
SRSF 5	0. 37 87	0. 02 94	0. 39 86	0. 03 1	標的型	過小発現
PDE4 D	0. 42 55	0. 03 5	0. 26 85	0. 00 05	標的型	過小発現
PDK4	0. 64 15	0. 04 84	0. 52	0. 00 19	標的型	過小発現
F12	5. 52 35	0. 04 28	2. 78 97	0. 26 38	標的型	過剰発現
F3	0. 59 1462 629	0. 02 6150 109	0. 64 1392 413	0. 07 0885 567	経路	過小発現
HJUR P	17. 7 2622 995	0. 02 8647 576	58. 2 1478 537	0. 00 1862 129	経路	過剰発現
CENP F	4. 00 9668 447	0. 02 8698 111	9. 89 2737 548	8. 66 E-05	経路	過剰発現
MYBP C1	0. 61 6919 233	0. 00 9107 673	0. 59 6731 068	0. 00 1740 583	経路	過小発現
SELE	0. 50 6452 771	0. 02 3940 071	0. 49 4071 466	0. 00 6723 235	経路	過小発現
CEBP D	0. 33 3662 83	0. 01 2163 084	0. 18 8671 187	1. 76 E-05	経路	過小発現
XBP1	0. 22 7185 248	0. 00 0837 328	0. 27 4781 347	0. 00 0600 431	文献	過小発現
TPT1	NA	NA	NA	NA	文献	NA
RPS1 4	NA	NA	NA	NA	文献	NA
RPL3 7A	NA	NA	NA	NA	文献	NA

【0176】

要約された IHC は参照遺伝子を標的とする。

【0177】

表 8

10

20

30

40

【表 8】

	転移生物学グループにおける発現	高メチル化
ADAMTS 9	過小発現	高メチル化
EMP 1	過小発現	高メチル化
F 3	過小発現	高メチル化
LDLR	過小発現	高メチル化
LGALS 3	過小発現	高メチル化
MALAT 1	過小発現	高メチル化
MTUS 1	過小発現	高メチル化
NR4A 3	過小発現	高メチル化
PTGS 2	過小発現	高メチル化
RIN 2	過小発現	高メチル化
SLC 15 A 2	過小発現	高メチル化
SOC S 3	過小発現	高メチル化
TSC 2 2 D 1	過小発現	高メチル化

10

【 0 1 7 8 】

高メチル化レベルが増加した上位過小発現マーカー。

【 0 1 7 9 】

表 9

20

【表 9 - 1】

Gene	多変量		一変量		転移生物学 グループに おける発現
	HR	p v a l	HR	p v a l	
FOX M1	3. 6 3 5 3 5 1 0 2 1	0. 1 5 8 3 4 4 6 1 9	9. 4 4 6 3 2 0 5 8 5	0. 0 1 1 6 5 8 4 2 5	過剰発現
CENPF	3. 5 9 3 3 3 8 4 8 4	0. 0 4 1 6 5 1 1 6 6	9. 1 9 4 3 2 2 7 6 8	0. 0 0 0 1 1 2 7 6 2	過剰発現
HJURP	13. 5 7 8 6 7 6 9 3	0. 0 4 2 8 3 9 9 0 1	46. 0 5 5 5 7 0 0 7	0. 0 0 2 6 4 9 0 4 6	過剰発現
RNFT2	38. 7 2 4 8 2 5 0 2	0. 0 1 6 8 4 2 0 8 3	52. 6 3 3 9 0 8 7 5	0. 0 0 7 0 4 5 6 8 7	過剰発現
XBP1	0. 2 2 7 1 8 5 2 4 8	0. 0 0 0 8 3 7 3 2 8	0. 2 7 4 7 8 1 3 4 7	0. 0 0 0 6 0 0 4 3 1	過小発現
SOCS2	0. 2 9 5 5 0 9 6 0 6	0. 0 0 3 3 9 5 9 5 3	0. 2 3 9 1 9 8 1 6 3	0. 0 0 0 5 0 3 7 7 9	過小発現
NR4A3	0. 3 4 9 8 1 4 6 8 3	0. 0 0 5 8 8 3 6 7 4	0. 3 2 8 7 5 2 9 4 3	0. 0 0 1 3 7 1 2 0 6	過小発現
EMP1	0. 4 3 4 7 8 3 5 5 7	0. 0 0 7 1 0 1 4 7	0. 3 7 6 8 6 4 5 3	0. 0 0 0 6 7 4 4 5 8	過小発現
ZFP36	0. 5 1 7 5 0 9 0 1 6	0. 0 1 0 8 1 9 3 8 6	0. 4 3 8 5 2 0 2 5 3	0. 0 0 0 1 8 2 3 1 3	過小発現
IL1R1	0. 4 8 0 0 9 4 3 3 1	0. 0 1 0 8 7 2 2 7 9	0. 3 5 7 0 6 8 8 7 7	0. 0 0 0 2 4 2 4 9 5	過小発現
SELE	0. 4 7 8 4 5 2 7 2 6	0. 0 1 3 9 6 6 7 4 8	0. 4 7 2 4 9 9 3 6	0. 0 0 3 6 1 4 6 1	過小発現
LGALS3	0. 2 4 2 5 1 3 7 4 4	0. 0 1 6 3 0 0 2 5 7	0. 1 3 6 3 4 5 3 0 9	0. 0 0 0 5 5 8 6 3 7	過小発現
MALAT1	0. 1 4 4 4 9 2 2 0 2	0. 0 2 6 4 3 9 9 0 2	0. 2 7 3 2 1 6 0 9 4	0. 1 1 7 4 5 9 6 3 5	過小発現
NFIL3	0. 4 9 4 8 9 3 0 0 3	0. 0 2 7 1 4 5 5 9 5	0. 3 8 5 3 5 0 4 7 4	0. 0 0 0 6 2 2 8 1 8	過小発現
LDLR	0. 4 5 4 0 0 0 6 4 7	0. 0 2 9 9 3 2 6 3 4	0. 2 8 4 5 1 9 1 4	0. 0 0 0 1 7 9 1 3 8	過小発現

10

20

30

40

【表 9 - 2】

ERRFI 1	0. 554 20485 1	0. 030 01458 5	0. 526 35411	0. 007 82529 7	過小発現
KLF10	0. 501 71683 1	0. 030 92503 5	0. 439 40248 7	0. 006 61946 7	過小発現
JUNB	0. 548 42818 7	0. 034 74925 8	0. 446 03455 8	0. 000 83611 2	過小発現
MTUS1	0. 446 12608 8	0. 043 87008 3	0. 293 67702 5	0. 000 17362 4	過小発現
CREM	0. 233 09159 4	0. 044 88416 6	0. 194 79224 7	0. 015 95	過小発現
RHOBT B3	0. 545 74307 3	0. 045 52871	0. 449 84832 7	0. 011 74624 2	過小発現
DKK1	0. 287 10250 3	0. 048 24126 5	0. 342 83137	0. 047 37526 5	過小発現

10

20

## 【0180】

転移生物学グループにおいて特異的に発現されたFOX M1およびFOX M1 C H I P - S e q 標的。

## 【0181】

方法

患者サンプル

126個のサンプル(70個の前立腺に臨床的に限定される切除された原発性前立腺癌、20個の公知の随伴性転移性疾患を有する原発性前立腺癌、11個の転移性疾患を有するリンパ節、および25個の正常前立腺)は、ローカルな倫理審査による承認の後に、Addenbrookes Hospitalおよびカロリンスカ(Karolinska) Instituteによって提供された。

30

## 【0182】

サブグループおよび予後有意性が、179個のサンプル(131個の原発性腫瘍、29個の正常および19個の転移性疾患)を含むTaylor et alによって公開されたデータセットにおいて立証および試験された。生化学的再発までの時間および手術後の再発状態を使用して予後有意性を試験し、(手術タイプPCA0056、およびネオアダジュバント処置、PCA0050、PCA0103、PCA119およびPCA0176)のため、5つのサンプルを分析から除外した。

## 【0183】

Sun et al(79個の腫瘍サンプル)、サンプルは手術後であり、79症例のうち39個が疾患再発を有すると分類された。

40

## 【0184】

遺伝子発現プロファイリング

以前に記載されている(Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P et al. Development and independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. J Clin Oncol 2011; 29: 4620-4626) Roche High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics Ltd.)を使用して、顕微解剖FFPE腫瘍サンプルから全RNAを抽出した。全RNAを、NuGEN WT - Ovation(登録商標)FFPE System(NuGEN)を使用して増幅し、以前に記載されているAlmac Prostate Cancer DSA(登録商標)(Affymetrix)とハイブリダイズした。

