

(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2008-545634
(P2008-545634A)

(43) 公表日 平成20年12月18日(2008.12.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/48 (2006.01)	A 6 1 K 35/48	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2008-511655 (P2008-511655)
 (86) (22) 出願日 平成18年5月22日 (2006.5.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年1月17日 (2008.1.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/004818
 (87) 国際公開番号 W02006/125580
 (87) 国際公開日 平成18年11月30日 (2006.11.30)
 (31) 優先権主張番号 05011042.8
 (32) 優先日 平成17年5月21日 (2005.5.21)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 05026092.6
 (32) 優先日 平成17年11月30日 (2005.11.30)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 504385384
 プロテオジス アクチェンゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国 5 5 1 2 9 マインツ
 カール ツァイス シュトラーセ 5 1
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 ケイヒル マイケル
 ドイツ連邦共和国 5 5 2 9 6 レールツ
 ヴァイラー ヴァインベルクシュトラーセ
 3 4
 (72) 発明者 シュラッテンホルツ アンドレ
 ドイツ連邦共和国 5 5 1 2 9 マインツ
 ヒンター デル キルヒェ 4 3
 Fターム(参考) 4C084 AA02 BA44 CA30 DA27 NA14
 ZB262

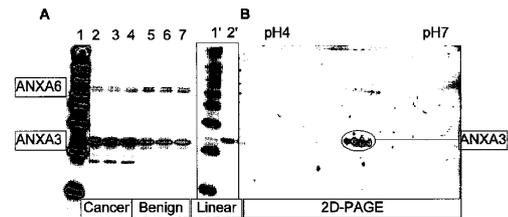
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌危険度評価用アネキシン

(57) 【要約】

本発明は、癌、特に、泌尿器管および/または腸管の癌の治療のための、少なくとも一つのアネキシンタンパクの使用、および、癌、特に、泌尿器管および/または腸管の癌の診断、および/または、癌組織および非癌組織の鑑別のための方法に関する。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

癌、特に、泌尿生殖管および/または腸管の癌の治療のための、少なくとも一つのアネキシンタンパク、好ましくはA3アネキシンの使用。

【請求項 2】

癌、特に、泌尿生殖管および/または腸管の癌を診断する方法、および/または、癌組織および非癌組織を鑑別する方法であって、特に、尿サンプル、またはその分画を用いて

- 少なくとも一つのアネキシンタンパクの細胞内量を定量すること、および/または、
 - 少なくとも一つのアネキシンタンパクの細胞外量を定量すること、
- から成る独立工程を含む方法。

10

【請求項 3】

アネキシンタンパクが、アネキシンA1、アネキシンA2、アネキシンA3、アネキシンA4、アネキシンA5、アネキシンA6、アネキシンA7、アネキシンA8、およびアネキシンA10から成るグループの少なくとも1員であり、かつ、前記少なくとも一つのアネキシンタンパクの量は、少なくとも一つのさらに別のタンパク量と共に定量されることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、少なくとも一つの別のタンパク量と共に定量されることを特徴とする、請求項 2 または 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、血清アミロイドP、イソペプチダーゼT、筋肉型脂肪酸結合タンパク、ガレクチン1、熱ショックタンパク90、BiP、タンパクジスルフィドイソメラーゼ、上皮型脂肪酸結合タンパク、エノイル補酵素Aヒドラターゼ、およびヌクレオフォスミンから成るグループから選ばれる、少なくとももう一つのタンパクの量と共に定量されることを特徴とする、請求項 2 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、14-3-3ファミリー、プロテアソーム、アクチベータサブユニット2、サイトケラチンファミリー、KNP-1アルファ-タンパク、およびKNP-1ベータタンパクから成るグループから選ばれる、少なくとももう一つのタンパクの量と共に定量されることを特徴とする、請求項 2 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 7】

少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、少なくとも一つの血液または血清マーカー、特に、カリクラインプロテアーゼファミリーの少なくとも一つのメンバー、好ましくは前立腺特異的抗原 (PSA) の量と共に定量されることを特徴とする、請求項 2 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、少なくとも一つの上皮細胞マーカー、特に、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) の量と共に定量されることを特徴とする、請求項 2 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 9】

アネキシンA3および/またはアネキシンA8、好ましくはアネキシンA3が使用されることを特徴とする、請求項 2 から 8 のいずれか 1 項による方法。

【請求項 10】

癌が、前立腺癌、腎臓癌、膀胱癌、尿道癌、卵巣癌、子宮癌、または結腸癌から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項 2 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも一つのアネキシンタンパクの量を定量する前に、尿サンプルまたはその分画に対し分離工程を実施し細胞ペレットおよび上清を生成することを特徴とする、請求項 2 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

少なくとも一つのアネキシタンパクの細胞内量を定量するために、ペレットが用いられることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

少なくとも一つのアネキシタンパクの細胞外量を定量するために、上清が用いられることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

少なくとも一つのアネキシタンパクの量を定量する前に、陽イオンキレート剤、特に、EDTAおよび/またはEGTAが添加されることを特徴とする、請求項 2 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

タンパクの量が、免疫組織化学的方法によって定量されることを特徴とする、請求項 2 から 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

尿サンプル、またはその分画が、尿、特に、前立腺マッサージ、特に、直腸への指挿入による前立腺マッサージ後に回収される前立腺尿から得られることを特徴とする、請求項 2 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

尿サンプルまたはその分画が、精製され、殊に、磁気ビーズによって精製され、特に、好中球、単球、または、抹消血単核球 (PMBC) が取り除かれることを特徴とする、請求項 2 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

朝の尿サンプル、またはその分画が使用されることを特徴とする、請求項 2 から 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

アネキシレベルが、大便、または腸管上皮細胞において測定されることを特徴とする、請求項 1 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

大便の任意の分画または調製品 (エキソソーム生産の可能性を持つ任意の上皮表面) におけるアネキシレベルが、消化管の上皮癌の診断のために使用されることを特徴とする、請求項 1 から 1 5 および 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 2 1】

アネキシレベルが、結腸直腸癌を診断するために使用されることを特徴とする、請求項 1 から 1 5 および 1 9 から 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記方法が、炎症性病態 (クローン病または潰瘍性大腸炎を、癌と) 鑑別するために、好中球、特に、カルプロテクチンおよび/または好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL) の定量と組み合わせられることを特徴とする、請求項 2 から 2 1 のいずれか 1 項による方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、癌、特に、泌尿器管および/または腸管の癌の治療および/または診断に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

癌は、西洋文明におけるヒトの死亡の主要原因の一つであるが、多くの場合その診断が困難である。例えば、前立腺癌は、男性における癌死亡の主要原因の一つであるが、異種の原因がからみあった、診断の難しい疾患である。個別の腫瘍について、それが将来辿る行程を予測することはほとんど不可能である。前立腺癌の診断マーカーに関する現状は、

50

前立腺特異的抗原 (PSA) の種々の異性形に事実上基づくが、全体として、擬似陰性および擬似陽性の点で満足すべきものではない(1-4)。最近、それに代わる様々な分子マーカーが、体液または前立腺組織にもとづいて示唆されている(5-11)。前立腺癌については、少なくとも3種類のサブタイプが特定されているが、これらのサブタイプは、腫瘍の等級、再発率、および転移と関連するようである(12)。脂肪酸シンターゼだけは、前立腺癌の、明瞭な分子マーカーとして役立つ(13)。それでもなお、個別の癌制圧を改善するための、新規の、適切な、広範囲治療を開発するために、患者を、その進行の危険度について評価するための、より詳細で、信頼性の高い治療的、診断的パラメータが、従来と変わらず緊急に求められている(14-16)。

【発明の開示】

【0003】

上記に鑑みて、本発明が向き合う課題は、第1局面において、癌、特に、泌尿生殖管および/または腸管の癌、好ましくは前立腺癌の治療ために、少なくとも一つのアネキシンタンパク、好ましくはA3アネキシンを使用することによって解決される。

【0004】

さらに、本発明は、癌、特に、泌尿生殖管および/または腸管の癌、好ましくは前立腺癌の治療用薬剤の製造のために、少なくとも一つのアネキシンタンパク、好ましくはA3アネキシンを使用することを含む。好ましい実施態様では、癌治療は、少なくとも一つのアネキシンタンパクのインピボ量の増加、特に、少なくとも一つの外アネキシンタンパクのインピボ量の増加によって実行される。

【0005】

上記に鑑み、本発明が向き合う課題は、さらにもう一つの局面において、癌、特に、泌尿生殖管および/または腸管の癌を診断する方法、および/または、癌組織および非癌組織を鑑別する方法であって、特に、尿サンプル、またはその分画を用いて、

- 少なくとも一つのアネキシンタンパクの細胞内量を定量すること、および/または、
 - 少なくとも一つのアネキシンタンパクの細胞外量を定量すること、
- から成る独立工程を含む方法によって解決される。

【0006】

ある好ましい実施態様では、本発明の方法は、特に、尿サンプル、またはその分画を用いて、

- 少なくとも一つのアネキシンタンパクの細胞内量を定量すること、および
 - 少なくとも一つのアネキシンタンパクの細胞外量を定量すること、
- から成る独立工程を含む。

【0007】

さらに別の好ましい実施態様では、本発明の方法は、特に、尿サンプル、またはその分画を用いて、

- 少なくとも一つのアネキシンタンパクの細胞内量を定量すること、および
 - 少なくとも一つの前記アネキシンタンパクの細胞外量を定量すること、
- から成る独立工程を含む。

【0008】

少なくとも一つのアネキシンの細胞内および細胞外の量を定量した後、細胞内量に対する細胞外量の比、またはその逆が定量される。細胞内量に対する細胞外量の比が定量されることが好ましい。得られた比は、癌の診断、および/または、癌組織および非癌組織の鑑別用の診断パラメータとして好適である。

【0009】

本発明によれば、「細胞外」という用語は、細胞の原形質膜の外面を含む細胞外空間と理解される。

【0010】

本発明によれば、「非癌組織」という用語は、健康組織と、病理組織、特に、良性前立腺肥大、慢性前立腺炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症組織および線維症、特に、二次

10

20

30

40

50

的線維症を含む。

【0011】

本発明によれば、「量」という用語は、タンパクの、それぞれ、細胞内および/または細胞外レベルおよび濃度と理解される。

【0012】

本発明によれば、「アネキシンタンパク」、および一般に「タンパク」という用語は、異性形、および、その突然変異形、短縮変異形、および翻訳後修飾形を含む。翻訳後修飾形は、特に、タンパク分解処理によって得られるタンパク様形態を含んでもよい。

【0013】

本発明によれば、「処置」という用語は、「治療」と等価であり、従って、癌と関連する障害の処置を含む。

10

【0014】

ある好ましい実施態様の場合、アネキシンタンパクは、アネキシンA1、アネキシンA2、アネキシンA3、アネキシンA4、アネキシンA5、アネキシンA6、アネキシンA7、アネキシンA8、およびアネキシンA10から成るグループの少なくとも1員であり、この少なくとも一つのアネキシンタンパクの量は、少なくとももう一つのタンパクの量と共に定量されることが好ましい。前記さらに別のタンパクに関しては、下記の説明を参照されたい。

【0015】

もう一つの実施態様では、少なくとも一つのアネキシンタンパクの量は、小型分子または核酸マーカーの量と共に定量される。

20

【0016】

アネキシンは、カルシウム結合タンパクであるが、各種細胞内および細胞外機能、例えば、膜トラフィック、リンパ球移動、細胞運動、カルシウムフラックス、およびシグナル変換を含む機能に影響を及ぼすと考えられている。アネキシンは極めて豊富であり、陰性荷電した膜脂質に対するカルシウム依存性の大容量マスキングは、アネキシン機能にとって重要と考えられる(17)。

【0017】

31名の前立腺癌患者から得た良性および腫瘍組織の間でタンパク量の差を比較した以前のプロテオミクス研究において、本発明人等は、アネキシンA3が、様々に変動しながらも、腫瘍においてより豊富であることを特定し、前立腺癌の各種サブタイプの診断マーカーとなる可能性のあることを示した。アネキシンA3は、アネキシンファミリーの中でも比較的稀なメンバーであるが、31名の患者全体において平均2.4倍上方調整されていた(95%信頼区間が1.1から5.4倍; $P=0.045$)。クラスター分析によって示唆されて、試みにサブクラスターとして選んだ22名の患者では、アネキシンA3は、平均4.4倍上方調整された(95%信頼区間が2.2および9.1倍; $P=0.0008$)。これは、あるタイプの腫瘍では、アネキシンA3が、癌の表現型に関与している可能性を示唆する。さらに詳細については、特許出願PCT/EP2005/00156を参照されたい。なお、この特許文書の全体を本明細書に含める。

