



(10) **DE 10 2015 114 026 A1** 2017.03.02

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2015 114 026.8**

(22) Anmeldetag: **24.08.2015**

(43) Offenlegungstag: **02.03.2017**

(51) Int Cl.: **G01N 33/68 (2006.01)**

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(71) Anmelder:
**Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften-
ISAS-e.V., 44139 Dortmund, DE**

(72) Erfinder:
**Beine, Birte, 44789 Bochum, DE; Henkel, Corinna,
Dr., 44789 Bochum, DE**

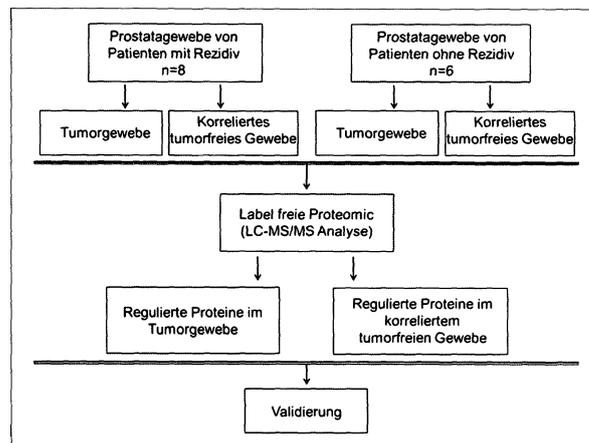
(74) Vertreter:
Simandi Patentanwälte, 53773 Hennef, DE

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Biomarker-Panel für die Diagnose von rezidivem Prostatakrebs**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs, wobei eine Bestimmung mittels ausgewählter Biomarker erfolgt. Ferner betrifft die Erfindung hierzu geeignete Kombinationen von Biomarkern-Biomarker-Panel samt Kit, insbesondere zur in-vitro Diagnostik.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs, wobei eine Bestimmung mittels ausgewählter Biomarkern erfolgt. Ferner betrifft die Erfindung hierzu geeignete Kombinationen von Biomarkern-Biomarker-Panel samt Kit, insbesondere zur in-vitro Diagnostik.

[0002] Ein geeigneter Biomarker(-Panel) soll die Diagnose des aggressiven, rezidivierenden Prostatakarzinoms (PCa) zu einem frühestmöglichen Zeitpunkt erlauben. Prostatakrebs ist die häufigste Krebserkrankung von Männern in Deutschland. Die Zahl der Neuerkrankungen ist in den letzten Jahren stetig angestiegen, in 2011 lag sie bei 64.515 Fällen [1]. Die Anzahl der durch Prostatakrebs bedingten Todesfälle, ist ebenfalls zwei Jahrzehnte in Deutschland stetig gestiegen. Seit 2003 jedoch, ist die alters-standardisierte Todesrate nahezu konstant geblieben. In 2011 verstarben 13.324 Männern an dieser Krankheit [1]. Eine große Herausforderung bei der Erkennung und Behandlung von Prostatakrebs ist die Einschätzung des Rezidivrisikos für die Patienten. Derzeit gibt es im Stand der Technik kein Verfahren, das eine zuverlässige Aussage über die Tumorprogression der Prostata ermöglicht. Die vollständige Entfernung der Prostata sichert häufig keinen Überlebensvorteil, führt jedoch zur starken Einschränkungen der Lebensqualität, bedingt durch Nebenwirkungen wie Impotenz oder Inkontinenz. Die Einschätzung der Aggressivität der Tumore und des Rezidivrisikos einzelner Patienten vor Entfernung der Prostata ist nicht möglich. Anhand des Levels an Prostataspezifischen Antigen (kurz: PSA) im Serum der Patienten ist es bisher lediglich möglich, die Rezidivprogression postoperativ zu überwachen [2]. Der Anstieg von PSA nach einer Prostatektomie ist ein sicherer Hinweis auf ein Rezidiv und aggressiven Krebs, als Biomarker zur Detektion von aggressivem Prostatakrebs vor Entfernung der Prostata, ist PSA jedoch nicht nutzbar [2]. Für die notwendige personalisierte Therapie von Prostatakrebspatienten werden dringend neue diagnostische Tests benötigt, die Aufschluss über die individuelle Tumorprogression eines Patienten geben. Für die Entwicklung der klinischen Testverfahren werden zunächst entsprechende Targets/Antigene bzw. Biomarker benötigt.

