

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-507069

(P2010-507069A)

(43) 公表日 平成22年3月4日(2010.3.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 B O 2 4
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2009-519608 (P2009-519608)	(71) 出願人	509008042
(86) (22) 出願日	平成19年7月6日 (2007.7.6)		ユニバーシティー オブ ケンタッキー
(85) 翻訳文提出日	平成21年2月20日 (2009.2.20)		リサーチ ファンデーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/072943		アメリカ合衆国 40506-0057
(87) 国際公開番号	W02008/008708		ケンタッキー州, レキシントン, ユニバー
(87) 国際公開日	平成20年1月17日 (2008.1.17)		シティー オブ ケンタッキー, キンケー
(31) 優先権主張番号	60/806, 778		ド ホール 102
(32) 優先日	平成18年7月8日 (2006.7.8)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	PCT/US2006/060796	(74) 代理人	100096183
(32) 優先日	平成18年11月10日 (2006.11.10)		弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺癌診断アッセイ

(57) 【要約】

患者における肺癌の存在を測定するための診断アッセイは、肺癌に関連する抗体の存在を確認することに部分的に依拠している。このアッセイは、ラジオグラフィにより検出可能な癌組織の証拠の前に肺癌を予測した。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肺癌についてラジオグラフィー検査を受ける患者を選択する方法であって、

- (a) 該患者に由来する流体サンプルを準備し；
- (b) 該サンプル中の肺癌に関連するマーカーの存在をランダムポリペプチドを用いて調べ；
- (c) 該サンプル中に該マーカーを有する患者をラジオグラフィー検査のために選択する、ことを含む、上記方法。

【請求項 2】

マーカーが自己抗体である、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

患者が無症候性である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

患者が、肺癌をラジオグラフィーにより検出できない高リスクの患者である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ラジオグラフィーにより検出可能な肺癌が患者に存在するより最長 5 年前に、マーカーが発現している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

肺癌マーカーを含む組成物であって、該マーカーが、ラジオグラフィーにより検出可能な肺癌が患者に存在するより最長 5 年前に、該患者の流体サンプル中に存在する分子の結合パートナーであり、かつランダムポリペプチドである、上記組成物。

20

【請求項 7】

前記サンプル中の前記分子が自己抗体である、請求項 6 記載の組成物。

【請求項 8】

ビーズを含む、請求項 6 記載の組成物。

【請求項 9】

膜を含む、請求項 6 記載の組成物。

【請求項 10】

平らな表面を含む、請求項 6 記載の組成物。

30

【請求項 11】

請求項 6 記載の組成物を含むアッセイデバイス。

【請求項 12】

マイクロアレイを含む請求項 11 記載のアッセイデバイス。

【請求項 13】

少なくとも 2 個の肺癌マーカーおよび固相を含む診断用デバイスであって、該マーカーがランダムポリペプチドである、上記デバイス。

【請求項 14】

前記マーカーが、自己抗体のエピトープである請求項 13 記載のデバイス。

【請求項 15】

固相がビーズを含む、請求項 13 記載のデバイス。

40

【請求項 16】

固相が膜を含む、請求項 13 記載のデバイス。

【請求項 17】

アレイを含む、請求項 13 記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肺癌を体液サンプルを用いて早期発見するためのアッセイ、方法及びキットに関する。特に、本発明は、1 個またはパネルのマーカー（例えば、自己抗体バイオマー

50

カー)の存在を評価することによる肺癌の発見に関する。

【背景技術】

【0002】

肺癌は米国及び多くの他の諸国での男女の癌の主な死因である。この疾患による死亡数は米国だけでも過去5年間で毎年ほぼ164,000人に増えており、大部分は非小細胞癌(NSCLC)により死亡している。これは乳癌、前立腺癌及び結腸直腸癌を合わせた死亡率を超えている。

【0003】

多くの専門家は、肺癌の早期発見が生存を向上させるための鍵であると考えている。幾つかの研究が、肺癌を早期の限局している時期に発見し、外科的に切除可能ならば、5年生存率が85%に達し得ることを示している。しかしながら、肺癌が他の臓器、特に遠隔部位に広がった後では生存率は劇的に低下し、5年生存率は患者の2%くらいである。残念ながら、肺癌は不均質性疾患であり、進んだ時期に達するまで通常無症候性である。よって、肺癌の15%しか早期の限局している時期に発見されない。従って、無症候性の人をスクリーニングして肺癌を最も早く、最も治療可能な時期に発見するのを助けるツールが切望されている。

10

【0004】

胸部X線及びコンピューター断層撮影(CT)スキャンが早期肺癌を発見するための有効なスクリーニングツールとして研究されてきた。残念ながら、コストが高く、偽陽性率が高いために、これらのラジオグラフィーツールは広く使用するには実用的でない。例えば、米国国立癌研究所の最近の研究は、肺癌を胸部X線でスクリーニングすると早期肺癌を発見できるが、余計な経過観察検査を要する偽陽性試験結果が多く生じると結論づけた。Okenら, Journal of the National Cancer Institute, 97(24), 1832-1839, 2005。トライアルの参加時に基準X線を受けた67,000人のうちほぼ6,000人(9%)が経過観察が必要な異常な結果を有していた。これらの中で、最初の胸部X線から12ヶ月以内に肺癌と診断されたのは126人(X線で異常が見られた6,000人の参加者の2%)のみであった。

20

【0005】

偽陽性の同様の問題は、CTスキャンを含む継続中のトライアルでも見られる。CTスクリーニングの無病正診率は不確定なラジオグラフィー所見の数に基づいて約65%と計算される。

30

【0006】

更なる調査を必要とし、その多くが最終的には良性と判定される有病スキャンで見つかる多数の不確定な肺結節にヘルスケアコストの大部分が支払われる恐れがあるために、専門家は実施するCTスクリーニングスキャン1回あたりに発見される癌の数を算定して節約される一生あたりのヘルスコストについて重大な関心を提起している。

【0007】

PETスキャンも別の診断オプションであるが、PETスキャンは費用がかかり、通常スクリーニングプログラムに使用できない。

40

【0008】

現在、大規模スクリーニング研究による選択基準として使用されてきたリスク因子は年齢及び喫煙歴のたった2つである。

【0009】

ラジオグラフィーにより明らかな癌(>0.5cm)並びに潜在性及び前悪性癌(ラジオグラフィー検出限界以下)を発見できる血液検査は、ラジオグラフィースクリーニングを最も正当に受ける資格のある個人を同定し、事実上更なる精密検査が必要となる良性の肺所見の数を減らすであろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

50

【0010】

【非特許文献1】Okenb, Journal of the National Cancer Institute, 97(24), 1832-1839, 2005

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従って、上記したラジオグラフィ技術の限界を解消する肺癌のスクリーニング及び検出ツールを改善することが緊急に要望されていることは明らかである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、肺癌を体液サンプルを用いて早期発見するためのアッセイ、方法及びキットに関する。特に、本発明は、1個またはパネルのマーカ（例えば、自己抗体バイオマーカー）の存在を評価することによる肺癌の検出に関する。

【0013】

本発明は、特にラジオグラフィ画像診断及び他のスクリーニングモダリティと共に使用される場合、包括的な肺癌スクリーニング戦略に使用され得る。本発明は、肺癌の存在の可能性を除外するために更なるラジオグラフィ分析のための個体数を増やすために使用され得る。

【0014】

要するに、本発明は、1つの実施形態では患者から血液サンプルを用意し、患者の血液サンプルを1個またはパネルの肺癌関連自己抗体の存在について分析することによる患者における肺癌の存在の可能性を検出する方法に関する。前記パネルは、例えば該パネルのメンバーに関連する癌の最大尤度を評価することにより同定され得る。結果に対する複数の変量の同時寄与を評価するために各種統計ツールが使用され得る。

【0015】

本発明は、大CTスクリーニングトライアルで得たサンプルを分析し、早期及び後期肺癌並びに潜在性疾患をリスク照合対照から区別するために使用された。本アッセイは、ラジオグラフィによる検出の長くとも5年前に肺癌の存在をほぼ90%の精度で予測した。本アッセイは、無症候性患者または容認されている検査及びプロトコルを用いて肺癌とまだ診断されていない高リスク群の患者（すなわち、例えばラジオグラフィにより肺癌を検出できていない患者）に対するスクリーニング検査として使用され得る。

【0016】

本発明は、高いコスト及び低い無病正診率を有する、胸部X線または低線量CTのような現在の肺癌スクリーニング方法に対する代替方法を提供する。本アッセイは、更に評価しなければならない良性肺結節の検出を制限しながら癌検出を最大限にし、従って包括的早期発見戦略に容易に組み入れられる有効かつ費用効率が適切なツールである。

【0017】

本発明の上記した及び他の特徴、態様及び作用効果は以下の説明及び特許請求の範囲にて更なる理解されるであろう。

【発明を実施するための形態】

【0018】

病的状態の早期診断は有益である。しかしながら、すべての病的状態が容易に検出可能な簡単なサインを有しているわけではない。他の病的状態は病因または表現型の点で、或いはその発症時期を通して不均質である。そのような状況で、1つの、精度が高い、特異的な診断サインまたはマーカは存在していそうもない。

【0019】

今回、単独では十分な予測パワーを有していないかもしれないが、ある組合せでパネルは実際の使用のために十分な特異性及び精度を有しているマーカを複数用いる適当な診断アッセイを開発することができる。更に、多数の技術及びデータ処理能力により、使用が簡単で且つ限定的な集団または一般的な集団に対してより大きい予測パワーを有する特

10

20

30

40

50

殊化・個人化診断アッセイの開発が柔軟となる。

【0020】

本発明は、肺癌のような疾患を従来手段よりもより早期に、より正確に検出するための新しいアッセイ及び方法を提供する。要するに、患者または被験者からのサンプル（例えば、血液サンプル）を入手し、パネルの抗体バイオマーカーの存在または不在について分析する。肺癌の場合1個またはパネルのマーカーを使用し、各マーカーはある程度肺癌に関連し、その大部分はパネルを使用するとき不均質集団において肺癌を有している可能性の予測可能な測度を与える。

【0021】

以下により詳細に記載するように、本発明のアッセイ及び方法は早期及び後期肺癌患者を正確に同定した。早期肺癌患者を同定することは、現在のアッセイ及びスクリーニングモダリティがロバストで費用効率が適切な方法でそうすることが殆どできないので特に貴重である。本発明のスクリーニングアッセイによると、多くの場合費用がかかる現在使用されているアッセイに比してより高い予測可能性を与え、より少ない偽陽性しか生じない。本アッセイは用途が広く、多数のサンプルを同時に検査することができるアッセイフォーマット（例えば、マイクロアレイ）を用いることにより任意の集団に対する対照サンプルを同時に流して高信頼度を有する判別データを得ることができる。この場合、複数の対照はできるだけ多くのパラメータについて試験集団に照合されている。こうすると、生じる可能性があり、結果を混乱させる恐れがある集団の差（例えば、人種、性別、年齢、多型等）を補正することができる。

10

20

【0022】

定義

本明細書中で使用されている以下の用語は以下の意味を有する。

【0023】

「肺癌」は肺における悪性のプロセス、状態及び組織を意味する。

【0024】

「タンパク質」はアミノ酸のポリマーであるペプチド、オリゴペプチドまたはポリペプチドであり、これらの用語は本明細書中で互換可能に使用されている。ライブラリーに関連して、ポリペプチドは生物活性を有する分子をコードする必要はない。当該抗体はエピトープまたは決定基を結合する。エピトープは無傷の機能性分子の一部であり、タンパク質に関連して約3～約5個くらいの隣接アミノ酸を含み得る。

30

【0025】

「正規化された」は、メトリック、統計量または測度が反応の真の反映、応答または結果であるかまたは有意でなくランダムであるかを判定するために観察された結果に対するバックグラウンド及びランダム寄与を補正または調節するためのメトリックまたは測度の統計処理に関する。

【0026】

「非小細胞肺癌」(NSCLC)はすべての肺癌の約80%を占める肺癌のサブタイプであり、燕麦細胞癌としても公知の小さい卵形細胞を特徴とする小細胞癌と対照的である。NSCLCサブタイプには扁平上皮癌、腺癌及び大細胞癌が含まれる。

40

【0027】

「体液」は検査のための患者サンプルとして使用され得る身体から得られるかまたは身体に由来する液体サンプル、例えば血液、唾液、精液、涙、組織抽出物、滲出液、体腔洗浄液、血清、血漿、組織流体等である。体液をそのまま使用することが好ましいが、検査する前に例えば遠心により清澄化のような処理をしてもよい。体液サンプルは流体サンプルである。

【0028】

「血液サンプル」は個人から得た通常静脈血の少量アリコートの意味する。血液を加工してもよく、例えば凝固因子を例えばヘパリンまたはEDTAを用いて不活化し、赤血球を除去すると血漿サンプルが得られる。血液を凝固させ、固体相及び液体相を分離すると

50

、血清が得られ得る。このような「加工した」血液サンプルのすべてが本明細書中で使用されている「血液サンプル」の定義の範囲に入る。

【0029】

「エピトープ」は抗体により結合される特定の分子構造を意味する。同義語は「決定基」である。ポリペプチドエピトープは3～5アミノ酸くらいであり得る。

【0030】

「バイオマーカー」は、結果（例えば、生命体の現在の状態または将来の健康状態）を予測するのに有用であることが判明している因子、インジケータ、スコア、メトリック、数学的操作等を指す。バイオマーカーはマーカーと同義である。

【0031】

「パネル」はアッセイのため、アッセイにおいて一緒に測定されるマーカーのコンパイルセットを意味する。パネルは2個のマーカー、3個のマーカー、4個のマーカー、5個のマーカー、6個のマーカー、7個のマーカー、8個のマーカー、9個のマーカー、10個のマーカー、11個のマーカー、12個のマーカーまたはそれ以上のマーカーを含み得る。本明細書中で教示されており、本発明を実施する際に適用され得る統計処理及びアッセイ方法は当該アッセイにおける多数の有益なマーカーの使用のために用意されている。

【0032】

「結果」は予測または検出（発見）されるものである。

【0033】

「自己抗体」は病的細胞（例えば、感染細胞及び腫瘍細胞）を含めた「自家性」（自己）タンパク質に対する免疫グロブリンまたは抗体（これらの用語は本明細書中で互換可能に使用されている）を意味する。この場合、腫瘍に対する自己抗体は、個人自身の腫瘍に由来し、個人自身の細胞の遺伝的異常である。

【0034】

「加重和」は各々が予測値を有している個々のマーカーに由来するスコアの合計を意味する。より大きな予測値を有するマーカーが合計により多く寄与する。個々のマーカーの相対値は公知の統計パラダイム（例えば、ロジスティック回帰）を用いて多変量式の値を最大とするために統計的に誘導される。多数の市販されている統計パッケージが使用され得る。相加因子の式（例えば、回帰式）において各因子（マーカー）の「重要性」は該因子の係数として表される。

【0035】

「統計上有意」は偶然のみではまずあり得ない差を意味する。

【0036】

「マーカー」は診断時に評価され、使用され得る因子、インジケータ、メトリック、スコア、数学的操作等である。マーカーは例えばポリペプチドまたは抗原であっても、抗原を結合する抗体であってもよい。また、マーカーは結合対または結合パートナーの1つであり得、結合対または結合パートナーは相互に対して特異性を有する物体であり、例えば抗体と抗原、ホルモンと受容体、リガンドとリガンドに結合して複合体を形成する分子、酵素と補酵素、酵素と基質等々であり得る。

【0037】

「予測マーカー」は肺癌を公知技術を用いて検出する前に存在しているマーカーである。よって、本アッセイは患者中にラジオグラフィにより検出可能な癌が検出される前に、例えばラジオグラフィにより検出可能な癌が発見されるより最長5年前に肺癌特異的自己抗体を検出する。このような自己抗体は予測マーカーである。

【0038】

「標的集団」は特定のマーカー、状態、条件、疾患等により類型化される集団の部分集合を意味する。よって、標的集団は例えば肺癌の特定の形または時期にある特定患者または喫煙者集団であり得る。標的集団は1つ以上のリスク因子を有する人から構成され得る。標的集団は今後、より好機にモニターするのに値する疑わしい検査結果（例えば、肺における異常性の存在）を有する人から構成され得る。

10

20

30

40

50

【0039】

「ラジオグラフィーによる」はC A T、P E T、X線等のような画像診断方法を指す。

【0040】

「ラジオグラフィーにより検出可能な癌」はラジオグラフィー手段による癌の診断または検出を指す。癌の存在は通常組織像により確認される。

【0041】

「組織サンプル」は特定組織に由来するサンプルを指す。液体形態の組織サンプルについて、サンプルは体液であっても、液体組織（例えば、血液）または加工した血液アリコートに由来するものであってもよい。相は固体組織から得られる流体、例えば滲出液、使用済組織培養液、細かく刻んだ固体組織の洗浄液等にも関する。

10

【0042】

バイオマーカーの選択

肺癌関連マーカー（例えば、自己抗体、及び自己抗体に対して特異的アフィニティーを有するまたは自己抗体により結合されるタンパク質）は当業者が利用している方法を用いる手段により選択及び同定され得る。抗体バイオマーカーの場合、各種の免疫学ベースの方法が実施され得る。当業界で公知のように、抗体の代わりに結合特異性を有するアプタマー、スピーゲルマー等も使用され得る。抗体 - 抗原反応に依拠する多くの公知のハイスループット法が本発明において実施され得る。

【0043】

標的集団中の個人からの分子を対照集団からの分子と比較して、例えばサブトラクション法などによる選別により肺癌特異的な分子を同定することができる。或いは、標的集団及び正常（対照）集団サンプルを使用して、分子のライブラリーから標的集団に対して特異的である分子を同定することができる。

20

【0044】

アフィニティー選択の形態は、候補分子のライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして抗体を用いてライブラリーで実施され得る。候補分子をスクリーニングするための抗体の使用は「バイオパニング」として公知である。この場合、標的集団特異的分子及びその使用を確認し、その後標的集団のメンバーの予測子として個々のマーカーのパワーを測定する。

【0045】

30

適当な手段は、肺癌に対して特異的であるか否かの分子のライブラリーを得、前記ライブラリーを標的集団のメンバー中の抗体を結合する分子についてスクリーニングする。タンパク質またはポリペプチドエピトープはその長さが3 ~ 10アミノ酸未満、20アミノ酸未満等くらいであり得るので、ライブラリーの個々のメンバーの平均サイズは設計上の選択である。よって、ライブラリーのより小さいメンバーは1個の決定基を模倣するために約3 ~ 5アミノ酸であり得、20以上のアミノ酸のメンバーは2個以上の決定基を模倣しているか、または含んでいる。炭水化物、脂質、核酸及びその組合せのような他の分子がエピトープであり得、よって肺癌マーカーとして、または肺癌マーカーを同定するために使用され得るので、ライブラリーはポリペプチドに限定される必要はない。

