

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6074049号
(P6074049)

(45) 発行日 平成29年2月1日(2017.2.1)

(24) 登録日 平成29年1月13日(2017.1.13)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)
G O 1 N 33/53 (2006.01)
G O 1 N 33/574 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A
 G O 1 N 33/53 M
 G O 1 N 33/574 A
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 35/04

請求項の数 35 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-536237 (P2015-536237)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月9日(2013.10.9)
 (65) 公表番号 特表2016-500517 (P2016-500517A)
 (43) 公表日 平成28年1月14日(2016.1.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/002866
 (87) 国際公開番号 W02014/057357
 (87) 国際公開日 平成26年4月17日(2014.4.17)
 審査請求日 平成27年5月29日(2015.5.29)
 (31) 優先権主張番号 61/713, 318
 (32) 優先日 平成24年10月12日(2012.10.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 515097535
 インバイオモーション エセ. エレ.
 スペイン国 08021 バルセロナ,
 エントロ. 1 600, アベニーダ
 ディアゴナル
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74) 代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 c-M A Fを用いた前立腺がん転移の診断、予後診断および処置のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

前立腺腫瘍サンプル中の c-M A F 遺伝子の発現レベルを、前立腺がんを有する被験体における転移のおよび／または前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の指標とするインビトロでの方法であって、前記方法は、

(i) 前記被験体の前立腺腫瘍サンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルを定量する工程および

(i i) (i) において得られた発現レベルをコントロールサンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、

ここで前記腫瘍サンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルが、前記コントロールサンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルと比較して上昇している場合、前記被験体は、転移について陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高い、方法。

【請求項 2】

前立腺腫瘍サンプル中の c-M A F 遺伝子の発現レベルを、前立腺がんを有する被験体のための個別化治療のデザインのための指標とするインビトロでの方法であって、

(i) 前記被験体の前立腺腫瘍サンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルを定量する工程および

(i i) (i) において得られた発現レベルをコントロールサンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、

ここで前記腫瘍サンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルが、前記コントロール

10

20

サンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルと比較して上昇している場合、前記被験体は、前記がんの転移の予防、阻害および／または処置を意図する治療を受けるのに適格である、方法。

【請求項 3】

前記転移が、骨転移である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記骨転移が、溶骨性転移である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

骨転移性腫瘍組織サンプル中の c-M A F 遺伝子の発現レベルを、骨転移を有する前立腺がんを有する被験体のための個別化治療のデザインのための指標とするインビトロでの方法であって、

10

(i) 前記被験体の骨転移性腫瘍組織サンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルを定量する工程および

(i i) 工程 (i) において得られた発現レベルをコントロールサンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、

ここで前記腫瘍組織サンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルが前記コントロールサンプル中の前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルと比較して上昇している場合、前記被験体は、骨分解の予防または阻害を意図する治療を受けるのに適格である、方法。

【請求項 6】

前記骨分解を予防または阻害することが意図される薬剤が、ビスホスホネート、R A N K L インヒビター、P T H または P T H L H インヒビター（中和抗体およびペプチドを包含する）、P R G アナログ、ラネル酸ストロンチウム、D K K-1 インヒビター、M E T および V E G F R 2 の二重インヒビター、エストロゲンレセプター調節因子、カルシトニン、ラジウム-223、およびカテプシン K インヒビターからなる群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記 R A N K L インヒビターが、R A N K L 特異的抗体、R A N K L 特異的ナノボディおよびオステオプロテゲリンからなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 R A N K L 特異的抗体が、デノスマブである、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記ビスホスホネートが、ゾレドロン酸である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルの定量が、前記遺伝子のメッセンジャー R N A (m R N A) または前記 m R N A のフラグメント、前記遺伝子の相補 D N A (c D N A) または前記 c D N A のフラグメントを定量する工程を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記発現レベルが、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 、または D N A もしくは R N A アレイ、またはヌクレオチドハイブリダイゼーション技術によって定量される、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記 c-M A F 遺伝子の発現レベルの定量が、前記遺伝子によってコードされるタンパク質またはそのバリエーションのレベルを定量する工程を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

前記タンパク質のレベルが、ウエスタンブロット、E L I S A 、免疫組織化学またはタンパク質アレイによって定量される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

c-M A F 遺伝子の増幅を、前立腺がんを有する被験体における転移の、および／また

50

は前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の指標とするインビトロでの方法であって、前記 c-M A F 遺伝子が、参照遺伝子コピー数と比較して前記被験体の腫瘍サンプルにおいて増幅しているかどうかを決定する工程を含み、ここで前記参照遺伝子コピー数と比較した前記 c-M A F 遺伝子の増幅は、転移の存在または転移を起こすリスクがより高いことを示す、方法。

【請求項 1 5】

前記 c-M A F 遺伝子の増幅が、遺伝子座 1 6 q 2 2 - q 2 4 の増幅を決定することによって決定される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 c-M A F 遺伝子の増幅が、c-M A F 遺伝子特異的プローブを使用することによって決定される、請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の方法。

10

【請求項 1 7】

前記参照遺伝子コピー数が、転移に罹患していない被験体由来の前立腺がんの腫瘍組織サンプルのものである、請求項 1 4 ～ 1 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8】

前記増幅が、インサイチュハイブリダイゼーションまたは P C R によって決定される、請求項 1 4 ～ 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 9】

前記転移が、骨転移である、請求項 1 4 ～ 1 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 0】

20

前記骨転移が、溶骨性転移である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前立腺腫瘍サンプル中の c-M A F の発現レベルを、前立腺がん罹患している被験体をコホートに分類することの指標とする方法であって、前記方法は、a) 前記被験体の前立腺腫瘍サンプル中の c-M A F の発現レベルを決定する工程；および b) 前記サンプル中の c-M A F の発現レベルを c-M A F 発現の所定の参照レベルと比較する工程；を含み、前記サンプル中の c-M A F の前記発現レベルに基づいて、前記被験体は、コホートに分類されることを特徴とし、ここで、前記サンプル中の c-M A F の発現レベルが、c-M A F 発現の前記所定の参照レベルと比較して上昇している場合、前記コホートの被験体は、転移の上昇したリスクを有すると分類される、方法。

30

【請求項 2 2】

前記 R A N K L 特異的ナノボディは、A L X - 0 1 4 1 である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 M E T および V E G F R 2 の二重インヒビターは、カボザンチニブである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前立腺がん罹患している被験体における骨転移の処置のための医薬製品の調製における、骨分解を予防または阻害することができる薬剤の使用であって、ここで、前記被験体は、転移性腫瘍サンプルにおいてコントロールサンプルと比較して上昇した c-M A F レベルを有すると決定されており、ここで、前記薬剤は、R A N K L 特異的ナノボディ A L X - 0 1 4 1 である、使用。

40

【請求項 2 5】

前立腺がん罹患している被験体における骨転移の処置のための医薬製品の調製における、骨分解を予防または阻害することができる薬剤の使用であって、ここで、前記被験体は、転移性腫瘍サンプルにおいてコントロールサンプルと比較して上昇した c-M A F レベルを有すると決定されており、ここで、前記薬剤は、M E T および V E G F R 2 の二重インヒビターカボザンチニブである、使用。

【請求項 2 6】

前記 c-M A F 遺伝子特異的プローブは、V y s i s L S I / I G H M A F D u

50

a l C o l o r 二重融合プローブである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 7】

c-M A F の発現レベルを、前立腺がん罹患している被験体から得たサンプルをタイプ分けするための指標とするインビトロでの方法であって、前記方法は、

前記サンプル中の c-M A F の発現レベルを定量する工程を包含し、前記 c-M A F の定量した発現レベルと、c-M A F 発現の所定の参照レベルとを比較することによって、前記サンプルがタイプ分けされることを特徴とし、

ここで前記タイプ分けする工程は、前記被験体における骨転移のリスクに関連した予後情報を提供する、方法。

10

【請求項 2 8】

c-M A F 遺伝子の転座を、前立腺がん罹患している被験体における前立腺がんの骨転移の指標とするインビトロでの方法であって、前記方法は、前記 c-M A F 遺伝子が前記被験体から得た腫瘍サンプル中で転座しているか否かを決定する工程を包含し、ここで前記 c-M A F 遺伝子の転座は、骨転移の増大したリスクを示す、方法。

【請求項 2 9】

c-M A F 遺伝子の増幅を、骨転移を伴う前立腺がんを有する被験体の個別化治療のデザインの指標とするインビトロでの方法であって、前記 c-M A F 遺伝子が、参照遺伝子コピー数と比較して前記被験体の腫瘍サンプル中で増幅されているか否かを決定する工程を包含し、ここで前記参照遺伝子コピー数と比較しての前記 c-M A F 遺伝子の増幅は、前記被験体が、骨分解を予防または阻害することが意図された治療を受ける候補であることを示す、方法。

20

【請求項 3 0】

前記骨分解を予防することまたは阻害することが意図された薬剤は、ビスホスホネート、R A N K L インヒビター、P T H または P T H L H インヒビター（中和抗体およびペプチドを包含する）、P R G アナログ、ラネル酸ストロンチウム、D K K-1 インヒビター、M E T および V E G F R の二重インヒビター、エストロゲンレセプター調節因子、カルシトニン、ラジウム-2 2 3、およびカテプシン K インヒビターからなる群より選択される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記 R A N K L インヒビターは、R A N K L 特異的抗体、R A N K L 特異的ナノボディ、およびオステオプロテゲリンからなる群より選択される、請求項 3 0 に記載の方法。

30

【請求項 3 2】

前記 R A N K L 特異的抗体は、デノスマブである、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記ビスホスホネートは、ゾレドロン酸である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

c-M A F の前記発現レベルを定量するための手段は、前記 c-M A F 遺伝子、1 6 q 2 3 遺伝子座もしくは 1 6 q 2 2-1 6 q 2 4 染色体領域を特異的に結合および／もしくは増幅するプローブおよび／もしくはプライマーのセットを含む、請求項 2 7 に記載の方法。

40

【請求項 3 5】

前記転移の予防、阻害および／または処置を意図する治療が、c-M A F 阻害剤；化学療法、ホルモン療法および免疫療法を含むがこれらに限定されない全身性処置；放射線治療；手術；m T o r インヒビター；S r c キナーゼインヒビター；C O X-2 インヒビター；アルファラディン；ビスホスホネート；R A N K L インヒビター；P T H または P T H L H インヒビター、P R G アナログ；ラネル酸ストロンチウム；D K K-1 インヒビター；M E T および V E G F R 2 の二重インヒビター；エストロゲンレセプター調節因子；カルシトニン；カテプシン K インヒビター；C C R 5 アンタゴニスト、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表への言及

本願とともに出願され、電子的に提出される配列表（「3190__0030001__SEQIDListing__ascii.txt」、48,245バイト、2013年10月7日に作成）の内容は、その全体が参照により本明細書中に援用される。

【0002】

関連出願の引用

本願は、2012年10月12日に米国仮特許出願第61/713,318号に対する米国特許法第119条(e)項の下での優先権を主張し、この出願は、その全体が本明細書に参考として援用される。

【0003】

発明の背景

発明の分野

本発明は、16q22-24ゲノム領域内のc-MAF遺伝子が原発腫瘍サンプルにおいて増幅されたかどうかの決定に基づく、前立腺がんの転移の診断または予後診断に関する。同様に、本発明は、前立腺がんにおける転移の診断または予後診断のための方法に関し、ならびに前立腺がんを有する被験体において個別化治療(customized therapy)をデザインするための方法にも関し、その方法は、c-MAF遺伝子の発現レベルまたは16q22-24増幅を決定する工程を含む。最後に、本発明は、前立腺がんの転移の処置のための治療標的としてのc-MAFインヒビターの使用に関する。

【背景技術】

【0004】

背景技術

課題：

様々な重要な器官において腫瘍細胞と周囲の正常組織との間の込み入った相互作用によって引き起こされる複雑なプロセスである転移は、固形腫瘍を有する患者における、すべてのがんによる死亡の90パーセントを占める。原発性腫瘍に転移を形成させる分子機序および細胞機序は、この生命を脅かす大きな問題に対してよりよく対処するために理解されなければならない。転移遺伝子および機序の同定は、この致命的な状態の基本的な生物学および臨床的な実践に対するその関係の理解にとって不可欠である。

【0005】

序論および関心事：前立腺器官特異的転移

前立腺がんは、前立腺（男性の生殖系にある腺）において発生するがんの1形態である。大部分の前立腺がんは、ゆっくりと増殖する；しかし、アグレッシブ前立腺がんの症例がある。上記がん細胞は、前立腺から身体他の部分、特に、骨およびリンパ節へと転移し得る（拡がり得る）。前立腺がんは、疼痛、排尿困難、性行為中の問題、または勃起不全を引き起こし得る。他の症状は、潜在的には、上記疾患のより後期のステージの間に発生し得る。

【0006】

前立腺がんの検出率は、世界中で広く変動し、南アジアおよび東アジアでは、欧州および特に米国においてよりも検出頻度が低い。前立腺がんは、男性において50歳を超えると発生する傾向にあり、それは男性におけるがんのうちの最も優勢なタイプのうちの1つであるものの、多くは症状を有さず、治療を受けず、最終的には、他の原因で死亡する。症例のうちの約2/3はゆっくりと成長し、他方の1/3はよりアグレッシブ(aggressive)であり、早く発生する。

【0007】

多くの因子（遺伝的性質および食餌を含む）は、前立腺がんの発生に影響を与えている。前立腺がんの存在は、症状、身体検査、前立腺特異的抗原(PSA)、もしくは生検に

10

20

30

40

50

よって示され得る。上記 P S A 試験は、がん検出を増大させるが、死亡率を減少させない。さらに、前立腺試験スクリーニングは今のところ議論の余地があり、いくらかの患者においては、不必要な、有害でさえある結果をもたらし得る。それにも関わらず、疑われる前立腺がんは、代表的には、前立腺の生検を行ってそれを鏡検することによって確認される。さらなる試験（例えば、C T スキャンおよび骨スキャン）は、前立腺がんが既に拡がっているか否かを決定するために行われ得る。

【0008】

前立腺がんの管理戦略は、該疾患の重症度によって左右されるべきである。多くの低リスク腫瘍は、積極的サーベイランスで安全に追跡され得る。治癒的処置は、一般に、手術、種々の形態の放射線療法、もしくはそれほど一般的ではないが、凍結手術を要し；ホルモン療法および化学療法は、一般に、進行した疾患の症例用に使わず残しておく（しかし、ホルモン療法は、いくらかの症例では照射とともに与えられ得る）。

10

【0009】

男性の年齢および根底にある健康状態、転移の程度、顕微鏡下での外見および最初の処置に対するがんの応答は、上記疾患の転帰を決定するにあたって重要である。治癒を目指して限局性の前立腺がん（前立腺内に含まれている腫瘍）を処置するか否かの決定は、患者の生存およびクオリティ・オブ・ライフの観点から見れば、予測される有益な影響と有害な影響との間の患者の折り合いである。

【0010】

前立腺がんの具体的な原因は未知のままである。遺伝的バックグラウンドは、人種、家族、および特定の遺伝子バリエーションとの関連によって示唆されるように、前立腺がんリスクの一因であり得る。1つの遺伝子によって前立腺がんになるわけではない；多くの異なる遺伝子が関係している。B R C A 1 および B R C A 2（女性の卵巣がんおよび乳がんの重要なリスク因子）における変異もまた、前立腺がんに関係している。他の連鎖遺伝子としては、遺伝性前立腺がん遺伝子 1（H P C 1）、アンドロゲンレセプター、およびビタミン D レセプターが挙げられる。T M P R S S 2 - E T S 遺伝子ファミリー融合物（特に、T M P R S S 2 - E R G もしくは T M P R S S 2 - E T V 1 / 4）は、がん細胞増殖を促進する。

20

【0011】

前立腺がんの発癌現象において早期に起こるがん抑制遺伝子の喪失は、染色体 8 p、1 0 q、1 3 q、および 1 6 q にあると突き止められた。原発性前立腺がんにおける p 5 3 変異は、比較的低く、転移状況においてより頻繁に認められる。よって、p 5 3 変異は、前立腺がんの病状において後期の事象である。前立腺がんにおいて役割を果たすと考えられる他の腫瘍抑制遺伝子としては、P T E N（遺伝子）および K A I 1 が挙げられる。前立腺がんを有する男性のうちの最大 7 0 % までが、診断時点で P T E N 遺伝子の 1 コピーを失っている。E - カドヘリンおよび C D 4 4 の相対的喪失頻度もまた、観察されてきた。

30

【0012】

前立腺がんは、正常な精液分泌前立腺細胞ががん細胞へと変異する場合に始まる腺癌（adenocarcinoma または glandular cancer）と分類される。腺癌が最も一般的である前立腺の領域は、末梢区域である。最初は、がん細胞の小さな塊が、他の点では正常な前立腺（上皮内癌もしくは前立腺上皮内腫瘍（P I N）として公知の状態）に留められたままである。P I N ががん前駆体であるという証明はないが、それは、がんと密接に関連している。時間が経つと、これらのがん細胞は、増殖および周りの前立腺組織（間質）に拡がり始め、腫瘍を形成する。最終的には、上記腫瘍は、近くの器官（例えば、精嚢もしくは直腸）を侵襲するために十分大きく増殖し得るか、または上記腫瘍細胞は、血流およびリンパ系の中に移動する能力を発展させ得る。前立腺がんは、悪性腫瘍と考えられている。なぜならそれは、身体他の部分を侵襲し得る細胞の塊だからである。この他の器官の侵襲は、転移といわれる。前立腺がんは、最も一般には、骨、リンパ節へと転移し、限局性進行（local progression）後に、直腸、

40

50

膀胱および下部尿管に侵襲し得る。

【0013】

前立腺がんの分子形質

RUNX2は、がん細胞にアポトーシスを受けさせず、それによって、前立腺がんの発生に寄与する転写因子である。

【0014】

PI3k/Aktシグナル伝達カスケードは、トランスフォーミング増殖因子β/SMADシグナル伝達カスケードとともに働いて、前立腺がん細胞の生存、およびアポトーシスからの防御を確実にする。アポトーシスのX連鎖インヒビター(XIAP)は、前立腺がん細胞の生存および増殖を促進すると仮定されており、研究対象である。なぜなら、このインヒビターが機能停止され得る場合、その後アポトーシスカスケードが、がん細胞増殖を予防することにおいてその機能を果たし得るからである。マクロファージ阻害性サイトカイン-1(MIC-1)は、前立腺がん細胞の増殖および生存をもたらす接着斑キナーゼ(focal adhesion kinase)(FAK)シグナル伝達経路を刺激する。

10

【0015】

アンドロゲンレセプターは、前立腺がん細胞が生存するのを助け、多くの抗がん調査研究の標的である；これまでは、アンドロゲンレセプターの阻害は、マウス研究において有効であることが証明されたのみである。前立腺特異的膜抗原(PSMA)は、がん細胞が生存および増殖するために使用するフォレートレベルを増大させることによって、前立腺がんの発生を刺激する；PSMAは、グルタミン酸化フォレート(glutamated folates)を加水分解することによって、使用に有効なフォレートを増大させる。

20

【0016】

診断

前立腺がんの診断を十分に確認し得る唯一の検査は、生検(鏡検のために前立腺の薄片を取り出すこと)である。しかし、生検前に、侵襲性のより低い検査が行われ得る。

【0017】

前立腺および尿路についてより多くの情報を集めるために使用され得るいくつかの他の検査もまた存在する。直腸指診(DRE)は、医師が前立腺異常を検出することを可能にし得る。膀胱鏡検査は、細い可撓性のカメラチューブを尿道から挿入して使用して、膀胱の内側から尿路を見せる。経直腸的超音波検査法は、直腸内のプローブからの音波を使用して、前立腺の写真を作る。

30

【0018】

前立腺画像化

超音波(US)および磁気共鳴画像診断法(MRI)は、前立腺がん検出のために使用される2つの主要な画像化法である。

【0019】

生検

傍神経侵襲を伴う前立腺がん(従来のがん)を示す顕微鏡写真。H&E染色。

40

【0020】

がんが疑われる場合、生検は、便宜上提案される。生検の間に、泌尿器科医もしくは放射線科医は、直腸を経由して前立腺から組織サンプルを得る。生検銃(biopsy gun)は、特別な中空コアニードルを挿入し、1秒未満で取り出す(通常は、前立腺の各側面に対して3~6箇所)。前立腺生検は、慣用的には、外来患者扱いで行われ、希に入院を要する。男性のうちの55%は、前立腺生検中に不快感を訴える。

【0021】

グリソンスコア

次いで、組織サンプルは、顕微鏡下で検査されて、がん細胞が存在するか否かを決定し、任意の見出されるがんの顕微的特徴(もしくはグリソンスコア)を評価する。前立腺特

50

異的膜抗原は、膜貫通型カルボキシペプチダーゼであり、葉酸ヒドロラーゼ活性を示す。このタンパク質は、前立腺がん組織において過剰発現され、より高いグリソンスコアと関連する。

【0022】

腫瘍マーカー

組織サンプルは、転移した悪性細胞の起源を決定するために、P S Aおよび他の腫瘍マーカーの存在について染色され得る。

【0023】

小細胞癌は、P S Aを使用して診断できない非常に希な（1%）タイプの前立腺がんである。2009年当時、研究者らは、このタイプの前立腺がんをスクリーニングするための最良の方法を決定しようとしている。なぜなら、それは、比較的未知でありかつ希なタイプの前立腺がんであるが、非常に重症で身体の一部へ拡がるのが早いからである。考えられる方法としては、質量分析法によるクロマトグラフィー的な分離法、またはイムノアッセイもしくは免疫した抗体によるタンパク質捕捉が挙げられる。検査法は、グリソンスコアを参照して、バイオマーカーP C Iの量を定量することを要する。この検査は迅速であるのみならず、感度も高い。その検査法は、診断的グレーゾーンの患者を、特に、10～20%の血清遊離前立腺特異的抗原／総前立腺特異的抗原比を有する患者を検出し得る。

10

【0024】

免疫組織化学によるK i - 6 7の発現は、前立腺がんを有する男性の患者転帰の重要な予測因子であり得る。

20

【0025】

分類

前立腺がんを評価することの重要な部分は、ステージの決定、またはどの程度遠くまで該がんが拡がっているかである。ステージを知ることは、予後診断を明確にするのに役立ち、治療を選択する場合に有用である。最も一般的なシステムは、4段階T N Mシステム（腫瘍／リンパ節／転移（T u m o r / N o d e s / M e t a s t a s e s）の略）である。その構成要素は、腫瘍のサイズ、関与しているリンパ節の数、および任意の他の転移の存在を含む。

【0026】

30

任意の病期分類システムによって行われる最も重要な鑑別は、がんが前立腺になお限られているか否かである。T N Mシステムでは、臨床的T 1およびT 2のがんは、前立腺の中にのみ見出される一方で、T 3およびT 4のがんは、他の場所へ既に拡がっている。いくつかの試験が、拡がっている証拠を探すために使用され得る。これらとしては、骨盤内への拡がり进行评估するコンピューター断層撮影法、骨への拡がりを探す骨スキャン、ならびに前立腺被膜および精嚢を近くで評価する直腸内コイル磁気共鳴画像診断法が挙げられる。骨スキャンは、転移する多くの他のがんにおいて見出されるものとは対照的に、骨転移の領域において増大した骨密度に起因する造骨像を明らかにするはずである。

【0027】

前立腺生検の後に、病理医は、顕微鏡下でサンプルを確かめる。がんが存在する場合、その病理医は、腫瘍のグレードを報告する。そのグレードは、腫瘍組織が正常前立腺組織からどの程度異なっているかを物語り、腫瘍がどの程度急激に増殖する可能性があるかを示唆する。グリソンシステムは、前立腺腫瘍を2から10までグレード分けするために使用され、ここでグリソンスコア10は、最も高い異常性を示す。その病理医は、1から5までの数字を、顕微鏡下で認められる最も一般的なパターンについて割り当て、次いで、2番目に多い一般的なパターンについても同じことを行う。これら2つの数字の合計が、グリソンスコアである。W h i t m o r e - J e w e t tステージは、ときおり使用されるもう1つの方法である。

40

【0028】

スクリーニング

50

前立腺がんスクリーニングは、思いもよらないがんを見出そうとする試みであり、より具体的な追跡検査（例えば、細胞サンプルがより厳密な調査のために採取される生検材料）をもたらし得る。選択肢としては、直腸指診（DRE）および前立腺特異的抗原（PSA）血液検査が挙げられる。このようなスクリーニングは、議論の余地があり、いくらかの患者においては、不要な、有害ですらある帰結をもたらし得る。2010年の分析から、DREもしくはPSAいずれかでの慣用的スクリーニングは、スクリーニングによる死亡率低下がないとして、証拠によって裏付けられないと結論づけられた。より近年になってからは、米国予防医学作業部会（USPSTF）は、健常男性における前立腺がんスクリーニングに関して、PSA検査に反対する勧告を出した。このUSPSTFの勧告（2011年10月発表）は、「前立腺特異的抗原ベースのスクリーニングによる前立腺がん特異的死亡率の低減は小さいかもしくは全くなく、そしてその後の評価および処置（そのうちのいくつかは不要であり得る）に関する害悪と関連する」と結論づけた「エビデンスの審査」調査に基づく。

10

【0029】

現代のスクリーニング検査は、重篤な疾患へと決して発展しないと思われるがんを見出し、「前立腺の外科的除去もしくは前立腺を放射線照射で処置することによりリスクが僅かに低減しても、これら処置の実質的副作用が重すぎると思われる」ことを見出し、CDCもまた、この見解を共有している。

【0030】

アグレッシブがん

20

がんが前立腺を越えて拡がってしまっている場合、処置選択肢は大きく変化するので、前立腺がんを処置する大部分の医師は、拡がる確率を、種々のノモグラムを使用して推定する。注意深い経過観察／積極的サーベイランス、外部ビーム照射療法、小線源療法、凍結手術、HIFU、および外科手術による処置は、一般に、がんが前立腺内に留まっている男性に提案される。ホルモン療法および化学療法はしばしば、前立腺を越えて拡がってしまった疾患のためにとっておかれる。しかし、例外はある：放射線療法は、一部の進行した腫瘍に使用され得、ホルモン療法は、一部の初期ステージの腫瘍に使用される。凍結療法（腫瘍を凍結するプロセス）、ホルモン療法、および化学療法はまた、最初の処置が失敗し、がんが進行する場合に提案され得る。

【0031】

30

上記疾患が臨床ステージT3もしくはT4に達してしまった場合、それは進行した前立腺がんとして分類される。骨転移もしくはリンパ節転移を伴う進行した前立腺がんは、その疾患の初期ステージにおけるより前立腺がん症状を引き起こす確率はより高い。医師は通常、臨床ステージ分類におけるMおよびNによってそれぞれ示される骨転移およびリンパ節転移をチェックする。

【0032】

臨床ステージT3では、腫瘍は、前立腺被膜を越えて、恐らく精嚢へと拡がっており、前立腺外拡大（*extraprostatic extension*）と具体的にいわれる。前立腺外とは、「前立腺とは独立している」ことを意味する。臨床ステージT4では、上記疾患は、周囲の（精嚢以外の）膀胱頸部、外括約筋、もしくは直腸のような器官に侵襲している。

40

【0033】

転移は、進行した前立腺がんの間に起こる可能性がより高い。転移疾患は、前立腺およびその隣接する器官から離れた前立腺がんをいう。進行した前立腺がんの骨転移およびリンパ節転移（局所もしくは遠位であり得る）の両方が、進行した前立腺がんに関連する。転移は、前立腺がん処置ガイドにない症状を必然的に伴い得る。

【0034】

前立腺がんのリンパ節転移。身体は、白血球を含みかつリンパ系を通して循環するリンパといわれる液体を生成する。リンパ節は、この液体を濾過する、小さな楕円形もしくは円形の器官である。身体を通して循環するがん性細胞は、上記リンパ節に捕捉され得る

50

。いったん捕捉されると、がん性細胞は、それらの病的な分裂サイクルを開始し得、リンパ節転移を生じ得る。

【0035】

リンパ節転移には2タイプ：局所および遠位、がある。局所リンパ節転移は、臨床ステージN1によって示される。2つのリンパ節が、膀胱のいずれの側にもある。これらリンパ節は前立腺に近いので、転移は、局所とみなされる。がん性細胞が任意の他のリンパ節で増殖し始める場合には、その転移は、遠位とみなされる。遠位リンパ節転移は、臨床ステージM1aによって示される。

【0036】

前立腺がんの骨転移。 骨がんの原発性の症例は、比較的希である。骨がんを発生させる患者は、進行した前立腺がんの転移の結果として上記疾患を発生させる可能性がより高い。前立腺がんにおいて、骨の疾患をもたらす拡大は、臨床ステージM1bによって示される。個体が前立腺がんの結果として骨の疾患を発生させる場合、彼は、ここで、骨がんを有しない。上記がんは、これが端を発した場所に従って分類されるので、彼は、骨転移を伴う前立腺がんを有する。

【0037】

骨格転移は、進行したステージの前立腺がんのうちの80%超で起こり、それらは、高レベルの罹病率、5年生存率25%および生存中央値約40ヶ月を与える。USA、EUおよび日本では、転移性骨疾患と関連した年間100万人の死亡のうち、約20%が、進行したステージの前立腺がんの症例である。処置ナীবの転移性前立腺がんは、アンドロゲン抑制療法に主に感受性であるが、精巣除去抵抗性前立腺がんへの進行は、処置を開始して18~20ヶ月後に起こる。転移性骨疾患は、進行したステージのがんの最も悲惨な症状のうちのいくつかを引き起こす；概算によれば、精巣除去抵抗性前立腺がんを有し、転移性骨疾患と関連する男性のうちの約30%において、骨の疼痛の処置が必要とされることが示されている；22%は、1箇所もしくは複数箇所の病的な骨折（skel et al fracture）の処置を；7%は、脊髄圧迫の処置を；3~4%は、片側不全麻痺もしくは不全麻痺の処置を要する。骨転移疾患の最初の診断時に、治療的介入は、多くは痛みを軽減することを目的とした待期的な選択肢である、全身性化学療法、ホルモン療法またはデノスマブを普通含む。

【0038】

健康な骨格の骨において、新しい骨基質の形成および古い骨基質の吸収の均しいバランスは、骨を分解する破骨細胞と骨を形成する骨芽細胞との協調した活性を介して達成される。転移骨疾患の間に、骨吸収と骨形成との正常なバランスは、浸潤する腫瘍細胞、骨芽細胞、および破骨細胞の間に生じるホモタイプおよびヘテロタイプの細胞間相互作用によって破壊される。去勢抵抗性前立腺がんに関連するものを含む二次性骨腫瘍を有するほとんどの患者は、溶骨性病変の症状を示す。そのため、転移性骨疾患において現在使用されているまたは評価段階にあるほとんどの処置戦略は、破骨細胞の骨分解活性の上昇から骨基質を保護するようにデザインされてきた。去勢抵抗性前立腺がんおよび転移骨疾患を有する男性の80%超において存在するさらなる合併症は、骨形成病変もしくは骨芽細胞病変としても知られている骨硬化性病変または混合型病変とも呼ばれる溶骨性病変および骨硬化性病変の両方の組み合わせである。骨硬化性病変は、網状の外観および機械的な強度の低下を有する、不十分に組織化されたI型コラーゲン原線維の複数の層を有する骨沈着物が典型である。

【0039】

前立腺がん細胞は、それぞれのサブタイプの間でも、ゲノム異常により誘導される転写の変化を高忠実度で維持する。結果として生じるドミナント遺伝子は、系全般において実質的なゲノム、転写、翻訳、および生物学的な不均一性が存在するにもかかわらず、転移性の転帰を予測する分子事象を明らかにする。しかしながら、がんの発生の経緯により、部位特異的な転移についての異なるまたは共通の媒介物質がもたらされるかどうかは未知である。起源となる細胞と関係する素因は、転移性の進行の間に様々な律速的な障壁を生

10

20

30

40

50

じさせ得る。本明細書では、本発明者らは、将来的な骨転移事象を予測する原発性腫瘍における予後診断因子としての新たなバイオマーカーの使用を提唱した。さらに、本発明者らはまた、前立腺がん由来骨転移を予防、停止および治癒するための潜在的治療標的としてのこの遺伝子の使用を提唱する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0040】

(発明の概要)

本発明者らは、播種性前立腺がん細胞骨転移に影響を与えるシグナルのバランスの同定が、疾患の予後診断を確立するためのおよびこの疾患に対する予防的な治療的介入のための有益な情報を提供するということを決定した。c-MAF発現レベルおよびMAF遺伝子を含む16q22-24 真正のER+乳がん骨転移ゲノム増幅、骨転移、および特に、溶骨性骨転移への寄与に基づいて、本発明者らは、MAF遺伝子を含む16q22-24がまた、前立腺骨転移病変、特に、溶骨性の前立腺骨転移を引き起こす原因であることを同定した。

【0041】

本発明者らは、前立腺がんが転移、特に骨転移を引き起こす傾向がより高いことに関連するマーカーとしてc-MAFを同定した。この過剰発現は、c-MAF遺伝子が位置する遺伝子座16q22-q24の増幅によるように思われる。

