

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-516005

(P2016-516005A)

(43) 公表日 平成28年6月2日 (2016. 6. 2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/72 (2006. 01)	C 0 7 K 14/72 Z N A	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-559041 (P2015-559041)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月24日 (2014. 2. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年10月26日 (2015. 10. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/017977
 (87) 国際公開番号 W02014/130932
 (87) 国際公開日 平成26年8月28日 (2014. 8. 28)
 (31) 優先権主張番号 61/768, 860
 (32) 優先日 平成25年2月25日 (2013. 2. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/878, 669
 (32) 優先日 平成25年9月17日 (2013. 9. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
 3 5
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規のアンドロゲンレセプター変異

(57) 【要約】

A R 関連の疾患、例えば、前立腺がんなどの前立腺疾患、乳がん、および他の多くの疾患などの診断、予後診断、および処置のための組成物および方法を提供する。特に、アンドロゲンレセプター (A R) の位置 8 7 6 における新規の臨床的に関連する変異が同定された。薬物感受性を予測することができ、この変異の存在もしくは不在に基づいて、治療レジメンを計画することができる。変異体 A R を含むポリペプチド、それに対する抗体、それをコードするポリヌクレオチドを使用して、新規の処置を同定することができる。位置 7 4 1 および 8 7 7 での A R における二重変異も、患者の層別化にとって有用であることが示された。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

位置 876 を含むかまたは位置 876 にまたがるアンドロゲンレセプターまたはその断片もしくはバリエーションを含むポリペプチドを含む組成物であって、位置 876 のアミノ酸が、置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン (F) 以外である (前記アミノ酸の位置は、配列番号 54 の付番に従う)、組成物。

【請求項 2】

前記位置 876 のアミノ酸が欠失している、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記位置 876 のアミノ酸がロイシン (L) である、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

位置 876 を含むかまたは位置 876 にまたがるアンドロゲンレセプターまたはその断片もしくはバリエーションを含むポリペプチドを含む組成物であって、位置 876 のアミノ酸が、置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン (F) 以外であり (前記アミノ酸の位置は、配列番号 54 の付番に従う)、

前記ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションが、任意により、他の位置の 1 つまたは複数の変異を含む、組成物。

【請求項 5】

位置 877 のアミノ酸がトレオニン (T) ではなく、位置 874 のアミノ酸がヒスチジン (H) ではなく、位置 715 のアミノ酸がバリン (V) ではなく、かつ／または位置 741 のアミノ酸がトリプトファン (W) ではない、請求項 4 に記載の組成物。

20

【請求項 6】

前記断片が、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 35、少なくとも 40、少なくとも 50、少なくとも 60、少なくとも 75、少なくとも 100、または少なくとも 150、少なくとも 200、少なくとも 250、少なくとも 300、少なくとも 350、少なくとも 400、少なくとも 450、少なくとも 500、少なくとも 550、少なくとも 600、少なくとも 650、少なくとも 700、少なくとも 750、少なくとも 800、少なくとも 850、および／または少なくとも 900 のアミノ酸長である、請求項 4 に記載の組成物。

30

【請求項 7】

前記断片またはバリエーションが、F876 の変異を欠く野生型 AR、または F876 の少なくとも 1 つの活性を保持する、請求項 1 または 4 に記載の組成物。

【請求項 8】

配列番号 54 の残基の 50% 以下での 1 つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加、挿入、または置換において異なり、配列番号 54 に記載される配列またはそのバリエーションを有する、ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションを含む組成物であって、その結果、前記ポリペプチドが配列番号 54 のポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保持する、組成物。

【請求項 9】

配列番号 54 の残基の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50% 以下での 1 つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加、挿入、または置換において異なる、配列番号 54 に記載される配列またはそのバリエーションを有する、ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションを含む組成物であって、その結果、前記ポリペプチドが配列番号 54 のポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保持する、組成物。

40

【請求項 10】

前記断片が、配列番号 54 の少なくとも 10 個の連続するアミノ酸を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

50

前記断片が、配列番号 54 の少なくとも 15 個の連続するアミノ酸を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションを含む組成物であって、前記ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 54 に示され、前記配列が、位置 876 のアミノ酸が置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン (F) ではないような、配列番号 54 のアミノ酸位置 876 におけるもしくは位置 876 にまたがる変異を含有し、任意により、位置 877 のアミノ酸がトレオニン (T) ではなく、位置 874 のアミノ酸がヒスチジン (H) ではなく、位置 715 のアミノ酸がバリン (V) ではなく、かつ／または位置 741 のアミノ酸がトリプトファン (W) ではなく、前記断片の配列が、配列番号 54 の少なくとも 5 個、10 個、または 15 個の連続するアミノ酸を含み、かつ位置 876 を含む、組成物。

10

【請求項 13】

配列番号 3 から 53 のいずれかを含む配列を含むポリペプチドを含む組成物。

【請求項 14】

患者からの試料における AR ポリヌクレオチドまたはポリペプチドにおける位置 F876 での変異を検出する方法であって、

(a) 前記患者から AR を含む試料を得る工程；および

(b) 前記 AR が位置 F876 の変異を含むか否かを決定するために、前記 AR ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはその一部の配列を決定する工程を含む、方法。

20

【請求項 15】

患者を診断、予後診断、および／または処置する方法であって、

(a) 前記患者から AR を含む試料を得る工程；

(b) 前記 AR が位置 F876 の変異を含むか否かを決定するために、前記 AR ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはその一部の配列を決定する工程；および

(c) AR が F876 の変異を含まない場合に MDV3100 を含む治療的組成物を投与する工程もしくはその投与を推奨する工程；または、AR が F876 の変異を含む場合に MDV3100 を含まない治療的組成物を投与する工程もしくはその投与を推奨する工程

30

を含む、方法。

【請求項 16】

MDV3100 を含まない前記治療的組成物が、ビカルタミドまたは LEE011 もしくは PD0332991 などの CDK4/6 阻害剤、あるいは治療的核酸を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

患者を診断、予後診断、および／または処置する方法であって、

(a) 患者におけるアンドロゲンレセプターまたはその断片の位置 741 および 877 のアミノ酸が、それぞれ、トリプトファン (W) およびトレオニン (T) であるか否かを決定する工程；

40

(b) (1) 前記位置 741 および 877 のアミノ酸が、それぞれ、トリプトファン (W) およびトレオニン (T) である場合にはビカルタミドもしくは MDV3100；または (2) 前記位置 741 および 877 のアミノ酸が、それぞれ、トリプトファン (W) およびトレオニン (T) でない場合にはビカルタミドもしくは MDV3100 以外の前立腺疾患処置の前記患者への投与を推奨する工程および／またはそれを前記患者に投与する工程

を含む、方法。

【請求項 18】

前記ビカルタミドまたは MDV3100 を含まない処置が、LEE011 もしくは PD0332991 などの CDK4/6 阻害剤または治療的核酸を含む、請求項 17 に記載の

50

方法。

【請求項 18】

位置 876 を含む配列番号 54 の少なくとも 5 個の連続するアミノ酸をコードする第 1 の配列を有し、かつ／またはそれに対して相補的な配列を有する、0、1、2、または 3 つのミスマッチを含む少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドであって、位置 876 のアミノ酸が、置換されているかもしくは欠失しており、かつフェニルアラニン（F）以外のアミノ酸である、ポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 19】

前記第 1 の配列が、配列番号 2 の少なくとも 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、または 15 個の連続するアミノ酸をコードし、前記少なくとも 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、または 15 個の連続するアミノ酸が、配列番号 2 の位置 876 を含むかもしくは位置 876 にまたがり、前記位置 876 のアミノ酸はフェニルアラニン（F）ではなく、任意により、位置 877 のアミノ酸はトレオニン（T）ではなく、874 のアミノ酸はヒスチジン（H）ではなく、位置 715 のアミノ酸はバリン（V）ではなく、かつ／または位置 741 のアミノ酸はトリプトファン（W）ではない、請求項 18 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

請求項 18 または 19 に記載のポリヌクレオチドを含む発現構築物またはベクター。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の発現構築物またはベクターを含む宿主細胞。

【請求項 22】

コードされた変異体アンドロゲンレセプタータンパク質が配列番号 2 の位置 876 にロイシン（L）を含有することを除いて、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む前記変異体アンドロゲンレセプターをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 23】

プロモーター；および変異体アンドロゲンレセプターもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む発現構築物またはベクターであって、前記アンドロゲンレセプターのアミノ酸配列が配列番号 2 に示され、前記配列が、位置 876 のアミノ酸がフェニルアラニン（F）ではないような、配列番号 2 のアミノ酸位置 876 における変異を含有し、任意により、位置 877 のアミノ酸がトレオニン（T）ではなく、874 のアミノ酸がヒスチジン（H）ではなく、位置 715 のアミノ酸がバリン（V）ではなく、かつ／または位置 741 のアミノ酸がトリプトファン（W）ではなく、前記断片の配列が、配列番号 2 の少なくとも 5 個の連続するアミノ酸を含み、かつ位置 876 を含み、前記ポリヌクレオチドセグメントが、前記プロモーターの下流に位置し、前記ポリヌクレオチドセグメントの転写が前記プロモーターにおいて開始される、発現構築物またはベクター。

【請求項 24】

単離ポリヌクレオチドもしくはその相補体が、配列番号 54 の少なくとも 10 個、15 個、または 20 個の連続するアミノ酸をコードし、前記少なくとも 10 個の連続するアミノ酸が配列番号 54 の位置 876 を含むかもしくは位置 876 にまたがり、位置 876 のアミノ酸が、置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン（F）ではない、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 25】

プロモーター、および請求項 22 または 24 に記載のポリヌクレオチドを含む構築物を含む宿主細胞。

【請求項 26】

MDV3100 に対する細胞の感受性を決定する方法であって、

（a）もしあれば、前記細胞におけるアンドロゲンレセプター的位置 876 のアミノ酸を決定する工程であって、前記位置 876 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

10

20

30

40

50

(b) もしあれば、前記位置 876 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、アミノ酸の不在またはフェニルアラニン以外のアミノ酸の存在が、前記細胞が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程を含む、方法。

【請求項 27】

前記細胞が、前立腺がん細胞、乳がん細胞、または他の AR 関連疾患細胞である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項 27 に記載の方法。

10

【請求項 29】

MDV3100 による処置に対する AR 関連疾患の患者の感受性を予測する方法であって、

(a) もしあれば、前記患者におけるまたは前記患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置 876 のアミノ酸を決定する工程であって、前記位置 876 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

(b) もしあれば、前記位置 876 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、アミノ酸の不在またはフェニルアラニン以外のアミノ酸の存在が、前記患者が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程を含む、方法。

20

【請求項 30】

前記 AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

AR 関連疾患を有する患者を処置する方法であって、

(a) もしあれば、前記患者におけるまたは前記患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置 876 のアミノ酸を決定する工程であって、前記位置 876 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

30

(b) もしあれば、前記位置 876 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、アミノ酸の不在またはフェニルアラニン以外のアミノ酸の存在が、前記患者が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程；

(c) 876 の位置の前記アミノ酸がフェニルアラニンでない場合、MDV3100 を含まない処置を投与する工程；または、前記位置 876 のアミノ酸がフェニルアラニンである場合、MDV3100 を含む処置を投与する工程；ならびに

(d) 疾患の進行または緩和についてアッセイする工程を含む、方法。

【請求項 33】

前記 AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、請求項 32 に記載の方法。

40

【請求項 34】

前記 AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

MDV3100 に対する細胞の感受性を決定する方法であって、

(a) もしあれば、前記細胞におけるアンドロゲンレセプターの位置 741 および 877 のアミノ酸を決定する工程であって、前記位置 741 および 877 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

(b) もしあれば、前記位置 741 および 877 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、位置 741 におけるアミノ酸の不在またはトリプトフ

50

ァン（W）以外のアミノ酸の存在および位置 877 におけるアミノ酸の不在またはトレオニン（T）以外のアミノ酸の存在が共に、前記細胞が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程を含む、方法。

【請求項 36】

前記細胞が、前立腺がん細胞、乳がん細胞、または他の AR 関連疾患細胞である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項 35 に記載の方法。

10

【請求項 38】

MDV3100 による処置に対する AR 関連疾患の患者の感受性を予測する方法であって、

（a）もしあれば、前記患者におけるまたは前記患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置 741 および 877 のアミノ酸を決定する工程であって、前記位置 741 および 877 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

（b）もしあれば、前記位置 741 および 877 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、位置 741 におけるアミノ酸の不在またはトリプトファン（W）以外のアミノ酸の存在および位置 877 におけるアミノ酸の不在またはトレオニン（T）以外のアミノ酸の存在が共に、前記患者が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程を含む、方法。

20

【請求項 39】

前記 AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記 AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

AR 関連疾患を有する患者を処置する方法であって、

（a）もしあれば、前記患者におけるまたは前記患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置 741 および 877 のアミノ酸を決定する工程であって、前記位置 741 および 877 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

30

（b）もしあれば、前記位置 741 および 877 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、位置 741 におけるアミノ酸の不在またはトリプトファン（W）以外のアミノ酸の存在および位置 877 におけるアミノ酸の不在またはトレオニン（T）以外のアミノ酸の存在が共に、前記患者が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程；

（c）876 の位置の前記アミノ酸がフェニルアラニンでない場合、MDV3100 を含まない処置を投与する工程；または、前記位置 741 および 877 のアミノ酸がフェニルアラニンである場合、MDV3100 を含む処置を投与する工程；ならびに

40

（d）疾患の進行または緩和についてアッセイする工程を含む、方法。

【請求項 42】

前記 AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記 AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

アンドロゲンレセプター（AR）関連疾患を有する患者を処置する方法であって、AR の 876 の位置のアミノ酸が不在であるか、またはフェニルアラニンではなく、前記方法

50

がMDV3100を含まない治療的組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項45】

前記MDV3100を含まない治療的組成物が、ピカルタミドまたはLEE011もしくはPD0332991などのCDK4／6阻害剤、あるいは治療的核酸を含む、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

前記AR関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、請求項41に記載の方法。

【請求項47】

前記AR関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項41に記載の方法。

10

【請求項48】

アンドロゲンレセプター（AR）関連疾患を有する患者を処置する方法であって、ARの位置741および877のアミノ酸がフェニルアラニンであり、前記方法がMDV3100を含む治療的組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項49】

前記AR関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記AR関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項48に記載の方法。

【請求項51】

アンドロゲンレセプター（AR）関連疾患を有する患者を処置する方法であって、ARの876の位置のアミノ酸が不在であるか、またはフェニルアラニンではなく、前記方法がCDK4／6阻害剤を含む治療的組成物を投与する工程を含む、方法。

20

【請求項52】

前記CDK4／6阻害剤が、LEE011またはPD0332991である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記AR関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、請求項51に記載の方法。

【請求項54】

前記AR関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項51に記載の方法。

30

【請求項55】

アンドロゲンレセプター（AR）関連疾患を有する患者を処置する方法であって、前記ARが野生型であるか、またはARの876の位置のアミノ酸が不在であるかもしくはフェニルアラニンではなく、前記方法がCDK4／6阻害剤を含む治療的組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項56】

前記CDK4／6阻害剤が、LEE011またはPD0332991である、請求項51に記載の方法。

【請求項57】

前記AR関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、請求項51に記載の方法。

40

【請求項58】

前記AR関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、請求項51に記載の方法。

【請求項59】

前記CDK4／6阻害剤が、インビトロまたはインビボにおいて、アンドロゲンレセプターを発現する細胞株の成長を阻害し、前記アンドロゲンレセプターの876の位置のアミノ酸が不在であるかまたはフェニルアラニンではない、請求項55に記載の方法。

【請求項60】

前記成長阻害が、増殖速度、コロニーアッセイ、顕微鏡アッセイ、および／または画像

50

分析によって決定される、請求項 59 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本開示は、概して、アンドロゲンレセプター（AR）に関連する状態、例えば、前立腺がん（PCa）などの前立腺疾患、乳がん、および他の様々な疾患などの処置にとって有用な組成物および方法に関する。本開示は、より詳細には、F876における新規の変異を有するアンドロゲンレセプターまたはそれらの断片もしくは変異体〔AR（F876）〕を含む組成物に関連する。この変異は、いくつかの治療法（MDV3100など）に対してAR耐性にするが他の治療法（抗アンドロゲン剤のビカルタミド、またはCDK4／6阻害剤のLEE011およびPD0332991）に対してはAR耐性にしないので、患者の層別化、薬物感受性の予測、および治療レジメンの設計にとって有用である。このF876の変異は、MDV3100に対してアンタゴニストからアゴニストへの切り替えをも生じ得る。本開示は、変異ARを含むポリペプチド、それに対する抗体、およびそれをコードするポリヌクレオチドにも関連し、それらの全てを使用して、AR関連疾患のための新規の処置を同定することができる。本開示は、MDV3100に対する耐性も付与する、位置W741およびT877におけるARの二重変異にも関する。したがって、これらのARの変異は、患者の層別化およびAR関連疾患のための新規の治療法の開発にとって有用である。本開示は、ARがF876またはW741／T877の変異を有する、AR関連疾患の処置方法にも関する。この開示は、療法の併用を伴う処置方法にも関する。

10

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

アンドロゲンレセプター（AR）は、テストステロンおよびジヒドロテストステロンなどのリガンドに結合して細胞核へ移行するレセプターである。これは、そこでDNA結合転写因子として機能し、遺伝子発現および多くの他の機能を制御する。

【0003】

ARの過剰発現または変異は、前立腺がんなどのがんおよび他の多くの疾患を含む、様々な疾患に関係している。

30

【0004】

前立腺がんは、世界で最も一般的に診断されるがんの1つである。Kawata et al. The Prostate 70, 745-754 (2010)；およびJemal et al. CA 58, 71-96 (2008)。局所腫瘍は、多くの場合、治癒的であるが、患者のかんりの割合において遠隔転移が生じる。Scher et al. Journal of clinical oncology 23, 8253-8261 (2005)；およびClegg et al. Cancer research 72, 1494-1503 (2012)。外科的もしくは化学的性腺摘除を含む、アンドロゲン枯渇療法は、初期には有効であるが、ほとんど常に、耐性が獲得され、結果として、去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）と呼ばれるはるかに攻撃的な形態の腫瘍を生じる。CRPCは、アメリカ人男性におけるがん関連死の二番目に最も一般的な原因であり〔Jemal et al. CA: a cancer journal for clinicians 60, 277-300 (2010)〕、現在、不治である。CRPCにおける保存される特徴は、AR遺伝子の過剰発現／増幅およびAR遺伝子の変異を含む多くのメカニズムによる、ARシグナリングの持続的活性である〔Chen et al. Nature medicine 10, 33-39 (2004)〕。Scher et al. Journal of clinical oncology 23, 8253-8261 (2005)。CRPCにおけるARシグナリングへの継続的な依拠は、ARのリガンド結合ポケットへの結合に対してアンドロゲンと拮抗する拮抗阻害剤の開発につながった。ビカルタミドは、そのような抗アンドロゲン剤であり、アンドロゲンの作用を妨げるために、単独療法としてまたは性腺摘除との組み合わせにおいて、長年にわたって臨床的に使用されてきた。しかしながら、CRPCの場合、ビカルタミドは、アンタゴニストからアゴニストへの切り替えを受け、逆に、ARシグナリング活性を強めてしまう

40

50

。Culig et al. British journal of cancer 81, 242-251 (1999)。

【0005】

近年、より強力な抗アンドロゲン剤であるMDV3100（エンザルタミド、Astellas Pharma US, Inc.（ノースブルック、イリノイ州）およびMedivation Inc.（サンフランシスコ、カリフォルニア）によってXTANDI（登録商標）として市販されている）は、アゴニスト活性を欠いていることが見出されている。Tran et al. Science 324, 787-790 (2009)。説得力のある臨床前および臨床データに基づき、MDV3100は、ドセタキセルによる処置の前の、転移性CRPCを有する男性の処置のためにFDAによって承認されている。継続中の臨床試験は、進行した前立腺がんを有するまだ性腺摘除されていない患者における単独療法として、ならびに前立腺がん

10

【0006】

MDV3100は臨床試験において素晴らしい効力を示したが、初期において好ましく反応した人の多くは、後に、この第2世代抗アンドロゲン剤に対する耐性を発現した。Kim et al. Current treatment options in oncology 13, 189-200 (2012)。

【0007】

したがって、患者の層別化ならびに前立腺がん、乳がん、および他のAR関連疾患に対する処置の薬物感受性の予測のための新規の組成物および方法が必要とされている。さらに、AR関連疾患に対する新規の治療法も必要とされている。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

発明の要旨

本開示の目的は、アンドロゲンレセプター（AR）関連疾患、例えば、去勢抵抗性Pca（CRPC）を含む、前立腺がん（Pca）などの前立腺疾患、および乳がんなど、ならびに他のAR関連障害、例えば、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症（spinal and muscular atrophy）、ならびにケネディ病などの診断、予後診断、および処置のためのツールおよび方法を提供することである。本開示のこれらおよび他の目的は、下記において説明される1つまたは複数の実施形態によ

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

様々な態様において、本開示は、治療的MDV3100に対する耐性を付与し、さらにはこの薬物に対してアンタゴニストからアゴニストへの切り替え（antagonist-to-agonist switch）を引き起こす、ARにおける新規の臨床的に関連する変異、すなわち、位置F876（配列番号1または54の配列に従って付番される）における変異、に関する。本開示はさらに、AR関連疾患の患者の細胞もしくは組織試料においてこの変異の存在もしくは不在を検出する工程、ならびにそれに従った処置計画を予測および設計する工程を伴う、患者の層別化方法にも関する。本開示はさらに、アンドロゲンレセプター（AR）関連疾患を有する患者を処置する方法であって、ARの876の位置のアミノ酸が不在であるかもしくはフェニルアラニンではなく、方法がCDK4/6阻害剤を含む治療的組成物を投与する工程を含む、方法にも関する。様々な実施形態において、当該CDK4/6阻害剤は、LEE011またはPD0332991であり、これは、AR関連疾患のための治療法（therapeutic）として使用することができる。これは、ARがF876の変異を含んでいるAR関連疾患を含む。さらに、PD0332991、LEE011、および他のCDK4/6阻害剤は、ARが野生型であるAR関連疾患に対する治療法として有用である。F876変異を有するARポリペプチド、それらに対する抗体、およびそれらをコードするポリヌクレオチドも、新規の治療法のスクリーニングのために有用である。さらに、様々な態様において、本開示は、位置W741およびT877（配列番号1の配列に

40

50

従って付番される)でのARにおける二重変異に関し、本開示はさらに、MDV3100に対する耐性も付与することを示す。

【0010】

変異アンドロゲンレセプター (AR) ポリペプチド

様々な態様において、本開示は、位置876を含むかまたは位置876にまたがるアンドロゲンレセプターまたはその断片もしくはバリエーションを含むポリペプチドもしくは同様のものであるAR (F876)であって、位置876のアミノ酸が、置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン (F) 以外である (当該アミノ酸の位置は、配列番号54の付番に従っている)、AR (F876)に関する。いくつかの態様において、位置876のアミノ酸は、置換されているかまたは欠失している。いくつかの態様において、位置876のアミノ酸は、ロイシン (L) である。様々な態様において、AR (F876) ポリペプチドまたはそれらの断片もしくはバリエーションは、任意により、位置877のアミノ酸がトレオニン (T) ではなく、位置874のアミノ酸がヒスチジン (H) ではなく、位置715のアミノ酸がバリン (V) ではなく、かつ/または位置741のアミノ酸がトリプトファン (W) ではないような、他の位置における1つまたは複数の変異を含む。

10

【0011】

様々な実施形態において、当該断片は、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも75、少なくとも100、または少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも350、少なくとも400、少なくとも450、少なくとも500、少なくとも550、少なくとも600、少なくとも650、少なくとも700、少なくとも750、少なくとも800、少なくとも850、および/または少なくとも900のアミノ酸長である。様々な実施形態において、AR (F876) の断片もしくはバリエーションは、F876の変異を欠く野生型 (または「WT」) ARあるいはAR (F876) の少なくとも1つの活性を保持する。

20

【0012】

一態様において、本開示は、配列番号54の残基の50%以下での1つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加、挿入、もしくは置換において異なり、その結果、AR (F876) の少なくとも1つの活性を保持する、配列番号54に記載される配列を有する単離AR (F876) ポリペプチドまたはそのバリエーションを提供する。

30

【0013】

一態様において、本開示は、配列番号54の残基の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または50%以下での1つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加、挿入、もしくは置換において異なり、その結果、AR (F876) の少なくとも1つの活性を保持する、配列番号54に記載される配列を有する単離AR (F876) ポリペプチドまたはそのバリエーションを提供する。

【0014】

本開示の別の実施形態は、断片が少なくとも10個の配列番号54における連続するアミノ酸を含む、上記において説明されるような単離ポリペプチドを提供する。

40

【0015】

本開示の別の実施形態は、断片が少なくとも15個の配列番号54における連続するアミノ酸を含む、上記において説明されるような単離ポリペプチドを提供する。

【0016】

本開示の別の実施形態は、変異体アンドロゲンレセプターもしくはその断片を含む単離ポリペプチドであって、変異体アンドロゲンレセプターのアミノ酸配列が配列番号54に示され、当該配列が、位置876のアミノ酸が置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン (F) ではないような、配列番号54のアミノ酸位置876におけるもしくは位置876にまたがる変異を含有し、任意により、位置877のアミノ酸がト

50

レオニン（T）ではなく、位置 874 のアミノ酸がヒスチジン（H）ではなく、位置 715 のアミノ酸がバリン（V）ではなく、かつ／または位置 741 のアミノ酸がトリプトファン（W）ではなく、断片の配列が、少なくとも 5 個の配列番号 54 における連続するアミノ酸を含みかつ位置 876 を含む、ポリペプチドを提供する。

【0017】

本開示の別の実施形態は、断片が少なくとも 10 個の配列番号 54 における連続するアミノ酸を含む、上記において説明されるような単離ポリペプチドを提供する。

【0018】

本開示の別の実施形態は、断片が少なくとも 15 個の配列番号 54 における連続するアミノ酸を含む、上記において説明されるような単離ポリペプチドを提供する。

10

【0019】

様々な態様において、本開示は、位置 876 を含むアンドロゲンレセプターまたはその断片を含むポリペプチドもしくは同様のものである AR（F876）であって、位置 876 のアミノ酸がフェニルアラニン（F）以外のアミノ酸である、AR（F876）に関する。

【0020】

したがって、様々な態様において、本開示は、位置 F876 での変異を有する（任意により他の位置の 1 つまたは複数の変異を有する）AR または位置 F876 を含むかもしくは位置 876 にまたがるその断片もしくはバリエーションを含む、様々なポリペプチドであって、当該ポリペプチド、断片、またはバリエーションが、その位置に変異を有する AR の少なくとも 1 つの活性を保持する、ポリペプチドに関する。

20

【0021】

AR（F876）を検出する方法および患者を層別化する方法

さらなる態様内において、本開示は、患者においてのもしくは患者からの試料において、AR の位置 F876 における変異の存在または不在を検出する方法を提供する。AR の F876 における変異は、臨床的に関連しているもので、そのような変異体 AR を示す患者は、MDV3100 で処置すべきではなく、むしろ、MDV3100 を含まない処置（例えば、ピカルタミドまたは LEE011 もしくは PD0332991 などの CDK4/6 阻害剤）によって処置されるべきである。CDK4/6 阻害剤（例えば、LEE011 および PD0332991）は、AR が野生型である場合の AR 関連疾患の処置方法においても有効であることも留意されたい。CDK4/6 阻害剤に対する反応は、アンドロゲン非依存性 22Rv1 細胞のような F876L を保有する細胞に限定されない（WT AR を発現し、MDV3100 処理条件下において AR シグナリングならびに DHFR および TK1 の発現を維持することができる PCa 株は、CDK4/6 阻害剤に対しても強い感受性を示した）。これらのデータは、CDK4/6 機能の標的化が、一般的におそらくアンドロゲン非依存性である、MDV3100 に対する耐性の複数のメカニズムの処置に対して効果的な戦略として役に立ち得ることを繰り返し示唆している。

30

【0022】

試料内の細胞は異種であってもよい、すなわち、いくつかは AR（F876）を発現し得る一方で、他のものは WT（野生型）AR および／または他の変異体 AR を発現し得ることに留意されたい。本明細書において説明される様々な態様において、本開示は、AR（F876）、WT AR、および／または他の変異体 AR の混合物を含み得る試料の AR の位置 F876 における変異を検出する方法に関する。

40

【0023】

様々な態様において、本開示は、患者からの試料における AR ポリヌクレオチドまたはポリペプチドにおける位置 F876 での変異を検出する方法であって、（a）患者から AR を含む試料を得る工程；および（b）AR が位置 F876 の変異を含むか否かを決定するために、AR ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはその一部の配列を決定する工程を含む方法を提供する。当該方法は、任意により、患者の診断、予後診断、および／または処置に関し、ならびに任意によりさらに追加の工程：（c）AR が F876 の変異

50

を含まない場合にMDV3100を含む治療的組成物を投与する工程もしくはその投与を推奨する工程；または、ARがF876の変異を含む場合にMDV3100を含まない治療的組成物を投与する工程もしくはその投与を推奨する工程を含む。様々な態様において、MDV3100を含まない治療的組成物は、ビカルタミドまたはCDK4／6阻害剤、例えば、LEE011またはPD0332991など、あるいは治療的核酸である。様々な態様において、試料が、AR（F876）、WT AR、および／または他の変異体ARを発現する細胞の混合物を含むと決定された場合、当該混合物内の異なるタイプの細胞を攻撃する（attack）ためにいくつかの工程が必要となり得る。さらに、WTおよび様々な変異体ARを示す細胞の比率は、細胞の分集団が、死滅するか、または場合によっては治療によって活性化されて、耐性クローンが生じた場合に变化し得る。したがって、工程（a）、（b）、および（c）は繰り返され得る。 10

【0024】

様々な態様において、ARの位置876のアミノ酸がフェニルアラニン（F）であるかを決定する方法としては、これらに限定されるわけではないが、とりわけ、核酸配列決定法の使用、またはAR（F876）に対して特異的な抗体もしくは核酸の使用が挙げられる。

【0025】

さらなる他の態様内において、本開示は、（a）試料を、AR（F876）に対して特異的な核酸またはその断片もしくはバリエーションに、ある条件下および試料中の核酸と当該核酸とのハイブリダイゼーションを可能にする十分な時間において接触させる工程；および（b）ハイブリダイゼーションのレベルを検出する工程を含む、試料におけるAR（F876）発現を検出する方法を提供する。 20

【0026】

細胞における増殖反応を調整する方法であって、AR（F876）活性を調整する薬剤に細胞を接触させる工程を含む方法も提供する。

【0027】

さらなる態様内において、細胞の分化を調整するための方法であって、AR（F876）活性を調整する薬剤に細胞を接触させる工程を含む方法が提供される。

【0028】

本開示はさらに、細胞生存を調整する方法であって、AR（F876）活性を調整する薬剤に細胞を接触させる工程を含む方法も提供する。 30

【0029】

したがって、様々な態様において、本開示は、AR（F876）を検出する、またはこのポリペプチドを発現するもしくは発現しない患者を層別化する、様々な方法に関する。

【0030】

一態様において、本開示は、MDV3100に対する細胞の感受性を決定する方法であって、（a）もしあれば、細胞におけるアンドロゲンレセプターの位置876のアミノ酸を決定する工程であって、位置876が配列番号54の付番に従って決定される、工程；（b）もしあれば、位置876のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、アミノ酸の不在またはフェニルアラニン以外のアミノ酸の存在が、当該細胞がMDV3100に対して感受性でないことを示す、工程を含む方法に関する。一態様において、当該細胞は、前立腺がん細胞、乳がん細胞、または他のAR関連疾患細胞である。一態様において、当該AR関連疾患は、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である。 40

【0031】

一態様において、本開示は、MDV3100による処置に対するAR関連疾患の患者の感受性を予測する方法であって、（a）もしあれば、患者におけるまたは患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置876のアミノ酸を決定する工程であって、位置876が配列番号54の付番に従って決定される、工程；（b）もしあれば、位置876のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、アミノ酸 50

の不在またはフェニルアラニン以外のアミノ酸の存在が、当該患者がMDV3100に対して感受性でないことを示す、工程を含む方法に関する。一態様において、AR関連疾患は、前立腺がんまたは乳がんである。一態様において、当該AR関連疾患は、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である。

【0032】

一態様において、本開示は、AR関連疾患を有する患者を処置する方法であって、(a) もしあれば、患者におけるまたは患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置876のアミノ酸を決定する工程であって、位置876が配列番号54の付番に従って決定される、工程；(b) もしあれば、位置876のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、アミノ酸の不在またはフェニルアラニン以外のアミノ酸の存在が、当該患者がMDV3100に対して感受性でないことを示す、工程、(c) 876の位置のアミノ酸がフェニルアラニンでない場合に、MDV3100を含まない処置を投与する（施す(administering)）工程；または、位置876のアミノ酸がフェニルアラニンの場合に、MDV3100を含む処置を投与する工程；ならびに(d) 疾患の進行または緩和(palliation)についてアッセイする工程を含む方法に関する。一態様において、AR関連疾患は、前立腺がんまたは乳がんである。一態様において、当該AR関連疾患は、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である。

【0033】

AR(W741/T877)を検出する方法および患者を層別化する方法

さらなる態様内において、本開示はさらに、位置W741およびT877における二重変異；患者からの試料においてこの二重変異を検出する方法；ならびに、この二重変異を示す患者はMDV3100またはビカルタミドで処置すべきではなく、むしろMDV3100またはビカルタミドを含まない処置によって処置すべきであるように、患者を層別化する方法にも関する。

【0034】

様々な態様において、本開示は、患者におけるAR(W741/T877)発現を検出する方法であって、患者におけるアンドロゲンレセプターまたはその断片の位置741および877のアミノ酸が、それぞれ、トリプトファン(W)およびトレオニン(T)であるか否かを決定する工程を含む方法を提供する。様々な態様において、当該方法はさらに、(a) 位置741および877のアミノ酸がそれぞれトリプトファン(W)およびトレオニン(T)である場合にはビカルタミドもしくはMDV3100；または(b) 位置741および877のアミノ酸がそれぞれトリプトファン(W)およびトレオニン(T)でない場合にはビカルタミドもしくはMDV3100以外の前立腺疾患処置、の患者への投与を推奨する工程および／またはそれを患者に投与する工程を含む。ビカルタミドまたはMDV3100を含まない処置は、非限定例として、他の治療、例えば、LEE011もしくはPD0332991などのCDK4/6阻害剤、または治療的核酸を含み得る。

【0035】

様々な態様において、本開示は、AR関連疾患を有するかまたは有すると疑われる患者を診断、予後診断、および／または処置する方法であって、アンドロゲンレセプターを発現する細胞を含む生体試料を患者から得る工程；アンドロゲンレセプターが、位置741のアミノ酸がトリプトファン(W)ではなくかつ位置877のアミノ酸がトレオニン(T)ではないように、位置741および877に二重変異を含むか否かを決定する工程、および以下いずれか；アンドロゲンレセプターがアミノ酸位置741にトリプトファン(W)を含みかつ位置877にトレオニン(T)を含む場合に、ビカルタミドまたはMDV3100を含む処置によって患者を処置する工程、あるいは、アンドロゲンレセプターがアミノ酸位置741にトリプトファン(W)以外のアミノ酸を含みかつアミノ酸位置877にトレオニン(T)以外のアミノ酸を含む場合に、ビカルタミドまたはMDV3100を含まない、前立腺疾患のための処置によって患者を処置する工程を含む方法を提供する。

