

(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2017-525337
(P2017-525337A)

(43) 公表日 平成29年9月7日(2017.9.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 9
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4 B O 6 3
G01N 33/53 (2006.01)	C12N 15/00 F	
C12M 1/00 (2006.01)	G01N 33/53 D	
	C12M 1/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)

(21) 出願番号 特願2016-573588 (P2016-573588)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月19日 (2015. 6. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年2月14日 (2017. 2. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/036677
 (87) 国際公開番号 W02015/196064
 (87) 国際公開日 平成27年12月23日 (2015. 12. 23)
 (31) 優先権主張番号 62/014, 594
 (32) 優先日 平成26年6月19日 (2014. 6. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

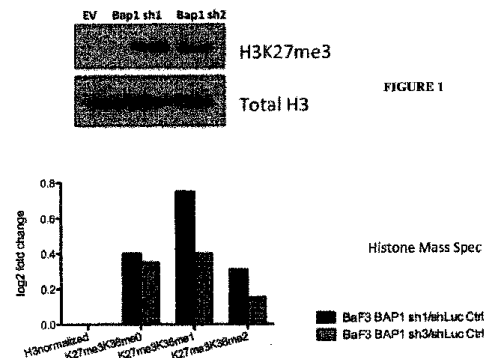
(71) 出願人 500213834
 メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 レビン, ロス
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1233, アpartment 23エー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E Z H 2 阻害剤への応答についてのバイオマーカー

(57) 【要約】

本明細書で開示される主題は、E Z H 2 阻害剤が被験体において抗がん効果を生じさせる可能性を評価するための1または複数のバイオマーカーの使用に関する。それは、少なくとも部分的には、B A P 1 を喪失させると、E Z H 2 の発現および活性の上方調節が結果としてもたらされるという発見に基づく。具体的で非限定的な実施形態では、方法は、被験体からがんの試料を得るステップと、試料中において、B A P 1 バイオマーカーの発現レベルを決定するステップとを含み、B A P 1 バイオマーカーが、がんにおいて非存在であるか、または基準対照レベルと比較して低レベルで発現する場合、抗がん効果を生じさせるための治療有効量のE Z H 2 阻害剤を投与する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

EZH2阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるのかどうかを決定するための方法であって、該がんの1または複数の細胞におけるBAP1バイオマーカの発現を決定するステップを含み、該BAP1バイオマーカが、該がんにおいて非存在であるか、または基準対照レベルと比較して低レベルで発現する場合、抗がん効果を生じさせるための治療有効量のEZH2阻害剤を投与する、方法。

【請求項 2】

前記がんが、悪性中皮腫、ブドウ膜黒色腫、腎細胞癌、皮膚黒色腫、肺がん、乳がん、卵巣がん、黒色腫でない皮膚がん、髄膜腫、胆管癌、平滑筋肉腫、神経内分泌腫瘍、膵臓がん、傍神経節腫、悪性線維性組織球腫、メラノサイトBAP1変異非定型皮内腫瘍(MBAIT)、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、および膀胱がんからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記BAP1バイオマーカの発現を、免疫蛍光法により決定する、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記BAP1バイオマーカの発現を、ウェスタンブロットにより決定する、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記BAP1バイオマーカの発現を、*in situ*ハイブリダイゼーションにより決定する、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記BAP1バイオマーカの発現を、ポリメラーゼ連鎖反応により決定する、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記BAP1バイオマーカの発現を、該BAP1バイオマーカと特異的に結合する試薬を使用することにより検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記試薬が、抗体またはその抗原結合性断片である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記がんが、悪性中皮腫である、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記がんが、ブドウ膜黒色腫である、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記がんが、腎細胞癌である、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

試料中のEZH2の発現レベルを決定するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

がんを有する被験体を処置するための方法であって、該被験体から該がんの試料を得るステップと、該試料中において、BAP1バイオマーカの発現レベル、ならびに/またはEZH2および/もしくはSUZ12の発現レベルを決定するステップとを含み、該BAP1バイオマーカが非存在であるか、もしくはBAP1の基準対照レベルより低レベルで発現し、かつ/またはEZH2および/もしくはSUZ12の発現が、EZH2の基準対照レベルと比較して増大する場合、治療有効量のEZH2阻害剤による該被験体の処置を開始する、方法。

40

【請求項 14】

前記がんが、悪性中皮腫である、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

50

前記がんが、ブドウ膜黒色腫である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記がんが、腎細胞癌である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 B A P 1 バイオマーカ、 S U Z 1 2、および E Z H 2 の発現を、免疫蛍光法により決定する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 B A P 1 バイオマーカ、 S U Z 1 2、および E Z H 2 の発現を、ウェスタンブロットにより決定する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】

E Z H 2 阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるのかどうかを決定するための方法であって、被験体から該がんの試料を得るステップと、該試料中において、B A P 1 バイオマーカの発現レベルを決定するステップとを含み、該 B A P 1 バイオマーカが、該がんにおいて非存在であるか、または基準対照レベルと比較して低レベルで発現する場合、該 E Z H 2 阻害剤は、該がんに対して抗がん効果を有する可能性が高い、方法。

【請求項 2 0】

前記がんが、悪性中皮腫、ブドウ膜黒色腫、腎細胞癌、皮膚黒色腫、肺がん、乳がん、卵巣がん、黒色腫でない皮膚がん、髄膜腫、胆管癌、平滑筋肉腫、神経内分泌腫瘍、膵臓がん、傍神経節腫、悪性線維性組織球腫、メラノサイト B A P 1 変異非定型皮内腫瘍 (M B A I T)、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、および膀胱がんからなる群から選択される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 B A P 1 バイオマーカが、B A P 1 タンパク質バイオマーカである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 B A P 1 バイオマーカが、B A P 1 核酸バイオマーカである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 B A P 1 バイオマーカの発現を、免疫蛍光法により決定する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 B A P 1 バイオマーカの発現を、ウェスタンブロットにより決定する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

E Z H 2 阻害剤に対する、患者におけるがんの感受性を予測する方法であって、該患者から該がんの試料を得るステップと、該試料を含む細胞における B A P 1 タンパク質バイオマーカの発現レベルを決定するステップとを含み、該 B A P 1 バイオマーカが非存在であるか、または発現レベルが基準対照レベルと比較して低減されている場合、該がんは、E Z H 2 阻害剤に対して感受性であることが予測される、方法。

【請求項 2 6】

前記がんが、悪性中皮腫、ブドウ膜黒色腫、腎細胞癌、皮膚黒色腫、肺がん、乳がん、卵巣がん、黒色腫でない皮膚がん、髄膜腫、胆管癌、平滑筋肉腫、神経内分泌腫瘍、膵臓がん、傍神経節腫、悪性線維性組織球腫、メラノサイト B A P 1 変異非定型皮内腫瘍 (M B A I T)、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、および膀胱がんからなる群から選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

E Z H 2 阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるのかどうかを決定するためのキットであって、B A P 1 バイオマーカを検出するための手段を含むキット。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

BAP1バイオマーカを検出するための前記手段が、1もしくは複数のパッケージングされたプライマー、プローブ、アレイ/マイクロアレイ、バイオマーカ特異的抗体、および/またはビーズを含む、請求項27に記載のキット。

【請求項 29】

BAP1バイオマーカを検出するための前記手段が、BAP1バイオマーカを検出するための1もしくは複数の抗体、またはその抗原結合性断片を含む、請求項27に記載のキット。

【請求項 30】

EZH2の発現、L3MBTL2の発現、および/またはSUZ12の発現を検出するための1もしくは複数のプライマー、プローブ、アレイ/マイクロアレイ、バイオマーカ特異的抗体、および/またはビーズをさらに含む、請求項27に記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、2014年6月19日に出願された米国仮特許出願第62/014,594号に対する優先権を主張する。この出願の内容は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

助成金情報

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された助成金番号F31CA180642-01下の政府助成によりなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

20

【0003】

1. 序説

本発明は、EZH2阻害剤が被験体において抗がん効果を生じさせる可能性を評価するのに使用することができるバイオマーカに関する。したがって、これらのバイオマーカは、がん患者を処置する方法において使用することができる。

【背景技術】

【0004】

30

2. 発明の背景

BRC A1関連タンパク質1(BAP1)とは、タンパク質からのユビキチンの除去に関与する、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼである。BAP1は、BRC A1のRINGフィンガードメインを介して、1型乳がん感受性タンパク質(BRC A1)に結合し、腫瘍抑制因子として作用することができる。BAP1は、転写の調節、細胞周期および細胞成長の調節、DNA損傷への応答、ならびにクロマチンダイナミクスに関与する。ゲノムシーケンシング研究は、におけるBAP1の生殖細胞系列変異が、悪性中皮腫、ブドウ膜黒色腫、および皮膚黒色腫を含むがんの危険性の増大を伴う、腫瘍素因症候群(TPDS)と関連しうることを示している。さらなる研究は、肺腺癌および腎細胞癌を含む他のがんに関連する、BAP1生殖細胞系列変異を同定している。悪性中皮腫を有する多くの患者は、自身の疾患で死亡するので、BAP1変異を有する一部の患者の予後は、極めて不良であり、有効な処置が確認されていない。腎細胞癌を有する患者におけるBAP1変異からは、予後不良が予測され、ブドウ膜黒色腫患者におけるBAP1変異からは、高危険性群および転移が予測される。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

ゼスト相同体2のエンハンサー(EZH2)とは、そのメンバーが、ヒストンタンパク質のメチル化によって、遺伝子の転写状態の調節に関与する、ポリコーム群(PcG)ファミリーのメンバーである。EZH2を特異的にターゲティングする薬物が開発されてお

50

り、様々な腫瘍を有する患者におけるこのような薬物の効果は、活発な調査領域をなしている。EZH2阻害剤は現在、EZH2活性化変異を有するリンパ腫患者において、臨床試験にかけている。したがって、当技術分野では、BAP1変異を有する患者のための処置と、EZH2阻害剤を使用してがんを処置すべき場合を決定するのに有用なバイオマーカーとが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

3. 発明の概要

本発明は、EZH2阻害剤が被験体において抗がん効果を生じさせる可能性を評価するための1または複数のバイオマーカーの使用に関する。それは、少なくとも部分的には、BAP1活性を喪失させると、EZH2の発現および活性の上方調節が結果としてもたらされるという発見に基づく。

10

【0007】

したがって、非限定的な実施形態では、本発明は、患者に由来する試料中において、1または複数のバイオマーカー、例えば、BAP1バイオマーカーの存在を決定するためのアッセイ方法およびキットと、このような決定を、がん患者のための治療レジメンの選択およびがん患者の処置方法において使用する方法とを提供する。

【0008】

本発明は、EZH2阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるかどうかを決定するための方法を提供する。ある非限定的な実施形態では、方法は、がんの1または複数の細胞におけるBAP1バイオマーカーの発現を決定するステップを含み、BAP1バイオマーカーが、がんにおいて非存在であるか、または基準対照レベルと比較して低レベルで発現する場合、抗がん効果を生じさせる治療有効量のEZH2阻害剤を投与する。ある特定の非限定的な実施形態では、BAP1バイオマーカーの発現を、免疫蛍光法、ウェスタンブロット、*in situ*ハイブリダイゼーション、またはポリメラーゼ連鎖反応により決定することができる。ある特定の実施形態では、方法はさらに、試料中のEZH2、SUZ12、および/またはL3MBTL2の発現レベルを決定するステップも含みうる。

20

【0009】

本発明はさらに、がんを有する被験体を処置するための方法も提供する。ある特定の非限定的な実施形態では、方法は、被験体からがんの試料を得るステップと、試料中において、BAP1バイオマーカーの発現レベル、ならびに/またはEZH2および/もしくはSUZ12の発現レベルを決定するステップとを含み、BAP1バイオマーカーが非存在であるか、もしくはBAP1の基準対照レベルより低レベルで発現し、かつ/またはEZH2および/もしくはSUZ12の発現が、EZH2および/もしくはSUZ12の基準対照レベルと比較して増大する場合、治療有効量のEZH2阻害剤による被験体の処置を開始する。

30

【0010】

本発明はさらに、EZH2阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性あるのかどうかを決定するための方法も提供する。ある非限定的な実施形態では、方法は、被験体からがんの試料を得るステップと、試料中において、BAP1バイオマーカーの発現レベルを決定するステップとを含み、BAP1バイオマーカーが、がんにおいて非存在であるか、または基準対照レベルと比較して低レベルで発現する場合、EZH2阻害剤は、がんに対して抗がん効果を有する可能性が高い。ある特定の実施形態では、BAP1バイオマーカーは、BAP1タンパク質バイオマーカーである。ある特定の実施形態では、BAP1バイオマーカーは、BAP1核酸バイオマーカーである。

40

【0011】

本発明はさらに、EZH2阻害剤に対する、患者におけるがんの感受性を予測する方法も提供する。ある非限定的な実施形態では、方法は、患者からがんの試料を得るステップと、細胞を含む試料におけるBAP1タンパク質バイオマーカーの発現レベルを決定する

50

ステップとを含み、BAP1バイオマーカが非存在であるか、または発現レベルが基準対照レベルと比較して低減されている場合、がんは、EZH2阻害剤に対して感受性であることが予測される。

【0012】

ある特定の実施形態では、がんは、悪性中皮腫、ブドウ膜黒色腫、腎細胞癌、皮膚黒色腫、肺がん、乳がん、卵巣がん、黒色腫でない皮膚がん、髄膜腫、胆管癌、平滑筋肉腫 (leiomyosarcoma)、神経内分泌腫瘍、膵臓がん、傍神経節腫、悪性線維性組織球腫、メラノサイトBAP1変異非定型皮内腫瘍 (MBAIT)、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、または膀胱がんでありうる。

【0013】

本発明は、EZH2阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるかどうかを決定するためのキットを提供する。ある非限定的な実施形態では、キットは、BAP1バイオマーカを検出するための手段を含む。ある特定の実施形態では、BAP1バイオマーカを検出するための手段は、1もしくは複数のパッケージングされたプライマー、プローブ、アレイ/マイクロアレイ、バイオマーカ特異的抗体、および/またはビーズを含む。ある特定の実施形態では、BAP1バイオマーカを検出するための手段は、BAP1バイオマーカを検出するための1もしくは複数の抗体、またはその抗原結合性断片を含む。ある特定の実施形態では、キットは、EZH2および/またはSUZ12の発現を検出するための1もしくは複数のプライマー、プローブ、アレイ/マイクロアレイ、バイオマーカ特異的抗体、および/またはビーズをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】 *in vitro*において、BAP1を喪失させたところ、ヒストンのH3K27me3が上方調節された。

【図2】EZH2は、BAP1変異体の中皮腫細胞において過剰発現した。

【図3】BAP1の発現を獲得/喪失させると、PRC2サブユニットの発現の変更が結果としてもたらされた。

【図4】EZH2を阻害したところ、中皮腫異種移植片において腫瘍体積が減少した。

【図5A-L】Bap1の条件付き造血系欠失 (conditional hematopoietic deletion) についての特徴付け。(a)TCGAによるAML (急性骨髄性白血病)患者、および (b)TCGAによる中皮腫患者における、BAP1、ASXL1、ASXL2、およびASXL3の平均遺伝子発現を、正規化されたリードカウントについて、標準誤差を伴う数学的平均値として表した図である。(c)C57/B6Hマウスの、精製された造血細胞集団における、qRT-PCRによるBap1の発現。LT-HSC、長期造血幹細胞 (HSC)、(Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD150⁺CD48⁻); ST-HSC、短期HSC (Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD150⁺CD48⁺); MP、多能性 (multipotent) 前駆細胞、(Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD150⁻CD48⁺); LSK、Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺; MP、骨髄系前駆細胞 (Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺); GMP、顆粒球マクロファージ前駆細胞 (Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺CD34⁺Fcγ⁺); CMP、骨髄球系共通前駆細胞 (Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺CD34⁺Fcγ^{1°}); MEP; マクロファージ・赤血球系前駆細胞 (Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺CD34⁻Fcγ⁻); MONO; 単球 (Mac1⁺Gr1⁻); PMN; (多形核好中球、Mac1⁺Gr1⁺); T細胞、CD3⁺; およびB細胞、B220⁺。(d)EUCOMMコンソーシアムから得たマウス胚性幹細胞における、Bap1ターゲティングスキーム。キメラを作製した後で、マウスを、トランスジェニックFLPEマウスと交配させて、未成熟停止カセットを切り出した。次いで、マウスを、Mx1-Creトランスジェニックマウスと交配させた。遺伝子型を確認する遺伝子型決定スキームと、polyIpolyC (pIpC) 処理の4週間後における切出しである。pIpCによる処理して切出しを誘導した後の、対照マウスおよびBap1 KOマウスにおける、(e)末梢血における白血球の計数、および(f)

10

20

30

40

50

) フローサイトメトリーによる骨髓系細胞 ($Mac1^+Gr1^+$) の計数。pI pC 誘導型切出しの後における、対照マウスおよび $Bap1$ KO マウスの骨髓における、(g) 末梢血におけるヘマトクリット百分率、および (h) フローサイトメトリーによる赤血球前駆体 ($CD71^+Ter119^+$) の計数。(i) 対照細胞集団および $Bap1$ KO 骨髓の骨髓系前駆細胞集団 ($Lin^-c-Kit^+Sca1^-$) の相対頻度。細胞は、系列陰性生細胞集団にゲーティングをかけた。(j) 対照マウスおよび $Bap1$ KO マウスにおける、骨髓の骨髓系前駆細胞集団 (GMP、CMP、MEP) の相対定量。(k) 前駆体および GMP の拡大を裏付ける、実施例の対照動物および骨髓動物からのフロープロット。(l) 循環前駆細胞 ($Ki67/DAPI$ 染色) の、フローサイトメトリーによる計数を示す図であり ; 全ての実験について、CON マウスは $n = 5$ であり、 $Bap1$ KO マウスは $n = 8$ である。