30

【0018】

前立腺癌と関連していくつかのアネキシンは下方調整されることが報告されている。そのようなアネキシンとして、アネキシンA1、アネキシンA2、アネキシンA4、アネキシンA7、およびアネキシンA10が挙げられる(6)。Alaiya等(18)も、前立腺の「悪性組織と良性組織を区別する、ある鑑別値(アネキシンA3)」を報告している。最近、アネキシンA3は、培養肝臓細胞におけるDNA複製に必要であることが示されているが(19)、肝実質の肝細胞よりも高い増殖能および増殖速度を有する小型肝細胞においてより高度に発現されるようである(20)。本発明人等の、この結果は、アネキシンA3は、通常はこのファミリーでは滅多に見られぬメンバーであるので、ある種の患者の癌治療のための、生体マーカー、または標的、または治療要素となる可能性のあることを示唆する。

40

【0019】

アネキシンは、細胞原形質性ではあるが、細胞外にも認められる。ただし、細胞外のは、分泌性リーダー配列を欠如する。例えば、Carlsson等(24)は、男性不妊症に関わる

50

抗精子抗体の特異性としてアネキシンA3を特定した。Oh等(25)は、アネキシンA1が、硬い肺腫瘍の近傍の上皮外面に露出すること、および、動物実験において、該タンパクに対する放射性標識抗体の投与が腫瘍の寛解をもたらすことを見出した。実際、A5の細胞表面への転移は、アポトーシスと関連し(26)、かつ、別にリポコルチン1とも呼ばれるアネキシンA1は、好中球および単球/マクロファージから、抗炎症剤として、大量に細胞外空間に放出される。事実、アネキシンA1は、グルココルチコイドの抗炎症作用の一次介在因子であるようである(27,28)。

【0020】

分泌、特に、アネキシンA3の細胞外排出、エキソソーム経路、および前立腺の免疫監視調整の変化を合わせ統括するアネキシン分泌機構については全く報告されていない(17)。エキソソームは、直径30から100 nmの膜小胞であり、インビトロでは、種々の起源の細胞によって生産、分泌されるが、抗原提示細胞に対する腫瘍抗原の移送の他に、特異的免疫反応刺激にも関与すると考えられている(21)。アネキシンA3およびアネキシンA8を含めたアネキシンファミリーのメンバーは、通常、エキソソームの中に認められる(21-23)。

【0021】

Hegmann等(29)は、エキソソームは、細胞壊死が見られない状態で、熱ショックタンパクの細胞外環境への放出に関与すると想定した。腔におけるエキソソーム環境では、インビトロにおいて仮定されるアネキシンカルシウムイオンチャンネル機能に必要な低pH値が実現されると考えられたが、このことについては、細胞の生存性と不適合であるために反対の議論が起こっている(17)。事実、生理的アネキシンイオンチャンネルの報告例が、いずれも正常な細胞の生存性とはかけ離れた状況である、骨芽細胞形成、および軟骨細胞の最終分化および細胞死に関与する基質小胞にも見られる(30)。本発明人等によれば、アネキシンイオンチャンネルは、エキソソーム小胞の浸透圧性破裂(原形質膜と分泌融合する前に、多胞性小胞内か、または細胞外で)に関与し、そうすることによって、腫瘍またはその他の組織の、例えば、骨粗しょう症の場合であれば骨の細胞外環境を変えると考えられる。

【0022】

Bondanza等(31)は、放射線被爆腫瘍細胞が、マクロファージによって効率的に貪食されるが、細胞表面のフォスファチジルセリンがアネキシンA5によってマスクされると、マクロファージ経路が抑えられ、CD8+樹状細胞依存性の強力な免疫反応が引き起こされることを最近報告した。前述したように、アネキシンA1は、好中球招集を抑え、それによって組織の炎症を下げる抗炎症モジュレーターである。アネキシンA1は、好中球およびマクロファージ上の、特定の細胞外ALX(リポキシンA)受容体に結合し、そうすることによってマクロファージの食作用を変えることができる(27,28)。組織内の活動部位において、アネキシンA1およびそのN-末端ペプチド(Ac2-26)は、アポトーシス好中球の食作用を増進し、そうすることによって、抗炎症性サイトカイン、例えば、TGF(トランスフォーミング増殖因子)- β を介する免疫反応を下げ、従って、Th1(T-ヘルパー1)およびTh2(T-ヘルパー2)の、抗原誘発性T細胞増殖もまた、ペプチドAc2-26によって抑制される。腫瘍におけるアネキシンA3の変化は、アネキシンの細胞外プールの性質および/または濃度を変え、延いてはマクロファージ/顆粒細胞優勢反応、および/または、体液性反応の間の相互作用を変えることによって、前立腺組織に対する免疫監視に影響を及ぼす可能性がある。

【0023】

本発明の一実施態様によれば、好ましくは、アネキシンA1、アネキシンA2、アネキシンA3、アネキシンA4、アネキシンA5、アネキシンA6、アネキシンA7、アネキシンA8、およびアネキシンA10から成るグループから選ばれる、少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、少なくとももう一つのアネキシンタンパクの量と共に定量される。

【0024】

本発明のさらにもう一つの実施態様の場合、少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、血清アミロイドP、イソペプチダーゼT、筋肉型脂肪酸結合タンパク、ガレクチン1、熱ショックタンパク90、BiP(ヒトタンパク:P11021-78kDa糖調節タンパク前駆体、GRP78

10

20

30

40

50

、免疫グロブリン重鎖結合タンパク、小胞体腔Ca²⁺結合タンパクgrp78)、タンパクジスルフィドイソメラーゼ、上皮型脂肪酸結合タンパク、エノイル補酵素Aヒドラーゼ、およびヌクレオフォスミンから成るグループから選ばれる、少なくとももう一つのタンパクの量と共に定量される。

【0025】

さらに、少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、14-3-3ファミリー、プロテアソーム、特に、プロソームおよび/またはマクロパイン、アクチベータサブユニット2、サイトケラチンファミリー、KNP-1アルファ-タンパク(NCBIアクセスBAA95554.1、GI:7768772)、およびKNP-1ベータタンパク(NCBIアクセスBAA21139.1、GI:2250701)から成るグループから選ばれる、少なくとももう一つのタンパクの量と共に定量される。

10

【0026】

ある場合には、従来の、診断用腫瘍マーカーの診断価値は限定的である。例えば、前立腺抗原(PSA)の高いか、または極めて低い血清値は、前立腺癌に関して、相当に信頼性の高い診断指数を提供する。しかしながら、2から10 ng/ml、殊に4から10 ng/ml、特に2から6 ng/mlの範囲のPSA術前値は、診断信頼度に関して、特に、前立腺全摘術における術後治癒率の予測に関し信頼度が極端に低い。

【0027】

従って、本発明の特に好ましい実施態様では、少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、少なくとも一つの血液または血清マーカー、特に、カリクラインプロテアーゼファミリーのマーカー、好ましくは前立腺特異的抗原(PSA)のマーカーの量と共に定量される。種々の形のPSA量、特に、PSA総量(tPSA)、遊離PSA(fPSA)の相対または絶対量、および、PSA複合体(cPSA)の相対または絶対量が、アネキシンA3の量と共に定量される。さらに、カリクラインプロテアーゼファミリーの他のメンバーもこの局面で使用が可能であることも、この実施態様の範囲の中に含まれる。本発明による診断目的のために、これらのタンパク量の相互の関係を、一つ以上のアネキシンパラメータの測定値または計算値と組み合わせて用いてもよい。当然のことであるが、有用と考えられるアネキシンパラメータは、この開示に例として用いられるものに限定されない。

20

【0028】

さらに別の好ましい実施態様の場合、少なくとも一つのアネキシンタンパクの量が、少なくとも一つの上皮細胞マーカー、特に、前立腺特異的膜抗原(PSMA)の量と共に定量される。

30

【0029】

本発明の特に好ましい実施態様では、アネキシンA3および/またはアネキシンA8、好ましくはアネキシンA3が使用される。

【0030】

本発明によれば、治療および/または診断される癌は、泌尿生殖管および/または腸管に由来するものである。癌は、前立腺癌、腎臓癌、膀胱癌、尿道癌、卵巣癌、子宮癌、または結腸癌から成るグループから選ばれる。診断される癌は、前立腺癌および/または結腸癌であることが好ましい。前立腺癌に関しては、本発明の方法が、前立腺癌組織サンプル、良性の前立腺肥大(BPH)組織サンプル、慢性前立腺炎組織サンプル、線維症疾患組織サンプル、および健康な組織サンプルの間の鑑別を可能とするものであることが好ましい。

40

【0031】

腸管の癌、特に結腸癌に関しては、本発明の方法は、癌組織サンプルと、炎症性腸疾患、特にクローン病および/または潰瘍性大腸炎によって冒される組織サンプルとの鑑別を可能とすることが好ましい。

【0032】

本発明のさらに別の実施態様によれば、癌のサブグループを治療および/または診断することが可能である。さらに、癌の種々の段階を、本発明によって治療および/または診断することが可能である。さらに、本発明の手段によって、非癌組織から癌組織への移行

50

を監視することが可能である。

【0033】

本発明のさらに別の好ましい実施態様の場合、排泄サンプルまたはその分画、殊に尿、特に、前立腺尿のサンプルまたはその分画に対し、少なくとも一つのアネキシンタンパクの量を定量する前に、分離工程を実施し、細胞ペレットと上清を生成する。分離工程は、当業者には明らかなように、遠心、特に、低速度の遠心（例えば、200 x g、4 で5分）によって実施することが好ましく、それによって細胞を、液体媒体から分離する。もちろん、測定のために細胞内アネキシンから可溶性またはエキソソーム結合アネキシンを分離するためには、適切なものであれば、任意の遠心プロトコール、例えば、異なる条件における連続遠心、遠心と他の方法との組み合わせを含むプロトコールの使用も考えられてよい。細胞内アネキシンから、可溶性またはエキソソーム結合アネキシンを分離するには、当業者には明らかなように、他の手段、またはそれらの組み合わせ（例えば、磁気ビーズ、ろ過、クロマトグラフィー等）を使用することも可能である。

10

【0034】

本発明のさらに別の実施態様によれば、少なくとも一つのアネキシンタンパク、好ましくはアネキシンA3の細胞内量を定量するためには、細胞ペレットが用いられる。

【0035】

上の説明でも既に述べたように、アネキシンは、骨芽細胞炎および骨溶解の過程と複雑に絡み合っている。アネキシンは、骨のミネラル沈着過程に関与する。これは注目に値する。なぜなら、前立腺癌転移は、高頻度の骨芽細胞病変を呈する癌では稀なことだからである。多くの癌転移は、高い破骨細胞骨溶解（骨を溶かす）活性を持つという特徴を有するが、一方、前立腺癌転移は、破骨細胞活性およびミネラル沈着骨芽細胞活性の両方の活性を示す。

20

【0036】

生理的なミネラル沈着は、極めて複雑ではあるが、統制された過程である。骨のミネラル沈着は、ミネラル化骨格細胞の形質膜から放出される、基質小胞と呼ばれる小さな囊胞によって起動される。最初のミネラル相は、基質小胞の内側に形成される。これらは膜の中に封鎖されているので、ミネラルイオンが入るためにはチャンネルタンパクが必要である。アネキシンは、この基質小胞の中に、Ca²⁺が進入するためのチャンネルを形成する。これによって、リン酸カルシウムのミネラル沈着がもたらされる。小胞内結晶があるサイズに達すると、結晶は膜を破る。これが、次に、炎症、すなわち、癌およびアネキシンの生物学に共通の特徴に関連し、骨と免疫系の間の相互作用を引き起こす。従って、本発明の方法のある特定の好ましい実施態様によれば、骨粗しょう症の診断および/または治療のために、アネキシン量、好ましくはアネキシンA3および/またはアネキシンA8の量が、体液、生体分泌物、組織サンプル、細胞グループまたは細胞において、殊に、当業者に既知の方法によって定量される。このような治療は、アネキシンタンパクの量、細胞下/細胞外分布、翻訳後修飾、または活性に影響を及ぼす物質の投与を含んでもよい。この点における活性としては、殊に、適宜に増加または低減されるイオンチャンネル活性が挙げられる。骨粗しょう症の治療に用いられてもよい物質としては、はっきりとアネキシンA3、その短縮型または突然変異変種、または抗体、または、他の、特に先端技術で既知のアフィニティー試薬が挙げられる。前記物質としては、さらに、核酸、または化学的関連物質、例えば、ペプチド核酸（pNA）、特に、先端技術で既知の、短い干渉性RNA（siRNA）としても使用される核酸が挙げられる。

30

40

【0037】

癌、良性前立腺肥大（BPH）、または、病状が癌とは無関係と診断されたコントロール患者から得られた、前立腺マッサージ後の前立腺尿細胞ペレットのタンパク分析の例を、それぞれ、図3、図4、および図5に示す。図3から5の各図において、上段は、ウェスタンプロットの、アネキシンA3強調化学発光（ECL）信号を示し、下段は、ボンソーSで染色した、全体負荷タンパクを示す（「タンパク」）。各ゲルは、分子量マーカー（M）の外、陽性コントロールとして、アネキシンA3を含む前立腺腫瘍からの、7.5 μgの総細胞タンパク分

