

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6760666号  
(P6760666)

(45) 発行日 令和2年9月23日 (2020.9.23)

(24) 登録日 令和2年9月7日 (2020.9.7)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 33/574 (2006.01)

G O 1 N 33/574

A

請求項の数 15 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2018-503149 (P2018-503149)  
 (86) (22) 出願日 平成28年7月22日 (2016.7.22)  
 (65) 公表番号 特表2018-520366 (P2018-520366A)  
 (43) 公表日 平成30年7月26日 (2018.7.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2016/000260  
 (87) 国際公開番号 WO2017/011855  
 (87) 国際公開日 平成29年1月26日 (2017.1.26)  
 審査請求日 令和1年6月18日 (2019.6.18)  
 (31) 優先権主張番号 2015902919  
 (32) 優先日 平成27年7月22日 (2015.7.22)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 オーストラリア (AU)

(73) 特許権者 516214180  
 ミノミック インターナショナル リミテ  
 イド  
 オーストラリア国、ニューサウスウェール  
 ズ 2113, マクアリー パーク, タラ  
 ベラ ロード 75, グランド フロア,  
 スイート 2  
 (74) 代理人 100126505  
 弁理士 佐貫 伸一  
 (74) 代理人 100131392  
 弁理士 丹羽 武司  
 (72) 発明者 ウォルシュ, ブラッドリー  
 オーストラリア ニューサウスウェールズ  
 2074 ターラマラ マスグレイブ  
 ストリート 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺疾患のためのバイオマーカーの組み合わせ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者における前立腺癌 (C a P) を検出するためのデータを取得する方法であって、  
 前記方法は、患者由来の生体試料中のグリピカン - 1 (G P C - 1) を含む少なくとも  
 2 つのバイオマーカーのレベルを測定すること、および

前記生体試料中の前記 G P C - 1 を含む少なくとも 2 つのバイオマーカーのレベルに基  
 づき、前記患者が C a P を有することを決定すること、を含み、

前記 C a P を検出することが、患者が C a P を有するか又は前立腺肥大症 (B P H) を  
 有するかを決定することによるものであり、

前記 C a P を有することを決定することが、

( a ) B P H を有する対象の集団及び C a P を有する対象の集団から得られた一連の生  
 体試料中の前記 G P C - 1 を含む少なくとも 2 つのバイオマーカーを検出し、それによ  
 って、一連の各前記生体試料中の各前記バイオマーカーのバイオマーカーレベルを得ること  
 ;

B P H 試料と C a P 試料の判別を可能にするようにバイオマーカーレベルを組み合わせ  
 ること ; 及び組み合わせたバイオマーカーレベルから閾値を選択し、試料中の B P H と C  
 a P を判別するための基礎として前記閾値を用いること、

によって B P H と前立腺癌を判別する閾値を生成すること ;

( b ) 対象からの生体試料中の前記 G P C - 1 を含む少なくとも 2 つのバイオマーカー  
 を検出し、それによって、対象の生体試料中の各前記バイオマーカーについてのバイオマ

10

20

ーカーレベルを得ること；並びに

(c) 対象の生体試料から得られた個々の又は組み合わせたバイオマーカールレベルに適切なアルゴリズム及び／又は変換を適用し、それによって、閾値との比較のための患者のバイオマーカール値を生成すること；並びに

(d) 患者のバイオマーカール値と閾値の比較により、該対象がBPH又はCaPを有するかどうかを決定すること、

を含み、

前記GPC-1を含む少なくとも2つのバイオマーカールは、以下のバイオマーカールの組み合わせ；

GPC-1と肝細胞増殖因子(HGF)；

GPC-1と上皮増殖因子(EGF)；

GPC-1とプラスミノゲン活性化因子阻害剤1(PAI-1)；

GPC-1と顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)；

GPC-1とヒトインターロイキン18(HuIL-18)；

GPC-1と血小板由来増殖因子AB.BB(PDGFA.BB)；

GPC-1と血小板由来成長因子BB(PDGFBB)；

GPC-1と可溶性CD40リガンド(sCD40L)；

GPC-1とヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(HuGM-CSF)；

GPC-1とインターフェロンガンマ(IFN)；及び

GPC-1とフォリスタチン

のうちのいずれか1つから選択されるものである、  
方法。

#### 【請求項2】

前記GPC-1を含む少なくとも2つのバイオマーカールが、

GPC-1、HGF及びPAI-1；

GPC-1、HGFとヒト線維芽細胞増殖因子ベータ(HuFGFb)；

GPC-1、HGFとEGF；

GPC-1、HGFとPDGFBB；

GPC-1、HGFとフォリスタチン；

GPC-1、HGFとG-CSF；

GPC-1、HGFとヒトインターロイキン8(HuIL-8)；

GPC-1、HGFと可溶性CD40リガンド(sCD40L)；

GPC-1、HGFとヒト皮膚T細胞誘引性サイトカイン(cutaneous T-cell attracting cytokine)(CTACK-C-Cモチーフリガンド27又はCCL27としても知られている)；

GPC-1、HGFとPDGFAB.BB；

GPC-1、HGFとIFN；

GPC-1、HGFとヒト単球走化性・活性化因子(HuMCP1/MCAF)；

GPC-1、HGFとHuIL-18；

GPC-1、HGF、HuGM-CSF；

GPC-1、HGFとウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子(uPA)；

GPC-1、HGFとヒトメラノーマ成長刺激活性アルファ(HuGROa、CXCMモチーフリガンド1、CXCL1としても知られている)；

GPC-1、HGFと可溶性血管内皮増殖因子受容体(sVEGFR)；

GPC-1、EGFとフォリスタチン；

GPC-1、EGFと腫瘍壊死因子(TNF)；並びに

GPC-1、G-CSFと免疫グロブリン様及びEGF様ドメイン2を有する可溶性チロシンキナーゼ(sTIE2)、

のうちのいずれか1つから選択される、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

( i ) 前記組み合わせたバイオマーカーレベルから閾値を選択することが、組み合わせたバイオマーカーレベルのサブセットの選択を含み、及び / 又は

( i i ) B P H 試料と C a P 試料の判別を可能にするように、前記バイオマーカーレベルを組み合わせることが、

$$\text{式： } S = w_1 A_1 + w_2 A_2 \cdots w_n A_n$$

( 式中、S は加重和であり、w は最終的なバイオマーカー加重であり、A は、n 個の異なるバイオマーカーからの所与のバイオマーカーレベル、又は数値的な若しくはバイオマーカー値の比としての所与のバイオマーカーのレベルの変換である )

に従って、B P H 試料と C a P 試料の判別を最大限にするように、これらのバイオマーカーレベルの加重線形和を組み合わせることを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

#### 【請求項 4】

( i ) 所与のバイオマーカーのレベルの数値的な前記変換が、指数関数、べき乗関数及び / 又はルート関数の使用を含み、及び / 又は

( i i ) 最終的なバイオマーカーの加重 w の取得が 1 に設定されるか、又は

$$\text{式： } W = \max ( M ) / M$$

( 式中、 $W = \{ w_1, \cdots, w_n \}$  及び  $M = \{ \text{中央値} ( A_1 ), \cdots, \text{中央値} ( A_n ) \}$  であり、 $\max ( M )$  が得られたバイオマーカーレベルの最大レベルの中央値であり、M が、各前記バイオマーカーについて得られたバイオマーカーレベルの中央値を含有するベクトルである )

に従って生成された初期のバイオマーカーの加重 ( W ) の生成を含む、請求項 3 に記載の方法。

20

#### 【請求項 5】

各前記最終的なバイオマーカーの加重が、一連の生体試料中の B P H と C a P の判別における最適化の判別関数を用いて決定される、請求項 4 に記載の方法。

#### 【請求項 6】

( a ) 前記判別関数が、

( i ) R O C 解析によって生成された曲線下面積；

( i i ) 真陽性率 ( T P R ) と真陰性率 ( T N R ) の組み合わせ；

( i i i ) 制限された特異性の範囲内の R O C 解析によって生成された曲線下面積；

( i v ) 制限された感度の範囲内の R O C 解析によって生成された曲線下面積

のうちの任意の 1 以上である、及び / 又は

30

( b ) 最適化のための前記判別関数は、ネルダーミード ( シンプレックス法 )、確率的方法、勾配降下法、確率的勾配降下法、遺伝的アルゴリズム、粒子群法、及び / 又はブルートフォース法のうちの任意の 1 以上である、請求項 5 に記載の方法。

#### 【請求項 7】

( i ) 対象の生体試料から得られた個々の又は組み合わせたバイオマーカーレベルに適用される適切なアルゴリズム及び / 又は変換が、

$$\text{式： } S = w_1 A_1 + w_2 A_2 \cdots w_n A_n$$

( 式中、S は加重和であり、w は最終的なバイオマーカー加重であり、A は、n 個の異なるバイオマーカーからの所与のバイオマーカーレベル、又は数値的な若しくはバイオマーカー値の比としての所与のバイオマーカーのレベルの変換である )

に従う、及び / 又は

40

( i i ) バイオマーカーレベルを組み合わせることが、B P H 試料と C a P 試料の判別を最大限にする、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 8】

( i ) B P H と C a P との間の誤分類率を低下させ；及び / 又は

( i i ) B P H と C a P の判別の感度を増大させ；及び / 又は

( i i i ) B P H と C a P の判別における特異性を増大させる

ように、組み合わせたバイオマーカーレベルから閾値を選択することを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 9】

B P HとC a Pとの間の誤分類率を低下させるように、組み合わせバイオマーカーレベルから閾値を選択することが、

( i ) 適切な真陽性率及び / 又は真陰性率を選択すること ;

( i i ) 誤分類率を最小化すること ; 及び / 又は

( i i i ) 真陽性率が真陰性率と交差する点を特定することによってB P HとC a Pとの間の誤分類率を最小化すること、

の1つ以上を含む、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

( i ) B P HとC a Pの判別における感度を増大させるように、組み合わせバイオマーカーレベルから閾値を選択することが、R O C解析によって作成された曲線下の部分面積 ( p A U C ) を最適化するために、加重和ネルダーミード最適化手順を使用することを含み、p A U Cが、値0と特定値e ( 例えば、0 . 5 ) との間の制限 ( 1 - 感度 ) 範囲内のR O C下面積を表すものであり ; 及び / 又は

( i i ) B P HとC a Pの判別における感度を増大させるように、組み合わせバイオマーカーレベルから閾値を選択することが、前記感度を最大化する又は前記特異性を最大限にするものである、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 11】

B P HとC a Pの判別における特異性を増大させるように、組み合わせバイオマーカーレベルから閾値を選択することが、R O C解析 ( p A U C ) によって作成された曲線下の部分面積を最適化するために、加重和ネルダーミード最適化手順を使用することを含み、p A U Cが、値0と特定値e ( 例えば、0 . 5 ) との間の制限 ( 1 - 特異性 ) 範囲内のR O C下面積を表す、請求項 8 又は10に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記G P C - 1を含む少なくとも2つのバイオマーカーが、以下のバイオマーカーの組み合わせ :

G P C - 1 / E G F / フォリスタチン ;

G P C - 1 / E G F / T N F ;

G P C - 1 / H G F ;

G P C - 1 / H G F / P A I - 1 ;

G P C - 1 / H G F / H u F G F b ;

G P C - 1 / H G F / E G F ;

G P C - 1 / H G F / H u P D F G B B ;

G P C - 1 / E G F ;

G P C - 1 / P A I - 1 ;

G P C - 1 / G - C S F ; 及び

G P C - 1 / P D G F A B . B B

のうちのいずれか1つから選択される、請求項 8、10又は11に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記G P C - 1を含む少なくとも2つのバイオマーカーが、以下のバイオマーカーの組み合わせ :

G P C - 1 / H G F ;

G P C - 1 / P A I - 1 ;

G P C - 1 / G - C S F ;

G P C - 1 / E G F ;

G P C - 1 / P D G F A B . B B ;

G P C - 1 / H G F / F G F b ;

G P C - 1 / H G F / P A I - 1 ;

G P C - 1 / H G F / E G F ;

G P C - 1 / H G F / フォリスタチン ; 及び

G P C - 1 / H G F / G - C S F

のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 4】**

対象の生体試料における G P C - 1 を含む少なくとも 2 つのバイオマーカーを検出することが、

( i ) 各前記バイオマーカーのレベルを示す 1 以上の蛍光シグナルを測定すること；

( i i ) 試料中の前記バイオマーカーの加重 / 量の測定値を得ること；

( i i i ) 各前記バイオマーカーのレベルを示す吸光度シグナルを測定すること；又は

( i v ) 質量分析、タンパク質アレイ技術、高速液体クロマトグラフィー ( H P L C )

、ゲル電気泳動、放射性標識、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される技術を使用することを含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

**【請求項 1 5】**

( i ) 一連の生体試料及び対象の生体試料中のバイオマーカーレベルを得ることが、第 1 及び第 2 の抗体集団と各前記試料を接触させることを含み、各前記抗体集団が前記バイオマーカーのうちの 1 つに結合特異性を有し、第 1 及び第 2 の抗体集団が異なる結合特異性を有する；及び / 又は