ビカルタミドまたはMDV3100を含まない処置は、非限定例として、他の治療、例えば、LEE011もしくはPD0332991などのCDK4/6阻害剤、または治療的核酸を含み得る。本開示はさらに、CDK4/6阻害剤が、ARが野生型であるAR関連疾患の処置方法においても使用することができることについても述べる。AR関連疾患の処置（例えば、ビカルタミドおよび／またはLEE011および／またはPD0332991および／または当技術分野において既知の他の処置）において、複数の薬剤および／または治療法を含む併用療法（combination therapy）を使用することができることにも留意されたい。

【0036】

一態様において、本開示は、MDV3100に対する細胞の感受性を決定する方法であって、（a）もしあれば、細胞におけるアンドロゲンレセプターの位置741および877のアミノ酸を決定する工程であって、位置741および877が配列番号54の付番に従って決定される、工程；（b）もしあれば、位置741および877のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、位置741におけるアミノ酸の不在またはトリプトファン（W）以外のアミノ酸の存在および位置877におけるアミノ酸の不在またはトレオニン（T）以外のアミノ酸の存在が共に（together）、当該細胞がMDV3100に対して感受性でないことを示す、工程を含む方法に関する。一態様において、当該細胞は、前立腺がん細胞、乳がん細胞、または他のAR関連疾患細胞である。一態様において、当該AR関連疾患は、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である。

【0037】

一態様において、本開示は、MDV3100による処置に対する、AR関連疾患の患者の感受性を予測する方法であって、（a）もしあれば、患者におけるまたは患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置741および877のアミノ酸を決定する工程であって、位置741および877が配列番号54の付番に従って決定される、工程；（b）もしあれば、位置741および877のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、位置741におけるアミノ酸の不在またはトリプトファン（W）以外のアミノ酸の存在および位置877におけるアミノ酸の不在またはトレオニン（T）以外のアミノ酸の存在が共に、当該患者がMDV3100に対して感受性でないことを示す、工程を含む方法に関する。一態様において、AR関連疾患は、前立腺がんまたは乳がんである。一態様において、当該AR関連疾患は、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である。

【0038】

一態様において、本開示は、AR関連疾患を有する患者を処置する方法であって、（a）もしあれば、患者におけるまたは患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置741および877のアミノ酸を決定する工程であって、位置741および877が配列番号54の付番に従って決定される、工程；（b）もしあれば、位置741および877のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、位置741におけるアミノ酸の不在またはトリプトファン（W）以外のアミノ酸の存在、および位置877におけるアミノ酸の不在またはトレオニン（T）以外のアミノ酸の存在が共に、当該患者がMDV3100に対して感受性でないことを示す、工程、（c）876の位置のアミノ酸がフェニルアラニンでない場合に、MDV3100を含まない処置を投与する工程；または、位置741および877のアミノ酸がフェニルアラニンの場合に、MDV3100を含む処置を投与する工程；ならびに（d）疾患の進行または緩和についてアッセイする工程を含む方法に関する。一態様において、AR関連疾患は、前立腺がんまたは乳がんである。一態様において、当該AR関連疾患は、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である。

【0039】

したがって、様々な態様において、本開示は、AR（W741/T877）を検出し、このポリペプチドを発現するもしくは発現しない患者を層別化する様々な方法に関する。

【0040】

新規の治療法のスクリーニング

位置 F 8 7 6 の変異は、A R を、M D V 3 1 0 0 に対して耐性を有するようにし、さらには、この薬物に対してアンタゴニストからアゴニストへの切り替えも引き起こす。したがって、A R (F 8 7 6) と相互作用し、A R のそのような変異を有する A R 関連疾患の患者の処置にとって有用である、新規の治療法が必要とされている。

【0041】

本開示はさらに、他の態様内において、A R (F 8 7 6) を相互作用する能力について分子（例えば、潜在的治療法）をスクリーニングする方法であって、（a）ある条件下において、候補の分子と A R (F 8 7 6) ポリペプチドとが相互作用することができる十分な時間において、当該候補の分子をポリペプチドと接触させる工程；ならびに（b）候補の分子の、当該ポリペプチドへの結合の存在もしくは不在および／または当該ポリペプチドと相互作用する能力、またはポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を減じる能力を検出する工程を含む方法を提供する。検出工程は、例えば、A R (F 8 7 6) および A R レポーター（例えば、A R E [W T または A T (F 8 7 6) が結合している D N A 配列] を含むポリヌクレオチドなど）、プロモーター、ならびにレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ）の使用を含み得る。検出工程は、例えば、候補の分子が、A R レポーターから発現を駆動する A R (F 8 7 6) の能力を妨げるかもしくは低下させるか否かを決定する工程を含み得る。検出工程は、例えば、アフィニティー精製工程、酵母ツーハイブリッドスクリーニング法、またはファージディスプレイライブラリーのスクリーニング法を含み得る。

【0042】

いくつかの態様内において、新規の治療法をスクリーニングする方法は、A R (F 8 7 6) ポリペプチドまたは、位置 8 7 6 のアミノ酸を含むかまたは当該アミノ酸にまたがるその断片もしくはバリエーションの使用を伴う。このポリペプチドは、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからの発現を含めた、当技術分野において既知の任意の方法において産生することができる。

【0043】

本開示は、A R (F 8 7 6) ポリペプチドを産生する方法も包含する。

【0044】

本開示はさらに、他の態様内において、A R (F 8 7 6) ポリペプチドを産生する方法であって、（a）上記において説明したような宿主細胞を、A R (F 8 7 6) ポリペプチドの発現が可能な条件下において培養する工程；および（b）宿主細胞培養物から A R (F 8 7 6) ポリペプチドを単離する工程を含む方法も提供する。

【0045】

したがって、本開示は、様々な態様内において、A R (F 8 7 6) を含むポリペプチド、A R (F 8 7 6) を含むポリペプチドに対する抗体、および A R (F 8 7 6) をコードするポリヌクレオチドを含む、新規の治療法をスクリーニングおよび開発するための組成物および方法に関する。

【0046】

処置方法

様々な実施形態内において、本開示は、A R 関連疾患の処置方法であって、A R が本明細書において説明した変異を有する方法に関する。

【0047】

一実施形態内において、本開示は、アンドロゲンレセプター（A R）関連疾患を有する患者を処置する方法であって、A R の 8 7 6 の位置のアミノ酸が不在であるか、またはフェニルアラニンではなく、方法が M D V 3 1 0 0 を含まない治療的組成物を投与する工程を含む、方法に関する。

【0048】

様々な実施形態内において、M D V 3 1 0 0 を含まない治療的組成物は、ビカルタミドま

10

20

30

40

50

たは L E E 0 1 1 もしくは P D 0 3 3 2 9 9 1 などの C D K 4 / 6 阻害剤、あるいは治療的核酸を含む。

【 0 0 4 9 】

一実施形態において、本開示は、アンドロゲンレセプター（A R）関連疾患を有する患者を処置する方法であって、A R の位置 7 4 1 および 8 7 7 のアミノ酸がフェニルアラニンであり、方法が M D V 3 1 0 0 を含む治療的組成物を投与する工程を含む、方法に関する。

【 0 0 5 0 】

一実施形態において、本開示は、アンドロゲンレセプター（A R）関連疾患を有する患者を処置する方法であって、A R の 8 7 6 の位置のアミノ酸が不在であるかもしくはフェニルアラニンではなく、方法が C D K 4 / 6 阻害剤を含む治療的組成物を投与する工程を含む、方法にも関する。

10

【 0 0 5 1 】

様々な実施形態において、C D K 4 / 6 阻害剤は、L E E 0 1 1 または P D 0 3 3 2 9 9 1 である。

【 0 0 5 2 】

様々な実施形態において、A R 関連疾患は、前立腺がんまたは乳がんである。様々な実施形態において、当該 A R 関連疾患は、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である。

【 0 0 5 3 】

20

A R （ F 8 7 6 ） ポリヌクレオチド

別の態様において、本開示は、配列番号 5 4 の配列を有し、かつ／または位置 8 7 6 を含む、配列番号 5 4 の少なくとも 5 個の連続するアミノ酸をコードする配列に対して検出可能にハイブリダイズすることができる、少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチド（0、1 つ、2 つ、または 3 つのミスマッチを含む）を含むポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドであって、位置 8 7 6 のアミノ酸が、置換されているかもしくは欠失しており、フェニルアラニン（F）以外のアミノ酸であり、ハイブリダイゼーションが洗浄を含む条件下において行われる、ポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドを提供する。これらのポリヌクレオチドは、A R （ F 8 7 6 ） ポリペプチドをコード（例えば、発現）するために使用することができ、または治療的核酸（例えば、A R （ F 8 7 6 ） に対する s i R N A など）に組み入れることができる。

30

【 0 0 5 4 】

本開示の別の実施形態は、単離アンドロゲンレセプターポリヌクレオチドを提供し、この場合、当該単離ポリヌクレオチドもしくはその相補体は、配列番号 2 の少なくとも 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、1 2 個、1 3 個、1 4 個、または 1 5 個の連続するアミノ酸をコードし、当該少なくとも 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、1 2 個、1 3 個、1 4 個、または 1 5 個の連続するアミノ酸は、配列番号 2 の位置 8 7 6 を含むかしくは位置 8 7 6 にまたがり、ならびに位置 8 7 6 のアミノ酸はフェニルアラニン（F）ではなく、任意により、位置 8 7 7 のアミノ酸はトレオニン（T）ではなく、8 7 4 のアミノ酸はヒスチジン（H）ではなく、位置 7 1 5 のアミノ酸はバリン（V）ではなく、かつ／または位置 7 4 1 のアミノ酸はトリプトファン（W）ではない。

40

【 0 0 5 5 】

本開示の別の実施形態は、上記において説明したような単離アンドロゲンレセプターポリヌクレオチドを含む発現構築物（または発現ベクター）を提供する。

【 0 0 5 6 】

本開示の別の実施形態は、上記において説明したような単離アンドロゲンレセプターポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。

【 0 0 5 7 】

本開示の別の実施形態は、コードされた変異体アンドロゲンレセプタータンパク質が配列番号 2 の位置 8 7 6 にロイシン（L）を含有することを除いて配列番号 2 のアミノ酸配

50

列を含む変異体アンドロゲンレセプターをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0058】

本開示の別の実施形態は、プロモーター；および変異体アンドロゲンレセプターもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む構築物であって、アンドロゲンレセプターのアミノ酸配列が配列番号2に示され、当該配列が、位置876のアミノ酸がフェニルアラニン（F）ではなく、任意により、位置877のアミノ酸がトレオニン（T）ではなく、874のアミノ酸がヒスチジン（H）ではなく、位置715のアミノ酸がバリン（V）ではなく、かつ／または位置741のアミノ酸がトリプトファン（W）ではないような、配列番号2のアミノ酸位置876における変異を含有し、当該断片の配列が、配列番号2の少なくとも5個の連続するアミノ酸を含み、ならびに位置876を含み、当該ポリヌクレオチドセグメントが、プロモーターの下流に位置し、ポリヌクレオチドセグメントの転写がプロモーターにおいて開始される、構築物を提供する。

10

【0059】

本開示の別の実施形態は、単離ポリヌクレオチドを提供し、この場合、当該単離ポリヌクレオチドもしくはその相補体は、配列番号54の少なくとも10個、15個、または20個の連続するアミノ酸をコードし、当該少なくとも10個の連続するアミノ酸が配列番号54の位置876を含み、位置876のアミノ酸は、置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン（F）ではない。

【0060】

本開示の別の実施形態は、プロモーター、および上記において説明されるような任意のポリヌクレオチドを含む構築物を含む宿主細胞を提供する。

20

【0061】

したがって、様々な態様において、本開示は、AR（F876）またはその断片もしくはバリエーションをコードするポリヌクレオチドに関する。

【0062】

本開示のこれらおよび他の態様は、以下の詳細な説明および添付の図面の参照により、明らかとなるであろう。本明細書において開示される全ての参考文献は、あたかも各々が個々に組み入れられているかのように、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

30

【0063】

【図1】 LNCaP細胞に由来するMDV3100耐性クローンの特徴付け。A、10%のFCS（左上）、10%のCSS（右上）、10%のFCS+1μMのMDV3100（左下）、および10%のFCS+1μMのMDV3100+1nMのR1881（右下）を補ったRPMI培地において培養したLNCaP細胞のフェーズ対比画像。目盛り線は50μMである。B、適用される実験的パラダイムの概略図（詳細は本文を参照のこと）。C、MDV3100（上側）およびビカルタミド（下側）で処理した、3つの対照（茶線）および7つの耐性クローン（緑および赤）の個別（左）および平均（右）の成長抑制曲線。データは、Cell Titer-Gloアッセイによって測定した場合の、DMSO処理条件に対するパーセント成長として提示したデータ。D、対照株および耐性株におけるAR発現のウェスタンブロット分析。β-アクチンを負荷対照として使用した。E、ベースラインにおいて10%のFCSにおいて成長させた（続いて2週間の退薬）C1～C3および7つの耐性クローンのAR経路活性スコア（ベージュ線）。さらに、参照として10μMのMDV3100で24時間処理したC1～C3について計算したスコア（緑色のバー）。分析のために、アンドロゲンによって上方制御された遺伝子を使用した。

40

【図2】 耐性クローンは、MDV3100に対するAR経路感受性に基づいて分離する。A、左、10μMのMDV3100で24時間の処理における、対照（茶色のフォント）、弱耐性株（赤）、および強耐性株（緑）での遺伝子の発現の差を示すヒートマップ。少なくとも1つの試料セット（対照、弱耐性試料、および強耐性試料）に対する少なくとも2の平均倍率変化（MDV対DMSO）のプロープセットが示されている。右に記載され

50

たローマ数字は、示差的に発現した遺伝子の広いクラスを表している。中央、クラス I I I の遺伝子の G O パスウェイ強化分析の結果を示す表。青い網掛けは、「A R 活性化」遺伝子セットからの遺伝子の著しい強化を強調している。右、経路分析から有意スコアに加えられた A R 制御遺伝子（青い矢印）の相対位置を示すクラス I I I の拡大図。全てのデータは、M D V 対 D M S O 処理の $\log 2$ 比として表されている。B、対照（左）、弱耐性株（中央）、および強耐性株（右）における $10 \mu\text{M}$ の M D V 3 1 0 0 で 24 時間の処理についての上位の遺伝子との比較における A R 遺伝子シグネチャーの間の相関。緑線は、経路活性のレベルを表しており、黒い対角線からの偏位が大きい程、M D V 3 1 0 0 処理による経路活性の抑制が大きいことを表している。C、D M S O または M D V 3 1 0 0 で 24 時間処理した 10 種の株のカノニカル A R 標的遺伝子の発現の q P C R 分析。データは、D M S O（100%での無作為に設定）に対する M D V 3 1 0 0 処理試料での発現のパーセンテージとして表されている。D は D M S O を表し；M は $10 \mu\text{M}$ の M D V 3 1 0 0 を表す。発現を正規化するために T B P を使用した。データは平均 $\pm$ S E M； $n = 3$ を表す。* $P < 0.05$ （スチューデント t 検定）。D、D M S O、 $10 \mu\text{M}$ の M D V 3 1 0 0（M D V）、または 0.1 nM の R 1 8 8 1（R 1 8 8 1）で 24 時間処理した、対照（C 1、茶色）および耐性クローン（# 1、緑色）における内因性 A R 発現の核一細胞質比の定量化。比率を決定するために、補足の図 S 3 に提示されたウェスタンブロットデータを I m a g e J によって分析した。

【図 3】全トランスクリプトーム配列分析により、強い耐性株および異種移植腫瘍における A R の新規の F 8 7 6 L 変異が同定される。A、上側、対照（茶色のフォント）、弱耐性クローン（赤色のフォント）、および強耐性クローン（緑色のフォント）において検出された体細胞変異の無作為の階層クラスタリング。灰色の線は、変異の欠如を表しており；オレンジ色の線は単一の再発性異型接合変異を表しており；赤色の線は、再発性同型接合変異を表しており；緑色の線は、緑色の矢印によって示されるように、A R における再発性変異を表している。下側、ヒトアンドロゲンレセプターの概略図。N T D は N 末端ドメインを表し；D B D は D N A 結合ドメインを表し；L B D はリガンド結合ドメインを表す。F 8 7 6 L 変異の部位は、緑色の線と緑色のフォントで示されている。B、左側、強耐性クローンにおける A R のエキソン 8 における F 8 7 6 L 変異の異型接合特性を示す I G V プロット（緑色の矢印）。F 8 7 6 L 変異は、L N C a P における既存の同型接合 T 8 7 7 A 変異（オレンジ色の網掛け）に隣接している。右側、強耐性クローンにおける野生型（W T、赤色の網掛け）および変異体（M u t、緑色の網掛け）A R 対立遺伝子の生のカウント。C、2 つのビヒクル処理された L N C a P 腫瘍（赤色の曲線）および 4 つの M D V 3 1 0 0 処理された L N C a P 腫瘍（緑色の曲線）の腫瘍成長動態。D、M D V 3 1 0 0 耐性腫瘍における F 8 7 6 L を促進するヌクレオチド置換の相対位置および頻度を示す I G V プロット。C 1 ~ C 2 はビヒクル処理された腫瘍を表し；R 1 ~ R 4 は M D V 3 1 0 0 耐性腫瘍を表す。E、I G V プロットからのデータを列挙する表。赤色の網掛けは、腫瘍を有する W T A R であり、その一方で、緑色の網掛けは、腫瘍を有する F 8 7 6 L 変異体 A R を強調する。F、L N C a P 腫瘍における A R 標的遺伝子 K L K 3 および N K X 3 - 1 の相対的発現を示す棒グラフ。赤色のバーは A R - W T を発現する腫瘍からの発現データを表し；緑色のバーは A R - F 8 7 6 L を含む腫瘍からの発現データを表す。

【図 4】F 8 7 6 L 変異は、機能上、アンタゴニストからアゴニストへの切り替えを付与する。A、野生型（W T）A R の不活性状態での M D V 3 1 0 0 のドッキングモード（左側）と、変異体 A R の活性状態に結合した M D V 3 1 0 0 の推測モデル（右側）との比較。B、様々な A R 発現構築物（A R^{W T}、A R^{T 8 7 7 A}、A R^{F 8 7 6 L}、A R^{F 8 7 6 L / T 8 7 7 A}）による 293 T 細胞（上）および V C a P 細胞（下）のトランスフェクションおよびその後のビヒクル（V e h）、 0.1 nM の R 1 8 8 1（R）、 $10 \mu\text{M}$ の M D V 3 1 0 0（M D V）、 $10 \mu\text{M}$ ビカルタミド（B i c）、 $10 \mu\text{M}$ の M D V 3 1 0 0 + 0.1 nM の R 1 8 8 1（M / R）、または $10 \mu\text{M}$ ビカルタミド + 0.1 nM の R 1 8 8 1（B / R）による 24 時間の処理の後の正規化された A R レポーター活性を示

す棒グラフ。全てのデータは、ウミシイタケルシフェラーゼ (R_{LUC}) 発現に対して正規化されている。データは、平均±SEM; $n=3$ を表している。* $P<0.001$ (スチューデントt検定)。C、10%のCSS中において、ビヒクル (V)、0.1 nMのR1881、0.1 nMのR1881+10 μ MのMDV3100 (MDV)、および0.1 nMのR1881+10 μ Mのビカルタミド (Bic) で24時間処理した後の、対照株 (C1)、弱耐性クローン (赤色のフォント)、および強耐性クローン (緑色のフォント) におけるKLK3発現のqPCR分析。発現を正規化するためにTBPを使用した。データは平均±SEM; $n=3$ を表している。* $P<0.05$ であり、** $P<0.01$ である (スチューデントt検定)。

【図5】AR-F876L/T877Aを過剰発現するように遺伝子操作されたPCa細胞は、遺伝的および表現型的にMDV3100に対して耐性を有する。A、遺伝子操作された様々な株 (ベクター対照 (Vec); T877A; F876L/T877A、F876L; W741C/T877A、W741C) におけるKLK3 (上) およびNKX3-1 (下) 発現のqPCR分析。全ての株を、ビヒクル (-) またはドキシサイクリン (+) で3日間前処理した後に、10%のFCS中においてDMSO (左) または10 μ MのMDV3100 (右) で24時間処理した。発現を正規化するためにTBPを使用した。データは平均±SEM; $n=3$ を表している。* $P<0.05$ であり、** $P<0.01$ である (スチューデントt検定)。B、10%のCSSを補った培地においてDMSO (D) または10 μ MのMDV3100 (M) で処理した様々な遺伝子操作された株から単離した細胞質分画および細胞核分画における外因性AR (HA) 発現のウェスタン分析。全ての株は、Doxで3日間前処理した後に、DMSOまたはMDV3100で24時間処理した。F876LはF876L/T877Aを表し; W741CはW741C/T877Aを表す。細胞質分画および細胞核分画の純度を確認するために、それぞれ、 β -チューブリン (β -tub) およびヒストンH3 (H3) を調べた。C、DMSO、1 μ MのMDV3100 (MDV)、または1 μ Mのビカルタミド (BIC) で3~4週間処理した、様々な遺伝子操作された株 (Dox-/+) のコロニー形成アッセイ。3つの非依存性実験からの代表的な実験が示されている。D、上、DMSO (左側のウェル) または10 μ MのMDV3100 (右側のウェル、MDV) で約14日間処理したAR-T877A (左) またはAR-F876L/T877A (右) (Dox-/+) を発現するように遺伝子操作されたMyc-CaP細胞のコロニー形成アッセイ。下側、Image Jによるコロニー形成データの定量化。E、ビヒクル (Veh) または30 mg/kgのMDV3100 (MDV) で処理した対照 (C1、赤色) および耐性クローン#1 (#1、緑色) 腫瘍の腫瘍体積測定。実線の赤色および緑色の矢印は、それぞれ、対照 (C1) マウスおよびクローン#1 (#1) マウスにおいてMDV3100の連日投与を開始した日を示している。点線の緑色の矢印は、クローン#1 (#1、暗緑色) を注入した30匹のうちの15匹のマウスにおいての休薬日の前の、MDV3100による処理の連続する2日を強調している。#1veh ($n=2$) を除いて、全ての群に対して $n=7\sim8$ の腫瘍である。データは平均±SEMを表す。F、触知可能な腫瘍が成長するマウスのパーセンテージを示す棒グラフ (棒の上の数値は、腫瘍を示すマウスの数を表している)。G、ビヒクル (Veh) またはMDV3100 (MDV) で処理した対照 (C1) および耐性 (#1) 腫瘍におけるTMPRSS2およびSLC45A3発現のqPCR分析。発現を正規化するためにTBPを使用した。データは平均±SEM; (ビヒクルで処理したC1が $n=2$ であることを除いて、全ての群において) $n=3$ 、を表す。* $P<0.05$ であり、** $P<0.01$ である (スチューデントt検定)。

【図6】CDK4/6の標的化は、MDV3100耐性前立腺がん細胞株の増殖を減少させる。A、DMSO (D)、10 μ MのMDV3100 (M)、10 μ MのLEE011 (L)、または10 μ MのMDV3100および10 μ MのLEE011 (M+L) による24時間の処理における、C1およびクローン#1株におけるDHFRおよびTK1を標的とするE2F1のqPCR分析。B、PD033299 (上側) およびLEE011 (下側) で処理した、3つの対照 (茶線) および7つの耐性クローン (緑および赤) に対

10

20

30

40

50

する平均成長阻害曲線。データは、Cell Titer-Gloアッセイによって測定した場合の、DMSO処理条件に対する成長パーセントとして提示された。C、DMSO、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のDV3100 (MDV)、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のビカルタミド (Bic)、または $10\text{ }\mu\text{M}$ のLEE011 (LEE)で28日間処理したAR-T877AおよびAR-F876L/T877A株のコロニー形成アッセイからのデータの相対定量化 (Image Jで定量化した)。D、DMSO、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のMDV3100 (MDV)、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のLEE011 (LEE)、または $10\text{ }\mu\text{M}$ のMDV3100および $10\text{ }\mu\text{M}$ のLEE011 (MDV+LEE)で48時間処理したアンドロゲン非依存性22Rv1株におけるDHFRおよびTK1を標的とするE2F1のqPCR分析。E、示された様々な化合物 (DMSO、ビカルタミド (Bic)、MDV3100 (MDV)、またはLEE011 (LEE))で14日間処理した22Rv1細胞のコロニー形成アッセイ。

10

【図7】AR-F876Lを標的化するために適用することができる治療戦略の概略図。左、MDV3100 (茶色の円)は、AR-WT (赤色の楕円)への結合の際のE2F1およびカノニカルAR標的遺伝子の発現を抑制する。中央、AR-F876L (緑色の楕円)は、アゴニストとしてMDV3100を用いることにより、E2F1およびカノニカルAR標的遺伝子の発現を維持する。右、構造的に異なる抗アンドロゲンでのCDK4/6またはARの標的化は、それぞれ、E2F1およびカノニカルAR標的遺伝子を抑制することによって増殖を妨げる。灰色の矢印の長さは、経路活性の相対的レベルを表している。赤色および青色の円は、それぞれ、CDK4/6阻害剤およびビカルタミドを表している。EBSはE2F1結合部位を表し；AREはアンドロゲン反応エレメントを表す。

20

【図8】弱耐性クローンおよび強耐性クローンは、MDV3100に対する部分的耐性を示す。様々な濃度のMDV3100 (黄色のフォントで示される、 μM)で処理した対照1 (C1、左)、強耐性クローン#1 (中央)、および弱耐性クローン#14 (右)の長期間コロニー形成アッセイ。

【図9】強耐性クローンは、MDV3100で処理された場合にAR経路活性の調整を示さない。A、アンドロゲン誘導遺伝子シグネチャーを使用して、対照 (凝集塊) および耐性株に対してクラスタリング分析を実施した。アンドロゲン誘導遺伝子シグネチャーから遺伝子をマッピングする全てのプローブセットを使用した。全ての発現データは、MDV3100処理試料対DMSO処理試料での平均倍率変化として示される。B、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のMDV3100で24時間処理した場合の、対照 (左)、弱い耐性株 (中央)、および強い耐性株 (右)でのAR経路活性における変更を示すパスウェイ強化分析。対照 (左)、弱い耐性株 (中央)、および強い耐性株 (右)における、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のMDV3100による24時間の処理についての上位遺伝子との比較におけるAR遺伝子シグネチャーの間の相関。緑線は、経路活性のレベルを表しており、黒い対角線からの偏位が大きい程、MDV3100処理による経路活性の抑制が大きいことを表している。

30

【図10】DMSO、 0.1 nM のR1881、または $10\text{ }\mu\text{M}$ のMDV3100 (MDV)で24時間処理された対照 (C1) および強耐性クローン (#1) から単離された細胞質分画および細胞核分画におけるAR発現のウェスタン分析。細胞質分画および細胞核分画の純度を確認するために、それぞれ、 β -チューブリンおよびヒストンH3を調べた。両方とも、負荷対照としての役割も果たした。

40

【図11】強耐性クローン (クローン#1) および弱耐性クローン (クローン#10) から単離された遺伝子DNAのサンガー配列決定トレースプロット。矢印は、クローン#1における2つのヌクレオチドの存在を示している。

【図12】ARにおけるW741CおよびW741L変異は、ビカルタミドに対して特異的な、アンタゴニストからアゴニストへの切り替えを付与する。A、HEK293T細胞における様々なAR構築物の一過性トランスフェクションの後のARの発現レベルを示すウェスタン分析。B、ARなし (左)での、またはW741L (中央)もしくはW741C (右)変異体ARによる、同時トランスフェクションの後のARレポーター活性を示す棒グラフ。細胞を、ビヒクル (Veh)、 0.1 nM のR1881、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のMDV3100 (MDV)、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のビカルタミド (Bic)、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のMDV3100+0

50

． 1 nMのR1881 (M/R) または10 μMのBic + 0. 1 nMのR1881 (B/R) で処理した。全てのデータは、ウミシイタケルシフェラーゼ (R_{LU}C) 発現に対して正規化されている。データは平均±SEM; n = 3を表している。* * P < 0. 01 (スチューデント t 検定)。

【図13】F876L変異は、単独もしくはT877Aとの組み合わせにおいて、PC3細胞においてMDV3100に特異的なアンタゴニストからアゴニストへの切り替えを付与する。PC3におけるWT AR (左)、T877A (2番目)、F876L (3番目)、またはF876L/T877A (右) 変異体ARによる同時トランスフェクションの後のARレポーター活性を示す棒グラフ。細胞を、ビヒクル (Veh)、0. 1 nMのR1881、10 μMのMDV3100 (MDV)、10 μMのビカルタミド (Bic)、10 μMのMDV3100 + 0. 1 nMのR1881 (M/R)、または10 μMのBic + 0. 1 nMのR1881 (B/R) で処理した。全てのデータは、ウミシイタケルシフェラーゼ (R_{LU}C) 発現に対して正規化されている。データは平均±SEM; n = 3を表している。* P < 0. 05 (スチューデント t 検定)。

【図14】T877A (赤色のバー)、F876L/T877A (緑色のバー)、またはW741C/T877A (青色のバー) ARを誘導的に発現するように遺伝子操作されたLNCaPは、qPCR (上側) 分析およびウェスタン分析 (下側) の両方によって評価した場合にわずかな過剰発現を示す。-/+は、それぞれ、Doxによる処理の有り無しを表す。TBPおよびβ-アクチンを、それぞれ、qPCR分析およびウェスタン分析のための負荷対照として使用した。データは平均±SEMを表す。

【図15】F876L/T877A変異体ARは、MDV3100の存在下においてARシグナリングを効率的にレスキューすることができる。10%のFCSを補ったRPMI 1640中での、DMSO (Veh)、10 μMのMDV3100 (MDV)、10 μMのビカルタミド (Bic)、または10 μMのヒドロキシフルタミド (OH-F) による処理の後での、遺伝子操作された様々な株でのKLK3発現のqPCR分析 (ベクター: ベージュ色のバー; T877A: 赤色のバー; F876L/T877A: 緑色のバー; W741C/T877A: 青色のバー)。-/+は、それぞれ、Doxによる処理の有り無しを表す。発現を正規化するためにTBPを使用した。データは、平均±SEM; n = 3を表している。* P < 0. 05であり、* * P < 0. 01である (スチューデント t 検定)。

【図16】F876L/T877A変異体ARは、アンドロゲン枯渇培地においてアゴニストとしてMDV3100を利用する。A、10%のCSS中での、DMSO (Veh)、0. 1 nMのR1881 (R1881)、または10 μMのMDV3100 (MDV) で処理した、遺伝子操作された様々な株でのKLK3およびNKX3-1発現のqPCR分析 (ベクター: ベージュ色のバー; T877A: 赤色のバー; F876L/T877A: 緑色のバー; W741C/T877A: 青色のバー)。-/+は、それぞれ、Doxによる処理の有り無しを表す。発現を正規化するためにTBPを使用した。データは平均±SEM; n = 3を表す。* P < 0. 05であり、* * P < 0. 01である (スチューデント t 検定)。B、DMSO (Veh)、0. 1 nMのR1881 (R1881)、または10 μMのMDV3100 (MDV) で24時間処理した、遺伝子操作されたT877AおよびF876L/T877A株の細胞質分画および細胞核分画における外因性AR発現レベルのウェスタン分析 (HAで調べた)。分画の純度を検証するために、β-チューブリン (細胞質タンパク質) およびヒストンH3 (細胞核タンパク質) を調べた。遺伝子操作された株を、処理前に、Doxの存在下で3~4日間、10%のCSS中において培養した。

【図17】ARにおけるF876L変異は、MDV3100の存在下において核移行を促進する。A、10%のFCSを補った培地においてDMSO (D) または10 μMのMDV3100 (M) で処理した様々な遺伝子操作された株から単離した細胞質分画および細胞核分画における外因性AR (HA) 発現のウェスタン分析。全ての株は、Doxで3日間前処理した後に、DMSOまたはMDV3100で24時間処理した。F876LはF

10

20

30

40

50

876L/T877Aを表し；W741CはW741C/T877Aを表す。細胞質分画の純度を確認するために、 β -チューブリン (β -tub) を調べ、細胞核分画の純度を確認するために、ヒストンH3 (H3) を調べた。B、DMSOまたは10 μ MのMDV3100 (MDV) で24時間処理した、T877A (赤色のバー)、F876L/T877A (緑色のバー)、およびW741C/T877A (青色のバー) 過剰発現株における外因性AR発現 (HAタグ付けAR) の細胞核：細胞質比。細胞核：細胞質比を決定するために、図5BおよびパネルAに提示されたウェスタンブロットデータを、ImageJによって分析した。示された培養条件 (10%のFCSまたは10%のCSS) でのDMSOまたはMDV3100による処理の前に、細胞をドキシサイクリンで3日間処理した。

10

【図18】F876L/T877AおよびW741C/T877A変異体ARは、MDV3100に対する表現型耐性を付与する。A、MDV3100の濃度を10 μ Mまで増加させて処理した遺伝子操作された株に対して得られる成長阻害曲線。Dox-は赤色で表され；Dox+は緑色で表される。データは、CellTiter-Gloアッセイによって測定した場合の、DMSO処理条件に対する成長パーセントとして提示した。B、10日間の処理後のAからの、MDV3100処理細胞のフェーズ対比画像。目盛り線は50 μ mである。

【図19】LNCaP細胞におけるAR-F876L過剰発現は、MDV3100に対する遺伝的および表現型的耐性を駆動するのに十分である。A、DMSOおよびMDV3100処理条件下においてLNCaP細胞を発現するAR-WT (赤色のバー) およびAR-F876L (緑色のバー) におけるAR (KLK3、NKX3-1、SLC45A3、TMPRSS2) の下流標的遺伝子の相対的発現を示すqPCR分析。DMSOまたはMDV3100で24時間処理する前に、細胞をDox (+) で2日間処理した。データは平均 $\pm$ SEMを表す。* $P < 0.05$ (スチューデントt検定)。B、様々なMDV3100濃度 (黒色のフォントで記述、 μ M) においてAR-F876L (Dox+) を発現するLNCaP細胞の持続的成長を示すコロニー形成アッセイ。

20

【図20】ARでのF876L変異を安定して発現するVCaP細胞は、MDV3100に対して部分的耐性である。AR-T877A発現性VCaP細胞は、MDV3100 (左) に対して感受性のままであるが、その一方で、AR-F876L/T877Aの発現は、結果として、MDV3100処理条件下での部分的成長を生じる (右)。データは平均 $\pm$ SEMを表す。* $P < 0.05$ (スチューデントt検定)。

30

【図21】AR-F876L変異体を含むクローンのMDV3100処理は、インビトロにおいてアンドロゲン枯渇培地における細胞成長を促進することができない。10%のCSSを補ったRPMI 1640において培養した細胞の細胞成長に対するR1881 (赤)、MDV3100 (緑)、およびピカルタミド (青) 処理の濃度増加の影響を表している折れ線グラフ。適用した最大用量は、10 nMのR1881ならびにMDV3100およびピカルタミドについて10 μ Mであった。データは、DMSO処理条件に対する細胞数の倍率変化として表した (CellTiter-Gloアッセイによって測定)。分析前に細胞を13日間処理した。

【図22】対照1およびクローン#1異種移植片の重量測定。A：対照1およびB：クローン#1異種移植片の重量を1週間に1度測定した。データは、平均 $\pm$ SDとして表した。