【0042】

c-MAF発現レベルを、任意の時点で骨への転移を起こす5つの腫瘍、骨以外の他の部位への転移を起こし、5年間の最小限の臨床上の経過観察を有する3つ、および転移を起こさず、5年間の最小限の臨床上の経過観察を有する29の前立腺原発性腫瘍を含む前立腺原発性腫瘍生検材料から構成される組織マイクロアレイにおいて研究した。腫瘍細胞および腫瘍生検材料におけるc-MAFタンパク質の発現は、再発および骨転移を含んだ様々な臨床パラメーターと正の相関をする。さらに、発明者らは、c-MAF遺伝子を含むゲノム遺伝子座16q22-q24の増幅を、前立腺がん、特に骨転移を形成する前立腺がんを有する被験体における転移の存在と関連させた。

【0043】

したがって、第1の態様において、本発明は、前立腺がんを有する被験体における転移の診断および／または前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断のためのインビトロでの方法であって、

(i) 上記被験体の腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子またはタンパク質の発現レベルまたはコピー数の増加を定量する工程および

(ii) 以前に得られた発現レベルまたはコピー数をコントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルまたはコピーと比較する工程を含み、コントロールサンプルにおける上記遺伝子の発現レベルと比較して、上記遺伝子の発現レベルが上昇しているかまたはゲノム領域が増幅されている場合、上記被験体は、転移について陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高い方法に関する。

【0044】

第2の態様において、本発明は、前立腺がんを有する被験体のための個別化治療をデザインするためのインビトロでの方法であって、

(i) 上記被験体の腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子またはタンパク質の発現レベルを定量する工程および

(ii) 以前に得られた発現レベルをコントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、コントロールサンプルにおける上記遺伝子の発現レベルと比較して、発現レベルが上昇している場合、上記被験体は、転移の予防および／または処置を目指す治療を受けるのに適格である方法に関する。この方法の特定の態様において、被験体は、その後、骨転移を予防する、阻害する、および／または処置する少なくとも1つの治療薬を投与され、上記参

10

20

30

40

50

照値と比較して、発現レベルが上昇しない場合、上記被験体は、骨転移の予防、阻害、および／または処置を目指す治療を受けるのに適格ではない。本方法の特定の態様では、次いで、被験体は、骨転移を予防、阻害、および／または処置する少なくとも1つの治療薬が投与されない。

【0045】

第3の態様において、本発明は、骨転移を有する前立腺がんを有する被験体のための個別化治療をデザインするためのインビトロでの方法であって、

(i) 上記被験体の骨転移性腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子またはタンパク質発現レベルを定量する工程および

(ii) 工程(i)において得られた発現レベルをコントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、

コントロールサンプルにおける上記遺伝子またはタンパク質の発現レベルと比較して、c-MAF遺伝子またはタンパク質の発現レベルが上昇している場合、上記被験体は、骨分解の予防を目指す治療を受けるのに適格である方法に関する。この方法の特定の態様において、被験体は、その後、骨転移を予防する、阻害する、および／または処置する少なくとも1つの治療薬を投与され、上記参照値と比較して、c-MAF遺伝子またはタンパク質の発現レベルが上昇しない場合、上記被験体は、骨分解の予防のための治療を受けるのに適格ではない。本方法の特定の態様では、次いで、被験体は、骨転移を予防、阻害、および／または処置する少なくとも1つの治療薬が投与されない。

【0046】

第4の態様において、本発明は、前立腺がんを有する被験体における転移の診断および／または前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断のためのインビトロでの方法であって、c-MAF遺伝子が上記被験体の腫瘍組織サンプルにおいて増幅しているかどうかを決定する工程を含み、上記遺伝子がコントロールサンプルと比較して増幅しているかまたは転座しているか場合、上記被験体は、転移について陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高い方法に関する。この方法の特定の態様において、被験体は、その後、骨転移を予防するまたは阻害する少なくとも1つの治療薬を投与される。骨転移を予防する、阻害する、および／または処置する。

【0047】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している患者の臨床転帰を予測するためのインビトロでの方法に関し、その方法は、上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子が、参照遺伝子コピー数と比べて増幅されているかを決定する工程を含み、ここで、上記参照遺伝子コピー数と比較したときのc-MAF遺伝子の増幅は、不良な臨床転帰を示す。この方法の特定の態様において、被験体は、その後、骨転移を予防する、阻害するおよび／または処置する少なくとも1つの治療薬を投与される。そのような増幅が観察されない場合、被験体は、骨転移を予防する、阻害するおよび／または処置する少なくとも1つの治療薬を投与されない。別の実施形態において、本発明は、前立腺がん罹患している患者の臨床転帰を予測するためのインビトロでの方法に関し、その方法は、上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子が、転座しているかを決定する工程を含み、ここで、c-MAF遺伝子の転座（すなわち、t(14, 16)）は、不良な臨床転帰を示す。

【0048】

第5の態様において、本発明は、前立腺がん転移、特に骨転移を処置するおよび／またはは予防するための医薬製品の調製におけるc-MAF阻害剤の使用に関する。

【0049】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患しており、かつ転移腫瘍組織サンプルにおいてコントロールサンプルと比較して上昇したc-MAFレベルを有する被験体における骨転移の処置のための医薬製品の調製における、骨分解を回避するかもしくは予防することができる薬剤の使用に関する。

【0050】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している被験体における上記がんの骨

10

20

30

40

50

転移を予測するためのキットに関し、そのキットは：a) 上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子の転座を決定するための手段；およびb) 上記サンプル中のc-MAFの転座を参照c-MAFサンプルと比較するための手段を備える。本発明はまた、そのようながん罹患している被験体における前立腺がんの骨転移を予測するためのそのようなキットの使用に関する。1つの実施形態において、被験体は、その後、そのキットを使用した結果に基づいて、骨転移を予防する、阻害する、および／もしくは処置する少なくとも1つの治療薬を投与されるかまたはその治療薬が除外される。

【0051】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している被験体における前立腺がんの骨転移を予測するためのキットに関し、そのキットは：a) 上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子の増幅、16q23または16q22-24遺伝子座の増幅または転座を定量するための手段；およびb) 上記サンプル中のc-MAF遺伝子の増幅されたレベル、16q23または16q22-24遺伝子座の増幅または転座を参照と比較するための手段を備える。

【0052】

別の態様において、本発明は、前立腺がんからの骨転移に罹患している被験体の臨床転帰を予測するためのキットに関し、そのキットは：a) 上記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための手段；およびb) 上記サンプル中の定量されたc-MAFの発現レベルを参照c-MAF発現レベルと比較するための手段を備える。本発明は、前立腺がんからの骨転移に罹患している被験体の臨床転帰を予測するための、そのようなキットの使用にも関する。1つの実施形態において、被験体は、その後、そのキットを使用した結果に基づいて、骨転移を予防する、阻害するおよび／もしくは処置する少なくとも1つの治療薬を投与されるか、またはその治療薬が除外される。

【0053】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している被験体に対する治療を決定するためのキットに関し、そのキットは：a) 上記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための手段；b) 上記サンプル中の定量されたc-MAFの発現レベルを参照c-MAF発現レベルと比較するための手段；ならびにc) 定量された発現レベルと参照発現レベルとの比較に基づいて、上記被験体において骨転移を予防するためおよび／または減少させるための治療を決定するための手段を備える。本発明は、前立腺がん罹患している被験体に対する治療を決定するための、そのようなキットの使用にも関する。1つの実施形態において、被験体は、その後、そのキットを使用した結果に基づいて、骨転移を予防する、阻害するおよび／もしくは処置する少なくとも1つの治療薬を投与されるか、またはその治療薬が除外される。

【0054】

別の態様において、本発明は、i) 前立腺がん罹患している被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための試薬、およびii) 骨転移のリスクと相関するように予め決定されている1つまたは複数のc-MAF遺伝子発現レベルの指標を備えるキットに関する。本発明は、前立腺がん罹患している被験体における上記がんの骨転移を予測するための、そのようなキットの使用にも関する。1つの実施形態において、被験体は、その後、そのキットを使用した結果に基づいて、骨転移を予防する、阻害するおよび／もしくは処置する少なくとも1つの治療薬を投与されるか、またはその治療薬が除外される。

【0055】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している被験体のサンプルをタイプ分けするためのインビトロでの方法に関し、その方法は：

- a) 上記被験体からのサンプルを提供する工程；
- b) 上記サンプル中のc-MAFの発現レベルを定量する工程；
- c) 定量されたc-MAFの発現レベルを、c-MAF発現の所定の参照レベルと比較することによって上記サンプルをタイプ分けする工程；

を含み、ここで、上記タイプ分けは、上記被験体における骨転移のリスクに関する予後情報を提供する。1つの実施形態において、被験体は、タイプ分けによって提供される予後情報に基づいて、少なくとも1つの治療剤を投与されるか、またはその治療剤が除外される。

【0056】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している被験体における骨転移を予防するためまたはそのリスクを減少させるための方法に関し、上記方法は、骨転移を予防するかまたは減少させる薬剤を上記被験体に投与する工程を含み、ここで、上記薬剤は、上記被験体におけるc-MAFの発現レベルの定量から決定された処置レジメンに従って投与される。

10

【0057】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している被験体をコホートに分類する方法に関し、その方法は：a)上記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを決定する工程；b)上記サンプル中のc-MAFの発現レベルをc-MAF発現の所定の参照レベルと比較する工程；およびc)そのサンプル中のc-MAFの上記発現レベルに基づいて、上記被験体をコホートに分類する工程を含む。特定の態様において、そのコホートは、臨床試験を行うために使用される。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

前立腺がんを有する被験体における転移の診断のためのおよび／または前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断のためのインビトロでの方法であって、前記方法は、

20

(i)前記被験体の前立腺腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子の発現レベルを定量する工程および

(ii)(i)において得られた発現レベルをコントロールサンプル中の前記c-MAF遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、

ここで前記腫瘍サンプル中の前記c-MAF遺伝子の発現レベルが、前記コントロールサンプル中の前記c-MAF遺伝子の発現レベルと比較して上昇している場合、前記被験体は、転移について陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高い、方法。

(項目2)

30

前立腺がんを有する被験体のための個別化治療をデザインするためのインビトロでの方法であって、

(i)前記被験体の前立腺腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子の発現レベルを定量する工程および

(ii)(i)において得られた発現レベルをコントロールサンプル中の前記c-MAF遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、

ここで前記腫瘍サンプル中の前記c-MAF遺伝子の発現レベルが、前記コントロールサンプル中の前記c-MAF遺伝子の発現レベルと比較して上昇している場合、前記被験体は、前記がんの転移の予防、阻害および／または処置を意図する治療を受けるのに適格である、方法。

40

(項目3)

前記転移が、骨転移である、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

前記骨転移が、溶骨性転移である、項目3に記載の方法。

(項目5)

骨転移を有する前立腺がんを有する被験体のための個別化治療をデザインするためのインビトロでの方法であって、

(i)前記被験体の骨転移性腫瘍組織サンプル中のc-MAF遺伝子の発現レベルを定量する工程および

(ii)工程(i)において得られた発現レベルをコントロールサンプル中の前記c-

50

MAF遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、

ここで前記腫瘍組織サンプル中の前記c-MAF遺伝子の発現レベルが前記コントロールサンプル中の前記c-MAF遺伝子の発現レベルと比較して上昇している場合、前記被験体は、骨分解の予防または阻害を意図する治療を受けるのに適格である、方法。

(項目6)

前記骨分解を予防または阻害することが意図される薬剤が、ビスホスホネート、RANKLインヒビター、PTH、PTHrPインヒビター（中和抗体およびペプチドを包含する）、PRGアナログ、ラネル酸ストロンチウム、DKK-1インヒビター、METおよびVEGFR2の二重インヒビター、エストロゲンレセプター調節因子、カルシトニン、ラジウム-223、CCR5アンタゴニスト、Srcキナーゼインヒビター、COX-2インヒビター、mTORインヒビターおよびカテプシンKインヒビターからなる群より選択される、項目5に記載の方法。

10

(項目7)

前記RANKLインヒビターが、RANKL特異的抗体、RANKL特異的ナノボディおよびオステオプロテゲリンからなる群より選択される、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記RANKL特異的抗体が、デノスマブである、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記ビスホスホネートが、ゾレドロン酸である、項目6に記載の方法。

20

(項目10)

前記c-MAF遺伝子の発現レベルの定量が、前記遺伝子のメッセンジャーRNA (mRNA) または前記mRNAのフラグメント、前記遺伝子の相補DNA (cDNA) または前記cDNAのフラグメントを定量する工程を含む、項目1～9のいずれかに記載の方法。

(項目11)

前記発現レベルが、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、またはDNAもしくはRNAアレイ、またはヌクレオチドハイブリダイゼーション技術によって定量される、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記c-MAF遺伝子の発現レベルの定量が、前記遺伝子によってコードされるタンパク質またはそのバリエーションのレベルを定量する工程を含む、項目1～10のいずれかに記載の方法。

30

(項目13)

前記タンパク質のレベルが、ウエスタンブロット、ELISA、免疫組織化学またはタンパク質アレイによって定量される、項目12に記載の方法。

(項目14)

前立腺がんを有する被験体における転移を診断するためのおよび／または前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断のためのインビトロでの方法であって、前記c-MAF遺伝子が、参照遺伝子コピー数と比較して前記被験体の腫瘍サンプルにおいて増幅しているかどうかを決定する工程を含み、ここで前記参照遺伝子コピー数と比較した前記c-MAF遺伝子の増幅は、転移の存在または転移を起こすリスクがより高いことを示す、方法。

40

(項目15)

前記c-MAF遺伝子の増幅が、遺伝子座16q22-q24の増幅を決定することによって決定される、項目14に記載の方法。

(項目16)

前記c-MAF遺伝子の増幅が、c-MAF遺伝子特異的プローブを使用することによって決定される、項目14または項目15に記載の方法。

(項目17)

前記参照遺伝子コピー数が、転移に罹患していない被験体由来の前立腺がんの腫瘍組織

50

サンプルのものである、項目 14～16 のいずれかに記載の方法。

(項目 18)

前記増幅が、インサイチュハイブリダイゼーションまたは PCR によって決定される、項目 14～17 のいずれかに記載の方法。

(項目 19)

前記転移が、骨転移である、項目 14～18 のいずれかに記載の方法。

(項目 20)

前記骨転移が、溶骨性転移である、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前立腺がんから骨転移を処置および／または予防するための医薬製品の調製における c-MAF 阻害剤の使用。

10

(項目 22)

前記 c-MAF 阻害剤が、c-MAF 特異的 siRNA、c-MAF 特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド、c-MAF 特異的リボザイム、c-MAF 阻害性抗体もしくはナノボディ、ドミナント陰性 c-MAF バリエーション、表 1 もしくは表 2 からの化合物、c-MAF 特異的小分子、c-MAF 特異的抗体、c-MAF 特異的抗体様分子、c-MAF 特異的な構造的に拘束された（環状）ペプチド、c-MAF 特異的ステープルドペプチドまたは c-MAF 特異的アルファボディからなる群から選択される、項目 21 に記載の使用。

(項目 23)

前立腺がん罹患しており、転移性腫瘍サンプルにおいてコントロールサンプルと比較して上昇した c-MAF レベルを有する被験体における骨転移の処置のための医薬製品の調製における、骨分解を予防または阻害することができる薬剤の使用。

20

(項目 24)

骨分解を回避または予防することができる薬剤が、ビスホスホネート、RANKL インヒビター、PTH、PTHrP インヒビター（中和抗体およびペプチドを包含する）、PRG アナログ、ラネル酸ストロンチウム、DKK-1 インヒビター、METF および VEGFR2 の二重インヒビター、エストロゲンレセプター調節因子、EGFR インヒビター、カルシトニン、ラジウム-223、CCR5 アンタゴニスト、Src キナーゼインヒビター、COX-2 インヒビター、mTOR インヒビターおよびカテプシン K インヒビターからなる群から選択される、項目 23 に記載の使用。

30

(項目 25)

前記 RANKL インヒビターが、RANKL 特異的抗体、RANKL 特異的ナノボディおよびオステオプロテゲリンの群から選択される、項目 25 に記載の使用。

(項目 26)

前記 RANKL 特異的抗体が、デノスマブである、項目 26 に記載の使用。

(項目 27)

前記ビスホスホネートが、ゾレドロン酸である、項目 24 に記載の使用。

(項目 28)

前記骨転移が、溶骨性転移である、項目 24～27 のいずれかに記載の使用。

40

(項目 29)

前立腺がん罹患している被験体における前記がんの骨転移を予測するためのキットであって、前記キットは：a) 前記被験体の腫瘍サンプル中の c-MAF の発現レベルを定量するための手段；および b) 前記サンプル中の定量された c-MAF の発現レベルを参照 c-MAF 発現レベルと比較するための手段を備える、キット。

(項目 30)

前立腺がん罹患している被験体のサンプルをタイプ分けするためのインビトロでの方法であって、前記方法は：

a) 前記被験体からサンプルを提供する工程；

b) 前記サンプル中の c-MAF の発現レベルを定量する工程；

50

c) 定量された c-M A F の発現レベルを c-M A F 発現の所定の参照レベルと比較することによって前記サンプルをタイプ分けする工程；

を含み、ここで、前記タイプ分けは、前記被験体における骨転移のリスクに関する予後情報を提供する、インビトロでの方法。

(項目 3 1)

前立腺がん罹患している被験体における骨転移を予防するため、阻害するため、またはリスクを減少させるための方法であって、前記方法は、骨転移を予防するかまたは減少させる薬剤を前記被験体に投与する工程を含み、ここで、前記薬剤は、前記被験体における c-M A F の発現レベルの定量から決定された処置レジメンに従って投与される、方法。

10

(項目 3 2)

前立腺がん罹患している被験体をコホートに分類する方法であって、前記方法は、a) 前記被験体の前立腺腫瘍サンプル中の c-M A F の発現レベルを決定する工程；b) 前記サンプル中の c-M A F の発現レベルを c-M A F 発現の所定の参照レベルと比較する工程；および c) 前記サンプル中の c-M A F の前記発現レベルに基づいて、前記被験体をコホートに分類する工程を含む、方法。

(項目 3 3)

前記 R A N K L 特異的ナノボディは、A L X-0 1 4 1 である、項目 6 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記 M E T および V E G F R 2 の二重インヒビターは、カボザンチニブである、項目 6 に記載の方法。

20

(項目 3 5)

前記 R A N K L 特異的ナノボディは、A L X-9 1 4 1 である、項目 2 4 に記載の使用。

(項目 3 6)

前記 M E T および V E G F R 2 の二重インヒビターは、カボザンチニブである、項目 2 4 に記載の使用。

(項目 3 7)

前記 c-M A F 遺伝子特異的プローブは、V y s i s L S I / I G H M A F D u a l C o l o r 二重融合プローブである、項目 1 6 に記載の方法。

30

(項目 3 8)

前立腺がん罹患している被験体の治療を決定するためのキットであって、前記キットは、a) 前記被験体の腫瘍サンプル中の c-M A F の発現レベルを定量するための手段；b) 前記サンプル中の c-M A F の定量した発現レベルを、参照 c-M A F 発現レベルと比較するための手段；ならびに c) 前記定量した発現レベルと前記参照発現レベルとの比較に基づいて、前記被験体における骨転移を予防、阻害および／または低減させるための治療を決定するための手段を含む、キット。

(項目 3 9)

i) 前立腺がん罹患している被験体の腫瘍サンプル中の c-M A F の発現レベルを定量するための試薬、および i i) 骨転移のリスクと相関することが予め決定された 1 またはそれより多くの c-M A F 遺伝子発現レベル指標を含む、キット。

40

(項目 4 0)

前記発現を定量するための手段は、前記 c-M A F 遺伝子、1 6 q 2 3 遺伝子座もしくは 1 6 q 2 2-1 6 q 2 4 染色体領域を特異的に結合および／もしくは増幅する、プローブおよび／もしくはプライマーのセットを含む、項目 3 8 ~ 3 9 に記載のキット。

(項目 4 1)

前立腺がん罹患している被験体のサンプルをタイプ分けするためのインビトロでの方法であって、前記方法は、

(i) 前記被験体由来する腫瘍サンプルを提供する工程；

(i i) 前記サンプル中の c-M A F の発現レベルを定量する工程；

50

(i i i) 前記 c-M A F の定量した発現レベルと、 c-M A F 発現の所定の参照レベルとを比較することによって、前記サンプルをタイプ分けする工程；
を包含し、

ここで前記タイプ分けする工程は、前記被験体における骨転移のリスクに関連した予後情報を提供する、
方法。

(項目 4 2)

前立腺がん罹患している被験体における骨転移を予防するため、阻害するため、またはリスクを減少させるための方法であって、前記方法は、骨転移を予防するかまたは減少させる薬剤を、前記被験体に投与するかまたは投与しない工程を包含し、ここで前記薬剤は、前記被験体における c-M A F の発現レベルを定量する工程から少なくとも部分的に決定される処置レジメンに従って投与される、方法。

10

(項目 4 3)

前立腺がん罹患している被験体をコホートに分類する方法であって、前記方法は、 a) 前記被験体のがん腫瘍サンプル中の c-M A F の発現レベルを決定する工程； b) 前記サンプル中の c-M A F の発現レベルと、 c-M A F 発現の所定の参照レベルとを比較する工程；および c) 前記サンプル中の c-M A F の発現レベルに基づいて、前記被験体をコホートに分類する工程、を包含する、方法。

(項目 4 4)

前記コホートは、前記参照発現レベルとの比較において、 c-M A F の匹敵する発現レベルを有すると決定された少なくとも 1 の他の個体を含む、項目 4 3 に記載の方法。

20

(項目 4 5)

前記サンプル中の c-M A F の発現レベルは、前記所定の参照レベルと比較して増大しており、前記コホートのメンバーは、骨転移の増大したリスクを有すると分類されている、項目 4 3 または 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記コホートは、臨床試験を行うためのものである、項目 4 3 ~ 4 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 7)

前立腺がん罹患している被験体における前立腺がんの骨転移を推定するためのインビトロでの方法であって、前記方法は、 c-M A F 遺伝子が前記被験体の腫瘍サンプル中で転座しているか否かを決定する工程を包含し、ここで前記 c-M A F 遺伝子の転座は、骨転移の増大したリスクを示す、方法。

30

(項目 4 8)

骨転移を伴う前立腺がんを有する被験体の個別化治療をデザインするためのインビトロでの方法であって、 c-M A F 遺伝子が、参照遺伝子コピー数と比較して前記被験体の腫瘍サンプル中で増幅されているか否かを決定する工程を包含し、ここで前記参照遺伝子コピー数と比較しての前記 c-M A F 遺伝子の増幅は、前記被験体が、骨分解を予防または阻害することが意図された治療を受ける候補であることを示す、方法。

(項目 4 9)

40

前記骨分解を予防または阻害することが意図された薬剤は、ビスホスホネート、 R A N K L インヒビター、 P T H、 P T H L H インヒビター（中和抗体およびペプチドを包含する）、 P R G アナログ、ラネル酸ストロンチウム、 D K K - 1 インヒビター、 M E T および V E G F R の二重インヒビター、エストロゲンレセプター調節因子、カルシトニン、ラジウム-223、 C C R 5 アンタゴニスト、 S r c キナーゼインヒビター、 C O X - 2 インヒビター、 m T o r インヒビター、およびカテプシン K インヒビターからなる群より選択される、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記 R A N K L インヒビターは、 R A N K L 特異的抗体、 R A N K L 特異的ナノボディ、およびオステオプロテゲリンからなる群より選択される、項目 4 9 に記載の方法。

50

(項目 5 1)

前記 R A N K L 特異的抗体は、デノスマブである、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記ビスホスホネートは、ゾレドロン酸である、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 3)

前記発現を定量するための手段は、前記 c-M A F 遺伝子、前記 1 6 q 2 3 遺伝子座もしくは前記 1 6 q 2 2-1 6 q 2 4 染色体領域を特異的に結合および／もしくは増幅するプローブおよび／もしくはプライマーのセットを含む、項目 2 3～2 8 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記発現を定量するための手段は、前記 c-M A F 遺伝子、前記 1 6 q 2 3 遺伝子座もしくは前記 1 6 q 2 2-1 6 q 2 4 染色体領域を特異的に結合および／もしくは増幅するプローブおよび／もしくはプライマーのセットを含む、項目 2 9～3 2 に記載の方法。

10

(項目 5 5)

前記発現を定量するための手段は、前記 c-M A F 遺伝子、1 6 q 2 3 遺伝子座もしくは 1 6 q 2 2-1 6 q 2 4 染色体領域を特異的に結合および／もしくは増幅するプローブおよび／もしくはプライマーのセットを含む、項目 4 1～4 7 に記載の方法。

【発明を実施するための形態】【0058】

発明の詳細な説明

c-M A F 発現レベルに基づく前立腺がん転移の診断および予後診断のための方法

20

本発明者らは、c-M A F 遺伝子およびタンパク質が、前立腺がん転移において過剰発現されること、ならびに原発性前立腺腫瘍における c-M A F 発現レベルが、前立腺がんの様々な臨床上のパラメーター（特に再発および転移の確率）と相関することを示した。したがって、c-M A F 過剰発現は、（特に骨における）前立腺腫瘍転移の発症および高リスクと関連する。そのため、c-M A F は、前立腺がんを有する被験体における転移（特に骨転移）の診断および／または予後診断のためのマーカーとして使用することができる。

【0059】

したがって、一態様において、本発明は、前立腺がんを有する被験体における転移の診断および／または前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断のためのインビトロでの方法であって、

30

(i) 上記被験体由来の腫瘍サンプル（例えば前立腺腫瘍組織、循環前立腺腫瘍細胞、循環前立腺腫瘍 D N A）中の c-M A F 遺伝子発現レベルを定量する工程および

(i i) 以前に得られた発現レベルをコントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、

上記遺伝子の発現レベルが、コントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルと比較して上昇している場合、上記被験体は、転移について陽性の診断を有するかまたは転移（好ましい部位の骨転移で）を起こす傾向がより高い、方法に関する。

【0060】

c-M A F 遺伝子（M A F または M G C 7 1 6 8 5 としても知られる v-m a f 筋腱膜性線維肉腫癌遺伝子ホモログ（鳥類））は、ホモ二量体またはヘテロ二量体のように作用するロイシンジッパーを含む転写因子である。D N A 結合部位に応じて、コードされるタンパク質は、転写活性化因子または転写抑制因子であり得る。c-M A F をコードする D N A 配列は、アクセッション番号 N G _ 0 1 6 4 4 0 （配列番号 1）（コーディング）として N C B I データベースに記載されている。c-M A F のゲノム配列は、配列番号 1 3 に示されている。本発明の方法は、コード配列またはゲノム D N A 配列のいずれをも利用し得る。上記 D N A 配列からは 2 つのメッセンジャー R N A が転写され、その各々が、2 つの c-M A F タンパク質アイソフォーム、α アイソフォームおよび β アイソフォームのうちの 1 つを生じる。上記アイソフォームの各々に対する相補 D N A 配列は、それぞれ、アクセッション番号 N M _ 0 0 5 3 6 0 . 4 （配列番号 2）および N M _ 0 0 1 0 3 1 8

40

50

04.2 (配列番号3)としてNCBIデータベースに記載されている。三重陰性(triple-negative)かつER+乳がんの予後を予測するためのc-MAF遺伝子の使用は、国際出願番号PCT/IB2013/001204(これは、その全体において本明細書に参考として援用される)に記載されている。甲状腺がんの予後を予測するためのc-MAF遺伝子の使用は、米国仮特許出願第61/801,769号(これは、その全体において本明細書に参考として援用される)に記載されている。腎細胞がんの予後を予測するためのc-MAF遺伝子の使用は、米国仮特許出願第61/801,642号(これは、その全体において本明細書に参考として援用される)に記載されている。乳がん罹患している個体の予後を決定するための目的の遺伝子(c-MAFおよびc-MAF遺伝子の遺伝子座を含む)の使用は、米国仮特許出願第61/801,718号(これは、その全体において本明細書に参考として援用される)に記載されている。肺がんの予後を予測するためのc-MAF遺伝子の使用は、国際出願番号PCT/US2013/044584(これは、その全体において本明細書に参考として援用される)に見出される。

10

【0061】

本発明の文脈においては、「転移」は、最初のがんが生じた器官から異なる器官へのがんの伝播として理解されている。転移は、通常、血液またはリンパ系を通じて起きる。がん細胞が広がって、新しい腫瘍を形成するとき、後者は、二次性腫瘍または転移性腫瘍と呼ばれる。二次性腫瘍を形成しているがん細胞は、元の腫瘍のがん細胞に似ている。前立腺がんが、例えば、骨に広がる(転移する)場合、二次性腫瘍は、悪性の前立腺がん細胞から形成される。その骨における疾患は、転移性前立腺がんであって、骨がんではない。本発明の方法の特定の実施形態において、転移は、骨に広がった(転移した)前立腺がんである。

20

【0062】

本発明において、「前立腺がんを有する被験体における転移の診断」は、そのサインを研究することによって、すなわち本発明の文脈において、コントロールサンプルと比較した、前立腺がん腫瘍組織中のc-MAF遺伝子発現レベルの上昇(すなわち過剰発現)によって、疾患(転移)を同定することと理解される。

【0063】

本発明において、「前立腺がんを有する被験体における転移を起こす傾向の予後診断」は、上記被験体が有する前立腺がんが今後転移するであろうかどうかをサインに基づいて知ることと理解される。本発明の文脈において、サインは、腫瘍組織中のc-MAF遺伝子過剰発現である。

30

【0064】

本発明の方法は、第1の工程において、被験体由来の腫瘍組織サンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルを定量する工程を含む。

【0065】

好ましい実施形態において、本発明の第1の方法は、単一のマーカーとしてc-MAF遺伝子発現レベルのみを定量する工程を含む、すなわち、この方法は、何らかのさらなるマーカーの発現レベルを決定する工程を含まない。

40

【0066】

本明細書中で使用されるとき、用語「被験体」または「患者」とは、哺乳動物として分類されるすべての動物のことを指し、それらとしては、家畜(domestic animal)および家畜(farm animal)、霊長類およびヒト、例えば、人間、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコまたはげっ歯類が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、被験体は、任意の年齢または人種のヒトの男性または女性である。

【0067】

用語「不良」または「良好」は、本明細書中で使用されるとき、被験体が好ましいまたは好ましくない転帰を示すことを意味する臨床転帰のことを指す。当業者によって理解さ

50

れるように、そのような確率の評価は、診断される被験体の100%に対して正しいことが好ましいが、正しくない場合もある。しかしながら、この用語は、被験体の統計学的に有意な一部が、所与の転帰についての素因を有すると同定され得ることを要求する。ある一部が統計学的に有意であるかどうかは、当業者によって、様々な周知の統計評価ツール、例えば、信頼区間の決定、p値の決定、スチューデントt検定、マン・ホイットニー検定などを使用して容易に決定され得る。詳細には、DowdyおよびWearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983に見出される。好ましい信頼区間は、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%である。p値は、好ましくは、0.05、0.01、0.005もしくは0.0001またはそれ未満である。より好ましくは、集団の被験体の少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセントまたは少なくとも約90パーセントが、本発明の方法によって適切に同定され得る。

10

【0068】

本発明において、「腫瘍サンプル」は、原発性前立腺がん腫瘍を起源とするサンプル（例えば、腫瘍組織、循環腫瘍細胞、循環腫瘍DNA）と理解される。上記サンプルは、従来の方法、例えば、関連する医学的技法の当業者に周知の方法を用いる生検によって、得ることができる。生検サンプルを得るための方法は、腫瘍を大きな片に分割する工程、または顕微解剖、または当該分野で公知の他の細胞分離方法を含む。腫瘍細胞は、さらに、小ゲージ針を用いた吸引による細胞診によって得ることができる。サンプルの保存および取扱いを単純にするために、サンプルは、ホルマリン中で固定されて、パラフィンに浸され得るか、またはまず凍結されて、次いで、急速凍結を可能にする極低温媒体（highly cryogenic medium）への浸漬によってOCT化合物などの組織凍結媒体に浸され得る。

20

【0069】

当業者が理解するように、遺伝子発現レベルは、上記遺伝子の、または上記遺伝子によってコードされるタンパク質のメッセンジャーRNAレベル、ならびに上記遺伝子を含むゲノム領域のコピー数または転座数を測定することによって、定量され得る。

【0070】

この目的のために、生物学的サンプルは、組織または細胞の構造を物理的にまたは機械的に壊すように処理されて、細胞内の構成要素が核酸を調製するための水溶液中または有機溶液中に放出され得る。核酸は、当業者に公知の商業的に利用可能な方法によって抽出される（Sambrook, J. ら、「*Molecular cloning: a Laboratory Manual*」, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., 1-3巻）。

30

【0071】

したがって、c-MAF遺伝子発現レベルは、上記遺伝子の転写に起因するRNA（メッセンジャーRNAまたはmRNA）またはあるいは上記遺伝子の相補DNA（cDNA）から定量され得る。ゆえに、本発明の特定の実施形態において、c-MAF遺伝子発現レベルの定量は、c-MAF遺伝子のメッセンジャーRNAもしくは上記mRNAのフラグメント、c-MAF遺伝子の相補DNAもしくは上記cDNAのフラグメントまたはそれらの混合物の定量を含む。