【図 6 A - L】 $Bap1$ を欠失させると、 $Asx11$ の喪失と比較した、分化経路の活性化、および $H3K27me3$ の増大がもたらされる。(a) $Bap1$ の条件付き欠失の 3 週間後における脾臓画像、ならびに対照 (同腹 $Bap1 f/f$ マウス、CON) 骨髓、および $Bap1$ ノックアウト ($Mx1-Cre$ $Bap1 f/f$ マウス、 $Bap1$ KO) 骨髓についてのウェスタンプロットによる、 $Bap1$ の欠失の検証。(b) $Bap1$ KO マウスおよび $Asx11$ KO マウスにおける、骨髓系前駆細胞による遺伝子発現を比較するベン図である、 $p < 0.05$; 比較は、遺伝子重複および同方向の遺伝子変化を含む。(c) $Bap1$ KO マウスおよび対照マウス ($n = 3$) から分取された顆粒球マクローファージ前駆細胞 (GMP ; $Lin^-c-Kit^+Sca1^-CD34^+Fc\gamma R^+$) における、 $HoxA$ クラスターについての定量的リアルタイム qPCR (qRT-PCR) 。(d) 総ヒストン H3 に対して正規化された、 $Bap1$ KO および対照由来の $c-Kit^+$ 富化骨髓細胞から精製されたヒストンについての質量分析。(e) $Bap1$ KO 骨髓および対照骨髓から精製されたヒストンにおける、 $H3K27me3$ および総 H3 についてのウェスタンプロット。(f) CON 試料および $Bap1$ KO 試料において判定される、 $H3K27me3$ ブロードドメインの数。固有のブロードドメインおよび重複するブロードドメインを示すベン図である。(g) $c-Kit$ 富化骨髓細胞 ($n = 2$) における、正規化された $H3K27me3$ リードを示す箱髴図。(h) ブロードドメイン密度を、CON 試料中および $Bap1$ KO 試料中の両方で判定された、 $H3K27me3$ ドメインからの距離の関数としてプロットする図。(i) 下方調節される遺伝子との遺伝子発現相関を裏付ける GSEA。(j) $HoxA$ 遺伝子座における、 $H3K27me3$ ChIP-seq についての局所的プロット。(k) p 値と対比した比 (KO / CON) により表示されるボルカノプロット内で表示される、分取された GMP 細胞における $H3K27me3$ ChIP-seq によるピーク判定。(l) $H3K27me3$ 結合性遺伝子および RNA-seq に対する特定の遺伝子シグネチャーの有意性。統計学的解析は、学生 t 検定による * $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$; 報告値 \pm SEM として計算した。

【図 7 A - C】 $Bap1$ および $Asx11$ を喪失させると、反対の遺伝子発現変化が結果としてもたらされる。(a) 対照対 $Bap1$ KO マウスの顆粒球マクローファージ前駆細胞 (GMP ; $Lin^-c-Kit^+Sca1^-CD34^+Fc\gamma R^+$) において差次的に発現する遺伝子の RNA-seq データを示す図であり、細胞は、DESeq2 により解析した (カットオフ p 値 : $p < 0.05$) 。ヒートマップは、発現の増大する遺伝子 (赤) および減少する遺伝子 (青) を示す。(b) $Bap1$ KO および $Asx11$ KO についての GSEA 解析からの、 $FDR < 0.25$ に達している正に富化される遺伝子セットおよび負に富化される遺伝子セットの数 (上) 。RNA-seq により、 $Bap1$ KO 骨髓系前駆細胞内と、 $Asx11$ KO 骨髓系前駆細胞内とで、反対に富化される遺伝子セットを描示するベン図 (下) 。(c) $Bap1$ KO および $Asx11$ KO 前駆細胞において反対に富化され、統計学的に有意である $HoxA$ クラスター遺伝子セットについての GSEA。p 値および FDR 値を表示する。

【図 8 A - C】 $Bap1$ を欠失させると、PRC2 活性が増強される。(a) $Bap1$

10

20

30

40

50

KOマウスおよび対照マウスに由来する骨髄細胞から精製されたヒストンにおける総H3に対して正規化された、H3K27me3についてのELISA。(b)遺伝子転写の開始部位(プロモーター、エクソン、イントロン、下流(± 2 kb)、遠位(2~5 kb)、および遺伝子間(> 50 kb))との関連で判定されるH3K27me3ブロードメインの百分率。(c)GSEAを使用して、分取された骨髄集団由来の公表されたRNA-Seq(Lara-Astiasoら、2014年)を、Bap1喪失後に差次的に下方調節され、H3K27me3によりマークされる遺伝子と比較することにより解析した。下方調節され、H3K27me3によりマークされる遺伝子が、造血前駆細胞集団だけと関連したことから、これらが、関与性の標的集団でありうることが示唆される。これらのデータは、Bap1 KOマウスモデルにおいて見られた前駆細胞の拡大を説明する。

10

【図9A-C】*in vitro*においてBAP1を攪乱させると、H3K27me3の変化をもたらされる。(a)2つの独立のBAP1 shRNAを形質導入されたSET2細胞についてのウェスタンブロットであって、精製されたヒストンにおけるH3K27me3レベルと、全細胞抽出物からのBAP1のノックダウンとを明らかにするウェスタンブロット。(b)対照骨髄細胞およびBap1 KO骨髄細胞についてのメチルセルロースアッセイ。BAP1 cDNA構築物を、対照細胞およびBap1欠失細胞へと再導入した。ヒストンについてのELISAアッセイを、H3K27me3について実施した。BAP1構築物の発現を評価する定量的qPCRである。(c)BAP1およびデユビキチナーゼ変異体であるBAP1 C91Aの、Bap1欠損マウス細胞内への再導入。ヒストンについてのウェスタンブロットを、H3K27me3および総H3について実施した。構築物の発現レベルを示す定量的qPCRである。

20

【図10A-D】Bap1/Ezh2複合KOマウスについての特徴付け。(a)多様なBap1/Ezh2遺伝子型についての骨髄病態。(b)表示の遺伝子型(CD71、Ter119)にある赤血球系細胞についての、フローサイトメトリーによる染色および定量。(I~IV)は、Iを最も未成熟な段階とし、IVを最も成熟した段階とする、赤血球系の分化の段階を表示する。代表的フロープロットの右側の図は、これらの表現型の定量を示す。(c)pIpCの4週間後における、表示の遺伝子型についての脾臓サイズ。(d)pIpCの4週間後における、表示の遺伝子型についての白血球カウント。

【図11A-K】Bap1の欠失により誘導される増殖は、Ezh2の喪失によりレスキューされる。(a)Bap1 KOマウス、Ezh2 KOマウス、Bap1/Ezh2 KOマウス、および対照マウスの骨髄から精製されたヒストンにおける、H3K27me3レベルについてのウェスタンブロット。pIpCの3週間後における、表示の遺伝子型のマウスからの(b)脾臓の代表的画像、および(c)脾臓重量の計量。Hemave tにより定量される、(d)末梢白血球カウント、および(e)ヘマトクリット百分率。フローサイトメトリーによる、(f)骨髄系前駆細胞(Lin⁻c-Kit⁺Scal⁻)、および(g)成熟骨髄系細胞(Mac1⁺Gr1⁺)の計数。(h)Ki67染色およびDAPI染色を使用する、骨髄系前駆細胞における細胞周期解析(n=3/群)。(i)500mg/kgのEPZ011989で、1日2回、16日間にわたり処置されたマウス(n=5/群)における、H3K27me3レベルについてのウェスタンブロット。処置後における、(j)脾臓重量、および(k)白血球カウント。そうでないことが指示されない限りにおいて、CONのn=5、Ezh2 KOのn=5、Bap1 KOのn=8、およびBap1/Ezh2 KOのn=11であり、統計学的解析は、スチューデントのt検定による * p < 0.05、** p < 0.005; 報告値 \pm SEMとして計算した。

30

40

【図12A-C】Bap1 KO動物におけるヒストン解析。(a)対照細胞およびBap1 KO細胞におけるqPCRにより評価される、EZH2転写。細胞には、空ベクターまたはBAP1過剰発現構築物のいずれかを形質導入した。(b)対照動物およびBap1 KO動物の、c-kit富化骨髄細胞における、ヒストンについての質量分析、n=2。(c)FLAGタグ付けされたBAP1、ASXL1、およびBmi1を過剰発現させる293T細胞における、H4K20me1についてのChIP-qPCR実験。

50

【図13A-L】BAP1を枯渇させると、PRC2成分の発現の増大、H4K20me1の増大、およびL3MBTL2の脱ユビキチン化がもたらされる。(a)SET2細胞における、内因性のEZH2およびBAP1の共免疫沈降に続く、ウェスタンブロット解析(DNAに依存する相互作用を阻害するベンゾナーゼの存在下で実施される)。(b)qRT-PCRによる、Bap1、Ezh2、およびSuz12の、分取された顆粒球マクロファージ前駆細胞(GMP; Lin⁻c-Kit⁺Scal⁻CD34⁺Fc⁺)からの発現。(c)Bap1 KOマウスおよび対照マウスに由来する骨髄細胞における、Bap1およびEzh2についてのウェスタンブロット解析。(d)ヒストンについての質量分析実験による、H4K20me1の定量。BAP1野生型(MSTO-211H、Meso10)細胞系および変異体(欠失であるH226;触媒性変異であるH2452)細胞系における、(e)Cell Titer Glo生存率アッセイにより評価される細胞生存率、および(f)SETD8の過剰発現実験のためのアネキシンVアッセイ。(g)SETD8を過剰発現させるBAP1変異体細胞における、SETD8およびEZH2についての定量的qPCR。(h)BAP1野生型細胞系における、SETD8およびEZH2についてのウェスタンブロット解析。(i)DMSOまたは5、10、20 μMのBVT594で処理された細胞におけるCell Titer Gloアッセイ。(j)BAP1野生型細胞系(Met5a、JMN)、およびBAP1変異体中皮腫細胞系(H226、H2452、H28)における、L3MBTL2およびBAP1の発現。(k)Myc-Hisタグ付けされたユビキチンを過剰発現させる293T細胞と、L3MBTL2 cDNAを過剰発現させる293T細胞、ならびに種々のレベルのBAP1(0、5 μg、2.5 μg、1 μg)。Niビーズにより共免疫沈降実験を行い、一連のストリンジェントな洗浄を行った。(l)BAP1の調節が、クロマチンおよび遺伝子発現に対する効果をもたらすことを描示するモデル。統計学的解析は、スチューデントのt検定による * p < 0.05、* * p < 0.005; 報告値 ± SEMとして計算した。

【図14A-B】BAP1、ASXL1、HCF-1、およびOGTの結合についての解析。(a)BAP1、ASXL1、HCF-1、およびOGTのChIP-Seqについての、k-meansクラスタリング解析。(b)BAP1結合性クラスターにおけるHomerデノボモチーフ解析。

【図15A-I】L3MBTL2およびBAP1は、EZH2を共調節する。(a)対照骨髄細胞内およびBap1 KO骨髄細胞における、Bap1およびL3mbtl2の発現。(b)qPCRによる、GMPにおける、L3mbtl2の発現。(c)25 μMのMG132で処理された、H226細胞およびH2452細胞についてのウェスタンブロット。不溶性画分は、2%のSDSを含有する溶解緩衝液を使用して抽出した。(d)L3MBTL2を過剰発現させる細胞系における、EZH2の発現。(e)1.9 kBのEZH2プロモーターを含有する構築物およびRenilla対照ベクターを、293T細胞へと、空ベクター、BAP1発現ベクター、またはL3MBTL2発現ベクターと共に一過性にトランスフェクトする、EZH2プロモーター活性アッセイ。これらの条件の各々において、ホタルルシフェラーゼ活性は、Renilla活性に対して正規化した。(f)2つの独立のヘアピンを使用して、SET2細胞におけるL3MBTL2タンパク質をノックダウンしたこと。短時間および長時間にわたる曝露を含むウェスタンブロット解析を、L3MBTL2、EZH2、およびアクチンについて行った。(g)293T細胞における、L3MBTL2についてのChIPに続く、EZH2遺伝子座、SUZ12遺伝子座、E2F6(陽性対照)遺伝子座、PHF20(陽性対照)遺伝子座、およびMORC3(陰性対照)遺伝子座におけるqPCR。(h)FLAG-L3MBTL2またはFLAG-BAP1を過剰発現させる293T細胞における、抗FLAG ChIPに続く、EZH2遺伝子座におけるqPCR。JAM2は、陽性対照である。FLAGの過剰発現を伴わない293T細胞と比較する。(i)293T細胞における、L3MBTL2およびBAP1についてのウェスタンブロットに続く、それぞれのIP。DNA消化を示すように、アガロースDNAゲルを組み入れた。

【図16A-H】BAP1変異体の中皮腫細胞系モデルおよび異種移植片モデルは、EZH2

H2の阻害に対して感受性である。(a)TCGAによる中皮腫患者における、EZH2転写物の発現を、マッチさせた正常者と比較して示す図である。(b)空ベクターまたはEZH2をターゲティングするヘアピンのいずれかを発現させる、BAP1野生型細胞系および変異体細胞系における、アネキシンVアッセイ。(c)中皮腫細胞系におけるアネキシンV実験の定量。(d)NOD-SCIDマウスへと植え込まれた、EZH2ヘアピンを発現させる、Mes o 10細胞系およびH226細胞系の腫瘍サイズ、n = 6 / 群。(e)1.25 μMのEPZ011989による2週間の処置の後における、2D Cell Titer Glo生存率アッセイ。(f)3週間の、1.25 μMのEPZ011989処置の後における、3D Cell Titer Glo生存率アッセイ。NOD-SCIDマウスへと植え込まれ、媒体(vehicle)または500 mg / kgで1日2

10

【図17】PRC2成分の発現は、分取集団および全骨髄において増大した。

【図18】BAP1 KOマウスでは、H3K27me3が、局所的または全体的に増大した。BAP1 KO動物におけるヒストンのメチル化は、対照骨髄およびBAP1 KO骨髄について、酸抽出を行うことに続く、ウェスタンブロットにより評価した。クロマチン免疫沈降シーケンシング(ChIP-Seq)はまた、cKitに富む骨髄についても遂行した。ChIP-Seqを、RNA-シーケンシングデータと重ね合わせることで、BAP1 KOマウスにおいて下方調節される遺伝子はいっそう、H3K27me3によりマークされることが裏付けられた。BAP1 KOマウスでは、H3K27me3は、HOXA遺伝子座など、EZH2標的遺伝子において増大することが観察された。

20

【図19】BAP1 KO細胞における、H3K27me2/3の上方調節は、H3K27me0/1を消費して生じた。

【図20A-D】BAP1変異体細胞系は、EZH2の阻害に対してより感受性である。(a)EZH2を過剰発現させるMes o 10細胞系は、NOD-SCIDマウスの脇腹への注射の後で、いっそう増殖した。(b)EZH2が、MSTO-211H細胞系およびMes o 10細胞系において過剰発現した。細胞系は、EZH2の過剰発現により、EPZ011989に対していっそう感受性となった。(c)BAP1変異体細胞は、EZH2阻害剤であるGSK126で処理されると、浸潤性を低下させた。(d)GSK126による処理に続く、H226細胞系における、Eカドヘリン発現の増大。

30

【図21A-C】BAP1変異体の中皮腫細胞系モデルおよび異種移植片モデルは、EZH2の阻害に対して感受性である。(a)150 mg / kgのGSK126または媒体で毎日処置された、H2452異種移植片の腫瘍体積(1群当たりn = 10匹のマウス)。各群から5匹ずつのマウスを、16日の処置の後に安楽死させて、H3K27me3の枯渇について評価した。残りのマウスは、試験の残りの期間にわたり処置した。(b)in vivoで処置されたマウスに由来する、16日の処置の後における腫瘍におけるH3K27me3レベルについての、ヒストンについてのELISAおよびヒストンについてのウェスタンブロット解析。(c)媒体で処置されたマウス、およびGSK126で処置されたマウスから抽出された腫瘍の、H&E染色、Ki67染色、およびTUNEL染色(10倍の倍率)。

40

【発明を実施するための形態】

【0015】

5. 詳細な説明

明確さのためであり、限定を目的とするものではないが、本発明についての詳細な説明

50

は、以下の小節：

- (i) B A P 1 バイオマーカー；
- (i i) E Z H 2 阻害剤；
- (i i i) がん標的；
- (i v) バイオマーカーの検出；
- (v) 使用方法；および
- (v i) キット

へと分けられる。

【 0 0 1 6 】

5 . 1 B A P 1 バイオマーカー

本明細書で使用される「バイオマーカー」という用語は、被験体における、本明細書で B A P 1 と表記される B R C A 1 関連タンパク質 1 の活性レベルと関連する、核酸およびタンパク質を含む。

【 0 0 1 7 】

本明細書で互換的に使用される、「患者」または「被験体」は、ヒトまたは非ヒト被験体を指す。非ヒト被験体の非限定的な例は、非ヒト霊長動物、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ブタ、家禽、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、クジラなどを含む。

【 0 0 1 8 】

ある特定の非限定的な実施形態では、開示される B A P 1 バイオマーカーは、核酸でありうる。例えば、限定を目的とするものではないが、バイオマーカーは、デオキシリボ核酸 (D N A)、またはリボ核酸 (R N A)、例えば、m R N A でありうる。

【 0 0 1 9 】

ある特定の非限定的な実施形態では、B A P 1 核酸バイオマーカーは、N C B I データベース受託番号 N G _ _ 0 3 1 8 5 9 . 1 もしくは N M _ _ 0 0 4 6 5 6 に示される配列を有するヒト B A P 1 核酸、または N C B I データベース受託番号 N P _ _ 0 0 4 6 4 7 に示されるアミノ酸配列を有する B A P 1 タンパク質分子をコードする核酸でありうる。

【 0 0 2 0 】

具体的で非限定的な実施形態では、B A P 1 核酸バイオマーカーは、N C B I データベース受託番号 N M _ _ 0 2 7 0 8 8 に示される配列を有するマウス B A P 1 核酸、または N C B I データベース受託番号 N P _ _ 0 8 1 3 6 4 . 1 に示されるアミノ酸配列を有する B A P 1 タンパク質分子をコードする核酸でありうる。

【 0 0 2 1 】

具体的で非限定的な実施形態では、B A P 1 核酸バイオマーカーは、N C B I データベース受託番号 N M _ _ 0 0 1 1 0 7 2 9 2 . 1 に示される配列を有するラット B A P 1 核酸、または N C B I データベース受託番号 N P _ _ 0 0 1 1 0 0 7 6 2 . 1 に示されるアミノ酸配列を有する B A P 1 タンパク質分子をコードする核酸でありうる。

【 0 0 2 2 】

ある特定の非限定的な実施形態では、B A P 1 バイオマーカーは、タンパク質でありうる。

【 0 0 2 3 】

具体的で非限定的な実施形態では、B A P 1 タンパク質バイオマーカーは、N C B I データベース受託番号 N P _ _ 0 0 4 6 4 7 に示されるアミノ酸配列を有するヒト B A P 1 タンパク質でありうる。

【 0 0 2 4 】

具体的で非限定的な実施形態では、B A P 1 タンパク質バイオマーカーは、N C B I データベース受託番号 N P _ _ 0 8 1 3 6 4 . 1 に示されるアミノ酸配列を有するマウス B A P 1 タンパク質でありうる。

【 0 0 2 5 】

具体的で非限定的な実施形態では、B A P 1 タンパク質バイオマーカーは、N C B I データベース受託番号 N P _ _ 0 0 1 1 0 0 7 6 2 . 1 に示されるアミノ酸配列を有するラッ

10

20

30

40

50

ト B A P 1 タンパク質でありうる。

【 0 0 2 6 】

ある特定の実施形態では、B A P 1 バイオマーカのレベルを、基準対照レベルと比較する。本明細書で互換的に使用される、B A P 1 の「基準対照レベル」または「基準対照発現レベル」とは、例えば、基準対照試料を使用して確立することができる。基準対照試料の非限定的な例は、野生型の B A P 1 活性を有する正常細胞および / または健常細胞を含む。ある特定の実施形態では、B A P 1 の基準対照レベルは、例えば、正常細胞、例えば、患者において、腫瘍に隣接して位置する良性細胞を使用して確立することができる。

