



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0016809
(43) 공개일자 2008년02월22일

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7027128

(22) 출원일자 2007년11월21일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년11월21일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/004818

국제출원일자 2006년05월22일

(87) 국제공개번호 WO 2006/125580

국제공개일자 2006년11월30일

(30) 우선권주장

05011042.8 2005년05월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

05026092.6 2005년11월30일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

프로테오시스 약티엔게젤샤프트

독일 55129 마인쯔 카를-짜이스-슈트라쎄 51

(72) 발명자

케이힐 마이클

독일 55296 뢰르츠자일러 바인베르크슈트라쎄 34

슈라텐홀츠 안드레

독일 55129 마인쯔 힌터 더 키르헤 43

(74) 대리인

특허법인코리아나

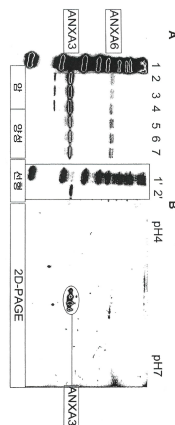
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 암 위험 평가를 위한 아넥신

(57) 요약

본 발명은 암, 특히 비노생식관 및/또는 장관의 암을 치료하기 위한 하나 이상의 아넥신 단백질의 용도, 및 암, 특히 비노생식관 및/또는 장관의 암의 진단을 위한, 및/또는 양성 및 비-양성 조직 사이의 구별을 위한 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

암, 특히 비노생식관 및/또는 장관의 암의 치료를 위한, 하나 이상의 아넥신 단백질, 바람직하게는 아넥신 A3의 용도.

청구항 2

특히 소변 샘플 또는 그의 분획을 사용하는,

- 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포내부 존재도를 측정하는 단계 및/또는
- 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포외부 존재도를 측정하는 단계

의 개별 단계를 포함하는, 암, 특히 비노생식관 및/또는 장관의 암의 진단, 및/또는 양성 및 비-양성 조직 사이의 구별 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 아넥신 단백질이 아넥신 A1, 아넥신 A2, 아넥신 A3, 아넥신 A4, 아넥신 A5, 아넥신 A6, 아넥신 A7, 아넥신 A8 및 아넥신 A10 으로 이루어진 군의 일원 이상이고, 여기서 바람직하게는 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도가 하나 이상의 추가 단백질의 존재도와 함께 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도가 하나 이상의 또 다른 아넥신 단백질의 존재도와 함께 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도가 혈청 아밀로이드 P, 이소렙티다아제 T, 근육-유형 지방산 결합 단백질, 갈락틴 1, 열 충격 단백질 90, BiP, 단백질 디설피드 이소머라아제, 상피-유형 지방산 결합 단백질, 에노일 조효소 A 히드라타아제 및 뉴클레오포스민으로 이루어진 군 중의 하나 이상의 추가 단백질의 존재도와 함께 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 2 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도가 14-3-3 족, 프로테아좀, 활성화 서브유닛 2, 사이토케라틴 족, KNP-I 알파 단백질 및 KNP-I 베타 단백질로 이루어진 군 중의 하나 이상의 추가 단백질의 존재도와 함께 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 2 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도가 하나 이상의 혈액 또는 혈청 마커, 특히 칼리크레인 (Kallikrein) 프로테아제 족의 하나 이상의 일원, 바람직하게는 전립선 특이적 항원 (PSA) 의 존재도와 함께 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 2 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도가 하나 이상의 상피 세포 마커, 특히 전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 의 존재도와 함께 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 2 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 아넥신 A3 및/또는 아넥신 A8, 바람직하게는 아넥신 A3 이 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 2 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 전립선암, 신장암, 방광암, 요도암, 난소암, 자궁암 또는

결장암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 2 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 소변 샘플 또는 그의 분획을, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도를 측정하기 전 분리 공정에 적용하여 세포 펠렛 및 상청액을 산출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 펠렛을 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포내부 존재도를 측정하기 위해 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상청액을 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포외부 존재도를 측정하기 위해 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 2 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 양이온 킬레이터, 특히 EDTA 및/또는 EGTA 를 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도를 측정하기 전에 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 2 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질의 존재도를 면역조직학적 방법에 의해 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 2 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 소변 샘플 또는 그의 분획이, 전립선 마사지 후, 특히 직장 손가락 삽입에 의해 회수된 소변, 특히 실험용 소변으로부터 수득되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 2 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 소변 샘플 또는 그의 분획이, 특히 중성구, 단핵구 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PMBC) 가 없도록, 특히 마그네토 비이드에 의해 정제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 2 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 오전 소변의 샘플 또는 그의 분획을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 아넥신 수준을 장관의 배설물 또는 상피 세포에서 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 15 항 또는 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 아넥신 수준을 배설물의 임의의 분획 또는 표본 (임의의 잠재적인 엑소좀-생성 상피 표면) 중의 위장관의 상피 암을 진단하기 위해 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1 항 내지 제 15 항, 제 19 항 또는 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 아넥신 수준을 직장결장 암을 진단하기 위해 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 2 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 염증성 상태 (암으로부터의 크론 (Crohn's) 질환

또는 케양 대장염) 를 구별하기 위해 중성구, 특히 칼프로텍틴 (calprotectin) 및/또는 중성구 겔라티나아제-관련 리포칼린 (NGAL) 의 측정과 조합하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

<1> 본 발명은 암, 특히 비뇨생식관 및/또는 장관의 암의 치료 및/또는 진단에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 암은 서구 문명화에서 인간 사망의 주요 원인 중 하나이며, 종종 진단하기에 어려움이 있다. 예를 들어, 전립선암은 남성의 암 사망의 주요 원인 중 하나이나, 진단하기가 어려운 이종 질환이다. 개개의 종양이 겪을 과정을 예측하는 것은 거의 불가능하다. 진단성 전립선암 마커의 현상태는 전립선 특이적 항원 (PSA) 의 상이한 동종형을 본질적으로 근본으로 하며, 전체는 가음성 및 가양성의 관점에서 만족스럽지 않다 (1-4). 최근, 체액 또는 전립선 조직으로부터 다양한 대안적 분자 마커들이 제안되었다 (5-11). 3 개 이상의 상이한 서브계열의 전립선암은 종양 등급, 재발 발생 및, 전이와 관련되는 것 같이 확인되었다 (12). 지방산 신타아제는 단독으로 전립선암에 대한 뚜렷한 분자 표지로 정의된다 (13). 그러나, 개선된 개별 암 제어에 대한 신규 적합한 다중 요법 전략을 개발하기 위해, 진행 위험에 따라 환자를 특정화시키기 위한 더욱 정교하고 신뢰성 있는 치료적 및 진단성 파라미터에 대한 조속한 필요성이 남아 있다 (14-16).

발명의 상세한 설명

- <3> 그의 관점에서, 본 발명에 의해 다루지는 문제는 첫 번째 양상에서, 암, 특히 비뇨생식관 및/또는 장관의 암, 바람직하게는 전립선암의 치료를 위한, 하나 이상의 아넥신 단백질, 바람직하게는 아넥신 A3 의 용도에 의해 해결된다.
- <4> 게다가, 본 발명은 암, 특히 비뇨생식관 및/또는 장관의 암, 바람직하게는 전립선암의 치료용 의약의 제조를 위한 하나 이상의 아넥신 단백질, 바람직하게는 아넥신 A3 의 용도를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 암 치료는 하나 이상의 아넥신 단백질의 생체 내 존재도 (abundance) 의 증대에 의해, 특히 하나 이상의 세포외부 아넥신 단백질의 생체 내 존재도의 증대에 의해 수행된다.
- <5> 그의 관점에서, 본 발명에 의해 다루지는 문제는 추가 양상에서, 특히 소변 샘플 또는 그의 분획을 사용하는,
- <6> - 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포내부 존재도를 측정하는 단계 및/또는
- <7> - 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포외부 존재도를 측정하는 단계
- <8> 의 개별 단계를 포함하는, 암, 특히 비뇨생식관 및/또는 장관의 암의 진단을 위한, 및/또는 양성 및 비-양성 조직 사이의 구별을 위한 방법에 의해 해결된다.
- <9> 바람직한 구현예에서 본 발명의 방법은, 특히 소변 샘플 또는 그의 분획을 사용하는,
- <10> - 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포내부 존재도를 측정하는 단계 및
- <11> - 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포외부 존재도를 측정하는 단계
- <12> 의 개별 단계를 포함한다.
- <13> 추가의 바람직한 구현예에서 본 발명의 방법은, 특히 소변 샘플 또는 그의 분획을 사용하는,
- <14> - 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포내부 존재도를 측정하는 단계 및
- <15> - 하나 이상의 상기 아넥신 단백질의 세포외부 존재도를 측정하는 단계
- <16> 의 개별 단계를 포함한다.
- <17> 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포내부- 및 세포외부 존재도의 측정 후, 세포내부 존재도에 대한 세포외부 존재도의 비 또는 그 반대를 측정할 수 있다. 바람직하게는, 세포내부 존재도에 대한 세포외부 존재도의 비를 측정한다. 수득된 비는 암 및/또는 양성 및 비-양성 조직 사이의 구별을 위한 유리한 진단 파라미터이다.
- <18> 본 발명에 따르면 용어 "세포외부" 는 세포의 원형질 막의 외부 표면을 포함하는 세포외부 공간으로서

이해된다.