40

【0072】

c-MAF遺伝子によってコードされるmRNAレベルまたはその対応するcDNAのmRNAレベルを検出するためおよび定量するために、実質的に任意の従来の方法を本発明の範囲内で使用することができる。非限定的な例証として、上記遺伝子によってコードされるmRNAレベルは、従来の方法、例えば、mRNA増幅および上記mRNA増幅産物の定量を含む方法（例えば、電気泳動および染色、またはあるいはサザンブロットおよび好適なプローブの使用、ノーザンブロットおよび目的の遺伝子（c-MAF）のmRNAの、またはその対応するcDNAの特異的プローブの使用、S1ヌクレアーゼを用いた

50

マッピング、R T－P C R、ハイブリダイゼーション、マイクロアレイなど）を用いて、好ましくは、好適なマーカーを使用するリアルタイム定量的P C Rによって、定量され得る。同様に、c－M A F遺伝子によってコードされる上記m R N Aに対応するc D N Aレベルもまた、従来の技法を用いることによって定量され得る；この場合、本発明の方法は、対応するm R N Aの逆転写（R T）によって、対応するc D N Aを合成し、それに続く増幅および上記c D N A増幅産物の定量のための工程を含む。発現レベルを定量するための従来の方法は、例えば、S a m b r o o kら、2 0 0 1（上掲）に見出すことができる。これらの方法は当該分野で公知であり、当業者は、各技術に必要な正規化に精通している。例えば、多重P C Rを使用して生成される発現測定値は、測定されている遺伝子の発現と、いわゆる「ハウスキーピング」遺伝子（その発現は、全てのサンプルを通して一定であるはずであるので、比較するためのベースライン発現を提供する）または発現ががんによって調節されることが公知である他のコントロール遺伝子の発現とを比較することによって、正規化されるはずである。

10

【0073】

特定の実施形態において、c－M A F遺伝子発現レベルは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）またはD N A、R N Aアレイもしくはヌクレオチドハイブリダイゼーション技法によって定量される。

【0074】

さらに、c－M A F遺伝子発現レベルは、上記遺伝子によってコードされるタンパク質、すなわち、c－M A Fタンパク質（c－M A F）[N C B I，アクセッション番号O 7 5 4 4 4]またはc－M A Fタンパク質の任意の機能的に等価なバリエーションの発現レベルを定量することによっても定量され得る。2つのc－M A Fタンパク質アイソフォーム、4 0 3アミノ酸で構成されているαアイソフォーム（N P__0 0 5 3 5 1. 2）（配列番号4）および3 7 3アミノ酸で構成されているβアイソフォーム（N C B I，N P__0 0 1 0 2 6 9 7 4. 1）（配列番号5）が存在する。c－M A F遺伝子発現レベルは、いずれかのc－M A Fタンパク質アイソフォームの発現レベルを定量することによって定量され得る。したがって、特定の実施形態において、c－M A F遺伝子によってコードされるタンパク質のレベルの定量は、c－M A Fタンパク質の定量を含む。

20

【0075】

本発明の文脈において、「c－M A Fタンパク質の機能的に等価なバリエーション」は、（i）アミノ酸残基の1つまたは複数、保存されたまたは保存されていないアミノ酸残基（好ましくは、保存されたアミノ酸残基）によって置換された、c－M A Fタンパク質（配列番号4または配列番号5）のバリエーション（ここで、そのような置換されたアミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸残基であってもよい、そうでなくてもよい）または（i i）1つまたは複数のアミノ酸の挿入または欠失を含みかつc－M A Fタンパク質と同じ機能を有する、すなわち、D N A結合転写因子として作用するバリエーションと理解される。c－M A Fタンパク質のバリエーションは、国際特許出願W O 2 0 0 5 / 0 4 6 7 3 1（その全体が参照により本明細書中に援用される）に示されているような、c－M A Fがインビトロにおける細胞増殖を促進する能力に基づく方法、W O 2 0 0 8 0 9 8 3 5 1（その全体が参照により本明細書中に援用される）に記載されているような、c－M A Fを発現する細胞においてサイクリンD 2プロモーターまたはc－M A F応答領域（M A R Eまたはc－M A F応答エレメント）を含むプロモーターの支配下のレポーター遺伝子の転写能力をいわゆるインヒビターが阻止する能力に基づく方法、またはU S 2 0 0 9 0 4 8 1 1 7 A（その全体が参照により本明細書中に援用される）に記載されているような、N F A T c 2およびc－M A Fを発現する細胞においてP M A / イオノマイシンによる刺激に応答してI L－4プロモーターの支配下のレポーター遺伝子の発現をいわゆるインヒビターが阻止する能力に基づく方法を用いて同定され得る。

30

40

【0076】

本発明に係るバリエーションは、好ましくは、いずれかのc－M A Fタンパク質アイソフォーム（配列番号4または配列番号5）のアミノ酸配列と少なくとも約5 0 %、少なくとも

50

約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%の配列類似性を有する。バリエーションと先に定義された特定のc-MAFタンパク質配列との間の類似性の程度は、当業者に広く公知のアルゴリズムおよびコンピュータプロセスを用いて決定される。2つのアミノ酸配列間の類似度は、好ましくは、BLASTPアルゴリズム [BLAST Manual, Altschul, S. ら、NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S. ら、J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)] を用いて決定される。

【0077】

c-MAFタンパク質発現レベルは、被験体由来のサンプル中の上記タンパク質の検出および定量を可能にする任意の従来の方法によって定量され得る。非限定的な例証として、上記タンパク質レベルは、例えば、c-MAF結合能を有する抗体（または抗原決定基を含むそのフラグメント）を使用し、続いて、形成された複合体を定量することによって、定量され得る。これらのアッセイにおいて使用される抗体は、標識されていてもよいし、されていなくてもよい。使用され得るマーカーの例証的な例としては、放射性同位体、酵素、フルオロフォア、化学発光試薬、酵素基質または補因子、酵素インヒビター、粒子、色素などが挙げられる。標識されていない抗体（一次抗体）および標識された抗体（二次抗体）を使用する本発明において使用され得る幅広い公知のアッセイがある；これらの技法としては、ウェスタンブロットまたはウェスタントランスファー、ELISA（酵素結合免疫吸着測定法）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、競合EIA（競合酵素免疫測定法）、DAS-ELISA（二重抗体サンドイッチELISA）、免疫細胞化学的および免疫組織化学的技法、特異的抗体を含むタンパク質マイクロアレイもしくはバイオチップの使用に基づく技法、またはディップスティックなどの形式でのコロイド沈殿に基づくアッセイが挙げられる。上記c-MAFタンパク質を検出するためおよび定量するための他の方法としては、アフィニティークロマトグラフィー法、リガンド結合アッセイなどが挙げられる。免疫学的方法が使用されるとき、c-MAFタンパク質に高親和性で結合すると知られている任意の抗体または試薬が、その量を検出するために使用され得る。これとしては、抗体、例えば、ポリクローナル血清、ハイブリドーマの上清またはモノクローナル抗体、抗体フラグメント、Fv、Fab、Fab' およびF(ab')₂、scFv、ヒト化ダイアボディ、トリアボディ (triabody)、テトラボディ (tetra body)、抗体、ナノボディ、アルファボディ、ステープルド (stapled) ペプチドおよびシクロペプチドの使用が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の状況において使用され得る市販の抗c-MAFタンパク質抗体は、販売されている（例えば、抗体ab427、ab55502、ab55502、ab72584、ab76817、ab77071 (Abcam plc, 330 Science Park, Cambridge CB4 0FL, United Kingdom)、AbD SerotecのO75444モノクローナル抗体（マウス抗ヒトMAFアジド不含モノクローナル抗体、非結合体化、クローン6b8 (Mouse Anti-Human MAF Azide free Monoclonal antibody, Unconjugated, Clone 6b8)）など）。抗c-MAF抗体を提供している多くの営利会社がある（例えば、Abnova Corporation、Bethyl Laboratories、Bioworld Technology、GeneTexなど）。

【0078】

特定の実施形態において、c-MAFタンパク質レベルは、ウェスタンブロット、免疫組織化学、ELISAまたはタンパク質アレイによって定量される。

【0079】

本発明の第1の方法は、第2の工程において、被験体由来の腫瘍サンプル（原発性腫瘍生検材料、循環腫瘍細胞、および循環腫瘍DNAを含むが、これらに限定されない）中で得られるc-MAF遺伝子発現レベルを、コントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レ

10

20

30

40

50

ベルと比較する工程を含む。

【0080】

いったん、前立腺がんを有する被験体由来の腫瘍組織サンプル、循環腫瘍細胞、または循環腫瘍DNA中のc-MAF遺伝子発現レベルが、測定され、コントロールサンプルと比較されたら、上記遺伝子の発現レベルがコントロールサンプル中のその発現レベルと比較して上昇している場合、上記被験体は、転移について陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高いと結論づけられ得る。

【0081】

c-MAF遺伝子発現レベルの決定は、コントロールサンプルまたは参照サンプルの値と相関しているはずである。解析されるべき腫瘍のタイプに応じて、コントロールサンプルの正確な性質は変動し得る。したがって、診断が評価されることになっている場合、参照サンプルは、転移していない前立腺がんを有する被験体由来の腫瘍組織サンプルまたは転移していない前立腺がんを有する被験体由来の生検サンプルの腫瘍組織コレクションにおいて測定されたc-MAF遺伝子発現レベルの中央値に対応する腫瘍組織サンプルである。

【0082】

上記参照サンプルは、代表的には、被験体集団由来の等量のサンプルを合わせることで得られる。一般に、代表的な参照サンプルは、臨床的に十分に検証されている被験体および転移が無いことが十分に特徴付けられている被験体から得られる。そのようなサンプルでは、バイオマーカー(c-MAF遺伝子)の正常濃度(参照濃度)が、例えば、参照集団の平均濃度を提供することによって決定され得る。マーカーの参照濃度を決定する場合に、様々な考慮がなされる。そのような考慮すべき事柄は、患者の年齢、体重、性別、全般的な身体的状態などである。例えば、好ましくは、上記の考慮すべき事柄に従って、例えば、様々な年齢カテゴリーに従って分類された、等量の少なくとも約2人、少なくとも約10人、少なくとも約100人から好ましくは、1000人を超える被験体の群が、参照群としてみなされる。参照レベルが由来するサンプル集合は、好ましくは、その研究の患者対象と同じタイプのがん(例えば、前立腺がん)に罹患している被験体によって形成される。同様に、患者のコホート内の参照値は、すべての感度(all de sensitivity)および特異度のペアについて、どのペアが最善の値を提供し、かつ対応する参照値が何であるかを決定するために、受信者動作曲線(ROC)を使用し、曲線下面積を測定して、確立することができる。ROCは、標準的な統計概念である。説明は、Stuart G. Baker "The Central Role of Receiver Operating Characteristic (ROC) curves in Evaluating Tests for the Early Detection of Cancer" Journal of The National Cancer Institute (2003) Vol 95, No. 7, 511-515に見出され得る。

【0083】

いったん、この中央値または参照値が確立されたら、この中央値を有する患者由来の腫瘍組織において発現されたこのマーカーのレベルは、比較し、したがって、「上昇した」発現レベルに割り当てることができる。被験体の間のばらつき(例えば年齢、人種などに関連する側面)のために、c-MAF発現の絶対参照値を確立することは非常に困難である(事実上不可能ではないにしても)。したがって、特定の実施形態において、c-MAF発現の「上昇した」または「低下した」発現に対する参照値は、有している疾患が上で述べられた方法のいずれかによって十分に検証された被験体から単離された1つまたはいくつかのサンプルにおいてアッセイを行うことを含む従来の手段によってc-MAF発現レベルのパーセンタイルを計算することによって決定される。次いで、c-MAFの「低下した」レベルは、好ましくは、c-MAF発現レベルが正常集団における50パーセンタイル以下である(例えば、正常集団における60パーセンタイル以下、正常集団における70パーセンタイル以下、正常集団における80パーセンタイル以下、正常集団にお

10

20

30

40

50

る90パーセント以下および正常集団における95パーセント以下である発現レベルを含む) サンプルに対して割り当てられ得る。次いで、「上昇した」c-MAF遺伝子発現レベルは、好ましくは、c-MAF遺伝子発現レベルが正常集団における50パーセント以上である(例えば、正常集団における60パーセント以上、正常集団における70パーセント以上、正常集団における80パーセント以上、正常集団における90パーセント以上および正常集団における95パーセント以上である発現レベルを含む) サンプルに対して割り当てられ得る。

【0084】

本発明においては、「上昇した発現レベル」(複数)または「上昇した発現レベル」(単数)は、それが参照サンプルまたはコントロールサンプルにおけるc-MAF遺伝子のレベルよりも高いレベルのことを指すときの発現レベルと理解される。特に、参照サンプル中の発現レベルが、患者から単離したサンプルと比較して、少なくとも、約1.1倍、1.5倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍またはなおもそれより高いとき、そのサンプルは、高いc-MAF発現レベルを有すると考えられ得る。

10

【0085】

本発明の文脈において、被験体が罹患している前立腺がんが、身体の他の器官(特定の実施形態において骨)に転移している場合、「被験体は、転移について陽性の診断を有する」ことが理解される。

【0086】

20

なおさらに別の実施形態において、骨への転移は、溶骨性骨転移である。本明細書中で使用されるとき、「溶骨性骨転移」という表現は、腫瘍細胞による破骨細胞活性の刺激に起因して転移の近傍で骨吸収(骨密度の進行性消失)が生じ、重篤な疼痛、病理学的骨折、高カルシウム血症、脊髄圧迫、および神経圧迫に起因する他の症候群を特徴とする、転移のタイプを指す。

【0087】

他方では、被験体が罹患している前立腺がんが今後転移する確率が高い場合、「被験体は、転移を起こす傾向がより高い」ことが本発明において理解される。

【0088】

当業者は、原発性前立腺腫瘍が転移する傾向の予測が、同定されるすべての被験体(すなわち、被験体の100%)に対して正しくあることを意図していないことを理解する。それにもかかわらず、その用語は、被験体の統計学的に有意な一部(例えば、コホート研究におけるコホート)の同定を可能にすることを必要とする。ある一部が統計学的に有意であるかどうかは、当業者によって、様々な周知の統計評価ツール、例えば、信頼区間の決定、p値の決定、スチューデントt検定、マン・ホイットニー検定などを使用する単純な様式で決定され得る。詳細は、DowdyおよびWearden, *Statistics for Research*, John Wiley and Sons, New York 1983に提供されている。好ましい信頼区間は、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%である。p値は、好ましくは、0.1、0.05、0.01、0.005または0.0001である。より好ましくは、集団の被験体の少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%または少なくとも約90%が、本発明の方法によって適切に同定され得る。

30

40

【0089】

本明細書中で使用されるとき、「骨分解を回避するためまたは予防するための薬剤」とは、骨芽細胞の増殖を刺激するか、または破骨細胞の増殖を阻害するか、または骨の構造を固定することによって、骨分解を予防するか、阻害するか、処置するか、減少させるか、または停止することができる任意の分子のことを指す。

【0090】

本明細書中で使用されるとき、「c-MAF阻害剤」とは、c-MAF遺伝子発現を完全にまたは部分的に阻害することができる(その両方が、上記遺伝子の発現産物の生成を

50

妨げること（c-MAF遺伝子の転写を妨害することおよび／またはc-MAF遺伝子発現に由来するmRNAの翻訳を阻止すること）およびc-MAFタンパク質活性を直接阻害することによって）任意の分子のことを指す。c-MAF遺伝子発現インヒビターは、国際特許出願WO2005/046731（その全内容が本明細書によって参照により援用される）に示されているような、c-MAFがインビトロにおける細胞増殖を促進する能力をいわゆるインヒビターが阻止する能力に基づく方法、WO2008098351（その全内容が本明細書によって参照により援用される）に記載されているような、c-MAFを発現する細胞においてサイクリンD2プロモーターもしくはc-MAF応答領域（MAREまたはc-MAF応答エレメント）を含むプロモーターの支配下のレポーター遺伝子の転写能力をいわゆるインヒビターが阻止する能力に基づく方法、またはUS2009048117A（その全内容が本明細書によって参照により援用される）に記載されているような、NFATc2およびc-MAFを発現する細胞においてPMA／イオノマイシンによる刺激にตอบสนองしてIL-4プロモーターの支配下のレポーター遺伝子の発現をいわゆるインヒビターが阻止する能力に基づく方法を用いて同定され得る。

10

【0091】

本明細書中で使用されるとき、ラパマイシンの哺乳動物における標的（mTOR）または「mTor」とは、EC2.7.11.1に相当するタンパク質のことを指す。mTor酵素は、セリン／トレオニンタンパク質キナーゼであり、細胞増殖、細胞運動性、細胞成長、細胞生存および転写を制御する。

【0092】

20

本明細書中で使用されるとき、「mTorインヒビター」とは、mTor遺伝子の発現を完全にまたは部分的に阻害することができる（その両方が、上記遺伝子の発現産物の生成を妨げること（mTor遺伝子の転写を妨害することおよび／またはmTor遺伝子発現に由来するmRNAの翻訳を阻止すること）およびmTorタンパク質活性を直接阻害することによって）任意の分子のことを指す。二重の、またはそれより多くの標的およびそれらの中でもmTorタンパク質活性を有するインヒビターを含む。

【0093】

本明細書中で使用されるとき、「Src」とは、EC2.7.10.2に相当するタンパク質のことを指す。Srcは、非レセプターチロシンキナーゼおよび癌原遺伝子である。Srcは、細胞成長および胚発生において役割を果たし得る。

30

【0094】

本明細書中で使用されるとき、「Srcインヒビター」とは、Src遺伝子の発現を完全にまたは部分的に阻害することができる（その両方が、上記遺伝子の発現産物の生成を妨げること（Src遺伝子の転写を妨害することおよび／またはSrc遺伝子発現に由来するmRNAの翻訳を阻止すること）およびSrcタンパク質活性を直接阻害することによって）任意の分子のことを指す。

【0095】

本明細書中で使用されるとき、「プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ2」、「シクロオキシゲナーゼ2」または「COX-2」とは、EC1.14.99.1に相当するタンパク質のことを指す。COX-2は、アラキドン酸からのプロスタグランジンエンドペルオキシドH₂への変換に関与する。

40

【0096】

本明細書中で使用されるとき、「COX-2インヒビター」とは、COX-2遺伝子の発現を完全にまたは部分的に阻害することができる（その両方が、上記遺伝子の発現産物の生成を妨げること（COX-2遺伝子の転写を妨害することおよび／またはCOX-2遺伝子発現に由来するmRNAの翻訳を阻止すること）およびCOX-2タンパク質活性を直接阻害することによって）任意の分子のことを指す。

【0097】

本明細書中で使用されるとき、「転帰」または「臨床転帰」とは、結果として生じる疾患の経過および／または疾患の進行のことを指し、例えば、再発、再発までの期間、転移

50

、転移までの期間、転移の数、転移の部位の数および／または疾患に起因する死亡によって特徴付けられ得る。例えば、良好な臨床転帰としては、治癒、再発の予防、転移の予防および／または一定の期間内の生存（再発なし）が挙げられ、不良な臨床転帰としては、疾患の進行、転移および／または一定の期間内の死亡が挙げられる。

【0098】

「予測する」は、本明細書中で使用されるとき、肺がん罹患している被験体が遠隔器官への転移を起こす可能性の決定のことを指す。本明細書中で使用されるとき、「予後良好」は、被験体が、一定期間内において生存するおよび／または再発もしくは遠隔転移を有しないかもしくは有するリスクが低いと予想される（例えば、予測される）ことを示す。用語「低い」は、相対的な用語であり、本願の文脈において、臨床転帰（再発、遠隔転移など）に関して「低」発現グループのリスクのことを指す。「低」リスクは、不均一ながん患者集団に対する平均リスクより低いリスクと考えられ得る。Paikら（2004）の研究では、再発の全体的な「低」リスクは、15パーセントより低いと考えられた。そのリスクはまた、期間に応じて変動し得る。その期間は、がんの最初の診断の後または予後診断が行われた後の、例えば、5年、10年、15年またはなおも20年であり得る。

10

【0099】

本明細書中で使用されるとき、「予後不良」は、被験体が、一定期間内において生存しないおよび／または再発もしくは遠隔転移を有するかもしくは有するリスクが高いと予想される、例えば、予測されることを示す。用語「高い」は、相対的な用語であり、本願の文脈において、臨床転帰（再発、遠隔転移など）に関して「高」発現グループのリスクのことを指す。「高」リスクは、不均一ながん患者集団に対する平均リスクより高いリスクと考えられ得る。Paikら（2004）の研究では、再発の全体的な「高」リスクは、15パーセントより高いと考えられた。そのリスクはまた、期間に応じて変動し得る。その期間は、がんの最初の診断のまたは予後診断が行われた後の、例えば、5年、10年、15年またはなおも20年であり得る。

20

【0100】

「参照値」は、本明細書中で使用されるとき、患者または患者から回収されたサンプルの臨床検査によって得られた値／データに対する参照として使用される検査値のことを指す。参照値または参照レベルは、絶対値；相対値；上限および／もしくは下限を有する値；一連の値；平均値（average value）；中央値、平均値（mean value）、または特定のコントロール値もしくはベースライン値と比較される値であり得る。参照値は、個別のサンプル値、例えば、試験されている被験体から得られた値などであるが、より早い時点における値に基づき得る。参照値は、多数のサンプル（例えば、暦年齢が一致する群の被験体の集団由来）に基づいてもよいし、試験されるべきサンプルを含むまたは除外したサンプルのプールに基づいてもよい。

30

【0101】

用語「処置」は、本明細書中で使用されるとき、本明細書中に記載されるような臨床状態を終結させるか、予防するか、回復させるか、またはその臨床状態への罹患性を低下させることを目指す任意のタイプの治療のことを指す。好ましい実施形態において、処置という用語は、本明細書中で定義されるような障害または状態の予防的処置（すなわち、臨床状態への罹患性を低下させる治療）に関する。したがって、「処置」、「処置する」およびそれらの等価な用語は、ヒトを含む哺乳動物において、病理学的な状態または障害の任意の処置を包含する、所望の薬理学的効果または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、障害もしくはその徴候を完全にもしくは部分的に予防することに関して予防的であり得、かつ／または障害および／もしくはその障害に起因し得る有害作用に対する部分的もしくは完全な治癒に関して治療的であり得る。すなわち、「処置」は、（1）被験体において障害が生じることもしくは再発することを予防すること、（2）障害を阻害すること、例えば、その進行を停止すること、（3）例えば、失った機能、不足している機能もしくは不完全な機能を再建するかもしくは修復するか、または非効率なプロセスを刺激

40

50

することによって、宿主が障害もしくはその徴候にもはや罹患していないように、障害もしくはそれに関連する少なくとも徴候を停止することもしくは終結させること（例えば、障害またはその徴候の後退を引き起こすこと）、または（４）障害もしくはそれに関連する徴候を軽減すること、緩和すること、もしくは回復させること（ここで、回復させることとは、少なくとも、パラメータ（例えば、炎症、疼痛または免疫不全）の大きさの減少のことを指すために広い意味において使用される）を含む。

【0102】

本明細書中で使用されるとき、「サンプル」または「生物学的サンプル」は、被験体から単離された生物学的材料を意味する。生物学的サンプルは、c-MAF遺伝子の発現レベルの決定に適した任意の生物学的材料を含み得る。サンプルは、任意の好適な生物学的組織または体液（例えば、腫瘍組織、血液、血漿、血清、尿または脳脊髄液（CSF）など）から単離され得る。

10

【0103】

本明細書中で使用されるとき、本明細書中で使用される遺伝子の「発現レベル」という用語は、被験体のサンプル中の遺伝子によって生成される遺伝子産物の測定可能な量のことを指し、ここで、その遺伝子産物は、転写産物または翻訳産物であり得る。したがって、発現レベルは、核酸遺伝子産物（例えば、mRNAまたはcDNA）またはポリペプチド遺伝子産物に関係し得る。発現レベルは、被験体のサンプルおよび／または参照サンプル（複数可）から得られ、例えば、新規に検出され得るか、または事前の測定値に対応し得る。発現レベルは、例えば、当業者に公知であるような、マイクロアレイ法、PCR法（例えば、qPCR）および／または抗体ベースの方法を用いて、決定され得るかまたは測定され得る。

20

【0104】

本明細書中で使用されるとき、用語「遺伝子コピー数」とは、細胞における核酸分子のコピー数のことを指す。遺伝子コピー数は、細胞のゲノム（染色体）DNAにおける遺伝子コピー数を含む。正常な細胞（非腫瘍細胞）では、遺伝子コピー数は、通常、2コピー（染色体対の各メンバーにおいて1コピー）である。遺伝子コピー数は、時折、細胞集団のサンプルから採取された遺伝子コピー数の半数を含む。

【0105】

「上昇した発現レベル」は、それが参照サンプルまたはコントロールサンプルにおけるc-MAF遺伝子のレベルよりも高いレベルのことを指すときの発現レベルと理解される。この上昇したレベルは、ある遺伝子または16q23もしくは16q22-24染色体遺伝子座の増幅または転座によって、他の機序を排除せずに引き起こされ得る。特に、患者から単離されたサンプル中の発現レベルが、参照またはコントロールと比較して、少なくとも、約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍またはなおもそれより高いとき、そのサンプルは、高いc-MAF発現レベルを有すると考えられ得る。

30

【0106】

「プローブ」は、本明細書中で使用されるとき、目的の特定の核酸配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列のことを指す。いくつかの実施形態において、プローブは、転座を起こすと知られている染色体の領域に特異的であり得る。いくつかの実施形態において、プローブは、特異的な標識またはタグを有する。いくつかの実施形態において、タグは、フルオロフォアである。いくつかの実施形態において、プローブは、その標識が核酸およびタンパク質への白金の安定な配位結合（coordinative binding）に基づくDNAインサイチュハイブリダイゼーションプローブである。いくつかの実施形態において、プローブは、米国特許出願12/067532および米国特許出願12/181,399（これらの全体が参照により援用される）に記載されているか、またはSweenhuisら、「Construction of repeat-free fluorescence in situ hybridization probes

40

50

」Nucleic Acids Research 40(3):e20(2012)に記載されている。

【0107】

「タグ」または「標識」は、本明細書中で使用されるとき、プローブまたはプローブの位置を可視化するか、マークするか、または別途捕捉することを可能にする、プローブと直接または間接的に会合されている任意の物理的な分子のことを指す。

【0108】

「転座」は、本明細書中で使用されるとき、等しくない量または等しい量で染色体間で染色体材料が交換することを指す。場合によっては、転座は、同じ染色体上で起きる。場合によっては、転座は、異なる染色体間で起きる。転座は、乳がんおよび白血病を含む多くのタイプのがんにおいて高頻度で生じる。転座は、主要な相互転座またはより複雑な二次転座であり得る。多くのがんの起因事象を構成すると考えられている免疫グロブリン(immunoglobulin)重鎖(IgH)遺伝子座に関わる主要な転座がいくつかある(Eychene, A., Rocques, N., および Puoponnnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews : Cancer. 8:683-693)。

【0109】

「倍数体」または「倍数性」は、本明細書中で使用されるとき、細胞が、2より多いコピーの目的の遺伝子を含むことを示す。場合によっては、目的の遺伝子は、MAFである。いくつかの実施形態において、倍数性は、目的の遺伝子の発現の蓄積に関連する。いくつかの実施形態において、倍数性は、ゲノム不安定性に関連する。いくつかの実施形態において、ゲノム不安定性は、染色体転座に至り得る。

【0110】

「ホールゲノムシーケンシング」は、本明細書中で使用されるとき、生物のゲノム全体が1回で配列決定されるプロセスである。例えば、Ng., P. C. and Kirkness, E. F., Whole Genome Sequencing. 2010. Methods in Molecular Biology. 628:215-226を参照のこと。

【0111】

「エクソームシーケンシング」は、本明細書中で使用されるとき、生物のDNAのコード領域全体が配列決定されるプロセスである。エクソームシーケンシングでは、mRNAが配列決定される。ゲノムの非翻訳領域は、エクソームシーケンシングに含められない。例えば、Choi, M. ら、Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. 2009. PNAS. 106(45):19096-19101を参照のこと。

【0112】

「腫瘍組織サンプル」は、前立腺がん腫瘍（循環腫瘍細胞および循環腫瘍DNAが挙げられるがこれらに眼底されない）を起源とする組織サンプルと理解される。上記サンプルは、従来の方法、例えば、関連する医学的技法の当業者に周知の方法を用いる生検によって、得ることができる。

【0113】

「溶骨性骨転移」とは、骨吸収（骨密度の進行性消失）が、腫瘍細胞による破骨細胞活性の刺激に起因する転移の近くにおいて生じる転移のタイプのことを指し、重篤な疼痛、病理学的骨折、高カルシウム血症、脊髄圧迫、および神経圧迫に起因する他の症候群を特徴とする。

【0114】

前立腺腫瘍を有する患者において本発明の個別化治療をデザインするための方法

当該分野において公知であるように、がん罹患している被験体に施されるべき処置は、後者が悪性腫瘍であるかどうか、すなわち、それが転移を起こす高い確率を有するかど

10

20

30

40

50

うか、または後者が良性の腫瘍であるかどうかにより左右される。第1の仮定では、一般に好まれる処置は、化学療法などの全身性処置であり、第2の仮定では、一般に好まれる処置は、放射線治療などの局所性処置である。

【0115】

ゆえに、本発明に記載されるように、前立腺がん細胞におけるc-MAF遺伝子の過剰発現が、転移の存在に関係することを考えれば、c-MAF遺伝子の発現レベルは、上記がん罹患している被験体に最も適した治療に関して決定することを可能にする。

【0116】

したがって、別の態様において、本発明は、前立腺がんを有する被験体のために個別化治療をデザインするためのインビトロでの方法に関し、その方法は、

(i) 上記被験体の腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルを定量する工程、および

(ii) 以前に得られた発現レベルをコントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルと比較する工程

を含み、ここで、その発現レベルが、上記コントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルと比較して上昇している場合、上記被験体は、転移の予防および／または処置を目指す治療を受けるのに適格である。この方法の特定の局面では、次いで、被験体は、骨転移を予防、阻害および／または処置する少なくとも1つの治療薬を投与される。

c-MAF遺伝子発現レベルが、上記参照値と比較して上昇していない場合、上記被験体は、骨転移を予防するための治療を受けるのに適格ではない。本方法の特定の態様では、次いで、被験体は、骨転移を予防、阻害および／または処置する少なくとも1つの治療薬が投与されない。

【0117】

特定の実施形態において、転移は、骨転移である。より好ましい実施形態では、骨転移は、溶骨性転移である。

【0118】

用語および表現「被験体」、「前立腺がん」、「腫瘍サンプル」、「転移」、「発現レベルの決定」、「c-MAF遺伝子」、「上昇した発現レベル」、および「コントロールサンプル」は、本発明の第1の方法に関して詳細に説明されており、本発明の第2および第3の方法に等しく適用可能である。

【0119】

本発明の第2の方法は、第1の工程に、前立腺がん罹患している被験体の腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルを定量する工程を含む。

【0120】

好ましい実施形態において、本発明の第2の方法は、c-MAF遺伝子発現レベルだけを単一マーカーとして定量する工程を含み、すなわち、その方法は、いかなる追加のマーカーの発現レベルを決定する工程も含まない。

【0121】

本発明の第2の方法の場合、サンプルは、被験体の原発腫瘍組織サンプルである。第2の工程において、被験体の腫瘍サンプルにおいて得られたc-MAF遺伝子発現レベルは、コントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルと比較される。c-MAF遺伝子発現レベルの決定は、コントロールサンプルまたは参照サンプルの値と関係づけられるはずである。解析されるべき腫瘍のタイプに応じて、コントロールサンプルの正確な性質は変動し得る。したがって、好ましくは、参照サンプルは、転移していない前立腺がんを有する被験体の腫瘍組織サンプル、または転移していない前立腺がんを有する被験体の生検サンプルの腫瘍組織コレクションにおいて測定されたc-MAF遺伝子発現レベルの中央値に対応するサンプルである。

【0122】

なおも別の実施形態において、平均より高いc-MAFの発現レベルは、骨転移の上昇したリスクを示し、上記リスクは、c-MAF発現のレベルに比例する。したがって、肺

10

20

30

40

50

がん罹患している被験体における骨転移のリスクは、用量依存的である。

【0123】

いったん、サンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルが、測定されて、コントロールサンプルと比較されたら、上記遺伝子の発現レベルが、コントロールサンプルにおけるそれらの発現レベルと比較して上昇している場合、上記被験体は、転移の予防（被験体がまだ転移を起こしていない場合）および／または処置（被験体がすでに転移を受けている場合）を目指す治療を受けるのに適格であると結論づけられ得る。そのような上昇した発現が観察されない場合、被験体は、骨転移を予防、阻害および／または処置する少なくとも1つの治療薬が投与されない。

【0124】

本明細書中で使用されるとき、「骨分解を回避するためまたは予防するための薬剤」とは、骨芽細胞の増殖を刺激するか、または破骨細胞の増殖を阻害することによって、骨分解を予処置するかまたは停止することができる任意の分子のことを指す。骨分解の回避および／または予防のために使用される薬剤の例証的な例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

- ・副甲状腺ホルモン（PTH）および副甲状腺ホルモン様ホルモン（Parathyroid like hormone；PTH-LH）インヒビター（ブロック抗体を含む）またはその組換え型（PTHのアミノ酸7～34に対応するテリパラチド）。このホルモンは、破骨細胞を刺激してその活性を高めることによって作用する。

