

(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2016-537652

(P2016-537652A)

(43) 公表日 平成28年12月1日(2016.12.1)

(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 2 9
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	4 H 0 4 5
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-552704 (P2016-552704)
 (86) (22) 出願日 平成26年11月11日 (2014.11.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月1日 (2016.7.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2014/053340
 (87) 国際公開番号 W02015/067969
 (87) 国際公開日 平成27年5月14日 (2015.5.14)
 (31) 優先権主張番号 1319878.3
 (32) 優先日 平成25年11月11日 (2013.11.11)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

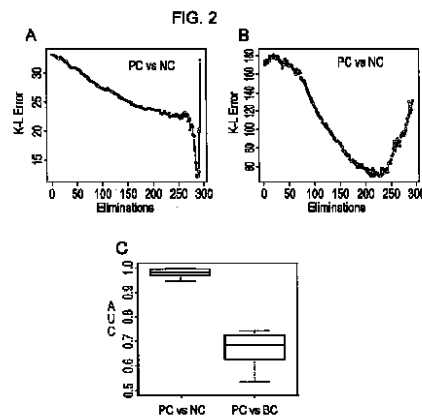
(71) 出願人 510145945
 イムノヴィア・アクチエボラード
 スウェーデン国エスエー-223 81ル
 ンド、メディコンヴィレッジ
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 カール・アーネ・クリステル・ボーレバエ
 ック
 スウェーデン国エス-223 63ル
 ンド、ヘルゴナヴェーゲン21

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵臓がんを決定するための方法、アレイおよびそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、個体において膵臓がんの存在を決定するための方法であって、(a) 個体からの試験しようとするサンプルを用意する工程、および(b) 試験サンプル中における表Aで規定された群から選択される1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することによって、試験サンプルのバイオマーカーシグネチャーを決定する工程を含むかまたはからなり、試験サンプル中における表Aで規定された群から選択される1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現は、膵臓がんを有する個体の指標である前記方法に関する。本発明はまた、本発明の方法で使用するためのアレイおよびキットオブパーツも含む。コアバイオマーカーは、H A D H 2 および T N F R S F 3 である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体において膵臓がんの存在を決定するための方法であって、

a) 該個体からの試験しようとするサンプルを用意する工程；

b) 該試験サンプル中における表 A (i)、(i i) または (i i i) で規定された群から選択される 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することによって、試験サンプルのバイオマーカーシグネチャーを決定する工程

を含むかまたはからなり、該試験サンプル中における表 A (i)、(i i) または (i i i) で規定された群から選択される該 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現は、膵臓がんの存在の指標である前記方法。

10

【請求項 2】

c) 膵臓がんには罹っていない個体からの対照サンプルを用意する工程；

d) 対照サンプル中における工程 (b) で測定された 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することによって、該対照サンプルのバイオマーカーシグネチャーを決定する工程

をさらに含むかまたはからなり、膵臓がんの存在は、試験サンプル中における工程 (b) で測定された該 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現が、該対照サンプル中における工程 (d) で測定された該 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現と異なっている場合に同定される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

e) 膵臓がんには罹った個体からの対照サンプルを用意する工程；

f) 対照サンプル中における工程 (b) で測定された 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することによって、該対照サンプルのバイオマーカーシグネチャーを決定する工程

をさらに含むかまたはからなり、膵臓がんの存在は、試験サンプル中における工程 (b) で測定された該 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現が、該対照サンプル中における工程 (f) で測定された該 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現と一致している場合に同定される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 (b) は、表 A (i) に列挙されたバイオマーカーの 1 種またはそれ以上、例えば、表 A (i v) に列挙されたバイオマーカーの少なくとも 2 種の発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 5】

工程 (b) は、H A D H 2 および / または T N F R S F 3 の発現を測定すること、例えば、H A D H 2 の発現を測定すること、T N F R S F 3 の発現を測定すること、または H A D H 2 および T N F R S F 3 の発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (b) は、表 A (i) に列挙されたバイオマーカーのそれぞれの発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 7】

工程 (b) は、表 A (i i) に列挙されたバイオマーカーの 1 種またはそれ以上、例えば表 A (i i) に列挙されたバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8 または 9 種の発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (b) は、表 A (i i) に列挙されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

工程 (b) は、表 A (i i i) に列挙されたバイオマーカーからの 1 種またはそれ以上

50

のバイオマーカー、例えば表 A (i i i) に列挙されたバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 または 17 種の発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

工程 (b) は、表 A (i v) に列挙されたバイオマーカーからの 1 種またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 A (i v) に列挙されたバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 または 24 種の発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 11】

工程 (b) は、表 A (v) に列挙されたバイオマーカーからの 1 種またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表 A (v) に列挙されたバイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、または 56 種の発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

工程 (b) は、表 A (v i) に列挙されたバイオマーカーからの 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 13】

工程 (b) は、試験サンプル中における表 A で規定されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

膵臓がんは、腺癌、腺扁平上皮癌、印環細胞癌、類肝細胞癌、膠様癌、未分化癌、および破骨細胞様巨細胞未分化癌からなる群から選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

膵臓がんは、腺癌である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 16】

工程 (b)、(d) および / または工程 (f) は、1 種またはそれ以上のバイオマーカーに結合することができる第 1 の結合剤を使用して行われる、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

第 1 の結合剤は、抗体またはその抗原結合フラグメントを含むかまたはからなる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

抗体またはその抗原結合フラグメントは、組換え抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 16 に記載の方法。

40

【請求項 19】

抗体またはその抗原結合フラグメントは、免疫グロブリン分子の s c F v ; F a b ; 結合ドメインからなる群から選択される、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 20】

第 1 の結合剤は、表面上に固定化されている、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

試験サンプル中における 1 種またはそれ以上のバイオマーカーは、検出可能な部分で標識されている、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 22】

対照サンプル中における 1 種またはそれ以上のバイオマーカーは、検出可能な部分で標識されている、請求項 2 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

検出可能な部分は、蛍光性の部分；発光性の部分；化学発光性の部分；放射性的部分；酵素的な部分からなる群から選択される、請求項 21 または 22 に記載の方法。

【請求項 24】

検出可能な部分は、ビオチンである、請求項 21 または 23 に記載の方法。

【請求項 25】

工程 (b)、(d) および / または工程 (f) は、1 種またはそれ以上のバイオマーカーに結合することができる第 2 の結合剤を含むアッセイを使用して行われ、第 2 の結合剤は検出可能な部分を含む、請求項 16 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 26】

第 2 の結合剤は、抗体またはその抗原結合フラグメントを含むかまたはからなる、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

抗体またはその抗原結合フラグメントは、組換え抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

抗体またはその抗原結合フラグメントは、免疫グロブリン分子の scFv；Fab；結合ドメインからなる群から選択される、請求項 26 または 27 に記載の方法。

20

【請求項 29】

検出可能な部分は、蛍光性の部分；発光性の部分；化学発光性の部分；放射性的部分；酵素的な部分からなる群から選択される、請求項 25 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

検出可能な部分は、蛍光性の部分（例えば Alexa Fluor 色素、例えば Alexa 647）である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

ELISA（酵素結合免疫吸着検査法）を含むかまたはからなる、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 32】

工程 (b)、(d) および / または工程 (f) は、アレイを使用して行われる、請求項 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

アレイは、ビーズベースのアレイである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

アレイは、表面ベースのアレイである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

アレイは、マクロアレイ；マイクロアレイ；ナノアレイからなる群から選択される、請求項 32 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 36】

(v) サンプル中に存在するバイオマーカーをビオチンで標識する工程；

(v i) 該ビオチンで標識されたタンパク質を、アレイの表面上に別々の位置で固定化された複数の scFv を含むアレイと接触させる工程であって、scFv は表 A 中のタンパク質の 1 種またはそれ以上に対する特異性を有する、工程；

(v i i) 該固定化された scFv を、蛍光色素を含むストレプトアビジンコンジュゲートと接触させる工程；および

(v i i i) 該アレイ表面上の別々の位置における該色素の存在を検出する工程を含み、該アレイ表面上での該色素の発現は、サンプル中における表 A からのバイオマー

50

カーの発現の指標である、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

工程 (b)、(d) および / または (f) は、1 種またはそれ以上のバイオマーカーをコードする核酸分子の発現を測定することを含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

核酸分子は、c D N A 分子または m R N A 分子である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

核酸分子は、m R N A 分子である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

工程 (b)、(d) および / または (f) における 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することは、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、逆転写酵素 P C R (R T - P C R)、定量リアルタイム P C R (q R T - P C R)、ナノアレイ、マイクロアレイ、マクロアレイ、オートラジオグラフィおよびインサイチュハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法を使用して行われる、請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 4 1】

工程 (b) における 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することは、D N A マイクロアレイを使用して決定される、請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 4 2】

工程 (b)、(d) および / または (f) における 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することは、表 A で同定されたバイオマーカーの 1 種をコードする核酸分子にそれぞれ個々に選択的に結合することができる 1 つまたはそれ以上の結合部分を使用して行われる、請求項 3 7 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

1 つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、核酸分子を含むかまたはからなる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

1 つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、D N A、R N A、P N A、L N A、G N A、T N A または P M O を含むかまたはからなる、請求項 4 2 に記載の方法。

30

【請求項 4 5】

1 つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、D N A を含むかまたはからなる、請求項 4 2 または 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

1 つまたはそれ以上の結合部分は、5 から 1 0 0 ヌクレオチドの長さである、請求項 4 2 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

1 つまたはそれ以上の核酸分子は、1 5 から 3 5 ヌクレオチドの長さである、請求項 4 2 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 4 8】

結合部分は、検出可能な部分を含む、請求項 4 3 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

検出可能な部分は、蛍光性の部分；発光性の部分；化学発光性の部分；放射性的部分（例えば、放射性原子）；または酵素的な部分からなる群から選択される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

検出可能な部分は、放射性原子を含むかまたはからなる、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

放射性原子は、テクネチウム - 9 9 m、ヨウ素 - 1 2 3、ヨウ素 - 1 2 5、ヨウ素 - 1

50

3 1、インジウム - 1 1 1、フッ素 - 1 9、炭素 - 1 3、窒素 - 1 5、酸素 - 1 7、リン - 3 2、硫黄 - 3 5、重水素、トリチウム、レニウム - 1 8 6、レニウム - 1 8 8 および イットリウム - 9 0 からなる群から選択される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

結合部分の検出可能な部分は、蛍光性の部分である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 3】

工程 (b)、(d) および / または (f) で用意されるサンプルは、未分画の血液、血漿、血清、組織液、膵臓組織、膵液、胆汁および尿からなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

工程 (b)、(d) および / または (f) で用意されるサンプルは、未分画の血液、血漿および血清からなる群から選択される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

工程 (b)、(d) および / または (f) で用意されるサンプルは、血漿である、請求項 5 3 または 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

請求項 1 6 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の 1 種またはそれ以上の結合剤を含む、個体において膵臓がんの存在を決定するためのアレイ。

【請求項 5 7】

1 種またはそれ以上の結合剤は、表 A で規定されたタンパク質の全てに結合することができる、請求項 5 6 に記載のアレイ。

【請求項 5 8】

個体において膵臓がんの存在を決定するための診断マーカーとしての、表 A で規定された群から選択される 1 種またはそれ以上のバイオマーカーの使用。

【請求項 5 9】

表 A で規定されたタンパク質の全ては、個体において膵臓がんの存在を決定するための診断マーカーとして使用される、請求項 5 8 に記載の使用。

【請求項 6 0】

膵臓がんの存在を決定するためのキットであって：

A) 請求項 1 6 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の 1 種もしくはそれ以上の第 1 の結合剤または請求項 3 2 ~ 3 5 もしくは請求項 5 6 もしくは 5 7 に記載のアレイ；

B) 請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法または請求項 5 8 もしくは 5 9 に記載の使用を行うための説明書を含む前記キット。

【請求項 6 1】

請求項 3 5 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の第 2 の結合剤をさらに含む、請求項 6 0 に記載のキット。

【請求項 6 2】

実質的に本明細書で説明されている、個体において膵臓がんの存在を決定するための方法または使用。

【請求項 6 3】

実質的に本明細書で説明されている、個体において膵臓がんの存在を決定するためのアレイまたはキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、膵臓がんを検出するための方法、ならびにそれにおいて使用するためのバイオマーカーおよびアレイに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

10

20

30

40

50

膵管腺癌、または膵臓がん（PC）は、4番目に最も一般的ながん関連の死亡原因であり、米国では、10分の1の低さの発生率にもかかわらず乳がんとはほぼ同数の死をもたらす[非特許文献1]。腫瘍発生から転移能の獲得まで5年より長い年数を要することがデータから裏付けられているにもかかわらず、予後不良は主として早期段階でPCを検出できないことに起因しており[非特許文献2]、すなわちマーカーが利用可能であれば、早期発見できる絶好の機会があることを明確に示している。現在、がんは、疾患の進行が進んだ状態で検出されることが多く、腫瘍は手術不能であり、すでに転移している[非特許文献1、3]。しかしながら、大きい腫瘍の切除の5年生存率はわずか10~20%であるとしても[非特許文献4、5]、20mm未満の腫瘍を切除することができる場合、5年生存率は30~60%に増加し[非特許文献6、7]、切除時のサイズが10mm未満である場合、5年生存率は75%より高く増加する[非特許文献8]。遅い検出は、不特定の臨床症状、加えて早期診断のための高感度ならびに技術およびマーカーの欠如に起因する。興味深いことに、膵臓腫瘍は、無症状期で臨床診断前の6カ月もの早期に切除することが可能であることが研究から示唆されている[非特許文献9、10]。

10

20

30

40

50

【0003】

PCに関してこれまでに最も評価されたマーカーであるCA19-9は、膵臓炎や他のがんでも高いレベルであり、ルイスaおよびb陰性の腫瘍では全く存在せず、特異度が不十分であるという問題がある。結果として、膵臓がんのスクリーニングのためのCA19-9の使用は推奨されていない[非特許文献11]。多くの努力にもかかわらず、CA19-9よりも性能が優れている他の単一のバイオマーカーは示されておらず、近年この分野は、感度および特異度を増加させるための多重化マーカーパネルに移行しつつある[非特許文献12]。パネルは、主として、高度に豊富な血液タンパク質、しばしば急性期反応物質（例えばCRPおよびSAA）、公知の腫瘍マーカー（例えばCA242、CA125およびCEA）、接着分子（例えばICAM-1およびADCAM）、細胞外マトリックス分解に関与するタンパク質（例えばMMPおよびTIMP1）、リポタンパク質（例えばApo-C1、Apo-A2）、および数種の他のものからなっており、ほとんどの場合CA19-9と組み合わせられている[非特許文献13~18]。PCと健康な対照または良性の膵臓の状態とに関して感度が高いことが報告されているにもかかわらず、これらのパネルはどれも臨床用途に関して未だ検証されていない。

【0004】

がんと炎症との関係が解明され続けるにつれて、すでに述べられたマーカーの他にも数種の免疫調節タンパク質が腫瘍バイオマーカーとして興味深いものである可能性がある[非特許文献19]。多くの免疫調節タンパク質の全身性作用と多数の機能を考慮すると、一般的に、2から5種のマーカーの小さいパネルは、特に膵臓炎および類似の症状を示す他の状態から膵臓がんを識別しようとする場合、膵臓がん十分に特異的ではないと考えられている。しかしながら、これまでの研究から、これらの分析物の数を増加させること（25）が、疾患に対する全身応答を反映する高度に疾患特異的な免疫シグネチャー（immunosignature）をもたらす可能性があることが示されてきた[非特許文献20~22]。

【0005】

それにもかかわらず、免疫調節性のプロテオームの分析は、数々の問題を伴う。第1に、目的のタンパク質の血清濃度は、1mL当たり上はマイクログラムから下はピコグラムまで広いダイナミックレンジを提示し、それが、従来のプロテオーム手法を使用したそれらの同時検出を複雑にしている[非特許文献23、24]。第2に、最も量が少ない、しばしば低分子量のタンパク質のなかから有望ながんマーカーが見出される可能性がより高いという意見で一致しているようである[非特許文献25、26]。第3に、これらの量が少ない分析物の血清レベルにおける疾患関連の変化は小さいと予想されることから、十分な統計には有意な数の臨床サンプルが必要であると予想される[非特許文献27]。これらの目的のために、本発明者らは、主として免疫調節タンパク質を標的とするほぼ300種のscFv抗体を有する高度に多重化された組換え抗体のマイクロアレイを設計した

【非特許文献28】。これらのアレイを用いれば、高度に再現可能なハイスループットの方式で何百ものサンプルにおいてタンパク質発現を測定することができる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Siegel R、Naishadham D、Jemal A. Cancer statistics、2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2012; 62: 10~29.

【非特許文献2】Yachida S、Jones S、Bozic I、Antal T、Leary R、Fu B、et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. Nature. 2010; 467: 1114~7.

10

【非特許文献3】Hidalgo M. Pancreatic cancer. The New England journal of medicine. 2010; 362: 1605~17.

【非特許文献4】Conlon KC、Klimstra DS、Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. Annals of surgery. 1996; 223: 273~9.

20

【非特許文献5】Sohn TA、Yeo CJ、Cameron JL、Koniaris L、Kaushal S、Abrams RA、et al. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract. 2000; 4: 567~79.

30

【非特許文献6】Furukawa H、Okada S、Saisho H、Ariyama J、Karasawa E、Nakaizumi A、et al. Clinicopathologic features of small pancreatic adenocarcinoma. A collective study. Cancer. 1996; 78: 986~90.

【非特許文献7】Shimizu Y、Yasui K、Matsueda K、Yanagisawa A、Yamao K. Small carcinoma of the pancreas is curable: new computed tomography finding、pathological study and postoperative results from a single institute. Journal of gastroenterology and hepatology. 2005; 20: 1591~4.

40

【非特許文献8】Ishikawa O、Ohigashi H、Imaoka S、Nakaizumi A、Uehara H、Kitamura T、et al. Minute carcinoma of the pancreas measuring 1 cm or less in diameter - collective review of Japanese case reports. Hepato-gastroenterology. 1999; 46: 8~15.

【非特許文献9】Gangi S、Fletcher JG、Nathan MA、Christensen JA、Harmsen WS、Crownhart BS、et

50

al. Time interval between abnormalities seen on CT and the clinical diagnosis of pancreatic cancer: retrospective review of CT scans obtained before diagnosis. *AJR American journal of roentgenology*. 2004; 182: 897~903.

【非特許文献10】Pelaez-Luna M、Takahashi N、Fletcher JG、Chari ST. Resectability of presymptomatic pancreatic cancer and its relationship to onset of diabetes: a retrospective review of CT scans and fasting glucose values prior to diagnosis. *The American journal of gastroenterology*. 2007; 102: 2157~63.

10

【非特許文献11】Locker GY、Hamilton S、Harris J、Jessup JM、Kemeny N、Macdonald JS、et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; 24: 5313~27.

20

【非特許文献12】Koopmann J、Rosenzweig CN、Zhang Z、Canto MI、Brown DA、Hunter M、et al. Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006; 12: 442~6.

【非特許文献13】Jiang JT、Wu CP、Deng HF、Lu MY、Wu J、Zhang HY、et al. Serum level of TSGF, CA242 and CA19-9 in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2004; 10: 1675~7.

30

【非特許文献14】Duraker N、Hot S、Polat Y、Hobek A、Gencler N、Urhan N. CEA, CA 19-9, and CA 125 in the differential diagnosis of benign and malignant pancreatic diseases with or without jaundice. *Journal of surgical oncology*. 2007; 95: 142~7.

40

【非特許文献15】Ni XG、Bai XF、Mao YL、Shao YF、Wu JX、Shan Y、et al. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2005; 31: 164~9.

【非特許文献16】Faca VM、Song KS、Wang H、Zhang Q、Krasnoselsky AL、Newcomb LF、et al. A mouse

50

to human search for plasma proteome changes associated with pancreatic tumor development. *PLoS medicine*. 2008; 5: e123.

【非特許文献17】Firpo MA、Gay DZ、Granger SR、Scaife CL、DiSario JA、Boucher KM、et al. Improved diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using haptoglobin and serum amyloid A in a panel screen. *World journal of surgery*. 2009; 33: 716~22.

【非特許文献18】Orchekowski R、Hamelinck D、Li L、Gliwa E、vanBrocklin M、Marrero JA、et al. Antibody microarray profiling reveals individual and combined serum proteins associated with pancreatic cancer. *Cancer research*. 2005; 65: 11193~202.

【非特許文献19】Cousens LM、Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420: 860~7.

【非特許文献20】Carlsson A、Wuttge DM、Ingvarsson J、Bengtsson AA、Sturfelt G、Borrebaeck CA、et al. Serum protein profiling of systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis using recombinant antibody microarrays. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011; 10: M110 005033.

【非特許文献21】Ingvarsson J、Wingren C、Carlsson A、Ellmark P、Wahren B、Engstrom G、et al. Detection of pancreatic cancer using antibody microarray-based serum protein profiling. *Proteomics*. 2008; 8: 2211~9.

【非特許文献22】Wingren C、Sandstrom A、Segersvard R、Carlsson A、Andersson R、Lohr M、et al. Identification of serum biomarker signatures associated with pancreatic cancer. *Cancer research*. 2012; 72: 2481~90.

【非特許文献23】Anderson NL、Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2002; 1: 845~67.

【非特許文献24】Zhang H、Liu AY、Loriaux P、Wollscheid B、Zhou Y、Watts JD、et al. Mass spectrometric detection of tissue proteins in plasma. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2007; 6: 64~71.

【非特許文献25】Surinova S、Schiess R、Huttenhain R、Cerciello F、Wollscheid B、Aebersold R. On the development of plasma protein biomarkers. *Journal of proteome research*. 2011; 10: 5~16.

【非特許文献26】Haab BB、Geierstanger BH、Michailidis G、Vitzthum F、Forrester S、Okon R、et

10

20

30

40

50

al. Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data. *Proteomics*. 2005; 5: 3278~91.