50

解産物の二重サンプル(+C)を含む。異なるゲルのサンプルにおいて得られたアネキシンA3信号は、正規化によって、それぞれの複製陽性コントロールの平均値に対応させることが可能である。予備実験において、本発明人等は、癌患者から得られた前立腺尿サンプルのペレットでは、アネキシンA3の含量が、良性前立腺肥大(BPH)患者や、健康なコントロール患者のいずれよりもはるかに少ないことを見出した(図6)。例えば、PR_26CAに見られるアネキシンA3信号量の0.2倍の参照値に関して、癌患者では、5/30(5:25)前立腺尿サンプルのみが0.2倍参照値を上回っているだけなのに、一方、BPH患者の前立腺尿サンプルの23/30(23:7)、および健康なコントロール患者の前立腺尿サンプルの18/30(18:12)が、この参照値を超えた。これらの結果は、平均して、癌患者の前立腺尿サンプルから得られた細胞ペレットでは、アネキシンA3の含量が、BPH患者や、健康なコントロール患者の前立腺尿サンプルよりも少ないことを示す。

10

【0038】

本発明のさらに別の実施態様によれば、尿サンプル、特に、前立腺尿サンプル、およびその分画の分離過程によって得られる上清は、少なくとも一つのアネキシンタンパク、好ましくはアネキシンA3の細胞外量の定量に用いられる。

【0039】

癌、特に、泌尿生殖管および/または腸管の癌の診断、および/または、癌組織および非癌組織の鑑別のために、前記上清を使用することは特に好ましい。

【0040】

本発明のさらに別の好ましい実施態様の場合では、少なくとも一つのアネキシンタンパク、好ましくはアネキシンA3の量を定量する前に、陽イオンキレート剤、殊にCa²⁺-キレート剤、特に、EDTAおよび/またはEGTAが、尿サンプルまたはその分画に添加される。ある好ましい実施態様では、陽イオンキレート剤の添加は、サンプルまたはその分画に対し分離過程を実施する前に行われる。

20

【0041】

少なくとも一つの前立腺尿サンプル、特にアネキシンA3の定量が、陽イオンキレート剤、特にEDTAおよび/またはEGTA処理の上清において、かつ、比較のために、陽イオンキレート剤、特にEDTAおよび/またはEGTAを欠く上清において実行されることが好ましい。この上清は、同じ尿サンプル、特に前立腺尿サンプルまたはその分画から得られることが好ましい。

30

【0042】

特に、アネキシンA3の、細胞の内部から外部への転移が、前立腺癌の発達中に差別的に影響されるとする考察に基づき、本発明は、癌に関連して、アネキシンA3の細胞内/細胞外分布に何らかの差が有るかどうかを定量することを含む。前述の明細において既に述べた通り細胞外環境は、細胞の原形質膜の外面を含む細胞外空間と理解される。臨床的前立腺マッサージ後に得られる前立腺尿は、前立腺から排出された細胞を含む。エキソソーム内の細胞外アネキシンA3の可能性の外に、遊離アネキシンA3が、細胞表面の陰性荷電基、例えば、リン脂質に、カルシウム依存性に結合している可能性がある。後者のアネキシンA3分画は、媒体にEDTA/EGTAを添加してカルシウムをキレート化することによって、細胞の表面から上清に放出させることが可能である。

40

【0043】

二重盲検、4箇所センターにおけるさらに別の試験において、上清に対する、ペレットのアネキシンA3総量の比に基づいて、非癌患者のグループにおいて線維症と標識される症例を診断することが可能であることが証明された。線維症は、良性過程と関連するので、非癌を示す。合計103名の非癌症例において、AUROCは、'pu.anx.tot.ratio'について0.7072であった。比の相関は負であり、従って、上清におけるアネキシンA3総量の増加が、このグループへの分類の決定基準となった。これは、癌症例では、上清のアネキシンA3値の減少が観察されるので理にかなっている(下記参照)。

【0044】

癌対非癌の診断的決定を超えて、データ分析について、さらに継続的および/または多

50

数のパラメータ工程を実行するためには、ペレット / 上清におけるアネキシンA3含量比によって、非癌患者（BPH、慢性前立腺炎、線維症、PIN1-3）のさらに詳細なプロフィールを得ることが本発明の重要な局面となる。

【0045】

さらに、本発明人等は、別の、独立した、複数の集団の患者について、上清および細胞ペレットにおけるアネキシン3の含量を定量し、前立腺尿サンプルの細胞ペレットおよび上清の両方におけるアネキシンA3の相対量を比較した。再び、この異なる患者集団について、癌患者から得られた前立腺尿ペレットサンプルにおけるアネキシンA3の量は、BPH患者または健康な患者から得られた前立腺尿ペレットサンプルにおけるアネキシンA3の量よりも低いことが認められた。上清に関しては、この同じ患者から得られたアネキシンA3量は、癌患者の前立腺尿サンプルのEDTA処理上清の方が、BPH患者または健康な患者の前立腺尿サンプルの、EDTA処理上清よりも高かった。図7に示すように、前立腺尿について、細胞外（EDTA-処理上清）割合、および、細胞内（1000 x gペレット）割合の個別の比を取ると、さらに明瞭な全体像が浮かび上がってくる。以上まとめると、これらのデータは、表1に示すように、擬似陽性は10%前後、またはそれ以下であること、さらに、上清におけるアネキシンA3発現（アネキシンA3-S）、対、ペレットにおけるアネキシンA3発現（アネキシンA3-P）の比に基づいて、癌対BPH対コントロールを鑑別することが可能であることを示す。すなわち、ほぼ常にアネキシンA3-Sは、癌およびBPHにおいて高く、コントロールにおいて低い、一方、アネキシンA3-Pは、BPHおよびコントロールにおいて高く、癌において低い。従って、癌では高いS（またはS/P）低いPであり；BPHでは高いS（またはS/P）および高いPであり；かつ、コントロールでは低いS（またはS/P）および高いPであり；ペレット単独と比較して、個別の比（S/P）の方がもっとも明瞭な全体像を示す（図7）。タンパク量についてさらに較正すると、この全体像はさらに改善される。

10

20

【0046】

本発明のさらに別の実施態様によれば、少なくとも一つのアネキシンタンパク、好ましくはアネキシンA3の量が、特に、組織サンプル、例えば、組織切片を用いて、免疫化学的方法によって定量される。

【0047】

本発明はさらに、癌、特に、泌尿生殖管および/または腸管の診断、および/または、癌組織および非癌組織の鑑別のために、少なくとも一つのアネキシン抗体、特に、抗アネキシンA3抗体の使用を含む。好ましい実施態様では、抗アネキシン抗体は、組織サンプル、特に、組織切片の病理組織学的診断用染色のために使用される。サンプルは、バイオプシー、または完全な組織摘出によって得られてもよい。特に、抗アネキシン抗体によって染色される組織サンプルは、前立腺バイオプシー、または、前立腺摘出術後の前立腺組織から得られる。

30

【0048】

免疫組織化学によって、前立腺組織におけるアネキシンA3の局在を明らかにするために、アネキシンA3に対する抗体を含む、ウサギのポリクロナール抗体が獲得、使用される。アネキシンファミリーのメンバーは多数あるので、本発明人等は、免疫組織化学検査の前に、ウェスタンブロットによって、抗アネキシンA3ポリクロナール抗体の特異性について明らかにした。前立腺の良性腫瘍および癌組織細胞分解物のウェスタンブロットによって得られる信号の圧倒的多数は、アネキシンA3由来のものである（図1）。信号の僅少量は、恐らくアネキシンA6と考えられる、より高分子量のタンパクに観察された。この抗体は、同じ条件において、約120ngの、組み換え60kDa GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）-アネキシンA3を用いると、強力で、明瞭なバンドを生成した。バイオプシーサンプルの2Dゲルから得られた放射線値、バイオプシーおよび前立腺尿の1Dおよび2Dゲルのタンパク染色、および1Dおよび2Dウェスタンブロットに基づく厳密な定量から、0.02から>15ng/mlの範囲に亘る、前立腺尿サンプルにおけるタンパク濃度の検出限界が決められた。この検出限界は、0.01ng/mlをやや下回るが、近かった。タンパク含量について言うと、範囲は、総タンパク μg 当たり0.001から0.3ngであった。

40

50

【0049】

従って、この抗体が、図2に示すように、免疫組織化学的検査において主にアネキシンA3を認識することは確かであると考えられる。すなわち、図2では、健康な前立腺では、対応するアネキシンA3信号は上皮細胞に限局し、腫瘍ではさらに癌細胞にも広がる。前立腺癌およびBPH組織におけるアネキシンA3の違いを説明する理論的根拠として、コントロールと比較した場合、細胞内の、比較的限局した、総体的に低い発現から、細胞外の、総体的に高い発現への移行が示される。

【0050】

アネキシンA3染色の分布は、細胞原形質および膜への局在を示す(図2)。ただし、個別の細胞における染色の総体レベルは、良性組織よりも癌の方が低いようであるが(図2)、同じ癌細胞ではアネキシンA3の総体レベルは比較的高い(例えば、図1)。これは、癌組織では比較的多数のアネキシンA3含有細胞、および/または、癌組織には比較的多量の細胞外アネキシンA3があることによって説明可能かもしれない。

10

【0051】

250名の患者の前立腺尿の上清およびペレットにおけるアネキシン総量を考慮し、測定するばかりでなく、アネキシンA3信号に対する好中球の関与を定量する(好中球マーカーNGALの並行定量による)ために行われた総合的試験(4センター、二重盲検)において、癌患者の前立腺尿の上清においてアネキシンAレベルが低下することが観察された。一般的に言って、この結果は、癌患者においてよりも、線維症/BPHの、非癌患者の前立腺尿において、より高いレベルのアネキシンA3が観察されることを示す。一方、このレベルは、前立腺マッサージを行わないで得られた、通常の尿でははるかに低いか、無視できる程度であった。従って、前立腺尿において測定されたアネキシンA3は、主に前立腺起源であり、前立腺マッサージ過程の結果尿の中に放出されたものであると結論された。アネキシンA3は、主に、健康な前立腺の管の上皮細胞において発現されることは既に上に示した。癌・対・非癌の鑑別だけについて言えば、本データは、上清のアネキシンA3量が最大の診断数値を持つことを示す(4-10の初期PSA値を持つ前立腺癌患者の前立腺尿の上清における、タンパク μg 当たりのアネキシンA3、および、総アネキシンA3量の組み合わせ読み取り値に対するAUROC値は、0.78-0.82であった)。比較的高いNGAL値の場合、ペレット-アネキシンA3の変動が観察された。従って、ペレットアネキシンA3の対応するAUROC値は、0.55-0.65の範囲にあった)。

20

30

【0052】

さらに、癌の前立腺では、管の上皮細胞のごくわずかのパーセンテージしか癌性ではないことが知られる。従って、論理的考察に従えば、細胞外アネキシンA3量の測定される差は有意であるはずがない。それにも拘わらず、非癌患者に比べ、癌患者の前立腺尿のアネキシンA3平均量の低下は、相当で、有意であることが観察された。なぜこうなるのかを合理的に説明することは難しい。なぜなら、非癌性上皮細胞も、本能的な身についた知恵に基づいてアネキシンA3を分泌し続けているのに違いないのであるから。恐らく、癌の存在が、横断的活性を持つ物質、例えば、サイトカインの分泌を招き、これが、癌病変を持つ前立腺の上皮細胞の大部分において、そのアネキシンA3分泌に影響を及ぼすのであろう。この横断活性因子が、癌細胞自体に由来するものであるか、または他の細胞から来るものであるかは不明である。横断活性因子が、癌細胞と、その間葉/支質環境との間の関係に影響を及ぼすこと、また、その逆については十分報告されている。それに与るメカニズムはともかく、これらの経験的な所見は疑いがないところであり、驚くべきことであるが、前立腺尿におけるアネキシンA3の比較的低いレベルは、その患者が、前立腺に腫瘍細胞を抱える可能性に関する予測的測定値となることを明瞭に示す。この、前立腺尿におけるアネキシンA3レベルの診断的使用は、実施例でも実証するように、他の診断指数、例えば、前立腺特異的抗原(PSA)のレベルと組み合わせることも可能である。これらの結果もまた、アネキシンA3タンパクの存在が、健康な表現型と関連することを示唆する。従って、細胞外アネキシンA3のレベルを上げることによって癌を治療する方法として、アネキシンA3タンパクを投与することも可能である。

40

50

【0053】

観察された結果の基となるメカニズムは現在研究中であるが、恐らく、そのメカニズムは、前立腺尿のペレットと上清の両方におけるアネキシンA3レベルの上昇と関連する、ある種の、完全に健康な前立腺上皮から、非癌状態（線維症/BPH）へ進行する転移を反映するものと考えられ、従って、アネキシンA3総量の前述の比（p/s）がもっとも高い診断値を持つのであろう。癌では、癌患者の前立腺尿の上清におけるアネキシンA3量の低下に対し明白な、しかし驚くべき相関がある。ペレットのアネキシンA3量は、NGAL-陽性の白血球/好中球から汚染性の影響を受けているものと思われる。

