

(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2018-507702

(P2018-507702A)

(43) 公表日 平成30年3月22日 (2018.3.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

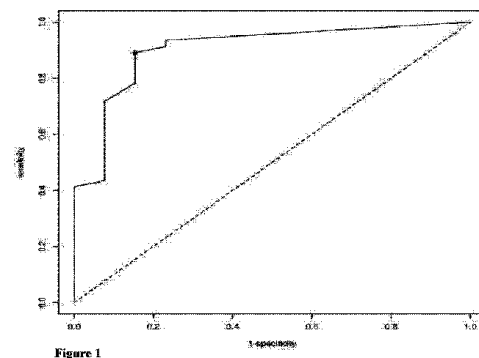
(21) 出願番号	特願2017-548024 (P2017-548024)	(71) 出願人	397060175
(86) (22) 出願日	平成28年3月11日 (2016.3.11)		ヤンセン ファーマシューティカ エヌ.
(85) 翻訳文提出日	平成29年11月10日 (2017.11.10)		ベー.
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/022004		ベルギー国 ベー. - 2 3 4 0 ベルセ
(87) 国際公開番号	W02016/145308		トルンハウッサーヴェヒ 3 0
(87) 国際公開日	平成28年9月15日 (2016.9.15)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	62/132, 064		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成27年3月12日 (2015.3.12)	(74) 代理人	100095360
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100093676
			弁理士 小林 純子
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100149010
			弁理士 星川 亮

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌を予測するための全血ベースmRNAマーカー及びそれを検出するための方法

(57) 【要約】

前立腺癌を予測するための全血ベースmRNAバイオマーカー及びそれを検出するための方法が提供される。本開示のmRNAマーカー及び方法により、前立腺癌患者の識別／診断、高リスクの前立腺癌患者の識別／高リスクの前立腺癌の予測、及び前立腺癌患者の治療が可能である。また、本開示の全血ベースmRNAバイオマーカーを含む遺伝子チップも提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者からの全血サンプル中における前立腺癌特異的 mRNA バイオマーカーを検出するための方法であって、

前記全血サンプルから RNA を単離することと、

前記単離した RNA から cDNA を合成することと、

KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP.ERG、ARV3.7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、COL1A1、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、及びこれらの任意の組み合わせから成る群から選択される少なくとも 1 つの mRNA バイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記合成工程の後で、前記 cDNA は事前増幅される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

事前増幅工程は、14 サイクル行われる、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記増幅工程は、qRT-PCR によって行われる、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記全血サンプルは、採血チューブ内に収集される、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前立腺癌患者を識別するための方法であって、

前記患者の全血サンプルから cDNA を得ることと、

COL1A1 のプライマー対及びプローブを含む遺伝子チップに、前記 cDNA を接触させることと、

30

COL1A1 の発現レベルを測定することと、

COL1A1 の前記発現レベルと COL1A1 の対照レベルとを比較することと、を含み、前記対照レベルと比較したときの前記全血サンプル中の COL1A1 の前記発現レベルの増加が、前立腺癌を示す、方法。

【請求項 7】

前記遺伝子チップは、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP.ERG、ARV3.7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、及びこれらの任意の組み合わせから成る群から選択される少なくとも 1 つの追加の mRNA バイオマーカーのプライマー対及びプローブを更に含んでおり、

40

前記方法は、更に、

前記少なくとも 1 つの追加の mRNA バイオマーカーの発現レベルを測定することと、

前記少なくとも 1 つの追加の mRNA バイオマーカーの前記発現レベルと、前記少なくとも 1 つの追加の mRNA バイオマーカーの対照レベルとを比較することと、を含み、前記対照レベルと比較したときの前記少なくとも 1 つの追加の mRNA バイオマーカーの前

50

記発現レベルの増加が、前立腺癌を示す、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記合成工程の後で、前記 cDNA は事前増幅される、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】

事前増幅工程は、14 サイクル行われる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記増幅工程は、qRT-PCR によって行われる、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記全血サンプルは、PAX gene RNA チューブ内に収集される、請求項 6 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの mRNA バイオマーカの前記発現レベルを、リアルタイム PCR によって確認することを更に含む、請求項 6 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前立腺癌に対するリスクファクターを指定することを更に含む、KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、又はこれらの任意の組み合わせの発現レベルの増加が、高リスクの前立腺癌を示す、請求項 6 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

高リスクの前立腺癌患者を識別するための方法であって、

前記患者の全血サンプルから cDNA を得ることと、

20

高リスクの前立腺癌を示す少なくとも 1 つの mRNA バイオマーカであって、KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、又はこれらの任意の組み合わせを含む少なくとも 1 つの mRNA バイオマーカのプライマー対及びプローブを含む遺伝子チップに、前記 cDNA を接触させることと、

前記少なくとも 1 つの mRNA バイオマーカの発現レベルを測定することと、

前記少なくとも 1 つの mRNA バイオマーカの発現レベルと、前記少なくとも 1 つの mRNA バイオマーカの対照レベルとを比較することとを含み、前記対照レベルと比較したときの前記少なくとも 1 つの mRNA バイオマーカの発現レベルの増加が、高リスクの前立腺癌を示す、方法。

【請求項 15】

30

前立腺癌患者を治療するための方法であって、

前記患者の全血サンプルから cDNA を得ることと、

COL1A1 のプライマー対及びプローブを含む遺伝子チップに、前記 cDNA を接触させることと、

COL1A1 の発現レベルを測定することと、

COL1A1 の前記発現レベルと COL1A1 の対照レベルとを比較することと、

COL1A1 の前記対照レベルと比較して COL1A1 の前記発現レベルが増加している場合、前記患者を治療することと、を含む、方法。

【請求項 16】

40

前記遺伝子チップは、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP. ERG、ARV3. 7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1P1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3. 1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、及びこれらの任意の組み合わせから成る群から選択される少なくとも 1 つの追加の mRNA バイオマーカのプライマー対及びプローブを更に含んでおり、

前記方法は、更に、

50

前記少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの発現レベルを測定することと、
前記少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの前記発現レベルと、前記少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの対照レベルとを比較することと、

前記少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの前記対照と比較して、前記少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの前記発現レベルが増加している場合、前記患者を治療することと、を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

患者からの全血サンプル中においてARV7（ARV3.7）を検出するための方法であって、

前記全血サンプルからRNAを単離することと、

前記単離したRNAからcDNAを合成することと、

ARV3.7の発現レベルを測定することと、を含む、方法。

【請求項18】

前記合成工程の後で、前記cDNAは事前増幅される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記事前増幅工程は、2～14サイクル行われる、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記全血サンプルは、採血チューブ内に収集される、請求項17～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記測定工程は、配列番号2の順方向プライマー及び配列番号3の逆方向プライマーを含む遺伝子チップを用いて行われる、請求項17～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記遺伝子チップは、配列番号1のプローブを更に含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記患者の前記全血サンプルからのARV7（ARV3.7）の前記発現レベルと、ARV7（ARV3.7）の発現の対照レベルとを比較することを更に含む、請求項17～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

ARV7（ARV3.7）の前記対照レベルは、前立腺癌に罹患していない個体からの全血サンプルにおけるARV7（ARV3.7）の発現レベルである、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記患者の前記全血サンプルからのARV7（ARV3.7）の前記発現レベルが、ARV7（ARV3.7）の発現の前記対照レベルと比較して、増加しているか減少しているかを判定することを更に含む、請求項22又は23に記載の方法。

【請求項26】

患者からの全血サンプル中において前立腺癌特異的mRNA転写物を検出するための遺伝子チップであって、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP、ERG、ARV3.7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEM66、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、COL1A1、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、及びこれらの任意の組み合わせから成る群から選択されるmRNAバイオマーカーを増幅及び検出するように構成されたプライマー対及びプローブを含む、遺伝子チップ。

【請求項27】

高リスクの前立腺癌患者を識別するための方法であって、

10

20

30

40

50

前記患者の全血サンプルから cDNA を得ることと、

高リスクの前立腺癌を示す 8 個の mRNA バイオマーカーであって、KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、COL1A1、GPX8、FAM13C、SLCO1B3、KLK2、TMEFF2、NROB1、PITX2、ACADL、SFRP4、AGR2、HNF1A、GRHL2、又はこれらの任意の組み合わせから成る群から選択される前記少なくとも 8 個の mRNA バイオマーカーのプライマー対及びプローブのセットを含む遺伝子チップに、前記 cDNA を接触させることと、

全ての mRNA バイオマーカーの発現レベルを測定することと、

前記少なくとも 8 個の mRNA バイオマーカーの前記発現レベルと、前記少なくとも 8 個の mRNA バイオマーカーの対照レベルとを比較することと、を含み、前記少なくとも 8 個の mRNA バイオマーカーの前記対照レベルと比較したときの前記少なくとも 8 個の mRNA バイオマーカーの前記発現レベルの増加が、高リスクの前立腺癌を示す、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

前立腺癌を予測するための全血ベース mRNA バイオマーカー及びそれを検出するための方法が、本明細書において提供される。詳細には、本開示の mRNA マーカー及び方法は、患者からの全血サンプル中における前立腺癌特異的 mRNA バイオマーカーの検出と、前立腺癌患者の識別と、高リスクの前立腺癌患者の識別と、前立腺癌患者の治療と、を可能にする。

【背景技術】

【0002】

前立腺癌は、米国の男性にとって 2 番目に最も多い癌である。前立腺癌はまた、全人種及びヒスパニック系人口の男性の癌による死亡の主要原因の 1 つである。2010 年には、米国において 196,038 人の男性が前立腺癌であると診断され、米国において 28,560 人の男性が前立腺癌により死亡した。(U. S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 1999~2010 Incidence and Mortality Web-based Report. Atlanta (GA): Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Cancer Institute; 2013.)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

