

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6381519号  
(P6381519)

(45) 発行日 平成30年8月29日(2018.8.29)

(24) 登録日 平成30年8月10日(2018.8.10)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 12 Q 1/6851 (2018.01)	C 12 Q 1/6851	Z
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/09	Z
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	N
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 K 39/395	D
A 61 P 19/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	

請求項の数 14 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-505034 (P2015-505034)
(86) (22) 出願日	平成25年3月15日 (2013.3.15)
(65) 公表番号	特表2015-520606 (P2015-520606A)
(43) 公表日	平成27年7月23日 (2015.7.23)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2013/001204
(87) 國際公開番号	W02013/153458
(87) 國際公開日	平成25年10月17日 (2013.10.17)
審査請求日	平成28年3月15日 (2016.3.15)
(31) 優先権主張番号	61/724,807
(32) 優先日	平成24年11月9日 (2012.11.9)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/621,949
(32) 優先日	平成24年4月9日 (2012.4.9)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	513082856 フンダシオ インスティトゥト デ レセ ルカ ピオメティカ (イエレベ バルセロ ナ) スペイン国 エ-08028 バルセロナ , バルディリ イ レイサック, 10 -12
(73) 特許権者	514256243 インスティトゥーシオ カタラーナ デ レセルカ イ エストゥディス アバンサ ツツ スペイン国 08028 バルセロナ, ペヘ ジュイス カンパニーズ, 23
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】がん転移の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】

c - M A F 遺伝子の発現レベルをトリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんに罹患している被験体における前記がんの骨転移、再発および/または不良な臨床転帰の指標とするインピトロでの方法であって、該方法は、

i ) 前記被験体のサンプル中の c - M A F 遺伝子の発現レベル、コピー数、または増幅を決定する工程、および

i i ) 工程 i ) において得られた発現レベル、コピー数、または増幅を参照値と比較する工程

を含み、ここで、前記参照値と比較して上昇した前記遺伝子の発現レベル、コピー数、または増幅の程度は、骨転移または再発および/または不良な臨床転帰を起こす上昇したリスクを示す、インピトロでの方法。

## 【請求項 2】

c - M A F 遺伝子の発現レベルをトリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんに罹患している被験体のために個別化治療をデザインするための指標とするインピトロでの方法であって、該方法は、

i ) 前記被験体のサンプル中の c - M A F 遺伝子発現レベル、コピー数、または増幅を定量する工程、および

i i ) i ) において得られた発現レベル、コピー数、または増幅を参照値と比較する工程を含み、ここで、該発現レベル、コピー数、または増幅の程度が、前記参照値と比較して

10

20

上昇している場合、前記被験体は、骨転移、再発および／または不良な臨床転帰の予防および／または処置を目指す治療を受けるのに適格である、インビトロでの方法。

【請求項 3】

平均より高い前記遺伝子の発現レベル、コピー数、または増幅が、骨転移または再発および／または不良な臨床転帰の上昇したリスクを示し、このリスクは、c - M A F 発現のレベルに比例する、請求項 1 に記載のインビトロでの方法。

【請求項 4】

前記骨分解または骨転移を予防する薬剤が、ビスホスホネート、R A N K L インヒビター、P T H もしくはP T H L H のインヒビターまたは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 - 2 2 3 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、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 5】

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 4 に記載の方法。

【請求項 6】

c - M A F 遺伝子の増幅をトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはE R + 乳がん（ルミナルA およびB を含む）に罹患している被験体における前記がんの骨転移または再発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ときの前記 c - M A F 遺伝子の前記増幅は、骨転移または再発を起こす上昇したリスクを示す、方法。

20

【請求項 7】

c - M A F 遺伝子の増幅をトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんに罹患している被験体の臨床転帰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ときの前記 c - M A F 遺伝子の前記増幅は、不良な臨床転帰を示す、方法。

【請求項 8】

c - M A F 遺伝子の転座を、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはE R + 乳がん（ルミナルA およびB を含む）に罹患している被験体の臨床転帰の指標とするインビトロでの方法であって、前記方法は、前記被験体のサンプル中の前記 c - M A F 遺伝子が、転座しているかを決定する工程を含み、ここで、前記 c - M A F 遺伝子の前記転座は、不良な臨床転帰を示す、方法。

30

【請求項 9】

前記がんに罹患している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をさらに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ときの前記 c - M A F 遺伝子の増幅は、骨転移を起こす上昇したリスクを示す、請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

40

前記被験体サンプルが、前記 c - M A F 遺伝子の倍数体であるかをさらに決定する工程を含む、請求項 6 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

患者におけるトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはE R + 乳がんからの骨転移または再発または骨分解の処置および／または予防のために使用するための、c - M A F 阻害剤を含む組成物であって、前記 c - M A F 阻害剤が、c - M A F 特異的 s i R N A、c - M A F 特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド、c - M A F 特異的リボザイム、c - M A F 阻害性抗体もしくはナノボディ、ドミナントネガティブ c - M A F バリアント、表 1 もしくは表 2 の化合物、触媒 R N A、D N A 酵素、阻害性抗体、阻害性ペプチド、c - M A F 特異的小分子、c - M A F 特異的抗体、c - M A F 特異的抗体様分子、c -

50

M A F 特異的な構造的に制約された（環状の）ペプチド、c - M A F 特異的ステープルドペプチド、または c - M A F 特異的アルファボディからなる群より選択され、前記組成物は、前記患者における c - M A F の発現レベル、コピー数または増幅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ことを特徴とし、ここで、参照値に対する、前記遺伝子の上昇した発現レベル、コピー数、または増幅は、骨転移または再発および／または不良な臨床転帰を起こす上昇したリスクを示し、それによって、前記患者が前記組成物によって処置されるべきであることを示す、組成物。

【請求項 1 2】

トリプルネガティブ乳がんを有する患者における骨分解を回避または予防する際に使用するための、骨分解を回避するかまたは予防することができる薬剤を含む組成物であって、該薬剤が、ビスホスホネート、R A N K L インヒビター、P T H もしくはP T H L H インヒビターまたは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 - 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、前記組成物は、前記患者における c - M A F の発現レベル、コピー数または増幅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ことを特徴とし、ここで、参照値に対する、前記遺伝子の上昇した発現レベル、コピー数、または増幅は、骨転移または再発および／または不良な臨床転帰を起こす上昇したリスクを示し、それによって、前記患者が前記組成物によって処置されるべきであることを示す、組成物。

【請求項 1 3】

トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはE R + 乳がんに罹患している被験体における骨転移のリスクを予防するためまたは減少させるための組成物であって、骨転移を予防するかまたは減少させる薬剤を含み、ここで、前記骨転移を予防するかまたは減少させる薬剤は、治療有効量の c - M A F インヒビター、治療有効量の、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、C C R 5 アンタゴニストおよび／またはラジウム - 2 2 3 からなる群から選択される、骨転移を阻害および／または処置することを目的とする治療薬であり、前記組成物は、前記被験体における c - M A F の発現レベル、コピー数または増幅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ことを特徴とし、ここで、参照値に対する、前記遺伝子の上昇した発現レベル、コピー数、または増幅は、骨転移または再発および／または不良な臨床転帰を起こす上昇したリスクを示し、それによって、前記被験体が前記組成物によって処置されるべきであることを示す、組成物。

【請求項 1 4】

骨転移を処置するためまたは予防するためには使用される前記治療が、m T o r インヒビター、C C R 5 アンタゴニスト、c - M A F 阻害剤またはS r c キナーゼインヒビターである、請求項 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

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（「3 1 9 0 \_ 0 0 1 P C 0 3 \_ S E Q I D L i s t i n g \_ a s c i i . t x t 」、4 8 , 2 6 9 バイト、2 0 1 3 年 3 月 1 5 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。

【0 0 0 2】

発明の背景

発明の分野

本発明は、原発腫瘍サンプルにおける c - M A F 遺伝子のレベル、1 6 q 2 3 または1 6 q 2 2 - 2 4 遺伝子座の増幅または転座の決定に基づく、トリプルネガティブ（基底細胞様（b a s a l - l i k e ）を含む）乳がんまたはあるいはE R + 乳がん（ルミナルタイプ（l u m i n a l t y p e ）A およびルミナルタイプBを含む）における骨転移の

10

20

30

40

50

予後診断に関する。同様に、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはE R + 乳がんを有する被験体において個別化治療（c u s t o m i z e d t h e r a p y）をデザインするための方法にも関し、その方法は、c - M A F 遺伝子の発現レベル、1 6 q 2 3 または1 6 q 2 2 - 2 4 遺伝子座の増幅または転座を決定する工程を含む。最後に、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんの転移またはE R + 乳がんの転移、特に、骨転移の処置における治療薬としてのc - M A F インヒビターの使用に関する。

#### 【背景技術】

##### 【0 0 0 3】

###### 背景技術

10

乳がんは、世界中で2番目に一般的なタイプのがん（10.4%；肺がんの次位）および5番目に一般的ながんによる死亡原因（肺がん、胃がん、肝臓がんおよび結腸がんの次位）である。女性の中で、乳がんは、最も一般的ながんによる死亡原因である。2005年は、世界中で502,000人が乳がんによって死亡した（がんによる死亡数の7%；全死亡数のほぼ1%）。1970年代から、世界中の症例数は著しく増加しており、これは、西洋諸国における現代的な生活様式に一部起因する現象である。

##### 【0 0 0 4】

乳がんは、TNMシステムに従ってステージに分類される（American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002（その全体が参照により本明細書中に援用される）を参照のこと）。予後診断は、ステージ分類の結果と密接な関係があり、ステージ分類は、臨床試験と医療行為の両方において患者を処置に割り当てるためにも使用される。ステージに分類するための情報は、以下のとおりである：

20

- ・T X：原発腫瘍の評価が不可能である。T 0：腫瘍のエビデンスが無い。T i s：上皮内癌腫（in situ carcinoma）で、浸潤無し。T 1：腫瘍は、2 cm以下である。T 2：腫瘍は、2 cmより大きいが5 cm未満である。T 3：腫瘍は、5 cmより大きい。T 4：胸壁もしくは皮膚において成長している任意のサイズの腫瘍、または炎症性乳がん。

- ・N X：近傍のリンパ節の評価が不可能である。N 0：がんは、領域リンパ節に広がっていない。N 1：がんは、1～3つの腋窩リンパ節または1つの内乳腺リンパ節に広がっている。N 2：がんは、4～9つの腋窩リンパ節または複数の内乳腺リンパ節に広がっている。N 3：以下のうちの1つに当てはまる：

30

- ・がんは、10個以上の腋窩リンパ節に広がっているか、またはがんは、鎖骨下リンパ節に広がっているか、またはがんは、鎖骨上リンパ節に広がっているか、またはがんは、腋窩リンパ節に波及していて、内乳腺リンパ節に広がっているか、またはがんは、4つ以上の腋窩リンパ節に波及していて、最小限のがんが、内乳腺リンパ節またはセンチネルリンパ節の生検材料に存在する。

- ・M X：遠隔拡散（転移）の存在の評価が不可能である。M 0：遠隔拡散は無い。M 1：鎖骨上リンパ節を含まない遠隔器官への広がりが生じている。

40

##### 【0 0 0 5】

固形腫瘍がんを有する患者のほとんどが転移後に死亡するという事実は、腫瘍を転移させる分子機序および細胞機序を理解することが極めて重要であることを意味している。最近の刊行物は、まだほとんど知られていない複雑な機序によってどのようにして転移が引き起こされるか、およびまた、どのようにして種々の転移細胞型が特定の器官に対する指向性を有するかを示してきた。これらの組織特異的な転移細胞は、それらを特定の器官に転移増殖させる（colonize）、獲得した一連の機能を有する。

##### 【0 0 0 6】

すべての細胞が、その表面上、細胞質内および細胞核内にレセプターを有する。ある特定の化学メッセンジャー（例えば、ホルモン）は、上記レセプターに結合し、これにより

50

、細胞に変化が引き起こされる。乳がん細胞に影響し得る重要なレセプターは3つ存在する：エストロゲンレセプター（ER）、プロゲステロンレセプター（PR）およびHER2/neuである。これらのレセプターのいずれかを有する細胞を命名する目的で、そのレセプターが存在するときは、陽性の符号がそれに付けられ、存在しないときは、陰性の符号が付けられる：ER陽性（ER+）、ER陰性（ER-）、PR陽性（PR+）、PR陰性（PR-）、HER2陽性（HER2+）およびHER2陰性（HER2-）。レセプターの状態は、特定の処置、例えば、タモキシフェンまたはトラスツズマブを使用する適格性を決定するものであるので、そのレセプターの状態は、すべての乳がんに対して重大な評価になっている。

## 【0007】

10

教師なし遺伝子発現アレイプロファイリングは、内因性サブタイプ（例えば、ルミナルA、ルミナルB、HER2+/ER-および基底細胞様サブタイプ）の識別を通じて、乳がんの不均質性に対する生物学的エビデンスを提供した。

## 【0008】

トリプルネガティブがんは、エストロゲンレセプター（ER）、プロゲステロンレセプター（PR）およびHER2に対する遺伝子を発現しない腫瘍と定義されている。このサブグループは、全タイプの乳がんの15%を占め、閉経前のアフリカ人女性およびアフリカ系アメリカ人女性に生じる乳がんのより高いパーセンテージを占める。トリプルネガティブ乳がんは、エストロゲンレセプター陽性乳がんとは非常に異なる再発パターンを有する：再発のリスクは、最初の3～5年間はかなり高いが、その後は、急激に低下し、エストロゲンレセプター陽性乳がんのリスクよりも実質的に低くなる。

20

## 【0009】

基底細胞様サブタイプは、ERとHER2の両方の遺伝子クラスターの低発現を特徴とするので、典型的には、臨床試験においてER陰性、PR陰性かつHER2陰性である；この理由で、「トリプルネガティブ」乳がんと呼ばれることが多い（Breast Cancer Research 2007, 9 (Suppl 1) : S13）。基底細胞様がんは、高分子量サイトケラチン（5/6、14および17）、P-カドヘリン、カベオリン1および2、ネスチン、Bクリスタリンならびに上皮成長因子レセプターを含む、正常な乳房の「基底」／筋上皮細胞に通常見られる遺伝子を発現する（Reiss-Fiho J.ら、<http://www.uscap.org/site~/98th/pdf/companion03h03.pdf>）。

30

## 【0010】

基底細胞様乳がんに対して国際的に認められた定義が存在しないことを考えると、トリプルネガティブ乳がんおよび基底細胞様乳がんが同義であるか否かに関する混乱が非常に大きいことは、驚くべきことではない。いくつかのグループは、これらの用語を交換可能に使用しているが、すべての基底細胞様がんが、ER、PRおよびHER2を欠くとは限らず、すべてのトリプルネガティブがんが、基底細胞様の表現型を示すとも限らないことに注意すべきである。圧倒的多数のトリプルネガティブがんが、基底細胞様の表現型である。同様に、「基底細胞」マーカーを発現している圧倒的多数の腫瘍が、トリプルネガティブである。しかしながら、基底細胞マーカーを発現しないかなりの数のトリプルネガティブがんおよびホルモンレセプターまたはHER2のいずれかを発現する基底細胞様がんの小さいがなおもかなりのサブグループが存在することに注意すべきである。Bertuccio J.（Int J Cancer. 2008 Jul 1; 123 (1) : 236-40）は、この問題に真っすぐに取り組み、遺伝子発現プロファイリングによって解析されたとき、すべてのトリプルネガティブ腫瘍が、基底細胞様がんとして分類されるとは限らないこと（すなわち、71%しか基底細胞様の表現型でなかった）および発現アレイによって分類されたすべての基底細胞様乳がん腫が、トリプルネガティブ表現型を示すとは限らないこと（すなわち77%）を立証した。

40

## 【0011】

乳がんを処置する場合に要となるものは、腫瘍が限局性であるとき、実行可能なアジュ

50

バントホルモン療法（タモキシフェンまたはアロマターゼインヒビターを用いる）、化学療法および／または放射線治療を伴う、手術である。現在、手術後の処置に対する提案（補助療法）は、あるパターンに従う。世界的な多施設研究の実際の結果を議論する世界会議がSt. Gallen, Switzerlandで2年ごとに開催されるので、このパターンは、変更される可能性がある。同様に、上記パターンはまた、National Institute of Health (NIH) のコンセンサス基準に従って見直される。これらの基準に基づくと、リンパ節に転移を有しない患者の85～90%超が、アジュバント全身療法を受ける候補になるだろう。

#### 【0012】

現在、Oncotype DXなどのPCRアッセイまたはMammaPrintなどのマイクロアレイアッセイが、特定の遺伝子の発現に基づいて乳がん再発のリスクを予測し得る。2007年2月に、MammaPrintアッセイは、Food and Drug Administrationの公的認可を獲得した最初の乳がん指標になった。

#### 【0013】

特許出願EP1961825-A1には、骨、肺、肝臓または脳への乳がん転移の発生率を予測するための方法が記載されており、その方法は、コントロールサンプルにおける対応する発現レベルと比べて、腫瘍組織サンプルにおいて1つまたは複数のマーカー(c-MAFを含む)の発現レベルを決定する工程を含む。しかしながら、この文書では、乳がん患者の生存時間の決定を可能にするいくつかの遺伝子を同時に決定することが要求されており、骨転移なしでの生存可能性の予測についての遺伝子シグネチャ(genes signature)の能力の相関関係は、統計学的に有意でなかった。

#### 【0014】

特許出願US2011/0150979には、基底細胞様乳がんの予後を予測するための方法が記載されており、その方法は、FOXC1のレベルを検出する工程を含む。

#### 【0015】

特許出願US2010/0210738は、トリプルネガティブ乳がんを有する被験体におけるがんを予後診断するための方法に関し、その方法は、サンプル中の、ランダムにアップレギュレートされているかまたはダウンレギュレートされている一連の遺伝子の発現レベルを検出する工程を含む。

#### 【0016】

特許出願US2011/0130296は、トリプルネガティブ乳がんの診断および予後診断において有用なマーカー遺伝子の同定に関する。

#### 【0017】

トリプルネガティブ乳がんに罹患している被験体が転移を起こす確率の予測を可能にする新しいマーカーを同定する必要がある。新しい予後因子の同定は、最も適した処置の選択において指針となり得る。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0018】

【非特許文献1】American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002

【非特許文献2】Breast Cancer Research 2007, 9 (Suppl 1): S13

【非特許文献3】Reis-Finho J.ら、<http://www.uscap.org/site~/98th/pdf/companion03h03.pdf>

【非特許文献4】Bertuccioら(Int J Cancer. 2008 Jul 1; 123 (1): 236-40)

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

## 【0019】

1つの態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはE R + 乳がん（ルミナルAおよびBを含む）に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インビトロでの方法に関し、その方法は、

i ) 上記被験体のサンプル中のc - M A F 遺伝子の発現レベルを決定する工程、および  
i i ) 工程i )において得られた発現レベルを参照値と比較する工程

を含み、ここで、上記参照値と比較して上昇した上記遺伝子の発現レベルは、骨転移を起こす上昇したリスクを示す。

## 【0020】

別の態様において、本発明は、骨転移性トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいは骨転移性E R + 乳がんに罹患している患者の臨床転帰を予測するための10  
インビトロでの方法に関し、その方法は、

i ) 上記被験体のサンプル中の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参照値と比較する工程  
を含み、ここで、上記参照値と比較して上昇した上記遺伝子の発現レベルは、不良な臨床転帰を示す。

## 【0021】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはE R + 乳がんに罹患してい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、20

i ) 上記被験体のサンプル中のc - M A F 遺伝子発現レベルを定量する工程、および  
i i ) i )において得られた発現レベルを参照値と比較する工程  
を含み、ここで、その発現レベルが、上記参照値と比較して上昇している場合、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ある (is  
susceptible to receive a therapy)。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。発現レベルが、上記参照値と比較して高くない場合、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。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ない。30

## 【0022】

別の態様において、本発明は、乳がん、例えば、トリプルネガティブ乳がんまたはE R + 乳がんに罹患している被験体における骨転移のリスクを決定するための方法に関し、その方法は、上記被験体のサンプル中のc - M A F 遺伝子の発現レベルを決定する工程を含み、ここで、平均値 + 1 標準偏差より高い上記遺伝子の発現レベルは、早期の骨転移の上昇したリスクを示す。この方法の特定の態様において、被験体は、その後、骨転移を予防するかまたは阻害する少なくとも1つの治療薬を投与される。

## 【0023】

別の態様において、本発明は、骨転移を伴うトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはE R + 乳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、40

i ) 上記被験体の骨転移サンプル中のc - M A F 遺伝子発現レベルを定量する工程、および

i i ) 工程 (i )において得られた発現レベルを参照値と比較する工程  
を含み、ここで、c - M A F 遺伝子発現レベルが、上記参照値と比較して上昇している場合、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ある。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る。c - M A F 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、被験体は、その後、骨転移を予防する50

、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。

【0024】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに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、骨転移を起こす上昇したリスクを示す。この方法の特定の態様において、被験体は、その後、骨転移を予防するかまたは阻害する少なくとも1つの治療薬を投与される。

【0025】

別の態様において、本発明は、乳がん、例えば、トリプルネガティブ乳がんまたはER+乳がんに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、骨転移を起こす上昇したリスクを示す。この方法の特定の態様において、被験体は、その後、骨転移を予防するかまたは阻害する少なくとも1つの治療薬を投与される。

【0026】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに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、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ない。別の実施形態において、本発明は、乳がんに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。いくつかの実施形態において、本発明は、c-MAFの増幅または転座を有する患者のために個別化治療をデザインすることに関する。いくつかの実施形態において、個別化治療は、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つの治療薬である。

【0027】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはER+乳がんからの骨転移の予防において使用するためのc-MAF阻害剤に関する。

【0028】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患しており、かつ転移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において使用するための、c-MAF阻害剤、または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に関する。

【0029】

別の態様において、本発明は、乳がんに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。

【0030】

別の態様において、本発明は、乳がんに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

10

20

30

40

50

参照 c - M A F サンプルと比較するための手段を備える。本発明は、乳がんに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。

#### 【 0 0 3 1 】

別の態様において、本発明は、乳がんに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 - M A F 遺伝子の増幅、16 q 2 3 または 16 q 2 2 - 2 4 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 - M A F 遺伝子の増幅されたレベル、16 q 2 3 または 16 q 2 2 - 2 4 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。

10

#### 【 0 0 3 2 】

別の態様において、本発明は、乳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 - M A F 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 - M A F の発現レベルを参照 c - M A F 発現レベルと比較するための手段を備える。本発明は、乳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。

20

#### 【 0 0 3 3 】

別の態様において、本発明は、乳がんに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 - M A F 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 - M A F の発現レベルを参照 c - M A F 発現レベルと比較するための手段；ならびに c ) 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、乳がんに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。

30

#### 【 0 0 3 4 】

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

40

#### 【 0 0 3 5 】

別の態様において、本発明は、乳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：

- 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 - M A F の発現レベルを定量する工程；
  - 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つの治療薬を投与されるか、またはその治療薬が除外され

50

る。

【 0 0 3 6 】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんに罹患している被験体における骨転移のリスクを予防するためまたは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 - 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。

【 0 0 3 7 】

別の態様において、本発明は、乳がんに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 - M A F の発現レベルを決定する工程；b ) 上記サンプル中の 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 ) そのサンプル中の c - M A F 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 )

トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんに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インピトロでの方法であって、該方法は、

i ) 前記被験体のサンプル中の c - M A F 遺伝子の発現レベルを決定する工程、および  
i i ) 工程 i ) において得られた発現レベルを参照値と比較する工程

を含み、ここで、前記参照値と比較して上昇した前記遺伝子の発現レベルは、骨転移を起こす上昇したリスクを示す、インピトロでの方法。

( 項目 2 )

トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんからの骨転移に罹患している患者の臨床転帰を予測するためのインピトロでの方法であって、該方法は、

i ) 前記被験体のサンプル中の 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参照値と比較する工程  
を含み、ここで、前記参照値と比較して上昇した前記遺伝子の発現レベルは、不良な臨床転帰を示す、インピトロでの方法。

( 項目 3 )

トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんに罹患してい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ピトロでの方法であって、該方法は、

i ) 前記被験体のサンプル中の c - M A F 遺伝子発現レベルを定量する工程、および  
i i ) i ) において得られた発現レベルを参照値と比較する工程  
を含み、ここで、該発現レベルが、前記参照値と比較して上昇した場合、前記被験体は、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ある、インピトロでの方法。

( 項目 4 )

トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんに罹患してい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ピトロでの方法であって、該方法は、

i i i ) 前記被験体のサンプル中の c - M A F 遺伝子発現レベルを定量する工程、および  
i v ) i ) において得られた発現レベルを参照値と比較する工程  
を含み、ここで、該発現レベルが、前記参照値と比較して上昇していない場合、前記被験体は、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、インピトロでの方法。

( 項目 5 )

平均より高い前記遺伝子の発現レベルが、骨転移の上昇したリスクを示し、このリスクは、c - M A F 発現のレベルに比例する、項目 1 に記載のインピトロでの方法。

( 項目 6 )

乳がんに罹患している被験体における骨転移のリスクを決定するためのインピトロでの方

10

20

30

40

50

法であって、該方法は、前記被験体のサンプル中の c - M A F 遺伝子の発現レベルを決定する工程を含み、ここで、平均値 + 1 標準偏差より高い前記遺伝子の発現レベルは、早期の骨転移の上昇したリスクを示す、インピトロでの方法。

(項目 7)

該乳がんが、トリプルネガティブ乳がん、基底細胞様乳がんまたは E R + (ルミナル A および B を含む) 乳がんである、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

該骨転移が、溶骨性転移である、項目 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

骨転移を伴うトリプルネガティブ (基底細胞様を含む) 乳がんまたは E R + (ルミナル A および B を含む) 乳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ピトロでの方法であって、該方法は、

i ) 前記被験体の骨転移サンプル中の c - M A F 遺伝子発現レベルを定量する工程、および

i i ) 工程 (i) において得られた発現レベルを参照値と比較する工程

を含み、ここで、該 c - M A F 遺伝子発現レベルが、前記参照値と比較して上昇している場合、前記被験体は、骨分解の予防を目指す治療を受けるのに適格である、インピトロでの方法。