- ・ラネル酸ストロンチウムは、代替の経口処置であり、骨芽細胞の増殖を刺激し、破骨細胞の増殖を阻害するので、「二重作用骨剤」（DABA）と呼ばれる薬物の群の一部を形成する。

- ・「エストロゲンレセプター調節因子」（SERM）は、機序に関係なくエストロゲンがレセプターに結合するのを干渉するかまたは阻害する化合物のことを指す。エストロゲンレセプター調節因子の例としては、とりわけ、エストロゲンプロゲステルゲン、エストラジオール、ドロキシフェン、ラロキシフェン、ラソホキシフェン、TSE-424、タモキシフェン、イドキシフェン、LY353381、LY117081、トレミフェン、フルベストラント、4-[7-(2,2-ジメチル-1-オキソプロポキシ-4-メチル-2-[4-[2-(1-ピペリジニル)エトキシ]フェニル]-2H-1-ベンゾピラン-3-イル)-フェニル-2,2-ジメチルプロパノエート 4,4'-ジヒドロキシベンゾフェノン-2,4-ジニトロフェニル-ヒドラゾンおよびSH646が挙げられる。

- ・カルシトニン、カルシトニンレセプターを介して破骨細胞の活性を直接阻害する。カルシトニンレセプターは、破骨細胞の表面上で同定されている。

- ・ビスホスホネートは、骨粗鬆症および骨転移を伴うがん（後者は、乳がんおよび前立腺がんに関連する高カルシウム血症を伴うかまたは伴わない）などの、骨吸収および再吸収を伴う疾患の予防および処置のために使用される医薬品の群である。本発明の第5の方法によってデザインされる治療において使用され得るビスホスホネートの例としては、窒素含有ビスホスホネート（例えば、パミドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、アレンドロネート、イバンドロネート、リセドロネート、インカドロネート、ゾレドロネートまたはゾレドロン酸など）および窒素非含有ビスホスホネート（例えば、エチドロネート、クロドロネート、チルドロネートなど）が挙げられるが、これらに限定されない。

- ・「カテプシンKインヒビター」とは、カテプシンKシステインプロテアーゼ活性に干渉する化合物のことを指す。カテプシンKインヒビターの非限定的な例としては、4-アミノ-ピリミジン-2-カルボニトリル誘導体（Novartis Pharma GmbHの名称下の国際特許出願WO03/020278に記載されている）、公報WO03/020721（Novartis Pharma GmbH）および公報WO04/000843（ASTRAZENECA AB）に記載されているピロローピリミジン、ならびにAxy's Pharmaceuticalsの公報PCT WO00/55126、Merck Frosst Canada & Co. およびAxy's PharmaceuticalsのWO01/49288に記載されているインヒビターが挙げられる。

10

20

30

40

50

・本明細書中で使用されるとき「DKK-1 (Dickkopf-1) インヒビター」は、DKK-1 活性を低下させることができる任意の化合物のことを指す。DKK-1 は、主に成体の骨において発現され、溶骨性病変を有するミエローマ患者においてアップレギュレートされる、可溶性Wnt 経路アンタゴニストである。DKK-1 を標的化する薬剤は、多発性骨髄腫患者における溶骨性骨疾患の予防に役割を果たし得る。Novartis 製のBHQ880 は、ファースト・イン・クラスの完全ヒト型抗DKK-1 中和抗体である。前臨床試験は、BHQ880 が骨形成を促進し、それによって、腫瘍が誘導する溶骨性疾患を阻害するという仮説を支持している (Ettenberg S. ら、American Association for Cancer Research Annual Meeting. 4月 12-16, 2008; San Diego, Calif. 要旨)。

10

・本明細書中で使用されるとき「METおよびVEGFR2の二重インヒビター」は、METによって駆動される腫瘍エスケープを阻止するようにデザインされた、MET経路およびVEGF経路の強力な二重インヒビターである任意の化合物のことを指す。METは、腫瘍細胞および内皮細胞だけでなく、骨芽細胞(骨を形成する細胞)および破骨細胞(骨を除去する細胞)においても発現される。HGFは、これらの細胞型のすべてにおけるMETに結合し、MET経路に、複数のオートクラインループおよびパラクリンループにおいて重要な役割を与える。腫瘍細胞におけるMETの活性化は、転移性の骨病変の確立において重要であるとみられる。同時に、骨芽細胞および破骨細胞におけるMET経路の活性化は、異常な骨の成長(すなわち、芽細胞性の病変)または破壊(すなわち、溶解性の病変)を含む骨転移の病理学的特色をもたらし得る。したがって、MET経路の標的化は、転移性の骨病変の確立および進行の予防の実行可能な戦略であり得る。以前はXL184 (CAS849217-68-1)として知られていたカボザンチニブ(Exelixis, Inc)は、METによって駆動される腫瘍エスケープを阻止するようにデザインされた、MET経路およびVEGF経路の強力な二重インヒビターである。複数の前臨床試験において、カボザンチニブは、腫瘍細胞を死滅させ、転移を減少させ、血管新生(腫瘍の成長を支えるために必要な新しい血管の形成)を阻害することが示されている。別の好適な二重インヒビターは、E7050 (N-[2-フルオロ-4-({2-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]カルボニルアミノピリジン-4-イル}オキシ)フェニル]-N'-(4-フルオロフェニル)シクロプロパン-1,1-ジカルボキサミド(2R,3R)-タルトレート)(CAS928037-13-2)またはフォレチニブ(GSK1363089、XL880、CAS849217-64-7としても知られる)である。

20

30

・本明細書中で使用されるとき「RANKLインヒビター」は、RANK活性を低下させることができる任意の化合物のことを指す。RANKLは、ストローマ細胞およびT-リンパ球細胞の骨芽細胞膜の表面上に見出され、これらのT-リンパ球細胞は、それを分泌する能力が証明されている唯一の細胞である。その主要な機能は、骨吸収に関わる細胞である破骨細胞の活性化である。RANKLインヒビターは、RANKLがそのレセプター(RANK)に結合するのを阻止すること、RANK媒介性シグナル伝達を阻止すること、またはRANKLの転写もしくは翻訳を阻止することによってRANKLの発現を減少させることによって、作用し得る。本発明における使用に適したRANKLアンタゴニストまたはインヒビターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

40

・RANKLに結合することができ、RANKタンパク質の細胞外ドメインの全体またはフラグメントを含む、好適なRANKタンパク質。可溶性RANKは、マウスもしくはヒトRANKポリペプチドのシグナルペプチドおよび細胞外ドメインを含み得るか、またはあるいは、シグナルペプチドが除去されたそのタンパク質の成熟型が使用され得る。

・オステオプロテゲリンまたはRANKL結合能を有するそのバリエーション。

・RANKL特異的アンチセンス分子。

・RANKLの転写産物をプロセッシングすることができるリボザイム。

・特異的な抗RANKL抗体。「抗RANKL抗体またはRANKLに対し指向する抗

50

体」は、1つまたは複数のRANKLの機能を阻害する、核因子κBに対する活性化レセプターのリガンド(RANKL)に特異的に結合することができるすべての抗体と本明細書中で理解される。それらの抗体は、当業者に公知の任意の方法を用いて調製され得る。したがって、ポリクローナル抗体は、阻害されるべきタンパク質で動物を免疫することによって調製される。モノクローナル抗体は、Kohler, Milsteinら(Nature, 1975, 256:495)に記載されている方法を用いて調製される。本発明の文脈において好適な抗体としては、可変抗原結合領域および定常領域を含むインタクトな抗体、フラグメント「Fab」、「F(ab')₂」および「Fab'」、Fv、scFv、ダイアボディおよび二重特異性抗体が挙げられる。

・特異的な抗RANKLナノボディ。ナノボディは、天然に存在する重鎖抗体の独特の構造および機能的特性を含む、抗体由来の治療タンパク質である。ナノボディ技術は、ラクダ科動物(ラクダおよびラマ)が軽鎖を欠く完全に機能的な抗体を有するという発見の後に、最初に開発された。ナノボディの一般構造は、

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

であり、ここで、FR1からFR4は、フレームワーク領域1~4であり、CDR1からCDR3は、相補性決定領域1~3である。これらの重鎖抗体は、単一の可変ドメイン(VHH)および2つの定常ドメイン(CH2およびCH3)を含む。重要なことには、クローニングされ、単離されたVHHドメインは、元の重鎖抗体の完全な抗原結合能を有する完全に安定なポリペプチドである。独特の構造および機能的特性を有するこれらの新しく発見されたVHHドメインは、Ablynxがナノボディと名付けた新世代の治療用抗体の基礎を形成している。

【0125】

1つの実施形態において、RANKLインヒビターは、RANKL特異的抗体、RANKL特異的ナノボディおよびオステオプロテゲリンからなる群より選択される。特定の実施形態において、抗RANKL抗体は、モノクローナル抗体である。なおもさらなる特定の実施形態において、抗RANKL抗体は、デノスマブ(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1(3):210-215、CAS番号615258-40-7)である(その内容全体は本明細書に参考により援用される)。本発明の状況では、デノスマブは、RANKLに結合して、その活性化を妨げる完全ヒト型モノクローナル抗体である(これは、RANKレセプターには結合しない)。デノスマブの様々な態様が、米国特許第6,740,522号;同第7,411,050号;同第7,097,834号;同第7,364,736号(これらの各々の全内容が本明細書によって参照により援用される)によって包含されている。別の実施形態において、RANKLインヒビターは、デノスマブと同じエピトープに結合する抗体、抗体フラグメントまたは融合構築物である。

【0126】

好ましい実施形態において、抗RANKLナノボディは、WO2008142164(その内容は参照により本願に援用される)に記載されているようなナノボディのいずれかである。なおもより好ましい実施形態において、抗RANKL抗体は、ALX-0141(Ablynx)である。ALX-0141は、閉経後の骨粗鬆症、関節リウマチ、がんおよびある特定の薬剤に関連する骨減少を阻害するように、および健全な骨代謝のバランスを再建するように、デザインされた。

【0127】

好ましい実施形態において、骨分解を予防する薬剤は、ビスホスホネート、RANKLインヒビター、PTHおよびPTHrPインヒビターまたはPRGアナログ、ラネル酸ストロンチウム、DKK-1インヒビター、METおよびVEGFR2の二重インヒビター、エストロゲンレセプター調節因子、ラジウム-223、カルシトニンならびにカテプシンKインヒビターからなる群より選択される。より好ましい実施形態において、骨分解を予防する薬剤は、ビスホスホネートである。なおもより好ましい実施形態において、ビスホスホネートは、ゾレドロン酸である。

【0128】

1つの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、骨への原発性前立腺がん腫瘍の転移を予防するためまたは阻害するために投与される。1つの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、大分子である。別の実施形態において、CCR5アンタゴニストは、小分子である。いくつかの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、Maravirocである。いくつかの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、Vicrivirocである。いくつかの態様において、CCR5アンタゴニストは、Aplavirocである。いくつかの態様において、CCR5アンタゴニストは、スピロピペリジン CCR5アンタゴニスト (Rotstein D. M. ら、2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19(18):5401-5406) である。いくつかの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、INCB009471 (Kuritzkes, D. R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4(2):82-7) である。

10

【0129】

好ましい実施形態において、METおよびVEGFR2の二重インヒビターは、Cabozantinib、ForetinibおよびE7050からなる群より選択される。

【0130】

別の態様において、処置は、mTorインヒビターである。いくつかの態様において、mTorインヒビターは、mTor/PI3キナーゼの二重インヒビターである。いくつかの態様において、mTorインヒビターは、転移を予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、mTorインヒビターは：ABI009 (シロリムス)、ラパマイシン (シロリムス)、Abraxane (パクリタキセル)、Absorb (エベロリムス)、Afinitor (エベロリムス)、Gleevecと併用のAfinitor、AS703026 (ピマセルチブ (pimasertib))、Axxess (ウミロリムス (umirolimus))、AZD2014、BEZ235、Biofreedom (ウミロリムス)、BioMatrix (ウミロリムス)、BioMatrix flex (ウミロリムス)、CC115、CC223、Combo Bio-engineered Sirolimus Eluting Stent ORBUSNEICH (シロリムス)、Curaxin CBLC102 (メパクリン)、DE109 (シロリムス)、DS3078、Endeavor DES (ゾタロリムス)、Endeavor Resolute (ゾタロリムス)、Femara (レトロゾール)、Hocena (アントロキノノール (antroquinonol))、INK128、Inspiron (シロリムス)、IPI504 (レタスピマイシン (retaspimycin) 塩酸塩)、KRN951 (チボザニブ (tivozanib))、ME344、MGA031 (テプリズマブ (teplizumab))、MiStent SES (シロリムス)、MKC1、Nobori (ウミロリムス)、OSI027、OVI123 (コルジセピン)、Palomid 529、PF04691502、Promus Element (エベロリムス)、PWT33597、Rapamune (シロリムス)、Resolute DES (ゾタロリムス)、RG7422、SAR245409、SF1126、SGN75 (ボルセツズマブマホドチン (vorsetuzumab mafodotin))、Synergy (エベロリムス)、Taltorvic (リダフォロリムス (ridaforolimus))、Tarceva (エルロチニブ)、Torisel (テムシロリムス)、Xience Prime (エベロリムス)、Xience V (エベロリムス)、Zomaxx (ゾタロリムス)、Zortress (エベロリムス)、ゾタロリムス溶出性末梢ステント (Peripheral Stent) MEDTRONIC (ゾタロリムス)、AP23841、AP24170、ARmTOR26、BN107、BN108、Canstatin GENZYME (カンスタチン (canstatin))、CU906、EC0371、EC0565、KI1004、LOR220

20

30

40

50

、NV128、Rapamycin ONCOIMMUNE (シロリムス)、SB2602、Sirolimus PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (シロリムス)、TOP216、VLI27、VS5584、WYE125132、XL388、Advacan (エベロリムス)、AZD8055、Cypher Select Plus シロリムス溶出性冠動脈ステント (シロリムス)、Cypher シロリムス溶出性冠動脈ステント (シロリムス)、薬物コーティングされたバルーン (シロリムス)、E-Magic Plus (シロリムス)、Emtor (シロリムス)、Esprit (エベロリムス)、Evertor (エベロリムス)、HBF0079、LCP-Siro (シロリムス)、Limus CLARIS (シロリムス)、mTORインヒビター CELLZOME、Nevo シロリムス溶出性冠動脈ステント (シロリムス)、nPT-mTOR、Rapacan (シロリムス)、Renacept (シロリムス)、ReZolve (シロリムス)、Rocas (シロリムス)、SF1126、Sirolim (シロリムス)、Sirolimus NORTH CHINA (シロリムス)、Sirolimus RANBAXY (シロリムス)、Sirolimus WATSON (シロリムス) Siropan (シロリムス)、Sirova (シロリムス)、Supralimus (シロリムス)、Supralimus-Core (シロリムス)、Tacrolimus WATSON (タクロリムス)、TAF A93、Temsirolimus ACCORD (テムシロリムス)、Temsirolimus SANDOZ (テムシロリムス)、TOP216、Xience Prime (エベロリムス)、Xience V (エベロリムス) からなる群より選択される。具体的な態様において、mTor インヒビターは、Afinitor (エベロリムス) (http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=4029462064338207963; 最終アクセス日2012年11月28日) である。別の態様において、mTor インヒビターは、当該分野で公知の方法によって特定され得る (例えば、Zhou, H. ら、Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10 (7): 571-81 (これは本明細書中で参照により援用される) を参照のこと)。いくつかの態様において、mTor インヒビターは、進行した前立腺がんを有する患者において転移を処置するためまたは予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、mTor インヒビターは、第2の処置と組み合わせて使用される。いくつかの態様において、第2の処置は、本明細書中に記載される任意の処置である。

【0131】

別の態様において、処置は、Srcキナーゼインヒビターである。いくつかの態様において、Src インヒビターは、転移を予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、Srcキナーゼインヒビターは、以下の群：AZD0530 (サラカチニブ (saracatinib))、Bosulif (ボスチニブ (bosutinib))、ENMD981693、KD020、KX01、Sprycel (ダサチニブ (dasatinib))、Yervoy (イピリムマブ (ipilimumab))、AP23464、AP23485、AP23588、AZD0424、c-Srcキナーゼインヒビター KISSEI、CU201、KX2361、SKS927、SRN004、SUNK706、TG100435、TG100948、AP23451、Dasatinib HETERO (ダサチニブ)、Dasatinib VALEANT (ダサチニブ)、Fontrax (ダサチニブ)、Srcキナーゼインヒビター KINEX、VX680 (トザセルチブ (tozasertib) 乳酸塩)、XL228およびSUNK706から選択される。いくつかの実施形態において、Srcキナーゼインヒビターは、ダサチニブである。別の態様において、Srcキナーゼインヒビターは、当該分野で公知の方法によって特定され得る (例えば、Sen, B. and Johnson, F. M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2

10

20

30

40

50

011:14 pages (これは本明細書中で参照により援用される)を参照のこと)。いくつかの態様において、Srcキナーゼインヒビターは、SRC応答性シグネチャ(SRS)が陽性である患者において転移を処置するためまたは予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、Srcキナーゼインヒビターは、進行した前立腺がんを有する患者において転移を処置するためまたは予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、Srcキナーゼインヒビターは、第2の処置と組み合わせて使用される。いくつかの態様において、第2の処置は、本明細書中に記載される任意の処置である。

【0132】

別の態様において、処置は、COX-2インヒビターである。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、転移を予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、以下の群：ABT963、Acetaminophen ER JOHNSON (アセトアミノフェン)、Acular X (ケトロラクトロメタミン)、BAY1019036 (アスピリン)、BAY987111 (ジフェンヒドラミン、ナプロキセンナトリウム)、BAY11902 (ピロキシカム)、BCIBUCH001 (イブプロフェン)、Capoxigem (アプリコキシブ (apricoxib))、CS502、CS670 (ペルビプロフェン (pelubipirofen))、Diclofenac HPBCD (ジクロフェナク)、Diractin (ケトプロフェン)、GW406381、HCT1026 (ニトロフルビプロフェン (nitroflurbiprofen))、Hyanalgesee-D (ジクロフェナク)、HydrocoDex (アセトアミノフェン、デキストロメトルファン、ヒドロコドン)、Ibuprofen Sodium PFIZER (イブプロフェンナトリウム)、Ibuprofen with Acetaminophen PFIZER (アセトアミノフェン、イブプロフェン)、Impracor (ケトプロフェン)、IP880 (ジクロフェナク)、IP940 (インドメタシン)、ISV205 (ジクロフェナクナトリウム)、JNS013 (アセトアミノフェン、トラマドール塩酸塩)、Ketoprofen TDS (ケトプロフェン)、LTNS001 (ナプロキセンエテメシル (naproxen etemesil))、Mesalamine SALIX (メサラミン)、Mesalamine SOFAR (メサラミン)、Mesalazine (メサラミン)、ML3000 (リコフェロン (licofelone))、MRX7EAT (エトドラク)、Naproxen IROKO (ナプロキセン)、NCX4016 (ニトロアスピリン)、NCX701 (ニトロアセトアミノフェン)、Nuprin SCOLAR (イブプロフェン)、OMS103HP (アミトリプチリン塩酸塩、ケトプロフェン、オキシメタゾリン塩酸塩)、Oralease (ジクロフェナク)、OxycoDex (デキストロメトルファン、オキシコドン)、P54、PercoDex (アセトアミノフェン、デキストロメトルファン、オキシコドン)、PL3100 (ナプロキセン、ホスファチジルコリン)、PSD508、R-Ketoprofen (ケトプロフェン)、Remura (ブロムフェナクナトリウム)、ROX828 (ケトロラクトロメタミン)、RP19583 (ケトプロフェンリジン)、RQ00317076、SDX101 (R-エトドラク)、TDS943 (ジクロフェナクナトリウム)、TDT070 (ケトプロフェン)、TPR100、TQ1011 (ケトプロフェン)、TT063 (S-フルビプロフェン)、UR8880 (シミコキシブ (cimicoxib))、V0498TA01A (イブプロフェン)、VT122 (エトドラク、プロプラノロール)、XP20B (アセトアミノフェン、デキストロプロポキシフェン)、XP21B (ジクロフェナクカリウム)、XP21L (ジクロフェナクカリウム)、Zoenasa (アセチルシステイン、メサラミン)、Acephen、Actifed Plus、Actifed-P、Acular、Acular LS、Acular PF、Acular X、Acuvail、Advil、Advil Allergy Sinus、Advil Cold and Sinus、Advil Congestion Relief、Advil PM、Advil PM Capsule、Air Salonpas、Airtal、A

10

20

30

40

50

lcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief, Ale
 ve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltz
 er, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer Extra
 Strength, Alka-Seltzer Lemon-Lime, Alka-S
 eltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-S
 eltzer plus Cold and Cough, Alka-Seltzer
 plus Cold and Cough Formula, Alka-Seltzer
 Plus Day and Night Cold Formula, Alka-Se
 ltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula, A
 lka-Seltzer Plus Flu Formula, Alka-Seltze
 r Plus Night Cold Formula, Alka-Seltzer P
 lus Sinus Formula, Alka-Seltzer Plus Spar
 kling Original Cold Formula, Alka-Seltzer
 PM, Alka-Seltzer Wake-Up Call, Anacin, Ana
 prox, Anaprox MINERVA, Ansaïd, Apitoxin, Apr
 anax, Apranax abdi, Arcoxia, Arthritis Form
 ula Bengay, Arthrotec, Asacol, Asacol HD, As
 acol MEDUNA ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM,
 Aspirin BAYER, Aspirin Complex, Aspirin Mi
 gran, AZD3582, Azulfidine, Baralgan M, BAY10
 19036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, Bena
 dryl Allergy, Benadryl Day and Night, Beny
 lin 4 Flu, Benylin Cold and Flu, Benylin C
 old and Flu Day and Night, Benylin Cold a
 nd Sinus Day and Night, Benylin Cold and
 Sinus Plus, Benylin Day and Night Cold an
 d Flu Relief, Benylin1 All-In-One, Brexin,
 Brexin ANGELINI, Bromday, Bufferin, Buscopa
 n Plus, Caldolor, Calmatel, Cambia, Canasa, C
 apoxigem, Cataflam, Celebrex, Celebrex ORIF
 ARM, Children's Advil Allergy Sinus, Child
 ren's Tylenol, Children's Tylenol Cough a
 nd Runny Nose, Children's Tylenol plus co
 ld, Children's Tylenol plus Cold and Coug
 h, Children's Tylenol plus cold and stuff
 y nose, Children's Tylenol plus Flu, Child
 ren's Tylenol plus cold & allergy, Childr
 en's Tylenol plus Cough & Runny Nose, Chi
 ldren's Tylenol plus Cough & Sore Throat
 , Children's Tylenol plus multi symptom c
 old, Clinoril, Codral Cold and Flu, Codral
 Day and Night Day Tablets, Codral Day and
 Night Night Tablets, Codral Nighttime, Col
 azal, Combunox, Contac Cold plus Flu, Conta
 c Cold plus Flu Non-Drowsy, Coricidin D, C
 oricidin HBP Cold and Flu, Coricidin HBP
 Day and Night Multi-Symptom Cold, Coricid
 in HBP Maximum Strength Flu, Coricidin HB
 P Nighttime Multi-Symptom Cold, Coricidin
 II Extra Strength Cold and Flu, CS502, CS

10

20

30

40

50

670、Daypro、Daypro Alta、DDS06C、Demazin Cold and Flu、Demazin Cough、Cold and Flu、Demazin day/night Cold and Flu、Demazin PE Cold and Flu、Demazin PE day/night Cold and Flu、Diclofenac HPBCD、Dimetapp Day Relief、Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu、Dimetapp Night Relief、Dimetapp Pain and Fever Relief、Dimetapp PE Sinus Pain、Dimetapp PE Sinus Pain plus Allergy、Dipentum、Diractin、Disprin Cold 'n' Fever、Disprin Extra、Disprin Forte、Disprin Plus、Dristan Cold、Dristan Junior、Drixoral Plus、Duexis、Dynastat、Efferalgan、Efferalgan Plus Vitamin C、Efferalgan Vitamin C、Elixsure IB、Excedrin Back and Body、Excedrin Migraine、Excedrin PM、Excedrin Sinus Headache、Excedrin Tension Headache、Falcol、Fansamac、Feldene、FeverAll、Fiorinal、Fiorinal with Codeine、Flanax、Flector Patch、Flucam、Fortagesic、Gerbin、Giazo、Gladio、Goody's Back and Body Pain、Goody's Cool Orange、Goody's Extra Strength、Goody's PM、Greaseless Bengay、GW406381、HCT1026、He Xing Yi、Hyanalgesic-D、Hydrocodex、Ibuprofen Sodium PFIZER、Ibuprofen with、Acetaminophen PFIZER、Icy Hot SANOFI AVENTIS、Impracor、Indocin、Indomethacin APP PHARMA、Indomethacin MYLAN、Infants' Tylenol、IP880、IP940、Iremod、ISV205、JNS013、Jr. Tylenol、Junifen、Junior Strength Advil、Junior Strength Motrin、Ketoprofen TDS、Lemsip Max、Lemsip Max All in One、Lemsip Max All Night、Lemsip Max Cold and Flu、Lialda、Listerine Mouth Wash、Lloyds Cream、Lodine、Lorfit P、Loxonin、LTNS001、Mersyndol、Mesalamine SALIX、Mesalamine SOFAR、Mesalazine、Mesasal GLAXO、Mesasal SANOFI、Mesulid、Metsal Heat Rub、Midol Complete、Midol Extended Relief、Midol Liquid Gels、Midol PM、Midol Teen Formula、Migranin COATED TABLETS、ML3000、Mobic、Mohrus、Motrin、Motrin Cold and Sinus Pain、Motrin PM、Movalis ASPEN、MRX7EAT、Nalfon、Nalfon PEDINOL、Naprelan、Naprosyn、Naprosyn RPG LIFE SCIENCE、Naproxen IROKO、NCX4016、NCX701、NeoProfen LUNDBECK、Nevanac、Nexcede、Niflan、Norgesic MEDICIS、Novalgin、Nuprin SCOLR、Nurofen、Nurofen Cold and Flu、Nurofen Max Strength Migraine、Nurofen Plus、Nuromol、NyQuil with Vitamin C、Ocufen、OMS103HP、Oralease、Orudis ABBOTT JAPAN、Oru

vail, Osteluc, Oxycodex, P54, Panadol, Panadol
 Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Peon
 ea, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon
 , Percodan, Percodan-Demi, Percodex, Percoge
 sic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prex
 ige, Prolensa, PSD508, R-Ketoprofen, Rantudi
 l, Relafen, Remura, Robaxisal, Rotec, Rowasa,
 ROX828, RP19583, RQ00317076, Rubor, Salofalk
 , Salonpas, Saridon, SDX101, Seltouch, sfRowa
 sa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab, sinu 10
 s, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed Cold and C
 ough, Sudafed Head Cold and Sinus, Sudafed
 PE Cold plus Cough, Sudafed PE Pressure
 plus Pain, Sudafed PE, Severe Cold, Sudafed
 PE Sinus Day plus Night Relief Day Tabl
 ets, Sudafed PE Sinus Day plus Night Reli
 ef Night Tablets, Sudafed PE Sinus plus A
 nti-inflammatory Pain Relief, Sudafed Sin
 us Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Ta
 vist allergy/sinus/headache, TDS943, TDT07 20
 0, Theraflu Cold and Sore Throat, Theraflu
 Daytime Severe Cold and Cough, Theraflu
 Daytime Warming Relief, Theraflu Warming
 Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Col
 d, Theraflu Warming Relief Cold and Chest
 Congestion, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thom
 apyrin Effervescent, Thomapyrin Medium, Ti
 lcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ
 1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Tr
 eo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol 30
 Allergy Multi-Symptom, Tylenol Back Pain
 , Tylenol Cold & Cough Daytime, Tylenol Co
 ld & Cough Nighttime, Tylenol Cold and Si
 nus Daytime, Tylenol Cold and Sinus Night
 time, Tylenol Cold Head Congestion Severe
 , Tylenol Cold Multi Symptom Daytime, Tyle
 nol Cold Multi Symptom Nighttime Liquid,
 Tylenol Cold Multi Symptom Severe, Tyleno
 l Cold Non-Drowsiness Formula, Tylenol Co
 ld Severe Congestion Daytime, Tylenol Com 40
 plete Cold, Cough and Flu Night time, Tyle
 nol Flu Nighttime, Tylenol Menstrual, Tyle
 nol PM, Tylenol Sinus Congestion & Pain D
 aytime, Tylenol Sinus Congestion & Pain N
 ighttime, Tylenol Sinus Congestion & Pain
 Severe, Tylenol Sinus Severe Congestion
 Daytime, Tylenol Ultra Relief, Tylenol wit
 h Caffeine and Codeine phosphate, Tylenol
 with Codeine phosphate, Ultra Strength B
 engay Cream, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, V 50

icks NyQuil Cold and Flu Relief、Vicoprofen、Vimovo、Voltaren Emulgel、Voltaren GEL、Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH、Voltaren XR、VT122、Xefo、Xefo Rapid、Xefocam、Xibrom、XL3、Xodol、XP20B、XP21B、XP21L、ZipsorおよびZoenasalから選択される。別の態様において、COX-2インヒビターは、当該分野で公知の方法によって特定され得る（例えば、Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors—current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36:109-126（これは本明細書中で参照により援用される）を参照のこと）。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、進行した前立腺がんを有する患者において転移を処置するためまたは予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、第2の処置と組み合わせて使用される。いくつかの態様において、第2の処置は、本明細書中に記載される任意の処置である。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、デノスマブ、Zometa (http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=2935376934467633633; 最終アクセス日2012年12月2日)、CarbozantinibまたはCabozantinib、PTHrP（副甲状腺ホルモン様ホルモン）またはPTHrP（副甲状腺ホルモン関連タンパク質）を阻害する抗体またはペプチドからなる群より選択される第2の処置と組み合わせて使用される。

【0133】

一つの実施形態において、処置は、ラジウム-223である。好ましい実施形態において、ラジウム-223療法は、アルファラディン（別名Xofigo）（ラジウム-223二塩化物）である。アルファラディンは、がん細胞を殺すために、ラジウム-223の崩壊からのアルファ線を使用する。ラジウム-223は、天然に、カルシウム模倣物としてのその特性のおかげで骨転移に対して自身を標的化する。アルファ線は、2~10個の細胞という非常に短い範囲（ベータまたはガンマ線に基づく現行の放射線治療と比べて）を有するので、周囲の健全な組織（特に骨髄）にもたらす損傷はより少ない。カルシウムとよく似た特性を有するので、ラジウム-223は、身体内の骨を構築するためにカルシウムが使用されている位置（去勢抵抗性の進行前立腺がんを有する男性の骨格転移に見られるようなより速い異常な骨成長の部位を含む）に引き込まれる。ラジウム-223は、注射後、異常に骨が成長している部位に血流によって運ばれる。がんが身体内で生じ始めた位置は、原発腫瘍として公知である。これらの細胞のうちのいくつかは、離脱して、血流によって身体の別の部位に運ばれ得る。次いで、それらががん細胞は、身体のその位置に定着して、新しい腫瘍を形成し得る。これが起きる場合、それは、二次がんまたは転移と呼ばれる。末期の前立腺がんを有するほとんどの患者は、骨にその疾患の最大の負担を被る。ラジウム-223を用いる目的は、この二次がんを選択的に標的化することである。骨に取り込まれない任意のラジウム-223は、すみやかに腸へと経路を定められ、排泄される。

【0134】

あるいは、転移を処置するためおよび／もしくは予防するために上で述べられた薬剤のうちの2つ以上の薬剤が組み合わされる組合せ処置が行われ得るか、または上記薬剤は、他のサプリメント（例えば、カルシウムまたはビタミンD）もしくはホルモン処置と組み合わせられ得る。

【0135】

がんが転移していたとき、化学療法、ホルモン処置、免疫療法またはそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない全身性処置が使用される。さらに、放射線治療および／または手術が使用され得る。処置の選択は、通常、原発がんのタイプ、サイズ、転移の位置、患者の年齢、全般的な健康状態、および以前に使用された処置のタイプに左右される

。

【0136】

全身性処置は、全身に到達する処置である：

・化学療法は、がん細胞を破壊する医薬の使用である。それらの医薬は、通常、経口または静脈内の経路によって投与される。時折、化学療法は、放射線処置とともに使用される。

。

・ホルモン治療は、いくつかのホルモンががん成長を促進するという事実に基づく。例えば、卵巣によって生成された女性におけるエストロゲンは、時折、乳がんの成長を促進する。これらのホルモンの産生を停止するためのいくつかの方法がある。1つの方法は、それらを生成する器官を摘出することであり、女性の場合は、卵巣であって、男性の場合は、精巣である。より頻繁には、これらの器官がホルモンを生成するのを予防するかまたはホルモンががん細胞に作用するのを予防する医薬を使用することができる。

・免疫療法は、がんと戦う患者の免疫系自体を助ける処置である。患者における転移を処置するために使用される免疫療法にはいくつかのタイプがある。これらとしては、サイトカイン、モノクローナル抗体および抗腫瘍ワクチンが挙げられるがこれらに限定されない。

