

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-507723
(P2016-507723A)

(43) 公表日 平成28年3月10日(2016.3.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 B O 6 3
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁)

(21) 出願番号 特願2015-545504 (P2015-545504)
 (86) (22) 出願日 平成25年12月2日 (2013.12.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年7月17日 (2015.7.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/072691
 (87) 国際公開番号 W02014/085826
 (87) 国際公開日 平成26年6月5日 (2014.6.5)
 (31) 優先権主張番号 61/732,024
 (32) 優先日 平成24年11月30日 (2012.11.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/772,979
 (32) 優先日 平成25年3月5日 (2013.3.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515137347
 アプライド・プロテオミクス、インコーポ
 レイテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・921
 21, サン・ディエゴ、ジョン・ホプキン
 ス・コート・3545、スイート・150
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明
 (74) 代理人 100129713
 弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸腫瘍の存在またはリスクの評価方法

(57) 【要約】

該開示方法は、患者における結腸腫瘍状態を予想または評価するために使用される。それらは、腫瘍の性質、再発、または治療に対する患者の応答を決定するために使用されうる。該方法の幾つかの実施形態は、臨床処置に関する報告を作成することを含む。本発明で提供される方法は、技術的变化を検出し、データ正規化を可能にし、シグナル検出を増強し、疾患状態および応答の予想タンパク質プロファイルを構築すると意図される。

【選択図】 図 10

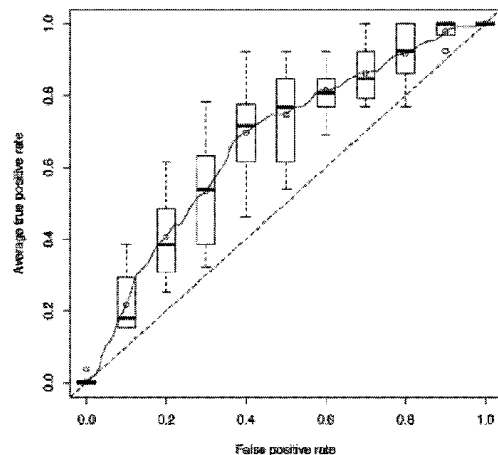


FIG. 10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

70%を超える感度または70%を超える選択性で、被験者における結腸の腺腫またはポリープの存在を検出する方法であって、該方法が、

(a) 被験者から血液サンプルを得、

(b) 該血液サンプル中のタンパク質を切断して、ペプチドを含むサンプルを得、

(c) 少なくとも10個のペプチドの存在に関して該サンプルを分析し、

(d) 該サンプルの分析結果を対照参照値と比較して、70%を超える感度または70%を超える選択性で結腸の腺腫またはポリープの存在に関する陽性または陰性スコアを決定する工程を含む、方法。

10

【請求項 2】

該感度が、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超、95%超および99%超から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

該選択性が、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超、95%超および99%超から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

該選択性および該感度が90%を超える、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

該被験者が無症候性である、請求項1記載の方法。

20

【請求項 6】

該被験者が結腸ポリープに対する治療を既に受けている、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

該分析工程が分光分析、質量分析、免疫学的分析、酵素反応性分析およびそれらの組合せを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

該分析が質量分析を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

前記の少なくとも10個のペプチドが図8の中性質量分類子から選択される、請求項1記載の方法。

30

【請求項 10】

(a) 請求項1記載の方法を行って、腺腫またはポリープの存在に関して陽性スコアを有する被験者を得、

(b) 該被験者において、腺腫またはポリープ組織の除去のための処置を行うことを含む、被験者における結腸の腺腫またはポリープの治療方法。

【請求項 11】

(a) 被験者から生物学的サンプルを得、

(b) 1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量に関して該生物学的サンプルの分析を行い、

(c) 該生物学的サンプルからの1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を対照参照値と比較し、

40

(d) 1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を被験者の腺腫またはポリープ状態と相関させる工程を含む、結腸の腺腫またはポリープの症状または家族病歴を有さない被験者における結腸の腺腫またはポリープの存在または非存在を検出する方法。

【請求項 12】

該方法が、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超から選択される感度を達成する、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

該方法が、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%

50

%超から選択される特異性を達成する、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 4】

該方法が、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超から選択される感度および特異性をそれぞれ個々に達成する、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 5】

腺腫またはポリープの存在または非存在を示す、該被験者に関する報告を作成することを更に含む、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 6】

該報告が、ポリープの発生の素因もしくはリスク、細胞異形成の度合、腺腫性ポリープの亜型または良性結腸腫瘍疾患の亜型を示す、請求項 1 5 記載の方法。

10

【請求項 1 7】

該方法が腺腫の存在または非存在を検出する、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 8】

該腺腫が腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫である、請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

該腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫が、有茎性ポリープおよび無茎性ポリープの群から選択される、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

該腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫を細胞異形成または前悪性の度合に従い特徴づける、請求項 1 8 記載の方法。

20

【請求項 2 1】

該方法が結腸直腸癌の存在または非存在を更に検出する、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 2 2】

該方法が結腸直腸癌の存在または非存在を検出しない、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

結腸直腸癌の存在または非存在を決定しない、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

該存在または非存在を結腸内視鏡検査、イメージングおよび/または手術により確認する、請求項 1 1 記載の方法。

30

【請求項 2 5】

該生物学的サンプルが、全血、血清、血漿、血液成分、骨髓、唾液、頬スワブ、尿、便、リンパ液、CNS液および病変滲出物からなる群から選択される、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 2 6】

該生物学的サンプルが、全血、血清および血漿からなる群から選択される、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

該被験者が無症候性である、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 2 8】

該被験者が18~49歳である、請求項 1 1 記載の方法。

40

【請求項 2 9】

該被験者が結腸内視鏡検査をこれまでに受けていない、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 3 0】

該被験者が結腸直腸癌の症状を有さず、結腸直腸癌の家族病歴を有さず、結腸直腸癌の認識されたリスク因子を有さない、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 3 1】

該被験者が結腸直腸癌の症状を有さず、結腸直腸癌の家族病歴を有さず、年齢以外の結腸直腸癌の認識されたリスク因子を有さない、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 3 2】

50

工程 (b) の分析が、分光分析、質量分析、免疫学的分析および酵素反応性からなる群から選択される方法を含む、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 3 3】

該分析が質量分析である、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

該免疫学的分析が酵素結合イムノソルベントアッセイまたはラジオイムノアッセイを含む、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 5】

該免疫学的分析がイムノプロット法、免疫拡散法、免疫電気泳動または免疫沈降法を含む、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 6】

該免疫学的分析が免疫染色および / またはフローサイトメトリー分析を含む、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 7】

該対照参照体が、同じ生物学的サンプルにおける 1 以上の非重複タンパク質および / またはペプチドのセットの存在および量である、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 3 8】

該対照参照体が、結腸の腺腫またはポリープが存在する 1 以上の被験者から得られたタンパク質および / またはペプチドの重複セットの存在および量である、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 3 9】

該対照参照体が、結腸の腺腫またはポリープが存在しない 1 以上の被験者から得られたタンパク質および / またはペプチドの重複セットの存在および量である、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 4 0】

該分析が或る数のタンパク質およびポリペプチドの存在および量を検出し、該数が少なくとも 2、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 50、少なくとも 100 および少なくとも 1000 から選択される、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 4 1】

該分析が、以下のセット：

i) SCDC26 (CD26)、CEA 分子 5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELP LG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1 および RPSA および / または図 9 におけるタンパク質ならびにそれらの組合せから選択される 1 以上のタンパク質；

ii) SCDC26 (CD26)、CEA 分子 5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELP LG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1 および RPSA および / または図 9 におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1 以上のペプチド断片；

iii) SCDC26 (CD26)、CEA 分子 5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELP LG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANX

10

20

30

40

50

A 4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せに対する配列相同性を有する1以上のペプチド；ここで、該配列相同性は、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超の群から選択される；ならびに

iv) SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELP1)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1以上の結合相手

の1以上の存在および量を検出する、請求項11記載の方法。

【請求項42】

該分析が図7または図8からの1以上の中性質量クラスターの存在および/または量を検出する、請求項11記載の方法。

【請求項43】

該分析が図7または図8からの或る数の中性質量クラスターの存在および/または量を検出し、該数が少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも500および少なくとも1000から選択される、請求項42記載の方法。

【請求項44】

該分析が図7または図8からの或る数の中性質量クラスターの存在および/または量を検出し、該数が少なくとも1であり、5未満、10未満、50未満、100未満、200未満、500未満および1000未満から選択される、請求項42記載の方法。

【請求項45】

該分析が図7または図8からの或る数の中性質量クラスターの存在および/または量を検出し、該数が、10~50、60~100、150~300、400~600および800~1000（これらの数を含む）からなる群から選択される、請求項42記載の方法。

【請求項46】

該中性質量クラスターが、分割分類子に関して70/30の練習/試験に従い試験された場合に、ある分類子頻度を有し、該分類子頻度が、50のうちの少なくとも3、50のうちの少なくとも10、50のうちの少なくとも20、50のうちの少なくとも30、および50のうちの少なくとも40から選択される、請求項42記載の方法。

【請求項47】

該分析が、図7または図8からの1以上の中性質量クラスターが誘導されたタンパク質またはペプチドの存在および/または量を検出する、請求項42記載の方法。

【請求項48】

(e) 代謝産物、DNA配列、RNA配列およびそれらの組合せからなる群から選択される1以上のアナライトの存在および量に関する生物学的サンプルの分析を行い、

(f) 該アナライトの存在および量を対照参照値と比較し、

(g) 該アナライトの存在および量を被験者の腺腫またはポリープ状態と関連させることを更に含む、請求項11記載の方法。

【請求項49】

(a) 結腸内視鏡検査に基づいて腺腫またはポリープの陰性の診断がなされた被験者から生物学的サンプルを得、

(b) 1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量に関して該生物学的サンプルの分析を行い、

10

20

30

40

50

(c) 該生物学的サンプルからの 1 以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を対照参照値と比較し、

(d) 1 以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を被験者の腺腫またはポリープ状態と関連させる工程を含む、結腸内視鏡検査が陰性結果を示した被験者における結腸の腺腫またはポリープの存在または非存在を検出する方法。

【請求項 5 0】

該方法が、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超から選択される感度を達成する、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 1】

該方法が、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超から選択される特異性を達成する、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 2】

該方法が、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超から選択される感度および特異性をそれぞれ個々に達成する、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 3】

腺腫またはポリープの存在または非存在を示す、該被験者に関する報告を作成することを更に含む、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 4】

該報告が、ポリープの発生の素因もしくはリスク、細胞異形成の度合、腺腫性ポリープの亜型または良性結腸腫瘍疾患の亜型を示す、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 5】

該方法が腺腫の存在または非存在を検出する、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 6】

該腺腫が腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫である、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 7】

該腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫が、有茎性ポリープおよび無茎性ポリープの群から選択される、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

該腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫を細胞異形成または前悪性の度合に従い特徴づける、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 9】

該方法が結腸直腸癌の存在または非存在を更に検出する、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 6 0】

該方法が結腸直腸癌の存在または非存在を検出しない、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 6 1】

結腸直腸癌の存在または非存在を決定しない、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 6 2】

該存在または非存在を結腸内視鏡検査、イメージングおよび/または手術により確認する、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 6 3】

該生物学的サンプルが、全血、血清、血漿、血液成分、骨髓、唾液、頬スワブ、尿、便、リンパ液、CNS液および病変滲出物からなる群から選択される、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 6 4】

該生物学的サンプルが、全血、血清および血漿からなる群から選択される、請求項 6 3 記載の方法。

【請求項 6 5】

該被験者が無症候性である、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 6 6】

10

20

30

40

50

該被験者が18～49歳である、請求項49記載の方法。

【請求項67】

該被験者が結腸直腸癌の症状を有さず、結腸直腸癌の家族病歴を有さず、結腸直腸癌の認識されたリスク因子を有さない、請求項49記載の方法。

【請求項68】

該被験者が結腸直腸癌の症状を有さず、結腸直腸癌の家族病歴を有さず、年齢以外の結腸直腸癌の認識されたリスク因子を有さない、請求項49記載の方法。

【請求項69】

工程(b)の分析が、分光分析、質量分析、免疫学的分析および酵素反応性からなる群から選択される方法を含む、請求項49記載の方法。

10

【請求項70】

該分析が質量分析である、請求項69記載の方法。

【請求項71】

該免疫学的分析が酵素結合イムノソルベントアッセイまたはラジオイムノアッセイを含む、請求項69記載の方法。

【請求項72】

該免疫学的分析がイムノプロット法、免疫拡散法、免疫電気泳動または免疫沈降法を含む、請求項69記載の方法。

【請求項73】

該免疫学的分析が免疫染色および/またはフローサイトメトリー分析を含む、請求項69記載の方法。

20

【請求項74】

該対照参照体が、同じ生物学的サンプルにおける1以上の非重複タンパク質および/またはペプチドのセットの存在および量である、請求項49記載の方法。

【請求項75】

該対照参照体が、結腸の腺腫またはポリープが存在する1以上の被験者から得られたタンパク質および/またはペプチドの重複セットの存在および量である、請求項49記載の方法。

【請求項76】

該対照参照体が、結腸の腺腫またはポリープが存在しない1以上の被験者から得られたタンパク質および/またはペプチドの重複セットの存在および量である、請求項49記載の方法。

30

【請求項77】

該分析が或る数のタンパク質およびポリペプチドの存在および量を検出し、該数が少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100および少なくとも1000から選択される、請求項49記載の方法。

【請求項78】

該分析が、以下のセット：

i) SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELP LG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せから選択される1以上のタンパク質；

40

ii) SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELP LG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA

50

4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1以上のペプチド断片；

iii) SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELLPLG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せに対する配列相同性を有する1以上のペプチド；ここで、該配列相同性は、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超の群から選択される；ならびに

iv) SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELLPLG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1以上の結合相手

の1以上の存在および量を検出する、請求項49記載の方法。

【請求項79】

該分析が図7または図8からの1以上の中性質量クラスターの存在および/または量を検出する、請求項49記載の方法。

【請求項80】

該分析が図7または図8からの或る数の中性質量クラスターの存在および/または量を検出し、該数が少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも500および少なくとも1000から選択される、請求項79記載の方法。

【請求項81】

該分析が図7または図8からの或る数の中性質量クラスターの存在および/または量を検出し、該数が少なくとも1であり、5未満、10未満、50未満、100未満、200未満、500未満および1000未満から選択される、請求項79記載の方法。

【請求項82】

該分析が図7または図8からの或る数の中性質量クラスターの存在および/または量を検出し、該数が、10~50、60~100、150~300、400~600および800~1000 (これらの数を含む) からなる群から選択される、請求項79記載の方法。

【請求項83】

該中性質量クラスターが、分割分類子に関して70/30の練習/試験に従い試験された場合に、ある分類子頻度を有し、該分類子頻度が、50のうちの少なくとも3、50のうちの少なくとも10、50のうちの少なくとも20、50のうちの少なくとも30、および50のうちの少なくとも40から選択される、請求項79記載の方法。

【請求項84】

該分析が、図7または図8からの1以上の中性質量クラスターが誘導されたタンパク質またはペプチドの存在および/または量を検出する、請求項79記載の方法。

【請求項85】

(e) 代謝産物、DNA配列、RNA配列およびそれらの組合せからなる群から選択される1以上のアナライトの存在および量に関する生物学的サンプルの分析を行い、

10

20

30

40

50

(f) 該アナライトの存在および量を対照参照値と比較し、

(g) 該アナライトの存在および量を被験者の腺腫またはポリープ状態と関連させることを更に含む、請求項 79 記載の方法。

【請求項 86】

(a) 結腸の腺腫またはポリープに対する治療を過去に受けた被験者から生物学的サンプルを得、

(b) 1 以上のタンパク質および / またはペプチドの存在および量に関して該生物学的サンプルの分析を行い、

(c) 該生物学的サンプルからの 1 以上のタンパク質および / またはペプチドの存在および量を対照参照値と比較し、

(d) 1 以上のタンパク質および / またはペプチドの存在および量を被験者の腺腫またはポリープ状態と関連させる工程を含む、結腸の腺腫またはポリープに対する治療を過去に受けた被験者における結腸の腺腫またはポリープの再発または非存在を検出する方法。

【請求項 87】

該方法が、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超から選択される感度を達成する、請求項 86 記載の方法。

【請求項 88】

該方法が、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超から選択される特異性を達成する、請求項 86 記載の方法。

【請求項 89】

該方法が、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超から選択される感度および特異性をそれぞれ個々に達成する、請求項 86 記載の方法。

【請求項 90】

腺腫またはポリープの存在または非存在を示す、該被験者に関する報告を作成することを更に含む、請求項 86 記載の方法。

【請求項 91】

該報告が、ポリープの発生の素因もしくはリスク、細胞異形成の度合、腺腫性ポリープの亜型または良性結腸腫瘍疾患の亜型を示す、請求項 90 記載の方法。

【請求項 92】

該方法が腺腫の存在または非存在を検出する、請求項 86 記載の方法。

【請求項 93】

該腺腫が腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫である、請求項 92 記載の方法。

【請求項 94】

該腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫が、有茎性ポリープおよび無茎性ポリープの群から選択される、請求項 93 記載の方法。

【請求項 95】

該腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫を細胞異形成または前悪性の度合に従い特徴づける、請求項 93 記載の方法。

【請求項 96】

該方法が結腸直腸癌の存在または非存在を更に検出する、請求項 86 記載の方法。

【請求項 97】

該方法が結腸直腸癌の存在または非存在を検出しない、請求項 86 記載の方法。

【請求項 98】

結腸直腸癌の存在または非存在を決定しない、請求項 86 記載の方法。

【請求項 99】

該存在または非存在を結腸内視鏡検査、イメージングおよび / または手術により確認する、請求項 86 記載の方法。

【請求項 100】

該生物学的サンプルが、全血、血清、血漿、血液成分、骨髓、唾液、頬スワブ、尿、便

10

20

30

40

50

、リンパ液、CNS液および病変滲出物からなる群から選択される、請求項86記載の方法。

【請求項101】

該生物学的サンプルが、全血、血清および血漿からなる群から選択される、請求項100記載の方法。

【請求項102】

該被験者が無症候性である、請求項86記載の方法。

【請求項103】

該被験者が18～49歳である、請求項86記載の方法。

【請求項104】

該被験者が結腸直腸癌の症状を有さず、結腸直腸癌の家族病歴を有さず、結腸直腸癌の認識されたリスク因子を有さない、請求項86記載の方法。

【請求項105】

該被験者が結腸直腸癌の症状を有さず、結腸直腸癌の家族病歴を有さず、年齢以外の結腸直腸癌の認識されたリスク因子を有さない、請求項86記載の方法。

【請求項106】

工程(b)の分析が、分光分析、質量分析、免疫学的分析および酵素反応性からなる群から選択される方法を含む、請求項86記載の方法。

【請求項107】

該分析が質量分析である、請求項106記載の方法。

【請求項108】

該免疫学的分析が酵素結合イムノソルベントアッセイまたはラジオイムノアッセイを含む、請求項106記載の方法。

【請求項109】

該免疫学的分析がイムノプロット法、免疫拡散法、免疫電気泳動または免疫沈降法を含む、請求項106記載の方法。

【請求項110】

該免疫学的分析が免疫染色および/またはフローサイトメトリー分析を含む、請求項106記載の方法。

【請求項111】

該対照参照体が、同じ生物学的サンプルにおける1以上の非重複タンパク質および/またはペプチドのセットの存在および量である、請求項86記載の方法。

【請求項112】

該対照参照体が、結腸の腺腫またはポリープが存在する1以上の被験者から得られたタンパク質および/またはペプチドの重複セットの存在および量である、請求項86記載の方法。

【請求項113】

該対照参照体が、結腸の腺腫またはポリープが存在しない1以上の被験者から得られたタンパク質および/またはペプチドの重複セットの存在および量である、請求項86記載の方法。

【請求項114】

該分析が或る数のタンパク質およびポリペプチドの存在および量を検出し、該数が少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100および少なくとも1000から選択される、請求項86記載の方法。

【請求項115】

該分析が、以下のセット：

i) SCDC26(CD26)、CEA分子5(CEACAM5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELP LG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4

10

20

30

40

50

、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せから選択される1以上のタンパク質；

ii) SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELP LG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1以上のペプチド断片；

iii) SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELP LG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せに対する配列相同性を有する1以上のペプチド；ここで、該配列相同性は、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超の群から選択される；ならびに

iv) SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクチン (SELP LG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1)、A-L-フコシダーゼ (FUCA2)、およびANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1以上の結合相手

の1以上の存在および量を検出する、請求項86記載の方法。

【請求項116】

該分析が図7または図8からの1以上の中性質量クラスターの存在および/または量を検出する、請求項86記載の方法。

【請求項117】

該分析が図7または図8からの或る数の中性質量クラスターの存在および/または量を検出し、該数が少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも500および少なくとも1000から選択される、請求項116記載の方法。

【請求項118】

該分析が図7または図8からの或る数の中性質量クラスターの存在および/または量を検出し、該数が少なくとも1であり、5未満、10未満、50未満、100未満、200未満、500未満および1000未満から選択される、請求項116記載の方法。

【請求項119】

該分析が図7または図8からの或る数の中性質量クラスターの存在および/または量を検出し、該数が、10~50、60~100、150~300、400~600および800~1000 (これらの数を含む) からなる群から選択される、請求項116記載の方法。

【請求項120】

該中性質量クラスターが、分割分類子に関して70/30の練習/試験に従い試験された場合に、ある分類子頻度を有し、該分類子頻度が、50のうちの少なくとも3、50の

10

20

30

40

50

うちの少なくとも10、50のうちの少なくとも20、50のうちの少なくとも30、および50のうちの少なくとも40から選択される、請求項116記載の方法。

【請求項121】

該分析が、図7または図8からの1以上の中性質量クラスターが誘導されたタンパク質またはペプチドの存在および/または量を検出する、請求項116記載の方法。

【請求項122】

(e)代謝産物、DNA配列、RNA配列およびそれらの組合せからなる群から選択される1以上のアナライトの存在および量に関する生物学的サンプルの分析を行い、

(f)該アナライトの存在および量を対照参照値と比較し、

(g)該アナライトの存在および量を被験者の腺腫またはポリープ状態と関連させることを更に含む、請求項86記載の方法。

【請求項123】

該被験者が結腸のポリープに対して該ポリープの除去によりこれまでに治療された、請求項86記載の方法。

【請求項124】

該被験者が結腸からの少なくとも1センチメートルの組織の除去によりこれまでに治療された、請求項86記載の方法。

【請求項125】

診断用途のためのタンパク質および/またはペプチドの検出の方法であって、該方法が

(a)被験者から生物学的サンプルを得、

(b)1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量に関して該生物学的サンプルの分析を行い、

(c)該生物学的サンプルからの1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を対照参照値と比較し、

(d)1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を該被験者の診断と関連させる工程を含み、該分析が、以下のセット：

i)SCDC26(CD26)、CEA分子5(CEACAM5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せから選択される1以上のタンパク質；

ii)SCDC26(CD26)、CEA分子5(CEACAM5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、およびANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1以上のペプチド断片；

iii)SCDC26(CD26)、CEA分子5(CEACAM5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せに

10

20

30

40

50

対する配列相同性を有する 1 以上のペプチド；ここで、該配列相同性は、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超の群から選択される；

i v) S C D C 2 6 (C D 2 6)、C E A 分子 5 (C E A C A M 5)、C A 1 9 5 (C C R 5)、C A 1 9 - 9、M 2 P K (P K M 2)、T I M P 1、P - セレクチン (S E L P L G)、V E G F A、H c G B (C G B)、V I L L I N、T A T I (S P I N K 1)、A - L - フコシダーゼ (F U C A 2)、および A N X A 5、G A P D H、P K M 2、A N X A 4、G A R S、R R B P 1、K R T 8、S Y N C R I P、S 1 0 0 A 9、A N X A 3、C A P G、H N R N P F、P P A 1、N M E 1、P S M E 3、A H C Y、T P T 1、H S P B 1 および R P S A および / または図 9 におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1 以上の結合相手；ならびに

v) 図 7 または図 8 からの 1 以上の中性質量クラスターが誘導されたタンパク質またはペプチド

の 1 以上の存在および量を検出する、方法。

【請求項 1 2 6】

該診断が、結腸の腺腫、ポリープ、結腸直腸癌およびそれらの組合せからなる群から選択される状態の存在または非存在である、請求項 1 2 5 記載の方法。

【請求項 1 2 7】

(b 1) 該生物学的サンプルまたはその一部を、第 1 ペプチドに特異的な第 1 抗ペプチド抗体と接触させ、

(b 2) 該生物学的サンプルまたはその一部を、第 2 ペプチドに特異的な第 2 抗ペプチド抗体と接触させ、ここで、該第 2 抗ペプチド抗体は該第 1 抗ペプチド抗体とは異なり、

(b 3) 該第 1 および第 2 抗ペプチド抗体が結合したペプチドを未結合ペプチドから分離し、

(b 4) 質量分析、フローサイトメトリー、非重複励起スペクトル、ウエスタン分析、酵素結合イムノソルベントアッセイ、デンストメトリーまたはそれらの組合せを用いて、該第 1 および第 2 抗ペプチド抗体が結合した該ペプチドの量を検出および / または測定することにより、工程 (b) における該量を決定することを更に含む、請求項 1 2 5 記載の方法。

【請求項 1 2 8】

該生物学的サンプルまたはその一部が該生物学的サンプルのタンパク質分解消化物である、請求項 1 2 7 記載の方法。

【請求項 1 2 9】

工程 (b 4) が質量分析を含む、請求項 1 2 7 記載の方法。

【請求項 1 3 0】

(a) 被験者からのサンプルを収集するための容器、

(b) 1 以上のタンパク質またはペプチドを検出するための手段、あるいは該容器を試験施設へ移すための手段、および

(c) 書面による説明を含む、請求項 1 ~ 1 2 9 のいずれか 1 項記載の方法を行うためのキット。

【請求項 1 3 1】

1 以上のタンパク質またはペプチドを検出するための手段が、以下のセット：

i) S C D C 2 6 (C D 2 6)、C E A 分子 5 (C E A C A M 5)、C A 1 9 5 (C C R 5)、C A 1 9 - 9、M 2 P K (P K M 2)、T I M P 1、P - セレクチン (S E L P L G)、V E G F A、H c G B (C G B)、V I L L I N、T A T I (S P I N K 1)、A - L - フコシダーゼ (F U C A 2)、A N X A 5、G A P D H、P K M 2、A N X A 4、G A R S、R R B P 1、K R T 8、S Y N C R I P、S 1 0 0 A 9、A N X A 3、C A P G、H N R N P F、P P A 1、N M E 1、P S M E 3、A H C Y、T P T 1、H S P B 1 および R P S A および / または図 9 におけるタンパク質ならびにそれらの組合せから選択される 1 以上のタンパク質；

i i) S C D C 2 6 (C D 2 6)、C E A 分子 5 (C E A C A M 5)、C A 1 9 5 (C

10

20

30

40

50

CR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、およびANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1以上のペプチド断片;

iii) SCDC26(CD26)、CEA分子5(CEACAM5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せに対する配列相同性を有する1以上のペプチド;ここで、該配列相同性は、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超および99%超の群から選択される;

iv) SCDC26(CD26)、CEA分子5(CEACAM5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAおよび/または図9におけるタンパク質ならびにそれらの組合せの、1以上の結合相手;ならびに

v) 図7または図8からの1以上の中性質量クラスターが誘導されたタンパク質またはペプチド

の1以上に結合する1以上の抗体を含む、請求項130記載のキット。

【請求項132】

1以上の抗体がそれぞれ、標識でタグ付けされている、請求項131記載のキット。

【請求項133】

該標識が、放射能標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグおよびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項132記載のキット。

【請求項134】

該抗体が水性媒体中に又は凍結乾燥形態でパッケージ化されている、請求項131記載のキット。

【請求項135】

1以上のタンパク質またはペプチドを検出するための手段が酵素結合イムノソルベントアッセイを含む、請求項130記載のキット。

【請求項136】

被験者からの生物学的サンプルにおけるACTB、ACTH、ANGT、SAHH、ALDR、AKT1、ALBU、AL1A1、AL1B1、ALDOA、AMY2B、ANXA1、ANXA3、ANXA4、ANXA5、APC、APOA1、APOC1、APOH、GDIR1、ATPB、BANK1、MIC1、CA195、CO3、CO9、CAH1、CAH2、CALR、CAPG、CD24、CD63、CDD、CEAM3、CEAM5、CEAM6、CGHB、CH3L1、KCRB、CLC4D、CLUS、CNN1、COR1C、CRP、CSF1、CTNB1、CATD、CATS、CATZ、CUL1、SYDC、DEF1、DEF3、DESM、DPP4、DPYL2、DYHC1、ECH1、EF2、IF4A3、ENOA、EZRI、NIBL2、SEPR、FBX4、FIBB、FIBG、FHL1、FLNA、FRMD3、FRIH、FRIL、FUCO、GBRA1、G3P、SYG、GDF15、GELS、GSTP1、HABP2、

10

20

30

40

50

HGF、1A68、HMGB1、ROA1、ROA2、HNRPF、HPT、HS90B、ENPL、GRP75、HSPB1、CH60、SIAL、IFT74、IGF1、IGHA2、IL2RB、IL8、IL9、RASK、K1C19、K2C8、LAMA2、LEG3、LMNB1、MARE1、MCM4、MIF、MMP7、MMP9、CD20、MYL6、MYL9、NDKA、NNMT、A1AG1、PCKGM、PDIA3、PDIA6、PDXK、PEBP1、PIPNA、KPYM、UROK、IPYR、PRDX1、KPCD1、PRL、TMG4、PSME3、PTEN、FAK1、FAK2、RBX1、REG4、RHOA、RHOB、RHOC、RSSA、RRBP1、S10AB、S10AC、S10A8、S109、SAA1、SAA2、SEGN、SDCG3、DHSA、SBP1、SELPL、SEP9、A1AT、AACT、ILEU、SPB6、SF3B3、SKP1、ADT2、ISK1、SPON2、OSTP、SRC、STK11、HNRPQ、TAL1、TRFE、TSP1、TIMP1、TKT、TSG6、TR10B、TNF6B、P53、TPM2、TCTP、TRAP1、THTR、TBB1、UGDH、UGPA、VEGFA、VILI、VIME、VNN1、1433Z、CCR5、FUCOおよびそれらの組合せの群から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを測定することを含む、被験者における結腸疾患の診断、予想、予後および/またはモニタリングのための方法。

10

【請求項137】

被験者からの生物学的サンプルにおけるSPB6、FRIL、P53、1A68、ENOA、TKTおよびそれらの組合せの群から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを測定することを含む、被験者における結腸疾患の診断、予想、予後および/またはモニタリングのための方法。

20

【請求項138】

被験者からの生物学的サンプルにおけるSPB6、FRIL、P53、1A68、ENOA、TKT、TSG6、TPM2、ADT2、FHL1、CCR5、CEAM5、SPON2、1A68、RBX1、COR1C、VIME、PSME3およびそれらの組合せの群から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを測定することを含む、被験者における結腸疾患の診断、予想、予後および/またはモニタリングのための方法。

【請求項139】

被験者からの生物学的サンプルにおけるSPB6、FRIL、P53、1A68、ENOA、TKT、TSG6、TPM2、ADT2、FHL1、CCR5、CEAM5、SPON2、1A68、RBX1、COR1C、VIME、PSME3、MIC1、STK11、IPYR、SBP1、PEBP1、CATD、HPT、ANXA5、ALDOA、LAMA2、CATZ、ACTB、AACTおよびそれらの組合せの群から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを測定することを含む、被験者における結腸疾患の診断、予想、予後および/またはモニタリングのための方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は結腸腫瘍の存在またはリスクの評価方法に関する。

40

【0002】

相互参照

本出願は、35 U.S.C. § 119(e)に従い、2012年11月30日付け出願の米国仮特許出願第61/732,024号および2013年3月5日付け出願の米国仮特許出願第61/772,979号(それらの全ての全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に基づく優先権を主張するものである。

【0003】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体を参照により本明細書に組み入れることとする。2013年11月27日付けで作成された該ASCII

50

I コピーは 3 6 7 6 5 - 7 0 3 . 2 0 1 __ S L . t x t と称され、7 8 3 , 9 3 6 バイトのサイズを有する。

【背景技術】

【0004】

当技術分野で公知のとおり、ゲノムの情報内容はDNAとして運ばれる。遺伝子発現の第1段階はDNAからmRNAへの転写である。遺伝子発現の第2段階はmRNAからポリペプチドへの合成であり、この場合、mRNAの各3ヌクレオチドは、ポリペプチドを構成する1つのアミノ酸残基をコードする。翻訳後、ポリペプチドは、しばしば、種々の化学基、例えば炭水化物、脂質およびホスファート基の付加により、ならびに特定のペプチド結合のタンパク質分解切断により、翻訳後修飾される。これらの化学修飾は、特有の三次元コンホメーションをポリペプチドがとることを可能にして、成熟タンパク質を与える。これらの翻訳後修飾はmRNA鋳型から直接はコードされないが、それらは、全体的なコンホメーションおよび利用可能な相互作用部位を変化させることによりタンパク質の機能をモジュレーションするように作用する該タンパク質の極めて重要な特性である。更に、細胞内のタンパク質レベルは、個体が健康状態であるか疾患状態であるかを反映しうる。したがって、タンパク質は疾患状態、疾患の早期発現および疾患のリスクの非常に貴重なバイオマーカー源である。

10

【0005】

mRNAおよびタンパク質は共に、別々の経路により絶えず合成され、分解される。また、合成および分解経路上には複数のレベルの調節が存在する。これを考慮すると、mRNA種の存在量と、それがコードするタンパク質の実際の量との間に単純な相関性が存在しないことは驚くべきことではない(Ander sonおよびSeilhamer, Electrophoresis 18:533-537; Gygiら, Mol. Cell. Biol. 19:1720-1730, 1999)。したがって、発現タンパク質のレベルを示すために、mRNAレベルが外挿されることが多いが、タンパク質の最終レベルは、mRNAレベルを測定することによっては必ずしも得ることができない(Patton, J. Chromatogr. 722:203-223, 1999; Pattonら, J. Biol. Chem. 270:21404-21410(1995))。

20

【0006】

したがって、生物学的サンプルのタンパク質プロファイルを決定する方法が必要とされている。

30

【発明の概要】

【0007】

開示の概要

70%を超える感度または70%を超える選択性で、被験者における結腸の腺腫、癌またはポリープの存在を検出するための方法を開示する。種々の実施形態においては、該方法は、(a)被験者から血液サンプルを得、(b)該血液サンプル中のタンパク質を切断して、ペプチドを含むサンプルを得、(c)少なくとも10個のペプチドの存在に関して該サンプルを分析し、(d)該サンプルの分析結果を対照参照値と比較して、70%を超える感度または70%を超える選択性で結腸の腺腫またはポリープの存在に関する陽性または陰性スコアを決定する工程を含む。また、(a)本明細書に記載されているとおりに検出する方法を行って、腺腫、癌またはポリープの存在に関して陽性スコアを有する被験者を得、(b)該被験者において、腺腫またはポリープ組織の除去のための処置を行うことを含む、被験者における結腸の腺腫、癌またはポリープの治療方法を開示する。