(項目 10)

骨転移を伴うトリプルネガティブ (基底細胞様を含む) 乳がんまたは E R + (ルミナル A および B を含む) 乳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ピトロでの方法であって、該方法は、

i i i ) 前記被験体の骨転移サンプル中の c - M A F 遺伝子発現レベルを定量する工程、および

i v ) 工程 (i) において得られた発現レベルを参照値と比較する工程  
を含み、ここで、該 c - M A F 遺伝子発現レベルが、前記参照値と比較して上昇していない場合、前記被験体は、骨分解の予防を目指す治療を受けるのに適格ではない、インピトロでの方法。

(項目 11)

前記骨分解を予防する薬剤が、ビスホスホネート、R A N K L インヒビター、P T H および P T H L H のインヒビターまたは 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、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、項目 3 ~ 4 または 9 ~ 1 0 に記載の方法。

(項目 12)

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、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 13)

前記 R A N K L 特異的抗体が、デノスマブである、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 14)

前記 R A N K L 特異的ナノボディが、A L X - 0 1 4 1 である、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 15)

前記ビスホスホネートが、ゾレドロン酸である、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 16)

前記 M E T および V E G F R 2 の二重インヒビターが、C a b o z a n t i n i b である、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 17)

ラジウム - 2 2 3 が、アルファラディンである、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 18)

前記 c - M A F 遺伝子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1～17のいずれかに記載の方法。

(項目19)

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、RNAアレイ、またはヌクレオチドハイブリダイゼーション法によって定量される、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記c-MAF遺伝子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ントのレベルを定量する工程を含む、項目1～17のいずれかに記載の方法。

10

(項目21)

前記タンパク質のレベルが、ウエスタンプロット、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20に記載の方法。

(項目22)

前記参照値が、転移に罹患していない被験体由来のトリプルネガティブ乳がんまたはあるいはER+乳がん(ルミナルAおよびBを含む)のサンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルである、項目1～21のいずれかに記載の方法。

20

(項目23)

トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんまたはあるいはER+乳がん(ルミナルAおよびBを含む)に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インビトロでの方法であって、前記方法は、前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、前記参照遺伝子コピー数と比較したときの前記c-MAF遺伝子の増幅は、骨転移を起こす上昇したリスクを示す、方法。

(項目24)

トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんに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インビトロでの方法であって、前記方法は、前記被験体のサンプル中の前記c-MAF遺伝子が、転座しているかを決定する工程を含む、方法。

30

(項目25)

前記骨転移が、溶骨性転移である、項目23～24のいずれか1項に記載の方法。

(項目26)

トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんに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であって、前記方法は、前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、前記参照遺伝子コピー数と比較したときの前記c-MAF遺伝子の増幅は、不良な臨床転帰を示す、方法。

(項目27)

トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんまたはあるいはER+乳がん(ルミナルAおよびBを含む)に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であって、前記方法は、前記被験体のサンプル中の前記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、前記c-MAF遺伝子の転座は、不良な臨床転帰を示す、方法。

40

(項目28)

遺伝子座16q23または16q22-q24が、転座している、項目24および27のいずれかに記載の方法。

(項目29)

遺伝子座16q23または16q22-q24が、14番染色体の遺伝子座14q32に転座している、項目24、27または28のいずれかに記載の方法。

(項目30)

50

前記がんに罹患している被験体のサンプル中の c - M A F 遺伝子が、参考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さらに含み、ここで、前記参考遺伝子コピー数と比較したときの前記 c - M A F 遺伝子の増幅は、骨転移を起こす上昇したリスクを示す、項目 23 ~ 29 のいずれかに記載の方法。

(項目 31)

前記 c - M A F 遺伝子の増幅および転座が、遺伝子座 16q23 または 16q22 - q24 の増幅または転座を決定することによって決定される、項目 23 ~ 30 のいずれかに記載の方法。

(項目 32)

前記 c - M A F 遺伝子の増幅または転座が、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、項目 23 ~ 31 のいずれかに記載の方法。 10

(項目 33)

前記 c - M A F 遺伝子特異的プローブが、Vysis LSI / IGH MAF Dual Color Dual Fusion Probe である、項目 32 に記載の方法。

(項目 34)

前記参考遺伝子コピー数が、転移に罹患していない被験体由来のトリプルネガティブ乳がんの腫瘍組織サンプル中の遺伝子コピー数である、項目 23 ~ 33 のいずれかに記載の方法。

(項目 35)

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 23 ~ 34 のいずれかに記載の方法。 20

(項目 36)

前記被験体サンプルが、前記 c - M A F 遺伝子の倍数体であるかをさらに決定する工程を含む、項目 23 ~ 35 のいずれかに記載の方法。

(項目 37)

前記サンプルが、腫瘍組織サンプルである、項目 1 ~ 36 のいずれかに記載の方法。

(項目 38)

トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたは ER + 乳がんからの骨転移の予防において使用するための c - M A F 阻害剤。

(項目 39)

トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたは ER + (ルミナル A および B を含む) 乳がんに罹患しており、かつ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 - M A F レベルを有する被験体における骨転移の処置において使用するための、c - M A F 阻害剤、または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。 30

(項目 40)

前記 c - M A F 阻害剤が、c - M A F 特異的 siRNA、c - M A F 特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド、c - M A F 特異的リボザイム、c - M A F 阻害性抗体もしくはナノボディ、ドミナントネガティブ c - M A F バリアント、表 1 もしくは表 2 の化合物、c - M A F 特異的小分子、c - M A F 特異的抗体、c - M A F 特異的抗体様分子、c - M A F 特異的な構造的に制約された（環状の）ペプチド、c - M A F 特異的ステープルドペプチド、または c - M A F 特異的アルファボディからなる群より選択される、項目 38 または 39 のいずれかに記載の使用のための c - M A F 阻害剤。 40

(項目 41)

前記薬剤が、ビスホスホネート、RANKL インヒビター、PTH もしくは PTHLH 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、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、項目 39 に記載の、使用するための、骨分解を回避するかまたは予防することができる薬剤。 50

(項目42)

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41に記載の、使用するための、骨分解を回避するかまたは予防することができる薬剤。

(項目43)

前記RANKL特異的抗体が、デノスマブである、項目42に記載の、使用するための、骨分解を回避するかまたは予防することができる薬剤。

(項目44)

前記RANKL特異的ナノボディが、ALX-0141である、項目42に記載の、使用するための、骨分解を回避するかまたは予防することができる薬剤。

10

(項目45)

前記ビスホスホネートが、ゾレドロン酸である、項目41に記載の、使用するための、骨分解を回避するかまたは予防することができる薬剤。

(項目46)

前記METおよびVEGFR2の二重インヒビターが、Cabozantinibである、項目41に記載の、使用するための、骨分解を回避するかまたは予防することができる薬剤。

(項目47)

前記ラジウム-223が、アルファラディンである、項目41に記載の、使用するための、骨分解を回避するかまたは予防することができる薬剤。

20

(項目48)

前記骨転移が、溶骨性転移である、項目38～47のいずれかに記載の、使用するための、c-MAF阻害剤、または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。

(項目49)

乳がんに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50)

乳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であって、前記キットは：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、キット。

30

(項目51)

乳がんに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であって、前記キットは：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；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、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、キット。

40

(項目52)

i)乳がんに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關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、キット。

(項目53)

発現を定量するための前記手段が、c-MAF遺伝子、16q23遺伝子座または16q22-16q24染色体領域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、項目49～52のいずれか1項に記載のキット。

(項目54)

前記がんが、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはER+（ルミナルA

50

および B を含む ) 乳がんである、項目 4 9 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のキット。

( 項目 5 5 )

トリプルネガティブ ( 基底細胞様を含む ) 乳がんまたはあるいは E R + 乳がん ( ルミナル A および B を含む ) 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ピ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 - M A F の発現レベルを定量する工程；

( 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探する、インピトロでの方法。

10

( 項目 5 6 )

トリプルネガティブ ( 基底細胞様を含む ) 乳がんまたは E R + 乳がんに罹患している被験体における骨転移のリスクを予防するためまたは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。

( 項目 5 7 )

乳がんに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。

20

( 項目 5 8 )

前記コホートが、前記参照発現レベルと比較して、匹敵する c - M A F 発現レベルを有すると決定された少なくとも 1 つの他の個体を含む、項目 5 7 に記載の方法。

( 項目 5 9 )

前記サンプル中の c - M A F の前記発現レベルが、前記所定の参照レベルと比べて上昇しており、前記コホートのメンバーが、骨転移の上昇したリスクを有すると分類される、項目 5 7 または 5 8 に記載の方法。

30

( 項目 6 0 )

前記コホートが、臨床試験を行うためのコホートである、項目 5 7 ~ 5 8 のいずれかに記載の方法。

( 項目 6 1 )

前記乳がんが、トリプルネガティブ ( 基底細胞様を含む ) 乳がんまたは E R + ( ルミナル A および B を含む ) 乳がんである、項目 5 7 ~ 6 0 のいずれかに記載の方法。

( 項目 6 2 )

前記サンプルが、腫瘍組織サンプルである、項目 5 5 ~ 6 0 のいずれかに記載の方法。

( 項目 6 3 )

c - M A F 遺伝子、 1 6 q 2 3 または 1 6 q 2 2 - 1 6 q 2 4 染色体領域が、増幅されているか、または転座されている、項目 5 5 ~ 6 0 のいずれかに記載の方法。

40

( 項目 6 4 )

骨転移を処置するためまたは予防するために使用される前記治療が、 m T o r インヒビターである、項目 3 に記載の方法。

( 項目 6 5 )

前記 m T o r インヒビターが、 E v e r o l i m u s である、項目 6 4 に記載の方法。

( 項目 6 6 )

骨転移を処置するためまたは予防するために使用される前記治療が、 S r c キナーゼインヒビターである、項目 3 に記載の方法。

前記 S r c キナーゼインヒビターが、ダサチニブである、項目 6 6 に記載の方法。

50

(項目 6 7 )

骨転移を処置するためまたは予防するために使用される前記治療が、COX-2インヒビターである、項目3に記載の方法。

(項目 6 8 )

第2の処置が、前記COX-2インヒビターと組み合わせて使用される、項目67に記載の方法。

(項目 7 0 )

骨転移を処置するためまたは予防するために使用される前記治療が、Alpharadinである、項目3に記載の方法。

## 【図面の簡単な説明】

10

## 【0038】

【図1】各スコアの密度プロット。ESR1、ERBB2、PGR、ルミナル、増殖。

【図2】Triple Negative (トリプルネガティブ) 乳がんを有する患者に対する骨転移までの時間のカプラン・マイヤーグラフ (p値0.04)。各グラフの群は、c-MAFのレベルによって定義される。(-)、(uk)および(+)は、以下のようなc-MAF発現レベルを表す: (-) (<平均値 - SD)、(uk) (= 平均値 - SD) および (+) (>平均値 + SD)。SDは、標準偏差を表す。

【図3】c-MAF (mRNA) は、ER+乳がんにおける乳がんの骨転移に対する臨床的バイオマーカーである。ER+原発性乳がん患者における、骨(左)、脳(右上)および肺(右下)への無転移生存率のカプラン・マイヤー曲線 (GSE2603、GSE2034およびGSE12276) のデータセットの組み合わせまたはコホートI)。低、中および高は、以下のようなc-MAF発現レベルを表す: 低 (<平均値 - SD)、中 (= 平均値 - SD) および 高 (>平均値 + SD)。骨転移を有する患者は、脳転移および肺転移の解析から除外された。

【図4】c-MAF (タンパク質) は、乳がんの骨転移に対する臨床的バイオマーカーである。a) 原発性乳がん組織の代表的なc-MAF免疫染色。症例1は、c-MAF陰性腫瘍を表す (OD < 1000)。症例2および症例3は、MAF陽性腫瘍である (それぞれOD > 1000および> 2500)。b) プロットは、380個の原発性乳がん腫瘍のコホート (コホートII) におけるc-MAFタンパク質発現 (OD) を示している。BCサブタイプ (ER+、HER2+およびTN) に従って腫瘍を分ける。下の灰色の目盛りは、骨転移を有する腫瘍を示している。OD: c-MAF免疫染色に基づく光学密度。c, d) 380個の原発性乳がん腫瘍 (ステージI、IIおよびIII) のコホートにおける無病生存率 (c) および無骨転移生存率 (d) のカプラン・マイヤー曲線。c-MAF高群 (赤線, OD > 1000); c-MAF低群 (緑線, OD < 1000)。e) 各々のBCサブタイプ (ER+、HER2+およびTN) におけるc-MAFの骨転移の診断性能を表している表。CI (信頼区間); Se - 感度; Sp - 特異度; PPV (正の予後値); NPV (負の予後値)。

20

【図5A】乳がん細胞の骨転移に対するc-MAFの寄与。a) c-MAF (短および長アイソフォーム) 発現ありまたはなしの親MCF7細胞をマウスの左心室に注射し、インビオ生物発光 (bioluminescent) イメージングによって骨転移増殖 (bone colonization) を解析した。無骨転移生存率のカプラン・マイヤープロットが示されている。エンドポイントにおける代表的な骨の全光子束、Hand E染色およびCTスキャンに対応する画像が、示されている。

30

【図5B】乳がん細胞の骨転移に対するc-MAFの寄与。b) c-MAF (短および長アイソフォーム) 発現ありまたはなしの親T47D細胞をマウスの左心室に注射し、骨転移増殖をインビオ生物発光イメージングによって解析した。無骨転移生存率のカプラン・マイヤープロットが示されている。

40

【図5C】乳がん細胞の骨転移に対するc-MAFの寄与。c) c-MAF (短および長アイソフォームの組合せまたは単独) の発現が枯渇したまたはその発現に対してレスキューされたBOM2骨転移性MCF7細胞派生物 (cell derivatives)

50

を、マウスの左心室に注射し、骨転移増殖をインビボ生物発光イメージングによって解析した。無骨転移生存率のカプラン・マイヤープロットが示されている。エンドポイントにおける代表的な骨の全光子束、H and E 染色およびCTスキャンに対応する画像が示されている。

【図5D】乳がん細胞の骨転移に対するc-MAFの寄与。 d) c-MAF(短および長アイソフォーム)発現ありまたはなしの親MCF7細胞をマウスの尾静脈を介して注射し、肺転移増殖(lung colonization)をインビボ生物発光イメージングによって解析した。無肺転移生存率のカプラン・マイヤープロットが示されている。ウイルコクソン符号付き順位検定によって統計的差異を決定した。

【図6】MCF7親および骨転移誘導物BoM2におけるMAFレベル。 a) コントロール、c-MAF短、c-MAF長またはc-MAF短および長アイソフォーム発現構築物でトランスフェクトされた親細胞(左)、ならびにBoM2コントロール、shMAFまたはRescue(レスキュー)BoM2細胞(右)におけるMAF発現レベル。MAF長の発現レベルを、TaqManプローブを使用して決定し、Bo2Mレベルに対して正規化した。MAF短の内因性レベルを、示したプライマーを用いるSyber Green反応を使用して決定し、ベータアクチンレベルに対して正規化した。異所的に発現されたc-MAF短アイソフォームの存在を、PCR反応を使用して検出した。 b) 親コントロール、MAF短およびMAF長アイソフォームを(同時に)過剰発現している細胞、ならびにBoM2コントロール、shMAFまたはRescue BoM2細胞におけるc-MAFタンパク質レベルを示しているWB。 - チューブリンをローディングコントロールとして使用した。 c) a) およびb) に記載されたようなMCF7とBoM2とMAF枯渇BoM2との間のc-MAF mRNAおよびタンパク質の発現の直接比較。 d) コントロール、c-MAF短アイソフォーム、c-MAF長アイソフォームまたはc-MAF短および長アイソフォームを発現するベクターで一過性にトランスフェクトされた親細胞におけるC-MARE(c-MAF応答エレメント)レポータープラスミドのRenilla活性。C-MAREプロモーターの活性は、コントロール条件に対して正規化され、任意単位で提示されている。データは、sdを伴う、3つの独立した実験の平均値である。

【図7】MAFは、実験的乳がん転移マウスモデルにおいて骨転移を駆動する。(左)無骨転移生存率のカプラン・マイヤー曲線。親コントロールを過剰発現している細胞ならびにc-MAF短アイソフォームを過剰発現している細胞およびc-MAF長アイソフォームを過剰発現している細胞を左心室に注射し、転移を生物発光によって決定した。(右)各群に対する、マウス後肢の代表的なCTスキャンおよび骨転移のH & E染色とともに、0日目およびエンドポイントである54日目における代表的な生物発光の画像が示されている。スケールバー, 100 μm。溶骨性の領域 - 黄色破線。(右)エキソビオでの後肢の全光子束をエンドポイントである54日目に計測し、0日目に対して正規化した。コントロールおよびc-MAF短発現ベクターとc-MAF長発現ベクターの両方で、同時に(左)または別々に(右)トランスフェクトされた親細胞を比較することによって、P値を計算した。

【図8】c-MAFは、骨への乳がん転移の原因媒介物質である。骨転移発生の生物発光イメージングプロットが示されている。値は、0日目に対して正規化されている。コントロール、shMAFまたはRescue BoM2細胞をヌードマウスの左心室に注射した。骨転移を再発した動物だけを含む統計値を計算した。

【図9a-c】c-MAFは、乳がんの骨転移病変において破骨細胞の分化の引き金を引く。 a) 骨病変の総数(ルミネセンスによって計測)あたりの溶骨性病変(X線によって計測)のパーセンテージ。親細胞、c-MAF短、c-MAF長ならびにc-MAF短および長を発現している親細胞、ならびにBoM2骨転移性MCF7細胞派生物をマウスの左心室に注射し、インビボ生物発光イメージングによって骨転移増殖を解析した。 b) MCF7親細胞、またはc-MAFアイソフォーム(短-短アイソフォームおよび長-長アイソフォーム)のいずれかを過剰発現している細胞を起源とする馴化培地を使用した

10

20

30

40

50

、マウス骨髄由来前駆細胞からの破骨細胞分化のアッセイ。破骨細胞の数を、T R A P 技法によって測定する（> 3 個の多核細胞）。c および d ) 親細胞、c - M A F 短を発現している親細胞、c - M A F 長を発現している親細胞ならびに c - M A F 短および長を発現している親細胞、ならびに B o M 2 骨転移性 M C F 7 細胞派生物を心臓内に（i n t r a c a r d i a c a l l y ）注射されたマウスからの代表的な骨転移性病変の T R A P 染色。骨腫瘍境界面に沿った T R A P 陽性破骨細胞（紫色）を、4 匹の独立したマウスの少なくとも 4 つの異なる視野において数え、S D 値とともにプロットした。スケールバー 50  $\mu$  M。群間の統計的差異を、両側ウィルコクソン検定によって評価する。

【図 9 d】c - M A F は、乳がんの骨転移病変において破骨細胞の分化の引き金を引く。

a ) 骨病変の総数（ルミネセンスによって計測）あたりの溶骨性病変（X 線によって計測）のパーセンテージ。親細胞、c - M A F 短、c - M A F 長ならびに c - M A F 短および長を発現している親細胞、ならびに B o M 2 骨転移性 M C F 7 細胞派生物をマウスの左心室に注射し、インビボ生物発光イメージングによって骨転移増殖を解析した。b ) M C F 7 親細胞、または c - M A F アイソフォーム（短 - 短アイソフォームおよび長 - 長アイソフォーム）のいずれかを過剰発現している細胞を起源とする馴化培地を使用した、マウス骨髄由来前駆細胞からの破骨細胞分化のアッセイ。破骨細胞の数を、T R A P 技法によって測定する（> 3 個の多核細胞）。c および d ) 親細胞、c - M A F 短を発現している親細胞、c - M A F 長を発現している親細胞ならびに c - M A F 短および長を発現している親細胞、ならびに B o M 2 骨転移性 M C F 7 細胞派生物を心臓内に（i n t r a c a r d i a c a l l y ）注射されたマウスからの代表的な骨転移性病変の T R A P 染色。骨腫瘍境界面に沿った T R A P 陽性破骨細胞（紫色）を、4 匹の独立したマウスの少なくとも 4 つの異なる視野において数え、S D 値とともにプロットした。スケールバー 50  $\mu$  M。群間の統計的差異を、両側ウィルコクソン検定によって評価する。

【図 10】c - M A F は、乳がんの増殖を支援しない。皮下注射の模式的表示。（上）親コントロールまたは c - M A F 短アイソフォームおよび c - M A F 長アイソフォームを（同時に）過剰発現している細胞からの（f o r m ）皮下腫瘍の成長曲線。値は、s d を伴う平均値を表している。（下）コントロールまたは c - M A F 短アイソフォームおよび c - M A F 長アイソフォームを（同時に）過剰発現している細胞からの皮下腫瘍における K i 6 7 陽性細胞のパーセンテージ。各腫瘍について、最低 10 個のランダムな視野を、K i 6 7 陽性細胞について数えた。値は、s d を伴う平均値である（n = 4 ）。

【図 11】c - M A F の下流の P T H L H は、乳がんの骨転移に寄与し、媒介する。a ) B 2 M の発現レベルに対して正規化された、親細胞、c - M A F 短を発現している親細胞、c - M A F 長を発現している親細胞ならびに c - M A F 短および長を発現している親細胞、ならびに B o M 2 骨転移性 M C F 7 細胞派生物における P T H L H の相対的な発現レベル。\* p 値 < 0 . 0 5 。b ) G S E 1 4 0 2 0 データセットからのヒト乳がん転移における P T H L H の標準化された発現に対する M A F の標準化された発現のドットチャート。赤色の点は、骨転移を示しており、黒色の点は、他の軟部組織転移を示している。点線は、転移サンプルにおける平均 M A F 発現または平均 P T H L H 発現を示した。c ) 破骨細胞分化培地と、親細胞、c - M A F 短および長を発現している親細胞ならびに B o M 2 骨転移性 M C F 7 細胞派生物の馴化培地（C M ）との 5 0 : 5 0 、または C M 無しだがヒト P T H L H アンタゴニストペプチド（7 - 3 4 ）（5  $\mu$  g / m l ）で処理した骨髄細胞。破骨細胞の数を、T R A P 技法によって測定し（破骨細胞（O s t o c l a s t s ）は、白矢印で強調されている、> 3 個の多核細胞である）、コントロールに対して正規化する。d ) 親細胞、ルシフェラーゼ遺伝子で標識された c - M A F 短および長を発現している親細胞を、マウスの左心室に注射し、インビボ生物発光イメージングによって骨転移増殖を解析した。

c - M A F 短および長を発現している親細胞を注射されたマウスを、実験の経過中、1 日に 2 回、腹腔内に接種される（6  $\mu$  g / 動物）P T H L H アンタゴニストペプチド（7 - 3 4 ）で処置したかまたは処置しなかった。そのプロットは、実験終点におけるエキソビオでの全光子束を表しており、これは、病変 1 つあたりの転移細胞の数を反映している（左パネル）。溶骨性骨転移の病変が示されている（右パネル）。

10

20

30

40

50

e ) 1群あたりの代表的な溶骨性病変のX線(CTスキャン)画像。骨腫瘍境界面に沿ったTRAP陽性破骨細胞(白矢印で強調されている黒色)が、種々の群について示されている。病変から骨腫瘍境界面に沿ったTRAP陽性破骨細胞(黒色)を、独立した各マウスからの少なくとも4つの異なる視野において数え、SD値とともにプロットした。スケールバー50μM。群間の統計的差異を、両側ウィルコクソン検定によって評価する。

【図12-1】四次スプライン(パッケージphenotypeにおけるsmooth Coxph関数)を用いるCox回帰モデルによる、c-MAFの発現と骨転移のハザード比との関係の推定。これらのプロットは、記載の群に対応する:c-MAF発現レベルが平均(0と命名)より高い腫瘍における骨転移を予測するc-MAFの能力のHR比およびp値(GSE2603、GSE2034およびGSE12276データセットの組み合わせ、コホートI)。続いて、発現レベルにおける1は、1標準偏差を示す。

【図12-2】四次スプライン(パッケージphenotypeにおけるsmooth Coxph関数)を用いるCox回帰モデルによる、c-MAFの発現と骨転移のハザード比との関係の推定。これらのプロットは、記載の群に対応する:c-MAF発現レベルが平均(0と命名)より高い腫瘍における骨転移を予測するc-MAFの能力のHR比およびp値(GSE2603、GSE2034およびGSE12276データセットの組み合わせ、コホートI)。続いて、発現レベルにおける1は、1標準偏差を示す。

【図13】c-MAF発現および骨転移リスクの決定。本発明者らは、どの程度ここまでc-MAFの用量が高くなると骨再発のリスクが高くなるかを検証コホートIIにおいてアッセイした。本発明者らは、上に記載されたようなコンピュータ処理システムを使用した染色の光学密度の決定(図4a, b)を用いて免疫組織化学(IHC)によってc-MAF発現を定量した。2つのタイプのc-MAF陽性乳がん腫瘍に基づいて、それらが二峰性の挙動を有するとき、本発明者らは、それらを2群に分離し得る(左パネル)。この2つのカテゴリーを基礎にして、本発明者らは、c-MAFの染色が強いほど、骨転移のリスクが高く(HR(骨転移)=19.45; p値<0.001)、より早く骨転移が生じる(右パネル)という観察結果を検証する。

【図14】種々の時点におけるc-MAFおよび骨転移の独立性を試験するためのフィッシャーの正確検定の結果を示しているグラフ(GSE2603、GSE2034およびGSE12276データセットの組み合わせ、コホートI)。分割表およびフィッシャー検定のp値の比率が、各パネルに示されている。

【図15a-b】c-MAFの過剰発現は、コピー数の変化に起因して起き得る。a)遺伝子発現に基づくコピー数の変化の解析(ACEアルゴリズム)。影の領域は、ER+乳がん腫瘍において再発と有意に関連するDNAゲノム増幅を表している(GSE2603、GSE2034およびGSE12276データセットの組み合わせ、コホートI)。

b) MAF遺伝子コピー(16q23)とIGH(14q32)遺伝子コピーとの比に基づいて、親細胞およびMAF遺伝子が増幅しているBOM2骨転移細胞のパーセンテージを示しているパネル。FISHで染色した親細胞およびBOM2細胞の代表的な画像。

c) 16番染色体について、黒色の点および灰色の横線は、それぞれ、正規化された10g2強度比およびセグメントを表している。BOM2は、MCF7親細胞に対して比較される。下に灰色で16q22-24DNAゲノム増幅が強調されている。