50

## 【 0 1 8 5 】

## 統計分析方法

一元配置 A N O V A 分析は、 $abs(FC) > 2$  の倍数変化 (FC) 閾値および偽発見率 (FDR) で調整された有意性 p - 値閾値 ( $p - 値 FDR < 0.05$ ) を使用して、29 個の原発性転移生物学グループ腫瘍および 41 個の原発性非転移生物学腫瘍グループコントロール間で特異的に発現されるプローブセットを同定した。ユニークな遺伝子を、少なくとも 6 つのアラインされたプローブにてセンス方向におけるものとして決定した。

## 【 0 1 8 6 】

背景および分散の組み合わせフィルターをデータマトリックスに適用し、組織内開発特徴選択プログラムを使用して非常にバリエーションな遺伝子を同定した。第 1 に、背景フィルターを使用して、背景ノイズから区別するには低すぎる発現値を有する遺伝子を除去した。高い閾値を使用して、多くのプローブセットを除去し、これらのプローブセットが高く発現されることを保証した (閾値:  $\leq 10^{-16}$ )。第 2 に、強度依存性分散フィルターをデータマトリックスに適用し、全てのサンプルにわたって低い分散を有するプローブセットを除去した (閾値:  $\leq 5 \cdot 10^{-16}$ )。特徴選択は、1651 個の非常にバリエーションなプローブセットをももたらした。

10

## 【 0 1 8 7 】

階層的クラスタ分析 (ピアソン相関関係距離および Ward の連結 (linkage)) をそれぞれのデータセットからのプローブセットおよびサンプルに別々に適用した。サブクラスタの数は、ギャップ統計値を使用して決定した。

20

## 【 0 1 8 8 】

## IHC 標的の同定

興味ある IHC 標的は、転移および非転移グループ (List 1 および 2) 間で低く相関されるものならびに非転移および良性グループ (List 3) 間で高く相関されるものである。

## 【 0 1 8 9 】

3 つのリストのそれぞれにおいてプローブセットに対する相関関係 p - 値を、これらの基準にしたがって順位付けした。それぞれのリストにおいて上位 10,000 個のプローブセットにて観察された p - 値の範囲は、List 1 に対して  $[0.62e-05]$ 、List 2 に対して  $[1.03e-19 - 6.17e-04]$  および List 3 に対して  $[0.99 - 0.82]$  に及んだ。

30

## 【 0 1 9 0 】

3 つのリストにおいて上位 10,000 個のプローブセットの共通部分は、512 個の共通なプローブセットを示した (図 4)。アンチセンスプローブセットおよび該プローブセットにアラインされた 6 つ未満のプローブでのものを除去し、393 個を残した。Partek (登録商標) Genomics Suite<sup>TM</sup> バージョン 6.6 を使用して、倍数変化値を産生した。

## 【 0 1 9 1 】

## メチル化

11 個の転移生物学サブグループおよび 11 個の非転移生物学サブグループである 22 人の患者について、Recoverall (Life technologies) を使用して DNA を抽出した。Illumina Infinium Methylation Assay を使用するとき推奨される代替インキュベーション条件にて、製造業者の手順にしたがって Zymo EZ DNA Methylation Kit<sup>TM</sup> (Zymo Research, Orange, CA, USA) を使用して、ゲノム DNA (800 ng) を亜硫酸水素ナトリウムで処理した。メチル化アッセイを、Infinium HD Methylation Assay プロトコールにしたがって 50 ng /  $\mu$ l で 4  $\mu$ l の亜硫酸水素転換ゲノム DNA にて行った。サンプルを、製造業者の手順のとおり Illumina 450k アレイにて処理した。未補正 b - 値を同じソフトウェアにて抽出した。統計的に有意である 2 つの値 (bivalues) における変化を有するプローブセットを、マイクロアレイの有意性分析 (SAM) を使用して評価した (Tusher et al 2001)。0.05 の偽発見率 (FDR) を使用して、アレイ

40

50

上の 2 3 5 , 5 2 6 個のプローブセットの 3 2 , 2 8 6 は、低メチル化 ( 7 , 2 2 2 個のユニークな遺伝子に対応する ) および 9 , 1 8 4 個のプローブセット ( 4 , 0 0 3 個のユニークな遺伝子 ) であった。

【 0 1 9 2 】

文献

【表 1 0 】

Albertsen PC, Hanley JA, Barrows GH, Penson DF, Kowalczyk PD, Sanders MM *et al* (2005).

Prostate cancer and the Will Rogers phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 97: 1248-1253.



## 【表 1 1】

Altekruse SF, Huang L, Cucinelli JE, McNeel TS, Wells KM, Oliver MN (2010). Spatial patterns of localized-stage prostate cancer incidence among white and black men in the southeastern United States, 1999-2001. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 1460-1467.

Babbio F, Pistore C, Curti L, Castiglioni I, Kunderfranco P, Brino L *et al* (2012). The SRA protein UHRF1 promotes epigenetic crosstalks and is involved in prostate cancer progression. *Oncogene*.

10

Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Lloriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene*. 2004 Feb 19;23(7):1377-91. PubMed PMID: 14973550.

Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317: 1760-1764.

20

Chen X, Muller GA, Quaas M, Fischer M, Han N, Stutchbury B *et al* (2013). The forkhead transcription factor FOXM1 controls cell cycle-dependent gene expression through an atypical chromatin binding mechanism. *Mol Cell Biol* 33: 227-236.

Howlader A (2012). SEER Cancer Statistics Review, 1978-2009.

Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT (1999). Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol* 17: 1499-1507.

Makarov DV, Sanderson H, Partin AW, Epstein JI (2002). Gleason score 7 prostate cancer on needle biopsy: is the prognostic difference in Gleason scores 4 + 3 and 3 + 4 independent of the number of involved cores? *J Urol* 167: 2440-2442.

30

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA *et al* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752.

Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC (1999). Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 281: 1591-1597.

40

Rasiah KK, Stricker PD, Haynes AM, Delprado W, Turner JJ, Golovsky D *et al* (2003). Prognostic significance of Gleason pattern in patients with Gleason score 7 prostate carcinoma. *Cancer* 98: 2560-2565.

## 【表 1 2】

Sanders DA, Ross-Innes CS, Beraldi D, Carroll JS, Balasubramanian S (2013). Genome-wide mapping of FOXM1 binding reveals co-binding with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Genome Biol* 14: R6.

Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA *et al* (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450: 908-912.

10

Smith EB, Frierson HF, Jr., Mills SE, Boyd JC, Theodorescu D (2002). Gleason scores of prostate biopsy and radical prostatectomy specimens over the past 10 years: is there evidence for systematic upgrading? *Cancer* 94: 2282-2287.

Sun Y, Goodison S. Optimizing molecular signatures for predicting prostate cancer recurrence. Prostate. 2009 Jul 1;69(10):1119-27. doi: 10.1002/pros.20961.

Tibshirani R, Walther G, Hastie T (2001). Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 63: 411-423.

20

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116-5121.

Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, Dolgalev I, Major JE, Wilson M, Socci ND, Lash AE, Heguy A, Eastham JA, Scher HI, Reuter VE, Scardino PT, Sander C, Sawyers CL, Gerald WL. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*. 2010 Jul 13;18(1):11-22. doi: 10.1016/j.ccr.2010.05.026. Epub 2010 Jun 24.

30

Unoki M, Kelly JD, Neal DE, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R (2009). UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer. *Br J Cancer* 101: 98-105.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M *et al* (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-536.

Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, Wu X, Stack EC, Loda M, Liu T, Xu H, Cato L, Thornton JE, Gregory RI, Morrissey C, Vessella RL, Montironi R, Magi-Galluzzi C, Kantoff PW, Balk SP, Liu XS, Brown M. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science*. 2012 Dec 14;338(6113):1465-9. doi: 10.1126/science.1227604. PubMed PMID: 23239736; PubMed Central PMCID: PMC3625962.