40

【0008】

また、(a)被験者から生物学的サンプルを得、(b)1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量に関して生物学的サンプルの分析を行い、(c)該生物学的サンプルからの1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を対照参照値と比較し、(d)1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を被験者の腺腫、癌またはポリープ状態と相関させる工程を含む、結腸の腺腫またはポリープの症状

50

または家族病歴を有さない被験者における結腸の腺腫またはポリープの存在または非存在を検出するための方法を開示する。

【0009】

また、(a) 結腸内視鏡検査に基づいて腺腫、癌またはポリープの陰性の診断がなされた被験者から生物学的サンプルを得、(b) 1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量に関して生物学的サンプルの分析を行い、(c) 該生物学的サンプルからの1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を対照参照値と比較し、(d) 1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を被験者の腺腫、癌またはポリープ状態と関連させる工程を含む、結腸内視鏡検査が陰性結果を示した被験者における結腸の腺腫、癌またはポリープの存在または非存在を検出するための方法を開示する。

10

【0010】

(a) 結腸の腺腫、癌またはポリープに対する治療を過去に受けた被験者から生物学的サンプルを得、(b) 1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量に関して生物学的サンプルの分析を行い、(c) 該生物学的サンプルからの1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を対照参照値と比較し、(d) 1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を被験者の腺腫、癌またはポリープ状態と関連させる工程を含む、結腸の腺腫、癌またはポリープに対する治療を過去に受けた被験者における結腸の腺腫、癌またはポリープの再発または非存在を検出するための方法を開示する。

20

【0011】

また、(a) 被験者から生物学的サンプルを得、(b) 1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量に関して生物学的サンプルの分析を行い、該分析が1以上のタンパク質、ペプチド、または本明細書に記載されている分類子の存在および量を検出し、(c) 該生物学的サンプルからの1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を対照参照値と比較し、(d) 1以上のタンパク質および/またはペプチドの存在および量を該被験者の診断と関連させる工程を含む、診断用途のためのタンパク質および/またはペプチド検出のための方法を開示する。

【0012】

更に、本明細書に記載されている方法を行うためのキットを開示し、該キットは、(a) 被験者からのサンプルを収集するための容器、(b) 1以上のタンパク質またはペプチドを検出するための手段、あるいは該容器を試験施設へ移すための手段、および(c) 書面による説明を含有する。

30

【0013】

最後に、本開示は、結腸疾患の診断、予想、予後および/またはモニタリングのための方法を提供する。被験者からの生物学的サンプルにおけるACTB、ACTH、ANGT、SAHH、ALDR、AKT1、ALBU、AL1A1、AL1B1、ALDOA、AMY2B、ANXA1、ANXA3、ANXA4、ANXA5、APC、APOA1、APOC1、APOH、GDIR1、ATPB、BANK1、MIC1、CA195、CO3、CO9、CAH1、CAH2、CALR、CAPG、CD24、CD63、CDD、CEAM3、CEAM5、CEAM6、CGHB、CH3L1、KCRB、CLC4D、CLUS、CNN1、COR1C、CRP、CSF1、CTNB1、CATD、CATS、CATZ、CUL1、SYDC、DEF1、DEF3、DESM、DPP4、DPYL2、DYHC1、ECH1、EF2、IF4A3、ENOA、EZRI、NIBL2、SEPR、FBX4、FIBB、FIBG、FHL1、FLNA、FRMD3、FRIH、FRIL、FUCO、GBRA1、G3P、SYG、GDF15、GELS、GSTP1、HABP2、HGF、1A68、HMGB1、ROA1、ROA2、HNRPF、HPT、HS90B、ENPL、GRP75、HSPB1、CH60、SIAL、IFT74、IGF1、IGHA2、IL2RB、IL8、IL9、RASK、K1C19、K2C8、LAMA2、LEG3、LMNB1、MARE1、MCM4、MIF、MMP7、M

40

50

MP9、CD20、MYL6、MYL9、NDKA、NNMT、A1AG1、PCKGM、PDIA3、PDIA6、PDXK、PEBP1、PIPNA、KPYM、UROK、IPYR、PRDX1、KPCD1、PRL、TMG4、PSME3、PTEN、FAK1、FAK2、RBX1、REG4、RHOA、RHOB、RHOC、RSSA、RRBP1、S10AB、S10AC、S10A8、S109、SAA1、SAA2、SEGN、SDCG3、DHSA、SBP1、SELPL、SEP9、A1AT、AACT、ILEU、SPB6、SF3B3、SKP1、ADT2、ISK1、SPON2、OSTP、SRC、STK11、HNRPQ、TAL1、TRFE、TSP1、TIMP1、TKT、TSG6、TR10B、TNF6B、P53、TPM2、TCTP、TRAP1、THTR、TBB1、UGDH、UGPA、VEGFA、VILI、VIME、VNN1、1433Z、CCR5、FUCOおよびそれらの組合せの群から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを測定することを含む、被験者における結腸疾患または結腸直腸癌の診断、予想、予後および/またはモニタリングのための方法も開示する。

10

【0014】

また、被験者からの生物学的サンプルにおけるSPB6、FRIL、P53、1A68、ENOA、TKTおよびそれらの組合せの群から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを測定することを含む、被験者における結腸疾患または結腸直腸癌の診断、予想、予後および/またはモニタリングのための方法を開示する。

【0015】

被験者からの生物学的サンプルにおけるSPB6、FRIL、P53、1A68、ENOA、TKT、TSG6、TPM2、ADT2、FHL1、CCR5、CEAM5、SPON2、1A68、RBX1、COR1C、VIME、PSME3およびそれらの組合せの群から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを測定することを含む、被験者における結腸疾患または結腸直腸癌の診断、予想、予後および/またはモニタリングのための方法を開示する。

20

【0016】

被験者からの生物学的サンプルにおけるSPB6、FRIL、P53、1A68、ENOA、TKT、TSG6、TPM2、ADT2、FHL1、CCR5、CEAM5、SPON2、1A68、RBX1、COR1C、VIME、PSME3、MIC1、STK11、IPYR、SBP1、PEBP1、CATD、HPT、ANXA5、ALDOA、LAMA2、CATZ、ACTB、AACTおよびそれらの組合せの群から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを測定することを含む、被験者における結腸疾患または結腸直腸癌の診断、予想、予後および/またはモニタリングのための方法を開示する。

30

【0017】

文献の援用

本明細書中に挙げられている全ての刊行物、特許および特許出願を、各個の刊行物、特許または特許出願が参照により本明細書に組み入れられると具体的かつ個別に示されている場合と同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。

【0018】

該開示の新規特徴は添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本開示の特徴および利点の更に深い理解は、本開示の原理が用いられている例示的实施例を記載している以下の詳細な説明および添付図面を参照することにより得られるであろう。

40

【0019】

開示の詳細な説明

I. 定義

「結腸直腸癌状態」なる語は被験者における該疾患の状態を意味する。結腸直腸癌状態のタイプの例には、結腸直腸癌を含む癌の被験者のリスク、疾患の存在または非存在（例えば、ポリープまたは腺癌）、患者における病期（例えば、癌）および疾患の治療の有効性が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0020】

50

「質量分析計」なる語は、気相イオンの質量対電荷 (m/z) 比に変換されうるパラメータを測定する気相イオン分光計を意味する。質量分析計は、一般に、イオン源および質量分析器を含む。質量分析計の例としては、飛行時間型、磁場型、四重極フィルター、イオントラップ、イオンサイクロトロン共鳴、静電場分析器およびこれらの混成型が挙げられる。「質量分析 (マススペクトロメトリー)」は、気相イオンを検出するための質量分析計の使用を意味する。

【0021】

「縦列 (タンデム) 質量分析計」なる語は、イオン混合物中のイオンを含むイオンの、 m/z に基づく識別または測定の、2つの連続的段階を行いうる任意の質量分析計を意味する。この語は、空間内で縦列したイオンの m/z に基づく識別または測定の2つの連続的段階を行いうる2つの質量分析器を有する質量分析計を含む。この語は更に、時間において縦列したイオンの m/z に基づく識別または測定の2つの連続的段階を行いうる単一の質量分析器を有する質量分析計を含む。したがって、この語は Qq -TOF 質量分析計、イオントラップ質量分析計、イオントラップ-TOF 質量分析計、TOF-TOF 質量分析計、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計、静電場-磁場質量分析計およびそれらの組合せを明らかに含む。

10

【0022】

「バイオチップ」なる語は、吸着剤が付着している一般には平面の表面を有する固体基体を意味する。しばしば、バイオチップの表面は複数のアドレス可能な位置を含み、それらの位置のそれぞれは、そこに結合した吸着剤を有する。バイオチップは、プローブインタフェースに関与するように適合可能であり、したがって、プローブとして機能しうる。タンパク質バイオチップは、ポリペプチドの捕捉のために適合され、アドレス可能な位置にクロマトグラフィーまたは二重特異性吸着剤が付着した表面を含みうる。マイクロアレイチップは、一般に、DNA および RNA 遺伝子発現検出のために使用される。

20

【0023】

「バイオマーカー」なる語は、対照被験者 (例えば、陰性診断または検出不可能な結腸直腸癌を有する者、健常被験者、あるいは例えば、異なる時点における同一個体) から採取された比較しうるサンプルと比較して、ヒト結腸直腸癌を有する被験者から採取されたサンプル中に差次的に存在する (特定の見掛け分子量の) ポリペプチドを意味する。「バイオマーカー」なる語は「マーカー」なる語と互換的に用いられる。バイオマーカーは、遺伝子、例えば DNA または RNA、あるいは DNA または RNA の遺伝的変異、それらの結合相手、スプライス変異体でありうる。バイオマーカーは、タンパク質もしくはタンパク質断片、またはアミノ酸配列の遷移イオン、またはタンパク質アミノ酸配列上の1以上の修飾でありうる。また、タンパク質バイオマーカーはタンパク質もしくはタンパク質断片またはアミノ酸配列の遷移イオンの結合相手でありうる。

30

【0024】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」なる語は本明細書においては互換的に用いられ、アミノ酸残基の重合体を意味する。ポリペプチドは、隣接アミノ酸残基のカルボキシル基とアミノ基との間のペプチド結合により互いに結合しているアミノ酸の単一直鎖状重合体鎖である。ポリペプチドは、例えば、炭水化物の付加、リン酸化などにより修飾されうる。

40

【0025】

「イムノアッセイ」なる語は、抗原 (例えば、マーカー) に特異的に結合する抗体を使用するアッセイである。イムノアッセイは、抗原の単離、標的化および/または定量的ための、特定の抗体の特異的結合特性の利用により特徴づけられる。

【0026】

「抗体」なる語は、エピトープに特異的に結合しそれを認識する、単数もしくは複数の免疫グロブリン遺伝子またはそれらの断片により実質的にコードされたポリペプチドリガンドを意味する。抗体は、例えば、完全免疫グロブリンとして、または種々のペプチダーゼでの消化により製造される幾つかの十分に特徴づけられたフラグメントとして存在する

50

。これは例えば F a b ' ' および F (a b) ' ' ₂ フラグメントを含む。本明細書中で用いる「抗体」なる語は、全抗体の修飾により製造される抗体フラグメント、または組換え DNA 法を用いて新たに合成される抗体フラグメントをも含む。それはまた、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体または一本鎖抗体を含む。抗体の「Fc」部分は、1以上の重鎖定常領域ドメインを含むが重鎖可変領域を含まない、免疫グロブリン重鎖の部分の意味する。

【0027】

「腫瘍」なる語は、癌細胞または非癌細胞により形成されうる固形または流体充填病変を意味する。「塊」および「小結節」なる語は「腫瘍」と同義で用いられることが多い。腫瘍は悪性腫瘍または良性腫瘍を含む。悪性腫瘍の一例としては、トランスフォーム細胞を含むことが知られている癌が挙げられうる。

10

【0028】

「ポリープ」なる語は、粘膜から突出する組織の異常成長を意味する。それが、細長く伸長した茎により表面に付着している場合、それは有茎性ポリープと称される。茎が存在しない場合、それは無茎性ポリープと称される。ポリープは悪性、前癌性または良性でありうる。ポリープは種々の方法、例えば手術により、あるいはポリープ切除を伴う結腸内視鏡検査中に除去されうる。

【0029】

「腺腫性ポリープ」または「腺腫」なる語は本明細書においては互換的に用いられ、結腸の裏層上に成長し癌のリスクの増大を招くポリープを意味する。腺腫性ポリープは前悪性とみなされるが、幾つかは結腸癌へと進展する可能性がある。管状腺腫が腺腫性ポリープのなかで最もよく見られ、それは、結腸癌へと進展する可能性が最も低い結腸ポリープである。腺管絨毛腺腫は更にもう1つのタイプである。絨毛腺腫は、通常はその他の2つのタイプの腺腫より大きなサイズを有する第3のタイプであり、それは全てのポリープのなかで最高の罹患率および死亡率に関連づけられる。

20

【0030】

「結合相手」なる語は、分子のペア、典型的には、特異的結合を示す生体分子のペアを意味する。タンパク質 - タンパク質相互作用は2以上のタンパク質の間で生じうるが、それらは、しばしば、互いに結合した場合に、それらの生物学的機能が達成される。タンパク質間の相互作用は大多数の生物学的機能に重要である。例えば、細胞の外部からのシグナルは、リガンドおよび受容体タンパク質を介して、シグナリング分子のタンパク質 - タンパク質相互作用により、その細胞の内部に媒介される。例えば、分子結合相手には、受容体およびリガンド、抗体および抗原、ビオチンおよびアビジンなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0031】

「対照参照(体)」なる語は、変動を調べるため又は非定常分子または正常非罹患健康状態を比較するための相対マーカーとして用いられる既知定常状態分子または非罹患健康状態を意味し、あるいはそれは、値を較正または正規化するためにも用いられうる。種々の実施形態においては、対照参照値は因子の組合せ、または因子の範囲の組合せ、例えば、バイオマーカー濃度の組合せ、または濃度の範囲の組合せからの計算値である。

40

【0032】

「被験者」、「個体」または「患者」なる語は本明細書においては互換的に用いられ、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを意味する。哺乳動物には、マウス、サル、農場動物、競技用動物およびペットが含まれるが、これらに限定されるものではない。非ヒト哺乳動物には、ヒト以外の全ての哺乳動物が含まれる。インビトロで得られた又はインビトロで培養された生物学的存在の組織、細胞およびそれらの後代も含まれる。

【0033】

「インビボ」なる語は、被験者の体内で生じる事象を意味する。

【0034】

50

「インビトロ」なる語は、被験者の体の外部で生じる事象を意味する。例えば、インビトロアッセイは本アッセイ以外の任意のアッセイの実施を含む。インビトロアッセイは、生きた又は死んだ細胞を使用する、細胞に基づくアッセイを含む。インビトロアッセイは、無傷細胞を使用しない無細胞アッセイをも含む。

【0035】

「測定」なる語は、サンプル中のマーカーの存在または非存在を検出すること、サンプル中のマーカーの量を定量すること、および/またはバイオマーカーのタイプを定性化することを含む方法を意味する。測定は、当技術分野で公知の方法および本明細書に更に記載されている方法、例えば、質量分析法およびイムノアッセイ法（これらに限定されるものではない）により達成可能であり、あるいは本明細書に記載されているマーカーの1以上を検出し測定するためのいずれかの適当な方法が用いられうる。

10

【0036】

「検出」なる語は、検出されるべき対象の存在、非存在または量の特定を意味する。非限定的な例には、DNA分子、タンパク質、ペプチド、タンパク質複合体、RNA分子または代謝産物の検出が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0037】

「差次的に存在する」なる語は、対照参照体または対照非罹患健康被験者と比較された場合の、被験者から採取されたサンプル中に存在するマーカーの量および/または頻度における相違に関するものである。マーカーは量、頻度またはそれらの両方に関して差次的に存在しうる。

20

【0038】

「モニタリング」なる語は、絶えず変動するパラメータの変化を記録することを意味する。

【0039】

「診断用（診断的）」または「診断」なる語は本明細書においては互換的に用いられ、病理学的状態の存在もしくは性質、または病理学的状態のサブタイプ、すなわち、結腸ポリープの存在もしくはリスクを特定することを意味する。診断方法はそれらの感度および特異性において異なる。診断方法は状態の確定的診断をもたらさないかもしれないが、診断を補助する陽性指標を該方法が示すのであれば十分である。

30

【0040】

「予後」なる語は本明細書においては、再発および治療応答を含む、疾患の可能性または疾患の進行の予想を意味するものとして用いられる。

【0041】

「予想」なる語は本明細書においては、陽性または陰性を含む特定の臨床的結果を患者が有する可能性に関するものとして用いられる。本開示の予想方法は、いずれかの特定の患者のための最も適切な治療法を選択することにより治療判断を行うために臨床的に用いられうる。

【0042】

「報告」なる語は、必要に応じて本発明の方法から医師に提供される印刷された結果（未確定の又は確定的なものを含む）を意味する。該報告は病理学的状態の存在、性質またはリスクを示しうる。該報告は、どのような治療（例えば、何もしない、手術、更なる試験、または治療剤の投与）が最も適切であるのかも示しうる。

40

【0043】

II. 一般的概観

疾患の診断、予後および予想薬物応答に関するバイオマーカープロファイルの開発は医学界にとって有用でありうる。

【0044】

本開示は、臨床状態または健康状態における悪化または改善を示すバイオマーカーを決定（測定）するために、コンピュータ読取可能媒体により命令されるプロセッサにより実行されるアルゴリズムと組合された種々のアッセイを用いて、個体からの複雑な生物学

50

的サンプルを分析する方法、組成物、システムおよびキットを提供する。一般に、該方法は、生物学的系のポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）、ポリペプチドおよび代謝レベルのような分子生物学の複数レベルからの種々の分子を使用して、結腸癌、結腸ポリープおよび種々の結腸直腸疾患のような疾患のバイオマーカーまたはバイオマーカープロファイルを特定することが想定される。

【0045】

本開示はまた、個体における結腸ポリープまたは結腸癌の存在または回復に関する診断、予想、予後またはモニタリングに有用なバイオマーカーおよび系を提供する。

【0046】

本開示はまた、本明細書において提供されるバイオマーカーの検出に使用される組成物、説明、および個体における結腸ポリープまたは結腸癌の診断、予想、予後、存在または回復を示す報告を一般に含む商業用診断キットを提供する。該報告により示される臨床的予想または状態は、例えば、結腸ポリープまたは癌を未だ臨床的に示していない個体において或る期間内または或る年齢で被験者が結腸ポリープおよび結腸癌を臨床的に発生する可能性、確率またはリスクを示しうる。

10

【0047】

III. 方法

本開示は、質量分析により得られたデータを使用する、プロテオミクスパターンおよび/またはゲノムパターンに基づく医学的診断方法を提供する。該方法は、患者のプロテオミクスパターンおよび/またはゲノムパターンに基づいて彼らの病期に関して患者を分類

20

【0048】

結腸直腸癌は結腸癌、直腸癌または大腸癌としても公知であり、結腸または直腸における無制御な細胞増殖から生じる癌である。また、本開示は結腸ポリープおよび結腸直腸癌の医学的診断のための新規バイオマーカーを提供する。

【0049】

結腸ポリープは、大腸または結腸の裏層上に生じる良性細胞塊である。ほとんど全てのポリープは初期には非悪性である。しかし、時間の経過と共に、幾つかは癌性病変に変化しうる。ほとんどの結腸ポリープの原因は未知であるが、それらは成人でよく見られる。結腸ポリープは無症状であるため、結腸ポリープに関する定期的なスクリーニングが推奨される。現在、ポリープに関するスクリーニングに用いられている方法は非常に侵襲的であり高価である。したがって、結腸癌の予防および軽減において結腸内視鏡スクリーニングが有益であるにもかかわらず、該方法が推奨される人々の多くは、主として経費、不快感および有害事象に関する懸念ゆえに、それを受けることを拒む。この群は米国だけでも何千万人に相当する。

30

【0050】

結腸ポリープ、腺腫または癌性腫瘍、例えば癌の存在の、より高いリスクを患者が有する可能性を分類することを補助する分子的試験は、結腸内視鏡検査を受けることを嫌がることに関して患者の態度および行動を医師が誘導することを補助しうる。結腸内視鏡スクリーニングの応諾の促進は癌または前癌腺腫の早期検出、ならびに結腸癌に関連した罹患率および死亡率の減少をもたらすであろう。

40

【0051】

本開示は、結腸内視鏡検査ほどは侵襲的でなく、個体のタンパク質発現フィンガープリントまたはプロファイルを決定するタンパク質バイオマーカー試験を提供する。本開示の幾つかの用途においては、結腸ポリープまたは結腸癌を発生する、個体のポリープ状態および/またはリスクの予想可能性に基づいて、報告を作成する。したがって、本開示は、結腸ポリープまたは結腸癌を発生する、個体の結腸ポリープ状態および/またはリスクに関する情報を提供する方法、キット、組成物およびシステムを提供する。

【0052】

該開示の1つの態様においては、患者における結腸ポリープ、腺腫または癌の存在また

50

は非存在に関する結腸内視鏡検査法の結果の予想を可能にするLCMSに基づく方法により、タンパク質に基づく分類子のセット（組合せ）を特定している。

【0053】

該開示の1つの態様においては、ポリープ、腺腫または腫瘍を有する可能性がより高い患者を識別する1以上の分類子を含みうる、血漿タンパク質に基づく分子的特徴を特定するために、LCMSに基づくアプローチを用いている。

【0054】

該開示の1つの態様においては、どの個体がポリープ、腺腫または腫瘍を有する可能性が低く、したがって結腸内視鏡検査を受ける必要がないと考えられうるかを決定するために、分類子を使用する。

【0055】

該開示の1つの態様においては、結腸内視鏡検査中の疑わしいポリープの除去の完全性を、該処置の前および後の分類子値を比較することにより測定するために、分類子を使用する。

【0056】

該開示の1つの態様においては、定期的なスクリーニング結腸内視鏡検査の、検査と検査との間の期間に、分類子を使用して、いわゆるインターバル（interval；間欠期）疾患を捕える。

【0057】

該開示の1つの態様においては、上昇したリスクプロファイルを有する患者における連続的な結腸内視鏡検査の、検査と検査との間の期間を増加させるために、分類子を使用する。上昇したリスクプロファイルを有する患者の例は、過去にポリープ切除を受けた又は他の病状を有する患者を含みうる。

【0058】

該開示は、結腸の罹患状態に特徴的な完全タンパク質ポリペプチド鎖に沿った酵素切断（例えば、トリプシン消化など）が生じる位置と共に無傷タンパク質に由来する特定のフラグメントのサイズおよび配列に関する血液タンパク質フラグメンテーションプロファイルを作成し分析する方法を提供する。

【0059】

該開示により提供される方法、キット、組成物およびシステムは、用途に応じて全体的または部分的に自動化されることも可能であると想定される。

【0060】

A．アルゴリズムに基づく方法

本開示は、結腸ポリープまたは結腸癌を有する患者に関する臨床結果を予想するための、アルゴリズムに基づく診断アッセイを提供する。1以上のタンパク質バイオマーカーの発現レベルは単独で使用されることが可能であり、あるいは臨床結果の可能性を予想するために用いられうる定量的スコアを計算するために機能的な部分集合に整理されうる。

【0061】

本開示の「バイオマーカー」または「マーカー」は特定の見掛け分子量のポリペプチド、遺伝子、例えばDNAもしくはRNAまたは該DNAもしくはRNAの遺伝的変異、それらの結合相手、スプライス変異体でありうる。バイオマーカーはタンパク質もしくはタンパク質断片またはアミノ酸配列の遷移イオン、あるいはタンパク質アミノ酸配列上の1以上の修飾体でありうる。また、タンパク質バイオマーカーはタンパク質もしくはタンパク質断片またはアミノ酸配列の遷移イオンの結合相手でありうる。

【0062】

本開示の方法の実施により提供される、アルゴリズムに基づくアッセイおよび関連情報は、結腸腫瘍を示している患者における最適な治療判断を促進する。例えば、そのような臨床的手段は、ポリープまたは癌を有する低い可能性を有し、したがって抗癌治療を必要としない、あるいは浸潤性癌を有する高い可能性を有し、したがって抗癌治療を必要とする患者を医師が特定することを可能にするであろう。

10

20

30

40

50

【0063】

定量的スコアは特定のアルゴリズムの適用により決定されうる。本明細書に開示されている方法における定量的スコアを計算するために使用されるアルゴリズムはバイオマーカ―またはバイオマーカ―群の発現レベル値を分類しうる。また、特定のバイオマーカ―群の形成は定量的スコアに対するバイオマーカ―またはバイオマーカ―部分集合（例えば、分類子）の種々の発現レベルの寄与の数学的加重を促進しうる。本開示は、定量的スコアを計算するための種々のアルゴリズムを提供する。

【0064】

B．データの正規化

本明細書に開示されている方法において使用される発現データは正規化されうる。正規化は、例えば、アッセイされた遺伝子またはタンパク質レベルの量における相違および使用される鑄型の質における変動性を補正し、遺伝子またはタンパク質発現の処理および検出に関わる望ましくない系統的変動測定源を除去するための方法を意味する。他の系統的変動源は実験処理条件に起因すると考えられうる。

10

【0065】

幾つかの場合には、実験処理条件の正規化のために正規化方法が用いられうる。該開示の方法で用いられうる実験処理の正規化の非限定的な例には、データ収集における日付および時間もしくは時間経過ならびに／またはデータ生成プロセス中に使用される装置、試薬および設備の間の系統的相違の解釈が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0066】

関連条件下で発現レベルにおいて有意には異ならない或る正規化標準遺伝子またはタンパク質の発現を含めることにより（すなわち、それらは、その特定のサンプルタイプにおいて安定化された一貫した発現レベルを有することが知られている）、アッセイは正規化をもたらしうる。本開示において使用されうる適当な正規化遺伝子およびタンパク質には、ハウスキーピング遺伝子が含まれる（例えば、E. Eisenbergら, Trends in Genetics 19(7): 362-365 (2003)を参照されたい）。幾つかの用途においては、正規化バイオマーカ―（遺伝子およびタンパク質）（参照遺伝子とも称される）は、結腸ポリープを有さない患者と比較して、結腸ポリープまたは癌において有意に異なる発現レベルを示さないことが知られている。幾つかの用途においては、データ正規化に用いられる既知特性を有する実体に相当する使用可能な安定な同位体標識標準を加えることが有用かもしれない。他の用途においては、装置および日間測定変動性を解釈するために各分析用バッチと共に標準的な一定のサンプルが測定されうる。

20

30

【0067】

幾つかの用途においては、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40もしくは50個またはそれを超える参照遺伝子およびタンパク質の平均に対して診断用、予後用および予想用遺伝子が正規化されうる。正規化は、アッセイされたバイオマーカ―の全ての平均または中央値シグナルに基づくものであることが可能であり、あるいは包括的バイオマーカ―正規化アプローチによるものであることが可能である。正規化は多数の方法により達成されうると当業者は認識するであろう。前記の技術は典型例に過ぎないと意図される。

40

【0068】

C．データの標準化

本明細書に開示されている方法において使用される発現データは標準化されうる。標準化は、遺伝子の全てを、比較しうる規模で有効に配置するための方法を意味する。これを行うのは、幾つかの遺伝子は他の遺伝子より大きな変異（より広範囲の発現）を示すからである。標準化は、各発現値をその遺伝子またはタンパク質に関する全てのサンプルにおけるその標準偏差で割り算することにより行われる。

【0069】

D．臨床結果スコア

識別バイオマーカ―を副選択（sub-select）するための及び分類モデルを構

50

築するための機械学習アルゴリズムの使用が、臨床結果スコアを決定するために行われる。これらのアルゴリズムには、弾性ネットワーク、ランダム・フォレスト (random forest)、サポートベクターマシンおよびロジスティック回帰が含まれるが、これらに限定されるものではない。これらのアルゴリズムは重要なバイオマーカー特性に干渉し、根底にある測定結果を、例えば臨床結果、疾患リスク、治療応答および/または疾患状態の分類に関連したスコアまたは確率に変換しうる。

【0070】

幾つかの用途においては、定量的スコアの増加は不良な臨床結果、良好な臨床結果、高い疾患リスク、低い疾患リスク、完全な応答、部分的な応答、安定な疾患、無応答、および疾患処置に関する推奨される治療の可能性の増加を示す。幾つかの用途においては、定量的スコアの減少は不良な臨床結果、良好な臨床結果、高い疾患リスク、低い疾患リスク、完全な応答、部分的な応答、安定な疾患、無応答、および疾患処置に関する推奨される治療の可能性の増加を示す。

10

【0071】

幾つかの用途においては、参照プロファイルに類似した、患者からのバイオマーカープロファイルは、不良な臨床結果、良好な臨床結果、高い疾患リスク、低い疾患リスク、完全な応答、部分的な応答、安定な疾患、無応答、および疾患処置に関する推奨される治療の可能性の増加を示す。幾つかの用途においては、参照プロファイルに類似していない、患者からのバイオマーカープロファイルは、不良な臨床結果、良好な臨床結果、高い疾患リスク、低い疾患リスク、完全な応答、部分的な応答、安定な疾患、無応答、および疾患処置に関する推奨される治療の可能性の増加を示す。

20

【0072】

幾つかの用途においては、1以上のバイオマーカー閾値の増加は、不良な臨床結果、良好な臨床結果、高い疾患リスク、低い疾患リスク、完全な応答、部分的な応答、安定な疾患、無応答、および疾患処置に関する推奨される治療の可能性の増加を示す。幾つかの用途においては、1以上のバイオマーカー閾値の減少は、不良な臨床結果、良好な臨床結果、高い疾患リスク、低い疾患リスク、完全な応答、部分的な応答、安定な疾患、無応答、および疾患処置に関する推奨される治療の可能性の増加を示す。

【0073】

幾つかの用途においては、定量的スコア、1以上のバイオマーカー閾値、類似したバイオマーカープロファイル値またはそれらの組合せの増加は、不良な臨床結果、良好な臨床結果、高い疾患リスク、低い疾患リスク、完全な応答、部分的な応答、安定な疾患、無応答、および疾患処置に関する推奨される治療の可能性の増加を示す。幾つかの用途においては、定量的スコア、1以上のバイオマーカー閾値、類似したバイオマーカープロファイル値またはそれらの組合せの減少は、不良な臨床結果、良好な臨床結果、高い疾患リスク、低い疾患リスク、完全な応答、部分的な応答、安定な疾患、無応答、および疾患処置に関する推奨される治療の可能性の増加を示す。

30

【0074】

E. サンプルの調製および処理

サンプルを分析する前に、サンプルに対して1以上のサンプル調製操作を行うことが望ましいかもしれない。一般に、これらのサンプル調製操作は、細胞または組織からの細胞内物質の抽出および単離のような操作、例えば、サンプルからの核酸、タンパク質または他の巨大分子の抽出を含みうる。

40

【0075】

該開示の方法で用いられうるサンプル調製は、遠心分離、アフィニティークロマトグラフィー、磁気分離、イムノアッセイ、核酸アッセイ、受容体に基づくアッセイ、細胞数測定アッセイ、比色アッセイ、酵素アッセイ、電気泳動アッセイ、電気化学的アッセイ、分光学的アッセイ、クロマトグラフィーアッセイ、顕微鏡的アッセイ、トポグラフィックアッセイ、熱量測定アッセイ、放射性同位体アッセイ、タンパク質合成アッセイ、組織学的アッセイ、培養アッセイおよびそれらの組合せを含むが、これらに限定されるものではない

50

。

【0076】

サンプル調製は更に、適当な溶媒による希釈を含むことが可能であり、適当な範囲の濃度レベルを確保する量が或るアッセイにより検出される。

【0077】

サンプルの細胞間腔からの核酸および巨大分子の入手は、一般に、物理的、化学的方法またはそれらの両方の組合せにより行われうる。該方法の幾つかの用途においては、粗抽出物の単離の後、核酸、タンパク質、細胞膜粒子などを分離することが望ましいことが多いであろう。該方法の幾つかの用途においては、核酸をそのタンパク質および細胞膜粒子と共に維持するのが望ましいであろう。

10

【0078】

本発明で提供される方法の幾つかの用途においては、該開示の方法を用いて、分析前の生物学的サンプルから核酸およびタンパク質が抽出されうる。抽出は、界面活性剤ライセート、音波処理、またはガラスビーズでのボルテックスの利用（これらに限定されるものではない）を含む手段によるものでありうる。

【0079】

幾つかの用途においては、勾配遠心分離（例えば、塩化セシウム勾配、スクロース勾配、グルコース勾配など）、遠心分離法、煮沸、精製キットを用いる技術、および物質抽出法（例えば、TrizolまたはDNAzolを使用する方法）での液体抽出の利用を含む、当技術分野における適当ないずれかの技術を用いて、分子が単離されうる。

20

【0080】

サンプルは、所望の検出法に応じた標準的な生物学的サンプル調製により調製されうる。例えば、質量分析の場合、患者から得られた生物学的サンプルは遠心分離され、濾過され、イムノアフィニティカラムにより処理され、幾つかの画分に分離され、部分的に消化され、およびそれらの組合せに付されうる。種々の画分は適当な担体、例えばバッファー、または検出および分析のための他のタイプのローディング溶液（LCMSローディングバッファーを含む）に再懸濁されうる。

【0081】

F. 検出方法

本開示は、生物学的サンプル中のバイオマーカーを検出するための方法を提供する。バイオマーカーには、タンパク質、代謝産物、DNA分子およびRNA分子が含まれうるが、これらに限定されるものではない。より詳しくは、本開示は、結腸ポリープを有する又は結腸ポリープを発生する可能性のある被験者において差次的に発現されるタンパク質バイオマーカーの発見に基づくものである。したがって、生物学的サンプル中のこれらの差次的に発現されるバイオマーカーの1以上の検出は、被験者が結腸ポリープのリスクを有する又は結腸ポリープに罹患しているか否か、および病状の性質または状態のタイプの有用な情報を提供する。本明細書に記載されているバイオマーカーの1以上を検出するためのいずれかの適当な方法が用いられうる。

30

【0082】

本開示において使用されうる有用なアナライト捕捉剤には、抗体、例えば、抗体を含有する粗製血清、精製抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、合成抗体、抗体フラグメント（例えば、Fabフラグメント）；抗体相互作用性物質、例えばプロテインA、炭水化物結合性タンパク質および他の相互作用性物質；タンパク質相互作用性物質（例えば、アビジンおよびその誘導体）；ペプチド；ならびに小さな化学的実体、例えば酵素基質、補因子、金属イオン/キレートおよびハプテンが含まれるが、これらに限定されるものではない。抗体は、標的または固体表面（例えば、バイオチップおよびカラム）への結合を最適化するために修飾または化学的処理されうる。

