

(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2019-500623

(P2019-500623A)

(43) 公表日 **平成31年1月10日(2019.1.10)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	4 C 0 8 4
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 D	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-543078 (P2018-543078)
 (86) (22) 出願日 平成28年11月7日 (2016. 11. 7)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年6月26日 (2018. 6. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/060814
 (87) 国際公開番号 W02017/079738
 (87) 国際公開日 平成29年5月11日 (2017. 5. 11)
 (31) 優先権主張番号 62/251, 322
 (32) 優先日 平成27年11月5日 (2015. 11. 5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/351, 877
 (32) 優先日 平成28年6月17日 (2016. 6. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513137330
 エピザイム, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02
 139, ケンブリッジ, テクノロジー ス
 クエア 400, フォース フロア
 (74) 代理人 100169904
 弁理士 村井 康司
 (74) 代理人 100117422
 弁理士 堀川 かおり
 (72) 発明者 クリストファー プレシア
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02
 139, ケンブリッジ, テクノロジー ス
 クエア 400, フォース フロア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒストンH3メチル化ステータスをモニターするためのフローサイトメトリー

(57) 【要約】

本開示は、ヒストンのエピジェネティックな修飾を検出するための方法、ヒトヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2の阻害剤を含む組成物、および癌の処置のためのそれらの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒストン H 3 のリシン 2 7 のトリメチル化を定量すること、
 総 H 3 レベルを定量すること、および
 個々の細胞集団の免疫表現型を解析すること
 を含むフローサイトメトリー法。

【請求項 2】

前記個々の細胞集団が、被検体から得られる細胞の集団を含む、請求項 1 に記載の方法
 。

【請求項 3】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストン H 3 のリシン 2 7 のトリメチル化を定
 量することを含む方法。

10

【請求項 4】

前記細胞の集団が、前記被検体から得られる末梢血からまたは末梢血単核細胞の集団か
 ら単離される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞の集団が、リンパ系細胞を含む、から本質的になる、またはからなる、請求項
 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞の集団が、骨髄系細胞を含む、から本質的になる、またはからなる、請求項 2
 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記細胞の集団が、骨髄系幹細胞もしくは前駆細胞、赤芽球、巨核球、骨髄芽球、血小
 板、顆粒球、好塩基球、好酸球、好中球、前単球、単球、マクロファージ、骨髄系樹状細
 胞、M D C 1 c 細胞、M D C 2 細胞、肥満細胞、リンパ系幹細胞もしくは前駆細胞、胸腺
 細胞、T リンパ球、細胞障害性 T 細胞、T ヘルパー細胞、調節性 T 細胞、ナチュラルキラー
 - T (N K / T) 細胞、活性化 T 細胞、B 細胞、活性化 B 細胞、形質細胞、ナチュラルキ
 ラー B (N K / B) 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、形質細胞様樹状細胞、または
 その任意の組み合わせを含む、から本質的になる、またはからなる、請求項 2 ~ 6 のい
 ずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記細胞の集団が、細胞表面抗原または細胞表面抗原の組み合わせの発現によって特徴
 付けられる、請求項 2 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞表面抗原が、C D 1 c、C D 2、C D 3、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 0
 、C D 1 1、C D 1 1 b、C D 1 4、C D 1 5、C D 1 6、C D 1 9、C D 2 0、C D 2
 4、C D 2 5、C D 2 8、C D 3 0、C D 3 4、C D 3 8、C D 4 0、C D 4 4、C D 4
 5、C D 4 5 R、C D 4 9 b、C D 5 6、C D 6 1、C D 7 1、C D 9 5、C D 1 1 7、
 C D 1 2 3、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 1 4 1、C D 1 5 0、C D 1 8 4、C D 2 7
 1、C D 3 4 7、G R - 1、I g A、I g D、I g M、もしくは H L A - D R またはその
 任意の組み合わせである、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記細胞表面抗原または前記その組み合わせが、C D 3、C D 1 0、C D 1 1 b、C D
 1 4、C D 1 6、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 4、C D 2 8、C D 3 4、C D 3 8、C D
 4 0、C D 4 5、C D 4 5 R、C D 4 9 b、C D 9 5、C D 1 5 0、C D 1 8 4、G R -
 1、I g A、I g D、I g M、および H L A - D R またはその任意の組み合わせである、
 請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞の集団が、C D 1 3 3 +、C D 2 7 1 +、C D 1 1 +、および / もしくは C D
 3 4 7 + である骨髄系幹細胞もしくは前駆細胞；C D 7 1 + である赤芽球；C D 6 1 + で

50

ある巨核球；CD 6 1⁺である血小板；HLA - DR⁺およびCD 1 4⁻である顆粒球；CD 1 2 3⁺である好塩基球；CD 4 4⁺である好酸球；CD 1 5⁺および/もしくはCD 1 6⁺である好中球；CD 1 4⁺、CD 1 1 b⁺、CD 1 6⁻、および/もしくはHLA - DR⁺である単球；CD 1 c⁺であるMDC 1 c細胞；CD 1 4 1⁺であるMDC 2細胞；CD 1 1 7⁺である肥満細胞；CD 3 4⁺、CD 1 3 3⁺、CD 2 7 1⁺、CD 1 1 7⁺であるリンパ系幹細胞もしくは前駆細胞；CD 2⁺および/もしくはCD 3⁺であるTリンパ球（T細胞）；CD 8⁺である細胞障害性T細胞；CD 4⁺であるTヘルパー細胞；CD 4⁺およびCD 2 5⁺である調節性T細胞；CD 3⁺およびCD 5 6⁺であるNK/T細胞；CD 5 6⁺であるナチュラルキラーT細胞；CD 2 5⁺およびCD 3 0⁺である活性化T細胞；CD 1 9⁺および/もしくはCD 2 0⁺であるB細胞；CD 1 9⁺、CD 2 5⁺、および/もしくはCD 3 0⁺である活性化B細胞；CD 1 3 8⁺である形質細胞；CD 5 6⁺であるナチュラルキラーB細胞；CD 3⁻、CD 1 9⁻、HLA - DR⁺、およびCD 1 6⁻であるナチュラルキラー（NK）細胞；CD 3 0 4⁺である形質細胞様樹状細胞；またはその任意の組み合わせを含む、本質的にからなる、またはからなる、請求項 2 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記細胞の集団が、B細胞を含む、から本質的になる、またはからなる、請求項 2 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記細胞の集団が、T細胞を含む、から本質的になる、またはからなる、請求項 2 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記細胞の集団が、単球を含む、から本質的になる、またはからなる、請求項 2 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記単球が、CD 1 4⁺およびCD 1 6⁻；CD 1 4^{l o w}およびCD 1 6⁺；もしくはCD 1 4^{h i g h}およびCD 1 6^{l o w}単球またはその任意の組み合わせである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記細胞の集団が、顆粒球を含む、から本質的になる、またはからなる、請求項 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記顆粒球が、好中球、好酸球、もしくは肥満細胞またはその任意の組み合わせである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

ヒストン 3 のリシン 2 7 のトリメチル化の定量が、前記細胞の集団におけるヒストン 3 におけるトリメチル化リシン 2 7 のレベルを測定すること、前記細胞の集団におけるヒストン 3 の総レベルを測定すること、および前記細胞の集団における総ヒストン 3 レベルに対するヒストン 3 におけるトリメチル化リシン 2 7 レベルの比率を計算することを含む、請求項 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記被検体から血液サンプルまたは血球のサンプルを得ることをさらに含む、請求項 2 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記細胞の集団を単離することをさらに含む、請求項 2 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記単離が、フローサイトメトリーによる、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記フローサイトメトリーが、1つ以上の細胞表面抗原の発現に基づく、請求項 2 1 に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 23】

前記単離が、蛍光活性化細胞選別 (FACS) による、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記被検体が、

(a) 治療有効量の EZH2 阻害剤を投与することが予定されていたもしくは予定されている、または

(b) コントロールもしくは参照値と比較して H3K27me3 量の増加が同定される、請求項 2 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

ヒストン H3 のリシン 27 のトリメチル化の定量が、被検体が、治療有効量の EZH2 阻害剤を投与される前におよびその後に行われる、請求項 2 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

治療有効量の EZH2 阻害剤が、被検体に投与される期間に、前記被検体におけるヒストン H3 のリシン 27 のトリメチル化をモニターするために使用される、請求項 2 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

被検体由来のサンプルにおけるヒストンのエピジェネティックな修飾を定量するための方法であって、

(a) 透過処理サンプルを得るために透過処理組成物と前記サンプルにおける少なくとも 1 つの細胞を接触させること；

(b) H3K27me1、H3K27me2、または H3K27me3 内のエピトープに特異的に結合する第 1 の蛍光複合抗体と前記透過処理サンプルを接触させること；

(c) H3 内のエピトープに特異的に結合する第 2 の蛍光複合抗体と前記透過処理サンプルを接触させること；

(d) 前記第 1 の蛍光複合抗体からの第 1 の蛍光シグナルを検出すること；

(e) 前記第 2 の蛍光複合抗体からの第 2 の蛍光シグナルを検出すること；および

(d) 前記第 1 の蛍光シグナルの値を前記第 2 の蛍光シグナルの値によって割ること、それによって、前記サンプルにおける前記ヒストンの前記エピジェネティックな修飾を定量

を含む方法。

【請求項 28】

前記第 1 の蛍光複合抗体または前記第 2 の蛍光複合抗体のいずれかと前記透過処理サンプルを接触させる前に、細胞のサイズによって前記サンプルにおける少なくとも 1 つの細胞をソートすることをさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記サンプルにおける少なくとも 1 つの細胞の免疫表現型を解析することをさらに含み、

細胞型特有のマーカー上の第 3 のエピトープに特異的に結合する第 3 の蛍光複合抗体と前記サンプルを接触させること、および

前記第 3 の蛍光複合抗体からの第 3 の蛍光シグナルを検出すること

を含む、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記細胞型特有のマーカーが、細胞表面抗原である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記細胞表面抗原が、CD3、CD10、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD20、CD24、CD28、CD34、CD38、CD40、CD45、CD45R、CD49b、CD95、CD150、CD184、GR-1、IgA、IgD、IgM、および HLA-DR からなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

その必要がある被検体由来のサンプルにおけるヒストンのエピジェネティックな修飾のステータスをモニターするための方法であって、

(a) 事象の前に、請求項 2 7 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法に従って、ヒストンのエピジェネティックな修飾の第 1 の量を決定すること；

(b) 前記事象後に、請求項 2 7 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法に従って、前記ヒストンの前記エピジェネティックな修飾の第 2 の量を決定すること；および

(c) 前記第 1 の量を前記第 2 の量と比較すること

を含み、増加は、前記事象後のエピジェネティックな修飾の増加を示し、減少は、前記事象後のエピジェネティックな修飾の低下を示す方法。

10

【請求項 3 3】

前記事象が、前記被検体への E Z H 2 阻害剤の投与を含む処置である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記被検体が、癌を有するまたは癌と診断されている、請求項 3 2 または 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記エピジェネティックな修飾が、ヒストン 3 のリシン 2 7 のメチル化である、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

その必要がある被検体における癌を処置するための方法であって、

治療有効量の E Z H 2 阻害剤を前記被検体に投与することを含み、前記被検体が、請求項 2 7 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法に従って、H 3 の量と比較して H 3 K 2 7 me 3 の量が増加しているとして同定される方法。

20

【請求項 3 7】

前記透過処理組成物が、T r i t o n X - 1 0 0 (ポリエチレングリコール p (1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルブチル) - フェニルエーテル)、N o n i d e t P - 4 0 (オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)、T w e e n - 2 0、サポニン、ジギトニン、および n - オクチル - D - グルコピラノシドである、請求項 2 7 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 8】

前記透過処理組成物が、T r i t o n X - 1 0 0 (ポリエチレングリコール p (1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルブチル) - フェニルエーテル)である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記透過処理組成物は、約 0 . 2 5 w t / v o l % ~ 約 5 w t / v o l % の T r i t o n X - 1 0 0 (ポリエチレングリコール p (1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルブチル) - フェニルエーテル)を含む、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記第 1 の蛍光シグナルが、フローサイトメトリーによって検出される、請求項 2 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 4 1】

前記第 2 の蛍光シグナルが、フローサイトメトリーによって検出される、請求項 2 7 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記第 3 の蛍光シグナルが、フローサイトメトリーによって検出される、請求項 2 9 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記サンプルが、血液、皮膚、リンパ液、リンパ組織、骨髄、血液腫瘍、液性腫瘍、および固形腫瘍を含む、請求項 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 4 4】

前記血液サンプルが、赤血球、リンパ球、B細胞、単球、好酸球、好塩基球、好中球、血小板、またはその組み合わせを含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記サンプルが、B細胞を含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記リンパ組織および/またはリンパ液のサンプルが、内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、血液、リンパ液、またはその組み合わせを含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記骨髄のサンプルが、造血幹細胞、間質幹細胞、骨髄組織、黄色骨髄、赤血球、白血球、またはその組み合わせを含む、請求項 4 3 に記載の方法。

10

【請求項 4 8】

第 1 の蛍光結合抗体または第 2 の蛍光結合抗体と固定サンプルを接触させる前に、前記固定サンプルを得るために固定組成物と前記サンプルにおける少なくとも 1 つの細胞を接触させることをさらに含む、請求項 2 7 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記固定組成物が、メタノールフリー組成物である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記固定組成物が、約 1 % ~ 約 1 0 % の濃度のホルムアルデヒドを含むメタノールフリー組成物である、請求項 4 9 に記載の方法。

20

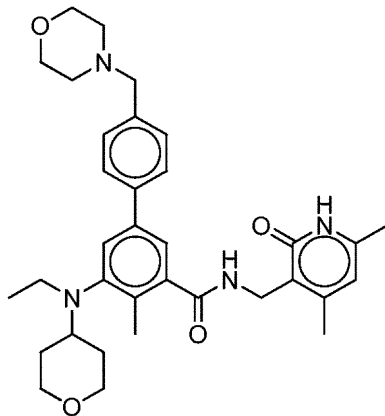
【請求項 5 1】

ホルムアルデヒドを含む前記メタノールフリー組成物が、約 4 % の濃度である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 E Z H 2 阻害剤が、

【化 1】



30

またはその薬学的に許容される塩である、請求項 3 3 ~ 5 1 に記載の方法。

40

【請求項 5 3】

前記被検体が、ヒトである、請求項 1 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記ヒトが、18歳以下である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記被検体が、癌を有する、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記癌が、リンパ腫である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記リンパ腫が、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、胚中心由来リンパ

50

腫、非胚中心由来リンパ腫、濾胞性リンパ腫（FL）、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBCL）、辺縁帯リンパ腫（MZL）、パーキットリンパ腫、および他の非ホジキンリンパ腫亜型から選択される、請求項56に記載の方法。

【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、2015年11月5日に出願された米国仮特許出願第62/251,322号明細書および2016年6月17日に出願された米国仮特許出願第62/351,877号明細書に対する優先権および利益を主張し、それぞれの内容は、全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【背景技術】

【0002】

たとえばヒストンメチルトランスフェラーゼ（HMT）によるメチル化によるヒストンの修飾は、遺伝子発現の変化に関連する。詳細には、HMTは、ヒストンタンパク質の特定のリシン残基およびアルギニン残基上への1つ以上のメチル基（メチルマーク）の転移によって遺伝子発現を調節する。ヒストンタンパク質配列の遺伝子変化は、HMT活性を変化させ、結果として、遺伝子発現の調節を誤り、ヒストン上へのメチルマークの異常な転移をもたらす得る。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

EZH2における突然変異および/またはこのヒストンメチルトランスフェラーゼの過剰活性は、様々な種類の癌に関連してきた。抗癌処置に使用するための有効なEZH2阻害剤の必要性があるが、未だ対処されていない。さらに、被検体におけるエピジェネティックな修飾を評価するための方法の必要性があるが、未だ対処されていない。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示のいくつかの態様は、関心のある細胞または組織においてエピジェネティックな修飾を決定するための方法、戦略、およびアッセイを提供する。本開示のいくつかの態様は、被検体における疾患、たとえば癌に関連するエピジェネティックな修飾を検出する、決定する、および/またはモニターするための方法、戦略、およびアッセイを提供する。本開示のいくつかの態様は、関心のある細胞および組織においてエピジェネティックなステータスを測定することによる、疾患の状態の検出のための方法、戦略、およびアッセイを提供する。たとえばフローサイトメトリーによって、生物学的サンプルにおけるエピジェネティックな修飾、たとえばヒストンメチル化を測定するための方法およびアッセイもまた、本明細書において提供される。たとえば、被検体、組織、または細胞における疾患の状態の検出のための；被検体における疾患または障害に関連する細胞または組織、たとえば癌細胞または腫瘍が、疾患または障害に関連するエピジェネティックな修飾を調整するための治療剤による処置に対して、たとえばEZH2阻害剤による処置に対して感受性であるかどうかを決定するための；およびエピジェネティックモジュレーターによる、たとえばEZH2阻害剤による、被検体における標的細胞または組織の、たとえば腫瘍の処置の効果をモニターするための本明細書において提供される方法、戦略、およびアッセイは、有用である。

30

40

【0005】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量すること、総H3レベルを定量すること、および個々の細胞集団の免疫表現型を解析することを含むフローサイトメトリー法を提供する。この方法のいくつかの実施形態では、個々の細胞集団は、被検体から得られる細胞の集団を含む。

【0006】

50

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、リンパ系細胞を含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、骨髄系細胞を含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、骨髄系幹細胞もしくは前駆細胞、赤芽球、巨核球、骨髄芽球、血小板、顆粒球、好塩基球、好酸球、好中球、前単球、単球、マクロファージ、骨髄系樹状細胞、MDC1c細胞、MDC2細胞、肥満細胞、リンパ系幹細胞もしくは前駆細胞、胸腺細胞、Tリンパ球、細胞障害性T細胞、Tヘルパー細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラーT(NK/T)細胞、活性化T細胞、B細胞、活性化B細胞、形質細胞、ナチュラルキラーB(NK/B)細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、形質細胞様樹状細胞、またはその任意の組み合わせを含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、被検体から得られる末梢血からまたは末梢血単核細胞の集団から単離される。

10

【0007】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、細胞表面抗原または細胞表面抗原の組み合わせの発現によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、CD1c、CD2、CD3、CD3、CD4、CD8、CD10、CD11、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD24、CD25、CD28、CD30、CD34、CD38、CD40、CD44、CD45、CD45R、CD49b、CD56、CD61、CD71、CD95、CD117、CD123、CD133、CD138、CD141、CD150、CD184、CD271、CD347、GR-1、IgA、IgD、IgM、もしくはHLA-DRまたはその任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、CD3、CD10、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD20、CD24、CD28、CD34、CD38、CD40、CD45、CD45R、CD49b、CD95、CD150、CD184、GR-1、IgA、IgD、IgM、およびHLA-DRまたはその任意の組み合わせである。

20

【0008】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、CD133⁺、CD271⁺、CD11⁺、および/もしくはCD347⁺である骨髄系幹細胞もしくは前駆細胞；CD71⁺である赤芽球；CD61⁺である巨核球；CD61⁺である血小板；HLA-DR⁺およびCD14⁻である顆粒球；CD123⁺である好塩基球；CD44⁺である好酸球；CD15⁺および/もしくはCD16⁺である好中球；CD14⁺、CD11b⁺、CD16⁻、および/もしくはHLA-DR⁺である単球；CD1c⁺であるMDC1c細胞；CD141⁺であるMDC2細胞；CD117⁺である肥満細胞；CD34⁺、CD133⁺、CD271⁺、CD117⁺であるリンパ系幹細胞もしくは前駆細胞；CD2⁺および/もしくはCD3⁺であるTリンパ球(T細胞)；CD8⁺である細胞障害性T細胞；CD4⁺であるTヘルパー細胞；CD4⁺およびCD25⁺である調節性T細胞；CD3⁺およびCD56⁺であるNK/T細胞；CD56⁺であるナチュラルキラーT細胞；CD25⁺およびCD30⁺である活性化T細胞；CD19⁺および/もしくはCD20⁺であるB細胞；CD19⁺、CD25⁺、および/もしくはCD30⁺である活性化B細胞；CD138⁺である形質細胞；CD56⁺であるナチュラルキラーB細胞；CD3⁻、CD19⁻、HLA-DR⁺、およびCD16⁻であるナチュラルキラー(NK)細胞；CD304⁺である形質細胞様樹状細胞；またはその任意の組み合わせを含む、から本質的になる、またはからなる。

30

40

【0009】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、B細胞を含む、から本質的になる、またはからなる。

【0010】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、T細胞を含む、から本質的になる、またはからなる。

50

【 0 0 1 1 】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、単球を含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、単球は、 $CD14^+$ および $CD16^-$; $CD14^{low}$ および $CD16^+$; もしくは $CD14^{high}$ および $CD16^{low}$ 単球またはその任意の組み合わせである。

【 0 0 1 2 】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、顆粒球を含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、顆粒球は、好中球、好酸球、もしくは肥満細胞またはその任意の組み合わせである。

【 0 0 1 3 】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、ヒストン3のリシン27のトリメチル化を定量することは、細胞の集団におけるヒストン3におけるトリメチル化リシン27のレベルを測定すること、細胞の集団におけるヒストン3の総レベルを測定すること、および細胞の集団における総ヒストン3レベルに対するヒストン3におけるトリメチル化リシン27レベルの比率を計算することを含む。