【非特許文献27】Alonzo TA、Pepe MS、Moskowitz CS. Sample size calculations for comparative studies of medical tests for detecting presence of disease. *Statistics in medicine* 10
2002; 21: 835~52.

【非特許文献28】Borrebaeck CA、Wingren C. Design of high-density antibody microarrays for disease proteomics: key technological issues. *Journal of proteomics*. 2009; 72: 928~35.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

この多施設研究において、膵臓がん、良性の膵臓疾患を有する患者、加えて正常対照からの338人分の血清サンプルを、本発明者らの社内で設計された抗体マイクロアレイで分析した。最も識別力のあるマーカーシグネチャーを規定するために、本発明者らは、サポートベクターマシン分析に基づき、抗体の最適な組合せを予測するように設計された繰り返しの後退消去 (backward elimination) 手順を適用した [31]。この目的を達成するために、独立した試験セットで前もって検証され、示差的なタンパク質発現の分析から導き出されたシグネチャーと比較されたトレーニングセットにおいて、良性および健康な対照からPCを識別するための25プレックスの免疫シグネチャーを同定した。加えて、タンパク質プロファイリングを適用して、膵臓における腫瘍の元の位置に基づき血清サンプルを階層化することが可能になり、これは、本発明者らが知る限りにおいてこれまでプロテオミクスを用いてなされていなかった。総合すると、これらの発見は、膵臓がんのプロテオームの難題に重要な情報を追加し、それにより最終的に多重化バイオマーカーがもたらされ、何千もの患者にとっての利益が提供される可能性がある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

従って、本発明の第1の態様は、個体において膵臓がんを検出するための方法であって、

a) 個体からの試験しようとするサンプルを用意する工程；

b) 試験サンプル中における表 $A(i)$ 、 (ii) または (iii) で規定された群から選択される少なくとも1種のバイオマーカーの発現を測定することによって、試験サンプルのバイオマーカーシグネチャーを決定する工程
40
を含むかまたはからなり、試験サンプル中における表 $A(i)$ 、 (ii) または (iii) で規定された群から選択される1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現は、膵臓がんの存在の指標である前記方法を提供する。

【0009】

「試験しようとするサンプル」、「試験サンプル」または「対照サンプル」には、個体から採取されたまたは得られた組織または流体サンプルが包含される。好ましくは、試験しようとするサンプルは、哺乳動物から提供される。哺乳動物は、あらゆる家畜または畜産動物であり得る。好ましくは、哺乳動物は、ラット、マウス、モルモット、ネコ、イヌ、ウマまたは霊長類である。最も好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。好ましくは、サ
50

ンプルは、血漿、形質細胞、血清、組織細胞を含むかもしくははからなる細胞もしくは組織サンプル（またはそれらの派生物）であるか、または細胞もしくは組織サンプルから得られたタンパク質もしくは核酸も同等に好ましい。好ましくは、試験および対照サンプルは、同じ種から得られる。

【0010】

代替または追加の実施形態において、組織サンプルは、膵臓組織である。代替または追加の実施形態において、細胞サンプルは、膵臓細胞のサンプルである。

【0011】

「発現」とは、mRNAまたはタンパク質などの遺伝子産物のレベルまたは量を意味する。

10

【0012】

タンパク質および/または核酸の濃度を検出および/または測定する方法は当業者周知であり、例えば Sambrook および Russell、2001、Cold Spring Harbor Laboratory Press を参照されたい。

【0013】

「バイオマーカー」とは、天然に存在する生体分子、またはその成分もしくはフラグメントを意味し、それらの測定は、膵臓がんの予後予測において有用な情報を提供することができる。例えば、バイオマーカーは、天然に存在するタンパク質もしくは炭水化物部分、またはそれらの抗原性の成分もしくはフラグメントであり得る。

【0014】

代替または追加の実施形態において、本方法は、工程（a）および（b）、ならびにさらなる工程：

20

c) 膵臓がんにかかっていない個体からの1つまたはそれ以上の対照サンプルを用意する工程；

d) 対照サンプル中における工程（b）で測定された1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することによって、対照サンプルのバイオマーカーシグネチャーを決定する工程

を含むかまたははからなり、膵臓がんの存在は、試験サンプル中における工程（b）で測定された1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現が、対照サンプル中における工程（d）で測定された1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現と異なっている場合に同定される。

30

【0015】

1つまたはそれ以上の対照サンプルは、健康な個体（すなわち、いかなる疾患もしくは状態にもかかっていない個体）、膵臓系ではない疾患もしくは状態にかかった個体、または良性の膵臓疾患もしくは状態（例えば、急性もしくは慢性膵臓炎）にかかった個体からのものであり得る。

【0016】

別の実施形態において、本方法は、工程（a）および（b）、ならびに場合により工程（c）および（d）、ならびに追加の工程：

40

e) 膵臓がんにかかった個体からの1つまたはそれ以上の対照サンプルを用意する工程；

f) 対照サンプル中における工程（b）で測定された1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することによって、対照サンプルのバイオマーカーシグネチャーを決定する工程

を含むかまたははからなり、膵臓がんの存在は、試験サンプル中における工程（b）で測定された1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現が、対照サンプル中における工程（f）で測定された1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現と一致している場合に同定される。

【0017】

代替または追加の実施形態において、1つまたはそれ以上の陽性または陰性対照の代わりに、またはそれに加えて、標準または参照値が使用される。従って、標準または参照値

50

は、別々の手順で試験値から決定することができる。

【0018】

代替または追加の実施形態において、本方法は、(i) 脾頭または(ii) 脾体もしくは脾尾に由来する脾臓がんの存在を決定するための方法である。この実施形態において、工程(e)は、(i) 脾頭に由来する脾臓がんに関与した個体からの1つもしくはそれ以上の対照サンプルを用意する工程、および/または(ii) 脾体もしくは脾尾に由来する脾臓がんに関与した個体からの1つもしくはそれ以上の対照サンプルを用意する工程を含んでいてもよい。

【0019】

この実施形態において、脾頭に由来する脾臓がんの存在は、(e)(i)の試験サンプル(存在する場合)中における工程(b)で測定された1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現が、対照サンプル中における工程(f)で測定された1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現と一致している場合、および/または(e)(ii)の試験サンプル(存在する場合)中における工程(b)で測定された1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現が、対照サンプル中における工程(f)で測定された1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現と異なっている場合に同定される。

10

【0020】

この実施形態において、脾体または脾尾に由来する脾臓がんの存在は、(e)(i)の試験サンプル(存在する場合)中における工程(b)で測定された1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現が、対照サンプル中における工程(f)で測定された1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現と異なっている場合、および/または(e)(ii)の試験サンプル(存在する場合)中における工程(b)で測定された1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現が、対照サンプル中における工程(f)で測定された1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現と一致している場合に同定される。

20

【0021】

「対照サンプル中における発現に一致している」は、試験しようとするサンプル中における1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現が、陽性対照サンプルの1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現と同じであるかまたは類似していることを包含する。好ましくは、試験しようとするサンプル中における1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現は、陽性対照サンプルの1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現と同一である。

30

【0022】

バイオマーカーの示差的発現(上方調節または下方調節)、またはそれらの欠如は、当業者公知のあらゆる好適な手段によって決定することができる。示差的発現は、少なくとも0.05未満のp値($p < 0.05$)まで、例えば、少なくとも < 0.04 、 < 0.03 、 < 0.02 、 < 0.01 、 < 0.009 、 < 0.005 、 < 0.001 、 < 0.0001 、 < 0.00001 または少なくとも < 0.000001 のp値まで決定される。好ましくは、示差的発現は、サポートベクターマシン(SVM)を使用して決定される。好ましくは、SVMは、後述されるSVMである。最も好ましくは、SVMは、以下の表Bに記載されているSVMである。

【0023】

示差的発現は、組み合わせて(すなわちバイオマーカーシグネチャーとして)検討される単一のバイオマーカーまたは複数のバイオマーカーに関するものであり得ることが当業者には理解されるものと予想される。従って、p値は、単一のバイオマーカーまたはバイオマーカーの群に関連するものであり得る。実際には、個々に検討した場合に0.05より大きい示差的発現のp値を有するタンパク質でも、それらの発現レベルが1種またはそれ以上の他のバイオマーカーと組み合わせて検討される場合、本発明に係るバイオマーカーとしてなお有用である可能性がある。

40

【0024】

添付の実施例で例示されるように、組織、血液、血清または血漿試験サンプル中におけるある特定のタンパク質の発現は、個体における脾臓がんの指標であり得る。例えば、単

50

一の試験サンプル中におけるある特定の血清タンパク質の相対的発現は、個体における膵臓がんの存在の指標であり得る。

【0025】

工程(b)は、表A(i)に列挙されたバイオマーカーからの1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。工程(b)は、表A(i)に列挙されたバイオマーカーのそれぞれ、例えば表A(i)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2種の発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。従って、工程(b)は、表A(i)に列挙されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。

10

【0026】

工程(b)は、表A(ii)に列挙されたバイオマーカーからの1種またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(ii)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8または9種の発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。従って、工程(b)は、表A(ii)に列挙されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。

【0027】

工程(b)は、表A(iii)に列挙されたバイオマーカーからの1種またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(iii)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16または17種の発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。従って、工程(b)は、表A(iii)に列挙されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。

20

【0028】

工程(b)は、表A(iv)に列挙されたバイオマーカーからの1種またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(iv)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22、23または24種の発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。従って、工程(b)は、表A(iv)に列挙されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。

30

【0029】

工程(b)は、表A(v)に列挙されたバイオマーカーからの1種またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(v)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55または56種の発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。従って、工程(b)は、表A(v)に列挙されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。

40

【0030】

工程(b)は、表A(vi)に列挙されたバイオマーカーからの1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。従って、工程(b)は、表A(vi)に列挙されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含んでもよく、またはそれからなってもよい。

【0031】

工程(b)は、表Aに列挙されたバイオマーカーからの1種またはそれ以上のバイオマーカー、例えば表Aに列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、

50

22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109または110種の発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなっているもよい。従って、工程(b)は、表Aに列挙されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含んでいてもよく、またはそれからなっているもよい。

10

【0032】

本方法が膵臓腺癌の存在を決定するためのものである場合、工程(b)は、好ましくは：

表A(i)に列挙されたバイオマーカーからの1種もしくはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(i)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2種；

表A(ii)に列挙されたバイオマーカーからの1種もしくはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(ii)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8もしくは9種；

表A(iii)に列挙されたバイオマーカーからの1種もしくはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(iii)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16もしくは17種；

20

表A(iv)に列挙されたバイオマーカーからの1種もしくはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(iv)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23もしくは24種；および/または

表A(v)に列挙されたバイオマーカーからの1種もしくはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(v)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55もしくは56種の発現を測定することを含むかまたはからなり、

30

表A(vi)に列挙されたバイオマーカーからの1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することを含むかまたはからなり；従って、工程(b)は、表A(vi)に列挙されたバイオマーカーの全ての発現を測定することを含んでもよく、またはそれからなっているもよい。

【0033】

本方法が(i)膵頭または(ii)膵体もしくは膵尾に由来する膵臓腺癌の存在を決定するためのものである場合、工程(b)は、好ましくは：

表A(ii)に列挙されたバイオマーカーからの1種もしくはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(ii)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8もしくは9種；

40

表A(iv)に列挙されたバイオマーカーからの1種もしくはそれ以上のバイオマーカー、例えば表A(iv)に列挙されたバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23もしくは24種；および/または

表A(vi)に列挙された1種もしくはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することを含むかまたはからなる。

【0034】

「正常な」病状と述べる場合、慢性膵臓炎(ChP)または急性炎症性膵臓炎(AIP)

50

）に罹っていない個体が包含される。好ましくは、個体は、いかなる腓臓疾患または障害にも罹っていない。最も好ましくは、個体は健康な個体であり、すなわち彼等は、いかなる疾患または障害にも罹っていない。

【 0 0 3 5 】

代替または追加の実施形態において、工程（b）は、転写因子 S O X - 1 1 の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インテグリンアルファ - 1 0 の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、E D F R の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、E P F R の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、L S A D H R の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、S E A H L R の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、A Q Q H Q W D G L L S Y Q D S L S の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、W T R N S N M N Y W L I I R L の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、W D S R の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、D F A E D K の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、F A S N タンパク質の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、G A K タンパク質の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、H A D H 2 タンパク質の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、L N V W G K の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、L T E F A K の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、L Y E I A R の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、巨核球関連チロシン - プロテインキナーゼの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、オキシステロール結合タンパク質関連タンパク質 3 の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、Q E A S F K の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、S S A Y S R の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、Q E A S F K の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、T E E Q L K の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、T L Y V G K の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、F L L M Q Y G G M D E H A R の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、G I V K Y L Y E D E G の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、G I V K Y L Y E D E G の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 3 の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、チロシン - プロテインキナーゼ S Y K の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、アンジオモチンの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C - C モチーフケモカイン 2 の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C - C モチーフケモカイン 5 の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C D 4 0 リガンドの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、グルカゴン様ペプチド - 1 の発現を測定することを含む

10

20

30

40

50

むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、免疫グロブリン（Immunoglobulin）Mの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-1アルファの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-1受容体アンタゴニストタンパク質の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-11の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-12の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-16の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-18の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-2の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-3の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-4の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-6の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-7の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン-9の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、リースxの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、リンフォトキシン-アルファの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、トランスフォーミング増殖因子ベータ-1の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、血管内皮増殖因子の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、視覚系ホメオボックス（Visual system homeobox）2の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、HLA-DR/DPの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、アポリタンパク質A1の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、アポリタンパク質A4の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、アポリタンパク質B-100の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ミトコンドリアのATPシターゼサブユニットベータの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ベータ-ガラクトシダーゼの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、カテプシンWの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C-Cモチーフケモカイン13の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C-Cモチーフケモカイン7の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、CD40タンパク質の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体C1qの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体C1sの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体C3の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体C4の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体C5の発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体因子Bの発現を測定することを含むかまたははからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、サイクリン

依存性キナーゼ2の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、シスタチン-Cの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、エオタキシンの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、上皮増殖因子受容体の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、グルカゴン様ペプチド1受容体の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、インテグリンアルファ-11の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、細胞間接着分子1の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、インターフェロンガンマの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、インターロイキン-1ベータの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、インターロイキン-10の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、インターロイキン-13の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、インターロイキン-5の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、インターロイキン-8の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、ケラチン、I型細胞骨格19の発現を測定することを含むかまたはからなる。

代替または追加の実施形態において、工程(b)は、レブチンの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、ルミカンの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ1の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ8の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、ムチン-1の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、ミオメシン-2の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、オステオポンチンの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ調節サブユニットアルファの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、血漿プロテアーゼC1阻害剤の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、プロパージンの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、前立腺特異的抗原の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、受容体チロシン-プロテインキナーゼerbB-2の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、ナンセンス転写物3Bのレギュレーターの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、リボソームタンパク質S6キナーゼアルファ-2の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、シアリルルイスxの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、シグナル伝達アダプタータンパク質2の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、SUMOコンジュゲート酵素UBC9の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、TBC1ドメインファミリーメンバー9の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、膜貫通ペプチドの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程(b)は、腫瘍壊死因子

10

20

30

40

50

アルファの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー14の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、チロシン-プロテインキナーゼBTKの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、チロシン-プロテインキナーゼJAK3の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、チロシン-タンパク質ホスファターゼ非受容体1型の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイムL5の発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ユビキチンコンジュゲート酵素E2Cの発現を測定することを含むかまたはからなる。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、FIQTDKの発現を測定することを含むかまたはからなる。

10

【0036】

代替または追加の実施形態において、工程（b）は、転写因子SOX-11の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インテグリンアルファ-10の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、EDFRの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、EPFRの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、LSADHRの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、SEALRの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、AQQHQWDGLLSYQDSL Sの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、WTRNSNMNYWLIIRLの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、WDSRの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、DFAEKの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、FASNタンパク質の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、GAKタンパク質の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、HADH2タンパク質の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、LNWVGKの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、LTEFAKの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、LYEIRの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、巨核球関連チロシン-プロテインキナーゼの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、オキシステロール結合タンパク質関連タンパク質3の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、QEASF Kの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、SSAYS Rの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、QEASF Kの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、TEEQ L Kの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、TLYVG Kの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、FLLMQYGGMDE

20

30

40

50

H A Rの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、G I V K Y L Y E D E Gの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、G I V K Y L Y E D E Gの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー3の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、チロシン-プロテインキナーゼS Y Kの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、アングイオモチンの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C - Cモチーフケモカイン2の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C - Cモチーフケモカイン5の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C D 4 0リガンドの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、グルカゴン様ペプチド - 1の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、免疫グロブリンMの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 1アルファの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 1受容体アンタゴニストタンパク質の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 1 1の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 1 2の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 1 6の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 1 8の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 2の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 3の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 4の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 6の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 7の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 9の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ルイスxの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、リンフォトキシン - アルファの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、トランスフォーミング増殖因子ベータ - 1の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、血管内皮増殖因子の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、視覚系ホメオボックス2の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、H L A - D R / D Pの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、アポリポタンパク質A 1の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、アポリポタンパク質A 4の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっ

10

20

30

40

50

ていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、アポリポタンパク質 B - 100 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ミトコンドリアの ATP シンターゼサブユニットベータの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ベータ - ガラクトシダーゼの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、カテプシン W の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C - C モチーフケモカイン 13 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、C - C モチーフケモカイン 7 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、CD 40 タンパク質の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体 C 1 q の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体 C 1 s の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体 C 3 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体 C 4 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体 C 5 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、補体因子 B の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、サイクリン依存性キナーゼ 2 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、シスチン - C の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、エオタキシンの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、上皮増殖因子受容体の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、グルカゴン様ペプチド 1 受容体の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インテグリンアルファ - 11 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、細胞間接着分子 1 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターフェロンガンマの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 1 ベータの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 10 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。

代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 13 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 5 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、インターロイキン - 8 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ケラチン、I 型細胞骨格 19 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、レプチンの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ルミカンの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 1 の発現を測定することを含まないかまたはそれ

10

20

30

40

50

からなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 8 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ムチン - 1 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ミオメシン - 2 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、オステオポンチンの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ調節サブユニットアルファの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、血漿プロテアーゼ C 1 阻害剤の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、プロパージンの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、前立腺特異的抗原の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、受容体チロシン - プロテインキナーゼ er b B - 2 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ナンセンス転写物 3 B のレギュレーター の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、リボソームタンパク質 S 6 キナーゼアルファ - 2 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、シアリルルイス x の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、シグナル伝達アダプタータンパク質 2 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、SUMOコンジュゲート酵素 U B C 9 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、T B C 1 ドメインファミリーメンバー 9 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、膜貫通ペプチドの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、腫瘍壊死因子アルファの発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 4 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、チロシン - プロテインキナーゼ B T K の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、チロシン - プロテインキナーゼ J A K 3 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、チロシン - タンパク質ホスファターゼ非受容体 1 型の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイム L 5 の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、ユビキチンコンジュゲート酵素 E 2 C の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。代替または追加の実施形態において、工程（b）は、F I Q T D K の発現を測定することを含まないかまたはそれからなっていない。

【 0 0 3 7 】

「膜貫通ペプチド」または「T M ペプチド」とは、以下の配列番号 1 の s c F v 抗体コンストラクトが特異性を有する 1 0 T M タンパク質から誘導されたペプチドを意味する（ここで C D R 配列は、太字、イタリック体で提示される）：

10

20

30

40

【化 1】

MAEVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLEWVSLISWDG~~
GSTYYADSVKGRFRTISRDN~~SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTWFDPNQGGTLVT~~
VSSGGGGSGGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVMWYQ
QLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYCAAWDDSL
SWVFGGGTKLTVLG

【配列番号 1】

【0038】

10

従って、この s c F v、または 10 T M タンパク質への結合に関してこの s c F v と競合するあらゆる抗体、もしくはそれらの抗原結合フラグメントを使用することができる。例えば、抗体、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 1 中に存在するものと同じ C D R を含んでいてもよい。

【0039】

このような抗体は、精製目的で（例えば C 末端に）親和性タグを含めて生産することができることが当業者には理解されるものと予想される。例えば、以下の配列番号 2 の親和性タグを利用してもよい：

D Y K D H D G D Y K D H D I D Y K D D D D K A A A H H H H H H

【配列番号 2】

20

【0040】

代替または追加の実施形態において、工程（b）で測定された 1 種またはそれ以上のバイオマーカーは：

アンジオモチン、Apo - A 1、Apo - A 4、ATP - 5 B、BTK、C1 inh、C1 q、C 3、C 5、CD 4 0、CD 4 0 L、シスタチン C、エオタキシン、因子 B、GAK、GM - CSF、HADH 2、IL - 1 1、IL - 1 3、IL - 3、IL - 4、IL - 6、IL - 8、IL - 9、KSYK - 1、LDL、MAPK 1、MCP - 1、PTP - 1 B、シアリルルイス x、Sox 1 1 A、TGF - ベータ 1、TNF - アルファ、TNF RSF 3、UCHL 5 および UPF 3 B

からなる群から選択される 1 種またはそれ以上のバイオマーカーを含むかまたはからなる。

30

【0041】

この実施形態において、本方法は、膵臓がん（PC）と、非膵臓がん（NC）および/または良性の膵臓状態（BC）とを識別するためのものであり得る。

【0042】

代替または追加の実施形態において、工程（b）で測定された 1 種またはそれ以上のバイオマーカーは：

アンジオモチン、ATP - 5 B、C1 inh、C1 q、C 3、C 5、CD 4 0、シスタチン C、エオタキシン、因子 B、GAK、HADH 2、IL - 1 1、IL - 1 3、IL - 6、IL - 8、LDL および TNF - アルファ