【 0 0 2 7 】

本発明のある特定の実施形態では、B A P 1 バイオマーカのレベルは、B A P 1 機能を評価することにより評価することができ、この場合、B A P 1 の発現レベルは、B A P 1 機能のレベルに正比例する。非限定的な一例では、B A P 1 の機能は、E Z H 2 の発現（例えば、E Z H 2 タンパク質の発現または E Z H 2 核酸の発現）の下方調節でありうる。例えば、限定を目的とするものではないが、B A P 1 バイオマーカのレベルは、被験体のがん細胞における E Z H 2 の発現レベルを、E Z H 2 の基準対照レベルと比較して決定することにより決定することができる。ある特定の実施形態では、E Z H 2 の基準対照レベルは、野生型の E Z H 2 活性および / もしくは正常な E Z H 2 活性、ならびに / または正常な B A P 1 活性を有する、正常細胞および / または健常細胞を使用して確立することができる。ある特定の実施形態では、E Z H 2 は、N C B I データベース受託番号 N G _ 0 3 2 0 4 3 . 1 ; N M _ 0 0 4 4 5 6 . 4 ; N M _ 0 0 1 2 0 3 2 4 9 . 1 ; N M _ 1 5 2 9 9 8 . 2 ; N M _ 0 0 1 2 0 3 2 4 7 . 1、および / もしくは N M _ 0 0 1 2 0 3 2 4 8 . 1 に示される配列を有するヒト E Z H 2 核酸、または N C B I データベース受託番号 N P _ 0 0 1 1 9 0 1 7 6 . 1 ; N P _ 0 0 1 1 9 0 1 7 7 . 1 ; N P _ 0 0 1 1 9 0 1 7 8 . 1 ; N P _ 0 0 4 4 4 7 . 2 ; および / もしくは N P _ 6 9 4 5 4 3 . 1 に示されるアミノ酸配列を有する E Z H 2 タンパク質分子をコードする核酸でありうる。具体的で非限定的な実施形態では、E Z H 2 は、N C B I データベース受託番号 N P _ 0 0 1 1 9 0 1 7 6 . 1 ; N P _ 0 0 1 1 9 0 1 7 7 . 1 ; N P _ 0 0 1 1 9 0 1 7 8 . 1 ; N P _ 0 0 4 4 4 7 . 2 ; および / または N P _ 6 9 4 5 4 3 . 1 に示されるアミノ酸配列を有するヒト E Z H 2 タンパク質でありうる。

【 0 0 2 8 】

非限定的な一例では、B A P 1 の機能は、S U Z 1 2 の発現（例えば、S U Z 1 2 タンパク質の発現または S U Z 1 2 核酸の発現）の調節でありうる。ある特定の実施形態では、B A P 1 バイオマーカのレベルは、被験体のがん細胞における S U Z 1 2 の発現レベルを、S U Z 1 2 の基準対照レベルと比較して決定することにより決定することができる。ある特定の実施形態では、S U Z 1 2 の基準対照レベルは、野生型の S U Z 1 2 活性および / もしくは正常な S U Z 1 2 活性、ならびに / または正常な B A P 1 活性を有する、正常細胞および / または健常細胞を使用して確立することができる。ある特定の実施形態では、S U Z 1 2 は、N C B I データベース受託番号 N M _ 0 1 5 3 5 5 . 2 に示される配列を有するヒト S U Z 1 2 核酸、または N C B I データベース受託番号 N P _ 0 5 6 1 7 0 . 2 に示されるアミノ酸配列を有する S U Z 1 2 タンパク質分子をコードする核酸でありうる。具体的で非限定的な実施形態では、S U Z 1 2 は、N C B I データベース受託番号 N P _ 0 5 6 1 7 0 . 2 に示されるアミノ酸配列を有するヒト S U Z 1 2 タンパク質でありうる。

【 0 0 2 9 】

本明細書で、基準対照発現レベルに照らした比較に言及する場合は、バイオマーカを、同じ種における基準対照発現レベルと比べて評価する。例えば、ヒト B A P 1 バイオマーカの発現レベルおよび / または存在を、ヒト B A P 1 の基準対照レベルと比較する。

【 0 0 3 0 】

特定の実施形態では、B A P 1 バイオマーカの非存在および / または発現の低減とは、基準対照レベルと比べて、約 9 0 % 未満、約 8 0 % 未満、約 7 0 % 未満、約

10

20

30

40

50

60%未満、約50%未満、約40%未満、約30%未満の発現の検出を意味する。

【0031】

5.2 EZH2阻害剤

EZH2阻害剤の非限定的な例は、EZH2の発現および/または活性を、阻害および/または低減する、化合物、分子、化学物質、ポリペプチド、タンパク質を含む。EZH2阻害剤のさらなる非限定的な例は、S-アデノシルメチオニン競合的低分子阻害剤を含む。特定の非限定的な実施形態では、EZH2阻害剤は、テトラメチルピペリジニル化合物に由来する。さらなる非限定的な例は、UNC1999、3-デアザネブラノシンA (DZnep)、EI1、EPZ-5676、EPZ-6438、GSK343、EPZ005687、EPZ011989、およびGSK126を含む。

10

【0032】

EZH2阻害剤のさらなる非限定的な例は、それらの内容が、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Garapaty-Raoら、Chemistry and Biology、20巻：1~11頁(2013年)、PCT特許出願第WO2013/138361号、同第WO2013/049770号、および同第WO2003/070887号、ならびに米国特許出願第US2014/0275081号、同第US2012/0071418号、同第US2014/0128393号、および同第US2011/0251216号において記載されている。

【0033】

EZH2阻害剤のさらなる非限定的な例は、EZH2の発現または活性を特異的に阻害する、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、shRNA分子、およびsiRNA分子を含む。EZH2阻害剤の非限定的な一例は、EZH2核酸配列の少なくとも一部分と相同なアンチセンス、shRNA、またはsiRNAの核酸配列を含み、この場合、EZH2配列と比べた部分の相同性は、少なくとも約75または少なくとも約80または少なくとも約85または少なくとも約90または少なくとも約95または少なくとも約98パーセントであり、ここで、相同性パーセントは、例えば、BLASTソフトウェアまたはFASTAソフトウェアにより決定することができる。ある特定の非限定的な実施形態では、相補的な部分は、少なくとも10ヌクレオチドまたは少なくとも15ヌクレオチドまたは少なくとも20ヌクレオチドまたは少なくとも25ヌクレオチドまたは少なくとも30ヌクレオチドを構成することが可能であり、アンチセンス核酸、shRNA分子、またはsiRNA分子は、最大で15、または最大で20、または最大で25、または最大で30、または最大で35、または最大で40、または最大で45、または最大で50、または最大で75、または最大で100ヌクレオチドの長さでありうる。アンチセンス分子、shRNA分子、またはsiRNA分子は、DNA、または、例えば、ホスホロチオエート残基であるがこれらに限定されない、非定型もしくは天然に存在しない残基を含みうる。

20

30

【0034】

ある特定の非限定的な実施形態では、EZH2阻害剤を、単独で使用することもでき、1または複数の抗がん剤と組み合わせて使用することもできる。抗がん剤は、抗がん効果を有する任意の分子、化合物、または組成物でありうる。抗がん剤は、化学療法剤、放射線治療剤、サイトカイン、血管新生抑制剤、アポトーシス誘導剤、または抗体などの抗がん性免疫毒素を含むがこれらに限定されない。「~と組み合わせた」とは、EZH2阻害剤と、1または複数の抗がん剤とを、被験体へと、処置レジメンまたは処置計画の一部として投与することを意味する。これらの用語は、EZH2阻害剤と、1または複数の抗がん剤とを、投与の前に物理的に組み合わせたり、それらを同じ時間枠により投与したりすることを要請するものではない。

40

【0035】

5.3 がん標的

本明細書で開示される主題の対象となりうるがんの非限定的な例は、悪性中皮腫、ブドウ膜黒色腫、腎細胞癌、皮膚黒色腫、肺がん、乳がん、卵巣がん、黒色腫でない皮膚がん

50

、髄膜腫、胆管癌 (cholangiocarcinoma)、平滑筋肉腫、神経内分泌腫瘍、膵臓がん、傍神経節腫、悪性線維性組織球腫、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、メラノサイト B A P 1 変異非定型皮内腫瘍 (M B A I T)、および膀胱がんを含む。

【 0 0 3 6 】

5 . 4 バイオマーカーの検出

B A P 1 核酸バイオマーカーである、E Z H 2 核酸、L 3 M B T L 2 核酸、または S U Z 1 2 核酸の発現レベルを、定性的かつ定量的に検出および/または決定するための方法は、従来の q P C R およびデジタル P C R を含むポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、i n s i t u ハイブリダイゼーション (例えば、蛍光 i n S i t u ハイブリダイゼーション (「 F I S H 」) であるがこれらに限定されない)、ゲル電気泳動、シークエンシングおよび配列解析、マイクロアレイ解析、ならびに当技術分野で公知の他の技法を含むがこれらに限定されない。

10

【 0 0 3 7 】

ある特定の実施形態では、検出方法は、リアルタイム P C R (R T - P C R)、定量的 P C R、蛍光 P C R、R T - M S P (R T メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応)、D N A の P i c o G r e e n (商標) (M o l e c u l a r P r o b e s、E u g e n e、O R) 検出、ラジオイムノアッセイ、または D N A の直接的な放射性標識化でありうる。例えば、限定を目的とするものではないが、核酸バイオマーカーは、c D N A へと逆転写するのに続いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) にかけることもでき、米国特許第 5, 3 2 2, 7 7 0 号において記載されている通り、両方のステップに単一の酵素を使用することもでき、R. L. Marshallら、PCR Methods and Applications、4 巻 : 8 0 ~ 8 4 頁 (1 9 9 4 年) により記載されている通り、バイオマーカーは、c D N A へと逆転写するのに続いて、対称ギャップリガーゼ連鎖反応 (R T - A G L C R) にかけることもできる。開示される方法における使用のためのプライマーの非限定的な例を、表 1 に示す。

20

【 0 0 3 8 】

ある特定の実施形態では、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (q R T - P C R) を使用して、バイオマーカーの m R N A レベルを評価する。バイオマーカー m R N A および対照 m R N A のレベルは、がん組織内またはがん細胞内および隣接する良性組織において定量することができる。ある特定の実施形態では、1 または複数のバイオマーカーのレベルは、生体試料において定量することができる。

30

【 0 0 3 9 】

ある非限定的な実施形態では、本発明の検出方法は、増幅に依拠せずに、例えば、標的配列のいかなるコピーもしくは複製を生成せずに、いかなるポリメラーゼの関与を伴わずに、またはいかなるサーマルサイクリングを必要とせずに実行することができる。ある特定の実施形態では、本発明の検出は、2 0 0 6 年 6 月 1 9 日に提出され、参照により本明細書に組み込まれる、米国出願第 1 1 / 4 7 1, 0 2 5 号において記載されている、Q u a n t i G e n e (商標) 方法において示される原理を使用して実施することができる。

【 0 0 4 0 】

ある特定の実施形態では、i n s i t u ハイブリダイゼーションによる視覚化を援用することができるが、ここでは、放射性標識されたアンチセンス R N A プローブを、生体試料、例えば、生検試料の薄い切片とハイブリダイズさせ、洗浄し、R N A ーゼで切断し、オートラジオグラフィーのための感受性エマルジョンへと曝露する。試料は、試料の組織学的組成を明示するために、ヘマトキシリンで染色することができ、適切な光フィルターを用いる暗視野イメージングにより、顕色したエマルジョンを示す。また、ジゴキシゲニンなどの非放射性標識も使用することができる。

40

【 0 0 4 1 】

ある特定の非限定的な実施形態では、核酸バイオマーカーの発現の評価は、蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (F I S H) により実施することができる。F I S H とは、細胞における D N A または R N A の特異的な領域を直接同定することが可能であり、

50

したがって、組織試料中のバイオマーカの発現の視覚的決定を可能とする技法である。FISH方法は、より客観的なスコア付けシステム、および同じ試料中の全ての非新生物性細胞内に存在するバイオマーカ遺伝子のシグナルからなる、内蔵の内部対照 (built-in internal control) の存在の利点を有する。FISHとは、比較的迅速かつ高感度であることが可能であり、また、自動化もなされうる、直接的な *in situ* 技法である。バイオマーカの発現レベルを、FISH単独で決定することが困難な場合は、免疫組織化学検査を、FISH方法と組み合わせることができる。

【0042】

ある特定の実施形態では、核酸バイオマーカの発現は、DNAアレイ上、DNAチップ上、またはDNAマイクロアレイ上で検出することができる。バイオマーカ（複数可）に対応するオリゴヌクレオチドを、チップ上に固定化し、次いで、これを、被験体から得られる生体試料、例えば、腫瘍試料の、標識された核酸とハイブリダイズさせる。陽性のハイブリダイゼーションシグナルは、バイオマーカ転写物を含む試料について得られる。当技術分野では、DNAアレイを調製する方法およびそれらの使用が周知である（例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第6,618,679号；同第6,379,897号；同第6,664,377号；同第6,451,536号；同第548,257号；米国特許出願第20030157485号；ならびにSchenら、1995年、*Science*、20巻：467～470頁；Gerholdら、1999年、*Trends in Biochem. Sci.*、24巻：168～173頁；およびLennonら、2000年、*Drug discovery Today*、5巻：59～65頁を参照されたい）。また、遺伝子発現連続解析 (SAGE) も実施することができる（例えば、米国特許出願第20030215858号を参照されたい）。

10

20

【0043】

ある特定の実施形態では、核酸バイオマーカ、例えば、BAP1 mRNAの発現レベルをモニタリングするには、mRNAを、被験生体試料から抽出し、逆転写し、蛍光標識されたcDNAプローブを作製することができる。次いで、標識されたcDNAプローブを、バイオマーカへとハイブリダイズすることが可能なマイクロアレイへと適用し、プローブのマイクロアレイへのハイブリダイゼーションを可能とし、スライドを走査して蛍光強度を測定することができる。この強度は、ハイブリダイゼーション強度およびバイオマーカの発現レベルと相関する。

30

【0044】

核酸バイオマーカの検出のためのプローブの種類は、cDNA、リボプローブ、合成オリゴヌクレオチド、およびゲノムプローブを含む。使用されるプローブの種類は一般に、例えば、*in situ* ハイブリダイゼーションのためのリボプローブ、およびノーザンプロット法のためのcDNAなど、特定の状況により決まる。ある特定の非限定的な実施形態では、プローブは、特定のバイオマーカRNAに固有のヌクレオチド領域を指向する。プローブは、特定のバイオマーカmRNA転写物を差次的に認識するのに要請される程度に短くすることができ、例えば、15塩基ほどの長さでありうる。また、少なくとも17塩基、18塩基、および20塩基のプローブも使用することができる。ある特定の実施形態では、プライマーとプローブとは、厳密な条件下で、標的遺伝子に対応するヌクレオチド配列を有する核酸断片へと特異的にハイブリダイズする。本明細書で使用される「厳密な条件」という用語とは、配列の間に、少なくとも95%または少なくとも97%の同一性が存在する場合に限り、ハイブリダイゼーションが生じることを意味する。

40

【0045】

プローブの標識化の形態は、放射性同位元素、例えば、 ^{32}P 、および ^{35}S 、またはフルオロフォアの使用など、任意の適切な形態でありうる。放射性同位元素による標識化は、プローブが化学合成されたのであれ生合成されたのであれ、適切に標識された塩基の使用により達成することができる。

【0046】

当業者には、タンパク質バイオマーカ、例えば、BAP1タンパク質バイオマーカ

50

、E Z H 2 タンパク質、L 3 M B T L 2 タンパク質、またはS U Z 1 2 タンパク質のレベルを検出および/または決定するための方法が周知であり、それらとしては、質量分析技法、1 Dまたは2 Dのゲルベースの解析システム、クロマトグラフィー、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素イムノアッセイ (E I A)、ウェスタンブロット法、免疫沈降、および免疫組織化学検査を含むがこれらに限定されない。これらの方法では、タンパク質を検出するために、抗体もしくは抗体同等物を使用するか、または生物物理的技法を使用する。また、抗体アレイまたはタンパク質チップも援用することができ、例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許出願第2003/0013208号；同第2002/0155493号、同第2003/0017515号；ならびに米国特許第6,329,209号、および同第6,365,418号を参照されたい。

【0047】

ある特定の非限定的な実施形態では、タンパク質バイオマーカーの発現を測定するための検出方法は、生体試料、例えば、組織試料を、バイオマーカーに選択的に結合する抗体またはそのバリエーション (例えば、断片) と接触させるステップと、抗体またはそのバリエーションが、試料に結合するのかどうかを検出するステップとを含む。方法はさらに、試料を、二次抗体、例えば、標識された抗体と接触させるステップも含みうる。方法はさらに、例えば、1または複数の試薬を除去する、1または複数の洗浄ステップも含みうる。

【0048】

ある特定の非限定的な実施形態では、ウェスタンブロット法を、バイオマーカータンパク質の発現レベルを検出および定量するために使用することができる。細胞を、溶解緩衝液中でホモジナイズして、溶解物を形成し、次いで、SDS-PAGEおよびニトロセルロースフィルターなどの膜へのプロットイングにかけることができる。次いで、抗体 (非標識) を、膜と接触させ、標識 (^{125}I 、西洋ワサビペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼを含む適切な標識) されたプロテインAまたは抗免疫グロブリンなどの二次免疫試薬でアッセイすることができる。また、クロマトグラフィーによる検出も使用することができる。ある特定の実施形態では、免疫検出は、増強化学発光システム (例えば、PerkinElmer Life Sciences、Boston、Mass. 製) を使用する、バイオマーカーに対する抗体により実施することができる。次いで、膜をはがし、対照タンパク質、例えば、アクチンに特異的な対照抗体で再プロットイングすることができる。

【0049】

免疫組織化学検査を使用して、例えば、生検試料中のバイオマーカーの発現および/または存在を検出することができる。適切な抗体を、例えば、細胞の薄層と接触させるのに続き、洗浄して、結合していない抗体を除去し、次いで、標識された二次抗体と接触させることができる。標識化は、蛍光マーカー、ペルオキシダーゼなどの酵素、アビジン、または放射性標識化によることができる。アッセイは、顕微鏡法を使用して、視覚的にスコア付けすることができ、結果は定量することができる。また、バイオマーカーについての免疫染色結果を測定するのに、機械ベースのシステムまたは自動イメージングシステムも使用することができる。

