

(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2018-531891

(P2018-531891A)

(43) 公表日 平成30年11月1日(2018.11.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06 Z N A	2 G 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/551 (2006.01)	A 6 1 K 31/551	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/137 (2006.01)	A 6 1 K 31/137	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-506976 (P2018-506976)
 (86) (22) 出願日 平成28年8月10日 (2016. 8. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年4月9日 (2018. 4. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/046318
 (87) 国際公開番号 W02017/027571
 (87) 国際公開日 平成29年2月16日 (2017. 2. 16)
 (31) 優先権主張番号 62/203, 128
 (32) 優先日 平成27年8月10日 (2015. 8. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 399052796
 ダイナ ファーバー キャンサー インス
 ティテュート, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 2 1 5, ポストン, ブルックライン ア
 ベニュー 4 5 0
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BETプロモドメインインヒビターに対する抵抗性の機構

(57) 【要約】

本開示は、BETインヒビター並びにプロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-xl)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを含む、がんに対する併用療法を提供する。併用療法は、単独療法と比較して、がんの治療において相乗作用的であると期待される。また、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有する対象を特定する方法も提供する。

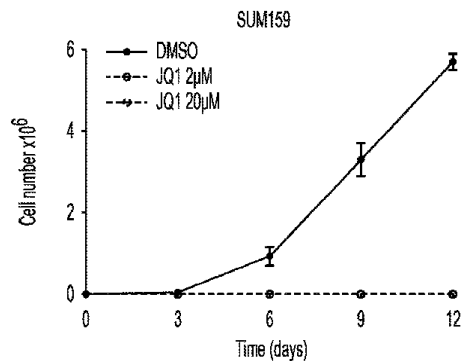


Fig. 3A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がんを治療する方法であって、

それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びにプロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーターを投与する工程

を含む方法。

【請求項 2】

がんが、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

BETインヒビター及びPP2Aアクチベーターが、BETインヒビター単体又はPP2Aアクチベーター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

BETインヒビターが、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

BETインヒビターが小分子である、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

BETインヒビターが、JQ1又はその誘導体である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

PP2Aアクチベーターが小分子である、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

PP2Aアクチベーターが、フェノチアジン化合物又はFTY720である、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

フェノチアジン化合物が、クロルプロマジン、メソリダジン、チオリダジン、アセトフェナジン、フルフェナジン、ペルフェナジン、トルフルオペラジン、並びにこれらの薬学的に許容される塩及びエステルからなる群から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

BETインヒビター及びPP2Aアクチベーターが、同時に又は連続して投与される、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

がんを治療する方法であって、

それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びに巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビターを投与する工程を含む方法。

【請求項 13】

がんが、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

BETインヒビター及びBcl-x1インヒビターが、BETインヒビター単体又はBcl-x1インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である、請求項12又は13に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

BETインヒビターが、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである、請求項12から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

BETインヒビターが小分子である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

BETインヒビターが、JQ1又はその誘導体である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

Bcl-xlインヒビターが小分子である、請求項12から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

Bcl-xlインヒビターが、ABT737、ABT-263、AT101、Sabutoclax又はTW-37である、請求項18に記載の方法。

10

【請求項20】

BETインヒビター及びBcl-xlインヒビターが、同時に又は連続して投与される、請求項12から19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む、請求項12から20のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項22】

がんを治療する方法であって、

それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びにカゼインキナーゼ2(CK2)インヒビターを投与する工程を含む方法。

【請求項23】

がんが、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

BETインヒビター及びCK2インヒビターが、BETインヒビター単体又はCK2インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である、請求項22又は23に記載の方法。

30

【請求項25】

BETインヒビターが、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである、請求項22から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

BETインヒビターが小分子である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

BETインヒビターが、JQ1又はその誘導体である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

CK2インヒビターが小分子である、請求項22から27のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項29】

CK2インヒビターが、CX-4945、DMAT、エラゲ酸、又はTTP22である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

BETインヒビター及びCK2インヒビターが、同時に又は連続して投与される、請求項22から29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-xl)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む、請求項22から30のいずれ

50

か一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

がんを治療する方法であって、

それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びにメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを投与する工程

を含む方法。

【請求項 3 3】

がんが、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ、請求項32に記載の方法。

【請求項 3 4】

BETインヒビター及びMED1インヒビターが、BETインヒビター単体又はMED1インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である、請求項32又は33に記載の方法。

【請求項 3 5】

BETインヒビターが、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである、請求項32から34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

BETインヒビターが小分子である、請求項35に記載の方法。

【請求項 3 7】

BETインヒビターが、JQ1又はその誘導体である、請求項36に記載の方法。

【請求項 3 8】

MED1インヒビターが、MED1とBRD4との間の相互作用を破壊する、請求項32から37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

MED1インヒビターが、小分子、抗体、ペプチド又はアンチセンス化合物である、請求項38に記載の方法。

【請求項 4 0】

BETインヒビター及びMED1インヒビターが、同時に又は連続して投与される、請求項32から39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、及び/又はカゼインキナーゼ2(CK2)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む、請求項32から40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有する対象を特定する方法であって、

BETインヒビター治療を受けた対象から得た腫瘍サンプル中のプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)の細胞内の位置を決定するアッセイを実施する工程と、

BRD4が核局在性を有する場合、BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして対象を特定する工程とを含む方法。

【請求項 4 3】

BRD4が細胞質内局在性を有する場合、対象が、BETインヒビター治療に抵抗性がないがんを有するものとして特定される、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 4】

BETインヒビターを、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターと組み合わせて投与することによって、BETインヒビター治療に抵抗性を持つがんを有す

10

20

30

40

50

るものとして特定された対象を治療する工程を更に含む、請求項42に記載の方法。

【請求項45】

アッセイが、免疫組織化学、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、ELISA、又はFACS分析を含む、請求項42から44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

BRD4の細胞内の位置が、抗体を免疫蛍光と併用して決定される、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有する対象を特定する方法であって、

10

がんを有する対象から得た腫瘍サンプル中のリン酸化プロモドメイン含有タンパク質4(pBRD4)の非リン酸化BRD4(BRD4)に対する比を決定するアッセイを実施する工程と、

pBRD4のBRD4に対する比が、対照のpBRD4のBRD4に対する比と比較して高い場合、BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして対象を特定する工程と

を含む方法。

【請求項48】

pBRD4のBRD4に対する比が、対照のpBRD4のBRD4に対する比と比較して低い場合又は変わらない場合、対象が、BETインヒビター治療に抵抗性がないがんを有するものとして特定される、請求項47に記載の方法。

20

【請求項49】

BETインヒビターを、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターと組み合わせて投与することによって、BETインヒビター治療に抵抗性を持つがんを有するものとして特定された対象を治療する工程を更に含む、請求項47に記載の方法。

【請求項50】

アッセイが、免疫プロット法、免疫組織化学、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、ELISA、又はFACS分析を含む、請求項47から49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

pBRD4のBRD4に対する比が、免疫プロット法によって決定される、請求項50に記載の方法。

30

【請求項52】

がんを治療する方法であって、

それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びにB細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビターを投与する工程を含む方法。

【請求項53】

がんが、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

BETインヒビター及びBcl-2インヒビターが、BETインヒビター単体又はBcl-2インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である、請求項52又は53に記載の方法。

40

【請求項55】

BETインヒビターが、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである、請求項52から54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

BETインヒビターが小分子である、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

50

BETインヒビターが、JQ1又はその誘導体である、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

Bcl-2インヒビターが小分子である、請求項52から57のいずれか一項に記載の方法。

【請求項59】

Bcl-2インヒビターがABT-199である、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

BETインヒビター及びBcl-2インヒビターが、同時に又は連続して投与される、請求項52から59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項61】

プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む、請求項52から60のいずれか一項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、全内容が参照により本明細書に援用される、2015年8月10日出願の米国仮特許出願第62/203,128号に対する米国特許法第119条(e)による優先権を主張するものである。

20

【0002】

政府助成

本発明は、米国国立衛生研究所により認可された第CA168504号及び第CA103867号の下、並びに米国国防総省により認可された第CDMRP BC122003号及び第CA120184号の下で国家支援によりなされたものである。米国政府は本発明にある権利を有している。

【背景技術】

【0003】

トリプルネガティブ乳がん(TNBC)は、エストロゲン受容体(ER)及びプロゲステロン受容体(PR)の発現がなく、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)の増幅がないことを特徴とする、主要な乳房腫瘍サブタイプである。TNBC患者は、特に遠位部位において、再発の5年リスクが他のいずれのサブタイプよりも高いため、不良臨床転帰を経験する。TNBCに焦点を当てたがんゲノム解読研究は、新規の反復突然変異がん促進遺伝子の特定に失敗し、標的の治療法開発の即座の機会を失われた。TNBCは不均一な疾患でもあり、一つの治療法がすべての患者に適合するわけではなく、新規に複数の治療戦略を必要とする。したがって、TNBCに対応する新規の治療選択が至急必要とされている。

30

【0004】

プロモドメイン及びエキストラ末端(BET: bromodomain and extra terminal)タンパク質(BRD2、BRD3及びBRD4)は、アセチル-リジンのツイン認識モジュール(twin acetyl-lysine recognition modules)(プロモドメイン)を介してプロモーター及びエンハンサー領域に局在化し、そこで、正の転写因子伸長複合体(CDK9及びサイクリンT、P-TEFb)の補充によって転写伸長を促進する。JQ1等のBETプロモドメインインヒビター(BBI)によるアセチル-リジンへの競合的結合は、クロマチンからBETを移動させ、結果として血液悪性腫瘍及び固形腫瘍のモデルにおいて選択的転写応答及び抗増殖の効力をもたらす。しかし、BETインヒビターに対する適応的抵抗性疾患(adaptive resistance disease to BET inhibitors)は、がんにおけるBBIに関する一般に普及した文献中の共通テーマであり、いまだ機構について洞察は一切得られていない。したがって、BBIに抵抗性を持つ又は抵抗性を生じ得るがんに対する新規の治療法の発見が必要とされている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

50

- 【特許文献 1】JP2009028043
- 【特許文献 2】JP2009183291
- 【特許文献 3】WO2011054843
- 【特許文献 4】WO2011054848
- 【特許文献 5】WO2009/084693A1
- 【特許文献 6】WO2009084693
- 【特許文献 7】WO2011054844
- 【特許文献 8】WO2011054846
- 【特許文献 9】US2012028912
- 【特許文献 10】JP2008-156311 10
- 【特許文献 11】US2011143651
- 【特許文献 12】WO2011143669
- 【特許文献 13】WO2011143660
- 【特許文献 14】WO2011054851
- 【特許文献 15】US2010/0267673
- 【特許文献 16】WO2009/117769
- 【特許文献 17】WO2013181488
- 【特許文献 18】WO2008/119109
- 【特許文献 19】WO2007/143081
- 【特許文献 20】WO2012/103059 20
- 【特許文献 21】US8309582
- 【特許文献 22】US8557812
- 【特許文献 23】US8865901
- 【特許文献 24】WO2012071374
- 【特許文献 25】US2011/0207789
- 【特許文献 26】US6607916
- 【特許文献 27】US2010/0256217
- 【特許文献 28】WO2006.065724
- 【非特許文献】
- 【0006】 30
- 【非特許文献 1】Stedman's Medical Dictionary、25編、Hensyl編、Williams & Wilkins : Philadelphia、1990年
- 【非特許文献 2】Filippakopoulos $\bar{\nu}$ 、Bioorg Med Chem. 20(6): 1878 ~ 1886、2012
- 【非特許文献 3】Chung $\bar{\nu}$ 、J Med Chem. 54(11):3827 ~ 38、2011
- 【非特許文献 4】Chung $\bar{\nu}$ 、J Biomol Screen. 16(10):1170 ~ 85、2011
- 【非特許文献 5】Sambrook、Fritsch及 $\bar{\nu}$ Maniatis、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、(現行版)
- 【非特許文献 6】CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F. M. Ausubel $\bar{\nu}$ 編、(現行版))
- 【非特許文献 7】the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (現行版) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney編(1987)). DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II(D. Glover編) 40
- 【非特許文献 8】Oligonucleotide Synthesis (N. Gait編、現行版)
- 【非特許文献 9】Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins編、現行版)
- 【非特許文献 10】Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, 編、現行版)
- 【非特許文献 11】Fundamental Virology, 2nd Edition, vol. I & II (B. N. Fields and D. M. Knipe編)
- 【非特許文献 12】Alonso A $\bar{\nu}$ 、(2004) Cell 117: 699 ~ 711 50

- 【非特許文献 1 3】 Janssens V & Goris J (2001) Biochem J 353:417 ~ 439
 【非特許文献 1 4】 Virshup D (2000) Curr Opin Cell Biol 12:180 ~ 185
 【非特許文献 1 5】 Lechward K (2001) Acta Biochem Pol 48:921 ~ 933
 【非特許文献 1 6】 Cohen P (1990) FEBS Lett 268:355 ~ 359
 【非特許文献 1 7】 Cangr (J Hematol Oncol 2015 8: 129)
 【非特許文献 1 8】 Tawfic (2001, Histol. Histopathol, 16:573 ~ 82
 【非特許文献 1 9】 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa

【非特許文献 2 0】 Applied Statistics for Engineers and Scientists by Petruccioli、Chen及びNandram 1999 再版

【非特許文献 2 1】 www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/

【非特許文献 2 2】 ccb.jhu.edu/software/tophat/igenomes.shtml

【非特許文献 2 3】 github.com/BradnerLab/pipeline/wiki/bamliquidator

【非特許文献 2 4】 younglab.wi.mit.edu/super_enhancer_code.html

【非特許文献 2 5】 github.com/BradnerLab/TNBC

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本開示のいくつかの態様は、がんを治療する方法を提供する。方法は、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びにプロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーターを投与する工程を含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、がんは、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ。

【0009】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びPP2Aアクチベーターは、BETインヒビター単体又はPP2Aアクチベーター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である。

【0010】

いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは小分子である。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、JQ1又はその誘導体である。

【0011】

いくつかの実施形態では、PP2Aアクチベーターは小分子である。いくつかの実施形態では、PP2Aアクチベーターは、フェノチアジン化合物又はFTY720である。いくつかの実施形態では、フェノチアジン化合物は、クロルプロマジン、メソリダジン、チオリダジン、アセトフェナジン、フルフェナジン、ペルフェナジン、トルフルオペラジン、並びにこれらの薬学的に許容される塩及びエステルからなる群から選択される。

【0012】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びPP2Aアクチベーターは、同時に又は連続して投与される。

【0013】

いくつかの実施形態では、方法は、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む。

【0014】

本開示のいくつかの態様は、がんを治療する方法を提供し、該方法は、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びに巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビターを投与する工程を含む。

【0015】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、がんは、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ。

【0016】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びBcl-x1インヒビターは、BETインヒビター単体又はBcl-x1インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である。

【0017】

いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは小分子である。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、JQ1又はその誘導体である。

10

【0018】

いくつかの実施形態では、Bcl-x1インヒビターは小分子である。いくつかの実施形態では、Bcl-x1インヒビターは、ABT737、ABT-263、AT101、Sabutoclax又はTW-37である。いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びBcl-x1インヒビターは、同時に又は連続して投与される。

【0019】

いくつかの実施形態では、方法は、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む。

20

【0020】

本開示のいくつかの態様は、がんを治療する方法を提供し、該方法は、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びにカゼインキナーゼ2(CK2)インヒビターを投与する工程を含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、がんは、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ。

【0022】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びCK2インヒビターは、BETインヒビター単体又はCK2インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である。

【0023】

いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは小分子である。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、JQ1又はその誘導体である。

30

【0024】

いくつかの実施形態では、CK2インヒビターは小分子である。いくつかの実施形態では、CK2インヒビターは、CX-4945、DMAT、エラグ酸、又はTTP22である。

【0025】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びCK2インヒビターは、同時に又は連続して投与される。

40

【0026】

いくつかの実施形態では、方法は、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む。

【0027】

本開示のいくつかの態様は、がんを治療する方法を提供し、該方法は、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びにメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを投与する工程を含

50

む。

【0028】

いくつかの実施形態では、がんは、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ。

【0029】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びMED1インヒビターは、BETインヒビター単体又はMED1インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である。

【0030】

いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは小分子である。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、JQ1又はその誘導体である。

10

【0031】

いくつかの実施形態では、MED1インヒビターは、MED1とBRD4との間の相互作用を破壊する。いくつかの実施形態では、MED1インヒビターは、小分子、抗体、ペプチド又はアンチセンス化合物である。

【0032】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びMED1インヒビターは、同時に又は連続して投与される。

【0033】

いくつかの実施形態では、方法は、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、及び/又はカゼインキナーゼ2(CK2)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む。

20

【0034】

本開示のいくつかの態様は、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有する対象を特定する方法を提供し、該方法は、BETインヒビター治療を受けた対象から得た腫瘍サンプル中のプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)の細胞内の位置を決定するアッセイを実施する工程と、BRD4が核局在性を有する場合、BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして対象を特定する工程とを含む。

30

【0035】

いくつかの実施形態では、BRD4が細胞質内局在性を有する場合、対象は、BETインヒビター治療に抵抗性がないがんを有するものとして特定される。

【0036】

いくつかの実施形態では、方法は、BETインヒビターを、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターと組み合わせて投与することによって、BETインヒビター治療に抵抗性を持つがんを有するものとして特定された対象を治療する工程を更に含む。

40

【0037】

いくつかの実施形態では、アッセイは、免疫組織化学、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、ELISA、又はFACS分析を含む。いくつかの実施形態では、BRD4の細胞内の位置は、抗体を免疫蛍光と併用して決定される。

【0038】

本開示のいくつかの態様は、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有する対象を特定する方法を提供し、該方法は、がんを有する対象から得た腫瘍サンプル中のリン酸化プロモドメイン含有タンパク質4(pBRD4)の非リン酸化BRD4(BRD4)に対する比を決定するアッセイを実施する工程と、pBRD4のBRD4に対する比が、対照のpBRD4のBRD4に対する比と比較して高い場合、

50

BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして対象を特定する工程とを含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、pBRD4のBRD4に対する比が、対照のpBRD4のBRD4に対する比と比較して低い場合又は変わらない場合、対象は、BETインヒビター治療に抵抗性がないがんを有するものとして特定される。

【0040】

いくつかの実施形態では、方法は、BETインヒビターを、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターと組み合わせて投与することによって、BETインヒビター治療に抵抗性を持つがんを有するものとして特定された対象を治療する工程を更に含む。

10

【0041】

いくつかの実施形態では、アッセイは、免疫プロット法、免疫組織化学、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、ELISA、又はFACS分析を含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、pBRD4のBRD4に対する比は、免疫プロット法によって決定される。

【0043】

本開示のいくつかの態様は、がんを治療する方法を提供し、該方法は、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びにB細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビターを投与する工程を含む。

20

【0044】

いくつかの実施形態では、がんは、BETインヒビター単体による治療に抵抗性を持つ。

【0045】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びBcl-2インヒビターは、BETインヒビター単体又はBcl-2インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である。

【0046】

いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、プロモドメイン含有タンパク質2(BRD2)インヒビター、プロモドメイン含有タンパク質3(BRD3)インヒビター、又はプロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)インヒビターである。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは小分子である。いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、JQ1又はその誘導体である。

30

【0047】

いくつかの実施形態では、Bcl-2インヒビターは小分子である。いくつかの実施形態では、Bcl-2インヒビターはABT-199である。

【0048】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びBcl-2インヒビターは、同時に又は連続して投与される。

40

【0049】

いくつかの実施形態では、方法は、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを対象に投与する工程を更に含む。

【0050】

本発明の実施形態及び態様はそれぞれ、単独で又は組み合わせて実践することができる。また、本明細書で用いられる表現及び専門用語は、説明を目的としたものであり、限定するものと見なすべきではない。「含めた(including)」、「含む(comprising)」、又は「有する(having)」、「含有する(containing)」、「要する(involving)」、及びこれら

50

の変形体の本明細書における使用は、以下に列挙する項目及びその同等物、並びに追加の項目を包含することを意味する。

【0051】

これら、また、本発明の他の態様、並びに様々な利点及び実用性が、詳細な説明を参照して明らかになるであろう。本発明の各態様は、当然のことながら、さまざまな実施形態を包含することができる。

【0052】

本出願中で確認されるすべての文献は、その全内容が参照により本明細書に援用される。

【図面の簡単な説明】

10

【0053】

【図1A】乳がんにおけるBBIに対する応答を示す図である。TNBC、HER2⁺、及び管腔細胞型乳がん、並びに不死化乳腺基底上皮細胞株のパネルにおける、BETインヒビター及び陰性対照としての不活性類似体(JQ1R及びアルプラゾラム)の平均IC50のヒートマップ。比色スケールにおけるIC50値:非常に感受性(<0.01 μM)、感受性(=1 μM)、抵抗性まで(>20 μM)。

【図1B】乳がんにおけるBBIに対する応答を示す図である。すべての誤差バーはSEMを表す。BETプロモドメインタンパク質を標的とするsiRNAのトランスフェクションの4日後の細胞生存率。

【図1C】乳がんにおけるBBIに対する応答を示す図である。G2/Mにおいて、100ng/mLのノコダゾールで同期化した後、放出の1時間前又は3時間後に添加したDMSO又はJQ1(500nM)を含む新鮮培地に置き換えたSUM159細胞の細胞周期プロファイル。放出後の異なる時点(0、6、12時間)で、細胞を採取した。

20

【図1D】乳がんにおけるBBIに対する応答を示す図である。乳房細胞株のパネルにおける、示したタンパク質の免疫プロット分析。

【図1E】乳がんにおけるBBIに対する応答を示す図である。JQ1(500nM)処理の前及び3日後のTNBC株における基底(高分子量-HMW)及び管腔(低分子量-LMW及びサイトケラチン18)サイトケラチンの免疫蛍光。スケールバーは20 μmを示す。

【図1F】乳がんにおけるBBIに対する応答を示す図である。すべての誤差バーはSEMを表す。箱ひげ図は、乳腺脂肪体への親の及びTET誘導性のshBRD4-発現SUM159細胞の注射の28日後及び60日後の異種移植片の質量を示す;nは、実験当たりのマウスの数を示す。マウスは、JQ1(50mg/kg、毎日)、14日目に開始して14日間ビヒクルのみ(SUM159)、又は注射の21日後にドキシサイクリン(SUM159-shBRD4)を投与された。

30

【図1G】乳がんにおけるBBIに対する応答を示す図である。JQ1処理した又はしていないSUM159の異種移植片における基底(HMWサイトケラチン、サイトケラチン17、pSTAT3、及びCD44)及び管腔(LMWサイトケラチン、サイトケラチン18、及びCD24)マーカーのヘマトキシリン-エオシン染色及び免疫蛍光分析。スケールバーは、それぞれ、H&Eについては100 μm、免疫蛍光については50 μmを示す。

【図2A】TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーに関連する遺伝子転写を示す図である。プロモーター転写開始部位(TSS)領域において結合するビオチン化JQ1(Bio-JQ1)、BRD4、及びH3K27ac並びにTSSと遠位のエンハンサー領域に結合するBio-JQ1(右)を示すヒートマップ。各行は、TSS又はエンハンサーセンターのいずれかからの単一のゲノム領域(+/-10kb)を表す。ゲノム占有率については、Bio-JQ1、BRD4、及びH3K27acについて、塩基対当たりのリード数/百万(rpm/bp)の単位での結合強度によって影をつけている。

40

【図2B】TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーに関連する遺伝子転写を示す図である。すべてのBio-JQ1が豊富な結合領域において、BRD4とBio-JQ1のゲノム結合の間の相関関係(左)又はH3K27acとBio-JQ1のゲノム結合の間の相関関係(右)を示す散布図。ゲノム占有率の単位は、rpm/bpである。単純線形回帰は、黒で描かれている。ピアソン相関関係による統計が示されている。

50

【図 2 C】TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーに関連する遺伝子転写を示す図である。HIF1A遺伝子座において、SUM159細胞におけるBio-JQ1、BRD4+DMSO、及びBRD4+JQ1を示す遺伝子のトラック。x軸は、以下に描かれている遺伝子構造を有する染色体に沿ったポジションを示す。y軸は、rpm/bpの単位でのゲノム占有率を示す。HIF1Aスーパーエンハンサーを太線で示す。

【図 2 D】TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーに関連する遺伝子転写を示す図である。SUM159のBio-JQ1結合領域におけるBRD4+/-JQ1(左)又はH3K27ac+/-JQ1(右)の \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。12,999個のBio-JQ1領域は、Bio-JQ1結合の増加によってランク付けされ、10個の別々のピンに分割される(左から右へと表示されている)。最も弱いBio-JQ1結合領域のピンと最も強いBio-JQ1結合領域のピンの間の平均BRD4の \log_2 変化倍率の統計的有意差が示されている(ウェルチのt-検定***p-値 $<1e-10$)。 10

【図 2 E】TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーに関連する遺伝子転写を示す図である。Bio-JQ1シグナル(単位rpm)が増加するようにランク付けされた未処理のSUM159細胞において画定されるランク付けされたエンハンサーのプロット。エンハンサーは、プロモーターに含有されないBio-JQ1結合の領域として画定される。典型的なエンハンサーとスーパーエンハンサーとを識別するカットオフは、灰色の破線として示されている。TNBCの特徴的遺伝子と関連するエンハンサーを強調している。

【図 2 F】TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーに関連する遺伝子転写を示す図である。処理の3、12、及び24時間後に、JQ1処理と関連するすべての活性遺伝子又はスーパーエンハンサー(SE)のいずれかのDMSO対照に対する発現における \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。すべての活性遺伝子とスーパーエンハンサーに関連する遺伝子の間の発現の変化の統計的有意差は、ウェルチのt-検定(**p-値 $<1e-5$ 、*p-値 $<1e-3$)によって示されている。 20

【図 2 G】TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーに関連する遺伝子転写を示す図である。SUM159細胞におけるJQ1に誘導される遺伝子発現の変化によって影響を受ける最も重要なシグナル伝達経路。

【図 3 A】TNBCにおいて獲得されたBBI抵抗性を示す図である。異なる用量のJQ1で処理したSUM159細胞の生存細胞数。誤差バーはSDを表す。

【図 3 B】TNBCにおいて獲得されたBBI抵抗性を示す図である。異なる用量のJQ1で処理したSUM159R細胞の生存細胞数。誤差バーはSDを表す。 30

【図 3 C】TNBCにおいて獲得されたBBI抵抗性を示す図である。BBIインヒビターで処理したSUM159細胞及びSUM159R細胞の細胞生存能。誤差バーは、パネルのSEMを表す。

【図 3 D】TNBCにおいて獲得されたBBI抵抗性を示す図である。CXCR2及びJAK2インヒビターで処理したSUM159細胞及びSUM159R細胞の細胞生存能。誤差バーは、パネルのSEMを表す。

【図 3 E】TNBCにおいて獲得されたBBI抵抗性を示す図である。異なる用量のJQ1で処理したSUM159細胞、並びにSUM159R細胞のプール及び単細胞クローンの細胞生存能。誤差バーは、パネルのSEMを表す。

【図 3 F】TNBCにおいて獲得されたBBI抵抗性を示す図である。SUM159細胞及びSUM159R細胞に由来する異種移植片の腫瘍質量。注射の後、マウスに、JQ1を14日間(SUM159)及び30日間(SUM159R)、それぞれ14日目及び26日目から開始して投与した。誤差バーは、パネルのSEMを表す。 40

【図 3 G】TNBCにおいて獲得されたBBI抵抗性を示す図である。プロモドメインタンパク質を標的とするsiRNAをトランスフェクトしたSUM159細胞及びSUM159R細胞の細胞生存能。誤差バーは、パネルのSEMを表す。

【図 4 A】BBI抵抗性TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーを示す図である。SUM159の親又はSUM159Rにおいてスーパーエンハンサーを含有する(Bio-JQ1結合によって定義される)すべてのゲノム領域をBio-JQ1ゲノム結合シグナルの \log_2 変化(親対抵抗性)によってランク付けして示す。x軸は、Bio-JQ1シグナルの \log_2 変化倍率を示す。Bio-JQ1レベルの変化は、変化の強度によって色付けした。 50

【図4B】 BBI抵抗性TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーを示す図である。抵抗性SUM159R細胞対親のSUM159細胞における取得された、保存された、又は消失した(左、中央、右)Bio-JQ1結合のいずれかを有する領域におけるBRD4ゲノム占有率の \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。

【図4C】 BBI抵抗性TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーを示す図である。抵抗性SUM159R細胞対親のSUM159細胞における取得された、保存された、又は消失した(左、中央、右)Bio-JQ1結合のいずれかを有する領域に近接する遺伝子における発現の \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。

【図4D】 BBI抵抗性TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーを示す図である。SUM159Rの取得したBCL-xL遺伝子座でSUM159の親細胞(上)又はSUM159R抵抗性細胞(下)におけるBio-JQ1、BRD4、及びH3K27acを示す遺伝子のトラック。x軸は、以下に描かれている遺伝子構造を有する染色体に沿ったポジションを示す。y軸は、rpm/bpの単位でのゲノム占有率を示す。BCL-xLスーパーエンハンサーをバーで示す。

【図4E】 BBI抵抗性TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーを示す図である。Bio-JQ1が結合したSOD2遺伝子座でSUM159の親細胞(上)又はSUM159R抵抗性細胞(下)におけるBio-JQ1、BRD4+/-JQ1、及びH3K27ac+/-JQ1を示す遺伝子のトラック。x軸は、以下に描かれている遺伝子構造を有する染色体に沿ったポジションを示す。y軸は、rpm/bpの単位でのゲノム占有率を示す。SOD2スーパーエンハンサーをバーで示す。

【図4F】 BBI抵抗性TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーを示す図である。親のSUM159細胞(左)又は抵抗性SUM159R細胞(右)のいずれかにおいて、Bio-JQ1が結合した領域でのBRD4のゲノム占有率における \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。

【図4G】 BBI抵抗性TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーを示す図である。親のSUM159細胞(左)又は抵抗性SUM159R細胞(右)のいずれかにおいて、Bio-JQ1が結合した領域でのH3K27acのゲノム占有率における \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。

【図4H】 BBI抵抗性TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーを示す図である。親のSUM159細胞において、処理の24時間後に、JQ1対DMSOによって上方調節された遺伝子の発現における \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。発現における \log_2 変化倍率は、親のSUM159細胞(左)又は抵抗性SUM159R細胞(右)のいずれかについて示される。

【図4I】 BBI抵抗性TNBCにおけるBRD4ゲノム結合及びスーパーエンハンサーを示す図である。親のSUM159細胞において、処理の24時間後に、JQ1対DMSOによって下方調節された(図4I)遺伝子の発現における \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。発現における \log_2 変化倍率は、親のSUM159細胞(左)又は抵抗性SUM159R細胞(右)のいずれかについて示される。

【図5A】 TNBCにおけるBBI抵抗性の機構を示す図である。SILAC RIMEに基づくJQ1処理後の、SUM159細胞及びSUM159R細胞におけるBRD4関連タンパク質の変化を示すプロット。軸は、変化倍率(FC)の \log_{10} を表す。

【図5B】 TNBCにおけるBBI抵抗性の機構を示す図である。SUM159細胞及びSUM159R細胞におけるBRD4免疫沈降物(上のパネル)及び総細胞溶解物(下のパネル)の免疫プロット分析。

【図5C】 TNBCにおけるBBI抵抗性の機構を示す図である。すべての誤差バーはSEMを表す。内因性BRD4の付随するノックダウンを有する外因性WT、BDmut、7A及び7D突然変異体BRD4を発現するSUM159細胞及びSUM159R細胞の細胞生存能。

【図5D】 TNBCにおけるBBI抵抗性の機構を示す図である。すべての誤差バーはSEMを表す。内因性BRD4の付随するノックダウンを有する、外因性WT又はBDmut BRD4を発現するSUM159細胞のJQ1に対する感受性。

【図5E】 TNBCにおけるBBI抵抗性の機構を示す図である。すべての誤差バーはSEMを表す。内因性BRD4の付随するノックダウンを有する、外因性WT又はBDmut BRD4を発現するSUM159R細胞のJQ1に対する感受性。

【図6A】 BRD4リン酸化の調節及び関連性を示す図である。示した用量のJQ1を用いる処理後のSUM159細胞及びSUM159R細胞におけるリン酸化BRD4(pBRD4)、BRD4、MED1、及びBRD3の免疫プロット分析。

【図6B】 BRD4リン酸化の調節及び関連性を示す図である。PP2A-A、PP2A-C又は両方のサ

10

20

30

40

50

ブユニットのノックダウン後のSUM149及びSUM159細胞におけるPP2AのA及びCサブユニット、pBRD4並びにBRD4の免疫プロット分析。

【図6C】BRD4リン酸化の調節及び関連性を示す図である。対照並びに異なる用量のJQ1を用いて処理されたSUM149及びshPP2A-C発現SUM149細胞の生存細胞数。誤差バーはSEMを表す。

【図6D】BRD4リン酸化の調節及び関連性を示す図である。異なる用量のフェノチアジンをを用いる治療の3時間後のSUM159R細胞におけるpBRD4及びBRD4の免疫プロット分析。

【図6E】BRD4リン酸化の調節及び関連性を示す図である。JQ1、フェノチアジン又は両方の化合物で処理したSUM159R細胞の生存細胞数。誤差バーはSDを表す。

【図6F】BRD4リン酸化の調節及び関連性を示す図である。JQ1(5 μ M)及びCK2インヒビター-CX-4945(10 μ M)を用いた処理の3時間後のBRD4免疫沈降物及びSUM159R細胞の総細胞溶解物の免疫プロット分析。

【図6G】BRD4リン酸化の調節及び関連性を示す図である。JQ1(5 μ M)及びフェノチアジン(20 μ M)を用いた処理の3時間後のBRD4免疫沈降物及びSUM159R細胞の総細胞溶解物の免疫プロット分析。

【図6H】BRD4リン酸化の調節及び関連性を示す図である。JQ1(5 μ M)を用いた処理の3時間後のFLAGでタグ付けしたWT又は突然変異体(7A、7D)のBRD4突然変異体タンパク質を発現するFLAG-BRD4免疫沈降物及びSUM159細胞の総細胞溶解物の免疫プロット分析。

【図6I】BRD4リン酸化の調節及び関連性を示す図である。外因性WT、7A又は7D突然変異体のBRD4を発現するSUM159細胞及びSUM159R細胞のJQ1感受性。誤差バーはSEMを表す。

【図7A】TNBCにおけるBETプロモドメインタンパク質及び細胞の成長を示す図である。TET誘導性BRD4標的化又はlacZ shRNAを発現するSUM159細胞及びMDA-MB-231細胞の細胞生存能。

【図7B】TNBCにおけるBETプロモドメインタンパク質及び細胞の成長を示す図である。siRNAによるトランスフェクションの4日後のBETプロモドメインタンパク質の免疫プロット分析。

【図7C】TNBCにおけるBETプロモドメインタンパク質及び細胞の成長を示す図である。100ng/mlのノコダゾールで同期化した後、放出の1時間前又は3時間後に添加されたDMSO又はJQ1(500nM)を有する新鮮な培地に置き換えたSUM159細胞の放出後の異なる時点(0、3、6、12時間)における、示したタンパク質の免疫プロット分析。

【図7D】TNBCにおけるBETプロモドメインタンパク質及び細胞の成長を示す図である。72時間のJQ1(500nM)を用いる処理又はTET誘導性shRNAを使用するBRD4の下方調節後のSUM159細胞の細胞周期分析。

【図7E】TNBCにおけるBETプロモドメインタンパク質及び細胞の成長を示す図である。72時間のJQ1(500nM)を用いる処理 TET誘導性shRNAを使用するBRD4の下方調節後のSUM159細胞のアネキシンV染色。すべての誤差バーはSEMを表す。

【図8A】TNBCにおけるBBIに対する応答を示す図である。SUM159細胞におけるJQ1処理(500nM)後の異なる時点における(上)及びSUM159細胞及びMDA-MB-436細胞における24時間の処理のための異なるJQ1用量における(下)、示したタンパク質の免疫プロット分析。

【図8B】TNBCにおけるBBIに対する応答を示す図である。SUM149、SUM159及びMDA-MB-231細胞におけるJQ1処理(500nM)後の異なる時点における、示したタンパク質の免疫プロット分析。

【図8C】TNBCにおけるBBIに対する応答を示す図である。3日間のJQ1処理後のSUM159細胞のH&E染色。

【図8D】TNBCにおけるBBIに対する応答を示す図である。3日間のJQ1処理後のSUM159細胞及びMDA-MB-231細胞の老化 ガラクトシダーゼ染色。スケールバーは100 μ mを示す。

【図8E】TNBCにおけるBBIに対する応答を示す図である。箱ひげ図は、NOGマウスの鼠径部乳腺脂肪体へのMDA-MB-231(2×10^6)及びIDC50X(2×10^5)細胞の注射の30日後の異種移植片の質量を示し、nは、実験当たりのマウスの頭数を示す。マウスには、注射の16日後(MDA-MB-231)又は10日後(IDC50X) (腫瘍が触診できる大きさに達した後)に開始して14日間、JQ

