

(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2004-526154

(P2004-526154A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 Y	2 GO 4 5
C 1 2 Q 1/00	C 1 2 Q 1/00 Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50 X	
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 290 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-572414 (P2002-572414)	(71) 出願人	502321021
(86) (22) 出願日	平成14年3月12日 (2002.3.12)		モノジェン インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月12日 (2003.9.12)		アメリカ合衆国 イリノイ州 バーノンヒルズ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/001125		バターフィールドロード 1033
(87) 国際公開番号	W02002/073204	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開日	平成14年9月19日 (2002.9.19)		弁理士 奥山 尚一
(31) 優先権主張番号	60/274, 638	(74) 代理人	100096769
(32) 優先日	平成13年3月12日 (2001.3.12)		弁理士 有原 幸一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		(72) 発明者	プレスマン, ノーマン・ジェイ
			アメリカ合衆国イリノイ州60022, グレンコー, グリーンウッド・アヴェニュー
			390
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】細胞ベースの検出および病態の判別

(57) 【要約】

本発明は、高い感度および特異性で病態を検出および判別する方法を提供する。本方法により、細胞ベースのサンプルが異常細胞を含むかどうかを決定可能であり、一定の疾患について存在する疾患の組織学的型を決定することができる。本方法は、細胞ベースのサンプルにおける分子マーカーの発現レベルおよび発現パターンの変化を検出する。パネル選択および確認手順もまた提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞ベースの診断を使用した一般的病態を検出するかまたは特定の病態を判別するためのパネルであって、一般的病態または特定の病態に関連するマーカーにそれぞれ特異的に結合する複数のプローブを含み、パネルの成分プローブによる細胞学的標本中の細胞への結合パターンにより、前記病態の存在または特定の性質を診断することを特徴とするパネル。

【請求項 2】

前記一般的病態が、がんおよび感染症からなる群から選択される、請求項 1 のパネル。

【請求項 3】

前記がんが、上皮細胞系のがん、固形腫瘍系のがん、分泌腺腫瘍系のがん、および血液系のがんからなる群から選択される、請求項 2 のパネル。

【請求項 4】

感染性生物がウイルス、細菌、原生動物、寄生虫、または真菌類である細胞ベースの疾患からなる群から前記感染症が選択される、請求項 2 のパネル。

【請求項 5】

前記パネルが、費用、地理的位置での一般的病態の有病率、地理的位置での特定の病態の有病率、プローブの利用可能性、および営利的検討材料からなる群から選択される重み係数の使用によって至適化される、請求項 1 のパネル。

【請求項 6】

前記各プローブが検出可能な標識を含む、請求項 1 のパネル。

【請求項 7】

前記プローブが抗体を含む、請求項 6 のパネル。

【請求項 8】

前記標識が、発色団、フルオロフォア、色素、放射性同位体、および酵素からなる群から選択される、請求項 6 のパネル。

【請求項 9】

前記標識が β 線、 γ 線、X 線、紫外線、可視光線、赤外線、およびマイクロ波からなる群から選択される電磁放射線を使用して検出される発色団である、請求項 8 のパネル。

【請求項 10】

前記結合パターンを光子顕微鏡検査法を使用して検出する、請求項 1 のパネル。

【請求項 11】

前記光子顕微鏡検査法が γ 線、X 線、 β 線、紫外線、可視光線、赤外線、およびマイクロ波からなる群から選択される少なくとも 1 つの電磁放射線を使用する、請求項 10 のパネル。

【請求項 12】

前記検出が肺がん用であり、前記判別を、扁平上皮がん、腺がん、大細胞がん、小細胞がん、および中皮腫について行なう、請求項 3 のパネル。

【請求項 13】

前記検出が性感染症であり、前記判別を、クラミジア、トリコモナス、淋病、ヘルペス、および梅毒について行なう、請求項 1 のパネル。

【請求項 14】

(a) 病態に関連するマーカーのライブラリーのメンバーにそれぞれ特異的に結合するプローブ結合の感受性および特異性を決定するステップと、
(b) 結合パターンにより前記病態の存在または特定の性質が診断される限定された複数のプローブを選択するステップと
を含む、細胞ベースの診断を使用した患者の病態の検出または病態の判別のためのパネルの形成方法。

【請求項 15】

前記決定が、

10

20

30

40

50

(a) 前記疾患を罹患していることが知られている患者由来の組織学的または細胞学的サンプルおよび前記疾患を罹患していないことが知られている患者由来の組織学的または細胞学的サンプルを、前記各プローブにそれぞれ接触させるステップと、

(b) 各プローブの特異的結合量を、その相補疾患マーカーが前記サンプルの細胞中に存在することが知られている遺伝子座においてその相補疾患マーカーを使用して測定するステップと、

(c) 前記量と前記疾患の存在または特定の性質とを相関させるステップとを含む、請求項 14 の方法。

【請求項 16】

前記選択が、1 つまたは複数の統計分析法、パターン認識法、および神経回路網分析を含む、請求項 14 の方法。 10

【請求項 17】

前記選択が重み係数の使用を含む、請求項 14 の方法。

【請求項 18】

(a) 病態に特徴的な異常細胞を含むと疑われる細胞学的サンプルに請求項 1 に記載のパネルを接触させるステップと、

(b) 前記病態の存在または特定の性質を診断する前記プローブの結合パターンを検出するステップと

を含む、疾患を検出するか病態を判別する方法。

【請求項 19】

前記細胞学的サンプルが、体液、上皮細胞ベースの器官系、細針吸引、または生検から採取された細胞サンプルである、請求項 18 の方法。 20

【請求項 20】

前記細胞学的サンプルが喀痰である、請求項 19 の方法。

【請求項 21】

前記パネルが請求項 14 に記載の方法によって形成された、細胞ベースの診断を使用した一般的病態を検出するかまたは特定の病態を判別するためのパネル。

【請求項 22】

前記病態が肺がんである、請求項 21 のパネル。

【請求項 23】

前記疾患マーカーが、形態学的生物マーカー、遺伝的生物マーカー、細胞周期生物マーカー、分子生物マーカー、および生化学的生物マーカーからなる群から選択される、請求項 1 のパネル。 30

【請求項 24】

前記上皮細胞系のがんが、肺 (pulmonary)、尿路、胃腸管、または生殖管に由来する、請求項 3 のパネル。

【請求項 25】

前記固形腫瘍系のがんが、肉腫、乳がん、膵臓がん、肝臓がん、腎臓がん、甲状腺がん、および前立腺がんからなる群から選択される、請求項 3 のパネル。

【請求項 26】

前記分泌腺系のがんが、肉腫、乳がん、膵臓がん、肝臓がん、腎臓がん、甲状腺がん、および前立腺がんからなる群から選択される、請求項 3 のパネル。 40

【請求項 27】

前記血液系のがんが、白血病およびリンパ腫からなる群から選択される、請求項 3 のパネル。

【請求項 28】

前記病態が肺がんであり、前記プローブが Glut 1、HERA、FGF、テロメラゼ、PCNA、CD44v6、サイクリン A、HGF、MUC-1、甲状腺転写因子、VEGF、EGF 受容体、PCNA、nm23、E-カドヘリン、Bcl-2、サイクリン D1、RB、N-カドヘリン、トロンプモジュリン、およびこれらの機能的等価物からなる 50

群から選択されるマーカーに結合する、請求項 24 のパネル。

【請求項 29】

前記体液が、血液、尿、脊髄液、およびリンパからなる群から選択される、請求項 19 の方法。

【請求項 30】

前記上皮細胞系の器官系が、気道、尿路、生殖管、および胃腸管からなる群から選択される、請求項 19 の方法。

【請求項 31】

前記細針吸引が器官および系における固形組織型に由来する、請求項 19 の方法。

【請求項 32】

前記生検が器官および系における固形組織型に由来する、請求項 19 の方法。

【請求項 33】

前記器官および系が、乳房、膵臓、肝臓、腎臓、甲状腺、骨髄、筋肉、前立腺、および肺からなる群から選択される、請求項 31 または請求項 32 の方法。

【請求項 34】

前記形態学的生物マーカーが、DNA 倍数体、MAC、および前悪性病変からなる群から選択される、請求項 23 のパネル。

【請求項 35】

前記遺伝的生物マーカーが、DNA 付加物、DNA 変異体、およびアポトーシス指数からなる群から選択される、請求項 23 のパネル。

【請求項 36】

前記細胞周期生物マーカーが、細胞増殖マーカー、分化マーカー、調節分子、およびアポトーシスマーカーからなる群から選択される、請求項 23 のパネル。

【請求項 37】

前記分子生物マーカーまたは生化学的生物マーカーが、がん遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、腫瘍抗原、成長因子および受容体、酵素、タンパク質、プロスタグランジン、ならびに接着分子からなる群から選択される、請求項 23 のパネル。

【請求項 38】

前記肺がん (pulmonary cancer) が、肺がん (lung cancer) である、請求項 24 のパネル。

【請求項 39】

前記複数のプローブがサイクリン A または相関マーカーもしくはそれに機能的に関連するマーカーに結合するプローブを含む、肺がん検出用の請求項 38 のパネル。

【請求項 40】

前記複数のプローブが、SP-B、HERA、または ER 関連 (p29) または相関マーカーもしくはこれらの機能的に関連するマーカーに結合する 1 つまたは複数のプローブをさらに含む、請求項 39 のパネル。

【請求項 41】

前記複数のプローブが、ムチン 1 および甲状腺転写因子 1 またはこれらの相関マーカーもしくは機能的に関連するマーカーを含む、他の肺がん型と腺がんを判別するための請求項 38 のパネル。

【請求項 42】

前記複数のプローブが、VEGF、SP-A、BCL-2、ER 関連 (p29)、および Glut3 またはこれらの相関マーカーもしくは機能的に関連するマーカーに結合する 1 つまたは複数のプローブをさらに含む、請求項 41 のパネル。

【請求項 43】

前記複数のプローブが、CD44v6 および ER 関連 (p29) の一方もしくは両方またはこれらの相関マーカーもしくは機能的に関連するマーカーに結合するプローブを含む、他の肺がん型と扁平上皮がんを判別するための請求項 38 のパネル。

【請求項 44】

10

20

30

40

50

前記複数のプローブが、VEGF、トロポモジュリン、Glut1、およびMAGE3、またはこれらの関連マーカーもしくは機能的に関連するマーカーに結合する1つまたは複数のプローブをさらに含む、請求項43のパネル。

【請求項45】

前記複数のプローブが、VEGF、サイクリンA、およびP120、またはこれらの関連マーカーもしくは機能的に関連するマーカーに結合する1つまたは複数のプローブに結合するプローブを含む、他の肺がん型と大細胞がんを判別するための請求項38のパネル。

【請求項46】

前記複数のプローブが、CD44v6、PCNA、およびHERAまたはこれらの関連マーカーもしくは機能的に関連するマーカーに結合する1つまたは複数のプローブに結合するプローブを含む、他の肺がん型と中皮腫を判別するための請求項38のパネル。 10

【請求項47】

前記複数のプローブが、PCNA、BCL-2、およびEGFRまたはこれらの関連マーカーもしくは機能的に関連するマーカーに結合する1つまたは複数のプローブに結合するプローブを含む、他の肺がん型と小細胞がんを判別するための請求項38のパネル。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者の一般的病態の初期検出に関する。本発明はまた、初期段階の特異的病態の判別（識別）に関する。 20

【背景技術】

【0002】

特定の病態の初期検出は、疾患がまだ局在し、その病理学的影響が解剖学および生理学的に限定されている初期診断および初期治療によって患者の生存する見込みを非常に高めることができる。任意の試験または疾患検出法における2つの重要な評価基準は、例外および標的疾患を罹患していない患者を誤って含むことなく全罹患患者を正確に検出するためにいかに良く試験が行われるかを示すその感度（感度＝真の陽性／（真の陽性＋偽陰性））および特異性（特異性＝真の陰性／（偽陽性＋真の陰性））である。組織学的には、感度および特異性が不十分であるために、多くの診断試験が批判されている。

【0003】

感度は、試験の試験される個体の標的疾患を正確に検出する能力の基準である。感度の不十分な試験は偽陰性（すなわち、特定の疾患を罹患しているが、罹患していないと誤って同定される個体）の比率が高い。偽陰性の潜在的な危険性は、罹患個体が一定期間診断および治療されず、その間に治療方法があるにしても有効性が低くなり得る後期まで疾患が進行し得ることである。感度の低い試験の例は、HIVのタンパク質ベースの血液検査である。疾患が十分に確立されて相当数のウイルスが血流に侵入するまでウイルスの存在が検出できないので、この試験型の感度は不十分である。対照的に、感度の高い試験の例は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用したウイルスロード検出である。この型の試験は、非常に少量のウイルスを検出することができるので、感度が高い（Lewis, D. R. ら、「Molecular Diagnostics: The Genomic Bridge Between Old and New Medicine: A White Paper on the Diagnostic Technology and Services Industry」、Thomas Weisel Partners、2001年6月13日を参照のこと）。 40

【0004】

他方では、特異性は、罹患していない患者を正確に同定する試験の能力の基準である。特異性の不十分な試験は、偽陽性（すなわち、疾患を誤って同定される個体）の比率が高い。偽陽性の欠点は、患者がリスク、感情的および金銭的ストレスを伴う不必要な医療行為を強要され、患者の健康状態に悪影響を及ぼすことである。特異性の高い診断試験の開発を困難にしている疾患の特徴は、疾患機構がしばしば複数の遺伝子およびタンパク質に関 50

連していることである。さらに、病態に関連しない理由についての一定のタンパク質が増加し得る。特異性の高い試験の例は、p53変異を検出することができる遺伝子ベースの試験である。がん細胞が存在しない限り、p53変異は決して検出されない（Lewis, D. R. ら、「Molecular Diagnostics: The Genomic Bridge Between Old and New Medicine: A White Paper on the Diagnostic Technology and Services Industry」、Thomas Weisel Partners、2001年6月13日を参照のこと）。

【0005】

細胞マーカーは、発見することができ健康な細胞および疾患細胞を特徴付けるか識別するために使用することができる細胞内の天然に存在する分子構造である。マーカーの存在を、マーカーを視覚化によって検出し、そして／または画像処理システムを使用して定量することができる、マーカーに結合するヒトによって発明および開発されたプローブによって検出することができる。4つのクラスの細胞ベースのマーカー検出テクノロジーは、細胞病理学、血球計算、細胞遺伝学、およびプロテオミクスであり、以下に同定および記載されている。

【0006】

細胞病理学は、専門家による染色された全細胞集団内の細胞形態学的変化の視覚的評価に依存する。例は、細胞検査および細胞病理学の専門家によるパパニコロー染色子宮頸部一腔検体の細胞学的スクリーニングおよび細胞診断である。細胞遺伝学、プロテオミクス、および血球計算と異なり、細胞病理学は定量ツールではない。これは臨床診断細胞学で最先端であるが、主観的であり、診断結果は特に初期のがん（例えば、ASCUS、LSIL）でしばしば感度が高くないか再現性がない。

【0007】

形態学的分析に依存する試験は、細胞および核の形状、サイズ、または染色の異常を同定するために顕微鏡で患者の細胞サンプルを観察することを含む。顕微鏡で観察した場合、正常な成熟上皮細胞は、巨大且つ十分に分化されており、核が凝縮している。しかし、形態異常症の細胞は、種々の分化段階で存在し、いくつかの細胞は異常に成熟している。最後に、浸潤がん細胞はしばしば未分化であり、細胞質が非常に少なく、核が比較的大きい。

【0008】

形態学的分析に依存する診断試験の欠点は、細胞形態学が遅い指標であることである。形態は機能に追従するので、疾患が形態学的分析によって証明されるまでに、病態はたいてい既に危機的段階に進行している。疾患の初期段階は、分子レベルの化学的变化を含む。顕微鏡での細胞の特徴の観察によって検出可能な変化は、疾患の後期段階まで明らかではない。したがって、「分子診断」と呼ばれる分子レベルの化学的变化を測定する試験は、形態学的分析のみに依存する試験よりも早く検出する可能性が高い。

【0009】

サイトメトリーは、溶液中の1ファイル中を移動する蛍光染色細胞のフロー微量蛍光機器分析または顕微鏡スライドガラス上に置いた染色細胞のコンピュータ支援の顕微鏡機器分析（画像サイトメトリー）に基づく。フローサイトメトリーは、白血病およびリンパ腫の免疫表現型分類を含む。画像サイトメトリーは、DNA倍数体、悪性関連変化（Malignancy-associated Change、MAC）、およびS期分析を含む。フローサイトメトリーおよび画像サイトメトリーアプローチにより、懸濁液または顕微鏡スライドガラス上の細胞を特徴付ける定量的データが得られる。フローサイトメトリーおよび画像サイトメトリーにより、細胞染色の感度および特異性ならびに使用したフロー／画像測定の特徴に依存して良好にマーカーを検出および識別結果を産生することができる。

【0010】

1900年代初期から中期にかけて悪性関連変化（MAC）が定量的に観察および報告さ

れていた (OC Gruner, 「Study of the changes met with leukocytes in certain cases of malignant disease」、Brit J Surg、3、506～522、1916) (HE Neiburgs, FG Zak, DC Allen, H Reisman, T Clardy, 「systemic cellular changes in material from human and animal tissues」、Transaction、第7巻、Ann Mtg Inter Soc Cytol Council、p. 137～144、1959)。1900年代半ばから1975年まで、頬粘膜、頬側塗抹標本 (Neiburgs, Finch, Klawe)、十二指腸 (Nieburgs)、肝臓 (Elias, Nieburgs)、巨核球 (Ramsdahl)、子宮頸管 (Nieburgs, Howdon)、皮膚 (Kwitiken)、血液および骨髓 (Nieburgs)、単球および白血球 (van Haas, Matisson, Clausen)、ならびに肺および痰 (Martuzzi and Oppen Toth) のMACが独立した定量的組織学および細胞学研究で報告された。1975年以前、これらの定量研究は、特定の疾患についてのMACベースの検出感度は76%～97%であり、特異性は50%～90%であると報告していた。1975年に、Oppen Tothは、定量的喀痰分析研究で感受性76%および特異性81%と報告した。

【0011】

MACベースのプロブ分析に関する定量的観察は、2～30年前から始まった (H Klawe, J Rowinski, 「Malignancy associated changes (MAC) in cells of buccal smears detected by means of objective image analysis」、Acta Cytol.、18、30～33、1974) (GL Wied, PH Bartels, M Bibbo, JJ Sychra, 「Cytomorphometric markers for uterine cancer in intermediate cells」、Analyt Quant Cytol、2、257～263、1980) (G Burger, U Jutting, K Rodenacker, 「Changes in benign population in cases of cervical cancer and its precursors」、Analyt Quant Cytol、3、261～271、1981)。MACは、頬粘膜および頬側塗抹標本 (Klawe, Burger)、子宮頸部 (Wied, Burger, Bartels, Vooijs, Reinhardt, Rosenthal, Boon, Katzke, Haroske, Zahniser)、乳房 (King, Bibbo, Susnik)、膀胱および前立腺 (Sherman, Montironi)、結腸 (Bibbo)、肺および痰 (Swank, MacAulay, Payne)、および鼻粘膜 (Reith) 研究における独立した定量的組織学および細胞学研究で報告され、MACベースの感受性は70～89%であり、特異性は52～100%であった。Mark and Nakhosteen (1999、アメリカ胸部学会年次会合) は、(a) 感度89%および特異性92%ならびに (b) 感度91%および特異性100%の2つの肺定量研究結果を示した。

【0012】

明らかに、悪性関連変化 (MAC) は、画像サイトメトリーマーカー検出テクノロジーに起因する潜在的に有用なプロブである。DNA染色核由来のMACベースの特徴は、他の分子診断プロブと組み合わせて肺がんおよび他の病態の検出および識別用の至適化分子診断パネルを作製するために使用することができる。

【0013】

細胞遺伝学は、例えば、in situハイブリッド形成 (ISH) テクノロジーを使用した特定の染色体ベースの細胞内の変化を検出する。ISHテクノロジーは、蛍光 (FISH)、多色蛍光 (M-FISH)、または光吸収ベースの色素原画像 (CHRISH) テクノロジーに基づき得る。ISHテクノロジーのファミリーは、クローニングされた細

菌細胞または培養された真核細胞中の相補DNA配列の存在の検出にDNAまたはRNAプローブを使用する。FISHテクノロジーを、例えば、一定のがんに関連する遺伝子異常の検出に使用することができる。例には、Trisomy 8およびHER-2neuが含まれる。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの他のテクノロジーを使用して、B細胞およびT細胞の遺伝子の再構成を検出することができる。病理学的条件が得られる原因または「誘発」分子事象が検出されるので、細胞遺伝学は高度に特異的なマーカー検出テクノロジーである。検出される事象が少ないので、細胞遺伝学は他のマーカー検出テクノロジーよりも感度が低い。in situハイブリッド形成（ISH）は、変異、染色体エラー、または特定の病原体によって挿入された遺伝物質などの遺伝子レベルの異常の検出に遺伝子ベースの分析を使用する分子診断法である。例えば、in situハイブリッド形成は、特定のmRNAにハイブリッド形成するようにデザインされた標識プライマーでの患者の細胞サンプルの処理によって特定のmRNAレベルを測定するステップと、非結合プライマーを洗浄して取り除くステップと、標識のシグナルを測定するステップとを含み得る。遺伝子配列の特異性により、遺伝子配列の検出を含む試験は特異性が高く、偽陽性は非常に少ないようである。しかし、細胞サンプル中の遺伝物質の量が非常に少ない可能性があるので、非常に弱いシグナルしか得られない場合がある。したがって、増幅技術を使用しないin situハイブリッド形成試験は、特異性が低く、多数の偽陰性が得られるようである。

10

【0014】

プロテオミクスは、正常または異常な細胞型集団中の固有または特定のタンパク質の過剰発現、過少発現、または有無に起因する細胞の特徴付けおよび識別に依存する。プロテオミクスには、タンパク質の同定および定量だけでなく、その局在、修飾、相互作用、化学活性、および細胞／細胞外機能の決定も含まれる。免疫化学（細胞中の免疫細胞化学および組織中の免疫組織化学（IHC））は、抗体を用いて抗原（すなわち、プロテオーム）を定性的または定量的に（QIHC）に染色するために使用されるテクノロジーである。免疫染色手順は、検出指標として色素を使用する。IHCの例には、ER（エストロゲン受容体）、PR（プロゲステロン受容体）、p53腫瘍抑制遺伝子、およびEGFR予後マーカーの分析が含まれる。プロテオミクスは、細胞遺伝学を使用して検出するための細胞遺伝学的変異または遺伝子配列変化が存在するよりもプロテオミクスを使用して検出するための多くのタンパク分子がしばしば大規模であるので、典型的には細胞遺伝学よりも感度の高いマーカー検出テクノロジーである。しかし、複数の病理学によりタンパク質の過剰発現または過少発現で類似の変化を得ることができるので、プロテオミクスは、細胞遺伝学的マーカー検出テクノロジーよりも特異性が低い可能性がある。免疫化学は、しばしばプローブ試薬として標識抗体を使用する組織切片または細胞調製物中の免疫反応物質の組織学的または細胞学的局在を含む。免疫化学を使用して、疾患マーカー上のエピトープに特異的に標識抗体（プローブ）などの薬剤での細胞の処理およびその後の非結合抗体の洗浄および標識シグナルの測定によって細胞サンプル中の疾患マーカー（特異的タンパク質）の濃度を測定することができる。免疫化学は、がん細胞が健康な細胞よりも一定の疾患マーカーレベルが異なるという性質に基づく。がん細胞中の疾患マーカーの濃度は、一般に、大きなシグナルの発生に十分なほど大きい。したがって、免疫化学に依存する試験は、感度が高く、偽陰性が少ないようである。しかし、病態に加えて、他の要因により、疾患マーカーの濃度が増減し、特定疾患の免疫化学分析に依存する試験は、特異性が低く、偽陽性の比率が高いようである。

20

30

40

【0015】

本発明は、高感度且つ高特異性の非侵襲性病態の検出および判別法を提供する。本方法は、罹患細胞を含むと疑われる細胞学的サンプルを特定のマーカーにそれぞれ定量的に結合する複数の薬剤を含むプローブに接触させるステップと、プローブ剤の結合パターンを検出および分析するステップとを含む。本発明はまた、特定の疾患（または疾患群）を検出し、種々の病態を判別するためのプローブのパネルを構築および確証する方法を提供する。肺がんの検出および異なる肺がん型の判別のためのパネルの例もまた提供する。

50

【0016】

ヒトの疾患は、体内の細胞、組織、器官、または系内の構造または機能を異常にする外部または内部傷害を中和するヒト器官の適応機構の不全に起因する。以下の表1に示すように、共通の原因機構によって疾患を分類することができる。

【0017】

【表1】

疾患クラス	病態の例
アレルギー	食物および植物に対する副作用
心血管	心不全、アテローム性動脈硬化症
変性（神経および筋肉）	アルツハイマー病およびパーキンソン病
食 事	非栄養物質および過剰／アンバランスな栄養
遺伝性	鎌状赤血球貧血、嚢胞性線維症
免 疫	HIVおよび自己免疫
感 染	ウイルス、細菌、真菌、寄生虫
代 謝	糖尿病
分子および細胞生物学	癌（新形成）
毒性傷害	アルコール、薬物、環境変異原、および発癌物質
外 傷	自動車の衝突による身体損傷

病態は、細胞内、細胞、組織、器官、またはヒトの解剖学的もしくは生理学的系のレベルでの異常な変化（すなわち、病理学的条件）に起因するか異常に変化する。多数の病態（例えば、肺がん）は、細胞内または細胞レベルでの異常な変化によって特徴付けられる。病態の存在および型について患者を診断するために、検体（例えば、子宮頸部PAP塗抹標本、排尿、血液、痰、結腸洗浄液）を病態が疑われる患者から採取することができる。分子病理学は、これらの細胞ベースの疾患に関連する分子の変化を同定して診断に使用する研究分野である。

【0018】

肺がんは、病態の存在を検出するために診断試験（例えば、分子診断パネルアッセイ）を使用してハイリスク集団および危険な状態にある個体のスクリーニングを行うことができる病態の例である。また、これらの手段によって肺がんまたは他の病態が検出された患者について、関連する診断試験を使用して特定の病態と関連する病態または同時に発症する病態を識別することができる。例えば、この肺がんの例では、さらなる分子診断パネルアッセイにより患者の病態が以下の肺がん型、すなわち、（a）肺の扁平上皮がん、（b）肺の腺がん、（c）肺の大細胞がん、（d）肺の小細胞がん、または（e）中皮腫の1つに一致する確率を示すことができる。細胞ベースの病態の初期の検出および判別は、患者の予後を改良する仮説的手段である。

【0019】

がんは、その自然の過程が致命的結果を招く新生物の疾患である。がん細胞は、良性の腫瘍細胞と異なり、侵襲性および転移性を示し、高度に未分化である。がんには、癌腫（c a r c i n o m a）および肉腫（s a r c o m a）の広範な2つのカテゴリーが含まれるが、通常、癌腫と同意語として使用される。世界保健機関（WHO）によれば、がんは毎年1000万人以上が罹患し、620万人以上が死亡している。

【0020】

がんは、実際には、事実上全ての身体の部分で発症し得る疾患の異種集団である。結果として、全てのがんまたは特定のがん型の段階でさえ異なる治療が同様に有効ではない。診断学（例えばマンモグラフィー、子宮頸部の細胞学、および血清PSA試験）の利点により、いくつかの場合、より多数の治療選択肢が存在する場合初期段階のがんを検出可能であり、治療はより有効である傾向がある。固形腫瘍が小さく且つ局在している場合、手術

10

20

30

40

50

のみで十分に治癒することができる。しかし、腫瘍が拡大している場合、手術の利益はせいぜい限られている。このような場合、化学療法および／または放射線治療を加えて転移性疾患を治療することができる。延命に幾らか有効であるが、転移性疾患患者の治療で治癒するのは稀である。初期応答があったとしても、時間と共に疾患は進行し、治療効果および／または副作用によって最終的に死亡する。

【0021】

証明されていないが、一般に、初期の検出および治療により罹患率、死亡率、およびがん治療の費用が減少することが認められている。初期検出により、多くの場合、転移前に治療を開始することができる。さらに、より多数の治療の選択肢が存在するので、治癒または長期生存する著しい改善の確率が高い。

10

【0022】

「危険な状態の」集団のスクリーニングに使用することができる試験の開発は、長い間医師の目的であった。乳がん用のマンモグラフィ、前立腺がん用のPSA試験、および子宮頸がん用のPAP塗抹標本などの幾らか成功しているが、ほとんどの場合、患者に自覚症状があり、ほぼ必ず致命的である比較的末期でがんが検出される。ほとんどのがんでは、試験および試験の組み合わせでは初期段階の疾患を罹患した患者が、費用効果が高い同定が可能なほど必ずしも感度および特異性が高くない。

【0023】

首尾よく且つ患者、意思、および第三者の支払人に受け入れられるがんスクリーニングプログラムのために、試験は有利であり（予後を変化させる）、広範に利用可能であり、基本的医療の枠組みの範囲内で容易に行うことができなければならない。試験は比較的非侵襲性であり、適切に遵守され、感度が高く、特異性および予測値が妥当であるべきである。さらに、試験は、比較的低コストで利用可能でなければならない。

20

【0024】

がんの疑いのある患者のために、診断を確認し、医師が適切な治療介入を行うために腫瘍の病期を細胞学的および臨床的に適切に設定しなければならない。しかし、がんの診断および病期設定で現在使用されているいくつかの試験（十分な感受性または特異性を欠く）は、侵襲性または費用が高すぎて集団ベースのスクリーニング試験としてのその使用が許容できない。以下に示す表2および3は、例えば、肺がん診断の感度および特異性の評価ならびに肺がんの検出に使用される診断試験の予想費用である。

30

【0025】

【表2】

肺癌診断の感受性および特異性の評価 [1]

診断試験	感度 (%)	特異性 (%)
従来の喀痰細胞診	51.0	100.0
胸部X線	16~85*	90~95
白色光気管支鏡検査法	48.0~80.0	91.1~96.8
LIFE気管支鏡検査法	72.0	86.7
コンピュータ連動断層撮影	63.0~99.9	80.0~61
PETスキャン	88.0~92.5	83.0~93.0

* 診断時の病期依存する。

40

【0026】

【表3】

肺癌で使用する診断試験の予想費用

診断試験	費用 (\$)
喀痰細胞診	90
胸部X線	44
気管支鏡検査法	725
コンピュータ連動断層撮影	378
PETスキャン	800~3000
直視下生検	12,847~14,121

10

【0027】

その妥当な感度、特異性の高さ、および低コストのために、がん病変の検出および位置付けに胸部X線（X線）をしばしば使用する。しかし、大きな腫瘍は比較的容易に胸部フィルム上に視覚化されるが小さな病変の検出は困難であり、検出時にはほとんどが既に転移している。したがって、胸部X線は初期検出法としての用途に必要な感度を欠く。

【0028】

コンピュータ連動断層撮影法（CT）は、肺小結節の確認および特徴付けに有用であり、標準的な胸部X線でしばしば見のがされるわずかな異常を検出可能である〔2〕。CT、特にスパイラルCT法には、事前に喀痰細胞診の結果が悪いが声帯麻痺の患者に残された試験である。従来の胸部フィルムよりも感度が改良されたCTは、中枢気道の画像処理の重要なツールとなりつつある〔3〕広範な領域を試験することが可能であると同時にCTを心肺運動由来の人工産物に供し、ヨウ化造影剤の使用によって分解能を改良することができる。

20

【0029】

スパイラルCTは、従来のCTまたはX線のいずれかよりも確実に初期がん病変を検出する可能性を有するより迅速且つ感度の高いCT形態である。スパイラルCTは、初期疾患診断において非常に改良された感度を有するようである。しかし、この試験は偽陽性率が20%と比較的感度が低い〔4〕。スパイラルCTはまた、肺がんの1/3を占める主な病変の検出感度が低い。さらに、初期試験費用が比較的安い（\$30）が、追跡調査の費用は高い。分子診断パネルアッセイを使用した細胞学は、スパイラルCTで疑われる肺小結節由来の細針吸引（FNA）または細針生検（FNB）での評価による偽陽性の結果を最小にすることによってスパイラルCT試験の特異性を改良するためにスパイラルCTを使用した補助試験として非常に有望である。

30

【0030】

蛍光気管支鏡検査法は、従来の白色光気管支鏡検査法よりも感度が高く、中枢気道内の小さな病変の検出が有意に改善される〔5〕。しかし、蛍光気管支鏡検査法は周辺病変を検出することができず、気管支鏡検査者が患者の気道を検査するのに時間がかかり、且つ高価な手順である。さらに、この手順は、中程度に侵襲性であり、集団ベースのスクリーニング試験としての使用には乗り越えられない障害である。

40

【0031】

陽電子断層撮影法（PET）は、肺内のがん細胞存在の同定に放射性グルコースを使用する感度の高い試験である〔6~8〕。試験施設の設置費用は高く、現場または付近にサイクロトロンが必要である。このことが試験費用の高さと共に初期疾患検出よりもむしろ肺がん患者の病期設定へのPETスキャンの使用を制限している。

【0032】

肺がんのスクリーニング手段として長い間使用されていたにもかかわらず、喀痰細胞診は、その感度の低さおよび疾患特異的死亡率を減少できないことから限られた成功しか収められていない。従来の喀痰細胞診では、病理学者は、悪性細胞の同定およびがんの診断に細胞形態の特徴的な変化を使用する。今日、肺がんの「危険性」があるか疑いのある患者

50

の15%しか喀痰細胞診を受診しておらず、5%未満が多面的評価を受けている[9]。腫瘍のサイズ、位置、分化の程度、細胞凝集、クリアランス機構の細胞および喀痰の外部環境への放出の無効性、および喀痰中の細胞の安定性の不十分さを含む多数の要因が試験を総合的に不十分にしている。

【0033】

がん診断は、伝統的に1分子マーカーの検出に依存している。不運にも、がんは典型的には1つのマーカーで疾患の多数の形態を検出または識別できない病態である。したがって、1つのマーカーのみを認識するプローブは、ほとんど無効であることが示されている。「特効薬」診断試験の包括的検索が進行中であるが、現在、普遍的に首尾の良い特効薬プローブは見出されていない。

10

【0034】

本発明の主な前提は、細胞系のがん診断およびスクリーニング、他の病態の診断および治療モニタリングを、複数を同時に標識したプローブのキットよりもむしろ1つのマーカー／プローブ分析を使用する最先端のものよりも有意に改良することである。この多重化分析アプローチは、がんが単一の疾患ではないのがん診断に特に十分に適する。さらに、この多因子「パネル」アプローチは、がんの細胞学および臨床的な不均一な性質に一致する。

【0035】

細胞ベースの診断試験に対するパネルアプローチの首尾の良い実施の手がかりは、種々の病態の特徴付けおよび判別を異なるマーカーのパターンを化学的に認識することができるプローブの至適化されたパネルのデザインおよび開発である。本特許出願は、このような新規且つ至適化されたパネルの有効且つ固有のデザインおよび開発方法を記載する。

20

【0036】

標本集団（例えば、喀痰細胞診用の診療現場検査用混合物）および調製物（例えば、新規の細胞学保存物および輸液ならびに液体ベースの細胞学調製物用機器）は、開発中であり、市販されるであろう。既存およびこれらの新規の方法と併せて、細胞ベースのパネルアッセイを使用したこの分子診断の首尾の良い実施により、（a）悪性腫瘍および他の病態の分子プロファイルが特徴付けられ、（b）初期のがんおよび他の病態を検出および識別するための改良法が得られ、および（c）臨床診断、予後、カスタマイズされた患者の治療、および治療モニタリングを改良する機会が与えられる。

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0037】

本発明は、細胞ベースの診断を使用して一般的病態を検出し、特定の病態を判別するためのパネルに関する。パネルは、一般的病態または特定の病態に関連するマーカーにそれぞれ特異的結合し、細胞診標本中の細胞へのパネルの成分プローブへの結合パターンが前記病態の存在または特定の性質の診断となる複数のプローブを含む。本発明はまた、細胞ベースの診断を使用した患者の病態の検出または病態の判別のためのパネルの形成方法に関する。本方法は、病態に関連するマーカーのライブラリーのメンバーにそれぞれ特異的に結合するプローブ結合の感受性および特異性を決定するステップと、結合パターンが前記病態の存在または特定の性質を診断する限定された複数のプローブを選択するステップとを含む。本方法はまた、疾患を検出するか病態を判別する方法に関する。本方法は、病態に特徴的な異常細胞を含むと疑われる細胞学的サンプルに請求項1に記載のパネルを接触させるステップと、前記病態の存在または特定の性質の診断となる前記プローブの結合パターンを検出するステップとを含む。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

1. 緒言

本発明は、感度および特異性の高い非侵襲性の病態を検出および判別する方法を提供する。本方法は、罹患細胞を含むと疑われる細胞学的サンプルを疾患マーカーにそれぞれ定量

50

的に結合する複数の薬剤を含むパネルに接触させるステップと、前記薬剤の結合パターンを検出するステップとを含む。このパターンには、パネルの成分プローブの結合の局在性および密度／濃度が含まれる。本発明はまた、疾患を検出し、病態も判別するためのパネルおよび初期肺がんを検出し、異なる肺がん型を判別するためのパネルを作製する方法を提供する。パネル試験は医療で使用されている。例えば、血清分析でパネルが使用されている。しかし、細胞学的分析は各細胞および組織内の特定のマーカーの画像化および位置付けを含んでいるので、本発明の前にパネルアプローチが細胞学的サンプルに有効であることは明らかではなかった。さらに、プローブの至適化された細胞ベースの診断パネルをデザインおよび開発するために統計分析を適用することができたとしても明らかではなかった。

10

【0039】

いくつかの例の細胞学ベースのスクリーニングプログラムのうちの1つは、子宮頸がんをスクリーニングするPAP塗抹標本である。50年以上にわたりこの方法は実施され、今日、PAP塗抹標本を受けた女性で子宮頸がんにより死亡した者はほとんどいないという事実非常に貢献している。しかし、PAP塗抹標本スクリーニングには欠点がある。例えば、PAPは手間がかかり、普遍的に受け入れられない。本発明のプローブパネルを使用した分子診断用細胞ベースのスクリーニング法は、これらの欠点がない。本方法は、完全に自動化できるので安価であり、この試験型への利用が増加する。

【0040】

本発明は、特異性および感度が共に高い病態の検出および病態の判別を行う方法を提供する。本発明は、がんおよび感染症などの任意の細胞ベースの病態に適用可能である。

20

【0041】

パネルは、病態の存在または特定の性質を診断する。本発明は、安い費用を維持したままでの細胞学的サンプル中の罹患細胞の迅速、正確、比較的非侵襲性、且つ容易な検出により公知の病態検出法の制限および欠点を克服する。

【0042】

本発明のパネル作製方法の特徴は、パネルを迅速に開発することができることである。

【0043】

病態を検出し、病態型を判別する方法での薬剤パネルの使用にはいくつかの利点が存在する。1つの利点は、病態の検出および特徴とするための薬剤パネルが十分であるので、試験の感度および特異性が増大することである。多数の病態が異なる性質を有する場合、1つの薬剤で大部分の症例を検出することはできない。

30

【0044】

パネル使用のさらなる利点は、パネルの使用により特定の発現パターン（プローブの位置および密度／濃度）に基づいて種々の病態型を判別可能であることである。種々の病態は、その進行速度、治療に対する反応、および死亡率が劇的に異なり得るので、特定の型の知識が医師の適切な治療アプローチの選択の助けとなり得る。

【0045】

2. パネル

本発明のパネルは、それぞれ疾患マーカーに定量的に結合し、パネルの成分薬剤の結合パターン（位置および密度／濃度）で病態の存在または特定の性質を診断する複数の薬剤を含む。したがって、パネルは検出パネルまたは判別パネルであり得る。検出パネルは細胞サンプル中に一般的病態が存在するかどうかを検出し、判別パネルは異なる疾患型を含む病態を罹患していることが知られている細胞サンプル中の異なる特定の病態を判別する。検出パネルと判別パネルの違いは、パネルに含まれる特定の薬剤にある。検出パネルは病態の存在を診断する結合パターンを有する薬剤を含み、判別パネルは病態の特定の性質（すなわち、各型）を決定可能な結合パターンを有する薬剤を含む。

40

【0046】

定義上は、パネルは1つを超えるメンバーを含む。何故一般的病態の検出または特定の病態の判別に1つのマーカーのみのパネルよりも複数のマーカーのパネルを使用することが

50

有利であるのかという理由は幾つか存在する。理由の1つは、健康な細胞中に存在しないが全ての疾患細胞中には存在する、正確な試験結果を得るために高い特異性および感度でその挙動を測定することができる1つのマーカーのプロープが存在する見込みがないことである。高い感度および特異性で特定の疾患を検出するこのような1つのプロープが存在する場合、既に臨床試験で使用されているだろう。さらに、これは、それぞれ臨床的に適切な試験を確実にする検出能力の範囲を得ることができる複数のプロープからなるパネル試験の方向性を持った選択である。

【0047】

それにもかかわらず1つまたは非常に少数のプロープを含むパネル試験の構築を選択する場合、任意の理由（例えば、生物学的変動性による標本細胞の反応性の減少；多数のプロープ試薬の固有の変動性；弱い、期限切れ、または不完全なプロセッシング試薬；プロープに不適切なプロセッシング時間または条件；）のために、標識を行うための任意の1つのマーカー／プロープ組み合わせの失敗により、標的疾患を検出または判別する試験は壊滅的に失敗する。各パネル試験に複数の過剰なプロープを含めることにより、任意の1つのプロープの失敗が試験の壊滅的失敗の原因とならない確率が非常に高くなる。

10

【0048】

プロープは、疾患マーカーに結合する任意の分子構造または基礎構造である。本明細書中で使用される、用語「薬剤」はまた、疾患マーカーに結合する分子構造または基礎構造をいうことができる。分子プロープは、特定の病態の指標となるマーカーの検出および位置付けのために生物学者および臨床医学者によって使用される自動誘導デバイスである。例えば、先に小細胞肺がんのマーカーとして同定されたタンパク質に特異的に結合する抗体を産生することができる。次いで、この抗体プロープを使用して、適切な免疫化学的プロトコールおよびインキュベーションの使用により罹患が疑われる患者の細胞および組織中の標的タンパク質マーカーを位置付けることができる。抗体プロープが化学量論（すなわち、定量）様式でその標的マーカーに結合し、色素形成または着色「タグ」で標識された場合、光学顕微鏡および画像サイトメトリーテクノロジーを使用してプロープおよび間接的にはその標的マーカーを位置付けおよび定量することができる。

20

【0049】

本発明は、当業者が利用可能な任意の数の方法を使用したDNA、RNA、またはタンパク質レベルでの分子マーカー発現の変化の検出を意図する。プロープの例は、パネル中の分子マーカーをコードする核酸配列に相補的なポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、もしくはそのフラグメントまたは核酸配列であり得る。プロープはまた、DNA鎖などの鎖であり得る。本発明で使用される多数の抗体は、マーカー物質としての種々の細胞表面抗原または細胞内抗原に特異的である。当業者に一般的に公知の技術を使用して、抗体を合成することができる。例えば、マーカーに対する抗体の最初の惹起の後、抗体を配列決定し、その後組換え技術によって調製することができる。あるいは、抗体を購入することができる。

30

【0050】

本発明の実施形態では、プロープは標識を含む。標識を含むプロープは、本明細書中でしばしば「標識プロープ」という。標識は、プロープがマーカーに結合した場合にシグナルが発生するか標識プロープをヒトによる観察または分析機器によって検出することができるようにプロープに結合することができる任意の物質であり得る。この標識を、「タグ」とも言うことができる。読み取り機器類により標識を視覚化することができる。用語「読み取り機器類」は、プロープの検出に使用される分析装置をいう。本発明によって想定される標識は、シグナルを発生してサンプル中の成分を同定することができる任意の標識である。好ましい標識には、放射性部分、蛍光発生部分、色素形成部分、または酵素部分が含まれる。したがって、可能な検出方法には、免疫細胞化学、免疫組織化学、in situ ハイブリッド形成、蛍光in situ ハイブリッド形成、フローサイトメトリー、および画像サイトメトリーが含まれるが、これらに限定されない。標識プロープによって発生したシグナルは、医療従事者による検出に十分な強度である。

40

50

【0051】

「マーカー」、「疾患マーカー」、または「分子マーカー」は、病態または病原体に相関する任意の分子構造または基礎構造である。用語「抗原」を、「マーカー」と交換可能に使用することができる。広義のマーカーは、特定の条件、事象、または物質の存在もしくは頻度および／または量を明らかにするか、検出するか、測定するために観察者または機器によって意図的に使用することができる生物学的指標である。例えば、ヌクレオチド塩基の特異的且つ固有の配列を、個体間および家族間の遺伝子の遺伝パターンを追跡するための遺伝子マーカーとして使用することができる。同様に、分子マーカーは細胞または組織内のその存在が特定の病態を示すタンパク質またはタンパク質フラグメントなどの特定の分子である。例えば、増殖がん細胞は同一の型の正常な細胞では見出されない新規の細胞表面タンパク質を発現することができるか、その発生量の増加または減少（例えば、それぞれ過剰発現または過少発現）を特定の病態のマーカーとして使用することができる特定の分泌タンパク質を過剰発現させることができる。

10

【0052】

細胞学パネルに適切なマーカーは、核、細胞質、または細胞膜の中または上に局在する物質である。マーカーは、細胞中のこれらの任意の位置に存在するオルガネラ中に局在することもできる。核内に局在するマーカーの例には、網膜芽腫遺伝子産物（Rb）、サイクリンA、ヌクレオシドニリン酸キナーゼ／nm23、テロメラゼ、Ki-67、サイクリンD1、増殖細胞核抗原（PCNA）、p120（増殖関連核抗原）、および甲状腺転写因子1（TTF-1）が含まれるが、これらに限定されない。細胞質中に局在するマーカーの例には、VEGF、サーファクタントアポタンパク質A（SP-A）、ヌクレオシドnm23、黒色腫抗原1（MAGE-1）、ムチン1、サーファクタントアポタンパク質B（SP-B）、ER関連タンパク質p29、および黒色腫抗原3（MAGE-3）が含まれるが、これらに限定されない。細胞膜中に局在するマーカーの例には、VEGF、トロンボモジュリン、CD44v6、E-カドヘリン、ムチン1、ヒト上皮関連抗原（HERA）、線維芽細胞成長因子（FGF）、肝細胞成長因子受容体（C-MET）、BCL-2、N-カドヘリン、表皮成長因子受容体（EGFR）、およびグルコース輸送物質3（GLUT-3）が含まれるが、これらに限定されない。細胞質オルガネラ中に存在するマーカーの例は、ミトコンドリア膜中に（一部）存在するBCL-2である。核のオルガネラ中に存在するマーカーの例は、核内に存在するp120（増殖関連核抗原）である。

20

30

【0053】

発現が変化し、疾患進行の初期に生じ、罹患細胞の大部分で示され、75%以上の所与の疾患型を検出可能であり、最も好ましくは90%以上の所与の疾患型を検出可能であり、そして／または異なる疾患型の性質を判別可能であるマーカーが好ましい。

【0054】

プローブがマーカーに結合するので、本発明のパネルをプローブのパネルまたはマーカーのパネルということができることに注目すべきである。したがって、パネルは、多数のマーカーを含み得るか、特定のマーカーに結合する多数のプローブを含み得る。一貫性をもたせるために、本発明のパネルをプローブのパネルというが、マーカーのパネルということもできる。

40

【0055】

マーカーは、細胞核中の悪性腫瘍関連変化（MAC）などの特徴または患者のがん家族歴に関連する特徴も含み得る。悪性腫瘍関連変化（すなわち、MAC）は、典型的にはがん細胞周辺に存在する正常と考えられる細胞に生じる微視的变化である。細胞核内のこれらの異常でわずかな変化は、生物学的には核基質およびクロマチン分布パターンの変化に起因し得る。これらの変化は訓練を受けた観察者でさえ各細胞の目視では確認できないが、高度に自動化されたコンピュータ制御の高速画像サイトメトリーを使用した細胞集団の統計分析によって決定することができる。MAC検出技術は当業者に周知であり、Gruner, O. C.、Brit J. Surg.、3、506～522、1916；Neib

50

urges, H. E. ら、Transaction、7th Annual Mtg. Inter. Soc. Cytol. Council、137～144、1959；Klawe, H. Acta. Cytol.、18、30～33、1974；Wied, G. L. ら、Analyt. Quant. Cytol.、2、257～263、1980；および Burger, G. ら、Analyt. Quant. Cytol.、3、261～271、1981にさらに詳述されている。

【0056】

本発明は、病態に相関する任意のマーカーを含む。各マーカー自体は、本発明の単なるツールに過ぎない。したがって、本発明は、特定のマーカーに制限されない。マーカーを分類する1つの方法は、他の分子に対するその機能的関係である。本明細書中で使用される「機能的に関連する」マーカーは、目的のマーカーと同一の生物学的過程または経路の成分であり、目的のマーカーと共に異常発現することが当業者に公知である。例えば、多数のマーカーは、線維芽細胞成長因子（FGF）、（血管内皮成長因子）VEGF、サイクリンA、およびサイクリンD1などの細胞増殖経路に関連する。他のマーカーは、Glut-1およびGlut-3などのグルコース輸送体である。

【0057】

当業者は、機能的に関連するマーカーを決定する知識を十分に備えており、種々のマーカーを検索するか、マーカーの機能的挙動を決定する実験を行うことができる。制限されない例により、マーカーを、血管新生に関連する分子、膜貫通糖タンパク質、細胞表面糖タンパク質、肺サーファクタントタンパク質、核DNA結合リントタンパク質、膜貫通Ca²⁺依存性細胞接着分子、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）の調節サブユニット、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、リボ核タンパク質酵素、増殖正常細胞および腫瘍性細胞で発現する核タンパク質、DNAポリメラーゼδの補因子、悪性新生物中で発現される場合でさえも正常な組織でサイレンとであり、自系の腫瘍指向性および特異的細胞傷害性T細胞（CTL）によって認識される遺伝子、グリコシル化分泌タンパク質、胃腸管または尿生殖管、肺サーファクタントの疎水性タンパク質、膜貫通糖タンパク質、増殖、分化、および血管新生に関連する分子、がん原遺伝子、ホメオドメイン転写因子、ミトコンドリア膜タンパク質、急速に増殖する細胞の核で見出される分子、グルコース輸送体、またはエストロゲン関連熱ショックタンパク質として分類することができる。

【0058】

生物マーカーおよびプローブの分類には、（a）DNA倍数体、MAC、および前悪性病変を含む形態学的生物マーカー、（b）DNA付加物、DNA変異体、およびアポトーシス指数を含む遺伝子生物マーカー、（c）細胞増殖、分化、調節分子およびアポトーシスマーカーを含む細胞周期生物マーカー、および（d）がん遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、腫瘍抗原、成長因子および受容体、酵素、タンパク質、プロスタグランジンレベル、ならびに接着分子を含む分子および生化学的的生物マーカーが含まれるが、これらに限定されない。

【0059】

「病態」は、任意の細胞ベースの疾患であり得る。いくつかの実施形態では、病態はがんである。他の実施形態では、病態は感染症である。がんは、気道、尿路、胃腸管、および生殖管由来の上皮細胞系のがん；肉腫、乳がん、膵臓がん、肝臓がん、腎臓がん、甲状腺がん、および前立腺がんなどの固形腫瘍および／または分泌腫瘍系のがんおよび；白血病およびリンパ腫などの血液系のがんが含まれるがこれらに限定されない任意のがんであり得る。本発明によって検出することができるがんの例は、肺がん、膀胱がん、胃腸のがん、子宮頸がん、乳がん、または前立腺がんである。検出することができる感染症の例は、感染生物がウイルス、細菌、原生動物、寄生虫、または真菌類である細胞ベースの疾患である。感染症は、例えば、HIV、肝炎、インフルエンザ、髄膜炎、単核細胞症、ヒト型結核菌、ならびにクラミジア、トリコモナス、淋病、ヘルペス、および梅毒などの性感染病（STD）であり得る。

【0060】

本明細書中で使用される、用語「一般的病態」は、肺がん、性感染病、および免疫ベース

の疾患などのいくつかの特定の疾患型を含む疾患をいう。特定の病態を、組織学的疾患型ともいう。例えば、用語「肺がん」は、扁平上皮がん、腺がん、大細胞がん、小細胞がん、および中皮腫などのいくつかの特定の疾患を含む。用語「性感染症」は、淋病、ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）、ヘルペス、および梅毒などのいくつかの特定の疾患を含む。用語「免疫ベースの疾患」は、全身性エリマトーデス（狼瘡）、慢性関節リウマチ、および悪性貧血などのいくつかの特定の疾患を含む。

【0061】

本明細書中で使用される、「ハイリスク集団」は、疾患原因因子（例えば、家庭内または職場の発がん物質）の個体の群（すなわち、肺がんの「ハイリスク集団」は、喫煙、受動喫煙、および職業曝露にさらされ得る）をいう。「ハイリスク集団」中の個体はまた、遺伝性疾患素質を有し得る。

10

【0062】

用語「危険な状態にある」は、無症候性であるが、家族歴または有意な曝露により病態発症リスクが有意な個体（すなわち、30パック年を超えて喫煙している肺がんの危険性のある個体；「パック年」は1日あたりの喫煙パック数にこの曝露の年数をかけて計算した基準単位）をいう。

【0063】

がんは、例えば、遺伝子発現の変化によって制御されずに細胞が分裂する疾患である。本発明の方法およびパネルでは、がんは任意の器官における任意の悪性増殖であり得る。例えば、がんは、肺がん、膀胱がん、胃腸がん、子宮頸がん、乳がん、または前立腺がんであり得る。各がんは、一連の疾患またはがんの組織学的型を含み得る。用語「組織学的型」は、異なる組織学のがんをいう。がんに依存して、1つまたは複数の組織学的型が存在し得る。例えば、肺がんには、扁平上皮がん、腺がん、大細胞がん、小細胞がん、および中皮腫が含まれるが、これらに限定されない。患者が罹患しているがんの組織学的型の知識は、医療従事者が疾患を位置付けおよび特徴付けて、最適な治療ストラテジーを決定するための一助となるので、非常に有用である。

20

【0064】

感染症には、感染性生物がウイルス、細菌、原生動物、寄生虫、または真菌類である細胞ベースの疾患が含まれる。

【0065】

検出および判別パネルの例は、肺がん（一般的病態）を検出するパネルならびに肺がんの全ての他の型および偽陽性に対して1つの肺がん型（特定の病態）を判別するパネルである。偽陽性には、転移性の肝臓がん、腎臓がん、または膵臓がんなどの異なる型の転移性がんを含み得る。

30

【0066】

3. パネルの作製方法

患者の一般的病態を検出するか特定の病態を判別するためのパネルの作製方法は、プローブが一般的病態または特定の病態に関連するマーカーのライブラリーに結合する感度および特異性を決定するステップと、その結合パターン（局在化および密度／濃度）で前記病態の存在または特定の性質を診断する複数のプローブを選択するステップとを含む。いくつかの実施形態では、任意選択的な予備的除去および調製ステップを行う。本発明のパネルの作製方法は、既知の組織学的病変サンプル中のマーカー（すなわち、ゴールドスタンダード、最も基準になる検査）へのプローブの結合パターンを分析するステップを含む。ゴールドスタンダードデータでデザインされた分類を使用して、サイトメトリー、特に自動化サイトメトリー分類をデザインすることができる。したがって、病理学分析から選択されたマーカープローブ組を使用して、痰、細針吸引、および尿などの細胞学的サンプルから得た新規の訓練データを作成する。特定した病変から分離した細胞を、ゴールドスタンダードに類似の様式で染色する。本明細書中に記載の方法は、ゴールドスタンダードの組織学的病変サンプルに基づく診断の完全性が高いので、最良の特徴の選択において実験誤差を排除している。原則的には、パネルの作製に細胞学的サンプルを使用することが可

40

50

能であるが、細胞学的サンプルは破片を含み、細胞学的サンプルの細胞を劣化させる可能性があり、病理学的診断で臨床的に確認することが困難になる可能性があるので、これはあまり望ましくない。

【0067】

マーカーのライブラリーは、マーカー群である。ライブラリーは、任意の数のマーカーを含むことができる。しかし、いくつかの実施形態では、ライブラリー中のマーカー数は、標本サイズなどの技術的および／または経済的実用性によって制限される。例えば、いくつかの実施形態では、各標本をパネル中の全マーカーに対して試験する。したがって、マーカー数は、標本を分割し得るサンプル数よりも多くてはならない。別の技術的実用性は時間である。典型的には、ライブラリーは60個未満のマーカーを含む。好ましくは、ライブラリーは50個未満のマーカーを含む。より好ましくは、ライブラリーは40個未満のマーカーを含む。最も好ましくは、ライブラリーは10～30個のマーカーを含む。潜在的なパネルマーカーのライブラリーはパネルの性能を最適にする機会が与えられるように10個を超えるマーカーを含むことが好ましい。本明細書中で使用される、「約」は、±3個のマーカーを意味する。

10

【0068】

いくつかの実施形態では、種々のマーカーについての情報源およびマーカーと一般的な／特定の病態との間の相関関係の調査によってライブラリーを得る。供給源の例には、実験結果、理論的または予測分析ならびに雑誌、書籍、カタログ、およびウェブサイトなどの文字情報源が含まれる。これらの種々の情報源は、組織学または細胞学を使用することができ、*in situ*ハイブリッド形成などの細胞遺伝学；免疫組織化学などのプロテオミクス；MACまたはDNA倍数体などのサイトメトリー；および／または形態学などの細胞病理学に依存し得る。マーカーを細胞中または細胞上のいずれかの位置に局在させることができる。例えば、マーカーを、核、細胞質、または細胞膜の中または上に局在させることができる。マーカーは、上記の任意の位置に局在するオルガネラ中に局在することもできる。

20

【0069】

いくつかの実施形態では、ライブラリーは不適切なサイズであり得る。したがって、パネルの基本的作製方法の開始前に1つまたは複数の削除ステップが必要であり得る。削除ステップは、1つまたは複数の連続的削除ステップを含み得る。1つの削除ステップは、例えば、感度および／または特異性についての任意の閾値を設定するステップを含み得る。したがって、実験によるか予測された感度および／または特異性が閾値未満である任意のマーカーを、ライブラリーから除去することができる。単独または他の削除ステップと連続して実施することができる削除ステップの他の例は、検出テクノロジーの要件、アクセスの制約、および報告された結果の非再現性に依存し得る。検出テクノロジーの要件に関して、特定のマーカーの検出に必要な機械類を利用しないことが可能である。アクセスの制約について、承認の制限により特定のマーカーに結合するプローブを得ることが困難であるか不可能である。いくつかの実施形態では、各マーカーが非常に熱心に研究されている。

30

【0070】

いくつかの実施形態では、パネルの基本的作製方法の開始前に、調製ステップを行う必要がある。調製ステップの例には、ライブラリー中のマーカーの目的の定量的検出プロトコルを至適化するステップおよび組織学的標本を回収するステップが含まれる。マーカーの目的の定量的検出プロトコルの至適化は、当業者の範囲内である。例えば、緩衝液、試薬、ソフトウェア、および装置などの必要な試薬および消耗品を得なければならない。試薬濃度を調節することが可能である。例えば、非特異的結合が認められた場合、当業者はプローブ溶液の濃度を希釈することができる。

40

【0071】

いくつかの実施形態では、組織学的標本はゴールドスタンダードである。用語「ゴールドスタンダード」は、標本の組織学および臨床診断が公知であることを意味することを当業

50

者は知っている。ゴールドスタンダードは、しばしば「訓練」データ集合をいう。ゴールドスタンダードは、判別プロセスに寄与することができる全ての特徴の基準の集合または信頼できる評価を含む。このような特徴を、既知の病態を罹患した代表的患者数から採取したサンプルから採取する。標準サンプルは細胞学的サンプルであり得るが、これはパネル選択にはあまり望ましくない。

【0072】

当業者に公知の任意の技術（例えば、生検）によって組織学サンプルを得ることができる。いくつかの実施形態では、患者あたりの標本サイズは、ライブラリー中の各マーカーの試験に十分な組織切片を得ることができるほどの大きさである必要がある。

【0073】

いくつかの実施形態では、それぞれの特定の病態と診断された複数の患者から標本を得る。患者あたり1つの標本を得ることができるか、患者あたり複数の標本を得ることができる。各患者から複数の標本を得る実施形態では、手術の専門家は、1人の患者から得た各標本がこの患者から得た他の標本に類似することに依存する。コントロール患者群からも標本を得る。コントロール患者群は、健康な患者または試験される一般的または特定の病態を罹患していない患者であり得る。

【0074】

基本的方法の第1のステップは、所望の病態に関連するマーカーのライブラリーへのプローブ結合の感度および特異性を判別することである。このステップでは、ライブラリー中の各マーカーに特異的なプローブを、患者の標本サンプルに適用する。したがって、いくつかの実施形態では、例えば、ライブラリー中に30個のマーカーが存在する場合、各患者の標本を30個のサンプルに分け、各サンプルを30個のマーカーの1つに特異的なプローブで処理する。プローブは、視覚化することができる標識を含む。したがって、マーカーへのプローブの結合パターンおよびレベルを検出することができる。結合パターンおよびレベルを、定量的（すなわち、分析機器による）または定性的（病理学者などの人による）に検出することができる。

【0075】

いくつかの実施形態では、マーカーへのプローブの結合パターンおよびレベルを検出するための客観的および／または定量的スコアリング方法を開発する。スコアリング方法を、試行錯誤によってデザインすることができる。スコアリング方法を使用して、例えば病理学者による主観的解釈を客観化する。適切なスコアリング方法の決定は、当業者の範囲内である。いくつかの実施形態では、スコアリング方法は、なし、弱い、中程度、または強いとしてマーカープローブの染色密度などの特徴を分類するステップを含み得る。別の実施形態では、これらの特徴を、顕微鏡スライド画像を操作するアルゴリズムを使用して測定することができる。スコアリング方法の例は、比率および密度を、強度を、なし＝0、弱い＝1、中程度＝2、強い＝3にランク分けし、細胞の比率を0～5％＝0、6～25％＝1、26～50％＝2、51～75％＝3、>75％＝4にランク分けし、2つのグレードを掛け合わせる、1つの「Hスコア」に統一するものである。例えば、50％の弱い染色＋50％の中程度の染色のスコアは、 $6 = (1 \times 2) + (2 \times 2)$ である。「Hスコア」に関しては、故Kenneth Hirsch氏（発明者らの1人）に敬意を払う。

【0076】

当業者は、病理学者およびサンプルに関連する潜在的先入観の最小化に関する問題に取り組むことができる。例えば、無作為化を使用して、系統的誤差を含む機会を最小にすることができる。盲検を使用して、試験者による実験の先入観を排除することができる。例えば、いくつかの実施形態では、病理学者によるばらつきを、二重盲検法によって最小にすることができる。本明細書中で使用される、「二重盲検法」は、データ収集とデータ分析が独立して行われる先入観を回避するための十分に確立された方法である。他の実施形態では、サンプルによるばらつきをサンプルの無作為化によって最小にする。例えば、病理学者がサンプルを分析する前にサンプルを無作為化する。実験プロトコルに関して無作

10

20

30

40

50

為化することもある。いくつかの実施形態では、各サンプルを、少なくとも2人の病理学者によって分析する。各患者について、マーカーへのプローブ結合の信頼できる評価が得られる。1つの実施形態では、信頼性をチェックするために患者あたり2人の適任の病理学者によってこの診断法を行う。

【0077】

信頼できるデザインおよび信頼できる統計評価を得るために十分なサンプル数を採取すべきである。どのようにして信頼できるデザインおよび信頼できる統計評価を得るために十分なサンプル数を得るかを決定することは当業者の範囲内である。ほとんどの標準的な分類デザインパッケージは、信頼できる評価が得られるまで性能評価の信頼性およびサンプルサイズを段階的に増大させることを決定する方法を有する。例えば、信頼できるデザインを得るために十分な評価を、200サンプルの採取および各サンプルから評価される27の異なる特徴を使用して行うことができる。

10

【0078】

第2のステップは、制限された複数のプローブを選択することである。選択ステップは、統計分析および／またはパターン認識技術を使用することができる。選択ステップを行うために、データをデータベースに統合することができる。いくつかの実施形態では、その有効性分析の間に認められない作用方法を提供し、先入観をさらに最小にするためにプローブ数を定める。この方法によって大量のデータが得られるので、厳密な統計技術を使用する。任意の統計法を使用することができ、当業者は多数の方法のうちどれが適切であるかを同定することができる。

20

【0079】

任意の数の統計分析および／またはパターン認識法を使用することができる。データ構造が最初に未知であり、異なる分類デザイン法が異なる構造にはより良く行われるので、データには少なくとも2つのデザイン法を使用することが好ましい。いくつかの実施形態では、3つの異なる方法を使用することができる。統計分析および／またはデータ集合のパターン認識の当業者は、一定の統計法が他の方法よりも有効な結果を得られる可能性が高いデータ集合構造の特徴から認識し、この場合の有効とは、所望の数のプローブを使用して一定レベルの感度および特異性を達成することを意味する。当業者は、統計分析および／または方法の有効性はデータに依存することを知っている。

【0080】

統計分析および／またはパターン認識法の例を以下に記載する。

30

【0081】

a) C4.5として公知の意思決定樹法。C4.5は<http://www.cse.unsw.edu.au/~quinlan/>からftpを介して利用可能な公的ドメインソフトウェアである。これは、特定の特徴への決定閾値の連続的適用によって最も良好に分類することができるデータに十分に適応している。これは、非相関データで最も効果的であり、分散が異なる類似の手段を含むデータにも対応する。C4.5パッケージを使用して、本明細書中に示す例を得た。

【0082】

b) 線形判別分析。これは、クラスを最良に分離する特徴の加重組み合わせを見出すステップを含む。これらの方法は、相関データで効果的であるが、類似の手段および分散が異なるデータでは効果的ではない。必要な性能評価およびグラフ出力に依存するいくつかの統計パッケージ(SPPS、SAS、およびR)を使用した。Fisherの線形判別関数を使用して、誤差率が最小の分類を得た。正準判別関数を使用して、識別閾値が変化した感度と選択性との間の妥協点を示す受信者動作特性(ROC)曲線を計算した。

40

【0083】

c) ロジスティック回帰。これは、線形回帰モデルの非線形変換である。従属変数をログオッズ比(ロジット)に置換する。判別分析と同様に、線形回帰は、線形モデルで見出された統計法のクラスに属する。このようなモデルは、説明変数間の線形関係に基づく。

【0084】

50

十分なサンプル数を使用し、上記の技術およびソフトウェアパッケージを使用して、クラスを良好に判別する特徴の組み合わせを検索することができる。統計分析および／またはパターン認識法の他の例は、SPSSにおける線形判別関数法ならびにRおよびSASにおけるロジスティック回帰法である。SPSSは、正式な製品名であり、所在地がSPSS, Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor, Chicago, Illinois 60606 (www.spss.com) のSPSS, Inc. から利用可能である。SASは正式な商品名であり、SAS Institute, Inc.、100 SAS Campus Drive, Cary, NC 27513-2414 (www.sas.com) から利用可能である。Rは正式な商品名であり、Free Software Foundation's (一般公共ライセンス) (<http://www.r-project.org/>) の条項にしたがってフリーソフトウェアとして利用可能である。 10

【0085】

いくつかの実施形態では、相関行列が得られる。相関は、変数対の間の線形関連量を測定する。あるマーカーを使用して得たデータと別のマーカーを使用して得たデータとを相関させることによって相関行列が得られる。閾値総関数を、例えば、50%相関に設定することができる。この場合、総関数が50%またはそれ以上の全マーカーを、相関マーカーとみなす。

【0086】

本発明のいくつかの実施形態では、使用者が提供した重み係数を使用して、至適化されたパネルを得ることができる。加重を、任意の係数と比較することができる。例えば、一定のマーカーを、費用、経済的な考慮、誤分類もしくは誤差率、地理的位置における一般的病態の罹患率、地理的位置における特定の病態の罹患率、プローブの冗長性および利用可能性により他のマーカーよりも加重することができる。使用者が一定のマーカーを他のマーカーよりも加重することを助長し得る費用に関連するいくつかの因子は、プローブの費用および経済的な権利の問題（ライセンス条項など）である。使用者が一定のマーカーを他のマーカーよりも加重することを助長し得る経済的検討材料に関連するいくつかの因子は、研究開発（R&D）期間、R&D費、R&Dリスク（すなわち、プローブが作用する確率）、最終的な分析機器の費用、最終的な性能、および製品化に要する時間である。検出パネルでは、例えば、使用者がいくつかのマーカーを他のマーカーよりも加重すること 20
を助長し得る誤分類または誤差率に関連するいくつかの因子は、偽陰性を最小にすることが望ましいことである。それに対して、判別パネルでは、偽陰性を最小にすることが望ましい。使用者がいくつかのプローブを他のプローブよりも加重することを助長し得る地理上の区域における一般的または特定の病態の罹患率に関連するいくつかの因子は、いくつかの地理的位置における一定の一般的または特定の病態の発生率がいくらか関連していることである。冗長性に関して、いくつかの例では、パネル中に冗長性を有することが望ましい。例えば、いくつかの理由のためにあるプローブが検出できない場合でも、パネル中のマーカーの生物学的変動性のために、病態は他のマーカーによって検出される。いくつかの実施形態では、好ましい冗長なマーカーであるマーカーにより加重することができる 30
。

【0087】

本発明は、費用または供給問題により最高の組み合わせが得られない場合、特徴の利用か応性に適用できる柔軟性がある。1つの実施形態では、本発明は、別の組み合わせを見出すための利用可能な特徴に簡単に適用することができる。別の実施形態では、アルゴリズムを使用して、最小の費用に到達するための選択プロセスに含むべき費用の加重が可能な特徴を選択する。例では、回収した全マーカーから選択した組み合わせまたは経済的に好ましいプローブの群のみについてのマーカー性能の評価を示す。例はまた、どのようにしてC4.5パッケージを使用して費用の高さに基づいた一定のプローブの加重を減少させることができるのかを示す。これらのプローブの組み合わせは、至適な組み合わせと同様に実行することができないが、性能は、費用が有意な因子である環境では利用可能である 40
 50

。

【0088】

使用したいいくつかの方法により、加重をクラスに適用可能である。これは、意思決定樹デザインにより費用を至適化することができるC4.5で利用可能である。また、判別関数法により、所望の偽陽性確率または偽陰性確率を得るために使用することができる1パラメータ出力が得られる。異なる閾値設定のためのこれらのパラメータのプロットは、受信者動作特性（ROC）曲線として公知である。ROC曲線は、分類の異なる閾値レベルについての真の陽性スコアに対する偽陽性の比率を評価する。

【0089】

多数の一般的病態が不均一な性質を有する場合、集団ベースのスクリーニングとしてのその使用を正当化するために試験が十分な感度、特異性、陽性予測値（陽性予測値＝真の陽性／（真の陽性＋偽陽性））、および陰性予測値（陰性予測値＝真の陰性／（偽陰性＋真の陰性））を有することを確実にするための冗長度を有するパネルを構築することができる。しかし、局所および地域の相違により、世界市場の異なるセグメントでの試験の特定の使用を決定することができ、それにより所与の市場用の最終的なパネル試験の構築に使用した基準に有意に影響を与える。臨床的有用性の至適化が最も重要であるが、手ごろな価格（費用）、技術的能力、研究所およびヘルスケア関連企業の資金、仕事の流れの問題、労働力需要、ならびにプローブおよび標識の利用可能性がパネルで使用するマーカーの最終的な部分的選択に寄与する。周知の線形判別関数分析を使用して潜在的な全選択要因を含めて評価するが、各部分的要因は方程式の項によって示され、それぞれその部分的に決定された有意性によって加重される。この方法では、世界のある地域での使用のために至適化されたパネル試験は、異なる地域での使用のために至適化されたパネル試験とは異なり得る。

【0090】

一旦上記の方法を使用して検出または判別パネルがデザインされると、次のステップは、既知の細胞学的サンプルを使用してパネルを検証することである。検証の前に、光学的至適化ステップを行うことができる。いくつかの実施形態では、細胞学的サンプルの採取方法を改良することができる。これは、患者からサンプルを得る方法および細胞学的サンプルを混合する方法を含む。他の実施形態では、細胞学的表示方法を改良することができる。例えば、光学的固定液（保存液）または輸送液の同定。

【0091】

ゴールドスタンダードの組織学的サンプルを使用して作製したパネルの細胞学的サンプルの検証に使用した細胞学的サンプルは、既知の診断を使用した細胞学的サンプルである。これらのサンプルを、当業者に公知の任意の方法を使用して採取することができる。例えば、喀痰サンプルを、自発的喀痰、誘導喀痰、および喀痰を高めるための薬剤の使用によって採取することができる。サンプルをパネル中の各サンプルに接触させ、プローブの結合レベルおよびパターンを分析してパネルの性能を決定する。いくつかの実施形態では、パネルをさらに至適化する必要がある。例えば、パネルからプローブを除去する必要がある。または、パネルにさらなるプローブを付加する必要がある。さらに、パネル上のあるプローブを別のプローブに置換する必要がある。新規のプローブを付加する場合、このプローブは、相関行列から決定したものと同様の相関マーカーであり得る。あるいは、プローブは、機能的に類似のマーカーであり得る。一旦パネルが至適化されると、パネルを臨床試験におけるさらなる試験に進めることができる。

【0092】

他の実施形態では、パネルを至適化する必要はない。細胞学的サンプルでの結果が組織学的サンプル由来の結果と相関する場合、パネルを至適化する必要はなく、パネルを臨床試験におけるさらなる試験に進めることができる。

【0093】

4. 使用方法

上記方法を使用して一旦パネルが得られた場合、パネルを細胞学的サンプルに適用するこ

とができる。方法を例示するために、がん、特に肺がんを例示する。類似のステップおよび手順を他の病態に適用する。特定の病変から分離した細胞を類似の様式で染色し、パネルを得るために使用した組織学的病変サンプルと類似の様式で細胞学的サンプル（細針吸引、痰、尿など）中で染色される。

【0094】

本発明の基本的方法は、典型的には、2つのステップを含む。第1に、罹患細胞を含む懸濁細胞学的サンプルを、疾患マーカーをそれぞれ定量的に結合する複数の薬剤を含むパネルに接触させる。次いで、疾患マーカーへの各薬剤の結合レベルまたはパターンを検出する。検出結果を使用して、一般的疾患の存在を診断するか、特定の病態を判別することができる。任意選択的な予備ステップは、細胞学的サンプルにおける疾患の検出または病態の判別を補助する薬剤の至適化パネルを同定するステップである。

10

【0095】

細胞学的標本には、血液、尿、脊髄液、およびリンパ系などの体液；気道（例えば、肺喀痰）、尿路（例えば、膀胱洗浄物）、生殖管（例えば、子宮頸部PAP塗抹標本）、および胃腸管（例えば、結腸洗浄物）などの上皮細胞ベースの器官系；および乳房、脾臓、肝臓、腎臓、甲状腺、骨髄、筋肉、前立腺、および肺などの器官および系中の固形組織部位由来の細針吸引物；乳房、脾臓、肝臓、腎臓、甲状腺、骨髄、筋肉、前立腺、および肺などの器官および系中の固形組織部位由来の生検；ならびに外科生検由来の組織などの組織学的標本から採取した細胞サンプルを含み得るが、これらに限定されない。

【0096】

本発明の薬剤パネルの例には、細胞学的サンプル中の悪性細胞の正確な検出が可能な任意の数の薬剤が含まれる。本発明によって確証された分子マーカーは、悪性細胞の検出を補助する任意の分子であり得る。マーカーの発現レベルまたはパターンの変化に関するいくつかの異なる基準に基づいて、パネルに含めるマーカーを選択することができる。発現の変化により、初期の腫瘍が進行し、腫瘍細胞の大部分によって示され、75%を超える所与の腫瘍型検出可能であり、最も好ましくは90%を超える所与の腫瘍型を検出可能であり、そして／またはがんの組織学的型を判別可能である分子マーカーが好ましい。

20

【0097】

基本的方法の第1のステップは、細胞学的サンプル中の薬剤パネルの発現レベルまたはパターンの変化の検出である。このステップは、典型的には、細胞学的サンプルを標識したポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体もしくはそのフラグメントまたは核酸プローブなどの薬剤に接触させるステップと、各細胞中のシグナルを観察するステップとを含む。シグナルが変化した細胞の検出は、標識プローブが指示された分子マーカーの発現レベルの変化の指標である。この変化は、試験される組織または部位から得た非悪性細胞と比較した発現レベルの増減に基づく。