【0050】

当技術分野では、免疫組織化学検査を伴う使用に適する、多様な自動式の試料加工システム、走査システム、および解析システムが利用可能である。このようなシステムは、自動式染色 (例えば、Benchmarkシステム、Ventana Medical Systems, Inc. を参照されたい)、ならびに顕微鏡による走査、コンピュータ化された画像解析、連続切片比較 (試料の配向性およびサイズのばらつきについて制御する)、デジタル報告書の作成、ならびに試料のアーカイブ化および追跡 (組織切片を置いたスライドなど) を含む。従来光学顕微鏡を、デジタル画像加工システムと組み合わせ、免疫染色された試料を含む、細胞および組織についての定量的解析を実施する、細胞イメージングシステムが市販されている。例えば、CAS-200システム (Be

cton, Dickinson & Co.) を参照されたい。

【0051】

また、バイオマーカーに対する、標識された抗体も、イメージングの目的で、例えば、被験体の細胞におけるバイオマーカーの存在を検出するために使用することができる。適切な標識は、放射性同位元素、ヨウ素 (^{125}I 、 ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、トリチウム (^3H)、インジウム (^{112}In)、およびテクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、ならびにビオチンを含む。免疫酵素による相互作用は、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどの異なる酵素、または DAB、AEC、もしくは Fast Red などの異なる色原体を使用して視覚化することができる。標識された抗体または抗体断片は、バイオマーカーを含有する細胞の場所に優先的に蓄積される。次いで、標識された抗体またはそのバリエーション、例えば、抗体断片は、公知の技法を使用して検出することができる。

10

【0052】

抗体は、天然であれ、合成であれ、全長であれ、その断片であれ、モノクローナルであれ、ポリクローナルであれ、検出されるバイオマーカーに、十分に強く、かつ、特異的に結合する、任意の抗体を含む。抗体の K_d は、最大でも約 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、および 10^{-12}M でありうる。「 \sim に特異的に結合する」という語句は、例えば、抗体の、エピトープまたは抗原または抗原決定基への結合であって、結合が、同一または同様のエピトープ、抗原、または抗原決定基による第2の調製物 (second preparation) で置き換えられるか、またはこれと競合しうるような形での結合を指す。

20

【0053】

使用しうる抗体およびその誘導体は、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、合成抗体および操作抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、霊長動物化 (CDR グラフト) 抗体、ペニヤ化抗体、または単鎖抗体、ファージ (phase) 産生抗体 (例えば、ファージディスプレイライブラリーによる) のほか、抗体の機能的結合断片を包含する。例えば、バイオマーカーまたはその部分に結合することが可能な抗体断片であって、Fv 断片、Fab 断片、Fab' 断片、および $(\text{Fab}')_2$ 断片を含むがこれらに限定されない抗体断片を使用することができる。このような断片は、酵素による切断によって作製することもでき、組換え技法により作製することもできる。市販されている BAP1 抗体の非限定的な例は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) 製の SC-8132、SC-48386、SC-13576、SC-28236、SC-8133、および SC-28383、Abcam (Cambridge, England) 製の Ab167250、ならびに、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 製の HPA028814 を含む。市販されている EZH2 抗体の非限定的な例は、Active Motif (Carlsbad, CA) 製の型番 39933、39875、および 39901、Millipore (Billerica, MA) 製の 07-689、ならびに、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) 製の PA1-46476 および PA5-24594 を含む。市販されている SUZ12 抗体の非限定的な例は、Abcam 製の Ab12073 を含む。市販されている L3MBTL2 抗体の非限定的な例は、Active Motif 製の 39569 を含む。

30

40

【0054】

ある特定の非限定的な実施形態では、抗体以外のポリペプチドに特異的に結合する、ペプチドなどの作用物質 (agent) を使用する。特異的に結合するペプチドは、当技術分野で公知の任意の手段、例えば、ペプチドファージディスプレイライブラリーにより同定することができる。一般に、バイオマーカーの存在を検出および/または定量するように、バイオマーカーポリペプチドを検出することが可能な作用物質を使用することができる。本明細書で規定される通り、「作用物質」とは、生体試料中のバイオマーカーを同定または検出することが可能な (例えば、バイオマーカーの mRNA、バイオマーカーの DNA

50

、バイオマーカーのタンパク質を同定または検出する)物質を指す。

【0055】

加えて、バイオマーカーは、MALDI/TOF(飛行時間)、SELDI/TOF、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)、ガスクロマトグラフィー-質量分析(GC-MS)、高速液体クロマトグラフィー-質量分析(HPLC-MS)、キャピラリー電気泳動-質量分析、核磁気共鳴分析法、またはタンデム質量分析(例えば、MS/MS、MS/MS/MS、ESI-MS/MSなど)などの質量分析を使用して検出することができる。例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許出願第2003/0199001号、同第2003/0134304号、同第2003/0077616号を参照されたい。

10

【0056】

当技術分野では、質量分析方法が周知であり、タンパク質などの生体分子を定量および/または同定するのに使用されている(例えば、Liら(2000年)、Tibtech、18巻:151~160頁;Rowleyら(2000年)、Methods、20巻:383~397頁;ならびにKusterおよびMann(1998年)、Curr. Opin. Structural Biol.、8巻:393~400頁を参照されたい)。さらに、単離されたタンパク質の少なくとも部分的なデノボシーケンシングを可能とする質量分析技法も開発されている。Chaitら、Science、262巻:89~92頁(1993年);Keoughら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、96巻:7131~6頁(1999年);Bergman、EXS、88巻:133~44頁(2000年)において概説されている。

20

【0057】

バイオマーカーまたは他の物質の存在の検出は、シグナル強度の検出を伴うことが典型的である。シグナル強度の検出は、ひいては、基材に結合するポリペプチドの量および特徴を反映しうる。例えば、ある特定の実施形態では、第1の試料のスペクトルによるピーク値のシグナル強度と、第2の試料のスペクトルによるピーク値のシグナル強度とを比較して(例えば、視覚的に、またはコンピュータ解析により)、特定のバイオマーカーの相対量を決定することができる。Biomarker Wizardプログラム(Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, Calif.)などのソフトウェアプログラムを使用して、質量スペクトルを解析する一助とすることができる。

30

【0058】

試料中の核酸バイオマーカーおよび/またはタンパク質バイオマーカーの発現を決定するためのさらなる方法は、例えば、それらの全てが参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第6,271,002号;米国特許第6,218,122号;米国特許第6,218,114号;および米国特許第6,004,755号;ならびにWangら、J. Clin. Oncol.、22巻(9号):1564~1671頁(2004年);およびSchenら、Science、270巻:467~470頁(1995年)において記載されている。

【0059】

5.5 使用方法

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、EZH2阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるのかどうかを決定する方法であって、BAP1バイオマーカー、例えば、BAP1核酸バイオマーカーおよび/またはBAP1タンパク質バイオマーカーの存在、非存在、および/または発現レベルを決定するステップを含む方法を提供する。BAP1バイオマーカーの存在、非存在、および/または発現レベルを決定するための方法は、上記の5.4節に示されている。処置に適するがんは、上記の5.3節に記載されている。EZH2阻害剤は、上記の5.2節に記載されている。

40

【0060】

ある特定の実施形態では、本開示は、がんにおいて抗がん効果を生じさせる方法であって、がんの細胞が、BAP1バイオマーカーを含有するのかどうかを決定するステップを

50

含み、BAP1バイオマーカが、がんにおいて非存在であり、そして/または基準対照レベルと比較して低レベルで発現する場合、抗がん効果を生じさせるための治療有効量のEZH2阻害剤を投与する方法を提示する。代替的に、BAP1バイオマーカが、基準対照レベルと比べて、同レベルまたは高レベルで発現することが見出される場合、EZH2阻害剤ではない作用物質による代替的治療を施す。

【0061】

「治療有効量」とは、抗がん効果、生存の延長、および/または再発までの期間の延長のうちの1または複数達成することが可能な量を指す。

【0062】

「抗がん効果」とは、がん細胞凝集塊の低減、がん細胞成長速度の低減、がん細胞増殖の低減、腫瘍塊の低減、腫瘍体積の低減、腫瘍細胞増殖の低減、腫瘍成長速度の低減、および/または腫瘍転移の低減のうちの1または複数指す。ある特定の実施形態では、抗がん効果は、がんを有すると診断された患者における、完全寛解、部分寛解、安定な疾患（進行または再発を伴わない）、後の再発を伴う寛解、または無進行生存を指すことができる。

10

【0063】

ある特定の実施形態では、本開示は、がんにおいて抗がん効果を生じさせる方法であって、がんの1または複数の細胞におけるBAP1バイオマーカの発現レベルを決定するステップを含み、BAP1タンパク質バイオマーカが、細胞において非存在であり、そして/または基準対照レベルと比較して低レベルで発現する場合、抗がん効果を生じさせるための治療有効量のEZH2阻害剤を投与する方法を提供する。ある特定の実施形態では、基準対照とは、正常細胞、例えば、がん隣接して位置する良性細胞におけるBAP1のレベルである。

20

【0064】

ある特定の非限定的な実施形態では、がん試料中および/または基準対照試料中のBAP1のレベルは、両方の試料中に存在する核酸および/またはタンパク質、例えば、ハウスキーピング遺伝子および/またはハウスキーピングタンパク質など、比較を可能とする基準タンパク質または基準核酸に対して正規化することができる。例えば、限定を目的とするものではないが、基準タンパク質または基準核酸は、アクチンまたはチューブリンでありうる。

30

【0065】

ある特定の非限定的な実施形態では、本開示は、EZH2阻害剤に対する、患者におけるがんの感受性を予測する方法であって、患者からがんの試料を得るステップと、試料を含む細胞におけるBAP1タンパク質バイオマーカの発現レベルを決定するステップとを含み、BAP1タンパク質バイオマーカが、非存在であるか、または基準対照レベルと比較して発現が低減される場合、がんは、EZH2阻害剤に対して感受性であることが予測される方法を提示する。ある特定の実施形態では、患者のがんが、EZH2阻害剤に対して感受性であることが予測される場合、患者はEZH2阻害剤で処置することができる。ある特定の実施形態では、患者のがんが、EZH2阻害剤に対して感受性でないことが予測される場合、患者はEZH2阻害剤ではない作用物質で処置することができる。

40

【0066】

ある特定の非限定的な実施形態では、本開示は、がんを有する被験体を処置するための方法を提示する。例えば、限定を目的とするものではないが、方法は、被験体からがんの試料を得るステップと、試料中において、BAP1バイオマーカの発現レベルを決定するステップとを含み、BAP1バイオマーカが非存在であるか、またはBAP1の基準対照レベルより低レベルで発現する場合、治療有効量のEZH2阻害剤による被験体の処置を開始する。代替的に、BAP1バイオマーカが、基準対照レベルと比べて、同レベルまたは高レベルで発現することが見出される場合、被験体はEZH2阻害剤ではない作用物質で処置することができる。

【0067】

50

ある特定の実施形態では、本発明の方法はさらに、試料中のEZH2、L3MBTL2、および/またはSUZ12の発現レベルを検出するステップも含みうる。例えば、限定を目的とするものではないが、EZH2、L3MBTL2、および/またはSUZ12の、mRNAおよび/またはタンパク質の発現レベルを検出することができる。ある特定の実施形態では、がんを有する被験体を処置するための方法は、被験体からがんの試料を得るステップと、試料中において、BAP1バイオマーカーの発現レベル、ならびにEZH2、L3MBTL2、および/もしくはSUZ12の発現レベルを決定するステップとを含み、BAP1バイオマーカーが非存在であるか、またはBAP1の基準対照レベルより低レベルで発現し、EZH2および/またはSUZ12の発現が、EZH2および/またはSUZ12の基準対照レベルと比較して増大する(かつ/またはL3MBTL2の発現が、L3MBTL2の基準対照レベルと比較して減少する)場合、治療有効量のEZH2阻害剤による被験体の処置を開始する。ある特定の実施形態では、試料は、EZH2阻害剤による処置の前および後において回収することができ、試料のEZH2の発現レベルを比較することができる。

10

【0068】

ある特定の非限定的な実施形態では、試料は、培養物における細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生物学的流体(例えば、血液、血漿、血清、糞便、尿、リンパ液、腹水、乳管洗浄液、乳首吸引物、唾液、気管支肺胞洗浄液、涙液、および脳脊髄液)、および組織試料を含むがこれらに限定されない。試料の供給源は、固形組織(例えば、新鮮な臓器、凍結された臓器、および/もしくは保存された臓器、または腫瘍試料、組織試料、生検、もしくは吸引物由来)、血液もしくは任意の血液成分、体液(例えば、尿、リンパ、脳脊髄液、羊水、腹水、または間質液など)、または個体に由来する細胞であって、循環腫瘍細胞を含む細胞でありうる。ある特定の非限定的な実施形態では、試料を、腫瘍から得る。ある特定の実施形態では、試料は、患者に由来する試料である「臨床試料」でありうる。

20

【0069】

5.6 キット

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、EZH2阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるのかどうかを決定するためのキットであって、前節で示した、BAP1バイオマーカーを検出するための手段を含むキットを提供する。前記キットはさらに、EZH2阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるのかどうかを決定するキットの使用について記載する指示もしくは支援材料、および/またはこれについて記載するウェブサイトもしくは刊行物への参照も含みうる。

30

【0070】

キットの種類は、パッケージングされたバイオマーカー特異的プローブおよびプライマーのセット(例えば、TaqManプローブ/プライマーセット)、アレイ/マイクロアレイ、バイオマーカー特異的抗体、バイオマーカー特異的ビーズを含むがこれらに限定されず、これらは、本発明の1または複数のバイオマーカーを検出するための1または複数のプローブ、プライマー、または他の試薬をさらに含有する。

40

【0071】

ある特定の非限定的な実施形態では、本発明は、EZH2阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるのかどうかを決定するためのキットであって、BAP1核酸バイオマーカーの存在を検出するための手段を含むキットを提供する。

【0072】

具体的で非限定的な実施形態では、キットは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または核酸シーケンシングに適するオリゴヌクレオチドプライマー対であって、同定される核酸バイオマーカー(複数可)を検出するためのオリゴヌクレオチドプライマー対を含みうる。プライマー対は、上記で示したバイオマーカーと相補的なヌクレオチド配列を含むことが可能であり、前記バイオマーカーと選択的にハイブリダイズするのに十分な長さでありうる。代替的に、相補的なヌクレオチドは、十分に近接した特異的領域であって、P C

50

R および / またはシーケンシングを実施するバイオマーカー位置に対して 5' 側および / または 3' 側の領域へと選択的にハイブリダイズしうる。複数のバイオマーカー特異的プライマーをキットに含めて、1つを超えるバイオマーカーを同時に検出することができる。キットはまた、1または複数のポリメラーゼ、逆転写酵素、およびヌクレオチド塩基も含むことが可能であり、この場合、ヌクレオチド塩基は、さらに検出可能に標識することもできる。

【0073】

ある特定の非限定的な実施形態では、プライマーは、少なくとも約 10ヌクレオチド、もしくは少なくとも約 15ヌクレオチド、もしくは少なくとも約 20ヌクレオチドの長さ、および / または最大で約 200ヌクレオチド、もしくは最大で約 150ヌクレオチド、もしくは最大で約 100ヌクレオチド、もしくは最大で約 75ヌクレオチド、もしくは最大で約 50ヌクレオチドの長さでありうる。プライマーの非限定的な例は、表 1 に提示する。例えば、限定を目的とするものではないが、本開示のプライマーは、表 1 に開示される配列のうちの 1 または複数を含みうる。

10

【0074】

さらなる非限定的な実施形態では、オリゴヌクレオチドプライマーを、固体表面上、基材上、または支持体上、例えば、核酸マイクロアレイ上に固定化することができ、この場合、固体表面または支持体へと結合させた各オリゴヌクレオチドプライマーの位置は、既知であり、同定可能である。オリゴヌクレオチドは、ガラス、プラスチック、紙、ナイロン、もしくは他の種類の膜、フィルター、チップ、ビーズ、または他の任意の適切な固体支持体などの基材へと固定することができる。ポリヌクレオチドは、基材上で直接合成することもでき、基材から離れて合成し、次いで、基材へと固定することもできる。アレイは、公知の方法を使用して調製する。

20

【0075】

具体的で非限定的な実施形態では、キットは、*in situ* ハイブリダイゼーションまたは蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションに適する、少なくとも 1つの核酸プローブであって、同定されるバイオマーカー（複数可）を検出するための核酸プローブを含みうる。このようなキットは一般に、多様なバイオマーカーに対する特異性を有する、1または複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む。複数のバイオマーカーを試験するための手段も、任意選択で、単一のキットに含めることができる。

30

【0076】

ある特定の実施形態では、キットは、各々が、方法において活用される多様な試薬（典型的には、富化形態にある）であって、例えば、あらかじめ製作されたマイクロアレイ、バッファ、適切なヌクレオチド三リン酸（例えば、dATP、dCTP、dGTP、および dTTP、または rATP、rCTP、rGTP、および UTP）、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、ならびに本発明の 1 または複数のプローブおよびプライマー（例えば、RNAポリメラーゼと反応性のプロモーターへと連結された、適切な長さの poly(T) またはランダムプライマー）を含む試薬のうちの 1 または複数を含む容器（方法の自動化された実装における使用に適するマイクロリッタープレート（microliter plate）を含む）を含みうる。

40

【0077】

非限定的な実施形態では、本発明は、EZH2阻害剤により、がんにおいて、抗がん効果が生じる可能性があるのかどうかを決定するためのキットであって、BAP1タンパク質バイオマーカーのレベルを検出するための手段を含むキットを提供する。

【0078】

非限定的な実施形態では、キットは、同定されるバイオマーカー（複数可）の免疫検出のための、少なくとも 1つの抗体またはその抗原結合性断片を含みうる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方であって、バイオマーカーに特異的な抗体は、当業者に一般に公知である、従来免疫技法を使用して調製することができる。キットの免疫検出試薬は、所与の抗体自体または抗原自体と会合させるか、またはこれらへと連結され

50

た、検出用標識を含みうる。このような検出用標識は、例えば、化学発光分子または蛍光分子（ローダミン、フルオレセイン、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、Cy3、Cy5、またはROX）、放射性標識（ ^3H 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、または ^{131}I ）、または酵素（アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）を含む。

【0079】

さらなる非限定的な実施形態では、カラムマトリックス、アレイまたはマイクロタイタープレートのウェルなどの固体支持体へと結合させた、1または複数のバイオマーカー特異的抗体も提供することができる。代替的に、支持体は、キットの別個のエLEMENTとして提供することもできる。

【0080】

キットにおける測定手段が、アレイを援用する、ある特定の非限定的な実施形態では、上記で示したバイオマーカーのセットは、マイクロアレイ上で表されるバイオマーカーの種のうちの少なくとも10パーセント、または少なくとも20パーセント、または少なくとも30パーセント、または少なくとも40パーセント、または少なくとも50パーセント、または少なくとも60パーセント、または少なくとも70パーセント、または少なくとも80パーセントを構成しうる。

【0081】

ある特定の非限定的な実施形態では、本開示のキットは、試料中のEZH2の発現レベルを検出するための1もしくは複数のプローブ、プライマー、抗体、または他の検出試薬を含有しうる。例えば、キットは、生体試料中のEZH2のタンパク質発現レベルを検出するための抗体またはその断片を含有しうる。

【0082】

ある特定の非限定的な実施形態では、本開示のキットは、試料におけるSUZ12の発現レベルを検出するための1もしくは複数のプローブ、プライマー、抗体、または他の検出試薬を含有しうる。例えば、キットは、生体試料におけるSUZ12のタンパク質発現レベルを検出するための抗体またはその断片を含有しうる。

