

(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2010-523990

(P2010-523990A)

(43) 公表日 平成22年7月15日(2010.7.15)

| (51) Int.Cl.                   | F I           | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| <b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b> | GO 1 N 33/574 | A           |
| <b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>  | GO 1 N 33/53  | N           |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

|               |                              |          |   |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2010-502455 (P2010-502455) | (71) 出願人 | 508362608<br>プロテオシス アクチエンゲゼルシャフト<br>ProteoSys AG  |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年4月9日 (2008.4.9)         |          | ドイツ連邦共和国 マインツ カールーツ<br>アイス-シュトラッセ 51<br>Carl-Zeiss-Strasse<br>51, D-55129 Mainz,<br>Germany |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成21年10月13日 (2009.10.13)     | (74) 代理人 | 100061815<br>弁理士 矢野 敏雄  |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2008/002802            | (74) 代理人 | 100094798<br>弁理士 山崎 利臣  |
| (87) 国際公開番号   | W02008/125262                | (74) 代理人 | 100099483<br>弁理士 久野 琢也  |
| (87) 国際公開日    | 平成20年10月23日 (2008.10.23)     |          |   |
| (31) 優先権主張番号  | 60/911, 329                  |          |   |
| (32) 優先日      | 平成19年4月12日 (2007.4.12)       |          |   |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アネキシンA3による前立腺癌の自己免疫制御

(57) 【要約】

本発明は、特定の試薬での、アネキシンA3 (ANXA3) 及び/又はANXA3に対する自己抗体を含む前立腺癌の診断方法に関する。該方法は、良性の前癌から悪性の状態までの分化を可能にする。さらに、該方法は、予後の関連を有する。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】  
試料を、アネキシン A 3 の細胞内分布に関して分析する、癌の診断方法。
- 【請求項 2】  
前記癌が、尿生殖器及び / 又は胃腸管の癌である、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 3】  
該癌が、上皮癌である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。
- 【請求項 4】  
該癌が、前立腺癌である、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 5】 10  
試薬が、抗体である、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 6】  
前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 7】  
組織化学的方法である、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 8】  
前記試料が、組織試料、特に生検材料である、請求項 7 に記載の方法。
- 【請求項 9】  
前記のアネキシン A 3 の細胞内分布を、上皮細胞において、特に前立腺上皮細胞において測定する、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の方法。 20
- 【請求項 10】  
( i ) 良性状態、  
( i i ) 前癌状態、及び  
( i i i ) 悪性状態  
から選択される疾病段階の鑑別診断を含む、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 11】  
少なくとも 1 つのさらなるマーカーを測定する、請求項 1 から 10 までのいずれか 1 項に記載の方法。 30
- 【請求項 12】  
前記のさらなるマーカーが、前立腺特異的抗原 ( P S A ) 及び / 又は前立腺特異的膜抗原 ( P S M A ) である、請求項 11 に記載の方法。
- 【請求項 13】  
アネキシン A 3 に対する自己抗体をさらに測定する、請求項 1 から 12 までのいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 14】  
癌、特に前立腺癌の診断方法であって、その際、試料、例えば組織又は体液試料を、アネキシン A 3 の存在、量及び / 又は細胞内分布に関して、並びにアネキシン A 3 に対する自己免疫反応に関して分析し、その際、該自己免疫反応は、有利には、アネキシン A 3 及び / 又はプロスタソーム / エキソソームに対する自己抗体の存在によって、又は A N X A 3 陽性の制御性 T 細胞の存在によって特徴付けられる、診断方法。 40
- 【請求項 15】  
癌、有利には前立腺癌の診断方法であって、その際試料を、アネキシン A 3 に対する自己抗体の存在及び / 又は量に関して、及び場合により制御性 T 細胞の存在及び / 又は量に関して分析する、診断方法。
- 【請求項 16】  
アネキシン A 3 の不在が、特に手術後の進行の高いリスクを有する、前立腺癌の侵襲性の亜群を示す、請求項 1 から 15 までのいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 17】 50

進行性前立腺癌の中間のリスクを有するように分類させた、被験者の層別化方法であって、その際、該被験者からの試料を、アネキシン A 3 の存在及び / 又は量に関して分析する方法。

【請求項 18】

( i ) アネキシン A 3 を測定するための試薬、並びに  
( i i ) アネキシン A 3 に対する自己抗体を測定するための試薬及び / 又は制御性 T 細胞を測定するための試薬  
を含む、癌の診断のための試験試薬。

【請求項 19】

前立腺癌の診断のための、請求項 18 に記載の試薬。

10

【請求項 20】

アネキシン A 3 に対する自己抗体を測定するための試薬を含む、前立腺癌の診断のための試験試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定の試薬での、アネキシン A 3 ( ANXA3 ) 及び / 又は ANXA3 に対する自己抗体の測定を含む前立腺癌の診断方法に関する。該方法は、良性、前癌及び悪性の状態までの分化を可能にする。さらに、該方法は、予後の関連を有する。

【0002】

20

以前の示差定量タンパク質発現の研究において、ANXA3 が、前立腺癌と極めて関係があることを示した ( 1 )。しかしながら、ヒト前立腺における ANXA3 の役割及び生物学については、殆ど知られていない。これまでは、ANXA3 が、放出された小さな小胞が上皮の多様性を形成する、いわゆるエキソソームの一部であり ( 2 )、該エキソソームが、先天性免疫系の制御における完全に理解されていない役割を有し ( 3 )、かつそれらが、ごく最近発見された抗腫瘍活性を有する ( 4 ) ことを示している。最近の報告は、前立腺からのエキソソームである、いわゆるプロスタソーム ( prostasome ) に対する前立腺癌患者における自己免疫 ( 5 ) を示している。

【0003】

前立腺癌及び尿路の他の上皮癌の治療又は診断のためのタンパク質バイオマーカーは、US 2005 130 876 号、WO 03 086 461 号、WO 2005 078 124 号、EP 05 011 042 . 8 号及び EP 05 026 092 . 6 号において記載されている。これらの文献の内容は、参照をもって本明細書に組み込まれたものとする。

30

【0004】

US 60 / 812 , 089 号及び US 60 / 859 , 489 号は、癌の診断を開示しており、その際試料は、非常に特異的なモノクローナル抗体で、アネキシン A 3 の存在及び / 又は量に関して分析される。これらの文献の内容は、参照をもって本明細書に組み込まれたものとする。

【0005】

40

ANXA3 は、前立腺癌のためのマーカーとして公知であるが、良性、前癌及び悪性の状態までの分化の診断のための改良された方法を要求する。

【0006】

現在の研究の目的の一つは、良性の前立腺上皮、高グレードの前立腺上皮内腫瘍 ( HGPIN ) 及び前立腺癌の上皮構成要素における ANXA3 の発現及び局在化を研究すること、並びに前立腺の悪性転換の過程における分化及び局在化の変化を理解することであった。

【0007】

本発明によって、良性の前立腺組織における抗 ANXA3 染色は、強く、かつ先端部である一方で、癌においては、弱く、かつより基底部であることを見出している。1900

50

より多い症例に関する組織アレイ研究は、良性、前癌及び悪性の前立腺組織におけるANXA3発現の種々のパターンが、予後の関連を有し、かつ機械論的理解を提供することを示している。