[0003] Derzeit gibt es keine Methode, die eine zuverlässige Aussage über die Tumorprogression der Prostatakarzinome ermöglicht. Noch heute ist der Goldstandard in der Diagnose des PCa der histopathologische Befund von Nadelbiopsien. Die Biopsie der Prostata ist ein invasiver Eingriff der häufig Komplikationen bei den Patienten hervorruft. So können neben Blutungen, Schmerzen, Entzündungen und Fieber beim Patienten auftreten [3, 4]. Ein Maß zur Einschätzung der Tumorprogression ist die histologische Charakterisierung des Tumors nach dem so genannten Gleason Scoring. Der Gleason Score beschreibt den Differenzierungsgrad der Prostatadrüsen [5]. Es existiert jedoch kein allgemeingültiger Zusammenhang von Gleason Score und Rezidivrisiko des Patienten. Ein bekannter jedoch in der Diagnostik gescheiterter Biomarker ist das Protein PSA. PSA ist im Serum detektierbar, ist jedoch kein ausreichend tumorspezifischer Biomarker. Heute wird PSA für das Monitoring von Patienten nach einer Prostatektomie eingesetzt. Wird nach einer Prostatektomie PSA im Serum eines Patienten detektiert, liegt ein sogenanntes biochemisches Rezidiv vor [1]. Trotz intensiver Bemühungen konnte bisher kein Biomarker identifiziert werden der zwischen aggressiven und indolenten Tumoren unterscheiden kann und in der Klinik Anwendung findet. Es besteht ein dringender Bedarf von Biomarkern sowohl für die immunhistologische Diagnostik als auch für die nicht invasive Diagnostik des PCa bzw. in-vitro Diagnostik.

[0004] Zwecks einer geeigneten Therapie von rezidivem Prostatakrebs bedarf es einer frühen Diagnose und Differenzierung in Verbindung mit der Notwendigkeit klinische Entscheidungen zu treffen.

[0005] Nachteilig an bekannten Diagnoseverfahren unter Verwendung der bisher bekannten Marker ist jedoch, dass eine frühzeitige und vollständige Erfassung von Risikopatienten nicht gelingt und daher eine Diagnose nur ungenügend oder gar zu spät erfolgt.

[0006] Eine der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht daher darin, ein Verfahren zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs zu entwickeln, das eine verbesserte frühzeitige Diagnose sowie verbesserte Erfassung von Risikopatienten ermöglicht und den Therapieerfolg verbessert, insbesondere vor Entfernung der Prostata (Prostatektomie).

[0007] Ferner ist nachteilig, dass im Stand der Technik zumeist keine hinreichende Sensitivität und/oder Spezifität der Marker erreicht wird. Zum Beispiel besteht eine wesentliche Schwierigkeit in der Frühdiagnose von rezidivem Prostatakrebs im Fehlen eines spezifischen Biomarkers (siehe supra zu PSA).

[0008] Gemäß der vorliegenden Erfindung konnten mittels einer gewebebasierten massenspektrometrischen Versuchsdurchführung Proteine als potentielle Biomarker identifiziert werden, die Tumore von Patienten mit

und ohne PCa-Rezidiv voneinander unterscheiden können. Prostatakarzinome sind sehr heterogene Tumore. Für die Identifizierung der spezifischen Biomarker ist die hohe Qualität der verwendeten Proben als auch die hervorragende Begutachtung der individuellen Fälle durch Pathologen erforderlich. Alle Prostatakrebspatienten in den durchgeführten Versuchen wurden einer Prostatektomie unterzogen, die Gewebe wurden pathologisch begutachtet und es wurden über mehrere Jahre Daten über die gesundheitliche Entwicklung der Patienten erhoben. Anhand eines regelmäßigen PSA Monitoring wurde die Entstehung eines Rezidivs beobachtet und dokumentiert. Für die Analyse der Gewebe wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: Patienten mit entwickeltem Rezidiv und Patienten, die kein Rezidiv entwickelten. Die Fälle wurden hinsichtlich histologischer und pathologischer Charakteristika gematcht (Gleason Score, TNM-Status, negativer Resektionsrand), außerdem wurden alle die Patienten von den Versuchen ausgeschlossen, die bereits vor der Prostatektomie eine Therapie erhalten hatten. Durch den Ausschluss dieser Patienten wurden artifiziell induzierte Effekte auf die Biochemie des Tumors ausgeschlossen. Die Versuche zeichnen sich durch die hoch spezialisierte Isolierung von Tumorzellen aus. Die hohe Spezifizierung wurde durch die gezielte Isolierung von Tumorzellen mittels lasergestützter Mikrodisektion möglich. Mittels labelfreier Massenspektrometrie wurden die Tumorphoteome der beiden Patientengruppen miteinander verglichen. Durch diesen Vergleich konnten differentiell regulierte Proteine identifiziert werden, die mit statistischer Signifikanz (siehe Fold Change) die Gruppen voneinander trennen und in Tabelle 1 dargestellt sind.