40

【発明を実施するための形態】

【0064】

発明の詳細な説明

本開示は、アンドロゲンレセプター (AR) 関連疾患に関する。本開示は、アンドロゲンレセプターの位置F876における新規の臨床的に関連する変異であって、薬物MDV3100に対する耐性を付与し、患者の層別化にとって有用な、変異に関する。この変異 [AR (F876)] を含むアンドロゲンレセプターならびにその断片およびバリエーションも、この変異体レセプターを標的とする新規の処置の考案にとって有用である。さらに、

50

位置W741およびT877での二重変異体ARならびにこの二重変異〔AR(W741/T877)〕を含むその断片およびバリエーションも、MDV3100に対して耐性であり、ならびに患者の層別化にとって有用である。したがって、本開示は、AR関連疾患、例えば、去勢抵抗性PCA(CRPC)を含む前立腺がん(PC)などの前立腺疾患、および乳がんなど、ならびに他のAR関連障害、例えば、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、ならびにケネディ病などの予後診断、診断、および処置において有用性を有する。

【0065】

前立腺がんは、世界で最も一般的に診断されるがんのうちの1つであるにもかかわらず、知識、リソース、および分析方法が不十分であることから、1)前立腺がんの信頼性高い診断、2)生死に関わる疾患と良性とを区別する能力、ならびに3)アンドロゲン枯渇療法で再発した患者を効率的に処理する能力、が妨げられることに科学者たちは悩まされている。化学的および外科的性腺摘除を含むアンドロゲン枯渇療法は、アンドロゲン依存PCAの処置において、初期には有効である。しかしながら、ほとんどの腫瘍が、去勢抵抗性PCA(CRPC)とも呼ばれる、はるかに攻撃的で不治の形態のPCAとして再発する。CRPCの極めて有害な性質から、CRPC患者の生存率を改善するための二次選択治療法として使用することができる、効果的な治療法の開発を促進させる積極的なキャンペーンが展開された。このために、CRPCが生き残るためにARシグナリングに頼り続けるという知識に基づいて、ARへの結合に対してアンドロゲンと競合するアンタゴニストが開発された。ここでの成功は、1)化合物の力価の不足、および2)CRPCが、当該化合物が、逆にARシグナリングを強めるような、アンタゴニストからアゴニストへの切り替えを促進することによって適合してしまうことから、あまり芳しいものではなかった。これらの限界を回避するために、近年、以前にドセタキセルで処置されている転移性CRPCを有する男性の処置のために、より強力なアンタゴニストであるMDV3100(エンザルタミド)がFDAによって承認された。場合によって、MDV3100は、去勢抵抗性前立腺がんに対しても、単独療法として使用することができる。当該化合物は、臨床試験において素晴らしい効力を示したが、初期に反応した患者の多くが、後に耐性を発症した。耐性の機制的理解が不足しているため、この演繹的知識は、代替の処置戦略の設計に対して批判的である。このために、本開示は、MDV3100に対する耐性を遺伝的および表現型的に付与する、ARにおける新規の変異(MDV3100の直接標的)の同定および特徴付けを提示する。

【0066】

耐性の機構を解明するために、本開示は、MDV3100に対して特異的な自然耐性モデルを確立するために、LNCaP(ビカルタミドに対する耐性を付与する臨床的に関連するW741C変異を同定するために以前に使用したモデル)を使用する。耐性クローンの2つの広いクラスが同定され、これらは、MDV3100処置に対してAR経路調節に対して感受性または耐性のいずれかを示す。心躍ることに、RNA-seq分析は、MDV3100による経路調節に対する耐性と関係のある、ARにおける新規のF876L/T877A変異を同定した。遺伝子操作された株の分析と組み合わせたトランス活性化アッセイにより、変異がMDV3100に対してアンタゴニストからアゴニストへの切り替えを促進する(最終的に表現型耐性へと翻訳される)ことが確認された。興味深いことに、本開示は、古い抗アンドロゲン剤であるビカルタミドによる処置がもう一度細胞を感応化するため、この変異が、MDV3100に対して非常に選択的であることを見出している。これらの研究結果は、1)薬物反応を予測するためのバイオマーカーとして変異を使用することができ、ならびに2)F876L/T877A変異を示す患者を、臨床的有益性を達成するために、ビカルタミドによって容易に処置することができることから著しい臨床的影響を有すると思われる。

【0067】

予想外なことに、本開示によってさらに、以前に同定したW741C/T877A変異(ビカルタミドに対する耐性を付与することが以前に示された)も、MDV3100に対

する表現型耐性を部分的に付与することが見出された。いかなる特定の理論にも束縛されることを望まないが、本開示は、このことはおそらく二重変異体A Rが構成型活性機能を獲得する間接的影響であろうと推測する。いずれにせよ、この調査結果は、この変異を示す患者は、抗アンドロゲン療法から恩恵を受ける可能性が低いであろうという翻訳影響を有すると思われる。さらに、発明者らの研究は、MDV3100に対する耐性を付与する可能性を決定するために、前立腺がんにおいて他のよく特徴付けられた変異をスクリーニングすることの重要性を強調することであり、H874Y、V715M、およびL701H/T877Aなどの変異が、広範囲のリガンド応答性を有することが分かっており、ならびに以前から、ヒドロキシフルタミドがこれらの変異体に対するアゴニストとして機能することが分かっている。

10

【0068】

本開示からの知見はおそらく、最終的に治療戦略の開発および実践に影響を及ぼすであろう様々な病理学的状態のためのドライバー変異の発見を速めるためのお膳立てをであろう。本開示は、以下の貢献を為す：1) ハイスループットRNA-seq技術を自然耐性のモデルと組み合わせることによって、本開示は、MDV3100に対する耐性を遺伝的および表現型的に付与する（それにもかかわらず、ビカルタミドに対する感受性を維持する）、A Rにおける新規の変異を同定する。このことは、患者の層別化および代替の処置戦略の開発に役立つであろう。2) 発明者らの自然細胞株は、少なくとも2つの耐性の非依存性モード（耐性メカニズムへのさらなる追求のためのPCaコミュニティにとって非常に有益であろうリソース）を表している。3) 本開示は、A Rのリガンド結合ポケットにおける耐性変異の保存された特徴が、化合物の他のクラスとは異なって、アンタゴニストからアゴニストへの切り替えを付与することであるということを示す。A R（876）を含む組成物は、このポリペプチドに対する抗体を生じさせるためにも使用することができ、ならびに、このポリペプチドを標的とする新規の治療法を開発するためにも使用することができ、ならびに、アンドロゲンレセプター関連疾患、とりわけ前立腺がんおよび乳がんなどの処置において有用である。

20

【0069】

MDV3100耐性を克服するための治療戦略としてのCDK4/6の標的化

次に、本発明者らは、インビトロおよびインビボにおいて様々な遺伝学的状況下でA R-F876LがMDV3100に対する耐性を促進することができることを確認することにより、変異体対立遺伝子と拮抗するための合理的な戦略を開発することを目的とした。A Rの高変異可能なりガンド結合ポケットを標的とし続ける新規の抗アンドロゲン剤の開発[Balbas et al. 2013 eLife 2:e00499]に対する代替策として、本発明者らは、診療所においてより持続可能であり得る治療戦略を同定することを目的とした。このために、本発明者らは、MDV3100で処理された強耐性クローンにおける「A R活性化」に加えて、「細胞周期」に属する遺伝子および「E2F1活性化」遺伝子セットに対するかなりの強化を観察し、これらのクローンが、E2F1標的遺伝子の継続的発現により、MDV3100処理条件下での増殖を潜在的に維持し得ることを提案した。アンドロゲンシグナリング（G1-S転移の重要なレギュレーター）が活性CDK4/サイクリンD1アセンブリを、したがってE2F1機能の活性化を促進することが知られているため、上記は、魅力的な仮説である。Schiewer et al. 2012 End. Relat. Cancer 9: 1-12。この概念に一致して、本発明者らは、MDV3100処理が、対照株においてE2F1標的遺伝子DHFRおよびTK1の発現を抑制するのを観察し、E2F1機能のレギュレーターとしてのA Rシグナリングを確認した。対照的に、F876Lを保有する細胞は、対照株と比べて、MDV3100処理条件下においてDHFRおよびTK1のより高い発現を維持することが可能であった（図6A）。これらのデータに基づいて、本発明者らは、E2F1活性は、A Rシグナリングの下流エフェクターとして機能し得、そのため、E2F1機能のレギュレーターは、A Rを対象とする療法が効果を失ったときに、重要な治療的ノードとして機能し得ると推論した。この仮説に従って、本発明者らは、強耐性クローン（図14B）およびA R-F876L/T877Aを発現するように遺伝子操作されたLNCa

30

40

50

P株（図6C）の成長は、ピカルタミドと同程度に、CDK4/6阻害剤LEE011 [Rader et al. 2013 CDK4/CDK6 inhibition is potently active in a definable subset of human neuroblastomas American Association for Cancer Research; Philadelphia, PA] およびPD0332991に対して感受性であることを見出した。興味深いことに、アンドロゲン非依存性22Rv1細胞（WT ARを発現し、MDV3100処理条件下においてARシグナリングならびにDHF RおよびTK1の発現を維持することができるPCa株（図6D））も、CDK4/6阻害に対して強い感受性を示した（図6E）ので、CDK4/6阻害に対する反応は、F876Lを保有する細胞のみに限定されない。これらのデータは、CDK4/6機能の標的化が、一般的におそらくアンドロゲン非依存性である、MDV3100に対する耐性の複数のメカニズムの処置に対して効果的な戦略として役に立ち得ることを繰り返し示唆している。

10

【0070】

定義

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲において使用されるある特定の用語および語句の意味を以下に提供する。本明細書の他の部分での用語の使用法と、このセクションにおいて提供されるその定義との間に明らかな相違が存在する場合、このセクションの定義が優先される。

【0071】

アンドロゲンレセプター

「アンドロゲンレセプター」もしくは「AR」は、NR3C4（細胞核レセプターサブファミリー3、グループC、メンバー4）としても知られかつ符号AR; AIS; DHT R; HUMARA; HYS P1; KD; NR3C4; SBMA; SMAX1; およびTFMならびに外部ID OMIM: 313700 MGI: 88064 Homologene: 28 IUPHAR: NR3C4 ChEMBL: 1871によっても知られる、遺伝子もしくは遺伝子産生物（例えば、ポリペプチド）を意味する。例示的ARのポリペプチドおよびヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号1および2に示されている。例示的AR（F876）ポリペプチド配列は、配列番号54に示されている。

20

【0072】

アンドロゲンレセプターは、細胞核レセプターの1種であり [Lu et al. 2006 Pharmacol. Rev. 58: 782-97]、細胞質中での男性ホルモンであるテストステロンまたはジヒドロテストステロンのいずれかとの結合およびその後の細胞核中への移行によって活性化される [Roy et al. Vitam. Horm. 55: 309-52]。当該アンドロゲンレセプターは、プロゲステロンレセプターに最も密接に関連しており、より多い用量でのプロゲステンは、アンドロゲンレセプターを妨げ得る。Bardin et al. 1983 Pharm. Ther. 23: 443-59; および Raudrant et al. 2003 Drugs 63: 463-92。アンドロゲンレセプターの主な機能は、遺伝子発現を制御するDNA-結合転写因子としてであるが [Mooradian et al. 1987 Endocr. Rev. 8: 1-28]；ただし、アンドロゲンレセプターは、他の機能も有する [Heinlein et al. 2002. Mol. Endocrinol. 16: 2181-7]。アンドロゲン制御遺伝子は、雄の性表現型の発育および保守にとって重要である。

30

【0073】

アンドロゲンレセプターへのアンドロゲンの結合は、当該レセプターに対して立体構造変化を誘発し、結果として、ヒートショックタンパク質の解離、二量化、およびサイトソルから細胞核への輸送を引き起こし、ここで、アンドロゲンレセプター二量体は、特定のDNA配列（ホルモン応答要素またはアンドロゲン応答要素（ARE）とも呼ばれる）に結合する。他の細胞核タンパク質との相互作用に応じて、ARは遺伝子発現を制御し、特定の遺伝子、例えば、インスリン様成長因子I（IGF-1）などの転写を増加もしくは減少させる。

40

【0074】

アンドロゲンレセプターはさらに、細胞質内のシグナル伝達タンパク質によって細胞質活性も有することができる。細胞質アンドロゲンレセプターへのアンドロゲンの結合は、

50

遺伝子転写に関係のない細胞機能（例えば、イオン輸送など）ならびに、例えば他のシグナル伝達経路を媒介することによる、遺伝子転写の間接的影響において急速な変化を引き起こし得、結果として、他の転写因子の活性に影響を及ぼし得る。

【0075】

アンドロゲンレセプター配列および変異

例示的ARのアミノ酸配列を以下に示す。

【0076】

【化1】

```
MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAQNLQSVREVIQNPGPRHPEAASAAPPGASLLLLLQQQ
QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPPRQQQQQQQGEDGSPQAHRRGPTGYLVLDDEEQPSQPQ
SALECHPERGCVPEPGAAVAASKGLPQQLPAPPDEDDSAAPSTLSLLGPTFPGLSSCSAD
LKDILSEASTMQLLQQQQQEAVSEGSSSGRAREASGAPTSSKDNLYLGGTSTISDNAKELC
KAVSVSMGLGVEALEHLSPEGQLRGDCMYAPLLGVPPAVRPTPCAPLAECKGSLDDDSAG
KSTEDTAEYSPFKGGYTKGLEGESLGCSSGSAAGSSGTLELPSTLSLYKSGALDEAAAYQ
SRDYINFLALAGPPPPPPPPHARIKLENPLDYGSAAAAAAQCRYGDLASLHGAGAA
GPGSGSPSAAASSSWHTLFTAEEGQLYGPCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGEAGAVAP
YGYTRPPQGLAQESDFTAPDVWYPGGMVSRVPYPSPTCVKSEMGPWMDSYSGPYGDMRL
ETARDHVLPIIDYFPPQKTCCLICGDEASGCHYGALTCGSKVFFKRAAEGKQKYL CASRN
DCTIDKFRRNKNCPSCLRLKCYEAGMTLGARKLKKLGNLKLQEEGEASSTTSPTTEETTQKL
TVSHIEGYECQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPDFAALLSSLNELGERQLVHVVKWA
KALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWSFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSR
MYSQCVRMRHLSQEFQWLQITPQEFCLMKALLLSFIIPVDGLKNQKFFDELRMNYIKELD
RIIACKRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTFDLLIKSHMVSVDFFEMMAEII
SVQVPKILSGKVKPIYFHTQ ( 配列番号 1)
```

10

20

【0077】

注目すべきいくつかのアミノ酸には下線が引かれており：

W741：多くのビカルタミド耐性腫瘍においてW741C／Lへと変異する。

H874：多くの前立腺腫瘍においてH874Yへと変異する。

F876：本明細書において、例えばF876Lなどに変異することが示された。F876L単一変異体およびF876L／T877A二重変異体ARは、MDV3100に対してかなりのトランス活性反応を有し、MDV3100に対して非常に特異的であるアン

30

タゴニストからアゴニストへの切り替えを提示する。

T877：多くの後期およびフルタミド耐性腫瘍においてT877Aに変異する。

【0078】

ARにおいて生じることが知られているさらなる変異は、V715および当技術分野における本明細書で説明された他のものを含む。

【0079】

本研究は、T877A変異に隣接するF876L変異を同定する。

本開示は、W741C／T877A変異も試験し、このタンパク質の異所性発現が、MDV3100に対する非特異的耐性を付与することを見出した。

これらの変異は、本明細書において開示されるように、患者の層別化および新規の治療法の開発において有用である。

40

【0080】

例示的ARのヌクレオチド配列を以下に示す。

【0081】

いて定義される場合、AR配列全体、例えば、配列番号1または54に示される配列全体、を含むポリペプチドを包含する。AR断片は、これらに限定されるわけではないが、全長未満の配列（例えば、配列番号1または54に示されるものより短い）を含むがARもしくはAR変異体〔例えばAR（F876）など〕によって媒介される少なくとも1つの活性を保持するARが挙げられる。バリエーションは、断片もしくは修飾されている全長ARである。そのような修飾としては、これらに限定されるわけではないが、翻訳後修飾（ペグ化、グリコシル化、メチル化など）が挙げられる。ARもしくは断片の修飾はさらに、共有結合性もしくは非共有結合性であり得る、ARもしくは断片とさらなる成分との組み合わせも含む。そのような他の成分は、融合ポリペプチドまたは融合タンパク質を形成する融合パートナー（例えば、Fc、例えばFcLALAなど）を含み得る。

10

【0086】

ARの断片およびバリエーションは、ARの様々なアイソフォームを含み得、および／またはARのドメインのうちの1つまたは複数を含み得る。ARは、2つのアイソフォーム：インビトロでのタンパク質分解の結果として、N末端が切断され、最初の187aa（アミノ酸）を欠くAR-A（87kDa）、において存在することが知られている。アイソフォームAR-Bは、100kDaおよび全長である。Wilson et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1234-8；およびGregory et al. 2001 2001. J. Mol. Endocrinol. 27: 309-19を参照されたい。

【0087】

断片は、本明細書において説明されるように、F876位置に「またがる」ものも含み得る。

20

【0088】

ARの様々なドメインとしては、N末端調節ドメイン（活性化機能1：AF-1；活性化機能5：AF-5；および二量体表面を含む）、DNA結合ドメイン（DBD）、ヒンジ領域、リガンド結合ドメイン（LBD）、およびC末端ドメインが挙げられる。AR（F876）およびAR（W741/T877）は、例えば、1つまたは複数のドメインを有することができるが、ただし、AR（F876）およびAR（W741/T877）の配列が、それぞれ、位置F876、または741および877を包含する場合に限る。

【0089】

アンドロゲンレセプター変異は、特定のアミノ酸の欠失および置換の両方を含むことにも留意されたい。したがって、AR（F876）は、F876において欠失を有する断片または全長ARまたはバリエーションであり；したがって、通常、F876に対応する位置にアミノ酸が存在しない（例えば、配列番号54に示されるように）。したがって、AR（F876）は、F876を飛ばして、位置877に対応するアミノ酸に直接結合している位置875のアミノ酸を含み得る。位置875および877のアミノ酸は、様々な実施形態において、任意により、変異させることもできる。

30

【0090】

したがって、用語「AR（F876）」および「AR（W741/T877）」は、ARによって媒介される少なくとも1つの活性を維持し、かつ、それぞれ、F876における変異あるいはW741およびT877の両方における二重変異を含み、任意によりさらなる変異を含む、任意の全長、断片、バリエーション、またはARの他の形態を包含することが意図される。

40

【0091】

本開示はさらに、AR（F876）およびAR（W741/T877）「ポリペプチド」、「ポリペプチド部分」、「タンパク質」などを含む組成物にも関する。用語「ポリペプチド」、「ポリペプチド部分」、「タンパク質」などは、本明細書において、任意の長さのアミノ酸残基の任意のポリマーを意味するために、相互互換的に使用される。当該ポリマーは、直鎖状もしくは非直鎖状（例えば、分岐鎖状）であり得、修飾アミノ酸もしくはアミノ酸類似体を含んでもよく、アミノ酸以外の化学部分によって割り込まれていてもよい。当該用語はさらに、自然に、あるいは介入によって；例えば、ジスルフィド結合形

50

成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、あるいは他の操作もしくは修飾、例えば、標識化もしくは生理活性成分とのコンジュゲート化などによって、修飾されているアミノ酸ポリマーも包含する。

【0092】

したがって、本開示は、F 8 7 6における変異またはW 7 4 1 / T 8 7 7における二重変異を含む（任意により、他の変異を含む）A Rまたはその断片もしくはバリエーションであって、患者の層別化および／またはアンドロゲンレセプター関連疾患の処置における使用のための新規の治療法の創出において有用である、A Rまたはその断片もしくはバリエーションに関する。

【0093】

W Tまたは変異体A Rの活性

様々な態様において、A Rもしくは変異体A R（例えば、A R（F 8 7 6）および／またはA R（W 7 4 1 / T 8 7 7など））の断片および／またはバリエーションは、全長W Tもしくは変異体ポリペプチド（例えば、配列番号1または54のポリペプチド）の少なくとも1つの活性を保持する。そのような活性としては、これらに限定されるわけではないが、アンドロゲン、テストステロン、および／またはジヒドロテストステロン；MDV 3 1 0 0を結合させる不能性；リガンドの結合の際の立体構造変化；ヒートショックタンパク質の解離；細胞質から細胞核への輸送；二量体化；DNAを結合させる能力；DNAにおけるH R E（ホルモン応答要素）配列への配列特異的結合；遺伝子転写の制御；他のレセプターのリン酸化における役割；細胞質におけるシグナル伝達タンパク質との相互作用；完全リガンド活性化転写活性に対する活性化機能1（A F - 1）；アゴニスト誘導活性の原因となる、活性化機能2（A F - 2）；および／または、A K T 1、B A G 1、β - カテニン、B R C A 1、C - j u n、カルモジュリン-1、カベオリン-1、C D K 9、C O X 5 B、C R E B - 結合タンパク質、サイクリンD 1、サイクリン依存性キナーゼ7、細胞死関連タンパク質6、大腸がんにおける欠失、E F C A B 6、上皮成長因子レセプター、F O X O 1、G A P D H、ゲルゾリン、G N B 2 L 1、G S K 3 B、H D A C 1、H S P 9 0 A A 1、H T A T I P、M A G E A 1 1、M E D 1、M Y S T 2、N C O A 1、N C O A 2、N C O A 3、N C O A 4、N C O A 6、N C O R 2、N O N O、P A 2 G 4、P A K 6、P A T Z 1、P I A S 2、P R P F 6、P T E N、R A D 9 A、R A N B P 9、R C H Y 1、網膜芽腫タンパク質、R N F 1 4、R N F 4、S A R T 3、S M A D 3、小ヘテロ二量体パートナー、S r c、S R Y、S T A T 3、S V I L、精巣レセプター2、精巣レセプター4、T G F B 1 I 1、T M F 1、T R I M 6 8、U B E 2 I、U X T、および／またはZ M I Z 1、との相互作用、あるいは媒介性特異的免疫原性、[例えば、A R（F 8 7 6）の断片は、免疫原性を模倣するのに十分な長さであるか、またはA RもしくはA R（F 8 7 6）の対応する断片もしくは配列に結合する抗体を産生もしくは誘発するために使用することができる、任意の断片であり得る]が挙げられる。したがって、例えば、A R（F 8 7 6）断片は、全A R（F 8 7 6）またはA R（F 8 7 6）にまたがるその断片の配列に特異的な免疫反応を誘発することができる活性を保持する任意の断片である。

【0094】

A Rのそのような活性の少なくとも1つは、以下においてより詳細に説明される、A Rの変異体、断片、またはバリエーション、例えば、A R（F 8 7 6）またはA R（W 7 4 1 / T 8 7 7）などによって保持される。

【0095】

A R（F 8 7 6）

本明細書において説明されるように、A RにおけるF 8 7 6変異体の出現は、処理の際のMDV 3 1 0 0に対する鈍化したA R反応および持続する増殖と相関があった。A R遺伝子における再発性F 8 7 6 L変異は、全ての4つの強耐性クローン（本明細書において説明される）において保存されるが、弱耐性クローンまたは対照細胞株においては見出されなかった。F 8 7 6変異は、A R（F 8 7 6 L）がアゴニストとしてMDV 3 1 0 0を

10

20

30

40

50

使用できるようにし、一貫して、これにより、F 8 7 6 L を保持する細胞は、インビボにおいて成長のためにMDV 3 1 0 0 の存在を必要とした。

【0096】

MDV 3 1 0 0 がARシグナリングを阻害するメカニズムは、ARの核移行を妨げるその能力に部分的に起因すると考えられていた。Tran et al. 2009 Science 324: 787-90。F 8 7 6 変異は、ARのリガンド結合ドメインに局在する。MDV 3 1 0 0 反応に対するF 8 7 6 変異の潜在的影響を評価するために、発明者らは、野生型(WT)および変異体レセプターへのMDV 3 1 0 0 の結合をコンピュータ的にモデル化した。発明者らは、WT ARの拮抗状態のドッキングモードにおいて、MDV 3 1 0 0 のみがAR (F 8 7 6) との弱い相互作用を示すことを見出した。しかしながら、F 8 7 6 変異の存在下において、MDV 3 1 0 0 のベンズアミドモチーフは、より小さいロイシン残基によって作り出されるアクセスチャネル内へと延び得る。これは、当該化合物が、アゴニストモードでのARリガンド結合ドメインのヘリックス-12と衝突するのを潜在的に防ぐであろう。したがって、コンピュータモデリングは、ARにおけるF 8 7 6 L 変異がMDV 3 1 0 0 のアンタゴニスト活性を無効にし得、ならびにアゴニスト活性を潜在的に可能にし得ることを示唆した。

10

【0097】

「AR (F 8 7 6)」または「AR-F 8 7 6」は、本明細書において定義されるように、位置876を含むかもしくは位置876にまたがる、アンドロゲンレセプターまたはその断片もしくはバリエーションを含むポリペプチドなどであり、この場合、位置876のアミノ酸は、置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン(F)以外である(この場合、アミノ酸の位置は、配列番号1または配列番号54の付番に従う)。「AR (F 8 7 6 L)」または「AR-F 8 7 6 L」は、本明細書において定義されるように、位置876を含むかもしくは位置876にまたがる、アンドロゲンレセプターまたはその断片もしくはバリエーションを含むポリペプチドなどであり、この場合、位置876のアミノ酸は、ロイシン(L)で置換されている(この場合、アミノ酸の位置は、配列番号1または配列番号54の付番に従う)。

20

【0098】

したがって、「AR (F 8 7 6)」は、以下の配列番号54 (この配列は、F 8 7 6 が「X」によって示されることを除いて、配列番号1と同一であり、F以外の任意のアミノ酸がこの位置で置換され得ること、またはこのアミノ酸が欠失し得ることを意味する)の全体もしくは断片を含む。したがって、AR (F 8 7 6) において、位置Xは、欠失し得るか、あるいはF以外の任意のアミノ酸であり得る。

30

【0099】

AR (F 8 7 6) ポリペプチド配列の非限定的例を以下に示す。

【0100】

【化 3】

MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFSVREVIQNPGPRHPEAASAAPPGASLLLLLQQQ
 QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQQQGEDGSPQAHRRGPTGYLVLDDEEQPSQPQ
 SALECHPERGCVPEPGAAVAASKGLPQQLPAPPDEDDSAAPSTLSLLGPTFPGLSSCSAD
 LKDILSEASTMQLLQQQQQEAVSEGSSSGRAREASGAPTSSKDNLYLGGTSTISDNAKELC
 KAVSVSMGLGVEALEHLSPGEQLRGDCMYAPLLGVPPAVRPTPCAPLAECKGSLDDDSAG
 KSTEDTAEYSPFKGGYTKGLEGESLGCSSGSAAGSSGTLELPSTLSLYKSGALDEAAAYQ
 SRDYNNFPLALAGPPPPPPPPHAPHARIKLENPLDYGSAWAAAAAQCRYGDLASLHGAGAA
 GPGSGSPSAAASSSWHTLFTAEEGQLYGPCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGEAGAVAP
 YGYTRPPQGLAGQESDFTAPDVWYPGGMVSRVPYPSPPTCVKSEMGPWMDSYSGPYGDMRL
 ETARDHVLPIIDYFPPQKTCCLICGDEASGCHYGALTCGSCKVFFKRAAEGKQKYL CASRN
 DCTIDKFRKNCPCRLRKCYEAGMTLGARKLKKLGNLKLQEEGEASSTTSPTTEETTQKL
 TVSHIEGYECQPIFLNVLEAIEPGVVACAGHDNNQPD SFAALLSSLNELGERQLVHVVKWA
 KALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWSFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSR
 MYSQCVRMRHLSQEFGLWQITPQEFCLMKALLFSIIPVDGLKNQKFFDELRMNYIKELD
 RIIACKRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQXTFDLLIKSHMVSVDPEPMAEII
 SVQVPKILSGKVPIYFHTQ (配列番号 54)

10

【0101】

したがって、例示的なAR (F876) ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションは、配列番号54のサブセット、例えば、ELHQXTFDLL (配列番号20)、LHQT F (配列番号21)、HQXTFD (配列番号22)、QXTFD (配列番号23) などを含み得、この場合、Xは、欠失しているか、またはF以外の任意のアミノ酸である。AR (F876) ポリペプチドの他の非限定的な例としては、例えば、本明細書において示されるような、配列番号3～53のいずれかを含むものが挙げられる。様々な実施形態において、当該断片は、ARの任意の活性を媒介することができる。

20

【0102】

用語「AR (F876)」は、位置F876に欠失を有するARも明確に包含する。したがって、「にまたがる」は、変異体ARが、位置F876のアミノ酸が欠失しているかまたは欠失されるような配列を含むことを意味する。例えば、F876「にまたがる」配列を含む変異体ARは、とりわけ、位置875および877のアミノ酸を含むがF876のアミノ酸は含まないアミノ酸配列を含み得る。別の非限定的例において、F876「にまたがる」配列を含む変異体ARは、F876を含む1つ、2つ、3つ、または4つのアミノ酸のギャップを含み得；例えば、当該変異体ARは、位置875および878のアミノ酸を含むか (876およびF877など、これらの間を欠く)、あるいは位置874および877のアミノ酸を含む (875および876など、これらの間を欠く) 配列を有し得る。したがって、例示的なAR (F876) ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションは、例えば、ELHQ__T (配列番号24)、LHQ__TF (配列番号25)、HQ__TFD (配列番号26)、またはQ__TFDL (配列番号27) などを含み得、この場合「__」は、位置F876でのアミノ酸の欠失を示している。

30

【0103】

AR (F876) は、例えば位置T877などにおいて、さらなる変異を含み得る。特異的AR (F876) は、指定されたもの、例えば、「F876L」 (「F876L AR」) または「F876L/T877A」 (「F876L/T877A AR」) などを含んでおり、それらが位置876においてFからLへの置換を有するか、または、位置876においてFからLへの置換および位置877においてTからAへの置換の両方を有することを示している。

40

【0104】

したがって、AR (F876) ポリペプチド、断片、もしくはバリエーションは、配列番号1のアミノ酸配列のサブセットを含み得、この場合、当該サブセットは、フェニルアラニン (F) 以外の任意のアミノ酸が位置876にあることを示した「X」として表される位

50

置 8 7 6 を含む。したがって、A R (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、またはバリエーションは、これらに限定されるわけではないが、とりわけ、例えば、以下を含み得る。

【 0 1 0 5 】

【 化 4 】

PIARELHQXT	(配列番号	3)
IARELHQXTF	(配列番号	4)
ARELHQXTFD	(配列番号	5)
RELHQXTFDL	(配列番号	6)
ELHQXTFDLL	(配列番号	7)
LHQXTFDLLI	(配列番号	8)
HQXTFDLLIK	(配列番号	9)
QXTFDLLIKS	(配列番号	10)
QXTFDLLIKSH	(配列番号	11)

10

【 0 1 0 6 】

したがって、二者択一的に、A R (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、またはバリエーションは、位置 8 7 6 にまたがる配列を含み得、この場合、当該位置におけるアミノ酸は欠失しており、それは、以下において「_」として表される。したがって、A R (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、またはバリエーションは、これらに限定されるわけではないが、とりわけ、例えば以下のものを含み得る。

20

【 0 1 0 7 】

【 化 5 】

QPIARELHQ_T	(配列番号	28)
PIARELHQ_TF	(配列番号	29)
IARELHQ_TFD	(配列番号	30)
ARELHQ_TFDL	(配列番号	31)
RELHQ_TFDLL	(配列番号	32)
ELHQ_TFDLLI	(配列番号	33)
LHQ_TFDLLIK	(配列番号	34)
HQ_TFDLLIKS	(配列番号	35)
Q_TFDLLIKSH	(配列番号	36)

30

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態において、A R (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、またはバリエーションは、F 8 7 6 の変異に加えて、1 つまたは複数の他の位置の変異を含み得る。

【 0 1 0 9 】

したがって、いくつかの実施形態において、A R (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、またはバリエーションは、以下の F 8 7 6 (配列「X X」の最初の「X」によって示される) および T 8 7 7 (配列「X X」の 2 番目の「X」によって示される) の両方に変異を有し得る。したがって、A R (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、もしくはバリエーションは、これらに限定されるわけではないが、とりわけ、例えば、以下を含み得る。

40

【 0 1 1 0 】

【化 6】

QPIARELHQXX	(配列番号	37)
PIARELHQXXF	(配列番号	38)
IARELHQXXFD	(配列番号	39)
ARELHQXXFDL	(配列番号	40)
RELHQXXFDLL	(配列番号	41)
ELHQXXFDLLI	(配列番号	42)
LHQXXFDLLIK	(配列番号	43)
HQXXFDLLIKS	(配列番号	44)
QXXFDLLIKSH	(配列番号	45)

10

【0 1 1 1】

いくつかの実施形態において、AR (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、またはバリエーションは、以下のH 8 7 4 (配列「X Q X X」の「X」によって示される) ; F 8 7 6 (配列「X Q X X」の2番目の「X」によって示される) およびT 8 7 7 (配列「X Q X X」の3番目の「X」によって示される) に変異を有し得る。したがって、AR (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、またはバリエーションは、これらに限定されるわけではないが、とりわけ、例えば、以下を含み得る。

【0 1 1 2】

【化 7】

20

QPIARELXQXX	(配列番号	46)
PIARELXQXXF	(配列番号	47)
IARELXQXXFD	(配列番号	48)
ARELXQXXFDL	(配列番号	49)
RELXQXXFDLL	(配列番号	50)
ELXQXXFDLLI	(配列番号	51)
LXQXXFDLLIK	(配列番号	52)
XQXXFDLLIKS	(配列番号	53)

【0 1 1 3】

30

様々な他の実施形態において、AR (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、またはバリエーションは、F 8 7 6における置換もしくは欠失、ならびに1つまたは複数の他の変異、修飾などを含み得る。AR (F 8 7 6) ポリペプチド、断片、またはバリエーションは、混合された様々な置換変異および欠失変異を含み得る。

【0 1 1 4】

他のAR変異

他のAR変異については前に説明した。

【0 1 1 5】

W 7 4 1 変異、例えばW 7 4 1 C、は、多くのビカルタミド耐性腫瘍において生じる。Hara et al. Cancer Res. 63: 149-153 (2003) ; Taplin et al. J. Clin. Oncol. 21: 2 673-2678 (2003); Haapala et al. Labor. Invest. 81: 1647-1651 (2001)。本開示は、この変異が、T 8 7 7 での変異との組み合わせにおいて、MDV 3 1 0 0 に対する表現型耐性も部分的に付与し得ることを示す。いかなる特定の理論にも束縛されることを望むわけではないが、本開示は、上記のことが、二重変異体ARが構成型活性機能を獲得する際の間接的影響に起因し得ると推測する。

【0 1 1 6】

H 8 7 4 YなどのH 8 7 4 変異は、多くの前立腺腫瘍において生じることが知られている。

【0 1 1 7】

例えばF 8 7 6 LなどのF 8 7 6 変異は、MDV 3 1 0 0 に対する耐性を生じさせるこ

50

とが本明細書に示されている。しかしながら、F 8 7 6 L / T 8 7 7 A 変異を示す患者は、臨床的有益性を達成するために、ピカルタミドなどのMDV 3 1 0 0を含まない処置によって容易に処置することができる。

