

(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2019-531738

(P2019-531738A)

(43) 公表日 令和1年11月7日 (2019.11.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z N A Z 2 G O 4 5
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50	P 4 B O 6 3
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/493 (2006.01)	G O 1 N 33/493	A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-518959 (P2019-518959)	(71) 出願人	515098691
(86) (22) 出願日	平成29年10月13日 (2017.10.13)		ユニヴェルズィテート チューリッヒ
(85) 翻訳文提出日	令和1年5月15日 (2019.5.15)		スイス国 チューリッヒ C H - 8 0 0 6
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/076169		レミーストラッセ 7 1
(87) 国際公開番号	W02018/069494	(74) 代理人	100149032
(87) 国際公開日	平成30年4月19日 (2018.4.19)		弁理士 森本 敏明
(31) 優先権主張番号	16194043.2	(72) 発明者	バンゾラ, イリナ
(32) 優先日	平成28年10月14日 (2016.10.14)		スイス国 チューリッヒ 8 0 5 2 ビュ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ッテンヴェーク 1 5
(31) 優先権主張番号	17179152.8	(72) 発明者	プロベンツァーノ, マウリツィオ
(32) 優先日	平成29年6月30日 (2017.6.30)		スイス国 アールガウ州 ビルルヴィル
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		5 7 0 8 ツェルグリ 7
		F ターム (参考)	2G045 AA26 CB03 DA14 DA20
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌の診断と予後のためのインドールアミン-2, 3-ジオキシゲナーゼ アクセシ

(57) 【要約】

本発明は、前立腺癌を発症する患者のリスクを予測する方法、又は P C a を有すると疑われ、それゆえ生検が選択された患者のうち緩慢性と侵攻性の癌を区別する方法、及び / 又は特に根治的前立腺摘除術、小線源療法、及び / 又は体外照射療法による前立腺癌治療を受けた患者における前立腺癌の進行リスクを予測する方法に関し、前記方法は、前記患者から得られた尿試料中のインドールアミン - 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ (I D O) の m R N A 又はタンパク質のレベルを検出 / 定量することを含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- 前立腺癌 (P C a) を有する又は発症する患者のリスクを予測する、
 - 前立腺生検に患者を割り当てる、
 - 臨床的に関連する (c l i n i c a l l y r e l e v a n t) P C a を有する患者のリスクを予測する、
 - 緩慢性の (i n d o l e n t) P C a を有する患者のリスクを予測する、
 - 緩慢性の癌と侵攻性の (a g g r e s s i v e) 癌とを区別する、
 - 前立腺癌の再発 (r e l a p s e) 又は生化学的再発 (b i o c h e m i c a l r e c u r r e n c e) の患者のリスクを予測する、及び / 又は
 - 緩慢性前立腺癌が臨床的に関連する前立腺癌に進行する患者のリスクを予測する、
- 方法であって、

前記方法は、前記患者から得られた尿試料中のインドールアミン - 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ (I D O) の m R N A 又はタンパク質のレベルを検出 / 定量することを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記尿試料を採取する前に直腸指診 (D R E) が行われたい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 I D O の m R N A のレベルが所定の m R N A 閾値 1 未満である場合、前立腺癌を有するリスクが前記患者について排除される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 I D O の m R N A のレベルが所定の m R N A 閾値 2 未満であるが前記所定の m R N A 閾値 1 を超える場合、前立腺癌を有するリスクが前記患者に割り当てられる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 I D O の m R N A のレベルが所定の m R N A 閾値 3 を超える場合、前記患者は前立腺生検に割り当てられる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 I D O の m R N A のレベルが所定の m R N A 閾値 3 を超える場合、グリーソンスコア (G l e a s o n s c o r e) 7 の前立腺癌を有する高いリスクが前記患者に割り当てられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 I D O の m R N A のレベルが前記所定の m R N A 閾値 3 を超える場合、5 年以内の前立腺癌の生化学的再発の高いリスクが、前立腺癌治療を受けている患者に割り当てられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 I D O の m R N A のレベルが所定の m R N A 閾値 4 を超える場合、再発のリスクが前記患者に割り当てられる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

I D O の m R N A の定量が、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、特に定量的リアルタイム P C R (q P C R) によって行われる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

I D O のタンパク質のレベルが所定のタンパク質閾値 1 未満である場合、前立腺癌を有する低いリスクが前記患者に割り当てられる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 11】

I D O のタンパク質のレベルが所定のタンパク質閾値 2 を超える場合、臨床的に関連する前立腺癌の明確なリスクが患者に割り当てられる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 12】

I D O のタンパク質の定量が酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) によって達成される、請求項 1 ~ 2 又は 10 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記尿試料が未処理の一定容量の尿である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記尿試料が、一定容量の尿を遠心分離することによって得られるペレットである、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

前立腺癌（P C a）は、男性において最も一般的な癌であり、先進国における男性の癌死亡率の主な原因である。末期前立腺癌のほとんどの症例は、成長が遅い臓器限定腫瘍から侵襲性の高い去勢抵抗性前立腺癌（C R P C）への進行過程を経て生じる。

【背景技術】

【0002】

大規模な研究（Schroder et al., (2009), New England J Med 360, 1320 - 8）によれば、現在の前立腺特異抗原（P S A）に基づくスクリーニングは前立腺癌による死亡率を 20 % 減少させるが、高い過剰診断のリスクに関連する。Rev Urol. 2009; 11 (3): 127 - 133 doi: 10.3909/riu0474。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】Schroder et al., (2009), New England J Med 360, 1320 - 8

【非特許文献 2】Rev Urol. 2009; 11 (3): 127 - 133 doi: 10.3909/riu0474

【非特許文献 3】Epstein et al., 根治的前立腺摘除術にて有意でない癌を予測するための飽和生検の有用性（Utility of saturation biopsy to predict insignificant cancer at radical prostatectomy）、第 66 巻、2005 年 8 月 2 日発行、356 - 360 頁

【非特許文献 4】Rabbani et al., 偽陰性の六ヶ所前立腺生検の発生率及び臨床的意義（Incidence and clinical significance of false-negative sextant prostate biopsies）、Journal of Urology、第 159 巻、第 4 号 72 1998 年 4 月、1247 - 1250 頁

【非特許文献 5】Vlaeminck - Guillem et al., Urology、2010; 75 (2): 447; Roobol et al., Eur Urol. 2010; 58 (4): 475

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

現在、前立腺生検は、患者に対する潜在的に有害な副作用、その高い費用及び明確な偽陽性率（11.5 %、Epstein et al., 根治的前立腺摘除術にて有意でない癌を予測するための飽和生検の有用性（Utility of saturation biopsy to predict insignificant cancer at radical prostatectomy）、第 66 巻、2005 年 8 月 2 日発行、356 - 360 頁による報告のとおり）及び偽陰性率（23 %、Rabbani et al., 偽陰性の六ヶ所前立腺生検の発生率及び臨床的意義（Incidence and clinical significance of false-negative sextant

10

20

30

40

50

prostate biopsies)、Journal of Urology、第159巻、第4号72 1998年4月、1247-1250頁に記載)に関連するにも関わらず、前立腺癌検出のための最も標準的な手順である。

【0005】

臨床的に限局性の前立腺癌は通常、根治的前立腺切除術、小線源治療(brachytherapy)、及び外照射療法のような十分に確立された治療法によって対処される。決定的な局所療法で多くの患者を治療することができるが、根治的前立腺摘除術による治療後に血清PSA上昇により検出された疾患である生化学的再発(biochemical recurrence)(BR)を有する者もいる。