- <19> 본 발명에 따르면, 용어 "비-암성 조직" 은 건강한 조직 및 병원성 조직, 특히 양성 전립선 비대, 만성 전립선염, 크론 (Crohn's) 질환, 대장염 궤양, 염증성 (inflammable) 조직 및 섬유증, 특히 2차 섬유증을 포함한다.
- <20> 본 발명에 따르면 용어 "존재도" 는 각각의 단백질의 세포내부 및/또는 세포외부 수준 및 농도로서 이해된다.
- <21> 본 발명에 따르면, 용어 "아넥신 단백질" 및 "단백질" 은 일반적으로 그의 동종형, 돌연변이체, 절단된 버전 및 번역 후 개질된 형태를 포함한다. 번역 후 개질된 형태에는 특히 단백질 가수분해 과정에 의해 수득가능한 단백질성 형태가 포함된다.
- <22> 본 발명에 따르면, 용어 "치료" 는 "요법" 과 동등하고, 그러므로 암과 관련된 문제점의 치료를 포함한다.
- <23> 바람직한 구현예의 경우에서, 아넥신 단백질은 아넥신 A1, 아넥신 A2, 아넥신 A3, 아넥신 A4, 아넥신 A5, 아넥신 A6, 아넥신 A7, 아넥신 A8 및 아넥신 A10 으로 이루어진 군의 일원 중 하나 이상이고, 여기서 바람직하게는 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도는 하나 이상의 추가 단백질의 존재도와 함께 측정된다. 상기 추가 단백질과 관련해서는 하기 기재에 언급된다.
- <24> 또다른 구현예에서, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도는 소분자 또는 핵산 마커의 존재도와 함께 측정된다.
- <25> 아넥신은 막 트래피킹 (trafficking), 림프구 이동, 세포 운동성, 칼슘 유입, 및 신호 전달을 포함하는 다양한 세포내부 및 외부 기능에 영향을 주는 것으로 생각되는 칼슘-결합 단백질이다. 이들은 매우 풍부하고, 음성 전하를 띤 막 지질의 칼슘-의존성 벌크 차폐는 아넥신 기능에 대해 중요할 수 있다 (17).
- <26> 31 명의 전립선암 환자로부터의 양성 및 종양성 조직 사이의 단백질의 차이 존재도를 비교하는 이전 단백질학 연구에서, 본 출원인은 아넥신 A3 이 종양에서 더욱 다양하고 상이하게 풍부하고, 다양한 서브-유형의 전립선암에 대한 진단 마커를 잠재적으로 나타내는 것으로 확인하였다. 아넥신 A3 은 모든 31 명의 환자에 대해 평균 2.4 배 (95 % 신뢰도 1.1 내지 5.4 배; P = 0.045) 상향조절된 비교적 드문 아넥신 족 일원이다. 클러스터 분석에 의해 제안되었던 22 명의 환자의 시험적인 서브-클러스터에서, 아넥신 A3 은 평균 4.4 배 (95 % 신뢰도 2.2 내지 9.1 배; P = 0.0008) 상향조절되었고, 특정 유형의 종양 아넥신 A3 존재도가 암성 표현형에 관여할 수 있다는 것을 암시한다. 추가 세부사항에 대해서는, 본원에 전체가 참조된 특허 출원 PCT/EP2005/001567 에 언급된다.
- <27> 여러 개의 아넥신이 아넥신 A1, 아넥신 A2, 아넥신 A4, 아넥신 A7 및 아넥신 A10 을 포함하는 전립선암과 관련되어 하향 조절되는 것으로 보고된다 (6). Alaiya et al. (18) 은 또한 악성 및 양성 전립선 조직 사이의 일부 상이한 (아넥신 A3) 값을 보고하였다. 최근, 아넥신 A3 은 배양된 간세포에서 DNA 복제를 위해 필요한 것으로 나타나고 (19), 실질 간세포보다 더 높은 성장 잠재성 및 증식 비율을 갖는 작은 간세포에서 더 높게 발견되는 것 같다 (20). 본 출원인의 결과는 그러므로 전형적으로 상기 족의 드문 일원인 아넥신 A3 이 특정 환자의 암 치료에 대해 생마커 또는 표적 또는 치료 원리를 제공할 수 있다는 것을 암시한다.
- <28> 아넥신은 세포질성이나, 분비 선도 서열이 결핍되어 있음에도 불구하고, 또한 세포외부에서 발견된다. 예를 들어, Carlsson et al. (24) 에서 아넥신 A3 은 남성 불임에 관여하는 항-정자 항체에 대한 항원으로서 확인되었다. Oh et al. (25) 은 아넥신 A1 이 고체 폐 종양의 부근의 상피면에 노출되었고, 단백질에 대항하는 방사능 표지된 항체의 투여가 동물 실험에서 종양 퇴행을 야기하였다는 것을 발견하였다. 게다가, 세포 표면으로의 아넥신 A5 전위는 세포자멸사와 관련되고 (26), 아넥신 A1 (또한 리포코르틴 1 로서 공지됨) 이, 항염증제로서 중성구 및 단핵구/대식세포로부터 대량 풍부하게 세포외부 공간으로 방출된다. 실제로, 아넥신 A1 은 글루코코르티코이드의 항-염증 효과의 일차 매개체일 수 있다 (27, 28).
- <29> 분비, 특히 아넥신 A3 의 세포 만출, 엑소솜 경로, 및 변경된 전립선의 면역 감시 조절을 조합하여 보고된 아넥신 분비에 대한 메카니즘은 없다 (17). 엑소솜은 직경 30 내지 100 nm 의 막 소포이고, 이것은 다양한 기원의 살아있는 세포에 의해 시험관 내에서 생성 및 분비되고, 항원 제시 세포에 대한 종양 항원의 전위 뿐만 아니라, 특정 면역 반응의 촉진에 관여하는 것으로 생각된다 (21). 아넥신 A3 및 아넥신 A8 을 포함하는 아넥신 족 일원은, 통상 엑소솜에서 발견된다 (21-23).
- <30> Hegmann et al. (29) 은 엑소솜이 세포 괴사의 부재에서 세포외부 환경에 대한 열 충격 단백질의 방출에 관여된다고 간주하였다. 장 엑소솜 환경은 생체 내 제안된 아넥신 칼슘 이온 채널 기능에 필요한 낮은 pH 값을 가능하게 하였고, 세포 생존력과의 부적합성 때문에 논쟁의 여지가 있다고 논의되어 왔다 (17). 게다가, 보고된 생리적 아넥신 이온 채널의 사례는 골모세포 뼈 형성에, 그리고 연골세포의 최종 분화 및 죽음에 관여되는

매트릭스 소포에서 일어나고 (30), 이것은 둘 다 정상 세포 생존력의 비정상적인 상황이다. 본 출원인에 따르면, 아넥신 이온 채널은 엑소좀 소포의 삼투압 과열에 관여할 수 있고 (세포질 막과의 분비 융합 전 다소포 소포 내, 또는 세포외부로), 그러므로 종양 또는 골다공증의 경우에서 뼈와 같은, 기타 조직의 세포외부 환경을 조절한다.

- <31> Bondanza et al. (31) 에는 최근 방사선 조사된 종양 세포가 대식세포에 의해 효과적으로 포식되나, 세포 표면 포스파티딜세린이 아넥신 A5 에 의해 차폐되는 경우, 대식세포 경로가 감소하고, 강한 CD8+ 수지상 세포-의존적 면역 반응이 도출되는 것으로 보고하였다. 상기 언급된 바와 같이, 아넥신 A1 은 중성구 동원을 감소시켜, 조직 염증을 감소시키는 항-염증성 조절제이다. 이것은 중성구 및 대식세포 상의 특정 세포외부 ALX (리폭신 A) 수용체에 결합하므로, 대식세포 포식작용을 조정할 수 있다 (27, 28). 조직 내의 작용 부위에서, 아넥신 A1 및 그의 N-말단 펩티드 (Ac2-26) 는 세포자멸성 중성구의 포식작용을 촉진하여, 항-염증성 사이토카인, 예컨대 TGF (Transforming Growth Factor: 전환 성장 인자)-β1 을 통한 염증 수준 및 면역 반응을 감소시키고 (28), 따라서, Th1 (T-보조 1) 및 Th2 (T-보조 2) T-세포의 항원-유도된 T 세포 증식은 또한 펩티드 Ac2-26 에 의해 억제된다 (32). 종양 중의 아넥신 A3 의 변화는 세포외부 아넥신 집단의 특성 및/또는 농도를 변경하여, 그리고 대식세포/과립구 우세한 반응 및/또는 체액성 반응 사이의 상호작용을 조정하여 전립선 조직의 면역 감시에 영향을 줄 수 있다.
- <32> 본 발명의 하나의 구현예에 따르면, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도는 또 다른 아넥신 단백질, 바람직하게는 아넥신 A1, 아넥신 A2, 아넥신 A3, 아넥신 A4, 아넥신 A5, 아넥신 A6, 아넥신 A7, 아넥신 A8 및 아넥신 A10 으로 이루어진 군 중 하나 이상의 존재도와 함께 측정된다.
- <33> 본 발명의 추가 구현예의 경우에서, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도는 혈청 아밀로이드 P, 이소펩티다아제 T, 근육-유형 지방산 결합 단백질, 갈락틴 1, 열 충격 단백질 90, BiP (인간 단백질: P11021 - 78 kDa 글루코오스-조절 단백질 선구체, GRP 78, 면역글로불린 중쇄 결합 단백질, 소포체 (Endoplasmic reticulum) 내강 Ca²⁺ 결합 단백질 grp78), 단백질 디설피드 이소메라아제, 상피-유형 지방산 결합 단백질, 에노일 조효소 A 히드라타아제 및 뉴클레오포스민으로 이루어진 군 중의 하나 이상의 추가 단백질의 존재도와 함께 측정된다.
- <34> 게다가, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도는 14-3-3 족, 프로테아좀, 특히 프로솜 및/또는 마크로파인, 활성화 서브유닛 2, 사이토케라틴 족, KNP-I 알파 단백질 (NCBI ACCESSION BAA95554.1 GI:7768772) 및 KNP-I 베타 단백질 (NCBI ACCESSION BAA21139.1 GI:2250701) 로 이루어진 군 중의 하나 이상의 추가 단백질의 존재도와 함께 측정될 수 있다.
- <35> 일부 경우, 진단을 위한 통상적 종양 마커의 진단 값은 제한된다. 예를 들어, 매우 또는 극히 낮은 혈청 전립선 항원 (PSA) 값은 전립선암에 대한 적합한 신뢰성 있는 진단 지표를 제공한다. 그러나, 2 내지 10 ng/ml, 특히 4 내지 10 ng/ml, 특히 2 내지 6 ng/ml 범위의 수술 전 PSA 값은, 진단성 신뢰도와 관련하여, 특히 근처 전립선 절제술에서의 수술 후 치유 비율의 예측과 관련하여 극히 열악하다.
- <36> 그러므로, 본 발명의 특정 바람직한 구현예에서, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도는 하나 이상의 혈액 또는 혈청 마커, 특히 칼리크레인 (Kallikrein) 프로테아제 족의 하나 이상의 일원, 바람직하게는 전립선 특이적 항원 (PSA) 의 존재도와 함께 측정된다. 다양한 형태의 PSA 의 존재도, 특히 총 PSA (tPSA) 존재도, 유리 PSA (fPSA) 의 상대적 또는 절대적 존재도 및 복합체화 PSA (cPSA) 의 상대적 또는 절대적 존재도는, 아넥신 A3 의 존재도와 함께 측정될 수 있다. 칼리크레인 프로테아제 족의 기타 일원이 이와 관련해 사용될 수 있다는 것이 또한 구현예의 범위 내에 있다. 서로에 대한 상기 단백질의 존재도는 또한 본 발명에 따른 진단 목적에 대한 하나 이상의 측정된 또는 계산된 아넥신 파라미터와 조합으로 사용될 수 있다. 유용할 수 있는 아넥신 파라미터는 상기 본 기재 내에 논증의 방식에 의해 사용된 것들에 제한되는 것은 명백히 아니다.
- <37> 추가 바람직한 구현예의 경우에서, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도는 하나 이상의 상피 세포 마커, 특히 전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 의 존재도와 함께 측정된다.
- <38> 본 발명의 특히 바람직한 구현예에 따라, 아넥신 A3 및/또는 아넥신 A8, 바람직하게는 아넥신 A3 이 사용된다.
- <39> 본 발명에 따르면 치료 및/또는 진단되는 암은 비뇨생식관 및/또는 장관으로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 암은 전립선암, 신장암, 방광암, 요도암, 난소암, 자궁암 또는 결장암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 진단되는 암은 전립선암 및/또는 결장암이다. 전립선암과 관련해, 본 발명의 방법은 바람직하게는 전립선암 조직 샘플, 양성 전립선 비대 (BPH) 조직 샘플, 만성 전립선염 조직 샘플, 섬유증이 있는 조직 샘플 및 건강한 조직 샘플 사이의 구별을 가능하게 한다.