【0046】

40

バイオマーカー同定方法は無傷のタンパク質または他の分子よりもむしろエピトープを同定しようと試みているので、スキャンまたはスクリーニングされるライブラリーが肺癌特異的である必要はなく、正常な個人の分子から作成しても、またはランダムな分子の集団から作成してもよいが、肺癌患者からのサンプルを使用すると適当な肺癌バイオマーカーを同定する可能性が高まり得る。それでも、エピトープまたは交差反応性分子は、エピトープを含有する分子の機能とは無関係に肺癌患者において存在し、免疫原性である。

【0047】

ランダムポリペプチドのライブラリーは、例えば、Clontech and New England Biolabs (NEB)より購入することができる。このようなライブラリーは、生物学的系において一般的に見いだされる20個のアミノ酸を使用して、ほとんどの（全てではないが）生じうる「

50

mers」の置換を含む。20個のアミノ酸を用いたランダムテトラマーまたはテトラペプチドのライブラリーは、理論上 1.6×10^5 個のテトラペプチドのほとんど（全てではない）を含みうる。いくつかのライブラリーは、好適な宿主において発現するためのオリゴヌクレオチドをコードするものとして構成される（例えば、ウイルス粒子）。本明細書において「ランダム」とは、当業者に公知であるように、ポリペプチドの場合、当該ポリペプチドが、例えばポリペプチドの生じうる置換体からなるライブラリーまたはバンクの一つとして作製されるか、あるいは起源、構造または機能に関係なく合成され得ることを指す（各残基は、残基の一属のうちのいずれかであり得る）。

【0048】

これらの方法の好例は、T7肺癌特異的cDNAファージライブラリー及びM13ランダムペプチドライブラリーを用いて実施例に記載されている。両者とも当業界で公知のようにファージディスプレイライブラリーで実施した。使用したT7ファージNSCLC cDNAライブラリーの1つは市販されており（米国ウィスコンシン州マディソンに所在のNovagen）、他のT7ライブラリーは腺癌細胞NCI-1650（米国メリーランド州ベセスダに所在の国立健康研究所のNCIのH. Oieより提供）から構築した。

10

【0049】

このように、ファージライブラリーは当業界で公知のように構築され得る。標的組織または細胞から全RNAを抽出し、選択する。N末端及びC末端アミノ酸配列の両方を確実に表示する第1鎖cDNA合成を実施する。cDNA産物を適合性のあるファージベクターに連結して、ライブラリーを作成する。このライブラリーを適当な細菌宿主において増幅させ、T7のような溶菌ファージについては、細胞を溶解させてファージ調製物を得る。ライゼートを標準条件下で滴定し、精製した後保存する。他のファージについては、ウイルス（例えばM13）を培地に入れ、上清から収集し、滴定する。

20

【0050】

ファージライブラリーは、肺癌患者においてリガンド（例えば、循環抗体）により認識される可能性ある表示分子を同定するために、肺癌患者からの組織サンプル、好ましくは血漿や血清のような流体サンプル及び正常な健康ドナーからの類似の組織サンプル（例えば、血漿または血清）を用いてバイオパニングまたはスクリーニングされる。

【0051】

1つの実施形態では、組織サンプルは血液サンプル（例えば、血漿または血清）であり、目的は標的集団（例えば、非小細胞肺癌患者）の血漿または血清中に見られる抗体により認識されるマーカーを同定することである。非標的集団の抗体により認識されるファージをライブラリーから除外するために、ファージディスプレイライブラリーを例えば正常な血清またはプールした血清に曝す。未反応ファージを非標的集団サンプルと反応するものから分離する。次いで、未反応ファージをNSCLC血清に曝して、NSCLC患者の血清中の抗体により認識されるファージを単離する。反応性ファージを集め、適当な細菌宿主において増幅させ、ライゼートを収集し、保存し、“サンプル1”または“バイオパン1”として同定する。精製プロセスを向上させるためにバイオパン及び増幅方法を、通常同一の対照及び標的サンプルを用いて複数回繰り返してもよい。

30

【0052】

バイオパンからのファージは、NSCLC患者からのサンプル中の抗体により特異的に認識される発現分子を含む可能性がより高い濃縮集団に相当する。多くのファージライブラリーがポリペプチドを発現するので、特定のファージがNSCLC関連抗体に対する“捕捉ペプチド”を発現し、当該ペプチドを示すと言われ得る。

40

【0053】

NSCLC特異的抗体により結合される分子を発現するファージクローンを更に選択するために、NSCLC患者の血清中の抗体に結合される複数の候補ファージ発現分子を有するマイクロアレイを生成するためにバイオパンで選択した個々のファージライゼートを例えばスライド（ニューハンプシャー州キーンに所在のSchleicher and Schuell）上にArrayer（カリフォルニア州サンタクララに所在のAffy

50

matrix)を用いて機械的にスポットし得る。

【0054】

いずれのファージディスプレイ分子が(NSCLC特異的抗体を結合できる)NSCLC特異的捕捉分子でありそうかを同定するために、スクリーニングスライドを例えば個々のNSCLC患者血清サンプル(理想的には、バイオパンで使用したものではない)とインキュベートし、更に標準の免疫アッセイ方法を用いてスクリーニングする。ファージに結合した抗体は、例えば当業界で公知のように適当な免疫試薬を用いるデュアルカラー標識により同定され得る。ここで、ファージベクター発現産物は第1の着色または検出可能なレポーター分子で標識されて各部位の発現産物の量を明らかにし、ファージ発現ポリペプチドに結合した抗体は第1のレポーター分子と異なり得る第2の着色または検出可能なレポーター分子で標識される。

10

【0055】

NSCLCサンプル中の抗体により結合されるNSCLCに関連するまたは特異的な捕捉分子を同定するためにデータを解釈するための1つの便利な方法は、スライド上のすべてのポリペプチドの平均シグナル及び標準偏差を指す多変量のコンピューター支援回帰分析による。統計処理は個々のファージで特異性を調べるために行われ、また複数のファージでファージの部分集合が、サンプルがNSCLC患者由来かまたはNSCLCを有している可能性があるかを調べる高い予測パワーを与え得るかを決定するために行われる。複数のサンプルをモニターする統計処理により、アッセイ内の変動レベルを調べることができる。集団サンプリングを増やすと、変動性を使用してアッセイ変動間を評価し、信頼できる集団パラメーターを得ることができる。

20

【0056】

よって、スライド、チップ等上の他のファージよりも大きく患者サンプル中の抗体を結合するファージは、例えばシグナルが回帰線(チップ上の平均シグナル)よりも1、2、もしくは3を上回るかまたはそれ以上の標準偏差であるとき候補因子と見なされる。本明細書中に記載した実験の幾つかでは、候補因子は4回バイオパンしたT7ライブラリーで構築したスクリーニングチップでファージディスプレイポリペプチドの約1/100に相当した。

【0057】

候補ファージクローンを“診断チップ”上にコンパイルし、更にNSCLC患者のサンプルを非NSCLC集団のサンプルと判別する際に独立した予測値について評価する。

30

【0058】

診断マーカーは、被験者におけるラジオグラフィにより検出可能な肺癌の存在または更なる存在をシグナル伝達/検出/同定する能力について選択する。幾つかの状態は複数の病因、複数の細胞起源等を有しており、疾患では不均質な背景上に現れるので、パネルまたは複数のマーカーは特定の状態をより予測または診断し得る。肺癌はそのような状態の1つである。

【0059】

生物統計学の分野では公知のように、関連する多変量、例えばマーカーのパネルまたはマーカーのパネルとの反応性のような集合的予測パワーを確認するために実施され得る統計スキームは多種多様である。よって、例えば動的統計モデリングが前記因子の2つ以上に依拠する予後検査を開発するために複数の因子からデータを解釈するために使用され得る。診断アッセイに含めるための適当なマーカーのパネルを選択するための他の方法には条件付き確率を用いるBayesianモデリング、最小二乗分析、部分最小二乗分析、ロジスティック多重回帰、ニューラルネットワーク、判別分析、分布によらない順位に基づく分析、その組合せ、その変形等が含まれる。目標は、多数の変量を処理した後、所望のメトリックを最大化するためにデータを加工することである。例えば、Pepe & Thompson, Biostatistics, 1, 123-140, 2000; McIntosh & Pepe, Biometrics, 58, 657-664, 2002; Baker, Biometrics, 56, 1082-1087, 2000; DeL

40

50

ongら、Biometrics, 44, 837-845, 1988; 及びKendziorowskiら、Biometrics, 62, 19-27, 2006を参照されたい。

【0060】

ある状況では、統計処理は受動者動作特性(ROC)曲線の曲線下面積(AUC)のような予測メトリックを最大にしようとする。この処理により、変量の選択した組に依拠する結果を最大にするような公式アプローチまたはアルゴリズムが生じ、変量の1つまたはすべての最大化結果に対する相対的影響が明らかとなる。マーカの相対的影響は変量の係数として関係を記載している誘導式で調べられ得る。よって、例えば以下に記載する例示の研究において同定した5個のマーカの2つのパネルを前記分析から選択し、最大AUCのスコアはいずれか1つの変量の係数として表される最大予測パワーを得るために式中の1個のマーカの相対加重で5個のマーカを含む式により記載されている。係数は重み付けを表し、誘導式は加重和を生ずる加重変量の和と見なされ得る。

10

【0061】

目標は、パラメーターにてらしてロバストな診断アッセイを可能とするために選択した、好ましくは最小数の変量(マーカ)に対して例えば特異性及び感度、または陽性の予測値を最大にするバランスを見つけることである。最大化結果に対する変量の加重または影響はいままで確認され、分析されたデータから誘導され、分析した患者の数が増えると再計算される。患者の数が増えると、メトリックが集団平均値とその平均の周りの値の信頼限界範囲を示す信頼度も高くなり得る。

【0062】

以下の実施例に記載しているように、例示されている5マーカパネルは個別の特異性がCTスキニングの観察される特異性を超えているマーカを含む。よって、65%以上の特異性を有するマーカの1個は、本アッセイが肺癌の診断において現在の標準のように効率的であり、低コスト及びより非侵襲的にデリバリーされるので肺癌に対する診断アッセイとして有利に使用され得る。

20

【0063】

また、5個のマーカを一緒にするとどんなメトリックでも1個のマーカよりもより高い予測パワーを与えることに注目されたい。マーカは各種準集団で予測され得、また2個以上のマーカの発現は組み合わせられる。例えば、これらは共通の生物学的存在または機能を共有し得る。総計予測値は必ずしも相加的でなく、マーカの各種組合せは異なる予測精度を与え得る。使用した統計処理は予測パワーを最大とし、5個のマーカの組合せは調べた基準集団に基づく結果であった。よって、患者サンプルを5個のマーカで検査し、2個以上のマーカの調和存在及び以下に教示されている5マーカパネルの1つのような複数のマーカに基づく診断メトリックのために原則として診断は5個のマーカに基づいて計算される。本明細書において検討されているように、ロジスティック回帰のような統計処理のために、多変量メトリックに寄与する変量の1つが多かれ少なかれ最大化トータルに寄与し得る。患者がマーカの1個以上に対して陰性である状況であっても、高含量マーカの数個以上が陽性であるので、患者が5個のマーカの総計メトリックの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%またはそれ以上のスコア、合計等を有しているならば、その患者は肺癌に対して陽性である可能性が高いと見なされる。基準または標準値であり得、集団の平均値及び肺癌の存在の可能性を示す陽性の検査結果を与えるようにスコア、合計等に対して患者/実験サンプル類似性の許容され得るレベルであり得る閾値スコア、合計等は設計上の選択であり、陽性サンプルの検出の信頼限界またはレベルを与える統計分析により決定され得、または偽陽性のリスクで経験的に開発され得る。上に教示されているように、そのレベルは5個のマーカの総計メトリックまたは集団和、基準値等の少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%またはそれ以上であり得る。閾値または「許容差」、すなわち集団スコア、和等からの患者のスコア、和等の許容できる類似度は上昇し得る。すなわち、患者スコアは感度を上昇させるためには集団スコアに非常に近くなければならない。

30

40

50

【0064】

マーカーまたはパネルの予測パワーは各種の統計量、例えば特異性、感度、陽性予測値、陰性予測値、診断精度、例えばROC曲線（ROC曲線の形状は当業界で公知のように予測値の関連する考慮事項であるが、ROC曲線は特異性と感度との関係である）のAUC等を用いて調べられ得る。

【0065】

複数のマーカーを使用すると、複数のマーカーの総計予測パワーはたった1個のマーカーの使用と比較してより大きいと考えられるので、よりロバストであり、より大きい集団を診断し得る診断検査となり得る。

【0066】

以下に詳記するように、本発明は各種アッセイフォーマットの使用を考えている。マイクロアレイにより複数のマーカーおよびサンプルを同時に検査することができる。よって、多数のポジティブ対照サンプル及びネガティブ対照サンプルをマイクロアレイに含めてもよい。次いで、アッセイを複数のサンプル（例えば、1つ以上の公知の罹患患者サンプル及び1つ以上の健常人からのサンプル）を1つ以上の検査し、比較しようとするサンプル、実験サンプル、患者サンプル及び検査しようとするサンプル等と一緒に同時に処理して行う。アッセイに内部対照を含めると、アッセイ内のシグナル強度を正規化、校正及び標準化することができる。例えば、ポジティブ対照、ネガティブ対照及び実験サンプルの各々を同時に流してもよく、複数のサンプルが連続希釈物であってもよい。対照及び実験部位も検査デバイスのサンプル部位の場所による変動を最小とするためにマイクロアレイデバイスにランダムにも配置され得る。

10

20

【0067】

よって、内部対照を含むマイクロアレイまたはチップにより、マイクロアレイまたはチップ上で同時に検査した実験者（患者）を診断することができる。制御的に検査し、データを獲得する多重方法により、適当な対照が明らかにされ、マーカーのパネルが個々に例えばROC曲線のAUCが0.85を上回り、5マーカーにわたる全AUCが0.95を上回るように合理的に高い予測パワーを有しているものならば、ポイントオブケア診断結果が得られ得るのでアッセイデバイス内で患者を診断することができる。

【0068】

アッセイは、パネルのマーカーの各々が以下の実施例のような相対的に匹敵する特性を有していることが判明しているときには定性的に操作され得る。よって、肺癌患者サンプルは5つすべてのマーカーに対して陽性であり、前記サンプルは肺癌陽性である可能性が高い。本明細書中に記載されているように全体として5個のマーカーに基づいてオッズを求め、患者に対して5個のマーカーのメトリックの合計またはスコアを得、その数値を上記した統計ツールを用いて誘導したマーカーの予測パワーと比較することにより確認され得る。4個のマーカーのパワーが大きいために、マーカーの4個に対して陽性の患者もリスクありと見なされるべきであり、肺癌と診断され得、及び/またはより詳細に試験されるべきである。3個のマーカーに対してのみ陽性の患者は再検査、他のマーカーを用いる検査、ラジオグラフィまたは他の検査を必要とし、または別の所定時間間隔の範囲で本アッセイを用いた更なる検査が要求され得る。

30

40

【0069】

よって、n個のマーカーのパネルに対して、5個のマーカーと結果の関係を規定する最大可能性グラフを規定する誘導予測パワー式、例えば回帰式がある。患者がn個未満のマーカーに対して陽性であり得る場合、マーカーの大部分、すなわち50%以上が患者中に存在しているときには患者は陽性または更なる考慮のために陽性でありそうと見なされ得る。また、幾つかのパネルが特定の疾患（例えば、NSCLC）に対して特異的であり得るので、患者が肺疾患の潜在的症候の明白な徴候を示しているならば、患者は他の肺疾患を除外するように更に分析する必要があるとあり得る。

【0070】

よって、n個のマーカーを有する1つのアッセイでは、予備的定性的結果が検査したマ

50

ーカーの総数の陽性シグナルの全数に基づいて得られ得る。合理的な閾値はマーカーの50%以上に対して陽性であることであり得る。よって、4個のマーカーを検査する場合、2、3または4個のマーカーに対して陽性のサンプルはおそらく肺癌を有していると推定上見なされ得る。5個のマーカーを検査する場合、3、4または5個のマーカーに対して陽性のサンプルは推定上陽性で見なされ得る。閾値は設計上の選択として変更され得る。

【0071】

データの獲得及び統計処理に基づいて、集団の観点からマーカーの最適化パネルはたえず変化し得、経時的に変動し得、新しいマーカーの開発に伴って変動し得、集団が変化、増加する等につれて変動し得る。

【0072】

また、検査集団のサイズが大きくなるにつれて、マーカーが生物学的または機械的に関連しているならば診断の正確な確率のマーカーの部分集団の信頼、加重係数及び可能性がより確実になり得、よって偏差、信頼限界または誤差限界が低下する。従って、本発明は一般的集団で使用され得るマーカーの部分集合の使用も考えている。或いは、当該アッセイデバイスは、特定の集団に対して最適化されるマーカーの部分集合のみを含み得、例えば以下に教示されている実施例で使用した5マーカーのパネルを含み得る。

【0073】

ポリペプチドをコードするファージクローンインサートを分析して、発現ポリペプチドのアミノ酸配列を決定し得る。例えば、ファージインサートを市販されているファージベクタープライマーを用いてPCR増幅させてもよい。特定のクローンをサイズの違い及びPCR産物の酵素消化パターンに基づいて同定し、その後特定のPCR産物を精製し、配列決定する。コード化ポリペプチドをBLASTサーチプログラムを用いて公知の配列（例えば、GenBankデータベース）と比較することにより同定する。

【0074】

よって、例えば、下記表1及び2に肺癌患者中の自己抗体を結合する肺癌cDNAの7ファージクローンを要約する。

10

20

【表1】

ファージ クローン#	推定ID— 遺伝子記号	推定ペプチド配列	ヌクレオチド配列
PC84*	ZNF440	TLERNHVNVSVVNP LVILLPIEYIKELTLEKS LMNIRNVGKHFIVPDI VDMKGFTWEKRLINV RNVEKHSRVPVMFVY MKGPTLGKISMNVSSV GKHYPQLQVFKHT (SEQ ID NO:1)	ACACTGGAGAGAAACCATGTGAATG TAAACAGTGTGGTAAATCCTTTAGTT ATTCTGCTACCCATCGAATACATAAA AGAACTCACACTGGAGAAAAGCCTT ATGAATATCAGGAATGTGGGAAAGC ATTTCATAGTCCCAGATCCTATCGTA GACATGAAAGGATTCACATGGGAGA AAAGGCTTATCAATGTAAGGAATGT GGAAAAGCATTACGTGTCCCCGTTA TGTTCTGATAATGAAAGGACCCACT CTAGGAAAAATCTCTATGAATGTAA GCAGTGTGGGAAAGCATTATCCTCTC TTACAAGTTTTCAAACACACGTAAGA TTGCACTCTGGAGAAAGACCTTATGA ATGTAAGATATTGTGGAAAAGACTTT TGTTCTGTGAATTCATTTCAAAGACA TGAAAAAATTCACAGTGGAGAGAAA CCCTATAAATGTAAGCAGTGTGGTAA AGCCTTCCCTCATTCCAGTTCCTTC GATATCATGAAAGGACTCACACTGG AGAGAAACCCTATGAGTGTAAAGCAA TGTGGGAA (SEQ ID NO:2)
PC87	STK2	GKVDVTSTQKEAENQ RRVVTGVSSSRSSEM SSSKDRPLSARERRR (SEQ ID NO:3)	GGGAAGGTGGATGTCACATCAACAC AAAAAGAGGCTGAAAACCAACGTAG AGTGGTCACTGGGTCTGTGAGCAGTT CAAGGAGCAGTGAGATGTCATCATC AAAGGATCGACCATTATCAGCCAGA GAGAGGAGGCGAC (SEQ ID NO:4)