( i i ) 一連の生体試料及び対象の生体試料が、それぞれ全血、血清、血漿、唾液、涙、尿、又は組織である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

20

**【0001】**

本発明は、概して、免疫学及び医学の分野に関する。より具体的には、本発明は、前立腺疾患の診断及び前立腺疾患の検出に使用することができる生体試料中のバイオマーカーの特定に関する。

**【背景技術】****【0002】**

前立腺癌は、最も頻繁に診断される内臓癌であり、男性の癌死亡原因の第 2 位である。国立癌研究所の S E E R プログラム及び疾病対策予防センターの国立健康統計センターによると、2014 年に、前立腺癌の 233,000 の症例が発生し (すべての新規癌症例の 14%)、29,480 人 (全ての癌死亡の 5%) が死亡した (S E E R 癌統計ファクトシート：前立腺癌、国立癌研究所、B e t h e s d a , M D , <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html> を参照されたい)。

30

**【0003】**

前立腺癌について一般的に使用されるスクリーニング検査には、直腸指診 (D R E) 及び血液中の前立腺特異的抗原 (P S A) の検出が含まれる。D R E は侵襲的で不正確であり、P S A アッセイの偽陰性 (すなわち、未検出癌) 及び偽陽性 (すなわち、存在しない癌が示されること) の結果の患者数は、十分に立証されている。例えば、推奨される 4.0 ng / ml カットオフで行われる標準的 P S A 検査は、癌患者に対して 86% の感度があるが、特異性はわずか 33% であり、非癌患者の約 67% において偽陽性をもたらす (H o f f m a n ら、B M C F a m P r a c t . 2002, 3:19)。前立腺癌についての P S A の診断値も、良性と癌性の状態間の特異性の欠如により限定される。上昇した P S A レベルが、前立腺肥大症 (B P H) 及び前立腺炎 (25 ~ 86%) を有する患者の大部分で (G a o ら、1997, P r o s t a t e 31:264-281)、ならびに他の非悪性障害において検出可能であり、このマーカーの診断特異性を著しく制限する。例えば、4 ~ 10 ng / ml の血清 P S A の上昇が B P H において観察され、さらに高い値が、前立腺炎、特に、急性前立腺炎で観察される。

40

**【0004】**

D R E 又は P S A スクリーニングでの陽性診断時の確認診断テストとしては、経直腸超音波検査、生検、及び経直腸の核磁気共鳴画像法 (M R I) 生検が挙げられる。これらの

50

技術は、侵襲的であり、検査中の対象に著しい不快感を引き起こす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

前立腺疾患を診断するための便利で、信頼できる正確な検査が一般的に必要とされている。好ましくは、検査は、前立腺癌と前立腺疾患の非癌性形態（例えば、前立腺肥大症（BPH））を判別する能力を有するほうがいい。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、前立腺疾患の検出に効果的なバイオマーカーの組み合わせを特定した。特に、該バイオマーカーの組み合わせは、前立腺疾患の癌性形態と非癌性形態を区別することが可能であり得る。したがって、本発明は、前立腺疾患の検出のためのこれらのバイオマーカーの組み合わせ及びそれらを利用するアッセイに関する。

【0007】

したがって、本発明は、少なくとも以下の一連の番号付き実施形態に関し、実施形態1と言った場合、下記の番号のついた実施形態1a、1b及び1cのそれぞれを含む：

実施形態1a：対象が、前立腺癌（CaP）からの前立腺肥大症（BPH）を有するかどうかを決定するための方法であって、

（a）BPHを有する対象の集団及びCaPを有する対象の集団から得られた一連の生体試料中の少なくとも2つの検体を検出し、それによって、一連の各前記生体試料中の各前記検体の検体レベルを得ること；

BPH試料とCaP試料の判別を可能にするように検体レベルを組み合わせること；及び組み合わせた検体レベルから閾値を選択し、試料中のBPHとCaPを判別するための基礎として前記閾値を用いること、

によってBPHと前立腺癌を判別する閾値を生成すること；

（b）対象からの生体試料中の前記少なくとも2つの検体を検出し、それによって、対象の生体試料中の各前記検体についての検体レベルを得ること；並びに

（c）対象の生体試料から得られた個々の又は組み合わせた検体レベルに適切なアルゴリズム及び/又は変換を適用し、それによって、閾値との比較のための患者の検体値を生成すること；並びに

（d）患者の検体値と閾値の比較により、該対象がBPH又はCaPを有するかどうかを決定すること、

を含み、

少なくとも2つの検体は、グリピカン-1（GPC-1）を含み、以下の検体の組み合わせ：

GPC-1と肝細胞増殖因子（HGF）；

GPC-1と上皮増殖因子（EGF）；

GPC-1とプラスミノゲン活性化因子阻害剤1（PAI-1）；

GPC-1と顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）；

GPC-1とヒトインターロイキン18（HuIL-18）；

GPC-1と血小板由来増殖因子AB<sub>2</sub>BB（PDGFAB<sub>2</sub>BB）；

GPC-1と血小板由来成長因子BB（PDGFB<sub>2</sub>BB）；

GPC-1と可溶性CD40リガンド（sCD40L）

GPC-1とヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（HuGM-CSF）；

GPC-1とインターフェロンガンマ（IFN $\gamma$ ）；及び

GPC-1とフォリスタチン

のうちのいずれか1つから選択される、方法。

【0008】

実施形態1b：対象が、前立腺肥大症（BPH）又は前立腺癌（CaP）を有するかどうかを決定するための方法であって、

( a ) B P Hを有する対象の集団及びC a Pを有する対象の集団から得られた一連の生体試料中の少なくとも2つの検体を検出し、それによって、一連の各前記生体試料中の各前記検体の検体レベルを得ること；

B P H試料とC a P試料の判別を可能にするように検体レベルを組み合わせること；及び組み合わせた検体レベルから閾値を選択し、試料中のB P HとC a Pを判別するための基礎として前記閾値を用いること、

によってB P Hと前立腺癌を判別する閾値を生成すること；

( b ) 対象からの生体試料中の前記少なくとも2つの検体を検出し、それによって、対象の生体試料中の各前記検体についての検体レベルを得ること；並びに

( c ) 対象の生体試料から得られた個々の又は組み合わせた検体レベルに適切なアルゴリズム及び/又は変換を適用し、それによって、閾値との比較のための患者の検体値を生成すること；並びに

( d ) 患者の検体値と閾値の比較により、対象がB P H又はC a Pを有するかどうかを決定すること、

を含み、

少なくとも2つの検体は、グリピカン - 1 ( G P C - 1 ) を含み、以下の検体の組み合わせ：

G P C - 1 と肝細胞増殖因子 ( H G F ) ；

G P C - 1 と上皮増殖因子 ( E G F ) ；

G P C - 1 とプラスミノゲン活性化因子阻害剤 1 ( P A I - 1 ) ；

G P C - 1 と顆粒球コロニー刺激因子 ( G - C S F ) ；

G P C - 1 とヒトインターロイキン 18 ( H u I L - 18 ) ；

G P C - 1 と血小板由来増殖因子 A B . B B ( P D G F A B . B B ) ；

G P C - 1 と血小板由来成長因子 B B ( P D G F B B ) ；

G P C - 1 と可溶性 C D 40 リガンド ( s C D 40 L ) ；

G P C - 1 とヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( H u G M - C S F ) ；

G P C - 1 とインターフェロンガンマ ( I F N ) ；及び

G P C - 1 とフォリスタチン

のうちのいずれか1つから選択される、方法。

【 0 0 0 9 】

実施形態 1 c : 前立腺肥大症 ( B P H ) と前立腺癌 ( C a P ) を判別するのに使用するための閾値を生成する方法であって、

( a ) B P Hを有することが知られている対象の集団及びC a Pを有することが知られている対象の集団から得られた一連の生体試料中の少なくとも2つの検体を検出し、それによって、一連の各前記生体試料中の各前記検体の検体レベルを得ること；

( b ) B P H試料とC a P試料の判別を可能にするように検体レベルを組み合わせること；及び

( c ) B P HとC a Pを判別するための基礎として役立つ閾値を組み合わせた検体レベルから選択すること

を含み、

少なくとも2つの検体は、グリピカン - 1 ( G P C - 1 ) を含み、以下の検体の組み合わせ：

G P C - 1 と肝細胞増殖因子 ( H G F ) ；

G P C - 1 と上皮増殖因子 ( E G F ) ；

G P C - 1 とプラスミノゲン活性化因子阻害剤 1 ( P A I - 1 ) ；

G P C - 1 と顆粒球コロニー刺激因子 ( G - C S F ) ；

G P C - 1 とヒトインターロイキン 18 ( H u I L - 18 ) ；

G P C - 1 と血小板由来増殖因子 A B . B B ( P D G F A B . B B ) ；

G P C - 1 と血小板由来成長因子 B B ( P D G F B B ) ；

G P C - 1 と可溶性 C D 40 リガンド ( s C D 40 L ) ；

10

20

30

40

50

G P C - 1 とヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( H u G M - C S F ) ;  
 G P C - 1 とインターフェロンガンマ ( I F N ) ; 及び  
 G P C - 1 とフォリスタチン  
 のうちのいずれか 1 つから選択される、方法。

#### 【 0 0 1 0 】

実施形態 2 . 少なくとも 2 つの検体が、以下の検体の組み合わせ :

G P C - 1、H G F 及び P A I - 1 ;  
 G P C - 1、H G F とヒト線維芽細胞増殖因子ベータ ( H u F G F b ) ;  
 G P C - 1、H G F と E G F ;  
 G P C - 1、H G F と P D G F B B ;  
 G P C - 1、H G F とフォリスタチン ;  
 G P C - 1、H G F と G - C S F ;  
 G P C - 1、H G F とヒトインターロイキン 8 ( H u I L - 8 ) ;  
 G P C - 1、H G F と可溶性 C D 4 0 リガンド ( s C D 4 0 L ) ;  
 G P C - 1、H G F とヒト皮膚 T 細胞誘引性サイトカイン ( c u t a n e o u s T - c e l l a t t r a c t i n g c y t o k i n e ) ( C T A C K - C - C モチーフリガ  
 ド 2 7 又は C C L 2 7 としても知られている ) ;  
 G P C - 1、H G F と P D G F A B . B B ;  
 G P C - 1、H G F と I F N ;  
 G P C - 1、H G F とヒト単球走化性・活性化因子 ( H u M C P 1 / M C A F ) ;  
 G P C - 1、H G F と H u I L - 1 8 ;  
 G P C - 1、H G F、H u G M - C S F ;  
 G P C - 1、H G F とウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子 ( u P A ) ;  
 G P C - 1、H G F とヒトメラノーマ成長刺激活性アルファ ( H u G R O a、C X C モチ  
 ーフリガンド 1、C X C L 1 としても知られている ) ;  
 G P C - 1、H G F と可溶性血管内皮増殖因子受容体 ( s V E G F R ) ;  
 G P C - 1、E G F とフォリスタチン ;  
 G P C - 1、E G F と腫瘍壊死因子 ( T N F ) ; 並びに  
 G P C - 1、G - C S F と免疫グロブリン様及び E G F 様ドメイン 2 を有する可溶性チロ  
 シンキナーゼ ( s T I E 2 )、  
 のうちのいずれか 1 つから選択される、実施形態 1 に記載の方法。

#### 【 0 0 1 1 】

実施形態 3 . 組み合わせ検体レベルから閾値を選択することが、組み合わせた検体レ  
 ベルのサブセットの選択を含む、実施形態 1 又は実施形態 2 に記載の方法。

#### 【 0 0 1 2 】

実施形態 4 . B P H 試料と C a P 試料の判別を可能にするように、検体レベルを組み合  
 わせることが、式 :  $S = w_1 A_1 + w_2 A_2 \cdots w_n A_n$  ( 式中、S は加重和であり、  
 w は最終的な検体加重であり、A は、n 個の異なる検体からの所与の検体レベル、又は数  
 値的な若しくは検体値の比としての所与の検体のレベルの変換である )  
 に従って、B P H 試料と C a P 試料の判別を最大限にするように、これらの検体レベルの  
 加重線形和を組み合わせることを含む、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

#### 【 0 0 1 3 】

実施形態 5 . 所与の検体のレベルの数値的な前記変換が、指数関数、べき乗関数及び /  
 又はルート関数の使用を含む、実施形態 4 に記載の方法。

#### 【 0 0 1 4 】

実施形態 6 . 最終的な検体の加重 w の取得が、1 に設定されるか、又は式 :  $W = \max ( M ) / M$  ( 式中、 $W = \{ w_1, \cdots w_n \}$  及び  $M = \{ \text{中央値} ( A_1 ), \dots \text{中央値} ( A_n ) \}$  であり、 $\max ( M )$  が得られた検体レベルの最大レベルの中央値であり、M が、  
 各前記検体について得られた検体レベルの中央値を含有するベクトルである ) に従って生  
 成された初期の検体の加重 ( W ) の生成を含む、実施形態 4 又は実施形態 5 に記載の方法

10

20

30

40

50

。

## 【 0 0 1 5 】

実施形態 7 . 各前記最終的な加重が、一連の生体試料中の B P H と C a P の判別における最適化の判別関数を用いて決定される、実施形態 6 に記載の方法。