【図15c】c-MAFの過剰発現は、コピー数の変化に起因して起き得る。a)遺伝子発現に基づくコピー数の変化の解析(ACEアルゴリズム)。影の領域は、ER+乳がん腫瘍において再発と有意に関連するDNAゲノム増幅を表している(GSE2603、GSE2034およびGSE12276データセットの組み合わせ、コホートI)。b) MAF遺伝子コピー(16q23)とIGH(14q32)遺伝子コピーとの比に基づいて、親細胞およびMAF遺伝子が増幅しているBOM2骨転移細胞のパーセンテージを示しているパネル。FISHで染色した親細胞およびBOM2細胞の代表的な画像。

c) 16番染色体について、黒色の点および灰色の横線は、それぞれ、正規化された10g2強度比およびセグメントを表している。BOM2は、MCF7親細胞に対して比較される。下に灰色で16q22-24DNAゲノム増幅が強調されている。

10

20

30

40

50

【図16】16q22-24ゲノムDNA領域の増幅は、乳がんの骨転移と関連する。aおよびb)ステージI、IIおよびIIIのBCヒト原発腫瘍セットにおける無骨転移生存率(a)または全生存率(b)のカプラン・マイヤー曲線(n=334)(コホートII)。腫瘍1つあたり3つのコアを使用して、平均として細胞1つあたり16q23の2.5コピーというカットオフに基づく16q23 FISH陰性群および16q23 FISH陽性群に従って、患者を層別化した。Se-感度; Sp-特異度; HR-ハザード比。c)I、IIおよびIIIのBCヒト原発腫瘍セットにおけるER陽性患者(左)またはトリプルネガティブ患者(右)における無骨転移生存率のカプラン・マイヤー曲線(それぞれn=250およびn=43)(コホートIIより)。腫瘍1つあたり3つのコアを使用して、平均として細胞1つあたり16q23に対する2.5コピーというカットオフに基づいて、患者を16q23 FISH陰性群および16q23 FISH陽性群に分けた。HR-ハザード比。d,e)全体(d)およびER+乳がん(e)における16q23増幅の診断性能についての受信者動作特性(ROC)曲線。ROC曲線において、真陽性率(感度)を、種々のカットオフ点に対する偽陽性率(100-特異度)の関数でプロットする。ROC曲線上の各点は、特定の決定閾値に対応する感度/特異度対を表す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0039】

###### 発明の詳細な説明

###### 一般的な用語および表現の定義

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。

##### 【0040】

本明細書中で使用されるとき、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種々なコピーが、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。

##### 【0041】

本明細書中で使用されるとき、用語「基底細胞様」「基底細胞様サブタイプ」、「基底細胞様サブタイプの乳がん」などは、本明細書中で使用されるとき、2つのレセプターERおよびHER2が陰性であること、ならびにCK5/6、CK14、CK17およびEGFRからなる群のうちの少なくとも1つのレセプターが陽性であることを特徴とする特定のサブタイプの乳がんのことを指す。したがって、トリプルネガティブ乳がん(ER、HER-2、PgR)を引き合いに出し、言及する本願中のすべての文は、ERおよびHER2が陰性であり、CK5/6、CK14、CK17およびEGFRのうちの少なくとも1つが陽性である、基底細胞様乳がんのことも引き合いに出し、言及し得る。あるいは、「基底細胞様」とは、以下の10個の遺伝子のアップレギュレーションおよび/またはダウンレギュレーションに基づく遺伝子発現プロファイルを特徴とする乳がんのことも指す:(1)フォークヘッドボックスC1(FOXC1);(2)メラノーマ阻害活性(MIA);(3)NDC80ホモログ、キネトコア複合体構成要素(KNTC2);(4)中心体タンパク質55kDa(CEP55);(5)アニリン(Anillin),アクチン結合タンパク質(ANLN);(6)母性胚性(Maternal embryonic)ロイシンジッパー-キナーゼ(MELK);(7)Gタンパク質共役レセプター-160(GPR160);(8)膜貫通タンパク質45B(TMEM45B);(9)エストロゲンレセプター-1(ESR1);(10)フォークヘッドボックスA1(FOXA1)。乳がん腫瘍を基底細胞様サブタイプとして分類するために使用される遺伝子発現プロファイルは、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプターまたはHer2を含まない。

10

20

30

40

50

いので、トリプルネガティブ乳がんと非トリプルネガティブ乳がんの両方が、基底細胞様サブタイプとして分類され得る。

【0042】

本明細書中で使用されるとき、「トリプルネガティブ乳がん」とは、ERとPRの両方の検出可能な発現を欠くことを特徴とする乳がんのことを指し(好ましくは、ERおよびPRの発現の測定が、M. Elizabeth Hら、Journal of Clinical Oncology, 28(16):2784-2795, 2010によって開示された方法によって行われるとき)、その腫瘍細胞では、正常には細胞表面上に位置するレセプターである上皮成長因子レセプタータイプ2(HER2またはErbb2)が増幅されていない。標準的な免疫組織化学的技法を用いて、5パーセント未満の腫瘍細胞核しか、ERおよびPR発現について染色されない場合、その腫瘍細胞は、ERおよびPRの発現について陰性であると考えられる。本明細書中で使用されるとき、腫瘍細胞は、ポリクローナル抗HER2一次抗体を使用する半定量的免疫組織化学的アッセイであるHerceptest™ Kit (Code K5204, Dako North America, Inc., Carpinteria, CA)を用いて試験されたときに0もしくは1+もしくは2+という試験結果スコアをもたらす場合、またはHER2 FISHが陰性である場合、HER2過剰発現について陰性であると考えられる。

【0043】

本明細書中で使用されるとき、「c-MAF遺伝子」(MAFまたはMGCG71685としても知られるv-maf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。DNA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-MAFをコードするDNA配列は、アクセシション番号NG\_016440(配列番号1(ゲノム))としてNCBIデータベースに記載されている。c-MAFのコード配列は、配列番号13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DNA配列を利用し得る。上記DNA配列からは2つのメッセンジャーRNAが転写され、その各々が、2つのc-MAFタンパク質アイソフォーム、アイソフォームおよび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DNA配列は、それぞれ、アクセシション番号NM\_005360.4(配列番号2)およびNM\_001031804.2(配列番号3)としてNCBIデータベースに記載されている。

【0044】

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。

【0045】

本明細書中で使用されるとき、ラバマイシンの哺乳動物における標的(mTOR)また

10

20

30

40

50

は「mT or」とは、EC 2 . 7 . 1 1 . 1 に相当するタンパク質のことを指す。mT or 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。

【0046】

本明細書中で使用されるとき、「mT or インヒビター」とは、mT or 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（mT or 遺伝子の転写を妨害することおよび / またはmT or 遺伝子発現に由来するmRNAの翻訳を阻止すること）およびmT or 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。二重またはそれより多くの標的および中でもmT or タンパク質活性を有するインヒビターを含む。

10

【0047】

本明細書中で使用されるとき、「S r c」とは、EC 2 . 7 . 1 0 . 2 に相当するタンパク質のことを指す。S r c 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。S r c は、細胞成長および胚発生において役割を果たし得る。

【0048】

本明細書中で使用されるとき、「S r c インヒビター」とは、S r c 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（S r c 遺伝子の転写を妨害することおよび / またはS r c 遺伝子発現に由来するmRNAの翻訳を阻止すること）およびS r c 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。

20

【0049】

本明細書中で使用されるとき、「プロスタグラミン - 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、EC 1 . 1 4 . 9 9 . 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ミンエンドペルオキシドH2への変換に関与する。

【0050】

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。

30

【0051】

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、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。

【0052】

本明細書中で使用されるとき、「ER + 乳がん」は、その腫瘍細胞がエストロゲンレセプター（ER）を発現する乳がんとして理解される。このおかげで上記腫瘍はエストロゲンに感受性になり、これは、エストロゲンががん性の乳房腫瘍を成長させることを意味する。対照的に、「ER - 乳がん」は、その腫瘍細胞がエストロゲンレセプター（ER）を発現しない乳がんとして理解される。ER + 乳がんには、ルミナルAおよびBサブタイプが含まれる。

40

【0053】

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

50

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、P C R法（例えば、q P C R）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。

【0054】

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）D N A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

【0055】

「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 - M A F 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、1.5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 - M A F 発現レベルを有すると考えられ得る。

20

【0056】

「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D N A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S w e n n e n h u i sら、「C o n s t r u c t i o n o f r e p e a t - f r e e f l u o r e s c e n c e i n s i t u h y b r i d i z a t i o n p r o b e s」N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 40(3):e20(2012)に記載されている。

30

【0057】

「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。

【0058】

「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（i m m u n o g l o b i n）重鎖（I g H）遺伝子座が関わる主要な転座がいくつある（E y c h e n e , A . , R o c q u e s , N . , およびP u o p o n n o t , C . , A n e w M A F i a i n c a n c e r . 2 0 0 8 . N a t u r e R e v i e w s : C a n c e r . 8 : 6 8 3 - 6 9 3 ）。

40

【0059】

「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

50

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、M A F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。

【0060】

「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、N g . , P . C . a m d K i r k n e s s , E . F . , W h o l e G e n o m e S e q u e n c i n g . 2 0 1 0 . M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y . 6 2 8 : 2 1 5 - 2 2 6 を参考のこと。

10

【0061】

「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D N A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、m R N A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、C h o i , M . ら、G e n e t i c d i a g n o s i s b y w h o l e e x o m e c a p t u r e a n d m a s s i v e l y p a r a l l e l D N A s e q u e n c i n g . 2 0 0 9 . P N A S . 1 0 6 ( 4 5 ) : 1 9 0 9 6 - 1 9 1 0 1 を参考のこと。

【0062】

「転移」は、本明細書中で使用されるとき、最初に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。乳がんが、例えば、肺に広がる（転移する）場合、二次性腫瘍は、悪性の乳がん細胞から形成される。その肺における疾患は、転移性乳がんであって、肺がんではない。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）トリプルネガティブ乳がんまたはあるいはE R + 乳がん（管腔タイプAおよびタイプBを含む）である。

20

【0063】

「予測する」は、本明細書中で使用されるとき、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいは（a l t e r n a t i a v e l y ）E R + 乳がんに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。P a i k ら（2 0 0 4 ）の研究では、再発の全体的な「低」リスクは、1 5 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、1 0 年、1 5 年またはなおも2 0 年であり得る。

30

【0064】

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。P a i k ら（2 0 0 4 ）の研究では、再発の全体的な「高」リスクは、1 5 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、1 0 年、1 5 年またはなおも2 0 年であり得る。

40

50

## 【0065】

「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、歴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。

10

## 【0066】

本明細書中で使用されるとき、「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)、靈長類およびヒト、例えば、人間、非ヒト靈長類、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「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、所望の薬理学的效果または生理学的效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もしくは修復するか、または非効率なプロセスを刺激することによって、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。

20

## 【0068】

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。

30

## 【0069】

「腫瘍組織サンプル」は、原発性トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がん腫瘍またはあるいは E R + 乳がん腫瘍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。

40

## 【0070】

「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

50

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。

【0071】

c - MAF の発現レベルに基づいてトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたは ER + 乳がんの骨転移を予測するための方法

驚いたことに、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんのサンプル中および ER + 乳がんのサンプル中の c - MAF の発現レベルが、骨転移に罹患するリスクと相關することが見出された。さらに、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）原発腫瘍および ER + 原発腫瘍における c - MAF の遺伝子発現は、骨転移の再発と有意に相關し、無骨転移生存率および生存率と逆相関した。さらに、c - MAF 発現レベルが、用量依存的様式で骨転移を予測することが見出された。

10

【0072】

第1の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいは ER + 乳がんに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インピトロでの方法（本明細書中以後、本発明の第1の方法）に関し、その方法は：

i ) 上記被験体のサンプル中の c - MAF 遺伝子の発現レベルを決定する工程、および  
i i ) 工程 i ) において得られた発現レベルを参照値と比較する工程

を含み、ここで、上記参照値と比較して上昇した上記遺伝子の発現レベルは、骨転移を起こす上昇したリスクを示す。

20

【0073】

本発明の方法は、第1の工程に、被験体由来のサンプル中の c - MAF 遺伝子発現レベルを決定する工程を含む。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。

【0074】

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。

30

【0075】

好ましい実施形態において、本発明の第1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。

【0076】

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。

40

【0077】

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）。

【0078】

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）

50

) 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 c DNA のフラグメントまたはそれらの混合物の定量を含む。

【 0079 】

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 c DNA 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 增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プロットおよび好適なプローブの使用、ノーザンプ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 c DNA の特異的プローブの使用、S1 ヌクレアーゼを用いたマッピング、RT - PCR、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 PCR によって、定量され得る。同様に、c - MAF 遺伝子によってコードされる上記 mRNA に対応する c DNA 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 mRNA の逆転写（RT）によって、対応する c DNA を合成し、それに続く増幅および上記 c DNA 增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、Sambrookら、2001（上掲）に見出すことができる。これららの方法は、当該分野で公知であり、当業者は、各技法に必要な正規化に精通している。例えば、多重 PCR を使用して生成された発現の測定値は、測定された遺伝子の発現をいわゆる「ハウスキーピング」遺伝子（その発現は、すべてのサンプルにわたっ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）またはその発現ががんによって調節されると知られている他のコントロール遺伝子と比較することによって正規化されるべきである。

【 0080 】

特定の実施形態において、c - MAF 遺伝子発現レベルは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または DNA / RNA アレイまたはヌクレオチドハイブリダイゼーション法によって定量される。

【 0081 】

さらに、c - MAF 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 - MAF タンパク質（c - MAF）[NCBI, アクセッション番号 O75444] または c - MAF タンパク質の任意の機能的に等価なバリエント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 - MAF タンパク質アイソフォーム、403 アミノ酸で構成されている アイソフォーム（NCBI, NP\_005351.2）（配列番号 4）および 373 アミノ酸で構成されている アイソフォーム（NCBI, NP\_001026974.1）（配列番号 5）が存在する。c - MAF 遺伝子発現レベルは、いずれかの c - MAF 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 - MAF 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 - MAF タンパク質の定量を含む。

【 0082 】

本発明の文脈において、「c - MAF タンパク質の機能的に等価なバリエント」は、（i）アミノ酸残基の1つまたは複数が、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 - MAF タンパク質（配列番号 4 または配列番号 5）のバリエント（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し、そうでなくてもよい）または（ii）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 - MAF タンパク質と同じ機能を有する、すなわち、DNA 結合転写因子として作用するバリエントと理解される。c - MAF タンパク質のバリエントは、国際特許出願 WO 2005 / 046731（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 -

10

20

30

40

50

MAF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、WO 2008098351（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-MAFを発現する細胞においてサイクリンD2プロモーターまたは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US 2009048117A（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、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。

## 【0083】

10

本発明に係るバリエントは、好ましくは、いずれかのc-MAF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。バリエント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、BLAST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。

## 【0084】

20

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、ウエスタンプロットまたはウエスタンrans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。それにもかかわらず、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（tetrabody）、ナノボディ、アルファボディ、ステープルド（stapled）ペプチド、シクロペプチドおよび抗体の使用が、好ましい。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

30

40

50

ーン 6 b 8 (Mouse Anti-Human MAF Azide free Monoclonal antibody, Unconjugated, Clone 6 b 8)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、Santa Cruz Biotechnology、Bioworld Technology、GeneTex など)。

【0085】

特定の実施形態において、c - MAF タンパク質レベルは、ウエスタンプロット、ELISA またはタンパク質アレイによって定量される。

【0086】

別の特定の実施形態において、c - MAF タンパク質レベルは、エキソソームまたは循環(circulating)DNA から定量される。エキソソームは、インビオおよびインビトロにおいてほとんどの細胞型によって分泌される 40 ~ 100 nm の膜ベシクルである。エキソソームは、コンパートメントの内腔に内向きに出芽することによって、多胞体(MVB)と呼ばれるエンドソームの特定の集団として形成する。MVB と原形質膜とが融合すると、これらの内部ベシクルが分泌される。エキソソームは、当該分野で周知のいくつかの方法によって多種多様な細胞系または体液から単離され得る(Thery C. ら、Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22)(その全内容が、本明細書中に参照により援用される)。ExoQuick<sup>TM</sup> または ExoTest<sup>TM</sup>などのいくつかの市販キットが、エキソソームを単離するために利用可能である。

【0087】

本発明の第 1 の方法は、第 2 の工程に、被験体由来のサンプル(例えば、腫瘍サンプル)において得られた c - MAF 遺伝子発現レベルを参照値と比較する工程を含む。

【0088】

いったん、乳がん、例えば、トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんまたはあるいは ER+ 乳がんを有する被験体由来のサンプル中の c - MAF 遺伝子発現レベルが、測定されて、参照値と比較されたら、上記遺伝子の発現レベルが、上記参照値と比較して上昇している場合、上記被験体は、骨転移を起こす傾向がより高いと結論づけられ得る。

【0089】

c - MAF 遺伝子発現レベルの決定は、参照値と相関するはずである。

【0090】

ある実施形態において、本明細書中で意図されるような参照値(複数可)は、c - MAF の絶対量を伝達し得る。別の実施形態において、試験されている被験体由来のサンプル中のいずれか 1 つまたは複数のバイオマーカーの量は、参照値と直接比べて決定され得る(例えば、増加もしくは減少または増加率もしくは減少率に関して)。有益なことに、これにより、いずれの 1 つまたは複数のバイオマーカーのそれぞれの絶対量を最初に決定する必要なく、被験体由来のサンプル中の該 1 つまたは複数のバイオマーカーの量を参照値と比較すること(換言すれば、参照値に対する被験体由来のサンプル中のいずれか 1 つまたは複数のバイオマーカーの相対量を測定すること)が可能になり得る。

【0091】

好みの実施形態において、参照値は、コントロールサンプルまたは参照サンプルにおける c - MAF 遺伝子発現レベルである。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または参照サンプルの正確な性質は変動し得る。したがって、予後が評価されるべき事象において、参照サンプルは、転移していないトリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんもしくはあるいは ER+ 乳がんを有する被験体由来のサンプル、または転移していないトリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんもしくはあるいは ER+ 乳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サンプルである。

【0092】

10

20

30

40

50

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。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つて、例えば、様々な年齢カテゴリーに従つて分類された、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、約 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に罹患している被験体によって形成される。 10

#### 【0093】

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考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、正常集団における 90 パーセンタイル以下および正常集団における 95 パーセンタイル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 パーセンタイル以上である (例えば、正常集団における 60 パーセンタイル以上、正常集団における 70 パーセンタイル以上、正常集団における 80 パーセンタイル以上、正常集団における 90 パーセンタイル以上および正常集団における 95 パーセンタイル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。 20

#### 【0094】

当業者は、原発性乳房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必要は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 Warden, 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 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 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 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 % または少なくとも 90 % が、本発明の方法によって適切に同定され得る。 40

#### 【0095】

なおも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。

#### 【0096】

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、乳がんに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。

#### 【0097】

c - MAF の発現レベルに基づいて、トリプルネガティブ (基底細胞様を含む) 乳がんまたはあるいは ER + 乳がんからの骨転移に罹患している患者の臨床転帰を予測するため 50

## の方法

別の態様において、本発明は、骨転移性トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいは骨転移性ER+骨がんに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2の方法）に関し、その方法は：

i ) 上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子の発現レベルを定量する工程、および  
i i ) 工程i)において得られた発現レベルを参照値と比較する工程

を含み、ここで、上記参照値と比較して上昇した上記遺伝子の発現レベルは、不良な臨床転帰を示す。

### 【0098】

本発明の第2の方法は、第1の工程に、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患している被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルを定量する工程を含む。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。

10

### 【0099】

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。

### 【0100】

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、参照値と比較される。好ましい実施形態において、参照値は、コントロールサンプル中の上記遺伝子の発現レベルである。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相關するはずである。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、本発明の第2の方法を含む場合において、参照サンプルは、骨転移に罹患していない乳がんを有する被験体のサンプルまたは転移に罹患していない乳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。

20

### 【0101】

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中の発現レベルと比較して上昇している場合、それは、不良な臨床転帰を示す。

30

### 【0102】

具体的な実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

### 【0103】

別の具体的な実施形態において、c-MAF遺伝子発現レベルの定量は、上記遺伝子のメッセンジャーRNA(mRNA)または上記mRNAのフラグメント、上記遺伝子の相補DNA(cDNA)または上記cDNAのフラグメントを定量する工程を含む。より好ましい実施形態において、発現レベルは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)またはDNAアレイもしくはRNAアレイにより定量される。

40

### 【0104】

別の実施形態において、c-MAF遺伝子発現レベルの定量は、上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ントのレベルを定量する工程を含む。なおもより好ましい実施形態において、タンパク質レベルは、ウエスタンプロット、免疫組織化学検査、ELISAまたはタンパク質アレイにより決定される。

### 【0105】

別の実施形態において、参照サンプルは、転移に罹患していない被験体由来のトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんの腫瘍組織サンプルである。

### 【0106】

患者の臨床転帰の決定のために広く認められている任意のパラメータが、本発明におい

50

て使用され得、それらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

- ・本明細書中で使用されるとき、研究中の期間に疾患を再発しなかった完全寛解の被験体の比率のことを記載する、無病進行。
- ・本明細書とともに使用されるとき、被験体が疾患の兆候なしに生存している、その疾患に対する処置後の時間の長さと理解される、無病生存率（D F S）。
- ・本発明において使用されるとき、完全奏効または部分奏効がみとめられる処置された被験体の比率のことを記載する、客観的奏効。
- ・本発明において使用されるとき、6ヶ月以上、完全奏効、部分奏効、低奏功（m i n o r r e s p o n s e）または安定病態がみとめられる、処置された被験体の比率に関する、腫瘍制御（t u m o u r c o n t r o l）。
- ・本明細書中で使用されるとき、処置開始からがんの成長が最初に決定されるまでの時間と定義される、無進行生存期間。
- ・本明細書中で使用されるとき、疾患が処置された後、疾患が悪化し始めるまでの時間に関する、進行までの期間（T T P）。用語「進行」は、先に定義されている。
- ・本明細書中で使用されるとき、治療の開始後、最初の6ヶ月で進行しない被験体のパーセンテージに関する、6ヶ月無進行生存率または「P F S 6」率、および
- ・本明細書中で使用されるとき、研究に登録された被験体の半数が未だ生存している時間に関する、生存期間中央値。

#### 【0107】

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Wearde n, 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。

#### 【0108】

トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳房腫瘍もしくはあるいはE R + 乳房腫瘍、またはS r c 応答性シグネチャ（S r c R e s p o n s i v e S i g n a t u r e）+ もしくはH E R 2 + 乳房腫瘍を有する患者において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、がんに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うか、または後者が良性の腫瘍であるかどうかに左右される。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。

#### 【0109】

ゆえに、本発明に記載されるように、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がん細胞またはあるいはE R + 乳がん細胞におけるc - M A F 遺伝子の過剰発現が、骨転移の存在に関係することを考えれば、c - M A F 遺伝子の発現レベルは、上記癌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ために有用である。

#### 【0110】

したがって、別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）

10

20

30

40

50

乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患してい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（本明細書中以後、本発明の第3の方法）に關し、その方法は、

i) 上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルを定量する工程、および  
 ii) i)において得られた発現レベルを参照値と比較する工程  
 を含み、ここで、その発現レベルが、上記参照値と比較して上昇している場合、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ある。その発現レベルが、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。

【0111】

10

特定の実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

【0112】

本発明の第3の方法は、第1の工程に、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患している被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルを定量する工程を含む。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。

【0113】

別の特定の実施形態において、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。

20

【0114】

本発明の第3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り得る。

【0115】

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、参照値と比較される。好ましい実施形態において、参照値は、コントロールサンプル中の上記遺伝子のc-MAF遺伝子発現レベルである。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、転移していないトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんもしくはあるいはER+乳がんを有する被験体のサンプル、または転移していないトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんもしくはあるいはER+乳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。

30

【0116】

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、参照値と比較されたら、上記遺伝子の発現レベルが、参照値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。

【0117】

40

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得る。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。

【0118】

全身性処置は、全身に到達する処置であり、例えば：

・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。乳がんに対する好適な化学療法処置としては、アントラサイクリン（ドキソルビシン、

50

エピルビシン、ペグ化リポソームドキソルビシン)、タキサン(パクリタキセル、ドセタキセル、アルブミンナノ粒子結合型パクリタキセル)、5-フルオロウラシル(5-FU持続注入、カペシタビン)、ビンカアルカロイド(ビノレルビン、ビンプラスチン)、ゲムシタビン、白金塩(シスプラチン、カルボプラチン)、シクロホスファミド、エトポシド、および上記の1つまたは複数の組み合わせ、例えば、シクロホスファミド/アントラサイクリン + / - 5-フルオロウラシルレジメン(例えば、ドキソルビシン/シクロホスファミド(AC)、エピルビシン/シクロホスファミド、(EC)シクロホスファミド/エピルビシン/5-フルオロウラシル(CEF)、シクロホスファミド/ドキソルビシン/5-フルオロウラシル(CAF)、5-フルオロウラシル/エピルビシン/シクロホスファミド(FEC))、シクロホスファミド/メトトレキサート(methotrexate)/5-フルオロウラシル(CMF)、アントラサイクリン/タキサン(例えば、ドキソルビシン/パクリタキセルまたはドキソルビシン/ドセタキセル)、ドセタキセル/カペシタビン、ゲムシタビン/パクリタキセル、タキサン/白金レジメン(例えば、パクリタキセル/カルボプラチンまたはドセタキセル/カルボプラチン)が挙げられるがこれらに限定されない。

・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。

#### 【0119】

別の態様において、処置は、アルファラディン(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、周囲の健常な組織(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。