【0008】

進行癌において、制御性T細胞(Tregs)のための対比染色と共存する、非上皮性散在性細胞におけるANXA3の存在が観察された。さらに、ANXA3に対する自己抗体の存在を、癌患者において検出することができた。それらのANXA3に対する自己抗体は、癌細胞の酸化ストレス下で、おそらく誘発される。これは、エキソソームによるANXA3の放出が、癌細胞が前立腺癌患者におけるANXA3を含有するプロスタソームに対する自己免疫を誘発することによって置き換えようとする防御機構を構成することの証明を提供する。従って、Tregsのシグナリングが、ANXA3エキソソーム及び/又は癌細胞によって調整されてよい。さらに、プロスタソーム/エキソソームに対する自己免疫抗体は、ANXA3-陽性T細胞によって誘発/制御されてよい。

10

【0009】

これらを一緒に考えると、良性前立腺肥大(BPH)中の前立腺の細胞外構成要素へのANXA3の放出が、癌に対する防御機構を構成し、かつ癌性組織が、ANXA3に対する自己免疫抗体の誘導によって、及び制御性T細胞(Tregs)を含む機構によって、最終的にはこの放出を弱めることを強く示している。種々のANXA3染色パターンは、初めて、Gleasonスコア、pT-ステージ及びPSAによって層別化した患者の中間リスク群におけるPSA無増悪生存期間を予想する可能性も提供する。

20

【0010】

最初の観点において、本発明は、癌、有利には前立腺癌の診断方法に関し、その際組織試料は、アネキシンA3の細胞内分布に関して分析される。

【0011】

他の観点において、本発明は、癌、特に前立腺癌の診断方法に関し、その際試料、例えば組織又は体液試料は、アネキシンA3の存在、量及び/又は細胞内分布に関して、並びにアネキシンA3に対する自己免疫反応に関して分析され、その際該自己免疫反応は、有利には、アネキシンA3に対する自己抗体の存在によって、及び/又は制御性T細胞の存在によって特徴付けられる。

【0012】

本発明の他の観点は、癌、有利には前立腺癌の診断方法に関し、その際試料は、アネキシンA3に対する自己抗体の存在及び/又は量に関して、及び場合により制御性T細胞の存在及び/又は量に関して分析される。

30

【0013】

さらに本発明の他の観点は、発達中の前立腺癌の中間リスクを有するように分類されている被験者の層別化のための方法に関し、その際該被験者からの試料は、アネキシンA3の存在、局在化及び/又は量に関して分析される。

【0014】

さらに本発明の他の観点は、(i)アネキシンA3を測定するための試薬、並びに(ii)アネキシンA3に対する自己抗体を測定するための試薬及び/又は制御性T細胞を測定するための試薬を含む、癌、特に前立腺癌の診断のための試験試薬である。

40

【0015】

さらに本発明の他の観点は、アネキシンA3に対する自己抗体を測定するための試薬を含む、前立腺癌の診断のための試験試薬である。

【0016】

本発明によって診断されてよい癌は、有利には、尿生殖及び/又は胃腸管の癌、例えば前立腺、膀胱、腎臓、尿道、卵巣、子宮又は大腸の癌である。特に、該癌は上皮癌である。特に好ましい一実施態様において、該癌は、前立腺癌である。

【0017】

好ましい一実施態様において、本発明は、疾病段階及び/又は予後評価の鑑別診断を含

50

む。例えば、本発明は、

( i ) 良性状態、特に良性の前立腺の状態、例えば良性前立腺肥大 ( B P H )、線維症及び慢性前立腺炎、

( i i ) 前癌状態、例えば高グレード前立腺上皮内腫瘍 ( H G P I N ) を含む種々の段階の前立腺上皮内腫瘍 ( P I N - 1 - 3 )、並びに / 又は

( i i i ) 悪性状態、例えば前立腺癌、特に Gleason スコア及び / 又は p T 段階によって示される進行状態における進行前立腺癌から選択される疾病段階の鑑別診断を可能にする。

【 0 0 1 8 】

より有利には、本発明は、一方では良性又は前癌状態、及び他方で悪性状態の鑑別診断を可能にする。

10

【 0 0 1 9 】

好ましい一実施態様において、ANXA3の存在、量及び / 又は分布は、体液又は組織試料であってよい、試料において測定される。より有利には、該試料は、前立腺組織からの組織試料、例えば組織切片又は生検材料である。他の一実施態様において、ANXA3の細胞内分布 / 局在化は、試料において測定されてよく、その際該試料は、例えば前立腺組織からの組織試料、有利には組織切片又は生検材料である。有利には、ANXA3の細胞内局在化は、上皮細胞において、特に前立腺上皮細胞において測定される。存在、量及び細胞内局在化は、シグナル組織試料に対して、又は種々の試料、例えば同一の被験者からの体液試料及び組織試料に対して測定されてよいことに注意すべきである。

20

【 0 0 2 0 】

例えば組織試料の強い染色に対応する、試料における多量のANXA3は、主に良性状態に関して示している。例えば組織試料の弱い / 中程度の染色に対応する、中程度の / 低い量のANXA3は、前癌状態に関して、又は初期 / 初期 - 中間段階の悪性状態に対して示している。試料におけるANXA3の不在は、悪性状態に関して、主に進行段階における、例えば中間又は最終段階における悪性状態に関して示している。さらに、試料におけるANXA3の不在は、特に手術、例えば根治的前立腺切除術後の進行の高いリスクを有する、前立腺癌の侵襲性亜群に関して示している。

【 0 0 2 1 】

ANXA3の先端部の細胞内局在化、特に先端部に局在化された小胞、例えばエキソソーム及び / 又はプロスタトソーム ( p r o s t a t o s o m e ) におけるANXA3の存在は、主に良性又は前癌状態に関して示している。ANXA3の散在性の細胞内局在化は、特に先端部に局在化された小胞の不在との組合せで、悪性状態に関して示している。

30

【 0 0 2 2 】

ANXA3に対する自己免疫反応の存在、例えばANXA3に対する自己抗体の存在及び / 又は強いANXA3 - 陽性 ( しかし細胞内にあり、先端部ではない ) 制御性T細胞の存在は、主に、悪性状態に関して、特に進行状態における悪性状態に関して示している。

【 0 0 2 3 】

本発明は、試料におけるポリペプチド又は細胞の測定を含む。有利には、この測定は、免疫学的方法を含み、その際測定される構成要素の存在、量及び / 又は局在化は、免疫学的試験試薬を使用する。

40

【 0 0 2 4 】

試料におけるANXA3を測定するための試薬は、有利には、ANXA3に特異的である抗体、例えばポリクローナル又はモノクローナル抗体である。US 60 / 812, 089号及びUS 60 / 859, 489号において記載されている非常に特異的なモノクローナル抗体が特に好ましく、参照をもって本明細書に組み込まれたものとする。

【 0 0 2 5 】

試料におけるANXA3自己抗体を測定するための試薬は、有利には、自己抗体によって認識されるエピトープを含むそれらのANXA3ポリペプチド又は断片である。より有利には、ANXA3ポリペプチドは、組換えANXA3ポリペプチドである。

50

## 【0026】

試料における制御性T細胞を測定するための試薬は、有利には、制御性T細胞のためのマーカー、例えばCD25もしくはFoxp3又は他のかかるマーカーに対する抗体である。

## 【0027】

本発明の方法は、自動装置に好適な試験形式を含む、免疫学的測定に好適なあらゆる試験形式において実施されてよい。いくつかの試験形式においては、ラベリング基、例えば視覚的マーカー、例えばラテックス又は金ビーズ、蛍光マーカー基、酵素マーカー基等を有する試薬を使用することが有利であってよい。試薬及びラベリング基の共役は、標準的な方法によって、例えば、試薬の反応性アミノ酸側基、例えばカルボキシ基、アミノ基及び/又はチオール基に対する、ラベリング基を用いた、例えば二官能性スペーサー分子を介した共有結合によって製造されてよい。

