

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-528441
(P2018-528441A)

(43) 公表日 平成30年9月27日(2018.9.27)

(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 0 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z	
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-533586 (P2018-533586)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月11日 (2015.9.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年4月5日 (2018.4.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2015/009552
 (87) 国際公開番号 WO2017/043679
 (87) 国際公開日 平成29年3月16日 (2017.3.16)

(71) 出願人 518085896
 アプタマー サイエンス インコーポレイ
 テッド
 APTAMER SCIENCES IN
 C.
 大韓民国 37673 ギョンサンブクド
 ボハンシ ナムグ チョンナムロ 77
 ポステック・バイオテック・センター
 282
 (74) 代理人 100121728
 弁理士 井関 勝守
 (74) 代理人 100165803
 弁理士 金子 修平
 (74) 代理人 100170900
 弁理士 大西 渉

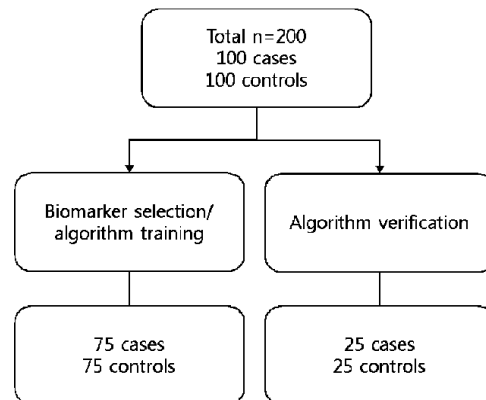
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非小細胞肺癌診断用タンパク質バイオマーカーパネル及びこれを用いた非小細胞肺癌診断方法

(57) 【要約】

本開示は、バイオマーカーを含むバイオマーカーパネルとヒトの肺癌を診断するための方法に関する。肺癌を診断するための方法が提供され、前記方法は、表2に提供されるバイオマーカーより選択された少なくとも1つのバイオマーカーに該当する少なくとも1つのバイオマーカー値をサンプルから検出する段階を備え、前記少なくとも1つのバイオマーカー値に基づいて、前記ヒトは非小細胞肺癌を持っているアジア人に分類されるか、肺癌を有する可能性を決定する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表 2 に記載のバイオマーカータンパク質のうち N 個を含むバイオマーカーパネルを提供する段階と、

前記パネルの N 個のバイオマーカータンパク質とそれぞれ対応するバイオマーカー値を付与するために、ヒトより得られた生物学的サンプルから前記バイオマーカータンパク質を検出する段階とを含み、

前記 N は少なくとも 2 である整数であり、

前記肺癌は、前記バイオマーカー値に基づいて診断されることを特徴とするヒトの肺癌を診断するための方法。

10

【請求項 2】

前記バイオマーカー値を検出する段階は、生体内検定を行う段階を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記生体内検定は、前記バイオマーカータンパク質それぞれに対応する 1 つの捕捉試薬を含み、アプタマー、抗体及び核酸プローブからなる群より少なくとも 1 つの捕捉試薬を選択する段階を更に含むことを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの捕捉試薬は、アプタマーであることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記生物学的サンプルは、全血、血漿及び血清からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記生物学的サンプルは血清であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ヒトはアジア人であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ヒトは喫煙者であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ヒトは悪性肺結節を持つことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記 N は、少なくとも 3 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 N は少なくとも 4 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 N は少なくとも 5 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 N は少なくとも 6 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 N は少なくとも 7 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記バイオマーカー値は、補体成分 C 9、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase) 6 (CA 6)、C-反応性タンパク質 (CRP)、表皮成長因子受容体 1 (EGFR 1)、マトリックスメタロプロテアーゼ 7 (MMP 7)、アルファ () 1-アンチプロテアーゼ (SERPINA 3) 及び幹細胞成長因子受容体 (KIT) の測定値を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記バイオマーカー値は、リアルタイム PCR、マイクロアレイ及びルミネックスマイクロビーズ検定法 (Luminex microbead assay) からなる群より測定されることを特徴と

50

する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記肺癌は統計的な方法で診断されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記統計的な方法は、線形判別分析、ロジスティック回帰分析、ナイーブベイズ分類、サポートベクターマシン及びランダムフォレスト (random forest) からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

ヒトの非小細胞肺癌を診断するためのタンパク質バイオマーカーパネルにおいて、前記パネルは、KITを含む表 2 に記載のバイオマーカータンパク質のうち N 個のバイオマーカータンパク質を含み、N は少なくとも 2 であることを特徴とするパネル。

10

【請求項 20】

前記 N は少なくとも 3 であることを特徴とする、請求項 19 に記載のパネル。

【請求項 21】

前記 N は少なくとも 4 であることを特徴とする、請求項 19 に記載のパネル。

【請求項 22】

前記 N は少なくとも 5 であることを特徴とする、請求項 19 に記載のパネル。

【請求項 23】

前記 N は少なくとも 6 であることを特徴とする、請求項 19 に記載のパネル。

【請求項 24】

前記 N は少なくとも 7 であることを特徴とする、請求項 19 に記載のパネル。

20

【請求項 25】

前記パネルは、補体成分 C9、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase) 6 (CA6)、C-反応性タンパク質 (CRP)、表皮成長因子受容体 1 (EGFR1)、マトリックスメタロプロテアーゼ 7 (MMP7)、アルファ () 1-アンチプロテアーゼ (SERPINA3) 及び幹細胞成長因子受容体 (KIT) の測定値を有することを特徴とする、請求項 19 に記載のパネル。

【請求項 26】

前記ヒトはアジア人であることを特徴とする、請求項 19 に記載のパネル。

【請求項 27】

前記ヒトは喫煙者であることを特徴とする、請求項 19 に記載のパネル。

30

【請求項 28】

前記ヒトは悪性肺結節を持つことを特徴とする、請求項 19 に記載のパネル。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非小細胞肺癌診断用タンパク質バイオマーカーパネル及びこれを用いた非小細胞肺癌診断方法に関し、より詳細には、幹細胞成長因子受容体 (KIT) を含むバイオマーカータンパク質のうち、N 個のタンパク質を持つ、ヒトの非小細胞肺癌を診断するためのタンパク質バイオマーカーパネルに関する。

40

【背景技術】

【0002】

以下の説明では本出願と関連する情報の要約を提供し、提供される情報や参照文献が本出願の従来技術として認められない。

【0003】

肺癌は、韓国及び世界全体において依然として癌関連死の主要原因である (Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, et al. (2015) Global cancer statistics, 2012, CA Cancer J Clin.). 2011 年に韓国で 21,753 件超の肺

50

癌が新たに発病し、15,000人を超える人が肺癌で亡くなったと推定される (Jung KW, Won YJ, Kong HJ, Oh CM, Lee DH, et al. (2014) Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence)。先進国では肺癌の罹患率と死亡率が減少しているが、喫煙率が増加し続けている開発途上国、特にアジア諸国では肺癌の罹患率と死亡率が急増している (Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, et al. (2015) Global cancer statistics, 2012, CA Cancer J Clin.)。

【0004】

早期肺癌を持つ大半の患者は症状が現れないため、60%を超える患者は治療可能性のない進行段階で診断される (Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM (2010) Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 19:1893-1907; Jett JR (1993) Current Treatment of Unresectable Lung-Cancer. Mayo Clinic Proceedings 68:603-611.)。肺癌が進んだ患者の5年生存率は10%未満であるが、1期患者の5年生存率は70%を超えることができる (Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE (2000) Lung cancer. Lancet 355:479-485.)。従って、死亡率及び罹患率の減少に重要な肺癌の早期診断という研究目的が肺癌検診法の開発に転換されている。

【0005】

全米肺検診臨床試験 (National Lung Screening Trial (NLST)) (Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, et al. (2011) Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. N Engl J Med 365:395-409) では、低線量CT (LDCT) 検診では肺癌関連の死亡率が20%減少することが判明されたが、LDCT検診の24.2%は陽性であり、これらの結節の96.4%は誤診であると判断される (Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, et al. (2011) Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. N Engl J Med 365:395-409.; Aberle DR, Abtin F, Brown K (2013) Computed Tomography Screening for Lung Cancer: Has It Finally Arrived? Implications of the National Lung Screening Trial. Journal of Clinical Oncology 31:1002-1008.)。攻撃性腫瘍の発見以外に、NLSTにおいてLDCTで発見した全ての肺癌のうち18%よりも多い肺癌が無痛症と見られ、LDCTによる肺癌診断の危険性を記述するとき、過度な診断も考慮されなければならない (Patz EF, Jr., Pinsky P, Gatsonis C, Sicks JD, Kramer BS, et al. (2014) Overdiagnosis in low-dose computed tomography screening for lung cancer. JAMA Intern Med 174:269-274)。

【0006】

従って、血清のように非侵襲式で収集した生物学的標本で測定した、感度と特異度を有する肺癌バイオマーカーは、高危険対象、特にCTを通じて非決定性肺結節が発見された患者に対して臨床的決定を下すのに役立つことができる。非小細胞肺癌 (NSCLC) の個別血清バイオマーカー、主にサイトケラチン19フラグメント21.1 (Cyfra 21-1)、癌胎児性抗原、そして組織ペプチド抗原に対して公開されたデータによれば、これらのバイオマーカーは、特に初期段階の疾病に限られた感度と特異度を示す (Pastor A, Mendez R, Cremades MJ, Pastor V, Llopis R, et al. (1997) Diagnostic value of SCC, CEA and CYFRA 21.1 in lung cancer: a Bayesian analysis. European Respiratory Journal 10:603-609.; Buccheri G, Torchio P, Ferrigno D (2003) Clinical equivalence of two cytokeratin markers in non-small cell lung cancer-A study of tissue polypeptide antigen and cytokeratin 19 fragments. Chest 124:622-632.; Lai RS, Hsu HK, Lu JY, Ger LP, Lai NS (1996) CYFRA 21-1 enzyme-linked immunosorbent assay. Evaluation as a tumor marker in non-small cell lung cancer. Chest 109:995-1000.)。

【0007】

分子診断法の発展とゲノム学に対する理解に伴い、現在の検診基準を補完する潜在力のある幾つかの肺癌バイオマーカーが発見された (Hasan N, Kumar R, Kavuru MS (201

10

20

30

40

50

4) Lung cancerscreening beyond low-dose computed tomography:the role of novel biomarkers.Lung 192:639-648.;Bigbee WL, Gopalakrishnan V, Weissfeld JL, Wilson DO, Dacic S, et al. (2012) A multiplexed serum biomarker immunoassay panel discriminates clinical lung cancer patients from high-risk individuals found to be cancer-free by CT screening. J Thorac Oncol 7:698-708.;Daly S, Rineault D, Fhied C, Basu S, Mahon B, et al. (2013) Development and validation of a plasma biomarker panel for discerning clinical significance of indeterminate pulmonary nodules. J Thorac Oncol 8:31-36.;Gold L, Ayers D, Bertino J, Bock C, Bock A, et al. (2010) Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. PLoS One 5:e15004.;Ostroff RM, Bigbee WL, Franklin W, Gold L, Mehan M, et al. (2010) Unlocking biomarker discovery:large scale application of aptamer proteomic technology for early detection of lung cancer. PLoS One 5:e15003.;Pecot CV, Li M, Zhang XJ, Rajanbabu R, Calitri C, et al. (2012) Added value of a serum proteomic signature in the diagnostic evaluation of lung nodules. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 21:786-792.)。Ostroffの他、多数は肺癌の早期診断のためのタンパク質バイオマーカーパネルを発見したことを報告している (Gold L, Ayers D, Bertino J, Bock C, Bock A, et al. (2010) Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. PLoS One 5:e15004.;Ostroff RM, Bigbee WL, Franklin W, Gold L, Mehan M, et al. (2010) Unlocking biomarker discovery:large scale application of aptamer proteomic technology for early detection of lung cancer. PLoS One 5:e15003.)。

10

20

30

40

50

【0008】

しかし、肺癌の疫学と分子生物学は、民族的又は地域的背景によって異なっており、タンパク質バイオマーカーの開発やCT画像化モデルへの統合も行われていない。

【0009】

アプタマー (aptamer) は新たな生体分子であって、大規模のオリゴ (oligo) ライブラリプールから選別される。一連のSELEX動作を通じて、特異リガンド (ligand) 対象のアプタマーを拡張し、最終的に選定する。アプタマーは化学的に合成可能であり、多様な目的のために変形し易い一本鎖の核酸である。また、アプタマーは、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction) 方法により増幅して分析することができ、高容量のDNAアレイ技術に適用することもできる。

【0010】

アプタマー基盤の高容量定量的検定法は、疾病の状態を診断するために多変量蛋白体の特徴を分別するための優れたプラットフォームとして報告され、証明された。単一のプラットフォームから1000個を超えるタンパク質を同時に測定することができ、これにより、疾病特異的蛋白体の特徴を見つけ出すために人体サンプルを分析できる機会が得られる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであって、その目的は、ヒトの非小細胞肺癌を診断する方法を提供することにある。

【0012】

また、本発明の他の目的は、非小細胞肺癌を発見するためのタンパク質バイオマーカーパネルを提供することにある。

【0013】

本発明のまた他の目的は、以上で言及したものに制限されず、言及されていない更に他の目的は、以下の記載から本発明が属する技術分野において通常の知識を有する者に明確に理解させることができる。

【課題を解決するための手段】

【0014】

前記技術的課題を解決するために、本発明の一実施形態は、肺癌、特に非小細胞肺癌を診断するためのタンパク質バイオマーカーパネルを提供する。本発明の一実施形態において、バイオマーカーは実施形態で詳細に説明する多重アプタマー基盤の検定法を用いて識別された。本願で説明する前記多重アプタマー基盤の検定法を用いることによって、本願は非小細胞肺癌の検出及び診断に有用な非小細胞肺癌バイオマーカーリストを説明する。これらのバイオマーカーを識別するために、かつて非小細胞肺癌の存否を診断されたアジア人の標本から小規模セットの候補バイオマーカータンパク質を測定した。各バイオマーカーを分析し、患者群と対照群を区分する性能を互いに比較して表2に記載されたように、より優れた性能を持つ小規模セットのバイオマーカーを選択した。ナীবベイズ定理 (naive Bayesian theorem) によって、実施形態に詳細に説明したように、多変量分類器を生成し分析した。

10

【0015】

本発明の目的を達成するために、本発明の一実施形態に係るヒトの肺癌を診断するための方法は、表2に記載のバイオマーカータンパク質のうちN個を含むバイオマーカーパネルを提供し、前記Nは少なくとも2である整数である段階と、前記パネルのN個のバイオマーカータンパク質とそれぞれ対応するバイオマーカー値を付与するために、ヒトより得られた生物学的サンプルから前記バイオマーカータンパク質を検出する段階とを含み、前記肺癌は、前記バイオマーカー値に基づいて診断されることを特徴とする。

20

【0016】

前記バイオマーカー値を検出する段階は、生体内検定を行う段階を含むことができる。

【0017】

前記生体内検定は、前記バイオマーカータンパク質それぞれに対応する1つの捕捉試薬を含むことができ、前記方法は、アプタマー、抗体及び核酸プローブからなる群より少なくとも1つの捕捉試薬を選択する段階を更に含むことができる。

【0018】

前記少なくとも1つの捕捉試薬は、アプタマーであり得る。

【0019】

前記生物学的サンプルは、全血、血漿及び血清からなる群より選択され得る。

【0020】

前記生物学的サンプルは、血清であり得る。

前記ヒトは、アジア人であり得る。

前記ヒトは、喫煙者であり得る。

前記ヒトは、悪性肺結節を持ち得る。

30

【0021】

前記Nは3、4、5、6、7或いはそれ以上であり得る。

【0022】

前記バイオマーカー値は、補体成分C9、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase) 6 (CA6)、C-反応性タンパク質 (CRP)、表皮成長因子受容体1 (EGFR1)、マトリックスメタロプロテアーゼ7 (MMP7)、アルファ () 1-アンチプロテアーゼ (SERPINA3) 及び幹細胞成長因子受容体 (KIT) の測定値であり得る。

40

【0023】

前記バイオマーカー値は、リアルタイムPCR、マイクロアレイ及びルミネックスマイクロビーズ検定法 (Luminex microbead assay) からなる群より測定され得る。

【0024】

前記肺癌は、統計的な方法で診断され得る。

【0025】

前記統計的な方法は、線形判別分析、ロジスティック回帰分析、ナীবベイズ分類、サポートベクターマシン及びランダムフォレスト (random forest) からなる群より選択され得る。

50

【 0 0 2 6 】

また、本発明の目的を達成するために、ヒトの非小細胞肺癌を診断するためのタンパク質バイオマーカーパネルにおいて、前記パネルは、K I Tを含む表 2 に記載のバイオマーカータンパク質のうち N 個のバイオマーカータンパク質を含み、N は少なくとも 2 であることを特徴とする。

【 0 0 2 7 】

前記 N は 3、4、5、6、7 或いはそれ以上であり得る。

前記パネルは、補体成分 C 9、炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase) 6 (C A 6)、C -反応性タンパク質 (C R P)、表皮成長因子受容体 1 (E G F R 1)、マトリックスメタロプロテアーゼ 7 (M M P 7)、アルファ () 1 -アンチプロテアーゼ (S E R P I N A 3) 及び幹細胞成長因子受容体 (K I T) の測定値を有することができる。

10

前記ヒトは、アジア人であり得る。

前記ヒトは、喫煙者であり得る。

前記ヒトは、悪性肺結節を持ち得る。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 8 】

本発明のタンパク質バイオマーカーパネルによれば、非小細胞肺癌を発見するためのタンパク質バイオマーカーパネルを提供できるという効果を奏する。

【 0 0 2 9 】

本発明の効果は、以上で言及したものに制限されず、言及されていない更に他の効果は、以下の記載から本発明が属する技術分野において通常の知識を有する者に明確に理解させることができる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 0 】

【 図 1 】 アルゴリズム教育及び確認のための研究フローチャートである。

【 図 2 】 アプタマー基盤の多重検定法を示す。

【 図 3 】 正規累積分布関数 (C D F) に適したモデルと共に未加工データの例を示す。

【 図 4 A 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 B 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 C 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

30

【 図 4 D 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 E 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 F 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 G 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 H 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 I 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 J 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 K 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 L 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

40

【 図 4 M 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 4 N 】 患者 - 対照群間の候補マーカーを比較した図である。

【 図 5 A 】 7 - マーカー単純ベイズ分類器 (naive Bayes classifier) に対する R O C 曲線を示す。

【 図 5 B 】 7 - マーカー単純ベイズ分類器 (naive Bayes classifier) に対する R O C 曲線を示す。

【 図 5 C 】 7 - マーカー単純ベイズ分類器 (naive Bayes classifier) に対する R O C 曲線を示す。

【 図 6 A 】 6 - マーカー単純ベイズ分類器に対する R O C 曲線を示す。

【 図 6 B 】 6 - マーカー単純ベイズ分類器に対する R O C 曲線を示す。

【 図 6 C 】 6 - マーカー単純ベイズ分類器に対する R O C 曲線を示す。

50

【図 6 D】 6-マーカー単純ベイズ分類器に対する R O C 曲線を示す。

【図 6 E】 6-マーカー単純ベイズ分類器に対する R O C 曲線を示す。

【図 6 F】 6-マーカー単純ベイズ分類器に対する R O C 曲線を示す。

【図 6 G】 6-マーカー単純ベイズ分類器に対する R O C 曲線を示す。

【図 7 A】 7-マーカー単純ベイズ分類器と Cyfra 2 1-1 の性能を比較した図である。

【図 7 B】 7-マーカー単純ベイズ分類器と Cyfra 2 1-1 の性能を比較した図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

代表的な実施形態を参照して本発明を具体的に記述する。本発明について列挙される実施形態と関連して説明するが、本発明は前記実施形態に限定されないことが理解できるはずである。これに対し、本発明は請求の範囲により定義されているような本発明の範囲内に含まれることができる全ての代案、変更及び同等物を含む。

10

【0032】

当業者らは、本願に記載されたものと類似又は同等な多くの方法と物質は、本発明の範囲内に含まれることができ、また含まれることが理解できるはずである。本発明は、記載された方法と物質に決して限定されない。

【0033】

他の定義がない限り、本願で用いられた技術及び科学的用語は、本発明が属する技術分野において当業者に一般に通用しているものと同一の意味を有する。たとえ、本願に記載されたものと類似又は同等な任意の方法、装置及び物質が本発明の実行又はテストに使用され得るとしても、好適な方法、装置及び物質をこれから記述する。

20

【0034】

本願に引用された全ての文献、公開特許文書及び特許出願は、本願が属する技術分野の水準を表す。本願に引用された全ての文献、公開特許文書及び特許出願は、それぞれの文献、公開特許文書又は特許出願が具体的、かつ明確に参照により統合されるものと示された程度と同じ程度の参照により統合されている。

【0035】

添付する請求の範囲を含んで本願で用いられる、単数形「1つ (“a”、“an”及び“the”）」は文脈上、特に明確に指示されていない限り、複数の表現を含み、「少なくとも1つ (at least one) 」及び「1つ又はそれ以上 (one or more) 」と混用される。従って、「アプタマー (an aptamer) 」はアプタマーの混合物を含み、「プローブ (a probe) 」はプローブの混合物を含む。

30

【0036】

本願で用いられた用語である「約 (about) 」は、数値と関連している項目の基本機能が変更されない程度の微々たる数値の変更又は変化を示す。

【0037】

本願で用いられた用語である「含む (“comprises”、“comprising”、“includes”、“including”、“contains”、“containing”）」及びこの用語の変化形は、ある要素や要素リストを含む工程、方法、方法限定物 (product-by-process) 、又は物質の組成が単にこれらの要素だけでなく、明確に列挙していないか、そのような工程、方法、方法限定物、又は物質の組成に固有な他の要素を含むことができる非排他的包含 (nonexclusive inclusion) を網羅する。

40

【0038】

一実施形態において、バイオマーカーサブセットやバイオマーカーパネルに有用なバイオマーカーの数は、特定のバイオマーカー値の組み合わせのための感度及び特異度値に基づく。ここで、「感度」及び「特異度」という用語は、生物学的サンプルから検出された1つ或いはそれ以上のバイオマーカー値に基づいて、個人が非小細胞肺癌を患っているかを正確に把握する能力と関連して用いられる。「感度」とは、非小細胞肺癌を患っているヒトを正確に識別する(各)バイオマーカーの性能を示す。「特異度」は、非小細胞肺癌を患っていないヒトを正確に識別する(各)バイオマーカーの性能を示す。