30

【0098】

当業者は、細胞学的サンプル中に悪性細胞が存在するかどうかを薬剤パネルの発現レベルまたはパターンの変化の分析によって高感度および高い特異性で決定することができる。用語「感度」は、患者が臨床試験で正確に同定される条件付確率（真の陽性の結果数／（真の陽性の結果数＋偽陰性の結果数））をいう。したがって、がん検出方法の感度が高い場合、検出されるがんの比率は高い（例えば、80%、好ましくは90%超）。用語「特異性」は、臨床試験によって罹患していない人が正確に同定される条件付確率（すなわち、真の陰性結果数／真の陰性結果数＋偽陽性結果数）をいう。したがって、がん検査方法の特異性が高い（80%、好ましくは90%、より好ましくは95%）場合、この方法で得られる偽陽性の比率は低い。「細胞学的サンプル」は、患者の細胞を含む患者から採取した任意のサンプルを含む。本発明によって想定された細胞学的サンプルの例には、体液、上皮細胞ベースの器官系洗浄物、擦過標本、ブラッシング生検、塗抹標本または滲出液、ならびに細針吸引または細針生検が含まれる。

40

【0099】

本発明に記載したマーカーの使用は、適切な細胞学的サンプルを日常的に得ることができ

50

、その後の評価のためにサンプルを適切に保存することができると考えられる。細胞学的サンプルを処理し、適切な防腐剤に保存することができる。好ましくは、細胞学的サンプルを、防腐剤を含むバイアル中に採取する。防腐剤は、細胞形態学を維持するか細胞タンパク質および核酸の分解を遮断することが公知の任意の分子または分子の組み合わせである。適切な固定を確実にするために、サンプルを採取部位で迅速に混合してサンプルを分離し、そして／または粘液などの覆い隠す物質を破壊して、細胞を防腐剤に曝露することができる。

【0100】

一旦標本が得られると、適切な混合デバイスを使用して標本を均一にすることが望ましい。これにより、1つを超える試験部位にアリコートを送る可能性を含む複数の目的のためにアリコートを使用し、複数のスライドおよび／またはスライド上の複数の沈殿物を調製することが可能である。したがって、使用前に標本および各アリコートの最初の均一化により、各個体のスライドの細胞分布が実質的に同一であることが確実となり、あるスライドと別のスライドの結果の比較が有意になる。

10

【0101】

分析用の標本の調製は、方法（細胞単層の塗抹、遠心分離、または沈殿が含まれるが、これらに限定されない）を使用してサンプルを顕微鏡スライドに塗布するステップを含む。このような方法は、手動、半自動、または完全な自動化で行うことができる。細胞懸濁液を、吸引によってフィルター上に細胞を沈着させ、細胞の単層をさらなる評価のために処理することができる調製済みスライドに移すことができる。このプロセスの繰り返しにより、必要に応じてスライドを調製することができる。本発明は、スライドあたり1つの分子マーカの検出を含む。スライドあたりいくつかの分子マーカの検出も想定される。好ましくは、スライドあたり1～6個のマーカが検出される。いくつかの実施形態では、スライドあたり2個のマーカが検出される。他の実施形態では、スライドあたり3個のマーカが検出される。

20

【0102】

本発明は、当業者が利用可能な任意の多数の方法を使用したDNA、RNA、またはタンパク質レベルでの分子マーカ発現の変化の検出を意図する。細胞学的サンプル中の分子マーカの発現レベルまたはパターンの変化の検出は、一般に、細胞学的サンプルをパネル集団「プローブ」および標識中の分子マーカをコードする核酸配列に相補的なポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、もしくはそのフラグメントまたは核酸配列に接触させるステップを含む。典型的には、プローブおよび標識成分は、プローブが分子マーカと反応した場合にシグナルを発生するように作動可能に連結されている（「標識プローブ」）。本発明によって想定される標識は、シグナルを発生するか発生可能であり、サンプル中の成分を同定可能な任意の標識である。好ましい標識には、放射性部分、蛍光発生部分、色素形成部分、または酵素部分が含まれる。したがって、可能な検出方法には、免疫細胞化学；プロテオミクス（免疫化学など）；細胞遺伝学（in situハイブリッド形成および蛍光in situハイブリッド形成など）；放射能検出、サイトメトリー、および電界効果（MACおよびDNA倍数体など）（自動化コンピュータ制御サイトメトリーを使用した化学量論的に染色された核DNAの定量）；および細胞病理学（形態学ベースの定量的細胞病理学など）が含まれるが、これらに限定されない。標識プローブによって発生したシグナルは、医療従事者および技術者による検出に十分な強度であることが好ましい。

30

40

【0103】

一旦スライドが調製されると、医療従事者は、がん診断に特徴的なマーカ発現の変化を示す細胞を同定するためにスライドを顕微鏡で観察する。医療従事者は、目的の細胞の同定に画像分析システムおよび自動化顕微鏡を使用することができる。データ分析に決定的な診断および至適な治療アプローチの選択を行えるように医師を支援する情報管理システムおよびアルゴリズムを使用することができる。医療従事者はまた、標識薬剤の存在を検出することができる機器プラットフォームを使用してサンプルを試験することができる。

50

【0104】

分子診断パネルアッセイにより、標識細胞および／または組織切片を含む1つまたは複数の顕微鏡ガラススライドが得られる。専門家による客観的且つ臨床的に有意義な結果が得られるこれらの（細胞）病理学的な多標識細胞調製物を評価する試みは、検出および理解においていかなる人も現実的に克服できない問題である。

【0105】

コンピュータ支援の画像処理システム（すなわち、光子顕微鏡（商標））を開発し、これを使用してプローブ標識細胞および組織の量および位置を定量的且つ再現可能に評価することができる。このような光子顕微鏡（商標）は、ロボットによるスライド操作機能、データ管理システム（例えば、医療情報）、ならびに類似の感度および制度で人の目視によって得ることができない細胞ベースのプローブ含有率および局在化データの検出および報告用の定量的デジタル（光学および電子）画像分析ハードウェアおよびソフトウェアモジュールが組み合わされている。これらのプローブデータを使用して、種々の病態についての各細胞ベースのマーカー中の関連する特徴および差異に基づいて細胞サンプルを特徴付けおよび識別することができる。

10

【0106】

本発明の方法は、分子診断パネルを細胞ベースの標本およびサンプルに適用し、その後コンピュータ支援画像処理システムを使用して分子診断パネル試験の結果を定量および報告する方法である。このような画像処理システムを使用して、所与のスライドベースのサンプルに対して複数のプローブを使用し、プローブが顕微鏡細胞学または組織学スライドで色によって識別されるのでプローブを個別に分析、定量、および報告することができる細胞ベースのサンプルを評価することができる。

20

【0107】

シグナルが適切な型であり、且つ十分な強度である場合、サンプル中の標識薬剤によって発生したシグナルを、標準的な顕微鏡またはコンピュータ支援の顕微鏡を使用して人（例えば、病理学者）が検出することができる〔167〕。コンピュータ支援の顕微鏡は、顕微鏡操作（例えば、ステージの移動、焦点合わせ）とマウス駆動コントロールとキーファンクション（例えば、スライドスキッピングパターン）のコンピュータ制御自動化とを統合した人間工学に基づくコンピュータ・インターフェース顕微鏡ワークステーションである。集中データ管理システムは、関連患者の情報ならびに全標本のスクリーニングの結果および病理学者の所見を保存、体系化、および表示する。バーコード上に刻まれ、サンプルスライドに添付された識別番号は、データベース中の各サンプルを固有に識別し、元の標本および患者を関連付ける。

30

【0108】

好ましい実施形態では、サンプル中の標識薬剤によって発生したシグナルを、集中データ管理システムにインターフェースで連結された自動化画像分析システム（すなわち、光子顕微鏡）を使用して検出および定量する。光子顕微鏡は、顕微鏡操作のソフトウェアコントロールが完全に自動化されており、非常に弱いシグナルまたは放射性標識部分由来のシグナルなどの人でさえ検出不可能なシグナルの定量に適切な検出器および他の成分が組み込まれている。自動化機器による迅速な再配置およびコンピュータ支援の顕微鏡を使用した人による検査のために、検出シグナルの位置を電子的に保存する〔168〕。

40

【0109】

集中データ管理システムは、バーコード識別番号を使用して全患者およびサンプルを保存する。複数のサイトからデータを非同期的に獲得することができ、このデータは細胞学者および／または自動化分析器による複数の観察および分析に由来し得る。これらのデータは、1つの以前に均一にした患者の標本由来のアリコートを示す複数のサンプルスライドからの結果を含み得る。データの一部および全部を、報告、保管、請求書作成、および規制要件を満たすために病因の実験情報システムへまたはこれらから移す。パネル試験および人による観察から得た結果を統合した1つの総括的報告を作製し、ハードコピーまたはネットワークコンピュータもしくはインターネットで電子的に送ることができる。

50

【0110】

いくつかの実施形態では、本発明の方法により、がんの異なる組織学的型などの異なる疾患を差別的に判別可能である。用語「組織学的型」は、特定の病態をいう。一般的な病態に依存して、1つまたは複数の組織学的型が存在し得る。例えば、肺がんには、扁平上皮がん、腺がん、大細胞がん、小細胞がん、および中皮腫が含まれるが、これらに限定されない。患者が罹患しているがんの組織学的型の知識は、医療従事者が疾患を位置付けおよび特徴付けて、最適な治療ストラテジーを決定するための一助となるので、非常に有用である。

【0111】

特定の病態を決定するために、特定の病態を判別することができるマーカーのパネルを選択する。例えば、分子マーカーのパネル内に、がんの特定の組織学的型の指標となる発現パターンを同定することができる。上記の方法によって、分子マーカーパネルの発現レベルの検出を行う。好ましくは、1〜20個の分子マーカーを含むパネルを使用して、肺がんの種々の組織学的型を判別する。しかし、最も好ましくは、4〜7個のマーカーを使用する。マーカー発現に基づく異なる組織学的型の判別を補助するために意思決定樹図を開発することができる。

【0112】

細胞学的サンプル中の悪性細胞を検出できることに加えて、本発明は病態の分子特徴付けに有用である。このような情報は、しばしば予後に有用であり、医師による特定の患者の至適な治療アプローチの選択を支援する。さらに、本発明に記載のマーカーパネルは、患者のモニタリングにおいて、再発または疾患の治療に使用される治療の有効性の測定するいずれかに有用である。

【0113】

非限定的な例として、肺がん検出パネルによって肺がんの存在を検出することができ、判別パネルによって肺がんの特定の型を検出することができる。医療従事者が細胞学的サンプル中に悪性細胞が存在すると決定した場合、肺がんの組織学的型のさらなる分析を行うことができる。本発明に含まれる肺がんの組織学的型には、扁平上皮がん、腺がん、大細胞がん、小細胞がん、および中皮腫が含まれるが、これらに限定されない。図1は、肺がんの異なる組織学的型の同定用のパネルに含められる好ましいマーカーである分子マーカーを示す。「%」と示した列は、特定のマーカーを発現する腫瘍標本の比率を示す。

【0114】

肺がんの種々の組織学的型の決定において、マーカー発現の相対レベルを分析する。図2は、どのようにして異なるマーカーを使用してがんの異なる組織学的型を判別することができるのかを示す。この表では、S Qは扁平上皮がんを示し、A Dは腺がんを示し、L Cは大細胞がんを示し、S Cは小細胞がんを示し、M Eは中皮腫を示す。各細胞中に示した数は、ある細胞型の別の細胞型に対するマーカーの変化の頻度を示す。表中に含めるために、比は2.0を超えるか0.5未満でなければならない。100を超える数は、一般に、第2のマーカーが発現されないことを示す。このような場合、分析のために分母を0.1に設定した。最後に、空白のセルは発現に相違がないか発現データが存在しないことを示す。

【0115】

収集されたデータの1つの分析方法は、意思決定樹図を構築することである。スキーム1〜4は、発現パターンを使用して肺がんの組織学的型の差異を決定することができるように構築することができる意思決定樹図の例である。本発明は、スキーム1〜4に示した意思決定樹図に決して限定されない。マーカー発現の相対レベルは、異なる組織学的型の悪性細胞中の分子マーカーの発現レベルより高いか、低い、同じ(N D)であり得る。各スキームは、示した分子マーカーのパネルの使用により、肺がんの5つの組織学的型を識別可能である。

【0116】

例えば、スキーム1では、パネルは、H E R A、M A G E-3、トロンプモジュリン、お

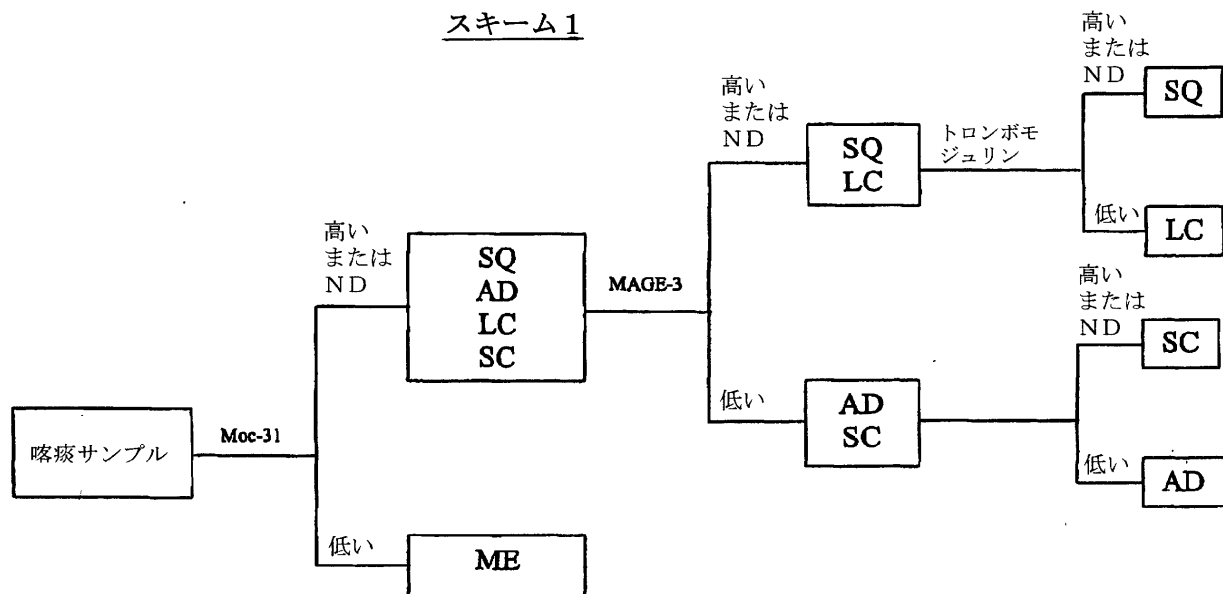
よびサイクリン1からなる。第1のサンプルを、HERAに指向する標識プローブに接触させる。HERA発現がコントロールよりも低い場合、試験は肺がんの組織学的型が中皮腫(ME)であることを示す。しかし、発現がコントロールより高いか同一の場合、サンプルをMAGE-3に指向するプローブに接触させる。MAGE-3の発現がコントロールより低い場合、サンプルをサイクリンD1に指向する標識プローブに接触させ、小細胞がん(SC)または腺がん(AD)と決定することができる。MAGE-3の発現がコントロールよりも高いか同一である場合、サンプルをトロンプモジュリンに指向する標識プローブに接触させ、扁平表皮がん(SQ)または大細胞がん(LC)と決定することができる。

【0117】

【化1】

10

スキーム1



20

【0118】

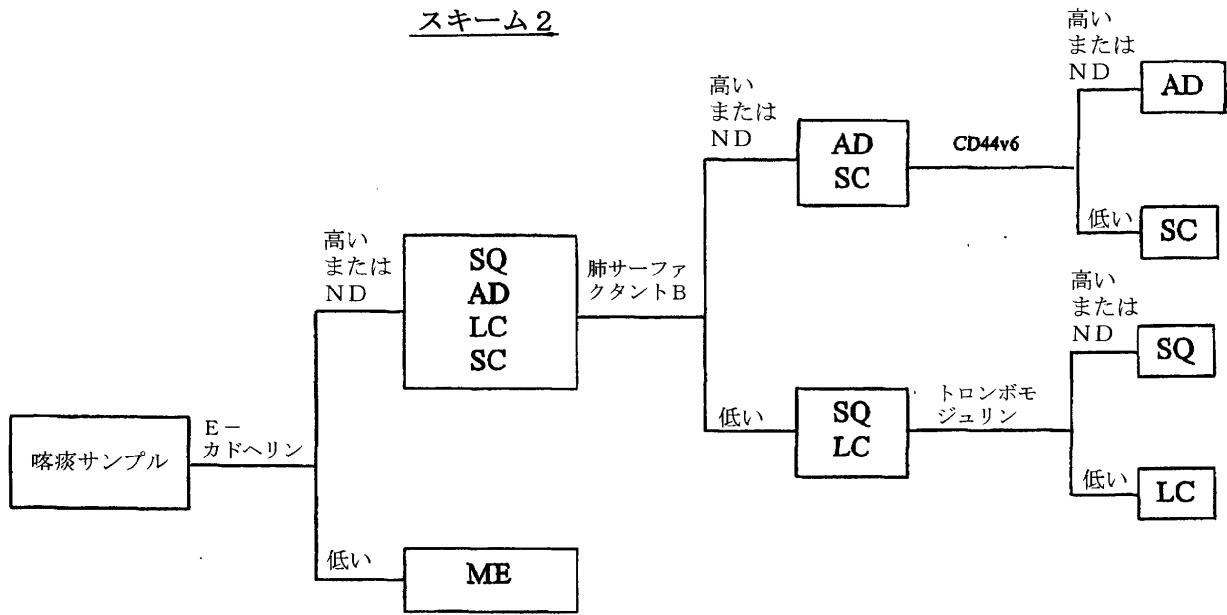
スキーム2では、パネルは、E-カドヘリン、肺サーファクタントB、およびトロンプモジュリンからなる。第1のサンプルを、E-カドヘリンに対する標識プローブに接触させる。E-カドヘリン発現がコントロールよりも低い場合、試験は肺がんの組織学的型が中皮腫(ME)であることを示す。しかし、発現がコントロールより高いか同一の場合、サンプルを肺サーファクタントBに指向するプローブに接触させる。肺サーファクタントB発現がコントロールより低い場合、サンプルをトロンプモジュリンに指向する標識プローブに接触させ、扁平上皮がん(SQ)または大細胞がん(LC)と決定することができる。肺サーファクタントB発現がコントロールよりも高いか同一である場合、サンプルをCD44v6に指向する標識プローブに接触させ、腺がん(AD)または小細胞がん(SC)と決定することができる。(意思決定樹図のさらなる例にはスキーム3および4を参照のこと)。

【0119】

【化2】

30

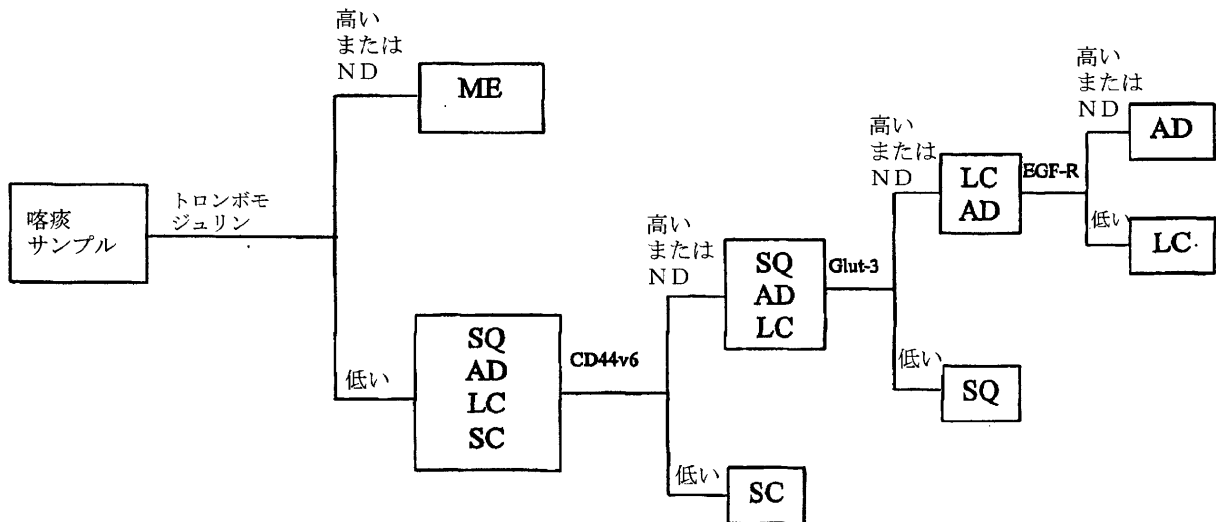
40

スキーム 2

10

【0120】

【化3】

スキーム 3

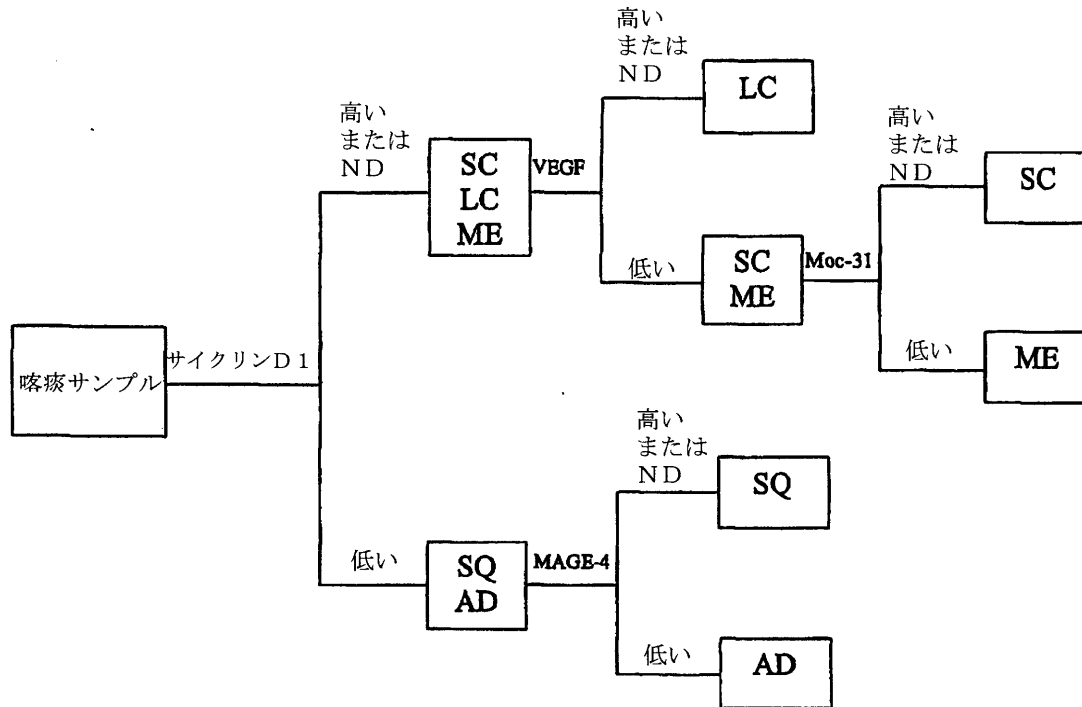
20

30

【0121】

【化4】

スキーム 4



10

20

30

40

50

【0122】

好ましい方法は、発現パターンの相違により肺がんの種々の組織学的型を判別可能な分子マーカーのパネルを使用するステップを含む。

【0123】

マーカー発現パターンを分析するために多数の異なる意思決定樹図を構築することができる。医師および他のヘルスケア関連企業がこの情報を使用して、患者の管理を決定し、最適な治療戦略を選択することができる。

【0124】

5. パネル分析結果の報告

パネル分析の結果を、いくつかの方法で報告することができる。例えば、結果を、簡単な「イエスまたはノー」と報告することができる。あるいは、結果を、試験結果が相関する確率として報告することができる。例えば、検出パネル研究由来の結果は、患者が一般的病態を有するかどうかを示すことができる。パネルは特異性および感度も報告されるので、結果を、患者が一般的病態を有する確率として報告することもできる。判別パネル分析による結果は、特定の病態を判別する。結果を、特定の病態が存在するかどうかに関して「イエスまたはノー」で報告することができる。あるいは、結果を、特定の病態が存在する確立として報告することができる。1人の患者由来の標本に対していくつかの判別パネル分析を行い、存在する病態が他の可能性に関して特定の病態である可能性のプロフィールを報告することも可能である。他の可能性には、偽陽性も含み得る。

【0125】

存在する各特異的な病態の確率のプロフィールを作製する実施形態では、いくつかの可能な結果が存在する。例えば、全確率は非常に低い確率であることが可能である。この例では、患者の標本診断が偽陽性であると医師が結論付けることができる。約80～90%であるものを除いて全可能性が低いことも可能である。この場合、試験により患者が高い確率で特定の病態を有すると医師が結論付けることが可能である。ほとんどの確率が低い、2つの特定の病態について同様に高い確率が報告されることも可能である。この場合、医師は、正確な病態が同定されることを確実にするためにより広範なパネル試験を推奨することができる。別の可能性は、報告された全確率が低く、残りのものよりわずかに確率が高いが、80～90%の範囲内よりもあまり高くない確率が存在することである。この

場合、医師は、正確な病態を同定し、そして／または異なるがん型の離れた原発性腫瘍からの転移がんを排除することを確実にするためにより広範なパネル試験を推奨することができる。

【0126】

以下の実施例は、疾患をスクリーニングし、疾患の異なるサブタイプを判別するためのクリニックでの疾患検出パネル、疾患判別パネルの選択、パネルの確証、ならびにパネルの使用のための本発明の方法の例である。一部世界規模の保険上の重要性のためにこの実施例では肺がんを選択するが、上記の一般的開示にしたがって、類似の手順は他のがん型ならびに感染症、変性疾患、および自己免疫疾患に適用される。

【実施例】

【0127】

本発明の方法を使用して、肺がん検出パネルおよび1つ肺がん型に特異的な判別パネルを開発した。肺がんは、2つの主なクラスに分類することができる非常に複雑な疾患の集合体である。全肺がんの約70～80%を占める非小細胞肺がん（NSCLC）を、扁平上皮がん、腺がん、および大細胞がんを含む3つの主な組織学的型にさらに細分することができる。肺がん患者の残りの20～30%は、小細胞肺がん（SCLC）である。さらに、胸膜腔の悪性中皮腫は、アスベストに曝露された個体で発症し、しばしば他の胸部構造を広範に侵襲しながら拡大する。異なる肺がん形態は、異なる肺がん領域に局在する傾向があり、異なる予後を示し、種々の治療形態に異なる反応を示す。

【0128】

世界保健機関（WHO）の最新の統計（G l o b o c a n、2000）によれば、肺がんは、毎年124万人が新規に罹患し、110万人が死亡している男女ともに最も一般的な致命的悪性疾患となりつつある。米国のみでも、国立がん研究所は、約186,000人が肺がんを新規に罹患し、毎年この疾患により162,000人が死亡し、全がん関連死の25%を占めると報告している。米国では、肺がん患者の40%が1年間生存するが、5年生存率はわずか14%である。世界の他の地域では、5年生存率は非常に低い（英国では5%）。肺がんの高い死亡率は、ほとんどの患者（85%）が治療オプションが制限されるほど進行し、疾患が転移している可能性があるという事実と診断されているという事実とに寄与し得る。これらの患者は、5年生存率が、診断時の段階に依存して2～30%である。これは、患者が初期に診断され、5年生存率が75%を超えるという場合と非常に対照的である。進行した肺がんの治療のために臨床実務で多数の新規の化学療法薬が導入されているという事実があるが、現在、長期生存は有意に改善されていない。初期疾患患者はおそらく手術で治療することがきるにもかかわらず、二次悪性疾患を発症する確立が高いので有意なリスクが残される。したがって、肺がん患者のために、初期検出および治療ならびにその後の積極的なモニタリングにより、罹患率および費用を減少させる長期生存率を有意に改善する最良の機会が得られる。

【0129】

現在のところ、X線で病変が疑われることと患者に症状が出現していることのいずれかにより、患者は肺がんが疑われている。結果として、ほとんどの患者が比較的末期の疾患を診断される。さらに、ほとんどの方法が初期疾患の検出に関する十分な感度を欠くので、米国国立癌研究所（NCI）、国立衛生研究所の現在の方針は、有意なリスクを有する患者集団でさえも肺がんのスクリーニングを推奨している。しかし、本発明のこの実施形態では、喀痰細胞診を使用して、比較的侵襲性で、より有効で、費用効果の高い肺がんの初期検出手段を提供する。

【0130】

喀痰細胞診の特異性は比較的高い。最近の研究により、経験豊かな細胞検査者は高い精度および信頼性で悪性細胞または重症形成異常細胞を認識することができることが示された[10]。サンプルを比較的疾患が進行した患者から採取した場合、検出率は80～90%ほどの高さであるが[11、12]、全体的には、喀痰細胞診の感度は30～40%のみである[13、14]。標本の獲得および調製が比較的高価であり得ることを考慮すれ

10

20

30

40

50

ば、喀痰細胞診の感度の低さは特に重要である。さらに、悪性疾患を検出できないことにより、治癒の機会が減少する。

【0131】

「危険な状態の」集団の選択もまた、スクリーニングツールとしての喀痰細胞診の価値に影響を与え得る。有意に危険な状態の個体には、肺がん診断前の個体、長期喫煙者、または喫煙経験のある個体（30パック年超）、および長期間アスベストまたは肺発がん物質に曝された個体が含まれる。一般的な疾病素因または家族歴を有する人も「危険な状態の」集団に含まれる。このような個体は、試験の恩恵を受ける可能性がある。リスクの低い個体を含めることは検出される症例の絶対数が増加することになり得るが、医療費の実質的な増加を正当化し難い。

10

【0132】

従来の喀痰細胞診の性能を相対的に低くしている他の要因には、病変の位置、腫瘍サイズ、組織学的型、およびサンプルの質が含まれる。扁平上皮がんは、全原発性肺新生物の31%を占める。これらの腫瘍のほとんどは区域気管支から発症し、近位肺葉および遠位亜区域枝に拡大する[15]。この理由のために、喀痰細胞診は、これらの病変の検出で合理的に有効である(79%)。現在、扁平表皮がんは、脱落細胞が評価により利用可能である可能性があるので、*in situ*および放射線学的に潜在的な段階に影響を受けやすい唯一の肺がん型と考えられる[15]。患者が胸部X線および喀痰細胞診の両方を受ける1つの大きな研究では、全肺がんの23%が細胞診のみで検出され、これは腫瘍が初期段階であり、放射線学的に潜在性を示すことが示唆される[16]。別の研究では[17]、喀痰細胞診により76%の患者で放射線学的に潜在的な腫瘍が検出された。

20

【0133】

腺がんの場合、肺周辺で腫瘍の70%が発症し、これは悪性細胞を従来の喀痰細胞標本で見出される。この理由により、腺がんは喀痰細胞診で稀にしか検出されず(45%) [12、18、19]、腺がんの罹患率が特に女性で増加していることは重要な検討材料である[20~22]。

【0134】

腫瘍サイズもまた無症候性の個体における疾患の検出のためのスクリーニング試験を考慮する場合に特に重要な因子であり、正確な診断の可能性に影響を与え得る。24mm未満の腫瘍が真の陽性であると読み取られる機会は50%しかないが、より大きな病変の検出確率は84%を超える[12]。

30

【0135】

現在の報告はまた、標本の細胞充実性が喀痰細胞診の感度に影響を与えることを示している[14、23]。一般に、扁平上皮がん患者で有意な腫瘍細胞数を有する標本が作製されるので、正確な診断の可能性が増大する[14、23]。腺がん患者については、喀痰標本中の腫瘍細胞の存在が95%の標本で10%未満、75%の標本で2%未満であると報告されており、これが診断を顕著により困難にしている。

【0136】

分化の程度もまた、特に腺がんにおける病理学者の悪性細胞の検出能力に影響を与え得る。十分に分化した腫瘍細胞は、非新生物性気道上皮細胞に類似している頻度が高い。小細胞肺がんの場合、喀痰サンプルは、しばしば異なる外観の弱く凝集した細胞の病巣を含む。しかし、現在喀痰サンプル処理に使用されている技術は細胞を分割する傾向があり、これが診断をより困難にしている。

40

【0137】

サンプルの質は、喀痰細胞診の感度を低くし得る別の要因である。最近の報告では、被験体の70~85%から適切なサンプルを得ることができることを示唆している。しかし、この測定を首尾よく行うためには患者の複数の標本を得ることが必要である[13]。この手順は不便であり、時間がかかり、費用がかかる。患者が数日間にわたる採取を指示される頻度が高いので、患者のコンプライアンスもまた一般に低い[13]。喫煙経験者は肺がん発症の有意な危険性を有するにもかかわらず、適切な標本が得られないという所見

50

も同様に重要である。サンプルの保存および処理は、診断試験としての喀痰細胞診の価値に影響を与え得る別の重要な要因である。

【0138】

最近、適切なサンプルを獲得して適切に調製することができる場合でさえ、細胞検査者は一般に標本あたり2～4本のスライドを観察し、典型的にはそれぞれ4分以内の検査時間である〔24〕。従来の喀痰細胞診の感度が低く、高度に複雑な技術を要し、重労働であることを考慮すると、この試験が肺がんの初期検出のための集団ベースのスクリーニングでほとんど普遍的に避けられていることは驚くべきことではない〔25〕。

【0139】

これらの技術の問題が解決されているとしても、喀痰細胞診の感度の低さは重要な問題である。偽陽性の結果の頻度が高いと、患者への潜在的に治癒可能な治療が著しく遅延し得る。より高い感度の試験を開発することができるかもしれないが、このような改良は特定の費用で実現してはならない。偽陽性数の増加により、患者が不必要でしばしば侵襲性および高価な追跡調査を受け、患者の生活の質に悪影響を与える場合がある。本発明は、肺がんの初期検出のための喀痰細胞診の使用に関連する制限を含む以前の初期がん検出方法に関連する多数の制限を克服する。 10

【0140】

肺がんは、疾患の異種集団である。集団ベースのスクリーニングとしてその使用を正当化するために必要な感度および特異性のレベルを有することを確実にするために、本発明は、例えば、パネルの開発に10～30個の細胞マーカーのライブラリーの使用を想定する。本発明のライブラリーの選択は、ほとんどの場合、マーカー発現を予後の発現に関連させることを意図する肺がん患者から採取した生検標本で測定している関連化学論文の再検討および再分析に基づいた。 20

【0141】

例えば、患者の喀痰中の肺がんの初期検出、特徴付け、および／またはモニタリングに好ましいパネルには、腫瘍標本の少なくとも75%で発現が変化するマーカーを含み得る。パネルの例には、VEGF、トロポモジュリン、CD44v6、SP-A、Rb、E-カドヘリン、サイクリンA、nm23、テロメラーゼ、Ki-67、サイクリンD1、PCNA、MAGE-1、ムチン、SP-B、HERA、FGF-2、C-MET、甲状腺転写因子、Bcl-2、N-カドヘリン、EGFR、Glut-1、ER関連(p29)、MAGE-3、およびGlut-3から選択されるマーカーが含まれる。最も好ましいパネルには、85%を超える腫瘍標本で発現が変化する分子マーカーが含まれる。パネルの例には、Glut1、HERA、Muc-1、テロメラーゼ、VEGF、HGF、FGF、E-カドヘリン、サイクリンA、EGF受容体、Bcl-2、サイクリンD1、およびN-カドヘリンから選択される分子マーカーが含まれる。RbおよびE-カドヘリンを除いて、肺がんの診断は、マーカー発現の増加に関連する。本発明で使用したプローブ／マーカーライブラリーの簡単な説明を、以下の表4に示す。以下の表中の抗体の番号は、この例を通して抗体／プローブ／マーカー数に一致することに留意すべきである。 30

【0142】

【表4】

肺パネル用のプローブおよびマーカー			
番号	マーカーの略称	抗体プローブの正式名称	標的マーカーの名称/説明
1	VEGF	抗VEGF	血管内皮成長因子タンパク質
2	トロンプモジュリン	抗トロンプモジュリン	膜貫通糖タンパク質
3	CD44v6	抗CD44v6	細胞表面糖タンパク質 (CD44変異体8遺伝子); 細胞接着分子
4	SP-A	抗サーファクタントアポタンパク質A	肺サーファクタントアポタンパク質
5	網膜芽腫	抗網膜芽腫遺伝子産物	リンタンパク質
6	E-カドヘリン	抗E-カドヘリン	膜貫通Ca ⁺⁺ 依存性細胞接着分子
7	サイクリンA	抗サイクリンA	サイクリン依存性キナーゼ酵素のタンパク質サブユニット; 細胞周期の調節
8	nm23	抗nm23	nm23-H1およびH2遺伝子によって産生された2つの密接に関連するタンパク質
9	テロメラーゼ	抗テロメラーゼ	染色体修復のためのリボ核タンパク質酵素
10	Mlb-1 (KI-67)	抗KI-67	核タンパク質; 増殖細胞中で発現する
11	サイクリンD1	抗サイクリンD1	サイクリン依存性キナーゼ酵素のタンパク質サブユニット; 細胞周期の調節
12	PCNA	抗増殖細胞核抗原	DNAポリメラーゼδのタンパク質補因子
13	MAGE-1	抗黒色腫関連抗原1	MAGE遺伝子ファミリーによってコードされる細胞認識タンパク質
14	ムチン1 (MUC-1)	抗ムチン1	細胞表面および分泌ムチン (高度にグリコシル化下タンパク質)
15	SP-B	抗成熟サーファクタントアポタンパク質B	肺サーファクタントアポタンパク質
16	HERA	抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)	細胞表面抗原 (膜貫通タンパク質)
17	FGF-2 (塩基性FGF)	抗線維芽細胞成長因子	細胞表面に結合するタンパク質
18	c-MET	抗c-MET	肝細胞成長因子 (HGF) の膜貫通受容体タンパク質
19	甲状腺転写因子 1	抗TTF-1	甲状腺特異的遺伝子の調節物質; 肺でも発現する
20	BCL-2	抗BCL-2	BCL2遺伝子によってコードされる細胞内膜結合タンパク質
21	P120	抗p-120	増殖関連核抗原タンパク質
22	N-カドヘリン	抗N-カドヘリン	膜貫通Ca ⁺⁺ 依存性細胞接着分子
23	EGFR	抗EGFR	上皮成長因子受容体; 膜貫通糖タンパク質
24	Glut1	抗Glut1	タンパク質のグルコース輸送膜貫通Glutファミリー
25	ER関連 (p29)	抗ER関連 (p29); 抗HSP27	エストロゲン受容体関連p29タンパク質; 熱ショックタンパク質27
26	Mage 3	抗黒色腫関連抗原3	MAGE遺伝子ファミリーによってコードされる細胞認識タンパク質
27	Glut 3	抗Glut3	タンパク質のグルコース輸送膜貫通Glutファミリー
28	PCNA (高希釈)	抗増殖細胞核抗原	DNAポリメラーゼδのタンパク質補因子

10

20

30

40

50

【0143】

好ましいパネル中の各分子マーカーを以下に記載する。各肺がん型についての組織中のマーカー発現の比率を列挙した表5を、この節の終わりに示す。

【0144】

グルコース輸送タンパク質 (Glut1およびGlut3) [26~28]

グルコース輸送体1 (Glut1) およびグルコース輸送体3 (Glut-3) は、至ところに発現する高親和性グルコース輸送体である。腫瘍細胞は、呼吸、グルコース取り込み、およびグルコース代謝の比率が正常細胞よりもしばしば高く、腫瘍細胞中のグルコース取り込みの増加は、グルコース輸送体によって媒介されていると考えられる。一定のG

L U T イソ型の過剰発現が肺がんで報告されている。G l u t 1 の細胞局在化は、細胞膜で認められる。G L U T - 1 および G L U T - 3 は、病態の検出に有用な疾患マーカーである。

【0145】

悪性細胞はグルコース取り込みが増加し、これはグルコース輸送タンパク質ファミリー (G l u t) によって媒介されると考えられている。がん遺伝子および成長因子は、これらのタンパク質の発現およびその活性を調節する用である。タンパク質の G l u t ファミリーメンバーは、種々のヒト組織で異なる分布パターンを示し、急速な増殖はしばしばその過剰発現に関連する。最近の証明により、高い比率の N S C L C および大部分の S C L C で G l u t 1 が発現することが示唆される。

10

【0146】

G l u t 3 の発現が N S C L C および S C L C の両方で比較的低いが、有意な比率の大細胞がん (3 9 . 5 %) がタンパク質を発現する。I 期では、8 3 % が幾らかのレベルで G l u t 1 を発現し、2 5 % の症例で 7 5 ~ 1 0 0 % の細胞が染色される。これらのデータにより、G l u t 1 の過剰発現が腫瘍進行の比較的初期の事象であることが示唆される。G l u t 1 の免疫反応性もまた、9 0 % を超える I I 期および I I I A 期のがんで検出された。G l u t 1 および G l u t 3 の免疫反応性と腫瘍識別との間に逆の相関関係も存在するようである。高レベルの G l u t 1 を発現する腫瘍は、特に悪性であり、予後がよくないようである。タンパク質に対して腫瘍が陰性の場合、より良好な生存率が認められた。

20

【0147】

ヒト上皮関連抗原 (H E R A) [2 9 、 3 0]

H E R A は、現時点で未知の機能を有する膜貫通糖タンパク質である。H E R A は、ほとんどの正常および悪性上皮に存在する。最近の報告では、H E R A 発現 N S C L C の全組織学的型で高く、これが検出マーカーとして有用であることが示唆されている。対照的に、H E R A 発現は中皮腫に存在しないので、判別マーカーとして有用性を有することが示唆される。H E R A の細胞における位置は、細胞表面である。

【0148】

塩基性線維芽細胞成長因子 (F G F) [3 1 ~ 3 4]

塩基性線維芽細胞成長因子 (F G F) は、ヘパリンおよび他のグリコサミノグリカンに高い親和性を示すポリペプチド成長因子である。がんでは、F G F は強力なマイトジェンとして作用し、血管新生、分化、および増殖で役割を果たし、腫瘍進行および転移に関与する。F G F の過剰発現は、S C L C および扁平表皮がんが頻繁に起こる。多くの症例では (6 2 %) 、細胞は F G F 受容体も発現し、オートクラインループの存在が示唆される。I 期腫瘍の 4 8 % が F G F を過剰発現する。I I 期肺がんの F G F の頻度は、8 4 % である。成長因子またはその受容体のいずれかの発現は、予後の不十分さに関連する。I 期疾患患者の 5 年生存率は F G F を発現する患者で 7 3 % に対し、F G F 陰性患者で 8 0 % である。細胞膜中に細胞が局在する。

30

【0149】

テロメラーゼ [3 5 ~ 4 2]

テロメラーゼは、真核生物染色体のテロメアを拡大および維持するリボ核タンパク質酵素である。これは、逆転写活性を有する触媒タンパク質サブユニット、逆転写活性を有する R N A サブユニット、およびテロメア伸長のテンプレートとして作用する R N A サブユニットからなる。テロメラーゼを発現しない細胞は、最終的に染色体が不安定になり、加齢し、細胞が死滅するそれぞれ細胞分裂した連続的に短縮したテロメアを有する。細胞中でテロメアは核に局在している。

40

【0150】

テロメラーゼ発現は不死化細胞および酵素で起こるようであり、活性は悪性表現型の共通の特徴である。約 8 0 ~ 9 4 % の肺腫瘍のテロメラーゼ活性レベルが高い。さらに、過形成の 7 1 % 、化生の 8 0 % 、および異形成の 8 2 % が酵素活性を発現する。全てのがんの

50

i n s i t u (C I S) 標本が、酵素活性を示す。前悪性組織の発現レベルの低さは、おそらく、サンプル中の少数の細胞 (5 % および 2 0 %) が酵素活性を発現するという事実に関連する。これは、20 ~ 60 % の細胞が酵素活性を発現することができる腫瘍と対照的である。限定数のサンプルに基づいて、テロメラーゼ活性の発現もまた S C L C に共通するようである。

【0151】

増殖細胞核抗原 (P C N A) [4 3 ~ 5 1]

P C N A は、D N A ポリメラーゼ δ の補因子として機能する。P C N A は、細胞周期の S 期および D N A 修復に関連する D N A 合成中で発現する。P C N A は、広範な正常組織および悪性組織中の増殖細胞で発現する。細胞中で P C N A は核に局在する。

10

【0152】

P C N A の発現は、急速に分裂する細胞の共通の特徴であり、腫瘍の 98 % で検出される。免疫組織化学的染色は、N S C L C の 83 % で検出される中程度から強く染色された核である。p 53 陰性腫瘍の 51 % で強い P C N A 染色が認められた。しかし、P C N A (50 % 超の細胞染色) および p 53 (10 % 超の細胞染色) が共に過剰発現させる場合、より短期間に進行して予後はよくない。肺がんの全段階で頻繁に検出される場合、P C N A の強い染色は転移性疾患でより一般的である。C I S の 31 % もまた P C N A を過剰発現する。

【0153】

C D 4 4 [5 1 ~ 5 8]

C D 4 4 v 6 は、細胞接着分子として作用する細胞表面糖タンパク質である。これは、上皮組織、中皮組織、および造血組織中の広範な正常細胞および悪性細胞に発現する。特定の C D 4 4 スプライス変異体の発現により、一定のヒト悪性疾患における転移および予後の悪さに関連することが示されている。これを扁平上皮がんおよび腺がんの検出および判別に使用されることが予想される。C D 4 4 は腫瘍の侵襲および転移で役割を果たすと考えられる細胞接着分子である。別のスプライシングにより、いくつかの変異イソ型が発現する。一般に、C D 4 4 発現は S C L C を欠き、N S C L C で可変的に発現する。扁平上皮がんでの発現レベルが最も高いので、腫瘍型の判別に利用価値がある。非新生物性組織では、気管支上皮細胞、マクロファージ、リンパ球、および肺胞上皮細胞で C D 4 4 染色が認められる。過剰発現が特に初期疾患で認められた場合、C D 4 4 発現と腫瘍段階、再発、または生存との有意な相関関係は認められなかった。転移性病変では、扁平上皮がんの 100 % および腺がんの 75 % で強力な C D 4 4 v 6 陽性を示した。これらのデータは、C D 4 4 発現が腫瘍進行の比較的后期に変化することを示す傾向があり、初期検出マーカーとしての価値が限定され得る。最近の所見により、C D 4 4 v 8 - 10 変異体は大部分の N S C L C によって発現し、候補マーカーとして可能であることが示唆される。

20

30

【0154】

サイクリン A [5 9 ~ 6 2]

サイクリン A は、細胞周期の特定の時期に移行点を調節するサイクリン依存性キナーゼ (C D K) の調節サブユニットである。これは、S 期および G 2 期に進行する間に検出可能である。細胞中でサイクリン A は核に局在する。

40

【0155】

サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼからなるタンパク質複合体は、細胞周期の進行を調節するように機能する。サイクリン発現の変化は、C C D N 1 遺伝子に影響を与える遺伝子の変化に関連する。サイクリンは調節分子として作用するが、サイクリン依存性キナーゼは R b を活性化および不活化する触媒サブユニットとして機能する。

【0156】

免疫組織化学的分析により、サイクリンの過剰発現が高い K i - 6 7 標識指標によって示される細胞増殖の増加に関連することが明らかとなった。サイクリン過剰発現は N S C L C の 75 % で起こり、腫瘍進行の比較的前期に起こるようである。最近の報告では、I / I I 期腫瘍の 66.7 % および I I I 期腫瘍の 70.9 % でサイクリン A が過剰発現して

50

いることが示されている。核染色は、不十分に分化した腫瘍に共通している。サイクリン A 発現は、平均生存期間および薬物耐性の発達傾向にしばしば関連している。しかし、発現の増加はドキソルビシンに対するより大きな反応にも関連している。

【0157】

サイクリン D 1 [63~73]

サイクリン A と同様に、サイクリン D 1 は、細胞周期の特定の時期に移行点を調節するサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の調節サブユニットである。サイクリン D 1 は、細胞周期の S 期への細胞の侵入を調節する。この遺伝子は頻繁に増殖され、そして／またはその発現は広範なヒト悪性疾患で無秩序となる。サイクリン D 1 は細胞中の核に局在している。

10

【0158】

サイクリン A と同様に、サイクリン D 1 は、細胞周期の進行を調節するように機能する。サイクリン D 1 は、細胞質で支配的に染色され、組織学的型とは無関係である。報告により、サイクリン D 1 の過剰発現は、NSCLC の 40~70%、SCLC の 80% で起こることが示唆される。サイクリン D 1 染色は、I 期腫瘍の 37.9%、II 期腫瘍の 60%、III 期腫瘍の 57.9% で認められた。サイクリン D 1 発現はまた、異形成組織および過形成組織で認められ、これは、これらの変化が腫瘍進行の比較的初期に起こることを証明している。サイクリン D 1 が過剰発現した患者は、平均生存期間が短く、5 年生存率が低い。

【0159】

肝細胞成長因子受容体 (C-MET) [74~77]

C-MET は、HGF の膜貫通受容体チロシンキナーゼをコードするがん原遺伝子である。HGF は肝細胞および内皮細胞のマイトジェンであり、上皮起源のいくつかの細胞型に対して多面発現を示す。C-MET は細胞中の細胞表面に局在している。

20

【0160】

肝細胞成長因子／散乱因子 (HGF／SF) は、増殖、移動、および血管新生を含む複雑な分化プログラムを実行させるように広範な上皮細胞を刺激する。HGF／SF は、c-MET がん遺伝子によってコードされる受容体に結合する。正常および悪性組織の両方が HGF 受容体を発現するが、HGF／SF 発現は悪性組織に限定されるようである。

【0161】

ヒトの肺の HGF／SF 発現レベルは一般に低い、NSCLC では発現が顕著に増加する。ウェスタンブロット分析を使用して、肺がんの 88.5% のタンパク質発現が増加している。腫瘍の全組織学的型が、高濃度のタンパク質を発現した。疾患の全段階でタンパク質レベルが増加するが、最近の証明により、がん細胞に加えて、間質細胞および／または炎症細胞は成長因子賛成を担い得ることが示唆される。

30

【0162】

ムチン-MUC-1 [78~82]

ムチン 1 は、気管気管支樹、胃腸管、および泌尿生殖管を被覆および保護する粘性ゲルの主要なタンパク質構成成分を含む高度にグリコシル化された分泌タンパク質に由来する。ムチン 1 は、上皮腫瘍で非定型に発現する。ムチン 1 は細胞中の細胞質および細胞表面に局在している。

40

【0163】

ムチンは、膜に結合しているか分泌された種々の分泌性上皮細胞によって合成される高分子量の糖タンパク質ファミリーである。気道内で、これらのタンパク質は、気管気管支樹を被覆および保護する粘性ゲルに寄与する。ムチン発現の変化は、一般に、肺がんを含む悪性疾患への変換と共に起こる。証拠により、これらの変化が細胞成長調節の変化、免疫系による認識、および腫瘍の転移可能性に寄与し得ることが示唆される。

【0164】

正常な肺組織が MUC-1 を発現するにもかかわらず、腺がん発症レベルの高い肺がんでは有意により高いレベルの発現が見出される。時期とは無関係に染色され、喫煙経験者また

50

は非喫煙者よりも喫煙者でより一般的である。いくつかの前悪性病変もまた、MUC-1発現が増加する。

【0165】

甲状腺転写因子1 (TTF-1) [83、84]

TTF-1は、甲状腺特異的および肺特異的分化遺伝子を活性化するホメオドメイン転写因子のファミリーに属する。TTF-1は細胞中の核に局在している。

【0166】

TTF-1は、サイログロブリン転写を倍加することが最初に見出されたタンパク質である。最近、TTF-1発現は、間脳および気管支肺胞上皮でも見出された。肺内でTTF-1がサーファクタントタンパク質およびクララ分泌タンパク質の合成を調節する転写因子として機能する。大部分の肺腺がんがTTF-1が過剰発現し、原発性肺がんが肺に移転したがんとの識別を補助することができる。TTF-1を発現し、サイトケラチン7陽性であり、サイトケラチン20陰性である腺がんを、95%の感度で検出することができる。

10

【0167】

血管内皮成長因子 (VEGF) [33、61、85～89]

VEGFは、腫瘍の進行および転移を促進する血管新生で重要な役割を果たす。VEGFには多数の形態が存在し、2つの小さなイソ型は分泌タンパク質であり、核酸作用因子として作用し、大きな残りの2つのイソ型は細胞に会合したままである。VEGFは細胞中の細胞質、細胞表面、および細胞外基質に局在している。

20

【0168】

血管内皮成長因子 (VEGF) は、重要な血管新生因子であり、且つ内皮細胞特異的マイトジェンである。血管新生は、発現現象の後期 (腫瘍の進行) で重要なプロセスであり、遠位転移進行に特に重要である。VEGFは、オートクラインループの存在が示唆される成長因子を発現する腫瘍にしばしば存在する特異的受容体Fltに結合する。

【0169】

免疫組織化学的分析により、VEGFを発現する細胞は拡散する細胞質の染色パターンを示すことが明らかとなる。非新生物性細胞によって発現されないが、VEGFはNSCLCの大部分およびSCLCにより低い比率で存在する。いくつかの報告で、肺がん初期に高レベルのVEGFが認められている。

30

【0170】

VEGF発現は、転移の頻度に関連している。研究により、VEGF発現が腺がんでの予後の不十分さおよび無疾患間隔の短さの指標となるが、扁平上皮がんでは指標とならないことが示された。高レベルのVEGFを発現する群の3年および5年生存率は、低VEGF群の90.9%および77.9%とそれぞれ比較して50%および16.7%である。

【0171】

上皮成長因子受容体 (EGFR) [90～104]

上皮成長因子受容体 (EGFR) は、種々のリガンドに結合して活性化することができる膜貫通糖タンパク質である。結合により、DNA合成、細胞増殖、および細胞分化が起こる一連の事象が開始される。EGFRは広範な正常組織で証明されており、種々の新生物でEGFR過剰発現が見出されている。肺の腺がんおよび大細胞がんが発現の増加が認められているが、小細胞肺がんでは認められていない。EGFRは、細胞中の細胞表面に局在している。

40

【0172】

EGFRは、細胞の成長および分化で重要な役割を果たす。EGFRは、基底側細胞膜に一樣に存在するが、組織学的に正常な気管支上皮の浅層でより多数存在する。これを除いて、正常組織の染色は一貫していない。最近の証明により、EGF受容体の過剰発現は、侵襲性肺がん発症の絶対的要件ではない可能性があることが示唆される。しかし、EGFRが過剰発現した場合、より進行した疾患ほどより染色が強い比較的初期の疾患であるようである。

50

【0173】

侵襲性がん患者について、50～77%の腫瘍がEGFを染色する。EGFRの過剰発現は腺がんよりも扁平上皮がんでは一般的であり、SCLCで一般的である。後期の転移性疾患でEGFRレベルが最も高く、I/I期腫瘍で認められるEGFR濃度の約2倍である。評価により、I期腫瘍で認められたEGFRレベルが正常な組織で認められるレベルの約2倍であることが示唆される。さらに、気管支病変の48%もまた、化生、異型、異形成、およびCISを含むEGFR染色を示す。これらの同一のがん患者の「正常な」気管支粘膜では、症例の39%でEGFRの過剰発現が認められたが、がんではない気管支上皮では認められなかった。さらに、EGFRの過剰発現は、特に扁平上皮がんの症例で非喫煙者よりも喫煙者の腫瘍で頻繁に認められた。

10

【0174】

いくつかの研究によりEGFRの過剰発現が不十分な予後に関連する一方で、他の研究ではこの相関関係は得られなかった。

【0175】

ヌクレオシド二リン酸キナーゼ / nm23 [105～111]

ヌクレオシド二リン酸キナーゼ (NDPKキナーゼ) / nm23は、ヌクレオシド二リン酸キナーゼである。転移の可能性の高い腫瘍細胞は、しばしばnm23タンパク質を欠くか少量しか発現しないので、nm23タンパク質は転移抑制タンパク質として説明されていた。nm23は細胞中の核および細胞質に局在している。

【0176】

nm23 / ヌクレオチド二リン酸 / キナーゼA (nm23) の発現は、発現可能性と転移可能性との間に逆の関係が存在する腫瘍進行のマーカーである。I期腫瘍がnm23を過剰発現する場合、35ヶ月の平均追跡期間で転移は認められなかった。免疫組織化学的分析により、拡散し、細胞質に存在し、一般に悪性細胞に限定される染色が明らかとなる。肺胞マクロファージもまたタンパク質を発現する。高レベルの発現が転移可能性の低さに関連する場合、何故正常な上皮細胞がnm23を発現しないのかということに関する説明は現在存在しない。

20

【0177】

高い比率のNSCLC (特に大細胞肺がん) およびSCLCの74%で強い染色が認められ、このタンパク質は腫瘍進行で重要な役割を果たすことが示唆される。扁平上皮がんを除いて、染色強度は、疾患の時期と共に増加する傾向がある。利用可能な証明に基づいて、nm23はSCLCおよびNSCLCの両方における予後因子である。

30

【0178】

Bcl-2 [101、112～125]

Bcl-2は、アポトーシス阻害で中心的役割を果たすミトコンドリア膜タンパク質である。bcl-2の過剰発現は、プログラム細胞死が停止される細胞の一般的特徴である。Bcl-2は、細胞中の細胞表面に局在している。

【0179】

Bcl-2は、細胞分化終結の促進、非循環細胞生存の延長、および循環細胞のアポトーシスの遮断で役割を果たすと考えられるがん原遺伝子である。Bcl-2は、Baxとのヘテロ二量体として存在するか、Baxとヘテロ二量体を形成することができる。ホモ二量体として、Baxはアポトーシスを誘導するように機能する。しかし、Bax-bcl-2複合体は、アポトーシスを遮断する。アポトーシスの遮断により、bcl-2発現は、罹患細胞にいくつかの利点を付与するようである。bcl-2発現は、薬物耐性の発達に役割を果たし得る。bcl-2発現は、p53によって下方制御される。

40

【0180】

bcl-2の免疫組織化学分析により、不均一な細胞質染色パターンが明らかとなる。腺がんでは、bcl-2発現は、より小さな腫瘍 (2cm未満) およびより低い増殖活性に有意に関連する。bcl-2発現は、神経エンドクリン分化により密接に関連し、高い比率のSCLCで起こるようである。

50

【0181】

前新生物病変でb c l - 2は過剰発現せず、腫瘍進行の比較的後期でb c l - 2が変化することが示唆される。腫瘍細胞に加えて、基底細胞中および正常な細気管支の管腔表面上にb c l - 2の免疫染色が認められたが、一般により分化した細胞型では検出されない。

【0182】

b c l - 2免疫反応性の改良されたN S C L C診断との組み合わせには、議論の余地がある。いくつかの報告により、b c l - 2を発現する腫瘍を有する患者が予後がより優れており、より長期間再発しないことが示唆される。いくつかの報告により、b c l - 2発現は転移性疾患を発症する患者が寄り少数である傾向があることが示される。扁平上皮がん患者について、b c l - 2発現は、5年生存率の改善に関連している。しかし、3年にわたる比較的大規模の研究では、特に初期疾患の患者ではb c l - 2発現に関連する生存の利点は存在しなかった。

10

【0183】

エストロゲン受容体関連タンパク質 (p 2 9) [1 2 6]

E R関連タンパク質p 2 9は、エストロゲン受容体発現に相関することが認められているエストロゲン関連熱ショックタンパク質である。p 2 9は、細胞中の細胞質に局在している。

【0184】

エストロゲン依存性細胞内プロセスは、正常な組織の成長調節で重要であり、悪性疾患の調節で役割を果たし得る。1つの研究では、111個の肺がん中109個(98%)でp 2 9発現が検出された。p 2 9発現と生存期間との関係は、男女で異なった。p 2 9発現は、特にI期およびII期疾患の女性で生存率にあまり関連しなかった。男性では、p 2 9発現と長期生存との間に相関関係は存在しなかった。

20

【0185】

網膜芽腫遺伝子産物 (R b) [6 8、7 3、1 2 3、1 2 7～1 4 1]

網膜芽腫遺伝子産物(R b)は、核DNA結合リンタンパク質である。リン酸条件下でR bはDNA腫瘍ウイルスのがんタンパク質に結合するので、遺伝子調節タンパク質はDNA複製を阻害する。R bタンパク質は、転写の調節によって作用することができ、R b機能の欠如により細胞成長が制御されない。R bは細胞中の核に局在している。

【0186】

網膜芽腫タンパク質(p R b)は、網膜芽腫遺伝子によってコードされ、細胞周期依存性様式でリン酸化および脱リン酸化されるタンパク質である。p R bは、G 0 / G 1期の細胞周期を調節するように機能する重要な腫瘍抑制遺伝子と考えられている。その低リン酸化状態では、p R bはG 1期からS期への移行を阻害する。G 1期中、サイクリン依存性キナーゼ(C D K)がタンパク質をリン酸化する場合、p R bの成長抑制性が不活化する。p R bの高リン酸化によりDNA合成に必要な転写因子タンパク質として機能するE 2 Fとの複合体形成が防止される。

30

【0187】

肺がんを含む種々のがん型で網膜芽腫(R b)遺伝子の不活化が報告されている。小細胞がんはp R bを染色することができず、R b機能の喪失を示す。概して、腫瘍の17.6%がp R bを発現できず、疾患の段階または結節の状態に関する相関関係は認められなかった。異形成気管支生検の31%でも染色の減少が認められた。しかし、p R b発現と異形成の重症度との間に相関関係は存在しないようである。対照的に、腫瘍の隣接領域から採取した正常な気管支上皮および細胞は、p R b陽性の核を発現した。これらのデータより、いくつかの肺がんの発症においてR bタンパク質発現が初期に変化し得ることが示唆される。

40

【0188】

R b陽性がん患者は、幾らか良好な予後を有する傾向があるが、多くの研究により、差は有意ではない。しかし、腫瘍がp R b陰性であり、且つp 5 3またはr a s陽性である腺がん患者は、5年生存率が減少する。扁平上皮がんでは類似の関係は存在しない。p R b

50

陰性腫瘍は、R b 陽性がんよりもドキソルビシンに耐性を示す可能性がより高いと報告されている。

【0189】

トロンボモジュリン [142～147]

トロンボモジュリンは、膜貫通糖タンパク質である。プロテインC活性化（その後プロテインSおよびトロンبینの結合により抗凝固剤として作用する）が促進されているにもかかわらず、TMの合成は、内皮細胞表面上の凝塊形成の減少に重要ないくつかの機構のうちの1つである。トロンボモジュリンは、細胞中の細胞表面に局在している。

【0190】

腫瘍細胞の循環による宿主血小板の凝集は、転移プロセスで重要な役割を果たすようである。トロンボモジュリンは、トロンبینによる抗凝固プロテインCの活性化で重要な役割を果たし、血管内凝固の重要な調整物質である。正常な扁平上皮でのその発現に加えて、扁平化生、がん *in situ* で、および侵襲性扁平上皮がん *in situ* でトロンボモジュリンが発現する。原発性扁平上皮がんの74%で存在するにもかかわらず、転移性病変のわずか44%がトロンボモジュリンを染色した。これらのデータにより、進行と共にトロンボモジュリン発現は減少することが示唆される。不十分に分化した腫瘍と比較して、十分および中程度に分化した腫瘍で高レベルで発現する傾向がある。

【0191】

トロンボモジュリン陰性扁平上皮がん患者は、予後がより悪い傾向がある。腫瘍がタンパク質について陽性に染色された症例での60%と比較して、トロンボモジュリン陰性患者の5年生存率は18%である。転移性疾患への進行もまた、トロンボモジュリン陰性腫瘍でより一般的であり（37%に対して69%）、これらの腫瘍が胸郭外部位で発症する傾向がより高い。したがって、トロンボモジュリン発現の喪失により、扁平上皮がんの予後となるようである。NSCLCの後期でトロンボモジュリン発現が変化し、正常な気管支上皮細胞によってタンパク質が発現するという所見は、初期検出用マーカーとしての有用性が制限される傾向がある。しかし、中皮腫の大部分および少数の腺がんがトロンボモジュリンを発現するので、マーカーはこれらの2つの型の判別に有用である可能性がある。

【0192】

E-カドヘリンおよびN-カドヘリン [148～151]

E-カドヘリンは、膜貫通Ca²⁺依存性細胞接着分子である。これは、組織構造の調節機構および組織の完全性の維持機構による細胞の成長および発達で重要な役割を果たす。E-カドヘリンは、上皮細胞の細胞内接着、上皮分極の確立、腺の分化、および層化に寄与する。多数のがんでE-カドヘリン発現の下方制御が認められ、これは通常疾患段階の進行および前進に関連する。E-カドヘリンは、細胞中の細胞表面に局在している。

【0193】

E-カドヘリンは、カルシウム依存性上皮細胞接着分子である。E-カドヘリン発現は、腫瘍の脱分化および転移ならびに患者の生存に関連している。中程度および不十分に分化した扁平上皮がんおよびSCLCで発現の減少が認められている。腺がんではE-カドヘリンの変化は認められなかった。さらに、腺がんはE-カドヘリンを発現するが、この腫瘍は、N-カドヘリンを発現するがE-カドヘリンを発現しない中皮腫と対照的にN-カドヘリンを発現することができない。したがって、これらのマーカーを使用して、腺がん *in situ* と中皮腫を判別することができる。

【0194】

E-カドヘリン発現を使用して、扁平上皮がん患者の予後を評価することもできる。E-カドヘリンを発現する腫瘍患者の60%が3年生存している一方で、発現が減少した患者の36%しか3年生存していない。

【0195】

MAGE-1およびMAGE-3 [152～156]

黒色腫抗原1 (MAGE-1) および黒色腫抗原3 (MAGE-3) は、正常な組織中では通常サイレントであるが、悪性新生物で発現された場合に自己腫瘍指向性および特異性

細胞傷害性T細胞（CTL）によって認識される遺伝子ファミリーのメンバーである。MAGE-1およびMAGE-3は、細胞中の細胞質に局在している。

【0196】

MAGE-1、MAGE-3、およびMAGE-4遺伝子産物は、細胞傷害性Tリンパ球によって認識される腫瘍関連抗原である。したがって、これらはNSCLCの免疫療法のための標的としての有用性を有し得る。MAGEタンパク質はまた、いくつかのSCLCによって発現されるが、正常な細胞によっては発現されない。MAGE発現の頻度は検出マーカーとしての使用に必要なレベル未満に減少し、組織学的型の間の発現パターンの相違により、MAGE発現が識別マーカーとしての有用性を有し得ることが示唆される。この有用性は、腫瘍細胞の90%を超える扁平上皮がんの50%がMAGE-3を過剰発現し、腫瘍細胞の30%が少なくとも50%の細胞で過剰発現を示すという所見によっても支持される。

10

【0197】

核タンパク質（p120） [157]

p120（増殖関連核抗原）は、初期G1期に急速に増殖する細胞の核小体で見出される。p120は、細胞中の核に局在している。

【0198】

核タンパク質p120は、その機能が依然として解明されていない増殖関連タンパク質である。腫瘍組織では強力に染色されるが、マクロファージまたは正常組織では染色されない。p120の過剰発現は、扁平上皮がんであり一般的であるが、腺がんまたは大細胞がんではこのマーカーは腫瘍型を判別する有用性を有し得る可能性が増大する。

20

【0199】

肺サーファクタント [83、158～166]

肺サーファクタントは、肺胞-液体境界の表面張力を減少させることにより、換気に必要な肺胞安定性が得られるように機能するリン脂質が豊富な混合物である。サーファクタントタンパク質は、気道で排他的に発現するようであり、肺胞II型細胞によって産生される。非新生物性肺では、正常および過形成性肺胞II型細胞ならびにいくつかの非線毛細気管支上皮細胞で前サーファクタントB免疫反応性が検出される。腺がんの60%が強い細胞質免疫反応性を示し、腫瘍細胞の10～50%がほとんど染色された。扁平上皮がんおよび大細胞がんは、前サーファクタントBを染色できなかった。

30

【0200】

サーファクタントアポタンパク質B（SP-B）は、II型肺胞細胞によって分泌されるリン脂質およびタンパク質複合体である、肺サーファクタントを形成する4つの疎水性タンパク質のうちの1つである。肺の扁平上皮がんおよび大細胞がんならびに非肺性腺がんはSP-Bを発現しない。SP-Bは細胞中の細胞質に局在している。

【0201】

SP-Aは、肺胞の呼気終結での虚脱の防止に不可欠な役割を果たす肺サーファクタントタンパク質である。SP-Aは、肺胞上皮細胞（II型肺胞上皮細胞）の固有のマーカーであり、新生物状態でさえも抗原が保存される。SP-Aは、細胞中の細胞質に局在している。

40

【0202】

肺サーファクタントAは、非粘液性気管支肺胞がんの特異的なようであり、粘液型が染色されないのと比較して100%染色される。肺サーファクタントは、肺がんが肺に転移したがんを判別する有用性を潜在的に有する。腫瘍細胞に加えて、非新生物性肺胞上皮細胞もまた、肺サーファクタントAを染色する。肺サーファクタントB染色と同様に、肺サーファクタントAは腺がんと比較的一般的であるが、他のNSCLC型またはSCLC型では一般的ではない。中皮腫は肺サーファクタントAを発現することができず、これにより、肺サーファクタントAは腺がんの中皮腫との間の判別に有用性を有し得るということが示唆される。

【0203】

50

K i - 6 7

K i - 6 7 は、増殖中の正常細胞および新生物細胞で発現し、静止期細胞で下方制御される核タンパク質である。K i - 6 7 は、細胞周期の G 1 期、S 期、G 2 期、および M 期に存在するが、G 0 期には存在しない。一般に増殖マーカーとして使用される。K i - 6 7 は、細胞中の核に局在している。

【 0 2 0 4 】

【表 5】

マーカー	扁平上皮癌	腺癌	大細胞癌	小細胞癌	中皮腫
Glut 1	100.0 ⁺	64.5	80.5	64.0	NDA [*]
Glut 3	17.5	16.0	39.5	9.0	NDA [*]
HERA	100.0	100.0	100.0	NDA	4.5
塩基性FGF	83.0	48.7	50.0	100.0	NDA
テロメラーゼ	82.3	86.3	93.0	66.7	NDA
PCNA	80.0	69.8	87.7	51.0	NDA
CD44v6	79.3	34.8	44.2	0.0	NDA
サイクリンA	79.0	68.0	83.5	97.0	NDA
サイクリンD1	42.7	36.0	62.0	90.0	NDA
肝細胞成長因子／散乱因子	75.5	78.3	100.0	NDA	100.0
MUC-1	55.5	90.0	100.0	100.0	NDA
TTF-1	38.0	76.0	NDA	83.0	NDA
VEGF	61.8	68.3	100.0	43.5	NDA
EGF受容体	63.1	45.6	96.0	頻 度	NDA
nm23	68.0	52.6	83.5	73.5	NDA
Bcl-2	45.5	43.3	42.5	92.0	NDA
pRb発現の喪失	20.1	25.8	35.4	85.3	NDA
トロポモジュリン	66.8	12.2	4.0	0.0	81.0
E-カドヘリン	69.0	85.0	NDA	100.0	0.0
N-カドヘリン	NDA	4.0	NDA	NDA	94.0
MAGE 1	45.0	35.0	NDA	16.5	NDA
MAGE 3	72.0	33.3	NDA	33.5	NDA
MAGE 4	45.5	11.0	NDA	50.0	NDA
核タンパク質 (p120)	68.0	35.0	30.0	NDA	NDA
肺サーファクタントB	0.0	61.5	0.0	NDA	NDA
肺サーファクタントA	12.0	52.9	17.5	20	0.0

+マーカー発現が変化した腫瘍の確率

*利用可能データなし

【 0 2 0 5 】

a. 適切なサイズのマーカーライブラリーの獲得

肺がんに関連するマーカーの適切なサイズのライブラリーを得るために、予備削除ステップが必要であった。文献中で数百を超える肺がんに関連関係を示すマーカーが公知である。文献で同定され、パネル試験に含まれる可能性が評価された候補プローブの一部には、b a x、B c l - 2、c - M E T (H G F r)、C D 4 4 S、C D 4 4 v 4、C D 4 4 v 5、C D 4 4 v 6、c d k 2 キナーゼ、C E A (がん胎児性抗原)、サイクリンA、サイクリンD1 (b c l - 1)、E - カドヘリン、E G F R、E R 関連 (p 2 9)、e r b B - 1、e r b B - 2、F G F - 2 (b F G F)、F O S、G l u t - 1、G l u t - 2、G l u t - 3、G l u t - 4、G l u t - 5、H E R A (M O C - 3 1)、H P V - 1 6、H P V - 1 8、H P V - 3 1、H P V - 3 3、H P V - 5 1、インテグリン V L A 2、

インテグリンVLA3、インテグリンVLA6、JUN、ケラチン、ケラチン7、ケラチン8、ケラチン10、ケラチン13、ケラチン14、ケラチン16、ケラチン17、ケラチン18、ケラチン19、A型ラミンズ（A；C）、B型ラミンズ（B1；B2）、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-4、黒色腫関連抗原クローンNK1/C3、mdm2、mib-1（Ki-67）、ムチン1（MUC-1）、ムチン2（MUC-2）、ムチン3（MUC-3）、ムチン4（MUC-4）、MYC、N-カドヘリン、NCAM（中性細胞接着分子）、nm23、p120、p16、p21、p27、p53、P-カドヘリン、PCNA、網膜芽腫、SP-A、SP-B、テロメラゼ、トロンプモジュリン、甲状腺転写因子1、VEGF、ビメンチン、およびwaf1に対する抗体が含まれる。最初のマーカーリストは、初期がん細胞の検出、異なるがん状態の細胞の判別、および標的がん細胞への標識の位置付けにおけるプローブの明らかな有効性についての最初の評価により文献から削除された。このマーカーリストでは、産生または獲得が困難であり、検出テクノロジー要件が不適切であるか、報告された結果の再現性が低いので実施が困難なマーカーの除去によってさらに削除した。全削除ステップの完了後、27個のマーカーライブラリーを得た。

【0206】

b. プロトコルの至適化およびゴールドスタンダード肺がんサンプルの獲得
パネル獲得前に予備調製ステップも必要であった。適切な標識を含むプローブは、業者から利用可能であった。プローブのプロトコルを、至適な客観的定量検出について分析した。例えば、PCNA濃度が低すぎることが決定された。最初に、PCNAをS809緩衝液で4000倍に希釈した。第2に、S809で3200倍に希釈した。各マーカー用の至適化プロトコルを以下に示す。第2の列は標識「抗体名」であることに留意すべきである。多数の業者がマーカー名で抗体を命名しているので、MOC-31を除いた本リストのプローブをマーカー名によって列挙する。これらの試薬を列挙し得る別の方法は、例えば、抗VEGF、抗トロンプモジュリン、および抗CD44v6などであることに留意すべきである。

【0207】

ゴールドスタンダード組織標本を、UCLAから得た。組織標本を、2つの供給源から得た。ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色スライドの検査および病歴を含む標準的な手順を使用して症例を診断した。病歴および抗体マーカーを病理学者に隠し、患者の秘密を守るために、標本スライドをコード化し、任意に番号を付けた。

【0208】

がん性および非がん性（コントロール）組織由来の組織切片を含む標本スライドを使用した。全部で175種の異なる症例を分析した。この集合内で、表6に示した以下の診断で、以下の頻度を示された。

【0209】

【表6】

	診 断	発症数
癌	腺 癌	25
	大細胞癌	18
	中皮腫	26
	小細胞癌	20
	扁平上皮癌	24
コントロール	気 腫	34
	肉芽腫性疾患	3
	間質性肺癌	25

【0210】

c. 分子マーカーパネルの発現レベルの決定

スライドあたり1つのプローブのみが試験されるように各症例について十分な標本スライドを調製した。一般に、特定の分子マーカーに指向する1つまたは複数の標識プローブに接触させた細胞学的サンプルを含む顕微鏡スライドを調製する。独立して、各病理学者は、H&E染色スライドを試験して各症例を診断し、その後、各プローブ反応性スライドおよび免疫化学的に染色されたスライドを試験してプローブ結合レベルを評価し、結果を正規化データフォームに記録した。

【0211】

より詳細には、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織に対して免疫組織化学的染色を行った。組織切片を、ポリL-リジン被覆スライド上で4ミクロン厚に切断し、室温で一晩乾燥させた。組織切片の脱パラフィン処理および再水和を以下のように行った。標本から全包埋媒質を完全に除去するために、2回連続してスライドをキシレン置換（Histoclear）浴でそれぞれ5分間インキュベートした。スライドを軽くたたいて全液体を除去し、その後2回連続して100%の試薬グレードのアルコールを含む浴でそれぞれ3分間インキュベートした。再度スライドを軽くたたいて過剰な全液体を除去し、最後に2回連続して95%の試薬グレードのアルコールを含む浴でそれぞれ3分間インキュベートした。95%の最後の浴後、スライドを水道水でリンスし、水浴（DAKO Autostainer 洗浄緩衝液、コード番号S3306の10倍希釈物に相当する0.05% Tween 20を含むTris緩衝化整理食塩洗浄緩衝液）に保持した。以下の表7は、対応する製品のコード番号を併記した本研究で使用した試薬の完全なリストを示す。本研究で使用した検出系は、DAKO EnVision+HRPマウス（コード番号K4007）またはウサギ（コード番号K4003）およびLSAB+HRP（コード番号K0690）であった。免疫アッセイのプロトコルは、添付文書に従った。キットは、液体の2つの成分DAB+基質色素原（コード番号K3468）を含んでいた。