【0118】

ただし、W 7 4 1 C / L 単一変異体は、感受性であり（少なくとも、レポーターアッセイによって決定される場合）；しかしながら、W 7 4 1 C / T 8 7 7 A A R は、構成的に活性であり、表現型耐性を示すということに留意されたい。

【0119】

例えばT 8 7 7 A などのT 8 7 7 変異は、多くの後期のフルタミド耐性腫瘍を生じさせることが知られている。Fenton et al. Clin. Cancer Res. 3: 1383-1388 (1997); Taplin et al. Cancer Res. 59: 2511-2515 (1999)。本開示は、W 7 4 1 およびT 8 7 7 における二重変異もMDV 3 1 0 0 に対する耐性を生じさせることを示している。 10

【0120】

さらなるAR変異としては、例えば、L 7 0 1（例えば、L 7 0 1 H）、V 7 1 5（例えば、V 7 1 5 M）、Q 9 0 2（例えば、Q 9 0 2 R）、およびA 7 2 1（例えば、A 7 2 1 T）のものが挙げられる。Fenton et al. Clin. Cancer Res. 3: 1383-1388 (1997)。いくつかの変異部位は、臨床的に関連することが知られている。例えば、H 8 7 4 Y、V 7 1 5 M、およびL 7 0 1 H / T 8 7 7 A は、幅広いリガンド応答性を有することが示されており、ヒドロキシフルタミドは、以前に、これらの変異体に対するアゴニストとして機能することが示されている。Fenton et al. Clin. Cancer Res. 3: 1383-1388 (1997); Hara et al. Cancer Res. 63: 149-153 (2003); Veldscholte et al. Biochem. 31: 2393-2399 (1992); Zhao et al. Nature Med. 6: 703-706 (2000)。T 8 7 7 A、T 8 7 7 S、およびH 8 7 4 Y 変異体は、WT A R と比べて、エストラジオールおよびプロゲステロンの両方に対して増加した応答性を有することが知られている。H 8 7 4 Y およびT 8 7 7 S A R は、ニルタミドによって活性化することができる。Fenton et al. Clin. Cancer Res. 3: 1383-1388 (1997) およびそこに列記された参考文献を参照されたい。 20

【0121】

変異であることに影響されやすいことが知られている部位は、しばしば、「ホットスポット」と呼ばれている。

【0122】

患者の層別化および投薬レジメン設計においては、様々な既知のAR変異の、既知の役割、薬物感受性、およびアンタゴニストからアゴニストへの切り替えを考慮しなければならない。 30

【0123】

いくつかの場合において、1つの置換のみが、特定の位置に対して説明されているが、本開示は、任意のアミノ酸が（または欠失の場合は何もない場所が）、変異のための部位であり得ることも想到する。したがって、本開示は、F 以外の任意のアミノ酸（または何もない場所）が、AR（F 8 7 6）における位置F 8 7 6 にあり得ることも想到する。好ましい置換は、MDV 3 1 0 0 に対して耐性である能力（例えば、F 8 7 6 L によって示される）を示すものである。同様に、特に二重変異（W 7 4 1 C / T 8 7 7 A と同様に）もMDV 3 1 0 0 に対する耐性を付与する場合、任意のアミノ酸が、W 7 4 1 / T 8 7 7 の二重変異において置換され得る（または欠失した位置であり得る）。 40

【0124】

AR（F 8 7 6）変異およびW 7 4 1 / T 8 7 7 二重変異のさらなる記述および説明を以下に提示する。これらの本文において、本開示は、AR（F 8 7 6）変異のF 8 7 6 L の例が、既存であるかそれともMDV 3 1 0 0 に対応して獲得されるか；W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 変異が、MDV 3 1 0 0 に対する耐性を間接的に付与すること；アンタゴニストからアゴニストへの切り替え；およびMDV 3 1 0 0 に対する耐性の代替のメカニズム、について説明する。

【0125】

F 8 7 6 L : M D V 3 1 0 0 処置に対する応答における A R のホットスポット変異

インビトロでの選択の際の F 8 7 6 L 変異の比較的速い出現 (図 3 A、3 B) は、最初は、この変異がおそらく低い頻度の既存のものであろうことを示唆した。しかしながら、2つの独立したヌクレオチド置換がインビボでの選択の際に F 8 7 6 L 変異を引き起こした (図 3 D および 3 E) という事実は、当該変異が処置の際に獲得され得たことを暗に示している。L N C a P 細胞は、ミスマッチ修復 (MMR) メカニズムに欠陥を有しており、P C a のサブセットにも欠陥が存在することが見出されたので [Chen et al. 2001 Cancer Res. 61: 4112-21]、それらが (M D V 3 1 0 0 処理の有無のいずれかにおいて) この変異をより容易に獲得し得ることが想像できる。しかしながら、B a l b a s および同僚ら (2 0 1 3) も、C W R 2 2 P C 細胞の長期処理における F 8 7 6 L の自然発生を報告しているように [Balbas et al. 2013 eLife 2:e00499]、完全な MMR メカニズムを有すると信じられている細胞株は、F 8 7 6 L が本当に、MMR の状態に関係なく前立腺腫瘍において耐性を付与する能力を有し得るホットスポット変異であり得ることを示唆している。

10

【0 1 2 6】

W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 変異は M D V 3 1 0 0 に対する耐性を間接的に付与する。

A R (F 8 7 6) に加えて、二重変異 A R (W 7 4 1 / T 8 7 7) も M D V 3 1 0 0 に対する耐性を付与することを上記において述べた。

【0 1 2 7】

予期していなかったが、本開示は、W 7 4 1 C / T 8 7 7 A A R の発現が、F 8 7 6 L / T 8 7 7 A 対立遺伝子よりもはるかに強い発現レベルにもかかわらず、M D V 3 1 0 0 に対する表現型耐性を付与することを、一貫して見出した。この現象は、以前の報告を支持して、構成的活性特性を獲得する W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 変異体 A R による間接的影響であると思われる。Hara, T., et al. Cancer research 63, 149-153 (2003)。遺伝子発現分析は、この変異が M D V 3 1 0 0 の存在下において、T 8 7 7 A 変異体 A R よりも効率的に、A R 経路活性をレスキューできることを示唆しているが (図 5 a)、この対立遺伝子の異所性発現がベースラインでの A R シグナリングを著しく増強するので (図 1 5 および 1 6 a、データは示されていない)、これは M D V 3 1 0 0 に非依存性であると思われる。これを支持して、本開示は、アンドロゲン枯渇条件下において、T 8 7 7 A A R に比べて、ベースラインでの W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 変異体 A R の著しい細胞核局在性を観察する。細胞核局在性は、M D V 3 1 0 0 に対して感受性のままであるが、処理によって局在性が著しく低下されるので、細胞核 W 7 4 1 C / T 8 7 7 A タンパク質のレベルは、M D V 3 1 0 0 処理後でも T 8 7 7 A A R よりも高いままであり、より高い程度の耐性へと翻訳される。耐性のメカニズムは、上記において説明した理由から間接的であるように思われるが、M D V 3 1 0 0 または他の抗アンドロゲン剤が完全に無効であると思われること、ならびに他のクラスの A R アンタゴニストを使用する「混合性アンドロゲン遮断」処置または、他のキーシグナリング経路も標的とする薬剤との併用療法の、W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 変異を含む腫瘍の処置においてより効果的であり得ることを暗に意味するであろうために、それは依然として注目に値する観察結果である。

20

30

【0 1 2 8】

W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 対立遺伝子が M D V 3 1 0 0 に対する部分的耐性を付与できるという予期されない知見は、臨床前立腺がん試料において、他のよく記録された A R の変異の機能をスクリーニングする必要性を暗に意味している。Taplin, M.E., et al. The New England journal of medicine 332, 1393-1398 (1995); Marcelli, M., et al. Cancer research 60, 944-949 (2000); および Culig, Z., et al. Molecular endocrinology 7, 1541-1550 (1993)。H 8 7 4 Y、V 7 1 5 M、および L 7 0 1 H / T 8 7 7 A などのいくつかの変異は、幅広いリガンド応答性を有していることが示されており、ならびに、ヒドロキシフルタミドは、以前に、これらの変異体に対するアゴニストとして機能することが示されている。Fenton, M.A., et al. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 3, 1383-1388 (1997); Hara

40

50

, T., et al. Cancer research 63, 149-153 (2003); Veldscholte, J., et al. Biochemistry 31, 2393-2399 (1992); および Zhao, X.Y., et al. Nature medicine 6, 703-706 (2000)。したがって、以前に同定された A R 変異のいずれも M D V 3 1 0 0 に対する耐性も付与することができるのか否か、できるのであれば、これらの変異と F 8 7 6 L とを組み合わせることにより、臨床設定における薬物感受性を予測することができるか否かを試験することは、臨床的に重要であるだろう。

【0129】

したがって、A R の位置 8 7 6 の変異（例えば、A R (F 8 7 6) ）の存在または不在を試験する患者試料の分析は、任意により、位置 7 4 1 および 8 7 7 の二重変異（例えば、A R (W 7 4 1 / T 8 7 7) ）の存在または不在を試験することができる。本明細書において説明されるように、これらの変異の存在または不在は、患者の層別化および投薬レジメンの設計に対して影響を有する。

10

【0130】

アンタゴニストからアゴニストへの切り替えおよび代替の治療戦略

本開示は、A R (F 8 7 6) 変異が、M D V 3 1 0 0 に対する耐性を可能にするだけでなく、アンタゴニストからアゴニストへの切り替えも引き起こすことを示し、この場合、A R (F 8 7 6) を発現する細胞は、M D V 3 1 0 0 の存在下においてより良く成長するかまたは存在下においてのみ成長する。

【0131】

抗アンドロゲン剤に対する耐性の獲得において繰り返されるテーマは、小分子阻害剤をアゴニストとして最終的に用いることができる変異の出現である。T 8 7 7 A / S、W 7 4 1 C / L、および（本明細書において示されるような）F 8 7 6 L（図 15）は、それぞれ、ヒドロキシフルタミド、ビカルタミド、および M D V 3 1 0 0 に対してアンタゴニストからアゴニストへの切り替えを促進する。これは、他のクラスの阻害剤、例えば、B C R - A B L を標的とするものなど [Gorre, M.E., et al. Science 293, 876-880 (2001)]、において観察される耐性とは明確に異なっており、この場合、当該変異は、分子標的を治療法に対して無反応にする。この切り替えが抗アンドロゲン剤に対して非常に一般的な特徴であるという事実は、1) より良好な治療指数のより強力な化合物の開発、または 2) 代替の治療戦略の探求、のどちらかを示唆する。最初の点に対処するため、Sawyers and Jung は、近年、次世代の抗アンドロゲン剤である A F N - 5 0 9 を開発し、これは、より強力であることが示され、より高い治療指数とより長い半減期を有し、その全てが、より少ない耐性へと翻訳されるはずである。Clegg et al. Cancer Res. 72: 1494-1503 (2012)。将来の研究によって、A F N - 5 0 9 に特異的な、耐性を付与する変異が同定されるなら、高い治療指数にもかかわらず、おそらく、A R を標的とする代替の戦略は、A R における変異によって耐性の影響をほとんど受け得ない、探求された戦略であるはずである。まず 1 つ目に、そのような戦略は、2 つの抗アンドロゲン剤を、両方に耐性を付与する変異の見込みが非常に低減されることを期待して、組み合わせること（組み合わせ、または連続的に）を含み得る。第二に、1) 活性化機能 2 (A F 2) 機能を妨げるか [Gao, W. Current pharmaceutical design 16, 1106-1113 (2010)]、または 2) N - 末端ドメイン活性化レポーター遺伝子転写を阻害することが示されている E P I - 0 0 1 と同様の方式において N 末端ドメインを標的とする、A R 特異的ペプチドアンタゴニストの開発などの戦略が、実行可能な選択肢としての役割を果たし得る。Gao, W. Current pharmaceutical design 16, 1106-1113 (2010); および Andersen, R.J., et al. Cancer cell 17, 535-546 (2010)。あるいは、A R における個々のドメインの機能について妥協するというよりむしろ、A R を不安定化する／劣化させる化合物も考慮され得る。

20

30

40

【0132】

M D V 3 1 0 0 が、F 8 7 6 L 変異を含むクローンにおいて A R 経路のアゴニストとして機能し得ることが示されているので、次に、本開示は、このアゴニストの切り替えが抗アンドロゲン枯渇条件下において細胞成長を増強することができるか否かを取り上げた。興

50

味深いことに、当該切り替えは、インビトロにおいてF876L保有クローンの増殖を駆動することができないが、本開示は、インビボにおいて、注目に値するMDV依存性成長を観察した。C1（対照1）腫瘍は、MDV3100処置において即座の停滞を示したのに対して、クローン#1腫瘍[AR（F876）]の成長は、実際には、MDV3100によって刺激され、ビヒクル群での15匹のうちの2匹と比べて、MDVで処置した15匹のうちの11匹のマウスが腫瘍を示した。その上、以前の観察結果に一致して、クローン#1[AR（F876）]腫瘍は、MDV3100の存在下において成長し続けた。まとめると、これらのデータは、変異体ARは、アゴニストとしてMDV3100を利用できるようにすることによって、おそらく、MDV3100に対する遺伝子的耐性および表現型的耐性を媒介するであろうことを暗に意味している。本明細書において説明される様々な実施形態において、ビヒクルはDMSOである。

10

【0133】

加えて、本発明者らは以下において、F876L変異が、遺伝子操作されたLNCaP細胞においてMDV3100に対する遺伝的および表現型的耐性を誘発するのに十分であることを示す。

【0134】

耐性付与におけるAR（F876）の役割は、いくつかの前立腺がん細胞株に広く適用可能である。ヒトVCaP株（TMPRSS2-ERG融合およびAR増幅を含む）およびネズミMyc-CaP株（Mycを過剰発現する）に、変異体ARを安定に発現するように形質導入した。LNCaP細胞において観察される耐性の表現型と一致して、両方の株も、MDV3100に対する部分的耐性を提示した。

20

【0135】

さらに、本発明者らは、AR（F876）保有細胞がインビボでの性腺摘除設定においてMDV3100に対して耐性であることを示す。本発明者らは、F876L保有細胞を性腺摘除された雄ネズミに移植した場合、インビボでの成長に対してMDV3100に対する著しい依存性を観察した。

【0136】

本発明者らはさらに、CDK4/6の標的化が、CDK4/6阻害剤のLEE011およびPD033299を使用したMDV3100耐性を克服するための治療戦略であることも示す。

30

【0137】

本開示は、LEE011およびPD0332991がAR関連疾患のための治療法として使用することができることを示す。これは、ARがF876の変異を含む、AR関連疾患を含む。さらに、PD0332991、LEE011、および他のCDK4/6阻害剤は、ARが野生型であるAR関連疾患に対する治療法として有用である。例えば、本明細書において示されるように、WT（野生型）ARを発現しかつMDV3100処置条件下においてARシグナリングならびにDHFrおよびTK1の発現を維持することができるPCa株も、CDK4/6抑制に対して強い感受性を示した。

【0138】

MDV3100に対する耐性の代替のメカニズム

40

耐性についての2つのメカニズムは、MDV3100に関与していた（構成型リガンド非依存性AR活性[Li, Y., et al. Cancer research 73, 483-489 (2013)]およびPI3Kシグナリング経路の活性化を引き起こすスプライスバリエーションの発現）。Mulholland, D.J., et al. Cancer cell 19, 792-804 (2011);およびCarver, B.S., et al. Cancer cell 19, 575-586 (2011)。しかしながら、本発明者らの研究において、弱耐性クローン（F876Lなし）は、トランケートされたARアイソフォーム（データは示されず）を発現せず、ベースラインPI3K活性（データは示されず）を継続的に示し、これらのクローンにおいてどちらも耐性の重要なメカニズムではないことを示唆している。これを支持して、LNCaP細胞におけるバリエーションV7（CRPC患者において高度に発現されるARの、臨床的に関連するアイソフォーム）の異所性発現は、ARシグナリング（デー

50

タは示されず)における強いレスキューにもかかわらず、MDV3100に対する表現型耐性を付与することができず、これは、以前の研究を支持している。Watson, P.A., et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 16759-16765 (2010)。本明細書において提示されたデータを考慮すると、いかなる特定の理論にも束縛されることを望むわけではないが、本開示は、F876L対立遺伝子を欠くクローンによって利用される耐性メカニズムが、おそらく、(MDV3100に対する特殊性の欠如に基づいて)抗アンドロゲン剤に対する一般的な耐性を駆動するという考えに一致する。これらのクローンに独特な変異、例えば、前立腺がんにおいて去勢抵抗性成長を駆動することが以前に示されたキナーゼ [Dai, B., et al. Cancer research 70, 5587-5596 (2010)] であるチロシンキナーゼBMXにおける変異など、が、一般的な耐性のドライバーとして潜在的に機能し得ることは可能である。RNA-seq分析によって同定されたさらなる変異の潜在的役割を調査する追跡調査が、現在も継続されている。

10

【0139】

まとめると、本開示は、ビカルタミドに対する感受性を維持するMDV3100に対する遺伝的および表現型的耐性のドライバーとしてF876L/T877A対立遺伝子をしかりと確立する。臨床的な意義は、広範囲に及び；1) 変異は、患者における薬物感受性を予測するために使用されるバイオマーカーとして機能することができ、ならびに2) この変異を示す患者を、臨床的有益性を達成するために、代替的にビカルタミドで処置することができる(図7)。

20

【0140】

したがって、本開示は、AR(F876)変異およびAR(W741/T877)二重変異の両方が臨床的に関連しており、MDV3100に対する耐性を付与し、ならびに、下記においてより詳細に説明されるように、様々なAR関連疾患の処置の際の患者の層別化および投薬レジメンの設計にとって有用であることを示す。

【0141】

アンドロゲンレセプター関連疾患

アンドロゲンレセプターの過剰発現および／より多くの変異が、いくつかの疾患、例えば、前立腺がんおよび乳がんを含むがんなど、ならびに他の障害、例えば、ポリグルタミン酸病、脱毛症(例えば、アンドロゲン性脱毛症)、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、ならびにケネディ病などにおいて示されている。Sawaya et al. J. Cutaneous Med. Surg. 3: 9-15 (1998); Schmidt et al. Gyn. Obstet. Invest. 22: 206-211 (1986); Giovannucci et al. Prostate 39: 130-134 (1999); Amato et al. Neurology 43: 4791 (1993); Ferlini et al. Am. J. Med. Gen. 55: 105-111 (2005); Monks et al., PNAS November 2 2007; Hillmer Am. J. H. Genet. 77: 140-148 (2005); WO 2012/065051およびUS 2010/0022632、ならびにそれらにおいて引用されている参考文献を参照されたい。

30

【0142】

前立腺疾患および乳がんなどのAR関連疾患について、以下においてより詳細に説明する。

40

【0143】

アンドロゲンレセプター関連疾患：前立腺疾患

「前立腺」は、膀胱の底部において男性の尿道を囲む筋肉性の腺器官を意味する。前立腺は非必須の器官である。前立腺は、精液の産生および貯蔵を助ける。成人男性において、典型的な前立腺は、長さ約3センチメートル、重さ約20グラムである。骨盤において、膀胱の下かつ直腸の正面に位置している。前立腺は、排尿の際に膀胱から尿を、ならびに射精の際に精液を運ぶ管である尿道の一部を囲んでいる。前立腺は、精液を構成する体液の約20パーセントを産生する多くの小さい腺を含んでいる。

【0144】

「前立腺疾患」は、前立腺に影響を及ぼす任意の疾患、例えば、良性前立腺過形成(B

50

P H)、前立腺炎、および去勢抵抗性 P C a (C R P C) を含む前立腺がん (P C a) など

を意味する。前立腺疾患は、場合により、頻尿症、夜間多尿症 (夜の排尿増加)、排尿の開始および尿の一定の流れの維持の困難さ、血尿 (尿中の血液)、ならびに排尿障害 (排尿痛) などの症状の原因となる。前立腺疾患の多くの犠牲者は症状を表さない。

【0145】

前立腺疾患は、良性前立腺過形成 (B P H) を含むが、B P H における A R の正確な役割は、不明のままである。Chatterjee Mol. Cell. Biochem. 253: 89-101 (2003); および Ho et al. Nat. Rev. Urol. 8: 29-41 (2011)、ならびにそれらにおいて引用された参考文献。B P H は、前立腺のサイズ増加であり、尿路閉塞症の原因となり、結果として尿失禁を引き起こす。80 歳までの男性のおよそ 80 % に生じる。B P H は、多くの場合、前立腺の経尿道的切除 (T U R P) によって外科的に処置される。この手段は、非常に一般的であり、米国において、毎年、500,000 の T U R P が実施されており、B P H は、男性における外科手術の 2 番目に最も一般的な原因である。残念ながら、T U R P の副作用は、陰茎の射精管および神経束の排除であり、結果として、患者の 90 % が不能症を生じる。B P H の処置のための薬物療法は、現在、前立腺平滑筋の弛緩 (α_1 遮断) および前立腺体積の減少 (アンドロゲン抑制) を目的としている。B P H の処置のために、選択的 α_1 遮断薬、抗アンドロゲン剤、5- α レダクターゼ阻害剤を評価するために、臨床試験が行われている。5- α レダクターゼ阻害剤であるフィナステリドは、大部分の患者において過形成性前立腺の改善を生じる能力を示している。Mocellini et. al. (1993) Prostate 22:291; および Marberger (1998) Urology 51:677-86。

10

20

【0146】

別の前立腺疾患は前立腺炎である。前立腺炎は、前立腺の炎症である。前立腺炎という用語は、前立腺の組織における組織学的炎症を意味する。炎症の全ての形態と同様に、前立腺炎は、感染症に対する適切な身体の反応と関連付けることができるが、それは、感染症の不在下においても生じる。

【0147】

「前立腺がん」または「P C a」などは、前立腺において発症するがんのある種の形態を意味する。前立腺がんには、アンドロゲンレセプターが関係している。「がん」は、比較的自律的な成長を示す細胞の異常な存在を意味し、したがって、それらは、細胞増殖調節の重大な欠如によって特徴付けられる異常成長表現型を示す。P C a のタイプの 1 つは、去勢抵抗性 P C a (C R P C) である。

30

【0148】

本発明の一実施形態は、前立腺がんを処置する方法を含む。

【0149】

いくつかの事例では活動的であるが、ほとんどの前立腺がんは成長が遅い。当該がん細胞は、前立腺から身体他の部位、例えば、骨またはリンパ節などに転移し得る。前立腺がんは、疼痛、排尿の困難、性交の際の問題、および／または勃起機能不全を引き起こし得る。

【0150】

前立腺がんの存在は、症状、身体的検査、前立腺特異的抗原 (P S A)、または生体組織検査によって示され得る。

40

【0151】

アンドロゲンレセプター、B R C A 1 および B R C A 2、H P C 1、ビタミン D レセプター、ならびに T M P R S S 2-E R G および T M P R S S 2-E T V 1 / 4 などの多くの異なる遺伝子が、前立腺がんに関係している。関連する腫瘍抑制遺伝子としては、P 5 3、P T E N、および K A I 1、E-カドヘリン、および C D 4 4 が挙げられる。

【0152】

前立腺がんは、アデノカルチノーマまたは腺がんであり、これは、正常な精液分泌前立腺腺細胞ががん細胞へと変異した場合に生じる。腺癌が最も一般的に見られる前立腺の領域は、辺縁帯である。最初に、がん細胞の小さな塊が、他の正常な前立腺に閉じ込められ

50

たままとなり、これは、上皮内癌または前立腺上皮細胞内新生物（P I N）として知られている状態である。時間の経過と共に、これらのがん細胞は増殖し始め、周囲の前立腺組織（間質）へと広がって腫瘍を形成する。最終的に、当該腫瘍は、貯精嚢または直腸などの付近の器官に侵入するほど十分に大きく成長し得るか、または腫瘍細胞が、血液およびリンパ系において移動する能力を発現し得る。前立腺がんは、身体他の部分に侵入することができる細胞の塊であるため、悪性腫瘍と見なされる。この器官への侵入は、転移と呼ばれる。最も一般的には、前立腺がんは、骨、リンパ節に転移し、ならびに直腸、膀胱、および尿管下部にも侵入し得る。

【0153】

アンドロゲンレセプターの過剰発現および／または変異は、乳がんを含むいくつかの他の疾患に関係している。

【0154】

アンドロゲンレセプター関連疾患：乳がん

アンドロゲンレセプターは、原発性乳房腫瘍において頻繁に発現され、発現は、乳がんの研究およびそのサブタイプに応じて、50%から90%までの間であると見積もられている。Birrell et al. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 52: 459-467 (1995); Moinfar et al. Cancer 98: 703-711 (2003); Buchanan et al. Cancer Res. 65: 8487-8496 (2005); Doane et al. Oncogene 25: 3994-4008 (2006); および Gonzalez-Angulo et al. Clin. Cancer Res. 15: 2472-2478 (2009) を参照されたい。しかしながら、AR が腫瘍抑制因子または発癌遺伝子として機能したか否かは明らかではない。この多機能的役割は、AR が関係していると報告されている多くの経路によって部分的に説明することができるが、アンドロゲンは、反対の機能を有し得る黄体ホルモンおよびエストロゲンの合成経路の間に位置しているので、代謝性の観点からも説明できる。Iacopetta et al. Drug Disc. Today: Disease Mech. (2012)。

【0155】

いくつかのシグナリングメカニズムが全て、乳がんにおけるAR機能に寄与している。ARは、以下の3つの方式：(i) ARが、DNAにおいてコードされる遺伝子の発現と相互作用し、ならびにそれを直接制御する、ゲノムシグナリング；(ii) 細胞核レセプターが他のタンパク質との相互作用を介してシグナリングを行う非ゲノムシグナリング（2つのシグナリングメカニズムの間にクロストークが存在するがまだ完全には理解されていない）；ならびに(iii) 成長因子およびサイトカインによるクロストークを介したシグナリングによって効果を発揮することが報告されている。Rahman et al. Trends Endocrin. Metab. 18: 371-378 (2007); および Iacopetta et al. Drug Disc. Today: Disease Mech. (2012) を参照されたい。

【0156】

ARは、エストロゲンレセプター（ER）陽性腫瘍および陰性腫瘍の両方において潜在的な臨床的有益性を有する。ERと比べて、ARは、ヒト乳がんにおいて変化するその役割に関連する独特な機能性ドメインを有している。ER陽性腫瘍の大部分は、ARを発現し、ER陰性腫瘍のかかなりの割合が、ARおよびERBB2/HER2発癌遺伝子の混合性標的化から恩恵を受けるかもしれない。ARのシグナリングの下流も、乳がんにおいて新たに注目された臨床的標的でもある、多くの臨床的に重要な経路に、影響を及ぼすかもしれない。ARの発現も、転移性疾患への腫瘍の進行の際に、ある役割を果たすかもしれない。レビューでは、Iacopetta et al. 2012. Drug Disc. Today: Disease Mechを参照されたい。

【0157】

いくつかの研究において、アンドロゲンレセプターは、乳がんの60%から85%において発現し、いくつかの場合においては、エストロゲンレセプター（ER）またはプロゲステロンレセプター（PR）よりも高度に発現される。さらに、疫学的研究から、アンドロゲンの高血中濃度が、特に閉経後の女性において、乳がんを発症するリスクの増加に関連することが見出された。乳房細胞に対するアンドロゲンの影響が主に増殖性であるかそ

れとも反増殖性であるかが不明であるため、乳房におけるアンドロゲンの生物学的役割についての理解は不完全である。最近、乳がん細胞株に対するアンドロゲンの影響および乳がんにおけるアンドロゲンレセプター経路の潜在的役割が調査された。結果は、乳がんにおけるアンドロゲンレセプター刺激および経路活性化の反増殖性の効果の可能性を示唆している。

【0158】

最近、浸潤性乳がんの分子的に定義されたカテゴリでの（特に三種陰性（またはbasal-like群）群ならびにホルモンレセプター陰性であると考えられるHER2群での）アンドロゲンレセプターの発現の評価に関心が持たれている。しかしながら、インサイチューでの、分子表現型との関連における、あるいは導管性癌を有する女性においての、アンドロゲンレセプターの発現を調査する大集団ベースの研究が欠けている。したがって、本開示の目的は、乳がんを有する女性の、よく特徴付けられた大集団を用いて、腫瘍の病期、病理学的特徴、および分子表現型との関連におけるアンドロゲンレセプターの発現を調べることである。Collins et al. 2011 Mod. Pathol. 24: 924-931およびそれらの中で引用された参考文献を参照されたい。

【0159】

Collins et al. 2011 Mod. Pathol. 24: 924-931も、全体で浸潤性乳癌の77%がアンドロゲンレセプター陽性であることを見出した。2,171の浸潤性がんの内、64%がluminal A、15%がluminal Bタイプ、6%がHER2タイプ、ならびに11%がbasal-likeタイプであった。アンドロゲンレセプター発現の頻度は、分子表現型によって著しく変わった（ $p < 0.0001$ ）。特に、アンドロゲンレセプターの発現は、luminal Aタイプのがん（91%）およびluminal Bタイプのがん（68%）において一般的に観察されるが、HER2タイプのがん（59%）では、頻繁には見られない。エストロゲンおよびプロゲステロンレセプター発現の不在によって定義され、かつホルモン性無反応であると考えられているにもかかわらず、basal-likeタイプのがんの32%は、アンドロゲンレセプターを発現した。インサイチューの腺管上皮内癌の246の症例の内、86%がアンドロゲンレセプター陽性であったが、アンドロゲンレセプター発現の頻度は、分子表現型によって有意に異なり（ $p = 0.001$ ）、高細胞核グレードの病変は、より低いグレードの病変と比較して、アンドロゲンレセプター陽性ではなさそうであった。

【0160】

MDV3100は、少なくともいくつかのタイプの乳がんに対する可能な処置として提案されてきた。Naderi et al. Breast Cancer Res. 13: R36 (2011)。したがって、AR（F876）またはAR（W741/T877）の二重変異を発現する試料の乳がん患者は、MDV3100に対して耐性であるように思われるので、本開示は、上記のタイプのAR関連疾患の処置においてこの薬物を使用する可能性に対する意義を有する。

【0161】

したがって、アンドロゲンレセプターの過剰発現および／より多くの変異が、いくつかの疾患（例えば、前立腺がんおよび乳がんなどのがん）ならびに他の障害（例えば、ポリグルタミン酸病、脱毛症（例えば、アンドロゲン性脱毛症）、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、ならびにケネディ病など）において示された。

【0162】

したがって、本開示は、F876における変異またはW741/T877における二重変異を含む（任意により、他の変異を含む）ARまたはその断片もしくはバリエーションである、患者の層別化および／またはアンドロゲンレセプター関連疾患（例えば、上記において列挙されたものなど）の処置における使用のための新規の治療法の創出において有用である、ARまたはその断片もしくはバリエーションに関する。患者の層別化および処置におけるこれらの変異の可用性について、下記において詳細に述べる。

【0163】

アンドロゲンレセプター関連疾患の処置

10

20

30

40

50

本開示は、A R 関連疾患の診断、予後診断、および処置にとって有用な、アンドロゲンレセプターにおける変異に関する。これらの変異の存在または不在は、様々な異なるタイプの疾患の処置の中から決定するために使用することができる。

【0164】

これらの処置は、細胞の増殖を抑制するため、および個体の疾患を緩和するために有用である。これらの処置は、有効量または治療量において提供されるであろう。

【0165】

本明細書において使用される場合、「処置」は、これに限定されるわけではないが、前立腺細胞の増殖の抑制などの有益なもしくは望ましい臨床結果を得るためのアプローチである。本発明の目的にとって、有益なもしくは望ましい臨床結果としては、これらに限定されるわけではないが、検出可能であるかまたは検出不能にかかわらず、症状の軽減、疾患の程度の縮小、疾患の状態の安定化（すなわち、非悪化）、疾患の広がり（すなわち、転移）の予防、疾患進行の遅延または鈍化、疾患状態の改善または緩和、人生の楽しみの質の向上、寛解（部分的または総合的にかかわらず）、が挙げられる。「処置」は、処置を受けなかった場合に予想される生存に比べてより長い生存も意味し得る。例えば、処置は、細胞の増殖を抑制することが可能であり得るか、または疾患を緩和することが可能であり得る。

【0166】

「細胞の増殖を抑制する」は、細胞の増殖、例えば、前立腺細胞、転移性腫瘍を含む前立腺由来腫瘍細胞、またはP S Aを発現する任意の細胞、あるいは乳房組織、特に乳がん細胞、の増殖が阻害されることを意味する。

【0167】

疾患の「緩和」は、本発明のポリアミン類似体コンジュゲートを投与しない場合と比べて、疾患の状態の程度および／または望ましくない臨床症状が和らぎ、かつ／または進行の時間経過が鈍化もしくは延長されることを意味する。

【0168】

本開示はさらに、処置の有効量もしくは治療量を使用した、個体の処置にも関する。

【0169】

「個体」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳類としては、これらに限定されるわけではないが、家畜、スポーツ動物、齧歯動物、霊長動物、および愛玩動物が挙げられる。好ましくは、個体は、前立腺疾患、例えば、B P H、前立腺炎、および／または前立腺がんなどを患っていることが知られているかまたは患っていることが疑われる。

【0170】

「有効量」または「治療量」は、有益なもしくは望ましい臨床結果を達成するのに十分な量である。有効量は、1回または複数回投与において投与することができる。本発明の目的のために、ポリアミン類似体コンジュゲートの有効量は、症状の進行を、緩和し、改善し、安定させ、回復させ、鈍化させ、または停滞させるのに十分な量である。本発明のポリアミン類似体コンジュゲートの治療量は、前立腺細胞の増殖を阻害するのに十分な量である。ポリアミン類似体コンジュゲートは、例えば、少なくとも1つのタイプの前立腺がん細胞株に対して有効な場合、たとえ異なる細胞株に対しては有効でなくても、前立腺疾患を処置するための有効な薬剤であると見なされる。

【0171】

アンドロゲンレセプター関連疾患の処置：様々な治療法および処置

様々な異なる処置がA R 関連疾患に対して使用されている。本開示は、患者の層別化および可能な疾患処置の決定において有用である、A R における特定の変異に関する。

【0172】

例えば、患者がA R (F 8 7 6) を示す場合、M D V 3 1 0 0 を含む処置は有用ではないであろうが、M D V 3 1 0 0 を含まない処置（例えば、ピカルタミド、L E E 0 1 1、治療的核酸、または他の処置）は使用することができる。患者がA R (W 7 4 1 / T 8 7

7)を示す場合、MDV3100またはビカルタミドを含む処置は有用ではないであろうが、これらの成分のどちらも含まない処置（例えば、LEE011もしくはPD0332991などのCDK4/6阻害剤、治療的核酸、または他の処置）は使用することができる。