10

20

30

40

50

1(50mg/kg、毎日)又はビヒクルのみ(対照)を投与した。EL12-58X PDXに対しては、マウスには、1x3x3mmに測定した組織片を鼠径部乳腺脂肪体に移植し、注射の21日後(腫瘍が触診できる大きさに達した後)に開始して14日間、毎日JQ1(50mg/kg)を投与した。

【図8F】TNBCにおけるBBIに対する応答を示す図である。JQ1処理した又はしていないEL12-58異種移植片のプロモドメインウリジン(BrdU)並びに管腔低分子量(Low MW CK)及び基底高分子量(High MW CK)サイトケラチンの染色。スケールバーは50 μ mを示す。

【図8G】TNBCにおけるBBIに対する応答を示す図である。shRNAを標的とするTET誘導性BDR4を発現するSUM159細胞の腫瘍体積。マウスには、注射の21日後(腫瘍が触診できる大きさに達した後)に開始して39日間、ドキシサイクリン又はビヒクルのみ(対照)を投与した。すべての誤差バーはSEMを表す。

【図9A】SUM149のJQ1への応答を示す図である。SUM149のBDR4結合領域におけるBRD4+/-JQ1(左)又はH3K27ac+/-JQ1(右)の \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。5,696個のBRD4結合領域は、バックグラウンドを差し引いたBRD4結合の増加によってランク付けされ、10個の別々のピンに分割される(左から右へと表示されている)。最も弱いBRD4結合領域のピンと最も強いBDR4結合領域のピンの間の平均BDR4の \log_2 変化倍率における統計的有意差が示されている(ウェルチのt-検定***p-値<1e-10)。

【図9B】SUM149のJQ1への応答を示す図である。BDR4シグナル(単位rpm)が増加するようにランク付けされた未処理のSUM149細胞において画定されるランク付けされたエンハンサーのプロット。エンハンサーは、プロモーターに含有されないBDR4結合の領域として画定される。典型的なエンハンサーとスーパーエンハンサーとを識別するカットオフは、灰色の破線として示されている。TNBCの特徴的遺伝子と関連するエンハンサーを強調している。

【図9C】SUM149のJQ1への応答を示す図である。SUM149(y軸)及びSUM159(x軸)における12時間のJQ1処理の際の遺伝子発現の \log_2 変化倍率の間の関係を示す散布図。単純線形回帰が描かれている。ピアソン相関関係による統計も示されている。

【図9D】SUM149のJQ1への応答を示す図である。図9D、12時間のJQ1処理に関連するすべての活性遺伝子又はスーパーエンハンサー(SE)のいずれかのDMSO対照と比較した発現の \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。すべての活性遺伝子とスーパーエンハンサーに関連する遺伝子の間の発現の変化の統計的有意差は、ウェルチのt-検定(*p-値<1e-3)によって示されている。

【図9E】SUM149のJQ1への応答を示す図である。親のSUM149細胞において、処理の12時間後に、JQ1対DMSOによって上方調節された遺伝子の発現における \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。発現における \log_2 変化倍率は、親のSUM149細胞(左)又は抵抗性SUM149R細胞(右)のいずれかについて示されている。

【図9F】SUM149のJQ1への応答を示す図である。親のSUM149細胞において、処理の12時間後に、JQ1対DMSOによって下方調節された遺伝子の発現における \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。発現における \log_2 変化倍率は、親のSUM149細胞(左)又は抵抗性SUM149R細胞(右)のいずれかについて示されている。

【図9G】SUM149のJQ1への応答を示す図である。異なる用量のJQ1(2 μ M、10 μ M)で処理されたSUM149(左)及びSUM149R(右)の生存細胞数。誤差バーはSDを表す。

【図10A】SUM159R細胞の特徴付けを示す図である。SUM159細胞及びSUM159R細胞のABCトランスポーターの発現。29個のABCトランスポーターの発現を2つの細胞株に関するRNA-seqデータに基づいて分析した。すべての誤差バーはSEMを表す。

【図10B】SUM159R細胞の特徴付けを示す図である。蛍光MDR(多剤耐性)物質で標識した細胞の顕微鏡検査(左)及びFACS(右)に基づいて、JQ1単体又はベラパミルと一緒に処理したSUM159R細胞及びSUM159R細胞におけるMDRポンプに対するアッセイ。

【図10C】SUM159R細胞の特徴付けを示す図である。示したタンパク質についての免疫プロット後の異なる時点におけるSUM159細胞及びSUM159R細胞のビオチン化JQ1(Bio-JQ1)の免疫沈降分析。

【図10D】SUM159R細胞の特徴付けを示す図である。shRNAを標的とするTET誘導性BDR4

10

20

30

40

50

又はlacZ shRNAを発現するSUM159R細胞の細胞生存能。すべての誤差バーはSEMを表す。

【図1 1 A】SUM159R細胞におけるBDR4結合を示す図である。JQ1の3時間の処理の前及びJQ1の3時間の処理(500nM)後のSUM159細胞及びSUM159R細胞におけるBCL-XL発現の免疫プロット分析。

【図1 1 B】SUM159R細胞におけるBDR4結合を示す図である。親のSUM159細胞において、処理の24時間後に、JQ1対DMSOによって上方又は下方調節された遺伝子の発現を示す箱ひげ図。発現は、親のSUM159細胞(左)又は抵抗性SUM159R細胞(右)のいずれかに対して、FPKMの単位で、DMSO及びJQ1で処理された状態において示される。DMSOで処理されたSUM159細胞及びJQ1で処理されたSUM159細胞に対する遺伝子発現の分布の間の統計的有意差が示される($p < 0.01$)。他のすべての分布の間の差は、有意であるとみなされない(N.S)。SUM159のDMSO遺伝子発現の分布と他のすべての分布の間の統計的有意差が示される(* p -値 $< 1e-3$)。他のすべての分布の間の差は、有意であるとみなされない。

【図1 1 C】SUM159R細胞におけるBDR4結合を示す図である。SUM159細胞及びSUM159R細胞における管腔及び基底細胞特異的遺伝子、並びにMYCの例。RNA-seqトラックが示されている。

【図1 1 D】SUM159R細胞におけるBDR4結合を示す図である。SUM159R異種移植片における、管腔サイトケラチン(CK18及びHMW)及び基底サイトケラチン(CK17及びLMW)並びに管腔細胞マーカー(VIM及びCD24)及び基底細胞マーカー(CDH1、CD44、及びpSTAT3)のH&E染色及び免疫蛍光分析。すべての誤差バーはSEMを表す。スケールバーは、それぞれ、H&Eについては100 μ m、IFについては50 μ mを示す。

【図1 2 A】他の乳がん細胞株におけるJQ1への応答。BCL-xL遺伝子座において、多発性TNBC細胞におけるBRD4+DMSO及びBRD4+JQ1を示す遺伝子のトラック。x軸は、以下に描かれている遺伝子構造を有する染色体に沿ったポジションを示す。y軸は、rpm/bpの単位でのゲノム占有率を示す。BCL-xLスーパーエンハンサーを、上で、バーとして示す。

【図1 2 B】他の乳がん細胞株におけるJQ1への応答。SOD2遺伝子座において、多発性TNBC細胞におけるBRD4+DMSO及びBRD4+JQ1を示す遺伝子のトラック。x軸は、以下に描かれている遺伝子構造を有する染色体に沿ったポジションを示す。y軸は、rpm/bpの単位でのゲノム占有率を示す。SOD2スーパーエンハンサーを、上で、バーとして示す。

【図1 2 C】他の乳がん細胞株におけるJQ1への応答。多発性TNBCに対する各細胞株のすべてのBDR4結合領域について、BRD4占有率 \pm JQ1の \log_2 変化倍率を示す箱ひげ図。細胞株は、それらのJQ1(IC50)によって順序付けられ、それらの感受性によって色付けされる。

【図1 2 D】他の乳がん細胞株におけるJQ1への応答。SUM149の親細胞又はSUM149R抵抗性細胞のBCL-xL座におけるH3K27AC占有率を示す遺伝子のトラック。x軸は、以下に描かれている遺伝子構造を有する染色体に沿ったポジションを示す。y軸は、rpm/bpの単位でのゲノム占有率を示す。

【図1 3 A】BBI抵抗性の機構を示す図である。JQ1処理した(5 μ M、3時間)又はしていない、示した細胞株におけるMED1に対するBRD4免疫沈降物の免疫プロット分析。

【図1 3 B】BBI抵抗性の機構を示す図である。siRNAのトランスフェクション後のBRD4の長い形態(BRD4L)及び短い形態(BRD4S)の免疫プロット分析。

【図1 3 C】BBI抵抗性の機構を示す図である。SUM159細胞及びSUM159R細胞における、示した、外因的に発現したFLAGでタグ付けしたBRD4タンパク質の免疫プロット分析。

【図1 3 D】BBI抵抗性の機構を示す図である。示した用量のCK2、PI3K、及びMEKインヒビターを用いて2時間処理したSUM159細胞及びSUM159R細胞におけるホスホBRD4(pBRD4)及びBRD4の免疫プロット分析。

【図1 3 E】BBI抵抗性の機構を示す図である。JQ1処理した又はしていない、示した細胞株におけるpBRD4、BRD4、MED1及びACTBの免疫プロット分析。

【図1 3 F】BBI抵抗性の機構を示す図である。CK2インヒビター(CX-4945、10 μ M)による3時間の処理後のSUM159細胞及びSUM159R細胞におけるCK2物質の免疫プロット分析。

【図1 3 G】BBI抵抗性の機構を示す図である。異なる用量のフェノチアジンで6時間処理した、示した細胞株におけるpBRD4及びBRD4の免疫プロット分析。

10

20

30

40

50

【図13H】 BBI抵抗性の機構を示す図である。JQ1処理(5 μ M、3時間)した又はしていないSUM159細胞における外因性FLAGでタグ付けしたBRD4タンパク質(WT、BD、7D及び7A)の免疫プロット分析。スケールバーは20 μ mを示す。

【図14A】 BBI抵抗性の克服を示す図である。JQ1とABT737(BCL-x1及びBCL-2インヒビター)との相乗作用の研究。点は、相乗作用について評価した薬物濃度の対応する値を表す。対角線は薬物相加性を示す。線の上の点は、拮抗する薬物の組合せを表し、線の下は相乗的な薬物の組合せを表す。

【図14B】 BBI抵抗性の克服を示す図である。JQ1とCX-4945(CK2インヒビター)との相乗作用の研究。点は、相乗作用について評価した薬物濃度の対応する値を表す。対角線は薬物相加性を示す。線の上の点は、拮抗する薬物の組合せを表し、線の下は相乗的な薬物の組合せを表す。

【図14C】 BBI抵抗性の克服を示す図である。JQ1とペルフェナジン(PP2Aアクチベーター)との相乗作用の研究。点は、相乗作用について評価した薬物濃度の対応する値を表す。対角線は薬物相加性を示す。線の上の点は、拮抗する薬物の組合せを表し、線の下は相乗的な薬物の組合せを表す。

【図15A】 BBI抵抗性細胞に由来する異種移植片の腫瘍質量に関するBBI併用療法の効果を示す図である。SUM149細胞に由来する腫瘍を有する、腫瘍保有マウスに、ビヒクル(対照)、単剤療法(JQ1、JAK2I、ABT 263、又はABT 199)、又はBBI併用療法(JAK2I+JQ1、ABT 263+JQ1、又はABT 199+JQ1)を投与した。

【図15B】 BBI抵抗性細胞に由来する異種移植片の腫瘍質量に関するBBI併用療法の効果を示す図である。SUM159細胞に由来する腫瘍を有する、腫瘍保有マウスに、ビヒクル(対照)、単剤療法(JQ1、JAK2I、ABT 263、又はABT 199)、又はBBI併用療法(JAK2I+JQ1、ABT 263+JQ1、又はABT 199+JQ1)を投与した。

【図16A】 ビヒクル、単剤療法、又はBBI併用療法で処理したBBI抵抗性SUM159異種移植片のH&E染色を示す図である。画像は、SUM159細胞に由来する腫瘍を有する、対照としてビヒクル(上のパネル)、JQ1(下のパネル)で処理した腫瘍保有マウスから得られた。

【図16B】 ビヒクル、単剤療法、又はBBI併用療法で処理したBBI抵抗性SUM159異種移植片のH&E染色を示す図である。画像は、SUM159細胞に由来する腫瘍を有する、ABT 199(上のパネル)、ABT 263(下のパネル)で処理した腫瘍保有マウスから得られた。

【図16C】 ビヒクル、単剤療法、又はBBI併用療法で処理したBBI抵抗性SUM159異種移植片のH&E染色を示す図である。画像は、SUM159細胞に由来する腫瘍を有する、INC 424(上のパネル)、ABT 199+JQ1(下のパネル)で処理した腫瘍保有マウスから得られた。

【図16D】 ビヒクル、単剤療法、又はBBI併用療法で処理したBBI抵抗性SUM159異種移植片のH&E染色を示す図である。画像は、SUM159細胞に由来する腫瘍を有する、ABT 263+JQ1(上のパネル)、INC 424+JQ1(下のパネル)で処理した腫瘍保有マウスから得られた。

【図17】 Bcl-x1マウス抗体を用いて染色したBBI感受性及びBBI抵抗性SUM159異種移植片の細胞の蛍光画像法を示す図である。BBI感受性SUM159細胞(上)及びBBI抵抗性SUM159細胞(下)に由来する異種移植片を染色して、Bcl-x1の相対的な存在を決定した。

【発明を実施するための形態】

【0054】

本開示は、BETプロモドメインインヒビター(BBI)による治療に抵抗性を持つ又はBBIによる治療に抵抗性を持ちやすい対象の特定及び治療の方法を提供する。本開示のいくつかの態様は、併用療法を用いた、このようながんの治療に関する。

【0055】

本発明によれば、BBIに抵抗性があるがんは、プロモドメインから独立した転写及び細胞増殖を支持する野生型BRD4に依然として左右されることが発見されている。抵抗性細胞中、プロテインホスファターゼ2A(PP2A、現在、主要なBRD4セリンホスファターゼと認定される)の活動低下及びメディエーター複合体サブユニット1(MED1)への結合増加に起因する過剰リン酸化のために、BRD4がクロマチンに補充される。カゼインキナーゼII(CK2)インヒビター又はPP2Aアクチベーター等のBRD4リン酸化反応の調節物質を使用して抵抗性細胞

10

20

30

40

50

胞中のBRD4リン酸化反応を阻害すると、BRD4免疫沈降実験におけるMED1量が低減され、リン酸化BRD4(pBRD4)が非リン酸化BRD4より効率的にMED1を結合することが実証されている。

【0056】

加えて、微分スーパーエンハンサー(SE)解析は、これらのゲノム遺伝子座に結合するBRD4の富化及び関連遺伝子の転写増加に関連した抵抗性細胞中のSEの数の有意な増加を発見した。その中でも最高に増加したスーパーエンハンサーは、BCL-xL遺伝子座のH3K27acが濃縮された上流及び遺伝子内領域であった。特に、BCL-xL及びBcl-2は、発現プロファイリングによれば、抵抗性細胞における、数少ない高度に上方調節された遺伝子のうちに入っており、その発見は、免疫プロット法及び蛍光画像それぞれによって確認された。特定のいづれの理論にも束縛されるものではないが、制御されずに増加するこうした抗アポトーシス因子の発現は、長期のBBI治療の間、アポトーシスに対する抵抗性をもたらすことが予測される。総合して、これらの結果から、PP2Aアクチベーター、CK2インヒビター、Bcl-2インヒビター、BCL-xLインヒビター又はMED1インヒビターと対にする等の、BBI抵抗性を予測し克服するための組合せ戦略の原理が生まれた。

10

【0057】

BETプロモドメインインヒビターJQ1と、BCL-XL(ABT737)、CK2インヒビター(CX-4945)、JAK2インヒビター(INC424)、Bcl-x1/Bcl-2インヒビター(ABT263)、Bcl-2インヒビター(ABT199)、及びPP2Aアクチベーター(ペルフェナジンPPZ)を標的とした分子との間で極めて大きな相乗作用が観察され、これらの複合薬が抵抗性細胞中でより高い効力を実現することが実証された。

20

【0058】

治療方法

これに応じて、本開示の態様は、がんを治療する方法であって、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター並びにプロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーターを投与する工程を含む方法を提供する。

【0059】

本開示のいくつかの態様は、がんを治療する方法であって、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン含有タンパク質インヒビター及びB細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビターを投与する工程を含む方法を提供する。

30

【0060】

本開示のいくつかの態様は、がんを治療する方法であって、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン含有タンパク質インヒビター及び巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビターを投与する工程を含む方法を提供する。

【0061】

本開示のいくつかの態様は、がんを治療する方法であって、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン含有タンパク質インヒビター及びカゼインキナーゼ2(CK2)インヒビターを投与する工程を含む方法を提供する。

40

【0062】

本開示のいくつかの態様は、がんを治療する方法であって、それを必要とする対象に、がんの治療に有効な量の、プロモドメイン含有タンパク質インヒビター及びメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを投与する工程を含む方法を提供する。

【0063】

「がん」という用語は、制御不能なほど増殖し、正常な体内組織に浸潤し破壊する能力を有する異常細胞の発達を特徴とする疾患類を指す。例えば、Stedman's Medical Dictionary、25編、Hensyl編、Williams & Wilkins: Philadelphia、1990年を参照。代表的ながんとしては、これに限定されないが、血液悪性腫瘍が挙げられる。「血液悪性腫瘍」という用語は、血液、骨髄、及び/又はリンパ節を侵す腫瘍を指す。代表的な血液悪性腫瘍には、これらに限定されないが、急性リンパ球性白血病(ALL)(例えば、B細胞ALL、T細胞ALL

50

)、急性骨髄性白血病(AML)(例えば、B細胞AML、T細胞AML)、慢性骨髄性白血病(CML)(例えば、B細胞CML、T細胞CML)、及び慢性リンパ球性白血病(CLL)(例えば、B細胞CLL、T細胞CLL)等の白血病、ホジキンリンパ腫(HL)(例えば、B細胞HL、T細胞HL)及び非ホジキンリンパ腫(NHL)(例えば、びまん性大細胞型リンパ腫(DLCL)(例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL、例えば活性化B細胞(ABC)DLBCL(ABC-DLBCL)))等のB細胞NHL)、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病/小リンパ球性リンパ腫(CLL/SLL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、辺縁帯B細胞リンパ腫(例えば、粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾性辺縁帯B細胞リンパ腫)、縦隔原発B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症(WM、リンパ形質細胞性リンパ腫)、毛髪様細胞白血病(HCL)、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆B細胞リンパ芽球性リンパ腫、中枢神経系(CNS)リンパ腫(例えば、一次性CNSリンパ腫及び二次性CNSリンパ腫)等のリンパ腫、並びに前駆T細胞リンパ芽球性リンパ腫/白血病、末梢T細胞リンパ腫(PTCL)(例えば、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)(例えば、菌状息肉腫、セザリー症候群)、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、節外性ナチュラルキラーT細胞リンパ腫、腸症型T細胞リンパ腫、皮下脂肪織炎様T細胞リンパ腫、及び未分化大細胞リンパ腫)等のT細胞NHL、免疫特権部位のリンパ腫(例えば、脳リンパ腫、眼球リンパ腫、胎盤のリンパ腫、胎児のリンパ腫、辜丸リンパ腫)、上記の1種以上の白血病/リンパ腫の混合、骨髄異形成、並びに多発性骨髄腫(MM)が挙げられる。追加の代表的ながんととしては、これらに限定されないが、肺がん(例えば、気管支癌、小細胞肺がん(SCLC)、非小細胞肺がん(NSCLC)、肺腺癌)、腎臓がん(例えば、腎芽細胞腫、別名ウィルムス腫瘍、腎細胞癌)、聴神経腫、腺癌、副腎がん、肛門がん、脈管肉腫(例えば、リンパ管肉腫、リンパ管皮内肉腫(lymphangioendotheliosarcoma)、血管肉腫)、虫垂がん、良性単クローン性免疫グロブリン血症、胆道がん(例えば、胆管癌)、膀胱がん、乳がん(例えば、乳腺腺癌、乳頭癌、トリプルネガティブ乳がん、乳がん(mammary cancer)、乳腺髓様癌)、脳がん(例えば、髄膜腫、グリア芽細胞腫、神経膠腫(例えば、星状細胞腫、乏突起膠腫)、髄芽細胞腫)、気管支がん、カルチノイド腫瘍、子宮頸がん(例えば、子宮頸部腺癌)、絨毛癌、脊索腫、頭蓋咽頭腫、結腸直腸がん(例えば、結腸がん、直腸がん、結腸直腸腺癌)、結合組織がん、上皮癌、上皮肉腫(例えば、カボジ肉腫、多発性特発性出血性肉腫)、子宮内膜がん(例えば、子宮がん、子宮肉腫)、食道がん(例えば、食道腺癌、パレット腺癌)、ユーイング肉腫、眼がん(例えば、眼内黒色腫、網膜芽細胞腫)、家族性過好酸球増加症(familial hypereosinophilia)、胆嚢がん、胃がん(例えば、胃腺癌)、消化管間質性腫瘍(GIST)、胚細胞がん、頭頸部がん(例えば、頭頸部扁平上皮癌、口腔がん(例えば、口腔扁平上皮癌)、咽喉がん(例えば、喉頭がん、咽頭がん、鼻咽腔がん、口腔咽頭がん))、重鎖病(例えば、アルファ鎖病、ガンマ鎖病、ミュー鎖病)、血管芽細胞腫、下咽頭がん、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍(inflammatory myofibroblastic tumors)、免疫球性アミロイドーシス、肝臓がん(例えば、肝細胞がん(HCC)、悪性ヘパトーマ)、平滑筋肉腫(LMS)、肥満細胞症(例えば、全身性肥満細胞症)、筋がん、骨髄異形成症候群(MDS)、中皮腫、骨髄増殖性疾患(MPD)(例えば、真性赤血球増加症(PV)、本態性血小板増加症(ET)、原発性骨髄線維症(AMM)、別名、骨髄線維症(MF)、慢性特発性骨髄線維症、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性好中球性白血病(CNL)、好酸球増加症候群(HES))、神経芽細胞腫、神経繊維腫(例えば、神経線維腫症(NF)1型又は2型、神経鞘腫症)、神経内分泌がん(例えば、胃腸膵神経内分泌腫瘍(gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor)(GEP-NET)、カルチノイド腫瘍)、骨肉腫(例えば、骨がん)、卵巣がん(例えば、嚢胞腺癌、卵巣胎児性癌、卵巣腺癌)、乳頭腺癌、膵臓がん(例えば、膵臓腺癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)、島細胞腫)、陰茎がん(例えば、陰茎及び陰嚢のパジェット病)、松果体腫、未分化神経外胚葉性腫瘍(PNT)、形質細胞腫瘍形成(plasma cell neoplasia)、腫瘍随伴症候群、上皮内新生物、前立腺がん(例えば、前立腺腺癌)、直腸がん、横紋筋肉腫、唾液腺がん、皮膚がん(例えば、扁平上皮癌(SCC)、角化性棘細胞腫(KA)、黒色腫、基底細胞癌(BCC))、小腸がん(例えば、虫垂がん)、軟部組織の肉腫(例えば、悪性線維性組織球腫(MFH)、脂肪肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)、軟骨肉腫、線維肉腫、粘液肉腫)、脂腺癌、小腸がん、汗腺癌、滑膜腫、辜丸がん(例えば、精上皮腫、精巣胎児性癌)、甲状腺がん(例えば

10

20

30

40

50

、甲状腺の乳頭状癌、甲状腺乳頭癌(PTC)、甲状腺髄様がん)、尿道がん、膣がん、及び外陰がん(例えば、外陰パジェット病)が挙げられる。いくつかの実施形態では、がんは乳がんである。いくつかの実施形態では、がんは、トリプルネガティブ乳がんである。

【0064】

いくつかの実施形態では、がんは、BETインヒビターによる治療に抵抗性がある。BETインヒビターに抵抗性のがんは、がんが、該インヒビターに応答しないことを意味し、これは、例えば継続した増殖並びに腫瘍成長及び腫瘍負荷の増加によって証明される。場合によっては、がんは、該インヒビターによる治療(本明細書では、先に行われる治療として見なされる)に最初は応答することもあるが、しばらくすると抵抗性が高くなっていくことがある。ある場合には、がんは、該インヒビターによる治療に対して全く応答していないこともある。

10

【0065】

「治療(treatment)」、「治療する(treat)」、「治療している(treating)」という用語は、がんの発症の好転、軽減、遅延、又はがんの進行の阻害を意味する。いくつかの実施形態では、疾患の徴候又は症状が1つ以上発現した後又は観察された後で、治療を行うことができる。他の実施形態では、疾患の徴候又は症状がない状態で治療を行うことができる。例えば、症状の発症に先立って、(例えば、症状の経歴に照らしてかつ/又は病原体への曝露に照らして)感受性対象に治療を行うことができる。また、症状が解決した後も、例えば、再発の遅延及び/又は防止のために、治療を継続することがある。

【0066】

「阻害(inhibition)」、「阻害している(inhibiting)」、「阻害する(inhibit)」、又は「インヒビター(inhibitor)」という用語は、ビヒクルに関連する細胞中の特定の生物学的過程の活動を低減、減速、停止、かつ/又は防止する化合物の能力を指す。いくつかの実施形態では、「阻害する」、「ブロックする」、「抑制する」又は「防止する」は、阻害、ブロック、抑制、又は防止された活動が、対照の活動(例えば、インヒビター非存在下の活動)と比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は100%低減されることを意味する。いくつかの実施形態では、「阻害する」、「ブロックする」、「抑制する」又は「防止する」は、インヒビター(例えば、プロモドメイン含有タンパク質)の標的の発現が、対照(例えば、インヒビター非存在下の発現)と比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%低減されることを意味する。

20

30

【0067】

「有効な量」は、所望の生物学的応答を引き出す、すなわちがんを治療するために十分な量を指す。当業者であれば理解するであろうが、本明細書に記載の化合物の有効な量は、所望の生物学的終点、化合物の薬物動態、治療条件、投与方法、並びに対象の年齢及び健康状態によって変動し得る。有効な量は、これらに限定されないが、がんに関連する1つ以上の症状を減速、低減、阻害、改善又は好転させるために必要な量を含む。例えば、がんの治療において、このような用語は、腫瘍サイズの縮小を指すこともある。

【0068】

対象に2種以上のインヒビターを投与する場合、有効な量は、併用有効量であり得る。第1のインヒビターの有効な量は、第2及び任意選択により第3のインヒビターと併用する場合、異なり得る。2種以上のインヒビターを併用する場合、それぞれの有効な量は、それらを単独で使用する場合と同じであってもよい。

40

【0069】

或いは、所望の効果が低用量で実現されるため、それぞれの有効な量は、単独で使ったときの有効な量より少なくてもよい。或いは、また一方で、対象が1種以上のインヒビターにより良好に耐えることができ、高用量がより治療的に有用になるならば、続けて高用量で投与することができるため、それぞれの有効な量は、単独で使ったときの有効な量より多くなり得る。

50

【0070】

化合物の有効な量は、1日～数日間の(投与方法による)、単回以上の投与において、約0.001mg/kg～約1000mg/kgの間で変動し得る。特定の実施形態では、有効な量は、約0.001mg/kg～約1000mg/kg、約0.01mg/kg～約750mg/kg、約0.1mg/kg～約500mg/kg、約1.0mg/kg～約250mg/kg、及び約10.0mg/kg～約150mg/kgの間で変動する。当業者は、治療に有効な適当量を実験的に求めることができると考えられる。

【0071】

本明細書全体を通して用いられる「対象」又は「患者」という用語は、がん又はがんに直接若しくは間接的に侵される任意の疾患に苦しむ又は悩まされる可能性があるヒト及び動物を含むことが意図されている。対象の例としては、哺乳動物、例えば、ヒト、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、ネズミ、ウサギ、ラット、及びトランスジェニック非ヒト動物が挙げられる。いくつかの実施形態では、対象は、コンパニオンアニマル、例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、及びラットを含む。いくつかの実施形態では、対象は、家畜、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、及びウサギを含む。いくつかの実施形態では、対象は、純血腫の動物又は見世物の動物、例えば、ウマ、ブタ、ウシ、及びウサギを含む。重要な実施形態では、対象は、ヒト、例えば、がんに罹患している、がんに罹患する危険性がある、又は潜在的にがんに罹患する可能性があるヒトである。

【0072】

「治療を必要とする対象」は、がんに罹患していると特定された対象であり、すなわち、医師によって(例えば、当技術分野において周知の方法を用いて)がんに罹患していると診断された対象である。いくつかの実施形態では、治療を必要とする対象は、がんを示す症状が1つ以上ある対象のような、がんに罹患している又はがんを発症している疑いがある対象である。「治療を必要とする対象」という用語は、一度がんに罹患したが症状が改善したヒトを更に含む。がんの1つ以上の症状又は臨床兆候は、腫瘍のタイプ及び位置によって決まる。例えば、肺腫瘍は、咳、息切れ、又は胸痛が生じ得る。結腸腫瘍は、体重減少、下痢、便秘、鉄欠乏性貧血、及び血便が生じ得る。以下の症状、すなわち悪寒、倦怠感、発熱、食欲不振、不快感、寝汗、及び体重減少は、ほとんどの腫瘍で起こる。「投与する」、「投与すること」、又は「投与」という用語は、本明細書で用いられる場合、1種以上の治療剤の埋め込み、吸収、摂取、注射、又は吸入を指す。

【0073】

いくつかの実施形態では、対象は、1つ以上の追加の抗腫瘍(anti-neoplasia)療法で更に治療される。例えば、対象は、手術、放射線療法、化学療法、遺伝子療法、DNA療法、ウイルス性治療、RNA療法、補助療法、免疫療法、又はこれらの組合せを受けることができる。

【0074】

本明細書に記載の化合物は、どの順序で対象に投与してもよい。BETインヒビター等の第1の治療剤は、本明細書に記載のPP2Aアクチベーター、Bcl-2インヒビター、Bcl-x1インヒビター、CK2インヒビター又はMED1インヒビター等の第2の治療剤の投与の前(例えば、5分前、15分前、30分前、45分前、1時間前、2時間前、4時間前、6時間前、12時間前、24時間前、48時間前、72時間前、96時間前、1週間前、2週間前、3週間前、4週間前、5週間前、6週間前、8週間前、又は12週間前)、それと同時に、又はそれに後続して(例えば、5分後、15分後、30分後、45分後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、12時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後、8週間後、又は12週間後)、がんを有する対象に投与することができる。したがって、BETインヒビターは、本明細書に記載のPP2Aアクチベーター、Bcl-2インヒビター、Bcl-x1インヒビター、CK2インヒビター又はMED1インヒビター等の第2の治療剤とは別々に、連続的に、又は同時に投与することができる。

【0075】

本明細書に記載の化合物は、腸内(例えば、経口)、非経口、静脈内、筋内、動脈内、髄内、鞘内、皮下、脳室内、経皮、皮内、直腸、膈内、腹腔内、局所(粉末、軟膏、クリー

10

20

30

40

50

ム、及び/若しくは点眼によって)、粘膜、経鼻、口腔、舌下を含めた任意の経路によって、気道内注入、気管支内注入、及び/若しくは吸入によって、並びに/又は口腔用スプレー、鼻腔用スプレー、及び/若しくはエアロゾルとして投与することができる。特に企図される経路は、経口投与、静脈内投与(例えば、全身静脈内注射)、血液及び/若しくはリンパ液の供給を介した局所投与、並びに/又は患部への直接投与である。一般に、最も適当な投与経路は、薬剤の性質(例えば、胃腸管の環境内での安定性)、及び/又は対象の状態(例えば、対象が経口投与に耐性があるか)を含めた様々な因子によって決まる。

【0076】

有効な量を実現するために必要な化合物の正確な量は、対象によって異なり、例えば、対象の種、年齢、及び全身状態、副作用又は疾患の重篤度、特定の化合物のアイデンティティ、投与方法等によって決まる。所望の投与量を、1日に3回、1日に2回、1日に1回、隔日、3日ごとに、毎週、隔週、3週間ごとに、又は4週間ごとに送達することができる。特定の実施形態では、所望の投与量を、複数回の投与(例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、又はそれを超える投与)を利用して送達することができる。

10

【0077】

特定の実施形態において、70kgの成人に1日に1回以上投与する化合物の有効な量は、単位剤形当たり、約0.0001mg～約3000mg、約0.0001mg～約2000mg、約0.0001mg～約1000mg、約0.001mg～約1000mg、約0.01mg～約1000mg、約0.1mg～約1000mg、約1mg～約1000mg、約1mg～約100mg、約10mg～約1000mg、又は約100mg～約1000mgの化合物で占めてよい。

20

【0078】

特定の実施形態において、本明細書で提供される化合物を、1日に、対象の体重1kg当たり、約0.001mg～約100mg、約0.01mg～約50mg、好ましくは約0.1mg～約40mg、好ましくは約0.5mg～約30mg、約0.01mg～約10mg、約0.1mg～約10mg、より好ましくは約1mg～約25mgで送達するために十分な投与量レベルで、1日に1回以上投与して、所望の治療効果を得ることができる。

【0079】

本明細書に記載の用量範囲は、成人への、生成された医薬組成物の投与の指導を提供すると理解されるであろう。例えば子供又は青年に投与する量は、開業医又は当業者によって求めることができ、成人に投与する量より少ないこともあれば同じ場合もある。

30

【0080】

プロモドメインインヒビター

プロモドメインインヒビターは、当技術分野において公知である。プロモドメインインヒビターは、少なくとも1つのプロモドメインとタンパク質のアセチル-リジン残基(例えば、ヒストンのアセチル-リジン残基)との結合を部分的に又は全体的に防止又は阻害することができる任意の分子又は化合物である。プロモドメインインヒビターは、DNA及びRNAアプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA及びshRNA等の核酸、小ペプチド、抗体又は抗体フラグメント、並びに小分子化合物等の小分子を含めた、上記のプロモドメインを阻害する任意の分子又は化合物でよい。プロモドメインインヒビターは、1種のプロモドメイン含有タンパク質のみを阻害し得る又は複数若しくはすべてのプロモドメイン含有タンパク質を阻害し得ることを理解されたい。

40

【0081】

プロモドメインインヒビターの例は、参照により本明細書に援用される、JP2009028043、JP2009183291、WO2011054843、WO2011054848、WO2009/084693A1、WO2009084693、WO2011054844、WO2011054846、US2012028912、Filippakopoulosら、Bioorg Med Chem. 20(6):1878～1886、2012、Chungら、J Med Chem. 54(11):3827～38、2011、及びChungら、J Biol Screen. 16(10):1170～85、2011に記載されている。

【0082】

いくつかの実施形態では、プロモドメインインヒビターは、1-[2-(1/-/-ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]-1,3-ジヒドロ-3-メチル-2H-ベンズイミダゾール-2-チオネ(J

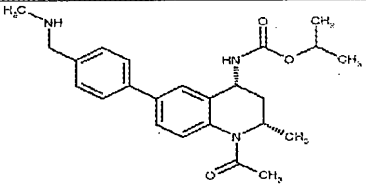
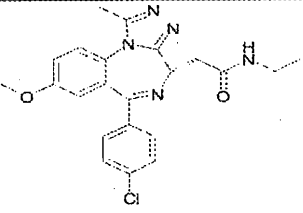
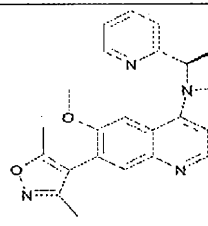
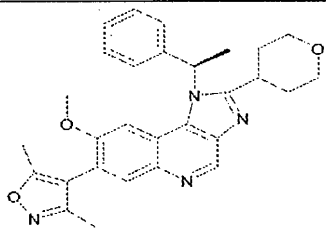
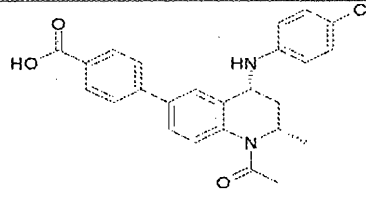
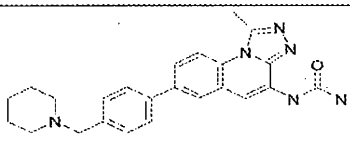
50

P2008-156311)、アルプラゾラム(Sigma-Aldrich社)、ミダゾラム(Sigma-Aldrich社)、GW841819X (BZD、GlaxoSmithKline社)、Table 1(表1)の化合物(WO2011054843)、又は本明細書に記載の任意の他のプロモドメインインヒビター化合物である。