からなる群から選択される 1 種またはそれ以上のバイオマーカーを含むかまたはからなる。

40

【0043】

この実施形態において、本方法は、膵臓がん（PC）と、非膵臓がん（NC）とを識別するためのものであり得る。

【0044】

代替または追加の実施形態において、工程（b）で測定された 1 種またはそれ以上のバイオマーカーは：

Apo - A 1、Apo - A 4、BTK、C1 inh、C 5、CD 4 0 L、CIMS、因子 B、GM - CSF、HADH 2、IL - 3、IL - 4、IL - 4、IL - 9、KSYK

50

- 1、MAPK1、MCP-1、PTP-1B、シアリル路易斯x、Sox11A、TGF-ベータ1、TNFRSF3、UCHL5およびUPF3B

からなる群から選択される1種またはそれ以上のバイオマーカーを含むかまたはからなる。

【0045】

この実施形態において、本方法は、膵臓がん(PC)と、良性の膵臓状態(BC)とを識別するためのものであり得る。

【0046】

代替または追加の実施形態において、本方法は、工程(a)および(b)、場合により、工程(c)および(d)、場合により、工程(e)および(f)、ならびに追加の工程

10

g)工程(b)で測定された1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現に基づき、膵臓がんの存在を決定する工程を含むかまたはからなる。

【0047】

代替または追加の実施形態は、表2で同定された傾向(上方または下方調節)に基づいている。

【0048】

代替または追加の実施形態において、工程(b)、および存在する場合、工程(d)および(f)は、例えば以下で定義される第1の結合部分のような、工程(b)で測定された1種またはそれ以上のバイオマーカーに関する結合部分と、試験しようとするサンプルを接触させることによって行われる。

20

【0049】

代替または追加の実施形態において、本方法は、表3に列挙されたバイオマーカーの使用を含むかまたはからなる。

【0050】

一般的に、診断は、少なくとも0.55のROC AUC、例えば、少なくとも、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99のROC AUC、または1.00のROC AUCを用いてなされる。好ましくは、診断は、少なくとも0.85のROC AUC、最も好ましくは1のROC AUCを用いてなされる。

30

【0051】

典型的には、診断は、サポートベクターマシン(SVM)、例えば<http://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html>(例えばe1071_1.5-24)より入手可能なものを使用して行われる。しかしながら、他のあらゆる好適な手段を使用することもできる。

【0052】

サポートベクターマシン(SVM)は、分類および回帰のために使用される関連する教師付き学習方法のセットである。トレーニング例のセットがそれぞれ2つのカテゴリーのうち1つに属するとマークされていると仮定すると、SVMトレーニングアルゴリズムは、新しい例が一方のカテゴリーに分類されるのか、または他方のカテゴリーに分類されるのかを予測するモデルを構築する。直感的に、SVMモデルは、別個のカテゴリーの例が可能な限り広い明確なギャップによって分割されるようにマッピングされた空間中のポイントとしての例の表示である。次いで新しい例は、その同じ空間にマッピングされ、それらがギャップのどちら側に行き当たるのかに基づくカテゴリーに属すると予測される。

40

【0053】

より形式的には、サポートベクターマシンは、高次元または無限次元の空間における超平面または超平面のセットを構築し、これは、分類、回帰または他のタスクに使用することができる。直感的に、一般的にマージンが大きいほど分類装置の汎化誤差がより低くなることから、優れた分離は、いずれかのクラスの最短のトレーニングデータポイントに対

50

する最も大きい距離（いわゆる関数マージン）を有する超平面によって達成される。SVMに関するより多くの情報については、例えば、Burgess、1998、Data Mining and Knowledge Discovery、2：121～167を参照されたい。

【0054】

本発明の代替または追加の実施形態において、疾患の状態がわかっている個体（例えば、膵臓がんを有することがわかっている個体、急性炎症性膵臓炎を有することがわかっている個体、慢性膵臓炎を有することがわかっている個体または健康であることがわかっている個体）からのバイオマーカープロファイルを使用して本発明の方法を行う前に、SVMは「トレーニングされる」。このようなトレーニングサンプルを試行することにより、SVMは、どのようなバイオマーカープロファイルが膵臓がんに関連があるのかを学習することができる。トレーニングプロセスが完了したら、SVMは、試験されたバイオマーカーサンプルが膵臓がんを有する個体からのものかどうかが可能になる。

10

【0055】

しかしながら、このトレーニング手順は、必要なトレーニングパラメータを用いてSVMを事前にプログラミングすることによって回避することができる。例えば、診断は、表Aに列挙されたバイオマーカーのいずれかまたは全ての測定に基づいて、表Bで詳述されるSVMアルゴリズムを使用する公知のSVMパラメータに従い行うことができる。

【0056】

好適なSVMパラメータは、データ（すなわち膵臓がんの状態がわかっている個体からのバイオマーカー測定値）の適切な選択を用いてSVMマシンをトレーニングすることによって、表Aに列挙されたバイオマーカーのあらゆる組合せごとに決定できることが、当業者には理解されるものと予想される。その代わりに、表2および3のデータは、当業界において公知の他のあらゆる好適な統計的方法に従って特定の膵臓がん関連の病状を決定するのに使用される場合もある。

20

【0057】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも60%の精度、例えば61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の精度を有する。

30

【0058】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも60%の感度、例えば61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の感度を有する。

【0059】

好ましくは、本発明の方法は、少なくとも60%の特異度、例えば61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の特異度を有する。

40

【0060】

「精度」とは、方法の正しい結果の比率を意味し、「感度」とは、正確に陽性と分類される全てのPaC陽性サンプルの比率を意味し、「特異度」とは、正確に陰性と分類される全てのPaC陰性サンプルの比率を意味する。

【0061】

代替または追加の実施形態において、膵臓がんには罹っていない個体は、膵臓がん（Pa

50

C)、慢性膵臓炎(C h P)または急性炎症性膵臓炎(A I P)に罹っていない。より好ましくは、健康な個体は、いかなる膵臓疾患または状態にも罹っていない。さらにより好ましくは、膵臓がんには罹っていない個体は、いかなる疾患または状態にも罹っていない。最も好ましくは、膵臓がんには罹っていない個体は、健康な個体である。「健康な個体」は、当業者によって、身体的に丈夫であり身体的な疾患がないとみなされる個体を包含する。

【0062】

しかしながら、別の実施形態において、膵臓がんには罹っていない個体は、慢性膵臓炎に罹っている。さらに別の実施形態において、膵臓がんには罹っていない個体は、急性炎症性膵臓炎に罹っている。

10

【0063】

上述したように、本発明の方法は、個体において膵臓がんの存在を決定するためのものである。代替または追加の実施形態において、膵臓がんは、腺癌、腺扁平上皮癌、印環細胞癌、類肝細胞癌、膠様癌、未分化癌、および破骨細胞様巨細胞未分化癌からなる群から選択される。好ましくは、膵臓がんは、膵臓腺癌である。より好ましくは、膵臓がんは、外分泌膵臓がんとしても知られている膵管腺癌である。

【0064】

さらなる実施形態において、工程(b)、(d)および/または工程(f)は、1種またはそれ以上のバイオマーカーに結合することができる第1の結合剤を使用して(すなわち、1種またはそれ以上の第1の結合剤を使用することであり、ここで各結合剤は、1種またはそれ以上のバイオマーカーの1種に特異的に結合することができる)行われる。第1の結合剤は、タンパク質バイオマーカーの1種に特異性を有する単一の種、またはそれぞれ異なるタンパク質バイオマーカーに特異性を有する複数の異なる種を含んでもよく、またはそれからなってもよいことが、当業者には理解されるものと予想される。

20

【0065】

好適な結合剤(また、結合分子とも称される)は、以下で論じられるように、所与のモチーフと結合するそれらの能力に基づいてライブラリーから選択することができる。

【0066】

結合剤の少なくとも1つのタイプ、より典型的には全てのタイプは、抗体もしくはその抗体の抗原結合フラグメント、またはそれらのパリアントを含んでもよく、またはそれからなってもよい。

30

【0067】

抗体を生産および使用するための方法は当業界において周知であり、例えばAntibodies: A Laboratory Manual、1988、HarlowおよびLane、Cold Spring Harbor Press、ISBN-13:978-0879693145、Using Antibodies: A Laboratory Manual、1998、HarlowおよびLane、Cold Spring Harbor Press、ISBN-13:978-0879695446、ならびにMaking and Using Antibodies: A Practical Handbook、2006、HowardおよびKaser、CRC Press、ISBN-13:978-0849335280を参照されたい(これらの開示は、参照によって本明細書に組み入れられる)。

40

【0068】

従って、フラグメントは、可変重鎖(V_H)または可変軽鎖(V_L)ドメインの1つまたはそれ以上を含んでもよい。例えば、抗体フラグメントという用語は、F_{ab}様分子(Betterら(1988)Science 240、1041); F_v分子(Skerraら(1988)Science 240、1038); V_HおよびV_Lパートナードメインがフレキシブルなオリゴペプチドを介して連結されている単鎖F_v(ScFv)分子(Birdら(1988)Science 242、423; Hustonら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85、5879)ならびに

50

分離したVドメインを含む単ドメイン抗体 (dAb) (Wardら (1989) Nature 341, 544) を包含する。

【0069】

用語「抗体バリエーション」は、あらゆる合成抗体、組換え抗体または抗体ハイブリッド、例えば、これらに限定されないが、免疫グロブリン軽鎖および/もしくは重鎖可変ならびに/もしくは定常領域のファージディスプレイによって生産された単鎖抗体分子、または当業者公知のイムノアッセイフォーマットで抗原に結合することができる他の免疫相互作用分子を包含する。

【0070】

それらの特異的な結合部位を保持する抗体フラグメントの合成に関する技術の一般的な総論は、WinterおよびMilstein (1991) Nature 349, 293~299で見出すことができる。

【0071】

分子ライブラリー、例えば抗体ライブラリー (Clacksonら、1991、Nature 352, 624~628; Marksら、1991、J Mol Biol 222 (3): 581~97)、ペプチドライブラリー (Smith、1985、Science 228 (4705): 1315~7)、発現されたcDNAライブラリー (Santillaら (2000) J Mol Biol 296 (2): 497~508)、アフィニティなどの抗体フレームワーク以外の他の足場上のライブラリー (Gunneriussonら、1999、Appl Environ Microbiol 65 (9): 4134~40) またはアダプターをベースとしたライブラリー (Kenanら、1999、Methods Mol Biol 118, 217~31) が、本発明の方法で使用するための所与のモチーフに特異的な結合分子が選択される源として使用される可能性がある。

【0072】

分子ライブラリーを、インピボにおいて原核細胞 (Clacksonら、1991、前掲書中; Marksら、1991、前掲書中) もしくは真核細胞 (Kiekerら、1999、Proc Natl Acad Sci USA, 96 (10): 5651~6) で発現してもよいし、またはインピトロにおいて細胞を関与させずに発現してもよい (HanesおよびPluckthun、1997、Proc Natl Acad Sci USA 94 (10): 4937~42; HeおよびTauszig、1997、Nucleic Acids Res 25 (24): 5132~4; Nemotoら、1997、FEBS Lett, 414 (2): 405~8)。

【0073】

タンパク質ベースのライブラリーが使用されるケースにおいて、しばしば可能性のある結合分子のライブラリーをコードする遺伝子は、ウイルス中にパッケージ化され、可能性のある結合分子は、ウイルス表面に提示される (Clacksonら、1991、前掲書中; Marksら、1991、前掲書中; Smith、1985、前掲書中)。

【0074】

今日最も一般的に使用されるこのようなシステムは、それらの表面に抗体フラグメントを提示する糸状バクテリオファージであり、抗体フラグメントは、バクテリオファージのマイナーコートタンパク質への融合体として発現される (Clacksonら、1991、前掲書中; Marksら、1991、前掲書中)。しかしながら、他のウイルス (EP 39578)、細菌 (Gunneriussonら、1999、前掲書中; Daughertyら、1998、Protein Eng 11 (9): 825~32; Daughertyら、1999、Protein Eng 12 (7): 613~21)、および酵母 (Shustaraら、1999、J Mol Biol 292 (5): 949~56) を使用するディスプレイのための他のシステムも使用されている。

【0075】

加えて、いわゆるリボソームディスプレイシステムでポリペプチド産物のそのコード化

10

20

30

40

50

mRNAへの連結 (Hanes および Pluckthun、1997、前掲書中; He および Tauszig、1997、前掲書中; Nemotoら、1997、前掲書中)、またはその代わりにポリペプチド産物のコード化DNAへの連結 (米国特許第5,856,090号およびWO98/37186を参照)を利用するディスプレイシステムが開発されている。

【0076】

可能性のある結合分子がライブラリーから選択される場合、通常、規定されたモチーフを有する1つまたは少数のセクターペプチドが採用される。セクターペプチドに関するモチーフの設計において、ペプチド中のフレキシビリティを減少させる構造をもたらすアミノ酸残基、または結合分子との相互作用を可能にする荷電、極性もしくは疎水性側鎖が使用される可能性がある。

10

【0077】

例えば:

(i) プロリンは、その側鎖がアルファ炭素と窒素との両方に結合しているため、ペプチド構造を安定化する可能性がある;

(ii) フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンは、芳香族側鎖を有し、高度に疎水性であり、それに対してロイシンおよびイソロイシンは、脂肪族側鎖を有し、疎水性でもある;

(iii) リシン、アルギニンおよびヒスチジンは、塩基性側鎖を有し、中性pHで正電荷を有すると予想され、それに対してアスパラギン酸およびグルタミン酸は、酸性側鎖を有し、中性pHで負電荷を有すると予想される;

20

(iv) アスパラギンおよびグルタミンは、中性pHで中性であるが、水素結合に参加する可能性があるアミド基を含む;

(v) セリン、スレオニンおよびチロシン側鎖は、水素結合に参加する可能性があるヒドロキシル基を含む。

【0078】

典型的には、結合剤の選択は、様々な結合分子に対応するスポットへの結合を分析するためのアレイ技術およびシステムの使用を含んでいてもよい。

【0079】

代替または追加の実施形態において、第1の結合剤は、表面上に(例えばマルチウェルプレートまたはアレイ上に)固定化されている。

30

【0080】

抗体の可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)ドメインは、抗原認識に関与し、これは初期のプロテアーゼ消化実験で初めて認識された事実である。げっ歯類抗体の「ヒト化」によってさらなる確証が得られた。結果生じる抗体が親のげっ歯類抗体の抗原特異性を保持するように、げっ歯類由来の可変ドメインをヒト由来の定常ドメインに融合してもよい(Morrisonら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851~6855)。

【0081】

抗原特異性が可変ドメインによって付与されたものであり定常ドメインとは無関係であることは、全て1つまたはそれ以上の可変ドメインを含む抗体フラグメントの細菌発現を含む実験から公知である。これらの分子としては、Fab様分子(Betterら(1988) Science 240, 1041); Fv分子(Skerraら(1988) Science 240, 1038); V_H および V_L パートナードメインがフレキシブルなオリゴペプチドを介して連結されている単鎖Fv(ScFv)分子(Birdら(1988) Science 242, 423; Hustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879)ならびに分離したVドメインを含む単一ドメイン抗体(dAb)(Wardら(1989) Nature 341, 544)が挙げられる。それらの特異的な結合部位を保持する抗体フラグメントの合成に関する技術の一般的な総論は、WinterおよびMilstein(1991) Nature

40

50

349、293～299で見出すことができる。

【0082】

「ScFv分子」とは、V_HおよびV_Lパートナードメインがフレキシブルなオリゴペプチドを介して連結されている分子を意味する。

【0083】

抗体全体よりも抗体フラグメントを使用することの利点は、何倍もある。フラグメントのより小さいサイズは、薬理学的特性の改善、例えばより優れた固形組織の浸透性をもたらす可能性がある。抗体全体のエフェクター機能、例えば補体結合は取り除かれる。Fab、Fv、ScFvおよびdAb抗体フラグメントはいずれも、大腸菌(E. coli)で発現させてそれから分泌させることができるため、前記フラグメントの容易な大量生産が可能になる。

10

【0084】

抗体全体、およびF(ab')₂フラグメントは、「2価」である。「2価」とは、前記抗体およびF(ab')₂フラグメントが2つの抗原の結合部位を有することを意味する。対照的に、Fab、Fv、ScFvおよびdAbフラグメントは1価であり、1つのみの抗原の結合部位を有する。

【0085】

抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。好適なモノクローナル抗体は、公知の技術、例えば、いずれも参照によって本明細書に組み入れられる「Monoclonal Antibodies: A manual of techniques」、H Zola (CRC Press、1988)および「Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and applications」、J G R Hurrell (CRC Press、1982)で開示された技術によって調製することができる。

20

【0086】

代替または追加の実施形態において、第1の結合剤は、表面上に(例えばマルチウェルプレートまたはアレイ上に)固定化されている。

【0087】

抗体全体よりも抗体フラグメントを使用することの利点は、何倍もある。フラグメントのより小さいサイズは、薬理学的特性の改善、例えばより優れた固形組織の浸透性をもたらす可能性がある。抗体全体のエフェクター機能、例えば補体結合は取り除かれる。Fab、Fv、ScFvおよびdAb抗体フラグメントはいずれも、大腸菌で発現させてそれから分泌させることができるため、前記フラグメントの容易な大量生産が可能になる。

30

【0088】

抗体全体、およびF(ab')₂フラグメントは、「2価」である。「2価」とは、前記抗体およびF(ab')₂フラグメントが2つの抗原の結合部位を有することを意味する。対照的に、Fab、Fv、ScFvおよびdAbフラグメントは1価であり、1つのみの抗原の結合部位を有する。

【0089】

抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。好適なモノクローナル抗体は、公知の技術、例えば、いずれも参照によって本明細書に組み入れられる「Monoclonal Antibodies: A manual of techniques」、H Zola (CRC Press、1988)および「Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and applications」、J G R Hurrell (CRC Press、1982)で開示された技術によって調製することができる。

40

【0090】

従って、第1の結合剤は、抗体またはその抗原結合フラグメントを含んでいてもよく、またはそれからなってもよい。好ましくは、抗体またはその抗原結合フラグメントは、組換え抗体またはその抗原結合フラグメントである。抗体またはその抗原結合フラグメ

50

ントは、免疫グロブリン分子の s c F v、F a b、および結合ドメインからなる群から選択することができる。

【0091】

第1の結合剤を表面上に固定化してもよい。

【0092】

試験サンプル中における1種またはそれ以上のバイオマーカーを、検出可能な部分で標識してもよい。

【0093】

「検出可能な部分」は、その部分が検出可能な部分であり、その部分の相対量および/または位置(例えば、アレイ上の位置)が決定されるという意味を包含する。

10

【0094】

好適な検出可能な部分は当業界において周知である。

【0095】

従って、検出可能な部分は、特定の条件に晒されると検出することができる蛍光性および/または発光性および/または化学発光性の部分であり得る。例えば、蛍光性の部分は、蛍光性の部分の励起を引き起こすために、放射線(すなわち光)に特定の波長および強度で晒されることが必要な場合があり、それによって、検出することができる特定の波長でその部分が検出可能な蛍光を放出することが可能になる。

【0096】

その代わりに、検出可能な部分は、(好ましくは検出不可能な)基質を可視化および/または検出することができる検出可能な生成物に変換することができる酵素であり得る。好適な酵素の例は、以下において、例えばELISAアッセイに関してより詳細に論じられる。

20

【0097】

その代わりに、検出可能な部分は、イメージングにおいて有用な放射性原子であり得る。好適な放射性原子としては、シンチグラフィによる研究の場合、 ^{99m}Tc および ^{123}I が挙げられる。他の容易に検出可能な部分としては、例えば、ここでも ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{19}F 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、ガドリニウム、マンガンまたは鉄などの磁気共鳴映像法(MRI)のためのスピン標識が挙げられる。明らかに、検出しようとする作用物質(例えば、本明細書で説明される試験サンプルおよび/もしくは対照サンプル中における1種またはそれ以上のバイオマーカー、ならびに/または選択されたタンパク質の検出で使用するための抗体分子など)は、検出可能な部分を容易に検出可能にするために十分な適切な原子同位体を有していなければならない。

30

【0098】

放射性または他の標識は、本発明の作用物質(すなわち本発明の方法のサンプルおよび/または本発明の結合剤中に存在するタンパク質)に公知の方法で取り入れることができる。例えば、結合部分がポリペプチドである場合、結合部分を生合成してもよいし、または例えば水素の代わりにフッ素-19を含む好適なアミノ酸前駆体を使用する化学的アミノ酸合成によって合成してもよい。 ^{99m}Tc 、 ^{123}I 、 ^{186}Rh 、 ^{188}Rh および ^{111}In などの標識は、例えば、結合部分中でシステイン残基を介して接続させることができる。イットリウム-90は、リシン残基を介して接続させることができる。 ^{123}I を取り入れるためには、IODOGEN方法(Frakerら(1978)Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49~57)を使用することができる。他の方法は、参考文献(「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」、J-F Chatal、CRC Press、1989)で詳細に説明されている。他の検出可能な部分(例えば酵素的、蛍光性、発光性、化学発光性または放射性的の部分)をタンパク質にコンジュゲートするための方法が当業界において周知である。

40

【0099】

好ましくは、対照サンプル中における1種またはそれ以上のバイオマーカーは、検出可

50

能な部分で標識されている。検出可能な部分は、蛍光性の部分；発光性の部分；化学発光性の部分；放射性の部分；酵素的な部分からなる群から選択することができる。しかしながら、検出可能な部分は、ビオチンであることが好ましい。

【0100】

追加の実施形態において、工程（b）、（d）および/または工程（f）は、1種またはそれ以上のバイオマーカーに結合することができる第2の結合剤を含むアッセイを使用して行われ、第2の結合剤は検出可能な部分を含む。好ましくは、第2の結合剤は、抗体またはその抗原結合フラグメントを含むかまたはからなる。好ましくは、抗体またはその抗原結合フラグメントは、組換え抗体またはその抗原結合フラグメントである。最も好ましくは、抗体またはその抗原結合フラグメントは、免疫グロブリン分子のscFv、Fab 10
および結合ドメインからなる群から選択される。代替または追加の実施形態において、検出可能な部分は、蛍光性の部分；発光性の部分；化学発光性の部分；放射性的部分および酵素的な部分からなる群から選択される。好ましくは、検出可能な部分は、蛍光性の部分（例えばAlexa Fluor色素、例えばAlexa647）である。