【 0 0 1 4 】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、方法は、被検体から血液サンプルまたは血球のサンプルを得ることをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、細胞の集団を単離することをさらに含む。いくつかの実施形態では、単離は、フローサイトメトリーによる。いくつかの実施形態では、フローサイトメトリーは、1つ以上の細胞表面抗原の発現に基づく。いくつかの実施形態では、単離は、蛍光活性化細胞選別 (FACS) による。いくつかの実施形態では、単離は、磁気活性化細胞選別 (MACS) による。

【 0 0 1 5 】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、被検体は、(a) 治療有効量の EZH2 阻害剤を投与することが予定されていたもしくは予定されている、または (b) コントロールもしくは参照値と比較して H3K27me3 量の増加が同定される。

【 0 0 1 6 】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、ヒストンH3のリシン27のトリメチル化の定量は、被検体が、治療有効量の EZH2 阻害剤を投与される前におよびその後に行われる。

【 0 0 1 7 】

本開示のフローサイトメトリー法のいくつかの実施形態では、方法は、治療有効量の EZH2 阻害剤が、被検体に投与される期間に、被検体におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化をモニターするために使用される。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態では、本開示は、被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法を提供する。この方法のいくつかの実施形態では、

【 0 0 1 9 】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、リンパ系細胞を含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、骨髄系細胞を含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、骨髄系幹細胞もしくは前駆細胞、赤芽球、巨核球、骨髄芽球、血小板、顆粒球、好塩基球、好酸球、好中球、前単球、単球、マクロファージ、骨髄系樹状細胞、MDC1c細胞、MDC2細胞、肥満細胞、リンパ系幹細胞もしくは前駆細胞、胸腺細胞、Tリンパ球、細胞障害性T細胞、Tヘルパー細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラーT (NK/T) 細胞、活性化T細胞、B細胞、活性化B細胞、形質細胞、ナチュラルキラーB (NK/B) 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、形質細胞様樹状細胞、またはその任意の組み合わせ

10

20

30

40

50

せを含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、被検体から得られる末梢血からまたは末梢血単核細胞の集団から単離される。

【0020】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、細胞表面抗原または細胞表面抗原の組み合わせの発現によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、CD1c、CD2、CD3、CD3、CD4、CD8、CD10、CD11、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD24、CD25、CD28、CD30、CD34、CD38、CD40、CD44、CD45、CD45R、CD49b、CD56、CD61、CD71、CD95、CD117、CD123、CD133、CD138、CD141、CD150、CD184、CD271、CD347、GR-1、IgA、IgD、IgM、もしくはHLA-DRまたはその任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、CD3、CD10、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD20、CD24、CD28、CD34、CD38、CD40、CD45、CD45R、CD49b、CD95、CD150、CD184、GR-1、IgA、IgD、IgM、およびHLA-DRまたはその任意の組み合わせである。

10

【0021】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、CD133⁺、CD271⁺、CD11⁺、および/もしくはCD347⁺である骨髄系幹細胞もしくは前駆細胞；CD71⁺である赤芽球；CD61⁺である巨核球；CD61⁺である血小板；HLA-DR⁺およびCD14⁻である顆粒球；CD123⁺である好塩基球；CD44⁺である好酸球；CD15⁺および/もしくはCD16⁺である好中球；CD14⁺、CD11b⁺、CD16⁻、および/もしくはHLA-DR⁺である単球；CD1c⁺であるMDC1c細胞；CD141⁺であるMDC2細胞；CD117⁺である肥満細胞；CD34⁺、CD133⁺、CD271⁺、CD117⁺であるリンパ系幹細胞もしくは前駆細胞；CD2⁺および/もしくはCD3⁺であるTリンパ球（T細胞）；CD8⁺である細胞障害性T細胞；CD4⁺であるTヘルパー細胞；CD4⁺およびCD25⁺である調節性T細胞；CD3⁺およびCD56⁺であるNK/T細胞；CD56⁺であるナチュラルキラーT細胞；CD25⁺およびCD30⁺である活性化T細胞；CD19⁺および/もしくはCD20⁺であるB細胞；CD19⁺、CD25⁺、および/もしくはCD30⁺である活性化B細胞；CD138⁺である形質細胞；CD56⁺であるナチュラルキラーB細胞；CD3⁻、CD19⁻、HLA-DR⁺、およびCD16⁻であるナチュラルキラー（NK）細胞；CD304⁺である形質細胞様樹状細胞；またはその任意の組み合わせを含む、から本質的になる、またはからなる。

20

30

【0022】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、B細胞を含む、から本質的になる、またはからなる。

40

【0023】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、T細胞を含む、から本質的になる、またはからなる。

【0024】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、単球を含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、単球は、CD14⁺およびCD16⁻；CD14^{low}およびCD16⁺；もしくはCD14^{high}およびCD16^{low}。w単球またはその任意の組み合わせである。

50

【 0 0 2 5 】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、細胞の集団は、顆粒球を含む、から本質的になる、またはからなる。いくつかの実施形態では、顆粒球は、好中球、好酸球、もしくは肥満細胞またはその任意の組み合わせである。

【 0 0 2 6 】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、ヒストン3のリシン27のトリメチル化の定量は、細胞の集団におけるヒストン3におけるトリメチル化リシン27のレベルを測定すること、細胞の集団におけるヒストン3の総レベルを測定すること、および細胞の集団における総ヒストン3レベルに対するヒストン3におけるトリメチル化リシン27レベルの比率を計算することを含む。

10

【 0 0 2 7 】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、方法は、被検体から血液サンプルまたは血球のサンプルを得ることをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、細胞の集団を単離することをさらに含む。いくつかの実施形態では、単離は、フローサイトメトリーによる。いくつかの実施形態では、フローサイトメトリーは、1つ以上の細胞表面抗原の発現に基づく。いくつかの実施形態では、単離は、蛍光活性化細胞選別 (FACS) による。いくつかの実施形態では、単離は、磁気活性化細胞選別 (MACS) による。

20

【 0 0 2 8 】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、被検体は、(a) 治療有効量のEZH2阻害剤を投与することが予定されていたもしくは予定されている、または(b) コントロールもしくは参照値と比較してH3K27me3量の増加が同定される。

【 0 0 2 9 】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、ヒストンH3のリシン27のトリメチル化の定量は、被検体が、治療有効量のEZH2阻害剤を投与される前におよびその後に行われる。

30

【 0 0 3 0 】

被検体から得られる細胞の集団におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化を定量することを含む方法のいくつかの実施形態では、方法は、治療有効量のEZH2阻害剤が、被検体に投与される期間に、被検体におけるヒストンH3のリシン27のトリメチル化をモニターするために使用される。

【 0 0 3 1 】

本開示は、被検体由来のサンプルにおけるヒストンのエピジェネティックな修飾を定量するための方法であって、(a) 透過処理サンプルを得るために透過処理組成物とサンプルにおける少なくとも1つの細胞を接触させること；(b) H3K27me1、H3K27me2、またはH3K27me3内のエピトープに特異的に結合する第1の蛍光複合抗体と透過処理サンプルを接触させること；(c) H3内のエピトープに特異的に結合する第2の蛍光複合抗体と透過処理サンプルを接触させること；(d) 第1の蛍光複合抗体からの第1の蛍光シグナルを検出すること；(e) 第2の蛍光複合抗体からの第2の蛍光シグナルを検出すること；および(d) 第1の蛍光シグナルの値を第2の蛍光シグナルの値によって割ること、それによって、サンプルにおけるヒストンのエピジェネティックな修飾を定量することを含む、エピジェネティック修飾されたH3の量を決定することを含む方法を提供する。

40

【 0 0 3 2 】

ヒストンのエピジェネティックな修飾を定量する方法は、第1の蛍光複合抗体または第2の蛍光複合抗体のいずれかと透過処理サンプルを接触させる前に、細胞のサイズによ

50

てサンプルにおける少なくとも1つの細胞をソートすることをさらに含んでもよい。

【0033】

ヒストンのエピジェネティックな修飾を定量する方法は、サンプルにおける少なくとも1つの細胞の免疫表現型を解析することを含んでもよく、細胞型特有のマーカー上の第3のエピトープに特異的に結合する第3の蛍光複合抗体とサンプルを接触させること、および第3の蛍光複合抗体からの第3の蛍光シグナルを検出することを含む。本開示の方法のある実施形態では、細胞型特有のマーカーは、細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、CD1c、CD2、CD3、CD3、CD4、CD8、CD10、CD11、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD24、CD25、CD28、CD30、CD34、CD38、CD40、CD44、CD45、CD45R、CD49b、CD56、CD61、CD71、CD95、CD117、CD123、CD133、CD138、CD141、CD150、CD184、CD271、CD347、GR-1、IgA、IgD、IgM、もしくはHLA-DRまたはその任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、CD3、CD10、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD20、CD24、CD28、CD34、CD38、CD40、CD45、CD45R、CD49b、CD95、CD150、CD184、GR-1、IgA、IgD、IgM、およびHLA-DRからなる群から選択されてもよい。

10

【0034】

本開示は、その必要がある被検体由来のサンプルにおけるヒストンのエピジェネティックな修飾のステータスをモニターするための方法であって、(a)事象の前に、上記に提供される任意の方法に従って、ヒストンのエピジェネティックな修飾の第1の量を決定すること；(b)上記に提供される任意の方法に従って、ヒストンのエピジェネティックな修飾の第2の量を決定すること；および(c)第1の量を第2の量と比較することを含み、増加は、事象後のエピジェネティックな修飾の増加を示し、減少は、事象後のエピジェネティックな修飾の低下を示す方法を提供する。ある実施形態では、事象は、被検体へのEZH2阻害剤の投与を含む処置である。被検体は、癌を有していてもよいまたは癌と診断されてもよい。エピジェネティックな修飾は、ヒストン3のリシン27のメチル化であってもよい。

20

【0035】

本開示は、その必要がある被検体における癌を処置するための方法であって、治療有効量のEZH2阻害剤を被検体に投与することを含み、被検体は、上記の方法のいずれかに従って、H3の量と比較してH3K27me3の量が増加しているとして同定される方法を提供する。

30

【0036】

方法の透過処理組成物は、Triton X-100 (ポリエチレングリコールp(1,1,3,3-テトラメチルブチル)-フェニルエーテル)、Nonidet P-40 (オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)、Tween-20、サポニン、ジギトニン、およびn-オクチル-D-グルコピラノシドからなる群から選択される試薬を含んでもよい、からなってもよい、またはから本質的になってもよい。一実施形態では、透過処理組成物は、Triton X-100 (ポリエチレングリコールp(1,1,3,3-テトラメチルブチル)-フェニルエーテル)である。ある実施形態では、透過処理組成物は、約0.25wt/vol%および約5wt/vol% Triton X-100 (ポリエチレングリコールp(1,1,3,3-テトラメチルブチル)-フェニルエーテル)である。

40

【0037】

本開示の方法のある実施形態では、第1の蛍光シグナルは、フローサイトメトリーによって検出される。本開示の方法のある実施形態では、第2の蛍光シグナルは、フローサイトメトリーによって検出される。本開示の方法のある実施形態では、第3の蛍光シグナルは、フローサイトメトリーによって検出される。方法のある実施形態では、第1、第2、

50

および第3の蛍光シグナルは、フローサイトメトリーによって同時に検出されてもよい。方法のある実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、および10の蛍光シグナルは、フローサイトメトリーによって同時に検出することができる。

【0038】

本開示の方法によれば、サンプルは、血液、皮膚、リンパ液、リンパ組織、骨髄、血液腫瘍、液性腫瘍、および固形腫瘍を含んでいてもよい、からなってもよい、またはから本質的になってもよい。一態様では、血液サンプルは、赤血球、リンパ球、B細胞、単球、好酸球、好塩基球、好中球、血小板、またはその組み合わせを含む、から本質的になる、またはからなる。サンプルは、B細胞を含んでいてもよい、からなってもよい、またはから本質的になってもよい。

10

【0039】

本開示の方法によれば、サンプルは、内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、血液、リンパ液、またはその組み合わせを含んでいてもよい、からなってもよい、またはから本質的になってもよい。骨髄サンプルは、造血幹細胞、間質幹細胞、骨髄組織、黄色骨髄、赤血球、白血球、またはその組み合わせを含んでいてもよい、からなってもよい、またはから本質的になってもよい。

【0040】

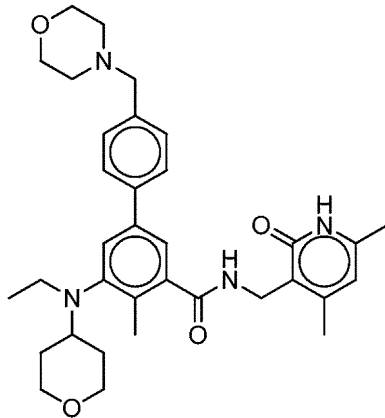
本開示の方法は、第1の蛍光結合抗体または第2の蛍光結合抗体と固定サンプルを接触させる前に、固定サンプルを得るために固定組成物とサンプルにおける少なくとも1つの細胞を接触させることをさらに含んでいてもよい。本開示の方法の固定組成物は、メタノールフリー組成物であってもよい。固定組成物は、約1%~約10%の濃度のホルムアルデヒドを含むメタノールフリー組成物であってもよい。メタノールフリー固定組成物は、約4%の濃度のホルムアルデヒドを含んでいてもよい。

20

【0041】

本開示の方法のある実施形態では、EZH2阻害剤は、

【化1】



30

またはその薬学的に許容される塩である。

40

【0042】

本開示の方法の被検体は、ヒトであってもよい。ヒト被検体は、18歳以下であってもよい。本開示の方法の被検体は、癌を有していてもよい。本開示の方法のある実施形態では、癌は、リンパ腫である。例示的なリンパ腫は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBC)、胚中心由来リンパ腫、非胚中心由来リンパ腫、濾胞性リンパ腫(FL)、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫(PMBCL)、辺縁帯リンパ腫(MZL)、パーキットリンパ腫、および他の非ホジキンリンパ腫亜型を含んでいてもよいが、これらに限定されない。

【0043】

前述の概念およびさらに詳細に下記に議論される、さらなる概念の組み合わせはすべて

50

(ただし、そのような概念が互いに矛盾していないことを条件とする)、本明細書において開示される本発明の主題の一部であるとして企図されることが十分に理解されるべきである。特に、本開示の最後に見られる、主張される主題の組み合わせはすべて、本明細書において開示される本発明の主題の一部であるとして企図される。参照により組み込まれる任意の開示においても見られてもよい本明細書において明示的に用いられる用語は、本明細書において開示される特定の概念と最も一致している意味が与えられるべきであることもまた、十分に理解されるべきである。

【0044】

他のシステム、プロセス、および特徴は、以下の図面および詳細な説明について検討する際に当業者らに明らかになるであろう。あらゆるそのようなさらなるシステム、プロセス、および特徴は、本明細書の範囲内に含まれ、本開示の範囲内にあり、かつ添付の請求項によって保護されることが意図される。

10

【0045】

特許または出願書類は、カラーで制作された少なくとも1つの図面を含有する。カラーの図面を有するこの特許または特許出願刊行物のコピーは、依頼および必要な料金の支払いと同時に特許庁によって提供されるであろう。

【0046】

当業者は、図面が、主として説明を目的とするものであり、本明細書において記載される本発明の主題の範囲を限定するようには意図されないことを理解するであろう。図面は、必ずしも一定の縮尺ではなく、ある場合には、本明細書において開示される本発明の主題の様々な態様は、様々な特徴についての理解を容易にするために、図面において誇張してまたは拡大して示されてもよい。図面において、同様の参照記号は、通常、同様の特徴(たとえば機能的に類似するおよび/または構造的に類似するエレメント)を指す。

20

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1A】図1Aは、血液サンプルと接触させた後の様々な透過処理条件の比較を示す一連のフローサイトメトリープロットを示す図である。一連のフローサイトメトリープロットは、CD3、CD19、CD14、CD16、およびHLA-DR(LN3)を含む血球由来の表面エピトープの検出に対する様々な処置条件(すなわち透過処理なし、0.1% Triton、70%メタノール)の効果を示す。以下のカラーコードをすべての条件に適用する: 事象はすべて、黒色に塗る; リンパ球はすべて、赤色に塗る; T細胞(CD3+CD19-)は、濃青色に塗る; CD3-CD19-リンパ球は、紫色に塗る; NK細胞は、濃緑色に塗る; 樹状細胞は、淡青色に塗る; B細胞(CD19+CD3-)は、黄色に塗る; 顆粒球および単球は、薄緑色に塗る; 単球(CD14+HLA-DR+)は、オレンジ色に塗る; 顆粒球(CD14-HLA-DR-)は、栗色に塗る。

30

【図1B】図1Bは、血球サンプル由来のCD16表面エピトープの検出に対するメタノールフリー処置条件と比較した、50%メタノール処置の比較を示すフローサイトメトリープロットを示す図である。

【図2A】図2Aは、血球の混合集団へのCD3抗体の様々なクローンの結合を示す一連のフローサイトメトリープロットを示す図である。

40

【図2B】図2Bは、血球サンプルとの接触後に得られる結果として生ずる蛍光シグナルに対する、フルオロフォア複合体選択の比較(すなわちCD3-APC-H7と比較したCD3-V500)を示す一連のフローサイトメトリープロットを示す図である。

【図2C】図2Cは、血球サンプルとの接触後に得られる結果として生ずるフローサイトメトリーシグナルに対する、H3K27me3抗体滴定(すなわち1:50、1:100、1:150)の効果を示すフローサイトメトリープロットを示す図である。1:150の条件(オレンジ色)は、このグラフにおいて左手のピークで示される。1:100の条件(青色)は、このグラフにおいて中央のピークで示される。1:50の条件(赤色)は、このグラフにおいて右手のピークで示される。

【図3A】図3Aは、処置していない条件と比較した、EZH2阻害剤であるEPZ00

50

7210（本明細書において化合物Dとも呼ばれる）と接触させた後のOCI-LY19細胞のH3K27me3メチル化状態を示すフローサイトメトリープロットを示す図である。EPZ007210条件は、左（明るいグレーまたは赤色）のピークによって示され、そのままの条件は、右（濃いグレーまたは青色）のピークによって示される。

【図3B】図3Bは、OCI-LY19細胞株におけるヒストンH3の検出を示すフローサイトメトリープロットを示す図である。

【図3C】図3Cは、EPZ007210により処置したまたは処置していないOCI-LY19細胞においてH3K27me3抗体と接触させた後にフローサイトメトリーによって検出される平均蛍光発光を示す図である。EPZ007210による処置後のまたは処置していない条件のOCI-LY19細胞において総ヒストンH3抗体と接触させた後にフローサイトメトリーによって検出される平均蛍光発光もまた、図3Cにおいて示される。

10

【図4A】図4Aは、細胞のH3K27メチル化状態に対する、様々な濃度のEPZ007210とのWSU細胞株およびOCI-LY19細胞株のインキュベートの効果を示す一連のフローサイトメトリープロットを示す図である。H3K27me3ステータスは、以下のEPZ007210濃度、DMSOのみ（黄色）、0.3nM（淡青色）、1nM（マゼンタ）、4nM（ピンク）、12nM（濃緑色）、37nM（薄緑色）、111nM（オレンジ色）、333nM（濃い青緑色）、および1000nM（赤色）とのインキュベーション後のフローサイトメトリープロットで示される。

【図4B】図4Bは、WSU細胞株およびOCI-LY19細胞株と接触させるためにEPZ007210を利用した用量応答研究の結果を示す1対のウェスタンブロット分析（およびプロットの結果を定量するそれらの対応するグラフ）を示す図である。IC₅₀は、挿入図として示す。クロマチンフローサイトメトリーおよびヒストンウェスタンは、OCI-LY19細胞について一致することが分かったが、WSU細胞については異なり、これは、もしかすると、WSU細胞の固有の自家蛍光発光が強いことによるかもしれない。

20

【図5A】図5Aは、抗体のパネルを使用する血球サンプルにおける細胞表面エピトープおよび核エピトープのフローサイトメトリーによる同時の検出を示す一連のフローサイトメトリープロットを示す図である。フローサイトメトリープロット上に示される抗体のパネルは、CD3-V500-C(SK7)、CD19-APC(HIB19)、CD16-PE-Cy7(CD16)、CD14-PerCP-Cy5.5(MP9)、HLA-DR-PE(LN3)、H3-Pacific Blue、およびH3K27me3-Alexa-488である。以下のカラーコードを適用する：事象はすべて、黒色に塗る；リンパ球はすべて、赤色に塗る；T細胞(CD3+CD19-)は、濃青色に塗る；CD3-CD19-リンパ球は、紫色に塗る；NK細胞は、濃緑色に塗る；樹状細胞は、淡青色に塗る；B細胞(CD19+CD3-)は、黄色に塗る；顆粒球および単球は、薄緑色に塗る；単球(CD14+HLA-DR+)は、オレンジ色に塗る；顆粒球(CD14-HLA-DR-)は、栗色に塗る。