10

## 【0028】

この試料は有利には、ヒト被験者から得られる。いくつかの実施態様において、前記の方法は、非侵襲性の診断方法であり、その際前記試料は、例えば尿試料、特に、圧搾液尿(exprimat urine)試料又は糞便試料であってよい。所望される場合に、該試料は、前処理法、例えばゲル濾過にかけられてよい。さらに他の実施態様において、前記方法は、組織化学的方法であってよく、その際その試料は、組織試料、特に生検材料、例えばTUR-P(前立腺の経尿道的切除)からのパンチもしくは切開生検材料又は試料であってよい。組織化学的な手法において、細胞内又は細胞外ANXA3の選択的な測定は、試料内でのANXA3の局所化の測定によって実施されてよい。

20

## 【0029】

好ましい一実施態様において、本発明は、ANXA3の半定量又は定量を含む。この半定量又は定量は、所定のカットオフ値に基づく試験結果の評価、及び評価の結果と疾病段階との相互関係を含んでよい。カットオフ値は、公知の方法による、健康な人及び/又は所定の疾病段階を有する人からの試料におけるANXA3の測定によって測定されてよい。さらに、試料におけるANXA3の量は、染色された組織試料の評価及び評価の結果と疾病段階との相互関係によって測定されてもよい。

## 【0030】

本発明は、自己免疫反応、例えばANXA3に対する自己抗体及び/又は制御性T細胞の存在の測定にも関する。この測定は、個々に又はANXA3の測定との組合せで実施されてよい。自己抗体の存在は、悪性状態、特に進行段階における悪性状態に関して示している。自己抗体の測定は、場合により、制御性T細胞の測定と組み合わせられる。制御性T細胞の存在は、悪性状態、特に進行段階における悪性状態に関して示している。

30

## 【0031】

前記の試料は、細胞外の及び細胞内のANXA3の別個の測定を可能にする分画化法にかけられてよい。例えば、該試料は、細胞ペレット及び上清を得るために遠心分離されてよく、その際細胞内アネキシンA3は、細胞ペレット中で測定され、かつ細胞外アネキシンA3は、上清中で測定される。特に好ましい一実施態様において、前記方法は、細胞外ANXA3の選択的測定を含む。さらに特に好ましい一実施態様において、前記方法は、細胞内ANXA3の選択的測定を含む。

40

## 【0032】

本発明の方法は、他の癌マーカー、例えば癌マーカーの測定をさらに含んでよい。他のマーカーの測定は、同一試料中で実施されてよく、その際、ANXA3は、種々の試料、例えば血液、血清及び/又は血漿試料中で測定される。血液、血清又は血漿マーカー、特にカリクレインプロテアーゼファミリーの少なくとも1つのメンバー、例えば、前立腺特異的抗原(PSA)及び/又は少なくとも1つの上皮細胞マーカー、特に前立腺特異的膜抗原(PSMA)の測定が、特に好ましい。

## 【0033】

本発明は、スクリーニング法であってよく、その際個人又は個人群は、癌、特に前立腺

50

癌に関して試験される。一方で、前記方法は、診断評価又は治療追跡試験を含んでもよく、その際、癌、特に前立腺癌又はそれらの前駆段階に関して陽性を既に診断されている個人は、予後評価及び/又は治療調整モニタリングを受ける。

【0034】

特に好ましい一実施態様において、本発明は、あらゆる診断評価における、特に治療調整のための高価なツールである、疾患の進行の予後評価に関する。予後評価は、単独又は他のマーカー、例えばPSAとの組合せでの、ANXA3の測定に基づいてよい。例えば、組織学的評価によって、及び/又はPSA又は他の癌マーカーの測定レベルによって、患者は、低いリスク群（例えばPSAレベル  $10 \text{ ng/ml}$ ）、中間のリスク群（例えばPSAレベル  $> 10$  及び  $< 20 \text{ ng/ml}$ ）、並びに高いリスク群（例えばPSAレベル  $20 \text{ ng/ml}$ ）で分類されてよい。これらの患者群におけるANXA3の測定は、特に中間のリスク群であると分類されている患者において、他の価値のある情報を導いてよい。これらの中間のリスク患者が、ANXA3陽性である場合に、無PSA生存率が、ANXA3に関して陰性であると測定されている患者におけるよりも有意に高くなる。従って、本発明は、個々の患者群のための他のリスクの層別化を可能にする。有利には、場合により中間のリスク群であると分類されている群における患者は、ANXA3の測定の結果に基づいて分類されてよい。ANXA3陽性である患者は、低いリスク群であると分類されてよく、かつANXA3陰性である（及び場合によりANXA3に対して自己免疫反応を有する）患者は、高いリスク群であると分類される。

10

【0035】

さらに、本発明は、以下の図及び実施例により、より詳細に説明されるものである。

20

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】 ANXA3染色強度の相違及び局在化を示す図。

【図2】 ANXA3染色の結果の概要を示す図。

【図3】 種々の患者群における無PSA生存時間とANXA3染色との関連を示す図。

【図4】 無PSA生存時間とANXA3状態との関連を示す図。

【図5】 前立腺癌患者からの血清における自己抗体の存在を示す図。

【0037】

図1は、良性の前立腺肥大試料（1A）、中間Gleasonスコアを有する前立腺癌組織からの試料（1B）、及びANXA3陽性散在細胞を有する進行癌の組織断片（1C）における、ANXA3染色強度及び局在化の相違を示す。このタイプの細胞は、CD3（一般的なT細胞マーカー、1D）、並びに制御性T細胞（Tregs）のための特異的マーカーのCD25（1E）、及びTregsのための他の特異的マーカーのFoxp3（1F）に関する陽性も染色する。

30

【0038】

図2は、それぞれの状態（良性状態、前癌状態PIN及び悪性状態、すなわちGleasonスコア（GS）によって分類された癌）から依存しているANXA3染色の結果（陰性、弱い、中程度、強い）の概要を示す：最も高い染色強度は、良性上皮において見出された。

40

（a）脱分化を増加することでPIN及び癌腫において増加された染色強度

（b）先端ANXA3染色が、癌の重症度の増加と反比例して関連される。前立腺の悪性転換の種々の段階での双方のパラメータの相互関係は、 $\text{値} < 0.001$ で、非常に有意である。ANXA3、アネキシンA3；PIN、前立腺上皮内腫瘍。

【0039】

図3は、種々の患者群における無PSA生存時間とANXA3染色との関連を示す。

（a）予後に関連のある亜群に分類することができる、先端部対散在性である染色パターンに関するANXA3陽性腫瘍のサブ分析

（b）リスク群分類によるPSA無増悪生存率

（c）最も大きいコホート（ $n = 969$ ）を示す中間のリスク群の、高い及び低いリスク

50

の亜群 ( = 0 . 0 0 0 1 ) への分類を可能にした A N X A 3 状態 ( 陰性対陽性 ) による二段層化。A N X A 3、アネキシン A 3 ; P S A、前立腺特異的抗原。

【 0 0 4 0 】

図 4 は、無 P S A 生存時間と A N X A 3 状態との関連を示す。陰性 A N X A 3 染色状態は、無 P S A 生存と著しく関連する。( b ) G l e a s o n グレード、( c ) p T 段階、及び ( d ) 手術前 P S A ( n g / m l ) による無 P S A 生存率。A N X A 3、アネキシン A 3 ; P S A、前立腺特異的抗原。