10

20

【0212】

【表7】

MonoGen研究で使用した試薬	
試 薬	コード番号
National DiagnosticsのHisto Clear	HS-200
Mallinckrodt試薬無水アルコール	7019-10
DAKO抗体希釈物	S809
DAKOバックグラウンド減少抗体希釈物	S3022
DAKO自動染色緩衝液（10倍）	S3306
DAKO標的修正溶液	S1700
DAKO標的高pH修正溶液	S3307
DAKOプロテイナーゼK	S3020
Rite Aid過酸化水素（3%）	なし
DAKOタンパク質ブロック（無血清）	X0909
DAKOヤギ血清	X0501
DAKOブタ血清	X0901
DAKO EnVision+マウス	K4007
DAKO EnVision+ウサギ	K4003
DAKO LSAB+	K0690
DAKO DAB+	K3468
DAKO ヘマトキシリン	S3302
Dako mount マウティング媒質	S3025
機器類	製造番号
DAKO 自動染色器	3400-6613-03
	3400-6142R-03
自動染色器IHCソフトウェアバージョンV3.0.2	

10

20

30

40

50

【0213】

肺組織に対してこれらの抗体を至適化する前処理は重要である。酵素消化が必要な抗体のために、DAKOプロテイナーゼK（コード番号S3020）を、室温で5分間使用した。熱誘導による標的の修正が必要な抗体は、DAKO標的修正溶液（コード番号S1700）またはDAKO高pH標的修正溶液（コード番号S3307）を使用して前処理した。組織を、予備加熱標的修正溶液に入れ、特定のプロトコルに依存して、95℃の水浴で20～40分間インキュベートした。次いで、組織切片を、さらに20分間室温に冷却した。

【0214】

脱パラフィン処理、再水和、および組織の前処理後、全標本を3%過酸化水素溶液中でインキュベートして内因性ペルオキシダーゼ活性を停止させた。特に2つの抗体FGFおよびテロメラゼのためにブロック試薬を使用して、非特異的バックグラウンドを最小にした。

【0215】

以下の表8に示すように、組織標本を、200μlの至適に希釈した一次抗体と共に一定時間インキュベートした。表8におけるマーカー／抗体の番号は、本明細書を通して抗体プローブおよびマーカーの番号であることを留意すべきである。次いで、スライドをDAKO 1×自動染色緩衝液（コード番号S3306）で洗浄した。抗体に依存して、正確な検出系を提供した。DAKO EnVision+HRPおよびLSAB+HRP検出系のステップおよび全インキュベーション時間を、以下の表9に示す。3, 3' - ジアミ

ノベンジジン（D A B）を使用して呈色反応を行い、反応部位に褐色沈着物が得られた。

【0216】

【表8】

MonoGen肺パネルの抗体									
番号	マーカー	前処理	ブロック	希 釈	一次抗体とのインキュベーション時間	検出系	クローン	業 者	コード番号
1	VEGF	S3307中で高pH TRSと20分間	なし	S809で15倍	30分間	EnV+マウス	JH121	NeoMarkers	MS-350-P
2	トロンボモジュリン	なし	なし	S809で100倍	30分間	EnV+マウス	1009	DAKO	M0617
3	CD44v6	S1700中でTRSと20分間	なし	RTU	30分間	EnV+マウス	VFF-7	NeoMarkers	MS-1093-R7
4	SP-A	なし	なし	S809で200倍	30分間	EnV+マウス	PE10	DAKO	M4501
5	網膜芽腫	S1700中でTRSと40分間	なし	S809で25倍	30分間	EnV+マウス	Rb1	DAKO	M7131
6	E-カドヘリン	S1700中でTRSと20分間	なし	S809で100倍	30分間	EnV+マウス	NCH-38	DAKO	M3612
7	サイクリンA	S1700中でTRSと20分間	なし	S809で25倍	30分間	EnV+マウス	6E6	Novocastra	NCL 117205
8	nm23	S3307中で高pH TRSと20分間	なし	S809で50倍	30分間	EnV+ウサギ	多クローン性	DAKO	A0096
9	テロメラゼ	S1700中でTRSと20分間	ProtブロックX0909の5重量%ヤギ血清X0501溶液で30分間	S809で400倍	一晚	EnV+ウサギ	多クローン性	α 診断	EST21-A
10	Ki-67	S1700中でTRSと40分間	なし	S809で200倍	30分間	EnV+マウス	IVAK-2	DAKO	M7240
11	サイクリンD1	S3307中で高pH TRSと20分間	なし	S3022で200倍	30分間	EnV+マウス	DCS-6	DAKO	M7155
12	PCNA希釈物1	S1700中でTRSと20分間	なし	S809で4000倍	30分間	EnV+マウス	PC10	DAKO	M0878
13	MAGE-1	S3307中で高pH TRSと20分間	なし	S809で250倍	30分間	EnV+マウス	MA454	NeoMarkers	MS 1067
14	ムチン1	S1700中でTRSと20分間	なし	S809で40倍	30分間	EnV+マウス	VU4H5	Santa Cruz Biotech	Sc-7313
15	SP-B	S1700中でTRSと20分間	なし	S809で100倍	30分間	EnV+マウス	SPB02	NeoMarkers	MS-1300-P1
16	HERA	S1700中でTRSと40分間	なし	S809で50倍	30分間	EnV+マウス	MOC-31	DAKO	M3525
17	FGF-2	なし	ProtブロックX0909の5重量%ブタ血清X0501溶液で30分間	S809で50倍	一晚	EnV+マウス	bFM-2	Upstate Biotech	#05-118
18	C-Met	不完全	なし	不完全	不完全	EnV+マウス	8F11	Novocastra	118406
19	TTF-1	S1700中でTRSと40分間	なし	S809で25倍	30分間	EnV+マウス	8G7G3/1	DAKO	M3575
20	Bcl-2	S3307中で高pH TRSと20分間	なし	S809で75倍	30分間	EnV+マウス	124	DAKO	M0887
21	p120	S1700中でTRSと20分間	なし	S809で10倍	30分間	EnV+マウス	FB-2	Biogenex	MU198-UC
22	N-カドヘリン	S1700中でTRSと40分間	なし	S809で75倍	30分間	EnV+マウス	BG4&BG11	DAKO	N/A
23	EGFR	ProtKの25倍希釈物と5分間	なし	S809で500倍	30分間	EnV+マウス	2-18C9	DAKO	K1492
24	Glut1	S1700中でTRSと40分間	なし	S809で200倍	30分間	LSAB+多クローン性	Santa Cruz Biotech	SC 1605	
25	ER関連 (p29)	S1700中でTRSと40分間	なし	S809で200倍	30分間	EnV+マウス	G3,1	Biogenex	MU171-UC
26	Mage3	S1700中でTRSと40分間	なし	S809で20倍	30分間	EnV+マウス	57B	G.Spagnof	N/A
27	Glut3	S1700中でTRSと20分間	なし	S809で80倍	30分間	LSAB+多クローン性	Santa Cruz Biotech	SC 7581	
28	PCNA希釈物2	S1700中でTRSと20分間	なし	S809で200倍	30分間	EnV+マウス	PC10	DAKO	M0879

【0217】

【表9】

MonoGen研究で使した検出系					
工					
程					
1	脱パラフィン処理および再水和				
	Histoclear浴中で各5分間を2回				
	100%アルコール浴中で各3分間を2回				
	95%アルコール浴中で各3分間を2回				
	水でリンス				
2	前処理				
	TRSと40分間または20分間				
	高pH TRSと20分間				
	プロテイナーゼKと5分間				
	水でリンス				
3	過酸化水素によるブロック				
	過酸化水素浴で5分間				
	水でリンス				
	緩衝液で5分間				
	H2O2ブロック後30分間タンパク質をブロック				
4	一次抗体				
	室温で30分間または一晚				
5	検出系				
	EnV+系	標識ポリマー	または	LSAB+系	二次試薬
		30分間			二次抗体と15分間
					三次試薬
					SA-HRPと15分間
6	色素原				
		色素原			色素原
		DAB+と10分間			DAB+と5分間

10

20

30

40

50

【0218】

免疫染色後、全スライドをDAKOヘマトキシリン（コード番号S3302）中で3分間インキュベートし、DAKOMountマウンティング媒質（S3025）を使用してカバースリップを載せた。全プロトコルを、IHCソフトウェアバージョン3.0.2を使用したDAKO自動染色器（製造番号3400-6612-03および3400-6142R-03）にて行った。

【0219】

コントロールが正確に染色され、組織がインタクトであるかどうかを決定するために、光学顕微鏡下で免疫染色を調査した。スライドを標識し、箱詰めし、結果を解釈するために指定された病理学者に送った。訓練された病理学者がサンプル中に見出されるがん型または他の病変を同定した。訓練された病理学者が染色細胞の染色密度および比率の評価によりマーカープローブに対する感度を評価した。これらのスコアを、患者のデータシートに記入した。病理学者は、元の診断を隠して免疫染色で抗体マーカーを使用した。少なくとも2人の病理学者によって各スライドを読み取り、結果をデータ収集フォームに記録した。プロセスをさらに完全にするために、本方法を、第2または第3の病理学者が繰り返す。次いで、得られたスコアを照合してデータ入力エラーを確認することができる。さらなるデータにより、より良好な分類デザインが得られる。

【0220】

それぞれの症例について、27個までのスライドを分析し、それぞれマーカーで染色したものを1～17および19～28の番号でコード化した。マーカー18（C-MET）染色は最適化することができなかったため、マーカー／プローブを使用しなかった。病理学者1は、全175症例由来のスライドを記録した。病理学者2は、99症例由来のスライドを記録した。病理学者3は、80症例由来のスライドを記録した。

【0221】

以下の表10は、各病理学者が記録したスライドの診断数を示す。

【0222】

【表10】

10

	診 断	病理学者1	病理学者2	病理学者3
癌	腺 癌	25	12	14
	大細胞肺癌	18	9	9
	中皮腫	26	14	8
	小細胞肺癌	20	12	6
	扁平上皮癌	24	13	11
コントロール	気 腫	34	23	13
	肉芽腫性疾患	3	3	2
	間質性肺疾患	25	13	17

20

【0223】

いくつかの選択した統計分析技術の目的のために、存在する全27個のスライドを記録した症例のみを考慮する必要がある。以下の表11は、全27スライドからのスコアを有するとの観点から完了している各症例の診断数を示す。

【0224】

【表11】

30

	診 断	病理学者1	病理学者2	病理学者3
癌	腺 癌	14	10	8
	大細胞肺癌	12	9	3
	中皮腫	17	13	3
	小細胞肺癌	7	9	1
	扁平上皮癌	12	13	4
コントロール	気 腫	32	21	1
	肉芽腫性疾患	2	1	0
	間質性肺疾患	23	7	3

40

【0225】

この表から、各病理学者は以下の全症例数を完全に記録したと結論付けることができる。病理学者1は199症例について全27スライドを記録した。病理学者2は83症例について全27スライドを記録した。病理学者3は23症例について全27スライドを記録した。

【0226】

全がんデータポイント数は172である。これは、病理学者1の113データポイントおよび病理学者2の60データポイントを含む。全コントロールデータポイント数は101

50

である。これは、病理学者 1 の 6 2 データポイントおよび病理学者 2 の 3 9 データポイントを含む。

【0 2 2 7】

図 3 は、コントロール組織およびがん性組織におけるプローブ 7 および 1 5 の H スコアの比較を示す。x 軸は H スコアを示し、y 軸は特定の H スコアを有する症例の比率を示す。H スコアの差は明らかである。

【0 2 2 8】

各患者について、診断、細胞染色率、および染色密度と共に患者分類を示すデータベースにスコアを統合する病態調査フォームにスコアを電子的に記入した。比率および密度を、強度を、なし = 0、弱い = 1、中程度 = 2、強い = 3 にランク分けし、細胞の比率を 0 ~ 5 % = 0、6 ~ 2 5 % = 1、2 6 ~ 5 0 % = 2、5 1 ~ 7 5 % = 3、> 7 5 % = 4 にランク分けし、2 つのグレードを掛け合わせる、1 つの「H スコア」に統合した。例えば、5 0 % の弱い染色 + 5 0 % の中程度の染色のスコアは、 $1 0 = 2 \times 2 + 2 \times 3$ である。これは、別のスコアリングシステムを調査した「他の（非 H スコア）客観的スコアリングパラメータの使用効果」というタイトルの以下の第 3（f）節以外分析を通して標準的なスコアリングシステムである。

【0 2 2 9】

標準的な分類手順を使用して、最良のプローブの組み合わせを見出した。典型的には、これらの手順は、識別力試験によってランク分けし、有意性試験によって切り捨てた最良の特徴の階層を見出すための「分岐限定アルゴリズム」などの検索手順を使用する。このプロセスはまた、決定基準または最良の分類基準を定義する。

【0 2 3 0】

これらの特徴を用いてデザインした分類の性能を、分類デザインに使用したデータから評価することができる。全デザインデータの分類への簡単な適用により、性能の評価が非常に矛盾する。

【0 2 3 1】

本実施例で収集したデータの分析により、プローブが最適に選択され、最良にクラス分けされる。したがって、分析に少数のプローブしか必要としないパネルが得られた。しかし、データは、他のプローブの組み合わせを使用して最適に近い性能を得ることができることを示した。したがって、本発明は、費用または消耗品の問題により最良の組み合わせを得ることができないプローブを利用できるように適合可能な柔軟性を有する。いくつかの場合では、本発明を利用可能な特徴に適用して、別の組み合わせを見出すことができる。他の場合では、アルゴリズムを使用して、選択プロセスで費用がかかる特徴を低価格にするように選択することができる。

【0 2 3 2】

データ収集および分析実験のデザインを、データ収集およびデータ分析が独立して行われる十分に確立された二重盲検法によって先入観を回避するように選択した。

【0 2 3 3】

第 1 の場合では、病理学者は、従来の染色を行ったスライドを調査して診断を行った。この診断は、病態調査フォームに記入した。次いで、病理学者は、無作為の順番で、染色細胞の比率および相対染色強度の記録用のためのマーカープローブで染色したスライドを提示した。病理学者がプローブに関する情報を排除するために、スライドに番号を付けた。データを完全にチェックするために、2 人の病理学者が全患者を調査した。

【0 2 3 4】

データをデータベースに統合し、統計学者グループによって調査した。有効性分析の間、作用方法が見えないようにプローブに番号を付けた。

【0 2 3 5】

分析の第 1 段階は、各患者のエントリーの比較によってデータの完全性をチェックすることであった。大きな相違が見出された場合、データエントリーをチェックし、任意の明確なエラーを修正した。説明できない相違をデータに残した。

【0236】

次いで、4人の統計学者が異なる統計方法がデータ中の異なる判別情報型に適合されるという事実の異なる認識技術を使用してデータを個別に分析した。

【0237】

最良のプロープの組み合わせの選択プロセスの第1のステップは、データを2つの集合（一方は分類デザインのための集合であり、他方は分類性能を試験するための集合である）に分けることである。デザイン（トレイン(train))集合を使用して作製したデザインの選択により、試験集合に対して最良の性能が評価されたが、分類法をデータ構造に正規化し、訓練集合で認められた特定の場合に適合されないことを確かに結論付けることができる。

10

【0238】

信頼性を試験するために、典型的には、多数の無作為に選択した訓練データ集合および試験データ集合を使用した分析を繰り返した。このアプローチは、一般に、分類法の性能を評価する良好な評価として受け入れられている。これらの試験によりプロープ選択が一貫していない場合、このようなプロープ選択は信頼できないと報告した。

【0239】

d. 統計分析および／またはパターン認識

1. データ分析への導入

a. 入力データ

i. 生データ

各患者について、診断、細胞染色率、および染色密度と共に患者分類を示すデータベースにスコアを統合する病態調査フォームにスコアを電子的に記入した。

20

【0240】

i i. 計算データ

分析で使用した各プロープのスコアの有効性を、強度／比率表から計算した。比率および密度を、単純な規則 $H = \text{染色比} \times (3 (\text{強い染色の場合}) + 2 (\text{中程度の染色の場合}) + 1 (\text{弱い染色の場合}))$ の1つの「Hスコア」に統合する。これは、このプロープに関連する特徴的な値である。

【0241】

i i i. 別の計算データパラメータ

上記のHスコアは、Hスコアを超える有意な改良を得ることができない比率と強度のより良好な組み合わせ方法を見出すための階層的に分けた単純な分析であった（「他の（非Hスコア）客観的スコアリングパラメータの使用効果」というタイトルの以下の第3（f）節）。大きなデータベースは将来はよりよい基準を抽出し得る。

30

【0242】

i v. ユーザーが供給するマーカーあたりの加重基準

本発明は、費用または消耗品の問題によ

り最良の組み合わせを得ることができない特徴を利用できるように適合可能な柔軟性を有する。例えば、本発明は、本発明を利用可能な特徴に単純に適用して、別の組み合わせを見出すことができる。あるいは、アルゴリズムを使用して、選択プロセスで費用がかかる特徴を最低の価格にするように選択することができる。マーカー性能の評価は、全マーカー収集または1つの業者のみからのマーカーから選択した組み合わせを示す。これはまた、どのようにしてC4.5パッケージを使用して一定のプロープの高い費用を基本とした加重を下げるのかということを示す。これらのプロープの組み合わせは至適な組み合わせと同様に行われえないが、性能は、費用が有意な要因である環境下で受け入れられるであろう。

40

【0243】

v. ユーザーが提供したクラスあたりの加重基準

使用したいいくつかの方法は、クラスに加重を適用することが可能である。これは、意思決定樹が費用を至適化することができるC4.5で利用可能である。判別関数法により、所

50

望の偽陽性または偽陰性の確率を得るために使用することができる1つのパラメータが出力される。異なる閾値設定のためのこれらのパラメータのプロットは、受信者動作特性（ROC）曲線として公知である。

【0244】

v i . 検出パネルー仮説

偽陰性の確率が低いことは、所望のがん検出プロセスに望ましい（再スクリーニングが必要な偽陽性数増加による費用で陽性患者の見落としが回避されるため）。がん判別プロセスは偽陽性スコアが低いことが必要である（誤った治療を受ける患者を最小にするため）ことが予想される。

【0245】

許容可能な性能を達成するために6個またはそれ以上のプローブを必要とする検出パネルは費用効果が高くないことが予想された。偽陰性エラー率が5%を超える検出パネルは許容できないこともまた予想された。このボックス外に除外されるパネルは受け入れられない。この予想により、サイトメトリーパネルが本明細書中で分析した組織学ベースのパネルよりも性能が悪い可能性があることが認められる。最終目標は、エラー率が20%未満のサイトメトリーパネルであり、これは、子宮頸部PAP塗抹標本スクリーニングの性能とほぼ同等である。

【0246】

v i i . 判別パネルー仮説

6個またはそれ以上のプローブを必要とするパネルは費用効果が高くなく、20%未満のエラー率が必要であることが予想される。このボックス外に除外されるパネルは受け入れられない。

【0247】

b . 出力データ

本発明の分析によって得られる出力は、どのようにして試験集合由来のデータが真の陽性、偽陽性、真の陰性、または偽陰性に分類されるかを示す混同行列を含んでいた。これらは、実数および比率で示すことができる。混同行列は、「性能行列」というタイトルの第2（d）節で考察されている。混同行列は、どのようにして試験集合由来のデータを、真の陽性、偽陽性、真の陰性、または偽陰性に分類するのかということを示す。腺がん、扁平上皮がん、大細胞がん、中皮腫、および小細胞がんの同時判別のための意思決定樹図によって分析されたデータから得た混同行列の例を、以下の表12に示す。

【0248】

【表12】

	腺 癌	扁平上皮癌	大細胞癌	中皮腫	小細胞癌
腺 癌	67.74%	6.45%	19.40%	0.00%	6.45%
扁平上皮癌	2.94%	76.47%	11.67%	0.00%	8.82%
大細胞癌	28.00%	8.00%	44.00%	8.00%	12.00%
中皮腫	0.00%	25.64%	51.28%	89.74%	2.56%
小細胞癌	0.00%	3.85%	23.08%	3.85%	69.23%

【0249】

・全偽分類の合計を得られた全分類数で割った混同行列中にデータをまとめたエラー率（%で示す）。

・受信者動作特性（ROC）曲線は、分類中の異なる閾値レベルについての偽陽性スコアおよび偽陰性スコアの比率（または単位確率あたり）の評価を示す。無作為選択よりも良好に判別することができない無関係の分類は、真および偽が等しく読み取られるROC曲線を示す。この曲線以下の領域は、50%である（確率0.5）。

・曲線下面積（AUC）は、分類性能の全体的評価としてしばしば使用され、および最も

10

20

30

40

50

標準的な判別機能はこのAUC図を提供する。完全な分類の曲線下面積は100%であり、有用性のない分類のAUCは50%付近(0.5)である。

・感度および特異性(は混同行列に由来し得る)。「感度および特性」というタイトルの第2(d)(iii)節を参照のこと。

・マーカー相関行列。図4を参照のこと。

【0250】

i. 検出パネル：組成

これらのパネルは、2つのクラス(5つのがんのいずれかの患者およびがんを罹患していない患者)に分類したデータに注目している。全てのプローブが全患者に存在するわけではない。特定の分析用の1つまたは複数のプローブを欠く場合、これらの症例をデータからははずす。したがって、分析されるプローブ数が減少する場合のために、データ集合はわずかに多い症例数を含み得る。

10

【0251】

分析に含まれるプローブ数は27である。多くの場合、偽プローブが付加されるにもかかわらず、このプローブのために入力したデータは0と12との間の範囲で乱数を一様に生成する乱数生成子集合に由来する。この偽プローブを、プローブ選択プロセスを確実に完全にするために初期分析の多くに含ませた。この偽プローブをあるアプローチで使用して、分析由来のプローブを段階的に排除した。偽プローブよりも情報が乏しいプローブを容易に同定して選択プロセスから排除することができる。このようなプローブの初期排除は分析を迅速にし、これらのプローブによって得られた分析結果(ノイズ)によるばらつきを減少させる。

20

【0252】

ii. 検出パネルの性能

この研究からのアウトプットとして、異なる方法によって選択したプローブの組み合わせおよび混同行列の関する性能評価、%エラー率、およびAUCを報告する。

【0253】

iii. 検出パネル別の組成

検出パネルを、減少したプローブ集合からも選択した。あるパネル集合では、商業的に好ましいマーカーに加重したパネルの性能基準を得た。判別プローブの新規の組み合わせを見出すために分析から最良のプローブが得られた場合に得られる性能も分析した。それ自体に対して作用する単一のプローブの性能は、非常に高いことが見出された(プローブ7)。しかし、線形判別分析を使用して評価した以下の性能図(表13)に示すように、より多くのマーカーが吹かされたので性能が改良された。プローブの最良の部分集合を、最良部分集合ロジスティック回帰を使用して決定した。改良は、統計的に有意である。

30

【0254】

【表13】

プローブ7

	癌	コントロール
癌	87.93%	12.07%
コントロール	0.00%	100.00%

プローブ7および16

	癌	コントロール
癌	93.10%	6.90%
コントロール	1.16%	98.84%

プローブ7、15および16

	癌	コントロール
癌	90.52%	9.48%
コントロール	1.16%	98.84%

プローブ1、7、15および16

	癌	コントロール
癌	90.52%	9.48%
コントロール	0.00%	100.0%

プローブ1、4、7、15および16

	癌	コントロール
癌	92.24%	7.76%
コントロール	1.16%	98.84%

10

20

30

40

50

【0255】

(最良部分集合ロジック回帰を使用して決定し、) ロジスティック回帰を使用して評価した最良および二番目に最良のプローブの部分集合を以下に示す。AUC = ROC曲線下面積。平均AUCは、無作為な訓練および試験区分(70% : 30%)に対する100回の試験の平均であることを留意すべきである。結果を、以下の表14に示す。

【0256】

【表14】

プローブ	平均AUC
7	94.28
28	80.14
7,16	95
7,15	94.59
7,15,16	95.94
1,7,16	95.33
1,7,15,16	95.61
4,7,15,16	95.34
1,4,7,15,16	95.3
1,7,11,15,16	95.57

【0257】

i v. 判別パネルー組成

この研究のために、5つの分類をデザインおよび試験し、それぞれ全がん患者由来の1つのがんの存在を検出するようにデザインされている。この5つの2つ一組の系の適用により、1回を超える分析で疾患の疑いあるかまたは全くないかがわかる。このような症例を同定し、より精密な検査に供し、再試験するか別の試験レジメに供することができる。

【0258】

さらに、本研究におけるプローブ数は27であり、分析数を減少させるために初期段階で偽プローブを使用した。

【0259】

v. 判別パネルー性能

上記の性能の評価を使用して、異なる技術によって発見された最良のプローブの組み合わせの性能を示した。

【0260】

vi. 判別パネルー別の組み合わせ

商業的に好ましいプローブを含むプローブの組み合わせについて分析を繰り返した。性能は低下したが、いくつかの集合が減少した分類に使用不可能ではなかった。以下のプローブ7を含まないプローブの最良の部分集合（最良の部分集合ロジスティック回帰を使用して決定）を、表15に示す。線形判別分析を使用して、データを評価した。

【0261】

【表15】

プローブ28

	癌	コントロール
癌	0.706897	0.293103
コントロール	0.093023	0.906977

プローブ10および28

	癌	コントロール
癌	0.793103	0.206897
コントロール	0.034884	0.965116

プローブ10、15および28

	癌	コントロール
癌	0.810345	0.189655
コントロール	0.011628	0.988372

プローブ1、10、15および28

	癌	コントロール
癌	0.827586	0.172414
コントロール	0.011628	0.988372

プローブ1、10、15、16および28

	癌	コントロール
癌	0.827586	0.172414
コントロール	0.011628	0.988372

【0262】

（最良部分集合ロジスティック回帰を使用して決定し、）ロジスティック回帰を使用して評価した最良および二番目に最良のプローブ7の部分集合を以下に示す。AUC = ROC曲線下面積。平均AUCは、無作為な訓練および試験区分（70%：30%）に対する100回の試験の平均であることに留意すべきである。結果を、以下の表16に示す。

【0263】

【表16】

10

20

30

40

プローブ	平均AUC
28	79.36%
10	82.28%
10,28	94.21%
15,28	88.68%
10,15,28	92.90%
1,10,28	93.59%
1,10,15,28	92.99%
8,10,15,28	93.20%
1,10,15,16,28	93.13%
1,8,10,15,28	93.57%

10

【0264】

2. データ分析法

この節では、使用した異なる方法由来の結果の解釈のガイドとしてのデータ構造の最初の理解を得るプロセスを記載する。

【0265】

a. ばらつきの分析

20

i. 病理学者による変動性および病理学者のスコアのプール

(1) t 検定

本臨床試験において、各患者のスライドを2人の病理学者が調査した。病理学者1は全患者を調査し、病理学者2もまたこの集団の約半分を調査し、病理学者3は残りを調査した。2つの独立したHスコアでの評価を使用して、病理学者の性能の一貫性を試験することができる。

【0266】

容易に利用可能な統計ツールを使用して、病理学者による変動性を試験した。これは、ペアードサンプルt検定である。この検定は、推定値の各対の差をとり、これらを平均し、これを全分散の比として示す。次いで、t検定により、この比を確率に変換し、2つのサンプル集合が同一集団に由来する尤度を評価する（P値）。

30

【0267】

この検定を、病理学者1および病理学者2によって調査された全症例ならびに病理学者1および病理学者3によって調査された全症例について各マーカープローブのスコアに適用した。27検定を適用したので（全プローブを網羅している）、「有意な閾値」として低い値（ $P=0.01$ ）を選択した。各プローブおよび病理学者の2つの対についてのPスコアを示す結果を、表17、18、19、および20に示す。病理学者1および病理学者2は、病理学者1および病理学者3よりも一貫していることが明らかである。

【0268】

【表17】

40

病理学者 1、病理学者 2 は以下のように記録した。

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
0.5875446	0.01051847	0.4659704	0.4659704	0.3772894	0.2307273	0.01001357

X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
0.004131056	0.7703014	0.1640003	0.2374452	0.9580652	0.1587876	0.001200265

X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
0.19742	0.3860899	0.3829022	NA	0.544601	0.08873848	0.1686243

X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
0.5428451	0.1912477	0.4031977	0.2477236	0.5673386	0.9174037	0.00339071

10

【 0 2 6 9 】

【 表 1 8 】

病理学者 1、病理学者 2 は閾値を 0. 0 1 ($\alpha = 1\%$ の有意水準) とした。

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
真	真	真	真	真	真	真

20

X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
偽	真	真	真	真	真	偽

X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
真	真	真	NA	真	真	真

X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
真	真	真	真	真	真	偽

30

【 0 2 7 0 】

【 表 1 9 】

病理学者 2 および病理学者 3 は以下のように記録した。

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
3.814506e-09	0.0399131	0.1954867	5.671062e-05	0.010856276	0.2757166	0.2292583

X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
2.044038e-12	0.004166467	0.00983267	0.003710155	0.01461007	0.03312421	0.0003367823

40

X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
0.0005162036	0.2276537	0.002987705		4.267708e-06	0.007287372	0.1654067

X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
0.02400127	0.0009497766	2.478456e-07	0.1591684	0.08318303	3.122143e-05	1

【 0 2 7 1 】

50

【表 2 0】

病理学者 1、病理学者 3 は閾値を 0.01 ($\alpha = 1\%$ の有意水準) とした。

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
偽	真	偽	偽	真	真	真

X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
偽	偽	偽	偽	真	真	偽

X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
偽	真	偽	偽	偽	偽	真

X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
真	偽	偽	真	真	偽	真

10

【0272】

Hスコアは主観的であるので、境界の場合に因数を差およびノイズとする傾向がある。従って、病理学者 1 と病理学者 2 との間で統計的にスコアが異なる 3 つの特徴が存在するにもかかわらず、この同時データは、計測器の典型として受け入れた。病理学者 1 および病理学者 2 は、分析プロセスのために 1 つのデータ集合に組み合わせた。病理学者 3 の結果は、独立した試験目的を控えた。病理学者 3 のデータを使用したこのような試験は先入観にとらわれており、有意差のために標準以下の性能を示す。

20

【0273】

病理学者 1 および病理学者 2 由来のデータを、これらのデータを個別の例として考慮することによって変動性と組み合わせて、任意の 1 つの例の結果との間の独立度を得た。このようなデータを試験する場合、性能の推定値はより楽観的な値に偏る。これは、同一の患者由来のサンプルが試験部分集団の訓練で同時に得ることができるためである。しかし、これにより特徴の最良の組み合わせを見出すために使用したプロセスを無効にされず、性能の推定値が偏っているにすぎない。

30

【0274】

(2) Hスコアの分散分析

(2) バックグラウンド

各プローブ内で、Hスコアは、多数の理由によって変化し得る。疾患型によって常に変化する範囲でこれは有用であり、病理学者がスライドを読むことによる変動は有益である一方で、無作為の変動により、以前の 2 つの変動元の検出を制限する。

【0275】

分散分析 (ANOVA) は、データ中の変動元を分割し、その統計的有意性を試験する標準的な技術である。ANOVA は、変動の特定の源または原因に寄与し得る項の合計としてデータ集合の全変動をまとめる。

40

【0276】

ANOVA は、多数の統計パッケージで利用可能である。公的なドメインパッケージ「R」を選択した (「統計計算のための R プロジェクト」、<http://www.R-project.org/>)。

【0277】

(b) 目的

病理学者 1 および 2 による Hスコアデータに対して ANOVA 分析を行い、さらなるパネル分析のためにこのデータを 1 つの一貫した集合に安全に融合することができるかどうかを判断するため。

【0278】

50

(c) 方法

データベースから、病理学者1および2によるデータを選択した。所与のプロープについて完全なデータのみを、このプロープについてANOVAで使用した。

【0279】

気腫、肉芽腫性疾患、および間質性肺疾患のコントロールカテゴリーを共にグループ化して「正常」と呼び、因子疾患内で6つのレベルを示す。

【0280】

病理学者を、2つのレベルを有する因子としてコード化した（病理学者1、病理学者2）。

【0281】

因数：Disease、Pathologist、および相互作用項Disease：Pathologistを使用して、各プロープの標準的なANOVA分析を行うためのRスクリプトを作成する。結果を以下の表21に示す。「Df」は、自由度と定義する。n観測のデータベースでは、平均からn-1偏差が求められ、nthが自動的に決定される。n-1は、自由度数である。合計Sqおよび平均Sqは、変動の基準である。FはF分布に基づいた2つの分散の質に関する検定統計量である。Pr(>F)は、変動性が統計的に有利であるかどうかを決定するために使用される確率である。

【0282】

【表21-A】

Hスコアの分散分析

プローブ1

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	443.56	88.71	15.8202	3.690e-13	***
病理学者	1	0.66	0.66	0.1174	0.7323	
疾患：病理学 者	5	15.34	3.07	0.5470	0.7405	
残り	204	1143.93	5.61			

有意性コード: 0'***' 0.001 '***' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 "1						

10

プローブ2

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	1067.39	213.48	24.1234	<2e-16	***
病理学者	1	13.02	13.02	1.4709	0.2263	
疾患：病理学 者	5	27.98	5.60	0.6324	0.6752	
残り	249	2203.50	8.85			

有意性コード: 0'***' 0.001 '***' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 "1						

20

プローブ3

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	1098.49	219.70	21.0751	<2e-16	***
病理学者	1	6.73	6.73	0.6458	0.4224	
疾患：病理学 者	5	29.72	5.94	0.5703	0.7227	
残り	243	2533.16	10.42			

有意性コード: 0'***' 0.001 '***' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 "1						

30

プローブ4

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	631.8	126.4	9.3707	3.454e-08	***
病理学者	1	6.6	6.6	0.4869	0.4860	
疾患：病理学 者	5	13.1	2.6	0.1939	0.9647	
残り	246	3317.1	13.5			

有意性コード: 0'***' 0.001 '***' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 "1						

40

【 0 2 8 3 】

【 表 2 1 - B 】

プロープ5

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	754.30	150.86	25.2826	<2e-16	***
病理学者	1	14.25	14.25	2.3875	0.1236	
疾患：病理学 者	5	7.54	1.51	0.2528	0.9381	
残り	248	1479.80	5.97			

有意性コード: 0 ^{****} 0.001 ^{***} 0.01 ^{**} 0.05 [*] 0.1 ^{''} 1						

10

プロープ6

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	721.91	144.38	11.8515	2.771e-10	***
病理学者	1	1.91	1.91	0.1568	0.6925	
疾患：病理学 者	5	47.82	9.56	0.7850	0.5613	
残り	246	2996.93	12.18			

有意性コード: 0 ^{***} 0.001 ^{***} 0.01 ^{**} 0.05 [*] 0.1 ^{''} 1						

20

プロープ7

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	1171.47	234.29	77.6802	<2e-16	***
病理学者	1	8.84	8.84	2.9294	0.08847	
疾患：病理学 者	5	46.36	9.27	3.0742	0.0	
残り	209	630.37	3.02		1063	*

有意性コード: 0 ^{****} 0.001 ^{***} 0.01 ^{**} 0.05 [*] 0.1 ^{''} 1						

30

プロープ8

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	209.82	41.96	6.4352	1.201e-05	***
病理学者	1	12.66	12.66	1.9407	0.16483	
疾患：病理学 者	5	71.20	14.24	2.1838	0.05654	
残り	251	1636.76	6.52			

有意性コード: 0 ^{****} 0.001 ^{***} 0.01 ^{**} 0.05 [*] 0.1 ^{''} 1						

40

【 0 2 8 4 】

【 表 2 1 - C 】

プローブ9

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	197.21	39.44	8.4348	2.015e-07	***
病理学者	1	7.33	7.33	1.5681	0.2116	
疾患：病理学 者	5	24.56	4.91	1.0505	0.3884	
残り	265	1239.17	4.68			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

10

プローブ10

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	1113.46	222.69	39.0730	<2e-16	***
病理学者	1	1.01	1.01	0.1778	0.67371	
疾患：病理学 者	5	62.45	12.49	2.1916	0.05635	
残り	213	1213.96	5.70			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

20

プローブ11

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	320.15	64.03	9.5553	2.416e-08	***
病理学者	1	1.28	1.28	0.1918	0.6618	
疾患：病理学 者	5	10.04	2.01	0.2996	0.9128	
残り	245	1641.76	6.70			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

30

プローブ12

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	832.26	166.45	27.8793	<2e-16	***
病理学者	1	0.18	0.18	0.0307	0.8610	
疾患：病理学 者	5	15.16	3.03	0.5079	0.7701	
残り	248	1480.68	5.97			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

40

【 0 2 8 5 】

【表 2 1 - D】

プローブ13

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	46.594	9.319	7.8408	8.674e-07	***
病理学者	1	0.044	0.044	0.0368	0.8481	
疾患：病理学 者	5	10.143	2.029	1.7069	0.1343	
残り	210	249.584	1.188			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

10

プローブ14

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	1305.69	261.14	23.9460	<2e-16	***
病理学者	1	28.66	28.66	2.6279	0.10630	
疾患：病理学 者	5	142.90	28.58	2.6208	0.02492	*
残り	243	2649.98	10.91			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

20

プローブ15

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	401.02	80.20	21.268	<2e-16	***
病理学者	1	13.17	13.17	3.493	0.0630	
疾患：病理学 者	5	6.17	1.23	0.327	0.8963	
残り	214	807.02	3.77			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

30

プローブ16

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	2520.26	504.05	65.5572	<2e-16	***
病理学者	1	0.15	0.15	0.0194	0.8892	
疾患：病理学 者	5	24.29	4.86	0.6318	0.6757	
残り	247	1899.12	7.69			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

40

【 0 2 8 6 】

【表 2 1 - E】

プローブ17

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	530.64	106.13	13.0178	2.426e-11	***
病理学者	1	8.42	8.42	1.0325	0.31050	
疾患：病理学 者	5	109.96	21.99	2.6975	0.02131	*
残り	266	2168.55	8.15			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

10

プローブ19

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	1670.86	334.17	29.1960	<2e-16	***
病理学者	1	2.17	2.17	0.1895	0.6637	
疾患：病理学 者	5	32.61	6.52	0.5698	0.7231	
残り	248	2838.56	11.45			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

20

プローブ20

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	964.71	192.94	34.2760	<2e-16	***
病理学者	1	8.83	8.83	1.5687	0.2116	
疾患：病理学 者	5	19.60	3.92	0.6963	0.6267	
残り	245	1379.12	5.63			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

30

プローブ21

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	6.927	1.385	2.0604	0.07076	
病理学者	1	0.464	0.464	0.6906	0.40670	
疾患：病理学 者	5	1.576	0.315	0.4687	0.79945	
残り	263	176.830	0.672			

有意性コード: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' ' 0.1 " 1						

40

【 0 2 8 7 】

【 表 2 1 - F 】

プローブ22					
	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)
疾 患	5	640.16	128.03	31.7250	<2e-16 ***
病理学者	1	1.64	1.64	0.4058	0.5247
疾患：病理学 者	5	18.78	3.76	0.9305	0.4617
残り	247	996.81	4.04		

有意性コード: 0'****' 0.001 '***' 0.01 '***' 0.05 '***' 0.1 '***' 1					

10

プローブ23					
	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)
疾 患	5	1915.62	383.12	46.5565	<2e-16 ***
病理学者	1	10.77	10.77	1.3092	0.2537
疾患：病理学 者	5	20.92	4.18	0.5084	0.7698
残り	246	2024.39	8.23		

有意性コード: 0'****' 0.001 '***' 0.01 '***' 0.05 '***' 0.1 '***' 1					

20

プローブ24					
	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)
疾 患	5	516.06	103.21	24.0786	<2e-16 ***
病理学者	1	9.52	9.52	2.2210	0.1376
疾患：病理学 者	5	12.48	2.50	0.5823	0.7135
残り	216	925.87	4.29		

有意性コード: 0'****' 0.001 '***' 0.01 '***' 0.05 '***' 0.1 '***' 1					

30

プローブ25					
	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)
疾 患	5	1761.26	352.25	34.5245	<2e-16 ***
病理学者	1	11.51	11.51	1.1285	0.2891
疾患：病理学 者	5	41.49	8.30	0.8134	0.5411
残り	248	2530.33	10.20		

有意性コード: 0'****' 0.001 '***' 0.01 '***' 0.05 '***' 0.1 '***' 1					

40

【0 2 8 8】

【表 2 1 - G】

プローブ26

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	399.85	79.97	13.6548	1.428e-11	***
病理学者	1	0.30	0.30	0.0517	0.8204	
疾患：病理学 者	5	14.81	2.96	0.5056	0.7719	
残り	214	1253.31	5.86			

有意性コード: 0'****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 "1						

10

プローブ27

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	117.92	23.58	6.2551	1.956e-05	***
病理学者	1	0.64	0.64	0.1695	0.6810	
疾患：病理学 者	5	25.52	5.10	1.3539	0.2431	
残り	212	799.31	3.77			

有意性コード: 0'****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 "1						

20

プローブ28

	Df	合計Sq	平均Sq	F値	Pr (>F)	
疾 患	5	1634.60	326.92	38.171	<2e-16	***
病理学者	1	8.40	8.40	0.981	0.3229	
疾患：病理学 者	5	16.15	3.23	0.377	0.8643	
残り	267	2286.76	8.56			

有意性コード: 0'****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 "1						

30

【0289】

(d) 分析結果

全症例（プローブ21を除く）では、プローブの反応を疾患に関連していた。プローブはおそらくこの目的で選択されているので、これは驚くべきことではない。病理学者に関連するプローブが反応する症例は存在しない（ $p = 0.05$ レベルで）。これは、このデータの融合が安全であり、データに対する2つの基準として2人の病理学者を使用することを示す。

【0290】

いくつかの症例（プローブ7、14、17）で、有意性が上昇する相互作用項についていくつかの証拠が存在する。これは、いくつかの疾患のスコアリングで病理学者間で幾らか相違が存在し得ることを示す。これらの症例のいくつかは、おそらく偶然の外れ値であろう。

40

【0291】

(e) 結論

結果は、さらなる分析のためにこのデータを融合することは安全であることを示す。データは、いくつかの症例での病理学者と疾患との間のわずかな相互作用がランダムソースを寄与するようであることを示す。

【0292】

50

i i . 患者による変動性

患者による変動性を、2 (a) (i) (2) 節の患者による変動性によって測定した（上記の「Hスコアの分散分析」を参照のこと）。

【0293】

i i i . マーカーによる変動性

コントロール対がんについての各プローブのマーカースコアの分布を示すヒストグラムをプロットした（PathologistData.xls、ワークシート：ヒストグラム）。

【0294】

b . マーカー相関行列分析

母相関係数（「応用多変数統計分析」、R. A. Johnson and D. W. Wichern、第2版、1988、Prentice-Hall、N. J.）は、確率変数対の間の一次関数的関連量を評価する。典型的には、確率変数の分布および関連するパラメータは未知であり、母相関係数を直接計算できない。この場合、標本データから標本相関係数を計算することが可能である。図4を参照のこと。しかし、標本相関係数は、唯一の母相関係数の推定値である。さらに、標本データに基づいて計算されるので、対応する確率変数間の関係が実際に存在し得ない場合に強い正相関および逆相関を示し得ることが全く偶然に可能である（「現代初歩統計学」、J. E. Freund、第6版、1984、Prentice-Hall、N. J.）。

10

【0295】

相関係数は、ある変数の他の変数を予想する能力を評価する。しかし、強力な一次関数的関連が因果関係を意味しない。相関関数の二乗は、決定係数と呼ばれる。二変数データ集合について計算した決定係数は、他の変数に対する一次関数的関係によって説明することができるある変数の変動率を評価する。いくつかの変数を扱う場合、各対について相関係数を計算することができ、その後係数集合を、相関行列と呼ばれる行列として記載することができる。図4を参照のこと。

20

【0296】

各マーカーのHスコアを、確率変数としてモデリングすることができる。この多変量データ集合の標本相関行列を、上記の「入力データ」節に記載の入力データから計算することができる。

30

【0297】

c . パターン認識

統計パターン認識は、定量的測定に基づいてシグナルまたは幾何学的オブジェクト（特徴と呼ばれる）を分類するアプローチである。統計パターン認識により、本質的に、n次元の特徴空間を目的のカテゴリまたはクラスに対応する領域に分類する問題を減少させる。

【0298】

本研究で使用した三次元分類法は、データ内の異なる構造形態に対して感度が高い。

【0299】

意思決定樹法のために、異なるデータの組み合わせの予備分析により、検出パネルのためにC4.5によって決して使用されないマーカーを同定した。これらを分析から除去し、これにより、選択プロセスに対するノイズのみに寄与する疎外プローブを示すより一貫した結果が得られる。

40

【0300】

同様に、検出パネルで使用したプローブの予備分析により、詳細な分析前に除去されるノイズプローブを同定した。

【0301】

SPSSにおける線形判別関数法は、分析におけるマーカー数を減少させるための組み込まれた段階的プロセスを有する。典型的には、これにより、分析で使用されるプローブが2個と7個との間に減少した。

50

【0302】

RおよびSASでのロジスティック回帰法は、変数選択のための段階的手順を実行する。SASでは、最良の部分集合の変数選択オプションもまた提供する。Rでは、回数の基づく変数選択のための発見的方法を開発するために複数の無作為検定と組み合わせた段階的方法を使用し、100個の訓練および検定データの無作為選択において所与の特徴を使用した（それぞれ分割70%：30%）。100を超える特徴の最小一致集合が得られるまで、人為的無作為特徴の度数に匹敵する度数を含む特徴を漸増的に排除した。

【0303】

i. 統計学的方法

複数の統計学的分析の観点から、高次空間中の密度関数の評価（およびこの空間の目的の領域への分割）が問題である。無作為（特徴）ベクターの分布が既知であると仮定すると、分類エラーの確率を最小にするので、理論的に最良の分類はベイズの分類である（K. Fukunaga、「統計的パターン認識」、第2版、Academic Press、1990、3頁）。不運なことに、特に特徴空間の次元が高い場合に複雑であるので、ベイズの分類の実行は困難である。実際、より単純な助変数分類を使用する。助変数分類は、基本的な密度または判別関数に関する仮定に基づく。最も一般的なこのような分類は、線形および二次分類である。多変量統計分析では、このような分類は判別分析に分類される。判別分析技術は、多変量線形回帰モデルおよび一般化線形モデル（ロジスティック回帰および多項回帰に含まれる）に密接に関連する。

【0304】

(1) 二項反応を使用したロジスティック回帰

(a) バックグラウンド

検出パネルで使用されるマーカー集合選択における問題を、二項反応を使用したロジスティック回帰問題として説明することができる。反応変数は、以下の2つのレベルの因数である。正常（がんなし）および異常（がんあり）。説明変数は、マーカーHスコアである。

【0305】

がん判別パネルで使用されるマーカー集合選択における問題を、二項反応を使用したロジスティック回帰問題として説明することができる。反応変数は、以下の2つのレベルの因数である。正常（目的のがんなし）および異常（目的のがんあり）。説明変数は、マーカーHスコアである。

【0306】

段階的変数選択を使用して、2つのクラスの判別に使用するための元の変数（マーカー）の部分集団を選択することができる。これはコンピュータを使用した高価な動作試験であり、コンピュータに最良に適する。いくつかの市販および公的なドメインソフトウェアパッケージ（例えば、R、S-plus、およびSAS）は、段階的ロジスティック回帰を実行する。

【0307】

それぞれRおよびSASで見出された段階的変数選択手順に基づいて、特徴選択に対する2つの異なるアプローチを調査した。

【0308】

(b) 実験データ

本発明の分析で使用したデータは、病理学者1および病理学者2によって試験され、本報告のいずれかに記載されている症例についてのマーカー1～17および19～28のHスコアからなる。さらに、ダミーマーカー18をデータ集合に付加した。ダミーマーカーは、均一な分布から無作為に選択した0～12の整数からなる。

【0309】

(c) 方法1：Rパッケージ（バージョン1.4.1）の使用

コンピュータ制御のモデル適合手順は、一般に、失われたデータを取り扱うことができない。これは、Rで使用されるglm（一般化線形モデルのためのglmスタンド）の場合

10

20

30

40

50

である。したがって、glmを使用してモデルを適合させた場合、1つまたは複数の失われた値が存在する全ての症例を排除する必要がある。初期の完全モデルを適合する場合、27個の真のマーカーおよび1つのダミーマーカーを含み、これによりデータ集合は202症例に減少する。観測値があまりにも少ないので、変数選択を行い、選択した変数を使用して分類を訓練し、その性能を評価するための最良の方法は、データの訓練集団および検定集団への無作為分割に対して100回検定を行うことであることを決定した。

【0310】

(i) データの訓練集団および検定集団への分割

各検定の開始時に、データを検定集団および訓練集団に分割する。検定集団を形成するために30%の異常および30%の正常を無作為に選択し、訓練集合を形成するために残りの観測値を使用することによってこれを行う。 10

【0311】

(ii) 変数（マーカー）選択

各検定の開始時に、全変数（マーカー）を含む完全モデルを、訓練データに適合させる。Rでは、glmを使用してロジスティック回帰モデルを適合する。使用したコードフラグメントを以下に示す。

【0312】

```
my.model <- Class ~ X1 + X2 + X2 + X3 + X4 + X5 + X6 + X7 +  
X8 + X9 + X10 + X11 + X12 + X13 + X14 + X15 + X16 + X17 + X1  
8 + X19 + X20 + X21 + X22 + X23 + X24 + X25 + X26 + X27 + X2 20  
8
```

【0313】

```
my.glm <- (my.model, family = binomial(link = l  
ogit), data = training.data)
```

【0314】

次いで、手順stepAICを使用して、赤池情報量基準（AIC）に基づいた段階的変数選択を行う。この手順は、公的に利用可能なMASSライブラリーの一部である。このライブラリーおよび手順は、「S-PLUSを使用した現代応用統計学」（W. N. Venables and B. D. Ripley, Springer-Verlag, Pathologist, New York, 1999）に記載されている。これを行うためのRコードフラグメントを以下に示す。 30

【0315】

```
my.step <- stepAIC(my.glm, direction = both)
```

【0316】

次いで、得られたモデルを、検定データに関して評価した。使用したコードフラグメントを以下に示す。

【0317】

```
probability_is_abnormal <-  
predict(my.step, testing.data, type = *respo  
nse*) 40
```

【0318】

分類の性能を、誤分類の実際のエラー率（AER）およびROC曲線下領域（AUC）に関して記録する。100回の検定後、100個のモデルおよびその関連するAERおよびAUCが残存する。度数分布表を構築し、100個のモデルの外観を作製した各変数の回数を記録する。例を、表22に示す。

【0319】

【表22】

変 数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	14
頻 度	2	6	4	1	4	16	100	40	3	10	43	1
変 数	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25	28	
頻 度	4	28	2	1	3	2	2	18	10	84	4	

【0320】

この表を使用して、マーカーを破棄するかどうかを決定する。第1に、10以下の頻度の全マーカーを破棄する。次に、ダミーマーカーの頻度に基づいてカットオフ頻度を選択する（典型的には、これはダミーマーカーの1または1.5倍）。このカットオフ値未満の頻度の全マーカーを破棄する。次いで、ダミーマーカーを含む残りのマーカーを、別の100回の検定の完全モデルとして使用し、削除プロセスを繰り返す。必要ならば、モデルから1つまたは複数のマーカーを排除するために、削除の厳格さを増加させることができる。必要ならば、残りのマーカーをさらに別の100回の検定の完全モデルとして使用することができる。所望のパネルメンバー数に達した場合または現在のモデルの平均AUC前のモデルの平均AUCよりも低い場合に、排除をやめる。

10

【0321】

排除プロセスを例示するために、上記の表を考慮する。検出パネルデータを使用して、表を得た。影をつけた入力は、排除後に保持されたマーカーを示す。以下の完全モデルを使用して、別の100回の検定を行った。

20

【0322】

`my. model <- Class ~ X6 + X7 + X8 + X12 + X16 + X18 + X23 + X25`

【0323】

また、度数分布表（表23）を構築する。

【0324】

【表23】

変 数	6	7	8	12	16	18	23	25
頻 度	63	100	51	48	30	47	66	98

30

【0325】

影をつけた入力は、排除後に保持されたマーカーを示す（47のカットオフを使用）。以下の完全モデルを使用して、別の100回の検定を行った。

【0326】

`my. model <- Class ~ X6 + X7 + X8 + X12 + X18 + X23 + X25`

【0327】

また、度数分布表（表24）を構築する。

40

【0328】

【表24】

変 数	6	7	8	12	18	23	25
頻 度	96	100	23	73	3	88	98

【0329】

この点では、50のカットオフを選択する。影をつけたエントリは、5メンバーパネル用の残りのマーカーを示す。各ステップでは、平均AUCは以下のように増加する。

50

. 37% → 95.45% → 95.78%。

【0330】

(iii) パネル性能の評価

パネル性能を評価するために、前述と同様であるが、段階的選択手順を使用しないで100回の検定を行った。各検定では、AUC、感度、および特異性を記録する。上記の検出パネルの例について、結果を以下に示す。

【0331】

【数1】

```
>my.model <- Class ~ X7 + X25 + X6 + X23 + X12
```

10

```
>summary(AUC)
```

```
Min. 1st Qu. Median Mean 3rd Qu. Max.
0.9289 0.9590 0.9615 0.9601 0.9630 0.9630
```

```
>summary(sensitivity)
```

```
Min. 1st Qu. Median Mean 3rd Qu. Max.
0.8519 0.9630 0.9630 0.9737 1.0000 1.0000
```

```
>summary(specificity)
```

```
Min. 1st Qu. Median Mean 3rd Qu. Max.
0.8378 0.9730 0.9730 0.9749 1.0000 1.0000
```

【0332】

まとめると、パネルの感度は97.37%であり、特異性は97.49%である。ROC 20
下領域は96.01%である。

【0333】

(d) 方法2: SAS (バージョン8.2) の使用

手順LOGISTICを使用して、SASにおけるロジスティック回帰を行うことができる。反応変数が二段因数である場合、下句はバイナリロジットモデル (family = binomial and link = logit) を有するRにおけるglmに等価) に適合する。SASは、特定されたモデルの全ての失われた多変量観測値を自動的に排除する。Rと異なり、SASは、最良の部分集合変数選択手順を行うことができる。これを行うために必要なSAS中のコードフラグメントを以下に示す。

【0334】

30

【数2】

```
PROC LOGISTIC DATA=WORK.panel;
```

```
CLASS Class;
```

```
MODEL Class = X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9 X10 X11 X12 X13 X14 X15 X16 X17 X18 X19 X20 X21  
X22 X23 X24 X25 X26 X27 X28 /SELECTION=
```

```
SCORE BEST=28;
```

```
RUN;
```

【0335】

この手順を、全データ集合に適用する。パラメータBEST=28は、SASに最良の2 40
8個の1変数モデル、最良の28個の2変数モデル、最良の28個の3変数モデル、最良
の28個の28変数モデルまでを見出すように命令する。

【0336】

(i) パネル性能の評価

方法1に記載の手順を使用して、各パネルの性能を評価する。検出パネルデータから以下の表25を作成した。個の表は、2つの最良の1、2、3、4、および5マーカーパネルの結果のみを列挙している。

【0337】

【表25】

パネル	パネル数	感度	特異性	ROC下領域
1	7			94.28%
2	28			80.14%
3	7,16			95.00%
4	7,15			94.59%
5	7,15,16			95.94%
6	1,7,16			95.33%
7	1,7,15,16			95.61%
8	4,7,15,16			95.34%
9	1,4,7,15,16			95.30%
10	1,7,11,15,16			95.57%

10

【0338】

(2) 線形判別分析

(a) バックグラウンド

市販の統計パッケージSPSSは、単純の線形判別関数でデザインおよび検定を行う手順を有する。

【0339】

20

一般的に使用される方法は、フィッシャーの線形判別関数である。これにより、良好にクラスを分離する特徴空間中の超平面が見出される。クラス分布が異なる手段を有するが多変量ガウス分布に類似しているという2つのクラスの問題のために、この分類により至適な性能が得られる。この方法を多クラス問題に発見的に拡大することができるが、本研究ではこれを適用しなかった。

【0340】

本方法は、そのアプローチが単純であるが、多数の特徴を含むデータ集合に関連する問題に対して強い（約200個の例（症例）のみを含むデータ集合で問題を生じる本発明者らの症例数27中のプローブ）。

【0341】

30

このパッケージは、判別プロセスに十分に起用する特徴の同定手順を有する。この「段階的方法」により、判別特徴のほとんどが最初に見出される。他の特徴を連続的に付加し、分類に対して評価する。組み合わせを調査し、それによりより良い組み合わせが見出された場合に最初に選択される特徴を最終的に排除することができる。統計検定により残りの特徴が分類プロセスに確実に起用しないことが示されるまで、特徴数を漸増させる。

【0342】

leave-one-out法の使用により、性能を評価する。これにより、データ集合から1サンプルを取り出し、訓練集合を形成する。残りのサンプルを、検定集合として保持し、分類に適用し、得られた分類を混同行列で累算する。データ中の症例についてこの手順を繰り返す。この手順により性能が公平に評価されるが、評価は高度に分散している。

40

【0343】

方法

SPSSは分析のために適切なデータ集合を選択し、「Analyze」を選択し、「Classify」を選択し、「Discriminant...」を選択し、表上で「Fishers method」、「leave one out testing」および「use stepwise method」を選択する。診断を「grouping variable」として入力し、全特徴を「independent」として入力する。分析を完了するために「OK」を入力する。他のパラメータのための事前にセットした値を、集合として残した。

50

【0344】

分析出力は、分析で利用した特徴、正準判別関数、混同行列、および正確な分類率（エラー率約1）のリストを示す。

【0345】

R O C 曲線を計算するために、正準判別関数を選択した特徴に適用して新規の特徴を得る。S P S S では、R O C 曲線をプロットするためにグラフを使用する。

【0346】

i i . 階層的方法：意思決定樹

(1) 背景

意思決定樹の学習は、帰納的推論のための最も広く使用されている実践的方法の1つである。これは、ノイズデータに強く、離散的発現を学習することができる分類法である（Tom M. Mitchell、「機械学習」、McGraw-Hill、New York、NY、1997）。

【0347】

最も一般的で利用しやすい機械学習パッケージは、「C4.5」であり、そのソースコードが（J. Ross Quinlan、「C4.5：機械学習プログラム」、Morgan Kaufman、San Mateo CA、1993）で公開されている。

【0348】

意思決定樹が訓練されている場合（訓練データ）、1つのデータが、最良に決定するためにこの節点で利用されるようにデータに帰する決定樹の各節点でアルゴリズムを決定する。したがって、この樹が完全に構築された場合、他を使用および無視するように帰するいくつかの集合が選択される。本発明者らの出願では、分子プローブから得た基準を処理するための意思決定樹を使用して、意思決定樹は、プローブパネルおよびデータ分類を最良に説明するプローブスコアの組み合わせ方法を有効に選択した。パネル性能を公平に評価するために、得られた意思決定樹により、訓練で使用されていないデータが評価されるはずである。これを行うための1つの標準的な技術は、相互検証である。10倍の相互検証を使用した。

【0349】

相互検証は、限られたデータを最良に使用する技術である。10倍の相互検証では、データを10個のほぼ等しいサイズの区画に分割し、各区画にわたりクラス中のほぼ同数の症例を含むように配慮する。次いで、意思決定樹を区画1に組み合わせて検定した区画2～9に対して訓練し、区画2に組み合わせて検定した区画1、3～9に対して訓練し、データによる保持試験集合を循環させて10の試験を一度に行う。この様式では、保持データに関してのみ試験が行われるので公平であり、全データが1回で正確に検定されるので、全データ集合にわたるエラー率の総計を計算することができる。

【0350】

通常、意思決定樹は、訓練データが非常に良好に適合するまで構築され、その後「ノイズ」の枝葉の除去により決定樹から「削除する」。これにより、意思決定樹の未知のデータを作成する能力が改良され、決定樹が良好な性能を得るために不可欠となる。C4.5パッケージは、2つの意思決定樹の削除方法（第1の標準的な意思決定樹削除アルゴリズムおよび第2の基準抽出アルゴリズム）を含む。一般に、意思決定樹ベースの方法により、このデータに対するより優れた結果が得られる。したがって、基準ベースの方法を報告しない。

【0351】

(2) データの作成

いずれかに記載のように、正常組織および5つの異なるがん（腺がん、大細胞がん、中皮腫、小細胞がん、および扁平上皮がん）に対する種々のプローブの反応に対するデータを得た。プローブ1～28のHスコアならびに病理学者（病理学者1および病理学者2）をデータベースから抽出し、フラットデータファイルに入力した。意思決定樹のために、染色に対する疾患の効果が個別に認められるように各データポイント（同一の物理スライド

に対して2つの病理学者による)を得た。これにより分類の性能がわずかに陽性に偏り得るが、パネル選択に影響を及ぼさないはずである。

- ・気腫、肉芽腫性疾患、および間質性肺疾患のコントロールカテゴリーをともにグループ化し、「正常」と呼んだ。

- ・パネル検出のために、がんを共にグループ化し、「異常」と呼び、これにより2クラス問題が生じた。

- ・1つの判別パネルのために、5クラス問題を得るために正常な症例をデータから除去した。

- ・保持判別パネルのために、各がんを保持し、その後残りのがんを「他」にグループ化し、5つの2クラス問題の集合を得た。

10

【0352】

C4.5には、データを説明し、分析に含まれる「名前」ファイルが必要である。判別パネルの名前ファイルの例を表26に示す。

【0353】

【表26】

MonoGenZF21診断データ用のC4.5名前ファイル

腺癌、大細胞癌、中皮腫、小細胞癌、扁平上皮癌Iクラス

P1: 継続

P2: 継続

P3: 継続

P4: 継続

P5: 継続

P6: 継続

P7: 継続

P8: 継続

P9: 継続

P10: 継続

P11: 継続

P12: 継続

P13: 継続

P14: 継続

P15: 継続

P16: 継続

P17: 継続

P18: 無視

P19: 継続

P20: 継続

P21: 継続

P22: 継続

P23: 継続

P24: 継続

P25: 継続

P26: 継続

P27: 継続

P28: 継続

10

20

30

【0354】

プローブ18はデータから失われており、全デザインで「無視」と設定した。設定により、名前ファイル中の「無視」という設定は、プローブのパネルからの簡単且つ有効なトリミング方法であり、データ分析で使用する。

40

【0355】

(3) データ分析

C4.5で供給されている「xval.sh」スクリプトを使用して、各データ集合に10倍相互検証を行った。パッケージに対する基準（デフォルト）パラメータを使用する。相互検証は、小さなデータ集合を訓練および検定する分類法のために開発された技術である。これには、データをN同等サイズの区画に無作為に分割するステップを含む。次いで、分類を、N-1区画に対して訓練し、残りの区画に対して検定する。これをN回繰り返す。

【0356】

50

1つの相互検証（C V）検定で訓練した意思決定樹は、別（選択されたプローブおよび樹の係数の両方が異なる）で得られた決定樹と異なり得るので、各プローブを10検定中の樹によって選択した回数を計算した。

【0357】

排除した樹中で10回のC V検定中5回またはそれ以上起こらない任意のプローブを「無視」と設定することにより第1のプローブ選択を行った。

次いで、この小さな候補プローブ集合を使用した相互検証を繰り返した。排除した樹中で10回のC V検定中5回またはそれ以上起こらない任意のプローブを「無視」と設定することにより第2のプローブ選択を行った。任意のさらなるプローブが脱落した場合、第3のC V検定を行った。

10

【0358】

種々の検定によってパネルを選択し、エラー性能の評価を、結果表に示す。意思決定樹分析についてのパネル性能を、以下の表27に示す。

【0359】

【表27】

パネル性能意思決定樹
検出パネル
プローブ3、7、19、25および28

	癌	コントロール
癌	99.42%	0.58%
コントロール	17.82%	82.18%

ペアワイズ判別
4、6、14、19および23

	腺癌	その他
腺癌	67.74%	32.26%
その他	11.20%	88.80%

ペアワイズ判別
3、6、17、19および25

	扁平上皮癌	その他
扁平上皮癌	70.59%	29.41%
その他	4.07%	95.93%

ペアワイズ判別
1、5、10、13、21、27および28

	大細胞癌	その他
大細胞癌	36.36%	63.64%
その他	7.37%	92.63%

ペアワイズ判別
3、12、および16

	中皮腫	その他
中皮腫	82.05%	17.95%
その他	5.00%	95.00%

ペアワイズ判別
12、17、20、23および25

	小細胞癌	その他
小細胞癌	69.23%	30.77%
その他	1.49%	98.51%

検出（プローブ7を除く）
6、10、16および19

	癌	コントロール
癌	89.60%	10.40%
コントロール	3.30%	96.70%

検出（商業的に好ましいプローブのみ）
5、6、10、16、19および23

	癌	コントロール
癌	92.80%	7.20%
コントロール	5.49%	94.51%

10

20

30

40

【0360】

小細胞肺がんを残りの4つのがん型を判別するための意思決定樹構造の例を、以下の表28および29に示す。

【0361】

C4. 5アウトプットフォーマット

【表28】

P23<=3:
 | P25<=2 : 小細胞肺癌 (18.0)
 | P25>2 :
 | | P17<=5 : 小細胞肺癌 (2.0)
 | | P17>5 :
 | | | P20<=11 : その他 (9.0)
 | | | P20>11 : 小細胞肺癌 (2.0)
 P23>3 :
 | P12>7 : その他 (120.0)
 | P12<=7 :
 | | P20<=2 : その他 (5.0)
 | | P20>2 : 小細胞肺癌 (4.0)

10

樹を保存

訓練データに対する評価 (160項目):

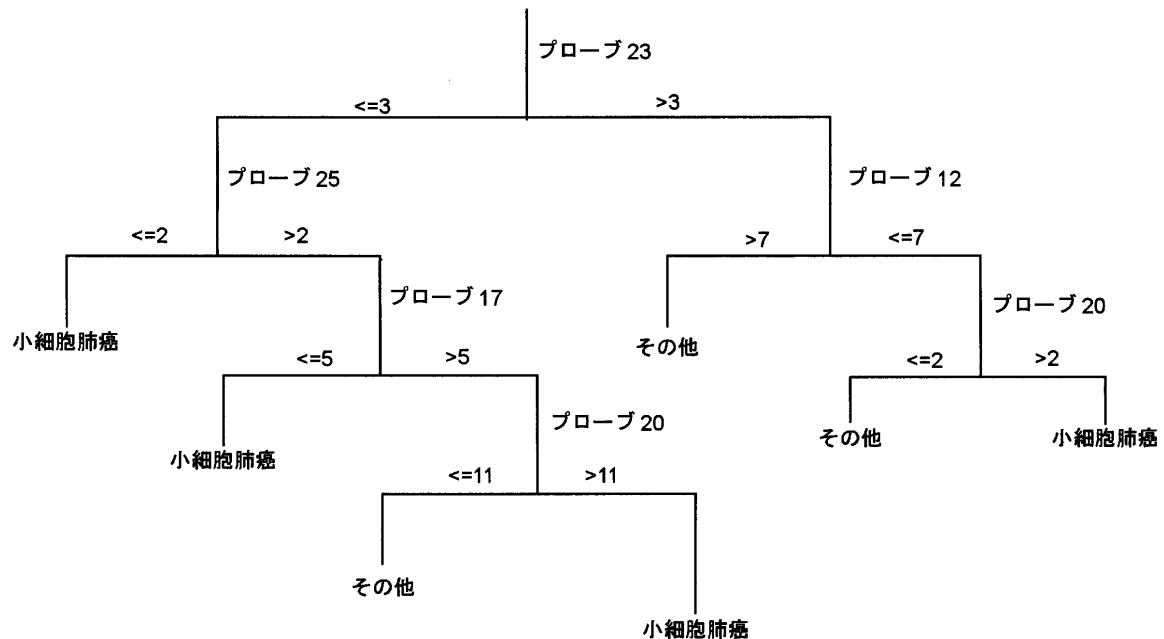
排除前		排除後		
サイズ	エラー	サイズ	エラー	評価
13	0 (0.0%)	13	0 (0.0%)	(5.2%) <<

20

【0362】

【表29】

図による形態



30

40

【0363】

段階的線形判別についてのパネル性能を、以下の表30に示す。

【0364】

50

【表 3 0】

パネル性能段階的LD
検出パネル
1、4、7、15および16

	癌	コントロール
癌	92.24%	7.76%
コントロール	1.16%	98.84%

ペアワイズ判別
4、5、14、19、20、25および27

	腺癌	その他
腺癌	91.67%	8.33%
その他	5.43%	94.57%

ペアワイズ判別
1、2、3、24、25および26

	扁平上皮癌	その他
扁平上皮癌	88.00%	12.00%
その他	6.59%	93.41%

ペアワイズ判別
1および7

	大細胞癌	その他
大細胞癌	80.95%	19.05%
その他	26.32%	73.68%

ペアワイズ判別
3、12および16

	中皮腫	その他
中皮腫	96.67%	3.33%
その他	4.65%	95.35%

ペアワイズ判別
12、19、22および23

	小細胞癌	その他
小細胞癌	93.75%	6.25%
その他	5.00%	95.00%

検出（プローブ7を除く）
1、2、3、4、10、11、15、16、23、24、27、
および28

	癌	コントロール
癌	85.34%	14.66%
コントロール	2.33%	97.67%

検出（商業的に好ましいプローブのみ）
8、10、11、19、23および28

	癌	コントロール
癌	81.20%	18.80%
コントロール	1.16%	98.84%

10

20

30

40

【0365】

段階的線形判別についてのパネル性能を、以下の表31に示す。

【0366】

【表31】

パネル性能段階的LR
検出パネル
6、7、12、23および24

	癌	コントロール
癌	97.49%	2.63%
コントロール	2.51%	97.49%

ペアワイズ判別
14、19、20、25および27

	腺癌	その他
腺癌	96.39%	3.61%
その他	12.29%	87.71%

ペアワイズ判別
3および10

	扁平上皮癌	その他
扁平上皮癌	94.93%	5.07%
その他	35.86%	64.14%

ペアワイズ判別
1、4、6、16および21

	大細胞癌	その他
大細胞癌	95.11%	4.89%
その他	61.00%	39.00%

ペアワイズ判別
3、7、12および16

	中皮腫	その他
中皮腫	95.07%	4.93%
その他	10.89%	89.11%

ペアワイズ判別
12、13および23

	小細胞癌	その他
小細胞癌	98.90%	1.10%
その他	4.00%	96.00%

検出（プローブ7を除く）
1、10、19、23および28

	癌	コントロール
癌	94.00%	6.00%
コントロール	5.80%	94.20%

検出（商業的に好ましいプローブのみ）
10、19、20、23および28

	癌	コントロール
癌	93.88%	6.12%
コントロール	6.39%	93.61%

10

20

30

40

50

【0367】

i i i . 神経回路網および別法

人工神経回路網（ANN）は、本発明と組み合わせて特徴の選択および分類のデザインに容易に適用することができる候補パターン認識技術である。しかし、このような技術は、データ構造の洞察およびLDFが与える方法で特定のプローブへの影響がほとんどない。この理由のために、このアルゴリズムのクラスを本研究では使用しなかった。LDFは、線形判別関数（その結果が分類を決定するための閾値である特徴の線形組み合わせ）を困難にする。

【0368】

この技術クラスには、多層パーセプトロン（MLP）、Back-Prop、Kohonenの自己組織化マップ、学習ベクトル量子化、K最近隣法、および遺伝的アルゴリズムが含まれる。

【0369】

i v. 特集

(1) 仮説

・線形判別分析

・2つのクラスについての共分散行列は等しいと仮定する。

・2つのクラスが多変量正規分布である場合のみ、誤分類コストを最小にする。

・説明変数が絶対的というよりもむしろ連続的であると仮定する（本研究では、Hスコアは絶対的であり、実際には（すなわち、自動化系では）、強度を連続的スケールで測定することができる）。

・ロジスティック回帰（2項式一般化線形モデル）

Venerables and Ripley、第7章、「S-PLUSを使用した現代応用統計学」（W. N. Venables and B. D. Ripley, Springer-Verlag, New York, 1999）を参照のこと。 10

【0370】

(2) マーカーの拒絶（除外）

判別分析および回帰手順のコンピュータ制御の実行には、段階的変数選択手順（例えば、RのstepAIC）が含まれる。これらの手順を、説明変数として使用するための変数の最良の部分集合を選択するようにデザインする。実際、これらの手順の段階的性質により、予想のために最良の変数が選択される保証はない（John and Wichern, 299頁）。にもかかわらず、このような手順は、マーカー選択および除外の基本となる。 20

【0371】

(3) ペアワイズ検定

多クラス分類のデザインにおける固有の問題は、「応用多変数統計分析」、R. A. Johnson and D. W. Wichern, 第2版、1988、Prentice-Hall、N. J. で考察されている。これは、いくつかの個別の2クラス分類（判別パネル）が開発される動機が存在する。

【0372】

(4) パネル比較における冗長性の考慮

「線形モデルは古典的統計の中心をなし、依然として統計実務の大部分の基礎である。」

「S-PLUSを使用した現代応用統計学」（W. N. Venables and B. D. Ripley, Springer-Verlag, New York, 1999）。 30
線形モデルは、t検定、分散分析（ANOVA）、回帰分析、および判別分析を含む種々の多変量法の基礎である。説明変数は、一次項としてモデルに入れても入れなくても良い。これもまた、真の（非線形）ロジスティック回帰である。ロジスティック回帰モデルは、単純に線形回帰モデルの非線形変換であり、従属変数を、ログオッズ比（ロジット）に置換される。まとめると、これらの統計学的方法は、説明変数間の一次の関係に基づく。したがって、パネルにおける冗長性を追求するための1つの手段は、高い相関変数（マーカー）を同定することである。類似の性能を達成するために、パネル中のあるマーカーを他のマーカーに置換することも可能であり得る。

【0373】

パネルにおける冗長性を追求するための別の手段は、「最良の部分集合」の回帰分析を行うことである。目的の全説明変数を有する開始モデルが存在する場合、目的は、最良の1変数回帰モデル、最良の2変数回帰モデルなどを見出すことである。この方法を、SAS統計学的パッケージで行った。 40

【0374】

(5) 加重スコアの使用

(a) 商業的および臨床的考慮

ストラテジーおよび商業的要因、費用、利用可能性、使いやすさを含む多くの理由のために、パネル中の一定のプロープの選択を促進して他の選択にペナルティーを科し、同時にパネルサイズおよび性能に対してこれを交換することが好ましい。 50

【0375】

(b) 属性負担

背景知識の組み込み (M. Nunez, 「背景知識の使用」、Machine Learning、6、231～250、1991) およびロボットセンサーからの情報獲得のための費用の相違 (M. Tan, 「ロボットにおける分類知識およびその適用の費用重視の学習」、Machine Learning、13、7～33、1993) などの他の文脈中の機械学習文献でこのような属性加重法 (意思決定樹における) が提案されている。

【0376】

文献中で「C4.5」(J. Ross Quinlan, 「C4.5: 機械学習プログラム」、Morgan Kaufmann, CA、1993) として公知の標準的な機械学習ソフトウェアパッケージのマイナーチェンジによってこれらの費用重視のアルゴリズムが実行されている。便利には、このアプローチの後に、Nunez の「EG2」アルゴリズムを実施した。 10

【0377】

C4.5 意思決定樹構築段階では、アルゴリズムは、それぞれ利用可能な分割属性を比較し、情報収集を最大する1つの分割属性 G_i を選択する。EG2 アルゴリズムでは、属性 i (C_i) の情報費用を組み込んだ $(2^{G_i} - 1) / (G_i + 1)$ を最大にする。加重ベクトルは、ユーザーによって推測的に設定される必要がある。 20

【0378】

(i) コード修正

C4.5 ソースコードを、M. Nunez (背景知識の使用、Machine Learning、6、231～250、1991) によって提案された経済的な生成子「EG2」アルゴリズムを実行する容易修正した。 20

【0379】

C4.5 パッケージの正確な修正を、以下に示す。

以下のファイル「R8/Src/contin.c」(J. Ross Quinlan, 「機械学習用C4.5プログラム」、Morgan Kaufmann, CA、1993) 中のラインの後に、 30

【数3】

```

ForEach(i, Xp, Lp - 1)
{
    if ( (Val = SplitGain[i] - ThreshCost) > BestVal )
    {
        BestI    = i;
        BestVal = Val;
    }
}

```

以下の新規のライン

【数4】

```

BestVal = (powf(2.0, BestVal) - 1.0) / (AttributeCosts[Att] + 1.0);

```

を挿入する。ユーザーによって維持されている次のファイル由来の費用属性のベクターを以前に読み出していた。

【0380】

(i i) 実験方法

商業的に好ましいプローブを以下に示す：2、4、5、6、8、10、11、12、16、19、20、22、23、28。

【0381】

例示の目的で、費用により上記プローブが商業的に好ましいと仮定すると、この費用を考慮して検出パネルを再選択することが望ましい。

【0382】

修正C4. 5意思決定樹ソフトウェアを使用して、商業的に好ましいプローブにペナルティー0を与え、商業的に好ましくないプローブにペナルティー2を与えた。修正C4. 5アルゴリズムを使用して、10倍相互検証パネル選択法（いずれかに記載）を行った。