【0006】

米国食品医薬品局(FDA)は、尿中の前立腺癌遺伝子3(PCa3)の検出に基づく前立腺癌検査を承認しているが、その臨床的有用性はPSA検出よりごくわずかに優れていないと報告されている(Vlaeminck-Guillemら、Urology、2010;75(2):447);Roobolら、Eur Urol.2010;58(4):475)。

【0007】

したがって、患者をスクリーニングするための現在の方法を改善することは非常に重要である。

【0008】

膨大な数の文献は、炎症とPCaとの間の直接的かつ因果的な相関関係はまだ確立されていないが、炎症がPCaの発症及び進行において重要な役割を果たす可能性があることを示唆している。考慮すべき疫学的証拠は、PCaがより高い度合の炎症を有する人口統計学的集団においてより優勢であること、そして肥満に冒された患者が前立腺癌特異的な死亡のリスクの増加を示すことを指している。さらに、前立腺組織の分析は、ほとんどの場合、腺癌が慢性炎症に隣接して見出されることを明らかにしている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

いくつかの遺伝子変異及び後成的変化の蓄積による形質転換の際、免疫の適応度に応じて腫瘍細胞は完全に排除されるか、明らかな癌へと進行するかどちらかである。特に、PCaにおける腫瘍免疫回避は、癌の免疫編集の調整やTDSFネットワークの調節においてインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)、アルギナーゼ、一酸化窒素シンターゼ(NOS)及びサイトカイン関連など免疫抑制特性を有する種々の腫瘍由来可溶性因子(TDSF)の分泌を通して起こる。いくつかの微小環境修飾因子の中で、我々の関心は、PCaの発症及び進行の可能性のあるメディエーターとして報告されているもの(IDO、IL-6、及びIL-1βなど)に集中した。癌における微小環境の役割についての論争の的となるデータは文献に報告されており、推定の腫瘍促進剤の発現は癌の侵襲性及び臨床転帰不良と一時的に相関することがある。確かに、高レベルのIDOは、卵巣癌、子宮内膜癌及び結腸癌、悪性黒色腫、乳癌及び肺癌における臨床予後不良と相関していたが、腎細胞癌(RCC)では相関していなかった。後者の場合、初発腫瘍又は転移における高レベルのIDOのmRNAは、より長い全生存期間と正の相関を示した。IDOの発現は、腫瘍細胞内ではなく、腫瘍領域内の新しく形成された血管の内皮細胞において検出された。他の著者らはこれらのデータを確認し、内皮細胞によって産生されたIDOが癌細胞から必須アミノ酸トリプトファンを奪い、それゆえそれらの増殖を阻害するであろうという仮説を立てた。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1A】図1Aは、IDOのmRNAについての閾値の定義及びDRE(前立腺マッサージ)なしでの検査の実現可能性を示す。GS 7の患者及びGS 6の患者はPCaを有し、GSは生検又は前立腺摘除後に可能な場合に評価した。GS 7は臨床的に関連するPCaを意味し、GS 6は緩慢性PCaを意味する。カットオフ1(a 0.0015

10

20

30

40

50

、生検への割り当て又は臨床的に関連するPCaを有するリスク：NPV 100%、PPV 47%；PCaを有するリスク：NPV = 100%、PPV = 82%）、カットオフ2（b 0.0075、生検への割り当て又は臨床的に関連するPCaを有するリスク：NPV 81%、PPV 72%；PCaを有するリスク：NPV = 47%、PPV = 100%）、カットオフ3（c 0.0096、生検への割り当て又は臨床的に関連するPCaを有するリスク：NPV 83%、PPV 88%）及びカットオフ4（d 0.0479、治療又は治療抵抗性のPCaから5年以内にBRを有するリスク：NPV 100%、PPV 40%）。IDO相対的遺伝子発現を、DREを実施せずに採取した患者の尿中で分析した。IDO検査は、不要な生検の数を、カットオフ1で14.8%、又はカットオフ2で51.8%、又はカットオフ3で66.6%減少させる。

【図1B】図1Bは、IDOタンパク質の閾値と、DRE（前立腺マッサージ）を実施しない検査の実現可能性を示す。タンパク質カットオフ1（a 42 pg/mL、生検への割り当て又は臨床的に関連するPCaを有するリスク：PPV 83%、NPV 63%、PCaを有するリスク：PPV 90%、NPV 83%）、タンパク質カットオフ2（b 200 pg/mL、生検への割り当て又は臨床的に関連するPCaを有するリスク：PPV 69%、NPV 100%；PCaを有するリスクPPV 100%、NPV 85%）及びDRE（前立腺マッサージ）を実行なしの検査の実現可能性。IDO相対的遺伝子発現を、DREを実施せずに採取した患者の尿中で分析した。GS 7、GS 6及びPCaなしは、生検又は前立腺摘除術からの結果である。IDO検査では、タンパク質カットオフ2により不要な生検の数を29.4%減少させる。

【図2】図2は、遠心分離なしの尿中検査の実現可能性を示す（遊離RNA対ペレット）。

【図3】前立腺マッサージは尿中のmRNA PSAの量を50倍に増加させる；（5人の患者において行われたDRE前後の遺伝子発現を比較する試験）。通常、DREは血清中のPSAタンパク質を3倍に増加させる。PSAとは異なり、前立腺マッサージはIDOの量を2～3倍わずかに増加させた。

【発明を実施するための形態】

【0011】

説明

本発明は

- 前立腺生検に患者を割り当てる、
- 前立腺癌を有する又は発症する患者のリスクを予測する、
- 臨床的に関連する（clinically relevant）前立腺癌を有する患者のリスクを予測する、
- 緩慢性（indolent）の前立腺癌を有する患者のリスクを予測する、
- 緩慢性の癌と侵襲性（aggressive）の癌を区別する、
- 患者の前立腺癌の再発（relapse）のリスクを予測する、
- 緩慢性前立腺癌から症候性前立腺癌へ進行する患者のリスクを予測する、

方法を提供する。

【0012】

いずれの場合でも、該方法は、患者から得られた尿試料中のインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）のmRNA又はタンパク質のレベルを検出/定量することを含む。

【0013】

特定の実施形態では、本発明は

- 前立腺癌を発症する患者のリスクを予測する、
 - 前立腺生検を受けるように指示された患者の中で緩慢性癌と侵襲性癌とを区別する、
 - 前立腺癌治療を受けた患者における前立腺癌の生化学的再発の可能性を予測する、
- 及び/又は

10

20

30

40

50

- 前立腺癌治療、特に根治的前立腺摘除術、小線源治療 (brachytherapy)、及び / 又は体外照射療法 ; を受けた患者における前記前立腺癌の進行のリスクを予測する、

方法を提供する。

【0014】

特定の実施形態では、本発明は

- 前立腺癌を有する患者のリスクを予測する、
- グリーソンスコア (Gleason score) 7 で、臨床的に関連する前立腺癌を有する患者のリスクを予測する、

- 前立腺癌及び / 又は慢性の多巣性前立腺炎症を有する患者のリスクを予測する、

10

- 前立腺癌を発症する患者のリスクを予測する、

- 前立腺生検に患者を割り当る、

- 前立腺生検を受けるように指示された患者の中で緩慢性癌と侵襲性癌とを区別する、

- 前立腺癌の生化学的再発の患者のリスクを予測する、及び / 又は

- 緩慢性前立腺癌から症候性前立腺癌へ進行する患者のリスクを予測する、

方法を提供する。

【0015】

本発明者らは、尿試料中のインドールアミン - 2, 3 - ジオキシゲナーゼ (IDO) の mRNA 及びタンパク質のレベルを定量し、患者が前立腺生検を受けることで利益を得るかどうか、及び生化学的再発及び / 又は治療不能へと進行する平均リスク (関連する患者群を比較検討) より高いかどうかを予測する相対カットオフを測定した。