【 0 0 4 1 】

図 5 は、前立腺癌患者からの血清における自己抗体の存在を示す。

【 0 0 4 2 】

10

実施例

1 . 材料及び方法

1 . 1 抗体

この研究において、次の抗体を使用した :

C l o n e t g c 7 P r o V I I 5 C 5 ( D S M A C C 2 7 8 0 )、モノクローナル、2 , 4 m g / m l ; 標的タンパク質 A N X A 3 に対する。

【 0 0 4 3 】

1 . 2 組織

3 0 0 0 より多い組織試料を含有する既存の前立腺癌 T M A を分析した。その組成物の詳細な説明を、結果の項目において提供する。

20

【 0 0 4 4 】

1 . 3 免疫組織化学 ( I H C )

ホルマリン固定組織におけるアネキシン A 3 の検出に好適な I H C プロトコルを開発した。詳細なプロトコルを以下で示す。

【 0 0 4 5 】

A N E X A 3 免疫染色 ( I H C ) プロトコル

スライド作成

・キシレン ( G F S 2 x 5 分キシレン ) 中で T M A を少なくとも 1 時間脱パラフィン化する

・下降エタノール系列中で蒸留水に近づくまで再水和する

30

・ P B S 緩衝液中で 5 分すすぐ

前処理 ( エピトープ検索 )

・酢酸 p H 2 中で 5 分間スライドを加圧殺菌する

・ P B S 緩衝液中で 5 分すすぐ

ペルオキシダーゼ阻害

・ 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / メタノール中で 1 0 分間インキュベートする

・ P B S 緩衝液中で 2 x 5 分すすぐ

抗体インキュベーション

・一次抗体 ( A N X A 3 ) 1 : 8 1 0 0 ( 0 . 3 μ g / m l ) を P B S 中で希釈する

・組織 / T M A 断片を希釈された抗体 1 0 0 ~ 2 0 0 μ l で覆う

40

・ 2 時間 3 0 で湿室でインキュベートする

・ T R I S - P B S 緩衝液 ( 1 : 1 0 ) 中で 2 x 5 分すすぐ

・ H R P 共役二次抗体 ( E n V i s i o n D A K O K 4 0 0 3、抗ウサギ ) を 3 0 分間 3 0 で適用する

・ T R I S - P B S 緩衝液中で 2 x 5 分すすぐ

色原体

・スライドを 1 0 分間 D A B - 色原体 ( L i q u i d D A B D A K O C o d e N o . : K 3 4 6 7 ) で、室温で覆う

・スライドを P B S 緩衝液で完全に洗浄する

・ 1 分秒間ヘマトキシリン ( H a r r i s H a e m a t o x y l i n H T X 3 1 0

50

00、Medite GmbH)で対比染色する

- ・水ですすぐ
- ・HCl-エタノールブルー中で5分間、水増加エタノール系列で識別する
- ・キシレンで覆う。

【0046】

#### 1.4 HClスコアリング

ある病理学者が、全ての染色を評価した。バージョンa)それぞれの組織試料及び抗体に関して、膜染色強度を、4段階の尺度(0、1、2、3)における目視検査によって判定した。さらに、腫瘍細胞の染色陰性の断片を、4段階尺度( $< 20\%$ 、 $\geq 20 < 40\%$ 、 $\geq 40 - < 90\%$ 、 $> 90\%$ )で判定した。最終IHCスコアを、それらの2つのパラメータから確立した。

10

【0047】

スコアの定義

【表1】

| スコア | 定義  |
|-----|---|
| 陰性  | <b>Int 0</b>  |
| 弱い  | 腫瘍細胞の $\leq 40\%$ で <b>Int 1</b> 又は<br>腫瘍細胞の $\leq 20\%$ で <b>Int 2</b>                                       |
| 中程度 | 腫瘍細胞の $> 40\%$ で <b>Int 1</b> 又は<br>腫瘍細胞の $> 20 \leq 90\%$ で <b>Int 2</b> 又は<br>腫瘍細胞の $< 40\%$ で <b>Int 3</b> |
| 強い  | 腫瘍細胞の $\geq 90\%$ で <b>Int 2</b> 又は<br>腫瘍細胞の $\geq 40\%$ で <b>Int 3</b>                                       |

20

確実な統計的分析のために、癌を、陰性(陰性)又は陽性(弱い、中程度、強い)として分類した。

【0048】

#### 1.5 データファイルの記載

この研究において生じた全てのデータを、データファイルで要約し、フィールド記述は以下である：

【表 2】

|                  |  |
|------------------|--|
| フィールド名<br>ブロック番号 | 説明<br>TMA 座標   |
| 局在化              | TMA 座標   |
| PSA              | 前手術 PSA (ng/ml)                                      |
| pT               | pT 段階  |
| pN               | 組織病理学的なリンパ節の状態                                       |
| Gleason パターン     | Gleason グレード(パターン)                                   |
| Gleason スコア      | Gleason グレード(スコア)                                    |
| リスク群             | 低い、中間及び高いと分類されたリスク分類                                 |
| 再発<br>月経過観察      | PSA 再発   |
| ANXA3 % PCA      | 染色された前立腺癌細胞の機能 (PCA)                                 |
| ANXA3 強度 PCA     | 染色強度 (0-3)   |
| ANXA3 スコア PCA    | IHC の結果。定義のために 2.4 を参照                               |
| ANXA3 パターン PCA   | 散在性細胞質 (散在性) として定義された染色 vs.<br>先端部で強調された細胞質 (先端部) 染色 |
| スコア/パターンの結合      | IHC スコア及び染色パターンを含む結合スコア                              |
| ANXA3 % PIN      | 染色された PIN 細胞の機能                                      |
| ANXA3 強度 PIN     | 染色強度 (0-3)   |
| ANXA3 スコア PIN    | IHC の結果。定義のために 2.4 を参照                               |
| ANXA3 パターン PIN   | 散在性細胞質 (散在性) として定義された染色 vs.<br>先端部で強調された細胞質 (先端部) 染色 |
| ANXA3 % 良性       | 染色された良性細胞の機能   |
| ANXA3 強度 良性      | 染色強度 (0-3)   |
| ANXA3 スコア 良性     | IHC の結果。定義のために 2.4 を参照                               |
| ANXA3 パターン 良性    | 散在性細胞質 (散在性) として定義された染色 vs.<br>先端部で強調された細胞質 (先端部) 染色 |

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 9 】

## 1. 6 統計

カイ二乗検定を使用して、種々の腫瘍サブセット間の ANXA3 発現の相違の確率を算出した。 Kaplan-Meier (Kaplan-Meier) プロットを算出して、患者の予後に対する ANXA3 発現の影響に対処した。多変量分析のために、Cox 回帰分析を実施した。

## 【 0 0 5 0 】

## 2. 結果

1679 の根治的前立腺切除術誘導検体の癌のコアを含む組織マイクロアレイの分析に基づいて、ANXA3 に対する特異的抗体での免疫細胞化学からの典型的な画像 (図 1) は、良性前立腺肥大の典型的な検体 (1A)、中間 Gleason スコアを有する前立腺癌組織 (1B)、及び進行癌 (1C) における ANXA3 染色強度及び局在化の相違を示す。さらに、135 の良性及び 125 の新生物発生前の病巣 (高グレード PIN) のセットを分析した。

