

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-533458

(P2013-533458A)

(43) 公表日 平成25年8月22日(2013.8.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Z N A P	2 G O 4 5
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 16/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/00	4 B O 6 3
<b>A O 1 K 67/027 (2006.01)</b>	A O 1 K 67/027	4 C O 8 4
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-505450 (P2013-505450)	(71) 出願人	591100596
(86) (22) 出願日	平成23年4月19日 (2011.4.19)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
(85) 翻訳文提出日	平成24年12月17日 (2012.12.17)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/056211		ディカル
(87) 国際公開番号	W02011/131652		フランス国 7 5 6 5 4 パリ セデック
(87) 国際公開日	平成23年10月27日 (2011.10.27)		ス 1 3 リュ ドゥ トルビアック 1 0
(31) 優先権主張番号	10305402.9		1
(32) 優先日	平成22年4月19日 (2010.4.19)	(74) 代理人	110001508
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		特許業務法人 津国
		(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100131808
			弁理士 柳橋 泰雄
		(74) 代理人	100119079
			弁理士 伊藤 佐保子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌におけるホルモンエスケープのマーカーとしてのC X C L 5

## (57) 【要約】

本発明は、前立腺癌細胞におけるホルモンエスケープを評価するためのマーカーとしてのC X C L 5の使用に関する。本発明はさらに、前立腺癌細胞におけるホルモンエスケープを評価するための診断法およびキット、並びに、前立腺癌および/または前立腺癌におけるホルモンエスケープの処置または予防に使用するためのC X C L 5アンタゴニストを提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

前立腺癌に罹患している患者におけるホルモンエスケープを評価するための *in vitro* における方法であって、

a) 前記患者の生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルを測定する工程 ; および

b) 工程 ( a ) で測定された量および / またはレベルを、ネガティブコントロール試料で測定された C X C L 5 の量および / またはレベルと比較する工程

を含み、前記ネガティブコントロール試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルと比較して、前記生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルの増加の検出は、前立腺癌細胞がホルモンエスケープを受けていることを示し、これにより前記患者におけるホルモンエスケープを評価する、前記方法。

10

## 【請求項 2】

少なくとも 2 倍の増加は、前立腺癌細胞がホルモンエスケープを受けていることを示す、請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

前記個体に対する処置レジメンを設計する工程をさらに含む、請求項 1 または 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

工程 ( a ) および ( b ) は、前記患者におけるホルモンエスケープの開始をモニタリングするためにおよび / または薬物に対する前記患者の応答性をモニタリングするために、少なくとも 2 つの異なる時点において繰り返される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

20

## 【請求項 5】

工程 ( a ) の測定が、免疫化学、E l i s a または R T - P C R によって実施される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 6】

前記生物学的試料が、前立腺組織、前立腺細胞、血清および尿からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 7】

i . C X C L 5 の量および / または発現レベルを検出するための手段 ; および  
i i . アンドロゲン非依存性前立腺癌に罹患している個体における C X C L 5 の量および / または発現レベルを示すポジティブコントロール試料 ; および / または  
i i i . アンドロゲン依存性前立腺癌に罹患している個体における C X C L 5 の量および / または発現レベルを示すネガティブコントロール試料  
を含む、前立腺癌に罹患している患者におけるホルモンエスケープを評価するためのキット。

30

## 【請求項 8】

アンドロゲン非依存性前立腺癌および / または前立腺癌におけるホルモンエスケープの治療または予防において使用するための C X C L 5 アンタゴニスト。

40

## 【請求項 9】

前記 C X C L 5 アンタゴニストが、C X C L 5 のドミナントネガティブ突然変異体、小分子、アンチセンス R N A、干渉 R N A、アプタマー、ペプチドおよび抗体からなる群より選択される、請求項 8 記載のアンタゴニスト。

## 【請求項 10】

前記 C X C L 5 アンタゴニストが、干渉 R N A および抗体からなる群より選択される、請求項 8 記載のアンタゴニスト。

## 【請求項 11】

a) 試験化合物を準備する工程 ; および

b) 前記試験化合物が C X C L 5 の生物学的活性を阻害するかどうかを決定する工程

50

を含み、前記試験化合物が C X C L 5 の生物学的活性を阻害するという決定は、前記試験化合物が、アンドロゲン非依存性癌の治療または予防のための薬物であることを示す、アンドロゲン非依存性癌の処置のための薬物についてスクリーニングする in vitro における方法。

【請求項 1 2】

前立腺癌におけるホルモンエスケープを評価するためのマーカーとしての C X C L 5 の使用。

【請求項 1 3】

アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞のための細胞モデルとしての前立腺癌細胞から誘導された組換え細胞株の使用であって、前記組換え細胞株のゲノムは、C X C L 5 を含む発現ベクターを含むことを特徴とする、前記使用。

10

【請求項 1 4】

請求項 1 3 において定義したような組換え細胞株を含む非ヒト動物。

【請求項 1 5】

アンドロゲン非依存性前立腺癌のためのモデルとしての請求項 1 4 の非ヒト動物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前立腺癌細胞におけるホルモンエスケープを評価するためのマーカーとしての C X C L 5 の使用に関する。本発明はさらに、前立腺癌細胞におけるホルモンエスケープを評価するための診断法およびキット、並びに、前立腺癌および/または前立腺癌におけるホルモンエスケープの処置または予防に使用するための C X C L 5 アンタゴニストを提供する。

20

【0002】

前立腺癌は、世界中でかなりの罹患率および死亡率を引き起こす疾病である。最も広まっている形態は前立腺腺癌である。米国だけで、毎年、約 219,000 の新たな前立腺腺癌の症例があり、前立腺腺癌に起因して約 27,000 人が死亡している。前立腺腺癌によるこれらの死亡の実質的に全ては、ホルモン抵抗性（アンドロゲン非依存性）疾病を有する男性に起こる。

30

【0003】

ホルモンエスケープは前立腺癌処置における大きな問題である。なぜなら、それは抗アンドロゲン物質を用いて処置された大半の患者に対して、14カ月から30カ月の一定の期間の後に生じるからである。

【0004】

実際に、前立腺癌は、アンドロゲン性ステロイドの影響下で発達および進行する悪性疾患である。種々の形態のアンドロゲン枯渇療法が、手術がもはや効果的な処置選択肢ではない前立腺癌と診断された患者を処置するために使用される。前立腺癌患者のためのアンドロゲン枯渇療法の有効性は、腫瘍細胞の増殖を抑制し、そしてこれらの細胞の少なくとも何分の一かのアポトーシスを誘導するその能力に基づく。しかしながら、必然的に、アンドロゲン枯渇療法を生き延びた残った前立腺腫瘍細胞は、ホルモン難治性であると考えられる状態にまで進行する。なぜなら、その増殖および生存はもはや、処置患者のアンドロゲン枯渇環境においては抑制されないからである。別の言葉で言えば、これらの細胞においてホルモンエスケープが起こった。ホルモンエスケープの発生は、前立腺癌の高い罹患率および死亡率に関連する。

40

【0005】

Araki et al. (2007 Cancer Res. 67:6854-62) は、I L - 8 ( C X C L 8 ) がアンドロゲン非依存性前立腺癌の増殖および進行の分子決定基であることを教義し、そして、I L - 8 アンタゴニストを、アンドロゲン非依存性前立腺癌の処置のための化学療法の脈絡で使用し得ることを示唆する。しかしながら、Araki et al. (2007) は、この結論が最終的

50

にはインターロイキンファミリーの他のメンバーにまで拡張され得ることを教義も示唆もしていない。

【0006】

Begley et al. (2008 Neoplasia. 10:244-54)は、CXCL5の発現が、前立腺腫瘍の進行と一致して増加することを教義している。しかしながら、Begley et al. (2008)は、CXCL5の発現が、アンドロゲン依存性の原因または結果であるかどうかの教義はしていない。特に、Begley et al. (2008)は、CXCL5がホルモンエスケープの開始に役割を果たすという教義も示唆もしていない。逆に、Begley et al. (2008)は、アンドロゲン非依存性機序が、CXCL5により媒介される前立腺癌細胞の増殖応答に關与することを示唆している。

10

【0007】

それ故、前立腺癌に罹患している患者におけるホルモンエスケープの開始を評価し、そしてホルモンエスケープが行なわれた患者を処置するのに効率的である薬物を同定する必要性がある。

【0008】

発明の説明

CXCL5ケモカインは、グレードの高い前立腺腫瘍の上皮細胞において高度に発現されていることが判明した。さらに、侵襲性の前立腺癌細胞株は、より悪性度の低い前立腺癌細胞株よりも高いレベルのCXCL5を産生する。このより高い発現は、CXCL5遺伝子プロモーターのより高い転写活性に起因することがさらに示された。

20

【0009】

研究は、アンドロゲンレセプター(AR)陽性の前立腺癌細胞株CWR-R1を用いて行なわれた。CWR-R1細胞をCXCL5 cDNAを用いてトランスフェクションし、そしてCXCL5 cDNAを安定に発現しているクローンを単離した。CXCL5の発現は、in vitroにおいて細胞の増殖を増加させ、そして細胞がプラスチック皿に付着する能力を低下させたことが驚くべきことに判明した。さらに、CXCL5の発現は、in vivoにおいてこれらの細胞に壮観な増殖を付与した。

【0010】

CXCL5遺伝子はアンドロゲンにより調節されていることが驚くべきことに判明した。実際に、アンドロゲンを除去するとその発現はアップレギュレーションされ、一方、アンドロゲンの添加はその発現を減少させた。さらに、抗アンドロゲン物質のビカルタミドを用いてCWR-R1を処置すると、CXCL5の増加した発現がもたらされた。

30

【0011】

CXCL5によるCWR-R1細胞の処理は、in vitroにおいてビカルタミドの存在下においてさえも細胞の増殖を増加させた。これはin vivoにおいて確認された。実際に、野生型CWR-R1細胞はアンドロゲンの非存在下において増殖できない。これとは対照的に、CXCL5の存在は、CWR-R1細胞の腫瘍取り込みを可能とした。さらに、CWR-R1-CXCL5腫瘍を有する動物を去勢すると、ホルモンエスケープが生じ、一方、野生型CWR-R1細胞はホルモンエスケープを受けることができなかった。

【0012】

血清中CXCL5レベルが腫瘍のそのレベルと一致することがさらに判明し、このことは本発明の脈絡において、CXCL5レベルを前立腺細胞ではなく血清中で測定し得ることを実証する。ヒトにおいて、CXCL5はまた患者の血清および尿中においても検出され得る。

40

【0013】

さらに、CXCL5活性の遮断は、その分裂促進効果を強く減少させることが判明した。

【0014】

要約すると、CXCL5は、前立腺癌細胞のホルモンエスケープに關与する、アンドロゲンにより調節される遺伝子であることが判明した。従って、CXCL5は、前立腺癌に

50

おけるホルモンエスケープに対するマーカー、および前立腺癌の処置のための治療標的を構成する。

【0015】

定義

「CXCL5」という用語は、C-X-Cモチーフケモカイン5を指す。ヒトCXCL5のアミノ酸配列は配列番号1（スイスプロットアクセションナンバーP42830）として示される。「CXCL5」という用語は、配列番号1のタンパク質（完全長および成熟アイソフォーム）並びに他の種におけるその相同体、タンパク質分解プロセッシングによって得られたその変異体、そのスプライス変異体およびその対立遺伝子変異体を包含する。

10

【0016】

本明細書において使用する「前立腺癌」という用語は、前立腺組織に位置する任意のタイプの悪性（すなわち良性ではない）腫瘍、例えば、前立腺腺癌、前立腺肉腫、未分化前立腺癌、前立腺扁平上皮癌、前立腺導管移行性癌および前立腺上皮内新生物を指す。前立腺癌は、好ましくは、前立腺の腺癌に対応する。

【0017】

前立腺癌は、好ましくは、「アンドロゲン非依存性前立腺癌」、すなわち、ホルモン難治性および非応答性として臨床的に定義されている前立腺癌に対応する。

【0018】

「処置法」によって、疾病に罹患している個体の状態を治癒、改善および/または寿命を延ばすことを目的とした方法を意味する。

20

【0019】

「予防法」によって、疾病の発生を予防することを目的とした方法を意味する。

【0020】

「生物学的試料」という用語は、任意のタイプの生物学的試料を指す。生物学的試料は、例えば、前立腺組織または前立腺細胞、最も好ましくは上皮前立腺癌細胞に対応し得、これは例えば手術による切除または生検によって得ることができる。ケモカインは分泌されているので、それらを直接的に生物学的液体中において検出することができる。例えば、CXCL5を患者の血清中および尿中において検出することができる（実施例9参照）。それ故、生物学的試料は、好ましくは、生物学的液体、例えば血液、血漿、血清、尿、精液またはリンパ液に対応する。特に、実施例7に示したように、血清中CXCL5レベルは、CXCL5の腫瘍内発現に相関する。さらに、従来技術からのデータは、前立腺癌に罹患している患者の血清中または血漿中のCXCL5発現レベルの変動を検出することができることを確認する(Sung et al. Cancer Res. 2008 Dec 1;68(23):9996-10003, et Macoska et al. Prostate. 2008 Mar 1;68(4):442-52)。従って、生物学的試料は最も好ましくは血漿または血清に対応する。

30

【0021】

前立腺に由来する細胞が少数でこのような生物学的液体中に見られることを注記し得る。従って、生物学的液体を場合により前立腺に由来する組織または細胞について濃縮し得る。前立腺細胞の濃縮は、例えば、前立腺特異的抗原（PSA）または前立腺特異的膜抗原（PSMA）に対して指向される抗体などの前立腺選択的抗体を使用した蛍光活性化細胞選別（FACS）などの細胞選別法を使用して達成され得る。あるいは、濃縮は、このような前立腺特異的抗体、例えば抗PSA抗体でコーティングされた、磁気ビーズまたは他の固相支持体、例えばカラムを使用して達成され得る。

40

【0022】

「抗体」は、完全な免疫グロブリン分子だけでなく、抗原結合部位を保持したそのフラグメント、例えばFab、F(ab')<sub>2</sub>、Fvおよびその他のフラグメントも含むことを意味する。「抗体」という用語はまた、一本鎖Fv分子(scFv)および単一ドメイン抗体(dAbs)などの抗体の遺伝子工学された誘導体も含む。この用語はさらに、ファージディスプレイ技術または分子のための他のランダム選択技術を使用して産生され得