[0009] Die Aufgabe wird daher durch ein Verfahren zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs gelöst, wobei eine Bestimmung mindestens eines der Polypeptide / Proteine ausgewählt aus der Gruppe der genannten Proteine gemäß Tabelle 1, insbesondere SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 54 oder jeweils Fragmente oder Teilpeptide davon an oder von einem zu untersuchenden Patienten erfolgt (nachstehend erfindungsgemäßes Verfahren).

[0010] Die Erfindung betrifft ebenfalls solche Aminosäure-Sequenzen (Polypeptide, Proteine), die eine Sequenzidentität oder Homologie von 70% und mehr, vorzugsweise von 80% und mehr, besonders bevorzugt von 90–95% und mehr mit SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 54 aufweisen. Ebenfalls mit eingeschlossen sind solche analoge Aminosäure-Sequenzen, die aufgrund des Austausches von einer oder mehreren Aminosäure (n) in diesen Sequenzen, dennoch die gewünschte Funktion eines Biomarkers zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs gewährleisten. Erfindungsgemäß ausdrücklich eingeschlossen sind insbesondere Teilpeptide oder Fragmente von SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 54.

[0011] Die erfindungsgemäßen Proteine (Biomarker) erweisen sich wie folgt:

Tabelle 1:

SEQ ID No.	Accession Uni-Prot/Swiss-Prot	Fold Change	Gene	Protein
1	Q99574	434,701119	SERPINI1	Neuroserpin
2	P47736	10,3179897	RAP1GAP	Rap1 GTPase-activating protein 1
3	Q9NX05	9,47936224	FAM120C	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 2
4	O00422	8,62108829	SAP18	Histone deacetylase complex subunit SAP18
5	P02511	7,14968658	CRYAB	Alpha-crystallin B chain
6	P47985	5,17263718	UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial
7	Q16540	4,59753322	MRPL23	39S ribosomal protein L23, mitochondrial
8	Q9Y5Q9	4,54232206	GTF3C3	General transcription factor 3C polypeptide 3
9	P17812	3,85181924	CTPS1	CTP synthase 1
10	Q8IWA4	2,88505736	MFN1	Mitofusin-1
11	O76062	2,50336733	TM7SF2	Delta(14)-sterol reductase
12	Q8TAE8	2,47536282	GADD45GIP1	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1

13	Q5VT66	2,29575709	MARC1	Mitochondrial amidoxime-reducing component 1
14	Q9BXP2	2,09899685	SLC12A9	Solute carrier family 12 member 9
15	Q13084	2,08712933	MRPL28	39S ribosomal protein L28, mitochondrial
16	P50148	2,00199726	GNAQ	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha
17	Q8NEU8	1,98739687	APPL2	DCC-interacting protein 13-beta
18	Q9BTX1	1,94833263	NDC1	Nucleoporin NDC1
19	Q9BZV1	1,82673834	UBXN6	UBX domain-containing protein 6
20	P02748	1,80819466	C9	Complement component C9
21	Q9NRF8	1,76343696	CTPS2	CTP synthase 2
22	Q6UXV4	1,71035998	APOOL	MICOS complex subunit MIC27
23	Q9Y2Q0	1,70725671	ATP8A1	Phospholipid-transporting ATPase IA
24	O60784	1,70596731	TOM1	Target of Myb protein 1
25	Q9H223	1,67405857	EHD4	EH domain-containing protein 4
26	Q8NE01	1,6471592	CNNM3	Metal transporter CNNM3
27	Q7Z2W7	1,63910696	TRPM8	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8
28	O15020	1,56776574	SPTBN2	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2
29	O15269	1,52096821	SPTLC1	Serine palmitoyltransferase 1
30	O43488	-1,52692754	AKR7A2	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2
31	Q9Y2H6	-1,54109511	FNDC3A	Fibronectin type-III domain-containing protein 3A
32	P23381	-1,58456831	WARS	Tryptophan-tRNA ligase, cytoplasmic
33	Q9Y3Q3	-1,60414618	TMED3	Transmembrane emp24 domain-containing protein 3
34	P13804	-1,60501137	ETFA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial
35	Q15435	-1,61918989	PPP1R7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7
36	P38117	-1,64315128	ETFB	Electron transfer flavoprotein subunit beta
37	Q9P2R7	-1,7068819	SUCLA2	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial
38	Q15293	-1,7270237	RCN1	Reticulocalbin-1
39	P26639	-1,72881925	TARS	Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic
40	Q13451	-1,79906061	FKBP5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5
41	Q9NP61	-1,82608643	ARFGAP3	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3
42	P07947	-1,84722983	YES1	Tyrosine-protein kinase Yes
43	P08727	-2,16474718	KRT19	Keratin, type I cytoskeletal 19
44	O75674	-2,18341	TOM1L1	TOM1-like protein 1