【0173】

MDV3100および／またはビカルタミドを含まない、AR関連疾患のための様々な他の処置が使用されてきた。これらは、外科手術（例えば、根治的前立腺切除術）、様々な形態の放射線治療（例えば、近接照射療法および外照射療法）、高密度焦点式超音波（HIFU）、凍結外科手術、ならびにホルモン療法および／または化学療法薬を含む。AR関連疾患のためのさらなる治療法としては、これらに限定されるわけではないが、化学的および外科手術的性腺摘除を含むアンドロゲン枯渇療法、グリシルサイクリン、ベンジル性オキシインドールピリミジン、チエノピリジン誘導体、デスチアゾリルリトナビル、インドリン-2-オン、およびアザ-インドリン-2-オン、イソフラボン誘導体、ニトリル誘導体、statt5阻害剤、プロトンポンプ阻害剤、シクロプロピルジカルボキシアミドおよび類似体、3-デスオキシ-2-メチレン-19-ノル-ビタミン-D類似体、および核酸療法が挙げられる。US2012/0329761；US2012/0329771；US2012/0329774；US2012/0329841；US2012/0321639；US2012/0322820；US2012/0322834；USPN8,338,422；USPN8,338,624；USPN8,338,454；WO2012/174095。アンドロゲンレセプター（AR）関連疾患、例えば、去勢抵抗性Pca（CRPC）を含む前立腺がん（PC）などの前立腺疾患、および乳がん、ならびに他のAR関連障害、例えば、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、ならびにケネディ病などを処置するためのさらなる治療法は、当技術分野において既知である。

【0174】

MDV3100、ビカルタミド、CDK4/6阻害剤（例えば、LEE011またはPD0332991）、および治療的核酸による処置について、以下においてより詳細に説明する。

【0175】

アンドロゲンレセプター関連疾患の処置：MDV3100

「MDV3100」、「MDV-3100」、「エンザルタミド」、「XTANDI」（登録商標）（商標）、「XTANDI（登録商標）カプセル剤」などは、4-〔3-〔4-シアノ-3-（トリフルオロメチル）フェニル〕-5,5-ジメチル-4-オキソ-2-スルファニリデンイミダゾリジン-1-イル〕-2-フルオロ-N-メチルベンズアミドの化学名の、Astellas Pharma US, Inc.（ノースブルック、IL）およびMedivation Inc.（サンフランシスコ、CA）によって市販されているアンドロゲンレセプター阻害剤を意味する。XTANDI（登録商標）の活性成分はエンザルタミドであり、不活性成分は、カプリロカプロイルポリオキシルグリセリド、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシルエン、ゼラチン、ソルビトールソルビタン溶液、グリセリン、精製水、二酸化チタン、黒色酸化鉄である。MDV3100は、強力な抗アンドロゲン剤であり、アゴニスト活性を欠く。Tran et al. Science 324,787-790(2009)。MDV3100は、以前にドセタキセルの処置を受けたことがある去勢抵抗性の転移性前立腺がんを有する患者の処置に対して提示される。参考文献として、Scher et al. N. Engl. J. Med. 2012; 367:1187-1197;ならびに米国特許第7,709,517号および同第8,183,274号を参照されたい。

【0176】

MDV3100は、アンドロゲンレセプターの過剰発現を有する前立腺がんモデルにおける活性に基づいた臨床開発のために、Astellas PharmaおよびMedivation Inc.によって選択される。エンザルタミドは、アンドロゲンレセプターの核移行、DNA結合、およびコアクチベータ漸増を阻害するという点において、現在

利用可能な抗アンドロゲン剤とは異なっている。それは、当該レセプターに対してより強い親和性も有しており、（従来の薬剤は成長を遅らせるのみである）異種移植モデルにおいて腫瘍の縮小を誘導し、既知のアゴニスト活性を有さない。前臨床研究において、MDV3100は、細胞死を誘導し、増殖を低下させ、腫瘍体積を減少させるように、前立腺がん細胞内において作用する。MDV3100は、アンドロゲンレセプターへのアンドロゲンの結合を拮抗阻害し、アンドロゲンレセプターの核移行を阻害し、DNAとのアンドロゲンレセプターの相互作用を阻害し、ならびに細胞死を誘導し、前立腺がん細胞の増殖を低下させ、腫瘍体積を減少させる。

【0177】

MDV3100に対して、いくつかの禁止、警告、および注意が存在する。MDV3100は、妊婦に投与された場合、その作用メカニズムに基づいて、胎児への害の原因となり得る。女性での使用に対して、MDV3100は提示されない。妊婦もしくは妊婦になり得る女性に対してMDV3100は禁止されている。

【0178】

無作為臨床試験において、XTANDIの患者の0.9%に痙攣が生じた。プラセボの患者は、痙攣を生じなかった。痙攣を起こした患者は、永久的に治療を中止した。全ての痙攣は解けた。痙攣閾値を下げることが知られている医薬を服薬している、痙攣の病歴を有する患者、または痙攣に対する他のリスク因子を有する患者は、臨床試験から除外した。XTANDI使用に関連する痙攣のリスクから、患者は、突然の意識喪失が彼らもしくは他の人に重大な害を及ぼし得るような任意の活動に従事する場合の危険性について知ら

【0179】

無作為臨床試験においてXTANDIを受けた患者において報告されている最も一般的である有害薬物反応（ $\geq 5\%$ ）は、無力症／疲労、背痛、下痢症状、関節痛、顔面潮紅、末梢性浮腫、筋骨格痛、頭痛、上気道炎、筋力低下、眩暈、不眠、下気道感染、脊髄圧迫および馬尾症候群、血尿、知覚異常、不安症、および高血圧症であった。

【0180】

MDV3100の薬物相互作用。MDV3100は、ヒトにおいて強いCYP3A4誘導物質ならびに中等度のCYP2C9およびCYP2C19誘導物質である。強いCYP2C8誘導物質の投与は、MDV3100に対する血漿曝露を増加させ得る。MDV3100と強いCYP2C8誘導物質との併用投与は、可能であれば避けるべきである。MDV3100の併用投与が避けられない場合、MDV3100の適用量を減らさなければならぬ。MDV3100と強いもしくは中等度のCYP3A4およびCYP2C8誘導物質との併用投与は、MDV3100に対する血漿曝露を変え得るので、可能であれば避けるべきである。狭い治療指数のCYP3A4、CYP2C9、およびCYP2C19基質では、MDV3100がこれらの薬物の血漿曝露を減少させ得るので、避けるべきである。MDV3100がワルファリン（CYP2C9基質）と併用投与される場合、さらなるINRモニタリングを行うべきである。

【0181】

推奨されるエンザルタミドの適用量およびスケジュールは、経口による160mgの1日1回投与である。

【0182】

MDV3100は、前立腺疾患の患者への使用が承認されているが、少なくともいくつかのタイプの乳がんに対する潜在的処置として位置付けられている。Naderi et al. Breast Cancer Res. 13: R36 (2011)。

【0183】

MDV3100は臨床試験において素晴らしい効力を示したが、初期において好ましく反応した人の多くは、後に、この第2世代抗アンドロゲン剤に対する耐性を発現した。Kim et al. Curr. Treat. Opt. Oncol. 13: 189-200 (2012)。本開示は、インビトロでのMDV3100による長期間の処置後のLNCaP細胞における自然耐性のモデルの世代を

示す。これらの細胞株の実験から、MDV3100に対して高度に特異的なアンタゴニストからアゴニストへの切り替えを付与するARのリガンド結合ポケットにおける高度に再発性のF876L/T877A変異が明らかとなった。この新規の変異は、ビカルタミドの細胞増殖抑制的な影響に対する感受性を維持しつつ、MDV3100に対して特異的な遺伝子のおよび表現型の耐性を駆動する。

【0184】

したがって、本開示は、ARにおけるF876での変異またはW741/T877での二重変異が、MDV3100に対する耐性を生じさせることを示す。当該F876変異は、実際に、MDV3100に対するアンタゴニストからアゴニストへの切り替えを生じさせ得る。したがって、AR(F876)変異を示す細胞は、MDV3100で処置することができないが、MDV3100を含まない他の処置、例えば、ビカルタミドなどに対しては感受性のままである。

10

【0185】

アンドロゲンレセプター関連疾患の他の処置：ビカルタミド

「ビカルタミド」およびその商標「CASODEX」、「SANDOZ BICALUTAMIDE」、「COSUDEX」、「CALUTIDE」、「KALUMID」などは、N-[4-シアノ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]-3-[(4-フルオロフェニル)スルホニル]-2-ヒドロキシ-2-メチルプロパンアミドの化学名の非ステロイド性抗アンドロゲン剤を意味する。Furr. Eur. Urol. 29 Suppl 2: 83-95(1996); Furr. Urology 47 (1A Suppl): 13-25; discussion 29-32 (1996); Schellhammer et al. Urology 50 (3): 330-6 (1997); Waller et al. J. Mol. Endocrinol. 24 (3): 339-51 (2000); Muderris et al. Gynecol. Endocrinol. 16 (1): 63-6 (2002); Schellhammer. Expert Opin Pharmacother 3 (9): 1313-28 (2002); Fradet et al. Expert Rev Anticancer Ther 4 (1): 37-48 (2004); Chen et al. Mol. Interv. 5 (3): 173-88 (2005); Klotz Urol. Clin. North Am. 33 (2): 161-6, v-vi (2006); Journal of cancer research and clinical oncology 132 Suppl 1: S7-16 (2006);およびLevine et al. Cancer 110 (11): 2448-56 (2007)。

20

【0186】

ビカルタミドは、非ステロイド性抗アンドロゲン剤として知られる医薬の群に属する。他の非ステロイド性抗アンドロゲン剤はフルタミドである。ビカルタミドなどの非ステロイド性抗アンドロゲン剤は、身体において男性ホルモンテストステロンの効果を妨げる。

30

【0187】

ビカルタミドは、後期（転移性）前立腺がんの処置のために、（黄体形成ホルモン放出ホルモン類似体（LHRH）と呼ばれる医薬または睾丸を取り除く外科手術のいずれかを有する）身体中のテストステロンの量を減じる他の処置と組み合わせて使用される。ビカルタミドは、非ステロイド性抗アンドロゲン剤として知られている医薬の群に属する。

【0188】

他の非ステロイド性抗アンドロゲン剤はフルタミドである。ビカルタミドなどの非ステロイド性抗アンドロゲン剤は、身体において男性ホルモンテストステロンの効果を妨げる。

40

【0189】

ビカルタミドは、後期（転移性）前立腺がんの処置のために、（黄体形成ホルモン放出ホルモン類似体（LHRH）と呼ばれる医薬または睾丸を取り除く外科手術のいずれかを有する）身体中のテストステロンの量を減じる他の処置と組み合わせて使用される。

【0190】

ビカルタミドは、ホルモン感受性前立腺がんにおいてARに対する阻害効果を有するが、がんがホルモン耐性になるとARを抑制できない。現在の抗アンドロゲン剤の2つの弱点は、ホルモン感受性段階からホルモン耐性疾患への前立腺がんの進行を防ぐことができないこと、およびホルモン耐性前立腺がんを効率的に処置できないことの原因とされている。ホルモン耐性前立腺がんにおいてARが過剰発現される場合、一方は、それらの弱い

50

アンタゴニスト活性であり、他方は、それらの強いアゴニスト活性である。したがって、より強力なアンタゴニスト活性および最小のアゴニスト活性を有するより良好なAR阻害剤が、疾患の進行を遅延させるため、ならびに致命的なホルモン耐性前立腺がんを処置するために必要である。

【0191】

ビカルタミドなどの非ステロイド性抗アンドロゲン剤は、より選択的でかつ副作用が少ないため、前立腺がんに対してステロイド系化合物よりも好ましかった。このクラスの化合物は、多くの特許、例えば、米国特許第4,097,578号、米国特許第5,411,981号、米国特許第5,705,654号、PCT国際出願WO97/00071およびWO00/17163、ならびに米国特許出願公開第2004/0009969号などに記載されており、なお、当該文献の全ては、参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0192】

ビカルタミドは、アンドロゲンの作用を妨げるために、単独療法としてまたは性腺摘除との組み合わせにおいて、長年にわたって臨床的に使用されてきた。しかしながら、CRPCの場合、ビカルタミドは、アンタゴニストからアゴニストへの切り替えを受け、逆に、ARシグナリング活性を強めてしまう。Culig, Et al. Brit. J. Cancer 81: 242-251 (1999)。

【0193】

ARにおけるW741/T877二重変異が、細胞をビカルタミドに対して耐性にすることが知られている。本開示はさらに、この二重変異が細胞をMDV3100に対して耐性にすることも示す。

20

【0194】

本開示はさらに、ARにおけるF876変異が、細胞をMDV3100に対して耐性にするが、ビカルタミドに対しては耐性にしないことも示す。したがって、ビカルタミドは、AR(F876)変異を有する細胞に対する治療法として使用することができる。

【0195】

ビカルタミドに加えて、アンドロゲンレセプター関連疾患のための、MDV3100を含まない他の治療法が存在し、それについては下記において説明する。

【0196】

アンドロゲンレセプター関連疾患のための他の治療法：LEE011

30

LEE011(Lee 011、Lee 011、LEE-011、およびLEE 011とも表される)(NovartisおよびAstex Pharmaceuticals)は、CDK4/6の活性を阻害するように設計された新しい経口薬である。PCT/US2007/069595; WO2010/020675; およびWO2011/130232を参照されたい。

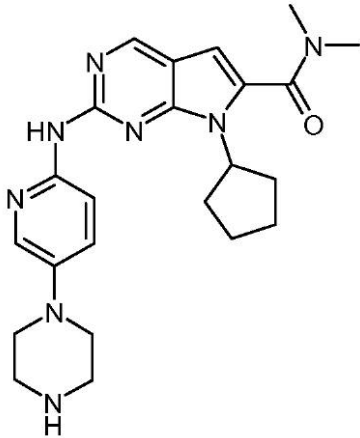
【0197】

LEE011の化学名は、7-シクロペンチル-2-(5-ピペラジン-1-イル-ピリジン-2-イルアミノ)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-カルボン酸ジメチルアミドである。LEE011の構造は以下の通りである。

【0198】

40

【化 8】



10

【0199】

LEE011は、がん細胞においてRbの完全な脱リン酸化およびG1停止を誘発する。CDK4/6は、正常な細胞およびがん細胞の両方が分裂し増殖することを可能にするプロセスに関係している。がん細胞は、多くの場合、CDK4の活性を増加させる異常によって、分裂し増殖するように駆動される。したがって、CDK4の活性を妨げることによって、乳がんおよび前立腺がんを含むいくつかのがんの成長を鈍化させることができる望みがある。

20

【0200】

本開示は、ARにおけるF876変異が細胞をMDV3100に対して耐性にすることを示す。W741/T877二重変異は、細胞をビカルタミドに対して耐性にすることが知られており、ここでは、細胞をMDV3100に対して耐性にすることが示された。しかしながら、本明細書において示されるように、ARにおけるF876変異またはW741/T877二重変異のどちらかを有する細胞は、関連のない細胞増殖抑制剤LEE011に対して感受性のままである。

【0201】

さらに、LEE011、PD0332991、および他のCDK4/6阻害剤は、ARが野生型であるAR関連疾患に対する治療法として有用である。例えば、本明細書において示されるように、WT（野生型）ARを発現しかつMDV3100処置条件下においてARシグナリングならびにDHF α およびTK1の発現を維持することができるPCa株も、CDK4/6抑制に対して強い感受性を示した。

30

【0202】

LEE011はさらに、AR関連疾患の処置方法において、1つまたは複数の他の治療法および/または処置との併用療法の一部としても使用することもできる。

【0203】

アンドロゲンレセプター関連疾患のための他の治療法：PD0332991

CDK4/6阻害剤であるPD-0332991 [またはPD0332991もしくはPD033299]は、乳がんを含む多発性悪性腫瘍に対してフェーズII臨床試験にある、強力な細胞増殖抑制剤である。Finn et al. 2009 Breast Cancer Res. 11: R77; Thangavel et al. 2011 End. Relat. Cancer 18: 333-45; Dean et al. 2010 Oncogene 29: 4018-32; および Dean et al. 2012 Cell Cycle 11: 2756-2761。

40

【0204】

本開示は、PD0332991がAR関連疾患のための治療法として使用することができることを示す。これは、ARがF876の変異を含む、AR関連疾患を含む。さらに、PD0332991、LEE011および他のCDK4/6阻害剤は、ARが野生型であるAR関連疾患に対する治療法として有用である。例えば、本明細書において示されるように、WT（野生型）ARを発現しかつMDV3100処置条件下においてARシグナリ

50

ングならびにD H F rおよびT K 1の発現を維持することができるP C a株も、C D K 4／6抑制に対して強い感受性を示した。

【0205】

アンドロゲンレセプター関連疾患のための他の治療法：治療的核酸および誘導体

いくつかの群は、アンドロゲンレセプター関連疾患の処置にとって有用な治療的核酸を示した。これらは、アンチセンス核酸、モルフォリン、s i R N Aなどを含む。

【0206】

W O 9 7／1 1 1 7 0では、良性前立腺過形成または前立腺がんを有するとして診断された患者を処置する方法であって、アンドロゲンレセプターm R N Aに対して選択的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与する工程を含む方法について報告されている。27～29のヌクレオチドの間の3つのアンチセンスオリゴヌクレオチド配列が開示されている。U S 6, 7 3 3, 7 7 6およびE P 0 6 9 2 9 7 2では、アンドロゲンレセプター遺伝子にハイブリダイズするアンチセンス核酸を含むリボソームを適用することによってアンドロゲン性脱毛症を処置する方法について報告されている。しかし、特異的な配列を有し、アンドロゲンレセプターを標的とする、アンチセンス分子は提供されていない。U S 2 0 0 5／0 1 6 4 9 7 0では、アンドロゲンレセプターm R N Aを標的とするs i R N A複合体を使用した前立腺がんの処置方法について報告されている。W O 2 0 0 5／0 2 7 8 3 3では、12～40の間のモルフォリノサブユニット長のモルフォリノオリゴヌクレオチドを患者に投与する工程を含む、前立腺がんを処置する方法について報告されている。W O 2 0 0 3／0 8 3 7 4 0では、ヒトアンドロゲンレセプターを標的とする、18～20の間の連続するユニットの荷電されていないモルホリノ骨格を有するアンチセンス化合物について報告されている。モルフォリノアンチセンス化合物は、他の分子、例えば、m R N A スプライシングまたは翻訳開始に関与する分子などによるm R N Aへのアクセスを妨げるために核酸標的への結合を介して作用する。U S 7, 0 6 7, 2 5 6では、おそらくアンドロゲンレセプターの不活性化を媒介すると思われるリボザイムについて報告されている。アンドロゲンレセプターm R N Aの対応する領域に対する19のヌクレオチドR N A分子アンチセンスが提供される。W O 2 0 1 2／0 6 5 0 5 1では、アンドロゲンレセプターに対するs i R N Aについて記載されている。

【0207】

本開示は、A RにおけるF 8 7 6変異またはW 7 4 1／8 7 7二重変異を有する細胞がM D V 3 1 0 0に対して耐性であることを示す。しかしながら、いかなる特定の理論にも束縛されることを望むものではないが、本開示は、治療を十分な量において細胞に提供することができる場合に限り、M D V 3 1 0 0を含まない治療法、例えば、治療的核酸（例えば、s i R N A）など、が、これらの細胞に対して有効であると推測する。

【0208】

さらに、本発明者らは、本明細書において、C D K 4／6の標的化が、C D K 4／6阻害剤であるL E E 0 1 1およびP D 0 3 3 2 9 9を使用した、M D V 3 1 0 0耐性を克服するための治療戦略であることを示す。

【0209】

本発明者らはさらに、F 8 7 6 Lバリエーションがビカルタミドに対する感受性を維持することも実証するが、アンドロゲン枯渇と一緒に同時もしくは順次のいずれかによる、構造的に異なる抗アンドロゲン剤との併用療法は、診療所においてA R耐性メカニズムに抵抗するための魅力的な治療戦略を提供し得る。

【0210】

さらに、C D K 4／6阻害剤によるC D K 4／6の標的化は、アンドロゲンレセプター関連疾患に対する有効な治療戦略であり、この場合、A RはW Tであるか、またはF 8 7 6などの変異を有する。

【0211】

A R（F 8 7 6）ポリヌクレオチド

別の態様において、本開示は、配列番号54の配列を有し、かつ／または位置876を

含む、配列番号54の少なくとも5個の連続するアミノ酸をコードする配列に対して検出可能にハイブリダイズすることができる、少なくとも15個の連続するヌクレオチド(0、1つ、2つ、または3つのミスマッチを含む)を含むポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドであって、位置876のアミノ酸が、フェニルアラニン(F)以外のアミノ酸であり、ハイブリダイゼーションが、 $0.1 \times \text{SSC}$ および 0.1% の SDS 中において 50°C で15分間の洗浄を含む条件下である、ポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドを提供する。そのようなポリヌクレオチドは、細胞または組織または患者内のAR(F876)ポリヌクレオチドの存在の検出にとって、あるいは、AR(F876)に対する治療的核酸の製造にとって、有用であり得る。様々な態様において、当該治療的核酸は、RNA、DNA、siRNA(様々な修飾および/またはエンドキャップの有無における、小さいもしくは短い干渉RNA)、RNA-DNAハイブリッド、DNA-RNAキメラ(dsRNAの一部がdsDNAで置換されていることを除いて、siRNAと同様である)、LNA(ロックド核酸)、TNA(トレオース核酸)、GNA(グリコール核酸)、モルホリノ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、shRNA、sisRNA(小さい内部セグメント化されたRNA)、aiRNA(非対称干渉RNA)、または上記のいずれかの組み合わせ(例えば、当該核酸の成分は、上記のものの1つまたは複数、例えば、RNA、GNA、LNA、モルホリノなどで置換されたいくつかのヌクレオチドを有するRNAなどを含む)などである。様々な実施形態において、当該ポリヌクレオチドおよび/またはアンチセンスポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であり、ならびに/あるいは、例えば、 $2'-\text{OMe}$ 、 $2'-\text{F}$ 、および/または $2'-\text{MOE}$ によって、ならびに/あるいは、リン酸の修飾および/または置き換えによって(例えば、メチル化されたリン酸、ヒ素、セレンなどによって)、修飾される。さらに、上記のポリヌクレオチドのいずれかを含む発現ベクターならびにそのような発現ベクターによってトランスフォームもしくはトランスフェクトされた宿主細胞も提供される。

【0212】

したがって、手短に言えば、本開示は、AR関連疾患を有する患者の診断、予後診断、および処置(例えば、一連の処置の設計)において有用な、ARにおける特定の変異に関する。

【0213】

下記において、特定のAR変異の検出および患者の層別化の方法についてより詳細に説明する。

【0214】

患者の層別化の方法ならびにAR(F876)の検出および患者の層別化の方法

さらなる態様内において、本開示は、患者(例えば、AR関連疾患で苦しめられているか、患っているか、または少なくとも1つの臨床兆候もしくは症状を示すか、発症のリスクがあるかもしくは発症する傾向にあるかもしくは有している疑いのある、患者)におけるもしくは患者からの試料(例えば、細胞もしくは組織試料)における、ARの位置F876での変異の存在もしくは不在を検出する方法を提供する。ARのF876における変異は、臨床的に関連しているので、そのような変異体ARを示す患者は、MDV3100で処置すべきではなく、むしろ、MDV3100を含まない処置(例えば、ピカルタミドまたはLEE011もしくはPD0332991などのCDK4/6阻害剤)によって処置されるべきである。

【0215】

試料内の細胞は異種であってもよいこと、すなわち、いくつかはAR(F876)を発現し得る一方で、他のものはWT(野生型)ARおよび/または他の変異体ARを発現し得ることに留意されたい。本明細書において説明される様々な態様において、本開示は、AR(F876)、WT AR、および/または他の変異体ARの混合物を含み得る試料のARの位置F876における変異を検出する方法に関する。いくつかの態様において、当該方法は、AR(F876)、WT AR、および/または他の変異体ARの混合物の比率を決定することができる。いくつかの試料において、AR(F876)は、少数のA

R 発現細胞であってもよい。

【0216】

様々な態様において、本開示は、（例えば、患者からの）試料における、A R ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの位置 F 8 7 6 での変異を検出する方法であって、（a）患者から A R を含む試料（例えば、生体試料、組織試料、細胞試料など）を得る工程；および（b）A R が位置 F 8 7 6（アミノ酸の位置は、配列番号 5 4 の付番に従う）に変異を含むか否かを決定するために、A R ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列またはその一部を決定する工程を含む方法を提供する。様々な態様において、当該試料は、依然として患者内および／または患者の一部である。様々な態様において、患者は、A R 関連疾患に苦しめられているか、患っているか、または少なくとも 1 つの臨床兆候もしくは症状を示すか、かつ／または発症のリスクにあるかもしくは発症する傾向にあるかもしくは有している疑いがある。当該方法は、任意により、患者の診断、予後診断、および／または処置に関し、ならびに任意によりさらに追加の工程：（c）A R が F 8 7 6 の変異を含まない場合に M D V 3 1 0 0 を含む治療的組成物を投与する工程もしくはその投与を推奨する工程；または、A R が F 8 7 6 の変異を含む場合に M D V 3 1 0 0 を含まない治療的組成物を投与する工程もしくはその投与を推奨する工程を含む。様々な態様において、M D V 3 1 0 0 を含まない治療的組成物は、ビカルタミドまたは L E E 0 1 1 もしくは P D 0 3 3 2 9 9 1 などの C D K 4 / 6 阻害剤、あるいは治療用核酸である。様々な態様において、試料が、A R（F 8 7 6）、W T A R、および／または他の変異体 A R を発現する細胞の混合物を含むと決定された場合、当該混合物内の異なるタイプの細胞を攻撃するためにいくつかの工程が必要となり得る。

10

20

【0217】

さらに、W T と様々な変異体 A R を示す細胞の比率は、細胞の部分集団が死滅するか、または場合によっては治療によって活性化されて、耐性クローンが生じた場合に变化し得る。したがって、工程（a）、（b）、および（c）は繰り返され得る。

【0218】

例えば、A R の位置 8 7 6 のアミノ酸がフェニルアラニンかどうかを決定し、患者を層別化する方法は、治療の 1 ラウンドまたは複数ラウンド後に実施することができる。腫瘍または他の病変組織は、複数のタイプの A R [例えば、W T A R、ならびに／あるいは A R（F 8 7 6）および／または他の変異体] を含む異種性であってもよい。細胞のこれらの部分集団の比率は、いくつかの細胞が治療によって死滅するかまたは活性化することにより変化し得る。本明細書において開示された実験は、M D V 3 1 0 0 への L N C a P 細胞の長期間の曝露が、M D V 3 1 0 0 に対して耐性のクローンの集団をもたらしたことを示している。他の研究は、M D V 3 1 0 0 または他の疾患処置に対する耐性の出現、または変異体である耐性細胞の富化を示していた。耐性が既存であるか（例えば、細胞の小規模の部分集団において）、それとも処置に反応して獲得されたものであるかは、不明瞭であり得ることに留意されたい。したがって、治療の 1 ラウンドまたは複数ラウンド後、工程（a）および（b）を繰り返すことにより、残存する細胞の特徴を決定することができ、工程（c）は、残存する細胞への攻撃のために適切な治療法を選択するために変更することができる。

30

40

【0219】

様々な態様において、A R の位置 8 7 6 のアミノ酸がフェニルアラニン（F）であるか否かを決定する方法としては、これらに限定されるわけではないが、とりわけ、核酸配列決定法（例えば、D N A 配列決定法、R N A - s e q、タンパク質配列決定法、全トランスクリプトーム配列決定法、または当技術分野において既知の他の方法）の使用、または A R（F 8 7 6）に特異的な抗体もしくは核酸の使用が挙げられる。

【0220】

様々な態様において、核酸配列決定法は、位置 F 8 7 6 を含むか位置 F 8 7 6 にまたがる A R またはその一部をコードすることができる核酸、または A R またはその一部をコードする核酸に対して相補的である核酸の配列決定法に関する。

50

【0221】

様々な態様において、ARの位置876のアミノ酸がフェニルアラニン（F）であるかを決定する方法としては、これらに限定されるわけではないが、とりわけ、AR（F876）に対して特異的な〔例えば、AR（F876）に結合するかもしれない認識するが、WT ARに対してはしない〕抗体またはその断片もしくはバリエーションの使用が挙げられる。様々な態様において、本開示は、（例えば、患者からの）試料においてAR（F876）発現を検出する方法であって、（a）抗体／AR（F876）複合体の形成を可能にする条件下およびそれに十分な時間において、試料を上記において説明したような抗体もしくはその抗原結合性断片に接触させる工程；および（b）抗体／AR（F876）複合体のレベルを検出する工程を含む方法を提供する。

10

【0222】

様々な態様において、ARの位置876のアミノ酸がフェニルアラニン（F）であるかを決定する方法としては、これらに限定されるわけではないが、とりわけ、AR（F876）に対して特異的な〔例えば、AR（F876）に結合するかもしれない認識するが、WT ARに対してはしない〕核酸の使用が挙げられる。

【0223】

さらなる他の態様内において、本開示は、（a）試料を、AR（F876）に対して特異的な核酸またはその断片もしくはバリエーションに、ある条件下および試料中の核酸と当該核酸とのハイブリダイゼーションを可能にする十分な時間において接触させる工程；および（b）ハイブリダイゼーションのレベルを検出する工程を含む、試料においてAR（F876）発現を検出する方法を提供する。

20

【0224】

ポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドにハイブリダイズする、試料中のAR（F876）アンチセンスポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの量は、例えば、配列決定法、ポリメラーゼ連鎖反応、またはハイブリダイゼーションアッセイを使用して決定され得る。

【0225】

AR（F876）活性を調整する薬剤に細胞を接触させる工程を含む、細胞における増殖反応を調整する方法も提供する。

【0226】

さらなる態様内において、AR（F876）活性を調整する薬剤に細胞を接触させる工程を含む、細胞の分化を調整するための方法が提供される。

30

【0227】

本開示はさらに、AR（F876）活性を調整する薬剤に細胞を接触させる工程を含む、細胞生存を調整する方法も提供する。

【0228】

したがって、様々な態様において、本開示は、AR（F876）を検出する、およびこのポリペプチドを発現するもしくは発現しない患者を層別化する、様々な方法に関する。

【0229】

様々な態様において、ARの位置876のアミノ酸がフェニルアラニン（F）であるかを決定する方法としては、これらに限定されるわけではないが、とりわけ、核酸配列決定法（例えば、DNA配列決定法、RNA-seq、タンパク質配列決定法、全トランスクリプトーム配列決定法、または当技術分野において既知の他の方法）の使用、またはAR（F876）に特異的な抗体もしくは核酸の使用が挙げられる。配列決定法に関連する様々な参考文献については、Morin et al. Nature 476: 298-303 (2011); Kridel et al. Blood 119: 1963-1971 (2012); Ren et al. Cell Res. 22: 806-821 (2012)、およびそれらの中で引用されている参考文献を参照されたい。

40

【0230】

簡潔に言えば、患者からの試料が特定の変異を有するARを含むか否かを決定するために、様々な方法が利用可能である。これらの様々な変異は、患者の層別化にとって、なら

50

びに処置レジメンの設計にとって有用である。

【0231】

新規の臨床的に関連する F 8 7 6 の A R 変異はさらに、この変異を含む A R ポリペプチド、これらのポリペプチドに対する抗体、およびそれらをコードするポリヌクレオチドを使用して、新しい治療法を開発またはスクリーニングすることができるという点においても有用である。

【0232】

新規の治療法の開発およびスクリーニングするための A R (F 8 7 6) の使用

位置 F 8 7 6 の変異は、A R を、M D V 3 1 0 0 に対して耐性にし、さらには、この薬物に対してアンタゴニストからアゴニストへの切り替えも引き起こす。したがって、A R (F 8 7 6) と相互作用し、A R のそのような変異を有する A R 関連疾患の患者の処置にとって有用である、新規の治療法が必要とされている。

【0233】

本開示はさらに、他の態様内において、A R (F 8 7 6) と相互作用する能力について分子（例えば、潜在的治療法）をスクリーニングする方法であって、（a）ある条件下において、候補の分子と A R (F 8 7 6) ポリペプチドとが相互作用することができる十分な時間において、当該候補の分子をポリペプチドと接触させる工程；ならびに（b）候補の分子の、当該ポリペプチドへの結合の存在もしくは不在および／または当該ポリペプチドと相互作用する能力、またはポリペプチドの少なくとも1つの活性を減じる能力を検出する工程を含む方法を提供する。検出工程は、例えば、A R (F 8 7 6) および A R レポーター（例えば、A R E [W T または A T (F 8 7 6) が結合している D N A 配列] を含むポリヌクレオチドなど）、プロモーター、ならびにレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ）の使用を含み得る。検出工程は、例えば、候補の分子が、A R レポーターから発現を駆動する A R (F 8 7 6) の能力を妨げるかもしくは低下させるか否かを決定する工程を含み得る。検出工程は、例えば、アフィニティー精製工程、酵母ツーハイブリッドスクリーニング法、またはファージディスプレイライブラリーのスクリーニング法を含み得る。

【0234】

いくつかの態様において、新規の治療法をスクリーニングする方法は、A R (F 8 7 6) ポリペプチドまたは、位置 8 7 6 のアミノ酸を含むかまたは当該アミノ酸にまたがるその断片もしくはバリエーションの使用を伴う。このポリペプチドは、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからの発現を含めた、当該技術分野において既知の任意の方法において産生することができる。

【0235】

本開示は、A R (F 8 7 6) ポリペプチドを産生する方法も包含する。

【0236】

本開示はさらに、他の態様内において、A R (F 8 7 6) ポリペプチドを産生する方法であって、（a）上記において説明したような宿主細胞を、A R (F 8 7 6) ポリペプチドの発現が可能な条件下において培養する工程；および（b）宿主細胞培養物から A R (F 8 7 6) ポリペプチドを単離する工程を含む方法も提供する。

【0237】

この変異体 A R に感作する薬物のスクリーニングにおいて変異体 A R (F 8 7 6) を使用するための多くの方法を、容易に考案することができる。

【0238】

本開示が適用した2つの方法は、1）トランス活性化、および2）A R 経路を標的とする化合物が変異体 A R の機能の阻害剤として使用することができるかどうかを決定するための遺伝子発現分析、を含む。両方の方法は、方法のセクションにおいて明確に概説されている。一方の方法は、実施例7において詳述される。

【0239】

簡潔に言えば、対照溶媒（例えば、D M S O など）、関心対象のアゴニスト、または関

10

20

30

40

50

心対象のアンタゴニストによる処置の前に、トランス活性化アッセイの場合、ARレポーター、コントロールプラスミド、およびWTもしくは変異体AR (F876) プラスミドを同時トランスフェクトする。ARレポーターは、例えば、ARE (ARが結合するアンドロゲン応答要素配列)、プロモーター、およびルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を含む。処置後、レポーター遺伝子 (例えば、バイオルミネセンス) の産生物を定量する。WT ARは、アゴニスト (例えば、R1881) の存在下においてARレポーターを活性化し、シグナルは、アンタゴニスト、例えば、MDV3100などの存在下において十分に抑制されるはずであることが予想される。しかしながら、AR (F876) の場合、アゴニストおよびアンタゴニスト、例えば、MDV3100などの存在下でのARレポーター活性が十分に活性化されることが予想される。理想的な新規のアンタゴニストは、

10

【0240】

トランス活性化アッセイに加えて、カノニカルAR遺伝子、例えば、KLK3、TMPRSS2、NKX3-1、およびSLC45A3などの遺伝子発現分析もモニターすることができる。この実験は、MDV3100が新規の化合物で置き換えられ得ることを除いて、本明細書の他の場所で概説された実験と同じである。シグナリングをレスキューするアゴニストとしてMDV3100を使用することができるが、新規の化合物は、F876L-AR保有細胞でのシグナリング活性の抑制を維持するために有効であり得ることが予想される。