50

る、抗体様分子を含む。この用語は、全てのクラスの抗体、およびより具体的には I g G、I g A、I g M、I g D および I g E を含む。抗体はポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体であれば好ましい。「モノクローナル抗体」という用語は、唯一つのタイプの抗原を認識する抗体を指す。「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマによって産生される抗体 (Kohler and Milstein 1975 Nature 256:495-7) および遺伝子工学を通して得られる組換え抗体の両方を包含する。より具体的には、モノクローナル抗体は、例えばファージディスプレイ (Vaughan et al. 1998 Nat Biotechnol. 16:535-9) またはトランスジェニック技術 (Lonberg 2005 Nat Biotechnol. 23:1117-25) によって産生され得る、キメラ抗体 (Boulianne et al. 1984 Nature 312:643-6)、ヒト化抗体 (Jones et al. 1986 Nature 321:522-5) および完全ヒト抗体を包含する。抗体をヒト患者に投与しようとするならば、モノクローナル抗体は完全なヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体であれば好ましい。

10

## 【0023】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、抗体フラグメントから形成される F v、F a b、F ( a b ' ) 2、F a b '、d s F v、s c F v、s c ( F v ) 2、ディアボディおよび多重特異的抗体を含む。「F a b」という用語は、約 50,000 の分子量および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを示し、I g G をプロテアーゼのパパインで処理することによって得られるフラグメントの中で、H 鎖の N 末端側の約半分と完全な L 鎖が、ジスルフィド結合を通して共に結合している。

20

## 【0024】

「F ( a b ' ) 2」は、I g G をプロテアーゼのパプシンで処理することによって得られるフラグメントの中で、ヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合した、F a b よりも僅かに大きい、約 100,000 の分子量および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを指す。

## 【0025】

「F a b '」という用語は、F ( a b ' ) 2 のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することによって得られる、約 50,000 の分子量および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを指す。

## 【0026】

一本鎖 F v (「s c F v」) ポリペプチドは、ペプチドをコードするリンカーによって連結された V H および V L をコードする遺伝子を含む遺伝子融合体から通常発現される、共有結合した V H : : V L ヘテロダイマーである。本発明のヒト s c F v フラグメントは、好ましくは遺伝子組換え技術を使用することによって、適切なコンフォメーションに保持された C D R を含む。

30

## 【0027】

「d s F v」は、ジスルフィド結合によって安定化された V H : : V L ヘテロダイマーである。二価および多価抗体フラグメントは、一価 s c F v s の会合によって自発的に形成され得るか、または二価 s c ( F v ) 2 などのペプチドリンカーによって一価 s c F v s をカップリングすることによって生成され得る。

40

## 【0028】

「ジアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを指し、このフラグメントは、同じポリペプチド鎖 (V H - V L) において軽鎖可変ドメイン (V L) に接続された重鎖可変ドメイン (V H) を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間で対を形成するには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対を形成させ、そして2つの抗原結合部位を作る。

## 【0029】

「s i R N A」という用語は、二本鎖の中の R N A 鎖のいずれかに相同な m R N A 配列を分解するように作用し、そして細胞、例えば哺乳動物細胞 (ヒト細胞を含む) および身体、例えば哺乳動物の身体 (ヒトを含む) において特定の遺伝子の転写後サイレンシング

50

を引き起こし得る、低分子干渉RNAを指す。RNA干渉の現象は、例えば、Bass (2001 Nature 411:428-29)、Elbahir et al. (2001 Nature 411: 494-98)、Fire et al. (1998 Nature 391:806-11)およびWO 01/75164に記載および考察されており、ここでは干渉RNAを作製する方法も考察されている。本明細書において開示した遺伝子産物をコードする配列および核酸に基づいたsiRNAは典型的には、100より少ない塩基対を有し、そして例えば約30塩基対またはより短くあり得、そして相補的DNA鎖の使用を含む当技術分野において公知のアプローチまたは合成アプローチによって作製され得る。siRNAは干渉を引き起こすことができ、そして細胞、例えば哺乳動物細胞(ヒト細胞を含む)および身体、例えば哺乳動物の身体(ヒトを含む)において特定の遺伝子の転写後サイレンシングを引き起こし得る。本発明による例示的なsiRNAは、30、25、22、20、15、10または5ヌクレオチドまでの長さ、またはそのあたりまたはその間の任意の整数の長さを有し得る。最適な抑制性siRNAを設計するためのツールは、DNAengine Inc. (Seattle, Washington, USA)およびAmbion, Inc. (Austin, Texas, USA)から入手できるものを含む。

10

#### 【0030】

「shRNA」(すなわち「ショートヘアピンRNA」という用語は、タイトなヘアピンターンを作り、そしてRNA干渉を介して遺伝子発現をサイレンスするために使用される、RNA配列を指す。shRNAはウイルスベクターを用いて、一般的にはレンチウイルスベクターを用いて細胞に導入され、よってそれらは通常、細胞のゲノムに組み込まれる。それ故、それらは娘細胞まで継代され、遺伝子サイレンシングが遺伝されることが可能となる。shRNA構築物は一般に、RNAが確実に合成されるためのプロモーターを含む。一旦産生されると、shRNAヘアピン構造は細胞機械によって切断されてsiRNAとなり、これはその後、前記の機序に従って遺伝子発現をサイレンスし得る。

20

#### 【0031】

別個の意味を有するが、「含む(comprising)」、「有する」、「含む(containing)」および「からなる」という用語は本明細書全体を通して同義語として使用され、そして互いに置き換え得る。

#### 【0032】

本発明による診断法および使用

CXCL5ケモカインは、グレードの高い前立腺腫瘍の上皮細胞において高度に発現されていることが判明した。さらに、驚くべきことに、CXCL5は、前立腺癌細胞のホルモンエスケープに關与する、アンドロゲンにより調節される遺伝子であることが判明した。最後に、前立腺癌細胞におけるCXCL5の過剰発現がホルモンエスケープを誘導することがin vivoのマウスにおいて実証された。全体として、これらのデータは、アンドロゲンによって調節されそしてその過剰発現がホルモンエスケープに至る、CXCL5は、前立腺癌におけるホルモンエスケープに重要な役割を果たしていることを示す。

30

#### 【0033】

それ故、本発明の局面は、前立腺癌におけるホルモンエスケープを評価するためのマーカーとしてのCXCL5の使用に關する。増加した量および/または増加した発現レベルのCXCL5は、ホルモンエスケープを示す。

40

#### 【0034】

「マーカーとして使用」によって、in vitroでの使用を意味し、CXCL5が例えばリガンド、抗体、プローブおよび/またはプライマーを使用して検出される。それ故、本発明はまた、前立腺癌におけるホルモンエスケープを評価するための、生物学的試料中のCXCL5を検出するための手段の使用にも關する。前記の生物学的試料は、前立腺癌に罹患している個体から、または罹患している可能性のある個体から前もって採取された。

#### 【0035】

1つの態様において、CXCL5は、少なくとも1つの他のケモカイン、例えばCXCL8などと組み合わせて使用される。

#### 【0036】

50

本発明はさらに、アンドロゲン非依存性前立腺癌を診断するための *in vitro* における方法に関し、

a) 前立腺癌に罹患しているまたは罹患している可能性のある個体の生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルを測定する工程 ;

b) 工程 ( a ) で測定された量および / または発現レベルを、ネガティブコントロール試料で測定された量および / またはレベルと比較する工程

を含み、前記のネガティブコントロール試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルと比較して、前記生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルの増加の検出は、前記個体が、アンドロゲン非依存性前立腺癌に罹患している可能性があることを示す。

10

【 0 0 3 7 】

C X C L 5 の発現はホルモンエスケープに相関しているので、本発明はまた、前立腺癌に罹患している患者におけるホルモンエスケープを評価するための *in vitro* における方法に関し、

a) 前記患者の生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルを測定する工程 ; および

b) 工程 ( a ) で測定された量および / またはレベルを、ネガティブコントロール試料中で測定された C X C L 5 の量および / またはレベルと比較する工程

を含み、前記のネガティブコントロール試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルと比較して、前記生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルの増加の検出は、前立腺癌細胞がホルモンエスケープを受けていることを示し、これにより前記患者におけるホルモンエスケープを評価する。

20

【 0 0 3 8 】

前記増加 ( あれば ) は好ましくは統計学的に有意である。生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルが、ネガティブコントロール試料中の量および / またはレベルと比較して、少なくとも 5 0 % 、好ましくは少なくとも 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 または 1 0 倍増加する場合に、増加は統計学的に有意であると判断する。

【 0 0 3 9 】

特定の態様において、本発明による方法は、

a) 前記患者の生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルを測定する工程 ; および

b) 工程 ( a ) で測定された C X C L 5 の量および / または発現レベルを、ネガティブコントロール試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルと比較する工程 ;

c) 前記生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルが、前記のネガティブコントロール試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルと比較して増加しているかどうかを決定する工程

を含み、増加した量および / または発現レベルは、前立腺癌細胞がホルモンエスケープを受けていることを示し、これにより前記患者におけるホルモンエスケープを評価する。

30

【 0 0 4 0 】

本明細書全体を通して使用する「コントロール試料」という用語は、既知量の C X C L 5 を含む試料、または健康であることが知られるもしくは前立腺癌に罹患していることが知られる個体から採取した試料を指す。このようなコントロール試料は、例えば、個体群において決定された C X C L 5 の平均量に対応する既知量の C X C L 5 を含み得る。C X C L 5 は、コントロール試料内で、例えばポリペプチド、DNA、RNA、cDNA または mRNA として存在し得る。

40

【 0 0 4 1 】

コントロール試料は、ポジティブコントロール試料またはネガティブコントロール試料のいずれかに対応し得る。

【 0 0 4 2 】

「ポジティブコントロール試料」は、例えば、アンドロゲン非依存性前立腺癌に罹患し

50

ている個体に見られる C X C L 5 の量を示す、C X C L 5 の量を含み得る。

【 0 0 4 3 】

「ネガティブコントロール試料」は、例えば、健康個体（すなわち前立腺癌に罹患していない個体）に見られる C X C L 5 の量、またはアンドロゲン依存性前立腺癌に罹患している個体における C X C L 5 の量のいずれかを示す、C X C L 5 の量を含み得る。

【 0 0 4 4 】

C X C L 5 の量および / または発現レベルを測定するための方法は当技術分野において周知である。量および / または発現レベルは、m R N A を定量することによって、またはタンパク質を定量することによってのいずれかにより測定され得る。適切な方法としては、例えば、免疫化学、E l i s a、ウェスタンブロット、フローサイトメトリー、ノザンブロット、P C R（例えば R T - P C R）、リガーゼ連鎖反応（L C R）、転写増幅法（T M A）、相補鎖置換増幅法（S D A）および核酸配列ベース増幅法（N A S B A）が挙げられる。

10

【 0 0 4 5 】

好ましい態様において、C X C L 5 の量および / または発現レベルは、E l i s a によって、例えば化学発光 E l i s a アッセイを通して測定される。このアッセイは、例えば、実施例 1 の 1 5 段落に記載の通りに実施され得る。簡潔に言うと、このアッセイは、

- マイクロタイタープレートを、抗 C X C L 5 抗体（例えばポリクローナル抗ヒト C X C L 5 A b、例えば R & D Systems の M A B 2 5 4）でコーティングする工程；
  - 前記マイクロタイタープレートを洗浄する工程；
  - 生物学的試料を加える工程；
  - マイクロタイタープレートを洗浄する工程；
  - ビオチニル化抗 C X C L 5 抗体（例えばビオチニル化ポリクローナル抗ヒト C X C L 5 A b、例えば R & D Systems の B A F 2 5 4）を加える工程；
  - 前記マイクロタイタープレートを洗浄する工程；
  - ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ（例えば BD Pharmingen 製）を加える工程；
  - マイクロタイタープレートを洗浄する工程；
  - 発光基質（例えば C S P D（登録商標）1, 2 - ジオキセタン発光基質）を加える工程；および
  - 発光を読み取る工程（例えば Centro LB960 Berthold ルミノメーターで）
- を含み得る。

20

30

【 0 0 4 6 】

本発明による前記方法はさらに、前記個体のための処置レジメンを設計する工程を含み得る。適切な処置レジメンの選択は、工程（a）で測定された量および / またはレベルに基づき、これは前立腺癌のアンドロゲン依存性を示す。前立腺癌がアンドロゲン依存性であるならば、臨床医はアンドロゲン療法を選択し得る。一方、前立腺癌がアンドロゲン非依存性であるならば、臨床医は化学療法を選択し得る。これらの療法は、追加的に放射線療法および / または手術と組合せ得る。

【 0 0 4 7 】

高いレベルの C X C L 5 は、前立腺癌が重度であることを示す。それ故、このような癌細胞を有する患者は、積極的な化学療法によって処置される必要がある。従って、本発明は、積極的な化学療法によって処置されるに適した前立腺癌に罹患している患者を選択するための方法に関し、これは、前記患者からの生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルを測定する工程、並びに C X C L 5 の高い量および / または発現レベルが工程（a）で測定されたならば患者を選択する工程を含む。

40

【 0 0 4 8 】

「C X C L 5 の高い量および / または発現レベルを有する患者」によって、ネガティブコントロール試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルよりも少なくとも 5 0 % 高い、好ましくは少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 倍高い、C X C

50

L 5 の量および / または発現レベルを有する患者を意味する。

【 0 0 4 9 】

「積極的な化学療法」によって、悪性度の高い癌を処置するに適した化学療法を意味する。特に、このような積極的な化学療法は第 2 選択の処置であり、これは副作用を誘導し得、それ故、悪性度が高くない癌の場合には好ましい処置レジメンを構成しない。積極的な化学療法は、典型的には、高用量の薬物を用いて行なわれる組合せ化学療法に対応する。このような第 2 選択の処置は、シクロホスファミド (Astra Medica)、5 - フルオロウラシル (Schering Health Care、Cambridge Laboratories)、ビンクリスチン (Eli Lilly)、シスプラチンおよびエピルピシン (Pharmacia)、リン酸エストラムスチン (Pharmacia、Pierre Fabre)、ピノレルピン (Pierre Fabre)、パクリタキセル (Bristol-Myers Squibb) およびドセタキセル (Sanofi-Aventis) などの薬物を用いて行なわれる化学療法を含む。

10

【 0 0 5 0 】

本発明による前記方法を少なくとも 2 回の異なる時点において繰り返し、患者におけるホルモンエスケープをモニタリングおよび / または処置に対する患者の応答性をモニタリングし得る。例えば、患者の長期処置の脈絡では、生物学的試料を一定の間隔で患者から採取し得る (例えば毎月、2 か月毎または 1 年に 2 回)。