【0101】

代替または追加の実施形態において、本発明の第1の態様の方法は、ELISA（酵素結合免疫吸着検査法）を含むかまたはからなる。

【0102】

血清または血漿タンパク質を検出するための好ましいアッセイとしては、酵素結合免疫吸着検査法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、イムノラジオメトリック 20
アッセイ（IRMA）および免疫酵素アッセイ（EMA）、例えばモノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体を使用するサンドイッチアッセイなどが挙げられる。例示的なサンドイッチアッセイは、参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第4,376,110号および4,486,530号でDavidらにより説明されている。当業者周知のように、細胞学実験の診断試験において周知の方法では、スライド上の細胞の抗体染色を使用する場合もある。

【0103】

典型的には、アッセイは、通常固相アッセイで着色された反応生成物を生じる酵素の使用を典型的に含むELISA（酵素結合免疫吸着検査法）である。ホースラディッシュペルオキシダーゼおよびホスファターゼなどの酵素が広く採用されてきた。ホスファターゼ 30
反応を増幅する方法は、直ちに第2の酵素系のための補酵素として作用するNADを生成するための基質としてNADPを使用することである。大腸菌（Escherichia coli）からのピロホスファターゼは、組織中に存在せず、安定であり、優れた反応色を示すことから、この酵素は優れたコンジュゲートを提供する。ルシフェラーゼなどの酵素をベースとした化学発光系も使用することができる。

【0104】

ELISA方法は当業界において周知であり、例えばELISA Guidebook (Methods in Molecular Biology)、2000、Crowther、Humana Press、ISBN-13:978-0896037281 40
（この開示は参照によって組み入れられる）を参照されたい。

【0105】

ビタミンであるビオチンとのコンジュゲーションは、ビオチンと、ビオチンが大きな特異性および親和性で結合する酵素に連結されたアビジンまたはストレプトアビジンとの反応によって容易に検出することができるため、頻繁に使用される。

【0106】

しかしながら、工程（b）、（d）および/または工程（f）はその代わりに、アレイを使用して行われる。アレイそれ自体は当業界において周知である。典型的には、アレイは、間隔を置いた（すなわち別々の）領域（「スポット」）を有し、それぞれ固体支持体の表面上に形成された有限の領域を有する線状または二次元構造から形成される。またアレイは、ビーズ構造であってもよく、その場合各ビーズは、分子コードまたはカラーコー 50

ドによって同定することもでき、または連続フロー中で同定することもできる。また分析を逐次的に行うこともでき、その場合、サンプルは一連のスポット上を通過して、それぞれが溶液から所定クラスの分子を吸着する。固体支持体は、典型的にはガラスまたはポリマーであり、最も一般的に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ビニルまたはポリプロピレンである。固体支持体は、チューブ、ビーズ、ディスク、シリコンチップ、マイクロプレート、ポリフッ化ビニリデン（P V D F）膜、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、他の多孔質膜、非多孔質膜（例えば、なかでも、プラスチック、ポリマー、パースペックス、シリコン）、複数のポリマー製のピン、もしくは複数のマイクロタイターウェル、またはタンパク質、ポリヌクレオチドおよび他の好適な分子の固定化ならびに／もしくはイムノアッセイの遂行に好適な他のあらゆる表面の形態であり得る。結合プロセスは当業界において周知であり、一般的に、タンパク質分子、ポリヌクレオチドまたは同種のを、固体支持体に架橋すること、共有結合させること、または物理的に吸着させることからなる。周知の技術、例えば接触型もしくは非接触型のプリンティング、マスキングまたはフォトリソグラフィを使用することによって、各スポットの位置を規定することができる。総論については、Jenkins、R. E.、Pennington、S. R.（2001、Proteomics、2、13～29）およびLalra（2002、Drug Discov Today 15；7（別冊18）：S143～9）を参照されたい。

10

【0107】

典型的には、アレイは、マイクロアレイである。「マイクロアレイ」は、少なくとも約 $100 / \text{cm}^2$ 、好ましくは少なくとも約 $1000 / \text{cm}^2$ の別々の領域の密度を有する領域のアレイを意味することを包含する。マイクロアレイ中の領域は、典型的な寸法、例えば、約 $10 \sim 250 \mu\text{m}$ の範囲の直径を有し、ほぼ同じ距離でアレイ中の他の領域から隔てられている。またアレイは、マクロアレイまたはナノアレイであってもよい。

20

【0108】

好適な結合分子（上記で論じられた）が同定され単離されたら、当業者は、分子生物学分野において周知の方法を使用してアレイを製造することができる。

【0109】

従って、アレイは、ビーズベースのアレイまたは表面ベースのアレイであってもよい。好ましくは、アレイは、マクロアレイ、マイクロアレイおよびナノアレイからなる群から選択される。

30

【0110】

代替または追加の実施形態において、本発明の第1の態様に係る方法は：

(i) サンプル中に存在するバイオマーカーをピオチンで標識する工程；

(ii) ピオチンで標識されたタンパク質を、アレイの表面上に別々の位置で固定化された複数の s c F v を含むアレイと接触させる工程であって、s c F v は表 I I I 中のタンパク質の1種またはそれ以上に対する特異性を有する、工程；

(iii) 固定化された s c F v を、蛍光色素を含むストレプトアビジンコンジュゲートと接触させる工程；および

(iv) アレイ表面上の別々の位置における該色素の存在を検出する工程
を含み、アレイ表面上での該色素の発現は、サンプル中における表 A からのバイオマーカーの発現の指標である。

40

【0111】

代替の実施形態において、工程 (b)、(d) および / または (f) は、1種またはそれ以上のバイオマーカーをコードする核酸分子の発現を測定することを含む。好ましくは、核酸分子は、c D N A 分子または m R N A 分子である。最も好ましくは、核酸分子は、m R N A 分子である。

【0112】

従って、工程 (b)、(d) および / または (f) における1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現は、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション

50

、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素PCR（RT-PCR）、定量リアルタイムPCR（qRT-PCR）、ナノアレイ、マイクロアレイ、マクロアレイ、オートラジオグラフィーおよびインサイチュハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法を使用して行ってもよい。好ましくは、工程（b）における1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現は、DNAマイクロアレイを使用して決定される。

【0113】

代替または追加の実施形態において、工程（b）、（d）および/または（f）における1種またはそれ以上のバイオマーカーの発現を測定することは、表Aで同定されたバイオマーカーの1種をコードする核酸分子にそれぞれ個々に選択的に結合することができる1つまたはそれ以上の結合部分を使用して行われる。

10

【0114】

さらなる実施形態において、1つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、核酸分子を含むかまたはからなる。従って、1つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、DNA、RNA、PNA、LNA、GNA、TNAまたはPMOを含んでもよいし、またはそれからなっているもよい。しかしながら、1つまたはそれ以上の結合部分はそれぞれ、DNAを含むかまたはからなることが好ましい。

【0115】

好ましくは、1つまたはそれ以上の結合部分は、5から100ヌクレオチドの長さである。より好ましくは、1つまたはそれ以上の核酸分子は、15から35ヌクレオチドの長さである。さらにより好ましくは、結合部分は、検出可能な部分を含む。

20

【0116】

追加の実施形態において、検出可能な部分は、蛍光性の部分；発光性の部分；化学発光性の部分；放射性的部分（例えば、放射性原子）；および酵素的な部分からなる群から選択される。好ましくは、検出可能な部分は、放射性原子を含むかまたはからなる。放射性原子は、テクネチウム-99m、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、リン-32、硫黄-35、重水素、トリチウム、レニウム-186、レニウム-188およびイットリウム-90からなる群から選択することができる。

【0117】

しかしながら、結合部分の検出可能な部分は、蛍光性の部分（例えばAlexa Fluor色素、例えばAlexa647）であり得る。

30

【0118】

代替または追加の実施形態において、工程（b）、（d）および/または（f）で用意されるサンプルは、未分画の血液、血漿、血清、組織液、膵臓組織、膵液、胆汁および尿からなる群から選択される。好ましくは、工程（b）、（d）および/または（f）で用意されるサンプルは、未分画の血液、血漿および血清からなる群から選択される。より好ましくは、工程（b）、（d）および/または（f）で用意されるサンプルは、血漿である。別の好ましい実施形態において、工程（b）、（d）および/または（f）で用意されるサンプルは、血清である。

【0119】

代替の実施形態において、本発明の第1の態様の方法は、膵体および/または膵尾がんを膵頭がんから区別するためであり：

40

a) 個体からの試験しようとするサンプルを用意する工程；

b) 試験サンプル中における表A(i)、(ii)、(iv)および/または(vi)で規定された群から選択される少なくとも1種のバイオマーカーの発現を測定することによって、試験サンプルのバイオマーカーシグネチャーを決定する工程

を含むかまたはからなり、試験サンプル中における表A(i)、(ii)および/または(iii)で規定された群から選択される少なくとも1種のバイオマーカーの発現は、膵体および/もしくは膵尾がん、または膵頭がんの存在の指標である。この実施形態において、試験サンプルは、膵臓がんサンプルであるとすでに同定されている可能性がある（例

50

えば、上述した方法を使用して)。その代わりに、試験サンプルは、膵臓がんサンプルであると同定されていない可能性がある。陽性および陰性対照サンプルは、適切に選択することができる。

【0120】

代替または追加の実施形態において、患者は、膵臓がんの同定後に適切に処置される。例えば、腫瘍を外科的に除去（切除）して、化学療法（すなわち、抗新生物薬）で処置するか、および/または放射線治療で処置することができる。従って、本発明は、膵臓がんを有するヒトの処置方法であって、患者は、本発明の第1の態様の方法を使用して膵臓がんを有すると同定される、前記方法を包含する。

【0121】

本発明の第2の態様は、本発明の第1の態様で規定されたような1種またはそれ以上の結合剤を含む、個体において膵臓がんの存在を決定するためのアレイを提供する。

【0122】

本発明の方法で使用するのに好適なアレイは、上記で論じられている。

【0123】

好ましくは、1種またはそれ以上の結合剤は、表Aで規定されたバイオマーカーの全てに結合することができる。

【0124】

本発明の第3の態様は、個体において膵臓がんの存在を決定するための診断マーカーとしての、本発明の第1の態様で規定された群から選択される1種またはそれ以上のバイオマーカーの使用を提供する。好ましくは、表IIIで規定されたタンパク質の全てが、個体において膵臓がんの存在を決定するための診断マーカーとして使用される。

【0125】

本発明の第4の態様は、膵臓がんの存在を決定するためのキットであって：

A) 本発明の第1の態様に係る1種またはそれ以上の第1の結合剤または本発明の第2の態様に係るアレイ；および

B) 本発明の第1の態様に係る方法を行うための説明書を含む前記キットを提供する。

【0126】

本発明の第5の態様は、個体において膵臓がんの存在を決定するための、本発明の第1の態様で規定された群から選択される1種またはそれ以上の結合剤/部分の使用を提供する。好ましくは、表IIIで規定されたタンパク質の全てに関する結合剤/部分が、個体において膵臓がんの存在を決定するための診断マーカーとして使用される。

【0127】

ここで、本発明のある特定の態様を例示する好ましい非限定的な例を以下の表および図面を参照しながら説明する。

【図面の簡単な説明】

【0128】

【図1】診断に従ってサンプルを着色したPCA（赤色 = PC、黄色 = BC、青色 = NC）の図である。データを、 $p = 1e - 10$ までフィルタリングした（63種の抗体）。

【図2】後退消去分析の図である。第1のトレーニングセットにおける各抗体消去ラウンド後のカルバック-ライブラー（K-L）の誤差を（A）PC対NCおよび（B）PC対BCに関してプロットした。（C）AUC値のボックスプロットを、トレーニング/試験セットの10の異なる対における25種の抗体のSVMモデルから生成した。

【図3】腫瘍の局在性に従ってサンプルを着色したPCA（赤色 = 頭の腫瘍、黄色 = 体および尾の腫瘍、青色 = 正常対照）の図である。データを、 $p = 1e - 10$ までフィルタリングした（46種の抗体）。

【図4】サンプルのハイブリダイゼーションおよびスキャニング後の、A1~6およびB1~7と表示された13のサブアレイを用いたマイクロアレイスライドの代表的な画像である。サブアレイB4を拡大して、 33×31 個のスポットを有するアレイのレイアウト

10

20

30

40

50

を示す。アレイは、標識されたBSAのプリントされた列（列1、11、21、および31）で隔てられた3つのセグメントからなる。各セグメント内の異なる位置に分布した各セグメントにつき1つの計3つの複製スポットに、各抗体をプリントした。

【図5】PCAプロットとして示されるデータの前処理の図である。A) R1~R5と表示された5ラウンド（日）の分析に従って着色された生データ。B) 分析のラウンドに基づくクラスタリングが消去されたことを示す正規化したデータ。

【図6】PC対NCに関するp値および変化倍率を対応させた、抗体の完全セットからのデータに基づきバイオマーカーによって同定された疾患に対する経路分析の図である。

【発明を実施するための形態】

【0129】

10

〔実施例〕

材料および方法

サンプル

インフォームドコンセント後、スペインの5つの異なる場所で、膵臓がんを有する患者（PC、n = 156）、良性対照（BC、n = 152）、および正常対照（NC、n = 30）から338個の血清サンプルを収集した（表1）。事前に最適化されたプロトコールを使用して単一の機会にサンプルの全セットを標識した[32、33]。簡単に言えば、粗サンプルをPBSで1:45に希釈し、結果として概算で2mg/mLのタンパク質濃度を得て、0.6mMのEZ-Linkスルホ-NHS-LC-ビオチン（Pierce、Rockford、IL、USA）を使用してタンパク質に対して15:1の過量モル濃度のビオチンで標識した。PBSに対して72時間透析することによって未結合のビオチンを除去した。標識されたサンプルを等分し、-20℃で保存した。

20

【0130】

抗体

合計で、98種の公知の血清抗原および31種の4~6アミノ酸のモチーフに対して向けられた293個のヒト組換えscFv抗体（ここではCIMS1-31と表示される）[34]を、抗体マイクロアレイの内容物として使用した（使用された抗体の完全なリストについては表4を参照）。15mLの大腸菌培養物中で抗体を産生し、MagneHisタンパク質精製システム（Promega、Madison、WI、USA）およびKingFisher96ロボット（ThermoFisherScientific、Waltham、MA、USA）を使用して300μL中のペリプラスムから精製した。Zeba96ウェル脱塩スピンプレート（Pierce）を使用して、溶出緩衝液をPBSと交換した。NanoDrop（ThermoScientific、Wilmington、DE、USA）を使用してタンパク質収量を測定し、10%SDS-PAGE（Invitrogen、Carlsbad、CA、USA）を使用して純度をチェックした。

30

【0131】

抗体マイクロアレイ

非接触型プリンター（SciFlexarrayerS11、Sciencion、Berlin、Germany）を使用して黒いMaxiSorpスライド（NUNC、Roskilde、Denmark）上に抗体マイクロアレイを生産した。各スライド上に13個の同一なサブアレイをプリントし、各アレイは、31×33個のスポットからなり、直径130μmであり、スポットの中心間の距離は200μmであった。各サブアレイは、標識されたBSAのプリントされた列で隔てられた3つのセグメントからなっていた（図4）。各サブアレイセグメントにつき1つの計3つの複製において各抗体をプリントし、十分な再現性を確保するために異なる位置に置いた。8つのスライド、すなわち104のサブアレイを5日間毎日プリントした。プリンティングを一晩行い、スライドを即座に翌日のアレイ分析に使用した。

40

【0132】

各スライドをハイブリダイゼーションガセット（Schott、Jena、Germany）

50

any)中にマウントし、PBSMT (PBS中、1% (w/v) 乳汁、1% (v/v) Tween-20)で1時間ブロックした。その間、標識されたサンプルのアリコート氷上で融解させ、96ウェルプレート中、PBSMTで1:10に希釈した。スライドを、PBST (PBS中0.05% (v/v) Tween-20)で4回洗浄し、その後、希釈プレートからサンプルを添加した。揺動テーブル上でサンプルを2時間インキュベートし、PBSTで4回洗浄し、揺動テーブル上でPBSMT中の1 μ g/mLストレプトアビジン-Alexaと共に1時間インキュベートし、再度PBSTで4回洗浄した。最後に、スライドをハイブリダイゼーションチャンバーから取り外し、迅速にdH₂O中に浸し、N₂流下で乾燥させた。共焦点マイクロアレイスキャナー (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Wellesley, MA, USA)において、10 μ mの解像度で、60%のPMTゲインおよび90%のレーザー出力を使用してスライドを即座にスキャンした。ScanArray Expressソフトウェアバージョン4.0 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences)を使用して、固定されたサークルオブションを使用して、シグナル強度を定量した。ローカルバックグラウンドサブトラクションを用いた強度値をデータ分析に使用した。

10

【0133】

データの前処理

いずれかの複製CVが平均値から15%を超えない限り3つの複製スポットの平均値を使用した。いずれかの複製CVが除外される場合は、その代わりに2つの残りの複製の平均値を使用した。平均複製CVは8.3% (\pm 5.5%)であった。15%のカットオフCVを適用して、全ての3つの複製スポットからデータ値の70%を計算し、残りの30%を2つの複製から計算した。

20

【0134】

分散の正規化戦略および初期分析の評価のために、3D主成分分析 (Glucose, Lund, Sweden)を使用してデータを可視化した。1つの(慢性膵臓炎)サンプルを異常値とみなし(いかなるシグナルもほとんど得られなかった)、データから排除した。log₁₀生データでの主成分分析から、i)スライド上のサンプルのサブアレイの配置、ii)患者の性別、iii)患者の年齢、およびiv)血清サンプル収集センターにおける差を見出すことができなかつたことが示された。分析の日間についてのみわずかな系統的な差を観察することができ(ラウンド1~5、特に1日目に関しては、アレイのプリンティング中の湿度の小さい差に起因する可能性がある。図4を参照)、これは正規化によって無効にされた。データを二段階で正規化した。第1に、減算グループ平均戦略 (subtract group mean strategy)を使用して分析のラウンド(日)間の差を消去した。分析の各ラウンド中に各抗体からの平均強度を計算し、単一の値から引くことにより、ゼロをデータの中心にした。それぞれの個々のデータポイントに各抗体からの全範囲の平均シグナルを足して、負の値を回避した。第2に、アレイとアレイとの間の差(例えば固有のサンプルバックグラウンドの蛍光差(図4を参照))を、これまでに説明されているようにして、最も低いCVを有する抗体の20%に基づき、各サブアレイにつきスケール因子を計算することによって操作した[23、35]。データの正規化をPCAプロットで可視化した(図5)。

30

40

【0135】

データ分析

分析は、PCA、階層的クラスター分析、スチューデントのt検定および変化倍率、加えて多群ANOVA (PC、NCおよびCP) (Glucose)を使用したPC対NCおよびPC対BCの2グループの比較に基づいていた。R (www.r-project.org)で、制約のコストを1 (デフォルト値)に設定した線状の核を使用してサポートベクターマシン (SVM) 分析を行った。データをトレーニングセットと試験セットとに無作為に分け、各グループからのサンプルの3分の2がトレーニングセットに、サンプルの残りの3分の1が試験セットになった。これまでに説明されているようにして、トレ

50

ーニングセットデータを使用して、その時点で1つの抗体を排除して、分類分析において最も小さいカルバック-ライブラーダイバージェンスが得られたときに除去された抗体を繰り返して消去する後退消去アルゴリズムを適用した[31]。消去しようとする最後の25種の抗体を使用して、対応する試験セットで直接適用されたトレーニングセットにおいて分類モデルを構築した。ROC曲線(AUC)下の面積を、試験セットにおけるシグネチャーの精度の尺度として使用した。10の異なる無作為に生成されたトレーニングおよび試験セットの対で、この手順を10回繰り返した。最終的に、各抗体に、10のトレーニングセットにおける消去の順番に基づくスコアが付与された。消去プロセスにおける平均耐久度からスコアを計算した(消去しようとする第1の抗体=1、消去しようとする最後の抗体=293)。ここではSN+SPの最大合計値と定義されるSVM予測値の最適な閾値から、感度(SN)および特異度(SP)を計算した。最後に、MetaCore(Thomson Reuters, New York, NY, USA)を使用して経路分析を行った。

【0136】

結果

示差的なタンパク質発現の分析

分散の分析から、血清サンプル中、がんと対照とで強い示差的なシグナル伝達パターンを有する多数の抗体が明らかになった。実際に、多群ANOVAから、抗体の75%が、血清データ中、 $p < 0.001$ の有意レベルを提示したことが示された。主成分分析から、がんサンプルは、明らかに、良性対照よりも正常対照からよりよく区別されたことが実証された(図1)。

【0137】

各サブグループの比較につき、最低のp値を提示する25種の抗体を表2に示す。PC対NCの比較から、強く上方および下方調節された分析物が明らかになったが、PC対BCの分析から、より控えめな変化倍率を示す分析物が同定され、これらはほとんど例外なくPC対BCで上方調節されていた(表2)。最高レベルの示差的発現を示す分析物は、PC対NCに関して、GAK、IL-6、LDL、およびMAPK8($p = 4 \times 10^{-20}$)であり、一方でPC対BCに関して有意に異なるタンパク質のセットを同定したところ、シスタチンC、IL-13、およびIL-1が最低のp値($p = 3 \times 10^{-10}$)を提示した。