10

20

ファージ クローン#	推定ID- 遺伝子記号	推定ペプチド配列	ヌクレオチド配列
PC125	SOCS5	NSSRRNQNCATEIPQIV EISIEKDNDSCVTPGTR LARRDSYSRHAPWGG KKKHSCSTKTQSS LDA DKKF (SEQ ID NO:5)	AATTCCTCAAGGAGAAATCAAATTT GTGCCACAGAAATCCCTCAAATTTGTT GAAATAAGCATCGAAAAGGATAATG ATTCTTGTGTTACCCAGGAACAAGA CTTGACGAAGAGATTCCTACTCTCG ACATGCTCCATGGGGTGGGAAGAAA AAACATTCCTGTTCTACAAAGACCCA GAGTTCATTGGA TGCTGATAAAAAGT TTGG (SEQ ID NO:6)
PC123	RPL4	RNTILRQARNHKLRVD KAAAAAALQAKSDE KAAVAGKKPVVGGK G (SEQ ID NO:7)	CGGAACACCATTCTTCGCCAGGCCAG GAATCACAAGCTCCGGTGGATAAG GCAGCTGCTGCAGCAGCGGCACTAC AAGCCAAATCAGATGAGAAGGCGGC GGTTCAGGCAAGAAGCCTGTGGTA GGTAAGAAAGGAAA (SEQ ID NO:8)
PC88 PC114 PC126†	RPL15	YWVGEDSTYKFFEVIL IDPFHKAIRRNPDQWI TKPVHKHREMRGLTS AGRKSRGLGKGHKFH HTIGGSRRAAWRRRN TLQLHRYR (SEQ ID NO:9)	TACTGGGTGGTGAAGATTCACATA CAAATTTTTTGAGGTTATCCTCATTG ATCCATCCATAAAGCTATCAGAAGA AATCCTGACACCCAGTGGATCACCA AACCACTCCACAAGCACAGGGAGAT GCGTGGGCTGACATCTGCAGGCCGA AAGAGCCGTGGCCTTGAAAGGGCC ACAAGTCCACCACACTATTGGTGGC TCTCGCGGGCAGCTTGAGAAAGGC GCAATACTCTCCAGCTCCACCGTTAC CGCTAA (SEQ ID NO:10)
PC40	NPM1	KLLSISGKRSAPGGGS KVPQKKVKLADED (SEQ ID NO:11)	AAACTCTTAAGTATATCTGGAAAGCG GTCTGCCCTGGAGGTGGTAGCAAG GTTCCACAGAAAAAAGTAAAATTG CTGCTGATGAAGATGATGACGATGA TGATGAAGAGGATGATGATGAAGAT GATGATGATGATGATTTTGATGATGA GGAAGCTGAAGAAAAAGCGCCA (SEQ ID NO:12)
G1802 PC20 PC22	p130	NKPAVTTKSPAVKPA AAPKQPVGGGQKLLT RKADSSSSEESSSSEE EKTKKMVATTKPKAT AKAALS LPAKQAPQG SRDSSSDSDSSSSEEEE EKTSKSAVKKKPKQV AGGAAPXKPPASAKKG KAESSNSSSDDSSEEE (SEQ ID NO:13)	AATTCCTCAAATAAGCCAGCTGTAC CACCAAGTCACCTGCAGTGAAGCCA GCTGCAGCCCCAAGCAACCTGTGG GCGGTGGCCAGAAGCTTCTGACGAG AAAGGCTGACAGCAGCTCCAGTGAG GAAGAGAGCAGCTCCAGTGAGGAGG AGAAGACAAAGAAGATGGTGGCCAC CACTAAGCCCAAGGCGACTGCCAAA GCAGCTCTATCTCTGCCTGCCAAGCA GGCTCCTCAGGGTAGTAGGGACAGC AGCTCTGATTCAGACAGCTCCAGCAG TGAGGAGGAGGAAGAGAAGACATCT AAGTCTGCAGTTAAGAAGAAGCCAC AGAAGGTAGCAGGAGGTGCAGCCCC TTCCAAGCCAGCCTCTGCAAAGAAA GGAAAGGCTGAGAGCAGCAACAGTT CTTCTTCTGATGACTCCAGTGAGGAA GAGGA (SEQ ID NO:14)

10

20

30

40

ファージ クローン#	推定ID- 遺伝子記号	推定ペプチド配列	ヌクレオチド配列	
PC57	NFI-B	FPQHHPGIPGVAHSV ISTRTPPPPSPLPFPTQA ILPPAPSSYFSHP TIRYP PHLNPQDTLKNYVPSY DPSSPQTSQSWYLG (SEQ ID NO:15)	TTCCCCCAGCACCACCATCCCGGAAT ACCTGGAGTTGCACACAGTGTTCATCT CAACTCGAACTCCACCTCCACCTTCA CCGTTGCCATTTCCAACACAAGCTAT CCTTCTCCAGCCCCATCGAGCTACT TTTCTCATCCAACAATCAGATATCCT CCCCACCTGAATCCTCAGGATACTCT GAAGAACTATGTACCTTCTTATGACC CATCCAGTCCACAAACCAGCCAGTCC TGGTACCTGGGCTAGCTTGGTTTCCTT TCCAAGTGTCAAATAGGACACCCATC TTACCGCCAATGTCCAAAATTACGG TTTGAACATAATTGGAGAACCCTTCC TTCAAGCAGAAACAAGCAACTGAGG GAAAAAGAAACACAACAATAGTTTA AGAAA (SEQ ID NO:16)	10
PC94	HMG14	PKRRSARLSAKPPAKV EAKPKKAAAKDKSSD KKVQTKGKRGAKGK QAEVANQETKEDLPA ENGETKTEESPASDEA GEKEAKSD (SEQ ID NO:17)	CCCAAGAGGAGATCGGCGCGGTTGT CAGCTAAACCTCCTGCAAAAAGTGGGA AGCGAAGCCGAAAAAGGCAGCAGCG AAGGATAAATCTTCAGACAAAAAAG TGCAAAACAAAAGGGAAAAGGGGAGC AAAGGGAAAACAGGCCGAAAGTGGCT AACCAAGAAACTAAAAGAAGACTTAC CTGCGGAAAACGGGGAAACGAAGAC TGAGGAGAGTCCAGCCTCTGATGAA GCAGGAGAGAAAAGAAGCCAAGTCTG ATTAATAACCATATACCATGTCTTAT CAGTGGTCCCTGTCTCCCTTCTTGTA CAATCCAGAGGAATATTTTTATCAAC TATTTTGTAATGCAAGTTTTTTTAGT AGCTCTAGAAACATTTTTAAGAAGG AGGGAATCCACCTCATCCATTTTT TAAGTGTAATGCTTTTTTTAAGAG GTGAAATCA.TTGCTGGTTGTTTATT (SEQ ID NO:18)	20
PC16	COX4	AMFFIGFTALVIMWQK HYVYGPLPQSFDKWEV VAKQTKRMLDMKVN PIQGLASKWDYEKNE WKK (SEQ ID NO:19)	GCCATGTTCTTCATCGGTTTCACCGC GCTCGTTATCATGTGGCAGAAGCACT ATGTGTACGGCCCCCTCCCGCAAAGC TTTGACAAAAGAGTGGGTGGCCAAGC AGACCAAGAGGATGCTGGACATGAA GGTGAACCCCATCCAGGGCTTAGCCT CCAAGTGGGACTACGAAAAGAACGA GTGGAAGAAGTGAGAGATGCTGGCC TGCGCCTGCACCTGCGCCTGGCTCTG TCACCGCCA (SEQ ID NO:20)	30
PC112	SFRS11	ATKKKSKDKEKDRER KSESDKDVKVRDYYD EEEQGYDSEKEKKEEK KPIETGSPKTKECSVEK GTGDS (SEQ ID NO:21)	GCAACGAAGAAGAAGAGTAAAGATA AGGAAAAGGACCGGAAAGAAAATC AGAGAGTGATAAAGATGTAAAAGTT ACACGGGATTATGATGAAGAGGAAC AGGGGTATGACAGTGAGAAAGAGAA AAAAGAAGAGAAGAAACCAATAGA AACAGGTTCCCTAAAACAAAGGAA TGTTCTGTGGAAAAGGGAAGTGGTG ATTCCT (SEQ ID NO:22)	40

ファージ クローン#	推定ID- 遺伝子記号	推定ペプチド配列	ヌクレオチド配列
PC91	AKAP12	ESFKRLVTPRKKSKSK LEEKSEDSLAGSGVEH STPDTEPGKEESWVSI KKFIPGRRKKRPDGKQ EQAPVEDAGPTGANE DDSDVPAVVPLSEYD AVERE (SEQ ID NO:23)	GAGTCATTTAAAAGGTTAGTCACGCC AAGAAAAAATCAAAGTCCAAGCTG GAAGAGAAAAGCGAAGACTCCATAG CTGGGTCTGGTGTAGAACATTCCACT CCAGACACTGAACCCGGTAAAGAAG AATCCTGGGTCTCAATCAAGAAGTTT ATTCCTGGACGAAGGAAGAAAAGGC CAGATGGGAAACAAGAACAAGCCCC TGTTGAAGACGCAGGGCCAACAGGG GCCAACGAAGATGACTCTGATGTCC GGCCGTGGTCCCTCTGTCTGAGTATG ATGCTGTAGAAAAGGGAGAA (SEQ ID NO:24)
L1804 L1862 L1864 L1873	GAGE	NSAPEQFSDEVEPATP EEGEPATQRQDPAAA QEGEDEGASAGQGPK PEAHSQEQQHPQTGCE CEDGPDGQEMDPPNP EEVKTPEEGEKQSQC (SEQ ID NO:25)	AATTCAGCGCCCGAGCAGTTCAGTG ATGAAGTGGAACCAGCAACACCTGA AGAAGGGGANCCAGCAACTCAACGT CAGGATCCTGCAGCTGCTCAGGAGG GAGAGGATGAGGGAGCATCTGCAGG TCAAGGGCCGAAGCCTGAAGCTCAT AGTCAGGAACAGGGTCACCCACAGA CTGGGTGTGAGTGTGAAGATGGTCCT GATGGGCAGGAGATGGACCCGCCAA ATCCAGAGGAGGTGAAAACGCCTGA AGAAGGTGAAAAGCAATCACAGTGT TAAAAGAAGGCACGTTGAAATGATG CAGGCTGCTCCTATGTTGGAAATTTG TTCATTAATAATTCTCCCAATAAAGCT T (SEQ ID NO:26)
PC6 PC8	RAB7	ARGSEFKLLLKVIILGD SGVGKTSLMNQYVNK KFSNQYKATIGADFLT KEXMVDRLVTMQIW DTAGQERFQSLGVAF YRGADCCVLVFDVTA PNTFKTLDSWRDEFLI QASPRDPENFPLVCFR GQSCFPTQQACGRTRV TS (SEQ ID NO:27)	
L968 L1318 L1847	UROD	NSATLQGNLDPCALY ASEEEIGQLVKQMLDD FGPHRYIANLGHGLYP DMDPEHVGAFVDAVH KHSRLLRQN (SEQ ID NO:28)	AATTCAGCGACATTGCAGGGCAACC TGGACCCCTGTGCCTTGTATGCATCT GAGGAGGAGATCGGGCAGTTGGTGA AGCAGATGCTGGATGACTTTGGACC ACATCGCTACATTGCCAACCTGGGCC ATGGGCTTTATCCTGACATGGACCCA GAACATGTGGGCGCCTTTGTGGATGC TGTGCATAAACTCACGCTCTGCTTC GACAGAACTGAGTGTATACCTTTACC CTCAAGTACCACTAACACAGATGATT GATCGTTTCCAGGACAATAAAAGTTT CGGAGTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA (SEQ ID NO:29)

10

20

30

40

* 本表および以下の表において、ファージクローン名におけるアルファベット文字は実験用の表記として定めたものである。本明細書中にて用いられる場合、ファージクローン名の数字部分はクローンを明確に同定する。

† 重複クローン

【 0 0 7 5 】

表 2 は、公知のポリペプチドをコードするようにみえない NSCLC と関連するとして同定された他のクローンを示す。

【表 2】

ファージ クローン#	推定ID- 遺伝子記号	推定ペプチド配列	ヌクレオチド配列
L1896	BAC clone RP11- 499F19	NSCSSFSRWKVEGTQN FRPNSAFLYAPRMKGL FVNLHVDFLNIQPAENG R (SEQ ID NO:30)	AATTCCTGTAGCTCATTAGCCGATG GAAGGTAGAAGGGACTCAGAAGCTTC AGGCCTaATTCTGCGTTTTGTATGCC CCAAGAATGAAAGGGCTCTTTGTGA ATTTGCATGTAGATTTATTTAACATT CAACCGGCAGAAAACGGAAGGTAGT GCATGACACTGGGGGAACCAGGCC CCCGCCACCTCACATCGTCATGGCA TTAGCTGTTTACTGGCTCCCGTGGAA ACATTGGAAGGGGATTTGTTTTGTGG TTGGGTTTCCTTTTTTTTTTTTTTTT (SEQ ID NO:31)
G922	Plakophilin	NSAWNCGAPRIADGVV SHRFSRYWKSTKDIQPT KYPYIPKK (SEQ ID NO:32)	AATTCAGCATGGAAGTGTGGAGCTCC AAGGATCGCAGACGGCGTTGTATCG CACAGGTCAGTAGGTATTGGAAATC TACAAAGGACATCCAGCCAACGAAG TACCCTTACATAACAAAGAAATAATT ATGCTCTGAACACAACAGCTACCTAC GCGGAGCCCTACAGGCCTATACAAT ACCGAGTGCAAGAGTGCAATTATAA CAGGCTTCAGCATGCAGTGCCGGCTG ATGATGGCACCACAAGATCCCCATC AATAGACAGCATTGAGGATCACGCC AGGCAAACTCCCTGGGGTCCCTTCTGA (SEQ ID NO:33)
L1919	SEC15L2	NSSLPLSATELLLGREV LPCPSPTPLPHHILSYLD SHGEEDVHTDIQISSKL ERPGYM (SEQ ID NO:34)	AATTCCTTCACTACCTTTGTCAGCTAC TGAGTTGCTTCTGGGGAGGGAAGTA CTTCCTTGCCCTCCCAACCCCTT ACCTCACCATATCCTATCATATCTTG ATAGTCATGGGGAAGAGGATGTGCA CACAGACATACAAATTTCTCAAAGC TGGAGAGACCAGGCTACATGTGAGC TCATAGATGCTGCTGAGGCTCATCCT GAGGGCTGGATGGTTGGCCAGGGTT TCAGAATGAGGGTAAGGGATGAGCA CTGCCACCCA (SEQ ID NO:35)

10

20

30

ファージ クローン#	推定ID- 遺伝子記号	推定ペプチド配列	ヌクレオチド配列
L1761	PMS2L15	NSASH (SEQ ID NO:36)	AATTCAGCATCTCATTGAAGTTTCAG GCAATGGATGTGGGGTAGAAGAAGA AAACTNCGNAGGCTTAATCTCTTTCA GCTCTGAAACATCACACATCTAAGAT TCGAGAGTTTGCCGACCTAACTCGGG TTGAAACTTTTGGCTTTCAGGGGAAA GCTCTGAGCTCACTTTGTGCACTGAG TGATGTCACCATTTCTACCTGCCACG TATCGGCGAAGGTTGGGACTCGACT GGTGTGTTGATCACGATGGGAAAATC ATCCAGAAAACCCCTACCCCAACC CAGAGGGACCCAGTCAGCGTGAAG CAGTTATTTTCTACGCTACCTGTGCG CCATAAGGAATTTCAAAGGAATATT AAGAAGTACAGAACCTGCTAAGGCC ATCAAACCTATTGATCGGAAGTCAGT CCATCAGATTTGCTCTGGGCCGGTGG TACTGAGTCTAAGCACTGCGGTGAA GAAGATAGTAGGAAACAGTCTGGAT GCTGGTGCCACTAATATTGATCTAAA GCTTGC GGCCGCACIC (SEQ ID NO:37)
L1747	BEFIA	NSASICANFWLEW (SEQ ID NO:38)	AATTCAGCTAGCATTTGTGCCAATTT CTGGTTGGAATGGTGACAACATGCTG GAGCCAAGTGCTAACATGCCTTGGTT CAAGGGATGGAAAGTCACCCGTAAG GATGGCAATGCCAGTGGAAACCACGC TGCTTGAGGCTCTGGACTGCATCCTA CCACCAACTCGTCCAAGTACAAGCC CTTGC GCTGCCTCTCCAGGATGTCT ACAAAATTGGTGGTATTGGTACTGTT CCTGTTGGCCGAGTGGAGACTGGTGT TCTCAAACCCGGTATGGTGGTCACCT TTGCTCCAGTCAACGTTACAACGGAA GTAAAATCTGTGCGAAATGCACCATG A (SEQ ID NO:39)
G1954	MALAT1	NFKRQEFQIENEKQAKT SIGEV (SEQ ID NO:40)	AATTTCAAGCGGCAAGAGTTTCAGAT AGAAAATGAAAAACAAGCTAAGACA AGTATTGGAGAAGIATAGAAGATAG AAAAATATAAAGCCAAAAATTGGAT AAAATAGCACTGAAAAAATGAGGAA ATTATTGGTAACCAATTTATTTTAAA AGCCCATCAATTTAATTTCTGGTGGT GCAGAAGTTAGAAGGTAAGCTTGA GAAGATGAGGGTGTACGTAGACC AGAACCAATTTAGAAGAATACTTGA AGCTAGAAGGGGA (SEQ ID NO:41)
G1689	XRCC5	NSAWERGH SRGAKISR NSQQVTWRRII (SEQ ID NO:42)	AATTCAGCTTGGGAACGCGGCCATTC AAGGGGAGCCAAAATCTCAAGAAAT TCCAGCAGGTTACCTGGAGGCGGA TCATCTAATTCCTGTGGAATGAATA CACACATATATATTACAAGGATA (SEQ ID NO:43)