【 0 0 8 3 】

【 表 1 】

Table 1: プロモドメインインヒビターの例

	名称	構造
例1	1-メチルエチル((2S,4R)-1-アセチル-2-メチル-6-{4-[(メチルアミノ)メチル]フェニル}-1,2,3,4-テトラヒドロ-4-キノリニル)カルバメート	
例2	2-[(4S)-6-(4-クロロフェニル)-1-メチル-8-(メチルオキシ)-4H-[1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ベンゾジアゼピン-4-イル]-N-エチルアセトアミド	
例3	7-(3,5-ジメチル-4-イソキサゾリル)-8-(メトキシ)-1-[(1R)-1-(2-ピリジニル)エチル]-1,3-ジヒドロ-2H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-2-オン	
例4	7-(3,5-ジメチル-4-イソキサゾリル)-8-(メトキシ)-1-[(1R)-1-フェニルエチル]-2-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン	
例5	4-[(2S,4R)-1-アセチル-4-[(4-クロロフェニル)アミノ]-2-メチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-6-キノリニル}安息香酸	
例6	N-{1-メチル-7-[4-(1-ピペリジニル)メチル]フェニル}[1,2,4]トリアゾロ[4,3-a]キノリン-4-イル}尿素	

10

20

30

40

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態では、プロモドメインインヒビターはBETインヒビターである。BETインヒビターは、少なくとも1つのBETファミリーメンバーのプロモドメインとタンパク質

50

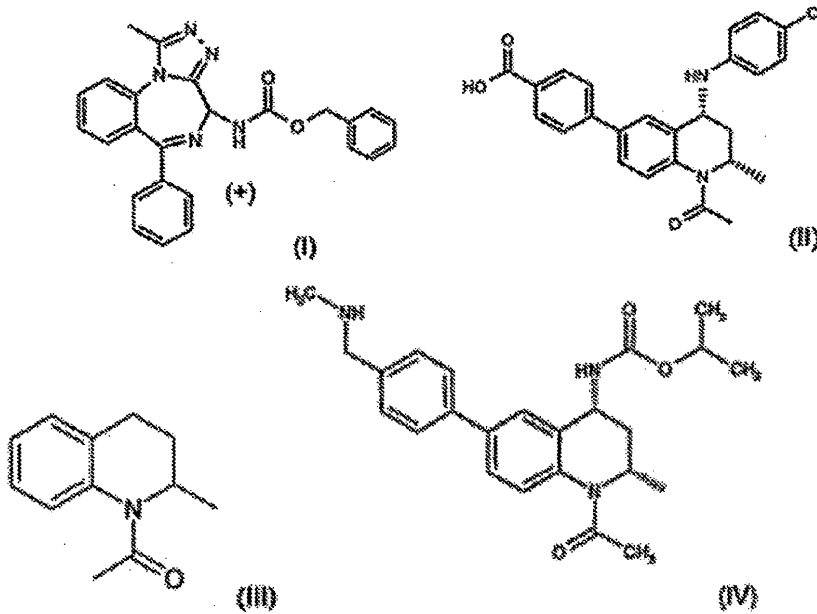
のアセチル-リジン残基との結合を防止又は阻害することができる任意の分子又は化合物である。BETインヒビターは、DNA及びRNAアプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA及びshRNA等の核酸、小ペプチド、抗体又は抗体フラグメント、及び低分子化合物等の小分子を含めた、上記のBETを阻害する任意の分子又は化合物でよい。

【0085】

BETインヒビターの例は、参照により本明細書に援用される、US2011143651、WO2009/084693A1、WO2011143669、WO2011143660、WO2011054851、及びJP2008156311に記載されている。BETインヒビターは、1つのBETファミリーメンバーのみを阻害し得る又は複数若しくはすべてのBETファミリーメンバーを阻害し得ることを理解されたい。当技術分野において公知のBETインヒビターの例としては、これらに限定されないが、RVX-208(Resverlogix社)、PFI-1(Structural Genomics Consortium社)、OTX015(Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation社)、BzT-7、GSK525762A(iBET、GlaxoSmithKline社)、及び以下の化合物(WO2011054851、GlaxoSmithKline社)が挙げられる。

【0086】

【化1】



【0087】

いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、BETファミリーメンバー(例えば、BRD1、BRD2、BRD3、BRD4、BRD7、BRD7、BRDT、WO2011143669参照)の第1のプロモドメインの結合ポケットに結合する小分子化合物(例えば、JQ1若しくはその誘導体及び式I-XXIIの化合物又は本明細書に記載の他の任意の化合物)である。

【0088】

いくつかの重要な実施形態では、BETインヒビターはJQ1であり、次式を有する。

【0089】

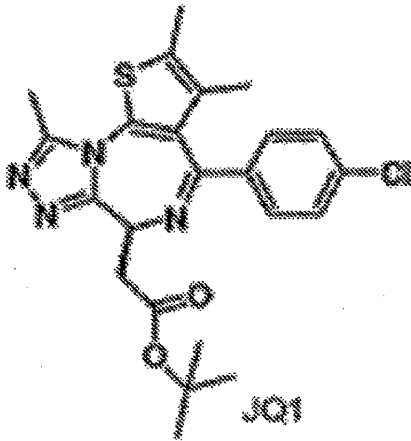
10

20

30

40

【化2】



10

【0090】

いくつかの実施形態では、BETインヒビターは、式I-XXII又は下記の他の任意の化合物の構造を有する。これらの構造は、当技術分野において公知である(参照により本明細書に援用されるWO2011143660)。

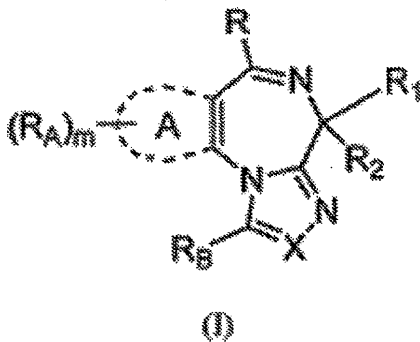
20

【0091】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、式Iの化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0092】

【化3】



30

【0093】

式中、Xは、N又はCR₅であり、R₅は、H、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換され、R_Bは、H、アルキル、ヒドロキシアルキル、アミノアルキル、アルコキシアルキル、ハロアルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、又は-COO-R₃であり、それぞれ任意選択により置換され、環Aは、アリール又はヘテロアリールであり、各R_Aは、独立に、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、若しくはヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される、又は任意の2つのR_Aは、それぞれが結合している原子と一緒に、縮合アリール基若しくはヘテロアリール基を形成することができ、Rは、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換され、

40

R_iは、-(CH₂)_n-Lであり、nは0~3であり、Lは、H、-COO-R₃、-CO-R₃、-CO-N(R₃R₄)、-S(O)₂-R₃、-S(O)₂-N(R₃R₄)、N(R₃R₄)、N(R₄)C(O)R₃、任意選択により置換されたアリール、

50

又は任意選択により置換されたヘテロアリアルであり、

R_2 は、H、D(重水素)、ハロゲン、又は任意選択により置換されたアルキルであり、

各 R_3 は、独立に、

(i)H、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、又は置換ヘテロアリアル、

(ii)ヘテロシクロアルキル又は置換ヘテロシクロアルキル、

(iii)- $C_1 \sim C_8$ アルキル、- $C_2 \sim C_8$ アルケニル又は- $C_2 \sim C_8$ アルキニル(それぞれO、S、又はNから選択される0、1、2、又は3個のヘテロ原子を含有する)、- $C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、置換- $C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、- $C_3 \sim C_{12}$ シクロアルケニル、又は置換- $C_3 \sim C_{12}$ シクロアルケニル(それぞれ任意選択により置換されていてよい)

(iv) NH_2 、 $N=CR_4R_6$

からなる群から選択され、

各 R_4 は、独立に、H、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリアル、若しくはヘテロアリアルであり、それぞれ任意選択により置換される、又は R_3 及び R_4 は、それらが結合している炭素原子と一緒に、4~10員環を形成し、

R_6 は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、アリアル、若しくはヘテロアリアルであり、それぞれ任意選択により置換される、又は R_4 及び R_6 は、それらが結合している炭素原子と一緒に、4~10員環を形成し、

m は0、1、2、又は3であるが、

但し

(a)環Aがチエニルであり、XがNであり、Rがフェニル又は置換フェニルであり、 R_2 がHであり、RBがメチルであり、 R_i が $-(CH_2)_n-L$ (式中、 n が1であり、Lが $-CO-N(R_3R_4)$ である)の場合、 R_3 及び R_4 は、それらが結合している窒素原子と一緒に、モルホリノ環を形成せず、

(b)環Aがチエニルであり、XがNであり、Rが置換フェニルであり、 R_2 がHであり、RBがメチルであり、 R_i が $-(CH_2)_n-L$ (式中、 n が1であり、Lが $-CO-N(R_3R_4)$ である)であり、 R_3 及び R_4 の一方がHである場合、 R_3 及び R_4 の他方は、メチル、ヒドロキシエチル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、ピリジル又は置換ピリジルではなく、

(c)環Aがチエニルであり、XがNであり、Rが置換フェニルであり、 R_2 がHであり、 R_B がメチルであり、 R_i が $-(CH_2)_n-L$ (式中、 n が1であり、Lが $-COO-R_3$ である)の場合、 R_3 はメチル又はエチルではないものとする。

【0094】

特定の実施形態では、Rは、アリアル又はヘテロアリアルであり、これらはそれぞれ任意選択により置換される。

【0095】

特定の実施形態では、Lは、H、 $-COO-R_3$ 、 $-CO-N(R_3R_4)$ 、 $-S(O)_2-R_3$ 、 $-S(O)_2-N(R_3R_4)$ 、 $N(R_3R_4)$ 、 $N(R_4)C(O)R_3$ 又は任意選択により置換されたアリアルである。特定の実施形態では、各 R_3 は、独立に、H、任意選択により置換され、O、S若しくはNから選択される0、1、2若しくは3個のヘテロ原子を含有する- $C_1 \sim C_8$ アルキル、又は NH_2 、 $N=CR_4R_6$ からなる群から選択される。

【0096】

特定の実施形態では、 R_2 は、H、D、ハロゲン又はメチルである。

【0097】

特定の実施形態では、 R_B は、アルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、又はアルコキシであり、それぞれ任意選択により置換される。

【0098】

特定の実施形態では、 R_B は、メチル、エチル、ヒドロキシメチル、メトキシメチル、トリフルオロメチル、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、 $COOEt$ 、又は $COOCH_2OC(O)CH_3$ である。

【0099】

特定の実施形態では、環Aは、5又は6員のアリアル又はヘテロアリアルである。特定の実施形態では、環Aは、チオフラニル、フェニル、ナフチル、ピフェニル、テトラヒドロナフチル、インダニル、ピリジル、フラニル、インドリル、ピリミジニル、ピリジジニル

10

20

30

40

50

、ピラジニル、イミダゾリル、オキサゾリル、チエニル、チアゾリル、トリアゾリル、イソオキサゾリル、キノリニル、ピロリル、ピラゾリル、又は5,6,7,8-テトラヒドロイソキノリニルである。

【0100】

特定の実施形態では、環Aは、フェニル又はチエニルである。

【0101】

特定の実施形態では、mは1又は2であり、 R_A の少なくとも1回の出現はメチルである。

【0102】

特定の実施形態では、各 R_A は、独立に、H、任意選択により置換されたアルキルである、又は任意の2つの R_A が、それぞれが結合する原子と一緒に、アリールを形成することができる。

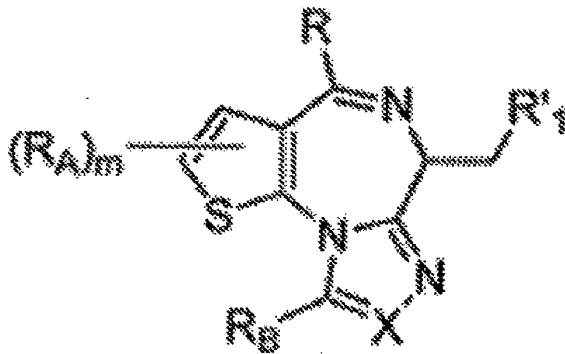
10

【0103】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、式IIの化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0104】

【化4】



20

(II)

30

【0105】

式中、Xは、N又は CR_5 であり、 R_5 は、H、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換され、 R_6 は、H、アルキル、ヒドロキシアルキル、アミノアルキル、アルコキシアルキル、ハロアルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、又は $-COO-R_3$ であり、それぞれ任意選択により置換され、

各 R_A は、独立に、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、若しくはヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される、又は任意の2つの R_A は、それぞれが結合している原子と一緒に、縮合アリール基若しくはヘテロアリール基を形成することができ、

40

Rは、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換され、

$R'1$ は、H、 $-COO-R_3$ 、 $-CO-R_3$ 、任意選択により置換されたアリール、又は任意選択により置換されたヘテロアリールであり、

各 R_3 は、独立に、

(i)H、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、又は置換ヘテロアリール、

(ii)ヘテロシクロアルキル又は置換ヘテロシクロアルキル、

(iii) $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル又は $-C_2 \sim C_8$ アルキニル(それぞれ0、S、又はNから選択される0、1、2、又は3個のヘテロ原子を含有する)、 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、置換 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルケニル、又は置換 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアル

50

ケニル(それぞれ任意選択により置換されていてよい)

からなる群から選択され、

mは0、1、2、又は3であるが、

但しR'₁が-COO-R₃であり、XがNであり、Rが置換フェニルであり、R_Bがメチルである場合、R₃はメチル又はエチルではないものとする。

【0106】

特定の実施形態では、Rは、アリール又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される。特定の実施形態では、Rは、フェニル又はピリジルであり、それぞれ任意選択により置換される。特定の実施形態では、Rは、p-Cl-フェニル、o-Cl-フェニル、m-Cl-フェニル、p-F-フェニル、o-F-フェニル、m-F-フェニル又はピリジニルである。

10

【0107】

特定の実施形態では、R'₁は、-COO-R₃、任意選択により置換されたアリール、又は任意選択により置換されたヘテロアリールであり、R₃は、O、S又はNから選択される0、1、2又は3個のヘテロ原子を含有し、任意選択により置換され得る-C₁~C₈アルキルである。特定の実施形態では、R'₁は、-COO-R₃であり、R₃は、メチル、エチル、プロピル、i-プロピル、ブチル、sec-ブチル、若しくはt-ブチルである、又はR'₁はH若しくは任意選択により置換されたフェニルである。

【0108】

特定の実施形態では、R_Bは、メチル、エチル、ヒドロキシメチル、メトキシメチル、トリフルオロメチル、COOH、COOMe、COOEt、COOCH₂OC(O)CH₃である。

20

【0109】

特定の実施形態では、各R_Aは、独立に、任意選択により置換されたアルキルである、又は2つの任意のR_Aは、それぞれが結合している原子と一緒に、縮合アリールを形成することができる。

【0110】

特定の実施形態では、各R_Aはメチルである。

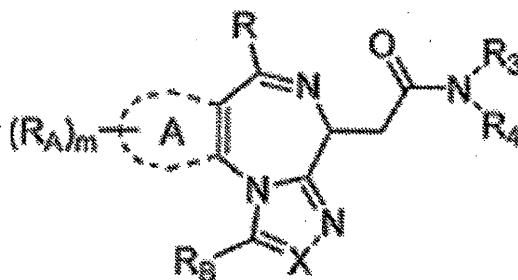
【0111】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、式IIIの化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0112】

【化5】

30



(III)

40

【0113】

式中、Xは、N又はCR₅であり、R₅は、H、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換され、R_Bは、H、アルキル、ヒドロキシアルキル、アミノアルキル、アルコキシアルキル、ハロアルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、又は-COO-R₃であり、それぞれ任意選択により置換され

50

、環Aは、アリール又はヘテロアリールであり、各 R_A は、独立に、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、若しくはヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される、又は任意の2つの R_A は、それぞれが結合している原子と一緒に、縮合アリール基若しくはヘテロアリール基を形成することができ、

Rは、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換され、

各 R_3 は、独立に、

(i) H、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、又は置換ヘテロアリール、

(ii) ヘテロシクロアルキル又は置換ヘテロシクロアルキル、

(iii) $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル又は $-C_2 \sim C_8$ アルキニル(それぞれO、S、又はNから選択される0、1、2、又は3個のヘテロ原子を含有する)、 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、置換 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルケニル、又は置換 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルケニル(それぞれ任意選択により置換されていてよい)

(iv) NH_2 、 $N=CR_4R_6$

からなる群から選択され、

各 R_4 は、独立に、H、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、若しくはヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される、又は R_3 及び R_4 は、それらが結合している窒素原子と一緒に、4~10員環を形成し、

R_6 は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、アリール、若しくはヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される、又は R_4 及び R_6 は、それらが結合している炭素原子と一緒に、4~10員環を形成し、

mは0、1、2、又は3であるが、

但し

(a) 環Aがチエニルであり、XがNであり、Rがフェニル又は置換フェニルであり、 R_B がメチルである場合、 R_3 及び R_4 は、それらが結合している窒素原子と一緒に、モルホリノ環を形成せず、

(b) 環Aがチエニルであり、XがNであり、Rが置換フェニルであり、 R_2 がHであり、 R_B がメチルであり、 R_3 及び R_4 の一方がHである場合、 R_3 及び R_4 の他方は、メチル、ヒドロキシエチル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、ピリジル又は置換ピリジルではないものとする。

【0114】

特定の実施形態では、Rは、アリール又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される。特定の実施形態では、Rは、フェニル又はピリジルであり、それぞれ任意選択により置換される。

【0115】

特定の実施形態では、Rは、p-Cl-フェニル、o-Cl-フェニル、m-Cl-フェニル、p-F-フェニル、o-F-フェニル、m-F-フェニル又はピリジニルである。特定の実施形態では、 R_3 は、H、 NH_2 、又は $N=CR_4R_6$ である。

【0116】

特定の実施形態では、各 R_4 は、独立に、H、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される。

【0117】

特定の実施形態では、 R_6 は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、アリール、又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される。

【0118】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、式IVの化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0119】

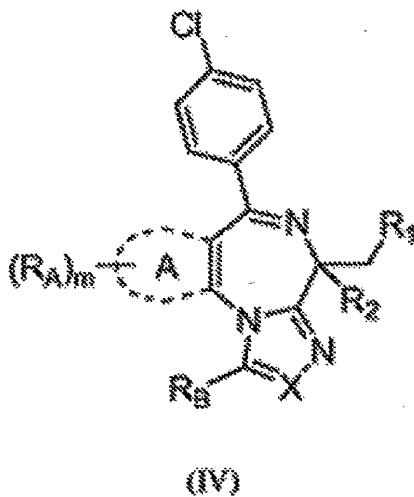
10

20

30

40

【化6】



10

【0120】

式中、Xは、N又はCR₅であり、R₅は、H、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、又はヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換され、

20

R_Bは、H、アルキル、ヒドロキシアルキル、アミノアルキル、アルコキシアルキル、ハロアルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、又は-COO-R₃であり、それぞれ任意選択により置換され、

環Aは、アリール又はヘテロアリールであり、

各R_Aは、独立に、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、若しくはヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される、又は任意の2つのR_Aは、それぞれが結合している原子と一緒に、縮合アリール基若しくはヘテロアリール基を形成することができる、

R_iは、-(CH₂)_n-Lであり、nは0~3であり、Lは、H、-COO-R₃、-CO-R₃、-CO-N(R₃R₄)、-S(O)₂-R₃、-S(O)₂-N(R₃R₄)、N(R₃R₄)、N(R₄)C(O)R₃、任意選択により置換されたアリール、

30

又は任意選択により置換されたヘテロアリールであり、

R₂は、H、D、ハロゲン、又は任意選択により置換されたアルキルであり、

各R₃は、独立に、

(i)H、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、又は置換ヘテロアリール、

(ii)ヘテロシクロアルキル又は置換ヘテロシクロアルキル、

(iii)-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル又は-C₂~C₈アルキニル(それぞれO、S、又はNから選択される0、1、2、又は3個のヘテロ原子を含有する)、-C₃~C₁₂シクロアルキル、置換-C₃~C₁₂シクロアルキル、-C₃~C₁₂シクロアルケニル、又は置換-C₃~C₁₂シクロアルケニル(それぞれ任意選択により置換されていてよい)、

(iv)NH₂、N=CR₄R₆

40

からなる群から選択され、

各R₄は、独立に、H、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、若しくはヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される、

又はR₃及びR₄は、それらが結合している窒素原子と一緒に、4~10員環を形成し、

R₆は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、アリール、若しくはヘテロアリールであり、それぞれ任意選択により置換される、又はR₄及びR₆は、それらが結合している炭素原子と一緒に、4~10員環を形成し、

mは0、1、2、又は3であるが、

但し

(a)環Aがチエニルであり、XがNであり、R₂がHであり、R_Bがメチルであり、R_iが-(CH₂)_n-L

50

(式中、 n が0であり、 L が $-\text{CO}-\text{N}(\text{R}_3\text{R}_4)$ である)の場合、 R_3 及び R_4 は、それらが結合している窒素原子と一緒に、モルホリノ環を形成せず、

(b)環Aがチエニルであり、 X が N であり、 R_2 が H であり、 RB がメチルであり、 R_i が $-(\text{CH}_2)_n-\text{L}$ (式中、 n が0であり、 L が $-\text{CO}-\text{N}(\text{R}_3\text{R}_4)$ である)であり、 R_3 及び R_4 の一方が H である場合、 R_3 及び R_4 の他方は、メチル、ヒドロキシエチル、アルコキシ、フェニル、置換フェニル、ピリジル又は置換ピリジルではなく、

(c)環Aがチエニルであり、 X が N であり、 R_2 が H であり、 R_B がメチルであり、 R_i が $-(\text{CH}_2)_n-\text{L}$ (式中、 n が0であり、 L が $-\text{COO}-\text{R}_3$ である)の場合、 R_3 はメチル又はエチルではないものとする。

【0121】

特定の実施形態では、 R_i は、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{L}$ (式中、 n が0~3であり、 L が $-\text{COO}-\text{R}_3$ である)、任意選択により置換されたアリール、又は任意選択により置換されたヘテロアリールであり、 R_3 は、 O 、 S 又は N から選択される0、1、2又は3個のヘテロ原子を含有し、任意選択により置換され得る $-\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキルである。特定の実施形態では、 n は1若しくは2であり、 L はアルキル若しくは $-\text{COO}-\text{R}_3$ であり、 R_3 は、メチル、エチル、プロピル、 i -プロピル、ブチル、 sec -ブチル、若しくは t -ブチルである、又は n は1若しくは2であり、 L は H 若しくは任意選択により置換されたフェニルである。

【0122】

特定の実施形態では、 R_2 は、 H 又はメチルである。

【0123】

特定の実施形態では、 R_B は、メチル、エチル、ヒドロキシメチル、メトキシメチル、トリフルオロメチル、 COOH 、 COOMe 、 COOEt 、 $\text{COOCH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ である。

【0124】

特定の実施形態では、環Aは、フェニル、ナフチル、ピフェニル、テトラヒドロナフチル、インダニル、ピリジル、フラニル、インドリル、ピリミジニル、ピリジジニル、ピラジニル、イミダゾリル、オキサゾリル、チエニル、チアゾリル、トリアゾリル、イソオキサゾリル、キノリニル、ピロリル、ピラゾリル、又は5,6,7,8-テトラヒドロイソキノリニルである。

【0125】

特定の実施形態では、各 R_A は、独立に、任意選択により置換されたアルキルである、又は任意の2つの R_A が、それぞれが結合している原子と一緒に、アリールを形成することができる。本発明はまた、式V-XXIIの化合物、及び本明細書に記載の任意の化合物も提供する。

【0126】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、以下、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

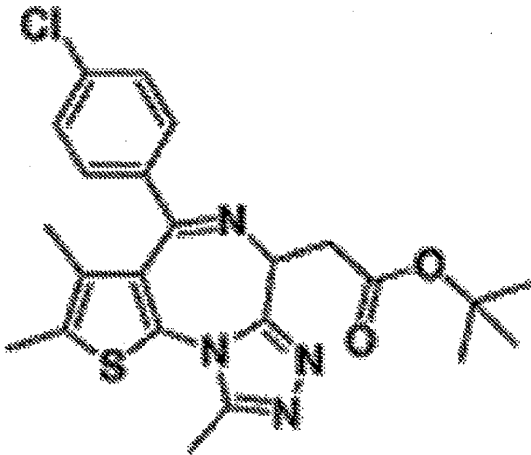
【0127】

10

20

30

【化7】



10

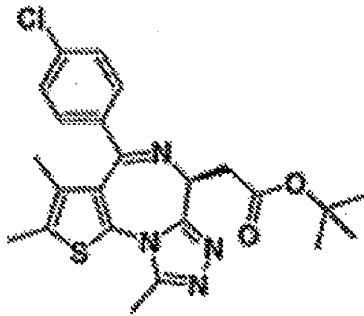
【0128】

特定の実施形態では、化合物は、(+)-JQ1、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0129】

20

【化8】



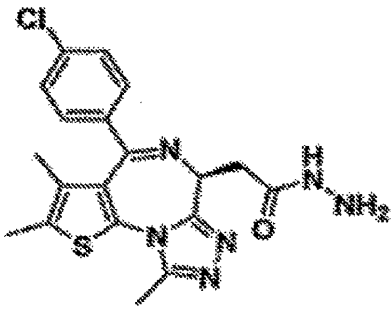
30

【0130】

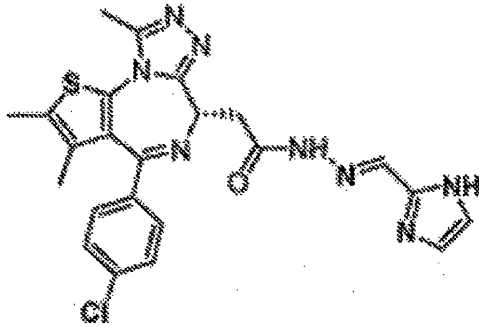
いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次式で表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0131】

【化9】

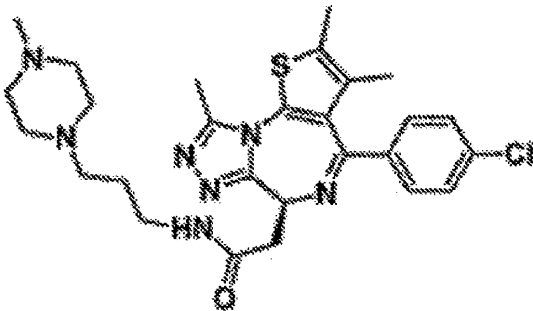


10

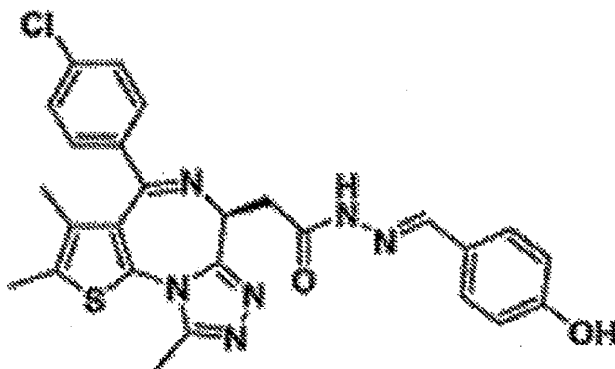


20

又は



30



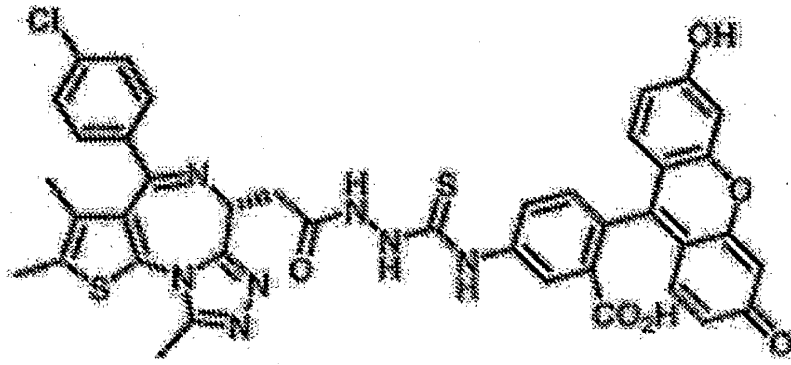
40

【0132】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次式で表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

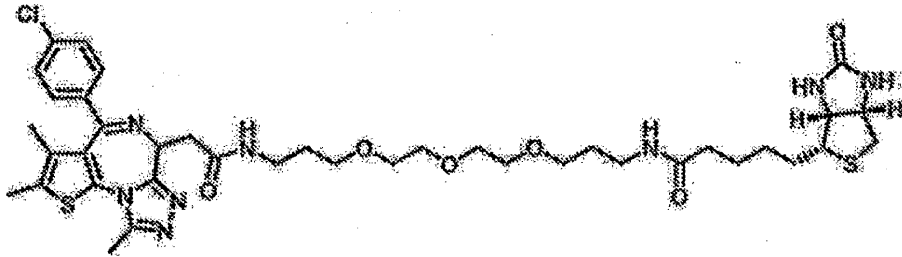
【0133】

【化10】



10

又は



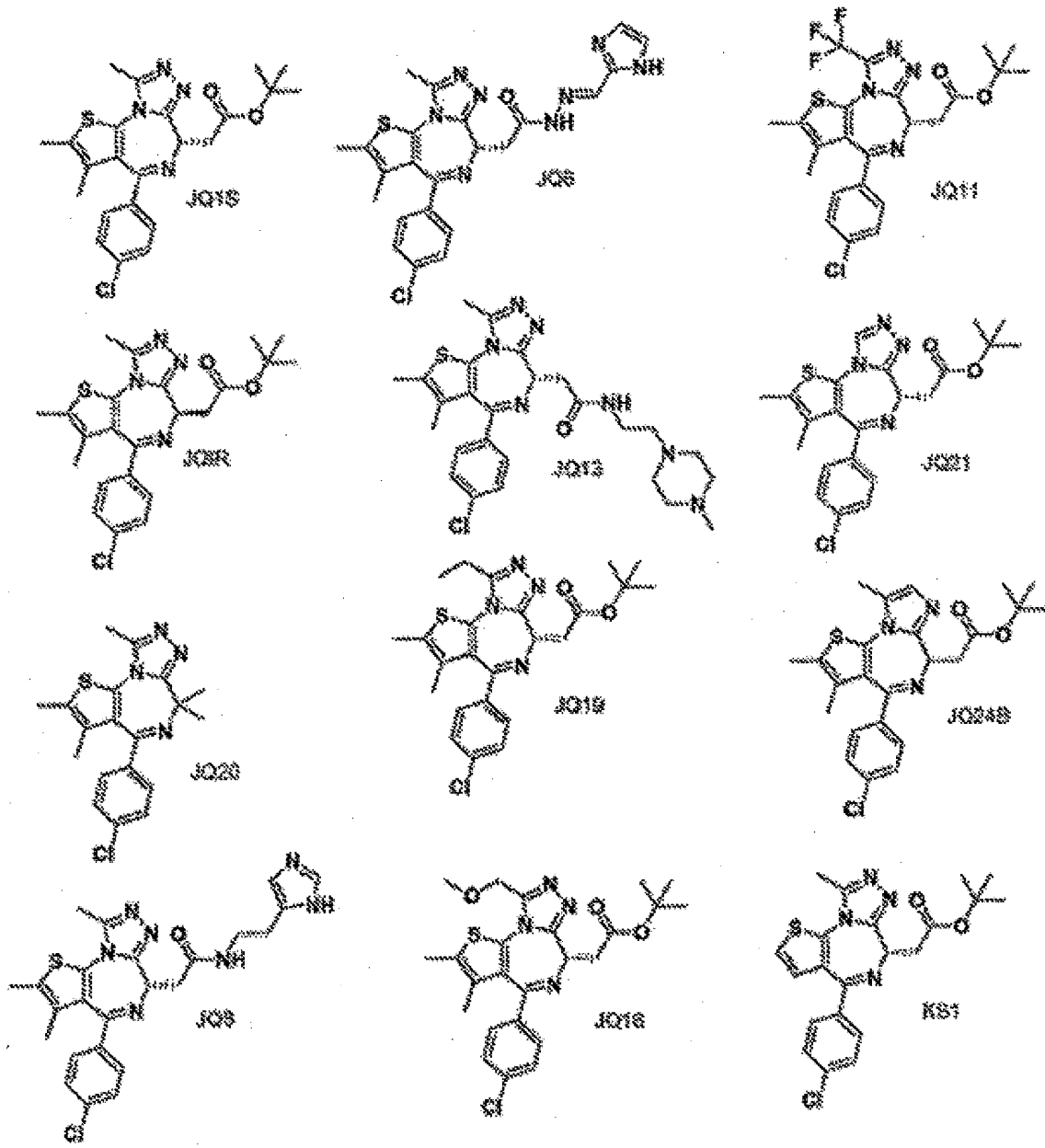
20

【0134】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次式で表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0135】

【化 1 1】



10

20

30

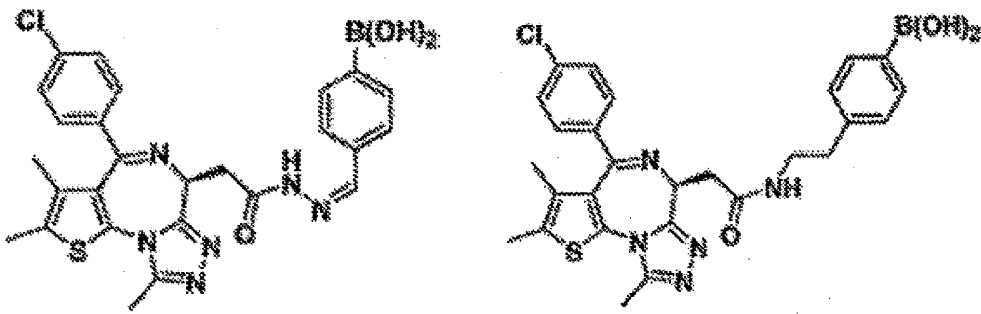
【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次式のうちのいずれか1つで表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【 0 1 3 7 】

40

【化 1 2】



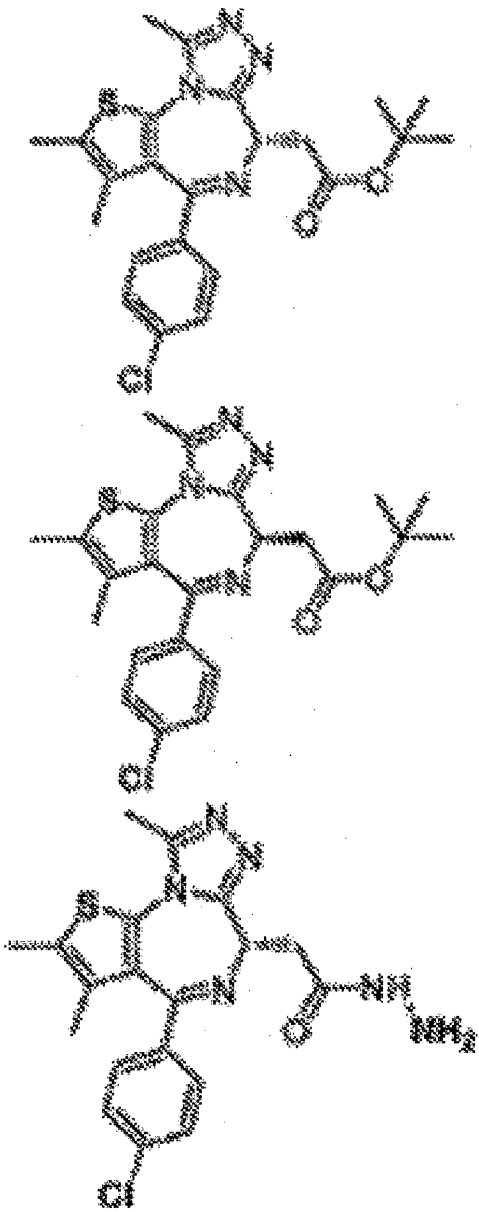
10

【 0 1 3 8】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次の構造のいずれかによって表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【 0 1 3 9】