50

【 0 0 3 9 】

本願は、バイオマーカー、方法、装置、試薬、システム及び非小細胞肺癌と癌の発見及び診断のためのキットを更に一般的に含む。

【 0 0 4 0 】

ここで用いられる「肺臓 (lung)」という用語は、「肺 (pulmonary)」という用語と混用され得る。

【 0 0 4 1 】

ここで用いられる「喫煙者」という用語は、タバコの煙を吸い込んだ履歴のある個人のことをいう。

【 0 0 4 2 】

「生物学的サンプル (biological sample)」、「サンプル (sample)」及び「試料 (test sample)」とは、個人より獲得するか、その他に異なって導出された物質、生物学的体液、組織又は細胞のことをいうものであって、本願において混用される。これは (全血 (whole blood)、白血球 (leukocytes)、末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells)、パフィーコート (buffycoat)、血漿 (plasma) 及び血清 (serum) を含む) 血液、喀痰 (sputum)、涙 (tears)、粘液 (mucus)、鼻洗浄液 (nasal washes)、鼻咽頭吸引液 (nasal aspirate)、呼吸 (breath)、小便 (urine)、精液 (semen)、唾液 (saliva)、腹腔洗浄液 (peritoneal washing)、嚢胞液 (cystic fluid)、羊水 (amniotic fluid)、腺液 (glandular fluid)、リンパ液 (lymph fluid)、細胞液 (cytologic fluid)、腹水 (ascites)、胸膜液 (pleural fluid)、乳頭吸引液 (nipple aspirate)、気管支吸引液 (bronchial aspirate)、気管支擦過ブラシ (bronchial brushing)、滑液 (synovial fluid)、関節吸引液 (joint aspirate)、組織分泌物 (organ secretions)、細胞 (cell)、細胞抽出物 (cell extract) 及び脳脊髄液 (cerebrospinal fluid) を含む。また、これは前記列挙したものから実験的に分離された分画 (fractions) を含む。例えば、血液サンプルは血清、血漿又は赤血球細胞又は白血球細胞のような特定形態の血液細胞を含む分画に分離されることできる。所望の場合、サンプルは組織サンプルと及び体液サンプルの組み合わせのように、個人のサンプル組み合わせであり得る。また、前記用語「生物学的サンプル (biological sample)」は例えば、大便サンプル、組織サンプル又は組織生検からのサンプルのような均質化した固体物質を含む物質を含む。また、前記用語「生物学的サンプル」は、組織培養又は細胞培養に由来する物質を含む。生物学的サンプルを得るための適切な方法が使用され得、代表的な方法として、例えば、採血、綿棒法 (例えば、口腔上皮細胞綿棒法) 及び細針吸引組織検査を含む。細針吸引が可能な代表的な組織は、リンパ節、肺、肺洗浄液、BAL (気管支肺胞洗浄液、bronchoalveolar lavage)、甲状腺、乳房及び肝臓 (liver) を含む。また、サンプルは例えば、顕微解剖 (例えば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (laser capture microdissection; LCM) 又はレーザーマイクロダイセクション (laser micro dissection; LMD))、膀胱洗浄、塗抹 (例えば、PAP塗抹) 又は乳管洗浄細胞診により収集され得る。個人より得られるか、由来する「生物学的サンプル」は、個人から得た後、適切な方法により処理されたサンプルを含む。

【 0 0 4 3 】

更に、生物学的サンプルは、多数のヒトより生物学的なサンプルを得てそのサンプルをプール (pool) にするか、各個人の生物学的サンプルの部分標本をプールにして導き出せることを理解すべきである。プールにしたサンプルは、一人の個人より得られたサンプルとして処理されることができ、前記プールにしたサンプルから癌の存在が確定されると、どの個人が非小細胞肺癌を持っているかを決定するために個別の生物学的サンプルを再びテストできる。

【 0 0 4 4 】

本明細書の目的のために、「個人の生物学的サンプルに起因するデータ」という文句は、前記データが個人の生物学的なサンプルに由来した任意の形式のデータであるか、生物学的なサンプルを用いて生成したデータであることを意味する。前記データは生成後、あ

10

20

30

40

50

る1つの測定方式の単位から他の測定方式の単位へ変換するように、ある程度再フォーマット、修正、又は数学的に変更されたものであり得る。しかし、前記データは生物学的サンプルに由来するか、生物学的サンプルを用いて生成されたものと理解される。

【0045】

「標的 (target)」、「標的分子 (target molecule)」及び「分析物 (analyte)」は、生物学的サンプルに存在し得る任意の関心分子を指すために本願において混用される。「関心分子 (molecule of interest)」は、例えば、タンパク質の場合にアミノ酸序列での軽微な変化、ジスルフィド結合形成 (disulfide bond formation)、グリコシル化 (glycosylation)、脂質化 (lipidation)、アセチル化 (acetylation)、リン酸化 (phosphorylation)、又は分子の本質を実質的に変更させない標識成分 (labeling component) との結合のようなその他の別の操作 (manipulation) 又は変更 (modification) などの特定分子の軽微な変化 (minor variation) を含む。「標的分子」、「標的」又は「分析物」は、1つの形態又は種類の分子又は多重-分子構造の複製セットである。「標的分子」、「標的」及び「分析物」は1つ以上のこのような分子のセットを意味する。標的分子の例には、タンパク質 (proteins)、ポリペプチド (polypeptides)、核酸 (nucleic acids)、炭水化物 (carbohydrates)、脂質 (lipids)、多糖類 (polysaccharides)、糖タンパク質 (glycoproteins)、ホルモン (hormones)、受容体 (receptors)、抗原 (antigens)、抗体 (antibodies)、アフィボディ (affibodies)、自己抗体 (autoantibodies)、抗体模倣体 (antibody mimics)、ウイルス (viruses)、病原体 (pathogens)、毒性物質 (toxic substances)、基質 (substrates)、代謝物質 (metabolites)、遷移状態類似体 (transition state analogs)、補助因子 (cofactors)、抑制剤 (inhibitors)、薬物 (drugs)、染料 (dyes)、栄養物 (nutrients)、成長因子 (growth factors)、細胞 (cells)、組織 (tissues) 及び前記列挙したものの断片又は部分が含まれる。

10

20

【0046】

本願で用いられた「ポリペプチド (polypeptide)」、「ペプチド (peptide)」及び「タンパク質 (protein)」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために本願において混用される。前記ポリマーは線形又は分岐型であることができ、変更されたアミノ酸を含むことができ、非アミノ酸 (non-amino acid) により切断され得る。また、前記用語は、自然的に又は人為的に、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、又は標識成分との結合のように、その他の別の操作又は変更によって変更されたアミノ酸ポリマーを含む。また、前記用語の定義には例えば、(例えば、非天然アミノ酸などを含む) 1つ又はそれ以上のアミノ酸の類似体だけでなく、当業界において公知となった他の変更を含むポリペプチドが含まれる。ポリペプチドは、単鎖又は連結鎖であり得る。タンパク質前駆体 (preprotein) 又は完全な成熟タンパク質 (intact mature protein); 成熟タンパク質に由来したペプチド又はポリペプチド; タンパク質の断片; スプライスバリエーション (splice variant); タンパク質の再組み合わせ形態、アミノ酸の変更、欠失又は置換を有するタンパク質バリエーション; 消化物 (digests) 及びグリコシル化、アセチル化、リン酸化などのような翻訳後修飾 (post-translational modification) も前記定義内に含まれる。

30

【0047】

本願で用いられた「マーカー (marker)」及び「バイオマーカー (biomarker)」は、個人において正常又は異常な進行の標識又は個人において疾病又は他の状態の標識であるか、それを示す標的分子を指すために混用される。より詳細には、「マーカー」又は「バイオマーカー」は正常又は異常、そして異常であれば、慢性又は急性の特定の生理学的状態又は進行の存在と関連する解剖的、生理学的、生化学的又は分子学的パラメーターである。バイオマーカーは、実験室検定法及び医療的画像化を含む多様な方法によって検出及び測定可能である。バイオマーカーがタンパク質である場合、バイオマーカーや前記バイオマーカーの発現を制御するタンパク質を暗号化する遺伝子の生物学的サンプル又はメチル化状態で、該当遺伝子の発現を該当タンパク質バイオマーカーの量又は存否に対する代替指標 (surrogate measure) として使用可能である。

40

50

【0048】

本願で用いられた「バイオマーカー値 (biomarker value)」、「値 (value)」、「バイオマーカーレベル (biomarker level)」及び「レベル (level)」は、生物学的サンプルからバイオマーカーを検出するための任意の分析方法を用いて測定され、また前記生物学的サンプルでバイオマーカーの、バイオマーカーのための、又はバイオマーカーに対応する存在、不在、絶対的な量又は濃度、相対的な量又は濃度、力価 (titer)、レベル (level)、発現レベル、測定されたレベルの比率などを示す測定値を指すために混用される。「値」又は「レベル」の正確な特性は、バイオマーカーを検出するのに用いられた特定分析方法の特定設計及び成分に依存する。

【0049】

バイオマーカーが個人における異常な進行又は疾病又は他の状態を示すか、その標識であれば、そのバイオマーカーは、一般に個人における正常な進行又は疾病又は他の状態の不在を示すか、その標識であるバイオマーカーの発現レベル又は値と比較して、過剰発現 (over-expressed) 又は過小発現 (under expressed) のうち1つで表現される。「上向き調節 (up-regulation)」、「上向き調節された (up-regulated)」、「過剰発現 (over-expression)」、「過剰発現された (over-expressed)」及びこれらの表現の変化形は、健常な又は正常な個人の類似する生物学的サンプルから典型的に検出されるバイオマーカーの値又はレベル (又は値又はレベルの範囲) よりも更に大きい生物学的サンプルにおけるバイオマーカーの値又はレベルを指すために混用される。また、前記用語は、特定疾病の互いに異なる段階で検出され得るバイオマーカーの値又はレベル (又は値又はレベルの範囲) よりも更に大きい生物学的サンプルにおけるバイオマーカー値又はレベルを指すことができる。

【0050】

「下向き調節 (down-regulation)」、「下向き調節された (down-regulated)」、「過小発現 (under-expression)」、「過小発現された (under-expressed)」及びこれらの表現の変化形は、健常な又は正常な個人の類似する生物学的サンプルから典型的に検出されるバイオマーカーの値又はレベル (又は値又はレベルの範囲) よりも更に小さな生物学的サンプルにおけるバイオマーカー値又はレベルを指すために混用される。また、前記用語は、特定疾病の互いに異なる段階で検出され得るバイオマーカーの値又はレベル (又は値又はレベルの範囲) よりも更に小さな生物学的サンプルにおけるバイオマーカー値又はレベルを指すことができる。

【0051】

また、過剰発現されるか、過小発現されたバイオマーカーは、個人における正常な進行又は疾病又は他の状態の不在の標識であるか、それを示すバイオマーカーの「正常な」発現レベル又は値と比較し、「差別的に発現 (differentially expressed)」されるか、「差別的なレベル (differential level)」又は「差別的な値 (differential value)」を有するものと言える。従って、バイオマーカーの「差別的な発現」は、バイオマーカーの「正常な」発現レベルの変化とも表現され得る。

【0052】

「差別的な遺伝子発現 (differential gene expression)」及び「差別的な発現 (differential expression)」という用語は、正常対象や対照対象での発現に比べて、特定の疾病を持つ対象において、より高いか、低いレベルで発現が活性化される遺伝子 (又はこれに対応するタンパク質発現産物) を指すために混用される。また、前記用語は、同一の疾病の互いに異なる段階で高いレベルか、低いレベルで発現が活性化される遺伝子 (又はこれに対応するタンパク質発現産物) を含む。また、前記用語は、差別的に発現された遺伝子が核酸レベル又はタンパク質レベルで活性化されるか、抑制され得るか、互いに異なるポリペプチド産物を生成する選択的スプライシング (alternative splicing) になり得る。このような差異は、ポリペプチドの mRNA レベル、表面発現、分泌又は分割 (partitioning) などの多様な変化を通じて明確になり得る。差別的な遺伝子発現は、2つ又はそれ以上の遺伝子又はそれらの遺伝子産物間の発現の比較、又は2つ又はそれ以上の遺伝子

10

20

30

40

50

又はそれらの遺伝子産物間の発現比率の比較、又はむしろ正常な被験者と疾病のある被験者間又は同一の疾病の多様な段階間で相異なる同一遺伝子が異なって処理された2つの産物の比較を含むことができる。差別的な発現は例えば、正常及び異常細胞、又は互いに異なる疾病又は疾病段階を経た細胞間での遺伝子又はその発現産物で時間に伴う又は細胞的発現パターンでの定量的差異と定性的差異を何れも含む。

【0053】

「診断する (diagnose)」、「診断すること (diagnosing)」、「診断 (diagnosis)」及びこれらの用語の変化形は、個人と関連する1つ又はそれ以上の徴候、症状、データ又はその他の情報に基づいて、個人の健康状態又は状況の発見、判断又は認知をいう。個人の健康状態は健常な/正常(即ち、疾病又は疾患不在)と診断されるか、健康の悪い/異常(即ち、疾病又は疾患の存在又は特性の評価)と診断され得る。前記用語の「診断する」、「診断すること」、「診断」などは、特定の疾病又は疾患と関連して疾病の早期発見、疾病の特性又は分類、疾病の進行、治癒、又は再発の発見、個人の処置又は治療後の疾病に対する反応の発見を含む。非小細胞肺癌の診断は、癌を患っていない個人と、癌を患っている個人の区別を含む。また、これは非小細胞肺癌と喫煙者と良性肺結節の区別を含む。

10

【0054】

「予知する (prognose)」、「予知すること (prognosing)」、「予知 (prognosis)」及びこれらの用語の変化形は、疾病又は疾患を持っている個人における疾病又は疾患の進行予測(例えば、患者の生存率を予測すること)をいい、このような用語は個人に対する処置又は治療後疾病反応の評価を含む。

20

【0055】

「評価する (evaluate)」、「評価すること (evaluating)」、「評価 (evaluation)」及びこれらの用語の変化形は、「診断する (diagnose)」及び「予知する (prognose)」の何れも含み、また疾病を持っていない個人における疾病又は疾患の進行に対する判断又は予測だけでなく、疾病が明確に治療された個人における疾病及び疾患が再発する可能性に関する判断又は予測を含む。また、前記用語の「評価する」は例えば、個人が治療剤に対して順調に反応するか、それとも治療剤に対して反応しないか(又は、例えば、毒性を経験するか、他の好ましくない副作用を経験するか)を予測すること、個人に投与する治療剤を選択すること、又は個人に対して施された治療に対する個人の反応を観察するか、発見することのように、治療に対する個人の反応評価を含む。従って、非小細胞肺癌を「評価すること」は例えば、個人の非小細胞肺癌の進行過程を予測すること、非小細胞肺癌が明確に治療された患者から非小細胞肺癌の再発を予測すること、又は非小細胞肺癌治療に対する個人の反応を判断したり予測すること、又は個人の生物学的サンプルから導出されたバイオマーカー値の測定に基づいて個人のための非小細胞肺癌治療法を選択することを含むことができる。

30

【0056】

下記の例は、非小細胞肺癌の「診断」又は「評価」、非小細胞肺癌の存否を早期検出、非小細胞肺癌の特定段階、類型又は下位類型、又はその他の分類又は特性を判断、疑いのある肺結節又は腫瘍が良性又は悪性非小細胞肺癌であるか否かの判断、又は非小細胞肺癌の進行(例えば、腫瘍の成長又は転移速度の観察)、快方又は再発の発見/観察と称され得る。

40

【0057】

本願で用いられた「追加的な生体医学情報 (additional biomedical information)」は、本願に記載されたバイオマーカーの使用を除いて、癌の危険度又はより具体的に非小細胞肺癌の危険度と関連する1つ又はそれ以上の個人の評価物をいう。「追加的な生体医学情報」は個人の外形、CT画像で発見された肺結節の外形、個人の身長及び/又は体重、個人の性別、個人の民族性、喫煙歴、職業経歴、公知となった発癌物質に対する曝露(例えば、石綿、ラドンガス、化学物質、火災による煙、及び産業/工場又は自動車/船舶/航空機の排出物のように、停滞しているか、動くソースからの放出物を含むことができ

50

る空気汚染、受動喫煙に対する曝露、非小細胞肺癌（又は他の癌）の家族歴、肺結節の存在、結節の大きさ、結節の位置、結節の形態（例えば、CT画像で発見された結節、スリガラス陰影（ground glass opacity;GGO）、固形、非固形、結節の境界面特性（例えば、平滑（smooth）、分葉状（lobulated）、明瞭（sharp and clear）、針状（spiculated）、浸潤（infiltrating））などを含む。喫煙歴は、主に喫煙年数に1日の喫煙箱数を掛けた数を意味する「パッケイヤー（pack years）」の観点で定量化される。例えば、平均的に35年にわたって1日に1箱のタバコを吸った人は35パッケイヤーの喫煙歴を持つものと表現される。追加的な生体医学情報は、公知の一般技術を用いて個人より獲得できる。例えば、日常問診又は健康歴問診などを通じて、個人又は医療従事者から追加的な生体医学情報を得ることができる。代案として、追加的な生体医学情報はCT画像（例えば、低線量CT画像）及びX線を含む一般的な映像技術から得ることができる。追加的な生体医学的情報の評価とバイオマーカーレベルのテストを結合すると、例えばバイオマーカーテストを単独で実施するか、追加的な生体医学情報のうちある特定の項目を単独で評価すること（例えば、CT画像単独）に比べて、非小細胞肺癌（又は他の非小細胞肺癌関連の用途）の検出に対する感度、特異度及び/又はAUCを向上させることができる。

【0058】

「曲線下の面積（area under the curve）」又は「AUC」は当業界において何れも周知されている受信者操作特性（receiver operating characteristic curve;ROC）曲線の下領域をいう。AUC測定は、データ範囲全体にわたって分類器の正確性を比較するのに有用である。より大きなAUCを有する分類器は、2つの関心群（例えば、非小細胞肺癌サンプル及び正常又は対照サンプル）間で未知のものを正確に分類する能力が更に大きい。ROC曲線は、2つの集団（例えば、非小細胞肺癌を持つ群と非小細胞肺癌ではない対照群）を区別するにおいて、特定の特性（例えば、本願に記載されたバイオマーカー及び/又は追加的な生体医学情報の任意の項目）の性能をグラフで表現するのに有用である。一般に、集団全体（例えば、患者群及び対照群）にわたる前記特性データは単一特性値に基づいて昇順に整理される。その後、前記特性に対するそれぞれの値に対して、データに対する真陽性率（true positive rate）及び偽陽性率（false positive rate）が計算される。前記真陽性率は、その特性に対する値以上のケースの数字を計算した後、ケース全体の数で割ることによって測定される。前記偽陽性率は、その特性に対する値以上の対照群の数字を計算した後、総対照群の数で割ることによって測定される。たとえ、この定義は対照群に比べて患者群で特性が高くなるシナリオを意味していても、またこの定義は、その特性が対照群と比較して患者群で低いシナリオにも適用される（このシナリオで前記特性に対する値よりも低いサンプルの数を計算できる）。ROC曲線はその他の別の単一算出だけでなく、単一特性に対して生成されることができ、単一合計値（single sum value）を提供するために、例えば2つ又はそれ以上の特性を（例えば、足す、引く、掛けるなど）数学的に組み合わせることができ、この単一合計値はROC曲線で示すことができる。付加的に、単一算出値が導出される多重特性の組み合わせをROC曲線で示すことができる。これらの特性組み合わせは、テストを構成することができる。前記ROC曲線は、テストの偽陽性率（1-特異度）に対するテストの真陽性率（感度）を示すグラフである。

【0059】

本願で用いられたバイオマーカー値に対する「検出（detecting）」又は「測定（determining）」は、バイオマーカー値に対応する信号を発見して記録するのに必要な器具及びその信号を生成するのに必要な（各）物質の使用を何れも含む。多様な実施形態において、前記バイオマーカー値は、蛍光（fluorescence）、化学発光（chemiluminescence）、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance）、表面弾性波（surface acoustic waves）、質量分析法（mass spectrometry）、赤外分光法（infrared spectroscopy）、ラマン分光法（raman spectroscopy）、原子間力顕微鏡（atomic force microscopy）、走査型トンネル顕微鏡（scanning tunneling microscopy）、電気化学検出法（electrochemical detection methods）、核磁気共鳴（nuclear magnetic resonance）、量子ドット（quant

10

20

30

40

50

um dots) などを含む方法のうち任意の適切な方法を用いて検出される。

【0060】

本願において「固体支持体 (solid support)」は、分子が共有結合又は非共有結合のうち1つを通じて直接又は間接的に付着され得る表面を持つ任意の基質をいう。「固体支持体」は、例えば、膜 (membrane)、チップ (chip) (例えば、タンパク質チップ)、スライド (slide) (例えば、ガラススライド又はカバースリップ)、カラム、中空形状、固体、半固体、例えばビーズ (bead) のような細孔 (pore) 又は空洞 (cavity) を持つ粒子、ゲル、光ファイバ物質を含む繊維、マトリックス及びサンプル容器 (receptacle) を包含できる多様な物理的形態を有することができる。サンプル容器の例としては、サンプルウェル、チューブ、毛細管、バイアル及びサンプルを固定できる任意の他の管、溝、又は屈曲が含まれる。サンプル容器は、マイクロタイタープレート (microtiter plate)、スライド、微量流体装置などのような多重-サンプルプラットフォーム上に位置し得る。支持体は、天然又は合成物質、有機又は無機物質からなることができる。一般に、試薬を捕獲する固体支持体の組成は付着方法 (例えば、共有結合 (covalent attachment)) に依存する。前記容器の他の例としては、内部で検定及び関連操作が発生し得る微細液滴 (microdroplet) 及び微量流体 (microfluid) が調節されるか、バルク状のオイル/水性油剤が含まれる。適切な固体支持体は、例えば、プラスチック、レジン、多糖類、シリカ又はシリカ基盤物質、機能性ガラス、改質シリコン、炭素、金属、無機ガラス、膜、ナイロン、(例えば、シルク、ウール及びコットンのような) 天然繊維、ポリマーなどを含む。前記物質は例えば、捕捉試薬を付着するために用いるカルボキシ (carboxy)、アミノ (amino) 又はヒドロキシル (hydroxyl) 基のような反応性基を含むことができる固体支持体で構成される。高分子性固体支持体は、例えば、ポリスチレン (polystyrene)、ポリエチレングリコールテトラフタルレート (polyethyleneglycol tetraphthalate)、ポリビニルアセテート (polyvinyl acetate)、ポリビニルクロリド (polyvinyl chloride)、ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone)、ポリアクリロニトリル (polyacrylonitrile)、ポリメチルメタクリレート (polymethyl methacrylate)、ポリテトラフルオロエチレン (polytetrafluoroethylene)、ブチルゴム (butyl rubber)、スチレンブタジエンゴム (styrenebutadienerubber)、天然ゴム (natural rubber)、ポリエチレン (polyethylene)、ポリプロピレン (polypropylene)、(ポリ)テトラフルオロエチレン ((poly) tetrafluoroethylene)、(ポリ)ビニリデンフルオリド ((poly) vinylidene fluoride)、ポリカーボネート (polycarbonate) 及びポリメチルペンテン (polymethylpentene) を含むことができる。使用可能な適切な固体支持体粒子は例えば、Luminex (登録商標) -タイプ of 符号化された粒子 (Luminex-type encoded particles)、磁性粒子 (magnetic particles) 及びガラス粒子 (glass particles) のような符号化された粒子 (encoded particles) を含む。

(バイオマーカーの例示的用途)

【0061】

多様な例示的な実施形態において、本願で記述する分析方法のうち1つを含む任意の数の分析方法により、血清や血漿のように、個人の循環系に存在する1つ或いはそれ以上のバイオマーカーに該当する1つ或いはそれ以上のバイオマーカー値を検出してヒト (個人) の非小細胞肺癌を診断するための方法を提供する。これらのバイオマーカーは、例えば、非小細胞肺癌を持っていない人に比べて非小細胞肺癌を持っているヒトにおいて差別的に発現する。個人におけるバイオマーカーの差別的発現の発見は、例えば、非小細胞肺癌の早期診断、良性肺結節と悪性肺結節間の区分 (例えば、CT画像で観察される結節)、非小細胞肺癌の再発の観察、又はその他に臨床的徴候の観察のために用いられることができる。