30

【図5B】図5Bは、抗体のパネルを使用する血球サンプルにおける細胞表面エピトープおよび核エピトープのフローサイトメトリーによる同時の検出を示す一連のフローサイトメトリープロットを示す図である。フローサイトメトリープロット上に示される抗体のパネルは、CD3-V500-C(SK7)、CD19-BV421(HIB19)、CD16-PE-Cy7(B73.1)、CD14-PerCP-Cy5.5(MP9)、HLA-DR-PE(LN3)、H3-Alexa647、およびH3K27me3-Alexa-488である。以下のカラーコードを適用する：事象はすべて、黒色に塗る；リンパ球はすべて、赤色に塗る；T細胞(CD3+CD19-)は、濃青色に塗る；CD3-CD19-リンパ球は、紫色に塗る；NK細胞は、濃緑色に塗る；樹状細胞は、淡青色に塗る；B細胞(CD19+CD3-)は、黄色に塗る；顆粒球および単球は、薄緑色に塗る；単球(CD14+HLA-DR+)は、オレンジ色に塗る；顆粒球(CD14-HLA-DR-)は、栗色に塗る。

40

50

【図5C】図5Cは、抗体のパネルを使用する血球サンプルにおける細胞表面エピトープおよび核エピトープのフローサイトメトリーによる同時の検出を示す一連のフローサイトメトリープロットを示す図である。フローサイトメトリープロット上に示される抗体のパネルは、CD3 - V500 - C (SK7)、CD19 - APC (HIB19)、CD16 - PE - Cy7 (CD16)、CD14 - PerCP - Cy5.5 (MP9)、HLA - DR - PE (LN3)、H3 - Pacific Blue、およびH3K27me3 - Alexa - 488である。以下のカラーコードを適用する：事象はすべて、黒色に塗る；リンパ球はすべて、赤色に塗る；T細胞 (CD3 + CD19 -) は、濃青色に塗る；CD3 - CD19 - リンパ球は、黄色に塗る；NK細胞は、濃緑色に塗る；樹状細胞は、淡青色に塗る；B細胞 (CD19 + CD3 -) は、紫色に塗る；顆粒球および単球は、薄緑色に塗る；単球 (CD14 + HLA - DR +) は、オレンジ色に塗る；顆粒球 (CD14 - HLA - DR -) は、栗色に塗る。右端のパネルに関して、高い左のピークは単球 (濃青色) を示し、高い右のピークはT細胞 (マゼンタ) を示す。

10

【図5D】図5Dは、抗体のパネルを使用する血球サンプルにおける細胞表面エピトープおよび核エピトープのフローサイトメトリーによる同時の検出を示す一連のプロットおよび対応するグラフを示す図である。フローサイトメトリープロット上に示される抗体のパネルは、CD3 - V500 - C (SK7)、CD19 - BV421 (HIB19)、CD16 - PE - Cy7 (B73.1)、CD14 - PerCP - Cy5.5 (MP9)、HLA - DR - PE (LN3)、H3 - Alexa647、およびH3K27me3 - Alexa - 488である。左上のパネルに関して、高い左のピークは単球 (濃青色) を示し、高い右のピークはT細胞 (マゼンタ) を示す。右上のパネルに関して、高い右のピークはT細胞 (マゼンタ) を示し、高い右のピークは単球 (濃青色) を示す。

20

【図6A】図6Aは、ヒト末梢血サンプルから得られた代表的なフローサイトメトリーデータを示す一連の棒グラフを示す図である。代表的なフローサイトメトリーデータを、同じドナーから得て、異なる抗体パネルの抗体により処理した。図6Aの左側の棒グラフにおいて、抗体の以下のパネルをフローサイトメトリー手順に使用した：CD3 - V500 - C (SK7)、CD19 - APC (HIB19)、CD16 - PE - Cy7 (CD16)、CD14 - PerCP - Cy5.5 (MP9)、HLA - DR - PE (LN3)、H3 - Pacific Blue、およびH3K27me3 - Alexa - 488。図6Bの右側の棒グラフにおいて、抗体の以下のパネルをフローサイトメトリー手順に使用した：CD3 - V500 - C (SK7)、CD19 - BV421 (HIB19)、CD16 - PE - Cy7 (B73.1)、CD14 - PerCP - Cy5.5 (MP9)、HLA - DR - PE (LN3)、H3 - Alexa647、およびH3K27me3 - Alexa - 488。

30

【図6B】図6Bは、ヒト末梢血サンプルから得られた代表的なフローサイトメトリーデータを示す一連の棒グラフを示す図である。代表的なフローサイトメトリーデータは、同じ抗体パネルにより処理した異なるドナーから得た。

【図7】図7は、細胞表面特異的抗体、H3K27me3およびヒストンH3に対する抗体と接触させた血液サンプルから得たフローサイトメトリーデータを示す図である。図7のグラフは、血球のタイプおよびH3K27me3ステータスの間の比較を示す。

40

【図8】図8は、EZH2阻害剤EPZ - 6438の投与の効果を確認することを目的としたインビボげっ歯動物用量応答研究から得られた結果を示す一連のフローサイトメトリープロットを示す図である。図8におけるフローサイトメトリーデータプロットは、コントロール、ビヒクルのみの処置を受けたげっ歯動物から取得した血液サンプルから得られたデータを示す。

【図9】図9は、げっ歯動物が特定の投薬量のEZH2阻害剤EPZ - 6438を受けたげっ歯動物インビボ用量応答研究のサンプルのフローサイトメトリー分析から得られた平均蛍光強度 (MFI) データを示す一連の棒グラフを示す図である。研究におけるげっ歯動物は、ビヒクル処置、125 mg / kg、250 mg / kg、または500 mg / kgのEPZ - 6438化合物を受けた。この研究のデータは、フローサイトメトリーアッセ

50

イから得た一連の棒グラフとして示される。

【図10】図10は、500mg/kgのEPZ-6438によるマウスの処置後のH3K27me3シグナルに対する個々の細胞集団の寄与を示すフローサイトメトリーデータから得られた棒グラフを示す図である。フローサイトメトリーアッセイにおいて使用される表面マーカーは、単球、NK細胞、B細胞、T細胞、および顆粒球におけるH3K27me3ステータスの決定を可能にした。

【図11】図11は、フローサイトメトリーアッセイまたはELISAのいずれかによって評価される様々な濃度のEPZ-6438の投与後のH3K27me3阻害パーセンテージを示す棒グラフを示す図である。全PBMCにおけるH3K27me3阻害の量を単球のH3K27me3阻害と比較する。研究においてげっ歯動物に投与したEPZ-6438の濃度は、125mg/kg、250mg/kg、または500mg/kgとした。フローサイトメトリーは黒色の棒によって示し、ELISAは赤色の棒によって示し、単球は青色の棒によって示した。

【図12】図12は、FACS後のマウス末梢血についてのゲーティングスキームを示すグラフの集合を示す図である。

【図13】図13は、マウス末梢血集団におけるH3K27me3メチルマークの蔓延を示す図である。

【図14】図14は、タゼメトスタットに対するマウス白血球集団の特異な感受性を示す一連のグラフを示す図である。

【図15】図15は、H3K27me3阻害全体に対する細胞型寄与を示す図である。

【図16】図16は、クロマチンフローサイトメトリー対ELISAのH3K27me3定量化を示す図である。

【図17】図17は、EZH2突然変異体および野生型細胞株におけるEPZ007210に対する用量応答を示す一連のプロットを示す図である。H3K27me3ステータスは、以下のEPZ007210濃度、DMSOのみ(黄色)、0.3nM(淡青色)、1nM(マゼンタ)、4nM(ピンク)、12nM(濃緑色)、37nM(薄緑色)、111nM(オレンジ色)、333nM(濃い青緑色)、および1000nM(赤色)とのインキュベーション後のフローサイトメトリープロットで示される。

【図18】図18は、FACS後のヒト末梢血についてのゲーティングスキームを示す一連のプロットを示す図である。以下のカラースキームを適用する：顆粒球は、赤色に塗り、単球は、青色に塗り、T細胞は、青色に塗り、B細胞は、マゼンタに塗る。

【図19】図19は、ヒト末梢血集団におけるH3K27me3メチルマークの相対的な蔓延を示す図である。

【図20】図20は、タゼメトスタット処置によるNHL治療におけるH3K27me3阻害を示す1対のグラフを示す図である。

【図21】図21は、サイクル2 1日目(C2D1)、サイクル2 15日目(C1D15)、および/またはサイクル2 1日目(C2D1)に800mg BIDタゼメトスタットを投薬した51人の患者から集められた血液に対するH3K27me3/H3フローによって単離された単球についての第II相薬力学を示す図である。

【図22】図22は、サイクル2 1日目(C2D1)、サイクル2 15日目(C1D15)、および/またはサイクル2 1日目(C2D1)に800mg BIDタゼメトスタットを投薬した51人の患者から集められた血液に対するH3K27me3/H3フローによって単離された顆粒球についての第II相薬力学を示す図である。

【図23】図23は、サイクル2 1日目(C2D1)、サイクル2 15日目(C1D15)、および/またはサイクル2 1日目(C2D1)に800mg BIDタゼメトスタットを投薬した51人の患者から集められた血液に対するH3K27me3/H3フローによって単離されたT細胞についての第II相薬力学を示す図である。T細胞は、タゼメトスタット暴露の15日目(サイクル1 15日目)にH3K37me3の中程度であるが、統計的に著しい増加を示し、その後、30日目(サイクル2、1日目)にベースラインに戻った。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0048】

導入

クロマチン構造のエピジェネティックな修飾は、遺伝子発現が調節される機序である。クロマチンは、DNA、RNA、およびタンパク質（たとえばヒストン）の複合体からなる。エピジェネティックな修飾は、他のプロセスの中でも、クロマチンのアセチル化およびメチル化を含む。異常なエピジェネティックな修飾および様々な種類の疾患の間の関係は、以前に示された。エピジェネティックな修飾における変化に関連する疾患は、様々な種類の癌、神経変性障害、炎症状態、および口の疾患を含む。

【0049】

様々な機序によるヒストンの修飾（たとえばメチル化、アセチル化、リン酸化、およびユビキチン化（ubiquitinylation））は、エピジェネティックな調節に関係する。ヒストンは、5つのファミリーに分類される。ヒストンのこれらのファミリーは、H1/H5、H2A、H2B、H3、およびH4である。これらのヒストンファミリーは、コアヒストン（H2A、H2B、H3、およびH4）ならびにリンカーヒストン（H1およびH5）としてさらに分類される。コアヒストンは、集まって、1組の8つのタンパク質になり、DNAが周囲を覆うヒストン八量体を作る。ヒストン八量体は、各コアヒストンの2つのコピーから構成される。ヒストンの修飾（たとえばHMTを介してのメチル化による）は、遺伝子発現における変化に関連する。ヒストンメチルトランスフェラーゼ（HMT）は、遺伝子発現をコントロールする調節系の一部を構成する。HMTは、特定のヒストンアミノ酸、すなわちリシン残基およびアルギニン残基上へのメチルマーク（たとえば1つ、2つ、または3つのメチル基）の転移によって、遺伝子発現を調節する。遺伝子変化は、HMT活性を変化させてもよく、結果として、調節の誤った遺伝子発現およびヒストン上へのメチルマークの結果として生ずる異常な転移により、HMTを腫瘍形成性にする。

エピジェネティックなマーク、たとえばヒストンメチル化マークを検出するための以前の方法は、エピジェネティックモジュレーター（たとえばタゼメトスタット）による被検体の処置の間のそのようなエピジェネティックなマークの有意な検出およびモニタリングを可能にできなかった。本開示のいくつかの態様は、細胞型が異なると、エピジェネティックモジュレーターの投与に対する反応が異なるという認識に関する。以前の方法と異なり、本開示の方法は、このばらつきを説明し、単離、濃縮、または精製細胞集団におけるエピジェネティックなマークの正確で有意な決定およびモニタリングを可能にする。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、たとえば、被検体または被検体から得られるサンプルから細胞の亜集団を単離し、そのような亜集団におけるエピジェネティックなマーカーを測定することによって、臨床の場で使用することができる、費用および時間について効率的な分析を提供する。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、たとえば、細胞の亜集団を単離するための蛍光活性化セルソーター技術または磁気細胞選別技術およびそのような亜集団におけるエピジェネティックなマーカーを測定することによる細胞選別手順を組み込む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、疾患または疾患に関連するエピジェネティックな状態を診断するために、被検体がエピジェネティックモジュレーターによる処置についての候補となるかどうかを決定するために、および/または被検体における、細胞の標的集団に対する、たとえば、血球の亜集団におけるヒストンメチル化に対する、エピジェネティックな状態にある被検体に投与される、たとえばヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤などのようなエピジェネティックモジュレーターの効果をモニターするために、被検体におけるエピジェネティックなマークを評価するのに有用である。

【0050】

エピジェネティックなバイオマーカーを決定するための方法

本開示は、H3メチル化マークの検出のための役立つ例を提供するが、本明細書において提供される方法は、このバイオマーカーに限定されない。本開示の方法、戦略、およびアッセイは、検出することができる任意のエピジェネティックな修飾（たとえばメチル化

10

20

30

40

50

、アセチル化、リン酸化、およびユビキチン化)のステータスをモニターするために使用されてもよい。

【0051】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される方法は、エピジェネティックモジュレーターとの投与に反応することが知られている、または疑われる標的細胞における任意のエピジェネティックな修飾のステータスをモニターするための手段を提供する。いくつかのそのような実施形態では、本開示の方法、戦略、およびアッセイは、関心のある細胞集団を単離するステップおよびその濃縮、単離、または精製細胞集団におけるエピジェネティックなマーク、たとえばヒストンメチル化マークを測定するステップを含む。

【0052】

いくつかの実施形態では、細胞の標的集団は、細胞の形状、サイズ、細胞表面タンパク質発現(細胞表面抗原を含むが、これらに限定されない)、エピジェネティックな修飾、またはその任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない1つ以上の物理的な特徴またはバイオマーカーによって同定されてもよい。エピジェネティックなおよびタンパク質の修飾は、バイオマーカーとして使用されてもよく、たとえばゲノム配列またはタンパク質配列のメチル化、アセチル化、ユビキチン化を含んでいてもよいが、これらに限定されなくてもよい。エピジェネティックなおよびタンパク質の修飾は、絶対的な(たとえば存在/不在)または相対的な用語(たとえば、未修飾部位もしくはタンパク質に対する修飾部位もしくはタンパク質の比率;全部位/利用可能な全部位もしくは総タンパク質に対する修飾部位もしくはタンパク質の比率;細胞当たりの修飾部位もしくはタンパク質の比率または亜集団もしくは細胞当たりの修飾細胞の数;外部標準(たとえば、癌の危険性を示すもしくは予測するための既知の閾値)と比較した修飾部位もしくはタンパク質の比率;またはその任意の組み合わせで測定されてもよい。上記に列挙されるバイオマーカーは、例示的なものであることが意図され、かつ本開示を限定しないことが理解されるであろう。さらなる適したバイオマーカーは、本開示および当技術分野における知識に基づいて当業者らに明らかになるであろう。

【0053】

標的細胞集団は、血液から、たとえば末梢血からまたは末梢血単核細胞、リンパ系細胞、骨髄系細胞、骨髄系幹細胞もしくは前駆細胞、赤芽球、巨核球、骨髄芽球、血小板、顆粒球、好塩基球、好酸球、好中球、前単球、単球、マクロファージ、骨髄系樹状細胞、MDC1c細胞、MDC2細胞、肥満細胞、リンパ系幹細胞もしくは前駆細胞、胸腺細胞、Tリンパ球、細胞障害性T細胞、Tヘルパー細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラーT(NK/T)細胞、活性化T細胞、B細胞、活性化B細胞、形質細胞、ナチュラルキラーB(NK/B)細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、形質細胞様樹状細胞;またはその任意の組み合わせの集団から単離される細胞を含むが、これらに限定されない任意の適した細胞型を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、標的細胞は、細胞表面抗原のまたは細胞表面抗原の組み合わせの存在または不在によって特徴付けられる。例示的な細胞表面抗原は、CD1c、CD2、CD3、CD3、CD4、CD8、CD10、CD11、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD24、CD25、CD28、CD30、CD34、CD38、CD40、CD44、CD45、CD45R、CD49b、CD56、CD61、CD71、CD95、CD117、CD123、CD133、CD138、CD141、CD150、CD184、CD271、CD347、GR-1、IgA、IgD、IgM、もしくはHLA-DRまたはその任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0054】

いくつかの実施形態では、標的細胞集団は、生物学的サンプルから単離される細胞の亜集団または他の細胞に加えて亜集団を含む細胞集団を含む。いくつかの実施形態では、細胞の亜集団は、細胞選別技術によって、たとえば磁気細胞選別またはフローサイトメトリーによって単離されてもよいまたは同定されてもよい。例示的な適した細胞選別技術は、蛍光活性化セルソーター(FACS)および磁気活性化細胞選別(MACS)を含むが、

10

20

30

40

50

これらに限定されない。

【0055】

本開示の方法、戦略、およびアッセイは、細胞集団または亜集団を、これらの集団が、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%のまたは中間の任意のパーセンテージの、本明細書において標的細胞とも呼ばれる関心のある細胞を含有するまで、単離する、ソートする、および/または精製するための1つ以上のステップを含んでいてもよい。関心のある細胞は、関心のある1つ以上の物理的な特徴またはバイオマーカーを提示してもよい。その代わりにまたはさらに、関心のある細胞は、エピジェネティックモジュレーターによる処置に対して感受性であってもよいまたはエピジェネティックモジュレーターによる処置に対して感受性である組織もしくは被検体から単離されてもよいもしくは得られてもよい。いくつかの実施形態では、エピジェネティックモジュレーターによる処置に対して感受性である標的細胞の集団は、標的細胞集団およびそのような処置に対して感受性ではない他の細胞またはそのような処置に対して標的細胞集団よりも小さな感受性をもしくは混合性の反応を示す細胞を含む細胞のより大きな集団から単離される。

10

【0056】

本開示の方法、戦略、およびアッセイは、エピジェネティックモジュレーターによる処置に対して感受性である細胞、組織、および/または被検体を同定するために使用されてもよい。本開示の方法、戦略、およびアッセイは、エピジェネティックモジュレーターによる処置の間の被検体、たとえばEZH2阻害剤(たとえばタゼメトスタット)を受けている被検体におけるエピジェネティックなマークの状態、たとえばヒストンメチル化のステータスをモニターするために使用されてもよい。本開示の方法、戦略、およびアッセイは、エピジェネティックモジュレーター(タゼメトスタットを含む)による被検体の処置の前に被検体から得られる細胞または組織におけるエピジェネティックなマークの第1のレベルを決定するステップ、治療有効量のエピジェネティックモジュレーターを投与するステップ、およびエピジェネティックモジュレーターによる処置後に被検体から得られる細胞または組織におけるエピジェネティックなマークの第2のレベルを決定するステップを含んでいてもよい。この方法は、各処置の後に、1回以上繰り返されてもよい。たとえば、被検体から得られる細胞または組織における第2のおよび/または次のレベルのエピジェネティックなマークは、エピジェネティックモジュレーターによる処置後、毎日、一日おき、毎週、1週間おき、毎月、または1か月おきに決定されてもよい。ある実施形態では、被検体から得られる細胞または組織における第2のおよび/または次のレベルのエピジェネティックなマークは、エピジェネティックモジュレーターによる処置後、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、もしくは24時間おき; 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、もしくは14日おき; 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくは12週間おき; 1、2、3、4、5、もしくは6か月おきにまたは毎年決定されてもよい。

20

30

【0057】

本開示の方法、戦略、およびアッセイは、特定の処置の転帰が達成されるまで、エピジェネティックモジュレーターによる処置の間の被検体、たとえばEZH2阻害剤(たとえばタゼメトスタット)を受けている被検体をモニターするために使用されてもよい。たとえば、本開示の方法、戦略、およびアッセイは、第2または次のレベルのエピジェネティックな修飾が、エピジェネティックな修飾の第1のレベルと比較して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、100%ダウンレギュレートされるまたは低下するまで、エピジェネティックモジュレーターによる処置の間の被検体、たとえばEZH2阻害剤(たとえばタゼメトスタット)を受けている被検体をモニターするために使用されてもよい。本開示の方法、戦略、およびアッセイは、被検体が疾患(たとえば癌)からの寛解の期間に入るまで、エピジェネティックモジュレーターによる処置の間の被検体、たとえばE

40

50

ZH2阻害剤(たとえばタゼメトスタット)を受けている被検体をモニターするために使用されてもよい。本開示の方法、戦略、およびアッセイは、被検体が少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12週間;1、2、3、4、5、もしくは6か月間;または1年間の期間、疾患または障害が無症状となるまで、エピジェネティックモジュレーターによる処置の間の被検体、たとえばEZH2阻害剤(たとえばタゼメトスタット)を受けている被検体をモニターするために使用されてもよい。

【0058】

ある実施形態では、あるレベルのエピジェネティックなマークは、健康または正常と考えられてもよいのに対して、この「正常な」レベルを上回るまたは下回るずれは、異常であると考えられる。たとえば、いくつかの実施形態では、「正常な」エピジェネティックな状態に特徴的な適した参照レベルは、健康な被検体において測定されるエピジェネティックなマークのレベル、被検体の集団、たとえば健康な被検体の集団もしくは被検体の一般集団にわたって測定されるエピジェネティックなマークの平均レベル、または歴史的なもしくは実験的な値である。さらなる適した参照レベルは、本発明の開示に基づいて当業者らに明らかになるであろう、また、本開示は、この点で限定されるものではない。本開示の方法、戦略、およびアッセイは、その被検体におけるエピジェネティックな修飾のレベルが病理学的に高いまたは低いレベルから「正常な」レベルに戻るまで、エピジェネティックモジュレーターによる処置の間の被検体、たとえばEZH2阻害剤(たとえばタゼメトスタット)を受けている被検体をモニターするために使用されてもよい。ある実施形態では、「正常な」レベルは、関心のある状態についていかなる徴候も症状もなく、任意選択で、関心のある状態を発症する病歴および/または遺伝的危険因子が全くない個体におけるエピジェネティックな修飾のレベルを検出することによって確立されてもよい。