前立腺癌の管理における主要な課題の 1 つとして、進行性形態の病気を止めるために十分な治療を受けるべき患者と、緩慢性形態への過剰処置を避けるべき患者とを区別するためのテストが無いことがある。前立腺癌の分子多様性と、患者から腫瘍組織を得ることの難しさにより、前立腺癌の個別管理が困難になっている。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本明細書では、患者からの全血サンプル中における前立腺癌特異的 mRNA バイオマーカーを検出するための方法が開示される。この方法は、全血サンプルから RNA を単離することと、単離された RNA から cDNA を合成することと、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP. ERG、ARV7 (ARV3.7)、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、COL1A1、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1

10

20

30

40

50

、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、及び／又はこれらの任意の組み合わせである、或いは、これらから実質的に成る群から選択される、少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含む、から成る、及び／又はから実質的に成る。

【0005】

また、患者からの全血サンプル中におけるARV7 (ARV3.7)を検出するための方法も開示されている。この方法は、全血サンプルからRNAを単離することと、単離されたRNAからcDNAを合成することと、ARV7 (ARV3.7)の発現レベルを測定することと、を含む、から成る、及び／又はから実質的に成る。

【0006】

また、前立腺癌患者を識別するための方法であって、患者の全血サンプルからcDNAを得ることと、COL1A1のプライマー対及びプローブを含む遺伝子チップに、このcDNAを接触させることと、COL1A1の発現レベルを測定することと、COL1A1の発現レベルとCOL1A1の対照レベルとを比較することと、を含む、から成り、及び／又はから実質的に成り、対照レベルと比較したときの全血サンプル中のCOL1A1の発現レベルの増加が、前立腺癌を示す、方法も開示されている。

【0007】

高リスクの前立腺癌患者を識別するための方法も提供される。この方法は、患者の全血サンプルからcDNAを得ることと、高リスクの前立腺癌を示す少なくとも1つのmRNAバイオマーカーであって、KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、COL1A1、GPX8、FAM13C、SLCO1B3、KLK2、TMEFF2、NROB1、PITX2、ACADL、SFRP4、AGR2、HNF1A、GRHL2、及び／又はこれらの任意の組み合わせから成る群から選択される要素、を含む、から成る、及び／又はから実質的に成る、少なくとも1つのmRNAバイオマーカーのプライマー対及びプローブを含む遺伝子チップに、このcDNAを接触させることと、少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの発現レベルを測定することと、少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの発現レベルと、少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの対照レベルとを比較することと、を含む、から成り、及び／又はから実質的に成り、対照レベルと比較したときの少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの発現レベルの増加が、高リスクの前立腺癌を示す。更に、mRNAバイオマーカーは、複数のmRNAバイオマーカーを含むバイオマーカーパネルと組み合わせられる場合がある。所定数、例えば、3、4、5、6、7、8、又は9個以上が検出された場合、対象は、バイオマーカー陽性と呼ばれる。バイオマーカー陽性ステータスは、高リスクの前立腺癌を示す。

【0008】

更に、前立腺癌患者を治療するための方法であって、患者の全血サンプルからcDNAを得ることと、COL1A1のプライマー対及びプローブを含む遺伝子チップに、このcDNAを接触させることと、COL1A1の発現レベルを測定することと、COL1A1の発現レベルとCOL1A1の対照レベルとを比較することと、COL1A1の対照レベルと比較してCOL1A1の発現レベルが増加している場合、患者に対して前立腺癌の治療を行うことと、を含む、から成る、及び／又はから実質的に成る方法が開示されている。この例は限定を意図したものではなく、例えば、本明細書に記載のmRNAバイオマーカーの発現又はバイオマーカー陽性ステータスは、治療を行う患者を選択するためにも使用される場合がある。

【0009】

また、患者からの全血サンプル中において前立腺癌特異的mRNA転写物を検出するための遺伝子チップであって、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP. ERG、ARV3.7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、COL1

10

20

30

40

50

A 1、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、及び／又はこれらの任意の組み合わせから成る群から選択される要素を増幅及び検出するように構成されたプライマー対及びプローブを含む、から成る、及び／又はから実質的に成る遺伝子チップも提供される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

要約、並びに以下の発明を実施するための形態は、添付の図面と併せて読むことで、更に理解される。本開示の方法及び遺伝子チップを説明するために、図面に、本方法及び遺伝子チップの例示的な実施形態を示す。しかし、本方法及び遺伝子チップは、ここに開示されている特定の実施形態に限定されない。以下の図面において、

【図1】COL1A1の例示的なROC曲線であり、マーカー発現レベルの全てにおいて、感度と特異度との間のトレードオフを示している。点は、感度及び特異度が最大化される最適なカットポイントを示す。

【図2】バイオマーカー又はバイオマーカーパネルに対する例示的な Kaplan-Meier 曲線であり、X軸が表す特定の時間までに、病気の再発又は病気による死亡などの出来事を経験しなかった対象の割合を示している。バイオマーカー陽性の対象は赤のラインで示され、バイオマーカー陰性の対象は黒のラインでそれぞれ示されている。バイオマーカー陽性の対象は、バイオマーカー陰性の対象よりも早くそのような出来事を経験する傾向が顕著に高い。すなわち、バイオマーカー陽性の対象は、予後が不良である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本開示の方法及び遺伝子チップは、本開示の一部を形成する添付図面に関してなされる以下の詳細な説明を参照することにより、より容易に理解することができる。本開示の方法及び遺伝子チップは、本明細書に記載及び／又は図示された特定の方法及び遺伝子チップに限定されないことが理解される。また、本明細書で使用される用語は、具体的な実施形態を例によって説明するためだけのものであり、請求項に記載の方法及び遺伝子チップを制限することを意図しないことが理解される。

【0012】

特別な記述が無い限り、動作に関する可能なメカニズム又は形態、或いは改善の理由についての説明は、説明のみを意図したものである。本開示の方法は、提案されている動作に関するメカニズム又は形態、或いは改善の理由の是非によって制限されない。

【0013】

特定の数値に関する言及は、文脈上他に明記されない限り、少なくともその特定の値を含むものとする。値の範囲が表されている場合、別の実施形態において、ある特定の値から、及び／又は他の特定の値までが含まれる。更に、範囲で記述される値に関する言及は、その範囲内のあらゆる値を含む。範囲はいずれも包括的であり、組み合わせが可能である。

【0014】

値が、先行詞「約」を用いて近似値として表現される場合、その特定の値は、別の実施形態を形成することが理解される。

【0015】

また、明確さのために本明細書では別々の実施形態の文脈で説明される、本開示の方法及び遺伝子チップの特定の複数の特徴は、単一の実施形態において組み合わせて提供され得ることも理解される。逆に、簡潔さのために単一の実施形態の文脈で説明される、本開示の方法及び遺伝子チップの種々の特徴が、別々に若しくは任意のサブコンビネーションとして提供される場合もある。

【0016】

本明細書で使用する時、単数形「a」、「an」、及び「the」は複数を含むもの

10

20

30

40

50

とする。

【0017】

本明細書で使用する時、「患者」という用語は、その全血サンプルが、本開示の方法によって分析可能なあらゆる哺乳類を指す。したがって、本開示の方法は、ヒト及びヒト以外の対象に適用可能である。ただし、ヒトに対して使用するのが最も好ましい。いくつかの実施形態では、患者のサンプルは、ヒトのサンプルである。他の実施形態では、患者のサンプルは、ヒト以外のサンプルである。「患者」及び「対象」は、本明細書において、交換可能に使用できる。

【0018】

本明細書で使用する時、「遺伝子チップにcDNAを接触させる」という表現は、遺伝子の発現を評価するために、患者の全血サンプルから得たcDNAを、遺伝子チップによって培養する又は遺伝子チップに加える手順のことを指す。

【0019】

「発現レベルの増加」という表現は、mRNAバイオマーカーが存在することと、対照サンプルと比較してmRNAバイオマーカーのレベルが上昇していることと、の両方を含む。例えば、本開示のmRNAバイオマーカーの1つ又は複数が、対照サンプルに含まれていない場合がある。そのようなmRNAバイオマーカーの場合は、「発現レベルの増加」という表現は、患者の全血サンプル中にmRNAバイオマーカーが存在していることを指す。逆に、本開示のmRNAバイオマーカーの1つ又は複数が、対照サンプルにある程度のレベルで存在する場合がある。そのようなmRNAバイオマーカーの場合は、「発現レベルの増加」という表現は、対照サンプルと比較して、患者の全血サンプル中のmRNAバイオマーカーのレベルが上昇していることを指す。

【0020】

本明細書で使用する時、「対照サンプル」とは、前立腺癌に罹患しておらず、かつ、過去に罹患したことのない個体又はそのような個体集団からの全血サンプルを指す。したがって、「～の対照レベル」とは、前立腺癌に罹患しておらず、かつ、過去に罹患したことのない個体又はそのような個体集団からの全血サンプル中における、本開示の1つ又は複数のバイオマーカーの発現レベルを指す。

【0021】

本明細書で使用する時、「プライマー対」とは、目的のmRNAバイオマーカーのcDNAを増幅するための順方向プライマー及び逆方向プライマーを指す。

【0022】

前立腺癌特異的mRNAバイオマーカーの検出

本明細書では、患者からの全血サンプル中における前立腺癌特異的mRNAバイオマーカーを検出するための方法が開示される。この方法は、全血サンプルからRNAを単離することと、単離したRNAからcDNAを合成することと、任意選択的にcDNAを事前増幅(preamplify)することと、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP、ERG、ARV7(ARV3.7)(ARV7としても知られている)、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、COL1A1、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、又はこれらの任意の組み合わせである少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの発現レベルを測定することと、を含む。

【0023】

本開示の方法により、全血サンプル中における前立腺癌特異的mRNAバイオマーカーを検出することができる。これらのマーカーの検出は、前立腺癌患者の識別／診断、高リスクの前立腺癌患者の識別／高リスクの前立腺癌の予測、及び前立腺癌患者の治療に使用

することができる。

【0024】

本明細書で使用する時、「前立腺癌特異的mRNAバイオマーカー」とは、全血サンプルから前立腺癌を検出するために使用することができる、単一のmRNAバイオマーカー又はmRNAバイオマーカーの群（すなわち、2つ以上の関連するバイオマーカー）を指す。例示的なmRNAバイオマーカーが表1にリストされており、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP.ERG、ARV3.7、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、COL1A1、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、及びCYP3A5が挙げられるが、これらに限定されない。