【0083】

ある特定の非限定的な実施形態では、本開示のキットは、試料におけるL3MBTL2の発現レベルを検出するための1もしくは複数のプローブ、プライマー、抗体、または他の検出試薬を含有しうる。例えば、キットは、生体試料におけるL3MBTL2のタンパク質発現レベルを検出するための抗体またはその断片を含有しうる。

【0084】

キットはさらに、がん試料中のバイオマーカーレベルと、基準対照試料中のバイオマーカーレベルとの間の比較を可能とするための手段も含有しうる。例えば、限定を目的とするものではないが、本開示のキットは、試料からの1または複数のバイオマーカーの発現レベルを正規化して、比較を可能とするのに使用しうる、基準タンパク質または基準mRNAを検出するための1もしくは複数のプローブ、プライマー、抗体、または他の検出試薬を含有しうる。基準タンパク質、例えば、ハウスキーピングタンパク質の非限定的な例は、アルファ-チューブリンまたはベータ-チューブリン、アクチン、コフィリン、ピンクリン、およびGADPHを含む。

【0085】

ある特定の非限定的な実施形態では、キットはさらに、キットを使用して、目的のバイオマーカーを検出するための指示も含みうる。例えば、指示は、本明細書で示されるBAP1バイオマーカーが、患者に由来するがん試料中に非存在であり、そして/または基準対照レベルと比較して発現が低度であることが、EZH2阻害剤によりがんにおいて抗がん効果を生じさせる見込みの増大を示すことについて記載しうる。

【0086】

ある特定の非限定的な実施形態では、本開示のキットはさらに、1または複数のEZH2阻害剤も含みうる。EZH2阻害剤の非限定的な例は、5.2節で開示されている。

【0087】

10

20

30

40

50

以下の実施例は、本開示をより完全に例示するために提示されるものであり、その範囲を限定するものとしてはみなされないものとする。

【実施例】

【0088】

6. 実施例1: *in vitro*において、BAP1の喪失は、EZH2の発現および活性の増大を結果としてもたらず

【0089】

本実施例では、BAP1活性の喪失が、疾患状態を結果としてもたらず機構について、*in vitro*において調査した。

【0090】

6.1. 結果

SET2細胞に、BAP1をターゲティングするshRNAを形質導入して、*in vitro*におけるBAP1の発現を低減した。ウェスタンブロットにより検証されるBAP1の発現の低減は、K27におけるヒストン3のトリメチル化(H3K27me3)の増大を結果としてもたらした(図1)。また、図9Aも参照されたい。BaF3細胞におけるBAP1タンパク質の発現を枯渇させ、BAP1の喪失は、ウェスタンブロットにより確認し、ヒストンについての質量分析を実施した。BaF3細胞におけるBAP1のノックダウンは、H3K27me3の増大を明らかにした(図1)。

【0091】

BAP1は、悪性中皮腫内およびブドウ膜黒色腫内など、充実性腫瘍において高度に変異することが示されている(Carboneら、2012年)。BAP1における変異、例えば、H28ホモ接合性欠失、H2452ホモ接合性ミスセンス、およびH226欠失変異を有する中皮腫細胞では、EZH2の発現の、野生型BAP1活性を有する細胞と比較した上方調節が観察された(図2)。さらに、*in vitro*において、293T細胞におけるBAP1の過剰発現が、EZH2およびSUZ12の発現の低減を結果としてもたらしたのに対し、BAP1の発現の喪失は、SUZ12の発現の上方調節を結果としてもたらした(図3)。

【0092】

6.2. 考察

上記で記載した通り、BAP1タンパク質の発現の喪失は、EZH2により付与される抑制性クロマチンマークであるH3K27me3の増大を引き起こし、*in vitro*のがん細胞系のシステムにおけるEZH2およびSUZ12の発現を増大させた。EZH2阻害剤は現在、EZH2活性化変異を有するリンパ腫患者において、臨床試験にかけられている。したがって、BAP1変異状態は、EZH2阻害剤による処置に応答しうる患者を同定する一助となる可能性があり、これは、BAP1変異体患者における生存を延長するのに有効でありうる。

【0093】

7. 実施例2: *in vivo*において、BAP1の喪失は、EZH2の発現および活性の増大を結果としてもたらず

【0094】

7.1 方法および材料

プライマー:

10

20

30

40

【表 1 - 1】

表 1

遺伝子	遺伝子型決定プライマー(マウス)
<i>Bap1</i> up	ACTGCAGCAATGTGGATCTG (配列番号 1)
<i>Bap1</i> down	GAAAAGGTCTGACCCAGATCA (配列番号 2)
<i>Bap1</i> flox F	GCGCAACGCAATTAATGATA (配列番号 3)
<i>Bap1</i> flox R	CAGTGTCCAGAATGGCTCAA (配列番号 4)

10

遺伝子	変異誘発プライマー(ヒト)
<i>BAP1 C91A</i> センス	CCACCAGCTGATACCCAACCTCTGCTGCAACTCATGC (配列番号 5)
<i>BAP1 C91A</i> アンチセンス	GCATGAGTTGCAGCAGAGTTGGGTATCAGCTGGTGG (配列番号 6)

20

遺伝子	マウス qPCR プライマー
<i>Ezh2</i> F	AGCACAAGTCATCCCGTTAAAG (配列番号 7)
<i>Ezh2</i> R	AATTCTGTTGTAAGGGCGACC (配列番号 8)
<i>Suz12</i> F	GGCTGACCACGAGCTTTTC (配列番号 9)
<i>Suz12</i> R	TGGTGCGATAAGATTTTCGAGTTC (配列番号 10)
<i>Bap1</i> F	GTTGGTGGATGACACGTCTG (配列番号 11)
<i>Bap1</i> R	CTCAGGACTGAAGCCTTTGG (配列番号 12)
<i>アクチンB</i> F	GATCTGGCACCACACCTTCT (配列番号 13)
<i>アクチンB</i> R	CCATCACAATGCCTGTGGTA (配列番号 14)
<i>HoxA5</i> F	GCTCAGCCCCAGATCTACC (配列番号 15)
<i>HoxA5</i> R	GGCATGAGCTATTTTCGATCC (配列番号 16)
<i>HoxA6</i> F	CCCTGTTTACCCCTGGATG (配列番号 17)
<i>HoxA6</i> R	ACCGACCGGAAGTACACAAG (配列番号 18)
<i>HoxA8</i> F	CTTCTCCAGTTCCAGCGTCT (配列番号 19)
<i>HoxA8</i> R	AGGTAGCGGTTGAAATGGAA (配列番号 20)
<i>HoxA9</i> F	ATGCTTGTGGTTCTCCTCCA (配列番号 21)
<i>HoxA9</i> R	GTTCCAGCGTCTGGTGT TTT (配列番号 22)

30

40

【表 1 - 2】

遺伝子	ヒト qPCR プライマー
<i>E-CAD F</i>	GACCGGTGCAATCTTCAAA (配列番号 23)
<i>E-CAD R</i>	TTGACGCCGAGAGCTACAC (配列番号 24)
<i>HPRT F</i>	CATTATGCCGAGGATTTGG (配列番号 25)
<i>HPRT R</i>	GCAAGTCTTTCAGTCCTGT (配列番号 26)
<i>BAP1 F</i>	CGATCCATTTGAACAGGAAGA (配列番号 27)
<i>BAP1 R</i>	CTCGTGGAAGATTTTCGGTGT (配列番号 28)

10

遺伝子	ChIP qPCR プライマー(ヒト)
<i>EZH2-1 F</i>	AGCTGACTCAAGCTGCTTGT (配列番号 29)
<i>EZH2-1 R</i>	CAGGAAACCTGAGATTTTCA (配列番号 30)
<i>EZH2-2 F</i>	CTCAGGACAG TTCTGTTTGG (配列番号 31)
<i>EZH2-2 R</i>	TCTGACTTAGTTGGAGAACT (配列番号 32)
<i>SUZ12-1 R</i>	TGAATACAGATGCAGTTATAAGAGAGA (配列番号 33)
<i>MORC3 F</i>	CATCTTCCCCAAGCTCCCAAT (配列番号 34)
<i>MORC3 R</i>	GAGCGAGCTACAAAGCCAGGA (配列番号 35)
<i>E2F6 F</i>	CCTGTTCCCTTCCTCTGGAA (配列番号 36)
<i>E2F6 R</i>	CGACGCAGACGGAAAAAGAG (配列番号 37)
<i>PHF20 F</i>	TGAGTGGGGACTTCGTGTTC (配列番号 38)
<i>PHF20 R</i>	GACCAACCGACAGAAGGACT (配列番号 39)
<i>JAM2 F</i>	TCCACCCCTAGGCTGAAAAG (配列番号 40)
<i>JAM2 R</i>	GATCGGCTTTGTGTCTGGTC (配列番号 41)

20

30

【0095】

動物：全ての動物は、Memorial Sloan Kettering Cancer Centerにおいて飼育した。全ての動物手順は、The Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animalsに従い遂行され、Memorial Sloan Kettering Cancer CenterにおけるThe Institutional Animal Care and Use Committeesにより承認された。

40

【0096】

Bap1欠損マウスおよびBap1/Ezh2欠損マウスの作製：Bap1のエクソン6~12をターゲティングする胚性幹細胞は、The European Conditional Mouse Consortiumから得た。lacZおよびネオマイシンカセットを含有する、Frtで挟まれた未成熟停止カセットを上流に挿入した。ES細胞

50

クローンを拡大し、初代胚盤胞へと注入した。作製されたマウスを、生殖細胞系列Flpディリター (deleter) (The Jackson Laboratory) と交配させて、Frtで挟まれたカセットを切り出した。その後、これらのマウスを、IFN-誘導Mx1-creトランスジェニックマウス (The Jackson Laboratory) と交配させて、造血系におけるBap1の誘導的喪失の効果を評価した。Bap1 fl/fl、Bap1 fl/+、およびBap1 +/+ の同腹マウスを、プライマーである、BAP1-up (actgcagcaatgtggatctg (配列番号1))、BAP1-down (gaaaaggctctgacccagatca (配列番号2)) を用いるPCRであって、以下のパラメータ：95 で10分間に続き、94 で10秒間、65 で40秒間、および72 で1分間にわたる40サイクルに次いで、72 で5分間を使用するPCRにより遺伝子型決定した。WT対立遺伝子が、300bpで検出されたのに対し、fllox化された対立遺伝子は、500bpのPCRで検出された。IFN-誘導後の切出しは、fllox化され、切り出されるバンドを検出するプライマー：BAP1-F (actgcagcaatgtggatctg (配列番号1))、BAP1-F2 (gcgcaacgcaatata (配列番号3))、およびBAP1-R (cagtgtccagaatggctcaa (配列番号4)) を有するPCRであって、上記で列挙した同じPCRパラメータを使用するPCRにより確認した。Mx1-Cre-Bap1 fl/flマウスを、Ezh2 fl/flマウスと交配させた。Mx1-Cre-Bap1 fl/fl条件付きマウスおよびBap1 fl/fl対照マウスに、1mg/mLのpolyI:polyC溶液、200μLの、4回にわたる腹腔内注射を施した。切出しの2週間後において、ヘパリン処理されたマイクロヘマトクリット (microhematocrit) 毛細管 (Thermo Fisher Scientific) を使用する眼窩後方採血を介して、末梢血を回収した。切出しを確認し、標準的な製造元の指示に従い、HemaVetを使用して、末梢血カウントを得た。ホルマリンで固定したパラフィン包埋組織切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で染色した。Bap1の欠失は、ゲノム切出しPCRおよびウェスタンブロット解析により確認した。尾部は、fllox化され、切り出された、Ezh2対立遺伝子についての、qPCRベースの遺伝子型決定のために、Transnetyx遺伝子型決定サービス (Cordova, TN) に出した。切出しは、ウェスタンブロットにより確認した。

【0097】

異種移植片およびin vivoにおけるEPZ011989の投与：10週齢のNOD-SCIDマウスの群の脇腹に、マトリゲルと培地との1:1混合物における中皮腫細胞系 (MSTO-211H、Mes010、H226、およびH2452) $6 \sim 10 \times 10^6$ 個を皮下注射した。腫瘍が、およそ60~80mm³のサイズに達したところで、媒体 (水中に0.5%のNaCMC+0.1%のTween-80) またはEPZ011989による処置を開始した。EPZ011989または媒体は、1日2回、500mg/kgの濃度で、実験期間にわたり、経口で施した。腫瘍体積は、キャリパーを使用して、3つの寸法で評価した。処置に続き、腫瘍または肺組織を抽出し、ウェスタンブロット法を利用して標的の阻害を評価した。植込みの後で腫瘍が形成されなかった場合 (同じ群からの植込みを受けた動物の平均値より75%小さい場合)、異種移植片実験においてマウスを除外するように、あらかじめ確立された基準を作成した。薬物試験からは、動物を除外しなかった。全ての異種移植片薬物研究では、腫瘍サイズを10日間にわたり追跡し、この時点で、マウスを、腫瘍サイズについて無作為化した。Bap1遺伝子KO EPZ011989試験は、polyI:polyCの3週間後におけるCBC解析を活用する無作為化により行い、WBCカウントの平均が、媒体群および処置群の両方において同等であることを確認した。1群当たり動物5匹ずつを、媒体 (上記で記載した) または500mg/kgのEPZ011989で、1日2回16日間にわたり経口処置した。これらの実験では、試験実施者を盲検としなかった。

【0098】

組織学的解析：マウスを屠殺し、剖検し、次いで、切除された組織試料を、4%のバラ

ホルムアルデヒドで24時間にわたり固定し、脱水し、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックを、4 μmに切片化し、H&E、Ki67、Eカドヘリン、またはTUNELで染色した。Axio Observer A1顕微鏡(Carl Zeiss)を使用して、画像を収集した。

【0099】

細胞培養物：293T細胞を、10%のウシ胎仔血清(FBS)および非必須アミノ酸を補充した、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で培養した。ヒト白血病細胞系(SET2)およびヒト中皮腫細胞系(JMN、Met5a、MSTO-211H、H2373、H226、H2452)を、10%のFBSを補充した、RPMI-1640培地中で培養した。MSTO-211Hは、ATCCから得たが、残りの中皮腫系は、Prasad Adusumilli氏から恵与された。

10

【0100】

RNAの単離、SMARTer増幅、Proton Transcriptomeシーケンシング、および解析：FACS Ariaを使用して、骨髄細胞を、GMP(Lin⁻c-Kit⁺Sca1⁻CD34⁺Fc⁺)について、FACS分取した。細胞200,000~500,000個からの総RNAは、TRIzol RNA単離試薬(型番15596-026、Life Technologies)を使用して抽出した。RNAの品質は、増幅の前に、RNA 6000 picoキットおよびbioAnalyzer(Agilent)を使用して、各試料20~50pgずつを解析することにより確認した。その後、製造元により提供される指示に従い、SMARTER(登録商標)Universal Low Input RNA Kit for Sequencing(Clontech Laboratory、型番634940)を使用して、10ngの高品質(RIN>8)総RNAを増幅した。増幅された材料を、16サイクルのPCRを用いるIon Total RNA-Seq Kit v2プロトコール(Life Technologies)に従い、全トランスクリプトームライブラリーの調製にかけた。試料をバーコード処理し、イオンワンタッチシステムIIおよびION PI(商標)Template OT2 200kit v2 Kit(Life Technologies)を使用して、template-positive ION PI(商標)ION SPHERE(商標)Particle(ISP)を調製した。200bpのバージョン2化学反応を使用して富化された粒子を、Protonシーケンシングシステム上で配列決定した。試料1例当たりの平均7000万~8000万リードを生成し、リードのうちの76~82%を、mRNAの塩基へとマッピングした。PICARD Sam2Fastqを使用して、BAMによるRAW出力を変換して、FASTQへと戻した。次いで、rnaStarを使用して、リードをまず、マウスゲノムへとマッピングした。使用されるゲノムは、ENSEMBL(Mus__musculus.NCBIM37.67)由来のジャンクションおよび、49のリード突出(read overhang)を有する、MM9であった。次いで、BWA MEM(バージョン0.7.5a)を使用して、任意のマッピングされなかったリードを、MM9へとマッピングした。次いで、2つのマッピングされたBAMをマージし、ソートし、htseq-count(-sオプションをyとし、-mオプションをintersection-strictとする)および同じ遺伝子モデル(Mus__musculus.NCBIM37.67)を使用して、遺伝子レベルカウントを計算した。生データを、以下の受託番号：GSE61360で、GEOデータベースへとアップロードした。

20

30

40

【0101】

ヒストンの抽出、ヒストンについてのELISA、ヒストンについてのウェスタンブロット、およびヒストンについてのLC/MS：ヒストンを、標準的な抽出技法により、または、Active Motif Histone Extract Minikit(40026)を使用して、一晚にわたり抽出した。ヒストンについてのELISAは、H3K27me3標準曲線および総H3タンパク質に対して正規化された、トリメチルK27 Elisa Kit(Active Motif、53106)を使用して行

50

った。ヒストンについてのウェスタンブロットは、3 ~ 5 μ g のヒストンを用いて行った。ヒストンについての LC / MS では、既に記載されている通り 26、対照細胞および Bap1 KO 細胞 1200 万個を溶解させ、核を単離し、0.4 N の H₂SO₄ を使用して、ヒストンを抽出し、無水プロピオン酸を使用して、化学的に誘導体化した。次いで、ヒストンを、トリプシンで消化し、TSQ Quantum Ultra 質量分析計へとカップリングさせた、ナノ液体クロマトグラフィー（内径 75 μ m、長さ 15 cm、MagiC18aq media を充填、dp 3 μ m）で分離した。データは、Skyline 2.7 で解析し、相対的定量は、ピーク面積により実施した。

【0102】

クロマチンの調製および免疫沈降、ChIP Library の調製およびシーケンシング、ならびに ChIP - Seq データの解析：EasySep Mouse Hematopoietic cell Enrichment Kit (Stem Cell Technologies、19756) を使用して、骨髄細胞を、c-Kit⁺ 細胞について富化した。細胞 5×10^6 個を、1% のメタノール非含有ホルムアルデヒド溶液で固定し、次いで、SDS 溶解緩衝液中に再懸濁させた。溶解物を、E220 focused-ultrasonicator (Covaris) で超音波処理して、100 ~ 500 塩基対の所望の断片サイズ分布とした。既に記載されている (Krivtsov ら、2008 年) 通り、細胞およそ 400,000 個に対して、抗トリメチル H3K27 (Cell Signaling、9733)、抗モノメチル H4K20 (Abcam、9051)、および IgG (Santa Cruz、2027) の各々を使用して、IP 反応を実施した。ChIP アッセイは、別の場所で記載されている (O'Geen ら、2011 年) 通り、Direct ChIP プロトコルを使用して、SX-8G IP-STAR Compact Automated System (Diagenode) 上で処理した。次いで、溶出させたクロマチン断片を脱架橋し、Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter) を使用して、DNA 断片を精製した。

【0103】

製造元の指示に従い、NEB Next ChIP - Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina (New England Biolabs) および TruSeq Adaptors (Illumina) を、SX-8G IP-STAR Compact Automated System (Diagenode) 上で使用して、バーコード処理されたライブラリーを、ChIP により富化されインプットされた DNA から調製した。Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) および TruSeq PCR Primers (Illumina) を使用して、ライブラリーを増幅し、次いで、AMPure XP ビーズを使用して精製し、アダプター二量体を除去して、HiSeq 2000 (Illumina) 上でマルチプレックス化した。