【0383】

(iii) 結果

標準的な意思決定樹検出パネルは、プローブ3、7、19、25、28からなる。得られたパネルメンバーは、2、6、7、10、19、25、28であり、商業的に好ましい2つのプローブP7およびP25のみを使用する。このデータについてのより優れた性能のために費用が上昇したにもかかわらず、これらのプローブを本方法で選択したことに留意のこと。パネルは、現在より大きくない、最初の5プローブに対して7プローブである。このデータに対するパネル性能において証明可能な低下は存在しないが、性能はプローブ費用の低下に対する代替物として現在最適には及ばない。

【0384】

(iv) 結論

パネル選択方法へのプローブの使用費用の組み込みのための簡単な方法を確立した。

(c) 誤分類費用

(i) バックグラウンド

多くの理由のために、異なる種類の分類エラーにかかる費用は変化し得ることを留意して至適パネルを選択することが望ましい。例えば、ある疾患（例えば、大細胞がん）に対する感度が増加したパネルを選択することが望ましく、混同行列中のいずれかでの特異性および感度の減少に対してこれを交換することが望ましい。

【0385】

理論的には、全ての可能な費用の組み合わせを組み込むために（混同行列と同一の次元の）誤分類費用行列が必要であり得る。実際に、不一致の費用（デフォルト）を入力する。

【0386】

市販の意思決定樹ソフトウェア See 5 (Rule Quest Research Pty Ltd, 30 Athena Avenue, St Ives Pathologist 3 SW 2075, Australia を参照のこと。(http://www.rulequest.com) は、この可能性が組み込まれており、以下の証明で使用した。

【0387】

(ii) 目的

標準的な同時判別パネル（いずれかに記載）は、以下のメンバーからなる。P2、3、4、5、12、14、16、19、22、23、28。以下に評価した混同行列を示す。

【0388】

【表32】

(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	以下のように分類
----	----	----	----	----	
24	4	2	5	2	(a): 腺癌クラス
8	7	3	5	4	(b): 大細胞癌クラス
1	1	33	1	4	(c): 中皮腫クラス
6	2	1	23		(d): 小細胞癌クラス
4	4	3	2	24	(e): 扁平上皮癌クラス

【0389】

大細胞がんの感度は、26%と低かった。新規にデザインしたパネルでこの感度を増大させたい場合、以下の方法を使用することができる。

【0390】

(iii) 方法

以下の費用ファイルは作成した。

【0391】

【表33】

ZF21 判断のための費用ファイル
「大細胞癌」の特異性の増加
中皮腫、大細胞癌：10
腺癌、大細胞癌：10
中皮腫、大細胞癌：10
小細胞肺癌、大細胞癌：10
扁平表皮癌、大細胞癌：10

10

20

【0392】

このファイルは、因子10によって他の任意のがんとして大細胞がんの判別を加重する。これは、このクラスの検出感度を増大させる傾向があるが（性能はいくらか低下する）、完全な分類を確実に加重することができない。

【0393】

標準的な意思決定樹パネル選択方法を適用した（C4.5の代わりにSee5を使用）。

【0394】

(iv) 結果

新規のパネルメンバーを以下に示す。P2、3、4、5、6、9、12、14、16、17、25、28。以下のように性能を評価した。

30

【0395】

【表34】

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	以下のように分類
	----	----	----	----	----	
癌	20	13	1	1	2	(a): 腺癌クラス
	3	13	3	2	6	(b): 大細胞癌クラス
癌	1	9	27	2	1	(c): 中皮腫クラス
	2	9		21		(d): 小細胞癌クラス
癌	1	15	2	1	18	(e): 扁平上皮癌クラス

40

【0396】

上記は、大細胞がんの評価された感度は本発明により48%に増加したことを示す。

【0397】

(v) 結論

誤分類による異なる費用をパネル選択方法に組み込むために簡単な方法を示した。

50

【0398】

d. 性能行列

各方法の性能を評価を示す分析によって得られた出力には以下が含まれる。

【0399】

i. ROC 分析

受信者動作特性 (ROC) 曲線は、分類中の異なる閾値レベルについての偽陽性スコアおよび偽陰性スコアの比率 (または単位確率あたり) の評価を示す。無作為選択よりも良好に判別することができない無関係の分類は、真および偽が等しく読み取られる ROC 曲線を示す。この曲線以下の領域は、50%である (確率0.5)。

【0400】

曲線下面積 (AUC) は、分類性能の全体的評価としてしばしば使用され、最も商業的な判別関数パッケージはこの数字を計算する。完全な分類の曲線下面積は100%であり、有用性のない分類の AUC は50%付近 (0.5) である。

【0401】

i i. 混同行列：数および比率

混同行列は、どのようにして試験集合由来のデータを分類するのかを示す。ペアワイズ検定のために、これらは真の陽性スコア、偽陽性スコア、真の陰性スコア、または偽の陰性スコアである。これらを、実数および比率で示すことができる。1つのパネルのみで固有の診断を行うことを意図する多重パネルのために、混同行列は、それぞれ正確な分類の数値を示す。例えば、小細胞がんが小細胞がんとして検出される度に、行列に斜線を1本入力する。不正確なスコア；例えば、小細胞がんが扁平上皮がんと何回同定されたかを行列の適切な非対角要素に入力する。エラー率を使用して、全偽分類の合計を全分類数で割ったものとして (%で示す) 混同行列にデータをまとめる。

【0402】

i i i. 感度および特異性

特異性は、任意の定義が無効な症例を排除する範囲をいう。特異性が低いと定義される場合、偽陽性である可能性が高い。これは、本当に障害が存在しない場合に障害を有する個体を標識することを意味する。感度は、任意の定義が有効な症例を含む範囲をいう。感度が低いと定義される場合、偽陰性の可能性が高い (障害が存在する個体が障害を有しないと誤って診断される個体)。

【0403】

3. データ分析および結果

a. サンプルサイズおよび変動性

- ・病理学者1および病理学者2のデータ集合を組み合わせた354症例のうち、202症例のみが各マーカーについてHスコアを有していた (変数または特徴)。
- ・少数の完全な観測値および多数の変数により問題が評価される (次元の過程)。したがって、分類の確率で使用した変数の数を排除する必要がある。
- ・少数の観測値のために、個別の訓練集合および検定集合にデータを分割するのは賢明ではない (分類性能の確実な評価に必要)。この理由のために、最サンプリング法 (相互検証および多重無作為検定) を使用する必要があった。
- ・各がん型の観測値が非常に少数であるので、がん判別のための多クラス分類のデザインは困難である。

【0404】

b. 除外マーカー

上記の方法を使用してマーカーを除外した。除外したマーカーは、パネル中で非選択と示される。

【0405】

c. 検出パネルの組成

i. 選択マーカープロープ

3つ全ての方法のための選択マーカープロープを図5にまとめる。

【0406】

i i . 最小選択マーカー集合

パネル検出のために、プローブ7は1つのマーカーについて最良の検出性能を送達することが明らかである。より多数のプローブを使用して信頼できるパネルを得ることができるかどうかを調査するためにプローブの組み合わせを分析した。

【0407】

(1) 方法

ロジスティック回帰法により、性能基準（フィッシャーのスコア）に関してサブセットを最良に分類することが可能である。この分析を使用して、1～5個のプローブの組み合わせを選択した。フィッシャーの線形判別関数およびロジットモデル（ロジスティック回帰）を使用して、これらの組み合わせの性能を示した。データを上に示す。 10

【0408】

(2) 結論

プローブ7は、それ自体が分類として十分に機能するが、プローブ7を使用の決定は、プローブ7の偽陰性スコアが高いことである。分類としてフィッシャーの線形判別関数を使用して最良の性能を示すものは、プローブ7および16であった。他の組み合わせを使用してパネル間の結果が変動することにより、より多数の特徴を付加されたノイズが分類スコアを改良する重要な任意の可能性を示すことが示唆される。不正確に記録された少数のサンプルは、これらのより稀な事象の統計が十分にとれていないことを示す。多数の症例を使用してデザインした分類により、分類がより良好にデザイン可能である。異なる分類を使用したプローブの最良の組み合わせを選択する技術により、データ構造に依存して異なる最良のパネルを作製することができる。 20

【0409】

i i i . 補足マーカー

異なるプローブの利用可能性に適合するようにパネルをデザインすることができることを示す。これらの部分集団の選択に以下の異なる方法を使用することができる。意思決定樹、ロジスティック回帰、および線形判別関数。データは上に示している。

【0410】

方法

S P S Sを使用して、フィッシャーの線形判別関数を、制限するために制限を適用したパネルから得たスコアに適用した。例えば、全てのプローブは1つの業者に由来する。また、特徴の最良の組み合わせを見出すために、段階的選択を選択した。L e a v e - O n e - O u t 相互検証検定を使用して性能を評価した。 30

【0411】

i v . 別のマーカー：生体作用機構（機能的に等価なマーカー）

当業者は、機能的に等価なマーカーを決定することができる。パネルで使用したマーカーの機能的挙動を、本明細書を通して記載する。

【0412】

v . マーカーの局在化

本研究で使用了種々のマーカーの局在化を、本明細書中のいずれかに記載する。 40

【0413】

v i . パネル性能

3つの方法の性能を上に示す。

【0414】

v i i . パネル性能の解釈の制限

・データ集合が小さく、再サンプリング法を使用する必要があるので、分類を過剰に訓練することは危険である（データが密接に適合しすぎる）。

・喀痰細胞診サンプルが組織学的確証研究で分析された細胞の代表である適当な数の細胞が含まれるかどうかは明らかではないので、細胞学的標本を使用したパネル性能は正確な予測が困難である。それにもかかわらず、適切な細胞サンプルサイズを有する場合、至適 50

化パネルは細胞学的標本と同様の挙動することが予想される。

【0415】

d. 判別パネルの組成

i. 全がん用の1つの5ウェイパネル

3つの分析技術のうち、意思決定樹のみが1つの5ウェイパネルに影響を受ける。したがって、全肺がん型を同時に分類するための1つの意思決定樹を構築した。パネルメンバーを、図5に示す。パネル性能を上記のパネル性能表に示す。

【0416】

i i. 他の全がん型に対して1つの肺がん型を判別するためのパネル

線形判別関数は、同時多クラス判別の実施には十分に適合しない。プールした全がん集合から1つのがんを個別に判別するようにそれぞれデザインされた5つの個別の分類の性能を分析した。このような組み合わせは、1つの候補がんを含む症例を区別する可能性はないが、2つまたは複数の候補がんを含む1つの症例を分類する可能性を有する。これは、さらなる調査のための矛盾する症例の同定において潜在的な利点を有する。

【0417】

全がん型のための1つの判別パネルの全エラー率がわずかに高いことが認められた（5ウェイ分類）。上記のパネル性能データでは、4つの他のがんの可能性から1つのがんを同定するようにそれぞれデザインされた5ペアワイズ分類の性能を示す。このアプローチは、意思決定樹および線形判別関数を使用した分析に影響を受ける。この技術は、適用した場合に所見が不明瞭であり、1人の患者のために2つまたはそれ以上の診断が得られ、さらなる臨床調査が示唆される。この技術は、所見が得られる可能性がなく、さらなる調査が示唆される（おそらく、検出パネルを使用した再試験）。

【0418】

i i i. 検出パネル由来の偽陽性症例の可能性を明らかにするためのパネル

偽陽性症例（検出パネル由来）および5つのがん型を判別するようにさらなるパネルを訓練することができる。これは、不正確に異常と分類された検出パネル由来の各症例を選択するステップを含む。これは、専用の分類をこれらの「特別な」症例を検出する「より困難な」問題に対して訓練する。しかし、これは、理論的に信頼できる課題であり、これら4つの症例および集団のみが得られる分析用のデータ集合は、存在していないと考えられる。

【0419】

i v. 選択マーカー

3つ全ての方法のための選択マーカープロブを、図5にまとめている。

【0420】

v. 最小選択マーカー集合

このトピックは、以下の「異なる方法を使用した類似の結果によって証明されたアプローチの信頼性」で取り組んでいる。

【0421】

v i. 補足マーカー

このトピックは、以下の「異なる方法を使用した類似の結果によって証明されたアプローチの信頼性」で取り組んでいる。

【0422】

v i i. 別のマーカー：作用の生物学的機構

当業者は、機能的に等価なマーカーを決定することができる。パネルで使用したマーカーの機能的挙動を、本明細書を通して記載する。

【0423】

v i i i. マーカーの局在化

本研究で使用した種々のマーカーの局在化を、本明細書中のいずれかに記載する。

【0424】

i x. パネル性能

10

20

30

40

50

3つの方法の性能を図5にまとめている。

【0425】

e. 加重パラメータの効果

前に考察したユーザーが提供するマーカーおよび病態（クラス）の加重基準に加えて、2値加重スキームを使用することもできる。例えば、全ての非DAKO供給プローブに「0」を加重し、全てのDAKO供給プローブに「1」を加重し、至適化パネルはDAKO供給プローブのみを含む。これは、自社製品のみを使用して分子診断パネルキットを開発および市場に出そうとしている任意の業者における重要な製品デザイン能力である。

【0426】

f. 他の（非Hスコア）客観的スコアリングパラメータの使用効果

10

i. バックグラウンド

以下の表32に示すように、病態調査シートは以下のボックス集合を含む。

【0427】

【表35】

強度	なし	弱い	中程度	強い
0~5%	☐ 0	☐ 0	☐ 0	☐ 0
6~25%	☐ 1	☐ 1	☐ 1	☐ 1
26~50%	☐ 2	☐ 2	☐ 2	☐ 2
51~75%	☐ 3	☐ 3	☐ 3	☐ 3
>75%	☐ 4	☐ 4	☐ 4	☐ 4

20

【0428】

標準的なスコアリングシステムは、強度を、なし=0、弱い=1、中程度=2、強い=3にランク分けし、細胞の比率を0~5%=0、6~25%=1、26~50%=2、51~75%=3、>75%=4にランク分けし、2つのグレードを掛け合わせる、「Hスコア」を使用する。例えば、50%の弱い染色+50%の中程度の染色のスコアは、 $10 = 2 \times 2 + 2 \times 3$ である。

30

【0429】

i i. 方法

反応が以下の低、中、および高に分けられる別のスコアリング法を分析した。

(a) 50%を超える細胞が中程度またはそれ以上染色される場合→高

(b) 50%を超える細胞が染色されない場合→低

(c) その他→中

【0430】

意思決定樹検出パネル選択法を、Hスコアの代わりにこの3レベルの因子を使用して繰り返した。これにより、意思決定樹は必要に応じて各節で3つに枝分かれした。

【0431】

40

i i i. 結果

選択されたパネルは以下であった。プローブ3、7、10、11、16、19、20、28。以下のように性能を評価した。

【0432】

【表36】

以下のように分類した	(a)	(b)	
コントロール (a)	79	22	特異性=78%
癌 (b)	24	149	感度=86%

【0433】

これを、Hスコアを使用した基準性能と比較すべきである。

【0434】

【表37】

10

以下のように分類した	(a)	(b)	
コントロール (a)	85	6	特異性=93%
癌 (b)	5	120	感度=96%

【0435】

i v. 結論

- ・実質的な性能の低下が認められる（提案した別のスコアリングシステムを使用した場合、よりパネルが大きく、感度が低く、特異性が低い）。
- ・連続変数（0～12の範囲）としてのHスコアの処理により、試験したデータに対するパネル選択は最適に近いようである。
- ・多数の他の可能なスコアリングシステムを試験したが、実験的に試験したパネルデザイン方法および開発方法に実行および適用可能なようである。

20

【0436】

4. 肺がん検出および判別パネル

上記実施例で決定した肺がん検出および判別パネルの例を以下に列挙する。以下に列挙したパネルは特定のプローブを示し、各特異的プローブを相関するプローブまたは機能的に関連するプローブに置換することができることに留意すべきである。

【0437】

30

検出（制限なし）

- ・1つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA
- ・抗サイクリンA、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）
- ・抗サイクリンA、抗ER関連P29
- ・抗サイクリンA、抗成熟サーファクタントアポタンパク質B
- ・抗サイクリンA、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF
- ・抗サイクリンA、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗成熟サーファクタントアポタンパク質B
- ・抗サイクリンA、抗成熟サーファクタントアポタンパク質B、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF
- ・抗サイクリンA、抗成熟サーファクタントアポタンパク質B、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗サーファクタントアポタンパク質A
- ・抗サイクリンA、抗成熟サーファクタントアポタンパク質B、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF、抗サーファクタントアポタンパク質A
- ・抗サイクリンA、抗成熟サーファクタントアポタンパク質B、抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）、抗VEGF、抗サイクリンD1
- ・1つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、1つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗ヒト上皮関連抗原（MOC-31）
- ・1つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗ER関連P29
- ・1つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリンA、抗成熟サーファク

40

50

タントアポタンパク質 B

・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリン A、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 VEGF

・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリン A、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B

・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリン A、抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 VEGF

・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリン A、抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗サーファクタントアポタンパク質 A

・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリン A、抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 VEGF、抗サーファクタントアポタンパク質 A

・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗サイクリン A、抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 VEGF、抗サイクリン D1

【0438】

検出 (WO/O 抗サイクリン A)

・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗 Ki-67

・ 抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、および抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B からなる群から選択された任意の 1 つのプローブと組み合わせた抗 Ki-67

・ 抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、および抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B からなる群から選択された任意の 2 つのプローブと組み合わせた抗 Ki-67

・ 抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、および抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B からなる群から選択された任意の 3 つのプローブと組み合わせた抗 Ki-67

・ 抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、および抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B からなる群から選択された任意の 4 つのプローブと組み合わせた抗 Ki-67

・ 抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、および抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B からなる群から選択された任意の 5 つのプローブと組み合わせた抗 Ki-67

・ 抗 Ki-67、抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、および抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B

・ 抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B、および 1 つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択された任意の 1 つのプローブと組み合わせた抗 Ki-67

・ 抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B、および 1 つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択された任意の 2 つのプローブと組み合わせた抗 Ki-67

・ 抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B、および 1 つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択された任意の 3 つのプローブと組み合わせた抗 Ki-67

・ 抗 VEGF、抗ヒト上皮関連抗原 (MOC-31)、抗 TTF-1、抗 EGFR、抗増殖細胞核抗原、抗成熟サーファクタントアポタンパク質 B、および 1 つまたは複数のさら

10

20

30

40

50

なるプローブからなる群から選択された任意の4つのプローブと組み合わせた抗K i - 67

・抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原(MOC-31)、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原、抗成熟サーファクタントアポタンパク質B、および1つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択された任意の5つのプローブと組み合わせた抗K i - 67

・抗K i - 67、抗VEGF、抗ヒト上皮関連抗原(MOC-31)、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原、抗成熟サーファクタントアポタンパク質B、および1つまたは複数のさらなるプローブ

【0439】

10

商業的に好ましいプローブの検出

・1つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗K i - 67
 ・1つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗TTF-1
 ・1つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗EGFR
 ・1つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗増殖細胞核抗原
 ・抗K i - 67、抗TTF-1、抗EGFR、および抗増殖細胞核抗原からなる群から選択される2つのプローブ

・抗K i - 67、抗TTF-1、抗EGFR、および抗増殖細胞核抗原からなる群から選択される3つのプローブ

・抗K i - 67、抗TTF-1、抗EGFR、および抗増殖細胞核抗原
 ・抗K i - 67、抗TTF-1、抗EGFR、および抗増殖細胞核抗原、および1つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される2つのプローブ
 ・抗K i - 67、抗TTF-1、抗EGFR、および抗増殖細胞核抗原、および1つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される3つのプローブ

20

・抗K i - 67、抗TTF-1、抗EGFR、抗増殖細胞核抗原、および1つまたは複数のさらなるプローブ

【0440】

腺がんおよび他の肺がん型の判別

・抗ムチン1および抗TTF-1
 ・抗VEGF、抗サーファクタントアポタンパク質A、抗BCL-2、抗ER関連P29、および抗Glu t 3からなる群から選択される任意の1つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1

30

・抗VEGF、抗サーファクタントアポタンパク質A、抗BCL-2、抗ER関連P29、および抗Glu t 3からなる群から選択される任意の2つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1

・抗VEGF、抗サーファクタントアポタンパク質A、抗BCL-2、抗ER関連P29、および抗Glu t 3からなる群から選択される任意の3つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1

・抗VEGF、抗サーファクタントアポタンパク質A、抗BCL-2、抗ER関連P29、および抗Glu t 3からなる群から選択される任意の4つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1

40

・抗VEGF、抗サーファクタントアポタンパク質A、抗ムチン1、抗TTF-1、抗BCL-2、抗ER関連P29、および抗Glu t 3

・抗ムチン1、抗TTF-1、および1つまたは複数のさらなるプローブ

・抗VEGF、抗サーファクタントアポタンパク質A、抗BCL-2、抗ER関連P29、抗Glu t 3、および1つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される任意の1つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1

・抗VEGF、抗サーファクタントアポタンパク質A、抗BCL-2、抗ER関連P29、抗Glu t 3、および1つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される任意の2つのプローブと組み合わせた抗ムチン1および抗TTF-1

50

- ・抗 V E G F、抗サーファクタントアポタンパク質 A、抗 B C L-2、抗 E R 関連 P 2 9、抗 G l u t 3、および 1 つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される任意の 3 つのプローブと組み合わせた抗ムチン 1 および抗 T T F-1
 - ・抗 V E G F、抗サーファクタントアポタンパク質 A、抗 B C L-2、抗 E R 関連 P 2 9、抗 G l u t 3、および 1 つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される任意の 4 つのプローブと組み合わせた抗ムチン 1 および抗 T T F-1
 - ・抗 V E G F、抗サーファクタントアポタンパク質 A、抗ムチン 1、抗 T T F-1、抗 B C L-2、抗 E R 関連 P 2 9、抗 G l u t 3、および 1 つまたは複数のさらなるプローブ
- 【0441】

扁平上皮がんおよび他の肺がん型の判別

- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、および抗黒色腫関連抗原 3 からなる群から選択される任意の 1 つのプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、および抗黒色腫関連抗原 3 からなる群から選択される任意の 2 つのプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、および抗黒色腫関連抗原 3 からなる群から選択される任意の 3 つのプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、および抗黒色腫関連抗原 3 からなる群から選択される任意の 4 つのプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・抗 C D 4 4 v 6、抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、および抗黒色腫関連抗原 3
- ・抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、抗黒色腫関連抗原 3、および 1 つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される任意の 1 つのプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、抗黒色腫関連抗原 3、および 1 つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される任意の 2 つのプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、抗黒色腫関連抗原 3、および 1 つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される任意の 3 つのプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、および抗黒色腫関連抗原 3、および 1 つまたは複数のさらなるプローブからなる群から選択される任意の 4 つのプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・抗 C D 4 4 v 6、抗 V E G F、抗トロンボモジュリン、抗 G l u t 1、抗 E R 関連 P 2 9、抗黒色腫関連抗原 3、および 1 つまたは複数のさらなるプローブ

【0442】

大細胞がんおよび他の肺がん型の判別

- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗 V E G F
 - ・抗 V E G F および抗 p 1 2 0
 - ・抗 V E G F および抗 G l u t 3
 - ・抗 V E G F、抗 p 1 2 0、および抗サイクリン A
 - ・抗 V E G F、抗 p 1 2 0、および 1 つまたは複数のさらなるプローブ
 - ・抗 V E G F、抗 G l u t 3、および 1 つまたは複数のさらなるプローブ
 - ・抗 V E G F、抗 p 1 2 0、抗サイクリン A、および 1 つまたは複数のさらなるプローブ
- 【0443】

中皮腫および他の肺がん型の判別

- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6
- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗増殖細胞核抗原
- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗ヒト上皮関連抗原 (M O C - 3 1)
- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗 C D 4 4 v 6、抗増殖細胞核抗原、および抗ヒト上皮関連抗原 (M O C - 3 1) からなる群から選択される 2 つのプローブ
- ・ 抗 C D 4 4 v 6、抗増殖細胞核抗原、抗ヒト上皮関連抗原 (M O C - 3 1)、および 1 つまたは複数のさらなるプローブ

【0 4 4 4】

小細胞がんおよび他の肺がん型の判別

- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗増殖細胞核抗原
- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗 B C L - 2
- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗 E G F R
- ・ 抗増殖細胞核抗原、抗 B C L - 2、および抗 E G F R からなる群らから選択される 2 つのプローブ
- ・ 抗増殖細胞核抗原、抗 B C L - 2、および抗 E G F R
- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗増殖細胞核抗原、抗 B C L - 2、および抗 E G F R からなる群らから選択される 2 つのプローブ
- ・ 抗増殖細胞核抗原、抗 B C L - 2、抗 E G F R、および 1 つまたは複数のさらなるプローブ

【0 4 4 5】

腺がん、扁平表皮がん、大細胞がん、中皮腫、および小細胞がんの同時判別

- ・ 抗 V E G F、抗トロポモジュリン、抗 C D 4 4 v 6、抗サーファクタントアポタンパク質 A、抗増殖細胞核抗原、抗ムチン 1、抗ヒト上皮関連抗原 (M O C - 3 1)、抗 T T F - 1、抗 N - カドヘリン、抗 E G F R、および抗増殖細胞核抗原から選択される 2 つまたはそれ以上のプローブ
- ・ 抗 V E G F、抗トロポモジュリン、抗 C D 4 4 v 6、抗サーファクタントアポタンパク質 A、抗増殖細胞核抗原、抗ムチン 1、抗ヒト上皮関連抗原 (M O C - 3 1)、抗 T T F - 1、抗 N - カドヘリン、抗 E G F R、および抗増殖細胞核抗原
- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗 V E G F、抗トロポモジュリン、抗 C D 4 4 v 6、抗サーファクタントアポタンパク質 A、抗増殖細胞核抗原、抗ムチン 1、抗ヒト上皮関連抗原 (M O C - 3 1)、抗 T T F - 1、抗 N - カドヘリン、抗 E G F R、および抗増殖細胞核抗原から選択される 2 つまたはそれ以上のプローブ
- ・ 1 つまたは複数のさらなるプローブと組み合わせた抗 V E G F、抗トロポモジュリン、抗 C D 4 4 v 6、抗サーファクタントアポタンパク質 A、抗増殖細胞核抗原、抗ムチン 1、抗ヒト上皮関連抗原 (M O C - 3 1)、抗 T T F - 1、抗 N - カドヘリン、抗 E G F R、および抗増殖細胞核抗原

【0 4 4 6】

5. 結論

a. 分子診断へのパネルアプローチの有効性

i. 非直感的解決

コントロール対がんについての各プローブのマーカースコアの分布を示すヒストグラムをプロットした (P a t h o l o g i s t D a t a . x l s、ワークシート: ヒストグラム)。特定のパネルのためのプローブの直感的選択では有効性は明らかではなく、記載の本発明によれば明白な方法を使用しなくても有効な組み合わせを得ることができることがこれらのヒストグラムから明らかである。

【0 4 4 7】

i i. 変化した産物適用の至適化

i i i. 異なる方法を使用した類似の結果によって証明されるアプローチの信頼性

本報告の主部における種々の分析によって得られ、表および図にまとめた結果の精査によ

10

20

30

40

50

り、以下の所見を示す。

【0448】

1. 各プローブの性能の慎重な精査によっても任意の1つのプローブのみよりも良好に作用し得る明白なプローブ組み合わせは得られない。
2. 評価した3つ全ての分類方法を類似の特徴集合に対して精査した。ある分類が別の分類よりも優先し得るデータ構造による小さな相違が認められた。
3. これらの方法の1つを使用してデザインした全分類は、独立した病理学者からのデータを試験した場合に良好な性能が得られることを示し、これはデザインプロセス中では認められない。これは本発明において信頼性が高かった。
4. プローブ7のみを基本とした検出プローブの性能が高かった。 10
5. プローブ7をプローブ16または25と組み合わせた場合、より良好な性能が得られる。
6. 他のプローブのプローブ7との組み合わせは性能が改善されるようであるが、捕捉した余剰の症例数は提示できないほど低く、このようにしてデザインした分類は一般化できなかった。
7. プローブ7以外のプローブから選択したパネルの性能は、ヒトスクリーニングを使用した現在の実務と比較していくらは判別され十分によいが、おそらく明日の臨床診断細胞学において自動化サイトメーターには十分ではないだろう（図6を参照のこと）。
8. プローブの他の組み合わせは、有用であり得るが、性能が低い。
9. いくつかのプローブが利用不可能である場合、本発明によりプローブの組み合わせを選択可能である。これを、商業的に好ましいプローブのみの集合に基づいた分類デザインによって例示した。図7を参照のこと。 20
10. 本発明によれば、高価なプローブを加重することが可能である。これらのプローブを分析からすべて排除するよりも、その寄与が重要な場合はこのプローブをパネルに含めることが可能である。
11. 本発明によれば、他のがん型から1つの肺がん型を判別することができる1つの肺がん型特異的判別をデザインすることが可能である。
12. 5つのがんを分類するための1つのパネルの性能の分析により判別は可能であるが、他のがんから1つのがんを判別するようにそれぞれデザインされた5つのパネルの集合よりも全エラー率が悪かった。 30
13. 5つの2ウェイ分類の組み合わせを使用して非常に有用な判別が得られた。
14. 共通のプローブ集合を5つの判別パネルのための3つの分類法によって選択し、この結果も信頼できる。
15. 腺がん単離用のプローブは、1、14、19、20、25、および27である。
16. 扁平上皮がん単離用のプローブは、1、2、3、24、25、および26である。
17. 大細胞がん単離用のプローブは、1および7、または1、および21である。
18. 中皮腫単離用のプローブは、3、12、および16である。
19. 小細胞がん単離用のプローブは、12、20および23である。
20. 全がんを同時に認識するためのプローブは、1、2、3、4、12、14、19、22、23、および28である。 40
21. 本発明によって定義された多ペアワイズパネル使用の利点は、疑いのある症例は5つの任意のパネルでは記録することができず、2つまたはそれ以上のパネルで紛らわしい症例を示すことができることである。このような変則な報告は、細胞学者にさらなる分析が必要であることを警告する。

【0449】

i v. 危険管理研究

本研究で適用した全検定は、本質的に統計であった。小さな性能の改良に基づいて選択したプローブは、新規のデータで検定した場合統計的に変動する。結果の信頼性を得るために、病理学者1および病理学者2のデータに対する線形判別分析から出現した最良の分類を検定した。病理学者3のデータは病理学者1および病理学者2のデータと統計的に異な 50

るので、病理学者3のデータを使用して検定した場合に良好な性能が得られた場合、これは非常に有望であることを思い出すべきである。

【0450】

(1) 未知のデータでの検定についての報告－検出パネル

(a) 方法

上記の「検出パネルの組成」というタイトルの節では、特徴7および16を使用して良好な性能が得られることを示した。SPSSを使用して、7および16についてHスコアが報告された病理学者3のデータを選択した。次いで、変換および計算を使用して、新規の特徴として正準判別関数を作成した。次いで、この特徴のみの性能を検定した。

【0451】

(b) 結果

病理学者1および病理学者2のデータならびに病理学者3のデータに対してデザインした分類の検定結果を示す。プローブ7および16に対する線形判別関数を使用して分類をデザインした。病理学者2正準関数は、 $= 0.965 * \text{プローブ7} - 0.298 * \text{プローブ16}$ であった。

【0452】

【表38】

プローブ7および16を使用した病理学者3のデータに対する分類の結果

		予想される群の構成要素		合計
		0	1	
元の値	診断 (UCLA)	0	1	
	0	20	1	21
%	1	6	41	47
	0	95.2	4.8	100.0
相互検証の値	1	12.8	87.2	100.0
	0	20	1	21
%	1	6	41	47
	0	95.2	4.8	100.0
	1	12.8	87.2	100.0

a 分析におけるこれらの症例のみにおいて相互検証を行う。相互検証では、各症例をこの症例以外の全症例から得た関数によって分類する。

b 最初にグループ分けされた症例の89.7%が正確に分類された。

c 相互検証にグループ分けされた症例の89.7%が正確に分類された。

【0453】

これは、以下に示したプローブ7のみに対する病理学者3のデータの分類よりも良好である。

【0454】

【表39】

プローブ7のみを使用した病理学者3のデータに対する分類の結果

		予想される群の構成要素		合計
		0	1	
元の値	診断 (UCLA)			
	0	20	1	21
%	1	8	39	47
	0	95.2	4.8	100.0
相互検証の値	1	17.0	83.0	100.0
	0	20	1	21
%	1	8	39	47
	0	95.2	4.8	100.0
	1	17.0	83.0	100.0

10

a 分析におけるこれらの症例のみにおいて相互検証を行う。相互検証では、各症例をこの症例以外の全症例から得た関数によって分類する。

b 最初にグループ分けされた症例の86.8%が正確に分類された。

c 相互検証にグループ分けされた症例の86.8%が正確に分類された。

【0455】

(c) 結論

20

これにより、プローブ7および16に基づく2プローブ分類はプローブ7のみよりも良好であるという確信が得られる。

【0456】

(2) 未知のデータでの検定についての報告－判別パネル

(a) バックグラウンド

以下に、LDFを使用して病理学者1および病理学者2のデータを使用してデザインし、未知の病理学者3のデータを使用して検定した分類の性能を報告した。デザイン段階の数は比較的小さく、検定データの数もまた小さいので、第1および第2の集合に対する性能の変動性が良好であると予想することができる。

【0457】

30

(b) 方法

SPSSでは、「パターン認識」というタイトルの節で導いた正準判別関数を確立し、5つ全てのがんクラスについて病理学者3のデータを検定した。

【0458】

(c) 結果

中皮腫LDF = プローブ3 s c^{*} . 385 - プローブ12 s^{*} . 317 + プローブ16 s^{*} 1.006

【0459】

【表40】

分類の結果

		予想される群の構成要素		合計
		中皮腫=1 その他=0	0 1	
元の値	0	38	2	40
	1	1	7	8
%	0	95.0	5.0	100.0
	1	12.5	87.5	100.0
相互検証の値	0	38	2	40
	1	1	7	8
%	0	95.0	5.0	100.0
	1	12.5	87.5	100.0

10

a 分析におけるこれらの症例のみにおいて相互検証を行う。相互検証では、各症例をこの症例以外の全症例から得た関数によって分類する。

b 最初にグループ分けされた症例の 93.8% が正確に分類された。

c 相互検証にグループ分けされた症例の 93.8% が正確に分類された。

【0460】

20

小細胞がん L D F = プローブ 1 2 s^{*}. 5 7 5 - プローブ 2 0 s^{*}. 4 0 8 - プローブ 2 2 s^{*}. 4 2 3 + プローブ 2 3 s^{*}. 3 4 4

【0461】

【表 4 1】

分類の結果

		予想される群の構成要素		合計
		小細胞癌=1 その他=0	0 1	
元の値	0	39	3	42
	1	1	5	6
%	0	92.9	7.1	100.0
	1	16.7	83.3	100.0
相互検証の値	0	39	3	42
	1	1	5	6
%	0	92.9	7.1	100.0
	1	16.7	83.3	100.0

30

a 分析におけるこれらの症例のみにおいて相互検証を行う。相互検証では、各症例をこの症例以外の全症例から得た関数によって分類する。

b 最初にグループ分けされた症例の 91.7% が正確に分類された。

c 相互検証にグループ分けされた症例の 91.7% が正確に分類された。

40

【0462】

扁平上皮がん L D F = プローブ 1 s c^{*}. 3 2 8 - プローブ 2 s c^{*}. 2 9 5 + プローブ 3 s c^{*}. 7 4 1 + プローブ 2 4 s^{*}. 4 9 0 + プローブ 2 5 s^{*}. 3 9 3 + プローブ 2 6 s^{*}. 4 2 6

【0463】

【表 4 2】

分類の結果

	予想される群の構成要素			合計
	扁平上皮癌=1 その他=0	0	1	
元の値	0	31	4	35
	1	2	9	11
%	0	88.6	11.4	100.0
	1	18.2	81.8	100.0
相互検証の値	0	31	4	35
	1	2	9	11
%	0	88.6	11.4	100.0
	1	18.2	81.8	100.0

10

a 分析におけるこれらの症例のみにおいて相互検証を行う。相互検証では、各症例をこの症例以外の全症例から得た関数によって分類する。

b 最初にグループ分けされた症例の 87. 0 % が正確に分類された。

c 相互検証にグループ分けされた症例の 87. 0 % が正確に分類された。

【0 4 6 4】

20

大細胞がん L D F = プローブ 1 s c^{*}. 8 4 7 - プローブ 7 s c^{*}. 4 5 2

【0 4 6 5】

【表 4 3】

分類の結果

	予想される群の構成要素			合計
	大細胞癌=1 その他=0	0	1	
元の値	0	23	15	38
	1	4	5	69
%	0	60.5	39.5	100.0
	1	44.4	55.6	100.0
相互検証の値	0	23	15	38
	1	4	5	9
%	0	60.5	39.5	100.0
	1	44.4	55.6	100.0

30

a 分析におけるこれらの症例のみにおいて相互検証を行う。相互検証では、各症例をこの症例以外の全症例から得た関数によって分類する。

b 最初にグループ分けされた症例の 59. 6 % が正確に分類された。

c 相互検証にグループ分けされた症例の 59. 6 % が正確に分類された。

40

【0 4 6 6】

非常に少数の大細胞がんの症例を用いてデザインおよび検定した分類の性能は低いが有用であり、この結果は依然として非常に有望である。

腺がん L D F = プローブ 4 s c^{*}. 5 1 5 - プローブ 5 s c^{*}. 2 9 9 - プローブ 4 s^{*}.
4 8 5 - プローブ 1 9 s^{*}. 3 4 7 + プローブ 2 0 s^{*}. 7 2 3 + プローブ 2 5 s^{*}. 3 2
7 + プローブ 2 7 s^{*}. 3 2 7

【0 4 6 7】

【表 4 4】

50

分類の結果

	予想される群の構成要素			合計
	腺癌=1 その他=0	0	1	
元の値	0	29	5	34
	1	0	14	14
%	0	85.3	14.7	100.0
	1	0	100.0	100.0
相互検証の値	0	29	5	34
	1	0	14	14
%	0	85.3	14.7	100.0
	1	0	100.0	100.0

10

a 分析におけるこれらの症例のみにおいて相互検証を行う。相互検証では、各症例をこの症例以外の全症例から得た関数によって分類する。

b 最初にグループ分けされた症例の 89.6% が正確に分類された。

c 相互検証にグループ分けされた症例の 89.6% が正確に分類された。

【0468】

20

(d) 結論

これらの分類の性能が未知のデータの適用に耐えたことに留意することは非常に有望である。これにより、各がんを検出する能力において非常に高い確信が得られる。

【0469】

(3) 異なる患者および病理学者由来のデータの訓練および検定

信頼性についての「最終の最終」試験として、LDFを、病理学者1および病理学者2の両方によって調査されたデータを訓練した。これには、病理学者3によって調査されたデータは除かれている。したがって、病理学者3+病理学者1のデータによって調査されたデータに対する検定は偏見がない。以前に、検定および訓練のための同一の患者由来のデータを使用した検定プロセスは偏りがある。

30

【0470】

LDFにより、含まれないプローブ4以外の特徴についての同一の集合が得られた。LDF = プローブ1 s c^{*}. 288 + プローブ7 s c^{*}. 846 - プローブ15 s^{*}. 249 - プローブ16 s^{*}. 534

【0471】

【表45】

分類の結果

曲線下面積=.977

		予想される群の構成要素		合計
		0	1	
元の値	診断 (UCLA)	0	1	
	0	20	0	20
%	1	9	37	46
	0	100.0	0	100.0
相互検証の値	1	19.6	80.4	100.0
	0	20	0	20
%	1	9	37	46
	0	100.0	0	100.0
	1	19.6	80.4	100.0

10

a 分析におけるこれらの症例のみにおいて相互検証を行う。相互検証では、各症例をこの症例以外の全症例から得た関数によって分類する。

b 最初にグループ分けされた症例の 86.4% が正確に分類された。

c 相互検証にグループ分けされた症例の 86.4% が正確に分類された。

20

【0472】

なお、妥当な結果であるが、類似の結果でもあり、しかし曲線下面積は小さく、病理学者3のデータのみに対してプローブ7のみを得た。

【0473】

【表46】

分類の結果

曲線下面積=.908

		予想される群の構成要素		合計
		0	1	
元の値	診断 (UCLA)	0	1	
	0	19	1	20
%	1	7	39	46
	0	95.0	5.0	100.0
相互検証の値	1	15.2	84.8	100.0
	0	19	1	20
%	1	7	39	46
	0	95.0	5.0	100.0
	1	15.2	84.8	100.0

30

a 分析におけるこれらの症例のみにおいて相互検証を行う。相互検証では、各症例をこの症例以外の全症例から得た関数によって分類する。

b 最初にグループ分けされた症例の 87.9% が正確に分類された。

c 相互検証にグループ分けされた症例の 87.9% が正確に分類された。

40

【0474】

[参考文献]

【表47-A】

- [1] Goldberg-Kahn, B., Healy, J.C. and Bishop, J.W. (1997) The cost of diagnosis: a comparison of four different strategies in the workup of solitary radiographic lung lesions. *Chest* 111, 870-6.
- [2] O'Donovan, P.B. (1997) The radiologic appearance of lung cancer. *Oncology (Huntingt)* 11, 1387-402; discussion 1402-4.
- [3] Worrell, J.A. (1995) Radiology of the central airways. *Otolaryngol Clin North Am* 28, 701-20.
- [4] Henschke, C.I., Miettinen, O.S., Yankelevitz, D.F., Libby, D.M. and Smith, J.P. (1994) Radiographic screening for cancer. Proposed paradigm for requisite research. *Clin Imaging* 18, 16-20. 10
- [5] Lam, S., Kennedy, T., Unger, M., Miller, Y.E., Gelmont, D., Rusch, V., Gipe, B., Howard, D., LeRiche, J.C., Coldman, A. and Gazdar, A.F. (1998) Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest* 113, 696-702.
- [6] Sazon, D.A., Santiago, S.M., Soo Hoo, G.W., Khonsary, A., Brown, C., Mandelkern, M., Bland, W. and Williams, A.J. (1996) Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in the detection and staging of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 417-21.
- [7] Lowe, V.J., DeLong, D.M., Hoffman, J.M. and Coleman, R.E. (1995) Optimum scanning protocol for FDG-PET evaluation of pulmonary malignancy. *J Nucl Med* 36, 883-7. 20
- [8] Lowe, V.J., Fletcher, J.W., Gobar, L., Lawson, M., Kirchner, P., Valk, P., Karis, J., Hubner, K., Delbeke, D., Heiberg, E.V., Patz, E.F. and Coleman, R.E. (1998) Prospective investigation of positron emission tomography in lung nodules. *J Clin Oncol* 16, 1075-84.
- [9] Raab, S.S., Hornberger, J. and Raffin, T. (1997) The importance of sputum cytology in the diagnosis of lung cancer: a cost-effectiveness analysis. *Chest* 112, 937-45.
- [10] Franklin, W.A. (1998) New molecular and cellular approaches to lung cancer detection. In: *Biology of Lung Cancer*, pp. 529-570.
- [11] Kern, W.H. (1988) The diagnostic accuracy of sputum and urine cytology. *Acta Cytol* 32, 651-4. 30
- [12] Mehta, A.C., Marty, J.J. and Lee, F.Y. (1993) Sputum cytology. *Clin Chest Med* 14, 69-85.
- [13] Gledhill, A., Bates, C., Henderson, D., DaCosta, P. and Thomas, G. (1997) Sputum cytology: a limited role. *J Clin Pathol* 50, 566-8.
- [14] Steffee, C.H., Segletes, L.A. and Geisinger, K.R. (1997) Changing cytologic and histologic utilization patterns in the diagnosis of 515 primary lung malignancies. *Cancer* 81, 105-15.
- [15] Zaman, M.B. (1991) Pulmonary cytology. *Clin Lab Med* 11, 293-315.
- [16] Flehinger, B.J. and Melamed, M.R. (1994) Current status of screening for lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* 4, 1-15. 40

- [17] Koss, L.G., Melamed, M.R. and Goodner, J.T. (1964) Pulmonary cytology: A brief survey of diagnostic results from July 1st, 1952 until December 31st, 1960. *Acta Cytol* 8, 104.
- [18] Saccomanno, G., Saunders, R.P., Ellis, H., Archer, V.E., Wood, B.G. and Beckler, P.A. (1963) Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum. *Acta Cytol* 5, 305-310.
- [19] Miura, H., Konaka, C., Kawate, N., Tsuchida, T. and Kato, H. (1992) Sputum cytology-positive, bronchoscopically negative adenocarcinoma of the lung [see comments]. *Chest* 102, 1328-32.
- [20] Valatis, J., Warrens, D. and Gamble, D. (1981) Increased incidence of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 47, 1042-1046. 10
- [21] Baldini, E.H. and Strauss, G.M. (1997) Women and lung cancer: waiting to exhale. *Chest* 112, 229S-234S.
- [22] Caldwell, C.J. and Berry, C.L. (1996) Is the incidence of primary adenocarcinoma of the lung increasing? *Virchows Arch* 429, 359-63.
- [23] Risse, E.K., Vooijs, G.P. and van't Hof, M.A. (1987) Relationship between the cellular composition of sputum and the cytologic diagnosis of lung cancer. *Acta Cytol* 31, 170-6.
- [24] Holiday, D.B., McLarty, J.W., Farley, M.L., Mabry, L.C., Cozens, D., Roby, T., Waldron, E., Underwood, R.D., Anderson, E., Culbreth, W. and *et al.* (1995) Sputum cytology within and across laboratories. A reliability study. *Acta Cytol* 39, 195-206. 20
- [25] Eddy, D.M. (1989) Screening for lung cancer [see comments]. *Ann Intern Med* 111, 232-7.
- [26] Younes, M., Brown, R.W., Stephenson, M., Gondo, M. and Cagle, P.T. (1997) Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 80, 1046-51.
- [27] Ogawa, J., Inoue, H. and Koide, S. (1997) Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int J Cancer* 74, 189-92.
- [28] Ito, T., Noguchi, Y., Satoh, S., Hayashi, H., Inayama, Y. and Kitamura, H. (1998) Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage [see comments]. *Mod Pathol* 11, 437-43. 30
- [29] Sosolik, R.C., McGaughy, V.R. and De Young, B.R. (1997) Anti-MOC-31: a potential addition to the pulmonary adenocarcinoma versus mesothelioma immunohistochemistry panel. *Mod Pathol* 10, 716-9.
- [30] Ordonez, N.G. (1998) Value of the MOC-31 monoclonal antibody in differentiating epithelial pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* 29, 166-9.
- [31] Takanami, I., Tanaka, F., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. and Kodaira, S. (1996) The basic fibroblast growth factor and its receptor in pulmonary adenocarcinomas: an investigation of their expression as prognostic markers. *Eur J Cancer* 32A, 1504-9. 40
- [32] Takanami, I., Imamura, T., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. and Kodaira, S. (1996) Immunohistochemical detection of basic fibroblast growth

- factor as a prognostic indicator in pulmonary adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 26, 293-7.
- [33] Ohta, Y., Endo, Y., Tanaka, M., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Watanabe, Y. and Sasaki, T. (1996) Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2, 1411-6 1996.
- [34] Volm, M., Koomagi, R., Mattern, J. and Stammers, G. (1997) Prognostic value of basic fibroblast growth factor and its receptor (FGFR-1) in patients with non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer* 33, 691-3.
- [35] Hiyama, K., Hiyama, E., Ishioka, S., Yamakido, M., Inai, K., Gazdar, A.F., Piatyszek, M.A. and Shay, J.W. (1995) Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 87, 895-902. 10
- [36] Yashima, K., Litzky, L.A., Kaiser, L., Rogers, T., Lam, S., Wistuba, II, Milchgrub, S., Srivastava, S., Piatyszek, M.A., Shay, J.W. and Gazdar, A.F. (1997) Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 57, 2373-7.
- [37] Ahrendt, S.A., Yang, S.C., Wu, L., Westra, W.H., Jen, J., Califano, J.A. and Sidransky, D. (1997) Comparison of oncogene mutation detection and telomerase activity for the molecular staging of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1207-14.
- [38] Albanell, J., Lonardo, F., Rusch, V., Engelhardt, M., Langenfeld, J., Han, W., Klimstra, D., Venkatraman, E., Moore, M.A. and Dmitrovsky, E. (1997) High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 89, 1609-15. 20
- [39] Hiyama, K., Ishioka, S., Shay, J.W., Taooka, Y., Maeda, A., Isobe, T., Hiyama, E., Maeda, H. and Yamakido, M. (1998) Telomerase activity as a novel marker of lung cancer and immune- associated lung diseases. *Int J Mol Med* 1, 545-9.
- [40] Yahata, N., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J.H., Iwama, H., Hayashi, S., Ando, K., Hirano, T., Tsuchida, T., Kato, H., Shay, J.W. and Toyama, K. (1998) Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst* 90, 684-90.
- [41] Lee, J.C., Jong, H.S., Yoo, C.G., Han, S.K., Shim, Y.S. and Kim, Y.W. (1998) Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer* 21, 99-103. 30
- [42] Arai, T., Yasuda, Y., Takaya, T., Ito, Y., Hayakawa, K., Toshima, S., Shibuya, C., Yoshimi, N. and Kashiki, Y. (1998) Application of telomerase activity for screening of primary lung cancer in broncho-alveolar lavage fluid. *Oncol Rep* 5, 405-8.
- [43] Fujii, M., Motoi, M., Saeki, H., Aoe, K. and Moriwaki, S. (1993) Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-small cell lung cancer. *Acta Med Okayama* 47, 103-8.
- [44] Kawai, T., Suzuki, M., Kono, S., Shinomiya, N., Rokutanda, M., Takagi, K., Ogata, T. and Tamai, S. (1994) Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in lung carcinoma. Correlation with DNA flow cytometric analysis. *Cancer* 74, 2468-75.
- [45] Ogawa, J., Tsurumi, T., Yamada, S., Koide, S. and Shohtsu, A. (1994) Blood vessel invasion and expression of sialyl Lewisx and proliferating cell nuclear antigen in stage I non-small cell lung cancer. Relation to postoperative recurrence. *Cancer* 73, 1177-83. 40

- [46] Ebina, M., Steinberg, S.M., Mulshine, J.L. and Linnoila, R.I. (1994) Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 54, 2496-503.
- [47] Fontanini, G., Vignati, S., Bigini, D., Merlo, G.R., Ribecchini, A., Angeletti, C.A., Basolo, F., Pingitore, R. and Bevilacqua, G. (1994) Human non-small cell lung cancer: p53 protein accumulation is an early event and persists during metastatic progression [see comments]. *J Pathol* 174, 23-31.
- [48] Wiethege, T., Voss, B. and Muller, K.M. (1995) P53 accumulation and proliferating-cell nuclear antigen expression in human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 121, 371-7. 10
- [49] Esposito, V., Baldi, A., De Luca, A., Micheli, P., Mazzarella, G., Baldi, F., Caputi, M. and Giordano, A. (1997) Prognostic value of p53 in non-small cell lung cancer: relationship with proliferating cell nuclear antigen and cigarette smoking. *Hum Pathol* 28, 233-7.
- [50] Caputi, M., Esposito, V., Groger, A.M., Pacilio, C., Murabito, M., Dekan, G., Baldi, F., Wolner, E. and Giordano, A. (1998) Prognostic role of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: an immunohistochemical analysis. *In Vivo* 12, 85-8.
- [51] Hirata, T., Fukuse, T., Naiki, H., Hitomi, S. and Wada, H. (1998) Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res* 58, 1108-10.
- [52] Ariza, A., Mate, J.L., Isamat, M., Lopez, D., Von Uexkull-Guldeband, C., Rosell, R., Fernandez-Vasalo, A. and Navas-Palacios, J.J. (1995) Standard and variant CD44 isoforms are commonly expressed in lung cancer of the non-small cell type but not of the small cell type. *J Pathol* 177, 363-8. 20
- [53] Fasano, M., Sabatini, M.T., Wieczorek, R., Sidhu, G., Goswami, S. and Jagirdar, J. (1997) CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors: a role in histogenesis? *Cancer* 80, 34-41.
- [54] Miyoshi, T., Kondo, K., Hino, N., Uyama, T. and Monden, Y. (1997) The expression of the CD44 variant exon 6 is associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1289-97.
- [55] Tran, T.A., Kallakury, B.V., Sheehan, C.E. and Ross, J.S. (1997) Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 28, 809-14. 30
- [56] Takigawa, N., Segawa, Y., Mandai, K., Takata, I. and Fujimoto, N. (1997) Serum CD44 levels in patients with non-small cell lung cancer and their relationship with clinicopathological features. *Lung Cancer* 18, 147-57.
- [57] Kondo, K., Miyoshi, T., Hino, N., Shimizu, E., Masuda, N., Takada, M., Uyama, T. and Monden, Y. (1998) High frequency expressions of CD44 standard and variant forms in non-small cell lung cancers, but not in small cell lung cancers. *J Surg Oncol* 69, 128-36.
- [58] Sasaki, J.I., Tanabe, K.K., Takahashi, K., Okamoto, I., Fujimoto, H., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M. and Saya, H. (1998) Expression of CD44 splicing isoforms in lung cancers: dominant expression of CD44v8-10 in non-small cell lung carcinomas. *Int J Oncol* 12, 525-33. 40

- [59] Volm, M., Koomagi, R., Matern, J. and Stammier, G. (1997) Cyclin A is associated with an unfavourable outcome in patients with non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 75, 1774-8.
- [60] Dobashi, Y., Shoji, M., Jiang, S.X., Kobayashi, M., Kawakubo, Y. and Kameya, T. (1998) Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *Am J Pathol* 153, 963-72.
- [61] Volm, M., Rittgen, W. and Drings, P. (1998) Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas [published erratum appears in *Br J Cancer* 1998 Apr;77(7):1198]. *Br J Cancer* 77, 663-9. 10
- [62] Shoji, M., Dobashi, Y., Morinaga, S., Jiang, S.X. and Kameya, T. (1999) Tumor extension and cell proliferation in adenocarcinomas of the lung. *Am J Pathol* 154, 909-18.
- [63] Shapiro, G.I., Edwards, C.D., Kobzik, L., Godleski, J., Richards, W., Sugarbaker, D.J. and Rollins, B.J. (1995) Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* 55, 505-9.
- [64] Betticher, D.C., Heighway, J., Hasleton, P.S., Altermatt, H.J., Ryder, W.D., Cerny, T. and Thatcher, N. (1996) Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 73, 294-300. 20
- [65] Mate, J.L., Ariza, A., Aracil, C., Lopez, D., Isamat, M., Perez-Piteira, J. and Navas-Palacios, J.J. (1996) Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol* 180, 395-9.
- [66] Yang, W.I., Chung, K.Y., Shin, D.H. and Kim, Y.B. (1996) Cyclin D1 protein expression in lung cancer. *Yonsei Med J* 37, 142-50.
- [67] Betticher, D.C., Heighway, J., Thatcher, N. and Hasleton, P.S. (1997) Abnormal expression of CCND1 and RB1 in resection margin epithelia of lung cancer patients. *Br J Cancer* 75, 1761-8.
- [68] Nishio, M., Koshikawa, T., Yatabe, Y., Kuroishi, T., Suyama, M., Nagatake, M., Sugiura, T., Ariyoshi, Y., Mitsudomi, T. and Takahashi, T. (1997) Prognostic significance of cyclin D1 and retinoblastoma expression in combination with p53 abnormalities in primary, resected non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 3, 1051-8. 30
- [69] Caputi, M., De Luca, L., Papaccio, G., A, D.A., Cavallotti, I., Scala, P., Scarano, F., Manna, M., Gualdiero, L. and De Luca, B. (1997) Prognostic role of cyclin D1 in non small cell lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Eur J Histochem* 41, 133-8.
- [70] Betticher, D.C., White, G.R., Vonlanthen, S., Liu, X., Kappeler, A., Altermatt, H.J., Thatcher, N. and Heighway, J. (1997) G1 control gene status is frequently altered in resectable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 74, 556-62.
- [71] Volm, M., Koomagi, R. and Rittgen, W. (1998) Clinical implications of cyclins, cyclin-dependent kinases, RB and E2F1 in squamous-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 79, 294-9. 40

- [72] Kurasono, Y., Ito, T., Kameda, Y., Nakamura, N. and Kitamura, H. (1998) Expression of cyclin D1, retinoblastoma gene protein, and p16 MTS1 protein in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. An immunohistochemical analysis. *Virchows Arch* 432, 207-15.
- [73] Tanaka, H., Fujii, Y., Hirabayashi, H., Miyoshi, S., Sakaguchi, M., Yoon, H.E. and Matsuda, H. (1998) Disruption of the RB pathway and cell-proliferative activity in non- small-cell lung cancers. *Int J Cancer* 79, 111-5.
- [74] Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C., Pennacchietti, S., Nicotra, M.R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P.G., Comoglio, P.M. and Di Renzo, M.F. (1996) Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 74, 1862-8. 10
- [75] Harvey, P., Warn, A., Newman, P., Perry, L.J., Ball, R.Y. and Warn, R.M. (1996) Immunoreactivity for hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, met, in human lung carcinomas and malignant mesotheliomas. *J Pathol* 180, 389-94.
- [76] Takanami, I., Tanana, F., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. and Kodaira, S. (1996) Hepatocyte growth factor and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in pulmonary adenocarcinomas: an evaluation of their expression as prognostic markers. *Oncology* 53, 392-7.
- [77] Siegfried, J.M., Weissfeld, L.A., Luketich, J.D., Weyant, R.J., Gubish, C.T. and Landreneau, R.J. (1998) The clinical significance of hepatocyte growth factor for non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 66, 1915-8. 20
- [78] Nguyen, P.L., Niehans, G.A., Cherwitz, D.L., Kim, Y.S. and Ho, S.B. (1996) Membrane-bound (MUC1) and secretory (MUC2, MUC3, and MUC4) mucin gene expression in human lung cancer. *Tumour Biol* 17, 176-92.
- [79] Yu, C.J., Yang, P.C., Shun, C.T., Lee, Y.C., Kuo, S.H. and Luh, K.T. (1996) Overexpression of MUC5 genes is associated with early post-operative metastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 69, 457-65.
- [80] Yu, C.J., Shun, C.T., Yang, P.C., Lee, Y.C., Shew, J.Y., Kuo, S.H. and Luh, K.T. (1997) Sialomucin expression is associated with erbB-2 oncoprotein overexpression, early recurrence, and cancer death in non-small-cell lung cancer [published erratum appears in *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Aug;156(2 Pt 1):677-8]. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1419-27. 30
- [81] Jarrard, J.A., Linnoila, R.I., Lee, H., Steinberg, S.M., Witschi, H. and Szabo, E. (1998) MUC1 is a novel marker for the type II pneumocyte lineage during lung carcinogenesis. *Cancer Res* 58, 5582-9.
- [82] Ohgami, A., Tsuda, T., Osaki, T., Mitsudomi, T., Morimoto, Y., Higashi, T. and Yasumoto, K. (1999) MUC1 mucin mRNA expression in stage I lung adenocarcinoma and its association with early recurrence. *Ann Thorac Surg* 67, 810-4.
- [83] Bejarano, P.A., Baughman, R.P., Biddinger, P.W., Miller, M.A., Fenoglio-Preiser, C., al-Kafaji, B., Di Lauro, R. and Whitsett, J.A. (1996) Surfactant proteins and thyroid transcription factor-1 in pulmonary and breast carcinomas. *Mod Pathol* 9, 445-52. 40
- [84] Harlamert, H.A., Mira, J., Bejarano, P.A., Baughman, R.P., Miller, M.A., Whitsett, J.A. and Yassin, R. (1998) Thyroid transcription factor-1 and cytokeratins 7 and 20 in pulmonary and breast carcinoma. *Acta Cytol* 42, 1382-8.

- [85] Fontanini, G., Vignati, S., Lucchi, M., Mussi, A., Calcinai, A., Boldrini, L., Chine, S., Silvestri, V., Angeletti, C.A., Basolo, F. and Bevilacqua, G. (1997) Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression [see comments]. *Br J Cancer* 75, 1295-301.
- [86] Shibusa, T., Shijubo, N. and Abe, S. (1998) Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 4, 1483-7.
- [87] Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Kakolyris, S., Turley, H., O'Byrne, K., Scott, P.A., Pezzella, F., Georgoulas, V., Harris, A.L. and Gatter, K.C. (1998) Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 4, 3017-24. 10
- [88] Fontanini, G., Boldrini, L., Vignati, S., Chine, S., Basolo, F., Silvestri, V., Lucchi, M., Mussi, A., Angeletti, C.A. and Bevilacqua, G. (1998) Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 34, 718-23.
- [89] Takahama, M., Tsutsumi, M., Tsujiuchi, T., Kido, A., Okajima, E., Nezu, K., Tojo, T., Kushibe, K., Kitamura, S. and Konishi, Y. (1998) Frequent expression of the vascular endothelial growth factor in human non-small-cell lung cancers. *Jpn J Clin Oncol* 28, 176-81.
- [90] Sozzi, G., Miozzo, M., Tagliabue, E., Calderone, C., Lombardi, L., Pilotti, S., Pastorino, U., Pierotti, M.A. and Della Porta, G. (1991) Cytogenetic abnormalities and overexpression of receptors for growth factors in normal bronchial epithelium and tumor samples of lung cancer patients. *Cancer Res* 51, 400-4. 20
- [91] Volm, M., Efferth, T., Mattern, J. and Wodrich, W. (1992) Overexpression of c-fos and c-erbB1 encoded proteins in squamous cell carcinomas of the lung of smokers. *Int J Oncol* 1, 69-71 1992.
- [92] Wodrich, W. and Volm, M. (1993) Overexpression of oncoproteins in non-small cell lung carcinomas of smokers. *Carcinogenesis* 14, 1121-4.
- [93] Pastorino, U., Sozzi, G., Miozzo, M., Tagliabue, E., Pilotti, S. and Pierotti, M.A. (1993) Genetic changes in lung cancer. *J Cell Biochem Suppl* 17F, 237-48. 30
- [94] Gorgoulis, V., Sfikakis, P.P., Karameris, A., Papastamatiou, H., Trigidou, R., Veslemes, M., Spandidos, D.A., Sfikakis, P. and Jordanoglou, J. (1995) Molecular and immunohistochemical study of class I growth factor receptors in squamous cell lung carcinomas. *Pathol Res Pract* 191, 973-81.
- [95] Rusch, V., Klimstra, D., Linkov, I. and Dmitrovsky, E. (1995) Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 55, 1365-72.
- [96] Rusch, V.W. and Dmitrovsky, E. (1995) Molecular biologic features of non-small cell lung cancer. Clinical implications. *Chest Surg Clin N Am* 5, 39-55.
- [97] Fontanini, G., Vignati, S., Bigini, D., Mussi, A., Lucchi, H., Angeletti, C.A., Pingitore, R., Pepe, S., Basolo, F. and Bevilacqua, G. (1995) Epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in non-small cell lung carcinomas correlates with 40

metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes in the squamous subtype. *Eur J Cancer* 31A, 178-83.

- [98] Pflug, B. and Djakiew, D. (1996) Expression of the low affinity nerve growth factor receptor in prostate epithelial cells negatively regulates nerve growth factor- mediated growth via induction of apoptosis (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A262 1996.
- [99] Rusch, V., Klimstra, D., Venkatraman, E., Langenfeld, J., Pisters, P. and Dmitrovsky, E. (1996) Overexpression of EGFR and TGF- α is frequent in early stage non-small cell lung cancer, but does not predict tumor progression (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A1314 1996. 10
- [100] Fujino, S., Enokibori, T., Tezuka, N., Asada, Y., Inoue, S., Kato, H. and Mori, A. (1996) A comparison of epidermal growth factor receptor levels and other prognostic parameters in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 32A, 2070-4.
- [101] Pastorino, U., Andreola, S., Tagliabue, E., Pezzella, F., Incarbone, M., Sozzi, G., Buyse, M., Menard, S., Pierotti, M. and Rilke, F. (1997) Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 15, 2858-65.
- [102] Sekine, I., Takami, S., Guang, S.G., Yokose, T., Kodama, T., Nishiwaki, Y., Kinoshita, M., Matsumoto, H., Ogura, T. and Nagai, K. (1998) Role of epidermal growth factor receptor overexpression, K-ras point mutation and c-myc amplification in the carcinogenesis of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 5, 351-4. 20
- [103] Pfeiffer, P., Nexø, E., Bentzen, S.M., Clausen, P.P., Andersen, K., Rose, C. and Nex, E. (1998) Enzyme-linked immunosorbent assay of epidermal growth factor receptor, in lung cancer: comparisons with immunohistochemistry, clinicopathological features and prognosis. *Br J Cancer* 78, 96-9.
- [104] D'Amico, T.A., Massey, M., Herndon, J.E., 2nd, Moore, M.B. and Harpole, D.H., Jr. (1999) A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117, 736-43.
- [105] Engel, M., Theisinger, B., Seib, T., Seitz, G., Huwer, H., Zang, K.D., Welter, C. and Dooley, S. (1993) High levels of nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA in human squamous- cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. *Int J Cancer* 55, 375-9. 30
- [106] Ozeki, Y., Takishima, K. and Mamiya, G. (1994) Immunohistochemical analysis of nm23/NDP kinase expression in human lung adenocarcinoma: association with tumor progression in Clara cell type. *Jpn J Cancer Res* 85, 840-6.
- [107] Lai, W.W., Wu, M.H., Yan, J.J. and Chen, F.F. (1996) Immunohistochemical analysis of nm23-H1 in stage I non-small cell lung cancer: a useful marker in prediction of metastases. *Ann Thorac Surg* 62, 1500-4.
- [108] Gazzeri, S., Brambilla, E., Negoescu, A., Thoraval, D., Veron, M., Moro, D. and Brambilla, C. (1996) Overexpression of nucleoside diphosphate/kinase A/nm23-H1 protein in human lung tumors: association with tumor progression in squamous carcinoma. *Lab Invest* 74, 158-67.
- [109] MacKinnon, M., Kerr, K.M., King, G., Kennedy, M.M., Cockburn, J.S. and Jeffrey, R.R. (1997) p53, c-erbB-2 and nm23 expression have no prognostic significance in primary pulmonary adenocarcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 11, 838-42. 40

- [110] Bosnar, M.H., Pavelic, K., Krizanac, S., Slobodnjak, Z. and Pavelic, J. (1997) Squamous cell lung carcinomas: the role of nm23-H1 gene. *J Mol Med* 75, 609-13.
- [111] Kawakubo, Y., Sato, Y., Koh, T., Kono, H. and Kameya, T. (1997) Expression of nm23 protein in pulmonary adenocarcinomas: inverse correlation to tumor progression. *Lung Cancer* 17, 103-13.
- [112] Ritter, J.H., Dresler, C.M. and Wick, M.R. (1995) Expression of bcl-2 protein in stage T1N0M0 non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol* 26, 1227-32.
- [113] Kitagawa, Y., Wong, F., Lo, P., Elliott, M., Verburg, L.M., Hogg, J.C. and Daya, M. (1996) Overexpression of Bcl-2 and mutations in p53 and K-ras in resected human non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15, 45-54. 10
- [114] Rao, S.K., Krishna, M., Woda, B.A., Savas, L. and Fraire, A.E. (1996) Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in adenocarcinoma and non-neoplastic cellular compartments of the lung. *Mod Pathol* 9, 555-9.
- [115] Boers, J.E., ten Velde, G.P. and Thunnissen, F.B. (1996) P53 in squamous metaplasia: a marker for risk of respiratory tract carcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 411-6.
- [116] Coppola, D., Clarke, M., Landreneau, R., Weyant, R.J., Cooper, D. and Yousem, S.A. (1996) Bcl-2, p53, CD44, and CD44v6 isoform expression in neuroendocrine tumors of the lung. *Mod Pathol* 9, 484-90.
- [117] Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H. and Tateishi, R. (1996) Bcl-2 oncoprotein expression is increased especially in the portion of small cell carcinoma within the combined type of small cell lung cancer. *Tumour Biol* 17, 341-4. 20
- [118] Strauss, G.M. (1997) Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 11, 409-34.
- [119] Anton, R.C., Brown, R.W., Younes, M., Gondo, M.M., Stephenson, M.A. and Cagle, P.T. (1997) Absence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases. *Hum Pathol* 28, 1079-82.
- [120] Ishida, H., Irie, K., Itoh, T., Furukawa, T. and Tokunaga, O. (1997) The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer* 80, 1034-45. 30
- [121] Stefanaki, K., Rontogiannis, D., Vamvouka, C., Bolioti, S., Chaniotis, V., Sotsiou, F., Vlychou, M., Delidis, G., Kakolyris, S., Georgoulas, V. and Kanavaros, P. (1998) Immunohistochemical detection of bcl2, p53, mdm2 and p21/waf1 proteins in small-cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 18, 1167-73.
- [122] Brambilla, E., Gazzeri, S., Lantuejoul, S., Coll, J.L., Moro, D., Negoescu, A. and Brambilla, C. (1998) p53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax, and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin Cancer Res* 4, 1609-18.
- [123] Salgia, R. and Skarin, A.T. (1998) Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 16, 1207-17.
- [124] Kim, Y.C., Park, K.O., Kern, J.A., Park, C.S., Lim, S.C., Jang, A.S. and Yang, J.B. (1998) The interactive effect of Ras, HER2, P53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 22, 181-90. 40

- [125] Groeger, A.M., Caputi, M., Esposito, V., De Luca, A., Salar, A., Murabito, M., Giordano, G.G., Baldi, F., Giordano, A. and Wolner, E. (1999) Bcl-2 protein expression correlates with nodal status in non small cell lung cancer. *Anticancer Res* 19, 821-4.
- [126] Vargas, S.O., Leslie, K.O., Vacek, P.M., Socinski, M.A. and Weaver, D.L. (1998) Estrogen-receptor-related protein p29 in primary nonsmall cell lung carcinoma: pathologic and prognostic correlations. *Cancer* 82, 1495-500.
- [127] Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H. and Tateishi, R. (1994) Retinoblastoma protein expression in lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Oncology* 51, 544-51. 10
- [128] Xu, H.J., Quinlan, D.C., Davidson, A.G. and et.al. (1994) Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early stage non-small cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 695-699.
- [129] Lee, J.S., Kalapurakal, S., Ro, J.Y. and Hong, W.K. (1995) Prognostic significance of retinoblastoma protein expression in non- small cell lung cancer (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 36, A3787 1995.
- [130] Dixon, G., Salisbury, J. and Walker, C. (1995) Expression of the retinoblastoma protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and lung cancer (Meeting abstract). *J Pathol* 176, 32A 1995.
- [131] Shapiro, G.I., Edwards, C.D., Kobzik, L., Godleski, J., Richards, W., Sugarbaker, D.J. and Rollins, B.J. (1995) Reciprocal Rb inactivation and p16 expression in lung cancer (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 36, A164 1995. 20
- [132] Volm, M. and Stammers, G. (1996) Retinoblastoma (Rb) protein expression and resistance in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 16, 891-4.
- [133] Dosaka-Akita, H., Hu, S.X., Kinoshita, I., Fujino, M., Harada, M., Kawakami, Y. and Benedict, W.F. (1996) Prognostic significance of Rb protein expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A1401 1996.
- [134] Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Akie, K., Mishina, T., Hiroumi, H. and Kawakami, Y. (1996) Significance of abnormal p16INK4 and RB protein expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A3979 1996. 30
- [135] Kratzke, R.A., Greatens, T.M., Rubins, J.B., Maddaus, M.A., Niewoehner, D.E., Niehans, G.A. and Geradts, J. (1996) Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res* 56, 3415-20.
- [136] Sakaguchi, M., Fujii, Y., Hirabayashi, H., Yoon, H.E., Komoto, Y., Oue, T., Kusafuka, T., Okada, A. and Matsuda, H. (1996) Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 65, 442-5.
- [137] Xu, H.J., Cagle, P.T., Hu, S.X., Li, J. and Benedict, W.F. (1996) Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis. *Clin Cancer Res* 2, 1169-76 1996. 40
- [138] Dosaka-Akita, H., Hu, S.X., Fujino, M., Harada, M., Kinoshita, I., Xu, H.J., Kuzumaki, N., Kawakami, Y. and Benedict, W.F. (1997) Altered retinoblastoma

protein expression in nonsmall cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. *Cancer* 79, 1329-37.

- [139] Cagle, P.T., el-Naggar, A.K., Xu, H.J., Hu, S.X. and Benedict, W.F. (1997) Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 150, 393-400.
- [140] Kashiwabara, K., Oyama, T., Sano, T., Fukuda, T. and Nakajima, T. (1998) Correlation between methylation status of the p16/CDKN2 gene and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers. *Int J Cancer* 79, 215-20.
- [141] Caputi, M., Esposito, V., Groger, A.M., De Luca, A., Pacilio, C., Dekan, G., Giordano, G.G., Baldi, F., Wolner, E. and Giordano, A. (1998) RB growth control evasion in lung cancer. *Anticancer Res* 18, 2371-4. 10
- [142] Tamura, A., Matsubara, O., Hirokawa, K. and Aoki, N. (1993) Detection of thrombomodulin in human lung cancer cells. *Am J Pathol* 142, 79-85.
- [143] Tamura, A., Komatsu, H., Hebisawa, A., Kurashima, A., Mori, M. and Katayama, T. (1996) Is thrombomodulin useful as a tumor marker of a lung cancer? *Lung Cancer* 15, 189-95.
- [144] Collins, C.L., Ordonez, N.G., Schaefer, R., Cook, C.D., Xie, S.S., Granger, J., Hsu, P.L., Fink, L. and Hsu, S.M. (1992) Thrombomodulin expression in malignant pleural mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma. *Am J Pathol* 141, 827-33.
- [145] Hamatake, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Akazawa, K. and Sugimachi, K. (1996) Prognostic value and clinicopathological correlation of thrombomodulin in squamous cell carcinoma of the human lung. *Clin Cancer Res* 2, 763-6 1996. 20
- [146] Ordonez, N.G. (1997) Value of thrombomodulin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Histopathology* 31, 25-30.
- [147] Tolnay, E., Wiethage, T. and Muller, K.M. (1997) Expression and localization of thrombomodulin in preneoplastic bronchial lesions and in lung cancer. *Virchows Arch* 430, 209-12.
- [148] Bohm, M., Totzeck, B. and Wieland, I. (1994) Differences of E-cadherin expression levels and patterns in human lung cancer. *Ann Hematol* 68, 81-3.
- [149] Bohm, M., Totzeck, B., Birchmeier, W. and Wieland, I. (1994) Differences of E-cadherin expression levels and patterns in primary and metastatic human lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 12, 55-62. 30
- [150] Peralta Soler, A., Knudsen, K.A., Jaurand, M.C., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., Klein-Szanto, A.J. and Salazar, H. (1995) The differential expression of N-cadherin and E-cadherin distinguishes pleural mesotheliomas from lung adenocarcinomas [see comments]. *Hum Pathol* 26, 1363-9.
- [151] Han, A.C., Peralta-Soler, A., Knudsen, K.A., Wheelock, M.J., Johnson, K.R. and Salazar, H. (1997) Differential expression of N-cadherin in pleural mesotheliomas and E-cadherin in lung adenocarcinomas in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues [see comments]. *Hum Pathol* 28, 641-5.
- [152] Weynants, P., Lethe, B., Brasseur, F., Marchand, M. and Boon, T. (1994) Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 56, 826-9. 40

- [153] Shichijo, S., Hayashi, A., Takamori, S., Tsumosue, R., Hoshino, T., Sakata, M., Kuramoto, T., Oizumi, K. and Itoh, K. (1995) Detection of MAGE-4 protein in lung cancers. *Int J Cancer* 64, 158-65.
- [154] Sakata, M. (1996) Expression of MAGE gene family in lung cancers. *Kurume Med J* 43, 55-61.
- [155] Fischer, C., Gudat, F., Stulz, P., Noppen, C., Schaefer, C., Zajac, P., Trutmann, M., Kocher, T., Zuber, M., Harder, F., Heberer, M. and Spagnoli, G.C. (1997) High expression of MAGE-3 protein in squamous-cell lung carcinoma [letter]. *Int J Cancer* 71, 1119-21.
- [156] Gotoh, K., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Ogawa, M., Takahashi, T. and Mitsudomi, T. (1998) Frequency of MAGE-3 gene expression in HLA-A2 positive patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 20, 117-25. 10
- [157] Uchiyama, B., Saijo, Y., Kumano, N., Abe, T., Fujimura, S., Ohkuda, K., Handa, M., Satoh, K. and Nukiwa, T. (1997) Expression of nucleolar protein p120 in human lung cancer: difference in histological types as a marker for proliferation. *Clin Cancer Res* 3, 1873-7.
- [158] Singh, G., Scheithauer, B.W. and Katyal, S.L. (1986) The pathobiologic features of carcinomas of type II pneumocytes. An immunocytologic study. *Cancer* 57, 994-9.
- [159] Mizutani, Y., Nakajima, T., Morinaga, S., Gotoh, M., Shimosato, Y., Akino, T. and Suzuki, A. (1988) Immunohistochemical localization of pulmonary surfactant apoproteins in various lung tumors. Special reference to nonmucus producing lung adenocarcinomas. *Cancer* 61, 532-7. 20
- [160] Noguchi, M., Nakajima, T., Hirohashi, S., Akiba, T. and Shimosato, Y. (1989) Immunohistochemical distinction of malignant mesothelioma from pulmonary adenocarcinoma with anti-surfactant apoprotein, anti-Lewis, and anti-Tn antibodies. *Hum Pathol* 20, 53-7.
- [161] Linnoila, R.I., Jensen, S.M., Steinberg, S.M., Mulshine, J.L., Eggleston, J.C. and Gazdar, A.F. (1992) Peripheral airway cell marker expression in non-small cell lung carcinoma. Association with distinct clinicopathologic features [see comments]. *Am J Clin Pathol* 97, 233-43.
- [162] Shijubo, N., Tsutahara, S., Hirasawa, M., Takahashi, H., Honda, Y., Suzuki, A., Kuroki, Y. and Akino, T. (1992) Pulmonary surfactant protein A in pleural effusions. *Cancer* 69, 2905-9. 30
- [163] Shijubo, N., Honda, Y., Fujishima, T., Takahashi, H., Kodama, T., Kuroki, Y., Akino, T. and Abe, S. (1995) Lung surfactant protein-A and carcinoembryonic antigen in pleural effusions due to lung adenocarcinoma and malignant mesothelioma. *Eur Respir J* 8, 403-6.
- [164] Nicholson, A.G., McCormick, C.J., Shimosato, Y., Butcher, D.N. and Sheppard, M.N. (1995) The value of PE-10, a monoclonal antibody against pulmonary surfactant, in distinguishing primary and metastatic lung tumours. *Histopathology* 27, 57-60.
- [165] Khoor, A., Whitsett, J.A., Stahlman, M.T. and Halter, S.A. (1997) Expression of surfactant protein B precursor and surfactant protein B mRNA in adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol* 10, 62-7. 40

- [166] Saitoh, H., Shimura, S., Fushimi, T., Okayama, H. and Shirato, K. (1997) Detection of surfactant protein-A gene transcript in the cells from pleural effusion for the diagnosis of lung adenocarcinoma. *Am J Med* 103, 400-4.
- [167] Grohs *et al.*, *Acta Cytologica*, 1996, 40(1):26-30.
- [168] Grohs *et al.*, *Acta Cytologica*, 1997, 41(1):144-152.