【0054】

従って、ペレットおよび上清の両方においてアネキシンA3のレベルを測定することがきわめて望ましい。タンパクレベルに関するこの情報は、ゲノム法では得られない。例えば、米国特許出願US2003/0108963A1によって表面的には触れられてはいるが、実際に確かめられてはいない。

10

【0055】

以上まとめると、アネキシンA3は、健康組織において主に細胞内染色を示すが、早期の癌組織では上皮外局在を示した。発達した癌では、癌細胞内では、アネキシンA3染色の著明な低下を示した。

【0056】

本発明のさらに別の実施態様では、尿サンプル、またはその分画は、尿、特に、前立腺マッサージ、特に、直腸への指挿入による前立腺マッサージ後に回収される前立腺尿から得られる。

20

【0057】

本発明のさらに別の実施態様では、尿サンプル、またはその分画は、精製され、殊に、磁気ビーズによって、特に、好中球、単球、または、抹消血単核球（PMBC）が取り除かれる。朝の尿サンプル、またはその分画を使用することが好ましい。

【0058】

本発明の一実施態様によれば、アネキシンレベルは、大便、または腸管上皮細胞において測定される。さらに、大便の任意の分画または調製品（エキソソーム生産の可能性のある任意の上皮表面）におけるアネキシンレベルが、消化管の上皮癌の治療および/または診断のために使用される。アネキシンレベルはさらに、結腸直腸癌の治療および/または診断のために使用される。好ましい実施態様によれば、本発明の方法は、炎症性病態（クローン病または潰瘍性大腸炎を、癌から）鑑別するために、好中球、特に、カルプロテクチンおよび/または好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）の定量と組み合わせてもよい。

30

【0059】

さらに、少なくとも一つのアネキシンタンパク、好ましくはアネキシンA3および/またはアネキシンA8、特にアネキシンA3を、本説明に開示される疾患、特に、前立腺癌、結腸直腸癌、および/または骨粗しょう症、好ましくはそれらのサブグループの、診断マーカーおよび/または治療標的として使用が可能であることもまた、本発明の範囲内にある。

【0060】

本発明によれば、癌、特に、泌尿生殖管および/または腸管の癌を治療することが可能である。これを、少なくとも一つのアネキシンタンパク、例えば、少なくとも一つの細胞外アネキシンのインビボ量を増大させることによって実現することが好ましい。

40

【0061】

さらに、本発明は、癌、特に、泌尿生殖管および/または腸管の癌の診断、および/または、癌組織および非癌組織の鑑別を可能とする。これを、特に、アネキシンタンパクの、それぞれ、細胞外量対細胞内量の比を、要すれば、他のタンパクの対応する比の定量と組み合わせることで実現する。癌の診断および/または癌組織および非癌組織の鑑別は、少なくとも一つのアネキシンタンパクの細胞外量に基づくことが好ましい。定量されたタンパクの比および量は、それぞれ、癌組織および非癌組織の違いを明らか

50

にし、患者のプロファイリングを可能にする。従って、アネキシタンパク、特に、アネキシンA3は、従来、癌診断に用いられる腫瘍マーカーに完全に取って代わる可能性のある、信頼度の高い診断マーカーである。

【 0 0 6 2 】

ここで、本発明のさらに詳細な説明のために、付属の表および図面の参照が求められる。

【 0 0 6 3 】

【表 1】

表 1

サンプル数	癌	BPH	コントロール	擬似陰性 (120 の%)	擬似陽性 (120 の%)
ANXA3-P (40 の%)					
マーカー下降	84	23	40		
マーカー上昇	16	77	60	6	13.3
ANXA3-S (40 の%)					
マーカー下降	5	20	91		
マーカー上昇	95	80	9		
ANXA3-S/ANXA3-P 分類					
癌	92	12	3		
BPH	6	80	6	1.5	7.5
コントロール	2	8	91		

10

20

【 0 0 6 4 】

表 1：診断結果の要約。アネキシンA3量は、癌患者の前立腺尿サンプルのペレット（アネキシンA3-P）において低く、BPH患者および健康患者の前立腺尿サンプルの対応ペレットでは比較的高い。前立腺尿サンプルの上清におけるアネキシンA3量（アネキシンA3-S）では、全体像が異なる。すなわち、健康な患者では低く、癌患者およびBPH患者では高い。この読み取り値の組み合わせは、表の下方部分に示す数字によって三つの症例を適切に分類する。さらに詳細に関しては、上記明細書を参照されたい。

30

【 0 0 6 5 】

【表 2】

表 2

名称	説明	
P_ug_tot	ペレット:タンパク総量(μg)	
U_ug_tot	上清*:タンパク総量(μg)	
P_ANX_ug	ペレット:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たりアネキシン信号レベル	
P_ANX_tot	ペレット:患者全体サンプル当たりアネキシン信号レベル	
U_ANX_ug	上清:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たりアネキシン信号レベル	
U_ANX_tot	上清:患者全体サンプル当たりアネキシン信号レベル	10
PU_ANX_ug	ペレット+上清:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たりアネキシンレベル	
PU_ANX_tot	ペレット+上清:患者全体サンプル当たりアネキシンレベル	
PU_ANX_ug_ratio	ペレット/上清・比:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たりアネキシンレベル	
PU_ANX_tot_ratio	ペレット/上清・比:患者全体サンプル当たりアネキシンレベル	
P_NGAL_ug	ペレット:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たり NGAL 信号レベル	
P_NGAL_tot	ペレット:患者全体サンプル当たり NGAL 信号レベル	
U_NGAL_ug	上清:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たり NGAL 信号レベル	
U_NGAL_tot	上清:患者全体サンプル当たり NGAL 信号レベル	20
PU_NGAL_ug	ペレット+上清:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たり NGAL レベル	
PU_NGAL_tot	ペレット+上清:患者全体サンプル当たり NGAL レベル	
PU_NGAL_ug_ratio	ペレット/上清・比:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たり NGAL レベル	
PU_NGAL_tot_ratio	ペレット/上清・比:患者全体サンプル当たりの NGAL レベル	
P_ANX_NGAL_ug_ratio	ペレット:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たりアネキシン/NGAL・比	
U_ANX_NGAL_ug_ratio	上清:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たりアネキシン/NGAL・比	
PU_ANX_NGAL_ug_ratio	ペレット+上清:タンパク $1\mu\text{g}$ 当たりアネキシン/NGAL・比	

('U' = 「上清」)

30

【 0 0 6 6 】

表 2 : 前立腺尿の上清およびペレット分画について測定されたタンパクパラメータ

【 0 0 6 7 】

【表 3】

表 3

変数	説明
P. ug. tot	ペレット:タンパク総量(μ g)
U. ug. tot	上清:タンパク総量(μ g)
P. ANX. ug	ペレット:1 μ g タンパク当たりアネキシンレベル
P. ANX. tot	ペレット:全体サンプル当たりアネキシンレベル
U. ANX. ug	上清:1 μ g タンパク当たりアネキシンレベル
U. ANX. tot	上清:全体サンプル当たりアネキシンレベル
PU. ANX. ug	上清+ペレット:1 μ g タンパク当たりアネキシンレベル
PU. ANX. tot	上清+ペレット:全体サンプル当たりアネキシンレベル
PU. ANX. ug. ratio	ペレット/上清・比:1 μ g タンパク当たりアネキシンレベル
PU. ANX. tot. ratio	ペレット/上清・比:全体サンプル当たりのアネキシンレベル
psa. ini	血液の PSA レベル
perc. free. psa	遊離 PSA パーセント

10

【 0 0 6 8 】

20

表 3 : 実施例4で用いられる短縮形および変数の説明

【 0 0 6 9 】

【表 4】

表 4

試験	AUROC	患者数
anx. comb. var	0.78	112
comb. var. anx. psa 1	0.76	112
u. anx. tot	0.76	112
pu. anx. tot	0.75	112
u. anx. ug	0.74	112
perc. free. psa	0.72	103
psa. ini	0.57	109

30

【 0 0 7 0 】

表 4 : 4-10ng/mLのPSA値に従ってグループ分けされた患者について実施された、表示の変数パラメータ(説明については表3参照)のROC曲線分析結果。試験パラメータ、得られたAUROC値、および分析当たりの患者数が表に掲げられる。

【 0 0 7 1 】

40

【表 5】

表 5

試験	AUROC	患者数
comb. var. anx. psa 2	0.79	109
comb. var. anx. psa 1	0.77	109
pu. anx. tot	0.73	109
anx. comb. var	0.71	109
u. anx. tot	0.71	109
pu. anx. ug	0.71	109
u. anx	0.71	109
p. anx. tot	0.69	109
psa. ini	0.69	109
perc. free. psa	0.69	109

10

【0072】

表 5 : 2-6ng/mLのPSA値に従ってグループ分けされた患者について実施された、表示の変数パラメータ（説明については表3参照）のROC曲線分析結果。試験パラメータ、得られたAUROC値、および分析当たりの患者数が表に掲げられる。

20

【0073】

【表 6】

表 6

試験	AUROC	患者数
comb. var. anx. psa 1	0.75	226
comb. var. anx. psa 2	0.73	244
perc. free. psa	0.70	227
psa. ini	0.68	239
anx. comb. var	0.67	244
pu. anx. tot	0.66	245

30

【0074】

表6：全ての患者について実施された、表示の変数パラメータ（説明については表3参照）のROC曲線分析結果。試験パラメータ、得られたAUROC値、および分析当たりの患者数が表に掲げられる。

【0075】

【表 7】
表 7

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
>=-3.5155	100.0 (93.7-100.0)	0.0 (0.0- 6.9)	1.00		52.3	
> -3.5155	98.2 (90.6- 99.7)	0.0 (0.0- 6.9)	0.98		51.9	0.0
> -2.6907	98.2 (90.6- 99.7)	1.9 (0.3- 10.3)	1.00	0.91	52.3	50.0
> -2.5444	98.2 (90.6- 99.7)	3.8 (0.6- 13.2)	1.02	0.46	52.8	66.7
> -2.0663	98.2 (90.6- 99.7)	5.8 (1.3- 16.0)	1.04	0.30	53.3	75.0
> -1.9579	98.2 (90.6- 99.7)	7.7 (2.2- 18.6)	1.06	0.23	53.8	80.0
> -1.9096	98.2 (90.6- 99.7)	9.6 (3.2- 21.0)	1.09	0.18	54.4	83.3
> -1.6827	98.2 (90.6- 99.7)	11.5 (4.4- 23.5)	1.11	0.15	54.9	85.7
> -1.6673	98.2 (90.6- 99.7)	13.5 (5.6- 25.8)	1.14	0.13	55.4	87.5
> -1.5429	96.5 (87.9- 99.5)	13.5 (5.6- 25.8)	1.12	0.26	55.0	77.8
> -1.4419	96.5 (87.9- 99.5)	15.4 (6.9- 28.1)	1.14	0.23	55.6	80.0
> -1.3903	94.7 (85.4- 98.8)	15.4 (6.9- 28.1)	1.12	0.34	55.1	72.7
> -1.273	94.7 (85.4- 98.8)	17.3 (8.3- 30.3)	1.15	0.30	55.7	75.0
> -1.2619	94.7 (85.4- 98.8)	19.2 (9.6- 32.5)	1.17	0.27	56.2	76.9
> -1.1825	93.0 (83.0- 98.0)	19.2 (9.6- 32.5)	1.15	0.36	55.8	71.4
> -1.1791	93.0 (83.0- 98.0)	21.2 (11.1- 34.7)	1.18	0.33	56.4	73.3
> -1.0689	91.2 (80.7- 97.1)	21.2 (11.1- 34.7)	1.16	0.41	55.9	68.7
> -1.0621	91.2 (80.7- 97.1)	23.1 (12.5- 36.8)	1.19	0.38	56.5	70.6
> -1.0192	91.2 (80.7- 97.1)	25.0 (14.0- 38.9)	1.22	0.35	57.1	72.2
> -1.0041	91.2 (80.7- 97.1)	26.9 (15.6- 41.0)	1.25	0.33	57.8	73.7
> -0.9502	91.2 (80.7- 97.1)	28.8 (17.1- 43.1)	1.28	0.30	58.4	75.0
> -0.8458	89.5 (78.5- 96.0)	28.8 (17.1- 43.1)	1.26	0.36	58.0	71.4
> -0.8339	89.5 (78.5- 96.0)	30.8 (18.7- 45.1)	1.29	0.34	58.6	72.7
> -0.8285	87.7 (76.3- 94.9)	30.8 (18.7- 45.1)	1.27	0.40	58.1	69.6
> -0.8253	87.7 (76.3- 94.9)	32.7 (20.3- 47.1)	1.30	0.38	58.8	70.8
> -0.8237	87.7 (76.3- 94.9)	34.6 (22.0- 49.1)	1.34	0.35	59.5	72.0
> -0.8044	87.7 (76.3- 94.9)	36.5 (23.6- 51.0)	1.38	0.34	60.2	73.1
> -0.7935	87.7 (76.3- 94.9)	38.5 (25.3- 53.0)	1.43	0.32	61.0	74.1
> -0.7836	87.7 (76.3- 94.9)	40.4 (27.0- 54.9)	1.47	0.30	61.7	75.0
> -0.7431	87.7 (76.3- 94.9)	42.3 (28.7- 56.8)	1.52	0.29	62.5	75.9
> -0.7371	86.0 (74.2- 93.7)	42.3 (28.7- 56.8)	1.49	0.33	62.0	73.3
> -0.6841	86.0 (74.2- 93.7)	44.2 (30.5- 58.7)	1.54	0.32	62.8	74.2