【 0 0 5 1 】

処置に対する患者の応答性をモニタリングする脈絡では、生物学的試料を、好ましくは、患者の処置の開始前および開始後に採取する。

20

【 0 0 5 2 】

より具体的には、本発明は、薬物に対する、前立腺癌に罹患している患者の応答性をモニタリングするための *in vitro* における方法に関し、前記方法は、

a) 前記薬物を用いて前記患者を処置する前および後に、前記患者の生物学的試料中の C X C L 5 の量および / または発現レベルを測定する工程 ;

b) 工程 ( a ) で測定された量および / または発現レベルを比較する工程 ; および場合により

c) 前記の量および / または発現レベルの差異を、前記患者を処置するための薬物の有効性と相関させる工程を含む。

30

【 0 0 5 3 】

処置開始前の量および / または発現レベルと比較した、処置開始後の量および / または発現レベルの増加は、ホルモンエスケープが起こっており、そして前記薬物は前記患者を処置するのに効果的ではないことを示す。逆に、工程 ( b ) で量および / または発現レベルの有意な差異が見られなければ、または工程 ( b ) で減少が見られれば、患者は前記薬物に応答し、そして薬物は前記患者を処置するのに効果的である。

【 0 0 5 4 】

本発明によるキット

本発明はさらに、前記方法において有用であるキットを開示する。このようなキットは、C X C L 5 の量および / または発現レベルを検出するための手段を含む。

40

【 0 0 5 5 】

それらは、例えば、アンドロゲン非依存性前立腺癌を診断するために、前立腺癌に罹患している患者におけるホルモンエスケープを評価するために、処置レジメンを設計するために、前立腺癌の進行をモニタリングするために、および / または前立腺癌に罹患している患者におけるホルモンエスケープの開始をモニタリングするために、薬物に対する応答性をモニタリングするために、および / または前立腺癌に罹患している患者の処置を調整するために使用され得る。

【 0 0 5 6 】

キットはさらに、C X C L 5 以外のケモカインの量および / または発現レベルを検出するための手段、例えば、C X C L 8 の量および / または発現レベルを検出するための手段

50

などを含み得る。

【0057】

好ましい態様において、本発明によるキットは、C X C L 5 の量および / または発現レベルを検出するための手段に加えて、前立腺癌に罹患している個体における C X C L 5 の量および / または発現レベルを示すコントロール試料を含む。

【0058】

本発明によるキットは、例えば、C X C L 5 の量および / または発現レベルを検出するための手段に加えて、以下の ( i ) ~ ( i v ) :

i . アンドロゲン非依存性癌に罹患している個体における C X C L 5 の量および / または発現レベルを示すポジティブコントロール試料 ;

i i . 健康個体における C X C L 5 の量および / または発現レベルを示すネガティブコントロール試料 ;

i i i . アンドロゲン依存性癌に罹患している個体における C X C L 5 の量および / または発現レベルを示すネガティブコントロール試料 ; および / または

i v . 前立腺癌を診断する、前立腺癌の重度を評価するおよび / または前立腺癌におけるホルモンエスケープの開始を評価する上での、前記キットの使用説明書を含み得る。

【0059】

このようなキットは、例えば、( i ) および ( i i )、( i ) および ( i i i )、( i ) および ( i v )、( i i ) および ( i i i )、( i i ) および ( i v )、( i i i ) および ( i v )、( i )、( i i ) および ( i i i )、( i )、( i i ) および ( i v )、( i i )、( i i i ) および ( i v )、または ( i ) から ( i v ) の全てを含み得る。

【0060】

C X C L 5 の量および / または発現レベルを検出するための手段は当技術分野において周知である。それらは、例えば、C X C L 5 をコードする遺伝子または c D N A のフラグメントまたはそれに相補的な配列を含むまたはからなるプライマーおよびプローブ、並びに、C X C L 5 に特異的に結合する抗体を含む。

【0061】

このような手段を、フルオロフォアまたは放射性化合物などの検出可能な化合物を用いて標識し得る。例えば、C X C L 5 に特異的に結合するプローブまたは抗体を、検出可能な化合物を用いて標識し得る。あるいは、キットが抗体を含む場合、キットはさらに、検出可能な化合物で標識された二次抗体を含み得、この二次抗体は C X C L 5 に特異的に結合する標識されていない抗体に結合する。

【0062】

C X C L 5 の量および / または発現レベルを検出するための手段はまた、例えば反応緩衝液、ハイブリダイゼーション緩衝液および / または洗浄緩衝液などの試薬を含み得る。前記手段は、例えばバイアルまたはマイクロタイタープレート中に存在し得るか、またはプライマーおよびプローブの場合ではそうであり得るようにマイクロアレイなどの固相支持体に付着され得る。

【0063】

キットは、例えば、C X C L 5 の量および / または発現レベルを検出するための手段として配列番号 4 および 5 のプライマーを含み得る。あるいは、キットは、M A B 2 5 4 抗体 ( R & D Systems, Minneapolis, USA ) および / または A F 2 5 4 抗体 ( R & D Systems, Minneapolis, USA ) を、C X C L 5 の量および / または発現レベルを検出するための手段として含み得る。

【0064】

特定の態様において、キットは、化学発光 E l i s a アッセイ、例えば実施例 1、1 5 段落に記載した化学発光 E l i s a アッセイなどを実施するのに適している。このようなキットは、例えば、C X C L 5 の量および / または発現レベルを検出するための手段として以下 :

10

20

30

40

50

- 場合によりマイクロタイタープレート上にコーティングされた、抗CXCL5抗体（例えばポリクローナル抗ヒトCXCL5 Ab、例えばR&D SystemsのMAB254）；
  - ビオチニル化抗CXCL5抗体（例えばビオチニル化ポリクローナル抗ヒトCXCL5 Ab、例えばR&D SystemsのBAF254）；場合により
  - ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ（例えばBD Pharmingen製）；および場合により
  - 発光基質（例えばCSPD（登録商標）1, 2 - ジオキセタン発光基質）
- を含み得る。

## 【0065】

## in vivoにおけるイメージング

前立腺におけるCXCL5レベルはまた、in vivoにおいてイメージング技術を使用して検出され得る。それ故、本発明のさらなる局面は、アンドロゲン非依存性前立腺癌のイメージングに使用するための、検出可能な部分およびCXCL5に特異的に結合する抗体を含む、診断剤を提供する。

## 【0066】

本明細書で前記に提示したように、CXCL5の発現レベルは、前立腺癌細胞の侵襲性およびアンドロゲン依存性に正に相関する。それ故、このような診断剤は、アンドロゲン非依存性前立腺癌の診断に、患者におけるホルモンエスケープの評価に、処置レジメンの設計に、前立腺癌の進行をモニタリングするのに、および/または前立腺癌に罹患している患者におけるホルモンエスケープの開始をモニタリングするのに、薬物に対する応答性をモニタリングするのに、および/または前立腺癌に罹患している患者の処置を調整するのに有用である。

## 【0067】

イメージング技術としては、例えばシンチグラフィ研究、磁気共鳴画像法（MRI）、光学イメージング、単一光子放射型コンピューター断層撮影法（SPECT）および陽電子放出断層撮影（PET）が挙げられる。

## 【0068】

「検出可能な部分」によって、患者への本発明の診断剤の投与後に標的部に位置する場合に、身体の外側から非侵襲的に検出され得る部分を意味する。検出可能な部分は、選択したイメージング技術に依存する。典型的には、容易に検出可能な部分は放射性元素であるか、またはそれを含む。

## 【0069】

シンチグラフィ研究のための適切な検出可能な部分としては、例えばテクネチウム<sup>99m</sup>Tc、<sup>123</sup>I、<sup>111</sup>C、<sup>131</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>18</sup>F、<sup>51</sup>Cr、<sup>67</sup>Ga、<sup>111</sup>In、<sup>113m</sup>In、<sup>131</sup>I、<sup>133</sup>Xeおよび<sup>201</sup>Tlが挙げられる。MRIのための適切な検出可能な部分としては、例えば、<sup>125</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>In、<sup>19</sup>F、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>17</sup>O、ガドリニウム、マンガンおよび鉄が挙げられる。光学イメージングのための適切な検出可能な部分としては、多くの近赤外線（NIR）フルオロフォア、例えばKodak X-SIGHTナノスフィア、並びに色素および色素コンジュゲート、例えばCy（登録商標）5.5、Cy7、Alexa Fluor（登録商標）680、Alexa Fluor 750、IRDye（登録商標）680、およびIRDye 800CWが挙げられる。SPECTの脈絡では、<sup>18</sup>Fおよび放射性トレーサ、例えば<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>201</sup>Tlおよび<sup>133</sup>Xeを検出可能な部分として使用することができる。PETを実施するのに適した検出可能な部分としては、例えば、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>18</sup>F、<sup>64</sup>Cu、<sup>62</sup>Cu、<sup>124</sup>I、<sup>76</sup>Br、<sup>82</sup>Rbおよび<sup>68</sup>Gaが挙げられる。

## 【0070】

好ましくは、容易に検出可能な部分は、テクネチウム - 99m（<sup>99m</sup>Tc）、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>18</sup>FまたはNIRフルオロフォアを含むまたはからなる。

## 【0071】

本発明のさらなる局面は、(i)本発明による診断剤を、前立腺癌に罹患している、ま

10

20

30

40

50

たは罹患している可能性のある個体に投与する工程、および ( i i ) 前記個体の前立腺に前記診断剤の結合の有無を検出する工程を含む、前立腺癌をイメージングする方法を提供する。

【 0 0 7 2 】

本発明のさらなる局面は、前立腺癌を診断する方法を提供し、前記方法は、( i ) 本発明による診断剤を、前立腺癌に罹患している、または罹患している可能性のある個体に投与する工程、および ( i i ) 前記個体の前立腺への前記診断剤の結合の有無を検出する工程を含み、前記個体の前立腺への前記診断剤の結合の検出は、前記個体が前立腺癌に罹患している可能性があることを示す。

【 0 0 7 3 】

前記方法はまた、前記個体の前立腺への前記診断剤の結合レベルを検出し、そして前記レベルを、前立腺癌の重度および/または前立腺癌におけるホルモンエスケープの開始と関連させることによって、前立腺癌の重度を評価するのに、および/または前立腺癌におけるホルモンエスケープの開始を評価するのに使用され得る。

【 0 0 7 4 】

本発明によるアンタゴニストおよびこのようなアンタゴニストをスクリーニングするための方法

前立腺癌においては、C X C L 5 のレベルがアンドロゲンによって負に調節され ( 図 5 参照 )、そして抗アンドロゲン物質によって正に調節されている ( 図 6 参照 ) ことが驚くべきことに判明した。一方で、アンドロゲンの除去は C X C L 5 の発現を増加させる。この後者の現象は、前立腺癌に罹患している患者において観察されるホルモンエスケープ現象と非常に類似している。それ故、ホルモン療法処置時に、C X C L 5 レベルは増加し、これにより前立腺癌細胞はより悪性度が高く、より転移性となり、アンドロゲンの非存在下において増殖することができるようになると考えられる。結果として、ホルモンエスケープは、C X C L 5 の生物学的活性を阻害することによって予防または処置され得る。

【 0 0 7 5 】

それ故、本発明は、前立腺癌のおよび/または前立腺癌におけるホルモンエスケープの処置または予防において使用するための C X C L 5 アンタゴニストを提供する。本発明による C X C L 5 アンタゴニストは、好ましくは、アンドロゲン非依存性前立腺癌の処置または予防において使用するためのものである。

【 0 0 7 6 】

本明細書において使用する「C X C L 5 アンタゴニスト」という用語は、C X C L 5 の生物学的活性を阻害または減少させる化合物を指す。

【 0 0 7 7 】

C X C L 5 の生物学的活性は、その濃度 ( すなわちその発現レベル ) およびその比活性の両方に依存する。それ故、本発明による C X C L 5 アンタゴニストは、例えば、( i ) 前立腺細胞における C X C L 5 の発現を減少または阻害し得、および/または ( i i ) 結合パートナーへの C X C L 5 の結合を減少または阻害し、これにより、シグナル伝達経路内のシグナルの伝達を減少または阻害し得る。

【 0 0 7 8 】

化合物が C X C L 5 アンタゴニストであるかどうかを決定するための方法は、当業者には周知である。

【 0 0 7 9 】

例えば、当業者は、化合物が前立腺細胞における C X C L 5 の発現を減少または消失させるかどうかを、R T - P C R、ノザンプロット、E L I S A、免疫染色またはウェスタンプロットによって評価することができる。実施例 1 . 6 および 1 . 7 に提供したプロトコルを例えば使用し得る。

【 0 0 8 0 】

C X C L 5 の生物学的活性はまた、前立腺細胞におけるその天然の結合パートナー、例えばそのレセプター ( 群 ) などに C X C L 5 が結合する能力を評価することによって測定

10

20

30

40

50

され得る。例えば、CXCL5はCXCR2レセプターに結合することが知られている。CXCL5のその結合パートナーの1つ(例えばCXCR2)への結合は、例えば、ツークハイブリッドシステム、免疫沈降法または表面プラズモン共鳴装置(BIAcore)を使用して評価され得る。前立腺細胞におけるその天然の結合パートナーの少なくとも1つ(例えばCXCR2)へのCXCL5の結合を減少または消失させる化合物が、CXCL5アンタゴニストとして定義される。

【0081】

あるいは、CXCL5の生物学的活性は、走化性を測定することによって評価され得る。走化性を誘起するCXCL5の能力を減少または消失させる化合物が、CXCL5アンタゴニストとして定義される。

10

【0082】

CXCL5の生物学的活性はまた、CXCL5によって誘導されるシグナル伝達カスケードが活性化されるかどうかを決定することによって測定され得る。例えば、ウェスタンブロットによるERKリン酸化の定量を測定することができる(例えば、Begley et al. 2008 Neoplasia 10:244-254参照)。

【0083】

CXCL5アンタゴニストは、任意のタイプの化合物に対応し得る。それは例えば、CXCL5のドミナントネガティブな突然変異体、化合物、例えば小分子、アンチセンスRNA、干渉RNA(例えばsiRNAまたはshRNA)、アプタマー、ペプチドまたは抗体に対応し得る。

20

【0084】

本発明によるCXCL5アンタゴニストは、好ましくは精製および/または単離されており、すなわち、それは、ヒト身体から、動物身体から、および/または化合物のライブラリーから精製および/または単離されている。特定の態様において、本発明によるCXCL5アンタゴニストは、天然に存在する化合物には対応しない。それは好ましくは薬学的組成物に製剤化されている。