【0138】

PC対NCに関するp値および変化倍率を対応させた抗体の全セット($n = 293$)に基づく経路分析から、バイオマーカーによって疾患を検索した場合、上位ヒットとしてインスリン産生に関する疾患(高インスリン血症およびインスリン耐性)が示唆された(図6)。また代謝に関連する状態、例えばグルコース代謝障害、肥満症、および過体重も有意な関連を示し、IおよびII型糖尿病、クローン病、肝炎、自己免疫および感染性の状態、および様々な種類の新生物(膵臓の新生物を包含する)のコアバイオマーカーネットワークも同様であった。従って経路分析によって同定された疾患の大半は、PCに関連していたか、または症状の面でPCと関連している。

【0139】

分類のためのシグネチャー

次に、データを無作為にトレーニングおよび試験セットにさらに分けた。トレーニングセットを使用して、SVM分析に基づく後退消去アルゴリズムを適用して、抗体を1つずつ排除することによって、最も識別力のある抗体の組合せを同定した。消去プロセス全体にわたりカルバック-ライブラー(K-L)ダイバージェンスが小さかったこと(33.2)によって示されるように、PCおよびNCの分類は高度に正確であった(図2A)。消去プロセス中に7種の抗体のみが残ったとき、突出したK-L最小値(12.0)が達成された。この7プレックスのタンパク質パネルは、IL-6、シスタチンC、IL-8、IL-11、C1阻害剤、エオタキシン、およびHADH2を包含し、事前に見たことがないサンプルの対応する試験セットでそれぞれ100%および96%の感度(SN)

10

20

30

40

50

および特異度 (SP) を提示したことから、ごく少数の分析物を組み合わせることによって PC および NC の分類がほぼ完全になることが実証された。対照的に、PC を BC と比較した場合、K-L 値はそれより有意に高かった (181.3)。ここで、最小の K-L 値 (50.0) はそれほど突出していなかったことから、PC と BC との最適な区別には、よりかなり大きい抗体パネルが必要であったことが示された (図 2 B)。各サブグループの比較につき、10 の異なる無作為に生成されたトレーニングセットが後退消去に使用されるまで手順を繰り返した。結果得られた K-L 曲線は図 2 に示した曲線に高度に類似していたことから、PC 対 BC の最適な分類のためには、平均 67 種の抗体が必要であると予想されることが示された (図 2 B)。

【0140】

実現可能な数の抗体のシグネチャーを生成して評価するために、本発明者らは、各消去プロセスから上位 25 種の抗体を選び、これらを使用してトレーニングセットにおいて SVM 分類モデルを構築した。対応する試験セットにおけるモデルによって生成された AUC 値を、分類精度の尺度として使用した (図 2 C)。生成されたそれぞれ 25 抗体のシグネチャーは、高い精度で (平均 AUC は 0.98) NC から PC を予測することができた。10 のシグネチャーの感度および特異度は、90% SN および 85% SP から、100% SN および SP までの範囲であり、平均 SN および SP は 95% であった。対照的に、BC から PC を予測することはより難しく (平均 AUC は 0.67)、最良性能のシグネチャーで 76% SN および 67% SP であった。

【0141】

最後に、各抗体に、消去プロセスにおけるその平均耐久度に対応するスコアが付与された (表 3)。PC 対 NC 分析中、10 種のシグネチャーが高度に類似していた。例えば、上位の抗体は、IL-11 を標的化するものであり、293 回の消去から 291.4 の総合スコアを示し、10 回のうち 4 回において消去しようとする最後の抗体であった。合計で、PC 対 NC に関して 25 種の最高のスコア付けされた抗体は、サイトカインおよびケモカイン (IL-11、IL-6、IL-13、IL-8、TNF-、およびエオタキシン)、補体成分 (C1 阻害剤、C1q、C5、および因子 B)、酵素 (HADH2、GAK、および ATP-5B) からより多くに至る 20 種の重複のない分析物に相当していた。高度に異なるタンパク質のセットは、PC 対 BC に関して上位マーカーのようであり、上位にスコア付けされた分析物のなかでも、MAPK1、TNFRSF3、UCHL5、IL-4、Apo-A1、Apo-A4、CD40 リガンド、KSYK およびその他を含んでいた (表 3)。

【0142】

抗体スコアに基づくシグネチャー (表 3) が p 値から導き出されたもの (表 2) と異なっていたとしても、特に PC 対 NC のシグネチャーに関して有意なオーバーラップが観察され、25 種の抗体のうち 8 種 (IL-11、IL-6、IL-13、HADH2、LDL、GAK、C1q、および TNF-) が両方のシグネチャーで出現した。実際には、全てが上位 25 種の p 値リストに存在していないとしても、PC 対 NC に関する上位 25 種のスコア付けされた抗体の全てが有意に示差的に発現されていた。

【0143】

腫瘍の局在性

血清タンパク質プロファイルに基づいて、脾臓における腫瘍の由来に従ってがんサンプルを階層化することもできた。主成分分析から、脾体または脾尾に位置する腫瘍からのサンプルは、脾頭に位置する腫瘍からのサンプルがそうするよりも正常対照に近似してある程度クラスター化されること、および腫瘍の局在性に基づくがんサンプルの分離 (頭対体/尾) を観察することができたこと (図 3) が示された。示差的なタンパク質発現の分析から、頭および体/尾の腫瘍からの血清サンプル中で有意に異なるレベルを有する分析物の大規模リストが明らかになり、そこで抗体の 39% が p 値 < 0.001 を提示し、ほとんど例外なく体および尾の腫瘍と比較して頭の腫瘍で上方調節されたレベルを示した (表 5)。

10

20

30

40

50

【0144】

考察

この研究は、これまでに遂行されてきた膵臓がんを予測するためのバイオマーカーパネルの最大の多施設分析の1つを表す。これまで本発明者らが知る限りにおいて、これは、このような親和性プロテオミクスを使用した大きい膵臓がんコホート (> 300 サンプル) における血清分析物の最も多重化された分析である。社内の組換え抗体マイクロアレイを使用して分析を行ったが、このマイクロアレイは、数年かけて進化させた、現在主として免疫調節プロテオームの様々な標的に対して厳重に選択されたほぼ300種の抗体を包含するプラットフォームである [32、36]。ハイスループット生産および精製のために新規のプロトコルを採用して、これらの抗体を1週間未満で容易に生成し、平面マイクロアレイ上で3つの複製スポットにピコリットルスケールで迅速にプリントした。現行の設定で、ほんのわずかな体積 (< 1 μ L) の希釈していない血清を使用して、1日および1つのワークステーション当たり100個を超えるサンプルを並行して分析することができ、大きいサンプルコホートを数日中に分析することを可能にする。

10

【0145】

本発明の研究において、これらのアレイで338種の血清サンプルをプロファイリングし、膵臓がんを正常対照および良性対照と比較した。現行のアッセイなどの高度に多重化されたアッセイを使用すれば、特に免疫系のタンパク質などの高度に相互連結したタンパク質が標的化される場合、一定レベルの相関がみられる可能性が高い。単一のp値によって表された個々の抗体の識別力がそれでもなお興味あるものだとしても、最適な抗体の組合せを同定することに関して他の統計アプローチがより正確である可能性がある [37]。ここで、サポートベクターマシン分析に基づく教師付きモデルを使用した。データをトレーニングセットに分け、繰り返しの後退消去アルゴリズム、およびシグネチャーの分類力を試験した相補的な検証セットによって、それからバイオマーカーシグネチャーを同定した。

20

【0146】

このアプローチを採用することにより、p値によって表された示差的発現パターンと後退消去分析との両方から目的のタンパク質のリストを導き出した。後者から、PC対NCのほぼ完全な識別にわずか4から10種の抗体で十分であると予想されることが示され、この結果は、非常に励みになるものであり、免疫調節プロテオームをアッセイすることによって健康な対照からPCを容易に識別することができるという本発明者らの以前の観察を確認するものである [23、24]。しかしながら、PCをBC (主として慢性膵臓炎) と比較した場合、67種もの多くの抗体が最適な分類力に必要なようであった。これは、測定されたタンパク質のタイプによって部分的に説明することができる；免疫調節性の分析物は、いずれの状態においても免疫系が高度に影響を受けるために、単独の疾患特異性を示す可能性が低い。実際に、この研究で遂行された経路分析から、PCの高度に類似した全身性の影響、ならびに様々な他の状態、例えば高インスリン血症、インスリン耐性および代謝性疾患、加えて自己免疫および感染が確認され、ここでも症状の面で関連する良性の状態からPCを区別することにおける課題が実証された。従ってPCに関する関連免疫シグネチャーを同定することは、バランスを取る作業である。各結合剤がアッセイのコストと複雑さを増加させるため小さいパネルが望ましいが、それでもなおシグネチャーは、高感度で特異的な疾患のフィンガープリントを構成するほど十分に大きいことが必要である。この発見段階で、本発明者らは、25種の分析物が実現可能な開始点であると推論し、追跡研究によって、診断イムノアッセイに必要な感度および特異度をなお提示しつつも、これらのシグネチャーをよりいっそう小さいバイオマーカーパネルに簡略化できるかどうか判定されると予想される。

30

40

【0147】

シグネチャーの同定に2つの極めて異なる戦略を採用しているにもかかわらず、異なる分析から導き出されたシグネチャー間でそれでもなお大きいオーバーラップがあり、すなわち最高の総合後退消去スコアを獲得したマーカーは、一般的にも高度に示差的に発現さ

50

れていた。例えば、IL-11、IL-6、C1阻害剤、IL-13、HADH2、LDL、GAK、C1q、およびTNF- は両方のシグネチャーで出現することから、PC対NCに関して低いp値および高い後退消去スコアの両方が実証された。PC対BCに関して、C5、Apo-A4、BTk、TGF-1、MCP-1、およびUPF3Bで2つのシグネチャーがオーバーラップした。注目すべきことに、多数のマーカーが、NCおよびBCと比較した場合、両方でPCに関して可能性を示した。本発明者ら[23、24]および他者[38~40]による以前の研究では、C1阻害剤、C5、因子B、IL-13、MCP-1、およびTNF- を含むこれらのうち数種がPCに関連していたが、一方でHADH2、アセチルCoAデヒドロゲナーゼは、本発明者らが知る限りにおいてPCに関してこれまで報告されていなかった。加えて、これまでに本発明者らによって測定されてこなかった他のタンパク質もPCを区別する可能性を示した。例えば、GAK、セリン/スレオニンキナーゼはPC対NCにおいて大きく下方調節され、PC対NCに関する後退消去シグネチャーにも出現した。加えて、PC対BCに関して、TNFRSF3 (TNF- 受容体)、およびUPF3B、mRNAレギュレータータンパク質がp値および抗体スコアシグネチャーの両方に包含された。最終的に、MAPK1 (ERK2)は、PCで脱調節されることが示されているMAPK/ERKシグナル伝達経路のキナーゼであるが[41]、PC対BCに関して、後退消去シグネチャーで最高にスコア付けされたタンパク質であった。

【0148】

また血清サンプルも膵臓中の腫瘍位置に基づき階層化したが、これは本発明者らが知る限りにおいてこれまでプロテオミクスを用いてなされていなかった。腫瘍の由来に基づきサンプルを一定の程度に分離することができたこと、さらに、尾および体の腫瘍を有する患者からのサンプルの主要部分が、膵頭の腫瘍を有する患者からの血清がそうするよりも正常対照にわずかに近似してクラスター化されたことが示された。従ってこれらの結果から、膵臓中のその由来に基づくがんの全身性の影響における不一致が実証された。体/尾の腫瘍からのサンプルと比較して頭の腫瘍からのサンプル中で上方調節されることが見出された莫大な数の血清免疫調節タンパク質が、しばしば膵臓を十二指腸につなぐ周囲の腸間膜血管に侵入する膵頭に位置する腫瘍からのより深刻な全身性の影響を反映する可能性がある[3]。従ってこれらの発見から、抗体マイクロアレイでの血清プロファイリングは、膵頭の腫瘍と膵体/膵尾の腫瘍とを区別するのに適用できることから、潜在的に腫瘍処置の決定に役立つ可能性があることが示唆される。

【0149】

米国では、4番目に最も致死的ながんであるにもかかわらず、PCの発生率は低く、個体100000人当たり約11人である[42]。医療経済的な観点から、低い発生率が、一般集団でのPCに関するスクリーニングの動機を与えることを難しくしている。しかしながら、本発明者らがこれまでに示した感度および特異度に基づいて[24]、近年の研究は、PCに関してハイリスクの個体をスクリーニングすることの費用対効果を確認している[43]。PCに関する危険因子は、膵臓炎および良性新生物だけでなく、例えば家族性膵臓がん、遺伝性膵臓炎、BRCA変異、ポイツ-ジェガース症候群、糖尿病、およびヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 感染も包含する[44]。次の工程は、診断PCイムノアッセイのための関連標的集団の代表であるPCのリスクが高い個体のなかからPCを診断するために、本発明の研究において同定されたシグネチャーを調査することと予想される。

【0150】

結論として、90~100%の範囲で感度および特異度を提示する膵臓がんに関連する免疫シグネチャーを明らかにしたこの大規模に多重化された多施設研究は、PC診断の適用可能性を明確に実証したことに加え、膵臓中の腫瘍位置に基づき血清サンプルを階層化するための組換え抗体マイクロアレイの潜在力も示した。

【0151】

参考文献

10

20

30

40

50

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62:10-29.
- [2] Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467:1114-7.
- [3] Hidalgo M. Pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;362:1605-17.
- [4] Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Annals of surgery*. 1996;223:273-9. 10
- [5] Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, et al. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2000;4:567-79.
- [6] Furukawa H, Okada S, Saisho H, Ariyama J, Karasawa E, Nakaizumi A, et al. Clinicopathologic features of small pancreatic adenocarcinoma. A collective study. *Cancer*. 1996;78:986-90.
- [7] Shimizu Y, Yasui K, Matsueda K, Yanagisawa A, Yamao K. Small carcinoma of the pancreas is curable: new computed tomography finding, pathological study and postoperative results from a single institute. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2005;20:1591-4. 20
- [8] Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Nakaizumi A, Uehara H, Kitamura T, et al. Minute carcinoma of the pancreas measuring 1 cm or less in diameter--collective review of Japanese case reports. *Hepato-gastroenterology*. 1999;46:8-15.
- [9] Gangi S, Fletcher JG, Nathan MA, Christensen JA, Harmsen WS, Crownhart BS, et al. Time interval between abnormalities seen on CT and the clinical diagnosis of pancreatic cancer: retrospective review of CT scans obtained before diagnosis. *AJR American journal of roentgenology*. 2004;182:897-903.
- [10] Pelaez-Luna M, Takahashi N, Fletcher JG, Chari ST. Resectability of presymptomatic pancreatic cancer and its relationship to onset of diabetes: a retrospective review of CT scans and fasting glucose values prior to diagnosis. *The American journal of gastroenterology*. 2007;102:2157-63. 30
- [11] Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24:5313-27.
- [12] Koopmann J, Rosenzweig CN, Zhang Z, Canto MI, Brown DA, Hunter M, et al. Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12:442-6. 40
- [13] Brand RE, Nolen BM, Zeh HJ, Allen PJ, Eloubeidi MA, Goldberg M, et al. Serum biomarker panels for the detection of pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17:805-16.
- [14] Bunger S, Laubert T, Roblick UJ, Habermann JK. Serum biomarkers for improved diagnostic of pancreatic cancer: a current overview. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137:375-89.
- [15] Jiang JT, Wu CP, Deng HF, Lu MY, Wu J, Zhang HY, et al. Serum level of TSGF, CA242 and CA19-9 in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2004;10:1675-7. 50

- [16] Duraker N, Hot S, Polat Y, Hobek A, Gencler N, Urhan N. CEA, CA 19-9, and C A 125 in the differential diagnosis of benign and malignant pancreatic diseases with or without jaundice. *Journal of surgical oncology*. 2007;95:142-7.
- [17] Ni XG, Bai XF, Mao YL, Shao YF, Wu JX, Shan Y, et al. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2005;31:164-9.
- [18] Faca VM, Song KS, Wang H, Zhang Q, Krasnoselsky AL, Newcomb LF, et al. A mouse to human search for plasma proteome changes associated with pancreatic tumor development. *PLoS medicine*. 2008;5:e123. 10
- [19] Firpo MA, Gay DZ, Granger SR, Scaife CL, DiSario JA, Boucher KM, et al. Improved diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using haptoglobin and serum amyloid A in a panel screen. *World journal of surgery*. 2009;33:716-22.
- [20] Orzechowski R, Hamelinck D, Li L, Gliwa E, vanBrocklin M, Marrero JA, et al. Antibody microarray profiling reveals individual and combined serum proteins associated with pancreatic cancer. *Cancer research*. 2005;65:11193-202.
- [21] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:860-7.
- [22] Carlsson A, Wuttge DM, Ingvarsson J, Bengtsson AA, Sturfelt G, Borrebaeck CA, et al. Serum protein profiling of systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis using recombinant antibody microarrays. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10:M110 005033. 20
- [23] Ingvarsson J, Wingren C, Carlsson A, Ellmark P, Wahren B, Engstrom G, et al. Detection of pancreatic cancer using antibody microarray-based serum protein profiling. *Proteomics*. 2008;8:2211-9.
- [24] Wingren C, Sandstrom A, Segersvard R, Carlsson A, Andersson R, Lohr M, et al. Identification of serum biomarker signatures associated with pancreatic cancer. *Cancer research*. 2012;72:2481-90.
- [25] Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2002;1:845-67. 30
- [26] Zhang H, Liu AY, Loriaux P, Wollscheid B, Zhou Y, Watts JD, et al. Mass spectrometric detection of tissue proteins in plasma. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2007;6:64-71.
- [27] Surinova S, Schiess R, Huttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. On the development of plasma protein biomarkers. *Journal of proteome research*. 2011;10:5-16.
- [28] Haab BB, Geierstanger BH, Michailidis G, Vitzthum F, Forrester S, Okon R, et al. Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data. *Proteomics*. 2005;5:3278-91. 40
- [29] Alonzo TA, Pepe MS, Moskowitz CS. Sample size calculations for comparative studies of medical tests for detecting presence of disease. *Statistics in medicine*. 2002;21:835-52.
- [30] Borrebaeck CA, Wingren C. Design of high-density antibody microarrays for disease proteomics: key technological issues. *Journal of proteomics*. 2009;72:928-35.
- [31] Carlsson A, Wingren C, Kristensson M, Rose C, Ferno M, Olsson H, et al. Molecular serum portraits in patients with primary breast cancer predict the development of distant metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:14252-7. 50

- [32] Wingren C, Ingvarsson J, Dexlin L, Szul D, Borrebaeck CA. Design of recombinant antibody microarrays for complex proteome analysis: choice of sample labeling-tag and solid support. *Proteomics*. 2007;7:3055-65.
- [33] Carlsson A, Persson O, Ingvarsson J, Widegren B, Salford L, Borrebaeck CA, et al. Plasma proteome profiling reveals biomarker patterns associated with prognosis and therapy selection in glioblastoma multiforme patients. *Proteomics Clinical applications*. 2010;4:591-602.
- [34] Olsson N, Wallin S, James P, Borrebaeck CA, Wingren C. Epitope-specificity of recombinant antibodies reveals promiscuous peptide-binding properties. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2012;21:1897-910. 10
- [35] Carlsson A, Wingren C, Ingvarsson J, Ellmark P, Baldertorp B, Ferno M, et al. Serum proteome profiling of metastatic breast cancer using recombinant antibody microarrays. *Eur J Cancer*. 2008;44:472-80.
- [36] Ingvarsson J, Larsson A, Sjöholm AG, Truedsson L, Jansson B, Borrebaeck CA, et al. Design of recombinant antibody microarrays for serum protein profiling: targeting of complement proteins. *Journal of proteome research*. 2007;6:3527-36.
- [37] Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nature reviews Genetics*. 2001;2:418-27.
- [38] Ma Y, Hwang RF, Logsdon CD, Ullrich SE. Dynamic mast cell-stromal cell interactions promote growth of pancreatic cancer. *Cancer research*. 2013;73:3927-37. 20
- [39] Kudo-Saito C, Shirako H, Ohike M, Tsukamoto N, Kawakami Y. CCL2 is critical for immunosuppression to promote cancer metastasis. *Clinical & experimental metastasis*. 2013;30:393-405.
- [40] McDade TP, Perugini RA, Vittimberga FJ, Jr., Carrigan RC, Callery MP. Salicylates inhibit NF-kappaB activation and enhance TNF-alpha-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *The Journal of surgical research*. 1999;83:56-61.
- [41] Arlt A, Muerkoster SS, Schafer H. Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer. *Cancer letters*. 2013;332:346-58.
- [42] Shaib YH, Davila JA, El-Serag HB. The epidemiology of pancreatic cancer in the United States: changes below the surface. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2006;24:87-94. 30
- [43] Ghatnekar O, Andersson R, Svensson M, Persson U, Ringdahl U, Zeilon P, et al. Modelling the benefits of early diagnosis of pancreatic cancer using a biomarker signature. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013.
- [44] Konstantinou F, Syrigos KN, Saif MW. Pancreatic cancer: what about screening and detection? *JOP : Journal of the pancreas*. 2013;14:312-5.

