

(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2005-531301

(P2005-531301A)

(43) 公表日 平成17年10月20日(2005.10.20)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 31/4545</b>	A 6 1 K 31/4545	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 P 35/00</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 6 3
<b>C 1 2 N 15/09</b>	G O 1 N 33/53 Y	4 C 0 8 6
<b>G O 1 N 33/53</b>	C 1 2 N 15/00 A	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2004-509422 (P2004-509422)	(71) 出願人	504436745 ドルデラー, ユルゲン
(86) (22) 出願日	平成15年5月30日 (2003.5.30)		ドイツ国、65375 エストリヒーヴィンケル、ラインガウシュトラーセ136
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月27日 (2004.12.27)	(74) 代理人	100116838 弁理士 渡邊 潤三
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/005710	(72) 発明者	ドルデラー, ユルゲン
(87) 国際公開番号	W02003/102588		ドイツ国、65375 エストリヒーヴィンケル、ラインガウシュトラーセ136
(87) 国際公開日	平成15年12月11日 (2003.12.11)	Fターム(参考)	4B024 AA01 AA12 BA36 BA80 CA04 CA09 CA12 DA03 HA12 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ53 QQ79 QR07 QR08 QR62 QS25 4C063 AA01 BB03 CC12 DD10 EE01
(31) 優先権主張番号	102 24 534.7		
(32) 優先日	平成14年5月31日 (2002.5.31)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の診断剤、癌の検出方法、及び癌の治療手段

(57) 【要約】

ヒトの大腸または後腸の組織試料の中に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出することを特徴とする癌の診断剤及び癌の検出方法を開示する。さらに、抗不整脈剤E-4031を用いた結腸・直腸癌の治療方法を開示する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しないヒト組織又はリンパ節、あるいは体液を試料とし、該試料中に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出することを特徴とする、癌を検出するための診断剤。

## 【請求項 2】

健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しない組織又はリンパ節、あるいは体液を試料とし、該試料中に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出することを特徴とする、癌の診断方法。

## 【請求項 3】

ヒトの大腸又は後腸の組織又はリンパ節中に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出することで、結腸・直腸癌の診断を行うことを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

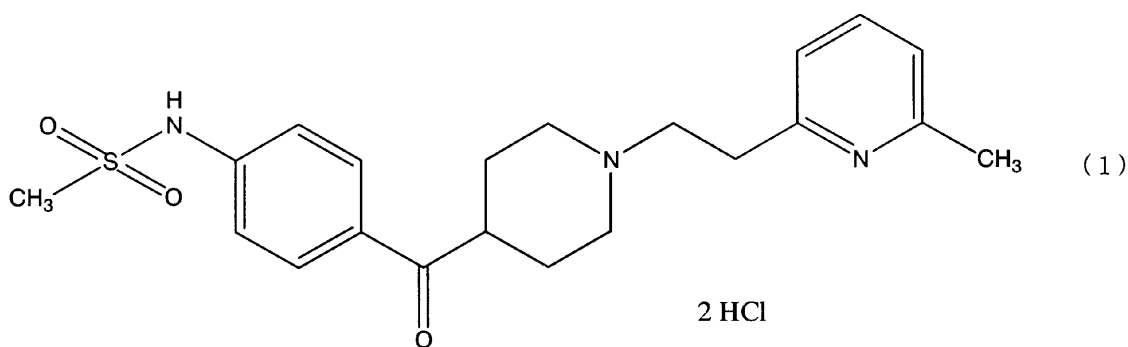
10

## 【請求項 4】

HERGカリウムチャンネルの存在によって確認した癌に対し、抗不整脈剤である式 1 で表される 1 - [ 2 - ( 6 - メチル - 2 - ピリジニル ) エチル - 4 - ピペリジニル ] カルボニル ] メタンサルホンアリニド , 2 H C l ( E - 4 0 3 1 ) を用いることを特徴とする治療方法。

## 【化 1】

20



30

## 【請求項 5】

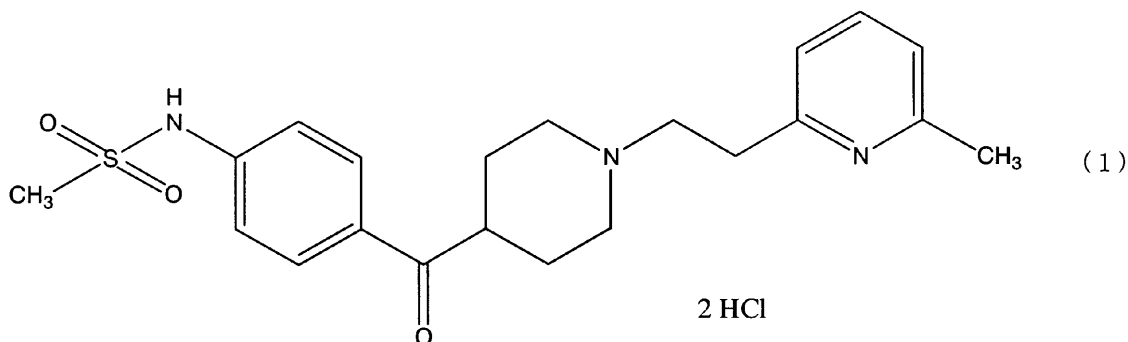
抗不整脈剤である式 1 で表される 1 - [ 2 - ( 6 - メチル - 2 - ピリジニル ) エチル - 4 - ピペリジニル ] カルボニル ] メタンサルホンアリニド , 2 H C l ( E - 4 0 3 1 ) を用いた、HERGカリウムチャンネルの存在によって確認した癌を治療するための薬剤の製造方法。

## 【請求項 6】

抗不整脈剤である式 1 で表される 1 - [ 2 - ( 6 - メチル - 2 - ピリジニル ) エチル - 4 - ピペリジニル ] カルボニル ] メタンサルホンアリニド , 2 H C l ( E - 4 0 3 1 ) を用いた、結腸・直腸癌の治療方法。

40

## 【化 2】



10

## 【請求項 7】

抗不整脈剤である式 1 で表される抗不整脈剤 1 - [ 2 - ( 6 - メチル - 2 - ピリジンニル ) エチル - 4 - ピペリジンニル ] カルボニル ] メタンスルホンアリニド , 2 H C l ( E - 4 0 3 1 ) を用いた、結腸・直腸癌を治療するための薬剤の製造方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、癌の診断剤、癌の検出方法、特にヒトの大腸または後腸組織に生ずる結腸・直腸癌（大腸癌）の検出方法、及び癌、特に結腸・直腸癌の治療手段に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