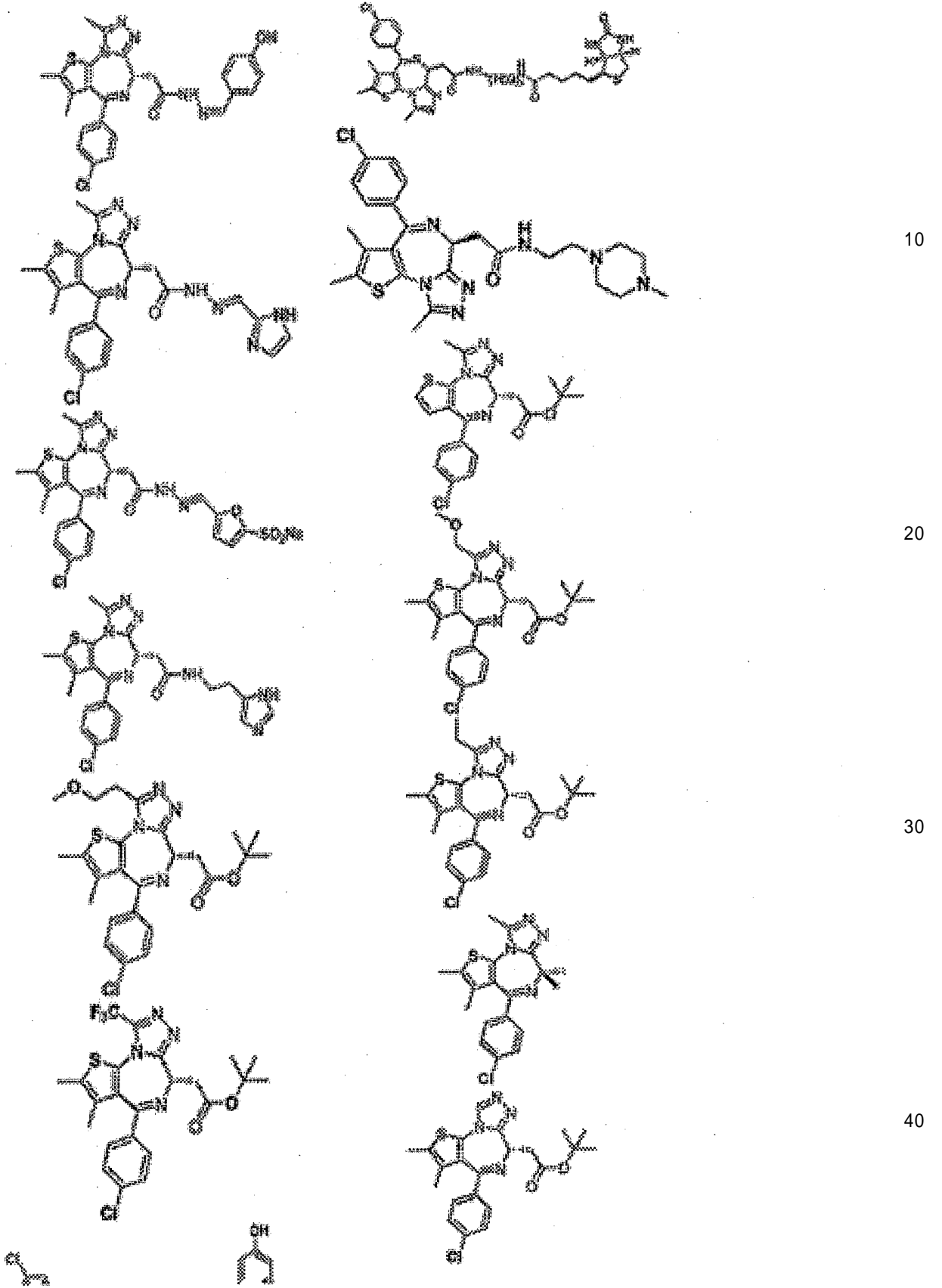
【化 1 3】

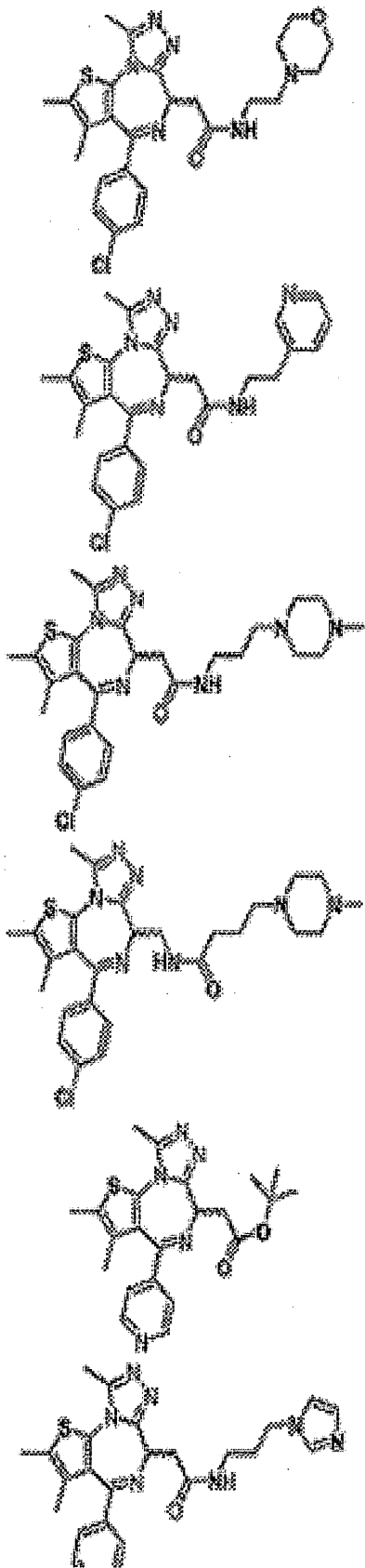
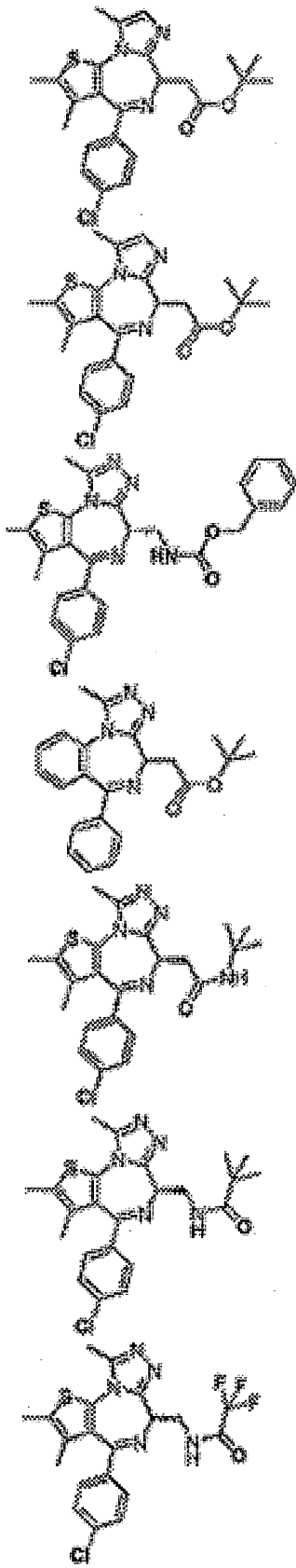


10

20

30



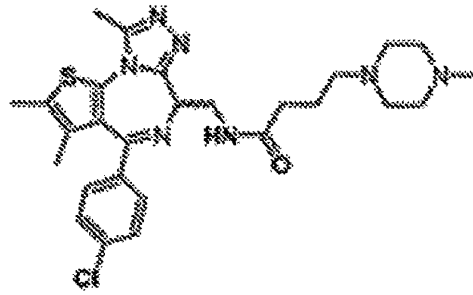
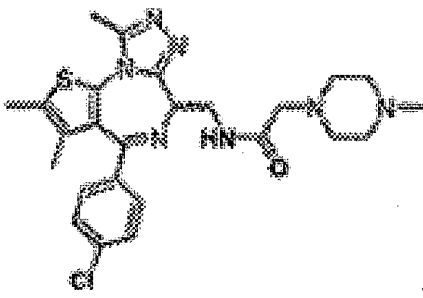


10

20

30

40



又は

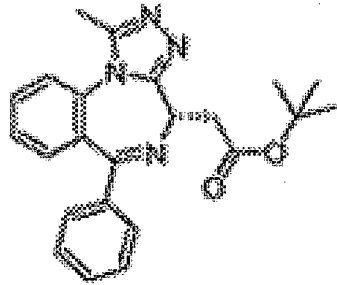
10

【0140】

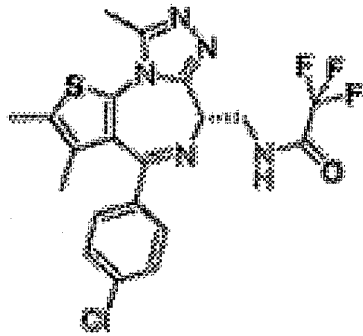
いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次の構造の1つ、その塩、溶媒和物又は水和物であってよい。

【0141】

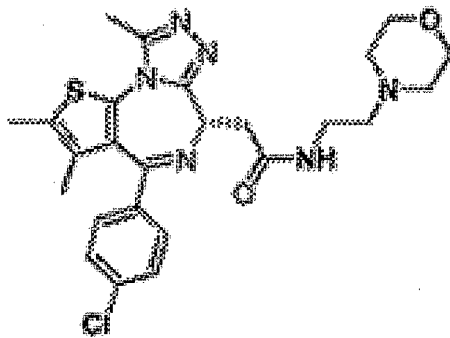
【化14】



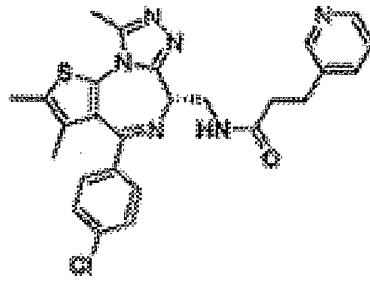
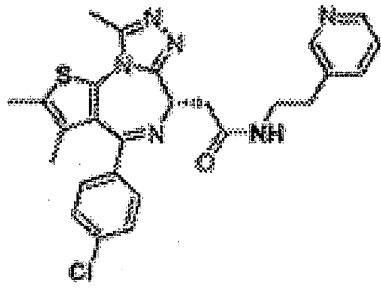
20



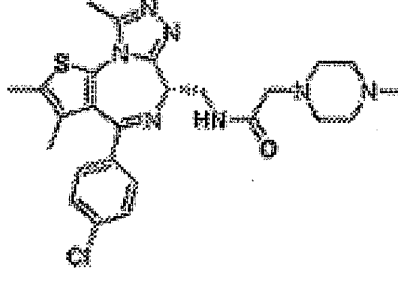
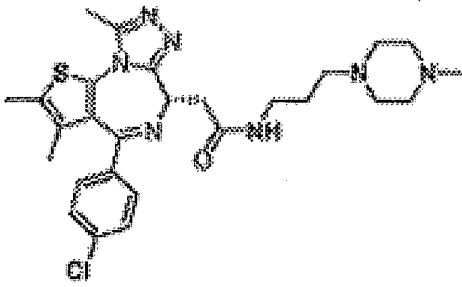
30



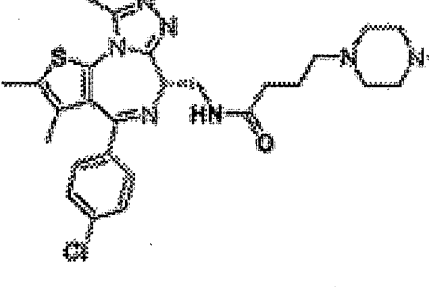
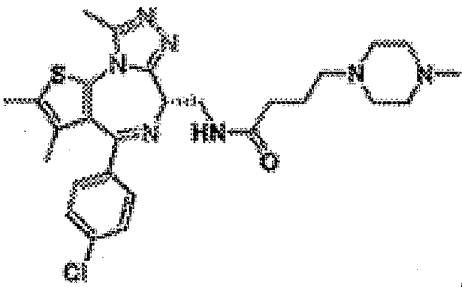
40



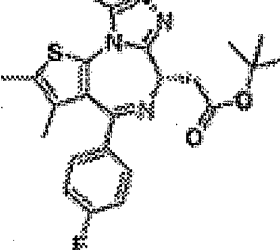
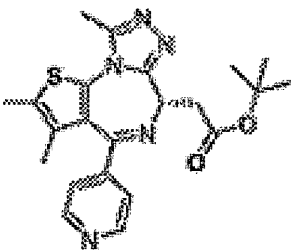
10



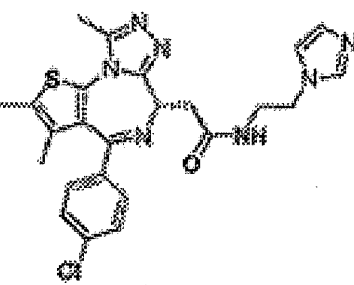
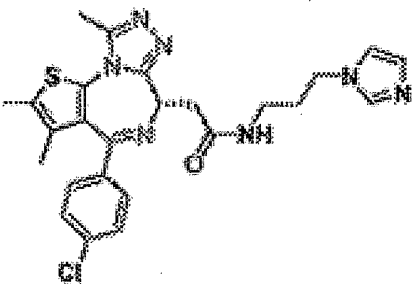
20

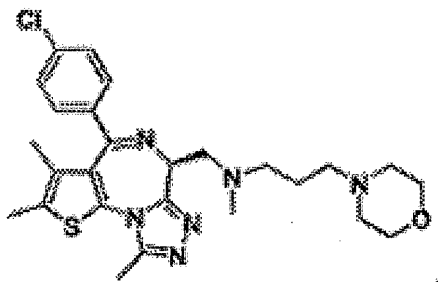
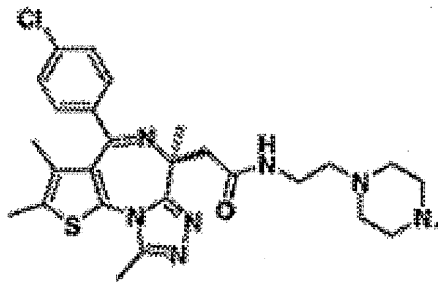
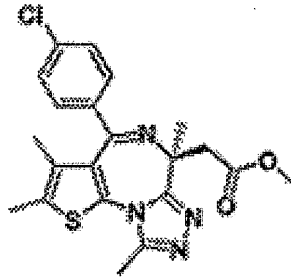
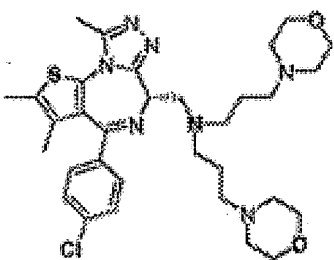
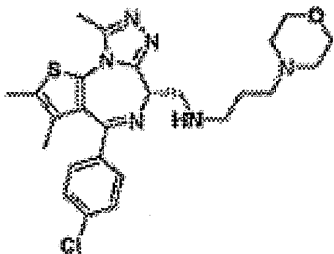
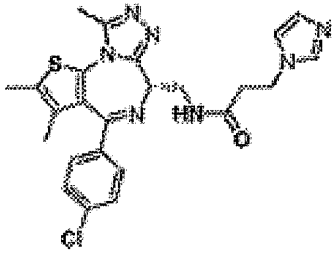
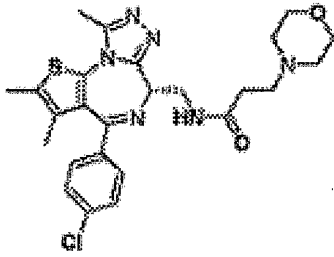


30

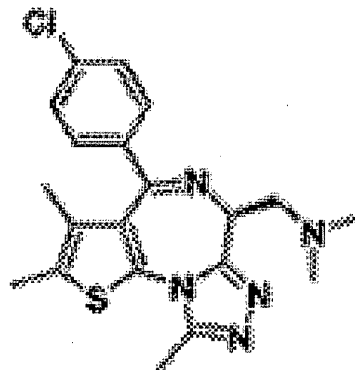
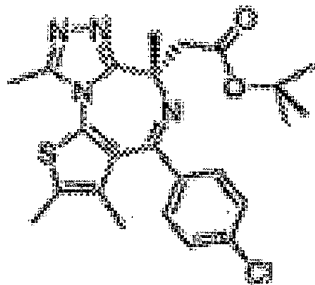


40





又は



10

20

30

40

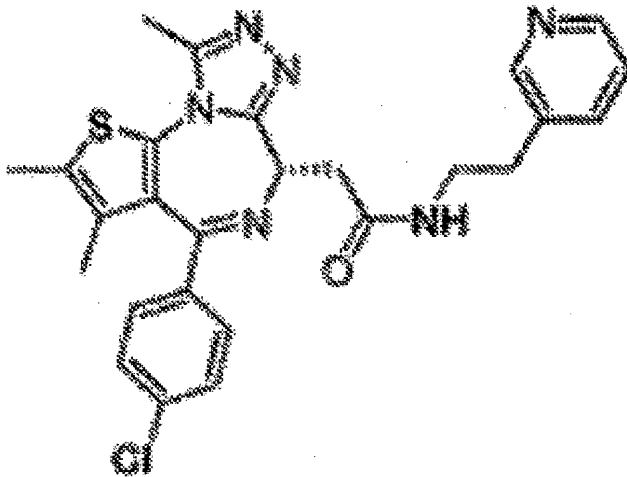
【0142】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次の構造で表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0143】

50

【化15】



10

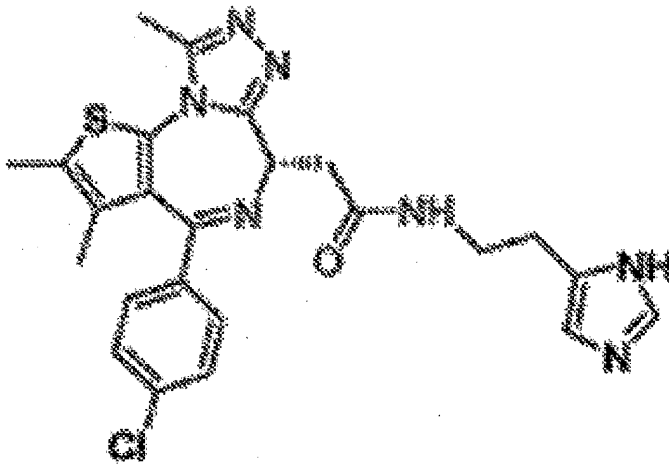
【0144】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次の構造で表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0145】

20

【化16】



30

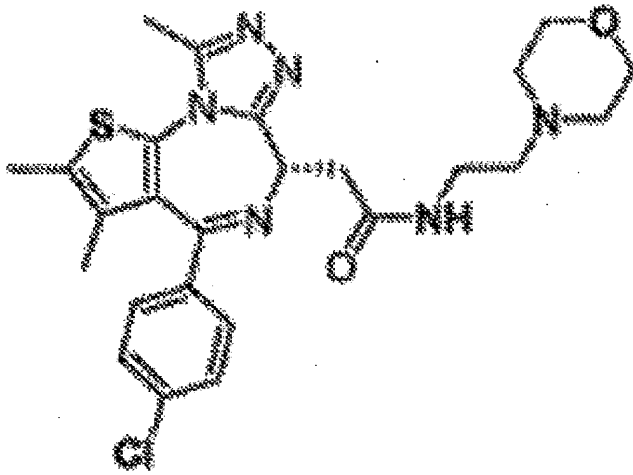
【0146】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次の構造で表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0147】

40

【化 1 7】



10

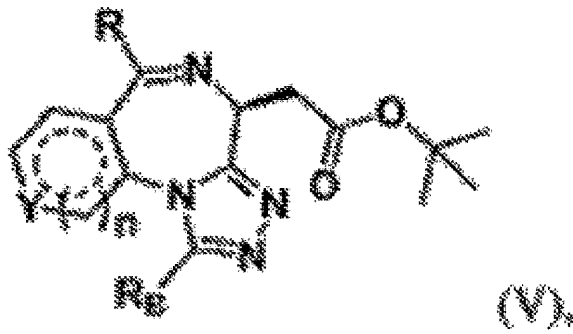
【 0 1 4 8】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、本明細書に示す任意の化合物と逆のキラリティーを有する化合物である。いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、式(V)、(VI)、又は(VII)によって表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

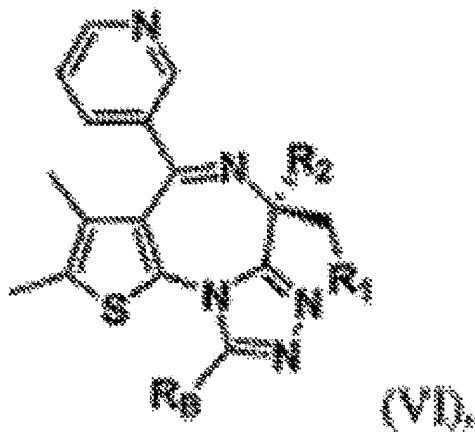
20

【 0 1 4 9】

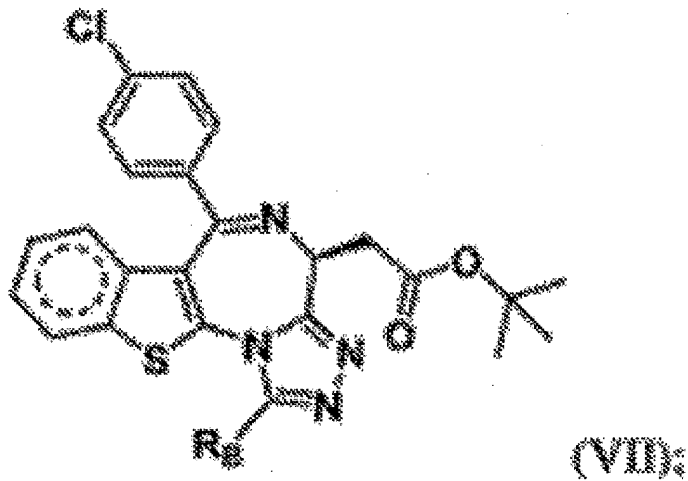
【化 1 8】



10



20



30

40

【0150】

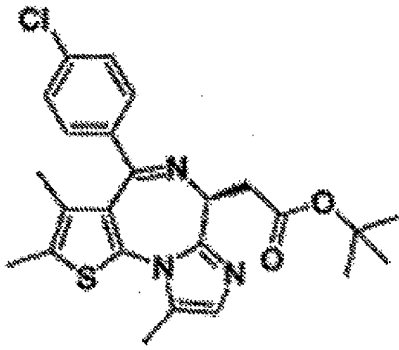
[式中、R、R₁、及びR₂並びにR₃は、式(1)中と同じ意味を有し、Yは、O、N、S、又はCR₅であり、式中、R₅は式(1)中と同じ意味を有し、nは0又は1であり、式(VII)中の破線の円は、芳香族又は非芳香族環を示す]

【0151】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、次式で表される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0152】

【化19】



(VIII)

10

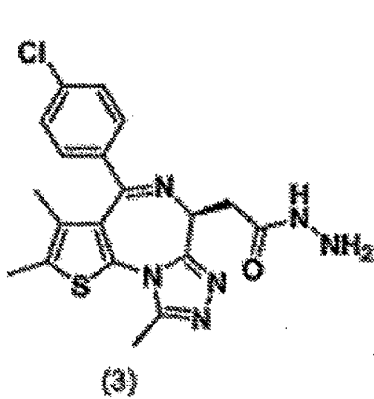
【0153】

いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、(ラセミ体の)JQ1であり、特定の実施形態では、化合物は(+)-JQ1である。いくつかの実施形態では、プロモドメイン又はBETインヒビターは、以下からなる群から選択される化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物である。

【0154】

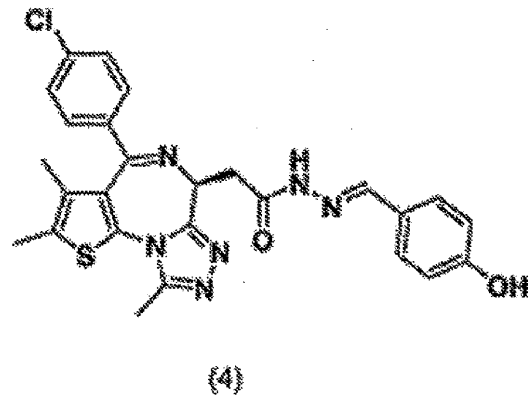
20

【化20】



(3)

及び



(4)

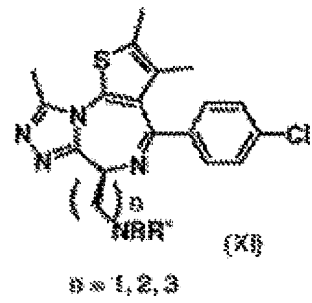
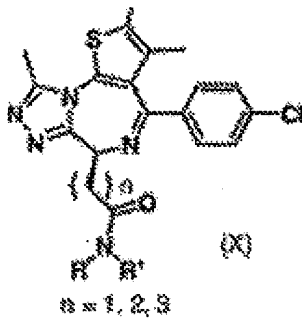
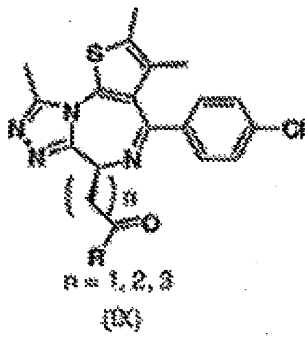
30

【0155】

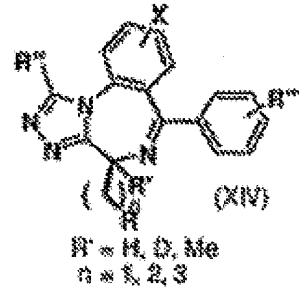
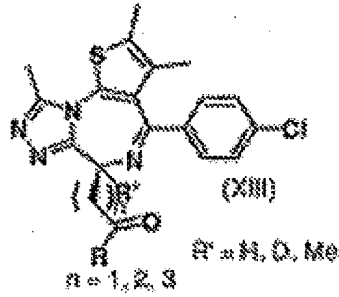
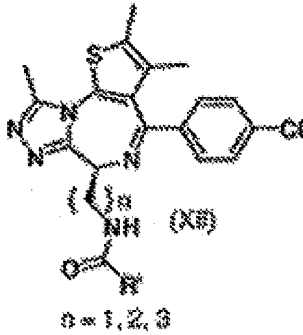
化合物の更なる例としては、次式のいずれかによる化合物、又はその塩、溶媒和物若しくは水和物が挙げられる。

【0156】

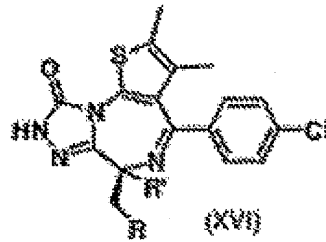
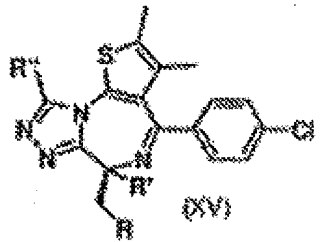
【化 2 1】



10

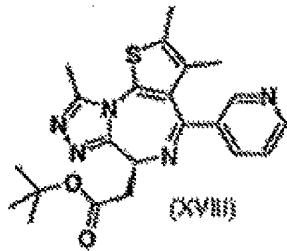
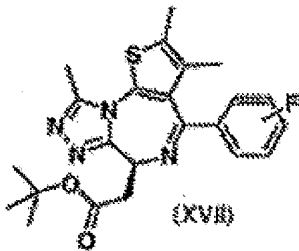


20

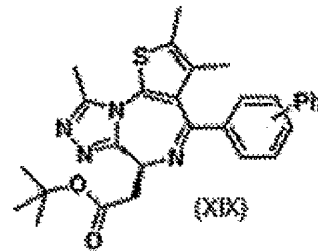


$R' = OMe, CH_2OH, CH_2NH_2, CH_2OMe$

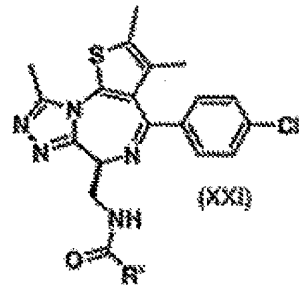
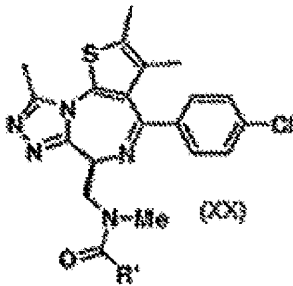
30

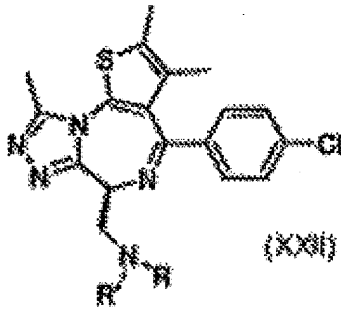


又は2-及び4-ピリジル



40





10

【0157】

式IX~XXII中、R及びR'は、例えば、H、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、置換 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルケニル、又は置換 $-C_3 \sim C_{12}$ シクロアルケニルであってよく、それぞれ任意選択により置換されていてよい。式XIV中、Xは、本明細書に記載のアリール基の任意の置換基であってよい。

【0158】

本明細書に記載の化合物は、当技術分野において周知の方法を用いて調製することができる(例えば、全内容が参照により本明細書に援用される、WO2011143669を参照)。

【0159】

本明細書で用いる場合、「芳香族環」又は「アリール」という用語は、炭素及び水素原子を含む単環式又は多環式芳香族環又は環基を意味する。好適なアリール基の例としては、これらに限定されないが、フェニル、トリル、アントラセニル、フルオレニル、インデニル、アズレニル、及びナフチル、並びにベンゾ縮合炭素環部分、例えば5,6,7,8-テトラヒドロナフチルが挙げられる。アリール基は、非置換であってもよいが、任意選択により1つ以上の置換基、例えばアルキル基(限定されないがアルキル(好ましくは低級アルキル又は1つ以上のハロで置換されたアルキル)を含む)、ヒドロキシ、アルコキシ、(好ましくは低級アルコキシ)、アルキルチオ、シアノ、ハロ、アミノ、ボロン酸($-B(OH)_2$ 及びニトロ)の本明細書に記載の置換基で置換されていてよい。特定の実施形態では、アリール基は、単環であり、該環は6個の炭素原子を含む。

20

30

【0160】

本明細書で用いる場合、「アルキル」という用語は、典型的には1~10個の炭素原子を有する飽和、直鎖又は分枝の非環式炭化水素を意味する。代表的な飽和直鎖アルキルには、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル及びn-デシルが挙げられるが、飽和分枝アルキルには、イソプロピル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、イソペンチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、2-メチルヘキシル、3-メチルヘキシル、4-メチルヘキシル、5-メチルヘキシル、2,3-ジメチルブチル、2,3-ジメチルペンチル、2,4-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルヘキシル、2,4-ジメチルヘキシル、2,5-ジメチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル、2,2-ジメチルヘキシル、3,3-ジメチルペンチル、3,3-ジメチルヘキシル、4,4-ジメチルヘキシル、2-エチルペンチル、3-エチルペンチル、2-エチルヘキシル、3-エチルヘキシル、4-エチルヘキシル、2-メチル-2-エチルペンチル、2-メチル-3-エチルペンチル、2-メチル-4-エチルペンチル、2-メチル-2-エチルヘキシル、2-メチル-3-エチルヘキシル、2-メチル-4-エチルヘキシル、2,2-ジエチルペンチル、3,3-ジエチルヘキシル、2,2-ジエチルヘキシル、3,3-ジエチルヘキシル等が挙げられる。本発明の化合物中に含まれるアルキル基は、非置換であってもよいが、任意選択により1つ以上の置換基、例えばアミノ、アルキルアミノ、アリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、アルコキシ、アルキルチオ、オキソ、ハロ、アシル、ニトロ、ヒドロキシル、シアノ、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、アリールアミノ

40

50

、ヘテロアリールアミノ、カルボシクリル、カルボシクリルオキシ、カルボシクリルチオ、カルボシクリルアミノ、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルオキシ、ヘテロシクリルアミノ、ヘテロシクリルチオ等で置換されていてもよい。低級アルキルは、典型的には、本発明の化合物に好ましい。

【0161】

「ジアステレオマー」という用語は、2つ以上の非対称の中心を有し、それらの分子が互いに鏡像ではない立体異性体を指す。

【0162】

「鏡像異性体」という用語は、互いに重ね合わせることができない鏡像である化合物の2つの立体異性体を指す。等モルの2つの鏡像異性体の混合物を「ラセミ混合物」又は「ラセミ体」と呼ぶ。

10

【0163】

「ハロゲン」という用語は、-F、-Cl、-Br又は-Iを示す。

【0164】

「ハロアルキル」という用語は、ハロゲンによって一置換、二置換又は多置換された上記のアルキル基、例えばフルオロメチル及びトリフルオロメチルを含むことが意図される。

【0165】

「ヒドロキシル」という用語は、-OHを意味する。

【0166】

「ヘテロ原子」という用語は、本明細書で用いる場合、炭素又は水素以外の任意の元素の原子を意味する。好ましいヘテロ原子は、窒素、酸素、硫黄及びリンである。

20

【0167】

「ヘテロアリール」という用語は、芳香族5~8員単環、8~12員二環、又は11~14員三環系を指し、単環の場合は1~4個の環ヘテロ原子、二環の場合は1~6個のヘテロ原子、又は三環の場合は1~9個のヘテロ原子を有し、前記ヘテロ原子は、O、N、又はSから選択され、残余環原子は炭素である。ヘテロアリール基は、アリール基の場合と同様に、任意選択により1つ以上の置換基で置換されてよい。ヘテロアリール基の例としては、これらに限定されないが、ピリジル、フラニル、ベンゾジオキソリル、チエニル、ピロリル、オキサゾリル、オキサジアゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソオキサゾリル、キノリニル、ピラゾリル、イソチアゾリル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、トリアゾリル、チアジアゾリル、イソキノリニル、インダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾフリル、インドリジニル、イミダゾピリジル、テトラゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾオキサジアゾリル、及びインドリルが挙げられる。

30

【0168】

「複素環式」という用語は、本明細書で用いる場合、環構造内の炭素以外に少なくとも1個の原子(例えば、S、O、N)を含有する有機化合物を指す。これらの有機化合物中の環構造は、芳香族又は非芳香族のいずれであってもよい。複素環式部分のいくつかの例としては、これらに限定されないが、ピリジン、ピリミジン、ピロリジン、フラン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロチオフェン、及びジオキササンが挙げられる。

40

【0169】

「異性体」又は「立体異性体」という用語は、同一の化学構造を有するが、空間内の原子又は基の配置に関しては異なる化合物を指す。

【0170】

「同位体誘導体」という用語は、化合物中の1個以上の原子が、対応する原子の同位体で置き換えられる化合物の誘導体を含む。例えば、炭素原子(C112")を含有する化合物の同位体誘導体は、化合物の炭素原子が、C13同位体で置き換えられるものと考えられる。

【0171】

「光学異性体」という用語は、本明細書で用いる場合、正確な、互いに重ね合わせるこ

50

とができない安定性の鏡像である、キラル分子としても知られる分子を含む。

【0172】

「多環式」又は「多環式基」という用語は、2個以上の炭素が、2つの隣接している環に共通している、2つ以上の環(例えば、環は「縮合環」である)(例えば、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール及び/又は複素環)の基を指す。非隣接原子を通してつながる環を「架橋環」と称する。多環の各環は、上記のような置換基、例えば、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシレート、アルキルカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィネート、シアノ、アミノ(アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、及びアルキルアリールアミノを含む)、アシルアミノ(アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイル及びウレイドを含む)、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシレート、サルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、複素環、アルキル、アルキルアリール、又は芳香族若しくはヘテロ芳香族部分で置換されてよい。

10

【0173】

「スルフヒドリル」又は「チオール」という用語は、-SHを意味する。

【0174】

本明細書の変形形態のいずれの定義にある化学基のリストの記述も、任意の単一の基又は列挙する基の組合せとしてのその変形形態の定義を含む。本明細書における変形形態又は態様の実施形態の記述は、任意の単一の実施形態としての実施形態又は他の任意の実施形態若しくはその一部と組み合わせた実施形態を含む。

20

【0175】

「小分子」という用語は、天然の又は人工的に作製された(例えば、化学合成によって)、比較的分子量の分子を指す。典型的には、小分子は、有機化合物である(すなわち、炭素を含有する)。小分子は、複数の炭素-炭素結合、立体中心、及び他の官能基(例えば、アミン、ヒドロキシル、カルボニル、及び複素環等)を含有してよい。特定の実施形態では、小分子の分子量は、約1000g/mol以下、約900g/mol以下、約800g/mol以下、約700g/mol以下、約600g/mol以下、約500g/mol以下、約400g/mol以下、約300g/mol以下、約200g/mol以下、又は約100g/mol以下である。特定の実施形態では、小分子の分子量は、少なくとも約100g/mol、少なくとも約200g/mol、少なくとも約300g/mol、少なくとも約400g/mol、少なくとも約500g/mol、少なくとも約600g/mol、少なくとも約700g/mol、少なくとも約800g/mol、又は少なくとも約900g/mol、又は少なくとも約1000g/molである。上記の範囲の組合せ(例えば、少なくとも約200g/molと約500g/mol以下)も可能である。特定の実施形態では、小分子は、薬物(例えば、連邦規制基準(C.F.R.)に規定されているように、米国食品医薬品局によって認可された分子)等の治療に有効な作用剤である。小分子はまた、1個以上の金属原子及び/又は金属イオンと錯体を形成し得る。この場合、小分子は、「有機金属小分子」とも呼ばれる。好ましい小分子は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおいて生物学的効果を生むという点で生物学的に活性である。小分子には、これらに限定されないが、放射性核種及び造影剤が挙げられる。特定の実施形態では、小分子は薬物である。好ましくは、必ずしも必要ではないが、薬物は、しかるべき行政機関又は規制機関によって、既にヒト又は動物への使用に安全及び有効であると見なされているものである。例えば、ヒトへの使用が認可されている薬物は、参照により本明細書に援用される、21 C.F.R. § § 330.5、331~361及び440~460の下、FDAによって列挙され、家畜に使用される薬物は、参照により本明細書に援用される、21 C.F.R. § § 500~589の下、FDAによって列挙されている。すべての列挙される薬物は、本発明による使用に許容されると見なされる。

30

40

【0176】

いくつかの実施形態では、プロモドメインインヒビターは、BRD含有タンパク質の発現

50

を低減又は防止する任意の分子又は化合物である。このようなインヒビターの例としては、siRNA、shRNA、dsRNA、オリゴ糖ミミック、及びプロテアーゼが挙げられ、これらは、1種以上のBRD含有タンパク質を標的とする。

【0177】

上記のインヒビターを生成する方法は、当技術分野において周知である(例えば、Sambrook、Fritsch及びManiatis、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、(現行版); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F. M. Ausubelら編、(現行版)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (現行版) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney編(1987)).

DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II(D. Glover編); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait編、現行版); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins編、現行版); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins編、現行版); Fundamental Virology, 2nd Edition, vol. I & II (B. N. Fields and D. M. Knipe編)を参照)。

10

【0178】

プロテインホスファターゼ2A(PP2A)

ヒトゲノムは、約107のチロシンプロテインホスファターゼを含有する(Alonso Aら、(2004) Cell 117: 699~711)が、セリン-トレオニン(Ser/Thr)プロテインホスファターゼはごく少数である。Ser/Thrプロテインホスファターゼは、3つの構造的に異なったファミリーであるPPM、PPP及びFCP/SCPに分類される。プロテインホスファターゼ2A(PP2A)は、PPPファミリーに属し、多くの細胞機能及び制御の必須面に関与し得る主要Ser/Thrホスファターゼである(Janssens V & Goris J (2001) Biochem J 353:417~439; Virshup D (2000) Curr Opin Cell Biol 12:180~185; Lechward Kら(2001) Acta Biochem Pol 48:921~933)。いくつかの推定から、PP2Aは、哺乳類細胞中の全てのSer/Thrホスファターゼ活性の大部分の原因となり得る。PP2Aは、細胞周期調節、細胞増殖のコントロール、発達、多重シグナル変換経路の制御、細胞骨格動態及び細胞移動度において主要な役割を果たす。PP2Aの必須機能は、PP2Aの触媒サブユニットが、種のうちでも最も保存されている酵素であるという事実によって反映される(Cohen Pら(1990) FEBS Lett 268:355~359)。

20

【0179】

PP2Aアクチベーターは、当技術分野において公知である。PP2Aアクチベーターは、PP2A発現又はPP2Aホスファターゼ活性に検出可能な任意のプラス効果がある任意の分子又は化合物である。いくつかの実施形態では、PP2Aアクチベーターは、上記のPP2Aを、対照の活性(例えば、アクチベーターがない状態での活性)と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、又は少なくとも500%以上活性化する。PP2Aのアクチベーターは、小分子、核酸、タンパク質、ペプチド、抗体又は抗体フラグメントであってよい。

30

【0180】

PP2Aアクチベーターの例は、参照により本明細書に援用される、US2010/0267673、WO2009/117769、WO2013181488に記載されている。いくつかの実施形態では、PP2Aアクチベーターは、これらに限定されないが、クロルプロマジン、メソリダジン、チオリダジン、アセトフェナジン、フルフェナジン、ペルフェナジン、トルフルオペラジン、並びにこれらの薬学的に許容される塩及びエステルを含めた、フェノチアジン化合物である(参照により本明細書に援用される、WO2008/119109参照)。いくつかの実施形態では、PP2Aアクチベーターは、FTY720((2-アミノ-2-[2-(4-オクチルフェニル)エチル]プロパン1,3-ジオール塩酸塩、Fingolimod/Gilenya(商標)である(参照により本明細書に援用されるWO2007/143081参照)。

40

【0181】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びPP2Aアクチベーターは、BETインヒビター単体又はPP2Aアクチベーター単体と比較して、がんを治療する上で相乗作用的である。いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びPP2Aアクチベーターは、本明細書に記載

50

のB細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-xl)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターと一緒に投与する。

【0182】

B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター

Bcl-2タンパク質は、がん及び正常細胞の両方におけるアポトーシスの重要な調整剤として機能する。Bcl-2タンパク質は、アポトーシスをチェックして、細胞を生き延びるために健康かつ有用にする働きをする。このタンパク質ファミリーは、Bcl-2、Bcl-xL、及びMcl-1等の抗アポトーシスタンパク質、並びにBid、Bim、Bad、Bak及びBaxを含めたアポトーシス促進分子を含む。Bcl-2及びBcl-xLタンパク質は、Bak、Bax、Bim、Bid、Puma、及びBad等のアポトーシス促進Bcl-2ファミリータンパク質とのヘテロ二量化によりアポトーシスを阻害する。

10

【0183】

本明細書で用いる場合、「Bcl-xlインヒビター」は、Bcl-xlの生存促進機能を部分的に又は完全に防止又は阻害することができる任意の分子又は化合物を指す。Bcl-xlインヒビターは、DNA及びRNAアプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA及びshRNA等の核酸、小ペプチド、抗体又は抗体フラグメント、並びに小分子化合物等の小分子を含めた、任意の分子又は化合物でよい。Bcl-xlインヒビターは、Bcl-xlのみを阻害することができる、又は複数の若しくは全てのBcl-xl抗アポトーシスタンパク質を阻害することができることを理解されたい。

20

【0184】

本明細書で用いる場合、「Bcl-2インヒビター」は、Bcl-2の生存促進機能を部分的に又は完全に防止又は阻害することができる任意の分子又は化合物を指す。Bcl-2インヒビターは、DNA及びRNAアプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA及びshRNA等の核酸、小ペプチド、抗体又は抗体フラグメント、並びに小分子化合物等の小分子を含めた、任意の分子又は化合物でよい。Bcl-2インヒビターは、Bcl-2のみを阻害することができる、又は複数の若しくは全てのBcl-2抗アポトーシスタンパク質を阻害することができることを理解されたい。いくつかの実施形態では、Bcl-2インヒビターは、Bcl-xlを阻害する。

【0185】

Bcl-xl及びBcl-2インヒビターは、当技術分野において公知である。Bcl-xl及びBcl-2インヒビターの例は、参照により本明細書に援用される、WO2012/103059、US8309582、US8557812、US8865901、WO2012071374、及びCangら(J Hematol Oncol 2015 8: 129)に記載されている。本明細書に記載の方法は、任意の既知の又は以下に開発されたBcl-xlインヒビターによって有用である。

30

【0186】

いくつかの実施形態では、Bcl-xlインヒビターとしては、これらに限定されないが、ABT-737(4-[4-[[2-(4-クロロフェニル)フェニル]メチル]ピペラジン-1-イル]-N-[4-[[[(2R)-4-(ジメチルアミノ)-1-フェニルスルファニルブタン-2-イル]アミノ]-3-ニトロフェニル]スルホニルベンズアミド; Santa Cruz Biotechnology社)、ABT-263(4-[4-[[2-(4-クロロフェニル)-5,5-ジメチルシクロヘキセン-1-イル]メチル]ピペラジン-1-イル]-N-[4-[[[(2R)-4-ホルリン-4-イル-1-フェニルスルファニルブタン-2-イル]アミノ]-3-(トリフルオロメチルスルホニル)フェニル]スルホニルベンズアミド; Navitoclax-ApeXBIO社)、AT101((-)-1,1',6,6',7,7'-ヘキサヒドロキシ-3,3'-ジメチル-5,5'-ビス(1-メチルエチル)-[2,2'-ピナフタレン]-8,8'-ジカルボキサリデヒド)、Sabutoclax(2,3,5-トリヒドロキシ-7-メチル-N-[(2R)-2-フェニルプロピル]-6-[1,6,7-トリヒドロキシ-3-メチル-5-[[[(2R)-2-フェニルプロピル]カルバモイル]ナフタレン-2-イル]ナフタレン-1-カルボキサミド; TOCRIS社)及びTW37(N-[4-[[2-(1,1-ジメチルエチル)フェニル]スルホニル]フェニル]-2,3,4-トリヒドロキシ-5-[[2-(1-メチルエチル)フェニル]メチル]ベンズアミド; TOCRIS社)が挙げられる。いくつかの実施形態では、Bcl-2インヒビターとしては、これらに限定されな

40

50

いが、ABT-199(4-[4-[[2-(4-クロロフェニル)-4,4-ジメチルシクロヘキセン-1-イル]メチル]ピペラジン-1-イル]-N-[3-ニトロ-4-(オキサン-4-イルメチルアミノ)フェニル]スルホニル-2-(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-5-イルオキシ)ベンズアミド)が挙げられる。

【0187】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びBcl-x1インヒビターは、BETインヒビター単体又はBcl-x1インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である。いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びBcl-x1インヒビターを、本明細書に記載のプロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターと一緒に、対象に投与する。

10

【0188】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びBcl-2インヒビターは、BETインヒビター単体又はBcl-2インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である。いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びBcl-2インヒビターを、本明細書に記載のBcl-x1、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターと一緒に、対象に投与する。

【0189】

カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター

カゼインプロテインキナーゼ2(CK2)は、細胞成長及び増殖並びにアポトーシスの制御を含めた細胞内の複数の機能に関与する、遍在するタンパク質セリン/トレオニンキナーゼである(例えば、Tawficら、2001、Histol. Histopathol、16:573~82参照)。CK2は、高度に保存された酵素であり、細胞の生存に必須であることが示唆されてきた。キナーゼは、2つのサブユニットと錯体を形成する2つの触媒サブユニット(及び/又は')からなるヘテロ四量体である。CK2が細胞成長を制御するための一手段は、核基質及びクロマチンが優先的な標的であるように見える核の中のシグナル伝達を通す。CK2インヒビターは、DNA及びRNAアプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA及びshRNA等の核酸、小ペプチド、抗体又は抗体フラグメント、並びに小分子化合物等の小分子を含めた、任意の分子又は化合物であってよい。

20

【0190】

CK2インヒビターは、当技術分野において公知である。CK2インヒビターの例は、参照により本明細書に援用される、US2011/0207789、US6607916、US2010/0256217、及びWO2006.065724に記載されている。本明細書に記載の方法は、任意の既知の又は以下に開示されたCK2インヒビターによって有用である。

30

【0191】

いくつかの実施形態では、CK2インヒビターとしては、これらに限定されないが、CX-4945(5-(3-クロロアニリノ)ベンゾ[c][2,6]ナフチリジン-8-カルボン酸; Silmitasertib、A PeXBIO社)、DMAT(MCE MedChem Express)、エラグ酸(MCE MedChem Express)、TTP22(MCE MedChem Express)が挙げられる。

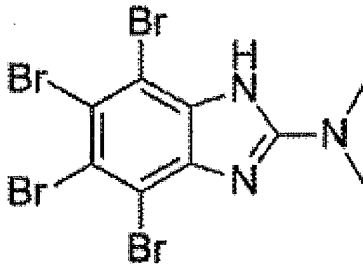
【0192】

DMATの化学構造は、以下である。

40

【0193】

【化22】



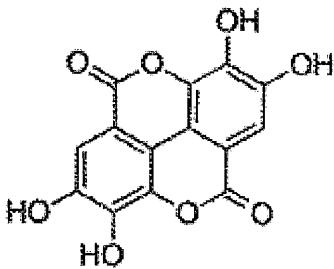
10

【0194】

エラゲ酸の化学構造は、以下である。

【0195】

【化23】



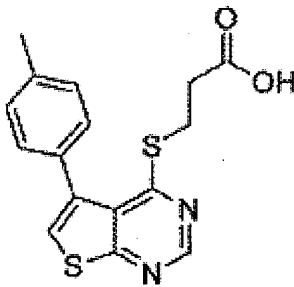
20

【0196】

TTP22の化学構造は、以下である。

【0197】

【化24】



30

【0198】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びCK2インヒビターは、BETインヒビター単体又はCK2インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である。いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びCK2インヒビターを、本明細書に記載のプロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターと一緒に、対象に投与する。

40

【0199】

メディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビター

遺伝子転写の活性化は、DNA中の転写エンハンサー部位を認識する因子によって誘発される多段階プロセスである。これらの因子は、コアクチベーターと共に作用し、RNAポリメラーゼII装置による転写開始を誘導する。RNAポリメラーゼII転写サブユニット1(MED1)タンパク質のメディエーターは、TFIIDと共に、SP1による効率的な活性化に必要とされる

50

CRSP(SP1活性化に必要な補助因子)複合体のサブユニットである。このタンパク質は、他のマルチサブユニット複合体(例えば、TRと相互作用し、開始因子及び補助因子と連動してDNA鋳型上のTR機能を促進する甲状腺ホルモン受容体-(TR-)関連タンパク質)の成分でもある。また、p53依存的アポトーシスも制御し、脂質生成に必須である。このタンパク質は、自己オリゴマー形成能を有することが知られている。

【0200】

CK2インヒビターは、DNA及びRNAアプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA及びshRNA等の核酸、小ペプチド、抗体又は抗体フラグメント、並びに小分子化合物等の小分子を含めた、任意の分子又は化合物でよい。いくつかの実施形態では、MED1インヒビターは、MED1とBRD4との間の相互作用を破壊する。

10

【0201】

いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びMED1インヒビターは、BETインヒビター単体又はMED1インヒビター単体と比較して、がんの治療において相乗作用的である。いくつかの実施形態では、BETインヒビター及びMED1インヒビターを、本明細書に記載のプロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、及び/又はカゼインキナーゼ2(CK2)インヒビターと一緒に、対象に投与する。

【0202】

医薬組成物

本開示の一態様は、BETインヒビター及びプロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター 巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)インヒビターを含む医薬組成物に関する。本明細書に記載されている医薬組成物は、それを必要とする対象において、BETインヒビターに抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがん等のがんを治療及び/又は予防する際に有用となりうる。本明細書に記載されている医薬組成物は、それを必要とする対象において、BETインヒビターを用いる治療に対するがんの抵抗性を低減する、遅延させる、及び/又は予防する際に有用でありうる。

20

【0203】

本明細書に記載されている医薬組成物は、薬理学の技術分野において公知の任意の方法によって調製することができる。一般に、そのような調製方法は、BETインヒビター及び/又はPP2Aアクチベーター等の本明細書に記載されている活性成分を、担体若しくは賦形剤、及び/又は1種若しくは複数の他の副成分と会合させる工程と、次いで、必要ならば及び/又は所望の場合、生成物を所望の単回又は多数回用量単位に成型する工程及び/又は包装する工程を含む。医薬組成物は、単回単位用量として及び/又は複数の単回単位用量として、バルクで調製され、包装され、及び/又は販売することができる。本明細書で使用する場合、「単位用量」は、所定量の活性成分を含む医薬組成物の離散的な量である。活性成分の量は、一般的に、対象に投与される活性成分の投薬量及び/又はそのような投薬量の都合のよい画分、例えば、そのような投薬量の2分の1又は3分の1等に等しい。

30

【0204】

本発明の医薬調製物は、薬学的に許容される担体を含んでもよく、又は薬学的に許容される担体に希釈されてもよい。本明細書で使用する用語「薬学的に許容される担体」は、ヒト又は他の哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、又はウマへの投与に適する、1種又は複数の適合可能な充填剤、希釈剤又は他のそのような物質を意味する。用語「担体」は、適用を促進するために、活性成分と組み合わせられる、天然又は合成の、有機又は無機の成分を示す。担体は、所望の薬学的有効性又は安定性を実質的に損なうような相互作用が存在しないように、本発明の調製物と、且つ互いに混合することができる。経口、皮下、静脈内、筋肉内等のための製剤に適する担体は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Easton、Paに見られる。

40

【0205】

50

セラノスティック法

本発明の一部の態様は、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして対象を特定するための方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、BETインヒビター治療を受けている対象から得た腫瘍サンプルにおいて、プロモドメイン含有タンパク質4(BRD4)の細胞内の位置を決定するアッセイを実施する工程と、BRD4が核局在性を有する場合、BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして対象を特定する工程とを含む。

【0206】

本明細書に記載されている方法は、対象が、プロモドメイン及びエキストラ末端(BET)インヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するか否かを確立すること又は示すこと(すなわち、特定すること)を助ける。本明細書で使用する場合、「BETインヒビター治療に抵抗性を持つがん」は、例えば、継続した増殖並びに腫瘍成長及び腫瘍負荷の増加によって証明されるように、がんが、そのようなインヒビターに応答しないことを意味する。一部の実施形態では、がんは、そのようなインヒビターを用いる治療(本明細書では、以前に投与された療法として言及される)に最初は応答することもあるが、しばらくすると、抵抗性が高くなる可能性がある(すなわち、がんは、BETインヒビター治療に抵抗性を生じる危険性がある)。一部の実施形態では、がんは、そのようなインヒビターを用いる治療に全く応答していないこともある。

10

【0207】

対象は、医師によって(例えば、当技術分野で公知の方法を使用して)がんを有すると診断され、BETインヒビター治療で治療される。

20

【0208】

対象から得た腫瘍サンプル中のBRD4の細胞内の位置は、当技術分野で公知のアッセイを使用して決定することができる。例えば、BRD4の細胞内の位置は、免疫組織化学、免疫蛍光、免疫プロット法、ラジオイムノアッセイ、ELISA又はFACS分析によって決定されてもよい。一部の実施形態では、BRD4の細胞内の位置は、免疫蛍光と組み合わせて、抗体を使用して決定される。

【0209】

対象は、BRD4が核局在性を有する場合、BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有すると特定される。或いは、対象は、BRD4が細胞質局在性を有する場合、BETインヒビター治療に抵抗性がないがんを有すると特定される。対象は、BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有すると特定される場合、その後、対象は、タンパク質ホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター、及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)と組み合わせてBETインヒビターを投与することによって治療されうる。したがって、本明細書に記載されている方法は、BETインヒビターを用いる単剤療法に代わって、併用療法による治療から利益を受ける可能性の高い対象を特定することも助ける。

30

【0210】

一部の実施形態では、方法は、がんを有する対象から得た腫瘍サンプル中のリン酸化プロモドメイン含有タンパク質4(pBRD4)の非リン酸化BRD4(BRD4)に対する比を決定するアッセイを実施する工程と、pBRD4のBRD4に対する比が、対照のpBRD4のBRD4に対する比と比較して高い場合、BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして対象を特定する工程とを含む。

40

【0211】

対象は、医師によって(例えば、当技術分野で公知の方法を使用して)がんを有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、BETインヒビター治療を用いて治療される。一部の実施形態では、対象は、BETインヒビターを用いる治療を受けないが、その治療を考慮される。

50

【0212】

腫瘍サンプル中のリン酸化プロモドメイン含有タンパク質4(pBRD4)の非リン酸化BRD4(BRD4)に対する比は、免疫プロット法、免疫組織化学、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、ELISA又はFACS分析によって決定することができる。一部の実施形態では、多色免疫蛍光を使用してpBRD4のBRD4に対する比を決定する。一部の実施形態では、pBRD4のBRD4に対する比は免疫プロットによって決定される。

【0213】

pBRD4のBRD4に対する比が、対照のpBRD4のBRD4に対する比と比較して高い場合、対象は、BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして特定される。或いは、pBRD4のBRD4に対する比が、対照のpBRD4のBRD4に対する比と比較して低い場合又は変わらない場合、対象は、BETインヒビター治療に抵抗性がないがんを有するものとして特定される。pBRD4のBRD4に対する対照の比は決定することも、既に存在していた比とすることもできる。一部の実施形態では、対照の比は、BRD4インヒビター治療に抵抗性がないがんを有する対象から得た腫瘍サンプル中のpBRD4のBRD4に対する比である。一部の実施形態では、対照の比は、がんを有さない対象から得られた組織サンプル中のpBRD4のBRD4に対する比である。

【0214】

対象のpBRD4のBRD4に対する比と対照の比との間の差の大きさは変化してもよい。例えば、対象は、pBRD4のBRD4に対する比が、対照の比よりも少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも250%、少なくとも500%、少なくとも1000%高い場合、BETインヒビター療法に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして特定されてもよい。一部の実施形態では、対象は、pBRD4のBRD4に対する比が、対照の比よりも少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍以上高い場合、BETインヒビター療法に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして特定されてもよい。有意差は、適当な統計検定を使用して特定されてもよい。有意差に関する検定は、当技術分野において周知であり、Applied Statistics for Engineers and Scientists by Petrucci, Chen及びNandram 1999 再版において例示されている。

【0215】

対象が、BETインヒビター治療に抵抗性を持つ又は抵抗性を生じる危険性があるがんを有するものとして特定される場合、その後、対象は、BETインヒビターを、プロテインホスファターゼ2A(PP2A)アクチベーター、B細胞リンパ腫-2(Bcl-2)インヒビター、巨大B細胞リンパ腫(Bcl-x1)インヒビター、カゼインキナーゼ2(CK2)インヒビター及び/又はメディエーター複合体サブユニット1(MED1)と組み合わせて投与することによって治療されてもよい。したがって、本明細書に記載されている方法は、BETインヒビターを用いる単剤療法に代わって、併用療法による治療から利益を受ける可能性の高い対象を特定することも助ける。

【0216】

本発明は、以下の実施例によって更に例証されるが、決して更に限定するものとして解釈されるべきではない。この出願全体にわたって引用されている参考文献のすべて(参考文献、発行された特許、公開された特許出願、及び同時係属中の特許出願を含む)の全内容は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【実施例】

【0217】

BETプロモドメインインヒビターに対する乳がんの感受性

転写により定義されるサブタイプ:管腔、HER2⁺、及びTNBC(基底及び間葉系サブセットの両方)を反映する乳がん細胞のパネルにおいて、BBIの効果をも最初に評価した³、²²。JQ1に加えて、構造的に異なる化学プローブ(iBET151、PFI-1)、治療薬(iBET、GSK-762; Y803

10

20

30

40

50

、OTX-015)、及び不活性類似体(アルプラゾラム及び不活性JQ1エナンチオマー、R-JQ1)のサンプルを調製した。ほとんどのTNBC細胞株の増殖は、低いnM範囲において、IC50に関する効能比例方式において著しく阻害されたが、管腔細胞株は比較的抵抗性であった(図1A)。BETプロモドメインに関するTNBC細胞の依存度は、RNA干渉によって確認され、このことによって、BRD4の下方調節は、ほとんど一貫してBBIの表現型をそっくり写しとったものであることが明らかとなった(図1B、図7A~図7B)。

【0218】

TNBC増殖に関するBBIの効果を理解するために、細胞周期の異なる期におけるJQ1の効果を特徴付けた。SUM159細胞は、G2/Mにおいて、ノコダゾールを用いて最初に同期化された。JQ1を放出の1時間前又は3時間後に投与し、細胞周期をフローサイトメトリーによって評価した。放出前にJQ1で処理した細胞は、高いサイクリンD1レベルを有する初期G1において停止し、一方G2/M停止から放出の3時間後のJQ1の添加は、あまり顕著な効果を有さず、S及びG2/M期の進行を実質的に可能とした(図1C及び図7C~図7D)。これらのデータは、G2/MからG1期の進行におけるBRD4の報告された役割^{12、23}と一致する。BRD4タンパク質レベルの低下は、G1/Sまで進行した同期化細胞として検出され、これは、おそらくBBIの効果を強調するJQ1処理によって更に悪化した(図7C)。JQ1への曝露を延長すると(48~72時間)、アポトーシス応答を惹起し、これは、サブG1画分及びアネキシンV染色の増加によって測定された(図7D~図7E)。初期G1停止及び後期アポトーシスについて同等の誘導が、BRD4ノックダウンで観察され、TNBCにおけるこのコアクチベーターに対する重要な役割を裏付けた(図7D~図7E)。

10

20

【0219】

BBIに対する感受性が、標的BETタンパク質の存在量、JQ1の抗がん作用を媒介することが記載された因子、又はTNBCの成長に必要とされるとして以前に特定されたシグナル伝達経路の生化学マーカー²⁴に関連するか否かを調査するために、細胞株のパネルにおいて、免疫プロット分析を実施した。MYC及びBRD4の相対的発現、並びにpSTAT3及びpJAK2の相対的存在量を、JQ1への高い感受性を有する別々のTNBC株(例えば、SUM159)で評価したが、これらの測定値は全て、JQ1感受性との明確な関連を示さなかった(図1D)。JQ1で処理したSUM159細胞で実施したこれらの因子の動態研究により、12時間後のpSTAT3及びpJAK2における低下と、24時間でのMYCにおける用量応答性の低下が明らかとなった(図8A~図8B)。これらのデータは、T細胞性急性リンパ性白血病において報告されたJAK-STATシグナル伝達における効果²⁵と一致したが、BBIがMYCを急速に枯渇させる悪性血液疾患の以前の研究^{8、9}からはそれている。合わせて、これらの研究により、TNBCのBBIへの応答は、機構及び表現型に関し以前の報告と異なる場合があることが示唆される。

30

【0220】

実際に、TNBC細胞をJQ1と培養した場合に、顕著な形態変化が観察され、細胞状態に関するBET阻害の効果が示唆された(図8C)。細胞老化に関する効果を測定するために、TNBC細胞(SUM159及びMDA-MB-231)をJQ1で処理し、ガラクトシダーゼ染色を実施した。BETプロモドメイン阻害は、老化の強力な誘導と整合することには酸性ガラクトシダーゼ活性を著しく増加させた(図8D)。分化状態に関する効果を評価するために、基底及び管腔マーカーについて、免疫蛍光顕微鏡法を実施した。JQ1処理により、管腔細胞に固有の低分子量(LMW)サイトケラチン及びサイトケラチン18(CK18)の上昇と、基底細胞に固有の高分子量(HMW)サイトケラチンの付随する低下が生じ、より多くの管腔上皮表現型へのシフトが示された(図1E)。これらの老化及び分化に関する初期の、強力な作用は、がんにおけるBBIの以前の研究^{8、14、18}、及び細胞状態の動的メディエーターとしてのBETプロモドメインの新たに出現した生物学的知見²⁶に呼応したものである。

40

【0221】

これらの知見の橋渡しの意義を拡大するために、ヒト乳がんモデルの4頭のマウス異種移植片における乳腺腫瘍の成長を阻害するJQ1の能力をin vivoで評価した。2週間のJQ1処理は、患者由来の原発ヒトTNBC異種移植片のものと同様に、SUM159細胞株及びMDA-MB-231 TNBC細胞株由来の定着腫瘍の成長を有効に阻害した(図1F及び図8E~8F)。次いで、in vi

50

voでのBRD4への特異的依存度を、SUM159モデルにおいて2つの独立したTET誘導性shRNAを使用して確立した。BRD4の下方調節は、腫瘍の完全な退縮を導き、ドキシサイクリン処理を中断した後でさえも再成長することができなくなる、更により顕著な効果を有することが分かった(図1F及び図8G)。基底(HMWサイトケラチン及びpSTAT3の減少)及び管腔(LMWサイトケラチン及びCD24の増加)マーカーの免疫蛍光顕微鏡法による薬力学測定によって、BBIに誘導された基底から管腔への分化のエビデンスをin vivoで確認した(図1G及び図8F)。

【 0 2 2 2 】

TNBCにおけるBBIの転写標的

次に、総合的なエピゲノム分析を使用して、TNBCにおけるBBIの直接的な転写標的を特定した。予め固定し、断片化した核クロマチンのリガンド-アフィニティークロマトグラフィーを超並列DNAシーケンシング(Chem-seq)²⁷と一組にすることによって、エピゲノム内の別々の作用部位にクロマチン活性小分子を空間的に位置づけることができる技術を報告した。Chem-seqは、JQ1(Bio-JQ1)²⁷、及びBBI感受性TNBC細胞株(SUM159)の回復可能な、ピオチン化誘導体を使用して実施した。BBIの機能部位は、富化配列リードをヒトゲノムにアラインし、プロモーター(ヒストン3リシン4トリメチル化;H3K4me3)、エンハンサー(ヒストン3リシン27アセチル化;H3K27ac)及びBRD4コアクチベーターに対してChIP-seqデータと局所的且つ全体的に比較することによってマッピングした。プロモドメインインヒビター結合を、ゲノム全体で、活性エンハンサーのBRD4の富化且つ強い富化の部位にほぼ完全に共存する(図2B)、活性プロモーター及びエンハンサー領域で特定する(図2A)。期待されるように、BBIは、処理されたTNBC細胞におけるクロマチン結合BRD4を有効に移動させることが分かった(図2C)。この効果は、Chem-seqによってBio-JQ1富化の上昇を示すゲノム領域でより顕著であり(図2D)、最も高い富化部位でBRD4結合の破壊が増強されることを裏付けた。第2のBBI感受性TNBC株である、SUM149細胞におけるBRD4 ChIP-seq研究により、これらの知見を確認した(図9A)。

【 0 2 2 3 】

SUM159細胞及びSUM149細胞におけるBBIの生物学的に関連する、直接的な標的を特定するために、ゲノム全体でBio-JQ1とBRD4の結合を定量化したところ、強い富化は、それぞれ、219スーパーエンハンサー及び159スーパーエンハンサーにおいて見られた(SE;図2E及び図9B)^{6, 16-18}。スーパーエンハンサーは、JQ1によってより効率的にBRD4を枯渇されていることが見出された。これによって、SE関連遺伝子に対する選択的な効果が説明される^{6, 16-18}。SUM159における最も重要なSE関連遺伝子のうちで、発生及び乳がんにおいて重要な役割を有するPOU5F1B/MYC²⁸、IRX2^{29, 30}、HIF1³¹、TFs、及びCD180(RP105)、TLR4-アクセサリ分子は、肥満、炎症、及びアテローム性動脈硬化に関連する³²(図9B)。POU5F1B/MYC²⁸及びHIF1は、SUM149細胞においてもSE関連遺伝子のうちで最も重要であった。JQ1処理後の異なる時点で、RNA-seqによって、両細胞株の遺伝子発現の変化を分析することにより、遺伝子発現に関する一貫した比例的効果を実証され(図9C)、SEに関連する遺伝子が、すべての活性遺伝子と比較して著しく下方調節されやすいことが特定された(図2F及び図9D)。24時間の処理後に、JQ1対DMSOによって上方又は下方調節される遺伝子の発現を、処理の3、12、及び24時間後に実施した。上方調節された遺伝子には、DHR2、HEXIM及びCDKN1Aが含まれ、下方調節された遺伝子には、CD180、PTPN22、及びHNF4Gが含まれた。SE破壊後に実際に期待されたように、遺伝子発現の変化はJQ1処理の3時間後には観察され、より多くの遺伝子を上方調節よりも有意に下方調節した(図9D~図9F)。重要なこととして、ほとんどの下方調節された遺伝子は直接的なBRD4標的であったのに対し、上方調節された遺伝子はそうでなく、この差はJQ1処理後の早い時点で最も顕著であった(データは示さず)。SUM159細胞において、CD180、PTPN22、HNF4G、及びKRT17は、最も重要な下方調節された遺伝子のうちに入っており、一方、BETプロモドメインインヒビターによって上方調節されることが知られている遺伝子であるHEXIM、並びにDHR2及びCDKN1Aは、最も重要な上方調節された遺伝子のうちに入っている。Metacore suit³³を使用して、JQ1によって影響を受けた標的経路の教師なし機能分析により、抗アポトーシス、骨リモデリン

10

20

30

40

50

グ、WNT、及びJAK/STATシグナル伝達経路における調節遺伝子及びエフェクター遺伝子の下方調節が明らかとなった(図2G)。合わせて、これらの研究により、細胞増殖、侵入、及び生存に関わる協調した転写経路の調節解除を導くJQ1によるSE関連遺伝子の選択的破壊が支持される。

【0224】

BET依存TNBCにおけるプロモドメイン阻害への抵抗性

獲得された抵抗性は、標的化療法のほぼ必然的な特徴である。標的化療法に対する抵抗性を精査することは、薬物及び標的の作用機構を説明し、患者を治療する又は患者の薬物抵抗性を予期するための手法を示唆するのに重要である。したがって、漸増用量のJQ1において、SUM159細胞及びSUM149細胞の長期培養によって、BBI抵抗性TNBC細胞を確立した

10

【0225】

親のSUM159細胞株及びSUM149細胞株の増殖は、低用量(0.5 μ M)及び高用量(2.0 μ M)のJQ1によってひどく損なわれ、生存細胞の数は、6日間の処理にわたって減少する(図3A及び図9G)。対照的に、単離されたJQ1抵抗性細胞(SUM159R及びSUM149R)は、高濃度(20 μ Mまで)のJQ1の存在下であっても、経時的に、直線的に増殖を続ける(図3B及び図9G)。構造的に異なるインヒビターがJQ1と等しく不活性であり(図3C)、MDR1及び他のトランスポーターが転写によって上方調節されず(図10A)、ペラパミル等のMDR1インヒビターとのコインキュベーションは効果を有さない(図10B)ので、BBI抵抗性は薬物の輸送に寄与しない。さらなる裏付けは、感受性及び抵抗性細胞におけるBRD4の同等の関与によって与えられ、Bio-JQ1投与によって、リガンドクロマトグラフィー及び免疫プロットを用いて実証される(図10C)。ATP含量に関するすべてのBBIの弱いがはっきりとした用量範囲の効果は、短期間の培養で観察され(図3C)、JQ1を除いて、EC50は、感受性株において細胞増殖を減弱させるのに必要な濃度と一致する(図1A)。これらの短期間の用量応答曲線の肩は、長期間の培養では明確に観察された細胞死を伴わず、薬物抵抗性増殖の表現型を裏付ける(図3A)。感受性及び抵抗性のTNBC細胞は、異なる薬物クラス由来の化合物、例えば、TNBC細胞を標的とすることが公知のCXCR2及びJAK2インヒビターに、等しく感受性であり³⁴、したがって、抵抗性は、他の標的化された薬剤のうちで、BETインヒビターに特異的である(図3D)。10個の独立した単細胞由来のクローンが、SUM159R細胞のプールと同じ抵抗性プロファイルを示したので、適応的の薬物抵抗性は、少数派の細胞の亜集団の生育に起因しなかった(図3E)。SUM159R細胞に由来する異種移植片は、感受性TNBC細胞を用いる並行研究において、JQ1処理に反応しなかったため、同様の結果が*in vivo*でも得られた(図3F)。

20

30

【0226】

標的化療法への抵抗性は、チロシンキナーゼのいわゆる「ゲートキーパー」突然変異³⁵の場合のように、標的タンパク質をコードする遺伝子の体細胞変異によって媒介されることが多い。研究されたすべての抵抗性TNBC集団において、エクソームシーケンスによって、BETプロモドメインをコードする遺伝子への変異を特定することはできなかった。標的化療法への適応的抵抗性は、肺がんにおけるEGFRインヒビター抵抗性に続くMET活性化の場合のように³⁶、バイパス経路の活性化によっても通常生じ、細胞は新しいシグナル伝達因子に依存し、かつ薬物標的にはもはや依存しなくなる。対照的に、ここで、エクソームシーケンスによって、並行経路の活性化を示唆する公知のドライバー遺伝子における、選択された又は出現する変異を特定することはできなかった。驚くべきことに、SUM159R細胞は、RNA干渉実験で確立されたように、細胞成長に対してBRD4に依存したままである(図3G及び図10D)。

40

【0227】

抵抗性TNBCにおけるBRD4のプロモドメインと独立した局在化

BRD4への持続的な依存及び遺伝学による説明の欠如により、薬物抵抗性の根底にあるエピゲノム機構について検討することとした。ゲノム全体での、クロマチン構造、BRD4、及びJQ1の局在化が、SUM159Rで測定され、SUM159とのペアワイズ比較が可能となった。差分SE分析により、マクロファージ及び内皮細胞における炎症の遷移についての研究において

50

記載されているように²⁶、BRD4の機能に起因する細胞状態の動的変化を研究する強力なツールであることが判明した。推定のBRD4に依存する細胞状態の変化を特徴付けるために、感受性細胞及び抵抗性細胞のBio-JQ1 Chem-seqプロファイルと比較した。差分SE分析により、抵抗性SUM159R細胞におけるSEの数の著しい取得と、より少ないSEのあまり顕著ではない消失が見られた(図4A)。Bio-JQ1のSEの取得は、これらの遺伝子座に結合するBRD4に対する富化(図4B)と、また、関連する遺伝子の転写の増加(図4C)とに関連する。上の中で、SUM159細胞において取得されたスーパーエンハンサーは、BCL-xL座で豊富なH3K27acの上流領域及び遺伝子内領域にあった(図4D)。特に、BCL-xLは、発現プロファイリングによれば、抵抗性細胞における、数少ない、高度に上方調節された遺伝子のうちに入っており、その発見は、免疫プロットによって確認された(図11A)。この抗アポトーシス因子の調節解除された発現の増加によって、JQ1を用いる長期処理の間に、アポトーシスに対する抵抗性が付与される。