10

20

30

40

ファージ クローン#	推定ID- 遺伝子記号	推定ペプチド配列	ヌクレオチド配列
G740	CD44 transcript variant 5	NSVLNECWLQNQFLVL YQRSRREETFDLGKA KCT (SEQ ID NO:44)	AATTCAGTATTGAATGAATGTTGGCT ACAAAATCAATTCTTGGTGTATATC AGAGGAGTAGGAGAGAGGAAACATT TGACTTATCTGGAAAAGCAAATGT ACTTAAGAATAAGAATAACATGGTC CATTACCTTTATGTTATAGATATGT CTTTGTGTAATCATTGTTTTGAGTT TTCAAAGAATAGCCATTGTTCAATC TTGTGCTGTACAATGACCACTGNTTA TTGTTACTTTGACTTTTCAGAGCACA CCCTTCTCTGGTTTTTGTATATTTAT TGATGGATCAATAAATGAGGAAA GCATGATATGTATATTGCTGAGTTGT TAGCCTTTTA (SEQ ID NO:45)
G313 G1750 G1792 G1896 G1923 G2004 L1839 L1857	Paxillin (PXN)	NSRPKRQHPSTSFSEE LAGLGSKEGVSKYSSL (SEQ ID NO:46)	AATTCTAGGCCCAAAGGGTGCAAC ACCTTCAACCAGTTTCAGTGAAGAG CTTGCTGGCCTGGGAAGTAAAGAAG GGGTTTCAAATACAGCAGTTTATAA AACAGTCTGGTGAGCTATGAAGTG AAAGAGGGGGAGTACAGAGCTGCT CCCAGTTCACCTGCTGTGCTAAGAA ACAATAAAATACAAATTGCTTCCCCA CCCCAACCTCAGTACAAAGCAAAC TTCACACCAGAGCCACCATCAGTGAC AGGCCAGTGGCGGTGGATGAGGAA GCTT (SEQ ID NO:47)
L1676 L1829 L1841 L1916	BMI-1	NSARDRGETMGMWAR EPRGLAAPPSPAE (SEQ ID NO:48)	AATTCAGCCAGAGATCGGGGCGAGA CAATGGGGATGTGGGCGCGGGAGCC CCGTTCCGGCTTAGCAGCACCTOCCA GCCCCGAGAATAAAACCGATCGCG CCCCCTCCGCGCGCCCTCCCCCGA GTGCGGAGCGGGAGGAGGCGGCGGC GGCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGC CCCGGAGGAGGAGGCGTTGGAGGTC GAGGCGGAGGCGGAGGAGGAGGAG GCCGAGGCGCCGAGGAGGCGCGAGG CGCCGAGCAGGAGGAGGCGCGCGG GAGGCGGCATGAGACGAGCGTGGCG GCCGCGGCTGCTCGGGGCCGCGCTG GTTGCCATTGACAGCGGCGTCTGCA GCTCGCTTCAAGATGGCCGCTTGGCT CGCATTCAATTTCTGCTGAACGACTT TTAATTTTCAATGCTTTTCCGCCCGC TTCGATCGCCTCGCGCCGGCTGCTCT TTCCGGGATTTTTATCAAGCAGAAA TGCATCGAACAACGAGAATCAAGAT CACTGAGCTAAATCCCCACCTGATGT GTGTGCTTTGTGGAGGGTACTTCATT GATGCCACAAC (SEQ ID NO:49)

10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

ランダムペプチドライブラリーは、NSCLC患者にあるが正常人にはない循環抗体を結合する候補ポリペプチドを同定するためにも使用され得る。よって、例えばウイルスマイナーコートタンパク質に融合した 10^9 ランダムペプチドを含むファージディスプレイペプチドライブラリーを肺癌患者抗体を結合する捕捉タンパク質について上記した技術に類似の技術（例えば、マイクロアレイ）を用いて当業界で公知のようにスクリーニングし得る。使用した1つのM13ライブラリー（New England Biolabs）はファージ表面上のループ構造物として7アミノ酸ポリペプチドインサートを発現する。

【 0 0 7 7 】

本明細書中に記載されているように、ライブラリーをバイオパンして、NSCLC患者

血清中の循環抗体により特異的に認識されるファージ発現タンパク質を濃縮する。選択したクローンのファージ培養物をスライド（ニューハンプシャー州キーンに所在の Schleicher and Schuell）上に機械的（カリフォルニア州サンタクララに所在の Affymetrix ; ArrayIt（登録商標）, Sunnyvale, CA）に2回スポットする。アレイしたファージを NSCLC 患者からの血清または血漿サンプルとインキュベートして、循環肺腫瘍関連抗体により結合されるファージ発現タンパク質を同定する。

【0078】

適当なレポーター分子を用いる公知のイムノアッセイを用いて、スライド上のすべてのポリペプチドの平均シグナル及び標準偏差を指すコンピューター作成回帰線を使用して、NSCLC 患者血漿中の抗体により結合されたペプチドを同定する。NSCLC 血漿サンプルからの抗体のファージ結合有意量（例えば、回帰線から2を上回る標準偏差）を有する者が更なる評価のための候補者と見なされる。

表3 M13クローン

【表3】

ファージID	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列(3文字)
MC0425	AAG GAG ACG AGT CGT TTT ACG (SEQ ID NO:50)	Lys Glu Thr Ser Arg Phe Thr (SEQ ID NO:51)
MC0457	ATT GTG AAT AAG CAT AAG GTT (SEQ ID NO:52)	Ile Val Asn Lys His Lys Val (SEQ ID NO:53)
MC0838	CCG CCG GCG ACG CAG GGG CAT (SEQ ID NO:54)	Pro Pro Ala Thr Gln Gly His (SEQ ID NO:55)
MC0908	GAG CGG TCT CTG AGT CCG ATT (SEQ ID NO:56)	Glu Arg Ser Leu Ser Pro Ile (SEQ ID NO:57)
MC0919	TTG AGT CAG AAT CCG CAT AAG (SEQ ID NO:58)	Leu Ser Gln Asn Pro His Lys (SEQ ID NO:59)
MC0996	ATT CAT AAT AAG TGG GGG TAT (SEQ ID NO:60)	Ile His Asn Lys Cys Gly Tyr (SEQ ID NO:61)
MC1000	TCT AAT AAT AGT ATT CAT CAG (SEQ ID NO:62)	Ser Asn Asn Ser Ile His Gln (SEQ ID NO:63)
MC1011	AGT ATG ACG CAG TCG GAT AAG (SEQ ID NO:64)	Ser Met Thr Gln Ser Asp Lys (SEQ ID NO:65)
MC1326	ATT GCT AAG GGT ACT CCG CTG (SEQ ID NO:66)	Ile Ala Lys Gly Thr Pro Leu (SEQ ID NO:67)

10

20

30

ファージID	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列(3文字)
MC0425	AAG GAG ACG AGT CGT TTT ACG (SEQ ID NO:50)	Lys Glu Thr Ser Arg Phe Thr (SEQ ID NO:51)
MC1484	AAT GCG AGT CAT AAG TGT TCT (SEQ ID NO:68)	Asn Ala Ser His Lys Cys Ser (SEQ ID NO:69)
MC1509	AAT GCG CTG GCT AAT CCT TCG (SEQ ID NO:70)	Asn Ala Leu Ala Asn Pro Ser (SEQ ID NO:71)
MC1521	GCG AAG CCG CCG AAG CTG TCT (SEQ ID NO:72)	Ala Lys Pro Pro Lys Leu Ser (SEQ ID NO:73)
MC1524	AGG GCT CTG GAT CCG GAT TCG (SEQ ID NO:74)	Arg Ala Leu Asp Pro Asp Ser (SEQ ID NO:75)
MC1694	CAT CAG CAT CCT CAT CAT ACT (SEQ ID NO:76)	His Gln His Pro His His Thr (SEQ ID NO:77)
MC1760	TTA TCT ACT GGG TCG CCT CTG (SEQ ID NO:78)	Leu Ser Thr Gly Ser Pro Leu (SEQ ID NO:79)
MC1786	AAG GTT AAT ACT CAT CAT ACT (SEQ ID NO:80)	Lys Val Asn Thr His His Thr (SEQ ID NO:81)
MC1805	ATT CTG ACT CTT CAT AAG AGT (SEQ ID NO:82)	Ile Leu Thr Leu His Lys Ser (SEQ ID NO:83)
MC2238 MC2628 MC2978 MC3018	AAG AAT TGG TTT GGT CAT ACG (SEQ ID NO:84)	Lys Asn Trp Phe Gly His Thr (SEQ ID NO:85)
MC2434	GGT ACT AGT CAG AAG GAG ACG (SEQ ID NO:86)	Gly Thr Ser Gln Lys Glu Thr (SEQ ID NO:87)
MC2541	CTG TTT CTG ACG GCG CAG GCG (SEQ ID NO:88)	Leu Phe Leu Thr Ala Gln Ala (SEQ ID NO:89)
MC2624	GCG CAT GTG CCG AAG CAG ACG (SEQ ID NO:90)	Ala His Val Pro Lys Gln Thr (SEQ ID NO:91)
MC2645 MC2720	TTT AAT TGG TAT AAT TCG TCG (SEQ ID NO:92)	Phe Asn Trp Tyr Asn Ser Ser (SEQ ID NO:93)
MC2729	CTT CCG CAT CAG CTG CGG TGG (SEQ ID NO:94)	Leu Pro His Gln Leu Ala Trp (SEQ ID NO:95)
MC2853	CTT GCG TGG TAT GCG AAG AGT (SEQ ID NO:96)	Leu Ala Trp Tyr Ala Lys Ser (SEQ ID NO:97)
MC2900	AAG ATT GGG ACG GCG TGG CTT (SEQ ID NO:98)	Lys Ile Gly Thr Ala Trp Leu (SEQ ID NO:99)
MC2984	ACG CTG AAT CAG ACG AGG GTG (SEQ ID NO:100)	Thr Leu Asn Gln Thr Arg Val (SEQ ID NO:101)
MC2986	ACG CCT ACT CAT GGT GGG AAG (SEQ ID NO:102)	Thr Pro Thr His Gly Gly Lys (SEQ ID NO:103)
MC2987	ACT GTG AAT GCT AAG GGT TAT (SEQ ID NO:104)	Thr Val Asn Ala Lys Gly Tyr (SEQ ID NO:105)
MC2993	CAT ACG ACT TCG CCG TGG ACG (SEQ ID NO:106)	His Thr Thr Ser Pro Trp Thr (SEQ ID NO:107)
MC2996	ACT CCT ACT TAT GCG GGG TAT (SEQ ID NO:108)	Thr Pro Thr Tyr Ala Gly Tyr (SEQ ID NO:109)
MC2997	TCG CCT ACG CAT GCT GGG CTG (SEQ ID NO:110)	Ser Pro Thr His Ala Gly Leu (SEQ ID NO:111)
MC2998	ATG CCG GCT ACT ACG CCT CAG (SEQ ID NO:112)	Met Pro Ala Thr Thr Pro Gln (SEQ ID NO:113)
MC3000	AAG GCG TGG TTT GGG CAG ATT (SEQ ID NO:114)	Lys Ala Trp Phe Gly Gln Ile (SEQ ID NO:115)
MC3001	CCT CCG CTT CAT AAG TGT AGT (SEQ ID NO:116)	Pro Pro Leu His Lys Cys Ser (SEQ ID NO:117)

10

20

30

40

ファージID	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列(3文字)
MC0425	AAG GAG ACG AGT CGT TTT ACG (SEQ ID NO:50)	Lys Glu Thr Ser Arg Phe Thr (SEQ ID NO:51)
MC3007	AAG CAT GAG ACT AAT CAG TGG (SEQ ID NO:118)	Lys His Glu Thr Asn Gln Trp (SEQ ID NO:119)
MC3010 MC3063 MC3088 MC3146	CAG TCT TAT CAT AAG CGT ACT (SEQ ID NO:120)	Gln Ser Tyr His Lys Arg Thr (SEQ ID NO:121)
MC3013	AAG AAT CAG ACT AAT AAT ATT (SEQ ID NO:122)	Lys Asn Gln Thr Asn Asn Ile (SEQ ID NO:123)
MC3014	CAG ATG CCG CAT TCT AAG ACG (SEQ ID NO:124)	Gln Met Pro His Ser Lys Thr (SEQ ID NO:125)
MC3015 MC3045 MC3047 MC3055	ACG GCG CTT CAT CAG CTT AGT (SEQ ID NO:126)	Thr Ala Leu His Gln Leu Ser (SEQ ID NO:127)
MC3019	CTT TCG CAT ATT TCT ACG TCG (SEQ ID NO:128)	Leu Ser His Ile Ser Thr Ser (SEQ ID NO:129)
MC3020	GCT TCT GTT CCG AAG CGG TCT (SEQ ID NO:130)	Ala Ser Val Pro Lys Arg Ser (SEQ ID NO:131)
MC3023	CAT ACT CAT CAT GAT AAG CAT (SEQ ID NO:132)	His Thr His His Asp Lys His (SEQ ID NO:133)
MC3032	AAT TTG CAT GCT GCT CGG CCT (SEQ ID NO:134)	Asn Leu His Ala Ala Arg Pro (SEQ ID NO:135)
MC3033	GAT TCG TCG CCT TCT CCG CTT (SEQ ID NO:136)	Asp Ser Ser Pro Ser Pro Leu (SEQ ID NO:137)
MC3046	ATT ACG AAT AAG TGG GGG TAT (SEQ ID NO:138)	Ile Thr Asn Lys Trp Gly Tyr (SEQ ID NO:139)
MC3048	GTG GTT AAT AAG CAT AAT ACG (SEQ ID NO:140)	Val Val Asn Lys His Asn Thr (SEQ ID NO:141)
MC3050	CTG AAT ACG CAT TCG TCT CAG (SEQ ID NO:142)	Leu Asn Thr His Ser Ser Gln (SEQ ID NO:143)
MC3052	AGT GGT ACG TCT CCT CAT TTG (SEQ ID NO:144)	Ser Gly Thr Ser Pro His Leu (SEQ ID NO:145)
MC3058	TTG GCG GAT CAG CTG CCG AGT (SEQ ID NO:146)	Leu Ala Asp Gln Leu Pro Ser (SEQ ID NO:147)
MC3059	AAG GTG GGG CGT CTG CCT GAT (SEQ ID NO:148)	Lys Val Gly Arg Leu Pro Asp (SEQ ID NO:149)
MC3096 MC3127	ACT AAG ACT TGG TAT GGG TCG (SEQ ID NO:150)	Thr Lys Thr Trp Tyr Gly Ser (SEQ ID NO:151)
MC3100	ATT ACT TCT TGG TAT GGG CGT (SEQ ID NO:152)	Ile Thr Ser Trp Tyr Gly Arg (SEQ ID NO:153)
MC3130	CCT TCT AGT AGT AAG GAG GAG (SEQ ID NO:154)	Pro Ser Ser Ser Lys Glu Glu (SEQ ID NO:155)
MC3135	TCT CCG ATT TCT CTT AAG GTG (SEQ ID NO:156)	Ser Pro Ile Ser Leu Lys Val (SEQ ID NO:157)
MC3143	GGG CCT GCG TGG GAG GAT CCG (SEQ ID NO:158)	Gly Pro Ala Trp Glu Asp Pro (SEQ ID NO:159)
MC3148	CCT CAG GCG TCT AAT CCG CTT (SEQ ID NO:160)	Pro Gln Ala Ser Asn Pro Leu (SEQ ID NO:161)
MC3156	AGT GAT AAG CAG CCT AAG GAT (SEQ ID NO:162)	Ser Asp Lys Gln Pro Lys Asp (SEQ ID NO:163)

10

20

30

40

【 0 0 7 9 】

当該ペプチドの特定のアミノ酸は、別のアミノ酸または他の分子と置換することが可能であるが、ただし当該ペプチドは当該診断用自己抗体に対する結合能は保持しなければならない。例えば、一アミノ酸を別のアミノ酸に置換することができる。一般に、置換アミノ酸は、同様のサイズ、形状および/または電荷からなる側鎖を有するアミノ酸である。例えば、Ala (A)は、Val (V), Leu (L)またはIle (I)と置換することができる。Arg (R)は、Lys (K), Gln (Q)またはAsn (N)と置換することができる。Nは、Q, His (H), KまたはRと置換することができる。Asp (D)は、Glu (E)と置換することができる。Cys (C)は、Ser

50

(S) と置換することができる。Qは、Nと置換することができる。Eは、Dと置換することができる。Gly (G)は、Pro (P)またはAと置換することができる。Hは、N、Q、KまたはRと置換することができる。Iは、L、V、Met (M)、A、Phe (F)またはnorLと置換することができる。Lは、norL、I、V、M、AまたはFと置換することができる。Kは、R、QまたはNと置換することができる。Mは、L、FまたはIと置換することができる。Fは、L、V、I、AまたはTyr (Y)と置換することができる。Pは、Aと置換することができる。Sは、Thr (T)と置換することができる。Tは、Sと置換することができる。Trp (W)は、YまたはFと置換することができる。Yは、W、F、TまたはSと置換することができる。Vは、I、L、M、F、AまたはnorLと置換することができる。本明細書中に教示するように、改変ペプチドは、当該免疫学アッセイにおいて改変ペプチドを親に変えて使用することによって、本発明において使用可能なものとして決定することができ、肺癌を有する患者に由来する血漿サンプルの結合レベルを、親ペプチドを用いたそれと比較することができる。同一またはより良好な結合が、好ましい。

10

【0080】

発現したペプチドが、肺癌の自己抗体に結合する限り、核酸配列の対して様々な変更がなされることも理解されよう。それは、未改変の親クローンの配列からなる発現されたポリペプチドと比較することによって、本明細書中に教示するいずれかの結合アッセイにより調べることが可能である。

【0081】

ライブラリーのハイスループットスクリーニングの目的は、すべての癌特異的タンパク質を同定するのではなく、むしろパネルとして最大の程度の特異性及び感度で被験者が肺癌コホートに入るか否かを予測するために使用され得る予測マーカーのコホートを同定することである。よって、このアプローチは包括的プロテオミクプロファイルを作成することまたは肺癌タンパク質のような疾患タンパク質を同定することを標的としているのではなく、疾患を予測し、パネルとして集めたとき不均質な集団中の不均質疾患に対するロバストな予測アッセイを可能とする多数のマーカーを同定することである。1個のマーカーが肺発癌における直接的な役割を有していることも有していないこともあり、ペプチドとしてペプチドの起源の分子の実際の役割は現在未知であり得る。

20

【0082】

個々の捕捉タンパク質への抗体結合の測定

診断チップ上にコンパイルされている捕捉タンパク質を使用して、血液サンプル中の肺癌特異的抗体の相対量を測定することができる。これは、各種プラットフォーム、ポリペプチドの各種製剤（例えば、ファージ発現、cDNA由来の、ペプチドライブラリーまたは精製タンパク質）、及び各種のサンプル間及びサンプル中を比較することができる各種統計順序を用いてなされ得る。比較には、測定値を外部校正または内部正規化により標準化する必要がある。よって、スクリーニング手段として免疫学アッセイを用いて多数のファージ発現捕捉タンパク質（例えば、M13及びT7ファージ）及び多数の陰性外部対照タンパク質（患者血漿中の抗体により結合されないファージ、及び“空”ファージと称されるインサートを持たないM13またはT7ファージ）からなる例示したスライドガラスアレイでは、データを2つの非限定的統計アプローチを用いてファージカプシドの2つの蛍光標識及び血漿サンプル抗体結合により正規化した：

30

40

抗体 / ファージカプシドシグナル比

1つの診断チップ上のスクリーニングで同定した捕捉タンパク質、多数の非反応性ファージ及び“空”ファージを標準の免疫化学技術およびデュアルカラー染色法を用いてサンプルとインキュベートする。捕捉タンパク質を結合する抗体のメジアン（または、平均）シグナルをファージカプシドタンパク質に対する市販の抗体のメジアン（または、平均）シグナルで除し、スポット中の総タンパク質の量を求める。よって、血漿 / ファージカプシドシグナル比（例えば、Cy5 / Cy3シグナル比）により、特定のファージ発現タンパク質に対するヒト抗体の正規化測定値が得られる。次いで、測定値は、空ファージに対するバックグラウンド反応性を差し引き、ファージシグナルのメジアン（または、平均）