周知のように、癌はすべての国でますます問題となっている病気である。癌の治療と治療の成功は、特にその早期発見の方法にかかっている。したがって、信頼できる癌診断手段が強く求められている。特に、明らかな組織学上の所見がまだ得られていない場合や、組織学上の所見が陰性という結果になった場合でも、転移及び微小転移の検出を可能にする、信頼できる癌の診断手段が強く求められている。

30

## 【0003】

結腸・直腸癌は癌による死亡例の中で 2 番目に多く、その罹病中は絶えず進行し、その手術後もしばしば再発する。結腸・直腸癌（悪性の大腸・後腸腫瘍）は先進国では増え続け、男性では 2 番目、女性では 3 番目に多い癌である。結腸・直腸癌は悪性腫瘍の 15% を占め、年に 20 万人以上の新しい患者が発症し、そのうち 10 万人以上が死亡する。結腸・直腸癌は癌による死亡原因では 2 番目である。

## 【0004】

結腸・直腸癌は、*de novo* に、あるいは腺腫様ポリープから adenoma-carcinoma-sequence 説（アデノーマがカルチノーマに変わるという説）に基づいて発生する。腺腫が悪性になる確率は 1 ~ 40% である。この意味では、結腸・直腸ポリープを有する患者はリスクグループのひとつである。この理由から、腺腫であるうちに結腸・直腸癌を早期に発見すること、及び良性の結腸・直腸組織から癌化組織を確実に鑑別することは、特に予後診断と治療過程にとって決定的に重要である。

40

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

この種の癌の診断及び予後診断は、初診時に存在する多くの特性の影響を受ける。これ

50

らの特性として、年齢、性別、症状期間、腸閉塞の状態、腫瘍の局在部位、輸血の必要性、外科的介入の質などが挙げられる。これまでは確かに、脈管・リンパ腺浸潤、従来の腫瘍マーカーに基づく鑑別度及び手術前測定濃度など、多くの腫瘍特性が診断価値をもっていた。しかし、癌の初期段階（良性の結腸・直腸癌の前段階（腺腫）の変性）の発見のための適切なマーカーや、外科手術の後であっても癌の再発の原因となり得る、組織病理学的には検出困難な微小転移（微小残存病変）のための適切なマーカーは、これまで知られていない。これまでに使用されてきた腫瘍マーカーであるCEA、CK-19およびCK-20は、現在では予後診断方法を決定するための指針にはなるものの、鑑別診断において信頼できるものではない。

【課題を解決するための手段】

10

【0006】

したがって、本発明の課題は、任意に用いることができ信頼できる、癌の診断剤及び癌の検出方法、さらには、任意に用いることのできる癌を治療するための有効な手段を提供することである。下記の検出実験は結腸・直腸癌の場合を例にとり行ったが、それ以外の癌の診断と治療にも適用できる。

【0007】

上記課題の解決のために、本発明においては、組織から採った試料中のHERGカリウムチャンネルの有無を調べる。

【0008】

したがって、本発明の主題は、健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しないヒトの組織又は体液を試料とし、該試料中に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出することを特徴とする、癌の検出のための診断剤である。また、本発明のもう一つの主題は、健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しない組織又は体液を試料とし、該試料中に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出することを特徴とする、癌の診断方法である。

20

【0009】

本発明の診断方法によるHERGカリウムチャンネルの検出においては、健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しない組織またはリンパ節においてHERGカリウムチャンネルが検出された場合、癌の存在の確かなしるしとなる。これは、健常者ではHERGカリウムチャンネルが常に存在する心筋組織や脳組織には該当しない。しかし、たとえば、周知のごとく、健常者においてはHERGカリウムチャンネルが決して存在しない大腸組織や後腸組織の試料からHERGカリウムチャンネルが検出されれば、それは癌の存在を示す確実な証拠となる。

30

【0010】

HERGカリウムチャンネルの発見を目標とする癌検出は、通常はカリウムチャンネルが決して検出されることのない血液、血漿、血清、尿、汗又は涙液のような体液、あるいは便においてHERGカリウムチャンネルが検出される場合に、その信頼性が高い。

【0011】

本発明の癌の検出及び診断の例としては、ヒト大腸の組織の試料に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出し、結腸・直腸癌を診断することが挙げられる。

40

【0012】

診断のために、大腸または後腸の結腸組織試料を実験室で調べる。このとき結腸・直腸癌の細胞におけるHERGカリウムチャンネルの存在を調べる。HERGカリウムチャンネルは、高感度なRT-PCR方法によっても、病院でよく使う免疫組織化学法によっても検出することができる。HERGカリウムチャンネルは結腸・直腸癌に対して高い選択性を有する機能性の腫瘍マーカーであるため、診断法、特に癌の初期段階での発見、検出困難な微小転移の検知、及び健康な結腸・直腸組織からの癌の鑑別に使用できる。これは意外且つ価値ある結果である。

【0013】

Ether a go-go (EAG) 遺伝子のコードするカリウムチャンネルファミリーのサブユ

50

ニット、特に、ヒト E R G ( H E R G ) カリウムチャンネルのようなエストロゲン ( e a g ) 依存性 ( e a g - r e l a t e d - g e n e ; E R G ) 遺伝子産物は、診断に適していた。これらは組織発生の異なるいろいろな腫瘍細胞株に見出すことができ、細胞増殖と変異においてある役割を担うことが知られている。

【 0 0 1 4 】

逆転写酵素・ポリメラーゼ連鎖反応法 ( R T - P C R 法 ) は、微小な腫瘍に関連した m R N A の転写を検出するために非常に有効で感度の高い方法である。免疫組織化学法は、病院でよく用いられる、広く普及した方法であり、簡単に日常業務に組み入れることができる。

【 0 0 1 5 】

H E R G ( h u m a n e a g r e l a t e d g e n e ) カリウムチャンネルは、電位差により活性化されるカリウムチャンネルの e a g ( e t h e r a g o - g o ) ファミリーに属する特殊な型のヒトカリウムチャンネルである。種々な組織より発生した腫瘍細胞において、H E R G カリウムチャンネルは、調節メカニズムにおいて重要な病理生理学上の役割を演じていると考えられ、無制限な腫瘍増殖を引き起こす。