【0241】

したがって、AR (F876) は、この変異体ARに影響を及ぼす新規の薬物および治療法をスクリーニングするために使用されてきたし、使用することができる。

20

【0242】

AR (F876) に対する抗体

AR (F876) に対して特異的に結合するがF876に変異のないAR (したがって、位置876にフェニルアラニンを含むAR、断片、もしくはバリエーション) には結合しない抗体を開発することができる。

【0243】

用語「抗体」は、少なくとも1種の免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質を意味する。例えば、抗体は、重(H)鎖可変領域 (本明細書ではVHとして省略される) と、軽(L)鎖可変領域 (本明細書ではVLとして省略される) とを含み得る。別の実施例において、抗体は、2つの重(H)鎖可変領域と2つの軽(L)鎖可変領域とを含む。用語「抗体」は、抗体の抗原結合性断片 (例えば、単鎖抗体、FabおよびsFab断片、F(ab')₂、Fd断片、Fv断片、scFv、およびドメイン抗体(dAb)断片 (de Wildt et al., Eur J. Immunol. 1996; 26 (3):629-39)、ならびに完全抗体を包含する。抗体は、IgA、IgG、IgE、IgD、IgM (ならびにそれらのサブタイプ) の構造的特徴を有し得る。抗体は、任意の供給源由来であり得るが、霊長類 (ヒトおよび非ヒト霊長類) 抗体および霊長類化抗体が好ましい。

30

【0244】

VHおよびVL領域はさらに、「フレームワーク領域」(「FR」) と呼ばれるより変異の少ない領域が散在する、「相補性決定領域」(「CDR」) と呼ばれる超変異性領域にさらに分けることができる。フレームワーク領域およびCDRの程度は、正確に定義されている (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, および Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917、を参照されたい、さらに www.hgmp.mrc.ac.uk も参照されたい)。本明細書ではKabatの定義を使用する。各VHおよびVLは、典型的には、以下の順序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4、においてアミノ末端からカルボキシ末端まで整列された、3つのCDRと4つのFRで構成される。

40

50

【0245】

抗体のVHまたはVL鎖はさらに、重鎖または軽鎖定常領域の全てもしくは一部を含み得、それにより、それぞれ、免疫グロブリン重鎖または免疫グロブリン軽鎖を形成する。一実施形態において、当該抗体は、2つの免疫グロブリン重鎖と2つの免疫グロブリン軽鎖とによる四量体であり、この場合、当該免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖は、例えばジスルフィド結合などによって内部連結される。IgGにおいて、重鎖定常領域は、3つの免疫グロブリンドメインのCH1、CH2、およびCH3を含む。軽鎖定常領域はCLドメインを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、典型的には、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1成分（C1q）を含む、宿主組織もしくは宿主因子への抗体の結合を媒介する。免疫グロブリンの軽鎖は、タイプκまたはタイプλであり得る。一実施形態において、抗体はグリコシル化されている。抗体は、抗体依存性細胞毒性および／または補体媒介性細胞毒性に対して機能的であり得る。

10

【0246】

抗体の1つまたは複数の領域は、ヒト由来または実質的にヒト由来であり得る。例えば、可変領域の1つまたは複数のヒト由来または実質的にヒト由来であり得る。例えば、CDRの1つまたは複数のヒト由来、例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、およびLC CDR3など、であり得る。各軽鎖CDRは、ヒト由来であり得る。HC CDR3は、ヒト由来であり得る。フレームワーク領域の1つまたは複数のヒト由来、例えば、HCまたはLCのFR1、FR2、FR3、およびFR4など、であり得る。例えば、Fc領域は、ヒト由来であり得る。一実施形態において、すべてのフレームワーク領域は、ヒト由来、例えば、ヒト体細胞由来、例えば、免疫グロブリンを産生する造血細胞または非造血細胞など、であり得る。一実施形態において、ヒト配列は、例えば、生殖細胞系核酸によってコードされる、生殖細胞系配列である。一実施形態において、選択されたFabのフレームワーク（FR）残基は、ほとんど同様の霊長類生殖細胞系遺伝子、特にヒト生殖細胞系遺伝子、において、アミノ酸タイプの対応する残基へと変換され得る。定常領域の1つまたは複数のヒト由来または実質的にヒト由来であり得る。例えば、免疫グロブリン可変ドメインの少なくとも70、75、80、85、90、92、95、98、または100%、定常領域、定常ドメイン（CH1、CH2、CH3、CL1）、または抗体全体は、ヒト由来、または実質的にヒト由来であり得る。

20

30

【0247】

抗体の全体もしくは一部は、免疫グロブリン遺伝子またはそのセグメントによってコードされ得る。例示的ヒト免疫グロブリン遺伝子としては、κ、λ、α（IgA1およびIgA2）、γ（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、δ、ε、およびμ定常領域遺伝子、ならびに、多くの免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。全長免疫グロブリン「軽鎖」（約25KDaまたは約214のアミノ酸）は、NH2-末端における可変領域遺伝子（約110のアミノ酸）によって、およびCOOH-末端におけるκもしくはλ定常領域遺伝子によってコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」（約50KDaまたは約446のアミノ酸）は、同様に、可変領域遺伝子（約116のアミノ酸）によって、および他の前述の定常領域遺伝子、例えば、γ（約330のアミノ酸をコードする）によってコードされる。HC CDR3が約3つのアミノ酸残基から35を超えるアミノ酸残基まで変わるため、ヒトHCの長さは少なからず変わる。

40

【0248】

したがって、抗体、小分子、AR（F876）を特異的に標的化するsiRNAは、AR（F876）を使用して考案することができる。

【0249】

AR（F876）ポリヌクレオチド

本開示はさらに、AR（F876）ポリヌクレオチドにも関する。これらのポリヌクレオチドは、AR（F876）ポリペプチドをコード（例えば、発現）するために使用する

50

ことができ、または治療的核酸（例えば、AR（F876）に対する siRNA など）に組み入れることができる。

【0250】

一態様において、本開示は、配列番号54の配列を有し、かつ／または位置876を含む、配列番号54の少なくとも5個の連続するアミノ酸をコードする配列に対して検出可能にハイブリダイズすることができる、少なくとも15個の連続するヌクレオチド（0、1つ、2つ、または3つのミスマッチを含む）を含むポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドであって、位置876のアミノ酸が、フェニルアラニン（F）以外のアミノ酸であり、ハイブリダイゼーションが洗浄を含む条件下である、ポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドを提供する。そのようなポリヌクレオチドは、細胞または組織または患者内のAR（F876）ポリヌクレオチドの存在を検出するために、あるいはAR（F876）に対する治療的核酸を産生するために、有用であり得る。さらに、前述のポリヌクレオチドのいずれかを含む発現ベクターならびにそのような発現ベクターによってトランスフォームもしくはトランスフェクトされる宿主細胞も提供する。

10

【0251】

本開示の別の実施形態は、単離アンドロゲンレセプターポリヌクレオチドを提供し、この場合、当該単離ポリヌクレオチドもしくはその相補体は、配列番号2の少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個の連続するアミノ酸をコードし、当該少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個の連続するアミノ酸は、配列番号2の位置876を含むかもしくは位置876にまたがり、ならびに位置876のアミノ酸はフェニルアラニン（F）ではなく、任意により、位置877のアミノ酸はトレオニン（T）ではなく、874のアミノ酸はヒスチジン（H）ではなく、位置715のアミノ酸はバリン（V）ではなく、かつ／または位置741のアミノ酸はトリプトファン（W）ではない。

20

【0252】

本開示の別の実施形態は、上記において説明したような単離アンドロゲンレセプターポリヌクレオチドを含む発現構築物（または発現ベクター）を提供する。

【0253】

本開示の別の実施形態は、上記において説明したような単離アンドロゲンレセプターポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。

30

【0254】

本開示の別の実施形態は、プロモーター、および上記において説明されるような任意の単離アンドロゲンレセプターポリヌクレオチドを含む構築物を含む宿主細胞を提供する。

【0255】

本開示の別の実施形態は、コードされた変異体アンドロゲンレセプターが配列番号2の位置876にロイシン（L）を含有することを除いて配列番号2のアミノ酸配列を含む変異体アンドロゲンレセプターをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0256】

本開示の別の態様は、プロモーター；および変異体アンドロゲンレセプターまたはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む構築物であって、アンドロゲンレセプターのアミノ酸配列が配列番号2に示され、当該配列が、位置876のアミノ酸がフェニルアラニン（F）ではなく、任意により、位置877のアミノ酸がトレオニン（T）ではなく、874のアミノ酸がヒスチジン（H）ではなく、位置715のアミノ酸がバリン（V）ではなく、かつ／または位置741のアミノ酸がトリプトファン（W）ではないような、配列番号2のアミノ酸位置876における変異を含有し、当該断片の配列が、配列番号2の少なくとも5個の連続するアミノ酸を含みかつ位置876を含み、当該ポリヌクレオチドセグメントが、プロモーターの下流に位置し、ポリヌクレオチドセグメントの転写がプロモーターにおいて開始される、構築物を提供する。

40

【0257】

本開示の別の実施形態は、単離ポリヌクレオチドを提供し、この場合、当該単離ポリヌ

50

クレオチドもしくはその相補体は、配列番号 54 の少なくとも 10 個の連続するアミノ酸をコードし、当該少なくとも 10 個の連続するアミノ酸が配列番号 54 の位置 876 を含み、位置 876 のアミノ酸は、置換されているかまたは欠失しており、またはフェニルアラニン (F) ではない。

【0258】

本開示の別の実施形態は、単離ポリヌクレオチドを提供し、この場合、当該単離ポリヌクレオチドもしくはその相補体は、配列番号 54 の少なくとも 15 個の連続するアミノ酸をコードし、当該少なくとも 15 個の連続するアミノ酸が配列番号 54 の位置 876 を含み、位置 876 のアミノ酸は、置換されているかまたは欠失しており、またはフェニルアラニン (F) ではない。

10

【0259】

本開示の別の実施形態は、単離ポリヌクレオチドを提供し、この場合、当該単離ポリヌクレオチドもしくはその相補体は、配列番号 54 の少なくとも 20 個の連続するアミノ酸をコードし、当該少なくとも 20 個の連続するアミノ酸が配列番号 54 の位置 876 を含み、位置 876 のアミノ酸は、置換されているかまたは欠失しており、またはフェニルアラニン (F) ではない。

【0260】

本開示の別の実施形態は、上記において説明したような任意の単離ポリヌクレオチドを含む発現構築物を提供する。

【0261】

20

本開示の別の実施形態は、上記において説明されるような任意の単離ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。

【0262】

本開示の別の実施形態は、プロモーター、および上記において説明されるような任意のポリヌクレオチドを含む構築物を含む宿主細胞を提供する。

【0263】

本開示の別の実施形態は、変異体アンドロゲンレセプターポリペプチドまたはその断片をコードする単離ポリヌクレオチドであって、当該アンドロゲンレセプターのアミノ酸配列が配列番号 54 に示され、当該配列が、位置 876 におけるアミノ酸が置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン (F) ではないような、配列番号 54 のアミノ酸位置 876 における変異を含有し、当該断片の配列が、配列番号 54 の少なくとも 5 個の連続するアミノ酸を含みかつ位置 876 を含む、単離ポリヌクレオチドを提供する。

30

【0264】

本開示の別の実施形態は、コードされた変異体アンドロゲンレセプタータンパク質が配列番号 54 の位置 876 にロイシン (L) を含有することを除いて配列番号 54 のアミノ酸配列を含む変異体アンドロゲンレセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0265】

したがって、様々な態様において、本開示は、AR (F876) またはその断片もしくはバリエーションをコードするポリヌクレオチドに関する。下記において、本開示は、この変異に関係するさらに詳細な実験データを提示する。

40

【0266】

F876 変異を有するアンドロゲンレセプター

本開示の目的は、前立腺疾患（例えば、去勢抵抗性 Pca (CRPC)）を含む前立腺がん (Pca) などの診断、予後診断、および処置するためのツールおよび方法を提供することである。本開示のこれらおよび他の目的は、下記において説明される 1 つまたは複数の実施形態によって提供される。

【0267】

様々な態様において、本開示は、位置 876 を含むアンドロゲンレセプターまたはその

50

断片を含むポリペプチドもしくは同様のものであるAR (F876)であって、位置876のアミノ酸がフェニルアラニン (F) 以外のアミノ酸である、AR (F876)に関する。いくつかの態様において、位置876のアミノ酸は、ロイシン (L) である。様々な態様において、当該AR (F876) ポリペプチドは、任意により、位置877のアミノ酸がトレオニン (T) ではなく、874のアミノ酸がヒスチジン (H) ではなく、位置715のアミノ酸がバリン (V) ではなく、かつ／または位置741のアミノ酸がトリプトファン (W) ではないような、他の位置における変異を含む。さらなる態様において、本開示は、アンドロゲンレセプターあるいは位置741および877を含むその断片を含むポリペプチドもしくは同様のものであるAR (W741/T877)であって、位置741のアミノ酸がトリプトファン (W) ではなく、位置877のアミノ酸がトレオニン (T) ではない、AR (W741/T877)に関する。

10

【0268】

様々な態様において、本開示は、患者におけるAR (W741/T877) 発現を検出する方法であって、患者におけるアンドロゲンレセプターまたはその断片の位置741および877のアミノ酸が、それぞれ、トリプトファン (W) およびトレオニン (T) であるか否かを決定する工程を含む方法を提供する。様々な態様において、当該方法はさらに、(a) 位置741および877のアミノ酸がそれぞれトリプトファン (W) およびトレオニン (T) である場合にはビカルタミドもしくはMDV3100；または(b) 位置741および877のアミノ酸がそれぞれトリプトファン (W) およびトレオニン (T) でない場合にビカルタミドもしくはMDV3100以外の前立腺疾患処置の投与を推奨する工程および／またはそれを患者に投与する工程を含む。

20

【0269】

本開示は、MDV3100に対するアンタゴニストからアゴニストへの切り替えとしての、ARにおけるF876L/T877A変異を同定するため、およびその役割を機能的に確認するために、LNCaPモデル (ビカルタミドに対する耐性を付与する臨床的に関連するW741C変異を同定するために、以前に使用したモデル [Hara et al. Cancer Res. 63: 149-153 (2003)]) を利用する。遺伝子発現および表現型分析により、本開示は、ビカルタミドに対して感受性が維持されるので、ARにおけるF876L/T877A変異体によって付与されるアゴニスト切り替えが、MDV3100に対して高度に選択的であることを示す。このことは、この変異 (既存であるかまたは治療法に対する反応において獲得された) を示す患者は、MDV3100による処置の際は疾患の急速な臨床的進行を示すであろうが、ビカルタミドに対して有利に、または他のクラスの抗アンドロゲン剤に対しては潜在的に、反応し得ることを暗に意味するであろう。この変異を同定するために患者をスクリーニングすることは、治療前または耐性の発症後のいずれかにおいて、薬物の感受性の予測において役立ち、代替の臨床管理戦略を導くであろう。

30

【実施例】

【0270】

実施例1 材料および方法

方法

細胞培養

40

LNCaP-FGCおよびPC3細胞を、示されたように10%のFCS (HyClone) または10%のCSS (Omega、カタログ# fb-04) を含むRPMI 1640培地において継代させた。22Rv1細胞を、10%のFCSを含むRPMI 1640培地において継代させた。VCaP細胞を、10%のFCSまたは10%のCSSを含むDMEM培地において継代させた。Myc-CaP細胞を、10%のFCSを含むDMEM培地において継代させた。293FT細胞を、10%のFCSおよび1×NEAAを補ったDMEMにおいて継代させた。Myc-CaP細胞を除く全ての株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) から入手し、細胞は、単一ヌクレオチド多型フィンガープリントによって試験され認証された。親切にも、Myc-CaP細胞は、Charles

50

Sawyers 博士によって提供され、さらなる試験もしくは認証は行っていない。

【0271】

インビトロでのMDV3100自然耐性LNCaPクローンの発生

200万のLNCaP細胞を、10%のFCSを補ったフェノールレッド不含のRPMI 1640培地の4つの150cm²の組織培養皿に播種した。翌日、それぞれ、DM SOおよびエタノール（対照1、C1）、DMSOおよび1.0nMのR1881（対照2、C2）、1μMのMDV+1.0nMのR1881（対照3、C3）、および1μM MDV3100を、皿1から4にそれぞれ加えた。1週間に1度、適切な処理によって補った150cm²皿に細胞を再播種した。毎週、皿4に対して培地および化合物を取り替えた。耐性クローンが出現すると、皿4から培地を吸引した。トリプシンを含浸させた3mmの無菌クロニングディスク（Scienceware、カタログ# 17-2.X）を使用して、耐性クローンに重ね、1～2分間のインキュベート後、クロニングディスクを、10%のFCSおよびMDV3100を補ったフェノールレッド不含のRPMI 1640培地を有する24ウェルプレートに移した。耐性クローンが出現するまで継代した対照皿1～3からの細胞を、対照細胞株および実験細胞株に対して一定の培養期間維持するために凍結保存した。

10

【0272】

安定した形質導入株の発生

WTまたは変異体ARをコードするコドン最適化cDNAを合成し（DNA2.0）、pLKO-TREX-HA-Neo（Invitrogen）にサブクロニングした。1:2.5:1.25の比率のVSVG:deltaR8.9:cDNA構築物を293FT細胞にトランスフェクトすることによってレンチウイルスを作成した。トランスフェクトの2～3日後にウイルスを収穫し、ろ過して、8μg/mlのポリブレンの存在下においてLNCaP、MyC-CaP、およびVCaP細胞培養物に感染させるために使用した。感染した細胞を、3週間ネオマイシンにおいて継代した。全例において、少なくとも1000の非依存性クローンを、クロンバリエーションを避けて安定な細胞株を発生させるためにプールした。並行して、実験対照として使用するために、対照ベクターに感染させた安定な細胞株を発生させた。

20

【0273】

マイクロアレイ

3×10⁵の細胞を6ウェルプレートに播種し、2～3日後にDMSOまたは10μMのMDV3100で24時間処理した。Qiagen RNeasyキットを使用して細胞から全RNAを単離した。Bioanalyzer 2100（Agilent Technologies）においてRNA 6000 Nano LabChipシステムにより、RNAの完全性および純度を評価した。前に説明したような標準的プロトコルを使用して、標識化されたcDNAの発生およびAffymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array（Affymetrix Inc.）へのハイブリダイゼーションを実施した（8）。

30

【0274】

発現分析

アフィメトリクス遺伝子発現データセットからのプローブセットを、150のトリミングした平均目標によりMAS5を使用して正規化し、Log2-形質転換させた。次いで、様々な試料でのそれらの最大値が少なくとも5である場合に限り含ませるように、プローブセットをフィルターにかけた。共変量として0～1のインジケータ変数を使用して最小2乗法を実施し；1つのインジケータは、各クロンのベースライン（未処理試料）を表すために使用し、3つのインジケータ変数は、試料の各クラス（対照、弱耐性クロン、および強耐性クロン）に対するMDV3100による処理を表した。この回帰を使用して、名目p値および回帰係数（すなわち、倍率変化）を得た。個々のプローブセットは、それらの倍率変化が≥1.5の場合に、名目p値≤0.05において、有意差的に発現したと見なした。

40

50

【0275】

遺伝子セット強化の分析

A R 遺伝子シグネチャーの間の相関 (30) を、M D V-3100 による処理について上位の遺伝子と比較した。青色の線は、発現したプローブセットの位置を表しており、平均倍率変化によってランク付けし；少なくとも1つの試料において少なくとも32のMA S 5-150レベルで発現したプローブセットのみを含ませた。赤色の線は、A R 遺伝子シグネチャーにおける遺伝子へのプローブセットのマッピングが、我々のデータセットに現れる場所を表し、灰色の線は、名目有意に達しないプローブセットを表し、より高い赤色の線は、少なくとも1.5の倍率変化および0.05未満の名目p値のプローブセットを表している。黒色の曲線は、A R 遺伝子シグネチャーにおけるプローブセットの累積和を表し、点線は、強化されていない遺伝子の無作為リストに対する仮定的累積和を表す。

10

【0276】

パスウェイ強化のスコア

候補シグネチャー (30) に対して、これらのシグネチャーで遺伝子を表すプローブセットが、発現はしたが示差的でなかったプローブセットと比べて、少なくとも1.5倍以上もしくは下方制御したプローブセットのセットに対して出現頻度が低いかまたは高いかを0.05以下の名目p値において決定するために両側フィッシャー直接検定を行った。バイアスのかからないアプローチの場合、GOタームおよび転写因子ネットワークに由来するパスウェイを、アレイ上に表された全ての遺伝子と比べて0.05以下の名目p値において1.5倍以上変わる遺伝子を使用して、片側補間フィッシャー直接検定により過剰表現について分析し；次いで、これらのp値にBenjamin-Hochberg (BH) 補正を適用した (8)。

20

【0277】

サンガー配列決定法

ゲノムDNAは、Blood and Tissue DNAeasyキット (Qiagen、カタログ# 69581) を使用して、製造元の指示に従って様々な1μMのMDV耐性クローンおよび適切な対照株から単離した。プライマーを使用してエキソン8を増幅し (F876L変異の部位) (前方: 5'-ATTGCGAGAGAGCTGCATCA-3' (配列番号55) ; 後方: 5'TTCTCTGTCACCTATTGGCCCTC-3' (配列番号56)) ; 増幅されたcDNAを、同じプライマーを使用してGenewizによって配列決定した。F876L変異の存在を確認するために、トレースファイル进行分析した。

30

【0278】

定量的リアルタイムPCR

自然発生クローンについて: 200kの細胞を、10%のFCSを補ったRPMI 1640に6ウェルプレートに播種し、その2日後に様々な化合物で24時間処理した。あるいは、アンドロゲン枯渇に関連する実験のために、200kの細胞を10%のFCSを補ったフェノール不含のRPMI 1640において6ウェルプレートに播種し、2日間培養した。培地を吸引し、10%のCSSを補ったフェノールレッド不含のRPMI 1640で交換し、3~4日後に様々な化合物で24時間処理した。十分なトランスジェン発現を可能にするために、様々な化合物で処理する少なくとも2日前に細胞をDoxで前処理したことを除いて、同様のプロトコルを遺伝子組み換え株に適用した。RNeasyプラスミニキット (Qiagen、カタログ# 74136) を使用して、製造元の指示に従って全RNAを抽出した。高容量cDNA逆転写キット (Applied Biosystems、カタログ# 4368813) を使用したcDNA合成のために、1~2μgの全RNAを使用した。各試料からのcDNAを、15~20倍に希釈し、ABI 7900HTシリーズPCRマシンにおいて、遺伝子特異的プライマーおよびFastStart Universal Probe Master Mix (Roche) (Roche Applied Science) を使用して、トリプリケートにおいてリアルタイムPCRを実施した。発現レベルは、TBP発現に対して正規化した。全ての分析は、

40

50

S D S 2. 3 ソフトウェアを使用して実施した。以下の遺伝子特異的プライマー (I n v i t r o g e n) を使用した: A R (H s 0 0 1 7 1 1 7 2 _ m 1)、K L K 3 (H s 0 2 5 7 6 3 4 5 _ m 1)、N K X 3 - 1 (H s 0 0 1 7 1 8 3 4 _ m 1)、T M P R S S 2 (H s 0 1 1 2 0 9 6 5 _ m 1)、S L C 4 5 A 3 (H s 0 0 2 6 3 8 3 2 _ m 1)、T B P (H s 0 0 4 2 7 6 2 0 _ m 1)、D H F R (H s 0 0 7 5 8 8 2 2 _ s 1)、および T K 1 (H s 0 1 0 6 2 1 2 5 _ m 1)。

【0279】

インビボでの腫瘍形成アッセイ

マトリゲルと 1 : 1 混合した 1 0 0 0 万の L N C a P 細胞 (C 1、クローン # 1) を、性腺摘除後 7 ~ 8 週間の雄の n u / n u マウスの横腹に皮下注入した。腫瘍保有マウス (腫瘍体積 = 1 5 0 ~ 3 0 0 m m ³) を、ビヒクルまたは 3 0 m g / k g の M D V 3 1 0 0 で毎日処置した。キャリパーを使用して腫瘍を測定し、長さ × 幅² / 2 により腫瘍体積を算出した。データは、平均 ± S E M として表される。全ての動物実験は、ノバルティスバイオメディカル研究所の動物実験委員会 (N o v a r t i s B i o m e d i c a l R e s e a r c h A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e) のプロトコルおよび規定のガイドラインに従って実施した。

10

【0280】

統計分析

結果は、平均 ± S E M (平均値の標準誤差) として報告した。遺伝子発現レベルおよびインビトロでのルシフェラーゼアッセイのエンドポイントを分析するために、等分散性の仮定のない両側独立スチューデント t 検定を実施した。遺伝子セット強化の分析の場合、示された p 値は、全ての他のプローブセットの有意 / 無意に対して、有意性に合格する遺伝子シグネチャーにおけるプローブセットとそうでないものとを比較する両側フィッシャー直接検定に基づいている。動物実験の場合、各群において触知可能な腫瘍が成長したマウスのパーセンテージにおける有意性を決定するために、両側フィッシャー直接検定を実施した。

20

【0281】

受託番号

自然発生株および遺伝子操作された株での M D V 3 1 0 0 対 D M S O での処置における示差的遺伝子発現を分析するために使用した遺伝子発現マイクロアレイデータは、それぞれ、受託番号 G S E 4 4 9 2 4 および G S E 4 4 9 2 7 において遺伝子発現情報データベース (N C B I G e n e E x p r e s s i o n O m n i b u s) に蓄積した。

30

【0282】

さらなる実験手順は、方法に関する補足情報に列挙する。

【0283】

方法に関する補足情報

R N A - S e q 分析

R N A - s e q アライメントは、f a s t q 前処理、アライメントするための共通ゲノム / トランスクリプトーム f a s t a ファイルの生成、ならびに b o w t i e 2 および t o p h a t 1. 3 の修正バージョンによるアライメントからなり、詳細については下記を参照されたい。

40

【0284】

F A S T Q 前処理

3 ' 末端ならびにアダプター配列における低品質塩基をトリミングするために、ペアにしたリードを前処理した。最初に、B W A アルゴリズムを使用して低品質塩基を 3 ' 末端から除去した (すなわち、p h r e d スケーリング品質スコアの合計から結果として得られるリード長の 2 0 倍を差し引いたものを最大にするために、リードをトリミングする)。品質トリミング後にどちらかのリードが 5 0 b p 長未満であるリードペアを除去した。次に、リードペアを相補性についてチェックした。結果として I l l u m i n a アダプター配列の 1 つに一致する 3 ' オーバーハングを生じる相補性は、トリミングされたオーバ

50

ーハングを有していた。相補性が、67bp未満の断片挿入サイズを示した場合、そのリードペアは除去した。

【0285】

結合ゲノム／トランスクリプトームファイルの生成

ゲノム（DNA汚染、無作為転写、またはmRNA前駆体に由来する）およびトランスクリプトームの両方に対してリードを競争的にアライメントするために、多数の統合されたFASTAファイルを作成した。さらに、phiX、rRNA、1000-ゲノム由来の「デコイ」配列、およびRefSeq（1）からのウイルス性（TaxID 10239）核酸配列を表す配列を、統合されたFASTAファイルに含めた。使用したゲノムは、NCBI GRCh37.5であったが、しかしながら、参照における全ての塩基多型は、代替の対立遺伝子がdbSNP137による注釈付きの集団の少なくとも75%においてより一般的である場合に、この対立遺伝子に交換した。トランスクリプトーム配列は、UCSC knownGeneを使用して作成した。上記の配列に追加するために以下の3つのトランスクリプトームFASTAファイルを作成した。

【0286】

（1）使用される最も長いリード長は101のヌクレオチドであるので、各注釈付きの接合部に隣接する100の塩基対が含まれており、この場合、当該隣接部は、100bp長未満のエキシソンの他の接合部に続いていた。したがって、Tophatの第1ステップにおいて、シングルエンドアライメントを実施するバージョンを使用した。

【0287】

（2）典型的には、断片サイズの99番目のパーセンタイルは、500塩基対未満の長さであった。したがって、各注釈付きの接合部に隣接する500塩基対の後に続くバージョンも作成し、この場合、隣接部は、関心対象の転写産物の他の注釈付きの接合部に続いていた。目標FASTAアライメントファイルを最小化するために、オーバーラップする接合部を統合し；例えば、すべてのエキソンが<500bp長である1つのアイソフォームしか持たない遺伝子は、cDNA全体の配列を含む1つのFASTAレコードしか持たないであろう。一方が交互にスプライスされたエキソンを含む、2つのアイソフォームを有する遺伝子は、2つのFASTAレコードを有し；cDNA全体を有する一方は交互にスプライスされたエキソンを含み、1000のヌクレオチド長であるもう一方は、当該エキソンをスプライスアウトした接合部に隣接する500bpを含む。このバージョンは、Bowtie2を使用して、ペア化したエンドアライメントに対して使用した。

【0288】

（3）より長い断片サイズを有する試料の場合、（2）と同じであるが、500bpの隣接部の代わりに1000bpの隣接部を使用する。各接合部に対する配列名は、ゲノム座標に容易にマッピングし戻すことができるように、参照ゲノムにおける含められたヌクレオチドの位置を示していた。これら3つのバージョンのそれぞれは、参照ゲノム+上記に列挙される他の配列に連結され、Bowtie2.0.0-beta7ならびにbowtie0.12.8を使用してインデックス化した。

【0289】

FASTQファイルのアライメント：最初に、FASTQファイルを、bowtie2.0.0-beta7（2）を使用し、以下のパラメータ：

```
bowtie2 -D 18 -R 0 -L 28 -N 1 -i L, 0, . 3
2 --mp 40, 30
--score-min C, -132, 0 --gbar 3 --rdg 80
, 2 --rfg 80, 5 -k 10
-x GRCh37c_knownGene_pe500.juncs
-l read1.fastq.trimmed.txt -l read2.fastq.trimmed.txt
--no-mixed -X 1000 -p 4 -reorder
```

ならびにrg-idおよび様々なrgパラメータを使用してアライメントすることにより

、試料を同定したが、この場合、ファイル `GRCh37c_knownGene_pe500.juncs` は、上記のゲノム／トランスクリプトーム接合ファイルにおける (2) を意味する。

【0290】

マッピングしなかったリード、非依存的に10回(許容される最大値)マッピングしたリード、または最初もしくは最後の2bpにミスマッチを有していたリードは、アライメントしていないと見なし、`Tophat` を使用して再マッピングするために `FASTQ` ファイルにリダイレクトした。全ての他のリードは、ゲノム座標を使用するために編集された `BAM` ファイルを有しており、ならびに、統合されたゲノム／トランスクリプトームファイルの除去によって生じた冗長なマッピングを有していた。

10

【0291】

初期 `Bowtie2` アライメントによってアライメントされていないリードは、`Tophat version 1.3` の修正バージョンによってアライメントした (3)。修正は、主に、示されたハイブリッドゲノム／トランスクリプトーム `fasta` ファイル(上記からの (1)) をトランスクリプトームマッピングされたリードの入力および変換として、`tophat` 内のそれらのゲノム位置に戻せるようにする。可能な単一アライメントから最良のペア化したアライメントを選択するための決定ツリープロセスも、反復プロセスにおいて修正し、塩基ペアのミスマッチの数の低減を最適化した。マイナーな修正は、全長リードのセグメント化およびセグメントのマッピングのために使用される隣接配列の量に対する修正を含んでいた。`Tophat` を、適切なリードグループパラメータと共に、以下の例示的引数：

20

```
tophat --num-threads=4 -r -34 --mate-std-dev 126 --bwt-index-prefix=GRCh37c
--with-transcriptome-prefix=GRCh37c_knownGene.se.juncs
-G knownGene.refFlat.gtf --library-type fr-unstranded
--segment-length=25 --max-insertion-length 10
--max-deletion-length 10
-F 0.05 -a 12 --microexon-search --no-coverage-search --bowtie-e 45
--segment-mismatches 2 --max-multihits 25
```

30

`bowtie2_unaligned.1.fq.gz` `bowtie2_unaligned.2.fq.gz` を使用して呼び出した。この場合、挿入サイズパラメータ (`-r` および `--mate-std-dev`) は、結合ゲノム／トランスクリプトームへの初期 `bowtie2` マッピングから経験的に推定される。修正された `tophat` 内での初期シングルエンド `bowtie` マッピングは、以下：

```
bowtie -q -e 45 --no-mq-round --sam --sam-no-head -p 4 -k 25 -m 25
GRCh37c_knownGene.se.juncs - < zcat left_kept_reads.fq.gz
```

40

のように呼び出される。

【0292】

次いで、`tophat` からの `bam` アウトプット (`accepted_hits.bam`) を、元の `bowtie2` アライメントからのアウトプットと統合して、単一のアライメントファイルを作成した。ヒトゲノム／トランスクリプトームに対して独特の最良のアライメントを有するリードペアのみを、最終アウトプットアライメントファイルに維持した(すなわち、マルチマッピングされたリード、`rRNA` リード、およびウイルスリード

50

を、後続の分析から排除した)。

【0293】

RNA-Seq 耐性関連の変異の発見

アライメントされたbamファイルを、Picardから入手可能なMarkDuplicatesツールを使用して、重複リードのためにマーキングした。次に、既知の部位としてのdbSNP137ならびに標準共分散およびオプションを使用して、塩基品質再較正のためにGATK v1.5(4)を使用した。バリエントを、GATK v1.5からUnifiedGenotyperを使用して呼び出し、標準クオリティメトリクス、dbSNP137での存在、NHLEIエクソーム配列決定プロジェクト(ESP6500, Exome Variant Server, NHLEI GO Exome Sequencing Project (ESP) (シアトル、WA))、およびCOSMIC v58(5)、ならびにSnpeFF(6)およびSnpeFFから利用可能なアンサンブル転写データベースGRCh37.68を使用する機能について注釈付けした。

【0294】

次いで、全ての試料において一貫していた変異を除去した。UnifiedGenotyperからアウトプットされた事後尤度スコアを、各バリエントに対する各遺伝子型(ホモ接合型参照、ヘテロ接合型、およびホモ接合型代替)に対して、全ての試料について合計し;3つの合計スコアの最小値は、バリエントあたりのphredスケール値の不一致の限度を表しており;100未満の不一致を有するバリエントは、ホモ接合性の試行において生じたバリエント、またはホモ接合型参照と呼ばれる試料の代替対立遺伝子の証拠(>10%)を示したバリエント、または平均して20%未満の、ヘテロ接合型もしくはホモ接合型代替と呼ばれる試料の代替対立遺伝子からのリードを有したバリエントと同様に、さらなる分析から排除した。バリエントが結果としてタンパク質コーディング配列への予測された変化を生じなかった場合にも、そのバリエントを除去した。

【0295】

イムノブロット分析

全細胞溶解物:細胞を、Haltプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤混合物(Thermo Scientific、カタログ# 78440)を含有するTPER緩衝液(Thermo Scientific、カタログ# 78510)に溶解させ、その後、5分間沸騰させた。1レーンあたりおよそ20μgのタンパク質を装入し、SDSポリアクリルアミド電気泳動によって分離させた。タンパク質をニトロセルロース膜に移して、5%の低脂肪乳中でブロックし、ARN-20に対する抗体(1:1000希釈、Santa Cruz、カタログ# Sc-816)、ヒストンH3(1:2000希釈、Cell signaling、カタログ# 9715s)、β-チューブリン(1:1000希釈、Abcam、カタログ# ab6046)、HA-HRP(1:500、Roche、カタログ# 12013819001)、β-アクチン(1:3000希釈、Sigma、カタログ# A-2228)、およびp-AKT(1:1000希釈、Cell Signaling、カタログ# 4060)でプロービングを実施した。膜を、ワサビペルオキシダーゼ(HRP)抱合型抗マウス二次抗体(1:4000希釈、Millipore、カタログ# 12-348)または抗ウサギ二次抗体(1:4000希釈、Pierce、カタログ# 31430)で1時間インキュベートし、ECL法(GE Healthcare)を用いてシグナルを発生させた。