【0025】

【表 1】

表 1 : 例示的な mRNA バイオマーカー

mRNA バイオマーカー	名称	GenBank登録番号
KLK3	カリクレイン-3	NM_001030047
ACADL	アシルCoAデヒドロゲナーゼ、長鎖	NM_001608.3
GRHL2	grainyhead-like2 (ショウジョウバエ)	NM_024915.3
HOXB13	ホメオボックスB13	NM_006361.5
HSD3B1	ヒドロキシーデルター5-ステロイドデヒドロゲナーゼ、 3ペーター及びステロイドデルターイソメラーゼ1	NM_000862.2
TMP. ERG	TMP-ERG融合 (Yu. J., et al. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. Cancer Cell (2010) 17(5): 443~454に記載)	
ARV3.7	アンドロゲン受容体スプライス変異体 (Hu, R., et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone refractory prostate cancer. Cancer Res. (2009)69(1):16~22.に記載)	
FOLH1	葉酸ヒドロラーゼ (前立腺特異膜抗原)1	NM_001193471.1
KLK2	カリクレイン関連ペプチターゼ2	NM_001002231.2
HSD3B2	ヒドロキシーデルター5-ステロイドデヒドロゲナーゼ、 3ペーター及びステロイドデルターイソメラーゼ2	NM_000198.3
AGR2	アンテリアグラジエント2	NM_006408.3
AZGP1	アルファ-2-グリコプロテイン1、亜鉛結合疑似遺伝子1	NR_036679.1
STEAP2	STEAPファミリーメンバー2、メタロレダクターゼ	NM_001040665.1
KCNN2	カリウム中間体/低コンダクタンスカルシウム活性化チャネル、 サブファミリーN、メンバー2	NM_001278204.1
GPX8	グルタチオンペルオキシダーゼ8 (推定)	NM_001008397.2
SLCO1B3	溶質輸送体有機アニオントランスポーターファミリー、 メンバー1B3	NM_019844.3
TMEFF2	EGF様及び2つのフォリスチン様ドメイン2を有する トランスメンブランタンパク質	NM_016192.2
SPINK1	セリンプロテアーゼインヒビター、カザールタイプ1	NM_003122.3
SFRP4	分泌型フリッツルド関連タンパク質4	NM_003014.3
NROB1	核受容体サブファミリー0、グループB、メンバー1	NM_000475.4
FAM13C	配列類似性を有するファミリー13、メンバーC	NM_001001971.2
HNF1A	HNF1ホメオボックスA	NM_000545.5
CDH12	カドヘリン12、タイプ2 (N-カドヘリン2)	NM_004061.3
PGR	プロゲステロン受容体	NM_000926.4
PITX2	ペア様ホメオドメイン2	NM_000325.5
MYBPC1	ミオシン結合タンパク質C、slowタイプ	NM_001254718.1
FOXA1	フォークヘッドボックスA1	NM_004496.3
SRD5A2	ステロイド-5-アルファ-レダクターゼ、アルファポリペプチド2 (3-オキソ-5アルファ-ステロイドデルタ4- デヒドロゲナーゼアルファ2)	NM_000348.3
COL1A1	コラーゲン、タイプI、 α 1	NM_000088.3
NPY	ニューロペプチドY	NM_000905.3
UGT2B17	UDPグルクロノシルトランスフェラーゼ2ファミリー、 ポリペプチドB17	NM_001077.3
CLUL1	クラスタリン様1 (網膜)	NM_014410.4
C9orf152	第9染色体オープンリーディングフレーム152	NM_001012993.2
FLNC	フィラミンC、ガンマ	NM_001127487.1
GPR39	Gタンパク質結合受容体39	NM_001508.2
RELN	リーリン	NM_005045.3
THBS2	トロンボスポンジン2	NM_003247.2
CYP17A1	シトクロムP450、ファミリー17、サブファミリーA、ポリペプチド1	NM_000102.3
CYP3A5	シトクロムP450、ファミリー3、サブファミリーA、ポリペプチド5	NM_000777.3

好適なmRNAバイオマーカーは、アンドロゲン制御群、アビラテロン抵抗群、神経内分泌バイパス群、又はその他のバイパスパスウェイに、機能的に分類することができる。このように、いくつかの実施形態では、少なくとも1つのmRNAバイオマーカーは、アンドロゲン制御群、アビラテロン抵抗群、神経内分泌バイパス群、その他のバイパスパスウェイ、又はこれらの任意の組み合わせのメンバーであり得る。

【0027】

全血の発現プロファイリングには、腫瘍組織の発現プロファイリングに対して、いくつかの実用上の利点がある。サンプル採取時の侵襲性が最小限である性質、サンプリング手順の標準化が比較的容易であること、そして、長い期間繰り返しサンプルを得られること（腫瘍組織は、標準的治療の一部として採取されることがないため）である。全血サンプルは、当該技術分野で既知の多くの技術（例えば、静脈穿刺が挙げられるが、これに限定されない）によって、患者から得ることができる。全血サンプルは、採血チューブ内に収集することができる。いくつかの実施形態では、採血チューブは、PAXgene（登録商標）ブランドのblood RNAチューブであり得る。

10

【0028】

全血サンプルからRNAを単離するための技術は、当該技術分野において既知である。好適な市販のキットには、例えば、QIAGENのPAXgene Blood RNA Kitが挙げられる。この手順が、実施例のセクションにて説明される。

【0029】

単離したRNAからcDNAを合成するための技術は、当該技術分野において既知であり、RNAの逆転写が挙げられるが、これに限定されない。

20

【0030】

いくつかの実施形態では、cDNAは、合成工程の後で事前増幅され得る。事前増幅工程は、任意の好適なサイクル数行われ得る。サイクル数は、初発のcDNAの量及び／又は増幅工程の実行に必要なcDNAの量によって決まる部分がある。好適な事前増幅のサイクル数としては、1～20サイクルが含まれるが、これらに限定されない。したがって、事前増幅工程は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20サイクルのうち任意のサイクル数行うことができる。いくつかの態様では、事前増幅工程は、2サイクル行うことができる。他の態様では、事前増幅工程は、14サイクル行うことができる。更に他の態様では、事前増幅工程は、20サイクルより多く行うことができる。

30

【0031】

少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの発現レベルを測定することは、cDNAを増幅することと、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP、ERG、ARV3.7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、COL1A1、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、又はこれらの任意の組み合わせのプライマー対及びプローブを含む遺伝子チップを用いて、増幅したcDNAを検出することと、を含む。いくつかの態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカーに対してプライマー対及び1つのプローブを含み得る。他の態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカーに対して1つより多いプライマー対及び1つより多いプローブを含み得る。

40

【0032】

理論に束縛されることを意図しないが、遺伝子チップに添加された事前増幅されたcDNAは、目的のmRNAバイオマーカー内の領域に特異的なプライマー対に結合されて、増幅される。cDNAが増幅されると、増幅されたcDNAは、目的のmRNAバイオマ

50

ーカー内の領域に特異的なプローブに結合される。増幅されたcDNAへのプローブの結合により、増幅工程が起こったときに増幅されたcDNAの検出が可能となる。このように、本開示の方法により、増幅プロセス中の早い段階で少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの発現レベルを検出することができ、その結果、感度及び精度が向上する。

【0033】

測定工程は、事前増幅されたcDNAに対しても、増幅されていないcDNAに対しても行うことができる。cDNAの増幅は、例えば、qRT-PCRによって行うことができる。好適な試薬及び条件は、当該技術分野の当業者に知られている。qRT-PCRは、多くの好適なプラットフォーム上で行うことができる。いくつかの態様では、例えば、Fluidigm（商標）を用いてqRT-PCRを行うことができる。したがって、いくつかの実施形態では、測定工程は、Fluidigm（商標）のプラットフォームにおける、上述のように少なくとも1つのmRNAバイオマーカーを含むFluidigm（商標）のGene expression chipを用いたqRT-PCRによって、cDNAを増幅することを含み得る。

【0034】

また、患者からの全血サンプル中においてARV7（ARV3.7）を検出するための方法も開示されている。本開示の方法は、全血サンプルからRNAを単離することと、単離されたRNAからcDNAを合成することと、ARV3.7の発現レベルを測定することと、を含む。

【0035】

いくつかの実施形態では、cDNAは、合成工程の後で事前増幅され得る。好適な事前増幅のサイクル数としては、1～20サイクルが含まれるが、これらに限定されない。したがって、事前増幅工程は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20サイクル行うことができる。いくつかの態様では、事前増幅工程は、2サイクル行うことができる。

【0036】

全血サンプルは、PAXgene（登録商標）blood RNAチューブなどの採血チューブ内に収集することができる。

【0037】

測定工程は、ARV3.7のプライマー及びプローブを含む、本開示の遺伝子チップのうちのいずれか1つを用いて行うことができる。いくつかの実施形態では、測定工程は、配列番号2の順方向プライマー及び配列番号3の逆方向プライマーを含む遺伝子チップを用いて行うことができる。いくつかの態様では、遺伝子チップは、配列番号1のプライマーを更に含む場合がある。

【0038】

ARV7（ARV3.7）の発現を検出するための方法は、患者の全血サンプルからのARV7（ARV3.7）の発現レベルと、ARV7（ARV3.7）の発現の対照レベルとを比較することを更に含む場合がある。ARV7（ARV3.7）の発現の好適な対照レベルとしては、例えば、前立腺癌に罹患していない個体からの全血サンプルにおけるARV7（ARV3.7）の対照レベルが挙げられる。比較工程を使用して、患者の全血サンプルからのARV7（ARV3.7）の発現レベルが、ARV7（ARV3.7）の発現の対照レベルと比較して、増加しているか減少しているかを判定することができる。