10

【図面の簡単な説明】

【0475】

【図1】肺がんの異なる組織学的型を同定するためのパネル中に含まれる好ましいマーカーである分子マーカーを示す図である。「%」と示した列は、特定のマーカーを発現する腫瘍標本の比率を示す。

【図2】異なるマーカーを使用して肺がんの特定の型を判別することができる可能性のある方法を示す図である。S Qは扁平上皮がんを示し、A Dは腺がんを示し、L Cは大細胞がんを示し、S Cは小細胞がんを示し、M Eは中皮腫を示す。各細胞中に示した数は、ある細胞型の別の細胞型に対するマーカーの変化の頻度を示す。表中に含めるために、比は2.0を超えるか0.5未満でなければならない。100を超える数は、一般に、第2の

20

マーカーが発現されないことを示す。このような場合、分析のために分母を0.1に設定した。最後に、空白のセルは発現に相違がないか発現データが存在しないことを示す。

【図3】コントロール組織とがん性組織におけるプローブ7および15のHスコアの比較を示す図である。x軸はHスコアを示し、y軸は症例の比率を示す。

【図4】相関により変数の対の直線的関係が測定される相関行列を示す図である。この行列中の相関数が50%またはそれ以上の全マーカーを、相関マーカーとみなす。

【図5】検出パネルの構成、ペアワイズ判別パネル組成、および同時判別パネル組成を示す図である。意志決定樹分析、ステップワイズLR、およびステップワイズLDを使用したパネル組成を示す。

30

【図6】プローブとしてプローブ7が含まれない検出パネル組成を示す図である。意志決定樹分析、ステップワイズLR、およびステップワイズLDを使用したパネル組成を示す。

【図7】市販の好ましいプローブのみを使用した検出パネル組成を示す図である。意志決定樹分析、ステップワイズLR、およびステップワイズLDを使用したパネル組成を示す。

【図 6】

パネル	分類	検定対	グループ																											
			1	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
検出	意思決定者	絶対コントロール																												
	防衛的LR	絶対コントロール																												
	防衛的LD	絶対コントロール																												
	共通のグループ (>=2)																													

Fig.6

【図 7】

パネル	分類	検定対	グループ																											
			1	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
検出	意思決定者	絶対コントロール																												
	防衛的LR	絶対コントロール																												
	防衛的LD	絶対コントロール																												
	共通のグループ (>= 2)																													

Fig.7

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/073204 A2(51) International Patent Classification: G01N 33/569, (74) Agent: W.P. THOMPSON & CO., Coopers Building,
33/574 Church Street, Liverpool L1 3AB (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB02/01125

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IT, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 12 March 2002 (12.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/274,638 12 March 2001 (12.03.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant: MONOGEN, INC [US/US]; 1033 Butterfield Road, Vernon Hills, IL 60061-1360 (US).

(71) Applicant (for BB, BG only): MCCALL, John, Douglas [GB/GB]; 25 Haddon Drive, Pensby, Wirral CH61 8TT (GB).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

(72) Inventors: PRESSMAN, Norman, J.; 390 Greenwood Avenue, Glencoe, IL 60022 (US). HIRSCH, Kenneth, S.; 807 Portman Drive, Redwood City, CA 94065 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/073204 A2

(54) Title: CELL-BASED DETECTION AND DIFFERENTIATION OF DISEASE STATES

(57) Abstract: The present invention provides a method for detecting and differentiating disease states with high sensitivity and specificity. The method allows for a determination of whether a cell-based sample contains abnormal cells and, for certain diseases, is capable of determining the histologic type of disease present. The method detects changes in the level and pattern of expression of the molecular markers in the cell-based sample. Panel selection and validation procedures are also provided.

**CELL-BASED DETECTION AND
DIFFERENTIATION OF DISEASE STATES**

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention relates to early detection of a general disease state in a patient. The present invention also relates to discrimination (differentiation) between specific disease states in their early stages.

Early detection of a specific disease state can greatly improve a patient's chance for survival by permitting early diagnosis and early treatment while the disease is still localized and its pathologic effects limited anatomically and physiologically. Two key evaluative measures of any test or disease detection method are its sensitivity (Sensitivity = True Positives/(True Positives + False Negatives) and specificity (Specificity = True Negatives/(False Positives + True Negatives), which measure how well the test performs to accurately detect all affected individuals without exception, and without falsely including individuals who do not have the target disease. Historically, many diagnostic tests have been criticized due to poor sensitivity and specificity.

Sensitivity is a measure of a test's ability to detect correctly the target disease in an individual being tested. A test having poor sensitivity produces a high rate of false negatives, i.e., individuals who have the disease but are falsely identified as being free of that particular disease. The potential danger of a false negative is that the diseased individual will remain undiagnosed and untreated for some period of time, during which the disease may progress to a later stage wherein treatments, if any, may be less effective. An example of a test that has low sensitivity is a protein-based blood test for HIV. This type of test exhibits poor sensitivity because it fails to detect the presence of the virus until the disease is well established and the virus has invaded the bloodstream in substantial numbers. In contrast, an example of a test that has high sensitivity is viral-load detection using the polymerase chain reaction (PCR). High sensitivity is achieved because this type of test can detect very small quantities of the virus (see Lewis, D.R. *et al.* "Molecular Diagnostics: The Genomic Bridge Between Old and New Medicine: A White Paper on the Diagnostic Technology and Services Industry" Thomas Weisel Partners, June 13, 2001).

Specificity, on the other hand, is a measure of a test's ability to identify accurately patients who are free of the disease state. A test having poor specificity produces

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

a high rate of false positives, i.e., individuals who are falsely identified as having the disease. A drawback of false positives is that they force patients to undergo unnecessary medical procedures treatments with their attendant risks, emotional and financial stresses, and which could have adverse effects on the patient's health. A feature of diseases which makes it difficult to develop diagnostic tests with high specificity is that disease mechanisms often involve a plurality of genes and proteins. Additionally, certain proteins may be elevated for reasons unrelated to a disease state. An example of a test that has high specificity is a gene-based test that can detect a p53 mutation. A p53 mutation will never be detected unless there are cancer cells present (see Lewis, D.R. *et al.* "Molecular Diagnostics: The Genomic Bridge Between Old and New Medicine: A White Paper on the Diagnostic Technology and Services Industry" Thomas Weisel Partners, June 13, 2001).

Cellular markers are naturally occurring molecular structures within cells that can be discovered and used to characterize or differentiate cells in health and disease. Their presence can be detected by probes, invented and developed by human beings, which bind to markers enabling the markers to be detected through visualization and/or quantified using imaging systems. Four classes of cell-based marker detection technologies are cytopathology, cytometry, cytogenetics and proteomics, which are identified and described below.

Cytopathology relies upon the visual assessment by human experts of cytomorphological changes within stained whole-cell populations. An example is the cytological screening and cytodiagnosis of Papanicolaou-stained cervical-vaginal specimens by cytotechnologists and cytopathologists, respectively. Unlike cytogenetics, proteomics and cytometry, cytopathology is not a quantitative tool. While it is the state-of-the-art in clinical diagnostic cytology, it is subjective and the diagnostic results are often not highly sensitive or reproducible, especially at early stages of cancer (e.g., ASCUS, LSIL).

Tests that rely on morphological analyses involve observing a sample of a patient's cells under a microscope to identify abnormalities in cell and nuclear shape, size, or staining behavior. When viewed through a microscope, normal mature epithelial cells appear large and well differentiated, with condensed nuclei. Cells characterized by dysplasia, however, may be in a variety of stages of differentiation, with some cells being very immature. Finally, cells characterized by invasive carcinoma often appear undifferentiated, with very little cytoplasm and relatively large nuclei.

A drawback to diagnostic tests that rely on morphological analyses is that cell morphology is a lagging indicator. Since form follows function, often the disease state has

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

already progressed to a critical stage by the time the disease becomes evident by morphological analysis. The initial stages of a disease involve chemical changes at a molecular level. Changes that are detectable by viewing cell features under a microscope are not apparent until later stages of the disease. Therefore, tests that measure chemical changes on a molecular level, referred to as "molecular diagnostic" tests, are more likely to provide early detection than tests that rely on morphological analyses alone.

Cytometry is based upon the flow-microfluorometric instrumental analysis of fluorescently stained cells moving in single file in solution (flow cytometry) or the computer-aided microscope instrumental analysis of stained cells deposited onto glass microscope slides (image cytometry). Flow cytometry applications include leukemia and lymphoma immunophenotyping. Image cytometry applications include DNA ploidy, Malignancy-Associated Changes (MACs) and S-phase analyses. The flow and image cytometry approaches yield quantitative data characterizing the cells in suspension or on a glass microscope slide. Flow and image cytometry can produce good marker detection and differentiation results depending upon the sensitivity and specificity of the cellular stains and flow/image measurement features used.

Malignancy-Associated Changes (MACs) have been qualitatively observed and reported since the early to mid-1900's (OC Gruner: "Study of the changes met with leukocytes in certain cases of malignant disease" in *Brit J Surg* 3: 506-522, 1916) (HE Nieburgs, FG Zak, DC Allen, H Reisman, T Clardy: "Systemic cellular changes in material from human and animal tissues" in *Transactions, 7th Ann Mtg Inter Soc Cytol Council*, pp 137-144, 1959). From the mid-1900's through 1975, MACs were documented in independent qualitative histology and cytology studies in buccal mucosa and buccal smears (Nieburgs, Finch, Klawe), duodenum (Nieburgs), liver (Elias, Nieburgs), megakaryocytes (Ramsdahl), cervix (Nieburgs, Howdon), skin (Kwitken), blood and bone marrow (Nieburgs), monocytes and leukocytes (van Haas, Matison, Clausen), and lung and sputum (Martuzzi and Oppen Toth). Before 1975 these qualitative studies reported MAC-based sensitivities for specific disease detection from 76% to 97% and specificities from 50% to 90%. In 1975 Oppen Toth reported a sensitivity of 76% and specificity of 81% in a qualitative sputum analysis study.

Quantitative observations regarding MAC-based probe analysis began two to three decades ago (H Klawe, J Rowinski: "Malignancy associated changes (MAC) in cells of buccal smears detected by means of objective image analysis" in *Acta Cytol* 18: 30-33, 1974) (GL Wied, PH Bartels, M Bibbo, JJ Sychra: "Cytomorphometric markers for uterine cancer

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

in intermediate cells" in *Analyt Quant Cytol* 2: 257-263, 1980) (G Burger, U Jutting, K Rodenacker: "Changes in benign population in cases of cervical cancer and its precursors" in *Analyt Quant Cytol* 3: 261-271, 1981). MACs were documented in independent quantitative histology and cytology studies in buccal mucosa and smears (Klawe, Burger), cervix (Wied, Burger, Bartels, Vooijs, Reinhardt, Rosenthal, Boon, Katzke, Haroske, Zahniser), breast (King, Bibbo, Susnik), bladder and prostate (Sherman, Montironi), colon (Bibbo), lung and sputum (Swank, MacAulay, Payne), and nasal mucosa (Reith) studies with MAC-based sensitivities from 70% to 89% and specificities from 52% to 100%. Marek and Nakhosteen showed (1999, American Thoracic Society annual meeting) the results from two quantitative pulmonary studies showing (a) sensitivity of 89% and specificity of 92%, and (b) sensitivity of 91% and specificity of 100%.

Clearly, Malignancy-Associated Changes (MACs) are potentially useful probes that result from the image-cytometry marker detection technology. MAC-based features from DNA-stained nuclei can be used in conjunction with other molecular diagnostic probes to create optimized molecular diagnostic panels for the detection and differentiation of lung cancer and other disease states.

Cytogenetics detects specific chromosome-based intracellular changes using, for example, *in situ* hybridization (ISH) technology. ISH technology can be based upon fluorescence (FISH), multi-color fluorescence (M-FISH), or light-absorption-based chromogenics imaging (CHRISH) technologies. The family of ISH technologies uses DNA or RNA probes to detect the presence of the complementary DNA sequence in cloned bacterial or cultured eukaryotic cells. FISH technology can, for example, be used for the detection of genetic abnormalities associated with certain cancers. Examples include probes for Trisomy 8 and HER-2 neu. Other technologies such as polymerase chain reactions (PCR) can be used to detect B-cell and T-cell gene rearrangements. Cytogenetics is a highly specific marker detection technology since it detects the causative or "trigger" molecular event producing a pathology condition. It may be less sensitive than the other marker detection technologies because fewer events may be present to detect. *In situ* hybridization (ISH) is a molecular diagnostic method uses gene-based analyses to detect abnormalities on the genetic level such as mutations, chromosome errors or genetic material inserted by a specific pathogen. For example, *in situ* hybridization may involve measuring the level of a specific mRNA by treating a sample of a patient's cells with labeled primers designed to hybridize to the specific mRNA, washing away unbound primers and measuring the signal of the label. Due to the uniqueness of gene sequences, a test involving the detection of gene

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

sequences will likely have a high specificity, yielding very few false positives. However, because the amount of genetic material in a sample of cells may be very low, only a very weak signal may be obtained. Therefore, *in situ* hybridization tests that do not employ pre-amplification techniques will likely have a poor specificity, yielding many false negatives.

Proteomics depends upon cell characterization and differentiation resulting from the over-expression, under-expression, or presence/absence of unique or specific proteins in populations of normal or abnormal cell types. Proteomics includes not only the identification and quantification of proteins, but also the determination of their localization, modifications, interactions, chemical activities, and cellular/extracellular functions.

Immunocytochemistry (immunocytochemistry in cells and immunohistochemistry (IHC) in tissues) is the technology used, either qualitatively or quantitatively (QIHC) to stain antigens (i.e., proteomes) using antibodies. Immunostaining procedures use a dye as the detection indicator. Examples of IHC applications include analyses for ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor), p53 tumor suppressor genes, and EGFR prognostic markers. Proteomics is typically a more sensitive marker detection technology than cytogenetics because there are often orders of magnitude more protein molecules to detect using proteomics than there are cytogenetic mutations or gene-sequence alterations to detect using cytogenetics. However, proteomics may have a poorer specificity than the cytogenetic marker detection technology since multiple pathologies may result in similar changes in protein over-expression or under-expression. Immunocytochemistry involves histological or cytological localization of immunoreactive substances in tissue sections or cell preparations, respectively, often utilizing labeled antibodies as probe reagents. Immunocytochemistry can be used to measure the concentration of a disease marker (specific protein) in a sample of cells by treating the cells with an agent such as a labeled antibody (probe) that is specific for an epitope on the disease marker, then washing away unbound antibodies and measuring the signal of the label. Immunocytochemistry is based on the property that cancer cells possess different levels of certain disease markers than do healthy cells. The concentration of a disease marker in a cancer cell is generally large enough to produce a large signal. Therefore, tests that rely on immunocytochemistry will likely have a high sensitivity, yielding few false negatives. However, because other factors in addition to the disease state may cause the concentration of a disease marker to become raised or lowered, tests that rely on immunochemical analysis of a specific disease marker will likely have poor specificity, yielding a high rate of false positives.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

The present invention provides a noninvasive disease state detection and discrimination method with both high sensitivity and high specificity. The method involves contacting a cytological sample suspected of containing diseased cells with a panel of probes comprising a plurality of agents, each of which quantitatively binds to a specific disease marker, and detecting and analyzing the pattern of binding of the probe agents. The present invention also provides methods of constructing and validating a panel of probes for detecting a specific disease (or group of diseases) and discriminating among its various disease states. Illustrative panels for detecting lung cancer and discriminating among different types of lung cancer are also provided.

A human disease results from the failure of the human organism's adaptive mechanisms to neutralize external or internal insults which result in abnormal structures or functions within the body's cells, tissues, organs or systems. Diseases can be grouped by shared mechanisms of causation as illustrated below, in Table 1.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 1:

Classes of Diseases	Examples of Disease States
Allergy	Adverse reactions to foods and plants
Cardiovascular	heart failure, atherosclerosis
Degenerative (neurological and muscular)	Alzheimer's and Parkinson's
Diet	Non-nutritional substances and excess/imbalanced nutrition
Hereditary	Sickle cell anemia, cystic fibrosis
Immune	HIV and autoimmune
Infection	Viral, bacterial, fungal, parasitic
Metabolic	Diabetes
Molecular and cell biology	Cancer (neoplasia)
Toxic insults	Alcohol, drugs, environmental mutagens and carcinogens
Trauma	Bodily injury from automobile collision

Disease states are either caused by or result in abnormal changes (i.e., pathological conditions) at a subcellular, cellular, tissue, organ, or human anatomic or physiological system level. Many disease states (e.g., lung cancer) are characterized by abnormal changes at a subcellular or cellular level. Specimens (e.g., cervical PAP smears, voided urine, blood, sputum, colonic washings) can be collected from patients with suspected disease states to diagnose those patients for the presence and type of the disease state. Molecular pathology is the discipline that attempts to identify and diagnostically exploit the molecular changes associated with these cell-based diseases.

Lung cancer is an illustrative example of a disease state in which screening of high-risk populations and at-risk individuals can be performed using diagnostic tests (e.g., molecular diagnostic panel assays) to detect the presence of the disease state. Also, for patients in which lung cancer or other disease states have been detected by these means, related diagnostic tests can be employed to differentiate the specific disease state from related or co-occurring disease states. For example, in this lung cancer illustration, additional molecular diagnostic panel assays may indicate the probabilities that the patient's disease

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

state is consistent with one of the following types of lung cancer: (a) squamous cell carcinoma of the lung, (b) adenocarcinoma of the lung, (c) large cell carcinoma of the lung, (d) small cell carcinoma of the lung, or (e) mesothelioma. Early detection and differentiation of cell-based disease states is a hypothesized means to improve patient outcomes.

Cancer is a neoplastic disease the natural course of which is fatal. Cancer cells, unlike benign tumor cells, exhibit the properties of invasion and metastasis and are highly anaplastic. Cancer includes the two broad categories of carcinoma and sarcoma, but in normal usage it is often used synonymously with carcinoma. According to the World Health Organization (WHO), cancer affects more than 10 million people each year and is responsible for in excess of 6.2 million deaths.

Cancer is, in reality, a heterogeneous collection of diseases that can occur in virtually any part of the body. As a result, different treatments are not equally effective in all cancers or even among the stages of a specific type of cancer. Advances in diagnostics (e.g., mammography, cervical cytology, and serum PSA testing) have, in some cases, allowed for the detection of early-stage cancer when there are a greater number of treatment options, and therapies tend to be more effective. In cases where a solid tumor is small and localized, surgery alone may be sufficient to produce a cure. However, in cases where the tumor has spread, surgery may provide, at best, only limited benefits. In such cases the addition of chemotherapy and/or radiation therapy may be used to treat metastatic disease. While somewhat effective in prolonging life, treatment of patients with metastatic disease rarely produces a cure. Even though there may be an initial response, with time the disease progresses and the patient ultimately dies from its effects and/or from the toxic effects of the treatments.

While not proven, it is generally accepted that early detection and treatment will reduce the morbidity, mortality and cost of cancer. Early detection will, in many cases, permit treatment to be initiated prior to metastasis. Furthermore, because there are a greater number of treatment options, there is a higher probability of achieving a cure or significant improvement in long-term survival.

Developing a test that can be used to screen an "at-risk" population has long been a goal of health practitioners. While there have been some successes such as mammography for breast cancer, PSA testing for prostate cancer, and the PAP smear for cervical cancer, in most cases cancer is detected at a relatively late stage where the patient is symptomatic and the disease is almost always fatal. For most cancers, no test or combination

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

of tests has exhibited the necessary sensitivity and specificity to permit cost-effective identification of patients with early stage disease.

For a cancer screening program to be successful and gain acceptance by patients, physicians, and third party payers, the test must have implied benefit (changes the outcome), be widely available and be able to be carried out readily within the framework of general healthcare. The test should be relatively noninvasive, leading to adequate compliance, have high sensitivity, and reasonable specificity and predictive value. In addition, the test must be available at relatively low cost.

For patients who are suspected of having cancer, the diagnosis must be confirmed and the tumor properly staged cytologically and clinically in order for physicians to undertake appropriate therapeutic intervention. Some tests currently being used in the diagnosis and staging of cancer, however, either lack sufficient sensitivity or specificity, are too invasive, or are too costly to justify their use as a population-based screening test. Shown below in Tables 2 and 3, for example, are estimates of sensitivity and specificity of lung cancer diagnostics and estimated costs for diagnostic tests used to detect lung cancer.

Table 2:

ESTIMATES OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF LUNG CANCER DIAGNOSTICS [1]

DIAGNOSTIC TEST	SENSITIVITY (%)	SPECIFICITY (%)
Conventional Sputum Cytology	51.0	100.0
Chest X-ray	16-85*	90-95
White Light Bronchoscopy	48.0-80.0	91.1-96.8
LIFE Bronchoscopy	72.0	86.7
Computed Tomography	63.0-99.9	80.0-61
PET Scan	88.0-92.5	83.0-93.0

*Dependent upon the stage of the disease at the time of diagnosis

Table 3:

ESTIMATED COSTS FOR DIAGNOSTIC TESTS USED IN LUNG CANCER [1]

DIAGNOSTIC TEST	COST (\$)
Sputum Cytology	90
Chest X-ray	44
Bronchoscopy	725
Computed Tomography	378
PET Scan	800-3000
Open Biopsy	12,847-14,121

The chest radiograph (X-ray) is often used to detect and localize cancer lesions due to its reasonable sensitivity, high specificity and low cost. However, small lesions are often difficult to detect and although larger tumors are relatively easy to visualize on a chest film, at the time of detection most have already metastasized. Thus, chest X-rays lack the necessary sensitivity for use as an early detection method.

Computed tomography (CT) is useful in the confirmation and characterization of pulmonary nodules and allows the detection of subtle abnormalities that are often missed on a standard chest X-ray [2]. CT, and Spiral CT methods in particular, remains the test of choice for patients who present with a prior malignant sputum cytology result or vocal chord paralysis. CT, with its improved sensitivity over the conventional chest film, has become the primary tool for imaging the central airway [3]. While capable of examining large areas, CT is subject to artifacts from cardiac and respiratory motion although improved resolution can be achieved through the use of iodinated contrast material.

Spiral CT is a more rapid and sensitive form of CT that has the potential to detect early cancer lesions more reliably than either conventional CT or X-ray. Spiral CT appears to have greatly improved sensitivity in diagnosing early disease. However, the test has relatively low specificity with a 20% false positive rate [4]. Spiral CT is also less sensitive in detecting the central lesions that represent one-third of all lung cancers. Furthermore, while the cost of the initial test is relatively low (\$300), the cost of follow-up can be high. Cytology using molecular diagnostic panel assays offers significant promise as an adjunctive test with Spiral CT to improve the specificity of Spiral CT testing by minimizing false positive results through the evaluation of fine needle aspirations (FNAs) or biopsies (FNBs) from Spiral CT-suspicious pulmonary nodules.

Fluorescence bronchoscopy provides increased sensitivity over conventional white light bronchoscopy, significantly improving the detection of small lesions within the central airway [5]. However, fluorescence bronchoscopy is unable to detect peripheral lesions, it takes a long time for bronchoscopists to examine a patient's airways, and it is an expensive procedure. Additionally, the procedure is moderately invasive, creating an insurmountable barrier to its use as a population-based screening test.

Positron Emission Tomography (PET) is a highly sensitive test that utilizes radioactive glucose to identify the presence of cancer cells within the lung [6-8]. The cost of establishing a testing facility is high and there is the need for a cyclotron on site or nearby.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

This, coupled with the high cost of the test, has limited the use of PET scans to staging lung cancer patients rather than for early detection of the disease.

Although used for some time as a means of screening for lung cancer, sputum cytology has enjoyed only limited success due to its low sensitivity and its failure to reduce disease-specific mortality. In conventional sputum cytology, the pathologist uses characteristic changes in cellular morphology to identify malignant cells and make a diagnosis of cancer. Today only 15% of patients who are 'at-risk' or who are suspected of having lung cancer undergo sputum cytology testing, and less than 5% undergo multiple evaluations [9]. A number of factors including tumor size, location, degree of differentiation, cell clumping, inefficiency of clearing mechanisms to release cells and sputum to the external environment, and the poor stability of cells within the sputum contribute to the overall poor performance of the test.

Cancer diagnostics has traditionally relied upon the detection of single molecular markers. Unfortunately, cancer is a disease state in which single markers have typically failed to detect or differentiate many forms of the disease. Thus, probes that recognize only a single marker have been shown to be largely ineffective. Exhaustive searches for "magic bullet" diagnostic tests have been underway for many decades though no universal successful magic bullet probes have been found to date.

A major premise of this invention is that cell-based cancer diagnostics and the screening, diagnosis for, and therapeutic monitoring of other disease states will be significantly improved over the state-of-the-art that uses single marker/probe analyses rather than kits of multiple, simultaneously labeled probes. This multiplexed analytical approach is particularly well suited for cancer diagnostics since cancer is not a single disease. Furthermore, this multi-factorial "panel" approach is consistent with the heterogeneous nature of cancer, both cytologically and clinically.

Key to the successful implementation of a panel approach to cell-based diagnostic tests is the design and development of optimized panels of probes that can chemically recognize the pattern of markers that characterizes and distinguishes a variety of disease states. This patent application describes an efficient and unique methodology to design and develop such novel and optimized panels.

Improved methods for specimen collection (e.g., point-of-care mixers for sputum cytology) and preparation (e.g., new cytology preservation and transportation fluids, and liquid-based cytology preparation instruments) are under development and becoming commercially available. In conjunction with existing and these emerging methods, a

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

successful implementation of this molecular diagnostics cell-based panel assay will lead to (a) characterization of the molecular profile of malignant tumors and other disease states, (b) improved methods for early cancer and other disease state detection and differentiation, and (c) opportunities for improved clinical diagnoses, prognoses, customized patient treatments, and therapeutic monitoring.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to a panel for detecting a generic disease state or discriminating between specific disease states using cell-based diagnosis. The panel comprises a plurality of probes each of which specifically binds to a marker associated with a generic or specific disease state, wherein the pattern of binding of the component probes of the panel to cells in a cytology specimen is diagnostic of the presence or specific nature of said disease state. The present invention is also directed to a method of forming a panel for detecting a disease state or discriminating between disease states in a patient using cell-based diagnosis. The method involves determining the sensitivity and specificity of binding of probes each of which specifically binds to a member of a library of markers associated with a disease state and selecting a limited plurality of said probes whose pattern of binding is diagnostic for the presence or specific nature of said disease state. The present method is also directed to a method of detecting a disease or discriminating between disease states comprising . The method involves contacting a cytological sample suspected of containing abnormal cells characteristic of a disease state with a panel according to claim 1 and detecting a pattern of binding of said probes that is diagnostic for the presence or specific nature of said disease state.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. Molecular markers that are preferable markers to be included in a panel for identifying different histologic types of lung cancer. The column labeled "%" indicates the percentage of tumor specimens that express a particular marker.

Figure 2. Potential ways in which different markers may be used to discriminate between specific types of lung cancer. SQ indicates squamous cell carcinoma, AD indicates adenocarcinoma, LC indicates large cell carcinoma, SC indicates small cell carcinoma and ME indicates mesothelioma. The numbers appearing in each cell represent frequency of marker change in one cell type versus another. To be included in the table, the

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

ratio must be greater than 2.0 or less than 0.5. A number larger than 100 generally indicates that the second marker is not expressed. In such cases the denominator was set at 0.1 for the purpose of the analysis. Finally, empty cells represent either no difference in expression or the absence of expression data.

Figure 3. Comparisons between H-scores for probes 7 and 15 in control tissue and in cancerous tissue. The x-axis shows the H-scores while the y-axis shows the percent of cases.

Figure 4. Correlation matrix, in which correlation measures the amount of linear association between a pair of variables. All markers in this matrix with a correlation number of 50% or higher are considered correlate markers.

Figure 5. Detection panel compositions, pair-wise discrimination panel compositions and joint discrimination panel compositions. Panel compositions using decision tree analysis, stepwise LR and stepwise LD are shown.

Figure 6. Detection panel compositions wherein probe 7 was not included as a probe. Panel compositions using decision tree analysis, stepwise LR and stepwise LD are shown.

Figure 7. Detection panel compositions using only commercially preferred probes. Panel compositions using decision tree analysis, stepwise LR and stepwise LD are shown.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

1. Introduction

The present invention provides a noninvasive disease state detection and discrimination method with high sensitivity and specificity. The method involves contacting a cytological sample suspected of containing diseased cells with a panel comprising a plurality of agents, each of which quantitatively binds to a disease marker, and detecting a pattern of binding of the agents. This pattern includes the localization and density/concentration of binding of the component probes of the panel. The present invention also provides methods of making a panel for detecting a disease and also for discriminating between disease states as well as panels for detecting lung cancer in early stages and discriminating between different types of lung cancer. Panel tests have been used in medicine. For example, panels are used in blood serum analysis. However, because a cytology analysis involves imaging and localization of specific markers within individual cells and tissues, prior to the present invention it was not apparent that the panel approach

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

would be effective for cytology samples. Additionally, it was not apparent which, if any statistical analyses could be applied to design and develop an optimized cell-based diagnostic panel of probes.

One of the few examples of a cytology-based screening program is the PAP Smear, which screens for cervical cancer. For over 50 years this method has been practiced and has greatly contributed to the fact that today, almost no woman who has regular PAP smears dies of cervical cancer. There are drawbacks, however, to the PAP smear screening program. For example, PAP smears are labor intensive and are not universally accessible. The present molecular diagnostic cell-based screening method utilizing probe panels does not suffer from these drawbacks. The method may be fully automated and thereby made less expensive, increasing access to this type of testing.

The present invention provides a method, having both high specificity and high sensitivity, for detecting a disease state and for discriminating between disease states. The invention is applicable to any cell-based disease state, such as cancer and infectious diseases.

The panel is diagnostic of the presence or specific nature of the disease state. The present invention overcomes the limitations and drawbacks of known disease state detection methods by enabling quick, accurate, relatively noninvasive and easy detection and discrimination of diseased cells in a cytological sample while keeping costs low.

A feature of the inventive method for making a panel of the present invention is the rapidity with which the panel may be developed.

There are several benefits to using a panel of agents in a method for detecting a disease state, and for discriminating between types of disease states. One benefit is that a panel of agents has sufficient redundancy to permit detection and characterization of disease states thereby increasing the sensitivity and specificity of the test. Given the heterogeneous nature of many disease states, no single agent is capable of identifying the vast majority of cases.

An additional benefit to using a panel is that use of a panel permits discrimination between the various types of a disease state based on specific patterns (probe localization and density/concentration) of expression. As the various types of a disease may exhibit dramatic differences in their rate of progression, response to therapy, and lethality, knowledge of the specific type can help physicians choose the optimal therapeutic approach.

2. The Panel

The panel of the present invention comprises a plurality of agents, each of which quantitatively binds to a disease marker, wherein the pattern (localization and density/concentration) of binding of the component agents of the panel is diagnostic of the presence or specific nature of a disease state. Therefore, the panel may be a detection panel or a discrimination panel. A detection panel detects whether a generic disease state is present in a sample of cells, while a discrimination panel discriminates among different specific disease states in a sample of cells known to be affected by a disease state which comprises different types of diseases. The difference between a detection panel and a discrimination panel lies in the specific agents that the panels comprise. A detection panel comprises agents having a pattern of binding that is diagnostic of the presence of a disease state, while a discrimination panel comprises agents having a pattern of binding that allows for determining the specific nature (i.e., each type) of the disease state.

A panel, by definition, contains more than one member. There are several reasons why it is beneficial to use a panel of markers rather than just one marker alone to detect a generic disease state or to discriminate among specific disease states. One reason is the unlikely existence of a probe for one single marker, that is present in all diseased cells yet not present in healthy cells, whose behavior can be measured with a high specificity and sensitivity to yield an accurate test result. If such a single probe existed for detection of a particular disease with high sensitivity and specificity, it would already have been utilized for clinical testing. Rather, it is the directed selection of panel tests, each consisting of multiple probes, that together can provide the range of detection capability to ensure clinically adequate testing.

If one nevertheless chooses to construct a panel test comprising one or a very few probes, then the failure of any single marker/probe combination to perform its labeling function for any reason (for example, diminished reactivity of the specimen cells due to biological variability; inherent variability between lots of probe reagents; a weak, outdated or defective processing reagent; improper processing time or conditions for that probe) could result in a catastrophic failure of the test to detect or discriminate the target disease. The inclusion of multiple, and even redundant probes in each panel test greatly enhances the probability that a failure of any one probe will not cause a catastrophic failure of the test.

A probe is any molecular structure or substructure that binds to a disease marker. The term "agent" as used herein, may also refer to a molecular structure or

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

substructure that binds to a disease marker. Molecular probes are homing devices used by biologists and clinicians to detect and locate markers indicative of the specific disease states. For example, antibodies may be produced that bind specifically to a protein previously identified as a marker for small cell lung cancer. This antibody probe can then be used to localize the target protein marker in cells and tissues of patients suspected of having the disease by using appropriate immunochemical protocols and incubations. If the antibody probe binds to its target marker in a stoichiometric (i.e., quantitative) fashion and is labeled with a chromogenic or colored "tag", then localization and quantitation of the probe and, indirectly, its target marker may be accomplished using an optical microscope and image cytometry technology.

The present invention contemplates detecting changes in molecular marker expression at the DNA, RNA or protein level using any of a number of methods available to an ordinary skilled artisan. Exemplary probes may be a polyclonal or monoclonal antibody or fragment thereof or a nucleic acid sequences that is complementary to the nucleic acid sequence encoding a molecular marker in the panel. A probe may also be a stain, such as a DNA stain. Many of the antibodies used in the present invention are specific to a variety of cell surface or intracellular antigens as marker substances. The antibodies may be synthesized using techniques generally known to those of skill in the art. For example, after the initial raising of antibodies to the marker, the antibodies can be sequenced and subsequently prepared by recombinant techniques. Alternatively, antibodies may be purchased.

In embodiments of the present invention, the probe contains a label. A probe containing a label is often referred to herein as a "labeled probe". The label may be any substance that can be attached to a probe so that when the probe binds to the marker a signal is emitted or the labeled probe can be detected by a human observer or an analytical instrument. This label may also be referred to as a "tag". The label may be visualized using reader instrumentation. The term "reader instrumentation" refers to the analytical equipment used to detect a probe. Labels envisioned by the present invention are any labels that emit a signal and allow for identification of a component in a sample. Preferred labels include radioactive, fluorogenic, chromogenic or enzymatic moieties. Therefore, possible methods of detection include, but are not limited to, immunocytochemistry, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, fluorescent *in situ* hybridization, flow cytometry and image cytometry. The signal generated by the labeled probe is of sufficient intensity to permit detection by a medical practitioner.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

A "marker", "disease marker" or "molecular marker" is any molecular structure or substructure that is correlated with a disease state or pathogen. The term "antigen" may be used interchangeably with "marker". Broadly defined, a marker is a biological indicator that may be deliberately used by an observer or instrument to reveal, detect, or measure the presence or frequency and/or amount of a specific condition, event or substance. For example, a specific and unique sequence of nucleotide bases may be used as a genetic marker to track patterns of genetic inheritance among individuals and through families. Similarly, molecular markers are specific molecules, such as proteins or protein fragments, whose presence within a cell or tissue indicates a particular disease state. For example, proliferating cancer cells may express novel cell-surface proteins not found on normal cells of the same type, or may over-express specific secretory proteins whose increased or decreased abundance (e.g., overexpression or underexpression, respectively) can serve as markers for a particular disease state.

Suitable markers for cytology panels are substances that are localized in or on the nucleus, cytoplasm or cell membrane. Markers may also be localized in organelles located in any of these locations in the cell. Exemplary markers localized in the nucleus include but are not limited to retinoblastoma gene product (Rb), Cyclin A, nucleoside diphosphate kinase/nm23, telomerase, Ki-67, Cyclin D1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p120 (proliferation-associated nucleolar antigen) and thyroid transcription factor 1 (TTF-1). Exemplary markers localized in the cytoplasm include but are not limited to VEGF, surfactant apoprotein A (SP-A), nucleoside nm23, melanoma antigen-1 (MAGE-1), Mucin 1, surfactant apoprotein B (SP-B), ER related protein p29 and melanoma antigen-3 (MAGE-3). Exemplary markers localized in the cell membrane include but are not limited to VEGF, thrombomodulin, CD44v6, E-Cadherin, Mucin 1, human epithelial related antigen (HERA), fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor receptor (C-MET), BCL-2, N-Cadherin, epidermal growth factor receptor (EGFR) and glucose transporter-3 (GLUT-3). An example of a marker located in an organelle of the cytoplasm is BCL-2, located (in part) in the mitochondrial membrane. An example of a marker located in an organelle of the nucleus is p120 (proliferating-associated nucleolar antigen), located in the nucleoli.

Preferred are markers where changes in expression: occur early in disease progression, are exhibited by a majority of diseased cells, allow for detection of in excess of 75% of a given disease type, most preferably in excess of 90% of a given disease type and/or allow for the discrimination between the nature of different types of a disease state.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

It is noted that the inventive panel may be referred to as a panel of probes or a panel of markers, since the probes bind to the markers. Therefore, the panel may comprise a number of markers or it may comprise a number of probes that bind to specific markers. For the sake of consistency, the present panel is referred to as a panel of probes; however, it could also be referred to as a panel of markers.

Markers can also include features such as malignancy-associated changes (MACs) in the cell nucleus or features related to the patient's family history of cancer. Malignancy-associated changes, or MACs, are typically sub-visual changes that occur in normal-appearing cells located in the vicinity of cancer cells. These exceedingly subtle changes in the cell nucleus may result biologically from changes in the nuclear matrix and the chromatin distribution pattern. They cannot be appreciated even by trained observers through the visual observation of individual cells, but may be determined from statistical analysis of cell populations using highly automated, computerized high-speed image cytometry. Techniques for detection of MACs are well known to those of skill in the art and are described in more detail in: Gruner, O.C. *Brit J. Surg.* 3 506-522 (1916); Neiburgs, H.E. *et al., Transaction, 7th Annual Mtg. Inter. Soc. Cytol. Council* 137-144 (1959); Klawe, H. *Acta. Cytol.* 18 30-33 (1974); Wied, G.L., *et al., Analyt. Quant. Cytol.* 2 257-263 (1980); and Burger, G., *et al., Analyt. Quant. Cytol.* 3 261-271 (1981).

The present invention encompasses any marker that is correlated with a disease state. The individual markers themselves are mere tools of the present invention. Therefore, the invention is not limited to specific markers. One way to classify markers is by their functional relationship to other molecules. As used herein, a "functionally related" marker is a component of the same biological process or pathway as the marker in question and would be known by a person of skill in the art to be abnormally expressed together with the marker in question. For example, many markers are associated with a cell proliferation pathway, such as fibroblast growth factor (FGF), (vascular endothelial growth factor) VEGF, CyclinA and Cyclin D1. Other markers are glucose transporters, such as Glut-1 and Glut-3.

A person of ordinary skill in the art is well equipped to determine a functionally related marker and may research various markers or perform experiments in which the functional behavior of a marker is determined. By way of non-limiting example, a marker may be classified as a molecule involved in angiogenesis, a transmembrane glycoprotein, a cell surface glycoprotein, a pulmonary surfactant protein, a nuclear DNA-binding phosphoprotein, a transmembrane Ca^{2+} dependent cell adhesion molecule, a regulatory subunit of the cyclin-dependent kinases (CDK's), a nucleoside diphosphate kinase,

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

a ribonucleoprotein enzyme, a nuclear protein that is expressed in proliferating normal and neoplastic cells, a cofactor for DNA polymerase delta, a gene that is silent in normal tissues yet when it is expressed in malignant neoplasms is recognized by autologous, tumor-directed and specific cytotoxic T cells (CTL's), a glycosylated secretory protein, the gastrointestinal tract or genitourinary tract, a hydrophobic protein of a pulmonary surfactant, a transmembrane glycoprotein, a molecule involved in proliferation, differentiation and angiogenesis, a proto-oncogene, a homeodomain transcription factor, a mitochondrial membrane protein, a molecule found in nucleoli of a rapidly proliferating cell, a glucose transporter, or an estrogen-related heat shock protein.

Classes of biomarkers and probes include, but are not limited to: (a) morphologic biomarkers, including DNA ploidy, MACs and premalignant lesions; (b) genetic biomarkers including DNA adducts, DNA mutations and apoptotic indices; (c) cell cycle biomarkers including cellular proliferation, differentiation, regulatory molecules and apoptosis markers, and; (d) molecular and biochemical biomarkers including oncogenes, tumor suppressor genes, tumor antigens, growth factors and receptors, enzymes, proteins, prostaglandin levels and adhesion molecules.

A "disease state" may be any cell-based disease. In some embodiments the disease state is cancer. In other embodiments, the disease state is an infectious disease. The cancer may be any cancer, including, but not limited to epithelial cell-based cancers from the pulmonary, urinary, gastrointestinal, and genital tracts; solid and/or secretory tumor-based cancers, such as sarcomas, breast cancer, cancer of the pancreas, cancer of the liver, cancer of the kidneys, cancer of the thyroid, and cancer of the prostate; and blood-based cancers, such as leukemias and lymphomas. Exemplary cancers which may be detected by the present invention are lung, bladder, gastrointestinal, cervical, breast or prostate cancer. Exemplary infectious diseases which may be detected are cell-based diseases in which the infectious organism is a virus, bacteria, protozoan, parasite, or fungus. The infectious disease, for example, may be HIV, hepatitis, influenza, meningitis, mononucleosis, tuberculosis and sexually transmitted diseases (STDs), such as chlamydia, trichomonas, gonorrhea, herpes and syphilis.

As used herein, the term "generic disease state" refers to a disease which comprises several types of specific diseases, such as lung cancer, sexually transmitted diseases and immune-based diseases. Specific disease states are also referred to as histologic types of diseases. For example, the term "lung cancer" comprises several specific diseases, among which are squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, large cell carcinoma, small cell

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

lung cancer and mesothelioma. The term "sexually transmitted diseases" comprises several specific diseases, among which are Gonorrhea, Human Papilloma Virus (HPV), herpes and Syphilis. The term "immune-based diseases" comprises several specific diseases, such as systemic lupus erythematosus (Lupus), rheumatoid arthritis and pernicious anemia.

As used herein, the term "high-risk population" refers to a group of individuals who are exposed to disease causing agents, e.g., carcinogens, either at home or in the workplace (i.e., a "high risk population" for lung cancer might be exposed to smoking, passive smoking and occupational exposure). Individuals in a "high-risk population" may also have a genetic predisposition.

The term "at-risk" refers to individuals who are asymptomatic but, because of a family history or significant exposure are at a significant risk of developing a disease state (i.e., an individual at risk for lung cancer with a > 30 pack-year history of smoking; "pack-year" is a measurement unit computed by multiplying the number of packs smoked per day, times the number of years for this exposure).

Cancer is a disease in which cells divide without control due to, for example, altered gene expression. In the methods and panels of the present invention, the cancer may be any malignant growth in any organ. For example, the cancer may be lung, bladder, gastrointestinal, cervical, breast or prostate cancer. Each cancer may comprise a collection of diseases or histological types of cancer. The term "histologic type" refers to cancers of different histology. Depending on the cancer there can be one or several histologic types. For example, lung cancer includes, but is not limited to, squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, large cell carcinoma, small cell carcinoma and mesothelioma. Knowledge of the histologic type of cancer affecting a patient is very useful because it helps the medical practitioner to localize and characterize the disease and to determine the optimal treatment strategy.

Infectious diseases include cell-based diseases in which the infectious organism is a virus, bacteria, protozoan, parasite or fungus.

Exemplary detection and discrimination panels are panels that detect lung cancer, a general disease state, and panels that discriminate a single lung cancer type, specific disease state, against all other types of lung cancer and false positives. False positives can include metastatic cancer of a different type, such as metastasized liver, kidney or pancreatic cancer.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

3. *Methods of Making a Panel*

The method of making a panel for detecting a generic disease state or discriminating between specific disease states in a patient involves determining the sensitivity and specificity of binding of probes to a library of markers associated with a generic or specific disease state and selecting a plurality of said probes whose pattern of binding (localization and density/concentration) is diagnostic of the presence or specific nature of the disease state. In some embodiments, optional preliminary pruning and preparation steps are performed. The method of making a panel of the present invention involves analyzing the pattern of binding of probes to markers in known histologic pathology samples, i.e. gold standards. The classifier designed on the gold standard data can then be used to design a classifier for cytometry, especially automated cytometry. Therefore, the set of marker probes selected from the pathology analysis is used to prepare a new training data set taken from a cytology sample, such as sputum, fine needle aspirations, urine, etc. Cells shed from the specified lesions will stain in a similar fashion to the gold standards. The method described here eliminates the experimental error in selecting the best features set because the integrity of the diagnosis based on gold standard histologic pathology samples is high. Although it is, in principle, possible to use cytology samples to produce a panel, this is less desirable because cytology samples contain debris, there may be deterioration of the cells in a cytology sample, and the pathology diagnosis may be difficult to confirm clinically.

A library of markers is a group of markers. The library can comprise any number of markers. However, in some embodiments the number of markers in the library is limited by technical and/or commercial practicalities, such as specimen size. For example, in some embodiments, each specimen is tested against all of the markers in the panel. Therefore, the number of markers must not be larger than the number of samples into which the specimen may be divided. Another technical practicality is time. Typically, the library contains less than 60 markers. Preferably, the library contains less than 50 markers. More preferably, the library contains less than 40 markers. Most preferably the library contains 10-30 markers. It is preferable that the library of potential panel members contain more than 10 markers so that there is opportunity to optimize the performance of the panel. As used herein, the term "about" means plus or minus 3 markers.

In some embodiments, a library is obtained by consulting sources which contain information about various markers and correlations between the markers and generic/specific disease states. Exemplary sources include experimental results, theoretical

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

or predicted analyses and literary sources, such as journals, books, catalogues and web sites. These various sources may use histology or cytology and may rely on cytogenetics, such as *in situ* hybridization; proteomics, such as immunohistochemistry; cytometry, such as MACs or DNA ploidy; and/or cytopathology, such as morphology. The markers may be localized anywhere in or on a cell. For example, the markers may be localized in or on the nucleus, the cytoplasm or the cell membrane. The marker may also be localized in an organelle within any of the aforementioned localizations.

In some embodiments, the library may be of an unsuitable size. Therefore, one or more pruning steps may be required prior to initiating the basic method for making a panel. The pruning step may involve one or several successive pruning steps. One pruning step may involve, for example, setting an arbitrary threshold for sensitivity and/or specificity. Therefore, any marker whose experimental or predicted sensitivity and/or specificity falls below the threshold may be removed from the library. Other exemplary pruning steps, which may be performed alone or in sequence with other pruning steps, may rely on detection technology requirements, access constraints and irreproducibility of reported results. With respect to detection technology requirements, it is possible that the machinery required to detect a particular marker is unavailable. With respect to access constraints, it is possible that licensing restrictions make it difficult or impossible to obtain a probe that binds to a particular marker. In some embodiments, a due diligence study is performed on each marker.

In some embodiments, prior to beginning the basic method for making a panel, it may be necessary to perform preparation steps. Exemplary preparation steps include optimizing the protocols for objective quantitative detection of the markers in the library and collecting histology specimens. Optimization of the protocols for objective quantitative detection of the markers is within the skill of an ordinary artisan. For example, the necessary reagents and supplies must be obtained, such as buffers, reagents, software and equipment. It is possible that the concentration of reagents may need to be adjusted. For example, if non-specific binding is observed, a person of ordinary skill in the art may dilute the concentration of the probe solution.

In some embodiments, the histology specimens are Gold Standards. The term "Gold Standard" is known by a person of ordinary skill in the art to mean that the histology and clinical diagnosis of the specimen is known. The gold standards are often referred to as a "training" data set. The gold standards comprise a set of measurements, or reliable estimates, of all the features that may contribute to the discriminating process. Such features are collected from samples collected from a representative number of patients with known

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

disease states. The standard samples can be cytology samples but this is less desirable for panel selection.

The histology samples may be obtained by any technique known to those of skill in the art, for example biopsy. In some embodiments, it is necessary that the size of the specimen per patient be large enough so that enough tissue sections can be obtained to test each marker in the library.

In some embodiments, specimens are obtained from multiple patients diagnosed with each specific disease state. One specimen per patient may be obtained, or multiple specimens per patient may be obtained. In embodiments in which multiple specimens are obtained from individual patients, the expertise of the surgeon is relied upon to establish that each specimen obtained from a single patient is similar to the other specimens obtained from that patient. Specimens are also obtained from a control group of patients. The control group of patients may be healthy patients or patients that are not suffering from the generic or specific disease state that is being tested.

The first step of the basic method is determining the sensitivity and specificity of binding of probes to a library of markers associated with the desired disease state. In this step, a probe that is specific for each marker in the library is applied to a sample of the patients' specimens. Therefore, in some embodiments, if there are, for example, 30 markers in the library, each patient's specimen will be divided into 30 samples and each sample will be treated with a probe that is specific for one of the 30 markers. The probe contains a label that may be visualized. Therefore, the pattern and level of binding of the probe to the marker can be detected. The pattern and level of binding may be detected either quantitatively, i.e., by an analytical instrument, or qualitatively, by a human, such as a pathologist.

In some embodiments, an objective and/or quantitative scoring method is developed to detect the pattern and level of binding of the probe to the markers. The scoring method may be heuristically designed. Scoring methods are used to objectify a subjective interpretation, for example, by a pathologist. It is within the skill of an ordinary artisan to determine a suitable scoring method. In some embodiments, the scoring method may comprise categorizing features, such as the density of a marker probe stain as: none, weak, moderate, or intense. In another embodiment, these features may be measured with algorithms operating on microscope slide images. An exemplary scoring method is one in which the proportions and density are consolidated into a single "H Score" obtained by grading the intensity as: none = 0, weak = 1, moderate = 2, intense = 3, and the percentage cells as: 0-5% = 0, 6-25% = 1, 26-50% = 2, 51-75% = 3, >75% = 4, and then multiplying the

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

two grades together. For example, 50% weakly stained plus 50% moderately stained would score $6 = (1 \times 2) + (2 \times 2)$. The "H score" honors the late Kenneth Hirsch, one of the present inventors.

An ordinary artisan is capable of addressing issues related to minimizing potential biases related to pathologists and samples. For example, randomizing may be used to minimize the chance of having a systematic error. Blinding may be used to eliminate experimental biases by the people conducting the experiments. For example, in some embodiments, pathologist-to-pathologist variation may be minimized by conducting a double blind study. As used herein, the term "double blind study" is a well establish method for avoiding biases, where the data collection and data analysis are done independently. In other embodiments, sample-to-sample variation is minimized by randomizing the samples. For example, the samples are randomized before the pathologist analyzes them. There is also randomization involved in the experimental protocols. In some embodiments, each sample is analyzed by at least two pathologists. For each patient, a reliable assessment of the binding of the probe to the marker is obtained. In one embodiment, this diagnosis is made by qualified pathologists, using two pathologists per patient, to check for reliability.

A sufficient number of samples should be collected to produce reliable designs and reliable statistical performance estimates. It is within the skill of a normal artisan to determine how many samples are sufficient to produce reliable designs and reliable statistical performance estimates. Most standard classifier design packages have methods for determining the reliability of the performance estimates and the sample size should be progressively increased until reliable estimates are achieved. For example, sufficient estimates to produce reliable designs may be achieved with 200 samples collected and 27 different features estimated from each sample.

The second step is selecting a limited plurality of probes. The selecting step may employ statistical analysis and/or pattern recognition techniques. In order to perform the selecting step, the data may be consolidated into a database. In some embodiments, the probes may be numbered to render their method of action as unseen during the analysis of their effectiveness and further minimize biases. Rigorous statistical techniques are used because of the large amount of data that is generated by this method. Any statistical method may be used and an ordinary skilled statistician will be able to identify which and how many methods are appropriate.

Any number of statistical analysis and/or pattern recognition methods may be employed. Since the structure of the data is initially unknown, and since different classifier

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

design methods perform better for different structures, it is preferred to use at least two design methods on the data. In some embodiments, three different methodologies may be used. One of ordinary skill in the art of statistical analysis and/or pattern recognition of data sets would recognize from characteristics of the data set structures that certain statistical methods would be more likely to yield an efficient result than others, where efficient in this case means achieving a certain level of sensitivity and specificity with a desired number of probes. A person of ordinary skill in the art would know that the efficiency of the statistical analysis and/or method is data dependent.

Exemplary statistical analysis and/or pattern recognition methods are described below:

a) A decision tree method, known as C4.5. C4.5 is public domain software available via ftp from <http://www.cse.unsw.edu.au/~quinlan/>. This is well suited to data that can be best classified by sequentially applying a decision threshold to specific features in turn. This works best with uncorrelated data; it also copes with data with similar means provided the variances differ. The C4.5 package was used to provide the examples shown herein.

b) Linear Discriminant Analysis. This involves finding weighted combinations of the features that give the best separation of the classes. These methods work well with correlated data, but not in data with similar means and different variances. Several statistical packages were used (SPSS, SAS and R), depending on the performance estimates and graphical outputs required. Fisher's linear discriminant function was used to obtain the classifier that minimized the error rate. A canonical discriminant function was used to compute receiver operating characteristic (ROC) curves showing the trade-off between sensitivity and selectivity as the decision threshold is changed.

c) Logistic Regression. This is a non-linear transformation of the linear regression model: the dependent variable is replaced by a log odds ratio (logit). Linear regression, like discriminant analysis, belongs to a class of statistical methods founded on linear models. Such models are based on linear relationships between the explanatory variables.

With a sufficient number of samples it is possible, using the above techniques and software packages, to search for combinations of features giving good discrimination between the classes. Other exemplary statistical analysis and/or pattern recognition methods are the linear Discriminant Function Method in SPSS and Logistic Regression Method in R and SAS. SPSS is the full product name and is available from SPSS, Inc., located at SPSS,

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor, Chicago, Illinois 60606 (www.spss.com). SAS is the full product name and is available from SAS Institute, Inc., 100 SAS Campus Drive, Cary, NC 27513-2414, USA (www.sas.com). R is the full product name and is available as Free Software under the terms of the Free Software Foundation's GNU (General Public License).
<http://www.r-project.org/>.

In some embodiments, a correlation matrix is obtained. Correlation measures the amount of linear association between a pair of variables. A correlation matrix is obtained by correlating the data obtained with one marker to data obtained with another marker. A threshold correlation number may be set, for example, 50% correlation. In this case, all markers with a correlation number of 50% or higher would be considered correlate markers.

In some embodiments of the present invention, user supplied weighting factors may be used to obtain optimized panels. Weighting may be related to any factor. For example, certain markers may be weighted higher than others due to cost, commercial considerations, misclassifications or error rates, prevalence of a generic disease state in a geographic location, prevalence of a specific disease state in a geographic location, redundancy and availability of probes. Some factors related to cost that may encourage a user to weight certain markers higher than others is the cost of the probe and commercial access issues, such as license terms and conditions. Some factors related to commercial considerations that may encourage a user to weight certain markers higher than others are Research and Development (R&D) time, R&D cost, R&D risk, i.e., the probability that the probe will work, cost of final analytical instrument, final performance and the time to market. In a detection panel, for example, some factors related to misclassifications or error rates that may encourage a user to weight some markers higher than others is that it may be desirable to minimize false negatives. In a discrimination panel, on the other hand, it may be desirable to minimize false positives. Some factors related to prevalence of a generic or specific disease state in a geographic area that may encourage a user to weight some probes higher than others are that in some geographic locations the incidence of certain generic or specific diseases are more or less prevalent. With respect to redundancies, in some instances it is desirable to have redundancies in the panel. For example, if for some reason one probe fails to be detected, due to the biological variability of the markers in the panel, a disease state will still be detected by the other markers. In some embodiments, markers that are preferred redundant markers may be weighted more heavily.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

The invention is flexible in being adaptable to the availability of features where cost or supply problems may not allow the very best combination. In one embodiment, the invention can simply be applied to the available features to find an alternative combination. In another embodiment, the algorithm is used to select features that allow cost weightings to be included in the selection process to arrive at a minimum cost solution. In the examples, marker performance estimates for combinations selected from all the markers collected or for only a group of commercially preferred probes are shown. The examples also demonstrate how the C4.5 package can be used to down weight certain probes on the basis of their high cost. These probe combinations may not perform as well as the optimum combination, but the performance might be acceptable in circumstances where cost is a significant factor.

Some of the methods used allow weightings to be applied to the classes. This is available in C4.5 where the tree design can optimize the cost. Also, the Discriminant Function method gives a single parameter output which can be used to give a desired false positive or false negative probability. A plot of these parameters for different threshold settings is known as the receiver operating characteristic (ROC) curve. An ROC curve shows the estimated percentage of false positive against true positive scores for different threshold levels of a classifier.

Given the heterogeneous nature of many generic disease states, the panels may be constructed with a degree of redundancy to ensure that the tests have sufficient sensitivity, specificity, positive predictive value ($\text{Positive Predictive Value} = \frac{\text{True Positives}}{\text{True Positives} + \text{False Positives}}$) and negative predictive value ($\text{Negative Predictive Value} = \frac{\text{True Negatives}}{\text{False Negatives} + \text{True Negatives}}$) to justify their use as a population-based screen. However, local and regional differences may dictate specific use of the tests in different segments of the global market, and so may significantly influence the criteria used to construct the final panel test for a given market. While the optimization of clinical utility is of utmost importance, local factors including affordability (cost), technical competence, laboratory and healthcare provider resources, workflow issues, manpower requirements, and availability of the probes and labels will contribute to a final, local selection of the markers used in the panel. Well known linear discriminant function analysis is used to include and assess all potential selection factors, by which each local factor is represented by a term in the equation, and each is weighted according to its locally determined significance. In this way, a panel test optimized for use in one world region may differ from a panel test optimized for use in a different region.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Once detection or discrimination panels have been designed using the above described method, the next step is to validate the panel using known cytology samples. Prior to validation, optional optimization steps may be performed. In some embodiments, the method for collecting cytology samples may be improved. This encompasses methods of obtaining the sample from the patient as well as methods for mixing the cytology sample. In other embodiments, the cytology presentation methods may be improved. For example, identifying optimal fixatives (preservation fluids) or transportation fluids.

The cytology samples used to validate the panels produced using the gold standard histology samples are cytology samples with known diagnoses. These samples may be collected using any method known by those of skill in the art. For example, sputum samples can be collected by spontaneous production, induced production and through the use of agents that enhance sputum production. The sample is contacted with each probe in the panel and the level and pattern of binding of the probes is analyzed to determine the performance of the panel. In some embodiments, it may be necessary to further optimize the panel. For example, it may be necessary to remove a probe from the panel. Or, it may be necessary to add an additional probe to the panel. Additionally, it may be necessary to replace one probe on the panel with another probe. If a new probe is added, this probe may be a correlate marker as determined from a correlation matrix. Alternatively, the probe may be a functionally similar marker. Once the panel is optimized, the panel may proceed for further testing in clinical studies.

In other embodiments, it is not necessary to optimize the panel. If the results with the cytology samples correlate with the results from the histology samples, there may not be a need to optimize the panel and the panel may proceed for further testing in clinical studies.

4. Methods of Use

Once a panel is obtained using the above described method, it may be applied to cytologic samples. To illustrate the method, cancer, especially lung cancer, will be exemplified. Similar steps and procedures will be applied for other disease states. It is to be expected that cells shed from the specified lesions will stain in a similar fashion and show in a cytologic sample, such as a fine needle aspiration, sputum, urine, in a similar fashion as in the histologic pathology samples used to obtain the panel.

The basic method of the present invention typically involves two steps. First, a cytological sample suspected of containing diseased cells is contacted with a panel

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

containing a plurality of agents, each of which quantitatively binds to a disease marker. Then, the level or pattern of binding of each agent to a disease marker is detected. The results of the detection may be used to diagnose the presence of a generic disease or to discriminate among specific disease states. An optional preliminary step is identifying an optimized panel of agents that will aid in the detection of a disease or the discrimination between disease states in a cytologic sample.

Cytology specimens may include, but are not limited to, cellular samples collected from body fluids, such as blood, urine, spinal fluids, and lymphatic systems; epithelial cell-based organ systems, such as the pulmonary tract, e.g., lung sputum, urinary tract, e.g., bladder washings, genital tract, e.g., cervical PAP smears, and gastrointestinal tract, e.g., colonic washings; and fine needle aspirations from solid tissue sites in organs and systems such as the breast, pancreas, liver, kidneys, thyroid, bone marrow, muscles, prostate, and lungs; biopsies from solid tissue sites in organs and systems such as the breast, pancreas, liver, kidneys, thyroid, bone marrow, muscles, prostate, and lungs; and histology specimens, such as tissue from surgical biopsies.

An illustrative panel of agents according to the present invention includes any number of agents that allows for accurate detection of malignant cells in a cytological sample. Molecular markers envisioned by the present invention may be any molecule that aids in the detection of malignant cells. Markers may be selected for inclusion in a panel based on several different criteria relating to changes in level or pattern of expression of the marker. Preferred are molecular markers where changes in expression: occur early in tumor progression, are exhibited by a majority of tumor cells, allow for detection of in excess of 75% of a given tumor type, most preferably in excess of 90% of a given tumor type and/or allow for the discrimination between histologic types of cancer.

The first step of the basic method is the detection of changes in the level or pattern of expression of the panel of agents in a cytological sample. This step typically involves contacting the cytologic sample with an agent, such as a labeled polyclonal or monoclonal antibody or fragment thereof or a nucleic acid probe, and observing the signal in individual cells. Detection of cells where there is a change in signal is indicative of a change in the level of expression of the molecular marker to which the label probe is directed. The changes are based on an increase or decrease in the level of expression relative to nonmalignant cells obtained from the tissue or site being examined..

An analysis of the changes in the level or pattern of expression of a panel of agents enables a skilled artisan to determine, with high sensitivity and high specificity,

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

whether malignant cells are present in the cytologic sample. The term "sensitivity" refers to the conditional probability that a person having a disease will be correctly identified by a clinical test, (the number of true positive results divided by the number of true positive and false negative results). Therefore, if a cancer detection method has high sensitivity, the percentage of cancers detected is high e.g., 80%, preferably greater than 90%. The term "specificity" refers to the conditional probability that a person not having a disease will be correctly identified by a clinical test, (i.e., the number of true negative results divided by the number of true negative and false positive results). Therefore, if a cancer detection method has high specificity, 80%, preferably 90%, more preferably 95%, the percentage of false positives the method produces is low. A "cytologic sample" encompasses any sample collected from a patient that contains that patient's cells. Examples of cytological samples envisioned by the present invention include body fluids, epithelial cell-based organ system washings, scrapings, brushings, smears or effusions, and fine-needle aspirates and biopsies.

Use of the markers described in this invention assumes that it is possible to obtain an adequate cytologic sample routinely and that the samples can be adequately preserved for subsequent evaluation. The cytologic sample may be processed and stored in a suitable preservative. Preferably, the cytologic sample is collected in a vial containing the preservative. The preservative is any molecule or combination of molecules known to maintain cellular morphology and inhibit or block degradation of cellular proteins and nucleic acids. To ensure proper fixation, the sample may be mixed at the collection site at high speeds to disaggregate the sample and/or break up obscuring material such as mucus, thereby exposing the cells to the preservative.

Once a specimen is obtained, it is desirable to homogenize it, using an appropriate mixing device. This permits using aliquots for multiple purposes, including the possibility of sending aliquots to more than one testing site, as well as preparing multiple slides and/or multiple depositions on a slide. The initial homogenization of the specimen and of each aliquot before use will ensure that each individual slide will have substantially the same distribution of cells, so that comparisons of results from one slide to another will be meaningful.

Preparation of a specimen for analysis involves applying a sample to a microscope slide using methods including, but not limited to, smears, centrifugation, or deposition of a monolayer of cells. Such methods may be manual, semi-automated, or fully automated. The cell suspension may be aspirated depositing the cells on a filter and a monolayer of cells transferred to a prepared slide that may be processed for further

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

evaluation. By repeating this process additional slides may be prepared as necessary. The present invention encompasses detection of one molecular marker per slide. Detection of several molecular markers per slide is also envisioned. Preferably, 1-6 markers are detected per slide. In some embodiments 2 markers are detected per slide. In other embodiments, 3 markers are detected per slide.

The present invention contemplates detecting changes in molecular marker expression at the DNA, RNA or protein level using any of a number of methods available to an ordinary skilled artisan. Detection of the changes in the level or pattern of expression of the molecular markers in a cytologic sample generally involves contacting a cytologic sample with a polyclonal or monoclonal antibody or fragment thereof or a nucleic acid sequence that is complementary to the nucleic acid sequence encoding a molecular marker in the panel, collectively "probes", and a label. Typically, the probe and label components are operatively linked so that when the probe reacts with the molecular marker a signal is emitted (a "labeled probe"). Labels envisioned by the present invention are any labels that emit or enable a signal and allow for identification of a component in a sample. Preferred labels include radioactive, fluorogenic, chromogenic or enzymatic moieties. Therefore, possible methods of detection include, but are not limited to, immunocytochemistry; proteomics, such as immunochemistry; cytogenetics, such as *in situ* hybridization, and fluorescence *in situ* hybridization; radiodetection, cytometry and field effects, such as MACs and DNA ploidy (the quantitation of stoichiometrically-stained nuclear DNA using automated computerized cytometry) and; cytopathology, such as quantitative cytopathology based on morphology. The signal generated by the labeled probe is preferably of sufficient intensity to permit detection by a medical practitioner or technician.

Once the slide is prepared, a medical practitioner conducts a microscopic review of the slides in order to identify cells that exhibit a change in marker expression characteristic of a diagnosis of cancer. The medical practitioner may use an image analysis system and automated microscope to identify cells of interest. Analysis of the data may make use of an information management system and algorithms that will assist the physician in making a definitive diagnosis and select the optimal therapeutic approach. A medical practitioner may also examine the sample using an instrument platform that is capable of detecting the presence of the labeled agent.

A molecular diagnostic panel assay will result in one or more glass microscope slides with labeled cells and/or tissue sections. The challenge for human experts to assess these (cyto)pathology multilabeled-cell preparations objectively and with clinically

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

meaningful results is a virtually insurmountable detection and perception problem for any human being.

Computer-aided imaging systems (i.e., Photonic Microscopes™) can be developed and used to assess quantitatively and reproducibly the amount and location of probe-labeled cells and tissues. Such Photonic Microscopes™ combine robotic slide-handling capabilities, data management systems (e.g., medical informatics), and quantitative digital (optical and electronic) image analysis hardware and software modules to detect and report cell-based probe content and localization data that cannot be obtained by human visualization with comparable sensitivity and accuracy. These probe data can be used to characterize and differentiate cellular samples based upon their related characteristics and differences in their respective cell-based markers for a variety of disease states.

The present methodology is a methodology whereby the molecular diagnostic panels are applied to cell-based specimens and samples, and whereby computer-aided imaging systems are subsequently used to quantify and report the results of the molecular diagnostic panel tests. Such imaging systems can be used to evaluate cell-based samples in which multiple probes are used simultaneously on a given slide-based sample, and in which the probes can be separately analyzed, quantified, and reported because the probes are differentiated by color on the microscope cytology or histology slide.

The signals generated by a labeled agent in the sample may, if they are of appropriate type and of sufficient intensity, be detected by a human reviewer (e.g., pathologist) using a standard microscope or a Computer-Aided Microscope [167]. The Computer-Aided Microscope is an ergonomic, computer-interfaced microscope workstation that integrates mouse-driven control of microscope operation (e.g., stage movement, focusing) with computerized automation of key functions (e.g., slide scanning patterns). A centralized Data Management System stores, organizes and displays relevant patient information as well as results from all specimen screenings and pathologist reviews. An identification number that is imprinted onto barcodes and affixed to each sample slide uniquely identifies each sample in the database, and relates it to the original specimen and the patient.

In a preferred embodiment the signals generated by a labeled agent in the sample will be detected and quantitated using an automated image analysis system, or Photonic Microscope, interfaced to the centralized Data Management System. The Photonic Microscope provides fully automated software control of the microscope operations and

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

incorporates detectors and other components appropriate for quantitation even of signals not detectable by human reviewers, such as very faint signals or signals from radiolabeled moieties. The location of detected signals is stored electronically for rapid relocation by automated instruments, and for human review using a Computer-Aided Microscope [168].

The centralized Data Management System archives all patient and sample data using the bar-coded identification number. The data may be acquired asynchronously, from a multiplicity of sites, and may be derived from multiple reviews and analyses by human cytologists and/or automated analyzers. These data may include results from multiple sample slides representing aliquots from a single previously homogenized patient specimen. Part or all of the data may be transferred to or from a hospital's Laboratory Information System to meet reporting, archiving, billing or regulatory requirements. A single, comprehensive report with integrated results from panel tests and human reviews may be generated and delivered to the physician in hardcopy, or electronically through networked computers or the Internet.

In some embodiments, the instant method allows for differential discrimination of different diseases, such as different histologic types of cancers. The term "histologic type" refers to specific disease states. Depending on the general disease state there can be one or several histologic types. For example, lung cancer includes, but is not limited to, squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, large cell carcinoma, small cell carcinoma and mesothelioma. Knowledge of the histologic type of cancer affecting a patient is very useful because it helps the medical practitioner to localize and characterize the disease and to determine the optimal treatment strategy.

In order to determine the specific disease state, a panel of markers is selected that allows for discrimination between specific disease states. For example, within a panel of molecular markers, a pattern of expression may be identified that is indicative of a particular histologic type of cancer. The detection of the level of expression of the panel of molecular markers is achieved by the above-described methods. Preferably, a panel of 1-20 molecular markers is employed to discriminate among the various histologic types of lung cancer. However, most preferably, 4-7 markers are used. Decision trees may be developed to aid in discriminating between different histologic types based on patterns of marker expression.

In addition to allowing for the detection of malignant cells in a cytologic sample, the instant invention has utility in the molecular characterization of the disease state. Such information is often of prognostic significance and can assist the physician in the selection of the optimal therapeutic approach for a particular patient. In addition, the panel of

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

markers described in this invention may have utility in monitoring the patient for either recurrence or to measure the efficacy of the therapy being used to treat the disease.

By way of non-limiting example, the presence of lung cancer may be detected by a lung cancer detection panel and the specific type of lung cancer may be detected by a discrimination panel. If the medical practitioner determines that malignant cells are present in the cytologic sample, a further analysis of the histologic type of lung cancer may be performed. The histologic type of lung cancer encompassed by the present invention includes but is not limited to squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, large cell carcinoma, small cell carcinoma and mesothelioma. Figure 1 illustrates molecular markers that are preferable markers to be included in a panel for identifying different histologic types of lung cancer. The column labeled “%” indicates the percentage of tumor specimens that express a particular marker.

In determining the various histologic types of lung cancer, the relative level of expression of a marker is analyzed. Figure 2 illustrates how different markers may be used to discriminate among different histologic types of cancer. In this table, SQ indicates squamous cell carcinoma, AD indicates adenocarcinoma, LC indicates large cell carcinoma, SC indicates small cell carcinoma and ME indicates mesothelioma. The numbers appearing in each cell represent frequency of marker change in one cell type versus another. To be included in the table, the ratio must be greater than 2.0 or less than 0.5. A number larger than 100 generally indicates that the second marker is not expressed. In such cases the denominator was set at 0.1 for the purpose of the analysis. Finally, empty cells represent either no difference in expression or the absence of expression data.

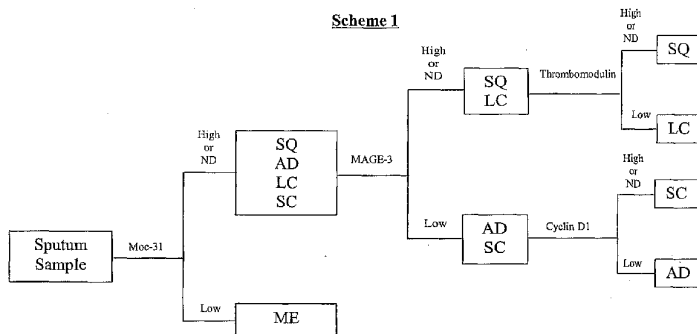
One method for analyzing the data collected is to construct decision trees. Schemes 1-4 are examples of decision trees that may be constructed to enable a differential determination of a histologic type of lung cancer using the patterns of expression. The present invention is in no way limited to the decision trees presented in Schemes 1-4. The relative level of expression of a marker can be higher, lower, or the same (ND) as the level of expression of the molecular marker in a malignant cell of a different histologic type. Each scheme enables a distinction between five histologic types of lung cancer through the use of the indicated panel of molecular markers.

For example, in Scheme 1 the panel consists of HERA, MAGE-3, Thrombomodulin and Cyclin D1. First the sample is contacted with a labeled probe directed toward HERA. If the expression of HERA is lower than the control, the test indicates that the histologic type of lung cancer is mesothelioma (ME). If, however, the expression is higher or

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

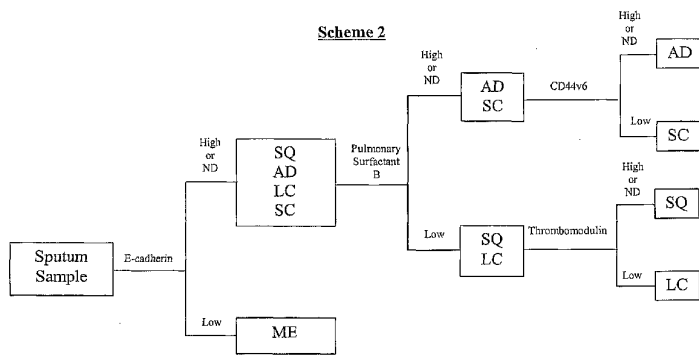
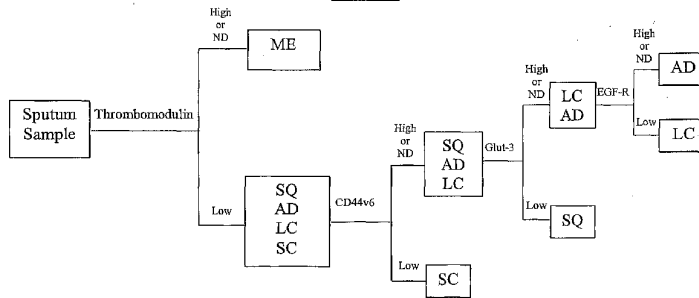
the same as the control, the sample is contacted with a probe directed toward MAGE-3. If the expression of MAGE-3 is lower than the control, the sample is contacted with a labeled probe directed toward Cyclin D1 and a determination of small cell carcinoma (SC) or adenocarcinoma (AD) is possible. If the expression of MAGE-3 is higher than or the same as the control, the sample is contacted with a labeled probe directed toward Thrombomodulin and a determination of squamous cell carcinoma (SC) or large cell carcinoma (LC) is possible.



In Scheme 2 the panel consists of E-Cadherin, Pulmonary Surfactant B and Thrombomodulin. First the sample is contacted with a labeled probe directed toward E-Cadherin. If the expression of E-Cadherin is lower than the control, the test indicates that the histologic type of lung cancer is mesothelioma (ME). If, however, the expression is higher or the same as the control, the sample is contacted with a probe directed toward Pulmonary Surfactant B. If the expression of Pulmonary Surfactant B is lower than the control, the sample is contacted with a labeled probe directed toward Thrombomodulin and a determination of squamous cell carcinoma (SQ) or large cell carcinoma (LC) is possible. If the expression of Pulmonary Surfactant B is higher than or the same as the control, the sample is contacted with a labeled probe directed toward CD44v6 and a determination of adenocarcinoma (AD) and small cell carcinoma (SC) is possible. (See Schemes 3 and 4 for more examples of decision trees).