【0296】

細胞核および細胞質のタンパク質分画:自然耐性クローンの場合、100万のC1細胞およびクローン#1細胞を、T75フラスコにおいて、10%のFCSを補ったRPMI 1640培地に播種し、2日間培養した後、DMSO、0.1nMのR1881、または10μMのMDV3100で24時間処理した。遺伝子操作された株の場合、100万のLNCaP由来株を、T75フラスコにおいて、10%のFCSおよび100ng/mlのDox(Sigma、44577-1G)を補ったRPMI 1640培地に播種し

、2日間放置した後、DMSO、0.1 nMのR1881、または10 μMのMDV3100で24時間処理した。あるいは、培地を吸引し、10%のCSSおよび100 ng/mlのDoxを含有するフェノールレッド不含のRPMI 1640培地と取り替えた。10%のCSSにおいて4日間培養した後、DMSOまたは10 μMのMDV3100をフラスコに加えて一晩放置した。翌日、細胞をトリプシンで収穫し、500 x gで5分間遠心分離し、PBSで洗浄し、1.5 mlのマイクロ遠心分離管に移し、500 x gで2～3分間遠心分離することによってペレット化した。製造元の取扱説明書(Thermo Scientific、カタログ# 78833)に従って、細胞質および細胞核タンパク質抽出を実施した。簡潔には、ペレットを500 μlの氷冷Cer I緩衝液中に再懸濁させ、氷上で10分間インキュベートした。インキュベート後、27.5 μlの氷冷Cer I I緩衝液を加え、ボルテックスして、氷上で1分間インキュベートした。溶解物/Cer I/I I混合物を再びボルテックスし、14000 x gで5分間遠心分離し、細胞質抽出物(上清)を予冷却した管に移した。細胞核を含む不溶性のペレットを、250 μlの氷冷NER緩衝液に再懸濁させ、ボルテックスし、氷上に置いた。試料を、40分間にわたって10分毎に15秒間ボルテックスした。インキュベート後、試料を14000 x gで10分間遠心分離した。細胞核抽出物を含む上清を、予冷却した管に移した。これらの試料を、上記において説明したようなイムノブロット分析のために処理した。

【0297】

QuickChangeによる変異誘発

PCRで増幅されたARコード領域を、pcDNA3.1ベクターに挿入した。単一変異体T877A、W741C、W741L、F876L、および二重変異体F876L/T877A発現プラスミドを、以下のプライマーセットにより、QuickChange XL部位特異的変異誘発キット(QuickChange XL site-directed mutagenesis kit)(Agilent、カタログ# 200517-5)を使用した部位特異的変異誘発によって産生した。

【0298】

【化9】

(5'-

GAGAGCTGCATCAGTTCGCTTTTGACCTGCTAATC-3' (配列番号 58) および 5'-

GATTAGCAGGTCAAAAGCGAACTGATGCAGCTCTC-3' (配列番号 59), 5'-

CATTCAGTACTCCTGCATGGGGCTCATGGTG-3' (配列番号 60) および 5'-

CACCATGAGCCCCATGCAGGAGTACTGAATG-3' (配列番号 61), 5'-

GTCATTGAGTACTCCCTGATGGGGCTCATGG-3' (配列番号 62) および 5'-

CCATGAGCCCCATCAGGGAGTACTGAATGAC-3' (配列番号 63), 5'-

GAGAGCTGCATCAGCTCACTTTTGACCTG-3' (配列番号 64) および 5'-

CAGGTCAAAAGTGAGCTGATGCAGCTCTC-3' (配列番号 65), 5'-

GAGAGCTGCATCAGCTCGCTTTTGACCTG-3' (配列番号 66) および 5'-

CAGGTCAAAAGCGAGCTGATGCAGCTCTC-3' (配列番号 67))

【0299】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

以下のようにレポーターアッセイを実施した。 3×10^5 のHEK293T細胞を、6ウェルプレートにおいて、10%のFCSおよび 1×10^6 のVCaP細胞または 3×10^5 のPC3細胞を、6ウェルプレートにおいて、10%のCSSを補った適切な培地に播種し、24時間後にトランスフェクトした。翌日、400 ngのARホタルレポータープラスミド（4×ARE-ルシフェラーゼ）、100 ngのコントロールプラスミド（構成型ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド）、および上記において説明した200 ngのAR過剰発現pcDNAプラスミドを、Lipofectamine 2000（Invitrogen、カタログ# 11668027）を使用して同時トランスフェクトした。トランスフェクトの6時間後に、培地を、DMSO、0.1 nMのR1881、10 μ MのMDV3100、10 μ Mのビカルタミド、10 μ MのMDV3100+0.1 nMのR1881、および10 μ Mのビカルタミド+0.1 nMのR1881を含む新鮮な培地と取り替えた。処理の約16時間後に細胞を収集し、GloMax 96マイクロプレートルミノメーター（Promega）を使用してルシフェラーゼ活性についてアッセイした。ホタル活性は、Dual Luciferase Assay試薬（Promega、E1910）を使用してウミシイタケに対して正規化した。全ての実験を少なくとも3回実施した。

10

【0300】

細胞成長アッセイ

LNCaP細胞

20

短期間マイクロタイタープレートアッセイ：1000の細胞（自然耐性株または遺伝子操作された株）を、10%のFCSを補った培地に播種した。自然耐性クローンの場合、播種の日、漸増する濃度の化合物を加え、その一方で、遺伝子操作された株の場合、ドキシサイクリン処理の2日後に化合物を加えた。全ての場合において、化合物処理の7日後に、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Reagent（Promega、カタログ# G7573）を使用して、成長アッセイを実施した。

【0301】

長期間コロニー形成アッセイ：5000～7500細胞（自然耐性株または遺伝子操作された株）を、6ウェルプレートにおいて、10%のFCSを補った培地に播種した。自然耐性クローンの場合、播種の日MDV3100をプレートに加え、培地／化合物を毎週取り替えた。遺伝子操作された株の場合、播種の日ドキシサイクリンを加え、2日後に、様々な濃度の化合物（MDV3100／ビカルタミド）を加えた。自然耐性株と同様に、培地／dox／化合物を毎週取り替えた。3～4週間の培養後に、生存可能なコロニーを染色した。培地を吸引した後、0.5%のクリスタルバイオレットをウェルに加え、一晩放置した。翌朝、クリスタルバイオレット溶液を除去し、ウェルを注意深くddH₂Oで洗浄して、残留する染色溶液を除去した。プレートを一晩風乾した後、写真を撮影した。

30

【0302】

VCaP細胞

40

AR-T877AまたはAR-F876L／T877Aのいずれかを発現するVCaP細胞を、6ウェルプレートにおいて、10%のFCSを補ったDMEMに500,000細胞／ウェルにおいて播種した。ドキシサイクリンを使用してARプラスミドの発現を誘導し、2日後にDMSOまたは10 μ MのMDV3100を加えた。化合物処理の8日後に、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Reagent（Promega、カタログ# G7573）を使用して、成長アッセイを実施した。データを0日目（化合物を投与した日）と比較した。

【0303】

Myc-CaP細胞

AR-T877Aまたは-F876L／T877Aのいずれかを保有するMyc-Ca

50

P細胞を、6ウェルプレートにおいて、10%のFCSを補ったDMEMに100細胞／ウェルにおいて播種した。0.2 μg/mlのドキサイクリンを培地に加えて、ARの発現を誘導した。コロニーが形成されるまで（約2週間）、3日毎に培地を交換した。0.1%のクリスタルバイオレットを使用してコロニーを染色した。

【0304】

22RV1細胞

22RV1細胞を、6ウェルプレートにおいて、10%のFCSを補ったDMEMに5000細胞／ウェルにおいて播種した。細胞を様々な化合物で処理し、14日後に、0.1%のクリスタルバイオレットで染色した。

【0305】

MDV3100自然耐性LNCaP異種移植片の発生

10×10⁶のLNCaP細胞を、性腺摘除した雄のマウスの横腹に皮下移植した。腫瘍が200～300mm³に達したら、ビヒクルまたは30mg/kgのMDV3100による処理を開始した。3～4ヶ月にわたって毎日処理した後、いくつかの腫瘍は、自然発生的に、MDV3100の存在下において成長する能力を獲得した。これらの腫瘍が約1000～1500mm³に達したとき、マウスを犠牲にして腫瘍を採取した。続いて、2種のMDV3100耐性腫瘍からの腫瘍断片（マウス1からの1つの断片およびマウス2からの3つの断片）を、第2のレシピエントに再移植し、MDV3100による処置を再び開始した（R1～R4）。さらに、マウス1および2の両方からの1つの腫瘍断片を、第2のレシピエントに移植して、ビヒクルで処理した（C1～C2）。腫瘍が1000～15000mm³に達したら、全ての腫瘍からRNAを採取し、前に説明したように、全トランスクリプトーム配列決定を実施した。

【0306】

参考文献

【化10】

1. Pruitt KD, Tatusova T, Brown GR, Maglott DR. NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic acids research*. 2012;40(Database issue):D130-5. Epub 2011/11/29.
2. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*. 2012;9(4):357-9. Epub 2012/03/06.
3. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. 2009;25(9):1105-11. Epub 2009/03/18.
4. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics*. 2011;43(5):491-8. Epub 2011/04/12.
5. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):D945-50. Epub 2010/10/19.
6. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*. 2012;6(2):80-92. Epub 2012/06/26.

10

20

30

40

50

【0307】

実施例2 MDV3100に対する自然耐性のモデルの発生および特徴付け

MDV3100に対する耐性の内因性メカニズムを解明するために、本開示は、LNCaP細胞における自然耐性のモデルについて説明する(図1b)。MDV3100による短期間培養(<1.5ヶ月)は、母集団全体の停滞を誘導し(図1a、FCSに対するFCS+MDV)、1μMのMDV3100による長期間培養に対して、いくつかの細胞が免れることができ、結果として、耐性クローンの出現が生じた(図1b)。さらなる特徴付けのために、対照集団(C1~C3、図1b)と同様の成長特性を示した耐性クローンを選択する。短期間CTGベース(図1c)および長期間コロニー形成アッセイにより、部分的耐性表現型を確認した。さらなる特徴付けにより、7つの耐性クローンのうちの4つ(クローン#1、15、19、24-強耐性、緑色の曲線およびフォント)は、MDV3100に対する著しく高い耐性を示すことが明らかとなった(残りの3つのクローン(クローン#9、10、および14-弱耐性、赤色の曲線およびフォント)の<10μMおよび対照の0.2μMと比べて、凝集塊のIC₅₀は>10μMであった)(図1c)。対照的に、弱耐性クローンは、ビカルタミドに対するより高い耐性を示し(強耐性の5μMおよび対照の1μMに対し、IC₅₀は>10μMである)(図1c)、クローンの両方のセットは、対照集団としての関係ない細胞増殖抑制剤Leet011に対して同様の感受性を示した(図6b)。これらのデータは総合的に、単離した耐性クローンが、(MDV3100に対する耐性を特異的に促進するように微調整された強耐性クローンにおける耐性のメカニズムによって)抗アンドロゲン剤に対する耐性を優先的に示すことを示唆している。

10

20

【0308】

耐性のメカニズムを解明するために、最初に、ARの発現レベルを分析し;ARの過剰発現が、アンドロゲンおよび抗アンドロゲンビカルタミドの去勢抵抗性のレベルを促進することが前に示された。Chen et al. Nature Med. 10: 33-39 (2004);およびKawata et al. Prostate 70: 745-754 (2010)。予想外なことに、本開示は、RNAでのAR発現(データは示されていない)およびタンパク質レベル(図1d)において有意な変化を確認できなかった。さらに、AR経路活性のグローバル分析は、いくつかの下流の標的遺伝子を例外として、ベースラインにおいてほとんど変化を示さず(図1e)、ベースラインでのAR経路の有意な調整のないことを繰り返し示唆している。

30

【0309】

実施例3 強耐性クローンはMDV3100によるAR経路調整に対して回復的である

耐性を駆動する分子メカニズムをさらに探求するために、本開示は、DMSOまたはMDV3100で24時間処理した3つの対照および7つの耐性クローンについて、アレイ分析を実施した。予想されるように、本開示は、MDV3100で処理した場合に3つの対照において独特に示差的に発現する多くの遺伝子(約101)(細胞周期およびDNA損傷修復に関連する機能を圧倒的に強化された遺伝子)を見出し、MDV3100の細胞増殖抑制性の影響に対するそれらの感受性を確認した。本開示はさらに、対照および弱耐性クローンにおいて有意な示差的発現のみを示した約191の遺伝子を明らかにした(下方制御された遺伝子が、細胞周期/DNA損傷、ならびに、予想外なことにアンドロゲンレセプター細胞核シグナリング経路、に対して強化される($P = 2.01 \times 10^{-2}$))。この知見は、MDV3100によるアンドロゲン経路の示差的制御に対する最初の兆しを提供するものであり、この場合、強耐性クローンは、調節に対する耐性を明白に示した。これを支持して、クラスタリング(図6a)およびGSEA分析(図2bおよび図9b)の両方は、MDV3100による処理における、対照および弱耐性株でのAR経路活性の低下を確認したが、強耐性クローンでは有意な変化は観察されなかった。これは、qPCR分析によって確認され、強耐性クローンにおいて特異的なAR標的遺伝子KLK3、NKX3-1、およびSLC45A3の発現に対するMDV3100の効果の鈍化も確認した(図2c)。

40

【0310】

50

MDV3100に対する示差的経路反応が、様々なクローンでのARの局在性における変化に対応するか否かを評価するために、本開示は、DMSOまたはMDV3100で処理した対照株（C1）および強耐性株（クローン#1）から細胞質および細胞核タンパク質分画を単離した。細胞核のAR局在性は、MDV3100で処理した対照株ではかなり損なわれるが、その一方で、強耐性クローンでは、AR局在性はほとんど変わらず、これは、強耐性株ではAR経路活性が持続することの説明を提供する。凝集塊において、様々なクローンの分析により、2つのグループ（表現型的により感受性が高く、MDV3100処理においてAR経路活性が著しく損なわれることを示す一方と、表現型的におよび遺伝的に、MDV3100に対してより回復的である他方）の間の明確な区別が明らかとなる。

10

【0311】

実施例4 RNA-seq分析により、耐性と相関がある、ARにおける高再発性変異を明らかにする

強耐性クローンではAR経路活性がMDV3100による調整に対して回復的であることは明らかであるが、1) どのようにしてこの経路がMDV3100の存在下において活性のままであるか、および2) 持続されるAR経路活性が、強耐性クローンにおいて観察される耐性表現型の原因であるか否か、については不明である。アレイ分析では、持続するAR経路活性を合理的に説明し得るような、関連する遺伝子／経路を同定することができないので、本開示は、いかなる特定の理論にも束縛されることを望むものではないが、おそらく、AR経路の構成要素における変異が、強耐性クローンをMDV3100に対して鈍化し得ると推論した。この可能性を探究するために、本開示は、上記において説明した株についてRNA-seq分析を実施し、10 μ MのMDV3100での長期間の培養に対して自然耐性となったいくつかの株を含めた（これらのクローンは、弱耐性クローンと同様に、MDV3100に対する反応においてAR経路調節を示し続けた）。興味深いことに、本開示は、対照集団では検出されずその逆も同様である、大部分の耐性クローンにおいて共通のいくつかの再発性変異を発見した。このデータは、親LNCaPにおける少なくとも2つの集団（MDV3100に対して表現型的に高感受性である主要分画と、おそらく多世代前に分化し、多くの新規の変異を生じ、MDV3100に対して表現型的により耐性である少数の部分集団）の存在を暗に意味している。各クローンの変異プロファイルに基づく監督なしのクラスタリング分析は、結果として、2つのクラスター（3つの対照株および強耐性クローン#19を含む一方と、残りの全てのクローンをクラスタリングするもう一方）を生じた。実際に、大部分のクローンクラスターは一緒に、先験的知識がなく、ドライバー変異の同定を困難にしたが、しかしながら、強耐性クローンにおける鈍化したAR経路調節についての知識が、これらのクローンに独特の変異に対する本発明者らの探求への集中を可能にした。興奮することに、本開示は、4つ全てに共通の単一の再発性変異を同定した（ARにおける変異、MDV3100の直接標的化）。新規のF876L変異は、ARのリガンド結合ドメインにあり、異型接合であり（図11）、ならびにLNCaP細胞における既存の同型接合T877A変異（フルタミドに対する耐性を付与することが知られている変異）に隣接する（Fenton et al. 1997; および Hara et al. 2003）。野生型に対する変異体の対立遺伝子頻度は、最も低い20%を示したクローン#15を除いて、およそ40%である。ゲノムDNAにおけるF876L変異の存在は、サンガー配列決定法によって確認される（図11）。

20

30

40

【0312】

実施例5 アンタゴニストからアゴニストへの切り替えのコンピュータモデリングおよび実験検証

コンピュータモデリングによって得られる仮説を機能的に試験するために、本開示は、トランス活性化アッセイにおいて、野生型；単一の変異体T877A、W741C、W741L、およびF876L；および二重変異体F876L/T876A ARの、アゴニストおよび抗アンドロゲン剤のビカルタミドおよびMDV3100、に対する転写反応を評価した。モデリングデータを支持して、本開示は、F876L単一変異体およびF87

50

6 L / T 8 7 7 A 二重変異体 A R のみが、M D V 3 1 0 0 に対するかなりのトランス活性化反応を有したことを見出し (0.1 nM の R 1 8 8 1 に匹敵する)、これは、M D V 3 1 0 0 に対して非常に特異的なアンタゴニストからアゴニストへの切り替えを示唆している。しかしながら、これらのデータは、M D V 3 1 0 0 に対する反応において、強耐性クローンにおいて観察される経路調節の欠如に対して著しく対照的である (図 2 b ~ c)。これらの明らかに矛盾する結果は、部分的には実験条件に起因し得、トランス活性実験は、A R 非発現株における単一の対立遺伝子の影響をアッセイするのに対し、強耐性クローンは、異型接合方式において F 8 7 6 L 変異を含む。M D V 3 1 0 0 に対するアンタゴニストからアゴニストへの切り替えが、強耐性クローンにおいても観察されるか否かを試験するために、本開示は、(基本 A R 経路活性を最小化し、M D V 3 1 0 0 に対する内因性 A R の反応を減じる) 内因性アンドロゲンを除いた培地での転写反応を評価する。レポーターベースのアッセイから為される観察と同じに、M D V 3 1 0 0 処理は、単独でまたはアゴニストとの組み合わせにおいて、強耐性クローンでの K L K 3 発現を著しく高める。凝集塊でのこれらのデータは、F 8 7 6 L / T 8 7 7 A 変異が、変異体 A R が M D V 3 1 0 0 をアゴニストとして利用することを可能にすることを暗に意味している (ピカルタミドに対する感度として M D V 3 1 0 0 に特異的な切り替えが維持される)。

10

【0313】

実施例 6 F 8 7 6 L / T 8 7 7 A 変異体 A R は、遺伝子操作された L N C a P において M D V 3 1 0 0 に対する表現型耐性を付与する

20

F 8 7 6 L および F 8 7 6 L / T 8 7 7 A 対立遺伝子は、M D V 3 1 0 0 の存在下において A R 経路を強力に再活性化するが、経路活性におけるこのレスキューが、(特に、いくつかの他の変異を含む強耐性クローンにおいて) 表現型耐性へと十分に翻訳されるか否かについては依然として不明である。この問題に対して十分に対処するために、本開示は、T 8 7 7 A、F 8 7 6 L / T 8 7 7 A、および W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 変異体 A R を誘導的に発現するように L N C a P 細胞を遺伝子操作する。F 8 7 6 L / T 8 7 7 A A R の発現レベルは、q P C R およびウェスタン分析によって評価した場合に、T 8 7 7 A および W 4 1 C / T 8 7 7 A 変異体 A R よりも著しく低い。以前の報告を支持して、全ての T 8 7 7 A 保有変異体対立遺伝子および W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 対立遺伝子の発現は、それぞれ、ヒドロキシフルタミド (Fenton et al. 1997; および Hara et al. 2003) ; およびピカルタミド (Hara et al. 2003) に対して特異的な、アンタゴニストからアゴニストへの切り替えを促進した (図 1 5)。対照的に、F 8 7 6 L / T 8 7 7 A 対立遺伝子の弱い発現にもかかわらず、A R 経路活性の著しいレスキューが、M D V 3 1 0 0 の存在下において特異的に観察され、これは、アンタゴニストからアゴニストへの切り替えを確認するものである (図 5 a および図 1 5)。さらに、T 8 7 7 A および W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 対立遺伝子の異所性発現は、M D V 3 1 0 0 の存在下において A R シグナリングを弱くしかレスキューせず、再び、新規の F 8 7 6 L 変異の特異性および有効性を確認した (図 5 1 および図 1 5)。遺伝子発現データと一致して、A R の細胞核局在性は、T 8 7 7 A 発現株において著しく損なわれるが、その一方で、A R の局在性は、M D V 3 1 0 0 による処置に関して、F 8 7 6 L / T 8 7 7 A 株において影響を受けず、F 8 7 6 L 株での A R 活性の持続を確認した (図 5 b)。

30

40

【0314】

アゴニストとして M D V 3 1 0 0 を利用する、F 8 7 6 L / T 8 7 7 A 変異体 A R の最大の可能性は、同様の実験をアンドロゲン枯渇条件下において実施する場合に実現される。T 8 7 7 A および W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 対立遺伝子の発現は、経路活性を最小限にしかレスキューしないが、その一方で、F 8 7 6 L / T 8 7 7 A 対立遺伝子の発現は、M D V 処理条件下において K L K 3 および N K X 3 - 1 発現を 3 ~ 4 倍に高める (図 1 6 a)。興味深いことに、W 7 4 1 C / T 8 7 7 A A R は、構成型活性機能を示し、ベースライン条件下において K L K 3 および N K X 3 - 1 の発現を駆動する (図 1 6)。上記において観察された発現レベルの変化は、A R の局在性における変化に忠実に対応する (F 8 7 6 L / T 8 7 7 A A R は、次第に、M D V 3 1 0 0 による処理後に局在化した細胞核

50

となる（図16bおよび5b））。再び、W741C/T877A ARは、高められた細胞核の局在性がベースラインにおいて観察されるような構成型活性を示した（図5b）。

【0315】

F876L/T877A変異体対立遺伝子がアゴニストとしてMDV3100を利用することができることをしっかりと確認したので、本開示は、次に、F876L/T877A ARの異所性発現が表現型耐性を付与することができるか否かについて試験した。T877A対立遺伝子の発現は、成長をレスキューしなかったが、その一方で、F876L/T877A対立遺伝子の発現は、MDV3100条件下において成長をレスキューした（図5cおよび図18a、b）。以前の観察（図15）に一致して、F876L/T877A過剰発現株は、ピカルタミドに対して感受性のままであった（図5c）。興味深いことに、W741C/T877Aの異所性発現は、MDV3100およびピカルタミド処理条件下においても成長を著しくレスキューした（MDV3100に対する耐性は、その構成活性に一部起因して、おそらく間接的である（図5b、16））。

10

【0316】

実施例7 変異体ARに感作する薬物をスクリーニングするための変異体AR（F876）の使用

本開示が適用した2つの方法は、1）トランス活性化、および2）AR経路を標的とする化合物が変異体ARの機能の阻害剤として使用することができるかどうかを決定するための遺伝子発現分析、を含む。両方の方法は、方法のセクションにおいて明確に概説されている。

20

【0317】

簡潔に言えば、トランス活性化アッセイの場合、DMSO、関心対象のアゴニストもしくはアンタゴニストによる処置の4時間前に、ARレポーター、コントロールプラスミド、およびWTもしくは変異体ARプラスミドを同時トランスフェクトする。ARレポーターは、ARE（ARが結合するアンドロゲン応答要素配列）、プロモーター、およびレポーター遺伝子（この場合はルシフェラーゼ）を含む。処理の16時間後、バイオルミネセンスを定量する。本開示は、WT ARが、R1881（アゴニスト）の存在下においてARレポーターを活性化し、シグナルは、MDV3100または他のアンタゴニストの存在下において十分に抑制されるはずであると予想する。しかしながら、F876L ARの場合、本開示は、アゴニストおよびMDV3100の存在下において、ARレポーター活性が十分に活性化されると予想する。本発明者らは、新規のアンタゴニストが（ピカルタミドと同様の方式において）F876L AR機能を十分に妨げることを期待する。

30

【0318】

トランス活性化アッセイに加えて、カノニカルAR遺伝子、例えば、KLK3、TMPRSS2、NKX3-1、およびSLC45A3などの遺伝子発現分析もモニターすることができる。この実験は、MDV3100が新規の化合物で置き換えられ得ることを除いて、図5bにおいて概説された実験と同じである。本開示は、シグナリングをレスキューするアゴニストとしてMDV3100を使用することができるが、新規の化合物は、F876L-AR保有細胞でのシグナリング活性の抑制を維持するために有効であり得ると予想する。

40

【0319】

実施例8 F876L変異は、遺伝子操作されたLNCaPにおいてMDV3100に対する遺伝的および表現型的耐性を誘発するのに十分である

強耐性クローンが、F876L変異に加えて、いくつかの配列バリエーションを含んでいるのであれば、本発明者らは、AR-F876Lバリエーションが、MDV3100耐性成長表現型を促進するのに十分であるか否かを正式に試験したかった。このために、T877A、F876L/T877A、およびW741C/T877A変異体ARを誘導的に発現するようにLNCaP細胞を遺伝子操作した。前の報告を支持して、全てのT877A保有変異体対立遺伝子およびW741C/T877A対立遺伝子の発現は、AR標的遺伝子K

50

L K 3 (P S A) の制御に基づいて、それぞれ、ヒドロキシフルタミド (Tan et al. 1997 Mol. Endocrin. 11:450-9; Fenton et al. 1997 Clin. Cancer Res. 3: 1383-8; および Veldscholte et al. 1990 Biochem. Biophys. Res. Comm. 173: 534-40) およびビカルタミド (Hara et al. 2003 Cancer Res. 63: 149-53) に特異的なアンタゴニストからアゴニストへの切り替えを促進した。

【0320】

A R - F 8 7 6 L / T 8 7 7 A のわずかに低い発現にもかかわらず、A R 経路活性の著しいレスキューが、10%のF C S 培養条件下において観察され、ならびに著しいアゴニスト効果が、10%のC S S 培養条件下において観察された。A R - F 8 7 6 L / T 8 7 7 A が、10%のF C S および10%のC S S の両方の培養条件下において、T 8 7 7 A 株と比べてより大きな核内流入を示す (M D V 3 1 0 0 対 D M S O) ので、経路活性に対する A R - F 8 7 6 L / T 8 7 7 A の影響は、A R の局在化の変化に密接に対応した。予想外なことに、本発明者らはさらに、以前に報告されたように (Hara et al. 2003 Cancer Res. 63: 149-53)、二重変異によって付与される構成型活性機能におそらく起因する、W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 株における経路活性の著しいレスキューも観察した。A R - F 8 7 6 L / T 8 7 7 A がアゴニストとして M D V 3 1 0 0 を利用できることが確立されているので、本発明者らは、次に、A R - F 8 7 6 L / T 8 7 7 A の異所性発現が、表現型耐性を付与するのに十分であるか否かを試験した。短期間増殖アッセイでは、成長における中等度のレスキューのみが観察されたが、M D V 3 1 0 0 に反応して、しかしビカルタミドには反応せず、頑健なレスキューが長期間コロニー形成アッセイにおいて観察された。とりわけ、W 7 4 1 C / T 8 7 7 A 株はさらに、以前に観察された経路活性のレスキューに一致して、M D V 3 1 0 0 の存在下において著しい成長を示した。

【0321】

T 8 7 7 A 変異が耐性表現型にとって必要であるか否かを評価するために、単一の変異体 A R - F 8 7 6 L を安定して発現するように L N C a P 細胞を遺伝子操作した。

【0322】

トランス活性データと一致して、A R F 8 7 6 L は、M D V 3 1 0 0 に対する遺伝子的小および表現型耐性を付与し、このことは、F 8 7 6 L が (単独でまたは T 8 7 7 A との併用において)、アゴニスト切り替えを付与することができることと等しいことを示唆している。

【0323】

実施例 9 耐性付与における A R - F 8 7 6 L の役割はいくつかの前立腺がん株に広く適用可能である

A R における F 8 7 6 L 変異が P T E N n u l l L N C a P 細胞において M D V 3 1 0 0 に対する耐性を促進できると仮定して、本発明者らは、次に、この変異が、様々な遺伝的背景の P C a 株において広く耐性を付与するのに十分であるか否かについて検討した。このために、ヒト V C a P 株 (T M P R S S 2 - E R G 融合および A R 増幅を含む) およびネズミ M y c - C a P 株 (M y c を過剰発現する) に、変異体 A R を安定して発現するように形質導入した。

【0324】

L N C a P 細胞において観察される耐性表現型と一致して、両方の株は、M D V 3 1 0 0 に対する部分的耐性も示し、このことは、A R における F 8 7 6 L 変異が、様々な遺伝的状況下において M D V 3 1 0 0 に対する耐性を付与する可能性を有していることを示唆している。

【0325】

まとめると、本発明者らのデータは、A R - F 8 7 6 L、A R - F 8 7 6 L / T 8 7 7 A、および潜在的に構成的に活性な A R バリエーション、例えば W 7 4 1 C / T 8 7 7 A などの、M D V 3 1 0 0 に対する耐性のドライバーとしての直接的な役割を示唆している。構成的活性なバリエーションは、様々なクラスの抗アンドロゲン剤に対する耐性を無差別に促進するが、その一方で、本発明者らは、A R における F 8 7 6 L 変異が M D V 3 1 0 0 に対

する耐性を選択的に促進することを示す。

【0326】

実施例10 AR-F876L保有細胞がインビボでの性腺摘除設定においてMDV3100に対して耐性である

ARにおけるF876L変異が、耐性を促進することができる、MDV3100に対するアゴニスト切り替えを付与することを示したが、本発明者らは次に、F876L保有細胞が、アンドロゲン枯渇条件下において細胞成長に対してこの切り替えに依存するようになるか否かについて、すなわち、フルタミドなどの他の抗アンドロゲン剤に対して診療所において観察された依存性 (Suzuki et al. 1996 Prostate 29: 153-8)、について検討した。興味深いことに、当該切り替えは、インビトロにおいてF876L保有クローンの増殖を駆動しなかったが、本発明者らは、F876L保有細胞を性腺摘除された雄のマウスに移植した場合、インビボでの成長についてMDV3100に対する顕著な依存を観察した。対照腫瘍 (C1) は、MDV3100処理に対して即座の停滞を示したが、耐性腫瘍 (クローン#1) は、MDV3100によって刺激されるまで成長できなかった。具体的には、長期間の停滞の後、ビヒクル群の15匹のうちの2匹と比べて、MDV3100で処置した15匹のマウスのうち10匹が腫瘍の急速な成長を示したが ($P = 0.0078$ 、フィッシャー直接t検定、両側)、その一方で、当該腫瘍は、対照細胞 (C1) における比率に対しては有意な差はなかった (15匹のうちの9匹対15匹のうちの10匹)。さらに、耐性腫瘍は、以前のインビトロでの観察に一致して、MDV3100の存在下において成長し続け、これは、累積的に、AR-F876L保有細胞が、インビボにおいて成長のためにMDV3100を必要とすることを示唆した。全ての4つのグループにおいて、処置期間中に有意な体重減少は観察されなかった。エンドポイント分子分析により、MDV3100で処置した耐性腫瘍が、ビヒクルで処置した耐性腫瘍と比べた場合、AR標的遺伝子発現によって示されたように、やや高いAR経路活性を示し、ならびに、ビヒクルで処置した対照腫瘍に比べた場合、著しく高い活性を示したので、MDV3100のアゴニスト切り替えがインビボにおいてF876L変異と関連することを確認した。これらのデータは、アンドロゲン枯渇条件下でのインビボでの成長にとっての、MDV3100に対するF876L保有細胞の依存性を累積的に強調している。

【0327】

実施例11 MDV3100耐性を克服するための治療戦略としてのCDK4/6標的化
次に、本発明者らは、インビトロおよびインビボにおいて様々な遺伝学的状況下でAR-F876LがMDV3100に対する抵抗性を促進することができることを確認することにより、変異体対立遺伝子と拮抗するための合理的な戦略を開発することを目的とした。ARの高変異可能ナリガンド結合ポケットを標的とし続ける新規の抗アンドロゲン剤の開発 (Balbas et al. 2013 eLife 2: e00499) に対する代替策として、本発明者らは、診療所においてより持続可能であり得る治療戦略を同定することを目的とした。このために、本発明者らは、MDV3100で処理された強耐性クローンにおける「AR活性化」に加えて、「細胞周期」に属する遺伝子および「E2F1活性化」遺伝子セットに対するかなりの強化を観察し、これらのクローンが、E2F1標的遺伝子の継続的発現により、MDV3100処理条件下での増殖を潜在的に維持し得ることを提案した。アンドロゲンシグナリング (G1-S移行の重要なレギュレーター) が活性CDK4/サイクリンD1アセンブリを、したがってE2F1機能の活性化を、促進することが知られているため、上記は、魅力的な仮説である (Schiewer et al. End. Relat. Cancer 19: 1-12)。この概念に一致して、本発明者らは、MDV3100処理が、対照株においてE2F1標的遺伝子DHFRおよびTK1の発現を抑制するのを観察し、E2F1機能のレギュレーターとしてのARシグナリングを確認した。対照的に、F876Lを保有する細胞は、対照株と比べて、MDV3100処理条件下においてDHFRおよびTK1のより高い発現を維持することが可能であった (図6A)。これらのデータに基づいて、本発明者らは、E2F1活性は、ARシグナリングの下流エフェクターとして機能し得、そのため、E2F1機能のレギュレーターは、ARを対象とする療法が効果を失ったときに、重要な治療的ノー

ドとして機能し得ると推論した。この仮説に従って、本発明者らは、強耐性クローン（図6B）およびAR-F876L/T877Aを発現するように遺伝子操作されたLNCaP株（図6C）の成長が、ビカルタミドと同程度にCDK4/6阻害剤LEE011およびPD033299に対して感受性であることを見出した。興味深いことに、アンドロゲン非依存性22Rv1細胞（WT ARを発現し、MDV3100処理条件下においてARシグナリングならびにDHFARおよびTK1の発現を維持することができるPCa株（図6D））も、CDKL4/6阻害に対して強い感受性を示した（図6E）ので、CDK4/6阻害に対する反応は、F876Lを保有する細胞のみに限定されない。これらのデータは、CDK4/6機能の標的化が、一般的におそらくアンドロゲン非依存性である、MDV3100に対する抵抗性の複数のメカニズムの処置に対して効果的な戦略として役に立ち得ることを繰り返し示唆している。

【0328】

実施形態

1. 位置876を含むかまたは位置876にまたがるアンドロゲンレセプターまたはその断片もしくはバリエーションを含むポリペプチドを含む組成物であって、位置876のアミノ酸が、置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン（F）以外である（アミノ酸の位置は、配列番号54の付番に従う）、組成物。