40

【0083】

該開示の1つの態様においては、該バイオマーカーは、イムノアッセイを用いて生物学的サンプルにおいて検出されうる。イムノアッセイは、抗原（例えば、バイオマーカー、

50

タンパク質またはペプチド上の部位)に特異的に結合しそれを認識する抗体を使用するアッセイである。該方法は、生物学的サンプルを抗体と接触させ、該抗体が該サンプル中の抗原との複合体を形成することを可能にし、該サンプルを洗浄し、該抗体-抗原複合体を検出試薬で検出する工程を含む。1つの実施形態においては、バイオマーカーを認識する抗体は商業的に入手可能でありうる。もう1つの実施形態においては、バイオマーカーを認識する抗体は抗体製造の公知方法により製造されうる。

【0084】

あるいは、サンプル中のマーカーは、例えば、結合マーカー特異的抗体を検出するために第2標識抗体を使用する間接アッセイを用いて検出されうる。典型的な検出可能標識には、磁気ビーズ(例えば、DYNABEADS(商標))、蛍光色素、放射能標識、酵素(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび他の一般に使用されているもの)および熱量測定標識、例えばコロイド金または着色ガラスまたはプラスチックビーズが含まれる。サンプル中のマーカーは、例えば、マーカーの特徴的エピトープに結合するモノクローナル抗体を該混合物と共に同時にインキュベートする競合もしくは阻害アッセイを用いて及び/又は該アッセイにおいて検出されうる。

10

【0085】

イムノアッセイを用いて抗原を検出するための条件は、使用される個々の抗体に左右されるであろう。また、インキュベーション時間はアッセイ形態、マーカー、溶液の体積、濃度などに左右されるであろう。イムノアッセイは、使用される抗体に応じて或る範囲の温度、例えば10 ~ 40で行われうるが、一般に、イムノアッセイは室温で行われる。

20

【0086】

本開示のバイオマーカーの検出のためにアッセイを適合させるための出発原理として使用されうる種々のタイプのイムノアッセイが当技術分野で公知である。有用なアッセイには、例えば酵素免疫アッセイ(EIA)、例えば酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)が含まれうる。これらのアプローチの多数の変法が存在するが、それらは類似した考えに基づいている。例えば、抗原が固体支持体または表面に結合しうる場合、それは、それを特異的抗体と反応させることにより検出可能であり、該抗体は、それを二次抗体と反応させることにより又は一次抗体内に標識を組込むことにより定量されうる。あるいは抗体を固体表面に結合させ、抗原を加えることが可能である。ついで、抗原上の異なるエピトープを認識する二次抗体を加え、検出することが可能である。これはしばしば「サンドイッチアッセイ」と呼ばれ、しばしば、高いバックグラウンドまたは非特異的反応の問題を回避するために用いられうる。これらのタイプのアッセイは、生物学的サンプル中の低濃度の抗原を測定するのに十分な程度に高感度であり、再現可能である。

30

【0087】

サンプル中のマーカーの存在または非存在およびサンプル中のマーカーの量を決定するために、イムノアッセイが使用されうる。抗体-マーカー複合体の量または存在を測定するための方法には、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、複屈折または屈折率(例えば、表面プラズモン共鳴、エリブソメトリー、共鳴鏡法、グレーティング・カップラー波長(grating coupler waveguide)法または干渉法)が含まれるが、これらに限定されるものではない。一般に、これらの試薬は、光学的検出法、例えば種々の形態の顕微鏡検査、イメージング法および非イメージング法と共に使用される。電気化学的方法には、ボルタメトリー法およびアンペロメトリー法が含まれる。高周波法には、多極共鳴分光法が含まれる。

40

【0088】

1つの態様においては、該開示はバイオマーカーの検出のための抗体を使用しうる。本アッセイのバイオマーカーに特異的に結合する抗体は、当技術分野で公知の標準的な方法を用いて製造されうる。例えば、ポリクローナル抗体は、大量の抗体を得るために哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジまたはウマに抗原を注射することにより製造されうる。これらの動物から単離される血液はポリクローナル抗体(すなわち、同

50

一抗原に結合する複数の抗体)を含有する。あるいは、ポリクローナル抗体は、卵黄内でポリクローナル抗体を産生させるためにニワトリに抗原を注射することにより製造される。また、バイオマーカーの修飾形態、例えばバイオマーカーのリン酸化形態を特異的に認識する抗体が製造される。すなわち、それらはリン酸化後にチロシンまたはセリンを認識するが、ホスファートの非存在下ではこれは生じない。このように、特定のバイオマーカーのリン酸化状態を決定するために、抗体が使用される。

【0089】

抗体は商業的に入手可能であり、あるいは十分に確立された方法を用いて製造される。抗原の単一エピトープに特異的な抗体を得るために、抗体分泌リンパ球を動物から単離し、それらを癌細胞系と融合することにより不死化させる。該融合細胞はハイブリドーマと称され、絶えず成長し、培養内に抗体を分泌する。単一ハイブリドーマ細胞を希釈クローニングにより単離して、同一抗体を全てが産生する細胞クローンを得る。これらの抗体はモノクローナル抗体と称される。

10

【0090】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は幾つかの方法で精製される。例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインIまたは組換え融合タンパク質プロテインA/Gのような細菌タンパク質に結合した抗原アフィニティークロマトグラフィーを用い、ついで溶出画分を280nmの吸光のUV光での検出に付して、どの画分が抗体を含有するのかを決定して、抗体を単離することが可能である。プロテインA/GはヒトIgGの全サブクラスに結合し、このため、それは、サブクラスが決定されていないポリクローナルまたはモノクローナルIgG抗体の精製に有用である。また、それはIgA、IgE、IgMおよび(より低い割合で)IgDに結合する。プロテインA/GはマウスIgGの全サブクラスにも結合するが、マウスIgA、IgMまたは血清アルブミンには結合しない。この特徴は、プロテインA/Gが、IgA、IgMおよび血清アルブミンからの干渉を伴うことなくマウスモノクローナルIgG抗体の精製および検出に使用されることを可能にする。

20

【0091】

抗体は分子の種々のクラスまたはイソタイプ、例えばIgA、IgA、IgD、IgE、IgMおよびIgGから誘導される。IgAは、体液中に分泌するように設計され、一方、IgMのような他のものは、細胞表面上で発現されるように設計される。生物学的研究において最も有用な抗体はIgGクラスであり、これは、産生され分泌され特異的抗原を認識しうるタンパク質分子である。IgGは、2本の「重」鎖および2本の「軽」鎖を含む2つのサブユニットから構成される。これらは対称構造で構築され、各IgGは2つの同一抗原認識ドメインを有する。抗原認識ドメインは重鎖および軽鎖の両方からのアミノ酸の組合せである。該分子はほぼ「Y」のような形状をしており、該分子のアーム/先端は抗原認識領域またはFab(抗原結合性フラグメント)領域を含み、一方、Fc(結晶性フラグメント)領域のステムは認識には関与せず、相当に定常性である。定常領域は同一アイソタイプの全抗体においては同一であるが、異なるアイソタイプの抗体においては異なる。

30

【0092】

また、ウエスタンブロット法により分画した後にタンパク質を検出するために抗体を使用することも可能である。1つの態様においては、該開示は、バイオマーカーの検出のためにウエスタンブロット法を使用する。ウエスタンブロット(タンパク質イムノブロット)は、与えられたサンプルまたはサンプルからのタンパク質抽出物における特異的タンパク質を検出するために用いられる分析技術である。それはゲル電気泳動、SDS-PAGEを使用して、天然タンパク質をそれらの三次元構造により分離する。あるいはそれを変性条件下で泳動させて、タンパク質をそれらの長さにより分離することが可能である。ついで、ゲル電気泳動による分離の後、タンパク質を膜(典型的にはニトロセルロースまたはPVDF)に移す。ついで、SDS-PAGEから膜に移されたタンパク質を穏やかな攪拌下で特定の抗体と共にインキュベートし、非特異的結合を除去するために洗浄し、ブ

40

50

ロットに結合したタンパク質 - 抗体複合体を、1工程または2工程検出法を用いて検出することが可能である。該1工程法は、関心のあるタンパク質を認識し且つ検出可能標識（公知タンパク質タグに関してしばしば利用可能であるプローブ）を含有するプローブ抗体を含む。該2工程検出法は、レポーター酵素を有する二次抗体またはそれに結合したレポーターを含む。適当な参照対照と共に、このアプローチは、タンパク質の存在量を測定するために用いられうる。

【0093】

1つの態様においては、該開示の方法はフローサイトメトリーを使用しうる。フローサイトメトリーは、バイオマーカー検出、定量（細胞計数）および細胞単離のために使用されうる、レーザーに基づく生物物理学的技術である。この技術は健康障害、特に血液癌の診断において常套的に使用される。一般に、フローサイトメトリーは以下のとおりに作動する。単一細胞を流体流に懸濁させ、単一波長の光（通常なレーザー光）のビームを液体流上に向け、通過細胞により生じる散乱光を電子的検出装置により検出する。蛍光標識式細胞分取器（FACS）は特殊タイプのフローサイトメトリーであり、しばしば、関心のある細胞上の抗原を検出するための蛍光標識抗体の補助を利用する。FACSにおける抗体標識使用のこの追加的特徴は、各細胞蛍光標識細胞の特異的光散乱および蛍光特性に基づく同時多パラメータ分析および定量をもたらす、それは、伝統的なフローサイトメトリーと同様に、関心のある細胞の集団の物理的分離をもたらす。

【0094】

フローサイトメトリーにおける標識としては多種多様な発蛍光団が使用されうる。発蛍光団は典型的には、細胞の表面上または内部の標的特性を認識する抗体に結合される。適当な蛍光標識の例には、フルオレセイン（FITC）、5,6-カルボキシメチルフルオレセイン、テキサスレッド、ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル（NBD）ならびにシアニン色素Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5およびCy7が含まれるが、これらに限定されるものではない。他の蛍光標識、例えばAlexa Fluor（登録商標）色素、DNA含有色素、例えばDAPI、ヘキスト（Hoechst）色素が当技術分野でよく知られており、全ては種々の商業的入手源から容易に入手可能である。各発蛍光団は特徴的なピーク励起および発光波長を有し、発光スペクトルは重複することが多い。これらの発蛍光団のそれぞれ吸収および発光最大はFITC（490 nm；520 nm）、Cy3（554 nm；568 nm）、Cy3.5（581 nm；588 nm）、Cy5（652 nm；672 nm）、Cy5.5（682 nm；703 nm）およびCy7（755 nm；778 nm）であり、したがって、多くのスペクトル重複を有さないものの選択はそれらの同時検出を可能にする。蛍光標識は種々の商業的入手源から入手可能である。識別可能な蛍光標識の最大数は約17または18個の異なる蛍光標識であると考えられる。このレベルの複雑な読出しは、アーチファクトを制限するための面倒な最適化、および重複スペクトルを分離するための複雑なデコンボリューションアルゴリズムを要する。伝統的な発蛍光団の代わりに量子ドットが用いられることもある。なぜなら、それはより狭い発光ピークを有するからである。検出に用いられうる他の方法には、同位体標識抗体、例えばランタニド同位体が含まれる。しかし、この技術は結局は細胞を破壊して、更なる分析のためのその回収を不可能にする。

【0095】

1つの態様においては、該開示の方法は、本開示のバイオマーカーの発現レベルを検出するために免疫組織化学を用いうる。したがって、組織サンプルにおける特許請求されているバイオマーカーの発現を検出するために、各マーカーに特異的な抗体を使用する。該抗体は、例えば放射能標識、蛍光標識、ハプテン標識（例えば、ビオチン）または酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）での、抗体自体の直接標識により検出されうる。あるいは、非標識一次抗体が、該一次抗体に特異的な抗血清、ポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体を含む標識二次抗体と共に使用される。免疫組織化学プロトコールは当技術分野でよく知られており、プロトコールおよび抗体は商業的に入手可能である。あるいは、組織サンプルにおける発現レベルを決

10

20

30

40

50

定するために有用である本明細書に開示されているバイオマーカーまたはバイオマーカーの修飾形態または結合相手に対する抗体を製造することが可能であろう。

【0096】

1つの態様においては、該開示の方法はバイオチップを使用しうる。バイオチップは、多数の巨大分子をスクリーニングするために使用されうる。この技術においては、秩序だったアレイ形態で巨大分子をバイオチップの表面に結合させる。試験領域の格子状パターンは、個々のアナライトのそれらの所定位置（アドレス）における迅速かつ同時に定量するための、イメージングソフトウェアによる分析を可能にする。CCDカメラは、チップ上の非常に低レベルの光を正確に検出し定量しうる高感度かつ高分解能のセンサーである。

10

【0097】

バイオチップは、固定化核酸分子、完全長タンパク質、抗体、アフィボディ（モノクローナル抗体を模倣して設計された小分子）、アプタマー（核酸に基づくリガンド）または化合物を使用して設計されうる。チップは、チップ上の複数の巨大分子型を検出するように設計されうるであろう。例えば、チップは、チップ上の核酸分子、タンパク質および代謝産物を検出するように設計されうるであろう。バイオチップは、単一サンプルにおけるパネルバイオマーカーを同時に分析してこれらのバイオマーカーの被験者プロフィールを与えるように使用され設計される。バイオチップの使用は、複数の分析を行って全体的な処理時間および必要なサンプルの量を減少させることを可能にする。

20

【0098】

タンパク質マイクロアレイは、本開示で使用されうる特定のタイプのバイオチップである。該チップは、捕捉タンパク質のアレイがアレイ形態で固体表面上に結合している支持体表面、例えばガラススライド、ニトロセルロース膜、ビーズまたはマイクロタイタープレートからなる。タンパク質アレイ検出法は高いシグナルおよび低いバックグラウンドを示す必要がある。検出プローブ分子（典型的には蛍光色素で標識されている）を該アレイに加える。該プローブと該固定化タンパク質との間のいずれかの反応が蛍光シグナルを発生し、これはレーザースキャナーにより読取られる。そのようなタンパク質マイクロアレイは迅速であり、自動化され、診断試験のためのタンパク質バイオマーカー読出しの高い感度をもたらす。しかし、それらは、この技術で用いられうる種々の検出方法である、と当業者に直ちに理解されるであろう。

30

【0099】

タンパク質の生化学的活性を研究するために現在使用されている少なくとも3つのタイプのタンパク質マイクロアレイが存在する。例えば、分析用マイクロアレイ（捕捉アッセイとしても公知である）、機能的タンパク質マイクロアレイ（標的タンパク質アレイとしても公知である）および逆相タンパク質マイクロアレイ（RPA）が存在する。

【0100】

本開示は、分析用タンパク質マイクロアレイを使用するバイオマーカーの検出を提供する。分析用タンパク質マイクロアレイは、抗体、アプタマーまたはアフィボディのライブラリーを使用して構築される。該アレイは、複合タンパク質溶液、例えば血液、血清または細胞ライセートでプローブされ、それらが特異的に結合するタンパク質分子を捕捉することにより機能する。種々の検出系を用いる生じた結合反応の分析は、結合アフィニティおよび特異性の測定ならびにサンプル中の特定のタンパク質の発現レベルに関する情報を提供しうる。このタイプのタンパク質マイクロアレイは、種々のサンプルにおけるタンパク質発現を比較する際に特に有用である。

40

【0101】

1つの態様においては、該開示の方法は機能的タンパク質マイクロアレイを使用することが可能であり、これは、多数の精製完全長機能的タンパク質またはタンパク質ドメインを固定化することにより構築され、タンパク質-タンパク質、タンパク質-DNA、タンパク質-RNA、タンパク質-リン脂質およびタンパク質-小分子相互作用を特定するために、酵素活性をアッセイするために、ならびに抗体を検出しその特異性を示すために使

50

用される。これらのタンパク質マイクロアレイバイオチップは、サンプルにおける全プロテオームの生化学的活性を研究するために使用されうる。

【0102】

1つの態様においては、該開示の方法は逆相タンパク質マイクロアレイ(RPA)を使用しうる。マイクロアレイ上にアレイ化され、関心のある標的タンパク質に対する抗体でプローブされる組織および細胞ライセートから、逆相タンパク質マイクロアレイは構成される。これらの抗体は、典型的には、化学発光、蛍光または比色アッセイで検出される。タンパク質の定量を可能にするために、ライセート中のタンパク質に加えて、参照対照ペプチドがスライド上に印刷される。RPAは、疾患の結果でありうる及び罹患細胞内に存在しうる改変タンパク質または他の物質の存在の決定を可能にする。

10

【0103】

本開示は、質量分析(あるいはマススペクトロメトリーと称される)を用いるバイオマーカーの検出を提供する。質量分析(MS)は、荷電粒子の質量対電荷比を測定する分析技術である。それは主として、サンプルまたは分子の元素組成を決定するために、ならびにペプチドおよび他の化合物のような分子の化学構造を解明するために用いられる。化合物をイオン化させて荷電分子または分子フラグメントし、それらの質量対電荷比を測定することにより、MSは行われる。MS装置は典型的には以下の3つのモジュールからなる：(1)イオン源；これは気相サンプル分子をイオンへと変換しうる(またはエレクトロスプレーイオン化の場合には、溶液中に存在するイオンを気相へ移動させうる)、(2)質量分析器；これは、電磁場をかけることによりイオンをそれらの質量により選別する、および(3)検出器；これは指標量の値を測定して、存在する各イオンの存在量を計算するためのデータを与える。

20

【0104】

本開示で用いられる適当な質量分析方法は、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)、ESI-MS/MS、ESI-MS/(MS)_n、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS)、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析(SELDI-TOF-MS)、縦列液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS/MS)質量分析、シリコン上脱離/イオン化(DIOS)、二次イオン質量分析(SIMS)、四重極飛行時間型(Q-TOF)、大気圧化学イオン化質量分析(APCI-MS)、APCI-MS/MS、APCI-(MS)、大気圧光イオン化質量分析(APCI-MS)、APPI-MS/MS、およびAPPI-(MS)_n、四重極質量分析、フーリエ変換質量分析(FTMS)およびイオントラップ質量分析(ここで、nは0より大きな整数である)の1以上を含むが、これらに限定されるものではない。

30

【0105】

サンプルの根本的なプロテオミクスに対する洞察を得るためには、一般にはLC-MSを用いて複雑な混合物の成分を分離する。LC-MS法は一般に、プロテアーゼ消化および変性[通常はプロテアーゼ、例えばトリプシンおよび変性剤、例えば尿素(三次構造を変性させるためのもの)およびヨードアセトアミド(システイン残基を保護するためのもの)]を使用する、ならびにそれらに続く、個々のペプチドの配列を誘導するためのペプチド質量フィンガープリンティングでのLC-MSまたはLC-MS/MS(縦列MS)を含む。LC-MS/MSは、高分解能質量分析計を使用した場合でさえもペプチドの質量が重複しうる複雑なサンプルのプロテオミクス分析に最も一般に使用される。ヒト血清のような複雑な生物学的流体のサンプルを、まず、SDS-PAGEゲルまたはHPLC-SCX上で分離し、ついでLC-MS/MSに付して、1000個を超えるタンパク質の特定が可能となりうる。

40

【0106】

本明細書に記載されているとおり該開示の方法では複数の質量分析法が用いられうるが、幾つかの用途においては、関心のあるタンパク質の選択された部分集合から生物学的サンプル中のタンパク質を定量することが望ましいかもしれない。本開示で用いられうる1

50

つのようなMS技術は多反応モニタリング質量分析(Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry)(MRM-MS)であり、これは選択反応モニタリング質量分析(Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry)(SRM-MS)とも称される。

【0107】

MRM-MS技術はトリプル四重極(QQQ)質量分析計を使用して、関心のあるペプチドから正荷電イオンを選択し、該正荷電イオンをフラグメント化し、ついで、選択された正荷電フラグメントイオンの存在量を測定する。この測定は一般にトランジション(transition)と称される。該方法から得られたトランジションの例としては、表1を参照されたい。

10

【0108】

幾つかの用途においては、MRM-MSは高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)と共に、そしてより最近では超高压液体クロマトグラフィー(UHPLC)と共に使用される。他の用途においては、関心のあるペプチドおよびタンパク質の全ての所望のLC-MSトランジション測定を行うために、MRM-MSは、QQQ質量分析計を伴うUHPLCと共に使用される。

【0109】

幾つかの用途においては、四重極飛行時間型(qTOF)質量分析計、飛行時間型飛行時間型(TOF-TOF)質量分析計、オービトラップ(Orbitrap)質量分析計、四重極オービトラップ質量分析計またはいずれかの四重極イオントラップ質量分析計の利用を行って、関心のある1以上のペプチドから正荷電イオンを選択することが可能である。ついでフラグメント化正荷電イオンを測定して、関心のあるペプチドまたはタンパク質の定量のために正荷電イオンの存在量を決定することが可能である。

20

【0110】

幾つかの用途においては、飛行時間型(TOF)、四重極飛行時間型(qTOF)質量分析計、飛行時間型飛行時間型(TOF-TOF)質量分析計、オービトラップ(Orbitrap)質量分析計または四重極オービトラップ質量分析計の利用を行って、定量のために、フラグメント化を伴うことなく関心のあるタンパク質からの正荷電ペプチドイオンの質量および存在量を測定することが可能である。この用途においては、アナライトの質量測定精度がアッセイの選択基準として用いられうる。既知組成および濃度の同位体標識内部標準が質量分析定量法の一部として使用されうる。

30

【0111】

幾つかの用途においては、飛行時間型(TOF)、四重極飛行時間型(qTOF)質量分析計、飛行時間型飛行時間型(TOF-TOF)質量分析計、オービトラップ(Orbitrap)質量分析計または四重極オービトラップ質量分析計を使用して、定量のために関心のあるタンパク質の質量および存在量を測定することが可能である。この用途においては、アナライトの質量測定精度がアッセイの選択基準として用いられうる。所望により、この用途は質量分析による分析の前にタンパク質のタンパク質分解消化を用いうる。既知組成および濃度の同位体標識内部標準が質量分析定量法の一部として使用されうる。

40

【0112】

幾つかの用途においては、種々のイオン化技術を、本明細書に記載されている質量分析計と共に用いて、所望の情報を得ることが可能である。本開示で使用されうる非限定的な典型的なイオン化技術には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)、脱離エレクトロスプレーイオン化(DESI)、直接支援リアルタイム(DART)、表面支援レーザー脱離イオン化(SALDI)またはエレクトロスプレーイオン化(ESI)が含まれる。

【0113】

幾つかの用途においては、HPLCおよびUHPLCが質量分析計と共に使用可能であ

50

り、質量分析の前に幾つかの他のペプチドおよびタンパク質分離技術が行われうる。マトリックスバックグラウンドからの所望のアナライト（例えば、ペプチドまたはタンパク質）の分離に用いられうる幾つかの典型的な分離技術には、タンパク質またはペプチドの逆相液体クロマトグラフィー（R P - L C）、M A L D I 前のオフライン液体クロマトグラフィー（L C）、一次元ゲル分離、二次元ゲル分離、強カチオン交換（S C X）クロマトグラフィー、強アニオン交換（S A X）クロマトグラフィー、弱カチオン交換（W C X）および弱アニオン交換（W A X）が含まれるが、これらに限定されるものではない。前記技術の1以上は質量分析の前に用いられうる。

【0114】

該開示の1つの態様においては、バイオマーカーは、マイクロアレイを使用して生物学的サンプルにおいて検出されうる。マイクロアレイ技術を用いて差次的遺伝子発現も特定または確認されうる。したがって、マイクロアレイ技術を用いて、新鮮または固定組織において発現プロファイルバイオマーカーが測定されうる。この方法においては、関心のあるポリヌクレオチド配列（c D N A およびオリゴヌクレオチドを含む）をマイクロチップ基体上でプレーティングまたはアレイ化する。ついで該アレイ化配列を、関心のある細胞または組織からの特異的 D N A プローブでハイブリダイズさせる。m R N A 源は典型的には、生物学的サンプルから単離された全 R N A であり、対応する正常組織または細胞系を使用して差次的発現を測定することが可能である。

10

【0115】

該マイクロアレイ技術の特定の実施形態においては、c D N A クローンの P C R 増幅インサートを濃密アレイで基体に適用する。好ましくは、少なくとも 10,000 ヌクレオチド配列を基体に適用する。マイクロチップ上にそれぞれ 10,000 要素で固定化されたマイクロアレイ化遺伝子がストリンジентな条件下のハイブリダイゼーションに適している。関心のある組織から抽出された R N A の逆転写による蛍光ヌクレオチドの組み込みにより蛍光標識 c D N A プローブが調製されうる。該チップに適用された標識 c D N A プローブは該アレイ上の D N A の各スポットに特異的にハイブリダイズする。非特異的結合プローブを除去するためのストリンジентな洗浄の後、マイクロアレイチップを、共焦点レーザー顕微鏡のような装置または C C D カメラのような別の検出法によりスキャンする。各アレイ化要素のハイブリダイゼーションの定量は対応 m R N A 存在量の評価を可能にする。二重色蛍光を用いて、2つの R N A 源から調製された別々に標識された c D N A プローブをペアとして該アレイにハイブリダイズさせる。このようにして、特定された各遺伝子に対応する2つの起源からの転写産物の相対存在量が同時に決定される。マイクロアレイ分析は、製造業者のプロトコールに従い、商業的に入手可能な装置により行われうる。

20

30

【0116】

該開示の1つの態様においては、薬物処理の存在下または非存在下、正常および腫瘍組織において、異なるサンプル集団において m R N A レベルを比較するために、遺伝子発現のパターンを特徴づけるために、密接に関連した m R N A を識別するために、および R N A 構造を分析するために用いられうる q R T - P C R を用いて、生物学的サンプルにおいてバイオマーカーを検出することが可能である。R T - P C R による遺伝子発現プロファイリングにおける第1工程は、生物学的サンプルから R N A を抽出し、ついで該 R N A 鋳型から c D N A への逆転写および P C R 反応による増幅を行うことである。該逆転写反応工程は一般に、発現プロファイリングの目的に応じて特異的プライマー、ランダムヘキサマーまたはオリゴ-d T プライマーを使用して開始される。2つの一般的に使用される逆転写酵素として、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（A M V - R T）およびモロニーマウス白血病ウイルス（M L V - R T）が挙げられる。

40

【0117】

P C R 工程は種々の耐熱性 D N A 依存性 D N A ポリメラーゼを使用しうるが、それは典型的には T a q D N A ポリメラーゼを使用し、これは 5' - 3' ヌクレアーゼ活性を有するが、3' - 5' ブルーフリーディングエンドヌクレアーゼ活性を欠く。したがって、

50

TaqMan (商標) PCRは典型的には、標的アンプリコンに結合したハイブリダイゼーションプローブをハイブリダイズさせるためにTaqまたはTthポリメラーゼの5' -ヌクレアーゼ活性を利用するが、同等の5' -ヌクレアーゼ活性を有する酵素が使用されうる。PCR反応に典型的なアンプリコンを得るために、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。第3のオリゴヌクレオチド、すなわちプローブは、それらの2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計される。該プローブはTaq DNAポリメラーゼ酵素によっては伸長不可能であり、レポーター蛍光色素および消光蛍光色素で標識される。それらの2つの色素が接近してプローブ上に位置する場合に、該レポーター色素からの任意のレーザー誘発性発光が該消光色素により消光される。増幅反応中、Taq DNAポリメラーゼ酵素は鋳型依存的に該プローブを切断する。生じたプローブ断片は溶液中で解離し、該遊離レポーター色素からのシグナルは第2の発光団の消光効果を喪失している。新たな分子が合成されるたびに1分子のレポーター色素が遊離し、非消光レポーター色素の検出はデータの定量的解釈の基礎をもたらす。

【0118】

TaqMan (商標) RT-PCRは、商業的に入手可能な装置、例えばABI PRISM 7700 (商標) Sequence Detection System (商標) (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) またはLightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を使用して行われうる。好ましい実施形態においては、5' -ヌクレアーゼ法をリアルタイム定量PCR装置、例えばABI PRISM 7700 (商標) Sequence Detection System (商標) において行う。該システムはサーモサイクラ、レーザー、電荷結合素子 (CCD)、カメラおよびコンピュータからなる。該システムは、該装置を作動させるための及びデータを分析するためのソフトウェアを含む。5' -ヌクレアーゼアッセイデータは最初はCt、すなわち閾値サイクルとして表される。前記のとおり、蛍光値は各サイクル中に記録され、増幅反応におけるその時点までに増幅された産物の量を表す。蛍光シグナルが統計的に有意なものとして最初に記録された時点が閾値サイクル (Ct) である。

【0119】

サンプルごとの変動の誤差および影響を最小にするために、RT-PCRは通常、内部標準を使用して行われる。理想的な内部標準は種々の組織において一定レベルで発現され、実験処理によっては影響されない。遺伝子発現のパターンを正規化するために最も頻繁に使用されるRNAはハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸-デヒドロゲナーゼ (GAPDH) およびベータ-アクチンのmRNAである。

【0120】

RT-PCR技術のより最近の変法はリアルタイム定量PCRであり、これは二重標識発光プローブ (すなわち、TaqMan (商標) プローブ) によりPCR産物蓄積を測定する。リアルタイムPCRは、各標的配列に対する内部競合体が正規化のために使用される定量競合PCR、およびサンプル中に含有される正規化遺伝子またはRT-PCR用のハウスキーピング遺伝子を使用する定量競合PCRの両方に適合する。更なる詳細は、例えば、Heldら, Genome Research 6: 986-994 (1996) を参照されたい。

【0121】

G. データの取り扱い

前記のアッセイからの値は手動で計算され保存されうる。あるいは前記工程は完全または部分的にコンピュータプログラム製品により行われうる。したがって、本開示は、コンピュータ読取可能記憶媒体上に保存されたコンピュータプログラムを有するコンピュータ読取可能記憶媒体を含むコンピュータプログラム製品を提供する。該プログラムは、コンピュータにより読取られると、個体からの1以上の生物学的サンプルの分析から得られた値 (例えば、遺伝子またはタンパク質発現レベル、正規化、標準化、閾値処理、ならびに

臨床結果スコアおよび/または臨床状態もしくは段階および関連情報のテキストもしくはグラフィック描写へのアッセイからの値の変換)に基づく関連計算を実行しうる。該コンピュータプログラム製品は、そのなかに、該計算を行うためのコンピュータプログラムを保存している。

【0122】

本開示は、データ収集を実行し前記ソフトウェアプログラムを操作または計算するためのシステムを提供し、該システムは一般に、a)中央コンピューティング環境、b)患者データ(該患者データは、例えば、該患者からの生物学的サンプルを使用するアッセイから得られた遺伝子もしくはタンパク質発現レベルまたは他の値、あるいは本開示により提供されるアッセイのいずれかに関する質量分析データを含みうる)を受け取るための、該コンピュータ環境に機能的に連結された入力装置、c)情報を使用者(例えば、医療関係者)に提供するための、該コンピュータ環境に連結された出力装置、およびd)該中央コンピューティング環境(例えば、プロセッサ)により実行されるアルゴリズム(該アルゴリズムは、該入力装置により受け取られたデータに基づいて実行され、該アルゴリズムは発現スコア、閾値処理または本明細書に記載の他の機能を計算する)を含む。また、本開示により提供される方法は全体的または部分的に自動化されうる。

10

【0123】

H.被験者

結腸腫瘍またはポリープを有する可能性を決定することを望む被験者から生物学的サンプルを収集する。該開示は、健康および無症状性でありうる被験者を提示する。種々の実施形態においては、該被験者は健康であり、無症候性であり、20~50歳である。種々の実施形態においては、該被験者は健康であり、無症候性であり、腺癌またはポリープの家族病歴を有さない。種々の実施形態においては、該被験者は健康であり、無症候性であり、結腸内視鏡検査を受けたことがない。該開示はまた、定期検査の一部として又はバイオマーカーのベースラインレベルを確定するために試験を受けている健康な被験者を提示する。

20

【0124】

該開示は、結腸直腸癌の症状を有さず、結腸直腸癌の家族病歴を有さず、結腸直腸癌の認識されたりスク因子を有さない被験者を提示する。該開示は、結腸直腸癌の症状を有さず、結腸直腸癌の家族病歴を有さず、年齢以外の結腸直腸癌の認識されたりスク因子を有さない被験者を提示する。

30

【0125】

生物学的サンプルは、家族病歴に基づいて結腸直腸ポリープもしくは癌の高いリスクを有すると判定された、結腸直腸ポリープもしくは癌の治療を過去に受けたことがある及び/又は寛解中である被験者からも収集されうる。生物学的サンプルは、結腸直腸癌に関連していることが知られている身体症状を示す被験者、スクリーニングアッセイ(例えば、便潜血検査またはS状結腸鏡検査)あるいは直腸指診または非柔軟性もしくは柔軟性結腸内視鏡検査またはCTスキャンまたは他のX線技術により特定された被験者からも収集されうる。生物学的サンプルは、被験者が受けている療法または治療の有効性を判定するために治療を現在受けている被験者からも収集されうる。

40

【0126】

I.生物学的サンプル

バイオマーカーは種々のタイプの生物学的サンプルにおいて測定されうる。該サンプルは、好ましくは、系全体を収集し調査する生物学的サンプルからのものである。本開示において有用な生物学的サンプル型の例には、尿、便、涙、全血、血清、血漿、血液成分、骨髓、組織、細胞、器官、唾液、頬スワブ、リンパ液、脳脊髄液、病変滲出物、および身体により産生される他の流体の1以上が含まれるが、これらに限定されるものではない。バイオマーカーは凍結、固定、パラフィン包埋または新鮮生検サンプルからも抽出されうる。

【0127】

50

IV. バイオマーカーおよびバイオマーカープロファイル

本開示のバイオマーカーは、結腸ポリープに罹患している又はその発生のリスクを有する者と健康な個体との間の識別、ならびに結腸ポリープの種々の状態（例えば、過形成性、悪性、癌または腫瘍亜型）の間の識別を可能にする。特に、バイオマーカーの本開示の発見は、結腸ポリープおよび結腸癌の臨床評価および処置を補助する診断方法、キットを提供する。

【0128】

結腸ポリープの臨床評価および処置に有用でありうるバイオマーカーには、以下のタンパク質（UNIPROTEIN ID番号）の完全タンパク質、ペプチド断片、核酸または遷移イオンが含まれる：SPB6__HUMAN、FRIL__HUMAN、P53__HUMAN、1A68__HUMAN、ENOA__HUMAN、TKT__HUMANおよびそれらの組合せ。

10

【0129】

結腸ポリープの臨床評価および処置に有用でありうるバイオマーカーには、以下のタンパク質（UNIPROTEIN ID番号）の完全タンパク質、ペプチド断片、核酸または遷移イオンが含まれる：SPB6__HUMAN、FRIL__HUMAN、P53__HUMAN、1A68__HUMAN、ENOA__HUMAN、TKT__HUMAN、TSG6__HUMAN、TPM2__HUMAN、ADT2__HUMAN、FHL1__HUMAN、CCR5__HUMAN、CEAM5__HUMAN、SPON2__HUMAN、1A68__HUMAN、RBX1__HUMAN、COR1C__HUMAN、VIME__HUMAN、PSME3__HUMANおよびそれらの組合せ。