【 0 0 1 6 】

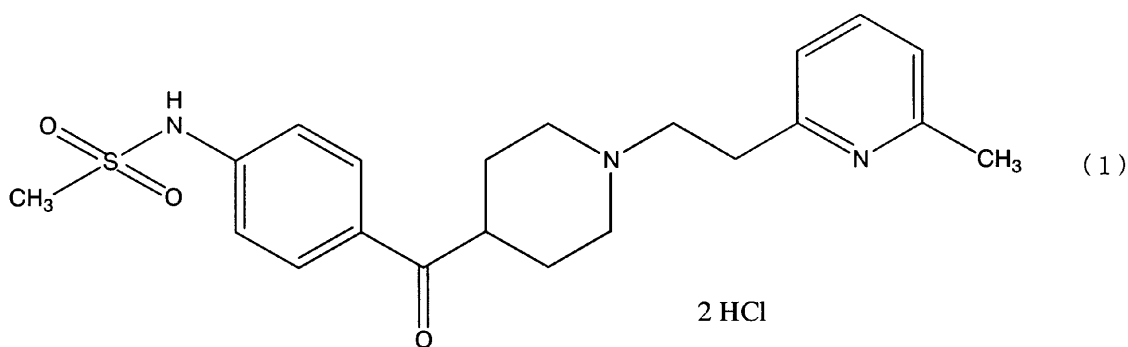
本発明では、結腸・直腸癌の細胞の治療に抗不整脈剤 E - 4 0 3 1 を用いることを提案する。これは、細胞増殖と癌成長に大きな役割を果たす機能性 H E R G カリウムチャンネルを選択的に抗不整脈剤 E - 4 0 3 1 によって阻害できるという価値ある認識に基づいている。これによって、癌治療の新しい試みが可能となる。

【 0 0 1 7 】

抗不整脈剤 E - 4 0 3 1 は、下記式 1 で表される 1 - [ 2 - ( 6 - メチル - 2 - ピリジニル ) エチル - 4 - ピペリジニル ] カルボニル ] メタンスルホンアリニド、2 H C l である。

【 0 0 1 8 】

【 化 1 】



【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 9 】

本発明は以下の実験と測定に基づくものである。

【 0 0 2 0 】

患者

U I C C 分類 I ~ I V の結腸・直腸癌患者 1 8 名 ( 女性 1 2 名と男性 6 名、年齢 5 1 ~ 8 6 歳、平均年齢 6 7 . 7 歳 ) から 2 4 の組織試料を採取し、検査した。5 例は結腸、4 例は S 字結腸、9 例は直腸に癌が局在した。クロスコンタミネーションを避けるために、組織試料を周囲の組織から隔離する際には、各組織試料につき新しいメスを使用した。

## 【0021】

結腸・直腸の腺腫癌の患者の臨床及び組織病理学上のUICC分類及びDukes分類は、以下の通りである：

ステージI           Dukes A : 3 ( p T 1 = 1、p T 2 = 2 )  
 ステージII           Dukes B : 5 ( p T 3 = 5、p T 4 = 0 )  
 ステージIII           Dukes C : 7 ( p N 1 = 4、p N 2 = 3 )  
 ステージIV           Dukes D : 3 ( p M 1 = 3 )

## 【0022】

患者7名(女性4名と男性3名、年齢60~68歳、平均年齢62.8歳)より得た、組織病理学的に陰性の結腸組織試料(このうち、3つの試料は結腸の腺管状腸絨毛腺腫であり、4つの試料はS字結腸憩室炎の組織である)を陰性の対照として用いた(表2)。 10

## 【0023】

組織病理学的診断、UICC分類、Dukes分類及びTNM分類は、標準条件下で行い、組織試料は切除後直ちに液体窒素で凍結し、RNA抽出まで-80で貯蔵した。

## 【0024】

細胞内全RNAの分離は、Qiagen Rneasy mini-kitを用いて製造元(ドイツ国、Hilden社)のマニュアルに従って凍結した組織試料を用いて行った。RNAの含有量と純度は、260nm及び280nmの波長による分光光度法で測定した。

## 【0025】

結腸・直腸の癌細胞株(Colo-250)は、この実験の感度を確認するための陽性の対照として用いた。 20

## 【0026】

逆転写

cDNAは、全RNA 2µgを含む反応混合物20µlで合成した。この反応混合物は、4µlの5×反応緩衝液(50mmol/LのTris-HCl(pH8.3)、75mmol/LのKCl及び3mmol/LのMgCl<sub>2</sub>)、500µmol/LのdNTP、100µmol/Lのpoly-dT15-Primer溶液(ドイツ国、マンハイム、Roche Diagnostics社製)、及び400UのSuperscript II(米国、メリーランド州、ガイサースバーグ、Gibco BRL社製)を含む。反応混合物は、42で60分間インキュベートし、90で2分間加熱し、それから氷上で冷却した。 30

## 【0027】

RT-PCR試験のプライマー配列

続いて行うRT-PCR試験において、次のプライマー配列を用いた。

## 【0028】

CEAのmRNAのプライマー配列としては、次のA、B及びCを用いた：

A : 5'-TCTGGAACCTTCTCCTGGTTCTCTCAGCTGG-3'(アウターセンスプライマー)；  
 B : 5'-TGTAGCTGTTGCRNAATGCTTTAAGGAAGAA-3'(アンチセンスプライマー)；  
 C : 5'-GGGCCACTGTCGGCATCATGATTGG-3'(インナーセンスプライマー)。

## 【0029】

CK-19のmRNAのプライマー配列としては、次のA、B及びCを用いた： 40

A : 5'-GTGGAGGTGGATTCCGCTCC-3'(アウターセンスプライマー)；  
 B : 5'-TGGCAATCTCCTGCTCCAG-3'(アウターアンチセンスプライマー)；  
 C : 5'-ATGGCCGAGCAGAACCGGAA-3'(インナーセンスプライマー)；  
 D : 5'-CCATGAGCCGCTGGTACTCC-3'(インナーアンチセンスプライマー)。

## 【0030】

CK-20のmRNAのプライマー配列としては、次のA、B、C及びDを用いた：

A : 5'-GCGTTTATGGGGTGCTGGAG-3'(アウターセンスプライマー)；  
 B : 5'-AAGGCTCTGGGAGGTGCGTCTC-3'(インナーセンスプライマー)；  
 C : 5'-CGGCGGGGACCTGTTTGT-3'(アウターアンチセンスプライマー)；  
 D : 5'-CAGTGTGCCAGATGCTTGTG-3'(インナーアンチセンスプライマー)。 50

## 【0031】

HERGのmRNAのプライマー配列としては、次のA及びBを用いた：

A：5'-AGCTGATCGGGCTGCTGAAGACTG-3' (アップ (up) プライマー)；

B：5'-AATGAGCATGACGCAGATGGAGAAG-3' (ダウン (down) プライマー)。

## 【0032】

抽出したRNAの純度を検査し、且つ、使用するRNAが等モル量であることを確かめるために、抽出したRNAについて、グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (GAPDH) mRNAをRT-PCRで定量した。GAPDHのmRNAのプライマー配列としては、5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' (センスプライマー) 及び5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAC C-3' (アンチセンスプライマー) を用いた。