#### 【0120】

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))、Axess(ウミロリムス(umirolimus))、AZD2014、BEZ235、Bi of freedom(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 ORBUSHNEICH(シロリムス)、Curaxin CBL C102(メパクリン)、DE109(シロリムス)、DS3078、Endeavor DES(ゾタロリムス)、En

10

20

30

40

50

deavor Resolute(ゾタロリムス)、Femara(レトロゾール)、Hocena(アントロキノノール(antrouquinonol))、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、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 CELLZONE、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)、Tauroliimus WATSON(タクロリムス)、TAFA93、Temsiroliimus ACCORD(テムシロリムス)、Temsiroliimus 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.affinitor.com/index.jsp?usertrack.filter\\_app lied=true&Novaid=4029462064338207963](http://www.affinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_app lied=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、エベロリムスは、アロマターゼインヒビターと組合わされる(例えば、Baselga, J.ら、Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529(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)。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

参考のこと）。いくつかの態様において、mTorインヒビターは、ホルモンレセプター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（例えば、Baselga, J. ら、Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366 (6) : 520 - 529を参考のこと）。いくつかの実施形態において、患者は、ER+である。いくつかの態様において、mTorインヒビターは、進行乳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。 10

#### 【0121】

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）、Fontraxy（ダサチニブ）、Srcキナーゼインヒビター KINEX、VX680（トザセルチブ(tozaserib)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考により援用される）を参考のこと）。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、患者は、SRS+かつER-である（例えば、Zhang, C.H. - F. ら、Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16: 67 - 78（これは本明細書中で参考により援用される）を参考のこと）。いくつかの態様において、Srcキナーゼインヒビターは、進行乳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。 40

#### 【0122】

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（アブリコキシブ(apricoxib)）、CS502、CS670（ペルビプロフェン(pelubiprofen)）、Diclofenac HPBCD（ジクロフェナク）、Diract 50

in (ケトプロフェン)、GW406381、HCT1026 (ニトロフルルビプロフェン (nitroflurbiprofen))、Hyanalgese-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リル (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 SCOL R (イブプロフェン)、OMS103HP (アミトリピチリン塩酸塩、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 (ブロムフェナカナトリウム)、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 (ジクロフェナカナトリウム)、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 (アセチルシスティン、メサラミン)、Ac phen、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 Sal onpas、Airtal、Alcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief、Aleve、Aleve ABDI IBRAHIM、Aleve-D、Alka-Seltzer、Alka-Seltzer BAYER、Alka-Seltzer Extra Strength、Alka-Seltzer Lemon-Lime、Alka-Seltzer Original、Alka-Seltzer Plus、Alka-Seltzer plus Cold and Cough、Alka-Seltzer plus Cold and Cough Formula、Alka-Seltzer Plus Day and Night Cold Formula、Alka-Seltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula、Alka-Seltzer Plus Flu Formula、Alka-Seltzer Plus Night Cold Formula、Alka-Seltzer Plus Sinus Formula、Alka-Seltzer Plus Sparkling Original Cold Formula、Alka-Seltzer PM、Alka-Seltzer Wake-Up Call、Anacin、Anaprox、Anaprox MINERVA、Ansaid、Apitoxin、Apranax、Apranax abdi、Arcoxia、Arthritis Formula Bengay、Arthrotec、Asacol、Asacol HD、Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL、Asacol ORIFARM、  
10  
20  
30  
40  
50

Aspirin BAYER, Aspirin Complex, Aspirin Mi-  
gran, AZD3582, Azulfidine, Baralgan M, BAY10  
19036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, Ben-  
adryl 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, Benylin 1 All-In-One, Brexin,  
Brexin ANGELINI, Bromday, Bufferin, Buscopa 10  
Plus, Caldolor, CalmateL, Cambia, Canasa, Ca-  
poxigem, 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 cold,  
Children's Tylenol plus Cold and Cough,  
Children's Tylenol plus cold and stuffy  
nose, Children's Tylenol plus Flu, Child-  
ren's Tylenol plus cold & allergy, Child-  
ren's Tylenol plus Cough & Runny Nose, Chi- 20  
ldren's Tylenol plus Cough & Sore Throat  
Children's Tylenol plus multi symptom  
cold, Clinoril, Codral Cold and Flu, Codral  
Day and Night Day Tablets, Codral Day and  
Night Night Tablets, Codral Nightime, Col-  
azal, Combunox, Contac Cold plus Flu, Conta-  
c Cold plus Flu Non-Drowsy, Coricidin D, Co-  
ricidin HBP Cold and Flu, Coricidin HBP  
Day and Night Multi-Symptom Cold, Coricid- 30  
in HBP Maximum Strength Flu, Coricidin HB  
P 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, De-  
mazin day/night Cold and Flu, Demazin PE  
Cold and Flu, Demazin PE day/night Cold a-  
nd Flu, Diclofenac HPBCD, Dimetapp Day Rel-  
ief, Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu,  
Dimetapp Night Relief, Dimetapp Pain and 40  
Fever Relief, Dimetapp PE Sinus Pain, Dime-  
tapp PE Sinus Pain plus Allergy, Dipentum  
Diractin, Disprin Cold 'n' Fever, Disprin  
Extra, Disprin Forte, Disprin Plus, Dristan  
Cold, Dristan Junior, Drixoral Plus, Due-  
xis, Dynastat, Efferalgan, Efferalgan Plus  
Vitamin C, Efferalgan Vitamin C, ElixiSure  
I B, Excedrin Back and Body, Excedrin Migraine,  
Excedrin PM, Excedrin Sinus Headache, Ex-  
cedrin Tension Headache, Falcol, Fansamac  
Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal with 50

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、Hyana lgese-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、IS 10 V205、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、Lloyd's 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 COAT ED 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、Oruvail、Osteluc、Oxy codex、P54、Panadol、Panadol Actifast、Paradine、Paramax、Parfenac、Peda、Pennsaid、Pentasa、Pentasa ORIFARM、Peon、Percodan、Percodan-Demi、PercoDex、Percogesic、Perfalgan、PL 2200、PL3100、Ponstel、Prexige、Prolensa、PSD 508、R-Ketoprofen、Rantudil、Relafen、Remura、Robaxisal、Rotec、Rowasa、ROX828、RP19583、RQ00317076、Rubor、Salofalk、Salonpas、Saridon、SDX101、Seltouch、sfRowasa、Shinbaro、Sinumax、Sinutab、Sinutab、sinus、Spalt、Sprix、Strefen、Sudafed Cold and Cough、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 Tablets、Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Night Tablets、Sudafed PE Sinus plus Anti-inflammatory 20

30

40

50

Pain Relief、Sudafed Sinus Advance、Surgam、Synalgos-DC、Synflex、Tavist allergy/sinus/headache、TDS943、TDT070、Theraflu Cold and Sore Throat、Theraflu Daytime Severe Cold and Cough、Theraflu Daytime Warming Relief、Theraflu Warming Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Cold、Theraflu Warming Relief Cold and Chest Congestion、Thomapyrin、Thomapyrin C、Thomapyrin Effervescent、Thomapyrin Medium、Tilcotil、Tispol、Tolectin、Toradol、TPR100、TQ1011、Trauma-Salbe、Trauma-Salbe Kwizda、Treo、Treximet、Troxex、TT063、Tylenol、Tylenol Allergy Multi-Symptom、Tylenol Back Pain、Tylenol Cold & Cough Daytime、Tylenol Cold & Cough Nighttime、Tylenol Cold and Sinus Daytime、Tylenol Cold and Sinus Nighttime、Tylenol Cold Head Congestion Severe、Tylenol Cold Multi-Symptom Daytime、Tylenol Cold Multi-Symptom Nighttime Liquid、Tylenol Cold Multi-Symptom Severe、Tylenol Cold Non-Drowsiness Formula、Tylenol Cold Severe Congestion Daytime、Tylenol Complete Cold, Cough and Flu Nighttime、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、Ultrace、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、Xodo1、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、進行乳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=29353769344676336](http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaID=29353769344676336))

33 ; 最終アクセス日 2012年12月2日)、Carbozantinib または Cabozantinib、PTH-LH(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)を阻止する抗体またはペプチドおよびEverolimus 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。

【0123】

別の態様において、骨分解を回避するためおよび/または予防するために使用される処置剤としては、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)インヒビターおよび副甲状腺様ホルモン(PTH-LH)インヒビター(阻止抗体を含む)またはそれらの組換え型(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。10

・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(dual action bone agents)」(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(modulator)」(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、エストロゲンプログスターーゲン、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(lasoofoxifene)、TSE-424、タモキシフェン、イドキシフェン(idoxifene)、LY353381、LY117081、トレミフェン、フルベストラント(fluvestrant)、4-[7-[2,2-ジメチル-1-オキソプロポキシ-4-メチル-2-[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。20

・カルシトニンは、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(neridronate)、オルパドロネート(olpadronate)、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(zoledronate)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。30

・「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-ピリミジン、ならびにAxys Pharmaceuticalsの公報PCT WO00/55126、Merck Frosst Canada & Co.およびAxys PharmaceuticalsのWO01/49288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、多発性骨髓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。Novartis4050

s 製の B H Q 8 8 0 は、ファースト・イン・クラスの完全にヒトの抗 D K K - 1 中和抗体である。前臨床試験は、B H Q 8 8 0 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. April 12 - 16, 2008; San Diego, Calif. 要旨)。

・本明細書中で使用されるとき「M E T および V E G F R 2 の二重インヒビター」は、M E T 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、M E T 経路および V E G F 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。M E T 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。H G F は、これらの細胞型のすべてにおいて M E T に結合し、M E T 経路に複数のオートクライブループおよびパラクリンループにおける重要な役割を与える。腫瘍細胞における M E T 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 M E T 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、M E T 経路の標的化は、転移性の骨病変の確立および進行を予防する実行可能なストラテジーであり得る。以前は X L 1 8 4 (C A S 8 4 9 2 1 7 - 6 8 - 1) として知られていたカボザンチニブ (cabozantinib) (Exelixis, Inc) は、M E T 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、M E T 経路および V E G F 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、E 7 0 5 0 (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) (C A S 9 2 8 0 3 7 - 1 3 - 2) またはフォレチニブ (foretinib) (G S K 1 3 6 3 0 8 9, X L 8 8 0, C A S 8 4 9 2 1 7 - 6 4 - 7 としても知られる) である。

・本明細書中で使用されるとき「R A N K L インヒビター」は、R A N K 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。R A N K L 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。R A N K L インヒビターは、R A N K L がそのレセプター (R A N K) に結合するのを阻止すること、R A N K 媒介性シグナル伝達を阻止すること、またはR A N K L の転写もしくは翻訳を阻止することによってR A N K L 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R A N K L 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：

- ・R A N K L に結合することができ、R A N K 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R A N K タンパク質。可溶性R A N K は、マウスもしくはヒトR A N K 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R A N K L 結合能を有するそのバリアント。
- ・R A N K L 特異的アンチセンス分子。
- ・R A N K L 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R A N K L 抗体。「抗R A N K L 抗体またはR A N K L に対し指向する抗体」は、1つまたは複数のR A N K L の機能を阻害する、核因子 B に対する活性化レセプターのリガンド (R A N K L) 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

10

20

30

40

50

つて調製される。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」、「Fab'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的構造的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

10

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。独特の構造的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。

#### 【0124】

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)(Pagineau, 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にヒトの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。

20

#### 【0125】

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、および健常な骨代謝のバランスを再建するように、デザインされた。

30

#### 【0126】

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PTH-LH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。

40

#### 【0127】

1つの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、骨への原発性乳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

50

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、マラビロク(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、ビクリビロク(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、アプラビロク(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、INC B009471(Kuritzkes, D. R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4 (2): 82 - 7)である。

## 【0128】

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、カボザンチニブ、フォレチニブおよびE7050からなる群より選択される。

## 【0129】

好ましい実施形態において、ラジウム223治療は、アルファラディンである。

## 【0130】

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合わされ得る。

## 【0131】

乳がん患者における早期の骨転移を予測するための方法

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんまたはあるいはER+乳がんなどの乳がんに罹患している被験体における骨転移のリスクを決定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遺伝子の発現レベルを決定する工程を含み、ここで、平均値+1標準偏差より高い上記遺伝子の発現レベルは、早期の骨転移の上昇したリスクを示す。

## 【0132】

好ましい実施形態において、骨転移は、非常に早期の骨転移である。

## 【0133】

好ましい実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

## 【0134】

「早期の骨転移」は、本明細書中で使用されるとき、乳がんの患者における手術後5年より前に現れる骨転移に関する。

## 【0135】

「非常に早期の骨転移」は、本明細書中で使用されるとき、乳がんの患者における手術後3年より前に現れる骨転移に関する。

## 【0136】

本発明の第4の方法は、第1の工程に、トリプルネガティブ(基底細胞様)乳がんまたはあるいはER+乳がんなどの乳がんに罹患している被験体のサンプル中のc-MAF遺

10

20

30

40

50

伝子発現レベルを定量する工程を含む。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。

【0137】

好ましい実施形態において、本発明の第4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、

【0138】

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。c-MAF遺伝子発現レベルは、本発明の第1の方法に対して先に開示されたように定量され得る。

【0139】

好ましい実施形態において、乳がんは、基底細胞様乳がんを含むトリプルネガティブ乳がんまたはあるいはルミナルAおよびBを含むER+乳がんである。

【0140】

第2の工程において、平均値+1標準偏差より高い上記遺伝子の発現レベルは、早期の骨転移の上昇したリスクを示す。

【0141】

「平均レベル」は、本明細書中で使用されるとき、一群の等しくない値の全体的な有意性を要約するかまたは表す、c-MAF発現レベルの単一の値（平均値、最頻値または中央値として）に関する。好ましい実施形態において、平均レベルは、乳がん腫瘍の代表的なコホートから得られる発現レベルの平均に対応する。その患者コホートは、評価しようとしている個々の患者を代表する年齢によって定義される。

【0142】

「標準偏差」は、本明細書中で使用されるとき、数値の集合のばらつきの尺度に関する。例えば、c-MAFの正常な平均レベルに対する標準偏差は、乳房腫瘍サンプルに見出されるc-MAFレベルの集合のばらつきである。そのデータから離れて広がるほど、偏差は大きくなる。標準偏差は、度数分布における平均値からの、実測値の平方偏差の平均値の平方根を求ることによって得ることができる。

【0143】

いったん、乳がん（例えば、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がん）を有する被験体由来のサンプル中のc-MAF遺伝子発現レベルが、測定されて、平均レベルと比較されたら、上記遺伝子の発現レベルが、平均レベルと比較して平均+1標準偏差より高い場合、上記被験体は、早期の骨転移を起こす傾向がより高いと結論づけられ得る。

【0144】

骨転移を伴うトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がん患者またはあるいはER+乳がん患者において個別化治療をデザインするための方法

別の態様において、本発明は、骨転移を伴うトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいは骨転移を伴うER+乳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ピトロでの方法（本明細書中以後、本発明の第5の方法）に関し、その方法は、

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

ii) 工程(i)において得られた発現レベルを参照値と比較する工程を含み、ここで、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。

【0145】

好ましい実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

【0146】

本発明の第5の方法は、第1の工程に、乳がんに罹患している被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子発現レベル（またはc-MAFの転座もしくは増幅）を定量する工程を含

10

20

30

40

50

む。本発明の第5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り得る。

【0147】

好ましい実施形態において、本発明の第5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。

【0148】

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（またはc-MAFの転座もしくは増幅）は、参照値と比較される。好ましい実施形態において、参照値は、コントロールサンプルにおけるc-MAF遺伝子発現レベルである。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、本発明の第5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乳がんを有する被験体のサンプル、または転移に罹患していない乳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。

10

【0149】

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、参照値（例えば、コントロールサンプルのc-MAF遺伝子発現レベル）と比較されたら、上記遺伝子の発現レベルが、参照値と比較して上昇している場合、これは、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ことを示している。

【0150】

20

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）インヒビターおよび副甲状腺様ホルモン（PTH-LH）インヒビター（阻止抗体を含む）またはそれらの組換え型（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ターーゲン、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、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-ペペリジニル)エトキシ]フェニル]-2H-1-ベンゾピラノ-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。

30

- ・カルシトニンは、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。

40

- ・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。

- ・アルファラディン（ラジウム-223二塩化物）。アルファラディンは、がん細胞を死滅させるために、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

50

3は、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向けて自然に自身を標的化する。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、周囲の健常な組織（特に骨髄）にほとんど損傷をもたらさない。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認められるよう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。これが起きた場合、それは、二次がんまたは転移と呼ばれる。後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荷を被る。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、すみやかに腸を経由して排泄される。

・「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-ピリミジン、ならびにAxyx Pharmaceuticalsの公報PCT WO00/55126、Merck Frosst Canada & Co. およびAxyx PharmaceuticalsのWO01/49288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（Dikkopf-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）。

・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ブ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ストラテジーであり得る。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

10

20

30

40

50

いる。別の好適な二重インヒビターは、E 7 0 5 0 ( 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 ( 2 R , 3 R ) - タルトレート ) ( C A S 9 2 8 0 3 7 - 1 3 - 2 ) またはフォレチニブ ( G S K 1 3 6 3 0 8 9 , X L 8 8 0 , C A S 8 4 9 2 1 7 - 6 4 - 7 としても知られる ) である。

・本明細書中で使用されるとき「 R A N K L インヒビター」は、 R A N K 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。 R A N K L 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。 R A N K L インヒビターは、 R A N K L がそのレセプター ( R A N K ) に結合するのを阻止すること、 R A N K 媒介性シグナル伝達を阻止すること、または R A N K L の転写もしくは翻訳を阻止することによって R A N K L 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 R A N K L 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：

・ R A N K L に結合することができ、 R A N K 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 R A N K タンパク質。可溶性 R A N K は、マウスもしくはヒト R A N K 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 R A N K L 結合能を有するそのバリアント。

・ R A N K L 特異的アンチセンス分子。

・ R A N K L 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 R A N K L 抗体。「抗 R A N K L 抗体または R A N K L に対し指向する抗体」は、1つまたは複数の R A N K L の機能を阻害する、核因子 B に対する活性化レセプターのリガンド ( R A N K L ) 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、 K o h l e r , M i l s t e i n ら ( N a t u r e , 1 9 7 5 , 2 5 6 : 4 9 5 ) 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「 F a b 」、「 F ( a b ' ) 2 」および「 F a b ' 」、 F v 、 s c F v 、 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 R A N K L 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的構造的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、

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4

であり、ここで、 F R 1 から F R 4 は、フレームワーク領域 1 ~ 4 であり、 C D R 1 から C D R 3 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 ( V H H ) および 2 つの定常ドメイン ( C H 2 および C H 3 ) を含む。重要なことには、クローニングされ、単離された V H H 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。独特の構造的および機能的特性を有するこれらの新しく発見された V H H ドメインは、 A b l y n x 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。

#### 【 0 1 5 1 】

1 つの実施形態において、 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。具体的な実施形態において、抗 R A N K L 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 R A N K L 抗体は、デノスマブ ( P a g e a u , S t e v e n C . ( 2 0 0 9 ) . m A b s 1 ( 3 ) : 2 1 0 - 2 1 5 、 C A S 番号 6 1 5 2 5 8 - 4

10

20

30

40

50

0 - 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にヒトの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。

【0152】

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、および健常な骨代謝のバランスを再建するように、デザインされた。

【0153】

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PTH-LH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ーテン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。

【0154】

1つの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、骨への原発性乳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、Aplavirroc(Demarest J. F.ら、2005.Update on Aplavirroc: 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、INCBO09471(Kuritzkes, D. R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4(2): 82-7)である。

【0155】

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。

【0156】

好ましい実施形態において、ラジウム223治療は、アルファラディンである。

10

20

30

40

50

## 【0157】

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され得る。

## 【0158】

c - MAF遺伝子の増幅の検出に基づく、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳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、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに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インビトロでの方法（本明細書中以後、本発明の第6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、骨転移を起こす上昇したリスクを示す。

10

## 【0159】

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、およそ16番染色体の約79, 392, 959bp～約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番染色体の約79, 392, 959bp～約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

## 【0160】

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。別の好ましい実施形態において、c - MAF遺伝子の増幅は、14q32および16q23に対するプローブを含むYysis LSI IGH/MAF Dual Color二重融合プローブを使用することによって決定される。

30

## 【0161】

本発明の第6の方法は、第1の工程に、c - MAF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。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。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。

40

## 【0162】

特定の実施形態において、乳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第6の方法は、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、c - MAFコピー数が、コントロールサンプルのc - MAFコピー数より多い場合、その被験体は、骨転移を起こす傾向がより高い。

## 【0163】

コントロールサンプルとは、転移に罹患していないトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんもしくはあるいはER+乳がんを有する被験体のサンプル、または転移に罹患していない、それぞれトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんもしくはER+乳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

50

A F 遺伝子コピー数の中央値に対応するサンプルのことを指す。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増加している場合、被験体は、転移を起こす傾向がより高い。

【0164】

好みの実施形態において、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、2倍増加している（すなわち、6コピー）、3倍増加している（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。

【0165】

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P C Rによって決定される。

【0166】

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（I S H）（例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（F I S H）、色素形成インサイチュハイブリダイゼーション（C I S H）またはシルバーインサイチュハイブリダイゼーション（S I S H））、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P C R）が挙げられるがこれらに限定されない。いずれのI S H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。

【0167】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（F I S H）は、染色体における特定のD N A配列の有無を検出するためおよびその特定のD N A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。F I S H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F I S H法では、D N Aプローブは、ニックトランスレーションまたはP C Rなどの酵素反応を用いてD N Aに組み込まれる、代表的には、フッ素-d U T P、ジゴキシゲニン-d U T P、ビオチン-d U T Pまたはハプテン-d U T P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。

【0168】

C I S H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。

【0169】

D N A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

10

20

30

40

50

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。

#### 【0170】

c-MAF遺伝子の増幅、16q23遺伝子座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、被験体が骨転移を起こす傾向がより高いという事実が示される。

#### 【0171】

c-MAF遺伝子の増幅の決定は、転移に罹患していない乳がんを有する被験体のサンプルにおいて計測された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乳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關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、転移を起こす傾向がより高い。

#### 【0172】

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。

#### 【0173】

c-MAF遺伝子の転座の検出に基づく、トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんまたはあるいはER+乳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、トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患している患者の臨床転帰を予測するためのインピ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。

#### 【0174】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患している患者の臨床転帰を予測するためのインピ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】

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、およそ16番染色体の約79, 392, 959 bp ~ 約79, 663, 806 bp(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、およそ16番染色体の約79, 392, 959 bp ~ 約79, 663, 806 bp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

10

20

30

40

50

領域に特異的なプローブを使用して測定される。

#### 【0176】

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 Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693)。

#### 【0177】

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。

#### 【0178】

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-freetm-poseidontm-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](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.cancergeneticsitalia.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=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/Multiplex%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://> 50

/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](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/renatalogy/cytocell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf](http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/renatalogy/cytocell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf);最終アクセス日2012年11月5日)、Metasy 10 systems XL IGH/MAF Translocation - Dual Fusion Probe([http://www.metasytems-international.com/index.php?option=com\\_joodb&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272](http://www.metasytems-international.com/index.php?option=com_joodb&view=article&joobase=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, 100µl, 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 20 cell Biotech IGH/MAF Dual Fusion Probe([http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&src=s&source=web&cd=1&ved=0CCQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproducts%2Fbrochures%2F1phmie6\\_86.ppt&ei=MhGYUOi3GKWH0QG1t4DoDw&usg=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf31VgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx\\_Ww](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&src=s&source=web&cd=1&ved=0CCQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproducts%2Fbrochures%2F1phmie6_86.ppt&ei=MhGYUOi3GKWH0QG1t4DoDw&usg=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf31VgoFTFQ&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。

30

#### 【0179】

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。

40

#### 【0180】

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、PlatinumBright 50

ht505である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Platinum Bright550である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Platinum Bright547である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Platinum Bright570である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Platinum Bright590である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Platinum Bright647である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Platinum Bright495/550である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、Platinum Bright415/495/550である。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、D API/Platinum Bright495/550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、DECである。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、R6G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D APIである。いくつかの実施形態において、D API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

#### 【0181】

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。  
20

#### 【0182】

特定の実施形態において、乳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。

#### 【0183】

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、c-MAF遺伝子に特異的なプライマーおよびIGH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。  
30  
40

#### 【0184】

いくつかの実施形態において、c-MAF遺伝子の増幅およびコピー数は、c-MAF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-MAF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  
50

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。

【0185】

c - M A F 遺伝子の増幅の検出に基づく、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはE R + 乳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、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはE R + 乳がんに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。

【0186】

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。

【0187】

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。

【0188】

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、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、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。

【0189】

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トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはE R + 乳がんのサンプル中の遺伝子コピー数である。

【0190】

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P C Rによって決定される。

【0191】

トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳房腫瘍またはあるいはE R + 乳房腫瘍またはH E R 2 + 乳房腫瘍を有する患者において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、がんに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否か、すなわち、それが転移を起こす高い確率を有するか否か、または後者が良性の腫瘍であるか否かに左右される。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

10

20

30

40

50

射線治療などの局所性処置である。

【0192】

ゆえに、本願に記載されるように、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がん細胞またはあるいはER+乳がん細胞におけるc-MAF遺伝子の増幅または転座が、骨転移の存在に関係することを考えれば、c-MAF遺伝子の増幅または転座は、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ために有用である。好ましい実施形態において、c-MAF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-MAF遺伝子の増幅は、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。

10

【0193】

したがって、別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患してい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（本明細書中以後、本発明の第3の方法）に関し、その方法は、

i i i ) 上記被験体のサンプル中のc-MAF遺伝子の増幅または転座を定量する工程、および

i v ) i )において得られた遺伝子の増幅または転座を参照値と比較する工程を含み、ここで、c-MAF遺伝子の増幅または転座が、上記参照値と比較して増加している場合、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ある。c-MAF遺伝子の増幅または転座が、上記参照値と比較して増加していない場合、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。好ましい実施形態において、c-MAF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-MAF遺伝子の増幅は、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。

20

【0194】

特定の実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

【0195】

本発明の別な方法は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患している被験体におけるサンプル中のc-MAF遺伝子の増幅または転座を定量する工程を含む。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。