20

【0130】

結腸ポリープの臨床評価および処置に有用でありうるバイオマーカーには、以下のタンパク質（UNIPROTEIN ID番号）の完全タンパク質、ペプチド断片、核酸または遷移イオンが含まれる：SPB6__HUMAN、FRIL__HUMAN、P53__HUMAN、1A68__HUMAN、ENOA__HUMANおよびTKT__HUMAN、TSG6__HUMAN、TPM2__HUMAN、ADT2__HUMAN、FHL1__HUMAN、CCR5__HUMAN、CEAM5__HUMAN、SPON2__HUMAN、1A68__HUMAN、RBX1__HUMAN、COR1C__HUMAN、VIME__HUMAN、PSME3__HUMAN、MIC1__HUMAN、STK11__HUMAN、IPYR__HUMAN、SBP1__HUMAN、PEBP1__HUMAN、CATD__HUMAN、HPT__HUMAN、ANXA5__HUMAN、ALDOA__HUMAN、LAMA2__HUMAN、CATZ__HUMAN、ACTB__HUMAN、AACT__HUMANならびにそれらの組合せ。

30

【0131】

結腸ポリープの臨床評価および処置に有用でありうるバイオマーカーには、図12の遷移イオンが含まれる。

【0132】

該開示の方法により全血清から特定されるバイオマーカーには、以下のタンパク質（UNIPROTEIN ID番号）に対応する完全タンパク質、ペプチド断片、核酸または遷移イオンが含まれる：アクチン，細胞質1（ACTB__HUMAN）（配列番号1）、アクチン，ガンマ-腸平滑筋前駆体（ACTH__HUMAN）（配列番号2）、アンジオテンシノーゲン前駆体（ANGT__HUMAN）（配列番号3）、アデノシルホモシステイナーゼ（SAHH__HUMAN）（配列番号4）、アルドースレダクターゼ（ALDR__HUMAN）（配列番号5）、RAC-アルファセリン/トレオニン-タンパク質キナーゼ（AKT1__HUMAN）（配列番号6）、血清アルブミン前駆体（ALBU__HUMAN）（配列番号7）、網膜デヒドロゲナーゼ1（AL1A1__HUMAN）（配列番号8）、アルデヒドデヒドロゲナーゼX，ミトコンドリア前駆体（AL1B1__HUMAN）（配列番号9）、フルクトース-ビスホスファートアルドラーゼA（ALDOA__HUMAN）（配列番号10）、アルファ-アミラーゼ2B前駆体（AMY2B__HUMAN）

40

50

N) (配列番号 11)、アネキシン A1 (ANXA1__HUMAN) (配列番号 12)、
 アネキシン A3 (ANXA3__HUMAN) (配列番号 13)、アネキシン A4 (ANXA4__HUMAN) (配列番号 14)、アネキシン A5 (ANXA5__HUMAN) (配列番号 15)、大腸腺腫症タンパク質 (APC__HUMAN) (配列番号 16)、アポリポタンパク質 A-I 前駆体 (APOA1__HUMAN) (配列番号 17)、アポリポタンパク質 C-I 前駆体 (APOC1__HUMAN) (配列番号 18)、ベータ-2-糖タンパク質 1 前駆体 (APOH__HUMAN) (配列番号 19)、Rho GDP-解離インヒビター 1 (GDIR1__HUMAN) (配列番号 20)、ATPシンターゼサブユニットベータ, ミトコンドリア前駆体 (ATPB__HUMAN) (配列番号 21)、アンキリン反復を有する B-細胞スカフォールドタンパク質 (BANK1__HUMAN) (配列番号 22)、未特徴づけタンパク質 C18orf8 (MIC1__HUMAN) (配列番号 23)、推定未特徴づけタンパク質 C1orf195 (CA195__HUMAN) (配列番号 24)、補体 C3 前駆体 (CO3__HUMAN) (配列番号 25)、補体成分 C9 前駆体 (CO9__HUMAN) (配列番号 26)、炭酸脱水酵素 1 (CAH1__HUMAN) (配列番号 27)、炭酸脱水酵素 2 (CAH2__HUMAN) (配列番号 28)、カルレティキュリン前駆体 (CALR__HUMAN) (配列番号 29)、マクロファージ-キャッピングタンパク質 (CAPG__HUMAN) (配列番号 30)、シグナルトランスドューサー CD24 前駆体 (CD24__HUMAN) (配列番号 31)、CD63 抗原 (CD63__HUMAN) (配列番号 32)、シチジンデアミナーゼ (CDD__HUMAN) (配列番号 33)、癌胎児性抗原関連細胞接着分子 3 (CEAM3__HUMAN) (配列番号 34)、癌胎児性抗原関連細胞接着分子 5 (CEAM5__HUMAN) (配列番号 35)、癌胎児性抗原関連細胞接着分子 6 (CEAM6__HUMAN) (配列番号 36)、絨毛性ゴナドトロピンサブユニットベータ前駆体 (CGB__HUMAN) (配列番号 37)、キチナーゼ 3 様タンパク質 1 前駆体 (CH3L1__HUMAN) (配列番号 38)、クレアチニンキナーゼ B 型 (KCRB__HUMAN) (配列番号 39)、C 型レクチンドメインファミリー 4 メンバー D (CLC4D__HUMAN) (配列番号 40)、クラステリン前駆体 (CLUS__HUMAN) (配列番号 41)、カルボニン-1 (CNN1__HUMAN) (配列番号 42)、コロニン-1C (COR1C__HUMAN) (配列番号 43)、C-反応性タンパク質前駆体 (CRP__HUMAN) (配列番号 44)、マクロファージコロニー刺激因子 1 前駆体 (CSF1__HUMAN) (配列番号 45)、カテニンベータ-1 (CTNB1__HUMAN) (配列番号 46)、カテプシン D 前駆体 (CATD__HUMAN) (配列番号 47)、カテプシン S 前駆体 (CATS__HUMAN) (配列番号 48)、カテプシン Z 前駆体 (CATZ__HUMAN) (配列番号 49)、カリン-1 (CUL1__HUMAN) (配列番号 50)、アスパルタート-tRNAリガーゼ, 細胞質 (SYDC__HUMAN) (配列番号 51)、好中球デフェンシン 1 (DEF1__HUMAN) (配列番号 52)、好中球デフェンシン 3 (DEF3__HUMAN) (配列番号 53)、デスミン (DESM__HUMAN) (配列番号 54)、ジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP4__HUMAN) (配列番号 55)、ジヒドロピリミジナーゼ関連タンパク質 2 (DPYL2__HUMAN) (配列番号 56)、細胞質ダイニン 1 重鎖 1 (DYHC1__HUMAN) (配列番号 57)、デルタ(3,5)-デルタ(2,4)-ジエノイル-CoA イソメラーゼ, ミトコンドリア前駆体 (ECH1__HUMAN) (配列番号 58)、伸長因子 2 (EF2__HUMAN) (配列番号 59)、真核生物開始因子 4A-II (IF4A3__HUMAN) (配列番号 60)、アルファ-エノラーゼ (ENOA__HUMAN) (配列番号 61)、エズリン (EZRI__HUMAN) (配列番号 62)、ニバン様前駆体 2 (NIBL2__HUMAN) (配列番号 63)、セプラーゼ (SEPR__HUMAN) (配列番号 64)、Fボックスオンリータンパク質 4 (FBX4__HUMAN) (配列番号 65)、フィブリノーゲンベータ鎖前駆体 (FIBB__HUMAN) (配列番号 66)、フィブリノーゲンガンマ鎖 (FIBG__HUMAN) (配列番号 67)、フォー・アンド・ア・ハーフ (Four and a half) LIMドメインタンパク質 1 (FHL1__HUMAN) (配列番号 68)、フィラミン A (FLNA__HU

MAN) (配列番号69)、FERMドメイン含有タンパク質3 (FRMD3__HUMAN) (配列番号70)、フェリチン重鎖 (FRIH__HUMAN) (配列番号71)、フェリチン軽鎖 (FRIL__HUMAN) (配列番号72)、組織アルファ-L-フコシダーゼ前駆体 (FUCO__HUMAN) (配列番号73)、ガンマ-アミノ酪酸受容体サブユニットアルファ-1前駆体 (GBRA1__HUMAN) (配列番号74)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (G3P__HUMAN) (配列番号75)、グリシン-tRNAリガーゼ (SYG__HUMAN) (配列番号76)、成長/分化因子15前駆体 (GDF15__HUMAN) (配列番号77)、ゲルソリン前駆体 (GELS__HUMAN) (配列番号78)、グルタチオンS-トランスフェラーゼP (GSTP1__HUMAN) (配列番号79)、ヒアルロナン結合タンパク質2前駆体 (HABP2__HUMAN) (配列番号80)、肝細胞増殖因子前駆体 (HGF__HUMAN) (配列番号81)、HLAクラスI組織適合性抗原, A-68アルファ鎖 (1A68__HUMAN) (配列番号82)、高移動度タンパク質B1 (HMGB1__HUMAN) (配列番号83)、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質A1 (ROA1__HUMAN) (配列番号84)、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質A2/B1 (ROA2__HUMAN) (配列番号85)、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質F (HNRPF__HUMAN) (配列番号86)、ハプトグロビン前駆体 (HPT__HUMAN) (配列番号87)、熱ショックタンパク質HSP90-ベータ (HS90B__HUMAN) (配列番号88)、エンドプラスミン前駆体 (ENPL__HUMAN) (配列番号89)、ストレス-70タンパク質, ミトコンドリア前駆体 (GRP75__HUMAN) (配列番号90)、熱ショックタンパク質ベータ-1 (HSPB1__HUMAN) (配列番号91)、60kDa熱ショックタンパク質, ミトコンドリア (CH60__HUMAN) (配列番号92)、骨シアロタンパク質2 (SIAL__HUMAN) (配列番号93)、鞭毛内輸送タンパク質74ホモログ (IFT74__HUMAN) (配列番号94)、インスリン様増殖因子I (IGF1__HUMAN) (配列番号95)、Igアルファ-2鎖C領域 (IGHA2__HUMAN) (配列番号96)、インターロイキン-2受容体サブユニットベータ前駆体 (IL2RB__HUMAN) (配列番号97)、インターロイキン-8 (IL8__HUMAN) (配列番号98)、インターロイキン-9 (IL9__HUMAN) (配列番号99)、GTPアーゼKRAS前駆体 (RASK__HUMAN) (配列番号100)、ケラチンI型細胞骨格19 (K1C19__HUMAN) (配列番号101)、ケラチンII型細胞骨格8 (K2C8__HUMAN) (配列番号102)、ラミニンサブユニットアルファ-2前駆体 (LAMA2__HUMAN) (配列番号103)、ガレクチン-3 (LEG3__HUMAN) (配列番号104)、ラミン-B1前駆体 (LMNB1__HUMAN) (配列番号105)、微小管関連タンパク質RP/EBファミリーメンバー1 (MARE1__HUMAN) (配列番号106)、DNA複製ライセンス因子MCM4 (MCM4__HUMAN) (配列番号107)、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF__HUMAN) (配列番号108)、マトリリシン前駆体 (MMP7__HUMAN) (配列番号109)、マトリックスメタロプロテイナーゼ-9前駆体 (MMP9__HUMAN) (配列番号110)、B-リンパ球抗原CD20 (CD20__HUMAN) (配列番号111)、ミオシン軽ポリペプチド6 (MYL6__HUMAN) (配列番号112)、ミオシン調節性軽ポリペプチド9 (MYL9__HUMAN) (配列番号113)、ヌクレオシド二リン酸キナーゼA (NDKA__HUMAN) (配列番号114)、ニコチンアミドN-メチルトランスフェラーゼ (NNMT__HUMAN) (配列番号115)、アルファ-1-酸糖タンパク質1前駆体 (A1AG1__HUMAN) (配列番号116)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ [GTP], ミトコンドリア前駆体 (PCKGM__HUMAN) (配列番号117)、タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼA3前駆体 (PDIA3__HUMAN) (配列番号118)、タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼA6前駆体 (PDIA6__HUMAN) (配列番号119)、ピリドキサルキナーゼ (PDXK__HUMAN) (配列番号120)、ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1 (PEBP1__HUMAN) (配列番号121)、ホスファチジルイノシトール転移タンパク質アルファアイソフォー

ム (P I P N A _ _ H U M A N) (配列番号 1 2 2)、ピルビン酸キナーゼアイソザイム M
 1 / M 2 (K P Y M _ _ H U M A N) (配列番号 1 2 3)、ウロキナーゼ型プラスミノーゲ
 ンアクチベータ前駆体 (U R O K _ _ H U M A N) (配列番号 1 2 4)、無機ピロホスファ
 ターゼ (I P Y R _ _ H U M A N) (配列番号 1 2 5)、ペルオキシレドキシニン - 1 (P R
 D X 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 2 6)、セリン/トレオニン - プロテインキナーゼ D
 1 (K P C D 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 2 7)、プロラクチン (P R L _ _ H U M A N
) (配列番号 1 2 8)、膜貫通ガンマ - カルボキシグルタミン酸タンパク質 4 前駆体 (T
 M G 4 _ _ H U M A N) (配列番号 1 2 9)、プロテアソームアクチベータ複合体サブユニ
 ット 3 (P S M E 3 _ _ H U M A N) (配列番号 1 3 0)、ホスファチジルイノシトール 3
 , 4 , 5 - 三リン酸 3 - ホスファターゼおよび二重特異性タンパク質ホスファターゼ P T
 E N (P T E N _ _ H U M A N) (配列番号 1 3 1)、接着斑キナーゼ 1 (F A K 1 _ _ H U
 M A N) (配列番号 1 3 2)、タンパク質 - チロシンキナーゼ 2 - ベータ (F A K 2 _ _ H
 U M A N) (配列番号 1 3 3)、E 3 ユビキチン - タンパク質リガーゼ R B X 1 (R B X
 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 3 4)、再生島由来タンパク質 4 前駆体 (R E G 4 _ _ H U
 M A N) (配列番号 1 3 5)、トランスフォーミングタンパク質 R h o A (R H O A _ _ H
 U M A N) (配列番号 1 3 6)、R h o 関連 G T P 結合タンパク質 R h o B (R H O B _ _
 H
 U M A N) (配列番号 1 3 7)、R h o 関連 G T P 結合タンパク質 R h o C (R H O C _ _
 H U M A N) (配列番号 1 3 8)、4 0 S リボソームタンパク質 S A (R S S A _ _ H U M
 A N) (配列番号 1 3 9)、リボソーム結合タンパク質 1 (R R B P 1 _ _ H U M A N) (配
 列番号 1 4 0)、タンパク質 S 1 0 0 - A 1 1 (S 1 0 A B _ _ H U M A N) (配列番号
 1 4 1)、タンパク質 S 1 0 0 - A 1 2 (S 1 0 A C _ _ H U M A N) (配列番号 1 4 2)
 、タンパク質 S 1 0 0 - A 8 (S 1 0 A 8 _ _ H U M A N) (配列番号 1 4 3)、タンパク
 質 S 1 0 0 - A 9 (S 1 0 A 9 _ _ H U M A N) (配列番号 1 4 4)、血清アミロイド A -
 1 タンパク質 (S A A 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 4 5)、血清アミロイド A - 2 タン
 パク質前駆体 (S A A 2 _ _ H U M A N) (配列番号 1 4 6)、セクレタゴギン (S E G N
 _ _ H U M A N) (配列番号 1 4 7)、血清学的規定結腸癌抗原 3 (S D C G 3 _ _ H U M A
 N) (配列番号 1 4 8)、コハク酸デヒドロゲナーゼ [ユビキノ] フラビントタンパク質
 サブユニット, ミトコンドリア前駆体 (D H S A _ _ H U M A N) (配列番号 1 4 9)、セ
 レン結合タンパク質 1 (S B P 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 5 0)、P - セレクチン糖
 タンパク質リガンド 1 前駆体 (S E L P L _ _ H U M A N) (配列番号 1 5 1)、セブチン
 - 9 (S E P T 9 _ _ H U M A N) (配列番号 1 5 2)、アルファ - 1 - アンチトリプシン
 前駆体 (A 1 A T _ _ H U M A N) (配列番号 1 5 3)、アルファ - 1 - アンチキモトリプ
 シン前駆体 (A A C T _ _ H U M A N) (配列番号 1 5 4)、白血球エラスターゼインヒビ
 ター (I L E U _ _ H U M A N) (配列番号 1 5 5)、セルピン B 6 (S P B 6 _ _ H U M A
 N) (配列番号 1 5 6)、スプライシング因子 3 B サブユニット 3 (S F 3 B 3 _ _ H U M
 A N) (配列番号 1 5 7)、S 相キナーゼ関連タンパク質 1 (S K P 1 _ _ H U M A N) (配
 列番号 1 5 8)、A D P / A T P トランスロカーゼ 2 (A D T 2 _ _ H U M A N) (配列
 番号 1 5 9)、膵分泌トリプシンインヒビター (I S K 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 6
 0)、スポンジン - 2 (S P O N 2 _ _ H U M A N) (配列番号 1 6 1)、オステオポンチ
 ン (O S T P _ _ H U M A N) (配列番号 1 6 2)、癌原遺伝子チロシン - タンパク質キナ
 ーゼ S r c (S R C _ _ H U M A N) (配列番号 1 6 3)、セリン/トレオニン - タンパク
 質キナーゼ S T K 1 1 (S T K 1 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 6 4)、ヘテロ核リボヌ
 クレオタンパク質 Q (H N R P Q _ _ H U M A N) (配列番号 1 6 5)、T 細胞急性リンパ
 性白血病タンパク質 1 (T A L 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 6 6)、セロトランスフェ
 リン前駆体 (T R F E _ _ H U M A N) (配列番号 1 6 7)、トロンボスポンジン 1 前駆体
 (T S P 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 6 8)、メタロプロテイナーゼインヒビター 1 (T
 I M P 1 _ _ H U M A N) (配列番号 1 6 9)、トランスケトラーゼ (T K T _ _ H U M A
 N) (配列番号 1 7 0)、腫瘍壊死因子誘導遺伝子 6 タンパク質前駆体 (T S G 6 _ _ H U
 M A N) (配列番号 1 7 1)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 B (

TR10B__HUMAN) (配列番号172)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー6B (TNF6B__HUMAN) (配列番号173)、細胞腫瘍抗原p53 (P53__HUMAN) (配列番号174)、トロポミオシンベータ鎖 (TPM2__HUMAN) (配列番号175)、翻訳制御腫瘍タンパク質 (CTTP__HUMAN) (配列番号176)、熱ショックタンパク質75kDa, ミトコンドリア前駆体 (TRAP1__HUMAN) (配列番号177)、チオ硫酸スルフトランスフェラーゼ (THTR__HUMAN) (配列番号178)、チューブリンベータ-1鎖 (TBB1__HUMAN) (配列番号179)、UDP-グルコース6-デヒドロゲナーゼ (UGDH__HUMAN) (配列番号180)、UTP-グルコース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ (UGPA__HUMAN) (配列番号181)、血管内皮増殖因子A (VEGFA__HUMAN) (配列番号182)、ピリン-1 (VILI__HUMAN) (配列番号183)、ピメンチン (VIME__HUMAN) (配列番号184)、パンテテイナーゼ前駆体 (VNN1__HUMAN) (配列番号185)、14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ (1433Z__HUMAN) (配列番号186)、C-Cケモカイン受容体5型 (CCR5__HUMAN) (配列番号187) または血漿アルファ-L-フコシダーゼ (FUCO2__HUMAN) (配列番号188)。本発明の方法は、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個の前記バイオマーカーの発現レベルを決定することを想定している。該方法は、前記バイオマーカーの少なくとも10個、少なくとも15個または少なくとも20個の発現レベルを決定することを含みうる。

10

20

【0133】

本開示の全開示において、該方法は、該方法は更に、本明細書に記載されている少なくとも2個のバイオマーカーの発現レベルを決定(測定)することを含みうる。本開示の方法は、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個の本明細書に記載されているバイオマーカーの発現レベルを決定することを更に含む、と更に想定される。該方法は、本明細書に記載されているバイオマーカーの少なくとも10個、少なくとも15個または少なくとも20個の発現レベルの決定を含みうる。

【0134】

該開示の方法により全血清から特定されるバイオマーカーには、以下のタンパク質に対応するペプチド/タンパク質断片または遺伝子が含まれる: SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACAM5)、CA195 (CCR5)、CA19-9、M2PK (PKM2)、TIMP1、P-セレクトリン (SELP LG)、VEGFA、HcGB (CGB)、VILLIN、TATI (SPINK1) およびA-L-フコシダーゼ (FUCA2)。前記タンパク質または遺伝子の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個および全12個の群が含まれる。そのような群はこの集合内のタンパク質または遺伝子を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質または遺伝子を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

30

【0135】

該開示の方法により全血清から特定されるバイオマーカーには、以下のタンパク質に対応するペプチド/タンパク質断片または遺伝子が含まれる: ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1 およびRPSA。前記タンパク質または遺伝子の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個および全19個の群が含まれる。そのような群はこの集合内のタンパク質または遺伝子を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質または遺伝子を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

40

50

【0136】

該開示の方法により全血清から特定されるバイオマーカーには、図9において特定されているタンパク質に対応するペプチド/タンパク質断片または遺伝子が含まれる。前記タンパク質または遺伝子の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個以上の群が含まれる。そのような群はこの集合内のタンパク質または遺伝子を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

【0137】

タンパク質は、しばしば、複数の異なる形態のサンプル中に存在することが公知である。なぜなら、それらは種々のタンパク質複合体の種々の形態で会合しうるからである。これらの形態は翻訳前および翻訳後修飾の一方または両方から生じうる。翻訳前修飾形態は対立変異体、スライス変異体およびRNA編集形態を含む。そのような場合、遺伝子発現産物は、ヒトデータベースにおいて定められているタンパク質に対する種々の相同性で存在することが公知である。したがって、該開示は、定められたバイオマーカーの種々の形態が存在しうると理解している。例えば、該配列相同性は、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上および99%以上からなる群から選択される。また、該バイオマーカーの翻訳後修飾形態が存在しうる。翻訳後修飾形態には、タンパク質バイオマーカーのタンパク質分解切断（例えば、親タンパク質の断片）、グリコシル化、リン酸化、脂質化、酸化、メチル化、シスチニル化、スルホン化およびアセチル化から生じる形態が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

20

【0138】

本開示のバイオマーカーには、完全長タンパク質、それらの対応RNAまたはDNAおよび全ての修飾形態が含まれる。バイオマーカーの修飾形態には、例えば、開示されているバイオマーカーの任意のスライス変異体およびそれらをコードするそれらの対応RNAまたはDNAが含まれる。ある場合には、該修飾形態または該タンパク質のトランケート化形態またはそれらの対応RNAもしくはDNAは完全長タンパク質より良好な識別力を診断において示しうる。

【0139】

タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのトランケート化体または断片は一般に、該タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのN末端および/またはC末端欠失またはトランケート化形態を意味する。この語は、該ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の選択的翻訳、エキソおよび/またはエンドタンパク質分解および/または分解（これらに限定されるものではない）、例えば、インビボまたはインビトロにおけるもの、例えば、物理的、化学的および/または酵素的タンパク質分解によるもののような任意のメカニズムにより生じる断片を含む。限定的なものではないが、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのトランケート化体または断片は、該タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列の少なくとも約5%または少なくとも約10%、例えば、>20%、>30%または>40%、例えば、>50%、例えば、>60%、>70%または>80%、または更には90%または>95%に相当しうる。

30

40

【0140】

限定的なものではないが、タンパク質のトランケート化または断片は対応完全長タンパク質の5個の連続的アミノ酸または10個の連続的アミノ酸または20個の連続的アミノ酸または30個の連続的アミノ酸または50個以上の連続的アミノ酸、例えば、60、70、80、90、100、200、300、400、500または600個の連続的アミノ酸の配列を含みうる。

【0141】

幾つかの場合には、断片は、対応する成熟完全長タンパク質またはその可溶性もしくは血漿循環形態と比較して1~約20アミノ酸、例えば、1~約15アミノ酸、または1~約10アミノ酸、または1~約5アミノ酸だけN末端および/またはC末端でトランケート化されていることが可能である。

50

【0142】

ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質およびそれらの断片のような本開示の任意のタンパク質バイオマーカーは、該マーカー、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質および断片の修飾形態、例えば、リン酸化、グリコシル化、脂質化、メチル化、システニル化、スルホン化、グルタチオン化、アセチル化、メチオニンからメチオニンスルホキシドまたはメチオニンスルホンへの酸化などのような修飾（これらに限定されるものではない）を含む発現後修飾を含有するものをも含む。

【0143】

幾つかの場合においては、与えられたタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの断片は、サンプルから有利に検出可能なペプチドを得るために該タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのインビトロタンパク質分解を行うことにより得られうる。例えば、そのようなタンパク質分解は、適当な物理的、化学的および/または酵素的物質、例えばプロテイナーゼ、好ましくはエンドプロテイナーゼ、すなわち、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチド鎖内で内的に切断するプロテアーゼにより行われうる。

10

【0144】

エンドプロテイナーゼの適当な非限定的な例には、セリンプロテイナーゼ（EC 3.4.21）、トレオニンプロテイナーゼ（EC 3.4.25）、システインプロテイナーゼ（EC 3.4.22）、アスパラギン酸プロテイナーゼ（EC 3.4.23）、メタロプロテイナーゼ（EC 3.4.24）およびグルタミン酸プロテイナーゼが含まれるが、これらに限定されるものではない。典型的な非限定的なエンドプロテイナーゼには、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、リソバクター・エンザイモゲネス（*Lysobacter enzymogenes*）エンドプロテイナーゼ Lys-C、スタヒロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）エンドプロテイナーゼ Glu-C（エンドペプチダーゼ V8）またはクロストリジウム・ヒストリチクム（*Clostridium histolyticum*）エンドプロテイナーゼ Arg-C（クロストリパイン（*clostripain*））が含まれる。

20

【0145】

好ましくは、該タンパク質分解は、トリプシン型（EC 3.4.21.4）のエンドペプチダーゼ、好ましくはトリプシン、例えば、ウシ膵臓、ヒト膵臓、ブタ膵臓からのトリプシンの調製物、組換えトリプシン、Lys-アセチル化トリプシン、溶液中のトリプシン、固体支持体に固定化されたトリプシンなど（これらに限定されるものではない）により行われうる。トリプシンは、とりわけ、切断の高い特異性および効率ゆえに、特に有用である。該開示はまた、任意のトリプシン様プロテアーゼ、すなわち、トリプシンに類似した特異性を有するプロテアーゼの使用を提供する。あるいは、タンパク質分解のために化学試薬が使用されうる。単なる例示に過ぎないが、CNBrはMetにおいて切断することが可能であり、BNPS-スカトールはTrpにおいて切断することが可能である。処理のための条件、例えばタンパク質濃度、酵素または化学試薬濃度、pH、バッファー、温度、時間は、使用される酵素または化学試薬に応じて、熟練した者により決定されうる。更に、公知の又は未だ特定されていない酵素が、所望のペプチド形態を得るために、それらの切断特異性および頻度に基づいて、本開示で使用されうる。

30

40

【0146】

幾つかの場合には、断片化タンパク質またはペプチドはN末端および/またはC末端でランケート化可能であり、N末端（a、b、cイオン）および/またはC末端（x、y、zイオン）でランケート化されたタンパク質またはペプチドの、1つ又は全ての遷移イオンである。例えば、該ペプチド断片がアミノ酸配列IAELLSPGSVDPLTRから構成される場合、該ペプチド断片の遷移イオンバイオマーカーは、表1に示されている以下の遷移イオンバイオマーカーの1以上を含む。

【表 1】

表 1: ペプチド配列 IAELLSPGSVDPLTR の全遷移イオンの例

遷移イオン	アミノ酸配列	
b1	I	
b2	IA	
b3	IAE	
b4	IAEL	10
b5	IAELL	
b6	IAELLS	
b7	IAELLSP	
b8	IAELLSPG	
b9	IAELLSPGS	
b10	IAELLSPGSV	
b11	IAELLSPGSVD	20
b12	IAELLSPGSVDP	
b13	IAELLSPGSVDPL	
b14	IAELLSPGSVDPLT	
y14	AELLSPGSVDPLTR	
y13	ELLSPGSVDPLTR	
y12	LLSPGSVDPLTR	30
y11	LSPGSVDPLTR	
y10	SPGSVDPLTR	
y9	PGSVDPLTR	
y8	GSVDPLTR	
y7	SVDPLTR	
y6	VDPLTR	
y5	DPLTR	40
y4	PLTR	
y3	LTR	
y2	TR	
y1	R	

【 0 1 4 7 】

該開示のバイオマーカーには、SCDC26 (CD26)、CEA分子5 (CEACA) 50

M5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)およびA-L-フコシダーゼ(FUCA2)の結合相手が含まれる。前記タンパク質の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個および全12個の群が含まれる。そのような群はこの集合内のタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

【0148】

該開示のバイオマーカーには、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAの結合相手が含まれる。前記タンパク質の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個および全19個の群が含まれる。そのような群はこの集合内のタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

10

【0149】

本明細書中に教示されている典型的なヒトマーカー、核酸、タンパク質またはポリペプチドは、NCBI Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)またはSwissprot/Uniprot(<http://www.uniprot.org/>)アクセッション番号でアノテーションされているとおりのものでありうる。幾つかの場合には、該配列は、本明細書に教示されているマーカー、核酸、タンパク質またはポリペプチドの前駆体(例えば、プレタンパク質)のものであることが可能であり、成熟分子からプロセッシング除去される部分を含みうる。幾つかの場合には、1以上のアイソフォームだけが開示されているかもしれないが、該配列の全アイソフォームが意図される。

20

【0150】

本開示のバイオマーカーには、図9において特定されているタンパク質の結合相手が含まれる。前記タンパク質の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個以上の群が含まれる。そのような群はこの集合内のタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である

30

前記バイオマーカーは、該開示の方法により特定された、分子量および部分配列により決定されたバイオマーカーの一例であり、例示的な具体例として記載されているに過ぎず、該開示を何ら限定するものではない。バイオマーカーまたは修飾バイオマーカーの1以上を検出するためには、適当な方法が使用可能であり、それらは本明細書に記載されている。幾つかの態様においては、該開示は、代謝産物、DNA配列、RNA配列およびそれらの組合せからなる群から選択される1以上のアナライトの追加的バイオマーカーの存在に関する生物学的サンプルの分析の実施を提供する。本明細書に挙げられているバイオマーカーは、遺伝的分析、例えば、被験者からの全ゲノムDNAまたはRNA配列決定のような他の情報と更に組合せられうる。

40

【0151】

本開示の全態様は、限られた数の該開示バイオマーカー、それらの結合相手、スプライス変異体ならびに対応DNAおよびRNAを使用することによっても実施されうる。

【0152】

対応DNAおよびRNAに加えて、本開示により提供されるバイオマーカーのDNAおよびRNA内で見出される変異は、個体の臨床状態を識別するための手段をもたらさうる。本方法で使用されうるそのようなDNAおよびRNA遺伝的変異マーカーの例には、制限断片長多型、一塩基DNA多型、一塩基cDNA多型、一塩基RNA多型、一塩基RNA多型、挿入、欠失、インデル、マイクロサテライト反復(単純配列反復)、ミニサテラ

50

イト反復（種々の数の縦列反復）、短い縦列反復、転位因子、ランダム増幅多型DNAおよび増幅断片長多型が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0153】

バイオマーカープロファイル

該開示の本方法はまた、作成されるバイオマーカープロファイル、および商業的医学診断製品またはキットにおける使用を提供する。

【0154】

該方法は、多数の方法で決定されるバイオマーカープロファイルを提供し、比または他のより複雑な関連づけ方法もしくはアルゴリズム（例えば、ルールベース法）を用いる、測定可能なバイオマーカーまたはバイオマーカーの態様の組合せでありうる。バイオマーカープロファイルは少なくとも2つの測定値を含むことが可能であり、該測定値は、同じ又は異なるバイオマーカーに対応しうる。バイオマーカープロファイルはまた、少なくとも3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55個またはそれ以上の測定値を含みうる。幾つかの用途においては、バイオマーカープロファイルは100個または更には1000個の測定値を含む。バイオマーカープロファイルは、個体のみからの測定値、および該個体に関連していることが知られている層別化集団または該個体に関連していないことが知られている層別化集団またはそれらの両方からの測定値を含みうる。

10

【0155】

また、該バイオマーカープロファイルはまた、本明細書に記載されているバイオマーカーの存在もしくは非存在または量を提示し、これらは、それぞれ別々に及び独立して評価されることが可能であり、あるいはそのような他のバイオマーカーの存在もしくは非存在および/または量は、本明細書に開示されている方法において確立される被験者プロファイルまたは参照プロファイル内に含まれうる。

20

【0156】

V. バイオマーカーの用途

一般に、該方法は少なくとも以下の工程を含む：(a) 生物学的サンプルを得、生物学的サンプルの分析を行い、(c) 該サンプルを参照対照と比較し、(d) タンパク質の存在または量を被験者の結腸ポリープ状態と関連させる。該開示の幾つかの態様においては、定量は、一定レベルであることが知られている内部標準対照に対して測定値を正規化することを含む。該開示の他の態様においては、定量は、腫瘍を有さない健康な非罹患被験者からの参照対照と比較し、差次的発現を決定することを含む。該開示の他の態様においては、定量は、腫瘍を有する罹患被験者からの参照対照と比較し、差次的発現を決定することを含む。この方法から得られたデータを用いて、疾患状態（病態）、再発または治療応答を予想するために使用される「プロファイル」を作成することが可能である。それを作成し、応答に対する相関性を誘導したら、試験結果を標準プロファイルと比較することが可能である。記載されているプロファイルは一般に最適化されると理解されるべきである。本開示はこの特定のバイオマーカープロファイルの使用に限定されない。有用な情報を提供する1以上のマーカーの任意の組合せが本開示の方法において使用されうる。例えば、該シグネチャ（signature）が有用な情報を与える能力を維持したまま、1以上のマーカーが加えられ又は該シグネチャから差し引かれうると理解されるべきである。

30

40

【0157】

該開示の1つの態様においては、被験者における結腸ポリープの存在の可能性を検出するために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せの定量が用いられうる。該開示のもう1つの態様においては、結腸腫瘍の性質を検出するために、例えば、被験者におけるサンプルの特性、例えば、良性の存在、ポリープのタイプ、前癌状態、異形成の度合、腺腫性ポリープの亜型または良性結腸腫瘍疾患の亜型および予後（これらに限定されるものではない）の1以上を特定するために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せが使用されうる。該開示の1つの態様においては、結腸腫瘍またはポリープを発生する可

50

能性を知るために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せが使用されうる。該開示の1つの態様においては、結腸腫瘍またはポリープの存在を除外するために、すなわち、被験者における結腸ポリープ、癌またはそれらの両方の非存在を決定するために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せが使用されうる。該開示のもう1つの態様においては、腫瘍の性質、すなわち、それが良性腫瘍ポリープ、悪性腫瘍、腺腫性ポリープ、有茎性ポリープまたは無茎性ポリープ型であるかどうかを決定するために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せが使用されうる。