10

## 【0033】

逆転写酵素・ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

2段階のRT-PCRを、CEA、CK-19およびCK-20及びHERGのcDNA増幅に用いた。

## 【0034】

PCRは、以下のように実施した。PCRは50µlの反応系で、1つの試料につき合計2µgのRNAを使用して実施した。1回目のPCRでは、2µlに分けた各cDNA溶液を、PCR反応混合液10.5µlと混合した。ただし、反応混合液は、1.25µlの10×PCR緩衝液 (10mmol/LのTris-HCl (pH 8.3)、50mmol/LのKCl及び1.5mmol/LのMgCl<sub>2</sub>)、200µmol/lのdNTP、0.5µmol/Lの各プライマー及び2.5UのPlatinum Taq Polymerase (米国、メリーランド州、ガイサースバーグ、Gibco BRL社製) を含むものである。

20

## 【0035】

PCRは、PCRサーモサイクラー (ドイツ国、ゲッチンゲン、Biometra社製) の中で継続した。CEA、CK-19及びCK-20の増幅には次の条件を適用した：Taq Polymeraseを95℃で4分間活性化し、95℃で45秒間DNAテンプレートを変性させ、60℃で45秒間アニーリングを行い、72℃で45秒間伸張反応を行うサイクルを20サイクル行った。HERGの増幅は、95℃で4分、55℃で1分、72℃で1分、95℃で1分のサイクルを30サイクル行った。最初のPCR産物の内2µlを第2のマイクロチューブに入れ、さらに増幅した (CEA、CK-19及びCK-20については95℃で4分、95℃で45秒、60℃で45秒、72℃で45秒のサイクルを20サイクル行い；HERGについては95℃で4分、55℃で1分、72℃で1分、95℃で1分のサイクルを30サイクル行った)。分注操作は全て氷上、無菌条件下で行い、その後、マイクロチューブを上記のサーモサイクラーに入れた。マイクロチューブは増幅を始める前に変成温度に加熱した。

30

## 【0036】

以下の増幅DNA断片が得られた：CEAプライマーペアに対し132塩基対 (bp) の断片、CK-19プライマーペアに対し328bpの断片、CK-20プライマーペアに対し485bpの断片、HERGのプライマーペアに対し386bpの断片。各組織試料について少なくとも2回実験を行った。

40

## 【0037】

cDNAの純度を測定するために、各cDNA断片について、603bpからなるGAPDH遺伝子の増幅を25サイクル行った (1サイクルは95℃で4分、95℃で45秒、60℃で45秒、72℃で45秒である)。

## 【0038】

PCR産物は、2%のアガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

## 【0039】

RT-PCR法の感度

結腸・直腸癌細胞株 (Colo-205) を陽性の対照として、上記実験の検出感度の検査に使用した。方法の感受性を求めるために、結腸・直腸癌細胞 (Colo-205)

50

の  $10^6$  から  $10^0$  までの希釈系列を作り、それらに健康な宿主由来のリンパ球を  $10^7$  加えた。全RNAを抽出した後、RT-PCRを行った。RNAの希釈系列を用いたことで、各プライマーが  $10^6$  個のリンパ球が存在する条件下でも、腫瘍細胞数に対応する量のmRNAを検出できることが示された。

【0040】

#### 免疫組織化学

結腸・直腸癌の組織と健康な結腸・直腸組織とを、緩衝化ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。各組織は、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した切片を用いて評価した。さらに組織切片は、免疫組織化学的検出に用いた。

【0041】

抗HERG抗体による免疫組織化学的所見には、ABC（アビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体）検出方法のプロトコルを用いた。

【0042】

切片をスライドガラスに貼り付け、1晩37℃で空気乾燥した後、キシレンを用いてパラフィンを除去し、アルコール濃度を段階的に下げながら復元した。切片を19mlのリン酸緩衝液、1mlのメタノール、200μlの30%  $H_2O_2$  からなる溶液に10分間浸漬することにより、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。続いて10分間のPBS洗浄を6回行った。

【0043】

非特異的な抗体結合を減らすために、切片をヤギの標準血清で予めインキュベートした。

【0044】

その後、500倍に希釈したウサギ抗ERG1一次抗体ERG1（HERG）（AB5222 - 200UL；米国、カリフォルニア州、テメクラ、Chemicon社製）を用いて4℃で1時間インキュベートした。PBSで3回洗浄した後、切片を200倍に希釈したビオチン化抗ウサギ抗体（Vector Laboratories社製）を用いて25℃で1時間インキュベートした。続いてPBSで3回洗浄した。その後ABC複合体（Vector Laboratories社製）を用いて25℃で1時間インキュベートした。数回洗浄した後、1次抗体を視覚化するために、切片を3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩（DAB）（Sigma社製）を用い、標準プロトコルに従い（0.1Mリン酸緩衝液の0.3%  $H_2O_2$  溶液に0.05%のDABを添加したものをを用い）25℃で3分間処理した。

【0045】

切片の色調を顕微鏡で観察した。染色反応はPBSで洗浄して停止した。

【0046】

抗体反応が陽性であるときは、該当する組織域は均一に褐色に染まる。

【0047】

免疫組織化学的処理の後、切片は1晩乾燥し、次いで脱水し、カバーガラスをかけた。

【0048】

陰性対照：1次抗体を用いる以外は上記と同様のプロセスを実施した。

陽性対照：抗ERG1（Her g）抗体を用いる実験を、ヒト心臓の切片で行った。

【0049】

#### E-4031を含む結腸・直腸癌細胞株Colo-205の増殖試験

増殖試験は、3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムプロマイド（MTT）試験で行った。結腸・直腸癌細胞株Colo-205の細胞は0.05%のEDTAで調製し、続いてその数を正確に数えた。次に細胞を96穴プレートの中に、細胞数がウエル当たり  $10^4$  個となるように蒔き、24時間放置して固着させた。24時間後、E-4031を1μM、5μM、10μM含む溶液で培地交換を行った。各ウエルの終濃度を200μMとした。0~7日間インキュベートした後、200μlのMTT（5mg/ml PBS溶液）を加え、37℃で2時間インキュベートした。それから溶液を取り除き、100μlのジメチルスルホキシド（ドイツ国、

10

20

30

40

50

Sigma社製)を10分かけて各ウエルに加えた。

【0050】

96穴マイクロプレートリーダー(ドイツ国、Comtek社製)で評価した。MTT試験は570nmオングストロームの波長でELISAマイクロプレートリーダーで読取った。平均濃度は5ウエルを一まとめにして測定した。