10

【0228】

JQ1に対するエピゲノム抵抗性は、プロモドメインとは独立した方式で、BRD4をSE座に動員することにより生じると仮定される。BRD4 ChIP-seqは、JQ1へ曝露する場合もしない場合も、感受性細胞及び抵抗性細胞で実施された。これらの研究により、BRD4は、SUM159R細胞におけるJQ1処理の後、クロマチンから移動しないという重要な機構についての発見が確認された(図4E)。Chem-seqにより画定されたSE領域で、SUM159細胞はBRD4を枯渇させるが、一方SUM159R細胞はクロマチンが結合したBRD4を保持する(図4F)。機能的には、抵抗性細胞のJQ1による処理によって、SUM159において最も動的に、JQ1により上方調節され、下方調節された転写においても、H3K27ac(図4G)又は全体的な転写(図11B)に影響を及ぼすことができない(図4H~図4I)。特に、FOXA1、重要な管腔転写因子³⁷、³⁸、CD24、及び管腔サイトケラチンを含むいくつかの管腔マーカーは、細胞培養及びin vivoの両方で、SUM159R細胞において高いレベルを有したが、一方CD44、FOXA2、pSTAT3、及び基底サイトケラチンを含む基底細胞マーカーの発現は低下した(図11C~図11D)。JQ1のBRD4に対する直接的結合を確認する上記のプルダウンデータ及び抵抗性TNBC細胞におけるBRD4との共存を実証するChem-seqデータと一緒に、これらのデータは、クロマチンに戻る必須のBRD4の動員を介するが、プロモドメインと独立した方式で抵抗性が生じるとするモデルを裏付ける。本質的に、SUM149R細胞、及び本来JQ1に抵抗性である細胞株においてさえも同じ観察がなされ(図9E~図9G及び図6A~図6D)、BET阻害に対するエピゲノム抵抗性のより一般的機構を示唆していた。

20

30

【0229】

JQ1抵抗性のTNBCにおけるpBRD4の蓄積

対のプロモドメインに加えて、BRD4は、定義された遺伝子調節因子に結合するさらなる構造上の特徴を有する。実際に、BRD4は、コーンバーグ³⁹によるメディエーター関連因子として、最初に特定された。より最近のプロテオミクス研究により、エキストラ末端ドメインのATAD5、CHD4、GLTSCR1、JMJD6、及びNSD3⁴⁰への強い結合、並びに遠位カルボキシ末端のCDK9及びサイクリン-T1⁴¹への強い結合が明らかにされた。これらの因子の多くは、それら自身のエピジェネティックリーダー分子、及びその機能がBRD4のプロモドメインと独立した動員に寄与しうる、より大きな巨大分子複合体を有する。感受性SUM159細胞と抵抗性SUM159細胞の間の、BRD4関連複合体における、潜在的な差を開示するために、JQ1の存在下及び非存在下で、RIME(内因性タンパク質の急速な免疫沈降質量分析(rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins))⁴²を使用して、公平なプロテオーム分析を実施した。

40

【0230】

親の細胞と比較して抵抗性に富むBRD4と会合したタンパク質に対する分析により、MED1及びBRD3が特定された。BRD4は、JQ1の存在下でも、これらのタンパク質に強く結合した(図5A~図5B及びTable 1(表2))。RIMEのデータからの観察は、BRD4免疫沈降と、その後のMED1及びBRD3に対する免疫プロット分析によって追跡された。JQ1は、感受性細胞において、BRD4をMED1から有効に移動させたが、MED1のBRD4との会合の増加が確認された抵抗性細胞

50

胞では、このような効果はなかった(図5C)。これらの発見は、本来、BBIに対して抵抗性を示すTNBC細胞株及び管腔細胞株と同様に、SUM149細胞及びBBI抵抗性SUM149R細胞において確認された(図13A)。SUM159R細胞におけるBRD4とBRD3の会合の増加は、免疫プロットでは確認されなかった(図5C)が、BRD3の存在量の上昇は観察された(図5D)。

【0231】

MED1によるBRD4のクロマチンへの動員の増加が、JQ1に対する抵抗性の基礎となるか否かを機能的に評価するために、プロモドメインを不活性化する突然変異体(BDmut)をコードするBRD4発現構築物を生成した。内因性BRD4のノックダウンの作用をレスキューする、これらの構築物の能力を、安定な細胞株において評価した(図13B~図13C)。内因性BRD4の下方調節により、親のSUM159細胞と抵抗性SUM159R細胞の両方における細胞成長が低下したが、これは、野生型BRD4の発現を強化することによってレスキューされた(図5D)。BDmut BRD4の発現は、親のSUM159細胞をレスキューすることができなかったが、プロモドメインと独立した動員仮説の機能的検証を与えるJQ1抵抗性のSUM159Rの成長を支持した(図5D)。次に、JQ1に対するBDmut BRD4を発現する細胞の感受性を評価した。親のSUM159細胞において、外因的に発現したBDmut BRD4は、JQ1に対する感受性に著しく影響を与えた(図5E)。対照的に、SUM159R細胞におけるBDmut BRD4の発現は、JQ1の抗増殖作用をレスキューした(図5F)。合わせて、これらの研究により、BBI抵抗性は、JQ1に影響を受けないプロモドメインと独立した方式で、MED1に対するBRD4の結合の増加と関連する。

【0232】

BBI抵抗性におけるBRD4の過剰リン酸化

最近の研究により、BRD4の安定性及び核局在が、カゼインキナーゼII(CK2)によるリン酸化に伴って増加することが報告された⁴³。BBI抵抗性に対するBRD4のリン酸化の寄与を探索するために、親の細胞及び抵抗性細胞において、免疫プロット分析を実施し、抵抗性細胞におけるホスホBRD4(pBRD4)の顕著な増加を発見した(図6A及び図13D)。CK2の小分子阻害により、SUM159細胞及びSUM159R細胞におけるBRD4のリン酸化は減少した(図13E)。これらの結果により、BRD4は、CK2によるリン酸化の増加によって、又は、或いは、未だ同定されていないBRD4ホスファターゼによる脱リン酸化を減少させることによってのいずれかで、抵抗性細胞において、過剰リン酸化されることが示された。これらの意見を調査するために、全CK2物質の免疫プロットを実施することによって、親の細胞及び抵抗性細胞において、最初のCK2活性を分析した。構成的に活性なキナーゼとして、CK2について記載する先行データ⁴⁴と一致して、感受性細胞株と抵抗性細胞株の間のCK2活性の有意な差は検出されなかった(図13F)。

【0233】

PP2A腫瘍サプレッサー遺伝子の不活性化は、乳がんにおいて共通の事象であることが示され、これは、治療抵抗性と予後不良に関連する⁴⁵。更に、PP2Aは、CK2の機能と対抗することの多いプロリフィクセリンホスファターゼである^{46、47}。したがって、PP2AがBRD4ホスファターゼである場合があるか否か、PP2A活性の低下がBBI抵抗性に重要な役割を果たすか否かが調査された。SUM149細胞及びSUM159細胞におけるPP2AのA及びCサブユニットのノックダウンにより、BRD4リン酸化が増加され、PP2Aが以前には認識されていなかったBRD4ホスファターゼとして確立された。PP2A活性とBBI抵抗性の間の関連を強めるために、SUM149細胞のJQ1感受性をPP2AのCサブユニットのノックダウン後に試験し、PP2Aの下方調節によりJQ1感受性が減少したことが決定された(図6C)。最近の研究により、PP2A酵素活性のアクチベーターとして、フェノチアジン化合物が特定された⁴⁸。したがって、SUM159R細胞株、SUM149R細胞株、及び他の細胞株におけるpBRD4のレベルが、フェノチアジン(PTZ)を用いる短期間の処理後に分析され、BRD4の急速な脱リン酸化が検出された(図6D及び図13G)。これに則して、PTZとJQ1を合わせた処理により、SUM159R細胞におけるBBI抵抗性が克服された(図6E)。BRD4の過剰リン酸化がBBI抵抗性に寄与する分子基盤を調査するために、BRD4リン酸化がMED1結合に影響を及ぼすか否かを分析した。実際に、CK2インヒビター又はPTZを用いて処理したSUM159R細胞は、両方、BRD4の免疫沈降実験において、MED1存在量を低下させ、このことは、pBRD4が、BRD4よりも効率的にMED1に結合すること

を示唆した(図6F~図6G)。

【0234】

BBI抵抗性及びMED1結合において、BRD4のリン酸化に対する役割を更に機能的に評価するために、CK2によってリン酸化することができない突然変異(7つのセリンからアラニンへの置換、「7A突然変異」)、又は構成的リン酸化を模倣できない突然変異(7つのセリンからアスパラギン酸への置換、「7D突然変異」)をコードするBRD4発現構築物を生成した。安定な細胞株における内因性BRD4のノックダウンの作用をレスキューする、これらの構築物の能力(図13B~図13C)を評価し、7D突然変異の発現が、親のSUM159細胞及びJQ1抵抗性SUM159R細胞の両方の成長を支持する一方、7A突然変異は、特にSUM159細胞において弱い作用しか有さないことが分かった(図5D)。次に、JQ1の存在下及び非存在下で、7A及び7D変異のMED1結合及び細胞内局在化を分析した。7A突然変異は、WT BRD4と比較して弱いMED1結合を示し、JQ1の後に完全に解離することが分かったが、一方、7D突然変異は、JQ1処理によって影響を及ぼされないMED1に対するより高い親和性を有するようである(図6H及び図13H)。

10

【0235】

最後に、7A又は7D突然変異BRD4を発現する細胞の、JQ1に対する感受性を評価した。親のSUM159細胞において、外因的に発現した7D突然変異BRD4は、JQ1に対する感受性を低下させたが、一方、7A突然変異は、感受性を若干増加させた(図6I)。対照的に、SUM159R細胞における7A突然変異BRD4の発現は、JQ1への感受性を回復させたが、一方、7D突然変異は、適度に、JQ1への感受性を更に減少させた(図6I)。これらの結果により、BBI抵抗性細胞におけるPP2A活性の低下によるBRD4の過剰リン酸化により、MED1へのBRD4の動員の増加及びBBIへの応答性の低下が導かれるという仮説が強く支持された。

20

【0236】

これらの知見の橋渡しの意義を拡大するために、JQ1及びBCL-XL (ABT737)を標的とする分子、SUM159R細胞において取得されたスーパーエンハンサー、及びBRD4リン酸化のモジュレーター、CK2インヒビターCX-4945、及びPP2Aアクチベーターであるペルフェナジン(PZ)に関する相乗作用のスクリーニングを行った。JQ1とABT737、CX-4945の間に、著しい相乗作用が観察され、また、PPZ(図14)は、これらの薬物の組合せにより、BBI単体よりも、TNBCにおいてより高い有効性が達成される傾向にあることが示された。

30

【0237】

相乗作用のスクリーニング実験に付け加えて、BBI抵抗性細胞に由来する腫瘍に関する異なるBBI併用療法の効果を検査した。BBI抵抗性SUM149細胞(図15A)に由来する腫瘍、又はBBI抵抗性SUM159細胞(図15B)に由来する腫瘍を保有するマウスに、ビヒクル、単剤療法、又はBBI併用療法を投与した。単剤療法は、BETインヒビター(JQ1)、JAK2インヒビター(INC424、又は「JAK2I」)、Bcl-xl/Bcl-2インヒビター(ABT 263)、又はBcl-2インヒビター(ABT 199)を投与することからなる。併用療法は、INC424、ABT 263、又はABT 199のいずれかと一緒にJQ1を投与することからなる。両方の異種移植片モデルでは、各BBI併用療法は、対応する単剤療法及びJQ1単体より大きな程度まで、腫瘍質量を低減する。

【0238】

BBI抵抗性SUM159細胞(SUM159R)に由来する異種移植片を、対照としてのビヒクル(図16A、上のパネル)、JQ1(図16A、下のパネル)、ABT 199(図16B、上のパネル)、ABT 263(図16B、下のパネル)、INC 424(図16C、上のパネル)、ABT 199+JQ1(図16C、下のパネル)、ABT 263+JQ1(図16D、上のパネル)、INC 424+JQ1(図16D、下のパネル)を用いる処理の後にH&E染色に供した。示したように、組合せ治療の細胞充実性は、対応する単剤療法と比較して、有意に低下した。合わせて、上記結果により、ある特定の併用療法は、BBI単体より、TNBCにおいて高い有効性を達成することが確認された。

40

【0239】

BBI抵抗性におけるBcl-xlの役割を更に調査するために、異種移植片由来の親のSUM159細胞(BBI感受性)及びSUM159R細胞(BBI抵抗性)を、マウスのBcl-xl抗体(1:50、終夜)で染色することによって、Bcl-xlについて染色した。蛍光画像法により、Bcl-xlは、BBI感受

50

性SUM159細胞(図17、上)におけるよりも、BBI抵抗性SUM159細胞(図17、下)においてより大きな程度まで存在することが示された。このエビデンスは、抗アポトーシスタンパク質であるBcl-xlの過剰発現が、BBI抵抗性に寄与する因子であるという前提と一致する。

【0240】

考察

トリプルネガティブ乳がんは、有効な標的化療法を欠く、唯一の主要な乳腺腫瘍の亜型である⁴。初期段階のTNBC患者のサブセットは、化学療法に十分に応答するが、大多数は、治療選択肢が限定される転移性疾患により、急速に再発する。したがって、新規な治療戦略が緊急に必要とされる。TNBCのがんゲノムシーケンシング研究によっては、依存性が認識されていないため、非遺伝子標的に対する調査を必要とする療法²を探索することができ、遺伝変異を特定することができなかつた。BET阻害に対する理論的解釈はTNBCにおいて確認され、これは、コア調節回路の確固たる理解を先取りするものである。

【0241】

BET阻害は、急速に増加している文献において、がんの異なるモデルにおいて、有効性を実証した。ここで観察されたように、これらの報告の大多数における明らかな抵抗性にもかかわらず、TNBCにおいてBET阻害抵抗性の機構は報告されなかつた。エピジェノミクス、プロテオミクス及びケミカルバイオロジーにおけるアプローチをまとめると、エピジェネティックな機構によって、エピジェネティックな薬物耐性の例が提供され、ここで、抵抗性細胞におけるPP2A活性低下の結果としてのその過剰リン酸化による、MED1への結合の増加によって、プロモドメインと独立した方式で、BRD4は、クロマチンに動員される。この研究により、BCL-xLインヒビター(例えば、ABT-737)又はCK2インヒビターと対にすること等、BBI抵抗性を予測し克服するための組合せ戦略を実証し、直交する生物物理学又は生化学的作用を介して、BET機能を破壊する第2世代のBETインヒビターの開発を誘導する。より迅速に、臨床前のモデルで観察される強力な有効性により、TNBC単体で、及び機構に基づく標的化療法と組み合わせたBET阻害の開発が支持される。

【0242】

材料及び方法

細胞株及び乳腺腫瘍組織

乳腺細胞株をthe ATCC and Dr. Steve Ethier, University of Michigan, Ann Arbor, MI (SUMシリーズ)から得た。提供者に勧められた培地中で細胞を培養し、それらの同一性をSTR分析によって確認し、及びマイコプラズマについて定期的に試験した。DF/HCC治験審査委員会によって承認されたプロトコルを使用して、乳腺腫瘍試料を収集した。腫瘍をレーザーブレードで切り刻み、2mg/mLのBSA、2mg/mLのコラゲナーゼIV、及び2mg/mLのヒアルロニダーゼを有するDMEM/F12中で、37℃で、3~4時間攪拌しながら消化した。消化の後、500ミクロンのメッシュを通して濾過し、5%のFBSを有するDMEM/F12中で洗浄し、5%のFBS及び10%のDMSO中で冷凍し、次の異種移植片の研究のために液体窒素中で保存した。

【0243】

乳腺細胞株パネルにおけるBETプロモドメインインヒビターのハイスループットなスクリーニング

パネルの化合物(Bradner labにおいて合成された)を、記載されているように⁸、本質的に、半自動化スクリーニングを使用して、ウェル当たり2,000個の細胞で、384ウェル形式において29人のヒト乳腺細胞株で試験した。72時間における細胞生存能を、ATPlite (Perkin Elmer社)を使用して評価した。

【0244】

相乗作用の研究

SUM149細胞、SUM149R細胞、SUM159細胞、及びSUM159R細胞を、無菌の、白色の、不透明な、384ウェルのマイクロタイタープレート(Thermo社)に、50µlの培地中、1ウェル当たり1,000個の細胞で、自動分配装置(BioTek EL406)を使用して、播種した。薬物は、JANUSワークステーション(100nl)を用いて、ロボットピン移動によって、DMSOに送達し、各化合物の対(各対は、8つの複製を有する)の用量応答インキュベーションのマトリックスを

実現した。72時間のインキュベーションの後、処理した細胞とビヒクル対照について、ATPレベルを決定した(ATPlite、PerkinElmer社)。データをビヒクル対照に対して正規化した。組合せ指数は、Chou及びTalalay⁴⁹の中位効果原理(CalcuSyn Software)を使用して決定した。アイソログラムプロットをGraphPad Prismソフトウェアを用いて作成した。点は、相乗作用について評価した薬物濃度の対応する値を表す。対角線は薬物相加性を示す。線の上の点は、拮抗する薬物の組合せを表し、線の下は相乗的な薬物の組合せを表す。相乗作用アッセイは三連で実施し、2~3回繰り返した。

【0245】

異種移植片アッセイ

異種移植片アッセイに対し、5~6週齢の雌のCrTac:NCr-Foxn1^{nu}及びNOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Su/g}/JicTacマウスをTaconicから購入した。腫瘍は、DMEM/F12又はMedium 171において、50%のMatrigel(BD Biosciences社)中 1×10^6 個の細胞(Medium 171中3%のFBS及び4 mg/mlのコラーゲンゲルを用いて注射したIDC50-X細胞を除く)を両側、同所性、乳腺脂肪体注射によって誘導した。動物実験は、Dana-Farber Cancer Institute Animal Care and Use Committeeにより承認されたプロトコル11-023に従って行った。すべての異種移植片研究について、各群の標本サイズ(5~10頭のマウス)を図に示した。

【0246】

細胞生存能、老化、及びMDRアッセイ

細胞生存能及び成長アッセイ(図1A~図1B、図3A~図3E、図3G、図5D~図5F、図6C、図6E、図6I、図7A、図10D、図14A~図14C)、周期、アポトーシス、及びMDRアッセイを三連で実施し、2~3回繰り返した。細胞増殖アッセイに対し、細胞を、96ウェルプレートにウェル当たり500個の細胞でプレATINGし、翌日、インヒビター、DMSO又はドキシサイクリン(500ng)で処理した。細胞を上述の培地中、5%のCO₂を用いて、37℃で培養し、細胞生存能を、処理の3日後に、CellTiter-Gloを使用して測定した。細胞成長アッセイに対し、細胞を、6ウェルプレートにウェル当たり5000個(SUM159)又は20000個(SUM149)の細胞でプレATINGし、翌日、インヒビターで処理した。細胞を、セルカウンターにより3日毎に計数した。細胞アポトーシスは、APCアネキシンV/7AADアポトーシス検出キット(BD Pharmingen社)を用いて分析した。アネキシンV/7AADの評価及び細胞周期のグラフィックは、Windows用FlowJoソフトウェアV7.6.1(Tree Star)を使用して作成した。老化ベータ-gal染色は、Cell signaling社からの老化 ガラクトシダーゼ染色キットを使用して実施した。簡単には、72時間のJQ1処理(500nM)の後、SUM159細胞及びMDA-MB-231細胞をFixative Solutionで15分間固定し、37℃で、終夜、ガラクトシダーゼ溶液によりインキュベーションした。染色は、青色の発色について、顕微鏡かでチェックした。Multi-Drug Resistance AssayをCayman Chemical社からのMDRアッセイキット(600370)を用いて実施した。簡単には、SUM159細胞及びSUM159R細胞を、SUM培地中で、JQ1又はDMSOを用いて、30分間処理した。ベラパミルを、1:1000希釈で陽性対照として使用した。その後、Calcein AM/Hoechst Dye染色溶液を添加し、細胞を、37℃で、15分間インキュベートした。細胞を、蛍光顕微鏡法及びFACSによって分析した。

【0247】

細胞周期の分析を、JQ1処理又はドキシサイクリンを用いるBRD4の下方調節の72時間後に、ヨウ化プロピジウム(PI)染色を使用して実施した。細胞を、最終濃度として、2 µg/mlのPI(Life Technologies社)を補充した1mlの成長培地中に再懸濁した。暗所で、37℃で、60分間後、FACS AriaII血球計算器(BD Biosciences社)上で、分析を実施した。細胞周期を、二重項を除いた後、ヒストグラムとしてプロットした。細胞同期化手順。SUM159細胞をノコダゾール(200ng/ml)で12時間処理し、次いで、細胞を、プレートから離すために軽くたたいた。PBSで2回洗浄した後、細胞を、コラーゲンコーティングしたプレートに、JQ1を用いて又は用いないで、再度プレATINGした。FACS及び免疫プロット分析のために、細胞を、0、3、6、12時間の時点で収集した。

【0248】

免疫蛍光染色

免疫蛍光のために使用される抗体は、CK18(Dako社、M7010)、CK17(Dako社、M7046)、HMW(Dako社、M0630)、LMW(Dako社、M0631)、CD44(NeoMarkers社、MS-668-P1)、CD24(NeoMarkers社、MS-1279-P1)、p-STAT3(Cell Signaling社、9145S)、VIM(Dako社、M073501)、CDH1(BD Biosciences社、610181)、FLAG(Sigma社、F1804)、BrdU(Roche社、11170376001)であった。免疫蛍光実験は、培養細胞中、又はホルマリンで固定したパラフィン包埋(FFPE)異種移植片腫瘍の全切片中で実施した。染色を、記載されているように⁵⁰実施した。抗体の希釈は以下の通りであった:pSTAT3(1:25)、CD44(1:100)、CD24(1:100)、CK18(1:200)、CK17(1:200)、HMK(1:200)、LMK(1:200)、VIM(1:100)、CDH1(1:100)、FLAG(1:50)、andBrdU(1:200)。

【 0 2 4 9 】

siRNA及びレンチウイルスのshRNA及び発現構築物

siRNAのために、トランスフェクション細胞を、96ウェルプレートにウェル当たり2,000個の細胞でプレATINGし、培地中、5%のCO2を用いて、37℃で培養した。翌日、細胞に、DharmaFECT 1(Dharmacon社)を使用して、目的の遺伝子に対するsiGENOME SMARTpools又は「Non-Targeting siRNA」対照を三連でトランスフェクトした。SMARTpoolsのsiRNAの配列を、Table 2(表3)に列挙する。細胞生存能を、トランスフェクションの3日後に、CellTiter-Glo(Promega社)を使用して測定し、各細胞株に関する各siRNA処理の効果を、siRNAなしの効果と比較した。

【 0 2 5 0 】

TET誘導性pLKO-TET-ONレンチウイルス構築物を、Lipofectamin(Life Technologies社)を使用して、レンチウイルスのヘパリン含有プラスミドpLKO.1並びにヘルパープラスミドpCMV-dR8.91及びpMD2.G-VSV-GをHEK293T細胞に同時にトランスフェクトすることによってパッケージングした。1000gで30分間のスピノキュレーションによる形質導入と1µg/mlのピユーロマイシン(Sigma社、St. Louis, MO)を72時間用いた選択の後、ノックダウンの有効性をウエスタンブロットングによって決定し、細胞を、上述のように、増殖アッセイのために播種した。使用したshRNAの配列をTable 2(表3)に列挙する。

【 0 2 5 1 】

pCDNA3の全長BRD4を、ハーバード大学医学大学院のBrigham and Women's HospitalのFrench博士から寄贈された。BRD4 BD1(N140A)及びBD2(N433A)のプロモドメインの突然変異、7A及び7D突然変異体を、Table 2(表3)に列挙したプライマーを使用して、Quickchange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent Technologies社)を使用して作成し、次に、シーケンシングによって確認した。

【 0 2 5 2 】

免疫プロット及び免疫沈降実験

細胞を、RIPA緩衝液中で、siRNAを用いたトランスフェクションの後、5日間溶解した。タンパク質をSDSポリアクリルアミドゲル(4%~12%)で分離し、トリスグリシン緩衝系を使用してPVDF膜に転写した。膜を、PBS中0.1%のTween20(PBS-T)中の5%の粉ミルクを用いて、室温で、1時間、ブロッキングした後、2.5%のミルクPBS-T中に1:1000で希釈した一次抗体を用いてインキュベートした。免疫沈降に対し、核抽出物を以下のように調製した:10×10⁶個の細胞を、5mlの緩衝液A:10mMのトリス(pH7.9)、1.5mMのMgCl₂、10mMのKCl、0.05%のNP-40、1mMのDTT、並びにプロテアーゼ及びホスファターゼインヒビター中に再懸濁した。細胞を、氷上で、15分間インキュベートし、5分毎に穏やかにボルテックスした。2,000gで5分間の遠心分離の後、ペレットを、0.3mlの緩衝液B(20mMのトリス(pH7.9)、25%のグリセロール、0.42MのNaCl、1.5mMのMgCl₂、1mMのKCl、0.5%のNP40、0.2mMのEDTA、1mMのDTT、並びにプロテアーゼ及びホスファターゼインヒビター)中に再懸濁し、氷上で、5分間インキュベートした。14gで、4℃で、10分間、溶解物を遠心分離した後、上清を0.6mlの緩衝液Aで希釈し、最終0.5%までNP-40を添加し、DNase Iで処理した。次いで、試料を、1:100で希釈したBRD4又はFlag抗体を用いて、4℃で、終夜インキュベートし、免疫沈降物を、Dynabeads Protein G上で2時間収集した。ビーズを、150mMのNaCl及び0.5%のNP-40を含有する緩衝液Bで3回洗浄し、次いで、ゲルローディング緩衝液に再懸濁した。免疫ブ

10

20

30

40

50

ロット及び免疫沈降実験を2~3回繰り返した。

【0253】

抗体及びインヒビター

免疫プロット、免疫沈降及びChip-seqのために使用した抗体は、以下の通りであった:BRD4(Bethyl社、A301-985A)、MED1(Bethyl社、A300-793a)、BRD3(Bethyl社、A302-368A)、BRD2(Bethyl社、A302-583A)、MYC(Santa Cruz社、sc764)、p-STAT3(Cell Signaling社、9145S)、STAT3(Cell Signaling社、4904)、p-STAT5(Cell Signaling社、9351)、p-JAK2(Cell Signaling社、3771)、CYCLIN D1(Cell Signaling社、2922)、p-H3(Cell Signaling社、12201)、CK2基質(Cell signaling社、8738)、PP2A-A(Cell signaling社、2039)、PP2A-C(Cell signaling社、2038)及びp-BRD4は、テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンターのChiang博士から寄贈された。ChIP-seqに使用された抗体は、BRD4(Bethyl社) Histone H3K27ac(Abcam社、ab4729)であった。CXCR2インヒビター(239819)及びCK2インヒビター(218860)はCalBiochem社から、JAK2インヒビター(INC424)、MEKインヒビター(GSK1120212、S2673)及びPI3Kインヒビター(BKM120、S2247)はSelleckchem社から、フェノチアジン(1525707)及びペルフェナジン(1511000)はSigma社から、ABT-737(s1002)はSelleckchem社からのものであった。

10

【0254】

SILAC-RIME実験及びデータ分析

SUM159細胞及びSUM159R細胞を、R/K-欠乏SILAC DMEM(paa社;E15-086)、10%の透析した血清(Sigma-Aldrich社;F0392)中で、「重い」標識培地に対しては800 µMのL-リシン¹³C₆¹⁵N₂塩酸塩及び482 µMのL-アルギニン¹³C₆¹⁵N₄塩酸塩(Cambridge Isotope lab)、又は「軽い」標識培地に対しては800 µMのL-リシン¹²C₆¹⁴N₂塩酸塩及び482 µMのL-アルギニン¹²C₆¹⁴N₄塩酸塩を補充して、成長させた。SILAC標識の後、RIMEを記載されているように⁴²実施した。

20

【0255】

in vitroでのChem-seq、ChIP-seq、及びRNA-seq

Chem-seqを、本質的に、記載されているように²⁷実施した。ChIP-seq:SUM159細胞及びSUM159R細胞(4 × 10⁷)をSUM培地中で成長させた。次いで、培地を除去し、1%のホルムアルデヒド(EMグレード;tebu-bio)を含有する培地に置き換え、8分間架橋させた。架橋は、グリシンを最終濃度0.2Mまで添加することによってクエンチした。細胞を氷冷したPBSで洗浄し、PBS中で回収し、細胞ペレットをPBSで洗浄した。核画分を、最初に、ペレットを10 mlのLB1緩衝液(50mMのHEPES-KOH[pH7.5]、140mMのNaCl、1mMのEDTA、10%のグリセロール、0.5%のNP-40又はIgepal CA-630、及び0.25%のTriton X-100)中に再懸濁することによって、4 で10分間抽出した。細胞をペレット化し、10mlのLB2緩衝液(10mMのTris-HCL[pH 8.0]、200mMのNaCl、1mMのEDTA、及び0.5mMのEGTA)中に再懸濁し、5分間混合した。細胞をペレット化し、300 µlのLB3緩衝液(10mMのTris-HCl[pH 8]、100mMのNaCl、1mMのEDTA、0.5mMのEGTA、0.1%のNa-デオキシコール酸、及び0.5%のN-ラウロイルザルコシン)に再懸濁し、covaris社のソニケーター中で10分間超音波処理した。合計30 µlの10%のTriton X-100を添加し、溶解物を20,000rcfで10分間遠心分離して、デブリを精製した。次いで、上清を、20 µgのBRD4抗体(Bethyl社、A301-985A)を予め結合させた100 µlの磁気ビーズ(Life Technologies社)を用いてインキュベートし、免疫沈降(IP)を、冷蔵室で、終夜行った。ビーズを、1mlのRIPA緩衝液中で10回、100mMの炭酸水素アンモニウム(AMBIC)溶液中で2回洗浄した。DNAを溶離緩衝液(50mMのTris-HCl(pH8)、10mMのEDTA、及び1%のSDS)中で溶出させた。架橋を65 で終夜元に戻した。RNAとタンパク質を、0.2mg/mLのRNase Aで2時間、続いて、0.2mg/mLのProteinase Kで1時間消化させた。DNAを、フェノールクロロホルム抽出及びエタノール沈殿で精製した。Illuminaシーケンシングのためのライブラリーを、Rubicon ThruPLEX-FDキットに従って、10~12サイクルで調製した。

30

40

【0256】

RNA-seq:SUM159及びSUM159Rを、500nMのJQ1又はDMSOで処理して、3、12及び24時間、生物学的に二連でインキュベートした。総RNAを、標準のQIAGEN RNeasyキット(74106)を使

50

用して抽出した。RNA濃度を測定し、品質をBioanalyzerで制御し、Sciclone NGSx workstationを使用するIllumina True-Seq RNAキットを使用してRNA-Seqライブラリーを作製した。

【0257】

すべてのRNA-seq及びChIP-seq実験(図2、図4、図9及び図12)は、二連で実施した。

【0258】

ゲノムデータ分析

アクセステータをこの文書で作成した。この公報で作成したすべてのChIP-seqデータ、Chem-seqデータ、及びRNA-seqデータは、GEO Publication Reference ID GSE63584(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)に関連するオンラインで見つけることができる。遺伝子セットとアノテーション。すべての分析は、RefSeq(NCBI37/HG19)ヒト遺伝子アノテーションを使用して実施した。RNA-seqデータ処理及び遺伝子発現の定量化。すべてのRNA-Seqデータセットを、ccb.jhu.edu/software/tophat/igenomes.shtmlから検索したIllumina igenomes NCBI37/HG19 UCSCトランスクリプトーム構造を使用するTophat2⁵²(バージョン2.0.11)を使用してトランスクリプトームにアラインした。アラインメントは、デフォルトパラメータを使用して実施した。転写発現の定量化は、FPKMの単位で遺伝子発現値を作成するためのデフォルトパラメータを用いるCufflinks⁵³(バージョン2.2.0)を使用して実施した。

10

【0259】

ChIP-seq及びChem-seqデータ処理。すべてのChIP-seq及びChem-seqデータセットをBowtie⁵⁴(バージョン2.2.1)を使用してアラインし、ヒトゲノムのバージョンNCBI37/HG19を構築するか、又はマウスゲノムのバージョンNCB37/MM9を構築した。アラインメントは以下の基準を使用して実施した:-k 1、デフォルトするためのすべての他のパラメータセットを有する。これらの基準によって、いかなるミスマッチもなく、ゲノムに独自にマッピングしたリードのみを保存した。

20

【0260】

リード密度の計算。ChIP-seq又はChem-seqのデータセットの正規化したリード密度を、Bamliquidator(バージョン0.9)リード密度計算器を使用して、任意の領域で計算した(github.com/BradnerLab/pipeline/wiki/bamliquidator)。簡単には、その領域にアラインするChIP-Seqリードを200bpまで伸長させ、ベースペア(bp)当たりのリードの密度を計算した。各領域のリードの密度を、reads per million mapped reads per bp(rpm/bp)の単位で、リード密度を生じる100万個のマッピングしたリードの総数に対して正規化した。

30

【0261】

ChIP-seq及びChem-seq富化領域の特定。MACSのバージョン1.4.2(ChIP-Seqの分析に基づくモデル)⁵⁵のピーク検出アルゴリズムを使用して、バックグラウンドに対するChIP-Seq富化領域を特定した。富化についてのp値の閾値、1e-9を、すべてのデータセットに対して使用した。

【0262】

ChIP-seq占有率のヒートマップ図の作成。様々な因子に対するChIP-seq占有率のヒートマップを、記載されているように⁵⁶作成した。ヒートマップを、すべての転写開始部位(TSS)に近接する+/-10kb領域に対して、又はすべてのTSS遠位BETプロモドメイン結合エンハンサーに近接する+/-10kb領域に対して作成した。各行は、特定のTSS又はエンハンサー領域をプロットする。行は、Bio-JQ1 Chem-seqシグナルによって決定されたBETプロモドメインのピーク占有率によってランク付けされている(図2A)。

40

【0263】

Bio-JQ1に対するBRD4占有率とH3K27ac占有率の相関。BRD4の占有率とH3K27acの占有率を、SUM159細胞のBio-JQ1富化領域のすべてにおけるBio-JQ1占有率に対して相関させた。ピアソン相関関係の統計を示す(図2B)。JQ1処理に関するBRD4占有率又はH3K27acの占有率の変化を定量化するために、すべてのBio-JQ1富化領域をSUM159細胞においてランク付けし、次いで、ピンに分けた(n=10)。BRD4又はH3K27acのlog₂変化倍率+/-JQ1の対応する箱ひげ図を、各ピンについて示す(図2D)。

50

【 0 2 6 4 】

Bio-JQ1占有率又はBRD4を使用するマッピングエンハンサー及びスーパーエンハンサー。エンハンサー及びスーパーエンハンサー(SE)を、記載されている¹⁶、¹⁷及び(younglab.wi.mit.edu/super_enhancer_code.html)で利用できるROSEソフトウェアパッケージを使用してマッピングした。SUM159細胞及びSUM159R細胞において、Bio-JQ1 Chem-Seq富化領域を使用して、エンハンサー及びSEをマッピングした(図2E)。SUM149細胞において、BRD4 ChIP-seq富化領域を使用して、エンハンサー及びSEをマッピングした(図9A~図9G)。

【 0 2 6 5 】

SE近位遺伝子の遺伝子発現の変化の定量化。SUM159又はSUM149におけるSEの50kb以内の遺伝子を、発現状態に対して特定して濾過し(任意の試料において>1のFPKM発現)、ポリアダニル化していない転写物(例えば、microRNA)を除去するために濾過した。SUM159について、SE関連遺伝子又はすべての発現した遺伝子の遺伝子発現の \log_2 変化倍率を、JQ1処理の3時間後、12時間後、及び24時間後に比較した(図2F)。SUM149について、比較は、JQ1処理の12時間後になされた(拡張データ図3B)。変化の分布間の統計的有意差を、ウェルチの両側t検定を使用して評価した。

10

【 0 2 6 6 】

JQ1処理に関して差次的に発現した遺伝子の特定。SUM159細胞又はSUM149細胞におけるJQ1処理によって調節された遺伝子を差次的に特定するために、 $>\log_2$ 変化倍率を有するすべての遺伝子を、SUM159については、24時間の+/-JQ1での変化倍率、又はSUM149については、12時間の+/-JQ1での変化倍率によって順序付けた。各遺伝子に対して \log_2 行のメジアンを用いて正規化された変化倍率(\log_2 row median normalized fold change)を、SUM159については図4H~図4Iに、SUM149については図9Dに示した。次の遺伝子セット及び経路分析のために、一貫した、統計的に有意な発現の変化伴うSUM159遺伝子を、12及び24時間にDMSO処理及びJQ1処理での発現値の間で、ウェルチの両側t検定を使用して選択した。