【0062】

本願に記載されたバイオマーカーは、多様な臨床的非小細胞肺癌の徴候に用いられることができ、(高危険の個人や集団における) 非小細胞肺癌の発見と、例えば、非小細胞肺癌と小細胞肺癌の区別及び/又は腺癌と扁平上皮癌間の区別を通じて (又は組織病理を容

10

20

30

40

50

易にして)、非小細胞肺癌の特性規定(例えば、非小細胞肺癌の類型、下位類型、又は病期決定)と、肺結節が良性結節か、悪性肺癌かを決定と、非小細胞肺癌の予後の決定と、非小細胞肺癌の進行又は快方の観察と、非小細胞肺癌の再発の観察と、転移の観察と、治療法の選定と、治療剤や他の治療法に対する反応の観察と、CT検診のための患者分類(例えば、非小細胞肺癌の危険度が高いため、螺旋形CT検診が最も大きく役立つ患者らを識別してCTの陽性予測度を増加させる)と、喫煙履歴などと結節の大きさの結合のように、バイオマーカーテストと追加的な生体医学情報の結合(例えば、CTテストやバイオマーカーテストを単独で行う場合に比べて、診断性能が向上した分析試験の提供)と、肺結節の悪性或いは良性への診断を容易にすることと、一応、CTにより肺結節が観察されると、臨床的意思の決定を容易にする(例えば、結節の大きさと関係なく、バイオマーカーによるテストが陰性である場合のように、結節の危険度が低いと判断されると、CT検診を繰り返すようにオーダーしたり、結節の大きさと関係なく、バイオマーカーによるテストが陽性である場合のように、結節の危険度が高いと判断されると、生検を考慮すること)と、(例えば、CT上で非石灰化結節が観察された後、CT検診、結節の切除、又は開胸術を繰り返し実施するかどうかのように)臨床的なフォローアップに対する意思決定を容易にすることと、を含む。バイオマーカーテストは、高危険の個人に対するCT又は胸部X線のみ実施する場合よりも陽性予測度を改善できる。本願で説明するバイオマーカーは、CT検診と共に用いられる場合に有用性を有するだけでなく、胸部X線、気管支内視鏡、蛍光気管支内視鏡、MRI又はPET検診のように、その他に非小細胞肺癌のために利用される画像方式と連係して用いられることができる。また、非小細胞肺癌の徴候を画像方式やその他の別の臨床的関連要因により発見する前、又は症状が現れる前に、このような用途のうち特定用途のために前記説明したバイオマーカーが有用に使用され得る。ここではCT検診や他の画像方式により観察された非決定性肺結節を持つ個人を区別し、非小細胞肺癌に対する高危険喫煙者の識別及び非小細胞肺癌にかかった個人の診断を更に含む。

10

20

【0063】

非小細胞肺癌の診断に本願で説明したバイオマーカーを使用できる方式の一例として、非小細胞肺癌があることを認知していない個人において前述したバイオマーカーの1つ或いはそれ以上の差別的発現は、その個人が非小細胞肺癌を持っていることを示すことができ、これにより、治療が最も効果的な初期に、恐らく他の手段により非小細胞肺癌を発見するか、非小細胞肺癌の症状が現れる前に非小細胞肺癌を発見できる。非小細胞肺癌の進行中、1つ或いはそれ以上のバイオマーカーの過剰発現は、非小細胞肺癌が進行中であること、例えば非小細胞肺癌の腫瘍の成長及び/又は転移(従って、予後がよくない)を示すことができ、他方では1つ或いはそれ以上のバイオマーカーの差別的な発現程度の減少は(即ち、後続バイオマーカーテストにおいて患者個人が「正常」発現レベルに向かっているか、近接する場合は)、非小細胞肺癌に対する快方があること、例えば非小細胞肺癌の腫瘍の大きさが減っていること(従って、予後が良いか、更に良くなる)を示すことができる。同様に、非小細胞肺癌治療過程において、1つ或いはそれ以上のバイオマーカーの差別的な発現程度の増加(即ち、後続バイオマーカーテストにおいて患者個人が「正常」発現レベルから遠ざかる場合は)、非小細胞肺癌が進行して治療が効果的でないことを示すことができ、反面、非小細胞肺癌治療過程において、1つ或いはそれ以上のバイオマーカーの差別的な発現程度の減少は、非小細胞肺癌に対する快方があり、治療の成功率が高いことを示すことができる。また、非小細胞肺癌を明確に治療した後、個人において1つ或いはそれ以上のバイオマーカーの差別的な発現程度が増加又は減少することは、非小細胞肺癌の再発を示すことができる。このような状況で、前記個人は非小細胞肺癌の再発がより遅くまで発見されない場合に比べて、より早い病期に治療を再開できる(又は患者が治療を続けている場合、薬の容量及び/又は頻度を増加させるなど、治療法を修正できる)。更に、個人によって異なって現れる1つ或いはそれ以上のバイオマーカーの発現レベルを通じて、特定治療剤に対する前記個人の反応を予見できる。非小細胞肺癌の再発や進行を観察するにおいて、バイオマーカーの発現レベルの変化は、例えば非小細胞肺癌の

30

40

50

活性度の決定又は治療法の変化必要性の決定のために、画像検診（例えば、CT検診）の繰り返しが必要であることを示すことができる。

【0064】

本願で記述するバイオマーカーの検出は、治療法の成功評価や治療後の非小細胞肺癌の消滅、再発及び/又は進行（転移を含む）を観察のように、非小細胞肺癌治療後又は非小細胞肺癌治療過程と連係して、特に更に有用である。非小細胞肺癌治療法は、例えば、個人に治療剤の処方、手術（例えば、少なくとも非小細胞肺癌の腫瘍の一部を外科的に切開するか、非小細胞肺癌と周辺組織を切除すること）、放射線治療、又はこの分野で用いられる他の種類の非小細胞肺癌治療法、そしてこれらの治療法の組み合わせを含む。肺癌の治療法には、例えば、患者個人に治療剤の処方、手術（例えば、肺腫瘍の少なくとも一部を外科的に切開）、放射線治療、又はこの分野で用いられる他の種類の非小細胞肺癌治療法、そしてこれらの治療法の組み合わせが含まれる。例えば、siRNA分子は、遺伝子の発現を防ぐ合成2本鎖のRNA分子であり、肺癌標的治療法として使用され得る。例えば、前記バイオマーカーのうち任意のバイオマーカーは治療後に少なくとも一度検出され得るか、治療後に複数回（例えば、周期的に）検出され得るか、治療前と治療後の両方で検出され得る。個人における前記バイオマーカーのうち任意のバイオマーカーの時間に伴う発現レベルの変化は、治療後の非小細胞肺癌の進行、快方又は再発の徴候であり得る。前記非小細胞肺癌の進行、快方又は再発の例には、バイオマーカーの発現レベルが治療前に比べて治療後に増加又は減少；バイオマーカーの発現レベルが治療後の早い時点に比べて治療後のより遅い時点に増加又は減少；及びバイオマーカーの発現レベルが治療後のある一時点で正常レベルと異なる場合が含まれる。

10

20

【0065】

具体的な例として、本願に記述されたバイオマーカーのうち任意のバイオマーカーに対するバイオマーカーレベルは、手術前と手術後（例えば、手術後2～16週経過）血清や血漿サンプルで測定できる。手術前のサンプルに比べて手術後のサンプルでバイオマーカー発現レベルが増加すると、これは非小細胞肺癌の進行（例えば、手術の失敗）の徴候であり得、手術前のサンプルに比べて手術後のサンプルでバイオマーカー発現レベルが減少すると、これは非小細胞肺癌の快方（例えば、手術により肺腫瘍の除去が成功）の徴候であり得る。放射線治療、治療剤の投与、又は癌予防ワクチンの投与前後のように、その他の別の治療法の実施前後も、バイオマーカーレベルを類似する方式で分析することができる。

30

【0066】

バイオマーカーレベルのテストを単一診断テストで行うこと以外に、疾病に対する危険度の増加を示すSNP又は他の遺伝的病変や変動性の測定と関連してバイオマーカーレベルをテストできる（例えば、Amos et al., Nature Genetics 40,616-622(2009)参照）。

【0067】

バイオマーカーレベルのテストを単一診断テストで行うこと以外に、CT検診のような放射線検診と共にバイオマーカーレベルテストを実施できる。例えば、非小細胞肺癌に対して危険性のある無症状集団（例えば、喫煙者）の検診のように、CT検診に対する医療的、経済的妥当性を提供できる。例えば、「CT-前」バイオマーカーレベルテストは、バイオマーカーレベルに基づいて非小細胞肺癌に対して危険度が高いため、CT検診を優先的に実施すべき者らの識別のように、高危険の個人をCT検診が要求される者に分類するのに利用され得る。CTテストを行う場合、（例えば、血清や血漿サンプルに対するアプタマー分析により）1つ或いはそれ以上のバイオマーカーのバイオマーカーレベルを測定でき、CTやバイオマーカーテストを単独で実施する場合よりも陽性予測度を改善するために、診断スコアを追加的な生体医学情報（例えば、CTテストにより決定された腫瘍媒介変数）と連係して評価できる。バイオマーカーレベルを測定するための「CT-後」アプタマーパネルは、CT（又は他の画像方式）で観察される肺結節が陽性であるか、陰性である可能性を決定するのに用いられることができる。

40

【0068】

50

本願で記述されたバイオマーカーうち任意のバイオマーカーの検出は、CT-後テストに有用であり得る。例えば、バイオマーカーテストはCTを単独で実施する場合に比べて相当数の偽陽性テストを除去したり、減少させることができる。また、バイオマーカーテストを通じて患者を容易に治療できる。例えば、肺結節の大きさが5mmよりも小さければ、バイオマーカーテストの結果により早期に患者を「経過観察 (watch and wait)」状態で組織検査を行う段階に進むことができる。仮に、肺結節が5~9mmであれば、バイオマーカーテストを通じて、偽陽性検診による組織検査や胸部切開を施さないことができる。そして、肺結節が10mmよりも大きければ、バイオマーカーテストを通じて、良性結節を持つ患者個体群に手術を行わないことができる。結節組織検査と関連する重要な病的状態が存在し、結節の位置によって結節組織を獲得するのに困難があるため、バイオマーカーテストに基づいてある患者では組織検査を行う必要性を除去することが有利であり得る。同様に、実際に結節が良性の場合のように、ある患者は手術する必要がなくなることによって、手術と関連する不要な危険とコストを回避できる。

10

20

30

40

50

【0069】

高危険群で放射線検診と連係してバイオマーカーレベルをテストすること (画像検診で観察される肺結節や腫瘍の大きさ、又はその他の特性と関連してバイオマーカーレベルを分析すること) 以外に、バイオマーカーに関する情報は他の種類のデータ、特に非小細胞肺癌に対する個人の危険度を示すデータ (例えば、患者の臨床的履歴、職業上の曝露履歴、症状、癌に対する家族歴、喫煙の有無のような危険因子、及び/又は他のバイオマーカーの状態など) と連係して評価できる。これらの多様なデータは、コンピュータやその他の装置で実行され得るコンピュータプログラム/ソフトウェアのように、自動化された方法により分析され得る。

【0070】

記載されたバイオマーカーは、画像テストにも使用され得る。例えば、その他の用途のうち、非小細胞肺癌の診断、進行/快方又は転移の観察、再発の観察、又は治療法に対する反応の観察のために、造影剤 (imaging agent) をバイオマーカーと結合し、非小細胞肺癌の診断の補助役割を果たすことができる。(バイオマーカー及びバイオマーカー値の検出及び測定)

【0071】

本願で記述されたバイオマーカーに対するバイオマーカー値は、公知の多様な分析方法を用いて検出できる。一実施形態において、バイオマーカー値は捕捉試薬を用いて検出する。本願で用いられる「捕捉剤 (capture agent)」又は「捕捉試薬 (capture reagent)」は、バイオマーカーに特異的に結合できる分子をいう。多様な実施形態において、前記捕捉試薬は溶液でバイオマーカーに曝露されるか、固体支持体上で固定されてバイオマーカーに曝露され得る。他の実施形態において、前記捕捉試薬は固体支持体上の2次特性と反応する特性を含む。これらの実施形態において、前記捕捉試薬は溶液でバイオマーカーに曝露され、その後、固体支持体上でバイオマーカーを固定するために、捕捉試薬の特性を固体支持体上の特性と共に用いることができる。捕捉試薬は、実施される分析法の類型によって選定される。捕捉試薬は、アプタマー、抗体、抗原、アドネクチン (adnectins)、アンキリン (ankyrins)、その他の抗体類似体などとタンパク質スキュフォールド、自己抗体、キメラ、小分子、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、単鎖Fvフラグメント、単鎖抗体フラグメント、核酸、レクチン、リガンド結合受容体、アフィボディ (affibody)、ナノボディ、刷込高分子、アヴィメール (avimer)、ペプチド模倣体、ホルモン受容体、サイトカイン受容体、合成受容体及びこれらの変形体とフラグメントを含むが、これらに限定されない。

【0072】

一実施形態において、バイオマーカー値は、バイオマーカー/捕捉試薬複合体を用いて検出する。

【0073】

他の実施形態において、前記バイオマーカー値はバイオマーカー/捕捉試薬複合体から

導出され、例えばバイオマーカー / 捕捉試薬の相互作用による反応の結果により検出される場合のように、間接的に検出されるが、バイオマーカー値はバイオマーカー / 捕捉試薬複合体の形成に依存する。

【 0 0 7 4 】

一実施形態において、前記バイオマーカー値は、生物学的なサンプルのバイオマーカーから直接的に検出される。

【 0 0 7 5 】

一実施形態において、バイオマーカーは、生物学的なサンプルから2つ或いはそれ以上のバイオマーカーの同時検出を許容する多重化フォーマットを用いて検出される。前記多重化フォーマットの一実施形態において、捕捉試薬は固体支持体上の離散位置で直接又は間接的に、共有結合又は非共有結合により固定される。他の実施形態において、多重化フォーマットは互いに異なる固体支持体を用い、それぞれの固体支持体は、例えば量子ドットのように、前記固体支持体と関連する固有な捕捉試薬を有する。他の実施形態において、生物学的なサンプルから検出される多重バイオマーカーのそれぞれの検出のために個別の装置が用いられる。個別装置は、生物学的なサンプルの各バイオマーカーが同時に処理可能に構成される。例えば、マイクロタイタープレートを用いて前記プレートの各ウェル (well) を生物学的なサンプルから検出される多重バイオマーカーのうち1つを固有分析するのに利用できる。

10

【 0 0 7 6 】

前記実施形態のうち1つ或いはそれ以上において、バイオマーカー値の検出が可能なようにバイオマーカー / 捕獲複合体の成分を標識するために蛍光タグを用いることができる。多様な実施形態において、前記蛍光タグを公知の技術を用いて本願に記述されたバイオマーカーのうち任意のバイオマーカーに固有な捕捉試薬に結合でき、その後、前記蛍光タグを該当バイオマーカー値を検出するために用いることができる。適切な蛍光標識には希土類キレート、フルオレセインとこれの派生物、ローダミンとこれの派生物、ダンシル、アロフィコシアニン、PBXL-3、Qdot 605、リサミン、フィコエリスリン、テキサスレッド及びその他にこのような化合物を含む。

20

【 0 0 7 7 】

一実施形態において、前記蛍光標識は蛍光染料分子 (fluorescent dye molecule) である。一実施形態において、前記蛍光染料分子は、インドリウム環の3-炭素状の置換基が化学的反応基 (chemically reactive group) 又は複合物質 (conjugated substance) を含む少なくとも1つの置換されたインドリウム環システム (indolium ring system) を含む。一実施形態において、前記染料分子は例えば、アレクサフルオル488 (AlexaFluor (登録商標) 488)、アレクサフルオル532 (AlexaFluor 532)、アレクサフルオル647 (AlexaFluor 647)、アレクサフルオル680 (AlexaFluor 680) 又はアレクサフルオル700 (AlexaFluor 700) のようなアレクサフルオル分子を含む。他の実施形態において、前記染料分子は例えば、2つの異なるアレクサフルオル分子のような第1型及び第2型の染料分子を含む。他の実施形態において、前記染料分子は第1型及び第2型の染料分子を含み、2つの染料分子は互いに異なる放出スペクトラムを有する。

30

40

【 0 0 7 8 】

蛍光発光は、広範な検定フォーマットに適した多様な手段を用いて測定され得る。例えば、分光光度計はマイクロタイタープレート、顕微鏡スライド、プリントされたアレイ、キュベットなどを分析するように設計される (Principles of Fluorescence Spectroscopy by J.R. Lakowicz, SpringerScience+Business Media, Inc., 2004. Bioluminescence&Chemiluminescence: Progress&Current Applications; Philip E. Stanley and Larry J. Kricka editors, World Scientific Publishing Company, January 2002 を参照)。

【 0 0 7 9 】

1つ又はそれ以上の前記実施形態において、化学発光タグはバイオマーカー値を検出することができるように、バイオマーカー / 捕獲複合体の成分を示す上で選択的に用いられ

50

ることができる。適切な化学発光物質は、塩化オキサリル (oxalyl chloride)、ローダミン 6 G、Ru(bipy)₃²⁺、TMAE (tetrakis(dimethylamino)ethylene)、ピロガロール (1,2,3-トリヒドロキシベンゼン) (Pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene))、ルシゲニン (Lucigenin)、ペルオキシオキサレート (peroxyoxalates)、アリアルオキサレート (Aryl oxalates)、アクリジニウムエステル (Acridinium esters)、ジオキセタン (dioxetanes) 及びその他の化学発光物質を含む。

【0080】

他の実施形態において、前記検出方法は、バイオマーカ値に対応する検出可能なシグナルを発生する酵素 / 基質化合物を含む。一般に、前記酵素は、分光光度法 (spectrophotometry)、蛍光発光 (fluorescence) 及び化学発光 (chemiluminescence) を含む多様な技術を用いて測定され得る発色性基質の化学的变化を促す。適切な酵素は、例えば、ルシフェラーゼ (luciferases)、ルシフェリン (luciferin)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (malate dehydrogenase; MDH)、ウレアーゼ (urease)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRPO)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase)、ベータガラクトシダーゼ (betagalactosidase)、グルコアミラーゼ (glucoamylase)、リゾチーム (lysozyme)、グルコースオキシダーゼ (glucose oxidase)、ガラクトースオキシダーゼ (galactoseoxidase) 及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (glucose-6-phosphate dehydrogenase)、ウリカーゼ (uricase)、キサンチンオキシダーゼ (xanthine oxidase)、ラクトペルオキシダーゼ (lactoperoxidase)、マイクロペルオキシダーゼ (microperoxidase) などを含む。

【0081】

他の実施形態において、前記検出方法は、測定可能なシグナルを発生する蛍光発光、化学発光、放射性核種 (radionuclide) 又は酵素 / 基質化合物の組み合わせであり得る。多重モードシグナリングは、バイオマーカ検定フォーマットにおいて固有の長所を有することができる。

【0082】

より詳細に、本願に記載されたバイオマーカに対するバイオマーカ値は、以下に説明するようなシングルフレックスアプタマー検定法 (singleplex aptamer assays)、多重化アプタマー検定法 (multiplexed aptamer assays)、シングルフレックス又は多重化免疫検定法 (immunoassays)、mRNA 発現プロファイリング (mRNA expression profiling)、miRNA 発現プロファイリング (miRNA expression profiling)、質量分光分析法 (mass spectrometric analysis)、組織的 (histological) / 細胞学的 (cytological) 方法などを含む公知の分析方法を用いて検出され得る。

(アプタマー基盤の検定法を用いてバイオマーカ値を決定)

【0083】

生物学的サンプル及びその他のサンプルにおいて、生理学的に重要な分子の検出及び定量のための検定法は、科学的研究及び保健分野で重要な手段である。このような検定法の 1 つは、固体支持体上に固定された 1 つ又はそれ以上のアプタマーを含むマイクロアレイの使用を含む。前記アプタマーのそれぞれは、非常に特異な方式及び非常に高い親和力で標的分子に結合することができる (「Nucleic Acid Ligand」という題名の U.S. Patent No. 5,475,096 及び「Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip」という題名の U.S. Patent No. 6,242,246, U.S. Patent No. 6,458,543 及び U.S. Patent No. 6,503,715 を参照)。一応、マイクロアレイがサンプルと接触すれば、アプタマーはサンプルに存在する標的分子にそれぞれ結合し、バイオマーカに対応するバイオマーカ値の測定を可能にする。

【0084】

本願で用いられた「アプタマー (aptamer)」とは、標的分子に対する特定結合親和力を有する核酸のことをいう。親和相互作用 (affinity interaction) は程度 (degree) の問題であるが、同状況において、標的に対するアプタマーの「特定結合親和力 (specific binding affinity)」は、前記アプタマーが試料において他の成分に結合するよりも一般に、より高い程度の親和力によりその標的に結合することを意味するということが分か

る。「アプタマー」とは、特定ヌクレオチド配列を有する一形態又は一種の核酸分子の複製セットのことをいう。アプタマーは、任意の個数の化学的に変形されたヌクレオチドを含み、適正個数のヌクレオチドを含むことができる。「アプタマー」とは、1つ以上のそのような分子セットのことをいう。互いに異なるアプタマーは、同一又は相異なる個数のヌクレオチドを有することができる。アプタマーは、DNA又はRNA又は化学的に変更された核酸であることができ、一本鎖、二本鎖又は二本鎖領域を含むことができ、非常に秩序整然とした構造を含むことができる。アプタマーは、光アプタマーであることもでき、この場合、光反応性又は化学的反応性機能基が対応する標的に共有して結合され得るようにアプタマーに含まれている。本願に記載された任意のアプタマー方法は、同一の標的分子と特異に結合する2つ又はそれ以上のアプタマーの使用を含むことができる。以下に更に記載されているように、アプタマーは、タグを含むことができる。もし、アプタマーがタグを含むのであれば、全てのアプタマーの複製は、同一のタグを有する必要がない。更に、もし互いに異なるアプタマーがそれぞれタグを含むのであれば、この互いに異なるアプタマーは互いに同一のタグ又は相異なるタグを有することができる。

10

【0085】

アプタマーは、SELEX工程を含む任意の公知の方法を用いて識別され得る。一応、識別されると、アプタマーは化学合成方法及び酵素合成方法を含む任意の公知の方法によって製造されるか、又は合成され得る。

【0086】

本願で用いられた「SOMAmer（登録商標）」又は遅いオフレートの変更されたアプタマー（Slow Off-Rate Modified Aptamer）は、向上したオフレート特性を有するアプタマーのことをいう。SOMAmerは「向上したオフレートを有するアプタマーを生成するための方法（Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates）」という題名の米国公開特許番号第2009/0004667号に記載の向上したSELEX方法を用いて製作することができる。