【0051】

未処理の対照ウエルの吸光度を100%と仮定して、 $IC_{50}$ を算出した。

【0052】

#### 統計的評価

$P < 0.05$ の差異を有意差とした。

10

【0053】

#### RT-PCRの結果

CEA、CK-19、CK-20について、癌組織及び対照組織、並びに結腸・直腸細胞株Colo-205で試験した。HERGの発現は100%ではなく、癌組織とColo-205細胞に限られた。図1及び表1に示したように、組織病理学試験において明らかに結腸・直腸癌を示す組織試料は、すべてのマーカー(CEA、CK-19、CK-20及びHERG)を発現していた。悪性病巣のない患者の結腸・直腸組織はCEA、CK-19及び/又はCK-20を発現していたが、HERGは検出できなかった(表2)。逆転写酵素を使わずにRT-PCRを行った時には、細胞株Colo-205にバンドパターンは検出できなかった。これはDNAが存在しないことを示すものであり、それ故RT-PCRの条件は非常によく調整されていることを意味する。

20

【0054】

図1においては、レーン1とレーン15に100bpのバンドを含む対照パターンを示した。レーン2には、すべての試料で陽性である対照のGAPDHを示した。レーン3~6は、S字結腸憩室炎を有する1人の患者(表2の患者No.6)の組織試料に関する結果、レーン7~10は、腺管絨毛結腸腺腫を有する1人の患者(表2の患者No.1)の組織試料に関する結果である。レーン11~14に見られるバンドパターンは、結腸・直腸癌を有する1人の患者(表1の患者No.3)の組織試料に関する結果である。DNA断片は2%アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

【0055】

表1にまとめたように、検査した18人の患者の結腸・直腸癌から得た24の試料のうち、CEAは22の試料(91.7%)、CK-19は19の試料(79.2%)、CK-20は23の試料(95.8%)で検出され、HERGは全ての試料(100%)で検出することができた。

30

【0056】

患者No.2におけるCK-19及びCK-20の発現以外は、同一の患者(患者No.4、6、7、8と9)から得た異なる組織試料のすべてにおいて、mRNAの発現結果に違いは見られなかった(表1)。

【0057】

【表 1】

RT-PCRを用いた、結腸・直腸癌における腫瘍マーカーCEA、CK-19、  
CK-20及びHERGのmRNA発現の検出

患者番号	GAPDH	CEA	CK-19	CK-20	HERG	ステージ-TNM分類	局在部位	
1	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	III - T4,N1(2/10),M0	S字結腸	10
2a	陽性	陽性	陰性	陰性	陽性	III - T3,N1(1/9),M0	結腸	
2b	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性			
3	陽性	陽性	陰性	陽性	陽性	II - T3,N0(0/15),M0	結腸	
4a	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	IV - T3,N2(25/27),M1	直腸	
4b	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性			
5	陽性	陰性	陽性	陽性	陽性	I - T2,N0(0/6),M0	S字結腸	
6a	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	IV - T3,N2(11/20),M1	直腸	20
6b	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性			
7a	陽性	陽性	陰性	陽性	陽性	III - T2,N1(2/12),M0	直腸	
7b	陽性	陽性	陰性	陽性	陽性			
8a	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	III - T3,N1(1/35),M0	結腸	
8b	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性			
9a	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	III - T3,N2(21/27),M0	直腸	
9b	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性			
10	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	I - T2,N0(0/10),M0	直腸	30
11	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	II - T3,N0(0/4),M0	結腸	
12	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	IV - T3,N2(6/16),M1	S字結腸	
13	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	II - T3,N0(0/7),M0	直腸	
14	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	II - T3,N0(0/13),M0	結腸	
15	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	III - T3,N2(6/11),M0	直腸	40
16	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	I - T1,N0(0/16),M0	S字結腸	
17	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	III - T3,N2(6/36),M0	直腸	
18	陽性	陰性	陰性	陽性	陽性	II - T3,N0(0/16),M0	直腸	

## 【0058】

結腸・直腸癌のグレード（組織病理学上の識別度）は、患者No. 1（G2～3）、患者No. 4（G3）、患者No. 9（G2～3）の組織試料を除く全ての組織試料でG2 50

であった。

【0059】

結腸の腺管絨毛腺腫を有する患者3名とS字結腸憩室炎を有する患者4名の組織試料を陰性対照として使用したが、その組織病理学的に陰性な結腸・直腸組織試料のいずれにも(0%)、HERGのmRNAは検出されなかった(図1と表2)。

【0060】

腫瘍マーカーCEA、CK-19及びCK-20のmRNAは、結腸腺腫を罹患しているすべての患者(100%)で陽性であった。S字結腸憩室炎を罹患している患者の組織試料では、腫瘍マーカーCEA、CK-19及びCK-20のmRNAは2人の患者(50%)で陽性であった。

【0061】

【表2】

RT-PCRを用いた、組織病理学的に陰性の組織における腫瘍マーカーCEA、CK-19、CK-20及びHERGのmRNA発現の検出

患者番号	GAPDH	CEA	CK-19	CK-20	HERG	組織学的分類	局在部位
1	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	腺管絨毛腺腫	結腸
2	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	腺管絨毛腺腫	結腸
3	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	腺管絨毛腺腫	結腸
4	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	S字結腸憩室炎	S字結腸
5	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	S字結腸憩室炎	S字結腸
6	陽性	陰性	陽性	陽性	陰性	S字結腸憩室炎	S字結腸
7	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	S字結腸憩室炎	S字結腸

【0062】

免疫組織化学的検出の結果

抗ERG1(HERG)抗体による免疫組織化学的検出の結果、結腸・直腸癌のすべての試料において、当該の悪性に変性した組織(腺)部分の染色で示される免疫組織化学的に陽性の反応が顕著になった(表3)。

【0063】

免疫反応性は、上皮細胞の細胞質の塩基性の部分に限られた(図3と4)。上皮細胞の他に粘膜と血管(血液細胞)に汎発性反応が見られた。さらに、筋肉層には孤立した、詳細な特徴が不明な細胞も存在する。

【0064】

同じ腫瘍患者より得られる、部分切除後の組織病理学的に陰性な残存腸部分は、大抵の組織試料で免疫組織化学的にも陰性であった。しかし、免疫組織化学的に陽性な組織試料

においては、部分切除後の組織病理学的に陰性な残存腸部分の腺基質の塩基性上皮細胞に弱いけれども明らかな陽性な免疫反応が見られた(図6)。患者のいくつかの代表例においては、結腸・直腸癌の切除後2年以内に癌の局所的再発が認められた(表3の患者No. 19~25)。