20

【 0 2 6 7 】

SUM159及びSUM159Rの間の取得/消失SEの特定。SE差分領域は、Brownら 2014²⁶におけるように定義された。簡単には、2つの条件間のスーパーエンハンサーの変化を定量化するために、バックグラウンドを差し引いたChIP-Seqシグナルを、少なくとも1つの条件で、スーパーとみなされるすべてのエンハンサー領域のセットで計算した。取得/消失スーパーエンハンサーを、いずれかの方向に \log_2 変化倍率超のシグナルを有するものとして決定した。すべてのランク順のSE含有領域におけるBio-JQ1占有率の \log_2 変化倍率が図4Aに示される。SE領域を、取得、保存、又は消失のいずれかとして分類した。取得/消失領域は、いずれかの方向に >1 の \log_2 変化倍率を有するものとして分類された。保存領域は、いずれかの方向に <0.25 の \log_2 変化倍率を有するものとして分類された。BRD4又は近位(50kb以内の領域)の遺伝子発現のいずれかにおける \log_2 変化倍率は、図4B~図4Cに示される。

30

【 0 2 6 8 】

Bio-JQ1領域でSUM159又はSUM159R細胞のいずれかにおけるJQ1処理に関するBRD4及びH3K27ac占有率の変化の定量化。BRD4又はH3K27acの \log_2 変化倍率を、それぞれの細胞株のBio-JQ1富化領域で定量化し、図4F~図4Gに示した。

【 0 2 6 9 】

Bio-JQ1又はBRD4占有率の関数としてのBRD4及びH3K27acの変化の定量化。SUM159におけるBio-JQ1富化領域又はSUM149におけるBRD4富化領域を、レベルの増加によってランク付けし、次いで、10個のピンに分配した。BRD4及びH3K27acの \log_2 変化倍率を、領域の各ピンにおいて定量化し、箱ひげ図として示した(図2D及び図9A)。

40

【 0 2 7 0 】

すべてのTNBCにおけるJQ1処理に関するBRD4占有率の変化の定量化。JQ1処理の際のBRD4の \log_2 変化倍率を各それぞれの細胞株のBRD4富化領域で定量化した。図12C。

【 0 2 7 1 】

ゲノム分析及びトランスクリプトーム分析に関連するすべてのコードは、github.com/radnerLab/TNBCにおいて見つけることができる。

50

【 0 2 7 2 】

【 表 2 】

Table 1. RIME によって特定された BRD4 関連ペプチドのリスト

試料名	因子	細胞株	処理	SILAC 重い標識	SILAC 軽い標識	データの 種類
S1	BRD4	Sum159	JQ1 vs DMSO	DMSO 処理	JQ1	未濾過の 結果
S2	BRD4	Sum159 vs Sum159-R	処理なし	Sum159	Sum159-R	未濾過の 結果
S3	BRD4	Sum159-R	JQ1 vs DMSO	DMSO 処理	JQ1	未濾過の 結果
S1_Filt	BRD4	Sum159	JQ1 vs DMSO	DMSO 処理	JQ1	濾過の結 果
S2_Filt	BRD4	Sum159 vs Sum159-R	処理なし	Sum159	Sum159-R	濾過の結 果
S3_Filt	BRD4	Sum159-R	JQ1 vs DMSO	DMSO 処理	JQ1	濾過の結 果

10

20

【 0 2 7 3 】

【 表 3 A 】

Table 2. siRNA、BDmut、7A、及び7Dプライマー、及びshRNA配列のリスト

配列名	配列の注釈	配列番 号	配列
si_BRD4_short isoform2_Sense	3UTR	1	rGrGrA rCrCrA rArArU rGrGrC rArGrC rCrUrG rArUrU rArCC A
si_BRD4_short isoform1_Sense	3UTR	2	rGrCrA rCrCrA rGrCrU rGrGrC rUrGrU rGrGrG rUrCrC rUrGA G
si_BRD4_Long isoform2_Sense	3UTR	3	rCrUrG rGrCrA rCrUrG rArCrU rUrUrG rCrCrU rUrGrA rArCA G
si_BRD4_Long isoform1_Sense	3UTR	4	rCrCrU rCrCrA rGrArC rArCrA rArUrG rGrCrA rCrUrG rCrUT A
siBRD3_1		5	rCrArGrArUrGrArCrArUrArGrUrGrCr UrArA
siBRD3_2		6	rGrCrUrUrUrGrUrCrArArCrArCrGrCr ArUrU
siBRD2_1		7	rCrCrArUrGrUrUrCrArCrCrArArCrUr GrUrU
siBRD2_2		8	rGrCrArArUrGrGrCrArCrGrArArArGr CrUrA
siBRD4_1		9	rGrCrUrCrArArGrArCrArCrUrArUrGr GrArA

30

40

50

【 0 2 7 4 】

【 表 3 B 】

siBRD4_2		10	rUrGrArUrCrArCrArArUrCrArArGrUr CrUrA	
BRD4N140A	BD1 突然変異	11	CTATGTTTACAAATTGTTACATCT ACGCCAAGCCTGGAGATGACATA GTCTT	10
BRD4N433A	BD2 突然変異	12	GTTCTCCAAGTCTATAAGTACGC CCCTCCTGACCATGAG	
shBRD4-1		13	CCTGGAGATGACATAGTCTTA	
shBRD4-2		14	CCAACCAAAGTCAGTTCCTTC	
BRD4-CK2-4A-5	7A突然変異 最初の4A 部位	15	GCCCCGCCCGCATCCAGCGACGC CAGCAGCGATGCCTCCGCGGACA GTGAC	20
BRD4-CK2-4A-3	7A突然変異 最初の4A 部位	16	GTCAGTGTCCGCGGAGGCATCGCT GCTGGCGTGCCTGGATGCGGGCG GGGC	
BRD4-CK2-3A-5	7A突然変異 その他の 3A部位	17	TCCGCGGACAGTGACGCTGCGAC TGATGACGCTGAGGAGGAGCGAG CC	
BRD4-CK2-3A-3	7A突然変異 その他の 3A部位	18	GGCTCGCTCCTCCTCAGCGTCATC AGTCGACGCTCACTGTCCGCGG A	30
BRD4-CK2-4D-5	7D突然変異 最初の4D 部位	19	GCCCCGCCCGATTCCAGCGACGA CAGCAGCGATGACTCCGACGACA GTGAC	
BRD4-CK2-4D-3	7D突然変異 最初の4D 部位	20	GTCAGTGTCCGCGGAGTCATCGCT GCTGTCCGCTGGAATCGGGCG GGGC	
BRD4-CK2-3D-5	7D突然変異 その他の 3D部位	21	TCCGACGACAGTGACGATGACAC TGATGACGATGAGGAGGAGCGAG CC	40
BRD4-CK2-3D-3	7D突然変異 その他の 3D部位	22	GGCTCGCTCCTCCTCATCGTCATC AGTGTTCATCGTCACTGTCCGCGGA	
shPP2A-C	PP2A-Cノックダウン	23	CCCATGTTGTTCTTTGTTATT	

【 0 2 7 5 】

(参考文献)

- 1 Vaz-Luis, I. *et al.* Outcomes by tumor subtype and treatment pattern in women with small, node-negative breast cancer: a multi-institutional study. *J Clin Oncol* 32, 2142-2150, (2014).
- 2 Shah, S. P. *et al.* The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, (2012).
- 3 Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121, (2011). 10
- 4 Metzger-Filho, O. *et al.* Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 30, 1879-1887, (2012).
- 5 Higgins, M. J. & Baselga, J. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest* 121, 3797-3803, (2011).
- 6 Hnisz, D. *et al.* Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* 155, 934-947, (2013).
- 7 Smith, E. & Shilatifard, A. Enhancer biology and enhanceropathies. *Nature structural & molecular biology* 21, 210-219, (2014). 20
- 8 Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146, 904-917, (2011).
- 9 Zuber, J. *et al.* RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 478, 524-528, (2011).
- 10 Belkina, A. C. & Denis, G. V. BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 465-477, (2012).
- 11 Wu, S. Y. & Chiang, C. M. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* 282, 13141-13145, (2007). 30
- 12 Yang, Z., He, N. & Zhou, Q. Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 28, 967-976, (2008).
- 13 Yang, Z. *et al.* Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* 19, 535-545, (2005).
- 14 Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468, 1067-1073, (2010). 40
- 15 Puissant, A. *et al.* Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer Discov* 3, 308-323, (2013).
- 16 Whyte, W. A. *et al.* Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153, 307-319, (2013).

- 17 Loven, J. *et al.* Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 153, 320-334, (2013).
- 18 Chapuy, B. *et al.* Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 24, 777-790, (2013).
- 19 Heiser, L. M. *et al.* Subtype and pathway specific responses to anticancer compounds in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, (2011).
- 20 Nagarajan, S. *et al.* Bromodomain protein BRD4 is required for estrogen receptor-dependent enhancer activation and gene transcription. *Cell reports* 8, 460-469, (2014). 10
- 21 Shi, J. *et al.* Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* 25, 210-225, (2014).
- 22 Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752., (2000).
- 23 Dey, A., Nishiyama, A., Karpova, T., McNally, J. & Ozato, K. Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Mol Biol Cell* 20, 4899-4909, (2009). 20
- 24 Marotta, L. L. *et al.* The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44CD24 stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest* 121, 2723-2735, (2011).
- 25 Ott, C. J. *et al.* BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120, 2843-2852, (2012).
- 26 Brown, J. D. *et al.* NF-kappaB Directs Dynamic Super Enhancer Formation in Inflammation and Atherogenesis. *Mol Cell* 56, 219-231, (2014). 30
- 27 Anders, L. *et al.* Genome-wide localization of small molecules. *Nat Biotechnol* 32, 92-96, (2014).
- 28 Hayashi, H. *et al.* The OCT4 pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer. *Oncogene*, (2013).
- 29 Liu, T. *et al.* Knockdown of IRX2 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by the AKT/MMP9 signaling pathway. *Molecular medicine reports* 10, 169-174, (2014).
- 30 Choy, S. W. *et al.* A cascade of irx1a and irx2a controls shh expression during retinogenesis. *Dev Dyn* 239, 3204-3214, (2010). 40
- 31 Semenza, G. L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 123, 3664-3671, (2013).
- 32 Watanabe, Y., Nagai, Y. & Takatsu, K. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Nutrients* 5, 3757-3778, (2013).

- 33 Bessarabova, M. *et al.* Functional synergies yet distinct modulators affected by genetic alterations in common human cancers. *Cancer Res* 71, 3471-3481, (2011).
- 34 Marotta, L. L. *et al.* The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest* 121, 2723-2735, (2011).
- 35 Arteaga, C. L. & Engelman, J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* 25, 282-303, (2014). 10
- 36 Engelman, J. A. *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043, (2007).
- 37 Bernardo, G. M. *et al.* FOXA1 represses the molecular phenotype of basal breast cancer cells. *Oncogene* 32, 554-563, (2013).
- 38 Bernardo, G. M. *et al.* FOXA1 is an essential determinant of ERalpha expression and mammary ductal morphogenesis. *Development* 137, 2045-2054, (2010).
- 39 Jiang, Y. W. *et al.* Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8538-8543, (1998). 20
- 40 Rahman, S. *et al.* The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Mol Cell Biol* 31, 2641-2652, (2011).
- 41 Schroder, S. *et al.* Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem* 287, 1090-1099, (2012). 30
- 42 Mohammed, H. *et al.* Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. *Cell reports* 3, 342-349, (2013).
- 43 Wu, S. Y., Lee, A. Y., Lai, H. T., Zhang, H. & Chiang, C. M. Phosphoswitch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting. *Mol Cell* 49, 843-857, (2013).
44. Choudhury, S. *et al.* Molecular Profiling of Human Mammary Gland Links Breast Cancer Risk to a p27(+) Cell Population with Progenitor Characteristics. *Cell stem cell* 13, 117-130 (2013). 40
45. Mellacheruvu, D. *et al.* The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods* 10, 730-736 (2013).
46. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105-1111 (2009).

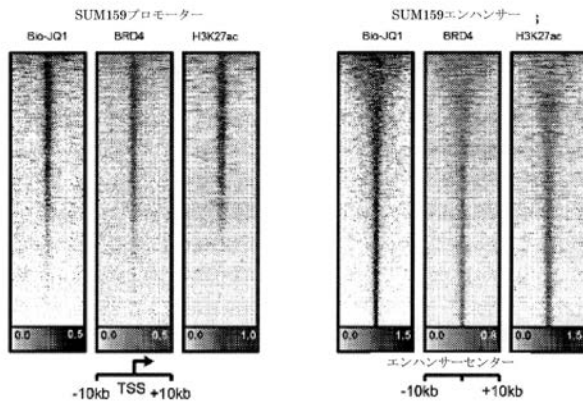
47. Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28, 511-515 (2010).
48. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10, R25 (2009).
49. Zhang, Y. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9, R137 (2008). 10
50. Lin, C. Y. *et al.* Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 151, 56-67 (2012).
- 49 Chou, T. C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation* 22, 27-55, (1984).
- 50 Choudhury, S. *et al.* Molecular Profiling of Human Mammary Gland Links Breast Cancer Risk to a p27(+) Cell Population with Progenitor Characteristics. *Cell stem cell* 13, 117-130, (2013). 20
- 51 Mellacheruvu, D. *et al.* The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods* 10, 730-736, (2013).
- 52 Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105-1111, (2009).
- 53 Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28, 511-515, (2010). 30
- 54 Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10, R25, (2009).
- 55 Zhang, Y. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9, R137, (2008).
- 56 Lin, C. Y. *et al.* Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 151, 56-67, (2012). 40

【 0 2 7 6 】

当業者は、本明細書に記載されている特定の実施形態に対する多くの均等物を、通常の範囲内の実験を使用して、認識し又は確認することができる。本明細書に記載されている本発明の実施形態の範囲は、上記記載に限定することを意図するものではなく、むしろ添付の特許請求の範囲に示されている。当業者は、以下の特許請求の範囲に定義されているように、本発明の精神又は範囲から逸脱することなく、この記載に対する様々な変化及び修正を行うことができる。

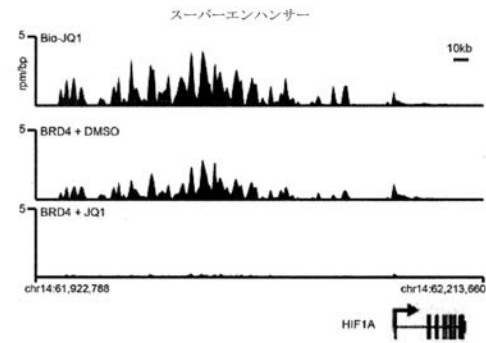
【 図 2 A 】

図2A



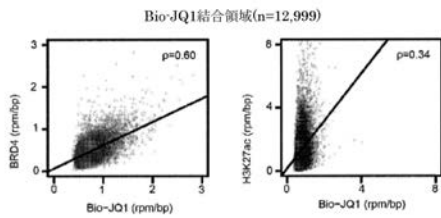
【 図 2 C 】

図2C



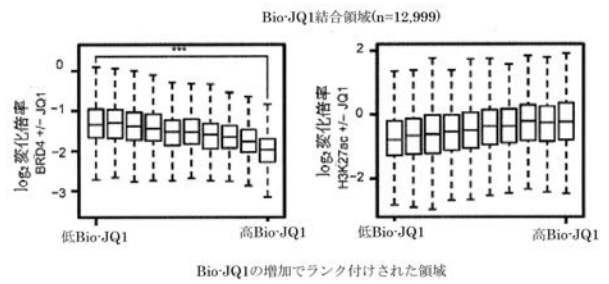
【 図 2 B 】

図2B



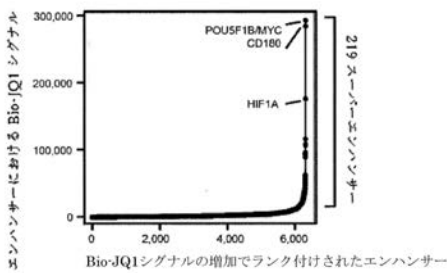
【 図 2 D 】

図2D



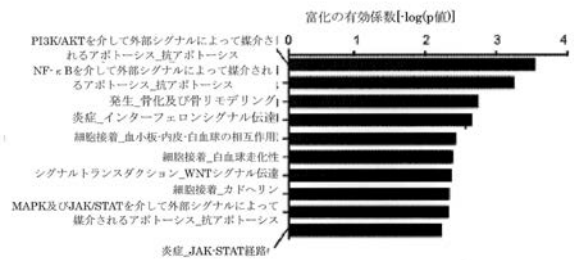
【 図 2 E 】

図2E



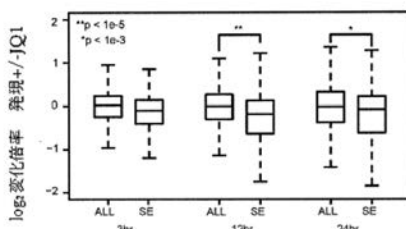
【 図 2 G 】

図2G



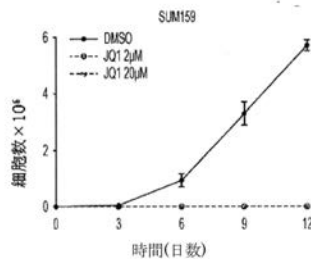
【 図 2 F 】

図2F

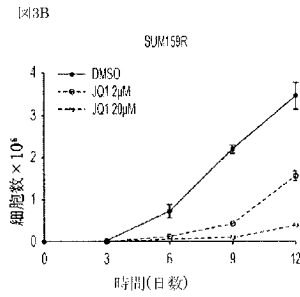


【 図 3 A 】

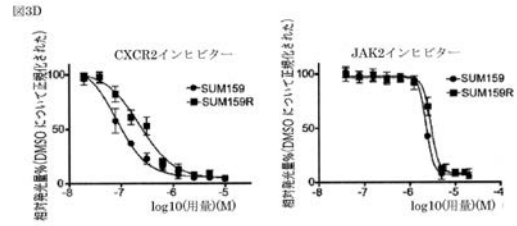
図3A



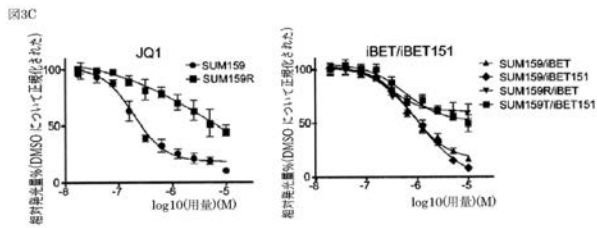
【 図 3 B 】



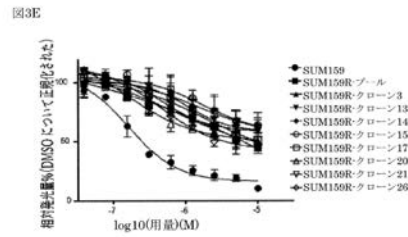
【 図 3 D 】



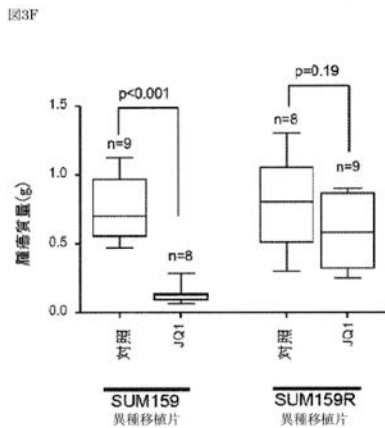
【 図 3 C 】



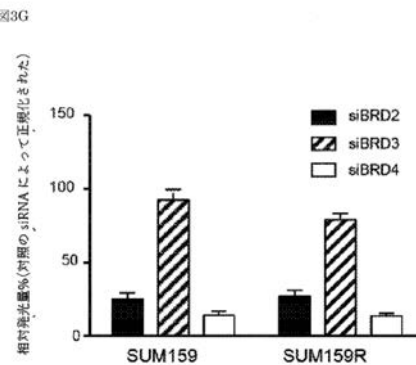
【 図 3 E 】



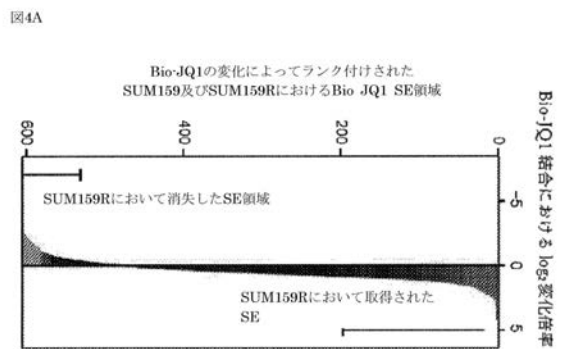
【 図 3 F 】



【 図 3 G 】

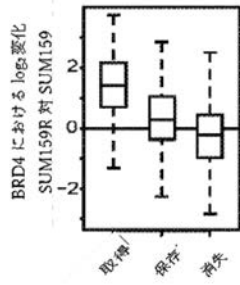


【 図 4 A 】



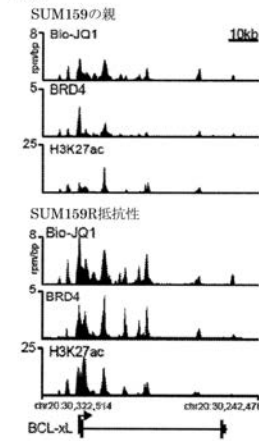
【 図 4 B 】

図4B



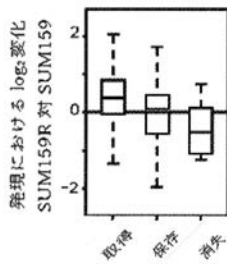
【 図 4 D 】

図4D



【 図 4 C 】

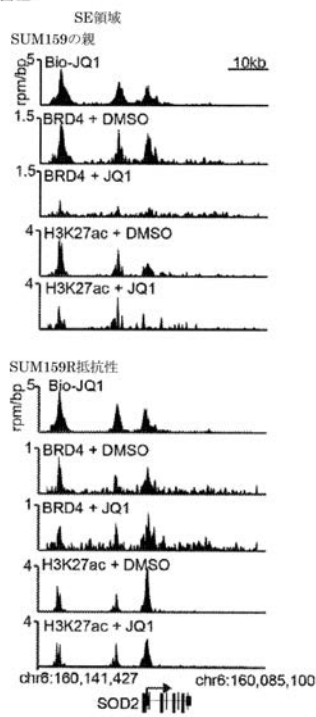
図4C



SUM159とSUM159Rとの間で変化したBio-JQ1のSE領域

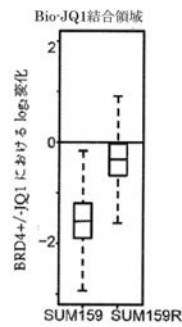
【 図 4 E 】

図4E



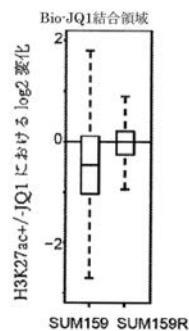
【 図 4 F 】

図4F

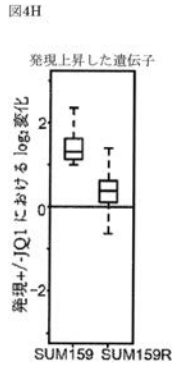


【 図 4 G 】

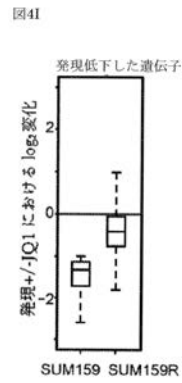
図4G



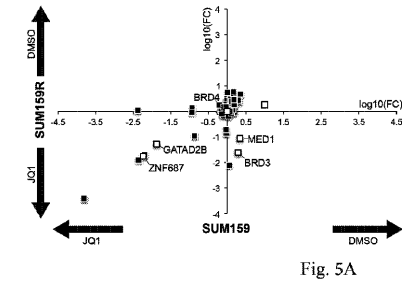
【 図 4 H 】



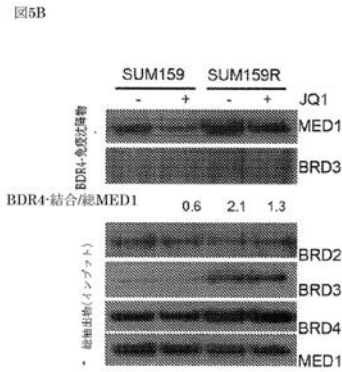
【 図 4 I 】



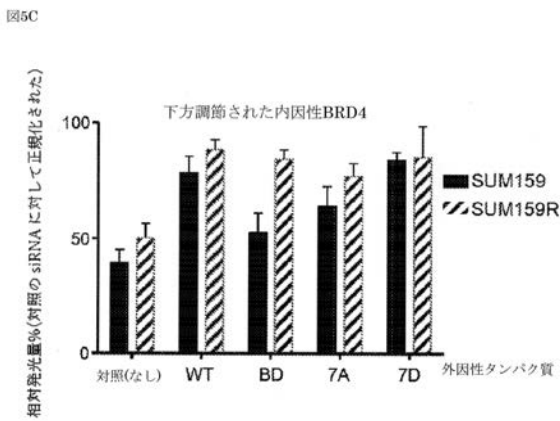
【 図 5 A 】



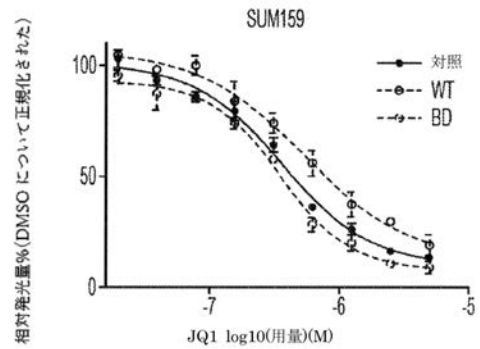
【 図 5 B 】



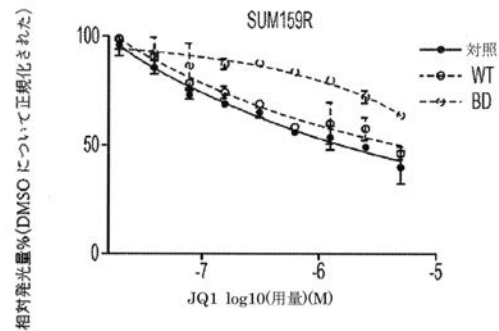
【 図 5 C 】



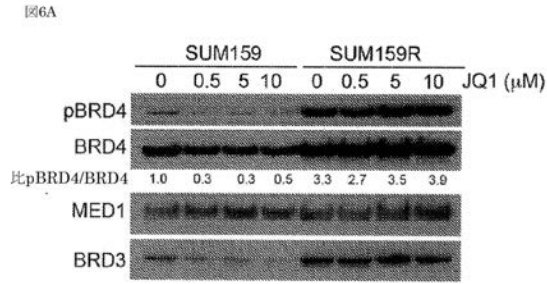
【 図 5 D 】



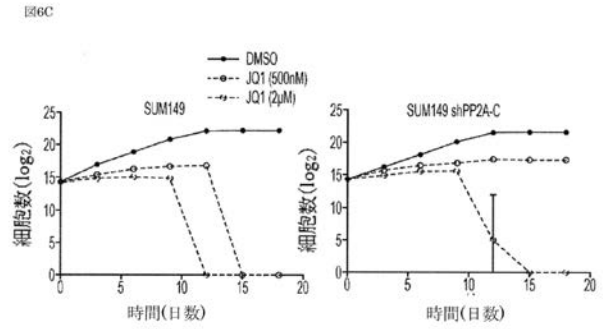
【 図 5 E 】



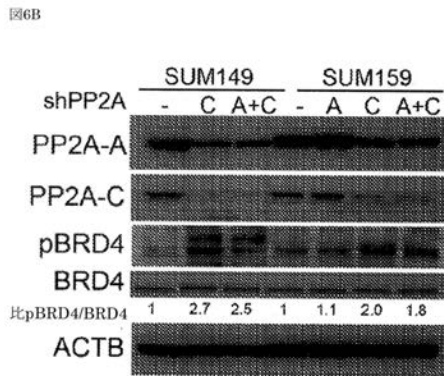
【 図 6 A 】



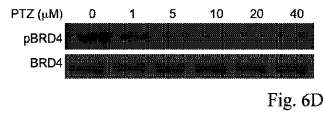
【 図 6 C 】



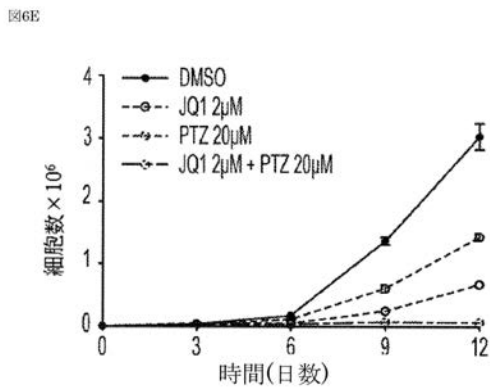
【 図 6 B 】



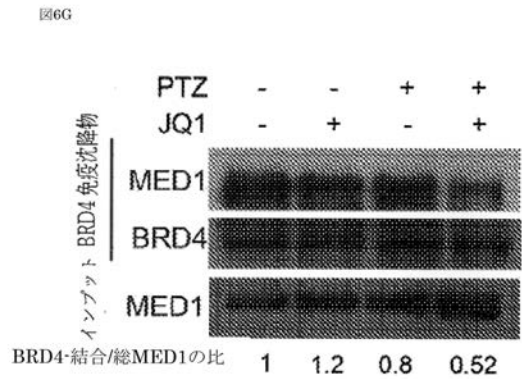
【 図 6 D 】



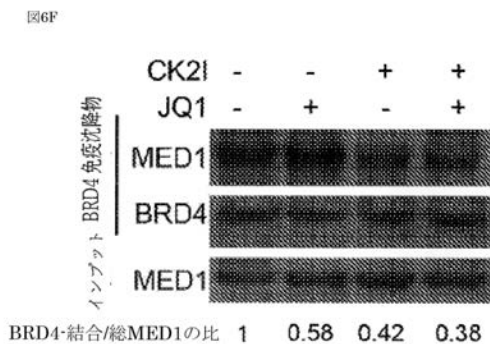
【 図 6 E 】



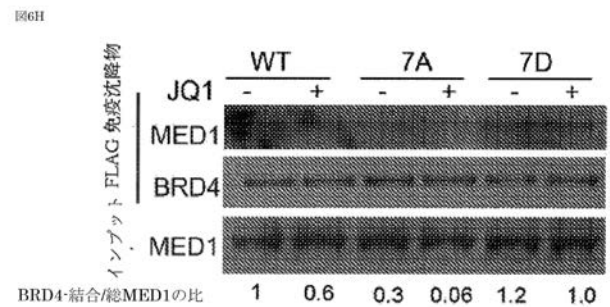
【 図 6 G 】



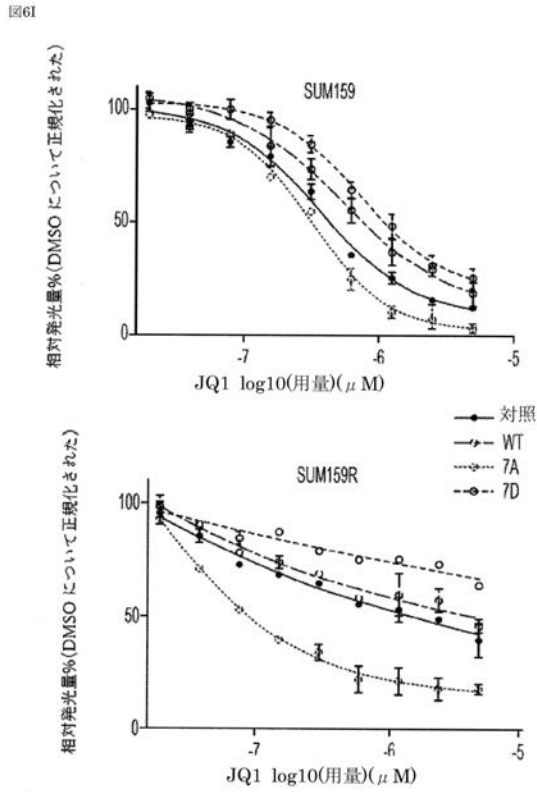
【 図 6 F 】



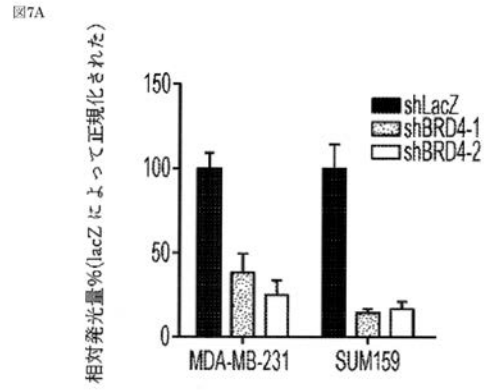
【 図 6 H 】



【 図 6 I 】



【 図 7 A 】



【 図 7 B 】

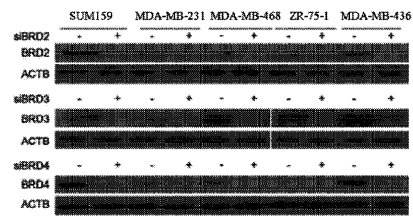
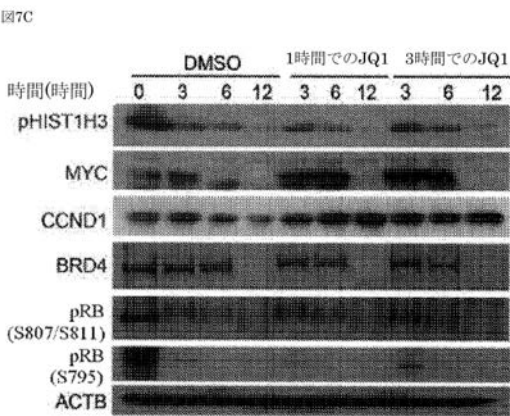
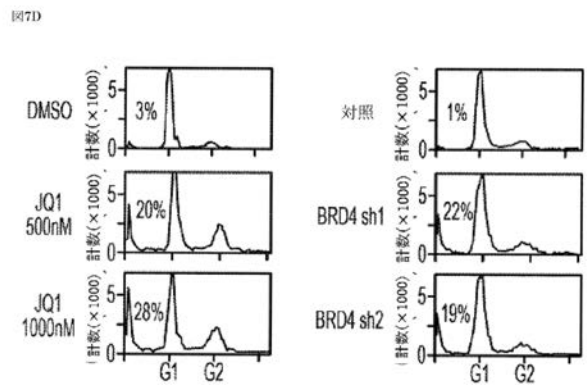