## 【 0 0 5 1 】

一般的に、ANXA3 染色は、主に細胞質であり、かつ細胞質及び膜境界/小胞模様が有する細胞内分化を示した。良性腺上皮において、顕著な細胞及び核 ANXA3 染色が見られた。さらに、染色を、細胞の先端部で濃縮され、先端部で強調された細胞質染色パターンをもたらす、小さな細胞質小胞において見出した。細胞の先端部で、ANXA3 陽性小胞の形成を、線管中への離出分泌法に対応して頻りに観察した。

## 【 0 0 5 2 】

良性の分泌細胞及びHGPIN病巣は、先端部で強調された細胞質染色でほとんど陽性を均一に染色した。しかしながら、HGPINにおいて、染色強度は、著しく低減した ( $p < 0.0001$ )。癌染色強度において、さらに著しい低減 (27%、 $p < 0.0001$  での陰性染色を含む)、及び先端部で強調された原形質染色パターンから散在性の原形質染色への明瞭な移行を観察した ( $p < 0.0001$ )。これらの結果の要約を、図2において示す。

#### 【0053】

陰性ANXA3染色を、PSA ( $p = 0.29$ )ではなく、pT段階及びGleasonスコア ( $p < 0.0001$ )と関連させた。 Kaplan-Meier分析は、著しく低減されたPSA無増悪生存期間を明らかにした ( $p < 0.0001$ 、ロジック検定)。多変量分析において、陰性ANXA3染色は、独立した予後予測であることを示された (HR 1.20、 $p = 0.002$ )。詳細は、第1表及び第2表において提供される。

10

#### 【0054】

抗体染色による進行癌における散在シグナル細胞の他の分析は、それらの細胞が、主にT細胞 (1D) 及びより詳述すれば制御性T細胞 (Tregs) であることを示した。それというのも、それらは、CD25 (1E) 及びFoxp3 (1F) を示すからである (6)。Tregsは、最近、腫瘍特異的寛容に寄与することが報告されている (7)。

#### 【0055】

ANXA3陽性癌の分析に関して、それらはGleasonスコア ( $p = 0.04$ ) に対して相関があるが、しかし期待値に反して、高グレードの癌は、強度に染色された癌の最大の割合 (35.6%) を示し、かつ弱く染色された癌の割合は、低い及び高いグレードの癌 (35.6%対36.3%) においてほとんど同一であった。染色強度は、PSAレベル ( $p = 0.0029$ ) とも関係があった。ANXA3に関してより強度に染色された癌は、PSAカテゴリー  $20 \text{ ng/ml}$  (41.1%) で最も頻繁に見出され、ANXA3に関する弱い染色は、PSAカテゴリー  $20 \text{ ng/ml}$  未満で最も頻繁に見出された。局所的進行癌において低減された染色強度の傾向があったが、しかしながら、これは、統計的相違に達しない ( $p = 0.0630$ )。

20

#### 【0056】

PSA経過観察は、1317人の患者において可能であった。生化学的再発を、2回の連続測定で、 $\text{PSA} \geq 0.1 \text{ ng/ml}$  として定義した。354人の患者は、PSA再発を生じた。全ての経過観察にわたる中央値は、33ヶ月であり、再発しない患者の経過観察の中央値は、39ヶ月であった。ANXA3-単変量分析の実施は、ANXA3に関する陰性染色が、ANXA3陽性腫瘍と比較して有意に低減させた無PSA生存期間と関連した ( $p < 0.0001$ ) ことを示すことができた。染色パターンに関するANXA3陽性腫瘍のサブ分析を、さらにこの群の患者を2つの予後に関するある亜群に分類することが可能であった。予後は、それらの先端染色された相当品と比較して、散在性の上皮染色を有するANXA3陽性腫瘍において著しく悪かった (ロジック試験  $p = 0.0013$ 、図3A)。

30

#### 【0057】

ANXA3状態が、十分に確立された古典的予後パラメータPSA、Gleasonグレード及びpT段階の併用に関連する予後を有するかどうかをさらに調査するために、3つのリスク群へコホートを分けた。PSAによって、患者のグレード及び段階を、低い、中間の、及び高い進行のリスクで分類した。進行の低いリスクにおいて、手術前のPSAは、 $10 \text{ ng/ml}$  以下であり、前立腺切除検体のGleasonスコアは、6以下であり、かつ癌は、制限された。進行の高いリスクにおいて、手術前のPSAは、 $20 \text{ ng/ml}$  より多く、前立腺切除検体のGleasonスコアは、7以上であり、かつ腫瘍段階は、pT3であった。低くも高くもないものは、中間リスク群に割り当てた。

40

#### 【0058】

図3Bにおいて見られるように、リスクの分類区分は、著しく異なる進行のリスクを示した ( $p < 0.0001$ )。ANXA3状態 (陰性対陽性) による二段層化を、最も大き

50

いコホート (  $n = 922$  ) を示す中間のリスク群の、高い及び低いリスクの亜群への分類を可能にした (  $p = 0.0001$  )。低い又は高いリスク群において定義されることができた亜群はなかった ( 第3表 )。中間リスクのカプラン - マイヤー分析は、ANXA3 陰性患者に関する著しく低減されたPSA PFSも示した ( 図3C )。

#### 【0059】

ANXA3 に関する陰性染色を、ANXA3 陽性腫瘍と比較して、著しく低減された無PSA生存時間と関連させた (  $< 0.0001$ 、図4A )。しかしながら、染色スコア ( 弱い対中程度対強い ) に関するANXA3 陽性癌の層別化は、予後関連亜群を示すことに失敗した ( ログランク試験、  $= 0.642$ 、データは示されていない )。ANXA3 染色 ( 陰性対陽性 ) に加えて、単変量分析は、確立された予後因子 Gleasonスコア、pT段階、及び手術前PSA血清レベルに関する予後の有意性も示した (  $p < 0.0001$ 、図4B ~ D )。

10

#### 【0060】

癌患者における抗ANXA3 自己免疫の可能性を、サンドイッチELISAにおける組換えANXA3 に対する免疫反応に関する患者の血清のスクリーニングによって試験することを行った。コントロールは、ホスホセリン被覆を有する及び有さない、ANXA5、MCV、Anaを含んだ。実際に、いくつかの前立腺癌患者において非常に高く特異的な抗ANXA3 滴定濃度が見られた。図4において示されているように、それらの患者の1人のポリクローナル血清は、対応するモノクローナル抗ANXA3 抗体での染色と比較して、組換えANXA3、前立腺癌細胞系 ( PC3細胞 ) からの天然ANXA3 を染色する。この患者の全血からB細胞を分離すること、及び特異的モノクローナル抗体、組換えANXA3 及びポジティブコントロールとしてPC3細胞抽出物を使用することで、B細胞クローンを産出する対応する抗ANXA3 抗体を分離及び培養して、そして、ヒトモノクローナル抗ANXA3 抗体を生じることができた。対応するウェスタンブロットを、図5において示す。

20

#### 【0061】

##### 3. 考察

良性から悪性の前立腺上皮へ移行中のANXA3 の局在化及び細胞内分布における一定変化、並びにその予後の意義は、前立腺組織の生物学におけるANXA3 の重要な役割を示唆する。エキソソーム/プロスタソームにおけるタンパク質の報告された存在と一致して、前立腺の細胞外構成要素における分泌されたANXA3 の存在 ( 2 )、及びこれらの小胞の提案された抗癌活性 ( 4 ) は、ANXA3 が、前立腺患者からの尿又はPC3細胞抽出物における抗体で利用できるかどうかを試験することを導く。FACS分析は、実際に、ANXA3 が、潜在的に抗原性の表面タンパク質であることを示した ( データは示されていない )。( ANXA3 の診断値を評価する大量の臨床研究からの ) 癌及びBPH患者からの血清をスクリーニングすることで、小さいセットの癌患者の抗体を見出し、かつB細胞を生じる抗ANXA3 抗体の対応するクローンを分離した。