40

## 【 0 1 9 3 】

補足表 1

【表 1 3】

特性	数	%
タイプ		
原発性腫瘍	7 0	1 0 0
転移を有する原発性腫瘍	2 1	1 0 0
転移性疾患	1 0	1 0 0
良性	2 5	1 0 0
合計	1 2 6	1 0 0
G l e a s o n スコア		
< 7	1 0	7 . 9 3 6 5 0 7 9 3 7
7	2 4	1 9 . 0 4 7 6 1 9 0 5
> 7	5 6	4 4 . 4 4 4 4 4 4 4 4
NA	3 6	2 8 . 5 7 1 4 2 8 5 7
	1 2 6	1 0 0
施設		
ケンブリッジ	7 3	5 7 . 9 3 6 5 0 7 9 4
カロリンスカ	5 3	4 2 . 0 6 3 4 9 2 0 6
合計	1 2 6	1 0 0

10

20

【 0 1 9 4 】

内部サンプルセットの患者特性。

【 0 1 9 5 】

補足表 2 F O X M 1 相関関係

【表 1 4 - 1】

遺伝子記号	r	p-値 (相関関係)	下限CI	上限CI	N	CHIP重複
CENP A	0.77 2942	2.91 E-26	0.69 1522	0.83 4968	126	あり
NUSA P1	0.77 022	5.55 E-26	0.68 7996	0.83 292	126	あり
KIF1 1	0.76 2821	3.08 E-25	0.67 8431	0.82 7343	126	あり
BUB1	0.76 0737	4.94 E-25	0.67 5742	0.82 577	126	あり
TOP2 A	0.75 4879	1.81 E-24	0.66 8194	0.82 1342	126	あり
CDCA 3	0.75 3481	2.46 E-24	0.66 6396	0.82 0285	126	あり
KIF1 1	0.74 9425	5.90 E-24	0.66 1184	0.81 7213	126	あり
ANLN	0.74 912	6.29 E-24	0.66 0793	0.81 6982	126	あり
FAM1 11B	0.74 6059	1.20 E-23	0.65 6866	0.81 4661	126	あり
KIFC 1	0.74 3611	2.00 E-23	0.65 3728	0.81 2804	126	あり
ASPM	0.74 1814	2.91 E-23	0.65 1427	0.81 1439	126	あり
CENP A	0.73 6676	8.26 E-23	0.64 4857	0.80 7534	126	あり
RRM2	0.73 1795	2.18 E-22	0.63 8628	0.80 3818	126	あり
CENP F	0.72 9636	3.33 E-22	0.63 5877	0.80 2173	126	あり
UBE2 C	0.72 5326	7.65 E-22	0.63 0392	0.79 8885	126	あり
ASPM	0.72 0223	2.01 E-21	0.62 3909	0.79 4985	126	あり
ZWIN T	0.71 6062	4.34 E-21	0.61 8633	0.79 1801	126	あり
NUSA P1	0.71 5926	4.45 E-21	0.61 8461	0.79 1698	126	あり
EZH2	0.71 5254	5.03 E-21	0.61 7611	0.79 1183	126	あり
PKMY T1	0.71 4612	5.65 E-21	0.61 6797	0.79 0691	126	あり
KIFC 1	0.71 3607	6.79 E-21	0.61 5525	0.78 9922	126	あり
IQGA P3	0.71 3452	6.98 E-21	0.61 5328	0.78 9802	126	あり

10

20

30

40

【表 1 4 - 2】

SPAG 5 // / -- - // / -- - // / AL DOC	0. 70 5 7 7 4	2. 75 E-20	0. 60 5 6 2 6	0. 78 3 9 1 2	1 2 6	あり
PTTG 1	0. 70 0 7 2 8	6. 62 E-20	0. 59 9 2 6 7	0. 78 0 0 3 4	1 2 6	あり
IQGA P3	0. 70 0 7 0 2	6. 65 E-20	0. 59 9 2 3 4	0. 78 0 0 1 4	1 2 6	あり
MLF1 IP	0. 69 5 6 4 9	1. 57 E-19	0. 59 2 8 7 9	0. 77 6 1 2 4	1 2 6	あり
CDCA 8	0. 69 5 1 2 2	1. 72 E-19	0. 59 2 2 1 6	0. 77 5 7 1 8	1 2 6	あり
CDCA 8	0. 69 0 8 0 6	3. 53 E-19	0. 58 6 7 9 8	0. 77 2 3 8 9	1 2 6	あり
AURK A	0. 69 0 1 3 3	3. 94 E-19	0. 58 5 9 5 4	0. 77 1 8 6 9	1 2 6	あり
PTTG 1	0. 68 9 0 2 6	4. 73 E-19	0. 58 4 5 6 7	0. 77 1 0 1 6	1 2 6	あり
HJUR P	0. 68 8 6 9 3	4. 99 E-19	0. 58 4 1 4 9	0. 77 0 7 5 8	1 2 6	あり
KIF1 4	0. 68 6 3 3 6	7. 34 E-19	0. 58 1 1 9 6	0. 76 8 9 3 7	1 2 6	あり
RRM2	0. 68 5 1 2 9	8. 92 E-19	0. 57 9 6 8 7	0. 76 8 0 0 5	1 2 6	あり
CDK1	0. 67 6 5 0 7	3. 51 E-18	0. 56 8 9 1 5	0. 76 1 3 3	1 2 6	あり
CENP F	0. 67 3 6 7 2	5. 44 E-18	0. 56 5 3 8 2	0. 75 9 1 3 2	1 2 6	あり
UHRF 1	0. 67 3 3 1 3	5. 75 E-18	0. 56 4 9 3 5	0. 75 8 8 5 4	1 2 6	あり
KIF2 0A	0. 66 6 1 2 6	1. 72 E-17	0. 55 5 9 9 7	0. 75 3 2 7 1	1 2 6	あり
CDK1	0. 66 3 7 9 4	2. 43 E-17	0. 55 3 1 0 2	0. 75 1 4 5 7	1 2 6	あり
HIST 1H2A J	0. 63 2 2 1 2	2. 03 E-15	0. 51 4 1 5 7	0. 72 6 7 5 7	1 2 6	あり
PLK1	0. 62 4 2 5 8	5. 72 E-15	0. 50 4 4 2 6	0. 72 0 4 9 8	1 2 6	あり
RNFT 2	0. 61 6 9 6	1. 44 E-14	0. 49 5 5 2 4	0. 71 4 7 4 1	1 2 6	あり
CBX2	0. 60 4 2 8 9	6. 80 E-14	0. 48 0 1 2 7	0. 70 4 7 1 4	1 2 6	あり
UBE2 T	0. 60 2 8 0 2	8. 12 E-14	0. 47 8 3 2 4	0. 70 3 5 3 4	1 2 6	あり

10

20

30

40

【表 1 4 - 3】

SGOL 1	0. 59 2 2 4 3	2. 79 E-1 3	0. 46 5 5 6	0. 69 5 1 4 4	1 2 6	あり
CDT 1	0. 57 3 0 1 8	2. 36 E-1 2	0. 44 2 4 5 4	0. 67 9 7 9 5	1 2 6	あり
RHPN 1	0. 53 6 5 8 6	9. 40 E-1 1	0. 39 9 1 3 6	0. 65 0 4 4 9	1 2 6	あり
AMH	0. 49 7 2 7 1	3. 16 E-0 9	0. 35 3 0 7 1	0. 61 8 3 9 5	1 2 6	あり
ZNF 2 5 1	0. 48 7 0 5 1	7. 33 E-0 9	0. 34 1 2 0 8	0. 60 9 9 9 5	1 2 6	あり
AR	0. 48 6 9 0 9	7. 42 E-0 9	0. 34 1 0 4 4	0. 60 9 8 7 8	1 2 6	あり
ZNF 4 6 7	0. 48 4 7 6 4	8. 82 E-0 9	0. 33 8 5 6	0. 60 8 1 1 2	1 2 6	あり
PRAM E	0. 47 9 3 2	1. 36 E-0 8	0. 33 2 2 6 6	0. 60 3 6 2 3	1 2 6	あり
MEX 3 A	0. 46 1 4 6 6	5. 38 E-0 8	0. 31 1 7 1 6	0. 58 8 8 4 7	1 2 6	あり
ZNF 4 6 7	0. 44 9 9 4 4	1. 25 E-0 7	0. 29 8 5 2 8	0. 57 9 2 6 6	1 2 6	あり
APLN	0. 44 8 3 8 2	1. 40 E-0 7	0. 29 6 7 4 5	0. 57 7 9 6 4	1 2 6	あり
GPC 2	0. 44 5 5 2 7	1. 72 E-0 7	0. 29 3 4 8 8	0. 57 5 5 8 4	1 2 6	あり
PRAM E	0. 43 9 5 9 1	2. 61 E-0 7	0. 28 6 7 2 7	0. 57 0 6 2 6	1 2 6	あり
SAC 3 D 1	0. 43 5 5 9 9	3. 44 E-0 7	0. 28 2 1 8 9	0. 56 7 2 8 7	1 2 6	あり
RPL 1 1	0. 40 9 9 3 2	1. 87 E-0 6	0. 25 3 1 7 5	0. 54 5 7 1 3	1 2 6	あり
HOXC 6	0. 40 8 1 2 8	2. 10 E-0 6	0. 25 1 1 4 6	0. 54 4 1 9 1	1 2 6	なし
IDUA	0. 40 7 0 3 4	2. 25 E-0 6	0. 24 9 9 1 7	0. 54 3 2 6 7	1 2 6	なし
LINC 0 0 6 6 2	0. 40 2 6 6	2. 95 E-0 6	0. 24 5 0 0 6	0. 53 9 5 6 9	1 2 6	なし
APLN	0. 40 1 3 0 4	3. 21 E-0 6	0. 24 3 4 8 5	0. 53 8 4 2 1	1 2 6	なし
DLX 1	0. 39 7 3 7 5	4. 08 E-0 6	0. 23 9 0 8 2	0. 53 5 0 9 3	1 2 6	なし
APLN	0. 39 7 3 1 1	4. 10 E-0 6	0. 23 9 0 1	0. 53 5 0 3 9	1 2 6	なし
KIFC 2	0. 38 6 6 7 4	7. 74 E-0 6	0. 22 7 1 2 5	0. 52 6 0 0 9	1 2 6	なし
AR	0. 38 3 6 6 7	9. 22 E-0 6	0. 22 3 7 7 4	0. 52 3 4 5	1 2 6	あり
AR	0. 37 5 4 7 6	1. 48 E-0 5	0. 21 4 6 6 4	0. 51 6 4 6 8	1 2 6	あり