- <40> 장관의 암, 특히 결장암과 관련해, 본 발명의 방법은 바람직하게는 염증성 장 질환, 특히 크론 (Crohn's) 질환 및/또는 궤양 대장염에 의해 영향을 받은 조직의 샘플 사이의 구별을 가능하게 한다.
- <41> 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 암의 하부 그룹을 치료 및/또는 진단하는 것이 가능하다. 게다가, 상이한 암 단계가 본 발명에 의해 치료 및/또는 진단될 수 있다. 본 발명에 의해 비-암성 조직이 암성 조직으로 이행되는 것을 모니터링하는 것이 가능하다.
- <42> 본 발명의 추가 바람직한 구현예의 경우에서, 배설물 샘플 또는 그의, 특히 소변의, 특히 실험용 소변의 분획을, 하나 이상의 아넥신 단백질의 존재도를 측정하기 전 분리 공정에 적용하여 세포 펠렛 및 상청액을 산출한다. 바람직하게는, 분리 공정은 당업계의 전문가에게 명백한 바와 같이 원심분리에 의해, 특히 액체 매질 외 세포의 저속 원심분리 (예를 들어, 200 x g, 4 °C 에서 5 분 동안) 에 의해 수행한다. 명백하게는, 상이한 조건 하의 연속적인 원심분리, 또는 기타 방법과 원심분리의 조합을 포함하는 임의의 적합한 원심분리 프로토콜이, 측정을 위해 세포내부 아넥신으로부터 가용성 또는 엑소좀-결합된 아넥신을 분리하기 위해 고려할 수 있게 사용될 수 있다. 세포내부 아넥신으로부터의 가용성 또는 엑소좀-결합된 아넥신의 분리의 기타 수단, 또는 그의 조합이 당업자에게 명백한 바와 같이 또한 사용될 수 있다 (예를 들어, 자석 비이드, 여과, 크로마토그래피, 등).
- <43> 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 세포 펠렛을 하나 이상의 아넥신 단백질의, 바람직하게는 아넥신 A3 의 세포내부 존재도를 측정하기 위해 사용한다.
- <44> 상기 기재에서 이미 언급된 바와 같이, 아넥신은 골형성화 (osteoblastosis) 및 뼈용해 과정에 복잡하게 관여된다. 아넥신은, 뼈 무기질침착 과정에 관여된다. 이것은 전립선암 전이가 높은 빈도의 골모세포 뼈 병변을 나타내며 암 중에서 드물기 때문에 두드러진다. 대부분의 암 전이는 파골세포 골용해성 (뼈 용해) 활성을 특징으로 하는 반면, 전립선 전이는 파골세포 및 무기질 침착 골모세포 활성을 둘 다 나타낸다.
- <45> 생리적 무기질침착은 매우 복잡하고 조절된 과정이다. 뼈 무기질침착은 무기질화 골격 세포의 원형질 막으로부터 방출된 매트릭스 소포라고 불리는 작은 소포에 의해 시작된다. 첫번째 무기질 상은 매트릭스 소포 내에 형성된다. 이것이 막으로 둘러싸이므로, 채널 단백질은 진입을 위해 무기질 이온을 필요로 한다. 아넥신은 Ca^{2+} 가 진입하는 매트릭스 소포 내에 채널을 형성하고, 칼슘 포스페이트 무기질침착의 시작을 야기한다. 일단 소포내 결정이 특정 크기에 도달하면 이들은 막을 파열시킨다. 이것은 차례로, 암 및 아넥신 생물학에 통상적인 특징인 염증에 관련되며, 뼈와 면역계 사이의 상호작용에 관여한다. 그러므로, 특징의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 골다공증을 진단 및/또는 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 방법의 특정 구현예에서, 아넥신 존재도, 바람직하게는 아넥신 A3 및/또는 아넥신 A8 의 존재도는, 체액, 체 분비, 조직 샘플, 세포 또는 세포들의 그룹에서, 특히 골다공증을 진단 및/또는 치료하기 위해 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정된다. 이러한 치료에는 아넥신 단백질의 존재도, 세포하부/세포외부 국소화, 번역 후 개질 또는 활성에 영향을 주는 물질의 적용을 포함할 수 있다. 이 경우에는 활성에는 특히 적합하게 증가 또는 감소될 수 있는 이온-채널 활성이 포함된다. 골다공증의 치료에 사용할 수 있는 물질에는 명백하게 아넥신 A3, 그의 절단된 또는 돌연변이체 버전, 또는 항체 또는 특히 당업계에 공지된 기타 친화성 시약이 포함된다. 상기 물질에는 특히 당업계에 공지된, 핵산, 또는 화학적으로 관련된 물질, 예컨대 소형 간섭 RNA (siRNA) 로 사용될 수 있는 펩티드 핵산 (pNA) 이 추가로 포함될 수 있다.
- <46> 암, 양성 전립선 비대 (BPH) 로 진단된 환자로부터의 또는 암과 무관한 것으로 진단된 상태의 대조군 환자의 실험용 마사지 (massaged) 전립선 소변 세포 펠렛의 단백질 분석의 예를 도 3, 도 4, 및 도 5, 각각에 나타낸다. 도 3 내지 도 5 각각의 상부 패널은 아넥신 A3 이 웨스턴 블롯으로부터의 화학발광 (ECL) 신호를 향상시켰다는 것을 나타내고, 하부 패널은 Ponceau S ('단백질') 로 염색된 것과 같이, 전체 적재된 단백질 신호를 나타낸다. 각 젤은 분자량 표지 (M) 뿐 아니라, 아넥신 A3 을 함유하는 전립선 종양으로부터의 총 세포 단백질 용해물 7.5 µg 을 양성 대조군 (+C) 으로서 이중으로 함유한다. 상이한 젤 상의 샘플로부터의 아넥신 A3 신호는 각각의 양성 대조군의 반복본의 평균 값에 대해 표준화하여 비교할 수 있다. 예비 연구에서, 본 출원인은 암 환자의 실험용 소변 샘플의 펠렛이 양성 전립선 비대 (BPH) 환자 또는 건강한 대조군 환자보다 아넥신 A3 을 훨씬 덜 갖는다는 것을 발견하였다 (도 6). 예를 들어, PR_26CA 에서와 같이 아넥신 A3 신호 (존재도) 의 0.2 배 양의 참조 값과 관련해, 오직 암 환자의 실험용 소변 샘플 5/30 (5:25) 만이 참조 값의 0.2 배 초과를 가지는 반면, BPH 환자의 실험용 소변 샘플의 23/30 (23:7) 및 건강한 대조군 환자의 실험용 소변 샘플의 18/30 (18:12) 은 상기 참조 값을 초과한다. 상기 결과는 평균적으로, 암 환자의 실험용 소변의 샘플로부터의 상기 세포 펠렛이 BPH 환자 또는 건강한 대조군 환자로부터의 실험용 소변의 샘플보다 아넥신 A3 을

덜 함유한다는 것을 나타낸다.

- <47> 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 소변 샘플의, 특히 실험용 소변 샘플 및 그의 분획의 분리 공정으로부터 수득된 상청액은 하나 이상의 아넥신 단백질의, 바람직하게는 아넥신 A3 의 세포외부 존재도를 측정하기 위해 사용된다.
- <48> 암, 특히 비뇨생식관 및/또는 장관의 암의 진단을 위해, 및/또는 양성 및 비-양성 조직 사이의 구별을 위해 상청액을 사용하는 것이 특히 바람직하다.
- <49> 본 발명의 추가 바람직한 구현예의 경우에서, 양이온 킬레이터, 특히 Ca^{2+} -킬레이터, 특히 EDTA 및/또는 EGTA 를 소변 샘플 또는 그의 분획에, 하나 이상의 아넥신 단백질의, 바람직하게는 아넥신 A3 의 존재도를 측정하기 전에 첨가한다. 바람직한 구현예에서 양이온 킬레이터의 첨가는 샘플 또는 그의 분획을 분리 과정에 적용하기 전에 일어난다.
- <50> 바람직하게는 하나 이상의 세포외부 아넥신 단백질의, 특히 아넥신 A3 의 존재도의 측정을, 양이온 킬레이터가 처리된, 특히 EDTA 및/또는 EGTA 가 처리된, 상청액에서 수행하고, 비교를 위해, 양이온 킬레이터, 특히 EDTA 및/또는 EGTA 가 결핍된 상청액에서 수행한다. 상청액은 바람직하게는 동일한 소변 샘플, 특히 실험용 소변 샘플, 또는 그의 분획으로부터 유래한다.
- <51> 세포 내부로부터 외부로의 특히 아넥신 A3 전위가 전립선암의 발달 동안 상이하게 영향을 미친다는 추리에 근거하여, 본 발명에는 암과 연관된 아넥신 A3 의 세포내부/세포외부 국소화에 임의의 차이가 있는지의 여부의 측정이 포함된다. 상기 명세서에 이미 언급된 바와 같은 세포외부 환경은 세포의 원형질 막의 외부 표면을 포함하는 세포외부 공간으로서 이해된다. 임상적 전립선 마사지 후 수득된 실험용 소변은 전립선으로부터 배출된 세포를 함유한다. 엑소좀 중의 세포외부 아넥신 A3 의 가능성 뿐 아니라, 유리 아넥신 A3 이 칼슘-의존적 방식으로 세포 표면 상에 인지질과 같은 음성 전하를 띤 군에 결합할 수 있을 것이다. 후자의 아넥신 A3-분획은 칼슘을 킬레이트하기 위해 매질에 EDTA/EGTA 를 첨가하여 세포의 표면으로부터 상청액 내로 방출될 수 있을 것이다.
- <52> 2중-블라인드, 4-센터 연구에서의 추가 조사는 상청액에 대한 펠렛의 총 아넥신 A3 의 비가 비-암 환자 군에서의 표지된 섬유증 경우를 진단할 수 있다는 것을 보여준다. 섬유증은 양성 과정과 관련되고, 비-암의 표지이다. AUROC 는 총 103 개의 비-암 경우에 대해 'pu.anx.tot.ratio' 에 대하여 0.7072 였다. 비율에 대한 상관관계는 음성이었으며, 그러므로 상청액에서의 증가된 총 아넥신 A3 양이 상기 그룹 내로 분류하는데 결정적이었다. 이것은 암 경우에 대해 상청액 중의 감소된 아넥신 A3 값이 관찰되는 바와 같이 논리적 (logic) 이다 (하기 참조).
- <53> 펠렛/상청액 중의 아넥신 A3 의 비에 의한 비-암 환자 (BPH, 만성 전립선염, 섬유증, PIN 1-3) 의 추가 프로파일링은 암 대 비-암의 진단 결정 너머의 데이터 분석의 연속적 일련 및/또는 다중 파라미터 단계에 대한 본 발명의 중요한 양상이다.
- <54> 추가적으로, 본 출원인은 실험용 소변 샘플의 세포 펠렛 및 상청액 둘 다에서 상대적 아넥신 A3 존재도를 비교하기 위해, 개별적인 독립적 일련의 환자의 상청액 및 세포 펠렛 중의 아넥신 3 존재도를 측정하였다. 또다시, 상기 상이한 환자 코호트 (cohort) 에 대해, 암 환자로부터의 실험용 소변 펠렛의 샘플 중의 아넥신 A3 의 존재도가 BPH 환자 또는 건강한 환자로부터의 실험용 소변 펠렛의 샘플 중의 아넥신 A3 의 존재도보다 낮다는 것을 발견하였다. 상청액과 관련해서, 상기 동일한 환자로부터의 아넥신 A3 존재도는 BPH 환자 또는 건강한 환자의 실험용 소변 샘플의 EDTA-처리된 상청액보다 암 환자의 실험용 소변 샘플의 EDTA-처리된 상청액에서 더 높다. 실험용 소변의 세포외부 (EDTA-처리된 상청액) 및 세포내부 (1000 x g 펠렛) 분획의 개별 비로부터 도 7 에서 제시되는 바와 같이, 더욱 깨끗한 이미지가 나왔다. 이를 함께 취하여, 상기 데이터는 10 % 근처 또는 미만의 가양성 비를 나타내고, 게다가 상청액 (아넥신 A3-S) 대 펠렛 (아넥신 A3-P) 중의 아넥신 A3 발현의 비가 표 1 에서 제시된 바와 같이 암 대 BPH 대 대조군의 구별을 가능하고: 본질적으로 아넥신 A3-S 는 암 및 BPH 에서 높고, 대조군에서 낮은 반면, 아넥신 A3-P 는 BPH 및 대조군에서 높고, 암에서 낮으므로; 암에 대해 높은 S (또는 S/P), 낮은 P ; BPH 에 대해 높은 S (또는 S/P) 및 높은 P; 및 대조군에 대해 낮은 S (또는 S/P) 및 높은 P 를 갖고; 개별적 비 (S/P) 는 펠렛 단독과 비교해서 가장 명확한 사진을 제시한다 (도 7). 단백질 존재도에 대한 부가적인 검정은 사진을 추가로 개선시킨다.
- <55> 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 하나 이상의 아넥신 단백질, 바람직하게는 아넥신 A3 의 존재도는, 면역 조직

화학 방법에 의해, 특히 조직 샘플, 예컨대 조직 섹션을 사용하여 측정한다.