【 0 1 5 2 】

【表 1】

表1. 血清サンプルの人口統計

診断	サブグループ	性別(M/F)	年齢(平均±sd)	サンプル数
膵臓がん(PC)		92/64	66 ± 13	156
	体			16
	頭			97
	尾			10
	その他			16
	不特定			17
良性対照(BC)		117/35	52 ± 14	152
	急性膵臓炎			33
	慢性膵臓炎			110
	ランゲルハンス新生物			3
	膵臓新生物			6
正常対照(NC)		20/10	62 ± 14	30
合計				338

【 0 1 5 3 】

【表2】

表2. 示差的なタンパク質発現の分析による有意性に基づく上位25種の抗体。個々の抗体クローンの接尾辞は括弧内に示される(複数の抗体クローンによって標的化された分析物の場合)。

FC=変化倍率

PC-NC-BC ANOVA		PC-NC t検定			PC-BC t検定		
抗体	p値	抗体	p値	FC	抗体	p値	FC
GAK (3)	4.14E-48	GAK (3)	3.44E-30	0.68	シスタチンC (3)	3.80E-11	1.08
IL-6 (7)	4.00E-43	IL-6 (7)	1.11E-27	0.71	IL-13 (3)	1.09E-10	1.13
GAK (2)	3.25E-36	GAK (1)	3.25E-26	0.77	IL-1α (1)	3.08E-10	1.11
IL-11 (2)	1.78E-32	LDL (2)	1.15E-22	0.62	表面ag X	5.57E-09	1.10
LDL (2)	6.09E-32	MAPK8 (1)	4.24E-20	0.81	BTK (2)	6.06E-09	1.05
TNF-α (3)	1.89E-31	IL-11 (2)	4.56E-18	0.69	シスタチンC (4)	6.60E-09	1.05
プロカテプシンW	4.88E-27	TNF-α (3)	2.93E-16	0.76	CIMS (26)	6.79E-09	1.10
IL-13 (3)	8.15E-27	HADH2 (3)	2.49E-15	0.89	CD40 (1)	1.02E-08	1.09
MAPK8 (1)	3.02E-22	プロカテプシンW	3.21E-14	0.79	TNFRSF3 (2)	1.29E-08	1.05
IL-1α (1)	5.83E-20	TNFRSF3 (1)	5.08E-13	0.91	ORP-3 (2)	2.16E-08	1.07
IL-13 (2)	3.36E-19	VEGF (3)	1.52E-12	1.24	Apo-A4 (3)	2.66E-08	1.07
TNFRSF3 (1)	8.51E-16	IL-1ra (1)	3.24E-12	1.16	UPF3B (2)	2.84E-08	1.04
IL-18 (2)	5.33E-15	C1 inh (1)	1.20E-11	1.22	MUC-1 (1)	3.49E-08	1.07
IL-1ra (1)	9.67E-15	IL-13 (3)	2.73E-11	0.77	TNF-α (3)	4.31E-08	1.08
HADH2 (3)	1.06E-14	C1q	4.12E-11	1.11	CIMS (16)	4.67E-08	1.08
CD40 (1)	1.48E-14	IL-16 (3)	5.19E-11	1.15	ATP-5B (1)	5.68E-08	1.06
シスタチンC (4)	2.36E-14	VEGF (1)	5.43E-11	1.19	CIMS (12)	6.00E-08	1.06
IL-4 (3)	3.12E-14	CD40L	6.21E-11	1.13	IL-13 (1)	6.31E-08	1.08
CIMS (18)	6.91E-14	IL-4 (3)	8.82E-11	1.24	MCP-1 (4)	9.64E-08	1.03
CIMS (16)	7.21E-14	シアリルルイスx	9.47E-11	1.10	CIMS (1)	1.14E-07	1.08
VEGF (3)	8.52E-14	IL-18 (2)	1.12E-10	1.20	CD40 (3)	1.28E-07	1.06
FASN (3)	1.18E-13	CIMS (18)	1.43E-10	1.16	プロカテプシンW	1.43E-07	1.07
TGF-β1 (2)	2.59E-13	CIMS (23)	2.64E-10	1.13	ジゴキシン	1.55E-07	1.08
CIMS (26)	2.61E-13	MCP-1 (2)	3.08E-10	1.16	TGF-β1 (2)	1.88E-07	1.09
CIMS (25)	6.47E-13	CIMS (25)	3.44E-10	1.24	CIMS (24)	3.32E-07	1.08

10

20

30

【 0 1 5 4 】

【表3】

表3. 10の後退消去の繰り返しからの抗体スコアに基づく上位25種の抗体。個々の抗体クローンの接尾辞は括弧内に示される(複数の抗体クローンによって標的化された分析物の場合)。

PC対NC	スコア	PC対BC	スコア
IL-11 (2)	291.4	MAPK1 (3)	276.5
IL-6 (7)	288.1	C5 (2)	273
シスタチンC (1)	286.9	TNFRSF3 (1)	265.5
C1 inh (3)	279.2	TNFRSF3 (2)	260.9
アンジオモチン (1)	276	UCHL5	259.6
IL-13 (2)	272.9	IL-4 (3)	258.7
IL-13 (3)	270.7	因子B (3)	258
CD40 (1)	270.6	Apo-A4 (3)	257.5
HADH2 (3)	270.4	KSYK-1	255.2
HADH2 (4)	269.7	Sox11A	253.1
C1 inh. (4)	269.4	CD40L	252.2
C1 inh. (2)	269.2	Apo-A1 (1)	251.4
LDL (2)	268.1	CIMS (13)	250.1
GAK (3)	268	BTK (2)	246.1
C3 (1)	266.1	GM-CSF (5)	245
CIMS (5)	264.3	TGF-β1 (2)	239.5
C1q	261.1	PTP-1B (2)	237.2
CD40 (4)	259.6	MCP-1 (7)	235.1
IL-8 (2)	259.4	UPF3B (1)	232.5
C5 (2)	258.5	C1 inh. (4)	228.3
ATP-5B (3)	257.1	シアリルルイスx	227.6
因子B (4)	256.2	IL-3 (1)	225.8
CIMS (10)	253.6	IL-9 (2)	224.2
TNF-α (3)	253.5	HADH2 (2)	222.7
エオタキシン (3)	248.4	IL-4 (4)	222.4

【 0 1 5 5 】

【表4】

表4. 抗体マイクロアレイ上で標的化された抗原

タンパク質	正式名称	抗体クローン 番号	
アンギオモチン	アンギオモチン	2	
Apo-A1	アポリポタンパク質A1	3	
Apo-A4	アポリポタンパク質A4	3	
ATP-5B	ミトコンドリアのATPシンターゼサブユニットベータ	3	
β-ガラクトシダーゼ	ベータ-ガラクトシダーゼ	1	
BTK	チロシン-プロテインキナーゼBTK	4	10
C1阻害剤	血漿プロテアーゼC1阻害剤	4	
C1q	補体C1q	1	
C1s	補体C1s	1	
C3	補体C3	6	
C4	補体C4	4	
C5	補体C5	3	
CD40	CD40タンパク質	4	
CD40L	CD40リガンド	1	
CDK-2	サイクリン依存性キナーゼ2	2	
CHX10	視覚系ホメオボックス2	3	
CT17	コレラ毒素サブユニットB	1	20
シスタチンC	シスタチンC	4	
ジゴキシン	ジゴキシン	1	
DUSP9	二重特異性タンパク質ホスファターゼ9	1	
EGFR	上皮増殖因子受容体(セツキシマブ(アービタックス) 抗体)	1	
エオタキシン	エオタキシン	3	
因子B	補体因子B	4	
FASN	FASNタンパク質	4	
GAK	GAKタンパク質	3	
GLP-1	グルカゴン様ペプチド-1	1	
GLP-1R	グルカゴン様ペプチド 1受容体	1	30
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	6	
HADH2	HADH2タンパク質	4	
Her2/ErbB-2	受容体チロシン-プロテインキナーゼerbB-2	4	
HLA-DR/DP	HLA-DR/DP	1	
ICAM-1	細胞間接着分子1	1	
IFN-γ	インターフェロンガンマ	3	
IgM	免疫グロブリンM	5	
IL-10	インターロイキン-10	3	
IL-11	インターロイキン-11	3	
IL-12	インターロイキン-12	4	
IL-13	インターロイキン-13	3	
IL-16	インターロイキン-16	3	40
IL-18	インターロイキン-18	3	
IL-1α	インターロイキン-1アルファ	3	
IL-1β	インターロイキン-1ベータ	3	
IL-1ra	インターロイキン-1受容体アンタゴニストタンパク質	3	
IL-2	インターロイキン-2	3	
IL-3	インターロイキン-3	3	

【 0 1 5 6 】

【表5】

IL-4	インターロイキン-4	4	
IL-5	インターロイキン-5	3	
IL-6	インターロイキン-6	8	
IL-7	インターロイキン-7	2	
IL-8	インターロイキン-8	3	
IL-9	インターロイキン-9	3	
インテグリン α -10	インテグリンアルファ-10	1	
インテグリン α -11	インテグリンアルファ-11	1	
JAK3	チロシン-プロテインキナーゼJAK3	1	10
ケラチン19	ケラチン、I型細胞骨格19	3	
KSYK	チロシン-プロテインキナーゼSYK	2	
LDL	アポリポタンパク質B-100	2	
レプチン	レプチン	1	
ルイスx	ルイスx	2	
ルイスy	ルイスy	1	
ルミカン	ルミカン	1	
MAPK1	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ1	4	
MAPK8	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ8	3	
MATK	巨核球関連チロシン-プロテインキナーゼ	3	
MCP-1	C-Cモチーフケモカイン2	9	20
MCP-3	C-Cモチーフケモカイン7	3	
MCP-4	C-Cモチーフケモカイン13	3	
MUC-1	ムチン-1	6	
ミオメシン-2	ミオメシン-2	2	
ORP-3	オキシステロール結合タンパク質関連タンパク質3	2	
オステオポンチン	オステオポンチン	3	
	ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ調節サブ		
P85A	ユニットアルファ	3	
PKBガンマ	RAC-ガンマセリン/スレオニン-プロテインキナーゼ	2	
プロカテプシンW	カテプシンW	1	
プロパージン	プロパージン	1	30
PSA	前立腺特異的抗原	1	
PTK-6	タンパク質-チロシンキナーゼ6	1	
PTP-1B	チロシン-タンパク質ホスファターゼ非受容体1型	3	
RANTES	C-Cモチーフケモカイン5	3	
RPS6KA2	リボソームタンパク質S6キナーゼアルファ-2	3	
シアリルルイスx	シアリルルイスx	1	
Sox11A	転写因子SOX-11	1	
STAP2	シグナル伝達アダプタータンパク質2	4	
STAT1	シグナル伝達兼転写活性1-アルファ/ベータ	2	
表面Ag X	表面Ag X	1	
TBC1D9	TBC1ドメインファミリーメンバー9	3	
TENS4	テンシン-4	1	40
TGF- β 1	トランスフォーミング増殖因子ベータ-1	3	
TMペプチド	膜貫通ペプチド	1	
TNF- α	腫瘍壊死因子	3	
TNF- β	リンフォトキシン-アルファ	4	
TNFRSF14	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー14	2	
TNFRSF3	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー3	3	
UBC9	SUMOコンジュゲート酵素UBC9	3	
UBE2C	ユビキチンコンジュゲート酵素E2 C	2	

【表6】

UCHL5	ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイムL5	1
UPF3B	ナンセンス転写物3Bのレギュレーター	2
VEGF	血管内皮増殖因子	4

【0158】

【表7】

表5. 位置の異なる膵臓腫瘍を有する患者から採取された血清サンプルの示差的なタンパク質発現の分析。上位40種の抗体ごとの体+尾の腫瘍対頭の腫瘍に関する結果を示す($p < 5 \times 10^{-5}$)。FC=変化倍率。

抗体	p値	FC
IL-1 α (2)	4.32E-07	0.874447
CIMS (16)	1.28E-06	0.874676
VEGF (1)	1.47E-06	0.870962
TNF- β (2)	1.57E-06	0.872955
IL-11 (2)	2.15E-06	0.833144
CIMS (18)	3.09E-06	0.891206
CD40L	3.89E-06	0.917468
IL-3 (3)	4.19E-06	0.87497
CIMS (30)	4.88E-06	0.919455
IL-6 (1)	7.01E-06	0.873484
HLA-DR/DP	8.10E-06	0.879348
IL-2 (3)	8.34E-06	0.845869
アンギオモチン (2)	8.45E-06	0.892806
インテグリン α -10	9.07E-06	0.864779
IL-18 (3)	9.40E-06	0.899675
Sox11A	1.05E-05	0.898637
IL-7 (1)	1.18E-05	0.892816
MCP-1 (3)	1.20E-05	0.885187
表面ag X	1.20E-05	0.865919
IL-9 (1)	1.21E-05	0.872639
CIMS (20)	1.36E-05	0.873286
IL-12 (3)	1.67E-05	0.872587
ルイスx (1)	1.77E-05	0.898973
IgM (3)	1.91E-05	0.893885
IL-7 (2)	1.98E-05	0.893886
CIMS (25)	2.25E-05	0.851688
CIMS (2)	2.30E-05	0.88583
CIMS (6)	2.41E-05	0.858863
IL-16 (3)	2.57E-05	0.905756
GLP-1	2.78E-05	0.890237
CHX10 (3)	2.83E-05	0.889864
IL-4 (3)	3.02E-05	0.860565
VEGF (4)	3.20E-05	0.848107
IL-3 (2)	3.35E-05	0.871146
IL-2 (2)	3.89E-05	0.843949
IL-1ra (3)	3.93E-05	0.88975
RANTES (3)	4.51E-05	0.933006
CIMS (31)	4.80E-05	0.886723
CIMS (27)	4.90E-05	0.915073
TGF- β 1 (3)	4.91E-05	0.889071

【0159】

10

20

30

40

【表 8】

表A

Uniprotエントリー 番号	推奨されるタンパク質の名称	省略名	診断		
			PC	PC(体および尾)対PC(頭)	
(i) コアバイオマーカー					
Q6IBS9	HADH2タンパク質	HADH2	X		
P36941	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー3	TNFRSF3	X		10
(ii) 好ましいバイオマーカー(PCおよびBTvH)					
P35716	転写因子SOX-11	Sox11A	X	X	
O75578	インテグリンアルファ-10	インテグリン a-10	X	X	
NA	EDFR		X	X	
NA	EPFR		X	X	
NA	LSADHR		X	X	
NA	SEHLR		X	X	
NA	AQQHQWDGLLSYQDSLS		X	X	20
NA	WTRNSNMNYWLIIRL		X	X	
NA	WDSR		X	X	
(iii) 好ましいバイオマーカー(PC)					
NA	DFAEDK		X		
Q6PJJ3	FASNタンパク質	FASN	X		
Q5U4P5	GAKタンパク質	GAK	X		
NA	LNVWGK		X		
NA	LTEFAK		X		
NA	LYEIAR		X		
P42679	巨核球関連チロシン-プロテインキナーゼ	MATK	X		30
Q9H4L5	オキシステロール結合タンパク質関連タンパク質3	ORP-3	X		
NA	QEASFK		X		
NA	SSAYSR		X		
NA	QEASFK		X		
NA	TEEQLK		X		
NA	TLYVGK		X		
NA	FLLMQYGGMDEHAR		X		
NA	GIVKLYEDEG		X		40
NA	GIVKLYEDEG		X		
P43405	チロシン-プロテインキナーゼ SYK	KSYK	X		

【 0 1 6 0 】

【表 9】

(iv) 場合によるバイオマーカー(PCおよびBTvH)

Q4VCS5	アンギオモチン	アンギオモチン	X	X	
P13500	C-Cモチーフケモカイン2	MCP-1	X	X	
P13501	C-Cモチーフケモカイン5	RANTES	X	X	
P29965	CD40リガンド	CD40L	X	X	
P01275	グルカゴン様ペプチド-1	GLP-1	X	X	
NA	免疫グロブリンM	IgM	X	X	
P01583	インターロイキン-1アルファ	IL-1a	X	X	10
	インターロイキン-1受容体				
P18510	アンタゴニストタンパク質	IL-1ra	X	X	
P20809	インターロイキン-11	IL-11	X	X	
P29459/60	インターロイキン-12	IL-12	X	X	
Q14005	インターロイキン-16	IL-16	X	X	
Q14116	インターロイキン-18	IL-18	X	X	
P60568	インターロイキン-2	IL-2	X	X	
P08700	インターロイキン-3	IL-3	X	X	
P05112	インターロイキン-4	IL-4	X	X	
P05231	インターロイキン-6	IL-6	X	X	20
P13232	インターロイキン-7	IL-7	X	X	
P15248	インターロイキン-9	IL-9	X	X	
NA	ルイスx	ルイスx	X	X	
P01374	リンフォトキシン-アルファ	TNF-b	X	X	
	トランスフォーミング増殖因子				
P01137	ベータ-1	TGF-b1	X	X	
P15692	血管内皮増殖因子	VEGF	X	X	
P58304	視覚系ホメオボックス2	CHX10	X	X	
P01903/P01911/ P79483/P13762/ Q30154/P20036/ P04440		HLA-DR/DP	X	X	30

(v) 場合によるバイオマーカー(PC)

P02647	アポリポタンパク質A1	Apo-A1	X		
P06727	アポリポタンパク質A4	Apo-A4	X		
P04114	アポリポタンパク質B-100	LDL	X		
	ミトコンドリアのATPシンター				
P06576	ゼサブユニットベータ	ATP-5B	X		
		B-ガラクトシ			
P16278	ベータ-ガラクトシダーゼ	ダーゼ	X		
		プロカテプシ			
P56202	カテプシンW	ンW	X		40
Q99616	C-Cモチーフケモカイン13	MCP-4	X		
P80098	C-Cモチーフケモカイン7	MCP-3	X		
Q6P2H9	CD40タンパク質	CD40	X		
P02745/6/7	補体C1q	C1q	X		
P09871	補体C1s	C1s	X		
P01024	補体C3	C3	X		
P0COL4/5	補体C4	C4	X		

【表 1 0】

P01031	補体C5	C5	X	
P00751	補体因子B	因子B	X	
P24941	サイクリン依存性キナーゼ2	CDK-2	X	
P01034	シスタチン-C	シスタチンC	X	
P51671	エオタキシン	エオタキシン	X	
P00533	上皮増殖因子受容体	EGFR	X	
P43220	グルカゴン様ペプチド 1受容体	GLP-1R	X	
P04141	顆粒球マクロファージコロニー 刺激因子	GM-CSF インテグリン	X	10
Q9UKX5	インテグリンアルファ-11	a-11	X	
P05362	細胞間接着分子1	ICAM-1	X	
P01579	インターフェロンガンマ	IFN-g	X	
P01584	インターロイキン-1ベータ	IL-1b	X	
P22301	インターロイキン-10	IL-10	X	
P35225	インターロイキン-13	IL-13	X	
P05113	インターロイキン-5	IL-5	X	
P10145	インターロイキン-8	IL-8	X	
P08727	ケラチン、I型細胞骨格19	ケラチン19	X	20
P41159	レプチン	レプチン	X	
P51884	ルミカン	ルミカン	X	
P28482	マイトジェン活性化タンパク質 キナーゼ1	MAPK1	X	
P45983	マイトジェン活性化タンパク質 キナーゼ8	MAPK8	X	
P15941	ムチン-1	MUC-1	X	
P54296	ミオメシン-2	ミオメシン-2	X	
P10451	オステオポンチン	オステオポン チン	X	30
P27986	ホスファチジルイノシトール3- キナーゼ調節サブユニットアル ファ	P85A	X	
P05155	血漿プロテアーゼC1阻害剤	C1 inh	X	
P27918	プロパージン	プロパージン	X	
P07288	前立腺特異的抗原	PSA	X	
P04626	受容体チロシン-プロテインキ ナーゼerbB-2	Her2/ErbB-2	X	
Q9BZ17	ナンセンス転写物3Bのレギュ レーター	UPF3B	X	
Q15349	リボソームタンパク質S6キナー ゼアルファ-2	RPS6KA2	X	40
NA	シアリルルイスx	シアリルルイ スx	X	
Q9UGK3	シグナル伝達アダプタータン パク質2	STAP2	X	
P63279	SUMOコンジュゲート酵素UBC9	UBC9	X	
Q6ZT07	TBC1ドメインファミリーメン バー9	TBC1D9	X	
NA	膜貫通ペプチド	(Tmペプチド)	X	

【表 1 1】

P01375	腫瘍壊死因子アルファ	TNF-a	X
Q92956	腫瘍壊死因子受容体スーパー ファミリーメンバー14	TNFRSF14	X
Q06187	チロシン-プロテインキナーゼ BTK	BTK	X
P52333	チロシン-プロテインキナーゼ JAK3	JAK3	X
P18031	チロシン-タンパク質ホスファ ターゼ非受容体1型	PTP-1B	X
Q9Y5K5	ユビキチンカルボキシル末端 ヒドロラーゼアイソザイムL5	UCHL5	X
O00762	ユビキチンコンジュゲート酵素 E2 C	UBE2C	X
(vi) 好ましいバイオマーカー(BTvH)			
NA	FIQTDK		X

10

【 0 1 6 3 】

【表 1 2】

表 B-トレーニングされた SVM プログラム

以下のパラメーターを、<http://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html> より入手可能な e1071 1.5-24SVM を使用して得た。

(i) 消去関数

```
# getWorstAb: 「最も悪い性能の」プロープの名称を戻す
getWorstAb <- function(errors, abNames)
{
  return(abNames[order(errors, decreasing = F)[1]])
}
10

# testModels: 一度消去された各プロープで全てのモデルを試験する
testModels <- function(models, elimData, averages, svmfac)
{
  nsamples <- ncol(elimData)
  d <- as.numeric(svmfac)-1
  y <- numeric(nsamples)
  E <- numeric(nsamples)
  analytes <- nrow(elimData)
  errors <- numeric(nrow(elimData))
  20

  for(k in 1:analytes)
  {
    # プロープ「k」を平均で置き換えるが、元の値を記憶する
    backup <- elimData[k,]
    elimData[k,] <- averages[k]
    30

    # すでに較正済みのモデルを使用してデータセット全体に LOO ループを行う
    for (i in 1:nsamples)
    {
      pred <- predict(models[[i]], t(elimData[,i]), decision.values=TRUE)
      # 決定値を保存する
      y[i] <- as.numeric(attributes(pred)$decision.values)
    }

    # 「尤度」を計算する
    y = 1/(1 + exp(-y))
    40

    # 消去された 1 つのプロープを用いて分類に関する K-L 誤差を計算する
    for (i in 1:nsamples)
    {
      E[i] <- -(d[i]*log(y[i])+(1-d[i])*log(1-y[i]))
    }
  }
}
```