## 【 0 0 1 6 】

実施形態 8 . 判別関数が、

( i ) R O C 解析によって生成された曲線下面積；

( i i ) 真陽性率 ( T P R ) と真陰性率 ( T N R ) の組み合わせ；

( i i i ) 制限された特異性の範囲内の R O C 解析によって生成された曲線下面積；

( i v ) 制限された感度の範囲内の R O C 解析によって生成された曲線下面積

10

のうちの任意の 1 以上である、実施形態 7 に記載の方法。

## 【 0 0 1 7 】

実施形態 9 . 最適化のための判別関数は、ネルダ - ミード ( シンプレックス法 ) 、確率的方法、勾配降下法、確率的勾配降下法、遺伝的アルゴリズム、粒子群法、及び / 又はブルートフォース法のうちの任意の 1 以上である、実施形態 7 又は実施形態 8 に記載の方法。

## 【 0 0 1 8 】

実施形態 1 0 . 対象の生体試料から得られた個々の又は組み合わせた検体レベルに適用される適切なアルゴリズム及び / 又は変換が、式： $S = w_1 A_1 + w_2 A_2 \cdots w_n A_n$  ( 式中、 $S$  は加重和であり、 $w$  は最終的な検体加重であり、 $A$  は、 $n$  個の異なる検体からの所与の検体レベル、又は数値的な若しくは検体値の比としての所与の検体のレベルの変換である ) に従う、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

## 【 0 0 1 9 】

実施形態 1 1 . 検体レベルを組み合わせることが、B P H 試料と C a P 試料の判別を最大限にする、実施形態 1 ~ 1 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 0 2 0 】

実施形態 1 2 . ( i ) B P H と C a P との間の誤分類率を低下させ、かつ / 又は

( i i ) B P H と C a P の判別の感度を増大させ、かつ / 又は

( i i i ) B P H と C a P の判別における特異性を増大させる

ように、組み合わせた検体レベルから閾値を選択することを含む、実施形態 1 ~ 1 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

## 【 0 0 2 1 】

実施形態 1 3 . B P H と C a P との間の誤分類率を低下させるように、組み合わせ検体レベルから閾値を選択することが、適切な真陽性率及び / 又は真陰性率の選択を含む、実施形態 1 2 に記載の方法。

## 【 0 0 2 2 】

実施形態 1 4 . B P H と C a P との間の誤分類率を低下させるように、組み合わせ検体レベルから閾値を選択することが、誤分類率を最小化する、実施形態 1 2 又は実施形態 1 3 に記載の方法。

## 【 0 0 2 3 】

40

実施形態 1 5 . B P H と C a P との間の誤分類率を低下させるように、組み合わせ検体レベルから閾値を選択することが、真陽性率が真陰性率と交差する点を特定することによって B P H と C a P との間の誤分類率を最小化する、実施形態 1 2 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 0 2 4 】

実施形態 1 6 . B P H と C a P の判別における感度を増大させるように、組み合わせ検体レベルから閾値を選択することが、R O C 解析によって作成された曲線下の部分面積 (  $p A U C$  ) を最適化するために、加重和ネルダーミード最適化手順を使用することを含み、 $p A U C$  が、値 0 と特定値  $e$  ( 例えば、0 . 5 ) との間の制限 ( 1 - 感度 ) 範囲内の R O C 下面積を表す、実施形態 1 2 に記載の方法。

50

## 【 0 0 2 5 】

実施形態 1 7 . B P H と C a P の判別における感度を増大させるように、組み合わせ検体レベルから閾値を選択することが、前記感度を最大化する、実施形態 1 2 又は実施形態 1 6 に記載の方法。

## 【 0 0 2 6 】

実施形態 1 8 . B P H と C a P の判別における特異性を増大させるように、組み合わせ検体レベルから閾値を選択することが、前記特異性を最大限にする、実施形態 1 2 又は実施形態 1 6 に記載の方法。

## 【 0 0 2 7 】

実施形態 1 9 . B P H と C a P の判別における特異性を増大させるように、組み合わせ検体レベルから閾値を選択することが、R O C 解析 ( p A U C ) によって作成された曲線下の部分面積を最適化するために、加重和ネルダーミッド最適化手順を使用することを含み、p A U C が、値 0 と特定値 e ( 例えば、0 . 5 ) との間の制限 ( 1 - 特異性 ) 範囲内の R O C 下面積を表す、実施形態 1 2 又は実施形態 1 8 に記載の方法。

10

## 【 0 0 2 8 】

実施形態 2 0 . 少なくとも 2 つの検体が、以下の検体の組み合わせ：  
G P C - 1 / E G F / フォリスタチン；及び  
G P C - 1 / E G F / T N F  
のうちのいずれか 1 つから選択される、実施形態 1 2、1 6、1 7、1 8 又は 1 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

## 【 0 0 2 9 】

実施形態 2 1 . 少なくとも 2 つの検体が、以下の検体の組み合わせ：  
G P C - 1 / H G F ；  
G P C - 1 / H G F / P A I - 1 ；  
G P C - 1 / H G F / H u F G F b ；  
G P C - 1 / H G F / E G F ；  
G P C - 1 / H G F / H u P D F G B B ；  
G P C - 1 / E G F ；  
G P C - 1 / P A I - 1 ；  
G P C - 1 / G - C S F ；及び  
G P C - 1 / P D G F A B . B B  
のうちのいずれか 1 つから選択される、実施形態 1 2、1 6、1 7、1 8 又は 1 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

## 【 0 0 3 0 】

実施形態 2 2 . 少なくとも 2 つの検体が、以下の検体の組み合わせ：  
G P C - 1 / H G F ；  
G P C - 1 / P A I - 1 ；  
G P C - 1 / G - C S F ；  
G P C - 1 / E G F ；  
G P C - 1 / P D G F A B . B B ；  
G P C - 1 / H G F / F G F b ；  
G P C - 1 / H G F / P A I - 1 ；  
G P C - 1 / H G F / E G F ；  
G P C - 1 / H G F / フォリスタチン；及び  
G P C - 1 / H G F / G - C S F  
のうちのいずれか 1 つから選択される、実施形態 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

## 【 0 0 3 1 】

実施形態 2 3 . 該対象が、前立腺疾患の陽性判定を以前に受けた、実施態様 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 0 3 2 】

50

実施形態 24 . 対象が、デジタル直腸検査 ( D R E ) 及び / 又は P S A 試験による前立腺疾患の陽性判定を以前に受けた、実施態様 1 ~ 23 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0033 】

実施形態 25 . 対象の生体試料における少なくとも 2 つの検体を検出することが、  
( i ) 各前記検体のレベルを示す 1 以上の蛍光シグナルを測定すること ;  
( i i ) 試料中の前記検体の加重 / 量の測定値を得ること ;  
( i i i ) 各前記検体のレベルを示す吸光度シグナルを測定すること ; 又は  
( i v ) 質量分析、タンパク質アレイ技術、高速液体クロマトグラフィー ( H P L C ) 、  
ゲル電気泳動、放射性標識、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される技術を使用すること  
を含む、実施態様 1 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【 0034 】

実施形態 26 . 一連の生体試料及び対象の生体試料中の検体レベルを得ることが、第 1 及び第 2 の抗体集団と各前記試料を接触させることを含み、各前記抗体集団が前記検体のうちの 1 つに結合特異性を有し、第 1 及び第 2 の抗体集団が異なる結合特異性を有する、実施態様 1 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0035 】

実施形態 27 . 第 1 及び / 又は第 2 の抗体集団が標識されている、実施形態 26 に記載の方法。

【 0036 】

20

実施形態 28 . 前記標識が、放射性標識、蛍光標識、ピオチン - アビジン増幅系、化学発光システム、マイクロスフェア、及びコロイド金からなる群から選択される、実施形態 27 に記載の方法。

【 0037 】

実施形態 29 . 各前記抗体集団の検体への結合が、免疫蛍光、放射性標識、免疫ブロッキング、ウェスタンブロッティング、酵素結合免疫吸着検定法 ( E L I S A ) 、フローサイトメトリー、免疫沈降、免疫組織化学、バイオフィルム試験、アフィニティリング試験、抗体アレイ光学濃度試験、及び化学発光からなる群から選択される技術によって検出される、実施形態 26 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0038 】

30

実施形態 30 . 一連の生体試料及び対象の生体試料が、それぞれ全血、血清、血漿、唾液、涙、尿、又は組織である、実施形態 1 ~ 29 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0039 】

実施形態 31 . 前記対象、B P H を有する前記対象集団、及び C a P を有する前記対象集団がヒトである、実施態様 1 ~ 30 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0040 】

実施形態 32 . 一連の生体試料及び / 又は対象の生体試料中の少なくとも 2 つの検体を検出することが、直接検体を検出することを含む、実施態様 1 ~ 31 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0041 】

40

実施形態 33 . 一連の生体試料及び / 又は対象の生体試料中の少なくとも 2 つの検体を検出することが、検体をコードする核酸を検出することを含む、実施態様 1 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0042 】

実施形態 34 . 対象からの生体試料中の少なくとも 2 つの検体を検出することが、生体内又は生体外で実施される、実施態様 1 ~ 33 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 発明を実施するための形態 】

【 0043 】

定義

本出願で使用する単数形「 1 つ ( a ) 」, 「 1 つ ( a n ) 」及び「その」は、文脈が明

50

確に指示しない限り、複数の言及を含む。例えば、語句「抗体」はまた、複数の抗体を含む。

【0044】

本明細書で使用する用語「含む (comprising)」は、「含む (including)」を意味する。「含む (comprise)」及び「含む (comprises)」などの単語「含む (comprising)」の変形は、対応して変化する意味を有する。したがって、例えば、検体 A 及び検体 B を含むバイオマーカーの組み合わせは、排他的に検体 A 及び検体 B からなり得るか、又は 1 以上の追加の構成要素 (例えば、検体 C) を含んでよい。

【0045】

本明細書で使用する用語「前立腺疾患」は、前立腺肥大症 (BPH)、前立腺上皮内腫瘍、前立腺炎、前立腺癌、前立腺腺癌、前立腺平滑筋肉腫及び前立腺横紋筋肉腫を含むが、これらに限定されない前立腺の疾患を指す。

【0046】

本明細書で使用する用語「生体試料」及び「試料」は、唾液試料、涙液試料、血液試料、血清試料、血漿試料、尿試料、又はそれらのサブフラクションを含むが、これらに限定されない、対象から採取された任意の体液又は組織を包含する。

【0047】

本明細書で使用する用語「診断すること」及び「診断」は、対象が所与の疾患又は状態に罹患しているか否かを当業者が推定し、さらには決定することができる方法を指す。例えば、そのレベルが病態の存在、重症度、又は非存在の指標である、本明細書に記載のバイオマーカー又はバイオマーカーの組み合わせの検出などの 1 以上の診断指標に基づいて診断を行うことができる。このように、用語「診断すること」及び「診断」は、したがって、前立腺癌の発症リスクを特定することも含む。

【0048】

本明細書で使用する用語「対象」及び「患者」には、特に断らない限り、互換的に使用され、ウシ、ウマ、ヒツジ、霊長類、鳥類及び齧歯類の種を含む経済的、社会的又は研究に重要な任意の動物が包含される。したがって、「対象」は、例えば、ヒトなどの哺乳類又は非ヒト哺乳類であり得る。生体分子 (例えば、抗体) への言及において、本明細書で使用する用語「単離された」は、それと共に天然に存在する構成要素の少なくとも一部を含まない生体分子である。

【0049】

本明細書で使用する用語「抗体」及び「複数の抗体」には、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む)、IgA (IgA1及びIgA2を含む)、IgD、IgE、IgM、及びIgY、単鎖の全抗体を含む全抗体、並びにその抗原結合断片が含まれる。抗原結合抗体断片には、Fv、Fab、Fab'及びF(ab')<sub>2</sub>、Fd、単鎖Fvs(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)及びVL又はVHドメインのいずれかを含む断片が含まれるが、これらに限定されない。該抗体は、任意の動物起源又は適切な生成宿主からのものであり得る。単鎖抗体を含む抗原結合抗体断片は、可変領域 (複数可) を単独で、又は以下のもの: ヒンジ領域、CH1、CH2、及びCH3ドメインの全体若しくは部分と組み合わせ含んでよい。可変領域 / (複数可) 及びヒンジ領域、CH1、CH2、及びCH3ドメインの任意の組み合わせも含まれる。抗体は、特異的に生体分子と結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体、又はヒトモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体であり得る。該抗体は、二重特異性抗体、アビボディ (avidin)、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体、VHHドメイン、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分的ヒト化抗体、アンチカリン、アドネクチン、又はアフィボディであり得る。