10

20

【0059】

例示的な適した細胞集団

本開示の方法、戦略、およびアッセイは、1つの細胞型またはエピジェネティックモジュレーターの投与に対して細胞の混合集団(たとえば、同様の物理的特徴を有するもしくは同様のバイオマーカーを示す細胞について濃縮する前の生検材料もしくは生物学的サンプル由来の細胞の集団)よりも類似して反応する非常に関係のある亜型(たとえば共通の幹細胞前駆体もしくは組織型に由来する)の収集物を主に含むように単離された、濃縮された、または精製された細胞集団を含む。たとえば、本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、リンパ系細胞を含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。いくつかの実施形態では、本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、骨髄系細胞を含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。いくつかの実施形態では、本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、骨髄系幹細胞もしくは前駆細胞、赤芽球、巨核球、骨髄芽球、血小板、顆粒球、好塩基球、好酸球、好中球、前単球、単球、マクロファージ、骨髄系樹状細胞、MDC1c細胞、MDC2細胞、肥満細胞、リンパ系幹細胞もしくは前駆細胞、胸腺細胞、Tリンパ球、細胞障害性T細胞、Tヘルパー細胞、調節性T細胞、ナチュラルキラーT(NK/T)細胞、活性化T細胞、B細胞、活性化B細胞、形質細胞、ナチュラルキラーB(NK/B)細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、形質細胞様樹状細胞、またはその任意の組み合わせを含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。いくつかの実施形態では、細胞の集団は、末梢血からまたは被検体から得られる末梢血単核細胞の集団から単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。

30

40

【0060】

本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、細胞表面抗原または細胞表面抗原の組み合わせの発現によって特徴付けられる細胞を含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、CD1c、CD2、CD3、CD3、CD4、CD8、

50

CD10、CD11、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD24、CD25、CD28、CD30、CD34、CD38、CD40、CD44、CD45、CD45R、CD49b、CD56、CD61、CD71、CD95、CD117、CD123、CD133、CD138、CD141、CD150、CD184、CD271、CD347、GR-1、IgA、IgD、IgM、もしくはHLA-DRまたはその任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、CD3、CD10、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD20、CD24、CD28、CD34、CD38、CD40、CD45、CD45R、CD49b、CD95、CD150、CD184、GR-1、IgA、IgD、IgM、およびHLA-DRまたはその任意の組み合わせである。

10

【0061】

本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、CD133⁺、CD271⁺、CD11⁺、および/もしくはCD347⁺である骨髄系幹細胞もしくは前駆細胞；CD71⁺である赤芽球；CD61⁺である巨核球；CD61⁺である血小板；HLA-DR⁺およびCD14⁻である顆粒球；CD123⁺である好塩基球；CD44⁺である好酸球；CD15⁺および/もしくはCD16⁺である好中球；CD14⁺、CD11b⁺、CD16⁻、および/もしくはHLA-DR⁺である単球；CD1c⁺であるMDC1c細胞；CD141⁺であるMDC2細胞；CD117⁺である肥満細胞；CD34⁺、CD133⁺、CD271⁺、CD117⁺であるリンパ系幹細胞もしくは前駆細胞；CD2⁺および/もしくはCD3⁺であるTリンパ球（T細胞）；CD8⁺である細胞障害性T細胞；CD4⁺であるTヘルパー細胞；CD4⁺およびCD25⁺である調節性T細胞；CD3⁺およびCD56⁺であるNK/T細胞；CD56⁺であるナチュラルキラーT細胞；CD25⁺およびCD30⁺である活性化T細胞；CD19⁺および/もしくはCD20⁺であるB細胞；CD19⁺、CD25⁺、および/もしくはCD30⁺である活性化B細胞；CD138⁺である形質細胞；CD56⁺であるナチュラルキラーB細胞；CD3⁻、CD19⁻、HLA-DR⁺、およびCD16⁻であるナチュラルキラー（NK）細胞；CD304⁺である形質細胞様樹状細胞；またはその任意の組み合わせを含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。

20

【0062】

本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、B細胞を含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。

30

【0063】

本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、T細胞を含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。

【0064】

本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、単球を含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。いくつかの実施形態では、単球は、CD14⁺およびCD16⁻；CD14^{1°w}およびCD16⁺；もしくはCD14^{hi}ig^hおよびCD16^{1°w}単球またはその任意の組み合わせである。

40

【0065】

本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、顆粒球を含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。いくつかの実施形態では、顆粒球は、好中球、好酸球、もしくは肥満細胞またはその任意の組み合わせである。

【0066】

本開示の方法、戦略、およびアッセイの細胞集団は、少なくとも50%、少なくとも6

50

0%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、100%、または中間の任意のパーセンテージの関心のある細胞を含む、から本質的になる、またはからなるように単離されてもよい、濃縮されてもよい、または精製されてもよい。関心のある細胞は、関心のある1つ以上の物理的な特徴またはバイオマーカーを提示してもよい。

【0067】

さらなる適した細胞集団は、本発明の開示に基づいて当業者らに明らかになるであろう、また、適した純度の適した細胞集団を単離するための適した細胞表面マーカーは、当業者らに知られているであろう。標的細胞集団は、当技術分野において知られている任意の適した細胞選別技術によって同定する、単離する、および/または精製することができる。適した細胞選別技術およびいくつかの例示的な適した標的細胞集団に特徴的な細胞表面マーカーは、いくつかの実施形態において、以下の1つ以上において記載されるものを含んでいてもよく、それぞれの内容は、全体が参照によって組み込まれる。Flow Cytometry Protocols (Methods in Molecular Biology) 3rd ed. 2011; by Teresa S. Hawley (Editor), and Robert G. Hawley (Editor); ISBN - 10: 1617379492; Flow Cytometry: Principles and Applications, 2007, by Marion G. Macey (Editor); ISBN - 10: 1588296911; T Cell Protocols (Methods in Molecular Biology), 2008, by Gennaro De Libero (Editor); ISBN - 10: 1588295877; Immunophenotyping, 1st Edition, by Carleton C. Stewart (Editor), Janet K. A. Nicholson (Editor); ISBN - 10: 0471239577; Flow Cytometry and Cell Sorting (Springer Lab Manuals) 2nd Edition, 2000; by Andreas Radbruch (Editor); ISBN - 10: 3642084923; 様々な細胞型についての例示的な適したCD抗原およびCD抗原プロファイルのリストは、Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 5th edition., by Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al.; New York: Garland Science; 2001.; ISBN - 10: 081533642XのAppendix II, CD Antigensにおいて提供される。

【0068】

EZH2

EZH2は、本開示の例示的なヒストンメチルトランスフェラーゼである。本開示は、あるエピジェネティックモジュレーター（たとえばEZH2阻害剤、特にタゼメトスタット）の機序の詳細な分析および使用を提供するが、本開示は、メチル化マーク、EZH2阻害剤、またはタゼメトスタットに限定されない。本明細書において記載される方法、戦略、およびアッセイは、任意のエピジェネティックな修飾に適用されてもよく、任意のエピジェネティックモジュレーターの進行をモニターするために使用されてもよい。

【0069】

ヒストンメチルトランスフェラーゼであるEZH2は、様々な種類の癌に関連している。詳細には、EZH2の突然変異および/または過剰活性が、リンパ腫、白血病、および乳癌などのような一連の癌において見つけられる。抗癌処置に使用するためのEZH2阻害剤として新規薬剤および混合細胞集団におけるエピジェネティックな修飾を評価するための新規方法の必要性が依然として存在する。

【0070】

EZH2はヒストンメチルトランスフェラーゼであり、ヒストンH3上のリジン27 (H3 - K27) のモノメチル化からトリメチル化を触媒するPRC2複合体の触媒サブユ

10

20

30

40

50

ニットである。ヒストンH3 - K27トリメチル化は、ヒストン修飾部位の近位にある特定遺伝子の転写を抑制する機序である。このトリメチル化は、前立腺癌などの癌における発現変化を示す癌マーカーであることが知られている（たとえば、米国特許出願公開第2003/0175736号明細書を参照されたい：その内容全体を、参照により本明細書に援用する）。他の研究から、EZH2発現の調節異常、転写抑制、および悪性形質転換の間の機能的な連結を示す証拠が提供された。Varambally et al. (2002) Nature 419 (6907) : 624 - 9 Kleer et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100 (20) : 11606 - 11。

【0071】

EZH2メチル化活性は、胚中心B細胞の調節および活性化に重要な役割を果たす。EZH2タンパク質レベルは、B細胞の活性化に伴って増大する。活性化後、B細胞はリンパ器官の胚中心に滞留し、そこで、抗アポトーシス遺伝子およびチェックポイント調節因子の抑制に関連した過程である体細胞高頻度変異が生じる。EZH2メチル化事象は、CDKN1A（細胞増殖に役割）、PRDM1（B細胞分化に役割）、およびIRF4（B細胞分化に役割）を含む、B細胞の増殖、分化、および成熟に関する遺伝子を標的にする。

【0072】

胚中心由来のB細胞の成熟および流出の後、B細胞内のEZH2レベルは低下する。しかしながら、B細胞成熟後のEZH2の存在および活性は、とりわけ胚中心B細胞リンパ腫を含む、いくつかの種類のリンパ腫に関連する。

【0073】

EZH2の異常な活性化または誤調節は、非ホジキンリンパ腫（NHL）の多くの一般的な亜型：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、胚中心B細胞様びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（GCB DLBCL）、活性化B細胞リンパ腫を含む、非胚中心B細胞様びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（ABC DLBCL）、パーキットリンパ腫、および非ホジキンリンパ腫の他の亜型に見出されている。EZH2の異常な活性化または誤調節はまた、濾胞性リンパ腫（FL）、縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBC）、および辺縁帯リンパ腫（MZL）に見出されている。

【0074】

いくつかの種類のEZH2活性化突然変異が、記載された。EZH2活性化突然変異は、ヒストン3リシン27のトリメチル化（H3K27me3）をもたらし、いくつかの腫瘍抑制遺伝子のサイレンシングをもたらす。ある実施形態では、ヒトEZH2のY641突然変異、同じくEZH2のY641突然変異は、野生型ヒトEZH2のY641に対応するアミノ酸残基がチロシン以外のアミノ酸残基によって置換される、一種の活性化EZH2突然変異を指す。

【0075】

野生型EZH2遺伝子を有する被検体は、H3K27me3メチル化マークを有してもよいが、EZH2遺伝子内の遺伝子変化は、ヒストンメチル化パターンの変化に関連する。アミノ酸Y641（Y646に等価、触媒ドメイン）のF、N、H、S、またはCへの変換をもたらすEZH2突然変異は、H3K27の過剰トリメチル化をもたらし、リンパ腫形成を促進する。H3K27のメチル化に影響を及ぼすさらなる遺伝的变化としては、EZH2 SETドメイン突然変異、EZH2の過剰発現、他のPRC2サブユニットの過剰発現、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）の機能喪失突然変異、およびMLL2の機能喪失を含む。EZH2 Y646突然変異についてヘテロ接合性である細胞は、EZH2タンパク質についてホモ接合性の野生型（WT）である細胞またはY646突然変異についてホモ接合性である細胞と比較して、H3K27の過剰トリメチル化をもたらす。

【0076】

本開示の方法のエピジェネティック修飾ヒストンは、H3K4me2/3、H3K79

10

20

30

40

50

me₃、H₃K₉me_{2/3}、H₃K₂₇me_{2/3}、H₃K₃₆me_{2/3}、および/
またはH₄K₂₀me₃を含んでいてもよいが、これらに限定されない。ある実施形態では、エピジェネティック修飾ヒストンは、H₃K₂₇me₃を含む。

【0077】

本開示の方法のエピジェネティック修飾ヒストン内のエピトープは、少なくとも1つのメチル化アミノ酸残基を含んでいてもよい。メチル化アミノ酸残基は、少なくとも1つのメチル基を含んでいてもよい。ある実施形態では、メチル化アミノ酸残基は、1つのメチル基を含んでいてもよい。ある実施形態では、メチル化アミノ酸残基は、2つのメチル基を含んでいてもよい。ある実施形態では、メチル化アミノ酸残基は、3つのメチル基を含んでいてもよい。

10

【0078】

本明細書において記載される方法のエピジェネティック修飾ヒストン内のエピトープは、非線状エピトープであってもよい。その代わりにまたはさらに、エピトープは、立体エピトープであってもよい。その代わりにまたはさらに、エピトープは、非線状エピトープであってもよい。その代わりにまたはさらに、エピトープは、非連続エピトープであってもよい。好ましくは、本開示のエピトープは、ヒトエピトープである。

【0079】

本明細書において記載される方法のエピジェネティック修飾ヒストン内のエピトープは、少なくとも1つのメチル化リシン(K)を含んでいてもよい。少なくとも1つのメチル化リシン(K)は、H₃またはH₄に位置してもよい。ある実施形態では、少なくとも1つのメチル化リシン(K)は、H₃に位置する。ある実施形態では、少なくとも1つのメチル化リシン(K)は、H₄に位置する。たとえば、あるメチル化リシン(K)は、H₃K₄me_{2/3}、H₃K₇₉me₃、H₃K₉me_{2/3}、および/
またはH₃K₂₇me_{2/3}であってもよい。たとえば、あるメチル化リシン(K)は、H₄K₂₀me₃であってもよい。

20

【0080】

クロマチンフローサイトメトリーは、インビボにおける化合物処置に際してメチル化の状態における細胞型特異的な変化をモニターするための有効な手段である。クロマチンフローサイトメトリーは、化合物処置によるエピジェネティックな修飾をモニターする手段として細胞株において検証された。マウスインビボ用量応答研究およびヒト臨床試験におけるPDモニタリングは、個々の細胞型でのエピジェネティックな調節を定量する有効な手段としてクロマチンフローサイトメトリーを確立する。ヒストンメチル化の従来手段にまさるこの手法の利点を考慮して、クロマチンフローサイトメトリーは、タゼメトスタットの進行中の第2相臨床試験および今後の臨床試験において、全血中白血球におけるH₃K₂₇me₃阻害の薬力学をモニターするために使用されるであろう。

30

【0081】

本開示の方法によれば、活性化EZH2突然変異は、H₃K₃₇のトリメチル化(H₃K₂₇me₃とも呼ばれる)をもたらしてもよい。

【0082】

本開示の方法によれば、ヒストンメチル化のレベルを検出することは、いくつかの実施形態では、被検体由来の生物学的サンプルにおいてH₃K₂₇トリメチル化(H₃K₂₇me₃)のレベルを検出することを含む。ヒストンメチル化ステータスは、処置の開始前に、被検体が処置を受けている間に、および/
または処置を終えた後に検出されてもよい。

40

【0083】

本開示の方法によれば、本開示のある実施形態では、H₃K₂₇me₃のレベルは、サンプル中の総Hのレベルとの比較によって比較されるおよび/
または標準化される。本開示のある実施形態では、比較/標準化のステップは、シグナルの安定性および/
または明確さを向上させる。本開示のある実施形態では、比較/標準化のステップは、シグナルの安定性の向上にとって不可欠である。本開示のある実施形態では、比較/標準化のステッ

50

ブは、アッセイ内およびアッセイ間のメチル化測定値の間の正確な比較を可能にする。

【0084】

本開示の方法によれば、突然変異型 EZH2 は、突然変異型 EZH2 ポリペプチドをコードするポリペプチド配列または核酸配列を含んでいてもよい、から本質的になってもよい、またはからなってもよい。ある実施形態では、突然変異型 EZH2 は、その基質ポケットドメインに1つまたは複数の突然変異を含む。たとえば、突然変異は、置換、点突然変異、ナンセンス突然変異、ミスセンス突然変異、欠失、または挿入であってもよい。EZH2 突然変異を検出する方法は、国際公開第2012/034132号パンフレット、国際公開第2013/138361号パンフレット、米国特許出願公開第2015-0099747号明細書においてさらに記載され、それぞれの内容は、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる。

10

【0085】

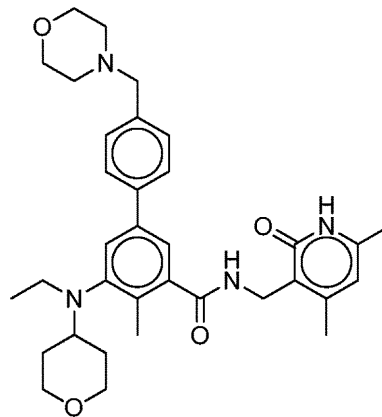
本開示の方法は、治療有効量の EZH2 阻害剤を被検体に投与するステップを含んでいてもよい。その代わりにまたはさらに、本開示は、EZH2 阻害剤の投与後に H3K27 のエピジェネティックなステータスをモニターするための方法を提供する。したがって、本開示の方法は、EZH2 阻害剤による処置前におよび/または後に癌を有する被検体の H2K27me3 ステータスを検出することならびに処置前の検出の結果を処置後の検出の結果と比較することを含み、検出の低下は、被検体のステータスの改善を示し、被検体に投与される EZH2 阻害剤の用量が治療的に有効であることを検証する。

20

【0086】

本開示の方法に適した EZH2 阻害剤は、

【化2】



30

(EPZ-6438 もしくはタゼメトスタットとも呼ばれる) またはその薬学的に許容される塩であってもよい。

【0087】

好ましくは、本開示の方法の被検体は、ヒトであるが、被検体は、任意の種であってもよい。被検体は、男性であっても女性であってもよい。被検体は、任意の年齢であってもよい。ある実施形態では、ヒト被検体は、40歳以下、30歳以下、20歳以下、または10歳以下である。ある実施形態では、ヒト被検体は、17歳以下である。

40

【0088】

本開示の方法の被検体は、癌を有していてもよい。ある実施形態では、癌は、リンパ腫であってもよい。リンパ腫の例示的な形態は、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、胚中心由来リンパ腫、非胚中心由来リンパ腫、濾胞性リンパ腫 (FL)、縦隔原発 B 細胞性大細胞型リンパ腫 (PMBCL)、辺縁帯リンパ腫 (MZL)、パーキットリンパ腫、および他の非ホジキンリンパ腫亜型を含むが、これらに限定されない。

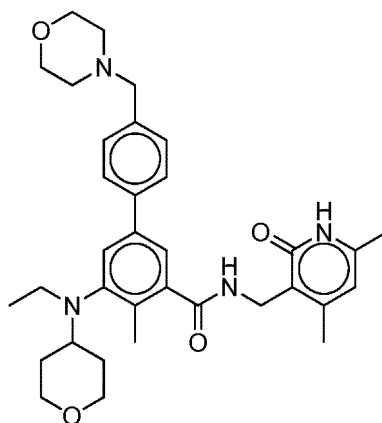
EPZ-6438 (タゼメトスタット)

【0089】

50

方法の E Z H 2 阻害剤は、E P Z - 6 4 3 8 (タゼメトスタット) :

【化 3】



10

またはその薬学的に許容される塩を含む、から本質的になる、またはからなる。本開示の方法の被検体への投与のための組成物は、E P Z - 6 4 3 8 (タゼメトスタット) またはその薬学的に許容される塩および薬学的に許容されるキャリアを含んでいてもよい、から本質的になってもよい、またはからなってもよい。

【0090】

20

本明細書に記載の E P Z - 6 4 3 8 またはその薬学的に許容される塩は、野生型および突然変異型 E Z H 2 の両方を標的にする能力がある。E P Z - 6 4 3 8 は、経口で生物利用可能であり、他のヒストンメチルトランスフェラーゼと比較して高い E Z H 2 選択性を有する (K_i に基づく 20,000 倍超の選択性) 。重要なことには、E P Z - 6 4 3 8 は、*in vitro* において、遺伝学的に定義された癌細胞を死滅させる標的メチルマーク阻害を有する。また動物モデルでは、標的メチルマークの阻害に続く持続的な *in vivo* 効力が示された。さらに本明細書に記載の臨床試験結果から、E P Z - 6 4 3 8 の安全性および効力が示された。

【0091】

E P Z - 6 4 3 8 またはその薬学的に許容される塩は、約 100 mg B I D ~ 約 1600 mg B I D などのように 1 日約 100 mg ~ 約 3200 mg の用量 (たとえば、100 mg B I D、200 mg B I D、400 mg B I D、800 mg B I D、または 1600 mg B I D) で被検体に投与されてもよい。E P Z - 6 4 3 8 またはその薬学的に許容される塩は、NHL を処置するために、約 100 mg B I D ~ 約 1600 mg B I D などのように 1 日約 100 mg ~ 約 3200 mg の用量 (たとえば、100 mg B I D、200 mg B I D、400 mg B I D、800 mg B I D、または 1600 mg B I D) で被検体に投与されてもよい。本開示の方法のある実施形態では、用量は、800 mg B I D である。