【 0 1 6 4 】

【表 1 3】

```

    }

    # 誤差を保存する
    errors[k] <- sum(E)

    # 元のプローブデータを元に戻す
    elimData[k,] <- backup
  }
  return( errors )
}

# getNewElimData: トレーニングデータから正しい抗体を除去する
getNewElimData <- function(errors, elimData)
{
  # 最も小さい誤差を位置決める
  tasBort <- order(errors,decreasing = F)[1]
  return(elimData[-tasBort,])
}

# getSmallestError: 最も小さい誤差を戻す
getSmallestError <- function(errors)
{
  return(min(errors))
}

# getNewAverages: プローブ消去後に平均の新しいリストを作成する
getNewAverages <- function(errors, averages)
{
  # 最も小さい誤差の位置を見つける
  tasBort <- order(errors, decreasing = F)[1]
  return(averages[-tasBort])
}

# getRemovedAb: 消去しようとするプローブの名称を戻す
getRemovedAb <- function(errors, abNames)
{
  return(abNames[order(errors, decreasing = T)[1]])
}

backElim <- function(filename, group1, group2, log = FALSE)
{
  # ライブラリー「e1071」および「tcltk」を算入する
  library(e1071)
  library(tcltk)

  # データを読み出す

```

【 0 1 6 5 】

【表 1 4】

```

rawfile <- read.delim(filename)

# グループを読み出す
groups <- rawfile[,2]

# サンプル名称を読み出す
samplenames <- as.character(rawfile[,1])

# データセットを作成する
data <- t(rawfile[,c(1,2)])

# 特定される場合、データをログ化する
if (log){data <- log(data)/log(2)}

# プローブの名称を得る
ProteinNames <- read.delim(filename,header=FALSE)
ProteinNames <- as.character(as.matrix(ProteinNames)[1,])
ProteinNames <- ProteinNames[-{1:2}]

# プローブの数を取得
antal <- length(ProteinNames)

# サンプルおよびプローブを名付ける
rownames(data) <- ProteinNames
colnames(data) <- samplenames

# サブセットを作成する(ブーリアン)
subset1 <- is.element(groups, strsplit(group1, ", ")[1])
subset2 <- is.element(groups, strsplit(group2, ", ")[1])

# ファクターとしてグループリストを作成する
svmfac <- factor(rep('rest', ncol(data)), levels=c(group1, group2, 'rest'))
svmfac[subset1] <- group1
svmfac[subset2] <- group2
svmfac <- svmfac[subset1|subset2]

# 各シグネチャー長さの K-L 誤差の記憶のためのベクターを作成する
smallestErrorPerLength <- rep(NA, antal)

# 全サンプルにわたり各プローブごとに平均シグナルを計算する
averages <- apply(data, 1, mean)

# プローブ名称の記憶のためのベクターを作成する。ここで誤差がその最小限に
# あるときに消去されたプローブが記憶される
abOrder <- rep(NA, antal)

# 消去を行うためのデータセットを作成する
elimData <- data[,subset1|subset2]

```

【0 1 6 6】

【表 1 5】

```

# サンプルの数を見つける
nsamples <- ncol(elimData)

# elimData 中の新しいサブセット
subset1 <- svmfac==group1
subset2 <- svmfac==group2

print(paste(nsamples, "samples"),quote=F)
print(paste(" ",sum(subset1), "in", group1),quote=F)
print(paste(" ",sum(subset2), "in", group2),quote=F)
# SVM モデルの記憶に関するリスト
models <- numeric(nsamples)

# 消去されたプローブの数を記憶するための変数
borttagna <- 0

# プログレスバーを作成する
wrst <- 0
proc <- 0
m <- 0
for(i in 1:(antal-1)){
  m <- m+(antal-i)*sqrt(antal-i)
}
pb <- tkProgressBar(title = "Progress:", min = 0, max = m, width = 400)

# プログレスバーをアップデートする
setTkProgressBar(pb, proc, label=paste("Eliminating first ab*", round((proc)/(m)*100, 0),"% done"))

# グループが正しい順番で示されているかどうかをチェックする
control <- as.numeric(svmfac)
if(sum(control[subset1]) > sum(control[subset2]))
{
  print("ERROR: データファイル中のグループ 1 およびグループ 2 の順番を変える!!!")
  break
}

# 2 つのプローブのみが残るまで後退消去を試行する
for(j in 1:(antal-1))
{
  # データセット elimData 中に残った全てのプローブを使用してサンプルの
  # N-1 個の組合せごとにモデルをトレーニングする
  for (i in 1:nsamples)
  {
    # モデルリストを含むベクター(モデル)にモデルを記憶する。
    models[i] <- list(svm(t(elimData[,-i]), svmfac[-i], kernel="linear"))
  }
}

```

【 0 1 6 7 】

【表 1 6】

```

# LOO クロス検証に必要な全てのモデルはここで較正され、「モデル」に記憶される。
# elimData 中のそれらの対応する LOO サンプルでモデルを全て試験する。
# elimData 中の各プローブは、それを事前に計算された平均値で置き換える
# ことによって1回の LOO ラウンドで消去される。
#
# 消去された1つのプローブを用いて elimData で全てのモデルが試験されたら、
# K-L 誤差が計算され、「誤差」に記憶される。この手順は全てのプローブが一度
# 消去されるまで繰り返され、その結果としてデータセット中に残ったプローブ
# の数と同じ長さを有する K-L 誤差のリストが得られる
10

# 各プローブが消去済みの現行のプローブ数(antal+1-j)に関する K-L 誤差を含む
# リストを作成する
errors <- testModels(models, elimData, averages, svmfac)

# 「abOrder」に分類時に最も悪い作用を有するプローブの名称を追加する
wrst<-getWorstAb(errors, row.names(elimData))
abOrder[j] <- wrst

# 最も小さい K-L 誤差値(上記の「abOrder」に追加されたプローブに対応する)を追加する
20
smallestErrorPerLength[j] <- getSmallestError(errors)

# 「平均」からプローブを除去する
averages <- getNewAverages(errors, averages)

# 「elimData」からプローブを除去する
elimData <- getNewElimData(errors, elimData)

# 除去されたプローブの数に1を足す
30
borttagna <- borttagna + 1

# プローブが除去されたこととそれが何時かを使用者に知らせる
print(paste(j, "probes eliminated @", Sys.time()), sep="")

# プログレスバーをアップデートする
proc <- proc + (antal-j)*sqrt(antal-j)
setTkProgressBar(pb, proc, label=paste(wrst,"eliminated%", round((proc/m)*100, 0),"% done"))
}

# 「abOrder」に最後の「消去されなかった」プローブの名称を追加する
40
abOrder[length(abOrder)] <- setdiff(ProteinNames, abOrder)

# 過去の試行の置き換えを回避するためにファイル名に付けられた乱数と
# 共に結果をファイルに保存する。
filename <- paste("Backward elimination result(",morm(1)+1,")",txt",sep="")
write.table(cbind(smallestErrorPerLength,abOrder), file=filename, sep="¥t", quote = F,row.names = F)
plot(smallestErrorPerLength, type ="b", ylab = "K-L Error", xlab = "Eliminations")
}

```

【 0 1 6 8 】

【表 17】

(ii) 単純ベイズ

```

NBtrainer <- function(data, fac){
  MeanVariancePval <- function(vec, fac){
    vec1 <- vec[fac==levels(fac)[1]]
    vec2 <- vec[fac==levels(fac)[2]]
    if (sum(!is.na(vec1))<=2 | sum(!is.na(vec2))<=2){
      return(c(NA,NA,NA,NA,NA))
    }
    mean1 <- mean(vec1, na.rm=TRUE)
    var1 <- var(vec1, na.rm=TRUE)
    mean2 <- mean(vec2, na.rm=TRUE)
    var2 <- var(vec2, na.rm=TRUE)
    if (var1==0 | var2==0){return(c(NA,NA,NA,NA,NA))}
    pval <- t.test(vec1,vec2,var.equal=TRUE)$p.value
    return(c(mean1,var1,mean2,var2,pval))
  }
  return(t(apply(data, 1, MeanVariancePval, fac)))
}
10
20

NBpredicter <- function(testdata, NBtrained, topnumber=Inf, logfoldcut=0, pcut=1){
  if (topnumber==Inf){
    indices <- !is.na(NBtrained[,5]) & NBtrained[,5]<=pcut & abs(NBtrained[,1]-NBtrained[,3])>=logfoldcut
  }else{
    preindices <- !is.na(NBtrained[,5]) & NBtrained[,5]<=pcut
    abs(NBtrained[preindices,1]-NBtrained[preindices,3]) -> foldchange
    cutfold <- sort(foldchange, decreasing=TRUE)[min(topnumber,length(foldchange))]
    indices <- preindices & (abs(NBtrained[,1]-NBtrained[,3]) >= cutfold)
  }
  NBtrainedred <- matrix(NBtrained[indices,],ncol=ncol(NBtrained))
  testdatared <- matrix(testdata[indices,], ncol=ncol(testdata))
  singlegene <- function( genepred){
    I1 <- -(genepred[6] - genepred[1])^2/(2*genepred[2])-0.5*log(2*pi*genepred[2])
    I2 <- -(genepred[6] - genepred[3])^2/(2*genepred[4])-0.5*log(2*pi*genepred[4])
    #print(genepred)
    return(I1-I2)
  }
  NBvectorpredicter <- function(vec){
    combined <- cbind(NBtrainedred, vec)
    combined <- matrix(combined[!is.na(vec),], ncol=6)
    return(sum(apply( combined, 1, singlegene)))
  }
  return(apply(testdatared, 2, NBvectorpredicter))
}
30
40

myROC <- function(numbers, fac){
  n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])

```

【表 1 8】

```

n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
wilcoxresult <- wilcox.test(numbers~fac , alternative="greater")
ROCarea <- as.numeric(wilcoxresult$statistic)/(n1*n2)
pval <- wilcoxresult$p.value
return(c(ROCarea,pval))
}

SensitivitySpecificity <- function(numbers, fac){
n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
un <- sort(unique(numbers), decreasing=TRUE)
SenSpe <- function(x){
sen <- sum(numbers>=x & fac==levels(fac)[1])/n1
spe <- 1 - sum(numbers>=x & fac==levels(fac)[2])/n2
return(list(Sensitivity=sen,Specificity=spe))
}
return(t(sapply(un , SenSpe)))
}

NBlooppreparer <- function(data , fac){
nsamples <- ncol(data)
ngenes <- nrow(data)
NBtrainedarray <- array(NA , dim=c(ngenes,5,nsamples))
for (i in 1:nsamples){ print(i)
NBtrainedarray[,i] <- NBtrainer(matrix(data[,i],ncol=nsamples-1),fac[-i])
}
return(NBtrainedarray)
}

NBleaveoneout <- function(NBtrainedarray , data , fac , topnumber=Inf , logfoldcut=0 , pcut=1){
nsamples <- ncol(data)
loglikelihoods <- rep(NA , nsamples)
for (i in 1:nsamples){
loglikelihoods[i] <- NBpredicter(matrix(data[,i],ncol=1),NBtrainedarray[,i],topnumber,logfoldcut,pcut)
}
return(loglikelihoods)
}

NBloopcv <- function(NBtrainedarray , data , fac , topnumber=Inf , logfoldcut=0 , pcut=1){
n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
SampleInformation <- paste(levels(fac)[1]," ",n1," , ",levels(fac)[2]," ",n2,sep="")
loglikelihoods <- NBleaveoneout(NBtrainedarray , data,fac,topnumber,logfoldcut,pcut)
names <- colnames(data , do.NULL=FALSE)
orden <- order(loglikelihoods , decreasing=TRUE)
Samples <- data.frame(names[orden],loglikelihoods[orden],fac[orden])
ROCdata <- myROC(loglikelihoods,fac)
SenSpe <- SensitivitySpecificity(loglikelihoods,fac)

```

【表 19】

```

return(list(SampleInformation=SampleInformation,ROCarea=ROCdata[1],p.value=ROCdata[2],
           topnumber=topnumber,pcut=pcut,SenSpe <- SenSpe,samples=Samples))
}

NBtwooutpreparer <- function(data , fac){
  nsamples <- ncol(data)
  ngenes <- nrow(data)
  NBdoublearray <- array(NA , dim=c(ngenes,5,nsamples*(nsamples-1)/2))
  for (i in 2:nsamples){
    for (j in 1:(i-1)){ print(paste(i," ",j));
      NBdoublearray[,,(i-1)*(i-2)/2+] <- NBtrainer(matrix(data[,-c(i,j)],ncol=nsamples-2),fac[-c(i,j)])
    }
  }
  return(NBdoublearray)
}

NBmaximizer <- function(NBtrainedarray , data , fac){
  functomaximize <- function(pcut , topnumber){
    NBloocv(NBtrainedarray , data , fac , topnumber=top , pcut=pcut)$ROCarea
  }
  rocmax <- 0
  pcutmax <- numeric(0)
  topmax <- numeric(0)
  pcuset <- c(1,0.05,0.01,0.005,0.001 , 0.0003 , 0.0005,0.0001)
  topset <- c(1,2,5,10,20,50,100)
  for (pcut in pcuset){
    for (top in topset){
      currentroc <- functomaximize(pcut,top); # print(paste(pcut," ",top," ",currentroc))
      if (currentroc >= rocmax){
        rocmax <- currentroc
        pcutmax <- pcut
        topmax <- top
      }
    }
  }
  print(paste("Result ",pcutmax," ",topmax," ",rocmax))
  return(c(pcutmax,topmax))
}

NBtotalvalidation <- function(NBdoublearray , NBtrainedarray , data , fac){
  n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
  n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
  nsamples <- n1+n2
  ngenes <- nrow(data)
  SampleInformation <- paste(levels(fac)[1]," ",n1," ",levels(fac)[2]," ",n2,sep="")
  maxarray <- matrix(NA , nrow=nsamples , ncol=2)
  colnames(maxarray) <- c('pcut','topnumber')
  NormScore <- numeric(nsamples)

```

【表 2 0】

```

loglikelihoods <- numeric(nsamples)
for (i in 1:nsamples){
  NBtemptrainedarray <- array(NA, dim=c(ngenes,5,nsamples-1))
  if (i > 1){
    for (j in 1:(i-1)){
      NBtemptrainedarray[,,j] <- NBdoublearray[,,(i-1)*(i-2)/2+j]
    }
  }
  if (i < nsamples){
    for (j in (i+1):nsamples){
      NBtemptrainedarray[,,j-1] <- NBdoublearray[,,(j-1)*(j-2)/2+i]
    }
  }
  maxarray[i,] <- NBmaximizer( NBtemptrainedarray , data[-i] , fac[-i])
  temploglikelihoods <- NBpredicter( data, NBtemptrainedarray[,,i] , pcut = maxarray[i,1] , topnumber=maxarray[i,2])
  loglikelihoods[i] <- temploglikelihoods[i]
  meanll <- mean(temploglikelihoods[-i])
  sdll <- sd(temploglikelihoods[-i])
  NormScore[i] <- (temploglikelihoods[i] - meanll)/sdll
}
names <- colnames(data , do.NULL=FALSE)
orden <- order( NormScore , decreasing=TRUE)
Samples <- data.frame(names[orden],NormScore[orden],loglikelihoods[orden],fac[orden] ,maxarray[orden,])
ROCdata <- myROC(NormScore,fac)
SenSpe <- SensitivitySpecificity(NormScore,fac)
return(list(SampleInformation=SampleInformation,ROCarea=ROCdata[1],p.value=ROCdata[2],
           ,SenSpe <- SenSpe,samples=Samples))
}

```

```

ROCplot <- function(clasRes , sensspecnumber=6){
  Sensitivity <- as.numeric(clasRes[[sensspecnumber]][,1])
  Specificity <- as.numeric(clasRes[[sensspecnumber]][,2])
  OneMinusSpecificity <- 1- Specificity
  ROCarea <- round(clasRes$ROC,digits=2)
  plot(OneMinusSpecificity , Sensitivity , type="l" , xlab="1-specificity" , ylab="sensitivity")
  title(paste("ROC area = " ,ROCarea),font.main=1)
}

```

```

ROCplotReverse <- function(clasRes){
  Sensitivity <- rev(as.numeric(clasRes[[4]][,2]))
  Specificity <- rev(as.numeric(clasRes[[4]][,1]))
  OneMinusSpecificity <- 1- Specificity
  ROCarea <- round(clasRes$ROC,digits=2)
  plot(OneMinusSpecificity , Sensitivity , type="l" , xlab="1-specificity" , ylab="sensitivity")
  title(paste("ROC area = " ,ROCarea),font.main=1)
}

```

(iii) ChP-PaC トレーニング 1+試験 1 モデル

【表 2 1】

```

> str(svmtrain)
29 種のリスト
$ call      : language svm.default(x = t(training[aprioriBoolean, ]), y = facTr, kernel = "linear")
$ type      : num 0
$ kernel    : num 0
$ cost      : num 1
$ degree    : num 3
$ gamma     : num 0.04
$ coef0     : num 0
$ nu        : num 0.5
$ epsilon   : num 0.1
$ sparse    : logi FALSE
$ scaled    : logi [1:25] TRUE TRUE TRUE TRUE TRUE TRUE ...
$ x.scale   : List of 2
  ..$ scaled:center: Named num [1:25] 3.14 3.42 3.28 3.33 2.66 ...
  ...- attr(*, "names")= chr [1:25] "ApoA1_001_C08" "APOA4_5" "C1e_032_A11" "C5.12" ...
  ..$ scaled:scale : Named num [1:25] 0.117 0.157 0.183 0.109 0.112 ...
  ...- attr(*, "names")= chr [1:25] "ApoA1_001_C08" "APOA4_5" "C1e_032_A11" "C5.12" ...
$ y.scale   : NULL
$ nclasses  : int 2
$ levels    : chr [1:3] "ChP" "PaC" "rest"
$ tot.nSV   : int 97
$ nSV       : int [1:2] 49 48
$ labels    : int [1:2] 1 2
$ SV        : num [1:97, 1:25] -0.407 0.147 -0.912 -0.256 0.478 ...
  ..- attr(*, "dimnames")=List of 2
  ...$: chr [1:97] "R2S1B7" "R4S5A1" "R1S1B4" "R1S8A3" ...
  ...$: chr [1:25] "ApoA1_001_C08" "APOA4_5" "C1e_032_A11" "C5.12" ...
$ index     : int [1:97] 1 3 6 8 13 16 20 21 22 23 ...
$ rho       : num 0.0805
$ compprob  : logi FALSE
$ probA     : NULL
$ probB     : NULL
$ sigma     : NULL
$ coefs     : num [1:97, 1] 1 1 0.0466 1 1 ...
$ na.action : NULL
$ fitted    : Factor w/ 3 levels "ChP","PaC","rest": 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 ...
  ..- attr(*, "names")= chr [1:204] "R2S1B7" "R1S2A6" "R4S5A1" "R3S5A2" ...
$ decision.values: num [1:204, 1] 0.935 2.207 0.329 3.534 1.665 ...
  ..- attr(*, "dimnames")=List of 2
  ...$: chr [1:204] "R2S1B7" "R1S2A6" "R4S5A1" "R3S5A2" ...
  ...$: chr "ChP/PaC"
  - attr(*, "class")= chr "svm"
>

```

(iv) N-PaC トレーニング 1+試験 1 モデル

【 0 1 7 3 】

【表 2 2】

```

> str(svmtrain)
29 種のリスト
$ call      : language svm.default(x = t(training[aprioriBoolea...]), y = factr, kernel = "linear")
$ type      : num 0
$ kernel    : num 0
$ cost      : num 1
$ degree    : num 3
$ gamma     : num 0.04
$ coef0     : num 0
$ nu        : num 0.5
$ epsilon   : num 0.1
$ sparse    : logi FALSE
$ scaled    : logi [1:25] TRUE TRUE TRUE TRUE TRUE TRUE ...
$ x.scale   :List of 2
..$ scaled:center: Named num [1:25] 3.53 3.37 3.11 3.26 3.72 ...
..- attr(*, "names")= chr [1:25] "Angiomotin.1" "APOA4_2" "BITM8.001.B04" "C1e_032_A11" ...
..$ scaled:scale : Named num [1:25] 0.135 0.186 0.235 0.192 0.177 ...
..- attr(*, "names")= chr [1:25] "Angiomotin.1" "APOA4_2" "BITM8.001.B04" "C1e_032_A11" ...
$ y.scale   : NULL
$ nclasses  : int 2
$ levels    : chr [1:3] "N" "PaC" "rest"
$ tot.nSV   : int 15
$ nSV       : int [1:2] 8 7
$ labels    : int [1:2] 1 2
$ SV        : num [1:15, 1:25] -0.392 -1.505 0.246 0.174 1.489 ...
..- attr(*, "dimnames")=List of 2
.. ..$: chr [1:15] "R3S6A1" "R3S1A5" "R4S5A5" "R3S5A3" ...
.. ..$: chr [1:25] "Angiomotin.1" "APOA4_2" "BITM8.001.B04" "C1e_032_A11" ...
$ index     : int [1:15] 1 9 14 15 16 17 19 20 27 69 ...
$ rho       : num 1.4
$ compprob  : logi FALSE
$ probA     : NULL
$ probB     : NULL
$ sigma     : NULL
$ coefs     : num [1:15, 1] 0.0642 0.0156 0.0414 0.0302 0.0184 ...
$ na.action : NULL
$ fitted    : Factor w/ 3 levels "N","PaC","rest": 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
..- attr(*, "names")= chr [1:124] "R3S6A1" "R6S1A3" "R3S4B3" "R6S2B1" ...
$ decision.values: num [1:124, 1] 1 1.88 1.2 1.67 2.61 ...
..- attr(*, "dimnames")=List of 2
.. ..$: chr [1:124] "R3S6A1" "R6S1A3" "R3S4B3" "R6S2B1" ...
.. ..$: chr "N/PaC"
- attr(*, "class")= chr "svm"
>