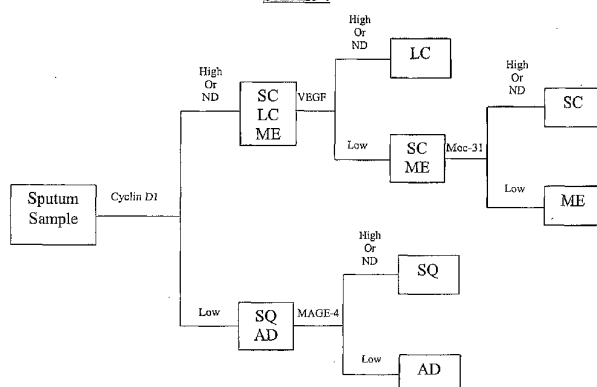
WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Scheme 2**Scheme 3**

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Scheme 4

A preferred method involves using panels of molecular markers where differences in the pattern of expression permits the discrimination between the various histologic type of lung cancer.

Many different decision trees may be constructed to analyze the patterns of marker expression. This information may be used by physicians or other healthcare providers to make patient management decisions and select an optimal treatment strategy.

5. Reporting of Results of Panel Analysis

The results from the panel analysis may be reported in several ways. For example, the results may be reported as a simple "yes or no" result. Alternatively, the result may be reported as a probability that the test results are correct. For example, the results from a detection panel study may indicate whether a patient has a generic disease state or not. As the panel also reports the specificity and sensitivity, the results may also be reported as the probability that the patient has a generic disease state. The results from a discrimination panel analysis will discriminate among specific disease states. The results may be reported as a "yes or no" with respect to whether the specific disease state is present. Alternatively, the results may be reported as a probability that a specific disease state is present. It is also

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

possible to perform several discrimination panel analyses on a specimen from one patient and report a profile of the probabilities that the disease state present is a specific disease state with respect to the other possibilities. The other possibilities may also include false positives.

In embodiments in which a profile of the probabilities of each specific disease state being present is produced, there are several possible outcomes. For example, it is possible that all of the probabilities will be a very small probability. In this instance, it is possible that the doctor will conclude that the patient's specimen diagnosis is a false positive. It is also possible that all of the probabilities will be low except for one that is above 80-90%. In this instance, it is possible that the doctor will conclude that the test verifies that the patient has the specific disease state that indicated the high probability. It is also possible that most of the probabilities will be low, but similarly high probabilities are reported for two specific disease states. In this case, a doctor may recommend more extensive panel testing to ensure that the correct disease state is identified. Another possibility is that all of the probabilities reported will be low, with one being *slightly* higher than the rest but not high enough to be in the 80-90% range. In this case, a doctor may recommend more extensive panel testing to ensure that the correct disease state is identified and/or to rule out metastatic cancer from a remote primary tumor of a different cancer type.

The following Example is illustrative of the method of the invention for selecting a disease detection panel, disease discrimination panels, validation of the panels and use of the panels in the clinic to screen for a disease and to discriminate among different subtypes of the disease. Lung cancer was selected for this illustrative example, in part because of its importance to world health, but it will be appreciated that similar procedures will apply to other types of cancer, as well as to infectious, degenerative and autoimmune diseases, according to the foregoing general disclosure.

ILLUSTRATIVE EXAMPLE

The present method was used to develop lung cancer detection panels as well as single lung cancer type specific discrimination panels. Lung cancer is an extremely complex collection of diseases that can be segregated into two main classes. Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) that accounts for approximately 70 to 80% of all lung cancers can be further subdivided into three main histologic types including squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and large cell carcinoma. The remaining 20 to 30% of lung cancer patients present with small cell lung carcinoma (SCLC). In addition, malignant mesothelioma of the

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

pleural space, can develop in individuals exposed to asbestos and will often spread widely invading other thoracic structures. Different forms of lung cancer tend to localize in different regions of the lung, have different prognoses, and respond differently to various forms of therapy.

According to the latest statistics from the World Health Organization (Globocan 2000), lung cancer has become the most common fatal malignancy in both men and women with an estimated 1.24 million new cases and 1.1 million deaths each year. In the U.S. alone, the National Cancer Institute reports that there are approximately 186,000 new cases of lung cancer and each year 162,000 people die of the disease, accounting for 25% of all cancer-related deaths. In the U.S., overall 1-year survival for patients with lung cancer is 40%, however, only 14% live 5 years. In other parts of the world, 5-year survival is significantly lower (5% in the UK). The high mortality of lung cancer can be attributed to the fact that most patients (85%) are diagnosed with advanced disease when treatment options are limited and the disease is likely to have metastasized. In these patients, 5-year survival is between 2-30% depending of the stage at the time of diagnosis. This is in sharp contrast to cases where patients are diagnosed early and 5-year survival is greater than 75%. While it is true that a number of new chemotherapeutic agents have been introduced into clinical practice for the treatment of advanced lung cancer, to date, none have yielded a significant improvement in long-term survival. Even though patients with early stage disease can presumably be cured by surgery, they remain at significant risk, as there is a high probability that they will develop a second malignancy. Thus, for the lung cancer patient, early detection and treatment followed by aggressive monitoring provides the best chance of achieving significant improvements in long-term survival along with a reduction in morbidity and cost.

At the present time, a patient is suspected of having lung cancer either because of a suspicious lesion on X-ray or because the patient becomes symptomatic. As a result, most patients are diagnosed with relatively late stage disease. In addition, because most methods lack sufficient sensitivity with respect to the detection of early stage disease, the current policy of the U.S. National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health, recommends against screening for lung cancer even in populations of patients who are at significant risk. In this embodiment of the present invention, however, sputum cytology is employed to provide a relatively noninvasive, more effective and cost-effective means for the early detection of lung cancer.

The specificity of sputum cytology is relatively high. Recent studies have indicated that experienced cytotechnologists are able to recognize malignant or severely

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

dysplastic cells with a high degree of accuracy and reliability [10]. While the detection rate can be as high as 80 to 90% when samples are collected from patients with a relatively advanced disease [11,12], overall, sputum cytology has a sensitivity of only 30-40% [13,14]. The low sensitivity of sputum cytology is particularly important given that obtaining and preparing the specimen can be relatively expensive. Furthermore, failing to detect a malignancy can significantly delay treatment thereby reducing the chance of achieving a cure.

The selection of an "at-risk" population can also influence the value of sputum cytology as a screening tool. Individuals who are at significant risk include those with a prior diagnosis of lung cancer, long-term smokers or former smokers (>30 pack years) and individuals with long-term exposure to asbestos or pulmonary carcinogens. People with a genetic predisposition or familial history are also included in an "at-risk" population. Such individuals are likely to benefit from testing. While the inclusion of individuals with lower risk may result in an increase in the absolute number of cases detected, it would be hard to justify the substantial increase in healthcare costs.

Other factors that contribute to the relatively poor performance of conventional sputum cytology include the location of the lesion, tumor size, histologic type, and the quality of the sample. Squamous-cell carcinoma accounts for 31% of all primary pulmonary neoplasms. Most of these tumors arise from segmental bronchi and extend to the proximal lobar and distal subsegmental branches [15]. For this reason, sputum cytology is reasonably effective (79%) in detecting these lesions. Currently, squamous cell carcinoma is viewed as the only type of lung cancer that is amenable to cytologic detection in an *in situ* and radiologically occult stage [15], as sloughed cells are more likely to be available for evaluation. In one large study where patients were followed with both chest X-ray and sputum cytology, 23% of all lung cancers were detected by cytology alone, suggesting that the tumors were early stage and radiologically occult [16]. In another study [17], sputum cytology detected 76% of patients with radiologically occult tumors.

In the case of adenocarcinoma, 70% of tumors occur in the periphery of the lung making it less likely that malignant cells will be found in a conventional sputum specimen. For this reason, adenocarcinomas are rarely detected by sputum cytology (45%) [12,18,19], an important consideration, since the incidence of adenocarcinoma appears to be increasing, particularly in women [20-22].

Tumor size can also affect the likelihood of achieving a correct diagnosis, a factor that is particularly important when considering a screening test for the detection of

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

disease in asymptomatic individuals. While there is only a 50% chance that tumors <24mm will be read as a true positive, the probability of detecting a larger lesion is in excess of 84% [12].

Recent reports also indicate that the cellularity of the specimen will affect the sensitivity of sputum cytology [14,23]. In general, patients with squamous cell carcinoma produce specimens with significant numbers of tumor cells, thereby increasing the likelihood of a correct diagnosis [14,23]. For patients with adenocarcinoma, the presence of tumor cells in a sputum specimen is reported to be less than 10% in 95% of the specimens and less than 2% in 75% of specimens, making the diagnosis significantly more difficult.

The degree of differentiation can also influence the ability of a pathologist to detect malignant cells, particularly in cases of adenocarcinoma. Well-differentiated tumor cells frequently resemble nonneoplastic respiratory epithelial cells. In the case of small-cell lung carcinoma, sputum samples often contain nests of loosely aggregated cells that have a distinct appearance. However, techniques currently used to process sputum samples tend to disaggregate the cells, making a diagnosis more difficult.

Sample quality is another factor that can contribute to the low sensitivity of sputum cytology. Recent reports suggest that it is possible to obtain adequate samples from 70-85% of subjects. However, achieving this measure of success often requires that patients provide multiple specimens [13]. This procedure is inconvenient, time-consuming and costly. Patient compliance is also generally low, as patients are frequently asked to collect over several days [13]. Of equal importance is the observation that former smokers, while at significant risk for developing lung cancer, often fail to produce an adequate specimen. Sample preservation and processing is another critical factor that can affect the value of sputum cytology as a diagnostic test.

Lastly, even if adequate samples could be obtained and optimally prepared, cytotechnologists generally still have to review 2-4 slides per specimen, each typically taking up to four minutes [24]. Given the low sensitivity, high technical complexity and labor intensity of conventional sputum cytology, it is not surprising that this test has been almost universally rejected as a population-based screen for the early detection of lung cancer [25].

Even if these technical issues were resolved, the low sensitivity of sputum cytology remains a significant problem. The high incidence of false negative results can significantly delay the patient receiving potentially curative therapy. While it may be possible to develop tests with greater sensitivity, such improvements must not come at the cost of specificity. An increase in the number of false positive results would subject patients

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

to unnecessary, often invasive and costly, follow-up and would have a negative impact on the patient's quality of life. The present invention overcomes many of the limitations associated with previous methods of early cancer detection, including those related to the use of sputum cytology for the early detection of lung cancer.

Lung cancer is a heterogeneous collection of diseases. To ensure that a test has the necessary level of sensitivity and specificity to justify its use as a population based screen, the present invention envisions using, for example, a library of 10 to 30 cellular markers to develop panels. Selection of the library of this invention was based on a review and reanalysis of the relevant scientific literature where, in most cases, marker expression was measured in biopsy specimens taken from patients with lung cancer in an attempt to link expression with prognosis.

For example, a preferred panel for early detection, characterization, and/or monitoring of lung cancer in a patient's sputum may include molecular markers for which a change in expression occurred in at least 75% of tumor specimens. An exemplary panel includes markers selected from VEGF, Thrombomodulin, CD44v6, SP-A, Rb, E-Cadherin, cyclin A, nm23, telomerase, Ki-67, cyclin D1, PCNA, MAGE-1, Mucin, SP-B, HERA, FGF-2, C-MET, thyroid transcription factor, Bcl-2, N-Cadherin, EGFR, Glut-1, ER-related (p29), MAGE-3 and Glut-3. A most preferred panel includes molecular markers for which a change in expression occurs in more than 85% of tumor specimens. An exemplary panel includes molecular markers selected from Glut1, HERA, Muc-1, Telomerase, VEGF, HGF, FGF, E-cadherin, Cyclin A, EGF Receptor, Bcl-2, Cyclin D1 and N-cadherin. With the exception of Rb and E-cadherin, a diagnosis of lung cancer is associated with an increase in marker expression. A brief description of the library of probes/markers utilized in the present example is provided below in Table 4. It is noted that the numbering of the antibodies in the table below is consistent with the number of the antibodies/probes/markers throughout this example.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 4:

Probes and Markers for Lung Panel			
No.	Marker Abbreviation	Full Name of Antibody Probe	Target Marker Name/Description
1	VEGF	anti-VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor protein
2	Thrombospondin	anti-Thrombospondin	anti-thrombospondin glycoprotein
3	CD44v6	anti-CD44v6	cell surface glycoprotein (CD44 variant 6 gene); cell adhesion molecule
4	SPA	anti-Surfactant Apoprotein A	pulmonary surfactant apoprotein
5	Phosphotyrosine	anti-phosphotyrosine gene product	phosphotyrosine
6	E-Cadherin	anti-E-Cadherin	transmembrane Ca ²⁺ dependent cell adhesion molecule
7	Cyclin A	anti-Cyclin A	protein subunit of cyclin-dependent kinase enzymes; for cell cycle regulation
8	HERA	anti-HERA	2 closely related proteins developed by HER2/NEU and HER3 genes
9	Topoisomerase	anti-Topoisomerase	deoxyribonuclease enzymes for chromosome replication
10	MSL-1 (K467)	anti-K467	nuclear protein, expressed in proliferating cells
11	Cyclin D1	anti-Cyclin D1	protein subunit of cyclin-dependent kinase enzymes; for cell cycle regulation
12	PCNA	anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen	protein cofactor for DNA polymerase delta
13	MAGE-1	anti-Melanoma-Associated Antigen 1	cell recognition protein coded by MAGE family of genes
14	MAA-1 (MUC-1)	anti-Axonal 1	cell surface and secreted mucin (glycosylated protein)
15	SP-B	anti-pulmonary Surfactant Apoprotein B	pulmonary surfactant apoprotein
16	HERA	anti-Human Epithelial Related Antigen (HERA-31)	cell nuclear antigen (transmembrane protein)
17	HER-2 (erbB-2, P185)	anti-ErbB2 Growth Factor	protein that binds to cell surface
18	K-MET	anti-K-MET	trans-membrane receptor protein for Heparanase Growth Factor (HGF)
19	Thyroid Transcription Factor 1	anti-TTF-1	regulator of thyroid-specific genes; also expressed in lung
20	HER-2	anti-HER-2	transmembrane tyrosine protein encoded by HER-2 gene
21	P120	anti-P120	Proliferation-Associated Nuclear Antigen protein
22	E-Cadherin	anti-E-Cadherin	transmembrane Ca ²⁺ dependent cell adhesion molecule
23	EGFR	anti-EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor; transmembrane glycoprotein
24	Glut 1	anti-Glut 1	glucose-transporting, transmembrane dual family of proteins
25	Glut 3	anti-Glut 3	glucose-transporting, transmembrane dual family of proteins
26	Glut 4	anti-Glut 4	glucose-transporting, transmembrane dual family of proteins
27	Glut 5	anti-Glut 5	glucose-transporting, transmembrane dual family of proteins
28	PCNA (higher dilution)	anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen	protein cofactor for DNA polymerase delta

Each molecular marker in the preferred panel is described below. Table 5, reciting the percentage of expression of the markers in tissue for each type of lung cancer is provided at the end of this section.

Glucose Transporter Proteins (Glut 1 and Glut 3) [26-28]

Glucose Transporter-1 (Glut 1) and Glucose Transporter-3 (Glut-3) are a ubiquitously expressed high affinity glucose transporter. Tumor cells often display higher rates of respiration, glucose uptake, and glucose metabolism than do normal cells, and the elevated uptake of glucose in tumor cells is thought to be mediated by glucose transporters. Overexpression of certain types of GLUT isoforms has been reported in lung cancer. The cellular localization of Glut 1 is in the cell membrane. GLUT-1 and GLUT-3 are disease markers useful for detection of a disease state.

Malignant cells exhibit an increase in glucose uptake that appears to be mediated by a family of glucose transporter proteins (Gluts). Oncogenes and growth factors appear to regulate the expression of these proteins as well as their activities. Members of the Glut family of proteins exhibit different patterns of distribution in various human tissues and rapid proliferation is often associated with their overexpression. Recent evidence suggests that Glut1 is expressed by a large percentage of NSCLC and by a majority of SCLC.

While the expression of Glut 3 is relatively low in both NSCLC and SCLC a significant percentage (39.5%) of large cell carcinomas express the protein. In stage I tumors, 83% express Glut 1 at some level with 75-100% of cells staining in 25% of cases.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

These data would suggest that Glut1 overexpression is a relatively early event in tumor progression. Glut1 immunoreactivity has also been detected in > 90% of stage II and IIIA cancers. There also appears to be an inverse correlation between Glut1 and Glut3 immunoreactivity and tumor differentiation. Tumors expressing high levels of Glut1 appear to be particularly aggressive that are associated with a poor prognosis. In cases where tumors were negative for the proteins better survival was observed.

Human Epithelial Related Antigen (HERA) [29,30]

HERA is a transmembrane glycoprotein with an, as yet, unknown function. HERA is present on most normal and malignant epithelia. Recent reports suggest that the while HERA expression is high in all histologic types of NSCLC making it useful as a detection marker. In contrast HERA expression is absent in mesothelioma and thus suggesting would have utility as a discrimination marker. The cellular localization of HERA is the cell surface.

Basic Fibroblast Growth Factor (FGF) [31-34]

Basic Fibroblast Growth Factor (FGF) is a polypeptide growth factor with a high affinity for heparin and other glycosaminoglycans. In cancer, FGF functions as a potent mitogen, plays a role in angiogenesis, differentiation, and proliferation, and is involved in tumor progression and metastasis. FGF overexpression frequently occurs in both SCLC and squamous cell carcinoma. In many cases (62%), the cells also express the FGF receptor suggesting the presence of an autocrine loop. Forty-eight percent of Stage I tumors overexpress FGF. The frequency of FGF in Stage II lung cancer is 84%. Expression of either the growth factor or its receptor was associated with the poor prognosis. Five-year survival rates for those patients with stage I disease were 73% for those expressing FGF versus 80% for those who were FGF negative. The cellular localization is the cell membrane.

Telomerase [35-42]

Telomerase is a ribonucleoprotein enzyme that extends and maintains telomeres of eukaryotic chromosomes. It consists of a catalytic protein subunit with reverse transcriptase activity and an RNA subunit with reverse transcriptase activity and an RNA subunit that serves as the template for telomere extension. Cells that do not express telomerase have successively-shortened telomeres with each cell division, which ultimately leads to chromosomal instability, aging and cell death. The cellular localization of telomerase is nuclear.

Expression of telomerase appears to occur in immortalized cells and enzyme activity is a common feature of the malignant phenotype. Approximately 80-94% of lung

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

tumors exhibit high levels of telomerase activity. In addition, 71% of hyperplasia, 80% of metaplasia, and 82% of dysplasia express enzyme activity. All the carcinoma *in situ* (CIS) specimens exhibit enzyme activity. The low levels of expression in premalignant tissues is probably related to the fact that only a small percentage of cells (5 and 20%) in the sample express enzyme activity. This is in contrast to tumors where 20-60% of cells may express enzyme activity. Based on a limited number of samples it would appear expression of telomerase activity is also common in SCLC.

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) [43-51]

PCNA functions as a cofactor for DNA polymerase delta. PCNA is expressed in both S phase of the cell cycle and during periods of DNA synthesis associated with DNA repair. PCNA is expressed in proliferating cells in a wide range of normal and malignant tissues. The cellular localization of PCNA is nuclear.

Expression of PCNA is a common feature of rapidly dividing cells and is detected in 98% of tumors. Immunohistochemical staining is nuclear with moderate to intense staining detected in 83% of NSCLC. Intense PCNA staining was observed in 51% of p53-negative tumors. However, when both PCNA (> 50% of cells staining) and p53 are overexpressed (>10% of cells stained) the prognosis tends to be poorer with a shorter time to progression. Although frequently detected in all stages of lung cancer, intense staining for PCNA is more common in metastatic disease. Thirty-one percent of CIS also overexpress PCNA.

CD44 [51-58]

CD44v6 is a cell surface glycoprotein that acts as a cellular adhesion molecule. It is expressed on a wide range of normal and malignant cells in epithelial, mesothelial and hematopoietic tissues. The expression of specific CD44 splice variants has been shown to be associated with metastasis and poor prognosis in certain human malignancies. It is expected to be used for detection and discrimination between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. CD44 is a cell adhesion molecule that appears to play a role in tumor invasion and metastasis. Alternative splicing results in the expression of several variant isoforms. CD44 expression is generally lacking in SCLC and is variably expressed in NSCLC. Highest levels of expression occur in squamous cell carcinoma, thus making it valuable in discriminating between tumor types. In non-neoplastic tissue, CD44 staining is observed in bronchial epithelial cells, macrophages, lymphocytes, and alveolar pneumocytes. There was no significant correlation between CD44 expression and tumor stage, recurrence, or survival particularly when overexpression occurs in early stage disease.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

In metastatic lesions 100% of squamous cell carcinoma and 75% of adenocarcinoma showed strong CD44v6 positivity. These data would tend to indicate that changes in CD44 expression occur relatively late in tumor progression that could limit its value as an early detection marker. Recent findings suggest that the CD44v8-10 variant is expressed by a majority of NSCLC making it a possible candidate marker.

Cyclin A [59-62]

Cyclin A is a regulatory subunit of the cyclin-dependent kinases (CDK's) which control the transition points at specific phases of the cell cycle. It is detectable in S phase and during progression into G2 phase. The cellular localization of Cyclin A is nuclear.

Protein complexes consisting of cyclins and cyclin-dependent kinases function to regulate cell cycle progression. Changes in cyclin expression are associated with genetic alterations affecting the CCND1 gene. While the cyclins act as regulatory molecules, the cyclin-dependent kinases function as catalytic subunits activating and inactivating Rb.

Immunohistochemical analysis has revealed that the overexpression of the cyclins is associated with an increase in cellular proliferation as indicated by a high Ki-67 labeling index. Cyclin overexpression occurs in 75% of NSCLC and appears to occur relatively early in tumor progression. Recent reports indicate that 66.7% of stage I/II and 70.9% of stage III tumors overexpress Cyclin A. Nuclear staining is common in poorly differentiated tumors. Expression of cyclin A is often associated with a decrease in mean survival time and a tendency towards the development of drug resistance. However, increased expression has also been associated with a greater response to doxorubicin.

Cyclin D1 [63-73]

Cyclin D1, as with Cyclin A, is a regulatory subunit of the cyclin-dependent kinases (CDK's) which control the transition points at specific phases of the cell cycle. Cyclin D1 regulates the entry of cells into S phase of the cell cycle. This gene is frequently amplified and/or its expression deregulated in a wide range of human malignancies. The cellular localization of Cyclin D1 is nuclear.

Like Cyclin A, cyclin D1 functions to regulate cell cycle progression. Staining of cyclin D1 is predominately cytoplasmic and independent of histologic type. Reports suggest that cyclin D1 overexpression occurs in 40-70% of NSCLC and 80% of SCLC. Cyclin D1, staining was observed in 37.9% of stage I, 60% stage II, and 57.9% of stage III tumors. Cyclin D1 expression has also been seen in dysplastic and hyperplastic tissue providing evidence that these changes occur relatively early in tumor progression.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Patients who overexpress cyclin D1 exhibit shorter mean survival time and lower five-year survival rate.

Hepatocyte Growth Factor Receptor (C-MET) [74-77]

C-MET is a proto-oncogene that encodes a transmembrane receptor tyrosine kinase for HGF. HGF is a mitogen for hepatocytes and endothelial cells, and exerts pleiotropic activity on several cell types of epithelial origin. The cellular localization of C-MET is the cell surface.

Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) stimulates a broad spectrum of epithelial cells causing them to proliferate, migrate, and carry out complex differentiation programs including angiogenesis. HGF/SF binds to a receptor encoded by the c-MET oncogene. While both normal and malignant tissues express the HGF receptor, expression of HGF/SF appears to be limited to malignant tissue.

While the human lung generally expresses low levels of HGF/SF, expression increases markedly in NSCLC. Using Western blot analysis, 88.5% of lung cancers exhibited an increase in the protein expression. All histologic types of tumors expressed the protein at increased concentrations. While increased levels of protein occur in all stages of the disease, recent evidence suggests that in addition to the cancer cells, stromal cells and/or inflammatory cells may be responsible for the production of the growth factor.

Mucin - MUC-1 [78-82]

Mucin-1 comes from a family of highly glycosylated secretory proteins which comprise the major protein constituents of the mucous gel which coats and protects the tracheobronchial tree, gastrointestinal tract and genitourinary tract. Mucin-1 is atypically expressed in epithelial tumors. The cellular localization of Mucin-1 is cytoplasm and the cell surface.

Mucins are a family of high molecular weight glycoproteins that are synthesized by a variety of secretory epithelial cells that are either membrane bound or secreted. Within the respiratory tract, these proteins contribute to the mucus gel that coats and protects that tracheobronchial tree. Changes in mucin expression commonly occur in conjunction with malignant transformation including lung cancer. Evidence exists suggesting that these changes may contribute to alterations in cell growth regulation, recognition by the immune system, and the metastatic potential of the tumor.

Although normal lung tissue expresses MUC-1, significantly higher levels of expression are found in lung cancer with highest levels occurring in adenocarcinoma. Staining appears to occur independently of stage and is more common in smokers than in

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

former smokers or nonsmokers. Some premalignant lesions also exhibit increased MUC-1 expression.

Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) [83,84]

TTF-1 belongs to a family of homeodomain transcription factors that activate thyroid-specific and pulmonary-specific differentiation genes. The cellular localization of TTF-1 is nuclear.

TTF-1 is a protein originally found to mediate the transcription of thyroglobulin. Recently, TTF-1 expression was also found in the diencephalon and bronchioloalveolar epithelium. Within the lung TTF-1 functions as a transcription factor regulating the synthesis of surfactant proteins and clara secretory protein. Overexpression of TTF-1 occurs in a large proportion of lung adenocarcinomas and can aid in distinguishing between primary lung cancer and cancers that metastasize to the lung. Adenocarcinomas that express TTF-1 and are cytokeratin 7 positive and cytokeratin 20 negative can be detected with 95% sensitivity.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [33,61,85-89]

VEGF plays an important role in angiogenesis, which promotes tumor progression and metastasis. There are multiple forms of VEGF; the two smaller isoforms are secreted proteins and act as diffusible agents, whereas the larger two remain cell associated. The cellular localization of VEGF is cytoplasmic, cell surface, and extracellular matrix.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is an important angiogenesis factor and endothelial cell-specific mitogen. Angiogenesis is an important process in the latter stages of carcinogenesis, tumor progression and is particularly important in the development of distant metastasis. VEGF binds to a specific receptor Flt that is often present in the tumors expressing the growth factor suggesting the presence of an autocrine loop.

Immunohistochemical analysis reveals that cells expressing VEGF exhibit a pattern of staining that is diffuse and cytoplasmic. While not expressed by nonneoplastic cells, VEGF is present in the majority of NSCLC and in a smaller percentage of SCLC. Several reports have shown high levels of VEGF in early stage lung cancer.

Expression of VEGF has been associated with an increased frequency of metastasis. Studies have shown that VEGF expression is indicative of a poor prognosis and shorter disease-free interval in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma. Three year and five year survival rates in the group expressing high levels of VEGF were 50% and 16.7% as compared to 90.9 and 77.9% respectively for the low VEGF group.

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) [90-104]

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a transmembrane glycoprotein, which can bind and become activated by various ligands. Binding initiates a chain of events that result in DNA synthesis, cell proliferation, and cell differentiation. EGFR has been demonstrated in a broad spectrum of normal tissues, and EGFR overexpression is found in a variety of neoplasms. Increased expression has been observed in adenocarcinomas of the lung and large cell carcinomas but not in small cell lung carcinomas. The cellular localization of EGFR is the cell surface.

The EGFR plays an important role in cell growth and differentiation. The EGFR is uniformly present in the basal cell layer but not in more the superficial layers of histologically normal bronchial epithelium. With this exception, there is no consistent staining of normal tissue. Recent evidence suggests that the overexpression of the EGF receptor may not be an absolute requirement for the development of invasive lung cancer. However, it appear that in cases where EGFR overexpression occurs it is a relatively early event with greater staining intensity in more advanced disease.

For patients with invasive carcinomas, 50-77% of tumors stain for EGF. Overexpression of the EGFR is more common in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma and common in SCLC. Highest levels of EGFR occur in conjunction with late stage and metastatic disease that have approximately twice the concentration of EGFR as that seen in stage I/II tumors. Estimates suggest that the level of the EGFR observed in stage I tumors is approximately twice that seen in normal tissue. In addition, 48% of bronchial lesions also show EGFR staining including, metaplasia, atypia, dysplasia, and CIS. In the "normal" bronchial mucosa, of these same cancer patients, overexpression of the EGFR was observed in 39% of cases but was absent in the bronchial epithelium of the non-cancer. In addition, overexpression of the EGFR occurs more frequently in the tumors of smokers than in nonsmokers, particularly in the case of squamous cell carcinoma.

While several studies have suggested that overexpression of the EGFR is associated with the poor prognosis, other studies have failed to make this correlation.

Nucleoside Diphosphate Kinase/nm23 [105-111]

Nucleoside diphosphate kinase (NDP kinase)/nm23 is a nucleoside diphosphate kinase. Tumor cells with high metastatic potential often lack or express only a low amount of nm23 protein, hence the nm23 protein has been described as a metastasis suppressor protein. The cellular localization of nm23 is nuclear and cytoplasmic.

Expression of nm23/nucleoside diphosphate/kinase A (nm23) is a marker of tumor progression where there is an inverse relationship between expression and metastatic

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

potential. In cases where stage I tumors overexpress nm23, no evidence of metastasis was seen during an average follow-up period of 35 months. Immunohistochemical analysis reveals staining that is diffuse, cytoplasmic and generally limited to malignant cells. Alveolar macrophages also express the protein. Given that high levels of expression are associated with a low metastatic potential, there is currently no explanation as to why normal epithelial cells do not express nm23.

Intense staining has been observed in high percentage of NSCLC particularly large cell lung cancer and 74% of SCLC suggesting that this protein plays an important role in tumor progression. With the exception of squamous cell carcinoma, staining intensity tends to increase with stage. Based on the available evidence, it would appear that nm23 is a prognostic factor in both SCLC and NSCLC.

Bcl-2 [101,112-125]

Bcl-2 is a mitochondrial membrane protein that plays a central role in the inhibition of apoptosis. Overexpression of bcl-2 is a common feature of cells in which programmed cell death has been arrested. The cellular localization of Bcl-2 is the cell surface.

Bcl-2 is a protooncogene believed to play a role in promoting the terminal differentiation of cells, prolonging the survival of non-cycling cells and blocking apoptosis in cycling cells. Bcl-2 can exist as a homodimers or can form a heterodimer with Bax. As a homodimer, Bax functions to induce apoptosis. However, the formation of a Bax-bcl-2 complex blocks apoptosis. By blocking apoptosis, bcl-2 expression appears to confer a survival advantage upon affected cells. Bcl-2 expression may also play a role in the development of drug resistance. The expression of bcl-2 is negatively regulated by p53.

Immunohistochemistry analysis of bcl-2 reveals a heterogeneous pattern of cytoplasmic staining. In adenocarcinoma, expression of bcl-2 was significantly associated with smaller tumors (<2 cm) and lower proliferative activity. The expression of bcl-2 appears to be more closely associated with neuroendocrine differentiation and occurs in a large percentage of SCLC.

Overexpression of bcl-2 is not present in preneoplastic lesions suggesting that changes in bcl-2 occur relatively late in tumor progression. In addition to tumor cells, bcl-2 immunostaining also occurs in basal cells and on the luminal surfaces of normal bronchioles but is generally not detected in more differentiated cell types.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Association of bcl-2 immunoreactivity with improved prognosis in NSCLC is controversial. Several reports of suggested that patients with tumors expressing bcl-2 have a superior prognosis and a longer time to recurrence. Several reports indicate that bcl-2 expression tends to be lower in those patients who develop metastatic disease. For patients with squamous cell carcinoma, expression of bcl-2 has been linked to an improvement in 5-year survival. However, in three relatively large studies there was no survival benefit linked to bcl-2 expression, particularly for patients with early stage disease.

Estrogen Receptor-related Protein (p29) [126]

ER related protein p29 is an estrogen-related heat shock protein that has been found to correlate with the expression of estrogen-receptor. The cellular localization of p29 is cytoplasmic.

Estrogen-dependent intracellular processes are important in the growth regulation of normal tissue and may play a role in the regulation of malignancies. In one study expression of p29 was detected in 109 (98%) of 111 lung cancers. The relation between p29 expression and survival time was different for men and women. Expression of p29 was associated with poorer survival particularly in women with Stage I and II disease. There was no correlation between p29 expression and long-term survival in men.

Retinoblastoma Gene Product (Rb) [68,73,123,127-141]

Retinoblastoma Gene Product (Rb) is a nuclear DNA-binding phosphoprotein. Under phosphorylated Rb binds oncoproteins of DNA tumor viruses and gene regulatory proteins thus inhibiting DNA replication. Rb protein may act by regulating transcription; loss of Rb function leads to uncontrolled cell growth. The cellular localization of Rb is nuclear.

Retinoblastoma protein (pRb) is a protein that is encoded by the retinoblastoma gene and is phosphorylated and dephosphorylated in a cell cycle dependent manner. pRb is considered an important tumor suppressor gene that functions to regulate the cell cycle at G0/G1. In its hypophosphorylated state, pRb inhibits the transition from G1 to S. During G1, inactivation of the growth suppressive properties of pRb occurs when the cyclin dependent kinases (CDK's) phosphorylate the protein. The hyperphosphorylation of pRb prevents it from forming a complex with E2F that functions as a transcription factor proteins that are required for DNA synthesis.

Inactivation of the retinoblastoma (Rb) gene has been documented in various types of cancer, including lung cancer. Small-cell carcinomas fail to stain for pRb indicating loss of Rb function. Overall, 17.6% of the tumors fail to express pRb with no correlation being seen with respect to stage or nodal status. A reduction in staining has also seen in 31%

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

dysplastic bronchial biopsies. However, there appears to be no correlation between pRb expression and the severity of dysplasia. In contrast, normal bronchial epithelium and cells taken from areas adjacent to tumors expressed pRb positive nuclei. These data suggest that alterations in the expression of the Rb protein may arise early in the development of some lung cancers.

Patients with Rb-positive carcinomas tend to have a somewhat better prognosis but, in most studies, the difference is not significant. However, patients with adenocarcinoma whose tumors are both pRb negative and either p53 or ras positive exhibit a decrease in 5-year survival. A similar relationship does not occur in squamous cell carcinoma. pRb negative tumors have been reported to be more likely to exhibit resistant to doxorubicin than Rb-positive carcinomas.

Thrombomodulin [142-147]

Thrombomodulin is a transmembrane glycoprotein. Through its accelerated activation of protein C (which in turn acts as an anticoagulant by binding protein S and thrombin), synthesis of TM is one of several mechanisms important in reducing clot formation on the surface of endothelial cells. The cellular localization of thrombomodulin is the cell surface.

Aggregation of host platelets by circulating tumor cells appears to play an important role in the metastatic process. Thrombomodulin plays an important role in the activation of the anticoagulant protein C by thrombin and is an important modulator of intravascular coagulation. In addition to its expression in normal squamous epithelium, expression of thrombomodulin also occurs in squamous metaplasia, carcinoma in situ, and invasive squamous cell carcinomas. Although present in 74% of primary squamous cell carcinomas, only 44% of metastatic lesions stained for thrombomodulin. These data suggest that, with progression, there is a decrease in thrombomodulin expression. Higher levels of expression tend to occur in well and moderately differentiated tumors when compared to poorly differentiated tumors.

Patients with thrombomodulin-negative squamous cell carcinoma tend to have a worse prognosis. Eighteen percent of patients with thrombomodulin-negative have a five-year survival as compared to 60% in cases where the tumors stained positive for the protein. Progression to metastatic disease was also more common in thrombomodulin-negative tumors (69% vs. 37%) and there was a greater tendency for these tumors to develop at extrathoracic sites. Thus, loss of thrombomodulin expression appears to be prognostic in cases of squamous cell carcinoma. The observation that changes in thrombomodulin

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

expression occur in later stages of NSCLC and that the protein is expressed by normal bronchial epithelial cells would tend to limit its utility as a marker for early detection. However, since a majority of mesotheliomas and only a small percentage of adenocarcinomas express thrombomodulin, the marker has potential utility in discriminating between these two tumor types.

E-cadherin & N-cadherin [148-151]

E-cadherin is a transmembrane Ca^{2+} dependent cell adhesion molecule. It plays an important role in the growth and development of cells via the mechanisms of control of tissue architecture and the maintenance of tissue integrity. E-cadherin contributes to intercellular adhesion of epithelial cells, the establishment of epithelial polarization, glandular differentiation, and stratification. Down-regulation of E-cadherin expression has been observed in a number of carcinomas and is usually associated with advanced stage and progression. The cellular localization of E-cadherin is the cell surface.

E-cadherin is a calcium-dependent epithelial cell adhesion molecule. A decrease in E-cadherin expression has been associated with tumor dedifferentiation and metastasis and decreased survival. Reduced expression has been observed in moderately and poorly differentiated squamous cell carcinoma and in SCLC. There was no change in E-cadherin expression in adenocarcinoma. Furthermore, while adenocarcinomas express E-cadherin these tumors fail to express N-cadherin which is in contrast to mesotheliomas that express N-cadherin but not E-cadherin. Thus, these markers can be used to discriminate between adenocarcinoma and mesothelioma.

Expression of E-cadherin can also be used to assess the prognosis of patients with squamous cell carcinoma. Whereas 60% of patients with tumors expressing E-cadherin survived three-year survival, only 36% of patients exhibiting a reduction in expression survived 3 years.

MAGE-1 and MAGE-3 [152-156]

Melanoma Antigen-1 (MAGE-1) and Melanoma Antigen-3 (MAGE-3) are members of a family of genes that are normally silent in normal tissues but when expressed in malignant neoplasms are recognized by autologous, tumor-directed and specific cytotoxic T cells (CTL's). The cellular localization of MAGE-1 and MAGE-3 is cytoplasmic.

MAGE-1, MAGE-3 and MAGE 4 gene products are tumor-associated antigens that are recognized by cytotoxic T lymphocytes. As such, they could have utility as targets for immunotherapy in NSCLC. MAGE proteins are also expressed by some SCLCs but not by normal cells. While the frequency of MAGE expression falls below the level

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

necessary for use as a detection marker, differences in the pattern of expression between histologic types suggest that MAGE expression may have utility as differentiation markers. This utility is also supported by the observation that, in 50% of squamous cell carcinoma greater than 90% of tumor cells showed evidence of MAGE-3 overexpression with 30% to tumors exhibiting overexpression in at least 50% of cells.

Nucleolar Protein (p120) [157]

p120 (proliferation-associated nucleolar antigen) is found in the cells of nucleoli of rapidly proliferating cells during early G1 phase. The cellular localization of p120 is nuclear.

Nucleolar protein p120 is a proliferation-associated protein whose function has yet to be elucidated. Strong staining has been detected in tumor tissue but not in macrophages or normal tissue. Overexpression of p120 was more common in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma or large cell carcinoma raising the possibility that this marker may have utility in discriminating between tumor types.

Pulmonary Surfactants [83,158-166]

Pulmonary surfactants are a phospholipid-rich mixture that functions to reduce the surface tension at the alveolar-liquid interface, thus providing the alveolar stability necessary for ventilation. Surfactant proteins appear to be expressed exclusively in the airway and are produced by alveolar type II cells. In the non-neoplastic lung, pro-surfactant-B immunoreactivity is detected in normal and hyperplastic alveolar type II cells and some non-ciliated bronchiolar epithelial cells. Sixty percent of adenocarcinomas contained strong cytoplasmic immunoreactivity with 10-50% of tumor cells exhibiting staining the majority of cases. Squamous cell carcinoma and large cell carcinoma failed to stain for pro-surfactant-B.

Surfactant Apoprotein B (SP-B) is one in four hydrophobic proteins that make up the pulmonary surfactant, which is a phospholipid and protein complex secreted by type II alveolar cells. Squamous cell and large cell carcinomas of the lung and nonpulmonary adenocarcinomas do not express SP-B. The cellular localization of SP-B is cytoplasmic.

SP-A is a pulmonary surfactant protein that plays an essential role in keeping alveoli from collapsing at the end of expiration. SP-A is a unique differentiation marker of pulmonary alveolar epithelial cells (type II pneumocytes); the antigen is preserved even in the neoplastic state. The cellular localization of SP-A is cytoplasmic.

Pulmonary surfactant A appears to be specific for non-mucinous bronchioloalveolar carcinoma with 100% staining as compared to none of the of mucinous type. Pulmonary surfactants potentially have utility in discriminating lung cancer from other

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

cancers metastasized to lung. In addition to tumor cells, non-neoplastic pneumocytes also stain for pulmonary surfactant A. As with pulmonary surfactant B staining for pulmonary surfactant A is relatively common in adenocarcinoma but not in other forms of NSCLC or in SCLC. Mesothelioma also fails to express pulmonary surfactant A leading to the suggestion that pulmonary surfactant A may have utility in the discrimination between adenocarcinoma and mesothelioma.

Ki-67

Ki-67 is a nuclear protein that is expressed in proliferating normal and neoplastic cells and is down-regulated in quiescent cells. It is present in G1, S, G2, and M phases of the cell cycle, but is absent in G₀ phase. Commonly used as a marker of proliferation. The cellular localization of Ki-67 is nuclear.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 5:

Marker	Squamous Cell Carcinoma	Adenocarcinoma	Large Cell Carcinoma	Small Cell Carcinoma	Mesothelioma
Glut1	100.0*	64.5	80.5	64.0	NDA*
Glut3	17.5	16.0	39.5	9.0	NDA*
HERA	100.0	100.0	100.0	NDA	4.5
Basic FGF	83.0	48.7	50.0	100.0	NDA
Telomerase	82.3	86.3	93.0	66.7	NDA
PCNA	80.0	69.8	87.7	51.0	NDA
CD44v6	79.3	34.8	44.2	0.0	NDA
Cyclin A	79.0	68.0	83.5	97.0	NDA
Cyclin D1	42.7	36.0	62.0	90.0	NDA
Hepatocyte Growth Factor /Scatter Factor	75.5	78.3	100.0	NDA	100.0
MUC-1	55.5	90.0	100.0	100	NDA
TTF-1	38.0	76.0	NDA	83.0	NDA
VEGF	61.8	68.3	100.0	43.5	NDA
EGF Receptor	63.1	45.3	96.0	Frequently	NDA
nm23	68.0	52.6	83.5	73.5	NDA
Bcl-2	45.5	43.3	42.5	92.0	NDA
Loss of pRb Expression	20.1	25.8	35.4	85.3	NDA
Thrombomodulin	66.8	12.2	4.0	0.0	81.0
E-cadherin	69.0	85.0	NDA	100.0	0.0
N-cadherin	NDA	4.0	NDA	NDA	94.0
MAGE 1	45.0	35.0	NDA	16.5	NDA
MAGE 3	72.0	33.3	NDA	33.5	NDA
MAGE 4	45.5	11.0	NDA	50.0	NDA
Nucleolar Protein (p120)	68.0	35.0	30.0	NDA	NDA
Pulmonary Surfactant B	0.0	61.5	0.0	NDA	NDA
Pulmonary Surfactant A	12.0	52.9	17.5	20	0.0

* percent of tumors exhibiting a change in marker expression

* No Data Available

a. **Obtaining a Library of Marker of a Suitable Size**

Preliminary pruning steps were required in order to obtain a suitable size library of markers that were correlated with lung cancer. More than a hundred markers correlated to lung cancer are known in the literature. A partial listing of candidate probes identified in the literature and evaluated for potential inclusion in panels tests include antibodies to: bax, Bcl-2, c-MET (HGFR), CD44S, CD44v4, CD44v5, CD44v6, cdk2 kinase, CEA (carcino-embryonic antigen), Cyclin A, Cyclin D1 (bcl-1), E-cadherin, EGFR, ER-related (p29), erbB-1, erbB-2, FGF-2 (bFGF), FOS, Glut-1, Glut-2, Glut-3, Glut-4, Glut-5,

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

HERA (MOC-31), HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-51, integrin VLA2, integrin VLA3, integrin VLA6, JUN, keratin, keratin 7, keratin 8, keratin 10, keratin 13, keratin 14, keratin 16, keratin 17, keratin 18, keratin 19, A-type lamins (A; C), B-type lamins (B1; B2), MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, melanoma-associated antigen clone NKI/C3, mdm2, mib-1 (Ki-67), mucin 1 (MUC-1), mucin 2 (MUC-2), mucin 3 (MUC-3), mucin 4 (MUC-4), MYC, N-cadherin, NCAM (neural cell adhesion molecule), nm23, p120, p16, p21, p27, p53, P-cadherin, PCNA, Retinoblastoma, SP-A, SP-B, Telomerase, Thrombomodulin, Thyroid Transcription Factor 1, VEGF, vimentin, and waf1. The initial list of markers was pruned by initially assessing, from the literature, the apparent effectiveness of the probes in detecting early stage cancer cells, discriminating between cells of differing cancer states, and localizing the label to the target cancer cells. This list of markers was further pruned by removing markers whose utilization would be difficult to reduce to practice because they are difficult to produce or obtain, have unsuitable detection technology requirements or poor reproducibility of reported results. After all of the pruning steps were complete, a library of 27 markers was obtained.

b. **Optimizing Protocols and Obtaining Gold Standard Lung Cancer Samples**

Preliminary preparation steps were also required prior to obtaining the panels. The probes containing appropriate labels were available from commercial vendors. The protocols of the probes were analyzed for optimum objective quantitative detection. For example, it was determined that the concentration of PCNA was too low. Originally, PCNA was diluted 1:4000 in S809 buffer. A second dilution was made, which was 1:3200 in S809. The optimized protocols for each marker is shown in below. It is noted that the second column is labeled "Antibody Name". Except for MOC-31, the probes in this list are listed by the marker name because many of the vendors refer to the antibody by the name of the marker. It is noted that an alternative way these reagents might be listed is, for example, anti-VEGF, anti-Thrombomodulin, anti-CD44v6, etc.

Gold standard tissue specimens were obtained from UCLA. Tissue specimens were received from two sources. Cases had been diagnosed using standard procedures including review of hematoxylin and eosin (H&E)-stained slides and the clinical history. Specimen slides were coded and labeled with arbitrary numbers to blind the study pathologists to the historical diagnosis and antibody marker and to protect patient confidentiality.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Specimen slides with tissue sections from cancerous and non cancerous (control) tissues were used. A total of 175 separate cases were analyzed. Within this set, the following diagnoses, located in Table 6 were present with the following frequencies:

Table 6:

	Diagnosis	Number of occurrences
Cancer	Adenocarcinoma	25
	Large Cell Carcinoma	18
	Mesothelioma	26
	Small Cell Lung Cancer	20
	Squamous Cell Carcinoma	24
Control	Emphysema	34
	Granulomatous Disease	3
	Interstitial Lung Disease	25

c. Determination of the Level of Expression of the Panel of Molecular Markers

Sufficient specimen slides were prepared for each case so that only one probe was tested per slide. In general, a microscope slide is prepared which contains the cytologic sample contacted with one or more labeled probes that are directed at particular molecular markers. Independently, each study pathologists examined an H&E-stained slide to make a diagnosis for each case, and then examined each probe-reacted and immunochemically-stained slide to assess the level of probe binding, recording the results on a standardized data form.

In greater detail, the immunohistochemical staining was performed on formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) tissue. Tissue sections were cut at 4 microns thick on poly-L-Lysine coated slides and dried at room temperature overnight. De-paraffinization and rehydration of the tissue sections were performed as follows: To completely remove all of the embedding medium from the specimen the slides were incubated in two consecutive Xylene-substitute (HistoClear) baths for five minutes each. All liquid was tapped off the slides before incubation in two consecutive baths of 100% reagent grade alcohol for three minutes each. Once again all excess liquid was tapped off the slides before being incubated in two final baths of 95% reagent grade alcohol for three minutes each. After the last bath of 95% the slides were rinsed in tap water and held in wash buffer (Tris-buffered saline wash buffer containing 0.05% Tween 20 corresponding to a 1:10 dilution of DAKO Autostainer

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Wash buffer, code S3306). Table 7, below, presents a complete list of the reagents used in this study along with corresponding product code numbers. Detection systems used in the study were DAKO EnVision+ HRP mouse (code K4007) or rabbit (code K4003) and LSAB+ HRP (code K0690). The protocols for immunoassaying were followed according to the package inserts. The kits contained liquid two component DAB+ substrate chromogen (code K3468).

Table 7:

Reagents used in the MonoGen Study	
Reagents	Code #
National Diagnostics HistoClear	HS-200
Mallinckrodt Reagent Alcohol Absolute	7019-10
DAKO Antibody Diluent	S809
DAKO Background Reducing Antibody Diluent	S3022
DAKO Autostainer Buffer 10X	S3306
DAKO Target Retrieval Solution	S1700
DAKO High pH Target Retrieval Solution	S3307
DAKO Proteinase K	S3020
Rile Aid Hydrogen Peroxide 3%	None
DAKO Protein Block Serum Free	X0809
DAKO Goat Serum	X0801
DAKO Swine Serum	X0801
DAKO EnVision+ Mouse	K4007
DAKO EnVision+ Rabbit	K4003
DAKO LSAB+	K0690
DAKO DAB+	K3468
DAKO Hematoxylin	S3302
Dakomount Mounting Media	S3025
Instruments	Serial Numbers
DAKO Autostainers	3400-6613-03
Autostainer IHC Software Version V3.0.2	3400-6142R-03

Pretreatments were critical in optimizing these antibodies on lung tissue. For antibodies requiring enzyme digestion, DAKO Proteinase K (code S3020) was used for 5 minutes at room temperature. Antibodies requiring heat induced target retrieval received pretreatment using either DAKO Target Retrieval Solution (code S1700) or DAKO High pH Target Retrieval Solution (code S3307). Tissues were placed in a pre-heated Target Retrieval Solution and incubated in a 95°C water bath for 20 or 40 minutes depending on the specific protocol. Tissue sections were then allowed to cool at room temperature for an additional 20 minutes.

After de-paraffinization, rehydration and tissue pretreatment, all specimens were incubated in a solution of 3% hydrogen peroxide to quench endogenous peroxidase

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

activity. Blocking reagents were used specifically for the two antibodies FGF and Telomerase in order to minimize nonspecific background.

As shown in Table 8, below, tissue specimens were incubated for a specified length of time with 200 micro liters of the optimally diluted primary antibody. It is noted that the numbering of the markers/antibodies in Table 8 is consistent with the numbering of the antibody probes and markers throughout this document. Slides were then washed in DAKO 1X Autostainer Buffer (code S3306). Depending on the antibody, the correct detection system was applied. The steps and total incubation times for the DAKO EnVision+ HRP and LSAB+ HRP detection systems are shown in Table 9, below. The color reaction is developed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) resulting in a brown color precipitate at the site of the reaction.

Table 8:

Antibodies for Monoclonal Lung Panel									
#	Antibody to	Block	Conc	Primary Inc	Detection Sys	Clone	Vendor	Code#	
1	EGF	Preabsorbed	None	1:10 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
2	Thyrotropin-releasing hormone	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
3	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
4	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
5	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
6	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
7	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
8	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
9	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
10	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
11	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
12	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
13	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
14	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
15	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
16	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
17	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
18	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
19	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
20	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
21	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
22	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
23	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
24	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
25	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
26	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
27	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	
28	CD44	None	None	1:100 to 1:500	20 minutes	EnVision+	DAKO	U7462	

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 9:

Detection Systems Used in the Monoclon Study				
Steps				
1	Deparaffinization and rehydration			
	2 baths of Histoclear for 5 mins each			
	2 baths of 100% alcohol for 3 mins each			
	2 baths of 95% alcohol for 3 mins each			
	Water Rinse			
2	Pretreatments			
	TRIS 10 or 20 mins			
	pH 7.4 TRIS 20 mins			
	Protease K for 5 mins			
	Water Rinse			
3	Peroxidase block			
	Peroxide bath for 5 mins			
	Water Rinse			
	Buffer for 5 mins			
	Protein Block for 30 mins after H2O2 block			
4	Primary Ab			
	30 mins or Overnight at room temp			
5	Detection System			
	EnV+ System	Labelled Polymer	OR	LS/AB+ System
		30 mins		Secondary Reagent
				15 mins Secondary Ab link
				Tertiary Reagent
				15 mins SAH-FITC
6	Chromogen			
	Chromogen			Chromogen
	10 mins DAB+			5 mins DAB+

Following immunostaining all slides were incubated in DAKO Hematoxylin (code S3302) for 3 minutes and coverslipped using DAKOMount Mounting Media (S3025). All protocols were run on DAKO Autostainers (serial #'s 3400-6612-03 & 3400-6142R-03) using the IHC software version 3.0.2.

Immunostaining was viewed under a light microscope to determine that controls were correctly stained and tissues were intact. Slides were labeled, boxed and sent to designated pathologists for results interpretation. Trained pathologists identified the type of cancer or other lesion seen in the samples. Trained pathologists assessed the sensitivity to the marker probe by estimating the staining density and proportion of cells stained. These scores were entered in a data sheet for that patient. The pathologists were blinded to the original diagnosis and antibody marker used in the immunostaining. Each slide was read by at least two pathologists and results recorded on a data collection form. To provide additional integrity to the process, the method is repeated with a second or third pathologist. The scores obtained can then be matched to identify data entry errors. The additional data also facilitates a better classifier design.

For each case, up to 27 slides were analyzed, each stained for a marker coded with numbers 1 through to 17, 19 through to 28. Staining for marker 18 (C-MET) could not

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

be optimized and the marker/probe was therefore not used. Pathologist 1 scored slides from all 175 cases. Pathologist 2 scored slides from 99 of the cases. Pathologist 3 scored slides from 80 of the cases.

Table 10 below shows how many cases of each diagnosis each pathologist scored slides from:

Table 10:

	Diagnosis	Pathologist 1	Pathologist 2	Pathologist 3
Cancer	Adenocarcinoma	25	12	14
	Large Cell Carcinoma	18	9	9
	Mesothelioma	26	14	8
	Small Cell Lung Cancer	20	12	6
	Squamous Cell Carcinoma	24	13	11
Control	Emphysema	34	23	13
	Granulomatous Disease	3	3	2
	Interstitial Lung Disease	25	13	17

For the purposes of some selected statistical analysis techniques, it was necessary to consider only those cases that had scores for all 27 slides present. Table 11 below shows how many cases of each diagnosis were complete in terms of having scores from all 27 slides.

Table 11:

	Diagnosis	Pathologist 1	Pathologist 2	Pathologist 3
Cancer	Adenocarcinoma	14	10	8
	Large Cell Carcinoma	12	9	3
	Mesothelioma	17	13	3
	Small Cell Lung Cancer	7	9	1
	Squamous Cell Carcinoma	12	13	4
Control	Emphysema	32	21	1
	Granulomatous Disease	2	1	0
	Interstitial Lung Disease	23	7	3

From this table, it can be calculated that each pathologist scored the following total number of complete cases. Pathologist 1 scored all 27 slides for 119 of the cases. Pathologist 2 scored all 27 slides for 83 of the cases. Pathologist 3 scored all 27 slides for 23 of the cases.

The total number of cancer data points is 172. This comprises 113 data points from Pathologist 1 and 60 data points from Pathologist 2. The total number of control data

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

points is 101. This comprises 62 data points from Pathologist 1 and 39 data points from Pathologist 2.

Figure 3 shows a comparisons between H-scores for probes 7 and 15 in control tissue and in cancerous tissue. The x-axis shows the H-scores while the y-axis shows the percent of cases with that particular H-score. The difference in H-scores is apparent.

For each patient the scores were entered electronically into a Pathology Review Form which consolidates the scores into a data base showing the patient identifier together with diagnosis, proportion of cells stained, and staining density. The proportions and density were consolidated into a single "H-Score" obtained by grading the intensity as: none = 0, weak = 1, moderate = 2, intense = 3, and the percentage cells as: 0-5% = 0, 6-25% = 1, 26-50% = 2, 51-75% = 3, >75% = 4, and then multiplying the two grades together. For example, 50% weakly stained plus 50% moderate stained would score $10 = 2 \times 2 + 2 \times 3$. This is the standard scoring system throughout the analysis, except for the section 3(f), below, titled "Effect of Using other (non-H-score) objective scoring parameters", which investigates alternative scoring systems.

Standard classification procedures were used to find the best combination of probes. Typically these use a search procedure such as the "Branch and Bound Algorithm" to find a hierarchy of the best features, ranked according to a test of discriminating power, and truncated according to a test of significance. This process also defines the decision rule or rules for best classification.

The performance of a classifier designed with these features can be estimated from the data used to design the classifier. The straightforward application of all the design data to the classifier gives a very unsound estimate of performance.

The analysis of the data collected in the present example provide the optimum selection of probes which provided the best separation of classes. Therefore, panels were obtained that only needed a few probes to perform the analysis. However the data showed that near-optimum performance could be obtained with other combinations of probes. Hence, the invention is flexible in being adaptable to the availability of probes where cost or supply problems may not allow the very best combination. In some cases, the invention can simply be applied to the available features to find an alternative combination. In other cases, the algorithm may be used to select features which allows cost weightings to be included in the selection process to arrive at a low cost solution.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

The design of data collection and analysis experiment was chosen to avoid biases through the well established double blind procedures where data collection and data analysis were done independently.

In the first case the pathologists reviewed slides with conventional staining to allow a diagnosis to be made. This diagnosis was entered on the Pathology Review form. The pathologists were then presented, in random order, with slides stained by the marker probes for scoring the percentage of cells stained and the relative intensity of the staining. The slides were numbered to exclude information about the probe from the pathologist. To allow data integrity to be checked two pathologists reviewed all patients.

Data were consolidated into a database that was then reviewed by a team of statisticians. Probes were numbered to render their method of action as unseen during the analysis of their effectiveness.

The first stage of the analysis was to check the integrity of the data by comparing entries for each patient. Where large differences were found, the data entries were checked and any obvious errors were corrected. Unexplained differences were left in the data.

The data were then separately analyzed by four statisticians, using different techniques in recognition of the fact that different statistical methodologies are suited to different types of discriminating information in the data.

The first step in the process of selecting the best probe combination is to divide the data into two sets, one for designing a classifier and one for testing the performance of the classifier. By selecting the design made with the design (train) set, but showing the best performance evaluated on the test set, it can be concluded with confidence that the classifier has generalized to the structure of the data and not adapted to particular cases seen in the training set.

In order to test for reliability the analysis was typically repeated with many randomly selected sets of training data and test data. This approach is generally accepted as giving good estimates of the classifier performance. Where these tests showed inconsistent selections of probes such probe selections were discounted as unreliable.

d. Statistical Analysis and/or Pattern Recognition

1. Introduction to Data Analysis

a. Input Data

i. Raw data

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

For each patient the scores were entered electronically into a Pathology Review Form that consolidates the scores into a database showing the patient identifier together with diagnosis, proportion of cells stained, and staining density.

ii. Computed data

The efficiency of the score for each probe used in the analysis is computed from the intensity/percentage tables. The proportions and density are consolidated into a single "H-Score" with a simple rule $H = \text{proportion stained} \times (3 \text{ if intense} + 2 \text{ if moderate} + 1 \text{ if weakly stained})$. This is the feature value associated with that probe.

iii. Alternative computed data parameters

The H-score described above was heuristically derived, a simple analysis to find a better way of combining percentages and intensity failed to show a significant improvement over H-score (Section 3(f), titled "Effect of Using other (non-H-score) objective scoring parameters"). A larger data base may allow the extraction of a better rule in future.

iv. User supplied weighting criteria per marker

The invention is flexible in being adaptable to the availability of features where cost or supply problems may not allow the very best combination. For example, the invention can simply be applied to the available features to find an alternative combination. Alternatively, the algorithm used to select features allows cost weightings to be included in the selection process to arrive at a minimum cost solution. Marker performance estimates are shown for combinations selected from all the markers collected or only those from one supplier. It is also shown how the C4.5 package can be used to down weight certain probes, say on the basis of their high cost. These probe combinations do not perform as well as the optimum combination, but the performance might be acceptable in circumstances where cost is a significant factor.

v. User supplied weighting criteria per class

Some of the methods used allow weightings to be applied to the classes. This is available in C4.5 where the tree design can optimize the cost. Also the Discriminant Function method gives a single parameter output which can be used to give a desired false positive or false negative probability. A plot of these parameters for different threshold settings is known as the Receiver Operating Curve.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

vi. Detection panels – assumptions

A low probability of a false negatives was assumed to be desirable for the cancer detection process (to avoid positive patients being missed at the cost of an increased number of false positives who would require re-screening). It was also assumed that the cancer discrimination process would require a lower false positive score (to minimize patients receiving the wrong treatment).

It was assumed that detection panels requiring 6 or more probes to achieve an acceptable performance would not be cost effective. It was also assumed that a detection panel with a false negative error rate of more than 5% would not be acceptable. Panels falling outside this box are not accepted. This assumption acknowledges that cytometric panels are likely to have a worse performance than the histology based panels analyzed here. The ultimate aim will be a cytometric panel which performs better than 20% error rate, this being approximately the performance of cervical PAP smear screeners.

vii. Discrimination panels – assumptions

It was assumed that panels requiring 6 or more probes are not cost effective and it was assumed that an error rate of better than 20% is required. Panels falling outside this box were not accepted.

b. Output data

Outputs provided by the present analysis included:

- Confusion Matrices, showing how data from the test set was classified as either true positive, false positive, true negative or false negative. These may be shown as actual counts or as percentages. Confusion matrices are discussed in section 2(d) titled "Performance Metrics". A confusion matrix shows how data from a test set was classified as either true positive, false positive, true negative or false negative. An exemplary confusion matrix, obtained from data analyzed by decision trees, is shown below in table 12 for simultaneous discrimination of adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, large cell carcinoma, mesothelioma and small cell carcinoma

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 12:

	Adeno	Squamous	Large Cell	Mesothelioma	Small Cell
Adeno	67.74%	6.45%	19.40%	0.00%	6.45%
Squamous Cell	2.94%	76.47%	11.67%	0.00%	8.82%
Large Cell	28.00%	8.00%	44.00%	8.00%	12.00%
Mesothelioma	0.00%	25.64%	51.28%	89.74%	2.56%
Small Cell	0.00%	3.85%	23.08%	3.85%	69.23%

- Error Rates, summarizing data in the confusion matrix as the sum of all false classifications divided by the total number of classifications made expressed as a percentage
- Receiver Operating Characteristic (ROC) curves show the estimated percentage (or per unit probability) of false positive and false negative scores for different threshold levels in the classifier. An indifferent classifier, unable to discriminate better than random choice would present a ROC curve with equal true and false readings. The area under this curve would be 50% (0.5 probability).
- Area Under the Curve (AUC) is often used as an overall estimate of classifier performance and most standard discriminant function packages provide this AUC figure. A perfect classifier would have 100% Area Under the Curve, and a useless classifier would have an AUC near 50% (0.5).
- Sensitivity and specificity (can be derived from the confusion matrix). See section 2(d)(iii) titled "Sensitivity and Specificity".
- Marker correlation matrices. See Figure 4.

i. Detection panels: composition

These panels are trained on data divided into two classes, patients with any of the five cancers and patients with none of the cancers. Not all probes were present for all patients. Where one or more probes were missing for a particular analysis these cases were excised from the data. Hence, where analysis was undertaken on reduced numbers of probes the data set might include slightly more cases.

The number of probes included in the analysis was 27. Although in many cases a false probe was added where the data entered for that probe was from a random number generator set to generate numbers uniformly between zero and 12. This false probe

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

was included in much of the early analysis to ensure integrity in the probe selection process. This false probe was also used in one approach to progressively eliminate probes from the analysis. Probes that contributed less information than the false probe could be readily identified and excluded from the selection process. Early elimination of such probes speeds the analysis and renders the analysis less vulnerable to variations in results (noise) caused by these probes.

ii. Detection Panel Performance

As outputs from this study, the probe combinations selected by the different methodologies and their performance estimates in terms of the confusion matrix, % error rate, and AUC are reported.

iii. Detection Panels – alternative compositions

Detection panels were also selected from reduced sets of probes. In one set of panels, performance measures of panels weighted for commercially preferred markers were obtained. The performances obtained when the best probe was removed from the analysis to find a new combination of discriminating probes was also analyzed. The performance of a single probe acting on its own was found to be very high (probe 7). However, as shown below in the performance diagrams, Table 13, evaluated using linear discriminant analysis, the performance was improved as more markers were added. The best subsets of probes were determined using best subsets logistic regression. The improvement is statistically significant.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 13:

	Cancer	Control
Probe 7	87.93%	12.07%
	0.00%	100.00%

	Cancer	Control
Probes 7 and 16	93.10%	6.90%
	1.16%	98.84%

	Cancer	Control
Probes 7, 15 and 16	90.52%	9.48%
	1.16%	98.84%

	Cancer	Control
Probes 1, 7, 15, and 16	90.52%	9.48%
	0.00%	100.00%

	Cancer	Control
Probes 1, 4, 7, 15, and 16	92.24%	7.76%
	1.16%	98.84%

The best and second best subsets of probes (determined using best subsets logistic regression) and evaluated using logistic regression is shown below. AUC=Area under ROC curve. It is noted that mean AUC is the average from 100 trials on random train and test partitions (70%:30%). The results are shown below, in Table 14.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 14:

Probes	Mean AUC
7	94.28
28	80.14
7, 16	95
7, 15	94.59
7, 15, 16	95.94
1, 7, 16	95.33
1, 7, 15, 16	95.61
4, 7, 15, 16	95.34
1, 4, 7, 15, 16	95.3
1, 7, 11, 15, 16	95.67

iv. Discrimination panels – composition

For this part of the study five classifiers were designed and tested, each designed to detect the presence of one of the cancer from all patients with cancer. The application of this five way pair-wise system allows doubtful cases to appear more than once in the analysis, or not at all. Such cases can be identified and subjected to closer scrutiny, re-testing or alternative testing regimes.

Again the number of probes in the study was 27, with a false probe used in the early stage to reduce the numbers in the analysis

v. Discriminant panels – performance

The performance estimators described above were used to show the performance of the best probe combinations discovered by the different techniques

vi. Discriminant panels – alternative composition

The analysis was repeated for a probe combination comprising commercially preferred probes. Performance was degraded, but not unusable for several reduced-set classifiers. Below, the best subsets of probes without probe 7, determined using best subsets logistic regression), is shown, as Table 15. The data was evaluated using linear discriminant analysis.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 15:

		Cancer	Control
Probe 28	Cancer	0.706897	0.293103
	Control	0.093023	0.906977

		Cancer	Control
Probes 10 and 28	Cancer	0.793103	0.206897
	Control	0.034884	0.965116

		Cancer	Control
Probes 10, 15 and 28	Cancer	0.810345	0.189655
	Control	0.011828	0.988372

		Cancer	Control
Probes 1, 10, 15 and 28	Cancer	0.827586	0.172414
	Control	0.011628	0.988372

		Cancer	Control
Probes 1, 10, 15, 16 and 28	Cancer	0.827586	0.172414
	Control	0.011628	0.988372

The best and second best subsets of probes with probe 7 (determined using best subsets logistic regression) and evaluated using logistic regression is shown below. AUC=Area under ROC curve. It is noted that mean AUC is the average from 100 trials on random train and test partitions (70%:30%). The results are shown below, in Table 16.

Table 16:

Probes	Mean AUC
28	79.36%
10	82.28%
10, 28	94.21%
15, 28	88.68%
10, 15, 28	92.90%
1, 10, 28	93.59%
1, 10, 15, 28	92.99%
8, 10, 15, 28	93.20%
1, 10, 15, 16, 28	93.13%
1, 8, 10, 15, 28	93.57%

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

2. *Data analysis methodology*

In this section, the process of gaining an initial understanding of the structure of the data as a guide to interpreting results from the different methodologies used is described.

a. Analysis of variance

i. Pathologist-to-pathologist variability and pooling pathologist scores.

(1) *t - Test*

Two pathologists reviewed each patient's slides in this clinical trial.

Pathologist 1 reviewed all patients, Pathologist 2 also reviewed approximately half of this set and Pathologist 3 reviewed the remainder. With two independent estimates of the H-score, the consistency of pathologist performance could be tested.

A readily available statistical tool was used to test the variability between pathologists. This is the paired-sample t-test. This takes the difference between each pair of estimates, averages these and expresses this as a proportion of the overall variances. The t-test then converts this ratio into a probability estimating the likelihood that the two samples sets came from the same population (the P value).

This test was applied to the scores for each marker probe, for all cases reviewed by Pathologist 1 and Pathologist 2, and also for all cases reviewed by Pathologist 1 and Pathologist 3. Since there were 27 tests applied (to cover all probes) a low value of $P=0.01$ was selected as the "significant threshold". Results, showing the P scores for each probe, and for the two pairs of pathologists, are shown below, in Tables 17, 18, 19 and 20. It is clear that Pathologist 1 and Pathologist 2 were more consistent than Pathologist 1 and Pathologist 3.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 17:

Pathologist 1, Pathologist 2 scores:

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
0.5875446	0.01051847	0.4659704	0.4659704	0.3772884	0.2307273	0.01001357
X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
0.004131056	0.7703014	0.1640003	0.2374452	0.5380652	0.1387876	0.001200265
X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
0.19742	0.3860899	0.3825022	NA	0.544601	0.08873848	0.1686243
X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
0.5428451	0.1912477	0.4031977	0.2477236	0.5673386	0.9174037	0.00339071

Table 18:Pathologist 1, Pathologist 2 scores thresholded at 0.01 ($\alpha = 1\%$ level of significance):

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE
X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
FALSE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	FALSE
X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
TRUE	TRUE	TRUE	NA	TRUE	TRUE	TRUE
X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	FALSE

Table 19:

Pathologist 2, Pathologist 3 scores:

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
3.814506e-09	0.0399131	0.1954867	5.671062e-05	0.01856376	0.2737166	0.2292583
X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
2.044038e-12	0.004166467	0.00983267	0.003710155	0.01461007	0.03312421	0.0003367823
X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
0.0005162036	0.2276537	0.002987705		4.267708e-06	0.007287372	0.1654067
X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
0.02400127	0.0009497766	2.478456e-07	0.1391684	0.08318303	3.122143e-05	1

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 20:Pathologist 1, Pathologist 3 scores thresholded at 0.01 ($\alpha = 1\%$ level of significance):

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
FALSE	TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	TRUE	TRUE
X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14
FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE	TRUE	FALSE
X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21
FALSE	TRUE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE
X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28
TRUE	FALSE	FALSE	TRUE	TRUE	FALSE	TRUE

Because the H score is subjective it is prone to scale factor differences and noise at marginal cases. So, in spite of the three features which showed statistically different scores between Pathologist 1 and Pathologist 2, this joint data was accepted as representative of a measuring instrument. Pathologist 1 and Pathologist 2 were combined into a single data set for the analysis process. The results for Pathologist 3 were withheld for independent testing purposes. Such tests using the Pathologist 3 data would be biased towards showing an under-performance because of the significant differences.

The data from Pathologist 1 and Pathologist 2 were combined by considering them as separate cases, with the variability giving a degree of independence between the results for any one case. When testing with such data the performance estimates will be biased towards a more optimistic value. This is because samples coming from the same patient may occur simultaneously in the training a test subsets. This does not however invalidate the processes used to find the best combination of features, it merely biases the estimate of performance.

(2) *Analysis of Variance of H-Scores*

(a) Background

Within each probe, the H-scores may vary due to many reasons. To the extent they vary consistently due to the type of disease this is useful, variation due to which pathologist read the slide is instructive, whereas random variation sets a limit on the detection of the previous two sources of variation.

Analysis of Variance (ANOVA) is a standard technique for splitting up the sources of variation in data and for testing its statistical significance. ANOVA summarizes

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

the total variation of a set of data as a sum of terms which can be attributed to specific sources, or causes, of variation.

ANOVA is available in many statistical packages. The public domain package "R" was chosen ("The R Project for Statistical Computing", <http://www.R-project.org/>).

(b) Aim

To perform ANOVA analyses on the H-score data from pathologists 1 and 2 and to consider whether this data can be safely merged into a single consistent set for further analysis for the selection of panels.

(c) Methodology

From the database, data was selected from pathologists 1 and 2. Only data which was complete for a given probe was used in the ANOVA for that probe.

The control categories of Emphysema, Granulomatous Disease, and Interstitial Lung Disease were grouped together and called "Normal" giving 6 levels within factor Disease.

Pathologist was coded as a factor with 2 levels (Pathologist 1, Pathologist 2).

An R script was written to perform a standard ANOVA analysis for each probe in turn, using the factors: Disease, Pathologist, and the interaction term Disease:Pathologist. The results are shown in below, in Table 21. "Df" is defined as the degrees of freedom. In a dataset of n observations, knowing n-1 deviations from the mean, the nth is automatically determined. N-1 is the number of degrees of freedom. Sum Sq and mean Sq are measures of variation. F is a test statistic concerning the equality of two variances based on the F distribution. Pr(>F) is the probability used to determine whether or not the variability is statistically significant.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 21:

Analysis of Variance of H-Scores

Probe1						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	443.56	88.71	15.8202	3.690e-13 ***	
Pathologist	1	0.66	0.66	0.1174	0.7323	
Disease:Pathologist	5	15.34	3.07	0.5470	0.7405	
Residuals	204	1143.93	5.61			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe2						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	1067.39	213.48	24.1234	<2e-16 ***	
Pathologist	1	13.02	13.02	1.4709	0.2263	
Disease:Pathologist	5	27.98	5.60	0.6324	0.6752	
Residuals	249	2203.50	8.85			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe3						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	1098.49	219.70	21.0751	<2e-16 ***	
Pathologist	1	6.73	6.73	0.6458	0.4224	
Disease:Pathologist	5	29.72	5.94	0.5703	0.7227	
Residuals	243	2533.16	10.42			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe4						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	631.8	126.4	9.3707	3.454e-08 ***	
Pathologist	1	6.6	6.6	0.4869	0.4860	
Disease:Pathologist	5	13.1	2.6	0.1939	0.9647	
Residuals	246	3317.1	13.5			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe5						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	754.30	150.86	25.2826	<2e-16 ***	
Pathologist	1	14.25	14.25	2.3875	0.1236	
Disease:Pathologist	5	7.54	1.51	0.2528	0.9381	
Residuals	248	1479.80	5.97			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe6						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	721.91	144.38	11.8515	2.771e-10 ***	
Pathologist	1	1.91	1.91	0.1568	0.6925	
Disease:Pathologist	5	47.82	9.56	0.7850	0.5613	
Residuals	246	2996.93	12.18			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Probe7						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	1171.47	234.29	77.6802	< 2e-16 ***	
Pathologist	1	8.84	8.84	2.9294	0.08847 .	
Disease:Pathologist	5	46.36	9.27	3.0742	0.01063 *	
Residuals	209	630.37	3.02			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe8						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	209.82	41.96	6.4352	1.201e-05 ***	
Pathologist	1	12.66	12.66	1.9407	0.16493 .	
Disease:Pathologist	5	71.20	14.24	2.1838	0.05654 .	
Residuals	251	1636.76	6.52			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe9						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	197.21	39.44	8.4346	2.015e-07 ***	
Pathologist	1	7.33	7.33	1.5681	0.2116	
Disease:Pathologist	5	24.56	4.91	1.0505	0.3884	
Residuals	265	1239.17	4.68			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe10						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	1113.46	222.69	39.0730	< 2e-16 ***	
Pathologist	1	1.01	1.01	0.1778	0.67371	
Disease:Pathologist	5	62.45	12.49	2.1916	0.05635 .	
Residuals	213	1213.96	5.70			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe11						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	320.15	64.03	9.5553	2.416e-08 ***	
Pathologist	1	1.28	1.28	0.1918	0.6618	
Disease:Pathologist	5	10.04	2.01	0.2996	0.9128	
Residuals	245	1641.76	6.70			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe12						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	832.26	166.45	27.8793	<2e-16 ***	
Pathologist	1	0.18	0.18	0.0307	0.8610	
Disease:Pathologist	5	15.16	3.03	0.5079	0.7701	
Residuals	248	1480.68	5.97			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Probe13						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	46.594	9.319	7.8408	8.674e-07	***
Pathologist	1	0.044	0.044	0.0368	0.8481	
Disease:Pathologist	5	10.143	2.029	1.7069	0.1343	
Residuals	210	249.584	1.188			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe14						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	1305.69	261.14	23.9460	< 2e-16	***
Pathologist	1	28.66	28.66	2.6279	0.10630	
Disease:Pathologist	5	142.90	28.58	2.6208	0.02492	*
Residuals	243	2649.98	10.91			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe15						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	401.02	80.20	21.268	<2e-16	***
Pathologist	1	13.17	13.17	3.493	0.0630	.
Disease:Pathologist	5	6.17	1.23	0.327	0.8963	
Residuals	214	807.02	3.77			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe16						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	2520.26	504.05	65.5572	<2e-16	***
Pathologist	1	0.15	0.15	0.0194	0.8892	
Disease:Pathologist	5	24.29	4.86	0.6318	0.6757	
Residuals	247	1899.12	7.69			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe17						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	530.64	106.13	13.0178	2.426e-11	***
Pathologist	1	8.42	8.42	1.0325	0.31050	
Disease:Pathologist	5	109.96	21.99	2.6975	0.02131	*
Residuals	266	2168.55	8.15			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe19						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	1670.86	334.17	29.1960	<2e-16	***
Pathologist	1	2.17	2.17	0.1895	0.6637	
Disease:Pathologist	5	32.61	6.52	0.5698	0.7231	
Residuals	248	2838.56	11.45			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Probe20						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	964.71	192.94	34.2760	<2e-16 ***	
Pathologist	1	8.83	8.83	1.5687	0.2116	
Disease:Pathologist	5	19.60	3.92	0.6963	0.6267	
Residuals	245	1379.12	5.63			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe21						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	6.927	1.385	2.0604	0.07076 .	
Pathologist	1	0.464	0.464	0.6906	0.40670	
Disease:Pathologist	5	1.576	0.315	0.4687	0.79945	
Residuals	263	176.830	0.672			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe22						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	640.16	128.03	31.7250	<2e-16 ***	
Pathologist	1	1.64	1.64	0.4058	0.5247	
Disease:Pathologist	5	18.78	3.76	0.9305	0.4617	
Residuals	247	996.81	4.04			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe23						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	1915.62	383.12	46.5565	<2e-16 ***	
Pathologist	1	10.77	10.77	1.3092	0.2537	
Disease:Pathologist	5	20.92	4.18	0.5084	0.7698	
Residuals	246	2024.39	8.23			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe24						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	516.06	103.21	24.0786	<2e-16 ***	
Pathologist	1	9.52	9.52	2.2210	0.1376	
Disease:Pathologist	5	12.48	2.50	0.5823	0.7135	
Residuals	216	925.87	4.29			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe25						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	1761.26	352.25	34.5245	<2e-16 ***	
Pathologist	1	11.51	11.51	1.1285	0.2891	
Disease:Pathologist	5	41.49	8.30	0.8134	0.5411	
Residuals	248	2530.33	10.20			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Probe26						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	399.85	79.97	13.6548	1.428e-11	***
Pathologist	1	0.30	0.30	0.0517	0.8204	
Disease:Pathologist	5	14.81	2.96	0.5056	0.7719	
Residuals	214	1253.31	5.86			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe27						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	117.92	23.58	6.2551	1.956e-05	***
Pathologist	1	0.64	0.64	0.1695	0.6810	
Disease:Pathologist	5	25.52	5.10	1.3539	0.2431	
Residuals	212	799.31	3.77			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Probe28						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Disease	5	1634.60	326.92	38.171	<2e-16	***
Pathologist	1	8.40	8.40	0.981	0.3229	
Disease:Pathologist	5	16.15	3.23	0.377	0.8643	
Residuals	267	2286.76	8.56			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

(d) Analysis of Results

In all cases (except for probe 21) the response of the probes was related to disease. This is not surprising since the probes have presumably been selected for this purpose. In no case is the response of the probe related to pathologist (at the $p=0.05$ level). This indicates that it would be safe to merge this data and use the two pathologists as two measurements on the data

In a few cases, probes 7, 14, 17, there is some evidence of an interaction term gaining significance. This indicates that there may be some difference between pathologists in their scoring of some diseases. Some of these cases may well be due to an occasional outlier in the data.