- <56> 본 발명은 부가적으로 암, 특히 비뇨생식관 및/또는 장관의 암의 진단을 위한, 및/또는 양성 및 비-양성 조직 사이의 구별을 위한 하나 이상의 항-아넥신 항체의, 특히 항-아넥신 A3 항체의 용도를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 항-아넥신 항체가 조직 샘플, 특히 조직 섹션의 병리조직학적-진단성 염색을 위해 사용된다. 샘플은 생검 또는 완전한 조직 절제에 의해 획득될 수 있다. 특히, 항-아넥신 항체에 의해 염색되는 조직 샘플은 전립선 절제 (proctectomy) 후의 전립선 생검 또는 전립선 조직으로부터 유래된다.
- <57> 아넥신 A3 에 대항하는 항체를 함유하는 폴리클론 토끼 혈청을 면역 조직화학에 의해 전립선 조직에서 아넥신 A3 을 국소화하기 위해 획득 및 사용하였다. 아넥신 족 일원이 다수이기 때문에, 본 출원인은 면역 조직화학 전 웨스턴 블롯에 의해 항-아넥신 A3 폴리클론 항체의 특이성을 특징화하였다. 전립선 양성 및 암 조직 세포 용해물의 웨스턴 블롯에 의해 획득된 신호의 대부분은 아넥신 A3 으로부터 유래한다 (도 1). 신호의 한계 존재도가 더 큰 분자량 단백질에 대해 관찰되었고, 이것은 아마도 아넥신 A6 이다. 상기 항체는 동일한 조건 하에서 대략 120 ng 재조합 60 kDa GST (Glutathione-S-Transferase: 글루타티온-S-트랜스페라아제)-아넥신 A3 을 사용하여 강한 깨끗한 밴드를 생성했다. 생검으로부터의 2D 젤로부터 방사능 값에 근거한, 완전한 정량은, 생검 및 실험용 소변으로부터의 1D 내지 2D 젤 및 1D 및 2D 웨스턴 블롯의 단백질 염색이, 0.02 내지 15 ng/ml 미만 범위의 실험용 소변 샘플 중의 단백질 농도의 검출 한계의 측정을 야기한다. 검출 한계는 0.01 ng/ml 미만 어딘가, 그러나 그 근처였다. 단백질 함량의 관점에서, 범위는 0.001 내지 0.3 ng/μg 총 단백질 초과이다.
- <58> 그러므로, 상기 항체는 도 2 에서 제시되는 바와 같이, 면역 조직화학에서 두드러지게 아넥신 A3 을 인지하고, 여기서 해당하는 아넥신 A3 신호는 건강한 전립선 중의 상피 세포에, 부가적으로 종양 중의 양성 세포에 제한될 가능성이 있다. 간질 세포는 초기 암에서 향상된 염색을 나타냈다. 전립선암 및 BPH 조직 중의 아넥신 A3 의 차이에 대한 매커니즘의 이론적 해석은 시험적으로 세포내로부터의 이행, 더욱 국소화된, 그리고 세포외부에 대한 총 더 낮은 발현 및 대조군과 비교하는 경우 총 더 높은 발현으로 표시한다.
- <59> 아넥신 A3 염색의 분포는 세포질 및 막 국소화를 제시하였고 (도 2), 개개의 세포 중의 전반적인 염색 수준이 양성 조직보다 암에서 더 낮은 것 같음에도 불구하고 (도 2), 동일한 암 조직 중의 아넥신 A3 의 전반적인 수준이 더 높았으며 (예, 도 1), 이것은 양성 조직 중의 더 많은 아넥신 A3-함유 세포, 및/또는 양성 조직 중의 더 많은 세포외부 아넥신 A3 에 의해 설명될 수 있다.
- <60> 첫번째로 250 명의 환자의 실험용 소변의 상청액 및 펠렛 중의 총 아넥신 양을 측정하고, 게다가 아넥신 A3 신호에 대한 중성구의 잠재적인 기여를 정량화 (중성구 마커 NGAL 의 평행적 정량화에 의해) 하는 것을 고려하는 종합 연구에서 (4-센터, 2중-블라인드), 아넥신 A3 수준이 암 환자의 실험용 소변의 상청액에서 감소하였다는 것을 발견하였다. 일반적인 용어로, 상기 결과는 섬유증/BPH 을 가진 비-암 환자의 실험용 소변에서, 암 환자보다 더 높은 수준의 아넥신 A3 이 관찰되었으나, 상기 수준은 비-실험용 통상적인 소변에서 무시할 정도로 훨씬 감소하였다는 것을 표시한다. 그러므로, 실험용 소변에서 측정된 아넥신 A3 은 우세하게 전립선에서 기원하고, 전립선 마사지 과정의 결과로서 소변 내로 방출된 것으로 결론을 내린다. 아넥신 A3 이 건강한 전립선의 도관 상피 세포에서 일차적으로 발현되는 것을 보여준다. 암 대 비-암 단독의 구별을 위해, 본 데이터는 상청액 중의 아넥신 A3 의 양이 최대 진단값을 갖는다는 것을 나타낸다 (4 내지 10 사이의 초기 PSA-값을 갖는 전립선암 환자의 실험용 소변의 상청액 중의 단백질 μg 당 아넥신 A3 및 총 아넥신 A3 의 조합 판독에 대한 AUROC-값은 0.78 내지 0.82 이었다). 여기서 더 높은 NGAL-값의 경우 펠렛-아넥신 A3 의 분포가 관찰되었고; 펠렛 아넥신 A3 에 대한 해당하는 AUROC 는 0.55 내지 0.65 의 범위였다).
- <61> 또한 암이 있는 전립선에서, 오직 적은 백분율의 상피 도관 세포가 양성이므로, 세포외부 아넥신 A3 존재도의 측정된 차이는 논리적 추리에 따라 유의한 것이 아니어야만 한다는 것으로 공지된다. 그럼에도 불구하고, 비-양성 환자에 비해 암 환자의 실험용 소변에서 평균 아넥신 A3 존재도의 고려할만하고 유의한 감소가 관찰되었다. 비양성 상피 세포가 직관적 통상의 지식에 따라 아넥신 A3 을 계속 분비해야만 하기 때문에 이것이 그 경우이어야만 하는 지가 합리적이지 않을 수 있다. 가능하게는, 암의 존재는 양성 병반이 있는 전립선 중의 상피 세포의 덩어리로부터 아넥신 A3 분비에 영향을 주는, 상호작용 물질, 예컨대 사이토카인의 분비를 야기한다. 상기 상호작용 인자가 양성 세포 그 자체, 또는 다른 세포에서 기원하는 것인지는 명확하지 않다. 상호작용 인자가 양성 세포와 그들의 중간엽/간질 환경 사이의 관계, 및 그 반대의 경우에 영향을 준다는 것은 문헌에 잘 나타나 있다. 담당하는 매커니즘(들) 과 관계없이, 본 경험적인 관찰은 명백하고, 명확하나 놀랍게도 실험용 소변 중의 아넥신 A3 의 더 낮은 수준이 환자가 전립선에 종양성 세포를 갖는다는 가능성의 예

측적 측정을 제공한다는 것을 보여준다. 실험용 소변 중의 아넥신 A3 수준의 상기 진단성 용도는 예의 방식에서 보여주는 바와 같이 다른 진단성 지표, 예컨대 전립선 특이적 항원 (PSA) 의 수준과 조합할 수 있다. 상기 결과는 또한 아넥신 A3 단백질의 존재가 건강한 표현형과 관련되어 있다는 것을 암시한다. 그러므로, 아넥신 A3 단백질은 세포외부 아넥신 A3 의 수준을 향상시켜, 암을 치료하기 위한 치료적 방식에 적용할 수 있다.

- <62> 관찰된 결과에 놓여있는 매커니즘은 조사하에 있고, 이들은 최고 진단값의 총 아넥신 A3 (p/s) 의 상기 비로, 실험용 소변의 펠렛 및 상청액 둘 다에서 상승된 수준의 아넥신 A3 과 연관된 비-암성 단계 (섬유증/BPH) 로 진행되는 완전히 건강한 전립선 상피의 일부 종류의 이행을 잠재적으로 반영한다. 암에서, 암 환자의 실험용 소변의 상청액 중의 감소된 아넥신 A3 양과 명백하고 놀라운 상관관계가 있다; 펠렛 아넥신 A3 양은 NGAL-양성 백혈구/중성구에 의한 오염 기여를 갖는 것으로 보인다.
- <63> 그러므로 펠렛 및 상청액 둘 다에서 아넥신 A3 수준을 측정하는 것이 매우 바람직하다. 단백질 수준에 대한 상기 정보는 예를 들어, USA 특허 출원 US2003/0108963A1 에 의해 놀랍게도 낫지시 언급되었지만 구현되지 않는 바와 같이, 계층 방법에 의해 접근할 수 없다.
- <64> 요약하면, 아넥신 A3 은 건강한 조직, 및 초기 암성 조직 중의 외부-상피 위치에서 두드러지는 세포내부 염색을 나타내고: 진행된 암은 암 세포 내에서 뚜렷하게 감소된 아넥신 A3 염색을 나타냈다.
- <65> 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 소변 샘플 또는 그의 분획은, 전립선 마사지 후, 특히 직장 손가락 삽입에 의해 회수된 소변, 특히 실험용 소변으로부터 수득된다.
- <66> 본 발명의 추가 구현예에서, 특히, 중성구, 단핵구 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PMBC) 가 없도록, 특히 마그네토 비이드에 의해 소변 샘플 또는 그의 분획을 정제한다. 바람직하게는, 오전 소변의 샘플 또는 그의 분획을 사용한다.
- <67> 본 발명의 구현예에 따르면, 아넥신 수준을 장관의 배설물 또는 상피 세포에서 측정한다. 추가로, 아넥신 수준은 배설물의 임의의 분획 또는 표본 (임의의 잠재적인 엑소좀-생성 상피 표면) 중의 위장관의 상피 암을 치료 및/또는 진단하기 위해 사용될 수 있다. 아넥신 수준은 직장결장 암을 치료 및/또는 진단하기 위해 추가로 사용된다. 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 염증성 상태 (암으로부터의 크론 (Crohn's) 질환 또는 궤양 대장염) 를 구별하기 위해 중성구, 특히 칼프로텍틴 (calprotectin) 및/또는 중성구 겔라티나아제-관련 리포칼린 (NGAL) 의 측정과 조합할 수 있다.
- <68> 추가로 하나 이상의 아넥신 단백질, 바람직하게는 아넥신 A3 및/또는 아넥신 A8, 특히 아넥신 A3 이 명세서에 기재된 질환에 대해, 특히 전립선암, 직장결장암 및/또는 골다공증, 바람직하게는 그의 하부 그룹에 대해 진단 마커 및/또는 치료적 표적으로 사용될 수 있다는 것이 본 발명의 범주 내에 있다.
- <69> 본 발명에 따르면, 암, 특히 비뇨생식관 및/또는 장관의 암을 치료하는 것이 가능하다. 이것은 바람직하게는 하나 이상의 아넥신 단백질의, 예를 들어 하나 이상의 세포외부 아넥신의 생체 내 존재도의 향상에 의해 달성된다. 게다가 본 발명은 암, 특히 비뇨생식관 및/또는 장관의 암의 진단, 및/또는 암성 및 비-암성 조직 사이의 구별을 가능하게 한다. 이것은 특히 적합한 경우, 기타 단백질에 대해 상응하는 비의 측정과 조합할 수 있는, 아넥신 단백질의 세포내부 대 세포외부 존재도 및 세포외부 대 세포내부 존재도 각각의 비의 측정에 의해 달성된다. 바람직하게는, 암의 진단 및/또는 암성 및 비-암성 조직 사이의 구별은 하나 이상의 아넥신 단백질의 세포외부 존재도에 기초한다. 측정된 단백질 비 및 존재도는 각각 암성 및 비-암성 조직 사이의 구별을 밝혀서, 환자의 프로파일링을 가능하게 한다. 그러므로, 아넥신 단백질, 특히 아넥신 A3 은, 암 진단에 통상적으로 적용되는 종양 마커를 심지어 완전히 대체할 수 있는 신뢰성 있는 진단 마커이다.
- <70> 본 발명의 더욱 상세한 설명을 위해, 이제 수반되는 표 및 도면을 참조할 것이다:

<71> 표: 1

샘플의 #	암 40	BPH 40	대조군 40	거짓 음성 (120의%)	거짓 양성 (120의%)
ANXA3-P (40의%) 생마커 아래 생마커 위	84 16	23 77	40 60	6	13.3
ANXA3-S (40의%) 생마커 아래 생마커 위	5 95	20 80	91 9		
Ratio ANXA3-S/ ANXA3-P 및 분류					
암	92	12	3		
BPH	6	80	6	1.5	7.5
대조군	2	8	91		

<72>

<73> 표 1 : 진단 결과의 요약, 아넥신 A3 존재도는 암 환자의 실험용 소변 샘플의 펠렛 (아넥신 A3-P) 에서 낮고, BPH 환자 및 건강한 환자의 실험용 소변 샘플의 해당하는 펠렛에서 상당히 높았다. 실험용 소변 샘플의 상청액 (아넥신 A3-S) 중의 아넥신 A3 존재도에 대해, 상이한 사진이 있다: 이들은 건강한 환자에 대해서 낮고 암 및 BPH 환자에 대해 낮았다. 조합된 판독은 표의 하단부에 표시된 수와 함께 세가지 경우를 올바르게 분류한다. 추가 세부사항을 고려하여, 상기 명서세를 언급한다.