45	P02747	-2,2808604	C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C
46	Q99538	-2,48514548	LGMN	Legumain
47	P36959	-2,50270965	GMPR	GMP reductase 1
48	Q14019	-2,56941981	COTL1	Coactosin-like protein
49	Q96AQ6	-2,77405581	PBXIP1	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1
50	P01877	-3,3034124	IGHA2	Ig alpha-2 chain C region
51	P08294	-3,6553748	SOD3	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]
52	Q14573	-4,07738514	ITPR3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3
53	P15907	-4,81753027	ST6GAL1	Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1
54	O15258	-12,0748768	RER1	Protein RER1

[0012] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind Kombinationen (Unterkombination aus der obigen Gesamtheit aller erfindungsgemäßen Biomarker) der erfindungsgemäßen Biomarker zur Diagnose vorteilhaft. Besonders bevorzugt ist jedoch SEQ ID No. 1 (Neuroserpin), SEQ ID No. 2 bis SEQ ID No. 6. Weiterhin bevorzugt ist ein Panel enthaltend mindestens SEQ ID No. 1 neben mindestens einer weiteren SEQ ID No. 2 bis SEQ ID No. 54, insbesondere SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 2 bis SEQ ID No. 6.

[0013] Darüber hinaus ist bevorzugt ein Panel enthaltend mindestens drei Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 54, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 3, und SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 6.

[0014] Gegenstand der Erfindung ist daher ein Panel (Anordnung) von Markern für die Diagnose von rezidivem Prostatakrebs umfassend mindestens zwei oder drei verschiedene Biomarker unabhängig voneinander ausgewählt aus den Sequenzen SEQ ID No. 1 bis 54, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 3, und SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 6, Homologen der Sequenzen SEQ ID No. 1 bis 54 mit mindestens 95 % Homologie und Teilsequenzen von SEQ ID No. 1 bis 54 und Teilsequenzen der Homologen von SEQ ID No. 1 bis 54 mit mindestens 95 % Homologie.

[0015] Aufgrund der hohen klinischen und serologischen Heterogenität der rezidiven Prostatakrebs-Erkrankung ist es schwierig, mit nur einem Biomarker rezidiven Prostatakrebs eindeutig zu diagnostizieren. Daher ist es oft erforderlich, möglichst unkorrelierte Antigene zu sogenannten Paneln von Markern („Biomarker-Panel für rezidiven Prostatakrebs“) zu kombinieren. Beispielsweise im Rahmen der individualisierten Medizin können entsprechende Panel von erfindungsgemäßen Biomarkern für rezidiven Prostatakrebs für einzelne Patienten oder Patientengruppen individuell zusammengestellt werden.

[0016] Der Begriff „rezidiven Prostatakrebs“ umfasst erfindungsgemäß einen solchen Prostatakrebs bzw. Prostatakarzinom oder entsprechenden Tumor, der mit einem Rezidivrisiko einhergeht, d.h. das Wiederauftreten eines Prostatakrebs nach erfolgter Erstbehandlung am Patienten.

[0017] Die Erfindung betrifft ebenfalls die Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Risiko oder/und einer ungünstigen Prognose eines rezidiven Prostatakrebs, insbesondere bei symptomatischen und / oder asymptomatischen Patienten.

[0018] Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht daher klinische Entscheidungen, die zu einem schnellen Therapieerfolg und zur Vermeidung von Todesfällen führen. Solche klinische Entscheidungen umfassen ebenfalls weiterführende Behandlungen mittels Arzneimitteln zur Behandlung oder Therapie von rezidivem Prostatakrebs als auch eine Entscheidung zur Prostatektomie.

[0019] Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur Diagnose von Patienten mit rezidivem Prostatakrebs zur Durchführung von klinischen Entscheidungen, wie weiterführende Behandlung und Therapie mittels Arzneimitteln.

[0020] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Diagnose zur Prognose, zur differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung, zur Beurteilung des Schweregrades und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung.

[0021] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Diagnostik zur Früh- oder Differentialdiagnose oder Prognose von rezidivem Prostatakrebs, wobei eine Bestimmung der erfindungsgemäßen Biomarker an oder von einem zu untersuchenden Patienten durchgeführt wird.

[0022] In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dem zu untersuchenden Patienten Gewebeprobe oder Körperflüssigkeit (Blut, Plasma, Prostatagewebe) entnommen, und die Diagnose erfolgt in vitro/ex vivo, d.h. außerhalb des menschlichen oder tierischen Körpers. Aufgrund der Bestimmung der erfindungsgemäßen Marker wird eine hohe Signifikanz für das rezidive Prostatakrebs erzielt und anhand der vorhandenen Menge oder deren Veränderung (Levelierung: Erhöhung / Erniedrigung) in mindestens einer Patientenprobe kann die Diagnose erfolgen.