50

シグナルで除すことにより正規化され得る $[(\text{ファージの } C y 5 / C y 3) - (\text{空ファージの } C y 5 / C y 3)] / (\text{空ファージの } C y 5 / C y 3)$ 。この手法は定量的であり、再現性を有し、チップ毎の変動を補正して、サンプルを比較することができる。

【0083】

標準化残差

1つの診断チップ上でスクリーニングして同定した捕捉タンパク質、多数の非反応性ファージ及び“空”ファージを標準の免疫化学技術およびデュアルカラー染色法を用いてサンプルとインキュベートする。統計的に決定した回折線からの距離を測定した後、その測定値を残差標準偏差により除して標準化する。このアプローチにより、各スポットにおけるタンパク質の量にわたり各々の特定のファージ発現タンパク質に結合する抗体の量を信頼可能に求めることができ、このアプローチは定量的であり、再現性を有し、チップ毎の変動を補正して、サンプルを比較することができる。

10

【0084】

シグナルの正規化は、患者がマーカーに対して陽性であるか否かを判定するための診断アッセイにおいて検査しようとする未知のものと使用され得る。このアッセイは抗体の存在の定性的測定値に依拠しており、例えばバックグラウンドよりも高い正規値は抗体が存在する証拠と見なされる。或いは、このアッセイは抗体応答の強さの反映としてマーカーに対するシグナルの強度を測定することにより定量され得る。よって、マーカーに対する反応の実際の正規化数値は本明細書中に記載されている癌診断の公式による判定に使用され得る。

20

【0085】

予測マーカーの同定

すべての候補ファージ発現タンパク質の正規化測定値は、患者群と正常群間の統計上の有意差について例えばJMP統計ソフトウェア(ノースカロライナ州ケアリーに所在のSAS, Inc.)を用いるt検定により独立して分析され得る。検査したサンプルに対して独立判別の異なるレベルを有するマーカーの各種組合せを各種方法で統計的に組み合わせ得る。統計処理は、多変量解析方式で各種組合せ中のマーカーのすべてを比較して病気の存在に関連する可能性が最大のマーカーのパネルを得ることを含むものである。集団統計におけるように、マーカーの選択は使用したサンプルの数及びタイプにより規定される。よって、「マーカーの最適な組合せ」は例えば集団毎に異なり得、または異常のステージに基づき得る。マーカーの最適な組合せは、より小さいサンプルサイズ(100未満)では明らかでない恐れがあったり、マーカーの集団有病率の確認のために低い偏差を示すことがあり得る変動性に基づいてより大きなサンプルセット(1000を上回る)で検査するときには変更され得る。加重ロジスティック回帰は多かれ少なかれ独立予測値を有するマーカーを組み合わせるための論理的アプローチである。検査したサンプルを判別するためのマーカーの最適な組合せは、データを例えばROC曲線を用いて組織化し、分析することにより規定され得る。

30

【0086】

クラスの予測

すべての候補ファージ発現タンパク質に対する標準化応答は、患者群と正常群間の統計上の有意差について例えばt検定により独立して分析される。統計処理は、多変量解析方式で各種組合せ中のマーカーのすべてを比較して癌の存在に関連する可能性が最大のマーカーのパネルを得ることを含むものである。

40

【0087】

肺癌について本明細書中に例示されているパネル(2個以上のマーカーの組合せ測定)は高い組合せ予測値を有し、優れた判別(癌があるのか癌がないのか)を示す。本発明は入手可能な癌サンプルと正常サンプル間の判別能力について選択した特定のペプチドパネルを含むが、本発明はすべてではないが幾つかの同定されたマーカー、すべてではないが潜在的に同定可能なマーカーまたはその組合せを用いて開発されたと考えられる。よって、パネルは少なくとも2個のマーカー、少なくとも3個のマーカー、少なくとも4個のマ

50

ーカー、少なくとも5個のマーカ、少なくとも6個のマーカ、少なくとも7個のマーカ、少なくとも8個のマーカ、少なくとも9個のマーカ、少なくとも10個のマーカまたはそれ以上を含み得、マーカの数結果の最大予測可能性が得られるように統計分析により決められる。従って、例えば本明細書中に記載されている実施例及びパネルは例にすぎない。

【0088】

統計の見地からも、追加マーカを包含させると最終的に、サンプル中のすべての罹患個人を同定する検査が得られる。しかしながら、商業的な実施形態では、多数のマーカ、必要とされ得る統計処理および多数の対照の必要性を、それぞれコストを勘案して、多数の変数を考慮するためにおよび1回で検査され得る実験サンプルの数を減らすために、

10

【0089】

しかしながら、多数のマーカまたはマーカの各種パネルにより感度及び/または特異性を向上させ得るといふ所見から、少数のマーカを用いたポジティブアッセイの後の経過観察研究は偽陽性の可能性を排除するために少数また多数のマーカ或いはマーカの各種パネルを用いて検査した患者サンプルを有する実施形態が得られる。バイオマーカの再構成パネルで当該アッセイを用いる経過観察研究は、より費用がかかり、潜在的に侵襲性の技術(例えば、患者に対して高レベルの放射線を照射するCTまたは生検)に対する魅力的な代替法である。よって、5マーカパネルに対して3つ以下の陽性を有する患者を確認検査としてマーカの大パネルを用いて検査してもよい。

20

【0090】

本アッセイは、X線またはCTスキャンのような別のアッセイフォーマットの確認としても使用され得る。特にX線またはCTスキャンが明確な診断を与えず再検査、迅速な経過観察、次の検査まで長いまたは短い期間等々を必要とするであろう場合に使用し得る。よって、本アッセイを前記患者における経過観察として使用し得る。陽性検査は肺癌の可能性を確認し、陰性検査は癌が良性であるかまたはまったくないことを示し、非診断的X線またはCTスキャンは正常な組織の変異を示していた。

【0091】

「商業的にすぐに使える」アッセイにおける正確なクラス予測は広い人口調査からの多数のサンプルの測定値に基づいているので、開発中すべての遡及的サンプル検査が最終的に分類子として包含され、アッセイのパワー(例えば、予測値)は連続的に向上される。このアッセイ開発の動的側面に加えて、マルチプレクス(マルチマーカ)アッセイの種類により予測マーカを開発または実施の際の任意の時点で加えることができる。

30

【0092】

この状況において、診断に使用するための確認マーカは、「正常範囲」を規定することにより予測精度を高める分類子の非常に安定な組を得る第二の目的に役立つ。正常範囲からの偏差から疾患の統計上の確率(例えば、回帰線から2を上回る標準偏差)が得られるが、臨床診断のために最も適切なカットオフ値は所定の標的集団における変動により決定されなければならない。

40

【0093】

複数マーカアッセイ及び用途

本明細書中により詳細に検討するように、本発明は各種アッセイフォーマットの使用を考えている。マイクロアレイにより、複数のサンプルを同時に検査することができる。よって、多数のポジティブ対照サンプル及びネガティブ対照サンプルをマイクロアレイに含めることができる。従って、アッセイは、公知の罹患患者由来のサンプル及び正常人由来のサンプルのような複数のサンプルを検査しようとするサンプルと一緒に同時に処理して行い得る。内部対照を用いると、アッセイ内のシグナル強度を正規化、校正及び標準化することができる。

【0094】

50

よって、内部対照を含むマイクロアレイ、MEMSデバイス、NEMSデバイスまたはチップにより、デバイスで同時に検査される実験者（患者）をポイント・オブ・ケア診断できる。MEMS及びNEMSデバイスはマイクロアレイアッセイのために使用されるものであり得、または追加のアッセイフォーマット及びレポーターを可能にするマイクロ流体等を含む“ラボチップ”フォーマット中に存在させ得る。

【0095】

予測パワー及び値並びに一般集団に対する適用可能性を強化し、コストを減らすために、本アッセイフォーマットは、通常低い製造コストで1つまたは少数の標的を同時に検出する標準イムノアッセイ（例えば、ディップスティック及びラテラルフローイムノアッセイ）から例えば96, 384以上のサンプルを同時に処理し得、臨床検査室に一般的であり、多くのサンプルを同時にハイスループット方式で検査する自動化、アレイ及びマイクロアレイフォーマットを受けることができる複数のウェル培養皿において操作するようししばしば構成されているELISAタイプフォーマットまでの範囲であり得る。アッセイは簡単な定性的判別（癌ありまたは癌なし）が得られるようにも構成され得る。

10

【0096】

しかしながら、疾患管理での複数の各種用途が可能であり、1つの用途にとって特有のマーカが本明細書中に教示されているように作成され得る。肺癌を他のタイプの癌から区別するため、早期癌を後期癌から区別するために、癌の特異的サブタイプを区別するために、治療介入後の疾患の進行を追跡するための各種マーカーセットが得られる。よって、治療レジメンを所要により治療または緩解の進行をモニターするために本アッセイを用いて繰り返し連続検査することにより評価及び操作され得る。例えば捕捉分子の連続希釈物を含むことによるアッセイの定量的バージョンにより癌のサイズの治療による縮小を判別することができる。

20

【0097】

ペプチドのような特定のエピトープを循環抗体を検出するために同定したら、特定のエピトープを当業界で公知のフォーマットで診断アッセイに使用し得る。相互作用は免疫反応であるので、各種の公知イムノアッセイフォーマットで適当な診断がなされ得る。よって、エピトープは例えば公知の化学的手法を用いて固相に固定し得る。また、エピトープは、当業界で公知のように、多くの場合エピトープよりも大きい別の分子にコンジュゲートして合成コンジュゲート分子を形成してもよく、または組換え方法を用いて複合分子として作成してもよい。多くのポリペプチドは組織培養デバイス（例えば、マルチウェルプレート）中に見られ得るプラスチック表面（例えば、ポリエチレン表面）に自然と結合する。しばしば、前記プラスチック表面は該表面に対する生物学的に適合する分子の結合が増強されるように処理されている。よって、ポリペプチドは捕捉エレメントを形成し、該エピトープに特異的に結合する自己抗体を有すると疑われる液体を捕捉エレメントに曝し、抗体は捕捉エレメントにくっつき、固定化され、その後洗浄し、結合した抗体を適当な検出可能に標識されているレポーター分子、例えばコロイド金属（例えば、コロイド金）、蛍光色素（例えば、フルオレセイン）等で標識した抗ヒト抗体を用いて検出する。そのメカニズムは例えばELISA、RIA、ウェスタンブロット等により表される。抗体を検出するためのイムノアッセイの具体的なフォーマットは設計上の選択である。

30

40

【0098】

或いは、特定のファージが肺癌患者で見られる自己抗体により特異的に結合されるエピトープを発現する（クローンは具体的に名付けられ、ストックとして保存されており、本出願が特許になったらリクエストに応じて利用されるようになるであろう）ので、アッセイの捕捉エレメントは細胞ライゼートから得られるような個々のファージであり得、各ファージは固相上の捕捉部位にある。また、担体上のハプテンのように発現エピトープが結合している反応上不活性な担体、例えばタンパク質（例えば、アルブミン及びキーホールリンペットヘモシアニン）または合成担体（例えば、合成ポリマー）、イムノアッセイ用固相上に当該エピトープを存在させるための他の手段が使用され得る。

【0099】

50

或いは、フォーマットは、固相に固定された捕捉エレメントが免疫グロブリンの非抗原結合部分（例えば、抗体のF_c部分）に結合するものである構成をとり得る。従って、適当な捕捉エレメントはプロテインA、プロテインG及び/または - F_c 抗体である。患者血漿を捕捉試薬に曝した後、肺癌特異的抗体の存在を例えば当業界で公知のように直接または競合フォーマットで標識マーカーを用いて検出する。

【0100】

また、捕捉エレメントは、上記したように特異的捕捉試薬を生ずるように別の手段を提供するためにエピトープを提示するファージに結合する抗体であり得る。

【0101】

イムノアッセイの分野で公知のように、捕捉エレメントは抗体が結合する決定基である。本明細書中に教示されているように、決定基は任意の分子、例えばポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、多糖等のような生物分子またはその一部、及び糖タンパク質またはリポタンパク質のようなその組合せであり得、その存在は肺癌患者中で見られる抗体の存在に相関している。決定基は例えば天然に存在し、精製され得る。或いは、決定基は、交差反応性を最小限とし得る組換え手段により作成され得るかまたは合成され得る。決定基は明らかな生物学的機能を有していなくても、また必ずしも特定の状態に関連していなくてもよいが、当該診断アッセイにおけるその使用を損なわないものである。

10

【0102】

イムノアッセイの固相は、当業界で公知の形態で当業界で公知のものであり得る。よって、固相はプラスチック（例えば、ポリスチレンまたはポリプロピレン）、ガラス、シリカを主成分とする構造物（例えば、シリコンチップ）、膜（例えば、ナイロン）、ペーパー等であり得る。固相は多数の各種の公知のフォーマット、例えばペーパーフォーマット、ビーズ、ディップスティックまたはラテラルフローデバイス（通常膜を使用する）の一部として、マイクロタイプレート、スライド、チップ等で提供され得る。固相をガラススライド上またはチップ中に見られるような硬質平面として存在し得る。幾つかの自動化デテクタデバイスは、光子をベースとするシグナルを検出し、読みとるために検出可能なシグナルを読みとるための手段（例えば、分光光度計、液体シンチレーションカウンター、比色計、蛍光光度計等）を取り付けた専用使い捨て用品を有している。

20

【0103】

結合した抗体を検出するための他の免疫試薬は当業界で公知である。例えば、抗ヒトIgG抗体は捕捉決定基、自己抗体及び抗ヒトIgG抗体を含むサンドイッチを形成するのに適している。抗ヒトIgG抗体の検出エレメントをレポーター分子（例えば酵素、コロイド金属、放射線核種、染料等）で直接標識してもよく、それ自体レポーター機能に役立つ第2分子により結合され得る。本質的に、結合抗体を検出するために任意の手段が使用され得、その任意の手段は操作者が見分け得るシグナルを生じさせるためにレポーター機能のための手段を含み得る。レポーターを形成するための分子の標識は当業界で公知である。

30

【0104】

複数のサンプルを同時に分析し得るデバイスに関連して、ポジティブ対照及びネガティブ対照の多数の対照エレメントをアッセイ性能、試薬性能、特異性及び感度をコントロールできるようにアッセイデバイスに含めてもよい。上記したように、当該デバイスを作成するための全部ではないが殆どのステップ及び多くのアッセイステップは多くの場合、技術者のエラーを最小とするために機械的手段（例えば、ロボット）により実施され得る。または、前記デバイスからのデータはスキャニング手段を用いてデジタル化され、デジタル情報はデータ保存手段に通信され、データもデータ処理手段に通信され、そこでデータに対して本明細書中に記載されているかまたは当業界で公知の種類の統計分析がなされて結果の測度を求め、次いでデータ提示手段（例えば、スクリーンまたは情報の読み出し）によりアッセイ結果を提示するために基準標準と比較するかまたは内部比較して、診断情報を得ることができる。

40

【0105】

少数のサンプルを分析したり、十分な集団データが利用され得るデバイスに対して、適

50

切な誤差測定値でポジティブ結果及びネガティブ結果を構成する誘導メトリックが設けられ得る。このような場合、単一のポジティブ対照及び単一のネガティブ対照が当業界で公知のように内部確認のために必要なすべてであり得る。アッセイデバイスは、例えば肺癌クラスターに含まれるかまたは含まれないより定性的な結果を生ずるように構成され得る。

【0106】

当業界で公知であり、利用されているように他のハイスループット及び/または自動化イムノアッセイフォーマットが使用され得る。よって、例えば比色、蛍光またはルミネッセントシグナルに基づくビーズベースアッセイ、例えば染料充填マイクロスフェアを用いる LumineX (テキサス州に所在の Austin) テクノロジー及び BD (ニュージャージーに所在の Franklin Lakes) Cytometric Bead Array system が使用され得る。いずれの場合も、当該エピトープがビーズに結合されている。

10

【0107】

別の多重アッセイは Gannotら, J. Mol. Diagnostics, 7, 427-436, 2005 の層状アレイ方法である。この方法では各々が異なる1つの結合対 (例えば、抗原やマーカーのような標的分子) を有している複数の膜を使用しており、これらの膜はインレジスタ (in register) にクロマトグラフィー移送する目的で他の結合対を有すると疑われるサンプルを受容するようにインレジスタ (in register) で構成されている。サンプルは吸い上げたり、三次元マトリックスを与えるように多数の整列された膜を介して輸送される。よって、例えば、多数の膜を分離ゲルの頂上に積み重ね、ゲル内容物を分離ゲルから排出し、積み重ねた膜を通過させる。1つの膜にくっつけた分子と膜スタックを介して輸送される分子間の分子の会合 (例えば、抗体に結合した抗原) は公知のレポーター、検出材料及び方法を用いて可視化され得る。例えば、米国特許第 6,602,661 及び同第 6,969,615 号; 並びに米国特許出願公開第 20050255473 号及び同第 20040081987 号を参照されたい。

20

【0108】

他の実施形態では、当該組成物またはデバイスは肺癌に関連または相関している分子の各種クラスを検出するために使用され得る。よって、アッセイは肺癌に関連または相関している循環自己抗体及び非抗体分子 (例えば、肺癌抗原) を検出し得る。例えば、Weynantsら, Eur. Respir. J., 10:1703-1719, 1997 及び Hirschら, Eur. Respir. J., 19:1151-1158, 2002 を参照されたい。従って、デバイスは捕捉エレメントとして肺癌分子に対する自己抗体及び結合分子に対するエピトープ (例えば、特異的抗体、アプタマー、リガンド等) を含み得る。

30

【0109】

サンプリング及び検査の例示

特にスクリーニングアッセイにおいて検査を受けることが可能なサンプルは通常患者から、おそらく非侵入性または最小の侵襲性方法で容易に得ることができるものである。サンプルは自己抗体を有していると公知のものである。血液サンプルはそのような適当なサンプルであり、多くのイムノアッセイフォーマットに容易にかけることが可能である。

40

【0110】

血液サンプルの関連で、多くの採血管が公知であり、多くは 5 または 10 ml の血液を集める。多くの一般的に注文されている診断血液検査と同様に、5 ml の血液を集めるが、マイクロアレイとして操作する本アッセイは 1 ml 未満の血液ですむことがあり得る。採血容器が抗凝固薬 (例えば、ヘパリン、クエン酸塩または EDTA) を含んでいてもよい。細胞エレメントを通常遠心することにより、例えば 4 で 1000 x g (RCF) で 10 分間遠心することにより分離し (分析のために ~ 40% の血漿を得る)、使用まで通常冷凍温度または 4 で保存し得る。好ましくは、血漿サンプルは採取から 3 日以内にアッセイするか、または例えば -20 で冷凍保存する。過剰のサンプルは所要による反復