30

【0196】

別の特定の実施形態において、本発明の方法は、c-MAF遺伝子の増幅または転座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。

【0197】

本発明のこの特定の方法の場合、サンプルは、被験体の原発腫瘍組織サンプルであり得る。

40

【0198】

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遺伝子の増幅または転座は、参照値と比較される。好ましい実施形態において、参照値は、コントロールサンプルにおける上記遺伝子のc-MAF遺伝子の増幅または転座である。c-MAF遺伝子の増幅または転座の測定は、コントロールサンプルまたは参照サンプルの値と関連させなければならない。解析される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、転移していないトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんもしくはあるいはER+乳がんを有する被験体のサンプル、または転移していないトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんもしくはあるいはER+乳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

50

て測定された c - M A F 遺伝子の増幅もしくは転座に対応するサンプルである。

【 0 1 9 9 】

いったん、サンプル中の c - M A F 遺伝子の増幅または転座が、計測されて、参照値と比較されたら、上記遺伝子の遺伝子の増幅または転座が、参照値と比較して増加している場合、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／または転移の処置（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。

【 0 2 0 0 】

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得る。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。

10

【 0 2 0 1 】

全身性処置は、全身に到達する処置であり、例えば：

・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。乳がんに対する好適な化学療法処置としては、アントラサイクリン（ドキソルビシン、エピルビシン、ペグ化リポソームドキソルビシン）、タキサン（パクリタキセル、ドセタキセル、アルブミンナノ粒子結合型パクリタキセル）、5 - フルオロウラシル（5 - F U 持続注入、カペシタビン）、ビンカアルカロイド（ビノレルビン、ビンプラスチン）、ゲムシタビン、白金塩（シスプラチニン、カルボプラチニン）、シクロホスファミド、エトポシド、および上記の1つまたは複数の組み合わせ、例えば、シクロホスファミド／アントラサイクリン + / - 5 - フルオロウラシルレジメン（例えば、ドキソルビシン／シクロホスファミド（A C）、エピルビシン／シクロホスファミド、（E C）シクロホスファミド／エピルビシン／5 - フルオロウラシル（C E F）、シクロホスファミド／ドキソルビシン／5 - フルオロウラシル（C A F）、5 - フルオロウラシル／エピルビシン／シクロホスファミド（F E C））、シクロホスファミド／メトトレキサート／5 - フルオロウラシル（C M F）、アントラサイクリン／タキサン（例えば、ドキソルビシン／パクリタキセルまたはドキソルビシン／ドセタキセル）、ドセタキセル／カペシタビン、ゲムシタビン／パクリタキセル、タキサン／白金レジメン（例えば、パクリタキセル／カルボプラチニンまたはドセタキセル／カルボプラチニン）が挙げられるがこれらに限定されない。

20

・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。

30

【 0 2 0 2 】

別の態様において、処置は、アルファラディン（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、周囲の健常な組織（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

40

50

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。

### 【0203】

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)、Affinitor (エベロリムス)、Gleevect と併用のAffinitor、AS703026 (ピマセルチブ)、Axcess (ウミロリムス)、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 (アントロキノール)、INK128、Inspiron (シロリムス)、IPI504 (レタスピマイシン塩酸塩)、KRN951 (チボザニブ)、ME344、MGA031 (テプリズマブ)、MiStent SES (シロリムス)、MKC1、Nobori (ウミロリムス)、OSI027、OVI123 (コルジセピン)、Palomid529、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 afodotin))、Synergy (エベロリムス)、Taltorvic (リダフオロリムス)、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)、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)、Esprit (エベロリムス)、Evertor (エベロリムス)、HBF0079、LCP-Siro (シロリムス)、Limus CLARISS (シロリムス)、mTOR インヒビター CELLZONE、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)、TAFAG3、Temsiroliimus ACCORD (テムシロリムス)、Tem

sirolimus 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](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、エベロリムスは、アロマターゼインヒビターと組合わされる (例えば、Baselga, J. ら、Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366 (6) : 520-529 (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)。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. Anti-cancer 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、ホルモンレセプター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 (例えば、Baselga, J. ら、Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366 (6) : 520-529を参照のこと)。いくつかの実施形態において、患者は、ER+である。いくつかの態様において、mTorインヒビターは、進行乳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。

#### 【0204】

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)、Bosulif (ボスチニブ)、ENMD981693、KD020、KX01、Sprycel (ダサチニブ)、Yervoy (イピリムマブ)、AP23464、AP23485、AP23588、AZD0424、c-Srcキナーゼインヒビタ-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 (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、患者は、SRS+かつER-である (例えば、Zhang, C.H. - F. ら、Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16: 67-78 (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、進行

10

20

30

40

50

乳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は使用される。いくつかの態様において、S r c 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。

【0205】

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は使用される。いくつかの態様において、COX-2インヒビターは、以下の群：A B T 9 6 3、A c e t a m i n o p h e n E R J O H N S O N (アセトアミノフェン)、A c u l a r X (ケトロラクトロメタミン)、B A Y 1 0 1 9 0 3 6 (アスピリン)、B A Y 9 8 7 1 1 10 1 (ジフェンヒドラミン、ナプロキセンナトリウム)、B A Y 1 1 9 0 2 (ピロキシカム)、B C I B U C H 0 0 1 (イブプロフェン)、C a p o x i g e m (アブリコキシブ)、C S 5 0 2、C S 6 7 0 (ペルビプロフェン)、D i c l o f e n a c H P B C D (ジクロフェナク)、D i r a c t i n (ケトプロフェン)、G W 4 0 6 3 8 1、H C T 1 0 2 6 (ニトロフルルビプロフェン)、H y a n a l g e s e - D (ジクロフェナク)、H y d r o c o D e x (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)、I b u p r o f e n S o d i u m P F I Z E R (イブプロフェンナトリウム)、I b u p r o f e n w i t h A c e t a m i n o p h e n P F I Z E R (アセトアミノフェン、イブプロフェン)、I m p r a c o r (ケトプロフェン)、I P 8 8 0 (ジクロフェナク)、I P 9 4 0 (インドメタシン)、I S V 2 0 5 (ジクロフェナクナトリウム)、J N S 0 1 3 (アセトアミノフェン、トラマドール塩酸塩)、K e t o p r o f e n T D S (ケトプロフェン)、L T N S 0 0 1 (ナプロキセンエテメシル)、M e s a l a m i n e S A L I X (メサラミン)、M e s a l a m i n e S O F A R (メサラミン)、M e s a l a z i n e (メサラミン)、M L 3 0 0 0 (リコフェロン)、M R X 7 E A T (エトドラク)、N a p r o x e n I R O K O (ナプロキセン)、N C X 4 0 1 6 (ニトロアスピリン)、N C X 7 0 1 (ニトロアセトアミノフェン)、N u p r i n S C O L R (イブプロフェン)、O M S 1 0 3 H P (アミトリピチリン塩酸塩、ケトプロフェン、オキシメタゾリン塩酸塩)、O r a l e a s e (ジクロフェナク)、O x y c o D e x (デキストロメトルファン、オキシコドン)、P 5 4、P e r c o D e x (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)、P L 3 1 0 0 (ナプロキセン、ホスファチジルコリン)、P S D 5 0 8、R - K e t o p r o f e n (ケトプロフェン)、R e m u r a (プロムフェナクナトリウム)、R O X 8 2 8 (ケトロラクトロメタミン)、R P 1 9 5 8 3 (ケトプロフェンリジン)、R Q 0 0 3 1 7 0 7 6、S D X 1 0 1 (R - エトドラク)、T D S 9 4 3 (ジクロフェナクナトリウム)、T D T 0 7 0 (ケトプロフェン)、T P R 1 0 0、T Q 1 0 1 1 (ケトプロフェン)、T T 0 6 3 (S - フルルビプロフェン)、U R 8 8 8 0 (シミコキシブ)、V 0 4 9 8 T A 0 1 A (イブプロフェン)、V T 1 2 2 (エトドラク、プロプラノロール)、X P 2 0 B (アセトアミノフェン、デキストロプロポキシフェン)、X P 2 1 B (ジクロフェナクカリウム)、X P 2 1 L (ジクロフェナクカリウム)、Z o e n a s a (アセチルシスティン、メサラミン)、A c e p h e n、A c t i f e d P l u s、A c t i f e d - P、A c u l a r、A c u l a r L S、A c u l a r P F、A c u l a r X、A c u v a i l、A d v i l、A d v i l A l l e r g y S i n u s、A d v i l C o l d a n d S i n u s、A d v i l C o n g e s t i o n R e l i e f、A d v i l P M、A d v i l P M C a p s u l e、A i r S a l o n p a s、A i r t a l、A l c o h o l - F r e e N y Q u i l C o l d & F l u R e l i e f、A l e v e、A l e v e A B D I I B R A H I M、A l e v e - D、A l k a - S e l t z e r、A l k a - S e l t z e r B A Y E R、A l k a - S e l t z e r E x t r a S t r e n g t h、A l k a - S e l t z e r L e m o n - L i m e、A l k a - S e l t z e r O r i g i n a l、A l k a - S e l t z e r P l u s、A l k a - S e l t z e r p l u s C o l d a n d C o u g h、A l k a - S e l t z e r p l u s C 40 50

old and Cough Formula、Alka-Seltzer Plus Day and Night Cold Formula、Alka-Seltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula、Alka-Seltzer Plus Flu Formula、Alka-Seltzer Plus Night Cold Formula、Alka-Seltzer Plus Sinus Formula、Alka-Seltzer Plus Sparkling Original Cold Formula、Alka-Seltzer PM、Alka-Seltzer Wake-Up Call、Anacin、Anaprox、Anaprox MINERVA、Ansaid、Apitoxin、Apranax、Apranax abdi、Arcoxia、Arthritis Formula Be 10 ngay、Arthrotec、Asacol、Asacol HD、Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL、Asacol ORIFARM、Aspirin BAYER、Aspirin Complex、Aspirin Migran、AZD3582、Azulfidine、Baralgan M、BAY1019036、BAY987111、BAY11902、BCIBUCH001、Benadryl Allergy、Benadryl Day and Night、Benylin 4 Flu、Benylin Cold and Flu、Benylin Cold and Flu Day and Night、Benylin Cold and Sinus Day and Night、Benylin Cold and Sinus Plus、Benylin Day and Night Cold and Flu 20 Relief、Benylin1 All-In-One、Brexin、Brexin ANGELINI、Bromday、Bufferin、Buscopan Plus、Caldolor、Calmate1、Cambia、Canasa、Capoxigem、Cataflam、Celebrex、Celebrex ORIFARM、Children's Advil Allergy Sinus、Children's Tylenol、Children's Tylenol Cough and Runny Nose、Children's Tylenol plus cold、Children's Tylenol plus Cold and Cough、Children's Tylenol plus cold and stuffy nose 30、Children's Tylenol plus Flu、Children's Tylenol plus cold & allergy、Children's Tylenol plus Cough & Runny Nose、Children's Tylenol plus Cough & Sore Throat、Children's Tylenol plus multi symptom cold、Clinoril、Codral Cold and Flu、Codral Day and Night Day Tablets、Codral Day and Night Night Tablets、Codral Nightime、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 Nightime Multi-Symptom Cold、Coricidin II Extra Strength Cold and Flu、CS502、CS670、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 40、Diclofenac HPBCD、Dimetapp Day Relief、Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu、Dimeta 50

pp 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, Feldeine, 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, Hyanalgese-D, Hydrocodex, Ibuprofen Sodium PFIZER, Ibuprofen with Acetaminophen PFIZER, Icy Hot SANOFI AVENTIS, Impracor, Indocin, Indometacin 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, Lorfilt 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, Movailis ASPEN, MRX7EAT, Nalfon, Nalfon PEDINOL, Naprelan, Naprosyn, Naprosyn RPG LIFE SCIENCE, Naproxen IROKO, NCX4016, NCX701, Neoprofen LUNDBECK, Nevanac, Nexcide, Nifilan, Norgesic MEDICIS, Novalgin, Nuprin SCOLR, Nurofen, Nurofen Cold and Flu, Nurofen Max Strength Migraine, Nurofen Plus, Nuroxomol, NyQuil with Vitamin C, Ocufen, OMS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oruvail, Osteluc, Oxycodex, P54, Panadol, Panadol Acetifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Pedea, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon, Percodan, Percodan-Demi, Percodex, Percogesic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prexige, Prolensa, PSD508, R-Ketoprofen, Rantudil, R 10 20 30 40 50

elafen、Remura、Robaxisal、Rotec、Rowasa、ROX  
828、RP19583、RQ00317076、Rubor、Salofalk、Sa  
lonpas、Saridon、SDX101、Sel-touch、sfRowasa、  
Shinbaro、Sinumax、Sinutab、Sinutab、sinus、S  
palt、Sprix、Strefen、Sudafed Cold and Coug  
h、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 Tablets  
、Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief 10  
Night Tablets、Sudafed PE Sinus plus Anti  
-inflammatory Pain Relief、Sudafed Sinus  
Advance、Surgam、Synalgos-DC、Synflex、Tavis  
t allergy/sinus/headache、TDS943、TDT070、T  
heraflu Cold and Sore Throat、Theraflu Da  
ytime Severe Cold and Cough、Theraflu Day  
time Warming Relief、Theraflu Warming Rel  
ief Caplets Daytime Multi-Symptom Cold、T  
heraflu Warming Relief Cold and Chest Co  
ngestion、Thomapyrin、Thomapyrin C、Thomapy  
rin Effervescent、Thomapyrin Medium、Tilco  
til、Tispol、Tolectin、Toradol、TPR100、TQ101  
1、Trauma-Salbe、Trauma-Salbe Kwizda、Treo  
、Treximet、Troxex、TT063、Tylenol、Tylenol Al  
lergy Multi-Symptom、Tylenol Back Pain、Ty  
lenol Cold & Cough Daytime、Tylenol Cold  
& Cough Nighttime、Tylenol Cold and Sinus  
Daytime、Tylenol Cold and Sinus Nighttime  
、Tylenol Cold Head Congestion Severe、Ty  
lenol Cold Multi Symptom Daytime、Tylenol 30  
Cold Multi Symptom Nighttime Liquid、Ty  
lenol Cold Multi Symptom Severe、Tylenol C  
old Non-Drowsiness Formula、Tylenol Cold  
Severe Congestion Daytime、Tylenol Comple  
te Cold, Cough and Flu Night time、Tylenol  
Flu Nighttime、Tylenol Menstrual、Tylenol  
PM、Tylenol Sinus Congestion & Pain Day  
time、Tylenol Sinus Congestion & Pain Nigh  
time、Tylenol Sinus Congestion & Pain Se  
vere、Tylenol Sinus Severe Congestion Day  
time、Tylenol Ultra Relief、Tylenol with C  
affeine and Codeine phosphate、Tylenol wi  
th Codeine phosphate、Ultra Strength Beng  
ay Cream、Ultrace、UR8880、V0498TA01A、Vick  
s NyQuil Cold and Flu Relief、Vicoprofen、  
Vimovo、Voltaren Emulgel、Voltaren GEL、Vol  
taren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH、Vol  
taren XR、VT122、Xefo、Xefo Rapid、Xefocam、Xi  
brom、XL3、Xodol、XP20B、XP21B、XP21L、Zipsorお  
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 40  
50

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、進行乳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](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、PTH-LH(副甲状腺ホルモン様ホルモン)またはPTH-rP(副甲状腺ホルモン関連タンパク質)を阻止する抗体またはペプチドおよびEverolimus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。

#### 【0206】

別の態様において、骨分解を回避するためおよび/または予防するために使用される処置剤としては、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)インヒビターおよび副甲状腺様ホルモン(PTH-LH)インヒビター(阻止抗体を含む)またはそれらの組換え型(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、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-ペリジニル)エトキシ]フェニル]-2H-1-ベンゾピラノ-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。
- カルシトニンは、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システィンプロテアーゼ活性を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の名称における国際特許出願WO03/020278に記載されている)、公報WO03/020721(Novartis Pharma GmbH)および公報WO04/50

000843 (AstraZeneca AB) に記載されているピロロ-ピリミジン、ならびに Axyss Pharmaceuticals の公報 PCT WO00/55126、Merck Frosst Canada & Co. および Axyss Pharmaceuticals の WO01/49288 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 (Dikkopf-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を予防する際に役割を果たし得る。Nova 10 rtis 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. April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract)。

・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ブループおよびパラクリンループにおける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を予防する際の実行可能なストラテジーであり得る。以前は XL184 (CAS 849217-68-1) として知られていた Cabozantinib (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、腫瘍細胞を殺し、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）を阻害すると示されている。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 Foretinib (GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7 としても知られる) である。

・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られ、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：

・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

10

20

30

40

50

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アント。
- ・RANKL特異的アンチセンス分子。
- ・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B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」、「Fab'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的構造的および機能的特性を含む、抗体由来の治療的タンパク質である。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、

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4

であり、ここで、F R 1 から F R 4 は、フレームワーク領域 1 ~ 4 であり、C D R 1 から C D R 3 は、相補性決定領域 1 ~ 3 である。これらの重鎖抗体は、1つの可変ドメイン(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。独特の構造的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治療用抗体の新時代の基礎を形成している。

#### 【0207】

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(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にヒトの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。

#### 【0208】

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、および健常な骨代謝のバランスを再建するように、デザインされた。

#### 【0209】

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PTH-LH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

10

20

30

40

50

、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。

【0210】

1つの実施形態において、CCR5アンタゴニストは、骨への原発性乳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 (Roststein 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、INCBO09471 (Kuritzkes, D. R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 4 (2): 82-7)である。

【0211】

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。

【0212】

好ましい実施形態において、ラジウム223治療は、アルファラディンである。

【0213】

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され得る。

【0214】

c-MAF阻害剤を使用して、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんからの骨転移を処置するための方法

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんからの骨転移の処置または予防において使用するためのc-MAF阻害剤（本明細書中以後、本発明の阻害剤）に関する。

【0215】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんからの骨転移の処置または予防のための医薬を製造するための、c-MAF阻害剤の使用に関する。

【0216】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんからの骨転移の処置または予防を必要とする被験体へのc-MAF

10

20

30

40

50

阻害剤の投与を含む、上記被験体におけるそのような処置または予防のための方法に関する。

【0217】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患している被験体における骨転移のリスクを予防するためまたは減少させるための方法に關し、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。

【0218】

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、特異的なリボザイム、阻害性抗体もしくはナノボディ、ドミナントネガティブc-MAFバリエント、または表1もしくは表2の化合物が挙げられる。

【0219】

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、薬物の潜在的な標的に結合し得る。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。

【0220】

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つの独特的な部分に相補的なRNAを生成する発現プラスミドとして、分配され得る。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、エキソビオ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、ホスホチオエ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5,176,996号；同第5,264,564号；および同第5,256,775号も参照のこと）（これらの各々は、その全体が参考により本明細書中に援用される）。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 Research 48:2659-2668, 1988に概説されている。

【0221】

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。

【0222】

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最近示された（Wagner, Nature

10

20

30

40

50

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。

10

### 【0223】

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、オリゴヌクレオチド配列は、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。

20

### 【0224】

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、Let singer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。

30

### 【0225】

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、キシリ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。

40

### 【0226】

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。

50

## 【0227】

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。

## 【0228】

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pol IIIまたはpol II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。

## 【0229】

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。

## 【0230】

## 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。

## 【0231】

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 - フルオロリボースのような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。

## 【0232】

s i RNAは、そのままで、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ことが、可能である。

## 【0233】

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DN

10

20

30

40

50

A領域が、転写の際にループを形成するスペ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。

【0234】

あるいは、siRNA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、siRNAを形成する各DNA鎖の転写が、同じであっても異なっても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。

【0235】

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IIプロモーターである。RNAポリメラーゼII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II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II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。本発明の文脈において、ERアルファ遺伝子プロモーターまたはサイクリンD1遺伝子プロモーターは、特に好適であり、ゆえに、乳房腫瘍、好ましくは、トリプルネガティブ

10

20

30

40

50

(基底細胞様を含む)乳房腫瘍において目的の遺伝子を特異的に発現させるために特に好ましい。

【0236】

s i R N A は、s i R N A 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s h R N A (短ヘアピンR N A ) から細胞内に產生され得る。s h R N A 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。s h R N A の発現に適したプロモーターは、s i R N A 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。

【0237】

s i R N A およびs h R N A 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、p U C 1 8 、p U C 1 9 、B l u e s c r i p t およびそれらの誘導体、m p 1 8 、m p 1 9 、p B R 3 2 2 、p M B 9 、C o I E 1 、p C R 1 、R P 4 ) 、ファージベクターおよびシャトルベクター (例えば、p S A 3 およびp A T 2 8 ) 、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ド、Y E P 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、p A C シリーズベクターおよびp V L シリーズベクター) 、植物発現ベクター (例えば、p I B I 、p E a r l e y G a t e 、p A V A 、p C A M B I A 、p G S A 、p G W B 、p M D C 、p M Y 、p O R E 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、アデノウイルス隨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、p c D N A 3 、p H C M V / Z e o 、p C R 3 . 1 、p E F 1 / H i s 、p I N D / G S 、p R c / H C M V 2 、p S V 4 0 / Z e o 2 、p T R A C E R - H C M V 、p U B 6 / V 5 - H i s 、p V A X 1 、p Z e o S V 2 、p C I 、p S V L およびp K S V - 1 0 、p B P V - 1 、p M L 2 d およびp T D T 1 ) 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。

【0238】

本発明のs i R N A およびs h R N A 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。s i R N A 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、2 5 ~ 5 0 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。s i R N A をデザインする1つの方法は、A A (N 1 9 ) T T モチーフの識別 (ここで、Nは、c - M A F 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、N A (N 2 1 ) 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。

【0239】

c - M A F 特異的s i R N A には、W O 2 0 0 5 0 4 6 7 3 1 に記載されているs i R N A が含まれ、その鎖のうちの一方は、A C G G C U C G A G C A G C G A C A A (配列番号6) である。他のc - M A F 特異的s i R N A 配列としては、C U U A C C A G U G U G U U C A C A A (配列番号7) 、U G G A A G A C U A C U A C U G G A U G (配列番号8) 、A U U U G C A G U C A U G G A G A A C C (配列番号9) 、C A A G G A G A A A U A C G A G A (配列番号10) 、A C A A G G A G A A A U A C G A G A (配列番号11) およびA C C U G G A A G A C U A C U A C U G G (配列番号12) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0240】

D N A 酵素

他方で、本発明は、本発明のc - M A F 遺伝子の発現を阻害するD N A 酵素の使用も企図する。D N A 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。D N A 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

10

20

30

40

50

的核酸を特異的に切断するように、デザインされる。

【0241】

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 0 9 3 2 4 6 号を参照のこと）。 10

【0242】

本発明において使用されるリボザイムは、エンドリボヌクレアーゼ RNA であるハンマーヘッド型リボザイム（本明細書中以後、「Cech 型リボザイム」）（Zaugら、 Science 224 : 574 - 578, 1984 を含む。 20

【0243】

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ボ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。 20

【0244】

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」、「Fab'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プ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。 40

【0245】

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などを妨げる、ペプチドのことを指す。 40

【0246】

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 50

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p18）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）。

## 【0247】

10

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バリアントが含まれる。これらのバリアントは、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アントである。したがって、例証的な様式では、ネガティブc-MAFドミナントバリアントには、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（米国特許第6274338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アントが含まれる。

## 【0248】

20

本発明は、ネガティブc-MAFドミナントバリアントと、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。

## 【0249】

30

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）；抗黃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（Christophersonら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6314-6318；Noら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 50

. U S A , 9 3 : 3 3 4 6 - 3 3 5 1 , S u h r ら、 1 9 9 8 , P r o c . N a t l . A cad . S c i . U S A , 9 5 : 7 9 9 9 - 8 0 0 4 および W O 9 7 3 8 1 1 7 ) 、 メタロチオネイン依存性プロモーター ( W O 8 6 0 4 9 2 0 ) および ラパマイシン依存性プロモーター ( R i v e r a ら、 1 9 9 6 , N a t . M e d . 2 : 1 0 2 8 - 3 2 ) として分類される。

#### 【 0 2 5 0 】

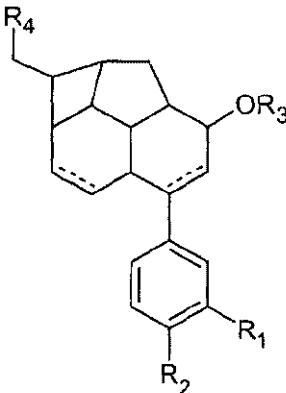
ネガティブ c - M A F ドミナントバリアントをコードするポリヌクレオチドの発現に適したベクターとしては、 原核生物発現ベクター由来のベクター ( 例えは、 p U C 1 8 、 p U C 1 9 、 B l u e s c r i p t および それらの誘導体、 m p 1 8 、 m p 1 9 、 p B R 3 2 2 、 p M B 9 、 C o l E 1 、 p C R 1 、 R P 4 ) 、 ファージおよびシャトルベクター ( 例えは、 p S A 3 および p A T 2 8 ) 、 酵母発現ベクター ( 例えは、 2 - ミクロンタイプのプラスミドベクター、 インテグレーションプラスミド、 Y E P 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 ( 例えは、 p A C シリーズベクターおよび p V L シリーズベクター ) 、 植物発現ベクター ( 例えは、 p I B I 、 p E a r l e y G a t e 、 p A V A 、 p C A M B I A 、 p G S A 、 p G W B 、 p M D C 、 p M Y 、 p O R E 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、 アデノウイルス隨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 ( 例えは、 p S i l e n c e r 4 . 1 - C M V ( A m b i o n ) 、 p c D N A 3 、 p c D N A 3 . 1 / h y g p H C M V / Z e o 、 p C R 3 . 1 、 p E F 1 / H i s 、 p I N D / G S 、 p R c / H C M V 2 、 p S V 4 0 / Z e o 2 、 p T R A C E R - H C M V 、 p U B 6 / V 5 - H i s 、 p V A X 1 、 p Z e o S V 2 、 p C I 、 p S V L および p K S V - 1 0 、 p B P V - 1 、 p M L 2 d および p T D T 1 ) が挙げられる。