20

【0016】

国際ガイドライン (生検前ノモグラム : 人種、年齢、家族歴、PSA レベル > 4 ng / mL、DRE の結果、以前の生検) に従って、医師による前立腺腫瘍を有するリスクがあるとして患者を選択することができる。医師によって前立腺腫瘍を有するリスクがあると選択された患者は、前立腺生検を受けるように指示される。本発明による検査は、これらの患者のうちのどちらが生検を受けなければならないか、どちらが受ける必要がないかを選択する。

【0017】

30

本発明による検査は、治療前又は治療後の任意の時点で、PCa の発症を監視するために繰り返し実施することができる。陽性の生検が検出され治療の適用が決定されると、診断はこの結果に基づく。

【0018】

生検後、患者が積極的な監視療法 (active surveillance) に割り当てられている場合は、IDO 検査を使用して病変の発症の変化を監視することができる。生検の後、患者が治療に割り当てられている場合、IDO 検査を使用して前立腺内の残存腫瘍組織の存在を監視することができる。

【0019】

40

特定の実施形態では、緩慢性前立腺癌が症候性又は臨床的に関連する前立腺癌に進行する患者のリスクは、前立腺の生検を実施するために選択された患者において測定される。

【0020】

特定の実施形態では、患者の前立腺癌の進行のリスク、特に緩慢性前立腺癌の症候性又は臨床的に関連のある前立腺癌への進行のリスクは、前立腺癌治療を受けた患者において測定される。

【0021】

特定の実施形態では、前立腺癌の生化学的再発の患者のリスクが測定される。

【0022】

特定の実施形態において、前立腺癌の生化学的再発の患者のリスクは、前立腺癌治療を受けた患者において測定される。特定の実施形態では、前立腺癌治療は根治的前立腺摘除術

50

、小線源治療、及び／又は体外照射療法から選択される。特定の実施形態では、前立腺癌の再発（r e l a p s e）の患者のリスクが測定される。

【0023】

特定の実施形態では、尿試料を採取する前にD R Eは行われない。本発明による方法は、D R Eを実行せずに重要な結果をもたらす。D R Eの放棄は、患者の適合性を向上させ、そして本発明による方法をより速くかつより容易にする。

【0024】

特定の実施形態では、D R Eは尿試料を採取する前に行われる。これは、コントロール及び標的遺伝子に関する技術的問題のために、本発明による最初のI D O検査が有益でない結果の場合に有益であり得る。

10

【0025】

特定の実施形態では、I D Oのm R N Aは前記尿試料中で定量される。

【0026】

特定の実施形態では、I D Oのm R N Aの定量化はポリメラーゼ連鎖反応（P C R）によって達成される。

【0027】

特定の実施形態では、I D Oのm R N Aの定量化は、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（q P C R）によって行われる。

【0028】

特定の実施形態では、I D Oのm R N Aの定量化は、デジタルポリメラーゼ連鎖反応（d P C R）によって行われる。デジタルP C Rは、核酸鎖を直接定量し、かつクローン的に増幅するために使用することができる従来のP C R法のバイオテクノロジーの改良である。デジタルP C Rは、反応を複数のより小さな反応に分割することによって、従来のP C R方法を改良する。試料内の個々の核酸分子が多くの特異的な領域内に局在するように試料を分割する。マイクロウェルプレート、キャピラリー、オイルエマルジョン、及び核酸結合表面を有する小型化チャンバーのアレイを使用して試料を分割することができる。

20

【0029】

あるいは、I D Oのm R N Aの定量化は、当業者に知られている他の技術によって達成することができる。

【0030】

当業者は、I D O及びコントロール遺伝子の発現との間の比率を計算するための適切な方法及び公式を心得ている。例示的な方法は、以下の「材料及び方法」に記載する。

30

【0031】

特定の実施形態では、コントロール遺伝子は、I D Oよりも高いレベルで前立腺細胞によって発現される任意の遺伝子である。当業者は、コントロール遺伝子の発現が前立腺癌の存在と無関係でなければならないことを心得ている。特定の実施形態では、コントロール遺伝子は、I D Oよりも高いレベルで前立腺細胞によって発現されるハウスキーピング遺伝子である。特定の実施形態では、コントロール遺伝子はG A P D Hである。

【0032】

特定の実施形態では、I D Oのm R N Aのレベルが所定のm R N A閾値1未満である場合、前立腺癌を有するリスクは患者に対して排除される。言い換えれば、I D Oのm R N Aのレベルは、所定のm R N A閾値1未満である場合、前立腺癌を有するリスクは0である（に近い）と測定される。

40

【0033】

特定の実施形態では、所定のm R N A閾値1は、I D Oのm R N A分子の絶対コピー数が試料内において0～100コピーの間である。試料は一定容量の未処理の尿、特に0.1 mL～5 mL、さらに特に0.2 mL～2 mL、さらに特に0.25～1 mL、なおさらに特に約0.5 mLであり得る。試料は、尿の遠心分離により、特に2 mL～100 mLの尿、さらに特に5 mL～75 mLの尿、さらに特に15 mL～50 mLの尿、なおさらに特に約20 mLの尿の遠心分離により得られるペレットであり得る。

50

【 0 0 3 4 】

特定の実施形態では、所定のmRNA閾値1は、コントロール遺伝子の発現に対するIDOのmRNAのコピー数の比である。

【 0 0 3 5 】

このmRNA閾値1未満のIDOのmRNAレベルを有する患者は、PCaを有する可能性が0%又はごくわずかであり(図1A)、それゆえ前立腺生検は推奨されない。

【 0 0 3 6 】

特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが前立腺癌に罹患していない個体のコントロール集団のIDOのmRNAレベルと比較して上昇している場合、前立腺癌を有する又は発症するリスクが患者に割り当てられる。これは前立腺生検の結果又は前立腺摘除術の結果(利用可能な場合)によって実証される。

10

【 0 0 3 7 】

特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値1を上回る場合、前立腺癌を有するという重大なリスクが患者に割り当てられる。

【 0 0 3 8 】

特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値2未満であるが所定のmRNA閾値1を超える場合、(臨床的に関連する癌よりも緩慢性前立腺癌を有する確率が高い)前立腺癌を有するリスクが患者に割り当てられる。

【 0 0 3 9 】

特定の実施形態では、前記所定のmRNA閾値2は、所定のmRNA閾値1の1.5~6

20

倍である。

【 0 0 4 0 】

この所定のmRNA閾値2未満であるが所定のmRNA閾値1を超えるIDOのmRNAレベルを有する患者は、生検が推奨され得る群に割り当てられる(図1A)。

【 0 0 4 1 】

特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルがmRNA閾値3を超える場合、(緩慢性前立腺癌よりも臨床的に関連のある癌を有するより高い可能性を有する)前立腺癌を有するより高いリスクを患者に割り当てる。