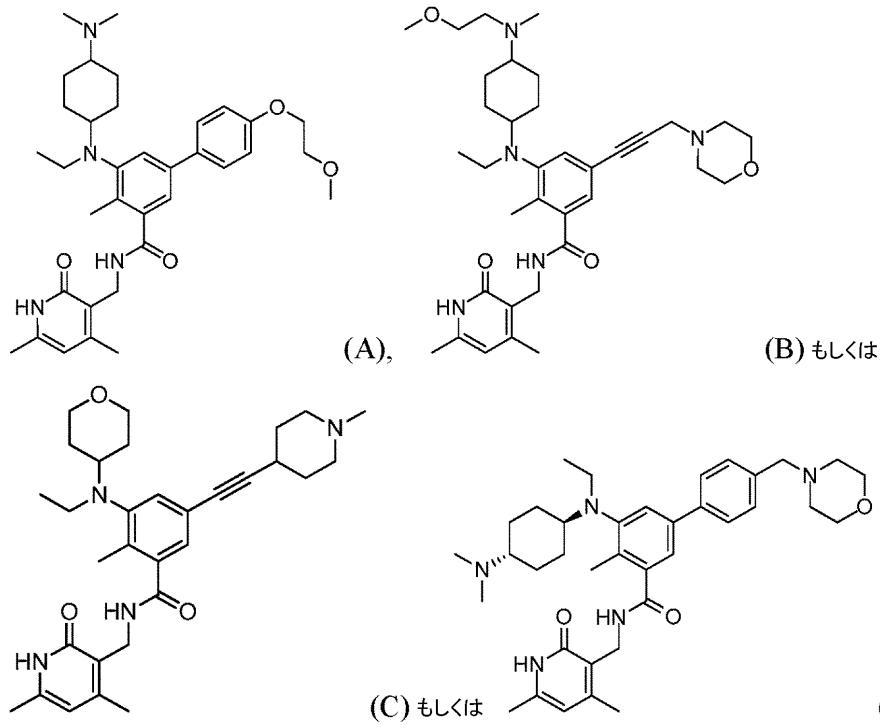
30

【0092】

いくつかの実施形態では、本明細書で示される任意の方法において使用することができる E Z H 2 阻害剤は、化合物 A ~ D のいずれか :

40

【化4】



10

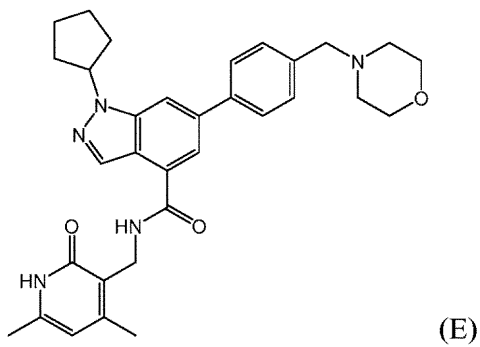
20

もしくはその立体異性体またはその薬学的に許容される塩および溶媒和物である。化合物 D はまた、本明細書において EPZ007210 と呼ばれる。

【0093】

ある実施形態では、本明細書で示される任意の方法において使用することができる EZH2 阻害剤は、化合物 E :

【化5】



30

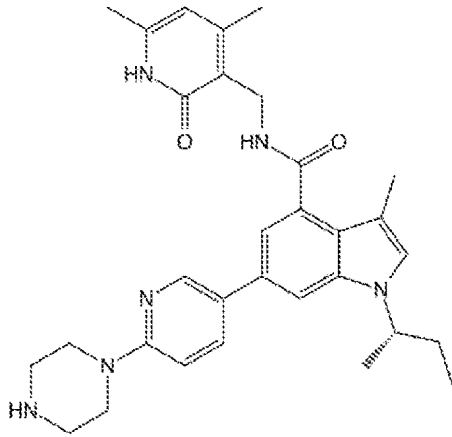
またはその薬学的に許容される塩である。

40

【0094】

いくつかの実施形態では、本明細書で示される任意の方法において使用することができる EZH2 阻害剤は、以下の式を有する GSK-126 :

【化6】



10

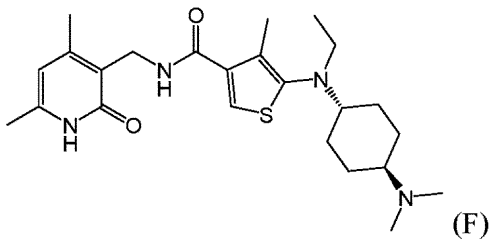
その立体異性体、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。

【0095】

ある実施形態では、本明細書で示される任意の方法において使用することができる E Z H 2 阻害剤は、化合物 F :

【化7】

20



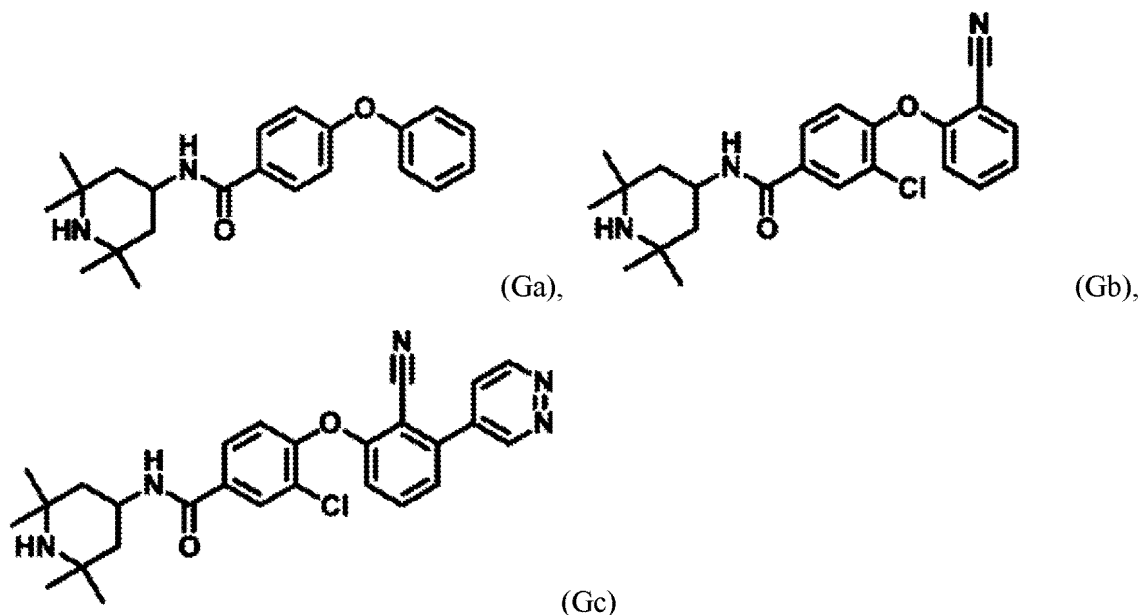
もしくはその立体異性体またはその薬学的に許容される塩および溶媒和物である。

30

【0096】

ある実施形態では、本明細書で示される任意の方法において使用することができる E Z H 2 阻害剤は、化合物 G a ~ G c のいずれか :

【化 8】



10

またはその立体異性体、薬学的に許容される塩、もしくは溶媒和物である。

20

【0097】

ある実施形態では、本明細書で示される任意の方法において使用することができる E Z H 2 阻害剤は、C P I - 1 2 0 5 または G S K 3 4 3 である。

【0098】

さらなる適した E Z H 2 阻害剤は、当業者らに明らかであろう。本明細書において提供される戦略、処置法、方法、組み合わせ、および組成物のいくつかの実施形態では、E Z H 2 阻害剤は、米国特許第 8, 536, 179 号明細書において記載される E Z H 2 阻害剤であり（他の化合物の中でも G S K - 1 2 6 について記載しており、国際公開第 2 0 1 1 / 1 4 0 3 2 4 号パンフレットに対応する）、それぞれの全内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。

30

【0099】

本明細書において提供される戦略、処置法、方法、組み合わせ、および組成物のいくつかの実施形態では、E Z H 2 阻害剤は、国際公開第 2 0 1 4 / 1 2 4 4 1 8 号パンフレットとして公開される P C T / U S 2 0 1 4 / 0 1 5 7 0 6 において、国際公開第 2 0 1 3 / 1 2 0 1 0 4 号パンフレットとして公開される P C T / U S 2 0 1 3 / 0 2 5 6 3 9 において、および米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 6 8 2 2 9 号明細書として公開される米国特許出願第 1 4 / 8 3 9, 2 7 3 号明細書において記載される E Z H 2 阻害剤であり、それぞれの全内容は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0100】

一実施形態では、本明細書に開示の化合物は、化合物それ自体、すなわち遊離塩基または「裸の」分子である。別の実施形態では、化合物は、その塩、たとえば、裸の分子のモノ H C l 塩またはトリ H C l 塩、モノ H B r 塩またはトリ H B r 塩である。

40

【0101】

窒素を含有する本明細書に開示の化合物は、酸化剤（たとえば、3-クロロペルオキシ安息香酸（m C P B A）および/または過酸化水素）による処理により N - オキシドに変換して、本明細書に開示の任意の方法に適した他の化合物にすることができる。したがって、提示し特許請求の範囲に記載する窒素含有化合物はすべて、原子価および構造により許容される場合、提示の化合物とその N - オキシド誘導体（N - O および N⁺ - O⁻ として示され得る）の両方を含むものと見なされる。さらに、他の例では、本明細書に開示の化合物中の窒素は、N - ヒドロキシ化合物または N - アルコキシ化合物に変換することが

50

できる。たとえば、N - ヒドロキシ化合物は、酸化剤、たとえば m - C P B A による親アミンの酸化により調製することができる。さらに、提示し特許請求の範囲に記載する窒素含有化合物はすべて、原子価および構造により許容される場合、提示の化合物と、その N - ヒドロキシ（すなわち、N - O H）誘導体および N - アルコキシ（すなわち、N - O R（式中、R は置換もしくは非置換 C₁ ~ C₆ アルキル、C₁ ~ C₆ アルケニル、C₁ ~ C₆ アルキニル、3 ~ 14 員炭素環または 3 ~ 14 員複素環である））誘導体との両方を包含すると見なされる。

【0102】

「異性」とは、化合物が同一の分子式を有するものの、その原子の結合順序またはその原子の空間配置が異なることを意味する。原子の空間配置が異なる異性体は「立体異性体」と呼ばれる。互いに鏡像でない立体異性体は「ジアステレオ異性体」と呼ばれ、互いに重ね合わせることができない鏡像である立体異性体は「エナンチオマー」と呼ばれ、光学異性体と呼ばれることもある。逆のキラリティーの各エナンチオマー形を等量含む混合物は「ラセミ混合物」と呼ばれる。

10

【0103】

同一でない4つの置換基に結合した炭素原子は「キラル中心」と呼ばれる。

【0104】

「キラル異性体」は、少なくとも1つのキラル中心を有する化合物を意味する。2つ以上のキラル中心を有する化合物は、個々のジアステレオマーとして存在することも、あるいは「ジアステレオマー混合物」と呼ばれるジアステレオマーの混合物として存在することも可能である。1つのキラル中心が存在する場合、立体異性体は、そのキラル中心の絶対配置（R または S）により特徴付けることができる。絶対配置とは、キラル中心に結合した置換基の空間配置を指す。検討対象のキラル中心に結合した置換基は、Sequence Rule of Cahn, Ingold and Prelog に従いランク付けされる。（Cahn et al., Angew. Chem. Inter. Edit. 1966, 5, 385; errata 511; Cahn et al., Angew. Chem. 1966, 78, 413; Cahn and Ingold, J. Chem. Soc. 1951 (London), 612; Cahn et al., Experientia 1956, 12, 81; Cahn, J. Chem. Educ. 1964, 41, 116）。

20

30

【0105】

「幾何異性体」は、存在する原因が二重結合またはシクロアルキルリンカー（たとえば、1,3 - シルコブチル）の周りの回転障壁であるジアステレオマーを意味する。これらの配置は、接頭辞シスおよびトランス、またはカーン - インゴルド - プレローグ順位則に従い各基が分子の二重結合に関して同じ側または反対側にあることを示す Z および E により、その名称で区別される。

【0106】

本明細書に開示の化合物は、異なるキラル異性体または幾何異性体として図示し得ることが理解されよう。さらに、化合物がキラル異性体形または幾何異性体形を有する場合、すべての異性体形が本開示の範囲に含まれることを意図しており、化合物の名称は任意の異性体形を除外するものではないことも理解されるべきである。

40

【0107】

さらに、こうした構造および本開示で考察された他の化合物は、そのすべてのアトロピック（atropic）異性体を含む。「アトロピック（atropic）異性体」は、2つの異性体の原子が空間で異なって配置されている立体異性体の1種である。アトロピック（atropic）異性体が存在する原因は、中心結合の周りの大きな基の回転障壁により引き起こされる回転の束縛である。こうしたアトロピック（atropic）異性体は典型的には混合物として存在するが、クロマトグラフィー技術の最近の進歩の結果、特定の場合、2つのアトロピック（atropic）異性体の混合物を分離することが可能になっている。

50

【0108】

「互変異性体」は、2つ以上の構造異性体が平衡状態で存在し、ある異性体形から別の異性体形に容易に変換される、それらの構造異性体の1つである。この変換の結果、水素原子が、隣接する共役二重結合の変化を伴って形式的に移動する。互変異性体は、溶液中で互変異性体のセットの混合物として存在する。互変異性が可能である溶液においては、互変異性体の化学平衡に達する。互変異性体の正確な比率は、温度、溶媒およびpHを含むいくつかの要因によって異なる。互変異性化により相互変換可能な互変異性体の概念は、互変異性と呼ばれる。

【0109】

本明細書に開示の化合物は、それ自体だけでなく、該当する場合には、その塩およびその溶媒和物も含む。塩は、たとえば、アニオンとアリアルまたはヘテロアリアル置換ベンゼン化合物の正電荷を帯びた基（たとえば、アミノ）との間で形成することができる。好適なアニオンとして、クロリド、プロミド、ヨージド、スルフェート、ビスルフェート、スルファメート、ニトレート、ホスフェート、シトレート、メタンスルホネート、トリフルオロアセテート、グルタメート、グルクロネート、グルタレート、マレート、マレエート、スクシネート、フマレート、タルトレート、トシレート、サリチレート、ラクテート、ナフタレンスルホネート、およびアセテート（たとえば、トリフルオロアセテート）が挙げられる。「薬学的に許容されるアニオン」という用語は、薬学的に許容される塩の形成に好適なアニオンをいう。同様に、塩は、カチオンとアリアルまたはヘテロアリアル置換ベンゼン化合物の負電荷を帯びた基（たとえば、カルボキシレート）の間でも形成することができる。好適なカチオンとして、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンおよびアンモニウムカチオン、たとえばテトラメチルアンモニウムイオンが挙げられる。アリアルまたはヘテロアリアル置換ベンゼン化合物は、第四級窒素原子を含む塩をさらに含む。塩形態では、化合物と塩のカチオンまたはアニオンとの比は、1：1であることも、1：1以外の任意の比、たとえば、3：1、2：1、1：2もしくは1：3であることもある。

10

20

【0110】

加えて、本明細書に開示の化合物、たとえば、化合物の塩は、水和もしくは非水和（無水）形態で存在しても、あるいは他の溶媒分子との溶媒和物として存在してもよい。水和物の非限定的な例として、一水和物、二水和物等が挙げられる。溶媒和物の非限定的な例として、エタノール溶媒和物、アセトン溶媒和物等が挙げられる。

30

【0111】

「溶媒和物」は、化学量論量あるいは非化学量論量の溶媒を含む溶媒付加形態を意味する。一部の化合物は、結晶性固体状態で一定のモル比の溶媒分子を捕捉する傾向があり、したがって溶媒和物を形成する。溶媒が水の場合、形成される溶媒和物は水和物であり、溶媒がアルコールの場合、形成される溶媒和物はアルコラートである。水和物は1つの物質分子と1つまたは複数の水分子の組み合わせにより形成され、水はその分子状態をH₂Oとして維持する。

【0112】

本明細書で使用する場合、「アナログ」という用語は、別の化学化合物と構造的に類似しているが、組成がやや異なる（異なる元素の原子による1つの原子の置き換え、または特定の官能基の存在、または別の官能基による1つの官能基の置き換えのように）化学化合物をいう。したがって、アナログは、参照化合物と機能および外観が類似または同様であるが、構造または起源が類似または同様でない化合物である。

40

【0113】

本明細書で定義した、「誘導体」という用語は、共通のコア構造を有するが、本明細書に記載するような様々な基で置換されている化合物をいう。たとえば、式(I)で表される化合物はすべて、アリアルまたはヘテロアリアル置換ベンゼン化合物であり、共通のコアとして式(I)を有する。

【0114】

50

本開示は、本化合物に存在する原子の同位体をすべて含むことを意図している。同位体は、同じ原子番号を有するが、異なる質量数を有する原子を含む。一般的な例として、限定するものではないが、水素の同位体としてトリチウムおよびジウテリウムがあり、炭素の同位体としてC - 13およびC - 14がある。

【0115】

本明細書で使用する場合、「処置すること」または「処置する」は、疾患、状態または障害の対処を目的とした患者の管理およびケアをいい、疾患、状態もしくは障害の症状または合併症を緩和するため、あるいは疾患、状態もしくは障害を除去するため本明細書に開示の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を投与することを含む。

10

【0116】

本明細書に開示の組成物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物はまた、疾患、状態または障害を予防するために使用してもよい。本明細書で使用する場合、「予防すること」または「予防する」は、疾患、状態もしくは障害の症状または合併症の発症を減少または除去することをいう。

【0117】

本明細書で使用する場合、「緩和する」という用語は、障害の徴候または症状の重症度を低下させるプロセスを記載することを意図している。重要な点として、徴候または症状は、除去することなく緩和することができる。好ましい実施形態では、本明細書に開示の医薬組成物を投与すると徴候または症状が除去されるが、しかしながら、除去は必須ではない。効果的な投薬量は徴候または症状の重症度を低下させると予想される。たとえば、複数の部位で起こり得る癌などの障害の徴候または症状は、複数の部位の少なくとも1つで癌の重症度が低下すると緩和される。

20

【0118】

本明細書において使用されるように、用語「重症度」は、疾患のステージまたは疾患の進行の可能性を指すことが意図される。癌との関連において、重症度は、癌が前癌性または良性状態から悪性状態に変化する可能性を典型的に指す。あるいは、またはさらに、重症度は、たとえば、TNM方式(International Union Against Cancer(UICC)およびAmerican Joint Committee on Cancer(AJCC)により認められた)により、あるいは他の当該技術分野において承認されている方法により癌の病期を記載し得る。癌の病期とは、原発腫瘍の位置、腫瘍の大きさ、腫瘍数およびリンパ節転移(癌のリンパ節への広がり)などの因子に基づく癌の程度または重症度をいう。あるいは、またはさらに、重症度は、当該技術分野において承認されている方法により腫瘍グレードを記載することを意図している(米国国立癌研究所(National Cancer Institute)、www.cancer.govを参照されたい)。腫瘍グレードは、癌細胞が顕微鏡下でどのように異常に見えるか、そして腫瘍がいかに急速に増殖し広がる傾向があるかという観点から癌細胞を分類するのに使用するシステムである。腫瘍グレードを判定する際は、細胞の構造および増殖パターンなど多くの因子が考慮される。腫瘍グレードの判定に使用される具体的な因子は、各癌型によって異なる。重症度はまた、腫瘍細胞が同じ組織型の正常な細胞にどの程度類似しているかを示す、分化とも呼ばれる組織学的グレードもいう(米国国立癌研究所(National Cancer Institute)、www.cancer.govを参照されたい)。さらに、重症度は、腫瘍細胞の核の大きさおよび形状と、分裂している腫瘍細胞の割合とを示す核グレードについてもいう(米国国立癌研究所(National Cancer Institute)、www.cancer.govを参照されたい)。

30

40

【0119】

別の態様では、重症度は、腫瘍が増殖因子をどの程度分泌したか、細胞外マトリックスをどの程度分解したか、どの程度血管新生化したか、隣接した組織への接着をどの程度失ったか、あるいはどの程度転移したかをいう。さらに重症度は、原発腫瘍が転移した部位

50

の数も示す。最後に、重症度は、様々な型および部位の腫瘍の処置のしにくさを含む。たとえば、手術不能な腫瘍、複数の器官に到達しやすい癌（血液系および免疫系の腫瘍）、および伝統的な処置に最も抵抗性があるものが、最も重度と見なされる。これらの状況において、被検体の平均余命の延長および/または疼痛の低下、癌性細胞の比率の低下または細胞が1つの系に限定されること、ならびに癌の病期/腫瘍グレード/組織学的グレード/核グレードの改善は、癌の徴候または症状の緩和と見なされる。

【0120】

本明細書で使用する場合、「症状」という用語は、疾患、疾病、障害または体内に適切でないものがあることの兆しと定義される。症状は、症状を経験している個体を感じあるいは気付くものであるが、他人は容易に気付くことができない。他人は、非医療専門家と

10

【0121】

本明細書で使用する場合、「徴候」という用語も、体内に適切でないものがあることの兆しと定義される。ただし、徴候は、医師、看護師または他の医療専門家により確認することができるものと定義される。

【0122】

癌は、ほとんどすべての徴候または症状を引き起こし得る疾患群である。徴候および症状は、癌がどこにあるか、癌の大きさ、および癌が近くの器官または構造にどの程度影響を与えるかによって異なる。癌が広がる（転移する）場合、症状は体の様々な部分で現れることがある。