10

20

30

40

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
> -0.6759	86.0 (74.2- 93.7)	46.2 (32.2- 60.5)	1.60	0.30	63.6	75.0
> -0.6297	86.0 (74.2- 93.7)	48.1 (34.0- 62.4)	1.66	0.29	64.5	75.8
> -0.6205	86.0 (74.2- 93.7)	50.0 (35.8- 64.2)	1.72	0.28	65.3	76.5
> -0.6095	86.0 (74.2- 93.7)	51.9 (37.6- 66.0)	1.79	0.27	66.2	77.1
> -0.5341	86.0 (74.2- 93.7)	53.8 (39.5- 67.8)	1.86	0.26	67.1	77.8
> -0.5077	86.0 (74.2- 93.7)	55.8 (41.3- 69.5)	1.94	0.25	68.1	78.4
> -0.503	86.0 (74.2- 93.7)	57.7 (43.2- 71.3)	2.03	0.24	69.0	78.9
> -0.4942	86.0 (74.2- 93.7)	59.6 (45.1- 73.0)	2.13	0.24	70.0	79.5
> -0.4548	84.2 (72.1- 92.5)	59.6 (45.1- 73.0)	2.09	0.26	69.6	77.5
> -0.4346	82.5 (70.1- 91.2)	59.6 (45.1- 73.0)	2.04	0.29	69.1	75.6
> -0.4211	80.7 (68.1- 89.9)	59.6 (45.1- 73.0)	2.00	0.32	68.7	73.8
> -0.3763	78.9 (66.1- 88.6)	59.6 (45.1- 73.0)	1.95	0.35	68.2	72.1
> -0.201	78.9 (66.1- 88.6)	61.5 (47.0- 74.7)	2.05	0.34	69.2	72.7
> -0.1764	78.9 (66.1- 88.6)	63.5 (49.0- 76.4)	2.16	0.33	70.3	73.3
> -0.1476	78.9 (66.1- 88.6)	65.4 (50.9- 78.0)	2.28	0.32	71.4	73.9
> -0.1049	77.2 (64.2- 87.2)	65.4 (50.9- 78.0)	2.23	0.35	71.0	72.3
> -0.0809	75.4 (62.2- 85.9)	65.4 (50.9- 78.0)	2.18	0.38	70.5	70.8
> -0.0773	75.4 (62.2- 85.9)	67.3 (52.9- 79.7)	2.31	0.36	71.7	71.4
> -0.0323	73.7 (60.3- 84.5)	67.3 (52.9- 79.7)	2.25	0.39	71.2	70.0
> -0.0007	71.9 (58.5- 83.0)	67.3 (52.9- 79.7)	2.20	0.42	70.7	68.6
> 0.007	71.9 (58.5- 83.0)	69.2 (54.9- 81.3)	2.34	0.41	71.9	69.2
> 0.0841	70.2 (56.6- 81.6)	69.2 (54.9- 81.3)	2.28	0.43	71.4	67.9
> 0.085	68.4 (54.8- 80.1)	69.2 (54.9- 81.3)	2.22	0.46	70.9	66.7
> 0.1274	68.4 (54.8- 80.1)	71.2 (56.9- 82.9)	2.37	0.44	72.2	67.3
> 0.1395	68.4 (54.8- 80.1)	73.1 (59.0- 84.4)	2.54	0.43	73.6	67.9
> 0.1475	68.4 (54.8- 80.1)	75.0 (61.1- 86.0)	2.74	0.42	75.0	68.4
> 0.1672	68.4 (54.8- 80.1)	76.9 (63.2- 87.5)	2.96	0.41	76.5	69.0
> 0.1764	68.4 (54.8- 80.1)	78.8 (65.3- 88.9)	3.23	0.40	78.0	69.5
> 0.1803	68.4 (54.8- 80.1)	80.8 (67.5- 90.4)	3.56	0.39	79.6	70.0
> 0.1808	66.7 (52.9- 78.6)	80.8 (67.5- 90.4)	3.47	0.41	79.2	68.9
> 0.2017	64.9 (51.1- 77.1)	80.8 (67.5- 90.4)	3.38	0.43	78.7	67.7
> 0.2682	63.2 (49.3- 75.5)	80.8 (67.5- 90.4)	3.28	0.46	78.3	66.7
> 0.2761	63.2 (49.3- 75.5)	82.7 (69.7- 91.7)	3.65	0.45	80.0	67.2
> 0.3249	61.4 (47.6- 74.0)	82.7 (69.7- 91.7)	3.55	0.47	79.5	66.2

10

20

30

40

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
> 0.3445	59.6 (45.8- 72.4)	82.7 (69.7- 91.7)	3.45	0.49	79.1	65.2
> 0.4091	57.9 (44.1- 70.9)	82.7 (69.7- 91.7)	3.35	0.51	78.6	64.2
> 0.476	57.9 (44.1- 70.9)	84.6 (71.9- 93.1)	3.76	0.50	80.5	64.7
> 0.4824	57.9 (44.1- 70.9)	86.5 (74.2- 94.4)	4.30	0.49	82.5	65.2
> 0.4969	57.9 (44.1- 70.9)	88.5 (76.5- 95.6)	5.02	0.48	84.6	65.7
> 0.5666	57.9 (44.1- 70.9)	90.4 (79.0- 96.8)	6.02	0.47	86.8	66.2
> 0.6639	57.9 (44.1- 70.9)	92.3 (81.4- 97.8)	7.53	0.46	89.2	66.7
> 0.683	56.1 (42.4- 69.3)	92.3 (81.4- 97.8)	7.30	0.48	88.9	65.8
> 0.6877	56.1 (42.4- 69.3)	94.2 (84.0- 98.7)	9.73	0.47	91.4	66.2
> 0.6934	54.4 (40.7- 67.6)	94.2 (84.0- 98.7)	9.43	0.48	91.2	65.3
> 0.7038 *	54.4 (40.7- 67.6)	96.2 (86.8- 99.4)	14.14	0.47	93.9	65.8
> 0.7226	52.6 (39.0- 66.0)	96.2 (86.8- 99.4)	13.68	0.49	93.8	64.9
> 0.8531	50.9 (37.3- 64.4)	96.2 (86.8- 99.4)	13.23	0.51	93.5	64.1
> 0.8868	49.1 (35.6- 62.7)	96.2 (86.8- 99.4)	12.77	0.53	93.3	63.3
> 0.9511	47.4 (34.0- 61.0)	96.2 (86.8- 99.4)	12.32	0.55	93.1	62.5
> 0.9527	45.6 (32.4- 59.3)	96.2 (86.8- 99.4)	11.86	0.57	92.9	61.7
> 1.0734	43.9 (30.7- 57.6)	96.2 (86.8- 99.4)	11.40	0.58	92.6	61.0
> 1.116	42.1 (29.1- 55.9)	96.2 (86.8- 99.4)	10.95	0.60	92.3	60.2
> 1.1278	40.4 (27.6- 54.2)	96.2 (86.8- 99.4)	10.49	0.62	92.0	59.5
> 1.1707	38.6 (26.0- 52.4)	96.2 (86.8- 99.4)	10.04	0.64	91.7	58.8
> 1.1763	36.8 (24.5- 50.7)	96.2 (86.8- 99.4)	9.58	0.66	91.3	58.1
> 1.2415	35.1 (22.9- 48.9)	96.2 (86.8- 99.4)	9.12	0.68	90.9	57.5
> 1.267	33.3 (21.4- 47.1)	96.2 (86.8- 99.4)	8.67	0.69	90.5	56.8
> 1.3195	31.6 (19.9- 45.2)	96.2 (86.8- 99.4)	8.21	0.71	90.0	56.2
> 1.3976	29.8 (18.4- 43.4)	96.2 (86.8- 99.4)	7.75	0.73	89.5	55.6
> 1.4368	28.1 (17.0- 41.5)	96.2 (86.8- 99.4)	7.30	0.75	88.9	54.9
> 1.4579	26.3 (15.5- 39.7)	96.2 (86.8- 99.4)	6.84	0.77	88.2	54.3
> 1.4781	24.6 (14.1- 37.8)	96.2 (86.8- 99.4)	6.39	0.78	87.5	53.8
> 1.6158	22.8 (12.8- 35.8)	96.2 (86.8- 99.4)	5.93	0.80	86.7	53.2
> 1.6423	21.1 (11.4- 33.9)	96.2 (86.8- 99.4)	5.47	0.82	85.7	52.6
> 1.6559	19.3 (10.1- 31.9)	96.2 (86.8- 99.4)	5.02	0.84	84.6	52.1
> 1.7477	17.5 (8.8- 29.9)	96.2 (86.8- 99.4)	4.56	0.86	83.3	51.5
> 1.7524	17.5 (8.8- 29.9)	98.1 (89.7- 99.7)	9.12	0.84	90.9	52.0
> 1.7628	17.5 (8.8- 29.9)	100.0 (93.1-100.0)		0.82	100.0	52.5

10

20

30

40

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
> 1.8054	15.8 (7.5- 27.9)	100.0 (93.1-100.0)		0.84	100.0	52.0
> 1.8153	14.0 (6.3- 25.8)	100.0 (93.1-100.0)		0.86	100.0	51.5
> 1.8787	12.3 (5.1- 23.7)	100.0 (93.1-100.0)		0.88	100.0	51.0
> 2.1994	10.5 (4.0- 21.5)	100.0 (93.1-100.0)		0.89	100.0	50.5
> 2.4311	8.8 (2.9- 19.3)	100.0 (93.1-100.0)		0.91	100.0	50.0
> 2.472	7.0 (2.0- 17.0)	100.0 (93.1-100.0)		0.93	100.0	49.5
> 2.5544	5.3 (1.2- 14.6)	100.0 (93.1-100.0)		0.95	100.0	49.1
> 2.5595	3.5 (0.5- 12.1)	100.0 (93.1-100.0)		0.96	100.0	48.6
> 2.8088	1.8 (0.3- 9.4)	100.0 (93.1-100.0)		0.98	100.0	48.1
> 3.6467	0.0 (0.0- 6.3)	100.0 (93.1-100.0)		1.00		47.7

10

Criterion=基準

Sens. =感度

Spec. =特異性

+LR =陽性尤度比

-LR =陰性尤度比

+PV =陽性予測値

-PV =陰性予測値

20

【 0 0 7 6 】

表 7 : 図9のROC曲線に対応するデータ。表8および9に最大尤度推定モデルが記載される。

【 0 0 7 7 】

【表 8】

表 8

30

パラメータ	DF	推定	誤差 (標準)	カイ二乗 (Wald)	確率> カイ二乗
中断	1	-2.3860	1.7461	1.8673	0.1718
Log PU ANX tot	1	-0.4747	0.1394	11.5908	0.0007
Log PSA ini	1	3.2942	1.0198	10.4343	0.0012

【 0 0 7 8 】

表 8 comb.var.anx.psa2をもたらず、logitモデルの圧縮SAS Output：最大尤度推定の分析

【 0 0 7 9 】

40

【表 9】

表 9

作用	推定 (点)	信頼(95%)	限界
log PU ANX tot	0.622	0.473	0.818
log PSA ini	26.956	3.652	198.934

【 0 0 8 0 】

表9 comb.var.anx.psa2：オッズ比推定をもたらず、logitモデルの圧縮SAS Output

【 0 0 8 1 】

50

本発明は実施例を参照しながら下記にさらに詳細に説明されるが、本発明は決してこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例 1】

【0082】

前立腺マッサージ後尿の処理

前立腺マッサージ後の前立腺尿は、臨床診察において血中の前立腺特異的抗原 (PSA) 量が、癌危険度の上昇を示すことで選別された患者から得られた。直腸からの指挿入によって活発に前立腺をマッサージした後に得た47mlの尿を、あらかじめ0℃に冷却した0.5M EDTA, pH8に加え、直ちに0℃に冷却した。尿量が<47mlの場合、容量を、氷冷のリン酸バッファ-生食液 (PBS) で補った。この冷却サンプルを、3000rpm、0℃で30分遠心し、細胞ペレットを形成した。上清の1 ml分液を取り出し、液体窒素で凍結させ、使用時まで-80℃で保存した。細胞ペレットは、2 mlの氷冷PBSにおいて穏やかに再懸濁し、氷上のエッペンドルフチューブに移し、次いで12000rpm、4℃で5分遠心した。上清は取り出し、ペレットは液体窒素で凍結し、使用時まで-80℃で保存した。