【0050】

抗体、抗体変異体、抗体誘導体、及び抗原結合断片などへの言及において、本明細書で

10

20

30

40

50

使用する用語「特異的に結合する (binding specifically)」並びに「特異的に結合する (specifically binding)」は、他の非標的分子よりも優先的に所与の標的分子に結合するその能力を指す。例えば、抗体、抗体変異体、抗体誘導体、又は抗原結合断片(「分子A」)が、所与の標的分子(「分子B」)に「特異的に結合する (binding specifically)」又は「特異的に結合 (specifically binding)」することができる場合、分子Aは、分子Bと任意の他の潜在的代替結合パートナーのメンバーを判別する能力を有する。したがって、潜在的結合パートナーとして異なるが、同等にアクセスできる複数の分子に暴露された場合に、分子Aは分子Bに選択的に結合し、他の潜在的代替結合パートナーは、分子Aに実質的に未結合のままである。一般に、分子Aは、他の潜在的結合パートナーよりも少なくとも10倍、好ましくは50倍、より好ましくは100倍、及び最も好ましくは100倍以上高頻度で、優先的に分子Bに結合する。分子Aは、弱い検出可能なレベルで、分子Bではない分子に結合することができる。これは、一般にバックグラウンド結合として知られており、例えば、適切な対照を使用することにより、分子B特異的結合から容易に判別可能である。

10

#### 【0051】

本明細書で使用する用語「キット」は、材料を送達するための任意の送達システムを指す。そのような送達システムは、反応試薬(例えば、適切な容器内の標識、参照試料、支持材料など)及び/又は支持材料(例えば、アッセイを行うための緩衝液、説明書)の貯蔵、ある場所から別の場所への輸送、又は送達を可能にするシステムを含む。例えば、キットは、関連する反応試薬及び/又は支持材料を含有する箱などの1以上の同封物を含んでよい。

20

#### 【0052】

数値の範囲を言及する場合、本明細書での用語「間」の使用は、範囲の各エンドポイントの数値を包含することを理解されたい。例えば、10残基長と20残基長の間のポリペプチドは、10残基長のポリペプチド及び20残基長のポリペプチドを含む。

#### 【0053】

本明細書の先行技術文献のすべての説明、又はそれらの文書に由来するか、若しくはそれらの文書に基づく本明細書の陳述は、文書又は誘導される陳述が、関連分野の共通の一般的知識の一部であることを認めるものではない。説明の目的のために、本明細書で言及される全ての文書は、特に断りのない限り、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0054】

##### 詳細な説明

特に初期の段階で、治療的介入が最高の成功の機会を有する場合、前立腺疾患の診断のための信頼性の高い、便利で正確な試験の開発は、依然として重要な目的である。しかしながら、DRE及びPSAアッセイなどの最初のスクリーニング手順は、不確かな/決定的でない診断結果となる場合が多く、癌性と非癌性の前立腺疾患を効果的に判別することができない。

#### 【0055】

本発明は、前立腺疾患を示すバイオマーカーの組み合わせを提供する。特に、バイオマーカーの組み合わせは、所与の対象において非癌性前立腺疾患(例えば、BPH)と前立腺癌を判別することが可能であり得る。対象は、1以上の診断試験(例えば、DRE、PSA試験)に基づいて、前立腺疾患の形態を有することが以前に決定されているか、又は前立腺疾患の形態を有することが疑われ得る。バイオマーカーの組み合わせは、対象における前立腺癌若しくはBPHの有無を診断するため、及び/又は前立腺癌患者とBPH患者を区別するための様々な方法及びアッセイフォーマットで使用され得る。

40

#### 【0056】

##### 前立腺疾患

本発明は、前立腺疾患の診断のための方法を提供する。本方法は、本明細書に記載の1

50

以上のバイオマーカーの組み合わせ（複数可）の検出を含む。

【 0 0 5 7 】

本方法に従って診断される前立腺疾患には、前立腺肥大症（BPH）、前立腺上皮内腫瘍、前立腺炎、前立腺癌、前立腺腺癌、前立腺平滑筋肉腫及び前立腺横紋筋肉腫が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 8 】

特定の実施形態において、本方法は、癌性前立腺疾患を全く又は顕著に有していない「正常」患者と前立腺癌を有する患者を区別するための能力を提供する。正常な患者は、例えば、BPH、前立腺上皮内腫瘍（PIN）、又は前立腺炎などの非癌性前立腺疾患を有している可能性がある。

10

【 0 0 5 9 】

当業者であれば、異なる前立腺疾患を分類するために使用される標準的な臨床試験及びパラメータをよく知っている（例えば、「前立腺疾患の2015年度年次報告書」、ハーバード健康出版（ハーバード大学医学部）、2015を参照されたく、この全内容は相互参照により本明細書に組み込まれる）。

【 0 0 6 0 】

本開示で企図される様々な前立腺疾患は、当技術分野で一般的に受け入れられているものと一致する特徴及び分類基準を有する。

【 0 0 6 1 】

例えば、本明細書で企図される前立腺肥大症（BPH）は、場合によって、残留尿量の増加を伴う頻尿、尿閉、及び刺激性又は閉塞した尿排尿パターンを含むが、これらに限定されない下部尿路症状に至る前立腺の臨床的拡大を指すと理解することができる。

20

【 0 0 6 2 】

前立腺炎は、慢性非細菌性前立腺炎及び急性又は慢性細菌性前立腺炎を含む前立腺の炎症に関連する障害を指すと理解することができ、これは一般的に尿意切迫及び／又は頻尿の症状と関連している。

【 0 0 6 3 】

前立腺上皮内腫瘍（PIN）は、高悪性度前立腺上皮内腫瘍及び低悪性度前立腺上皮内腫瘍を含むが、これらに限定されないPINの様々な形態及び／又は程度を包含すると理解することができる。PINは、一部の前立腺細胞が異常に見え始め、かつ／又は異常に振る舞い始める前癌状態とみなすことができる。異常細胞は、例えば、腺房及び管の内側を裏打ちする上皮細胞に位置することができるが、裏打ち自体は正常なままであり得る。

30

【 0 0 6 4 】

前立腺癌を有する対象において、前立腺の細胞は、無限に分裂し、異常増殖（例えば、腫瘍）を引き起こす。異常成長は、無痛及び無症候性であり得る。あるいは、異常増殖は、流体閉塞若しくは出血を含む物理的な不快感及び／又は他の局所的な症状を引き起こし得る。さらに又は代替的に、異常増殖は、正常な身体機能の不全から生じるものを含む全身症状に至る可能性がある。いくつかの実施形態において、前立腺癌の症状は、排便習慣又は膀胱機能の変化を含み得る。前立腺癌細胞は、良性又は転移性であり得る。

【 0 0 6 5 】

当業者に知られているように、前立腺癌は、疾患の進行に応じて段階的に分類することができる。非限定的な例として、前立腺癌の進行は、AJCC TNM分類システム、ホイットモア - ジュエット（Whitmore - Jewett）システム及び／又はD'Amicoリスクカテゴリーを使用して段階的に分類することができる。

40

【 0 0 6 6 】

当業者であれば、このような分類システム、その特性及びその使用に精通している。

【 0 0 6 7 】

前立腺癌の適切な分類システムはまた、「グリーソン分類（Gleason Grading System）」として当業者に知られている。このシステムは、前立腺癌を有する対象から得られた組織試料における癌の2大領域のそれぞれにグレードを割り当てる

50

。この分類は1～5の範囲であり、1は最も低い侵襲性形態であり、5は最も高い侵襲性形態である。転移は、グレード4又はグレード5が一般的であるが、例えば、グレード3の腫瘍では滅多に生じない。その後、2つのグレードは加算され、グリーソンスコアを生成する。2～4のスコアは低グレード；5～7は中間グレード；かつ8～10は高グレードと考えられている。グリーソンスコアが低い腫瘍は、典型的には、その一生の間に、患者に重大な脅威を与えないほど十分に遅い速度で成長し得る。

【0068】

当業者に知られているように、前立腺癌は異なるグレードの領域を有し得、その場合に、個々のグレードは、前立腺癌の大部分を構成する2つの領域に割り当てられ得る。これら2つのグレードは、グリーソンスコア/和を得るために加算され、一般的に、割り当てられる最初の数は、腫瘍の中で最も主なグレードである。例えば、グリーソンスコア/和が「3+4」として記述される場合は、7のグリーソンスコア/和について、腫瘍のほとんどがグレード3であり、残りはグレード4であることを意味する。

10

【0069】

非限定的な例として、3+4以上のグリーソンスコア/和は、本発明の方法に従って、前立腺癌の指標となり得る。

【0070】

前立腺疾患のバイオマーカー

本発明の方法に従って、前立腺疾患は、本明細書で特定された1以上のバイオマーカーを検出する方法によって診断することができる。

20

【0071】

本明細書で企図されるバイオマーカーは、検体であり得る。本明細書で企図される検体は、当業者にとってその通常の慣用的な意味を与えられるべきであり、限定されないが、検出及び定量化することができる生体試料（例えば、血液、脳脊髄液、尿、涙、リンパ液、唾液、間質液、汗など）中の物質又は化学成分を指す。非限定的な例として、サイトカイン及びケモカイン、並びに細胞表面受容体及びその可溶性形態が挙げられる。

【0072】

本発明に従って検出されるバイオマーカーの組み合わせは、2つ、3つ、4つ、5つ、又は5以上の個々のバイオマーカーを含むか、又はそれらからなり得る。したがって、本発明に係るバイオマーカーの組み合わせは、GPC-1と少なくとも1つの追加のバイオマーカー、GPC-1と少なくとも2つの追加のバイオマーカー、又はGPC-1と少なくとも3つの追加のバイオマーカーを含み得る。追加のバイオマーカーの1以上は、検体であり得る。

30

【0073】

いくつかの実施形態において、対象の生体試料中の少なくとも2つのバイオマーカーの組み合わせは、前立腺疾患の陽性又は陰性診断を行うための基礎として測定され、使用することができる。少なくとも2つのバイオマーカーの組み合わせは、GPC-1を含んでよい。前立腺疾患は、前立腺癌又はBPHであり得る。非限定的な例として、少なくとも2つのバイオマーカーの組み合わせは、以下の表1に記載のものから選択することができる。

40

【0074】

## 【表 1】

表 1 : 2 つのバイオマーカーの組み合わせ

バイオマーカー#1	バイオマーカー#2
GPC-1	HGF
GPC-1	EGF
GPC-1	PAI-1
GPC-1	G-CSF
GPC-1	HuIL-18
GPC-1	PDGFAB, BB
GPC-1	PDGFBB
GPC-1	sCD40L
GPC-1	HuGM-CSF
GPC-1	IFNg
GPC-1	フォリスタチン

10

## 【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態において、対象の生体試料中の少なくとも 3 つのバイオマーカーの組み合わせは、前立腺疾患の陽性又は陰性診断を行うための基礎として測定され、使用することができる。少なくとも 3 つのバイオマーカーの組み合わせは、GPC-1 を含んでよい。前立腺疾患は、前立腺癌又は BPH であり得る。非限定的な例として、少なくとも 3 つのバイオマーカーの組み合わせは、以下の表 2 に記載のものから選択することができる。

20

## 【 0 0 7 6 】

## 【表 2】

表 2 : 3 つのバイオマーカーの組み合わせ

バイオマーカー ー #1	バイオマーカー #2	バイオマーカー #3
GPC-1	HGF	PAI-1
GPC-1	HGF	HuFGFb
GPC-1	HGF	EGF
GPC-1	HGF	HuPDGFBB
GPC-1	HGF	フォリスタチン
GPC-1	HGF	G-CSF
GPC-1	HGF	sCD40L
GPC-1	HGF	HuIL-8
GPC-1	HGF	HuCTACK
GPC-1	HGF	PDGFAB, BB
GPC-1	HGF	IFNg
GPC-1	HGF	HuMCP1 MCAF
GPC-1	HGF	HuIL-18
GPC-1	HGF	HuGM-CSF
GPC-1	HGF	uPA
GPC-1	HGF	HuGROa
GPC-1	HGF	sVEGFR
GPC-1	EGF	フォリスタチン
GPC-1	EGF	TNFa
GPC-1	G-CSF	sTIE2

10

20

## 【 0 0 7 7 】

バイオマーカーの検出及び定量化

本発明に係るバイオマーカー又はバイオマーカーの組み合わせは、当業者に公知の任意の適切な方法を用いて、生体試料中で検出することができる。

30

## 【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態において、バイオマーカー又はバイオマーカーの組み合わせは、試料中のバイオマーカー又はバイオマーカーの組み合わせの特定のレベルを導出するために定量化される。バイオマーカー（複数可）のレベル（複数可）は、診断を提供するために、本明細書に提供する方法に従って分析することができる。

## 【 0 0 7 9 】

所与の生体試料中のバイオマーカー（複数可）の検出により、測定可能な出力が提供されるので、存在するバイオマーカー（複数可）のレベルを定量化する手段が提供され得る。出力シグナルの測定は、生体試料の体積当たりのバイオマーカーの正味の重量（例えば、 $\text{pg/mL}$  ;  $\mu\text{g/mL}$  ;  $\text{ng/mL}$  など）を示す図を作成するために使用され得る。

40

## 【 0 0 8 0 】

唯一の非限定的な例として、バイオマーカー（複数可）の検出は、試料中のバイオマーカー（複数可）のレベルを示す 1 以上の蛍光シグナルをもたらす得る。これらの蛍光シグナルは、本発明の方法に従って診断決定を行うために直接使用することができるか、あるいはその同じ目的のための異なる出力（例えば、すぐ上の段落に記載の体積当たりの重量）に変換することができる。