【0085】

本発明はまた、有効量のCXCL5アンタゴニストをそれを必要とする個体に投与する工程を含む、前立腺癌および/または前立腺癌におけるホルモンエスケープを処置または予防する方法に関する。「有効量」によって、処置しようとする疾病を予防または処置することのできるCXCL5アンタゴニストの濃度を達成するに十分な量を意味する。このような濃度は当業者によって慣用的に決定され得る。実際に投与される化合物の量は、典型的には、処置しようとする状態、選択する投与経路、投与する実際の化合物、個々の患者の年齢、体重および応答、患者の症状の重度などを含む関連する環境を鑑みて医師によって決定される。用量は投与されるCXCL5アンタゴニストの安定性に依存し得ることが当業者によって理解される。「それを必要とする個体」によって、処置または予防しようとする疾病に罹患している、または罹患している可能性のある個体を意味する。本発明の脈絡における処置しようとする個体は、任意の哺乳動物に対応し得る。好ましい態様において、個体はヒトである。

30

【0086】

このようなCXCL5アンタゴニストは当技術分野において周知である。例えば、CXCR2のアンタゴニスト、従ってCXCL5のアンタゴニストとしては、以下：

40

- 強力で選択的なCXCR2ケモカインレセプターアンタゴニストである、SB225002(White et al. 1998 J Biol Chem 273:10095-98)；
- SB272844(Glynn et al. 2002 Pulm Pharmacol Ther. 15:103-10)；
- CXCR1およびCXCR2レセプターの非競合的アロステリック阻害剤であるレペルタキシン(Repertaxin)；
- 高親和性のCXCR2アンタゴニストであるSB265610(de Kruijff et al. 2009 J Pharmacol Exp Ther 329:783-90)；
- CXCR2/CXCR1をターゲティングする経口で活性な小分子アンタゴニスト

50

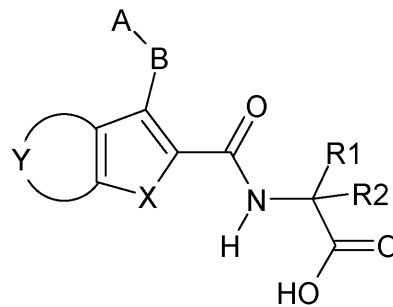
である S C H 5 2 7 1 2 3 および S C H 4 7 9 8 3 3 (Holz et al. 2010 Eur Respir J 35:564-70 および Singh et al. 2009 Clin Cancer Res 15:2380-6) ;

- C X C L 8 突然変異体 および C X C R 1 / C X C R 2 アンタゴニストである、C X C L 8 ( 3 - 7 4 ) K 1 1 R / G 3 1 P (Gordon et al. 2005 J Leukoc Biol 78:1265-72) ;

- 特許出願 W O 2 0 0 8 / 0 0 0 4 0 8 の 4 頁 2 2 行 から 1 2 頁 6 行 に 記 載 の よ う な 式 I :

【化 1】

(I)



で示される化合物 ;

および特に以下の化合物 :

2 - メチル - 2 - { [ 1 - ( 4 - トリフルオロメトキシ - ベンジルオキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - プロピオン酸 ; 2 - { [ 1 - ( ベンゾチアゾール - 2 - イルメトキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - 2 - メチル - プロピオン酸 ; 2 - メチル - 2 - { [ 1 - ( 4 - トリフルオロメチル - ベンジルオキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - プロピオン酸 ; 2 - メチル - 2 - { [ 1 - ( 6 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イルメトキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - プロピオン酸 ; 2 - { [ 1 - ( ベンゾチアゾール - 2 - イルメトキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - 2 - メチル - 酪酸 ; 2 - メチル - 2 - { [ 1 - ( 4 - トリフルオロメチル - ベンジルオキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - 酪酸 ; 2 - メチル - 2 - { [ 1 - ( 6 - トリフルオロメチル - ピリジン - 3 - イルメトキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - 酪酸 ; 2 - { [ 1 - ( 2 - フルオロ - 4 - トリフルオロメチル - ベンジルオキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - 2 - メチル - プロピオン酸 ; 2 - メチル - 2 - { [ 1 - ( 4 - トリフルオロメトキシ - ベンジルオキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - 酪酸 ; 2 - { [ 1 - ( 2 - フルオロ - 4 - トリフルオロメチル - ベンジルオキシ ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - ナフタレン - 2 - カルボニル ] - アミノ } - 2 - メチル - 酪酸 ; 2 - メチル - 2 - { [ 7 - メチル - 4 - ( 4 - トリフルオロメチル - ベンジルオキシ ) - インダン - 5 - カルボニル ] - アミノ } - プロピオン酸 ; 2 - メチル - 2 - { [ 7 - ( 4 - トリフルオロメチル - ベンジルオキシ ) - ベンゾ [ b ] チオフェン - 6 - カルボニル ] - アミノ } - プロピオン酸 ; 2 - メチル - 2 - { [ 4 - ( 4 - トリフルオロメチル - ベンジルオキシ ) - ベンゾ [ b ] チオフェン - 5 - カルボニル ] - アミノ } - プロピオン酸 ; 2 - メチル - 2 - { [ 4 - ( 5 - トリフルオロメチル - ピリジン - 2 - イルメトキシ ) - ベンゾ [ b ] チオフェン - 5 - カルボニル ] - アミノ } - プロピオン酸 ; および

- 選択的な C X C R 2 アンタゴニスト機能を示す N , N ' - ジアリアル尿素 (Widdowson et al. 2004 J Med Chem 47:1319-21)

が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 7 】

好ましい態様において、前記 C X C L 5 アンタゴニストは抗体である。C X C L 5 を特異的に認識する抗体は当技術分野において周知であり、そしてこれには、例えば、R&D systems (カタログ番号 A F 2 5 4 ) によって市販されているヤギ E N A - 7 8 ポリクローナル抗体が含まれる。従って、抗体は、例えば R&D systems によって市販されている E N A - 7 8 ポリクローナル抗体、その抗体と交差反応するモノクローナル抗体、または、例えば Kohler および Milstein (1975 Nature 256:495-7) に記載のようなハイブリドーマの産生を通して得られた、ポリクローナル抗体から得られたモノクローナル抗体に対応し得る。

## 【 0 0 8 8 】

別の好ましい態様において、C X C L 5 アンタゴニストは s i R N A または s h R N A である。s i R N A および s h R N A を得るための方法は当技術分野において周知である。例えば、抑制性 s i R N A を設計するためのツールは、DNAengine Inc. (Seattle, Washington, USA) または Ambion, Inc. (Austin, Texas, USA) から購入し得る。さらに、C X C L 5 をターゲティングする s i R N A および s h R N A を例えば Sigma-Aldrich から購入することができる。s h R N A は、例えば、配列番号 6 の配列によってコードされる s h R N A に対応し得る。

## 【 0 0 8 9 】

代替的にまたは追加的に、当業者は、スクリーニングを実施することによって、このような C X C L 5 アンタゴニストを単離し得る。

## 【 0 0 9 0 】

それ故、本発明の別の局面は、前立腺癌、特にアンドロゲン非依存性癌の処置のための薬物についての *in vitro* におけるスクリーニング法に関し、これは

a) 試験化合物を準備する工程；および

b) 前記試験化合物が、例えば前立腺細胞において、C X C L 5 の生物学的活性を阻害するかどうかを決定する工程

を含み、前記試験化合物が C X C L 5 の生物学的活性を阻害するという決定は、前記試験化合物が、前立腺癌の処置または予防のための薬物であることを示す。

## 【 0 0 9 1 】

前記したような方法の 1 つなどの、当技術分野において周知の任意の方法を工程 ( b ) で使用し得る。好ましい態様において、工程 ( b ) を前立腺細胞を用いて、最も好ましくは前立腺癌細胞を用いて実施する。例えば、前記試験化合物が C X C L 5 の生物学的活性を阻害するかどうかを決定する前記工程は、例えば、

- 前記試験化合物が、前立腺細胞において C X C L 5 の発現を阻害するかどうかを決定する工程；および/または

- 前記試験化合物が、前立腺細胞において天然の結合パートナーへの C X C L 5 の結合を阻害するかどうかを決定する工程

を含むまたはからなり得る。

## 【 0 0 9 2 】

より具体的には、この *in vitro* における方法は、

a) 試験化合物を準備する工程；および

b) 例えば前立腺細胞において、前記試験化合物の存在下において C X C L 5 の生物学的活性を決定する工程；

c) 例えば前立腺細胞において前記試験化合物の非存在下において C X C L の生物学的活性を決定する工程；および

d) 工程 ( b ) および ( c ) の結果を比較する工程

を含み得、工程 ( b ) で測定した生物学的活性が、工程 ( c ) で測定した生物学的活性よりも低いという決定は、前記試験化合物が、前立腺癌の処置または予防のための薬物であることを示す。

## 【 0 0 9 3 】

試験化合物は、任意のタイプの化合物に対応し得る。それは例えば、C X C L 5 のドミナントネガティブな突然変異体、小分子、アンチセンスRNA、干渉RNA（例えばsiRNAまたはshRNA）、アプタマー、ペプチドおよび抗体に対応し得る。好ましい態様において、小分子、ペプチド、抗体またはアプタマーのライブラリーを、本発明による方法を用いてスクリーニングする。

【0094】

本発明はまた、前立腺癌の処置のための薬物（C X C L 5 アンタゴニスト）についてスクリーニングするためのターゲットとしてのC X C L 5 の使用、および前立腺癌におけるホルモンエスケープの予防のための薬物（C X C L 5 アンタゴニスト）についてスクリーニングするためのターゲットとしてのC X C L 5 の使用に関する。

10

【0095】

細胞モデルおよび動物モデル

本発明の別の局面は、前立腺癌細胞から誘導された組換え細胞株に関し、これは、そのゲノムが、C X C L 5 をコードする核酸を含む発現ベクターを含むことを特徴とする。このような組換え細胞株は安定にC X C L 5 を発現し、そして例えばアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞のための細胞モデルとして使用され得る。

【0096】

本発明はさらに、本発明による組換え細胞株を含む、アンドロゲン非依存性前立腺癌のための非ヒト動物モデルに関する。このような非ヒト動物は、アンドロゲン非依存性前立腺癌のためのモデルとして、例えば前立腺癌に関する研究の脈絡において、前立腺癌の処置または予防のための薬物の前臨床試験中に使用され得る。

20

【0097】

本発明はまた、本発明による組換え宿主細胞を前記動物の前立腺に接種する工程を含むアンドロゲン非依存性前立腺癌のための非ヒト動物モデルを産生するための方法、並びに、このような方法によって得ることのできる動物モデルに関する。

【0098】

動物は、任意の非ヒト動物、例えばマウス、ラット、ウサギまたはサルに対応し得る。好ましい態様において、動物は無胸腺ヌードマウス、例えばNu / Fox n 1 無胸腺ヌードマウスである。

【0099】

ジャーナル記事または要約、公表された特許出願、発行された特許または任意の他の参考文献を含む、本明細書において引用した全ての参考文献は、引用した参考文献に提示された全てのデータ、表、図面および本文を含めて、本明細書への参照により全体が組み入れられる。

30

【0100】

本発明は、以下の実施例および図面の点からさらに評価される。

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】図1は、C X C L 5 発現レベルが前立腺癌組織のグリーソンスコアと正に相関することを示す。C X C L 5 の定量は、異なるグリーソンスコアを有する前立腺癌組織における免疫染色によって実施された。患者の数を示す。

40

【図2A】図2は、侵襲性の前立腺癌細胞株が高いレベルのC X C L 5 を産生することを示す。A . 前立腺癌細胞株によるC X C L 5 分泌のE l i s a 定量。結果は3回の独立した実験の平均 ± S D を示す。B . リアルタイムPCRによる前立腺癌細胞株におけるC X C L 5 RNA レベルの定量。結果は3回の独立した実験の平均 ± S D を示す。C . 前立腺癌細胞株におけるC X C L 5 遺伝子プロモーター活性の測定。結果は、3回の独立した実験の平均 ± S D を示す。

【図2B】図2は、侵襲性の前立腺癌細胞株が高いレベルのC X C L 5 を産生することを示す。A . 前立腺癌細胞株によるC X C L 5 分泌のE l i s a 定量。結果は3回の独立した実験の平均 ± S D を示す。B . リアルタイムPCRによる前立腺癌細胞株におけるC X

50

C X C L 5 R N A レベルの定量。結果は 3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。C . 前立腺癌細胞株における C X C L 5 遺伝子プロモーター活性の測定。結果は、3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。

【図 2 C】図 2 は、侵襲性の前立腺癌細胞株が高いレベルの C X C L 5 を産生することを示す。A . 前立腺癌細胞株による C X C L 5 分泌の E l i s a 定量。結果は 3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。B . リアルタイム P C R による前立腺癌細胞株における C X C L 5 R N A レベルの定量。結果は 3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。C . 前立腺癌細胞株における C X C L 5 遺伝子プロモーター活性の測定。結果は、3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。

【図 3 A】図 3 は、C X C L 5 が C W R - R 1 細胞の増殖を増強し、そしてその付着能を減少させることを示す。A . C W R - R 1、C W R - R 1 - L U C、C 2 S 2 および C 3 S 2 の安定なクローンにおける C X C L 5 分泌レベル。C 2 S 2 および C 3 S 2 は、C X C L 5 c D N A を用いて安定にトランスフェクションされた 2 つの C W R - R 1 クローンである。B . C W R - R 1 細胞の *in vitro* における増殖。結果は 3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S E M を示す。C . 種々の時間後のプラスチック皿上への C W R - R 1 細胞の *in vitro* における細胞接着。結果は 3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。

【図 3 B】図 3 は、C X C L 5 が C W R - R 1 細胞の増殖を増強し、そしてその付着能を減少させることを示す。A . C W R - R 1、C W R - R 1 - L U C、C 2 S 2 および C 3 S 2 の安定なクローンにおける C X C L 5 分泌レベル。C 2 S 2 および C 3 S 2 は、C X C L 5 c D N A を用いて安定にトランスフェクションされた 2 つの C W R - R 1 クローンである。B . C W R - R 1 細胞の *in vitro* における増殖。結果は 3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S E M を示す。C . 種々の時間後のプラスチック皿上への C W R - R 1 細胞の *in vitro* における細胞接着。結果は 3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。

【図 3 C】図 3 は、C X C L 5 が C W R - R 1 細胞の増殖を増強し、そしてその付着能を減少させることを示す。A . C W R - R 1、C W R - R 1 - L U C、C 2 S 2 および C 3 S 2 の安定なクローンにおける C X C L 5 分泌レベル。C 2 S 2 および C 3 S 2 は、C X C L 5 c D N A を用いて安定にトランスフェクションされた 2 つの C W R - R 1 クローンである。B . C W R - R 1 細胞の *in vitro* における増殖。結果は 3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S E M を示す。C . 種々の時間後のプラスチック皿上への C W R - R 1 細胞の *in vitro* における細胞接着。結果は 3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。