50

分析のために - 20 で (サンプルの凍結融解を避けるために霜のつかない冷凍庫において) 最長 2 週間保存する。2 週間以上の長期にわたる保存は - 80 でなければならない。抗体構造及び機能を保存するために当業界で公知のように標準の取り扱い及び保存方法を実施する。

【 0 1 1 1 】

次いで、流体サンプルを、例えば本明細書中に記載されている 5 マーカーパネルの 1 つの精製ポリペプチドのサンプルを適当なポジティブサンプル及びネガティブサンプルと一緒に充填した部位を含むマイクロアレイのような検査組成物に用いる。サンプルは定量を可能とするように連続希釈物のような漸変量で用意され得る。サンプルは位置的影響を考慮してマイクロアレイ上にランダムに配置され得る。インキュベートした後、マイクロアレイを洗浄した後、デテクタ (例えば、特定のマーカーで標識した抗ヒト抗体) に曝す。シグナルの正規化を可能とするために、例えばマイクロアレイに第 2 デテクタを添加して各部位のサンプルの測度を得る。単離したポリペプチドサンプル上の別の部位に対する抗体であり得、ポリペプチドを特異的反応に対して不活性な追加のシーケンスまたは分子を含むように修飾しても、ポリペプチドをマイクロアレイに添加する前にレポーターを有するように修飾してもよい。マイクロアレイを再び洗浄した後、所によりレポーターの検出を可能とするように試薬に曝す。例えばレポーターが金属ゾルのような着色粒子を含んでいるならば、特殊な検出手段は必要でない。蛍光分子を使用するならば、適切な入射光が使用される。酵素を使用するならば、マイクロアレイは適当な基質に曝される。次いで、マイクロアレイを部位に結合した反応産物について評価する。肉眼で評価してもよいが、検出し、所によりシグナルの強度を定量するデバイスがある。次いで、データを、例えばポジティブ対照サンプル及びネガティブ対照サンプルを観察することにより反応の正当性に関する情報を得るよう解釈し、正当ならば実験サンプルを評価する。次いで、情報を癌の存在について解釈する。例えば、患者が 3 個以上の抗体に対して陽性ならば、患者は肺癌について陽性であると診断される。或いは、マーカーの情報を肺癌の存在の結果に対する 5 個のマーカーの最大可能性関係を記載している式に適用してもよく、患者のスコアの糸口がパネルの同スコアの値の 50% 以上ならば、患者は癌に対して陽性であると診断される。適当なスコアは算出した AUC 値であり得る。

【 0 1 1 2 】

キットの使用及びアッセイ

その後の経過観察のための早期診断または早期警告は疾患の結果に対する潜在的な影響のために非常に有力であるが、本発明の血液検査は複数の使用及び用途を有する。本発明は肺癌のラジオグラフィースクリーニングを補うためのツールとして使用され得る。連続 CT スクリーニングは通常肺癌に対して感受性であるが、非常に高価で、非特異的 (報告されている特異性は 64%) である傾向にある。よって、CT は多数の、ほぼ 4 / 10 の偽陽性を生ずる。ラジオグラフィー画像診断で不確定な肺結節がルーチンに同定されると、しばしば高価な精密検査及び大手術を含めた潜在的に有害な介入につながる。現在、肺癌に対する大規模スクリーニング研究による選択基準として使用されているリスクファクターは年齢と喫煙歴のたった 2 つである。

【 0 1 1 3 】

ラジオグラフィーにより明らかな癌 (> 0.5 cm) 及び / または潜在性または悪性前癌 (慣用のラジオグラフィー検出の限界以下) を検出するために本発明の血液検査を使用すると、追加のスクリーニングを行うのに最も値する個人が特定される。よって、本発明のアッセイは一次スクリーニング検査として役立ち得、陽性結果は当業界で慣用されており、公知のラジオグラフィー分析 (例えば、CT、PET、X線等) のような更なる検査に対する指標である。加えて、定期的再検査により新しく出現した NSCLC が同定され得る。

【 0 1 1 4 】

本発明の検査を医療行為に組み入れ得る方法の 1 例は、高リスクの喫煙者 (例えば、20 年以上 1 日一箱くらい喫煙したヒト) は毎年の身体検査の一部として本発明の血液検査

を受けてもよい。更に明白な症状のない陰性の結果は少なくとも1年に1回更に検査することを示し得る。検査結果が陽性ならば、患者は可能性ある腫瘍を同定するために追加の検査、例えば本アッセイの繰り返し及び/またはCTスキャンもしくはX線を受ける。腫瘍がCTスキャンまたはX線で明らかでないならば、多分本アッセイをその年に1~2回、その後も腫瘍が少なくとも0.5mmの直径になるまで年に数回繰り返され、検出され、外科的に除去され得る。

【0115】

以下の実施例に記載されているように、例示した5マーカーパネルを用いたNSCLCに対する自己抗体プロファイリングの90%以下の感度はCTスクリーニング単独の感度にかなり有利に匹敵し、比較により小腫瘍に対して非常にうまく実行され得、潜在性疾患の検出における大きな進歩を示す。更に、本アッセイの80%以上の特異性はCTスクリーニングの特異性よりも非常に高く、このことはリスクのある集団での良性肺結節のパーセンテージが高くなり、例えばMayo Clinicスクリーニングトライアルでは参加者の約70%のレベルに上昇するので、ますます重要になりつつある。

10

【0116】

スクリーニングにおける使用に加えて、本発明のアッセイ及び方法は、CTスクリーニングで同定された良性結節と悪性結節を区別するという非常に関連する臨床問題に対しても有用であり得る。孤立性肺結節(SPN)は正常な肺組織で完全に囲まれている直径が3cm未満の単一の球形病巣と定義されている。SPN中の悪性疾患の有病率は約10%~約70%と報告されていたが、SPNの現代の定義を用いた最新の研究は約40%~約60%の悪性疾患の有病率を示している。良性病巣の大部分は肉芽腫の結果であるが、悪性病巣の大部分は原発性肺癌である。SPNの初期診断評価は、悪性疾患のリスクファクター、例えば年齢、喫煙歴、過去の悪性疾患の病歴及び結節の胸部ラジオグラフィ特徴(例えば、大きさ、石灰化、境界(とがったまたは平滑)及び過去の胸部X線の評価に基づく成長パターン)の評価に基づいている。その後、これらのファクターは悪性疾患の可能性を判断し、更なる患者の管理を指導するために使用される。

20

【0117】

初期評価した後、多くの結節は悪性疾患の中間確率(25~75%)を有するとして分類される。この群の患者は生検または手術を受ける前に本アッセイで追加検査する恩恵を受け得る。増殖または代謝イメージングを評価する連続スキャンニング(例えば、PETスキャンニング)のみが現在利用可能な唯一の非侵襲性オプションであり、理想とはかけ離れている。連続ラジオグラフィ分析は病巣が2年の時間枠で増殖を示さないことを要求する増殖の指標に依拠している。スキャン間の理想的間隔は決められていないが、2年間に3ヶ月毎のCTスキャンが慣用の縦断的評価である。PETスキャンは肺癌に対して90~95%の特異性及び80~85%の感度を有している。これらの予測値は良性肉芽腫疾患(例えば、ヒストプラズマ症)の限局性有病率に基づいて変動し得る。

30

【0118】

PETスキャンは通常1検査あたり\$2000~\$4000の費用がかかる。非外科的介入(例えば、気管支鏡検査または経胸腔針生検(TTNB))からの診断率は40~95%の範囲である。非診断処置施設でのその後の管理には問題があることがある。外科的介入は他の診断精密検査を用いたまたは用いない最も実行可能なオプションとしてしばしば遂行されている。この選択は悪性疾患の予備検査リスクが高いか低いか、特定の施設での検査の利用可能性、結節の特徴(例えば、大きさ及び場所)、患者の手術のリスク及び患者の採択に依拠する。他の肺外悪性疾患の過去の病歴から直ちに肺への転移性癌の可能性が示唆され、非侵襲性検査の適切さは無視されるようになる。肺癌が臨床上不確定的に疑われるSPNの混乱する臨床シナリオでは、循環腫瘍マーカーが潜在的に有害な侵襲性診断精密検査を避けるのに役立つ、逆に積極的な外科的介入に対する理論的根拠を裏付ける。

40

【0119】

よって、本発明によると、侵襲的診断の代わりに結節を連続的に画像診断するために選

50

択する臨床的満足が高まる。本発明は、連続 X 線または CT スクリーニングの間隔に影響を有し、臨床ヘルスケアコストを低下させるであろう。本発明は、肺癌が存在するか否かの確率を更に高めるための費用効率が適切な方法として PET スキャンングを補充または補足するであろう。

【0120】

本発明は、治療介入後の疾患の再発を評価する際に有用である。結腸癌及び前立腺癌に対する血液検査はこの可能性で一般的に使用されており、マーカーレベルは治療の成功または失敗の指標として追跡され、マーカーレベルが高くなると治療介入につながる再発についての更なる診断評価の必要性を示す。

【0121】

本発明は、腫瘍特性についての重要な情報を与える。予後の悪い腫瘍のサブタイプの決定は潜在的に毒性のある追加治療を推奨するための臨床的決定に重大な影響を及ぼし得る。なぜならば、アッセイは複数のマーカーを使用しており、マーカーの 1 個は特定の癌の特徴またはその独自のパラメーターであり得るからである。慣用の手術または化学療法の長期間強化のために使用される新しい治療の開発には注意深い費用 / 効率分析及び患者の選択が必要であり得る。

【0122】

よって、本アッセイはスクリーニング、治療の選択のために、治療の経過、治療の成功、再発、治癒等をモニターするために治療中に連続使用するために貴重なツールである。本アッセイの試薬、マーカーの特定パネルは具体的目的に適するように扱われ得る。例えば、スクリーニングアッセイでは、多数の個人に対する予測パワーを最大とするためにマーカーの大きなパネルまたは非常に一般的なマーカーのパネルが使用される。しかしながら、治療を受けている個人に関連して、例えば患者腫瘍の特定の抗体フィンガープリントを得、スクリーニングのために使用したマーカーのすべてを要することも要しないこともあり、マーカーの特殊化部分集合は患者における腫瘍の存在及びその後の治療介入をモニターするために使用され得る。

【0123】

当該アッセイの構成成分は分布等のために多種多様のフォーマットで構成され得る。よって、1 つ以上のエピトープが 1 つ以上の容器（例えば、ガラス容器、遠心管等）にアlicoートされ、保存される。エピトープ溶液が当業界で公知のように保存剤、抗菌剤、安定化剤等を含めた適当な緩衝剤等を含んでいてもよい。エピトープは乾燥、凍結乾燥等の保存形態をとり得る。エピトープを具体的アッセイに使用するために適当な固相上に配置してもよい。よって、エピトープを培養プレートのウェル中に配置し、乾燥し、層状アレイまたはラテラルフローイムノアッセイデバイス中の膜上にスポットし、マイクロアレイ用スライドまたは他の支持体上にスポットする等をしてよい。アイテムを最大の貯蔵寿命を確保するために当業界で公知のように、例えばプラスチックフィルムラップまたは不透明ラップで包装し、箱に入れてもよい。アッセイ容器は各々が容器中に入れられたポジティブ対照サンプル及びネガティブ対照サンプルをも含んでいてもよく、容器にはサンプルが液体ならば滴下装置または液滴の分配を可能にするキャップを有する容器、サンプル収集装置、他の液体移送デバイス、検出試薬、発色試薬（例えば、銀染色試薬及び酵素基質）、酸 / 塩基溶液、水等が含まれる。適当な使用説明書を添付してもよい。

【0124】

ビーズベースアッセイを用いるような他のフォーマットでは複数のエピトープをビーズの各種集団にくっつけ、次いで 1 つの試薬に組み合わせられ、患者サンプルに曝される得る。

【0125】

本発明を以下の非限定的実施例において例示する。データは Zhongら, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 172: 1308 - 1314, 2005 及び Zhongら, J. Thoracic Oncol., 1: 513 - 519, 2006 において報告されており、これらの内容は参照により全文を本明細書中に組み入れると

10

20

30

40

50

する。

【0126】

(実施例)

【実施例1】

【0127】

T7クローンを用いたNSCLC診断アッセイ

本実施例では、後期（II、III及びIV）NSCLCを診断するためのマーカーの同定を実施した。2つのT7ファージNSCLCライブラリーをNSCLC患者及び正常人血漿を用いてバイオパンして、NSCLC患者中を循環している抗体により認識されるポリペプチドを発現する免疫原性クローンの集団を濃縮した。

10

【0128】

1つのT7ファージNSCLC cDNAライブラリーを購入（米国ウィスコンシン州マディソンに所在のNovagen）し、第2のライブラリーは腺癌細胞株NCI-1650からNovagen OrientExpress cDNA合成及びクローニングシステムを用いて構築した。これらのライブラリーを5人のNSCLC患者（2～4期；組織学的に確認された診断）及び正常な健常ドナーからのプールした血漿を用いてバイオパンして、腫瘍関連抗体により認識されるファージ発現タンパク質の集団を濃縮した。簡単に説明すると、ファージディスプレイライブラリーを、非腫瘍特異的タンパク質を除外すべくプールした正常血清（250µlのプールした正常血清，1：20希釈，4で一晚）からの抗体で被覆したプロテインG寒天ビーズとインキュベートすることによりアフニティー選択した。非結合ファージを遠心により正常血漿中の抗体に結合したファージから分離した。次いで、上清をプールした患者血漿（4で一晚）で被覆したプロテインG寒天ビーズに対してバイオパンし、遠心により非結合ファージから分離した。結合/反応性ファージを1% SDSを用いて溶離した後、遠心することにより収集した。ファージを大腸菌NLY5615（ニューヨーク州グランドアイランドに所在のGibco BRL）において溶解するまで1mM IPTG及び50µg/ml カルベニシリンの存在下で増幅させた。増幅させたファージ含有ライゼートを収集し、バイオパン濃縮ラウンドに更に3回連続してかけた。第4のバイオパンからのファージ含有ライゼートを増幅させ、個々のファージクローンを単離し、下記するタンパク質アレイに組み入れた。

20

【0129】

アレイ構築及びハイスループットスクリーニング

個々のファージを単離するために、第4ラウンドのバイオパンニングからのファージライゼートを増幅させ、6% アガロースで被覆したLB-寒天プレート上で増殖させた。コロニーピッキングロボット（英国ハンプシャーに所在のGenetic QPix 2）を用いて4000個の個々のコロニー（2000/ライブラリー）を単離した。ピッキングしたファージを96ウェルプレートにおいて増幅させた後、各ウェルからの透明ライゼート5nlをFASTスライド（ニューハンプシャー州キーンに所在のSchleicher and Schuell）上にAffymetrix 417 Arrayer（カリフォルニア州サンタクララに所在のAffymetrix）を用いて機械的に2回スポットした。

40

【0130】

次いで、4000個のファージをバイオパンでは使用しなかった5個の個々のNSCLC患者血漿を用いてスクリーニングして、免疫原性ファージを同定した。家兎抗-T7一次抗体（ペンシルベニア州ウェスト・グローブに所在のJackson Immuno-Research）を用いて、ファージ量に対する対照としてのT7カプシドタンパク質を検出した。吸収前血漿（血漿：細菌ライゼート，1：30）サンプル及び抗-T7抗体の両方を1×TBS+0.1% トゥイーン20（TBST）を用いて1：3000希釈し、スクリーニングスライドと室温で1時間インキュベートした。スライドを洗浄した後、Cy5標識抗ヒト及びCy3標識抗家兎二次抗体（Jackson ImmunoResearch；1×TBST中1：4000各抗体）と一緒に室温で1時間インキュベ

50

トした。スライドを再び洗浄した後、Affymetrix 428 スキャナーを用いてスキャンした。画像をGenePix 5.0 ソフトウェア（カリフォルニア州ユニオンシティに所在のAxon Instruments）を用いて分析した。線形回帰から2標準偏差以上のCy5/Cy3シグナル比を有するファージを“診断チップ”で使用するための候補者として選択した。

【0131】

診断チップ設計及び抗体測定

上記したハイスループットスクリーニングで同定された212個の免疫反応性ファージ及び120個の“空”T7ファージを組み合わせ、再増幅させ、単一診断チップとしてのFASTスライド上に2回スポットした。重複チップを使用して、上記スクリーニングに関して記載したプロトコルを用いて40個の後期NSCLCサンプルをアッセイした。Cy5シグナルのメジアンを、特有のファージ発現タンパク質に対するヒト抗体の測定値としてCy3シグナルのメジアンに正規化した（Cy5/Cy3シグナル比）。チップ毎の変動性を補償するために、空T7ファージタンパク質に対する血漿のバックグラウンド反応性を差し引き、T7シグナルのメジアンを割ることにより更に正規化した〔（ファージのCy5/Cy3）-（T7のCy5/Cy3）/（T7のCy5/Cy3）〕。

10

【0132】

40人の患者（II～IV期）及び41人の正常人からの正規化シグナルのシュューデントt検定から、各候補マーカーの相対的予測値を示唆する統計的カットオフ（ $p < 0.01$ ）を得た。212個の候補者のうち、17個がカットオフ基準（ $p = 0.00003 \sim p = 0.01$ ）を満たした。

20

【0133】

群内の冗長度をPCR及び配列分析により評価し、幾つかの二重及び三重クローンを明らかにした。冗長なクローンを排除し、7個のファージ発現タンパク質の組を同定した。

【0134】

統計分析

ロジスティック回帰分析を実施して、サンプルがNSCLC患者由来の確率を予測した。全部で81個の患者サンプル及び正常人サンプルを2群に分けた。患者はNSCLCのII～IV期と診断された。第1群はランダムに選択した21個の正常人及び20個の患者血漿サンプルから構成し、個々のマーカーまたはマーカーの組合せを用いて患者サンプルと正常人サンプルを区別するマーカーを同定するためのトレーニング組として使用した。20個の患者サンプル及び20個の正常人サンプルから構成した第2群を使用して、トレーニング群を用いて同定したマーカーの予測率を確認した。予測感度及び特異性を各種マーカーを用いて比較するために受動者動作特性（ROC）曲線を作成し、曲線下面積（AUC）を求めた。更に、分類子をリーブ・ワン・アウト（LOO）法によるクロス確認（leave-one-out cross validation）を用いて調べた。喫煙歴及び病気のステージも分析し、比較した。

30

【0135】

次いで、2つの群を逆転させ、40個のサンプル群をNSCLCの存在を示すマーカーを同定するためのトレーニング群とした。次いで、最大予測パワーを与えるとして同定されたマーカーを他の41個のサンプル群においてNSCLCを診断するために使用した。

40

【表 4】

ROC曲線下面積および予測精度

ファージ クローン	トレーニング群*			確認群†	
	AUC‡	Spec (%)	Sens (%)	Spec (%)	Sens (%)
1864	.857	75	81	65	85
1896	.857	70	86	70	75
1919	.824	75	81	70	90
1761	.798	70	81	70	85
1747	.864	70	86	70	80
組み合わせ	.983	92	95	90	95