【0104】

デフォルトパラメータを使用する bowtie2 により、マウスアセンブリ mm9 にアラインする前に、「trim_galore」を使用して、リードを、品質トリミングおよびアダプタートリミングした。その後の解析の前に、アラインされたリードであって、開始位置および配向性が同じリードを、単一のリードへとまとめた。各リードを、平均ライブラリー断片サイズまで伸長させ、次いで、BEDTools スーツを使用して密度を計算することにより、密度プロファイルを作製した。富化された領域は、デフォルトパラメータによる MACS 1.4 を使用して発見し、マッチさせたインプットライブラリーに対してスコア付けした。全てのゲノムブラウザートラックおよび読み取り密度表は、配列決定深度に対して正規化した。対照条件における ChIP - seq 試料と KO 条件における ChIP - seq 試料とを比較するため、マン - ホイットニーの U 検定または t 検定を使用して、条件当たり 3 回反復のシグナルについて調べた。クラスター解析は、正規化されたカウントデータについて、kmeans クラスターリングパッケージを伴う Matlab により実施した。モチーフ解析は、Homer により、findMotifsGen

10

20

30

40

50

omeプログラムにデフォルトパラメータを使用して実施した。

【0105】

ウェスタンブロットおよび免疫沈降：ウェスタンブロットおよび免疫沈降実験のために、細胞を、以下の緩衝液：150mMのNaCl、20mMのトリス(pH7.4)、5mMのEDTA、1%のTriton、プロテアーゼアレスト(EMD)、およびホスファターゼ阻害剤(Calbiochem)中に溶解させた。ベンゾナーゼの存在下で免疫沈降を実施するため、細胞を、BC-300緩衝液：20mMのトリス(pH7.4)、10%のグリセロール、300mMのKCl、0.1%のNP-40に溶解させた。清明化させた溶解物を、MgCl₂で処理して、2.5mMとし、ベンゾナーゼを、1250U/mLで添加した。溶解物を、回転させながら、1時間にわたりインキュベートし、5mMのEDTAを添加することにより、反応を停止させた。免疫沈降実験を始める前に、臭化エチジウムゲルにおいて溶解物を泳動させることにより、DNAの消化を確認した。使用される抗体は、BAP1(C-4; Santa Cruz sc-28383)、EZH2(Active Motif、39933、Active Motif、39901、またはMillipore、07-689)、SUZ12(Abcam、Ab12073)、ASXL1(N-13; Santa Cruz sc-85283)、L3MBTL2(Active Motif、39569)、Myc-Tag(Cell Signaling、2276)、チューブリン(Sigma、T9026)、H3K27me3(Abcam、6002またはMillipore、07-449)、H3(Abcam、Ab1791)、およびH4K20me1(Abcam、Ab9051)を含んだ。

【0106】

フローサイトメトリー解析および抗体：生きた骨髄および脾臓細胞の表面マーカー染色は、まず、塩化アンモニウム-重炭酸カリウム溶解緩衝液で細胞を溶解させ、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で細胞を洗浄することにより行った。細胞は、PBSにおける抗体により、氷上で20分間にわたり染色した。造血幹細胞および前駆細胞の染色では、細胞を、CD4(RM4-5)、CD3(17A2)、B220(RA3-6B2)、NK1.1(PK136)、Gr-1(RB6-8C5)、Cd11b(M1/70)、およびTer119を含む、系列カクテルで染色し、成熟系列の、解析からの除外を可能とした。細胞はまた、c-Kit(2B8)、Sca-1(D7)、FcRII/III(2.4G2)、およびCD34(RAM34)に対する抗体でも染色した。成熟単核細胞の組成を評価するため、Mac1、Gr-1、B220、およびCD4/CD3を使用した。細胞周期解析は、細胞を、上記で記載した造血幹細胞と前駆細胞とのミックスと共に染色することにより行った。FIX and PERMキット(Invitrogen：型番GAS-003)を使用して、細胞を固定した。固定の後、細胞を、Ki67で染色し、次いで、LSR Fortessaにおける解析の前に、DAPIで染色した。

【0107】

プラスミド：ヒトFLAG-L3MBTL2のcDNA全長クローンは、Addgene(Plasmid28232)から得た。Myc-Hisタグ付けされたユビキチン構築物は、Xuejun Jiang氏から恵与された。HA-FLAG BAP1のcDNAヒト全長クローンは、Addgene(Plasmid22539)から得た。3xFLAGタグ付けされたBAP1構築物は、Marc Ladanyi氏から恵与された。デユビキチナーゼ変異体構築物(C91A、C91S)は、Agilent部位特異的変異誘発キットを使用して作製し、全長DNAシーケンシングにより確認した。短鎖ヘアピンRNAは、RNAi Consortium(TRC)から、pLKO.1ピューロマイシンベクターの状態を得た。短鎖ヘアピンの配列は、以下の通り：ヒトBAP1(TRCオリゴID：TRCN0000078702およびTRCN0000078698)、マウスBAP1(TRCN0000030719およびTRCN0000030720)、ヒトL3MBTL2(TRCN0000021724およびTRCN0000021726)、およびルシフェラーゼ(shLUC)についてのshRNAをコードする、対照pLKO.1-ピューロマイシンベクターであった。

【0108】

ユビキチンアッセイ：HEK293T細胞を、10cmのディッシュ内に播種し、24時間後、4 μ gのMyc-His-Ubi発現構築物と、対照である、1 μ gのL3MBTL2過剰発現構築物および/または1~10 μ gのBAP1-GFP過剰発現構築物とで形質導入した。トランスフェクションの48時間後において、細胞を、グアニジンHClベースの溶解緩衝液：6Mのグアニジン、0.1MのNaH₂PO₄、10mMのトリス、pH8.0、および10mMのBMEに溶解させた。His-Ubiタンパク質は、20 μ LのNi-NTAアガロース(Qiagen)による、室温で4時間にわたるインキュベーションにより精製した。ピーズは、4つの洗浄緩衝液：緩衝液A：6Mのグアニジン、0.1MのNaH₂PO₄、10mMのトリス、pH8.0、10mMのBME、および0.2%のTriton-X、緩衝液B：8Mの尿素、0.1MのNaH₂PO₄、10mMのトリス、pH8.0、10mMのBME、および0.2%のTriton-X、緩衝液C：0.1MのNaH₂PO₄、10mMのトリス、pH6.3、10mMのBME、および0.2%のTriton-X、ならびに緩衝液D：0.1MのNaH₂PO₄、10mMのトリス、pH6.3、10mMのBME、および0.1%のTriton-X 1mLずつにより、順次洗浄した。全ての緩衝液には、15mMのイミダゾールを補充した。Hisタグ付けされたタンパク質は、イミダゾールを補充した、2倍濃度のSDS Laemmli緩衝液と共に煮沸することにより、ピーズから精製した。次いで、タンパク質を、ウェスタンブロットにより解析した。

10

【0109】

in vitroコロニー形成アッセイ：細胞を、FACS Ariaを使用して、Lin⁻c-Kit⁺Sca1⁺細胞について分取した。細胞100個を、メチルセルロース(MethoCult GF M3434, Stem Cell Technologies)中に、2つ組で蒔いた。蒔いてから14日後においてコロニーをカウントし、PBSで洗浄することにより、コロニーを回収した。次いで、RNA抽出およびヒストン抽出のために、細胞を溶解させた。

20

【0110】

一過性トランスフェクション：X-treme遺伝子トランスフェクション試薬(Roche)により、293T細胞を、表示の構築物でトランスフェクトした。トランスフェクションの48~72時間後において、タンパク質および/またはヒストンを抽出した。

30

【0111】

浸潤アッセイ：中皮腫細胞(MSTO-211H、H2373、H226、およびH2452)を、T75フラスコ内に播種した(細胞100,000個)。12時間後、蒔いた細胞を、GSK126(0~2 μ M)(Chemiteck)で処理し、次いで、7日間にわたり放置して、増殖させた。次いで、処理された細胞250,000個を、無血清培地中の、Matrigel浸潤チャンパー(BD Biosciences、型番354480)の上部に入れる一方、下層チャンパーは、血清を有する培地を含有した。22時間後、膜の底部の細胞を、クリスタルバイオレットで染色し、ImageJで定量した。

【0112】

ルシフェラーゼアッセイ：293T細胞を、EV、BAP1、およびL3MBTL2構築物に加えて、pGL3-EZH2プロモーターレポーター構築物(Naomi Goldfinger氏から恵与された)およびSwitchgear Renilla対照構築物で一過性にトランスフェクトした。Dual Luciferase Reporter Assay System(Promega)を使用して、細胞を、ルシフェラーゼ活性について評価した。細胞を、24ウェルプレートに播種し、200ngのpGL3-EZH2-ルシフェラーゼ、200ngのRenillaルシフェラーゼ対照構築物、および500ngの実験構築物で共トランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後において、細胞をインキュベートし、室温で15分間にわたり溶解させ、ルミノメーターにより、ルシフェラーゼ活性を評価した。ホタルルシフェラーゼについてのリーディングは、Renillaによるトランスフェクション対照に対して正規化した。

40

50

【0113】

統計学的解析：本文中に記載されない限りにおいて、ウェルチの補正を用いる、スチューデントの t 検定を使用して、統計学的有意性を解析した。統計学的計算のためには、Prizm GraphPadソフトウェアを使用した。誤差は、SEMを使用して計算し、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ とした。

【0114】

7.2 結果

ゲノム研究により、異なる悪性腫瘍における、腫瘍抑制因子であるASXL1およびBAP1の体細胞変異が同定された。Drosophila ASXL1の相同体であるAsxと、BAP1の相同体であるCalypsoとは、H2AK119Ubを除去する複合体を形成する(Scheuermannら、2010年)。しかし、BAP1-ASXL1複合体は、BAP1変異体の形質転換において役割を有することが示されていない。骨髄系悪性腫瘍では、ASXL1の不活化変異が最も一般的である(Abdel-Wahabら、2011年; Ejarら、2011年; Gelsi-Boyerら、2009年)のに対し、中皮腫(Bottら、2011年)、腎細胞癌(Pena-Llopisら、2012年)、および転移性ブドウ膜黒色腫(Harbourら、2010年)では、再発性のBAP1変異が一般に観察されていることから、BAP1とASXL1とは、腫瘍の抑制において、顕著に異なる役割を有することが示唆される。これらの変異的プロファイルは、BAP1とASXL1との、差次的な組織特異的発現によっては説明することができない(図5A~C)。本実施例では、BAP1の喪失が、ASXL1に依存しない形質転換をもたらす機構を同定し、BAP1変異体のがん細胞における治療的脆弱性を同定する。

【0115】

近年の研究は、Bap1の体細胞性喪失が、造血系形質転換を促進しうることを示している(Deyら、2012年)。条件付きBap1欠失の、造血細胞における遺伝子発現およびクロマチン状態に対する影響について調査した(図5A、B)。Bap1の条件付き欠失は、図5Dに示されるスキームを使用して作製した。成体動物における誘導後に、造血組織におけるBap1の欠失を駆動するリコンビナーゼである、MX-Creを使用した。Bap1の喪失は、脾腫(図6A)、白血球増加症(図5E、F)、貧血(図5G、H)、および顆粒球マクロファージ前駆細胞(GMP)の拡大(図5I~K)を伴う、完全に浸潤性の骨髄増殖性疾患をもたらした。例えば、Bap1ノックアウト(KO)マウスでは、脾臓のサイズ、例えば、重量および長さが、BAP1野生型マウスより大きいことが観察された(図6A、10C、および11C)。また、Bap1欠損骨髄系前駆細胞の増殖および細胞周期進行の増大も観察された(図5L)。RNAシーケンシング解析は、Bap1欠損GMPで差次的に発現する遺伝子の大部分で、発現が低減されることを明らかにした($p\text{-adj} < 0.001$)(図7A)。Bap1 KO前駆細胞およびAsxl1 KO前駆細胞において差次的に発現する遺伝子のセットの間では、著明な重複が観察されたが、多くの場合、遺伝子発現に対する、対向する逆の効果も観察された(図6B)。遺伝子セット富化解析(GSEA)は、Bap1 KO前駆細胞およびAsxl1 KO前駆細胞で富化される遺伝子セットであって、反対の影響を受ける遺伝子セットを同定した(Abdel-Wahabら、2013年)(図7B)。ASXL1のサイレンシングは、PRC2活性の低減と符合する、HoxAクラスター遺伝子の発現の増大をもたらした(Abdel-Wahabら、2012年)。これに対し、Bap1欠損細胞では、HoxA遺伝子メンバーの発現の低減(図6C)と、HoxA遺伝子シグネチャーの発現の減少(図7C)とが観察された。これらのデータは、Asxl1の喪失とBap1の喪失とは、遺伝子調節に対して反対の効果をもつことを裏付ける。

【0116】

ASXL1は、PRC2複合体と直接的に相互作用し、ASXL1の枯渇は、全体的かつ部位特異的にH3K27me3を低減する(Abdel-Wahabら、2012年)。Asxl1の喪失とBap1の喪失との、遺伝子発現に対する分岐効果を踏まえ、Bap1の欠失の、H3K27me3に対する影響について調査した。ヒストンについての質量分析(図

6 D)、ウェスタンブロット(図6 E)、およびELISA(図8 A)により、Bap1 KO細胞におけるH3K27me3レベルは増大した。H3K27me3についてのクロマチン免疫沈降シーケンシング(ChIP-Seq)は、H3K27me3ブロードドメインの数の増大(Beguelinら、2013年)(図6 G)、および増大したH3K27me3ブロードドメインの、近傍の遺伝子座への「拡大」(図6 H)を伴う、Bap1 KOマウスにおける全体的増大(図6 F)を明らかにした。このH3K27me3の増大および拡大は、Bap1 KO細胞におけるHoxA遺伝子座内で十分に例示されている(図6 I)。Bap1 KO細胞において、H3K27me3によりマークされる部位は主に、遺伝子プロモーター領域に生じ(図8 B)、H3K27me3により占有されるプロモーターを伴う遺伝子が、抑制の増強について富化された(FDR < 0.001)(図6 J)。精製GMPにおいても、同様な知見が観察された(図6 K)。Bap1 KOに関連するH3K27me3による遺伝子の調節異常と、遺伝子の抑制とは、EZH2依存性の調節、系列コミットメント/分化、および増殖に参与していた(図6 L、図8 C)。BAP1のサイレンシングは、H3K27me3を増大させ(図9 A)、Bap1欠損細胞におけるBAP1の再発現は、H3K27me3レベルを低減した(図9 B)。これに対し、デユピキチナーゼ欠損BAP1対立遺伝子は、H3K27me3を低減しなかった(図9 C)ことから、H3K27me3の変更が、BAP1触媒性活性に起因することが裏付けられた。

10

【0117】

次に、Ezh2の喪失の、*in vivo*における形質転換に対する影響(Suら、2003年)を調査することにより、PRC2に媒介されるH3K27me3の、BAP1依存性形質転換に対する役割を評価した。Ezh2の欠失は、Bap1/Ezh2欠損マウスにおけるH3K27me3レベルを、Bap1ノックアウトマウスと比較して低減した(図11 A)。Ezh2の欠失は、Bap1の喪失により誘導される骨髄系悪性腫瘍を無効化し(図10 A)、脾腫(図11 B、C)、白血球増加症(図11 D)、および貧血(図11 E)を低減した。随伴するBap1/Ezh2の喪失は、骨髄系前駆細胞の拡大を低減し(図11 F)、Mac1⁺Gr1⁺骨髄系細胞の比率を低減し(図11 G)、赤血球系の分化(CD71⁺Ter119⁺)を回復させた(図10 B)。Bap1/Ezh2欠損前駆細胞の増殖の減少が観察された(図11 H)。Ezh2のハプロ不全が、Bap1欠損骨髄増殖を低減するが、これを無効化しなかった(図10 C、10 D)ことは、Ezh2に対する用量依存的な要請と符合する。Bap1 KOマウスの低分子阻害剤EPZ011989(Campbellら、2015年)による処置が、H3K27me3、脾腫、および白血球カウントを減少させた(図11 I~K)ことは、遺伝子データと符合する。これらのデータは、Bap1欠損骨髄系の形質転換には、PRC2の活性、および、具体的には、Ezh2の活性が要請されることを裏付ける。

20

30

【0118】

次に、Bap1の欠失が、H3K27me3レベルを上昇させる機構について調査した。ASXL1とBAP1との間で報告されている相互作用、およびASXL1とPRC2との間で報告されている相互作用とは対照的に、BAP1とEZH2との間の相互作用は、共IPによっては同定されなかった(図13 A)。Ezh2およびSuz12のmRNAおよびタンパク質の発現の増大が観察された(図13 B、C)ことは、PRC2の発現の調節におけるBap1の役割と符合する。加えて、Bap1 KOマウスの全骨髄から分取されたLin⁻Sca⁺Kit⁺細胞(造血幹細胞を含有する集団)についての解析は、Suz12およびEzh2 RNAの発現の、野生型BAP1マウスと比較した有意な増大を示した(図17)。さらに、全骨髄ウェスタンブロットは、Bap1 KO細胞における、EZH2およびSUZ12のタンパク質発現の、対照細胞と比較した増大も明らかにした(図17)。Bap1 KO骨髄細胞におけるBAP1の再発現は、Ezh2 mRNAの発現を、正常レベルへと低減した(図12 A)。Bap1の喪失は、他のヒストンマークも直接変更することが可能であり、次いで、これにより、EZH2を含む、鍵となる標的遺伝子座におけるクロマチン状態が変更されることが仮定された。ヒストン

40

50

についての質量分析は、Bap1 KO細胞における、他の測定されたヒストンマーク（図12B）と比較した、H4K20me1の顕著な減少（図13D）を明らかにした。BAP1の発現は、EZH2遺伝子座におけるH4K20me1を増大させたが、ASXL1またはBMI1は、これを増大させなかった（図12C）。したがって、H4K20me1マークの喪失は、BAP1依存性の遺伝子発現において、重要な役割を有していることが仮定された。SETD8は、公知のメチルトランスフェラーゼで、H4K20me1を付与する唯一のものである（Nishiokaら、2002年）。BAP1変異体の中皮腫細胞（H226、H2452）におけるSETD8の発現が、アポトーシスを増大させ、増殖を低減したのに対し、野生型（MSTO-211H、およびMesos10）細胞は、影響を受けなかった（図13E、F）。中皮腫細胞におけるSETD8の過剰発現は、EZH2のmRNAおよびタンパク質の発現を減少させた（図13G、H）。BAP1野生型細胞系は、SETD8阻害剤（Blumら、2014年）（BVT594）に対して、BAP1変異体細胞系より感受性であった（図13I）。