Fig. 7B

【 図 7 C 】

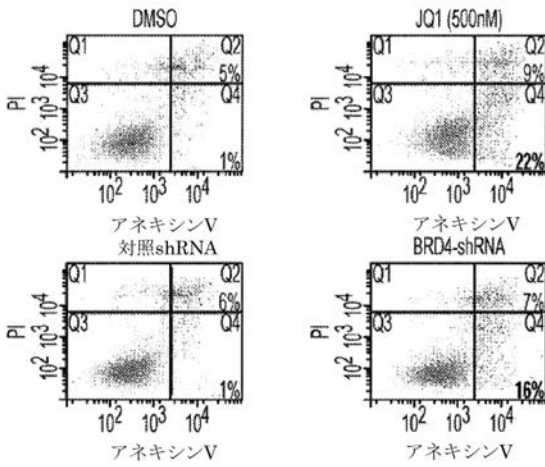


【 図 7 D 】



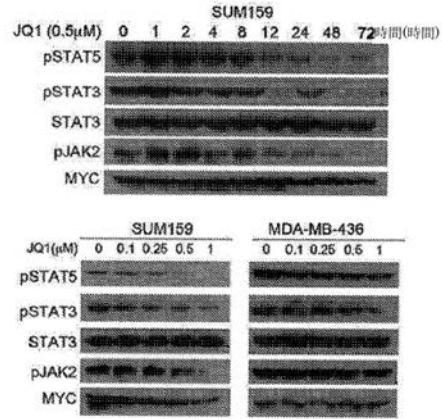
【 図 7 E 】

図7E



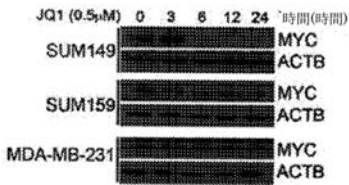
【 図 8 A 】

図8A



【 図 8 B 】

図8B



【 図 8 C 】

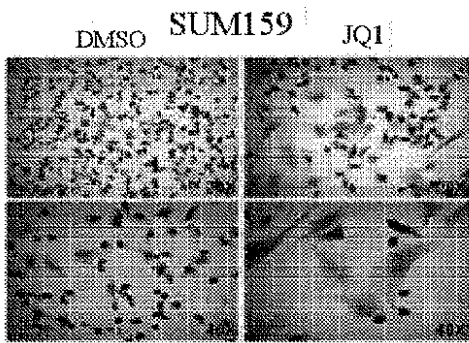


Fig. 8C

【 図 8 D 】

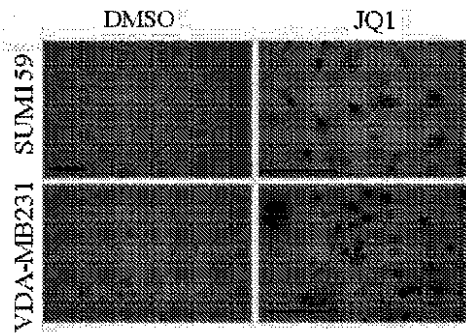
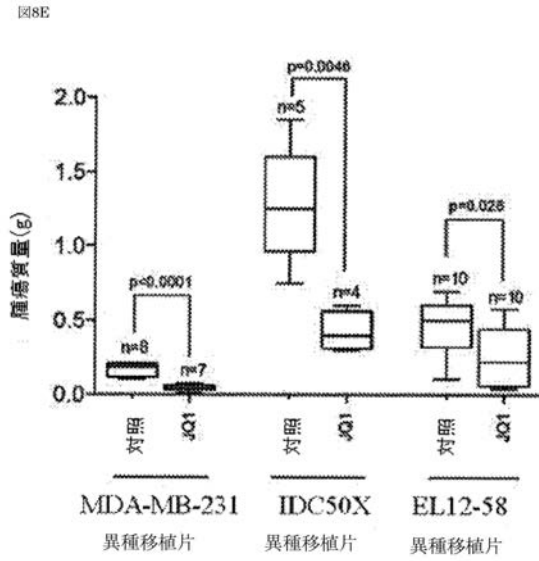


Fig. 8D

【 図 8 E 】



【 図 8 F 】

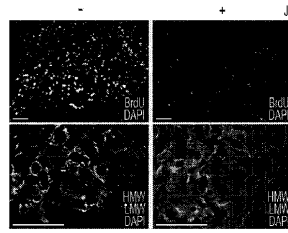
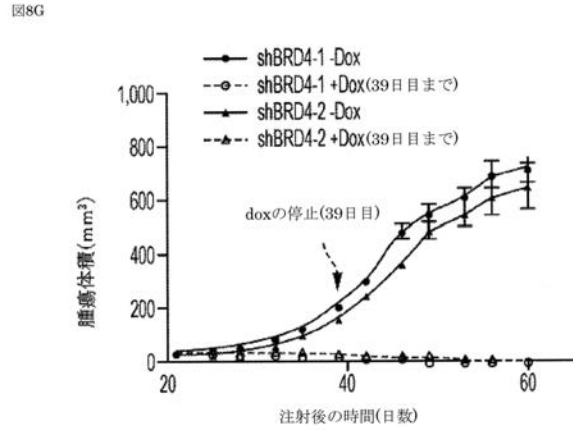
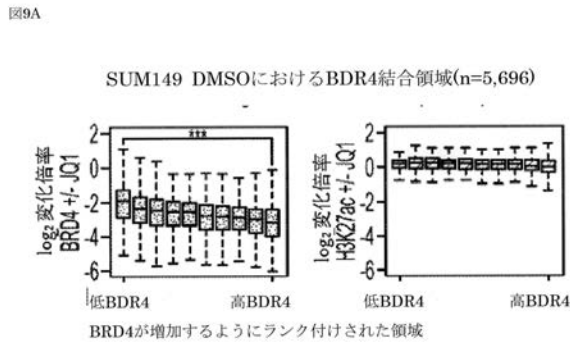


Fig. 8F

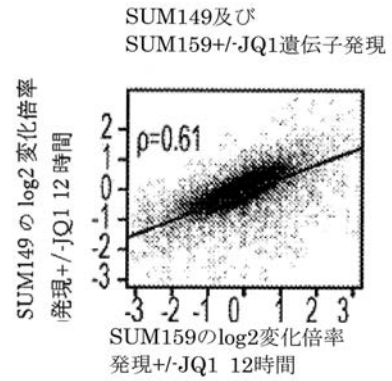
【 図 8 G 】



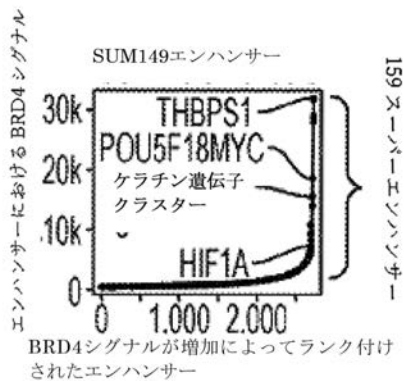
【 図 9 A 】



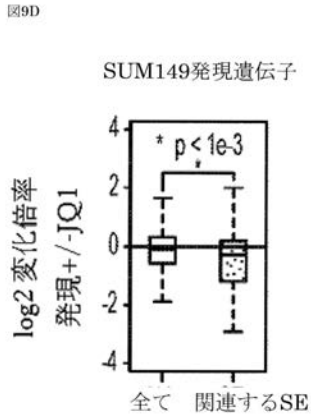
【 図 9 C 】



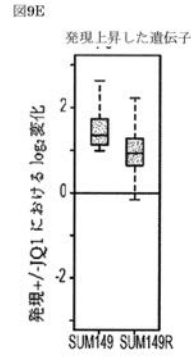
【 図 9 B 】



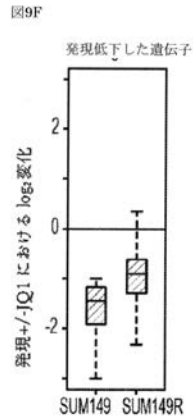
【 図 9 D 】



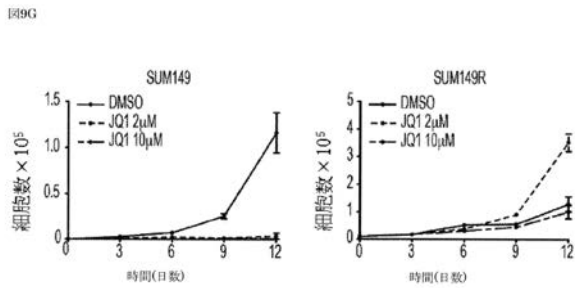
【 図 9 E 】



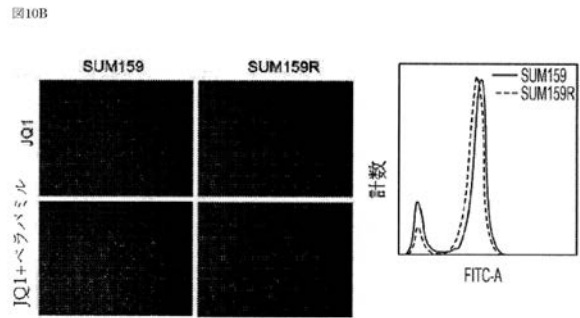
【 図 9 F 】



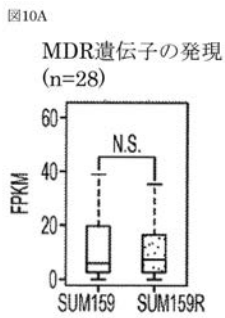
【 図 9 G 】



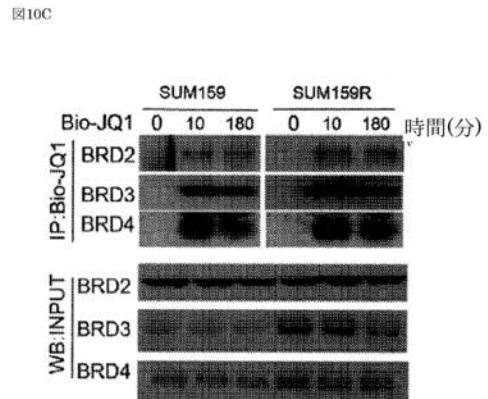
【 図 1 0 B 】



【 図 1 0 A 】

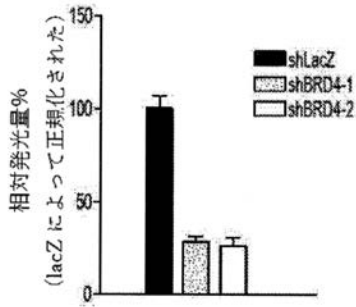


【 図 1 0 C 】



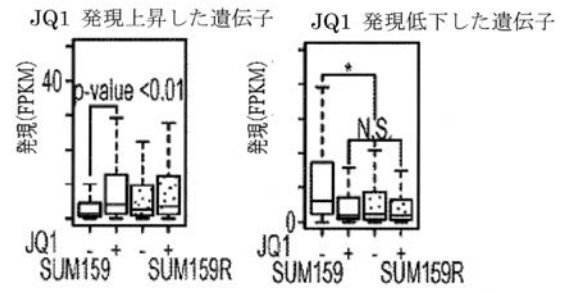
【 図 1 0 D 】

図10D



【 図 1 1 B 】

図11B



【 図 1 1 A 】

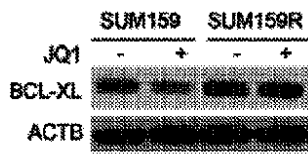


Fig. 11A

【 図 1 1 C 】

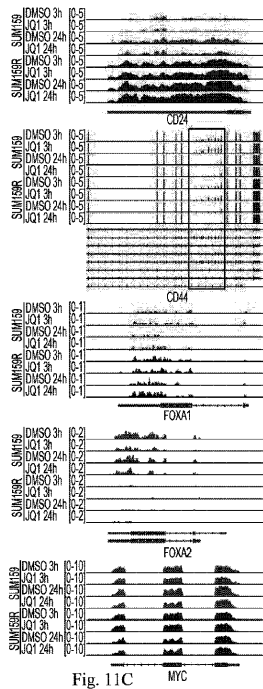


Fig. 11C

【 図 1 1 D 】

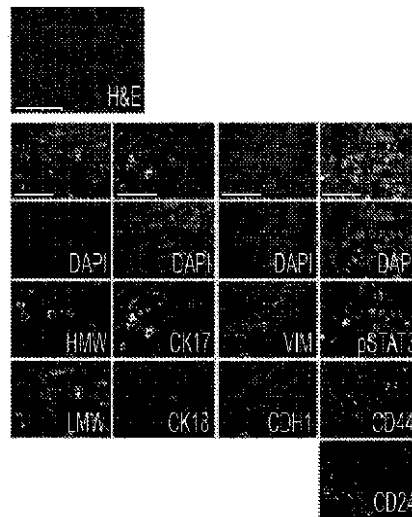
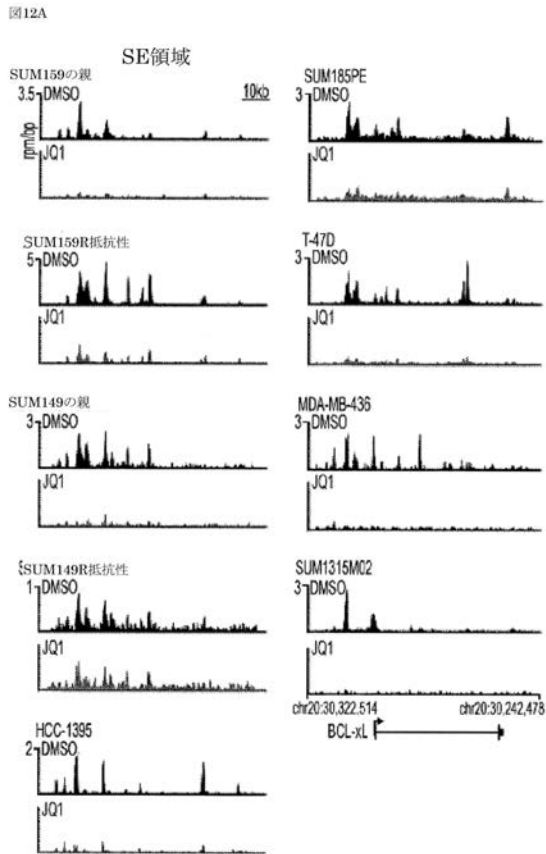
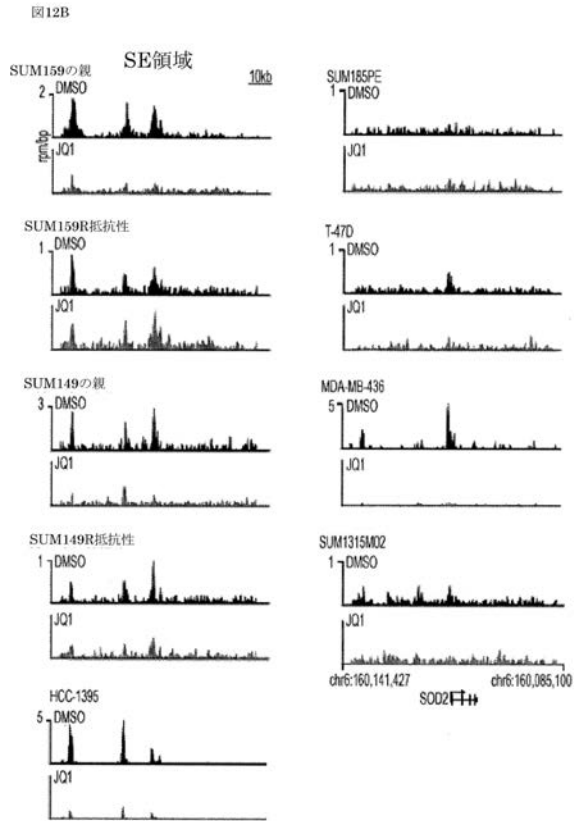


Fig. 11D

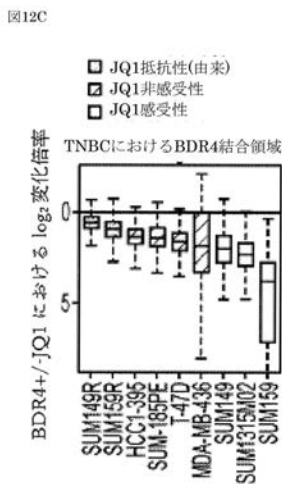
【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



【 図 1 2 C 】



【 図 1 2 D 】

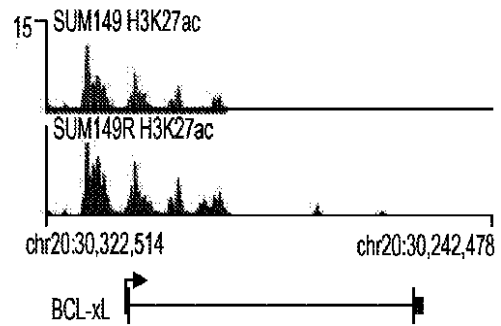


Fig. 12D

【 図 1 3 A 】



【 図 1 3 B 】

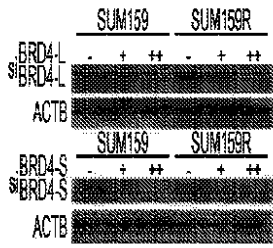
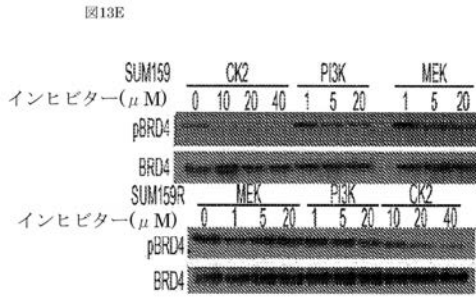
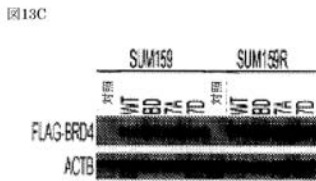


Fig. 13B

【 図 1 3 E 】



【 図 1 3 C 】



【 図 1 3 D 】

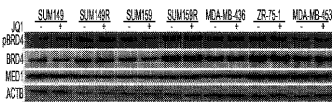


Fig. 13D

【 図 1 3 F 】

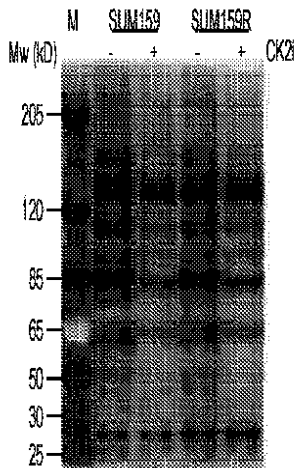
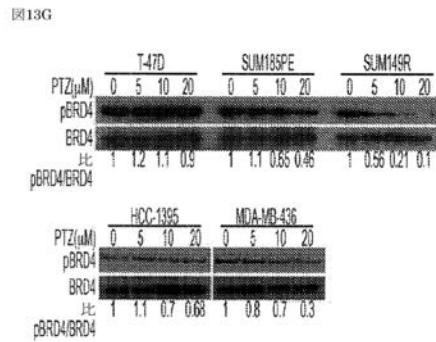


Fig. 13F

【 図 1 3 G 】



【 図 1 3 H 】

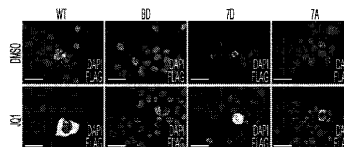
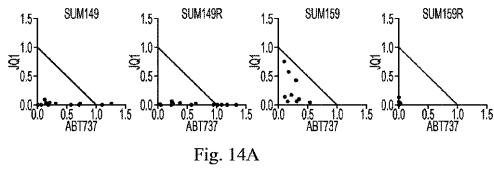
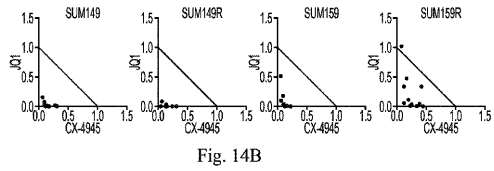


Fig. 13H

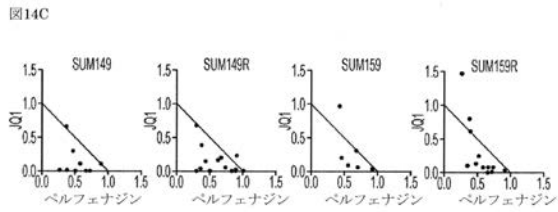
【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】

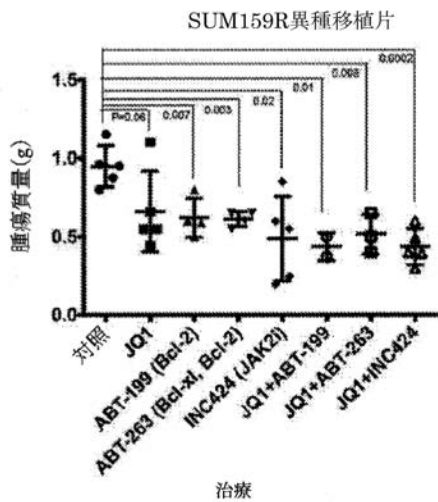


【 図 1 4 C 】



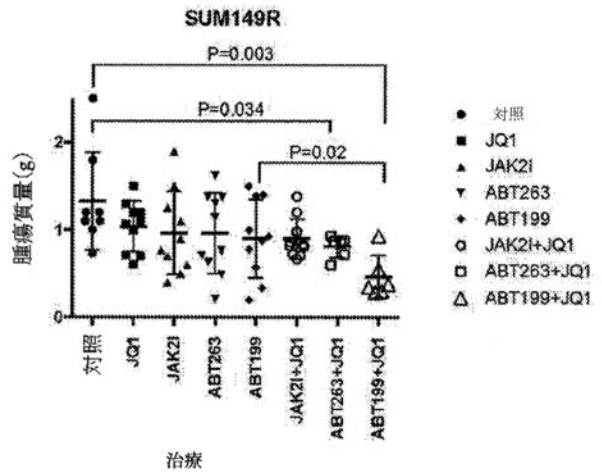
【 図 1 5 B 】

図15B



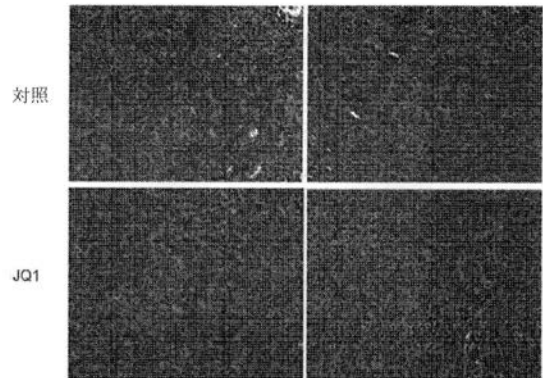
【 図 1 5 A 】

図15A



【 図 1 6 A 】

図16A



【 図 1 6 B 】

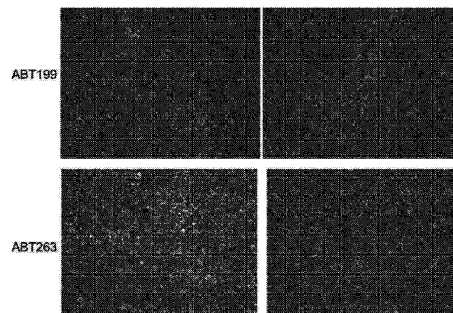


Fig. 16B

【 図 1 6 C 】

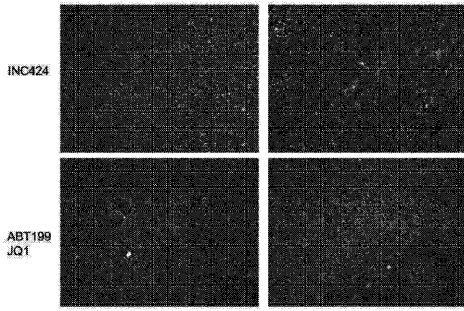


Fig. 16C

【 図 1 6 D 】

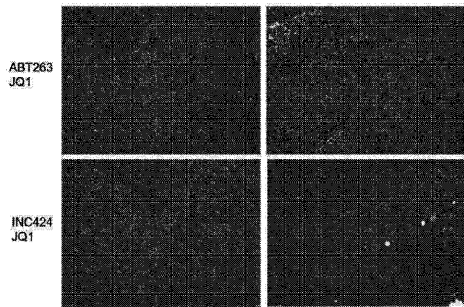


Fig. 16D

【 図 1 7 】

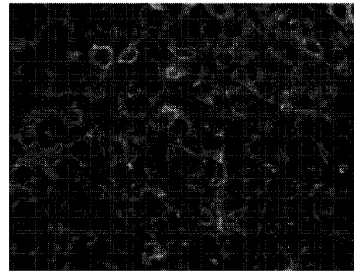
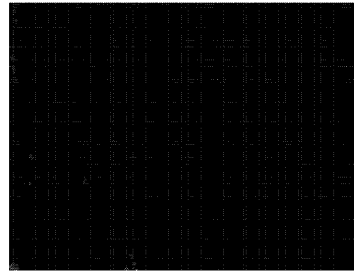


Fig. 17

【 配 列 表 】

2018531891000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46318

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07D 401/14, A61K 31/517, C07D 239/91 (2016.01) CPC - C07D 265/32, C07D 401/14, C07D 401/04, A61K 45/06 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) IPC(8) - C07D 401/14, A61K 31/517, C07D 239/91 (2016.01) CPC - C07D 265/32, C07D 401/14, C07D 401/04, A61K 45/06 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Patents and non-patent literature (classification, keyword; search terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Scholar (non-patent literature), Google Patents; search terms: cancer, bromodomain extra terminal, BET, inhibitor, protein phosphatase 2A (PP2A), FTY720, B-cell lymphoma, Bcl, cassin kinase, CK2, mediator complex subunit, MED1, resistance, synergy																									
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 2014/0005169 A1 (Albrecht et al.) 2 January 2014 (02.01.2014), entire document, especially abstract, para [0072], [0186], [0230], [0238]</td> <td>1 and 3/1 2 and 3/2</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>WO 2015/070020 A2 (Dana-Farber Cancer Institute, Inc.) 14 May 2015 (14.05.2015), entire document, especially abstract, pg 2 ln 17-18, pg 2 ln 20, pg 4 ln 27-28</td> <td>12, 14/12, 52, and 54/52 13, 14/13, 53 and 54/53</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>WO 2015/109286 A1 (Gilead Sciences, Inc.) 23 July 2015 (23.07.2015), entire document, especially abstract, para [0017], [0043], [0046], [0052], [0103]</td> <td>22 23 and 24</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 2014/0296218 A1 (Young et al.) 2 October 2014 (02.10.2014), entire document, especially abstract, para [0040], [0198], [0241]</td> <td>32 33 and 34</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Kumar et al., "GLI2-dependent c-MYC upregulation mediates resistance of pancreatic cancer cells to the BET bromodomain inhibitor JQ1," Scientific Reports, vol. 5, 25 March 2015 (25.04.2015), 9489, entire document</td> <td>2, 3/2, 13, 14/13, 23, 24, 33, 34, 53 and 54/53</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2014/0162971 A1 (Wang et al.) 12 June 2014 (12.06.2014), entire document</td> <td>1-3, 12-14, 22-24, 32-34, and 52-54</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Lee et al., "Synergistic effect of JQ1 and rapamycin for treatment of human osteosarcoma," International Journal of Cancer, vol. 136, 01 May 2015 (01.05.2015), pg 2055-2064, entire document</td> <td>1-3, 12-14, 22-24, 32-34, and 52-54</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	US 2014/0005169 A1 (Albrecht et al.) 2 January 2014 (02.01.2014), entire document, especially abstract, para [0072], [0186], [0230], [0238]	1 and 3/1 2 and 3/2	X — Y	WO 2015/070020 A2 (Dana-Farber Cancer Institute, Inc.) 14 May 2015 (14.05.2015), entire document, especially abstract, pg 2 ln 17-18, pg 2 ln 20, pg 4 ln 27-28	12, 14/12, 52, and 54/52 13, 14/13, 53 and 54/53	X — Y	WO 2015/109286 A1 (Gilead Sciences, Inc.) 23 July 2015 (23.07.2015), entire document, especially abstract, para [0017], [0043], [0046], [0052], [0103]	22 23 and 24	X — Y	US 2014/0296218 A1 (Young et al.) 2 October 2014 (02.10.2014), entire document, especially abstract, para [0040], [0198], [0241]	32 33 and 34	Y	Kumar et al., "GLI2-dependent c-MYC upregulation mediates resistance of pancreatic cancer cells to the BET bromodomain inhibitor JQ1," Scientific Reports, vol. 5, 25 March 2015 (25.04.2015), 9489, entire document	2, 3/2, 13, 14/13, 23, 24, 33, 34, 53 and 54/53	A	US 2014/0162971 A1 (Wang et al.) 12 June 2014 (12.06.2014), entire document	1-3, 12-14, 22-24, 32-34, and 52-54	A	Lee et al., "Synergistic effect of JQ1 and rapamycin for treatment of human osteosarcoma," International Journal of Cancer, vol. 136, 01 May 2015 (01.05.2015), pg 2055-2064, entire document	1-3, 12-14, 22-24, 32-34, and 52-54	<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																							
X — Y	US 2014/0005169 A1 (Albrecht et al.) 2 January 2014 (02.01.2014), entire document, especially abstract, para [0072], [0186], [0230], [0238]	1 and 3/1 2 and 3/2																							
X — Y	WO 2015/070020 A2 (Dana-Farber Cancer Institute, Inc.) 14 May 2015 (14.05.2015), entire document, especially abstract, pg 2 ln 17-18, pg 2 ln 20, pg 4 ln 27-28	12, 14/12, 52, and 54/52 13, 14/13, 53 and 54/53																							
X — Y	WO 2015/109286 A1 (Gilead Sciences, Inc.) 23 July 2015 (23.07.2015), entire document, especially abstract, para [0017], [0043], [0046], [0052], [0103]	22 23 and 24																							
X — Y	US 2014/0296218 A1 (Young et al.) 2 October 2014 (02.10.2014), entire document, especially abstract, para [0040], [0198], [0241]	32 33 and 34																							
Y	Kumar et al., "GLI2-dependent c-MYC upregulation mediates resistance of pancreatic cancer cells to the BET bromodomain inhibitor JQ1," Scientific Reports, vol. 5, 25 March 2015 (25.04.2015), 9489, entire document	2, 3/2, 13, 14/13, 23, 24, 33, 34, 53 and 54/53																							
A	US 2014/0162971 A1 (Wang et al.) 12 June 2014 (12.06.2014), entire document	1-3, 12-14, 22-24, 32-34, and 52-54																							
A	Lee et al., "Synergistic effect of JQ1 and rapamycin for treatment of human osteosarcoma," International Journal of Cancer, vol. 136, 01 May 2015 (01.05.2015), pg 2055-2064, entire document	1-3, 12-14, 22-24, 32-34, and 52-54																							
* 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 20 September 2016	Date of mailing of the international search report 16 DEC 2016																								
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																								

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46318

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46318

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.: 4-11, 15-21, 25-31, 35-41, and 55-61
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 Supplemental Box--

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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.:
1-3, 12-14, 22-24, 32-34, and 52-54

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 SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46318

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-3, 12-14, 22-24, 32-34, and 52-54 are directed to a method for treating a cancer.

Group II: Claims 42-51 are directed to a method to identify a subject having a cancer that is resistant to or at risk of developing resistance to bromodomain and extra terminal (BET) inhibitor therapy.

The inventions listed as Group I-II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Feature:

Group I does not require a method to identify a subject having a cancer that is resistant to or at risk of developing resistance to bromodomain and extra terminal (BET) inhibitor therapy, the method comprising: performing an assay to determine intracellular location of bromodomain-containing protein 4 (BRD4) in a tumor sample obtained from a subject receiving BET inhibitor therapy; and identifying the subject as having a cancer that is resistant to or at risk of developing resistance to BET inhibitor therapy if the BRD4 has a nuclear localization, as required by group II.

Group II does not require a method for treating a cancer, the method comprising administering to a subject in need thereof a bromodomain and extra terminal (BET) inhibitor and a protein phosphatase 2A (PP2A) activator in an amount effective to treat the cancer, as required by Group I.

Common Technical Features:

Group I-II share the technical feature of administering a BET inhibitor in combination with a protein phosphatase 2A (PP2A) activator, a B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) inhibitor, a B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl) inhibitor, a casein kinase 2 (CK2) inhibitor, or a mediator complex subunit 1 (MED1).

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by US 2014/0005169 A1 to Albrecht et al. (hereinafter 'Albrecht').

Albrecht teaches a method comprising: administering to a subject in need thereof (para [0186], administration of an effective amount of a compound according to this invention to a mammal, in particular a human in need of such treatment) a bromodomain and extra terminal (BET) inhibitor (para [0072], compound that binds to and/or inhibits the target bromodomain-containing protein (such as a BET protein)) and a protein phosphatase 2A (PP2A) activator (para [0230], FTY720).

As the shared technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common technical features that would otherwise unify the groups. Therefore, Groups I-II lack unity under PCT Rule 13.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/5415 (2006.01)	A 6 1 K 31/5415	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/495 (2006.01)	A 6 1 K 31/495	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	
A 6 1 K 31/11 (2006.01)	A 6 1 K 31/11	
A 6 1 K 31/166 (2006.01)	A 6 1 K 31/166	
A 6 1 K 31/167 (2006.01)	A 6 1 K 31/167	
A 6 1 K 31/4375 (2006.01)	A 6 1 K 31/4375	
A 6 1 K 31/4184 (2006.01)	A 6 1 K 31/4184	
A 6 1 K 31/37 (2006.01)	A 6 1 K 31/37	
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 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
G 0 1 N 33/533 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/534 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P
G 0 1 N 33/535 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	G 0 1 N 33/533	
C 0 7 K 2/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/534	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	G 0 1 N 33/535	
	C 0 7 K 16/18	
	C 0 7 K 2/00	
	C 1 2 N 15/113	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

2 . T r i t o n

(72)発明者 コーネリア・ポルヤック
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 4 4 5・ブルックライン・オーチャード・ロード・1 1

(72)発明者 シャオクン・シュウ
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 4 4 5・ブルックライン・ハイ・ストリート・1 8 3

(72)発明者 ジェームズ・イー・ブラドナー
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 4 9 3・ウェストン・バックスキン・ドライブ・6

(72)発明者 チャールズ・ヤン・リン
アメリカ合衆国・テキサス・7 7 0 0 4・ヒューストン・ラ・ブランチ・ストリート・5 5 2 0

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB24 CB02 DA36
4B063 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS33 QS36
QX02
4C084 AA02 AA13 AA19 AA20 BA03 MA02 NA05 ZB261 ZB262 ZC192
ZC202 ZC412 ZC751
4C085 AA13 AA14 CC23 EE03
4C086 AA01 AA02 BC39 BC50 BC73 CA01 CB09 CB29 CB30 DA26
EA16 GA07 GA10 GA12 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZC75
4C206 AA01 AA02 CB08 FA08 GA12 GA28 JA20 KA01 KA04 MA02
MA04 NA05 ZB26 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 DA75 EA28

专利名称(译)	BET溴结构域抑制剂的耐药机制		
公开(公告)号	JP2018531891A	公开(公告)日	2018-11-01
申请号	JP2018506976	申请日	2016-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	Dana Farber癌症研究所有限公司		
[标]发明人	コーネリアポルヤック シャオクンシュウ ジェームズイーブラドナー チャールズヤンリン		
发明人	コーネリア・ポルヤック シャオクン・シュウ ジェームズ・イー・ブラドナー チャールズ・ヤン・リン		
IPC分类号	A61K45/06 A61P35/00 A61P43/00 A61K31/551 A61K31/137 A61K31/5415 A61K31/495 A61K31/5377 A61K31/11 A61K31/166 A61K31/167 A61K31/4375 A61K31/4184 A61K31/37 A61K31/519 A61K31 /7088 A61K48/00 A61K38/02 A61K39/395 C12Q1/02 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/533 G01N33 /534 G01N33/535 C07K16/18 C07K2/00 C12N15/113		
CPC分类号	A61K31/137 A61K31/5415 A61K31/551 A61K31/635 A61K45/06 C07D215/42 C07D255/04 C07D471 /04 C07D495/14 G01N33/6872 G01N2800/52 A61K2300/00 A61K31/4745 A61K31/496 A61K39/395 A61P35/00		
FI分类号	A61K45/06.ZNA A61P35/00 A61P43/00.121 A61K31/551 A61K31/137 A61K31/5415 A61K31/495 A61K31/5377 A61K31/11 A61K31/166 A61K31/167 A61K31/4375 A61K31/4184 A61K31/37 A61K31 /519 A61K31/7088 A61K48/00 A61K38/02 A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.N A61K39/395.T C12Q1/02 G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 C07K16/18 C07K2/00 C12N15/113.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB24 2G045/CB02 2G045/DA36 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063 /QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/AA20 4C084/BA03 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084 /ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C084/ZC412 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C085/CC23 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC39 4C086/BC50 4C086/BC73 4C086/CA01 4C086/CB09 4C086/CB29 4C086/CB30 4C086/DA26 4C086/EA16 4C086/GA07 4C086 /GA10 4C086/GA12 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB26 4C086/ZC75 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/CB08 4C206/FA08 4C206/GA12 4C206/GA28 4C206/JA20 4C206/KA01 4C206 /KA04 4C206/MA02 4C206/MA04 4C206/NA05 4C206/ZB26 4C206/ZC75 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA75 4H045/EA28		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	62/203128 2015-08-10 US		
其他公开文献	JP2018531891A5		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本公开内容提供了BET抑制剂和蛋白磷酸酶2A (PP2A) 激活剂, B细胞淋巴瘤2 (Bcl-2) 抑制剂, 巨细胞B细胞淋巴瘤 (Bcl-xl) 抑制剂, 酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或 提供了用于癌症的联合疗法, 包括介质复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。 与单一疗法相比, 组合疗法有望在治疗癌症中发挥协同作用。 还提供了鉴定患有对溴结构域和额外的末端 (BET) 抑制剂治疗有抗性或有发展抗性风险的癌症的受试者的方法。

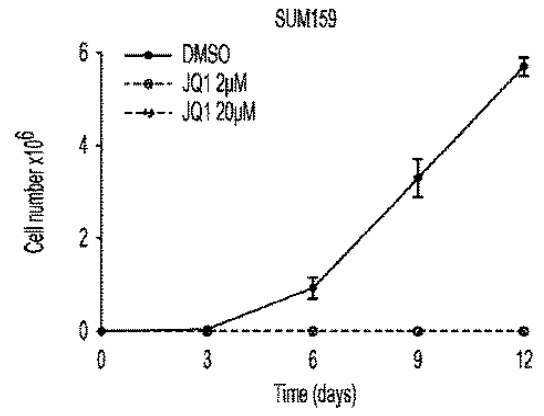


Fig. 3A