10

20

30

40

【表 1 4 - 4】

---	0. 3 7	1. 6 2	0. 2 1	0. 5 1	1 2 6	なし
///	3 8 2 1	E-0 5	2 8 2 7	5 0 5 5		
---						
COMT	0. 3 5	3. 6 7	0. 1 9	0. 5 0	1 2 6	あり
D1	8 9 2	E-0 5	6 3 3 6	2 2 9 7		
PTPR	0. 3 5	4. 0 4	0. 1 9	0. 5 0	1 2 6	なし
T	7 1 2 2	E-0 5	4 3 5 2	0 7 5 3		
ECE2	0. 3 5	4. 3 9	0. 1 9	0. 4 9	1 2 6	なし
	5 5 7	E-0 5	2 6 4 1	9 4 2		
CANX	0. 3 5	4. 4 5	0. 1 9	0. 4 9	1 2 6	あり
	5 3 0 6	E-0 5	2 3 4 9	9 1 9 3		
MIA3	0. 3 4	9. 3 6	0. 1 7	0. 4 8	1 2 6	なし
	0 9 3 9	E-0 5	6 5 5 7	6 8 1 8		
CPNE	0. 3 3	0. 0 0	0. 1 7	0. 4 8	1 2 6	なし
4	8 8 9 7	0 1 0 3	4 3 2	5 0 5 5		
		7 2 3				
ODAM	0. 3 2	0. 0 0	0. 1 6	0. 4 7	1 2 6	あり
	8 7 4 7	0 1 7 0	3 2 2 3	6 2 7 1		
		9 9 1				
AR	0. 3 2	0. 0 0	0. 1 5	0. 4 7	1 2 6	あり
	1 7 3 6	0 2 3 9	5 5 8 1	0 1 8 6		
		1 0 5				
CPNE	0. 3 1	0. 0 0	0. 1 4	0. 4 6	1 2 6	なし
4	3 2 1 1	0 3 5 5	6 3 1 7	2 7 6 9		
		5 6 8				
RPS2	0. 3 1	0. 0 0	0. 1 4	0. 4 6	1 2 6	なし
///	1 1 4 2	0 3 9 0	4 0 7 3	0 9 6 6		
Sなし		8 2 9				
RA64						
///						
Sなし						
RA10						
AR	0. 3 1	0. 0 0	0. 1 4	0. 4 6	1 2 6	あり
	0 8 9 9	0 3 9 5	3 8 1	0 7 5 4		
		1 7 4				
HOXC	0. 3 1	0. 0 0	0. 1 4	0. 4 6	1 2 6	なし
4	0 5 7 3	0 4 0 1	3 4 5 6	0 4 6 9		
		0 8 1				
PTPR	0. 3 0	0. 0 0	0. 1 4	0. 4 5	1 2 6	なし
T	9 9 7	0 4 1 2	2 8 0 2	9 9 4 3		
		2 1 3				
CPNE	0. 3 0	0. 0 0	0. 1 3	0. 4 5	1 2 6	なし
4	6 8 8 3	0 4 7 3	9 4 5 8	7 2 4 9		
		8				
DSCA	0. 3 0	0. 0 0	0. 1 3	0. 4 5	1 2 6	なし
M-AS	5 9 5 7	0 4 9 3	8 4 5 6	6 4 4		
1		8 6 3				
PPFI	0. 3 0	0. 0 0	0. 1 3	0. 4 5	1 2 6	なし
A2	0 4 6 6	0 6 2 9	2 5 2 1	1 6 4 1		
		7 7 2				

10

20

30

40

【表 1 4 - 5】

IRAK 1	0. 29 9 0 8 1	0. 00 0 6 6 9 1 2 6	0. 13 1 0 2 5	0. 45 0 4 2 8	1 2 6	なし
---	0. 29 3 3 5 5	0. 00 0 8 5 6 8 6 5	0. 12 4 8 5 1	0. 44 5 4 1	1 2 6	なし
HOXC 4	0. 29 2 1 5 2	0. 00 0 9 0 1 9 7 8	0. 12 3 5 5 5	0. 44 4 3 5 5	1 2 6	なし
FOLH 1 // / FO LH1B	0. 28 9 0 7 6	0. 00 1 0 2 7 4 1	0. 12 0 2 4 6	0. 44 1 6 5 5	1 2 6	なし
---	0. 28 2 2 2 6	0. 00 1 3 6 5 9 6	0. 11 2 8 8 8	0. 43 5 6 3 1	1 2 6	なし
NCAM 2	0. 27 9 0 5 8	0. 00 1 5 5 4 5 4	0. 10 9 4 9 2	0. 43 2 8 4 1	1 2 6	なし
---	0. 26 6 0 9 9	0. 00 2 5 9 8 0 2	0. 09 5 6 4 0 8	0. 42 1 3 9 6	1 2 6	なし
---	0. 26 5 4 6 6	0. 00 2 6 6 2 3 9	0. 09 4 9 6 5 5	0. 42 0 8 3 6	1 2 6	なし
MT-T G // / MT -CO3 /// MT- TR / // M T-ND 4L / // M T-ND 3	0. 26 2 8 1 1	0. 00 2 9 4 8 2 1	0. 09 2 1 3 5 8	0. 41 8 4 8 4	1 2 6	なし
NTNG 2	0. 25 9 6 7 1	0. 00 3 3 2 1 5 5	0. 08 8 7 9 4 4	0. 41 5 7 0 1	1 2 6	なし
SLC2 5A16	0. 25 6 5 6 3	0. 00 3 7 3 2 6 6	0. 08 5 4 8 9 2	0. 41 2 9 4 2	1 2 6	なし
---	0. 23 5 9 7 2	0. 00 7 8 1 2 7	0. 06 3 6 9 1	0. 39 4 5 9 6	1 2 6	なし
E1F3 K	0. 22 9 9 2	0. 00 9 5 9 9 7 2	0. 05 7 3 1 5 3	0. 38 9 1 8	1 2 6	なし

10

20

30

40



【表 1 4 - 6】

SSTR 1	0. 22 8 9 2 7	0. 00 9 9 2 5 1 2	0. 05 6 2 7 0 2	0. 38 8 2 8 9	1 2 6	なし
CST1	0. 22 1 4 4 1	0. 01 2 7 0 5 5	0. 04 8 4 0 6 2	0. 38 1 5 7 2	1 2 6	なし
NIPA L1	0. 21 1 5 3 7	0. 01 7 4 1 6 1	0. 03 8 0 3 3 9	0. 37 2 6 5 8	1 2 6	なし
SSTR 1	0. 20 4 8 8 5	0. 02 1 3 7 0 3	0. 03 1 0 8 9	0. 36 6 6 5 5	1 2 6	なし
---	0. 18 4 4 2 6	0. 03 8 7 0 4 6	0. 00 9 8 3 3 1 5	0. 34 8 1 0 7	1 2 6	なし
OXR1	0. 18 1 8 2 1	0. 04 1 5 8 8 4	0. 00 7 1 3 8 2 7	0. 34 5 7 3 6	1 2 6	あり
OPRK 1	0. 16 1 5 8 8	0. 07 0 6 6 2 1	-0. 0 1 3 7 0 9 6	0. 32 7 2 4 9	1 2 6	なし
MT-T A // / MT -TY /// MT-T C // / MT -TN	0. 13 9 9 0 3	0. 11 8 1 8 2	-0. 0 3 5 8 8 5 2	0. 30 7 2 9 3	1 2 6	なし
LRRN 1	0. 13 7 1 5 9	0. 12 5 6 4 4	-0. 0 3 8 6 7 9 3	0. 30 4 7 5 8	1 2 6	なし
MT-T C // / MT -TN /// MT-T Y // / MT -TA	0. 12 9 4 9 8	0. 14 8 3 9 8	-0. 0 4 6 4 6 4 7	0. 29 7 6 6 6	1 2 6	なし
LRRN 1	0. 12 5 8 6 7	0. 16 0 2 1	-0. 0 5 0 1 4 6 9	0. 29 4 2 9 8	1 2 6	なし