【0158】

該開示の1つの態様においては、結腸直腸癌または結腸腫瘍の臨床処置のための次工程を補助する報告を作成するために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せが使用されうる。該開示の1つの態様においては、結腸直腸癌または結腸腫瘍に対する種々の治療に対する応答性をモニタリングするために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せが使用されうる。該開示の1つの態様においては、結腸直腸癌または結腸腫瘍を発生する素因を有する被験者をモニタリングするために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せが使用されうる。該開示の1つの態様においては、結腸直腸癌または結腸腫瘍の再発に関して被験者をモニタリングするために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せが使用されうる。該開示の1つの態様においては、結腸直腸癌またはポリープの被験者の再発をモニタリングするために、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せが使用されうる。

10

【0159】

幾つかの実施形態においては、該方法は、被験者からの生物学的サンプルの細胞におけるバイオマーカーのプロファイルを特定することを含み、該パターンは、疾患または状態または応答の可能性に相関される。

20

【0160】

この方法の幾つかの態様においては、例えば定量的免疫蛍光またはELISAに基づくアッセイ、フローサイトメトリーまたは他のイムノアッセイ（本発明で提供されるもの）によりタンパク質の発現レベルを定量することにより、バイオマーカーまたはバイオマーカープロファイルの1以上を検出する。この方法の幾つかの態様においては、該バイオマーカープロファイルは、例えば、バイオマーカー対応DNAまたはRNAを特異的に増幅するプライマーセットを使用するリアルタイムPCRによるポリヌクレオチドの検出發現レベルである。該開示のもう1つの態様においては、バイオマーカーに関する捕捉特徴（例えば、抗体、プローブなど）を含有するバイオチップにより該プロファイルを検出する。生物学的サンプルにおける又は被験者からのポリヌクレオチド、例えばmRNAの発現レベルにより、あるいは例えば抗体を使用して患者サンプルにおけるタンパク質の発現レベルにより、バイオチップはバイオマーカープロファイルの存在を検出する。もう1つの幾つかの実施形態においては、癌幹細胞シグネチャを含む遺伝子を特異的に増幅するプライマーセットを使用するリアルタイムPCRにより腫瘍細胞プロファイルを検出する。該開示の他の実施形態においては、予後において使用される癌幹細胞シグネチャの発現を検出するポリヌクレオチドまたはタンパク質（すなわち、抗体）を含有するマイクロアレイを提供する。

30

40

【0161】

生物学的サンプルのバイオマーカープロファイルを参照プロファイルと比較することが可能であり、結果を決定することが可能である。該開示の1つの態様においては、本明細書に記載されている試験から得られたデータを、生物学的サンプルの1以上からの測定から誘導されたプロファイルモデルにより定められる参照プロファイルと比較する。個々の患者サンプルがこれらの集団で考慮され、1つの集団またはその他の集団または両方の混合体に割り当てられ、ついで、この相関性が患者の処置、療法、予後などに使用されうるように、試験は構築されうる。

【0162】

該開示の1つの態様においては、本明細書に記載されている方法およびキット試験から

50

得られたデータを可視化手段と共に使用し、これは、サンプルにおける前記の1以上のマーカーまたは断片の量が或る閾値レベルより高い又は低いかどうか、あるいはサンプルにおける前記の1以上のマーカーまたは断片が前記の1以上のマーカーまたは断片の量の参照値から逸脱しているか否かを示すことが可能であり、該参照値は、本明細書に教示されている疾患または状態の既知の診断、予想または予後を表している。

【0163】

該開示の1つの態様においては、閾値レベルとして決定された本明細書に記載されている方法およびキット試験から得られたデータは、(マーカーおよび疾患または状態に応じて)該閾値レベルより高い又は低い該サンプルにおける前記の1以上のマーカーおよび/または断片の量が、該被験者がそれぞれの疾患もしくは状態を有する又はそれらのリスクを有することを示す、あるいは該被験者におけるそれらに関する不良な予後を示すように、ならびに(マーカーおよび疾患または状態に応じて)該閾値レベルより低い又は高い該サンプルにおける前記の1以上のマーカーおよび/または断片の量が、該被験者が、本明細書に教示されている疾患もしくは状態を有さない又はそれらのリスクを有さないことを示す、あるいは該被験者におけるそれらに関する良好な予後を示すように選択される。

10

【0164】

該開示の1つの態様においては、サンプルにおける核酸分子またはアナライトの相対量として決定された本明細書に記載されている方法およびキット試験から得られたデータは、前記の別の値(例えば、本明細書に教示されている参照値、重量またはランク)と比較された場合の増加もしくは減少として又は増加率もしくは減少率として有利に表されうる。第1および第2パラメータ(例えば、第1および第2量)の間の相対比較の実施は、前記第1および第2パラメータの絶対値を最初に決定することでありうるが、必ずしもこれが要求されるわけではない。例えば、測定方法は前記第1および第2パラメータに関する定量可能な読出し値(例えば、シグナル強度)を示すことが可能であり、該読出し値は該パラメータの値の関数であり、該読出し値を直接比較して、第1パラメータ対第2パラメータに関する相対値を得ることが可能であり、この場合、該読出し値をそれぞれのパラメータの絶対値に最初に変換することは実際には要求されない。

20

【0165】

A. 感度および特異性

感度および特異性は二項分類試験の性能の統計的尺度である。完全な分類予測因子は100%の感度(すなわち、罹患群からの全ての者を罹患者と予測する)および100%の特異性(すなわち、健常群からのいずれの者をも罹患者と予測しない)として示されるが、理論的には任意の分類予測因子が最小誤差を有するであろう(Altman DG, Bland JM (1994). "Diagnostic tests Sensitivity and Specificity". BMJ 308(6943): 1552およびLoong T (2003). "Understanding sensitivity and specificity with the right side of the brain". BMJ 327(7417): 716-719)。

30

【0166】

該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の腺腫またはポリープ状態に関して60%以上の真陽性、70%以上の真陽性、75%以上の真陽性、85%以上の真陽性、90%以上の真陽性、95%以上の真陽性または99%以上の真陽性から選択される感度を示す。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の腺腫、癌またはポリープ状態に関して60%以上の真陰性、70%以上の真陰性、75%以上の真陰性、85%以上の真陰性、90%以上の真陰性、95%以上の真陰性または99%以上の真陰性から選択される特異性を示す。該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せを使用する該開示の方法の1つの態様においては、結腸直腸癌の存在または非存在が除外され、あるいは決定されない。該開示の方法の1つの態様においては、腺腫、癌またはポリープ状態の存在または非存在を追加的試験、例えば結腸内視鏡検査、他のイメージング法

40

50

または診断試験または手術により確認する。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の腺腫、癌またはポリープ状態に関して70%以上の真陽性および30%未満の真陰性、75%以上の真陽性および25%未満の真陰性、85%以上の真陽性および15%未満の真陰性、90%以上の真陽性および10%未満の真陰性、95%以上の真陽性および5%未満の真陰性、または99%以上の真陽性および1%未満の真陰性から選択される感度および特異性を示す。

【0167】

該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の結腸直腸癌の存在または非存在に関して70%以上の真陽性、75%以上の真陽性、85%以上の真陽性、90%以上の真陽性、95%以上の真陽性または99%以上の真陽性から選択される感度を示す。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の結腸直腸癌の存在または非存在に関して70%以上の真陰性、75%以上の真陰性、85%以上の真陰性、90%以上の真陰性、95%以上の真陰性または99%以上の真陰性から選択される特異性を示す。該開示の方法の1つの態様においては、結腸直腸癌の存在または非存在を検出しない。該開示の方法の1つの態様においては、結腸直腸癌の存在または非存在を追加的試験、例えば結腸内視鏡検査、他のイメージング法または診断試験または手術により確認する。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の結腸直腸癌の存在または非存在に関して70%以上の真陽性および30%未満の真陰性、75%以上の真陽性および25%未満の真陰性、85%以上の真陽性および15%未満の真陰性、90%以上の真陽性および10%未満の真陰性、95%以上の真陽性および5%未満の真陰性、または99%以上の真陽性および1%未満の真陰性から選択される感度および特異性を示す。

10

20

【0168】

該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫の存在または非存在に関して70%以上の真陽性、75%以上の真陽性、85%以上の真陽性、90%以上の真陽性、95%以上の真陽性または99%以上の真陽性から選択される感度を示す。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫の存在または非存在に関して70%以上の真陰性、75%以上の真陰性、85%以上の真陰性、90%以上の真陰性、95%以上の真陰性または99%以上の真陰性から選択される特異性を示す。該開示の方法の1つの態様においては、腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫を追加的試験、例えば結腸内視鏡検査、他のイメージング法または診断試験または手術により確認する。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫の存在または非存在に関して70%以上の真陽性および30%未満の真陰性、75%以上の真陽性および25%未満の真陰性、85%以上の真陽性および15%未満の真陰性、90%以上の真陽性および10%未満の真陰性、95%以上の真陽性および5%未満の真陰性、または99%以上の真陽性および1%未満の真陰性から選択される感度および特異性を示す。

30

40

【0169】

該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の有茎性ポリープおよび無茎性ポリープの存在または非存在に関して70%以上の真陽性、75%以上の真陽性、85%以上の真陽性、90%以上の真陽性、95%以上の真陽性または99%以上の真陽性から選択される感度を示す。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の有茎性ポリープおよび無茎性ポリープの存在または非存在に関して70%以上の真陰性、75%以上の真陰性、85%以上の真陰性、90%以上の真陰性、95%以上の真陰性または99%以上の真陰性から選択される特異性を示す。該開示の方法の1つの態様においては、有茎性ポリープおよび無茎性ポリープを追加的試験、例えば結腸内視鏡検査、他

50

のイメージング法または診断試験または手術により確認する。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の有茎性ポリープおよび無茎性ポリープの存在または非存在に関して70%以上の真陽性および30%未満の真陰性、75%以上の真陽性および25%未満の真陰性、85%以上の真陽性および15%未満の真陰性、90%以上の真陽性および10%未満の真陰性、95%以上の真陽性および5%未満の真陰性、または99%以上の真陽性および1%未満の真陰性から選択される感度および特異性を示す。

【0170】

該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫の存在または非存在に関して70%以上の真陽性、75%以上の真陽性、85%以上の真陽性、90%以上の真陽性、95%以上の真陽性または99%以上の真陽性から選択される感度を示し、これは細胞異形成または前悪性の度合に従い特徴づけられる。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫の存在または非存在に関して70%以上の真陰性、75%以上の真陰性、85%以上の真陰性、90%以上の真陰性、95%以上の真陰性または99%以上の真陰性から選択される特異性を示し、これは細胞異形成または前悪性の度合に従い特徴づけられる。該開示の方法の1つの態様においては、腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫は、追加的試験、例えば結腸内視鏡検査、他のイメージング法または診断試験または手術により確認される細胞異形成または前悪性の度合に従い特徴づけられる。該開示の方法の1つの態様においては、該バイオマーカーの全て又は幾つか又は組合せの使用は、被験者の腺腫性ポリープまたはポリープ様腺腫の存在または非存在に関して70%以上の真陽性および30%未満の真陰性、75%以上の真陽性および25%未満の真陰性、85%以上の真陽性および15%未満の真陰性、90%以上の真陽性および10%未満の真陰性、95%以上の真陽性および5%未満の真陰性、または99%以上の真陽性および1%未満の真陰性から選択される感度および特異性を示し、これは細胞異形成または前悪性の度合に従い特徴づけられる。

【0171】

VI. システム

本開示のシステムおよび方法は、1以上のコンピュータプロセッサシステム上で、および/または1以上のコンピュータプロセッサシステムを使用することにより実施される。該開示のコンピュータシステムの例は後記に記載されている。該開示のシステムおよび方法のためのプラットフォームが与えられる限り、記載されているコンピュータシステムに対する変更が可能である。

【0172】

該開示のコンピュータシステムの一例を図13に示す。図13に例示されているコンピュータシステム1300は、固定媒体1312を有するサーバー1309に所望により接続されうる媒体1311および/またはネットワークポート1305からの命令を読み取りうる理論的装置として理解されうる。該システム(例えば、図13に示されているもの)はCPU1301、ディスクドライブ1303、随意的(すなわち、所望により使用されうる)インプット装置、例えばキーボード1315および/またはマウス1316および随意的モニター1307を含みうる。データ通信は、近くの又は遠くの位置のサーバーに対して、示されている通信媒体を介して達成されうる。該通信媒体は、データを伝送および/または受信する任意の手段を含みうる。例えば、該通信媒体はネットワーク接続、無線接続またはインターネット接続でありうる。そのような接続はワールド・ワイド・ウェブ上の通信をもたらしうる。本開示に関するデータは、図13に例示されているとおり、パーティ1322による受信および/または閲覧のために、そのようなネットワークまたは接続により伝送されうると予想される。

【0173】

図14は、本開示の例示実施形態に関して使用されうるコンピュータシステム1400

の例示構造を示すブロックダイアグラムである。図14に示されているとおり、該例示コンピュータシステムは、命令を処理するためのプロセッサ1402を含みうる。プロセッサの非限定的な例には、Intel Xeon™プロセッサ、AMD Opteron™プロセッサ、Samsung 32-ビットRISC ARM 1176JZ(F)-Sv1.0™プロセッサ、ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100™プロセッサ、ARM Cortex-A8 Apple A4™プロセッサ、Marvell PXA 930™プロセッサまたは機能的に同等なプロセッサが含まれる。並列処理のためにマルチスレッドの実行が用いられうる。該開示の幾つかの態様においては、単一コンピュータシステムにおいても、クラスターにおいても、あるいは複数のコンピュータ、携帯電話および/またはパーソナルデータアシスタント装置を含むネットワーク上のシステムに分布している場合であっても、マルチコアを有するマルチプロセッサも使用されうる。

10

【0174】

図14に例示されているとおり、高速キャッシュ1404はプロセッサ1402に接続され、またはプロセッサ1402内に組込まれて、プロセッサ1402により最近または頻繁に使用されているデータまたは命令のための高速メモリを与えうる。プロセッサ1402はプロセッサバス1408によりノースブリッジ1406に接続される。ノースブリッジ1406はメモリバス1412によりランダムアクセスメモリ(RAM)1410に接続され、プロセッサ1402によりRAM1410へのアクセスを管理する。ノースブリッジ1406はまた、チップセットバス1416によりサウスブリッジ1414に接続される。サウスブリッジ1414は今度は周辺バス1418に接続される。周辺バスは、例えばPCI、PCI-X、PCI Expressまたは他の周辺バスでありうる。ノースブリッジおよびサウスブリッジは、しばしば、プロセッサチップと称され、プロセッサ、RAM、および周辺バス1418上の周辺コンポーネントの間のデータ輸送を管理する。幾つかの代替的構造においては、別個のノースブリッジチップを使用する代わりに、ノースブリッジの機能がプロセッサ内に組込まれうる。該開示の幾つかの態様においては、システム100は、周辺バス1418に結合したアクセラレータカード1422を含みうる。該アクセラレータはフィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)、または或る処理を加速するための他のハードウェアを含みうる。例えば、適応データ再構築(adaptive data restructuring)のために、または拡張セット

20

30

【0175】

ソフトウェアおよびデータは外部記憶装置1424内に保存(記憶)され、プロセッサによる使用のためにRAM1410および/またはキャッシュ1404内にローディングされうる。システム1400は、システムリソースを管理するためのオペレーティングシステムを含む。オペレーティングシステムの非限定的な例には、Linux(登録商標)、Windows™、MAC OS™、BlackBerry OS™、iOS™、および他の機能的に同等なオペレーティングシステム、ならびに本開示の例示実施形態におけるデータ記憶および最適化を管理するためのオペレーティングシステムの上で動作するアプリケーションソフトウェアが含まれる。

40

【0176】

この例においては、システム1400はまた、Network Attached Storage(NAS)のような外部記憶装置および分散並列処理のために使用されうる他のコンピュータシステムへのネットワークインターフェースをもたらすネットワーク周辺バスに接続されたネットワークインターフェースカード(NIC)1420および1421を含む。

【0177】

図15は、複数のコンピュータシステム1502aおよび1502b、複数の携帯電話およびパーソナルデータアシスタント1502cならびにネットワーク接続ストレージ(

50

N A S) 1 5 0 4 a および 1 5 0 4 b を有するネットワーク 1 5 0 0 を示すダイアグラムである。例示実施形態においては、システム 1 5 0 2 a、1 5 0 2 b および 1 5 0 2 c はデータ保存を管理し、ネットワーク接続ストレージ (N A S) 1 5 0 4 a および 1 5 0 4 b 内に保存されたデータのためのデータアクセスを最適化する。数学的モデルが該データのために使用可能であり、コンピュータシステム 1 5 0 2 a および 1 5 0 2 b ならびに携帯電話およびパーソナルデータアシスタントシステム 1 5 0 2 c にわたる分散並列処理を用いて評価されうる。コンピュータシステム 1 5 0 2 a および 1 5 0 2 b ならびに携帯電話およびパーソナルデータアシスタントシステム 1 5 0 2 c はまた、ネットワーク接続ストレージ (N A S) 1 5 0 4 a および 1 5 0 4 b 内に保存されたデータの適応データ再構築のための並列処理をもたらす。多種多様な他のコンピュータアーキテクチャおよびシステムが本開示の種々の実施形態と共に使用されうる。例えば、並列処理をもたらすために、ブレードサーバが使用されうる。プロセッサブレードはバックプレーンを介して接続されて、並列処理をもたらす。また、記憶装置はバックプレーンに又はネットワーク接続ストレージ (N A S) として別個のネットワークインターフェースを介して接続されうる。

10

【 0 1 7 8 】

幾つかの例示実施形態においては、プロセッサは別個のメモリスペースを維持し、ネットワークインターフェース、バックプレーンまたは他のプロセッサによる並列処理のための他のコネクタを介してデータを伝送する。他の実施形態においては、該プロセッサの幾つか又は全ては共有仮想アドレスメモリスペースを使用する。

20

【 0 1 7 9 】

図 1 6 は、例示実施形態に従う共有仮想アドレスメモリスペースを使用するマルチプロセッサコンピュータシステム 1 6 0 0 のブロックダイアグラムである。該システムは、共有メモリスブシステム 1 6 0 4 にアクセスする複数のプロセッサ 1 6 0 2 a ~ f を含む。該システムは複数のプログラマブルハードウェアメモリアルゴリズムプロセッサ (M A P) 1 6 0 図 7 - f をメモリスブシステム 1 6 0 4 内に組込んでいる。各 M A P 1 6 0 6 a ~ f はメモリ 1 6 0 8 a ~ f および 1 以上のフィールドプログラマブルゲートアレイ (F P G A) 1 6 1 0 a ~ f を含む。M A P は、配置可能な機能ユニットを提供し、特定のアルゴリズムまたはアルゴリズムの部分が、それぞれのプロセッサとの密接に協同した処理のために F P G A 1 6 1 0 a ~ f に提供されうる。例えば、データモデルに関する代数式を評価するために、および例示実施形態における適応データ再構築を行うために、M A P が使用されうる。この例においては、各 M A P はこれらの目的のためにプロセッサの全てによりグローバルにアクセス可能である。1つの構成においては、各 M A P は、付属メモリ 1 6 0 8 a ~ f にアクセスするために直接メモリアクセス (D M A) を使用することが可能であり、それぞれのマイクロプロセッサ 1 6 0 2 a ~ f から独立して及び非同期的にそれがタスクを実行することを可能にする。この構成においては、M A P は、アルゴリズムの並列実行およびパイプライン処理のために別の M A P に結果を直接供給することが可能である。該開示は、コンピュータ読取可能記憶媒体、例えば C D - R O M、メモリキー、フラッシュメモリカード、ディスクまたは他の有形的表現媒体 (t a n g i b l e m e d i u m) を想定しており、これらには、コンピューティング環境において実行されると、該開示の方法により記載されている提供された生物学的サンプルの予想可能性または評価の結果の全部または一部を行うカスタムアルゴリズムの実行をもたらすプログラムが保存されている。種々の実施形態においては、該コンピュータ読取可能記憶媒体は非一過性 (n o n - t r a n s i t o r y) である。

30

40

【 0 1 8 0 】

本発明のシステムおよび方法は、検査 (実験) 装置の、1以上の部分を統合する。

【 0 1 8 1 】

幾つかの実施形態においては、該統合は検査室情報管理システム (L I M S) またはより低いレベルで行われる。コンピュータシステムは複数の実験装置を動作させうる。検査用途のためのソフトウェアおよびハードウェアは、本発明の方法およびシステムを使用し

50

て統合されうる。種々の実施形態においては、共有機能を有する類似コンポーネントが複数の検査装置において反復される。

【0182】

コンピュータシステムは種々の装置部分の複数のコンポーネントを制御して、利用可能なコンポーネントの新たな組合せを生み出しうる。もう1つの例においては、本発明のコンピュータシステムは、ポンプ、センサーまたはこの検査装置部分内の他のコンポーネントを制御することにより、質量分析、プレート処理、液体クロマトグラフィーを制御しうる。ソフトウェアは、独立した検査エンドユーザーまたはいずれかの他の適当な使用者を含むいずれかの者により提供されうる。統合された検査システムにおけるLIMSの使用は米国特許出願第7,991,560号(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に更に詳細に記載されている。

10

【0183】

該キットがコンピュータ読取可能媒体を提供する態様においては、それは、該開示の方法を行うための完全なプログラムを含有するであろう。該プログラムは出力の収集、分析および作成のためのプログラムの説明を含み、一般に、本明細書に記載されているとおり使用者と対話(インタラクト)し、分析情報と共にそのデータを処理し、その使用者のための特有の印刷媒体または電子媒体を作成するためのコンピュータ読取可能コードおよび装置を含む。

【0184】

他の態様においては、該キットは、該開示の方法の一部においてのみ動作する限られたコンピュータ読取可能媒体を提供する。この態様においては、該キットは、使用者からのデータ入力を提供する及びサーバのようリモートサイトのコンピューティング環境への(例えば、インターネット、イントラネットなどを介した)使用者によるデータ入力の伝送のためのプログラム(これにおいて、該開示のカスタム数学的アルゴリズムが行われる)を提供する。使用者により提供されたデータの処理または処理の完了はリモートサイトで行われ、サーバも、報告を作成するように機能するであろう。該報告の精査、および完全な報告を得るためのいずれかの必要な手動介入の完了の後、該完全報告は電子的報告または印刷報告として再び使用者に伝送される。

20

【0185】

該開示におけるプログラムを含有する記憶媒体は、プログラムのインストールおよび使用のための説明、またはそのような説明が入手可能なウェブアドレスと共にパッケージ化されうる。

30

【0186】

VII. 報告

該開示の方法が医学分野におけるような商業的診断目的に使用される場合、一般に、該方法から得られた情報の報告または要約が作成される。

【0187】

該方法の報告または要約は、1以上の遺伝子もしくはタンパク質の発現レベル、ポリープもしくは腫瘍の分類、患者のリスクレベル(例えば、高、中、低)、患者の予後、治療選択肢、治療推奨、バイオマーカー発現、どのようにしてバイオマーカーレベルが決定されたか、バイオマーカープロファイル、臨床的および病理学的因子に関する情報、ならびに/または患者もしくは患者の病態に関連した集団群の他の標準的な臨床情報を含みうる。

40

【0188】

該方法および報告はデータベース内に保存されうる。該方法はデータベース内に報告を作成し、データと共に該報告を配置しうる。該報告は紙報告、聴覚的報告または電子的報告でありうる。該報告は、コンピューティング装置(例えば、携帯用装置、デスクトップコンピュータ、スマートデバイス、ウェブサイトなど)上に表示および/または保存されうる。該報告は医師および/または患者に提供されると想定される。該報告の受領は、該データおよび報告を含むサーバコンピュータへのネットワーク接続を確立すること、なら

50

びに該サーバコンピュータから該データおよび報告をリクエストすることを更に含む。

【0189】

もう1つの態様においては、本開示は、被験者から得られた生物学的サンプルに関するバイオマーカー情報を含む報告の製造方法（作成方法）を提供し、該方法は、1以上のバイオマーカー、すなわち、SCDC26（CD26）、CEA分子5（CEACAM5）、CA195（CCR5）、CA19-9、M2PK（PKM2）、TIMP1、P-セレクチン（SELP LG）、VEGFA、HcGB（CGB）、VILLIN、TATI（SPINK1）、A-L-フコシダーゼ（FUCA2）、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAならびに/もしくは図9におけるタンパク質またはそれらの修飾形態もしくはそれらの結合相手の1つの、サンプルのバイオマーカープロファイル発現レベルを決定し、それらの発現レベルを要約した報告を作成する工程を含む。幾つかの態様においては、該報告は、「低リスク」、「中リスク」または「高リスク」のようなリスク群への被験者の分類を更に含む。種々の実施形態においては、前記タンパク質の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個および全12個の群が含まれる。そのような群は追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

10

20

【0190】

該方法の1つの態様においては、1以上のバイオマーカー、すなわち、SCDC26（CD26）、CEA分子5（CEACAM5）、CA195（CCR5）、CA19-9、M2PK（PKM2）、TIMP1、P-セレクチン（SELP LG）、VEGFA、HcGB（CGB）、VILLIN、TATI（SPINK1）、A-L-フコシダーゼ（FUCA2）、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAならびに/もしくは図9におけるタンパク質またはそれらの修飾形態もしくはそれらの結合相手の1つの発現の増強が決定された場合、該報告は、該被験者が結腸ポリープを有する増大した可能性を有するという予想を含む。種々の実施形態においては、前記タンパク質の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個および全12個の群が含まれる。そのような群は追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

30

【0191】

該方法のもう1つの態様においては、1以上のバイオマーカー、すなわち、SCDC26（CD26）、CEA分子5（CEACAM5）、CA195（CCR5）、CA19-9、M2PK（PKM2）、TIMP1、P-セレクチン（SELP LG）、VEGFA、HcGB（CGB）、VILLIN、TATI（SPINK1）、A-L-フコシダーゼ（FUCA2）、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAならびに/もしくは図9におけるタンパク質またはそれらの修飾形態もしくはそれらの結合相手の1つの発現の増強が決定された場合、該報告は、該被験者が結腸ポリープを有する減少した可能性を有するという予想を含む。種々の実施形態においては、前記タンパク質の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個および全12個の群が含まれる。そのような群は追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

40

【0192】

1つの態様においては、該報告は該患者に対する治療推奨を支持する情報を含む。例えば、該情報は、1以上の診断試験、結腸内視鏡検査、手術、治療を指示すること及び更な

50

る医療行為を行わないことを推奨すること、そのような治療からの有益なスコアの可能性、または他のそのようなデータを含みうる。幾つかの実施形態においては、該報告は更に、該患者に対する治療方式の推奨を含む。

【0193】

該開示の1つの態様においては、該報告は紙形態である。該開示の1つの態様においては、該報告は電子的形態、例えばCD-ROM、フラッシュドライブまたは当技術分野で公知の他の電子的記憶装置である。該開示のもう1つの態様においては、該電子的報告は有線または無線ネットワークから二次コンピュータ装置、例えばラップトップ、携帯電話またはタブレットにダウンロードされる。

【0194】

1つの態様においては、1以上のバイオマーカー、すなわち、SCDC26(CD26)、CEA分子5(CEACAM5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAならびに/もしくは図9におけるタンパク質またはそれらの修飾形態もしくはそれらの結合相手の1つの発現の増強が決定された場合、該報告は、該被験者が5~10年後の結腸ポリープまたは腫瘍の再発の、増大した可能性を有するという予想を含む。種々の実施形態においては、前記タンパク質の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個および全12個の群が含まれる。そのような群は追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

【0195】

もう1つの態様においては、1以上のバイオマーカー、すなわち、SCDC26(CD26)、CEA分子5(CEACAM5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PPA1、NME1、PSME3、AHCY、TPT1、HSPB1およびRPSAならびに/もしくは図9におけるタンパク質またはそれらの修飾形態もしくはそれらの結合相手の1つの発現の増強が決定された場合、該報告は、該被験者が5~10年後の結腸ポリープまたは腫瘍の再発の、減少した可能性を有するという予想を含む。種々の実施形態においては、前記タンパク質の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個および全12個の群が含まれる。そのような群は追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

【0196】

該開示の幾つかの態様においては、該報告は結腸疾患の治療処置のための患者に対する治療方式に関する推奨を更に含む。治療処置選択肢は、他の診断試験、例えば結腸内視鏡検査、柔軟(フレックス)S状結腸鏡検査、CTコロノグラフィー、検便、糞便試験、治療剤による更なる治療、外科的介入および更なる行為の不実施を含みうるが、これらに限定されるものではない。

【0197】

本開示はまた、a)被験者から得られた生物学的サンプルにおけるSCDC26(CD26)、CEA分子5(CEACAM5)、CA195(CCR5)、CA19-9、M2PK(PKM2)、TIMP1、P-セレクチン(SELPLG)、VEGFA、HcGB(CGB)、VILLIN、TATI(SPINK1)、A-L-フコシダーゼ(FUCA2)、ANXA5、GAPDH、PKM2、ANXA4、GARS、RRBP1、KRT8、SYNCRIP、S100A9、ANXA3、CAPG、HNRNPF、PP

10

20

30

40

50

A 1、NME 1、PSME 3、AHCY、TPT 1、HSPB 1およびRPSAならびに / もしくは図 9 におけるタンパク質またはそれらの修飾形態もしくはその発現産物の少なくとも 1 以上の正規化発現レベルを決定し、(b) 該遺伝子発現分析により得られたデータを要約した報告を作成することによる、患者に関する個人的バイオマーカープロファイルの製造方法(作成方法)を提供する。種々の実施形態においては、前記タンパク質の 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個および全 12 個の群が含まれる。そのような群は追加的なタンパク質を除外することが可能であり、あるいは追加的なタンパク質を更に含むことが可能である。

【0198】

VIII. キット

本開示の方法における使用のための物質は、よく知られた方法に従い製造されるキットの製造に適している。本開示により提供されるキットは、医師、臨床検査科学者、看護師、薬剤師、処方職員を含む医療提供者に、あるいは直接的に消費者に販売される。

【0199】

キットは、しばしば、インサート資料、組成物、試薬、装置成分、および個々の生物学的サンプル型に該方法または試験を行う方法に関する説明を含みうる。該キットは、種々のアッセイ型、例えばELISAアッセイ、イムノアッセイ、タンパク質チップもしくはマイクロアレイ、DNA/RNAチップもしくはマイクロアレイ、RT-PCR、核酸配列決定、質量分析、免疫組織化学法、フローサイトメトリーまたは高含量細胞スクリーニングによるバイオマーカーの検出を可能にする試薬を更に含むうる。

【0200】

本開示は、いずれかの 1 以上のバイオマーカー、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質およびそれらの断片(本明細書に教示されているもの)に特異的に結合しうる結合剤のような組成物を提供する。結合剤には、抗体、アプタマー、フォトアプタマー(photo aptamer)、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体または小分子が含まれうる。本開示により提供される結合剤には、1 以上の所望の分子またはアナライトに、例えば関心のある 1 以上のタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドまたはそれらの断片(無作為または無関係な他の分子は実質的に除外され、そして所望により、構造的に類似または関連している他の分子は実質的に除外される)に結合することにより作用する特異的結合剤が含まれる。「特異的に結合」なる語は、結合剤がその意図される標的のみに結合することを必ずしも要しない。例えば、結合剤が、関心のあるタンパク質、ポリペプチド、ペプチドおよび / またはそれらの断片に特異的に結合すると言えるのは、結合条件下のそのような意図される標的に対するそのアフィニティが、非標的分子に対するそのアフィニティより少なくとも約 2 倍大きい、好ましくは少なくとも約 5 倍大きい、より好ましくは少なくとも約 10 倍大きい、更により好ましくは少なくとも約 25 倍大きい、より一層好ましくは少なくとも約 50 倍大きい、更により一層好ましくは少なくとも約 100 倍大きい場合である。

【0201】

好ましくは、該結合剤は、 $KA = 1 \times 10^6 M^{-1}$ 、より好ましくは $KA = 1 \times 10^7 M^{-1}$ 、更により好ましくは $KA = 1 \times 10^8 M^{-1}$ 、より一層好ましくは $KA = 1 \times 10^9 M^{-1}$ 、更に好ましくは $KA = 1 \times 10^{10} M^{-1}$ または $KA = 1 \times 10^{11} M^{-1}$ の、そのような結合の親和(アフィニティ)定数で、その意図される標的に結合しうる。ここで、 $KA = [SBA \cdot T] / [SBA][1]$ であり、SBAは特異的結合剤を示し、Tは意図される標的を示す。KAの決定は、当技術分野で公知の方法により、例えば、平衡透析およびスキャッチャードプロット分析を用いて行われうる。

【0202】

該方法およびキットの幾つかの用途においては、結合剤は免疫学的結合剤、例えば抗体である。本開示で使用されうる抗体の例には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびにそれらのフラグメントが含まれ、これらは当技術分野でよく知られている。本開示の方法およびキットにおいて使用されうる抗体の追加的な例には、所望の生物学的

10

20

30

40

50

活性（特に、関心のある抗原に特異的に結合する能力）を示す、少なくとも2つの完全抗体および抗体フラグメントから形成される多価（例えば、2価、3価またはそれ以上の価数）および/または多重特異性抗体（例えば、二重またはそれ以上の多重性の特異性の抗体）、ならびにそのようなフラグメントの多価および/または多重特異性複合体が含まれる。

【0203】

抗体はIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMクラスのいずれかであることが可能であり、好ましくはIgGクラス抗体である。抗体はポリクローナル抗体、例えば、抗血清またはそれから精製（例えば、アフィニティ精製）された免疫グロブリンでありうる。抗体はモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体の混合物でありうる。モノクローナル抗体は特定の抗原または抗原内の特定のエピトープをより大きな選択性および再現性で標的化しうる。非限定的な例示に過ぎないが、モノクローナル抗体は、Kohlerら1975（Nature 256:495）により最初に記載されたハイブリドーマ法により製造可能であり、あるいは組換えDNA法（例えば、US 4,816,567における方法）により製造可能である。モノクローナル抗体はまた、例えばClacksonら1991（Nature 352:624-628）およびMarksら1991（J Mol Biol 222:581-597）により記載されている技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離されうる。

10

【0204】

抗体結合剤は抗体フラグメントでありうる。「抗体フラグメント」は完全抗体の一部を含み、その抗原結合性または可変領域を含む。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、FvおよびscFvフラグメント；ジアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成される多価および/または多重特異性抗体、例えばジボディ、トリボディおよびマルチボディが含まれる。Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFvなどの前記名称は、当技術分野で確立されているそれらの意味を有すると意図される。

20

【0205】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびにそれらのフラグメントの製造方法は、組換え抗体またはそのフラグメントの製造方法と同様に、当技術分野でよく知られている（例えば、HarlowおよびLane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1988; HarlowおよびLane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1999, ISBN 0879695447; "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", Zola編, CRC Press 1987, ISBN 0849364760; "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach", Dean & Shepherd編, Oxford University Press 2000, ISBN 0199637229; Methods in Molecular Biology, vol. 248: "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Lo編, Humana Press 2004, ISBN 1588290921を参照されたい）。