30

#### 【0062】

早期の前立腺癌検出、PSAのための ( 8、9 )、及び生検材料、又は完全な前立腺切除後の検体を使用したリスクアセスメントに関する困難な判断に関する ( 10、11 ) 最新の標準バイオマーカーの不足の背景に対して、ANXA3 は、総合診断タンパク質バイオマーカーの潜在性を示す。

40

#### 【0063】

ANXA3 の重要な特徴の一つは、細胞内及び細胞外の分布並びに局在化が、前立腺癌の早期検出のための体液における安定な非侵襲性の検出を可能にするだけでなく、DNA/RNA分析 ( 主に全体のANXA3 の代用物のみを検出できる ) で利用できない腫瘍生物学の重要な観点を反映することである。

#### 【0064】

結果は、より高次のGleasonスコアの前立腺癌に対して、PINによるBPHからの前立腺の悪性転換中に徐々に失われる、有利にはエキソソーム/プロスタソームにお

50

ける B P H の前立腺上皮から選択された A N X A 3 の抗癌及び保護の役割と一致する。エキソソーム A N X A 3 の低減は、細胞外プロスタソームの表面抗原で意図された、制御性 T 細胞によって進行癌において誘発された自己免疫機構による。

【 0 0 6 5 】

初めて、中間リスク群における患者の多数の群を、さらに分布することができ、かつ経過観察の将来性、A N X A 3 を基礎とした前立腺癌の進行の予測に非常に関心のあるものであってよい。特定のこの前立腺癌における A N X A 3 の分子の背景 ( 1 )、並びに癌の段階への前立腺悪性転換の免疫制御における役割、膜輸送、リンパ球遊走、細胞運動性及びシグナル変換における A N X A 3 の役割 ( 1 2 )、エキソソームにおける ( 2 ) 及びプロスタソームにおける ( 1 3 ) その存在を意図することは、特に関心がある。プロスタソームは、不活性免疫系を制御する ( 1 4、1 5 ) とみなされ、さらに最近、前立腺癌の種々の段階と関連づけられている ( 5、1 6 )。

10

【 0 0 6 6 】

組織と尿の A N X A 3 の関連は、さらに、A N X A 3 の局在化及び放出の癌関連運動学を理解するのに役立つ。ここで促進された前立腺癌についてのマーカーとしての A N X A 3 の発見は、より一般的な合意を有することが可能であり、それというのも2つのごく最近の報告が、逆に卵巣明細胞癌 ( 1 7 ) 及び結腸直腸癌 ( 1 8、1 9 ) に関する研究と同一の相互関係のあるマーカーとして A N X A 3 を見出したからである。それゆえ、A N X A 3 放出が、上皮腺癌のための、一般的な癌関連の役割を果たす仮説は、さらなる関心に値する。

20

【 0 0 6 7 】

前立腺癌における独立した予後因子である A N X A 3 のための陰性染色は、最も重要な研究の結果を表す。A N X A 3 のための陰性染色は、根治的前立腺切除術後の進行の高いリスクを有する前立腺癌の生物学的に侵襲性の亜群を特徴付ける。結論として、A N X A 3 は、標準の予後パラメータと組み合わせた場合に、個々の患者における予後のより正確な予測を提供し、かつ従って今後の患者の管理に起因することを示唆している、見込みのある候補組織のマーカーを表す。

【 0 0 6 8 】

表：

【表 3】

30

|        |                 | 良性         |              | PIN        |              | PCA         |              | P       |
|--------|-----------------|------------|--------------|------------|--------------|-------------|--------------|---------|
|        |                 | n          | %            | n          | %            | n           | %            |         |
| 染色強度   | 陰性              | 0          | 0.0          | 0          | 0.0          | 431         | 27.1         | <0.0001 |
|        | 弱い              | 3          | 2.2          | 18         | 14.4         | 444         | 27.9         |         |
|        | 中程度             | 20         | 14.8         | 52         | 41.6         | 393         | 24.7         |         |
|        | 強い              | 112        | 83.0         | 55         | 44.0         | 324         | 20.3         |         |
|        | <b>n 合計 (%)</b> | <b>135</b> | <b>100.0</b> | <b>125</b> | <b>100.0</b> | <b>1592</b> | <b>100.0</b> |         |
| 染色パターン | 先端部             | 96         | 72.7         | 77         | 62.6         | 405         | 34.9         | <0.0001 |
|        | 散在性             | 36         | 27.3         | 46         | 37.4         | 756         | 65.1         |         |
|        | <b>n 合計 (%)</b> | <b>132</b> | <b>100.0</b> | <b>123</b> | <b>100.0</b> | <b>1161</b> | <b>100.0</b> |         |

40

【 0 0 6 9 】

第 1 表：良性、前癌 ( P I N ) 及び悪性の前立腺上皮における A N X A 染色

【表 4】

|     |         | 染色陰性 |      | 染色陽性 |      | 合計 n | 合計 % | p       |
|-----|---------|------|------|------|------|------|------|---------|
|     |         | n    | %    | n    | %    |      |      |         |
| PT  | 2       | 199  | 22.0 | 706  | 78.0 | 905  | 100  | <0.0001 |
|     | >=3     | 232  | 33.6 | 458  | 66.4 | 690  | 100  |         |
|     | 合計      |      |      |      |      | 1595 |      |         |
| GS  | <3+3    | 128  | 22.3 | 447  | 77.7 | 575  | 100  | <0.0001 |
|     | 3+4     | 208  | 27.1 | 559  | 72.9 | 767  | 100  |         |
|     | >=4+3   | 95   | 37.3 | 160  | 62.7 | 255  | 100  |         |
|     | 合計      |      |      |      |      | 1597 |      |         |
| PSA | <4      | 66   | 30.6 | 150  | 69.4 | 216  | 100  | 0.2878  |
|     | >=4>10  | 226  | 28.0 | 580  | 72.0 | 806  | 100  |         |
|     | >=10<20 |      |      |      |      |      |      |         |
|     | 0       | 99   | 25.6 | 287  | 74.4 | 386  | 100  |         |
|     | >20     | 36   | 22.5 | 124  | 77.5 | 160  | 100  |         |
|     | 合計      |      |      |      |      | 1568 |      |         |

10

【0070】

第2表：ANXA3染色と、pT段階、Gleasonスコア(GS)及びPSAとの相互関係

20

【表 5】

| リスク群 | ANXA3<br>状態 | PSA 再発無し |      | PSA 再発 |       | p       |
|------|-------------|----------|------|--------|-------|---------|
|      |             | n        | %    | n      | %     |         |
| 低い   | 陰性          | 65       | 95.6 | 3      | 4.4   | 1.00    |
|      | 陽性          | 226      | 95.4 | 11     | 4.6   |         |
| 中間   | 陰性          | 178      | 46.4 | 106    | 53.6  | <0.0001 |
|      | 陽性          | 492      | 77.1 | 146    | 22.9  |         |
| 高い   | 陰性          | 1        | 9.1  | 10     | 90.9  | 1.00    |
|      | 陽性          | 2        | 6.25 | 30     | 93.75 |         |