【0039】

前立腺癌患者を識別するための方法

また、本明細書では、前立腺癌患者を識別するための方法も開示されている。本開示の方法は、患者の全血サンプルからcDNAを得ることと、COL1A1のプライマー対及びプローブを含む遺伝子チップに、このcDNAを接触させることと、COL1A1の発現レベルを測定することと、COL1A1の発現レベルとCOL1A1の対照レベルとを比較することと、を含む、から成り、及び／又はから実質的に成り、対照レベルと比較したときの全血サンプル中のCOL1A1の発現レベルの増加が、前立腺癌を示す、方法も

開示されている。

【0040】

全血サンプルからRNAを単離して、単離したRNAからcDNAを合成することによって、cDNAを全血サンプルから得ることができる。RNAの単離及びcDNAの合成を行うための好適な技術には、上記で開示された技術と、更に、実施例のセクションで開示される技術と、が含まれる。いくつかの実施形態では、cDNAは、合成工程の後で事前増幅され得る。事前増幅工程は、任意の好適なサイクル数行うことができる。例えば、1～20サイクル行うことができるが、これらに限定されない。したがって、事前増幅工程は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20サイクル行うことができる。いくつかの態様では、事前増幅工程は、14サイクル行うことができる。

10

【0041】

いくつかの実施形態では、遺伝子チップは、KLK3、ACADL、GRHL2、HOBX13、HSD3B1、TMP. ERG、ARV3. 7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3. SNAI2、CDH12、NKX3. 1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、又はこれらの任意の組み合わせである少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーのプライマー対及びプローブを更に含む。遺伝子チップが、少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーのプライマー対及びプローブを含む実施形態では、本方法は、少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの発現レベルを測定することと、少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの発現レベルと少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの対照レベルとを比較することと、を更に含み、対照レベルと比較したときの少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの発現レベルの増加が、前立腺癌を示す。

20

【0042】

いくつかの態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカーに対して1つのプライマー対及び1つのプローブを含み得る。他の態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカーに対して1つより多いプライマー対及び1つより多いプローブを含み得る。

30

【0043】

遺伝子チップが、少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーのプライマー対及びプローブを更に含む実施形態では、本方法は、COL1A1及び少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの発現レベルを測定することと、COL1A1及び少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの発現レベルと、COL1A1及び少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの対照レベルとを比較することと、を更に含む。例えば、そして、制限することを意図せずに、いくつかの実施形態では、本方法は、COL1A1のプライマー対及びプローブと、MYBPC1のプライマー対及びプローブとを含む遺伝子チップにcDNAを接触させることと、COL1A1及びMYBPC1の発現レベルを測定することと、COL1A1及びMYBPC1の発現レベルとCOL1A1及びMYBPC1の対照レベルとを比較することと、を含む場合があり、対照レベルと比較したときの全血サンプル中のCOL1A1及びMYBPC1の発現レベルの増加が、前立腺癌を示す。

40

【0044】

COL1A1単独の、或いはCOL1A1と少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーとの組み合わせの発現レベルを測定することは、COL1A1のプライマー対を単独で用いて、或いはCOL1A1のプライマー対と少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーのプライマーとを組み合わせ用いて、cDNAを増幅することと、COL1

50

A1のプローブを単独で用いて、或いはCOL1A1のプローブと少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカースのプローブとを組み合わせ用いて、増幅されたcDNAを検出することと、を含む。測定工程は、事前増幅されたcDNAに対しても、増幅されていないcDNAに対しても行うことができる。cDNAの増幅は、例えば、qRT-PCRによって行うことができる。好適な試薬及び条件は、当該技術分野の当業者に知られている。qRT-PCRは、多くの好適なプラットフォーム上で行うことができる。いくつかの態様では、例えば、Fluidigm（商標）を用いてqRT-PCRを行うことができる。したがって、いくつかの実施形態では、測定工程は、Fluidigm（商標）のプラットフォーム上における、COL1A1のプライマー単独を又はCOL1A1のプライマーと上述のような少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカースのプライマーとの組み合わせを含むFluidigm（商標）のGene expression chipを用いたqRT-PCRによって、cDNAを増幅することを含み得る。 10

【0045】

全血サンプルは、PAX gene RNAチューブ（これに限定されない）などの採血チューブ内に収集することができる。

【0046】

前立腺癌患者を識別するための方法は、少なくとも1つのmRNAバイオマーカースの発現レベルを、リアルタイムPCRによって確認することを更に含む場合がある。

【0047】

いくつかの実施形態では、本方法は、前立腺癌に対するリスクファクターを指定することを更に含む場合があり、KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、又はこれらの任意の組み合わせの発現レベルの増加が、高リスクの前立腺癌を示す。 20

【0048】

高リスクの前立腺癌患者を識別するための方法

高リスクの前立腺癌患者を識別するための方法も開示される。本方法は、患者の全血サンプルからcDNAを得ることと、高リスクの前立腺癌を示すmRNAバイオマーカースのプライマー対と、このmRNAバイオマーカースのパネルであって、KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、COL1A1、GPX8、FAM13C、SLCO1B3、KLK2、TMFF2、NROB1、PITX2、ACADL、SFRP4、AGR2、HNF1A、GRHL2、又はこれらの任意の組み合わせを含むパネルと、を含む遺伝子チップに、cDNAを接触させることと、少なくとも1つのmRNAバイオマーカースの発現レベルを測定することと、少なくとも1つのmRNAバイオマーカースの発現レベルと、少なくとも1つのmRNAバイオマーカースの対照レベルとを比較することと、を含む、から成り、及び／又はから実質的に成り、対照レベルと比較したときの少なくとも1つのmRNAバイオマーカースの発現レベルの増加が、高リスクの前立腺癌を示す。 30

【0049】

本開示の方法により、全血サンプルからの、KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、COL1A1、GPX8、FAM13C、SLCO1B3、KLK2、TMFF2、NROB1、PITX2、ACADL、SFRP4、AGR2、HNF1A、GRHL2、又はこれらの任意の組み合わせの検出に基づいて、高リスクの前立腺癌を予測することができる。 40

【0050】

全血サンプルからRNAを単離して、単離したRNAからcDNAを合成することによって、cDNAを全血サンプルから得ることができる。RNAの単離及びcDNAの合成を行うための好適な技術には、上記で開示された技術と、更に、実施例のセクションで開示される技術と、が含まれる。いくつかの実施形態では、cDNAは、合成工程の後で事前増幅され得る。事前増幅工程は、任意の好適なサイクル数行われ得る。サイクル数は、開始cDNAの量及び／又は増幅工程の実行に必要なcDNAの量によって決まる部分がある。好適な事前増幅のサイクル数としては、1～20サイクルが含まれるが、これらに 50

限定されない。したがって、事前増幅工程は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20サイクル行うことができる。いくつかの態様では、事前増幅工程は、2サイクル行うことができる。他の態様では、事前増幅工程は、14サイクル行うことができる。更に他の態様では、事前増幅工程は、20サイクルより多く行うことができる。

【0051】

KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、COL1A1、GPX8、FAM13C、SLCO1B3、KLK2、TMEFF2、NROB1、PITX2、ACADL、SFRP4、AGR2、HNF1A、GRHL2、又はこれらの任意の組み合わせの発現レベルを測定することは、KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、COL1A1、GPX8、FAM13C、SLCO1B3、KLK2、TMEFF2、NROB1、PITX2、ACADL、SFRP4、AGR2、HNF1A、GRHL2、又はこれらの任意の組み合わせのプライマー対を用いて、cDNAを増幅させることと、KLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、COL1A1、GPX8、FAM13C、SLCO1B3、KLK2、TMEFF2、NROB1、PITX2、ACADL、SFRP4、AGR2、HNF1A、GRHL2、又はこれらの任意の組み合わせのプロープを用いて、増幅したcDNAを検出することと、を含む。測定工程は、事前増幅されたcDNAに対しても、増幅されていないcDNAに対しても行うことができる。cDNAの増幅は、例えば、qRT-PCRによって行うことができる。好適な試薬及び条件は、当該技術分野の当業者に知られている。qRT-PCRは、多くの好適なプラットフォーム上で行うことができる。いくつかの態様では、例えば、Fluidigm（商標）を用いてqRT-PCRを行うことができる。したがって、いくつかの実施形態では、測定工程は、Fluidigm（商標）のプラットフォームにおける、上述のようにKLK3、PGR、KCNN2、MYBPC1、HOXB13、COL1A1、GPX8、FAM13C、SLCO1B3、KLK2、TMEFF2、NROB1、PITX2、ACADL、SFRP4、AGR2、HNF1A、GRHL2、又はこれらの任意の組み合わせのプライマーを含むFluidigm（商標）のGene expression chipを用いたqRT-PCRによって、cDNAを増幅することを含む場合がある。

【0052】

いくつかの態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカーに対して1つのプライマー対及び1つのプロープを含み得る。他の態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカーに対して1つより多いプライマー対及び1つより多いプロープを含み得る。

【0053】

全血サンプルは、PAX gene RNAチューブ（これに限定されない）などの採血チューブ内に収集することができる。

【0054】

高リスクの前立腺癌患者を識別するための方法は、少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの発現レベルを、リアルタイムPCRによって確認することを更に含む場合がある。

【0055】

いくつかの実施形態では、本方法は、1つより多いmRNAバイオマーカーの発現レベルをリアルタイムPCRによって測定することと、閾値数より多い数のマーカーの陽性発現を検出することと、を伴う場合がある。これらの実施形態では、閾値数より多い数のマーカーが陽性発現を示す患者が、バイオマーカー陽性と考えられる。バイオマーカー陽性ステータスは、高リスクの病気の可能性の高さに関連している。

【0056】

前立腺癌患者を治療するための方法

本明細書では、前立腺癌患者を治療するための方法であって、患者の全血サンプルから

cDNAを得ることと、COL1A1のプライマー対及びプローブを含む遺伝子チップに、このcDNAを接触させることと、COL1A1の発現レベルを測定することと、COL1A1の発現レベルとCOL1A1の対照レベルとを比較することと、COL1A1の対照レベルと比較してCOL1A1の発現レベルが増加している場合、患者を治療することを含む方法が開示される。