## 【 0 0 8 1 】

本発明に係るバイオマーカーは、例えば、プロテオミクス技術及びバイオマーカーをコードする核酸を利用する技術を含む、当技術分野で公知の適切な方法を用いて検出及び定

50

量化することができる。

【0082】

適切なプロテオミクス技術の非限定的な例としては、質量分析、タンパク質アレイ技術（例えば、タンパク質チップ）、ゲル電気泳動、及び免疫蛍光、放射性標識、免疫組織化学、免疫沈降、ウエスタンブロット分析、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、蛍光細胞選別（FACS）、免疫ブロット法、化学発光を含むバイオマーカー（複数可）に対する特異性を有する抗体による他の方法、並びに／又は抗体でタンパク質を検出するために使用される他の既知の技術が挙げられる。

【0083】

核酸検出による適切な技術の非限定的な例としては、PCRベースの技術（例えば、定量的リアルタイムPCR、SYBRグリーン色素染色）などのDNA、RNA（例えば、mRNA）、及びcDNAなどを検出する技術、UV分光法、ハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、スロットブロットハイブリダイゼーション）、並びにマイクロアレイが挙げられる。

【0084】

モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を含む本発明に係るバイオマーカーに対する結合特異性を有する抗体は、容易に入手可能であり、様々な商業的供給源（例えば、Sigma-Aldrich社、Santa Cruz Biotechnology、Abcam、Abnovaなど）から購入することができる。さらに又は代替的に、本発明に係るバイオマーカーに対する結合特異性を有する抗体は、当技術分野で標準的な方法を用いて生成することができる。モノクローナル抗体を生成することができるハイブリドーマ細胞の生成技術は、当技術分野でよく知られている。非限定的な例としては、ハイブリドーマ法（Kohler及びMilstein, (1975) Nature, 256: 495 - 497; Coliganら、分子生物学の方法の2.5.1 - 2.6.7節（section 2.5.1 - 2.6.7 in Methods In Molecular Biology (Humana Press 1992)）；並びにHarlow及びLane、抗体：実験室マニュアル（Laboratory Manual）、ページ726（Cold Spring Harbor Pub. 1988）を参照されたい）、ヒトモノクローナル抗体を生成するためのEBV - ハイブリドーマ法（Coleら、1985、モノクローナル抗体及び癌療法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy）, Alan R. Liss社、pp. 77 - 96を参照されたい）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら、1983, Immunology Today 4: 72を参照されたい）、並びにトリオーマ技術が挙げられる。

【0085】

いくつかの実施形態において、生体試料（例えば、体液又は組織試料）中のバイオマーカー（複数可）の検出／定量化は、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）を用いて達成される。ELISAは、例えば、比色、化学発光、及び／又は蛍光に基づくことができる。本発明の方法において使用するのに適するELISAは、抗体及びその誘導体、並びにタンパク質リガンドなどを含む、任意の適切な捕捉試薬及び検出試薬を使用することができる。

【0086】

非限定的な例として、ダイレクトELISAでは、目的のバイオマーカーは、アッセイプレート上への直接吸着又はプレートの表面に付着した捕捉抗体を用いて固定することができる。抗原の検出は、その後、酵素結合一次抗体（直接検出）又は非標識一次及び共役二次抗体（間接検出）の適合セットを使用して行うことができる。間接的な検出方法は、一次抗体に対する結合特異性を有する検出のために標識された二次抗体を利用することができる。捕捉抗体（使用する場合）及び／又は一次抗体は、異なる宿主種に由来し得る。

【0087】

いくつかの実施形態において、ELISAは、競合ELISA、サンドイッチELISA、細胞内ELISA、又はELISPOT（酵素結合免疫スポットアッセイ）である。

## 【0088】

調製し、ELISA法を実施するための方法は、当業者によく知られている。ELISAプレートの選択及びコーティング、適切な抗体又はプローブの使用、ブロッキングバッファー及び洗浄バッファーの使用、検出ステップの詳細（例えば、放射性又は蛍光タグ、及び酵素基質など）などの方法の考慮事項は、当技術分野で十分に確立されており、定められた通りである（例えば、「イムノアッセイハンドブック。リガンド結合、ELISA及び関連技術の理論と応用（The Immunoassay Handbook. Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques）」、Wild, D.（編）、第4版、2013年、Elsevierを参照されたい）。

10

## 【0089】

他の実施形態において、生体試料（例えば、体液又は組織試料）中のバイオマーカー（複数可）の検出／定量化は、ウェスタンブロッティングを使用して達成される。ウェスタンブロット法は、当業者によく知られている（例えば、Harlow及びLane、抗体の使用、実験室マニュアル（Using antibodies. A Laboratory Manual）、Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999; Bold及びMahoney, Analytical Biochemistry 257, 185-192, 1997を参照されたい）。簡単に説明すると、所与のバイオマーカーに対する結合親和性を有する抗体を用いて、ゲル電気泳動によってサイズに基づいて分離されたタンパク質の混合物中でバイオマーカーを定量化することができる。例えば、ニトロセルロース、又はポリフッ化ビニリデン（PVDF）から作られた膜は、生体試料からのタンパク質混合物を含むゲルの隣に配置することができ、ゲルから該膜へタンパク質を移行させるために電流が印加され得る。次いで、該膜を、目的のバイオマーカーに対して特異性を有する抗体と接触させ、二次抗体及び／又は検出試薬を用いて可視化することができる。

20

## 【0090】

他の実施形態において、生体試料（例えば、体液又は組織試料）中の複数のバイオマーカーの検出／定量化は、多重タンパク質アッセイ（例えば、平面アッセイ又はビーズベースのアッセイ）を用いて達成される。多数の多重タンパク質アッセイ形式が市販されており（例えば、Bio-Rad社、Luminex、EMD Millipore）、適切な多重タンパク質アッセイの非限定的な例としては、本明細書の実施例の節に記載されている。

30

## 【0091】

他の実施形態において、生体試料（例えば、体液又は組織試料）中のバイオマーカー（複数可）の検出／定量化は、流体の流れに懸濁した標的実体（例えば、細胞及びタンパク質）を計数、調査及び選別するための技術であるフローサイトメトリーにより達成される。これは、光学／電子検出装置を通して流れる実体の物理的及び／又は化学的特性の同時マルチパラメトリック分析（例えば、標的バイオマーカー（複数可）の定量化）を可能にする。

## 【0092】

40

他の実施形態において、生体試料（例えば、体液又は組織試料）中のバイオマーカー（複数可）の検出／定量化は、組織又は細胞内の抗原に対する結合特異性を有する抗体又はタンパク質結合剤を用いて、組織切片又は細胞にタンパク質を局在化するプロセスである免疫組織化学又は免疫細胞化学によって達成される。色（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ）又は蛍光（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）又はフィコエリトリン（PE））を生成する標識で、抗体／薬剤をタグ付けすることによって視覚化することができる。

## 【0093】

当業者は、本発明に係るバイオマーカー（複数可）又はそれらをコードする核酸を検出するために使用される特定の方法が、本発明の介入を必要としないルーチンの選択事項で

50

あることを認識するであろう。

【0094】

バイオマーカーの分析及び診断

本発明の方法によれば、所与のバイオマーカー又は所与のバイオマーカーの組み合わせの検出及び定量化を用いて、前立腺疾患を診断することができる。

【0095】

一般的に、本方法は、試料中のバイオマーカー（複数可）の定量的測定を行うために、所与の生体試料又は一連の生体試料中の標的バイオマーカー（複数可）を分析することを含む。適切なバイオマーカー（複数可）には、表1及び表2で言及されるそれらのバイオマーカー及びバイオマーカーの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。唯一の非限定的な例として、定量的測定は、バイオマーカー（複数可）を検出及び定量化するために設計されたアッセイによって生成される蛍光シグナル又は吸光度シグナルの形態であり得る。さらに又は代替的に、定量的測定は、試料（複数可）中のバイオマーカー（複数可）の重量/体積測定の状態を提供され得る。

【0096】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、本明細書に記載の前立腺疾患に罹患していることが知られている患者集団におけるバイオマーカー（複数可）のレベルの比較を含み得る。例えば、バイオマーカー（複数可）のレベルは、第1の前立腺疾患を有する患者から得られた一連の生体試料及び第2の前立腺疾患を有する患者から得られた一連の生体試料から確認することができる。第1の前立腺疾患は、例えば、BPH、PIN又は前立腺炎などの非癌性の前立腺疾患であり得る。第2の前立腺疾患は、前立腺腺癌、前立腺平滑筋肉腫及び前立腺横紋筋肉腫の任意の1以上などのその形態を含む前立腺癌であり得る。前立腺癌は、最小のグリーソン分類又はスコア/和（例えば、少なくとも6（例えば、3+3、4+2又は2+4）、少なくとも7（例えば、3+4又は4+3、5+2）、又は少なくとも8（例えば、4+4、5+3、又は3+5）によって特徴付けることができる。

【0097】

各個体集団からの試料において観察されるバイオマーカー（複数可）のレベルは、癌性又は非癌性前立腺疾患の診断を提供するための基礎として使用することができる閾値を決定するために集散的に分析され得る。例えば、前立腺疾患に罹患していることが確認された又は疑われる患者からの生体試料を分析し、本発明に係る標的バイオマーカー（複数可）のレベルを決定することができる。患者の試料中のバイオマーカー（複数可）のレベルと患者集団からもたらされた閾値（複数可）の比較は、癌性又は非癌性の前立腺疾患を診断するための基礎として役立つことができる。

【0098】

したがって、いくつかの実施形態において、本発明の方法は、所与の患者が、非癌性前立腺疾患又は癌性の前立腺疾患に罹患しているかどうかを診断することを含む。該患者は、例えば、DRE及び/又はPSA試験の結果として、前立腺疾患を有することが以前に確認されたか、又は有していることが疑われ得る。そのような状況では、本明細書に記載の方法による非癌性の前立腺疾患の診断では、前立腺生検の必要性が回避されるので、前立腺疾患が癌であるか否かを決定することは患者にとって都合がよい。

【0099】

特に制限なく、本発明による診断方法は、対象が前立腺疾患の特定の形態を有するかどうかを判別することを含み得る。本方法は、前立腺疾患Aを患っていると予め判定された第1の患者群からの第1の一連の生体試料、及び前立腺疾患Aを患っていないと予め判定された第2の患者群からの第2の一連の生体試料を得ることを含み得る。第2の患者群は、異なる前立腺疾患（例えば、前立腺疾患B）を患っていてもよく、あるいは、いずれの前立腺疾患（前立腺疾患-）も患っていないくてもよい。第1と第2の患者群間の判別のための閾値は、第1及び第2の一連の生体試料中の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は5以上のバイオマーカーを検出することによって生成され、それによって、各一連の各生体試

料中の各バイオマーカーについてバイオマーカーのレベルを取得することができる。検体レベルは、第1の患者群と第2の患者群の試料間の判別を可能にするように組み合わせることができる。閾値は、第1の患者群と第2の患者群間の誤分類率を低下させ、かつ/又は第1の患者群と第2の患者群間の判別における感度を増大若しくは最大化させ、かつ/又は第1の患者群と第2の患者群間の判別における特異性を増大若しくは最大化させる方法のうちの任意の1以上などの適切な方法で組み合わせ検体レベルから選択することができる。該閾値は、所与の候補試料中の前立腺疾患Aの有無を判別するための基礎として使用することができる。したがって、前立腺疾患Aに関連する状態が未確定である対象の生体試料を取得してもよく、該バイオマーカー（複数可）は、患者のバイオマーカー値を取得するために、第1及び第2の患者群と同じ方法で測定される閾値を生成するための基礎として役立ち得る。定量化されたバイオマーカーレベル（複数可）に由来する患者のバイオマーカー値を、その後、前立腺疾患Aを決定するための閾値と比較することができる。対象の生体試料から得られた個々の若しくは組み合わせたバイオマーカーレベルの適切なアルゴリズム及び/又は変換を用いて、閾値との比較のための患者のバイオマーカー値を作成することができる。いくつかの実施形態において、閾値及び/又は患者のバイオマーカー値を導出する際に使用される1以上のパラメータが加重される。

10

#### 【0100】

いくつかの実施形態において、患者のバイオマーカー値が閾値未満である場合は、該患者は前立腺疾患Aについて陰性であると診断される。いくつかの実施形態において、該患者のバイオマーカー値が閾値を超える場合は、該患者は、前立腺疾患Aについて陰性であると診断される。いくつかの実施形態において、患者のバイオマーカー値が閾値未満である場合は、該患者は前立腺疾患Aについて陽性であると診断される。いくつかの実施形態において、患者のバイオマーカー値が閾値を超える場合は、該患者は前立腺疾患Aについて陽性であると診断される。いくつかの実施形態において、前立腺疾患Aは、非癌性前立腺疾患（例えば、BPH、PIN、又は前立腺炎）である。いくつかの実施形態において、前立腺疾患Aは、前立腺癌、前立腺腺癌、前立腺平滑筋肉腫及び/又は前立腺横紋筋肉腫である。