```

(v) スクリプト ChP-PaC トレーニング 1+試験 1

```
apri<-c(" IL-1a-145      ",
```

【表 2 3】

```

" IL-4-55 "
" TGF-b1-34 "
" C-BTK-1 "
" C-UBE2C-1 "
" C-PTPN1-3 "
" CT17 "
" C5-12 "
" Sox11A_A6 "
" C-HADH2-8 "
" MCP1_001_A04 "
" C-TNFRSF3-1 "
" C-UCHL5-1 "
" TNF-a-89 "
" C-TNFRSF3-2 "
" Eotaxin-2 "
" MCP1_005_A11 "
" C1e_032_A11 "
" APOA4_5 "
" ApoA1_001_C08 "
" C-MK08-1 "
" C-FASN-6 "
" IL-16-1 "
" C-Keratin19-3 "
" C-GAK-5 ")

```

```

library(MASS)
library(gplots)
library(e1071)
#source("C:/Program/R/R-2.8.1/library/NaiveBayesian")
source("NaiveBayesian")

```

```

filnamn<-"serum ChP-PaC train1+test1.txt"
rawfile <- read.delim(filnamn)
samplenames <- as.character(rawfile[,1])
groups <- rawfile[,2]
data <- t(rawfile[,c(1,2)])
ProteinNames <- read.delim(filnamn,header=FALSE)
ProteinNames <- as.character(as.matrix(ProteinNames)[1,])
ProteinNames <- ProteinNames[1:2]
rownames(data) <- ProteinNames
colnames(data) <- samplenames

```

```

group1 <- "ChP"
group2 <- "PaC"

```

```

nTrainingSamples <- 204

```

【 0 1 7 5 】

【表 2 4】

```

nTestSamples <- 102

training <- data[,1:nTrainingSamples ]
test <- data[(nTrainingSamples+1):(nTrainingSamples+nTestSamples)]

aprioriBoolean <- is.element(rownames(data) , apri)
facTr <- factor(rep("rest",ncol(training)),levels=c(group1, group2, "rest"))
subset1Tr <- is.element(groups[1:nTrainingSamples] , group1)
subset2Tr <- is.element(groups[1:nTrainingSamples] , group2)
facTr[subset1Tr] <- group1
facTr[subset2Tr] <- group2

facTe <- factor(rep("rest",ncol(test)),levels=c(group1, group2, "rest"))
subset1Te <- is.element(groups[(nTrainingSamples+1):(nTrainingSamples+nTestSamples)] , strsplit(group1," ")[1])
subset2Te <- is.element(groups[(nTrainingSamples+1):(nTrainingSamples+nTestSamples)] , strsplit(group2," ")[1])
facTe[subset1Te] <- group1
facTe[subset2Te] <- group2

svmtrain <- svm(t(training[aprioriBoolean,]) , facTr, kernel="linear")
pred <- predict(svmtrain, t(test[aprioriBoolean,]) , decision.values = TRUE, probability = T)
res <- as.numeric(attributes(pred)$decision.values, probability = T)
facnames <- colnames(attributes(pred)$decision.values)[1]
ROCdata <- myROC(res,facTe)
ROCdata[1]

SenSpe <- SensitivitySpecificity(res,facTe)
Sensitivity <- as.numeric(SenSpe[,1])
Specificity <- as.numeric(SenSpe[,2])
omSpecificity <- 1-Specificity
plot(omSpecificity, Sensitivity, ylab="Sensitivity", xlab="1-Specificity",type="l")
mtext(side=1, line = -1.1, paste("ROC AUC = ",signif(ROCdata[1], digits=2)))

ROCdata

Sensitivity+Specificity
max(Sensitivity+Specificity)

SenSpe

(vi) スクリプト N-PaC トレーニング 1+試験 1

apri<-c(" C-IL6-5          ",
"   CystC_002_A01      ",
"   IL-8-10            ",
"   IL-11-42           ",
"   C1e_032_A11        ",
"   Eotaxin-2          ")

```

【表 2 5】

```

" C-HADH2-8      ",
" FB_009_B01    ",
" C5-9          ",
" CD40-44       ",
" C-CDK2-1      ",
" FN3-001-B04   ",
" Angiototin-1  ",
" LDL-2         ",
" C5_029_C08    ",
" C1q-4         ",
" IL-1a-122     ",
" C-CDK2-2      ",
" C1e_032_E05   ",
" APOA4_2       ",
" FB_009_E05    ",
" C-P85A-4      ",
" C-BTK-1       ",
" BITM8-001-B04",
" IL-13-16     ")

```

```

library(MASS)
library(gplots)
library(e1071)
#source("C:/Program/R/R-2.8.1/library/NaiveBayesian")
source("NaiveBayesian")

```

```

filnamn<-"serum N-PaC train1+test1.txt"
rawfile <- read.delim(filnamn)
samplenames <- as.character(rawfile[,1])
groups <- rawfile[,2]
data <- t(rawfile[,-c(1,2)])
ProteinNames <- read.delim(filnamn,header=FALSE)
ProteinNames <- as.character(as.matrix(ProteinNames)[1,])
ProteinNames <- ProteinNames[-(1:2)]
rownames(data) <- ProteinNames
colnames(data) <- samplenames

```

```

group1 <- "N"
group2 <- "PaC"

```

```

nTrainingSamples <- 124
nTestSamples <- 62

```

```

training <- data[1:nTrainingSamples ]
test <- data[(nTrainingSamples+1):(nTrainingSamples+nTestSamples)]

```

【表 2 6】

```

aprioriBoolean <- is.element(rownames(data), apri)
facTr <- factor(rep("rest", ncol(training)), levels=c(group1, group2, "rest"))
subset1Tr <- is.element(groups[1:nTrainingSamples], group1)
subset2Tr <- is.element(groups[1:nTrainingSamples], group2)
facTr[subset1Tr] <- group1
facTr[subset2Tr] <- group2

facTe <- factor(rep("rest", ncol(test)), levels=c(group1, group2, "rest"))
subset1Te <- is.element(groups[(nTrainingSamples+1):(nTrainingSamples+nTestSamples)], strsplit(group1, ", ")[1])
subset2Te <- is.element(groups[(nTrainingSamples+1):(nTrainingSamples+nTestSamples)], strsplit(group2, ", ")[1])
facTe[subset1Te] <- group1
facTe[subset2Te] <- group2

svmtrain <- svm(t(training[aprioriBoolean,]), facTr, kernel="linear")
pred <- predict(svmtrain, t(test[aprioriBoolean,]), decision.values = TRUE, probability = T)
res <- as.numeric(attributes(pred)$decision.values, probability = T)
facnames <- colnames(attributes(pred)$decision.values)[1]
ROCdata <- myROC(res, facTe)
ROCdata[1]

SenSpe <- SensitivitySpecificity(res, facTe)
Sensitivity <- as.numeric(SenSpe[, 1])
Specificity <- as.numeric(SenSpe[, 2])
omSpecificity <- 1-Specificity
plot(omSpecificity, Sensitivity, ylab="Sensitivity", xlab="1-Specificity", type="l")
mtext(side=1, line = -1.1, paste("ROC AUC = ", signif(ROCdata[1], digits=2)))

ROCdata

Sensitivity+Specificity
max(Sensitivity+Specificity)

SenSpe

```

【 0 1 7 8 】

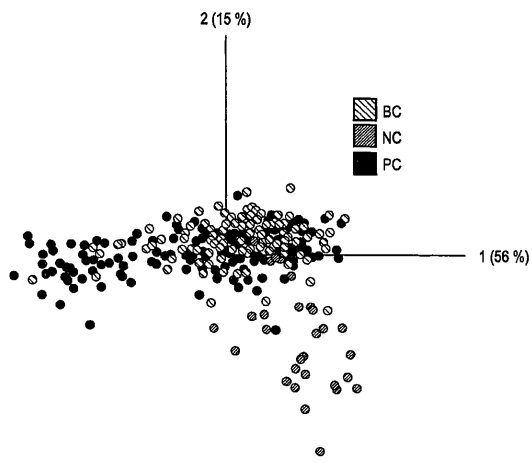
【表 2 7】

表C-バイオマーカーおよびバイオマーカー組合せの例示的な識別力(PC対NC)

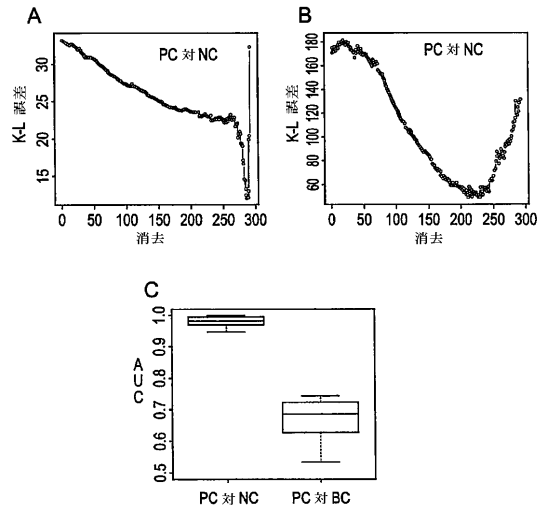
ROC-AUC	バイオマーカーシグネチャー
0.9	HADH2
0.83	TNFRSF3
0.93	HADH2+TNFRSF3
0.96	HADH2+TNFRSF3+GAK
0.95	HADH2+TNFRSF3+GAK+UPF3B
0.95	HADH2+TNFRSF3+GAK+UPF3B+インテグリン α -10

40

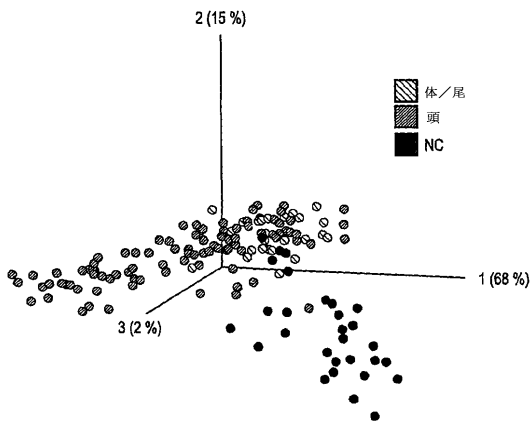
【 图 1 】



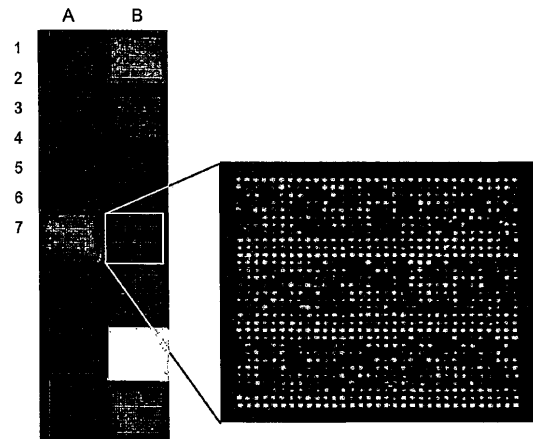
【 图 2 】



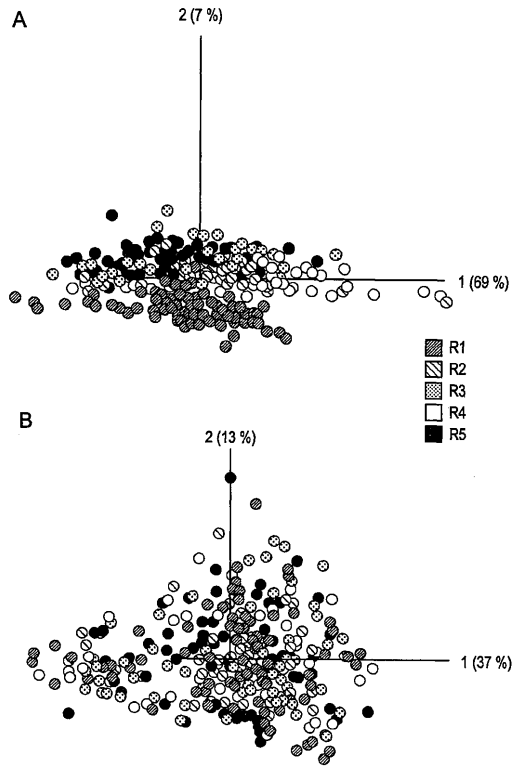
【 图 3 】



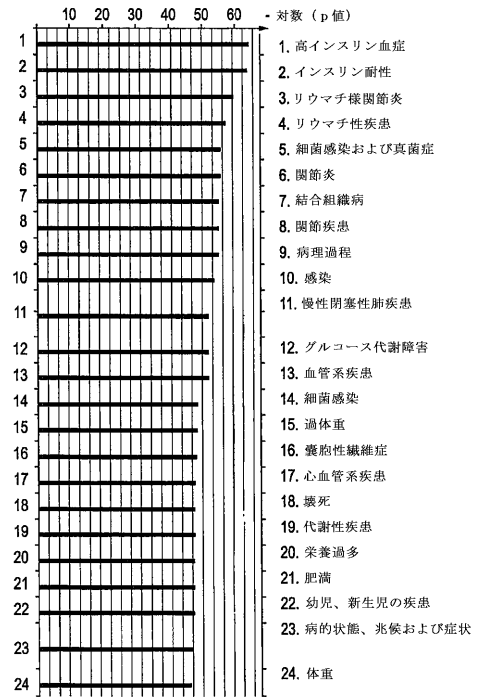
【 图 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2016537652000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2014/053340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI H ET AL: "Expressions of Syk and VEGF-D protein in pancreatic cancer and their clinical significance", CHINESE JOURNAL OF CANCER PREVENTION AND TREATMENT 200808 CN, vol. 15, no. 15, August 2008 (2008-08), pages 1166-1168, XP008175337, ISSN: 1673-5269 abstract	1-6, 13-63
X	US 2007/212738 A1 (HALEY JOHN D [US] ET AL) 13 September 2007 (2007-09-13)	1-6, 14-56, 58,60-63
Y	the whole document	5
A	in particular: paragraphs [0061], [0077], [0079], [0113], [0130]	13,57,59
	----- -/--	
<input checked="" 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		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 17 June 2015		Date of mailing of the international search report 23/06/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tuyman, Antonin

6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2014/053340

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/110581 A2 (CHIRON CORP [US]; SAGRES DISCOVERY INC [US]; LAI ALBERT [US]; FANIDI A) 19 October 2006 (2006-10-19)	1-6, 14-56, 58,60-63
Y	claims 15,27	5
A	paragraph [0009] - paragraph [00012] paragraphs [0045], [0011200300]	13,57,59
Y	----- FUJIWARA S I ET AL: "Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 338, no. 2, 16 December 2005 (2005-12-16), pages 1256-1262, XP027218471, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2005.10.080 [retrieved on 2005-11-09] abstract	5
A	----- C. WINGREN ET AL: "Identification of Serum Biomarker Signatures Associated with Pancreatic Cancer", CANCER RESEARCH, vol. 72, no. 10, 15 May 2012 (2012-05-15), pages 2481-2490, XP055172675, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2883 the whole document in particular: table 2 figures 1,3,4	1-6, 13-63
A	----- JOHAN INGVARSSON ET AL: "Detection of pancreatic cancer using antibody microarray-based serum protein profiling", PROTEOMICS, vol. 8, no. 11, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 2211-2219, XP055172677, ISSN: 1615-9853, DOI: 10.1002/pmic.200701167 the whole document in particular: abstract table 2 figures 3,4	1-6, 13-63
	----- -/--	

6

Form PCTASA/Z10 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No PCT/GB2014/053340

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRIDA PAULY ET AL: "Protein Expression Profiling of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Using Recombinant Antibody Microarrays", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 12, no. 12, 24 September 2013 (2013-09-24), pages 5943-5953, XP055194718, ISSN: 1535-3893, DOI: 10.1021/pr4003245	56, 60, 61, 63
A	abstract table 1	1-9, 13-55, 57-59, 62
X	----- CHO J H ET AL: "W1412 Expression of Sox-11 and Sox-4 Is Involved in Pathogenesis of Solid Pseudopapillary Tumor in Pancreas", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 134, no. 4, 1 April 2008 (2008-04-01), pages A-699, XP023435059, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1016/S0016-5085(08)63262-X [retrieved on 2008-04-01]	1, 7, 58, 60, 62, 63
Y	abstract	2-4, 15-55, 61
A		8, 13, 14, 57, 59
X	----- WO 2012/120288 A2 (IMMUNOVIA AB [SE]; SMITH STEPHEN EDWARD [GB]; BORREBAECK CARL ARNE KRI) 13 September 2012 (2012-09-13)	1-4, 7, 14-56, 58, 60-63
Y	the whole document	2-4, 15-55, 61
A	in particular: claims 1-91 table IV page 5, line 1 - line 18 -----	8, 13, 57, 59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2014/053340

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-9(completely); 13-63(partially)

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2014/053340

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 5, 6(completely); 1-4, 13-63(partially)

Methods and products for determining the presence of pancreatic cancer in an individual, wherein the biomarker is a core biomarker from table A(i): HADH2 and TNFRSF3.

2. claims: 7, 8(completely); 1-4, 13-63(partially)

Methods and products for determining the presence of pancreatic cancer in an individual, wherein the biomarker is a biomarker for PC, which also allows for tumour localisation chosen from Table A(ii).

3. claims: 1-4, 9, 13-63(all partially)

Methods and products for determining the presence of pancreatic cancer in an individual, wherein the biomarker is a biomarker for PC, which is a small peptide of 6 amino acids chosen from Table A(iii).

4. claims: 1-4, 9, 13-63(all partially)

Methods and products for determining the presence of pancreatic cancer in an individual, wherein the biomarker is a biomarker for PC, which is a small peptide of 11-14 amino acids chosen from Table A(iii).

5. claims: 1-4, 9, 13-63(all partially)

Methods and products for determining the presence of pancreatic cancer in an individual, wherein the biomarker is a biomarker for PC, which is a kinase chosen from Table A (iii).

6. claims: 1-4, 9, 13-63(all partially)

Methods and products for determining the presence of pancreatic cancer in an individual, wherein the biomarker is a biomarker for PC, which is another protein (OBP3 and FASN) chosen from Table A(iii).

7. claims: 10(completely); 56-63(partially)

Methods and products for determining the presence of pancreatic cancer in an individual, wherein the biomarker is a biomarker for PC, which also allow for tumor localisation

International Application No. PCT/GB2014/053340

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

chosen from Table A(iv).

8-64. claims: 11(completely); 56-63(partially)

Methods and products for determining the presence of pancreatic cancer in an individual, wherein the biomarker is a biomarker for PC, which is a biomarker chosen from Table A (v).

65. claims: 12(completely); 56-63(partially)

Methods and products for determining the presence of pancreatic cancer in an individual, wherein the biomarker is a biomarker for PC, which is a biomarker chosen from Table A (vi).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2014/053340

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007212738 A1	13-09-2007	EP 2135086 A2	23-12-2009
		JP 2010527232 A	12-08-2010
		US 2007212738 A1	13-09-2007
		US 2014018375 A1	16-01-2014
		WO 2008127718 A2	23-10-2008

WO 2006110581 A2	19-10-2006	AU 2006235258 A1	19-10-2006
		CA 2604844 A1	19-10-2006
		EP 1871911 A2	02-01-2008
		EP 1910557 A2	16-04-2008
		EP 2083088 A2	29-07-2009
		JP 2008535494 A	04-09-2008
		JP 2008535853 A	04-09-2008
		US 2009220495 A1	03-09-2009
		WO 2006110581 A2	19-10-2006
		WO 2006110585 A2	19-10-2006

WO 2012120288 A2	13-09-2012	CA 2828338 A1	13-09-2012
		CN 103534594 A	22-01-2014
		EP 2681563 A2	08-01-2014
		JP 2014508298 A	03-04-2014
		KR 20140040118 A	02-04-2014
		US 2014038844 A1	06-02-2014
WO 2012120288 A2	13-09-2012		

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 N 15/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 Z
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
	C 1 2 M 1/00	A
	C 1 2 M 1/34	F
	C 0 7 K 16/30	

(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 クリステル・ラーシュ・ベルティル・ウィングレン

スウェーデン国エスエー - 2 4 7 3 2 スードラ . サンドビー . ウースタクラヴェーゲン 2 3

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA08 BB11 FA03 GA01 GA03
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ42 QQ52 QR08 QS34 QX02
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA41 EA50 FA74

专利名称(译)	方法，阵列及其用于确定胰腺癌的方法		
公开(公告)号	JP2016537652A	公开(公告)日	2016-12-01
申请号	JP2016552704	申请日	2014-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	伊缪诺维亚公司		
申请(专利权)人(译)	Imunovia-Akuchieboragu		
[标]发明人	カールアーネクリステルポーレバエック クリステルラーシュベルティルウイングレン		
发明人	カール・アーネ・クリステル・ポーレバエック クリステル・ラーシュ・ベルティル・ウイングレン		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 C12N15/09 C12N15/00 C12Q1/68 C12M1/00 C12M1/34 C07K16/30		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57438 G01N33/57484 C12Q1/6834 G01N33/54386 G01N33/581		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/543.575 G01N33/53.U G01N33/543.545.A G01N33/53.M G01N33/543.541.Z G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.ZNA C12Q1/68.A C12M1/00.A C12M1/34.F C07K16/30		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA08 4B029/BB11 4B029/FA03 4B029/GA01 4B029/GA03 4B063/QA01 4B063 /QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QS34 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2013019878 2013-11-11 GB		
其他公开文献	JP6600637B2 JP2016537652A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是一种用于确定个体中胰腺癌的存在的方法，该方法包括：(a) 从该个体提供要测试的样品，和 (b) 在测试样品中定义在表A中。包括通过测量一种或多种选自表A定义的组中的一种或多种生物标志物在试验样品中的表达来确定试验样品的生物标志物签名的步骤。选自以上的一种或多种生物标志物的表达涉及以上方法，其是患有胰腺癌的个体的指标。本发明还包括用于本发明方法的零件阵列和试剂盒。核心生物标志物是HADH2和TNFRSF3。