2. 位置876のアミノ酸が欠失している、実施形態1の組成物。

3. 位置876のアミノ酸がロイシン（L）である、実施形態1の組成物。

4. 位置876を含むかまたは位置876にまたがるアンドロゲンレセプターまたはその断片もしくはバリエーションを含むポリペプチドを含む組成物であって、位置876のアミノ酸が、置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン（F）以外であり（アミノ酸の位置は、配列番号54の付番に従う）、

ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションが、任意により、他の位置の1つまたは複数の変異を含む、組成物。

5. 位置877のアミノ酸がトレオニン（T）ではなく、位置874のアミノ酸がヒスチジン（H）ではなく、位置715のアミノ酸がバリン（V）ではなく、かつ／または位置741のアミノ酸がトリプトファン（W）ではない、実施形態4の組成物。

6. 断片が、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも75、少なくとも100、または少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも350、少なくとも400、少なくとも450、少なくとも500、少なくとも550、少なくとも600、少なくとも650、少なくとも700、少なくとも750、少なくとも800、少なくとも850、および／または少なくとも900のアミノ酸長である、実施形態4の組成物。

7. 断片またはバリエーションが、F876の変異を欠く野生型AR、またはF876の少なくとも1つの活性を保持する、実施形態1または4の組成物。

8. 配列番号54の残基の50%以下での1つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加、挿入、または置換において異なる、配列番号54に記載される配列またはそのバリエーションを有する、ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションを含み、その結果、ポリペプチドが、配列番号54のポリペプチドの少なくとも1つの活性を保持する組成物。

9. 配列番号54の残基の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または50%以下での1つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加、挿入、または置換において異なる、配列番号54に記載される配列またはそのバリエーションを有する、ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションを含み、その結果、ポリペプチドが、配列番号54のポリペプチドの少なくとも1つの活性を保持する組成物。

10. 断片が、配列番号54の少なくとも10個の連続するアミノ酸を含む、実施形態9の組成物。

10

20

30

40

50

11. 断片が、配列番号54の少なくとも15個の連続するアミノ酸を含む、実施形態9の組成物。

12. ポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションを含む組成物であって、ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号54に示され、前記配列が、位置876のアミノ酸が置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン(F)ではないような、配列番号54のアミノ酸位置876におけるもしくは位置876にまたがる変異を含有し、任意により、位置877のアミノ酸がトレオニン(T)ではなく、位置874のアミノ酸がヒスチジン(H)ではなく、位置715のアミノ酸がバリン(V)ではなく、かつ／または位置741のアミノ酸がトリプトファン(W)ではなく、断片の配列が、配列番号54の少なくとも5個、10個、または15個の連続するアミノ酸を含み、かつ位置876を含む、組成物。

10

13. 配列番号3から53のいずれかを含む配列を含むポリペプチドを含む組成物。

14. 患者からの試料におけるARポリヌクレオチドまたはポリペプチドにおける位置F876での変異を検出する方法であって、(a)患者からARを含む試料を得る工程；および(b)ARが位置F876の変異を含むか否かを決定するために、ARポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはその一部の配列を決定する工程を含む方法。

15. 患者を診断、予後診断、および／または処置する方法であって、(a)患者からARを含む試料を得る工程；(b)ARが位置F876の変異を含むか否かを決定するために、ARポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはその一部の配列を決定する工程；および(c)ARがF876の変異を含まない場合にMDV3100を含む治療的組成物を投与する工程もしくはその投与を推奨する工程；または、ARがF876の変異を含む場合にMDV3100を含まない治療的組成物を投与する工程もしくはその投与を推奨する工程を含む方法。

20

16. MDV3100を含まない治療的組成物が、ビカルタミドまたはLEE011もしくはPD0332991などのCDK4／6阻害剤、あるいは治療的核酸を含む、実施形態15の方法。

17. 患者を診断、予後診断、および／または処置する方法であって、(a)患者におけるアンドロゲンレセプターまたはその断片の位置741および877のアミノ酸が、それぞれ、トリプトファン(W)およびトレオニン(T)であるか否かを決定する工程、(b)(1)位置741および877のアミノ酸が、それぞれ、トリプトファン(W)およびトレオニン(T)である場合にはビカルタミドもしくはMDV3100；または(2)位置741および877のアミノ酸が、それぞれ、トリプトファン(W)およびトレオニン(T)でない場合にはビカルタミドもしくはMDV3100以外の前立腺疾患処置、の患者への投与を推奨する工程および／またはそれを9患者に投与する工程を含む方法。

30

18. ビカルタミドまたはMDV3100を含まない処置が、LEE011もしくはPD0332991などのCDK4／6阻害剤または治療的核酸を含む、実施形態17の方法。

18. 位置876を含む配列番号54の少なくとも5個の連続するアミノ酸をコードする第1の配列を有し、かつ／またはそれに対して相補的な配列を有する、0、1、2、または3つのミスマッチを含む少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドであって、位置876のアミノ酸が、置換されているかもしくは欠失しており、フェニルアラニン(F)以外のアミノ酸である、ポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチド。

40

19. 第1の配列が、配列番号2の少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個の連続するアミノ酸をコードし、少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個の連続するアミノ酸が、配列番号2の位置876を含むかしくは位置876にまたがり、位置876のアミノ酸はフェニルアラニン(F)ではなく、任意により、位置877のアミノ酸はトレオニン(T)ではなく、874のアミノ酸はヒスチジン(H)ではなく、位置715のアミノ酸はバリン(V)ではなく、かつ／または位置741のアミ

50

ノ酸はトリプトファン（W）ではない、実施形態 18 のポリヌクレオチド。

20. 実施形態 18 または 19 のポリヌクレオチドを含む発現構築物もしくはベクター。

21. 実施形態 20 の発現構築物もしくはベクターを含む宿主細胞。

22. コードされた変異体アンドロゲンレセプタータンパク質が配列番号 2 の位置 876 にロイシン（L）を含有することを除いて、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む変異体アンドロゲンレセプターをコードするポリヌクレオチド。

23. プロモーター；および変異体アンドロゲンレセプターもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む発現構築物またはベクターであって、アンドロゲンレセプターのアミノ酸配列が配列番号 2 に示され、前記配列が、位置 876 のアミノ酸がフェニルアラニン（F）ではなく、任意により、位置 877 のアミノ酸がトレオニン（T）ではなく、874 のアミノ酸がヒスチジン（H）ではなく、位置 715 のアミノ酸がバリン（V）ではなく、かつ／または位置 741 のアミノ酸がトリプトファン（W）ではないような、配列番号 2 のアミノ酸位置 876 における変異を含有し、断片の配列が、配列番号 2 の少なくとも 5 個の連続するアミノ酸を含み、かつ位置 876 を含み、ポリヌクレオチドセグメントが、プロモーターの下流に位置し、ポリヌクレオチドセグメントの転写がプロモーターにおいて開始される、発現構築物またはベクター。 10

24. 単離ポリヌクレオチドもしくはその相補体が、配列番号 54 の少なくとも 10 個、15 個、または 20 個の連続するアミノ酸をコードし、少なくとも 10 個の連続するアミノ酸が配列番号 54 の位置 876 を含むかもしくは位置 876 にまたがり、位置 876 のアミノ酸が、置換されているかまたは欠失しているかまたはフェニルアラニン（F）ではない、単離ポリヌクレオチド。 20

25. プロモーター、および実施形態 22 または 24 のポリヌクレオチドを含む構築物を含む宿主細胞。

26. MDV3100 に対する細胞の感受性を決定する方法であって、

（a）もしあれば、細胞におけるアンドロゲンレセプター的位置 876 のアミノ酸を決定する工程であって、位置 876 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

（b）もしあれば、位置 876 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、アミノ酸の不在またはフェニルアラニン以外のアミノ酸の存在が、細胞が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程を含む方法。 30

27. 細胞が、前立腺がん細胞、乳がん細胞、または他の AR 関連疾患細胞である、実施形態 26 の方法。

28. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 27 の方法。

29. MDV3100 による処置に対する AR 関連疾患の患者の感受性を予測する方法であって、

（a）もしあれば、患者におけるまたは患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプター位置 876 のアミノ酸を決定する工程であって、位置 876 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程； 40

（b）もしあれば、位置 876 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、アミノ酸の不在またはフェニルアラニン以外のアミノ酸の存在が、患者が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程を含む方法。

30. AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、実施形態 29 の方法。

31. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 29 の方法。

32. AR 関連疾患を有する患者を処置する方法であって、

（a）もしあれば、患者におけるまたは患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプター位置 876 のアミノ酸を決定する工程であって、位置 876 が配列番号 54 の 50

付番に従って決定される、工程；

(b) もしあれば、位置 876 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、アミノ酸の不在またはフェニルアラニン以外のアミノ酸の存在が、患者が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程；

(c) 876 の位置のアミノ酸がフェニルアラニンでない場合、MDV3100 を含まない処置を投与する工程；または、位置 876 のアミノ酸がフェニルアラニンである場合、MDV3100 を含む処置を投与する工程；ならびに

(d) 疾患の進行または緩和についてアッセイする工程を含む方法。

33. AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、実施形態 32 の方法。

34. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 32 の方法。

35. MDV3100 に対する細胞の感受性を決定する方法であって、

(a) もしあれば、細胞におけるアンドロゲンレセプターの位置 741 および 877 のアミノ酸を決定する工程であって、位置 741 および 877 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

(b) もしあれば、位置 741 および 877 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、位置 741 におけるアミノ酸の不在またはトリプトファン (W) 以外のアミノ酸の存在および位置 877 におけるアミノ酸の不在またはトレオニン (T) 以外のアミノ酸の存在が共に、細胞が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程を含む方法。

36. 細胞が、前立腺がん細胞、乳がん細胞、または他の AR 関連疾患細胞である、実施形態 35 の方法。

37. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 35 の方法。

38. MDV3100 による処置に対する AR 関連疾患の患者の感受性を予測する方法であって、

(a) もしあれば、患者におけるまたは患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置 741 および 877 のアミノ酸を決定する工程であって、位置 741 および 877 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

(b) もしあれば、位置 741 および 877 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、位置 741 におけるアミノ酸の不在またはトリプトファン (W) 以外のアミノ酸の存在および位置 877 におけるアミノ酸の不在またはトレオニン (T) 以外のアミノ酸の存在が共に、患者が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程を含む方法。

39. AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、実施形態 38 の方法。

40. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 38 の方法。

41. AR 関連疾患を有する患者を処置する方法であって、

(a) もしあれば、患者におけるまたは患者から得られる試料におけるアンドロゲンレセプターの位置 741 および 877 のアミノ酸を決定する工程であって、位置 741 および 877 が配列番号 54 の付番に従って決定される、工程；

(b) もしあれば、位置 741 および 877 のアミノ酸を、野生型アンドロゲンレセプターと比較する工程であって、位置 741 におけるアミノ酸の不在またはトリプトファン (W) 以外のアミノ酸の存在および位置 877 におけるアミノ酸の不在またはトレオニン (T) 以外のアミノ酸の存在が共に、患者が MDV3100 に対して感受性でないことを示す、工程；

(c) 876 の位置のアミノ酸がフェニルアラニンでない場合、MDV3100 を含ま

10

20

30

40

50

ない処置を投与する工程；または、位置 7 4 1 および 8 7 7 のアミノ酸がフェニルアラニンである場合、MDV 3 1 0 0 を含む処置を投与する工程；ならびに

(d) 疾患の進行または緩和についてアッセイする工程、を含む方法。

4 2. AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、実施形態 4 1 の方法。

4 3. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 4 1 の方法。

4 4. アンドロゲンレセプター (AR) 関連疾患を有する患者を処置する方法であって、AR の 8 7 6 の位置のアミノ酸が不在であるか、またはフェニルアラニンではなく、方法が MDV 3 1 0 0 を含まない治療的組成物を投与する工程を含む、方法。

4 5. MDV 3 1 0 0 を含まない治療的組成物が、ビカルタミドまたは L E E 0 1 1 もしくは PD 0 3 3 2 9 9 1 などの CDK 4 / 6 阻害剤、あるいは治療的核酸を含む、実施形態 4 4 の方法。

4 6. AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、実施形態 4 1 の方法。

4 7. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 4 1 の方法。

4 8. アンドロゲンレセプター (AR) 関連疾患を有する患者を処置する方法であって、AR の位置 7 4 1 および 8 7 7 のアミノ酸がフェニルアラニンであり、方法が MDV 3 1 0 0 を含む治療的組成物を投与する工程を含む、方法。

4 9. AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、実施形態 4 8 の方法。

5 0. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 4 8 の方法。

5 1. アンドロゲンレセプター (AR) 関連疾患を有する患者を処置する方法であって、AR の 8 7 6 の位置のアミノ酸が不在であるか、またはフェニルアラニンではなく、方法が CDK 4 / 6 阻害剤を含む治療的組成物を投与する工程を含む、方法。

5 2. CDK 4 / 6 阻害剤が、L E E 0 1 1 または PD 0 3 3 2 9 9 1 である、実施形態 5 1 の方法。

5 3. AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、実施形態 5 1 の方法。

5 4. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 5 1 の方法。

5 5. アンドロゲンレセプター (AR) 関連疾患を有する患者を処置する方法であって、AR が野生型であるか、または AR の 8 7 6 の位置のアミノ酸が不在であるかもしくはフェニルアラニンではなく、方法が CDK 4 / 6 阻害剤を含む治療的組成物を投与する工程を含む、方法。

5 6. CDK 4 / 6 阻害剤が、L E E 0 1 1 または PD 0 3 3 2 9 9 1 である、実施形態 5 1 の方法。

5 7. AR 関連疾患が前立腺がんまたは乳がんである、実施形態 5 1 の方法。

5 8. AR 関連疾患が、ポリグルタミン酸病、脱毛症、良性前立腺肥大、多毛症、座瘡、脊髄および筋萎縮症、またはケネディ病である、実施形態 5 1 の方法。

5 9. CDK 4 / 6 阻害剤が、インビトロまたはインビボにおいて、アンドロゲンレセプターを発現する細胞株の成長を阻害し、アンドロゲンレセプターの 8 7 6 の位置のアミノ酸が不在であるかまたはフェニルアラニンではない、実施形態 5 5 の方法。

6 0. 成長阻害が、増殖速度、コロニーアッセイ、顕微鏡アッセイ、および／または画像分析によって決定される、実施形態 5 9 の方法。

【0 3 2 9】

特に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語は、本開示が属する分野に精通する専門家によって通常理解されるのと同じ意味を有する。特に明記されない限り、具体的に詳細に説明されていない全ての方法、工程、技術、および操作を実施することができ、当業者にとって明らかなそれ自体既知である方式において実施した。例えば、再び、標準のハンドブックと本明細書に参照された一般的な背景技術と更な

10

20

30

40

50

るそこに引用された文献を参照する。特に明記されない限り、本明細書において引用される各参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0330】

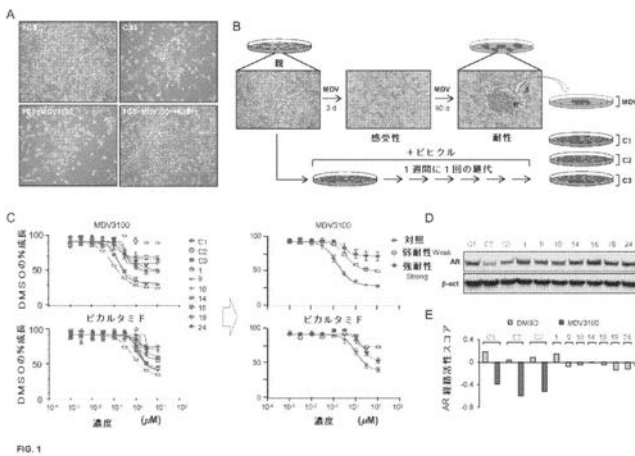
請求項は非限定的であり、以下に提供する。

【0331】

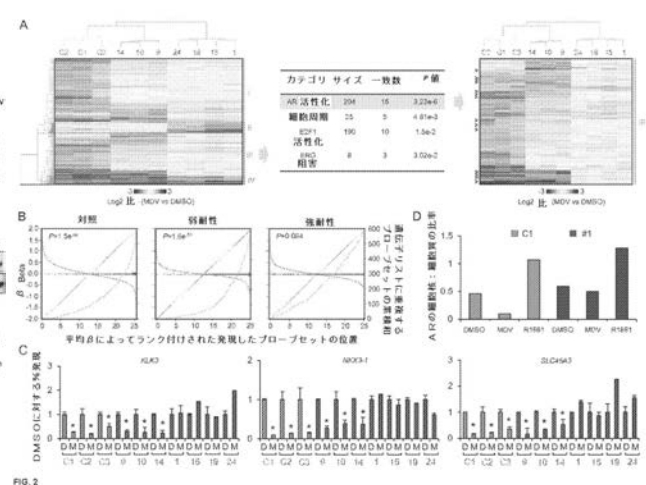
特定の実施形態および請求項が本明細書において詳細に開示されているが、これは、一例として例示目的のみのために為され、あるいは、添付の特許請求の範囲または任意の対応する将来の応用の特許請求の範囲の主題の範囲に関する限定であることを意図するものではない。特に、本発明者らは、請求項によって定義される開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、本開示に対して様々な置換、代替、変更を為し得ることに想到する。核酸出発物質、関心対象のクローン、またはライブラリータイプの選択は、本明細書において説明される実施形態の知識を有する当業者にとって日常的仕事であると考えられる。他の態様、利点、および変更は、以下の特許請求の範囲の範囲内であると見なされた。当業者は、通常の実験を使用するだけで、本明細書において説明した開示の特定の実施形態の多くの同等物を認識し、または確認することができるであろう。そのような同等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。後に出願された対応する出願における特許請求の範囲の補正は、様々な国の特許法による限定のためであって、特許請求の範囲の主題を放棄すると解釈されるべきではない。

10

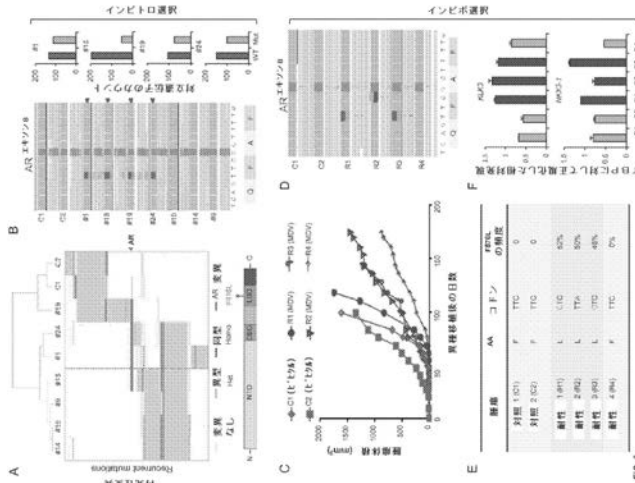
【図 1】



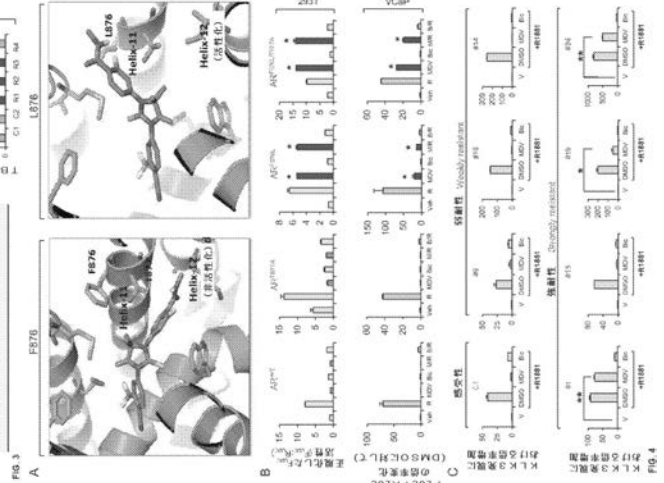
【図 2】



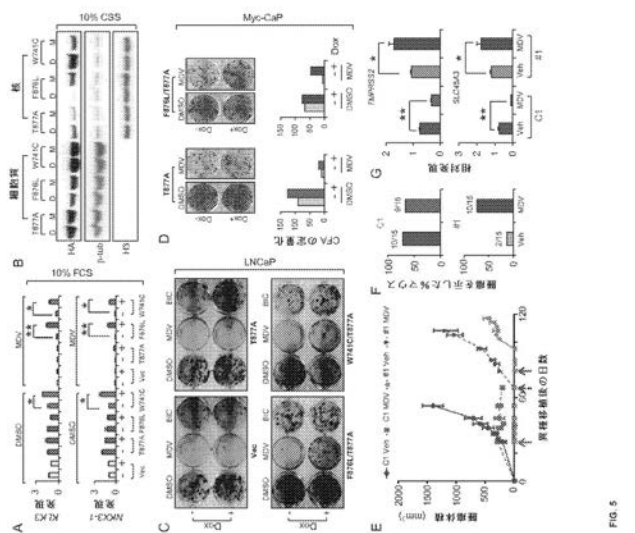
【図 3】



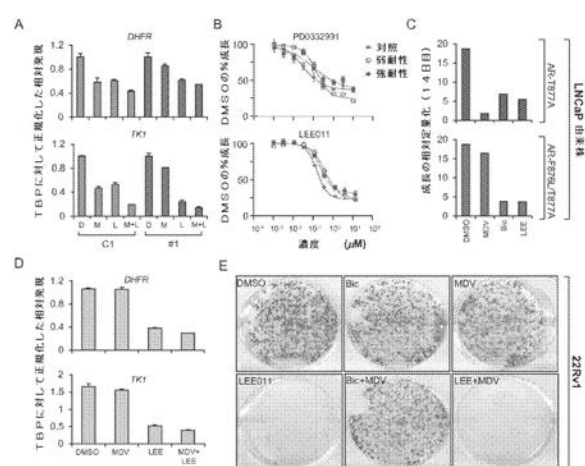
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

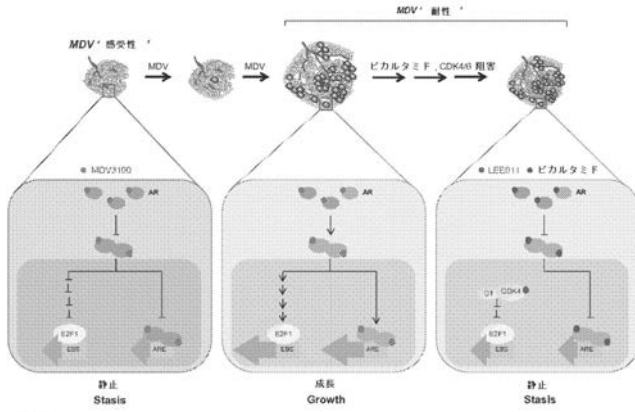


FIG. 7

【図 8】

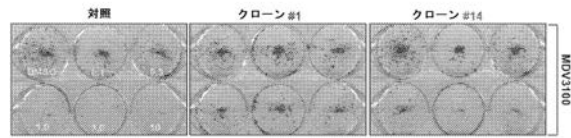


FIG. 8

【図 9】

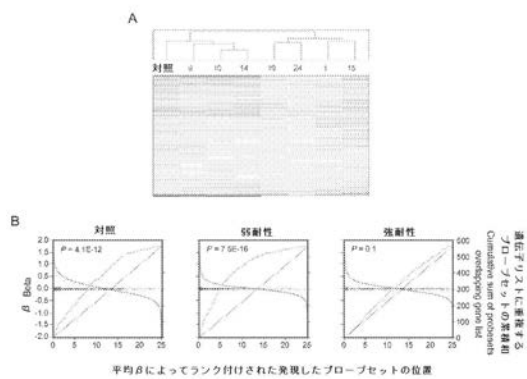


FIG. 9

【図 10】

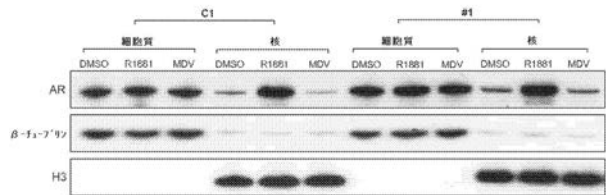


FIG. 10

【図 11】

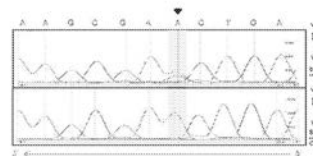


FIG. 11

【図 1 2】

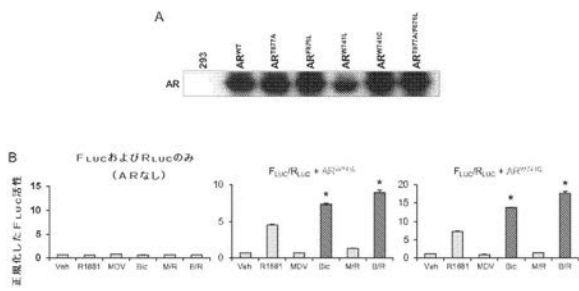


FIG. 12

【図 1 3】

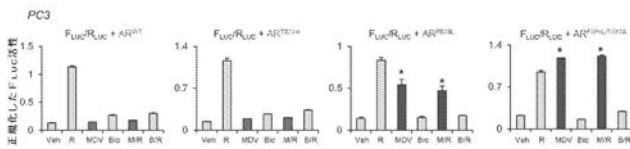


FIG. 13

【図 1 5】

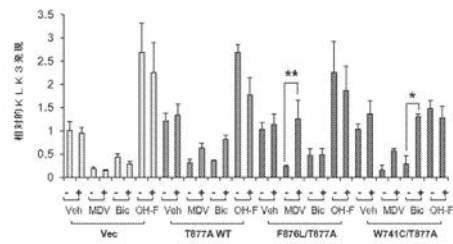


FIG. 15

【図 1 4】

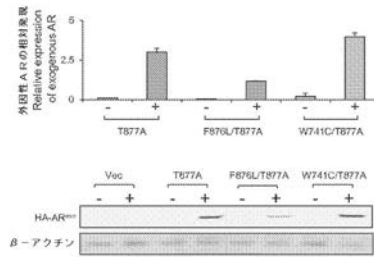


FIG. 14

【図 1 6】

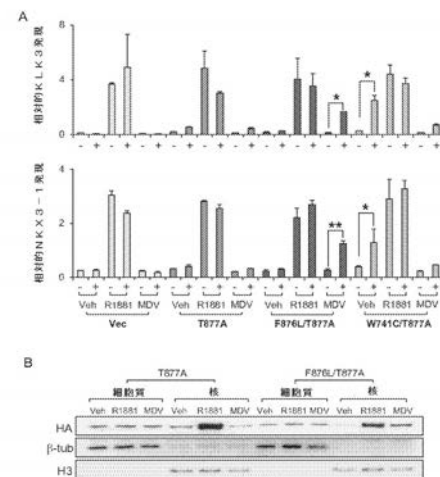


FIG. 16

【図 17】

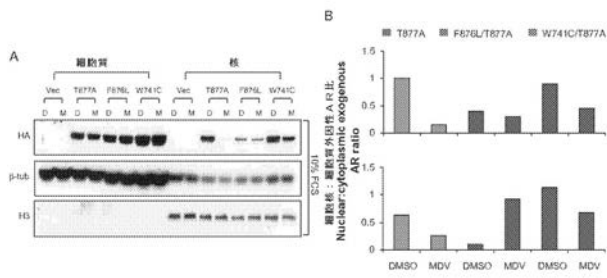


FIG. 17

【図 18】

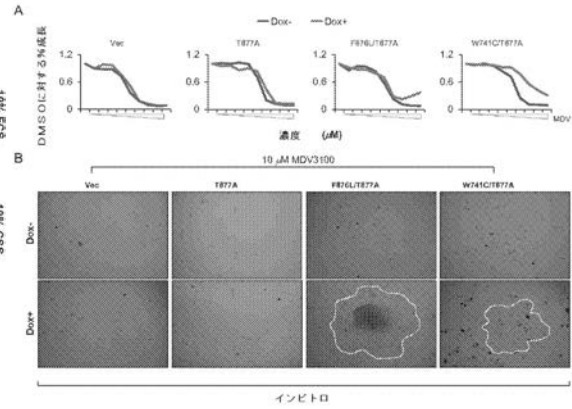


FIG. 18

【図 19】

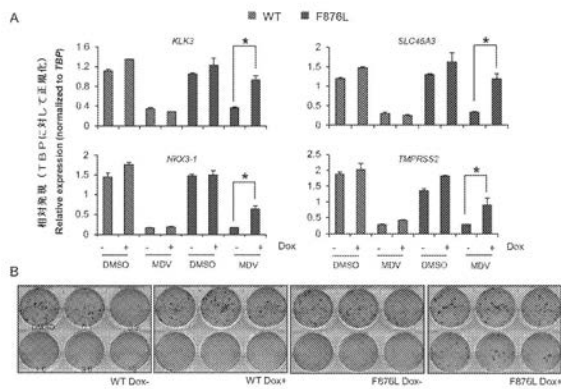


FIG. 19

【図 20】

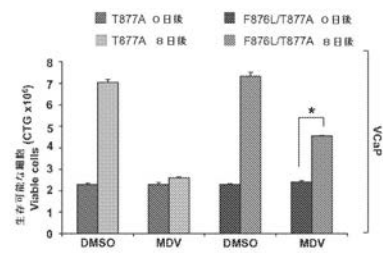


FIG. 20

【図 2 1】

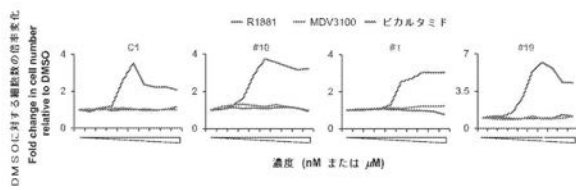


FIG. 21

【図 2 2】

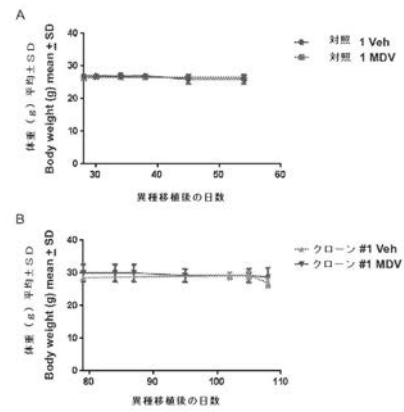


FIG. 22

【配列表】

2016516005000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/017977

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 C07K14/705 G01N33/74 A61K31/00 C07K14/72 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q C07K G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/00617 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; SALVATI MARK E [US]; GOTTARDIS MARCO M []) 3 January 2002 (2002-01-03) pages 17-18; claim 23 -----	1-14, 18-25
A	JOLY-PHARABOZ M O ET AL: "Inhibition of growth and induction of apoptosis by androgens of a variant of LNCaP cell line", JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD., OXFORD, GB, vol. 73, no. 5, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 237-249, XP027377457, ISSN: 0960-0760 [retrieved on 2000-08-01] abstract page 241 ----- -/-	1-14, 18-25
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 June 2014		27/08/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Lunter, Pim

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/017977

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHIHUEI WANG ET AL: "Isolation and Characterization of the Androgen Receptor Mutants with Divergent Transcriptional Activity in Response to Hydroxyflutamide", ENDOCRINE, vol. 12, no. 1, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 69-76, XP055121943, DOI: 10.1385/ENDO:12:1:69 abstract -----	1-14, 18-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/017977

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-14, 18-25

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2014/017977

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-14, 18-25

Composition comprising Androgen Receptor (AR) wherein the amino acid at position 876 is substituted or deleted; method of detecting a mutation at position F876 in AR; polynucleotides, expression constructs or vectors; host cells;

2. claims: 15, 16, 26-34, 44, 45

Methods of diagnosing, prognosing and/or treating a patient; methods of determining the sensitivity of a cell to MDV3100; methods of predicting sensitivity of a patient to MDV3100; methods of treating a patient, comprising determining if the AR comprises a mutation at position F876, and administering MDV3100 if the AR does not comprise a mutation at position 876

3. claims: 17, 35-43, 46, 47

Methods of diagnosing, prognosing and/or treating a patient; methods of determining the sensitivity of a cell to MDV3100; methods of predicting sensitivity of a patient to MDV3100; methods of treating a patient, comprising determining if the amino acids at positions 741 and 877 of AR are respectively tryptophan and threonine, and recommending administering bicalutamide or MDV3100 if the amino acids are tryptophan and threonine, respectively.

4. claims: 48-50

Methods of treating a patient using MDV3100, wherein amino acids 741 and 877 of AR are phenylalanine.

5. claims: 51-54, 56-58(completely); 55, 59, 60(partially)

Methods of treating a patient wherein amino acid 876 of AR is absent or not phenylalanine and comprising the step of administering a CDK4/6 inhibitor.

6. claims: 55, 59, 60(all partially)

Method of treating a patient wherein the AR is wild type, comprising the step of administering a CDK4/6 inhibitor.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/017977

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0200617	A2	03-01-2002	AU 8821301 A	08-01-2002
			AU 2001288213 B2	14-04-2005
			BR 0111298 A	10-05-2005
			CA 2413417 A1	03-01-2002
			CN 1454083 A	05-11-2003
			CZ 20024214 A3	16-04-2003
			EP 1299094 A2	09-04-2003
			HU 0303172 A2	29-12-2003
			JP 2004509072 A	25-03-2004
			KR 20030016310 A	26-02-2003
			MX PA02012605 A	14-05-2003
			NO 20026194 A	26-02-2003
			US 2002173445 A1	21-11-2002
			US 2005256048 A1	17-11-2005
			WO 0200617 A2	03-01-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 C 0 8 6	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 C 2 0 6	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	4 H 0 4 5	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	P	
G 0 1 N	33/68	(2006.01)	G 0 1 N	33/68		
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/14		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 K	31/4166	(2006.01)	A 6 1 K	31/4166		
A 6 1 K	31/277	(2006.01)	A 6 1 K	31/277		
A 6 1 K	31/519	(2006.01)	A 6 1 K	31/519		
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		

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

(72)発明者 クック, ヴェッセリーナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニ
ュー 2 5 0, ノバルティス インスティトゥーツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ
ーポレーテッド

(72)発明者 コーン, ジョシュア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニ
ュー 2 5 0, ノバルティス インスティトゥーツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ
ーポレーテッド

(72)発明者 コーバル, マナヴ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニ
ュー 2 5 0, ノバルティス インスティトゥーツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ
ーポレーテッド

(72)発明者 チョウ, ウェンライ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニ
ュー 2 5 0, ノバルティス インスティトゥーツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ
ーポレーテッド

(72)発明者 チュー, ピン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニ
ュー 2 5 0, ノバルティス インスティトゥーツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ
ーポレーテッド

(72)発明者 デラーハ, スコット

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 250, ノバルティス インスティトゥーツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド

(72)発明者 カポニグロ, ジョルダノ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 250, ノバルティス インスティトゥーツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド

F ターム(参考) 2G045 AA25 DA13 DA36

4B024 AA11 BA63 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 GA11 HA01
HA12

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32
QR35 QR48 QR55 QR62 QR72 QR77 QS32 QS36 QX01 QX02

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA46

4C084 AA13 NA14 ZA02 ZA81 ZA89 ZA92 ZA94 ZB26 ZC20

4C086 AA01 AA02 BC38 CB09 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA81
ZA89 ZA92 ZA94 ZB26 ZC20

4C206 AA01 AA02 JA19 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA81 ZA89 ZA92
ZA94 ZB26 ZC20

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 EA50 FA74