20

#### 【0101】

これらの分析を実施するのに適する非限定的な方法は、本出願の実施例に記載されている。

30

#### 【0102】

そのような方法の非限定的な一例は、受信者操作特性（ROC）曲線分析である。一般的に、ROC解析は、適切な参照物質の基準に基づく「真」の分類と各試験患者の分類とを比較することを含み得る。このような方法での複数の患者の分類は、感度及び特異性の測定の導出を可能にし得る。感度は、一般的に、真に陽性であるものの全ての中での正確に分類された患者の割合であり、特異性は、真に陰性であるものの全ての中での正確に分類された症例の割合である。一般的に、トレードオフは、陽性分類を決定するために選択された閾値に応じて、感度と特異性の間に存在し得る。低い閾値は、一般的に、高感度だが、比較的低い特異性を有し得る。対照的に、高い閾値は、一般的に、低感度だが、比較的高い特異性を有し得る。ROC曲線は、感度対特異性のプロットを水平に反転することによって作成することができる。得られた反転横軸は、偽陽性画分であり、1から差し引いた特異性に等しい。ROC曲線下面積（AUC）は、可能性のある特異性の全範囲にわたる平均感度、又は可能性のある感度の全範囲にわたる平均特異性として解釈することができる。AUCは、全体の精度の尺度を表し、全ての可能な解釈の閾値を網羅する精度の尺度も表す。

40

#### 【0103】

ROC曲線全体の分析を用いる方法が包含されるが、該方法は、部分領域の統計分析（部分的AUC分析）に拡張することができることも意図される。部分的AUC分析における水平軸又は垂直軸に沿った適切な範囲の選択は、臨床目的に少なくとも部分的に依存し得る。高精度で所与の前立腺疾患の存在を検出することが重要である臨床設定では、高感

50

度に対応する比較的高い偽陽性画分の範囲を用いることができる。あるいは、所与の前立腺疾患を除外することが重要である臨床設定では、高い特異性と同等の比較的低い偽陽性画分の範囲を用いることができる。

#### 【0104】

##### 対象、試料及び対照

本発明の方法に従って分析される試料は、一人又は一連の対象に由来する。本明細書で言及する対象又は患者には、ウシ、ウマ、ヒツジ、霊長類、鳥類及び齧歯類の種を含む、経済的、社会的又は研究に重要な任意の動物が包含される。対象又は患者は、例えば、ヒトなどの哺乳類又は非ヒト哺乳類であり得る。本明細書に記載の対象及び患者は、前立腺疾患に罹患していても又はしていなくてもよく、癌性前立腺疾患に罹患していても又はしていなくてもよく、あるいは非癌性前立腺疾患に罹患していても又はしていなくてもよい。

10

#### 【0105】

本発明の方法に従って使用される試料は、当業者による分析を可能にするのに適する形態であり得る。適切な試料には、血液、血漿、血清、精液、尿、涙、脳脊髄液、リンパ液、唾液、間質液、汗などの様々な体液が含まれる。尿は、前立腺のマッサージ後に取得され得る。

#### 【0106】

試料は、組織生検などの組織試料、又は組織から掻き取られた表面試料であり得る。組織は、前立腺由来のものであり得る。別の実施形態において、試料は、組織から作製された細胞の懸濁液を形成することによって調製することができる。

20

#### 【0107】

本発明の方法は、いくつかの実施形態において、対照試料の使用を含むことができる。

#### 【0108】

対照試料は、前立腺疾患のない個体から採取される任意の対応する試料（組織試料、血液、血漿、血清、精液、涙、又は尿）である。特定の実施形態において、対照試料は、本発明に係るバイオマーカーをコードする核酸材料を含むか、又はそれからなり得る。

#### 【0109】

いくつかの実施形態において、対照試料は、標準試料を含むことができる。標準試料は、対照レベルと見なされるレベルでバイオマーカーの参照量を提供することができる。例えば、標準試料は、前立腺疾患を有し得る、又は有していない1人以上の対象からの1以上の試料中の、本明細書に記載のバイオマーカーの量又はレベル（例えば、複数の試料からの量又はレベルの平均）を模倣するように調製することができる。

30

#### 【0110】

いくつかの実施形態において、対照データを利用することができる。対照データは、参考として使用される場合、データのコンパイルを含むことができ、対照レベルと見なされるバイオマーカーの量又はレベルを提供する表、チャート、グラフ（例えば、データベース又は標準曲線）に含まれ得る。そのようなデータは、例えば、前立腺疾患を有し得るか、又は有していない1人以上の対象からの1以上の試料中のバイオマーカーの量又はレベル（例えば、複数の試料からの量又はレベルの平均）を取得することによってコンパイルすることができる。

40

#### 【0111】

##### キット

本発明の方法を実施するためのキットも、本明細書において企図される。

#### 【0112】

該キットは、表1及び表2で言及されるそれらのバイオマーカー及びバイオマーカーの組み合わせを含むが、これらに限定されない、本明細書に記載の1以上のバイオマーカー（複数可）を検出するのに適する試薬を含むことができる。

#### 【0113】

非限定的な例として、該キットは、本明細書に記載の1種又は一連のバイオマーカーに

50

特異的に結合することができる１種又は一連の抗体を含み得る。

【０１１４】

さらに又は代替的に、該キットは、本明細書に記載の１以上のバイオマーカー（複数可）を定量化することができるアッセイを調製及び／若しくは実施するための試薬並びに／又は成分（例えば、ＥＬＩＳＡ、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、免疫組織化学、ゲル電気泳動（タンパク質及び／若しくは核酸分離に適するような）並びに／又は定量的ＰＣＲを行うための試薬）を含むことができる。

【０１１５】

さらに又は代替的に、該キットは、患者から、本明細書に記載の生体試料を取得及び／又は処理するための装置を含むことができる。

10

【０１１６】

広く記載されているように、本発明の趣旨又は範囲から逸脱することなく、特定の実施形態に開示されているように、多くの変形及び／又は変更が本発明に対してなされ得ることは、当業者なら理解するであろう。したがって、本実施形態は、あらゆる点で例示的であり、制限的なものではないと考慮されるべきである。

【実施例】

【０１１７】

本発明は、これから、特定の実施例を参照して記載されるが、限定するものとして解釈されるべきではない。

【０１１８】

20

実施例１：前立腺肥大症[ＢＰＨ]及び前立腺癌[ＣａＰ]患者における検体発現

正常な患者（アーム１）、前立腺肥大症（ＢＰＨ、ＡＲＭ２）患者及び前立腺癌患者（ＣａＰ、アーム３）からの血漿試料において、バイオラッドＢｉoplex多検体アレイシステムを使用して８２検体の発現を調べた。可溶性ＧＰＣ－１のレベルを、ヤギポリクローナル抗ＧＰＣ－１捕捉抗体及びＭＩＬ－３８抗ＧＰＣ－１モノクローナル検出抗体からなるサンドイッチＥＬＩＳＡを用いて決定した。

【０１１９】

１．材料及び方法

１．１患者

２９８人の患者からの血漿試料を、多検体の分析のために収集した。３つのグループ：正常（９８人の患者）、前立腺肥大症[ＢＰＨ、１００人の患者]及び前立腺癌[ＣａＰ、１００人の患者]の各々からの試料を分析した。

30

【０１２０】

患者のカテゴリを以下のように定義した：

アーム１－正常

包含

少なくとも１週間で、かつ最長で１年の時点で診断した正常ＤＲＥ及び正常ＰＳＡを有し、遮断薬を服用している人を含む５０歳以上の男性であって、その前の３ヶ月間のＤＲＥを除いて下部尿路のいかなる操作（例えば、内視鏡検査など）もせず、

５０～６０歳ではＰＳＡ＜２ｎｇ／ｍＬ

40

６０歳超ではＰＳＡ＜３ｎｇ／ｍＬ

として定義されるＰＳＡを有する男性。

【０１２１】

典型的には、このような患者は、精管切除、ステント若しくは石の処置又は勃起不全について相談する。

【０１２２】

除外

その前の３ヶ月間のＤＲＥ以外下部尿路操作を受けた全てのアーム１患者を除外した。ＤＲＥ結果がないか、又は承認された期間以外にＤＲＥを受けた全てのアーム１患者を除外した。

50

## 【 0 1 2 3 】

P S A 結果がないか、又は承認された期間以外の P S A があるアーム 1 患者を除外した。

## 【 0 1 2 4 】

無症候性 B P H を有する任意のアーム 1 患者は、アーム 1 から除外されたが、アーム 2 ( B P H ) に含まれると考えられ得る。

## 【 0 1 2 5 】

アーム 2 - 前立腺肥大症 ( B P H )

## 包含

少なくとも 4 週間以内で、かつ最長で 1 年の時点で病理学的に確認された前立腺肥大症を有し、遮断薬を服用している人を含む 5 0 歳以上の男性。加えて、P S A が年齢調整された正常範囲内である場合、下部尿路症状 ( L U T S ) を含む臨床 B P H を有する 5 0 歳以上の男性を包含し、少なくとも 1 週間以内で、かつ最長で 1 2 ヶ月の時点で P S A 検査を行った。正常 P S A を、5 0 ~ 6 0 歳では P S A < 2 n g / m L 及び 6 0 歳超では P S A < 3 n g / m L として定義した。

10

## 【 0 1 2 6 】

## 除外

P I N 又は異型性を有するアーム 2 の全ての患者を除外した。

## 【 0 1 2 7 】

アーム 3 - 前立腺癌 ( C a P )

## 包含

遮断薬を服用している人を含め、生検後少なくとも 1 週間の時点で確認された前立腺癌患者であり、グリーンソン 3 + 4 又はグリーンソン 4 + 3 として少なくとも 7 のグリーンソンスコアを有する 5 0 歳以上の男性。

20

## 【 0 1 2 8 】

## 除外

部分的若しくは根治的前立腺切除術又は H I F U 若しくは近接照射療法などの他の治療処置を受けたアーム 3 の全患者 ( 前立腺癌又は C a P ) を除外した。

## 【 0 1 2 9 】

フィナステリドの最終投与から最低 2 日の投与中止及びデュラステリド ( d u r a s t e r i d e ) の最終投与から最低 3 0 週の投与中止がない限り、5 種類のアルファレダクターゼ阻害剤 ( 5 A R I ) を服用しているアーム 3 の全患者を除外した。

30

## 【 0 1 3 0 】

最終投与から最低 1 ヶ月の投与中止がない限り、ノコギリヤシを服用しているアーム 3 の全患者を除外した。

## 【 0 1 3 1 】

アンドロゲン除去療法 ( A D T ) を行っているか、又は任意の実験的薬剤を服用しているアーム 3 の全患者を除外した。

## 【 0 1 3 2 】

全てのアームの除外基準は以下の通りであった：

40

- ・選択基準を満たしていない全ての患者を除外した。
- ・基底皮膚癌又は扁平上皮皮膚癌を除く前立腺癌以外の癌の病歴を有する任意の患者を除外した。

## 【 0 1 3 3 】

## 1 . 2 試料収集

患者から採取した全血試料を、血漿成分を分離するために遠心分離にかけ、- 2 0 で保存した。試料を収集場所から出荷し、その後、融解し、等分し、- 8 0 で保存した。

## 【 0 1 3 4 】

## 1 . 3 多検体アレイ

患者の血漿試料を、氷上で解凍し、その後、1 . 5 m L の遠心管に移した。この試料を

50

、4 で10分間、20,000gで遠心分離した。ペレット又は脂質層を除去するために、中間画分を0.22µmの遠心濾過装置に移し、完了するまで4 で、11,000gで遠心した。次いで、バイオプレックス読み取りのために処理することができるように、試料をマイクロタイタープレートに分注した。バイオプレックスキットの指示に従って、処理して、オーストラリアのプロテオーム解析施設で実行することができるまで、プレートを-80 で保存した。製造業者の説明書に従って、かつBreenら(Breenら, 2015, Cytokine 71, 188-198を参照されたい)に記載の通りに、この試料を、Bio Plex-200アナライザーを用いて分析した。Bio-plex 200システム(Bio-Rad社)は、フローサイトメトリーの原理に基づくフレキシブル分析器である。このシステムは、少量の試料を用いて、単一のマイクロプレートウェル中で100検体まで多重化(同時に測定)することができる。Bio-plexアッセイは、個々のアッセイの判別を可能にするために、それぞれ異なるカラーコード(スペクトルアドレス)を有する微小ビーズを用いて設計されている。ビーズは、異なる比率の2つのフルオロフォアで染色されるので、100個の特有のビード領域に分類される(xMAP技術)。

#### 【0135】

四つのキットを、この分析のためにBiorad社から入手した：

Bio Plex Pro (商標) ヒトサイトカイン21-プレックスアッセイ、カタログ番号MF0-005KMII

Bio Plex Pro (商標) ヒトサイトカイン27-プレックスアッセイ、カタログ番号M50-0KCAF0Y

Bio Plex Pro (商標) ヒト癌バイオマーカーパネル1、16-プレックス、カタログ#171-AC500M

Bio Plex Pro (商標) ヒト癌バイオマーカーパネル2、18-プレックス、カタログ#171-AC600M

#### 【0136】

各キットに含まれるサイトカイン及び成長因子は以下の通りであった：

27-プレックス：IL-1ベータ、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN-ガンマ、IP-10、MCP-1(MCAF)、MIP-1、MIP-1ベータ、PDGF-BB、RANTES、TNF- 及びVEGF；