<74> 표: 2

<75>	명칭	기재
<76>	P _{ug_tot}	펠렛: 총 단백질 양 (μg)
<77>	U _{ug_tot}	상청액*: 총 단백질 양 (μg)
<78>	P _{ANX_ug}	펠렛: μg 단백질 당 아넥신 신호 수준
<79>	P _{ANX_tot}	펠렛: 총 환자 샘플 당 아넥신 신호 수준
<80>	U _{ANX_ug}	상청액: μg 단백질 당 아넥신 신호 수준
<81>	U _{ANX_tot}	상청액: 총 환자 샘플 당 아넥신 신호 수준
<82>	PU _{ANX_ug}	펠렛 + 상청액: μg 단백질 당 아넥신-수준
<83>	PU _{ANX_tot}	펠렛 + 상청액: 총 환자 샘플 당 아넥신-수준
<84>	PU _{ANX_ug_ratio}	펠렛 / 상청액의 비: ug 단백질 당 아넥신 수준
<85>	PU _{ANX_tot_ratio}	펠렛 / 상청액의 비: 총 환자 샘플 당 아넥신 수준
<86>	P _{NGAL_ug}	펠렛: μg 단백질 당 NGAL 신호 수준
<87>	P _{NGAL_tot}	펠렛: 총 환자 샘플 당 NGAL 신호 수준
<88>	U _{NGAL_ug}	상청액: μg 단백질 당 NGAL 신호 수준
<89>	U _{NGAL_tot}	상청액: 총 환자 샘플 당 NGAL 신호 수준
<90>	PU _{NGAL_ug}	펠렛 + 상청액: μg 단백질 당 NGAL-수준
<91>	PU _{NGAL_tot}	펠렛 + 상청액: 총 환자 샘플 당 NGAL-수준
<92>	PU _{NGAL_ug_ratio}	펠렛 / 상청액의 비: ug 단백질 당 NGAL 수준
<93>	PU _{NGAL_tot_ratio}	펠렛 / 상청액의 비: 총 환자 샘플 당 NGAL 수준
<94>	P _{ANX_NGAL_ug_ratio}	펠렛: μg 단백질 당 아넥신/NGAL 비

- <95> U_ANX_NGAL_ug_ratio 상청액: μg 단백질 당 아넥신/NGAL 비
- <96> PU_ANX_NGAL_ug_ratio 펠렛+상청액: μg 단백질 당 아넥신/NGAL 비
- <97> ('U' = '상청액')
- <98> 표 2. 실험용 소변 상청액 및 펠렛 분획으로부터 측정된 단백질 파라미터.
- <99> 표 3:
- <100>

변수	기재
----	----
- <101> P.ug.tot 펠렛: 총 단백질 양 (μg)
- <102> U.ug.tot 상청액: 총 단백질 양 (μg)
- <103> P.ANX.ug 펠렛: μg 단백질 당 아넥신-수준
- <104> P.ANX.tot 펠렛: 총 샘플 당 아넥신-수준
- <105> U.ANX.ug 상청액: μg 단백질 당 아넥신-수준
- <106> U.ANX.tot 상청액: 총 샘플 당 아넥신-수준
- <107> PU.ANX.ug 상청액+펠렛: μg 단백질 당 아넥신-수준
- <108> PU.ANX.tot 상청액+펠렛: 총 샘플 당 아넥신-수준
- <109> PU.ANX.ug.ratio 펠렛 / 상청액 비: μg 단백질 당 아넥신 수준
- <110> PU.ANX.tot.ratio 펠렛 / 상청액 비: 총 샘플 당 아넥신 수준
- <111> psa.ini 혈액 PSA 수준
- <112> perc.free.psa 백분율 유리 PSA
- <113> 표 3: 실시예 4 에서 사용된 약어 및 변수의 기재
- <114> 표 4:

시험	AUROC	환자
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

- <115>
- <116> 표 4: 4 내지 10 ng/mL 의 PSA 값에 따라 그룹지어진 환자에 대해 수행된, 지시된 변수 파라미터 (표 3 기재 참조) 에 대한 ROC 곡선 분석 결과. AUROC 값을 산출하는 시험 파라미터, 및 분석 당 포함된 환자 수를 표에 제시한다.

<117> 표: 5

시험	AUROC	환자
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

<118>

<119> 표 5. PSA 값 2 내지 6 ng/mL 에 따라 그룹지어진 환자에 대해 수행된, 지시된 변수 파라미터 (표 3 기재 참조) 에 대한 ROC 곡선 분석 결과. AUROC 값을 산출하는 시험 파라미터, 및 분석 당 포함된 환자 수를 표에 제시한다.

<120> 표 6:

시험	AUROC	환자
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

<121>

<122> 표 6: 모든 PSA 값을 포함하는, 모든 환자에 대해 수행된, 지시된 변수 파라미터 (표 3 기재 참조) 에 대한 ROC 곡선 분석 결과. AUROC 값을 산출하는 시험 파라미터, 및 분석 당 포함된 환자 수를 표에 제시한다.

<123>

표 7:

기준	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
> -0.6759	86.0 (74.2- 93.7)	46.2 (32.2- 60.5)	1.60	0.30	63.6	75.0

<124>

기준	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
> -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
> 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

기준	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
> 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
> 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

Sens. = 민감도

Spec. = 특이성

+LR = 양성 우도비

-LR = 음성 우도비

+PV = 양성 예측값

-PV = 음성 예측값

<126>

<127> 표 7: 도 9 의 ROC 곡선에 해당하는 데이터. 최대 우도 추정치 모델이 표 8 및 9 에 기재된다.

<128>

표 8:

파라미터	DF	추정값	오차 (표준)	카이 - 제곱 (Wald)	Pr > ChiSq
절편	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

<129>

<130> 표 8 comb.var.anx.psa2 를 야기하는 로짓 모델에 대한 간략화된 SAS 산출량: 최대 우도 추정치의 분석

<131> 표 9:

효과	추정치 (지점)	신뢰 (95%)	한계
log PU ANX tot	0.622	0.473	0.818
log PSA ini	26.956	3.652	198.934

<132>

<133> 표 9 comb.var.anx.psa2 를 야기하는 로짓 모델에 대한 간략화된 SAS 산출량: 홀수 비 추정치

실시예

<176> 본 발명이 실시예를 참조로 더욱 상세히 기재되고 있지만, 본 발명은 상기 실시예에 제한되는 것은 아니다.

<177> 실시예 1 :

<178> 전립선 마사지 후 소변의 처리:

<179> 혈액 전립선 특이적 항원 (PSA) 존재도에 대해 암의 위험이 높은 것으로 표시된 스크리닝 후, 임상 시험 중의 환자로부터 전립선 마사지 실험용 소변을 수득하였다. 직장 손가락 삽입에 의해 강력한 전립선 마사지 후 수득된 소변 47 ml 을 0°C 로 미리 냉각된 3 ml 0.5 M EDTA, pH 8 에 첨가하고, 즉시 0°C 로 냉각시켰다. 소변 부피가 47 ml 미만인 경우, 부피를 빙냉 인산 완충 식염수 (PBS) 용액으로 조절하였다. 냉각된 샘플을 3000 rpm 의 0°C 에서 30 분 동안 원심분리하여 세포 펠렛을 제조하였다. 상청액의 1 ml 분취물을 제거하고, 액체 질소에서 냉동시키고, 사용할 때까지 -80°C 에서 저장하였다. 세포 펠렛을 2 ml 빙냉 PBS 에서 서서히 재현탁하고, 빙상에서 Eppendorf 튜브에 옮긴 후, 4°C 에서 5 분 동안 12000 rpm 에서 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 펠렛을 액체 질소에서 냉동시키고 사용할 때까지 -80°C 에서 저장하였다.

<180> 실시예 2:

<181> 웨스턴 블롯팅:

<182> 웨스턴 블롯팅을 위한 SDS-PAGE 젤을 제조자의 지침에 따라 BioRad-Mini 젤 장치 및 1 mm 스페이서 및 15 웰의 12% T 폴리아크릴아미드 젤을 사용하여 준비하였다. 항-아넥신 A3 (아넥신 A3) 은 하기 기재되는 동일한 항체였다. 1:20,000 로 희석하였다. 재조합 GST-아넥신 A3 단백질을 Abnova Corporation (#ABV0040710002; Lot: T04G01-ANNEXINA3, 0.05 µg/µl, 61 kDa) 로부터 구입하였다. 항체 결합은 ECL 검출법 (Pierce) 을 사용하여 1:1000 으로 희석된 염소 항-토끼 IgG (Sigma A 3937, lot# 121K9151) 및, DIANA III CCD 카메라-기재 화학발광 검출기 (Raytest, Straubenhardt, Germany) 로 가시화하였다. 재조합 박테리아로 발현된 아넥신 A3 에 대항한 토끼 폴리클론 혈청은 아넥신 A3 에 대해 일차 특이성 및 아넥신 A6 에 대해 일부 교차 반응성을 나타낸다.

<183> 실시예 3:

<184> 면역 조직화학:

<185> 면역 조직화학을 Zymed PicTure PLUS Kit (Broad Spectrum, DAB, Zymed, South San Fransisco, CA) 를 사용하는 표준 호오스 래디쉬 페록시다아제 (Horse Radish Peroxidase) 면역조직화학 프로토콜에 따라 폴리클론 항-아넥신 A3 혈청을 사용하여 5 µm 파라핀 조직 섹션으로 수행하였다. 면역염색 후, 섹션을 Gill's 헤마톡실린 용액 (Sigma) 으로 반대염색하였다.

<186> 실시예: 250 명의 환자의 실험용 소변을 사용하는 임상 연구

<187> 전립선암 (PCa) 의 존재에 대해 양성 또는 음성인 것으로 진단받은 임상 환자의 실험용 소변에서 아넥신 A3 수준을 측정하였다. 다양한 부가적인 파라미터, 예컨대 혈액 중의 전립선 특이적 항원 (PSA) 수준, 및 하기 열거된 기타 변수를 측정하였다.

<188> 소변에 EDTA 를 첨가하지 않는 것을 제외하고, 실시예 1 과 같이 샘플을 수집했다. 전립선 마사지 후, 전체 실험용 소변 부피를 수집하고 기록하였다. Combur-10-Test® (Roche Diagnostics Cat. No. 11 203 479) 를 소변의 분취물 상에서 즉시 수행하고, 비중, pH, 백혈구 수, 및 니트라이트, 단백질, 글루코오스, 케톤, 우로빌리노겐, 빌리루빈, 및 적혈구 수준을 기록하였다. 그 다음 소변을 실온에서 1000 x g 에서 15 분 동안 원심

분리하였다. 상기 상청액의 세포 펠렛 및 상청액을 분리하여 취급하였다. 상청액의 최종 자취를 제거한 후, 펠렛을 1 ml 병냉 인산 완충 식염수에 재현탁하고, 액체 질소 중에서 또는 냉각된 CO₂ 에서 냉동시켰다.

개별 분취물 2 x 1.8 ml 및 2 x 50 ml 이하의 상청액을 유사하게 냉동시켰다.