#### 【 0 2 5 1 】

##### 小分子

本発明における使用に適した他の c - M A F 阻害性化合物としては：

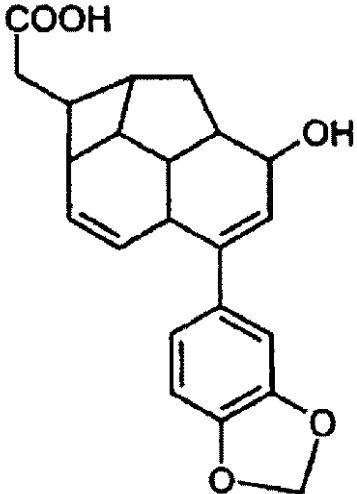
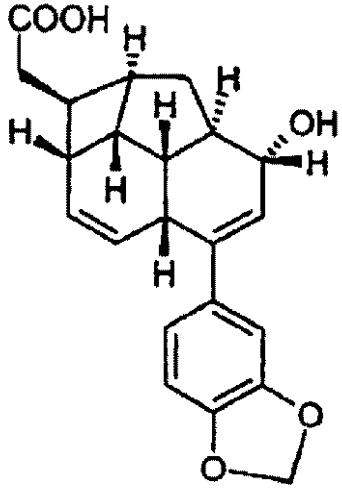
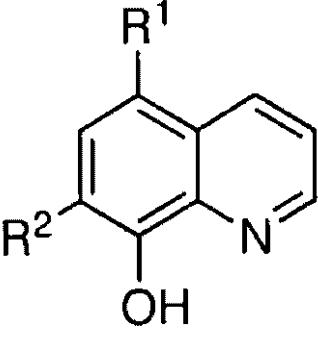
【表 1 - 1】

I	一般式
	10
	
	20
	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、
	20
	R <sub>1</sub> およびR <sub>2</sub> は、互いに独立しており、
	30
	1.0 Hまたは
	2.0 -O-C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -アルキル、-O-C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -アルケニル、-O-C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -アルキニルまたは -O-C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub> -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 <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -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 <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -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 <sub>6</sub> -C <sub>10</sub> -アリール、
	2.6 -NH-C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -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 <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -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 <sub>2</sub> または
	2.9 ハロゲン

【表1-2】

	<p>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、</p> <p>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R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、一体となって環を形成し、ここで、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、-O-[(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)-アルキレン]-O-基を意味する)であり、</p> <p>R<sub>3</sub>は、</p> <p>1.0 Hまたは</p> <p>2.0 -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキル、-O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-アルケニル、-O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-アルキニルもしくは-O-C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-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:</p> <p>2.1 -OH、</p> <p>2.2 =O、</p> <p>2.3 -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキル(ここで、アルキルは、直鎖または分枝鎖である)、</p> <p>2.4 -O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-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)、</p> <p>2.5 -C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-アリール、</p> <p>2.6 -NH-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-アルキル(ここで、アルキルは、直鎖または分枝鎖である)、</p> <p>2.7 -NH-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-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)、</p> <p>2.8 -NH<sub>2</sub>または</p> <p>2.9 ハロゲン</p> <p>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、</p> <p>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、</p>
	10
	20
	30
	40

【表1-3】

	<p><math>R_4</math>は、<math>CO_2R_3</math>、<math>CO_2NHR_3</math>、<math>CHO</math>、<math>CH_2OR_3</math>、<math>CH_2OSi(R_3)_3</math>、<math>CH_2Br</math>、<math>CH_2CN</math>(ここで、<math>R_3</math>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</p>  
II	<p>一般式</p>  <p>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、  <math>R_1</math>は、<math>NO_2</math>、<math>NH_2</math>、<math>NH(C_1-C_6\text{-アルキル})</math>および<math>N(C_1-C_6\text{-アルキル})(C_1-C_6\text{-アルキル})</math>から  なる群より選択され;  <math>R_2</math>は、H、ハロゲン、<math>C_1-C_6\text{-アルキル}</math>およびフルオロ置換<math>C_1-C_6\text{-アルキル}</math>から選択される  か、または  <math>R_1</math>は、Clであり、<math>R_2</math>は、BrまたはHである)、</p>

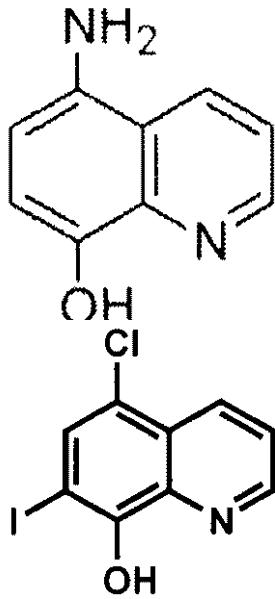
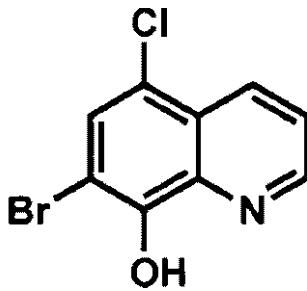
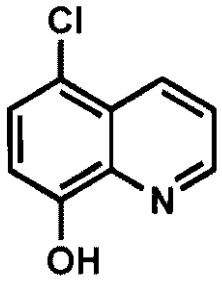
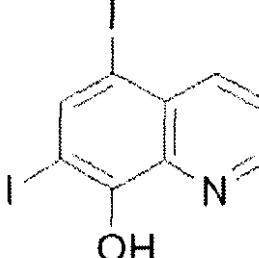
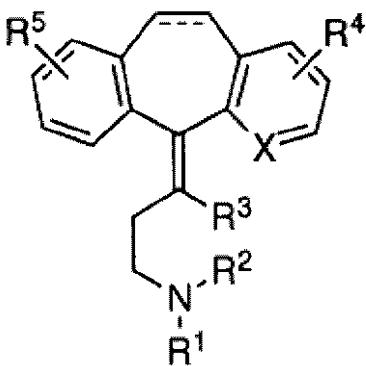
10

20

30

40

【表 1 - 4】

	および好ましくは、以下の化合物。	
	  	10
	 	20
III	WO9049410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】

	<p>のWO08098351に記載されている化合物などの化合物(式中、 ==: は、単結合または二重結合であり、 R<sup>1</sup>は、H、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルおよび C(O)NHC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルからなる群より選択され; R<sup>2</sup>は、HおよびC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルから選択され; R<sup>3</sup>は、HおよびC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルから選択されるか; またはR<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>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<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は、独立して、H、ハロゲン、ヒドロキシ、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、フルオロ置換C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキルおよびC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコキシから選択され; Xは、C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)、 アミトリピチリン(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(Cyclobenzrapine)(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)</p>	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)	20
		30
		40

表1:c-MAF阻害能を有する小分子

【0252】

他のc-MAFインヒビターは、特許出願WO2005063252(その全体が本明細書中に参照により援用される)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 プリンアナログ	cdk2阻害活性についての参考文献
フルバラノール類、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 <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>6</sub> Oを有する2-(1R-イソプロピル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-6-(3-クロロアミノ)-9-イソプロピルプリン、Purvalanol B、アミノフルバラノール、化合物52(フルバラノール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 (#O0886)としてSigma-Aldrichから入手可能な分子式C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> Oを有する2-(ヒドロキシエチルアミノ)-6-ベンジルアミノ-9-メチルプリン、商品名N <sup>9</sup> -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 <sub>17</sub> F <sub>22</sub> N <sub>6</sub> Oを有する2-(2'-ヒドロキシエチルアミノ)-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 <sub>19</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O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 <sub>19</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>7</sub> 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).
CI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 <sub>2</sub> 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ルアン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).
イソペンテニルーアデニン	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	
インジルビン類、例えば、商品名(#I0404)としてSigma-Aldrichから入手可能なC <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> の分子式を有するインジルビン-3'—モノオキシム、インジルビン5-ースルホネート、5-クロロインジルビン	Davies, T.G. ら、 <i>Structure</i> , 9, 389-397 (2001); Marko, D. ら、 <i>Bx. J. Cancer</i> , 84, 283-289 (2001); Hoessl, 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
この表のカラム2に参照されやすく述べて載せられているFischerのオキシンドール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, R.W. ら、 <i>J. Med. Chem.</i> , 45, 5233-5248 (2002).
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); Mettey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GW8510(#G7791)としてSigma-Aldrichから入手可能なC <sub>21</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> 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
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、スタウロスボリン(#S1016, A. G. Scientific, San Diego, CA)またはUCN-01(7-ヒドロキシスタウロスボリン)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 <sub>16</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>2</sub> Oの分子式を有する9-ブロモ-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 <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 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
アルカロイドであるCGP41251	Begemann, M. ら、 (1998) <i>Anticancer Res.</i> ,

10

20

30

40

【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 <sub>11</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>6</sub> O <sub>2</sub> の分子式を有する10z-ヒメニアルジン(H-1150)	Meijer, L.ら、 (1999) <i>Chemistry &amp; 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
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 <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub> 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-メルト-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

10

20

表2: c-MAF インヒビター

## 【0253】

好ましい実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

## 【0254】

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。

## 【0255】

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ー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。

30

## 【0256】

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。

40

## 【0257】

50

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. Faulli i Trillo, Luzan 5, S.A., 1993 Edition*および*Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20<sup>th</sup> 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。

#### 【0258】

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。

#### 【0259】

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、0.0

1、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。

#### 【0260】

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オ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。

#### 【0261】

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

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患しており、かつ転移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において使用するための、c-MAF阻害剤、または骨分解を回避するもしくは予防することができる薬剤に関する。

#### 【0262】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんまたはあるいはER+乳がんに罹患しており、かつ転移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を製造するための、c-MAF阻害剤、または骨分解を回避するもしくは予防することができる薬剤の使用に関する。

#### 【0263】

あるいは、本発明は、乳がんに罹患しており、かつ転移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/または処置の方法に関し、その方法は、c-MAF阻害剤、または骨分解を回避するためもしくは予防するための薬剤を前記被験体に投与する工程を含む。

#### 【0264】

特定の実施形態において、骨転移は、溶骨性転移である。

#### 【0265】

本発明に記載される治療方法に適した、c-MAF阻害剤、および骨分解を回避するかまたは予防することができる薬剤は、個別化治療法の文脈において、上で詳細に記載されている。

#### 【0266】

参照サンプルまたはコントロールサンプルは、転移に罹患していないトリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳がんもしくはあるいはER+乳がんを有する被験体のサンプル、または転移に罹患していないトリプルネガティブ(基底細胞様を含む)乳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計測された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。

10

20

30

40

50

## 【0267】

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するためまたは定量するための方法は、本発明の第1の方法に関して詳細に記載されてきたが、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。

## 【0268】

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合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。

## 【0269】

10

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。

## 【0270】

以下の例は、本発明を例証するものであって、その範囲を限定しない。

## 【0271】

## 本発明のキット

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに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の発現レベルを参考c - MAF発現レベルと比較するための手段を備える。

20

## 【0272】

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブの基底細胞様乳がんまたはあるいはER+乳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の発現レベルを参考c - MAF発現レベルと比較するための手段を備える。

## 【0273】

30

別の態様において、本発明は、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに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の発現レベルを参考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考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。

## 【0274】

別の態様において、本発明は、i) トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がんまたはあるいはER+乳がんに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關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トに関する。

40

## 【0275】

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。

## 【0276】

好みの実施形態において、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。

## 【0277】

特定の実施形態において、乳がんは、トリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がん

50

または E R + (ルミナル A および B を含む) 乳がんである。

【 0 2 7 8 】

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。

【 0 2 7 9 】

乳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

別の態様において、本発明は、乳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：

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 - M A F の発現レベルを定量する工程；

10

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。

【 0 2 8 0 】

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 - M A F 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。

【 0 2 8 1 】

特定の実施形態において、乳がんは、トリプルネガティブ (基底細胞様を含む) 乳がんまたは E R + (ルミナル A および B を含む) 乳がんである。

20

【 0 2 8 2 】

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。

【 0 2 8 3 】

乳がんに罹患している被験体を分類するための方法

別の態様において、本発明は、乳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 - 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 ) そのサンプル中の 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。

【 0 2 8 4 】

30

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 - M A F 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。

【 0 2 8 5 】

特定の実施形態において、乳がんは、トリプルネガティブ (基底細胞様を含む) 乳がんまたは E R + (ルミナル A および B を含む) 乳がんである。

【 0 2 8 6 】

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。

【 0 2 8 7 】

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 - M A F 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。

40

【 0 2 8 8 】

別の好ましい実施形態において、前記サンプル中の c - M A F 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。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。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 】

【 0 2 8 9 】

コホート I . 乳がん原発腫瘍コホートの発見

ヒト乳房腫瘍を、 P A M 5 0   B r e a s t   C a n c e r   I n t r i n s i c   C

50

l a s s i f i e r に記載されているような 5 つのサブタイプに分類し、次いで、これらの腫瘍における c - M A F ( M A F ) 発現が所与のサブタイプのいくつかにおいて骨転移事象と相關するかを確かめるために、適切な統計解析を行った。 P A M 5 0 は、基底細胞様と命名されたサブタイプを有する。その代わりに、トリプルネガティブの群を使用した。患者の情報は、 G E O ( T . B a r r e t t , D . B . T r o u p , S . E . W i l h i t e , P . L e d o u x , D . R u d n e v , C . E v a n g e l i s t a , I . F . K i m , A . S o b o l e v a , M . T o m a s h e v s k y , a n d R . E d g a r . N C B I G E O : m i n i n g t e n s o f m i l l i o n s o f e x p r e s s i o n p r o f i l e s - d a t a b a s e a n d t o o l s u p d a t e . N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 3 5 , J a n u a r y 2 0 0 7 . I S S N 1 3 6 2 - 4 9 6 2 ) ) からダウンロードした。以下のデータセットを使用した: G S E 2 6 0 3 、 G S E 2 0 3 4 および G S E 1 2 2 7 6 の組み合わせ。この組み合わせコホートは、 5 6 0 人の患者を有した。体系的なバイアス ( s y s t e m a t i c b i a s e ) を排除するために、マージする前に、すべての遺伝子の発現の測定値を z - スコアに変換した。すべての統計解析を、 B i o c o n d u c t o r ( R . C . G e n t l e m a n , V . J . C a r e y , D . M . B a t e s , B . B o l s t a d , M . D e t t l i n g , o S . D u - d o i t , B . E l l i s , L . G a u t i e r , Y . G e , J . G e n t r y , K . H o r n i k , T . H o t h o r n , W . H u b e r , S . I a c u s , R . I r i z a r r y , F . L e i s c h , C . L i , M . M a e c h l e r , A . J . R o s s i n i , G . S a w i t z k i , C . S m i t h , G . S m y t h , L . T i e r n e y , J . Y . H . Y a n g , a n d J . Z h a n g . B i o c o n d u c t o r : O p e n s o f t w a r e d e v e l o p m e n t f o r c o m p u t a t i o n a l b i o l o g y a n d b i o i n f o r m a t i c s . G e n o m e B i o l o g y , 5 : R 8 0 , 2 0 0 4 . U R L [h t t p : / / g e n o m e b i o l o g y . c o m / 2 0 0 4 / 5 / 1 0 / R 8 0](http://genomebiology.org/2004/5/10/R80) ) を使用して行った。

## 【 0 2 9 0 】

コホート I I . 乳がん原発腫瘍サンプルコホートの検証 :

## 【 0 2 9 1 】

上記の患者腫瘍サンプルコホート I で見出された仮説を検証するために、第 2 のヒト乳房腫瘍コホートを使用した。独立した検証セットは、ステージ I 、 I I または I I I B C を有し、追跡の注釈が付けられている患者由来の 3 8 0 個より多くの原発乳がん検体から構成される ( R o j o F . , A n n O n c o l ( 2 0 1 2 ) 2 3 ( 5 ) : 1 1 5 6 - 1 1 6 4 ) 。組織マイクロアレイを標準的な手順に従って処理した。腫瘍を、 E R + 、トリプルネガティブおよび H E R 2 + に従って 3 つのサブタイプに分類し、次いで、これらの腫瘍における c - M A F ( M A F ) 発現および 1 6 q 2 2 - 2 4 増幅が所与のサブタイプのいくつかにおいて骨転移事象と相關するかを確かめるために、適切な統計解析を行った。

## 【 0 2 9 2 】

この第 2 のコホートにおける統計解析は、以下の前提に基づいた :

## 【 0 2 9 3 】

i ) ベースラインの特徴の比較 ( 表 3 および 6 ) 。

## 【 0 2 9 4 】

年齢の分散の一様性を、 F o l d e d F 検定を用いて検定する。年齢の平均値の差異を、分散の一様性に応じて、プールされた ( p o o l e d ) t 検定または S a t t e r h w a i t e t 検定 ( 複数のカテゴリーを比較するための、 A N O V A または K r u s k a l - W a l l i s ) を用いて検定する。適用できる場合、分類変数を、カイニ乗検定または F i s h e r 検定を用いて比較する。

## 【 0 2 9 5 】

i i ) F I S H および I H C の診断性能

## 【 0 2 9 6 】

10

20

30

40

50

$p < 0.2$  の変数を算入するための  $p$  値の判定基準および調整後のモデルにおいて  $p < 0.10$  の変数を保持するための判定基準を用いるステップワイズ選択 (stepwise selection) を介して、多変量解析を行う。診断性能は、ROC曲線のAUCを比較することによって評価される。モデルの適合度は、Hosmer-Lemeshow検定を用いて評価される（有意である場合、さらなる解析は行わない）。

#### 【0297】

最も予測的な変数 (16q23 FISH および MAF IHC) に基づいて、各分類カテゴリーに対して感度 (Se)、特異度 (Sp)、陽性予測値 (PPV) および陰性予測値 (NPV) を計算する。データの過適合の問題を克服するために、PPV および NPV のブートストラッピングを行う。

10

#### 【0298】

i i i ) 予後診断の役割

#### 【0299】

骨転移までの結果時間 (outcome time) の Cox 回帰モデリングを、同順位の「efron」マネジメントを用いて行う。事象の数は、それらのモデルに入れられる変数の数を操る（各 5 ~ 10 事象につき約 1 变数）。

#### 【0300】

比例ハザード仮説は、SAS9.3 に実装されているように、比例ハザード仮説について上限検定 (supremum test) を用いて調べられる。この仮説が棄却される場合、この検定は、有意な  $p$  値をもたらす。

20

#### 【0301】

乳がんサブタイプの分類

組み合わせコホート（発見コホート I）の PAM50 遺伝子を、PAM50 遺伝子シグネチャにおいてコントロール遺伝子として記載されている遺伝子に対して正規化した。各患者について、その同じ患者に対するコントロール遺伝子の平均値を減算することによって、発現の推定値を正規化した。

#### 【0302】

5 つのスコアを計算することにより、患者を分類した：

- ESR1 の状態：遺伝子 ESR1 の分布は、双峰性を示した（図 1）。それらの 2 つのモードは、ESR1 低の患者および ESR1 高の患者を識別する。パッケージ「mc1us」を使用して、正規分布の混合物を 2 成分に当てはめ、各患者が ESR1 低および ESR1 高の成分に属する事後確率を得た。この群に属する事後確率が 80 % より高い場合、患者を ESR1 低と見なした。同じ判定基準を ESR1 高に対しても使用した。患者が、ESR1 高でも ESR1 低でもない場合、ESR1 中間と見なした。

30

- 管腔の状態：各患者について、ルミナル遺伝子リストにおけるすべての遺伝子の発現を平均することによって、ルミナルスコアを計算した。ルミナルスコアの分布は、双峰性を示した（図 1）ので、ルミナルの状態は、ESR1 の状態と同じように記載された。

- 増殖の状態：各患者について、ルミナル遺伝子リストにおけるすべての遺伝子の発現を平均することによって、増殖スコアを計算した。増殖遺伝子の平均値は、双峰性を示さなかった（図 1）。ゆえに、最も低い平均値を有する患者の半数を、増殖少と見なした。残りは、増殖多と見なした。

40

- PGR1 の状態：遺伝子 PGR1 は、双峰分布を示す（図 1）ので、PGR1 の状態は、ルミナルの状態と同じように記載された。

- ERBB2 の状態：遺伝子 ERBB2 は、双峰分布を示さない（図 1）。ERBB2 の発現値が、ERBB2 の平均値 + ERBB2 の 1 標準偏差より高いとき、サンプルを ERBB2 高と記載した。その他の場合は、サンプルを ERBB2 低と見なした。

#### 【0303】

2 つのルミナル遺伝子および 1 つの増殖遺伝子は、組み合わせコホートに存在しなかった。それらを使用しなかった。すべての患者を PAM50 に従ってサブタイプに割り当てる。

50

## 【0304】

P A M 5 0 の分類に従っていずれのサブタイプにも割り当てることができない患者が 5 8 人いた。本発明者らは、2 つ以上のサブタイプに属する患者を見出さなかった。

## 【0305】

エストロゲンレセプター陽性 ( E R + ) 腫瘍は、 E S R 1 高と定義される。

## 【0306】

トリプルネガティブ腫瘍は、 E S R 1 、 P G R 1 および E R B B 2 低と定義される。

## 【0307】

検証コホート I I の場合、患者の分類は、診断目的に従う通例の病理学者スコアに基づいた。 E R + 腫瘍は、 E S R 1 を発現する腫瘍と定義された。トリプルネガティブ乳がん腫瘍は、 E S R 1 、 P R および H E R 2 を発現しない腫瘍と定義された。 H E R 2 + 腫瘍は、病理学者スコアに従って 2 + および 3 + H E R 2 腫瘍と定義された。上記サブタイプのいずれにも割り当てることができない患者が 6 人いた。本発明者らは、2 つ以上のサブタイプに属する患者を見出さなかった。 10

## 【0308】

トリプルネガティブ乳がんのコホートにおける、転移、骨転移を予測する c - M A F 遺伝子発現の能力の解析

コホート I において骨転移を解析するとき、骨転移と別の転移を同時に有することに起因して、33人の患者が除外され、事象までの1つの時間だけを報告した。本発明者らは、最初の転移に关心があり、どの転移が最初であるかを知る方法がない場合、本発明者らは、2つの転移部位の注釈を有する患者を解析から除外した。 20

## 【0309】

いったん、本発明者らは、目的のサブタイプであるトリプルネガティブ（これには、基底細胞様乳がんの大部分が含まれる）を識別し、その患者を選択したら、調整変数 ( a d j u s t m e n t v a r i a b l e ) としてのコホートを含めて、 C o x 比例ハザードモデル ( P a c k a g e d s u r v i v a l の R 関数 c o x p h を使用する ) を調整して、サブタイプおよび c - M A F 発現によって各表現型（骨転移）を説明できるかを確かめた。 c - M A F は、サブタイプと統計学的に有意な相互作用を有した ( p = 0 . 0 4 3 ) 。これは、本発明者らに、 c - M A F と生存率との関連性が、患者のサブタイプに従つて有意に異なることを知らせた。トリプルネガティブ乳がん原発腫瘍における c - M A F の遺伝子発現は、骨転移と有意に相關した（表 3 および図 2 ）。 30

## 【表 3 】

サブタイプ	n	ハザード比	95% 信頼区間	p 値
トリプルネガティブ	164	1.444	[1.016-2.054]	0.040

表3. 生存解析

## 【0310】

c - M A F は、トリプルネガティブ乳がん（これには、基底細胞様乳がんの大部分が含まれる）を有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断を決定するために使用することができる（表 3 および図 2 ）。 40

## 【0311】

E R + 乳がん腫瘍における転移、骨転移を予測する c - M A F 遺伝子発現の能力の解析

本発明者らは、 E R + 乳がん（これには、 A および B サブタイプを含むルミナル乳がんの大部分が含まれる）に焦点を当てた。本発明者らは、 C o x 比例ハザードモデル ( P a c k a g e d s u r v i v a l の R 関数 c o x p h を使用する ) を調整して、 c - M A F 発現によって各表現型（骨転移、肺転移または脳転移）を説明できるかを確かめた。 E R + 乳がん原発腫瘍における c - M A F の遺伝子発現は、骨転移と有意に相關した（表 4 および図 3 ）。

【表4】

サブタイプ	n	ハザード比	95% 信頼区間	p値
エストロゲン レセプター陽性	349	1.22	[1.014-1.473]	0.032

表4. 生存解析

## 【0312】

c-MAFは、ER+乳がん（これには、AおよびBサブタイプを含むルミナル乳がんの大部分が含まれる）を有する被験体において転移を起こす傾向の予後診断を決定するために使用することができる（表4および図3）。

10

## 【0313】

コホートII、特にER+およびTNにおいて、c-MAFが乳がんの骨転移に対する臨床的バイオマーカーであることの免疫組織化学による検証

## 【0314】

Dako Linkプラットフォームにおいて正に帯電したスライドガラス上に置かれた3 μmヒトBC腫瘍組織切片を使用して、c-MAF免疫染色を行った。脱パラフィン後、pH 6.1, 0.01 mol/L クエン酸ベース緩衝液（Dako）中で加熱抗原回復を行った。内因性ペルオキシダーゼをクエンチした。ウサギポリクローナル抗MAF抗体を、室温において30分間1:100希釈で使用し、その後、ペルオキシダーゼと結合した抗ウサギIgGデキストランポリマー（F1ex+, Dako）とともにインキュベーションした。次いで、3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）を用いて切片を可視化し、ヘマトキシリンで対比染色した。

20

## 【0315】

c-MAF抗体感度（1:100）は、1:10から1:1000まで一次抗体のクレセント希釈度（crescent dilution）の範囲において算出された。親MCF7およびT47DヒトBC細胞ならびにc-MAFを過剰発現する（+c-MAF長/短）MCF7およびT47DヒトBC細胞を使用して、特異度を決定した。ホルマリン固定された細胞ペレットを、IHCについて記載されたように処理し、全溶解産物からのウエスタンプロットによって結果を確認した。特異度は、BALB-cヌードマウスにおける異所性MCF7およびc-MAF過剰発現MCF7の異種移植でも示された。一次抗体の代わりに正常なウサギIgG2（IS600, Dako）とインキュベートされた同じ検体からの切片を、ネガティブコントロールとして使用した。