10

20

30

40

【表 1 4 - 7】

MT-N D 2 / // M TND 2 P 2 8 //// MT-T W	0. 1 1 8 7 9 7	0. 1 8 5 2 0 4	-0. 0 5 7 3 0 3 6	0. 2 8 7 7 2 9	1 2 6	なし
MT-T H // / MT -TS 2 //// MT- ND 4 //// MT-N D 5 / // M T-TL 2	0. 0 8 2 8 3 0 4	0. 3 5 6 4 8 2	-0. 0 9 3 4 3 3 3	0. 2 5 4 0 6	1 2 6	なし
MT-T Q	0. 0 6 9 3 9 7 4	0. 4 4 0 0 2 5	-0. 1 0 6 8 0 9	0. 2 4 1 3 7 8	1 2 6	なし
WNT 5 A	0. 0 5 5 1 7 8 5	0. 5 3 9 4 3 2	-0. 1 2 0 8 9 8	0. 2 2 7 8 8 9	1 2 6	なし
SなしR A 6 1 //// SNHG 1 2 / // S なしRA 4 4	0. 0 5 0 8 9 9 3	0. 5 7 1 3 8 3	-0. 1 2 5 1 2 5	0. 2 2 3 8 1 7	1 2 6	なし
MT-T C // / MT -TN //// MT-T A // / MT -TY	-0. 0 0 8 6 1 5 2	0. 9 2 3 7 2 4	-0. 1 8 3 2 4 9	0. 1 6 6 5 4 6	1 2 6	なし
MT-C O 1 / // M T-TW //// MT- ND 2	-0. 0 1 0 1 8 8 2	0. 9 0 9 8 5 2	-0. 1 8 4 7 6 9	0. 1 6 5 0 1 6	1 2 6	なし

10

20

30

40

【0 1 9 6】

全体の内部データセットにわたってFOX M 1レベルに対する過剰発現標的のピアソン相関関係。

50

【 0 1 9 7 】

補足表 3

メチル化分析のために使用されるサンプル

【 表 1 5 】

mRNA クラスラ ベル	サンプル タイプ	施設	サンプル 年齢	手術タイ プ	Gleason スコア	ステージ
転移生物 学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	1	根治	6	T 2 C
転移生物 学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	2	根治	8	T 3 A
転移生物 学	転移性前 立腺サン プル	ケンブリ ッジ	7	根治	9	NA
転移生物 学	転移性前 立腺サン プル	ケンブリ ッジ	4	TURP S	9	NA
転移生物 学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	8	根治	8	T B C
転移生物 学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	1	根治	8	T 3 A
転移生物 学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	1	TURP S	9	T 3 A
転移生物 学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	1	根治	8	T 2 A
転移生物 学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	6	根治	7	T 3 B
転移生物 学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	1	根治	8	T 3 A
転移生物 学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	1	根治	9	T 2 C
非転移生 物学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	2	根治	7	T 3 A
非転移生 物学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	2	根治	6	T 3 A
非転移生 物学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	2	根治	8	T 3 A
非転移生 物学	原発性腫 瘍	ケンブリ ッジ	2	根治	7	T 3 B
非転移生 物学	原発性腫 瘍	ケンブリ ッジ	1	根治	9	T 3 B
非転移生 物学	原発性腫 瘍	ケンブリ ッジ	1	根治	7	T 3 A
非転移生 物学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	5	根治	8	T 2 C
非転移生 物学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	2	根治	9	T 3 A
非転移生 物学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	1	根治	9	T 3 A
非転移生 物学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	7	根治	8	T 2 C
非転移生 物学	原発性腫 瘍	カロリン スカ	1	根治	8	T 3 B

【 0 1 9 8 】

## 前立腺 I H C 開発 アプローチ

適当な抗体を同定するために、本願発明者らは、(マイクロアレイプロファイリングによって確認される)バイオマーカーポジティブな前立腺癌サンプルからの4 uMの全断面(full face)切片に対して選択される標的について標的あたり3つの抗体の分析を行った。それぞれの抗体を、3つの希釈物を使用して3つの抗原回復方法を使用して試験した(図7)。

### 【0199】

それぞれの全断面切片は、腫瘍領域、前立腺上皮内腫瘍(PIN)、正常前立腺上皮、ストロマおよびいくつかの切片において浸潤免疫細胞を含んだ。

10

### 【0200】

このプロセスは、興味ある標的を検出する抗体、抗原回復プロトコールおよび希釈物の同定を可能にした。

### 【0201】

#### 方法

前立腺腫瘍の全断面FFPE切片(4 μm)を使用した。

### 【0202】

試験サンプル:

前立腺腫瘍(DI20052):年齢58:男性。前立腺の病理学的腺癌。腫瘍悪性度:3+4=7。

20

前立腺腫瘍(DI20054):年齢70:男性:前立腺の病理学的腺癌。腫瘍悪性度:3+4=7。

### 【0203】

#### プロトコール

全てのインキュベーションは、特に明記されていない限り、室温で行った。

### 【0204】

1. 標的回復(FFPE):

抗原回復1 - Dako PT Linkおよび3-in-1 pH6.1 標的回復(TR)溶液。

・自動加熱および冷却しながら\_\_97 20分。

30

抗原回復2 - Dako PT Linkおよび3-in-1 pH9 標的回復(TR)溶液。

・自動加熱および冷却しながら\_\_97 20分。

抗原回復3 - Microwave Vector クエン酸 pH6.1 熱誘導エピトープ回復(HIER)。

・スライドを脱パラフィンし、親水化し(rehydrated)、次に全出力に設定された電子レンジで沸騰させた(3×5分)。

全てのスライドをPBSで濯いだ - 10分。

### 【0205】

2. アッセイ工程(DAKO Envision Flex plus)

40

・\_\_Envision ペルオキシダーゼブロック - 5分

・\_\_濯ぎ

・\_\_Dako CSAII 無血清タンパク質ブロック - 10分

・\_\_空気除去

・\_\_一次抗体 - 30分

・\_\_濯ぎ×2

・\_\_Envision Flex/HRP - 20分

・\_\_濯ぎ×2

・\_\_DAB - 10分

### 【0206】

50

## 3. 対比染色およびカバースリッピング(coverslipping)

- ・Mayerのヘマトキシリン対比染色
- ・エタノールの上昇系列での脱水
- ・キシレンの透徹(×3)
- ・DePeX下でカバースリップ

## 【0207】

試薬 - 一次抗体

## CREM - 抗 - cAMP 応答配列モジュレーター

1) 4、2 および 1 μg/ml で試験される Abcam Cat No: AB64832

10

2) 4、2 および 1 μg/ml で試験される Novus biomedical Cat No: NBP1-81760

3) 0.8、0.4 および 0.2 μg/ml (推奨濃度 0.16 μg/ml) で試験される Sigma Aldrich Cat No: HPA001818-100UL

・R-IgG - ウサギポリクローナル IgG (ウサギアイソタイプコントロール) Alere Cat No: X0936

## 【0208】

## ERRFI1 - 抗 - ERBB 受容体フィードバックインヒビター 1

1) 4、2 および 1 μg/ml で試験される Abcam Cat No: ab50272

20

2) 4、2 および 1 μg/ml で試験される Insight biotechnology Cat No: SC-137154 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