20

【0123】

癌を処置すると、腫瘍の大きさが小さくなることがある。腫瘍の大きさが小さくなることは、「腫瘍退縮」という場合もある。好ましくは、処置後、腫瘍の大きさは、処置前のその大きさと比較して5%以上縮小し；一層好ましくは、腫瘍の大きさは10%以上縮小し；一層好ましくは20%以上縮小し；一層好ましくは30%以上縮小し；一層好ましくは40%以上縮小し；なお一層好ましくは、50%以上縮小し；最も好ましくは、75%超縮小する。腫瘍の大きさは、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。腫瘍の大きさは、腫瘍の直径として測定してもよい。

【0124】

癌を処置すると、腫瘍容積が縮小することがある。好ましくは、処置後、腫瘍容積は、処置前のその大きさと比較して5%以上縮小し；一層好ましくは、腫瘍容積は10%以上縮小し；一層好ましくは20%以上縮小し；一層好ましくは30%以上縮小し；一層好ましくは40%以上縮小し；なお一層好ましくは50%以上縮小し；最も好ましくは75%超縮小する。腫瘍容積は、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。

30

【0125】

癌を処置すると、腫瘍の数が減少する。好ましくは、処置後、腫瘍数は、処置前の数と比較して5%以上減少し；一層好ましくは、腫瘍数は10%以上減少し；一層好ましくは20%以上減少し；一層好ましくは30%以上減少し；一層好ましくは40%以上減少し；なお一層好ましくは50%以上減少し；最も好ましくは75%超減少する。腫瘍の数は、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。腫瘍の数は、肉眼または特定の倍率で観察できる腫瘍をカウントすることにより測定することができる。好ましくは、特定の倍率は2倍、3倍、4倍、5倍、10倍または50倍である。

40

【0126】

癌を処置すると、原発腫瘍部位から離れた他の組織または器官における転移病変の数が減少することがある。好ましくは、処置後、転移病変の数は、処置前の数と比較して5%以上減少し；一層好ましくは、転移病変の数は10%以上減少し；一層好ましくは20%以上減少し；一層好ましくは30%以上減少し；一層好ましくは40%以上減少し；なお一層好ましくは50%以上減少し；最も好ましくは75%超減少する。転移病変の数は、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。転移病変の数は、肉眼または特定の倍率で観察できる転移病変をカウントすることにより測定することができる。好まし

50

くは、特定の倍率は2倍、3倍、4倍、5倍、10倍または50倍である。

【0127】

癌を処置すると、処置した被検体の集団の平均生存期間が、キャリアを単独投与した集団と比較して延長されることがある。好ましくは、平均生存期間は30日を超えて；一層好ましくは60日を超えて；一層好ましくは90日を超えて；最も好ましくは120日を超えて延長される。集団の平均生存期間の延長は、任意の再現可能な手段により測定することができる。集団の平均生存期間の延長は、たとえば、集団について活性化化合物による処置の開始後の平均生存期間を計算することにより測定してもよい。集団の平均生存期間の延長はまた、たとえば、集団について活性化化合物による初回処置の終了後の平均生存期間を計算することにより測定してもよい。

10

【0128】

癌を処置すると、処置した被検体の集団の平均生存期間が、未処置被検体の集団と比較して延長されることがある。好ましくは、平均生存期間は30日を超えて；一層好ましくは60日を超えて；一層好ましくは90日を超えて；最も好ましくは120日を超えて延長される。集団の平均生存期間の延長は、任意の再現可能な手段により測定することができる。集団の平均生存期間の延長は、たとえば、集団について活性化化合物による処置の開始後の平均生存期間を計算することにより測定してもよい。集団の平均生存期間の延長はまた、たとえば、集団について活性化化合物による初回処置の終了後の平均生存期間を計算することにより測定してもよい。

20

【0129】

癌を処置すると、処置した被検体の集団の平均生存期間が、本明細書に開示の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、アナログもしくは誘導体ではない薬剤による単独療法を受けた集団と比較して延長されることがある。好ましくは、平均生存期間は30日を超えて；一層好ましくは60日を超えて；一層好ましくは90日を超えて；最も好ましくは120日を超えて延長される。集団の平均生存期間の延長は、任意の再現可能な手段により測定することができる。集団の平均生存期間の延長は、たとえば、集団について活性化化合物による処置の開始後の平均生存期間を計算することにより測定してもよい。集団の平均生存期間の延長はまた、たとえば、集団について活性化化合物による初回処置の終了後の平均生存期間を計算することにより測定してもよい。

30

【0130】

癌を処置すると、処置した被検体の集団の死亡率がキャリアを単独投与した集団と比較して低下することがある。癌を処置すると、処置した被検体の集団の死亡率が未処置集団と比較して低下することがある。癌を処置すると、処置した被検体の集団の死亡率が、本明細書に開示の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、アナログもしくは誘導体ではない薬剤による単独療法を受けた集団と比較して低下することがある。好ましくは、死亡率は2%超；一層好ましくは5%超；一層好ましくは10%超；最も好ましくは25%超低下する。処置した被検体の集団の死亡率の低下は、任意の再現可能な手段により測定することができる。集団の死亡率の低下は、たとえば、集団について活性化化合物による処置の開始後の単位時間当たりの疾患関連死亡の平均数を計算することにより測定してもよい。集団の死亡率の低下はまた、たとえば、集団について活性化化合物による初回処置の終了後の単位時間当たりの疾患関連死亡の平均数を計算することにより測定してもよい。

40

【0131】

癌を処置すると、腫瘍の成長率が低下することがある。好ましくは、処置後、腫瘍の成長率は処置前の数と比較して少なくとも5%低下し；一層好ましくは、腫瘍の成長率は少なくとも10%低下し；一層好ましくは少なくとも20%低下し；一層好ましくは少なくとも30%低下し；一層好ましくは少なくとも40%低下し；一層好ましくは少なくとも50%低下し；なお一層好ましくは少なくとも50%低下し；最も好ましくは少なくとも75%低下する。腫瘍の成長率は、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。腫瘍の成長率は、単位時間当たり腫瘍直径の変化により測定してもよい。

50

【0132】

癌を処置すると、腫瘍の再増殖が抑制されることがある。好ましくは、処置後、腫瘍の再増殖は5%未満であり；一層好ましくは、腫瘍の再増殖は10%未満であり；一層好ましくは20%未満であり；一層好ましくは30%未満であり；一層好ましくは40%未満であり；一層好ましくは50%未満であり；なお一層好ましくは50%未満であり；最も好ましくは75%未満である。腫瘍の再増殖は、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。腫瘍の再増殖は、たとえば、以前の腫瘍縮小後に、処置後生じた腫瘍の直径の増加を測定することにより測定してもよい。腫瘍の再増殖の抑制は、処置を中止した後に腫瘍が再発しないことにより示される。

【0133】

細胞増殖性障害を処置または予防すると、細胞増殖率が低下することがある。好ましくは、処置後、細胞増殖率は少なくとも5%低下し；一層好ましくは少なくとも10%低下し；一層好ましくは少なくとも20%低下し；一層好ましくは少なくとも30%低下し；一層好ましくは少なくとも40%低下し；一層好ましくは少なくとも50%低下し；なお一層好ましくは少なくとも50%低下し；最も好ましくは少なくとも75%低下する。細胞増殖率は、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。細胞増殖率は、たとえば、組織サンプルにおいて単位時間当たりに分裂している細胞数を測定することにより測定してもよい。

【0134】

細胞増殖性障害を処置または予防すると、増殖している細胞の比率が低下することがある。好ましくは、処置後、増殖している細胞の比率は少なくとも5%；一層好ましくは少なくとも10%；一層好ましくは少なくとも20%；一層好ましくは少なくとも30%；一層好ましくは少なくとも40%；一層好ましくは少なくとも50%；なお一層好ましくは少なくとも50%；最も好ましくは少なくとも75%低下する。増殖している細胞の比率は、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。好ましくは、増殖している細胞の比率は、たとえば組織サンプルにおいて分裂している細胞数を非分裂細胞の数と比較して定量することにより測定される。増殖している細胞の比率は、分裂指数と等価であり得る。

【0135】

細胞増殖性障害を処置または予防すると、細胞の増殖部位または領域の大きさが小さくなることがある。好ましくは、処置後、細胞の増殖部位または領域の大きさは、処置前のその大きさと比較して少なくとも5%縮小し；一層好ましくは少なくとも10%縮小し；一層好ましくは少なくとも20%縮小し；一層好ましくは少なくとも30%縮小し；一層好ましくは少なくとも40%縮小し；一層好ましくは少なくとも50%縮小し；なお一層好ましくは少なくとも50%縮小し；最も好ましくは少なくとも75%縮小する。細胞の増殖部位または領域の大きさは、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。細胞の増殖部位または領域の大きさは、細胞の増殖部位または領域の直径または幅として測定してもよい。

【0136】

細胞増殖性障害を処置または予防すると、異常な外観もしくは形態を有する細胞の数または比率が低下することがある。好ましくは、処置後、異常な形態を有する細胞数は、処置前のその大きさと比較して少なくとも5%減少し；一層好ましくは少なくとも10%減少し；一層好ましくは少なくとも20%減少し；一層好ましくは少なくとも30%減少し；一層好ましくは少なくとも40%減少し；一層好ましくは少なくとも50%減少し；なお一層好ましくは少なくとも50%減少し；最も好ましくは少なくとも75%減少する。異常な細胞外観または形態は、任意の再現可能な測定手段により測定することができる。異常な細胞形態は、たとえば倒立型培養顕微鏡を用いて顕微鏡観察により測定してもよい。異常な細胞形態は、核異型の形をとることがある。

【0137】

本明細書で使用する場合、「選択的に」という用語は、ある集団において別の集団より

10

20

30

40

50

高頻度で起こる傾向があることを意味する。比較される集団は細胞集団であってもよい。好ましくは、本明細書に開示の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物は、癌または前癌性細胞に選択的に作用するが、正常な細胞には作用しない。好ましくは、本明細書に開示の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物は、ある分子標的（たとえば、標的タンパク質メチルトランスフェラーゼ）を調節するが、別の分子標的（たとえば、非標的タンパク質メチルトランスフェラーゼ）をあまり調節しないように選択的に作用する。本開示はまた、酵素、たとえばタンパク質メチルトランスフェラーゼの活性を選択的に阻害するための方法を提供する。好ましくは、あるイベントが集団 B と比較して集団 A で 2 倍を超える高い頻度で起こる場合、そのイベントは、集団 B に対して集団 A において選択的に起こる。あるイベントが集団 A で 5 倍を超える高い頻度で起こる場合、そのイベントは選択的に起こる。あるイベントが集団 B と比較して集団 A で 10 倍を超える高い頻度で；一層好ましくは 50 倍を超える；なお一層好ましくは 100 倍を超える；最も好ましくは 1000 倍を超える高い頻度で、集団 A で起こる場合、そのイベントは選択的に起こる。たとえば、細胞死は、正常な細胞と比較して癌細胞で 2 倍を超える頻度で起こる場合、癌細胞で選択的に起こるといえると考えられる。

10

20

30

40

50

【0138】

本明細書に開示の組成物、たとえば、本明細書に開示の任意の化合物またはその薬学的に許容される塩を含む組成物は、分子標的（たとえば、標的タンパク質メチルトランスフェラーゼ）の活性を調節することができる。調節とは、分子標的の活性を刺激または阻害することをいう。好ましくは、本明細書に開示の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記化合物が存在しないこと以外は同じ条件下の分子標的の活性と比較して分子標的の活性を少なくとも 2 倍刺激または阻害する場合、その化合物は分子標的の活性を調節する。一層好ましくは、本明細書に開示の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が、前記化合物が存在しないこと以外は同じ条件下の分子標的の活性と比較して分子標的の活性を少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍刺激または阻害する場合、その化合物は分子標的の活性を調節する。分子標的の活性は、任意の再現可能な手段により測定することができる。分子標的の活性はインピトロで測定しても、あるいはインピボで測定してもよい。たとえば、分子標的の活性は酵素活性アッセイまたは DNA 結合アッセイによりインピトロで測定してもよいし、あるいは、分子標的の活性はレポーター遺伝子の発現をアッセイすることによりインピボで測定してもよい。

【0139】

本明細書に開示の組成物は、化合物の添加により分子標的の活性が、前記化合物が存在しないこと以外は同じ条件下の分子標的の活性と比較して 10% を超えて刺激または阻害されない場合、分子標的の活性をあまり調節しない。

【0140】

好ましくは、本明細書に開示の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物は、生物学的作用を得るのに必要な投薬量で最低 4 倍の差、好ましくは 10 倍の差、一層好ましくは 50 倍の差を示す。好ましくは、本明細書に開示の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物は、阻害範囲にわたりこの差を示し、この差の例として IC_{50} 、すなわち、目的の分子標的の 50% 阻害が挙げられる。

【0141】

本明細書において使用されるように、用語「フローサイトメトリー」は、関心のある細胞を流れている液体中に懸濁し、検出装置の前を細胞に通過させることによって特徴付けられる細胞のカウント、細胞選別、細胞の特徴付け、細胞の定量化、バイオマーカー検出、およびタンパク質工学において用いられる生物物理的な技術を指す。ある実施形態では、フローサイトメトリーは、細胞に付けられた蛍光化合物の存在または不在を評価するために使用され、任意選択で定量的な方式で実行される、レーザーベースのアッセイである蛍光活性化細胞選別 (FACS) との関連において使用されてもよく、付けられた特定の蛍光化合物を有する細胞の数は、混合細胞サンプルから定量することができる。ある実施

形態では、フローサイトメトリーは、任意選択で定量的な方式で実行される、細胞に付けられた磁気または常磁性化合物の存在または不在を評価するための方法である磁気活性化細胞選別 (MACS) との関連において使用されてもよく、付けられた特定の磁気または常磁性化合物を有する細胞の数は、混合細胞サンプルから定量することができる。

【0142】

用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (MAb)、キメラ抗体、可溶性のまたは結合した形態で標識することができる抗体に対する抗イディオタイプ (抗 Id) 抗体、およびヒト化抗体ならびにこれらに限定されないが、酵素的切断、ペプチド合成、または組換え技術などのような任意の知られている技術によって提供されるその断片を含むことが意図される。用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、区別なく使用される。

10

【0143】

抗体が分子と特異的に反応し、それによって分子を抗体に結合させることができる場合、抗体は、分子に「結合することができる」と言われる。用語「エピトープ」は、抗体が結合することのできる、その抗体によって認識することもできる任意の分子の一部を指すことが意図される。エピトープまたは「抗原決定基」は、通常、アミノ酸または糖側鎖などのような分子の化学的に活性な表面基からなり、特定の三次元構造特性および特定の電荷特性を有する。

【0144】

「抗原」は、抗体が結合することができ、そのうえ、その抗原のエピトープに結合することのできる抗体を産生するよう動物を誘導することができる分子または分子の一部である。抗原は、1つ以上のエピトープを有していてもよい。エピトープは、抗体によって認識される抗原の一部である。上記に言及される特異な反応は、抗原が、その対応する抗体と高度に選択的な方式で反応し、他の抗原によって誘起されるかもしれない多くの他の抗体とは反応しないであろうということを示すことが意図される。

20

【0145】

本明細書に開示の組成物を細胞またはそれを必要とする被検体に投与すると、目的のタンパク質メチルトランスフェラーゼの活性が調節 (たとえば、刺激または阻害) され得る。

【0146】

本明細書に開示の化合物、たとえば、本明細書に開示の任意の化合物または薬学的に許容される塩と1つまたは複数の他の治療剤、たとえばプレドニゾンとを含む組成物を、細胞またはそれを必要とする被検体に投与すると、細胞内標的 (たとえば、基質) の活性が調節 (たとえば、刺激または阻害) される。本明細書に開示の化合物を用いて、以下に限定されるものではないが、タンパク質メチルトランスフェラーゼなどいくつかの細胞内標的を調節することができる。

30

【0147】

活性化とは、組成物 (たとえば、タンパク質または核酸) を所望の生物学的機能を発揮するのに好適な状態に置くことをいう。活性化することができる組成物はまた、不活性化状態も有する。活性化組成物は、阻害性の生物学的機能または刺激性の生物学的機能を有しても、あるいはその両方を有してもよい。

40

【0148】

「活性化突然変異」は、増加したおよび/または恒常的な生物学的活性をもたらす突然変異である。たとえば、活性化突然変異は、生理学的活性化因子の非存在下において恒常的な生物学的活性をもたらす。本明細書において使用されるように、用語「活性化突然変異」は、「機能獲得型の」突然変異を含む。

【0149】

「線状エピトープ」は、アミノ酸のエピトープの線状配列 (一次構造) によって抗体によって認識されるエピトープである。線状エピトープはまた、立体エピトープであってもよい。

50

【0150】

「立体エピトープ」は、エピトープの三次元の形状によって抗体によって認識されるエピトープである。

【0151】

「非連続エピトープ」は、三次元の形状および/または隣接していない残基またはその一部分によって抗体によって認識されるエピトープである。本開示の方法の「非線状」エピトープは、非連続エピトープからなってもよい、から本質的になってもよい、またはからなってもよい。

【0152】

「複合抗体」は、別の化合物に連結される抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）である。たとえば、複合抗体は、蛍光または発色性標識に連結することができる。

【0153】

上昇とは、組成物（たとえば、タンパク質または核酸）の所望の生物活性の増加をいう。上昇は、組成物の濃度の増加により起きてもよい。

【0154】

癌または細胞増殖性障害を処置すると、細胞死が起こることがあり、好ましくは細胞死により、ある集団で細胞の数が少なくとも10%減少する。一層好ましくは、細胞死は、少なくとも20%の減少；一層好ましくは少なくとも30%の減少；一層好ましくは少なくとも40%の減少；一層好ましくは少なくとも50%の減少；最も好ましくは少なくとも75%の減少を意味する。集団における細胞数は、任意の再現可能な手段により測定することができる。集団における細胞数は、蛍光活性化セルソーター（FACS）、免疫蛍光顕微鏡および光学顕微鏡により測定してもよい。細胞死を測定する方法は、Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100(5): 2674-8, 2003に示される通りである。一態様では、細胞死はアポトーシスにより起こる。

【0155】

好ましくは、本明細書に開示の組成物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物の有効量は、正常な細胞に対してあまり細胞毒性を示さない。治療有効量の化合物の投与により細胞死が正常な細胞の10%より多く誘導されない場合、治療有効量の化合物は正常な細胞に対してあまり細胞毒性を示さない。治療有効量の化合物の投与により細胞死が正常な細胞の10%より多く誘導されない場合、治療有効量の化合物は正常な細胞の生存率にあまり影響を与えない。一態様では、細胞死はアポトーシスにより起こる。

【0156】

本明細書に開示のEZH2阻害剤またはその組成物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と細胞を接触させると、癌細胞の細胞死を選択的に誘導または活性化することができる。それを必要とする被検体に本明細書に開示の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を投与すると、癌細胞の細胞死を選択的に誘導または活性化することができる。本明細書に開示の組成物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物と細胞を接触させると、細胞増殖性障害に冒された1つまたは複数の細胞の細胞死を選択的に誘導することができる。好ましくは、それを必要とする被検体に本明細書に開示の組成物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を投与すると、細胞増殖性障害に冒された1つまたは複数の細胞の細胞死が選択的に誘導される。

【0157】

本開示は、それを必要とする被験体に、本明細書に開示の組成物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を投与することにより、癌を処置または予防する方法であって、本明細書に開示の組成物、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を投与すると、以下の1つまたは複数：細胞周期の1つまたは複数の期（たとえば、G1、G1/S、G2/M）への細胞の蓄積、または細胞老化の誘導、または腫瘍細胞分化の促進による癌細胞増殖の防止；正常細胞において相当量の細胞死を起こすことのない、細胞毒性、ネクローシスまたはアポトーシスによる癌細胞の細胞死の促進、動物における治療係

10

20

30

40

50

数が少なくとも2の抗腫瘍活性がもたらされる方法に関する。本明細書で使用する場合、「治療係数」は最大耐量を有効用量で除した値である。

【0158】

al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2000); Coligan et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, N.Y.; Enna et al., Current Protocols in Pharmacology, John Wiley & Sons, N.Y.; Fingl et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics (1975), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition (1990)が挙げられる。さらにこれらの文献は、本開示の態様の製造または使用の際に参照してもよいことは、言うまでもない。

10

【0159】

本明細書において開示される本発明をより理解しやすくするために、実施例が下記に提供される。これらの実施例は、説明のみを目的とし、本開示を限定するとして決して解釈されないものと理解されるべきである。

20

【実施例】

【0160】

実施例1：フローサイトメトリーによるエピジェネティックな修飾の検出

フローサイトメトリー手法によるH3K27me3の検出についてのプロトコルを下記に示す。

【0161】

【表1】

表1:フローサイトメトリー手順についての非抗体試薬

30

試薬			
構成成分	ベンダー	カタログ #	
Pharm Lyse	BD	555899	
16%メタノールフリーホルムアルデヒド	Fisher Scientific	PI-28908	
抗マウスIgkCompビーズ	BD	552843	
プロテインGビーズ	Bangs Laboratories	554	
Live/Dead Fixable Near IR	Invitrogen	L10119	
Viability Dye Compensation Standard	Bangs Laboratories	451	
染色バッファー	BD	554656	
ヒトFcブロック	BD	564220	