21-プレックス：IL-1アルファ、IL-2Rアルファ、IL-3、IL-12(p70)、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- 、HGF、IFN-アルファ2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、ベータ-NGF、SCF、SCGF-ベータ、SDF-1アルファ、TNF-ベータ及びTRAIL；

16-プレックス(癌パネル1)：sEGFR、FGF塩基性、フォリスタチン、G-CSF、HGF、sHER-2/neu、IL-6R、レプチン、オステオポンチン、PECAM-1、PDGF-AB/BB、プロラクチン、SCF、sTIE-2、sVEGFR-1、sVEGFR-2；

18-プレックス(癌パネル2)：アンジオポエチン-2、sCD40L、EGF、エンドグリン、sFASL、HB-EGF、IGFBP-1、L-6、IL-8、IL-18、PAI-1、PLGF、TGF-、TNF-、uPA、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D。

#### 【0137】

1.4 MiCheck (商標) GPC-1 ELISA

MiCheck (商標) ELISAは、96ウェルプレートにおける標準的なサンドイッチELISA形式である。これは、検出のためにポリクローナル抗GPC-1捕捉抗体(LS Bio、カタログ番号LS-C313545)及びMIL-38モノクローナル抗体を使用する。アッセイは、2時間で実行され、全ての一般的な自動化されたELISA

10

20

30

40

50

システムと互換性がある。

#### 【 0 1 3 8 】

血清及び血漿を使用して、プロトタイプ M i C h e c k ( 商 標 ) アッセイの内部検証が成功して完了した。結果は以下の通りであった：

- ・直線性：10 pg / mL ~ 1.5 ng / mL の作業濃度範囲にわたって、アッセイの直線性が実証された
- ・感度：組換え G P C - 1 の計算された検出限界 ( L O D ) 及び定量限界 ( L O Q ) は、それぞれ、およそ 3.4 pg / mL 及び 7.2 pg / mL であった。
- ・ヒト血清及び血漿試料の検出：2 ~ 128 倍の希釈範囲にわたって評価した。4 倍 ~ 128 倍に希釈した血清 / 血漿 - 10 ~ 20 倍の平均希釈で、良好な検出の直線性が観察された。G P C - 1 の補間値の平均は 5.4 ng / mL であり、様々な希釈にわたり C V は 3.8 % であった。

精度：平均 C V を、アッセイの作業範囲内で分析した G P C - 1 の 3 つの濃度 ( 1.0 / 0.5 / 0.25 / ng / mL ) から計算した。

#### 【 0 1 3 9 】

##### 【表 3】

表 3：血清及び血漿についての M i C h e c k ( 商 標 ) E L I S A のアッセイ内及びアッセイ間の性能

	アッセイ内	アッセイ間
n =	3	3
CV (%)	4.3	2.3

#### 【 0 1 4 0 】

##### 1.5 データ分析

B i o p l e x 分析のために、試料を 96 ウェルマイクロタイタープレートの各列の下方向に順次内部ナンバリングシステムに従って等分した。蛍光値を測定し、分析のために使用した。

#### 【 0 1 4 1 】

##### R O C 解析 ( A U C )

R O C 解析を、R 統計パッケージを用いて決定した ( R o b i n ら、2011, B M C B i o i n f o r m a t i c s , 12 , p 77 ) 。

#### 【 0 1 4 2 】

##### 加重モデル

良性と前立腺癌の検体を区別する検体発現の最適な組み合わせを見つけるためのアルゴリズムを開発した。このモデルは、以下のように n 個の異なる検体 ( A ) からの発現の加重和 ( S ) を使用する：

$$S = w_1 A_1 + w_2 A_2 \dots w_n A_n$$

#### 【 0 1 4 3 】

加重  $w_1 \sim w_n$  を汎用最適化手順である、R 解析プログラムのネルダ - ミードアルゴリズムを用いて決定した。

#### 【 0 1 4 4 】

この手順は、良性又は P C の状態のいずれかを割り当てるために、S の値における R O C 解析の最大 A U C のために最適化した。

#### 【 0 1 4 5 】

各加重の初期値を、これらの検体からの最大の中央値に対する各検体発現値の中央値間の比を取ることによって決定した：

$$W = \max(M) / M$$

$W = \{w_1, \dots, w_n\}$  及び  $M = \{\text{中央値}(A_1), \dots, \text{中央値}(A_n)\}$ 。

【0146】

このモデルを利用して、2検体と3検体の組み合わせの両方についてSを最適化した（Pepeら、2003, Biometrics, 59:133を参照されたい）。

【0147】

#### 部分的AUCの最適化

別のアプローチを利用し、それによって、加重和ネルダ - ミード最適化手順を、部分的AUCの最適化に適用した。pAUCは、制限（1 - 特異性）範囲内のROC下面積を表し、一般的に、この範囲は値0 ~ eの間に存在し、eは指定されなければならない。本明細書では、eを0.5に設定した。両方のAUCが等しいとき、後から上昇する別のROCよりも早く上昇するROCは、より高い特異性を有する。完全なAUCよりむしろpAUCの最適化は、より高い特異性を有する検査のための最適化である。

【0148】

このアプローチを使用して、ROC AUC分析について記載されるように、R解析プログラムを用いてN検体の加重和を生成した。

【0149】

#### 2. 結果

##### 2.1 分析

##### GPC - 1 分析

可溶性GPC - 1レベルを、MiCheck（商標）ELISAアッセイを用いて、健康者、BPH及びCaP患者において決定した（表4）。GPC - 1レベルは、正常試料又はBPH試料のいずれかよりも、CaP患者試料においてより低かった。

【0150】

【表4】

表4：（アーム1通常）、アーム2（BPH）及びアーム3（CaP）についてのGPC - 1 ELISAの結果

測定	研究アーム	N =	平均 (ng/ml)	標準偏差	範囲
血漿	1	98	8.0	2.0	4.3-15.8
	2	100	8.2	2.4	3.5-17.1
	3	100	7.4	1.9	4.2-14.6
血清	1	99	8.4	2.0	3.7-17.3
	2	100	8.7	2.7	4.9-17.6
	3	99	7.8	2.1	4.4-17.0

【0151】

GPC - 1レベルを対数変換し、通常の変換データ分布を得た。BPH群とCaP群を判別するMiCheck（商標）ELISAの感度及び特異性を、異なるカットポイントで決定した（表5）。

【0152】

対数GPC - 1レベルは、1.95のカットポイントで最大AUCが0.585であり、感度及び特異性は、それぞれ0.51（51％）及び0.66（61％）になった。

【0153】

データの第2の独立した分析では、AUCが0.61、感度／特異性が0.57／0.57であった。異なる固定した特異性における感度は、90％の特異性で20％、85％の特異性で29％、80％の特異性で33％及び75％の特異性で35％であった。

【0154】

## 【表 5】

表 5：異なるカットポイントで B P H 試料と C a P 試料を区別するための対数変換した G P C - 1 値の感度及び特異性

	カットポイント			
	1.85	1.90	1.95	2.00
感度	0.300 (0.212-0.400)	0.390 (0.294-0.493)	0.510 (0.408-0.611)	0.590 (0.487-0.687)
特異性	0.810 (0.719-0.882)	0.700 (0.600-0.788)	0.660 (0.558-0.752)	0.570 (0.467-0.669)
PPV	0.612 (0.462-0.748)	0.565 (0.440-0.684)	0.600 (0.488-0.705)	0.578 (0.477-0.676)
NPV	0.536 (0.454-0.618)	0.534 (0.445-0.622)	0.574 (0.478-0.666)	0.582 (0.478-0.681)
LR+	1.58 (0.78-2.38)	1.30 (0.79-1.81)	1.50 (1.00-2.01)	1.37 (0.99-1.76)
LR-	0.86 (0.73-1.00)	0.87 (0.69-1.05)	0.74 (0.56-0.93)	0.72 (0.51-0.93)
AUC	0.555	0.545	0.585	0.580
p 値 *	0.070	0.181	0.014	0.023

10

	カットポイント			
	2.05	2.10	2.15	2.20
感度	0.670 (0.569-0.761)	0.750 (0.653-0.831)	0.820 (0.731-0.890)	0.840 (0.753-0.906)
特異性	0.450 (0.350-0.553)	0.390 (0.294-0.493)	0.330 (0.239-0.431)	0.270 (0.186-0.368)
PPV	0.549 (0.457-0.639)	0.551 (0.464-0.637)	0.550 (0.467-0.632)	0.535 (0.454-0.615)
NPV	0.577 (0.460-0.688)	0.609 (0.479-0.729)	0.647 (0.501-0.776)	0.628 (0.467-0.770)
LR+	1.22 (0.94-1.49)	1.23 (0.99-1.47)	1.22 (1.02-1.43)	1.15 (0.98-1.32)
LR-	0.73 (0.47-1.00)	0.64 (0.37-0.91)	0.55 (0.27-0.82)	0.59 (0.26-0.92)
AUC	0.560	0.570	0.575	0.550
p 値 *	0.081	0.033	0.014	0.057

\* 偶然との比較

20

「0.30」と表される感度又は特異性の値は、30%に相当することに留意されたい。

## 【0155】

## 複数の検体分析

P S A 検査の高感度（約80%）を補完するために、高い特異性を有する前立腺癌検査が必要とされている。したがって、特異性を最大にするカットポイントを決定した。高い特異性のための最適なカットポイントは1.85と決定され、0.3の感度（30%）及び0.81（81%）の特異性が得られた。

30

## 【0156】

診断検査の特異性及び感度は、単一検体ではなく複数の検体を測定することによって増加させることができる。したがって、B P H 及び C a P 患者の判別における、G P C - 1 レベルを有する追加検体を含めることによる効果を決定した。

## 【0157】

B P H と C a P 患者の区別を最大限にするために、異なる加重を有する検体の組み合わせを使用する加重和最適化手順を評価した。合計82の異なる検体を、組み合わせの性能を最適化するために G P C - 1 と組み合わせで検査した。最適化された加重和の決定を行った。加重和を用いて、カットオフ閾値を確立し、それによって、受信者操作曲線（R O C）の曲線下面積（A U C）を最大にし、誤分類率を最小化した。感度及び特異性を、この最大 A U C 値で決定した。この分析を独立して3回行った。

40

## 【0158】

## G P C - 1 及び1つの他の検体

G P C - 1 及び1つの他の検体に対する A U C 最適化分析の結果を、以下の表6にまとめる。3回の分析の特定の組み合わせの出現頻度を示す。以下の検体の組み合わせを特定した。

## 【0159】

## 【表 6】

表 6 : G P C - 1 と 1 つの他の検体のための A U C 最適化分析

統一検体	追加の検体	頻度(3回中)
GPC-1	HGF	3
	EGF	3
	PAI-1	3
	G-CSF	3
	PDGFAB. BB	3
	PDGFBB	2
	HuIL-18	1
	sCD40L	1
	HuGM-CSF	1
	HuIFNg	1
	フォリスタチン	1

10

## 【 0 1 6 0 】

結果は、適切な加重と検体の組み合わせにより改善された A U C、感度及び特異性の結果が得られたことを示す。上位 11 の組み合わせに対する A U C 値は全て、G P C - 1 単独で 0.585 の A U C から改善した。組み合わせの A U C は、0.629 ( G P C - 1 / H u G M - C S F、分析 2 ) ~ 最大 0.71 ( G P C - 1 / H G F、分析 3 ) の範囲で改善した。感度及び / 又は特異性はまた、G P C - 1 単独を上回る改善を示した。例えば、G P C - 1 / H G F の組み合わせは、G P C - 1 単独の 0.51 及び 0.66 と比較して、0.64 と 0.72 の感度及び特異性を示した ( 分析 2、表 7 )。