10

【0119】

BAP1は、H4K20me1を調節するクロマチンモジュレーターを脱ユビキチン化することが仮定された。ChIP-Seqデータの解析（Abdel-Wahabら、2013年；Deyら、2012年）は、Bap1の占有を伴うが、Asxl1の結合は伴わない遺伝子のクラスター（クラスター1）を同定し、これをE-boxモチーフについて富化した（図14A、B）。先行研究は、非定型ポリコームタンパク質である、L3MBTL1およびL3MBTL2は、E-boxモチーフに結合し、H4K20me1に結合することが可能であり、これを維持することを示している（Guoら、2009年；Qinら、2012年；Trojerら、2011年；Trojerら、2007年）。L3mbtl1欠損マウスが、明白な表現型を持たない（Qinら、2010年）のに対し、L3mbtl2欠損マウスは、Bap1の喪失と同様のタイミングで胎性致死である（Deyら、2012年；Qinら、2012年）。したがって、Bap1の喪失が、L3mbtl2の発現の変更をもたらすのかどうかについて調査した。L3mbtl2のタンパク質の発現は、Bap1 KO造血細胞（図15A、B）内、およびBAP1変異体の中皮腫細胞において、BAP1野生型の中皮腫細胞（図13J）と比較して低減されたが、RNAの発現は、低減されなかった。L3MBTL2のユビキチン化は、BAP1を発現させる細胞では低減され（図13K）、プロテアソーム阻害剤による処理は、BAP1変異体細胞における、L3MBTL2の安定性を増大させた（図15C）。L3MBTL2の発現は、BAP1の共発現を伴う場合も、これを伴わない場合も、EZH2タンパク質レベルを低下させ（図15D）、BAP1の発現またはL3MBTL2の過剰発現は、EZH2のプロモーター活性を低減した（図15E）。逆に、L3MBTL2のサイレンシングは、EZH2の発現を増大させた（図15F）。L3MBTL2およびBAP1を発現させる細胞では、EZH2遺伝子座における、L3MBTL2およびBAP1についての富化が観察された（図15G、H）。特定の理論に束縛されることなく述べると、これらのデータは、BAP1とL3MBTL2とは、相互作用し（図15I）、EZH2遺伝子座を共占有することを示唆する。BAP1の喪失は、L3MBTL2の安定性の低減と、EZH2転写出力の増大とをもたらす（図13L）。

20

30

40

【0120】

TCGAデータの解析は、中皮腫において、EZH2 mRNAの発現が増大することを明らかにした（図16A）。次に、EZH2の阻害が、BAP1変異体の中皮腫細胞系の生存を阻害するかどうかについて評価した。EZH2のサイレンシングが、BAP1変異体細胞系におけるアポトーシスを誘導したのに対し、野生型細胞系は、増殖し続けた（図16B、C）。EZH2のサイレンシングは、in vivoにおけるBAP1変異体の腫瘍形成を無効化したが、野生型細胞系の腫瘍形成は無効化しなかった（図16D）。BAP1野生型細胞系におけるEZH2の過剰発現は、増殖（図20A）、およびEZH2の阻害に対する感受性（図20B）を増大させた。BAP1変異体細胞系は、in vitroで、2D培養物（図16E）および3D培養物（図16F）のいずれ

50

においても、EZH2の阻害(E P Z 0 1 1 9 8 9)に対してより感受性であった。次に、*in vivo*におけるEZH2の阻害の影響を評価した。H3K27me3に対する同様の効果にもかかわらず、EZH2の阻害が、BAP1変異体の腫瘍サイズを、媒体で処置されたマウスと比較して有意に低減した(図16G)のに対し、野生型の腫瘍は、EZH2の阻害に対する応答性が小さかった/見られなかった(図16H)。EZH2の阻害が、転移の潜在性を有するBAP1変異体の中皮腫細胞系における肺転移を無効化した(図16G)ことは、転移におけるBAP1/EZH2の役割(Harbourら、2010年)と符合する。EZH2の阻害は、浸潤を低減し、*in vitro*におけるEカドヘリン発現を増大させた(図20C~D)。次に、BAP1阻害剤である、GSK126を使用するEZH2の阻害の影響について評価した。BAP1変異体の中皮腫細胞を、NOD-SCIDマウスの脇腹へと注射し、次いで、腫瘍形成の後で、媒体または150mg/kgのGSK126による処置を開始した。EZH2の阻害は、腫瘍サイズを、媒体で処置されたマウスと比較して有意に低減した(図21Aおよび図4)。GSK126による処置は、*in vivo*において、BAP1変異体細胞におけるH3K27me3を有意に減弱させた(図21B)。病理学的解析は、EZH2の阻害が、Ki67染色の低減およびTUNEL染色の増大と関連することを明らかにした(図21C)。これらのデータは、EZH2が、BAP1変異体のがん細胞における潜在的治療的標的を表すことを示す。

10

20

30

40

50

【0121】

EZH2の発がん性変異の同定(Morinら、2010年;Morinら、2011年;Pasqualucciら、2011年)は、変異体特異的エピジェネティック療法の開発をもたらした。しかし、エピジェネティック調節因子における大半の変異は、機能喪失を結果としてもたらすために、扱いやすい直接的治療標的を表さない。EZH2阻害剤は近年、臨床試験にかけられ(McCabeら、2012年)ており、開示されたデータは、BAP1の喪失が、前臨床研究および臨床研究においてさらに探索すべきであるPRC2における変異特異的依存性を結果としてもたらすことを示唆する。これらのデータは、SWI/SNF変異体ラブドイド腫瘍におけるPRC2の阻害の役割を示唆する近年の研究(Alimovaら、2013年;Knutsonら、2013年)、およびBAP1変異が、SWI/SNF変異と互いに排他的であることを示す解析(Wilsonら、2010年)と共鳴する(resonate)。これらのデータは、エピジェネティック調節因子における変異についての詳細な研究を、異なる悪性コンテキストにおけるエピジェネティック状態に対する、変異体特異的効果を転換する(reverse)療法の開発についての情報を得るのに使用しうることを示唆する。

【0122】

7.3 考察

BAP1とASXL1とは、相互作用して、ヒストンのH2Aリシン119(H2AK119Ub)から、モノユビキチンを除去しうる、ポリコームデユビキチナーゼ複合体を形成する。しかし、BAP1とASXL1とが、顕著に異なるがん型において変異することは、エピジェネティック状態の調節および悪性形質転換における独立の役割と符合する。本実施例では、Bap1の喪失が、トリメチル化ヒストンH3リシン27(H3K27me3)の増大を結果としてもたらし、Ezh2の発現を上昇させ、ポリコーム抑制性複合体2(PRC2)標的の抑制を増強したことが裏付けられる。これらの知見は、Asxl1の喪失について見られる、H3K27me3の低減と対照的である。*in vivo*における、Bap1およびEzh2の条件付き欠失は、Bap1の喪失単独により誘導される骨髄系前駆細胞の拡大を無効化する。Bap1の喪失は、H4K20モノメチル化(H4K20me1)の顕著な減少を結果としてもたらす。H4K20me1メチルトランスフェラーゼであるSETD8の発現が、EZH2の発現を低減し、BAP1変異体細胞の増殖を無効化することは、EZH2の転写の調節におけるH4K20me1の役割と符合する。さらに、BAP1を欠く中皮腫細胞が、EZH2の薬理的阻害に対して感受性であることから、BAP1変異体の悪性腫瘍に対する新規の治療手法が示唆される。

【0123】

8 . 参考文献

- Abdel-Wahab, O., Adli, M., LaFave, L.M., Gao, J., Hricik, T., Shih, A.H., Pandey, S., Patel, J.P., Chung, Y.R., Koche, R., et al. (2012). ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* 22, 180-193.
- Abdel-Wahab, O., Gao, J., Adli, M., Dey, A., Trimarchi, T., Chung, Y.R., Kuscu, C., Hricik, T., Ndiaye-Lobry, D., Lafave, L.M., et al. (2013). Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* 210, 2641-2659.
- Abdel-Wahab, O., Pardanani, A., Patel, J., Wadleigh, M., Lasho, T., Heguy, A., Beran, M., Gilliland, D.G., Levine, R.L., and Tefferi, A. (2011). Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 25, 1200-1202.
- Alimova, I., Birks, D.K., Harris, P.S., Knipstein, J.A., Venkataraman, S., Marquez, V.E., Foreman, N.K., and Vibhakar, R. (2013). Inhibition of EZH2 suppresses self-renewal and induces radiation sensitivity in atypical rhabdoid teratoid tumor cells. *Neuro Oncol* 15, 149-160.
- Beguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K.L., Rosen, M., Shen, H., Yang, S.N., Wang, L., Ezponda, T., et al. (2013). EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell* 23, 677-692.
- Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., et al. (2011). Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine* 364, 2496-2506.
- Blum, G., Ibanez, G., Rao, X., Shum, D., Radu, C., Djaballah, H., Rice, J.C., and Luo, M. (2014). Small-molecule inhibitors of SETD8 with cellular activity. *ACS Chem Biol* 9, 2471-2478.
- Bott, M., Brevet, M., Taylor, B.S., Shimizu, S., Ito, T., Wang, L., Creaney, J., Lake, R.A., Zakowski, M.F., Reva, B., et al. (2011). The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nature genetics* 43, 668-672.
- Campbell, J.E., Kuntz, K.W., Knutson, S.K., Warholic, N.M., Keilhack, H., Wigle, T.J., Raimondi, A., Klaus, C.R., Rioux, N., Yokoi, A., et al. (2015). EPZ011989, A Potent, Orally-Available EZH2 Inhibitor with Robust in Vivo Activity. *ACS Med Chem Lett* 6, 491-495.
- Dey, A., Seshasayee, D., Noubade, R., French, D.M., Liu, J., Chaurushiya, M.S., Kirkpatrick, D.S., Pham, V.C., Lill, J.R., Bakalarski, C.E., et al. (2012). Loss of the tumor suppressor BAP1 causes myeloid transformation. *Science* 337, 1541-1546.
- Garcia, B.A., Mollah, S., Ueberheide, B.M., Busby, S.A., Muratore, T.L., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (2007). Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2, 933-938.
- Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adelaide, J., Bonansea, J., Cervera, N., Carbuccia, N., Lagarde, A., Prebet, T., Nezri, M., Sainty, D., et al. (2009). Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British journal o*

f haematology 145, 788-800.

Guo, Y., Nady, N., Qi, C., Allali-Hassani, A., Zhu, H., Pan, P., Adams-Cioaba, M.A., Amaya, M.F., Dong, A., Vedadi, M., et al. (2009). Methylation-state-specific recognition of histones by the MBT repeat protein L3MBTL2. *Nucleic Acids Res* 37, 2204-2210.

Harbour, J.W., Onken, M.D., Roberson, E.D., Duan, S., Cao, L., Worley, L.A., Council, M.L., Matatall, K.A., Helms, C., and Bowcock, A.M. (2010). Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 330, 1410-1413.

Knutson, S.K., Warholic, N.M., Wigle, T.J., Klaus, C.R., Allain, C. J., Raimondi, A., Porter Scott, M., Chesworth, R., Moyer, M.P., Copeland, R.A., et al. (2013). Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 7922-7927. 10

Krivtsov, A.V., Feng, Z., Lemieux, M.E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A.U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A.P., Silverman, L.B., et al. (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14, 355-368.

Lara-Astiaso, D., et al. Immunogenetics. Chromatin state dynamics during blood formation. *Science* 345, 943-949 (2014). 20

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15, 550.

MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., and MacCoss, M.J. (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26, 966-968.

McCabe, M.T., Ott, H.M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G.S., Liu, Y., Graves, A.P., Della Pietra, A., 3rd, Diaz, E., et al. (2012). EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492, 108-112. 30

Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature genetics* 42, 181-185.

Morin, R.D., Mendez-Lago, M., Mungall, A.J., Goya, R., Mungall, K.L., Corbett, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Chiu, R., Field, M., et al. (2011). Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476, 298-303. 40

Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., et al. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* 9, 1201-1213.

O'Geen, H., Echipare, L., and Farnham, P.J. (2011). Using ChIP-seq technology to generate high-resolution profiles of histone modifications. *Methods Mol Biol* 791, 265-286.

Pasqualucci, L., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., Wells, V.A., Grunn, A., Messina, M., Elliot, O., et al. (50

2011). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* 43, 830-837.

Pena-Llopis, S., Vega-Rubin-de-Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavia-Jimenez, A., Wang, S., Yamasaki, T., Zhrebker, L., Sivanand, S., Spence, P., et al. (2012). BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* 44, 751-759.

Phung, Y.T., Barbone, D., Broaddus, V.C., and Ho, M. (2011). Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy. *Journal of Cancer* 2, 507-514.

Qin, J., Van Buren, D., Huang, H.S., Zhong, L., Mostoslavsky, R., Akbarian, S., and Hock, H. (2010). Chromatin protein L3MBTL1 is dispensable for development and tumor suppression in mice. *J Biol Chem* 285, 27767-27775.

Qin, J., Whyte, W.A., Anderssen, E., Apostolou, E., Chen, H.H., Akbarian, S., Bronson, R.T., Hochedlinger, K., Ramaswamy, S., Young, R.A., et al. (2012). The polycomb group protein L3mbtl2 assembles an atypical PRC1-family complex that is essential in pluripotent stem cells and early development. *Cell Stem Cell* 11, 319-332.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Muller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 465, 243-247.

Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., et al. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, 337-342.

Su, I.H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T., and Tarakhovskiy, A. (2003). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol* 4, 124-131.

Suraokar, M.B., Nunez, M.I., Diao, L., Chow, C.W., Kim, D., Behrens, C., Lin, H., Lee, S., Raso, G., Moran, C., et al. (2014). Expression profiling stratifies mesothelioma tumors and signifies deregulation of spindle checkpoint pathway and microtubule network with therapeutic implications. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 25, 1184-1192.

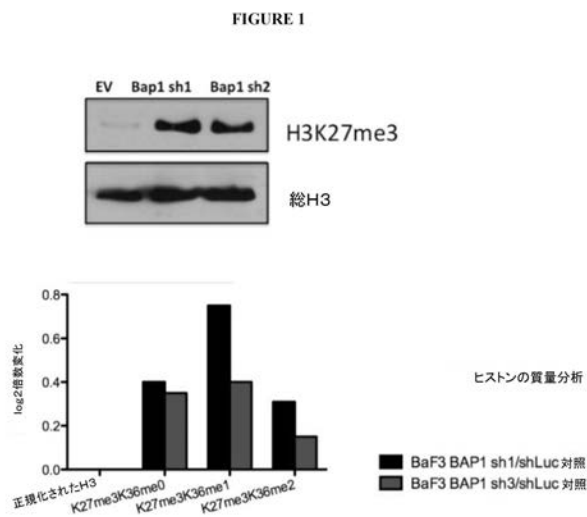
Trojer, P., Cao, A.R., Gao, Z., Li, Y., Zhang, J., Xu, X., Li, G., Losson, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et al. (2011). L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Mol Cell* 42, 438-450.

Trojer, P., Li, G., Sims, R.J., 3rd, Vaquero, A., Kalakonda, N., Boccuni, P., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nimer, S.D., et al. (2007). L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* 129, 915-928.

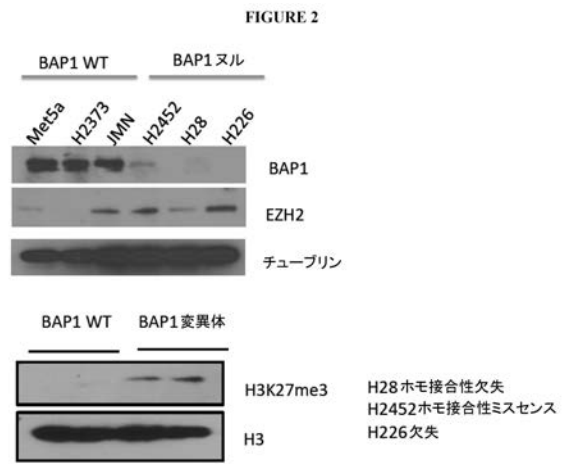
Wilson, B.G., Wang, X., Shen, X., McKenna, E.S., Lemieux, M.E., Cho, Y.J., Koellhoffer, E.C., Pomeroy, S.L., Orkin, S.H., and Roberts, C.W. (2010). Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18, 316-328.

本明細書では、それらの内容が、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、多様な参考文献が引用されている。本明細書では、多様な核酸およびアミノ酸配列受託番号が引用されており、これらの受託番号により言及される完全な配列が、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。