【 0 0 4 2 】

特定の実施形態では、前記所定のmRNA閾値3は、所定のmRNA閾値4の6~10倍

30

である。

【 0 0 4 3 】

このmRNA閾値3を超えるIDOのmRNAレベルを有する患者は、生検が常に推奨される群に割り当てられる。

【 0 0 4 4 】

特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値3を超える場合、臨床的に関連する前立腺癌を有する高いリスクが患者に割り当てられる。特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値3を超える場合、グリーソンスコア7によって特徴付けられる前立腺癌を有する高いリスクが患者に割り当てられる。特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値3を超える場合、前立腺生検後に治療を必要とする前立腺癌を有する高いリスクが患者に割り当てられる。これらの患者には前立腺生検が常に推奨される。

40

【 0 0 4 5 】

特定の実施形態において、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値3を超える場合、5年以内の前立腺癌の生化学的再発の高いリスクが患者に割り当てられる。

【 0 0 4 6 】

特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値4を超える場合、臨床的に関連する前立腺癌を有する高いリスクが患者に割り当てられる。特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値4を超える場合、グリーソンスコア7によって特徴付けられる前立腺癌を有する高いリスクが患者に割り当てられる。特

50

定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値4を超える場合、前立腺生検後に治療を必要とする前立腺癌を有する高いリスクが患者に割り当てられる。これらの患者には前立腺生検が常に推奨される。

【0047】

特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値4を超える場合、より高い進行及び転移の可能性を有する前立腺癌を有する高いリスクが患者に割り当てられる。

【0048】

特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値4を超える場合、再発のリスクが患者に割り当てられる。

10

【0049】

特定の実施形態では、IDOのmRNAのレベルが所定のmRNA閾値4を超える場合、5年以内の前立腺癌の生化学的再発の高いリスクが患者に割り当てられる。

【0050】

特定の実施形態において、第4の所定のmRNA閾値は、mRNA閾値1よりも20倍以上高い。このmRNA閾値4を超えるIDOのmRNAレベルを有する患者は、緊急治療の選択肢のために生検が常に推奨される群に割り当てられる(図1A)。

【0051】

GAPDH発現に対するIDOのmRNA発現閾値

特定の実施形態では、所定のmRNA閾値1は、GAPDH発現に対して0.0001~0.004倍の発現である。特定の実施形態では、所定のmRNA閾値1は、GAPDH発現に対して0.0015倍のIDO発現である。

20

【0052】

本発明者らのデータは、このmRNA閾値1を下回るIDOのmRNAレベルを有する患者は、PCaを有する可能性が0%又は無視できる程度であることを実証する(図1A)。

【0053】

特定の実施形態では、所定のmRNA閾値2は、GAPDHと比較して0.004~0.0090倍の発現である。特定の実施形態では、所定のmRNA閾値2は、GAPDH発現に対して0.0075倍のIDO発現である。

30

【0054】

特定の実施形態では、所定のmRNA閾値3は、GAPDHと比較して0.0090~0.03倍の発現である。特定の実施形態では、所定のmRNA閾値3は、GAPDH発現に対して0.0096倍のIDO発現である。

【0055】

本発明者らのデータは、緩慢性PCaを有する患者の87.5%(GS 6かつBR-かつ生検後の治療なし)、PCaを有しない患者の100%及び臨床的に関連性のあるPCaを有する患者の27%(GS 7、BR-、生検後の治療)は、0.0096未満のIDOを発現したことを実証する(図1A)。

【0056】

本発明者らのデータは、臨床的に関連するPCaを有する患者の72%(GS 7、生検後の治療)が0.0096を超えるIDOを発現したことを実証する(図1A)。

40

【0057】

特定の実施形態では、所定のmRNA閾値4は、GAPDH発現に対して0.03~0.05倍発現である。特定の実施形態では、所定のmRNA閾値4は、GAPDH発現に対して0.0479倍のIDO発現である。

【0058】

本発明者らのデータは、BR+ PCa (GS 7、生検後の治療、5年以内のBR)を有するか又は放射線療法に反応しない患者の100%が0.0479を超えるIDOを発現したことを実証する(図1A)。

50

【 0 0 5 9 】

特定の実施形態では、I D O タンパク質は前記尿試料中で定量される。特定の実施形態では、I D O タンパク質の定量化は酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) によって行われる。

【 0 0 6 0 】

あるいは、I D O タンパク質の定量化は、当業者に知られている他の技術によって達成され得る。

【 0 0 6 1 】

特定の実施形態では、I D O タンパク質のレベルが所定のタンパク質閾値 1 未満である場合、前立腺癌を有するリスクは患者に対して排除される。特定の実施形態では、I D O タンパク質のレベルが所定のタンパク質閾値 1 未満である場合、前立腺癌を有するリスクは患者のリスクが非常に低いと測定される。特定の実施形態では、所定のタンパク質閾値 1 は、I D O タンパク質の絶対濃度であり、0 ~ 1 0 0 p g / m L の間である。

10

【 0 0 6 2 】

このタンパク質閾値 1 未満の I D O タンパク質レベルを有する患者は、P C a を有する可能性が低く (図 1 B)、したがって前立腺生検は推奨されない。

【 0 0 6 3 】

特定の実施形態では、I D O タンパク質のレベルが前立腺癌に罹患していない個体のコントロール集団の I D O タンパク質レベルと比較して上昇している場合、前立腺癌を有する又は発症するリスクが患者に割り当てられる。これは前立腺生検の結果又は前立腺摘除術の結果 (利用可能な場合) により実証される。

20

【 0 0 6 4 】

特定の実施形態では、I D O タンパク質のレベルが所定のタンパク質閾値 1 を超える場合、前立腺癌を有するという有意なリスクが患者に割り当てられる。

【 0 0 6 5 】

特定の実施形態では、I D O タンパク質のレベルが所定のタンパク質閾値 2 を超える場合、(臨床的に関連する癌よりも緩慢性前立腺癌が発生する可能性がより高い) 前立腺癌を有するというより高いリスクが患者に割り当てられる。特定の実施形態において、前記所定のタンパク質閾値 2 は、所定のタンパク質閾値 1 の 1 . 5 から 6 倍の間である。特定の実施形態では、前記所定のタンパク質閾値 2 は 1 0 0 から 3 0 0 p g / m L の間である。特定の実施形態では、前記所定のタンパク質閾値 2 は 2 0 0 p g / m L である。

30

【 0 0 6 6 】

特定の実施形態において、タンパク質閾値 2 未満であるがタンパク質閾値 1 を超える I D O タンパク質レベルを有する患者は、生検が推奨され得る群に割り当てられる。

【 0 0 6 7 】

特定の実施形態において、このタンパク質閾値 2 を超える I D O タンパク質レベルを有する患者は、生検が常に推奨される群に割り当てられる。

【 0 0 6 8 】

特定の実施形態では、I D O タンパク質のレベルが所定のタンパク質閾値 3 を超える場合、(緩慢性前立腺癌より臨床的に関連する癌を有する可能性がより高い) 前立腺癌を有するというより高いリスクを患者に割り当てる。特定の実施形態では、前記所定のタンパク質閾値 3 は、3 0 0 p g / m L よりも大きい、又は所定のタンパク質閾値 1 の 2 倍よりも大きい。これらの患者に対しては、前立腺生検が常に推奨される。

40

【 0 0 6 9 】

本発明者らのデータは、P C a を有さない患者の 8 3 % が 2 0 0 p g 未満の I D O タンパク質レベルを有することを実証する。本発明者らのデータは、臨床的に関連する P C a を有する患者の 8 7 . 5 % (G S 7、B R -、生検後の治療) が 2 0 0 p g を超える I D O タンパク質レベルを有することを実証する。本発明者らのデータは、緩慢性 P C a を有する又は P C a を有さない患者の 1 0 0 % がタンパク質閾値 3 未満の I D O タンパク質レベルを有することを実証する (図 1 B)。特定の実施形態において、尿試料は処理されず