3) Sigma Aldrich Cat No: HPA027206-100UL Tested at 4、2 および 1 μg/ml

・M-IgG1 - マウスモノクローナル IgG1 (マウスアイソタイプコントロール) Alere Cat No: X0931

・R-IgG1 - ウサギポリクローナル IgG (ウサギアイソタイプコントロール) Alere Cat No: X0936

## 【0209】

30

## HJURP 抗 - ホリデイ構造認識タンパク質

1) 4、2 および 1 μg/ml ウサギポリクローナルで試験される Abcam Cat No: AB100800

2) 4、2 および 1 μg/ml マウスモノクローナルで試験される Abcam Cat No: AB175577

3) 4、2 および 1 μg/ml ウサギポリクローナルで試験される Biorbyt Cat No: ORB140157

・ウサギアイソタイプコントロール Alere Cat No: X0936

・マウス IgG1 コントロール Alere Cat No: X0931

## 【0210】

40

## PDK4 - 抗 - ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ、アイソザイム 4

1) 4、2 および 1 μg/ml で試験される Sigma Aldrich Cat No: HPA056731-100UL

2) 4、2 および 1 μg/ml で試験される LifeSpan BioSciences Cat No: LS-B3459

3) 4、2 および 1 μg/ml で試験される Thermo scientific Cat No: PA5-13778

・R-IgG - ウサギポリクローナル IgG (ウサギアイソタイプコントロール) Alere Cat No: X0936

## 【0211】

50

・SRSF5 - 抗 - セリン / アルギニン - リッチスプライシング因子5

1) 4、2および1  $\mu$ g / mlで試験されるNovus Biomedical Cat No: H00006430 - B01P

2) 4、2および1  $\mu$ g / mlで試験されるSigma Aldrich Cat No: HPA043484 - 100UL

3) 4、2および1  $\mu$ g / mlで試験されるLifeSpan BioSciences Cat No: LS - B3091

・R-IgG1 - ウサギポリクローナルIgG (ウサギアイソタイプコントロール) Alere Cat No: X0936

・Sigma Aldrich Cat No: F3520 - 1ML

・PolyマウスIgG (M-IgG1、2a、2b)

・M-IgG1 - Alere Cat No: X0931

・M-IgG2a - Alere Cat No: X0943

・M-IgG2b - Alere Cat No: X0944

【0212】

PDRG1 - 抗 - p53およびDNA損傷制御タンパク質1

1) 4、2および1  $\mu$ g / mlで試験されるAbcam Cat No: AB175965

2) 4、2および1  $\mu$ g / mlで試験されるBiorbyt Cat No: ORB162334

3) 4、2および1  $\mu$ g / mlで試験されるNovus Biomedical Cat No: NBP2 - 01854

・M-IgG1 - マウスモノクローナルIgG1 (マウスアイソタイプコントロール) Alere Cat No: X0931

・R-IgG1 - ウサギポリクローナルIgG (ウサギアイソタイプコントロール) Alere Cat No: X0936

【0213】

#### 結果

全てのデータのレビューに続いて、以下の標的は、前立腺癌分類または予後に対して特異性および感受性であり、使用することができるIHCアッセイを証明している。

【0214】

10

20

30

【表 16】

標的	適当な抗体例	回復条件例	濃度例
CREM	Sigma Aldrich HPA001818	pH9 PT L i n k	0.8 $\mu$ g/ml
		pH6 Micro wave	0.8 $\mu$ g/ml
	Novus Bio medical NBP1-81760	pH6 PT l i n k	4 $\mu$ g/ml
ERRFI1	ABCAM AB50272	pH9 PT L i n k	4 $\mu$ g/ml
	Sigma Aldrich HPA027206	pH9 PT L i n k	4 $\mu$ g/ml
HJURP	Biorbyt ORB140157	pH6 PT l i n k	4 $\mu$ g/ml
PDK4	Thermo Scientific PAS-13778	pH6 PT l i n k	4 $\mu$ g/ml
		pH9 PT L i n k	4 $\mu$ g/ml
	Sigma Aldrich HPA056731	pH9 PT L i n k	4 $\mu$ g/ml
SRSF5	Sigma Aldrich HPA043484	pH6 PT l i n k	4 $\mu$ g/ml
PDRG1	ABCAM AB175965	pH9 PT L i n k	4 $\mu$ g/ml

10

20

## 【0215】

本願発明は、本願明細書に記載されている特定の態様による範囲において限定されるべきではない。実際に、本願明細書に記載されているものに加えて、本願発明の種々の修飾が、前記および図面から当業者にとって明らかである。かかる修飾が、特許請求の範囲の範囲内に入ると意図される。さらに、本願明細書に記載されている全ての態様は、適当なとき、広範に適用でき、および任意の、および全ての他の一貫した態様と組み合わせることができると考えられる。

30

## 【0216】

様々な文献が本願明細書に引用されており、かかる文献の記載は全体において出典明示により包含させる。

【図 1 - 1】

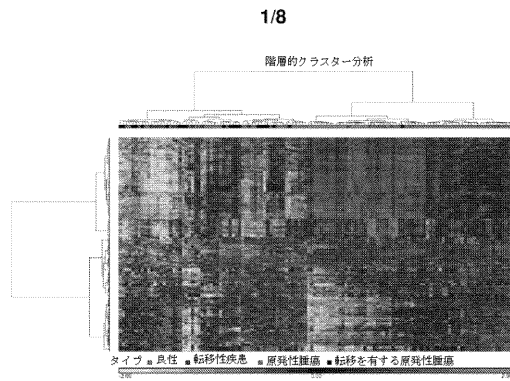


Figure 1A

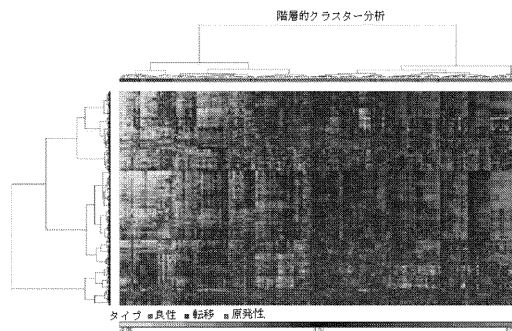


Figure 1B

【図 1 - 2】

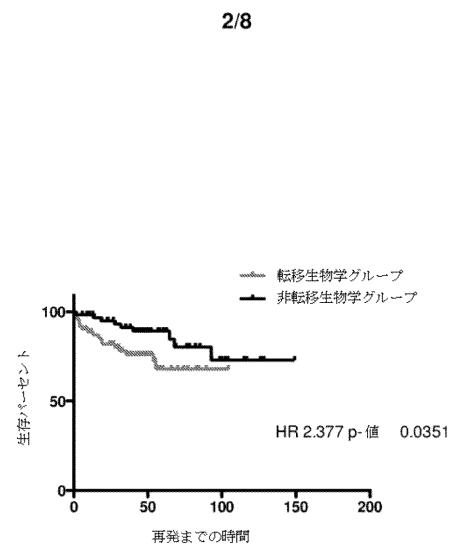


Figure 1C

【図 2】

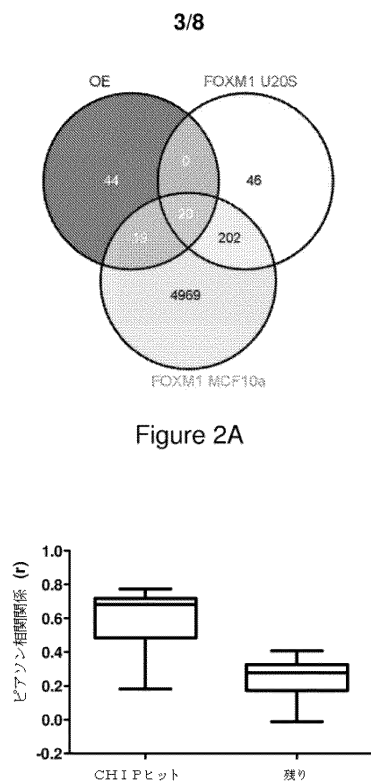
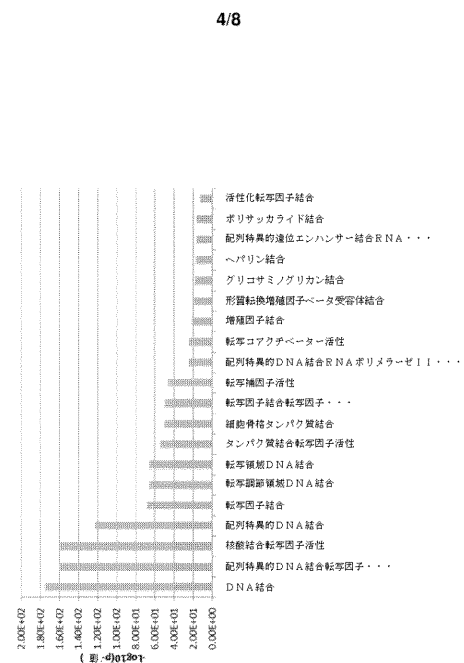


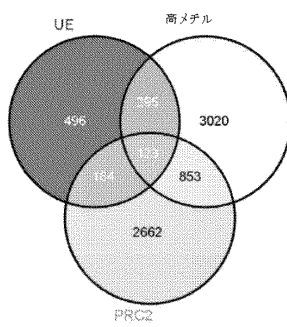
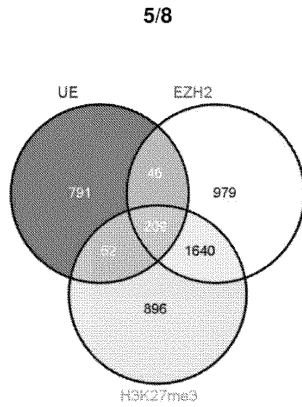
Figure 2B