【0057】

いくつかの実施形態では、遺伝子チップは、KLK3、ACADL、GRHL2、HOBX13、HSD3B1、TMP、ERG、ARV3、7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、又はこれらの任意の組み合わせである少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカのプライマー対及びプローブを更に含む。遺伝子チップが、少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカのプライマー対及びプローブを含む実施形態では、本方法は、少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの発現レベルを測定することと、少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの発現レベルと少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの対照レベルとを比較することと、少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの発現レベルが少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの対照よりも増加している場合、患者を治療することと、を更に含む。

【0058】

他の実施形態では、遺伝子チップは、複数のmRNAバイオマーカのプライマー対及びプローブを更に含む。

【0059】

いくつかの態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカに対して1つのプライマー対及び1つのプローブを含み得る。他の態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカに対して1つより多いプライマー対及び1つより多いプローブを含み得る。

【0060】

遺伝子チップが、少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカのプライマー対及びプローブを更に含む実施形態では、前立腺癌患者を治療するための方法は、COL1A1及び少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの発現レベルを測定することと、COL1A1及び少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの発現レベルとCOL1A1及び少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの対照レベルとを比較することと、COL1A1及び少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの発現レベルが、COL1A1及び少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカの対照レベルより増加している場合、患者を治療することと、を含む。例えば、そして、制限することを意図せずに、いくつかの実施形態では、本方法は、COL1A1のプライマー対及びプローブと、MYBPC1のプライマー対及びプローブとを含む遺伝子チップにcDNAを接触させることと、COL1A1及びMYBPC1の発現レベルを測定することと、COL1A1及びMYBPC1の発現レベルとCOL1A1及びMYBPC1の対照レベルとを比較することと、COL1A1及びMYBPC1の対照レベルと比較してCOL1A1及びMYBPC1の発現レベルが増加している場合、患者を治療することとを含み得る。

【0061】

遺伝子チップが、複数のmRNAバイオマーカのプライマー対及びプローブを更に含む実施形態では、前立腺癌患者を治療するための方法は、複数のmRNAバイオマーカの発現レベルを測定することと、mRNAバイオマーカの発現レベルと各mRNAバイオマーカの発現の対照レベルとを比較することと、閾値数より多い数のmRNAバイオ

マーカーが、対照レベルより高い発現レベルで検出された場合、患者を治療することと、を含む。

【0062】

全血サンプルからRNAを単離して、単離したRNAからcDNAを合成することによって、cDNAを全血サンプルから得ることができる。RNAの単離及びcDNAの合成を行うための好適な技術には、上記で開示された技術と、更に、実施例のセクションで開示される技術と、が含まれる。いくつかの実施形態では、cDNAは、合成工程の後で事前増幅され得る。事前増幅工程は、任意の好適なサイクル数行われ得る。サイクル数は、開始cDNAの量及び／又は増幅工程の実行に必要なcDNAの量によって決まる部分がある。好適な事前増幅のサイクル数としては、1～20サイクルが含まれるが、これらに限定されない。したがって、事前増幅工程は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20サイクル行うことができる。いくつかの態様では、事前増幅工程は、2サイクル行うことができる。他の態様では、事前増幅工程は、14サイクル行うことができる。更に他の態様では、事前増幅工程は、20サイクルより多く行うことができる。

10

【0063】

COL1A1単独の、或いはCOL1A1と少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーとの組み合わせの発現レベルを測定することは、COL1A1のプライマー対を単独で用いて、或いはCOL1A1のプライマー対と少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーのプライマー対との組み合わせを用いて、cDNAを増幅することと、COL1A1のプロブを単独で用いて、或いはCOL1A1単独のプロブと少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーのプロブとの組み合わせを用いて、増幅されたcDNAを検出することと、を含む。測定工程は、事前増幅されたcDNAに対しても、増幅されていないcDNAに対しても行うことができる。cDNAの増幅は、例えば、qRT-PCRによって行うことができる。好適な試薬及び条件は、当該技術分野の当業者に知られている。qRT-PCRは、多くの好適なプラットフォーム上で行うことができる。いくつかの態様では、例えば、Fluidigm（商標）を用いてqRT-PCRを行うことができる。したがって、いくつかの実施形態では、測定工程は、Fluidigm（商標）のプラットフォーム上における、COL1A1のプライマー単独を又はCOL1A1のプライマーと上述のような少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーのプライマーとの組み合わせを含むFluidigm（商標）のGene expression chipを用いたqRT-PCRによって、cDNAを増幅することを含み得る。

20

30

【0064】

全血サンプルは、PAX gene RNAチューブ（これに限定されない）などの採血チューブ内に収集することができる。

【0065】

前立腺癌患者を治療するための方法は、少なくとも1つのmRNAバイオマーカーの発現レベルを、リアルタイムPCRによって確認することを更に含む場合がある。

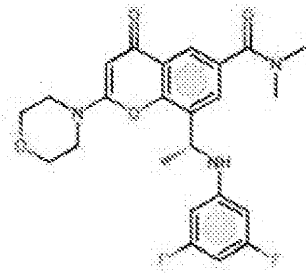
【0066】

COL1A1又はCOL1A1及び少なくとも1つの追加のmRNAバイオマーカーの発現レベルが増加している患者を治療するための好適な化合物としては、以下の化合物が含まれる（ただし、これらに限定されない）。

40

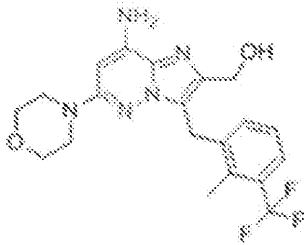
【0067】

【化 1】



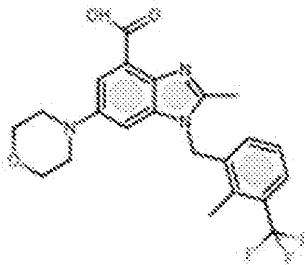
(化合物 I)

10



(化合物 II)

20



(化合物 III)

【0068】

遺伝子チップ

本明細書では、患者からの全血サンプル中における前立腺癌特異的mRNA転写物を検出するための遺伝子チップが開示される。いくつかの実施形態では、遺伝子チップは、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP、ERG、ARV3.7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、COL1A1、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、又はこれらの任意の組み合わせを増幅及び検出するように構成されたプライマー対及びプローブを含む場合がある。

30

【0069】

いくつかの実施形態では、遺伝子チップは、KLK3、ACADL、GRHL2、HOXB13、HSD3B1、TMP、ERG、ARV3.7、ARV567、FOLH1、KLK2、HSD3B2、AGR2、AZGP1、STEAP2、KCNN2、GPX8、SLCO1B3、TMEFF2、SPINK1、SFRP4、NROB1、FAM13C、HNF1A、CDH12、PGR、PITX2、MYBPC1、FOXA1、SRD5A2、COL1A1、NPY、UGT2B17、CLUL1、C9orf152、FLNC、GPR39、RELN、THBS2、CYP17A1、CYP3A5、BRS3、SNAI2、CDH12、NKX3.1、LGR5、TRPM8、SLCO1B3、又はこれらの任意の組み合わせを増幅及び検出するように構成された複数のプライマー対及び複数のプローブを含む場合がある。例えば、そして、制限することを意図せずに、いくつかの態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカーに対して1つのプ

40

50

ライマー対及び1つのプローブを含み得る。他の態様では、遺伝子チップは、分析対象の各mRNAバイオマーカーに対して1つより多いプライマー対及び1つより多いプローブを含み得る。

【0070】

好適なプローブとしては、表2にリストされたものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0071】

【表2】

表2：本開示の遺伝子チップの例示的なプローブ

アッセイID (Life Technologies)	対象
Hs02576345_m1	KLK3
Hs00380670_m1	GPX8
Hs00165843_m1	SRD5A2
Hs01085277_m1	ACADL
Hs00227745_m1	GRHL2
H00426435_m1	HSD3B1
Hs00197189_m1	HOXB13
Hs00428383_m1	KLK2
Hs03043658_m1	NROB1
Hs00167041_m1	HNF1A
Hs01591157_m1	AZGP1P1
Hs00189528_m1	FOLH1(PSMA)
Hs04234069_mH	PTX2(PITX2)
Hs00300346_m1	FAM13C
Hs00164004_m1	COL1A1
Hs01556702_m1	PGR
Hs00362037_m1	N-カドヘリン(CDH12)
Hs00605123_m1	HSD3B2
Hs01030641_m1	KCNN2
Hs00401292_m1	STEAP2
Hs00180066_m1	SFRP4
Hs00356521_m1	AGR2
Hs00162154_m1	SPINK1
Hs00270129_m1	FOXA1
Hs00251986_m1	SLCO1B3
Hs01086906_m1	TMEFF2
Hs00159451_m1	MYBPC1
Hs00179951_m1	(ボンベシン)BRS3
Hs00900370_m1	CHGA
Hs00969422_m1	LGR5
Hs00950344_m1	SNAI2

TaqMan（登録商標）レポーター＝FAM

【0072】

TMPに好適なプライマー及びプローブ：EGR及びARV7（ARV3.7）としては、表3にリストされたものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0073】

10

20

30

40

【表 3】

表 3：本開示の遺伝子チップの例示的なプライマー及びプローブ

アッセイ 番号	対象	プローブ配列	順方向プライマー	逆方向プライマー 5' - 3'
アンドロゲン受容体アッセイ				
Custom	AR変異体3/ 変異体7 (ARV3. 7)	CTGGGAGAAAAA TTCCGGGT (配列番号1)	GGAAATGTTATG AAGCAGGGATG (配列番号2)	TTTGAGATGCTT GCAATTGCC (配列番号3)
Custom	AR変異体567 (ARV567)	CTTGCCTGATTG CGAGAG (配列番号4)	CTGGGAGAGAGA CAGCTTGTACAC (配列番号5)	CAGGTCAAAAGT GAACTGATGCA (配列番号6)
TMPRSS2:ETS融合アッセイ				
Custom	TMPRSS2:ERG (TMP:ERG)	CGGCAGGAAGCC TTAT (配列番号7)	GAGCTAAGCAGG AGGCGGA (配列番号8)	TAGGCACACTCA AACAACGACTG (配列番号9)
コントロール遺伝子アッセイ				
Custom	RPL19	CCACAAGCTGAA GGC (配列番号10)	GCGGATTCTCAT GGAACACA (配列番号11)	GGTCAGCCAGGA GCTTCTTG (配列番号12)