【0065】

組織病理学的には癌の確認が困難な組織においても、高感度で確実にHERGを検出し、更に微小転移も証明できるので、HERGは信頼性の高い腫瘍マーカーである。

【0066】

組織病理学的に陰性である良性の腸腫瘍(S字結腸憩室炎、結腸・直腸腺腫)の結腸・直腸組織試料及び健康な結腸・直腸組織試料(健康な腸粘膜)は、どのような場合でも変色することはなかった。したがって、いずれも免疫組織化学的に陰性反応を示した(表4と図5)。

【0067】

【表3】

同じ癌患者の、結腸・直腸癌組織及び、組織病理学的には陰性である残りの結腸・直腸組織における、免疫組織化学的検査の結果(患者No. 1~25の中には、PCR分析に用いた患者No. 1~18が含まれる)

患者番号	癌組織	部分切除後の、組織病理学的に陰性の残存腸部分
1~18	陽性	陰性
19~25	陽性	陽性

【0068】

【表4】

組織病理学的に陰性な組織の免疫組織化学検出の結果(患者No. 1~25の中には、PCR分析に用いた患者No. 1~7が含まれる)

患者番号	健康な腸粘膜
1~6	陰性
	S字結腸憩室炎
7~18	陰性
	結腸・直腸腺腫
19~25	陰性

【0069】

増殖試験の結果

図2は、HERGカリウムチャンネルの選択的阻害剤であるE-4031による結腸・直腸癌細胞株の増殖阻害を示す。

## 【0070】

E-4031を3つの異なる濃度(1、5、10 $\mu$ M)で細胞に与え、その後5日に渡る結腸・直腸癌細胞の増殖を測定した。癌細胞の増殖はいずれの濃度のE-4031の場合も、癌の増殖にとって重要なカリウムチャンネルの阻害によって抑制され、細胞は壊死した。

## 【0071】

本発明により、発癌性(悪性)組織を非発癌性(良性)の組織から確実に区別し、その結果、発癌性組織を検出することが可能な腫瘍マーカーを見出すことができた。さらに、この腫瘍マーカーは組織病理学的には癌の検出ができない組織においても発癌性の腫瘍細胞を検出することができる。これは、結腸・直腸腺腫における癌細胞の確実な早期発見、組織及びリンパ腺における組織病理学的には検出できない微小転移の確実な認知、治療経過及び予後診断にとって大きな意味をもつ。

10

## 【0072】

CEAは上述のようなマーカーには適していない。というのは、CEAのmRNAは、ステージIの結腸・直腸癌では検出されないが、腺管絨毛・結腸腺腫の全ての組織試料及び陰性の対照として用いるS字結腸憩室炎の2つの試料で検出されたからである。上記の結果と同様に、Bhatnagar et al.は、定量的な酵素免疫測定法と免疫細胞化学とを用いて、正常組織又は正常組織と極めて区別困難な結腸・直腸腫瘍にはCEAは全く存在しないことを示した。Boucher et al.は、CEAは結腸の腺癌のみならず、結腸の腺癌に隣接する健康な粘膜組織にも存在することを示した。

20

## 【0073】

CK-19とCK-20は、血清のみならず結腸・直腸組織においても確実な腫瘍マーカーではない。CK-19とCK-20は、ステージIIIまで進行した癌では検出されないが、一部の対照組織で検出される。これは、CK-19とCK-20は健康な腸粘膜にも見つかるが、いくつかの腫瘍では見つからないというかつての観察結果を実証するものである。区別の容易な腫瘍細胞と細胞増殖能の低い軽度の異形成におけるCK-19の大量発現、区別の困難な腫瘍組織と細胞増殖能の高い重度の異形成におけるCK-19の少量発現、及び健康な結腸組織と比べて比結腸直腸癌におけるCK-20の発現が少量であることから、ステージIIIの陰性腫瘍試料は高い増殖状態にあると推測される。さらに、患者No.2(表1)の組織試料間の矛盾する結果は、マーカーが腫瘍に均一に分布していないことを示す。

30

## 【0074】

CEA、CK-19及びCK-20の結果に反して、HERGの発現は、腫瘍のステージに関係なく、すべての結腸・直腸癌に選択的に存在し、各対照組織で陰性であった。この結果は、PCR法によるHERGのRNAの検出によって分子生物学的に証明され、また、結腸・直腸癌細胞に対して選択的なHERGタンパク質の検出によって免疫組織化学的にも証明された。

## 【0075】

腫瘍患者の、部分切除後の組織病理学的に陰性の残存腸部分において、HERGの免疫組織化学的に陽性反応が認められた。これらの患者には、癌の切除後2年の間に、結腸・直腸癌の局所的な再発がみられた。これは、組織病理学的には確認が困難な結腸・直腸組織における微小転移を示すものである。

40

## 【0076】

通常の方法ではあるが、互いに関連性のない、検出感度の高い2つの方法を組み合わせることでHERGを検出することより、検出の質と確実性を高めることができる。

## 【0077】

したがって、HERGカリウムチャンネルは、結腸・直腸組織に対して高い選択性を示す腫瘍マーカーである。

## 【0078】

HERGカリウムチャンネルは、子宮粘膜癌にも存在するので、他の上皮性癌に対する

50

貴重なマーカーでもある。上記のデータは、最近の *in vitro* の研究に基づいて推測された、HERGカリウムチャンネルを含むEAGカリウムチャンネルが癌発生に大きく係るという知見を裏付けるものである。このカリウムチャンネルはいくつかの腫瘍細胞系において見出されたが、そのような腫瘍細胞系は、哺乳動物由来の癌化細胞に特徴的な癌細胞の表現型を表し、免疫を抑制したマウスにおける腫瘍増殖を促進するものである。カリウムチャンネルは腫瘍の成長及び/又は腫瘍の残存に非常に重要であるため、増殖試験においては、E-4031がHERGカリウムチャンネルを選択的に阻害することによって腫瘍細胞は壊死に至ることが証明された。したがって、HERGカリウムチャンネルは、結腸・直腸癌の機能的腫瘍マーカーとして、選択的腫瘍マーカーであるだけでなく、E-4031による選択的抑制により癌治療のための新しい試みを可能にするものである。

10

## 【0079】

本発明の意外且つ価値のある知見は次のようにまとめられる。結腸・直腸癌細胞の確実な診断は2つの互いに無関係な試験方法(免疫組織学とPCR)によって選択的にHERG遺伝子を検出することによって可能となる。この方法においては、HERGカリウムチャンネルを新規な高度に選択的なマーカーとして検出し、また、腫瘍細胞の増殖は抗不整脈剤E-4031によって抑制することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0080】