50

、そしてRNA又はタンパク質の分析を可能にする。

【0070】

特定の実施形態では、尿試料は、RNAを保存するための試薬を添加した一定量の尿である。

【0071】

特定の実施形態では、尿試料は尿を遠心分離することによって得られるペレットである。特定の実施形態では、尿試料は、300g超で5分間を超えて尿を超遠心分離することによって得られるペレットである。特定の実施形態では、尿試料は、200～2000Gで5分間を超えて尿を遠心分離することによって得られるペレットである。特定の実施形態では、尿試料は、300gで5分間を超えて尿を超遠心分離することによって得られるペレットである。特定の実施形態では、尿試料は、700gを上回り10分間以上尿を遠心分離することによって得られるペレットである。

10

【0072】

特定の実施形態では、方法は以下の工程を含む：

a．尿試料を採取直後に少なくとも5分間、特に5～30分間、さらに特に8～15分間10未満、特に10～4の間で遠心分離する。

b．任意に、1つ又は複数のRNAse阻害剤化合物を収集時又は遠心分離前に試料に添加する。

【0073】

特定の実施形態では、尿試料は無細胞RNA試料である。この発現は、RNA単離の前に（例えば遠心分離によって）処理されていない尿試料から得られたRNA調製物に関する。IDO遺伝子発現に関してペレットと無細胞RNAの間に違いは検出されなかった（図2）。

20

【0074】

尿は、採取直後に、3～25、特に4での遠心分離（ペレットを採取するため）又は分注（無細胞RNA又はタンパク質分析のため）のいずれかで処理する必要がある。RNAを分解から保護するための溶液の添加も可能である。採取後に試料を4に保ち、数時間（例えば1～24時間）後に遠心分離を行うことも可能である。無細胞RNAを分析するために、遠心分離せずに0.5mLの尿からRNAを抽出する。任意に1つ又は複数のRNAse阻害剤又はRNA安定剤化合物を収集時に試料に添加する。mRNAを逆転写することによって生成されたIDOC DNAは、従って、IDO遺伝子を標的とする一組のプライマー及びプローブを使用することによってリアルタイムPCRによって定量される（実施例に示されるTaqManアッセイはその一例である）。適切なIDO領域の一例は触媒領域である。実施例に示されるTaqManアッセイは、IDOの触媒領域を標的とする。逆転写は、標的特異的プライマー又は混合プライマーを用いて実施することができる。逆転写は別々の反応であり得る、もしくは標的配列の定量化に使用されるのと同じ反応で行われ得る。定量化は、リアルタイムPCR又は他の定量的方法、例えばデジタルPCRもしくはRNA-seqにより行うことができる。検査をPSA測定から独立させるために、コントロール遺伝子を用いてIDOの相対的遺伝子発現を計算する。

30

【0075】

特定の実施形態では、コントロール遺伝子はGAPDHである。特定の実施形態において、18sリボソームRNA（rRNA）は、増幅のための遺伝物質の量を測定するための内部コントロール（技術的コントロール）として使用される。18s>7Ct（リアルタイムPCRの閾値サイクル）の場合、検査は有益ではない可能性があるため、それゆえ新しい尿試料を採取し、適切に検査を繰り返す必要がある。特定の実施形態では、DREは技術的コントロール遺伝子のパフォーマンスを改善すると想定され得る。

40

【0076】

特定の実施形態では、この方法は、以下のプライマー及びプローブのうちの少なくとも1つ、そして特にその全てを使用する。

プライマーF 5'-G A A G A C C C A A A G G A G T T T G C - 3'（配列番号01

50

)

プライマー R 5' - T G G A G G A A C T G A G C A G C A T - 3' (配列番号 02)

プローブ: 5' - T G G G C A T C C A G C A G A C T - 3' (配列番号 03)。

【0077】

特定の実施形態では、プローブは、5'末端又は3'末端を蛍光色素分子で、及び他の末端を蛍光色素分子消光剤で修飾される。蛍光色素分子消光剤は、励起時に蛍光色素分子から放出される蛍光を消光することができる。配列番号03の特定のプローブ配列に関して、MGBは、異なる蛍光色素分子と組み合わせて使用することができる特に有用な蛍光色素分子消光剤である。非限定的な例は、FAM/MGB、VIC/MGB、TWT/MGB、ヤキマイエロー/MGB、HEX/MGB及びCy5/MGBである。蛍光色素分子と蛍光色素分子消光剤の他の有用なペアは、カルボキシフルオレセイン(FAM)/(マイナーグロブバインダー(MGB))、FAM/ブラックホールクエンチャー1(BHQ1)、YYE/BHQ1、ROX/BHQ2、Cy5/BHQ2である。

10

【0078】

特定の実施形態では、プローブは、5'側がFAM(6-カルボキシフルオレセイン)、3'側がMGBで修飾される。

【0079】

特定の実施形態では、IDOタンパク質はELISAによって定量化される。特定の実施形態では、定量化は、Immundiagnostik AG、Stubenwald-Allee 8a、64625 ベンスハイム、ドイツによるIDK(登録商標)IDO ELISAキットを使用して行う。

20

【0080】

特定の実施形態では、尿試料は未処理の尿量である。本明細書において、このような試料は「無細胞」RNA試料とも呼ばれる。「未処理」は、試料がRNA単離の前に遠心分離されていないということを言い、それゆえ、それは遠心分離によって一次試料から分離された画分ではなく「全」尿を含む(言い換えれば:患者から得られた試料)。未処理のRNA試料は、RNAの分解を防ぐために添加された溶液を含み得る。

【0081】

特定の実施形態では、尿試料は、一定量の尿を遠心分離することによって得られるペレットである。

30

【0082】

IDOのmRNAはPCa組織において高レベルで発現される。IDOタンパク質は、染色によってPCa組織に存在することが報告されているが、絶対的な方法で定量されたことはない。IDOのmRNA及びタンパク質は前立腺癌を有すると疑われる患者の尿中に高レベルで検出され得、そしてそのレベルは腫瘍保持患者又は生検によるそれらの状態のさらなる測定を必要とする患者を識別するためのバイオマーカーとして使用され得るという所見は驚くべきことである:

【0083】

疾患又は他の損傷を受けた組織から体液(血液、尿及び唾液など)へのmRNA及びタンパク質の検出は、疾患の発症中に組織により受ける損傷の種類によって異なる。

40

【0084】

参照として役立つ可能性がある1つの事例は、PSAの検出である。PSAは非常に特異的な前立腺分子であり、末梢循環中のその上昇したレベルは、腫瘍、良性疾患もしくは炎症(すなわち前立腺炎)の存在による前立腺損傷、又は年齢もしくは性交による過剰産生のいずれかの指標である。特にPSAは腫瘍特異的ではない。PSAは現在、PCaの診断に最も一般的に使用されているバイオマーカーである。PSAタンパク質は前立腺細胞によって前立腺腺の内腔に分泌され、前立腺管に運ばれる。それにより尿に到達し、そして検出することが可能である。PSAはまた、その不活性形態(遊離PSA)において、有意ではないレベル(4 ng/mL)で生理学的に血流に入るが、後者の量は年齢とともに増加する。より高い病期及び悪性度で腫瘍発症の間に、前立腺構造への損傷のために、

50

P S A タンパク質レベルは患者の血清中で有意に増加し、そしてこれまでのところ、この検体においてのみ前立腺癌に対する予測力を有する。この分泌タンパク質は尿中に検出することができるが、尿中のそのレベルだけでは予測できない (B o l d u c ら、(2 0 0 7)、C a n . U r o l . A s s o c . J . 1、3 7 7 - 8 1)。

【 0 0 8 5 】

相同性において、I D O が前立腺癌組織において他の臓器の状態よりも高いレベルで検出可能であるという事実は、I D O が尿中で検出可能であることを予測せず、はるかに少なく、この検体において、他の症状を有する患者と比較してP C a 腫瘍を有する患者からの試料においてより上昇したレベルで検出することができる。前立腺摘除術後に採取された前立腺腫瘍試料では高いレベルのI D O が検出されており、早期段階での前立腺の存在 (例：前立腺生検) は今までに報告されておらず、それゆえ前立腺癌 (P S A 検査で示されるとおり) を内部に持つリスクがあるが、その診断はまだ評価されていない (前立腺生検の前) 患者の尿中にI D O を検出することができることは、予想外のことである。さらに、前立腺内の他の細胞は免疫調節が起こる特定の領域でそれを放出する可能性があるため、I D O は前立腺特異的タンパク質ではない。したがって、内皮細胞、マクロファージなどの前立腺における他のI D O 源は、患者において検出可能なバックグラウンドレベルに寄与する。非腫瘍特異的マーカーが有効な診断 / 予後ツールであることに関連するのは、腫瘍を有する患者における生理学的ベースラインを超えたその有意な過剰発現である。バックグラウンドレベルにもかかわらず、I D O は生理的に豊富には尿中に分泌されず、かつP S A のようにそれは前立腺マッサージ後に有意に増加しない (図 3)。したがって、P S A の場合のように体液中で上昇したレベルでの検出は予想されない。予備データに基づいて、本発明者らは、P C a のリスクがある患者の尿中のI D O 検出 (m R N A 及びタンパク質) が診断力を有することを観察した (図 1)。

10

20

30

【 0 0 8 6 】

尿は、それらの生理学的機能により、剥離した細胞、細胞片、及び排出物質の存在を特徴とする検体であり、R N a s e、D N a s e 及びその他の分解酵素が豊富である。それゆえ、それらは、細胞がより長い期間生存することができる血液と比較して、R N A の分析 (そのような条件では不安定でそして容易かつ迅速に分解されると考えられる) には困難な材料と考えられる。さらに、排出物質の存在は、I D O (タンパク質は前立腺中のいくつかの種類の細胞に存在する) のように、1 種類の細胞によって独占的に発現されない分子のバックグラウンドレベルを増加させると予想される。そのような検体中のI D O のR N A 及びタンパク質の検出は、それ故に予想外である。さらに驚くべきことは、予測力を持つ定量的マーカーとしてそれを使用する可能性である (図 1)。

【 0 0 8 7 】

用語と定義

本明細書の文脈において、表現「m R N A」は、一次転写物 (m R N A 前駆体とも呼ばれる) 及びm R N A 前駆体からm R N A のプロセシング中に形成される任意の中間構築物を含む、所与の遺伝子の発現の定量化に使用できる任意のR N A 種を含むことを意味する。

【 0 0 8 8 】

本明細書の文脈における「P C a」は、「前立腺癌」に関する。

40

【 0 0 8 9 】

本明細書の文脈における「P S A」は、「前立腺特異抗原」に関する。

【 0 0 9 0 】

本明細書の文脈における「R P」は「根治的前立腺摘除術」に関する。

【 0 0 9 1 】

本明細書の文脈における「R T x」は「放射線療法」に関する。

【 0 0 9 2 】

本明細書の文脈における「A S」は、手術又は化学療法などの即時治療ではなく、定期的な検査によって病状の進行を監視する方法に関する「能動的監視」に関する。

【 0 0 9 3 】

50

本明細書の文脈における「DRE」は、「直腸指診」に関する。

【0094】

本明細書の文脈における「BR」は「生化学的再発」に関し、そして検出可能なレベルの生化学的癌マーカーの上昇、特にPSAの血中レベルの上昇を規定する。BRは、例えば手術又は放射線療法によって前立腺癌が治療されている前立腺癌患者において起こり得る。罹患の患者は症状を示さないことがある。「BR-」は5年以内に前立腺癌の生化学的再発がないことを意味し、「BR+」は5年以内に前立腺癌の生化学的再発を意味する。

【0095】

本明細書の文脈における「PCaの再発」は、PCaの再発、特に生化学的再発、及び治療に対する無反応性/不応性を含むことを意味する。

10

【0096】

本明細書の文脈における「GS」は「グリーソンスコア」に関する。グリーソンスコアは、病理学者によって評価された、その微視的外観に基づいてPCa組織を等級付けするシステムである。GSの範囲は2から10である。GSが高いほど、PCaのより予後不良を伴う侵襲性になる。

【0097】

本明細書の文脈における「PPV」は「陽性適中率」に関する。

【0098】

本明細書の文脈における「NPV」は「陰性適中率」に関する。

20

【0099】

本明細書の文脈における「GAPDH」は「グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ」に関する。GAPDHはほとんどの細胞で構成的に発現しており、遺伝子発現レベルの正常化に使用することができる。

【0100】

本明細書の文脈における「緩慢性前立腺癌」は、GS 6の前立腺癌に関する。

【0101】

本明細書の文脈における「臨床的に関連する前立腺癌」は、担当医によってそのように分類されるであろう前立腺癌に関する。臨床的に関連するPCaの診断は、通常、外科手術、化学療法、凍結療法、ホルモン療法、及び/又は放射線療法から選択される方法により治療の推奨をもたらす。ほとんどの場合、臨床的に関連するPCaはGS 7で特徴付けられる。

30

【0102】

本明細書の文脈における用語「症候性前立腺癌」及び「侵襲性前立腺癌」は、「臨床的に関連する前立腺癌」と同義語として使用される。

【0103】

本明細書の文脈において、GS 7の前立腺癌に関する。

【0104】

本明細書の文脈において、表現「(前立腺癌を有する)リスク」は「(前立腺癌を有する)可能性」と同義である。

【0105】

本明細書の文脈において、表現「閾値」は「カットオフ」と同義である。本明細書の文脈において、表現「閾値1」は「第1の閾値」と同義である。

40

【0106】

単一の分離可能な特徴に対する代替が、本明細書において「実施形態」として既述される場合は常に、そのような代替が自由に組み合わせられて本明細書に開示される本発明の個別の実施形態を形成し得ることを理解されたい。したがって、検出可能な標識についての任意の代替の実施形態は、任意の代替の実施形態の配列と組み合わせることができ、かつこれらの組み合わせは、本明細書に記載の任意の医学的症状又は診断方法と組み合わせることができる。

【実施例】

50

【0107】

本発明は、以下の実施例及び図面によってさらに説明され、これから、さらなる実施形態及び利点を引き出すことができる。これらの実施例は本発明を説明するためのものであり、その範囲を限定するためのものではない。

【0108】

材料及び方法

尿の収集

患者は、採取の前の24時間前は性行為を避ける必要がある。朝の最初の尿を無菌容器に採取する。

【0109】

ペレット：20 mLを2000 rpmで10分間遠心分離し、上清を捨て、そしてペレットをRNA抽出に使用する。

【0110】

無細胞RNA及びタンパク質：RNA抽出に500 µLの尿を使用する。

【0111】

RNA抽出

RNA抽出は、RNA Aqueous Kitの手順（アンピオン（Ambion））に従って行う。700 µLの溶解溶液をペレット又は500 µLの尿のいずれかに添加する。溶出工程は、毎回50 µLの容量で同じチューブ内で2回行う（最終容量は100 µLである）。試料を-80 で保存する。

【0112】

逆転写

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（アプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems））を用いて調製した30 µLの混合物に30 µLのRNAを添加する。

【0113】

10 µLの混合物は、2.0 µLの10×RT緩衝液、0.8 µLのdNTP、2.0 µLのランダムプライマー、1.0 µLのマルチスクライプ逆転写酵素及び4.2 µLの水を含む。反応は、サーモサイクラー中にて4段階で行われる：25 で10分、37 で120分、85 で5分及び4 で5分。試料を-80 で保存する。

【0114】

リアルタイムPCR

IDO1アッセイを、エクソン9と10の間のエクソン-エクソン接合部をカバーするように設計する。プライマーを、最適な長さが20 bp、かつCG含有量が30%～80%の間で、58 °C～61 °Cの間の融解温度を持つように設計する。プローブを、プライマーの一つよりも10 高い融解温度を持ち、かつGで開始しないように設計する。プライマー及びプローブを、それぞれ最終濃度400 nM及び200 nMで使用する。

【0115】

例示的なTaqManアッセイは以下の配列によって表される。

プライマーF 5' - G A A G A C C C A A A G G A G T T T G C - 3'（配列番号01）

プライマーR 5' - T G G A G G A A C T G A G C A G C A T - 3'（配列番号02）

プローブ：5' - T G G G C A T C C A G C A G A C T - 3'（配列番号03）

【0116】

プローブは5'側をFAM（6-カルボキシフルオレセイン）で及び3'側の端部をMGB（マイナーグループバインダー、FAMスペクトル品質に適合する非蛍光消光剤、アプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）から購入）で修飾する。定量的PCRのための混合物は、TaqMan 遺伝子発現マスターミックス（アプライドバイオシステムズ）を使用して調製される：それは10 µLのマスターミックス2×、7 µLの水、0.8 µLのプライマーF（10 µM）、0.8 µLのプライマーR

10

20

30

40

50

($10\text{ }\mu\text{M}$)及び $0.4\text{ }\mu\text{L}$ のプロープ($10\text{ }\mu\text{M}$)を(1ウェル当たり)含む。 $1\text{ }\mu\text{L}$ のcDNAを1ウェル当たりで試験する。試料は3回ずつ実行される。各実験について、ネガティブコントロールも3回ずつ試験する。

【0117】

PCRプログラムは以下の通りである：UNGインキュベーション(50°C で2分)。ポリメラーゼ活性化(95°C で10分)。PCRサイクル($40\times$)：変性(95°C で15秒)及びアニーリング(60°C で1分)。

【0118】

IDOのタンパク質の定量

ELISAによるIDOのタンパク質の定量には、 $125\text{ }\mu\text{L}$ の尿を使用した。このアッセイは、ヒトインドールアミン2,3-デオキシゲナーゼ1(IDO1)に結合する2つの選択されたポリクローナル抗体を用いる2部位サンドイッチ技術を利用する(イムンダイアグノスティック社(Imundiagnostik AG)シュトゥーベンヴァルト-アレ(Stubenwald-Allee)8a、64625 ベンスハイム、ドイツのIDKR IDO ELISAキット K7727)。尿試料を、高アフィンポリクローナル抗ヒトIDO1抗体で被覆したマイクロプレートのウェルに添加する。第1のインキュベーション工程の間に、試料中のIDO1は固定化抗体によって捕捉される。次いで、ビオチン化検出抗体、ポリクローナル抗ヒトIDO1抗体を添加する。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応物に添加し、そしてテトラメチルベンジジン(TMB)をペルオキシダーゼの基質として使用する。反応を停止させるために酸性停止溶液を添加する。プレートリーダーを使用して 450 nm での吸光度を測定し、標準曲線から得られた値を使用してIDO1の濃度を計算する。

【0119】

データ分析

遺伝子発現の正規化は、GAPDH又は18Sのいずれかを用いて行った。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法を使用して、DRE前後の対象遺伝子(PSA及びIDO)の倍率変化(fold change)を計算した。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法を使用して、またGAPDH遺伝子発現と比較したIDOの倍率の減少を1として計算した。 10^{-7} 以下の値はすべて検出不能と見なした。

【0120】

特定のカットオフの選択

臨床的に関連するPCa(GS 7)、緩慢性PCa(GS 6)及びPCaを含まない生検患者と診断された患者を比較することによって、特定のカットオフを選択した。

【0121】

図1は、A)カットオフ1(0.0015)、カットオフ2(0.0075)、カットオフ3(0.0096)、カットオフ4(0.0479)、B)カットオフ5(42 pg/mL)、カットオフ6(200 pg/mL)の定義を示す。

【0122】

生検を受けている患者を陰性の結果(NPV 100% ； 0% 偽陽性)で識別するために、 0.0015 の第1のカットオフ(カットオフ1)を生成した。

【0123】

低リスクPCaを集めるために、 0.0075 の第2のカットオフ(カットオフ2)を生成した。PCaがGS 6かつBR-の患者又はPCaを有さない患者の 82% がIDO <0.0075 を発現した。このカットオフ2未満の患者には、生検は推奨されない。

【0124】

中/高リスクPCaを集めるために、 0.0096 の第3のカットオフ(カットオフ3)を生成した。PCaがGS 6かつBR-又はPCaを有さない患者の 93.7% が、IDO <0.0096 を発現した。このカットオフ3を超える患者には、生検が常に推奨される。

【0125】

10

20

30

40

50

進行する可能性が高い患者を診断するために、0.0479の第4のカットオフ（カットオフ4）を生成した。このカットオフ4より上の患者は直ちに生検を受け、かつおそらく治療を受ける必要がある。

【0126】

生検を受けている患者を陰性の結果（PCaのリスク：PPV = 90%；NPV = 83%）で識別するために、42 pg/mLの第1のタンパク質カットオフ（タンパク質カットオフ1）を生成した。

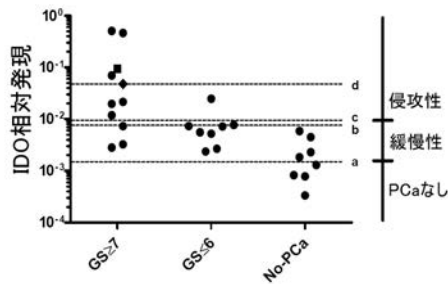
【0127】

中/高リスクPCaを集めるために、200 pg/mLの第2のタンパク質カットオフ（タンパク質カットオフ2）を生成した（PPV = 100%、NPV = 69%）。このタンパク質カットオフ2を超える患者には、生検が常に推奨される。

10

【図1A】

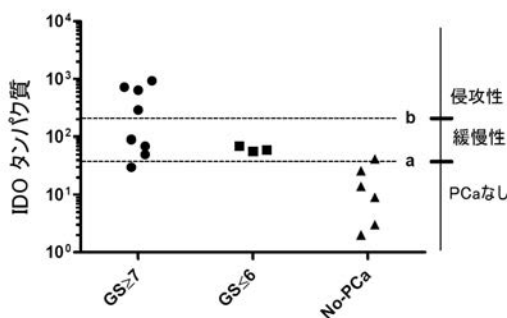
図1A



- ◆ IDO = 0.0479 で、BRを有する患者
- IDO = 0.0931 で、放射線療法に反応しない患者 (PSA増加)