[0023] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann das erfindungsgemäße Verfahren im Rahmen einer in-vitro Diagnose mittels parallelen oder simultanen Bestimmungen der Marker durchgeführt werden (z.B. Multititerplatten mit 96 und mehr Kavitäten), wobei die Bestimmungen an mindestens einer Patientenprobe durchgeführt werden.

[0024] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann das erfindungsgemäße Verfahren mit Hilfe einer 2D-Elektrophorese erfolgen, wobei in der ersten Dimension eine isoelektrische Fokussierung, in der zweiten Dimension eine Gelelektrophorese durchgeführt wird (im weitesten Sinne ist hierzu die Proteomforschung („Proteomics“) anzuwenden).

[0025] In einer weiteren Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Verfahren und dessen Bestimmungen mittels einem Schnelltest durchgeführt werden (z.B. lateral-flow Test), sei es in Einzel- oder Multiparameterbestimmung.

[0026] Der Fachmann ist in der Lage ausgewiesene Sonden und Antikörper zur Detektion der erfindungsgemäßen Biomarker herzustellen und einzusetzen, siehe unten.

[0027] In einer weiteren Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Verfahren in-vivo durchgeführt werden, wobei die erfindungsgemäßen Biomarker mit einer Sonde, insbesondere ein Antikörper, die ein Kontrastmittel aufweisen markiert und mit einem in der Bildgebung geeigneten Detektor („Molecular Imaging“) nachgewiesen werden (Ralph Weissleder, Molecular Imaging in Cancer, Science, Vol. 312, 1168 (2006)).

[0028] Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Biomarker zur Diagnose und / oder Prognose und/oder zur Früh- oder Differentialdiagnose von rezidivem Prostatakrebs.

[0029] Die Erfindung betrifft zudem ein Kit oder eine diagnostische Vorrichtung zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren, insbesondere enthaltend Nachweisreagenzien und weitere Hilfsmittel. Solche Nachweisreagenzien umfassen z.B. Antikörper etc.

[0030] Im Rahmen dieser Erfindung wird unter einer solchen diagnostischen Vorrichtung, insbesondere ein Array oder Assay verstanden (z.B. Immunoassay, ELISA etc.), insbesondere ein Proteinbiochip (US6346413B1. US20050014292) im weitesten Sinne eine Vorrichtung zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren.

[0031] Der Nachweis und die Quantifizierung der erfindungsgemäßen Biomarker kann ebenfalls mit Hilfe weiterer, dem Fachmann geläufiger Protein-Diagnoseverfahren durchgeführt werden, insbesondere unter Verwendung radioaktiv oder fluoreszenzmarkierter Antikörper. Zu nennen sind hier insbesondere dazu geeignete bioanalytische Verfahren, wie zum Beispiel Immunhistochemie, Antikörperarrays, Luminex, ELISA, Immunfluoreszenz, Radioimmunoassays sowie weiteren geeigneten bioanalytischen Verfahren, wie zum Beispiel massenspektrometrischen Verfahren, z.B. MRM (Multi reaction monitoring) oder AQUA (absolute Quantification), mit deren Hilfe die Biomarker quantitativ gemessen werden können, durchgeführt werden.

[0032] Nachfolgende Beispiele und Abbildungen dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung, jedoch ohne die Erfindung auf diese Beispiele und Abbildungen zu beschränken.

Beispiele und Abbildungen:

Experimentelles Design

[0033] Ziel der Studie war die Identifizierung von Unterschieden in den Tumorproteomen von Prostatakrebspatienten mit und ohne Rezidiventwicklung nach einer radikalen Prostatektomie.

Abb. 1:

[0034] Die **Abb. 1** zeigt das experimentelle Design schematisch und zeigt den Workflow zur Identifizierung von Biomarkern. Tumorgewebe und korrelierendes tumorfreies Gewebe von Prostatakrebspatienten mit oder ohne Rezidiv wurde mittels labelfreier Massenspektrometrie analysiert.

Beispiel 1:

Klinische Daten

[0035] Das Tumorgewebe von 14 Prostatakrebspatienten wurde für eine differenzielle labelfreie Proteomstudie verwendet. Die Patientenproben wurden hinsichtlich ihres Tumorstatus (TNM System, T3a/b, N0, M0) und Gleason Scores (Differenzierung der Drüsen, Gleason 7) gematcht. Es wurden Patienten mit und ohne Entwicklung eines Rezidivs nach radikaler Prostatektomie untersucht. Vor der Operation erhielten die Patienten weder eine Hormontherapie, noch Bestrahlung. Alle Patienten wiesen nach der Prostatektomie einen negativen Resektionsrand auf (R0). Die Patienten dieser Studie wurden in der Klinik für Urologie der Uniklinik RWTH Aachen behandelt. Die Prostatektomieproben wurden nach der Operation in flüssigen Stickstoff schockgefroren und unter Tieftemperatur (-80°C) gelagert. Die Befundung der Gewebeproben wurde in der Pathologie der Uniklinik RWTH Aachen nach dem UICC TNM Systems [1] durchgeführt. Die Follow-up Informationen über den Krankheitsverlauf der Patienten wurden gesammelt und dokumentiert. Ein Rezidiv wurde definiert als der Anstieg von Prostata spezifischen Antigen (PSA) im Blut der Patienten ($> 0,2 \text{ ng/ml}$). In dieser Studie wurden Patienten untersucht die im Mittel nach 38 Monaten ein Rezidiv entwickelten. Das Follow-up der rezidivfreien Patienten wurde im Mittel über 56 Monate gesammelt.