。

【0137】

骨転移を有する前立腺がん患者において本発明の個別化治療をデザインするための方法
既に骨に転移しており、c-MAFレベルが上昇している前立腺がん罹患している患者は、破骨細胞活性の上昇によって引き起こされる骨分解の予防を目指した治療から特に利益を得ることができる。

【0138】

したがって、別の態様において、本発明は、骨転移を有する前立腺がんを有する被験体のために個別化治療をデザインするためのインビトロでの方法であって、

(i) 上記被験体の骨由来の転移性腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルを定量する工程および

(ii) 以前に得られた発現レベルをコントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルと比較する工程を含み、

発現レベルが、コントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルと比較して上昇している場合、上記被験体は、骨分解の予防を目指す治療を受けるのに適格であり、

発現レベルが上記参照値と比較して上昇していない場合、上記被験体は、骨転移の予防および／または処置を目指す治療を受けるのに適格ではない方法に関する。

【0139】

用語および表現「被験体」、「前立腺がん」、「腫瘍サンプル」、「転移」、「発現レベルの決定」、「c-MAF遺伝子」、「上昇した発現レベル」、および「コントロールサンプル」は、本発明の第1の方法に関して詳細に説明されており、本発明の第2および第3の方法に等しく適用可能である。

【0140】

好ましい実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

【0141】

本発明の第3の方法は、第1の工程に、前立腺がん罹患している被験体の腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルを定量する工程を含む。本発明の第3の方法の場合、サンプルは、骨転移からの組織サンプルである。

【0142】

好ましい実施形態において、本発明の第3の方法は、c-MAF遺伝子発現レベルだけを単一マーカーとして定量する工程を含み、すなわち、その方法は、いかなる追加のマーカーの発現レベルを決定する工程も含まない。

【0143】

第2の工程において、被験体の腫瘍サンプルにおいて得られたc-MAF遺伝子発現レベルは、コントロールサンプルにおける前記遺伝子の発現レベルと比較される。c-MAF

10

20

30

40

50

F 遺伝子発現レベルの決定は、コントロールサンプルまたは参照サンプルの値と相関されなければならない。解析されるべき腫瘍のタイプに応じて、コントロールサンプルの正確な性質は変動し得る。したがって、本発明の第3の方法を含む場合において、参照サンプルは、転移に罹患していない前立腺がんを有する被験体の腫瘍組織サンプル、または転移に罹患していない前立腺がんを有する被験体の生検サンプルの腫瘍組織コレクションにおいて測定された c-M A F 遺伝子発現レベルの中央値に対応するサンプルである。

【0144】

いったん、サンプル中の c-M A F 遺伝子発現レベルが、測定されて、コントロールサンプルと比較されたら、上記遺伝子の発現レベルが、コントロールサンプル中のその発現レベルと比較して上昇している場合、上記被験体が、骨分解の回避または予防を目指す治療を受けるのに適格であると結論することができる。

10

【0145】

本明細書中で使用されるとき、「骨分解を回避するためまたは予防するための薬剤」とは、骨芽細胞の増殖を刺激するか、または破骨細胞の増殖を阻害することによって、骨分解を予処置するかまたは停止することができる任意の分子のことを指す。骨分解の回避および／または予防のために使用される薬剤の例証的な例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

- ・副甲状腺ホルモン (P T H) および副甲状腺ホルモン様ホルモン (P T H L H) インヒビター (ブロッキング抗体を含む) またはその組換え型 (P T H のアミノ酸 1 ~ 3 4 に対応するテリパラチド)。このホルモンは、破骨細胞を刺激してその活性を高めることによって作用する。

20

- ・ラネル酸ストロンチウムは、代替の経口処置であり、骨芽細胞の増殖を刺激し、破骨細胞の増殖を阻害するので、「二重作用骨剤」(D A B A) と呼ばれる薬物の群の一部を形成する。

- ・「エストロゲンレセプター調節因子」(S E R M) は、機序に関係なくエストロゲンがレセプターに結合するのを干渉するかまたは阻害する化合物のことを指す。エストロゲンレセプター調節因子の例としては、とりわけ、エストロゲンプロゲスターゲン、エストラジオール、ドロキシフェン、ラロキシフェン、ラソホキシフェン、T S E - 4 2 4、タモキシフェン、イドキシフェン、L Y 3 5 3 3 8 1、L Y 1 1 7 0 8 1、トレミフェン、フルベストラント、4 - [7 - (2 , 2 - ジメチル - 1 - オキソプロポキシ - 4 - メチル - 2 - [4 - [2 - (1 - ピペリジニル) エトキシ] フェニル] - 2 H - 1 - ベンゾピラン - 3 - イル] - フェニル - 2 , 2 - ジメチルプロパノエート 4 , 4 ' ジヒドロキシベンゾフェノン - 2 , 4 - ジニトロフェニル - ヒドラゾンおよび S H 6 4 6 が挙げられる。

30

- ・カルシトニン、カルシトニンレセプターを介して破骨細胞の活性を直接阻害する。カルシトニンレセプターは、破骨細胞の表面上で同定されている。

- ・ビスホスホネートは、骨粗鬆症および骨転移を伴うがん (後者は、乳がんおよび前立腺がんに関連する高カルシウム血症を伴うかまたは伴わない) などの、骨吸収および再吸収を伴う疾患の予防および処置のために使用される医薬品の群である。本発明の第5の方法によってデザインされる治療において使用され得るビスホスホネートの例としては、窒素含有ビスホスホネート (例えば、パミドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、アレンドロネート、イバンドロネート、リセドロネート、インカドロネート、ゾレドロネートまたはゾレドロン酸など) および窒素非含有ビスホスホネート (例えば、エチドロネート、クロドロネート、チルドロネートなど) が挙げられるが、これらに限定されない。

40

- ・「カテプシン K インヒビター」とは、カテプシン K システインプロテアーゼ活性に干渉する化合物のことを指す。カテプシン K インヒビターの非限定的な例としては、4 - アミノ - ピリミジン - 2 - カルボニトリル誘導体 (N o v a r t i s P h a r m a G M B H の名称下の国際特許出願 W O 0 3 / 0 2 0 2 7 8 に記載されている)、公報 W O 0 3 / 0 2 0 7 2 1 (N o v a r t i s P h a r m a G M B H) および公報 W O 0 4 / 0 0 0 8 4 3 (A S T R A Z E N E C A A B) に記載されているピロローピリミジン、ならびに A x y s P h a r m a c e u t i c a l s の公報 P C T W O 0 0 / 5 5 1 2 6、

50

Merck Frosst Canada & Co. および Axys Pharmaceuticals の WO 01/49288 に記載されているインヒビターが挙げられる。

・本明細書中で使用されるとき「DKK-1 (Dickkopf-1) インヒビター」は、DKK-1 活性を低下させることができる任意の化合物のことを指す。DKK-1 は、主に成体の骨において発現され、溶骨性病変を有するミエローマ患者においてアップレギュレートされる、可溶性 Wnt 経路アンタゴニストである。DKK-1 を標的化する薬剤は、多発性骨髄腫患者における溶骨性骨疾患の予防に役割を果たし得る。Novartis 製の BHQ880 は、ファースト・イン・クラスの完全にヒトの抗 DKK-1 中和抗体である。前臨床試験は、BHQ880 が骨形成を促進し、それによって、腫瘍が誘導する溶骨性疾患を阻害するという仮説を支持している (Ettenberg S. ら、American Association for Cancer Research Annual Meeting. 4月 12-16, 2008; San Diego, Calif. 要旨)。

10

・本明細書中で使用されるとき「MET および VEGFR2 の二重インヒビター」は、MET によって駆動される腫瘍エスケープを阻止するようにデザインされた、MET 経路および VEGF 経路の強力な二重インヒビターである任意の化合物のことを指す。MET は、腫瘍細胞および内皮細胞だけでなく、骨芽細胞 (骨を形成する細胞) および破骨細胞 (骨を除去する細胞) においても発現される。HGF は、これらの細胞型のすべてにおける MET に結合し、MET 経路に、複数のオートクラインループおよびパラクリンループにおいて重要な役割を与える。腫瘍細胞における MET の活性化は、転移性の骨病変の確立において重要であるとみられる。同時に、骨芽細胞および破骨細胞における MET 経路の活性化は、異常な骨の成長 (すなわち、芽細胞性の病変) または破壊 (すなわち、溶解性の病変) を含む骨転移の病理学的特色をもたらす。したがって、MET 経路の標的化は、転移性の骨病変の確立および進行の予防の実行可能な戦略であり得る。以前は XL184 (CAS 849217-68-1) として知られていたカボザンチニブ (Exelixis, Inc) は、MET によって駆動される腫瘍エスケープを阻止するようにデザインされた、MET 経路および VEGF 経路の強力な二重インヒビターである。複数の前臨床試験において、カボザンチニブは、腫瘍細胞を死滅させ、転移を減少させ、血管新生 (腫瘍の成長を支えるために必要な新しい血管の形成) を阻害することが示されている。別の好適な二重インヒビターは、E7050 (N-[2-フルオロ-4-({2-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル) ピペリジン-1-イル] カルボニルアミノピリジン-4-イル} オキシ) フェニル]-N'-(4-フルオロフェニル) シクロプロパン-1, 1-ジカルボキサミド (2R, 3R)-タルトレート) (CAS 928037-13-2) または フォレチニブ (GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7 としても知られる) である。

20

30

・本明細書中で使用されるとき「RANKL インヒビター」は、RANK 活性を低下させることができる任意の化合物のことを指す。RANKL は、ストローマ細胞および T-リンパ球細胞の骨芽細胞膜の表面上に見出され、これらの T-リンパ球細胞は、それを分泌する能力が証明されている唯一の細胞である。その主要な機能は、骨吸収に関わる細胞である破骨細胞の活性化である。RANKL インヒビターは、RANKL がそのレセプター (RANK) に結合するのを阻止すること、RANK 媒介性シグナル伝達を阻止すること、または RANKL の転写もしくは翻訳を阻止することによって RANKL の発現を減少させることによって、作用し得る。本発明における使用に適した RANKL アンタゴニストまたはインヒビターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

40

・RANKL に結合することができ、RANK タンパク質の細胞外ドメインの全体またはフラグメントを含む、好適な RANK タンパク質。可溶性 RANK は、マウスもしくはヒト RANK ポリペプチドのシグナルペプチドおよび細胞外ドメインを含み得るか、またはあるいは、シグナルペプチドが除去されたそのタンパク質の成熟型が使用され得る。

・オステオプロテゲリンまたは RANKL 結合能を有するそのバリエーション。

・RANKL 特異的アンチセンス分子。

50

・RANKLの転写産物をプロセシングすることができるリボザイム。

・特異的な抗RANKL抗体。「抗RANKL抗体またはRANKLに対し指向する抗体」は、1つまたは複数のRANKLの機能を阻害する、核因子κBに対する活性化レセプターのリガンド(RANKL)に特異的に結合することができるすべての抗体と本明細書中で理解される。それらの抗体は、当業者に公知の任意の方法を用いて調製され得る。したがって、ポリクローナル抗体は、阻害されるべきタンパク質で動物を免疫することによって調製される。モノクローナル抗体は、Kohler, Milsteinら(Nature, 1975, 256:495)に記載されている方法を用いて調製される。本発明の文脈において好適な抗体としては、可変抗原結合領域および定常領域を含むインタクトな抗体、フラグメント「Fab」、「F(ab')₂」および「Fab'」、Fv、scFv、ダイアボディおよび二重特異性抗体が挙げられる。

10

・特異的な抗RANKLナノボディ。ナノボディは、天然に存在する重鎖抗体の独特の構造および機能的特性を含む、抗体由来の治療タンパク質である。ナノボディ技術は、ラクダ科動物(ラクダおよびラマ)が軽鎖を欠く完全に機能的な抗体を有するという発見の後に、最初に開発された。ナノボディの一般構造は、

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

であり、ここで、FR1からFR4は、フレームワーク領域1~4であり、CDR1からCDR3は、相補性決定領域1~3である。これらの重鎖抗体は、単一の可変ドメイン(VHH)および2つの定常ドメイン(CH2およびCH3)を含む。重要なことには、クローニングされ、単離されたVHHドメインは、元の重鎖抗体の完全な抗原結合能を有する完全に安定なポリペプチドである。独特の構造および機能的特性を有するこれらの新しく発見されたVHHドメインは、Ablynxがナノボディと名付けた新世代の治療用抗体の基礎を形成している。

20

【0146】

1つの実施形態において、RANKLインヒビターは、RANKL特異的抗体、RANKL特異的ナノボディおよびオステオプロテゲリンからなる群より選択される。具体的な実施形態において、抗RANKL抗体は、モノクローナル抗体である。なおもより具体的な実施形態において、抗RANKL抗体は、デノスマブ(denosumab)(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1(3):210-215、CAS番号615258-40-7)(その全内容が本明細書によって参照により援用される)である。デノスマブは、RANKLに結合して、その活性化を妨げる完全ヒト型モノクローナル抗体である(これは、RANKレセプターには結合しない)。デノスマブの様々な態様が、米国特許第6,740,522号;同第7,411,050号;同第7,097,834号;同第7,364,736号(これらの各々の全内容が本明細書によってその全体において参照により援用される)によって包含されている。別の実施形態において、RANKLインヒビターは、デノスマブと同じエピトープに結合する抗体、抗体フラグメントまたは融合構築物。

30

【0147】

好ましい実施形態において、抗RANKLナノボディは、WO2008142164(その内容は参照により本願に援用される)に記載されているようなナノボディのいずれかである。なおもより好ましい実施形態において、抗RANKL抗体は、ALX-0141(Ablynx)である。ALX-0141は、閉経後の骨粗鬆症、関節リウマチ(rheumatoid arthritis)、がんおよびある特定の医薬に関連する骨減少を阻害するように、および健全な骨代謝のバランスを再建するように、デザインされた。

40

【0148】

好ましい実施形態において、骨分解を予防する薬剤は、ビスホスホネート、RANKLインヒビター、PTHおよびPTHrPインヒビターまたはPRGアナログ、ラネル酸ストロンチウム、DKK-1インヒビター、METおよびVEGFR2の二重インヒビター、エストロゲンレセプター調節因子、ラジウム-223、カルシトニンならびにカテプシンKインヒビターからなる群より選択される。より好ましい実施形態において、骨分解を

50

予防する薬剤は、ビスホスホネートである。なおもより好ましい実施形態において、ビスホスホネートは、ゾレドロン酸である。

【0149】

1つの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、骨への原発性前立腺がん腫瘍の転移を予防するためまたは阻害するために投与される。1つの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、大分子である。別の実施形態において、CCR5アンタゴニストは、小分子である。いくつかの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、Maraviroc (Velasco-Vela'quez, M. ら、2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850) である。いくつかの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、Vicriviroc (Velasco-Vela'quez, M. ら、2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850) である。いくつかの態様において、CCR5アンタゴニストは、Aplaviroc (Demarest J. F. ら、2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. Retrovirology 2 (Suppl. 1):S13) である。いくつかの態様において、CCR5アンタゴニストは、スピロピペリジンCCR5アンタゴニスト (Rotstein D. M. ら、2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19 (18):5401-5406) である。いくつかの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、INCB009471 (Kuritzkes, D. R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4 (2):82-7) である。

【0150】

好ましい実施形態において、METおよびVEGFR2の二重インヒビターは、Cabozantinib、ForetinibおよびE7050からなる群より選択される。

【0151】

別の態様において、処置は、mTorインヒビターである。いくつかの態様において、mTorインヒビターは、mTor/PI3キナーゼの二重インヒビターである。いくつかの態様において、mTorインヒビターは、転移を予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、mTorインヒビターは：AB1009 (シロリムス)、ラパマイシン (シロリムス)、Abraxane (パクリタキセル)、Absorb (エベロリムス)、Afinitor (エベロリムス)、Gleevecと併用のAfinitor、AS703026 (ピマセルチブ (pimasertib))、Axxess (ウミロリムス (umirolimus))、AZD2014、BEZ235、Biofreedom (ウミロリムス)、BioMatrix (ウミロリムス)、BioMatrix flex (ウミロリムス)、CC115、CC223、Combo Bio-engineered Sirolimus Eluting Stent ORBUSNEICH (シロリムス)、Curaxin CBLC102 (メパクリン)、DE109 (シロリムス)、DS3078、Endeavor DES (ゾタロリムス)、Endeavor Resolute (ゾタロリムス)、Femara (レトロゾール)、Hocena (アントロキノノール (antroquinonol))、INK128、Inspiron (シロリムス)、IPI504 (レタスピマイシン (retaspimycin) 塩酸塩)、KRN951 (チボザニブ (tivozanib))、ME344、MGA031 (テプリズマブ (teplizumab))、MiStent SES (シロリムス)、MKC1、Nobori (ウミロリムス)、OSI027、OVI123 (コルジセピン)、Palomid 529、PF04691502、Promus Element (エベロリムス)、PWT33597、Rapamune (シロリムス)、R

10

20

30

40

50

esolute DES (ゾタロリムス)、RG7422、SAR245409、SF1126、SGN75 (ボルセツズマブマホドチン (vorsetuzumab mafodotin))、Synergy (エベロリムス)、Taltorvic (リダフォロリムス (ridaforolimus))、Tarceva (エルロチニブ)、Torisel (テムシロリムス)、Xience Prime (エベロリムス)、Xience V (エベロリムス)、Zomaxx (ゾタロリムス)、Zortress (エベロリムス)、ゾタロリムス溶出性末梢ステント (Peripheral Stent) MEDTRONIC (ゾタロリムス)、AP23841、AP24170、ARmTOR26、BN107、BN108、Canstatin GENZYME (カンスタチン (canstatin))、CU906、EC0371、EC0565、KI1004、LOR220、NV128、Rapamycin ONCOIMMUNE (シロリムス)、SB2602、Sirolimus PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (シロリムス)、TOP216、VLI27、VS5584、WYE125132、XL388、Advacan (エベロリムス)、AZD8055、Cypher Select Plus シロリムス溶出性冠動脈ステント (シロリムス)、Cypher シロリムス溶出性冠動脈ステント (シロリムス)、薬物コーティングされたバルーン (シロリムス)、E-Magic Plus (シロリムス)、Emtor (シロリムス)、Espirit (エベロリムス)、Evertor (エベロリムス)、HBF0079、LCP-Siro (シロリムス)、Limus CLARIS (シロリムス)、mTORインヒビター CELLZOME、Nevo シロリムス溶出性冠動脈ステント (シロリムス)、nPT-mTOR、Rapacan (シロリムス)、Renacept (シロリムス)、ReZolve (シロリムス)、Rocas (シロリムス)、SF1126、Sirolim (シロリムス)、Sirolimus NORTH CHINA (シロリムス)、Sirolimus RANBAXY (シロリムス)、Sirolimus WATSON (シロリムス) Siropan (シロリムス)、Sirova (シロリムス)、Supralimus (シロリムス)、Supralimus-Core (シロリムス)、Tacrolimus WATSON (タクロリムス)、TAF93、Temsirolimus ACCORD (テムシロリムス)、Temsirolimus SANDOZ (テムシロリムス)、TOP216、Xience Prime (エベロリムス)、Xienc V (エベロリムス) からなる群より選択される。具体的な態様において、mTorインヒビターは、Afinitor (エベロリムス) (http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=4029462064338207963; 最終アクセス日2012年11月28日) である。別の態様において、mTorインヒビターは、当該分野で公知の方法によって特定され得る (例えば、Zhou, H. ら、Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10 (7): 571-81 (これは本明細書中で参照により援用される) を参照のこと)。いくつかの態様において、mTorインヒビターは、進行した前立腺がんを有する患者において転移を処置するためまたは予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、mTorインヒビターは、第2の処置と組み合わせて使用される。いくつかの態様において、第2の処置は、本明細書中に記載される任意の処置である。

【0152】

別の態様において、処置は、Srcキナーゼインヒビターである。いくつかの態様において、Srcインヒビターは、転移を予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、Srcキナーゼインヒビターは、以下の群: AZD0530 (サラカチニブ (saracatinib))、Bosulif (ボスチニブ (bosutinib))、ENMD981693、KD020、KX01、Sprycel (ダサチニブ (dasatinib))、Yervoy (イピリムマブ (ipilimumab))、AP23464、AP23485、AP23588、AZD0424、c-Srcキナ

10

20

30

40

50

ーゼインヒビター KISSEI、CU201、KX2361、SKS927、SRN004、SUNK706、TG100435、TG100948、AP23451、Dasatinib HETERO（ダサチニブ）、Dasatinib VALEANT（ダサチニブ）、Fontrax（ダサチニブ）、Srcキナーゼインヒビター KINEX、VX680（トザセルチブ（tozasertib）乳酸塩）、XL228およびSUNK706から選択される。いくつかの実施形態において、Srcキナーゼインヒビターは、ダサチニブである。別の態様において、Srcキナーゼインヒビターは、当該分野で公知の方法によって特定され得る（例えば、Sen, B. and Johnson, F. M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011:14 pages（これは本明細書中で参照により援用される）を参照のこと）。いくつかの態様において、Srcキナーゼインヒビターは、SRC応答性シグネチャ（SRSS）が陽性である患者において転移を処置するためまたは予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、Srcキナーゼインヒビターは、進行した前立腺がんを有する患者において転移を処置するためまたは予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、Srcキナーゼインヒビターは、第2の処置と組み合わせて使用される。いくつかの態様において、第2の処置は、本明細書中に記載される任意の処置である。

【0153】

別の態様において、処置は、COX-2インヒビターである。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、転移を予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、以下の群：ABT963、Acetaminophen ER JOHNSON（アセトアミノフェン）、Acular X（ケトロラクトロメタミン）、BAY1019036（アスピリン）、BAY987111（ジフェンヒドラミン、ナプロキセンナトリウム）、BAY11902（ピロキシカム）、BCIBUCH001（イブプロフェン）、Capoxigem（アプリコキシブ（apricoxib））、CS502、CS670（ペルビプロフェン（pelubipirofen））、Diclofenac HPBCD（ジクロフェナク）、Diractin（ケトプロフェン）、GW406381、HCT1026（ニトロフルビプロフェン（nitroflurbiprofen））、Hyanalgesed（ジクロフェナク）、HydrocoDex（アセトアミノフェン、デキストロメトルファン、ヒドロコドン）、Ibuprofen Sodium PFIZER（イブプロフェンナトリウム）、Ibuprofen with Acetaminophen PFIZER（アセトアミノフェン、イブプロフェン）、Impracor（ケトプロフェン）、IP880（ジクロフェナク）、IP940（インドメタシン）、ISV205（ジクロフェナクナトリウム）、JNS013（アセトアミノフェン、トラマドール塩酸塩）、Ketoprofen TDS（ケトプロフェン）、LTNS001（ナプロキセンエテメシル（naproxen etemesil））、Mesalamine SALIX（メサラミン）、Mesalamine SOFAR（メサラミン）、Mesalazine（メサラミン）、ML3000（リコフェロン（licofelone））、MRX7EAT（エトドラク）、Naproxen IROKO（ナプロキセン）、NCX4016（ニトロアスピリン）、NCX701（ニトロアセトアミノフェン）、Nuprin SCOLR（イブプロフェン）、OMS103HP（アミトリプチリン塩酸塩、ケトプロフェン、オキシメタゾリン塩酸塩）、Oralease（ジクロフェナク）、OxycoDex（デキストロメトルファン、オキシコドン）、P54、Percodex（アセトアミノフェン、デキストロメトルファン、オキシコドン）、PL3100（ナプロキセン、ホスファチジルコリン）、PSD508、R-Ketoprofen（ケトプロフェン）、Remura（ブロムフェナクナトリウム）、ROX828（ケトロラクトロメタミン）、RP19583（ケトプロフェンリジン）、RQ00317076、SDX101（R-エトドラク）、TDS943（ジクロフェナクナトリウム）、TDT070（ケトプロフェ

10

20

30

40

50

ン)、TPR100、TQ1011 (ケトプロフェン)、TT063 (S-フルルビプロ
 フェン)、UR8880 (シミコキシブ (c im i c o x i b))、V0498TA01
 A (イブプロフェン)、VT122 (エトドラク、プロプラノロール)、XP20B (ア
 セトアミノフェン、デキストロプロポキシフェン)、XP21B (ジクロフェナクカリウ
 ム)、XP21L (ジクロフェナクカリウム)、Zoenasa (アセチルシステイン、
 メサラミン)、Acephen、Actifed Plus、Actifed-P、Ac
 ular、Acular LS、Acular PF、Acular X、Acuvai
 l、Advil、Advil Allergy Sinus、Advil Cold a
 nd Sinus、Advil Congestion Relief、Advil P
 M、Advil PM Capsule、Air Salonpas、Airtal、A
 lcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief、Ale
 ve、Aleve ABDI IBRAHIM、Aleve-D、Alka-Seltz
 er、Alka-Seltzer BAYER、Alka-Seltzer Extra
 Strength、Alka-Seltzer Lemon-Lime、Alka-S
 eltzer Original、Alka-Seltzer Plus、Alka-S
 eltzer plus Cold and Cough、Alka-Seltzer
 plus Cold and Cough Formula、Alka-Seltzer
 Plus Day and Night Cold Formula、Alka-Se
 ltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula、A
 lka-Seltzer Plus Flu Formula、Alka-Seltze
 r Plus Night Cold Formula、Alka-Seltzer P
 lus Sinus Formula、Alka-Seltzer Plus Spar
 kling Original Cold Formula、Alka-Seltzer
 PM、Alka-Seltzer Wake-Up Call、Anacin、Ana
 prox、Anaprox MINERVA、Ansaid、Apitoxin、Apr
 anax、Apranax abdi、Arcoxia、Arthritis Form
 ula Bengay、Arthrotec、Asacol、Asacol HD、As
 acol MEDUNA ARZNEIMITTEL、Asacol ORIFARM、
 Aspirin BAYER、Aspirin Complex、Aspirin Mi
 gran、AZD3582、Azulfidine、Baralgan M、BAY10
 19036、BAY987111、BAY11902、BCIBUCH001、Bena
 dryl Allergy、Benadryl Day and Night、Beny
 lin 4 Flu、Benylin Cold and Flu、Benylin C
 old and Flu Day and Night、Benylin Cold a
 nd Sinus Day and Night、Benylin Cold and
 Sinus Plus、Benylin Day and Night Cold an
 d Flu Relief、Benylin1 All-In-One、Brexin、
 Brexin ANGELINI、Bromday、Bufferin、Buscopa
 n Plus、Caldolor、Calmatel、Cambia、Canasa、C
 apoxigem、Cataflam、Celebrex、Celebrex ORIF
 ARM、Children's Advil Allergy Sinus、Child
 ren's Tylenol、Children's Tylenol Cough a
 nd Runny Nose、Children's Tylenol plus co
 ld、Children's Tylenol plus Cold and Coug
 h、Children's Tylenol plus cold and stuff
 y nose、Children's Tylenol plus Flu、Child
 ren's Tylenol plus cold & allergy、Childr
 en's Tylenol plus Cough & Runny Nose、Chi
 ldren's Tylenol plus Cough & Sore Throat
 、Children's Tylenol plus multi symptom c

10

20

30

40

50

old, Clinoril, Codral Cold and Flu, Codral Day and Night Day Tablets, Codral Day and Night Night Tablets, Codral Nighttime, Colazal, Combunox, Contac Cold plus Flu, Contac Cold plus Flu Non-Drowsy, Coricidin D, Coricidin HBP Cold and Flu, Coricidin HBP Day and Night Multi-Symptom Cold, Coricidin HBP Maximum Strength Flu, Coricidin HBP Nighttime Multi-Symptom Cold, Coricidin II Extra Strength Cold and Flu, CS502, CS 670, Daypro, Daypro Alta, DDS06C, Demazin Cold and Flu, Demazin Cough, Cold and Flu, Demazin day/night Cold and Flu, Demazin PE Cold and Flu, Demazin PE day/night Cold and Flu, Diclofenac HPBCD, Dimetapp Day Relief, Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu, Dimetapp Night Relief, Dimetapp Pain and Fever Relief, Dimetapp PE Sinus Pain, Dimetapp PE Sinus Pain plus Allergy, Dipentum, Diractin, Disprin Cold 'n' Fever, Disprin Extra, Disprin Forte, Disprin Plus, Dristan Cold, Dristan Junior, Drixoral Plus, Duexis, Dynastat, Efferalgan, Efferalgan Plus Vitamin C, Efferalgan Vitamin C, Elixsure IB, Excedrin Back and Body, Excedrin Migraine, Excedrin PM, Excedrin Sinus Headache, Excedrin Tension Headache, Falcol, Fansamac, Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal with Codeine, Flanax, Flector Patch, Flucam, Fortagesic, Gerbin, Giazol, Gladio, Goody's Back and Body Pain, Goody's Cool Orange, Goody's Extra Strength, Goody's PM, Greaseless Bengay, GW406381, HCT1026, He Xing Yi, Hyanalgesic-D, Hydrocodex, Ibuprofen Sodium PFIZER, Ibuprofen with, Acetaminophen PFIZER, Icy Hot SANOFI AVENTIS, Impracor, Indocin, Indomethacin APP PHARMA, Indomethacin MYLAN, Infants' Tylenol, IP880, IP940, Iremod, ISV205, JNS013, Jr. Tylenol, Junifen, Junior Strength Advil, Junior Strength Motrin, Ketoprofen TDS, Lemsip Max, Lemsip Max All in One, Lemsip Max All Night, Lemsip Max Cold and Flu, Lialda, Listerine Mouth Wash, Lloyds Cream, Lodine, Lorfit P, Loxonin, LTNS001, Mersyndol, Mesalamine SALIX, Mesalamine SOFAR, Mesalazine, Mesasal GLAXO, Mesasal SANOFI, Mesulid, Metsal Heat Rub, Midol Complete, Midol Extended Relief, Midol Liquid Gels, Midol PM, Midol Teen Formula, Migranin COATED TABLETS, ML3000, Mobic,

10

20

30

40

50

Mohrus, Motrin, Motrin Cold and Sinus Pain
 , Motrin PM, Movalis ASPEN, MRX7EAT, Nalfon,
 Nalfon PEDINOL, Naprelan, Naprosyn, Naprosy
 n RPG LIFE SCIENCE, Naproxen IROKO, NCX401
 6, NCX701, NeoProfen LUNDBECK, Nevanac, Nexce
 dede, Niflan, Norgesic MEDICIS, Novalgin, Nup
 rin SCOLR, Nurofen, Nurofen Cold and Flu, N
 urofen Max Strength Migraine, Nurofen Plu
 s, Nuromol, NyQuil with Vitamin C, Ocufen, O
 MS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oru
 vail, Osteluc, Oxycodex, P54, Panadol, Panado
 l Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Ped
 ea, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon
 , Percodan, Percodan-Demi, Percodex, Percoge
 sic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prex
 ige, Prolensa, PSD508, R-Ketoprofen, Rantudi
 l, Relafen, Remura, Robaxisal, Rotec, Rowasa,
 ROX828, RP19583, RQ00317076, Rubor, Salofalk
 , Salonpas, Saridon, SDX101, Seltouch, sfRowa
 sa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab, sinu
 s, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed Cold and C
 ough, Sudafed Head Cold and Sinus, Sudafed
 PE Cold plus Cough, Sudafed PE Pressure
 plus Pain, Sudafed PE, Severe Cold, Sudafed
 PE Sinus Day plus Night Relief Day Tabl
 ets, Sudafed PE Sinus Day plus Night Reli
 ef Night Tablets, Sudafed PE Sinus plus A
 nti-inflammatory Pain Relief, Sudafed Sin
 us Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Ta
 vist allergy/sinus/headache, TDS943, TDT07
 0, Theraflu Cold and Sore Throat, Theraflu
 Daytime Severe Cold and Cough, Theraflu
 Daytime Warming Relief, Theraflu Warming
 Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Col
 d, Theraflu Warming Relief Cold and Chest
 Congestion, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thom
 apyrin Effervescent, Thomapyrin Medium, Ti
 lcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ
 1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Tr
 eo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol
 Allergy Multi-Symptom, Tylenol Back Pain
 , Tylenol Cold & Cough Daytime, Tylenol Co
 ld & Cough Nighttime, Tylenol Cold and Si
 nus Daytime, Tylenol Cold and Sinus Night
 time, Tylenol Cold Head Congestion Severe
 , Tylenol Cold Multi Symptom Daytime, Tyle
 nol Cold Multi Symptom Nighttime Liquid,
 Tylenol Cold Multi Symptom Severe, Tyleno
 l Cold Non-Drowsiness Formula, Tylenol Co
 ld Severe Congestion Daytime, Tylenol Com

10

20

30

40

50

plete Cold, Cough and Flu Night time, Tylenol Flu Nighttime, Tylenol Menstrual, Tylenol PM, Tylenol Sinus Congestion & Pain Daytime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Nighttime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Severe, Tylenol Sinus Severe Congestion Daytime, Tylenol Ultra Relief, Tylenol with Caffeine and Codeine phosphate, Tylenol with Codeine phosphate, Ultra Strength Bengay Cream, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil Cold and Flu Relief, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, ZipsorおよびZoenasaから選択される。別の態様において、COX-2インヒビターは、当該分野で公知の方法によって特定され得る（例えば、Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors—current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36:109-126（これは本明細書中で参照により援用される）を参照のこと）。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、進行した前立腺がんを有する患者において転移を処置するためまたは予防するためまたは阻害するために使用される。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、第2の処置と組み合わせて使用される。いくつかの態様において、第2の処置は、本明細書中に記載される任意の処置である。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、デノスマブ、Zometa (http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novaid=2935376934467633633; 最終アクセス日2012年12月2日)、CarbozantinibまたはCabozantinib、PTHrP（副甲状腺ホルモン様ホルモン）またはPTHrP（副甲状腺ホルモン関連タンパク質）を阻害する抗体またはペプチドからなる群より選択される第2の処置と組み合わせて使用される。