* 21個の正常人サンプルおよび20個のNSCLC患者サンプルから構成されるトレーニング群

† 20個の正常人サンプルおよび20個のNSCLC患者サンプルから構成される確認群

‡ AUC: ROC曲線下面積

10

【表 5】

リープ・ワン・アウト法による確認*

20

ファージクローン	特異性%	感度%	診断精度†%
1864	70	82.9	76.5
1896	70	82.9	75.3
1919	70	82.9	76.5
1761	60	82.9	71.6
1747	72.5	82.9	77.8
組み合わせ	87.5	90.2	88.9

* リープ・ワン・アウト法による確認: 全部で81個のサンプルを含む検査組から1つのサンプルを排除した。分類子は排除したサンプルの状態(正常または患者)をサンプルの残りをを用いて予測するために作成した。この手順はすべてのサンプルについて繰り返した。

† 診断精度 = (真に陽性の数 + 真に陰性の数) / サンプルの総数

30

【 0 1 3 6 】

ファージ発現タンパク質の配列分析

t検定及びp値 < 0.01を用いて推定予測値について選択した17個のファージを冗長度を同定するために配列決定し、7つの特異な配列を明らかにした。ファージ発現タンパク質の身元が当該診断アッセイにおいて使用するために重要でないが、配列を別の(独立した)スクリーニング手法を用いた従来の研究で得た配列と比較し、GenBankデータベースとも比較して、ありそうな身元を得た。7つのクローンから得たヌクレオチド配列はGAGE7、NOPP140、EEF1A、PMS2L15、SEC15L2、パキシリン及びBACクローンRP11-499F19と相同性を示した。

40

【 0 1 3 7 】

7個のタンパク質のうち、タンパク質合成機構のコア成分のEEF1A(真核翻訳伸長因子1)及び癌精巢抗原のGAGE7を幾つかの肺癌において過剰発現させる。パキシリンは細胞接着及び移動を調節するフォーカルアドヒージョンタンパク質である。パキシリンの異常発現及び異常活性は肺癌を含めた幾つかの悪性疾患における侵襲性転移表現型に関連している。PMS2L15はDNAミスマッチ修復関連タンパク質であるが、癌において変異はまだ同定されていない。また、細胞内トラフィッキングタンパク質のSEC15L2及び転写活性の調節に関する核小体タンパク質のNOPP140は公知の悪性関

50

連を持たない。しかしながら、これら3つのタンパク質の生理学的機能は、各々が悪性表現型において機能を有し得ると示唆している。

【0138】

統計モデリング及びアッセイ予測精度

より高い予測率についてユニークな7つのファージ発現タンパク質を用いて分類子を開発するために、81個のサンプルをランダムに2群に分けた。1群はトレーニングの目的で、他群は確認のために使用した。ロジスティック回帰を用いて、個別のファージ発現タンパク質及び複数のファージ発現マーカーの組合せを用いる予測精度に対する感度及び特異性を計算した。結果は、5個のファージマーカーがトレーニング組において患者サンプルを正常対照と区別するための有意な能力を有していたことを示している。それぞれにつ

10

【0139】

20個の正常対照及び20個のNSCLCサンプルを含む確認群を検査するための統計モデルを用いると、アッセイは90%の感度及び95%の特異性を与えた(表4)。

【0140】

分類子と診断感度及び特異性の関連を更に調べるために、すべての81チップについてのLOO法によるクロス確認を用いるクラス予測を実施した。

【0141】

81個のサンプルについて感度及び特異性はそれぞれ90%及び87%であり、全体の診断精度は89%であった(表5)。全部で81個のサンプルを用いて、対応のクローンID、遺伝子名及びp値は次の通りであった: 1864, GAGE7, $p = 9.1 \times 10^{-9}$; 1896, BACクローンRP11-499F19, $p = 3.5 \times 10^{-8}$; 1919, SEC15L2, $p = 1.2 \times 10^{-6}$; 1761, PMS2L15, $p = 5.2 \times 10^{-7}$; 及び1747, EEF1A, $p = 5.9 \times 10^{-7}$ 。5個すべてのマーカーが $0.001/262 = 3.8 \times 10^{-6}$ のボンフェローニ補正を合格し、これらのうちの1つ以上が偽陽性である確率は0.001未満であった。

20

【0142】

従って、全体として、5個のマーカーのパネルを使用して、40人のNSCLC患者及び41人の正常人からのサンプルを分離した。サンプルが5個全部のマーカーを含んでいたときの合格同定率は89%であった。

30

【実施例2】

【0143】

T7クローンを用いた早期肺癌の検出

本実施例では、I期肺癌及び潜在性疾患をリスク照合対照サンプルから区別し得るマーカーを同定するための本発明のアッセイ及び方法の能力を調査した。

【0144】

ヒト被験者

インフォームドコンセント後、ケンタッキー大学及びレキシントン退役軍人医療センターで組織学的にNSCLCが確認された個人から血漿サンプルを得た。非癌対照をMayo Clinic肺スクリーニングトライアルに参加した1520人の被験者からランダムに選択した。簡単に説明すると、少なくとも20年の喫煙歴(20 pack-year)、50~75才の年齢及び研究開始の5年以内に他の悪性疾患のない個人がCTスクリーニングトライアルに適格であった。Mayo肺スクリーニングトライアルからの非癌サンプルに加えて、6個のI期NSCLCサンプル及び40個の診断前サンプルを分析のために使用した。診断前サンプルは研究開始時にサンプル採取から1~5年後にCTスクリーニングでNSCLCの癌が発生すると診断された被験者から採取した。

40

【0145】

ファージライブラリー

50

ファージライブラリー、パンニング及びスクリーニングは上記した通りであった。

【0146】

診断チップ設計及び抗体測定

上記ハイスループットスクリーニングで同定された212個の免疫反応性ファージ及び120個の“空”T7ファージを一緒にし、再増幅させ、単一の診断チップとしてFASTスライド上に2回スポットした。複製チップを使用して、上記スクリーニングについて記載したプロトコルを用いて23個のI期NSCLC及び23個のリスク照合血漿サンプルをアッセイした。

【0147】

統計分析

212個のファージ発現タンパク質の各々についての正規化Cy5/Cy3比を、上記実施例に記載されているようにJMP統計ソフトウェア(ノースカロライナ州ケアリーに所在のSAS, Inc.)を用いるt検定により23個の患者と23個の対照サンプルの統計上有意差について独立して分析した。46個すべてのサンプルを使用して、個別のマーカ-またはマーカ-の組合せを用いて患者を正常サンプルから区別することができた分類子を構築した。推定感度、特異性を比較するためにROC曲線を作成し、AUCを求めた。次いで、46個すべてのサンプルに対して公差確認を用いて分類子を調べた。

【0148】

次いで、分類子の組を使用して、Mayo Clinic肺スクリーニングトライアルからの102の症例及びリスク照合対照の独立した組における疾患の確率を予測した。喫煙及び他の非悪性肺疾患の相対的影響も評価した。

【0149】

予測能力を推定するために46個のサンプルすべてをアッセイすることにより求めた各々の個別マーカ-のROC AUCは.74~.95の範囲であり、5個のマーカ-の組合せはリスク照合対照から早期患者サンプルを区別する有意な能力を示した(AUC=0.99)。LOO法によるクロス確認を用いて計算した感度及び特異性はそれぞれ91.3%及び91.3%であった(表7)。

【0150】

次いで、診断の0~5年前に採取した46個のサンプル(6個の癌有病サンプル及び40個の前癌サンプル)及び被スクリーニング集団からの56個のリスク照合サンプルを含めたMayo Clinic CTスクリーニングトライアルからのサンプルコホートを独立したデータ組として分析した。結果は、49/56の非癌サンプル、6/6のスクリーニングCTでのラジオグラフィ-検出時に採取した癌サンプル、9/12の診断の1年前に採取したサンプル、8/11の診断の2年前に採取したサンプル、10/11の診断の3年前に採取したサンプル、4/4の診断の4年前に採取したサンプル、1/2の診断の5年前に採取したサンプルの正確な分類を示し、これは87.5%の特異性及び82.6%の感度に相当した。アッセイにより不正確に分類された8個の前癌サンプルのうちの3個は気管支肺胞細胞組織像を有していた。

【0151】

検査組の中で、6/6の非癌対照は慢性閉塞性肺疾患(COPD)の臨床診断で正しく同定され、1人の個人はサルコイドーシスと同定され、1人の個人は乳癌の中間診断と同定された。後者の独立した検査組の中で、限局性前立腺癌を有する2人の個人も正常と正しく分類された。以前に(5年より前)乳癌と診断された1人の個人は非癌と分類されたが、二人目は癌と分類された。79人の非癌被験者の34人はスクリーニングCTスキャンで検出された良性結節を有していた。現在の喫煙歴対以前の喫煙歴は検査の予測精度に影響を及ぼさないようであった。アッセイ感度と診断までの時間も関係はなかった。

【0152】

ファージ発現タンパク質の配列分析

5つの予測ファージ発現タンパク質のヌクレオチド配列をGenBankデータベースと比較した。最終予測モデルで用いた5個のクローンから得たヌクレオチド配列はパキシ

10

20

30

40

50

リン、SEC15L2、BACクローンRP11-499F19、XRCC5及びMALAT1と高い相同性を示した。最初の3つは先の実施例に記載した進行期の肺癌患者からの血漿と免疫反応性であると同定された。XRCC5は幾つかの肺癌で過剰発現したDNA修復遺伝子である。フォーカルアドヒージョンタンパク質であるパキシリンの異常活性及び異常発現は肺癌及び他の悪性疾患における侵襲性転移表現型と関連していた。MALAT1は肺癌において異常発現することが知られている調節RNAである。

【0153】

本アッセイの肺癌に対するラジオグラフィースクリーニングを補う可能性はその後の確認において認識され得、これらの5個の抗体マーカーの組み合わせた測度は49/56のMayo Clinic肺スクリーニングトライアルからの非癌サンプル、6/6の有病癌、32/40のラジオグラフィー検出の1~5年前に採取した血液からの癌発生を正しく推定し、87.5%の特異性及び82.6%の感度に相当した。

10

【0154】

Mayo Clinic肺スクリーニングトライアルの最初のレポートにはCTのみで診断された35例のNSCLC、喀痰細胞診検査のみで検出された1例のNSCLC、毎年のスクリーニングスキャンで臨床的に検出された1例のIV期NSCLCが記載されており、これはCTスキャン単独の94.5%の感度に相当する。更に、第1回の発病率スキャン後の遡及的検討から、有病スキャンの26%で小さい肺結節が見逃されたことを示した。これは他のCTスクリーニングトライアルで報告されている有意な偽陰性率と一致した。遡及的に同定された結節の直径は231人の参加者(375人の参加者の62%)で4mm未満、137人(37%)で4~7mm、6人(2%)で8~20mmであった。よって、NSCLCに対する自己抗体プロファイリングの82.6%の感度はCTスクリーニング単独の感度にかなり有利に匹敵し、比較により小さい腫瘍に対して特になくなされ得、潜在性疾患の検出において大きな前進を示す。更に、本アッセイの87.5%の特異性はCTスキャンの特異性をはるかに超えており、リスクのある集団での良性肺結節のパーセンテージが高くなり、Mayo Clinicスクリーニングトライアルでは参加者の69%のレベルに達するのでより重要となる。

20

【表6】

トレーニング群におけるロジスティック回帰/リープ・ワン・アウト法による確認

30

ファージ クローン	トレーニング*			確認†	
	AUC‡	特異性%	感度%	特異性%	感度%
L1919	0.85	82.6	78.3	82.6	60.9
L1896	0.95	87	87	87	87
G2004	0.80	82.6	65.2	82.6	65.2
G1954	0.74	82.6	87	73.9	69.6
G1689	0.82	82.6	65.2	82.6	65.2
組み合わせ	0.99	100	95.7	91.3	91.3

40

*トレーニング組は23個の高リスク正常人サンプル及び23個のNSCLC I期患者サンプルから構成した。

†リープ・ワン・アウト法による確認: 45個の症例及び対照に基づいて1つのサンプルの予測

‡AUC: ROC曲線下の面積

【0155】

5個のマーカーは潜在性及びI期肺癌を正確に診断した。被験者中に2個以上のマーカーが存在すると、標準の手法を用いて診断する前に癌を予測することができる。NSCLC細胞に結合する循環抗体が現在では利用されている手法を用いて陰性と診断される患者中に存在している。この実施例では、上記のサンプルセット中の約半分の対照は、良性肉

50

芽種疾患のX線写真の証拠を有しており、これは発明者らの癌と非癌の識別能力を混乱させるとは考えられなかった。

【実施例3】

【0156】

肺癌特異的ランダムペプチドマーカの同定およびこれを用いたNSCLC診断アッセイの開発

ファージディスプレイランダムペプチドを用いて、肺癌特異的マーカーも得た。このようなライブラリは市販されており、あるいは当技術分野において公知のとおりで作製することができる。ベクターとしてM13を選択した。

【0157】

マーカの同定

小さなコートタンパク質に融合した 2×10^9 個のランダムペプチドを含む市販のM13ファージディスプレイペプチドライブラリを使用した(Ph.D.TM-C7C, NEB)。各ファージクローンは、ファージ表面上のループ構造中に固有の7個のアミノ酸のペプチドを発現する。このループ構造は、細菌のペリプラズム中で形成する単一の隣接するジスルフィド結合によって制約される。

【0158】

このライブラリを、上記の肺癌患者および対照から得た血漿を用いて2ラウンドの「バイオパニング」に供した。次いで、このバイオパニングされたライブラリを、個々のファージを単離するために増幅した。自動コロニーピッキングロボット(Q-Pix II, Genetix社、New Milton, Hampshire, UK)を使用して個々のコロニーをピッキングした。ピッキングしたファージを96穴プレート中で増幅し、各ウェルから得た上清は、レプリカとして、Affymetrix 417 Arrayer(Affymetrix, Santa Clara, CA)を用いて、FASTスライド(Schleicher and Schuell社, Keene, NH)上にロボットでスポットした。その後、アレイされたファージを、NSCLCに罹患している患者およびNSCLCに罹患していない個人から得た血漿サンプルと共にインキュベートして、肺癌特異的自己抗体に反応するクローンを同定した。

【0159】

ファージに結合した抗体を、ヒトIgGに結合する赤色蛍光標識した二次抗体によって示した。各スポット中に存在し得る可変量のタンパク質を示すため、ファージカプシドに直接結合する、緑色蛍光標識を有する抗体を使用した。スライドの二色スキャンングにより、各タンパク質に結合している抗体の量を示す赤色シグナルと、各スポットにおけるタンパク質の量を示す緑色シグナルを得た。このデータをコンパイルし、スライド上の各スポットについて、緑色シグナル(タンパク質の量)上に赤色シグナル(抗体の量)のスクアットプロットを作成するプログラムによって示した。スライド上の全てのタンパク質の平均シグナルおよび標準偏差を示す、コンピューターで作成した回帰分析を用いて、NSCLC患者の血漿中の抗体に結合されたタンパク質を同定した。NSCLCの血漿サンプル(回帰線からの標準偏差が2を超える)から得られた多量の抗体に結合するファージは、さらなる評価の候補と考えられた。約500個の候補ファージを選択し、NSCLCサンプルを対照と識別する可能性を評価した。これらの免疫反応性ファージを集め、増殖させて、精製したプロトタイプ・マイクロアレイ上の空のファージ(ランダムオリゴヌクレオチドの挿入を有さないファージ)と共にアレイした。このマイクロアレイは、NSCLCおよび非癌の個別の血漿サンプルを用いてアッセイした。

【0160】

パネル選択

ハイスループット(HT)スクリーニングにおいて、5つのNSCLCサンプルのうち少なくとも1つと反応性が高い(コンピューターで作成した回帰線を用いて、標準偏差が少なくとも2)と同定された483個の免疫反応性ファージと、挿入ペプチドを有していない63個のファージとを増幅させ、レプリカとしてFASTスライド上にアレイした。標準残留測定(残留標準偏差によって分割された回帰線からの距離)により、各スポット中のタンパク質の量を超える、固有のファージ発現タンパク質の各々に結合している抗体の量の信頼できる測定

10

20

30

40

50

を可能なものとした。この方法は、定量的で、再現性があり、チップ間の変動性を補償し、サンプル間およびサンプル内の比較を可能とした。

【0161】

DNA配列分析を用いて、重複するファージが選択されなかったことを確認した。選択した候補ファージには、低レベルの冗長性(4%未満)が観察された。

【0162】

483個の候補マーカー各々の標準残留は、入手可能なサンプルセットの半分に由来する63個の症例と対照との間の統計的有意差について、JMP統計ソフトウェア(SAS社, Cary, NC)を用いてt検定により独立に分析した。483個の候補マーカーのうち、224個は、32個の症例と31個の対照との間に統計的有意差($p < 0.05$)を示し、155個のマーカーは有意水準 $p < 0.01$ を有し；85個のマーカーは有意水準 $p < 0.001$ を有し；また32個のマーカーは有意水準 $p < 0.0001$ を有していた。

10

【0163】

独立性の高い識別レベルを有する32個の固有のマーカーを、ROCによって決定した独立の予測値および組み合わせの予測値についてさらに評価した。サンプルセットの半分(グループA: 62個の症例および対照)に由来する個々のマーカーのROCのAUCは、0.729から0.954まで変動した(平均0.811)。125個の症例および対照(サンプルセットAとBとの組み合わせ)の全てを用いて測定した個々のマーカーのAUCは、0.727から0.908(平均0.766)まで変動した。

20

【0164】

レプリケートチップを用いて、NSCLCの血漿サンプル(ステージII-IV)、初期段階の癌に罹患した患者(サンプルは、施設内治験審査委員会(IRB)が承認したプロトコルに基づいてUniversity of Kentuckyにおいて収集した)、癌および正常対照のラジオグラフィック検出の1~5年前に採取された血液サンプル(50歳超の高リスク喫煙者と、Central Kentucky Blood Centerの献血者)に相当する、Mayo Clinic予測スクリーニングトライアル(Bachら, JAMA 297, 953, 2007)から得られた症例を、本明細書中でスクリーニング用に記載したプロトコルを使用してアッセイした。

【0165】

アッセイの検証

最も高い独立した識別力を有するマーカーの様々な組み合わせを、加重ロジスティック回帰を用いて評価し、予測精度を評価した。例えば、 $p < 0.007 \sim p < 2 \times 10^{-6}$ の範囲のp値を有する12個のマーカーの組み合わせは、.973のROC曲線下面積を生じ、リーブ・ワン・アウト法による統計的検証における予測精度についてさらに評価される。個々のマーカーのROC分析は、.591 ~ .893の範囲のAUC値を生じた。

30

【実施例4】

【0166】

初期段階の癌を検出するための4個のランダムペプチドのパネル

実施例3に示した実験から得られた4個のクローン(MC1484、MC2628、MC2853およびMC3050)のパネルを、University of Kentucky (UK)において進行中の研究で初期段階の癌(一般的にはステージI)と診断された患者のサンプルと、癌でない患者のサンプルとを用いて試験した。95%の特異性($n=39$)が得られ、LOO法によるクロス確認では、特異性は90%であった。感度($n=17$)は94%であり、LOO法によるクロス確認では、感度は82%であった。