Beispiel 2:

Probenpräparation

[0036] Wenn nicht anders gekennzeichnet wurden für alle Schritte der Probenpräparation Chemikalien mit einem geeigneten Reinheitsgrad für Massenspektrometrie verwendet.

Beispiel 3:

Gewebepräparation

[0037] Nach der Prostatektomie wurde das Gewebe im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei Tieftemperaturen (-80°C) gelagert. Für die labelfreie Proteomstudie wurden $10 \mu\text{m}$ dicke Schnitte auf Glasträgern angefertigt und von einem Pathologen begutachtet. Nach der Befundung wurden $10 \mu\text{m}$ dicke Schnitte auf PEN-Slides (Zeiss, München, GER) für die Lasermikrodissektion aufgebracht. Um einen proteolytischen Abbau der Proteine zu vermeiden und die Gewebestrukturen zu konservieren wurden die Schnitte in einer Ethanolreihe fixiert (70 %, 1 min, 100 %, 5 sec). Die Schnitte wurden bis zur Lasermikrodissektion in luftdichten Boxen bei -80°C gelagert.

Beispiel 4:

Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung

[0038] Um die Gewebestrukturen und Zellen für die Lasermikrodissektion zu visualisieren, wurde eine HE Färbung durchgeführt. Alle Lösungen für die Färbung der Gewebeschnitte wurden gekühlt (4°C), Leitungswasser wurde mit Proteaseinhibitoren versetzt (complete EDTA free protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, GER). Nach kurzem Eintauchen in Leitungswasser, wurden die Schnitte 2 min in Hämatoxylin (Sigma Aldrich Co. LLC, MO, USA) inkubiert, gefolgt von einer erneuten Inkubation in Leitungswasser zum Bläuen des Gewebes. Eosin Y (0,5 %) wurden zum Anfärben der Bindegewebsanteile benutzt, der

Schnitt wurde wenige Sekunden inkubiert. Das Gewebe wurde dann durch eine Ethanolreihe (50 %, 70 %, 95 %, je 15 sec und 100 %, 1 min) dehydriert und anschließend mikrodisssektiert.

Beispiel 5:

Lasermikrodisssektion

[0039] Um die Tumorzellen und Epithelzellen gezielt aus dem Gewebeverbund isolieren und analysieren zu können, wurde eine lasergestützte Mikrodisssektion (PALM MicroBeam, Zeiss) vorgenommen. Für jeden Patienten und jede experimentelle Bedingung (siehe **Abb. 1**) wurde 1 mm² Tumorzellen bzw. korrespondierende tumorfreie Drüsenzellen isoliert. Die Zellen wurden in Aufschlusspuffer (0,1 M Ammoniumbicarbonat, 0,1 % RapiGest™ surfactant (Waters GmbH, Eschborn, GER, pH 8.3)) gesammelt und bei -80°C gelagert.

Beispiel 6:

Verdau und Identifizierung von Proteinen

[0040] Für die labelfreie Flüssigchromatographie und anschließende Massenspektrometrie (liquid chromatography mass spectrometry LC-MS/MS) wurden die gesammelten Zellen zuerst aufgeschlossen und dann proteolytisch mit Trypsin verdaut. Für die Lyse der Zellen wurden die Proben zweimal in eisgekühlten Wasser sonifiziert (1 min, 20 sec). Die Proben wurden zentrifugiert und die Proteine bei 95°C (5 min) denaturiert. Die denaturierten Proteine wurden mit Dithiothreitol (Endkonzentration von 5 mM) reduziert (60°C, 30 min) und mit Iodacetamid (Endkonzentration 15 mM) unter Lichtausschluss alkyliert (Raumtemperatur, 30 min). Der proteolytische Verdau wurde mit Trypsin (Serva Electrophoresis, Heidelberg, GER) in einem Verhältnis von 1:20 zur Probe über Nacht bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde unter Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA, Sigma Aldrich Co. LLC, Endkonzentration von 0,5 %) gestoppt. Das Detergenz RapiGest und die PEN-Membran wurde mittels Zentrifugation (16.000 g, 10 min) aus der Probe gefällt. Die Peptidkonzentration wurde mittels Aminosäuresequenzanalyse (ASA) bestimmt. Dazu wurde eine ACQUITY-UPLC mit einer AccQ Tag Ultra-UPLC Säule (Waters), kalibriert mit Pierce Amino Acid Standard (Thermo Scientific, Bremen, GER) eingesetzt. Die Peptide wurden für die LC-MS/MS Analyse in 0,1 % TFA gelöst. Jede Probe wurde in technischen Triplikaten vermessen.