40

【0162】

【表 2】

表2:フローサイトメトリー手順についての抗体試薬

抗体				
エピトープ	複合体	クローン	ベンダー	カタログ #
CD3	V500C	SK7	BD	647454
CD19	BV421	H1B19	BD	562440
CD16	PE-Cy7	B73.1	BD	335788
CD14	PerCP-Cy5.5	MqP9	BD	562692
HLA-DR	PE	LN3	eBioscience	12-9956
H3	Alexa Fluor 647	D1H2	Cell Signaling Technology	12230
H3K27me3	Alexa Fluor 488	C36B11	Cell Signaling Technology	5499

10

【 0 1 6 3 】

赤血球溶解および生死判別染色についてのプロトコール

1. 2 ml の全血を 50 ml コニカルチューブに等分する。(注意: RBC 溶解が不十分になってしまうので、1本の50 ml チューブに対して2 ml を超えないようにすること。しかしながら、2本の50 ml チューブのペレットをステップ#7で組み合わせ、1本の50 ml チューブにしてもよい。)

2. 20 ml の 1 x BD Pharm Lyse を追加し、穏やかにボルテックスする。

3. 光から保護し、ロッカーで室温で15分間インキュベートする。

4. 15 ml PBS を追加し、5分間300 x g で遠心分離する。

5. 径が小さいチップで液体を吸引し(たとえば20 µl Rainin ピペットチップ)、ペレットの上に1~2 ml の液体を残す。細胞を吸引しないように気をつける。

6. 残った液体においてペレットを再懸濁するために1 ml ピペットを使用する。

7. 懸濁液を5 ml 丸底 FACS チューブに移す。

8. PBS を4 ml の容量まで追加し、5分間300 x g で遠心分離する。

9. PBS を吸引し、残容量約500 µL を残す。

10. 以下の2 x 2再懸濁技術を使用して細胞を洗浄する: 2 ml PBS (BSA またはアジドを含有する染色溶液ではない) を追加し、ペレットを分離するために1 ml ピペットを使用し、細胞を再懸濁し、さらに2 ml のPBS を追加する。(注意: 4 ml すべてを追加したり、ボルテックスによってまたは逆さにして再懸濁しないこと。再懸濁が不十分になってしまう。)

11. 5分間300 x g で遠心分離する。

12. PBS を吸引し、残容量500 µL を残し、上記に詳述されるように4 ml PBS 中でペレットを再懸濁する(2 x 2技術)。

13. 4 µL の還元 Invitrogen LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit を追加する。

14. 光から保護し、ロッカーで室温で30分間インキュベートする。

15. 5分間300 x g で遠心分離し、2 x 2技術を介して4 ml PBS 中で再懸濁する。

16. 上記のように遠心分離し、上記のように吸引し、1 ml ピペットにより2 ml PBS 中で再懸濁する。

17. チューブにもう1 ml 追加する(合計3 ml)。

18. チューブに1 ml の16%メタノールフリーホルムアルデヒドを追加する(4%の最終濃度)。

19. 光から保護し、ロッカーで室温で15分間インキュベートする。

20. 上記のように遠心分離し、吸引し、4 ml 中で再懸濁する。

21. 上記のように遠心分離し、吸引する。

22. 2 ml の0.1% Triton X-100 を追加し、1 ml ピペットにより再懸濁し、2 ml の0.1% Triton X-100 をさらに追加する。

40

50

23. 光から保護し、ロッカーで室温で15分間インキュベートする。
24. 上記のように遠心分離し、吸引し、4 mL 中で再懸濁する。
25. 上記のように遠心分離し、吸引する。
26. 2 mL のBD染色バッファー中で再懸濁する。
27. 生存および非生存細胞をカウントする（透過処理された細胞はトリパンブルーを取込むであろう）。
28. $3 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mL に適切な容量で再懸濁する³。（注意：全血の2 mL アリコートについて期待される収量は $> 8 \times 10^6$ 細胞となるはずである）。
29. 染色に進むまたは一晩、光から保護し、4 で保存する。

【0164】

抗体染色についてのプロトコール

1. 試験ウェル当たり100 μ l の細胞懸濁液を等分する（96ウェルプレート）。
2. それぞれの試験ウェルに5 μ l BDヒトFcブロックを追加し、5回上下にピペティングすることによって混合する。
3. 穏やかに振盪させながら室温で10分間インキュベートする。
4. それぞれの試験ウェルに1:75で抗H3-Alexa Fluor 647を追加し、5回上下にピペティングすることによって混合する。
5. 穏やかに振盪させながら室温で45分間インキュベートする。
6. 表3に列挙する希釈で残りの抗体を追加する。
7. コンペーンションコントロールを作る。（注意：電圧は、染色パネルに対して標準化するべきであり、毎日、既知の標準物質に対して検証するべきである（BD機器については、これは、使用前に、パネルについてのアプリケーション設定を作成し、CSTビーズにより較正することを意味する）。表面マーカー抗体はすべて、マウス抗体であり、BD Compビーズに結合することができる。H3およびH3K27me3抗体は、ウサギIgGであり、Bangs LabsプロテインGビーズに結合することができる。Bangs Labs Viability Dye Compensation Standardは、Live/Deadコンペーンションに使用されるべきである。）
8. 5回上下にピペティングすることによってすべてのウェルを混合する。
9. 穏やかに振盪させながら室温で1時間インキュベートする。
10. 5分間300 x gでプレートを遠心分離する。
11. 素早く手首を動かして流しの中にプレートをデカントし、その後、実験用ティッシュペーパーと速やかに穏やかに接触させる（遅れたり、動作を逆にしないこと）。
12. 200 μ l BD染色バッファーを試験&コンペーンションウェルに追加し、5回上下にピペティングすることによって混合する。
13. 5分間300 x gでプレートを遠心分離する。
14. 上記のようにデカントする。
15. 200 μ l BD染色バッファーを追加し、分析に進む。

【0165】

【表3】

表3:抗体クローンおよび希釈

抗体	複合体	クローン	希釈
CD3	V500C	SK7	1:20
CD19	BV421	H1B19	1:20
CD16	PE-Cy7	C616	1:20
CD14	PerCP-Cy5.5	MpP9	1:20
HLA-DR	PE	LN3	1:20
H3K27me3	Alexa Fluor 488	C36B11	1:150

【0166】

実施例 2 : サンプル調製 - 透過処理方法の比較

血液サンプル中の表面エピトープ検出の保存に対する透過処理の効果を評価するために様々な透過処理方法を比較した。最終的に選ばれる透過処理技術は、表面マーカー同定に基づいた正確な集団の区別を可能にするべきである。図 1 (すなわち図 1 A および 1 B) は、血球の混合集団を、0.1% triton X-100 溶液、70%メタノール溶液、または PBS のみ (透過処理溶液なし) と接触させた場合の表面エピトープ HLA-DR (LN3)、CD14、CD3、CD14、CD16、および CD19 の保存の結果を示す。細胞をこれらの条件でインキュベートした後、細胞を洗浄し、表面エピトープ (たとえば HLA-DR (LN3)、CD14、CD3、CD14、CD16、および CD19) に向けられる抗体のカクテルと共にインキュベートした。細胞への抗体の結合をフローサイトメトリーによって評価した。データは、70%メタノールによる透過処理が、表面抗原を検出する能力における大幅な低下をもたらしたことを明らかに示す。図 1 は、70%メタノールとのインキュベーションが、CD19 および CD14 エピトープ検出のほぼ完全な損失をもたらしたことを実証する。対照的に、0.1% triton X-100 溶液による透過処理は、試験した表面エピトープのあらゆる検出を可能にした。

【0167】

別の一連の実験を、メタノールなしの条件と比較した 50%メタノールによる血液サンプルの透過処理の比較に向けた。これらのデータを図 1 B に示す。データは、表面マーカー CD16 の検出が、メタノールなしの条件と比較して激減することを実証する。

【0168】

まとめると、これらのデータは、メタノールによる透過処理が、0.1% triton X-100 による透過処理と比較して、一連の表面エピトープの保存を可能にしないことを実証する。

【0169】

実施例 3 : 表面マーカーを検出するための抗体の選択

一連の抗体クローンを、実施例 1 のフローサイトメトリープロトコールを使用して試験した。これらの実験の代表的な発見を図 2 (すなわち図 2 A および 2 B) に示す。データは、同一のエピトープを標的にする様々な抗体クローンが、サンプル調製技術に対して多種多様な耐性を有し、アイソタイプに基づいて特異な作用を有し、非特異的結合に関して差異を示し、最適な滴定濃度にばらつきがあったことを示す。図 2 A および 2 C を参照されたい。同様の発見はまた、フルオロフォアの選択の際にも見つけられた。図 2 B を参照されたい。特に、様々なフルオロフォアは、相対的な明るさ、機器の適合性、色素安定性、およびバックグラウンド蛍光レベルにおいてばらつきを示した。抗体および対応するフルオロフォアのフローサイトメトリー分析は、表 2 および 3 において示される抗体および希釈の同定を可能にした。

【0170】

実施例 4 : 細胞サンプルにおける H3K27メチル化パターンのばらつきの評価

フローサイトメトリーを、OCI-LY19 細胞株における H3K27me3 ステータスを確認するために使用した。このフローサイトメトリー研究のための標準化コントロールとして、ヒストン 3 (H3) の総量を OCI-LY19 細胞株において評価した。データを、図 3 (すなわち図 3 A、3 B、および 3 C) に示す。図 3 A におけるフローサイトメトリープロットは、OCI-LY19 細胞株への EPZ007210 の追加が、処置していない未処理コントロールと比較して、H3K27me3 シグナルの減少をもたらすことを示す。図 3 B は、OCI-LY19 細胞株への EPZ007210 の追加が、検出される総 H3 の量に影響を与えないことを示す。これは、H3 に結合する抗体を標準化コントロールとして使用することができることを示す。図 3 C は、EPZ007210 と OCI-LY19 細胞株を接触させた後に H3K27me3 および総 H3 の存在についてフローサイトメトリーによって観察される平均蛍光強度を示す図である。

【0171】

概念実証として、用量応答実験を、WSU 細胞株 (EZH2 突然変異体) および OCI

10

20

30

40

50

- L Y 1 9 (E Z H 2) 細胞株と共に E P Z 0 0 7 2 1 0 を使用して行った。図 4 A を参照されたい。細胞株と接触させた E P Z 0 0 7 2 1 0 の量は、以下のように条件ごとに変動した：0 n M、0.3 n M、1 n M、4 n M、12 n M、37 n M、111 n M、333 n M、および 1000 n M。データは、W S U 細胞株 (E Z H 2 突然変異体) および O C I - L Y 1 9 (E Z H 2) 細胞株の両方において、E P Z 0 0 7 2 1 0 暴露量が次第に高くなるにつれて H 3 K 2 7 m e 3 シグナルが減少したことを示す。H 3 K 2 7 m e 2 の量は、W S U 細胞株 (E Z H 2 突然変異体) において安定したままであったが、O C I - L Y 1 9 細胞株と共にインキュベートした E P Z 0 0 7 2 1 0 の量が次第に高くなるにつれて H 3 K 2 7 m e 2 シグナルが減少した。重要なことには、さまざまな濃度の E P Z 0 0 7 2 1 0 への暴露後にいずれの細胞株においても H 3 シグナルの総量に変化はなかった。フローサイトメトリーの観察を、ウェスタンブロットアッセイによって確認した。図 4 B を参照されたい。

10

【 0 1 7 2 】

まとめると、これらのデータは、一実施形態において、フローサイトメトリーが、実施例 1 において詳述されるプロトコールを使用して、E Z H 2 阻害剤への細胞のインビトロにおける暴露後の H 3 K 2 7 メチル化状態における変化を評価するために使用することができることを示す。

【 0 1 7 3 】

実施例 5：表面抗原および核内抗原の検出のためのフローサイトメトリーアッセイの開発
表面抗原および H 3 K 2 7 メチル化状態の同時の検出を、フローサイトメトリーによって決定した。この一連の実験について、様々な抗体パネルを、もしあればどのパネルが様々な条件において強いシグナル検出をもたらすかを確認するために使用した。これらのパネルのそれぞれについて、バックグラウンドシグナル、クローンの性能、および滴定を個々に最適化した。パネルの開発における別の重要な検討は、明るさに基づいてエピトープとフルオロフォアをペアにすることであった。下記の表 4 は、アッセイした選択パネルを示す。表 5 A ~ 5 C は、マーカーおよびこれらのマーカーが同定する細胞型をリストする。

20

【 0 1 7 4 】

【表4】

表4.フローサイトメトリーアッセイにおいて使用される抗体パネル

パネル#1	パネル#2	パネル#3
CD3-V500-C (SK7)	CD3-APC-H7 (SK7)	CD3-V500-C (SK7)
CD19-APC (HIB19)	CD19-BV421 (HIB19)	CD19-APC-H7 (HIB19)
CD16-PE-Cy7 (CB16)	CD16-PE-Cy7 (B73.1)	CD16-PE-Cy7 (B73.1)
CD14-PerCP-Cy5.5 (MφP9)	CD33-PerCP-Cy5.5 (P67.6)	CD33-PerCP-Cy5.5 (P67.6)
HLA-DR-PE (LN3)	HLA-DR-PE (LN3)	HLA-DR-PE (LN3)
H3-Pacific Blue	H3-Alexa 647	H3-Pacific Blue
H3K27me3-Alexa 488 (1:150)	H3K27me3-Alexa 488	H3K27me3-Alexa 488

10

パネル#4
CD-V500-C (SK7)
CD19-BV421 (HIB19)
CD16-PE-Cy7 (B73.1)
CD14-PerCP-Cy5.5 (MφP9)
HLA-DR-PA (LN3)
H3-Alexa 647
H3K27me3-Alexa 488

20

【0175】

【表5】

表5A.ヒト血液における細胞型の同定のためのマーカー

マーカー	サブセット
CD3+	T細胞
CD19+	B細胞
CD3-, CD19-, HLA-DR-, CD16+	NK細胞
CD3-, CD19-, HLA-DR+, CD16-	DC細胞
HLA-DR+, CD14+	単球
HLA-DR-, CD14-	顆粒球

30

【0176】

【表6】

表5B.ヒト血液における細胞型の同定のためのマーカー

集団	マーカー
T細胞	CD3+ / CD19-
B細胞	CD19+ / CD3-
NK細胞	CD3- / CD45R- / CD16+
樹状細胞	CD3- / CD19- / CD16- / HLA-DR+
単球	SSC hi / CD14+ / HLA-DR+
顆粒球	SSC hi / CD14- / HLA-DR-

40

【0177】

【表 7】

表5C.マウス血液における細胞型の同定のためのマーカー

集団	マーカー
T細胞	CD3+ / CD45R-
B細胞	CD45R+ / CD3-
NK細胞	CD3- / CD45R- / CD49b+
単球	CD11b+ / SSC low
顆粒球	GR-1+ / SSC hi

10

【 0 1 7 8 】

フローサイトメトリーによる血液サンプルにおける表面エピトープおよび核内抗原の同時の検出を、図 5 A ~ 5 D に示す。図 5 A および 5 B は、フローサイトメトリーによるいくつかの血球（たとえば B 細胞、T 細胞、単球、および顆粒球）の表面エピトープに対応する様々な抗原の検出を示す。図 5 C は、パネル 1 の抗体を使用する代表的なフローサイトメトリー散布図およびヒストグラムプロットを示す。これらの散布図は、特定の種類の細胞の H 3 K 2 7 m e 3 ステータスが、実施例 1 において記載されるプロトコールに従うフローサイトメトリーの使用によってかつ表 4 において列挙される抗体の使用によって同定することができることを示す。図 5 D は、H 3 K 2 7 m e 3 抗体から得られるシグナルの標準化に使用される、ヒストン 3 (H 3) に結合する抗体の包含を示す。これらのデータは、血液サンプルから得られる様々な種類の細胞において見つけられる H 3 K 2 7 m e 3 の量のばらつきを示す。

20

【 0 1 7 9 】

表面エピトープおよび H 3 K 2 7 m e 3 の抗体検出の再現性を、表 4 の様々な抗体パネルと 1 人のドナーから得られる血液サンプルを接触させることによって確認した。図 6 A を参照されたい。これらのデータは、2 つの異なる抗体パネルにより染色した単一のサンプルで得られた H 3 K 2 7 m e 3 シグナルにおいて強い相関性があることを示す。ドナー間の再現性もまた、評価した。これらのアッセイについては、2 人の別々のドナー由来の血液サンプルを、表 4 の抗体のパネルにより処理した。データは、ドナーサンプル間の H 3 K 2 7 m e 3 の量にわずかな差異があることを示すが、しかしながら、末梢血集団におけるシグナルの全体的なパターンは、保存されている。図 6 B を参照されたい。

30

【 0 1 8 0 】

血球のタイプおよび H 3 K 2 7 m e 3 ステータスの間の比較もまた、評価した。これらのアッセイのデータは、様々な種類の血球のタイプで見つけられた H 3 K 2 7 m e 3 の量に差異があることを明らかにした。図 7 を参照されたい。たとえば、B 細胞は、H 3 K 2 7 m e 3 が多く存在するが、末梢血単核細胞 (P B M C) の 1 4 % かつすべての末梢白血球 (W B C) の 3 % しか構成していない。重要なことには、メチル化のレベルが高くかつ全体的に相当するものが少ない細胞型のシグナルの調節は、ウェスタンアッセイによってまたは E L I S A アッセイにより検出することが困難である。しかしながら、これらの差異は、本明細書において記載されるフローサイトメトリーアッセイの使用によって確認することができる。

40

【 0 1 8 1 】

実施例 6 : E Z H 2 阻害剤 E P Z - 6 4 3 8 の投与後のインビボ用量応答のフローサイトメトリーによる評価

インビボげっ歯動物用量応答研究を、E Z H 2 阻害剤 E P Z - 6 4 3 8 の投与の効果を確認するために実行した。この研究について、以下の投薬量条件を確立した：ビヒクルのみ、1 2 5 m g / k g、2 5 0 m g / k g、および 5 0 0 m g / k g。E P Z - 6 4 3 8 投与頻度は、合計 7 日間、口によって、1 日当たり 2 回、1 2 時間ごととした。この期間の後、血液をげっ歯動物から集め、実施例 1 において記載されるように処理した。この研

50

究については、抗体パネル1を使用した。データは、すべての蛍光チャンネルで好適なシグナルおよび集団の分離があり、チューブ間で標識強度のばらつきがなかったことを示す。図8を参照されたい。血液の少量の凝固が細胞収量の低下をもたらしたこともまた、この研究において注意されたい。これらの研究から得られたデータを図9に要約する。結果は、単球およびナチュラルキラー（NK）細胞のみが、EPZ-6438の投与後に用量依存的なメチルマークの減少を示すことを示す。単球およびNK細胞は、アッセイした白血球の9.2%および6.5%をそれぞれ含む。全体的なメチルマークの減少に関連しての単球およびNK細胞集団におけるH3K27me3の量の減少は、末梢血において見つけられたこれらの細胞の組み合わせた量を考慮すると、10%である。大量のH3K27me3シグナルに対する個々の細胞の集団の寄与を、図10に示す。

10

【0182】

フローサイトメトリーによって得たH3K27me3データを、大量の血球集団で実行したELISAアッセイと比較した。図11を参照されたい。図10において示されるように、単球応答は、大量の集団よりもはるかに頑健であった（robust）。アッセイのこの比較は、フローサイトメトリーアッセイが、最も応答性の細胞集団（たとえば単球およびNK細胞）を検査することによって、メチルマークにおける変化に対するより優れた感受性をもたらすことを明らかにする。フローサイトメトリーアッセイは、用量応答性の結果が、100~300 μ Lの全血サンプルから可能であることをさらに支持する。

【0183】

実施例7：EZH2阻害剤タゼメトスタットへの暴露後のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）および濾胞性リンパ腫（FL）患者の血液におけるH3K27me3薬力学のクロマチンフローサイトメトリーベースの評価は特定のPBMC亜集団における異なる応答プロファイルを明らかにする

20

血液中のヒストンメチル化の薬力学（PD）のモニターは、大量の末梢血単核細胞（PBMC）溶解物または精製ヒストンの分析に決まって依存してきた。これらの方法は、試験したすべての用量で（100~1600mgを毎日2回（BID）投薬）、タゼメトスタット第1相研究において集められた血液サンプルを使用するH3K27me3レベルにおいて変化をほとんど示さなかった。対照的に、H3K27me3レベルの著しい減少（50%まで）が、400~1600mg BIDの範囲の用量の第1相研究で集められた投与後の皮膚生検材料において観察された。2つの代理の組織におけるタゼメトスタットに対する明らかに異なるPD応答を考慮して、PBMCサブセットにおけるH3K27me3レベルを検査するためにフローサイトメトリーベースのエピジェネティックアッセイを開発することによって、PBMCサブセットがタゼメトスタット暴露に対して特異的に応答するかもしれない可能性について調査した。

30

【0184】

進行中のタゼメトスタット第2相NHL治験に登録されたDLBCLまたはFLの患者の末梢血を投与前に（C1D1）ならびに2回の投与後の時点、サイクル1 15日目（C1D15）およびサイクル2 1日目（C2D1、30日後のベースライン）で集めた。H3K27me3および総ヒストンH3（H3）抗体の蛍光染色とB細胞、T細胞、顆粒球、および単球集団のフローサイトメトリーベースの免疫表現型の解析は、PBMCサブセットにおける標準化H3K27me3レベルの定量化を可能にした。