【図 4】図 4 は、C X C L 5 が *in vivo* において腫瘍増殖を劇的に増強することを示す。C W R - R 1 - L U C または C W R - R 1 C 2 S 2 細胞を、無胸腺マウスの前立腺に同所性に注入した。*in vivo* における腫瘍増殖を Berthold NightOwl カメラを用いて測定した。結果は、1 群あたり 6 匹のマウスの平均  $\pm$  S D を示す。

【図 5 A】図 5 は、C X C L 5 R N A レベルが、L N C a P および C W R - R 1 細胞においてアンドロゲンによってダウンレギュレーションされていることを示す。C W R - R 1 (A) または L N C a p (B) 細胞を、全ウシ胎児血清 (F C S)、活性炭処理済み血清 (C D F C S) または  $10^{-8}$  M ジヒドロテストステロンの補充された C D F C S (C D F C S + D H T) のいずれかの存在下で培養した。C X C L 5 R N A レベルをリアルタイム P C R によって測定した。F C S の存在下における C X C L 5 レベルを 1 に設定した。結果は、3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。

【図 5 B】図 5 は、C X C L 5 R N A レベルが、L N C a P および C W R - R 1 細胞においてアンドロゲンによってダウンレギュレーションされていることを示す。C W R - R 1 (A) または L N C a p (B) 細胞を、全ウシ胎児血清 (F C S)、活性炭処理済み血清 (C D F C S) または  $10^{-8}$  M ジヒドロテストステロンの補充された C D F C S (C D F C S + D H T) のいずれかの存在下で培養した。C X C L 5 R N A レベルをリアルタイム P C R によって測定した。F C S の存在下における C X C L 5 レベルを 1 に設定した。結果は、3 回の独立した実験の平均  $\pm$  S D を示す。

【図 6 A】図 6 は、抗アンドロゲン物質のピカルタミドの効果を示す。A . C X C L 5 R N A レベルは、C W R - R 1 細胞において抗アンドロゲン物質のピカルタミドによってア

10

20

30

40

50

アップレギュレーションされる。CWR-R1細胞を、全ウシ胎児血清(FCS)中、0.1、1または10 $\mu$ Mのピカルタミドの非存在下または存在下において培養した。CXCL5 RNAレベルをリアルタイムPCRによって測定した。FCSの存在下におけるCXCL5レベルを1に設定した。結果は、3回の独立した実験の平均 $\pm$ SDを示す。B.CXCL5は、抗アンドロゲン物質のピカルタミドの非存在下および存在下の両方においてCWR-R1細胞の増殖を増強する。CWR-R1細胞をFCS中で培養した。いくらかの細胞を10 $\times$ 10<sup>-5</sup>Mのピカルタミドで処理した。細胞をエタノールビヒクル(C)またはCXCL5(1または50ng/ml)のいずれかで処理した。増殖を、細胞を計測することによって処理から5日後に定量した。

【図6B】図6は、抗アンドロゲン物質のピカルタミドの効果を示す。A.CXCL5 RNAレベルは、CWR-R1細胞において抗アンドロゲン物質のピカルタミドによってアップレギュレーションされる。CWR-R1細胞を、全ウシ胎児血清(FCS)中、0.1、1または10 $\mu$ Mのピカルタミドの非存在下または存在下において培養した。CXCL5 RNAレベルをリアルタイムPCRによって測定した。FCSの存在下におけるCXCL5レベルを1に設定した。結果は、3回の独立した実験の平均 $\pm$ SDを示す。B.CXCL5は、抗アンドロゲン物質のピカルタミドの非存在下および存在下の両方においてCWR-R1細胞の増殖を増強する。CWR-R1細胞をFCS中で培養した。いくらかの細胞を10 $\times$ 10<sup>-5</sup>Mのピカルタミドで処理した。細胞をエタノールビヒクル(C)またはCXCL5(1または50ng/ml)のいずれかで処理した。増殖を、細胞を計測することによって処理から5日後に定量した。

【図7A】図7は、CXCL5が、*in vivo*において前立腺癌細胞に対してアンドロゲン非依存性増殖を付与することを示す。A.CWR-R1-LucまたはCWR-R1-CXCL5(クローンC2S2)細胞を、注入から6日前に去勢しておいた無胸腺マウスの前立腺に注入した。腫瘍の増殖をBerthold NightOwlカメラを用いて毎週測定した。結果は、1群あたり8匹のマウスの平均 $\pm$ SDを示す。B.CWR-R1-LucまたはCWR-R1-CXCL5(クローンC2S2)細胞を、無胸腺マウスの前立腺に注入した。注入から14日後、マウスを2つの群に分けた：一方は去勢したもの、そして他方はニセで処理したもの。腫瘍の増殖をBerthold NightOwlカメラを用いて毎週測定した。結果は、1群あたり8匹のマウスの平均 $\pm$ SDを示す。矢印は去勢の時期を示す。

【図7B】図7は、CXCL5が、*in vivo*において前立腺癌細胞に対してアンドロゲン非依存性増殖を付与することを示す。A.CWR-R1-LucまたはCWR-R1-CXCL5(クローンC2S2)細胞を、注入から6日前に去勢しておいた無胸腺マウスの前立腺に注入した。腫瘍の増殖をBerthold NightOwlカメラを用いて毎週測定した。結果は、1群あたり8匹のマウスの平均 $\pm$ SDを示す。B.CWR-R1-LucまたはCWR-R1-CXCL5(クローンC2S2)細胞を、無胸腺マウスの前立腺に注入した。注入から14日後、マウスを2つの群に分けた：一方は去勢したもの、そして他方はニセで処理したもの。腫瘍の増殖をBerthold NightOwlカメラを用いて毎週測定した。結果は、1群あたり8匹のマウスの平均 $\pm$ SDを示す。矢印は去勢の時期を示す。

【図8A】図8は、血清中のCXCL5レベルが腫瘍内発現に相関することを示す。A.全抽出物を、CWR-R1またはCWR-R1-CXCL5細胞の移植された動物の前立腺腫瘍から調製した。CXCL5腫瘍内レベルをElisaによって決定した。結果は5匹の動物の平均 $\pm$ SDを示す。B.同じマウスからの血清を回収し、そしてCXCL5含量についてアッセイした。結果は5匹の動物の平均 $\pm$ SDを示す。

【図8B】図8は、血清中のCXCL5レベルが腫瘍内発現に相関することを示す。A.全抽出物を、CWR-R1またはCWR-R1-CXCL5細胞の移植された動物の前立腺腫瘍から調製した。CXCL5腫瘍内レベルをElisaによって決定した。結果は5匹の動物の平均 $\pm$ SDを示す。B.同じマウスからの血清を回収し、そしてCXCL5含量についてアッセイした。結果は5匹の動物の平均 $\pm$ SDを示す。

【図9A】図9は、CXCL5の遮断により、PC-3の細胞増殖が阻害されることを示す。A.PC-3細胞を4日間増殖させ、そして処理しないか(コントロール)、または

10

20

30

40

50

アイソタイプコントロール抗体としてのヤギ血清（1/20に希釈）で処理するか（アイソタイプ）または0.5 µg/mlのCXCL5抗体で処理した（CXCL5 Ab）。処理したまたはしない培地を、2日目に交換した。結果は、3回の独立した実験の4日後の、ルシフェラーゼ活性の平均±SDを示す。B、C、PC-3細胞を、非ターゲットshRNAコントロール（shCt）またはshCXCL5ベクターを用いてトランスフェクションした。4日後、培地を回収し、そしてCXCL5レベルをELISAによって測定した（B）。細胞数を4日目に計測した（C）。代表的な実験をここに示す。

【図9B】図9は、CXCL5の遮断により、PC-3の細胞増殖が阻害されることを示す。A、PC-3細胞を4日間増殖させ、そして処理しないか（コントロール）、またはアイソタイプコントロール抗体としてのヤギ血清（1/20に希釈）で処理するか（アイソタイプ）または0.5 µg/mlのCXCL5抗体で処理した（CXCL5 Ab）。処理したまたはしない培地を、2日目に交換した。結果は、3回の独立した実験の4日後の、ルシフェラーゼ活性の平均±SDを示す。B、C、PC-3細胞を、非ターゲットshRNAコントロール（shCt）またはshCXCL5ベクターを用いてトランスフェクションした。4日後、培地を回収し、そしてCXCL5レベルをELISAによって測定した（B）。細胞数を4日目に計測した（C）。代表的な実験をここに示す。

10

【図9C】図9は、CXCL5の遮断により、PC-3の細胞増殖が阻害されることを示す。A、PC-3細胞を4日間増殖させ、そして処理しないか（コントロール）、またはアイソタイプコントロール抗体としてのヤギ血清（1/20に希釈）で処理するか（アイソタイプ）または0.5 µg/mlのCXCL5抗体で処理した（CXCL5 Ab）。処理したまたはしない培地を、2日目に交換した。結果は、3回の独立した実験の4日後の、ルシフェラーゼ活性の平均±SDを示す。B、C、PC-3細胞を、非ターゲットshRNAコントロール（shCt）またはshCXCL5ベクターを用いてトランスフェクションした。4日後、培地を回収し、そしてCXCL5レベルをELISAによって測定した（B）。細胞数を4日目に計測した（C）。代表的な実験をここに示す。

20

【図10A】図10は、CXCL5レベルをヒト血清中および尿中において測定できることを示す。CXCL5レベルは、20人の患者の血清（A）または尿（B）中で化学発光ELISAによって決定された。

【図10B】図10は、CXCL5レベルをヒト血清中および尿中において測定できることを示す。CXCL5レベルは、20人の患者の血清（A）または尿（B）中で化学発光ELISAによって決定された。

30

#### 【0102】

配列の記載

配列番号1は、CXCL5のアミノ酸配列を示す。

#### 【0103】

配列番号2～5は、リアルタイムPCR実験の脈絡でmRNAレベルを検出するために使用されるプライマー配列を示す。

#### 【0104】

配列番号6は、CXCL5をターゲティングするshRNAをコードする配列を示す。

#### 【0105】

実施例

実施例1：材料および方法

##### 1.1. 細胞培養

CWR-R1およびLNCaP細胞を、10%ウシ胎児血清（FCS）およびゲンタマイシンを用いて完成される、グルタマックスを含むRPMI 1640（Invitrogen, Carlsbad, USA）中に維持した。アンドロゲンによる刺激のために、細胞を10%CDFCS（活性炭デキストラン処理FCS）の補充されたフェノールレッドを含まないRPMI 1640中で4日間培養することによって、あらゆる実験の前に細胞からステロイドを除去した。

40

#### 【0106】

50

## 1.2. CXCL5の免疫組織化学

40の病的スコア(グリーンソン6~10)および8つの非病的スコアを含む、前立腺癌の組織マイクロアレイ(TMA)を使用した(SuperBioChips Laboratories, Korea)。

### 【0107】

免疫染色を、TMA上で、標準的なアビジン-ビオチン複合体技術およびCXCL5に対するマウスモノクローナル抗体を使用して実施した。トリス緩衝液pH9.0中のスライドにマイクロ波を当てることによってスライドを前処理して、抗原を想起した。その後、TMAを2時間かけて室温で一次CXCL5抗体(ヒトCXCL5/ENA-78 MAB254; R&D Systems, Minneapolis, USA)と共に15 µg/mlのPBSの濃度でインキュベーションした。CXCL5発現を、染色の強度に基づいて、盲検的にネガティブ(スコア=0)、弱い(スコア=1)、中程度(スコア=2)または強い(スコア=3)としてスコアリングした。製品スコアを全組織のスコアについて計算し、そして平均製品スコアを各グリーンソンスコアについて決定した。

10

### 【0108】

## 1.3. CXCL5を発現する細胞株の作製およびshRNA構築物

CWR-R1細胞を、CMV-ホタルルシフェラーゼを用いてJetPEI試薬(MP Biomedicals, Irvine, USA)を使用して、pLv01-CXCL5プラスミド(Origene, Rockville, USA)またはコントロールとしての空ベクターのいずれかを用いてトランスフェクションした。トランスフェクションは、製造業者のプロトコールに従って実施された。コロニーを2mg/mlのG418で選択した。各コロニーのルシフェラーゼ活性を、ルシフェラーゼ活性緩衝液(Promega, Madison, USA)の注入後にルミノメーターMITRASを使用して試験した。CXCL5の構成的発現をELISAを使用して測定した。

20

### 【0109】

## 1.4. プラスチック皿上への細胞株の細胞接着

CXCL5を安定に発現しているCWR-R1の細胞接着を研究するために、クローンをプラスチック皿上に播種した。200000個の細胞を12ウェルのプレートに播種した。ウェルを種々の時点で(5、10、15、30、45、60分後)PBS(2回)を用いて洗浄した。その後、200 µlの溶解緩衝液(Promega, Madison, USA)を各ウェルに加えた。各ウェルのルシフェラーゼ活性を以前に記載されているように測定した。種々の時点における発光を、各ウェルに最初に播種された細胞数の発光と比較することによって、接着率を計算した。

30

### 【0110】

## 1.5. CXCL5プロモーターの一過性トランスフェクション

CXCL5開始部位に対してヌクレオチド-1379/+43からなる、CXCL5プロモーターを、pXP2ルシフェラーゼリポータープラスミド(GenBankアクセッションナンバーAF093682.1)にクローニングした。3×10<sup>5</sup>個のステロイドを除去した細胞を、トランスフェクションの24時間前に、12ウェルプレートの、10%CDFCSの補充されたフェノールレッドを含まないRPMI1640中に播種した。トランスフェクションをリポフェクタミンを使用して製造業者の推奨に従って、すなわち、1ウェルあたり2 µgのCXCL5プロモーターpXP2-CXCL5ルシフェラーゼリポーターを、0.5 µgの内部標準リポータープラスミド(CMV-Gal)と共に使用して実施した。6時間インキュベーションした後、培地を除去し、そして細胞を新たな培地に入れた。24時間後、細胞を収集し、そしてCentro LB960 Bertholdルミノメーターを使用してルシフェラーゼ活性についてアッセイした。 - ガラクトシダーゼを以前に記載されているように(Freund et al. 2004 Oncogene 23:6105-6114)決定した。

40

### 【0111】

## 1.6. CXCL5のELISAによる定量

CXCL5の分泌を、製造業者の推奨に従って、ELISA(R&D Systems, Minneapolis, USA)によって測定した。簡潔に言うと、平底96ウェルマイクロタイタープレート(Probind, Falcon)を、PBS中4 µg/mlの特異的ポリクローナル抗ヒトCXCL5抗