- <189> 냉동된 단백질 샘플을 녹이고, 1/100 부피의 2% 테우시콜레이트를 첨가한 후, 불텍싱한 다음, 1/10 부피의 트리클로로아세트산의 첨가, 불텍싱, 및 0°C 에서 10 분 인큐베이션하였다. 이것을 4°C 에서 15 분 동안 10000 x g 에서 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 상청액을 제거하고, 펠렛을 강하게 불텍싱하여 병냉 80% 아세톤으로 펠렛을 3 회 세척하여, 잔여 TCA 를 완전히 제거한 후, 각 세척 전 후 10000 x g 에서 재원심분리하였다. 최종 원심분리 후, 상청액을 제거하고, 펠렛이 완전히 탈수되지 않도록 주의를 기울이면서 펠렛을 2 분 동안 공기 건조시켰다. 펠렛을 끓는 XT-샘플 완충액 (1x XT-Buffer: 141 mM Tris-Base; 106 mM Tris-HCl; 2% SDS; BPB; pH 약 8.5; 50 mM DTT; 35% 글리세롤) 에 재현탁시켰다.
- <190> 각 샘플의 단백질 농도는 1차원 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 (SDS-PAGE) 젤 (Criterion XT-precaster gel: Biorad, Cat# 345-0119, lot# CX070706B2) 에 각 샘플의 한정된 부피를 적재하여 추정하고, 이것은 전체 간 세포 용해물로부터 래트 단백질의 검정된 양의 연속 희석물을 함유하고, 제조자의 지침에 따라 BioRad Criterion 전기영동 장치에서 전기영동 하였다. 젤을 제조자의 지침에 따라 Sypro Ruby 를 사용하여 염색하였다. 간략히는, 젤을 50% 메탄올, 7% 아세트산을 함유하는 수용액으로 2 x 30 분 고정시킨 후, Sypro Ruby 용액 (Molecular Probes, # S 12001) 으로 밤새 염색하였다. 젤을 10% 메탄올, 7% 아세트산으로 30 분, 그 다음 물로 2x 5 분 세척하였다. Sypro Ruby 로의 단백질 염색을 Diana III CCD-기재 디지털 영상기 (Raytest Isoto-pennmessgerate GmbH, Straubenhard Germany: Sypro Filter, 605nm) 로 정량화하였다.
- <191> Sypro Ruby-염색된 젤 레인의 단백질 염색 강도를 표준 단백질과 환자 소변 샘플 사이에서 비교하였다. 상청액에 대해, 전체 레인을 측정을 위해 사용하였다. 소변 펠렛 샘플에 대해 오직 우세한 유로모듈린 밴드 아래의 면적만을 고려하여, "유로모듈린 정정된 단백질 농도" 를 산출하였다.
- <192> 각 샘플 중의 아넥신 A3 및 중성구 젤라티나아제-관련 리포칼린 (NGAL, SWISSPROT Accession P80188, 중성구에 대한 마커) 수준을 상기 기재된 바와 같이 SDS-PAGE 젤에 정상화된 단백질 양을 적재하여 정량화하였고, 여기서 각 젤은 PC3 인간 전립선암 세포주로부터 표준화된 단백질 추출물 2µg 의 3 개 반복 레인을 함유하였던 반면, 이것은 아넥신 A3 및 NGAL 둘 다의 통상적인 참조 양을 함유하였다. 상기 젤로부터의 단백질을 표준 방법에 따라 PVDF (폴리비닐리덴 플루오라이드) 막 상에 15V 정전압 및 3 mA/cm² 의 한계에서 1.5 시간 동안 웨스턴 블롯팅하였다.
- <193> 블롯팅된 막 상의 비-특이적 단백질 결합 부위를 5% 재용해된 건조 밀크 분말을 함유하는 TBS (175 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 20 mM Tris, pH 7.4) 중에서 완만하게 진동시켜 2 시간 인큐베이션에 의해 차단하였다. 아넥신 A3 (1:20000 희석, 폴리클론 토끼 항-인간 아넥신 A3) 또는 NGAL (1:500 희석, 항-인간 리포칼린, 염소로부터의 폴리클론, R&D Systems, Nr. AF1757, lot JBH025051) 에 특이적인 일차 항체를 첨가하였다. 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션 후, 완충액을 제거하고, 10 분 동안 TBS 로 3 회 세척한 다음, 토끼 IgG (인간 IgG 및 마우스 IgG 로 미리 흡수된 염소 항-토끼-IgG, 호오스 래디쉬 페록시다아제에 공액됨. Santa Cruz, #sc-2054, lot# G2005. 1:5000 희석) 또는 염소 IgG (인간 IgG 및 마우스 IgG 로 미리 흡수된, 토끼로부터의 항-염소 IgG, 호오스 래디쉬 페록시다아제에 공액됨. Santa Cruz Biotechnology, #sc-2922 lot# C1405. 1:5000 희석) 에 대항하는 적합한 각각의 이차 항체로 인큐베이션시킨다. 향상된 화학발광 (ECL) 을 Super Signal West Dura, Pierce (0.1 ml/cm²) 의 첨가 후 측정하였다.
- <194> NGAL 또는 아넥신 A3 신호의 값을 각 젤 상의 3 개의 참조 PC3 레인의 각각으로부터 평균 신호에 대해 정상화하였으며, 정상화된 아넥신 A3 또는 NGAL 값을 통계 분석에 대해 사용하였다. 상기 값으로부터, 양쪽 단백질의 수준을 절대적 샘플 부피에 대해 계산하였고, 또한 단백질 농도에 대해 정상화하였다. 상기 값을 펠렛 및 상청액 뿐 아니라, 펠렛:상청액 비에 대해 개별적으로 계산하였다. 암과 관련된 PSA 값과 비교된 파라미터를 표 2 에 요약한다.
- <195> 기록된 임상 파라미터에는 혈액 PSA 수준, 유리 총 PSA 수준, 및 복합 PSA 수준 뿐 아니라, 표준 디지털 직장 검사 (DRE) 과정 동안, 실험용 소변의 기증 후 수득된 전립선 조직 생검의 조직학적 평가가 포함된다. 높은 수준의 혈청 PSA 및 DRE 가 전립선 절제의 필요성을 나타내는 경우에서, 조직학적 평가를 사전 생검 없이 물질에서 수행하였다.

- <196> 상기 데이터 파라미터를 병원에서 기록된 임상 데이터가 또한 포함되는 통계 분석에 포함시켰다. 전립선 생검 또는 전립선 절제를 모든 환자로부터 수득하고, 임상적이 상기 조직의 조직학적 검사에 기반한 PCa 에 대해 양성 또는 음성의 진단을 내린다. 혈액 PSA 수준을 또한 표준 임상 실시예 따라 수득하였다. 미국 식약청 (FDA) 은 50 세 이상의 연령의 남성에서 전립선암의 매년 스크리닝을 위해 PSA 시험을 승인하였다. 4 내지 10 ng/mL (밀리리터 당 나노그램) 사이의 PSA 수준을 의심스러운 것으로 간주하고, 직장 초음파 이미지화 및 지시되는 경우, 생검을 해야만 한다. PSA 는 가양성- 및 가음성-경향이 있다. 고등급 암을 포함하는 생검-검출된 전립선암은, 4.0 ng/mL 이하의 PSA 수준을 갖는 남성 중에서 흔하지 않으며, 수준은 일반적으로 정상 범위 내인 것으로 생각된다.
- <197> 데이터 세트는 250 명의 환자로부터의 복합 데이터 파일로 이루어진다. 초기 PSA 값은 250 명의 환자 중 243 명에서 가능하였고, 7 명의 환자가 빠졌다. 게다가, 마지막 7 명의 환자 중 두명 및 5 명의 다른 환자는 생검의 조직학적 결과가 없었다 (전립선암 ○/×). 그러므로, 모든 결과는 여기서 오직 PCa 상태가 공지된 243 명의 환자: PCa 진단이 양성인 140 명의 환자 및 음성인 103 명의 환자에서의 데이터만을 사용하여 제시하였다. 도 8 및 9 에서, 임상 결과를 사용하여 생성된 Receiver Operating Characteristic (ROC) 곡선은 PSA 외의 모든 ROC 곡선에 대한 반대 값을 사용하여 나타내고; 즉, 암 환자에서 더 높은 PSA 값과 관련시키기 위해, 암 환자에 대해 측정된 더 낮은 평균 아넥신 A3 신호와 함께, ROC 곡선 하의 영역을 관찰하였다.
- <198> PSA 에 대한 ROC 곡선 하의 면적 (AUROC) 은 0.684 였고, 이것은 0.5 의 AUROC 와 유의하게 상이하나, 클리닉에 참여하는 환자 모집으로 인해 다소 인위적으로 높았다 (분야의 모든 전문가에게 공지된 바와 같음). 그러나, 환자 중 일부가 다른 센터에서 높은 PSA 기록을 받은 후, 본 시험 클리닉에서 시험을 받았기 때문에, 본 환자 집단에 통상 높은 비율의 암 환자 (57%) 가 있었음을 명시한다. 측정된 개별 아넥신 A3-기재 변수에 대한 AUROC 값은 동일한 범위에 있고 (최대값은 PU_ANX_tot 에 의해 획득됨, AUROC 0.666; 데이터는 제시하지 않음), 또한 0.5 와 유의하게 상이하다. 그러므로, 아넥신 A3 은 또한 PSA (2-6 ng/ml 및 4-10 ng/ml) 의 중요한 회색 영역에 있기 때문에, PSA 를 전체적으로 대체하기 위해 사용될 수 있을 것이고, 아넥신 3 은 허용 가능한 민감도에서 높은 특이성을 가지고 고려할만한 이점을 제공하고 (표 4 내지 6 에서 ROC 곡선 0.78 및 0.791 참조), PSA-값의 전체 범위를 고려하여, 유사한 전체 수행을 나타낸다.
- <199> 본 환자 선별에 있어서 아넥신 A3 에 대한 예비 선택은 없었고, 아넥신 A3 발현/분비 및 혈류로의 PSA 유입이 개별 메커니즘에 의해 조절되는 것을 표시하는, 아넥신 A3 값 및 PSA 값 사이의 상호 관련이 없었다. PSA 또는 아넥신 A3 수준과 환자 연령에 관한 상호 관련을 관찰하지 않았다. 아마도 높은 비율의 암-양성 환자는 (그 중 일부가 다른 센터에서 측정된 의심스럽게 높은 PSA 값을 근거로 예비 선택되었음), 연령이 증가함에 따라 예상될 것인, 예상되는 더 높은 PSA 수준의 존재도를 뒤집었다. 그러나 아넥신 A3 이 미리 선택되지 않았으므로, 그 수준이 아마도 연령-관련되지 않는 것으로 결론지었다.
- <200> 간격 2 ng/mL 내지 6 ng/mL 의 초기 PSA 값의 환자의 하부 집단의 통계 분석에 특정 강조를 둔다. 다시, 오직 57 PCa 환자 및 52 비-PCa 환자가 하부 집단을 정의하는 PSA 기준을 충족시킴에도 불구하고, 측정된 개별 파라미터에 대한 모든 7 개 AUROC 값은 0.5 과 유의하게 상이하다. 전체 결과와는 반대로, PSA_ini 의 AUROC 는 더이상 가장 큰 값이 아니나, 아넥신 A3 기재 변수의 6 개 AUROC 값 중 5 개에 의해 대체된다 (P_ANX_ug 만 오직 제외됨). 가장 큰 AUROC 값, 0.735 은, PU_ANX_tot 에 의해 획득된다.
- <201> PSA 범위 2 ng/mL - 6 ng/mL 외에도, PSA 범위 2.5 ng/mL - 12 ng/mL 은 특별한 관심대상이다: 상기 하부 집단에서 PSA_ini 그 자체가 열악하게 수행한 반면 (AUROC 0.580), U_ANX_tot 는 최상으로 수행한다 (AUROC 0.693). 그러므로, 상기 PSA 범위는 계통 증거의 방식에 의해 제시된, 하기 2-단계 절차의 특징을 평가하기에 적합한 것으로 보인다:
- <202> 첫번째 단계에서, 환자를 그의 초기 PSA 값에 따라 3 계열 중 1 개로 할당한다:
- <203> PSA_ini < 2.5 → 저 PCa 위험,
- <204> PSA_ini > 12 → 고 PCa 위험,
- <205> PSA_ini [2.5, 12] 내 → 침윤 진단 절차가 표시되었는지 아닌지의 여부를 결정하는 두번째 단계로서 U_ANX_tot 에 기초한 시험의 적용.
- <206> (첫번째 2 개의 경우는 도 8 의 주석에서 "가장 명백한 결정" 으로 언급된다)

<207> 그 다음 상기 2-단계 절차를 단일 변량에 혼입하고, 본원에서 다음과 같이 정의되는, twostepvar1 로 부른다.

$$\text{twostepvar1} := \begin{cases} 100000, & \text{if PSA_ini} < 2.5 \\ U_ANX_tot, & \text{if PSA_ini} \in [2.5, 12] \\ 0, & \text{if PSA_ini} > 12. \end{cases}$$

<208>

<209> U_ANX_tot 의 낮은 값은 전립선암의 증가된 위험 및 높은 값은 더 낮은 위험을 나타낸다. 값 100000 은 실제로 측정된 가장 큰 U_ANX_tot 값보다 항상 더 커야만 하는 것을 확실히 하기 위해 선택된다. twostepvar1 의 수행은 도 8 에서 볼 수 있다. (2.5 미만 12 초과의 PSA_ini 값에 대한 twostepvar1 의 불변성은 ROC 곡선이 현저한 직선 구획으로 시작 및 끝나게 한다). 0.740 의 AUROC 는 물론 0.5 와 매우 유의하게 상이하다. 게다가, 통상의 PSA 시험과의 비교는: 예를 들어, 기준 "PSA_ini > 4" 는 상기 분석 데이터 세트에서, 80.3 % 의 민감도 및 49.5 % 의 특이성을 야기한다는 것을 깨우쳐준다. 동일한 민감도, 80.3 % 은, 기준 "twostepvar1 < 450" 을 사용해서 취득되나, 이제 57.4 % 의 특이성이 달성된다.