10

【実施例 2】

【0083】

ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティング用のSDS-PAGEゲルは、1 mmスペーサおよび15ウェルを備えるBioRadミニゲル装置、および12% T ポリアクリルアミドゲルをメーカーの指示に従って用いて調製した。抗アネキシンA3 (アネキシンA3) は、後述のものと同じ抗体であった。希釈度は1:20,000。組み換えGST-アネキシンA3タンパクは、Abnova社 (#ABV 0040710002; ロット: T04G01-ANNEXINA3, 0.05 µg/µl, 61 kDa) から購入した。抗体結合は、1:1000に希釈したヤギ抗ウサギIgG (Sigma A 3937, ロット番号121K9151) を、ECL検出法 (Pierce) およびDIANA III CCDカメラによる化学的発光検出器 (Raytest, Straubenhardt, ドイツ) を用いて視像化した。組み換え法によって細菌において発現されたアネキシンA3に対する、ウサギのポリクロナール抗血清は、アネキシンA3に対し一次的特異性を示し、かつ、アネキシンA6に対して若干の交差反応性を示した。

20

【実施例 3】

【0084】

免疫組織化学

免疫組織化学検査を、ポリクロナール抗アネキシンA3血清を用い、5 µmのパラフィン包埋組織切片について行った。検査は、Zymed PicTure PLUSキット (広範囲スペクトラム、DAB, Zymed、南サンフランシスコ、カリフォルニア州) を、標準的西洋ワサビペルオキシダーゼ免疫組織化学プロトコールに従って用いた。免疫染色後、Gillのヘマトキシリン液 (Sigma) によって切片をカウンターステインした。

30

【0085】

実施例: 250名の患者の前立腺尿を用いた臨床治験

前立腺癌 (PCa) の存在に関して陽性またな陰性と診断された患者の前立腺尿についてアネキシンA3レベルを定量した。それに加えて種々のパラメータ、例えば、前立腺特異的抗原 (PSA) の血中レベル、および下記に掲載する、その他の変数についても調べた。

40

【0086】

サンプル採取は、実施例1に記載の通りに行ったが、ただし、尿にEDTAは加えなかった。前立腺マッサージ後、前立腺尿の総量を採取し、記録した。直ちに、尿分液についてComb ur-10試験 (登録商標) (Roche Diagnostics、カタログ番号11 203 479) を実施し、比重、pH、白血球カウント、および、亜硝酸塩、タンパク、グルコース、ケトン類、ウロビリノーゲン、ビリルビン、および赤血球のレベルを記録した。次に、尿を、1000xg、室温で15分遠心した。このサンプルの細胞ペレットと上清は別々に取り扱った。上清の最後の痕跡を取り去った後、1 mlの氷冷リン酸バッファ-生食液にペレットを再懸濁し、液体窒素またはドライアイスにて凍結した。上清について、2 x 1.8 mlから最大2 x 50 mlの別々の分液も同様に凍結した。

50

【0087】

凍結タンパクサンプルを解凍し、2%デオキシコール酸1/100容を加え、次いで渦巻き攪拌し、トリクロロ酢酸1/10容を加え、渦巻き攪拌し、0 で10分インキュベーションした。この後、10000 x g、4 で15分遠心してタンパクを沈殿させた。上清を取り出し、ペレットは、残留TCAを完全に除去するために、該ペレットを活発に渦巻き攪拌しながら、氷冷80%アセトンによって3回洗浄し、次いで、各洗浄後に、前回同様10000 x gで再遠心した。最後の遠心後、上清を取り出し、ペレットを、該ペレットを完全に脱水させることがないように注意しながら2分間放置して空気乾燥した。ペレットを、沸騰XT-サンプルバッファ（1 x XT-バッファ：141 mM Tris-Base；106 mM Tris-HCl；2% SDS；BPB；pH約8.5；50 mM DTT；35%グリセロール）に再懸濁した。

10

【0088】

各サンプルのタンパク濃度は次のようにして推定した。全体肝臓細胞溶解物から得られた較正量のラットタンパクの連続希釈を含む、一次元SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）ゲル（Criterion XT-プレカストゲル：Biorad、カタログ番号345-0119、ロット番号CX070706B2）に、定められた容量の各サンプルを負荷し、BioRad Criterion電気泳動装置をメーカーの指示に従って用いて電気泳動した。Sypro Rubyをメーカーの指示に従って用いてゲルを染色した。簡単に言うと、50%メタノール、7%酢酸を含む水溶液においてゲルを2x30分固定し、次いで、Sypro Ruby溶液（Molecular Probes、#S12001）において一晩染色した。10%メタノール、7%酢酸において30分、次いで水で2x5分、ゲルを洗浄した。Sypro Rubyによるタンパク染色を、Diana III CCD装備デジタルカメラ（Raytest Isotopenmessgeraete GmbH、Straubenhard、ドイツ：Syproフィルター、605 nm）にて定量した。

20

【0089】

Sypro Ruby染色ゲルレーンのタンパク染色強度を、標準タンパクと患者の尿サンプルとの間で比較した。上清については、定量のために全体レーンを用いた。尿のペレットサンプルについては、優勢なウロモジュリンバンド下のレーン面積のみを考慮した。これによって「ウロモジュリン補正タンパク濃度」が得られた。

【0090】

各サンプルについて、前述のように正規化されたタンパク量をSDS-PAGEゲルに負荷することによって、アネキシンA3、および、好中球セラチナーゼ関連リポカリン（NGAL、SWISSPORTアクセスP80188、好中球のマーカー）レベルを定量した。すなわち、各ゲルは、アネキシンA3とNGALの両方について好適な参照量を含む、ヒト前立腺癌細胞系統PC3由来の標準化タンパク抽出物2μgから成る三重レーンを含んでいた。これらのゲルのタンパクを、標準法に従って、15V定電圧、3mA/cm²限界において1.5時間PVDF（フッ化ポリビニリデン）膜においてウェスタンブロットした。

30

【0091】

ブロット膜における、非特異的タンパク結合部位は、5%再溶解乾燥ミルク粉末を含むTBS（175 mM NaCl，3.5 mM KCl，20 mM Tris，pH7.4）において穏やかに攪拌しながらインキュベーションすることによってブロックした。アネキシンA3に対して特異的な一次抗体（1:20000希釈、ウサギ抗ヒト・アネキシンA3ポリクロナール抗体）、またはNGALに対して特異的な一次抗体（1:500希釈、ヤギ抗ヒト・リポカリンポリクロナール抗体、R&D Systems，Nr. AF1757、ロットJBH025051）を加えた。室温で2時間インキュベーションした後、バッファを除去し、TBSで10分3回洗浄し、次に、それぞれ好適な二次抗体、一方はウサギIgGに対するもの（西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した、あらかじめヒトIgGおよびマウスIgGに吸収させたヤギ抗ウサギIgG、Santa Cruz、#sc-2054、ロット番号G2005、1:5000希釈）、および、他方はヤギIgGに対するもの（西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した、あらかじめヒトIgGおよびマウスIgGに吸収させたウサギ抗ヤギIgG、Santa Cruz Biotechnology、#sc-2922、ロット番号C1405、1:5000希釈）とインキュベートした。Super Signal West Dura，Pierce（0.1 ml/cm²）の添加後、強化された化学的発光（ECL）を測定した。

40

50

【0092】

NGALまたはアネキシンA3信号の値は、各ゲルにおける3個のPC3レーンそれぞれから得られる平均信号に対して正規化し、このようにして得られた、アネキシンまたはNGALの正規化値を統計学的分析に用いた。これらの値から、両タンパクのレベルを、サンプルの絶対容量に対する相対値として計算し、さらにタンパク濃度に対して正規化した。これらの値を、ペレットと上清について別々に計算し、かつ、ペレット：上清比についても計算した。癌と相関し、PSA値と近似するパラメータを表2にまとめた。

【0093】

記録された臨床パラメータには、血中PSAレベル、遊離PSA総合レベル、および複合体形成PSAレベルの外に、前立腺尿の採取後、標準的な指による直腸診察（DRE）時に得られた、前立腺組織バイオプシーの組織学的検査が含まれた。血清PSAおよびDREの高レベルから前立腺摘出が指示された場合には、先行バイオプシーが無くともその材料について組織学的評価を行った。

10

【0094】

前述のデータパラメータを、この中には病院で記録された臨床データも含まれるが、統計学的分析に含めた。前立腺バイオプシー、または前立腺摘出標本が全ての患者から得られ、前記組織の組織学的検査に基づいて、臨床家がPCAに関する陽性または陰性の診断を行った。PSAの血中レベルも、標準的臨床手技によって得られた。米国食品薬品局（FDA）は、50歳以上の男性における前立腺癌に関する毎年のスクリーニングのためのPSA試験を承認した。4から10ng/mL（1ミリリットル当たりのナノグラム数）のPSAレベルは、疑いありと見なされ、直腸の超音波画像診断を行い、そこで有りと指示されれば、バイオプシーを行うべきであるとされる。PSAは、擬似陽性、および擬似陰性を生ずる傾向がある。一般に正常範囲と見なされる、PSAレベルが4.0ng/mL以下の男性において、バイオプシーによって高度の癌を含め前立腺癌が検出されることは稀ではない。

20

【0095】

データセットは、250名の患者から得られた複合データファイルから成る。PSA初期値は、250名の内243名で得られたが、7名の患者では失われた。さらに、後者の7名の患者の内2名の、および、他の患者の内5名において、バイオプシーの組織学的結果（前立腺癌の有無）が失われた。従って、ここに示す結果は全て、そのPCa状態が既知の243名の患者のデータのみを用いたものである。すなわち、PCa診断陽性の140名の患者、およびPCa診断陰性の103名の患者である。図8および9に、臨床結果を用いて生成された受容者動作特性（ROC）曲線が示される。この曲線には、PSA以外の全てのROC曲線の逆数値が用いられる。すなわち、このROC曲線下面積は、癌患者では比較的高いPSA値と相関し、かつ、癌患者では比較的低いアネキシンA3信号測定値と相関することが観察された。

30

【0096】

PSAのROC曲線下面積（AUROC）は0.684であり、これは、0.5のAUROCと有意に異なっているが、臨床治験参加に患者を招集したことによってやや人工的に高められたせいでもある（当業者には周知のように）。一方、我々は、我々の取り扱った患者は全体として異常に高率（57%）の癌患者を有することに注目している。これは、我々の臨床治験によって調べられた患者の内若干名は、他のセンターにおいて高いPSA読み取り値を呈したためであった。アネキシンA3に基づく変数の個別の測定値におけるAUROC値も同じ範囲にあり（最大値はPU_ANX_totによって実現され、AUROCは0.666であった、データ示さず）、これらも同様に0.5とは有意に異なっていた。以上から、アネキシンA3は、PSAに完全に置き換わることが可能であると考えられる。なぜなら、PSAにとって致命的なグレイゾーン（2-6 ng/mlおよび4-10 ng/ml）において、アネキシン3は、受容可能な感度において高い特異性を持ち、かつ、PSA値の全体範囲を考慮しても、類似の全体性能を示すという相当な利点を提供するからである。

40

【0097】

我々の患者の選択には、アネキシンA3に対する事前偏向はなく、かつ、アネキシンA3値とPSA値との間にも相関は無かった。これは、アネキシンA3の発現/分泌と、PSAの血流

50

進入とは、別々の機構によって調節されることを示す。我々は、PSAレベル、A3レベルのいずれにも、患者の年齢との相関を認めなかった。恐らく、癌陽性患者が、その内の何人かは、他のセンターで測定された高いPSA値を持つことで癌を疑われあらかじめ選別された患者であるが、高い割合を占めているために、加齢と共にPSAレベルの上昇を予期する期待が覆されたものと思われる。一方、アネキシンA3は事前選択されていないので、そのレベルは恐らく年齢とは無関係であろうと判断する。

【0098】

PSA初期値が2ng/mLから6ng/mL区間にある患者の下位集団に関する統計分析に対しては特に注目した。この下位集団においても、個別のパラメータ測定値におけるAUROC値は、0.5と有意に異なっていた。一方、この下位集団を定義するPSA基準を満たすPCa患者は僅かに57名であり、非PCa患者は52名であった。総合結果とは対照的に、PSA_iniのAUROCはもはや最大ではなく、アネキシンA3に基づく変数の6個のAUROC値の内5個に追い越される(すなわち、P_ANX_ugが唯一の例外であった)。最高AUROC値0.735は、PU_ANX_totによって実現される。

10

【0099】

PSA範囲2 ng/mL - 6 ng/mLの外にも、PSA範囲2.5 ng/mL - 12 ng/mLも特に興味深い。この下位集団では、PSA_ini自体の成績は悪いが(AUROC 0.580)、一方、U_ANX_totの成績は最高である(AUROC 0.693)である。従って、このPSA範囲は、下記の二工程処置の特性を評価するのに好適であると思われる。この処置を、方法的例示として下記に述べる。