【図 3 - 1】

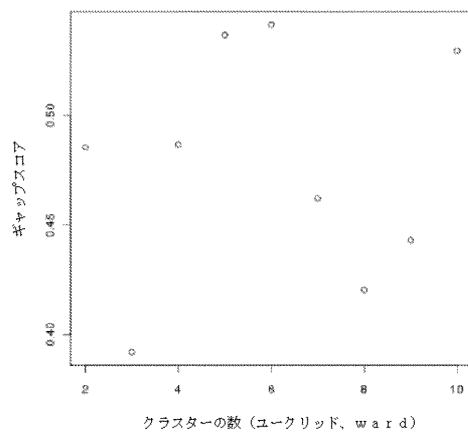




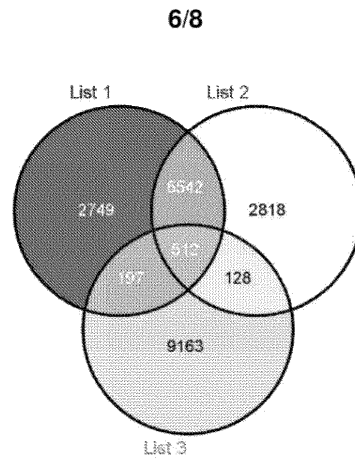
【 図 3 - 2 】



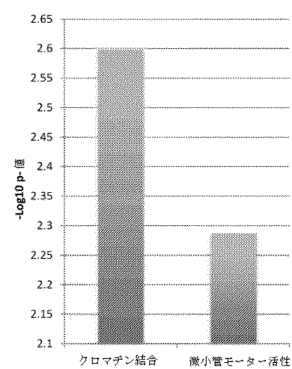
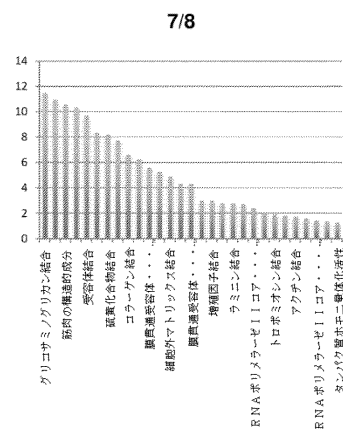
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】



【 図 7 】

8/8

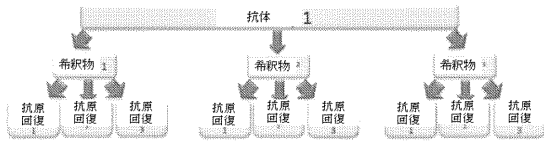


Figure 7

【 配 列 表 】

2017507320000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/053694

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68  
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)  
C12Q

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, Sequence Search, 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.
Y	WO 2011/153287 A2 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; BADVE SUNIL [US]; NAKSHATRI HARIKRI) 8 December 2011 (2011-12-08) claims 1, 20; table 2 -----	1-25, 35-43, 46-48
Y	WO 2013/003384 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; DEPINHO RONALD A [US]; DING ZHIHU [U]) 3 January 2013 (2013-01-03) claims 1, 4, 5, 13; table 5 -----	1-25, 35-43, 46-48
Y	WO 2011/094233 A1 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; KULKARNI PRAKASH [US]; SUYAMA TAKAHITO [US];) 4 August 2011 (2011-08-04) claims 1, 8-10, 39; table 5 ----- -/--	1-25, 35-43, 46-48



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

14 July 2015

Date of mailing of the international search report

24/07/2015

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

Santagati, Fabio

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
PCT/GB2014/053694
**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.:  
1-43, 46-49(all partially)
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/053694

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/091776 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; RUBIN MARK A [US]; DEMICHELIS FRANCESC) 31 August 2006 (2006-08-31) claims 1, 10, 26; figure 7 -----	1-25, 35-43, 46-48
A	TULIPPE LA E ET AL: "Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 62, no. 15, 1 August 2002 (2002-08-01), pages 4499-4506, XP002395331, ISSN: 0008-5472 table 2 -----	1,3-6, 8-25,36, 38,39, 41-43,48
X	Ghassan Yehia ET AL: "The Expression of Inducible cAMP Early Repressor (ICER) Is Altered in Prostate Cancer Cells and Reverses the Transformed Phenotype of the LNCaP Prostate Tumor Cell Line 1", CANCER RESEARCH Biochemistry and Molecular Biology, 15 August 2001 (2001-08-15), pages 6055-6059, XP055170623, Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/16/6055.full.pdf [retrieved on 2015-02-18]	33-35,46
A	page 6055, right-hand column, last paragraph; figures 2, 3 -----	1,3-6, 8-25,36, 38,39, 41-43,48
X	AFFYMETRIX: "GeneChip TM Human Genome Arrays", INTERNET CITATION, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 1-4, XP002714318, Retrieved from the Internet: URL:http://www.osa.sunysb.edu/udmf/ArraySheets/human_datasheet.pdf [retrieved on 2013-10-08]	40,49
Y	the whole document -/--	47

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/053694

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>&amp; Anonymous: "Information for probe set 207630_s_at (HG-U133_Plus_2)",  1 January 2014 (2014-01-01), XP055170951,  Retrieved from the Internet:  URL: <a href="http://genecards.weizmann.ac.il/cgi-bin/geneannot/GA_search.pl?keyword_type=probe_set_id&amp;target=genecards&amp;keyword=207630_s_at&amp;array=HG-U133_Plus_2">http://genecards.weizmann.ac.il/cgi-bin/geneannot/GA_search.pl?keyword_type=probe_set_id&amp;target=genecards&amp;keyword=207630_s_at&amp;array=HG-U133_Plus_2</a>  [retrieved on 2015-02-19]  the whole document</p> <p>-----</p>	
X	<p>TANNOCK IAN F ET AL: "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer",  NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE,  MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, BOSTON, MA,  US,  vol. 351, no. 15,  7 October 2004 (2004-10-07), pages  1502-1512, XP002623317,  ISSN: 1533-4406, DOI: 10.1056/NEJMOA040720  the whole document</p> <p>-----</p>	26-32
Y	<p>YUCHAN WANG ET AL: "Low expression of cyclic amp response element modulator-1 can increase the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma",  TUMOR BIOLOGY,  vol. 34, no. 6, 9 August 2013 (2013-08-09),  pages 3649-3657, XP055171022,  ISSN: 1010-4283, DOI:  10.1007/s13277-013-0946-1  page 3656, right-hand column, last  paragraph; figure 1; table 1</p> <p>-----</p>	1,3-6, 8-25,36, 38,39, 41-43, 47,48
A	<p>ELISABETH MÉMIN ET AL: "ICER reverses tumorigenesis of rat prostate tumor cells without affecting cell growth",  THE PROSTATE,  vol. 53, no. 3,  17 October 2002 (2002-10-17), pages  225-231, XP055171032,  ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/pros.10149  the whole document</p> <p>-----</p>	1,3-6, 8-36, 38-43, 46-49
X	<p>WO 2012/018609 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; SIDRANSKY DAVID [US]; CHANG XIAOFEI [US]) 9 February 2012 (2012-02-09)  paragraphs [0032], [0039]; claim 1;  figure 3</p> <p>-----</p>	33
Y	<p>-----</p> <p>-/--</p>	22-25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/053694

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/106709 A2 (UNIV TEXAS [US]; DINNEY COLIN P; FLOARES ALEXANDRU GEORGE; ADAM LIANA) 1 September 2011 (2011-09-01)  claim 11; figure 6 -----	1,3-6, 8-25,36, 38,39, 41-43,48
X	WO 2013/142939 A1 (FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE [BR]; SUPREMUM ASSESSORIA E CONSULTORIA LTDA) 3 October 2013 (2013-10-03) paragraph [0003]; claims 36, 41 -----	1-21,35, 38, 41-43, 47,48 22-25, 36,37
X	HANNAH L. GAUTREY ET AL: "Regulation of Mcl-1 by SRSF1 and SRSF5 in Cancer Cells", PLOS ONE, vol. 7, no. 12, 17 December 2012 (2012-12-17), page e51497, XP055201127, DOI: 10.1371/journal.pone.0051497 page 2, left-hand column, last paragraph -----	33,34,46
Y	WILLIAM JACKSON ET AL: "Gleason pattern 5 is the strongest pathologic predictor of recurrence, metastasis, and prostate cancer-specific death in patients receiving salvage radiation therapy following radical prostatectomy", CANCER, vol. 119, no. 18, 2 September 2013 (2013-09-02), pages 3287-3294, XP055201484, ISSN: 0008-543X, DOI: 10.1002/cncr.28215 tables 3-5 -----	36,37
X	S. KAMARAJUGADDA ET AL: "Glucose Oxidation Modulates Anoikis and Tumor Metastasis", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 32, no. 10, 15 May 2012 (2012-05-15), pages 1893-1907, XP055201748, ISSN: 0270-7306, DOI: 10.1128/MCB.06248-11 -----	33,34
Y	page 1894, right-hand column, paragraph 4 page 1901, right-hand column, paragraph 2; figures 1-3 ----- -/--	1-25, 35-43, 46-48