<210> 도 8 의 실시예는 PSA 수준에 따라 다른 상이한 측정 (PSA 또는 아넥신 A3 값) 에 의존하는 단계된 AUROC 값의 원리를 보여준다. 전문가에게 명백할 것인 상기 원리는, 표 4 내지 6 에서 제시된 여러 결과에서 사용된 것과 동일하고, 이것은 더 높은 AUROC 값을 제공한다. 중간 수준의 혈청 PSA 를 갖는 환자에서 변수인 아넥신 A3 의 암 예측의 뛰어난 수행은 중간 PSA 값을 갖는 환자에 대한 아넥신 A3-기재 다중 변수를 고려하여 추가로 증명된다.

<211> 상기 논증된 방법 및 전략에 따르면, 표 3 내지 6 에 제시된 파라미터에 대해 ROC 곡선 분석을 수행하였다.

<212> 부가적으로 상기 변수에 대해, 논리 회귀 분석에 의해 발생된 하기 파라미터를 사용하여 ROC 곡선 분석을 수행하였다.

<213> **anx.comb.var** 은 하기 관계식에 따른 변수로서 조합된 U_ANX_ug 및 U_ANX_tot 를 사용하는 논리 회귀 분석에 근거한다.

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

<214>

<215> **comb.var.anx.psa1** 은 하기 관계식에 따른 변수로서 조합된 PSA_ini 및 U_ANX_tot 를 사용하는 논리 회귀 분석에 근거한다.

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

<216>

<217> **comb.var.anx.psa2** 는 하기 관계식에 따른 변수로서 조합된 PSA_ini 및 PU_ANX_tot 를 사용하는 논리 회귀 분석에 근거한다.

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

<218>

<219> 극히 높은 또는 극히 낮은 PSA 값이 암/비-암 상태의 비교적 신뢰성있는 할당을 제공하는 반면, 표 4 내지 6 의 결과는 명확하게 아넥신 A3-기재 파라미터의 다양한 조합이 PSA 의 중간 값에 대해 PSA 를 능가하는 것을 증명한다. 그러므로, 바람직하게는 상청액 대 펠렛 비를 포함하는, 실험용 소변 상청액 또는 펠렛 중의 아넥신 A3 수준의 측정은 개선된 진단 신뢰성을 제공한다.

<220> 상기 결과의 유용성을 증명하기 위해, **comb.var.anx.psa2** 에 대한 ROC 곡선을 도 9, 및 표 7 에 상세하게 제시한다. 상기 ROC 곡선은 2 ng/mL 내지 6 ng/mL 사이의 PSA 값을 갖는 환자에게만 기초하고, 분석을 위한 상기 범위 중 오직 109 명의 환자의 이용에도 불구하고 0.791 의 매우 유의한 AUROC 값을 산출한다. 게다가, 상기 ROC 곡선은 민감도 (진양성 분획) 가 특이성 (진음성 분획) 에 비해 극도로 급상승하는 것을 나타내고, 이것은 예측값과 관련해 꽤 유리하다. 예를 들어 54% 의 민감도 수준에서, 특이성은 96% 이다 (도 9, 표 7). **anx.comb.var** 에 대한 ROC 곡선을, 91% 의 특이성을 갖는 38% 의 민감도 (AUROC 0.78) 로 PSA 범위 4 ng/mL 내지 10 ng/mL 에 대해 유사하게 수행하였다. 본원에 기재된 데이터는 아넥신 A3 이 전립선암에 대한 신규하고 강력한 마커이고, 이것은 특히 PSA 값이 신뢰성이 없는 환자에서 강력하다는 것을 설득력있게 보여준다.

<221> 이를 함께 취하여, 2중-블라인드 및 다중-센터인 세번째 종합 연구는 가장 강하고 통계적으로 유의한 진단 관독이 표준 저속 원심분리로 잠재적 전립선암 환자에 대한 표준 임상 절차 (DRE) 동안 수득된 전립선 마사지 후 실험용 소변의 상청액 중의 아넥신 A3-양이라는 것을 보여준다. 이것은 펠렛화된 샘플의 사전 가용화 (세제, 염, 화학물질 등의 간섭의 위험) 없이, ELISA-기재 또는 기타 항체-기재 검정법에 직접 접근하는 것을 가능하게 하기 때문에 매우 호의적이다. 상청액 중의 상기 아넥신 A3-양은 비-암에서 암과 반대로 연관되고, 비-암 경우의 부가적이고 연속되는 프로파일링이 전체 진단값을 심지어 개선할 수 있다는 특정 징후와 함께, 아넥신 A3-양이 더 높다.

<222> 결과는 첫번째 2 개의 연구와 완전히 일치하고, 이것은 더 적고, 일부 양상에서 샘플 수집 및 샘플 대조군과 관련하여 불완전하다. 첫번째 연구에는 오직 펠렛만이 포함되고 (도 6), 그러나 그럼에도 불구하고 여기서 암 환자에 대한 반대 상관 관계가 발견되었다. 상기 연구에서 건강한 지원자 그룹을 포함시켰고, 이것은 수반된 연구에 대한 경우가 아니었다. 상청액-아넥신 A3 및 펠렛-아넥신 A3 을 고려하는 두번째 연구 동안 (통계적으로 유의한 용액을 충족시키기에는 너무 적은 샘플 수를 갖기는 하나), BPH 및 기타 비-암에 비교되는 바와 같이, 암 환자에서 더 높은 상청액 대 펠렛 비에 대한 경향이 있었다. 이것은 명백하게, 낮은 펠렛 아넥신 A3-양이 약간 더 높은 아넥신 A3-양을 더 높은 비를 갖는 암 환자와 조합되기 때문에 (도 7) 첫번째 및 세번째 연구와 완벽하게 일치한다. 비-암 (예를 들어, BPH, 섬유증 및 기타) 에서, 명백하게 전체적으로 펠렛 및 상청액 중의 고려할만하게 더 큰 아넥신 A3-양이 더 낮은 전체 비와 조합된다. 상청액 중의 강한 아넥신 A3-신호는 실험적이고 임상적인 이점 및 용이한 진단성 관독을 제공한다.

도면의 간단한 설명

<134> 도 1: 웨스턴 블롯에 의한 항-아넥신 A3 토끼 폴리클론 항혈청의 특징화. (A) 1-D SDS 젤의 웨스턴 블롯. 레인 1: Magic Mark (Invitrogen) 분자량 마커 레인 당 3 μl 은, 120, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 및 20 kDa 질량을 제공한다. 반복된 레인은 환자 29 로부터의 암 (레인 2-4) 및 양성 (레인 5-7) 전립선으로부터 전체 조직 단백질 추출물 15 μg 을 함유한다. 필터를 항-아넥신 3 폴리클론 혈청 (1:20,000) 을 사용하여 인큐베이션하였다. 레인 1-7 은 전체 필터로부터 신호의 가색조 이미지를 나타낸다. 박스 안의 삽입부 (레인 1' 및 2') 는 레인 1 및 2 의 단일 색조 묘사를 나타낸다. 아넥신 A3 및 재개된 아넥신 A6 밴드의 위치를 표시한다. (B) 가색조 중의 환자 29 의 암 샘플로부터 단백질 100 μg 추출물의 2D-PAGE 웨스턴 블롯은 폴리클론 혈청에 대한 교차 반응성을 갖는 단백질의 분포를 제시한다. 3 개의 가장 강한 (적색 표시) 아넥신 A3 스폿의 확인은 MALDI-TOF PMF 에 의해 확인되었고 (데이터는 제시하지 않음), 그 중 가장 강한 것은 단백질학 분석에서 검출된 단백질 스폿에 해당된다.

<135> 도 2:

<136> 아넥신 3 의 면역 조직화학: 항-아넥신 A3 폴리클론 혈청 (희석: 1:100) 의 아넥신 A3 면역반응성을 A) 양성 전립선 조직의 상피 세포에서 발견하였다. B) 체모양의 (cribbriiform) 전립선 상피내 신생물생성 (neoplasia) (PIN) 및 C) 암 조직에서, 상피 및 암 세포를 염색하였다. 확산 상피외 국소화의 상승된 수준이 또한 관찰되었다. 갈색 색조는 아넥신 A3-특이적 페록시다아제 염색을 표시한다. 청색 색조는 Gill's 헤마톡실린 용액 (Sigma) 으로의 조직의 반대 염색을 나타낸다.

<137> 도 3:

<138> 암 환자의 전립선 마사지 후 수득된 소변의 실험용 펠렛 중의 아넥신 A3 의 웨스턴 블롯 정량화. 상부 패널은 블롯된 단백질로부터 화학발광 아넥신 A3 신호를 나타낸다. 하부 패널은 Ponceau S ('단백질') 로 염색된 적재된 단백질을 나타낸다. 각 젤은 분자량 표지 (M) 뿐 아니라, 아넥신 A3 을 함유하는 전립선 종양으로부터의 총 세포 단백질 용해물 7.5 μg 을 양성 대조군 (+C) 으로서 이중으로 함유한다.

<139> 도 4:

<140> BPH 환자의 전립선 마사지 후 수득된 소변의 실험용 펠렛 중의 아넥신 A3 의 웨스턴 블롯 정량화. 기타 상세 사항은 도 3 을 따른다.

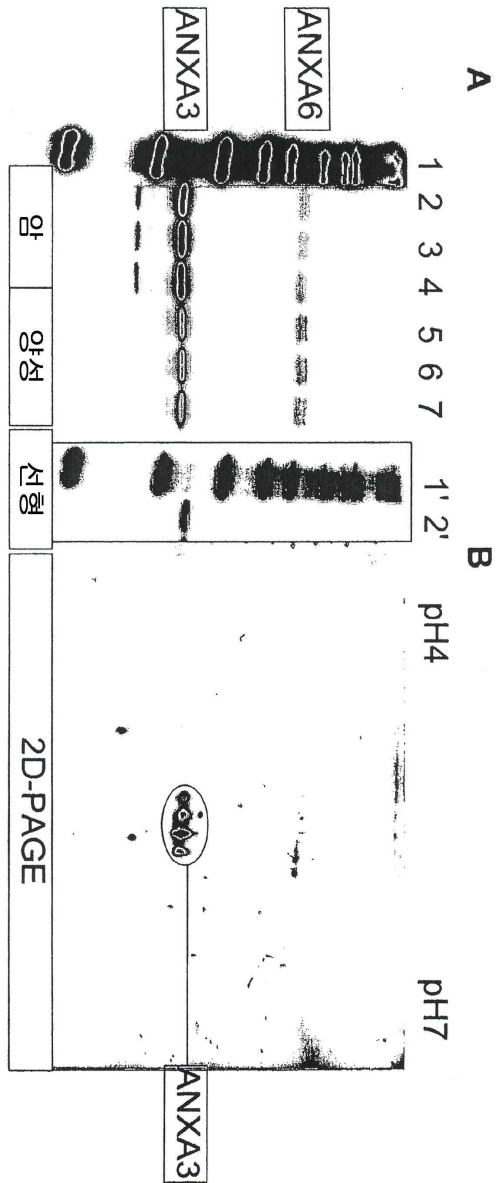
<141> 도 5:

<142> 비-암 대조군 환자의 전립선 마사지 후 수득된 소변의 실험용 펠렛 중의 아넥신 A3 의 웨스턴 블롯 정량화. 기타 상세 사항은 도 3 을 따른다.