【0154】

1つの実施形態において、処置はラジウム223である。好ましい実施形態において、ラジウム-223療法は、アルファラディン（別名Xofigo）（ラジウム-223二塩化物）である。アルファラディンは、がん細胞を殺すために、ラジウム-223の崩壊からのアルファ線を使用する。ラジウム-223は、天然に、カルシウム模倣物としてのその特性のおかげで骨転移に対して自身を標的化する。アルファ線は、2～10個の細胞という非常に短い範囲（ベータまたはガンマ線に基づく現行の放射線治療と比べて）を有するので、周囲の健全な組織（特に骨髄）にもたらす損傷はより少ない。カルシウムとよく似た特性を有するので、ラジウム-223は、身体内の骨を構築するためにカルシウムが使用されている位置（去勢抵抗性の進行前立腺がんを有する男性の骨格転移に見られるようなより速い異常な骨成長の部位を含む）に引き込まれる。ラジウム-223は、注射後、異常に骨が成長している部位に血流によって運ばれる。がんが身体内で生じ始めた位置は、原発腫瘍として公知である。これらの細胞のうちのいくつかは、離脱して、血流によって身体の別の部位に運ばれ得る。次いで、それらのがん細胞は、身体のその位置に定着して、新しい腫瘍を形成し得る。これが起きる場合、それは、二次がんまたは転移と呼ばれる。末期の前立腺がんを有するほとんどの患者は、骨にその疾患の最大の負担を被る。ラジウム-223を用いる目的は、この二次がんを選択的に標的化することである。骨に取り込まれない任意のラジウム-223は、すみやかに腸へと経路を定められ、排泄される。

10

20

30

40

50

【0155】

あるいは、転移を処置するためおよび／もしくは予防するために上で述べられた薬剤のうちの2つ以上の薬剤が組み合わせられる組合せ処置が行われ得るか、または上記薬剤は、他のサプリメント（例えば、カルシウムまたはビタミンD）もしくはホルモン処置と組み合わせられ得る。

【0156】

c-MAF 遺伝子の増幅の検出に基づく、前立腺がんにおける転移の診断または予後診断の方法

一態様において、本発明は、前立腺がんを有する被験体における転移の診断（以後、本発明の第4の診断方法）および／または前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断のためのインビトロでの方法であって、c-MAF 遺伝子が上記被験体の腫瘍組織サンプルにおいて増幅しているか否かを決定する工程を含み、上記遺伝子がコントロールサンプルと比較して増幅している場合、上記被験体は、転移について陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高い、方法に関する。

10

【0157】

用語「c-MAF 遺伝子」、「転移」、「腫瘍サンプル」、「前立腺がん」、「前立腺がんを有する被験体における転移の診断」、「前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断」、「被験体」、「患者」、「転移の陽性の診断を有する被験体」、「転移を起こす傾向がより高い被験体」は、本発明の第1の方法の文脈において詳細に説明されており、本発明の第4の方法に等しく適用可能である。

20

【0158】

特定の実施形態において、c-MAF 遺伝子の増幅の程度は、上記遺伝子を含む染色体領域の増幅の決定によって決定され得る。好ましくは、その増幅がc-MAF 遺伝子の増幅の存在を示す染色体領域は、c-MAF 遺伝子を含む遺伝子座16q22-q24である。遺伝子座16q22-q24は、16番染色体、上記染色体の長腕およびバンド22～バンド24の範囲に位置する。この領域は、NCBI データベースにおいてコンティグNT_010498.15およびNT_010542.15と対応する。別の好ましい実施形態において、c-MAF 遺伝子の増幅の程度は、上記遺伝子に特異的なプローブを使用することによって決定され得る。

【0159】

本発明の第4の診断／予後診断方法は、第1の工程に、c-MAF 遺伝子が被験体の腫瘍サンプルにおいて増幅されているかを決定する工程を含む。その目的のために、腫瘍サンプル中のc-MAF 遺伝子の増幅は、コントロールサンプルと比較される。

30

【0160】

本明細書中で理解されるように、用語「遺伝子の増幅」とは、遺伝子または遺伝子フラグメントの様々なコピーが、個別の細胞または細胞系において形成されるプロセスのことを指す。その遺伝子のコピーは、必ずしも同じ染色体に位置するとは限らない。その重複領域は、「アンプリコン」と呼ばれることが多い。通常は、生成されるmRNAの量、すなわち、遺伝子発現レベルは、特定の遺伝子のコピー数に比例して増加する。

【0161】

特定の実施形態において、前立腺がんを有する被験体における転移の診断のためおよび／または前立腺がんを有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断のための本発明の第4の方法は、上記被験体の腫瘍サンプル中のc-MAF 遺伝子コピー数を決定する工程および上記コピー数を、コントロールまたは参照サンプルのコピー数と比較する工程を含み、c-MAF コピー数が、コントロールサンプルのc-MAF コピー数と比較して高い場合、被験体は、転移について陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高い。

40

【0162】

コントロールサンプルは、転移に罹患していない前立腺がんを有する被験体の腫瘍サンプルまたは転移に罹患していない前立腺がんを有する被験体の生検サンプル中の腫瘍組織

50

コレクションにおいて測定された c-M A F 遺伝子コピー数の中央値に対応する腫瘍サンプルを指す。上記参照サンプルは、代表的には、被験体集団由来の等量のサンプルを合わせることによって得られる。c-M A F 遺伝子コピー数が、コントロールサンプル中の上記遺伝子のコピー数と比較して上昇している場合、被験体は、転移について陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高い。

【0163】

本明細書中で使用されるとき、用語「遺伝子コピー数」とは、細胞における核酸分子のコピー数のことを指す。遺伝子コピー数は、細胞のゲノム（染色体）DNAにおける遺伝子コピー数を含む。正常な細胞（非腫瘍細胞）では、遺伝子コピー数は、通常、2コピー（染色体対の各メンバーにおいて1コピー）である。遺伝子コピー数は、時折、細胞集団のサンプルから採取された遺伝子コピー数の半数を含む。

10

【0164】

本発明において、「遺伝子コピー数の上昇」は、c-M A F 遺伝子コピー数が、参照サンプルまたはコントロールサンプルが有するコピー数よりも多い場合と理解される。特に、c-M A F 遺伝子のコピー数が、2コピーを超える、例えば3、4、5、6、7、8、9、または10コピーである、さらに10コピーを超える場合、サンプルのc-M A F コピー数が上昇していると考えることができる。

【0165】

いくつかの実施形態において、増幅は、16q23 遺伝子座の領域における増幅である。いくつかの実施形態において、増幅は、16番染色体の79, 392, 959bp~79, 663, 806bp（セントロメアからテロメアまで）の染色体領域の任意の部分における増幅である。いくつかの実施形態において、増幅は、16番染色体の79, 392, 959bp~79, 663, 806bpであるがDNA反復エレメントを排除したゲノム領域における増幅である。いくつかの実施形態において、増幅は、その領域に特異的なプローブを使用して測定される。

20

【0166】

特定の実施形態において、増幅またはコピー数は、インサイチュハイブリダイゼーションまたはPCRによって決定される。

【0167】

c-M A F 遺伝子または染色体領域16q22-q24が増幅されているかを決定するための方法は、当該分野において広く公知である。上記方法としては、インサイチュハイブリダイゼーション（ISH）（例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）、色素形成インサイチュハイブリダイゼーション（CISH）またはシルバーインサイチュハイブリダイゼーション（SISH））、ゲノム比較ハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応（例えば、リアルタイム定量的PCR）が挙げられるがこれらに限定されない。いずれのISH法の場合も、増幅またはコピー数は、染色体または核における、蛍光の点、有色の点または銀を有する点の数を数えることによって測定され得る。

30

【0168】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）は、染色体における特定のDNA配列の有無を検出するためおよびその特定のDNA配列の位置を特定するために使用される、細胞遺伝学的技法である。FISHは、染色体のいくつかの部分にだけ結合する蛍光プローブ（このプローブは、それらの部分と高い程度の配列類似性を示す）を使用する。代表的なFISH法では、DNAプローブは、ニックトランスレーションまたはPCRなどの酵素反応を用いてDNAに組み込まれる、代表的には、フッ素-dUTP、ジグキシゲニン-dUTP、ビオチン-dUTPまたはハプテン-dUTPの形態の、蛍光分子またはハプテンで標識される。遺伝物質（染色体）を含むサンプルを、スライドガラスに載せ、ホルムアミド処理によって変性させる。次いで、標識されたプローブを、当業者が決定する好適な条件下で、その遺伝物質を含むサンプルとハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの後、直接（フッ素で標識されたプローブの場合）または間接的に（ハ

40

50

プテンを検出する蛍光標識された抗体を使用して) サンプルを観察する。

【0169】

CISHの場合、プローブを、ジゴキシゲニン、ビオチンまたはフルオレセインで標識し、好適な条件において、遺伝物質を含むサンプルとハイブリダイズさせる。

【0170】

DNAに結合し得る任意のマーキング分子または標識分子が、本発明の第4の方法において使用されるプローブを標識するために使用され得、それにより、核酸分子の検出が可能になる。標識するための標識の例としては、放射性同位体、酵素基質、補因子、リガンド、化学発光剤、フルオロフォア、ハプテン、酵素およびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。標識するための方法および種々の目的のために適した標識を選択するための指針は、例えば、Sambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989)およびAusubelら(In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998)に見られ得る。

【0171】

c-MAF遺伝子の増幅を直接決定すること、または遺伝子座16q22-q24の増幅を決定することによって、増幅の存在が決定され、コントロールサンプル中の上記遺伝子の増幅と比較されたら、その後、c-MAF遺伝子における増幅が検出される場合、被験体が、転移についての陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高いという事実が示される。

【0172】

c-MAF遺伝子の増幅の決定は、転移に罹患していない前立腺がんを有する被験体の腫瘍組織サンプルにおいて測定されたc-MAF遺伝子の増幅のレベルに対応するか、または転移に罹患していない前立腺がんを有する被験体の生検サンプルの腫瘍組織コレクションにおいて測定されたc-MAF遺伝子の増幅の中央値に対応する、コントロールサンプルまたは参照サンプルの値と相関させることを必要とする。上記参照サンプルは、代表的には、被験体集団由来の等量のサンプルを合わせることによって得られる。一般に、代表的な参照サンプルは、臨床的に十分に考証されている被験体および転移が無いことが十分に特徴付けられている被験体から得られる。参照レベルが由来するサンプルコレクションは、好ましくは、その研究の患者対象と同じタイプのがんに罹患している被験体で構成されている。いったん、この中央値が確立されたら、患者の腫瘍組織におけるc-MAFの増幅のレベルは、この中央値と比較され得、ゆえに、増幅が存在する場合、被験体は、転移についての陽性の診断を有するかまたは転移を起こす傾向がより高い。

【0173】

好ましい実施形態において、転移は、骨転移である。なおより好ましい実施形態において、骨転移は、溶骨性骨転移である。本明細書中で使用されるとき、「溶骨性骨転移」と言う表現は、腫瘍細胞による破骨細胞活性の刺激に起因して転移の近傍で骨吸収(骨密度の進行性消失)が生じ、重篤な疼痛、病理学的骨折、高カルシウム血症、脊髄圧迫、および神経圧迫に起因する他の症候群を特徴とする、転移のタイプを指す。

【0174】

c-MAF遺伝子の転座の検出に基づく、前立腺がんにおける転移の予後診断の方法別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している患者の臨床転帰を予測するためのインビトロでの方法に関し、その方法は、上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子が、転座しているかを決定する工程を含み、ここで、c-MAF遺伝子の転座は、不良な臨床転帰を示す。

【0175】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している患者の臨床転帰を予測するためのインビトロでの方法に関し、その方法は、上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子が、転座しているかを決定する工程を含み、ここで、c-MAF遺伝子の転座は、不良

な臨床転帰を示す。

【0176】

いくつかの実施形態において、転座遺伝子は、16q23遺伝子座の領域由来である。いくつかの実施形態において、転座遺伝子は、16番染色体の79, 392, 959bp～79, 663, 806bp（セントロメアからテロメアまで）の染色体領域の任意の部分由来である。いくつかの実施形態において、転座遺伝子は、16番染色体の79, 392, 959bp～79, 663, 806bpであるがDNA反復エレメントを排除したゲノム領域由来である。いくつかの実施形態において、転座は、その領域に特異的なプローブを使用して測定される。

【0177】

特定の実施形態において、c-MAF遺伝子の転座は、上記遺伝子を含む染色体領域の転座の決定によって決定され得る。1つの実施形態において、転座は、t(14, 16)転座である。別の実施形態において、転座している染色体領域は、遺伝子座16q22-q24由来である。遺伝子座16q22-q24は、16番染色体、上記染色体の長腕およびバンド22～バンド24の範囲に位置する。この領域は、NCBIデータベースにおいてコンティグNT_010498.15およびNT_010542.15と対応する。好ましい実施形態において、c-MAF遺伝子は、14番染色体の遺伝子座14q32に転座し、転座t(14, 16)(q32, q23)が生じる。この転座は、IGH遺伝子座における強力なエンハンサーの隣にMAF遺伝子に配置し、このことは、場合によってはMAFの過剰発現をもたらす(Eychene, A., Rocques, N., and Puoponnnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8:683-693)。

【0178】

好ましい実施形態において、c-MAF遺伝子の転座は、上記転座に特異的なプローブを使用することによって決定され得る。いくつかの実施形態において、転座は、二色プローブを使用して測定される。いくつかの実施形態において、転座は、二重融合プローブを使用して測定される。いくつかの実施形態において、転座は、二色の二重融合プローブを使用して測定される。いくつかの実施形態において、転座は、2つの別個のプローブを使用して測定される。

【0179】

別の好ましい実施形態において、c-MAF遺伝子の転座は、14q32および16q23に対するプローブを含むVysis LSI IGH/MAF Dual Color二重融合プローブ(<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-maf-dual-color-dual-fusion-probe.html>;最終アクセス日2012年11月5日)を使用して決定される。別の好ましい実施形態において、c-MAF遺伝子の転座は、Kreatech diagnostics MAF/IGH gt(14;16) Fusionプローブ(<http://www.kreatech.com/products/repeat-free-tm-poseidon-tm-fish-probes/hematology/maf-igh-gt1416-fusion-probe.html>;最終アクセス日2012年11月5日)、Abnova MAF FISHプローブ(http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=FA0375;最終アクセス日2012年11月5日)、Cancer Genetics Italia IGH/MAF Two Color, Two Fusion転座プローブ(<http://www.cancer-genetics-italia.com/dna-fish-probe/ighmaf/>;最終アクセス日2012年11月5日)、Creative Bioarray IGH/MAF-t(14;16)(q32;q23) FISHプローブ(<http://www.creative-bioarray.com/products.asp?cid=>

10

20

30

40

50

35 & page = 10 ; 最終アクセス日 2012 年 11 月 5 日)、Arup Laboratories の FISH による多発性骨髄腫パネル (<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>; 最終アクセス日 2012 年 11 月 5 日)、Agilent の 16q23 または 14q32 に特異的なプローブ (<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>; 最終アクセス日 2012 年 11 月 5 日; <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>; 最終アクセス日 2012 年 11 月 5 日)、Dako の 16q23 または 14q32 に特異的なプローブ (http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?setCountry=true&purl=ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country; 最終アクセス日 2012 年 11 月 5 日)、Cytocell IGH/MAF Translocation, Dual Fusion Probe (http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/prenatalogy/cytocell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf; 最終アクセス日 2012 年 11 月 5 日)、Metasystems XL IGH/MAF Translocation - Dual Fusion Probe (http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joobdb&view=article&jooibase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272; 最終アクセス日 2012 年 11 月 5 日)、Zeiss FISH Probes XL, 100 µl, IGH/MAFB (<https://www.micro-shop.zeiss.com/?s=440675675dedc6&l=en&p=uk&f=r&i=5000&o=&h=25&n=1&sd=000000-0528-231-uk>; 最終アクセス日 2012 年 11 月 5 日) または Geny cell Biotech IGH/MAF Dual Fusion Probe (http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&src=s&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2F1phmie6__86.ppt&ei=MhGYUOi3GKWH0QGlt4DoDw&usg=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf3lVgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx_Ww; 最終アクセス日 2012 年 11 月 5 日) を使用して決定される。

【0180】

いくつかの実施形態において、プローブ上の標識は、フルオロフォアである。いくつかの実施形態において、プローブ上のフルオロフォアは、橙色である。いくつかの実施形態において、プローブ上のフルオロフォアは、緑色である。いくつかの実施形態において、プローブ上のフルオロフォアは、赤色である。場合によっては、プローブ上のフルオロフォアは、黄色である。いくつかの実施形態において、1つのプローブは、赤色フルオロフォアで標識され、1つは、緑色フルオロフォアで標識される。いくつかの実施形態において、1つのプローブは、緑色フルオロフォアで標識され、1つは、橙色フルオロフォアで標識される。場合によっては、プローブ上のフルオロフォアは、黄色である。例えば、MAF 特異的プローブが、赤色フルオロフォアで標識され、IGH 特異的プローブが、緑色フルオロフォアで標識され、白色が見られる場合、それは、それらのシグナルが重なっており、転座が起きていることを示す。

【0181】

いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、SpectrumOrangeである。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、SpectrumGreenである。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、DAPIである。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright405である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright415である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright495である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright505である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright550である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright547である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright570である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright590である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright647である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright495/550である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、PlatinumBright415/495/550である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、DAPI/PlatinumBright495/550である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、FITCである。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Texas Redである。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、DEACである。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、RGである。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Cy5である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、FITC、Texas RedおよびDAPIである。いくつかの実施形態において、DAPI対比染色は、転座、増幅またはコピー数の変化を可視化するために使用される。

10

20

【0182】

本発明の1つの実施形態は、第1の工程においてc-MAF遺伝子が被験体のサンプル中で転座しているかを決定する方法を含む。好ましい実施形態において、サンプルは、腫瘍組織サンプルである。

【0183】

特定の実施形態において、前立腺がんを有する被験体において骨転移を起こす傾向の予後診断のための本発明の方法は、c-MAF遺伝子が転座している上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子コピー数を決定する工程および上記コピー数をコントロールサンプルまたは参照サンプルのコピー数と比較する工程を含み、ここで、そのc-MAFのコピー数が、コントロールサンプルのc-MAFのコピー数と比較して多い場合、その被験体は、骨転移を起こす傾向がより高い。

30

【0184】

c-MAF遺伝子または染色体領域16q22-q24が転座しているかを決定するための方法は、当該分野において広く公知であり、c-MAFの増幅について先に記載された方法を含む。上記方法としては、インサイチュハイブリダイゼーション（ISH）（例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）、色素形成インサイチュハイブリダイゼーション（CISH）またはシルバーインサイチュハイブリダイゼーション（SISH））、ゲノム比較ハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応（例えば、リアルタイム定量的PCR）が挙げられるがこれらに限定されない。いずれのISH方法の場合も、増幅、コピー数または転座は、染色体または核における、蛍光の点、有色の点または銀を有する点の数を数えることによって決定され得る。他の実施形態において、コピー数の変化および転座の検出は、ホールゲノムシーケンシング、エクソームシーケンシングの使用、または任意のPCRに由来する技術の使用によって検出され得る。例えば、PCRは、転座を検出するためにゲノムDNAのサンプルにおいて行われ得る。1つの実施形態において、定量的PCRが使用される。1つの実施形態において、PCRは、

40

50

c-M A F 遺伝子に特異的なプライマーおよび I G H プロモーター領域に特異的なプライマーを用いて行われる；生成物が生成される場合、転座が生じている。

【0185】

いくつかの実施形態において、c-M A F 遺伝子の増幅およびコピー数は、c-M A F 遺伝子の転座が決定された後に、決定される。いくつかの実施形態において、プローブを使用して、細胞がc-M A F 遺伝子倍数体であるかが決定される。いくつかの実施形態において、倍数性の決定は、目的の遺伝子からの2種より多いシグナルが存在するかを決定することによって行われる。いくつかの実施形態において、倍数性は、目的の遺伝子に特異的なプローブからのシグナルを測定し、それをセントロメアプローブまたは他のプローブと比較することによって決定される。

10

【0186】

c-M A F 遺伝子の増幅または転座の検出に基づく、前立腺がんにおける臨床転帰の予後診断の方法

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している患者の臨床転帰を予測するためのインビトロでの方法（本明細書中以後、本発明の第7の方法）に関し、その方法は、上記被験体のサンプル中のc-M A F 遺伝子が、参照遺伝子コピー数と比べて増幅されているかまたは転座しているかを決定する工程を含み、ここで、上記参照遺伝子コピー数と比較したときのc-M A F 遺伝子の増幅は、不良な臨床転帰を示す。

【0187】

本発明の第7の方法は、第1の工程に、c-M A F 遺伝子が被験体のサンプルにおいて増幅されているかを決定する工程を含む。c-M A F の増幅の決定は、本質的に本発明の第5の方法に記載されているように行われる。好ましい実施形態において、サンプルは、腫瘍組織サンプルである。好ましい実施形態において、c-M A F 遺伝子の増幅は、遺伝子座16q23または16q22-q24の増幅を決定することによって決定される。別の好ましい実施形態において、c-M A F 遺伝子の増幅は、c-M A F 遺伝子特異的プローブを使用することによって決定される。

20

【0188】

第2の工程において、本発明の第7の方法は、上記コピー数をコントロールサンプルまたは参照サンプルのコピー数と比較する工程を含み、ここで、そのc-M A F コピー数が、コントロールサンプルのc-M A F コピー数と比べて多い場合、これは、不良な臨床転帰を示す。

30

【0189】

好ましい実施形態において、c-M A F 遺伝子コピー数が、参照サンプルまたはコントロールサンプルが有するコピー数より多いとき、c-M A F 遺伝子は、参照遺伝子コピー数と比較して、増幅されている。1つの例において、c-M A F 遺伝子のゲノムコピー数が、試験サンプルにおいて、コントロールサンプルと比べて少なくとも、約2倍増加（すなわち、6コピー）、3倍増加（すなわち、8コピー）、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍または50倍増加している場合、c-M A F 遺伝子は、「増幅されている」と言われる。別の例において、細胞1つあたりのc-M A F 遺伝子のゲノムコピー数が、少なくとも、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30などである場合、c-M A F 遺伝子は、「増幅されている」と言われる。

40

【0190】

別の実施形態において、参照遺伝子コピー数は、骨転移に罹患していない被験体由来の前立腺がんのサンプル中の遺伝子コピー数である。

【0191】

別の実施形態において、増幅は、インサイチュハイブリダイゼーションまたはPCRによって決定される。

【0192】

50

別の実施形態においておよび本発明に記載されるように、c-MAF遺伝子を含むchr16q22-24が前立腺がん細胞において増幅され、転移の存在に関連していると仮定すると、c-MAF遺伝子を含むchr16q22-24の増幅は、上記がんに罹患している被験体に最も適した治療に関して決定することを可能にする。

【0193】

従って、別の態様において、本発明は、前立腺がんを有する被験体の個別化治療をデザインするためのインビトロでの方法に関し、上記方法は、

(i) 上記被験体の腫瘍サンプル中のc-MAF遺伝子を含むchr16q22-24の増幅を定量する工程および

(ii) 先に得られたc-MAF遺伝子を含むchr16q22-24の増幅と、コントロールサンプル中の上記遺伝子の増幅の程度とを比較する工程、
を含み、

ここでc-MAF遺伝子を含むchr16q22-24が上記コントロールサンプル中の同じゲノム領域のコピー数と比較して増幅されている場合、上記被験体は、転移を予防および／もしくは処置することを目的とした治療を受けるのに適格である。この方法の特定の態様において、上記被験体は、その後、骨転移を予防、阻害および／もしくは処置する少なくとも1種の治療薬物を投与される。

ここでc-MAF遺伝子を含むchr16q22-24が参照サンプル中の同じゲノム領域のコピー数と比較して増幅されていない場合、上記被験体は、骨分解を予防するための治療を受けるのに適格ではない。この方法の特定の態様において、上記被験体は、その後、骨転移を予防、阻害および／もしくは処置する少なくとも1種の治療薬物を投与されない。

【0194】

本発明は、先に列挙されたものに由来する骨転移を予防、阻害および／もしくは処置する治療薬物に関する。

【0195】

本発明の治療方法

c-MAF阻害剤を使用する骨転移の処置

c-MAF遺伝子発現阻害剤または上記遺伝子によってコードされるタンパク質の阻害剤は、前立腺がん転移の処置および／または予防において使用することができる。

【0196】

そのため、別の態様において、本発明は、前立腺がん転移を処置するおよび／または予防するための医薬製品の調製における、c-MAF遺伝子発現阻害剤または上記遺伝子によってコードされるタンパク質の阻害剤（以後、本発明の阻害剤）の使用に関する。あるいは、本発明は、前立腺がん転移の処置および／または予防における使用のための、c-MAF遺伝子発現阻害剤または上記遺伝子によってコードされるタンパク質の阻害剤に関する。あるいは、本発明は、被験体における前立腺がん転移を処置するための方法であって、上記被験体にc-MAFインヒビターを投与する工程を含む方法に関する。本明細書中で使用されるとき、「c-MAF阻害剤」とは、c-MAF遺伝子発現を完全にまたは部分的に阻害することができる（その両方が、上記遺伝子の発現産物の生成を妨げること

(c-MAF遺伝子の転写を妨害することおよび／またはc-MAF遺伝子発現に由来するmRNAの翻訳を阻止すること) およびc-MAFタンパク質活性を直接阻害することによって) 任意の分子のことを指す。C-MAF遺伝子発現インヒビターは、国際特許出願WO2005/046731（その全内容が本明細書によって参照により援用される）に示されているような、c-MAFがインビトロにおける細胞増殖を促進する能力をいわゆるインヒビターが阻止する能力に基づく方法、WO2008098351（その全内容が本明細書によって参照により援用される）に記載されているような、c-MAFを発現する細胞においてサイクリンD2プロモーターもしくはc-MAF応答領域(MAREまたはc-MAF応答エレメント)を含むプロモーターの支配下のレポーター遺伝子の転写能力をいわゆるインヒビターが阻止する能力に基づく方法、またはUS20090481

17A（その全内容が本明細書によって参照により援用される）に記載されているような、NFATc2およびc-MAFを発現する細胞においてPMA／イオノマイシンによる刺激に応答してIL-4プロモーターの支配下のレポーター遺伝子の発現をいわゆるインヒビターが阻止する能力に基づく方法を用いて同定され得る。

【0197】

非限定的な例証として、本発明における使用に適したc-MAF阻害剤としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、干渉RNA（siRNA）、触媒RNAまたは特異的なリボザイム、および阻害性抗体が挙げられる。

【0198】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明のさらなる態様は、発現を阻害する、例えば、活性が阻害されるべきであるc-MAFをコードする核酸の転写および／または翻訳を阻害するための、単離された「アンチセンス」核酸の使用に関する。アンチセンス核酸は、従来の塩基相補性によって、または、例えば、二重らせんの主溝（large groove）における特異的な相互作用を介して二本鎖DNAに結合する場合、薬物の可能性のある標的に結合し得る。通常、これらの方法は、当該分野において通常使用される一連の技法のことを指し、それらには、オリゴヌクレオチド配列への特異的結合に基づく任意の方法が含まれる。

【0199】

本発明のアンチセンス構築物は、例えば、細胞において転写されるときに、c-MAFをコードする細胞mRNAの少なくとも1つの独特の部分に相補的なRNAを生成する発現プラスミドとして、投与され得る。あるいは、アンチセンス構築物は、細胞に導入されたら、標的核酸のmRNAおよび／または遺伝子配列とハイブリダイズして遺伝子発現の阻害をもたらす、エキソビボにおいて生成されたオリゴヌクレオチドプローブである。そのようなオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは、内因性ヌクレアーゼ、例えば、エキソヌクレアーゼおよび／またはエンドヌクレアーゼに抵抗性であるがゆえにインビボにおいて安定である、改変されたオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしてそれらを使用するための核酸分子の例は、ホスホルアミデート、ホスホチオネートおよびメチルホスホネートのDNAアナログである（米国特許第5176996号；同第5264564号；および同第5256775号も参照のこと）（それらの全体が参照により本明細書に援用される）。さらに、アンチセンス治療において有用なオリゴマーを構築するための一般的なアプロキシメーション（approximations）は、例えば、Van der Krolら、BioTechniques 6:958-976, 1988；およびSteinら、Cancer Res 48:2659-2668, 1988に概説されている。

【0200】

アンチセンスオリゴヌクレオチドに関して、標的遺伝子の翻訳開始部位由来のオリゴデオキシリボヌクレオチド領域、例えば、-10～+10が、好ましい。アンチセンスアプロキシメーションは、標的ポリペプチドをコードするmRNAに相補的なオリゴヌクレオチドのデザイン（DNAまたはRNAのいずれか）を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、転写されたmRNAに結合して、翻訳が妨げられる。

【0201】

mRNAの5'末端、例えば、開始コドンAUGを含むそこまでの非翻訳5'配列に相補的なオリゴヌクレオチドは、翻訳を阻害するために最も効率的な様式で機能するに違いない。それにもかかわらず、mRNAの非翻訳3'配列に相補的な配列もまた、mRNA翻訳を阻害するために効率的であることが示された（Wagner, Nature 372:333, 1994）。ゆえに、mRNAの翻訳を阻害するアンチセンスアプロキシメーションでは、遺伝子の非コード領域である非翻訳5'または3'領域において相補的なオリゴヌクレオチドが、使用され得る。mRNAの非翻訳5'領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、開始コドンAUGの相補体を含まなければならない。mRNAのコード領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、それほど効率的な翻訳インヒビターでないが、それら

も、本発明に従って使用され得る。それらが、mRNAの5'領域、3'領域またはコード領域とハイブリダイズするようにデザインされる場合、アンチセンス核酸は、少なくとも約6ヌクレオチド長を有しなければならず、好ましくは、およそ100未満、より好ましくは、およそ50、25、17または10未満のヌクレオチド長を有しなければならない。

【0202】

好ましくは、まず、アンチセンスオリゴヌクレオチドが遺伝子発現を阻害する能力を定量するインビトロ研究を行う。好ましくは、これらの研究は、オリゴヌクレオチドのアンチセンス遺伝子阻害と非特異的な生物学的作用とを識別するコントロールを使用する。また、好ましくは、これらの研究は、標的RNAまたはタンパク質のレベルをRNAまたはタンパク質の内部コントロールのレベルと比較した。アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して得られる結果は、コントロールオリゴヌクレオチドを使用して得られる結果と比較され得る。好ましくは、コントロールオリゴヌクレオチドは、アッセイされるオリゴヌクレオチドとほぼ同じ長さであり、標的配列への特異的なハイブリダイゼーションを妨げるために必要であると考えられるアンチセンス配列にすぎないものと異なるオリゴヌクレオチド配列である。

【0203】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一本鎖もしくは二本鎖のDNAもしくはRNA、またはそれらのキメラ混合物もしくは誘導体もしくは修飾されたバージョンであり得る。オリゴヌクレオチドは、例えば、分子の安定性、そのハイブリダイゼーション能力などを改善するために、塩基の基、糖の基またはリン酸骨格において修飾され得る。オリゴヌクレオチドは、他の結合基（例えば、ペプチド（例えば、オリゴヌクレオチドを宿主細胞のレセプターに導くためのペプチド）または細胞膜を通じた輸送を促進するための物質（例えば、Lettingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:6553-6556, 1989; Lemaîtreら、Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652, 1987; PCT公開番号WO88/09810を参照のこと）もしくは血液脳関門を通じた輸送を促進するための物質（例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと）、挿入剤（例えば、Zon, Pharm. Res. 5:539-549, 1988を参照のこと））を含み得る。このために、オリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、ペプチド、輸送剤（transporting agent）、ハイブリダイゼーションによって惹起される切断剤などに結合体化され得る。

【0204】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾された塩基の少なくとも1つの基を含み得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシルロースおよびヘキソースを含むがこれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの修飾された糖の基も含み得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、中性ペプチドに類似の骨格も含み得る。そのような分子は、ペプチド核酸（PNA）オリゴマーとして知られており、例えば、Perry-O'Keefeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:14670, 1996およびEglomら、Nature 365:566, 1993に記載されている。

【0205】

なおも別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾されたリン酸骨格を含む。なおも別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アルファアノマーオリゴヌクレオチドである。

【0206】

標的mRNA配列のコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することができるが、転写される非翻訳領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することもできる。

【0207】

場合によっては、内因性のmRNA翻訳を抑制するのに十分な細胞内濃度のアンチセンスに到達することが難しいことがある。ゆえに、好ましいアプロキシメーションは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを強力なp o l I I Iまたはp o l I Iプロモーターの支配下に配置した組換えDNA構築物を使用する。