【図1】健康な結腸組織、腺管絨毛結腸腺腫及び結腸・直腸癌における、CEA、CK-19、CK-20及びHERGのmRNA発現をRT-PCRで検出した結果である。

20

【図2】HERG抑止剤E-4031の存在下における、Colo-205細胞の増殖を示したものである。

【図3】抗ERG1(HERG)抗体による免疫組織化学的に陽性な反応を示す結腸・直腸癌の1例を示したものである。

【図4】抗ERG1(HERG)抗体による免疫組織化学的に陽性な反応を示す結腸・直腸癌の他の1例を示したものである。

【図5】免疫組織化学的に陰性な反応を示す健康な組織を示したものである。

【図6】後に局所的な癌の再発を患う腫瘍患者の部分切除後の腸の残存部分であって、組織病理学的には確認困難であるが、免疫組織化学的には陽性反応を示す組織を示したものである。

30

## 【配列表フリーテキスト】

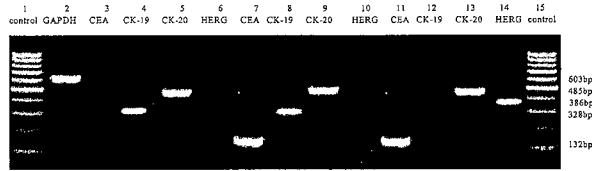
## 【0081】

配列番号1	合成配列に関する記載:	CEA mRNAのプライマー配列
配列番号2	合成配列に関する記載:	CEA mRNAのプライマー配列
配列番号3	合成配列に関する記載:	CEA mRNAのプライマー配列
配列番号4	合成配列に関する記載:	CK-19 mRNAのプライマー配列
配列番号5	合成配列に関する記載:	CK-19 mRNAのプライマー配列
配列番号6	合成配列に関する記載:	CK-19 mRNAのプライマー配列
配列番号7	合成配列に関する記載:	CK-19 mRNAのプライマー配列
配列番号8	合成配列に関する記載:	CK-20 mRNAのプライマー配列
配列番号9	合成配列に関する記載:	CK-20 mRNAのプライマー配列
配列番号10	合成配列に関する記載:	CK-20 mRNAのプライマー配列
配列番号11	合成配列に関する記載:	CK-20 mRNAのプライマー配列
配列番号12	合成配列に関する記載:	HERG mRNAのプライマー配列
配列番号13	合成配列に関する記載:	HERG mRNAのプライマー配列
配列番号14	合成配列に関する記載:	GAPDH mRNAのプライマー配列
配列番号15	合成配列に関する記載:	GAPDH mRNAのプライマー配列

40

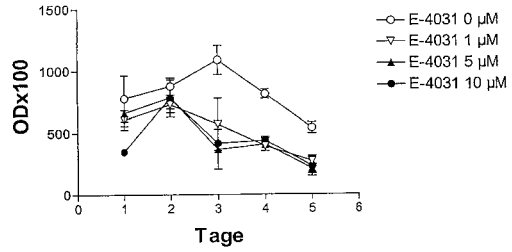
【 図 1 】

健康な結腸組織、腺管絨毛結腸腺腫及び結腸・直腸癌における、CEA、CK-19、CK-20及びHERGのmRNA発現をRT-PCRで検出した結果



【 図 2 】

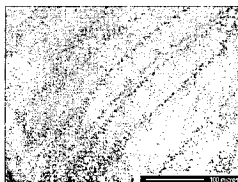
HERG抑制剤E-4031の存在下におけるColo-205細胞の増殖  
(初めに、各ウエルに1000個の細胞を播く)



結腸・直腸癌細胞株C o l o - 2 0 5細胞における、HERGカリウムチャンネルに対する選択的阻害剤であるE-4031による増殖抑制

【 図 3 】

抗ERG1 (HERG) 抗体による免疫組織化学的に陽性な反応を示す結腸・直腸癌



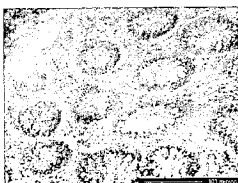
【 図 5 】

免疫組織化学的に陰性な反応を示す健康な組織



【 図 4 】

抗ERG1 (HERG) 抗体による免疫組織化学的に陽性な反応を示す結腸・直腸癌



【 図 6 】

後に局所的な癌の再発を患う腫瘍患者の部分切除後の腸の残存部分であって、組織病理学的には確認困難であるが、免疫組織化学的には陽性反応を示す組織



## 【配列表】

2005531301000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成16年4月30日(2004.4.30)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しないヒトの大腸又は後腸の組織又はリンパ節、あるいは体液を試料とし、該試料中に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出することを特徴とする、結腸・直腸癌を検出するための診断剤。

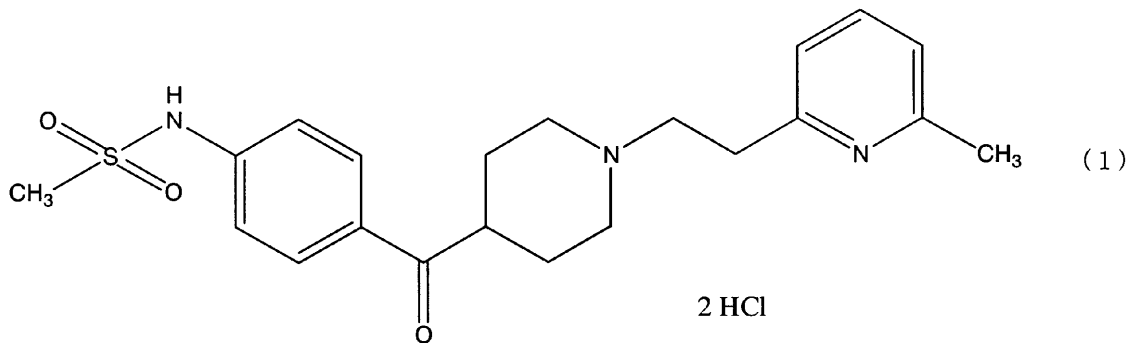
## 【請求項2】

健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しないヒトの大腸又は後腸の組織又はリンパ節、あるいは体液を試料とし、該試料中に少なくとも1つのHERGカリウムカリウムチャンネルを検出することを特徴とする、結腸・直腸癌の診断方法。

## 【請求項3】

抗不整脈剤である式1で表される1-[2-(6-メチル-2-ピリジンニル)エチル-4-ピペリジンニル]カルボニル]メタンスルホンアリニド、2HCl(E-4031)を用いた、結腸・直腸癌の治療方法。

## 【化1】



## 【請求項4】

抗不整脈剤である式1で表される抗不整脈剤1-[2-(6-メチル-2-ピリジンニル)エチル-4-ピペリジンニル]カルボニル]メタンスルホンアリニド、2HCl(E-4031)を用いた、結腸・直腸癌を治療するための薬剤の製造方法。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0006】