40

【実施例5】

【0167】

ラジオグラフィックで検出できる癌より前に癌を検出するための4個のランダムペプチドのパネル

M13ライブラリから得られた上記パネルのランダムマーカーを、上記実施例2に記載したMayo Clinicの研究から得られたサンプル(ラジオグラフィックで検出できる癌を有していないが、その後肺癌を発症した、肺癌の危険性がある個人に由来するサンプルを使用した)について試験したとき、26個のサンプルのうち18個が癌陽性と確認された。これらのサン

50

ブルは、試験したサンプルが得られた後1~4年後にX線で検出できる肺癌を有することが見出された個人から得られたものであった。

【実施例6】

【0168】

後期段階の肺癌を検出するための、10個のランダムペプチドのパネル

実施例3に記載の実験から得られた10個のM13クローン(MC908、MC919、MC1011、MC1521、MC1524、MC1760、MC2645、MC2900、MC3000およびMC3127)を含む別のパネルを、進行段階の癌を有する患者のサンプルについて、適切な数の「正常」サンプル(癌でない個人から得られた血液)を用いて試験した。94%の感度(n=36)(LOO法では86%)および94%の特異性(n=38)(LOO法では84%)が得られた。このように、38個の正常サンプルのうち36個が癌陰性と確認され、肺癌患者から得た36個のサンプルのうち34個が癌陽性と確認された。

10

【実施例7】

【0169】

肺癌を検出するための14個のランダムペプチドのパネル

実施例4~6に記載のファージクローンのパネルを組み合わせて、正常な患者と比較して、初期段階および後期段階の癌の患者において癌を検出したとき、観察された感度(n=52)は94%(LOOでは86%)であり、特異性(n=38)は92%(LOOでは71%)であった。従って、この実施例は、マーカーの特定の組み合わせは、任意の段階の肺癌を診断するために使用し得ることを示す。

20

【実施例8】

【0170】

肺癌を検出するための5個のランダムペプチドのパネル

「トレーニングおよび検査」の検証戦略を用いて、統計モデルのトレーニングに指定されたサンプルセットの半分を、同様に32個のNSCLCの症例(20個は進行段階、11個は初期段階)と、31個のリスク対照とを含む2個目の半分の分類予測のための分類指標として使用した。ロジスティック回帰モデルにおいて、最も高いAUCを有する個々のマーカーを逐次追加した。

【0171】

5個のマーカーの組み合わせ(908、3148、1011、3052および1000)により、全段階の癌の別個の検証セットにおいて、90.6%の感度と73.3%の特異性(予測精度82%)を得た。

30

【実施例9】

【0172】

肺癌を検出するための6個のランダムペプチドのパネル

異なるが重複しているデータセットを、124個のNSCLCの症例およびリスク対照のサンプル(表7)から得て、トレーニング用および検証用の2つのグループに分け、あるいは、サンプルサイズのバイアスを低減するリーブ・ワン・アウト分析で評価した；候補の抗体-マーカーは、症例と対照の識別レベルによって統計的に順位付けした。

【表7】

表7 患者の特徴

数	年齢 ^a	組織学 ^b			段階				
		A	S	N	I	II	III	IV	
サンプルセットA									
対照	30	63.8±6.4							
癌	32	65.6±9.9	9	12	9	11	3	8	6
サンプルセットB									
対照	30	64.1±7.4							
癌	32	66.2±10.3	9	11	8	11	10	10	1

40

^a 平均年齢±標準偏差

^b 組織学:A:腺癌;S:扁平上皮癌;N:その他の特定の非小細胞癌

【0173】

50

ROC-AUC分析は、様々なマーカーの組み合わせの予測可能性を示した。独立した個々のサンプルコホートについて、入手可能なサンプルをトレーニング群と検査群とに分割することによって分類予測を行い、またはリーブ・ワン・アウト法による検証戦略において、124個の症例および対照の各々について分類予測を逐次決定した。483個の各候補マーカーを、入手可能なサンプルセットの半分に由来する62個の症例と対照の統計的有意差についてt検定により独立に分析した。483個の候補マーカーのうち224個が、32個の症例と30個の対照との間で統計的有意差($p < 0.05$)を示し、155個のマーカーが統計的有意性を $p < 0.01$ のレベルで示し；85個のマーカーが統計的有意性を $p < 0.001$ で示し；33個のマーカーが統計的有意性を $p < 0.0001$ のレベルで示した。配列分析は、捕捉タンパク質間で極めて限られた重複率を示した。「トレーニングおよび検査」検証では、6個のマーカーの組み合わせが、32個の症例と31個の対照との完全な識別(AUC1.0)を達成した。表8を参照のこと。

10

【0174】

独立性の高い識別レベルを有する33個の固有のマーカーを、ROCによって決定した、独立した組み合わせの予測値についてさらに評価した。サンプルセットの半分(グループA: 62個の症例および対照)に由来する個々のマーカーのROCのAUCは、0.729~0.954まで変動した(平均0.811)。全124個の症例および対照(サンプルセットAおよびBの組み合わせ)を用いて決定された個々のマーカーのAUCは、0.727~0.908まで変動した(平均0.766)。

【0175】

アッセイの検証

「トレーニングおよび検査」の検証戦略を用いて、統計モデルのトレーニングに指定されたサンプルセットの半分以上を、同様に32個のNSCLCの症例(20個は進行段階、11個は初期段階)と、31個のリスク対照対照とを含む他の半分のサンプルにおける分類予測のための分類指標として使用した。最も高いAUCを有する個別のマーカーを、ロジスティック回帰モデルに逐次追加した。「トレーニングおよび検査」の検証では、6個のマーカーのパネルが、32個の症例と31個の対照との完全な識別(AUC 1.0)を達成した(表8)。全124個のサンプル中、7個のマーカーのパネルがAUC 0.949を生じ(表9参照)、11個のマーカーがAUC 0.947を生じ、25個のマーカーのセットが、完全な識別を達成した。幾つかの代替マーカーの組み合わせにより、高い識別レベルも得た。多様なマーカーの組み合わせにより、類似のAUCを得た。トレーニングおよび検査の検証を用いた分類予測は、90%の感度および73%の特異性をもたらした。

20

30

【0176】

サンプルサイズのバイアスを低減するため、全124個の入手可能な症例および対照のサンプルから得られた測定結果を組み込むLOO法によるクロス確認を用いた。幾つかのマーカーの組み合わせを試験した。サンプルコホートAにおいて完全な識別を提供した上位7個のマーカーは、完全なサンプルセットにおいてAUC 0.944をもたらし；リーブ・ワン・アウト法による検証は、90.4%の感度と82.7%の特異性を生じた(予測精度86%)。最大11個までのマーカーを加えると、AUCは0.947まで増加し、87.3%の感度および86.6%の特異性をもたらされるが、86%の予測精度は大きくは変化しない。全124個のサンプルのROCから算出される逐次順位付けしたマーカーを使用し、87.3%および84.5%の算出感度および特異性をそれぞれ有する9個のマーカーの組み合わせを用いてAUC=0.944を得た。代替マーカーの組み合わせは、極めて類似のレベルの予測を提供した。予想どおり、(AUCによる)独立した予測値がより低い多くのマーカーは、AUCの増加を要した。

40

【表 8】

表8: 逐次マーカーの組み合わせ、トレーニングおよびテストの検証

ファージクローン番号	908	3148	1011	3052	1000	838
アミノ酸配列	ERSLSPI	PQASNP L	SMTQSD K	SGTSPH L	SNNSIH Q	PPATQG H
分類指標: 32個のNSCLC対31個の対照						
AUC ($\alpha+\beta_1\chi$)	.945	.893	.866	.849	.848	.844
$\alpha+\beta_1\chi_1+\beta_2\chi_2$.944				
$\alpha+\beta_1\chi_1+\beta_2\chi_2+\beta_3\chi_3$.949			
$\alpha+\beta_1\chi_1+\beta_2\chi_2+\beta_3\chi_3+\beta_4\chi_4$.982		
$\alpha+\beta_1\chi_1+\beta_2\chi_2+\beta_3\chi_3+\beta_4\chi_4+\beta_5\chi_5$.982	
$\alpha+\beta_1\chi_1+\beta_2\chi_2+\beta_3\chi_3+\beta_4\chi_4+\beta_5\chi_5+\beta_6\chi_6$						1.00
分類予測: 31個のNSCLC対30個の対照						
感度	84%	84%	90.6%	90.6%	90.6%	不安定
特異性	68%	73%	63%	70%	73.3%	不安定
予測精度	76%	78.5%	77.4%	80%	82%	

10

20

【0177】

32個の癌の症例は、11個のステージIの癌サンプルと、21個のステージII-IVの癌サンプルとを含んでいた。マーカーを、ロジスティック回帰モデルに逐次追加した。31個の癌の症例(11個のステージIおよび20個のステージII-IV)と31個の非癌対照とを含む独立したサンプルセットにおける分類予測を、5個のマーカーの組み合わせについて計算した。MC838は配列番号55であり；MC908は配列番号57であり；MC1000は配列番号63であり；MC1011は配列番号65であり；MC3052は配列番号145であり；MC3148は配列番号161である。

30

【0178】

サンプルサイズのバイアスを低減するため、全125個の入手可能な症例および対照のサンプルから得られた測定結果を組み込むLOO法によるクロス確認モデルを用いた。幾つかのマーカーの組み合わせを試験した(例えば、表9を参照のこと)。

【表 9】

表9: マーカーの逐次追加およびリーブ・ワン・アウト法による検証

マーカーの番号	6	7	10	24
曲線下面積	.935	.949	.948	1.0
リーブ・ワン・アウト法				
感度	84.1%	88.8%	87.3%	不安定
特異性	79.3%	84.5%	84.5%	不安定

40

125個の症例および対照を試験した。最も高い曲線下面積(AUC)値を有するマーカーを逐次追加した。感度および特異性は、リーブ・ワン・アウト法を用いて計算した。

【実施例 10】

【0179】

ラジオグラフィによる検出の前に肺癌を予測するための13個のランダムペプチドのパネル

50

t検定によって選択した候補ペプチドの別の組み合わせ(表10)を、ラジオグラフィー検出の1~4年前に癌の発症を予測する能力について評価した。トレーニングおよび検査の検証を用いて、Mayo Clinic CTスクリーニング試験(Swensenら, Radiology. 2003;226:756-61;およびSwensenら, Radiology. 2005;235:259-65)への参加のときに採取された31個の前診断スクリーニングの症例および30個の非癌症例について、13個の固有のマーカの組み合わせの感度および特異性を決定した。

【表10】

表10:前癌予測のための、M13ファージ中で発現させた13個のペプチド

MC0908 SEQ ID NO:57	MC3001 SEQ ID NO:117	MC3100 SEQ ID NO:153	MC3050 SEQ ID NO:143	MC3052 SEQ ID NO:145
MC3010 SEQ ID NO:121	MC3014 SEQ ID NO:125	MC1011 SEQ ID NO:65	MC0838 SEQ ID NO:55	MC1694 SEQ ID NO:77
MC2624 SEQ ID NO:91	MC3148 SEQ ID NO:161	MC2984 SEQ ID NO:101		

10

【0180】

発生、血液の提供および罹患率CTスキャンの1~4年後に、罹患率CTスクリーニングにてNSCLCを診断した。トレーニングセットとして使用した入手可能なサンプルは、42個の進行段階のNSCLC、22個の初期のNSCLCおよび30個の非癌対照を含んでいた。ペプチドは、M13ファージ中で発現させ、本明細書中に記載のガラススライドマイクロアレイ上でアッセイした。

20

【0181】

このマーカは、トレーニングセット中で、合計0.987のROC曲線のAUCを与えた。このトレーニングセットを分類指標として用いたとき、検査セットにおける癌予測は、80.6%の感度と70%の特異性を示した。このデータは、ラジオグラフィー検出の1年前の10個の癌症例のうち8個；検出の2年前の7/9個；検出の3年前の9/10個；検出の4年前の2/3個；および21/30個の非癌対照の正確な予測に相当する。

30

【表11】

表11:肺癌予測

	非癌(n=30)	癌(n=31)			
		癌発症までの年数			
		1	2	3	4
正確な分類数/総数(n)	21/30	8/10	7/9	9/10	2/3
	特異性 = 70%	潜在的疾患の感度 = 80.6%			

40

【実施例11】

【0182】

肺癌を検出するための21個のランダムペプチドのパネル

t検定で選択した21個の固有のペプチドの候補マーカのプール(表12)を、42個の進行段階、22個の初期段階を含むNSCLC症例、38個の前診断スクリーニング症例および59個の非癌症例について試験した。非癌症例に対する単一の段階、全段階、前診断スクリーニングの症例のデータ、または多様な癌グループの組み合わせのデータからp値を計算した。t

50

検定におけるp値は、0.04 ~ <0.0000001であった。上記のパネルに含めるため、全ての比較用の、<0.05のp値を有するマーカーを選択した。表12の列2、3および4のデータは、このランダムなM13ファージ発現ペプチドのパネル中のクローンが、非癌症例と、初期段階の肺癌の症例、後期段階の肺癌の症例と、CTスキャンでは明らかにならなかった潜在的疾患の症例を、それぞれ、実施例1および2で記載のとおり、T7ファージディスプレイライブラリのペプチドを用いて識別することができたことを示す。

【表12】

表12：M13ファージ発現ペプチドのパネル

M13 ファージ クローン	癌 初期段階 (n=18)	癌 ステージ II-IV (n=46)	前診断 (n=38)	全ての癌 ステージ I-IV (n=64)	初期段階 および 前診断 (n=56)	全ての癌 および 前診断 (n=102)
MC0908	0.000000	0.000000	0.002102	0.000000	0.000006	0.000000
MC1011	0.000069	0.000000	0.018365	0.000000	0.000272	0.000000
MC1694	0.019258	0.000000	0.012563	0.000000	0.002916	0.000000
MC2978	0.003469	0.000004	0.033850	0.000002	0.006840	0.000010
MC2984	0.015700	0.000001	0.015243	0.000001	0.002606	0.000003
MC2993	0.000043	0.000359	0.001293	0.000014	0.000035	0.000004
MC2996	0.000001	0.000000	0.000166	0.000000	0.000003	0.000000
MC2997	0.003356	0.000028	0.001615	0.000002	0.000058	0.000001
MC3000	0.000112	0.000665	0.015736	0.000022	0.000371	0.000067
MC3007	0.000244	0.000000	0.006545	0.000000	0.000253	0.000000
MC3010	0.001291	0.000128	0.000548	0.000013	0.000031	0.000002
MC3013	0.000979	0.000053	0.000096	0.000002	0.000002	0.000000
MC3014	0.008036	0.000338	0.000039	0.000051	0.000006	0.000001
MC3015	0.008643	0.000003	0.000000	0.000002	0.000001	0.000000
MC3019	0.000003	0.003484	0.000185	0.000048	0.000001	0.000008
MC3050	0.002125	0.000070	0.000022	0.000010	0.000002	0.000000
MC3052	0.001430	0.000002	0.012623	0.000000	0.001306	0.000002
MC3058	0.018098	0.000000	0.004187	0.000001	0.001181	0.000003
MC3059	0.001558	0.000132	0.006965	0.000023	0.000620	0.000033
MC3100	0.002456	0.000221	0.011022	0.000013	0.000373	0.000013
MC3148	0.000515	0.000000	0.029794	0.000000	0.001327	0.000000

10

20

30

【0183】

本明細書中で引用される全ての参考文献は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0184】

本明細書中の教示に対して、本発明の精神および範囲から逸脱することなく様々な改変を加え得ることは明らかであろう。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/72943
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01),33/537(2006.01),33/538(2006.01),33/564(2006.01),33/566(2006.01) USPC: 435/7.1,7.92;436/501,506,509,536,538,541 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 7.92; 436/501, 506, 509, 536, 538, 541 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used). Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,E --- Y,E'	US 7,314,721 B2 (GURE et al) 01 January 2008 (01.01.2008), column 43, line 60 - column 45, line 14.	1-7 ----- 8-17
Y	US 4,351,824 (LEHRER) 28 September 1982 (28.09.1982), see abstract, column 6, lines 45-62.	8, 11, 13-15
Y	CANELLE et al. An efficient proteomics-based approach for the screening of autoantibodies. Journal of Immunological Methods. 11 March 2005, Vol. 299, pages 77-89, especially abstract and 78-81.	6, 7, 9-14, 16 and 17
X --- Y	US 6,645,465 B2 (HANASH et al) 11 November 2003 (11.11.2003), column 10, lines 3-26.	1-7, 10, 13, 14, 17 ----- 8, 9, 11, 12, 15, 16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 28 May 2008 (28.05.2008)		Date of mailing of the international search report 02 JUL 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Anne Holleran <i>J. Roberts for</i> Telephone No. 571-272-0600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/72943

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/US07/72943**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

Group I, claim(s) 1-5, drawn to a method for selecting a patient to undergo radiographic testing for lung cancer.

Group II, claim(s) 5-17, drawn to compositions and devices comprising the compositions, where the compositions comprising a lung cancer marker that is a random polypeptide and is binding partner for a molecule present in a fluid sample of a patient up to five years before radiographically detectable lung cancer is present in the patient.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the technical feature that is common between the two groups appears to be a lung cancer marker that is a polypeptide (although it is not clear what structure is meant by "random polypeptide"), and such a feature is not a special technical feature because it does not make a contribution over the prior art as a whole. For example, Hanash (US 6,645,465 B2, issued Nov. 11, 2003) teaches that Annexin I or Annexin II bind to serum autoantibodies present in the serum of lung cancer patients (see claim 1, column 14, lines 50-60). Therefore the technical feature of Group I is an assay method for detecting lung cancer autoantibodies using a polypeptide product that binds to lung cancer markers; and the technical feature of Group II is a composition comprising a polypeptide or polypeptides that bind to a molecule present in fluid sample of a patient up to five years before radiographically detectable lung cancer is present.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

US Patents Database (EAST), Medline

search terms: autoantibody, lung neoplasm, lung, diagnosis, detection, bead

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ハッター, ナダ エイチ.
アメリカ合衆国 40536 ケンタッキー州, レキシントン, ディビジョン オブ プルモナリー アンド クリティカル ケアー メディソン, デパートメント オブ インターナル メディソン, チャンドラー メディカル センター, ユニバーシティー オブ ケンタッキー

(72)発明者 ヒルショビッツ, エドワード エー.
アメリカ合衆国 40536 ケンタッキー州, レキシントン, ディビジョン オブ プルモナリー アンド クリティカル ケアー メディソン, デパートメント オブ インターナル メディソン, チャンドラー メディカル センター, ユニバーシティー オブ ケンタッキー

(72)発明者 チョン, リー
アメリカ合衆国 40536 ケンタッキー州, レキシントン, ディビジョン オブ プルモナリー アンド クリティカル ケアー メディソン, デパートメント オブ インターナル メディソン, チャンドラー メディカル センター, ユニバーシティー オブ ケンタッキー

(72)発明者 シュトロームバーグ, アーノルド, ジェイ.
アメリカ合衆国 40506 ケンタッキー州, レキシントン, デパートメント オブ スタティスティックス, ユニバーシティー オブ ケンタッキー

Fターム(参考) 4B024 AA12 DA06 EA03 GA11 HA03