全てのアッセイで、FAM TaqManレポーターを使用した。

【0074】

コントロール遺伝子アッセイで、内在性コントロールを使用した。

【実施例】

【0075】

方法

PAXgene（登録商標）blood RNAマニュアル抽出手順

RNAは、PAXgene Blood RNA Kit Handbook（Pre AnalytiX GmbH、2009年3月）に記載されているように（後で簡潔に述べる）、QIAGENのPAXgene（登録商標）Blood RNA Kitを用いて抽出された。

【0076】

PAXgene（登録商標）Blood RNAチューブを、スイングアウトローターを用いて、3000～5000×gで10分間遠心分離した。上清をデカント又はピペティングにより取り除いた。4mLのRNaseフリー水をペレットに加えて、新しい二次的なBD Hemogardキャップを用いてチューブを閉じた。ペレットが完全に溶解するまでチューブをボルテックスし、3000～5000×gで10分間遠心分離した。上清を全て取り除いて廃棄した。

【0077】

350μLのBuffer BR1を加えて、ペレットが完全に溶解するまでボルテックスした。1.5mLのマイクロ遠心チューブにサンプルをピペットで入れた。300μLのBuffer BR2及び40μLのプロテイナーゼKを加えた。このサンプルを、ボルテックスにより5秒間混和し、シェーカーインキュベーターを用いて55℃、400～1400rpmで10分間インキュベートした。

【0078】

溶解物を、2mLの処理チューブ（processing tube）に配置されたPAXgene（登録商標）Shredder spin column（紫色）に、ピペットで直接入れ、最高速度（ただし、20,000×gを超えない）で3分間遠心分離した。フロースルー画分の上清の全てを、新しい1.5mLのマイクロ遠心チューブに、処理チューブ内のペレットを乱さないように慎重に移した。350μLのエタノール（96～100%）を加え、ボルテックスにより混和し、短時間遠心分離にかけて、チューブの蓋の内側から水滴を除去した。

【0079】

10

20

30

40

50

700 μ Lのサンプルを、2 mLの処理チューブに配置されたPAXgene（登録商標）RNA spin column（赤）に、ピペットで入れ、8000 $\sim$ 20,000 $\times$ gで1分間遠心分離した。スピncラムを、新しい2 mLの処理チューブに配置した。残ったサンプルを、PAXgene（登録商標）RNA spin columnに、ピペットで入れ、8000 $\sim$ 20,000 $\times$ gで1分間遠心分離した。スピncラムを、新しい2 mLの処理チューブ内に配置し、フロースルーを含有する古い処理チューブを廃棄した。

【0080】

350 μ LのBuffer BR3を、PAXgene（登録商標）RNA spin columnに、ピペットで入れ、8000 $\sim$ 20,000 $\times$ gで1分間遠心分離した。スピncラムを、新しい2 mLの処理チューブに配置し、フロースルーを含有する古い処理チューブを廃棄した。

10

【0081】

70 μ LのBuffer RDDが入った1.5 mLのマイクロ遠心チューブに、10 μ LのDNase Iストック溶液を加えて、軽く混和した。DNase Iインキュベーションミックス（80 μ L）を、PAXgene（登録商標）RNA spin columnメンブレン上に、ピペットによって直接添加し、机上（20 $\sim$ 30 $^{\circ}$ C）に15分間載置した。350 μ LのBuffer BR3を、PAXgene（登録商標）RNA spin columnに、ピペットで入れ、8000 $\sim$ 20,000 $\times$ gで1分間遠心分離にかけた。スピncラムを、新しい2 mLの処理チューブ内に配置し、フロースルー画分を含有する古い処理チューブを廃棄した。

20

【0082】

更に、500 μ LのBuffer BR4を、PAXgene RNA spin columnに加え、8000 $\sim$ 20,000 $\times$ gで3分間遠心分離にかけた。フロースルーを含有するチューブを廃棄して、PAXgene（登録商標）RNAスピncラムを、新しい2 mLの処理チューブに配置して、8000 $\sim$ 20,000 $\times$ gで1分間遠心分離した。

【0083】

フロースルーを含有するチューブを廃棄した。PAXgene（登録商標）RNA spin columnを、1.5 mLのマイクロ遠心チューブ内に配置し、40 μ LのBuffer BR5を、PAXgene（登録商標）RNA spin columnメンブレン上に、ピペットによって直接添加した。カラムを8000 $\sim$ 20,000 $\times$ gで1分間遠心分離して、RNAを溶出した。この工程を、40 μ LのBuffer BR5及び同じマイクロ遠心チューブを用いて繰り返した。

30

【0084】

シェーカーインキュベーター中で、溶出物を、65 $^{\circ}$ Cで5分間振とうさせずにインキュベートした。インキュベーション後、チューブを氷上ですぐに冷やした。RNAサンプルをすぐに使用しない場合は、 -20° C又は -70° Cで保存した。

【0085】

cDNAの合成

40

2x逆転写マスターミックスの調製：適切な回数の反応が行われるように、表4に示すようにマスターミックス（2x）を氷上で調製した（反応数+10%、20 μ L反応あたり）。注：10 μ LのサンプルRNAをマスターミックスに加えて、最終反応量を20 μ Lとした。

【0086】

【表 4】

表 4

成分	1 反応当たりの量 (μL)
10X RT Bufferミックス	2
25X dNTPミックス	0.8
10X RTランダムプライマー	2
50U/μLのMultiScribe逆転写酵素	1
RNaseインヒビター	1
ヌクレアーゼ/RNaseフリーH ₂ O	3.2
トータル量	10

10

【0087】

マスターミックスを数回（5～10回）ボルテックスにより混和し、その後、短時間遠心分離した（1500×g、5～10秒間）。反応混合物を、96ウェルプレートの適切な各ウェルに10μLずつ加えた。

【0088】

マスターミックスへのRNAサンプルの添加：10μLの各RNAサンプルを、96ウェルプレートの適切なウェル（水のネガティブコントロールを含む）に加えて、最終反応量を20μLとした。3回上下にピペッティングすることにより、溶液を緩やかに混合した。96ウェル反応プレートをプレートシールで密閉して、短時間遠心分離した（1500×g、60秒間）。

20

【0089】

ABI9700の設定：ABI9700を下記のように設定した。

ステップ1：25℃で10分間

ステップ2：37℃で120分間

ステップ3：85℃で5秒間

ステップ4：4℃で最終ホールド

反応量は、20μLに設定した。

【0090】

cDNAの事前増幅

事前増幅及びリアルタイムPCRのためのプライマープローブアッセイミックスの調製：100μLの20Xプライマープローブ混合物を、リアルタイムPCR用に調製した。

30

【0091】

0.2X事前増幅アッセイプールの調製：0.2X事前増幅アッセイプールを、表5に示すように調製した。注：下記の量は、400μLの0.2X事前増幅アッセイプールを調製するためのものである。この量は、テストを行うサンプルの数/Taqmanアッセイの数に応じて調製することができる。

【0092】

【表 5】

表 5

事前増幅ストック						
TaqMan アッセイ	TaqMan アッセイの数	ストック アリコート	プライマー プール	1x TE (μL)	最終量 (μL)	最終濃度
20xの濃度	48	4	192	208	400	0.2x

40

【0093】

サンプル及び2xマスターミックスの調製：合成されたcDNA反応プレート及び0.2Xアッセイミックスプールを、氷上に載置した。2X事前増幅マスターミックスを、表6に示すように調製した。

【0094】

50

【表 6】

表 6

成分	1 反応当たりの量 (μL)
2X TaqMan 事前増幅マスターミックス	7.5
0.2X アッセイプール 1	3.75
トータル量	11.25

【0095】

11.25 μL のマスターミックスを、96 ウェル反応プレートの適切なウェルにアリコートした。3.75 μL の各 cDNA サンプル（ポジティブコントロール及びネガティブコントロールの両方を含む）を、マスターミックス反応プレート内の適切なウェルに移して、3 回上下にピペティングすることによって混合し、短時間遠心分離した。

10

【0096】

ABI 9700 の設定：ABI 9700 を下記のように設定した。

ステップ 1：95 °C で 10 分間

ステップ 2：95 °C で 15 秒間

ステップ 3：60 °C で 4 分間

ステップ 4：ステップ 2～3 を 14 サイクルに設定

ステップ 5：4 °C で最終ホールド

反応量を、15 μL に設定した。

20

【0097】

事前増幅物の希釈：事前増幅の完了後、事前増幅反応プレートを短時間遠心分離した（1500 × g で 60 秒間）。IDTE を、各反応ウェルに 135 μL ずつ加えて（1：10 希釈）、3 回上下にピペティングすることによってよく混合し、短時間遠心分離した（1500 × g で 5～10 秒間）。事前増幅物を、その後更に使用するまでの間、-20 °C で保存した。

【0098】

Fluidigm（商標）96.96 リアルタイム PCR

10X アッセイの調製：10X アッセイのアリコートを、表 7 に示す量で調製した。この量は、複数回の実行に合わせて増量することができる。

30

【0099】

【表 7】

表 7

成分	インレット当たりの量 (μL)	余剰分を含むインレット当たりの量 (μL)
20X TaqMan アッセイ	2.5	3
2X アッセイ充填試薬	2.5	3
トータル量	5.0	6

【0100】

サンプルプレミックス及びサンプルの調製：表 8 中の成分を組み合わせ、サンプルプレミックス及び最終サンプル混合物を作製した。この量は、複数回の実行に合わせて増量することができる。

40

【0101】

【表 8】

表 8

成分	インレット当たりの量 (μ L)	余剰分を含むインレット当たりの量 (μ L)
TaqMan(登録商標)Genotyping Mix(2X)	2.5	3
20X GEサンプル充填試薬	0.25	0.3
希釈された事前増幅物	2.25	2.7
トータル量	5.0	6