30

## 【0316】

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。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420~700 nmにおいて10 nm波長の間隔で取得した。画像のスペクトルデータセットを取得する前に、各波長においてデバイスのウェルをおよそ90%満たすに必要な露出時間を決定するためにスライドのブランク領域をイメージングしつつ、自動露出ルーチンを行い、線源強度、フィルター透過効率およびカメラ感度のばらつきを補償した。純粋なDABおよびヘマトキシリン色素の色のライブラリーを作製し、Nuance 1.6.4ソフトウェアを使用してそれらの色を分離（unmix）するために使用した。次いで、参照のキューブ（種々の波長において撮影された大量の画像）を、各新規症例に対して取得した後、同じ露出時間を使用して3つの代表的な組織の視野のスペクトルイメージングを得た。画像の逆重畳の後、照明の不均一を補償するためにスペクトルデータをフラットフィールド処理し（flat fielded）、バックグラウンドにフィルターにかけた。ペ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。

40

50

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る。解析によって、目的の領域の平均強度から c - MAF の定量的データが得られた。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。各症例を、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について算出した。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 56 ~ 70, 367 の範囲の連続データが生成された。

### 【0317】

原発性乳がん組織の代表的な c - MAF 免疫染色（IHC）が示されている（図4a）。症例1は、c - MAF 陰性腫瘍を表す（OD < 1000）。症例2および3は、c - MAF 陽性腫瘍である（それぞれOD > 1000 および > 25000）（図4a）。次に、380個の原発性乳がん腫瘍のコホートにおける c - MAF タンパク質の発現（コンピュータ処理された測定値、光学密度の任意単位、OD として表現されている）を表しているプロットから、すべての腫瘍 IHC シグナルの定量が要約された。BCサブタイプ（ER+、HER2+ および TN）に従って腫瘍を分けた（図4b）。上記の IHC 染色に基づいて、c - MAF（陽性または陰性）層別化に従って、380個の原発性乳がん腫瘍（ステージI、II および III）のコホートにおける、無病生存率（図4c）および無骨転移生存率（図4d）のカプラン・マイヤー曲線を描いた。また、種々の BCサブタイプ（ER+、HER2+ および TN）における c - MAF の診断性能（図4e）も計算した。ベースラインの特徴および Cox 多変量解析を、上で定義されたように行うことにより、他の任意の臨床的な病理学的パラメータの原発性乳がん腫瘍における骨転移予測に対する層別化基準としての c - MAF に対する影響を決定した（表5および6）。示されるように、9つを超えるリンパ節陽性を有する場合を除いて、他の任意のパラメータとの有意な関連はない。

10

20

【表5】

表5.c-MAF IHC発現によるベースラインの特徴

特徴	全系列 (n=380)		c-MAF 非過剰 発現 (n=309)		c-MAF 過剰発 現 (n=71)		P
	患者数	%	患者数	%	患者数	%	
年齢(中央値、範囲)	58, 26-90		58, 31-90		59, 26-90		
閉経の状態							0.726
閉経前	111	29.2	89	28.8	22	31.0	
閉経後	269	70.8	220	71.2	49	69.0	
腫瘍サイズ、mm							0.447
≤20	209	55.0	168	54.4	41	57.7	
21-50	113	35.0	112	36.2	21	29.6	
>50	38	10.0	29	9.4	9	12.7	
腫瘍グレード							0.782
I	67	17.6	56	18.1	11	15.5	
II	184	48.4	150	48.5	34	47.9	
III	129	33.9	103	32.9	26	36.6	
リンパ節							0.622
無し	227	59.7	182	58.9	45	63.4	
1-3	90	23.7	78	25.2	12	16.9	
4-9	40	10.5	31	10.0	9	12.7	
>9	23	5.1	18	5.8	5	7.0	
エストロゲン							0.807
レセプターの状態							
陰性	97	25.5	78	25.2	19	26.8	
陽性	283	74.5	231	74.8	52	73.2	
プロゲステロン							0.481
レセプターの状態							
陰性	133	35.0	106	34.3	27	38.0	
陽性	247	65.0	203	65.7	44	62.0	
HER2の状態							0.358
陰性	303	79.7	243	78.6	60	84.5	
陽性	77	20.3	66	21.4	11	15.5	
増殖 (Ki-67)							0.105
増殖少 (<15%)	278	73.2	232	75.1	46	64.8	
増殖多 (≥15%)	102	26.8	77	24.9	25	35.2	

省略形:HER2、ヒト上皮成長レセプター2

【表6-1】

表6. c-MAF IHC発現を有する患者におけるBDFS解析

変数	一変量(n=380)			多変量(n=380)		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
閉経の状態				0.818		
閉経前				—		
閉経後	1.00	0.42～ 1.97		—	—	
腫瘍サイズ、mm	0.91		0.067		—	
≤20				—		
21-50	1.00	1.08～ 5.41		—	—	
>50	2.42	0.76～ 7.70		—	—	
腫瘍グレード	2.41		0.062		0.130	
I				1.00		
II	1.00	0.81～ 45.8		4.41	0.58～ 33.503	
III	5.71	0.74～ 44.27		2.61	0.31～ 21.57	
リンパ節			0.005		0.006	
無し	1.00			1.00		
1-3	1.59	0.65～ 3.90		1.47	0.59～3.68	
4-9	0.88	0.20～ 4.09		0.96	0.21～4.35	
>9	6.72	2.64～ 17.10		6.89	2.56～ 18.56	
ホルモンレセプターの 状態				0.124		
陰性	1.00			—		
陽性	0.54	0.25～ 1.15		—		
HER2の状態				0.775		
陰性	1.00			—		
陽性	0.87	0.33～ 2.28		—	—	

【表 6 - 2】

増殖 (Ki-67)		0.029		0.133	
増殖少 (<15%)	1.00		1.00		
増殖多 ( $\geq 15\%$ )	2.32	1.11~ 4.82	1.85 0.84~4.06		
c-MAF (IHC)		<0.001		1e-05	
非過剰発現	1.00		1.00		
過剰発現	5.24	2.53~ 10.87	5.62 2.65~ 11.95		10

省略形: BDFS, 無骨病生存率; HR, ハザード比; CI, 信頼区間;

HER2, ヒト上皮成長因子レセプター2

## 【0318】

骨転移増殖アッセイ (bone metastasis colonization assay) における c-MAF の機能的検証

c-MAF の因果的寄与は、前臨床実験的異種移植マウスモデルを使用した骨転移増殖アッセイにおいて機能的に検証された。GFP / ルシフェラーゼベクターで標識された ER + ヒト乳腺細胞系、すなわち、MCF7 および T47D を使用し、心室内または尾静脈注射によって免疫不全マウスに接種した。これらのマウスは、異種移植モデルにおいて近接した腫瘍細胞に確実にホルモンを供給するためにエストロゲンペレット剤を有しなければならない。

## 【0319】

標準的なアプローチは、機能喪失および機能獲得実験であった。MCF7 親、T47D 、または高レベルの c-MAF 発現について選択された高度に骨転移性の細胞派生物 (BOM2) において、c-MAF を発現させるかまたはサイレンシングすることにより、転移におけるその機能を検証した (図 5 および 6)。c-MAF 遺伝子の骨転移機能を、マウスの心臓内に接種された転移細胞の生物発光検出を使用してインビボにおいて決定した。本発明者らは、BOM2 細胞において、内因性 c-MAF のレベルを 80% 超低下させ、c-MAF の外来性過剰発現によってレスキューされ得る、shRNA 媒介性 c-MAF ノックダウンを生じさせた (図 6)。さらに、本発明者らは、各 c-MAF アイソフォームを個別にまたは集合的に発現する細胞も作製し、レポーターアッセイにおいて転写活性化因子としてのその機能性を試験した (図 6)。親 MCF7 細胞、c-MAF (集合的にまたは独立して、短および長アイソフォーム) を有するかまたは有しない親 T47D 細胞、および c-MAF (短および長アイソフォーム) の発現が枯渇したまたはレスキューされた BOM2 骨転移性 MCF7 細胞派生物を、マウスの左心室に注射し、骨転移増殖をインビボ生物発光イメージングによって解析した。すべての場合において、対応するコントロールを接種した (図 5、6、7 および 8)。

## 【0320】

注射後 52 日目における、shControl BOM2 細胞 (すなわち、c-MAF を発現する細胞) における 90% またはレスキュー群における 50% (図 5c および 8) と比べて、BOM2 c-MAF ノックダウン細胞を接種されたマウスのわずか 23% しか骨転移を起こさなかった。c-MAF 枯渇細胞における骨転移の減少は、後肢の溶骨性病変の範囲の急激な減少を伴った (図 5c)。それどころか、MAF 過剰発現 (各アイソフォームの個別または集団的) は、心臓内注射後に骨に転移する ER + 乳がん細胞 (MCF7 および T47D) の能力を高め、転移量を増加させた (図 5a, b および 7)。興味深いことに、MAF を発現する細胞は、親 MCF7 細胞と比べてより溶骨性の骨転移をもたらし (図 5a、6 および 9a)、転移性病変の周囲の長さにおける酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP+) 破骨細胞の数の増加が検出され得る (図 9b, c, d)。MA

10

20

30

50

40

50

F過剰発現は、皮下に植え込まれたとき、親MCF7細胞の固有の増殖活性を増加させなかつた(図10)。高レベルのMAF発現は、肺転移増殖を助けなかつた(図5d)。

### 【0321】

機能喪失実験および機能獲得実験は、乳がん原発腫瘍における臨床的検証とともに、エストロゲンレセプター陽性(ルミナルAおよびB分子サブタイプを含む)およびトリプルネガティブ(基底細胞様分子サブタイプを含む)乳がんサブタイプにおける骨転移プロセスにおける、予後マーカーおよび予測マーカーならびに原因となる標的遺伝子としてのc-MAFの機能的検証に至つた。

### 【0322】

MAFは、破骨細胞分化の腫瘍細胞刺激、例えば、PTH LHサイトカインの転写調節を介して、溶骨性骨転移を媒介する

乳がん細胞に骨転移機能を提供する際にc-MAFの直接的な活性はなく、その代わりにc-MAFは、ホーミング能および骨リモデリング能を高める遺伝子の活性を転写的に調節することにより、骨に転移増殖させ得る。PTH LHの発現は、c-MAFの支配下だった。所見は、qPCR解析によって確かめられた(図11a)。さらに、骨において成長している患者の乳がん転移(GSE14020)は、他の箇所の転移と比べて、c-MAF発現を保持した(図11b)。さらに、平均より高いMAFおよびPTH LHを発現している転移の77%が、骨転移だった(図11b)。PTH LHは、悪性の体液性高カルシウム血症に関する因子として同定された。さらに、それは、部分的に破骨細胞分化の刺激に起因して、溶骨性骨転移において基本的役割を果たすことが示された。実際に、c-MAFを発現している細胞からの馴化培地は、PTH LHアンタゴニストペプチド(7-34Aa、PTH LH-AN)との同時インキュベーションの際には妨げられるプロセスである、破骨細胞分化の誘導をインビトロにおいて増加させた(図11c)。

### 【0323】

PTH LHが、乳がん細胞において、c-MAFによって駆動される骨転移を媒介するかを試験するために、本発明者らは、c-MAFを発現しているMCF7乳がん細胞を心臓内に注射し、PTH LH-ANの存在下または非存在下において骨転移を確立し、成長する能力を47日間にわたって評価した。インビオにおいてPTH LH活性を阻止するために、PBSに溶解された6μgの(7-34Aa)PTH LH-ANを1日に2回、動物に投与した。コントロール群は、PBSで処置した。c-MAFを発現している細胞は、類似の浸透度で骨転移を起こすが、PTH LH-ANでの処置は、後肢の溶骨性病変の範囲を劇的に減少させる(図11d, e)。この減少は、転移性病変の周囲の長さにおける破骨細胞(TRAP+細胞)の数の減少を伴つた(図11d, e)。これらの結果は、c-MAFが、乳がんの溶骨性骨転移を駆動することを示す。さらに、PTH LHの発現は、c-MAFによって駆動される乳がんの溶骨性骨転移にとって必要な因子である。最後に、破骨細胞分化プロセスを阻止することによって、c-MAFによって駆動される乳がんの骨転移が妨げられる。

### 【0324】

骨への転移を予測するc-MAFの能力は用量依存的である

まず、本発明者らは、骨転移を予測するc-MAF発現の能力が用量依存的であるかを評価した。

### 【0325】

患者の情報は、GEO(Barrettら(2007))からダウンロードした。以下のデータセットを使用した: GSE2603、GSE2034およびGSE12276の組み合わせ。この組み合わせコホートは、560人の患者を有した。体系的なバイアスを排除するために、マージする前に、すべての遺伝子の発現の測定値をz-スコアに変換した。

### 【0326】

すべての統計解析を、Biocconductor(Gentleman RCら、Genome Biology, 5:R80, 2004. URL <http://genom>

10

20

30

40

50

ebiology.com/2004/5/10/R80)を使用して行った。

【0327】

本発明者らは、四次スプライン（パッケージphenotestにおけるsmoothcoxph関数）を用いる Cox回帰モデルによる、c-MAFの発現と骨転移のハザード比との関係の滑らかな推定値を得た。パッケージphenotestにおけるsmoothcoxph関数は、遺伝子発現レベルによって平滑化された Cox比例ハザードをプロットする。したがって、ハザードが所与の遺伝子の種々の発現レベルにわたってどのように挙動するのかを示すプロットが構築される。信頼区間もまた提供される（使用法：smoothcoxph（時間、事象、x、xlim、ylim、その他）。アーギュメント：時間）変数（ここで、生存時間が保存される）；事象）変数（ここで、生存事象が保存される）；x）所与の遺伝子の発現レベルを含む数；xlim）プロット用のxlim；ylim）プロット用のylim；その他）プロットするためにパスされる他のアーギュメント）。

【0328】

四次スプラインを用いる Cox回帰モデルによる、c-MAFの発現と骨転移のハザード比との関係性は、図12に見られ得る。組み合わせコホートに存在するすべての乳がん腫瘍、組み合わせコホートにおけるエストロゲンレセプター陽性乳がん腫瘍および組み合わせコホートにおけるトリプルネガティブ腫瘍。その解析を行い、c-MAF発現レベルが平均（0と命名）より高い腫瘍における骨転移を予測するc-MAFの能力のハザード比（HR）およびp値が示された。発現レベルにおける1は、1標準偏差を示し、次いで、それに続くなど。

【0329】

本発明者らは、「高c-MAF」を発現している乳がん原発腫瘍を、乳がん原発腫瘍の代表的なコホートにおいて平均発現を超えてc-MAFを発現する腫瘍の群と定義した。本発明者らは、「低c-MAF」を発現している乳がん原発腫瘍を、乳がん原発腫瘍の代表的なコホートにおいて得られる平均を下回ってc-MAFを発現する腫瘍の群と定義した。

【0330】

高c-MAF発現レベルを有する乳がん腫瘍では、c-MAF発現は、用量依存的様式で骨転移のリスクを予測する（図12）。同様に、ER陽性（ルミナルAおよびB分子サブタイプを含む）およびトリプルネガティブ（基底細胞様分子サブタイプを含む）乳がんサブタイプにおいても、本発明者らは、同じ挙動をみとめた（図12）。

【0331】

結論として、c-MAF発現レベルが高くなるほど、骨転移に対するハザードリスクが、代表的な乳がん腫瘍セットの平均値を超えてc-MAFレベルを発現したER+およびTN乳がん腫瘍において高くなる。

【0332】

本発明者らは、どこまでc-MAFの用量が高くなると骨再発のリスクが高くなるかを検証コホートIIにおいてアッセイした。この目的を達成するために、本発明者らは、上に記載されたようなコンピュータ処理システムを使用した染色の光学密度の決定（図4a, b）を用いて免疫組織化学（IHC）によってc-MAF発現を定量した。c-MAF染色は、腫瘍細胞に特異的である（図4a）。染色に基づくと、本発明者らは、2つのタイプのc-MAF陽性乳がん腫瘍（症例2および3, 図4a, b）をみとめることができる。c-MAF陽性乳がん腫瘍におけるこれらの2つのタイプのc-MAF IHC染色に従って、それらが双峰性の挙動を有するとき、本発明者らは、それらを2群に分離し得る（図13, 左パネル）。これらの2つのカテゴリーを基礎にして、本発明者らは、c-MAFの染色が強いほど、骨転移のリスクが高く（HR（骨転移）=19.45; p値<0.001）、より早く骨転移が生じる（図13, 右パネル）という観察結果を検証した。

【0333】

10

20

30

40

50

### 早期の骨転移を予測する c - M A F の能力

乳がん腫瘍を、原発腫瘍の検出および外科的切除と遠位再発の観察時点との間の期間に応じて、早期（< 5 年）の再発性腫瘍と遅発性（> 5 年）の再発性腫瘍とに分類した。実際に、ある特定の状況下において、早期の遠位再発は、より短い期間にさらに限定された。E R 陽性腫瘍およびE R 陰性腫瘍が、早期の骨再発に関して異なって挙動すると記載されるなら、この分類は、臨床的に重要である。詳細には、トリプルネガティブおよび基底細胞様腫瘍を含むE R 陰性腫瘍は、早い時点において再発する一方で、E R 陽性腫瘍は、遅い時点と早い時点とで再発する傾向は同じである（Knight WAら、Cancer Research 1997; 37, 4669-4671, Goss PE Nature Review Cancer 2010; 10, 871-877）。

10

#### 【0334】

本発明者らは、c - M A F 発現が、乳がん、E R 陽性（ルミナルAおよびBを含む）およびトリプルネガティブ（基底細胞様を含む）乳がん原発腫瘍において早期の骨転移を予測し得るかを評価した。

#### 【0335】

患者の情報は、G E O からダウンロードした。以下のデータセットを使用した：G S E 2 6 0 3、G S E 2 0 3 4 およびG S E 1 2 2 7 6 の組み合わせ。この組み合わせコホートは、560人の患者を有する。体系的なバイアスを除去するために、マージする前に、すべての遺伝子の発現の測定値を z - スコアに変換した。すべての統計解析を、B i o c o n d u c t o r を使用して行った。

20

#### 【0336】

本発明者らは、種々の時点におけるc - M A F と骨転移との非依存を検定するためにフィッシャーの正確検定を行った。分割表の比率およびフィッシャー検定 p 値は、図14に見られ得る。

#### 【0337】

本発明者らは、「非常に高いc - M A F」を発現している乳がん原発腫瘍を、平均値 + 1 標準偏差を超えてc - M A F を発現する腫瘍の群と定義する。本発明者らは、「低いc - M A F」を発現している乳がん原発腫瘍を、乳がん原発腫瘍の代表的なコホートにおいて平均値 + 1 標準偏差を下回ってc - M A F を発現する腫瘍の群と定義した。

#### 【0338】

30

乳がん原発腫瘍において、非常に高いc - M A F レベル（R N A またはタンパク質）は、乳がん原発腫瘍の手術の3年後と5年後の両方において早期の骨転移を予測する（図14）。

#### 【0339】

特に、エストロゲンレセプター陽性（ルミナルAおよびB分子サブタイプを含む）において、c - M A F レベル（R N A またはタンパク質）が、それぞれ手術の3年後と5年後の両方において早期の骨転移を有する腫瘍の比率を有意に定義する（図14）ことが示される。

#### 【0340】

40

結論として、高レベルのc - M A F 発現は、早期の乳がん骨転移を含む骨転移のリスクが高い乳がん原発腫瘍を区別するためまたは予測するために使用することができる。

#### 【0341】

表7は、乳がん原発腫瘍（G S E 2 6 0 3、G S E 2 0 3 4 およびG S E 1 2 2 7 6 の組み合わせ）、エストロゲンレセプター陽性（ルミナルAおよびB分子サブタイプを含む）乳がん原発腫瘍およびトリプルネガティブ（基底細胞様分子サブタイプを含む）乳がんサブタイプにおける骨転移、早期の骨転移および非常に早期の骨転移の予測を示している。

【表7】

ER+ 乳がん原発腫瘍 (c-MAF)			
HR	CI.下	CI.上	P値
骨転移	1.56	3.87	0.00017
早期の骨転移 (< 5年)	1.20	3.20	0.00853
非常に早期の骨転移 (< 3年)	1.25	3.62	0.00694

10

トリプルネガティブ乳がん原発腫瘍 (c-MAF) 平均、n=96

HR	CI.下	CI.上	P値
骨転移	1.15	3.97	0.02262
早期の骨転移 (< 5年)	1.04	4.02	0.04534
非常に早期の骨転移 (< 3年)	1.09	3.87	0.03276

表7:HR(ハザード比)、CI(信頼区間)

## 【0342】

c-MAFを含む16q22-q24に位置する染色体領域の増幅は骨転移と関連する。本発明者らは、ACEアルゴリズムを適用することによって、転移のリスクに関連する原発性乳がん検体においてコピー数の変化(CNA)を同定した(発現データによるCNAの解析)(図15a)。中でも、染色体16q22-q24に位置する増幅された領域は、転移のリスクと有意に( $p < 0.05$ )関連し、その発現の増加が、個別におよび独立して、ER+ヒト乳がんにおける骨転移のリスクと関連する遺伝子であるc-MAFを含んだ(HR = 1.22,  $p = 0.032$ 、GSE2603、GSE2034およびGSE12276の組み合わせに基づく乳がん原発腫瘍データセット)。同様に、FISH(16q23)および比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)によって親MCF7(ER+)を骨転移性MCF7派生物(BoM2)細胞と比較したとき、本発明者らは、16q22-24染色体領域の獲得を確認した(図15b, c)。親細胞のサブセット(32.7%)が、このゲノム増幅を保有していたが、インビボでの骨転移選択により、この残余集団がその残りを引き継ぐこととなった(88.6%)。したがって、本発明者らは、16q22-q24が、転移、特に骨転移のリスクを有する乳がんにおいて増幅されており、インビボにおいて選択された細胞において、骨に転移する能力について裏付けされることを示す。

20

## 【0343】

コホートIIにおける、FISH決定による16q22-24DNAゲノム増幅の骨転移を予測する予後診断能力の検証

16q22-24ゲノム増幅が骨転移リスクを特異的に予測する能力をさらに検証するために、本発明者らは、ステージI、IIまたはIIIのBCを有し、追跡の注釈が付けられている患者由来の334個の原発性乳がん検体から構成される独立した検証セットにおいて、FISHによって(本発明者らは、16q23ゲノム領域を決定する商業的に入手可能な診断プローブ、IGH/MAF Abbott Vysisプローブを使用した)、16q22-24染色体領域ゲノムの獲得を解析した(Rojano F., Ann Oncol 2012)23(5):1156-1164)。組織マイクロアレイを標準的な手順に従って処理した。スライドを、MAF(16q23)およびIGH(14q32)プローブ混合物(ABBOTT VYSISプローブ)とともにインキュベートした。DAPI対比染色を適用し、適切な顕微鏡を用いて画像を取得した。

30

## 【0344】

ステージI、IIおよびIIIのBCヒト原発腫瘍セット(n=334)における無骨

40

50

転移生存率(図16a)または全生存率(図16b)のカプラン・マイヤー曲線を決定した。腫瘍1つあたり3つのコアを使用して、平均として細胞1つあたり2.5コピーの16q23というカットオフに基づく16q23 FISH陰性群および16q23 FISH陽性群に従って、患者を層別化した(図16aおよびb)。骨転移を予測するマーカーのハザード比(hazard ratio)(骨転移)、特異度および感度を算出した。データセットのベースラインの特徴および乳がん全体に対する Cox多変量解析を、上に記載されたように行った(表8および9)。

## 【0345】

I、IIおよびIIIのBCヒト原発腫瘍セットにおけるER陽性患者(左)またはトリプルネガティブ患者(右)に対する無骨転移生存率のカプラン・マイヤー曲線(それぞれn=250およびn=43)(図16c)も決定した。腫瘍1つあたり3つのコアを使用して、平均として細胞1つあたり2.5コピーの16q23というカットオフに基づいて、患者を16q23 FISH陰性群および16q23 FISH陽性群に分けた。ER+乳がんに対するCox多変量解析を上に記載されたように行った(表10)。

## 【表8】

表8 細胞1つあたり>2.5コピーの16q23(MAF)FISHによるベースラインの特徴の比較。腫瘍1つあたり3つのコアにおいて測定。(※この変数に対する欠測値なしで患者に対して計算されたパーセンテージ)

	16q23 (MAF) FISH ≤ 2.5 (n=262)	16q23 (MAF) FISH > 2.5 (n=75)	p値
年齢中央値(IQR)、歳	58 (17)	58 (21)	0.32
閉経後(%)	187 (71.4)	46 (61.3)	0.10
ER+ (%)	200 (76.4)	53 (70.7)	0.32
PR+ (%)	172 (65.7)	45 (60.0)	0.37
高悪性度(%)	83 (31.7)	35 (36.7)	0.016
Ki67* (%)	55 (22.3)	29 (41.4)	0.0014
サブタイプ* (%)			0.58
ルミナル	151 (66.5)	39 (66.1)	
Her2	44 (19.4)	9 (15.3)	
T N	32 (14.1)	11 (18.6)	
HER2+ (%)	51 (19.5)	13 (17.3)	0.68
pT (%)			0.21
1	164 (62.6)	41 (54.7)	
2-4	98 (37.4)	34 (45.3)	
pN (%)			0.27
0	163 (62.2)	42 (56.0)	
1-2	89 (34.0)	27 (36.0)	
3	10 (3.8)	6 (8.0)	

## 【表9】

表9 ステージI、II、IIIの乳がん

再発の最初の部位としての骨転移までの時間のCox回帰  
細胞1つあたり>2.5コピーの16q23(MAF)FISH。腫瘍1つあたり3つのコアを測定。

変数	一変量		多変量		10
	HR (95% CI)	p値	HR (95% CI)	p値	
16q23Fish>2.5	27.2 (8.1-91.0)	<0.0001	26.1 (7.8-87.4)	<0.0001	
Ki67	2.8 (1.2-6.4)	0.014			
pT					
1	Ref		Ref		
2-4	2.4 (1.1-5.3)	0.035	2.1 (0.9-4.6)	0.077	
pN					
0	Ref				
1-2	1.4 (0.6-3.3)	0.44			
3	4.8 (1.5-15.1)	0.0076			