20

【0087】

前記用語の「SELEX」及び「SELEX工程（SELEX process）」は、（1）好適な方式、例えば、タンパク質に高い親和力で結合する方式として、標的分子と相互作用するアプタマーの選別と（2）その選択された核酸の増幅の組み合わせを通称するために、本願において混用される。前記SELEX工程は、特定標的又はバイオマーカーに対して高い親和力を有するアプタマーを識別するために用いられることができる。

30

【0088】

SELEXは、一般に、核酸の候補物質混合物を製造する段階、親和複合体（affinity complex）を形成するために、所望の標的分子に候補物質混合物を結合させる段階、結合されていない候補物質核酸から親和複合体を分離する段階、親和複合体から核酸を分離及び単離する段階、核酸を精製する段階、特定アプタマー配列を増幅する段階を含む。選別されたアプタマーの親和力を更に改善させるために、前記工程を複数回実施することができる。前記工程は1つ又はそれ以上の工程ポイントにおいて増幅段階を含むことができる（例えば、「Nucleic Acid ligands」という題名のU.S. Patent No.5,475,096を参照）。前記SELEX工程は、標的に共有して結合するアプタマーだけでなく、標的に共有せずに結合するアプタマーを生成するために使用され得る（例えば、「Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment:Chemi-SELEX」という題名のU.S. Patent No. 5,705,337を参照）。

40

【0089】

前記SELEX工程は、例えば、生体内（in vivo）の安定性を向上させたり、又は運搬特性を向上させるために、アプタマーに向上した特性を付与する、変更されたヌクレオチドを含む高い親和性アプタマーを識別するために使用され得る。このような変更例は、リボース（ribose）及び/又はフォスフェイト（phosphate）及び/又は塩基位置における化学的置換を含む。SELEX工程で識別されたアプタマーは、ピリジンの5'-及び2'-の位置で化学的に変更されたヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチドについ

50

て記述している米国特許第5,660,985号(「High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides」)に記載されている。前記を参考とし、米国特許第5,580,737号は、2'-アミノ(2'-NH₂)、2'-フルオロ(2'-F)及び/又は2'-O-メチル(2'-OMe)で変更された1つ又はそれ以上のヌクレオチドを含む高特異性アプタマーについて記述している。また、SELEX及び光SELEXから拡張した物理及び化学的特性を有する核酸ライブラリー及びそれらの用途を記述している米国特許公開番号第2009/0098549号(「SELEX及びPHOTOSELEX」)を参考にすることができる。

【0090】

また、SELEXは、好ましいオフレート特性を有するアプタマーを識別するために用いられることができる。標的分子に結合できるアプタマーを生成するための、向上したSELEX方法を記述している米国特許出願公開番号第2009/0004667号(「Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates」)を参考にすることができる。各標的分子からより遅い解離速度を有するアプタマー及び光アプタマーを生成するための方法が記載されている。前記方法は、標的分子と候補物質混合物を接触させる段階と、核酸-標的複合体を形成する段階と、遅いオフレート増幅工程を行う段階とを含み、ここで速い解離速度を有する核酸-標的複合体は解離され、再生成されないが、遅い解離速度を有する複合体は正常に維持される。付加的に、前記方法は、向上したオフレート性能を有するアプタマーを生成するために、候補物質核酸混合物の生成時に変更されたヌクレオチドの使用を含む。

【0091】

この検定法を変形し、アプタマーが標的分子に共有結合又は「光架橋(photocrosslink)」結合を行うことができるようにする光反応性作用基を含むアプタマーを用いる(例えば、U.S. Patent No. 6,544,776,「Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip」を参考)。この光反応性アプタマーは、光アプタマーとも呼ばれる(例えば、それぞれ「Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX」という題名のU.S. Patent NO. 5,763,177, U.S. Patent No. 6,001,577及びU.S. Patent No. 6,291,184;「Photoselection of Nucleic Acid Ligands」という題名のU.S. Patent No. 6,458,539を参照)。前記マイクロアレイがサンプルと接触した後、光アプタマーには標的分子に結合できる機会が与えられ、前記光アプタマーは光活性化し、固体支持体は非特異結合した分子を除去するために洗浄される。光アプタマー上の光活性化した作用基により生成された共有結合のために光アプタマーに結合されている標的分子は、一般に除去されないため、厳格な洗浄条件が使用される。この方法において、前記検定法は試料からバイオマーカーに対応するバイオマーカー値を検出可能にする。

【0092】

このような全ての検定フォーマットにおいて、前記アプタマーは、サンプルと接触する前に固体支持体上に固定される。しかし、特定環境においては、サンプルと接触する前にアプタマーが固定されると、最適の検定が行われなくなる恐れもある。例えば、アプタマーを固定化する前(pre-immobilization)は、恐らく長い反応時間による固体支持体表面上の標的分子とアプタマーの非効率的な混合を引き起こす恐れがあるので、標的分子にアプタマーが効率的に結合するように培養期間を長くする必要がある。その上、光アプタマーが検定法に用いられ、固体支持体として用いられた物質に依存する場合、前記固体支持体は、光アプタマーと標的分子との共有結合のために用いられる光を散乱させたり、又は吸収する傾向があり得る。更に、使用方法によって、固体支持体の表面は標識試薬に曝露される影響を受けられるため、アプタマーに結合した標的分子の検出精度が低下する恐れがある。最後に、一般に、固体支持体上のアプタマーの固定化は、サンプルにアプタマーを曝露する前にアプタマーを製造する段階(即ち、固定化)を含み、この製造段階はアプタマーの活性度や機能性に影響を及ぼし得る。

【0093】

アプタマーが、溶液において標的を捕獲できるようにした後、検出前にアプタマー-標

的混合物の特定成分を除去するように考案された分離段階を用いるアプタマー検定法も記述されている（「Multiplexed Analyses of Test Samples」という題名のU.S.Patent Application Publication 2009/0042206を参照）。前記アプタマー検定方法は、核酸（即ち、アプタマー）の検出及び定量化により、サンプルにおいて非核酸標的（例えば、タンパク質標的）の検出及び定量化を可能にする。前記方法は、非核酸標的を検出して定量化するための核酸サロゲート（surrogate）（即ち、アプタマー）を生成し、増幅段階を含む多様な核酸技術がタンパク質標的を含む、好ましい広範囲な標的に適用され得るようにする。

【0094】

アプタマーは、アプタマーバイオマーカ－複合体（又は光アプタマーバイオマーカ－共有結合複合体）から検定成分の分離を容易にし、検出及び/又は定量化のためのアプタマーの単離が可能に構成され得る。一実施形態において、この構造体はアプタマーの配列内に切断可能か、又は放出可能な要素を含むことができる。他の実施形態において、付加的な機能、例えば、標識されたり、又は検出可能な成分、スペーサ成分又は特定の結合タグ又は固定化要素をアプタマーに導入することができる。例えば、前記アプタマーは、切断可能な部分（moiety）、標識、標識を分離するスペーサ成分及び放出可能な部分を介してアプタマーに連結されたタグを含むことができる。一実施形態において、切断可能な構成要素は、光切断可能なリンカーである。前記光切断可能なリンカーは、ビオチン部分（biotin moiety）及びスペーサ部分に付着することができるほか、アミンの誘導体化のためNH₂基を含むことができ、アプタマーにビオチン基を導入する上で用いられることによって、その後検定方法によってアプタマーの放出が可能になる。

10

20

【0095】

溶液において、あらゆる検定成分を処理する均質検定法（homogenous assays）は、シグナルの検出前にサンプル及び試薬の分離を要しない。この方法は速度が速く、かつ使用し易い。この方法は特定標的と反応する分子捕獲又は結合試薬を基にシグナルを生成する。

【0096】

一実施形態において、シグナルの生成方法はフルオロフォアで標識された（fluorophore-labeled）捕捉試薬と特定バイオマーカ－標的の相互作用に起因する異方性シグナルの変化を利用する。前記標識された捕捉剤が標的と反応するとき、増加した分子量により複合体に付着されたフルオロフォアの回転運動が更に鈍くなる。異方性変化を観察することで、結合反応は溶液においてバイオマーカ－の定量的な測定に用いることができる。その他の方法としては、蛍光偏光検定法（fluorescence polarization assay）、分子ビーコン法（molecular beacon methods）、時分割蛍光消光法（time resolved fluorescence quenching）、化学発光（chemiluminescence）、蛍光共鳴エネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer）などが含まれる。

30

【0097】

生物学的サンプルにおいてバイオマーカ－に対応するバイオマーカ－値を検出するために使用できる例示的な溶液基盤のアプタマー検定法は、（a）第1タグを含み、バイオマーカ－に対して特異親和力を有するアプタマーと生物学的サンプルを接触することによって、混合物を製造する段階、ここでバイオマーカ－がサンプルに存在する場合、アプタマー親和複合体が形成され、（b）第1捕獲構成要素を含む第1固体支持体に前記混合物を曝露させ、第1タグを前記第1固体支持体に結合させる段階、（c）前記第1固体支持体に結合されない混合物の任意の成分を除去する段階、（d）前記アプタマー親和複合体のバイオマーカ－成分に第2タグを付着する段階、（e）前記第1固体支持体から前記アプタマー親和複合体を分離する段階、（f）前記分離されたアプタマー親和複合体を第2捕獲構成要素を含む第2固体支持体に曝露させ、第2タグを第2捕獲構成要素に結合させる段階、（g）前記アプタマー親和複合体から非錯体（non-complexed）アプタマーを分割することによって、混合物から任意の非錯体されたアプタマーを除去する段階、（h）前記固体支持体からアプタマーを溶出する段階、（i）前記アプタマー親和複合体のアプタマ

40

50

一成分を検出することによって、バイオマーカーを検出する段階を含む。

【0098】

前記アプタマー親和複合体のアプタマー成分を検出し、バイオマーカー値を検出するために、当業界において公知の方法を用いることができる。親和複合体のアプタマー成分を検出するために、多数の互いに異なる検出方法、例えば混成化検定 (hybridization assays)、質量分析 (mass spectroscopy) 又は QPCR のような検出方法が使用され得る。

一実施形態において、核酸塩基配列分析方法を、アプタマー親和複合体のアプタマー成分を検出し、バイオマーカー値の検出に用いることができる。簡単に言えば、試料は試料に存在する1つ又はそれ以上のアプタマーの配列を確認して定量するために、任意の種類の核酸塩基配列分析方法の対象になり得る。一実施形態において、前記配列はアプタマー分子全体又は前記分子を固有識別するために使用され得る分子の部分を含む。他の実施形態において、識別性塩基配列は、アプタマーに添加された特異的配列であり、このような配列は「タグ (tags)」、「バーコード (barcodes)」又は「ジップコード (zipcodes)」とも呼ばれる。一実施形態において、前記塩基配列分析方法は、アプタマー配列を増幅するか、又は化学的に変形された RNA 及び DNA を含む核酸を塩基配列分析に適切な他の種類の核酸へ変換させるための酵素的段階を含む。

10

【0099】

一実施形態において、前記塩基配列分析方法は、1つ又はそれ以上の複製段階を含む。他の実施形態において、前記塩基配列分析方法は、複製段階のない直接塩基配列分析方法を含む。

20

【0100】

一実施形態において、前記塩基配列分析方法は、試料において1つ又はそれ以上のアプタマーを標的とする特定プライマーを用いる直接接近法を含む。他の実施形態において、前記塩基配列分析方法は、試料に存在するあらゆるアプタマーを標的とする多項目同時接近法を含む。

【0101】

一実施形態において、前記塩基配列分析方法は、塩基配列分析のために標的化された分子を増幅するための酵素的段階を含む。他の実施形態において、前記塩基配列分析方法は、単一分子の配列を直接的に分析する。生物学的サンプルにおいてバイオマーカーに対応するバイオマーカー値の検出のために使用可能な例示的な核酸塩基配列の分析に基づく方法は、(a) 酵素的段階を用いて化学的に変更されたヌクレオチドを含むアプタマーの混合物を変更されていない核酸へ転換する段階、(b) その結果、生成された変更されていない核酸を、例えば、454塩基配列分析システム (454 Sequencing System) (454 Life Sciences/roche)、イルミナ塩基配列分析システム (Illumina Sequencing System) (Illumina)、ABI SOLiD塩基配列分析システム (Applied Biosystems)、ヘリスコープ単一分子シーケンサー (Heliscope Single Molecule Sequencer) (Helicos Biosciences)、又はパシフィックバイオサイエンスリアルタイム単一分子塩基配列分析システム (Pacific Biosciences Real Time Single Molecule Sequencing System) (Pacific BioSciences) 又はポロネータージー塩基配列分析システム (PolonatorG Sequencing System) (Dover Systems) のような超並列的塩基配列分析プラットフォーム (massively parallel sequencing platform) を用いて同時に多項目の塩基配列を分析する段階、(c) 特定配列と配列係数 (sequence count) により混合物に存在するアプタマーを識別して定量化する段階を含む。

30

40

(免疫検定法を用いたバイオマーカー値の測定)

【0102】

免疫検定方法は、対応する標的又は分析物に対する抗体の反応に基づき、特定検定フォーマットに依存してサンプルから分析物を検出することができる。免疫-反応性に基づいて検定方法の特異度及び感度を向上させるために、単クローン抗体が有する特異なエピトープを認識するために単クローン抗体がよく使われる。多重クローン抗体は、単クローン抗体に比べて標的に対して増加した親和力を有するため、多重クローン抗体も多様

50

な免疫検定法においてよく用いられている。免疫検定法は、広範囲な生物学的サンプルマトリックスと共に使用するように設計された。免疫検定法のフォーマットは定性的、反定量的、更に定量的結果を提供するように設計された。

【0103】

定量的結果は公知の濃度を有する、検出される特定分析物を用いて生成された標準曲線により生成される。未知のサンプルから得られた反応又はシグナルを標準曲線をもって表し、未知のサンプルにおいて標的に対応する量又は値が確立する。数多くの免疫検定フォーマットが設計されてきた。ELISA又はEIAは分析物を定量的に検出することができる。この方法は、分析物又は抗体の何れかに対する標識の付着に依存し、前記標識成分は直接又は間接的に酵素を含む。ELISAテストは分析物の直接、間接、競争的又はサンドウィッチ検出のためのフォーマットを備えることができる。他の方法は、例えば、放射性同位元素 (radioisotope) (125) 又は蛍光発光のような標識に依存する。付加的な技術は、例えば、凝集 (agglutination)、比濁法 (nephelometry)、混濁法 (turbidimetry)、ウェスタンブロッティング (Western blot)、免疫沈降法 (immunoprecipitation)、免疫細胞化学法 (immunocytochemistry)、免疫組織化学法 (immunohistochemistry)、フローサイトメトリー (flow cytometry)、ルミネックス検定法 (Luminex assay) 及びその他のものを含む (ImmunoAssay: A Practical Guide, edited by Brain Law, published by Taylor & Francis, Ltd., 2005 edition を参照)。

10

【0104】

例示的な検定フォーマットは、酵素-結合免疫吸着検定法 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA)、放射性免疫検定法 (radioimmunoassay)、蛍光 (fluorescent)、化学発光 (chemiluminescence) 及び蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer; FRET) 又は時分割蛍光共鳴エネルギー移動 (time resolved-FRET; TR-FRET) の免疫検定法を含む。バイオマーカーの検出方法の例は、バイオマーカー免疫沈降法に加えてゲル電気泳動法 (gel electrophoresis)、毛細管電気移動 (capillary electrophoresis)、平面電気クロマトグラフィー (planar electrochromatography) などのような、大きさ及びペプチドレベルの区別を可能にする定量的方法を含む。

20

【0105】

検出可能な標識又はシグナル発生物質を検出及び/又は定量化する方法は標識の特性に依存する。適切な酵素により触媒化された反応産物は (ここで検出可能な標識が酵素である場合、前記を参照) 制限なしに蛍光性、発光性又は放射性であり得るか、それらは可視光線又は紫外線を吸収できる。このような検出可能な標識の検出に適した検出器の例は、制限なしに X 線フィルム、放射能計測器、閃光計測器、分光光度計、比色計、蛍光計、発光計及び濃度測定計を含む。

30

【0106】

検出方法は製造、処理及び反応に対し、適切な分析が可能なフォーマットで行うことができる。これは、例えば、多重-ウェル検定プレート (例えば、96 ウェル又は384 ウェル) や適切なアレイ又はマイクロアレイを用いることができる。多様な試薬のための保存溶液は手動で又は機械的に作ることができ、その後の全てのピペット操作、希釈、混合、分配、洗浄、培養、サンプルの判読、データの収集及び分析を常用分析ソフトウェア、ロボット工学及び検出可能な標識を検出できる検出機械を用いて機械的に完了することができる。

40

(遺伝子発現プロファイリングを用いたバイオマーカー値の測定)

【0107】

生物学的サンプルにおいて mRNA 測定は、前記生物学的サンプルで対応するタンパク質レベルの検出のためのサロゲートとして使用され得る。従って、本願に記載された任意のバイオマーカー又はバイオマーカーパネルもまた適切な RNA 検出により検出され得る。

【0108】

mRNA 発現レベルは、逆転写重合酵素連鎖反応 (reverse transcription quantitati

50

ve polymerase chain reaction;RT-PCR) (qPCRによるRT-PCR)により測定される。RT-PCRは、mRNAからcDNAを生成するのに用いられる。前記cDNAはDNAの増幅過程において、蛍光を生成するためにqPCRで使用され得る。標準曲線に比べ、qPCRは細胞当たりmRNA複製の数のような絶対測定値を生成することができる。毛細管電気移動と組み合わせられたノーザンブロッティング(Northern blots)、マイクロアレイ、インベダー検定法(invader assay)及びRT-PCRの何れもサンプルにおいてmRNAの発現レベルを測定する上で用いられている(Gene Expression Profiling:Method and Protocols, Richard A. Shimkets, editor, Humana Press, 2004を参照)。

【0109】

miRNA分子は非暗号化されているが、遺伝子の発現をコントロールする小型RNAである。mRNA発現レベルの測定に適した方法も対応miRNAに対して使用され得る。最近、多くの研究所で疾病に対するバイオマーカーとしてmiRNAsの使用について研究している。数多くの疾病が広範囲な転写調節(transcriptional regulation)を伴い、miRNAがバイオマーカーとしての役割を果たすことは驚くべきことではない。miRNA濃度と疾病との関連性は、時にタンパク質レベルと疾病との関連性よりも明確ではないが、miRNAバイオマーカーの値は実質的であり得る。もちろん、病気にかかっている間に異なって発現するRNAの場合のように、試験管内での(in vitro)診断製品を開発する際に直面する問題には、miRNAが異常細胞から生き残り、分析用として容易に抽出されたり、又はmiRNAが測定され得るほど十分に長く生き残る血液あるいは他のマトリックス内へ放出される要件を含む。たとえば、多数の潜在的なバイオマーカーが病中に傍分泌方式(paracrine fashion)により病理及び機能部位に意図的に分泌されるとしても、タンパク質バイオマーカーも類似の要件を有する。数多くの潜在的なタンパク質バイオマーカーがタンパク質が合成される細胞の外側で機能するように設計される。

(生体内の分子映像技術を用いたバイオマーカーの検出)

【0110】

前述されたバイオマーカーは、分子画像テストにも使用され得る。例えば、イメージング剤は非小細胞肺癌の診断を補助するために、疾病の進行/快方又は転移、疾病の再発、又は他の用途で治療に対する反応を観察するために使用され得る前述したバイオマーカーと結合され得る。

【0111】

生体内の映像化技術は、個人の身体において特定疾病の状態を判断するための非浸潤的方法を提供する。例えば、身体の全ての部分又は全身を3次元画像で検査することができ、これにより、身体の形態や構造に関する非常に有益な情報が得られる。このような技術は個人の癌の状態、特に非小細胞肺癌の状態に関する情報を提供するために、本願に記載されたバイオマーカーの検出と組み合わせることができる。

【0112】

多様な技術の発展に伴い、生体内分子画像技術の使用が広がっている。このような技術の発展には、身体内で強力なシグナルを提供できる放射性標識及び/又は蛍光性標識のような新しい造影剤(contrast agent)の開発及び有用な情報を提供するために優れた感度と正確性を有する、身体の外部からこのようなシグナルを検出し、分析できる強力な新しいイメージング技術の開発が含まれる。前記造影剤は、適切な画像システムにより顕在化することができ、造影剤の位置する身体の部分の画像が提供される。前記造影剤は、アプタマー又は抗体のような捕捉試薬、例えば、ペプチド又はタンパク質又は(例えば、遺伝子発現の検出のための)オリゴヌクレオチド、又は1つ又はそれ以上の巨大分子(macromolecules)及び/又は他の微粒子形態(particulate forms)を有するものを含む複合体と結合することができる。

【0113】

また、前記造影剤は、画像化に有用な放射性元素の特徴を有することができる。適切な放射性元素は、シンチグラフィ(scintigraphic)の研究のためのテクネチウム-99m

10

20

30

40

50

(technetium-99m)又はヨード-123 (iodine-123)を含む。その他、容易に検出可能な部分は、例えば、ヨード-123、ヨード-131 (iodine-131)、インジウム-111 (indium-111)、フッ素 (fluorine-19)、炭素-13 (carbon-13)、窒素-15 (nitrogen-15)、酸素-17 (oxygen-17)、ガドリニウム (gadolinium)、マンガン (manganese)又は鉄 (iron)のような磁気共鳴画像 (MRI)のためのスピン標識 (spin label)を含む。このような標識は、当業界において周知されており、当業者らにより容易に選択され得る。

【0114】

標準映像技術は、磁気共鳴画像、コンピュータ断層撮影 (computed tomography scanning)、陽電子放射形コンピュータ断層撮影 (positron emission tomography;PET)、単一光子放射断層撮影 (single photon emission computed tomography;SPECT)などを含むが、これに限定されない。診断的生体内の画像化のための、使用可能な検出器具の類型は標的 (タンパク質、mRNAなど)として用いられる、与えられた放射性核種 (radionuclide)及び特定バイオマーカーのような、与えられた造影剤を選択する上で主な因子となる。一般に、選択された前記放射性核種は、器具の与えられた形態により検出可能な崩壊 (decay)類型を有する。また、生体内の診断のための放射性核種を選択する際、半減期は標的組織により最大吸収 (uptake)時間に検出され得るだけ十分に長くなければならないが、宿主に有害な放射能が最小限に止まるように十分に短くなければならない。

10

【0115】

映像技術の例は、放射性核種が個人に対して総合的 (synthetically)又は局部的 (locally)に投与される映像技術であるPET及びSPECTを含むが、これに限定されない。その後、放射性核種の吸収は時間が経つにつれて測定され、標的化された組織及びバイオマーカーに関する情報を得るために使われる。用いられた特定同位元素の高エネルギー (ガンマ-レイ)の放出及びこれの検出に用いられる器具の感度と精巧性 (sophistication)のため、放射性核種の2次元分布は身体外部で推論することができる。

20

【0116】

PETにおいて一般に、用いられる陽電子放出核種 (positron-emitting nuclides)は、例えば、炭素-11 (carbon-11)、窒素-13 (nitrogen-13)、酸素-15 (oxygen-15)及びフッ素-18 (fluorine-18)を含む。電子捕獲 (electron capture)及び/又はガンマ線放出により崩壊される同位元素はSPECTに使われ、例えば、ヨード-123及びテクネチウム-99mを含む。テクネチウム-99mを用いてアミノ酸を標識するための例示的な方法は、テクネチウム-99m-化学走性ペプチド結合体 (technetium-99m-chemotactic peptide conjugate)を形成するために2つの機能を有するように変更された (bifunctionally modified)化学走性ペプチドの金属結合基と順次反応する不安定なテクネチウム-99m-前駆複合体 (technetium-99m-precursor complex)を形成するための、キレート性前駆体の存在のもとでの過テクネチウム酸塩 (pertechnetate ion)の還元である。