30

40

【0206】

本開示の抗体は、いずれかの動物種、好ましくは脊椎動物種（例えば、鳥類および哺乳動物を含む）に由来することが可能であり、あるいはそのような動物種から誘導された1以上の部分を含むことが可能である。限定的なものではないが、該抗体はニワトリ、ニワトリ卵、シチメンチョウ、ガチョウ、カモ、ホロホロチョウ、ウズラまたはキジの抗体でありうる。また、限定的なものではないが、該抗体はヒト、ネズミ科動物（例えば、マウス、ラットなど）、ロバ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ラクダ（例えば、フタコ

50

ブラクダおよびヒトコブラクダ)、ラマ(例えば、ラマ・パッコス(Lama paccos)、ラマ・グラマ(Lama glama)またはラマ・ビクグナ(Lama vicugna))またはウマの抗体でありうる。

【0207】

本発明において提供されるバイオマーカーに対する抗体は、1以上のアミノ酸の欠失、付加および/または置換(例えば、保存的置換)を含みうる。ただし、そのような改変はそれぞれの抗原のその結合を維持させるものでなければならない。抗体はまた、その構成アミノ酸残基の、1以上の天然または人工的修飾(例えば、グリコシル化など)を含みうる。

【0208】

本開示により提供される抗体は、免疫化を含む方法により産生される抗体には限定されず、関心のある抗原上のエピトープに特異的に結合しうる少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含むように製造された任意のポリペプチド、例えば、組換え発現ポリペプチドをも含む。したがって、抗体または免疫原性結合剤なる語は、インビトロで産生されたインビボで産生されたかには無関係に、そのような分子に適用される。

【0209】

本キットにおける抗体または免疫原性結合剤、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、バイオマーカーなどは種々の形態、例えば、凍結乾燥形態、溶液中の遊離形態、または固相上に固定化された形態でありうる。抗体または免疫原性結合剤は、例えば、多ウェルプレートにおいて、またはアレイもしくはマイクロアレイとして提供されることが可能であり、あるいはそれらは別個に及び/又は独立してパッケージ化されうる。それらは、本明細書に記載されているとおりに検出のために適切に標識されうる。本発明で提供されるキットは、該開示のアッセイ方法、例えばイムノアッセイ、ELISAアッセイ、質量分析アッセイ、フローサイトメトリーなどを行うのに特に適しているかもしれない。

【0210】

該開示は、適格な臨床科学者に届けられ該臨床科学者により使用されるキットを提供する。そのようなキットにおいては、該開示は、結腸腫瘍状態または治療応答を予想するために開示バイオマーカー、該バイオマーカーの修飾形態または結合相手の1以上の発現を定量するための、開示バイオマーカー、遺伝子特異的または遺伝子選択的プローブおよび/またはプライマーの1以上を認識する抗体読出し検出抗体を含みうる、種々の物質から構成されるキットを提供する。

【0211】

該キットは、該アッセイを行うための容器(該方法の自動実施における使用に適したマイクロタイタープレートを含む)、プレハブ式(pre-fabricated)バイオチップ、バッファー、適当な試薬、抗体、プローブ、酵素を更を含みうる。該開示の幾つかの態様においては、キットは、生物学的サンプルからのタンパク質および核酸の抽出のための試薬、ならびに/またはDNAもしくはRNA増幅もしくはタンパク質分画もしくは精製のための試薬、ならびにバイオマーカーを検出する捕捉バイオチップを含有しうる。該キットにおける試薬は、識別記載もしくはラベル、またはそれらの使用およびアッセイを行うための工程に関する説明を有するであろう。また、該キットは、結腸ポリープ/腫瘍状態および再発の可能性ならびに治療応答を決定するために使用される方法におけるそれらの使用に関する説明を更を含むことが可能であり、あるいは結腸ポリープ/腫瘍状態および再発の可能性ならびに治療応答を決定するためのコンピュータ読取可能記憶媒体も一緒に提供されうる。

【0212】

キットは、比較のための参照バイオマーカープロファイルを含みうる、データ分析のためのソフトウェアパッケージを更を含みうる。幾つかの用途においては、該キットのソフトウェアパッケージは、データ分析を行うために中央サーバに接続することを含み、ここで、報告は、病態、治療提案に関する推奨または治療もしくは疾患処置手順の推奨を伴う。

10

20

30

40

50

【0213】

該キットと共に提供される報告は紙または電子的報告でありうる。それは、該キット共に提供されるコンピュータソフトウェアにより作成されうる。あるいはそれは、使用者がウェブサイトにアップロードするコンピュータサーバにより作成可能であり、この場合、該コンピュータサーバが該報告を作成する。

【0214】

該開示の幾つかの態様においては、キットは、予後、診断、臨床状態または予想情報を推定または定量するために使用される数学的アルゴリズムをキットの成分として含有しうる。幾つかの態様においては、これはコンピュータ読取可能記憶媒体により届けられ、該開示の他の態様においては、これは、該数学的アルゴリズムを実行するための論理を含有するコンピュータサーバにアクセスするためのパスワードを使用者に供与することにより与えられうるであろう。

10

【0215】

該キットはいずれかの適当な様態でパッケージ化可能であり、典型的には、全ての要素が、該方法または試験を行うための印刷された説明のシートと共に単一容器内に含有されうる。

【0216】

該開示は、医師に届けられるキットを提供する。この目的のキットは、医学的情報を提供するための医師用の電子的な又は書かれた文書、および生物学的サンプルを含有する無菌容器に付けるためのバーコードラベル、および所望により含まれうる固定/保存試薬を含むであろう。幾つかの態様においては、そのようなキットは、送付説明、および本発明で提供される方法による処理のために郵便により送付されるべき供給物を含むであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0217】

【図1A】図1Aは、実施例3Aの結腸ポリープに関するバイオマーカープロファイルの予想特性を例示するグラフを示す。

【図1B】図1Bは、実施例3Bにおける結腸ポリープに関するバイオマーカープロファイルの予想特性を例示するグラフを示し、そのY軸は平均真陽性率を示し、X軸は偽陽性率を示す。

30

【図2A】図2Aは実施例3Aの試験装置特性の検証を示す。

【図2B】図2Bは実施例3Bの試験装置特性の検証を示し、そのY軸は平均真陽性率を示し、X軸は偽陽性率を示す。

【図3】図3は実施例3Aの特徴-頻度表のパレートプロットを示す。

【図4】図4は実施例3Bの特徴-頻度表のパレートプロットを示し、そのY軸は特徴出現率を示し、X軸は特徴ランクを示す。

【図5】図5は、より小さい装置における実施例3Aの結腸ポリープに関するバイオマーカープロファイルの予想特性を例示するグラフを示す。

【図6】図6は、より小さい装置における実施例3Aの試験設定特性の検証を示す。

【図7】図7は、実施例3Aにおいて構築された分類子において表される1014個の特徴の主要部を示す。

40

【図8】図8は、実施例3Bにおいて構築された分類子において表される206個の特徴の主要部を示す。

【図9】図9は包含または除外のための追加的バイオマーカーの表を示す。

【図10】図10は、実施例4におけるCRCに関するバイオマーカープロファイルの予想特性を例示するグラフを示し、そのY軸は平均真陽性率を示し、X軸は偽陽性率を示す。

【図11】図11は実施例4の特徴-頻度表のパレートプロットを示す。

【図12】図12は、実施例4において構築されたCRCを予示する分類子において表されるペプチドフラグメント遷移イオンを示す。

【図13】図13は一般化コンピュータシステム1300の種々の成分の実施形態を例示

50

する。

【図14】図14は、本開示1400の実施形態と共に使用されうるコンピュータシステムの構成の実施形態を例示する概要図を示す。

【図15】図15は、本開示1500の実施形態と共に使用されうるコンピュータネットワークの実施形態を例示する概要図である。

【図16】図16は、本開示1600の実施形態と共に使用されうるコンピュータシステムの構成の実施形態を例示する概要図である。

【0218】

実施例

実施例1

結腸内視鏡検査により陰性診断を示す個体における腺腫またはポリープ状態の特定

結腸内視鏡検査に基づいて腺腫またはポリープの陰性診断を示す患者からの全血清を、検証（妥当性確認）されたバイオマーカー分類子を使用して、結腸ポリープの存在または非存在に関して試験する。各部位のサンプルからのデータを独立して分析し（すなわち、該検証データセットは発見交差検証における試験または練習には使用されない）、ついで結果の重複に関して評価する。表E1における分類子のタンパク質および/またはペプチドに関してLC-MS/MS分析を行う。

【0219】

バイオマーカーは特定されている。例えば、バイオマーカー一覧を表E1および表E2および図7に示す。

【表2】

表E1:

番号	名称(別名)	
1	SCDC26 (CD26)	ジペプチジルペプチダーゼ4可溶性形態
2	CEA分子5 (CEACAM5)	癌胎児性抗原関連接着
3	CA195 (CCR5)	C-Cケモカイン受容体5型
4	CA19-9	炭水化物抗原19-9
5	M2PK (PKM2)	ピルビン酸キナーゼアイソザイムM1/M2
6	TIMP1	メタロプロテイナーゼインヒビター1
7	P-セレクチン (SELPLG)	P-セレクチン糖タンパク質リガンド1
8	VEGFA	血管内皮増殖因子A
9	HcGB (CGB)	絨毛性ゴナドトロピンサブユニットベータ
10	VILLIN	上皮細胞特異的Ca ²⁺ 調節アクチン
11	TATI (SPINK1)	膵分泌トリプシンインヒビター
12	A-L-フコシダーゼ(FUCA2)	血漿アルファ-L-フコシダーゼ

10

20

30

【表 3】

表 E2:

番号	名称(別名)	
1	ANXA5	アネキシンA5
2	GAPDH	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
3	PKM2	ピルビン酸キナーゼアイソザイムM1/M2
4	ANXA4	アネキシンA4
5	GARS	グリシル-tRNAシンテターゼ
6	RRBP1	リボソーム結合タンパク質1
7	KRT8	ケラチンII型細胞骨格8
8	SYNCRIP	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Q
9	S100A9	S100 A9カルシウム結合タンパク質
10	ANXA3	アネキシンA3
11	CAPG	マクロファージキャッピングタンパク質
12	HNRNPF	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質F
13	PPA1	無機ピロホスファターゼ
14	NME1	ヌクレオシド二リン酸キナーゼA
15	PSME3	プロテオソームアクチベータ複合体サブユニット3
16	AHCY	アデノシルホモシステイナーゼ
17	TPT1	翻訳制御腫瘍タンパク質
18	HSPB1	熱ショックタンパク質ベータ1
19	RPSA	40Sリボソームタンパク質SA

10

20

【0220】

これらの値を対照参照値と比較する。最後に、該分類子プロファイルを低ないし無リスク、中リスクおよび高リスク分類子プロファイルと比較して、患者サンプルを約90%以上の精度で被験者の予想腺腫/ポリープ状態または正常と相関させる。表E3を参照されたい。あるいは、イムノプロット法、バイオチップ、免疫染色および/またはフローサイトメトリー分析のような免疫学的分析により、該バイオマーカー分類子を使用して、臨床試験を行う。

30

【表 4】

表 E3:

	検証セット		発見セット	
	正常	ポリープ	正常	ポリープ
	n=500	n=600	n=400	n=700
正常(非ポリープ)として分類	461	0	387	0
ポリープを有するとして分類	0	543	0	673
分類不能	39	57	13	27

40

50

【0221】

実施例 2

結腸ポリープを有することが過去に示された個体におけるポリープ状態の再発の特定
対照参照体ならびに表 E 1 および / または表 E 2 におけるタンパク質バイオマーカー分類子に対する抗原に特異的に結合し又は該抗原を認識する抗体を含有する捕捉バイオチップを使用して、結腸ポリープ腫瘍を有することが既に示されている患者からの全血清サンプルにおける抗原をプロファイリングする。

【0222】

サンプルをスクリーニングして、該患者が結腸ポリープまたはポリープの再発を有していたかどうかを決定する。該チップを該サンプルと室温でインキュベートして、抗体が該サンプル中の抗原との複合体を形成することを可能にする。次に、該チップを穏和な界面活性剤溶液で洗浄して、特異的に結合していないタンパク質または抗体を除去する。検出試薬との二次抗体複合体を加え、該チップに結合させ、穏和界面活性剤で洗浄する。CCDカメラのようなリーダーを使用してタンパク質を定量する。最後に、該バイオチップ読出しからの分類子プロファイルを低いし無リスク、中リスクおよび高リスク再発分類子と比較して、患者の再発状態を決定する。

10

【0223】

実施例 3 A

この研究においては、結腸内視鏡検査を受けようとしている患者から血液を収集した、血漿中に存在するタンパク質ベース分子的特徴のプロファイルに関する定量的データを、縦列質量分析に基づく方法を用いて収集し、該データを使用して、結腸内視鏡検査法の結果を予想する能力を有する分類子を含む特徴を特定した。

20

【0224】

研究設計および患者サンプルの収集

血漿タンパク質プロファイルを患者の結腸内視鏡検査の結果と相関させるために、結腸内視鏡検査を受けるために現れた患者から彼らの検査の当日に血液サンプルを収集した。包含基準は、該患者が18歳以上であり、インフォームドコンセントに署名する意志および能力を有すること要した。これは、推奨された定期的スクリーニングとして、または過去の個人もしくは家族病歴ゆえの用心として、または個人の健康症状の追跡として患者が該検査を受けることが可能である「全来訪者 (all comers)」の研究であった。

30

【0225】

一晩の絶食、液型拘束 (liquid-type constraint)、および糞便を除去するための大腸の準備を含む、結腸内視鏡検査のための通常の準備の後、血液サンプルを、抗凝固剤としての EDTA を含む血漿収集装置内に採取した。該血液サンプルを混合し、製造業者の説明に従い血漿を分離するために遠心分離し、分離された血漿を集め、4時間以内に - 80 で凍結させた。

【0226】

該血漿サンプルに加えて、患者の臨床データ、例えば年齢、体重、性別、民族性、現在の投薬および適応症ならびに個人および家族病歴を集め、結腸内視鏡検査報告、およびいずれかの集められ検査された組織に関する病理学的報告を同様に集めた。500個を超える患者サンプルを集めた。患者の人口統計データを表 E 4、表 E 5 および表 E 6 に示す。

40

【表 5】

表 E4

	除外	対照	疾患			合計	合計(%)
		正常	ポリープ	腺腫及び ポリープ	腺腫		
合計	3	73	20	7	49	152	100.00%
定期的訪問	0	37	6	1	22	66	43.42%
病歴	0	14	10	5	15	44	28.95%
症状	3	22	4	1	12	42	27.63%
過去の結腸内視鏡検査	1	41	13	6	25	86	56.58%
男性	2	35	8	4	27	76	50.00%
女性	1	38	12	3	22	76	50.00%
アフリカ系アメリカ人	1	3	2	0	2	8	5.26%
アジア人	0	0	0	1	0	1	0.66%
白人	2	69	16	6	45	138	90.79%
ラテンアメリカ系	0	1	1	0	2	4	2.63%
インド人	0	0	1	0	0	1	0.66%
太平洋諸島人	0	0	0	0	0	0	0.00%

10

【表 6】

表 E5

	対照	疾患
女性	38	37
男性	35	39
		p=0.6808
年齢 (平均 +/- 標準偏差(歳))	58.8 +/- 9.8	58.9 +/- 9.6
		p=0.9305
定期的	37	29
病歴又は症状	36	47
		p=0.1237

20

30

関連性のカイ二乗検定からの p 値

【表 7】

表 E6

投薬の状態	#トレーニング セットにおける	コントロ ール有り	コントロ ール無し	疾患 有り	疾患 無し	カイ二乗 p値
アレルギー	27	15	58	12	64	0.450942
貧血	10	6	67	4	72	0.470814
不安障害	13	8	65	5	71	0.343321
関節炎	13	6	67	7	69	0.830237
喘息	16	5	68	10	66	0.199724
便秘	12	4	69	7	69	0.383146
うつ状態	32	19	54	13	63	0.184788
II型糖尿病	25	8	65	15	61	0.137476
憩室症	13	8	65	5	71	0.343321
胃食道逆流症(GERD)	36	13	60	22	54	0.108432
高コレステロール血症	22	11	62	11	65	0.918512
高脂血症 脂質異常症	45	16	57	27	49	0.066549
高血圧	64	29	44	34	42	0.535918
甲状腺機能低下症	21	8	65	13	63	0.280525
不眠症	13	8	65	5	71	0.343321
過敏性腸症候群(IBS)	17	10	63	7	69	0.388888
HCTZ ヒドロクロロチアジド	14	7	66	6	70	0.714104
ASA アスピリン	45	20	53	24	52	0.575854
アルブテロール	12	5	68	7	69	0.596230
カルシウムサプリメント	26	10	63	16	60	0.236565
魚油	23	11	62	22	64	0.903077
フロベント	15	9	64	6	70	0.368360
ホルモン補充療法	14	10	63	4	72	0.076930
イブプロフェン	11	6	67	5	71	0.701900
レボチロキシン	18	7	66	11	65	0.359898
リビトール	12	4	69	8	68	0.256630
リシノプリル	17	4	69	12	64	0.041113
メトホルミン	14	4	69	9	67	0.167563
プラバコール	11	3	70	8	68	0.132598
プリロセック	27	12	61	15	61	0.601195
ビタミンC	12	5	68	7	69	0.596230
ビタミンD	25	11	62	13	63	0.735244
ビタミンD3	10	3	70	7	69	0.211955
ゾコール	18	7	66	10	66	0.493048

10

20

30

【0227】

血漿タンパク質分析のためのサンプル調製

152個のサンプル(76個のポリープおよび/または腺腫および76個の対照)を分類子分析のために選択した。患者のポリープおよび/または腺腫群をより大きな研究コホートからランダムに選択し、年齢および性別に関して対照と釣り合わせた。患者血漿タンパク質サンプルを以下のとおりにLCMS測定のために調製した。血漿サンプルを-80の保存から解凍し、脂質および粒状物をフィルター遠心分離により除去した。該濾過血漿中の高存在量タンパク質を、イムノアフィニティカラムに基づく枯渇により除去した。より低い存在量のフロースルータンパク質を逆相HPLCにより画分中に分離した。選択されたタンパク質画分(6個/サンプル)をトリプシン-TFE消化によりペプチドへと縮小させ、生じたペプチドをアセトニトリル/ギ酸LCMSローディングバッファーに再懸濁させた。

40

【0228】

LCMSデータ取得およびタンパク質分子の特徴の定量

各患者の血漿サンプルの画分の幾つかからの再懸濁ペプチドを定量分析のためにUHPLCを介して縦列質量分析計(Q-TOF)内に注入した。分子的特徴(molecular feature)と称される観察ピークを検出するために、収集されたデータ(保持時間、質量/電荷比およびイオン存在量)を分析した。三次元ピーク積分アルゴリズムは分子的特徴の相対存在量を決定した。

【0229】

50

三次スプラインアルゴリズムを使用するデータセットオーバーレイおよびアライメントの後、複数の患者サンプルからの分子的特徴データを比較した。患者クラス（無病変（clean）またはポリープ/腺腫）の少なくとも1つの50%以上に存在すると決定された特徴のみを更なる分析のために考慮した。このセットにおける欠落患者特徴データの場合、他のサンプルにおいて観察されたピークのアプリアリ位置における生イオン存在量データを統合することにより、特徴値を帰属させた。152個の患者サンプルのそれぞれからの145,000個を超える分子的特徴が後続の分類子分析のための最終データセットを構成した。

【0230】

データ正規化、特徴選択および分類子構築

単一の元の中性質量から誘導された異なる分子的特徴に関する定量的データを組合せ、要約した。例えば、同じ親分子からの+2 m/zおよび+3 m/zの特徴を、単一中性質量クラスター（NMC）値へと合算することにより合体させた。

【0231】

異なるサンプルからの分子的特徴データを、同じ装置および実験日において収集されたサンプルからの平均調節NMCにより正規化した。ほぼ等しい数の無病変およびポリープ/腺腫サンプルがそれぞれの装置-日群において評価されるように、データ取得を釣り合わせた。この方法はクラスター-装置-日（「CID」）正規化と定義される。

【0232】

該データの初期分析は、女性サンプルのホルモン補充療法状態における不釣り合いが分類子構築における交絡因子でありうることを示唆した。その可能性を排除するために、HRTに関連していると示唆された分子的特徴を差次的分類子構築により特定し、後続の分析から除去した。

【0233】

全ての実験画分からの完全なデータを有するサンプルのみを分析に使用した。最初に決定された152個のサンプルのうち、108個の完全なサンプルが残った。除外されたサンプルのほとんどに関しては、前記の6個のサンプル画分の1以上のQC欠損が該除外を招いた。

【0234】

最終的な正規化データを使用して、分類子を作成し、無病変患者サンプルをポリープおよび/または腺腫サンプルから識別するそれらの能力に関して評価した。該サンプルデータの、50個の70/30の練習/試験分割のそれぞれにおいて、特徴選択にエラスチック・ネット（elastic-net）アプローチを用いて、100,000個以上からの考慮NMCの数を約200~250個に減少させた。ついでこれらの選択されたNMCを使用して、SVM（シグモイド・ケルネル（sigmoid-kernel））に基づく分類子を構築した。前記の50個の練習/試験分割の各反復において、ROCプロット上のAUC（感度および特異性の組合せ尺度）により測定された試験データに関して分類子の性能を決定した。0.79+/-0.08を示した平均AUCを図1Aに示す。このAUCは0.5（これは、該図を二分する破線による、識別力を伴わないランダムアッセイが達成する値である）とは有意に異なる。したがって、図1Aは試験セットの性能の比較を示す。x軸は偽陽性率を表す。y軸は真陽性率を表す。

【0235】

エラスチック・ネット/SVM分類子性能の頑強性（ロバストネス）を証明するために、ポリープ/腺腫と無病変とのクラス帰属をランダムに変更し、全体的な特徴選択および分類子構築法を50回の反復にわたって再び行った。得られた平均AUC 0.52+/-0.09は図2Aに示されており、結果（例えば、正しい帰属に関して決定されたもの）が偶然に生じたものとは考えにくいことを示している。したがって、図2Aは試験セット性能の検証を示す。x軸は偽陽性率を表す。y軸は真陽性率を表す。

【0236】

該結果の有意性のもう1つの尺度は、50個の70/30の練習/試験分割分類子にお

10

20

30

40

50

いて個々のNMCが現れる頻度の表である。各反復において、分類子に関して約200～250個の特徴を選択し、前記の50個の反復の少なくとも3個またはそれ以上における特徴は、偶然には予想されない結果である。特徴-頻度表のパレートプロット(ランク化ヒストグラム)を図3Aに示す。該データは、多数の特徴が複数回選択されることを示しており、このことは識別分類子へのそれらの寄与における頑強性を示唆している。最も頻繁な特徴(すなわち、異なる相関群からの上位30個)を選択し使用して、入れ子状態(ネスティッド; nested)の70(70/30)/30の分析構造内に分類子を構築した場合、得られる平均AUCはランダムな場合とは尚も有意に異なる。その結果は、選択された特徴セットから構築されうる複数の分類子が存在することを示している。

【0237】

分類子分子的特徴のサブセット

分類子特徴のより小さなサブセット(部分集合)を外側ループ/内側ループ法により特定した。このアプローチにおいては、該サンプルを50個の外側ループ70/30分割および500個の内側ループ70/30分割に分けた。それらの複数の内側ループを特徴選択のために行った。この場合、SVM-分類子内側-試験ROC AUCを計算し、前記の500個の反復のうち最良の5%を選択し、包含特徴を維持させた。エラスチック・ネットを用いて特徴の最終群を選択して、外側ループSVM-分類子を構築した。異なるサイズの分類子の場合、選択された内側ループからの特徴に関する頻度ランクを用いて、特徴に優先順位をつけた(例えば、最も頻繁な10個、20個、30個など)。得られた分類子を外側ループ試験セットに関して評価し、性能AUCを測定した。図5は50個の外側ループ反復に関する平均ROCを示し、サイズ30の分類子が有意な予想値(AUC = 0.645 + / - 0.092)を保有していたことを示している。図5においては、y軸は真陽性率を示し、x軸は偽陽性率を示す。この結果は偶然には得られなかったであろうということの証明として、サンプルクラス帰属がランダムに再帰属された50個の異なるサンプルセットに関して該方法を行った。図6に示されている得られたAUC, 0.502 + / - 0.101はランダムであった。したがって、このことは正しいクラス帰属の結果の頑強性を証明している。図6においては、y軸は真陽性率を示し、x軸は偽陽性率を示す。表E7は、有意な性能の類似証拠が、サイズ10の特徴またはNMCの分類子で実証されていることを示している。

【表8】

表 E7

サイズ	AUC	標準偏差
100	0.70	0.08
50	0.66	0.09
40	0.65	0.09
30	0.64	0.09
20	0.63	0.09
10	0.60	0.09

【0238】

分類子分子的特徴の特定

質量分析による分子的特徴の質量決定は、特有の特定をもたらすのに十分な程度に正確かつ厳密である。この実施例において構築された分類子において表される1014個の特徴の質量(それぞれは3回以上現れる)を図7としての添付表に列挙する。正確な質量は分子的特徴を本質的に特有に特定するものであり、したがって、これらの特徴の一次アミ

ノ酸配列およびいずれかの翻訳後修飾を決定して、それらの測定結果を代替的表示に変換することが可能である。

【0239】

実施例3B

以下の追加的詳細を伴う実施例3Aの研究設計に対応する研究設計

LCMSデータ取得およびタンパク質分子の特徴の定量

各患者の血漿サンプルの画分の幾つかからの再懸濁ペプチドを定量分析のためにUPLCを介して縦列質量分析計(Q-TOF)内に注入した。分子的特徴(molecular feature)と称される観察ピークを検出するために、収集されたデータ(保持時間、質量/電荷比およびイオン存在量)を分析した。三次元ピーク積分アルゴリズムは分子的特徴の相対存在量を決定した。平均で、約364,000個の分子的特徴が各血漿サンプルから検出され、定量された。

10

【0240】

三次スプラインアルゴリズムを使用するデータセットオーバーレイおよびアライメントの後、複数の患者サンプルからの分子的特徴データを比較した。患者クラス(無病変(clean)またはポリープ/腺腫)の少なくとも1つの50%以上に存在すると決定された特徴のみを更なる分析のために考慮した。このセットにおける欠落患者特徴データの場合、他のサンプルにおいて観察されたピークのアプリオリな位置における生イオン存在量データを統合することにより、特徴値を帰属させた。152個の患者サンプルのそれぞれからの149,000個の分子的特徴が後続の分類子分析のための最終データセットを構成した。

20

【0241】

データ正規化、特徴選択および分類子構築

単一の元の中性質量から誘導された異なる分子的特徴に関する定量的データを組合せ、要約した。例えば、同じ親分子からの+2 m/zおよび+3 m/zの特徴を、単一性質量クラスター(NMC)値へと合算することにより合体させた。NMCの総数は約105,000であった。

【0242】

詳細は実施例3Aと同様である。また、より高い特定確率を示すために使用されたパラメータにより特徴をフィルター処理した。例えば、1を超える電荷状態($z > 1$)を有する特徴のみを考慮した。これは、分類子分析に使用されるNMCの総数を4,7000に減少させた。

30

【0243】

実施例3Aの分析に付言すれば、この分析においては、10ラウンドの10倍交差検証を用いて、特徴を選択し、分類子を構築した。それぞれにおいて、回帰と共にエラスチック・ネット・アルゴリズムを使用して、特徴を選択するために、該データの90%を用い、該特徴に関する決定された係数の順位に基づいて上位20個の特徴を選択し、ついで、線形カーネル(linear kernel)を有するSVM分類子を構築した。ついでこの最終的な分類子を、与えられた倍数の試験セットにおいて維持されたサンプルの10%に関して評価した。したがって、10倍交差検証の各ラウンドにおいて、各サンプルは該試験セットにおいて僅か1回である。該サンプルのそれぞれに関する分類子からの予想試験セット値を用いて、各サンプル当たり1点でそのラウンドに関するROCプロットを構築した。10個のROCプロット(各ラウンドから1個)を平均し、プロットする。該分析において使用された108個の完全なサンプルに関して、結腸内視鏡検査で決定された元の診断をコンパレータとして用いた場合、20個の特徴分類子に関する中央値AUCは0.91であった。平均AUCは 0.91 ± 0.021 であった。図1B。

40

【0244】

分類子性能の頑強性(ロバストネス)を証明するために、ポリープ/腺腫と無病変とのクラス帰属をランダムに変更し、全体的な特徴選択および分類子構築法を、本明細書に記載されているとおりに10ラウンドの10倍交差検証にわたって再び行った。0.52

50

の平均 AUC および 0.52 ± 0.033 の平均 AUC (図 2 B) は、結果 (例えば、正しい帰属に関して決定されたもの) (AUC 0.91) が偶然に生じたものとは考えにくいことを示した。

【0245】

該結果の有意性のもう一つの尺度は、10 ラウンドの 10 倍交差検証において作成された 100 個の分類子において個々の NMC が現れる頻度の表である。各反復において、分類子に関して 20 個の特徴を選択した。複数の分類子における特徴の存在は該特徴選択および分類子プロセスの頑強性を示している。図 1 B に示されている分類子を構築するために元の診断を用いた場合、ほとんどの特徴は 2 回以上選択された。最も頻繁に選択された特徴は 100 個の分類子のうち 99 個において選択された。図 4 を参照されたい。これとは対照的に、ランダムな特徴選択を用いた場合には、最も頻繁に選択された特徴は 3 回しか選択されなかった。全体で、100 個の 20 - 特徴分類子の 1 以上において、206 個の特徴が存在した。

10

【0246】

分類子分子的特徴の特定

質量分析による分子的特徴の質量決定は、特有の特定をもたらすのに十分な程度に正確かつ厳密である。この実施例において構築された分類子において表される 206 個の特徴の質量を図 8 としての添付表に列挙する。正確な質量は分子的特徴を本質的に特有に特定するものであり、したがって、これらの特徴の一次アミノ酸配列およびいずれかの翻訳後修飾を決定して、それらの測定結果を代替的表示に変換することが可能である。

20

【0247】

実施例 4

M R M アッセイの開発

最初に、結腸直腸癌に対する関連性を有するものとして既に報告されている 188 個のタンパク質を、標的化プロテオミクスプロファイリングのための潜在的ペプチド候補を明らかにするために、インシリコで調べた。数万個の潜在的トリプシン性ペプチドから、1056 個の予備セットを実験検証のために選択した。187 個のタンパク質に相当する 337 個のペプチドの最終セットを実験検証から選択して、最終的な多反応モニタリング (M R M) アッセイに加えた。また、重 (全て炭素 13) アルギニン (R) またはリシン (K) で標識された厳密な配列組成の 337 個の相補ペプチドを内部標準として取り込ませ、正規化参照体として最終分析において使用した。

30

【0248】

血漿タンパク質分析のためのサンプル調製

2つの方法 (希釈法および枯渇法と称される) により、M R M L C M S 測定のために患者血漿タンパク質サンプルを調製した。

【0249】

希釈法においては、血漿サンプルを -80°C の保存から解凍し、脂質および粒状物をフィルター遠心分離により除去した。残存タンパク質をトリプシン - T F E 消化によりペプチドへと縮小させ、生じたペプチドをアセトニトリル / ギ酸 M R M L C M S ローディングバッファーに再懸濁させた。

40

【0250】

枯渇法においては、血漿サンプルを -80°C の保存から解凍し、脂質および粒状物をフィルター遠心分離により除去した。該濾過血漿中の高存在量タンパク質を、イムノアフィニティカラムに基づく枯渇により除去した。より低い存在量のフロースルータンパク質をトリプシン - T F E 消化によりペプチドへと縮小させ、生じたペプチドをアセトニトリル / ギ酸 L C M S ローディングバッファーに再懸濁させた。

【0251】

L C M S データ取得および遷移特徴定量

各患者血漿サンプルからの再懸濁ペプチドを定量分析のために U H P L C を介してトリプル四重極質量分析計 (Q Q Q) 内に注入した。遷移 (トランジション; t r a n s i t

50

ion) と称される観察ピークを検出するために、収集されたデータ(保持時間、前駆体質量、フラグメント質量およびイオン存在量)を分析した。

【0252】

遷移ピークのそれぞれの曲線下面積(AUC)を決定するために、二次元ピーク積分アルゴリズムを使用した。

【0253】

重(全て炭素13)アルギニン(R)またはリシン(K)で標識された厳密な配列組成の337個の相補ペプチドを676個の標的化遷移のそれぞれのための内部標準として使用した。遷移AUC値を該相補内部標準AUC値で正規化して、各遷移に関する濃度値を導き出した。

【0254】

データ正規化、特徴選択および分類子構築

分類子構築および性能評価のために、関連標識標準ペプチド生ピーク面積に対する生ペプチドピーク面積の比に基づいて特徴濃度値を用いた。基礎生ピーク面積の正規化は適用しなかった。該遷移に関する欠落値を0に設定した。

【0255】

分類子モデルおよび関連分類子性能を10×10倍交差検証プロセスにより評価した。このプロセスにおいては、まず、特徴選択を適用して、用いられる特徴の数を減少させ、ついで分類子モデルを開発し、ついで分類子性能評価を行った。該10倍交差検証のそれぞれに関して、データを10個の分割体(それぞれは練習セットとしての該サンプルの90%、および試験セットとしての該サンプルの残りの10%を含有する)に分離した。このプロセスにおいては、95個の全サンプルのそれぞれを試験セットにおいて1回評価した。特徴選択およびモデル構築プロセスを、該練習セットのみを使用して行い、ついでこれらのモデルを該試験セットに適用して、分類子の性能を評価した。

【0256】

分類子の性能の一般化を更に評価するために、この10倍交差検証法の全体を10回反復し、それぞれは、練習および試験セットの、異なるサンプリングで行った。

【0257】

分類子分析に使用された遷移特徴の総数は674であった。少数の特徴で分類子性能を調べるために、エラスチック・ネットワーク特徴選択を該分類子モデルの構築の前に適用した。このプロセスにおいては、エラスチック・ネットワーク・モデルを構築し、20個の遷移特徴を与えるモデルを該分類子モデルの開発において使用した。該交差倍数検証プロセスの各倍数はそれ自身の特徴選択工程を有するため、10×10倍交差検証プロセスにわたる該モデルにおいて使用される特徴の総数が20以上になるように、各倍数で、異なる特徴が選択されうる。

【0258】

該特徴選択工程の後、線形ケルネル(linear kernel)と共にサポートベクターマシン(SVM)アルゴリズムを使用して分類子モデルを構築した。練習セットにおける分類子モデルの構築の後、それを、試験セットへの修飾を行うことなく直接的に適用し、関連受信者動作特性(ROC)曲線を作成し、それから、曲線下面積(AUC)を求めた。該10×10倍交差検証プロセスにおいては、0.76+/-0.035の平均試験セットAUCを得た(図10)。これは、結腸直腸癌および正常患者サンプルを識別する該分類モデルの能力を示している。特徴選択プロセス中に選択された特徴を更に評価するために、頻度/順位(ランク)プロットを作成した(図11)。このプロットは、交差検証倍数の全て又はほぼ全てにおいて選択された幾つの特徴を示しており、正常サンプルから結腸直腸癌を識別する際のそれらの有用性を際立たせている。分類プロセスにより特定された特徴の一覧を図12に示す。