## 【表10】

表10 ステージI、II、IIIのER+乳がん

20

再発の最初の部位としての骨転移までの時間のCox回帰  
細胞1つあたり>2.5コピーの16q23(MAF)FISH。腫瘍1つあたり3つのコアを測定。

変数	一変量		多変量		30
	HR (95% CI)	p値	HR (95% CI)	p値	
16q23 Fish	53.5 (7.0-406.7)	0.0001	49.5 (6.5-376.3)	0.0002	
pT					
1	Ref		Ref		
2-4	3.4 (1.2-9.4)	0.018	2.8 (1.0-7.9)	0.047	
pN					
0	Ref				
1-2	2.6 (0.8-8.0)	0.094			
3	6.8 (1.6-28.8)	0.0089			

## 【0346】

乳がん全体(図16d)およびER+乳がん(図16e)における16q23增幅の診断性能に対する受信者動作特性(ROC)曲線も、診断性能を推定するために算出した。ROC曲線において、真陽性率(感度)は、種々のカットオフ点に対する偽陽性率(100-特異度)の関数としてプロットされる。ROC曲線上の各点は、特定の決定閾値に対する感度/特異度対を表す。

40

## 【0347】

要約すると、16q23 FISHプローブを用いて本明細書中で測定された16q22-24增幅は、乳がん原発腫瘍、特に、TNおよびER+乳がんサブタイプにおける骨転移のリスクを有意に予測する。

## 【0348】

c-MAF発現レベルに基づいてトリプルネガティブ乳がんと診断された被験体における処置レジメンの決定

腫瘍組織サンプルを、トリプルネガティブ乳がんを有すると診断された被験体から得る。そのサンプルを、組織の薄切片に切断し、パラフィンに包埋する。各パラフィン切片をスライドの上に載せる。そのスライドを抗MAF抗体とともにインキュベートする。MA

50

Fに結合した抗体の可視化および検出のために、蛍光色素と結合体化された抗体を使用する。その蛍光色素に励起ビームを提供することによって、スライドを可視化する。蛍光顕微鏡によって蛍光シグナルの画像を得る。その腫瘍サンプル中の蛍光シグナルを参照サンプルの蛍光シグナルと比較することによって、腫瘍サンプルにおけるc-MAFの相対的な発現レベルを得る。腫瘍サンプルにおける強度は、参照サンプルにおける強度と相関し、ここで、参照サンプルと比べて腫瘍サンプルにおけるより高い強度は、原発性乳がんを有する被験体の骨への転移の上昇したリスクと相関する。あるいは、16q22-24遺伝子座、16q23遺伝子座またはc-MAF遺伝子の増幅または転座が、インサイチュハイブリダイゼーション技法または類似のものを用いて決定される。

【0349】

10

上昇した骨転移のリスクの予後診断に基づいて、骨転移に対する予防的処置として抗RANKL抗体デノスマブを被験体に投与する。120mgのデノスマブを6ヶ月間にわたって1ヶ月に1回、被験体の皮下に(SC)投与する。次の4年半にわたって、120mgのSCを3ヶ月ごとに投与する。5年間にわたって、経口カルシウム(少なくとも500mg)およびビタミンD(少なくとも400IU)。5年後、被験体は、骨転移のいかなる証拠もない。上昇していない骨転移のリスクの予後診断に基づいて、患者は、この抗RANKL抗体を投与されない。

【0350】

本明細書中に記載される例および実施形態は、単なる例証目的であり、それを考慮した様々な改変または変更が、当業者に示唆され、本願の精神および範囲とともに含められるべきであることが理解される。

20

【0351】

本明細書に引用されたすべての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイトおよびアクセッション番号/データベース配列(ポリヌクレオチド配列とポリペプチド配列の両方を含む)は、各個別の刊行物、特許、特許出願、インターネットサイトまたはアクセッション番号/データベース配列が、参照により援用されると具体的かつ個別に示されたのと同程度にすべての目的のためにそれらの全体が本明細書中に参照により援用される。

【図1】

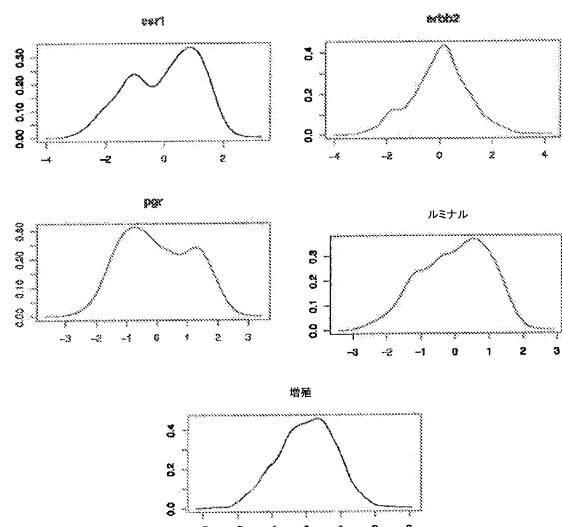


Figure 1

【図2】

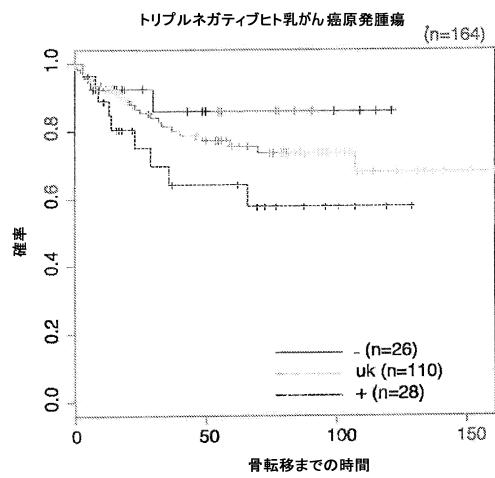


Figure 2

【図3】

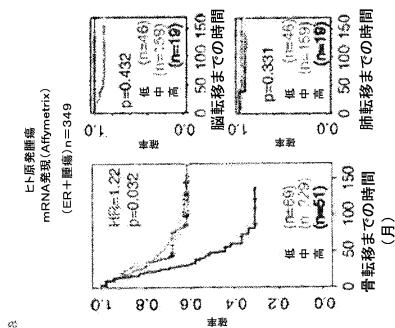


Figure 3

【図4】

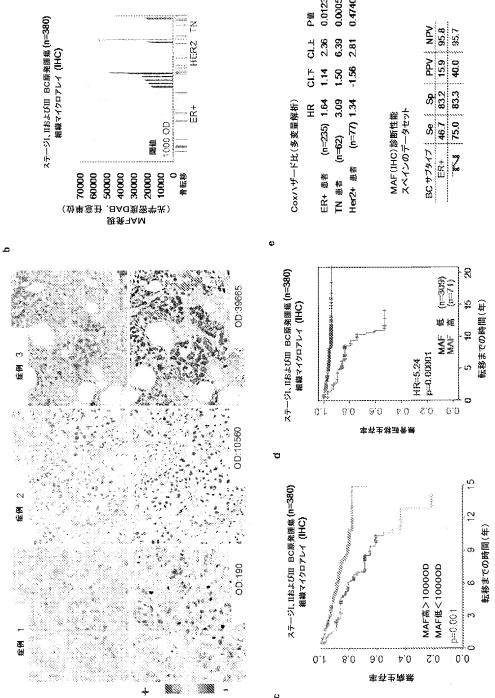


Figure 4

【図5A】

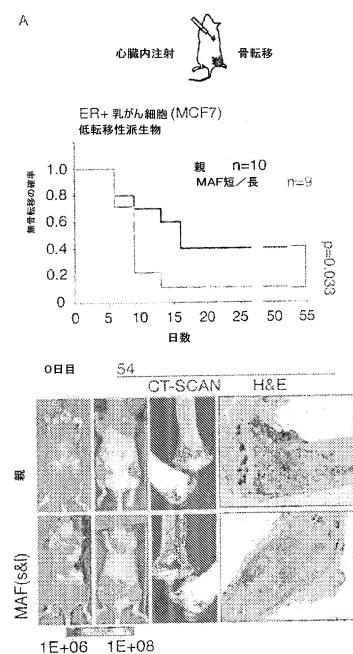


Figure 5A

【図5B】

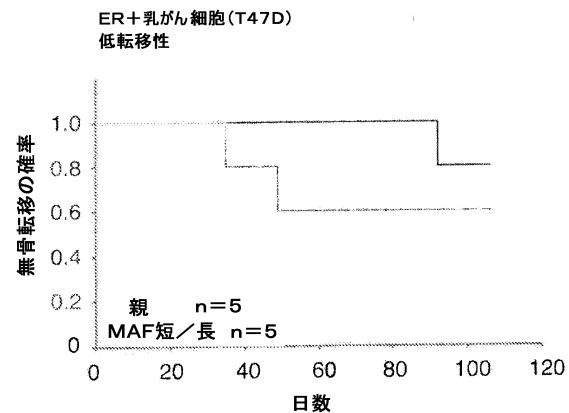


Figure 5B

【図5C】

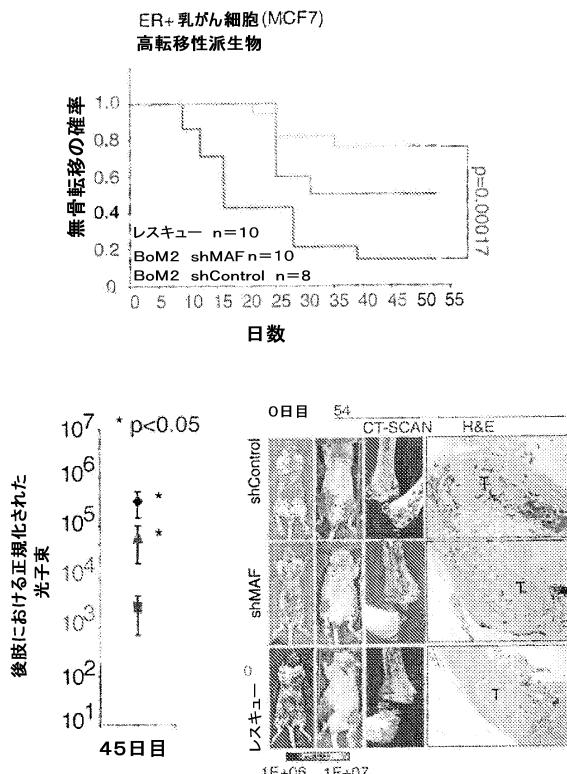


Figure 5C

【図5D】

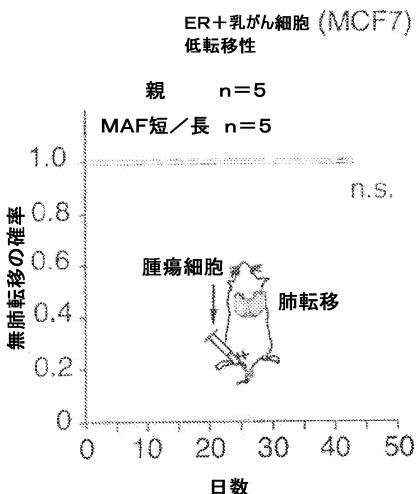


Figure 5D

【図6】

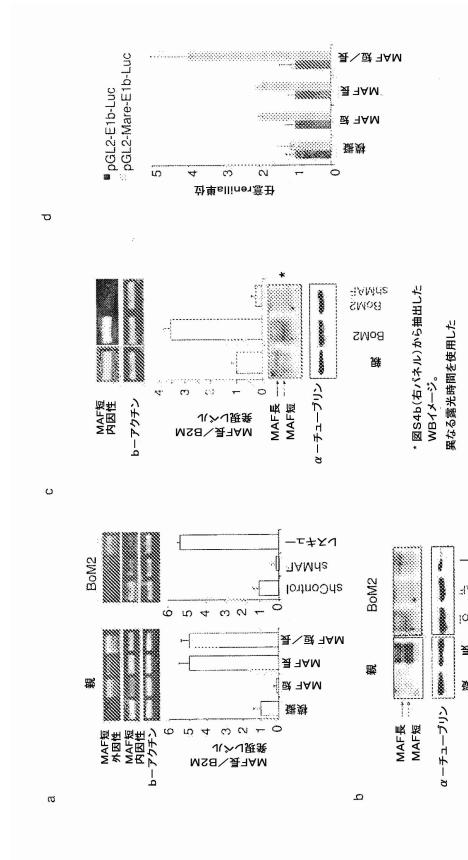


Figure 6

【図7】

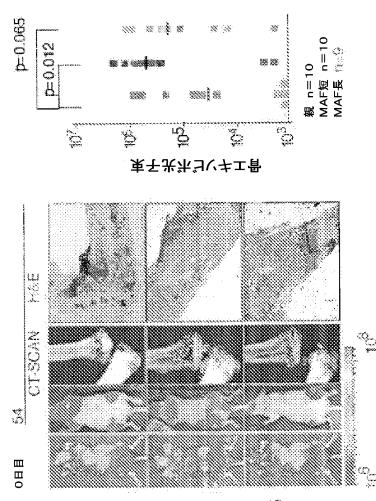


Figure 7

【図8】

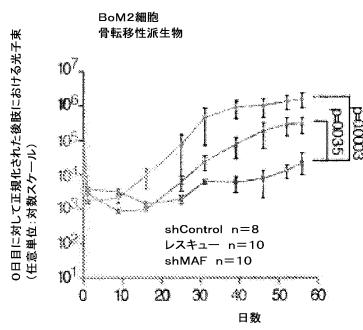


Figure 8

【図9 a - c】

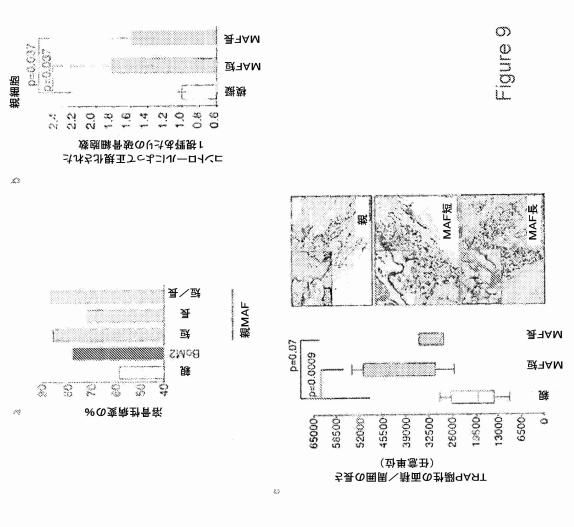


Figure 9

【図 9 d】

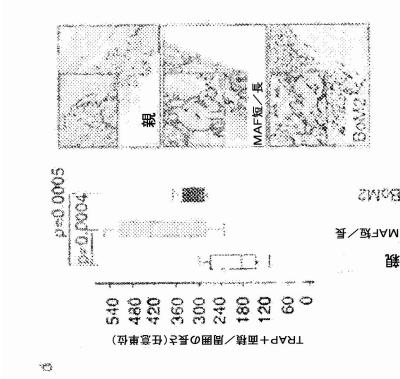


Figure 9

【図 10】

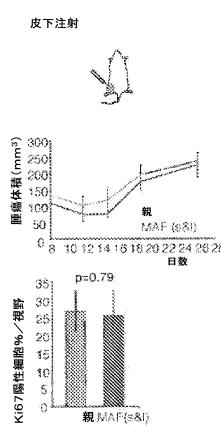


Figure 10

【図 11】

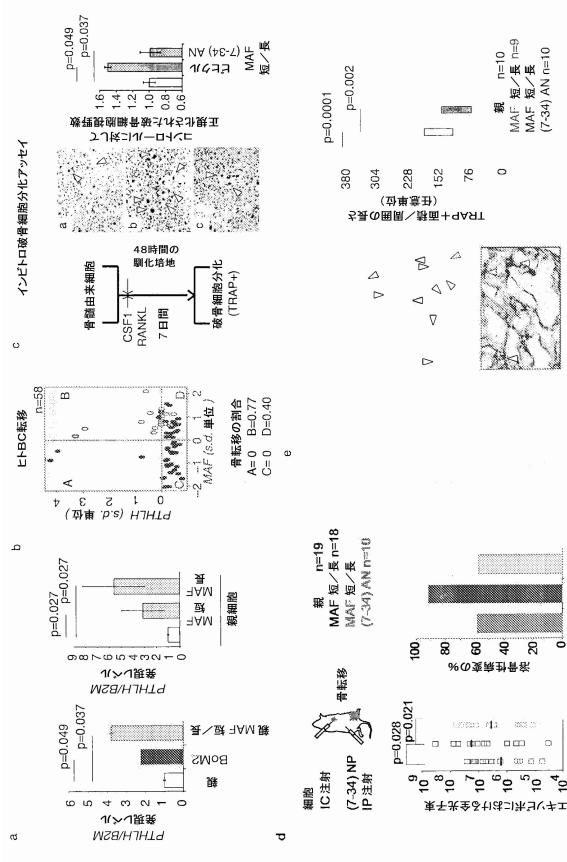


Figure 11

【図 12 - 1】

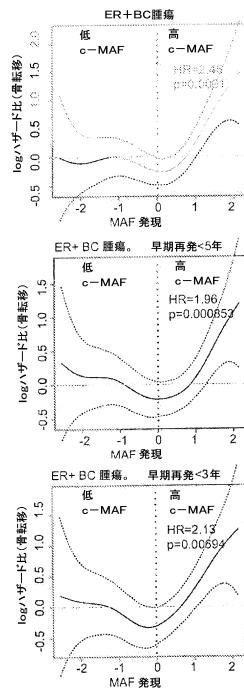


Figure 12

【図 1 2 - 2】

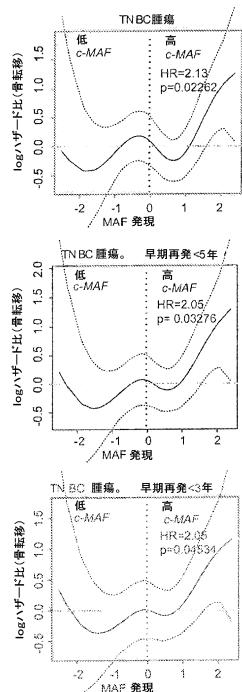


Figure 12 (つづき)

【図 1 3】

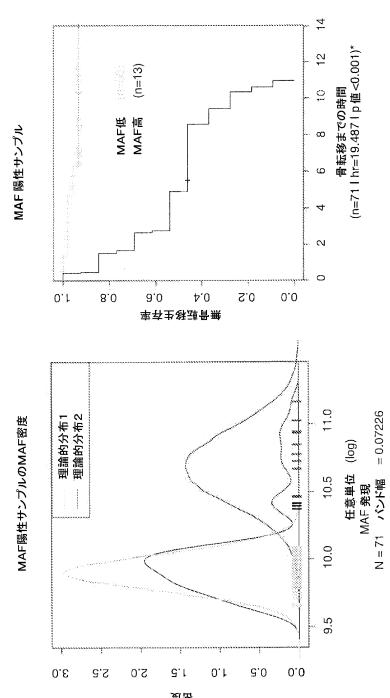
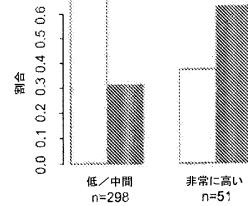


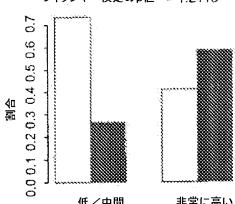
Figure 13

【図 1 4】

ER+乳がん腫瘍  
骨再発の割合  
フィッシャー検定のp値 = 2.773e-05



ER+乳がん腫瘍  
早期骨再発の割合 <5年  
フィッシャー検定のp値 = 1.241e



ER+ 乳がん腫瘍  
早期骨再発の割合 <3年  
フィッシャー検定のp値 = 0.001804

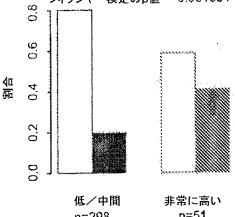


Figure 14

【図 1 5 a - b】

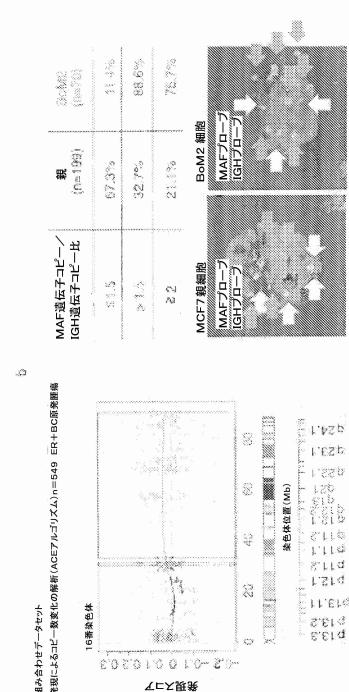


Figure 15

【図 15 c】

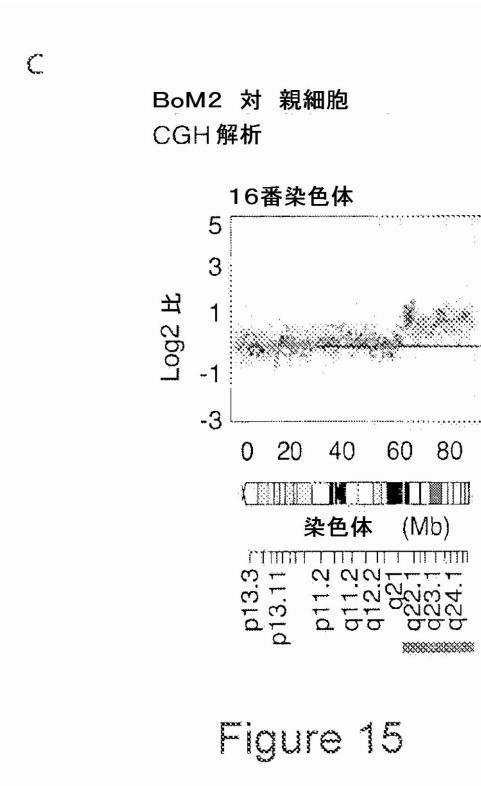


Figure 15

【図 16】

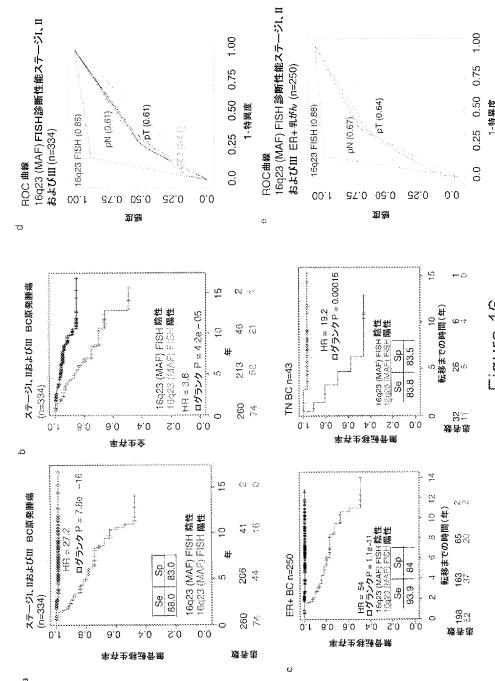


Figure 16

【配列表】

[0006381519000001.app](http://0006381519000001.app)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	48/00	(2006.01) A 6 1 P 19/00
A 6 1 K	31/713	(2006.01) A 6 1 K 48/00
A 6 1 K	31/7088	(2006.01) A 6 1 K 31/713
A 6 1 K	31/7105	(2006.01) A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K	38/00	(2006.01) A 6 1 K 31/7105
A 6 1 K	31/663	(2006.01) A 6 1 K 38/00
A 6 1 K	31/47	(2006.01) A 6 1 K 31/663
A 6 1 K	33/24	(2006.01) A 6 1 K 31/47
A 6 1 K	31/506	(2006.01) A 6 1 K 33/24
A 6 1 K	31/436	(2006.01) A 6 1 K 31/506
A 6 1 K	31/36	(2006.01) A 6 1 K 31/436
A 6 1 K	38/22	(2006.01) A 6 1 K 31/36
A 6 1 K	45/00	(2006.01) A 6 1 K 38/22
A 6 1 P	35/04	(2006.01) A 6 1 K 45/00
G 0 1 N	33/48	(2006.01) A 6 1 P 35/04
G 0 1 N	33/53	(2006.01) G 0 1 N 33/48 P
G 0 1 N	33/574	(2006.01) G 0 1 N 33/53 Y
G 0 1 N	33/543	(2006.01) G 0 1 N 33/574 A
		G 0 1 N 33/543 5 0 1 A

(31)優先権主張番号 12382139.9

(32)優先日 平成24年4月9日(2012.4.9)

(33)優先権主張国 歐州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 61/732,175

(32)優先日 平成24年11月30日(2012.11.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(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

(72)発明者 ゴミス, ロジェル

スペイン国 エ-08029 バルセロナ, セ/ロンドレス 2 エセセ ベ, 1-1ア

(72)発明者 パブロビック, ミリカ

スペイン国 カルネット デ マル, セ/ロンドレス 2 エセセ ベ, 1-1ア

(72)発明者 プラネット, エバリスト

スペイン国 エ-08029 バルセロナ, セ/ロンドレス 2 エセセ ベ, 1-1ア

(72)発明者 アルナル, アナ

スペイン国 エ-08029 バルセロナ, セ/ロンドレス 2 エセセ ベ, 1-1ア

(72)発明者 タラゴナ, マリア

スペイン国 エ-08029 バルセロナ, セ/ロンドレス 2 エセセ ベ, 1-1ア

審査官 中村 勇介

(56)参考文献 国際公開第2012/045905 (WO, A1)

特表2007-527247 (JP, A)

特表2010-518878 (JP, A)

特表2010-527620 (JP, A)

乳癌骨転移治療における抗RANKL抗体デノスマブ, 高橋 俊二, 2012年 1月, 第39

巻、第1号, 第89~94頁

平賀 徹, 乳癌の骨転移におけるシクロオキシゲナーゼ-2の役割, Bone, 2006年 9月20日, Vol.20, No.5, p.563-566

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q1/00-3/00

JST Plus / MEDLINE / JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)