30

【0117】

このような生体内の画像診断方法のために、抗体をよく用いる。生体内の診断のための抗体の製造及び使用は、当業界においてよく知られている。表2に示す任意のバイオマーカーに特異に結合する、標識された抗体は個人の疾病の状態を診断したり、又は評価するための目的で用いられた特定バイオマーカーによって検出可能な、特定種類の癌 (例えば、非小細胞肺癌)を持っていると疑われる個人に注入され得る。用いられた標識は、上述したように、用いられる画像化手法によって選択されるはずである。標識の位置により癌の範囲を測定することができる。また、器官又は組織内での標識の量によりその器官又は組織での癌の有無を決定することができる。

40

【0118】

同様に、アプタマーは、このような生体内の画像診断方法に用いることができる。例えば、表2に記載の特定バイオマーカーの識別のために用いられるアプタマーは、(従って、前記特定バイオマーカーに特異に結合する)適切に標識されることができ、個人の非小

50

細胞肺癌の状態を診断したり、又は判断するために、特定バイオマーカーにより検出可能な非小細胞肺癌を持っていると疑われる個人に注入される。用いられた標識は、上述したように、用いられた画像化手法に応じて選択される。標識の位置で癌の範囲を測定することができる。また、器官又は組織内での標識の量でその器官又は組織での癌の有無を決定することができる。アプタマー-誘導イメージング剤 (aptamer-directed imaging agents) は他のイメージング剤に比べ、組織浸入 (penetration)、組織分布 (distribution)、動力学 (kinetics)、除去 (elimination)、効能 (potency) 及び感性に関連する固有の、有利な特性を有することができる。

【0119】

これらの技術は、また、例えば、逆配列 (antisense) オリゴヌクレオチドを用いる画像化による遺伝子発現を検出するために、標識されたオリゴヌクレオチドを用いて選択的に行うことができる。これらの方法は、例えば、標識として蛍光性分子又は放射性核種を用いて、インサイチュハイブリダイゼーション (in situ hybridization) に用いられる。遺伝子発現を検出するための他の方法は、例えば、レポーター遺伝子 (reporter gene) 活性の検出を含む。

10

【0120】

その他の一般的な映像化技術は、被験者内部の蛍光シグナルが被験者外部にある光学器具により検出される光学画像化である。このシグナルは、実際の蛍光及び/又は生物発光 (bioluminescence) に起因し得る。光学検出器具の感度の向上により、生体内の診断を検定するための光学画像化の有用性が増えた。

20

【0121】

例えば、新しい癌治療を試みる際に、臨床的な効果をより迅速に測定する臨床実験及び/又は多発性硬化症 (multiple sclerosis) のようにプラシーボを用いる長期治療が倫理的に問題となり得る疾病において、プラシーボを用いた長期治療を避けるための臨床実験などにおいて、生体内分子バイオマーカーの画像化の使用が増えている。

【0122】

その他の技術をレビューする上で、n. Blow, Nature Methods, 6,465-469,2009を参照することができる。

(組織学的/細胞学的方法を用いたバイオマーカー値の測定)

【0123】

非小細胞肺癌を評価するために、多様な組織サンプルを組織学的又は細胞学的方法に用いることができる。サンプルは、主要腫瘍の位置及び転移部位によって選別する。例えば、末端気管支 (endo-bronchial) 及び経気管支 (trans-bronchial) 生検、細針吸引 (fine needle aspirates)、切断針 (cutting needles) 及び中心部生検 (core biopsy) は組織学に用いることができる。気管支洗浄液及びブラッシング (brushing)、肋膜吸引 (pleural aspiration) 及び喀痰 (sputum) は細胞学に用いることができる。細胞学的分析は、依然として非小細胞肺癌の診断に用いられる反面、組織学的方法は癌の検出に更に高い感度を提供すると知られている。非小細胞肺癌にかかっている個人において上向き調整されると現れた、本願で確認された任意のバイオマーカーは疾病の標識 (indicator) として組織学的サンプルの染色に用いることができる。

30

40

【0124】

一実施形態において、対応する(各)バイオマーカーに特異な1つ又はそれ以上の(各)捕捉試薬が肺組織細胞サンプルの細胞学的評価に用いられ、次の何れか1つ又はそれ以上を含むことができる:細胞サンプルの収集、細胞サンプルの固定 (fixing)、脱水 (dehydrating)、水洗い (clearing)、顕微鏡スライド上への細胞サンプルの固定化 (immobilizing)、細胞サンプルの透過性の増進 (permeabilizing)、分析物の復旧 (analyte retrieval) のための処理 (treating)、染色 (staining)、脱色 (destaining)、洗浄 (washing)、遮断 (blocking) 及び緩衝溶液において1つ又はそれ以上の(各)捕捉試薬と反応させること。一実施形態において、前記細胞サンプルは細胞ブロック (block) から生成される。

50

【0125】

他の実施形態において、対応するバイオマーカーに特異な1つ又はそれ以上の(各)捕捉試薬が肺組織サンプルの組織学的な評価に用いられ、次の何れか1つ又はそれ以上を含むことができる:組織サンプルの収集、組織サンプルの固定、脱水、水洗い、顕微鏡スライド上への組織サンプルの固定化、組織サンプルの透過性の増進、分析物の復旧のための処理、染色、脱色、洗浄、遮断、再水和(rehydrating)及び緩衝溶液において(各)捕捉試薬との反応。一実施形態において、固定及び脱水は凍結(freezing)で代替される。

【0126】

他の実施形態において、対応する(各)バイオマーカーに特異な1つ又はそれ以上の(各)アダプターは、組織又は細胞サンプルと反応させ、核酸の増幅方法において核酸標的として提供され得る。適した核酸の増幅方法は、例えば、PCR、q-ベータレプリカーゼ(q-beta replicase)、ローリングサークル増幅(rolling circle amplification)、鎖置換(strand displacement)、ヘリカーゼ依存増幅法(helicase dependent amplification)、ループ介在等温増幅(loop mediated isothermal amplification)、リガーゼ連鎖反応(ligase chain reaction)、及びローリングサークル増幅をサポートする制限(restriction)及び環状化(circularization)を含む。

10

【0127】

一実施形態において、組織学的又は細胞学的な評価に用いるために、対応するバイオマーカーに特異な1つ又はそれ以上の(各)捕捉試薬は任意の次のもの:遮断物質(blocking materials)、競合阻害物質(competitors)、洗剤(detergents)、安定化剤(stabilizers)、運搬核酸(carrier nucleic acid)、多価の陰イオン物質(polyanionic materials)などを含むことができる緩衝溶液に混合される。

20

【0128】

「細胞学プロトコル(cytology protocol)」は、一般に、サンプルの収集、サンプルの固定、サンプルの固定化及び染色を含む。「細胞製造(cell preparation)」は、製造された細胞の染色のための1つ又はそれ以上の遅いオフセットのアダプターの使用を含む、サンプル収集後の複数の工程段階を含むことができる。

【0129】

サンプル収集は処理されていない運搬容器にサンプルを直接入れること、一定の種類の培地が入っている運搬容器にサンプルを入れること、又は任意の処理又は固定なしにスライド上へ直接サンプルを置くこと(固定化)を含むことができる。

30

【0130】

サンプルの固定化(immobilization)は、ポリリシン(polylysine)、ゼラチン(gelatin)又はシラン(silane)で処理されたガラススライドに収集されたサンプルの一部を貼り付けることで、改善することができる。スライドは、スライド全域に薄く、平坦な細胞層を塗抹(smearing)することで製造することができる。一般に、機械的変形(mechanical distortion)及び乾燥人工物(drying artifact)を最小限にとどめるように注意する。液状サンプルは細胞ブロック方法で処理することができる。又は、代案として、液状サンプルは常温で約10分間、固定溶液と1:1で混合することができる。

【0131】

細胞ブロックは、残余滲出液(residual effusion)、喀痰(sputum)、尿沈渣(urine sediment)、胃腸液(gastrointestinal fluid)、肺液(pulmonary fluid)、細胞スクレイピング(cell scraping)又は細針吸引により生成することができる。細胞は、遠心分離又は膜ろ過により濃縮されるか、パッケージングされる。細胞ブロックを製造するための多くの方法が開発されている。代表的な方法として、沈殿物固定(fixed sediment)、細菌性寒天(bacterial agar)、又は膜ろ過方法が挙げられる。沈殿物の固定方法において、細胞沈殿物はブアン(Bouins)、ピクリン酸(picric acid)、又は緩衝ホルマリン(buffered formalin)のような固定液と混合された後、前記混合物は固定化された細胞をペレット化するために遠心分離される。できる限り、完全に細胞ペレットを乾燥して上層液を除去する。ペレットを収集してレンズペーパー(lens paper)で包んだ後、組織

40

50

カセット (tissue cassette) に入れる。前記組織カセットを追加の固定液と共にボトルに入れ、組織サンプルと同様に処理する。寒天法 (agar method) は非常に類似しているが、ペレットが除去され、ペーパータオル上で乾燥された後、半切にする。切り取った側をガラスライド上の溶解された寒天 1 滴に載せ、前記ペレットを寒天のなかで確実に泡が生成されないように寒天で覆う。前記寒天を固めた後、任意の余分の寒天を取りのける。これを組織カセットに入れれば、組織処理は完了する。代案として、前記ペレットは 65 で 2% 寒天溶液に直接懸濁することができ、サンプルは遠心分離される。前記寒天細胞ペレットを 4 で 1 時間凝固させる。前記固体寒天は、遠心分離チューブから除去されることができ、折半に分離され得る。前記寒天をろ過ペーパーで覆い、組織カセットに入れる。この時点の前の処理は前記に記載された通りである。遠心分離は、膜ろ過と共に任意のこのような方法で代替することができる。任意のこのような方法は「細胞ブロックサンプル (cell block sample)」の製作に用いることができる。

10

【0132】

細胞ブロックは、ローウェクリル樹脂 (Lowicryl resins)、LR ホワイト (LR White)、LR ゴールド (LR Gold)、ユニクリル (Unicryl) 及びモノステップ (MonoStep) を含む特性化された樹脂を用いて製造することができる。これらの樹脂は低粘度を有し、低い温度で紫外線を用いて重合することができる。包埋処理 (embedding process) は、脱水中にサンプルを漸進的に冷却させて、樹脂にサンプルを移し、最後に適切な UV 波長で低い温度でブロックを重合させることに依存する。

20

【0133】

細胞ブロックセクション (cell block sections) は、細胞形態学検査 (cytomorphological examination) のために、ヘマトキシリン-エオシンで染色することができ、同時に付加的な断片は特定マーカーに対する検査のために用いられる。

【0134】

前記工程が組織学的工程であるか、又は細胞学的工程であるかにかかわらず、前記サンプルはサンプルの分解を予防するために、付加的な処理を行う前に固定化することができる。この処理は「固定 (fixation)」と呼ばれ、混用され得る広範囲な物質及び方法を説明する。サンプル固定プロトコル及び試薬は、検出される標的と分析される特定細胞/組織を基に経験的に選択する。サンプルの固定はエタノール (ethanol)、ポリエチレングリコール (polyethylene glycol)、メタノール (methanol)、ホルマリン (formalin) 又はイソプロパノール (isopropanol) のような試薬に依存する。前記サンプルは、できる限りスライドに収集及び添加された後、即時固定されなければならない。しかし、選別された固定液は後続検出を更に難しくする多様な分子標的に構造的変化をもたらすことができる。固定及び固定化処理及びこれらの順序は細胞の外形を変更させることができ、このような変化を細胞を検査する者が予想し、認識しなければならない。固定液は特定の細胞類型を収縮させることができ、細胞質が顆粒状 (granular) 又は網様 (reticular) を呈するようにすることができる。数多くの固定液が細胞成分と架橋結合することで機能する。これは、特定のエピトープを損傷させたり、又は変更させ、新たなエピトープを生成することができる上、分子集合 (molecular associations) をもたらし、膜透過性を減少させることがある。ホルマリンの固定は、最も一般的な細胞学的/組織学的な方法の一つである。ホルマリンは、タンパク質周辺又はタンパク質内においてメチルブリッジ (methyl bridge) を形成する。沈殿 (precipitation) 又は凝固 (coagulation) も固定のために使われ、エタノールはこのようなタイプの固定によく用いられる。架橋結合 (crosslinking) 及び沈殿の組み合わせも固定のために用いることができる。強い固定処理は、形態学的な情報を保全する最善の方法である一方、弱い固定処理は分子標的の保存に最善の方法である。

30

40

【0135】

代表的な固定液は 50% 無水エタノール、2 mM ポリエチレングリコール (PEG)、1.85% ホルムアルデヒドである。この成分配合 (formulation) 上の変化はエタノール (50% ~ 95%)、メタノール (20% - 50%) 及びホルマリン (ホルムアルデヒド

50

）単独を含む。他の一般的な固定液は2%PEG1500、50%エタノール及び3%メタノールである。スライドは、常温で約10～15分間固定液に放置した後、除去して乾燥する。一応、スライドが固定されると、PBSのような緩衝溶液で洗い落とすことができる。

【0136】

広範囲な染料が細胞、芽細胞及び組織の特徴又は形態学的な構造を差別的に強調して比較したり、又は「染色(stain)」に用いることができる。ヘマトキシリン(hematoxylin)は、核を青色又は黒色に染める際に用いられる。オレンジG-6(Orange G-6)及びエオシニアズール(eosin azure)、何れも細胞の細胞質を染色する。オレンジGはケラチン(keratin)及びグリコーゲン(glycogen)含有細胞を黄色に染色する。エオシンYは核小体(nucleoli)、繊毛(cilia)、赤血球(red blood cells)及び表在性扁平上皮細胞(superficial epithelial squamous cells)の染色に用いられる。ロマノフスキー染色(romanowsky stains)は自然乾燥された(air dried)スライドに用いられ、多形成を増加させ、細胞質内(intracytoplasmic)物質から細胞外物質を区別する上で有用である。

10

【0137】

染色過程は、染色に対する細胞の透過性を増加させるための処理を含むことができる。洗剤(detergent)を用いた細胞の処理は、透過性を増加させる上で使用され得る。細胞及び組織の透過性を増加させるために、固定されたサンプルは溶媒(solvents)、サポニン(saponins)又は非イオン性洗剤(non-ionic detergents)により更に処理され得る。酵素的分解(enzymatic digestion)も組織サンプルにおいて特定標的への接近性を向上させることができる。

20

【0138】

染色の後、前記サンプルはアルコール濃度が増加する、連続的なアルコール洗いにより脱水される。最後の洗浄は、キシレン(xylene)又はスライドに用いられるカバースリップに近接した屈折率を有するシトラステルペン(citrus terpene)のようなキシレン代用物を用いて完了する。この最後の段階は水洗い(clearing)と呼ばれる。一応、サンプルが脱水、水洗いされると、封止剤(mounting medium)を用いる。前記封止剤はガラスに近接した屈折率を有するものを選択し、スライドにカバースリップをくっつけることができる。これは、また細胞の付加的な乾燥、収縮又は衰退(fading)を抑制するはずである。

30

【0139】

用いられた染色又は処理と関係なく、肺細胞サンプルの最終評価は、形態の外観検査(visual inspection)及びマーカーの存否の決定を可能にする特定タイプの顕微鏡による観察で行われる。例示的な顕微鏡方法は、明視野(brightfield)、位相差(phase contrast)、蛍光(fluorescence)及び微分干渉観察(differential interference contrast)を含む。

【0140】

検査後のサンプル上に第2のテストが要求されると、カバースリップを除去することができ、スライドは脱色させる。脱色(destaining)は、もともと追加の染料なしに、本来の染色過程の逆順でスライドを染色する上で用いられたオリジナル溶媒システム(original solvent system)を用いることを含む。脱また、脱色は細胞が無色になるまで酸性アルコールにスライドを浸すことで完了することができる。一応、無色のスライドを水槽でよく洗い、第2の染色処理を適用する。

40

【0141】

また、特定分子の識別は、抗体又は核酸プローブ又はアプタマーのような特定分子試薬の使用による細胞形態学的分析と共に実施することができる。これは診断細胞学の精度を向上させる。顕微解体(micro-dissection)は、特に異常なクロモソーム(abnormal chromosomes)、遺伝子発現(gene expression)又は変異(mutations)に対する更なる評価のための細胞のサブセットの単離に用いることができる。

【0142】

50

組織学的評価のための組織サンプルの製造は、固定 (fixation)、脱水 (dehydration)、浸入 (infiltration)、包埋 (embedding) 及び断片化 (sectioning) を含む。組織学で用いられる固定試薬は、細胞学で用いられるものと非常に類似しているか、又は同一であり、個々のタンパク質のような分子特徴を犠牲にし、形態学的特徴を保存するといった同一の問題を有する。もし、組織サンプルが固定されず、脱水されたものの、その代りに凍結された後、凍結中に断片化されるならば、時間の節約が可能である。これは、もう少し緩やかな処理方法であり、より多くの個々のマーカーを保存することができる。しかし、凍結は氷晶の生成により芽細胞情報が失われるため、組織サンプルの長期間保存に適していない。凍結された組織サンプル内の氷は、更に非常に薄いスライスを生成する断片化工程を妨げる。ホルマリン固定だけでなく、四酸化オスミウム (osmium tetroxide) も固定に用いられ、燐脂質燐 (膜) を染色する。

10

20

30

40

50

【0143】

組織はアルコールの濃度を増加させながら、連続的に洗浄、脱水される。水洗いはアルコール及び包埋物質と混ざる物質を用い、アルコール:水洗い促進剤 (clearing agent) (キシレン又はキシレン代用品) の割合を 50:50 からスタートする段階的工程を含む。浸入 (infiltration) は、まず組織を 50:50 の包埋試薬:水洗い促進剤において、さらに 100% 包埋試薬において、液体形態の包埋試薬 (ワームワックス (warm wax)、ニトロセルロース溶液 (nitrocellulose solution)) と共に培養するものを含む。包埋はモールド又はカセットに組織を位置させ、ワックス、寒天又はゼラチンのような溶解された包埋試薬を詰めることで完成する。前記包埋試薬を固める。固まった組織サンプルは、その後染色及び後続実験のために薄い断片に切断され得る。

【0144】

染色の前に、組織断片はワックスが除去され、再脱水される。キシレンは断片のワックスの除去に用いられ、1回又はそれ以上キシレンを取り替えることができ、組織は濃度を減らしたアルコールで連続的に洗浄することで、再脱水される。ワックスを除去する前に、組織断片は約 20 分間約 80°C でガラススライドに熱固定化することができる。

【0145】

レーザー捕獲顕微解体 (laser capture micro-dissection) は、組織断片から追加分析のための細胞のサブセット単離を可能にする。

【0146】

細胞学でと同じく、顕微鏡的特徴の顕在化を強化するために、組織断片又はスライスは多様な染色剤で染色することができる。多様な種類の常用染色剤が特異な特徴を強化させたり、又は識別するために使用され得る。

【0147】

細胞学的 / 組織学的サンプルと分子試薬の相互作用を一層増進するために、「分析物復旧 (analyte retrieval)」に向けた多くの技術が開発された。まずこのような最初技術は、固定されたサンプルを高温で加熱する。また、この方法は、熱-誘導エピトープ復旧 (heat-induced epitope retrieval) 又は HIER と称する。スチーム加熱 (steam heating)、電子レンジ加熱 (microwaving)、高圧殺菌 (autoclaving)、恒温水槽 (water bath) 及び加圧蒸煮 (pressure cooking) 又はこれらの加熱方法の組み合わせを含む、多様な加熱技術が用いられてきた。分析物復旧溶液は、例えば、水、クエン酸塩 (citrate) 及び一般の食塩水緩衝液 (saline buffers) を含む。分析物復旧の核心は高温での時間であるが、長期間にわたるより低い温度もよく用いられる。分析物を復旧する上でもう 1 つの核心は加熱溶液の pH である。低い pH は最適の免疫染色を提供すると知られているが、また、時には陰性対照群として第 2 組織断片の使用を要するバックグラウンドを生じさせる。(バックグラウンドを増加させることなく、免疫染色を増加させる) 最も強力なメリットは、一般に、緩衝組成物にかかわらず、高い pH 溶液を用いて得られるということにある。特定標的のための前記分析物の復旧工程は、工程の最適化のためのパラメータとして、熱、時間、pH 及び緩衝組成物を用いて経験的に最適化される。マイクロ波分析物の復旧方法を用いると、抗体試薬で互いに異なる標的に対する連続的な染色が可能であ

る。しかし、染色段階において、抗体と酵素複合体の完成に要される時間は、また細胞膜の分析物を低下させることが分かった。マイクロ波の加熱方法は、インサイチューハイブリダイゼーション (in situ hybridization) 方法においても改善される。

【0148】

分析物の復旧工程を開始するために、まず断片のワックスを除去して脱水させる。その後、スライドを皿やボトル中の pH 6.0 の 10 mM クエン酸ナトリウムバッファに浸ける。代表的な方法としては、1100 W のマイクロ波を用いて、2 分間 100 % 電力でスライドを電子レンジで加熱した後、溶液中で依然としてスライドカバーがされているかを確認した後、18 分間 20 % 電力を用いてスライドを電子レンジで加熱する。その後、スライドを、ふたのない容器で冷却させた後、蒸留水で洗い落とした。免疫化学的試薬に対する標的の反応性を向上させるために、HIER を酵素分解と共に用いることができる。

10

【0149】

このような酵素分解プロトコルは、プロテアーゼ K (proteinase K) を用いる。20 μ g / ml 濃度のプロテアーゼ K を 50 mM トリス塩、1 mM EDTA、0.5 % トリトン X-100、pH 8.0 のバッファとして製造する。前記工程はまず各 5 分ずつ、キシレンを 2 回置き換え、断片のワックスを除去することを含む。その後、サンプルをそれぞれ 3 分間 100 % エタノール 2 回、それぞれ 1 分間 95 % 及び 80 % エタノールで水和させ、蒸留水で洗い落とす。断片をプロテアーゼ K 作用液 (working solution) で覆い、湿ったチャンバーにおいて 37 °C で 10 ~ 20 分間培養する (最適の培養時間は組織形態及び固定化の程度に応じて変わることができる)。前記断片を 10 分間常温で冷却させた後、2 分間 2 回にわたって PBS ツイーン 20 (PBS Tween 20) で洗い落とす。もし、所望するならば、内在性化合物及び酵素からの潜在的な干渉を取り除くために、断片を遮断することができる。その後、前記断片を常温で 1 時間又は 4 °C で一晩中 1 次抗体希釈バッファに適切に希釈し、1 次抗体と共に培養する。前記断片を 2 分間 2 回にわたって PBS ツイーン 20 で洗い落とす。もし、特別な適用が必要であれば、付加的な遮断を行った後、2 分間 3 回にわたって PBS ツイーン 20 で追加的に洗い落とした後、最後に免疫染色プロトコルを完了する。