50

体 (MAB254, R&D Systems) でコーティングし、そして一晩かけて室温でインキュベーションした。その後、プレートを P B S (p H 7 . 5) および 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (洗淨緩衝液) を用いて洗淨した。プレートを、P B S 中 2 % B S A および 5 % スクロースを用いて 1 時間かけて室温で遮断し、その後、洗淨緩衝液を用いて 3 回洗淨した。試料または標準を加え、そしてプレートを室温で 2 時間かけてインキュベーションした。腫瘍内タンパク質のために、8 0 μg の全抽出物を使用した。C X C L 5 の血清レベルのために、5 0 μg の血清を使用した。プレートを 3 回洗淨した。ビオチニル化ポリクローナル抗ヒト C X C L 5 抗体 (AF254, R&D Systems) を 6 0 0 ng/ml (p H 7 . 5 の P B S および 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 中) で加え、そしてプレートを室温で 2 時間かけてインキュベーションした。プレートを 3 回洗淨し、ストレプトアビジン - H R P コンジュゲートを加え、そしてプレートを 2 0 分間かけて室温でインキュベーションした。プレートを再度洗淨し、そして 3 , 3 ' - 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン発色基質を加えた。プレートを 4 5 0 nm で自動マイクロタイタープレート読取機で読取りした。

10

#### 【 0 1 1 2 】

##### 1 . 7 . 化学発光 C X C L 5 の E L I S A

C X C L 5 の分泌を、化学発光アプローチを使用するためにいくつかの変更を加えて、E L I S A (R&D Systems) によって測定した。簡潔に言うと、平底 9 6 ウェルの不透明で白色のマイクロタイタープレート (Nunc) を、特異的なポリクローナル抗ヒト C X C L 5 A b (MAB254, R&D Systems) (P B S 中 2 μg/ml) を用いて一晩かけて 4 でコーティングし、そしてその後、P B S (p H 7 . 5) と 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 (洗淨緩衝液) を用いて洗淨した。プレートを遮断緩衝液 (P B S 中 0 . 2 % カゼイン) を用いて 1 時間かけて室温で遮断し、そしてその後、洗淨緩衝液を用いて 3 回洗淨した。試料または標準を加え、そしてプレートを室温で 1 時間かけてインキュベーションした。C X C L 5 の血清レベルのために、2 μl の血清を使用し、そして尿のために、2 0 μl の試料を使用した。プレートを 3 回洗淨した。ビオチニル化ポリクローナル抗ヒト C X C L 5 A b (B A F 2 5 4 , R & D S y s t e m s) (遮断緩衝液中 1 0 0 ng/ml) を加え、そしてプレートを室温で 1 時間かけてインキュベーションした。プレートを 3 回洗淨し、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ (B D P h a r m i n g e n) を加え、そしてプレートを 3 0 分間かけて室温でインキュベーションした。プレートを再度洗淨し、そして 3 0 分間の間に C S P D (登録商標) 1 , 2 - ジオキセタン発光基質を加え、その後、Centro LB960 Berthold ルミノメーターで発光を読取りした。

20

30

#### 【 0 1 1 3 】

##### 1 . 8 . C X C L 5 R N A レベルのリアルタイム P C R による定量

全 R N A を、TriReagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) を使用して調製した。R N A の量を、2 6 0 nm における分光測定法によって推定した。相補的 D N A (c D N A) は、リボヌクレアーゼを含まない 1 3 μl の水中における 3 μg の全 R N A の逆転写 (R T) から得られた。1 μl の d N T P (2 5 0 mM; Gibco BRL) の存在下においてプライマーとしての 1 μl のランダムヘキサヌクレオチド (p d (N) 6 , 5 0 mM) を R N A に加え、そして 5 分間 7 0 でインキュベーションした。後で、逆転写酵素 (1 μl) および逆転写酵素緩衝液 5 × (4 μl) を含む 5 μl の混液を R N A 溶液に加え、そして 1 時間 4 2 でインキュベーションした。その後、リアルタイム P C R 定量を、以前に記載されているように (Lucas et al. 2003 Biochem Biophys Res Commun 309:1011-1016) SYBR Green アプローチ (Light Cycler; Roche) を使用して実施した。各試料について、C X C L 5 m R N A レベルを R S 9 m R N A レベル (参照遺伝子) を用いて正規化した。使用したプライマーは以下であった。

40

## 【化2】

RS9 フォワード: 5'-AAGGCCGCCCCGGAACTGCTGAC-3' (配列番号 2)

RS9 リバース: 5'-ACCACCTGCTTGC GGACCCTGATA-3' (配列番号 3)

CXCL5 フォワード: 5'-CATCGCCAGCGCTGGTCCT-3' (配列番号 4)

CXCL5 リバース: 5'-GGGATGAACTCCTTGC GTGGTCT-3' (配列番号 5)

## 【0114】

## 1.9. 増殖アッセイ

1 ウェルあたり  $2.5 \times 10^4$  個の細胞を3つの24ウェル培養プレートの以前に記載した完全増殖培地中に播種した。細胞数を、2日間毎に6日間、malassezスライドで計測することによって、またはルシフェラーゼ活性を測定することによって決定した。完全ウシ胎児血清中での増殖のために、細胞を、RPMI 1640を含む1% FCS中に維持した。アンドロゲンの効果を試験するために、細胞を、10% FCSの補充されたフェノールレッドを含まないRPMI 1640培地中に維持した。

10

## 【0115】

## 1.10. 動物

8週令の雄Nu/Foxn1無胸腺ヌードマウスをHarlanから得た。マウスを実験前に1週間かけて気候順応させ、そして層流ボックスに病原体を含まない条件下で保持し(6匹のマウス/ケージ)、そして標準的な条件下で維持した( $22 \pm 2$ 、 $45 \pm 10$ % 相対湿度、12時間の光/12時間の暗闇のサイクルを毎日、標準的な食事および水を自由に)。全ての実験は、実験動物研究のためのフランスガイドラインに従って実施した。

20

## 【0116】

## 1.11. 異種移植およびin vivoにおける生物発光イメージング

注入前に、CWR-R1-LucまたはCWR-R1-CXCL5細胞をトリプシン処理した。 $10^6$ 個の細胞を、マトリゲル(3:1、v/v、BD Biosciences)と合わせた、 $40 \mu\text{l}$ のPBS中で調製した。1群のマウス( $n = 16$ )を移植の1週間前に去勢した。全てのマウスに、麻酔した動物の手術により露出された前立腺に同所性に $10^6$ 個のCWR-R1-LucまたはCWR-R1-CXCL5細胞を移植した。その後、ルシフェラーゼ活性を毎週8週間かけて測定した。ルシフェラーゼ活性を測定するために、マウスを最初にイソフルランガス麻酔システム(T.E.M., Bordeaux, France)によって鎮静化した。その後、マウスの腹腔内に、水溶液中の $125 \text{ mg/kg}$ (体重)のルシフェリン(ナトリウム塩; Promega)を注入した。発光をNightOWL II LB 981 CCDカメラを使用して測定し、そして5分間積分した。対象の領域(ROI)のシグナル強度を得て、そしてデータを光子として表現した(計数/秒)。バックグラウンドは、動物の近くの非発光領域に置かれた同じサイズの領域から定められ、そしてその後、測定した発光シグナル強度から差し引いた。全ての光学測定は、カメラ設定、撮影時間、動物からの距離および領域サイズを含めて、同じ条件下で実施した。動物内で放射される検出された光子の空間的な分布を示す、青色(最も強度が弱い)から赤色(最も強度が強い)までの疑似カラー発光イメージを、WinLightソフトウェア(Berthold Technologies)を使用して作製した。血清CXCL5レベルの測定のために、マウスを42日目に屠殺し、そして血液および腫瘍を回収した。

30

40

## 【0117】

## 1.12. タンパク質抽出物の調製

腫瘍試料を、MagNA Lyser装置(Roche)で7000rpmで15秒間、セラミックビーズを含有するチューブ(Lysing matrix, MP Biomedical)、および試料の重量の2倍のTEG緩衝液( $10 \text{ mM}$  トリス-HCl、 $\text{pH} 7.4$ 、 $1.5 \text{ mM}$  EDTA、およびプロテアーゼ阻害剤( $5 \mu\text{g/ml}$  アプロチニン、ロイペプチンおよびペプスタチンA、および $0.1 \text{ mM}$  フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含む10%グリセロール)中で粉碎した。その後、溶解液を10000rpmで30分間4で遠心分離にかけ、そして上清を保存し

50

た。

【0118】

1.13. CXCL5抗体を用いての遮断実験

10<sup>3</sup>個のPC-3細胞を、24ウェル中のRPMI1640を含む1%FCS中に播種した。次の日から4日間、処理していない(コントロール)またはアイソタイプコントロール抗体としてヤギ血清(1/20に希釈)でもしくは0.5µg/mlのCXCL5抗体(AF-254、R&D system)で処理。処理をしたまたはしない培地を2日目に交換した。細胞数をルシフェラーゼ活性を測定することによって4日目に決定した。

【0119】

1.14. shCXCL5を用いての遮断実験

6ウェル中のRPMI1640を含む10%FCS中に播種した10<sup>5</sup>個のPC-3細胞を、4µgの非ターゲットshRNAコントロールベクター(ShC002, Mission Library, Sigma-Aldrich)またはshCXCL5ベクター(SHCLND-NM\_002994 - TRCN0000057934 NM\_002994.3-304s1c1TRC1、配列番号6:

【化3】

CCGGGATCAGTAATCTGCAAGTGTTCGAGAACACTTGCAGATTACTGATCTTTTTG

Mission Library, Sigma-Aldrich)を用いて、Jet-PEI(登録商標)プロトコールを使用して各ウェルにおいてトランスフェクションした。トランスフェクションから8時間後に培地を交換した。CXCL5の分泌を、48時間後に馴化培地中でELISA(Duoset, DY254, R&D system)によって定量した。細胞を、トランスフェクションから4日後にmalassezスライドを使用して計測した。

【0120】

1.15. ヒト試料

血清および尿を、前立腺癌の疑いのために受診したが癌が診断されたか否かは示されていない一連のランダムな患者から得た。

【0121】

実施例2: CXCL5は、より悪性度の高い前立腺癌において発現される。

正常な前立腺および前立腺癌におけるCXCL5発現の評価を免疫組織化学によって行なった。結果は、CXCL5が主に上皮前立腺癌細胞によって産生されることを示した。さらに、CXCL5レベルは、前立腺腫瘍の悪性度の指標であるグリーソンスコア(図1)と共に増加した。

【0122】

明確な悪性度を示し、そしてアンドロゲンレセプター(AR、前立腺癌細胞のアンドロゲン感受性のメディエーター)を発現するまたはしない、明確な前立腺癌細胞株におけるCXCL5の分泌を次にELISAによって研究した。PC3、PC3-LUC、DU145およびMDAPCa1は、ARを発現しない悪性度の高い前立腺癌細胞株である。BRF41T、CWR-R1、22RV1、LNCaP、C4-2およびLAPC4は、中程度の悪性度であり、ARを発現する、前立腺癌細胞である。HPV7、BPH-1、BRF-55Tは良性で過形成の前立腺細胞株である。

【0123】

AR陰性の悪性度の高い細胞株は、AR陽性の細胞株と比較して、より高いレベルのCXCL5を分泌した(図2A)。さらに、過形成の細胞株は、非常に可変性のレベルのCXCL5を分泌した。

【0124】

ELISAアッセイを通して得られたこれらの結果は、RNAレベルで確認された(図2B)。

【0125】

最後に、CXCL5プロモーター構築物を異なる前立腺癌株にトランスフェクションし

10

20

30

40

50

た。C X C L 5 プロモーター活性は、A R 陽性細胞株と比較してA R 陰性前立腺癌株においてより高かったことが示された(図2C)。

【0126】

まとめると、これらの結果は、C X C L 5 は、グレードの高い前立腺腫瘍の上皮細胞によって、すなわち、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞において高度に発現されていることを実証する。

【0127】

実施例3：C X C L 5 は前立腺癌細胞の*in vitro*における増殖を増強する。

C W R - R 1 細胞の安定なトランスフェクション体が、C X C L 5 c D N A を用いてのトランスフェクションによって作製された。このようにして得られた安定なC W R - R 1 トランスフェクション体をさらにルシフェラーゼ遺伝子を用いてトランスフェクションし、*in vivo*においてその増殖をモニタリングした。野生型C W R - R 1 細胞(C W R - R 1 と呼ぶ)およびルシフェラーゼ遺伝子のみを用いてトランスフェクションされたC W R - R 1 細胞(C W R - R 1 L u c と呼ぶ)をコントロールとして使用した。

10

【0128】

C 3 S 2 およびC 2 S 2 と呼ばれる2つの別個のクローンを選択した。これらのクローンは、それぞれC X C L 5 の中程度(C 3 S 2 )および高度(C 2 S 2 )の発現を示した。特に、これらのクローンにおけるC X C L 5 の分泌は、D U - 1 4 5 またはM D A - P C a 1 などのA R 陰性細胞株においてより低かった。

20

【0129】

C X C L 5 を発現するクローンは、親C W R - R 1 細胞よりも2から3倍速い増殖を示した(図3B)。

【0130】

腫瘍細胞は転移するために支持体に付着する変化した能力を有さなければならないので、プラスチック皿への*in vitro*における付着の動態を実施した。C 2 S 2 およびC 3 S 2 クローンは、野生型細胞よりも遅い付着動態を有することが示された(図3C)。

【0131】

まとめると、これらの結果は、正常細胞をC X C L 5 を用いてトランスフェクションすると、野生型細胞と比べてより速い増殖および支持体に付着する変化した能力を示すトランスフェクション体が得られることを実証する。

30

【0132】

実施例4：C X C L 5 は*in vivo*において前立腺癌細胞の増殖を劇的に増加させる。

その後、腫瘍増殖に対するC X C L 5 の効果を評価した。

【0133】

C W R - R 1 - L U C 細胞またはC 2 S 2 細胞を無胸腺マウスの前立腺に注入した。興味深いことに、C X C L 5 を発現する細胞は、野生型細胞と比べてその増殖の劇的な増加を示した(図4)。

【0134】

この結果はさらに、C X C L 5 が細胞増殖において役割を果たすことを実証する。

【0135】

実施例5：C X C L 5 はアンドロゲンにより調節される遺伝子である。

C X C L 5 が前立腺腫瘍のホルモンエスケープに関与し得るかどうかを評価するために、次に、C X C L 5 がアンドロゲンによって調節されるかどうかを研究した。

40

【0136】

血清の脱ステロイド化によるアンドロゲンの除去は、C W R - R 1 (図5A)およびL N C a P (図5B)細胞におけるC X C L 5 R N A レベルを強く増加させたことが観察された。他方で、培地にジヒドロテストステロンを添加すると、C X C L 5 R N A のレベルは部分的に減少した(図5)。