10

20

30

40

【表 9】

研究設計および患者サンプル収集

	対照	CRC 疾患
女性	24	23
男性	24	24
		p = 1
年齢	65.0 +/- 9.7	65.5 +/- 9.6
(平均 +/- 標準偏差(歳))		
		p = 0.82

10

【 0 2 5 9 】

本明細書においては本開示の好ましい実施形態が示され記載されているが、そのような実施形態は例示として記載されているに過ぎないことが当業者に明らかであろう。該開示から逸脱することなく、多数の変更、変化および置換が当業者に見出されるであろう。本明細書に記載されている開示の実施形態の種々の代替物が該開示の実施において使用されうると理解されるべきである。以下の特許請求の範囲は該開示の範囲を定め、これらの特許請求の範囲の範囲内の方法および構造ならびにそれらの均等物が本発明に含まれると意図される。

20

【 図 1 A 】

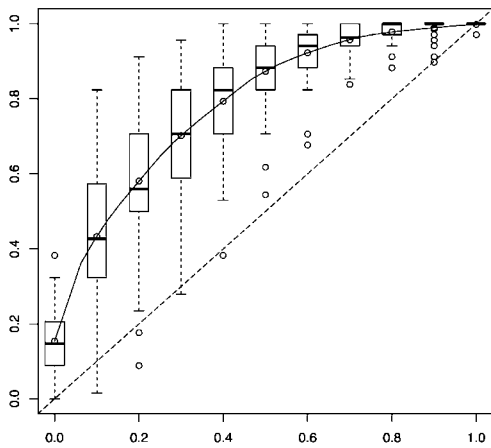


FIG. 1A

【 図 1 B 】

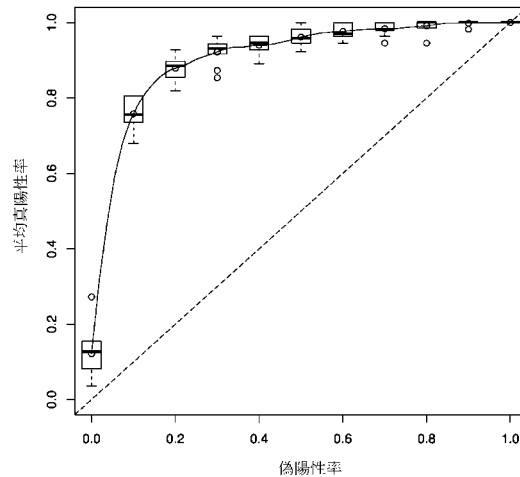


FIG. 1B

【 図 2 A 】

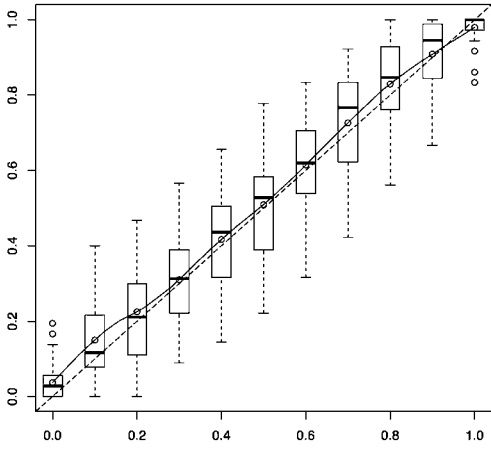


FIG. 2A

【 図 2 B 】

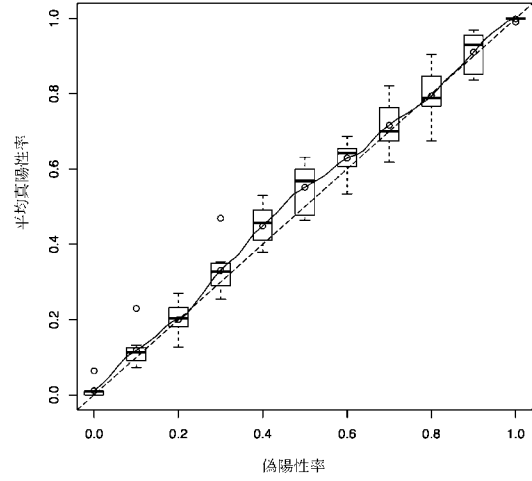


FIG. 2B

【 図 3 】

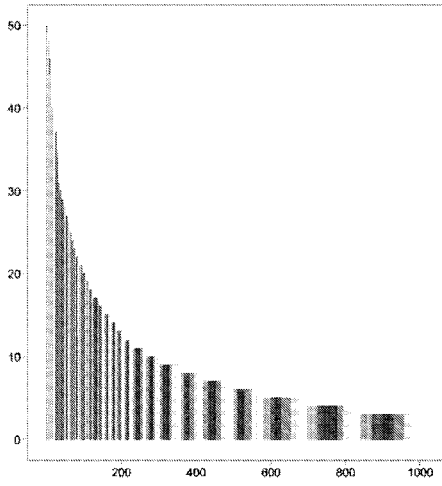


FIG. 3

【 図 4 】

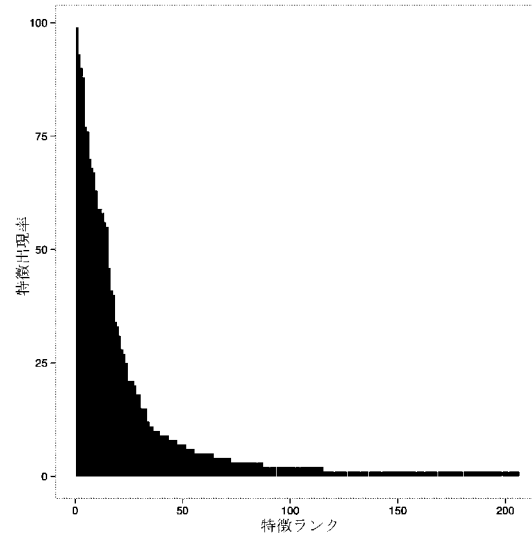


FIG. 4

【 図 5 】

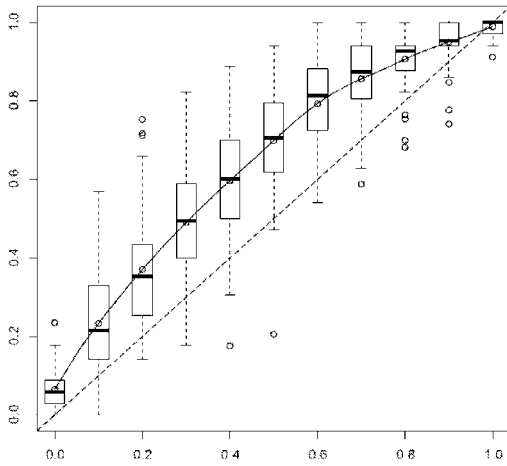


FIG. 5

【 図 6 】

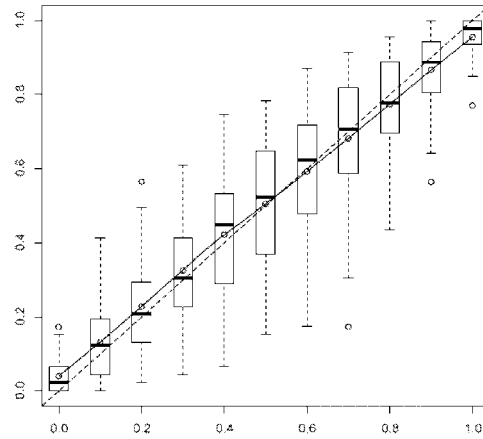


FIG. 6

【 図 7 A 】

中性質量	分粒子 頻度
1280.859291	50
1239.135649	49
1985.956097	49
2477.254682	49
1678.43676	49
828.0340546	49
3038.549902	48
1105.247979	47
1456.618686	46
1684.943282	44
1985.464468	44
1020.530256	43
707.13519	43
2912.732248	42
440.9806659	42
1337.835994	40
1476.761392	40
1146.561252	39
1818.760439	39
1531.353896	39
819.3393507	38
1628.704305	38
2946.47777	38
494.0646707	38
2524.19249	37
1679.261452	37
308.129724	37
422.2197066	35
3022.572148	34
3054.518133	33
1954.007725	32
2514.631558	32
1803.350451	31
1527.658305	31
1741.829691	31
1179.567226	31
2345.226012	30
2135.110474	30
1285.828757	30

930.4880521	30
2182.996603	30
1103.146186	29
1695.40379	29
2499.004523	29
588.3466599	28
651.3352566	28
1423.689546	28
2285.002747	28
1127.785206	28
1615.702692	28
957.5184233	27
1700.844794	27
1125.64933	27
1522.808276	27
2093.351988	27
3217.768912	27
3535.95808	27
1656.897164	26
1387.255205	26
1042.455695	26
3812.577464	26
960.2116197	26
1817.159874	26
2178.965074	25
1200.527528	25
2786.354169	25
2477.27019	24
1740.755479	24
2658.169206	24
984.2836764	24
1598.849716	24
718.8415383	24
386.182813	23
2039.908003	23
3038.544735	23
1793.818251	23
761.4358638	23
386.182813	23
1527.661981	23
477.2390672	23
2705.810237	22

1515.251442	22
2007.080071	22
3411.472434	22
2499.220722	22
1464.287383	22
727.8597579	22
1816.822377	22
1413.512843	22
1242.715861	21
344.2206758	21
3038.141022	21
1377.334925	21
2033.559716	21
2571.994949	21
1219.605149	21
1582.001996	21
1309.599756	20
3000.593189	20
1473.696014	20
2697.454242	20
1066.477284	20
1989.985366	20
1261.703826	20
2948.432217	20
711.4583118	20
2636.679097	19
1032.527911	19
893.4954426	19
1703.919962	19
2131.050072	19
1432.805134	19
1173.576204	19
705.4194027	19
1805.939025	19
1858.167945	19
728.3716681	19
493.2656827	18
771.6575623	18
920.3557768	18
1187.559054	18
919.4614047	18
2360.178399	18

FIG. 7

【 図 7 B 】

653.8098853	18
704.2321796	18
2506.17666	17
1593.789468	17
584.8024263	17
1594.936404	17
1786.905847	17
1816.825774	17
504.2580006	17
1280.769213	17
1815.795709	17
1925.26736	17
1402.646882	17
3014.194029	17
863.4861578	17
1271.199658	17
1623.975402	17
1595.849587	17
1163.592202	16
2793.251034	16
1613.890795	16
948.0663086	16
1792.847081	16
1195.612435	16
937.5333487	16
957.4246968	16
1474.674777	16
876.4693839	16
1764.027106	16
1471.564652	16
3385.620472	16
491.5615299	16
739.3925383	16
1178.697069	16
1598.7649	15
1476.958498	15
1110.547752	15
1694.841276	15
1303.640891	15
3605.670842	15
2967.573707	15
3089.114621	15
1278.524418	15
718.0305511	15

1489.688009	15
2419.924489	15
1195.63612	15
1955.951603	15
1666.807875	15
1826.487704	15
1188.630959	15
1671.775622	15
1498.803682	14
2400.077335	14
1195.603817	14
3821.960734	14
768.4683292	14
1826.897269	14
2924.447956	14
1772.772289	14
2454.999295	14
2768.043757	14
2315.16076	14
1960.018855	14
1735.714578	14
2092.909019	14
1439.725612	13
2715.328682	13
1098.637536	13
2739.342741	13
1108.545977	13
1318.379556	13
1196.599894	13
1894.928752	13
2783.03585	13
1206.543207	13
4132.787873	13
657.6284765	13
1160.538887	13
1477.080084	13
2735.321042	13
1368.685333	13
876.4488121	13
1347.705373	13
1812.384263	13
914.38315	13
654.4064948	13
1714.823278	12

934.4464616	12
2306.104719	12
816.3960753	12
1265.696286	12
2722.698224	12
2804.333903	12
2069.753131	12
3026.313863	12
1030.469647	12
823.4257554	12
1958.918846	12
1586.623048	12
821.4124091	12
584.3738522	12
1747.783535	12
1375.556966	12
2060.881933	12
797.9211875	12
2513.339943	12
3430.57265	12
911.6157399	12
2088.108877	11
2007.370937	11
1814.622166	11
1440.668445	11
2097.746504	11
323.1812761	11
2983.510241	11
1727.896543	11
1676.117941	11
2501.183652	11
1407.711204	11
2052.3864	11
2623.17241	11
1581.771638	11
1476.958498	11
1905.795577	11
2726.071081	11
2400.496006	11
1057.507955	11
1574.36094	11
3324.537295	11
2173.984642	11
1895.857411	11

FIG. 7 (Continued)

【 図 7 C 】

733.3253316	11
2150.07399	11
1667.970072	11
703.3636979	11
1990.982964	11
1179.693455	11
696.6799279	11
1118.461963	11
1747.734027	11
367.9914374	11
1682.821575	11
1060.539151	11
358.5316953	11
1080.429863	10
2831.291513	10
1607.95233	10
3437.665567	10
1224.918332	10
2137.224005	10
1553.802219	10
2251.022525	10
1916.343771	10
1170.633806	10
1368.225854	10
3734.59818	10
1536.730485	10
2052.342523	10
2856.521794	10
1368.563507	10
1473.691067	10
1653.44164	10
1258.295692	10
2121.131035	10
676.3574456	10
3183.496838	10
1455.583346	10
1280.755177	10
2088.113556	10
1312.910345	10
1004.571226	10
798.4157028	10
2057.364926	10
471.0146187	10
1953.956195	10

1751.874038	10
2220.101483	10
1602.685209	10
1241.620676	10
2020.73667	10
1966.928305	9
2159.206079	9
2244.081281	9
2309.114741	9
1806.971398	9
1372.658204	9
1482.678068	9
1319.271229	9
1817.162925	9
584.3540933	9
2006.908553	9
1521.851615	9
1559.341793	9
1194.476506	9
2124.512024	9
1184.830837	9
1636.206887	9
3209.098078	9
1764.867221	9
980.2696122	9
1047.507197	9
2194.944232	9
1402.657795	9
2020.995171	9
1607.799751	9
922.4371266	9
854.4266041	9
450.0304485	9
900.4553512	9
2249.985587	9
351.0089894	9
1554.790653	9
707.4043254	9
2601.11815	9
810.4639788	9
1939.94005	9
1474.401121	9
2834.430176	9
1328.628575	9

708.3710889	9
1658.764618	9
1271.187282	9
2185.457825	9
387.0141783	9
608.0503383	9
835.4977623	9
1084.544297	9
2245.067759	9
1707.747831	9
779.5412333	9
1552.656162	9
710.3428871	9
1706.048938	9
2266.064273	9
1423.68518	9
1682.834131	9
3910.86499	8
2775.829557	8
1820.876214	8
2195.919415	8
2222.147335	8
1060.554029	8
1534.673104	8
1136.497353	8
2307.571451	8
985.4844472	8
1013.870137	8
1550.109659	8
2253.166848	8
2424.683086	8
956.4093041	8
664.3678849	8
2429.102366	8
784.8656644	8
2092.905666	8
1202.59327	8
1227.997244	8
1602.804553	8
2450.256718	8
2077.956139	8
3045.126925	8
1431.737104	8
784.4779713	8

【 図 7 D 】

1064.485131	8
1000.621993	8
1950.97234	8
498.1605339	8
864.4392203	8
2278.113732	8
930.5547303	8
906.3131218	8
1424.655793	8
1265.288057	8
1254.634092	8
648.3611414	8
2200.032681	8
2244.081059	8
2919.33904	8
1205.613525	8
2198.073183	8
1080.470377	8
2221.190757	8
762.4664058	8
1205.694353	8
1548.741637	8
2158.447532	8
468.1876847	8
2692.127921	8
2020.94582	8
882.3832467	8
3248.638568	8
1522.698415	8
1970.433056	8
1319.584412	8
1789.845924	8
2153.178069	7
2714.202314	7
1271.521648	7
2978.6174	7
2388.188926	7
967.7284891	7
1289.924817	7
1124.609902	7
728.4159353	7
2466.628146	7
2092.905349	7
1969.841542	7

812.3975109	7
1225.248412	7
1828.785329	7
1319.594317	7
2116.107252	7
1728.872456	7
1863.828871	7
1585.653154	7
1280.575613	7
2075.067729	7
3587.91521	7
306.1163962	7
1522.371234	7
960.4072128	7
763.4469317	7
2272.168208	7
1779.806365	7
980.4035868	7
2945.323519	7
1187.836917	7
1219.232042	7
1325.616869	7
1102.077981	7
829.4562194	7
922.412735	7
1558.665482	7
2328.169627	7
2813.325097	7
1882.807354	7
2252.077728	7
3049.454318	7
2246.090539	7
1952.04901	7
836.3889703	7
1464.767821	7
1067.486806	7
433.6838883	7
1464.945542	7
1253.710646	7
2251.05848	7
2736.404077	7
2692.121934	7
1924.761793	7
4581.040704	7

1587.667066	7
324.1345984	7
1879.976033	7
1122.546573	7
1137.468423	7
1728.963084	7
760.4241916	7
1080.774434	7
1514.234311	7
2282.266671	7
1316.659239	7
1387.826928	7
2104.965173	7
1559.789808	7
414.2590501	7
613.3967363	7
1638.841843	7
867.5912787	7
1280.617782	7
621.2222873	7
1825.156071	7
784.4098098	7
1102.96774	7
1111.114842	7
1804.931648	7
1240.568222	7
1412.394226	7
2721.28938	7
1196.611575	6
2572.273634	6
1465.898146	6
1678.861022	6
1390.235581	6
2831.136747	6
952.4466364	6
1686.793021	6
3188.576592	6
1522.705903	6
2793.562436	6
1062.629846	6
825.082693	6
2562.285431	6
1740.774143	6
1385.674398	6

FIG. 7 (Continued)

FIG. 7 (Continued)

【 図 7 E 】

1298.182675	6
1552.715079	6
2760.072956	6
1483.661202	6
2404.191094	6
1418.718477	6
1643.681184	6
511.0573767	6
1193.552359	6
802.4651672	6
1517.086169	6
2232.058561	6
882.8805922	6
476.1447173	6
1939.017361	6
1706.219211	6
1735.713361	6
1683.421891	6
821.4135719	6
1741.291892	6
1956.909617	6
1078.632339	6
2768.039218	6
1705.951729	6
953.9306905	6
408.2068081	6
1105.581567	6
2172.053747	6
348.1806168	6
2240.145035	6
1489.689479	6
1571.526159	6
1482.820666	6
1636.776318	6
914.4373764	6
1271.52331	6
2150.080808	6
403.03199	6
1325.536346	6
1294.635295	6
550.2630003	6
1729.704265	6
1509.718758	6
1753.811503	6

1058.563161	6
821.4386902	6
2443.00922	6
1489.275347	6
787.348936	6
1464.966906	6
1582.336667	6
1728.815336	6
597.3618075	6
409.0531778	6
558.0135703	6
1150.547456	6
649.813554	6
423.302692	6
508.0470685	6
1855.911299	6
1673.443167	6
1947.848898	6
1337.941266	5
3016.536555	5
2015.840267	5
2199.059313	5
2228.095052	5
498.2814125	5
2750.165495	5
1924.774485	5
482.2054014	5
1585.652818	5
2506.136724	5
1116.025473	5
1134.539807	5
1392.64386	5
2059.093981	5
2479.148233	5
1157.61132	5
810.4701928	5
1043.283245	5
2336.074025	5
895.4441149	5
1600.720266	5
3150.616201	5
475.2329518	5
2612.409811	5
3770.564522	5

1278.306387	5
1197.61264	5
2116.208463	5
1696.701416	5
3271.403035	5
1611.797286	5
1457.697677	5
598.3006898	5
1553.75725	5
1633.066531	5
3089.304879	5
1806.941122	5
2166.948172	5
2349.030802	5
1225.652059	5
2029.882351	5
1073.47078	5
2454.113875	5
2715.224983	5
1385.255327	5
1904.403068	5
812.4009802	5
1865.902954	5
1943.817228	5
1115.491588	5
586.3788332	5
1038.433681	5
1778.690006	5
2238.993623	5
898.4217621	5
562.369265	5
1458.941578	5
2136.035951	5
942.4591629	5
1806.943641	5
1458.526209	5
1984.216015	5
849.4740621	5
1008.345191	5
1952.400077	5
3109.351257	5
1953.957878	5
2262.078784	5
1365.648371	5

【 図 7 F 】

336.1055586	5
1432.841048	5
1606.115429	5
706.3862112	5
2309.0673	5
588.347913	5
1888.258293	5
597.257281	5
1371.623975	5
2059.866272	5
399.198574	5
1636.799974	5
1382.60319	5
2082.281689	5
1520.973646	5
837.4292788	5
1460.632733	5
1509.038743	5
2150.169986	5
2207.051728	5
1079.582353	5
882.4158446	5
1284.629852	5
1068.474677	5
1068.619217	5
1286.072442	5
3827.631272	5
1482.628713	5
1038.569473	5
976.5514941	5
1508.770682	5
1603.991597	5
2477.243186	5
3113.513773	5
1908.843836	5

【 図 7 G 】

3139.383071	4	1593.705163	4	1204.571185	3
1474.675473	4	1142.787629	4	1671.732926	3
2992.481318	4	1953.999973	4	1558.771543	3
2349.079109	4	829.3705634	4	530.2769133	3
1712.75831	4	1176.623083	4	744.8456525	3
2158.024334	4	1714.41394	4	486.0057662	3
2971.391247	4	890.541987	4	1684.760451	3
1176.314031	4	1471.65187	4	2942.543754	3
1467.805878	4	317.0417319	4	1593.248626	3
2005.98819	4	312.1538262	4	2067.054012	3
1824.869186	4	626.334424	4	694.2740564	3
1280.57281	4	1509.954373	4	1443.393733	3
1349.652837	4	2549.38392	4	1618.670229	3
877.4726661	4	1918.414611	4	1233.853606	3
1266.630526	4	2418.574258	3	4058.214976	3
1790.850342	4	1677.713603	3	1774.01086	3
1125.918913	4	1887.94821	3	3361.718475	3
2350.078136	4	1137.59999	3	1482.699397	3
3248.517395	4	1940.057024	3	2274.236403	3
1308.613261	4	1054.547419	3	1928.937403	3
1802.873863	4	1655.678295	3	1156.541147	3
2488.212136	4	602.3338682	3	2315.01287	3
1508.373659	4	871.5136371	3	1177.497576	3
1420.701755	4	1044.003374	3	888.4498869	3
1946.763111	4	875.9571532	3	617.0585567	3
1766.762478	4	1570.667173	3	440.1539494	3
1495.275821	4	1261.705234	3	444.2398136	3
1271.690267	4	1617.814914	3	1165.544695	3
2099.129825	4	2181.191677	3	2160.06669	3
1492.717533	4	2951.531648	3	3363.480648	3
2254.912852	4	3183.504962	3	1872.940111	3
370.1858478	4	1098.492108	3	795.8580008	3
2033.914169	4	1369.743122	3	1516.637208	3
2072.467285	4	2729.296945	3	1188.175448	3
563.257074	4	1796.832914	3	1629.763759	3
1400.670896	4	3470.721763	3	1846.910751	3
1217.557764	4	1097.680902	3	2163.17881	3
723.3466866	4	1179.610068	3	903.5465302	3
1703.76068	4	2556.19933	3	1954.437292	3
3494.4887	4	2126.025425	3	1273.633235	3
1418.667349	4	1044.136622	3	3381.416499	3
1542.811358	4	1745.844374	3	3718.737385	3
3194.260872	4	1096.55528	3	2082.931277	3
1564.768646	4	2675.156445	3	1257.867522	3

FIG. 7 (Continued)

【 図 7 H 】

1378.587172	3	1040.671037	3	542.7340532	3
2311.545148	3	1683.220528	3	2407.945379	3
3069.411004	3	2523.347622	3	1696.647798	3
805.8934017	3	2329.878791	3	762.463039	3
2185.480854	3	2251.937416	3	1509.27719	3
1233.603324	3	567.9934426	3	425.9930884	3
2598.01642	3	2957.378373	3	1335.060653	3
717.8581098	3	2707.256826	3	1316.668112	3
1358.677603	3	568.6011113	3	2988.524358	3
1531.791439	3	2827.232752	3	1091.578089	3
1789.228382	3	1729.48511	3	966.6273457	3
1003.531248	3	2675.817991	3	1644.426577	3
2667.206219	3	1331.356918	3	1657.488012	3
4848.363443	3	2948.441045	3	1409.213525	3
2259.228315	3	1412.539611	3	1542.680219	3
600.2783787	3	3270.50955	3	2036.938778	3
1382.654292	3	1200.508199	3	1177.470252	3
2598.190466	3	1676.912138	3	554.3445036	3
2706.176516	3	535.3415708	3	1813.300887	3
1123.602954	3	2856.526452	3	1311.90907	3
906.3368054	3	1402.68831	3	1078.57678	3
2092.811796	3	1083.529348	3	1713.38049	3
406.0304723	3	1232.624375	3	2971.424773	3
2460.021453	3	849.4682922	3	2464.535358	3
3177.44115	3	1090.216953	3	1768.799889	3
1157.681776	3	1098.175282	3	932.4388026	3
2813.341777	3	1955.945428	3	855.511109	3
904.4490305	3	1732.825795	3	1709.033507	3
3350.513506	3	2599.727559	3	665.427559	3
3570.607889	3	773.4321059	3		
990.3076074	3	1262.903466	3		
1374.24927	3	1720.76919	3		
403.2062371	3	1665.424322	3		
493.7622045	3	1528.655314	3		
2369.060931	3	2272.53957	3		

【 図 8 A 】

順度 ランク	平均 中性質量	標準偏差 中性質量
1	2514.631	0.01
2	1628.705	0.033
3	1200.5275	0.0095
4	1985.956	0.0093
5	1741.8297	0.0049
6	1239.135	0.028
7	1368.683	0.012
8	1020.5302	0.0053
9	2831.291	0.015
10	1558.665	0.012
11	1146.5611	0.0076
12	1531.3539	0.0073
13	3313.679	0.023
14	1594.9364	0.0078
15	2477.254	0.065
16	2706.173	0.055
17	2786.354	0.022
18	3535.957	0.026
19	2285.002	0.023
20	2501.176	0.013
21	2060.881	0.016
22	1679.2614	0.0089
23	1439.725	0.012
24	1509.7188	0.0093
25	2813.325	0.013

FIG. 8

【 図 8 B 】

54	711.4583	0.0046
55	2272.168	0.01
56	1372.6582	0.0076
57	1500.717	0.014
58	2072.467	0.017
59	2059.094	0.048
60	1233.6033	0.005
61	1713.839	0.011
62	1219.6051	0.0064
63	2400.077	0.01
64	1595.849	0.017
65	1924.761	0.032
66	1392.682	0.01
67	1611.822	0.018
68	1402.6469	0.0061
69	2006.7983	0.009
70	1731.866	0.0096
71	1407.711	0.012
72	1985.464	0.01
73	1569.7434	0.0082
74	2159.205	0.019
75	2988.524	0.012
76	1989.985	0.015
77	2092.9057	0.007
78	1474.6748	0.0059
79	2193.11	0.01
80	2137.223	0.015
81	3748.584	0.01
82	1552.714	0.011
83	2116.107	0.01
84	3038.549	0.011
85	2359.135	0.032
86	1935.866	0.012
87	4132.788	0.013
88	1294.6353	0.0089
89	3055.456	0.022
90	2323.092	0.011
91	2156.087	0.022
92	1482.6287	0.0096
93	2841.328	0.013
94	947.4632	0.0047
95	2179.975	0.012
96	2088.108	0.014
97	2339.142	0.013
98	1365.648	0.012
99	1408.616	0.023
100	2245.067	0.012
101	2302.07	0.025
102	3183.496	0.02
103	2088.113	0.016
104	1956.909	0.035
105	1593.789	0.02
106	2318.131	0.023
107	1666.808	0.01
108	2721.292	0.026
109	2057.364	0.012
110	2546.197	0.02
111	3437.665	0.048
112	1684.943	0.016
113	1644.807	0.034

FIG. 8 (Continued)

【 図 8 C 】

114	3430.572	0.026
115	1598.7648	0.009
116	2624.749	0.016
117	1043.6006	0.0094
118	2735.32	0.02
119	2157.039	0.021
120	3126.56	0.025
121	1123.603	0.0045
122	2975.432	0.016
123	2164.0213	0.0072
124	1902.875	0.011
125	1411.6631	0.007
126	1428.6665	0.0088
127	1194.4768	0.0095
128	1483.661	0.016
129	972.504	0.014
130	802.465	0.01
131	1413.5127	0.0085
132	3139.383	0.015
133	1964.85	0.01
134	3035.284	0.017
135	2513.339	0.011
136	1686.816	0.0065
137	957.4247	0.006
138	2246.0905	0.0096
139	3115.433	0.016
140	1534.5889	0.0064
141	2971.426	0.045
142	1067.486	0.017
143	2938.371	0.015

144	1173.576	0.022
145	1526.7146	0.0099
146	2479.148	0.023
147	2844.508	0.016
148	1559.7897	0.0062
149	1432.8051	0.0087
150	1805.9391	0.0056
151	1875.0415	0.0084
152	1488.7758	0.0073
153	1179.693	0.01
154	1833.8703	0.0097
155	1110.5477	0.008
156	1794.4397	0.0079
157	2079.043	0.013
158	876.4686	0.0067
159	1844.8443	0.009
160	2563.5673	0.0081
161	3113.513	0.015
162	1410.769	0.011
163	2585.187	0.017
164	1290.7147	0.0085
165	2245.0142	0.0094
166	1778.801	0.018
167	2992.481	0.061
168	1553.755	0.014
169	1178.698	0.014
170	1554.79	0.012
171	2417.611	0.035
172	2027.916	0.011
173	1253.7095	0.0075

FIG. 8 (Continued)

【 図 8 D 】

174	1587.6671	0.007
175	2198.13	0.013
176	1140.5988	0.0071
177	2849.298	0.019
178	1242.6024	0.0073
179	3217.768	0.019
180	1392.643	0.015
181	1489.688	0.01
182	1464.767	0.036
183	4990.334	0.018
184	2549.203	0.01
185	1108.5459	0.0047
186	1575.7613	0.0064
187	1105.581	0.013
188	2651.119	0.017
189	1832.027	0.013
190	3031.42	0.014

191	1947.848	0.023
192	1482.633	0.011
193	1496.745	0.01
194	1436.1266	0.0093
195	3439.628	0.015
196	1612.2466	0.006
197	1727.896	0.0062
198	2315.157	0.016
199	1728.815	0.012
200	1628.847	0.011
201	3605.67	0.013
202	1187.6058	0.0067
203	3004.502	0.025
204	2001.5719	0.0091
205	3072.301	0.011
206	1384.6283	0.0075

【 図 9 A 】

遺伝子名	タンパク質
IIT74	難毛内輸送タンパク質 74 ホモログ
YWHAZ	14-3-3 タンパク質ゼータ/デルタ
RPSA	40S リボソームタンパク質 SA
HSPD1	60kDa 熱ショックタンパク質、ミトコンドリア
ACTB	アクチン、細胞質 1
ACTG2	アクチン、ガンマ-腸平滑筋
C3a-desArg	アシル化刺激タンパク質
APC	大腸腺腫症タンパク質
AHCY	アデノシルホモシステイナーゼ
SLC25A5	ADP/ATP トランスロカーゼ 2
ALDH1B1	アルデヒドデヒドロゲナーゼ X、ミトコンドリア
AKR1B1	アルドースレダクターゼ
ORM1	アルファ-1-酸糖タンパク質 1
SERPINA1	アルファ-1-アンチトリプシン
AMY2B	アルファ-アミラーゼ 2B
EXO1	アルファ-エノラーゼ
FUCA1	アルファ-L-フコシダーゼ
SERPINA1	アルファ-1-アンチトリプシン
AGT	アンジオテンシノーゲン
ANXA1	アネキシン A1
ANXA3	アネキシン A3
ANXA4	アネキシン A4
ANXA5	アネキシン A5
APOA1	アポリポタンパク質 A-1
APOC1	アポリポタンパク質 C1
DARS	アスバルチル-tRNA シンテターゼ、細胞質
ATP5B	ATP シンターゼサブユニットベータ、ミトコンドリア
BCNP1	B 細胞新規タンパク質 1
BANK1	アンキリン反復を有する B 細胞スカフォールドタンパク質
CTTNB1	ベータカテニン
APOH	ベータ-2-糖タンパク質 1
BSP	骨シアロタンパク質
CRP	C 反応性タンパク質
CA195	C-C ケモカイン受容体 5 型
CLEC4D	C 型レクチンドメインファミリー 4、メンバー D
CNN1	カルボニン-1
CALR	カルレチリン
CA 19-9	炭水化物抗原 19-9
CA1	炭酸脱水酵素 1

【 図 9 B 】

CA2	炭酸脱水酵素 2
CEA	癌胎児性抗原
CTSD	カテプシン D
CTSS	カテプシン S
CTSZ	カテプシン Z
MS4A1	CD20
CD63	CD63 抗原(メラノーマ 1 抗原)
CHI3L1	キチナーゼ 3 様 1(軟骨糖タンパク質-39)
CGB	絨毛性ゴナドトロピン、ベータ
CLU	クラスタリン
CRMP2	コラプシン応答メディエータータンパク質-2
CCSA-2	結腸癌特異抗原 2
CCSA-3	結腸癌特異抗原 3
CCSA-4	結腸癌特異抗原 4
MIC 1	結腸癌関連タンパク質 Mic1
CSF1	コロニー刺激因子 1(マクロファージ)
C3A	補体成分 c3a
C9	補体成分 9
C3	補体成分 C3
COR10C	コロニン-1C
CKB	クレアチンキナーゼ B 型
CDA	シチジンデアミナーゼ
CYFRA 21-1	サイトケラチン 19 断片
DYNC1H1	細胞質ダイニン 1 重鎖 1
ECH1	デルタ(3,5)-デルタ(2,4)-ジエノイル-CoA イソメラーゼ、ミトコンドリア
DES	デスミン
CRMP-2	ジヒドロピリミジナーゼ関連タンパク質 2
EEF2	伸長因子 2
HSP90B1	エンドプラスミン
E1F4A3	真核生物開始因子 4A-III
EZR	エズリン
FERR	フェリチン
FTL	フェリチン軽鎖
FGB	フィブリノーゲンベータ鎖[フィブリノペプチド B へ切断]
FGG A	フィブリノーゲンガン鎖
セブラーゼ	線維芽細胞活性化タンパク質アルファ
FLNA	フィラミン-A
FHL1	フォー・アンド・ア・ハーフ LIM ドメインタンパク質 1
MGC20553	FRMD3
ALDOA	フルクトース-ビスホスファートアルドラーゼ A
GABRA1	ガンマ-アミノ酪酸(GABA)A 受容体、アルファ 1
GSN	ゲルソリン