したがって、本発明の課題は、任意に用いることができ信頼できる、結腸・直腸癌の診断剤及び結腸・直腸癌の検出方法、さらには、任意に用いることのできる結腸・直腸癌

を治療するための有効な手段を提供することである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

上記課題の解決のために、本発明においては、ヒトの大腸又は後腸の組織から採った試料中のHERGカリウムチャンネルの有無を調べる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

したがって、本発明の主題は、健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しないヒトの大腸又は後腸の組織又は体液を試料とし、該試料中に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出することを特徴とする、結腸・直腸癌の検出のための診断剤である。また、本発明のもう一つの主題は、健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しないヒトの大腸又は後腸の組織又はリンパ節、あるいは体液を試料とし、該試料中に少なくとも1つのHERGカリウムチャンネルを検出することを特徴とする、結腸・直腸癌の診断方法である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

本発明の診断方法によるHERGカリウムチャンネルの検出においては、健常者ではHERGカリウムチャンネルが存在しないヒトの大腸又は後腸の組織又はリンパ節、あるいは体液においてHERGカリウムチャンネルが検出された場合、結腸・直腸癌の存在の確かなしるしとなる。これは、健常者ではHERGカリウムチャンネルが常に存在する心筋組織や脳組織には該当しない。しかし、たとえば、周知のごとく、健常者においてはHERGカリウムチャンネルが決して存在しない大腸組織や後腸組織の試料からHERGカリウムチャンネルが検出されれば、それは癌の存在を示す確実な証拠となる。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Classification No PCT/EP 03/05710
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/574 C12Q1/68 A61K31/44		
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) IPC 7 G01N C12Q A61K		
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) BIOSIS, EPO-Internal		
<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	SMITH GARTH A M ET AL: "Functional up-regulation of HERG K+ channels in neoplastic hematopoietic cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 21, 24 May 2002 (2002-05-24), pages 18528-18534, XP002260223 ISSN: 0021-9258 the whole document	1,2,4,5
X	WO 00 22001 A (SANOFI SYNTHELABO ;AVENET PATRICK (FR); RENARD STEPHANE (FR)) 20 April 2000 (2000-04-20) the whole document	1,2
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 November 2003		20/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Schwachtgen, J-L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/05710

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 54463 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;SANCHEZ PEREZ ARACELI (DE); BECKH SYNNOEV) 28 October 1999 (1999-10-28) the whole document -----	1,2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/05710

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

**Remark on Protest**

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 03/05710

## Continuation of I.1

Although Claims 1-3 relate to a diagnostic method practiced on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged properties of the compound or composition.

Although Claims 4 and 6 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/05710

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0022001	A	20-04-2000	EP 1002863 A1 24-05-2000
			AU 2536700 A 01-05-2000
			WO 0022001 A2 20-04-2000
WO 9954463	A	28-10-1999	CA 2323571 A1 28-10-1999
			WO 9954463 A2 28-10-1999
			EP 1073738 A2 07-02-2001
			JP 2002512029 T 23-04-2002
			US 2003087377 A1 08-05-2003
			US 2003092120 A1 15-05-2003
			US 2003077735 A1 24-04-2003
			US 2003087378 A1 08-05-2003

## INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

 Internationales Kennzeichen  
 PCT/EP 03/05710

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 G01N33/574 C12Q1/68 A61K31/44		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RESEARCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchiertes Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N C12Q A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, EPO-Internal		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SMITH GARTH A M ET AL: "Functional up-regulation of HERG K+ channels in neoplastic hematopoietic cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 277, Nr. 21, 24. Mai 2002 (2002-05-24), Seiten 18528-18534, XP002260223 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1, 2, 4, 5
X	WO 00 22001 A (SANOFI SYNTHELABO ; AVENET PATRICK (FR); RENARD STEPHANE (FR)) 20. April 2000 (2000-04-20) das ganze Dokument	1, 2
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 4. November 2003		Absperredatum des internationalen Recherchenberichts 20/11/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Bevollmächtigter Bediensteter Schwachtgen, J-L

## INTERNATIONALE FORSCHENBERICHT

Internationales Patentsymbol  
PCT/EP 03/05710

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 54463 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; SANCHEZ PEREZ ARACELI (DE); BECKH SYNNOEV) 28. Oktober 1999 (1999-10-28) das ganze Dokument -----	1,2

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen  
 PCT/EP 03/05710

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03 05710

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 1-3 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Obwohl die Ansprüche 4 und 6 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

## INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Patentzeichen

PCT/EP 03/05710

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0022001 A	20-04-2000	EP 1002863 A1	24-05-2000
		AU 2536700 A	01-05-2000
		WO 0022001 A2	20-04-2000
WO 9954463 A	28-10-1999	CA 2323571 A1	28-10-1999
		WO 9954463 A2	28-10-1999
		EP 1073738 A2	07-02-2001
		JP 2002512029 T	23-04-2002
		US 2003087377 A1	08-05-2003
		US 2003092120 A1	15-05-2003
		US 2003077735 A1	24-04-2003
		US 2003087378 A1	08-05-2003

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

// C 0 7 D 401/06

C 0 7 D 401/06

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC21 GA07 GA08 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZB26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005531301A5</a>	公开(公告)日	2006-06-15
申请号	JP2004509422	申请日	2003-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	美元德拉过尤尔根		
申请(专利权)人(译)	Dorudera , 尤尔根		
[标]发明人	ドルデラーユルゲン		
发明人	ドルデラー,ユルゲン		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K31/4545 A61P35/00 G01N33/53 C12N15/09 C07D401/06		
CPC分类号	A61K31/4545 A61P35/00 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/136 G01N33/57419		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K31/4545 A61P35/00 G01N33/53.Y C12N15/00.A C07D401/06		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4C063/AA01 4C063/BB03 4C063/CC12 4C063/DD10 4C063/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC21 4C086/GA07 4C086/GA08 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZB26		
优先权	10224534 2002-05-31 DE		
其他公开文献	JP2005531301A JP4328291B2		

#### 摘要(译)

公开了一种用于检测具有至少一个HERG钾离子通道的大肠癌的方法，其中在人类颜色或直肠的组织活检中检测到至少一个HERG钾通道。另外，公开了一种用于在需要所述治疗的患者中治疗具有至少一个HERG钾通道的大肠癌的方法，该方法包括向所述患者施用治疗有效量的4-[1-{2-(6-甲基-2-吡啶基)乙基-4-哌啶基}羰基]甲烷-磺酰苯胺2HCl通过选择性地阻断HERG钾通道足以治疗具有至少一个HERG钾通道的大肠癌。