【0137】

C X C L 5 の発現に対するピカルタミド(抗アンドロゲン物質)の効果も研究した。ピ

50

カルタミドは、CWR-R1細胞においてCXCL5RNAを2から3倍増加させたことが観察された(図6A)。

【0138】

ピカルタミドで処理したCWR-R1細胞は、減少した増殖を示した(図6B)。逆に、CXCL5を発現する安定なクローンについて観察されたように、組換えCXCL5の添加は、CWR-R1細胞の増殖を2~4倍増加させた(図6B)。興味深いことに、CXCL5の添加はまた、ピカルタミドによる増殖の阻害を部分的に軽減し得る(図6B)。

【0139】

この結果は、CXCL5がアンドロゲンによって負に調節されていることを示す。

10

【0140】

実施例6：CXCL5は、ピカルタミドの非存在下および存在下の両方においてCWR-R1細胞の増殖を増加させる。

CXCL5が、*in vivo*においてCWR-R1細胞に対してアンドロゲン非依存性増殖を付与し得るかどうかは次に決定された。

【0141】

無胸腺マウスを去勢し、そしてその後、CWR-R1またはC2S2細胞を前立腺に接種した(図7A)。CWR-R1細胞は、アンドロゲンの非存在下において腫瘍を形成できなかった。他方で、C2S2細胞は、去勢された動物において非常に急速に腫瘍を形成することができた。

20

【0142】

ホルモンエスケープを評価するために、CWR-R1またはC2S2細胞を、無胸腺マウスの前立腺に注入した(図7B)。接種から2週間後、マウスを2群に分け、一方は去勢し、他方はニセの操作をした。CWR-R1細胞は去勢した動物においては増殖できなかったが、インタクトな動物では、C2S2細胞と比べて2から3週間の遅延はあったが増殖することができた(図7B)。他方で、C2S2細胞は去勢によって弱い影響を受け、そして減少した増殖の1週間後に、去勢されていない動物に存在する細胞と同じくらい急速に再度増殖した。

【0143】

これらの結果は、CXCL5を発現する腫瘍を有する動物が去勢された場合に、ホルモンエスケープが起こることを示す。これとは対照的に、野生型はエスケープしない。まとめると、これらのデータは、CXCL5が前立腺癌細胞のホルモンエスケープに関与する新規なアンドロゲンにより調節される遺伝子であることを示す。

30

【0144】

実施例7：血清中CXCL5レベルは、CXCL5の腫瘍内発現と相関する。

血清中濃度の測定が実行可能であり、そしてCXCL5の腫瘍内発現と一致し得るかどうかを決定するために、CWR-R1またはCWR-R1-CXCL5腫瘍のいずれかを有するマウスの血清およびマウスの腫瘍の全細胞抽出物におけるCXCL5の発現を分析した。図8Aに示されるように、腫瘍内発現は、CWR-R1細胞の腫瘍よりも、CWR-R1-CXCR5細胞から構成される腫瘍の方が10倍以上高かった。CWR-R1腫瘍を有する動物の血清において、本発明者らはCXCL5レベルを検出することができず、一方、CXCL5レベルは、CWR-R1-CXCL5腫瘍を有する動物において高かった(約130pg/ml)(図8B)。これは、血清中CXCL5レベルが腫瘍のそのレベルと一致することを実証する。

40

【0145】

実施例8：CXCL5作用の阻害は細胞増殖を減少させる。

以前の結果に基づいて、CXCL5作用の遮断は見込みある治療アプローチを構成し得る。この理論を実証するために、2つのアプローチを使用した。1つは特異的な遮断抗体を使用することによるCXCL5作用の遮断、もう1つは、shRNA法を用いてのCXCL5発現のダウンレギュレーションによるCXCL5作用の遮断である。

50

## 【 0 1 4 6 】

高いレベルの C X C L 5 を天然に発現し、そして非常に悪性度の高い P C - 3 細胞を使用した。特異的抗体を用いて C X C L 5 の作用を遮断した場合に、P C - 3 細胞の増殖が、非特異的な免疫血清と比較して強く減少したことが観察された ( 図 9 A ) 。

## 【 0 1 4 7 】

P C - 3 細胞における C X C L 5 の発現は、それらを C X C L 5 に対する s h R N A 構築物を用いてトランスフェクションすることによって阻害された。C X C L 5 の発現は、4 日間の阻害後に非ターゲット s h R N A コントロールベクターと比べて強く減少したことが観察された ( 図 9 B ) 。トランスフェクションされた細胞の増殖を測定すると、C X C L 5 の阻害はまた、10 倍超で P C - 3 細胞の増殖を劇的に阻害し得ることが観察された。

10

## 【 0 1 4 8 】

結論すると、2 つのアプローチは、C X C L 5 の作用の遮断がその分裂促進効果を強く減少させ得ることを明らかに実証する。

## 【 0 1 4 9 】

実施例 9 : C X C L 5 はヒト血清中および尿中に検出され得る。

この実験の目標は、C X C L 5 タンパク質が、ヒト患者の血中および尿中に検出され得ることを実証することであった。これを達成するために、前立腺癌が疑われる 20 人の患者の血液および尿を回収した。本発明者らは感度の高い化学発光 E L I S A アッセイを据えた ( 実施例 1 の段落 1 . 1 5 参照 ) 。血清中では、C X C L 5 のレベルは 2 1 7 pg/ml ~ 2 1 8 2 pg/ml の範囲であった。尿中では、C X C L 5 のレベルははるかにより低く、4 . 2 pg/ml ~ 5 7 pg/ml の範囲であった ( 図 1 0 ) 。このことは、C X C L 5 タンパク質が患者の尿および血清中に検出され得ることを実証する。

20

## 【 0 1 5 0 】

実施例 1 0 : 結論

ホルモンエスケープは前立腺癌処置における大きな問題である。なぜなら、抗アンドロゲン物質で処置した全ての患者に 1 4 カ月から 3 0 カ月の一定の期間の後に起こるからである。ホルモン難治性の前立腺癌のためのマーカーおよび治療ターゲットの探索は重要であるようである。本発明者らは本明細書において、ケモカイン C X C L 5 ( E N A - 7 8 ) がグレードの高い前立腺腫瘍の上皮細胞によって高度に発現されていることを示す。さらに、侵襲性の前立腺癌細胞株は、より悪性度の低い細胞株と比べて、より高いレベルの C X C L 5 を産生する。このより高い発現は、C X C L 5 遺伝子プロモーターのより高い転写活性に起因する。アンドロゲンレセプター ( A R ) 陽性の前立腺癌細胞株 C W R - R 1 における C X C L 5 c D N A の安定なトランスフェクションは、その *in vitro* における増殖を増加させ、そしてプラスチック皿に付着するその能力を減少させる。さらに、C X C L 5 は、これらの細胞に *in vivo* における壮観な増殖を付与する。本発明者らはまた、C X C L 5 遺伝子がアンドロゲンにより調節され：アンドロゲンの除去はその発現をアップレギュレーションし、一方で、アンドロゲンの添加はその発現を減少させることを実証する。さらに、抗アンドロゲン物質のピカルタミドを用いて C W R - R 1 細胞を処理すると、C X C L 5 の発現は増加する。C W R - R 1 細胞の C X C L 5 による処理は、ピカルタミドの存在下でさえも *in vitro* における細胞増殖を増加させることができる。In vivo において、C X C L 5 はアンドロゲンの非存在下において C W R - R 1 細胞の腫瘍取り込みを可能とし、一方、野生型細胞はこれらの条件では増殖できない。さらに、C W R - R 1 - C X C L 5 腫瘍を有する動物が去勢されると、ホルモンエスケープが起こり、一方、野生型細胞はエスケープしない。本発明者らはまた、C X C L 血清レベルが、マウスにおける C X C L 5 の腫瘍内発現と相関することを示す。ヒトにおいて、C X C L 5 を血清中および尿中に検出することができた。さらに、本発明者らは、C X C L 5 遮断抗体によって、または s i R N A アプローチによりその発現をダウンレギュレーションすることによって、C X C L 5 の作用を遮断することは、前立腺癌細胞の増殖を阻害することを示す。まとめると、本発明者らのデータは、C X C L 5 は前立腺癌細胞のホルモンエスケープに