【0100】

第1工程において、患者を、そのPSA初期値に応じて三つのクラスの内の一に割り当てる。

20

PSA_ini < 2.5 --> 低PCa危険度

PSA_ini > 12 --> 高PCa危険度

PSA_ini in [2.5, 12] --> 第2工程としてU_AUX_totに基づく試験の実施。これによって、侵襲的診断処置が適当かどうかを決める。

(最初の二つの例は、図8の説明において「もっとも明白な決定」と呼ばれるものである。)

30

【0101】

次にこの二工程処置は、下記のように定義することによって、ここでは、twestepvar1と呼ばれる単一変数の中に組み込まれる。すなわち、

【数1】

$$\text{twestepvar1} := \begin{cases} 100000, & \text{if PSA_ini} < 2.5 \\ \text{U_ANX_tot} & \text{if PSA_ini} \in [2.5, 12] \\ 0, & \text{if PSA_ini} > 12 \end{cases}$$

【0102】

U_ANX_totの低値は、前立腺癌の危険度の上昇を示し、高値は比較的低い危険度を示す。100000という数値は、実際に測定されたU_ANX_totの最大値よりも常に大きくなるように選ばれたものである。このtwestepvar1の性能は図8において見てとることができる(2.5未満、および12を超えるPSA_ini値に対するtwestepvar1の定常性のために、ROC曲線は、著明な直線セグメントで開始し、かつ終了する)。0.740というAUROCはもちろん、0.5とは大きく有意に異なる。さらに、従来のPSA試験との比較が示唆に富む。例えば、基準"PSA_ini > 4"は、この分析データセットでは、感度80.3%および特異性49.5%をもたらす。同じ感度80.3%は、基準"twestepvar1 < 450"を用いることによって得られるが、しかしここで実現されるのは特異性57.4%である。

40

【0103】

50

図8の例は、PSAレベルに応じて異なる測定値（PSA値、またはアネキシンA3値）に依存する段階的AUROC値の原理を具体的に示す。この原理は、当業者には明らかなように、表4-6に示され、さらに高いAUROC値を与えるいくつかの結果に用いられるものと同じである。中間レベルの血清PSAを呈する患者に対する、アネキシンA3による癌予測の優れた性能は、PSA中間値を呈する患者におけるアネキシンA3に基づく複数の変数を考慮することによってさらに裏づけられる。

【0104】

上に示した方法および方策に従って、表3-6に示すパラメータについてROC分析を行った。さらに、これらの変数の外に、論理的回帰分析によって生成される下記のパラメータについてもROC曲線分析を行った。

10

【0105】

anx.comb.varは、U_ANX_ugおよびU_ANX_totの組み合わせを、下記の関係式：

$$4.463 + 2.906 \log(1 + U_ANX_ug) - 0.790 \log(1 + U_ANX_tot)$$

に従う変数として用いる論理的回帰分析に基づく。

comb.var.anx.psa1は、PSA_iniおよびU_ANX_totの組み合わせを、下記の関係式：

$$0.254 + 1.046 \log(1 + PSA_ini) - 0.342 \log(1 + U_ANX_tot)$$

に従う変数として用いる論理的回帰分析に基づく。

comb.var.anx.psa2は、PSA_iniおよびPU_ANX_totの組み合わせを、下記の関係式：

$$-2.386 + 3.294 \log(1 + PSA_ini) - 0.475 \log(1 + PU_ANA_tot)$$

に従う変数として用いる論理的回帰分析に基づく。

20

【0106】

極端に高いPSA値、または極端に低いPSA値は、癌/非癌状態について比較的信頼性の高い仕分けを実現するが、表4-6の結果は、PSA中間値については、アネキシンA3関係パラメータの種々の組み合わせの方が、PSAの成績を上回ることをはっきりと示す。したがって、前立腺尿の上清またはペレットにおけるアネキシンA3レベルの測定値、好ましくは、上清の、対ペレット比を含む測定値は、診断信頼度を向上させる。

【0107】

これらの結果の有用性を示すために、comb.var.anx.psa2のROC曲線の詳細を、図9および表7に掲げる。このROC曲線は、PSA値が2ng/mLと6ng/mLの間にある患者にのみ基づくものであるが、分析では、この範囲の109名の患者しか用いていないにも拘わらず、0.791という有意に高いAUROC値が得られた。さらに、このROC曲線は、特異性（真の陰性分画）に対する相対的感度（真の陽性分画）において極端に急激な上昇を示す。すなわち、予測値においてきわめて有利である。例えば、54%の感度レベルにおいて、特異性は96%である（図9、表7）。anx.comb.varのROC曲線の成績も同様であった。すなわち、4ng/mLから10ng/mLの範囲のPSAに対し、38%の感度は、91%の特異性（AUROC 0.78）を有していた。ここに開示されるデータは、アネキシンA3が、前立腺癌に対する新規で、強力なマーカーであること、特に、PSA値の信頼度がもっとも低い患者において有効であることを説得的に実証するものである。

30

【0108】

以上まとめると、二重盲検、複数センターによる、第3総合治験によって、もっとも強力で、統計的に有意な診断測定値は、前立腺マッサージ後の前立腺尿の上清におけるアネキシンA3量であることが示された。この上清は、前立腺癌の可能性のある患者から標準的臨床処置（DRE）の際に標準的低速遠心によって得られるものである。これは極めて好都合である。なぜなら、ペレット化サンプルをあらかじめ可溶化（界面活性剤、塩、薬品等による干渉の危険性がある）することなく、サンプルに対し、直ちにELISAによる、またはその他の抗体によるアッセイを実施することが可能だからである。上清における、このアネキシンA3量は、癌と逆相関し、一方、非癌では、アネキシンA3量は比較的高い。これは、非癌症例においてさらに別の、継時的プロファイリングを導入することは全体の診断価値を改善する可能性のあることを示す。

40

【0109】

50

これらの結果は、規模がより小さく、かつ、サンプル収集およびサンプル制御に関しいくつかの点で不完全であった最初の二回の治験と完全に一致する。最初の治験は、ペレットしか含んでいなかったが(図6)、それでもこの治験において、癌患者に対し逆相関が認められた。この治験では、その後の治験では見られない、健康なボランティアグループが含まれた。上清のアネキシンA3とペレットのアネキシンA3を考慮に入れた第2治験では(ただし、サンプル数が小さすぎて統計的に有意な解答に達することはできなかったが)、上清・対・ペレット比が、BPHおよび他の非癌病態に比べて、癌患者においてより高くなる傾向が認められた。これは、第1および第3治験と完全に一致する。というのは、当然のことながら、癌患者におけるペレットの低いアネキシンA3量を、上清のやや高いアネキシンA3量と組み合わせると、より大きな比をもたらすからである(図7)。非癌病態(例えば、BPH、線維症、その他)では、全体として、ペレットおよび上清における比較的高いアネキシンA3量は、組み合わせられると、当然のことながら低い総合比をもたらす。上清におけるアネキシンA3信号はきわめて強力であるために、これを用いることによって、実験的にも、臨床的にも有利で、簡便な診断測定値が得られる。

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】図1は、ウェスタンブロットによる、ウサギの、抗アネキシンA3ポリクロナール抗血清の特性解明を示す。(A)1-D SDSゲルのウェスタンブロット。レーン1: Magic Mark (Invitrogen)、レーン当たり3 μ lの分子量マーカ含有、は、120, 100, 80, 60, 50, 40, 30, および20 kDaの質量を示す。複製レーンは、患者29の前立腺癌(レーン2-4)、および、前立腺良性腫瘍(レーン5-7)から得た、15 μ gの全体組織タンパク抽出物を含む。フィルターを、抗アネキシン3ポリクロナール血清(1:20,000)を用いてインキュベートした。レーン1-7は、全体フィルターからの信号の擬似カラー画像を示す。四角で囲った挿入体(レーン1'および2')は、レーン1および2のモノクロ画像を示す。アネキシンA3、および回収アネキシンA6バンドの位置が示される。(B)擬似カラーで表した患者29の癌サンプルから得られた100 μ gのタンパク抽出物の2D-PAGEは、ポリクロナール血清と交差反応性を呈するタンパクの分布を示す。3個のもっとも強烈な(赤色)アネキシンA3スポットの正体は、MALDI-TOF PMFによって確認された(データ図示せず)。もっとも強烈なスポットは、我々のプロテオミクス分析で検出されたタンパクスポットに対応する。

【図2】図2は、アネキシン3の免疫組織化学的検査を示す。すなわち、抗アネキシンA3ポリクロナール血清(希釈率: 1:100)のアネキシンA3免疫反応性は、A) 良性の前立腺組織の上皮細胞に認められた。B) 篩状前立腺上皮内新形成(PIN)、および、C) 癌組織では、上皮および癌組織が染色された。瀰漫性上皮外分布のレベル上昇も観察された。褐色は、アネキシンA3特異的ペルオキシダーゼ染色を示す。青色は、Gillのヘマトキシリン液(Sigma)による組織のカウンター染色を表す。

【図3】図3は、癌患者の前立腺マッサージ後に得られた、尿の前立腺液ペレットにおけるアネキシンA3のウェスタンブロット定量を示す。上段パネルは、ブロットタンパクから得られた化学発光アネキシンA3信号を示す。下段パネルは、ボンソーSで染色した負荷タンパクを示す(「タンパク」)。各ゲルは、分子量マーカ(M)の外、陽性コントロールとして、アネキシンA3を含む前立腺腫瘍からの、7.5 μ gの総細胞タンパク分解産物の二重サンプル(+C)を含む。

【図4】図4は、BPH患者の前立腺マッサージ後に得られた、尿の前立腺液ペレットにおけるアネキシンA3のウェスタンブロット定量を示す。他の詳細は図3に従う。

【図5】図5は、非癌コントロール患者の前立腺マッサージ後に得られた、尿の前立腺液ペレットにおけるアネキシンA3のウェスタンブロット定量を示す。他の詳細は図3に従う。

【図6】図6は、図3から図5に示したものと同一、前立腺マッサージ後の患者尿の細胞ペレットから得られた、アネキシンA3の正規化信号を示す。異なるゲルのアネキシンA3値は、図3から5までの各図において陽性コントロールとして掲げられる、アネキシンA3を含む前立腺腫瘍(PR-26CA)から得られた7.5 μ gの総細胞タンパク分解産物の任意の単位とし

て正規化した。

【図7】図7は、前立腺マッサージ後の患者（図6には含まれない、さらに別の患者資料）の前立腺尿サンプルにおける、EDTA-処理上清および細胞ペレット間の、アネキシンA3含量比を示す。a.u.は任意単位である。

【図8】ROC曲線 - 2工程処理1: "Use U_ANX_tot if 2.5 PSA_ini 12, そうでなければもっとも明白な決定" 説明: 変数 = IF(PSA_ini<2.5; 100000; IF(PSA_ini<=12; u_anx_tot; 0) twostepvar1 分類変数: PCa陽性グループ: PCa=1 サンプルサイズ = 137 陰性グループ: PCa=0 サンプルサイズ=101 疾病頻度(%)=57.6 ROC曲線下面積=0.740 標準誤差=0.03395% 信頼区間=0.679から0.794 P (面積=0.5) <0.0001

【図9】ROC曲線 - T.comb.var.anx.psa2: $-2.386 + 3.294 \log(1+PSA_ini) - 0.475 \log(1 + PU_ANX_tot)$ 説明: 選択: AND(PSA_ini>=2; PSA_ini<=6) 分類変数 PCa陽性グループ: PCa=1、サンプルサイズ = 57 陰性グループ: PCa=0、サンプルサイズ= 52 疾病頻度(%)=52.3 ROC曲線下面積=0.791 標準誤差=0.04395% 信頼区間=0.703から0.863 P (面積=0.5) <0.0001