【 図 9 C 】

GSTP1	グルタチオン S-トランスフェラーゼ P
GAPDH	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
GARS	グリシル-tRNA シンテターゼ
GDF15	成長分化因子 15
HP	ハプトグロビン[ハプトグロビンアルファ鎖;ハプトグロビンベータ鎖へ切断]
HPS60	熱ショックタンパク質 60kDa
TRAP1	熱ショックタンパク質 75kDa, ミトコンドリア
HSPB1	熱ショックタンパク質ベータ-1
HGF	肝細胞増殖因子
HNRNPA1	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 A1
HNRNPF	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 F
SYNCRIP	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 Q
HNRNPA2B1	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質
HMGBl	高移動度タンパク質 B1
HLA_A	HLA クラス 1 組織適合性 A 抗原, A68 アルファ鎖
HSP90AB1	HSP90AB1 タンパク質
HNP 1	ヒト好中球デフェンシン 1
HNP 3	ヒト好中球デフェンシン 2
HABP2	ヒアルロン酸結合タンパク質 2
PPA1	無機ピロホスファターゼ
IGF-1	インスリン様増殖因子 1
IL2RB	インターロイキン 2 受容体, ベータ
IL-8	インターロイキン 8
IL-9	インターロイキン 9
CYFRA 21-1	ケラチン, I 型細胞骨格 19
KRT8	ケラチン, II 型細胞骨格 8
LMNB1	ラミン B1
LAMA2	ラミニン, アルファ 2
LGALS3	レクチン, ガラクトシド結合性, 可溶性, 3
SERPINB1	白血球エラスターゼインヒビター
M-CSF	マクロファージコロニー刺激因子 1
MIF	マクロファージ遊走阻止因子
CAPG	マクロファージキャッピングタンパク質
MMP7	マトリックスメタロプロテイナーゼ-7
MMP9	マトリックスメタロプロテイナーゼ-9
TIMP 1	マトロプロテイナーゼインヒビター-1
MAPRE1	微小管関連タンパク質 RP/EB ファミリーメンバー-1
MCM4	ミクロソーム維持複合体成分 4
MYL6	ミオシン軽ポリペプチド 6
MYL9	ミオシン調節性軽ポリペプチド 9
NM1T	ニコチンアミド X-メチルトランスフェラーゼ
NME1	ヌクレオシド二リン酸キナーゼ A

【 図 9 E 】

SAA2	血清アミロイド A2
sCD26	血清可溶性 CD26/ジペプチジルペプチダーゼ IV
SCF	Skp, カリン, F-ボックス含有複合体(多タンパク質複合体)
CD24	小細胞肺癌クラスター 4 抗原
SF3B3	スプライシング因子 3B サブユニット 3
スポンジン-2	スポンジン-2
HSPA9	ストレス-70 タンパク質, ミトコンドリア
SDHA	コハク酸デヒドロゲナーゼ[ユビキノリン]フラボタンパク質サブユニット, ミトコンドリア
TAL1	T 細胞急性リンパ球性白血病タンパク質 1
TST	チオ硫酸スルフトランスフェラーゼ
THBS1	トロンボスポンジン-1
TKT	トランスケトララーゼ
TPT1	翻訳制御腫瘍タンパク質
TPM2	トロポミオンベータ鎖
TUBB1	チューブリンベータ-1 鎖
Tra1-R2	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー, メンバー-10b
DcR3	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー, メンバー-6b, デコイ
TNFAIP6	腫瘍壊死因子, アルファ誘導性タンパク質 6
TP53	腫瘍タンパク質 53
UGDH	UDP-グルコース 6-デヒドロゲナーゼ
UGP2	UTP-グルコース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ
KRAS	v-Ki-ras2 クラスエンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ
VNN1	バニン 1
VEGF	血管内皮増殖因子
VIL1	ビリニン-1
VIM	ビメンチン
RAC	

【 図 9 D 】

OPN	オステオポンチン
TATI	膵分泌トリプシンインヒビター
PRDX1	ペルオキシレドキシニン-1
PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ
PEBP1	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 1
PITPNA	ホスファチジルイノシトール転移タンパク質アルファアイソフォーム
PCK2	ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ [GTP], ミトコンドリア
PLAU	プラスミノゲンアクチベータ, ウロキナーゼ
プロラクチン	プロラクチン
PRRG4	プロリンリッチ Glu4
PSME3	プロテアソームアクチベータ複合体サブユニット 3
PDIA3	タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ A3
PDIA6	タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ A6
PKD	タンパク質キナーゼ D
PTK2B	タンパク質チロシンキナーゼ 2 ベータ
SRC	癌原遺伝子チロシン-タンパク質キナーゼ Src
DKFZp686M08189	推定未特徴づけタンパク質 DKFZp686M08189
PDXK	ピリドキサルキナーゼ
PKM2	ピルビン酸キナーゼアイソザイム M1/M2
M2-PK	ピルビン酸キナーゼアイソザイム M1/M2
RhoA	Ras ホモログファミリーメンバーA
RhoB	Ras ホモログファミリーメンバーB
RhoC	Ras ホモログファミリーメンバーC
REG4	再生島由来タンパク質 4
ALDH1A1	レチナルデヒドロゲナーゼ 1
RHGD1A	Rho GDP 解離インヒビター-1
RRBP1	リボソーム結合タンパク質 1
S100A11	S100 A11 カルシウム結合タンパク質
S100A12	S100 A12 カルシウム結合タンパク質
S100A8	S100 A8 カルシウム結合タンパク質
S100A9	S100 A9 カルシウム結合タンパク質
SCGN	セクレタゴギン
SELP1G	セレクトイン F リガンド
SELENBP1	セレン結合タンパク質 1
SEPT9	セプチン 9
SERPINA3	セリンペプチダーゼインヒビター, クレド A, メンバー-3
IKB1/STK11	セリン/トレオニンキナーゼ 11
TF	セロトランスフェリン/トランスフェリン
SERPINB6	セルピン B6
ALB	血清アルブミン
SAA	血清アミロイド A

【 図 10 】

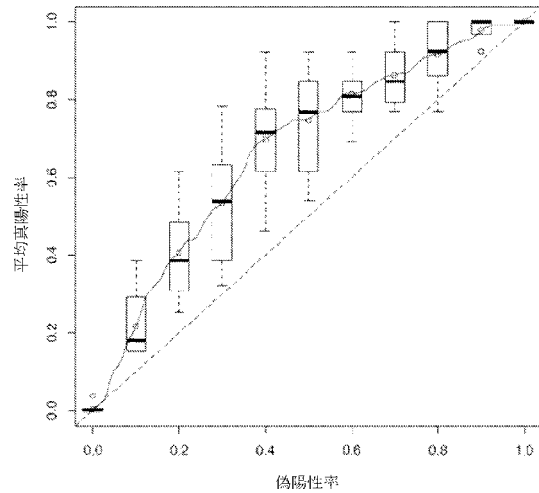


FIG. 10

【 図 1 1 】

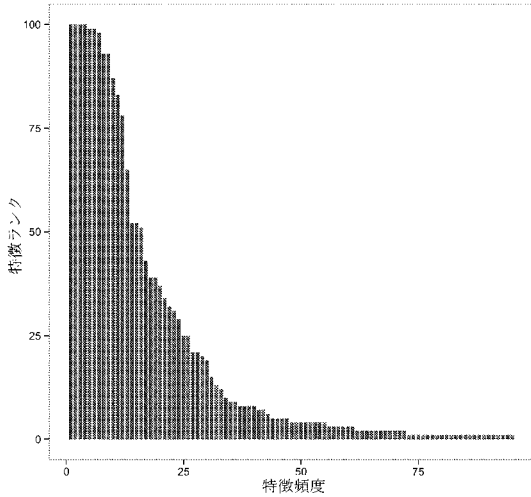


FIG. 11

【 図 1 2 A 】

遷移イオン	UNIPRO タンパク質ID	頻度順位
IAELSPGSDPLTR_b5	SPB6_HUMAN	1
KPAEDEWGK_y8	FRIL_HUMAN	2
VEYLDDR_y6	P53_HUMAN	3
WVAVVPSGQEQR_y7	1A68_HUMAN	4
DATNVGDEGGFAPNILENK_b5	ENOA_HUMAN	5
KPAEDEWGK_y3	FRIL_HUMAN	6
AVELAANTK_y5	TKT_HUMAN	7
FLSDASVTAGGFQIK_y6	TSG6_HUMAN	8
SLEAQADK_y6	TPM2_HUMAN	9
IYKSDGIK_b2	ADT2_HUMAN	10
QVIGTGSFFPK_y8	FHL1_HUMAN	11
YLAVVHAVFALKAR_y8	CCR5_HUMAN	12
INGIPQHTQVLFIAK_b3	CEAM5_HUMAN	13
HSLVSVVVR_y7	SPON2_HUMAN	14
WVAVVPSGQEQR_b3	1A68_HUMAN	15
EWEFQK_b3	RBX1_HUMAN	16
VGIVAWHPTAR_y6	COR1C_HUMAN	17
FADLSEANR_b3	VIME_HUMAN	18
ITSEAEVLVANFFPK_y7	PSME3_HUMAN	19
FEIELPAAPK_y8	MIC1_HUMAN	20
LFENIGK_y5	STK11_HUMAN	21
DPLNPIKQDVK_y7	IPYR_HUMAN	22
EPLGPAHAHELK_y8	SBP1_HUMAN	23
LYTLVLTDPDAPSR_y8	PEBP1_HUMAN	24
QPGITFIAAK_y5	CATD_HUMAN	25
TEGDGVYTLNNEK_b3	HPT_HUMAN	26
VLTEIASR_y6	ANXA5_HUMAN	27

FIG. 12

【 図 1 2 B 】

ALQASALK_y3	ALDOA_HUMAN	28
NSHIAAFDDTK_b3	LAMA2_HUMAN	29
VGDYGSLSGR_y6	CATZ_HUMAN	30
GYSFTTAER_b3	ACTB_HUMAN	31
GKITDLIK_y3	AACT_HUMAN	32
EIFVDEDK_y4	TMG4_HUMAN	33
DGAGDVAVFK_y8	TRFE_HUMAN	34
VLSIQSHVIR_y7	PDXK_HUMAN	35
LRISPDR_b3	MIF_HUMAN	36
ISRAALPEGLPEASR_b6	GDF15_HUMAN	37
EHSSLAFWK_y7	APOH_HUMAN	38
SERPVLVR_b3	APC_HUMAN	39
KIEEQLTLEK_y8	ILEU_HUMAN	40
LIQQTR_y6	FAK1_HUMAN	41
QAVTNPNTFYATK_b3	GRP75_HUMAN	42
TVDAASR_y6	VEGFA_HUMAN	43
DFDFVPPVVR_y5	CO3_HUMAN	44
GYSIFYATK_y8	CRP_HUMAN	45
GADVWFK_b3	S10A8_HUMAN	46
TGIIDYGR_y6	TSG6_HUMAN	47
NALLSLAK_y5	ANXA1_HUMAN	48
ADEGISFR_y3	PRDX1_HUMAN	49
AFVFDK_y3	HGF_HUMAN	50
EGNPEEDLTADK_y9	CAPG_HUMAN	51
LRDLLTR_b3	ECH1_HUMAN	52
YFLHQSHEER_y7	FRIH_HUMAN	53
FTAFYASR_y3	CUL1_HUMAN	54
LSKNEILR_y5	TAL1_HUMAN	55
AVSEGK_y5	CDD_HUMAN	56
QVTNAVVK_y6	CUL1_HUMAN	57

FIG. 12

【 図 1 2 C 】

LGANSLDLVVFGR_y8	DHSA_HUMAN	58
LAADVKGAGAER_y5	ADT2_HUMAN	59
NVDGVNYASITR_y9	CATZ_HUMAN	60
LLNLADLVER_y6	AL1B1_HUMAN	61
GHFDLSK_y5	S10AC_HUMAN	62
SPPGQVTEAVK_y8	ALDR_HUMAN	63
DLILNPR_y4	SF3B3_HUMAN	64
LGVVEVEDQITAVR_y10	SEPR_HUMAN	65
KAFVFPK_y5	CRP_HUMAN	66
FGSYAYTR_y3	GBRA1_HUMAN	67
QIDNPDYK_y4	CALR_HUMAN	68
TLIGHVPDQR_y5	PCKGM_HUMAN	69
PSISSNNSNPK_y6	CEAM3_HUMAN	70
DPGVLDLDR_y5	S10AB_HUMAN	71
LGANSLDLVVFGR_y5	DHSA_HUMAN	72
LFQVQGTGANNTK_b3	VIL1_HUMAN	73
TLAILAAILLVALQAQAEPLQAR_y8	DEF1_HUMAN	74
EAFQLFDR_b4	MYL6_HUMAN	75
LEGLTDEINFLR_y7	K2C8_HUMAN	76
PEYDEAGPSIVHR_y9	ACTH_HUMAN	77
ALQASALK_y6	ALDOA_HUMAN	78
YHTINGHNAEVR_b3	ROA2_HUMAN	79
SFEDIHHR_y6	RASK_HUMAN	80
FEIELPAAPK_y6	MIC1_HUMAN	81
ISELTTEVVK_y6	IFT74_HUMAN	82
FGSYAYTR_y5	GBRA1_HUMAN	83
FIDPLAK_y4	MCM4_HUMAN	84
DITSDTSGDFR_b3	ANXA1_HUMAN	85
IEDSEENGVFK_y7	SIAL_HUMAN	86
LQAILGVPWK_b3	ANGT_HUMAN	87

FIG. 12

【 図 1 2 D 】

AAGDSNLK_y7	AL1B1_HUMAN	88
LRDLLTR_y5	ECH1_HUMAN	89
LTIESTPFNVAEGK_b5	CEAM6_HUMAN	90
VTIDSSYDIK_y9	CH3L1_HUMAN	91
SGYLLPDTK_b3	ENPL_HUMAN	92
GGRALFQDIK_b3	FRIL_HUMAN	93
NQYVSNGLR_b3	SPON2_HUMAN	94
VVDLLAPYAK_y7	ATPB_HUMAN	95

【 図 1 3 】

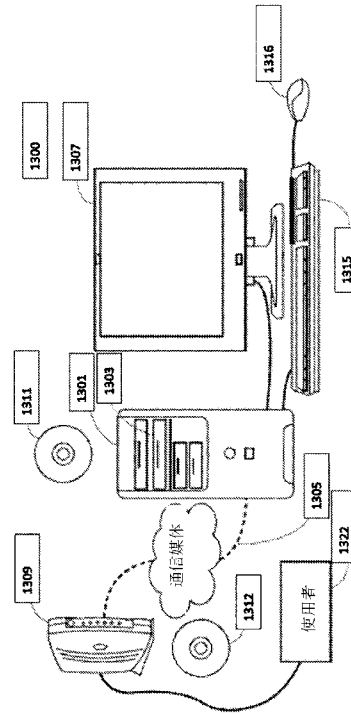


FIG. 13

【 図 1 4 】

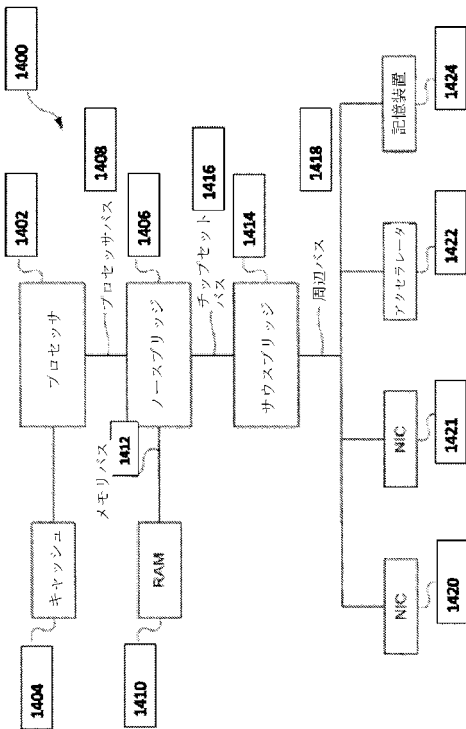


FIG. 14

【 図 1 5 】

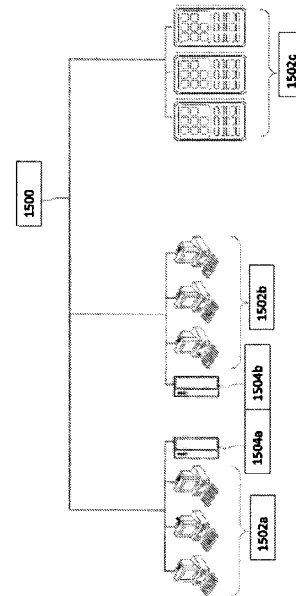


FIG. 15

【 図 16 】

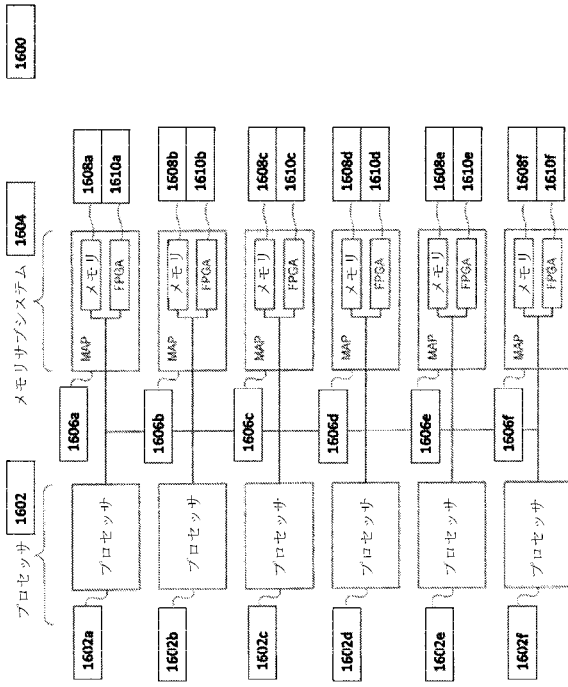


FIG. 16

【 配列表 】

2016507723000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/2691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - G01N 33/574; C12Q 1/00 (2014.01) USPC - 435/4, 7.1 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(B): G01N 33/53, 33/574; C12Q1/00 (2014.01) USPC: 435/7.23, 7.1, 4 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google/Google Scholar; PubMed; ProQuest; 'colorectal adenoma,' polyp, biomarker,'protein, peptide		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	WO 2008/053592 A1 (JUHL, H et al.) May 26, 2008; abstract, page 5, lines 8-10; page 5, lines 18-21; page 7, line 4; page 7, lines 19-20; page 8, lines 24-25; page 9, lines 10-11; page 9, lines 17-18; page 9, lines 19-26; page 10, lines 5-8; page 11, lines 5-8; page 11, lines 18-25; page 11, line 27 to page 12, line 1; page 12, lines 18-19; page 12, lines 28-30; page 13, lines 15-19; page 13, lines 21-26; page 15, lines 18-17; page 16, lines 16-27; page 17, lines 15-19; page 17, line 29; page 19, lines 22-25; page 24, lines 21-22; page 27, lines 15-17; page 29, lines 6-8; page 29, lines 15-17; page 32, lines 23-26; Claims 3, 10-12, 18-19	1-8, 10-18, 21-27, 29, 32-45, 47, 48, 86-93, 96-102, 106-119, 121-123, 125-129, 136-139 ----- 9, 19, 20, 28, 30, 31, 49-52, 84-85, 94, 95, 103-105, 124, 130-135 ----- 46, 83, 120, 130-135
Y	WO 2003/065003 A2 (BAUER, AJ et al.) August 7, 2003; abstract; page 14, lines 23-24; page 16, lines 22-23	19, 20, 57, 58, 94, 95, 130/19, 130/20, 130/57, 130/58, 130/94, 130/95, 131/130/19, 131/130/20, 131/130/57, 131/130/58, 131/130/94, 131/130/95, 132/131/130/19, 132/131/130/20, 132/131/130/57, 132/131/130/57, 132/131/130/58, 132/131/130/94, 132/131/130/95, .. Next Page...
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "g" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 April 2014 (24.04.2014)		Date of mailing of the international search report 12 AUG 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/72891

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	... Continued from Previous Page ...	133/132/131/130/19, 133/132/131/130/20, 133/132/131/130/57, 133/132/131/130/58, 133/132/131/130/94, 133/132/131/130/95, 134/131/19, 134/131/20, 134/131/57, 134/131/58, 134/131/94, 134/131/95, 135/130/19, 135/130/20, 135/130/57, 135/130/58, 135/130/94, 135/130/95
Y	WO 2009/101620 A1 (NISSAN, A et al.) August 20, 2009; abstract; page 4, paragraph 7; page 15, paragraph 1; page 20, paragraph 2; page 29, paragraph 2; page 30, Table 2.	28, 66, 103, 130-135
Y	US 2008/0145852 A1 (SHUBER, AP) June 19, 2008; abstract; paragraphs [0007], [0008]	30, 31, 67, 68, 104, 105, 130/30, 130/31, 130/67, 130/68, 130/104, 130/105, 131/130/30, 131/130/31, 131/130/67, 131/130/68, 131/130/104, 131/130/105, 132/131/130/30, 132/131/130/31, 132/131/130/67, 132/131/130/68, 132/131/130/104, 132/131/130/105, 133/132/131/130/30, 133/132/131/130/31, 133/132/131/130/67, 133/132/131/130/68, 133/132/131/130/104, 133/132/131/130/105, 134/131/130/30, 134/131/130/31, 134/131/130/67, 134/131/130/68, 134/131/130/104, 134/131/130/105, 135/130/30, 135/130/31, 135/130/67, 135/130/68, 135/130/104, 135/130/105
Y	WO 2000/70096 A2 (LAKEN, S) November 23, 2011; abstract; page 3, lines 16-18; page 10, lines 25-30	49-82, 84, 85, 130/49-130/78, 130/85, 131/130/49-131/130/78, 131/130/85, 132/131/130/49-132/131/ 130/56-132/131/130/78, 132/131/130/85, 133/132/131/130/49-133/ 132/131/130/56-133/132/ 131/130/78, 133/132/131/130/85, 134/131/130/49-134/131/ 130/56-134/131/130/78, 134/131/130/85, 135/130/49-135/130/78, 135/130/85
Y	US 6,440,861 B1 (OGREID, D et al.) August 27, 2002; abstract; column 10, lines 61-65; column 17, lines 1-2	124, 130-135
Y	US 2012/0021414 A1 (SHEN-ORR, SS et al.) January 26, 2012; Tables S7, S10	9
A		130-135
A	WO 2011/047358 A1 (CAVET, GL et al.) April 21, 2011; paragraph [0326]	46, 83, 120, 130-135

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/72691

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

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

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

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

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

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

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

-Please See Supplemental Page-

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-139, the first ten peptides selected from the neutral mass classifiers of Figure 8

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/72691

Box No. III: Observations Where Unity Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-139 are directed toward a method of detecting the presence, recurrence or absence of an adenoma or polyp of the colon in a subject comprising the steps of: (a) obtaining a biological sample from a subject; (b) performing an analysis of the biological sample for the presence and amount of one or more proteins and/or peptides; (c) comparing the presence and amount of one or more proteins and/or peptides from said biological sample to a control reference value; and (d) correlating the presence and amount of one or more proteins and/or peptides with the subject's adenoma or polyp status. Also a method of protein/and or peptide detection for diagnosis or prediction, prognosis and/or monitoring a colon disease in a subject.

The method of detecting the presence, recurrence or absence of an adenoma or polyp of the colon in a subject and a method of protein/and or peptide detection for diagnosis or prediction, prognosis and/or monitoring a colon disease in a subject will be searched to the extent that they encompass ten peptides comprising the first ten neutral mass classifiers of Figure 8, such that the identification of the source of these markers is provided, in order to render the claims associated with Figure 8 searchable. It is believed that Claims 1-8, 9 (in-part), 10-40, 41 (in-part), 42 (in-part), 43 (in-part), 44 (in-part), 45 (in-part), 46, 47 (in-part), 48-77, 78 (in-part), 79 (in-part), 80 (in-part), 81 (in-part), 82 (in-part), 83, 84 (in-part), 85-114, 115 (in-part), 116 (in-part), 117 (in-part), 118 (in-part), 119 (in-part), 120, 121 (in-part), 122-124, 125 (in-part), 126-120, 131 (in-part) and 132-139 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass the first ten peptides selected from the neutral mass classifiers of Figure 8. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: A protein of Figure 9 (intraflagellar transport protein 74 homolog).

Groups I+ share the technical features including a method of detecting the presence of an adenoma or polyp of the colon in a subject with a sensitivity of greater than 70% or a selectivity of greater than 70%; said method comprising the steps of: (a) obtaining a blood sample from a subject; (b) cleaving proteins in said blood sample to provide a sample comprising peptides; (c) analyzing said sample for the presence of at least ten peptides; (d) comparing the results of analyzing said sample with control reference values to determine a positive or negative score for the presence of an adenoma or polyp of the colon with a sensitivity of greater than 70% or a selectivity of greater than 70%; a method of detecting the recurrence, presence or absence of an adenoma or polyp of the colon in a subject, wherein said subject has no symptoms or family history of adenoma or polyps of the colon, a subject in whom a colonoscopy yielded a negative result, or a subject previously treated for adenoma or polyps of the colon, said method comprising the steps of: (a) obtaining a biological sample from said subject; (b) performing an analysis of the biological sample for the presence and amount of one or more proteins and/or peptides; (c) comparing the presence and amount of one or more proteins and/or peptides from said biological sample to a control reference value; and (d) correlating the presence and amount of one or more proteins and/or peptides with the subject's adenoma or polyp status; a method of protein and/or peptide detection for diagnostic application comprising the steps of: (a) obtaining a biological sample from a subject; (b) performing an analysis of the biological sample for the presence and amount of one or more proteins and/or peptides; (c) comparing the presence and amount of one or more proteins and/or peptides from said biological sample to a control reference value; and (d) correlating the presence and amount of one or more proteins and/or peptides with a diagnosis for said subject; wherein said analysis detects the presence and amount of: i) one or more proteins; ii) one or more peptide fragments of; iii) one or more peptides or a protein or peptide from which one or more neutral mass clusters is derived; and a method for the diagnosis, prediction, prognosis and/or monitoring a colon disease in a subject comprising: measuring at least one biomarker in a biological sample from the subject; and a kit.

---Continued on Next Supplemental Page---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/72691

Box No. III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking:

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2006/053592 A1 to Juhl, et al. (hereinafter 'Juhl'). Juhl discloses a method of detecting the presence of an adenoma (a method of detecting the presence of an adenoma; abstract) or polyp of the colon in a subject (of the colon in an individual (in a subject); abstract) with a sensitivity of greater than 70% or a selectivity of greater than 70% (with a sensitivity of greater than 70% or a selectivity of greater than 70%; page 27, lines 15-17; Table 2); said method comprising the steps of: (a) obtaining a blood sample from a subject (obtaining a blood sample from the subject; page 9, lines 26-29); (b) cleaving proteins in said blood sample to provide a sample comprising peptides (cleaving C3a in the sample (cleaving proteins in said blood sample to provide a sample comprising peptides); page 20-22); (c) analyzing the sample for the presence of at least two proteins (analyzing the sample for the presence of at least two proteins; page 16, lines 18-23) (d) comparing the results of analyzing said sample with control reference values (comparing the results of analyzing said sample with control reference values; page 11, lines 18-25) to determine a positive or negative score for the presence of an adenoma or polyp of the colon (to determine a positive or negative score for the presence of an adenoma or polyp of the colon; page 11, line 27 to page 12, line 1) with a sensitivity of greater than 70% or a selectivity of greater than 70% (with a sensitivity of greater than 70% or a selectivity of greater than 70%; page 27, lines 15-17; Table 2); a method of detecting the presence or absence of an adenoma (a method of detecting the presence of an adenoma; abstract) or polyp of the colon in a subject (of the colon in an individual (in a subject); abstract); (b) performing an analysis of the biological sample (measuring C3a in the sample (performing an analysis of the biological sample); page 10, lines 5-8; page 13, lines 21-29) for the presence and amount of one or more proteins and/or peptides (for the presence and amount of one or more proteins and/or peptides; page 10, lines 5-8; page 16, lines 18-23); (c) comparing the presence and amount of one or more proteins and/or peptides from said biological sample to a control reference value (comparing the presence and amount of one or more proteins and/or peptides from said biological sample to a control reference value; page 11, lines 18-25); and (d) correlating the presence and amount of one or more proteins and/or peptides with the subject's adenoma or polyp status (correlating the presence and amount of one or more proteins and/or peptides with the subject's adenoma or polyp status; page 11, line 27 to page 12, line 1); a method of protein and/or peptide detection for diagnostic application (a method of protein and/or peptide detection for diagnostic application; abstract) comprising the steps of: (a) obtaining a biological sample from a subject (obtaining a biological sample from a subject; page 9, lines 26-29); (b) performing an analysis of the biological sample (measuring C3a in the sample (performing an analysis of the biological sample); page 10, lines 5-8; page 13, lines 21-29) for the presence and amount of one or more proteins and/or peptides (for the presence and amount of one or more proteins and/or peptides; page 10, lines 5-8; page 16, lines 18-23); (c) comparing the presence and amount of one or more proteins and/or peptides from said biological sample to a control reference value (comparing the presence and amount of one or more proteins and/or peptides from said biological sample to a control reference value; page 11, lines 18-25); and (d) correlating the presence and amount of one or more proteins with a diagnosis for said subject (correlating the presence and amount of one or more proteins with a diagnosis for said subject; page 11, line 27 to page 12, line 1); wherein said analysis detects the presence and amount of: i) one or more proteins (wherein said analysis detects the presence and amount of: i) one or more proteins; page 10, lines 5-8; page 16, lines 18-23); ii) one or more peptide fragments of; iii) one or more peptides or a protein or peptide from which one or more neutral mass clusters is derived; and a method for the diagnosis, prediction, prognosis and/or monitoring a colon disease in a subject (a method for the diagnosis, prediction, prognosis and/or monitoring a colon disease in a subject; abstract) comprising: measuring at least one biomarker in a biological sample from the subject (comprising: measuring at least one biomarker in a biological sample from the subject), including long-term monitoring (long term monitoring; page 10, line 30 to page 11, line 3); and a kit (page 24, lines 18-19).

Juhl does not disclose analyzing said sample for the presence of at least ten peptides; a method of detecting the recurrence of an adenoma or polyp of the colon in a subject, wherein said subject has no symptoms or family history of adenoma or polyps of the colon, or a subject in whom a colonoscopy yielded a negative result, or a subject previously treated for adenoma or polyps of the colon.

However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have analyzed the sample for the presence of any desired number of peptides, including at least ten, provided the previous disclosure of Juhl, which previously discloses the combination of at least one additional marker with a first marker. Additionally, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to have increased the sensitivity and selectivity (specificity) of the detection and diagnosis, as analyzing a multi-marker panel would have achieved such an increase. Furthermore, although Juhl does not disclose detecting the recurrence of an adenoma or polyp of the colon in a subject, wherein said subject has no symptoms or family history of adenoma or polyps of the colon, or a subject in whom a colonoscopy yielded a negative result, or a subject previously treated for adenoma or polyps of the colon, because Juhl discloses a molecular level diagnosis, as well as long-term monitoring, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to have utilized the methods previously disclosed by Juhl as a part of a screening process for identifying early cases of adenoma, which would not present in colonoscopies, and in subjects without a family history of adenoma, as well as utilizing the methods disclosed by Juhl for detecting recurrences in subjects previously treated for adenoma during long-term monitoring, for rapidly detecting and enabling treatment of adenomas.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Juhl reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

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

(74) 代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74) 代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74) 代理人 100151448

弁理士 青木 孝博

(74) 代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74) 代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74) 代理人 100185959

弁理士 今藤 敏和

(74) 代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74) 代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72) 発明者 ブルーム, ジョン

アメリカ合衆国、ワシントン・9 8 2 2 9、ベリンハム、レイク・ワットクーム・ブルバード・2 5 6 0

(72) 発明者 ベンツ, ライアン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 6 4 8、ハンティントン・ビーチ、アンブローズ・レーン・1 8 7 9 7

(72) 発明者 クロナー, リサ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 1 3 1、サン・ディエゴ、ラムズデル・コート・1 1 7 0 4

(72) 発明者 ディロン, ロズリン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 0 0 7、カーディフ、ウィンザー・ロード・1 2 4 3

(72) 発明者 ランドール, アルロ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 6 7 3、サン・クレメンテ、カーレ・アルメジャ・8

(72) 発明者 ジョーンズ, ジェフリー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 1 0 8、グレンデール、ロッカービー・レーン・3 7 5 5

(72) 発明者 スコア, ヘザー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 1 0 3、サン・ディエゴ、アイビス・ストリート・3 7 9 9

(72) 発明者 ストックフィッシュ, トム

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 0 2 5、エスコンディード、キャニオン・ロード・2 3 3 6

(72) 発明者 ウィルコックス, ブルース

アメリカ合衆国、バージニア・2 2 8 0 1、ハリソンバーグ、オハイオ・アベニュー・4 3 0

(72) 発明者 ルダーマン, ダニエル

アメリカ合衆国、カリフォルニア・90027、ロサンゼルス、エフイングハム・プレイス・37
65

Fターム(参考) 2G041 CA01 FA12
2G045 AA26 CA25 CA26 CB03 CB04 CB07 DA36
4B063 QA13 QA19 QQ28 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR55 QR62
QS25 QX01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016507723A5	公开(公告)日	2017-01-19
申请号	JP2015545504	申请日	2013-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	应用蛋白质组学公司		
申请(专利权)人(译)	应用蛋白质组学公司		
[标]发明人	ブルームジョン ベンツライアン クロナーリサ デイロンロズリン ランドールアルロ ジョーンズジェフリー スコアヘザー ストックフィッシュトム ウィルコックスブルース ルダーマンダニエル		
发明人	ブルーム,ジョン ベンツ,ライアン クロナー,リサ デイロン,ロズリン ランドール,アルロ ジョーンズ,ジェフリー スコア,ヘザー ストックフィッシュ,トム ウィルコックス,ブルース ルダーマン,ダニエル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/574 G01N27/62 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/57419 G01N2800/60 G16B20/00 G16B40/00 G01N2800/52 G01N2800/7028		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.D G01N33/574.A G01N27/62.V C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA12 2G045/AA26 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/DA36 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ28 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX01		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 安藤健二 市川英彦 青木孝弘 近藤俊		
优先权	61/732024 2012-11-30 US 61/772979 2013-03-05 US		
其他公开文献	JP2016507723A		
摘要(译)			

所公开的方法用于预测或评估患者的结肠肿瘤状态。它们可用于确定肿瘤的性质，复发或患者对治疗的反应。该方法的一些实施例包括生成关于临床治疗的报告。本文提供的方法旨在检测技术变化，允许数据标准化，增强信号检测以及构建疾病状态和反应的预测蛋白谱。 [选择图]图
10