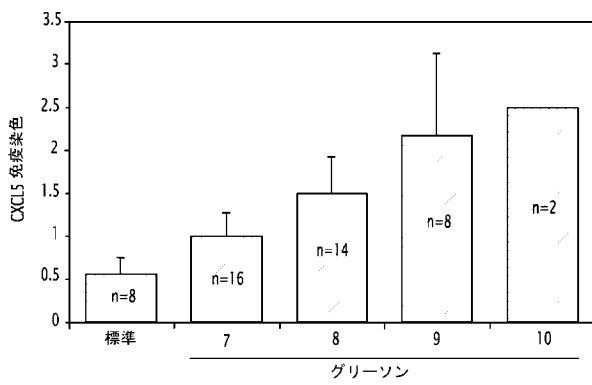
30

40

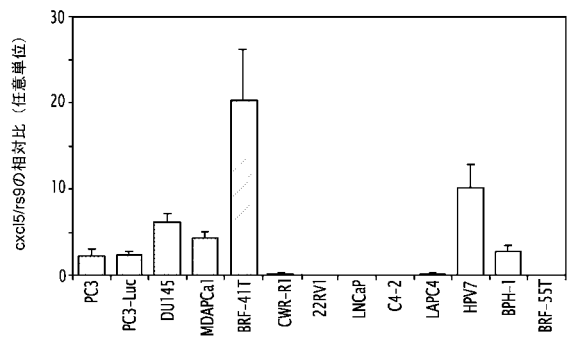
50

関与する新規なアンドロゲンにより調節される遺伝子であり、これは新規な治療ターゲットを構成し得ることを示す。

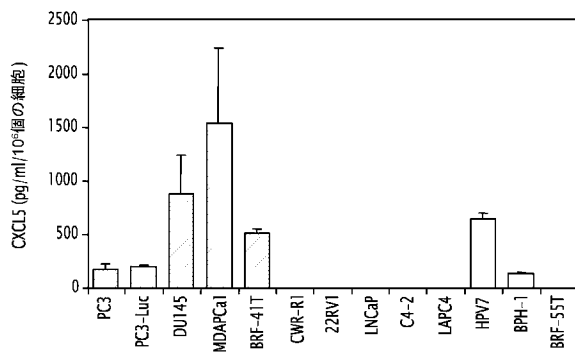
【 図 1 】



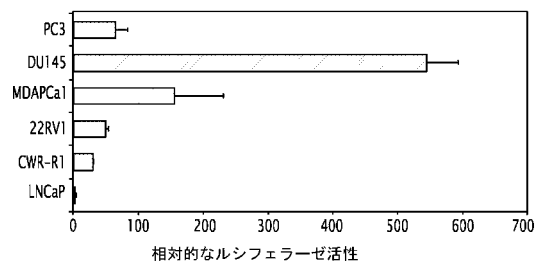
【 図 2 B 】



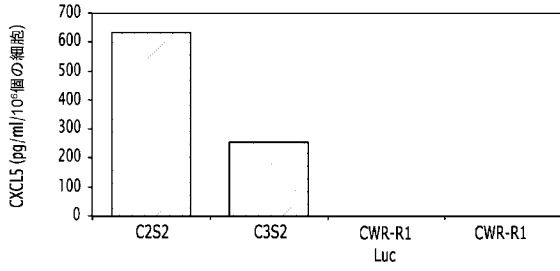
【 図 2 A 】



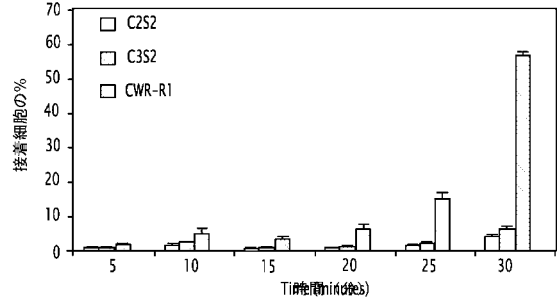
【 図 2 C 】



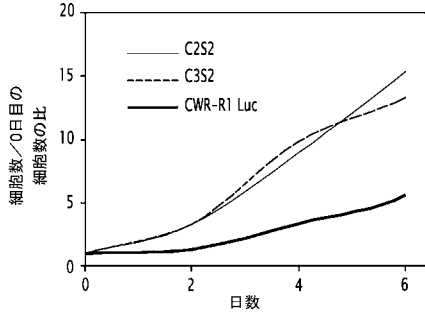
【 図 3 A 】



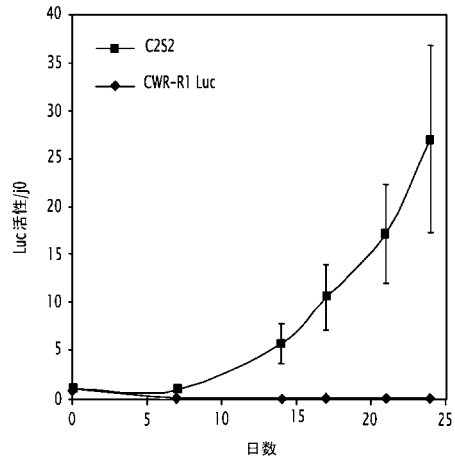
【 図 3 C 】



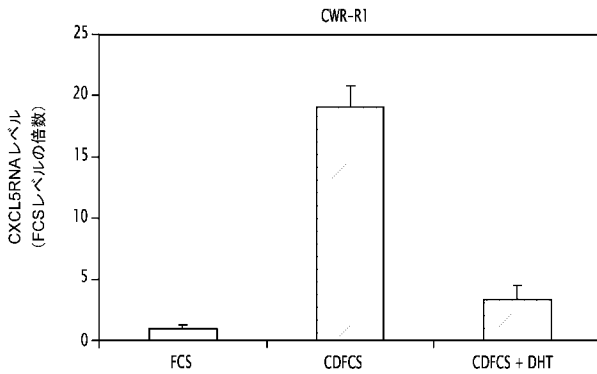
【 図 3 B 】



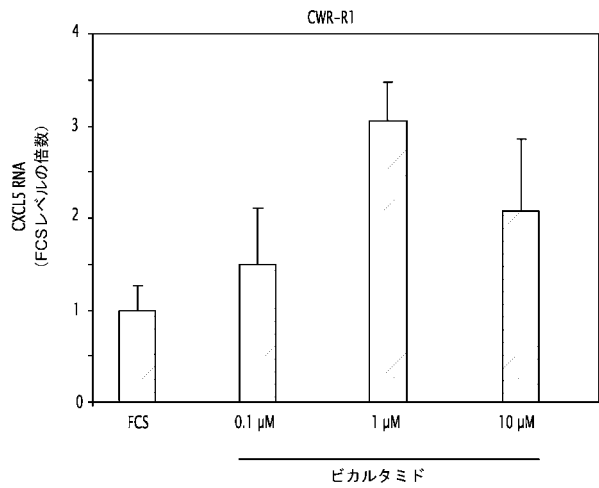
【 図 4 】



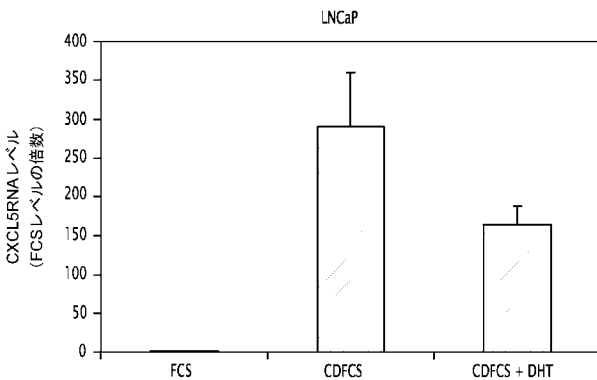
【 図 5 A 】



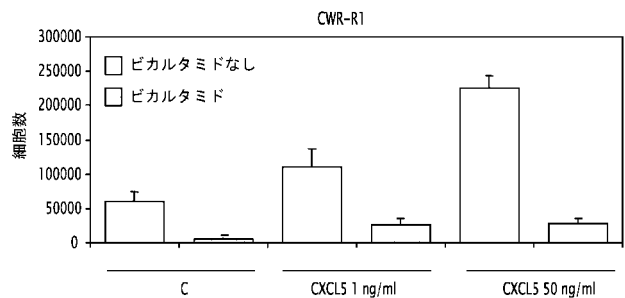
【 図 6 A 】



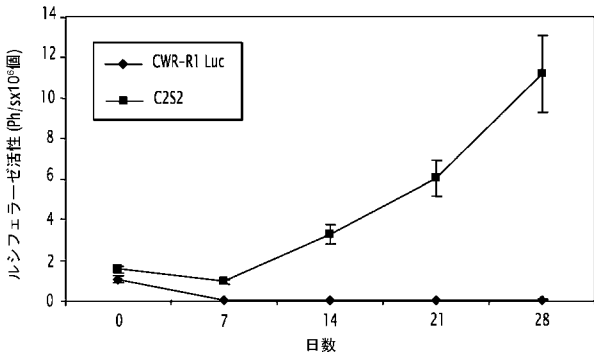
【 図 5 B 】



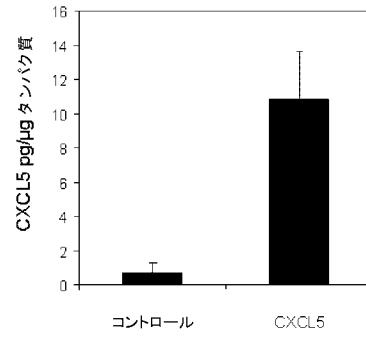
【 図 6 B 】



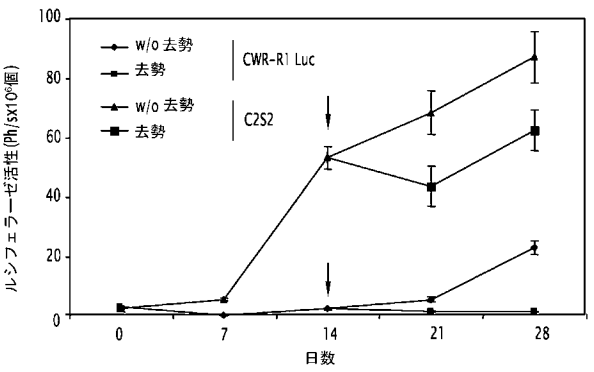
【 図 7 A 】



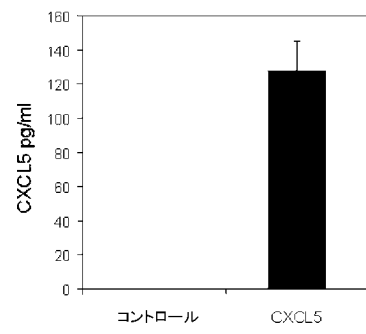
【 図 8 A 】



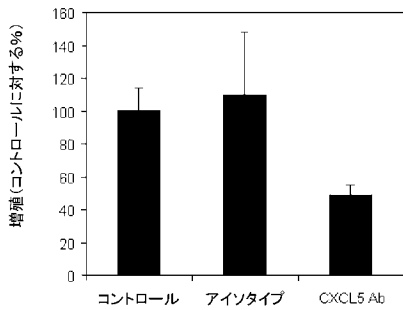
【 図 7 B 】



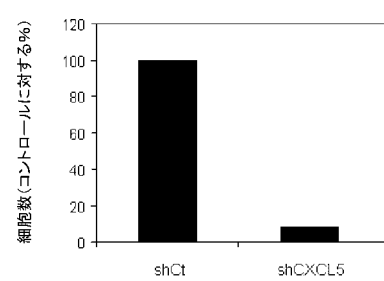
【 図 8 B 】



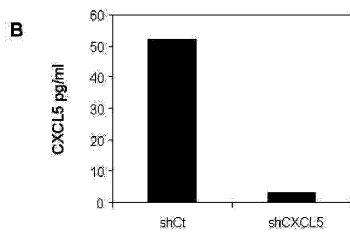
【 図 9 A 】



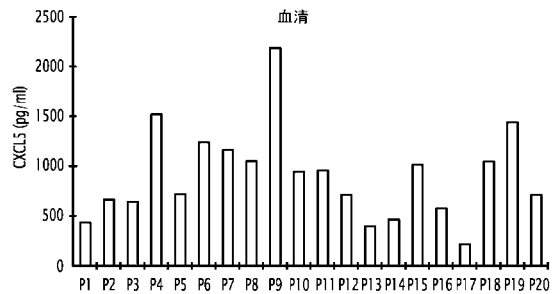
【 図 9 C 】



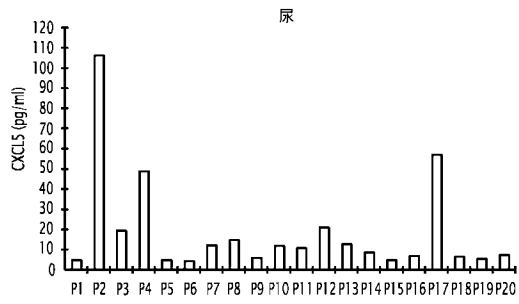
【 図 9 B 】



【 図 10 A 】



【 図 1 0 B 】



【 配 列 表 】

2013533458000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/056211
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPENDEX, FSTA, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Jill A. Macoska: "CXCL5 is a novel mediator of prostate cancer proliferation and migration/invasion", INTERNET ARTICLE; REPORT ON GRANT PROPOSAL 30 June 2008 (2008-06-30), XP008114106, Retrieved from the Internet: URL:http://www.stormingmedia.us/61/6108/A610884.html [retrieved on 2009-10-28] abstract Relevant for non-unity ----- -/--	1,8-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 July 2011		04/08/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  van der Kooij, M

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2011/056211

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2011/056211**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-10, 12
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2011/ 056211

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. claims: 1-6, 12

An in vitro method for assessing hormone escape in a patient suffering from prostate cancer comprising measuring the amount and/or expression level of CXCL5.  
The use of CXCL5 as a marker for assessing hormone escape in prostate cancer.

---

## 2. claim: 7

Kit comprising means for detecting amount and/or expression level of CXCL5, and a positive and/or negative control sample indicative of the amount and/or expression level of CXCL5 in an individual suffering from prostate cancer.

---

## 3. claims: 8-10

A CXCL5 antagonist for use in the treatment or prevention of androgen-independent prostate cancer and/or hormone escape in prostate cancer.

---

## 4. claim: 11

An in vitro method of screening for drugs for the treatment of an androgen-independent cancer employing CXCL5 as screening target.

---

## 5. claims: 13-15

Use of a recombinant cell line derived from a prostate cancer as a cellular model for androgen-independent cancer cells, characterized in that the genome of said recombinant cell line comprises an expression vector comprising CXCL5.  
A non human animal comprising a recombinant cell line derived from a prostate cancer cell whereby the genome of said cell line comprises an expression vector comprising CXCL5.  
Use of said non human animal as model for androgen-independent prostate cancer.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/056211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ARAKI SHINAKO ET AL: "Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer.",            CANCER RESEARCH 15 JUL 2007,            vol. 67, no. 14, 15 July 2007 (2007-07-15),            pages 6854-6862, XP002542955,            ISSN: 0008-5472            cited in the application            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-5
A	<p>BEGLEY LESA A ET AL: "CXCL5 promotes prostate cancer progression.",            NEOPLASIA (NEW YORK, N.Y.) MAR 2008,            vol. 10, no. 3, March 2008 (2008-03),            pages 244-254, XP002542954,            ISSN: 1476-5586            cited in the application            Relevant for non unity            abstract            figures 1,3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-6,12
X	<p>US 2008/206766 A1 (MACOSKA JILL A [US])            28 August 2008 (2008-08-28)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	8-10
A	<p>claims 1,6,9,12            paragraphs [0038], [0053], [0298],            [0331]; figures 13,21</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-6,12
X	<p>R&amp;D Systems: "human CXCL5/ENA-78 Catalog Number: DY254",            11 January 2010 (2010-01-11), pages 1-6,            XP55003839,            Retrieved from the Internet:            URL: <a href="http://www.rndsystems.com/pdf/dy254.pdf">http://www.rndsystems.com/pdf/dy254.pdf</a>            [retrieved on 2011-07-28]            page 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	7
A	<p>US 6 107 103 A (XUAN JIAN W [CA] ET AL)            22 August 2000 (2000-08-22)            column 4, line 49 - line 57</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-6,12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/056211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KARACA B ET AL: "Profiling of angiogenic cytokines produced by hormone- and drug-refractory prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145 before and after treatment with gossypol", EUROPEAN CYTOKINE NETWORK, JOHN LIBBEY EUROTEXT LTD., MONTROUGE, FR, vol. 19, no. 4, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 176-184, XP008113186, ISSN: 1148-5493 abstract figures 1-6</p> <p>-----</p>	8-10
A	<p>WHITE J R ET AL: "Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 24 APR 1998, vol. 273, no. 17, 24 April 1998 (1998-04-24), pages 10095-10098, XP002552669, ISSN: 0021-9258 abstract figures 1,2</p> <p>-----</p>	8-10
A	<p>GLYNN P C ET AL: "The selective CXCR2 antagonist SB272844 blocks interleukin-8 and growth-related oncogene-alpha-mediated inhibition of spontaneous neutrophil apoptosis.", PULMONARY PHARMACOLOGY &amp; THERAPEUTICS 2002, vol. 15, no. 2, 2002, pages 103-110, XP002552670, ISSN: 1094-5539 abstract</p> <p>-----</p>	8-10
T	<p>PO-LIN KUO ET AL: "CXCL5/ENA78 increased cell migration and epithelial-to-mesenchymal transition of hormone-independent prostate cancer by early growth response-1/snail signaling pathway", JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 226, no. 5, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 1224-1231, XP55003805, ISSN: 0021-9541, DOI: 10.1002/jcp.22445 the whole document</p> <p>-----</p>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2011/056211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008206766	A1	28-08-2008	NONE
-----			
US 6107103	A	22-08-2000	NONE
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(74)代理人 100135873  
弁理士 小澤 圭子

(74)代理人 100116528  
弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100122736  
弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747  
弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540  
弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146031  
弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100147533  
弁理士 岡崎 祐一

(72)発明者 ラゼネック, グウェンダル  
フランス国、エフ - 3 4 2 9 5 モンペリエ・セデックス 5、リュ・オーギュスタン・フリッ  
シュ 8 0、アンセルム・ユ 8 4 4・オピタル・サン・エロワ - バティマン・イエヌエム

(72)発明者 ヴァンドリュウ, ダヴィド  
フランス国、エフ - 3 4 2 9 5 モンペリエ・セデックス 5、リュ・オーギュスタン・フリッ  
シュ 8 0、アンセルム・ユ 8 4 4・オピタル・サン・エロワ - バティマン・イエヌエム

(72)発明者 マドリー, プリジット  
フランス国、エフ - 3 4 2 9 5 モンペリエ・セデックス 5、リュ・オーギュスタン・フリッ  
シュ 8 0、アンセルム・ユ 8 4 4・オピタル・サン・エロワ - バティマン・イエヌエム

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA26 AA29 AA40 BA13 BB03 BB20 CA26  
CB01 CB02 CB03 CB17 DA14 DA36 FB01 FB02 FB03 FB08  
FB12 GC15  
4B024 AA11 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA03 EA04 GA11  
HA01 HA11  
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55

	QR62	QS16	QS25	QS32	QX01			
4C084	AA02	AA13	AA17	BA44	DC50	NA14	ZA812	ZB262
4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA81	ZB26
4H045	AA11	AA30	BA10	CA40	DA75	EA20	EA50	FA74

专利名称(译)	CXCL5作为前列腺癌中激素逃逸的标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013533458A</a>	公开(公告)日	2013-08-22
申请号	JP2013505450	申请日	2011-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗		
[标]发明人	ラゼネックグウエンダル ヴァンドリュウダヴィド マドリーブリジット		
发明人	ラゼネック,グウエンダル ヴァンドリュウ,ダヴィド マドリー,ブリジット		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 C07K16/00 A01K67/027 G01N33/543 G01N33/50 G01N33/15 A61K45/00 A61K48/00 A61K31/7105 A61K38/00 A61P35/00 A61P13/08 C12N15/09		
CPC分类号	A61P13/08 G01N33/57434 G01N33/6863 G01N2333/521 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N2333/522 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.P C12Q1/68.A C07K16/00 A01K67/027 G01N33/543.501.A G01N33/50.Z G01N33/15. Z A61K45/00 A61K48/00 A61K31/7105 A61K37/02 A61P35/00 A61P13/08 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045 /BB03 2G045/BB20 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB17 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024 /AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063 /QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084 /BA44 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA812 4C084/ZB262 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 三宅 俊男 田中洋子 阿基奥·希巴达 冈崎雄一		
优先权	2010305402 2010-04-19 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及CXCL5作为评估前列腺癌细胞中激素逃逸的标志物的用途。本发明还提供了用于评估前列腺癌细胞中激素逃逸的诊断方法和试剂盒，以及用于治疗或预防前列腺癌中前列腺癌和/或激素逃逸的CXCL5拮抗剂。