20

【0150】

常温での 1 % SDS を用いた簡単な処理も免疫組織学的染色を向上させることが分かった。分析物の復旧方法は、スライドで覆われた断片だけでなく、自由流動断片においても適用され得る。他の処理オプションには pH 6.0 のクエン酸 0.1 N nonidet P40 を含む容器にスライドを漬かし、95 °C で加熱することがある。その後、PBS のような緩衝溶液で前記スライドを洗浄する。

30

【0151】

組織の免疫学的染色のために、血清又は脱脂粉乳 (non-fat dry milk) のようなタンパク質溶液に断片を浸けることで、組織タンパク質と抗体との非特異結合を防ぐ上で有用である。

【0152】

遮断反応 (blocking reaction) は、内在性ヌクレアーゼ (endogenous biotin) のレベルを低減させ、内因性の電荷効果 (endogenous charge effects) を除去し、内在性のヌクレアーゼ (endogenous nucleases) を不活性化させ / させたり、ペルオキシダーゼ (peroxidase) 及びアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase) のような内在性酵素を不活性化させる必要があり得る。内在性ヌクレアーゼは、プロテアーゼ K を用いた分解によって、熱処理によって、EDTA 又は EGTA のようなキレート剤を用い、運搬体 DNA 又は RNA の導入によって、ウレア (urea)、チオウレア (thiourea)、グアニジン塩酸塩 (guanidine hydrochloride)、グアニジンチオシアン酸塩 (guanidinetiocyanate)、過塩素酸リチウム (lithium perchlorate) など、又は二炭酸ジエチル (diethyl pyrocarbonate) のようなカオトロピック (chaotrope) で処理することで、不活性化することができる。アルカリホスファターゼは常温で 5 分間 0.1 N HCl で処理するか、1 mM レバミゾール (levamisole) で処理することで、不活性化することができる。ペルオ

40

50

キシダーゼの活性度は0.03%過酸化水素(hydrogen peroxide)で処理することで、除去することができる。内在性ビオチンは、スライド又は断片を常温で少なくとも15分間アビジン(avidin)溶液(ストレプトアビジン(streptavidin)、ニュートラアビジン(neutravidin)をその代わりに使用することができる)に浸けることで、遮断することができる。その後、前記スライド又は断片をバッファで少なくとも10分間洗浄する。洗浄は、少なくとも3回繰り返すことができる。その後、前記スライド又は断片を10分間ビオチン溶液に浸ける。これは毎回新しいビオチン溶液を用いて少なくとも3回にわたって繰り返すことができる。バッファの洗浄方法を繰り返す。遮断プロトコルは、細胞又は組織構造、又は(各)関心標的の損傷を予防するために最小限に使われなければならないが、これらプロトコルの1つ又はそれ以上は、1つ又はそれ以上の遅いオフレートアダプターと共に反応する前に、スライド又は断片を「遮断」するために組み合わせることができる(Basic Medical Histology:the Biology of Cells, Tissues and Organs,authored by Richard G. Kessel, Oxford University Press, 1998を参照)。

10

(質量分析方法を用いたバイオマーカー値の測定)

【0153】

多様な構成の質量分析器がバイオマーカー値を検出するのに使用され得る。多様な種類の質量分析器が使用可能であるが、多様な構成を有するように生産され得る。一般に、質量分析器は次のような主要構成要素を有する:サンプル流入口(inlet)、イオン供給源(ion source)、質量分析器(mass analyzer)、検出器(detector)、真空システム(vacuum system)及び器具-制御システム(instrument-control system)及びデータシステム(data system)。一般に、サンプル流入口、イオン供給源及び質量分析器の差が器具の形態と特性を定義する。例えば、前記流入口は、毛管カラム液体クロマトグラフィー供給源(capillary-column liquid chromatography source)や、マトリックス支援レーザー脱離(matrix-assisted laser desorption)に用いられるのと同じの直接プローブ(direct probe)又はステージ(stage)であり得る。通常のイオン供給源は例えば、ナノスプレー(nanospray)及びマイクロスプレー(microspray)を含むエレクトロスプレー(electrospray)又はマトリックス支援レーザー脱離である。通常の質量分析器は、四重極型質量フィルタ(quadrupole mass filter);イオントラップ質量分析器(ion trap mass analyzer)及び飛行時間型質量分析器(time-of-flight mass analyzer)を含む。追加的な質量分析方法は当業界においてよく知られている(Burlingame et al., Anal. Chem. 70:647R-716R(1998);Kinter and Sherman, New York(2000)を参照)。

20

30

【0154】

タンパク質バイオマーカー及びバイオマーカー値は、任意の下記:電子スプレーイオン化質量分析法(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)、ESI-MS/MS、ESI-MS/(MS)ⁿ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)、シリコン上での脱離/イオン化(desorption/ionization on silicon, DIOS)、二次イオン質量分析(secondary ion mass spectroscopy, SIMS)、四重極型飛行時間(quadrupole time-of-flight;Q-TOF)、ウルトラフレックス(ultraflex)III TOF/TOFと呼ばれるタンデム型飛行時間(tandem time-of-flight)(TOF/TOF)技術、大気圧化学イオン化質量分析法(atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry;APCI-MS)、APCI-MS/MS、APCI-(MS)^N、大気圧光イオン化質量分析法(atmospheric pressure photoionization mass spectrometry;APPI-MS)、APPI-MS/MS及びAPPI-(MS)^N、四重極型質量分析法(quadrupole mass spectrometry)、フーリエ変換質量分析法(Fourier transform mass spectrometry;FTMS)、定量的質量分析法(quantitative mass spectrometry)及びイオントラップ質量分析法(ion trap mass spectrometry)によって検出されて測定され得る。

40

【0155】

50

サンプル製造戦略は、タンパク質バイオマーカーの質量分析的特性化及びバイオマーカー値の検出前にサンプルを標識し、量を増やすのに用いられる。標識方法は、相対的、かつ絶対的な定量のための等圧タグ (isobaric tag) (isobaric tag for relative and absolute quantitation; iTRAQ) 及び細胞培養におけるアミノ酸を用いた安定した同位元素標識 (stable isotope labeling with amino acid in cell culture; SILAC) を含むが、これに限定されない。質量分析的分析の前に、候補バイオマーカータンパク質のためのサンプルを選択的に強化するために用いられる捕捉試薬はアプタマー、抗体、核酸プローブ、キメラ、小分子、F (a b ')₂ フラグメント、一本鎖抗体フラグメント (single chain antibody fragment)、Fv フラグメント (Fv fragment)、一本鎖 Fv フラグメント (single chain Fv fragment)、核酸 (nucleic acid)、レクチン (lectin)、リガンド結合受容体 (ligand-binding receptor)、アフィボディ (affibodies)、ナノボディ (nanobodies)、アンキリン (ankyrins)、ドメイン抗体 (domain antibodies)、オルタナティブ抗体スキャフォールド (alternative antibody scaffolds) (例えば、ダイアボディ (diabodies) など)、刷込高分子 (imprinted polymer)、アヴィメール (avimers)、ペプチド模倣体 (peptidomimetics)、ペプトイド (peptoids)、ペプチド核酸 (peptide nucleic acid)、トレース核酸 (threosenucleic acid)、ホルモン受容体 (hormone receptor)、サイトカイン受容体 (cytokine receptor)、及び合成受容体 (synthetic receptors) 及びこれらの変更及びフラグメントを含むが、これに限定されない。

(近接結合検定法を用いたバイオマーカー値の測定)

【0156】

近接結合検定法 (proximity ligation assay) は、バイオマーカー値の測定に用いられることができる。簡単に言えば、試料は一对の抗体又は一对のアプタマーであり得る一对のアフィニティープローブ (affinity probe) と接触し、前記対の各構成成分はオリゴヌクレオチドに延長される。一对のアフィニティープローブに対する標的は、1つのタンパク質上の2つの区別される決定因子であるか、ホモ多量体の (homomultimeric) 又はヘテロ多量体の (heteromultimeric) 複合体として存在し得る2つの互いに異なるタンパク質それぞれの1つの決定因子であり得る。プローブが標的決定因子に結合するとき、オリゴヌクレオチド拡張子 (oligonucleotide extension) の遊離端 (free end) は互いに混成化されるのに十分な程度に隣接するように移動する。オリゴヌクレオチド拡張子が十分に近接するように位置したとき、これらの架橋としての役割を果たす共通連結オリゴヌクレオチド (common connector oligonucleotide) により、オリゴヌクレオチド拡張子が容易に混成化される。一応、プローブのオリゴヌクレオチド拡張子が混成化されると、拡張子の末端は酵素 DNA 結合により互いに結合される。

【0157】

オリゴヌクレオチド拡張子のそれぞれは、PCR増幅のためのプライマー部位を含む。一応、前記オリゴヌクレオチド拡張子が互いに結合されると、前記オリゴヌクレオチドはPCR増幅によって標的タンパク質のアイデンティティ (identity) 及び量 (amount) に関する情報だけでなく、標的決定因子が2つの相異なるタンパク質上にある場合、タンパク質-タンパク質の相互作用に関する情報を示す連続的なDNA配列を形成する。近接結合は、リアルタイムPCRを通じてリアルタイムタンパク質の濃度及び相互作用の情報のための高い感度及び特異度を有する検定法を提供できる。関心決定要素と結合しないプローブは対応するオリゴヌクレオチド拡張子を近接移動させず、如何なる結合やPCR増幅も行われることができず、その結果、如何なるシグナルも生成されない。

【0158】

前記検定法により、非小細胞肺癌の診断法に有用に用いられることができるバイオマーカー値の検出が可能になり、前記方法は、個人の生物学的サンプルで表2に提供されるバイオマーカーからなる群より選択されたバイオマーカーにそれぞれ対応する少なくともN個のバイオマーカー値を検出する段階を含む。以下に説明するように、バイオマーカー値を用いた分類は、前記個人が非小細胞肺癌を患っているか否かを表す。記載された非小細胞肺癌バイオマーカーのうち特定のバイオマーカーは、単独で非小細胞肺癌を検出して診

断するのに有用ではあるものの、それぞれ3つ又はそれ以上のバイオマーカーを含むパネルとして有用な多重非小細胞肺癌バイオマーカーサブセットを定める方法を本願に説明する。従って、本発明の多様な実施形態においては、N個のバイオマーカーを含む組み合わせを提供し、ここでNは少なくとも3つのバイオマーカーである。他の実施形態において、Nは2~59個のバイオマーカーのうち任意に選択される。Nは、前記記載された範囲で任意に選択され得るだけでなく、類似しているが、より高次の範囲を含むように選択され得る。本願に記載された方法によって、バイオマーカー値は個別に検出されて分類されることができ、又は、例えば、多重検定フォーマットのように、集合的に検出されて分類され得る。

【0159】

他の様相によれば、非小細胞肺癌の不在を検出する方法を提供する。前記方法は、個人の生物学的サンプルで表2に提供されるバイオマーカーの群から選択されるバイオマーカーにそれぞれ対応する少なくともN個のバイオマーカー値を検出する段階を含む。以下に詳細に説明するように、バイオマーカー値を用いた分類は、前記個人において非小細胞肺癌が不在であることを表す。記載された非小細胞肺癌バイオマーカーのうち特定のバイオマーカーは、非小細胞肺癌の不在を検出して診断するのに単独で有用ではあるものの、3つ又はそれ以上のバイオマーカーのパネルとしてそれぞれ有用な非小細胞肺癌バイオマーカーの多重サブセットの分類のための方法を本願に説明する。従って、本発明の多様な実施形態は、N個のバイオマーカーを含む組み合わせを提供し、ここでNは少なくとも3つのバイオマーカーである。他の実施形態において、Nは2~59個のバイオマーカーのうち任意に選択される。Nは、前記記載された範囲で任意に選択され得るだけでなく、類似しているが、より高次の範囲を含むように選択され得る。本願に記載された方法によって、バイオマーカー値は個別に検出されて分類されることができ、又は、例えば、多重検定フォーマットのように、集合的に検出されて分類され得る。

(バイオマーカーの分類及び疾病スコアの計算)

【0160】

付与された診断テストのためのバイオマーカー「シグネチャー (signature)」は一連のマーカーを含み、各マーカーは関心集団で互いに異なるレベルを有する。ここで、互いに異なるレベルとは、2つ又はそれ以上の群の個人に対する相異なるマーカーレベルの平均、或いは2つ又はそれ以上の群の相異なる変化、又はこれら2つの両方の組み合わせを指すことができる。最も単純な形態の診断テストのために、2つの群の何れかである正常群又は疾病群に個人の未知サンプルを割り当てる際にこれらマーカーを用いることができる。2つ又はそれ以上の群の何れかにサンプルを割り当てることを分類といい、このようなサンプル割当のために用いられる方法を分類器 (classifier) 又は分類方法 (classification method) という。この他に分類方法はスコアリング方法 (scoring method) ともいう。多くの分類方法が一連のバイオマーカー値から診断分類器 (diagnostic classifier) を構成するために利用され得る。一般に、区別しようとする2つの (又は複数の分類状態のためにはそれ以上のデータセット) 互いに異なる群内で個人から得られたサンプルを用いてデータセットを収集する教師あり学習技術 (supervised learning techniques) を利用すれば、分類方法が最も容易に遂行される。各サンプルの属するクラス (群又は集団) は予め知られているため、前記の分類方法は所望する分類反応を与えられるようにトレーニングすることができる。診断分類器を生産するために、教師なし学習技術 (unsupervised learning techniques) を利用することもまた可能である。

【0161】

診断分類器の開発に向けた通常の接近法は、決定木 (decision tree) と、バギング (bagging) + ブースティング (boosting) + フォレスト (forests) と、学習基盤規則推論と、パルツェン窓 (Parzen Window) と、線形モデル (linear models) と、記号論理学 (logistic) と、神経回路網 (neural network) 方法と、クラスタリング (unsupervised clustering) と、K-平均 (K-means) と、階層的上昇/下降 (hierarchical ascending/descending) と、半教師あり学習 (semi-supervised learning) と、プロトタイプ方法 (prototy

10

20

30

40

50

pe methods) と、最近傍 (nearest neighbor) と、カーネル密度推定 (kernel density estimation) と、サポートベクトルマシン (support vector machines) と、隠れマルコフモデル (hidden Markov models) と、ボルツマン学習 (Boltzmann Learning) とを含み、分類器は単純結合したり、特定の目的関数 (objective function) を最小化する方式で結合され得る。Pattern Classification, R.O. Duda, et al., editors, John Wiley & Sons, 2nd edition, 2001 及び The Elements of Statistical Learning-Data Mining, Inference, and Prediction, T. Hastie, et al., editors, Springer Science+Business Media, LLC, 2nd edition, 2009 を参照できれば、これらのそれぞれは全体が参照統合される。

【0162】

教師あり学習技術を用いて分類器を生成するために、トレーニングデータと呼ばれる一連のサンプルを獲得する。診断テストにおいて、トレーニングデータは、後から未知のサンプルが割り当てられる、互いに区分される群 (分類) からのサンプルを含む。例えば、対照群の個人と特定の疾病群の個人より収集されたサンプルは、未知のサンプル (又は、より詳しくは、サンプルが得られた個人) を疾病の存否により分類できる分類器の開発のために用いられるトレーニングデータを構成することができる。トレーニングデータから分類器を開発することを分類器をトレーニングするという。分類器トレーニングに対する特異的な細部事項は、教師あり学習技術の特性に関わっている。説明のために、トレーニング単純ベイズ分類器 (naive Bayesian classifier) の例を以下に説明する (例えば、Pattern Classification, R.O. Duda, et al., editors, John Wiley & Sons, 2nd edition, 2001 を参照; また、The Elements of Statistical Learning-Data Mining, Inference, and prediction, T. Hastie, et al., editors, Springer Science+Business Media, LLC, 2nd edition, 2009 を参照)。

【0163】

通常、トレーニングセットのサンプルよりも更に多くの潜在的バイオマーカー値が存在するため、オーバーフィッティング (over-fitting) を避けるよう注意を傾けなければならない。統計学的モデルが底辺の関係の代わりにランダムエラーやノイズを記述する場合、オーバーフィッティングが生じる。オーバーフィッティングは、例えば、分類器の開発に用いられるマーカーの数を制限し、マーカーの反応が互いに独立していると仮定した上、その使用された基礎統計学的モデルの複雑性を制限し、そして基礎統計学的モデルがデータに基づくものであることを保障するなどの様々な方法で避けることができる。

【0164】

一連のバイオマーカーを用いた診断テスト開発の例は、単純ベイズ分類器、バイオマーカーを厳格に独立して処理するとともに、ベイズ原理に基づいた単純確率分類器の適用を含む。それぞれのバイオマーカーは、各クラスで測定された RFU 値又はログ RFU 値 (相対的蛍光単位) に対するクラス-依存性確率密度関数 (probability density function; pdf) により記述される。1つのクラスで一連のマーカーに対するジョイント pdf (joint pdfs) は、各バイオマーカーに対する個人クラス-依存性 pdf の産物と仮定する。これに関連し、単純ベイズ分類器をトレーニングすることは、前記クラス-依存性 pdf を特性化するためのパラメータを選定すること (「パラメータ化 (parameterization) 」) に該当する。クラス-依存性 pdf に対する基礎モデルが使用され得るが、前記モデルは一般にトレーニングセットで観察されたデータに合わなければならない。

【0165】

具体的に、疾病クラスのバイオマーカー i に対する値 x_i を測定するクラス-依存性確率は

$$p(x_i | d)$$

と記載され、

$$\{ \tilde{\text{over}}(x) \} = (x_1, x_2, \dots, x_n)$$

10

20

30

40

50

値を持つ n 個のマーカ-を観察できる総単純ベイズ確率は

$$p(\{\tilde{x}\}_d) = \prod_{i=1}^n p(x_i | d)$$

と記載され、ここで個人 x_i は R F U 又はログ R F U で測定されたバイオマーカ-レベルである。未知に対する分類指定は、同一の測定値に対して疾病を患わない可能性（対照群）

$$p(c|\{\tilde{x}\})$$

と比較し、測定値

$$\{\tilde{x}\}$$

のある疾病を患う可能性

$$p(d|\{\tilde{x}\})$$

【0166】

を計算することによって容易になる。これらの可能性などの比率は、ベイズ原理を適用してクラス-依存性 $p(d|f)$ から計算されることができ、ここで $p(d)$ はテストに適切な集団における疾病の罹病率である。前記比率の両方の対数を取り、前記の単純ベイズクラス-依存性確率を代入すれば、下記の通りである。

【0167】

この形態は、対数尤度比（log likelihood ratio）と知られており、単に疾病の存在と疾病の不在に対する対数尤度（log likelihood）をいい、一次的に n 個のバイオマーカ-それぞれの対数尤度比の和からなる。これに対する最も単純な形態において、未知のサンプル（又はより詳しくは、前記サンプルが得られた個人）は前記比率が 0 よりも大きければ疾病がないものと分類され、前記比率が 0 よりも小さければ疾病を持つものと分類される。

【0168】

例示的な一実施形態において、クラス-依存性バイオマーカ- $p(d|f)$

$$p(x_i | c)$$

及び

$$p(x_i | d)$$

は、測定された R F U 値 x_i 、即ち μ_d 及び σ_d を用いた $p(x_i | d)$ に対して類似の式を有する R F U 値で正規又はログ-正規分布と仮定される。前記モデルのパラメーター化のためには、トレーニングデータから各クラス-依存性 $p(d|f)$ に対する 2 つのパラメーター、平均 μ 及び分散 σ^2 推定を行う必要がある。これは、例えば、最大尤度推定、最小自乗及び当業者に公知となった任意の方法を含む多数の方法で達成され得る。 μ と σ^2 に対する正規分布を前記に定義された対数尤度比に代入すれば、下記の通りである。

【0169】

まず、一連の μ と σ^2 がトレーニングデータと集団の疾病罹病率から各クラスの各 $p(d|f)$ に対して定義されると、前記ベイズ分類器が完全に決定され、これを測定値 $\{\tilde{x}\}$ を用いて未知のサンプルを分類する上で利用することができる。

【0170】

単純ベイズ分類器の性能は分類器を構成し、トレーニングに用いられたバイオマーカ-の数と特性による。単一バイオマーカ-は、下記の例 3 に定義されているように、前記バイオマーカ-の K S - 距離（Kolmogorov-Smirnov）によって作動するはずである。万が一、分類器性能指標（classifier performance metric）が受信者操作特性曲線下の面積（AUC）で定義されれば、完璧な分類器は 1 のスコアになるはずであり、ランダム分類器は平均的に 0.5 のスコアになるはずである。サイズ n と m の 2 つのセット A と B との K

10

20

30

40

50

S - 距離は

$$D_{n,m} = \sup_x |F_{A,n}(x) - F_{B,m}(x)|$$

の値で定義され、これら 2 つの経験累積分布関数 (empirical cumulative distribution function, cdf) 間の最大の差である。n 番の観察 X_i セット A に対する経験的累積分布関数は次の通りに定義され、ここで $I_{X_i}(x)$ は $X_i < x$ である場合、1 と同一であり、そうでなければ 0 と同一の表示関数 (indicator function) である。その意味上、この値は 0 と 1 との間であり、ここで KS - 距離 1 は経験的分布が重複しないことを表す。

【0171】

優れた KS 距離 (例えば、 > 0.3) を持つ後続マーカーを添加する場合、前記添加されたマーカーが第 1 マーカーに対して独立していれば、一般に分類性能が向上する。分類器スコアとして受信者操作特性曲線下の面積 (AUC) を使用すれば、貪欲アルゴリズム (greedy algorithm) の変化を伴う多くの高得点分類器を生成し易い。(貪欲アルゴリズムは、全域最適化 (global optimum) を発見する可能性のある各段階で局部的な最適の選択を行うメタヒューリスティクス (metaheuristic) 方法を解決する問題を遂行する任意のアルゴリズムである。)

10

【0172】

全ての単一分析物分類器は、潜在的なバイオマーカーの表から生成され、リストに添加される。次に、可能な限り、全ての第 2 分析物をそれぞれの保存された単一分析物分類器に添加し、新しいリスト上に所定個数の最上得点ペア (pair)、いわゆる、例えば 1000 を保存する。最上の 2 - マーカー分類器に対する前記新しいリストを用いて、全ての可能な 3 つのマーカー分類器を調べ、改めてこれらのうち最上の 1000 を保存する。前記スコアが安定状態 (plateau) に達するか、又は付加的なマーカーの添加によって低下し始めるまでこの過程を続ける。意図する用途に対する好ましい性能のために、収斂後に残っている高得点分類器を評価することができる。例えば、一診断的適用において、高い感度と適当な特異度を有する分類器は、適当な感度と高い特異度を有することよりも好ましくなり得る。他の診断的適用において、高い特異度と適当な感度を有する分類器がより好ましくなり得る。一般に、理想的な性能レベルは、特定の診断に適用する際に許容される偽陽性の数と偽陰性の数との間に存在しなければならないトレードオフ (trade-off) に基づいて選択される。このようなトレードオフは誤診、一般に偽陽性又は偽陰性の何れかの医学的結果に依存する。