1. 5 mLのチューブ（チップを完全に満たすのに十分な量）内で、TaqMan Genotyping MixとGEサンプル充填試薬とを組み合わせた。その後、このサンプルプレミックスを、各サンプルに3.3 μ Lずつアリコートすることができる。

10

【0102】

チップの充填：プライム（136x）スクリプトが完了すると、プライムされたチップを、IFCコントローラーHXから取り出した。5 μ Lの各アッセイ及び各サンプルを、チップ上の対応するインレットに、ピペットで入れた。チップを、IFCコントローラーHXへと戻した。IFCコントローラーHXソフトウェアを用いて、ロードミックス（136x）スクリプトを実行して、サンプル及びアッセイをチップに充填した。ロードミックス（136x）スクリプトが完了すると、充填されたチップをIFCコントローラーから取り出した。

20

【0103】

データ収集ソフトウェアの使用：チップをBioMarkにロードして、遺伝子発現アッセイ用の説明書／ラン96.96用プロトコル（run 96.96 specific protocols）に従った。

【0104】

分析：データ分析には、自動検知器を選択した。CT<35及び4つの複写物のうち1つにおいても存在するサンプルは、増幅に関して陽性と考えた。

【0105】

AR軸ーリキッドバイオプシーアッセイの開発手順

プライマーの検証：カスタムデザイン及び再検証Taqman遺伝子発現アッセイを、ABIにオーダーした（表2及び3に、マーカー及び対応する遺伝子番号の詳細がリストされている）。4つの前立腺癌細胞株（VCaP、LNCaP、22RV1、及びPC-3）（これらの遺伝子の大部分を表す）のパネルを、アッセイ及びプライマーの検証に用いた。

30

【0106】

FFPET（formalin fixed paraffin embedded tissue；ホルマリン固定パラフィン包埋組織）由来RNAの検証：これらのマーカーが真に進行性の腫瘍を示すかどうかをテストするために、これらのアッセイを、40個のFFPE前立腺癌及び隣接する正常組織由来のRNAサンプルのセットにおいてテストした。FFPETブロック由来のRNAを、QiagenのAll Prep DNA/RNA FFPET Kitを用いて抽出した。RNA濃度を、Agilent Bio Analyzerで確認した。12 μ Lの量中の総RNA350~500 ngを、QiagenのQuantitect（商標）Reverse Transcription kit及びprotocolを用いて、逆転写した。cDNAの約1/3の事前増幅を、TaqMan PreAmp Master Mix/protocolを用いて、48個のマーカーを含む25 μ Lの反応量中で、14サイクル行った。事前増幅されたcDNAを、1x TEバッファーで1:20の比率に希釈した。希釈された事前増幅物を、96.96 Gene Expressionチップに充填して、ユーザーガイドに従ってBioMarkで実行した。ACTB及びGAPDHを内在性コントロールとして用いた。サンプルに対して、4通りのテストを行った（上述のように、Qiagen DNA-RNA FFPET Kitを用いたRNA抽出）。

40

50

【0107】

PAX gene（登録商標）血液にスパイクした細胞株：全血細胞（WBC）のバックグラウンドにおけるマーカーの発現が異なるかどうかをテストするために、VCaP細胞株を、健常ドナーからのPAX gene（登録商標）（Qiagen、Valencia、CA）血液サンプルに、段階的希釈（10、50、100、及び500細胞）でスパイクした。QiagenのPAX gene（登録商標）Blood RNA protocol（前述）を用いて、総RNAを抽出した。RNA濃度を、Agilent Bioanalyzer systemで測定した。10 μ LのRNAから、Applied BiosystemsのHigh Capacity cDNA Reverse Transcription kit/protocolを用いて、cDNAを調製した。cDNAの約1/3の事前増幅を、TaqMan PreAmp Master Mix/protocol（Applied Biosystems）を用いて、48個の遺伝子マーカーを含む15 μ Lの反応量中で、14サイクル行った。事前増幅されたcDNAを、1x TEバッファーで1:10の比率に更に希釈した。FluidigmのBioMarkユーザーガイドに従って、希釈された事前増幅物を、96.96 Gene Expressionチップに充填して、BioMarkで実行した。各サンプル及びマーカーのテストは重複して行った。その結果、各遺伝子/サンプルに対して4つの値が得られた。ACTB、GAPDH、及びRPL19を内因性コントロールとして使用し、BST1及びPTPRCをWBCコントロールとして使用した。

10

【0108】

20

前立腺癌患者からのPAX gene（登録商標）由来RNAに対するテスト：約170個のマーカーを、143人の前立腺癌患者及び20人の健常な男性対象由来のPAX gene（登録商標）RNAサンプル中でテストした（Capital Biosciences、Cureline、及びConversant Bioから取り寄せた癌サンプル）。進行性と緩慢性又は健常ドナーとで検出が異なっていたマーカーを最終的に残した。

【0109】

ViiA 7（商標）機器でのRT-PCRアッセイにより、BioMarkの結果を確認：BioMark（商標）（Fluidigm、San Francisco、CA）プラットフォームで検出されることが分かったマーカーに対して、ViiA 7（商標）（Life Technologies、Carlsbad、CA）によるテストを更にを行い、これらの結果を検証/確認した。ViiA 7によって順次検証されるマーカーの全てを最終的に残して、リキッドバイオプシーパネルを作成した。

30

【0110】

Fluidigm（登録商標）BioMark（商標）HDシステム：このハイスループットリアルタイムPCRアッセイを、96個のサンプル中の96個の検体を同時に検出可能であり、1回の実行で9,216個のデータポイントを作成可能なFluidigm（登録商標）BioMark（商標）HDシステムを用いて行った。BioMark（商標）HDプラットフォームは、わずか7nLの反応を必要とするサンプル及びアッセイの微小流体分布を用いており、完了までの時間が3時間未満である。

【0111】

40

手順：FFPET由来のRNA及びPAX gene（登録商標）RNAサンプルを、Applied BiosystemsのHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kitを用いて逆転写して、その後、Applied BiosystemsのTaqMan Pre-Amp Master Mixを用いて、cDNAの事前増幅を10/14サイクル行った。事前増幅されたcDNAを希釈して、Applied BiosystemsのViiA 7（商標）又はFluidigm（登録商標）の遺伝子発現用BioMark（商標）プラットフォームでテストした。

【0112】

前立腺癌患者からの全血から特異的に検出されたmRNAマーカーの検出

50

前立腺癌患者及び健常コントロールから採取した全血からのmRNAマーカー発現レベルから成るデータを使用して、アッセイパラメーターを導き出した。アッセイの独立した検証を可能とするため、データを、トレーニングセットとバリデーションセットに70%：30%の比率で分割した。閾値Ctの値を、トレーニングデータの受信者操作特性（ROC）分析に基づいて導き出した。また、アッセイの診断性を、感度、特異度、及びROC曲線下の面積（area under the ROC curve；AUC）を用いて評価した。アッセイを、この検証データにより、独立して評価した。このとき、トレーニングデータから得た閾値を使用して、どの患者が前立腺癌に罹患しているかを予測した。また、アッセイを、感度及び特異度で評価した。表9に、各マーカーに対して決定された閾値Ctの値をリストする。図1に、代表的なマーカーの個別のROC曲線を示す。

10

【0113】

【表9】

表9：選択されたマーカーのセットに関する診断情報

マーカー	用途	カットポイント	トレーニング			バリデーション	
			感度	特異度	AUC	感度	特異度
COL1A1	診断	30.7	0.891	0.846	0.904	0.778	0.875
MYBPC1	診断、高リスク	29.4	0.783	0.769	0.746	0.722	0.375
FAM13C	診断	29.2	0.674	0.692	0.719	0.722	0.5
GPX8	診断	32.9	0.652	0.692	0.676	0.556	0.875
HOXB13	診断、高リスク	31.4	0.457	0.846	0.648	0.278	1
SFRP4	診断	30.1	0.609	0.769	0.635	0.5	0.5
PITX2	診断	29.9	0.5	0.769	0.626	0.5	0.625
PGR	高リスク	30.3	0.457	0.538	0.419	0.389	0.375
KLK3	高リスク	39.1	0.152	1	0.576	0.167	1
KCNN2	高リスク	36.4	0.652	0.462	0.492	0.667	0.75

20

マーカーは、遺伝子記号で表わされている。カットポイントは、各マーカーの検出の閾値Ctの値を示す。感度（Sens）は、そのマーカーが、前立腺癌患者で検出される可能性と同等である。特異性は、そのマーカーが、前立腺癌に罹患していない患者で検出されない可能性と同等である。ROC曲線下の面積（AUC）は、そのマーカーが、前立腺癌患者で検出されるレベルが、健常コントロールよりも高い可能性である。

30

【0114】

全血からのmRNAマーカーの検出に基づいた、高リスク前立腺癌の予測

選択されたマーカーの予後能力を、前立腺癌患者及び健常コントロールから採取した全血におけるmRNAマーカーの発現レベルから成るデータセットにおいて評価した。トレーニングデータにおいて前立腺癌と正常な健常コントロールとを区別するために、閾値を、上述のROC分析を用いて導き出した。臨床リスクファクターとの関連性を、フィッシャー直接確率法を用いて評価した。臨床リスクファクターと顕著な関連性を有する選択されたマーカーを、表10～12にリストする。

【0115】

【表10】

表10：mRNAマーカーの存在／不存在とグリソンスコアとの関連性

マーカー	発現	N	グリソン、低	グリソン、高	p値
HOXB13	不存在	38	31	7	0.0060
	存在	26	12	14	
PGR	不存在	36	19	17	0.0072
	存在	28	24	4	

40

前立腺癌と正常な健常コントロールとの区別を最適に検出するために導き出された閾値を用いて、マーカーの発現を2つに分けた。診断からのグリソンスコアを用いて、患者を

50

、低（グリソン ≤ 6 ）リスクサブセットと高（グリソン ≥ 8 ）リスクサブセットとの2つに分けた。表に、各マーカーが発現した／発現しなかった腫瘍の総数（N）と、グリソン低リスク群及びグリソン高リスク群におけるマーカー検出を表にまとめたものと、を示す。顕著な関連性については、フィッシャー直接確率法（p値）を用いて判定した。