20

## 【 0 1 6 1 】

G P C - 1 及び 2 つの検体分析

G P C - 1 及び 2 つの追加の検体を用いて、最適化分析を繰り返した。最適化分析の結果を表 7 に示す。

## 【 0 1 6 2 】

30

【表 7】

表7: 1つ又は2つの検体の追加によるGPC-1の感度及び特性の結果のまとめ

GPC-1 検体の組み合わせ	分析 1				分析 2				分析 3								分析 4			
	AUC	感度	特異性	AUC	感度	特異性	AUC	感度	特異性	所与の特異性における感度				AUC	90%	85%	80%	75%		
										90%	85%	80%	75%							
GPC-1	0.7	0.65	0.65	0.585	0.51	0.66	0.61	0.57	0.64	0.37	0.45	0.51	0.54	0.39	0.41	0.52	0.56			
GPC-1/HGF	0.73	0.67	0.67	0.703	0.64	0.72	0.71	0.64	0.64	0.37	0.45	0.51	0.54	0.43	0.49	0.55	0.59			
GPC-1/HGF/HuGFβ	0.74	0.69	0.7	0.735	0.58	0.8	0.73	0.69	0.69	0.44	0.45	0.54	0.61	0.45	0.58	0.62	0.68			
GPC-1/HGF/EGF	0.72	0.67	0.67	0.731	0.596	0.81	0.73	0.69	0.69	0.44	0.45	0.54	0.61	0.45	0.58	0.62	0.68			
GPC-1/HGF/HuDPFGB8	0.72	0.67	0.67	0.727	0.636	0.75	0.72	0.69	0.69	0.35	0.47	0.49	0.51	0.32	0.36	0.52	0.61			
GPC-1/HGF/7 + リスタチン	0.72	0.66	0.66	0.724	0.626	0.73	0.72	0.65	0.65	0.38	0.45	0.54	0.57							
GPC-1/HGF/G-CSF	0.72	0.65	0.65	0.722	0.515	0.84	0.72	0.65	0.65	0.38	0.45	0.54	0.57							
GPC-1/HGF/SCD-40L				0.721	0.515	0.84														
GPC-1/HGF/HuIL-8				0.721	0.545	0.85														
GPC-1/HGF/HuTACK				0.721	0.707	0.65														
GPC-1/HGF/PDGFAB.88							0.72	0.65	0.65	0.38	0.45	0.54	0.57							
GPC-1/HGF/IFNγ							0.73	0.66	0.66	0.42	0.43	0.49	0.6							
GPC-1/HGF/HuMCP-1β/CAF	0.72	0.67	0.68																	
GPC-1/HGF/HuIL-18	0.72	0.68	0.68																	
GPC-1/HGF/HuGM-CSF	0.73	0.67	0.67				0.73	0.67	0.67	0.36	0.44	0.51	0.6							
GPC-1/HGF/PA							0.73	0.67	0.67	0.44	0.45	0.54	0.62							
GPC-1/HGF/HuGROα							0.72	0.64	0.64	0.44	0.47	0.49	0.53							
GPC-1/HGF/VEGFR	0.65	0.61	0.61	0.663	0.404	0.88	0.66	0.61	0.61	0.36	0.41	0.44	0.5	0.65	0.37	0.41	0.48			
GPC-1/EGF																				
GPC-1/EGF/7 + リスタチン																				
GPC-1/EGF/HGF	0.72	0.67	0.67	0.731	0.596	0.81								0.69	0.42	0.52	0.66			
GPC-1/EGF/TNFα														0.71	0.32	0.36	0.61			
GPC-1/PAI-1	0.68	0.64	0.64	0.687	0.747	0.58	0.69	0.65	0.65	0.25	0.34	0.41	0.5	0.71	0.32	0.36	0.61			
GPC-1/PAI-1/HGF	0.73	0.67	0.67	0.743	0.58	0.8								0.68	0.29	0.35	0.53			
GPC-1/G-CSF	0.67	0.63	0.63	0.673	0.576	0.72	0.68	0.64	0.64	0.24	0.33	0.43	0.55	0.73	0.43	0.49	0.59			
GPC-1/G-CSF/HGF	0.72	0.65	0.65	0.722	0.515	0.87	0.72	0.65	0.65	0.38	0.45	0.54	0.57	0.66	0.27	0.37	0.53			
GPC-1/G-CSF/AT1E2				0.721	0.677	0.74														
GPC-1/HuIL-18	0.72	0.68	0.68				0.65	0.62	0.62	0.21	0.34	0.41	0.5							
GPC-1/HuIL-18/HGF																				
GPC-1/PDGFAB.88	0.66	0.6	0.61	0.663	0.485	0.83	0.68	0.65	0.65	0.33	0.35	0.43	0.55	0.67	0.32	0.38	0.54			
GPC-1/PDGFAB.88/HGF							0.72	0.65	0.65	0.38	0.45	0.54	0.57							
GPC-1/PDGFβ8	0.72	0.67	0.67	0.642	0.657	0.61	0.66	0.63	0.63	0.27	0.34	0.48	0.55							
GPC-1/PDGFβ8/HGF				0.727	0.636	0.75														
GPC-1/SCD40L				0.722	0.515	0.84														
GPC-1/SCD40L/HGF				0.629	0.567	0.72														
GPC-1/HuGM-CSF	0.73	0.67	0.67																	
GPC-1/HuGM-CSF/HGF				0.636	0.6	0.63														
GPC-1/HuIFNβ							0.73	0.66	0.66	0.42	0.43	0.49	0.6							
GPC-1/HuIFNβ/HGF							0.65	0.58	0.58	0.26	0.38	0.43	0.44	0.69	0.42	0.52	0.66			
GPC-1/7 + リスタチン	0.72	0.66	0.66	0.724	0.636	0.73	0.72	0.69	0.69	0.35	0.47	0.49	0.51							
GPC-1/7 + リスタチン/HGF																				

最初のカラム (GPC-1 検体の組み合わせ) は、GPC-1 単独、又は1つ若しくは2つの他の検体との組み合わせで示している。GPC-1 + 2 検体の組み合わせを、共通の第2の検体に応じてグループ化する。分析1、2及び3は、3回の独立して行ったAUC最適化の結果を示す。分析3は、最適化した感度及び特異性並びに所与の固定した特異性での感度 (90%、85%、80%及び75%) を示す。分析4は、pAUC最適化の結果を示す。得られた曲線のAUCは、所与の固定した特異性での感度 (90%、85%、80%及び75%) と共に示されている。

【0163】

GPC-1への2つの検体の追加は、GPC-1又はGPC-1+1検体のいずれかを上回るAUC、感度及び/又は特異性のさらなる改善をもたらした(表8)。

【0164】

10

20

30

40

50

## 【表 8】

表 8 : G P C - 1 への 2 つの検体の追加

検体(複数可)	AUC	感度	特異性
GPC-1	0.585	0.51	0.62
GPC-1/HGF	0.703	0.64	0.72
GPC-1/HGF/FGFb	0.735	0.60	0.85
GPC-1/EGF	0.663	0.404	0.88
GPC-1/EGF/HGF	0.731	0.60	0.81

10

## 【0165】

以下の G P C - 1 プラス 2 検体の組み合わせが、この分析での最高性能の組み合わせとして特定された(表 9)。

## 【0166】

## 【表 9】

表 9 : 好ましい G P C - 1 プラス 2 検体の組み合わせ

統一検体	第 2 の検体	第 3 の検体
GPC-1	HGF	PAI-1, HuFGFb, EGF, HuPDGFBB, フォリスタチン, G-CSF, sCD40L, HuIL-8, HuCTACK, PDGFAB. BB, IFNg, HuMCP-1 MCAF, HuIL-18, HuGM-CSF, uPA, HuGR0a or sVEGFR
	EGF	フォリスタチン, HGF, TNFa
	PAI-1	HGF
	G-CSF	HGF, sTIE2
	HuIL-18	HGF
	PDGFAB. BB	HGF
	PDGFBB	HGF
	sCD40L	HGF
	HuGM-CSF	HGF
	フォリスタチン	EGF, HGF

20

30

## 【0167】

## p A U C 最適化

A U C 最適化分析の結果は、G P C - 1 プラス 1 つ又は 2 つの検体の使用が、検体の 1 つとしての G P C - 1 と比較して、アーム 2 の B P H とアーム 3 の C a P の判別を改善することができることを示した。

## 【0168】

G P C - 1 及び 1 つ又は 2 つの検体の最適な組み合わせを特定する目的は、B P H 患者群と C a P 患者群を判別する特異性を最大限にすることであった。

40

## 【0169】

修正した最適化アプローチを開発し、それによって、部分的 A U C を最適化するために、加重和ネルダ - ミード最適化手順を適用した。p A U C は、制限 ( 1 - 特異性 ) 範囲内の R O C 下面積を表し、一般的に、この範囲は値 0 と e の間に存在し、e は指定されなければならない。本明細書では、e を 0.5 に設定した。両方の A U C が等しいとき、後から上昇する別の R O C よりも早く上昇する R O C は、より高い特異性を有する。完全な A U C よりむしろ p A U C の最適化は、より高い特異性を有する検査のための最適化である。

50

## 【 0 1 7 0 】

部分的AUC最適化手順を、GPC-1+1検体（表10）及びGPC-1+2検体アプローチに適用した（表11）。90%、85%、80%及び75%の固定した特異性における感度を決定した。結果を、表7の「分析4」として示す。

## 【 0 1 7 1 】

GPC-1プラス1つの追加検体についての部分的AUC最適化手順を実施した。AUC最適化について観察されたように、GPC-1に加えて1検体を組み込むことにより、BPHとCaPの判別が向上した（以下の表7及び表12）。GPC-1+1検体の組み合わせに存在する、特定された上位5検体は以下の通りであった。

## 【 0 1 7 2 】

## 【表10】

表10：部分的AUC最適化に使用したGPC-1プラス1検体の組み合わせ

統一検体	追加の検体
GPC-1	HGF
	PAI-1
	G-CSF
	PDGFAB, BB
	HuIL-9

10

20

## 【 0 1 7 3 】

HuIL-9を除いて、全てのこれらの検体は、本明細書で前述したAUC加重最適化手順を用いて特定したものと共通していた。

## 【 0 1 7 4 】

GPC-1プラス2つの追加の検体を用いてpAUC最適化を行った。GPC-1プラス2検体の組み合わせを行った場合の上位は、以下の通りであった。

## 【 0 1 7 5 】

## 【表11】

表11：部分的AUC最適化に使用したGPC-1プラス2検体の組み合わせ

統一検体	第2の検体	第3の検体
GPC-1	HGF	HuFGFb, PAI-1, EGF
	EGF	フォリスタチン, HGF, TNFa

30

## 【 0 1 7 6 】

第3の検体の追加により、所定の固定した特異性で感度が向上した（表12）。

## 【 0 1 7 7 】

## 【表 1 2】

表 1 2 : p A U C 最適化から導かれた G P C - 1 検体及び G P C - 1 検体の組み合わせについての、固定した特異性での A U C 及び感度

検体(複数可)	AUC	固定した特異性での感度			
		90%	85%	80%	75%
GPC-1	0.61	0.2	0.29	0.33	0.35
GPC-1/HGF	0.7	0.39	0.41	0.52	0.56
GPC-1/HGF/FGFb 0.74	0.45	0.58	0.62	0.68	
GPC-1/EGF	0.663	0.37	0.41	0.44	0.48
GPC-1/EGF/HGF 0.731	0.42	0.54	0.54	0.62	

10

B P H と C a P を区別するための最良の実施の組み合わせ。

## 【 0 1 7 8 】

4 つの別々の分析 ( 3 つの A U C 最適化及び 1 つの p A U C 最適化 ) の結果は、以下の組み合わせが最も頻繁に発生し、最良の判別を提供することを示した ( 表 1 3 ) 。

20

## 【 0 1 7 9 】

## 【表 1 3】

表 1 3 : 最高頻度及び最適な判別能力を有する組み合わせ

組み合わせ	頻度	最良 AUC	最良 SENS/Spec	最良 Sens/SPEC
GPC-1/HGF	4/4	0.71	0.65/0.65	0.45/0.85
GPC-	4/4	0.69	0.75/0.58	0.35/0.85
GPC-1/C	4/4	0.68	0.64/0.64	0.37/0.85
GPC-1/EGF	4/4	0.66	0.61/0.61	0.40/0.88
GPC-1/PDGFAB.BB	4/4	0.68	0.65/0.65	0.49/0.83
GPC-1/HGF/FGFb	4/4	0.74	0.69/0.70	0.60/0.85
GPC-1/HGF/PAI-1	3/4	0.74	0.67/0.67	0.58/0.80
GPC-1/HGF/EGF	3/4	0.73	0.67/0.67	0.60/0.81
GPC-1/HGF/Follistatin	3/4	0.72	0.69/0.69	0.47/0.85
GPC-1/HGF/G-CSF	3/4	0.72	0.65/0.66	0.52/0.87

30

注 : S E N S / S p e c は、最高感度を有する感度及び特異性の組み合わせを意味する。

注 : S e n s / S P E C は、最高の特異性を有する感度及び特異性の組み合わせを意味する。

## 【 0 1 8 0 】

## 相互参照による組み込み

40

本発明は、「前立腺疾患のためのバイオマーカーの組み合わせ」と題する、M i n o m i c I n t e r n a t i o n a l 社の名前で 2 0 1 5 年 7 月 2 2 日に出願されたオーストラリア仮特許出願番号 2 0 1 5 9 0 2 9 1 9 号の優先権を主張するものであり、その全内容は相互参照により本明細書に組み込まれる。

---

フロントページの続き

(72)発明者 キャンベル, ダグラス

オーストラリア ニューサウスウェールズ 2090 クレモルネ クロード アベニュー 3

(72)発明者 スーン, ジュリー

オーストラリア ニューサウスウェールズ 2026 ノース ボンディ プレア ストリート  
58 ユニット 3

審査官 三好 貴大

(56)参考文献 特表2010-526766(JP, A)

国際公開第2008/092894(WO, A1)

米国特許出願公開第2007/0105105(US, A1)

国際公開第2015/106311(WO, A1)

SHORE, N. et al., GLYPICAN-1 AS A BIOMARKER FOR PROSTATE CANCER, THE JOURNAL OF UROLOGY, 2015年 5月, 193(4S), e496

DWIVEDI, S. et al., Diagnostic and Prognostic Significance of Prostate Specific Antigen and Serum Interleukin 18 and 10 in Patients with Locally Advanced Prostate Cancer: A Prospective Study, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 12(7), 1843-1848

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)