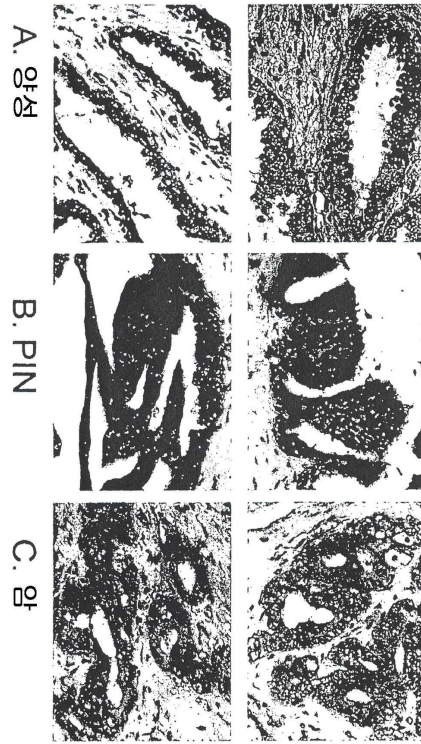
- <143> 도 6:
- <144> 도 3 내지 도 5 에서 나타나는 바와 같이, 전립선 마사지 후 환자의 소변의 세포 펠렛으로부터 정상화된 아넥신 A3 신호. 상이한 젤로부터의 아넥신 A3 값을 아넥신 A3 을 함유하는 전립선 종양 (PR-26CA) 으로부터 총 세포 단백질 용해물 7.5 μg 을 양성 대조군으로서 도 3 내지 도 5 각각에서 자의적 단위로 정상화한다.
- <145> 도 7:
- <146> 전립선 마사지 후 환자의 실험용 소변 샘플의 EDTA-처리된 상청액과 세포 펠렛 사이의 아넥신 A3 함량의 비 (도 6 에 함유되지 않은, 부가적 환자 자료), a.u. 는 자의적 단위이다.
- <147> 도 8:
- <148> ROC 곡선 - 2-단계 절차 1:
- <149> "2.5 \leq PSA_ini \leq 12 인 경우 U_ANX_tot 사용, 그렇지 않으면 가장 명백한 측정"
- <150> 설명:
- <151> VARIABLE = IF(PSA_ini<2.5;100000;IF(PSA_ini<=12;u_anx_tot;0))
- <152> twostepvar1
- <153> 분류 변수: PCa
- <154> 양성 그룹: PCa = 1
- <155> 샘플 크기 = 137
- <156> 음성 그룹: PCa = 0
- <157> 샘플 크기 = 101
- <158> 유병율 (%) = 57.6
- <159> ROC 곡선 하의 면적 = 0.740
- <160> 표준 오차 = 0.033
- <161> 95% 신뢰 구간 = 0.679 내지 0.794
- <162> P (면적 =0.5) < 0.0001
- <163> 도 9:
- <164> ROC 곡선 - T comb.var.anx.psa2:
- <165> $\equiv -2.386 + 3.294 \log(1+\text{PSA_ini}) - 0.475 \log(1+\text{PU_ANX_tot})$
- <166> 설명:
- <167> 선택 : AND(PSA_ini \geq 2;PSA_ini \leq 6)
- <168> 분류 변수 PCa
- <169> 양성 그룹: PCa = 1 , 샘플 크기 = 57
- <170> 음성 그룹: PCa = 0, 샘플 크기 = 52
- <171> 유병율 (%) = 52.3
- <172> ROC 곡선 하의 면적 = 0.791
- <173> 표준 오차 = 0.043
- <174> 95% 신뢰 구간 = 0.703 내지 0.863
- <175> P (면적=0.5) < 0.0001

도면

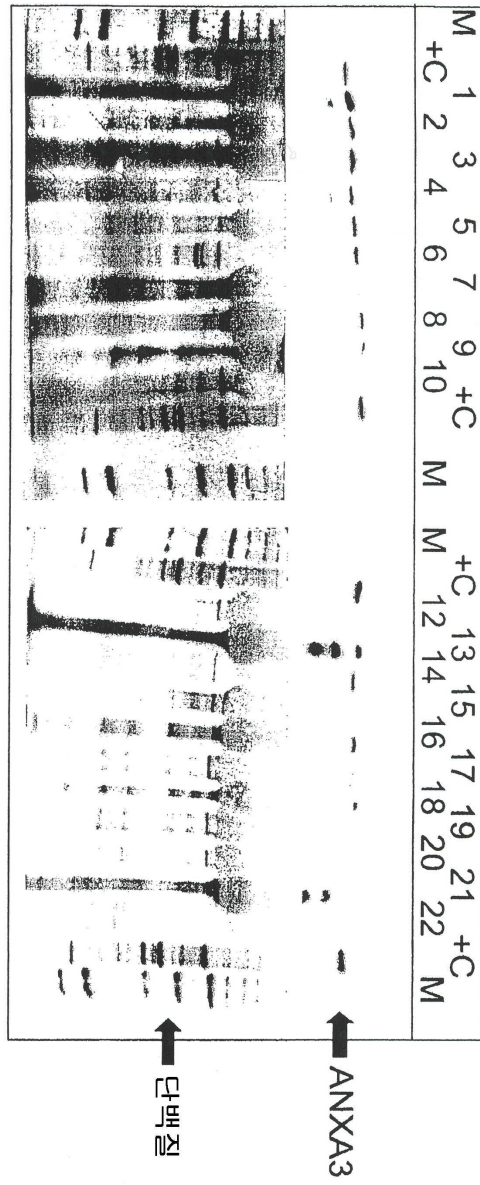
도면1



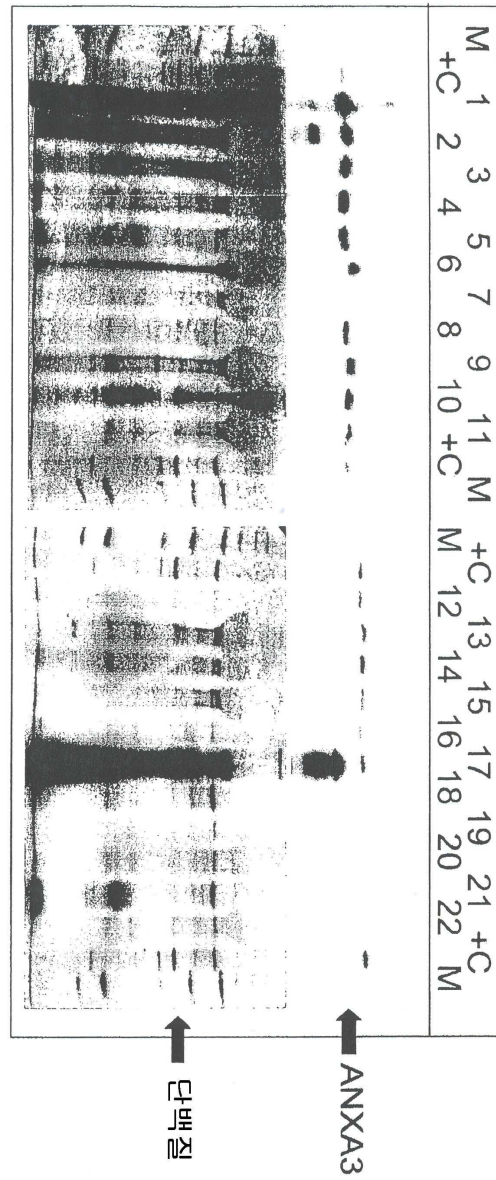
도면2



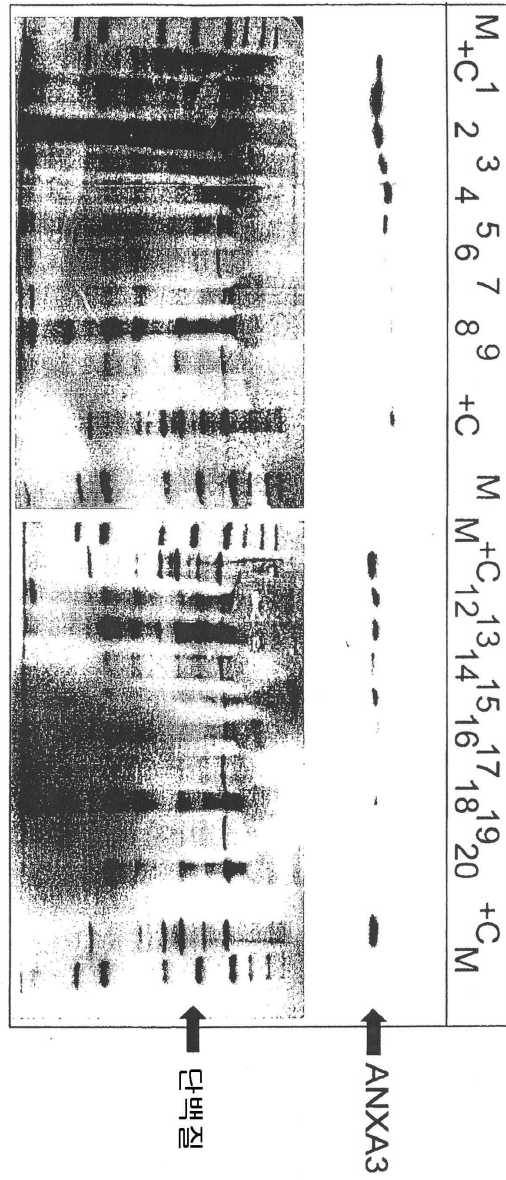
도면3



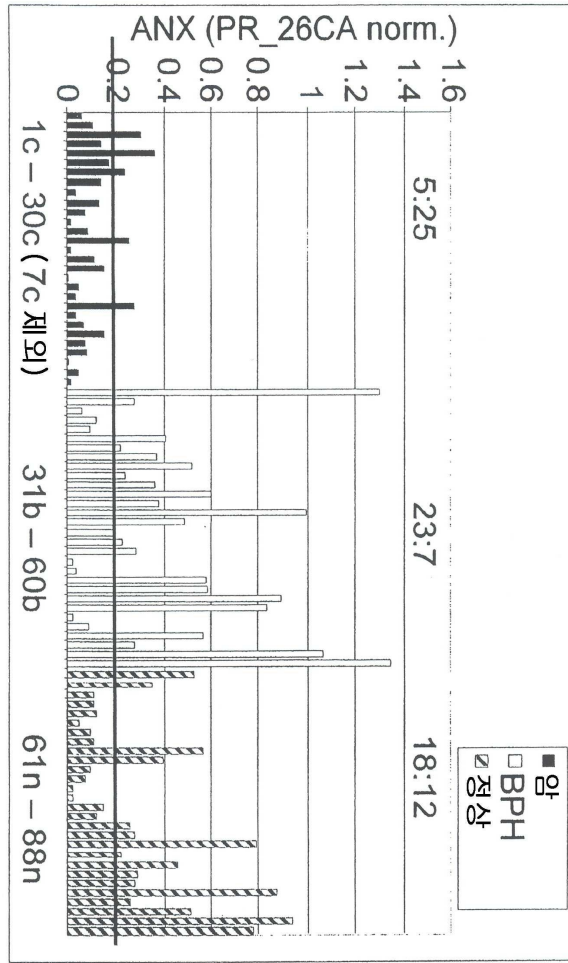
도면4



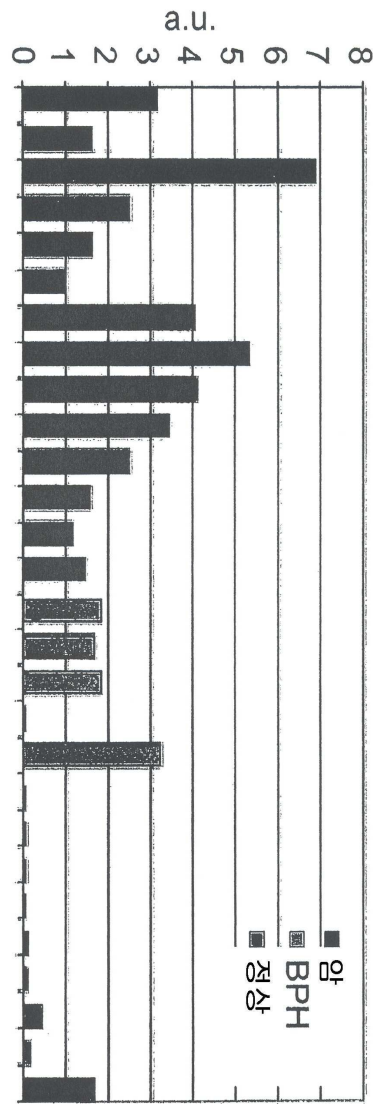
도면5



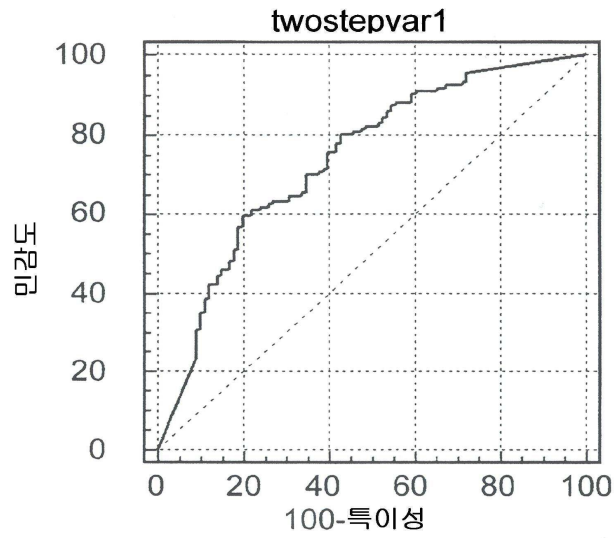
도면6



도면7



도면8



도면9