【0208】

あるいは、遺伝子制御領域（すなわち、プロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列に、体内の標的細胞において遺伝子転写を妨げる三重らせん構造を形成するように指示することによって、標的遺伝子発現を減少させることができる（Helene, Anticancer Drug Des. 6 (6) : 569-84, 1991を広く参照のこと）。ある特定の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンスモルホリンである。

【0209】

s i RNA

低分子干渉RNAまたはs i RNAは、RNA干渉によって標的遺伝子の発現を阻害することができる物質である。s i RNAは、化学的に合成され得るか、インビトロ転写によって得ることができるか、または標的細胞においてインビボで合成され得る。代表的には、s i RNAは、15～40ヌクレオチド長の二本鎖RNAからなり、1～6ヌクレオチドの3'および／または5'突出領域を含み得る。その突出領域の長さは、s i RNA分子の全長と無関係である。s i RNAは、転写後の標的メッセンジャーの分解またはサイレンシングによって作用する。

【0210】

本発明のs i RNAは、c-MAFをコードする遺伝子のmRNAまたは上記タンパク質をコードする遺伝子配列と実質的に相同である。「実質的に相同」は、s i RNAが、RNA干渉によって後者を分解することができるほど、標的mRNAと十分に相補的または類似である配列を有すると理解される。上記干渉を引き起こすために適したs i RNAとしては、RNAによって形成されるs i RNA、ならびに種々の化学修飾を含むs i RNA、例えば：

- ・ヌクレオチド間の結合が天然に見られる結合と異なる（例えば、ホスホロチオネート結合）s i RNA
 - ・フルオロフォアなどの機能的な試薬とRNA鎖の結合体
 - ・2'位の種々のヒドロキシル官能基での修飾による、RNA鎖の末端、特に3'末端の修飾
 - ・2'-O-メチルリボースまたは2'-O-フルオリボースのような2'位におけるO-アルキル化残基などの改変された糖を有するヌクレオチド
 - ・ハロゲン化された塩基（例えば、5-ブロモウラシルおよび5-ヨードウラシル）、アルキル化された塩基（例えば、7-メチルグアノシン）などの改変された塩基を有するヌクレオチド
- が挙げられる。

・s i RNAは、そのまま、すなわち、上述の特徴を有する二本鎖RNAの形態で、使用され得る。あるいは、s i RNAのセンス鎖配列およびアンチセンス鎖配列を含むベクターを、目的の細胞におけるその発現に好適なプロモーターの支配下で使用する事が、可能である。

・s i RNAの発現に適したベクターは、s i RNAの2本の鎖をコードする2つのDNA領域が、転写の際にループを形成するスパーサー領域によって分断された1本の同じDNA鎖においてタンデムに配置されているベクターであり、単一のプロモーターが、shRNAを生じるDNA分子の転写を指示する。

・あるいは、s i RNAを形成する各鎖が、異なる転写単位の転写から形成されるベクターを使用することも可能である。これらのベクターは、その後、分岐（divergent）転写ベクターと収束（convergent）転写ベクターとに分割される。分岐転写ベクターでは、s i RNAを形成する各DNA鎖の転写が、同じであっても異なっても

10

20

30

40

50

よいそれ自体のプロモーターに依存するように、その各DNA鎖をコードする転写単位が、ベクター内でタンデムに配置される(Wang, J. ら、2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100:5103-5106およびLee, N. S. ら、2002, Nat. Biotechnol., 20:500-505)。収束転写ベクターでは、siRNAを生じるDNA領域は、2つの逆方向のプロモーターに隣接したDNA領域のセンス鎖およびアンチセンス鎖を形成する。センスおよびアンチセンスのRNA鎖の転写の後、後者は、機能的siRNAを形成するためにハイブリッドを形成する。2つのU6プロモーター(Tran, N. ら、2003, BMC Biotechnol., 3:21)、マウスU6プロモーターおよびヒトH1プロモーター(Zheng, L. ら、2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 135-140およびWO2005026322)ならびにヒトU6プロモーターおよびマウスH1プロモーター(Kaykas, A. and Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5:16)が使用される逆方向プロモーター系を有するベクターが記載されている。

・収束発現ベクターまたは分岐発現ベクターからのsiRNAの発現におけるその使用に適したプロモーターには、siRNAを発現させようとする細胞と適合性の任意のプロモーターまたはプロモーター対が含まれる。したがって、本発明に適したプロモーターとしては、構成的プロモーター(例えば、真核生物ウイルス(例えば、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、SV40、CMV、トリ肉腫ウイルス、B型肝炎ウイルス)のゲノムに由来するプロモーター)、メタロチオネイン遺伝子プロモーター、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子プロモーター、レトロウイルスLTR領域、免疫グロブリン遺伝子プロモーター、アクチン遺伝子プロモーター、EF-1アルファ遺伝子プロモーター、ならびにタンパク質発現が分子または外来性シグナルの添加に依存する誘導性プロモーター、例えば、テトラサイクリンシステム、NFカッパーB/UV光システム、Cre/Loxシステムおよび熱ショック遺伝子プロモーター、WO/2006/135436に記載されている制御可能なRNAポリメラーゼIIプロモーターならびに組織特異的プロモーター(例えば、WO2006012221に記載されているPSAプロモーター)が挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。好ましい実施形態において、プロモーターは、恒常的に作用するRNAポリメラーゼIIIプロモーターである。RNAポリメラーゼIIIプロモーターは、限られた数の遺伝子(例えば、5S RNA、tRNA、7SL RNAおよびU6 snRNA)にしか見られない。他のRNAポリメラーゼIIIプロモーターとは異なり、III型プロモーターは、いかなる遺伝子内配列も必要とせず、むしろ、-34および-24位におけるTATAボックス、-66~-47の近位配列エレメントすなわちPSE、および場合によっては、-265~-149位の遠位配列エレメントすなわちDSEを含む5'方向の配列を必要とする。好ましい実施形態において、III型RNAポリメラーゼIIIプロモーターは、ヒトまたはマウスのH1遺伝子およびU6遺伝子のプロモーターである。なおもより好ましい実施形態において、プロモーターは、2つのヒトまたはマウスのU6プロモーター、マウスU6プロモーターおよびヒトH1プロモーターまたはヒトU6プロモーターおよびマウスH1プロモーターである。

・siRNAは、siRNAを形成する逆平行鎖がループまたはヘアピン領域によって接続されていることを特徴とするいわゆるshRNA(短ヘアピンRNA)から細胞内に産生され得る。shRNAは、プラスミドまたはウイルス、特にレトロウイルスによってコードされ得、プロモーターの支配下にある。shRNAの発現に適したプロモーターは、siRNAの発現についての上記のパラグラフにおいて示されたプロモーターである。

・siRNAおよびshRNAの発現に適したベクターとしては、原核生物発現ベクター(例えば、pUC18、pUC19、Bluescriptおよびそれらの誘導体、mp18、mp19、pBR322、pMB9、CoIE1、pCR1、RP4)、ファージベクターおよびシャトルベクター(例えば、pSA3およびpAT28)、酵母発現ベクター(例えば、2-ミクロンプラスミドタイプのベクター、インテグレーションプラスミ

10

20

30

40

50

ド、YEPベクター、セントロメアプラスミドなど）、昆虫細胞発現ベクター（例えば、pACシリーズベクターおよびpVLシリーズベクター）、植物発現ベクター（例えば、pIBI、pEarleyGate、pAVA、pCAMBIA、pGSA、pGWB、pMDC、pMY、pOREシリーズベクターなど）およびウイルスベクターベース（アデノウイルス、アデノウイルス随伴ウイルスならびにレトロウイルス、特にレンチウイルス）の高等真核生物細胞発現ベクターまたは非ウイルスベクター（例えば、pcDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、pZeoSV2、pCI、pSVLおよびpKSV-10、pBPV-1、pML2dおよびpTDT1）が挙げられる。好ましい実施形態において、ベクターは、レンチウイルスベクターである。

10

・本発明のsiRNAおよびshRNAは、当業者に公知の一連の技法を用いて得ることができる。siRNAをデザインするための基礎と考えられるヌクレオチド配列の領域は、限定的でなく、それは、コード配列（開始コドンと終止コドンの間）の領域を含み得るか、またはあるいは、好ましくは、25～50ヌクレオチド長で、開始コドンに対して3'方向の任意の位置の非翻訳5'または3'領域の配列を含み得る。siRNAをデザインする1つの方法は、AA(N19)TTモチーフの識別（ここで、Nは、c-MAF遺伝子配列内の任意のヌクレオチドであり得る）および高G/C含有量を有するそれらのモチーフの選択を含む。上記モチーフが見つからない場合、NA(N21)モチーフ（ここで、Nは、任意のヌクレオチドであり得る）を識別することができる。

20

【0211】

c-MAF特異的siRNAには、WO2005046731（その全体が本明細書に参考として援用される）に記載されているsiRNAが含まれ、その鎖のうちの一方は、ACGGCUCGAGCAGCGACAA（配列番号6）である。他のc-MAF特異的siRNA配列としては、CUUACCAAGUGUGUUCACAA（配列番号7）、UGGAAGACUACUACUGGAUG（配列番号8）、AUUUGCAGUCAUGGAGAAC（配列番号9）、CAAGGAGAAAUACGAGAAGU（配列番号10）、ACAAGGAGAAAUACGAGAAG（配列番号11）およびACCUUGGAAGACUACUACUGG（配列番号12）が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0212】

DNA酵素

他方で、本発明は、本発明のc-MAF遺伝子の発現を阻害するDNA酵素の使用も企図する。DNA酵素は、アンチセンス技術とリボザイム技術の両方の機構的な特色のいくつかを組み込んでいる。DNA酵素は、アンチセンスオリゴヌクレオチドと同様の特定の標的核酸配列を認識するが、それにもかかわらず、リボザイムと同様に触媒性であり、標的核酸を特異的に切断するように、デザインされる。

【0213】

リボザイム

活性が阻害されるべきであるc-MAFをコードするmRNAの翻訳を妨げるために標的mRNAの転写産物を触媒的に切断するためにデザインされたリボザイム分子もまた、使用され得る。リボザイムは、特定のRNAの切断を触媒することができる酵素的RNA分子である（概説として、Rossi, Current Biology 4:469-471, 1994を参照のこと）。リボザイムの作用機序は、相補的な標的RNAへのリボザイム分子配列の特異的なハイブリダイゼーションとその後のエンドヌクレアーゼによる切断事象を含む。リボザイム分子の組成は、好ましくは、標的mRNAに相補的な1つまたは複数の配列およびmRNAの切断を担う周知の配列または機能的に等価な配列を含む（例えば、米国特許第5,093,246号を参照のこと）。

40

【0214】

本発明において使用されるリボザイムは、ハンマーヘッド型リボザイムおよびエンドリ

50

ボヌクレアーゼRNA（本明細書中以後、「Cech型リボザイム」）（Zaugら、Science 224:574-578, 1984を含む）。

【0215】

リボザイムは、改変されたオリゴヌクレオチド（例えば、安定性、標的化などを改善するように改変されたオリゴヌクレオチド）によって形成され得、そしてそれらはインビトで標的遺伝子を発現する細胞に分配されるべきである。好ましい分配方法は、トランスフェクトされた細胞が、内因性の標的メッセンジャーを破壊して翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを産生するように、強力な構成的pol IIIまたはpol IIプロモーターの支配下においてリボザイムを「コードする」DNA構築物を使用することを含む。リボザイムは、触媒的であるので、他のアンチセンス分子とは異なり、その効率のために、低い細胞内濃度しか必要ない。

10

【0216】

阻害性抗体

本発明の文脈において、「阻害性抗体」は、c-MAFタンパク質に特異的に結合して、上記タンパク質の機能の1つまたは複数、好ましくは、転写に関連する機能を阻害することができる任意の抗体と理解される。それらの抗体は、当業者に公知である任意の方法（そのうちのいくつかが上で述べられた）を使用して、調製され得る。したがって、ポリクローナル抗体は、阻害されるべきタンパク質で動物を免疫することによって調製される。モノクローナル抗体は、Kohler, Milsteinら（Nature, 1975, 256:495）によって記載された方法を用いて調製される。本発明の文脈において、好適な抗体としては、可変抗原結合領域および定常領域を含むインタクトな抗体、「Fab」、「F(ab')₂」および「Fab'」、Fv、scFvフラグメント、ダイアボディ、二重特異性抗体、アルファボディ、シクロペプチドおよびステーブルドペプチドが挙げられる。いったん、c-MAFタンパク質結合能を有する抗体が同定されたら、このタンパク質の活性を阻害することができる抗体が、阻害剤識別アッセイを用いて選択される。

20

【0217】

阻害性ペプチド

本明細書中で使用されるとき、用語「阻害性ペプチド」とは、上で説明されたようにc-MAFタンパク質に結合してその活性を阻害することができる、すなわち、c-MAFの遺伝子転写を活性化させることができることを妨げる、ペプチドのことを指す。

30

【0218】

ネガティブc-MAFドミナント

mafファミリーのタンパク質は、ホモ二量体化およびAP-1ファミリーの他のメンバー（例えば、FosおよびJun）とのヘテロ二量体化をすることができるので、c-MAF活性を阻害する1つの方法は、c-MAFと二量体化することができるが転写を活性化させる能力を欠くネガティブドミナントの使用によるものである。したがって、ネガティブc-MAFドミナントは、細胞に存在し、トランス活性化ドメイン（例えば、mafK、mafF、mafgおよびpi8）を含むアミノ末端の3分の2を欠く、任意の小さいmafタンパク質であり得る（Fujiwaraら（1993）Oncogene 8, 2371-2380; Igarashiら（1995）J. Biol. Chem. 270, 7615-7624; Andrewsら（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11488-11492; Kataokaら（1995）Mol. Cell. Biol. 15, 2180-2190）（Kataokaら（1996）Oncogene 12, 53-62）。

40

【0219】

あるいは、ネガティブc-MAFドミナントには、他のタンパク質と二量体化する能力を維持しているが転写を活性化する能力を欠くc-MAFバリエーションが含まれる。これらのバリエーションは、例えば、タンパク質のN末端に位置するc-MAFトランス活性化ドメインを欠いているバリエーションである。したがって、例証的な様式では、ネガティブc-M

50

A Fドミナントバリエーションには、少なくともアミノ酸1～122、少なくともアミノ酸1～187または少なくともアミノ酸1～257（その全体が本明細書に参考として援用される米国特許第6,274,338号に記載されているようなヒトc-MAFのナンバリングを考慮することによって）が除去されているバリエーションが含まれる。

【0220】

本発明は、ネガティブc-MAFドミナントバリエーションと、標的細胞における発現に適したプロモーターの作動性の支配下のc-MAFをコードするポリヌクレオチドとの両方の使用を企図する。本発明のポリヌクレオチド転写を制御するために使用され得るプロモーターは、構成的プロモーター、すなわち、基底レベルの転写を指示するプロモーター、または転写活性に外部のシグナルが必要である誘導性プロモーターであり得る。転写の制御に適した構成的プロモーターは、とりわけ、CMVプロモーター、SV40プロモーター、DHF Rプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、1a伸長因子(EF1a)プロモーター、アルブミンプロモーター、ApoA1プロモーター、ケラチンプロモーター、CD3プロモーター、免疫グロブリン重鎖または軽鎖プロモーター、ニューロフィラメントプロモーター、ニューロン特異的エノラーゼプロモーター、L7プロモーター、CD2プロモーター、ミオシン軽鎖キナーゼプロモーター、HOX遺伝子プロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター、MyoD遺伝子プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)遺伝子プロモーター、低密度リポタンパク質(LDL)プロモーター、アクチン遺伝子プロモーターである。好ましい実施形態において、トランス活性化因子の発現を制御するプロモーターは、PGK遺伝子プロモーターである。好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド転写を制御するプロモーターは、T7ファージのRNAポリメラーゼプロモーターである。

【0221】

好ましくは、本発明の文脈において使用され得る誘導性プロモーターは、誘導剤(inducer agent)の非存在下ではゼロまたは無視できる基底発現を示す誘導剤に応答するプロモーターであり、3'位に位置する遺伝子の活性化を促進することができる。誘導剤のタイプに応じて、誘導性プロモーターは、Tet on/offプロモーター(Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551; Gossen, M. ら、1995, Science 268:1766-1769; Rossi, F. M. V. and H. M. Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456); Pip on/offプロモーター(米国特許第6287813号); 抗黄体ホルモン依存性プロモーター(US2004132086)、エクジソン依存性プロモーター(Christopher ら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6314-6318; No ら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351, Suhr ら、1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:7999-8004およびWO9738117)、メタロチオネイン依存性プロモーター(WO8604920)およびラパマイシン依存性プロモーター(Rivera ら、1996, Nat. Med. 2:1028-32)として分類される。

【0222】

ネガティブc-MAFドミナントバリエーションをコードするポリヌクレオチドの発現に適したベクターとしては、原核生物発現ベクター由来のベクター(例えば、pUC18、pUC19、Bluescriptおよびそれらの誘導体、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4)、ファージおよびシャトルベクター(例えば、pSA3およびpAT28)、酵母発現ベクター(例えば、2-ミクロンタイプのプラスミドベクター、インテグレーションプラスミド、YEPベクター、セントロメアプラスミドなど)、昆虫細胞発現ベクター(例えば、pACシリーズベクターおよびpV Lシリーズベクター)、植物発現ベクター(例えば、pIB1、pEarleyGate

、pAVA、pCAMBIA、pGSA、pGWB、pMDC、pMY、pOREシリーズベクターなど）およびウイルスベクターベース（アデノウイルス、アデノウイルス随伴ウイルスならびにレトロウイルスおよび特にレンチウイルス）の高等真核生物細胞発現ベクターまたは非ウイルスベクター（例えば、pSilencer 4.1-CMV（Ambion）、pcDNA3、pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、pZeoSV2、pCI、pSVLおよびpKSV-10、pBPV-1、pML2dおよびpTDT1）が挙げられる。

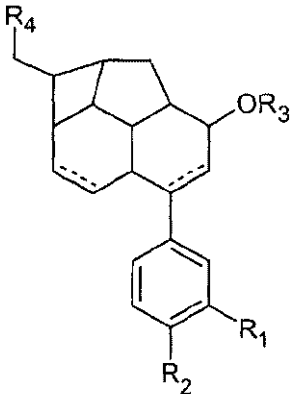
【0223】

10

c-MAFタンパク質活性の他の阻害性化合物

本発明における使用に適した他のc-MAF阻害性化合物としては、以下が挙げられる：

【表 1 - 1】

I	一般式  に対応する、WO2004014888に記載されているものなどのエンジアンドリン酸H誘導体 (式中、 R_1およびR_2は、互いに独立しており、 1.0 Hまたは 2.0 $-O-C_1-C_6-$アルキル、$-O-C_2-C_6-$アルケニル、$-O-C_2-C_6-$アルキニルまたは $-O-C_6-C_{10}-$アリール基(ここで、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、直鎖または 分枝鎖であり、上記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は: 2.1 $-OH$、 2.2 $=O$、 2.3 $-O-C_1-C_6-$アルキル(ここで、アルキルは、直鎖または分枝鎖である)、 2.4 $-O-C_2-C_6-$アルケニル(ここで、アルケニルは、直鎖または分枝鎖である)、 2.5 $C_6-C_{10}-$アリール、 2.6 $-NH-C_1-C_6-$アルキル(ここで、アルキルは、直鎖または分枝鎖である)、 2.7 $-NH-C_2-C_6-$アルケニル(ここで、アルケニルは、直鎖または分枝鎖である)、 2.8 $-NH_2$または 2.9 ハロゲン
---	---

10

20

30

40

【表 1 - 2】

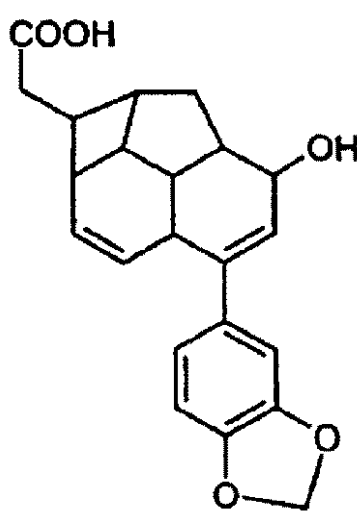
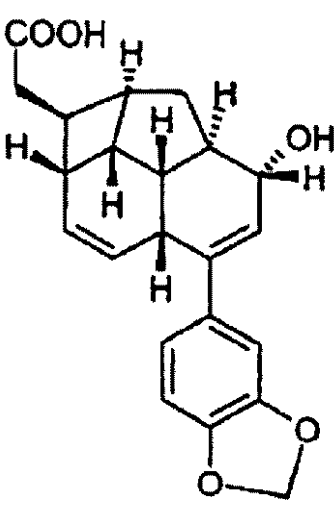
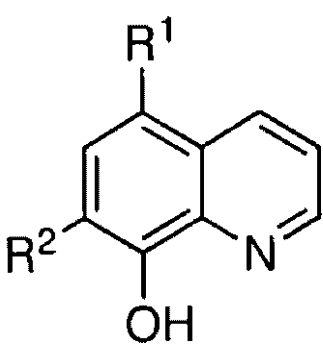
	で一置換または二置換されており、上記アリール基は、必要に応じて、置換基2.1または2.3～2.9で一置換または二置換されており、 置換基2.3、2.4、2.6および2.7は、-CN、-アミドもしくは-オキシム官能基でさらに置換され得、2.5は、-CNもしくはアミド官能基でさらに置換され得るか、またはR₁およびR₂は、一体となって環を形成し、ここで、R₁およびR₂は、-O-[(C₁-C₆)-アルキレン]-O-基を意味する)であり、 R₃は、 1.0 Hまたは 2.0 -O-C₁-C₆-アルキル、-O-C₂-C₆-アルケニル、-O-C₂-C₆-アルキニルもしくは-O-C₆-C₁₀-アリール基(ここで、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、直鎖または分枝鎖であり、上記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は: 2.1 -OH、 2.2 =O、 2.3 -O-C₁-C₆-アルキル(ここで、アルキルは、直鎖または分枝鎖である)、 2.4 -O-C₂-C₆-アルケニル(ここで、アルケニルは、直鎖または分枝鎖である)、 2.5 -C₆-C₁₀-アリール、 2.6 -NH-C₁-C₆-アルキル(ここで、アルキルは、直鎖または分枝鎖である)、 2.7 -NH-C₂-C₆-アルケニル(ここで、アルケニルは、直鎖または分枝鎖である)、 2.8 -NH₂または 2.9 ハロゲン で一置換または二置換されており、上記アリール基は、必要に応じて、置換基2.1または2.3～2.9で一置換または二置換されており、 置換基2.3、2.4、2.6および2.7は、-CN、-アミドもしくは-オキシム官能基でさらに置換され得、2.5は、-CNもしくはアミド官能基でさらに置換され得る)であり、
--	--

10

20

30

40

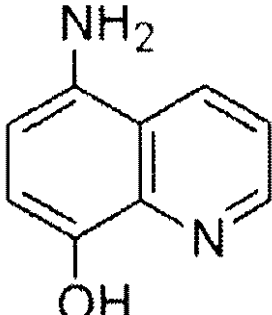
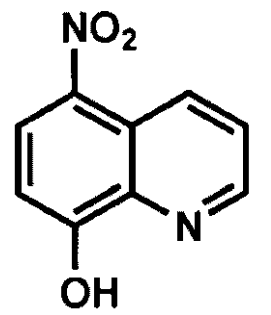
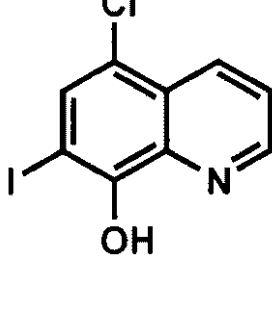
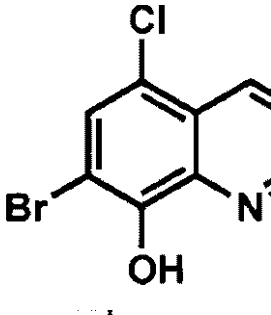
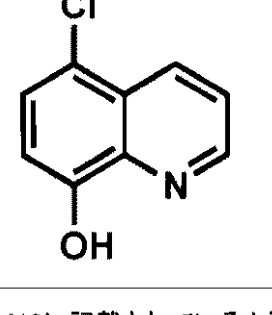
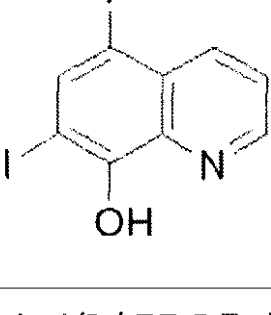
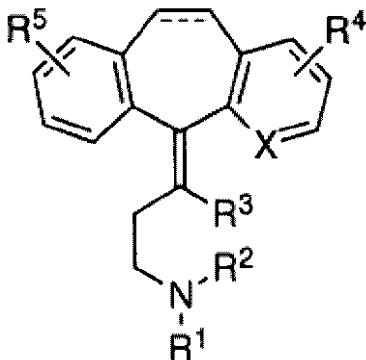
	R_4は、CO_2R_3、CO_2NHR_3、CHO、CH_2OR_3、$\text{CH}_2\text{OSi}(\text{R}_3)_3$、$\text{CH}_2\text{Br}$、$\text{CH}_2\text{CN}$(ここで、$\text{R}_3$は、上で定義されたとおりである)である) および特に以下の化合物  
II	一般式  のWO2009146546に記載されているものなどの8-ヒドロキシキノリン誘導体(式中、R_1は、NO_2、NH_2、$\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-アルキル})$および$\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-アルキル})(\text{C}_1\text{-C}_6\text{-アルキル})$からなる群より選択され; R_2は、H、ハロゲン、$\text{C}_1\text{-C}_6\text{アルキル}$およびフルオロ置換$\text{C}_1\text{-C}_6\text{アルキル}$から選択されるか、または R_1は、Clであり、R_2は、BrまたはHである)、

20

30

40

【表 1 - 4】

	および好ましくは、以下の化合物。      	10
III	WO09049410に記載されているようなクリオキノール(5-クロロ-7-ヨードキノリン-8-オール)	30
IV	一般式 	40

【表 1 - 5】

	のWO08098351に記載されている化合物などの化合物(式中、 $\text{---}\text{---}\text{---}$ は、単結合または二重結合であり、 R^1 は、H、$\text{C}_1\text{--C}_4$ アルキル、$\text{C}(\text{O})\text{OC}_1\text{--C}_4$ アルキル、$\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{--C}_4$ アルキルおよび $\text{C}(\text{O})\text{NHC}_1\text{--C}_4$ アルキルからなる群より選択され; R^2 は、Hおよび$\text{C}_1\text{--C}_4$ アルキルから選択され; R^3 は、Hおよび$\text{C}_1\text{--C}_4$ アルキルから選択されるか; またはR^2 およびR^3 は結合して、それらが結合している炭素原子および窒素原子と一体と なってピペリジン環を形成し、 R^4 およびR^5 は、独立して、H、ハロゲン、ヒドロキシ、$\text{C}_1\text{--C}_4$ アルキル、フルオロ置換$\text{C}_1\text{--C}_4$ アルキルおよび$\text{C}_1\text{--C}_4$ アルコキシから選択され; X は、OおよびNから選択される) および好ましい化合物、例えば、 シプロヘプタジン(4-(5H-ジベンゾ-[a,d]シクロヘプテン-5-イリデン)-1-メチルピペリジン 塩酸塩)、 アミトリプチリン(3-(10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[[a,d]]シクロヘプテン-5-イリデン)-N,N- ジメチル-1-プロパンアミン)、 ロラタジン(エチル4-(8-クロロ-5,6-ジヒドロ-11H-ベンゾ[5,6]シクロヘプタ[1,2-b]ピリジン -11-イリデン)-1-ピペリジンカルボキシレート、 シクロベンザプリン(Cyclobenzaprine)(3-(5H-ジベンゾ[a,d]シクロヘプテン-5-イリデン)-N,N-ジメチル-1-プロパンアミン)	10
V	WO0359249に記載されているようなニバレノール(12,13-エポキシ-3,4,7,15-テトラヒドロ キシトリコテカ-9-エン-8-オン)	40

表1:c-MAF阻害能を有する小分子

【0224】

他の c-MAF インヒビターは、特許出願 WO 2005 06 3 2 5 2 に記載されている
(例えば、以下の表 (表 2) に示されるもの)。

【表 2 - 1】

アンタゴニスト	cdk2阻害活性についての参考文献
プリンアナログ	
プルバラノール類、例えば、商品名Purvalanol A (#P4484, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)としてSigma-Aldrichから入手可能な分子式 $C_{19}H_{25}ClN_6O$ を有する2-(1R-イソプロピル-2-ヒドロキエチルアミノ)-6-(3-クロロアミノ)-9-イソプロピルプリン、Purvalanol B、アミノプルバラノール、化合物52 (プルバラノールAのイソプロピルがHで置換されている)	Gray, N.S. ら、 Science, 281, 533-538 (1998); Chang, Y.T. ら、 Chem. Biol., 6, 361-375 (1999).
商品名Olomoucine (#00886)としてSigma-Aldrichから入手可能な分子式 $C_{15}H_{18}N_6O$ を有する2-(ヒドロキエチルアミノ)-6-ベンジルアミノ-9-メチルプリン、商品名N ⁹ -イソプロピルオロモウシン (#I 0763)としてSigma-Aldrichから入手可能な分子式 $C_{17}F_{22}N_6O$ を有する2-(2'-ヒドロキエチルアミノ)-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリン; CVT-313	Vesely, J. ら、 (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11; Brooks, E.B. ら、 (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11
商品名Roscovitine (#R7772)としてSigma-Aldrichから入手可能な $C_{19}H_{26}N_6O$ の分子式を有する6-(ベンジルアミノ)-2(R)-[[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ]-9-イソプロピルプリン2-(R)-[[9-(1-メチルエチル)-6-[(フェニルメチル)アミノ]-9H-プリン-2-イル]アミノ]-1-ブタノール、メトキシロスコピチン	Wang, D. ら、 J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. ら、 Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L. ら、 (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36
商品名CGP74514 (#C3353)としてSigma-Aldrichから入手可能な $C_{19}H_{24}ClN_7$ の分子式を有するプリンアナログN2-(cis-2-アミノシクロヘキシル)-N6-(3-クロロフェニル)-9-エチル-9H-プリン-2, 6-ジアミン	Imbach, P. ら、 Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. ら、 J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
ClがCNで置換されており、OHが除去されており、シクロヘキサン環のオルト位がNH ₂ である、CGP74514(前出)のプリンアナログである、CGP79807	Imbach, P. ら、 Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. ら、 J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
O6-シクロヘキシルメチルグアニンNU2058などのプリンアナログ	Arris, C.E. ら、 J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000);

10

20

30

【表 2 - 2】

	Davies ら、 <i>Nature Structural Biology</i> , 9:10, 745-749, 2002	
NU6102などのプリンアナログ	Arris, C.E. ら、 <i>J. Med. Chem.</i> , 43, 2797-2804 (2000); Davies, T.G. ら、 <i>Nat. Struct. Biol.</i> , 9, 745-749 (2002).	
イソペンテニル-アデニン	Vesely, J. ら、 (1994) <i>Eur. J. Biochem.</i> , 224, 771-86	
プリンベースでない作用物質		
インジルピン類、例えば、商品名 (#I0404)としてSigma-Aldrichから入手可能なC ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₂ の分子式を有するインジルピン-3'-モノオキシム、インジルピン5-スルホネート、5-クロロインジルピン	Davies, T.G. ら、 <i>Structure</i> , 9, 389-397 (2001); Marko, D. ら、 <i>Br. J. Cancer</i> , 84, 283-289 (2001); Hoessel, R. ら、 (1999) <i>Nat. Cell Biol.</i> , 1, 60-7; WO 03/027275 として公開された Hellberg らに対する PCT/US02/30059	10
この表のカラム2に参照されやすくして載せられているFischerのオキシインドール1 (#IN118, JMAR Chemical	Porcs-Makkay, M. ら、 <i>Tetrahedron</i> 2000, 56, 5893; <i>Org. Process Res. Dev.</i> 2000, 4, 10	
インデノピラゾール類	Nugiel, D.A. ら、 <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. ら、 <i>J. Med. Chem.</i> , 45, 5224-5232 (2002); Yue, B.W. ら、 <i>J. Med. Chem.</i> , 45, 5233-5248 (2002).	20
ピリド(2, 3-d)ピリミジン-7-オン類、Fischerの化合物3	Barvian, M. ら、 <i>J. Med. Chem.</i> , 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., <i>Med. Res. Rev.</i> , 21, 487-498 (2001).	
キナゾリン類、例えば、アニリノキナゾリン	Sielecki, T.M. ら、 <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 11, 1157-1160 (2001); Mettrey ら、 <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236.	
チアゾール類、例えば、縮合チアゾール、商品名GW 8510 (#G7791)としてSigma-Aldrichから入手可能なC ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S ₂ の分子式を有する4-[[(7-オキソ-6, 7-ジヒドロ-8H-[1, 3]チアゾロ[5, 4-e]インドール-8-イリデン)メチル]アミノ-N-(2-ピリジル)ベンゼンスルホンアミド	Davis, S.T. ら、 <i>Science</i> , 291, 134-137 (2001); WO 03/027275 として公開された Hellberg らに対する PCT/US02/30059	30
フラボピリドール類(Flavopiridols)、例えば、フラボピリドール(L868275; NCS649890, National Cancer Institute, Bethesda, MD)およびデクロロ誘導体	Carlson, B.A. ら、 (1996) <i>Cancer Res.</i> , 56, 2973-8	
アルカロイド類、例えば、スタウロスポリン(#S1016, A. G. Scientific, San Diego, CA)またはUCN-01(7-ヒドロキシスタウロスポリン)National Cancer Institute, Bethesda, MD	Rialet, V. ら、 (1991) <i>Anticancer Res.</i> , 11, 1581-90; Wang, Q. ら、 (1995) <i>Cell Growth Differ.</i> , 6, 927-36, Akiyama, T. ら、 (1997) <i>Cancer Res.</i> , 57, 1495-501, Kawakami, K. ら、 (1996) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 219, 778-83	
パウロン類(Paullones)、例えば、商品名kenpaullone (#K3888)としてSigma-Aldrichから入手可能なC ₁₆ H ₁₁ BrN ₂ Oの分子式を有する9-ブromo-7, 12-ジヒドロインドロ[3, 2-d][1]ベンゾアゼピン-6(5H)-オン、または商品名alsterpaullone (#A4847)としてSigma-Aldrichから入手可能なC ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₃ の分子式を有する9-ニトロ-7, 12-ジヒドロインドロ[3, 2-d][1]ベンゾアゼピン-6(5)-オン	Zaharevitz, D.W. ら、 <i>Cancer Res.</i> , 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. ら、 <i>J. Med. Chem.</i> , 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W. ら、 (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59, 2566-9; WO 03/027275 として公開された Hellberg らに対する PCT/US02/30059	40
アルカロイドであるCGP41251	Begemann, M. ら、 (1998) <i>Anticancer Res.</i> ,	