30

【0071】

第3表：ANXA3状態による生化学的再発率を示す進行のための低い、中間の及び高いリスクに患者を分類するリスク層別化

参考文献

1. W. Wozny *et al.*, *Proteomics*. **7**, 313 (2007).
2. T. Pisitkun, R. F. Shen, M. A. Knepper, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13368 (2004).
3. S. Keller, M. P. Sanderson, A. Stoeck, P. Altevogt, *Immunol. Lett.* **107**, 102 (2006). 10
4. Y. Yang *et al.*, *J Cancer Res. Clin. Oncol.* (2007).
5. M. Schostak, A. Schratzenholz, *submitted* (2007).
6. A. Larsson *et al.*, *Urol. Oncol.* **24**, 195 (2006).
7. M. Miyara, S. Sakaguchi, *Trends Mol. Med.* (2007). 20
8. G. Zhou, H. I. Levitsky, *J Immunol.* **178**, 2155 (2007).
9. A. W. Roddam *et al.*, *Eur. Urol.* **48**, 386 (2005).
10. A. Stamey *et al.*, *J Urol.* **172**, 1297 (2004). 30
11. M. Amin *et al.*, *Scand. J Urol. Nephrol. Suppl* 20 (2005).
12. J. I. Epstein *et al.*, *Scand. J Urol. Nephrol. Suppl* 34 (2005).
13. V. Gerke, C. E. Creutz, S. E. Moss, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 449 (2005).

14. F. G. Kravets *et al.*, *Prostate* **43**, 169 (2000).

15. J. Radons, G. Multhoff, *Exerc. Immunol. Rev.* **11**, 17 (2005).

16. N. E. Scharz, N. Chaput, F. Andre, L. Zitvogel, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **4**, 372 (2002).

17. A. J. Abusamra *et al.*, *Blood Cells Mol. Dis.* **35**, 169 (2005).

18. A. Morita *et al.*, *Proteomics.* (2006).

19. P. Alfonso *et al.*, *Proteomics.* **5**, 2602 (2005).

20. J. Madoz-Gurpide *et al.*, *Mol. Cell Proteomics.* **5**, 1471 (2006).

10

20

【 図 1 】

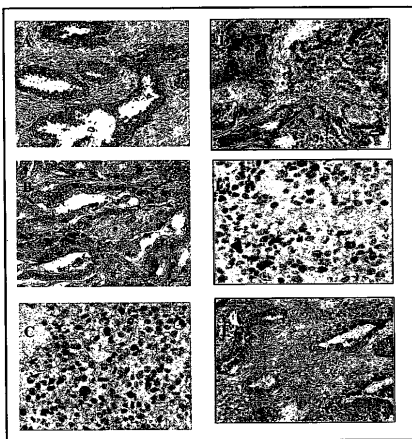
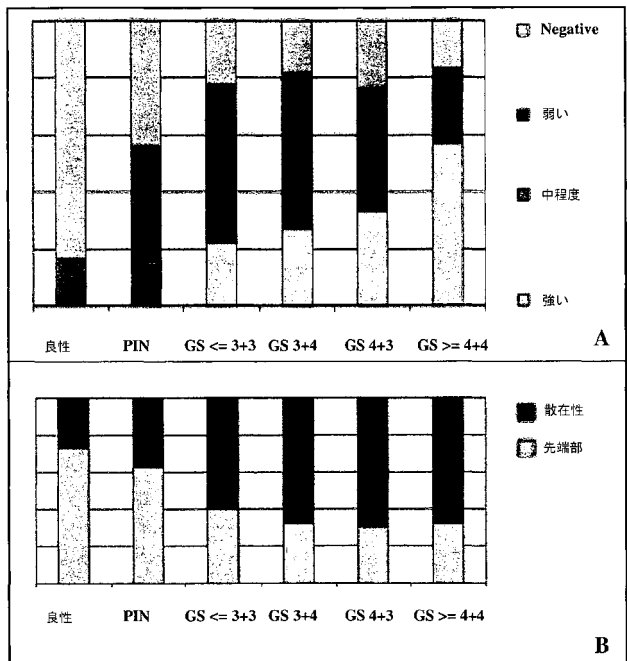
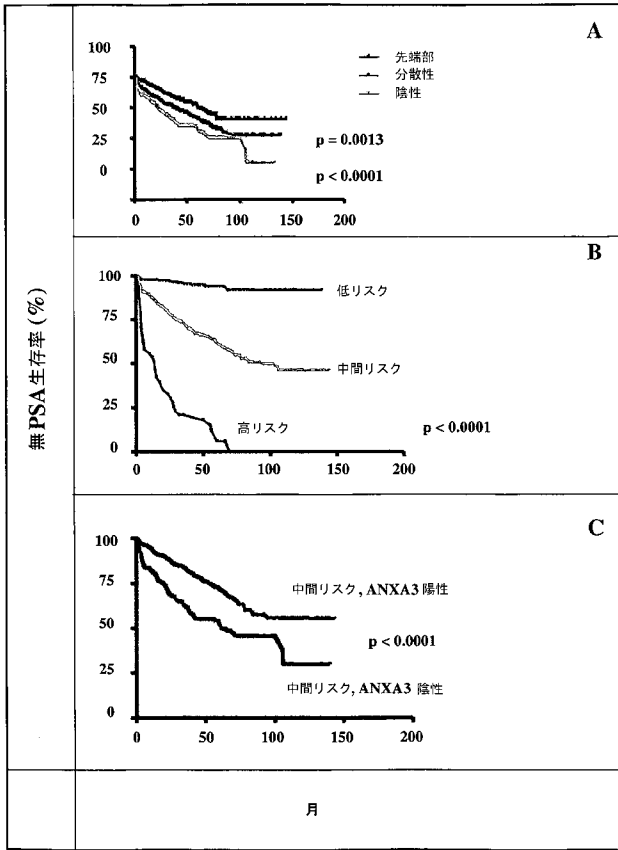


Fig. 1

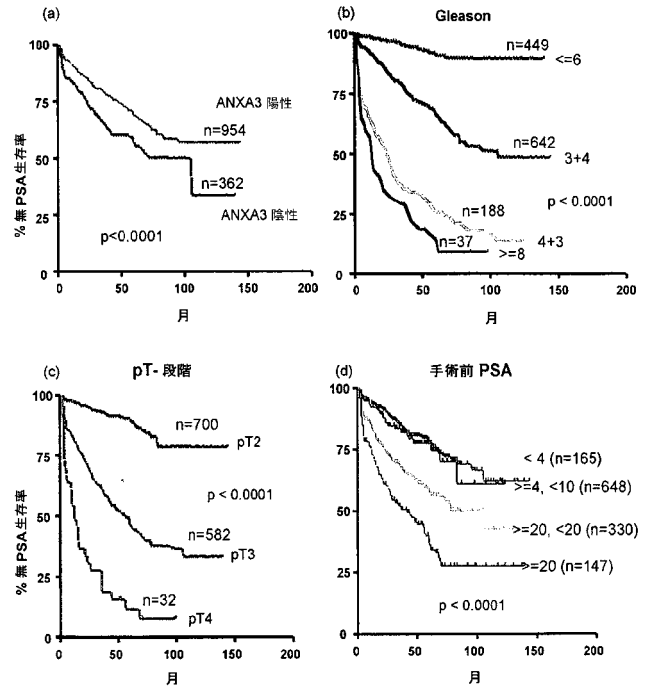
【 図 2 】



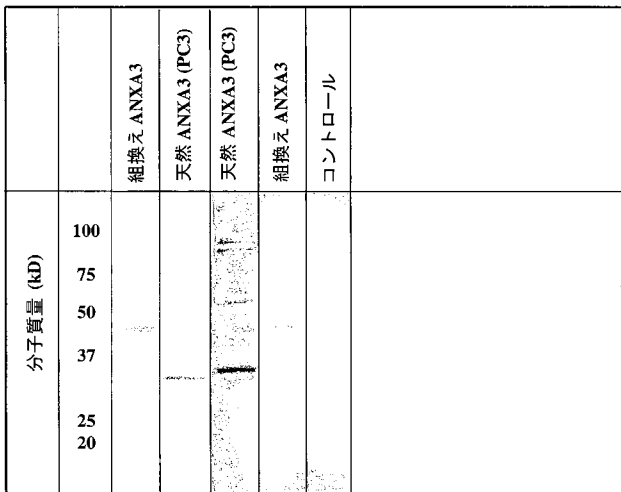
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/002802