Beispiel 7:

Labelfreie Massenspektrometrie

LC-MS/MS Analyse

[0041] Die LC-MS/MS wurde mit einem Ultimate 3000 RSLnano System gekoppelt an ein Orbitrap Elite Massenspektrometer (beides Thermo Scientific, Bremen, GER) durchgeführt. Für jede Analyse wurden 330 ng Peptide für auf einer Vorsäule (Acclaim® PepMap 100, 75 µm × 2 cm, nano Viper, C18, 3 µm, 100 Å) aufkonzentriert (7 min, 30 µl/min). Die Auftrennung der Probe wurde über eine analytische Säule (Acclaim® PepMap RSLC, 75 µm × 50 cm, nano Viper, C 18, 2 µm, 100 Å) mit einem Gradienten von 5 % bis 40 % Lösemittel B über 98 min durchgeführt (Lösemittel A, 0.1% Ameisensäure; Lösemittel B, 0.1% Ameisensäure, 84% Acetonitril). Die Flussgeschwindigkeit wurde dabei auf 400 nl/min, die Temperatur des Säulenofens auf 60°C eingestellt. Das Massenspektrometer operierte im „Data dependent mode“. Die Full-Scan Massenspektren wurden mit einer Auflösung von 60.000 in der Orbitrap aufgenommen, die Tandemmassenspektren der 20 höchst abundanten Peaks wurden in der linearen Ionenfalle nach der Peptidfragmentierung durch CID (collision induced dissociation) gemessen.

Beispiel 8:

Peptidquantifizierung und Filtern

[0042] Für die labelfreie Quantifizierung basierend auf Ionenintensitäten wurde Progenesis LC-MS™ (v.4.1, Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) genutzt. Nach dem Import des Rohdatenformats der gemessenen Proben, wurde der repräsentativste LC-MS/MS-Lauf als Referenz-Probe ausgewählt. Die Retentionszeiten der Vorläufermassen aller Läufe wurden demnach dem Referenzlauf angeglichen. Aus der generierten Feature Liste die alle m/z Werte der gemessenen Peptide enthält, wurden in einem weiteren Schritt nur die 2-, 3- und 4-fach positiv geladenen für die Quantifizierung genutzt. Nachfolgend wurden alle Abundanzen der

Rohdaten, für jedes Feature, automatisch normalisiert um die experimentellen Unterschiede auszugleichen. In diesem Schritt wurden auch die quantitativen Abundanzen aller Proben im Verhältnis zum Referenzlauf berechnet, logarithmiert und angepasst. Diese logarithmische Transformation ist nötig damit sowohl hoch- als auch herunterregulierte Features mit einbezogen werden. Basierend auf diesen Daten, stellt der anti-log des Mittels (Ratio) einen globalen Faktor für die Skalierung jedes einzelnen LC-MS Laufs dar. Dies wird genutzt, um dann alle Läufe hinsichtlich experimenteller und technischer Abweichungen anzupassen. Diese Unterschiede können z.B. die in das Massenspektrometer eingeführten Peptidmenge oder unterschiedliches Ionisierungsverhalten der Proben sein. In einem letzten Schritte werden die LC-MS-Läufe nach dem experimentellen Design für die weitere Analyse gruppiert.

Beispiel 9:

Proteinidentifizierung

[0043] Die Proteine wurde mittels Proteome Discoverer (ver.1.4.1.14, DBVersion:79, Thermo Scientific) und der UniProt Datenbank (Release 2014_11, 546.790 Einträge) via MASCOT (ver. 2.5.0) (Matrix Sciences Ltd., London, UK) identifiziert. Es wurden folgende Suchparameter eingestellt: Als variable Modifikation Oxidation am Methionin, als statische Modifikation eine Carbamidomethylierung am Cystein; Tryptischer Verdau mit 1 „missed cleavage“, eine Vorläuferionen Massentoleranz von 5 ppm und einer Fragmentionen Massentoleranz von 0,4 Da. Um die Ergebnisse weiter zu Filtern und eine „False Discovery Rate (FDR)“ auf Peptidebene von 1 % zu erlauben, wurde das Percolator Tool in den Proteom Discoverer Workflow integriert. Die Ergebnisse des Datenbankabgleichs wurden in Progenesis LC-MS™ importiert. Durch das Einfügen der Ergebnisse des Datenbankabgleichs wurde jedes Peptid einem vorher quantifizierten Feature zugeordnet.