【0116】

【表11】

表11：mRNAマーカーの存在／不存在と診断において測定されるPSA

レベルとの関連性

転写物	発現	N	PSA、低	PSA、高	p値
KLK3	不存在	54	44	10	—
	存在	9	4	5	0.0287
PGR	不存在	35	23	12	—
	存在	28	25	3	0.0385

10

前立腺癌と正常な健常コントロールとの区別を最適に検出するために導き出された閾値を用いて、マーカーの発現を2つに分けた。患者を、低（PSA < 20 ng/mL）リスクサブセットと高（PSA ≥ 20 ng/mL）リスクサブセットとの2つに分けた。表に、各マーカーが発現した／発現しなかった腫瘍の総数（N）と、PSA低リスク群及びPSA高リスク群におけるマーカー検出を表にまとめたものと、を示す。顕著な関連性については、フィッシャー直接確率法（p値）を用いて判定した。

20

【0117】

【表12】

表12：mRNAマーカーの存在／不存在と転移との関連性

転写物	発現	N	LOCAL	MET	p値
PGR	不存在	36	5	31	—
	存在	28	13	15	0.0055
KCNN2	不存在	22	2	20	—
	存在	42	16	26	0.0187
MYBPC1	不存在	15	1	14	—
	存在	49	17	32	0.0482

30

前立腺癌と正常な健常コントロールとの区別を最適に検出するために導き出された閾値を用いて、マーカーの発現を2つに分けた。表に、各マーカーが発現した／発現しなかった腫瘍の総数（N）と、転移性再発した／発現しなかった腫瘍におけるマーカー検出を表にまとめたものと、を示す。顕著な関連性については、フィッシャー直接確率法（p値）を用いて判定した。

【0118】

高リスクの前立腺癌を示す多変量バイオマーカーパネルの識別

40

複数のmRNAバイオマーカーを含むバイオマーカーパネルの識別を、前立腺癌患者及び健常コントロールから採取した全血におけるmRNAマーカーの発現レベルから成るデータセットにおいて行った。16個の遺伝子（ACADL、AGR2、COL1A1、FAM13C、GPX8、GRHL2、HNF1A、HOXB13、KLK2、KLK3、MYBPC1、NR0B1、PITX2、SFRP4、SLCO1B3、TMEFF2）が、前立腺癌サンプルにおいて、健常有志よりも顕著に高い発現を示すことが識別された。これらの16個の遺伝子を、後述するように、多変量バイオマーカーパネルに組み込んだ。閾値を、上述のようにROC分析を用いて導き出した。閾値は、90%の特異度で前立腺癌患者を識別するように、すなわち、90%以上の健常有志が、健常有志として正しく識別されるように選択した。機械学習プロセスを用いて、患者が高リスクとみなされる

50

べき検出陽性バイオマーカーの数を定義した。過剰適応を防止するために、データを、上述のように、トレーニングセットとバリデーションセットとに分割した。トレーニングセットを用いて、最適な数の陽性マーカーを含む分類ルールを定義する。具体的には、トレーニングデータから100個のサンプルをランダムに選択することにより、ブーストラップサンプルを作成した。分類ルールは、予測されるバイオマーカーのステータスと、生化学的再発までの時間との相関を評価することにより、作成した。この相関は、バイオマーカー陽性状態の対象が、バイオマーカー陰性状態の対象よりも早く生化学的再発を経験する可能性を測定する、C統計量（concordance index）を用いて測定された。分類ルールの最適な数の特徴として、8個のマーカーが識別された。すなわち、8個より多い数のマーカーが陽性対象が、バイオマーカー陽性であると判断され、生化学的再発までの時間がより短いと予測される。この分類ルールと生化学的再発までの時間との関連性を、cox回帰分析を用いたサンプルの独立バリデーションセットを用いて検証した。多変量バイオマーカーパネルにより、バイオマーカー陰性の母集団と比較して、生化学的再発までの時間が著しく短い対象のサブセットが識別された（HR = 7.94、p値 = 0.024）。

10

【0119】

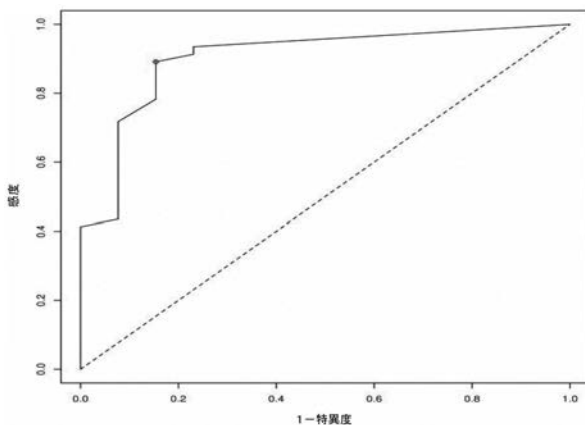
当業者であれば、本発明の好ましい実施形態に対して、多数の変更及び修正を加えることができ、そのような変更及び修正が、本発明の精神を逸脱しない範囲内で行うことができることを理解するであろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨及び範囲に含まれる、そのような等価的な変形の全てを網羅することが意図されている。

20

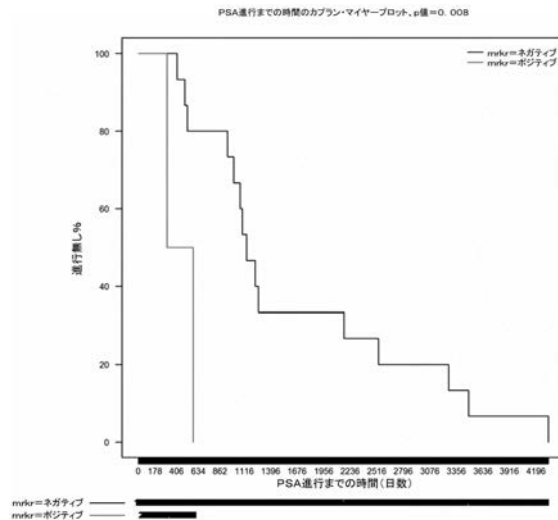
【0120】

本明細書に引用又は記載されている各特許、特許出願、及び刊行物の開示は、その全文において本明細書に参考として組み込まれる。

【図1】

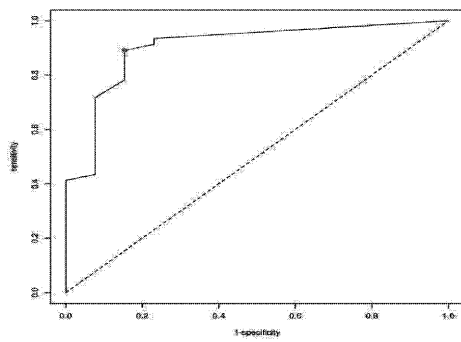


【図2】



バイオマーカー又はバイオマーカーパネルについての例示的な Kaplan-Meier 曲線であり、X 軸が表す特定の時間までに、病気の再発又は病気による死亡などの出来事を経験しなかった対象の割合を示している。

Figure 1



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/022004

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, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/028925 A1 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]) 20 February 2014 (2014-02-20) abstract; claims 1-11; example 1 -----	1-14, 17-27
X	R W ROSS ET AL: "Sensitivity and specificity of a whole-blood RNA transcript-based diagnostic test for the diagnosis of prostate cancer (CaP) compared with prostate-specific antigen (PSA) alone", 2009 ASCO ANNUAL MEETING, 1 January 2009 (2009-01-01), XP055284520, abstract ----- -/--	1-14, 17-27

☒ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 2016

Date of mailing of the international search report

22/09/2016

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

Aguilera, Miguel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/022004

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DAVID OLMOS ET AL: "Prognostic value of blood mRNA expression signatures in castration-resistant prostate cancer: a prospective, two-stage study", LANCET ONCOLOGY, vol. 13, no. 11, 1 November 2012 (2012-11-01), page 1114, XP055284539, GB ISSN: 1470-2045, DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70372-8 abstract -----	1-14, 17-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/022004**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.: 15, 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-14, 17-27(all partially)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/ US2016/ 022004

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-14, 17-27(all partially)

Method of detecting a prostate cancer specific mRNA biomarker in a whole blood sample from a patient comprising measuring the expression level of the KLK3 gene. Method of identifying a patient with high-risk prostate cancer using said method. Method of treating a prostate cancer patient comprising performing said method. Gene chip comprising a primer pair and a probe configured to amplify and detect said gene.

2-46. claims: 1-14, 17-27(all partially)

Method of detecting a prostate cancer specific mRNA biomarker in a whole blood sample from a patient comprising measuring the expression level of the ACADL gene. Method of identifying a patient with high-risk prostate cancer using said method. Method of treating a prostate cancer patient comprising performing said method. Gene chip comprising a primer pair and a probe configured to amplify and detect said gene.

[idem for each one of the genes listed in claim 1]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/ US2016/ 022004

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 15, 16

Although claims 15-16 are directed to methods of treatment of the human or animal body by therapy (Rule 39.1(iv) PCT), a search can usually be carried out based on the alleged effects of the compound used for treatment. However, this is not possible in the present case, because claims 15-16 do not mention any such compound or medicament. Claims 15-16 are therefore excluded from this search and opinion.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/022004

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014028925 A1	20-02-2014	AU 2013302406 A1	26-03-2015
		CA 2882253 A1	20-02-2014
		EP 2885428 A1	24-06-2015
		US 2015191792 A1	09-07-2015
		WO 2014028925 A1	20-02-2014

フロントページの続き

(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

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 リッチ, デボラ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08869, ラリタン, ルート 22 920

(72)発明者 ゴームレイ, マイケル

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1400

(72)発明者 トーマス, シブ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1400

(72)発明者 ラジュプロヒット, ヤショダ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1400

(72)発明者 シェーファー, マイケル

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, ウェルシュ アンド マッキーン ローズ

Fターム(参考) 4B063 QA13 QA19 QQ03 QQ28 QQ43 QR32 QR36 QR42 QR55 QR62

QS25