20

30

【0173】

その他、様々な技術が当業界で知られており、単純ベイズ分類器を用いるバイオマーカーのリストから多くの潜在的分類器を生成する上で利用され得る。一実施形態において、いわゆる遺伝アルゴリズム (genetic algorithms) が前記に定義された適正スコアを用いて互いに異なるマーカーを組み合わせるのに利用され得る。遺伝アルゴリズムは、特に、非常に大きく、様々な集団の潜在的分類器を見つける上でかなり適している。他の実施形態において、いわゆる蟻コロニー最適化 (ant colony optimization) が一連の分類器を生成する上で使用され得る。例えば、他の進化的な方法に限らず、模擬アニーリング (simulated annealing) 及び他の確率的探索法 (stochastic search methods) を含む当業界

40

(臨床サンプルの獲得)

【0174】

バイオマーカーを選択するために、患者群及び対照群を図 1 と表 1 に記載された研究デザインによって収集した。患者群は、病期が 1 期 ~ 4 期の非小細胞肺癌を患うアジア人である。対照群は、健常者と非悪性肺結節を患う患者からなる。各サンプルは、静脈穿刺によって抽出し、血清は一般的なプロトコルによって獲得した。それぞれの血清は、零下 80 以下で凍結して保存した。

(候補バイオマーカーの測定)

50

【0175】

候補マーカーの測定のために、アプタマー基盤の重検定法を図2に示すように実施した。光で切断可能なリンカーを通じてビオチン・フラグメントを各アプタマーに連結する。簡単に言えば、修正アプタマー混合体を希釈の血清と混合し、3時間37で培養して平衡結合を行う。その後、前記混合液は、ストレプトアビジン(streptavidin)でコーディングされたプレートに移送され、ビオチン・タグを通じてアプタマータンパク質複合体をアプタマー上に捕獲するために30分間培養した。一連の洗浄段階を行い、サンプルから非結合タンパク質を除去した。その後、ビオチンを捕獲されたタンパク質にタグリングするために、アミン反応性のビオチン試薬を培養した。その後、紫外線を照射してアプタマータンパク質複合体を光切断反応によって解除した。上澄液は、ストレプトアビジン(streptavidin)でコーディングされた新たなプレートに移送され、ビオチン・フラグメントによって複合体をタンパク質上に捕獲するために培養した。一連の洗浄段階を行って非結合アプタマーを除去した。その後、捕獲されたアプタマーを溶出緩衝液で高pHにより解除して中性化した。溶出液は、検出プローブとルミネックス-ビード結合捕獲プローブと脱水反応を起こす。ルミネックス-ビード混合体は洗浄され、ルミネックス200器具を用いて測定され、データはルミネックス3.1ソフトウェアを用いて分析された。

10

(バイオマーカー値の調整(calibration))

【0176】

検定変化を最小化するために、3点QCサンプルをサンプルと共に測定した。3点は、検定法の検出範囲でタンパク質濃度の高レベル、中レベル及び低レベルを示す。QCサンプルは、血清とスパイクタンパク質(spiked protein)からなり、従来テストを行った名目値を確認した。各検定時にQCサンプルのテストを行い、QCサンプルで測定されたタンパク質の値を名目値と比較し、各タンパク質に対して調整因子を生成した。その後、検定の結果を調整因子を利用して調整した。

20

(非小細胞肺癌のためのバイオマーカーの選定)

【0177】

非小細胞肺癌のための小規模のバイオマーカーセットを選択するために、患者群と対照群の調整されたMFI値を比較し、累積分布グラフと各アプタマーに対するROC曲線を導出した(図4A~図4N)。各マーカーは、曲線下領域をテストして比較した。

(単純ベイズ分類器の確立)

30

【0178】

多数の変化量を単一のスコアとするために、単純ベイズ分類器を生成した。非小細胞肺癌のためのバイオマーカーリストから、7つのマーカーを選択して単純ベイズ分類器を構成した。単一タンパク質の測定のための単純ベイズ分類器を以下に説明する。タンパク質の測定値がxである場合、疾病を患う確率は $P(d|x)$ である。そして、タンパク質の測定値がxである場合、疾病を患わない確率は $P(c|x)$ である。 $P(d|x) > P(c|x)$ である場合、タンパク質レベルxは疾病に分類できる。

【0179】

ベイズ整理によって、

事後確率(posterior) = 尤度(likelihood) × 事前確率(prior) / 証拠(evidence)

40

【0180】

クラス-依存性確率密度関数、 $p(x_i|c)$ 及び $p(x_i|d)$ は、平均uと偏差s2により規定されるログ-ノーマル分布関数でモデリングされ、ここで x_i はバイオマーカーiに対する調整MFI値のログ値である。前記7つのバイオマーカーのpdfのための変数は表3に記載されており、正規pdfに適合したモデルと共に未加工データの一例は図3に示す。このようなモデルのための単純ベイズ分類は、次式で表され、ここで $p(d)$ は集団の疾病罹病率である。

【0181】

(数式1)

尤度比率(likelihood ratio) = $P(d|x) / P(c|x) = p(d) / (1 - p(d))$

50

) $\times P_i (p (x | d) / p (x | c))$

対数尤度比は、疾病の状態を区分するための単一スコアで用いられる。

[実施形態]

【0182】

下記例は、単なる例示的目的のために提供されており、添付の請求の範囲により定義される本願の範囲を制限しない。本願に記載されている全ての例は、当業者に周知された標準技術を利用して実施されている。下記例に示した一般的な分子生物学技術は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001) といった標準実験室マニュアルに記載されているように実施され得る。

10

(実施形態1: サンプルの製造)

【0183】

サンプルを製造するために、全血をレッドトップチューブ (red top tube) に保管しなければならない。全血を採取した後、血液が30分間凝固するようテストチューブを常温で正常に培養する。その後、冷蔵遠心分離器で10分間1,000 ~ 2,000 x gで遠心分離を行い、血清と血栓を分離することができる。遠心分離後、上層部の血清を直ちに清潔なチューブに移動させなければならない。サンプルは、処理過程で2 ~ 8 の温度で維持しなければならない。血清が現場で分析されなければ、前記血清を直ちに少量のアリコート (aliquot) で分注して零下20 以下で保存しなければならない。冷凍-解凍の周期は、多くの血清成分に致命的であるため、避けることが重要となる。溶血性、黄疸性、又は高脂血症のサンプルは、特定のテストを無効化することができる。

20

(実施形態2: 多重アプタマー検定法によるサンプルの分析)

【0184】

本実施形態は、表2に記載されている非小細胞肺癌バイオマーカーの識別のためのサンプルを分析するために用いられる多重のアプタマー検定法を記述する。これらの方法では、溶液を添加する度にピペットチップを交換した。

【0185】

更に、他の記載がない限り、大半の溶液の移動と洗浄液の添加は、BioTek EL406 洗浄器とディスペンサを用いた。他の記載がない限り、手作業でピペットする段階では8 - チャンネル P200 Pipette man (Rainin Instruments, LLC, Oakland, Calif.) を用いた。SB17 と呼ばれるカスタマイズバッファは内部で製作し、40 mM HEPES、101 mM NaCl、5 mM KCl、5 mM MgCl₂、及び pH 7.5 の 1 mM EDTA からなる。他の記載がない限り、全ての段階は常温で実施された。

30

【0186】

1. アプタマーストック溶液 (aptamer stock solution) の製造

2%、0.1% 及び 0.01% 血清のためのカスタマイズ・ストックアプタマー溶液を 1 x SB17、0.05% ツイン-20 で 2 x 濃度で製造した。

【0187】

これらの溶液を使用するまで、零下20 で保管した。検定する日、各アプタマー混合液は10分間37 で解凍し、10分間沸騰する水槽に置いて20分間25 に冷やし、各段階の間で活発な混合が起きた。加熱-冷却後、それぞれの 2 x アプタマー混合液 55 μ l を手作業で96-ウェルPCRプレートにピペッティングし、プレートをホイールで密封した。

40

【0188】

2. 検定サンプルの製造

零下80 で保管された凍結100%の血清アリコートを5分間、25 の水槽に入れた。解凍したサンプルを氷上に載置し、ゆっくりと渦流が起きるようにしておき、その後、再び氷上に載置した。

【0189】

50

20 u l 8-チャンネルピペットを用いて、3 u l サンプルを96-ウェルPCRプレートに移動させることにより、各ウェルには4 で適正なサンプル希釈液72 u l (1 x S B 17、0.02% ツイン-20) を入れ、4% サンプル液 (最終2 x) を準備した。数回ピペティングしてサンプルを混合した後、4% サンプル溶液4 u l を移動させて適正なサンプル希釈液76 u l と混合し、0.2% サンプル液 (最終2 x) が得られた。最後に、0.2% サンプル液6 u l を移動させてサンプル希釈液54 u l と混合し、0.02% サンプル液 (最終2 x) が得られた。サンプル希釈液を準備した後、各サンプル55 u l を平衡結合のために新しいPCRプレートに移動させた。

【0190】

3. 平衡結合

3つの加熱-冷却アプタマー溶液を体積55 u l の適正なサンプル希釈液に移動させた。サンプルとアプタマー溶液をピペティングして混合し、ホイルカバーを覆った。その後、前記プレートを3時間、37 の培養器に置いた。

【0191】

4. キャッチ1 (Catch 1)

平衡結合段階の後、アプタマー-サンプル混合液100 u l をストレプトアビジンでコーティングされた新しいプレートに移し、該プレートをサーモミキサ (thermomixer) に置いて、30分間 (800 r p mで) 混合しながら37 で培養した。光を避けるために、前記プレートをキャッチ1段階の間、覆っておいた。

【0192】

5. 自動化段階1: 洗浄、タギング

キャッチ1段階の後、前記プレートをE L 406 洗浄器とディスペンサに置いた。前記E L 406 洗浄器とディスペンサは、次の段階を実施するようにプログラム化されている: 吸収されない物質は吸引によって除去し、ウェルは1 m Mのデキストラン硫酸と500 u Mのビオチンを補充した300 u l の緩衝液P B 1で4回洗浄した。その後、ウェルを300 u l の緩衝液P B 1で更に3回洗浄した。

【0193】

緩衝液P B 1で新たに準備した1 m M N H S - P E G 4 - ビオチン溶液150 u Lをウェルに添加して5分間振りながら培養した。液体は吸引され、ウェルは10 m Mのグリセリンが補充された300 u l の緩衝液P B 1で8回洗浄した。1 m Mのデキストラン硫酸を補充した100 u l の緩衝液P B 1を添加した。

【0194】

6. 動的誘発 (kinetic challenge)、光切断及びキャッチ2

プレートをE L 406 洗浄器とディスペンサから取り出して20分間5 c m離れた紫外線光源 (L E D紫外線光源) の下に配置されたサーモミキサに載置した。前記サーモミキサは、800 r p m及びR Tにセッティングされた。5分間照射した後、サンプルを洗浄した新たなストレプトアビジン・コーティングプレートに手作業で移した。キャッチ2段階は10分間、800 r p m及び常温のサーモミキサで行われた。

【0195】

7. 自動化段階2: 洗浄、溶出

キャッチ2段階の後、前記プレートをE L 406 洗浄器とディスペンサに載置した。前記E L 406 洗浄器とディスペンサは、次の段階を実施するようにプログラムされている: 液体を吸引し、25%のプロピレン・グリコールを補充した300 u l の緩衝液P B 1で8回洗浄した。ウェルを300 u l の緩衝液P B 1で5回洗浄し、最終洗浄液を吸引した。100 u l のC A P S O溶出緩衝液を添加し、アプタマーを5分間振りながら溶出した。

【0196】

8. 溶出及び中性化

これらの自動化段階の後、前記のプレートをプレート洗浄器のデッキから取り出し、90 u l のサンプルアリコートを手作業で10 u Lの中性化緩衝液を含んでいるPCRプレ

10

20

30

40

50

ートのウェルに移した。

【0197】

9. ルミネックスの読み出し

微小球体 (microsphere) を浮遊させるために、60秒間微小球体のストック溶液に渦流を起こして超音波処理を施した。浮遊する微小球体は、1.5 x T M A C 混成化溶液で毎反応あたり2000個の微小球体に希釈され、渦流及び超音波処理を施して混合された。毎反応あたり33 u L のビード混合液を96-ウェルP C Rプレートに移した。1 x T E 緩衝液で15 n M ビオチン化された検出オリゴヌクレオチド・ストック7 u l を毎反応ごとに添加して混合した。中性化された検定サンプル10 u l を添加し、前記プレートをシリコンキャップマットシールで封じた。前記プレートをまず5分間96°Cで培養し、遺伝子増幅器で一晩の間に攪拌せずに50°Cで培養した。フィルタープレートを0.5% B S A が補充された0.005 x T M A C 混成化溶液で予め浸しておいた。前記の混成化反応によりサンプル全体をフィルタープレートに移した。前記混成化プレートは0.5% B S A が補充された0.005 x T M A C 混成化溶液75 u l で洗浄し、残存の物質はフィルタープレートに移した。サンプルを緩い真空下でフィルターリングした。前記フィルタープレートは、0.5% B S A が補充された0.005 x T M A C 混成化溶液75 u l で1回洗浄し、フィルタープレートにある微小球体はサンプル緩衝液で更に1回浮遊処理を施した。フィルタープレートは遮光して1000 r p m で5分間サーモミキサで培養した。その後、フィルタープレートを0.5% B S A を含む0.005 x T M A C 溶液で洗浄した。0.5% B S A を含む0.005 x T M A C 溶液で10 u g / m l S A P E 075 u l を各反応ごとに添加し、1時間1000 r p m で25 のサーモミキサで培養した。フィルタープレートを0.5% B S A を含む0.005 x T M A C 溶液で2回洗浄し、フィルタープレートにある微小球体は0.5% B S A を含む0.005 x T M A C 混成化溶液75 u l で更に1回浮遊処理を施し、X P o n e n t 3.0 ソフトウェアを稼動するルミネックス200器具上で分析した。7500 ~ 18000 の高P M T 調整及びダブレット判別器のセッティング下で、ビード類型当たりになくとも100個の微小球体を計数した。

(実施形態3：バイオマーカーの識別)

【0198】

検定変化を最小化するために、3点のQ C サンプルをサンプルと共に測定した。3点は、検定法の検出範囲でタンパク質濃度の高レベル、中レベル及び低レベルを示す。Q C サンプルは、血清とスパイクタンパク質 (spiked protein) からなり、従来テストを行った名目値を確認した。各検定時にQ C サンプルのテストを行い、Q C サンプルで測定されたタンパク質の値を名目値と比較し、各タンパク質に対して調整因子を生成した。調整因子を名目値 / テスト値と称することができる。その後、検定の結果を調整因子を利用して調整した。

【0199】

非小細胞肺癌のための小規模のバイオマーカーセットを選択するために、患者群と対照群の調整されたM F I 値を比較し、各アプタマーに対するR O C 曲線を導出した (図4 A ~ 図4 N)。各マーカーは、曲線下領域のテストを行って比較した。

(実施形態4：非小細胞肺癌のための単純ベイズ分類器トレーニング)

【0200】

多数の変化量を単一スコアとするために、単純ベイズ分類器を生成した。非小細胞肺癌のためのバイオマーカーリストから、7つのマーカーを選択して単純ベイズ分類器を構成した。単一のタンパク質の測定のための単純ベイズ分類器を以下に説明する。タンパク質の測定値が x であれば、疾病を患う確率は $P(d | x)$ である。そして、タンパク質の測定値が x である場合、疾病を患わない確率は $P(c | x)$ である。 $P(d | x) > P(c | x)$ であれば、タンパク質レベル x は疾病に分類され得る。ベイズ整理によって、事後確率 (posterior) = 尤度 (likelihood) x 事前確率 (prior) / 証拠 (evidence)

【0201】

クラス-依存性確率密度関数、 $p(x_i | c)$ 及び $p(x_i | d)$ は、平均 u と偏差 s

2により規定されるログ-ノーマル分布関数でモデリングされ、ここで x_i はバイオマーカー i に対する調整MFI値のログ値である。前記7つのバイオマーカーのpdfのための変数は表3に記載されており、正規pdfに適したモデルと共に未加工データの一例は図5A~図5Cに示す。このようなモデルのための単純ベイズ分類は、次式で表され、ここで $p(d)$ は集団の疾病罹病率である。疾病の尤度 $P(d|x)/P(c|x)$ は、下記のように表され得る。

【0202】

(数式1)

$$P(d|x)/P(c|x) = p(d) / (1 - p(d) \times \prod_i (p(x_i|d)/p(x_i|c)))$$

10

対数尤度比($P(d|x)/P(c|x)$)は、疾病の状態を区分するための単一スコアで用いられる。

【0203】

7-マーカー分類器のための変数は、表4に記載されているように算出された。更に、トレーニングされた分類器は、図5A~図5C及び図7に示すように、疾病区分性能を示した。

(実施形態5)

【0204】

診断性能が損なわれることなく、パネルに要求されるバイオマーカーの最小の個数を最適化するために、貪欲後方消去アルゴリズム(greedy backward elimination algorithm)を用いた。簡単に言えば、7つの6-マーカー分類器を構成したものの、前記7-マーカーモデルに比べて性能が劣った(図6A~図6G及び表6)。肺癌診断のためのパネルを単純化するために、最小個数のタンパク質により最適の性能を示すように最終7-マーカーモデルを選択した。

20

(実施形態6:7-マーカー分類器の検証)

【0205】

分類器の疾病区別性能を検証するために、テストを行わないサンプルをアプタマー基盤の多重検定法で測定した。7つのマーカーの測定値を7-マーカー分類器に適用し、これらはトレーニングセットのある類似するROC曲線を示した(図5A~図5C及び図7、表5)。

30

(実施形態7:従来の血液テストと性能比較、Cyfra 21-1)

【0206】

7-マーカー分類器の性能を比較するために、サンプル全部をCyfra 21-1 Elisaキットを用いてテストを行った。酵素-テストCyfra 21-1(DRG Instruments GmbH, Germany)は、一般のサンドウィッチプロトコルに沿って酵素免疫検定技術に基づく。Cyfra 21-1の濃度は、標準曲線から算出した。検定法の感度は、0.15 ng/mLであった。Cyfra 21-1のROC曲線を描いて7-マーカー分類器のROC曲線と比較した(図7A及び図7B)。

【0207】

前記分類器のAUCは、全ての非小細胞肺癌ケースで0.88、初期肺癌患者(1期及び2期)で0.83が観察された一方、Cyfra 21-1は全てのケースに対して0.72のAUC、初期肺癌患者には0.63のAUCが確認された(図7A及び図7B)。

40

【0208】

【表 1】

	トレーニングセット		検証セット	
	患者群	対照群	患者群	対照群
対象数	75	75	25	25
平均年齢 (歳)	61.4	58.4	61.16	59.2
中間年齢 (歳)	63	58	59	57
組織病理				
扁平上皮細胞癌	21		8	
腺癌	53		17	
大細胞癌	1			
病期				
1期	21		9	
2期	8		4	
3期	14		2	
4期	32		10	
性別				
男性	46	50	19	18
女性	29	25	6	7
喫煙履歴				
非喫煙者	27	28	7	9
現在喫煙者	22	26	9	7
過去喫煙者	26	21	9	9
良性結節		34		14

10

20

30

【0209】

【表 2】

タンパク質	名称
EGFR1	上皮成長因子受容体1 (epidermal growth factor receptor 1)
MMP7	マトリックスメタロプロテイナーゼ7 (matrix metallo-proteinase 7)
CA6	炭酸脱水酵素6 (carbonic anhydrase 6)
PTN	プレイオトロフィン (pleiotrophin)
CRDL1	コルジン様タンパク質1 (chordin-like protein 1)
IGFBP2	インスリン様成長因子結合タンパク質2 (insulin like growth factor binding protein 2)
MMP12	マトリックスメタロプロテイナーゼ12 (matrix metallo-proteinase 12)
CNDP1	カルノシンジペプチダーゼ (carnosine dipeptidase)
KIT	幹細胞成長因子受容体
SERPINF2	アルファ2-抗プラスミン (alpha2-antiplasmin)
CRP	C-反応性タンパク質 (C-reactive protein)
C9	補体成分9 (complement component 9)
SELL	L-セレクトイン (L-selectin)
SERPINA3	アルファ-1-アンチキモトリプシン (alpha-1-antichymotrypsin)

10

20

【0210】

【表 3】

タンパク質	ROC曲線 上のAUC	重要度	方向	説明
EGFR1	0.69	$p < 0.0001$	下	受容体チロシンキナーゼ
MMP7	0.61	$p = 0.02447$	上	細胞外気質の崩壊、セル増殖に対する肯定的な規制、コラーゲン分解代謝、フィブロネクチンを低下させる
CA6	0.7	$p < 0.0001$	下	二酸化炭素の可逆的水和反応、一炭素代謝 (one-carbon metabolism)、窒素代謝
KIT	0.56	$p = 0.1784$	下	デコイ受容体 (decoy receptor)
CRP	0.66	$p < 0.0001$	上	炎症性急性期反応物質、免疫反応物質
C9	0.73	$p < 0.0001$	上	炎症性急性期反応物質、細胞溶解MAC複合体の孔形成小単位
SERPINA3	0.66	$p < 0.0001$	上	セリンプロテアーゼ抑制剤 (serine protease inhibitor)、急性期反応及び組織恒常性の一部

10

20

【0211】

【表 4】

分析物	対照群		非小細胞肺癌	
	平均 (μ_c)	標準偏差 (σ_c)	平均 (μ_d)	標準偏差 (σ_d)
EGFR1	2.89	0.06	2.82	0.10
MMP7	2.60	0.16	2.74	0.31
CA6	2.26	0.16	2.04	0.22
KIT	1.81	0.10	1.77	0.10
CRP	2.86	0.38	3.34	0.68
C9	4.08	0.13	4.21	0.13
SERPINA3	2.84	0.11	2.96	0.17

30

40

【0212】

【表 5】

		陽性	陰性			
患者群	全体ケース	75	25	100	75.00%	感度
	トレーニング	58	17	75	77.30%	
	検証	17	8	25	68.00%	
	初期 (1期、2期)	26	16	42	61.90%	
	トレーニング	20	9	29	69.00%	
	検証	6	7	13	46.20%	
対照群	全体対照群	27	73	100	73.00%	特異度
	トレーニング	21	54	75	72.00%	
	検証	6	19	25	76.00%	
	良性結節	4	44	48	91.70%	
	トレーニング	4	30	34	88.20%	
	検証	0	14	14	100%	