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

	18, 2275-82; Fabbroら、 <i>Pharmacol Ther.</i> 1999 May-Jun;82(2-3):293-301	
ヒメニアルジシン類(Hymenialdisines)、例えば、A. G. Scientific, Inc. (San Diego, CA)の一部門である Biochemicals. netから入手可能な $C_{11}H_{10}BrN_5O_2$ の分子式を有する10 α -ヒメニアルジシン(H-1150)	Meijer, L.ら、 (1999) <i>Chemistry & Biology</i> , 7, 51-63; WO 03/027275として公開された Hellbergらに対するPCT/US02/30059	
フェニルアミノピリミジンであるCGP60474	21; WO95/09853, Zimmermann ら、 September 21, 1994	10
チアゾロピリミジン2	Attaby ら、 <i>Z. Naturforsch.</i> 54b, 788-798 (1999)	
ジアリール尿素	Honma, T. ら、 <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 4628-4640 (2001), Honma, T. ら、 <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 4615-4627 (2001).	
商品名Butyrolactone-I(B7930)としてSigma-Aldrichから入手可能な $C_{24}H_{24}O_7$ の分子式を有する(2R)-2, 5-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-2-[(4-ヒドロキシ-3-(3-メチル-2-ブテニル)フェニル)メチル]-3-(4-ヒドロキシフェニル)-5-オキソ-2-フランカルボン酸メチルエステル	Kitagawa, M. ら、 <i>Oncogene</i> , 8, 2425-2432 (1993).	
Aloisine A, Cat. No. 128125 (Calbiochem, San Diego, CA)	Mettey ら、 <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236	20

表2: c-MAF インヒビター

【0225】

好ましい実施形態において、c-MAF阻害剤は、骨転移の処置および／または予防のために用いられる。なおもより好ましい実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

【0226】

c-MAF阻害剤は、代表的には、薬学的に許容され得るキャリアとともに投与される。

【0227】

用語「キャリア」とは、希釈剤または賦形剤のことを指し、それによって、活性成分が投与される。そのような薬学的キャリアは、滅菌された液体（例えば、水および油（石油、動物、植物または合成起源のものを含む（例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油など）））であり得る。特に注射可能な溶液用の、水または食塩水溶液ならびにデキストロス水溶液およびグリセロール水溶液が、キャリアとして使用されるのが好ましい。好適な薬学的キャリアは、E. W. Martin, 1995によって「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。好ましくは、本発明のキャリアは、州政府もしくは連邦政府の規制当局によって承認されたものであるか、または米国薬局方、もしくは動物、より具体的には人間におけるその使用について一般に認識されている他の薬局方に列挙されているものである。

【0228】

本発明の薬学的組成物の所望の薬学的剤形を製造するために必要なキャリアおよび補助物質は、他の因子のなかでも、選択される薬学的剤形に依存する。薬学的組成物の前記薬学的剤形は、当業者に公知の従来の方法に従って製造されるだろう。活性成分を投与するための種々の方法、使用されるべき賦形剤およびそれらを生成するためのプロセスの概説は、「Tratado de Farmacia Galenica」, C. Fauli i Trillo, Luzan 5, S. A. 1993 Editionに見られる。

薬学的組成物の例としては、経口投与、局所投与または非経口投与用の、任意の固体組成物（錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤など）または液体組成物（溶液、懸濁液またはエマルジョン）が挙げられる。さらに、薬学的組成物は、必要であると見なされる場合、安定剤、懸濁剤、保存剤、界面活性剤などを含み得る。

【0229】

医薬において使用するために、c-MAF阻害剤は、単離されたものとして、またはさらなる活性剤とともに、プロドラッグ、塩、溶媒和化合物もしくは包接化合物の形態で見出され得、薬学的に許容され得る賦形剤とともに製剤化され得る。本発明におけるその使用にとって好ましい賦形剤としては、糖、デンプン、セルロース、ゴムおよびタンパク質が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の薬学的組成物は、固体の薬学的剤形（例えば、錠剤、カプセル剤、丸剤、顆粒剤、坐剤、液体の形態を得るために再構成され得る滅菌された結晶または無定形固体など）、液体の薬学的剤形（例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン、エリキシル剤、ローション、軟膏など）または半固体の薬学的剤形（ゲル、軟膏、クリームなど）として製剤化されるだろう。本発明の薬学的組成物は、経口経路、静脈内経路、筋肉内経路、動脈内経路、髄内（intramedullary）経路、鞘内経路、心室内経路（intraventricular router）、経皮的経路、皮下経路、腹腔内経路、鼻腔内経路、腸管経路、局所経路、舌下経路または直腸経路が挙げられるがこれらに限定されない任意の経路によって投与され得る。活性成分を投与するための種々の方法、使用されるべき賦形剤およびそれらの製造プロセスの概説は、Tratado de Farmacia Galenica, C. Fauli i Trillo, Luzan 5, S. A., 1993 EditionおよびRemington's Pharmaceutical Sciences (A. R. Gennaro, Ed.), 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA (2000)に見られる。薬学的に許容され得るキャリアの例は、当該分野において公知であり、それらとしては、リン酸緩衝食塩水溶液、水、エマルジョン（例えば、油／水エマルジョン）、種々のタイプの湿潤剤、滅菌された溶液などが挙げられる。前記キャリアを含む組成物は、当該分野で公知の従来のプロセスによって製剤化され得る。

【0230】

核酸（siRNA、siRNAもしくはshRNAをコードするポリヌクレオチド、またはネガティブc-MAFドミナントをコードするポリヌクレオチド）が投与される場合、本発明は、前記核酸を投与するために個々に調製された薬学的組成物を企図する。その薬学的組成物は、前記裸の核酸、すなわち、身体のヌクレアーゼによる分解から核酸を保護する化合物の非存在下の核酸を含み得、それは、トランスフェクションのために使用される試薬に関連する毒性が排除されるという利点を必要とする。裸の化合物に適した投与経路としては、血管内経路、腫瘍内経路、頭蓋内経路、腹腔内経路、脾臓内経路、筋肉内経路、網膜下経路、皮下経路、粘膜経路、局所経路および経口経路が挙げられる（Templeton, 2002, DNA Cell Biol., 21:857-867）。あるいは、それらの核酸は、コレステロールに結合体化された、または細胞膜を通過して転座を促進することができる化合物（例えば、HIV-1 TATタンパク質由来のTatペプチド、D. melanogasterアンテナペディアンタンパク質のホメオドメインの3番目のらせん、単純ヘルペスウイルスVP22タンパク質、アルギニンオリゴマー、およびWO07069090に記載されているようなペプチド）に結合体化された、リボソームの一部を形成して、投与され得る（Lindgren, A. ら、2000, Trends Pharmacol. Sci, 21:99-103、Schwarze, S. R. ら、2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48、Lundberg, M ら、2003, Mol Therapy 8:143-150およびSnyder, E. L. and Dowdy, S. F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393）。あるいは、そのポリヌクレオチドは、アデノ随伴ウイルスまたはレトロウイルス（例えば、マウス白血病ウイルス（MLV）またはレンチウイルス（HIV、FIV、EIAV）に基づくウイルス）において、プラスミドベクターまたはウ

イルスベクター、好ましくは、アデノウイルスベースのベクターの一部を形成して、投与され得る。

【0231】

c-MAF阻害剤またはそれらを含む薬学的組成物は、体重1キログラムあたり10mg未満、好ましくは、体重1kgあたり5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005または0.00001mg未満の用量で投与され得る。単位用量は、注射、吸入または局所投与によって投与され得る。

【0232】

用量は、処置される状態の重症度および応答に依存し、それは、数日間～数ヶ月間またはその状態が鎮静するまで、変動し得る。患者の身体におけるその薬剤の濃度を定期的に測定することによって、最適な投与量が決定され得る。動物モデルにおける事前のインビトロまたはインビボアッセイによって得られるEC50値から、最適な用量が決定され得る。単位用量は、1日に1回または1日に1回未満、好ましくは、2、4、8または30日ごとに1回未満で投与され得る。あるいは、開始用量の後、1回または数回の維持用量（通常、開始用量よりも少ない量）を投与することが可能である。維持レジメンは、0.01μg～1.4mg/kg体重/日、例えば、10、1、0.1、0.01、0.001または0.00001mg/kg体重/日の用量範囲での患者の処置を含み得る。維持用量は、好ましくは、5、10または30日ごとにせいぜい1回投与される。処置は、患者が罹患している障害のタイプ、その重症度および患者の状態に従って変動する時間にわたって継続されなければならない。処置の後、その疾患がその処置に応答しない場合、用量を増加すべきかどうか、またはその疾患の改善がみとめられる場合もしくは望まれない副作用がみとめられる場合、用量を減少させるかどうかを決定するために、患者の進行をモニターしなければならない。

【0233】

上昇したc-MAFレベルを有する、骨転移を伴う前立腺がん患者における骨分解の処置または予防

骨に転移しており、かつ上記転移においてc-MAFレベルが上昇している前立腺がん罹患している患者は、破骨細胞活性の上昇によって引き起こされる骨分解の予防を目指した治療から特に利益を得ることができる。

【0234】

したがって、別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患しており、かつ転移腫瘍組織サンプルにおいてコントロールサンプルと比較して上昇したc-MAFレベルを有する被験体における骨転移の予防および／または処置のための医薬製品の調製における、骨分解を回避するかまたは予防するための薬剤の使用に関する。

【0235】

あるいは、本発明は、前立腺がん罹患しており、転移性腫瘍組織サンプルにおいてコントロールサンプルと比較して上昇したc-MAFレベルを有する被験体において、骨転移の予防および／または処置における使用のための骨分解を回避するかまたは予防するための薬剤に関する。

【0236】

あるいは、本発明は、前立腺がん罹患しており、転移性腫瘍組織サンプルにおいて、コントロールサンプルと比較して上昇したc-MAFレベルを有する被験体における分解の予防および／または処置の方法であって、上記被験体に、骨分解を回避するかまたは予防するための薬剤を投与する工程を含む方法に関する。

【0237】

特定の実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

【0238】

用語および表現「被験体」、「前立腺がん」、「腫瘍サンプル」、「転移」、「c-MAF遺伝子」、「増加または上昇した発現レベル」、および「コントロールサンプル」は

、本発明の第1の方法に関して詳細に説明されており、骨分解を回避するまたは予防するための薬剤に等しく適用可能である。

【0239】

本発明において記載される治療方法に適した骨分解を回避または予防することができる薬剤は、個別化治療方法の文脈において上記に詳細に説明されている。

【0240】

参照またはコントロールサンプルは、転移に罹患していない前立腺がんを有する被験体の腫瘍サンプルまたは転移に罹患していない前立腺がんを有する被験体の生検サンプル中の腫瘍組織コレクションにおいて測定されたc-MAF遺伝子発現レベルの中央値に対応する腫瘍サンプルである。

10

【0241】

c-MAFレベルがコントロールサンプルと比較して上昇しているかどうかを決定または定量するための方法は、本発明の第1の方法との関連において詳細に説明されており、骨分解を回避するためまたは予防するための薬剤にも等しく適用可能である。

【0242】

あるいは、骨分解を回避するためまたは予防するための、上で述べられた薬剤のうちの2つ以上の薬剤が組合わされることにより転移が処置されるおよび／もしくは予防される組み合わせ処置が行われ得るか、または前記薬剤が、他のサプリメント（例えば、カルシウムまたはビタミンD）もしくはホルモンと組合わされ得る。

20

【0243】

骨分解を回避するためまたは予防するための薬剤は、代表的には、薬学的に許容され得るキャリアとともに投与される。用語「キャリア」およびキャリアのタイプは、c-MAF阻害剤、ならびにそれらが投与され得る形態および用量について上で定義されてきたが、骨分解を回避するためまたは予防するための薬剤にも等しく適用可能である。

【0244】

以下の実施例は、本発明を例証するものであって、その範囲を限定しない。

【0245】

本発明のキット

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している被験体における前記がんの骨転移を予測するためのキットに関し、そのキットは：a) 前記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための手段；およびb) 前記サンプル中の定量されたc-MAFの発現レベルを参照c-MAF発現レベルと比較するための手段を備える。

30

【0246】

別の態様において、本発明は、前立腺がんからの骨転移に罹患している被験体の臨床転帰を予測するためのキットに関し、そのキットは：a) 前記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための手段；およびb) 前記サンプル中の定量されたc-MAFの発現レベルを参照c-MAF発現レベルと比較するための手段を備える。

【0247】

別の態様において、本発明は、前立腺がん罹患している被験体に対する治療を決定するためのキットに関し、そのキットは：a) 前記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための手段；b) 前記サンプル中の定量されたc-MAFの発現レベルを参照c-MAF発現レベルと比較するための手段；およびc) 定量された発現レベルと参照発現レベルとの比較に基づいて、前記被験体において骨転移を予防するためおよび／または減少させるための治療を決定するための手段を備える。d) 定量された発現レベルと参照発現レベルとの比較に基づいて、前記被験体において骨転移を予防するためおよび／または減少させるための治療を除外するための手段。

40

【0248】

別の態様において、本発明は、i) 前立腺がん罹患している被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための試薬、およびii) 骨転移のリスクと相関するように予め決定されている1つまたは複数のc-MAF遺伝子発現レベル指標を備えるキッ

50

トに関する。

【0249】

16q23および16q22-24遺伝子座の増幅および転座を含む前記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための手段は、先に詳細に記載された。

【0250】

好ましい実施形態において、発現を定量するための手段は、c-MAF遺伝子に特異的に結合および／または増幅するプローブおよび／またはプライマーのセットを含む。

【0251】

特定の実施形態において、前立腺がんは、前立腺腺腫または前立腺小細胞癌（prostate small cell carcinoma cancer）である。

10

【0252】

特定の実施形態において、キットは、前立腺がん生検材料、循環前立腺がん細胞、循環前立腺腫瘍DNA（これらに限定されない）に適用される。

【0253】

本発明の方法の特定の実施形態のすべてが、本発明のキットおよびそれらの使用に適用可能である。

【0254】

前立腺がんに罹患している被験体のサンプルをタイプ分けするための方法

【0255】

別の態様において、本発明は、前立腺がんに罹患している被験体のサンプルをタイプ分けするためのインビトロでの方法に関し、その方法は：

20

a) 前記被験体からサンプルを提供する工程；

b) 前記サンプル中のc-MAFの発現レベルを定量する工程；

c) 定量されたc-MAFの発現レベルをc-MAF発現の所定の参照レベルと比較することによって前記サンプルをタイプ分けする工程；

を含み、ここで、前記タイプ分けは、前記被験体における骨転移のリスクに関する予後情報を提供する。

【0256】

16q23および16q22-24遺伝子座の増幅および転座を含む、前記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための手段は、先に詳細に記載された。

30

【0257】

好ましい実施形態において、サンプルは、腫瘍組織サンプル、循環腫瘍細胞または循環腫瘍DNAである。

【0258】

前立腺がんに罹患している被験体を分類するための方法

【0259】

別の態様において、本発明は、前立腺がんに罹患している被験体をコホートに分類するための方法に関し、その方法は：a) 前記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを決定する工程；b) 前記サンプル中のc-MAFの発現レベルをc-MAF発現の所定の参照レベルと比較する工程；およびc) そのサンプル中のc-MAFの前記発現レベルに基づいて、前記被験体をコホートに分類する工程を含む。

40

【0260】

16q23および16q22-24遺伝子座の増幅および転座を含む、前記被験体のサンプル中のc-MAFの発現レベルを定量するための手段は、先に詳細に記載された。

【0261】

特定の実施形態において、前立腺がんは、腺腫または小細胞癌である。

【0262】

好ましい実施形態において、サンプルは、腫瘍組織サンプル、循環腫瘍細胞または循環DNAである。

【0263】

50

好ましい実施形態において、前記コホートは、前記参照発現レベルと比較して、匹敵する c-MAF 発現レベルを有すると判定された少なくとも 1 つの他の個体を含む。

【0264】

別の好ましい実施形態において、前記サンプル中の c-MAF の前記発現レベルは、前記所定の参照レベルと比べて上昇しており、コホートのメンバーは、骨転移の上昇したリスクを有すると分類される。

【0265】

別の好ましい実施形態において、前記コホートは、臨床試験を行うためのコホートである。

【0266】

好ましい実施形態において、サンプルは、腫瘍組織サンプルである。

【実施例】

【0267】

骨特異的転移遺伝子の臨床上の関連性および予後値

【0268】

c-MAF を、骨転移もしくは内臓転移までの時間の臨床的註釈がこれまで公知であった 37 個の前立腺腫瘍生検材料を含む組織マイクロアレイ (TMA) において試験した。これら腫瘍は、全ての前立腺がんサブタイプおよびステージの代表である。c-MAF のレベルを、c-MAF 特異的抗体を使用する免疫組織化学 (IHC) によって決定し、c-MAF 発現のレベルと骨再発のリスクとの間の関連を、オッズ比 (OR) 計算によって確立した。OR は、2 つのバイナリーデータの間の関連の強さもしくは非独立性を説明する効果量の尺度である。OR は、Glas, A. S. “The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance” (2003) J. of Clinical Epidemiology 56: 1129-1135 に記載されている。オッズ比は、2 つのバイナリーデータ値 (目的の遺伝子に陽性もしくは陰性、骨転移に陽性もしくは陰性) の間の関連の強さもしくは非独立性を説明する。いくつかの実施形態において、オッズ比は、少なくとも約 1、1.2、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、もしくは 5 である。上記 TMA におけるこれらサンプルは、前立腺腫瘍に由来するパラフィン包埋した原発性腫瘍組織である。これらサンプルを、必要とされる関連臨床データと一緒に、および臨床委員会の承認を得て、通常の臨床診療の間に Vall d'Hebron Oncology Institute および Vall d'Hebron Hospital で集めた。

【0269】

以下の選択基準を満たすサンプルを選択した：

【0270】

5 つのサンプルは、診断時に局所的疾患 (M0) を有し、経過観察の任意の時点で骨再発が確認された患者に属した。

【0271】

29 のサンプルは、少なくとも 5 年後に無転移のままである診断時の患者に属した。

【0272】

残りの 3 つの腫瘍は、診断時に M0 であり、後に骨以外の位置に再発を有した患者由来のものである。

【0273】

実施例 1：

c-MAF 発現は、転移、特に骨転移のリスクに関連する。

免疫組織化学分析

【0274】

c-MAF 免疫染色を、TMA 上で行った。この TMA を、スライドガラス上に作り、IHC を、Dako Link Platform を使用してその Operating

10

20

30

40

50

Procedureに従って行った。

【0275】

簡潔には、免疫染色を、Dako Linkプラットフォームにおいて正に荷電したスライドガラス（Superfrostもしくは類似品）上に配置した3 μ m TMA腫瘍組織切片について行った。脱パラフィン処理した後、熱による抗原回復（heat antigen retrieval）を、pH 6.1、0.01mol/L シトレートベースの緩衝溶液（Dako）中で行った。内因性ペルオキシダーゼをクエンチした。マウスポリクローナル抗c-MAF抗体（Santa Cruz）1：100希釈物を、室温において30分間使用し、続いて、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgデキストランポリマー（Flex+, Dako）とともにインキュベートした。次いで、切片を3, 3'-ジアミノベンジジン（DAB）で可視化し、ヘマトキシリンで対比染色した。

10

【0276】

肺がんにおける転移および骨転移についてのc-MAFの予後値および予測値

c-MAF免疫染色を、コンピュータ処理されたアルゴリズムによってスコア付けした。各検体の9つの代表的な画像を、Nuance FX Multispectral Imaging System（CRI Inc）を備えたDM2000 Leica顕微鏡を使用して420～700nmにおいて10nm波長の間隔で取得した。ベールの法則の変換を使用して、参照キューブで除算したサンプルの比の負のlogを得ることによって、陽性シグナルを透過濃度から光学密度単位に変換した。コンピュータ支援閾値（computer-aided threshold）を設定した。それにより、すべての陽性シグナルを強調する疑似カラー画像が生成された。以前の解析によって、c-MAF発現の定量的測定が補助された。

20

【0277】

上皮細胞（正常および悪性）の核だけが、異なるサイズ閾値を設定することによって自動的に検出され、ストローマ細胞またはリンパ球の核はそうではなく、それらは、病理学者によって確認された。各症例について、統計解析のために目的の全領域のシグナル強度の平均値を算出した。

【0278】

前立腺がんにおける転移および骨転移についてのc-MAFの予後値および予測値

【0279】

前立腺がんの転移についてのc-MAF発現の予後値および予測値を評価した。c-MAFタンパク質レベルを免疫組織化学（IHC）によって決定した。MAF免疫染色を、コンピュータ処理された測定値によってスコア付けした。コンピュータ処理された測定値の出力によって、c-MAF発現について1160～99760の光学密度単位（O.D.）の範囲の連続データが生成された。標準的な手順により、受信者動作曲線に基づいて、高および低発現についてカットオフ（10000 O.D.）を決定した。

30

【0280】

結果を表3において概説する。

【表3】

表3 c-MAF タンパク質発現レベル

40

骨転移

c-MAF 発現	なし	あり
$\leq 10,000$ OD	21	2
$> 10,000$ OD	5	6

【0281】

この値に基づいて、c-MAF高グループ対低グループにおける骨転移に罹患するリスクのオッズ比は、OR（任意の時点の骨転移）= 12.60（95% C.I. 1.93～

50

82.09)であった。

【0282】

解析した第2のコホートに基づいて、我々はいくつかの診断の臨床的特徴を抽出した。c-MAFタンパク質の高レベル発現は、0.75の感度、0.81の特異度で、骨転移を予測する。

これは、表4においてまとめられ、信頼区間を含めパーセンテージで表される。

【表4】

表 4

		C.I.	95%
感度	75.0%	40.9%	92.9%
特異度	80.8%	62.1%	91.5%

10

【0283】

前立腺腫瘍におけるc-MAF遺伝子もしくはタンパク質発現は、任意の時点での転移、特に、骨転移のリスクがある集団を同定する。

【0284】

実施例2：16q22-24染色体領域の獲得(CNA, コピー数変化)は、骨転移のリスクと関連する。

20

本発明者らは、chr16q22-q24(c-MAFゲノム遺伝子座を含んでいた)の獲得が、前立腺がん患者における骨転移のリスクと関連するか否かを試験した。この目的のために、本発明者らは、この場合には、chr16q23およびchr14q32二重蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)プローブによってchr16q22-q24増幅を同定する方法を使用して、chr16q22-24領域のコピー数を測定した。本発明者らはまた、chr14q32プローブを使用して、腫瘍倍数性を正規化した。

【0285】

c-MAF遺伝子を含む16q22-24内の16q23のゲノム領域増幅の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)分析を、蛍光DM2000 Leica顕微鏡を使用してOperating Procedureに従って上記のTMAで行った。我々は、MAF遺伝子ゲノム領域の側面に位置し、およそ2.2Mbのギャップを有する、それぞれおよそ350kbである2つのセグメントから構成される、SpectrumOrangeプローブミックスを用いた。セントロメアのセグメントは、chr16:75729985-76079705に位置し(March 2006 assembly、UCSC Genome Browser)、テロメアのセグメントは、chr16:78290003-78635873に位置する(March 2006 assembly、UCSC Genome Browser)。このプローブは5つの遺伝子VAT1L、CLEC3A、WWOX、5srRNA、およびMAFの側面に位置する(セントロメアからテロメアの順)。

30

40

【0286】

簡潔には、MAF遺伝子を含む16q23領域増幅、およびIGH遺伝子を含む14q32コントロール領域を、標準的手順を使用して、TMAの5μm切片についてFISHによって決定した。脱パラフィン処理した組織切片を、0.2M HClで、その後チオシアン酸ナトリウムで処理して、塩沈殿物を除去した。予備処理したスライドを、10分間、プロテイナーゼKの溶液中で37℃においてインキュベートした。次いで、そのスライドを緩衝化ホルマリン中で後固定した。蛍光標識した16q23/14q32 DNAプローブを、78℃で5分間変性させ、37℃において一晩ホットプレート上でハイブリダイズさせた。2×SSC/0.3% Nonidet P40の溶液中で、2分間、72℃において洗浄を行った。組織切片を10μlの4,6-ジアミノ-2-フェニルイン

50

ドールで対比染色した（D A P I 対比染色）。

【0287】

結果を、蛍光DM2000 Leica顕微鏡で獲得し、Nuance FX Multispectral Imaging Systemで分析した。蛍光シグナル（16q23については赤色、コントロール14q32領域については緑色）のFISHスコア付けを、各場合について平均50の重複しない核の各領域コピー数を計数することによって行った。前立腺がんにおける骨転移との染色体16q22-24 CNA獲得関連性の予後値および予測値を評価した。核1つあたりのchr16q23およびchr14q32領域コピー数を、FISHによって決定した。各プローブシグナルの予測数は、核1つあたり2であった。14q32領域コピー数によって正規化した場合に、平均16q23プローブシグナルが1.5より大きかった場合に、増幅とみなした。

10

【0288】

結果を表5および表6にまとめる。

【0289】

【表5】

表5: 比 chr16q23/chr14q32 および転移のリスク。

腫瘍は、カットオフ $\geq$ 14q32 のコピー数によって正規化した 16q23 が

1.5 コピーに基づくと、16q22-24 CNA 獲得について陽性である。

20

転移

比 16q23/14q32	なし	あり
≤ 1.5	27	2
> 1.5	2	6

【0290】

【表6】

表6: 比 chr16q23/chr14q32 > または ≥ 1.5 および骨転移のリスクの予測。

腫瘍は、カットオフ $\geq$ chr14q32 のコピー数によって正規化した chr16q23 が

30

1.5 コピーに基づくと、chr16q22-24 CNA 獲得について陽性である。

骨転移

比 16q23/14q32	なし	あり
≤ 1.5	31	2
> 1.5	1	3

【0291】

これら値に基づいて、本発明者らは、chr16q22-24 獲得もしくはCNA獲得陽性群 対 陰性群において、転移および骨転移を被るリスクのオッズ比を計算した。この概算に基づくと、chr16q22-24 CNA陽性患者が転移を被るORは、40.50（95%CI 4.72~347.82）であり、14q32陽性患者を使用して正規化したchr16q22-24 CNA獲得 対 コントロールおよび骨転移のORは、46.50であった（95%CI 3.20~676.24）。コホートのサイズが小さいために概算は不正確であるが、各場合において95%信頼で最低4.72および3.20の臨床的に関連性のあるOR内であった。

40

【0292】

FISHによって分析したデータに基づいて、本発明者らは、いくつかの診断的臨床特徴を抽出した。Chr16q22-24 CNA獲得（ $\geq$ chr14q32 に対して正規

50

化して1.5 16q23コピー／細胞)は、感度0.75、特異度0.93で前立腺がんの転移リスクを推定する。パーセンテージで表されるこの結果は、95%信頼区間(C.I.)を含め、以下のように表7にまとめられる。

【表7】

表7 前立腺がんの転移リスクの推定のために Chr16q22-24 CNA 獲得

($\geq$ chr14q32 に対して正規化して1.5 16q23 コピー／細胞)に基づいた

診断的臨床特徴

		C.I.	95%	
感度	75.0%	40.9%	—	92.9%
特異度	93.1%	78.0%	—	98.1%

10

【0293】

FISHによって分析したデータに基づいて、本発明者らは、いくつかの診断的臨床特徴を抽出した。Chr16q22-24 CNA獲得($\geq$ chr14q32 に対して正規化して1.5 16q23 コピー／細胞)は、感度0.60、特異度0.97で前立腺がんの骨転移リスクを推定する。パーセンテージで表されるこの結果は、95%信頼区間(C.I.)を含め、以下のように表8にまとめられる。

【表8】

表8. 前立腺がんの骨転移リスクの推定のために Chr16q22-24 CNA 獲得

20

($\geq$ chr14q32 に対して正規化して1.5 16q23 コピー／細胞)に基づいた

診断的臨床特徴

		CI	95%	
感度	60.0%	23.1%	—	88.2%
特異度	96.9%	84.3%	—	99.4%

【0294】

前立腺腫瘍におけるchr16q22-24(および特に、chr16q23)CNA獲得は、任意の時点で転移および骨転移のリスクを強く推定し、かつ関連する。

30

【配列表】

[0006074049000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 K	31/47	(2006.01)	A 6 1 K	31/47	
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/00	G
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

(72)発明者 ゴミス, ロジェル
スペイン国 08021 バルセロナ, セ/ アベニル 35

(72)発明者 ジーンーマイレット, ジョエル
スペイン国 08017 バルセロナ, カレール ガジエル 29

審査官 松岡 徹

(56)参考文献 特開2007-145715 (JP, A)
特開2006-176542 (JP, A)
国際公開第2012/115885 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 Q 1/68
C 1 2 N 15/00- 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

专利名称(译)	使用c-MAF诊断，预后和治疗前列腺癌转移的方法		
公开(公告)号	JP6074049B2	公开(公告)日	2017-02-01
申请号	JP2015536237	申请日	2013-10-09
申请(专利权)人(译)	在生物运动Essey耶.		
当前申请(专利权)人(译)	在生物运动Essey耶.		
[标]发明人	ゴミスロジェル ジーンマイレットジョエル		
发明人	ゴミス, ロジェル ジーン-マイレット, ジョエル		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574 A61K45/00 A61P35/04 A61P19/00 A61K31/47 C12N15/113 C12N15/09		
CPC分类号	A61K31/47 A61K31/675 A61P19/00 A61P19/08 C12Q1/6886 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33 /57434 G01N2333/82 G01N2800/56 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/569 C12Q2600/112 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/574.A A61K45/00 A61P35/04 A61P19/00 A61K31/47 C12N15 /00.G C12N15/00.A		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
审查员(译)	松冈彻		
优先权	61/713318 2012-10-12 US		
其他公开文献	JP2016500517A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断或预测前列腺癌中的转移的方法，其包括确定c-MAF基因是否在原发性肿瘤样品中扩增。同样，本发明还涉及用于诊断或预测前列腺癌中的转移的方法，以及用于确定相对于其他器官中的转移发展骨转移的趋势的方法，其包括测定c-MAF表达水平。最后，本发明涉及c-MAF抑制剂作为治疗靶标用于治疗前列腺癌的用途。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特 許 公 報(B2)	(11) 特許番号 特許第6074049号 (P6074049)
(45) 発行日 平成29年2月1日(2017.2.1)	(24) 登録日 平成29年1月13日(2017.1.13)	
(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)	FI C12Q 1/68 ZNAA G01N 33/53 M G01N 33/574 A A61K 45/00 A61P 35/04	
請求項の数 35 (全 85 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2015-536237 (P2015-536237)	(73) 特許権者 S15097535	
(86) (22) 出願日 平成25年10月9日(2013.10.9)	インバイオモーション エセ、エレ、	
(65) 公表番号 特表2016-500517 (P2016-500517A)	スペイン国 O8021 ハルセロナ、	
(43) 公表日 平成28年1月14日(2016.1.14)	エントロ、 I 600、 アベニエダ	
(86) 国際出願番号 PCT/IB2013/002866	ディアゴナル	
(87) 国際公開番号 W02014/057357	(74) 代理人 100078282	
(87) 国際公開日 平成26年4月17日(2014.4.17)	弁理士 山本 秀策	
審査請求日 平成27年5月29日(2015.5.29)	(74) 代理人 100113413	
(31) 優先権主張番号 61/713,318	弁理士 森下 夏樹	
(32) 優先日 平成24年10月12日(2012.10.12)	(74) 代理人 100181674	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 飯田 貴敏	
早期審査対象出願	(74) 代理人 100181641	
	弁理士 石川 大輔	
	(74) 代理人 230113332	
	弁理士 山本 健策	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 c-MAFを用いた前立腺がん転移の診断、予後診断および処置のための方法