10

【図1】

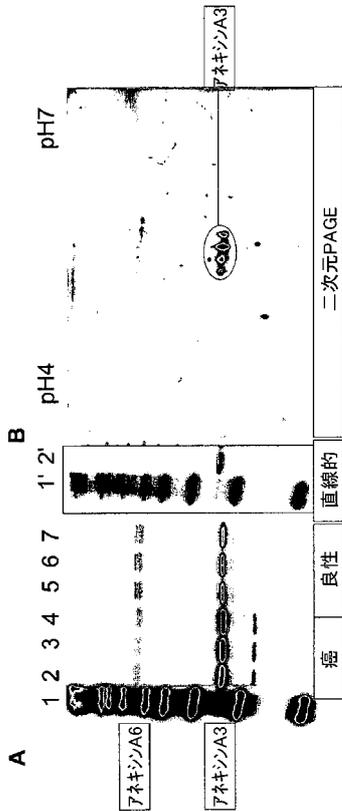


図1

【図2】

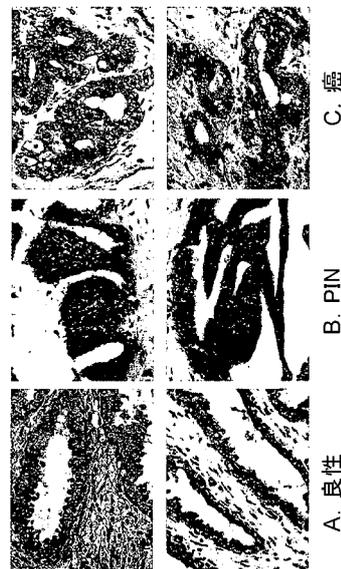


図2

【 図 3 】

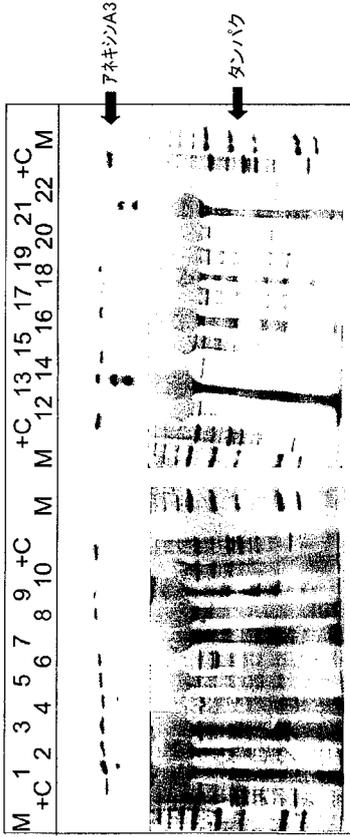


図3

【 図 4 】

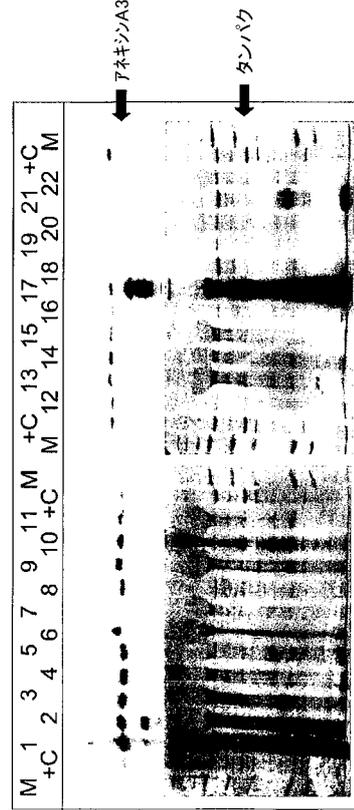


図4

【 図 5 】

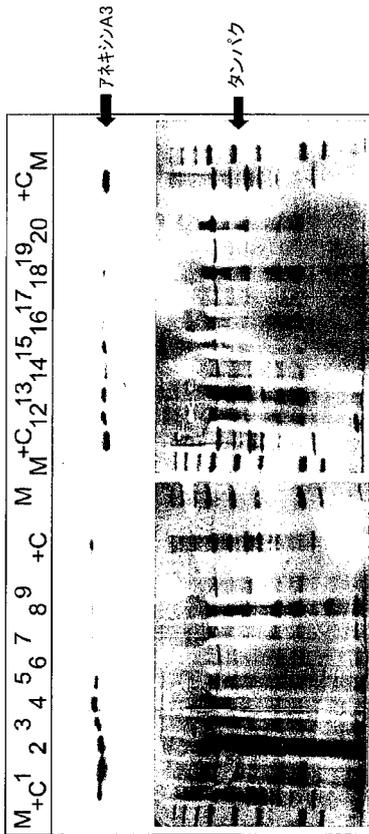


図5

【 図 6 】

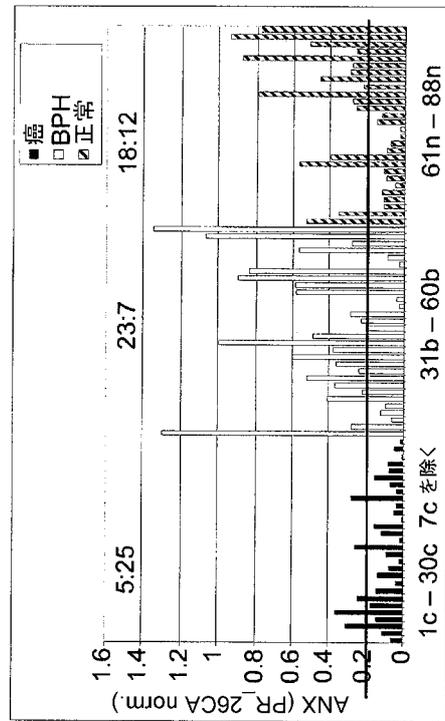


図6

【 图 7 】

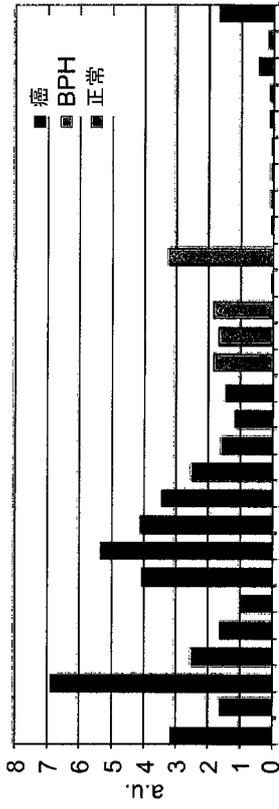


图7

【 图 8 】

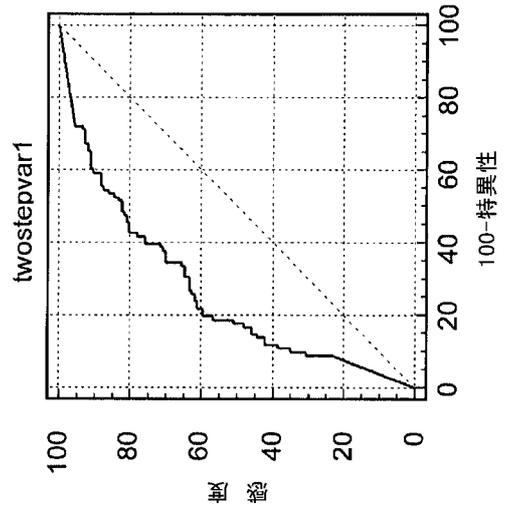


图8

【 图 9 】

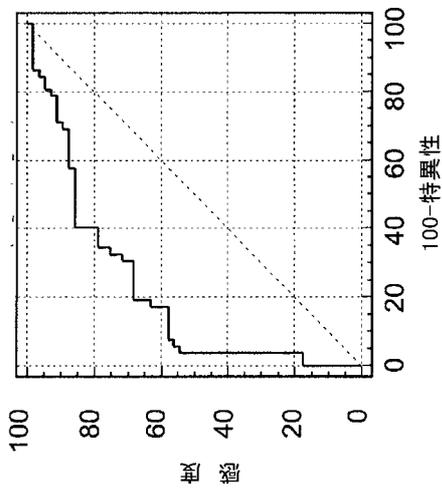


图9

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/004818

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/079368 A (AUVATION LTD; MURRAY, GRAEME, IAN; TELFER, COLIN, MATHESON; MELVIN, WI) 16 September 2004 (2004-09-16) claims table 2	1-22
X	US 2004/096916 A1 (KELLNER ROLAND ET AL) 20 May 2004 (2004-05-20) claims	1-22
X	US 2004/033502 A1 (WILLIAMS AMANDA ET AL) 19 February 2004 (2004-02-19) claims table 2 page 2, left-hand column, paragraph 14 page 2, left-hand column, paragraph 16 - right-hand column, paragraph 18 -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 September 2006		Date of mailing of the international search report 20/09/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Routledge, Brian

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2006/004818

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/232399 A1 (ROBERTSON JOHN FORSYTH RUSSELL ET AL) 18 December 2003 (2003-12-18) claims column 4, paragraph 53 column 5, paragraph 56 table B page 39, line 5 - page 40, line 16	1-22
X	US 2003/175736 A1 (CHINNAIYAN ARUL M ET AL) 18 September 2003 (2003-09-18) page 5, left-hand column, paragraph 36 - right-hand column, paragraph 36 page 9, right-hand column, paragraph 92 - page 10, left-hand column, paragraph 98 page 50, right-hand column, paragraph 521 - page 51, right-hand column, paragraph 530 tables 8-10	1-22
X	US 2003/165954 A1 (KATAGIRI TOYOMASA ET AL) 4 September 2003 (2003-09-04) claims column 1, paragraph 5 - column 3, paragraph 7 column 11, paragraph 96 column 12, paragraph 103 - paragraph 108 column 12, paragraph 111	1-22
X	US 2003/152923 A1 (YAKHINI ZOHAR ET AL) 14 August 2003 (2003-08-14) claims page 1, right-hand column, paragraph 4 page 1, right-hand column, paragraph 8 page 4, right-hand column, paragraph 38	1-22
X	US 2003/108963 A1 (SCHLEGEL ROBERT ET AL) 12 June 2003 (2003-06-12) claim 8 page 2, left-hand column, paragraph 19 - right-hand column, paragraph 22 tables 1-4	1-22
X	US 2002/168696 A1 (HANASH SAMIR M ET AL) 14 November 2002 (2002-11-14) claims page 1, right-hand column, paragraph 7 - page 2, left-hand column, paragraph 7 page 2, right-hand column, paragraph 14	1-22

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2006/004818

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LEE S-W ET AL: "Revealing urologic diseases by proteomic techniques" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 815, no. 1-2, 5 February 2005 (2005-02-05), pages 203-213, XP004713830 ISSN: 1570-0232 abstract table 4 page 210, left-hand column, paragraph 2 page 210, right-hand column, paragraph 1</p>	1-22
X	<p>ALAIYA A A ET AL: "Protein expression profiling in human lung, breast, bladder, renal, colorectal and ovarian cancers" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 787, no. 1, 5 April 2003 (2003-04-05), pages 207-222, XP004415592 ISSN: 1570-0232 page 217, right-hand column, paragraph 2</p>	1-22
X	<p>VAARALA M H ET AL: "Differentially expressed genes in two LNCaP prostate cancer cell lines reflecting changes during prostate cancer progression" LABORATORY INVESTIGATION, UNITED STATES AND CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY, BALTIMORE,, US, vol. 80, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 1259-1268, XP002225395 ISSN: 0023-6837 abstract tables 3,4 page 1265, left-hand column, paragraph 1</p>	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/004818**Box 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:
Although claim 1 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/004818

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004079368	A	16-09-2004	EP 1601969 A2	07-12-2005
			US 2006188883 A1	24-08-2006
US 2004096916	A1	20-05-2004	BR 0208603 A	02-03-2004
			CA 2442957 A1	17-10-2002
			CN 1630819 A	22-06-2005
			CZ 20032787 A3	17-03-2004
			WO 02082076 A2	17-10-2002
			HU 0303749 A2	01-03-2004
			JP 2004531713 T	14-10-2004
			MX PA03009018 A	12-02-2004
			PL 363009 A1	15-11-2004
			SK 12872003 A3	03-02-2004
			ZA 200308487 A	31-01-2005
US 2004033502	A1	19-02-2004	NONE	
US 2003232399	A1	18-12-2003	US 2003138860 A1	24-07-2003
US 2003175736	A1	18-09-2003	CA 2456184 A1	13-02-2003
			EP 1511855 A2	09-03-2005
			JP 2005518522 T	23-06-2005
			WO 03012067 A2	13-02-2003
			US 2005136493 A1	23-06-2005
US 2003165954	A1	04-09-2003	AU 2003201741 A1	24-07-2003
			WO 03057916 A2	17-07-2003
			JP 2005532036 T	27-10-2005
US 2003152923	A1	14-08-2003	NONE	
US 2003108963	A1	12-06-2003	US 2005191673 A1	01-09-2005
US 2002168696	A1	14-11-2002	AT 326699 T	15-06-2006
			AU 780772 B2	14-04-2005
			AU 6526200 A	05-03-2001
			CA 2380398 A1	15-02-2001
			EP 1200832 A1	02-05-2002
			JP 2003535309 T	25-11-2003
			WO 0111372 A1	15-02-2001
			US 2004048320 A1	11-03-2004

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 4C087 AA01 BB57 CA04 NA14 ZB26

专利名称(译)	癌症风险评估的Annexin		
公开(公告)号	JP2008545634A	公开(公告)日	2008-12-18
申请号	JP2008511655	申请日	2006-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	普罗迪奥塞斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	Puroteojisu股份公司		
[标]发明人	ケイヒルマイケル シュラッテンホルツアンドレ		
发明人	ケイヒル マイケル シュラッテンホルツ アンドレ		
IPC分类号	A61K38/00 A61K35/48 A61P35/00 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	A61P35/00 G01N33/57434 G01N33/57446 G01N2333/4718 G01N33/57484		
FI分类号	A61K37/02 A61K35/48 A61P35/00 G01N33/574.A G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/CA30 4C084/DA27 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C087/AA01 4C087/BB57 4C087/CA04 4C087/NA14 4C087/ZB26		
优先权	2005011042 2005-05-21 EP 2005026092 2005-11-30 EP		
其他公开文献	JP2008545634A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及至少一种膜联蛋白用于治疗癌症，特别是泌尿道和/或肠道癌的用途，以及癌症，特别是泌尿道和/或肠癌的诊断，和/或，一种用于区分癌组织和非癌组织的方法。点域1