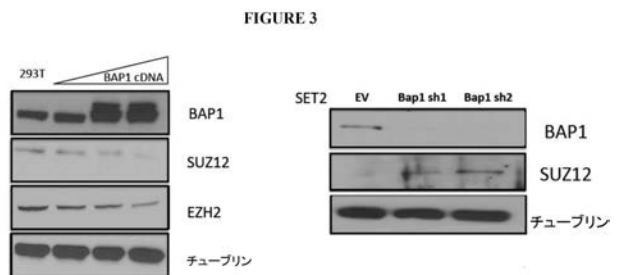
【 図 1 】



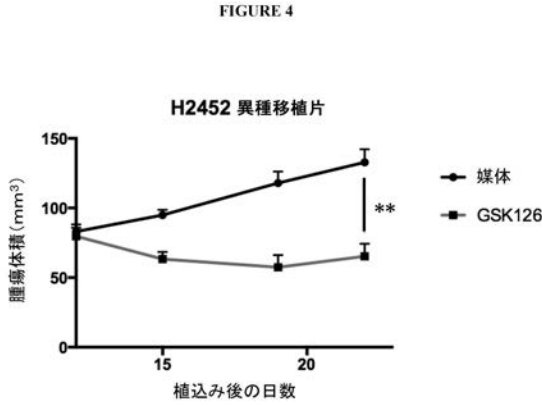
【 図 2 】



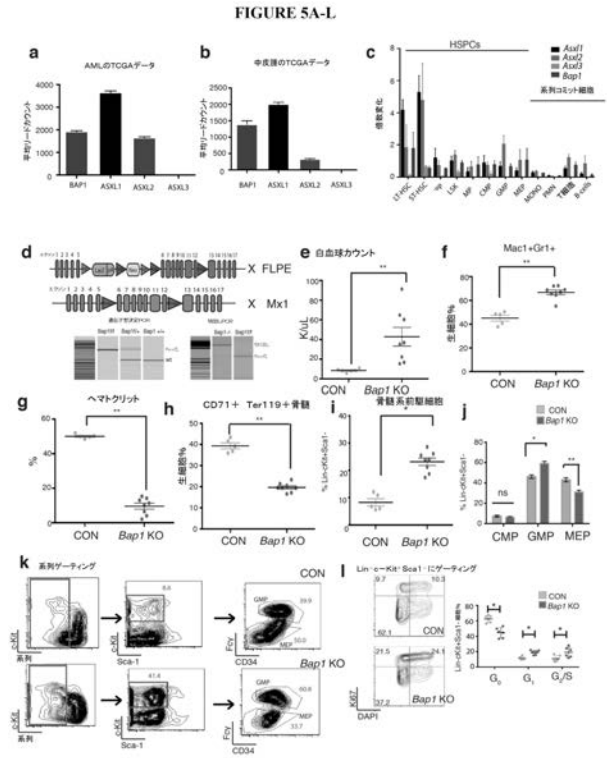
【 図 3 】



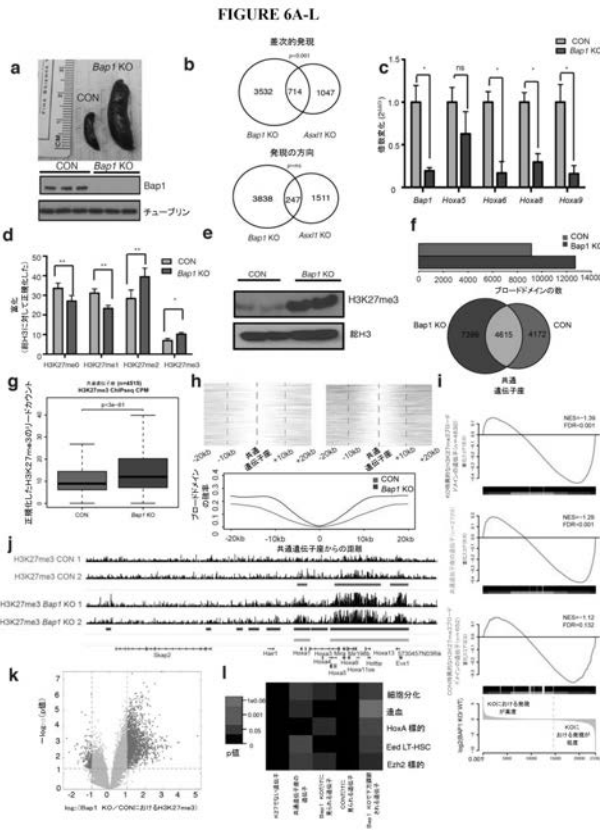
【 図 4 】



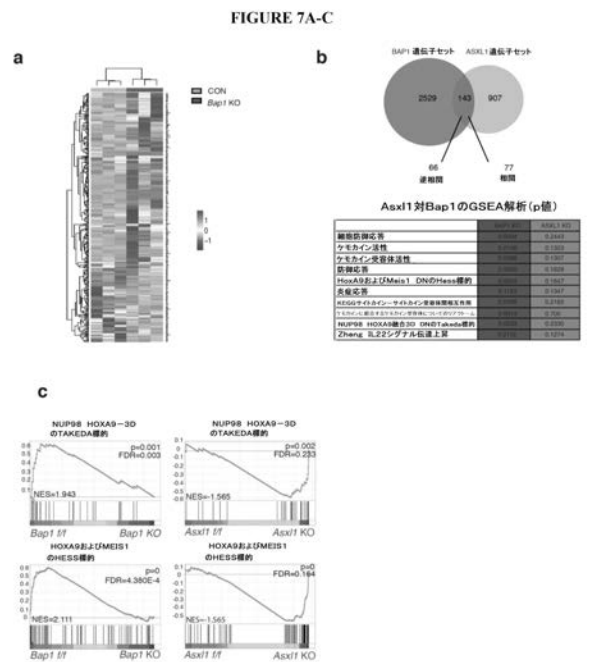
【 図 5 A - L 】



【 図 6 A - L 】

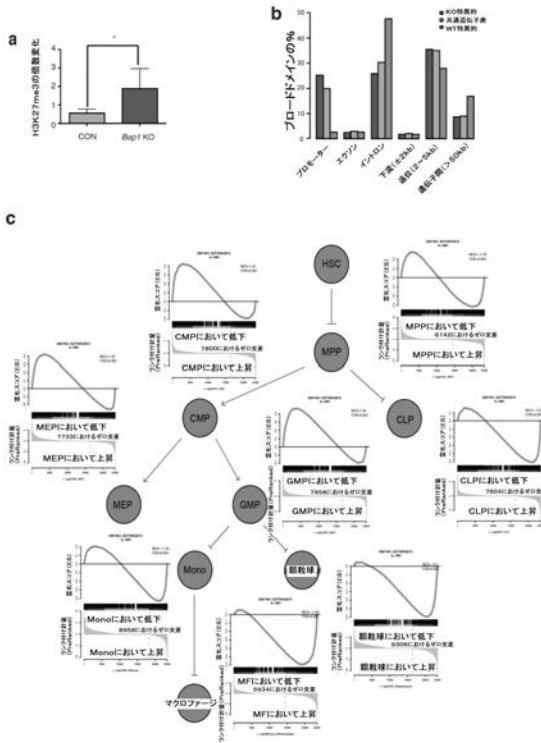


【 図 7 A - C 】



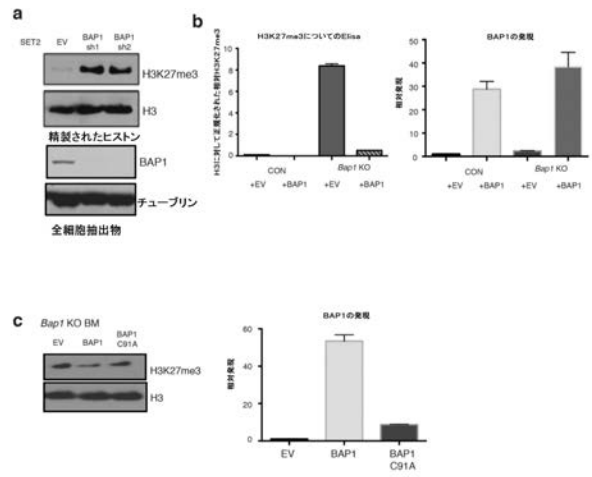
【 図 8 A - C 】

FIGURE 8A-C



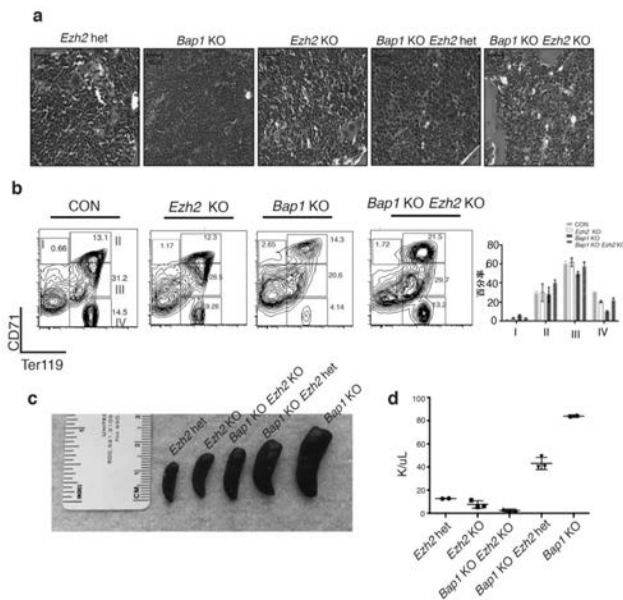
【 図 9 A - C 】

FIGURE 9A-C



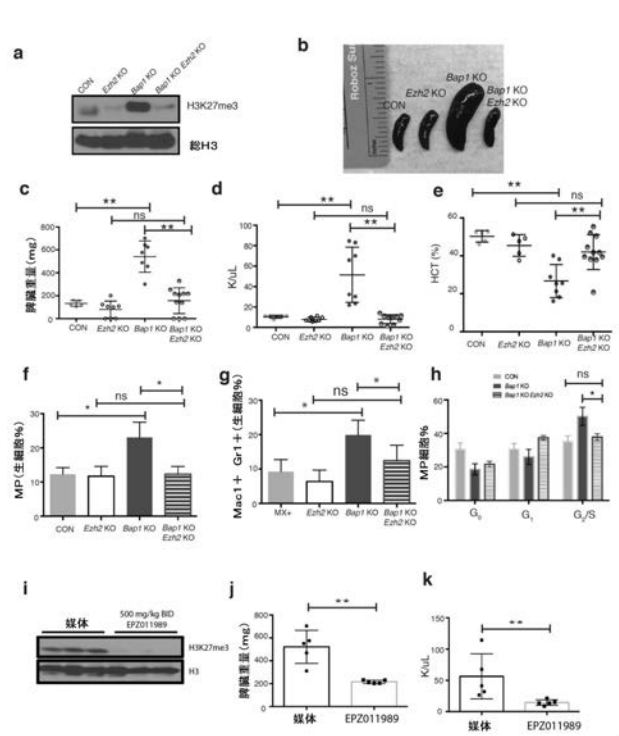
【 図 10 A - D 】

FIGURE 10A-D



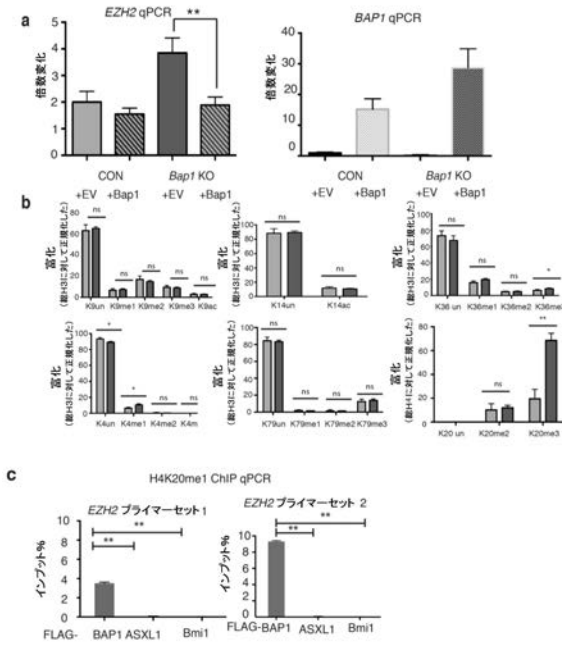
【 図 11 A - K 】

FIGURE 11A-K



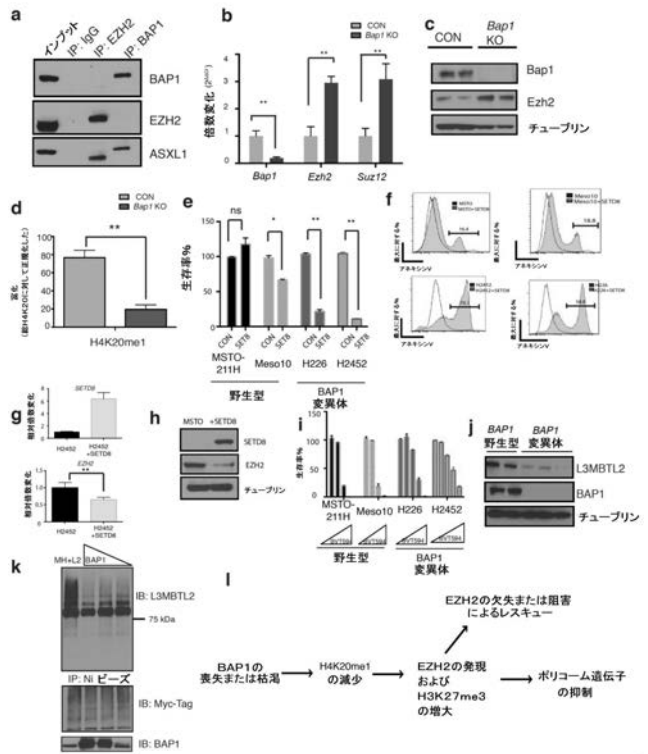
【 図 1 2 A - C 】

FIGURE 12A-C



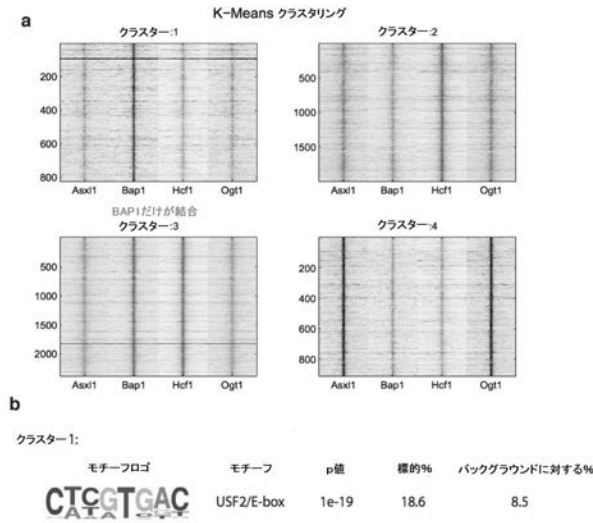
【 図 1 3 A - L 】

FIGURE 13A-L



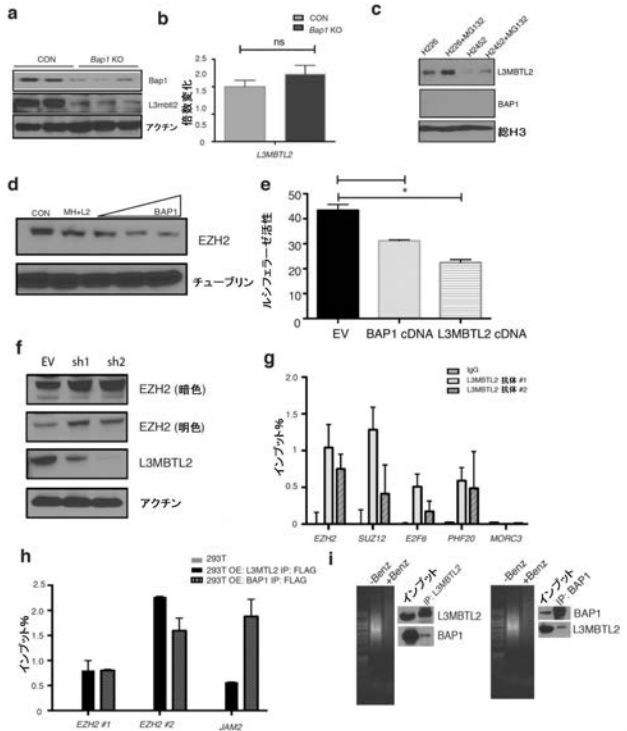
【 図 1 4 A - B 】

FIGURE 14A-B



【 図 1 5 A - I 】

FIGURE 15A-I



【配列表】

2017525337000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US15/36677
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/68, 33/574 (2015.01) CPC - C12Q 1/6886; G01N 33/57488, 33/57438 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): C12Q 1/68; G01N 33/68, 33/574 (2015.01) CPC: C12Q 1/6886, 2600/158; G01N 33/6893, 33/57488, 2333/96425, 33/57407, 33/57438; USPC: 435/7.23, 7.21, 7.2, 7.1, 4 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patseer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC, RU, AT, CH, TH, BR, PH); PubMed; EBSCO; Google/Google Scholar/Google Patents; 'BAP1,' 'EZHZ,' 'mesothelioma,' 'uveal melanoma,' 'renal cell carcinoma,' 'hypernephroma,' expression, activity, increase, reduce, 'SUZ12,' detect, measure, quantify, inhibit, '3-deazaneplanocin A'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y --- A	WO 2012/144220 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 26 October 2012; paragraphs [0006]-[0016]	13 ----- 14-18 ----- 1-12, 19-26
X --- Y --- A	US 2014/0011696 A1 (WIESNER, T et al.) 09 January 2014; Claims 1, 3, 14, 15	27-29 ----- 17, 18, 30 ----- 1-12, 19-26
Y	KEMP, CD et al. Polycomb Repressor Complex-2 Is A Novel Target For Mesothelioma Therapy. Clin Cancer Res. 01 January 2012, Vol. 18, No. 1; pages 77-90; abstract; page 79, second column, second paragraph; page 84, second column, second paragraph to page 84, third paragraphs; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0962.	14
Y	CHEN, X et al. MicroRNA-124a Is Epigenetically Regulated And Acts As A Tumor Suppressor By Controlling Multiple Targets In Uveal Melanoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 01 March 2013, Vol. 54, No. 3; pages 2248-2258; abstract; page 2253, figure 5; second column, third paragraph to page 2254, first column, first paragraph; DOI: 10.1167/iovs.12-10977.	15
Y	SHEN, Y et al. Expression And Significance Of Histone H3K27 Demethylases In Renal Cell Carcinoma. BMC Cancer. 12 October 2012, Vol. 12, No. 470; page 3, second column, fourth paragraph; DOI: 10.1186/1471-2407-12-470.	16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 08 September 2015 (08.09.2015)		Date of mailing of the international search report 02 OCT 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/36677

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BACHMANN, IM et al. Ezh2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate And Aggressive Tumor Subgroups In Cutaneous Melanoma And Cancers Of The Endometrium, Prostate, And Breast. J Clin Oncol. 10 January 2006, Vol. 24, No. 2; abstract; page 269, first column, third paragraph to second column, third paragraph; pages 268-273; DOI: 10.1200/JCO.2005.01.5180.	30
Y	WO 2013/049770 A2 (GLAXOSMITHKLINE LLC) 04 April 2013; page 3, lines 24-31; page 5, lines 1-5; page 11, lines 20-30; page 58, lines 7-14	17, 18
A		-----
A	WO 1999/25373 A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 27 May 1999; abstract	1-12, 19-26
A	BATTAGLIA, A. The Importance Of Multidisciplinary Approach In Early Detection Of BAP1 Tumor Predisposition Syndrome: Clinical Management And Risk Assessment. Clin Med Insights Oncol. 28 April 2014, Vol. 8; pages 37-47; DOI: 10.4137/CMO.S15239.	1-30
A		1-30

フロントページの続き

(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 . M A T L A B

(72)発明者 ラフェイブ, リンジー

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニューヨーク, イースト 71 エスティー ス
トリート 303, アパートメント 1イー

(72)発明者 アブデル - ワハブ, オマール

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, イースト 63 アールディー
ストリート 430, アパートメント 7ケー

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB11 BB20 CC02 CC03 FA15

4B063 QA01 QA13 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35

QR48 QR55 QR62 QR72 QR77 QS24 QS25 QS32 QS36 QX01

专利名称(译)	用于响应EZH2抑制剂的生物标志物		
公开(公告)号	JP2017525337A	公开(公告)日	2017-09-07
申请号	JP2016573588	申请日	2015-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	纪念斯隆-凯特琳癌症中心		
申请(专利权)人(译)	纪念斯隆 - 凯特琳癌症中心		
[标]发明人	レビンロス ラフェイブリンジー アブデルワハブオマール		
发明人	レビン, ロス ラフェイブ, リンジー アブデル-ワハブ, オマール		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 C12M1/00		
CPC分类号	A61K31/5377 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/5011 G01N2333/91017 G01N2800/7028 G01N33/5748 G01N2333/948		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.F G01N33/53.D C12M1/00.A		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB20 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	62/014594 2014-06-19 US		
其他公开文献	JP6684230B2 JP2017525337A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开的主题涉及一种或多种生物标志物用于评估EZH2抑制剂在受试者中产生抗癌作用的可能性的用途。它至少部分地基于以下发现：BAP1的丧失导致EZH2表达和活性的上调。在特定的非限制性实施方案中，该方法包括从受试者获得的癌症的样品，在样品中，并且确定BAP1生物标志物，生物标志物BAP1的表达水平的步骤，但如果它与参照对照水平相比不存在或以低水平表达，则治疗有效量为施用EZH2抑制剂。