|   |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. G01N33/574   |  |                       |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |                       |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>   |  |                       |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>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)<br>EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data                            |  |                       |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |                       |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| X   | WOZNY W ET AL: "Differential radioactive quantification of protein abundance ratios between benign and malignant prostate tissues: cancer association of annexin A3" PROTEOMICS, WILEY - VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 7, no. 2, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 313-322, XP002463512 ISSN: 1615-9853 abstract page 315, column 2, paragraph 1 page 320, column 2, paragraph 2<br>-----<br>-/- | 1-14,17               |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                             |  |                       |
| * Special categories of cited documents:  |  |                       |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |                       |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date  | *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |                       |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                 | *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  |                       |
| *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  | *Z* document member of the same patent family  |                       |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |                       |
| Date of the actual completion of the international search<br>3 July 2008  | Date of mailing of the international search report<br>28/07/2008   |                       |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer<br>Bigot-Maucher, Cora  |                       |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2008/002802

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| X  | MADOZ-GURPIDE J ET AL: "Proteomics-based validation of genomic data: applications in colorectal cancer diagnosis"<br>MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, ASBBM, BIRMINGHAM, AL, US,<br>vol. 5, no. 8, 29 May 2006 (2006-05-29),<br>pages 1471-1483, XP002463510<br>ISSN: 1535-9476<br>abstract<br>page 18, paragraph 2<br>page 24, paragraph 1         | 1-13                  |
| X  | EP 1 724 586 A (PROTEOSYS AG [DE])<br>22 November 2006 (2006-11-22)<br>abstract<br>page 6, paragraph 44; figures 1,2  | 1-13                  |
| A  | GERKE V MOSS S E: "Annexins and membrane dynamics"<br>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL,<br>vol. 1357, no. 2,<br>27 June 1997 (1997-06-27), pages 129-154,<br>XP004277613<br>ISSN: 0167-4889<br>abstract<br>page 142, column 1, paragraphs 2, FF - page 143, column 2, paragraph 1 | 1-20                  |
| A  | LI WEI-HUA ET AL: "Proteomics-based identification of autoantibodies in the sera of healthy Chinese individuals from Beijing."<br>PROTEOMICS SEP 2006,<br>vol. 6, no. 17, September 2006 (2006-09),<br>pages 4781-4789, XP002486843<br>ISSN: 1615-9853<br>the whole document  | 1-20                  |
| A  | DENZER K ET AL: "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device."<br>JOURNAL OF CELL SCIENCE OCT 2000,<br>vol. 113 Pt 19, October 2000 (2000-10),<br>pages 3365-3374, XP002486844<br>ISSN: 0021-9533<br>the whole document   | 1-20                  |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2008/002802

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| T  | <p>KÖLLERMANN, SCHLOMM, BANG, SCHWALL, EICHEL-STREIBER, SIMON, SCHOSTAK, HÜLAND, BERG, SAUTER, KLOCKER, SCHRATTENHOLZ:<br/> "Expression and Prognostic Relevance of Annexin A3 in Prostate Cancer"<br/> EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY, [Online] 16 January 2008 (2008-01-16), XP002486845<br/> Retrieved from the Internet:<br/> URL: <a href="http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&amp;_udi=B6X10-4RKVB7R-1&amp;_user=987766&amp;_rdoc=1&amp;_fmt=&amp;_orig=search&amp;_sort=d&amp;view=c&amp;_acct=C000049880&amp;_version=1&amp;_urlVersion=0&amp;_userid=987766&amp;md5=44907368a463166cb7b1a4619b2df91d">http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&amp;_udi=B6X10-4RKVB7R-1&amp;_user=987766&amp;_rdoc=1&amp;_fmt=&amp;_orig=search&amp;_sort=d&amp;view=c&amp;_acct=C000049880&amp;_version=1&amp;_urlVersion=0&amp;_userid=987766&amp;md5=44907368a463166cb7b1a4619b2df91d</a> [retrieved on 2008-07-03]<br/> the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1-20                  |

2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/002802

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| EP 1724586                             | A                | 22-11-2006              |                  |
|  |                  | AU 2006251380 A1        | 30-11-2006       |
|  |                  | CA 2608306 A1           | 30-11-2006       |
|  |                  | WO 2006125580 A1        | 30-11-2006       |
|  |                  | KR 20080016809 A        | 22-02-2008       |

## 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100110593

弁理士 杉本 博司

(74)代理人 100112793

弁理士 高橋 佳大

(74)代理人 100128679

弁理士 星 公弘

(74)代理人 100135633

弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100114890

弁理士 アイゼル・フェリックス＝ラインハルト

(72)発明者 アンドレ シュラッテンホルツ

ドイツ連邦共和国 マインツ ヒンター デア キルヒェ 43

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 膜联蛋白A3对前列腺癌的自身免疫控制                         |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2010523990A</a>              | 公开(公告)日 | 2010-07-15 |
| 申请号            | JP2010502455                               | 申请日     | 2008-04-09 |
| [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)    | Puroteoshisu股份公司                           |         |            |
| [标]发明人         | アンドレシュラッテンホルツ                              |         |            |
| 发明人            | アンドレ シュラッテンホルツ                             |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/574 G01N33/53                       |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/574 G01N2333/4718                   |         |            |
| FI分类号          | G01N33/574.A G01N33/53.N                   |         |            |
| 代理人(译)         | 矢野俊夫<br>杉本博司<br>星 公弘<br>二宮和也HiroshiYasushi |         |            |
| 优先权            | 60/911329 2007-04-12 US                    |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                  |         |            |

摘要(译)

本发明涉及诊断前列腺癌的方法，包括用特异性试剂测定膜联蛋白A3 (ANXA3) 和/或抗ANXA3的自身抗体。该方法允许区分良性，恶化前和恶性病症。此外，该方法具有预后相关性。

| スコア | 定義   |
|-----|--|
| 陰性  | Int 0  |
| 弱い  | 腫瘍細胞の $\leq 40\%$ で Int 1 又は<br>腫瘍細胞の $\leq 20\%$ で Int 2                                |
| 中程度 | 腫瘍細胞の $> 40\%$ で Int 1 又は<br>腫瘍細胞の $> 20 \leq 90\%$ で Int 2 又は<br>腫瘍細胞の $< 40\%$ で Int 3 |
| 強い  | 腫瘍細胞の $\geq 90\%$ で Int 2 又は<br>腫瘍細胞の $\geq 40\%$ で Int 3                                |