Beispiel 10:

Proteinquantifizierung und Filtern

[0044] Für die Quantifizierung der Proteine wurden nur die „unique peptides“ eines Proteins betrachtet und die Proteingruppierungsfunktion von Progenesis LC-MS™ wurde nicht genutzt. Die Signifikanz der Unterschiede in der Proteinexpression wurde mittels einer ANOVA getestet. Der ANOVA p Wert wurde basierend auf dem statistischen Mittel der drei Technischen Replikate jeder Probe berechnet. Proteine, welche nicht den Signifikanzkriterien (ANOVA p Wert ≤ 0.05) entsprachen, wurden entfernt. Ebenso Proteine, die eine geringere Regulierung der Proteinexpression als 1,5 zeigten.

Beispiel 11:

Analyse deregulierter Proteine

[0045] Um die Einflüsse der Proteinderegulierung auf den Organismus einschätzen zu können, wurde neben klassischer Literaturreche eine automatisierte Pathway Analyse durchgeführt. Dazu wurde die Software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA Version 24390178, 2015, www.ingenuity.com, QIAGEN, Hilden, Germany) genutzt.

Literatur:

- [1] Robert Koch Institut, Prostate cancer, ICD-10 C61, Stand 12.02.2015
- [2] Guidelines on Prostate Cancer, PROSTATE CANCER UPDATE APRIL 2014, N. Mottet (chair), P.J. Bastian, J. Bellmunt, R.C.N. van den Bergh, M. Bolla, N.J. van Casteren, P. Cornford, S. Joniau, M.D. Mason, V. Matveev, T.H. van der Kwast, H. van der Poel, O. Rouvière, T. Wiegel
- [3] MRI-guided core needle biopsy of the prostate: acceptance and side effects. Egbers N1, Schwenke C, Maxeiner A, Teichgräber U, Franiel T. Diagn Interv Radiol (Ank). 2015 May-Jun; 21(3): 215–21. doi: 10.5152/dir.2014.14372.
- [4] Pain and morbidity of an extensive prostate 10-biopsy protocol: a prospective study in 289 patients. Peyromaure M1, Ravery V, Messas A, Toublanc M, Boccon-Gibod L, Boccon-Gibod L. J Urol. 2002 Jan; 167(1): 218–21.
- [5] Modified Gleason grading. An updated review. Helpap B1, Egevad L. Histol Histopathol. 2009 May; 24(5): 661–6.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- US 6346413 B1 [0030]
- US 20050014292 [0030]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Ralph Weissleder, Molecular Imaging in Cancer, Science, Vol. 312, 1168 (2006) [0027]
- IPA Version 24390178, 2015, www.ingenuity.com, QIAGEN, Hilden, Germany [0045]

Patentansprüche

1. Verfahren zur in-vitro Diagnose von rezidivem Prostatakrebs, wobei eine Bestimmung mindestens eines Biomarkers ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 54 oder Fragmenten und Teilpeptiden davon an oder von einem zu untersuchenden Patienten erfolgt.
2. Verfahren zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der/die Biomarker ausgewählt ist/sind aus der Gruppe SEQ ID No. 1 (Neuroserpin) oder SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 6.
3. Verfahren zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs nach Anspruch 1, wobei ein Panel mindestens SEQ ID No. 1 neben mindestens einer weiteren SEQ ID No. 2 bis SEQ ID No. 54, insbesondere SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 2 bis SEQ ID No. 6 aufweist.
4. Verfahren zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs nach einem der vorstehenden Ansprüche 1 bis 3, wobei ein Panel mindestens zwei oder drei Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 54, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 3, oder SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 6 aufweist.
5. Verfahren zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs nach Anspruch 1 bis 4 zur Durchführung von klinischen Entscheidungen, insbesondere weiterführende Behandlung und Therapie mittels Arzneimitteln.
6. Verfahren zur Diagnose nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Diagnose zur Prognose, zur differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung, zur Beurteilung des Schweregrades und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung erfolgt.
7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bestimmungen mittels einem Schnelltest, insbesondere in Einzel- oder Multiparameterbestimmungen durchgeführt werden.
8. Panel zur Diagnose von rezidivem Prostatakrebs, wobei der Panel mindestens zwei oder drei Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 54, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 3, oder SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 6 aufweist.
9. Kit oder diagnostische Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens zur Diagnose nach einem der Ansprüche 1–7 enthaltend Nachweisreagenzien und weitere Hilfsmittel.
10. Kit oder diagnostische Vorrichtung nach Anspruch 9 enthaltend ein Panel nach Anspruch 8.

Es folgt eine Seite Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1:

