

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041331**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.11

(21) Номер заявки
201691952

(22) Дата подачи заявки
2015.03.27

(51) Int. Cl. **G06F 19/24** (2011.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И МЕТОДЫ, ИМЕЮЩИЕ ОТНОШЕНИЕ К ДИАГНОСТИКЕ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(31) **61/972,099**

(32) **2014.03.28**

(33) **US**

(43) **2017.05.31**

(86) **PCT/US2015/023096**

(87) **WO 2015/148979 2015.10.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОПКОУ ДАЙАГНОСТИКС, ЛЛК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Стейнмиллер Дейвид, Линдер
Винсент (US), Петтерсон Ким,
Ловгрэн Тимо (FI), Лилджа Ханс,
Скардино Питер Т., Вилкерс Эндрю
Дж. (US)**

(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(56) **US-A1-20130273643
WO-A2-2013172779**

PELTOLA et al. "Immunoassay for the discrimination of free prostate-specific antigen (fPSA) forms with internal cleavages at Lys145 or Lys146 from fPSA without internal cleavages at Lys145 or Lys146", Journal of Immunological Methods, 28 April 2011 (28.04.2011), Vol. 369, Iss. 1-2, Pgs. 74-80, entire document

TALVITIE, M. "DELFIА immunoassays: Guide to Converting ELISA Assays to DELFIА", PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Pgs. 1-16. 18 December 2006 (18.12.2006). Retrieved from the Internet: <http://www.perkinelmer.com/cmsresources/images/man_delfia_elisa_conversion.pdf> on 11 June 2015 (11.06.2015), entire document

WENSKE et al. "Evaluation of molecular forms of PSA and human kallikrein 2 in predicting biochemical failure following radical prostatectomy", International Journal of Cancer, 01 February 2009 (01.02.2009), Vol. 124, Iss. 3, Pgs. 659-663, entire document

ERIKSSON et al. "Dual-Label Time-resolved Immunofluorometric Assay of Free and Total Prostate-specific Antigen Based on Recombinant Fab Fragments", Clinical Chemistry, 31 May 2000 (31.05.2000), Vol. 46, Iss. 5, Pgs. 658-666, entire document

(57) Аспекты изобретения имеют отношение к усовершенствованным способам прогнозирования, будет ли биопсия ткани предстательной железы, полученная от субъекта, содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы.

B1**041331****041331 B1**

Повышенные уровни в крови общего количества простатического специфического антигена (PSA) связаны с заболеваниями предстательной железы, включая рак предстательной железы. Имеется большое число данных о том, что измерение уровней изоформ PSA по отдельности, в отличие от объединения их вместе при одновременном измерении общего PSA, ведет к более точному предсказанию наличия рака предстательной железы у субъекта. Также существует доказательство, что измерения hK2, молекулы, которая превращает PSA из его проактивной формы в активную форму, являются информативными для таких прогнозов. Более того, для оценки статуса рака предстательной железы у субъекта были предложены основанные на таких измерениях мультимаркерные панели. Тем не менее, сохраняется потребность в усовершенствованных способах оценки рака предстательной железы, в частности, для оценки необходимости проведения инвазивной биопсии ткани предстательной железы.

Сущность изобретения

Аспекты изобретения имеют отношение к усовершенствованным способам прогнозирования, содержит ли в себе ткань предстательной железы, полученная от субъекта при проведении биопсии, рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способы включают использование образца крови, полученного от субъекта, для проведения одного или более иммуноанализов, измеряющих уровни простатических специфических антигенов. В некоторых вариантах осуществления было обнаружено, что измерение уровней простатоспецифических антигенов в препаратах плазмы дает лучшие прогностические результаты, чем результаты, полученные при измерении уровней в других препаратах крови, например, в препаратах сыворотки. В некоторых вариантах осуществления было обнаружено, что проведение некоторых иммуноанализов в буфере с низким значением pH приводит к более точному обнаружению антигена и таким образом к лучшим прогностическим результатам. Более того, в некоторых вариантах осуществления обнаружено, что улучшенные прогностические результаты могут быть получены путем объединения информации относительно измеренных уровней простатоспецифического антигена с информацией, касающейся одного или более из числа возраста субъекта, результатов прошлого пальцевого ректального исследования и результатов предшествующей биопсии. Раскрытые в данном документе усовершенствованные способы пригодны для предсказания того, показана или нет инвазивная биопсия ткани предстательной железы для определения наличия у субъекта рака предстательной железы, в частности, высокозлокачественного рака предстательной железы (например, индекс Глиссона больше или равный 7,0). Кроме того, раскрытые в этом описании способы являются полезными, поскольку они дают результаты, информирующие о вероятности того, что инвазивные и относительно опасные диагностические процедуры, такие как биопсия ткани предстательной железы, будут информативными, а их проведение является целесообразным. Соответственно данные способы являются полезными, так как они позволяют медицинским работникам принимать более обоснованные решения в отношении лечения субъектов.

Аспекты изобретения имеют отношение к способам определения вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная от субъекта с помощью биопсии, может содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления данные способы включают:

- i) проведение иммуноанализа образца плазмы крови субъекта, с помощью которого измеряют уровень общего простатоспецифического антигена (tPSA) в данном образце плазмы крови;
- ii) если уровень tPSA превышает пороговое значение, определение вероятности того, что биопсийная ткань предстательной железы может содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы путем оценки измеренного уровня tPSA и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и
- iii) если уровень tPSA находится на уровне или ниже порогового значения, проведение иммуноанализа образца плазмы крови, с помощью которого измеряют уровни свободного простатоспецифического антигена (fPSA), интактного простатоспецифического антигена (iPSA) и человеческого калликреина 2 (hK2) в образце плазмы крови, и определение вероятности того, что полученная с помощью биопсии ткань предстательной железы может содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы путем оценки измеренных уровней tPSA, fPSA iPSA и hK2 и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы включают:

- i) проведение иммуноанализа образца плазмы крови субъекта, измеряющего уровни свободного простатоспецифического антигена (fPSA), интактного простатоспецифического антигена (iPSA), общего простатоспецифического антигена (tPSA) и человеческого калликреина 2 (hK2); и
- ii) определение вероятности того, что биопсийная ткань предстательной железы будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы путем оценки измеренных уровней fPSA, iPSA, tPSA и hK2 и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта.

Дополнительные аспекты раскрытия имеют отношение к способам определения, является ли субъект кандидатом на проведение биопсии ткани предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления данные способы включают:

- i) получение образца крови от субъекта;

ii) определение вероятности того, что биопсия ткани предстательной железы будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы при использовании образца крови, полученного на стадии i), при этом

a) если уровень tPSA, измеренный при использовании образца крови, превышает пороговое значение, вероятность основывается на оценке уровня tPSA и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта, в других случаях,

b) если уровень tPSA находится на уровне или ниже порогового значения, вероятность основывается на оценке уровней tPSA, fPSA, iPSA и hK2, измеренных в образце крови, и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и

iii) установление, является ли субъект кандидатом для проведения биопсии ткани предстательной железы, основывается на вероятности того, что биопсия ткани предстательной железы будет содержать обнаружимый рак предстательной железы, как определено на стадии ii).

Дополнительные аспекты раскрытия имеют отношение к методам оценки того, имеется ли у субъекта рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способы включают:

i) получение образца крови от субъекта;

ii) определение вероятности, что биопсия ткани предстательной железы, полученной от субъекта, будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы, при этом

a) если уровень tPSA, измеренный с использованием образца крови, превышает пороговый уровень, вероятность основывается на оценке уровня tPSA и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта, в иных случаях,

b) если уровень tPSA находится на уровне или ниже порогового значения, вероятность основывается на оценке уровней tPSA, fPSA, iPSA и hK2, измеренных в образце крови, и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта;

iii) установление, является ли субъект кандидатом для проведения биопсии ткани предстательной железы, основывается на результатах стадии ii); и

iv) если субъект является кандидатом для проведения биопсии ткани предстательной железы на основе результатов, полученных на стадии ii), получение ткани предстательной железы от субъекта с помощью биопсии и установление наличия рака предстательной железы у субъекта на основе анализа ткани предстательной железы, полученной с помощью биопсии.

Дополнительные аспекты раскрытия имеют отношение к способам определения, имеется ли у субъекта рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способы включают:

i) получение биопсии ткани предстательной железы от субъекта, причем субъекту рекомендуется проведение биопсии ткани предстательной железы на основе вероятности того, что ткань предстательной железы может содержать обнаружимый рак предстательной железы, при этом

a) если уровень tPSA, измеренный в образце крови, полученном от субъекта, превышает пороговый уровень, вероятность основывается на оценке уровня tPSA и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта, в других случаях,

b) если уровень tPSA находится на уровне или ниже порогового значения, вероятность основывается на оценке уровней tPSA, fPSA, iPSA и hK2, измеренных в образце крови, и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и

ii) установление наличия рака предстательной железы у субъекта на основе анализа ткани предстательной железы, полученной с помощью биопсии.

Дополнительные аспекты раскрытия имеют отношение к методам иммуноанализа, измеряющим уровень iPSA в образце. В некоторых вариантах осуществления методы включают контактирование iPSA, присутствующего в образце, с иммобилизованным антителом, специфичным к iPSA и nicked PSA, при условиях, в которых иммобилизованное антитело связывается, по меньшей мере, с iPSA, таким образом, приводя к образованию комплекса иммобилизованное антитело-iPSA; соединение комплекса иммобилизованное антитело-iPSA с соответствующим индикатором (меченым веществом) в буфере, имеющем значение pH в пределах от 6,5 до менее чем 7,75, так что индикатор связывается с комплексом иммобилизованное антитело-iPSA; и обнаружение индикатора, связанного с комплексом иммобилизованное антитело-iPSA. В некоторых вариантах осуществления способы включают контактирование iPSA, присутствующего в образце, с иммобилизованным антителом, специфичным к iPSA и nicked PSA, при условиях, в которых иммобилизованное антитело связывается, по меньшей мере, с iPSA, таким образом, приводя к образованию комплекса иммобилизованное антитело-iPSA, при этом иммобилизованное антитело представляет собой Fab; соединение комплекса иммобилизованное антитело-iPSA с соответствующим индикатором при условиях, в которых индикатор связывается с комплексом иммобилизованное антитело-iPSA; и обнаружение индикатора, связанного с комплексом иммобилизованное антитело-iPSA. В некоторых вариантах осуществления Fab представляет собой 5A10 Fab.

Дополнительные аспекты раскрытия имеют отношение к методам иммуноанализа, измеряющим уровень hK2 в образце. В некоторых вариантах осуществления методы включают контактирование hK2, присутствующего в образце, с иммобилизованным антителом, специфичным к hK2 и nicked PSA, при условиях, в которых иммобилизованное антитело связывается, по меньшей мере, с hK2, таким образом,

приводя к образованию комплекса иммобилизованное антитело-hK2, при этом иммобилизованное антитело представляет собой Fab; соединение комплекса иммобилизованное антитело-hK2 с соответствующим индикатором; и обнаружение индикатора, связанного с комплексом иммобилизованное антитело-hK2. В некоторых вариантах осуществления Fab представляет собой $F(ab)_2$. В некоторых вариантах осуществления $F(ab)_2$ представляет собой 6H10 $F(ab)_2$.

Дополнительные аспекты раскрытия имеют отношение к методам оценки образца (например, образца плазмы крови). В некоторых вариантах осуществления методы включают (а) проведение иммуноанализа образца с целью измерения уровней fPSA, iPSA, tPSA и hK2, при этом иммуноанализ, измеряющий уровень fPSA, включает контактирование fPSA, присутствующего в образце, с захватывающим антителом H117 для получения комплекса захватывающее антитело-fPSA, и обнаружение комплекса захватывающее антитело-fPSA с помощью 5A10 маркерного антитела, при этом иммуноанализ, измеряющий уровень iPSA включает контактирование iPSA, присутствующего в образце, с захватывающим антителом 5A10 Fab для получения комплекса захватывающее антитело-iPSA, и обнаружение комплекса захватывающее антитело-iPSA с помощью 4D4 индикаторного антитела, при этом иммуноанализ, измеряющий уровень tPSA включает контактирование tPSA, присутствующего в образце, с H117 захватывающим антителом с целью получения комплекса захватывающее антитело-tPSA, и обнаружение комплекса захватывающее антитело-tPSA с помощью H50 маркерного антитела, при этом иммуноанализ, измеряющий уровень hK2, включает контактирование PSA в образце плазмы крови с блокирующими антителами, контактирование hK2, присутствующего в образце, с 6H10 $F(ab)_2$ захватывающим антителом с целью получения комплекса захватывающее антитело-hK2 и обнаружение комплекса захватывающее антитело-hK2 с помощью 7G1 маркерного антитела; и (b) оценку образца на основе измеренных уровней fPSA, iPSA, tPSA и hK2.

Дополнительные аспекты раскрытия имеют отношение к методам определения вероятности события, связанного с раком предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способы включают получение через входной интерфейс информации, свидетельствующей об уровне tPSA, присутствующего в образце плазмы крови субъекта;

получение через входной интерфейс информации о том, была ли ранее проведена биопсия ткани предстательной железы у субъекта;

оценку с использованием по меньшей мере одного процессора логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на полученной информации с целью установления вероятности события, связанного с раком предстательной железы у субъекта,

при этом оценка логистической регрессионной модели включает

определение вероятности события, связанного с раком предстательной железы, основанной, по меньшей мере, отчасти на значении tPSA и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и

вывод показателя вероятности события, связанного с раком предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления способы включают получение через входной интерфейс информации, свидетельствующей об уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, присутствующих в образце плазмы крови субъекта; получение через входной интерфейс информации о том, была ли ранее проведена биопсия ткани предстательной железы у субъекта; оценку с использованием по меньшей мере одного процессора логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на полученной информации с целью установления вероятности события, связанного с раком предстательной железы у субъекта, при этом оценка логистической регрессионной модели включает: определение вероятности события, связанного с раком предстательной железы, основанной, по меньшей мере, отчасти на информации, свидетельствующей об уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и вывод показателя вероятности события, связанного с раком предстательной железы.

В некоторых аспектах раскрытия предоставляется компьютер, предназначенный для определения вероятности события, связанного с раком предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления компьютер включает входной интерфейс, сконфигурированный для получения информации, свидетельствующей об уровне tPSA, присутствующего в образце плазмы крови субъекта, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; по меньшей мере один процессор, запрограммированный на оценку логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на полученной информации, с целью установления вероятности события, связанного с раком предстательной железы у субъекта, при этом оценка логистической регрессионной модели включает: определение вероятности события, связанного с раком предстательной железы, основанной, по меньшей мере, отчасти на значении tPSA и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и выходной интерфейс, сконфигурированный для вывода данных в отношении показателя вероятности события, связанного с раком предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления компьютер включает входной интерфейс, сконфигурированный для получения информации, свидетельствующей об уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, присутствующих в образце плазмы крови субъекта, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани

предстательной железы у субъекта; по меньшей мере один процессор, запрограммированный на оценку логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на полученной информации, с целью установления вероятности события, связанного с раком предстательной железы у субъекта, при этом оценка логистической регрессионной модели включает: определение вероятности события, связанного с раком предстательной железы, основанной, по меньшей мере, отчасти на информации, свидетельствующей об уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и выходной интерфейс, сконфигурированный для вывода данных относительно показателя вероятности события, связанного с раком предстательной железы.

В других аспектах изобретения предоставляется система для определения вероятности события, связанного с раком предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления система включает:

a) детектор, сконфигурированный для измерения уровня tPSA, присутствующего в образце плазмы крови субъекта; и

b) компьютер, имеющий электронную связь с детектором, при этом компьютер включает:

i) входной интерфейс, сконфигурированный для получения информации от детектора, свидетельствующей об измеренном уровне tPSA, и получения информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта;

ii) по меньшей мере один процессор, запрограммированный на оценку логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на полученной информации, с целью установления вероятности события, связанного с раком предстательной железы у субъекта, при этом оценка логистической регрессионной модели включает: определение вероятности события, связанного с раком предстательной железы, основанной, по меньшей мере, отчасти на информации, свидетельствующей об уровне tPSA, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и

iii) выходной интерфейс, сконфигурированный для вывода данных в отношении показателя вероятности события, связанного с раком предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления система включает:

a) детектор, сконфигурированный для измерения уровней tPSA, fPSA, iPSA и hK2, присутствующих в образце плазмы крови субъекта; и

b) компьютер, имеющий электронную связь с детектором, при этом компьютер содержит:

i) входной интерфейс, сконфигурированный для получения информации от детектора, свидетельствующей об измеренных уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, и для получения информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта;

ii) по меньшей мере один процессор, запрограммированный на оценку логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на полученной информации с целью установления вероятности события, связанного с раком предстательной железы у субъекта, при этом

оценка логистической регрессионной модели включает

определение вероятности события, связанного с раком предстательной железы, основанной, по меньшей мере, отчасти на информации, свидетельствующей об уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и

iii) выходной интерфейс, сконфигурированный для вывода данных в отношении показателя вероятности события, связанного с раком предстательной железы.

В дополнительных аспектах раскрытия предоставляется машиночитаемый носитель информации, закодированный множеством команд, при выполнении которых компьютер осуществляет определение вероятности события, связанного с раком предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ включает: оценку логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на информации, свидетельствующей об уровне tPSA, присутствующего в образце плазмы крови субъекта, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта с целью определения вероятности события, связанного с раком предстательной железы у субъекта, при этом оценка логистической регрессионной модели включает определение вероятности события, связанного с раком предстательной железы, основанной, по меньшей мере, отчасти на значении tPSA, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и вывод данных в отношении показателя вероятности события, связанного с раком предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ включает оценку логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на информации, свидетельствующей об уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, присутствующих в образце плазмы крови субъекта, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта с целью определения вероятности события, связанного с раком предстательной железы у субъекта, при этом оценка логистической регрессионной модели включает: определение вероятности события, связанного с раком предстательной железы, основанной, по меньшей мере, отчасти на информации, свидетельствующей об уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и вывод данных в отношении показателя вероятности события, связанного с раком предстательной железы.

Краткое описание фигур

Фиг. 1А - не имеющее ограничительного характера схематическое изображение процесса определения вероятности того, что биопсийный материал будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы;

фиг. 1В - не имеющее ограничительного характера схематическое изображение компьютера, сконфигурированного для осуществления процесса определения вероятности того, что биопсийный материал будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы;

фиг. 1С - не имеющее ограничительного характера схематическое изображение компьютерной сети, сконфигурированной для осуществления процесса определения вероятности того, что биопсийный материал будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы;

фиг. 2 - не имеющий ограничительного характера пример графика, сравнивающего действительный риск с прогностическим риском высокозлокачественного рака;

фиг. 3 - не имеющий ограничительного характера пример графика, сравнивающего действительный риск с прогностическим риском рака любой степени злокачественности;

фиг. 4 - не имеющий ограничительного характера пример графика, показывающего анализ кривой принятия решений для высокозлокачественного рака;

фиг. 5 - не имеющий ограничительного характера пример графика, показывающего анализ кривой принятия решений для рака любой степени;

фиг. 6 - не имеющий ограничительного характера пример ROC-кривой (Receiver Operating Curve) для высокозлокачественного рака;

фиг. 7 - не имеющий ограничительного характера пример ROC-кривой для рака любой степени;

фиг. 8А - не имеющий ограничительного характера пример графика положительной прогностической значимости в соответствии с порогом биопсии для высокозлокачественного рака;

фиг. 8В - не имеющий ограничительного характера пример графика отрицательной прогностической значимости в соответствии с порогом биопсии для высокозлокачественного рака;

фиг. 9А - не имеющий ограничительного характера пример графика положительной прогностической значимости в соответствии с порогом биопсии для рака любой степени;

фиг. 9В - не имеющий ограничительного характера пример графика отрицательной прогностической значимости в соответствии с порогом биопсии для рака любой степени;

фиг. 10 - не имеющий ограничительного характера пример графика, демонстрирующего долю мужчин, у которых высокозлокачественная болезнь "скрывалась" до возраста, в котором была проведена биопсия;

фиг. 11А и 11В - не имеющий ограничительного характера пример графиков, демонстрирующих прогностическую вероятность в сравнении с действительной вероятностью обнаружения высокозлокачественного рака у всех пациентов валидационного исследования;

фиг. 11С - не имеющий ограничительного характера пример графика, демонстрирующего прогностическую вероятность в сравнении с действительной вероятностью обнаружения рака любой степени у всех пациентов валидационного исследования;

фиг. 12А и 12В - не имеющий ограничительного характера пример графиков, демонстрирующих прогностическую вероятность в сравнении с действительной вероятностью обнаружения высокозлокачественного рака у пациентов в возрасте 50-75 лет валидационного исследования;

фиг. 12С - не имеющий ограничительного характера пример графика, демонстрирующего прогностическую вероятность в сравнении с действительной вероятностью обнаружения рака любой степени у всех пациентов в возрасте 50-75 лет валидационного исследования;

фиг. 13А и 13В - не имеющий ограничительного характера пример графиков, демонстрирующих прогностическую вероятность в сравнении с действительной вероятностью обнаружения высокозлокачественного рака у пациентов в возрасте менее 71 года валидационного исследования;

фиг. 13С - не имеющий ограничительного характера пример графика, демонстрирующего прогностическую вероятность в сравнении с действительной вероятностью обнаружения рака любой степени у пациентов в возрасте менее 71 года;

фиг. 14А и 14В - не имеющий ограничительного характера пример графиков, демонстрирующих чистую пользу в сравнении с уровнями пороговой вероятности для всех пациентов валидационного исследования;

фиг. 15А и 15В - не имеющий ограничительного характера пример графиков, демонстрирующих чистую пользу в сравнении с уровнями пороговой вероятности для пациентов в возрасте 50-75 лет валидационного исследования; и

фиг. 16А и 16В - не имеющий ограничительного характера пример графиков, демонстрирующих чистую пользу в сравнении с уровнями пороговой вероятности для всех пациентов в возрасте менее 71 года валидационного исследования.

Подробное описание изобретения

Аспекты раскрытия имеют отношение к усовершенствованным способам прогнозирования, будет ли ткань предстательной железы, полученная от субъекта путем биопсии, содержать поддающийся обна-

ружению рак предстательной железы, включая высокозлокачественный рак предстательной железы (индекс Глиссона 7 или больше). Таким образом, описанные в данном документе способы могут использоваться медицинским работником в целях установления, является ли обоснованным проведение биопсии ткани предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способы включают использование полученного от субъекта образца крови для проведения одного или более иммуноанализов, с помощью которых измеряют уровни простатоспецифических антигенов, таких как общий простатоспецифический антиген (tPSA), свободный простатоспецифический антиген (fPSA), интактный простатоспецифический антиген (iPSA) и человеческий калликреин 2 (hK2). В некоторых вариантах осуществления было обнаружено, что измерение одного или более уровней этих антигенов в препаратах плазмы дает лучшие прогностические результаты, чем результаты, полученные путем измерения уровней в других препаратах крови, таких как сыворотка. В некоторых вариантах осуществления предоставляется предсказательная модель (например, логистическая регрессионная модель), учитывающая уровни в плазме tPSA, fPSA, iPSA и/или hK2, для определения вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная с помощью биопсии, будет содержать поддающийся обнаружению рак. Более того, в некоторых вариантах осуществления было обнаружено, что могут быть получены улучшенные прогностические результаты при сочетании информации, касающейся измеренных уровней простатоспецифического антигена, с информацией о пациенте, в частности, с информацией относительно того, проводилась или нет ранее биопсия у субъекта с целью обнаружения наличия рака предстательной железы. Соответственно предоставляются улучшенные способы, подходящие для установления того, следует ли подвергать субъекта процедуре инвазивной биопсии ткани предстательной железы.

Аспекты раскрытия предоставляют способы определения вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная от субъекта при биопсии, будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы. Такие способы могут включать проведение иммуноанализа полученного от субъекта образца плазмы крови, измеряющего, по меньшей мере, уровень общего простатоспецифического антигена (tPSA) в образце плазмы крови. Если уровень tPSA превышает пороговый уровень, тогда вероятность того, что ткань предстательной железы, полученная при проведении биопсии, будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы, может быть определена путем оценки измеренного уровня tPSA и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта. С другой стороны, если уровень tPSA находится на уровне или ниже порогового значения, тогда вероятность того, что ткань предстательной железы, полученная при проведении биопсии, будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы, может быть определена путем оценки измеренных уровней tPSA, fPSA, iPSA и hK2 и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта. Соответственно в некоторых вариантах осуществления предоставленные в данном описании способы могут включать проведение иммуноанализа образца плазмы крови, который измеряет уровни свободного простатоспецифического антигена (fPSA), интактного простатоспецифического антигена (iPSA) и человеческого калликреина 2 (hK2) в образце плазмы крови. В некоторых вариантах осуществления вероятность, кроме того, определяется оценкой параметра, характеризующего возраст субъекта. В некоторых вариантах осуществления вероятность, кроме того, определяется путем оценки одного или более параметров, характеризующих результаты проведения пальцевого ректального исследования у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень tPSA, использованный для выбора модели, представляет собой уровень, который указывает, будет ли достаточным использование tPSA в отдельности или в сочетании с некоторой конкретной информацией о пациенте (например, предшествующем статусе биопсии) для целей установления вероятности того, что полученная с помощью биопсии ткань предстательной железы будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение составляет 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 нг/мл. Поскольку информации об уровнях tPSA в сочетании с некоторой конкретной информацией о пациенте, в частности, о статусе предшествующей биопсии, может быть достаточно, чтобы сделать информативные прогнозы, в некоторых вариантах осуществления может быть экономически целесообразно не проводить иммуноанализы для обнаружения других антигенов до определения вначале уровней tPSA. Однако в некоторых вариантах осуществления уровни tPSA могут определяться параллельно или вместе с уровнями других маркеров, например, fPSA, iPSA или hK2.

В некоторых вариантах осуществления уровни антигенов (например, уровни двух или более из tPSA, fPSA, iPSA и hK2) определяются одновременно в одном и том же анализе. В других вариантах осуществления такие уровни антигенов определяют в отдельных анализах. В некоторых вариантах осуществления уровни антигенов определяют в одном и том же первоначальном заборе крови (например, заборе венозной крови) у пациента. В некоторых вариантах осуществления уровни антигенов определяют в разных заборах крови. В некоторых вариантах осуществления уровни антигенов определяют, используя препараты плазмы, полученной из одного и того же или разных заборов крови. В некоторых вариантах осуществления уровни одного или более антигенов определяют, используя препарат плазмы, а один или более других антигенов определяют, используя другой тип препарата крови, например, сыворотку. Плазма крови представляет собой жидкий компонент крови бледно-желтого цвета. В некоторых

вариантах осуществления плазму крови можно получить вращением пробирки с кровью, содержащей антикоагулянт (например, гепарин, ЭДТА и т.д.) в центрифуге, до тех пор, пока клетки крови и дебрис не осядут на дно пробирки, после чего плазму крови можно слить или извлечь.

В описании предоставляются способы определения, является ли субъектом кандидатом на проведение биопсии ткани предстательной железы. Такие способы могут включать получение врачом или медицинским работником образца крови от субъекта и определение вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная с помощью биопсии, будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы, основываясь, по меньшей мере, отчасти на измеренных уровнях антигенов, определенных в образце крови. Образец крови может быть обработан на месте (например, в том же самом медицинском или коммерческом учреждении, где субъект проходит обследование) или может быть отослан в стороннюю лабораторию или предприятие для обработки и проведения исследования. Если уровень tPSA, измеренный в образце крови, превышает пороговое значение, вероятность определяется, исходя из оценки уровня tPSA. В ином случае, если уровень tPSA находится на уровне или ниже порогового значения, вероятность основывается на оценке уровней tPSA, fPSA, iPSA и hK2, измеренных в образце крови. В любом случае, вероятность, как правило, основывается на оценке параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта. Врач или медицинский работник может установить, является ли субъект кандидатом для проведения биопсии ткани предстательной железы на основе вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная с помощью биопсии, будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления врач или медицинский работник может устанавливать граничное значение (порог отсечения) вероятности, при этом биопсия будет проводиться в том случае, если вероятность находится на уровне или выше порога отсечения. Например, если вероятность выше, чем 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99% или более, тогда врач или медицинский работник может установить, что субъект является кандидатом для проведения биопсии ткани предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления порог отсечения, основанный на вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная путем биопсии, будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы высокой степени злокачественности (например, счет по шкале Глисона 7 или больше), составляет 5, 7.5, 10, 12.5 или 15%. В некоторых вариантах осуществления порог отсечения, основанный на вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная путем биопсии, будет содержать поддающийся обнаружению рак предстательной железы любой степени, составляет 10, 12.5, 15, 20, 25 или 30%. В некоторых вариантах осуществления, если вероятность ниже порога отсечения, тогда врач или медицинский работник не будет назначать проведение биопсии, но будет продолжать контролировать субъекта, например, в отношении увеличения значения вероятности или изменений других факторов риска, свидетельствующих о раке предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления, если субъект определяется как кандидат для проведения биопсии ткани предстательной железы, тогда врач или медицинский работник может получить или отдать распоряжение о получении с помощью биопсии ткани предстательной железы от субъекта и определить, имеется ли у субъекта рак предстательной железы на основе исследования ткани предстательной железы, полученной с помощью биопсии. Ткань предстательной железы, полученную биопсией, можно исследовать с помощью любого подходящего способа, включая, например, цитологическое или гистологическое исследование. Образец ткани может быть охарактеризован на основе клинической стадии рака. Образец может быть охарактеризован на основе шкалы Глисона. Глисон 3+3 (6,0) соответствует опухоли низкой степени злокачественности и благоприятному прогнозу. Глисон 3+4 (7,0) и 3+5 (8,0) обычно соответствует опухоли, имеющей ткань преимущественно с низкой степенью злокачественности с некоторым количеством высокозлокачественной ткани. Глисон 4+3 (7,0) и 5+3 (8,0) обычно соответствует опухоли, имеющей ткань преимущественно с высокой степенью трансформации с некоторым количеством ткани с низкой степенью трансформации. Глисон 4+4 (8,0), 4+5 (9,0), (9,0), и 5+5 (10,0) соответствует высокозлокачественным опухолям. Соответственно в некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы включает высокозлокачественный рак (например, Глисон $\geq 7,0$).

Иммуноанализы

Уровни простатических специфических антигенов (например, tPSA, iPSA, fPSA и hK2) можно оценить с помощью любого подходящего способа. В некоторых вариантах осуществления предоставляются антитела или антигенсвязывающие фрагменты, подходящие для применения в иммуноанализах. Иммуноанализы, использующие такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, могут быть конкурентными и неконкурентными иммуноанализами, как в прямом, так и в непрямом формате. Не ограничивающими примерами подобных иммуноанализов являются иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), сэндвич-анализ (количественный иммунный анализ), проточная цитометрия, вестерн-блоттинг, анализы иммунопреципитации, иммуногистохимия, иммуномикроскопия, иммунохроматографические анализы с использованием технологии lateral flow и протеомные технологии. Антигены или антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ними, могут быть иммобилизованы, например, путем связывания с твердыми подложками (например, носителями, мембраной, колонками, протеомными наборами и т.д.). Примеры материалов для твердых подложек включают стекло,

полистирол, поливинилхлорид, поливинилидендифторид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозы, природную и модифицированную целлюлозу, такую как нитроцеллюлоза, полиакриламиды, агарозы и магнетит. По характеру подложка может быть или фиксированной или взвешенной в растворе (например, зерна).

В некоторых вариантах осуществления меченые антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться в качестве индикаторов (меток) для обнаружения комплексов антител, связанных с антигенами. Примеры типичных меток, которые можно использовать для обнаружения, включают ферменты, радиоизотопы, коллоидные металлы, флуоресцентные соединения, магнитные, хемилюминисцентные соединения и биолюминисцентные соединения. Радиомеченые антитела получают известными способами путем присоединения радиоактивного изотопа, такого как ^{153}Eu , ^3H , ^{32}P , ^{35}S , ^{59}Fe или ^{125}I , который затем может быть обнаружен с помощью счетчика гамма частиц, сцинтилляционного счетчика или авторадиографии. Как обсуждается в данном документе, альтернативно антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены ферментами, такими как алкогольдегидрогеназа дрожжей, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и тому подобным, после чего обрабатываются и обнаруживаются спектрофотометрически или визуально. Подходящие флуоресцентные метки включают флуоресцеин изотиоцианат, флуорескамин, родамин и тому подобное. Подходящие хемилюминисцентные метки включают луминол, имидазол, сложный эфир щавелевой кислоты, люциферин и другие.

Иммуноанализ может включать контактирование образца, например, образца плазмы, содержащего антиген, с антителом или антигенсвязывающим фрагментом (например, F(ab) , F(ab)_2), при условиях, обеспечивающих образование связывающих комплексов между антителом или антигенсвязывающим фрагментом и антигеном. В некоторых вариантах осуществления образец плазмы контактирует с антителом или антигенсвязывающим фрагментом при условиях, подходящих для связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с антигеном-мишенью, если антиген присутствует в образце. Это может быть осуществлено в подходящей реакционной камере, такой как пробирка, лунка планшета, ванна с мембраной, культуральная чашка, микропрепарат и другая камера. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент является иммобилизованным на твердой подложке. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с антигеном в образце, могут называться захватывающими антителами. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело содержит метку (например, биотинную метку), которая способствует его иммобилизации на твердой подложке путем вовлекающего метку взаимодействия (например, взаимодействия биотина со стрептавидином, иммобилизованным на твердой подложке). В некоторых вариантах осуществления твердая подложка является поверхностью реакционной камеры. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка выполнена из полимерной мембраны (например, нитроцеллюлозный стрип, поливинилидендифторидная (PVDF) мембрана и т.д.). В других вариантах осуществления твердая подложка является биологической структурой (например, поверхностью бактериальной клетки). Другие типичные примеры твердых подложек раскрываются в описании и будут понятны среднему специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитело и антигенсвязывающий фрагмент является иммобилизованным на твердой подложке до контактирования с антигеном. В других вариантах осуществления иммобилизация антитела и антигенсвязывающего фрагмента осуществляется после образования связывающих комплексов. В следующих вариантах осуществления антиген иммобилизуют на твердой подложке до образования связывающих комплексов. В некоторых вариантах осуществления в реакционную камеру может быть добавлена метка (индикатор) для обнаружения иммобилизованных связывающих комплексов. В некоторых вариантах осуществления метка содержит поддающееся обнаружению меченое вторичное антитело, направленное против антигена. В некоторых вариантах осуществления метка содержит поддающееся обнаружению меченое вторичное антитело, направленное против иммобилизованного антитела. В некоторых вариантах осуществления первичное антитело или антигенсвязывающий фрагмент сам является помеченным обнаружимым образом.

В одном варианте осуществления раскрытые в описании методы иммуноанализа включают иммобилизацию антитела или антигенсвязывающих фрагментов на твердой подложке; нанесение образца (например, образца плазмы) на твердую подложку при условиях, предоставляющих возможность связывания антигена с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, в случае его присутствия в образце; удаление избытка образца с твердой подложки; нанесение индикатора (например, обнаружимым образом меченого антитела или антигенсвязывающих фрагментов) при условиях, предоставляющих возможность связывания индикатора с антиген-связанными иммобилизованными антителами или антигенсвязывающими фрагментами; промывку твердой подложки и количественный анализ присутствия индикатора.

В некоторых вариантах осуществления антитело и антигенсвязывающий фрагмент иммобилизуются на твердой подложке после контактирования с антигеном в реакционной камере. В некоторых вариантах осуществления антитело и антигенсвязывающий фрагмент иммобилизуют на твердой подложке до контактирования с антигеном в реакционной камере. В любом случае в реакционную камеру для обнаружения иммобилизованных связывающих комплексов может быть добавлен индикатор. В некоторых вариантах осуществления индикатор содержит меченое обнаружимым образом вторичное антитело, направленное против антигена. В некоторых вариантах осуществления индикатор содержит меченое обна-

ружимым образом вторичное антитело, направленное против первичного антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Как раскрывается в описании, обнаружимый индикатор (метка) может быть, например, радиоизотопом, флуорофором, люминесцирующей молекулой, ферментом, молекулой биотина, эпитопной меткой или молекулой красителя. Подходящие обнаружимые метки описаны в документе.

В некоторых вариантах осуществления было обнаружено, что проведение некоторых иммуноанализов в буфере с низким значением pH приводит к обнаружению антигена с большей чувствительностью. Соответственно в некоторых вариантах осуществления меченое антитело контактирует с захватывающим антителом в буфере, имеющем значение pH в пределах от 6,5 до менее, чем 7,75, благодаря чему метка связывается с комплексом захватывающее антитело-антиген. В некоторых вариантах осуществления значение pH буфера составляет около 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 или 7,6.

Следует понимать, что во многих раскрытых в описании способах анализа захватывающие антитела могут заменяться мечеными антителами.

В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ, измеряющий уровень fPSA, включает контактирование fPSA, присутствующего в образце плазмы крови, с захватывающим антителом, специфическим к fPSA при условиях, в которых первое захватывающее антитело связывается с fPSA, таким образом образуя комплекс захватывающее антитело-fPSA; и обнаружение комплекса захватывающее антитело-fPSA с помощью индикатора. Захватывающее антитело может быть H117 антителом. В некоторых вариантах осуществления индикатор содержит 5A10 антитело или его фрагмент (например, F(ab) фрагмент).

Ниже показаны последовательности тяжелой и легкой цепи антитела 5A10, которые могут быть включены во фрагменты:

5A10 тяжелая цепь

EVQLVESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTTGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHLYW
DEDKRYNP SLKSR LTISEDSSRNQVFLKITSVGPADSATYYCARKGYYGYFDYWGGTA
LTVSS (SEQ ID NO: 1)

5A10 легкая цепь

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNTDVAWYQQKPGQSPKALIFSTSYR
SSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYFCQQYSNYPLTFGAGTKVDLN (SEQ ID
NO: 2)

В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ, измеряющий уровень iPSA, включает контактирование iPSA, присутствующего в образце плазмы крови, с захватывающим антителом, специфичным к свободному PSA, который включает iPSA и nicked PSA, при условиях, в которых второе захватывающее антитело связывается, по меньшей мере, с iPSA, таким образом, образуя комплекс захватывающее антитело-iPSA, и обнаружение комплекса захватывающее антитело-iPSA с помощью второго индикатора. В некоторых вариантах осуществления индикатор содержит 4D4 антитело. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело представляет собой 5A10 антитело или его фрагмент (например, F(ab) фрагмент).

В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ, измеряющий уровень tPSA, включает контактирование tPSA, присутствующего в образце плазмы крови, с захватывающим антителом, специфичным к tPSA при условиях, в которых третье захватывающее антитело связывается с tPSA, таким образом, образуя комплекс захватывающее антитело-tPSA; и обнаружение комплекса захватывающее антитело-tPSA с помощью третьей метки. В некоторых вариантах осуществления индикатор содержит H50 антитело. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело является H117 антителом.

В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ, измеряющий уровень hK2, включает контактирование PSA в образце плазмы крови с блокирующими антителами, специфичными к PSA; контактирование hK2, присутствующего в образце плазмы крови, с четвертым захватывающим антителом, специфичным к hK2, при условиях, в которых четвертое захватывающее антитело связывается с hK2, таким образом, образуя комплекс захватывающее антитело-hK2; и обнаружение комплекса захватывающее антитело-hK2 с помощью четвертого индикатора. В некоторых вариантах осуществления индикатор содержит 7G1 антитело. В некоторых вариантах осуществления захватывающее антитело представляет собой 6H10 F(ab)₂. В некоторых вариантах осуществления блокирующие антитела включают 5H7 антитело, 5H6 антитело и 2E9 антитело.

В табл. 0 ниже перечислены антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые могут использоваться в раскрытых в описании способах, и их соответствующие эпитопы.

Таблица 0. Антитела и эпитопы/источники антител

Название антитела	Эпитоп	Ссылка или источник
F(ab) ₂ 6H10		Becker <i>et al.</i> 2000, Sensitive и Specific Immunodetection of Human Glandular Kallikrein 2 in Serum. Clin Chem. 46(2), 198-206.
2E9	аминокислоты 79-93 и/или 80-91 белка PSA (SEQ ID NO: 3)	Lilja <i>et al.</i> 1991. Prostate-Specific Antigen in Serum Occurs Predominantly in Complex with alpha-1-Antichymotrypsin. Clin Chem. 37(9), 1618-1625. Piironen, <i>et al.</i> Determination и analysis of antigenic epitopes of prostate specific antigen (PSA) и human glandular kallikrein 2 (hK2) using synthetic peptides и компьютер modeling. Protein Science (1998), 7:259-269
5F7		Nurmikko <i>et al.</i> 2000, Production и Characterization of Novel Anti-Prostate-specific Antigen (PSA) Monoclonal Антитела That Do Not Detect Internally Cleaved Lys145-Lys146 Inactive PSA. Clin Chem. 46(10):1610-1618.
5H6	аминокислоты 225-237 белка PSA (SEQ ID NO: 3)	Nurmikko <i>et al.</i> 2000, <i>Supra</i>
7G1		Nurmikko <i>et al.</i> 2000, <i>Supra</i>
Fab 5A10	аминокислоты 75-89, 80-94 и/или 82-39 белка PSA (SEQ ID NO: 3)	Eriksson <i>et al.</i> 2000, Dual-label time-resolved immunofluorometric assay of свободный и total Prostate-specific Antigen Based on Recombinant Fab Fragments. Clin Chem 46(5), 658-666. Piironen <i>et al.</i> <i>Supra</i>
4D4	аминокислоты 130-144 белка PSA (SEQ ID NO: 3)	Патент США № 7872104
H117		Патент США № 5672480
H50		Патент США № 5672480
5A10	аминокислоты 75-89, 80-94 и/или 82-39 белка PSA (SEQ ID NO: 3)	U.S. Patent No. 5939533, European Collection of Animal Cell Cultures Accession number 93091201. Piironen <i>et al.</i> <i>Supra</i>

Микроструйные анализаторы образцов

Следует понимать, что любой из раскрытых в описании методов иммуноанализа может быть осуществлен при помощи микроструйного устройства (например, микроструйного анализатора образцов). Например, микроструйное устройство может использоваться для обнаружения одной или более характерных черт маркеров (например, уровней tPSA, fPSA, iPSA или hK2). В некоторых вариантах осуществления устройство представляет собой микроструйный анализатор образцов, сконфигурированный, например, для анализа образца, предоставленного в кассете, имеющей один или более микроструйных каналов, предназначенных для содержания образца и/или направляющих ток образца, который содержит компоненты для иммуноанализа (например, комплексы антиген-антитело, метки и т.д.). В некоторых вариантах осуществления прибор дополнительно содержит оптическую систему, включающую один или более источников света и/или один или более детекторов, сконфигурированных для измерения уровней комплексов антиген-антитело и/или индикаторе, присутствующих в одном или более микрофлюидных каналах. Более того, в некоторых вариантах осуществления предоставляются системы, которые могут включать процессор или компьютер, запрограммированный для оценки предсказательной модели (например, логистической регрессионной модели), использующие электронную связь с микроструйным устройством (например, микроструйным анализатором образцов) или другим прибором для определения вероятности события, связанного с раком предстательной железы, исходя из уровней маркеров (напри-

мер, уровней tPSA, fPSA, iPSA или hK2).

Неограничивающие примеры подходящих микроструйных устройств раскрыты в опубликованной патентной заявке США 2013/0273643, озаглавленной "METHODS AND APPARATUSES FOR PREDICTING RISK OF PROSTATE CANCER AND PROSTATE GLAND VOLUME," опубликованной 17 октября 2013, содержание которой полностью включается в данное описание путем отсылки во всех отношениях. Однако должно быть понятно, что также могут использоваться другие типы устройств (например, планшетные ридеры, микролуночные анализаторы для анализов типа ELISA и т.д.), поскольку раскрытие не ограничивается в этом отношении.

Предсказательные модели и компьютеризированные методы

Аспекты раскрытия предоставляют компьютеризированные методы для определения вероятности события, связанного с раком предстательной железы, например, вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная с помощью биопсии, будет содержать поддающийся обнаружению рак. Такие методы могут включать получение через входной интерфейс информации, свидетельствующей об уровне tPSA, присутствующего в образце плазмы крови субъекта, и получение через входной интерфейс информации о том, подвергался ли ранее субъект процедуре биопсии ткани предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают оценку с использованием по меньшей мере одного процессора подходящей предсказательной модели (например, логистической регрессионной модели), основанной, по меньшей мере, отчасти на полученной информации, с целью определения вероятности события, связанного с раком предстательной железы у субъекта. Предсказательная модель может определить вероятность события, связанного с раком предстательной железы, основываясь, по меньшей мере, отчасти на измеренных уровнях tPSA и информации о том, подвергался ли ранее субъект процедуре биопсии ткани предстательной железы. Предсказательная модель может определить вероятность события, связанного с раком предстательной железы, основываясь, по меньшей мере, отчасти на измеренных уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, и информации о том, подвергался ли ранее субъект процедуре биопсии ткани предстательной железы.

Фиг. 1 иллюстрирует схему процесса 100 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытия. На стадии 101, по меньшей мере один процессор получает данные о пациенте, представляющие одно или более значений и относящиеся к возрасту, результатам пальцевого ректального исследования и/или результатам предшествующей биопсии, для обработки с использованием одного или более методов, описанных в данном документе. На стадии 102, по меньшей мере один процессор получает одно или более значений, представляющих данные о маркерах для tPSA, fPSA, iPSA и/или hK2. Эти значения могут быть получены любым подходящим путем, включая, без ограничения, путь через локальный входной интерфейс, такой как клавиатура, сенсорный экран, микрофон или другое входное устройство, от подключенного к единой сети интерфейса, который получает значение(я) от устройства, расположенного удаленно от процессора(ов), или непосредственно от одного или более детекторов, которые измеряют уровень маркеров в крови (например, в исполнении, когда процессор(ы) объединены с измерительным прибором, включающим один или более детекторов).

На стадии 103, после получения значения (значений) tPSA процесс протекает следующим образом: если уровни tPSA превышают пороговое значение (например, 25 нг/мл), тогда выбирают первую предсказательную модель, а если уровни tPSA находятся на уровне или ниже порогового значения, тогда выбирают вторую предсказательную модель. Соответственно на стадии 104, если уровни tPSA превышают пороговое значение, тогда выбирают предсказательную модель, которая основывается на статусе DRE, статусе предшествующей биопсии и уровнях tPSA. Альтернативно на стадии 105, если уровни tPSA находятся на уровне или ниже порогового значения, тогда предсказательную модель выбирают, исходя из DRE статуса, статуса предшествующей биопсии и уровней tPSA, fPSA, iPSA и hK2. Предсказательная модель стадии 104, 105 используется для определения вероятности того, что у субъекта имеется рак предстательной железы. Прогноз может быть сделан для рака любой степени злокачественности или для высокозлокачественного рака, в зависимости от используемой модели.

После определения вероятности рака процесс протекает до стадии 106, когда информация о вероятности передается пользователю (например, врачу, пациенту) и является основанием для проведения дополнительной диагностической процедуры и/или принятия решения, связанного с лечением. Информация о вероятности может быть выдана любым подходящим способом. Например, в некоторых вариантах осуществления вероятность может отображаться в виде численного значения на экране дисплея. В других вариантах осуществления для выдачи данных о вероятности может использоваться один или более световых или других визуальных индикаторов на устройстве. В других вариантах осуществления вероятность может предоставляться с использованием звукового выходного сигнала, тактильного сигнала или какой-либо комбинации одного или более звуковых, тактильных и визуальных выходных сигналов. В некоторых вариантах осуществления выведение данных о вероятности включает отправку информации подключенному к единой сети устройству, чтобы информировать пользователя об установленной вероятности. Например, вероятность может быть определена с помощью одного или более процессоров, расположенных удаленно, а информация о вероятности, являющаяся результатом определения вероятности в удаленном месте, может быть послана на электронное устройство пользователя (например, врача) с

помощью одной или более сетей. Электронное устройство, обеспечивающее выход на пользователя в соответствии с описанными в данном документе методами, может быть любым подходящим устройством, включая, но не ограничиваясь этим, переносной, настольный или планшетный компьютер, смартфон, пейджер, персональный цифровой помощник и электронный дисплей.

В некоторых вариантах осуществления вероятность рака предстательной железы определяется в соответствии с уравнением (1), показанным ниже:

$$\text{Probability} = \frac{e^L}{1 + e^L} \quad (1)$$

где логит (L) определяется с помощью любой из множества логистических регрессионных моделей. Не имеющие ограничительного характера примеры различных типов логистических регрессионных моделей, которые могут использоваться в соответствии с описанными в данном документе методиками, включают следующее.

1. Простая модель (только tPSA).

$$L = \beta_0 + \beta_1(Age) + \beta_2(tPSA) + \beta_3(priorbx) \quad (2)$$

или

$$L = \beta_0 + \beta_1 tpsa + \beta_2 dre_{neg} + \beta_3 dre_{pos} + \beta_4 priorbx \quad (3)$$

2. Четыре модели анализа с использованием отношения свободный/общий.

В этой модели отношение свободного PSA к общему PSA используется вместо свободного PSA.

$$L = \beta_0 + \beta_1(Age) + \beta_2(tPSA) + \beta_3\left(\frac{fPSA}{tPSA}\right) + \beta_4(iPSA) + \beta_5(hK2) + \beta_6(priorbx) \quad (4)$$

3. Четыре модели анализа с использованием log(tPSA) и отношения свободный/общий.

В этой модели log tPSA заменяет член tPSA, чтобы учитывать повышенный вклад этого прогностического фактора.

$$L = \beta_0 + \beta_1(Age) + \beta_2(\log[tPSA]) + \beta_3\left(\frac{fPSA}{tPSA}\right) + \beta_4(iPSA) + \beta_5(hK2) + \beta_6(priorbx) \quad (5)$$

4. Полиномиальная модель.

В этой модели включаются дополнительные нелинейные члены для tPSA и fPSA. В уравнении, предоставленном ниже, используется площадь tPSA, чтобы подчеркнуть прямую зависимость между этим членом и риском рака предстательной железы, а квадратный корень члена свободный/общий PSA используется, чтобы отразить обратную связь этого члена с риском. Однако, следует понимать, что члены полинома высокого порядка (например, кубические) также могут включаться в некоторых вариантах осуществления.

$$L = \beta_0 + \beta_1(Age) + \beta_2(tPSA) + \beta_3(fPSA) + \beta_4(iPSA) + \beta_5(hK2) + \beta_6(tPSA^2) + \beta_7\left(\sqrt{\frac{fPSA}{tPSA}}\right) + \beta_8(priorbx) \quad (6)$$

5. Линейные сплайны для всех четырех анализов.

В этой модели добавлены линейные сплайны с одним узлом при медианном значении. Сплайны могут быть определены с помощью следующих уравнений:

$$\begin{aligned} sp1(x) &= x && \text{если } x < knot \\ sp1(x) &= knot && \text{если } x \geq knot \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} sp2(x) &= 0 && \text{если } x < knot \\ sp2(x) &= x - knot && \text{если } x \geq knot \end{aligned}$$

при этом данная модель изображается как

$$\begin{aligned} L = & \beta_0 + \beta_1(Age) + \beta_2(tPSA) + \beta_3(fPSA) + \beta_4(iPSA) + \beta_5(hK2) + \beta_6(sp1[tPSA]) \\ & + \beta_7(sp2[tPSA]) + \beta_8(sp1[fPSA]) + \beta_9(sp2[fPSA]) + \beta_{10}(sp1[iPSA]) + \beta_{11}(sp2[iPSA]) \\ & + \beta_{12}(sp1[hK2]) + \beta_{13}(sp2[hK2]) + \beta_{14}(priorbx) \end{aligned} \quad (8)$$

6. Линейные сплайны для tPSA и fPSA.

В этой модели линейные сплайны включаются только для tPSA и fPSA, чтобы уменьшить число переменных и упростить модель.

$$L = \beta_0 + \beta_1 (Age) + \beta_2 (tPSA) + \beta_3 (fPSA) + \beta_4 (iPSA) + \beta_5 (hK2) + \beta_6 (sp1[tPSA]) + \beta_7 (sp2[tPSA]) + \beta_8 (sp1[fPSA]) + \beta_9 (sp2[fPSA]) + \beta_{10}(priorbx) \quad (9)$$

В уравнениях, представленных выше, "priorbx" является двоичным значением, свидетельствующим о том, проводилась ли ранее биопсия у субъекта для обнаружения рака предстательной железы. Значение 1 показывает, что биопсия ранее проводилась, и значение 0 говорит о том, что биопсия ранее не проводилась.

Кубические сплайны для всех четырех анализов

В этой модели для каждого члена включены кубические сплайны. В предоставленном ниже примере описан кубический сплайн с четырьмя узлами. Однако, следует понимать, что альтернативно может использоваться кубический сплайн, использующий любое подходящее число узлов, включая, но не ограничиваясь этим, пять узлов, шесть узлов, семь узлов и восемь узлов. Сплайны могут быть определены с помощью следующих уравнений:

$$sp[x]1 = \max([x] - knot1, 0)^3 - \max([x] - knot3, 0)^3 \frac{knot4 - knot1}{knot4 - knot3} + \max([x] - knot4, 0)^3 \frac{knot3 - knot1}{knot4 - knot3} \quad (10)$$

$$sp[x]2 = \max([x] - knot2, 0)^3 - \max([x] - knot3, 0)^3 \frac{knot4 - knot2}{knot4 - knot3} + \max([x] - knot2, 0)^3 \frac{knot3 - knot2}{knot4 - knot3} \quad (11)$$

где knot1 и knot4 представляют собой внешние узлы для кубического сплайна и knot2 и knot3 представляют собой внутренние узлы для кубического сплайна. Внешние узлы могут быть установлены, как минимальные и максимальные уровни tPSA, fPSA, iPSA или hK2 в популяции. Внутренний узел (например, knot2) может быть установлен как 33.3 процентильное значение уровней tPSA, fPSA, iPSA или hK2 в популяции. Другой внутренний узел (например, knot3) может быть установлен как 66.6 процентильное значение уровней tPSA, fPSA, iPSA или hK2 в популяции.

В некоторых вариантах осуществления внутренние узлы определяются в пределах примерно от 2 до 8 и примерно от 3 до 6 для tPSA, примерно от 0,25 до 2 и примерно от 0,5 до 1,5 для fPSA, примерно от 0,2 до 0,5 и примерно от 0,4 до 0,8 для iPSA, и примерно от 0,02 до 0,04 и примерно от 0,04 до 0,08 для hK2. Например, в одном осуществлении изобретения значения 3,92 и 5,61 используются для внутренних узлов для tPSA, значения 0,82 и 1,21 используются для внутренних узлов для fPSA, значения 0,3 и 0,51 используются для внутренних узлов iPSA и значения 0,036 и 0,056 используются для внутренних узлов hK2.

В некоторых вариантах осуществления один или более внутренних узлов для tPSA могут независимо находиться в пределах примерно от 3 до 5, примерно от 3 до 6, примерно от 2,5 до 6, примерно от 2,5 до 6,5, примерно от 5 до 8, примерно от 5,5 до 8, примерно от 5 до 9, примерно от 5 до 10, примерно от 1 до 5, примерно от 1 до 4 и примерно от 1 до 3. Также возможны другие пределы.

В некоторых вариантах осуществления один или более внутренних узлов для fPSA могут независимо находиться в пределах примерно от 0,1 до 1,0, примерно от 0,1 до 1,2, примерно от 0,3 до 0,8, примерно от 0,4 до 0,9, примерно от 0,5 до 1,2, примерно от 0,7 до 1,4, примерно от 0,7 до 0,9, примерно от 1,1 до 1,6, примерно от 1,1 до 1,2 и примерно от 1,1 до 2. Также возможны другие пределы.

В некоторых вариантах осуществления один или более внутренних узлов для iPSA могут независимо находиться в пределах примерно от 0,05 до 0,5, примерно от 0,1 до 0,5, примерно от 0,2 до 0,5, примерно от 0,1 до 0,8, примерно от 0,2 до 0,8, примерно от 0,4 до 0,8, примерно от 0,4 до 1,0, примерно от 0,3 до 0,6, примерно от 0,5 до 1,0 и примерно от 0,6 до 0,8. Также возможны другие пределы.

В некоторых вариантах осуществления один или более внутренних узлов для hK2 могут независимо находиться в пределах примерно от 0,01 до 0,03, примерно от 0,01 до 0,04, примерно от 0,01 до 0,05, примерно от 0,02 до 0,05, примерно от 0,02 до 0,06, примерно от 0,03 до 0,05, примерно от 0,4 до 0,07, примерно от 0,04 до 1,0, примерно от 0,5 до 1,0 и примерно от 0,6 до 1,0. Также возможны другие пределы.

Как обсуждалось выше, могут использоваться кубические сплайны, включающие любое подходящее число внутренних узлов (например, три, четыре, пять, шесть внутренних узлов), и пример кубического сплайна, включающий два внутренних узла, предназначается только для иллюстрации, но не для ограничения. В одном варианте осуществления, который включает более, чем два внутренних узла, узлы могут помещаться в один или более пределов, рассмотренных выше, или в некоторый другой подходящий предел. Например, в некоторых вариантах осуществления узлы могут быть определены так, что

длина сегментов сплайна между каждой из пар соседних узлов будет фактически одинаковой.

Модель может быть представлена как:

$$L = \beta_0 + \beta_1(Age) + \beta_2(tPSA) + \beta_3(fPSA) + \beta_4(iPSA) + \beta_5(hK2) + \beta_6(sp1[tPSA]) + \beta_7(sp2[tPSA]) + \beta_8(sp1[fPSA]) + \beta_9(sp2[fPSA]) + \beta_{10}(sp1[iPSA]) + \beta_{11}(sp2[iPSA]) + \beta_{12}(sp1[hK2]) + \beta_{13}(sp2[hK2]) + \beta_{14}(priorbx) \quad (12)$$

8. Пороговая модель tPSA.

В некоторых вариантах осуществления выбранная модель может зависеть от того, установлен или нет пороговый уровень tPSA в образце. В некоторых вариантах осуществления, если уровень tPSA превышает пороговое значение в образце, тогда предсказательная модель выглядит следующим образом:

$$L = \beta_0 + \beta_1(tPSA) + \beta_2(DRE)_{neg} + \beta_3(DRE)_{pos} + \beta(priorbx) \quad (13)$$

В некоторых вариантах осуществления диапазоны значений коэффициентов взвешивания в этой модели представлены в табл. 1 ниже. Коэффициенты, подходящие для определения вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная с помощью биопсии, будет содержать рак какой-либо степени, показаны во второй и третьей колонках; тогда как коэффициенты, подходящие для определения вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная с помощью биопсии, будет содержать высокозлокачественный рак, показаны в четвертой и пятой колонках.

Таблица 1. Коэффициенты взвешивания, предназначенные для использования, когда уровень tPSA превышает пороговое значение

Диапазоны коэффициентов взвешивания	Рак любой степени злокачественности		Высокозлокачественный рак (по шкале Глисона $\geq 7,0$)	
	Низкий	Высокий	Низкий	Высокий
β_0	-1,22E+00	-9,07E-01	7,83E-01	9,31E-01
β_1	1,04E-01	1,22E-01	1,24E-02	1,59E-02
β_2	-6,62E-02	-4,99E-02	-2,19E-01	-1,72E-01
β_3	1,34E-01	1,71E-01	5,23E-01	6,44E-01
β_4	-1,30E+00	-8,91E-01	-1,94E+00	-1,68E+00

В некоторых вариантах осуществления, если уровень tPSA, обнаруженный в образце, меньше или равен пороговому уровню, тогда предсказательная модель выглядит следующим образом:

$$L = \beta_0 + \beta_1(Age) + \beta_2(tPSA) + \beta_3 sp1(tPSA) + \beta_4 sp2(tPSA) + \beta_5(fPSA) + \beta_6 sp1(fPSA) + \beta_7 sp2(fPSA) + \beta_8(iPSA) + \beta_9(hK2) + \beta_{10}(DRE)_{neg} + \beta_{11}(DRE)_{pos} + \beta_{12}(priorbx) \quad (14)$$

В некоторых вариантах осуществления диапазоны значений коэффициентов взвешивания в этой модели представлены в табл. 2, ниже. Коэффициенты, подходящие для определения вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная с помощью биопсии, будет содержать рак какой-либо степени, показаны во второй и третьей колонках; тогда как коэффициенты, подходящие для определения вероятности того, что ткань предстательной железы, полученная с помощью биопсии, будет содержать высокозлокачественный рак, показаны в четвертой и пятой колонках.

Таблица 2. Коэффициенты взвешивания, предназначенные для использования, когда уровень tPSA меньше или равен пороговому значению

Диапазоны коэффициентов взвешивания	Рак любой степени злокачественности		Высокозлокачественный рак (по шкале Глисона $\geq 7,0$)	
	Низкий	Высокий	Низкий	Высокий
β_0	-2,86E+00	-1,97E+00	-7,35E+00	-6,00E+00
β_1	2,88E-01	4,03E-01	4,79E-02	6,38E-02
β_2	3,76E-01	4,72E-01	7,44E-01	9,19E-01
β_3	-2,18E-04	-1,78E-04	-6,43E-03	-4,32E-03
β_4	-1,22E-03	-9,46E-04	1,20E-02	1,66E-02
β_5	-3,63E+00	-3,18E+00	-6,27E+00	-4,43E+00
β_6	5,07E-01	7,07E-01	7,63E-01	1,04E+00
β_7	-2,02E+00	-1,55E+00	-2,76E+00	-2,17E+00
β_8	4,16E-02	5,45E-02	1,96E+00	2,40E+00
β_9	7,87E+00	1,11E+01	6,62E+00	7,59E+00
β_{10}	-6,62E-02	-4,65E-02	-2,44E-01	-1,74E-01
β_{11}	1,28E-01	1,85E-01	4,57E-01	5,89E-01
β_{12}	-1,45E+00	-1,01E+00	-1,97E+00	-1,53E+00

Сплайновые члены $sp1(tPSA)$, $sp2(tPSA)$, $sp1(fPSA)$ и $sp2(fPSA)$ в представленной выше модели могут быть определены по формуле кубического сплайна, предоставленной выше, в соответствии с моделью #7, выше, (уравнения (10 и 11)). В некоторых вариантах осуществления значения внутренних узлов 2

и 3 и внешних узлов 1 и 4 находятся в пределах, представленных в табл. 3 (ниже) для tPSA и fPSA.

Таблица 3. Диапазоны значений узлов

Диапазоны значений узлов	Общий PSA		Свободный PSA	
	низкий	высокий	низкий	высокий
Knot 1	0	2	0	0,5
Knot 2	3,72E+00	4,16E+00	7,38E-01	9,43E-01
Knot 3	4,71E+00	6,56E+00	1,10E+00	1,43E+00
Knot 4	2,33E+02	3,13E+02	2,04E+01	2,78E+01

Применение компьютера

На фиг. 1В показана иллюстративная компьютерная система 106, в соответствии с которой могут реализовываться некоторые или все методы и/или взаимодействия пользователя с системой, описанные в этом документе. Компьютерная система 106 может включать один или более процессоров 107 и один или более машиночитаемых энергонезависимых накопителей информации (например, память 108 и одно или более энергонезависимых запоминающих устройств 110). Процессор(ы) 107 могут контролировать запись данных и прочтение данных из памяти 108 и энергонезависимого запоминающего устройства 110 в любом подходящем виде, так как аспекты настоящего изобретения, описанные в данном документе, не ограничиваются в этом отношении.

Для осуществления любого функционального назначения, описанного в данном документе, процессор(ы) 107 могут выполнять одну или более команд, например, программные модули, хранящиеся в одном или более машиночитаемом носителе (например, память 108), который может служить в качестве энергонезависимого машиночитаемого носителя, хранящего команды для выполнения процессором 107. В общем, программные модули включают стандартные программы, объекты, компоненты, структуры данных и т.д., которые выполняют конкретные задачи или обеспечивают выполнение конкретных абстрактных типов данных. Варианты осуществления также могут реализовываться в распределенной вычислительной среде, где задачи выполняются с помощью устройств для дистанционной обработки данных, которые связаны через коммуникационную сеть. В распределенной вычислительной среде программные модули могут располагаться как в локальных, так и в удаленных запоминающих носителях, включая устройства компьютерного хранения. Входные данные и команды управления программами компьютер 106 может получать через входной интерфейс 109. Входной интерфейс 109 может содержать клавиатуру, сенсорный экран, USB-порт, CD-дисковод, DVD-дисковод или другой входной интерфейс.

Компьютер 106 может работать в сетевом окружении, используя логические соединения с одним или более удаленными компьютерами. Один или более удаленных компьютеров могут включать персональный компьютер, сервер, маршрутизатор (роутер), сеть PC, одноранговое устройство или другой общий узел сети, и обычно включают многие или все элементы из описанных выше, относящихся к компьютеру 106. Логические соединения между компьютером 106 и одним или более удаленными компьютерами могут включать, без ограничения, локальную сеть (LAN) и территориальную вычислительную сеть (WAN), а также могут включать другие сети. Такие сети могут основываться на любой подходящей технологии и могут работать в соответствии с любым подходящим протоколом и могут включать беспроводные сети, проводные сети и оптоволоконные сети. Такие сетевые среды часто используются в офисах, вычислительных сетях в масштабах предприятия, внутренних сетях и для интернета.

При использовании в LAN сетевой среде компьютер 106 может присоединяться к LAN через сетевой интерфейс или адаптер. При использовании в WAN сетевой среде компьютер 106, как правило, включает модем или другие средства для установления связи через WAN, например, Интернет. В сетевом окружении программные модули или их части могут храниться в удаленном запоминающем устройстве.

Различные входные данные, описанные в этом документе и предназначенные для оценки риска рака предстательной железы и/или определения объема предстательной железы, компьютер 106 может получать через сеть (например, LAN, WAN или какую-либо другую сеть) от одного или более удаленных компьютеров или устройств, хранящих информацию, связанную с вводимыми данными. Один или более удаленных компьютеров/устройств могут проводить анализ удаленно-хранящихся данных до передачи результатов анализа в качестве входных данных на компьютер 300,

Альтернативно удаленно-хранящиеся данные могут быть посланы на компьютер 106 без какого-либо дистанционного анализа, потому что они хранились удаленно. Кроме того, входные данные могут быть получены непосредственно пользователем компьютера 106 с использованием любого числа входных интерфейсов (например, входного интерфейса 109), которые могут быть компонентами компьютера 106.

Различные выводимые данные, описанные в этом документе, включают вывод данных о вероятности риска рака предстательной железы и/или объеме предстательной железы, могут предоставляться визуально на выходном устройстве (например, дисплее), соединенном непосредственно с компьютером 106, или выводимые данные могут передаваться на удаленно расположенное выходное устройство, соединенное с компьютером 106 через одну или более проводных или беспроводных сетей, в силу того, что варианты осуществления изобретения не ограничиваются в этом отношении. Описанные в документе выходные данные могут дополнительно или альтернативно предоставляться иначе, чем с помощью визу-

ального представления. Например, компьютер 300 или удаленный компьютер, на который предоставляется выход, может включать один или более выходных интерфейсов включая, но не ограничиваясь этим, акустические колонки и вибрирующие выходные интерфейсы, для обеспечения индикации выхода данных.

Следует понимать, что хотя компьютер 106 демонстрируется на фиг. 1 как отдельное устройство, в некоторых вариантах осуществления компьютер 106 может содержать множество соединенных с возможностью связи устройств для осуществления некоторых или всех функциональных возможностей, описанных в данном документе, и компьютер 106 является только одним иллюстративным воплощением компьютера, который может использоваться в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Например, в некоторых вариантах осуществления компьютер 106 может быть интегрирован в и/или находиться в электронной связи с системой. Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления компьютер 106 может быть включен в сетевое окружение, куда передается информация об одном или более маркерах крови, используемая для определения вероятности рака предстательной железы и/или объема предстательной железы от внешнего источника на компьютер 106 для анализа с использованием одного или более методов, описанных в данном документе. Иллюстративное сетевое окружение 111 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения показано на фиг. 1С. В сетевом окружении 111 компьютер 106 соединяется с системой анализа 112 через сеть 114. Как обсуждалось выше, сеть 114 может быть любым подходящим типом проводной или беспроводной сети и может включать одну или более локальных вычислительных сетей (LAN) или широкомасштабных вычислительных сетей (WAN), таких как Интернет.

Методы расчета, последовательность действий, моделирование, алгоритмы, системы и элементы систем, описанные в этом документе, можно реализовать с помощью компьютерной системы, например, различных вариантов осуществления компьютерных систем, описанных ниже. Методы, последовательности действий, системы и элементы систем, описанные в данном документе, не ограничиваются при их воплощении какой-либо конкретной компьютерной системой, описанной здесь, поскольку могут использоваться многие другие машины.

Компьютерная система может включать процессор, например, коммерчески доступный процессор, такой как один из серии x86, процессоры Celeron и Pentium, доступные от компании Intel, сходные устройства от AMD и Cyrix, серия микропроцессоров 680X0, доступных от компании Motorola, PowerPC микропроцессор от компании IBM и ARM-процессоры. Доступны многие другие процессоры, и компьютерная система не ограничивается конкретным процессором.

Как правило, компьютер осуществляет программу, вызываемую операционной системой, примерами которой являются Windows 7, Windows 8, UNIX, Linux, DOS, VMS, MacOS и OSX, и iOS, которые контролируют выполнение других компьютерных программ и обеспечивают планирование, наладку, управление вводом/выводом, учет, компиляцию, распределение памяти и распределение данных, управление передачей данных и связанных с этим сервисов. Процессор и операционная система вместе определяют компьютерную платформу, для которой пишутся прикладные программы на языках программирования высокого уровня. Компьютерная система не ограничивается конкретной компьютерной платформой.

Компьютерная система может включать систему памяти, которая, как правило, включает машиночитаемый и доступный для записи энергонезависимый носитель информации, примерами которого являются магнитный диск, оптический диск, флэш-память и магнитная пленка. Такие носители информации могут быть сменными, например, гибкий диск, CD для чтения/записи или карта памяти, или могут быть постоянными, например жесткий диск.

Такие носители информации хранят сигналы, как правило, в двоичном виде (т.е., виде, интерпретируемом как последовательность единиц и нулей). Диск (например, магнитный или оптический) имеет некоторое количество дорожек, на которых могут храниться такие сигналы, как правило, в двоичном виде, т.е. виде, интерпретируемом как последовательность единиц и нулей. Такие сигналы могут определять программное обеспечение операционной системы, например, прикладную программу, которая должна быть выполнена микропроцессором, или информацию, которая должна быть обработана прикладной программой.

Устройство памяти компьютерной системы также может включать элемент ИС-памяти, который обычно является энергозависимым оперативным запоминающим устройством, таким как динамическая оперативная память (DRAM) или статическая память (SRAM). Как правило, во время работы процессор вызывает программы и данные, которые должны считываться с энергонезависимого носителя информации на ИС-память, обычно обеспечивающие более быстрый доступ к программным инструкциям и данным, чем энергонезависимый носитель информации.

В большинстве случаев процессор манипулирует данными в пределах элемента памяти на ИС в соответствии с программными инструкциями, а затем после завершения обработки копирует обрабатываемые данные на энергонезависимый носитель информации. Известен целый ряд механизмов для управления движением данных между энергонезависимым носителем информации и элементом памяти на ИС, причем компьютерная система, которая реализует методы, последовательности действий, системы и системные элементы, описанные выше, не ограничивается в этом отношении. Компьютерная система не

ограничивается конкретным запоминающим устройством.

По меньшей мере часть такой системы памяти, описанной выше, может использоваться для хранения одной или более структур данных (например, справочных таблиц) или уравнений, указанных выше. Например, по меньшей мере часть энергонезависимого носителя информации может хранить, по меньшей мере часть базы данных, включающей одну или более из таких структур данных. Такая база данных может быть любой из целого ряда типов баз данных, например, системой файлов, включающей одну или более структур данных на основе плоских файлов, где данные сформированы в блоки данных, разделенные символами-разграничителями, реляционной базой данных, где данные собраны в блоки данных, хранящиеся в таблицах, объектно-ориентированной базой данных, где данные собраны в блоки данных, хранящиеся как объекты, другим типом базы данных или их комбинацией.

Компьютерная система может включать видео- и аудиоданные I/O подсистемы. Аудио-часть подсистемы может включать аналого-цифровой (A/D) преобразователь, который получает аналоговую аудиоинформацию и преобразует ее в цифровую информацию. Цифровая информация может быть "сжата" с помощью известных систем сжатия для хранения на жестком диске с целью использования в другое время. Типичная видео-часть I/O подсистемы может включать компрессор/декомпрессор видеоизображения, в том числе известные в данной области техники. Такие компрессоры/декомпрессоры преобразуют аналоговую видеоинформацию в сжатую цифровую информацию и наоборот. Сжатая цифровая информация может храниться на жестком диске для использования в дальнейшем.

Компьютерная система может включать одно или более устройств вывода. Примеры устройств вывода включают катодно-лучевую трубку или экранный дисплей (CRT-дисплей), жидкокристаллический дисплей (LCD) и другие устройства видеовывода, принтеры, коммуникационные устройства, такие как модем или сетевой интерфейс, устройства для хранения данных, такие как диск или лента, и устройства со звуковым выходом, такие как колонки.

Компьютерная система также может включать одно или более устройств для ввода данных. Примеры устройств для ввода данных включают клавиатуру, шар трассировки (устройство для перемещения курсора на экране), мышку, стилус и планшет, коммуникационные устройства, такие как указанные выше, и такие устройства ввода данных, как устройство аудиозахвата и устройство захвата изображения и сенсорные устройства. Компьютерная система не ограничивается конкретными входными или выходными устройствами, описанными в данном документе.

Следует понимать, что для выполнения различных вариантов осуществления может использоваться одна или более из компьютерных систем любого типа, описанных в данном документе. Аспекты раскрытия могут реализовываться с помощью программно-аппаратных средств или программ или любой их комбинации. Компьютерная система может включать специально запрограммированное, специализированное оборудование, например, специализированную интегральную микросхему (ASIC). Такое специализированное устройство может предназначаться для осуществления одного или более методов, шагов, моделирований, алгоритмов, систем и элементов систем, описанных выше, в качестве части компьютерной системы, описанной выше, или в качестве независимого компонента.

Компьютерная система и ее компоненты могут программироваться с помощью какого-либо одного или более из целого ряда подходящих языков программирования. Такие языки могут включать процедурные языки программирования, например, C, Pascal, Fortran и BASIC, объектно-ориентированные языки, например, C++, Java и Eiffel и другие языки, такие как скриптовый язык или даже язык ассемблера.

Методы, шаги, моделирования, алгоритмы, системы и элементы систем могут осуществляться при использовании любого из целого ряда подходящих языков программирования, включая процедурные языки программирования, объектно-ориентированные языки программирования, другие языки и их сочетания, которые могут выполняться подобной компьютерной системой. Такие методы, шаги, моделирования, алгоритмы, системы и элементы систем могут выполняться как отдельные компоненты (модули) компьютерной программы или могут выполняться индивидуально как отдельные компьютерные программы. Такие модули и программы могут выполняться на отдельных компьютерах.

Такие методы, шаги, моделирования, алгоритмы, системы и элементы систем, индивидуально или в комбинации, могут осуществляться в виде продукта компьютерных программ, практически реализованного в виде машиночитаемых сигналов на машиночитаемом носителе, например, энергонезависимом носителе информации, на элементе ИС-памяти или их комбинации. Для каждого такого метода, шага, моделирования, алгоритма, системы или элемента системы такой компьютерный программный продукт может содержать машиночитаемые сигналы, практически содержащиеся на машиночитаемом носителе, который формулирует инструкции, например, в виде части одной или более программ, которые в результате выполнения компьютером приказывают компьютеру выполнять метод, шаг, моделирование, алгоритм, систему или элемент системы.

Следует понимать, что различные варианты осуществления могут создаваться с одним или более из вышеописанных отличительных признаков. Вышеупомянутые аспекты и отличительные признаки могут использоваться в любом подходящем сочетании, так как настоящее изобретение не ограничивается в этом отношении. Следует понимать, что чертежи иллюстрируют различные компоненты и отличительные признаки, которые могут быть включены в разные варианты осуществления. Для упрощения неко-

которые из чертежей могут иллюстрировать более, чем один дополнительный признак или компонент. Однако, изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в чертежах. Следует признать, что раскрытие рассматривает варианты осуществления, которые могут включать только часть компонентов, проиллюстрированных на любой из фигур, и/или может также рассматривать варианты осуществления, объединяющие компоненты, проиллюстрированные на нескольких разных фигурах.

Примеры

Пример 1. Анализ и предсказательная модель.

Здесь описывается анализ, основанный на панели из четырех маркеров калликреина, которая включает общий простатоспецифический антиген (tPSA), свободный PSA (fPSA), интактный PSA (iPSA) и человеческий калликреин 2 (hK2), связанный со специфической информацией о пациенте через многомерный алгоритм. Этот алгоритм выдает две точно определенные вероятности: одну для риска рака любой степени злокачественности и другую для риска высокозлокачественного рака (счет по шкале Глисона 7 или выше) до проведения биопсии.

Четыре маркера калликреина были исследованы по отдельности и в различных комбинациях относительно применения в области обнаружения рака предстательной железы. Логистический регрессионный алгоритм, включающий уровни в плазме крови этих четырех маркеров, а также специфическую информацию о пациенте, такую как возраст, результат пальцевого ректального исследования (DRE) и наличие отрицательного результата при проведении предшествующей биопсии(й) предстательной железы, продемонстрировал более высокое положительное прогностическое значение в отношении рака предстательной железы, чем тест PSA в отдельности.

В первоначальное калибровочное исследование было включено триста пациентов. Это с учетом первых 5 пациентов, включенных в каждом исследовательском центре, а затем последовательно включенных пациентов. Были исключены образцы, которые хранились или перевозились неоптимально, или образцы, при обработке которых в ходе измерения маркеров калликреина, были получены аномальные результаты.

Логистический регрессионный алгоритм для вычисления риска рака по биопсии

Формула предсказательной модели для вычисления риска рака по биопсии была установлена путем калибровочного исследования и представлена ниже. Следует отметить, что в зависимости от уровней общего PSA используется разная формула. Более того, используются различные коэффициенты взвешивания в зависимости от того, используется ли модель для определения вероятности биопсии, содержащей обнаружимый рак любой степени, в сравнении с обнаружимым высокозлокачественным раком (например, показатель по шкале Глисона 7,0 или выше). Коэффициенты взвешивания находятся в пределах, указанных в табл. 1 и 2. Переменные формул описаны в табл. 4.

Если общий PSA ≤ 25 нг/мл

$$X\beta = \beta_0 + \beta_1 age + \beta_2 tpsa + \beta_3 sptpsa1 + \beta_4 sptpsa2 + \beta_5 fpsa + \beta_6 spfpsa1 + \beta_7 spfpsa2 + \beta_8 ipsa + \beta_9 hK2 + \beta_{10} dre_{neg} + \beta_{11} dre_{pos} + \beta_{12} priorbx \quad (14)$$

Если общий PSA > 25 нг/мл

$$X\beta = \beta_0 + \beta_1 tpsa + \beta_2 dre_{neg} + \beta_3 dre_{pos} + \beta_4 priorbx \quad (13)$$

$$Risk\ of\ Cancer\ on\ Biopsy = \frac{e^{X\beta}}{1 + e^{X\beta}} \quad (15)$$

Ограниченные члены кубического сплайна

Для некоторых переменных в данных моделях (общий PSA и свободный PSA) были включены ограниченные члены кубического сплайна, означая, что два дополнительных члена добавлены к каждой из моделей для каждого splined term. Формулы для вычисления двух членов сплайна представлены ниже.

$$sp[var]1 = \max([var] - knot1, 0)^3 - \max([var] - knot3, 0)^3 \frac{knot4 - knot1}{knot4 - knot3} + \max([var] - knot4, 0)^3 \frac{knot3 - knot1}{knot4 - knot3} \quad (10)$$

$$sp[var]2 = \max([var] - knot2, 0)^3 - \max([var] - knot3, 0)^3 \frac{knot4 - knot2}{knot4 - knot3} + \max([var] - knot4, 0)^3 \frac{knot3 - knot2}{knot4 - knot3} \quad (11)$$

Sp[var]1 и sp[var]2 вычисляются для общего и свободного PSA с помощью приведенных выше формул. Член сплайна для общего PSA был вычислен с использованием узловых значений в пределах, указанных в табл. 3.

Таблица 4. Переменные для формулы для вычисления риска рака по биопсии

Название переменной	Описание
возраст	Возраст при взятии образца крови
tpsa	Общий PSA в нг/мл
fpsa	Свободный PSA в нг/мл
ipsa	Интактный PSA в нг/мл
hk2	hK2 в нг/мл
sptpsa1	Первый член сплайна для общего PSA
sptpsa2	Второй член сплайна для общего PSA
spfpsa1	Первый член сплайна для свободного PSA
spfpsa2	Второй член сплайна для свободного PSA
priorbx	Предшествующая биопсия; 0, если биопсия отсутствовала; 1, если ранее проводилась биопсия
dreneg	Значение равно 1, если DRE подтверждается как отрицательное, в другом случае - 0
drepos	Значение равно 1, если DRE подтверждается как положительное, в другом случае - 0

Результаты калибровки

Характеристики пациентов, включенных в фазу калибровки исследования, представлены в табл. 5.

Таблица 5. Характеристики пациентов в фазе калибровки

Характеристика	Отрицательная биопсия (N=173)	Положительная биопсия (N=127)	р-значение
Возраст при взятии образца крови, средний возраст в годах (25 и 75 перцентилей)	63 (59, 69)	65 (60, 70)	0,046
Ненормальное DRE, n	43 (25%)	39 (31%)	0,3
Предшествующая биопсия предстательной железы, n	37 (21%)	15 (12%)	0,030
Общий PSA, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	4,5 (3,4, 5,8)	5,4 (4,3, 7,5)	<0,0001
Свободный PSA, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	0,9 (0,6, 1,2)	0,7 (0,5, 1,2)	0,2
Интактный PSA, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	0,4 (0,3, 0,6)	0,5 (0,3, 0,7)	0,4
hK2, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	0,1 (0,0, 0,1)	0,1 (0,1, 0,1)	0,034
Клиническая стадия Т			
T1C		57 (45%)	
T2A		33 (26%)	
T2B		15 (12%)	
T2C		21 (17%)	
T3A		1 (0,8%)	
Биопсия по шкале Глисона (подробности)			
3+3		67 (53%)	
3+4		31 (24%)	
3+5		1 (0,8%)	
4+3		14 (11%)	
4+4		8 (6,3%)	
4+5		3 (2,4%)	
5+4		1 (0,8%)	
5+5		2 (1,6%)	

Калибровка модели

Модель была разработана на основе Европейской когорты. Была использована перекалибровка логистической регрессии с угловыми коэффициентами для проверки в отношении неправильной калибровки по Американской когорте.

$$\beta_0 + \beta_1 \log \left(\frac{L}{1-L} \right) \quad (16)$$

Если доказано, что $\beta_0 \neq 0$ или $\beta_1 \neq 1$, тогда это означает, что было бы полезно перекалибровать данную модель.

Данная модель, предсказывающая рак высокой степени злокачественности, продемонстрировала

почти безупречную калибровку для предсказаний ниже 0,2 (или 20%), тогда как, по-видимому, имеется некоторая недооценка действительного риска для предсказаний больше, чем 0,2 (или 20%) (фиг. 2). Следует отметить, что решение о направлении пациентов на биопсию может быть принято при пороговых значениях ниже 0,2 (или 20%), когда данная модель, по-видимому, точно предсказывает действительный риск рака высокой степени злокачественности. По этой причине, не проводилась перекалибровка для модели предсказания высокозлокачественного рака. Модель, предсказывающая рак любой степени не продемонстрировала существенной разрегулировки, и поэтому не была перекалибрована (фиг. 3). Значения на фиг. 2 и 3 показывают взаимоотношение между прогностической и действительной вероятностями, этим данным соответствует пунктирная линия. Показаны планки разбросов, демонстрирующие величину изменения действительной вероятности. Сплошная линия отражает точную калибровку, когда действительные вероятности равны предсказанным вероятностям.

Осуществление модели

Ниже представлено осуществление предсказательной модели. Все статистические данные были скорректированы для "переподгонки" с использованием повторной 10-проходной перекрестной проверки.

Таблица 6. Описание предсказательной модели

	AUC (95% CI)
Рак любой степени злокачественности	0,769 (0,715, 0,824)
Высокозлокачественный рак	0,857 (0,805, 0,909)

Таблица 7. Показатель Бриера для предсказательной модели

	Показатель Бриера
Рак любой степени злокачественности	0,1967
Высокозлокачественный рак	0,1144

Избегание биопсии при изменении схем биопсии

Было определено количество случаев высокозлокачественного рака (табл. 5) и рака любой степени злокачественности (табл. 6), обнаруженных и пропущенных при использовании различных схем биопсии (biopsying schemes) на 1000 пациентов.

Таблица 8. Случаи высокозлокачественного рака обнаруженные/пропущенные

Метка	Биопсия	Количество случаев избегания биопсии	Обнаруженный высоко-злокачественный рак	Пропущенный высоко-злокачественный рак
Вероятность высокозлокач. PCa>5%	686	314	190	10
>7,5%	538	462	181	19
>10%	445	555	173	27
>12,5%	370	630	167	33

Таблица 9. Случаи рака любой степени обнаруженный/пропущенный

Метка	Биопсия	Количество случаев избегания биопсии	Обнаруженный рак	Пропущенный рак
Вероятность высокозлокач. PCa>5%	686	314	371	52
>7,5%	538	462	329	95
>10%	445	555	297	126
>12,5%	370	630	270	154

Анализ кривой принятия решений

Анализ кривой принятия решения для высокозлокачественного рака показан на фиг. 4. Анализ кривой принятия решения для рака любой степени показан на фиг. 5.

Операционные характеристические кривые (ROC-кривые)

ROC-кривая для высокозлокачественного рака показана на фиг. 6. ROC-кривая для рака любой степени показана на фиг. 7.

Отрицательное предсказательное значение и положительное предсказательное значение на основе порогового значения биопсии

Положительное предсказательное значение и отрицательное предсказательное значение на основе порогового значения биопсии для высокозлокачественного рака показаны на фиг. 8A и 8B соответственно. Положительное предсказательное значение и отрицательное предсказательное значение на основе порогового значения биопсии для рака любой степени показаны на фиг. 9A и 9B соответственно.

Пример 2. Валидационное исследование.

Оценка работы модели, представленной в примере 1 и в порядке, установленном в уравнениях (10,

11, 13, 14), которая называется в этом примере "тестовой моделью", была проведена в отношении 663 пациентов, включенных в валидационную фазу исследования. Результаты представлены отдельно для полной когорты, мужчин со сделанной ранее биопсией, мужчин без предшествующей биопсии и мужчин в возрасте 50-75. Фиг. 10 показывает долю мужчин, у которых "скрывалась" высокозлокачественная болезнь до проведения биопсии в этом возрасте. Старшие мужчины имели значительно большие степени высокозлокачественной болезни.

Единственно возможной причиной наблюдаемого увеличения риска в более старшем возрасте является более избирательная биопсия. Другими словами, урологи имеют возможность проводить биопсию только у мужчин в возрасте более 70 - верхний предел для скрининга PSA, указанный во многих руководствах, - если существует вынуждающая причина делать это. Чтобы оценить, было ли увеличение доли высокозлокачественных опухолей среди мужчин старшего возраста следствием выбора проведения биопсии, мы использовали калькулятор риска PCPT (Смотри, Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Feng Z, Parnes HL, Coltman CA Jr. Assessing Prostate Cancer risk: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial, Journal of the National Cancer Institute 98: 529-534, 2006.). Калькулятор риска PCPT был создан на основе когорты мужчин, в которой биопсия была предложена всем мужчинам независимо от возраста. В логистической регрессионной модели, где высокозлокачественная болезнь служит в качестве результата предсказания, PCPT риск и старший возраст в качестве переменной, если возрастной коэффициент является значительным, это говорит о том, что эффект возраста, который мы наблюдаем, является следствием отбора, а не биологического увеличения риска. Эти результаты показывают, что риск у старших мужчин превышает ожидаемый ($p=0,072$), свидетельствуя об эффекте отбора. Был проведен анализ данных в подгруппе мужчин в возрасте 50-75. В связи с тем, что 20 пациентов были в возрасте менее 50 лет, был проведен анализ дополнительной подгруппы, который исключал пациентов старше 70 лет.

Были сравнены две отдельные модели: "тестовая модель" и базовая модель, которая была основана на уровне общего PSA, возрасте, предшествующей биопсии и DRE. Табл. 10 - краткий обзор различий в характеристиках пациентов между когортой калибровочной фазы и когортой валидационной фазы.

Таблица 10. Характеристики пациентов.

	Когорта валидационной фазы (N=663; 69%)	Когорта калибровочной фазы (N=300; 31%)	р- значение
Возраст при взятии образца крови, лет (25 и 75 перцентилей)	64 (58, 69)	64 (59, 69)	0,7
<50	24 (3,6%)	19 (6,3%)	
50-75	587 (89%)	261 (87%)	
>75	52 (7,8%)	20 (6,7%)	
Ненормальный DRE	152 (23%)	82 (27%)	0,14
Предшествующая биопсия предстательной железы	128 (19%)	52 (17%)	0,5
Общий PSA, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	4,7 (3,3, 6,8)	4,8 (3,6, 6,5)	0,4
Свободный PSA, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	0,9 (0,6, 1,4)	1,0 (0,6, 1,4)	0,7
Интактный PSA, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	0,4 (0,3, 0,7)	0,4 (0,3, 0,6)	0,7
hK2, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	0,1 (0,1, 0,1)	0,1 (0,0, 0,1)	0,4
Положительная биопсия	297 (45%)	127 (42%)	0,5
Высокозлокачественный рак	146 (22%)	60 (20%)	0,5

Таблица 11, ниже, показывает характеристики пациентов в когорте валидационной фазы, разделенных по статусу рака.

Было обнаружено, что тестовая модель демонстрирует более высокое распознавание в отношении высокозлокачественной болезни, чем базовая модель, при увеличении AUC примерно на 0,06. Это различие является относительно стабильным для всех характеристик. Оно немного выше для пациентов с предшествующей биопсией (0,09) и в диагностической "серой зоне" (0,07-0,09). Различия между базовой и тестовой моделями в отношении конечной точки положительной биопсии меньше, что явно демонстрирует селективность тестовой модели в отношении высокозлокачественной болезни.

Табл. 14 и 15, ниже, показывают количество случаев высокозлокачественного рака, обнаруженных и пропущенных, для всех пациентов и пациентов возрастом меньше 70 лет с использованием разных схем биопсии на 1000 пациентов. При анализе клинических результатов было обнаружено, что использо-

вание границы разделения 7,5% уменьшает число биопсий примерно на 50%. Это не приводит к пропуску некоторого количества случаев высокозлокачественного рака, этот эффект уменьшается, когда анализ ограничивается мужчинами в возрасте менее 71. Из более молодых пациентов с риском <7,5%, 5,5% имели счет по шкале Глисона 7 или 8, что означает, что 18 биопсий необходимо будет выполнить, чтобы обнаружить один высокозлокачественный рак в этой группе. Из пропущенных случаев высокозлокачественного рака, 53% были 3+4, 40% были 4+3 и 7% 4+4.

Таблица 11. Когорта валидационного исследования с помощью статуса рака.

	Рак отсутствует (N=366; 55%)	Рак (N=297; 45%)	p-значение
Возраст при взятии образца крови, лет (25 и 75 перцентилей)	63 (58, 68)	65 (59, 71)	0,0004
<50	19 (5,2%)	5 (1,7%)	
50-75	324 (89%)	263 (89%)	
>75	23 (6,3%)	29 (10%)	
Ненормальный DRE	77 (21%)	75 (25%)	0,2
Предшествующая биопсия предстательной железы	90 (25%)	38 (13%)	0,0001
Общий PSA, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	4,3 (2,8, 5,8)	5,3 (4,0, 8,1)	<0,0001
Свободный PSA, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	0,9 (0,6, 1,4)	1,0 (0,7, 1,4)	0,085
Интактный PSA, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	0,4 (0,3, 0,6)	0,5 (0,3, 0,7)	0,0003
hK2, нг/мл (25 и 75 перцентилей)	0,1 (0,0, 0,1)	0,1 (0,1, 0,1)	<0,0001
Клиническая стадия T			
T1A		1 (0,3%)	
T1B		1 (0,3%)	
T1C		194 (65%)	
T2A		53 (18%)	
T2B		22 (7,4%)	
T2C		23 (7,7%)	
T3A		2 (0,7%)	
T4		1 (0,3%)	
Биопсия по шкале Глисона			
6		151 (51%)	
7		102 (34%)	
8		25 (8,4%)	
9		17 (5,7%)	
10		2 (0,7%)	

Таблица 12. Различия моделей

Все пациенты	Тестовая модель	Базовая модель (tPSA, возраст, DRE и предшествующая биопсия)	PCPT
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,824 (0,784, 0,864)	0,763 (0,719, 0,806)	0,760 (0,718, 0,802)
Положительная биопсия	0,729 (0,691, 0,768)	0,704 (0,665, 0,744)	0,680 (0,639, 0,720)
Возраст 50-75			
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,816 (0,771, 0,860)	0,747 (0,699, 0,796)	0,741 (0,693, 0,788)
Положительная биопсия	0,730 (0,690, 0,771)	0,694 (0,651, 0,736)	0,662 (0,619, 0,706)
Предшествующая биопсия			
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,775 (0,654, 0,896)	0,687 (0,557, 0,817)	0,671 (0,524, 0,818)
Положительная биопсия	0,702 (0,596, 0,808)	0,654 (0,548, 0,759)	0,639 (0,535, 0,743)
Ранее не подвергавшиеся биопсии			
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,835 (0,795, 0,875)	0,766 (0,720, 0,813)	0,791 (0,749, 0,834)
Положительная биопсия	0,715 (0,672, 0,758)	0,692 (0,648, 0,737)	0,684 (0,639, 0,729)
Возраст менее 71			
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,822 (0,773, 0,870)	0,757 (0,705, 0,810)	0,757 (0,707, 0,806)
Положительная биопсия	0,737 (0,694, 0,780)	0,709 (0,665, 0,753)	0,684 (0,639, 0,729)
PSA 2 – 10 нг/мл ("Grey zone")			
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,768 (0,708, 0,829)	0,700 (0,634, 0,766)	0,677 (0,612, 0,741)
Положительная биопсия	0,707 (0,657, 0,757)	0,666 (0,614, 0,718)	0,622 (0,568, 0,675)

Таблица 13. Показатель Бриера

Все пациенты	Тестовая модель	Базовая модель (tPSA, возраст, DRE и предшествующая биопсия)	PCPT
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,1255	0,1432	0,1680
Положительная биопсия	0,2060	0,2178	0,2577
Age 50-75			
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,1222	0,1410	0,1615
Положительная биопсия	0,2054	0,2210	0,2609
Предшествующая биопсия			
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,1111	0,1156	0,1166
Положительная биопсия	0,1787	0,1921	0,2009
Ранее не подвергавшиеся биопсии			
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,1289	0,1498	0,1802
Положительная биопсия	0,2126	0,2239	0,2712
Возраст менее 71			
Высокозлокачественный рак (Bx GGS>6)	0,1116	0,1308	0,1471
Положительная биопсия	0,1990	0,2143	0,2495

Все пациенты

Таблица 14. Высокозлокачественный рак.

Метка	Биопсия	Избежавшие биопсии	Обнаруженные высокозлокач, опухоли	Пропущенные высокозлокач, опухоли
Вероятность высокозлокач, PCa>2,5%	805	195	210	11
>5%	664	336	204	17
>7,5%	534	466	193	27
>10%	454	546	181	39
>12,5%	386	614	169	51

Возраст менее 71

Таблица 15. Высокозлокачественный рак

Порог	Биопсия	Избежавшие биопсии	Обнаруженные высокозлокач, опухоли	Пропущенные высокозлокач, опухоли
Вероятность высокозлокач, PCa>2,5%	779	221	178	11
>5%	624	376	170	19
>7,5%	490	510	161	28
>10%	406	594	151	37
>12,5%	340	660	140	49

Фиг. 11А и 11В показывают прогностическую вероятность в сравнении с действительной вероятностью обнаружения высокозлокачественного рака у всех пациентов (n=663). Фиг. 11С показывает прогностическую вероятность в сравнении с действительной вероятностью обнаружения рака любой степени у всех пациентов (n=663). Фиг. 12А и 12В показывают прогностическую вероятность в сравнении с действительной вероятностью обнаружения высокозлокачественного рака у пациентов в возрасте 50-75 лет (n=587). Фиг. 12С показывает прогностическую в сравнении с действительной вероятностью обнаружения рака любой степени у всех пациентов в возрасте 50-75 лет (n=587). Фиг. 13А и 13В показывают прогностическую в сравнении с действительной вероятностью обнаружения высокозлокачественного рака у пациентов в возрасте менее 71 года (n=535). Фиг. 13С показывает прогностическую в сравнении с действительной вероятностью обнаружения рака любой степени у всех пациентов в возрасте менее 71 года (n=535). Вышеизложенные результаты показывают, что существует доля (степень) приблизительного прогноза риска, эффект, который уменьшается путем ограничения выборки пациентами в возрасте менее 71. На фиг. 11-13 точки показывают взаимоотношение между прогностической и действительной вероятностями, этим данным соответствует пунктирная линия. Показаны планки погрешностей, демонстрирующие величину изменения действительной вероятности. Сплошные линии отражают точную калибровку, когда действительные вероятности равны предсказанным вероятностям.

Фиг. 14А и 14В показывают чистую пользу в сравнении с уровнями пороговой вероятности для всех пациентов (n=663). Фиг. 15А и 15В показывают чистую пользу в сравнении с пороговыми уровнями вероятности для пациентов в возрасте 50-75 (n=587). Фиг. 16А и 16В показывают чистую пользу в сравнении с уровнями пороговой вероятности для всех пациентов в возрасте менее 71 (n=535). Результаты показывают, что использование предсказательной модели соотносится с очевидной чистой пользой для обнаружения высокозлокачественного рака. Этот эффект усиливается для пациентов в возрасте менее 71. Чистая польза оценивается, как описано в Vickers A.J. et al., Чистая польза и пороговая вероятность были установлены при использовании методов, раскрытых в Med Decis Making. 2006; 26(6): 565-574, полное содержание которой включается в описание путем отсылки.

Пример 3. Методы иммуноанализа.

Следующие методы анализа используются для определения уровней (например, уровней в нг/мл) tPSA, fPSA, iPSA и hK2, присутствующих в образцах плазмы крови с использованием AutoDELFIA автоматической системы иммуноанализа, эти методы и были использованы в примерах 1 и 2. Среднее количество каждого маркера вычисляется из повторных тестов для каждого маркера и используется в предсказательной модели для определения степени риска для данного образца человеческой плазмы, как представлено в примере 2. tPSA и fPSA также могут быть определены с помощью иммунологического анализатора Elecsys (Roche Diagnostics).

В каждом анализе используется, по меньшей мере один набор из трех планшетов -один планшет для f/tPSA, один планшет для iPSA и один планшет для hK2. Полный анализ в условиях полной загруженности включает два набора из этих трех планшетов. Вся процедура продолжается приблизительно от 3 до 5 ч от начала до получения результатов теста в зависимости от числа планшетов в анализе.

Реагенты:

hK2 аналитический буфер

iPSA Стандарты (A – G)

hK2 Стандарты (A – G)

Усиливающий раствор (Perkin Elmer Product # 1380 0753)

Промывочный концентрат (Perkin Elmer Product # B117-100)

Контроли для анализа iPSA (Low, Middle, и High)

Контроли для анализа hK2 (Low, Middle, и High)

96-луночный, желтый стрептавидиновый планшет (Perkin Elmer Product # AAAND-0005)

Химически чистая вода

Набор PROSTATUS для t/f PSA (Perkin Elmer Product # B073-301)

Раствор для захвата биотинилированного iPSA (100x)

Индикаторный раствор для iPSA (100x)

Раствор для захвата биотинилированного hK2 (100x)

hK2 блокирующий раствор (50x)

Индикаторный раствор для hK2 (100x)

Подробности о некоторых антителах и реагентах приведены в таблицах ниже.

Таблица 16. Реактивы

Название реактива	захватывающий 100x раствор для биотинилированного интактного (iPSA) PSA
Описание исходного материала	Белок Fab-5A10-Cys-His6 экспрессируется в клетках E. coli RV308, которые несут вектор pKK tac, кодирующий 5A10-Fab белок, соединенный на его N-конце с периплазматической нацеливающей последовательностью и на его C-конце с Ser-Cys-Pro-His6 (SEQ ID NO: 5) последовательностью. После высвобождения его в периплазматическое пространство, клетки лизируют с помощью осмотического шока. His-меченый белок захватывается из периплазматической фракции Ni-NTA смолой (в естественных условиях), его промывают, биотинилируют с помощью EZ-Link PEO-малеимид-активированного биотина. После элюирования имидазолом с использованием обессоленной колонки белок попадает в буфер для хранения.
Тип клеток	E. coli RV308
Вектор	pKK tac-Fab-4A10-Cys-His6, полученный из последовательности кДНК, клонированной из линии клеток, продуцирующих моноклональное антитело 5A10, как описано в Eriksson <i>et al.</i> 2000
Концентрация белка	150 мкг/мл, как вычислено из разбавления стокового раствора исходного материала
Буфер	50 mM Трис HCl, pH 7,75, 0,9% NaCl, 0,05% азид с 0,1% BSA

Название реагента	Индикаторный раствор 100X для интактного PSA (iPSA)
Описание исходного материала	Моноклональное антитело 4D4 (IgG), полученное из супернатанта культуры клеток гибридомы SP2/0, очищают с помощью колонки Protein G, разводят в 0,1М глицине, pH 2,7, немедленно нейтрализуют в 1/10 объеме 1М Трис HCl, pH 9, и осуществляют обмен на обессоленной колонке в 0,9% NaCl. Реакционная смесь для мечения содержит антитело в 0,9% NaCl, 50 мМ NaHCO ₃ , pH 9,8 и 50-200-кратный молярный избыток N1 хелата европия(III) (N1-(4-изотиоцианатобензил) диэтилентриамин-N1,N2,N3,N4-тетрауксусная кислота-Eu(III)) в течение ночи при +2...+8°C с последующей заменой буфера на TSA, pH 7,75, с помощью SEC, используя Superdex 200 HP или другую эквивалентную колонку.
Тип клеток	Полученные от гибридомы SP2/0
Клон	4D4C10C12; описанный в Nurmikko <i>et al.</i> 2000
Концентрация антитела	100 мкг/мл, как вычислено из разбавления стокового раствора исходного материала (A280)
Чистота	Клон 4D4 с >95% чистотой, полученной методом SDS PAGE (восстанавливающие и невосстанавливающие условия) до соединения с хелатом Европия
Буфер	50 мМ Трис HCl, pH 7,75, 0,9% NaCl, 0,05% азид с 0,1% BSA
Название реагента	Захватывающий 100x раствор для биотинилированного hK2
Описание исходного материала	Моноклональное антитело 6H10 (IgG), полученное из супернатанта культуры клеток гибридомы SP2/0, подвергается обработке бромелайном и очистке на колонке HiTrap Protein G. Очищенный F(ab)2-6H10 фрагмент подвергается биотинилированию с помощью биотинизотиоцианата при щелочном значении pH (50 мМ NaHCO ₃ , pH 9,8), а затем при использовании обменного буфера собирается в буфере для хранения путем эксклюзионной очистки на обессоленной колонке.
Тип клеток	полученные от гибридомы SP2/0
Клон	6H10G3D8; описанный в Becker <i>et al.</i> 2000
Конц. моноклонального антитела	250 мкг/мл, как вычислено из разбавления стокового раствора исходного материала (A280)
Буфер	50 мМ Трис HCl, pH 7,75, 0,9% NaCl, 0,05% азид с 0,1% BSA
Название реагента	Индикаторный раствор x100 для hK2
Описание продукта	Смесь подготовленного 7G1-Eu-меченого антитела и немеченого 5H6 блокирующего антитела, разведенного в буфере до 100x их концентрации в анализе hK2.
Меченое Европием 7G1 моноклональное антитело	50 мкг/мл
5H6 Конц. моноклонального антитела	250 мкг/мл
Буфер	50 мМ Трис HCl, pH 7,75, 0,9% NaCl, 0,05% азид с 0,1% BSA

Название реагента	hK2 блокирующий 50х раствор
Описание продукта	Раствор 50X, содержащий смесь подготовленных моноклональных антител 2E9, 5F7 и 5H6, разведенных в буфере до 50X их концентрации, необходимой для иммуноанализа hK2.
2E9 Концентрация антитела	500 мкг/мл
5F7 Концентрация антитела	500 мкг/мл
5H6 Концентрация антитела	250 мкг/мл
Буфер	50 mM Трис HCl, pH 7,75, 0,9% NaCl, 0,05% азид с 0,1% BSA
Название реагента	Антиген к интактному PSA (iPSA)
Описание продукта	Рекомбинантный pre-pro PSA экспрессируется в клетках <i>Trichoplusia ni</i> (High Five™), несущих частицы бакуловируса, включающие кодирующую последовательность для pre-pro PSA (амплифицированного из библиотеки человеческих простатических кДНК). Антиген к интактному PSA (iPSA) аффинно очищают из лизата с использованием биотинилированного моноклонального антитела 5A10, соединенного с Pierce High Capacity Streptavidin Chromatography Cartridge и элюируют в 0,2 М глицин, pH 2.5, затем нейтрализуют в 1/10 объеме 1M Трис HCl, pH 9. Смешанные фракции обменивали в 100 mM натрий-фосфатном буфере pH 7,0, 150 mM NaCl с использованием обессоленной колонки и замораживали при -70°C. Когда белок извлекали из морозилки, немедленно добавляли стабилизирующий буфер (содержащий 50 mM TSA, pH 7,75 с 0,5% BSA).
Тип клеток	<i>Trichoplusia ni</i> (High Five™)
Вектор	AcFAST-Bac-PSA (описанный в Rajakoski <i>et al.</i> 1997)
Концентрация белка	по меньшей мере, 1 мкг/мл при Prostatus анализе свободный /общий PSA
Буфер	50 mM натрий-фосфатный буфер, 75mM NaCl, 25 mM Трис-HCl, 0,25% BSA , pH 7,5

Название реагента	hK2 Антиген
Описание продукта	Рекомбинантный ekhK2 экспрессируется в клетках <i>Trichoplusia ni</i> (High Five™), несущих бакуловирусные частицы, которые содержат кодирующую последовательность для ekhK2 (ген <i>preprohK2</i> , амплифицированный из библиотеки человеческих простатических кДНК, а затем подвергнутый мутированию, чтобы заменить hK2 консенсусный сайт на -1 на энтерокиназный сайт). ekhK2 аффинно-очищают из лизата с использованием биотинилированного моноклонального антитела 11B6, соединенного с Pierce High Capacity Streptavidin Chromatography Cartridge, элюируют в 0,2 М глицин, pH 2,5, затем нейтрализуют в 1/10 объеме 1М Трис HCl, pH 9. Смешанные фракции замораживали при -70°C. Когда белок извлекали из морозилки, немедленно добавляли стабилизирующий буфер (содержащий 50 mM TSA, pH 7,75 с 0,5% BSA).
Тип клеток	<i>Trichoplusia ni</i> (High Five™)
Вектор	AcekhK2 (описанный в Rajakoski <i>et al.</i> 1997, Lovgren <i>et al.</i> 1999)
Концентрация белка	по меньшей мере, 1 мкг/мл при Prostatus анализе t-PSA
Буфер	30 mM Глицин, 72 mM Трис-HCl, 83 mM NaCl, 0,008% азид натрия (вес/об) с 0,42% BSA, pH 7,0

Оснащение.

Микродозаторы Wallac, 1,25 мл (Perkin Elmer Product # 1235-402)

Сосуды для разведения (Perkin Elmer Product # 1235-411)

15 мл пробирки

Несмываемый маркер

Оборудование.

Пипетки объемом 101-1000 мкл

Наконечники для пипеток

Планшетный процессор AutoDELFIA (Perkin Elmer: 1235-001)

Процессор для обработки образцов AutoDELFIA (Perkin Elmer: 1297-014)

Персональный компьютер PC AutoDELFIA (Perkin Elmer: 1235-8060)

(включает программное обеспечение, дисплейный терминал и Multicalc)

Образец: плазма.

Методика.

Загрузить аликвоту образца пациента в иммуноанализатор (например, прибор Roche) для определения tPSA и fPSA. Для определения iPSA, hK2 (и необязательно fPSA и tPSA) с помощью прибора AutoDELFIA следуйте указанной ниже процедуре: все реагенты довести до состояния комнатной температуры, включая Специфические стандарты для анализа (7 уровней), Специфические контроли для анализа (3 уровня). Развести захватывающий раствор (100×) для биотинилированного iPSA в 100 раз буфером (pH 6,8) для анализа iPSA и отмерить захватывающие растворы в каждую лунку планшетов для iPSA. Развести захватывающий раствор (100×) для биотинилированного hK2 в 100 раз буфером (pH 7,8) для анализа hK2 и отмерить захватывающие растворы в каждую лунку планшетов для hK2. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30-60 мин. Если для определения tPSA и fPSA используется набор Prostatus, следуйте инструкции, имеющейся в наборе для определения tPSA и fPSA. Загрузите реагент для анализа и образец пациента в прибор AutoDELFIA. При работе на приборах руководствуйтесь протоколами для анализа iPSA и анализа hK2, до завершения.

Получение и обработка образца.

Кровь собирают в K2EDTA-пробирку и хранят при температуре 2-8°C до отправления в течение ночи в лабораторию с использованием холодоэлемента. После доставки в лабораторию образец проверяют, и если он приемлем, регистрируют в лабораторной системе слежения, после чего хранят в K2EDTA-пробирке в холодильнике при 2-8°C. Кровь центрифугируют по возможности сразу же, полученную плазму отмеряют пипеткой в пробирки для переноса. В течение периодов времени 24 ч или менее от момента получения образец плазмы хранится при 2-8°C, но в течение периодов времени больше 24 ч, об-

разцы плазмы хранятся при температуре от -70°C до -80°C.

Пример 4. Последовательности PSA и человеческого калликреина 2.

PSA белок (SEQ ID NO: 3).

IVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVILLGRHSLFH
PEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPDDSSHDLMLLRLSEPAELTDAVKVMDL
PTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAG
RWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVA
NP

hK2 белок (SEQ ID NO: 4).

IVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHC GGVLVHPQWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHN
LFEPEDTGQRPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMLLRLSEPAKITDVVKVL
GLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLRPSRLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLC
AGLWTGGKDTCCGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKD
TIAANP

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения вероятности того, что биоптат ткани предстательной железы, полученный от субъекта, будет содержать поддающийся обнаружению высокостокачественный рак предстательной железы, где высокостокачественный рак предстательной железы - это рак предстательной железы, имеющий индекс Глисона 7 или более, включающий:

i) проведение одного или нескольких иммуноанализов образца крови субъекта, измеряющих уровни свободного простатоспецифического антигена (fPSA), общего простатоспецифического антигена (tPSA), интактного простатоспецифического антигена iPSA и человеческого калликреина 2 (hK2); и

ii) определение вероятности того, что биоптат ткани предстательной железы будет содержать поддающийся обнаружению высокостокачественный рак предстательной железы, используя логистическую регрессионную модель, где логит в логистической регрессионной модели определяют путем взвешивания измеренных уровней fPSA, tPSA, iPSA и hK2, параметра, характеризующего возраст субъекта, и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта.

2. Способ определения вероятности того, что биоптат ткани предстательной железы, полученный от субъекта, будет содержать поддающийся обнаружению высокостокачественный рак предстательной железы, где высокостокачественный рак предстательной железы - это рак предстательной железы, имеющий индекс Глисона 7 или более, включающий:

i) проведение иммуноанализа образца крови субъекта для измерения уровня общего простатоспецифического антигена (tPSA) в образце крови субъекта; и

ii) если уровень tPSA превышает пороговый уровень, определение вероятности того, что биоптат ткани предстательной железы будет содержать поддающийся обнаружению высокостокачественный рак предстательной железы, используя логистическую регрессионную модель, где логит в логистической регрессионной модели определяют путем взвешивания измеренных уровней tPSA, параметра, характеризующего возраст субъекта, и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; или

iii) если уровень tPSA ниже порогового уровня, то проведение одного или нескольких иммуноанализов образца крови субъекта, измеряющих уровни свободного простатоспецифического антигена (fPSA), интактного простатоспецифического антигена iPSA и человеческого калликреина 2 (hK2) в образце крови, и определение вероятности того, что биоптат ткани предстательной железы будет содержать поддающийся обнаружению высокостокачественный рак предстательной железы, используя логистическую регрессионную модель, где логит в логистической регрессионной модели определяют путем взвешивания измеренных уровней fPSA, tPSA, iPSA и hK2, параметра, характеризующего возраст субъекта, и параметра, показывающего, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта.

3. Способ по любому из пп.1 или 2, в котором логит в логистической регрессионной модели определяют путем дополнительного взвешивания параметра, характеризующего результат пальцевого ректального исследования, проведенного у субъекта.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором логит в логистической регрессионной модели определяют путем дополнительного взвешивания члена кубического сплайна на основе измеренного уровня tPSA.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором логит в логистической регрессионной модели определяют путем дополнительного взвешивания члена кубического сплайна на основе измеренного уровня fPSA.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором иммуноанализ, измеряющий уровень fPSA, включает контактирование fPSA, присутствующего в образце крови, с первым захватывающим антителом, специфичным к fPSA, при условиях, в которых первое захватывающее антитело связывается с fPSA, та-

ким образом, образуя комплекс захватывающее антитело - fPSA; и

обнаружение комплекса захватывающее антитело - fPSA с помощью первой метки.

7. Способ по п.6, в котором первая метка представляет собой антитело 5A10.

8. Способ по п.6 или 7, в котором первое захватывающее антитело является антителом H117.

9. Способ по любому из пп.1-8, согласно которому иммуноанализ, измеряющий уровень iPSA, включает

контактирование iPSA, присутствующего в образце крови, со вторым захватывающим антителом, специфичным к iPSA и расщепленному PSA, при условиях, в которых второе захватывающее антитело связывается, по меньшей мере, с iPSA, таким образом, образуя комплекс захватывающее антитело - iPSA;

комбинирование комплекса захватывающее антитело - iPSA с антителом-меткой в буфере, имеющем pH менее 7,75, таким образом, чтобы это антитело-метка специфически связывало комплекс захватывающее антитело - iPSA, и

обнаружение комплекса захватывающее антитело - iPSA с помощью второй метки.

10. Способ по п.9, в котором pH буфера находится в диапазоне от 6.5 до 7.0.

11. Способ по п.9 или 10, в котором вторая метка содержит антитело 4D4.

12. Способ по любому из пп.9, 10, в котором второе захватывающее антитело представляет собой 5A10 Fab.

13. Способ по любому из пп.1-12, согласно которому иммуноанализ, измеряющий уровень tPSA, включает

контактирование tPSA, присутствующего в образце крови, с третьим захватывающим антителом, специфичным к tPSA, при условиях, в которых третье захватывающее антитело связывается с tPSA, таким образом, образуя комплекс захватывающее антитело - tPSA; и

обнаружение комплекса захватывающее антитело - tPSA с помощью третьей метки.

14. Способ по п.13, в котором третья метка содержит антитело H50.

15. Способ по п.13 или 14, в котором третье захватывающее антитело является антителом H117.

16. Способ по любому из пп.1-15, согласно которому иммуноанализ, измеряющий уровень hK2, включает

контактирование PSA в образце крови с блокирующими антителами, специфичными к PSA;

контактирование hK2, присутствующего в образце крови, с четвертым захватывающим антителом, специфичным к hK2, при условиях, в которых четвертое захватывающее антитело связывается с hK2, таким образом, образуя комплекс захваченное антитело - hK2; и

обнаружение комплекса захваченное антитело - hK2 с помощью четвертой метки.

17. Способ по п.16, в котором четвертая метка содержит антитело 7G1.

18. Способ по пп.16, 17, в котором четвертое захватывающее антитело является 6H10 F(ab)₂.

19. Способ по любому из пп.16-18, в котором блокирующие антитела содержат антитело 5F7, антитело 5H6 и антитело 2E9.

20. Способ по любому из пп.6-19, в котором каждое или любое захватывающее антитело является связанным с твердой подложкой.

21. Способ по любому из пп.6-20, в котором каждая или любая метка содержит метку Европием.

22. Способ по любому из пп.1-21, где образец крови является образцом плазмы крови.

23. Способ по любому из пп.2-21, где пороговый уровень равен 25 нг/мл tPSA.

24. Система определения вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы, включающая

входной интерфейс, сконфигурированный для получения информации, свидетельствующей об уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, присутствующих в образце крови субъекта, информации о возрасте субъекта и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта;

по меньшей мере один процессор, запрограммированный на оценку логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на полученной информации, с целью определения вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы у субъекта, при этом оценка логистической регрессионной модели включает

определение вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы, используя логистическую регрессионную модель, где логит логистической регрессионной модели определяют с помощью взвешивания информации об уровнях fPSA, tPSA, iPSA и hK2, информации о возрасте субъекта и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта; и

интерфейс вывода сконфигурированного для вывода показателя вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы, при котором событие представляет собой биоптат ткани простаты, содержащий определяемый высокозлокачественный рак предстательной железы, где высокозлокачественный рак предстательной железы - это рак предстательной железы, имеющий индекс Глисона 7 или более.

25. Система для определения вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы, включающая:

а) детектор, сконфигурированный для измерения уровней tPSA, fPSA, iPSA и hK2, присутствующих в образце крови у субъекта;

б) компьютер, имеющий электронную связь с детектором, при этом компьютер содержит:

i) входной интерфейс, сконфигурированный для получения информации от детектора, свидетельствующей об измеренном уровне tPSA, fPSA, iPSA и hK2, получения информации о возрасте субъекта и для получения информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта;

ii) по меньшей мере один процессор, запрограммированный для оценки логистической регрессионной модели, основанной, по меньшей мере, отчасти на полученной информации для определения вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы у субъекта, при этом оценка логистической регрессионной модели включает

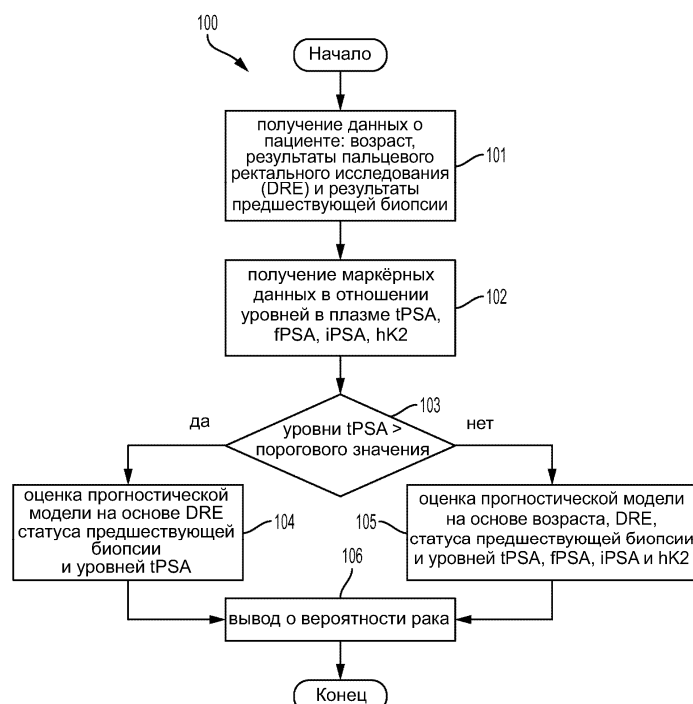
определение вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы, используя логистическую регрессионную модель, где логит логистической регрессионной модели определяется с помощью взвешивания информации, свидетельствующей об уровнях tPSA, fPSA, iPSA и hK2, информации о возрасте субъекта и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта;

iii) выходной интерфейс, сконфигурированный для вывода показателя вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы, при котором событие представляет собой биоптат ткани простаты, содержащий определяемый высокозлокачественный рак предстательной железы, где высокозлокачественный рак предстательной железы - это рак предстательной железы, имеющий индекс Глисона 7 или больше.

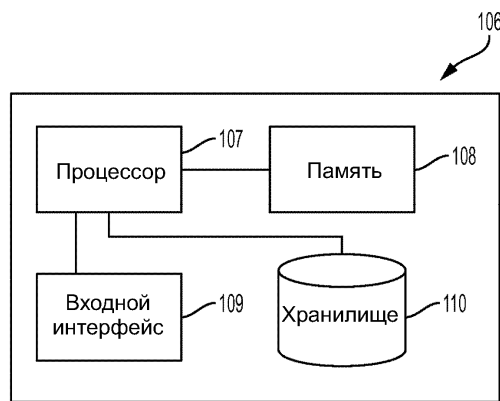
26. Машиночитаемый носитель информации, запрограммированный множеством команд, при выполнении которых компьютер осуществляет способ определения вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы, при этом способ включает

оценку логистической регрессионной модели для определения вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы у субъекта, где логит этой логистической регрессионной модели определяется с помощью взвешивания информации, показывающей уровни fPSA, tPSA, iPSA и hK2, присутствующих в образце крови субъекта, информации о возрасте субъекта и информации о том, проводилась ли ранее биопсия ткани предстательной железы у субъекта, для определения вероятности события, связанного с высокозлокачественным раком предстательной железы у субъекта; и

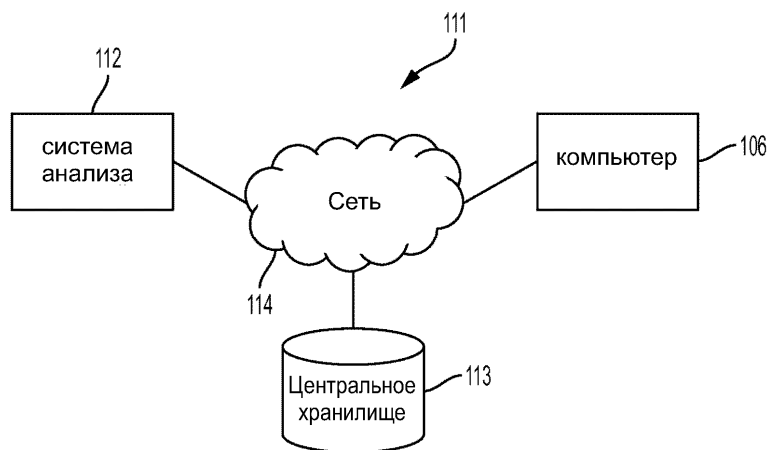
вывод показателя вероятности события, связанного с раком предстательной железы, где событие представляет собой биоптат ткани простаты, содержащий определяемый высокозлокачественный рак предстательной железы, где высокозлокачественный рак предстательной железы - это рак предстательной железы, имеющий индекс Глисона 7 или больше.