(e) Conclusions

The results indicate that it is safe to merge this data for further analysis. The data indicate that the slight interactions in some cases between pathologist and disease appear to be attributed to random sources.

ii. Patient to patient variability

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

The variability from patient to patient was measured by the disease:disease variability of section 2(a)(i)(2) (see above, "Analysis of Variance of H-Scores").

iii. Marker-to-marker variability

Histograms were plotted (PathologistData.xls, worksheet: Histograms) showing the distribution of marker scores for each probe for Control vs. Cancer.

b. Marker correlation matrix analyses

The *population correlation coefficient* ("Applied Multivariate Statistical Analysis", R. A. Johnson and D. W. Wichern, 2nd Ed, 1988, Prentice-Hall, N.J.) measures the amount of *linear* association between a pair of random variables. Typically the distributions and associated parameters of the random variables are not known and the population correlation coefficient cannot be directly computed. In this case it is possible to compute the *sample correlation coefficient* from sample data. See Figure 4. The sample correlation coefficient is, however, only an estimate of the population correlation coefficient. Moreover, because it is calculated on the basis of sample data it is possible, purely by chance, that it may indicate a strong positive or negative correlation when in reality there may be no actual relationship between the corresponding random variables ("Modern Elementary Statistics", J. E. Freund, 6th Ed, 1984, Prentice-Hall, N.J.).

The correlation coefficient measures the ability of one variable to predict the other. A strong linear association does not, however, imply a causal relationship. The square of the correlation coefficient is called the coefficient of determination. The coefficient of determination computed for a bivariate data set measures the proportion of the variability in one variable that can be accounted for by its linear relationship to the other. When dealing with several variables, the correlation coefficient can be calculated for each pair in turn and the set of coefficients can be written as a matrix called the correlation matrix. See Figure 4.

The H-scores for the individual markers can be modeled as random variables. The *sample correlation matrix* for this multivariate data set can be computed from the input data described in the section titled "Input Data", above.

c. Pattern recognition

Statistical pattern recognition is an approach to classifying signals or geometric objects on the basis of quantitative measurements (called features). Statistical pattern recognition essentially reduces to the problem of dividing the *n*-dimensional feature space into regions that correspond to the categories or classes of interest.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Three different classifier methodologies employed in this study are sensitive to different structural forms within the data.

For the **Decision Tree method** a preliminary analysis of different data combinations identified markers which were never used by C4.5 for the detection panel. These were removed from the analysis and this resulted in more consistent results, symptomatic of the left-out probes only contributing noise to the selection process.

Similarly a preliminary analysis of probes used in the detection panels identified the noisy probes for removal prior to the detailed analysis.

The **Linear Discriminant Function method** in SPSS has built-in stepwise processes for reducing the numbers of markers in the analysis. Typically, this reduced the probes used in the analysis to between 2 and 7.

The **Logistic Regression method** in R and SAS implement stepwise procedures for variable selection. In SAS, a best subsets variable selection option is also provided. In R, the stepwise methodology was used in conjunction with multiple random trials to develop a heuristic method for selecting variables based on the number of times a given feature was used in 100 random selections of training and test data (split 70%:30% respectively). Features with counts comparable to the count for artificial random feature were progressively eliminated until a minimal consistent set of features was obtained over 100 runs.

i. Statistical methods

From the point of view of multivariate statistical analysis, the problem is one of estimating density functions in high-dimensional space (and partitioning this space into the regions of interest). Assuming that the distributions of random (feature) vectors are known, the theoretically best classifier is the Bayes classifier because it minimizes the probability of classification error (K. Fukunaga, "Statistical Pattern Recognition", 2nd Ed., Academic Press 1990, p.3). Unfortunately the implementation of the Bayes classifier is difficult because of its complexity, especially when the dimensionality of the feature space is high. In practice, simpler parametric classifiers are used. Parametric classifiers are based on assumptions about the underlying density or discriminant functions. The most common such classifiers are linear and quadratic classifiers. In multivariate statistical analysis such classifiers fall under the heading of discriminant analysis. Discriminant analysis techniques are closely related to multivariate linear regression models and generalized linear models (encompassing logistic and multinomial regression).

(1) *Logistic Regression with a Binomial Response*

(a) Background

The problem of selecting a set of markers to be used on a detection panel can be formulated as a logistic regression problem with a binomial response. The response variable is a factor with two levels: normal (no cancer) and abnormal (cancer). The explanatory variables are the marker H-scores.

The problem of selecting a set of markers to be used on a cancer discrimination panel can also be formulated as a logistic regression problem with a binomial response. The response variable is a factor with two levels: normal (not the cancer of interest) and abnormal (cancer of interest). The explanatory variables are the marker H-scores.

Stepwise variable selection can be used to select a subset of the original variables (markers) for use in discriminating between the two classes. This is a computationally expensive exercise and is best suited to a computer. Several commercial and public domain software packages---e.g., R, S-plus, and SAS---implement stepwise logistic regression.

Two different approaches to feature selection were investigated based on the stepwise variable selection procedures found in R and SAS respectively.

(b) Experimental data

The data used for the present analysis consists of the H-scores for markers 1-17, and 19-28 for the cases examined by Pathologist 1 and Pathologist 2 and described elsewhere in this report. In addition, a dummy marker, 18, was added to the data set. The dummy marker consists of integer values from 0 to 12 selected at random from a uniform distribution.

(c) Method 1: Using the R package (version 1.4.1)

Computerized model fitting procedures generally cannot deal with missing data. This is the case for the **glm** (glm stands for generalized linear model) procedure used in R. Consequently when fitting a model using **glm** it was necessary to exclude all the cases for which there are one or more missing values. When fitting the initial full model, containing the 27 real markers and the single dummy marker, this reduces the data set to only 202 cases. With so few observations it was decided that the best way to perform variable selection, to

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

train a classifier using the selected variables, and to assess its performance was to undertake 100 trials on random partitions of the data into train and test sets.

- (i) Partitioning the data into train and test sets

At the start of each trial, the data is partitioned into a test set and a training set. This is done by randomly choosing 30% of the abnormals and 30% of the normals to form the test set, and using the remaining observations to form the training set.

- (ii) Variable (marker) selection

At the start of each trial, the full model, which includes all of the variables (markers), is fitted to the training data. In R the logistic regression model is fitted using **glm**. The code fragment used is as follows:

```
my.model <- Class ~ X1 + X2 + X2 + X3 + X4 + X5 + X6 + X7 + X8
+ X9 + X10 + X11 + X12 + X13 + X14 + X15 + X16 + X17 + X18 +
X19 + X20 + X21 + X22 + X23 + X24 + X25 + X26 + X27 + X28

my.glm <- glm(my.model, family=binomial(link=logit),
data=training.data)
```

The procedure **stepAIC** is then used to perform stepwise variable selection based on the Akaike Information Criterion (AIC). This procedure is part of the publicly available MASS library. The library and the procedure are described in "Modern Applied Statistics with S-PLUS" (W. N. Venables and B.D. Ripley, Springer-Verlag, Pathologist 3ew York, 1999). The R code fragment to do this is as follows:

```
my.step <- stepAIC(my.glm, direction=both)
```

The resulting model is then assessed on the test data. The code fragment used is as follows:

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

```
probability_is_abnormal <-
predict(my.step,testing.data,type="response")
```

The performance of the classifier is recorded in terms of the actual error rate of misclassification (AER) and the area under the ROC curve (AUC). After the 100 trials, 100 models and their associated AERs and AUCs remain. A frequency table is constructed, recording the number of times each variable made an appearance in the 100 models. An example is shown in Table 22:

Table 22:

Variable	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	14
Frequency	2	6	4	1	4	15	100	40	3	10	43	1
Variable	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25	28	
Frequency	4	28	2	1	3	2	2	18	10	34	4	

This table is used to decide which markers to discard. First, all of the markers that have a frequency less than or equal to 10 are discarded. Next a cut-off frequency is chosen based on the frequency of the dummy marker (typically this is 1 or 1.5 times that of the dummy marker). All markers with a frequency less than this cut-off value are discarded. The remaining markers, along with the dummy marker, are then used as the full model for another 100 trials and the pruning process is repeated. If necessary, the severity of the pruning can be increased to force one or more markers out of the model. If necessary, the remaining markers can be used as the full model for yet another 100 trials. Pruning stops when the desired number of panel members is reached or the average AUC for the current model is less than that for the preceding model.

To illustrate the pruning process consider the table above. The table was obtained using the detection panel data. The shaded entries indicate those markers that are retained after pruning. Another 100 trials is performed using the following full model:

```
my.model <- Class ~ X6 + X7 + X8 + X12 + X16 + X18 + X23 + X25
```

Again, a frequency table, Table 23 is constructed:

Table 23:

Variable	6	7	8	12	16	18	23	25
Frequency	63	100	51	38	30	47	66	98

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

The shaded entries show the markers retained after pruning (using a cutoff of 47). Another 100 trials is performed using the following full model:

```
my.model <- Class ~ X6 + X7 + X8 + X12 + X18 + X23 + X25
```

Again, a frequency table, Table 24 is constructed:

Table 24:

Variable	6	7	8	12	18	23	25
Frequency	96	400	23	75	3	88	98

At this point a cut-off of 50 is chosen. The shaded entries show the remaining markers for use on a 5 member panel. In each step, the average AUC increases: 94.37% → 95.45% → 95.78%.

(iii) Assessing the performance of the panel

To assess the performance of the panel, 100 trials were performed, as before, but without the stepwise selection procedure. For each trial, the AUC, sensitivity, and specificity are recorded. For the detection panel example above, the results are:

```
> my.model <- Class ~ X7 + X25 + X6 + X23 + X12
> summary(AUC)
  Min. 1st Qu. Median   Mean 3rd Qu.  Max.
0.9289 0.9590 0.9615 0.9601 0.9630 0.9630
> summary(sensitivity)
  Min. 1st Qu. Median   Mean 3rd Qu.  Max.
0.8519 0.9630 0.9630 0.9737 1.0000 1.0000
> summary(specificity)
  Min. 1st Qu. Median   Mean 3rd Qu.  Max.
0.8378 0.9730 0.9730 0.9749 1.0000 1.0000
```

In summary, the panel has a sensitivity of 97.37% and a specificity of 97.49%. The area under the ROC is 96.01%.

(d) Method 2: Using SAS (version 8.2)

Logistic regression can be performed in SAS using the procedure LOGISTIC. When the response variable is a two-level factor, the procedure fits a binary logit model (equivalent to `glm` in R with `family=binomial` and `link=logit`). SAS automatically excludes all of the missing multivariate observations for the model specified. Unlike R, SAS is able to

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

perform a best subsets variable selection procedure. The code fragment in SAS needed to do this is as follows:

```
PROC LOGISTIC DATA=WORK.panel;
  CLASS Class;
  MODEL Class = X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9 X10 X11 X12 X13 X14 X15 X16 X17 X18 X19 X20 X21
X22 X23 X24 X25 X26 X27 X28 /SELECTION=
  SCORE BEST=28;
RUN;
```

This procedure is applied to the entire data set. The parameter **BEST=28** directs SAS to find the best 28 single-variable models, the best 28 two-variable models, the best 28 three-variable models, up to the best 28 28-variable models.

(i) Assessing the performance of the panels

The procedure described in method 1 is used to assess the performance of each of the panels. The following, Table 25, was generated from the detection panel data. It lists results only for the two best one-, two-, three-, four-, and five-marker panels.

Table 25:

Panel	Panel members	Sensitivity	Specificity	Area under ROC
1	7			94.28%
2	28			80.14%
3	7, 16			95.00%
4	7, 15			94.59%
5	7, 15, 16			95.94%
6	1, 7, 16			95.33%
7	1, 7, 15, 16			95.61%
8	4, 7, 15, 16			95.34%
9	1, 4, 7, 15, 16			95.30%
10	1, 7, 11, 15, 16			95.57%

(2) *Linear Discriminant Analysis*

(a) Background

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

The commercial statistical package SPSS has procedures allowing simple linear discriminant functions to be design and tested.

A commonly used method is Fisher's Linear discriminant function. This finds the hyper-plane in feature space which gives a good separation of classes. For a two class problem where the class distributions have different means, but similar multivariate Gaussian distributions, this classifier gives optimum performance. The method can be extended heuristically to multi-class problems, but this was not applied in the study.

The method is simplistic in its approach but robust to problems associated with data sets containing a large number of features (the probes in our case number 27, giving problem for a data set comprising only some two hundred exemplars (cases)).

This package has a procedure for identifying the features which contribute well to the discrimination process. This "stepwise method" first finds the most discriminating feature. Other features are then sequentially added and evaluated against the classifier. Combinations are explored so the final solution may exclude features initially selected if better combinations are found. The number of features is gradually increased until a statistical test shows the remaining features do not contribute reliably to the classification process.

An estimate of the performance is gained by using the leave one out method. This removes one sample from the data set to form the training set. The left out sample is retained as the test set, applied to the classifier, and the resulting classification accumulated in the confusion matrix. The procedure is repeated for case in the data. This procedure gives an unbiased estimate of performance, but the estimate will have a high variance.

Method

In SPSS select the appropriate data set for analysis, select "Analyze", select "Classify", select "Discriminant...", on the table select "Fishers method", "leave one out testing" and "use stepwise method". Enter the diagnosis as the grouping variable and enter all the features as the independents. Enter 'OK' to complete the analysis. Pre-set values for other parameters were left as set.

The analysis output includes a list of the features used in the analysis, the canonical discriminant function and a confusion matrix and the correct-classification rate (1-error rate).

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

In order to compute an ROC curve the Canonical discriminant function is applied to the selected features to generate a new feature. In SPSS use Graphs, ROC to plot this curve

ii. Hierarchical methods: Decision trees

(1) *Background*

Decision tree learning is one of the most widely used and practical methods for inductive inference. It is a method for classification that is robust to noisy data and capable of learning disjunctive expressions (Tom M. Mitchell, "Machine Learning", McGraw-Hill, New York, NY, 1997.)

The most popular and accessible machine learning package is "C4.5" the source code of which is published in: (J. Ross Quinlan, "C4.5: Programs for Machine Learning", Morgan Kaufmann, San Mateo CA, 1993).

When a decision tree is being trained (on training data), the algorithm decides at each node of the tree which single attribute of the data to use at this node to best make a decision. Therefore when the tree is completely constructed, it will have selected some set of attributes to use and ignored others. In our application, using decision trees to process measurements gained from molecular probes, the decision tree has effectively chosen a panel of probes, and a method of combining the probe scores, which best explains the classification of the data. To obtain an unbiased estimate of the panel performance, the resulting tree must be evaluated on data which was not used in the training. One standard technique for doing this is cross-validation. A 10-fold cross-validation was employed.

Cross-validation is a technique for making the very best use of limited data. In 10-fold cross-validation the data is randomly split into 10 nearly-equal sized partitions, taking care to have approximately the same number of cases in a class across each partition. Then, the decision tree is trained on partitions 2-9 combined and tested on partition 1, then trained on partitions 1,3-9 combined and tested on partition 2, and so on for 10 trials rotating the held-out test set through the data once. In this manner tests are only ever performed on held-out data and so are unbiased, and all data is tested exactly once so an aggregate error rate across the whole data set can be computed.

Trees are usually constructed until they are a very good fit to the training data, then they are "pruned" back by clipping off "noisy" branches and leaves. This improves the

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

generalization ability of the decision tree on unseen data and is essential to obtain good performance. The C4.5 package includes two methods for pruning trees first a standard tree pruning algorithm, second a rule extraction algorithm. In general, the tree based method was found to give superior results on this data. Therefore, the rule-based method is not reported.

(2) *Data Preparation*

Data on the response of various probes to normal tissue and five different cancers (Adenocarcinoma, Large Cell Carcinoma, Mesothelioma, Small Cell Lung Cancer, and Squamous Cell Carcinoma) was obtained as described elsewhere. The H-scores for probes 1-28, and pathologists Pathologist 1 and Pathologist 2 were extracted from the database and put into a flat data file. For the decision tree analysis each data point (even by two pathologists on a same physical slide) was taken to be an independent observation of the effect of disease on staining. This may slightly positively bias the performance of classification but should have no effect on panel selection.

- The control categories of Emphysema, Granulomatous Disease, and Interstitial Lung Disease were grouped together and called "Normal".
- For the detection panel all the cancers were grouped together and called "Abnormal" making this a 2-class problem.
- For the single discrimination panel, the Normal cases were removed from the data to form a 5-class problem.
- For the hold-out discrimination panels, each cancer was held out in turn and the remaining cancers grouped into "Other" to give a set of five 2-class problems.

C4.5 requires a ".names" file which describes the data and the attributes to be included in the analysis. An example names file for the discrimination panel is, Table 26:

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 26:

	C4.5	Names file for MonoGen 2F21 diag data
		Adenocarcinoma, Large Cell Carcinoma, Mesothelioma, Small Cell Lung Cancer, Squamous Cell Carcinoma. classes
P1	:	continuous.
P2	:	continuous.
P3	:	continuous.
P4	:	continuous.
P5	:	continuous.
P7	:	continuous.
P8	:	continuous.
P9	:	continuous.
P10	:	continuous.
P11	:	continuous.
P12	:	continuous.
P13	:	continuous.
P14	:	continuous.
P15	:	continuous.
P16	:	continuous.
P17	:	continuous.
P18	:	ignore.
P19	:	continuous.
P20	:	continuous.
P21	:	continuous.
P22	:	continuous.
P23	:	continuous.
P24	:	continuous.
P25	:	continuous.
P26	:	continuous.
P27	:	continuous.
P28	:	continuous.

Probe 18 was missing from the data and was set to "ignore" in all the designs.

Setting attributes to "ignore" in the names file is an easy and effective way of trimming probes from the panels and is used in the data analysis.

(3) Data Analysis

Ten-fold cross validation was run on each data set using the "xval.sh" script supplied with C4.5. Standard (default) parameters for the package were used. Cross validation is a technique developed for classifier training and testing on small data sets. It involves randomly splitting the data into N equal sized partitions. The classifier is then trained on N-1 partitions together and tested on the remaining partition. This is repeated N times.

Since the decision tree trained in one cross-validation(CV) trial may differ from the tree obtained in another (different in both probes selected, and tree coefficients) the number of times each probe was selected by the tree in 10 trials was computed.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

The first cull of probes was done by setting to ignore any probe which did not occur in a pruned tree 5 or more times out of the 10 CV trials.

Then the cross-validation was repeated with this smaller set of candidate probes. The second cull of probes was done by setting to ignore any probe which did not occur in a pruned tree 5 or more times out of the 10 CV trials. If any further probes dropped out, a third CV run was done.

The panels were selected by the various runs, and their estimated error performance are shown in the results tables. The panel performance for decision tree analysis is shown below, in Table 27.

Table 27:**Panel Performance - Decision Trees**

	Cancer	Control
Detection Panel	99.42%	0.58%
Probes: 3, 7, 19, 25 and 28	17.82%	82.18%

	Adeno	Others
Pair-wise Discrimination	67.74%	32.26%
4, 6, 14, 19 and 23	11.20%	88.80%

	Squamous	Others
Pair-wise Discrimination	70.59%	29.41%
3, 6, 17, 19 and 25	4.07%	95.93%

	Large Cell	Others
Pair-wise Discrimination	36.36%	63.64%
1, 5, 10, 13, 21, 27 and 28	7.37%	92.63%

	Mesothelioma	Others
Pair-wise Discrimination	82.05%	17.95%
3, 12 and 16	5.00%	95.00%

	Small Cell	Others
Pair-wise Discrimination	69.23%	30.77%
12, 17, 20, 23 and 25	1.49%	98.51%

	Cancer	Control
Detection (without probe 7)	89.60%	10.40%
6, 10, 16 and 19	3.30%	96.70%

	Cancer	Control
Detection (only commercially preferred probes)	92.80%	7.20%
5, 6, 10, 16, 19 and 23	5.49%	94.51%

An example decision tree structure is shown in below, in Tables 28 and 29, for discriminating between Small Cell Lung Cancer and the remaining four types of cancer.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

C4.5 output format:

Table 28:

P23 <= 3 :
| P25 <= 2 : Small Cell Lung Cancer (18.0)
| P25 > 2 :
| | P17 <= 5 : Small Cell Lung Cancer (2.0)
| | P17 > 5 :
| | | P20 <= 11 : Other (9.0)
| | | P20 > 11 : Small Cell Lung Cancer (2.0)
P23 > 3 :
| P12 > 7 : Other (120.0)
| P12 <= 7 :
| | P20 <= 2 : Other (5.0)
| | P20 > 2 : Small Cell Lung Cancer (4.0)

Tree saved

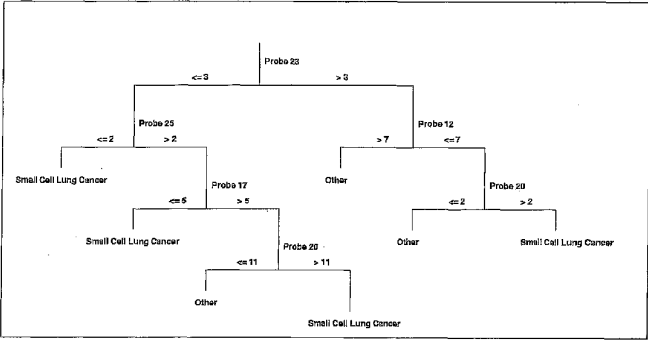
Evaluation on training data (160 items):

Before Pruning		After Pruning		
Size	Errors	Size	Errors	Estimate
13	0(0.0%)	13	0(0.0%)	(5.2%) <<

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 29:
Pictorial format:



The panel performance for stepwise linear discriminant is shown below, in

Table 30:

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 30:**Panel Performance - Stepwise LD**

Detection Panel
1, 4, 7, 15 and 16

	Cancer	Control
Cancer	92.24%	7.76%
Control	1.16%	98.84%

Pair-wise Discrimination
4, 5, 14, 19, 20, 25 and 27

	Adeno	Others
Adeno	91.67%	8.33%
Others	5.43%	94.57%

Pair-wise Discrimination
1, 2, 3, 24, 25 and 26

	Squamous	Others
Squamous	88.00%	12.00%
Others	6.59%	93.41%

Pair-wise Discrimination
1 and 7

	Large Cell	Others
Large Cell	80.95%	19.05%
Others	28.32%	73.68%

Pair-wise Discrimination
3, 12 and 16

	Mesothelioma	Others
Mesothelioma	96.67%	3.33%
Others	4.65%	95.35%

Pair-wise Discrimination
12, 19, 22 and 23

	Small Cell	Others
Small Cell	93.75%	6.25%
Others	5.00%	95.00%

Detection (without probe 7)
1, 2, 3, 4, 10, 11, 15, 16, 23, 24, 27 and 28

	Cancer	Control
Cancer	85.34%	14.66%
Control	2.33%	97.67%

Detection (only commercially preferred probes)
8, 10, 11, 19, 23 and 28

	Cancer	Control
Cancer	81.20%	18.80%
Control	1.16%	98.84%

The panel performance for stepwise logistic regression analysis is shown below, in Table 31:

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Table 31:**Panel Performance - Stepwise LR**

Detection Panel 6, 7, 12, 23 and 24		Cancer	Control
	Cancer	97.49%	2.63%
	Control	2.51%	97.49%
Pair-wise Discrimination 14, 19, 20, 25 and 27		Adeno	Others
	Adeno	96.39%	3.61%
	Others	12.29%	87.71%
Pair-wise Discrimination 3 and 10		Squamous	Others
	Squamous	94.93%	5.07%
	Others	35.86%	64.14%
Pair-wise Discrimination 1, 4, 6, 16 and 21		Large Cell	Others
	Large Cell	95.11%	4.89%
	Others	61.00%	39.00%
Pair-wise Discrimination 3, 7, 12 and 16		Mesothelioma	Others
	Mesothelioma	95.07%	4.93%
	Others	10.89%	89.11%
Pair-wise Discrimination 12, 13 and 23		Small Cell	Others
	Small Cell	98.90%	1.10%
	Others	4.00%	96.00%
Detection (without probe 7) 1, 10, 19, 23 and 28		Cancer	Control
	Cancer	94.00%	6.00%
	Control	5.80%	94.20%
Detection (only commercially preferred probes) 10, 19, 20, 23 and 28		Cancer	Control
	Cancer	93.88%	6.12%
	Control	6.39%	93.61%

iii. Neural networks and alternative methods

Artificial neural networks ANN's are candidate pattern recognition techniques which could readily be applied to select features and design classifiers in association with this invention. However such techniques give little insight to the structure of the data and the influence of particular probes in the way that LDF gives. For this reason this class of algorithm was not used in this study. LDF stands for linear discriminant function, a linear combination of features whose result is thresholded to determine the classification.

This class of techniques includes algorithms such as Multi-Layer Perceptron . MLP, Back-Prop, Kohonen's Self-Organizing Maps, Learning Vector Quantization, K-nearest neighbors and Genetic Algorithms.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

iv. Special topics(1) *Assumptions*

- Linear discriminant analysis
 - Assumes the covariance matrices for the two classes are equal.
 - Minimizes the cost of misclassification only when the two classes are multivariate normal.
 - Assumes that the explanatory variables are continuous rather than categorical (in this study, the H-scores are categorical while in practice (i.e., in an automated system) intensity can be measured on a continuous scale).
- Logistic regression (binomial generalized linear models)

See Venables and Ripley, chapter 7 ("Modern Applied Statistics with S-PLUS" (W.N. Venables and B.D. Ripley, Springer-Verlag, New York, 1999)).

(2) *Marker rejection (de-selection)*

Computerized implementations of discriminant analysis and regression procedures include stepwise variable selection procedures; e.g., stepAIC in R. These procedures are designed to select the *best* subset of variables for use as explanatory variables. In reality, because of the step-by-step nature of these procedures, there is no guarantee that the best variables are selected for prediction (Johnson and Wichern, p. 299). Nevertheless such procedures do provide the basis for marker selection and de-selection.

(3) *Pairwise tests*

Inherent problems in designing multiclass classifiers is discussed in "Applied Multivariate Statistical Analysis", R. A. Johnson and D. W. Wichern, 2nd Ed, 1988, Prentice-Hall, N.J. This is motivation for developing several separate two-class classifiers (discrimination panel).

(4) *Redundancy consideration in panel composition*

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

"Linear models form the core of classical statistics and are still the basis of much of statistical practice" "Modern Applied Statistics with S-PLUS" (W.N. Venables and B.D. Ripley, Springer-Verlag, New York, 1999). Linear models are the foundation for the t-test, analysis of variance (ANOVA), regression analysis, as well as a variety of multivariate methods including discriminant analysis. Explanatory variables may or may not enter the model as first-order terms. This is true also of (non-linear) logistic regression. The logistic regression model is simply a non-linear transformation of the linear regression model: the dependent variable is replaced by a log odds ratio (logit). In summary these statistical methods are based on linear relationships between the explanatory variables. Consequently, one avenue for seeking redundancy in panels is to identify highly correlated variables (markers). It may be possible to replace one marker with the other in a panel to achieve similar performance.

Another avenue for seeking redundancy in panels is to undertake a "best subsets" regression analysis. Given a starting model with all of the explanatory variables of interest, the aim is to find the best single-variable regression models, the best two-variable regression, etc. This methodology is implemented in the SAS statistical package.

(5) *Use of weighting scores*

(a) Commercial and clinical considerations

For many reasons, including strategic and commercial factors; cost; availability; ease of use, it may be preferred to encourage the selection of certain probes in a panel and penalize the selection of others, at the same time trading this off against panel size or performance.

(b) Attribute costing

Methods for such attribute weighting (in decision trees) have been proposed in the machine learning literature in other contexts such as the incorporation of background knowledge (M. Nunez, "The Use of Background Knowledge", Machine Learning 6: 231-250, 1991.), and the differential cost of obtaining information from robotic sensors (M. Tan, "Cost-sensitive Learning of Classification Knowledge and its Applications in Robotics", Machine Learning. 13: 7-33, 1993.)

Both of these cost-sensitive algorithms have been implemented in the literature by minor changes to the standard machine learning software package known as "C4.5 (J. Ross Quinlan, "C4.5: programs for machine learning", Morgan Kaufmann, CA.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

1993.) For convenience, this approach was followed to implement the "EG2" algorithm of Nunez.

In the C4.5 decision tree construction phase, the algorithm compares each available attribute to split on and chooses the single one which maximizes the information gain, G_i . In the EG2 algorithm, $(2^{G_i} - 1) / (C_i + 1)$ is maximized which incorporates the cost of information for attribute i , C_i . The vector of weights need to be set *a priori* by the user.

(i) Code Modifications

The C4.5 source code was modified to implement the economic generalizer "EG2" algorithm proposed by M. Nunez (The Use of Background Knowledge, Machine Learning 6: 231-250, 1991.)

The exact modifications to the C4.5 package are as follows.

After the following lines in file "R8/Src/contin.c". (J. Ross Quinlan, "C4.5: programs for machine learning", Morgan Kaufmann, CA. 1993)

```

ForEach(i, Xp, Lp - 1)
{
    if ( (Val = SplitGain[i] - ThreshCost) > BestVal )
    {
        BestI = i;
        BestVal = Val;
    }
}

```

The new line:

```
BestVal = (powf(2.0, BestVal) - 1.0) / (AttributeCosts[Att] + 1.0);
```

is inserted. Where the vector of attribute costs has been previously read in from a text file maintained by the user.

(ii) Experimental Methodology.

The commercially preferred probes are: 2,4,5,6,8,10,11,12,16,19,20,22,23,28.

For the sake of example, suppose the above probes are commercially preferred due to cost and it is desired to reselect the detection panel taking this cost into account.

The modified C4.5 decision tree software was used to give the commercially preferred probes a penalty of zero and non-commercially preferred probes a penalty of two. The 10-fold cross validated panel selection methodology (as described elsewhere) was run using the modified C4.5 algorithm

(iii) Results

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

The standard decision tree detection panel consists of probes 3, 7, 19, 25, 28. Resulting Panel Members: are 2, 6, 7, 10, 19, 25, 28 which used only 2 commercially preferred probes, P7 and P25. Note these probes have been selected by the method in spite of their increased cost due to their superior performance on this data. The panel is now larger: 7 probes versus 5 originally. There is no demonstrable drop in panel performance on this data although the performance will now be sub-optimal as a trade off against the reduced cost of probes.

(iv) Conclusion

A straightforward way has been established for incorporating costs of using probes into the panel selection methodology.

(c) Misclassification costing

(i) Background

For many reasons it may be desired to select an optimal panel bearing in mind that the costs of the different kinds of classification errors may vary. For example, it may be desired to select a panel which has an increased sensitivity to one disease (say Large Cell Carcinoma) and be willing to trade this off against reduced specificity and sensitivity elsewhere in the confusion matrix.

In theory a matrix of misclassification costs (of the same dimensions as the confusion matrix) to incorporate all the possible combinations of costs may be needed. In practice, only those costs which are non unity (the default) are entered.

The commercial decision tree software See5. (RuleQuest Research Pty Ltd, 30 Athena Avenue, St Ives Pathologist 3SW 2075, Australia. (<http://www.rulequest.com>)) incorporates this capability and was used in the following demonstration.

(ii) Aim

The standard joint discrimination panel (described elsewhere) consists of the members: P2, 3, 4, 5, 12, 14, 16, 19, 22, 23, 28. And gives the following estimated confusion matrix:

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	<-classified as
24	4	2	5	2	(a): class Adenocarcinoma
8	7	3	5	4	(b): class Large Cell Carcinoma
1	1	33	1	4	(c): class Mesothelioma
6	2	1	23		(d): class Small Cell Lung Cancer
4	4	3	2	24	(e): class Squamous Cell Carcinoma

The sensitivity of Large Cell Carcinoma is low at 26 percent. If one wished to increase this sensitivity in a newly designed panel, the following method may be employed.

(iii) Methodology

The following costs file was generated:

```
costs file for ZF21Discrim
|
| Increase sensitivity for "Large Cell Carcinoma"
|
Mesothelioma, Large Cell Carcinoma: 10
Adenocarcinoma, Large Cell Carcinoma: 10
Mesothelioma, Large Cell Carcinoma: 10
Small Cell Lung Cancer, Large Cell Carcinoma: 10
Squamous Cell Carcinoma, Large Cell Carcinoma: 10
```

This file upweights the misclassification of Large Cell Carcinoma as any of the other cancers by a factor of 10. This will tend to increase the sensitivity of detection in this class (with reduced performance elsewhere) but no weighting can ensure perfect classification.

The standard decision tree panel selection methodology was applied (using See5 instead of C4.5).

(iv) Results

The new panel members are: P2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 14, 16, 17, 25, 28. With an estimated performance of:

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	<-classified as
	20	13	1	1	2	(a): class Adenocarcinoma
	3	13	3	2	6	(b): class Large Cell
Carcinoma	1	9	27	2	1	(c): class Mesothelioma
	2	9		21		(d): class Small Cell Lung
Cancer	1	15	2	1	18	(e): class Squamous Cell
Carcinoma						

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

The above demonstrates that the estimated sensitivity of Large Cell Carcinoma has now increased to 48%.

(v) Conclusion

A straightforward way has been demonstrated for incorporating the differential costs of misclassification into the panel selection methodology.

d. Performance metrics

Outputs provided by the analysis indicating the estimated performance of each method include:

i. ROC analyses

Receiver Operating Characteristic (ROC) curves show the estimated percentage (or per unit probability) of false positive and false negative scores for different threshold levels in the classifier. An indifferent classifier, unable to discriminate better than random choice, would present a ROC curve with equal true and false readings. The area under this curve would be 50% (0.5 probability).

Area Under the Curve (AUC) is often used as an overall estimate of classifier performance and most commercial discriminant function packages compute this figure. A perfect classifier would have 100% Area Under the Curve, a useless classifier would have an AUC near 50% (0.5).

ii. Confusion matrices: counts and percentages

Confusion matrices show how data from the test set was classified. For pair wise tests these are counts of true positive, false positive, true negative or false negative scores. These may be shown as actual counts or as percentages. For the multi-way Panel, which attempts to give a unique diagnosis with one panel only, the confusion matrix would show counts for each correct classification. For instance, each time Small Cell carcinoma is detected as such it would be entered in one diagonal of the matrix. Incorrect scores; for instance how often a small cell carcinoma is incorrectly identified as squamous cell cancer would be entered in the appropriate off-diagonal element of the matrix. Error Rates are used to summarize data in the confusion matrix as the sum of all false classifications divided by the total number of classifications made, expressed as a percentage.

iii. Sensitivity and specificity

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Specificity refers to the extent to which any definition excludes invalid cases. If a definition has poor specificity, it is high in false positives. This means that it labels individuals as having a disorder when there is really no disorder present. Sensitivity refers to the extent to which any definition includes all valid cases. If a definition has poor sensitivity, it is high in false negatives (individuals who have a disorder present are falsely being diagnosed as not having one).

3. *Data analysis and results*

a. Sample size and variability

- Of the 354 cases in the combined Pathologist 1 and Pathologist 2 data set, only 202 cases possessed an H score for every marker (variable or feature).
- The small number of complete observations and the large number of variables leads to estimation problems (curse of dimensionality). Hence it is necessary to prune severely back the number of variables used to build a classifier.
- Due to the small number of observations it is not prudent to divide the data into separate training and testing sets (necessary for the robust estimation of classifier performance). For this reason, it was necessary to use resampling methods (such as cross-validation and multiple random trials).
- The design of a multiclass classifier for cancer discrimination is difficult because there are so few observations for each type of cancer.

b. **De-selected markers**

Markers were de-selected using the methodology described above. Markers that were de-selected are represented by non-selection in the panels.

c. **Detection panel(s) composition**

i. Selected marker probes

The selected marker probes for all three methods are summarized in Figure 5.

ii. Minimum selected marker set

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

For the detection panel it is clear that probe 7 delivered the best detection performance for a single marker. Combinations of probes were analyzed to see if a reliable panel could be obtained with more probes.

(1) *Method*

The Logistic Regression method allows best subsets to be ranked in terms of a performance measure (Fisher's score). This analysis was used to select the combinations from 1 through 5 probes. Fishers linear discriminant function and logit models (logistic regression) were used to illustrate the performance of these combinations. Data shown above.

(2) *Conclusions*

Probe 7 performs well on its own as a classifier; however, a drawback to using probe 7 alone is that probe 7 has a high false negative score. The best performance using Fishers linear discriminant function as a classifier was with probes 7 and 16. The variability of results amongst panels using other combinations suggests the noise added by more features is outweighing any potential to improve classification scores. The small number of incorrectly scored samples gives a poor representation of the statistics of these rarer events. A classifier designed with a larger number of cases may allow a better classifier to be designed. Techniques to select best combinations of probes using different classifiers may produce a different best panel, depending on the structure of the data.

iii. Supplemental markers

It is shown that panels can be designed to suit the availability of different probes. Different methodologies can be used for selecting these subsets: Decision Trees, Logistic Regression, and Linear Discriminant Functions. Data are shown above.

Method

Using SPSS a Fisher's Linear Discriminant function was applied to the scores obtained from the panel in which constraints were applied due to access constraints. For example, all of the probes come from one vendor. Again, the stepwise option was selected to find the best combination of features. Performance was estimated using the Leave-One-Out cross validation test.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

iv. Alternative markers: biological mechanisms of action
(functionally equivalent markers)

A person of ordinary skill in the art is able to determine functionally equivalent markers. The functional behaviors of the markers used in the panel are described throughout this document.

v. Marker localization

The localizations of the various markers used in this study are described elsewhere in this document.

vi. Panel Performance

The performance of the three methods is shown above.

vii. Limitations on interpretation of panel performance

- Due to small data set and the need to employ resampling methods, there is the danger that the classifiers have been over-trained (made to fit the data too closely).
- The panel performance using cytology specimens is difficult to forecast accurately since it is not clear whether sputum cytology samples will contain adequate numbers of cells that are representative of the cells analyzed in the histological validation studies. Nevertheless, given an adequate cellular sample size, one would expect the optimized panel to behave similarly with cytological specimens.

d. **Discriminant Panel Composition**

i. A single 5-way panel for all cancers

Of the three analysis techniques, only a decision tree is amenable to a single 5-way panel. A single decision tree was therefore constructed to simultaneously classify all types of lung cancer. The panel members are shown Figure 5. The panel performance is shown above in the panel performance tables.

ii. Panels for discriminating a single type of lung cancer against
all others

Linear discriminant functions are not well suited to performing simultaneous multi-class discrimination. The performance of five separate classifiers, each designed

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

separately to discriminate one of the cancers from a pooled set of all the cancers, was analyzed. Such combinations have the potential to classify none of the cases as having one of the candidate cancers, or classify a single case as having two or more of the candidate cancers. This has a potential advantage in identifying inconsistent cases for further review.

It has been seen that the overall error rate of a single discriminant panel for all cancer types has a fairly high error rate (a five way classifier). In the panel performance data shown above, the performance of five pair-wise classifiers, each designed to identify one cancer from the four other possible cancers is shown. This approach is amenable to analysis using Decision Trees, and Linear Discriminant functions. The technique has the potential to deliver an ambiguous finding when applied, giving two or more diagnoses for a single patient, suggesting further clinical investigation. The technique has the potential to deliver no finding, again suggesting further investigation (perhaps a re-test with the detection panel).

iii. Panels to account for possibility of false positive cases from detection panels

A further panel can be trained to discriminate among the false positive cases (from the detection panel) and the five cancer types. This involves selecting those individual cases from the detection panel that were incorrectly classified as abnormal. This trains a dedicated classifier on the 'harder' problem of detecting these 'special' cases. However, while this is a theoretically sound task, the data set only yielded four of these cases and the population was deemed to be under-represented for analysis.

iv. Selected Markers

The selected marker probes for all three methods are summarized in Figure 5.

v. Minimum selected marker set

This topic is addressed below under "Robustness of Approach Demonstrated by Similar Results Using Different Methods."

vi. Supplemental markers

This topic is addressed below under "Robustness of Approach Demonstrated by Similar Results Using Different Methods."

vii. Alternative markers: biological mechanisms of action

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

A person of ordinary skill in the art is able to determine functionally equivalent markers. The functional behaviors of the markers used in the panel are described throughout this document.

viii. Marker localization

The localization of the various markers used in this study are described throughout this document.

ix. Panel Performance

The performance of the three methods is summarized in Figure 5.

e. **Effect of weighting parameters**

In addition to user-supplied weighting criteria for markers and also for disease states (classes) as discussed earlier, one can also use a binary weighting scheme. For example, if all non-DAKO supplied probes are weighted "0" and all DAKO-supplied probes are weighted "1", then the optimized panel will contain only DAKO-supplied probes. This is an important product design capability for any vendor who intends to develop and market molecular diagnostic panel kits using only their supplies.

f. **Effect of using other (non H-score) objective scoring parameters**

i. Background

The Pathology Review sheet contains a set of boxes as follows, in Table 32:

Table 32:

Intensity	None	Weak	Moderate	Intense
0-5%	☐ 0	☐ 0	☐ 0	☐ 0
6-25%	☐ 1	☐ 1	☐ 1	☐ 1
26-50%	☐ 2	☐ 2	☐ 2	☐ 2
51-75%	☐ 3	☐ 3	☐ 3	☐ 3
>75%	☐ 4	☐ 4	☐ 4	☐ 4

The standard scoring system uses the "H score" which is obtained by grading the intensity as: none = 0, weak = 1, moderate = 2, intense = 3, and the percentage cells as: 0-5% = 0, 6-25% = 1, 26-50% = 2, 51-75% = 3, >75% = 4, and then multiplying the two

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

grades together. For example, 50% weakly stained plus 50% moderate stained would score $10 = 2 \times 2 + 2 \times 3$.

ii. Method

An alternative scoring method was analyzed in which the response was divided into low, medium and high as follows:

- (a) if more than 50% of cells had moderate or above stain → HIGH
- (b) if more than 50% of cells had no stain → LOW
- (c) otherwise → MEDIUM

The decision tree detection panel selection methodology was repeated using this 3-level factor instead of H-score. This caused the tree to split into 3 branches at each node, if required.

iii. Results

The panel selected was: Probes 3, 7, 10, 11, 16, 19, 20, 28

With an estimated performance of:

Classified as ->	(a)	(b)	
Control (a)	79	22	Specificity = 78%
Cancer (b)	24	149	Sensitivity = 86%

This should be compared to the reference performance with H-scores of:

Classified as ->	(a)	(b)	
Control (a)	85	6	Specificity = 93%
Cancer (b)	5	120	Sensitivity = 96%

iv. Conclusions

- There is a substantial loss of performance (larger panels, lower sensitivity and lower specificity when the proposed alternative scoring system is used.
- Treating the H-score as a continuous variable (in the range 0 to 12) seems to be near optimal for panel selection on the data examined.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- The many other possible scoring systems have not been examined, but may be feasible and applicable to the experimentally tested panel design and development methodology.

4. *Lung Cancer Detection and Discrimination Panels*

Listed below are exemplary lung cancer detection and discrimination panels determined by the above illustrative example. It is noted that although the panels listed below recite specific probes, each specific probe may be substituted by a correlate probe or a functionally related probe.

Detection (No Constraints)

- anti-Cyclin A combined with one or more additional probes
- anti-Cyclin A, anti-human epithelial related antigen (MOC-31)
- anti-Cyclin A, anti-ER-related P29
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B
- anti-Cyclin A, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-VEGF
- anti-Cyclin A, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-mature surfactant apoprotein B
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-VEGF
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-surfactant apoprotein A
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-VEGF, anti-Cyclin D1
- anti-Cyclin A, anti-human epithelial related antigen (MOC-31) combined with one or more additional probes

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- anti-Cyclin A, anti-ER-related P29 combined with one or more additional probes
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B combined with one or more additional probes
- anti-Cyclin A, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-VEGF combined with one or more additional probes
- anti-Cyclin A, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-mature surfactant apoprotein B combined with one or more additional probes
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-VEGF combined with one or more additional probes
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-surfactant apoprotein A combined with one or more additional probes
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A combined with one or more additional probes
- anti-Cyclin A, anti-mature surfactant apoprotein B, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-VEGF, anti-Cyclin D1 combined with one or more additional probes

Detection (W/O anti-Cyclin A)

- anti-Ki-67 combined with one or more additional probes.
- anti-Ki-67 combined with any one probe selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B.
- anti-Ki-67 combined with any two probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- anti-Ki-67 combined with any three probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B.
- anti-Ki-67 combined with any four probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B.
- anti-Ki-67 combined with any five probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B.
- anti-Ki-67, anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B
- anti-Ki-67 combined with any one probe selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B, and with one or more additional probes.
- anti-Ki-67 combined with any two probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B, and with one or more additional probes.
- anti-Ki-67 combined with any three probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B, and with one or more additional probes.
- anti-Ki-67 combined with any four probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B, and with one or more additional probes.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- anti-Ki-67 combined with any five probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-mature surfactant apoprotein B, and with one or more additional probes.
- anti-Ki-67, anti-VEGF, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-mature surfactant apoprotein B and one or more additional probes.

Detection With Commercially Preferred Probes

- anti-Ki-67 combined with one or more additional probes.
- anti-TTF-1 combined with one or more additional probes.
- anti-EGFR combined with one or more additional probes.
- anti-proliferating cell nuclear antigen combined with one or more additional probes.
- two probes selected from the group consisting of anti-Ki-67, anti-TTF-1, anti-EGFR and anti-proliferating cell nuclear antigen.
- three probes selected from the group consisting of anti-Ki-67, anti-TTF-1, anti-EGFR and anti-proliferating cell nuclear antigen.
- anti-Ki-67, anti-TTF-1, anti-EGFR and anti-proliferating cell nuclear antigen
- two probes selected from the group consisting of anti-Ki-67, anti-TTF-1, anti-EGFR and anti-proliferating cell nuclear antigen, and one or more additional probes.
- three probes selected from the group consisting of anti-Ki-67, anti-TTF-1, anti-EGFR and anti-proliferating cell nuclear antigen, and one or more additional probes.
- anti-Ki-67, anti-TTF-1, anti-EGFR, anti-proliferating cell nuclear antigen, and one or more additional probes.

Discrimination Between Adenocarcinoma And Other Lung Cancers

- anti-mucin 1 and anti-TTF-1

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- anti-mucin 1 and anti-TTF-1 combined with any one probe selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-BCL2, anti-ER-related P29 and anti-Glut 3
- anti-mucin 1 and anti-TTF-1 combined with and two probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-BCL2, anti-ER-related P29 and anti-Glut 3
- anti-mucin 1 and anti-TTF-1 combined with any three probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-BCL2, anti-ER-related P29 and anti-Glut 3
- anti-mucin 1 and anti-TTF-1 combined with any four probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-BCL2, anti-ER-related P29 and anti-Glut 3
- anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-mucin 1, anti-TTF-1, anti-BCL2, anti-ER-related P29 and anti-Glut 3
- anti-mucin 1, anti-TTF-1 and one or more additional probes
- anti-mucin 1 and anti-TTF-1 combined with any one probe selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-BCL2, anti-ER-related P29 and anti-Glut 3, and with one or more additional probes
- anti-mucin 1 and anti-TTF-1 combined with and two probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-BCL2, anti-ER-related P29 and anti-Glut 3, and with one or more additional probes
- anti-mucin 1 and anti-TTF-1 combined with any three probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-BCL2, anti-ER-related P29 and anti-Glut 3, and with one or more additional probes
- anti-mucin 1 and anti-TTF-1 combined with any four probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-BCL2, anti-ER-related P29 and anti-Glut 3, and with one or more additional probes

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- anti-VEGF, anti-surfactant apoprotein A, anti-mucin 1, anti-TTF-1, anti-BCL2, anti-ER-related P29, anti-Glut 3 and one or more additional probes

Discrimination Between Squamous Cell Carcinoma And Other Lung Cancers

- anti-CD44v6 combined with one or more additional probes
- anti-CD44v6 combined with any one probe selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29 and anti-melanoma-associated antigen 3
- anti-CD44v6 combined with any two probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29 and anti-melanoma-associated antigen 3
- anti-CD44v6 combined with any three probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29 and anti-melanoma-associated antigen 3
- anti-CD44v6 combined with any four probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29 and anti-melanoma-associated antigen 3
- anti-CD44v6, anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29 and anti-melanoma-associated antigen 3
- anti-CD44v6 combined with any one probe selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29 and anti-melanoma-associated antigen 3, and with one or more additional probes
- anti-CD44v6 combined with any two probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29 and anti-melanoma-associated antigen 3, and with one or more additional probes
- anti-CD44v6 combined with any three probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29 and anti-melanoma-associated antigen 3, and with one or more additional probes

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- anti-CD44v6 combined with any four probes selected from the group consisting of anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29 and anti-melanoma-associated antigen 3, and with one or more additional probes
- anti-CD44v6, anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-Glut 1, anti-ER-related P29, anti-melanoma-associated antigen 3 and one or more additional probes

Discrimination Between Large Cell Carcinoma And Other Lung Cancers

- anti-VEGF combined with one or more additional probes.
- anti-VEGF and anti-p120
- anti-VEGF and anti-Glut 3
- anti-VEGF, anti-p120 and anti-Cyclin A
- anti-VEGF, anti-p120 and one or more additional probes
- anti-VEGF, anti-Glut 3 and one or more additional probes
- anti-VEGF, anti-p120, anti-Cyclin A and one or more additional probes

Discrimination Between Mesothelioma And Other Lung Cancers

- anti-CD44v6 combined with one or more additional probes.
- anti-proliferating cell nuclear antigen combined with one or more additional probes.
- anti-human epithelial related antigen (MOC-31) combined with one or more additional probes.
- two probes selected from the group consisting of anti-CD44v6, anti-proliferating cell nuclear antigen and anti-human epithelial related antigen (MOC-31), combined with one or more additional probes
- anti-CD44v6, anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-human epithelial related antigen (MOC-31) and one or more additional probes.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Discrimination Between Small Cell And Other Lung Cancers

- anti-proliferating cell nuclear antigen combined with one or more additional probes.
- anti-BCL2 combined with one or more additional probes.
- anti-EGFR combined with one or more additional probes.
- two probes selected from the group consisting of anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-BCL2 and anti-EGFR
- anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-BCL2, anti-EGFR
- two probes selected from the group consisting of anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-BCL2 and anti-EGFR, combined with one or more additional probes
- anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-BCL2, anti-EGFR and one or more additional probes

Simultaneous Discrimination Of Adenocarcinoma, Squamous Cell Carcinoma, Large Cell Carcinoma, Mesothelioma And Small Cell Carcinoma

- two or more probes selected from anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-CD44v6, anti-surfactant apoprotein A, anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-mucin 1, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-N-cadherin, anti-EGFR and anti-proliferating cell nuclear antigen
- anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-CD44v6, anti-surfactant apoprotein A, anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-mucin 1, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-N-cadherin, anti-EGFR and anti-proliferating cell nuclear antigen
- two or more probes selected from anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-CD44v6, anti-surfactant apoprotein A, anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-mucin 1, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-N-cadherin, anti-EGFR and anti-proliferating cell nuclear antigen, combined with one or more additional probes

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- anti-VEGF, anti-thrombomodulin, anti-CD44v6, anti-surfactant apoprotein A, anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-mucin 1, anti-human epithelial related antigen (MOC-31), anti-TTF-1, anti-N-cadherin, anti-EGFR and anti-proliferating cell nuclear antigen, combined with one or more additional probes

5. Conclusions

a. Validity of panel approach to molecular diagnostics

i. Non-intuitive solutions

Histograms were plotted (PathologistData.xls, worksheet: Histograms) showing the distribution of marker scores for each probe for Control vs. Cancer. It is clear from these histograms that an intuitive selection of probes for specific panels is certainly not obvious and the invention described does allow effective combinations to be found in the absence of an obvious method.

ii. Optimization for varied product applications

iii. Robustness of approach demonstrated by similar results using different methods

Detailed scrutiny of the results obtained by the various analyses in the body of this report, and as summarized in the tables and figures, shows the following findings.

1. Careful scrutiny of the performance of individual probes does not make apparent probe combinations that might perform better than any one probe alone.
2. All three classification methodologies evaluated here in on similar sets of features. The small differences can be attributed to the data structure that may favor one classifier over another.
3. All the classifiers designed with one of these methods were shown to give good performance when tested on data from an independent pathologist, unseen during the design process. This gives high confidence in the invention.
4. A detection panel based on probe 7 alone gives a high performance.
5. If probe 7 is combined with probe 16 or 25 then a better performance is obtained.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

6. While combinations of other probes with probe 7 appear to improve performance further, the number of extra cases captured is so low that they may be unrepresentative and the classifier so designed may not generalize.
7. The performance of panels selected from probes excluding probe 7 provided some discrimination, good enough in comparison with current practice using human screening, but perhaps not good enough for an automated cytometer in tomorrow's clinical diagnostic cytology world (see Figure 6).
8. Other combinations of probes can provide a useful, but lesser, performance.
9. If some probes become unavailable this invention allows the selection of other combinations of probes. This was illustrated by classifier designs based on a commercially preferred set of probes only. See Figure 7.
10. The invention allows a weighting to be applied against costly probes. Rather than totally excluding them from the analysis this allows their inclusion in the panel if their contribution is important.
11. The invention allows the design of single lung cancer type specific discrimination panels that can discriminate one type of lung cancer from among all other cancers.
12. Analysis of the performance of a single panel to classify five cancers showed discrimination was possible but the overall error rate was worse than a set of five panels each designed to discriminate one of the cancers from the others.
13. A very useful discrimination was obtained with the combination of five two way classifiers.
14. Common sets of probes were selected by the three classification methodologies for the five discrimination panels, again giving confidence in this result.
15. Probes for isolating cases of Adenocarcinoma are 1, 14, 19, 20, 25, and 27.
16. Probes for isolating cases of Squamous Cell cancer are 1, 2, 3, 24, 25, and 26.
17. Probes for isolating cases of Large Cell cancer are 1 and 7 or 1, and 21.
18. Probes for isolating cases of Mesothelioma are 3, 12, and 16.
19. Probes for isolating cases of Small Cell cancer are 12, 20, and 23.
20. Probes for recognizing all cancers simultaneously are 1, 2, 3, 4, 12, 14, 19, 22, 23, and 28.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

21. An advantage of using the multiple pair-wise panels as defined by this invention is that doubtful cases may not score on any of the five panels, also confusing cases may show on two or more panels. Such anomalous reports would alert the cytologist that further analysis is indicated.

iv. Risk Management Study

All the tests applied in this study were statistical in nature. There is a risk that probes selected on the basis of small improvements in performance will have statistical variations when tested on new data. To give confidence in the results, the best classifier emerging from the Linear Discriminant analysis on the Pathologist 1 and Pathologist 2 data was tested. It should be remembered that the Pathologist 3 data was statistically different from the Pathologist 1 and Pathologist 2 data, so if good performances are obtained when tests using the Pathologist 3 data, then this would be encouraging indeed.

(I) *Report on Testing with unseen data – Detection panel*

(a) Method

In the Section titled "Detection Panel(s) Composition" above, we showed that good classification is obtained with features 7 and 16. Using SPSS all the Pathologist 3 data that reported H scores for both 7 and 16 was selected. Then, using Transform and Compute, the canonical discrimination function was generated as a new feature. The performance of this feature alone was then tested.

(b) Results

These are the results of testing the classifier designed on Pathologist 1 and Pathologist 2 data and testing on Pathologist 3 data. The classifier was designed using the linear discriminant function on probes 7 and 16. The Canonical Pathologist 2 function was $=0.965*Probe7-0.298*Probe16$.

PCT/GB02/01125

Classification Results on Pathologist 3 data using probes 7 and 16		
	Predicted	Total
Benign	10	10
Malignant	10	10
Total	20	20

		Predicted Group Membership		Total
Diagnosis (UCLA)		0	1	
Original Count	0	20	1	21
	1	6	41	47
%	0	95.2	4.8	100.0
	1	12.8	87.2	100.0
Cross-validated Count	0	20	1	21
	1	6	41	47
%	0	95.2	4.8	100.0
	1	12.8	87.2	100.0

a Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b 89.7% of original grouped cases correctly classified.

c 89.7% of cross-validated grouped cases correctly classified.

This is better than classifying the Pathologist 3 data on probe 7 only show as follows

Classification Results on Pathologist 3 data using probe 7 only

Predicted Group		Membership		Total
Diagnosis (UCLA)		0	1	
Original Count	0	20	1	21
	1	8	39	47
	%	0	95.2	4.8
	1	17.0	83.0	100.0
Cross-validated Count	0	20	1	21
	1	8	39	47
	%	0	95.2	4.8
	1	17.0	83.0	100.0

a Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b 86.8% of original grouped cases correctly classified.

c 86.8% of cross-validated grouped cases correctly classified.

(c) Conclusion

This gives confidence that the two-probe classifier based on 7 and 16 is better than probe 7 alone

(2) *Report on testing with unseen data – Discrimination*

Panel

(a) Background

WO 02/073204 PCT/GB02/01125

Reported below is the performance of the classifier designed with Pathologist 1 and Pathologist 2 data using LDF and tested with the unseen Pathologist 3 data. The numbers of cases at the design stage was relatively small and the numbers in the test data are also small, so a good degree of variability can be expected between performance on the first and second set.

(b) Method

In SPSS, the canonical discrimination functions derived in the section titled "Pattern recognition", were built and tested on Pathologist 3 data for all five classes of cancer

(c) Results

Mesothelioma LDF= probe3sc * .385 - probe12s * .317 + probe16s * 1.006

Classification Results		Predicted Group Membership		Total
		Meso = 1, others = 0	1	
Original	Count	0	38	2
		1	1	7
	%	0	95.0	5.0
Cross-validated	Count	0	38	2
		1	1	7
	%	0	95.0	5.0
		1	12.5	87.5
				100.0

- a Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.
- b 93.8% of original grouped cases correctly classified.
- c 93.8% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Small cell cancer LDF= probe12s * .575 - probe20s * .408 - probe22s * .423 + probe23s* .344

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Classification Results

		Predicted Group Membership		Total
		Small = 1, others = 0	1	
Original	Count	0	39	42
		1	1	6
	%	0	92.9	100.0
Cross-validated	Count	1	16.7	100.0
		0	39	42
	%	1	16.7	100.0

a Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b 91.7% of original grouped cases correctly classified.

c 91.7% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Squamous cell cancer LDF = - probe1sc * .328 - probe2sc * .295 + probe3sc * .741 + probe24s * .490 + probe25s * .393 + probe26s * .426

Classification Results

		Predicted Group Membership		Total
		Squamous = 1, others = 0	0	1
Original	Count	0	31	4
		1	2	9
	%	0	88.6	11.4
Cross-validated	Count	1	18.2	81.8
		0	31	4
	%	1	18.2	81.8

a Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b 87.0% of original grouped cases correctly classified.

c 87.0% of cross-validated grouped cases correctly classified.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Large cell cancer LDF= probe1sc * .847+ probe7sc * .452

Classification Results		Predicted Group Membership		Total
		Large = 1, others = 0	0	1
Original	Count	0	23	15
	%	1	4	5
Cross-validated	Count	0	60.5	39.5
	%	1	44.4	55.6
	Count	0	23	15
	%	1	4	5
	Count	0	60.5	39.5
	%	1	44.4	55.6

a Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b 59.6% of original grouped cases correctly classified.

c 59.6% of cross-validated grouped cases correctly classified.

The lower, but useful, performance was on a classifier designed and tested

with a very small number of cases of large cell cancer, so this result is still very encouraging.

Adenocarcinoma, LDF= - probe4sc * .515 + probe5sc * .299 - probe14s * .485 - probe19s * .347 + probe20s * .723 + probe25s * .327 + probe27s * .327

Classification Results		Predicted Group Membership		Total
		Adeno = 1, Others = 0	0	1
Original	Count	0	29	5
	%	1	0	14
Cross-validated	Count	0	85.3	14.7
	%	1	.0	100.0
	Count	0	29	5
	%	1	0	14
	Count	0	85.3	14.7
	%	1	.0	100.0

a Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b 89.6% of original grouped cases correctly classified.

c 89.6% of cross-validated grouped cases correctly classified.

(d) Conclusion

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

It is very encouraging to note the performance of these classifiers stand up to the tests of applying unseen data. This gives a very high confidence in the ability to detect the individual cancers.

(3) *Training and testing on data from different patients and pathologists*

As a "final final" test of robustness a LDF was trained on the data that was reviewed by both Pathologist 1 and Pathologist 2. This removes data reviewed by Pathologist 3. Hence testing on data reviewed by both Pathologist 3 plus Pathologist 1 data is not biased. Previously the test process was biased through using data from the same patient for test and train.

LDF produced the same set of features except for probe 4 which was not included. The LDF was = probe1sc * .288 + probe7sc * .846 - probe15s * .249 - probe16s * .534

Classification Results

Area under the Curve = .977

		Diagnosis (UCLA)	Predicted Group Membership		Total
			0	1	
Original	Count	0	20	0	20
		1	9	37	46
	%	0	100.0	.0	100.0
Cross- validated	Count	1	19.6	80.4	100.0
		0	20	0	20
	%	1	9	37	46
		0	100.0	.0	100.0
		1	19.6	80.4	100.0

a Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b 86.4% of original grouped cases correctly classified.

c 86.4% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Still a reasonable result, but a similar result, but with a smaller area under the curve, was obtained with probe7 alone on Pathologist 3 only data

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

Classification Results

Area under the curve = .908

		Predicted Group Membersh		Total	
		0	1		
Original	Count	0	19	1	20
		1	7	39	46
	%	0	95.0	5.0	100.0
Cross- validated	Count	1	15.2	84.8	100.0
		0	19	1	20
	%	1	7	39	46
		0	95.0	5.0	100.0
		1	15.2	84.8	100.0

a Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b 87.9% of original grouped cases correctly classified.

c 87.9% of cross-validated grouped cases correctly classified.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

References:

- [1] Goldberg-Kahn, B., Healy, J.C. and Bishop, J.W. (1997) The cost of diagnosis: a comparison of four different strategies in the workup of solitary radiographic lung lesions. *Chest* 111, 870-6.
- [2] O'Donovan, P.B. (1997) The radiologic appearance of lung cancer. *Oncology (Huntingt)* 11, 1387-402; discussion 1402-4.
- [3] Worrell, J.A. (1995) Radiology of the central airways. *Otolaryngol Clin North Am* 28, 701-20.
- [4] Henschke, C.I., Miettinen, O.S., Yankelevitz, D.F., Libby, D.M. and Smith, J.P. (1994) Radiographic screening for cancer. Proposed paradigm for requisite research. *Clin Imaging* 18, 16-20.
- [5] Lam, S., Kennedy, T., Unger, M., Miller, Y.E., Gelmont, D., Rusch, V., Gipe, B., Howard, D., LeRiche, J.C., Coldman, A. and Gazdar, A.F. (1998) Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest* 113, 696-702.
- [6] Sazon, D.A., Santiago, S.M., Soo Hoo, G.W., Khonsary, A., Brown, C., Mandelkern, M., Bland, W. and Williams, A.J. (1996) Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in the detection and staging of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 417-21.
- [7] Lowe, V.J., DeLong, D.M., Hoffman, J.M. and Coleman, R.E. (1995) Optimum scanning protocol for FDG-PET evaluation of pulmonary malignancy. *J Nucl Med* 36, 883-7.
- [8] Lowe, V.J., Fletcher, J.W., Gobar, L., Lawson, M., Kirchner, P., Valk, P., Karis, J., Hubner, K., Delfbeke, D., Heiberg, E.V., Patz, E.F. and Coleman, R.E. (1998) Prospective investigation of positron emission tomography in lung nodules. *J Clin Oncol* 16, 1075-84.
- [9] Raab, S.S., Hornberger, J. and Raffin, T. (1997) The importance of sputum cytology in the diagnosis of lung cancer: a cost-effectiveness analysis. *Chest* 112, 937-45.
- [10] Franklin, W.A. (1998) New molecular and cellular approaches to lung cancer detection. In: *Biology of Lung Cancer*, pp. 529-570.
- [11] Kern, W.H. (1988) The diagnostic accuracy of sputum and urine cytology. *Acta Cytol* 32, 651-4.
- [12] Mehta, A.C., Marty, J.J. and Lee, F.Y. (1993) Sputum cytology. *Clin Chest Med* 14, 69-85.
- [13] Gledhill, A., Bates, C., Henderson, D., DaCosta, P. and Thomas, G. (1997) Sputum cytology: a limited role. *J Clin Pathol* 50, 566-8.
- [14] Steffee, C.H., Segletes, L.A. and Geisinger, K.R. (1997) Changing cytologic and histologic utilization patterns in the diagnosis of 515 primary lung malignancies. *Cancer* 81, 105-15.
- [15] Zaman, M.B. (1991) Pulmonary cytology. *Clin Lab Med* 11, 293-315.
- [16] Flehinger, B.J. and Melamed, M.R. (1994) Current status of screening for lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* 4, 1-15.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- [17] Koss, L.G., Melamed, M.R. and Goodner, J.T. (1964) Pulmonary cytology: A brief survey of diagnostic results from July 1st, 1952 until December 31st, 1960. *Acta Cytol* 8, 104.
- [18] Saccomanno, G., Saunders, R.P., Ellis, H., Archer, V.E., Wood, B.G. and Beckler, P.A. (1963) Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum. *Acta Cytol* 5, 305-310.
- [19] Miura, H., Konaka, C., Kawate, N., Tsuchida, T. and Kato, H. (1992) Sputum cytology-positive, bronchoscopically negative adenocarcinoma of the lung [see comments]. *Chest* 102, 1328-32.
- [20] Valatis, J., Warrens, D. and Gamble, D. (1981) Increased incidence of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 47, 1042-1046.
- [21] Baldini, E.H. and Strauss, G.M. (1997) Women and lung cancer: waiting to exhale. *Chest* 112, 229S-234S.
- [22] Caldwell, C.J. and Berry, C.L. (1996) Is the incidence of primary adenocarcinoma of the lung increasing? *Virchows Arch* 429, 359-63.
- [23] Risse, E.K., Vooijs, G.P. and van't Hof, M.A. (1987) Relationship between the cellular composition of sputum and the cytologic diagnosis of lung cancer. *Acta Cytol* 31, 170-6.
- [24] Holiday, D.B., McLarty, J.W., Farley, M.L., Mabry, L.C., Cozens, D., Roby, T., Waldron, E., Underwood, R.D., Anderson, E., Culbreth, W. and *et al.* (1995) Sputum cytology within and across laboratories. A reliability study. *Acta Cytol* 39, 195-206.
- [25] Eddy, D.M. (1989) Screening for lung cancer [see comments]. *Ann Intern Med* 111, 232-7.
- [26] Younes, M., Brown, R.W., Stephenson, M., Gondo, M. and Cagle, P.T. (1997) Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 80, 1046-51.
- [27] Ogawa, J., Inoue, H. and Koide, S. (1997) Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int J Cancer* 74, 189-92.
- [28] Ito, T., Noguchi, Y., Satoh, S., Hayashi, H., Inayama, Y. and Kitamura, H. (1998) Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage [see comments]. *Mod Pathol* 11, 437-43.
- [29] Sosolik, R.C., McGaughey, V.R. and De Young, B.R. (1997) Anti-MOC-31: a potential addition to the pulmonary adenocarcinoma versus mesothelioma immunohistochemistry panel. *Mod Pathol* 10, 716-9.
- [30] Ordonez, N.G. (1998) Value of the MOC-31 monoclonal antibody in differentiating epithelial pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* 29, 166-9.
- [31] Takanami, I., Tanaka, F., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. and Kodaira, S. (1996) The basic fibroblast growth factor and its receptor in pulmonary adenocarcinomas: an investigation of their expression as prognostic markers. *Eur J Cancer* 32A, 1504-9.
- [32] Takanami, I., Imamura, T., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. and Kodaira, S. (1996) Immunohistochemical detection of basic fibroblast growth