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/053694

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	L. Mengual ET AL: "Perfil de expresión génica en el cáncer de próstata: identificación de marcadores candidatos para el diagnóstico no invasivo", Actas Urológicas Españolas, 25 October 2013 (2013-10-25), XP055201704, Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0210480613003252 [retrieved on 2015-07-10] the whole document & L. Mengual ET AL: "Gene expression profiles in prostate cancer: Identification of candidate non-invasive diagnostic markers", Actas Urológicas Españolas (English Edition), vol. 38, no. 3, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 143-149, XP055201687, ISSN: 2173-5786, DOI: 10.1016/j.acuroe.2013.12.002 figure 3 -----	1-24
Y	US 2013/064840 A1 (NAKAMURA YUSUKE [JP] ET AL) 14 March 2013 (2013-03-14)  paragraph [0450]; table 1 -----	1-6, 8-21,24, 40-43, 46-48
X	ZHI HU ET AL: "The expression level of HJURP has an independent prognostic impact and predicts the sensitivity to radiotherapy in breast cancer", BREAST CANCER RESEARCH, vol. 12, no. 2, 1 January 2010 (2010-01-01), page R18, XP055073614, ISSN: 1465-5411, DOI: 10.1186/bcr2487	33,34
Y	page 2, right-hand column, paragraph 2; figures 3-6 page 13, right-hand column -----	1-6, 8-21,24, 40-43, 46-48
X	LINGYAN JIANG ET AL: "PDRG1, a novel tumor marker for multiple malignancies that is selectively regulated by genotoxic stress", CANCER BIOLOGY & THERAPY, vol. 11, no. 6, 15 March 2011 (2011-03-15), pages 567-573, XP055202181, ISSN: 1538-4047, DOI: 10.4161/cbt.11.6.14412 page 572, right-hand column, paragraph 3; figure 2; table 1 ----- -/--	33,34



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/053694

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SUSUMU SAIGUSA: "Gene expression profiles of tumor regression grade in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy", ONCOLOGY REPORTS, 14 June 2012 (2012-06-14), XP055202187, ISSN: 1021-335X, DOI: 10.3892/or.2012.1863 figure 4; table 1</p> <p>-----</p>	<p>1-43, 46-49</p>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2014/053694

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011153287 A2	08-12-2011	CA 2836725 A1 US 2013202717 A1 WO 2011153287 A2	08-12-2011 08-08-2013 08-12-2011
WO 2013003384 A1	03-01-2013	AU 2012275500 A1 CA 2840066 A1 EP 2723905 A1 US 2014314765 A1 WO 2013003384 A1	16-01-2014 03-01-2013 30-04-2014 23-10-2014 03-01-2013
WO 2011094233 A1	04-08-2011	NONE	
WO 2006091776 A2	31-08-2006	US 2006234259 A1 US 2010137164 A1 WO 2006091776 A2	19-10-2006 03-06-2010 31-08-2006
WO 2012018609 A2	09-02-2012	EP 2598890 A2 US 2013190310 A1 WO 2012018609 A2	05-06-2013 25-07-2013 09-02-2012
WO 2011106709 A2	01-09-2011	US 2013058925 A1 WO 2011106709 A2	07-03-2013 01-09-2011
WO 2013142939 A1	03-10-2013	NONE	
US 2013064840 A1	14-03-2013	AU 2011225577 A1 CA 2792910 A1 CN 102884190 A EP 2545171 A1 JP 2013521761 A KR 20130006444 A RU 2012143396 A SG 183500 A1 TW 201132351 A US 2013064840 A1 US 2014256648 A1 WO 2011111392 A1	27-09-2012 15-09-2011 16-01-2013 16-01-2013 13-06-2013 16-01-2013 20-04-2014 27-09-2012 01-10-2011 14-03-2013 11-09-2014 15-09-2011

International Application No. PCT/ GB2014/ 053694

**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, 3-6, 8-36, 38-43, 46-49(all partially)

A method for characterising and/or prognosing prostate cancer in a subject comprising:determining the expression level of at least CREM in a sample from the subject wherein the determined expression level is used to provide a characterisation of and/or a prognosis for the prostate cancer. A method for selecting a treatment for prostate cancer in a subject comprising:(a) determining the expression level of at least CREM and (b) selecting a treatment appropriate to the characterisation of and/or prognosis for the prostate cancer. A chemotherapeutic agent for use in treating prostate cancer in a subject, wherein the subject is selected for treatment on the basis of said method. A chemotherapeutic agent for use in treating prostate cancer in a subject wherein the subject has a decreased expression level of at least CREM. An antibody that binds specifically to a protein product of CREM. Use of said antibody for characterising and/or prognosing a prostate cancer in a subject. A method for diagnosing a prostate cancer with an increased metastatic potential in a subject comprising:determining the expression level of at least CREM. A system or device for performing said methods. A system or test kit for characterising and/or prognosing prostate cancer in a subject, comprising:a) one or more testing devices for determining the expression level of at least CREM, b) a processor; and c) storage medium comprising a computer application that, when executed by the processor, is configured to: (i) access and/or calculate the determined expression levels of the at least CREM in the sample on the one or more testing devices (ii) calculate whether there is a decreased level of at least CREM in the sample; and (iii) output from the processor the characterisation of and/or prognosis for the prostate cancer. A computer application or storage medium comprising said computer application. A kit for characterising and/or prognosing prostate cancer in a subject comprising said antibody. A kit for characterising and/or prognosing prostate cancer in a subject comprising one or more oligonucleotide probes specific for an RNA product of CREM and further comprising one or more of the following components:a) a blocking probe b) a PreAmplifier c) an Amplifier and/or d) a Label molecule.

---

2-46. claims: 1-49(partially)

Idem as for invention 1 but wherein the gene is:

inv 2 = ERFFI1

inv 3 = SRSF5

.....

inv 46 = ZFP36

International Application No. PCT/ GB2014/ 053694

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

---

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 2 0 6
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/58 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	
A 6 1 K 31/277 (2006.01)	A 6 1 K 31/58	
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 31/277	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 C	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 13/08	
	G 0 1 N 33/50 P	
	G 0 1 N 33/53 Y	
	G 0 1 N 37/00 1 0 2	

(81)指定国 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, 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, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . F I R E W I R E

2 . T h u n d e r b o l t

- (72)発明者 スティーブン・ウォーカー  
英国ビーティ 6 3 ・ 5 キューディ、クレイガボン、シーゴー・インダストリアル・エステイト 2 0 番、アルマック・ハウス内
- (72)発明者 アンドリーナ・マッキヤビガン  
英国ビーティ 6 3 ・ 5 キューディ、クレイガボン、シーゴー・インダストリアル・エステイト 2 0 番、アルマック・ハウス内
- (72)発明者 ティモシー・デイビソン  
英国ビーティ 6 3 ・ 5 キューディ、クレイガボン、シーゴー・インダストリアル・エステイト 2 0 番、アルマック・ハウス内
- (72)発明者 リチャード・ケネディ  
英国ビーティ 6 3 ・ 5 キューディ、クレイガボン、シーゴー・インダストリアル・エステイト 2 0 番、アルマック・ハウス内
- (72)発明者 ポール・ハーキン  
英国ビーティ 6 3 ・ 5 キューディ、クレイガボン、シーゴー・インダストリアル・エステイト 2 0 番、アルマック・ハウス内
- (72)発明者 ローラ・ヒル  
英国ビーティ 6 3 ・ 5 キューディ、クレイガボン、シーゴー・インダストリアル・エステイト 2 0 番、アルマック・ハウス内

F ターム(参考) 2G045 AA26 DA14  
4B063 QA19 QQ02 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02  
4C084 AA11 AA17 ZA812 ZB262  
4C085 AA03 AA13 AA14 AA21 BB01 CC22 CC23 EE01  
4C086 AA01 AA02 BA02 DA12 HA12 MA01 MA04 ZA81 ZB26  
4C206 AA01 AA02 JA19 JB16 KA01 MA01 MA04 ZA81 ZB26  
4H045 AA11 DA76 EA51 FA72 FA74