10

【0213】

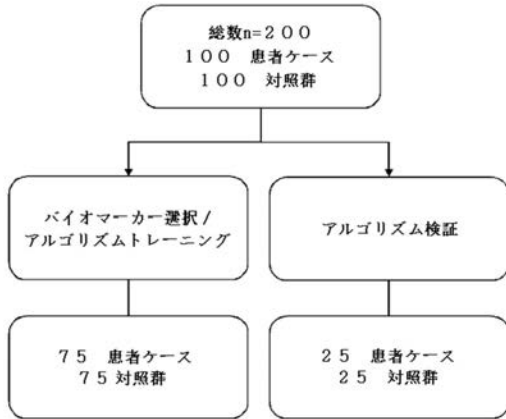
【表 6】

20

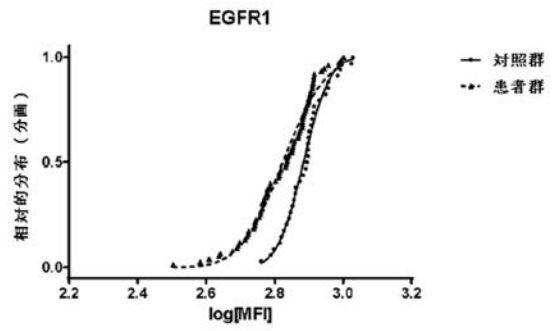
マーカー	75%感度における 特異度
EGFR1、MMP7、CA6、KIT、 CRP、C9、SERPINA3	91.70%
MMP7、CA6、KIT、CRP、C9、 SERPINA3	79.20%
EGFR1、CA6、KIT、CRP、C9、 SERPINA3	81.30%
EGFR1、MMP7、KIT、CRP、 C9、SERPINA3	62.50%
EGFR1、MMP7、CA6、CRP、 C9、SERPINA3	89.60%
EGFR1、MMP7、CA6、KIT、 C9、SERPINA3	87.50%
EGFR1、MMP7、CA6、KIT、 CRP、SERPINA3	89.60%
EGFR1、MMP7、CA6、KIT、 CRP、C9	89.60%

30

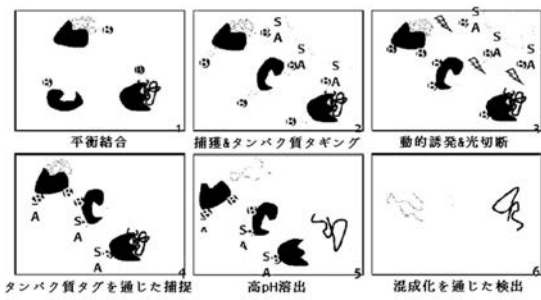
【 図 1 】



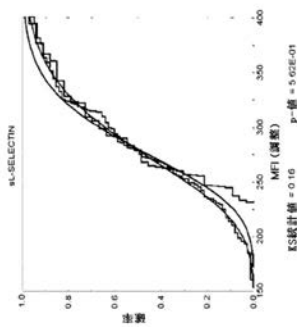
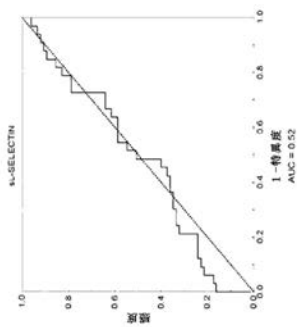
【 図 3 】



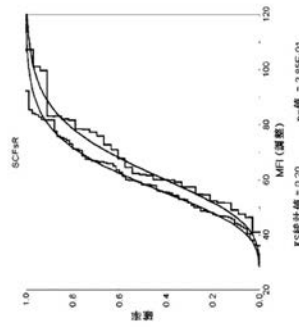
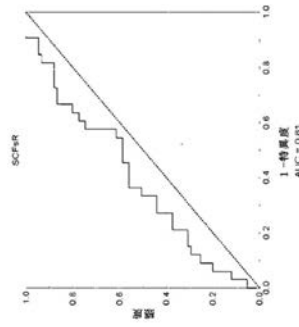
【 図 2 】



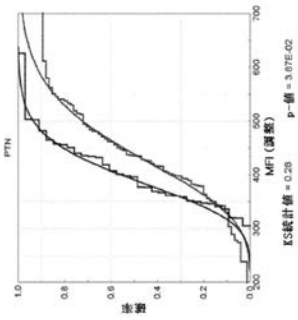
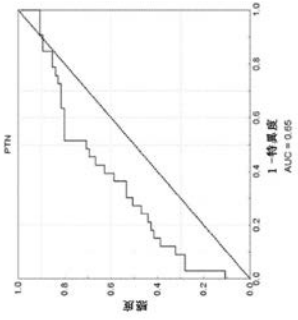
【 図 4 A 】



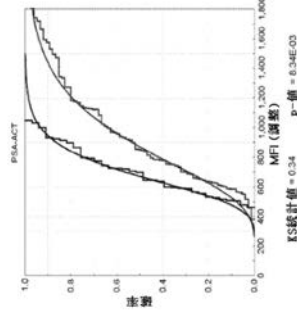
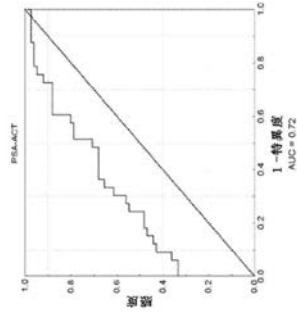
【 図 4 B 】



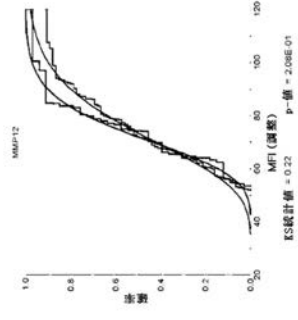
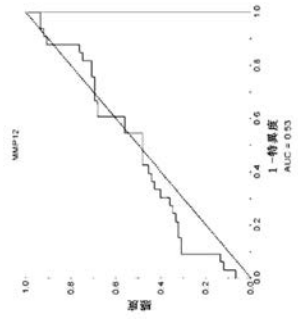
【 図 4 C 】



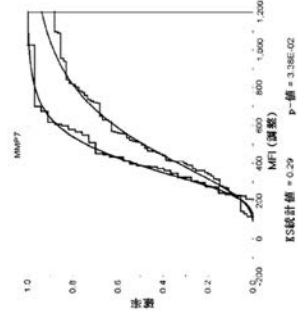
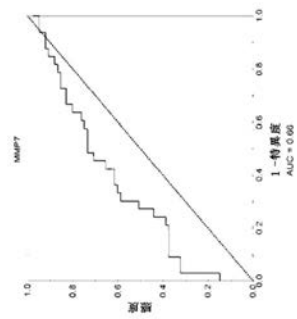
【 図 4 D 】



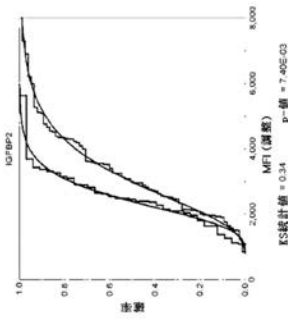
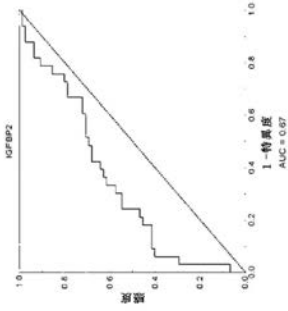
【 図 4 E 】



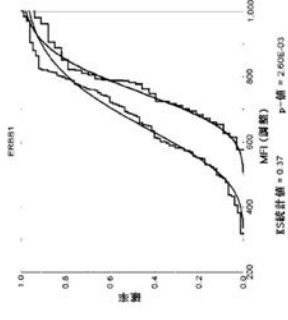
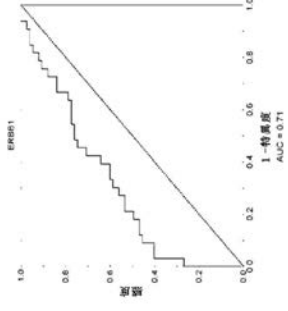
【 図 4 F 】



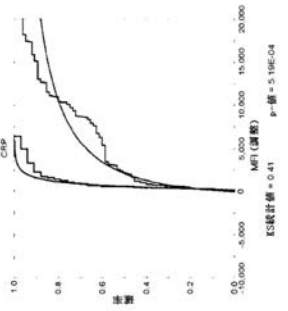
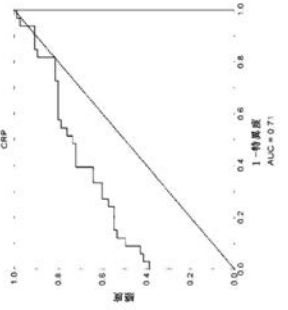
【 図 4 G 】



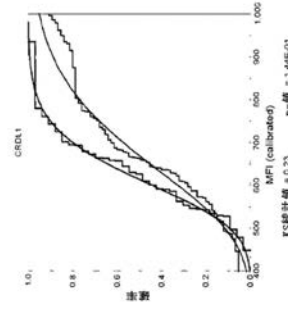
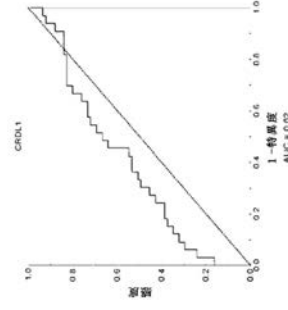
【 図 4 H 】



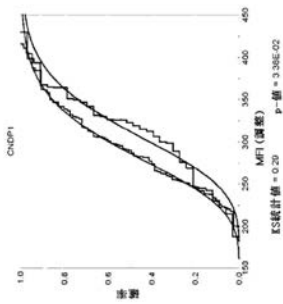
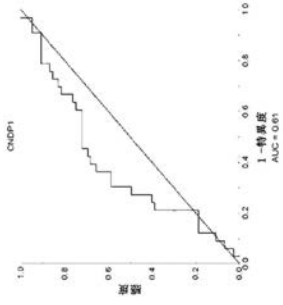
【 図 4 I 】



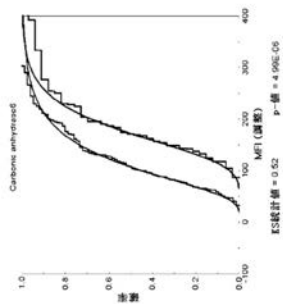
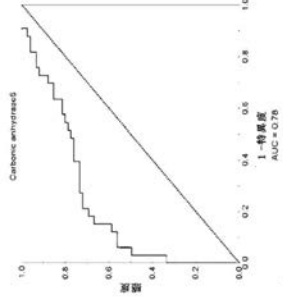
【 図 4 J 】



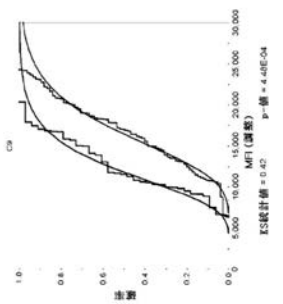
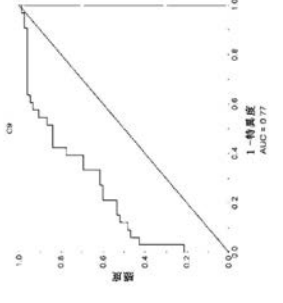
【 図 4 K 】



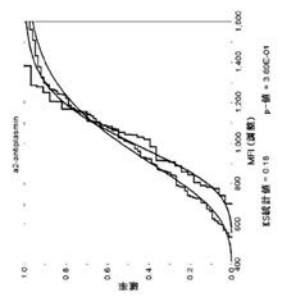
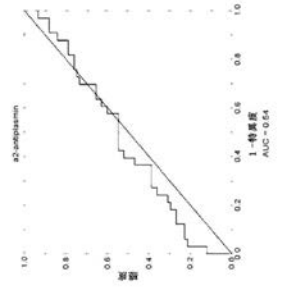
【 図 4 L 】



【 図 4 M 】

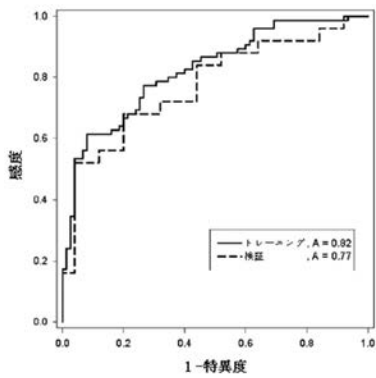


【 図 4 N 】



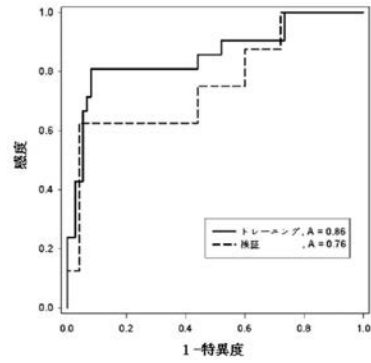
【図 5 A】

全体対照群に対する全体患者群



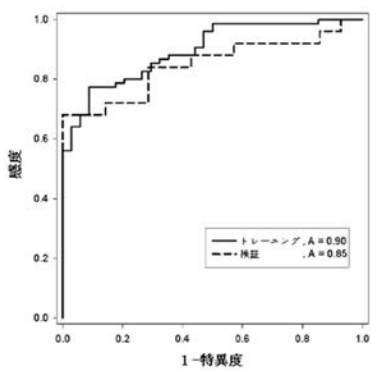
【図 5 C】

良性結節対照群に対する初期病期



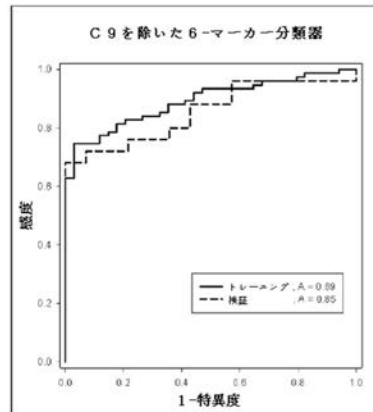
【図 5 B】

良性結節対照群に対する全体患者群



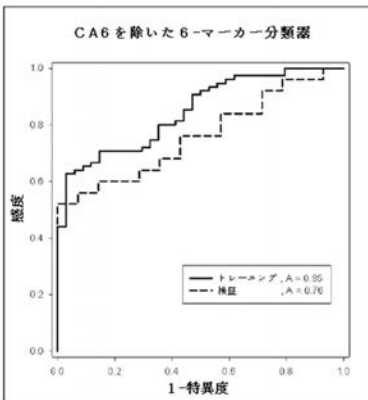
【図 6 A】

C 9を除いた6-マーカー分類器



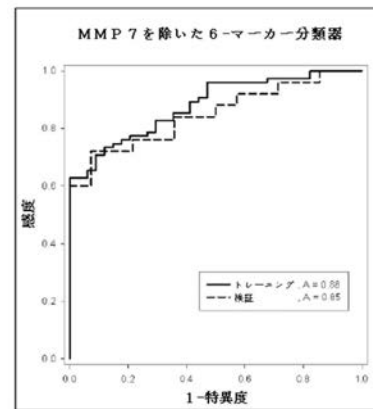
【図 6 B】

CA6を除いた6-マーカー分類器



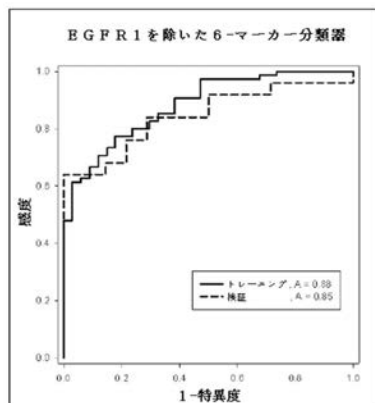
【図 6 D】

MMP 7を除いた6-マーカー分類器



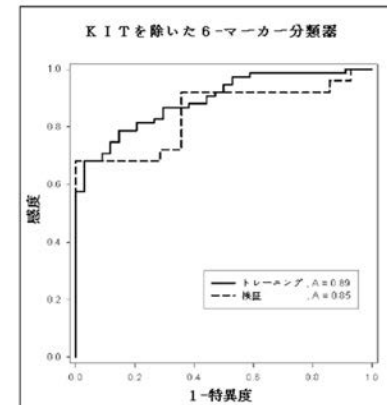
【図 6 C】

EGFR1を除いた6-マーカー分類器

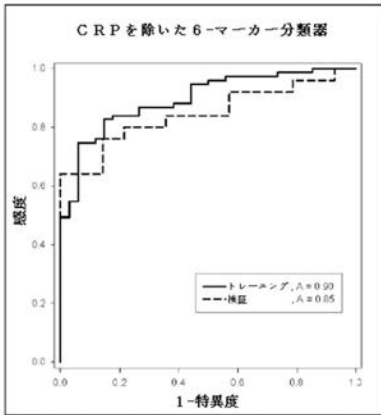


【図 6 E】

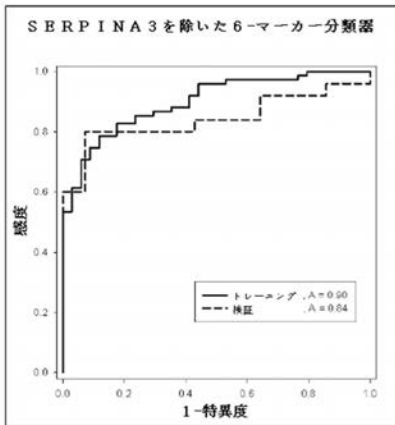
KITを除いた6-マーカー分類器



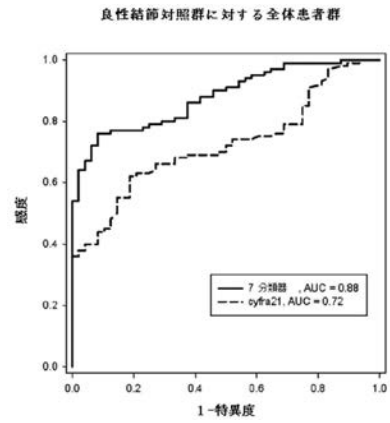
【 図 6 F 】



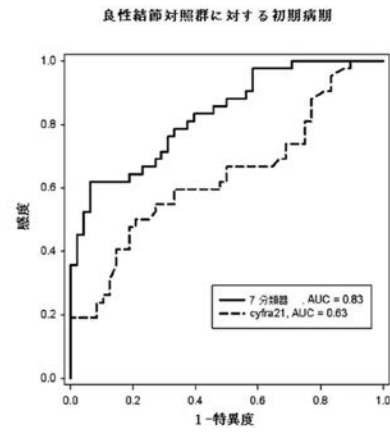
【 図 6 G 】





【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2015/009552
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/68; G06F 19/10; C07K 16/30; G01N 33/574; G01N 33/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords: non small cell lung cancer, biomarker, aptamer, serum, smoker, pulmonary malignant nodule, C9, CA6, CRP, EGFR1, MMP7, SERPINA3, KIT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013-062515 A2 (SOMALOGIC, INC.) 02 May 2013 See abstract; paragraphs [0024]-[0025], [0132], [0172]-[0180], [0232]; claims 1-18; Tables 1, 15.	1-28
X	WO 2010-030697 A1 (SOMALOGIC, INC.) 18 March 2010 See abstract; paragraph [00129]; claims 18-31.	1-28
A	WO 2013-152989 A2 (ETH ZURICH et al.) 17 October 2013 See abstract; claim 1.	1-28
A	WO 2011-015602 A2 (BIOSYSTEMS INTERNATIONAL SAS) 10 February 2011 See the whole document.	1-28
A	NADAL et al., 'A novel serum 4-microRNA signature for lung cancer detection' Scientific Reports, Vol.5, Article No.12464 (internal pages 1-9) (23 July 2015) See the whole document.	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 25 May 2016 (25.05.2016)		Date of mailing of the international search report 01 June 2016 (01.06.2016)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer KIM, Seung Beom  Telephone No. +82-42-481-3371

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/009552

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013-062515 A2	02/05/2013	AU 2011-378427 A1	16/05/2013
		AU 2011-378427 B2	16/07/2015
		CA 2847188 A1	02/05/2013
		CN 103890586 A	25/06/2014
		EP 2771692 A2	03/09/2014
		EP 2771692 A4	26/08/2015
		IL 231426 D0	30/04/2014
		JP 2015-501154 A	15/01/2015
		KR 10-2014-0082840 A	02/07/2014
		MX 2014004860 A	27/05/2014
		NZ 621733 A	29/05/2015
		SG 11201400375 A	28/04/2014
		WO 2013-062515 A3	17/04/2014
		WO 2010-030697 A1	18/03/2010
CN 102985819 A	20/03/2013		
CN 102985819 B	15/04/2015		
CN 104777313 A	15/07/2015		
EP 2591357 A2	15/05/2013		
EP 2591357 A4	01/01/2014		
JP 2013-532295 A	15/08/2013		
KR 10-2013-0129347 A	28/11/2013		
MX 2012014268 A	12/02/2013		
SG 186953 A1	28/02/2013		
US 2012-0101002 A1	26/04/2012		
US 2013-0116150 A1	09/05/2013		
WO 2012-006632 A2	12/01/2012		
WO 2012-006632 A3	18/05/2012		
WO 2013-152989 A2	17/10/2013	WO 2013-152989 A3	17/10/2013
		WO 2013-152989 A3	27/02/2014
WO 2011-015602 A2	10/02/2011	CA 2769406 A1	10/02/2011
		EP 2462164 A2	13/06/2012
		WO 2011-015602 A3	26/05/2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6837	Z
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813	Z
C 1 2 Q 1/6841 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6841	Z
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115	Z

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

(72)発明者 キム ヨンドン
大韓民国 1 0 3 0 7 ギョンギド ゴヤンシ イルサンドング ゴプンロ 4 4 - 2 5、1 0 8 - 7 0 3

(72)発明者 ソク ミンギョン
大韓民国 0 5 0 5 4 ソウル グァンジング アチャサンロ 4 6ギル 3 6 - 3

(72)発明者 ジョン ジョンハ
大韓民国 0 5 6 4 1 ソウル ソンパグ オグムロ 2 1ギル 5 - 6

(72)発明者 カティリウス, エヴァルダス
アメリカ合衆国 8 0 0 2 7 コロラド州 スーペリア ジャローサ・レーン 2 1 8 4

(72)発明者 ジチ, ドミニク アンソニー
アメリカ合衆国 8 0 3 0 4 コロラド州 ボルダール カルミア・アベニュー 2 2 0 0

(72)発明者 オストロフ, レイチェル エム.
アメリカ合衆国 8 0 0 3 1 コロラド州 ウェストミンスター キング・コート 1 0 2 0 3

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ22 QQ42 QQ53 QQ58 QQ79 QR08 QR32
QR35 QR55 QR62 QS25 QS32 QS34 QX02

专利名称(译)	用于诊断非小细胞肺癌的蛋白质生物标志物组和使用其的诊断非小细胞肺癌的方法		
公开(公告)号	JP2018528441A	公开(公告)日	2018-09-27
申请号	JP2018533586	申请日	2015-09-11
[标]发明人	キムヨンドン ソクミンギョン ジョンジョンハ カティリウスエヴァルダス ジチドミニクアンソニー オストロフレイチエルム		
发明人	キム ヨンドン ソク ミンギョン ジョン ジョンハ カティリウス, エヴァルダス ジチ,ドミニク アンソニー オストロフ,レイチエル エム.		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/566 C12Q1/6851 C12Q1/686 C12Q1/6837 C12Q1/6813 C12Q1/6841 C12N15/115		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57423 G01N2333/4737 G01N2333/70564 G01N2333/988 G01N33/57488		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.D G01N33/566 C12Q1/6851.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6837.Z C12Q1/6813.Z C12Q1/6841.Z C12N15/115.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ22 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	金子修平 大西亘		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及包含生物标志物的生物标志物组和用于诊断人肺癌的方法。提供了一种用于诊断肺癌的方法，包括从对应于选自表2中提供的生物标志物的至少一种生物标志物的样品中检测至少一种生物标志物值，基于至少一种生物标志物值，人类被分类为具有非小细胞肺癌或确定患有肺癌的可能性的亚洲人。 点域1