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- factor as a prognostic indicator in pulmonary adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 26, 293-7.
- [33] Ohta, Y., Endo, Y., Tanaka, M., Shimizu, J., Oda, M., Hayashi, Y., Watanabe, Y. and Sasaki, T. (1996) Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2, 1411-6 1996.
 - [34] Volm, M., Koomagi, R., Mattern, J. and Stammers, G. (1997) Prognostic value of basic fibroblast growth factor and its receptor (FGFR-1) in patients with non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer* 33, 691-3.
 - [35] Hiyama, K., Hiyama, E., Ishioka, S., Yamakido, M., Inai, K., Gazdar, A.F., Piatyszek, M.A. and Shay, J.W. (1995) Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 87, 895-902.
 - [36] Yashima, K., Litzky, L.A., Kaiser, L., Rogers, T., Lam, S., Wistuba, II, Milchgrub, S., Srivastava, S., Piatyszek, M.A., Shay, J.W. and Gazdar, A.F. (1997) Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 57, 2373-7.
 - [37] Ahrendt, S.A., Yang, S.C., Wu, L., Westra, W.H., Jen, J., Califano, J.A. and Sidransky, D. (1997) Comparison of oncogene mutation detection and telomerase activity for the molecular staging of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1207-14.
 - [38] Albanell, J., Lonardo, F., Rusch, V., Engelhardt, M., Langenfeld, J., Han, W., Klimstra, D., Venkatraman, E., Moore, M.A. and Dmitrovsky, E. (1997) High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 89, 1609-15.
 - [39] Hiyama, K., Ishioka, S., Shay, J.W., Taooka, Y., Maeda, A., Isobe, T., Hiyama, E., Maeda, H. and Yamakido, M. (1998) Telomerase activity as a novel marker of lung cancer and immune-associated lung diseases. *Int J Mol Med* 1, 545-9.
 - [40] Yahata, N., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J.H., Iwama, H., Hayashi, S., Ando, K., Hirano, T., Tsuchida, T., Kato, H., Shay, J.W. and Toyama, K. (1998) Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst* 90, 684-90.
 - [41] Lee, J.C., Jong, H.S., Yoo, C.G., Han, S.K., Shim, Y.S. and Kim, Y.W. (1998) Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer* 21, 99-103.
 - [42] Arai, T., Yasuda, Y., Takaya, T., Ito, Y., Hayakawa, K., Toshima, S., Shibuya, C., Yoshimi, N. and Kashiki, Y. (1998) Application of telomerase activity for screening of primary lung cancer in broncho-alveolar lavage fluid. *Oncol Rep* 5, 405-8.
 - [43] Fujii, M., Motoi, M., Saeki, H., Aoe, K. and Moriwaki, S. (1993) Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-small cell lung cancer. *Acta Med Okayama* 47, 103-8.
 - [44] Kawai, T., Suzuki, M., Kono, S., Shinomiya, N., Rokutanda, M., Takagi, K., Ogata, T. and Tamai, S. (1994) Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in lung carcinoma. Correlation with DNA flow cytometric analysis. *Cancer* 74, 2468-75.
 - [45] Ogawa, J., Tsurumi, T., Yamada, S., Koide, S. and Shohitsu, A. (1994) Blood vessel invasion and expression of sialyl Lewisx and proliferating cell nuclear antigen in stage I non-small cell lung cancer. Relation to postoperative recurrence. *Cancer* 73, 1177-83.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- [46] Ebina, M., Steinberg, S.M., Mulshine, J.L. and Linnoila, R.I. (1994) Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 54, 2496-503.
- [47] Fontanini, G., Vignati, S., Bigini, D., Merlo, G.R., Ribecchini, A., Angeletti, C.A., Basolo, F., Pingitore, R. and Bevilacqua, G. (1994) Human non-small cell lung cancer: p53 protein accumulation is an early event and persists during metastatic progression [see comments]. *J Pathol* 174, 23-31.
- [48] Wiethage, T., Voss, B. and Muller, K.M. (1995) P53 accumulation and proliferating-cell nuclear antigen expression in human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 121, 371-7.
- [49] Esposito, V., Baldi, A., De Luca, A., Micheli, P., Mazzaella, G., Baldi, F., Caputi, M. and Giordano, A. (1997) Prognostic value of p53 in non-small cell lung cancer: relationship with proliferating cell nuclear antigen and cigarette smoking. *Hum Pathol* 28, 233-7.
- [50] Caputi, M., Esposito, V., Groger, A.M., Pacilio, C., Murabito, M., Dekan, G., Baldi, F., Wolner, E. and Giordano, A. (1998) Prognostic role of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: an immunohistochemical analysis. *In Vivo* 12, 85-8.
- [51] Hirata, T., Fukuse, T., Naiki, H., Hitomi, S. and Wada, H. (1998) Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res* 58, 1108-10.
- [52] Ariza, A., Mate, J.L., Isamat, M., Lopez, D., Von Uexkull-Guldeband, C., Rosell, R., Fernandez-Vasalo, A. and Navas-Palacios, J.J. (1995) Standard and variant CD44 isoforms are commonly expressed in lung cancer of the non-small cell type but not of the small cell type. *J Pathol* 177, 363-8.
- [53] Fasano, M., Sabatini, M.T., Wiczorek, R., Sidhu, G., Goswami, S. and Jagirdar, J. (1997) CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors: a role in histogenesis? *Cancer* 80, 34-41.
- [54] Miyoshi, T., Kondo, K., Hino, N., Uyama, T. and Monden, Y. (1997) The expression of the CD44 variant exon 6 is associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1289-97.
- [55] Tran, T.A., Kallakury, B.V., Sheehan, C.E. and Ross, J.S. (1997) Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 28, 809-14.
- [56] Takigawa, N., Segawa, Y., Mandai, K., Takata, I. and Fujimoto, N. (1997) Serum CD44 levels in patients with non-small cell lung cancer and their relationship with clinicopathological features. *Lung Cancer* 18, 147-57.
- [57] Kondo, K., Miyoshi, T., Hino, N., Shimizu, E., Masuda, N., Takada, M., Uyama, T. and Monden, Y. (1998) High frequency expressions of CD44 standard and variant forms in non-small cell lung cancers, but not in small cell lung cancers. *J Surg Oncol* 69, 128-36.
- [58] Sasaki, J.I., Tanabe, K.K., Takahashi, K., Okamoto, I., Fujimoto, H., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M. and Saya, H. (1998) Expression of CD44 splicing isoforms in lung cancers: dominant expression of CD44v8-10 in non-small cell lung carcinomas. *Int J Oncol* 12, 525-33.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- [59] Volm, M., Koomagi, R., Mattern, J. and Stammers, G. (1997) Cyclin A is associated with an unfavourable outcome in patients with non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 75, 1774-8.
- [60] Dobashi, Y., Shoji, M., Jiang, S.X., Kobayashi, M., Kawakubo, Y. and Kameya, T. (1998) Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *Am J Pathol* 153, 963-72.
- [61] Volm, M., Rittgen, W. and Drings, P. (1998) Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas [published erratum appears in *Br J Cancer* 1998 Apr;77(7):1198]. *Br J Cancer* 77, 663-9.
- [62] Shoji, M., Dobashi, Y., Morinaga, S., Jiang, S.X. and Kameya, T. (1999) Tumor extension and cell proliferation in adenocarcinomas of the lung. *Am J Pathol* 154, 909-18.
- [63] Shapiro, G.I., Edwards, C.D., Kobzik, L., Godleski, J., Richards, W., Sugarbaker, D.J. and Rollins, B.J. (1995) Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* 55, 505-9.
- [64] Betticher, D.C., Heighway, J., Hasleton, P.S., Altermatt, H.J., Ryder, W.D., Cerny, T. and Thatcher, N. (1996) Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 73, 294-300.
- [65] Mate, J.L., Ariza, A., Aracil, C., Lopez, D., Isamat, M., Perez-Piteira, J. and Navas-Palacios, J.J. (1996) Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol* 180, 395-9.
- [66] Yang, W.L., Chung, K.Y., Shin, D.H. and Kim, Y.B. (1996) Cyclin D1 protein expression in lung cancer. *Yonsei Med J* 37, 142-50.
- [67] Betticher, D.C., Heighway, J., Thatcher, N. and Hasleton, P.S. (1997) Abnormal expression of CCND1 and RB1 in resection margin epithelia of lung cancer patients. *Br J Cancer* 75, 1761-8.
- [68] Nishio, M., Koshikawa, T., Yatabe, Y., Kuroishi, T., Suyama, M., Nagatake, M., Sugiura, T., Ariyoshi, Y., Mitsudomi, T. and Takahashi, T. (1997) Prognostic significance of cyclin D1 and retinoblastoma expression in combination with p53 abnormalities in primary, resected non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 3, 1051-8.
- [69] Caputi, M., De Luca, L., Papaccio, G., A. D.A., Cavallotti, I., Scala, P., Scarano, F., Manna, M., Gualdiero, L. and De Luca, B. (1997) Prognostic role of cyclin D1 in non small cell lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Eur J Histochem* 41, 133-8.
- [70] Betticher, D.C., White, G.R., Vonlanthen, S., Liu, X., Kappeler, A., Altermatt, H.J., Thatcher, N. and Heighway, J. (1997) G1 control gene status is frequently altered in resectable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 74, 556-62.
- [71] Volm, M., Koomagi, R. and Rittgen, W. (1998) Clinical implications of cyclins, cyclin-dependent kinases, RB and B2F1 in squamous-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 79, 294-9.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- [72] Kurasono, Y., Ito, T., Kameda, Y., Nakamura, N. and Kitamura, H. (1998) Expression of cyclin D1, retinoblastoma gene protein, and p16 MTS1 protein in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. An immunohistochemical analysis. *Virchows Arch* 432, 207-15.
- [73] Tanaka, H., Fujii, Y., Hirabayashi, H., Miyoshi, S., Sakaguchi, M., Yoon, H.E. and Matsuda, H. (1998) Disruption of the RB pathway and cell-proliferative activity in non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer* 79, 111-5.
- [74] Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C., Pennacchietti, S., Nicotra, M.R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P.G., Comoglio, P.M. and Di Renzo, M.F. (1996) Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 74, 1862-8.
- [75] Harvey, P., Warn, A., Newman, P., Perry, L.J., Ball, R.Y. and Warn, R.M. (1996) Immunoreactivity for hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, met, in human lung carcinomas and malignant mesotheliomas. *J Pathol* 180, 389-94.
- [76] Takanami, I., Tanana, F., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. and Kodaira, S. (1996) Hepatocyte growth factor and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in pulmonary adenocarcinomas: an evaluation of their expression as prognostic markers. *Oncology* 53, 392-7.
- [77] Siegfried, J.M., Weissfeld, L.A., Luketich, J.D., Weyant, R.J., Gubish, C.T. and Landreneau, R.J. (1998) The clinical significance of hepatocyte growth factor for non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 66, 1915-8.
- [78] Nguyen, P.L., Niehans, G.A., Cherwitz, D.L., Kim, Y.S. and Ho, S.B. (1996) Membrane-bound (MUC1) and secretory (MUC2, MUC3, and MUC4) mucin gene expression in human lung cancer. *Tumour Biol* 17, 176-92.
- [79] Yu, C.J., Yang, P.C., Shun, C.T., Lee, Y.C., Kuo, S.H. and Luh, K.T. (1996) Overexpression of MUC5 genes is associated with early post-operative metastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 69, 457-65.
- [80] Yu, C.J., Shun, C.T., Yang, P.C., Lee, Y.C., Shew, J.Y., Kuo, S.H. and Luh, K.T. (1997) Sialomucin expression is associated with erbB-2 oncoprotein overexpression, early recurrence, and cancer death in non-small-cell lung cancer [published erratum appears in *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Aug;156(2 Pt 1):677-8]. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1419-27.
- [81] Jarrard, J.A., Linnoila, R.I., Lee, H., Steinberg, S.M., Witschi, H. and Szabo, E. (1998) MUC1 is a novel marker for the type II pneumocyte lineage during lung carcinogenesis. *Cancer Res* 58, 5582-9.
- [82] Ohgami, A., Tsuda, T., Osaki, T., Mitsudomi, T., Morimoto, Y., Higashi, T. and Yasumoto, K. (1999) MUC1 mucin mRNA expression in stage I lung adenocarcinoma and its association with early recurrence. *Ann Thorac Surg* 67, 810-4.
- [83] Bejarano, P.A., Baughman, R.P., Biddinger, P.W., Miller, M.A., Fenoglio-Preiser, C., al-Kafaji, B., Di Lauro, R. and Whitsett, J.A. (1996) Surfactant proteins and thyroid transcription factor-1 in pulmonary and breast carcinomas. *Mod Pathol* 9, 445-52.
- [84] Harlamer, H.A., Mira, J., Bejarano, P.A., Baughman, R.P., Miller, M.A., Whitsett, J.A. and Yassin, R. (1998) Thyroid transcription factor-1 and cytokeratins 7 and 20 in pulmonary and breast carcinoma. *Acta Cytol* 42, 1382-8.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- [85] Fontanini, G., Vignati, S., Lucchi, M., Mussi, A., Calcinai, A., Boldrini, L., Chine, S., Silvestri, V., Angeletti, C.A., Basolo, F. and Bevilacqua, G. (1997) Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression [see comments]. *Br J Cancer* 75, 1295-301.
- [86] Shibusa, T., Shijubo, N. and Abe, S. (1998) Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 4, 1483-7.
- [87] Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Kakolyris, S., Turley, H., O'Byrne, K., Scott, P.A., Pezzella, F., Georgoulas, V., Harris, A.L. and Gatter, K.C. (1998) Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 4, 3017-24.
- [88] Fontanini, G., Boldrini, L., Vignati, S., Chine, S., Basolo, F., Silvestri, V., Lucchi, M., Mussi, A., Angeletti, C.A. and Bevilacqua, G. (1998) Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 34, 718-23.
- [89] Takahama, M., Tsutsumi, M., Tsujiuchi, T., Kido, A., Okajima, E., Nezu, K., Tojo, T., Kushibe, K., Kitamura, S. and Konishi, Y. (1998) Frequent expression of the vascular endothelial growth factor in human non-small-cell lung cancers. *Jpn J Clin Oncol* 28, 176-81.
- [90] Sozzi, G., Miozzo, M., Tagliabue, E., Calderone, C., Lombardi, L., Pilotti, S., Pastorino, U., Pierotti, M.A. and Della Porta, G. (1991) Cytogenetic abnormalities and overexpression of receptors for growth factors in normal bronchial epithelium and tumor samples of lung cancer patients. *Cancer Res* 51, 400-4.
- [91] Volm, M., Efferth, T., Mattern, J. and Wodrich, W. (1992) Overexpression of c-fos and c-erbB1 encoded proteins in squamous cell carcinomas of the lung of smokers. *Int J Oncol* 1, 69-71 1992.
- [92] Wodrich, W. and Volm, M. (1993) Overexpression of oncoproteins in non-small cell lung carcinomas of smokers. *Carcinogenesis* 14, 1121-4.
- [93] Pastorino, U., Sozzi, G., Miozzo, M., Tagliabue, E., Pilotti, S. and Pierotti, M.A. (1993) Genetic changes in lung cancer. *J Cell Biochem Suppl* 17F, 237-48.
- [94] Gorgoulis, V., Sfikakis, P.P., Karameris, A., Papastamatiou, H., Trigidou, R., Veslemes, M., Spandidos, D.A., Sfikakis, P. and Jordanoglou, J. (1995) Molecular and immunohistochemical study of class I growth factor receptors in squamous cell lung carcinomas. *Pathol Res Pract* 191, 973-81.
- [95] Rusch, V., Klimstra, D., Linkov, I. and Dmitrovsky, E. (1995) Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 55, 1365-72.
- [96] Rusch, V.W. and Dmitrovsky, E. (1995) Molecular biologic features of non-small cell lung cancer. Clinical implications. *Chest Surg Clin N Am* 5, 39-55.
- [97] Fontanini, G., Vignati, S., Bigini, D., Mussi, A., Lucchi, H., Angeletti, C.A., Pingitore, R., Pepe, S., Basolo, F. and Bevilacqua, G. (1995) Epidermal growth factor receptor (EGFr) expression in non-small cell lung carcinomas correlates with

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes in the squamous subtype. *Eur J Cancer* 31A, 178-83.
- [98] Pflug, B. and Djakiew, D. (1996) Expression of the low affinity nerve growth factor receptor in prostate epithelial cells negatively regulates nerve growth factor-mediated growth via induction of apoptosis (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A262 1996.
- [99] Rusch, V., Klimstra, D., Venkatraman, E., Langenfeld, J., Pisters, P. and Dmitrovsky, E. (1996) Overexpression of EGFR and TGF- α is frequent in early stage non-small cell lung cancer, but does not predict tumor progression (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A1314 1996.
- [100] Fujino, S., Enokibori, T., Tezuka, N., Asada, Y., Inoue, S., Kato, H. and Mori, A. (1996) A comparison of epidermal growth factor receptor levels and other prognostic parameters in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 32A, 2070-4.
- [101] Pastorino, U., Andreola, S., Tagliabue, E., Pezzella, F., Incarbone, M., Sozzi, G., Buyse, M., Menard, S., Pierotti, M. and Rilke, F. (1997) Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 15, 2858-65.
- [102] Sekine, I., Takami, S., Guang, S.G., Yokose, T., Kodama, T., Nishiwaki, Y., Kinoshita, M., Matsumoto, H., Ogura, T. and Nagai, K. (1998) Role of epidermal growth factor receptor overexpression, K-ras point mutation and c-myc amplification in the carcinogenesis of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 5, 351-4.
- [103] Pfeiffer, P., Nexø, E., Bentzen, S.M., Clausen, P.P., Andersen, K., Rose, C. and Nex, E. (1998) Enzyme-linked immunosorbent assay of epidermal growth factor receptor in lung cancer: comparisons with immunohistochemistry, clinicopathological features and prognosis. *Br J Cancer* 78, 96-9.
- [104] D'Amico, T.A., Massey, M., Herndon, J.E., 2nd, Moore, M.B. and Harpole, D.H., Jr. (1999) A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117, 736-43.
- [105] Engel, M., Theisinger, B., Seib, T., Seitz, G., Huwer, H., Zang, K.D., Welter, C. and Dooley, S. (1993) High levels of nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA in human squamous-cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. *Int J Cancer* 55, 375-9.
- [106] Ozeki, Y., Takishima, K. and Mamiya, G. (1994) Immunohistochemical analysis of nm23/NDP kinase expression in human lung adenocarcinoma: association with tumor progression in Clara cell type. *Jpn J Cancer Res* 85, 840-6.
- [107] Lai, W.W., Wu, M.H., Yan, J.J. and Chen, F.F. (1996) Immunohistochemical analysis of nm23-H1 in stage I non-small cell lung cancer: a useful marker in prediction of metastases. *Ann Thorac Surg* 62, 1500-4.
- [108] Gazzeri, S., Brambilla, E., Negoescu, A., Thoraval, D., Veron, M., Moro, D. and Brambilla, C. (1996) Overexpression of nucleoside diphosphate/kinase A/nm23-H1 protein in human lung tumors: association with tumor progression in squamous carcinoma. *Lab Invest* 74, 158-67.
- [109] MacKinnon, M., Kerr, K.M., King, G., Kennedy, M.M., Cockburn, J.S. and Jeffrey, R.R. (1997) p53, c-erbB-2 and nm23 expression have no prognostic significance in primary pulmonary adenocarcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 11, 838-42.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- [110] Bosnar, M.H., Pavelic, K., Krizanac, S., Slobodnjak, Z. and Pavelic, J. (1997) Squamous cell lung carcinomas: the role of nm23-H1 gene. *J Mol Med* 75, 609-13.
- [111] Kawakubo, Y., Sato, Y., Koh, T., Kono, H. and Kameya, T. (1997) Expression of nm23 protein in pulmonary adenocarcinomas: inverse correlation to tumor progression. *Lung Cancer* 17, 103-13.
- [112] Ritter, J.H., Dresler, C.M. and Wick, M.R. (1995) Expression of bcl-2 protein in stage T1N0M0 non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol* 26, 1227-32.
- [113] Kitagawa, Y., Wong, F., Lo, P., Elliott, M., Verburgt, L.M., Hogg, J.C. and Daya, M. (1996) Overexpression of Bcl-2 and mutations in p53 and K-ras in resected human non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15, 45-54.
- [114] Rao, S.K., Krishna, M., Woda, B.A., Savas, L. and Fraire, A.E. (1996) Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in adenocarcinoma and non-neoplastic cellular compartments of the lung. *Mod Pathol* 9, 555-9.
- [115] Boers, J.E., ten Velde, G.P. and Thunnissen, F.B. (1996) P53 in squamous metaplasia: a marker for risk of respiratory tract carcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 411-6.
- [116] Coppola, D., Clarke, M., Landreneau, R., Weyant, R.J., Cooper, D. and Yousem, S.A. (1996) Bcl-2, p53, CD44, and CD44v6 isoform expression in neuroendocrine tumors of the lung. *Mod Pathol* 9, 484-90.
- [117] Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H. and Tateishi, R. (1996) Bcl-2 oncoprotein expression is increased especially in the portion of small cell carcinoma within the combined type of small cell lung cancer. *Tumour Biol* 17, 341-4.
- [118] Strauss, G.M. (1997) Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 11, 409-34.
- [119] Anton, R.C., Brown, R.W., Younes, M., Gondo, M.M., Stephenson, M.A. and Cagle, P.T. (1997) Absence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases. *Hum Pathol* 28, 1079-82.
- [120] Ishida, H., Irie, K., Itoh, T., Furukawa, T. and Tokunaga, O. (1997) The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer* 80, 1034-45.
- [121] Stefanaki, K., Rontogiannis, D., Vamvouka, C., Bohoti, S., Chaniotis, V., Sotsiou, F., Vlychou, M., Delidis, G., Kakolyris, S., Georgoulas, V. and Kanavaros, P. (1998) Immunohistochemical detection of bcl2, p53, mdm2 and p21/waf1 proteins in small-cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 18, 1167-73.
- [122] Brambilla, E., Gazzeri, S., Lantuejoul, S., Coll, J.L., Moro, D., Negoescu, A. and Brambilla, C. (1998) p53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax, and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin Cancer Res* 4, 1609-18.
- [123] Salgia, R. and Skarin, A.T. (1998) Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 16, 1207-17.
- [124] Kim, Y.C., Park, K.O., Kern, J.A., Park, C.S., Lim, S.C., Jang, A.S. and Yang, J.B. (1998) The interactive effect of Ras, HER2, P53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 22, 181-90.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- [125] Groeger, A.M., Caputi, M., Esposito, V., De Luca, A., Salat, A., Murabito, M., Giordano, G.G., Baldi, F., Giordano, A. and Wolner, E. (1999) Bcl-2 protein expression correlates with nodal status in non small cell lung cancer. *Anticancer Res* 19, 821-4.
- [126] Vargas, S.O., Leslie, K.O., Vacek, P.M., Socinski, M.A. and Weaver, D.L. (1998) Estrogen-receptor-related protein p29 in primary nonsmall cell lung carcinoma: pathologic and prognostic correlations. *Cancer* 82, 1495-500.
- [127] Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H. and Tateishi, R. (1994) Retinoblastoma protein expression in lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Oncology* 51, 544-51.
- [128] Xu, H.J., Quinlan, D.C., Davidson, A.G. and et.al. (1994) Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early stage non-small cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 695-699.
- [129] Lee, J.S., Kalapurakal, S., Ro, J.Y. and Hong, W.K. (1995) Prognostic significance of retinoblastoma protein expression in non- small cell lung cancer (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 36, A3787 1995.
- [130] Dixon, G., Salisbury, J. and Walker, C. (1995) Expression of the retinoblastoma protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and lung cancer (Meeting abstract). *J Pathol* 176, 32A 1995.
- [131] Shapiro, G.I., Edwards, C.D., Kobzik, L., Godleski, J., Richards, W., Sugarbaker, D.J. and Rollins, B.J. (1995) Reciprocal Rb inactivation and p16 expression in lung cancer (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 36, A164 1995.
- [132] Volm, M. and Stämmler, G. (1996) Retinoblastoma (Rb) protein expression and resistance in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 16, 891-4.
- [133] Dosaka-Akita, H., Hu, S.X., Kinoshita, I., Fujino, M., Harada, M., Kawakami, Y. and Benedict, W.F. (1996) Prognostic significance of Rb protein expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A1401 1996.
- [134] Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Akie, K., Mishina, T., Hiroumi, H. and Kawakami, Y. (1996) Significance of abnormal p16INK4 and RB protein expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 37, A3979 1996.
- [135] Kratzke, R.A., Greatens, T.M., Rubins, J.B., Maddaus, M.A., Niewoehner, D.E., Niehans, G.A. and Geradts, J. (1996) Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res* 56, 3415-20.
- [136] Sakaguchi, M., Fujii, Y., Hirabayashi, H., Yoon, H.E., Komoto, Y., Oue, T., Kusafuka, T., Okada, A. and Matsuda, H. (1996) Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 65, 442-5.
- [137] Xu, H.J., Cagle, P.T., Hu, S.X., Li, J. and Benedict, W.F. (1996) Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis. *Clin Cancer Res* 2, 1169-76 1996.
- [138] Dosaka-Akita, H., Hu, S.X., Fujino, M., Harada, M., Kinoshita, I., Xu, H.J., Kuzumaki, N., Kawakami, Y. and Benedict, W.F. (1997) Altered retinoblastoma

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- protein expression in nonsmall cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. *Cancer* 79, 1329-37.
- [139] Cagle, P.T., el-Naggar, A.K., Xu, H.J., Hu, S.X. and Benedict, W.F. (1997) Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 150, 393-400.
 - [140] Kashiwabara, K., Oyama, T., Sano, T., Fukuda, T. and Nakajima, T. (1998) Correlation between methylation status of the p16/CDKN2 gene and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers. *Int J Cancer* 79, 215-20.
 - [141] Caputi, M., Esposito, V., Groger, A.M., De Luca, A., Pacilio, C., Dekan, G., Giordano, G.G., Baldi, F., Wolner, E. and Giordano, A. (1998) RB growth control evasion in lung cancer. *Anticancer Res* 18, 2371-4.
 - [142] Tamura, A., Matsubara, O., Hirokawa, K. and Aoki, N. (1993) Detection of thrombomodulin in human lung cancer cells. *Am J Pathol* 142, 79-85.
 - [143] Tamura, A., Komatsu, H., Hebisawa, A., Kurashima, A., Mori, M. and Katayama, T. (1996) Is thrombomodulin useful as a tumor marker of a lung cancer? *Lung Cancer* 15, 189-95.
 - [144] Collins, C.L., Ordonez, N.G., Schaefer, R., Cook, C.D., Xie, S.S., Granger, J., Hsu, P.L., Fink, L. and Hsu, S.M. (1992) Thrombomodulin expression in malignant pleural mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma. *Am J Pathol* 141, 827-33.
 - [145] Hamatake, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Akazawa, K. and Sugimachi, K. (1996) Prognostic value and clinicopathological correlation of thrombomodulin in squamous cell carcinoma of the human lung. *Clin Cancer Res* 2, 763-6 1996.
 - [146] Ordonez, N.G. (1997) Value of thrombomodulin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Histopathology* 31, 25-30.
 - [147] Tolnay, E., Wiethage, T. and Muller, K.M. (1997) Expression and localization of thrombomodulin in preneoplastic bronchial lesions and in lung cancer. *Virchows Arch* 430, 209-12.
 - [148] Bohm, M., Totzeck, B. and Wieland, I. (1994) Differences of E-cadherin expression levels and patterns in human lung cancer. *Ann Hematol* 68, 81-3.
 - [149] Bohm, M., Totzeck, B., Birchmeier, W. and Wieland, I. (1994) Differences of E-cadherin expression levels and patterns in primary and metastatic human lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 12, 55-62.
 - [150] Peralta Soler, A., Knudsen, K.A., Jaurand, M.C., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., Klein-Szanto, A.J. and Salazar, H. (1995) The differential expression of N-cadherin and E-cadherin distinguishes pleural mesotheliomas from lung adenocarcinomas [see comments]. *Hum Pathol* 26, 1363-9.
 - [151] Han, A.C., Peralta-Soler, A., Knudsen, K.A., Wheelock, M.J., Johnson, K.R. and Salazar, H. (1997) Differential expression of N-cadherin in pleural mesotheliomas and E-cadherin in lung adenocarcinomas in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues [see comments]. *Hum Pathol* 28, 641-5.
 - [152] Weynants, P., Lethe, B., Brasseur, F., Marchand, M. and Boon, T. (1994) Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 56, 826-9.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- [153] Shichijo, S., Hayashi, A., Takamori, S., Tsunosue, R., Hoshino, T., Sakata, M., Kuramoto, T., Oizumi, K. and Itoh, K. (1995) Detection of MAGE-4 protein in lung cancers. *Int J Cancer* 64, 158-65.
- [154] Sakata, M. (1996) Expression of MAGE gene family in lung cancers. *Kurume Med J* 43, 55-61.
- [155] Fischer, C., Gudat, F., Stulz, P., Noppen, C., Schaefer, C., Zajac, P., Trutmann, M., Kocher, T., Zuber, M., Harder, F., Heberer, M. and Spagnoli, G.C. (1997) High expression of MAGE-3 protein in squamous-cell lung carcinoma [letter]. *Int J Cancer* 71, 1119-21.
- [156] Gotoh, K., Yatabe, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Ogawa, M., Takahashi, T. and Mitsudomi, T. (1998) Frequency of MAGE-3 gene expression in HLA-A2 positive patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 20, 117-25.
- [157] Uchiyama, B., Saijo, Y., Kumano, N., Abe, T., Fujimura, S., Ohkuda, K., Handa, M., Satoh, K. and Nukiwa, T. (1997) Expression of nucleolar protein p120 in human lung cancer: difference in histological types as a marker for proliferation. *Clin Cancer Res* 3, 1873-7.
- [158] Singh, G., Scheithauer, B.W. and Katyal, S.L. (1986) The pathobiologic features of carcinomas of type II pneumocytes. An immunocytologic study. *Cancer* 57, 994-9.
- [159] Mizutani, Y., Nakajima, T., Morinaga, S., Gotoh, M., Shimosato, Y., Akino, T. and Suzuki, A. (1988) Immunohistochemical localization of pulmonary surfactant apoproteins in various lung tumors. Special reference to nonmucus producing lung adenocarcinomas. *Cancer* 61, 532-7.
- [160] Noguchi, M., Nakajima, T., Hirohashi, S., Akiba, T. and Shimosato, Y. (1989) Immunohistochemical distinction of malignant mesothelioma from pulmonary adenocarcinoma with anti-surfactant apoprotein, anti-Lewis, and anti-Tn antibodies. *Hum Pathol* 20, 53-7.
- [161] Linnoila, R.I., Jensen, S.M., Steinberg, S.M., Mulshine, J.L., Eggleston, J.C. and Gazdar, A.F. (1992) Peripheral airway cell marker expression in non-small cell lung carcinoma. Association with distinct clinicopathologic features [see comments]. *Am J Clin Pathol* 97, 233-43.
- [162] Shijubo, N., Tsutahara, S., Hirasawa, M., Takahashi, H., Honda, Y., Suzuki, A., Kuroki, Y. and Akino, T. (1992) Pulmonary surfactant protein A in pleural effusions. *Cancer* 69, 2905-9.
- [163] Shijubo, N., Honda, Y., Fujishima, T., Takahashi, H., Kodama, T., Kuroki, Y., Akino, T. and Abe, S. (1995) Lung surfactant protein-A and carcinoembryonic antigen in pleural effusions due to lung adenocarcinoma and malignant mesothelioma. *Eur Respir J* 8, 403-6.
- [164] Nicholson, A.G., McCormick, C.J., Shimosato, Y., Butcher, D.N. and Sheppard, M.N. (1995) The value of PE-10, a monoclonal antibody against pulmonary surfactant, in distinguishing primary and metastatic lung tumours. *Histopathology* 27, 57-60.
- [165] Khor, A., Whitsett, J.A., Stahlman, M.T. and Halter, S.A. (1997) Expression of surfactant protein B precursor and surfactant protein B mRNA in adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol* 10, 62-7.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

- [166] Saitoh, H., Shimura, S., Fushimi, T., Okayama, H. and Shirato, K. (1997) Detection of surfactant protein-A gene transcript in the cells from pleural effusion for the diagnosis of lung adenocarcinoma. *Am J Med* 103, 400-4.
- [167] Grohs *et al.*, *Acta Cytologica*, 1996, 40(1):26-30.
- [168] Grohs *et al.*, *Acta Cytologica*, 1997, 41(1):144-152.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A panel for detecting a generic disease state or discriminating between specific disease states using cell-based diagnosis, comprising a plurality of probes each of which specifically binds to a marker associated with a generic or specific disease state, wherein the pattern of binding of the component probes of the panel to cells in a cytology specimen is diagnostic of the presence or specific nature of said disease state.
2. The panel of claim 1, wherein said generic disease state is selected from the group consisting of cancer and infectious diseases.
3. The panel of claim 2, wherein said cancer is selected from the group consisting of epithelial cell-based cancers, solid tumor-based cancers, secretory tumor based cancers, and blood based cancers.
4. The panel of claim 2 wherein said infectious disease is selected from the group consisting of cell-based diseases in which the infectious organism is a virus, bacterium, protozoan, parasite, or fungus.
5. The panel of claim 1, wherein said panel is optimized by using weighting factors selected from the group consisting of cost, prevalence of a generic disease state in a geographic location, prevalence of a specific disease state in a geographic location, availability of probes and commercial considerations.
6. The panel of claim 1, wherein each of said probes comprises a detectable label.
7. The panel of claim 6, wherein said probes comprise antibodies.
8. The panel of claim 6, wherein said label is selected from the group consisting of a chromophore, a fluorophore, a dye, a radioisotope and an enzyme.
9. The panel of claim 8, wherein said label is a chromophore detected using electromagnetic radiation selected from the group consisting of beta rays, gamma rays, X rays, ultraviolet radiation, visible light, infrared radiation and microwaves.
10. The panel of claim 1, wherein said pattern of binding is detected using photonic microscopy.
11. The panel of claim 10, wherein said photonic microscopy utilizes at least one electromagnetic radiation selected from the group consisting of gamma rays, X rays, beta rays, ultraviolet radiation, visible light, infrared radiation and microwaves.
12. The panel of claim 3, wherein said detecting is for lung cancer and said discriminating is between squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, large cell carcinoma, small cell carcinoma and mesothelioma.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

13. The panel of claim 1, wherein said detecting is for sexually transmitted diseases and said discriminating is between chlamydia, trichomonas, gonorrhea, herpes and syphilis.
14. A method of forming a panel for detecting a disease state or discriminating between disease states in a patient using cell-based diagnosis, comprising:
- (a) determining the sensitivity and specificity of binding of probes each of which specifically binds to a member of a library of markers associated with a disease state; and
 - (b) selecting a limited plurality of said probes whose pattern of binding is diagnostic for the presence or specific nature of said disease state.
15. The method of claim 14, wherein said determining comprises:
- (a) separately contacting a histological or cytological sample from a patient known to be suffering from said disease and a histological or cytological sample from a patient known not to be suffering from said disease with each of said probes;
 - (b) measuring the amount of specific binding of each probe with its complementary disease marker at loci where said marker is known to be present in cells of said samples; and
 - (c) correlating each said amount with the presence or specific nature of said disease.
16. The method of claim 14, wherein said selecting comprises one or more of statistical analytical methods, pattern recognition methods and neural network analysis.
17. The method of claim 14, where said selecting comprises the use of weighting factors.
18. A method of detecting a disease or discriminating between disease states comprising :
- (a) contacting a cytological sample suspected of containing abnormal cells characteristic of a disease state with a panel according to claim 1; and
 - (b) detecting a pattern of binding of said probes that is diagnostic for the presence or specific nature of said disease state.
19. The method of claim 18, wherein said cytological sample is a cellular sample collected from a body fluid, an epithelial cell-based organ system, a fine needle aspiration or a biopsy.
20. The method of claim 19, wherein said cytological sample is sputum.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

21. A panel for detecting a generic disease state or discriminating between specific disease states using cell-based diagnosis, wherein said panel is formed according to the method of claim 14.
22. The panel of claim 21, wherein said disease state is lung cancer.
23. The panel of claim 1, wherein said disease marker is selected from the group consisting of a morphologic biomarker, a genetic biomarker, a cell cycle biomarker, a molecular biomarker and a biochemical biomarker.
24. The panel of claim 3, wherein said epithelial cell-based cancer is from the pulmonary, urinary, gastrointestinal or genital tract.
25. The panel of claim 3, wherein said solid tumor-based cancer is selected from the group consisting of a sarcoma, breast cancer, pancreatic cancer, liver cancer, kidney cancer, thyroid cancer, and prostate cancer.
26. The panel of claim 3, wherein said secretory tumor-based cancer is selected from the group consisting of a sarcoma, breast cancer, pancreatic cancer, liver cancer, kidney cancer, thyroid cancer, and prostate cancer.
27. The panel of claim 3, wherein said blood-based cancer is selected from the group consisting of leukemia and lymphoma.
28. The panel of claim 24, wherein said disease state is lung cancer and said probes bind to markers selected from the group consisting of Glut1, HERA, FGF, telomerase, PCNA, CD44v6, cyclin A, HGF, MUC-1, thyroid transcription factor, VEGF, EGF receptor, PCNA, nm23, E-cadherin, Bcl-2, cyclin D1, RB, N-Cadherin, thrombomodulin and functional equivalents thereof.
29. The method of claim 19, wherein said body fluid is selected from the group consisting of blood, urine, spinal fluid and lymph.
30. The method of claim 19, wherein said epithelial cell based organ system is selected from the group consisting of the pulmonary tract, the urinary tract, the genital tract and the gastrointestinal tract.
31. The method of claim 19, wherein said final needle aspiration is from solid tissue types in organs and systems.
32. The method of claim 19, wherein said biopsy is from solid tissue types in organs and systems.
33. The method of claim 31 or 32, wherein said organs and systems are selected from the group consisting of breast, pancreas, liver, kidney, thyroid, bone marrow, muscle, prostate and lung.

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

34. The panel of claim 23, wherein said morphologic biomarker is selected from the group consisting of DNA ploidy, MACs, and premalignant lesions.
35. The panel of claim 23, wherein said genetic biomarker is selected from the group consisting of DNA adducts, DNA mutations and apoptotic indices.
36. The panel of claim 23, wherein said cell cycle biomarker is selected from the group consisting of cellular proliferation markers, differentiation markers, regulatory molecules and apoptosis markers.
37. The panel of claim 23, wherein said molecular biomarker or biochemical biomarker is selected from the group consisting of oncogenes, tumor suppressor genes, tumor antigens, growth factors and receptors, enzymes, proteins, prostaglandins and adhesion molecules.
38. The panel of claim 24, wherein said pulmonary cancer is lung cancer.
39. The panel of claim 38 for detecting lung cancer wherein said plurality of probes comprises a probe that binds to cyclin A, or a correlate marker or functionally related marker thereof.
40. The panel of claim 39, wherein said plurality of probes further comprises one or more probes that bind to SP-B, HERA or ER-related (p29), or correlate markers or functionally related markers thereof.
41. The panel of claim 38 for discriminating adenocarcinoma among other types of lung cancers wherein said plurality of probes comprises a probe that binds to Mucin 1 and thyroid transcription factor 1, or correlate markers or functionally related markers thereof.
42. The panel of claim 41, wherein said plurality of probes further comprises one or more probes that bind to VEGF, SP-A, BCL-2, ER-related (p29) and Glut 3, or correlate markers or functionally related markers thereof.
43. The panel of claim 38 for discriminating squamous cell carcinoma among other types of lung cancers wherein said plurality of probes comprises a probe that binds to one or both of CD44v6 and ER-related (p29), or a correlate marker or functionally related marker thereof.
44. The panel of claim 43, wherein said plurality of probes further comprises one or more probes that bind to VEGF, thrombomodulin, Glut 1 and MAGE 3, or correlate markers or functionally related markers thereof.
45. The panel of claim 38 for discriminating large cell carcinoma among other types of lung cancers wherein said plurality of probes comprises a probe that binds to

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

one or more probes that bind to VEGF, cyclin A and P120, or correlate markers or functionally related markers thereof.

46. The panel of claim 38 for discriminating mesothelioma among other types of lung cancers wherein said plurality of probes comprises a probe that binds to one or more probes that bind to CD44v6, PCNA and HERA, or correlate markers or functionally related markers thereof.

47. The panel of claim 38 for discriminating small cell carcinoma among other types of lung cancers wherein said plurality of probes comprises a probe that binds to one or more probes that bind to PCNA, BCL-2 and EGFR, or correlate markers or functionally related markers thereof.

1/19

TUMOR TYPE				
SQUAMOUS CELL CARCINOMA	ADENOCARCINOMA	LARGE CELL CARCINOMA	SMALL CELL CARCINOMA	MESOTHELIOMA
Marker (%)	Marker (%)	Marker (%)	Marker (%)	Marker (%)
Glut1 100.0	MOC-31 100.0	VEGF 100.0	MOC-31 100.0	HGF 100.0
MOC-31 100.0	MUC-1 90.0	MUC-1 100.0	FGF 100.0	N-Cadherin 94.0
FGF 83.0	Telomerase 86.3	HGF 100.0	MUC-1 100.0	Thrombospondin 81.0
Telomerase 82.3	HGF 78.3	EGF Receptor 96.0	E-Cadherin 100.0	
PCNA 80.0	Thyroid 76.0	Telomerase 93.0	Cyclin A 97.0	
CD44v6 79.3	Transcription Factor 87.7	PCNA 83.5	Bcl-2 92.0	
Cyclin A 79.0		Cyclin A 83.5	Cyclin D1 90.0	
HGF 75.5		mm22-H1 85.3	Rb (loss) 85.3	
		Glut1 80.5	Thyroid Transcription Factor 83.0	

Fig.1

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

2/19

MARKER	SQ/AD	SQ/LC	SQ/SC	SQ/ME	AD/LC	AD/SC	AD/ME	LC/SC	LC/ME	SC/ME
N-Cadherin				22.22	.04		22.22			22.22
Moc-31						0.49		0.50		
FGF										
MAGE-3	2.16		2.15							
Thrombomodulin	5.64	17.20	688.00				0.15		0.05	0.00
VEGF								2.30		
MAGE-4	4.14					0.22				
Cyclin D1			0.47			0.40				
Thyroid Transcription Factor	0.50		0.46							
Glut3		0.44			0.41			4.39		
CD44v6	2.28		793.00	690.00		348.00	850.00	442.00		
E-Cadherin										
Nucleolar Protein		2.27						0.00		
P120										
EGF Receptor					0.47					
Bcl-2			0.5			0.47		0.46		
MAGE-1			2.73			2.12				
Rb (Decreased)			0.24			0.31		0.42		
Pulmonary Surfactant B	0.001				615.00					
Pulmonary Surfactant A	0.23				3.02	2.65	529			

Fig.2

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

3/19

KEY:--

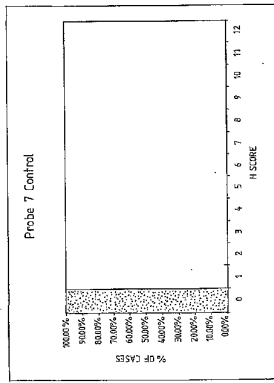


Fig.3a

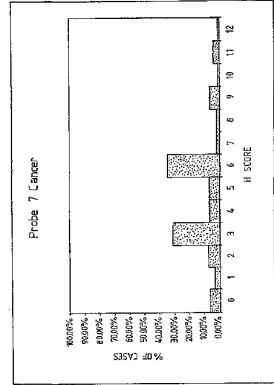


Fig.3b

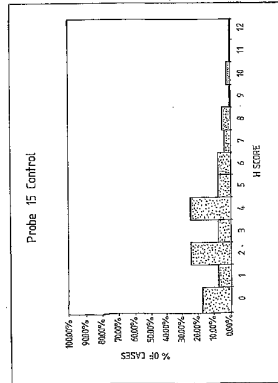


Fig.3c

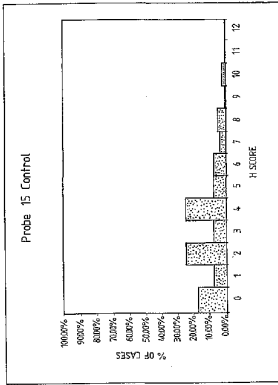


Fig.3d

4/19

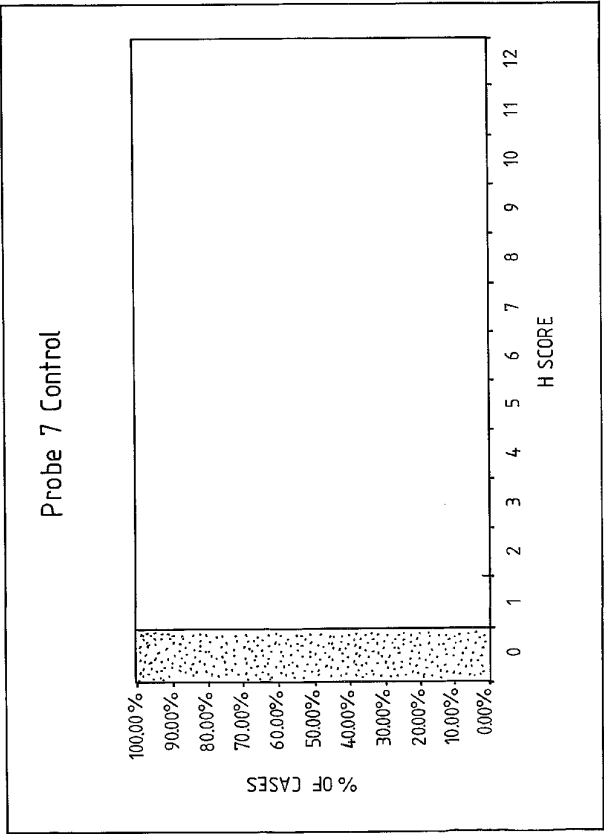


Fig.3a

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

5/19

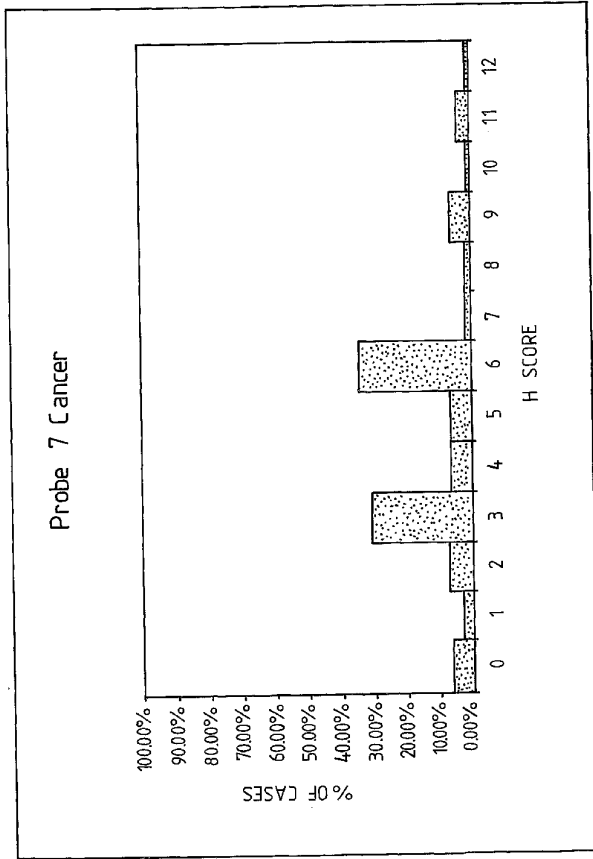


Fig.3b

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

6/19

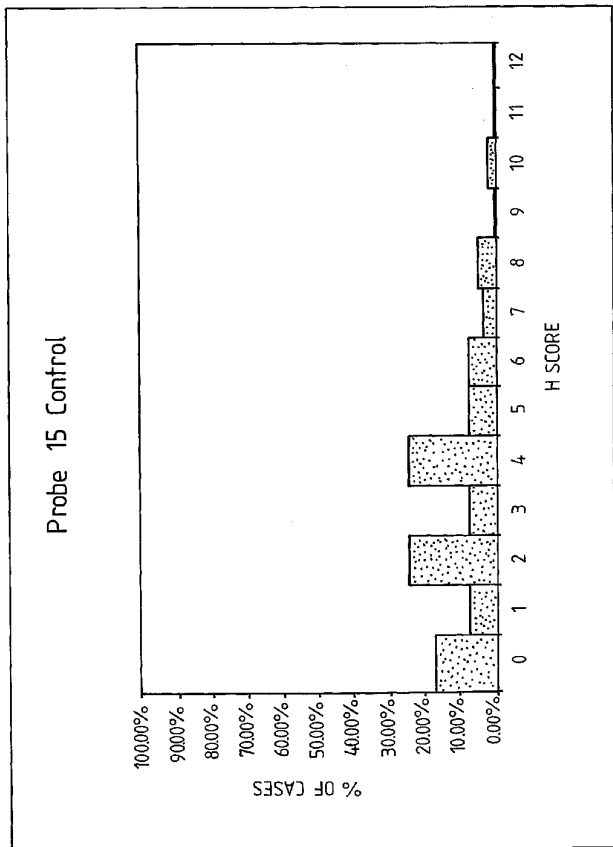


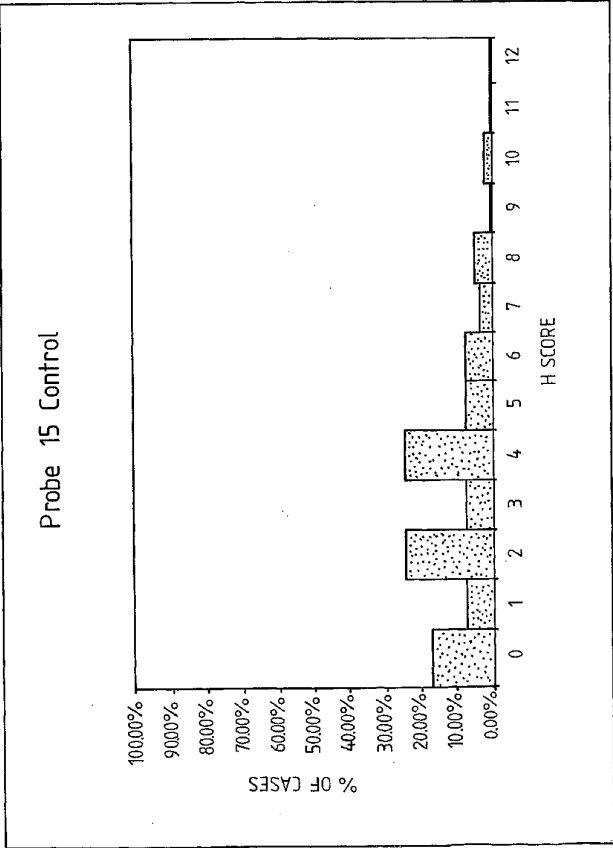
Fig.3c

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

7/19

Fig.3d



WO 02/073204

PCT/GB02/01125

8/19

KEY:-

Fig. 4a

Fig. 4b

Fig. 4c

Fig. 4d

KEY:-

Fig. 4e

Fig. 4f

Fig. 4g

Fig. 4h

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

9/19

Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	Probe5	Probe6
Probe1	1.0000	0.1779	0.0395	0.0999	0.1801
Probe2	0.1779	1.0000	0.4198	0.1565	0.4013
Probe3	0.0395	0.4198	1.0000	0.0301	0.2522
Probe4	0.0999	0.1565	0.0301	1.0000	0.2850
Probe5	0.1801	0.4013	0.2522	0.2850	1.0000
Probe6	0.0623	0.0638	0.1095	0.1753	0.2578
Probe7	0.4823	0.2315	0.1796	0.2192	0.2976
Probe8	0.1831	0.3182	0.0570	0.1065	0.3280
Probe9	0.1457	0.2969	0.0872	0.1521	0.2118
Probe10	0.2539	0.1833	0.2098	0.2789	0.2820
Probe11	0.1736	0.0132	0.1688	0.1493	0.0851
Probe12	0.3519	0.2378	0.1429	0.0748	0.3086
Probe13	0.2328	0.1513	0.1081	0.1230	0.2824
Probe14	0.1534	0.1727	0.0825	0.4242	0.3040
Probe15	0.2046	0.2540	0.0204	0.3179	0.2813
Probe16	0.0215	0.3376	0.1830	0.1988	0.3201
Probe17	0.3879	0.3683	0.0350	0.0605	0.2388
Probe18	0.0505	0.1805	0.0782	0.0134	0.0213
Probe19	0.1965	0.4001	0.0978	0.3328	0.3312
Probe20	0.0992	0.1381	0.1918	0.1354	0.1115
Probe21	0.1413	0.0903	0.0435	0.0973	0.1225
Probe22	0.0218	0.1342	0.1848	0.1347	0.0048
Probe23	0.0288	0.2365	0.3893	0.1038	0.1824
Probe24	0.1984	0.4013	0.2080	0.1888	0.3929
Probe25	0.1111	0.1380	0.2879	0.1537	0.0127
Probe26	0.2381	0.2848	0.1373	0.1893	0.3398
Probe27	0.2933	0.1562	0.1082	0.0569	0.2858
Probe28	0.4788	0.3943	0.0115	0.1814	0.3215

Fig.4a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

10/19

Probe7	Probe8	Probe9	Probe10	Probe11	Probe12	Probe13
0.4623	0.1631	0.1457	0.2539	0.1736	0.3518	0.2328
0.2335	0.3182	0.2986	0.1833	0.0132	0.2378	0.1513
0.1786	0.0570	0.0972	0.2068	0.1686	0.1429	0.1081
0.2192	0.1065	0.1521	0.2769	0.1483	0.0748	0.1230
0.2978	0.3280	0.2118	0.2820	0.0851	0.3066	0.2624
0.2008	0.2136	0.0321	0.2776	0.0801	0.0154	0.0915
1.0000	0.2806	0.1539	0.6685	0.0776	0.1289	0.3482
0.2606	1.0000	0.1052	0.2115	0.0340	0.3621	0.1781
0.1538	0.1052	1.0000	0.0902	0.0398	0.1284	0.1320
0.6885	0.2115	0.0902	1.0000	0.1061	0.0125	0.2284
0.0776	0.0340	0.0398	0.1061	1.0000	0.2161	0.0683
0.1289	0.3621	0.1284	0.0125	0.2161	1.0000	0.0732
0.3482	0.1781	0.1320	0.2284	0.0683	0.0732	1.0000
0.3381	0.0018	0.1302	0.4478	0.0954	0.0401	0.0135
0.4764	0.0740	0.1909	0.4497	0.1365	0.0332	0.1213
0.2443	0.2754	0.1547	0.4278	0.1866	0.0993	0.0920
0.3418	0.2033	0.2371	0.2415	0.0090	0.2253	0.0696
0.0081	0.0078	0.0464	0.0605	0.0503	0.0194	0.0124
0.3644	0.0606	0.2852	0.2761	0.0859	0.1203	0.1529
0.3287	0.0179	0.0472	0.3647	0.0187	0.2025	0.0627
0.1501	0.1983	0.0043	0.2229	0.0070	0.0590	0.0721
0.3096	0.0362	0.0696	0.4124	0.1615	0.1768	0.0688
0.3208	0.1104	0.0336	0.4128	0.1883	0.3684	0.1438
0.2123	0.1906	0.3356	0.1019	0.0220	0.2905	0.1126
0.2781	0.0523	0.1009	0.4490	0.1630	0.3176	0.0240
0.3889	0.1280	0.2850	0.1260	0.1552	0.1445	0.5168
0.1129	0.1126	0.2188	0.1288	0.0181	0.2647	0.2082
0.6565	0.2306	0.2031	0.4539	0.0410	0.3008	0.1543

Fig.4b

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

11/19

Probe14	Probe15	Probe16	Probe17	Probe18	Probe19	Probe20
0.1534	0.2046	0.0215	0.3879	0.0505	0.1965	0.0592
0.1727	0.2540	0.3176	0.3683	0.1805	0.4001	0.1381
0.0225	0.0204	0.1630	0.0350	0.0762	0.0878	0.1918
0.4242	0.3178	0.1888	0.0605	0.0134	0.3328	0.1384
0.3040	0.2913	0.3201	0.2386	0.0213	0.3312	0.1115
0.3715	0.2520	0.4533	0.0130	0.0392	0.2544	0.0709
0.3381	0.4784	0.2443	0.3419	0.0061	0.3844	0.3287
0.0016	0.0740	0.2754	0.2033	0.0079	0.0806	0.0179
0.1302	0.1908	0.1547	0.2371	0.0464	0.2852	0.0472
0.4478	0.4497	0.4276	0.2415	0.0605	0.2761	0.3847
0.0984	0.1365	0.1866	0.0090	0.0503	0.0859	0.0187
0.0401	0.0332	0.0883	0.2253	0.0194	0.1203	0.2025
0.0135	0.1213	0.0920	0.0886	0.0124	0.1529	0.0527
1.0000	0.3673	0.5053	0.1421	0.0126	0.4228	0.1196
0.3873	1.0000	0.3107	0.1931	0.0028	0.5108	0.1736
0.5053	0.3107	1.0000	0.2431	0.0327	0.4975	0.1254
0.1421	0.1931	0.2431	1.0000	0.0112	0.2829	0.0296
0.0126	0.0028	0.0327	0.0112	1.0000	0.0172	0.0148
0.4228	0.5108	0.4975	0.2829	0.0172	1.0000	0.0819
0.1196	0.1736	0.1254	0.0296	0.0149	0.0819	1.0000
0.0885	0.1002	0.0439	0.0417	0.0385	0.0705	0.2530
0.1285	0.1039	0.0268	0.1121	0.0338	0.1753	0.4817
0.2398	0.1748	0.0357	0.0051	0.0678	0.0323	0.4501
0.0678	0.2040	0.1052	0.1678	0.1235	0.2631	0.1017
0.2206	0.2219	0.2159	0.0556	0.0424	0.1528	0.3846
0.0353	0.1515	0.1133	0.1455	0.0508	0.2181	0.0633
0.0465	0.0407	0.1531	0.2242	0.0630	0.1851	0.1561
0.2402	0.3787	0.2658	0.4926	0.0357	0.4089	0.1296

Fig.4c

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

12/19

Probe21	Probe22	Probe23	Probe24	Probe25	Probe26	Probe27	Probe28
0.1413	0.0218	0.0288	0.1984	0.1111	0.2381	0.2933	0.4785
0.0903	0.1342	0.2365	0.4013	0.1360	0.2688	0.1562	0.3943
0.0435	0.1646	0.3883	0.2090	0.2879	0.1373	0.1062	0.0115
0.0873	0.1347	0.1038	0.1888	0.1537	0.1893	0.0569	0.1614
0.1225	0.0046	0.1824	0.3829	0.0127	0.3396	0.2858	0.3215
0.0472	0.0475	0.0123	0.0593	0.0747	0.0814	0.0558	0.1180
0.1501	0.3068	0.3206	0.2123	0.2761	0.3889	0.1129	0.6565
0.1983	0.0382	0.1104	0.1806	0.0523	0.1280	0.1125	0.2308
0.0043	0.0896	0.0336	0.3356	0.1008	0.2850	0.2166	0.2031
0.2228	0.4124	0.4128	0.1018	0.4480	0.1260	0.1295	0.4538
0.0070	0.1615	0.1888	0.0220	0.1630	0.1952	0.0181	0.0410
0.0590	0.1766	0.3684	0.2905	0.3176	0.1445	0.2647	0.3006
0.0721	0.0888	0.1438	0.1126	0.0240	0.5189	0.2062	0.1543
0.0685	0.1285	0.2388	0.0878	0.2206	0.0359	0.0465	0.2402
0.1002	0.1039	0.1749	0.2040	0.2219	0.1515	0.0407	0.3787
0.0439	0.0266	0.0357	0.1052	0.2158	0.1133	0.1531	0.2858
0.0417	0.1121	0.0051	0.1678	0.0558	0.1455	0.2242	0.4928
0.0385	0.0338	0.0678	0.1235	0.0424	0.0506	0.0430	0.0357
0.0705	0.1753	0.0323	0.2631	0.1528	0.2181	0.1851	0.4098
0.2530	0.4817	0.4501	0.1017	0.3848	0.0638	0.1551	0.1296
1.0000	0.3405	0.1840	0.0620	0.1804	0.0286	0.0128	0.0051
0.3405	1.0000	0.4867	0.0489	0.3583	0.0126	0.0783	0.0737
0.1840	0.4867	1.0000	0.1650	0.4888	0.0640	0.0965	0.0088
0.0620	0.0468	0.1850	1.0000	0.0983	0.2728	0.3146	0.1894
0.1804	0.3583	0.4988	0.0983	1.0000	0.0681	0.0033	0.1365
0.0298	0.0126	0.0640	0.2728	0.0681	1.0000	0.1923	0.2797
0.0128	0.0783	0.0995	0.3146	0.0033	0.1923	1.0000	0.1372
0.0051	0.0737	0.0088	0.1994	0.1365	0.2797	0.1372	1.0000

Fig.4d

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

13/
19

	Probe1	Probe2	Probe3	Probe4	Probe5	Probe6
Probe1	TRUE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe2	FALSE	TRUE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe3	FALSE	FALSE	TRUE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe4	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE	FALSE	FALSE
Probe5	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE	FALSE
Probe6	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	TRUE
Probe7	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe8	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe9	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe10	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe11	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe12	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe13	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe14	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe15	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe16	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe17	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe18	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe19	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe20	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe21	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe22	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe23	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe24	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe25	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe26	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe27	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
Probe28	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE

Fig.4e

Fig. 4f

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 4g

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 4h

[illegible]

WO 02/073204

PCT/GB02/01125

17/19

Panel	Classifier	Test Pairs	P R O B E																												Area Under ROC
			1	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	
Detection	Decision Trees	Cancer vs control																													NA
	Stepwise LR	Cancer vs control																													96.51
	Stepwise LD	Cancer vs control																													99.89%
	Common Priors (p=2)																														
Single Lung Cancer-Type Specific Discrimination Against All Other Lung Cancer-Type Specific (Pair-wise Pairs)	Decision Trees	Adeno vs others																													NA
	Stepwise LR	Adeno vs others																													92.90%
	Stepwise LD	Adeno vs others																													95.90%
	Common Priors (p=2)																														
	Decision Trees	Squamous vs others																													NA
	Stepwise LR	Squamous vs others																													85.19%
	Stepwise LD	Squamous vs others																													85.19%
	Common Priors (p=2)																														95.90%
	Decision Trees	Large Cell vs others																													NA
	Stepwise LR	Large Cell vs others																													91.80%
	Stepwise LD	Large Cell vs others																													75.20%
Single Lung Cancer-Type Specific Discrimination Against All Other Lung Cancer-Type Specific (Pair-wise Pairs)	Decision Trees	Small Cell vs others																													NA
	Stepwise LR	Small Cell vs others																													90.73%
	Stepwise LD	Small Cell vs others																													99.20%
	Common Priors (p=2)																														
	Decision Trees	Mesothelioma																													NA
	Stepwise LR	Mesothelioma																													90.73%
	Stepwise LD	Mesothelioma																													99.20%
	Common Priors (p=2)																														
	Decision Trees	Small Cell vs others																													NA
	Stepwise LR	Small Cell vs others																													98.19%
	Stepwise LD	Small Cell vs others																													93.90%
Joint Discrimination	Decision Trees	All simultaneously																													NA
	Stepwise LR	All simultaneously																													
	Stepwise LD	All simultaneously																													

Fig.5

Panel	Classifier	Test Pairs	P R O B E																											
			1	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
Detection	Decision Trees	Cancer vs control																												
	Stepwise LR	Cancer vs control																												
	Stepwise LD	Cancer vs control																												
	Common Probes ($p \leq 2$)																													

Fig.6

19/19

Panel	Classifier	Test Pairs	P R O B E																											
			1	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
Detection	Decision Trees	Cancer vs control																												
	Stepwise LR	Cancer vs control																												
	Stepwise LP	Cancer vs control																												
	Common Probes (p=2)																													

Fig.7

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/073204 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/569, 33/574, 33/571
- (21) International Application Number: PCT/GB02/01125
- (22) International Filing Date: 12 March 2002 (12.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/274,638 12 March 2001 (12.03.2001) US
- (71) Applicant: MONOGEN, INC [US/US]; 1033 Butterfield Road, Vernon Hills, IL 60061-1360 (US).
- (71) Applicant (for BB, MG only): MCCALL, John, Douglas [GB/GB]; 25 Haddon Drive, Pensby, Wirral CH61 8TF (GB).
- (72) Inventors: PRESSMAN, Norman, J.; 390 Greenwood Avenue, Glencoe, IL 60022 (US); HIRSCH, Kenneth, S.; 807 Portman Drive, Redwood City, CA 94065 (US).
- (74) Agent: W.P. THOMPSON & CO.; Coopers Building, Church Street, Liverpool L1 3AB (GB).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 30 October 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/073204 A3

(54) Title: CELL-BASED DETECTION AND DIFFERENTIATION OF DISEASE STATES

(57) Abstract: The present invention provides a method for detecting and differentiating disease states with high sensitivity and specificity. The method allows for a determination of whether a cell-based sample contains abnormal cells and, for certain diseases, is capable of determining the histologic type of disease present. The method detects changes in the level and pattern of expression of the molecular markers in the cell-based sample. Panel selection and validation procedures are also provided.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/01125
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/569 G01N33/574 G01N33/571		
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) IPC 7 G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 87 06620 A (MUREX CORP) 5 November 1987 (1987-11-05) the whole document	1,2,4-8, 13
X	US 5 731 162 A (ARCIONI LAURA ET AL) 24 March 1998 (1998-03-24) the whole document	1,2,4-8, 13
X	WO 94 24560 A (INT MUREX TECH CORP ;DUNCAN RICHARD JULIAN STUART (GB); BECKFORD U) 27 October 1994 (1994-10-27) abstract, p. 22, lines 26 - 36, p. 27, lines 13 - 24, Examples, claims 1, 8, 9 --- -/-	1,2,4-8, 14,21,23
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 March 2003		Date of mailing of the international search report 07.05.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentian 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 540-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 540-3016		Authorized officer Hoesel, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Application No.
 PCT/GB 02/01125

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02 08764 A (MEDICAL RES COUNCIL ;DOORBAR JOHN (GB)) 31 January 2002 (2002-01-31) claims 1, 2, 4, 6, 13, 15, 20	1-11, 18, 19, 21-24, 28, 30, 32, 36-39, 46, 47
X	WO 98 28622 A (FODSTAD OEYSTEIN ;HOEIFOEDT HANNE KLEPPE (NO)) 2 July 1998 (1998-07-02) p. 10 - 13, p. 15, lines 3 - 33, examples, Table I, claims 1 - 12	1-11, 14-19, 21-26, 28-33, 41, 45-47
X	LOZANO MARIA D ET AL: "Immunocytochemistry in the differential diagnosis of serous effusions: A comparative evaluation of eight monoclonal antibodies in Papanicolaou stained smears." CANCER, vol. 93, no. 1, 25 February 2001 (2001-02-25), pages 68-72, XP009002477 ISSN: 0008-543X abstract, p. 69, col. 1, lines 14 - 22, tables 1 and 2, Discussion	1-3, 5, 12, 14-19, 21-24, 30-33, 37, 38
X	US 5 997 866 A (SOLER ALEJANDRO PERALTA ET AL) 7 December 1999 (1999-12-07) Examples 1 - 3, claims 1 - 15	1-3, 6-12, 14, 15, 18, 19, 21-24, 28, 30, 32, 33
Y		20
Y	TUCKMAN M S ET AL: "SENSITIVE AND SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY RECOGNITION OF HUMAN LUNG CANCER ANTIGEN ON PRESERVED SPUTUM CELLS: A NEW APPROACH TO EARLY LUNG CANCER DETECTION" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 6, no. 11, 1 November 1988 (1988-11-01), pages 1685-1693, XP000614978 abstract	20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

Int'l Application No.
PCT/GB 02/01125

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRISMAN DENNIS M ET AL: "Methods in pathology: Immunocytochemistry in the differential diagnosis of effusions: Use of logistic regression to select a panel of antibodies to distinguish adenocarcinomas from mesothelial proliferations." MODERN PATHOLOGY, vol. 6, no. 2, 1993, pages 179-184, XP009002474 ISSN: 0893-3952 the whole document	1-3, 5, 12, 14-19, 21-24, 30-33, 37, 38
X	LEERS M P G ET AL: "E-cadherin and calretinin: A useful combination of immunochemical markers for differentiation between mesothelioma and metastatic adenocarcinoma." HISTOPATHOLOGY (OXFORD), vol. 32, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 209-216, XP00224146 ISSN: 0309-0167 abstract, Materials and Methods, Discussion	1-3, 5, 14-19, 21-24, 28, 30-33, 36-38
X	SKOV B G ET AL: "Differentiation of adenocarcinoma of the lung and malignant mesothelioma: Predictive value and reproducibility of immunoreactive antibodies." HISTOPATHOLOGY (OXFORD), vol. 25, no. 5, 1994, pages 431-437, XP009002475 ISSN: 0309-0167 the whole document	1-3, 5, 14-19, 21-24, 30-33, 37, 38
Y		20
Y	NEFT R E ET AL: "CONCURRENT FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY FOR THE DETECTION OF CHROMOSOME ABERRATIONS IN EXFOLIATED BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS" ACTA CYTOLOGICA, INTERNATIONAL ACADEMY OF CYTOLOGY, CHICAGO, IL., US, vol. 41, no. 6, 1997, pages 1769-1773, XP000961317 ISSN: 0001-5547 abstract	20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/01125
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	GONZALEZ-LOIS C ET AL: "Combined use of novel epithelial (MOC-31) and mesothelial (HBME-1) immunohistochemical markers for optimal first line diagnostic distinction between mesothelioma and metastatic carcinoma in pleura." HISTOPATHOLOGY (OXFORD), vol. 38, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 528-534, XP002224147 ISSN: 0309-0167 the whole document ----	1-3, 12, 14-19, 21-24
P, X	WO 01 36674 A (PASKINS LYNN DORA ;BULL JOHN HENRY (GB); ELLISON GILLIAN (GB); AST) 25 May 2001 (2001-05-25) p. 4, line 8 - p. 13, line 5, p. 20, lines 7 - 20, claims 1 - 9 ----	1-3, 14, 15, 18, 19, 21, 24-26, 29-33
X	US 5 543 291 A (KEYOMARSI KHANDAN ET AL) 6 August 1996 (1996-08-06) column 4, line 12 - line 24; claims 38, 39 ----	1-3, 6-9, 18, 19, 21-26, 28, 39
X	KALLAKURY BHASKAR V S ET AL: "The prognostic significance of proliferation-associated nucleolar protein p120 expression in prostate adenocarcinoma: A comparison with cyclins A and B1, Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, and p34cdc2." CANCER, vol. 85, no. 7, 1 April 1999 (1999-04-01), pages 1569-1576, XP002235530 ISSN: 0008-543X abstract, p. 1573, col. 1, line 3 - col. 2, line 16, ----	1-3, 6-11, 18, 19, 21-26, 28, 30, 32, 36, 37, 39, 45
X	VOLM M ET AL: "Prognostic value of ERBB-1, vEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas." BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 77, no. 4, February 1998 (1998-02), pages 663-669, XP009007843 ISSN: 0007-0920 abstract, p. 664, col. 1, line 8 - p. 666 end of col. 1, Tables 3, 4, 6, p. 668, col. 2, final paragraph ----- -/-	1-3, 6-12, 14-19, 21-24, 28-33, 36-39, 45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Initial Application No PC11/6B 02/01125
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; December 2000 (2000-12) DESSY E ET AL: "Surfactant protein and thyroid transcription factor 1 in pleuro-pulmonary neoplasia. Immunohistochemical study!" Database accession no. NLM11234300 XP002235534 abstract & PATHOLOGICA. ITALY DEC 2000, vol. 92, no. 6, December 2000 (2000-12), pages 496-502, ISSN: 0031-2983	1-3,6-9, 12, 14-19, 21-24, 28,30, 32,33, 36-38, 41,42
X	BEJARANO PABLO A ET AL: "Surfactant proteins and thyroid transcription factor-1 in pulmonary and breast carcinomas." MODERN PATHOLOGY, vol. 9, no. 4, 1996, pages 445-452, XP009007792 ISSN: 0893-3952 the whole document	1-3, 6-12, 14-19, 21-24, 28,30, 32,33, 36-38, 41,42
P,X	MITAS MICHAEL ET AL: "Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 93, no. 2, 2001, pages 162-171, XP002235531 ISSN: 0020-7136 the whole document	1-3,6,8, 9,18,19, 21-26, 28,31, 36,37, 41,42,45
X	GASPAR ROCIO HERNANDEZ ET AL: "Quantitative immunohistochemical analyses of the expression of E-cadherin, thrombomodulin, CD44H and CD44v6 in primary tumours of pharynx/larynx squamous cell carcinoma and their lymph node metastases." ANALYTICAL CELLULAR PATHOLOGY, vol. 18, no. 4, 1999, pages 183-190, XP009007804 ISSN: 0921-8912 abstract, p. 184, col. 2, lines 1 - 32 ----- -/--	1-3, 6-11, 14-17, 21-24, 28,43,44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor Application No PCT/GB 02/01125
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUKUSE TATSUO ET AL: "Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant isoforms in the primary and metastatic sites of nonsmall cell lung carcinoma with intrapulmonary metastases." CANCER, vol. 86, no. 7, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 1174-1181, XP002235532 ISSN: 0008-543X abstract, introduction, Fig. 2 and 3, p. 1180, col. 2, lines 4 - 12 ---	1-3, 6-12,18, 19,21, 24,28, 30,32, 33,36, 37,43, 46,47
X	AKSLEM LARS A ET AL: "Oncoproteins and tumor progression in papillary thyroid carcinoma: Presence of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein, estrogen receptor related protein, p21-ras protein, and proliferation indicators in relation to tumor recurrences and patient survival." CANCER (PHILADELPHIA), vol. 76, no. 9, 1995, pages 1643-1654, XP009007851 ISSN: 0008-543X abstr, p. 1644, col. 2, 2nd paragraph, p. 1649, col. 1, lines 5 - 17 ---	1-3, 6-9, 18,19, 21-26, 28,29, 31-34, 36,37, 43,47
X	REIS-FILHO JORGE S ET AL: "Evaluation of cell proliferation, epidermal growth factor receptor, and bcl-2 immunoexpression as prognostic factors for patients with World Health Organization Grade 2 oligodendroglioma." CANCER., vol. 88, no. 4, pages 862-869, XP002235533 ISSN: 0008-543X abstract, Table 3 ---	1-3, 6-11,18, 19, 21-23, 28,32, 36,37, 46,47
X	PASTORINO UGO ET AL: "Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: Relevance to prognosis." JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 15, no. 8, 1997, pages 2858-2865, XP009007844 ISSN: 0732-183X abstract, p. 2859, col. 2, 2nd paragraph, Table 4, p. 2863, col. 1, lines 12 - 30 ---	1-3, 6-12,18, 19, 21-24, 28-30, 32,33, 37,38,47
	--- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor Application No PCT/GB 02/01125
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ORCHARD G E ET AL: "Immunocytochemistry in the diagnosis of Kaposi's sarcoma and angiosarcoma." BRITISH JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE. ENGLAND MAR 1995, vol. 52, no. 1, March 1995 (1995-03), pages 35-49, XP009007990 ISSN: 0967-4845 p. 37, col. 1, last paragraph	1-3, 6-11,18, 19, 21-23, 25,26
X	PIATTI B ET AL: "Fine needle aspiration biopsy of hepatocellular carcinoma resembling neuroendocrine tumor. A case report." ACTA CYTOLOGICA. UNITED STATES 1997 MAR-APR, vol. 41, no. 2, March 1997 (1997-03), pages 583-586, XP009007979 ISSN: 0001-5547 abstract, p. 584, col. 2, lines 26 - 33, p. 585, col. 2, lines 12 - 20	1-3, 6-11,18, 19,21-26
X	LUCAS D R ET AL: "Ewing sarcoma vs lymphoblastic lymphoma. A comparative immunohistochemical study." AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY. UNITED STATES JAN 2001, vol. 115, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 11-17, XP009007975 ISSN: 0002-9173 the whole document	1-3, 6-11,14, 15,18, 19,21-27
X	CAMPANA D ET AL: "Immunophenotyping of leukemia." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. NETHERLANDS 2000 SEP 21, vol. 243, no. 1-2, 21 September 2000 (2000-09-21), pages 59-75, XP004210693 ISSN: 0022-1759 abstract, tables 2,3,4 page 3	1-3,6-9, 18,19, 21-23,27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national application No. PCT/GB 02/01125
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB 02/01125

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1 - 3, 5 - 8, 14 - 19, 21, 23, 24,
29 - 37 (all in part); 12, 22, 28, 38, complete

invention 1: panel comprising at least two probes specific for the markers listed in claim 28 for the diagnosis of lung cancer

2. Claims: 1-3, 5-11, 13-21, 23-27, 29-37 (all partially)

inventions 2 - 11: panel comprising at least two probes which specifically bind to a marker associated with cancer forms other than lung cancer listed in claims 25 - 27

3. Claims: 1-2, 5-11, 15-21, 23, 29-33, 37 (all in part), 4,
13 (complete)

invention 12: panel comprising at least two probes which specifically bind to a marker associated with an infectious disease caused by a pathogenic microorganism

4. Claims: 39, 40

invention 13: panel comprising at least two probes which specifically bind to a marker associated with lung cancer wherein at least one probe specifically binds to Cyclin A

5. Claims: 41, 42

invention 14: panel adapted for the differential diagnosis of lung adenocarcinoma, comprising probes which specifically bind to Mucin 1 and thyroid transcription factor 1 and optionally further probes

6. Claims: 43, 44

invention 15: panel adapted for the differential diagnosis of squamous cell carcinoma, comprising a plurality of probes wherein at least one probe specifically binds to CD44v6 or ER-related protein (p29)

7. Claim : 45

invention 16: panel adapted for the differential diagnosis of large cell carcinoma, comprising a plurality of probes

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB 02 01125

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

wherein at least one probe specifically binds to VEGF, P120 or cyclin A

8. Claim : 46

invention 17: panel adapted for the differential diagnosis of mesothelioma, comprising a plurality of probes wherein at least one probe specifically binds to PCNA, HERA or CD44v6

9. Claim : 47

invention 18: panel adapted for the detection of small cell carcinoma, comprising a plurality of probes wherein at least one probe specifically binds to PCNA, BCL-2, or EGFR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Inventor's Application No.
PC1/GB 02/01125

Patent document cited in search report

Publication date

Patent family member(s)

Publication date

WO 8706620	A	05-11-1987	AU 7357687 A WO 8706620 A1	24-11-1987 05-11-1987
US 5731162	A	24-03-1998	IT MI931197 A1 AU 686177 B2 AU 6997494 A DE 69405866 D1 DE 69405866 T2 EP 0702794 A1 GR 3025007 T3 JP 9500961 T AT 158656 T DK 702794 T3 WO 9429729 A1 ES 2107835 T3 NZ 267622 A ZA 9403950 A	07-12-1994 05-02-1998 03-01-1995 30-10-1997 12-02-1998 27-03-1996 30-01-1998 28-01-1997 15-10-1997 11-05-1998 22-12-1994 01-12-1997 26-11-1996 01-02-1995
WO 9424560	A	27-10-1994	AU 6508694 A BR 9404967 A CA 2137786 A1 CN 1105181 A CZ 9403150 A3 EP 0646241 A1 FI 945857 A WO 9424560 A1 GB 2282884 A JP 7508102 T SK 153594 A3	08-11-1994 15-06-1999 27-10-1994 12-07-1995 17-01-1996 05-04-1995 13-12-1994 27-10-1994 19-04-1995 07-09-1995 11-07-1995
WO 0208764	A	31-01-2002	AU 4087701 A WO 0208764 A1	05-02-2002 31-01-2002
WO 9828622	A	02-07-1998	NO 965531 A AU 728190 B2 AU 7875298 A EP 0951645 A1 WO 9828622 A1	22-06-1998 04-01-2001 17-07-1998 27-10-1999 02-07-1998
US 5997866	A	07-12-1999	US 5895748 A	20-04-1999
WO 0136674	A	25-05-2001	AU 1163101 A WO 0136674 A2	30-05-2001 25-05-2001
US 5543291	A	06-08-1996	AU 676720 B2 AU 6166894 A CA 2154251 A1 EP 0681701 A1 WO 9417414 A1	20-03-1997 15-08-1994 04-08-1994 15-11-1995 04-08-1994

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/569	G O 1 N 33/569	B
G O 1 N 33/571	G O 1 N 33/569	G
G O 1 N 33/574	G O 1 N 33/571	
G O 1 N 33/58	G O 1 N 33/574	D
G O 1 N 33/60	G O 1 N 33/58	Z
	G O 1 N 33/60	Z

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

(72)発明者 ハーシュ, ケネス・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア州94065, レッドウッド・シティ, ポートマン・ドライヴ 8
07

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BA14 BB24 CB01 CB02 FA16 FA25 FA26 FA27
FB07 FB08 GB01 JA01
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ21 QQ79 QR54 QR56
QR57 QS02 QS33 QS36 QX01 QX07

专利名称(译)	基于细胞的检测和病理学鉴定		
公开(公告)号	JP2004526154A	公开(公告)日	2004-08-26
申请号	JP2002572414	申请日	2002-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	蒙诺根有限公司		
申请(专利权)人(译)	Monojen公司		
[标]发明人	プレスマンノーマンジェイ ハーシュケネスエス		
发明人	プレスマン,ノーマン・ジェイ ハーシュ,ケネス・エス		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/08 C12Q1/00 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/574 G01N33/58 G01N33/60		
CPC分类号	G01N33/57423 G01N33/56966 G01N33/57492		
FI分类号	G01N33/53.Y C12Q1/00.Z C12Q1/02 G01N33/50.X G01N33/566 G01N33/569.B G01N33/569.G G01N33/571 G01N33/574.D G01N33/58.Z G01N33/60.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/FA16 2G045/ FA25 2G045/FA26 2G045/FA27 2G045/FB07 2G045/FB08 2G045/GB01 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ79 4B063/ QR54 4B063/QR56 4B063/QR57 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07		
优先权	60/274638 2001-03-12 US		
其他公开文献	JP2004526154A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种以高灵敏度和特异性检测和确定疾病状态的方法。利用该方法，可以确定基于细胞的样品是否含有异常细胞，并且可以确定针对给定疾病存在的组织学类型的疾病。该方法检测基于细胞的样品中分子标志物的表达水平和表达模式的变化。还提供了面板选择和确认程序。

疾患クラス	病態の例
アレルギー	食物および植物に対する副作用
心血管	心不全、アテローム性動脈硬化症
変性（神経および筋肉）	アルツハイマー病およびパーキンソン病
食 事	非栄養物質および過剰/アンバランスな栄養
遺伝性	鎌状赤血球貧血、嚢胞性線維症
免 疫	HIVおよび自己免疫
感 染	ウイルス、細菌、真菌、寄生虫
代 謝	糖尿病
分子および細胞生物学	癌（新形成）
毒性傷害	アルコール、薬物、環境変異原、および発癌物質
外 傷	自動車の衝突による身体損傷