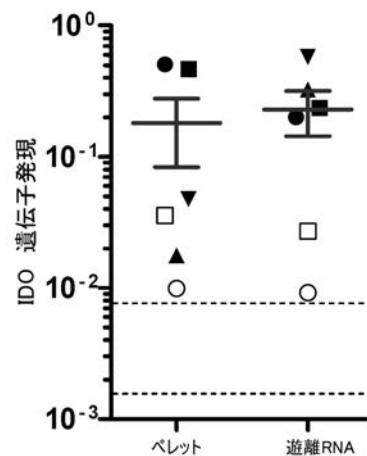
【図1B】

図1B



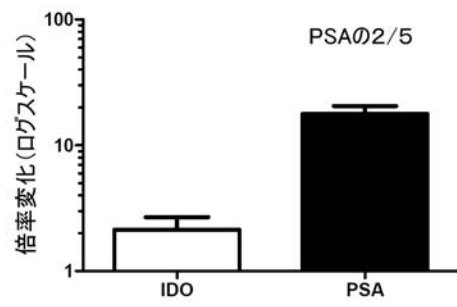
【図2】

図2



【 図 3 】

図3



【 配 列 表 】

2019531738000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/076169

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68 C12Q1/6886
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, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FEDER-MENGUS C ET AL: "High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase gene in prostate cancer", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 44, no. 15, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 2266-2275, XP025608945, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/J.EJCA.2008.05.023 [retrieved on 2008-07-09] the whole document ----- -/--	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 January 2018

Date of mailing of the international search report

29/01/2018

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

Gabriels, Jan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/076169

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHAI LIJIE ET AL: "The role of IDO in brain tumor immunotherapy", JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY, KLUWER, BOSTON, US, vol. 123, no. 3, 18 December 2014 (2014-12-18), pages 395-403, XP035510777, ISSN: 0167-594X, DOI: 10.1007/S11060-014-1687-8 [retrieved on 2014-12-18] page 396	1-14
A	----- VLAEMINCK-GUILLEM V ET AL: "Urinary Prostate Cancer 3 Test: Toward the Age of Reason?", UROLOGY, BELLE MEAD, NJ, US, vol. 75, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 447-453, XP026885615, ISSN: 0090-4295, DOI: 10.1016/J.UROLOGY.2009.03.046 [retrieved on 2009-07-08] the whole document	1-14
A	----- WO 2013/028788 A1 (EXOSOME DIAGNOSTICS INC [US]; RUSSO LEILEATA M [US]) 28 February 2013 (2013-02-28) claim 1	1-14
A	----- WO 2015/077414 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 28 May 2015 (2015-05-28) claim 1	1
A	----- WO 2013/190127 A1 (IMMUSMOL SAS [FR]) 27 December 2013 (2013-12-27) table 1	1
A	----- AMALIA KATAFIGIOTI ET AL: "In the search of novel urine biomarkers for the early diagnosis of prostate cancer. Intracellular or secreted proteins as the target group? Where and how to search for possible biomarkers useful in the everyday clinical practice", ARCHIVIO ITALIANO DI UROLOGIA, ANDROLOGIA : UROLOGICAL AND ANDROLOGICAL SCIENCES ; ORGANO UFFICIALE, vol. 88, no. 3, 5 October 2016 (2016-10-05), page 195, XP055440884, IT ISSN: 1124-3562, DOI: 10.4081/aiua.2016.3.195 the whole document	1
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/076169

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EIHAB AL KHASAWNEH ET AL: "Stable pediatric kidney transplant recipients run higher urine indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO) levels than healthy children", PEDIATRIC TRANSPLANTATION, vol. 18, no. 3, 1 February 2014 (2014-02-01), pages 254-257, XP055440899, DK ISSN: 1397-3142, DOI: 10.1111/petr.12232 the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/076169

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013028788 A1	28-02-2013	EP 2748335 A1 US 2015024949 A1 WO 2013028788 A1	02-07-2014 22-01-2015 28-02-2013
WO 2015077414 A1	28-05-2015	US 2016299146 A1 WO 2015077414 A1	13-10-2016 28-05-2015
WO 2013190127 A1	27-12-2013	EP 2864790 A1 US 2015175712 A1 WO 2013190127 A1	29-04-2015 25-06-2015 27-12-2013

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)		C 1 2 Q 1/6851		Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/09		Z

(81) 指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62
 QS13 QS25 QS34 QS36 QX02

专利名称(译)	吡啶胺-2,3-双加氧酶测定对前列腺癌的诊断和预后		
公开(公告)号	JP2019531738A	公开(公告)日	2019-11-07
申请号	JP2019518959	申请日	2017-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	苏黎世大学		
申请(专利权)人(译)	海胆威赛罗卡泰特苏黎世		
发明人	バンゾラ,イリナ プロベンツァーノ,マウリツィオ		
IPC分类号	C12Q1/686 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/493 C12Q1/6851 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/57434 G01N2800/50 G01N2800/54 G01N2800/56		
FI分类号	C12Q1/686.ZNA.Z G01N33/50.P G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/493.A C12Q1/6851.Z C12N15/09.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB03 2G045/DA14 2G045/DA20 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS13 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	2016194043 2016-10-14 EP 2017179152 2017-06-30 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于预测患者患前列腺癌的风险的方法，或在怀疑患有PCa并因此选择了活检的患者中区分惰性癌症和侵袭性癌症的方法，和/或或特别是一种用于预测接受根治性前列腺切除术，近距离放射治疗和/或外部放射疗法治疗的前列腺癌患者中前列腺癌进展风险的方法，所述方法包括从所述患者获得的尿液检测/定量样品中吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO) mRNA或蛋白质的水平。 [选择图]无

(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2019-531738 (P2019-531738A) (令和1年11月7日(2019.11.7))	
				(43) 公表日	
(51) Int. Cl.		F 1		ターマコード (参考)	
C 1 2 Q 1 / 686 (2018.01)	C 1 2 Q 1 / 686	Z N A Z	2 G 0 4 5		
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50	P	4 B 0 6 3		
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68				
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D			
G O 1 N 33/493 (2006.01)	G O 1 N 33/493	A			
審査請求 未請求		予備審査請求 未請求		(全 23 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号		特願2019-518959 (P2019-518959)		(71) 出願人	
(86) (22) 出願日		平成29年10月13日 (2017.10.13)		ウニヴェルズィテート チューリッヒ	
(85) 翻訳文提出日		令和1年5月15日 (2019.5.15)		スイス国 チューリッヒ CH-8006	
(86) 国際出願番号		PCT/EP2017/076169		レミーストラッセ 71	
(87) 国際公開番号		W02018/069494		(74) 代理人	
(87) 国際公開日		平成30年4月19日 (2018.4.19)		弁理士 森本 敬明	
(31) 優先権主張番号		16194043.2		(72) 発明者	
(32) 優先日		平成28年10月14日 (2016.10.14)		バンゾラ, イリナ	
(33) 優先権主張国・地域又は機関		欧州特許庁 (EP)		スイス国 チューリッヒ 8052 ビュッテンヴェーク 15	
(31) 優先権主張番号		17179152.8		(72) 発明者	
(32) 優先日		平成29年6月30日 (2017.6.30)		プロベンツァーノ, マウリツィオ	
(33) 優先権主張国・地域又は機関		欧州特許庁 (EP)		スイス国 アルガウ州 ビルツィル 5708 ツェルグリ 7	
				Fターム (参考) 2G045 AA26 CB03 DA14 DA20	
				最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 前立腺癌の診断と予後のためのインドールアミン-2, 3-ジオキシゲナーゼ アッセイ					