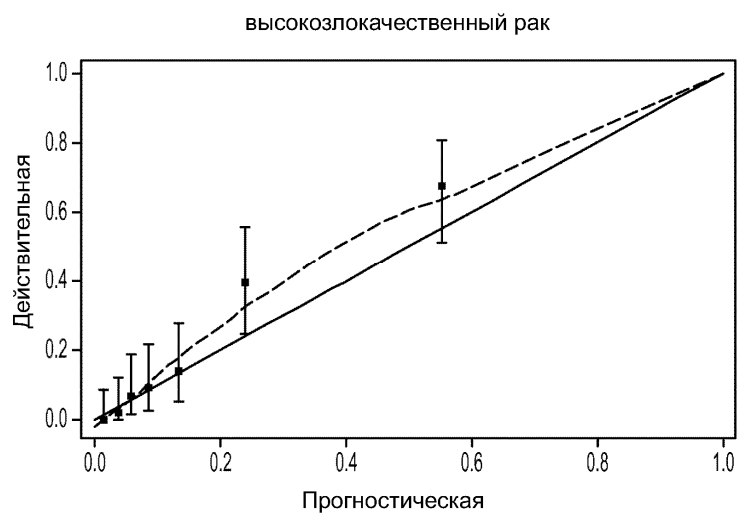
Фиг. 1А



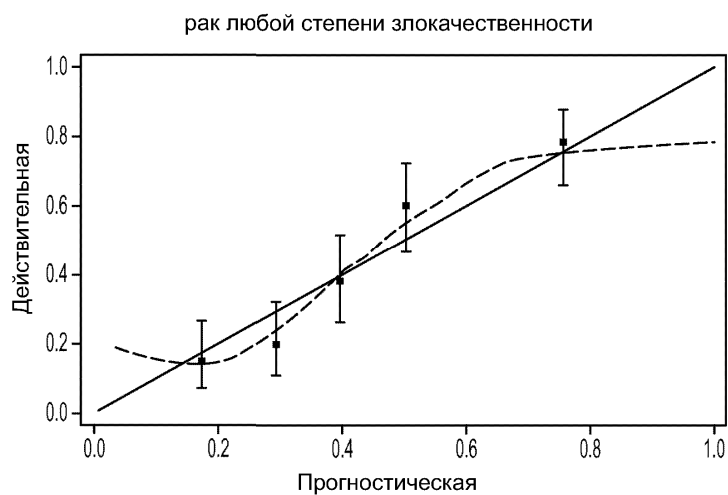
Фиг. 1В



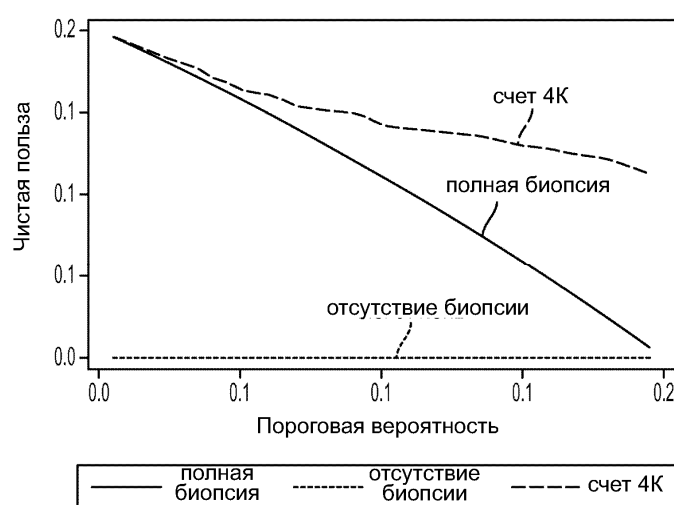
Фиг. 1С



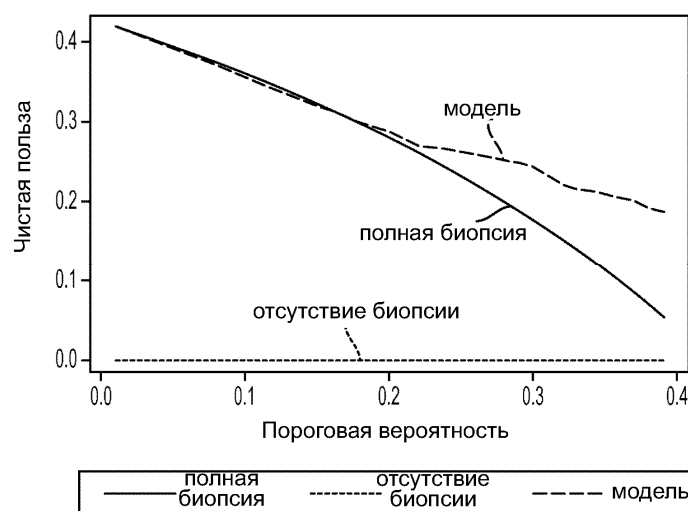
Фиг. 2



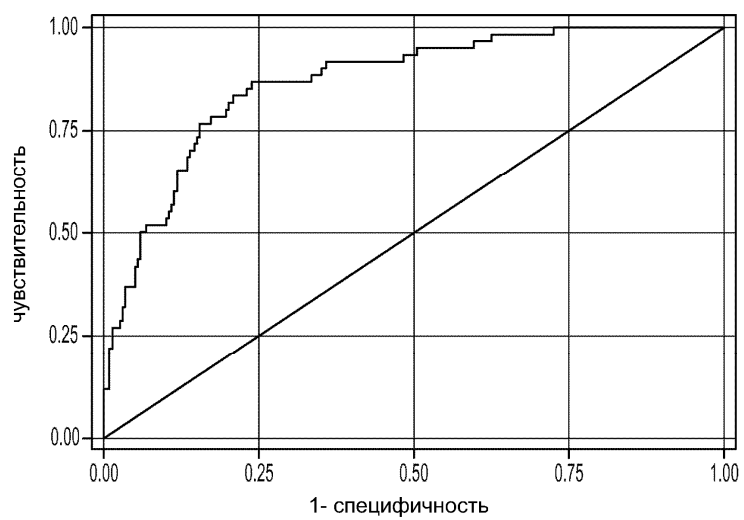
Фиг. 3



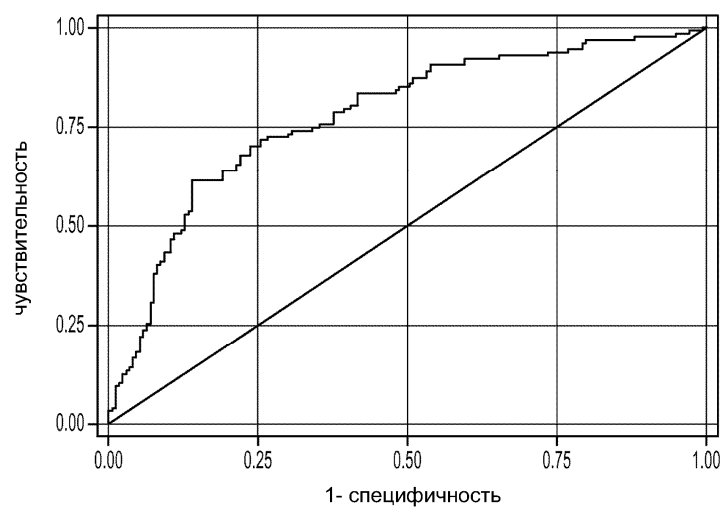
Фиг. 4



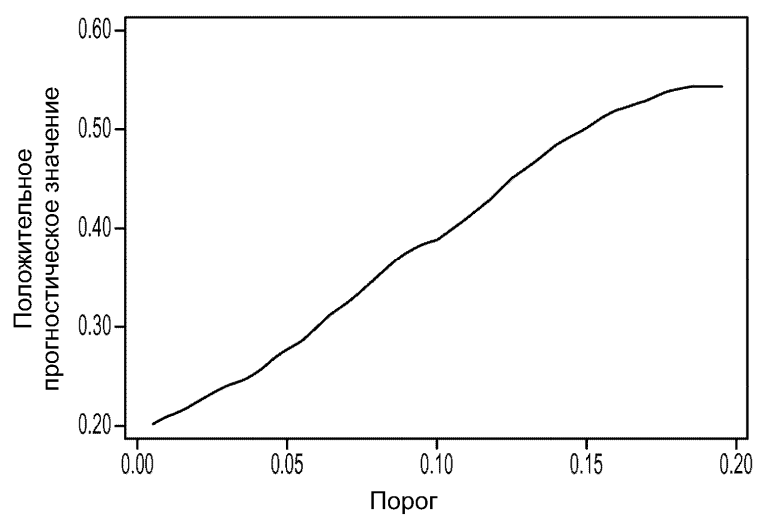
Фиг. 5



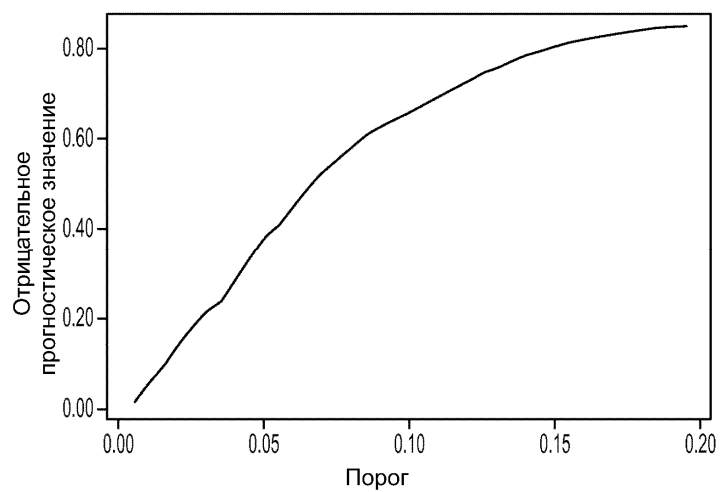
Фиг. 6



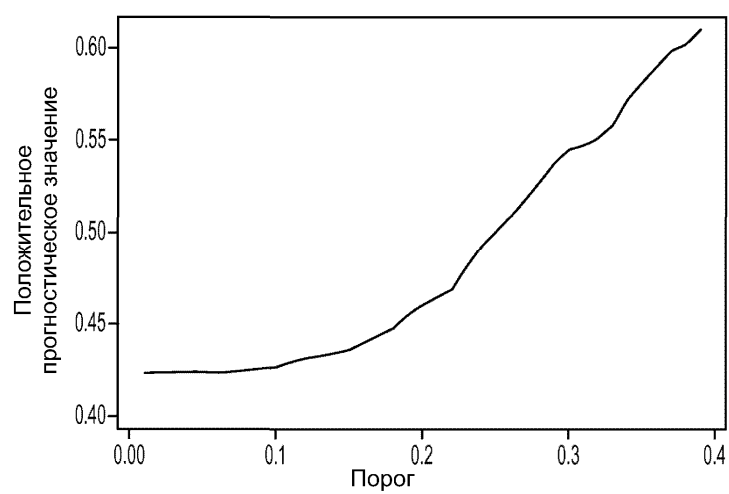
Фиг. 7



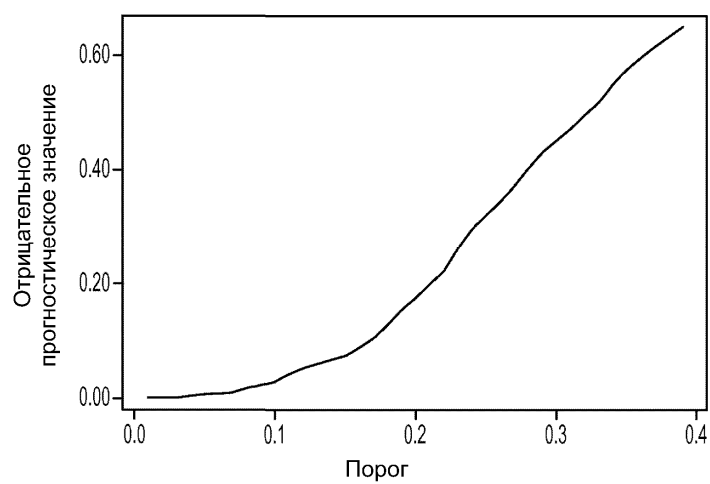
Фиг. 8А



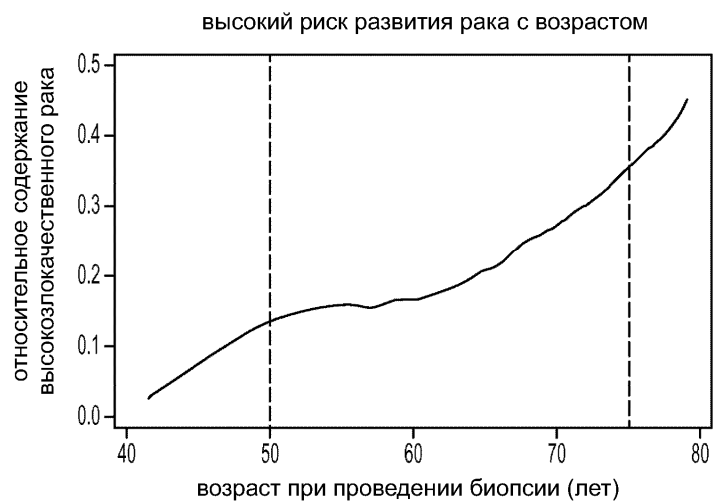
Фиг. 8В



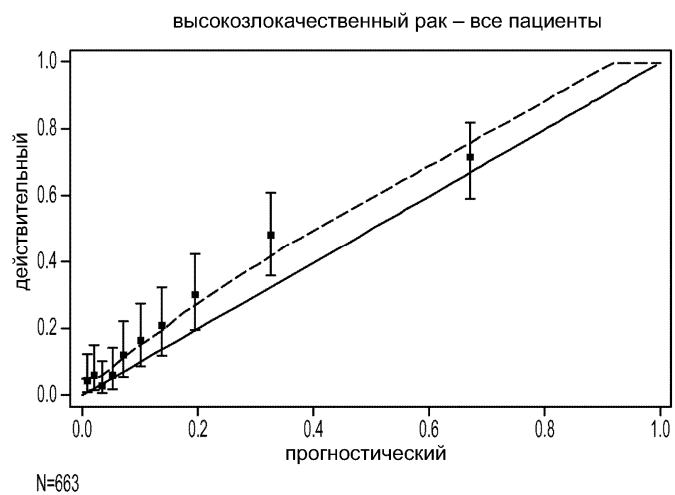
Фиг. 9А



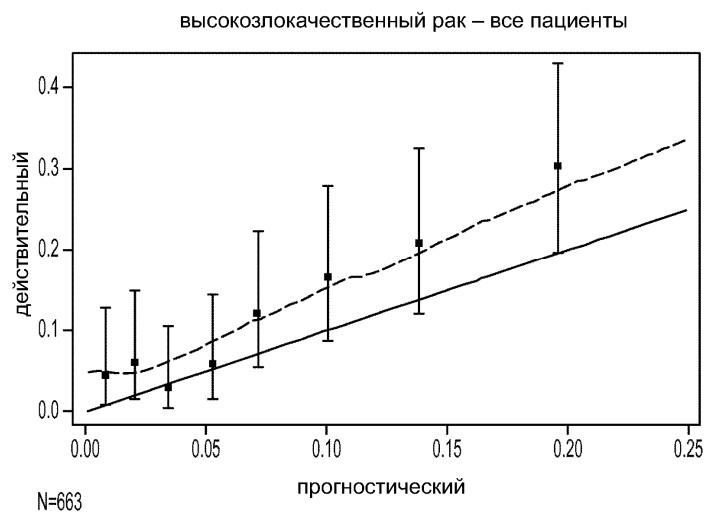
Фиг. 9В



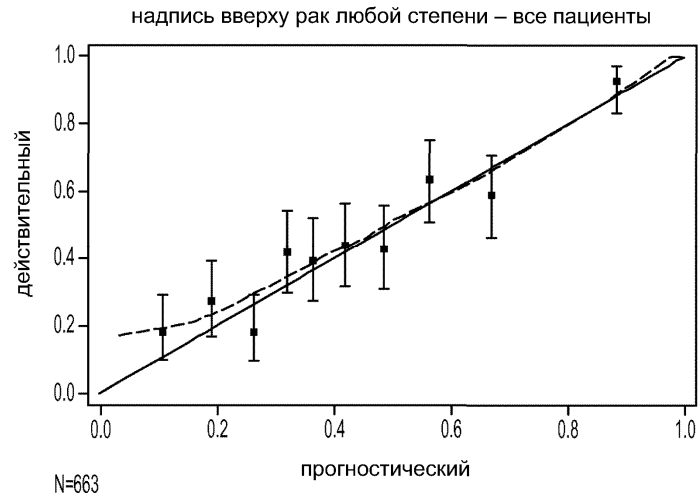
Фиг. 10



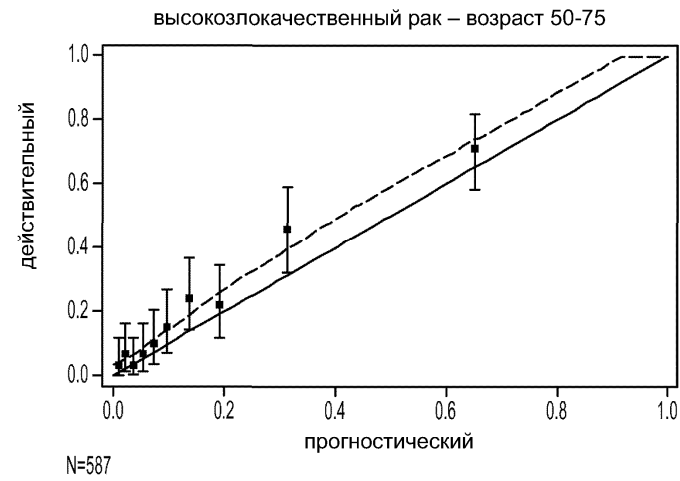
Фиг. 11А



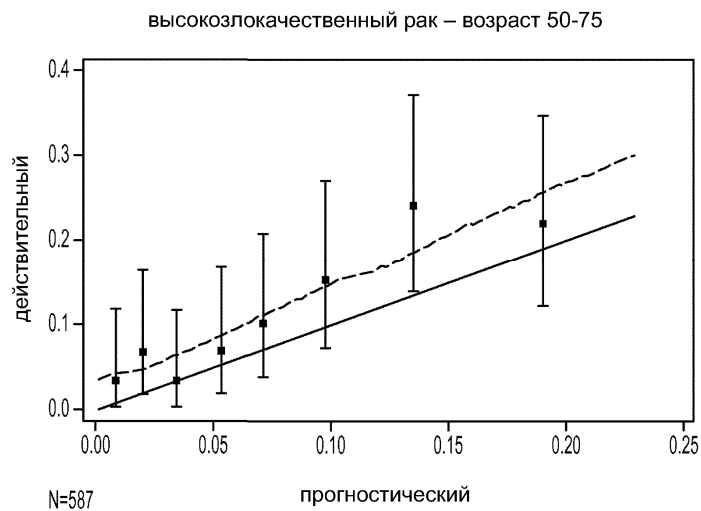
Фиг. 11В



Фиг. 11С

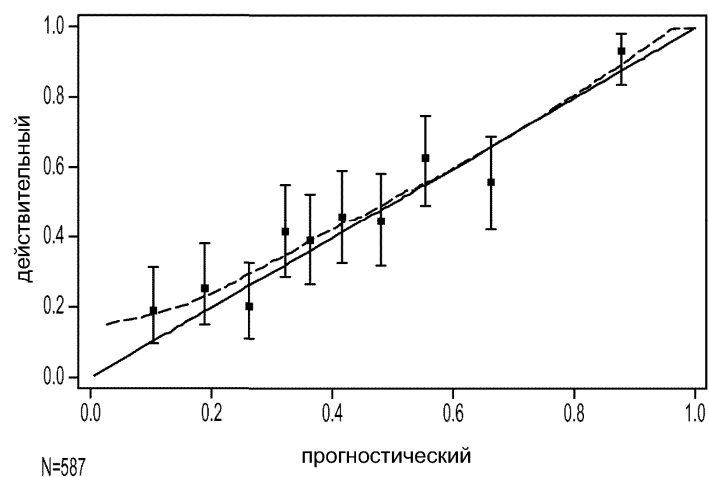


Фиг. 12А



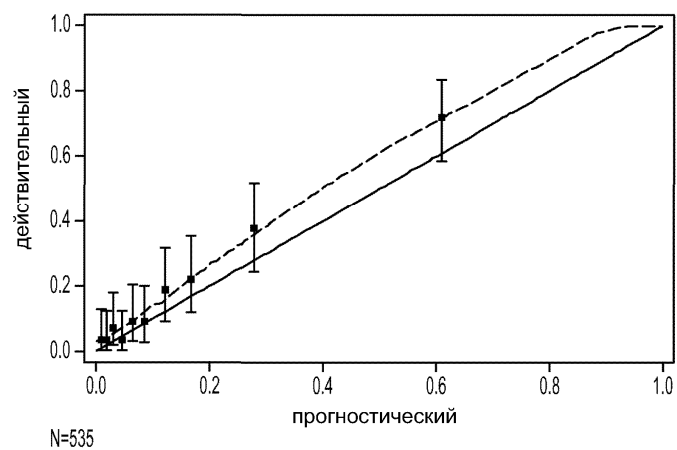
Фиг. 12В

рак любой степени – возраст 50-75



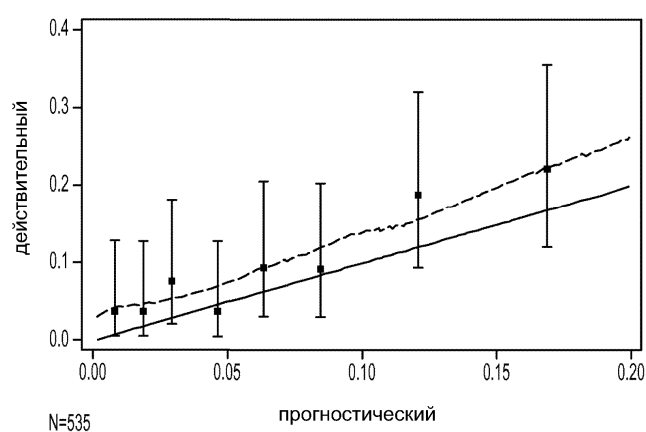
Фиг. 12С

высококвалифицированный рак – возраст менее 71

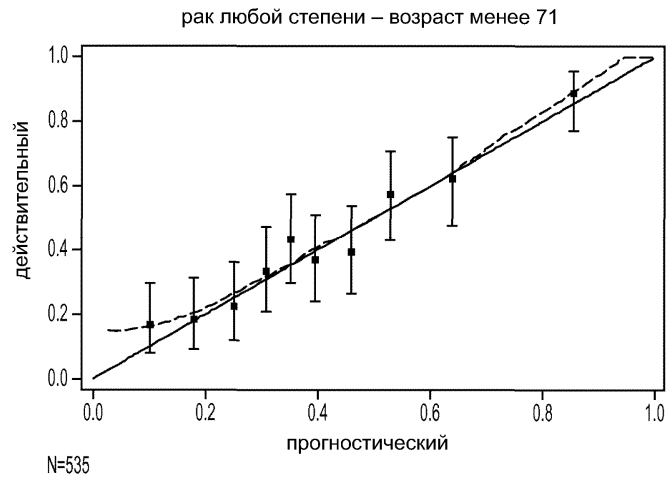


Фиг. 13А

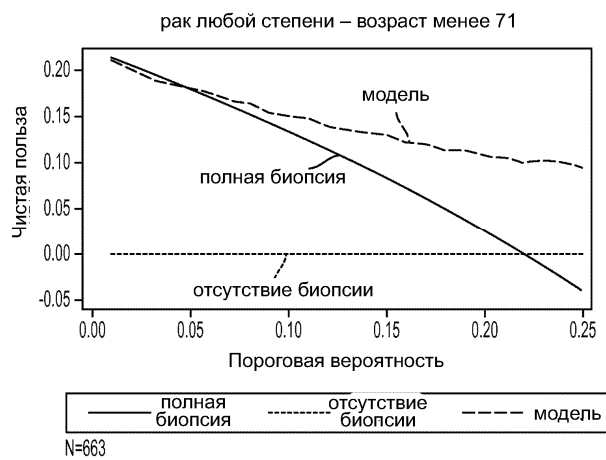
высококвалифицированный рак – возраст менее 71



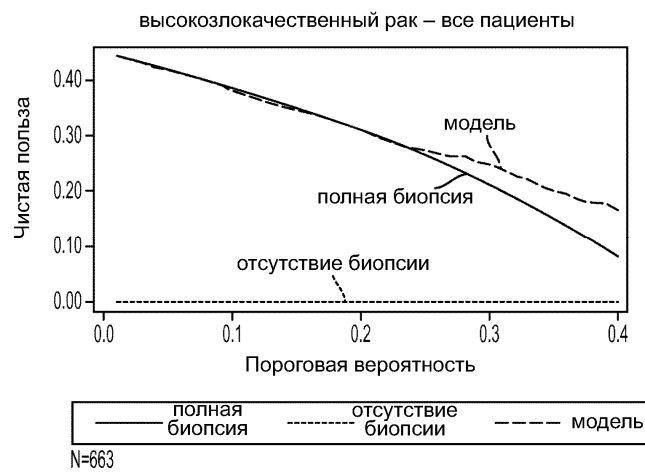
Фиг. 13В



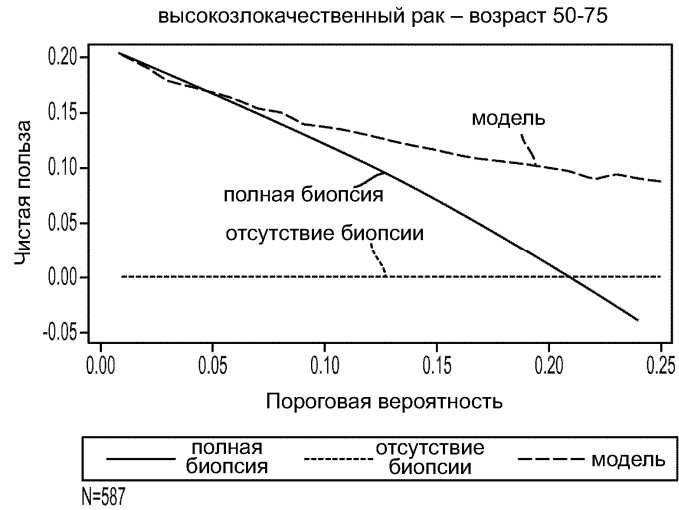
Фиг. 13С



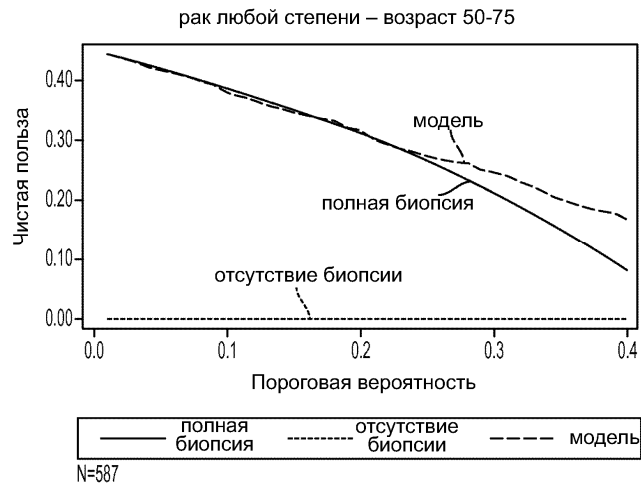
Фиг. 14А



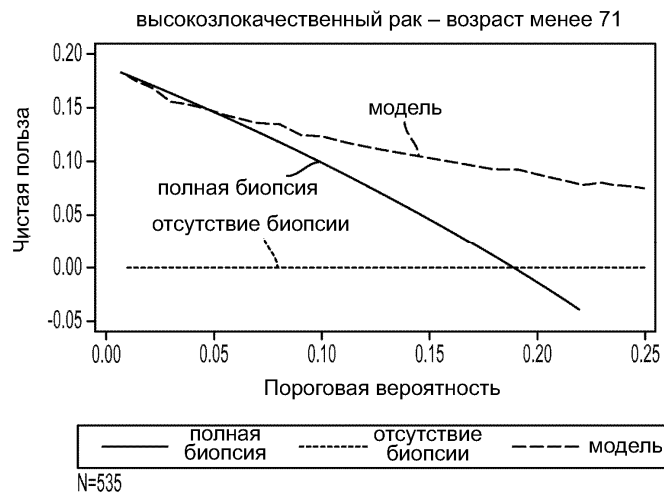
Фиг. 14В



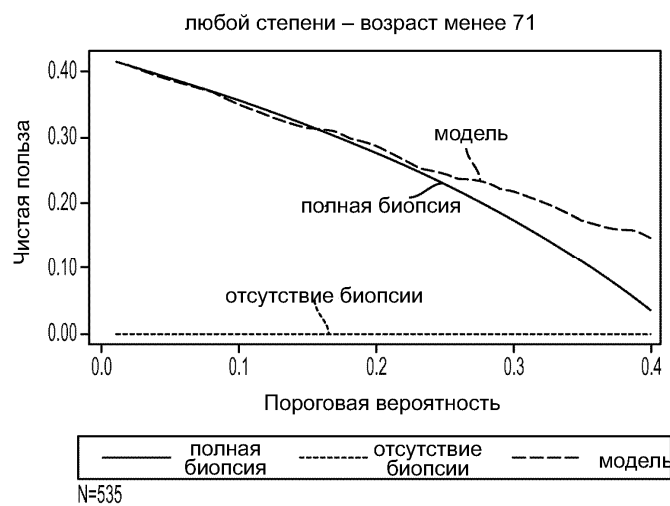
Фиг. 15А



Фиг. 15В



Фиг. 16А



Фиг. 16В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2