40

【0185】

【表 8】

表6:検出されたそれぞれのPBMCサブセットのH3K27me3レベル(H3に対して標準化)の平均 \pm 標準偏差(SD)([平均/SD]として示す):

細胞型	C1D1 n=36	C1D15 n=28	C2D1 n=27
T細胞	105.9 / 59.1	182.0 / 90.7	116.4 / 62.9
単球	18.1 / 10.0	5.3 / 2.6	4.0 / 2.5
顆粒球	12.3 / 7.6	2.6 / 1.5	1.8 / 1.3

表6における細胞型についてのマーカーは、表5において概説されるように特徴付けた。

10

【0186】

最初の研究は、抗CD19または抗CD20による最前線のNHL療法への先の暴露により大多数の患者においてB細胞集団が減っていることを示した。したがって、H3K27me3シグナルの定量化は、この集団において可能でなかった。T細胞は、最も高い基礎H3K27me3レベルを示し、単球および顆粒球がこれに続いた。タゼメトスタットへの暴露は、試験したすべての患者の血液から単離された単球および顆粒球においてH3K27me3の減少をもたらした。観察された減少は、両方の投与後の時点で両方の細胞集団について統計的に有意であった(t-検定:すべての症例において $p < 0.0001$)。対照的に、タゼメトスタット処置に対するT細胞の応答は、統計的に有意であったが、中程度であり、C1D15でH3K27me3が一過性に増加し($p < 0.0001$)、その後、C2D1でベースラインレベルに戻った。T細胞H3K27me3動態のいくらかの多様性が、投与後の時点にわたって様々な患者から観察された。

20

【0187】

図12は、末梢のマウス血液のフローサイトメトリー分析についての染色およびゲーティングスキームを示す。全血は、Naヘパリンバキュテナー中に集め、その後赤血球を溶解した。細胞は、4%メタノールフリーホルムアルデヒド中で固定し、0.1%Triton X-100により透過処理した。処理した細胞をFcブロックし、抗CD3-PerCP-Cy5.5、CD45R-BV421、CD49b-PE、CD11b-V500、GR-1-PE-Cy7、H3-AlexaFluor(登録商標)647、およびH3K27me3-AlexaFluor(登録商標)488抗体により染色した。

30

【0188】

図13は、マウス末梢血集団におけるH3K27me3メチルマークの蔓延を示す。H3K27me3レベルは、関心のあるそれぞれの集団について総H3含有量に対して標準化する。示す結果は、薬剤未処理マウス末梢血白血球集団におけるH3K27me3/H3の順位を示す。

【0189】

図14は、タゼメトスタットに対するマウス白血球集団の特異な感受性を示す。グラフにおいて示されるEZH2阻害剤タゼメトスタットによる7日間の用量応答研究の末梢血におけるH3K27me3/H3の定量化は、白血球集団の特異な感受性を明らかにする:単球およびNK細胞は、薬剤暴露に対して高い感受性を示す;B細胞、T細胞、および顆粒球は、低~中の感受性を示す。本明細書において示される結果は、細胞型特有の、エピジェネティック阻害剤に対する特異なインビボ応答についての最初の説明になる。

40

【0190】

図15は、H3K27me3阻害全体に対する細胞型寄与を示す。標準化H3K27me3の阻害パーセントは、500mg/kgタゼメトスタットにより処置したマウスにおける集団組成パーセントに対してプロットする。グラフは、高度に感受性の単球およびNK細胞集団が末梢血白血球全体のわずか14%および6%しか構成しないことを示す。個々の集団の寄与に基づいた500mg/kgの用量でのH3K27me3/H3レベルの全体的な差異は、-18.1%であった。

50

【0191】

図16は、クロマチンフローサイトメトリー対ELISAのH3K27me3定量化を比較する。示す結果は、従来のELISA定量化とよく一致していることを示す。クロマチンフローによる全体的な阻害は、すべての集団の一部の阻害の合計として計算した。

【0192】

図17は、EZH2突然変異体および野生型細胞株におけるEPZ007210に対する用量応答を示す。H3K27me3ステータスは、以下のEPZ007210濃度、DMSOのみ(黄色)、0.3nM(淡青色)、1nM(マゼンタ)、4nM(ピンク)、12nM(濃緑色)、37nM(薄緑色)、111nM(オレンジ色)、333nM(濃い青緑色)、および1000nM(赤色)とのインキュベーション後のフローサイトメトリープロットで示される。細胞株は、4日間、EPZ007210により処置し、その後、4%メタノール遊離ホルムアルデヒド中で固定し、0.1%Triton X-100中で透過処理した。染色は、H3K27me3-AlexaFluor488、H3K27me2-AlexaFluor-647、およびH3-Pacific Blueを使用し、1つのウェルにおいて実行した。突然変異細胞株(WSU)は、トリメチル化を示したが、ジメチル化H3K27は示さなかった。野生型株(OCI-LY19)は、H3K27のジメチル化およびトリメチル化の両方を示した。さらに、両方の細胞株は、EPZ007210処置でH3K27me3の用量応答性を示した。EZH2野生型細胞株もまた、阻害剤処置でH3K27me2の用量応答性を示したが、H3K27me2は、突然変異体株において観察されなかった。総H3は、投薬量やEZH2突然変異ステータスにかかわらず、一定のままであった。実験は、クロマチンフローサイトメトリーが、阻害剤処置による個々のH3K27メチル化状態の変化を検出することができ、1回のアッセイで複数のメチル化状態を区別することが可能であることを確認した。

10

20

【0193】

図18は、FACS後のヒト末梢血についてのゲーティングスキームを示す。以下のクラススキームを適用する：顆粒球は、赤色に塗り、単球は、青色に塗り、T細胞は、青色に塗り、B細胞は、マゼンタに塗る。全血は、Naヘパリンバキュテナー中に集め、その後赤血球を溶解した。細胞は、4%メタノールフリーホルムアルデヒド中で固定し、0.1%Triton X-100により透過処理した。処理した細胞をFcブロックし、抗CD3-V500、CD19-BV421、HLA-DR-PE、CD16-PE-Cy7、CD14-PerCP-Cy5.5、H3-AlexaFluor(登録商標)647、およびH3K27me3-AlexaFluor(登録商標)488により染色した。

30

【0194】

図19は、ヒト末梢血集団におけるH3K27me3メチルマークの相対的な蔓延を示す。H3K27me3レベルは、関心のあるそれぞれの集団について総H3含有量に対して標準化する。示す結果は、薬剤未処理ヒト末梢白血球集団におけるH3K27me3/H3の順位を示し、順位は、いくらかの患者間のばらつきを示す(たとえば、B細胞は、何人かの個人においてT細胞よりもH3K27me3/H3が大きい)。

40

【0195】

図20は、タゼメトスタット処置によるNHL治療においてH3K27me3阻害を示す。げっ歯動物研究において発見されたものと同様に、単球は、阻害剤処置に対して非常に感受性であることが示された。顆粒球もまた、ヒトにおいて高い感受性を示した。さらに、図において示していないデータは(N=1)、応答が投薬の30日目に持続していることを示唆する。図は、ヒト治療におけるフローサイトメトリーによるエピジェネティックな変化の薬力学的モニタリングの最初の実証になる。パネルA)は、サイクル1 1日目およびサイクル1 15日目のNHL治療における患者の末梢血中の総H3K27me3/H3における変化を示す図である。パネルB)は、ベースライン(サイクル1 1日目)~サイクル1 15日目のH3K27me3/H3の変化のパーセントを示す図である。

50

【0196】

図21は、サイクル2 1日目(C2D1)、サイクル2 15日目(C1D15)、および/またはサイクル2 1日目(C2D1)に800mg BIDタゼメトスタットを投薬した51人の患者から集められた血液に対するH3K27me3/H3フローによって単離された単球についての第I相薬力学を示す。単球は、タゼメトスタット暴露に応じたH3K27me3/H3の頑健な阻害を示す。サイクル2 1日目までの十分な長期的なデータセットを有する患者についての単球におけるH3K27me3阻害のプロファイルは(45日目に暴露)、わずかな患者間のばらつきを示す。H3K27me3阻害のプロファイルは、患者間で有意に変動する。特定のプロファイルは、いかなる臨床上的補助因子(たとえば年齢、性別、亜型)とも相関しない。

10

【0197】

図22は、サイクル2 1日目(C2D1)、サイクル2 15日目(C1D15)、および/またはサイクル2 1日目(C2D1)に800mg BIDタゼメトスタットを投薬した51人の患者から集められた血液に対するH3K27me3/H3フローによって単離された顆粒球についての第I相薬力学を示す。顆粒球は、タゼメトスタット暴露に応じたH3K27me3/H3の頑健な阻害を示す。サイクル2 1日目までの十分な長期的なデータセットを有する患者についての単球におけるH3K27me3阻害のプロファイルは(45日目に暴露)、わずかな患者間のばらつきを示す。H3K27me3阻害のプロファイルは、患者間で有意に変動する。特定のプロファイルは、いかなる臨床上的補助因子(たとえば年齢、性別、亜型)とも相関しない。

20

【0198】

図23は、サイクル2 1日目(C2D1)、サイクル2 15日目(C1D15)、および/またはサイクル2 1日目(C2D1)に800mg BIDタゼメトスタットを投薬した51人の患者から集められた血液に対するH3K27me3/H3フローによって単離されたT細胞についての第I相薬力学を示す。T細胞は、タゼメトスタット暴露の15日目(サイクル1 15日目)にH3K37me3の中程度であるが、統計的に著しい増加を示し、その後、30日目(サイクル2、1日目)にベースラインに戻った。サイクル2 1日目までの十分な長期的なデータセットを有する患者についての単球におけるH3K27me3阻害のプロファイルは(45日目に暴露)、わずかな患者間のばらつきを示す。H3K27me3阻害のプロファイルは、患者間で有意に変動する。特定のプロファイルは、いかなる臨床上的補助因子(たとえば年齢、性別、亜型)とも相関しない。T細胞亜型(すなわちCD4、CD8、Treg)の組成の変化は、H3K27me3の変化について観察されるプロファイルに影響を及ぼすかもしれない。

30

【0199】

これらの結果は、クロマチンフローサイトメトリーが、タゼメトスタットにより処置されたDLBCLおよびFL患者の血液から単離されたPBMCSサブセットにおけるH3K27me3 PDをモニターするのに有効な手段であることを示し、様々なPBMCSサブセットは、著しく異なるH3K27me3 PDプロファイルを示し、単球および顆粒球は、H3K27me3レベルにおいて一貫した、著しい投与後の減少を示す。

40

【0200】

本開示の1つ以上の実施形態の詳細は、上記の添付の説明において記載される。本発明の実施または試験において、本明細書に記載されたものと類似または同等の任意の方法および材料を使用してもよいが、好ましい方法および材料をここでは記載する。本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および請求項から明らかになるであろう。本明細書および添付の請求項では、単数形は、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、複数の指示物をさらに含む。他に定義しない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解しているものと同じ意味を持つ。

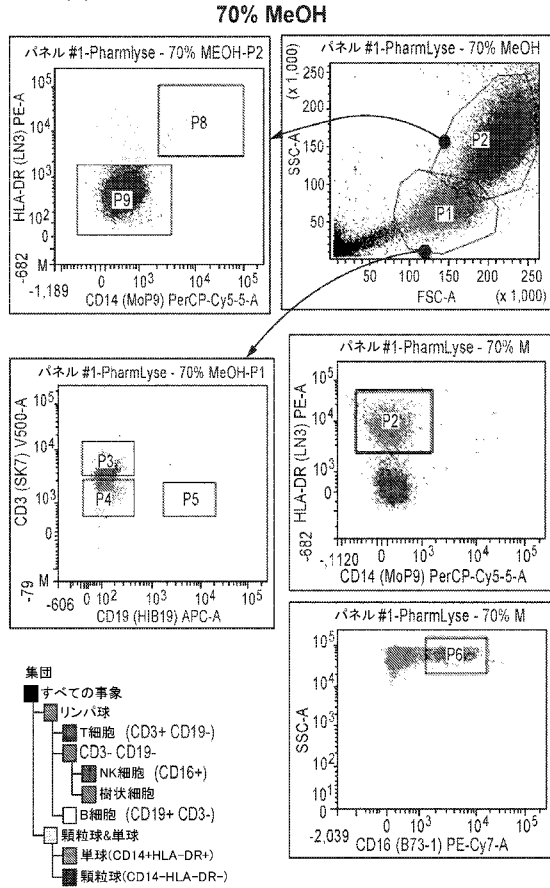
【0201】

本明細書に引用する特許および刊行物はすべて、それぞれのそのような刊行物または文

50

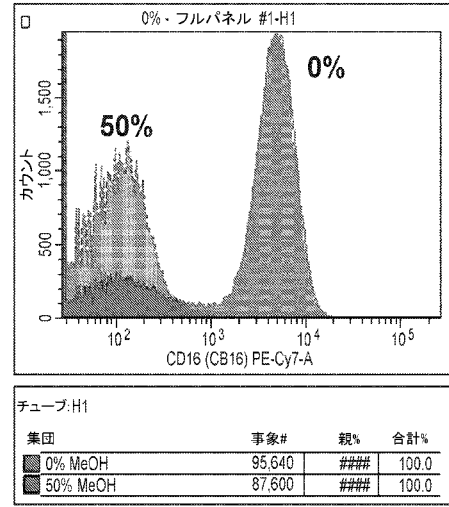
【 図 1 A - 3 】

図1A 続き



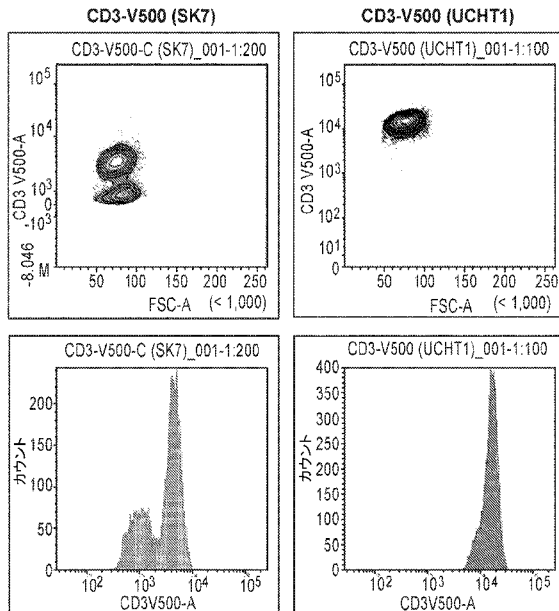
【 図 1 B 】

図1B



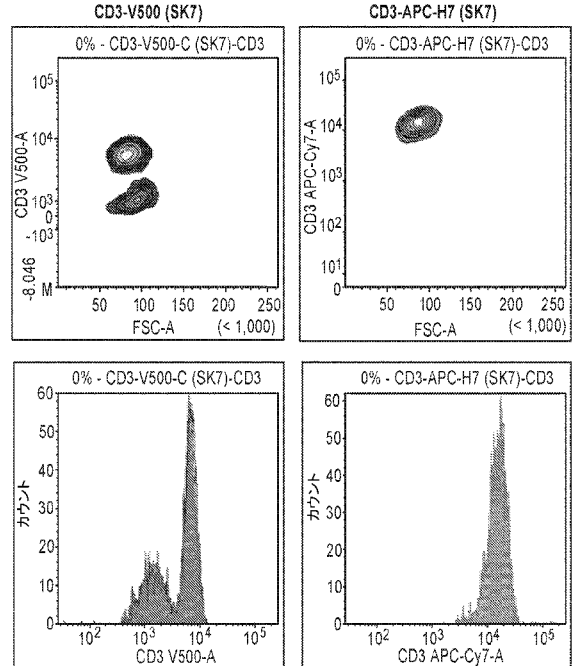
【 図 2 A 】

図2A

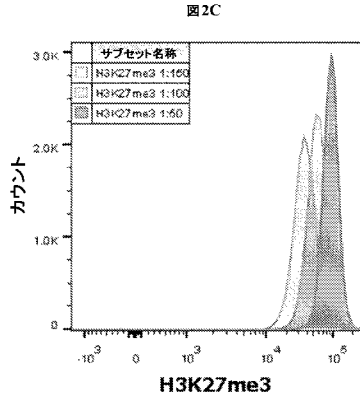


【 図 2 B 】

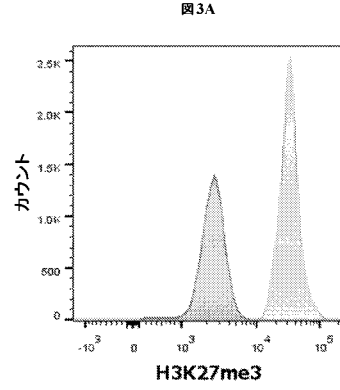
図2B



【 図 2 C 】

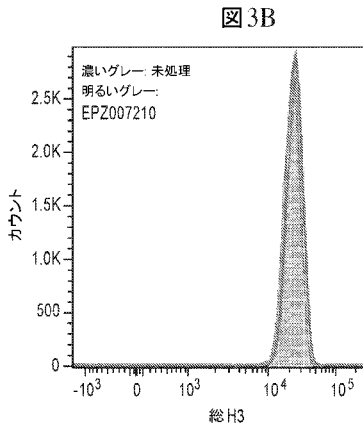


【 図 3 A 】

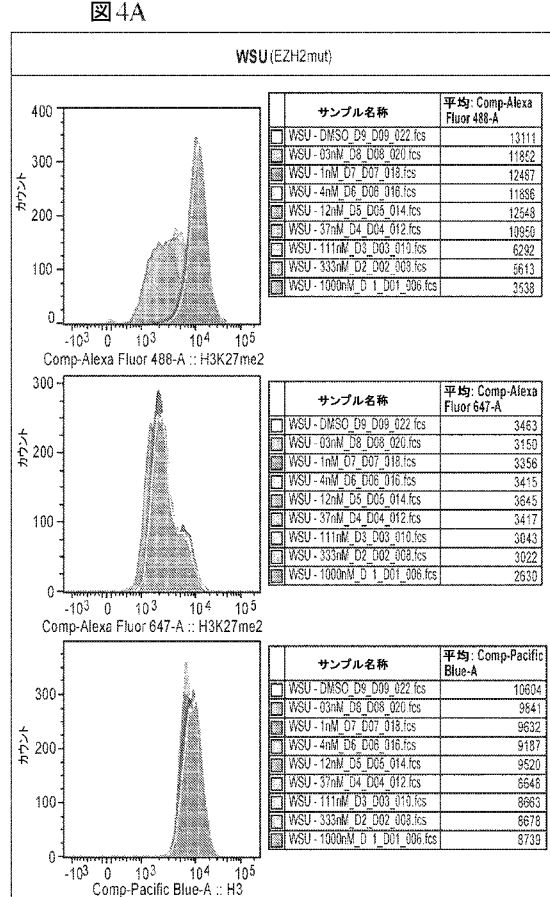


濃いグレー:未処理
 明るいグレー:EPZ007210

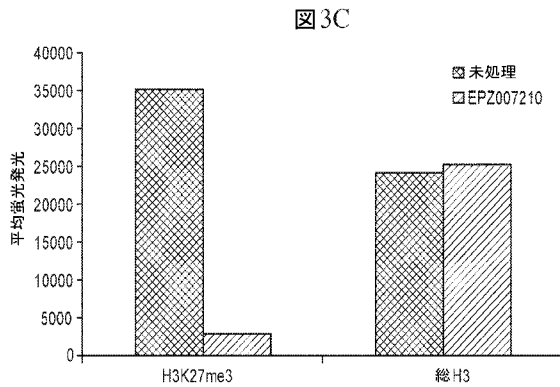
【 図 3 B 】



【 図 4 A - 1 】

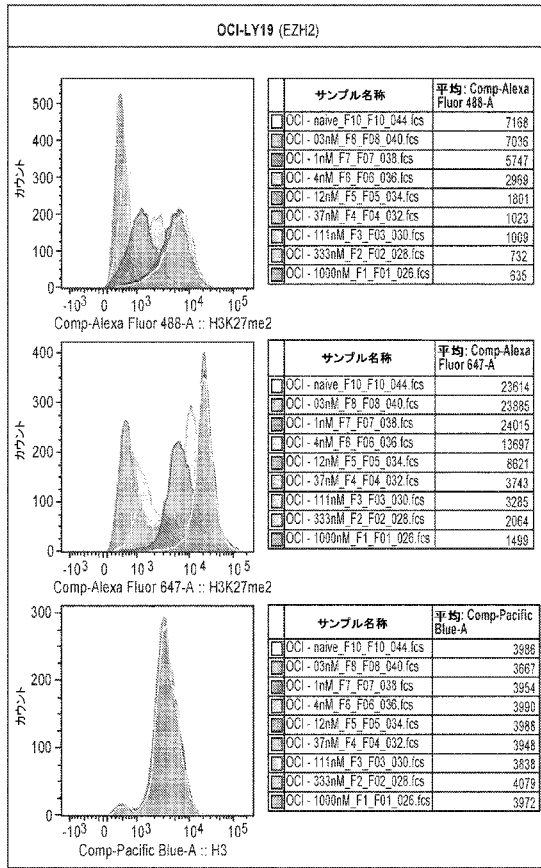


【 図 3 C 】

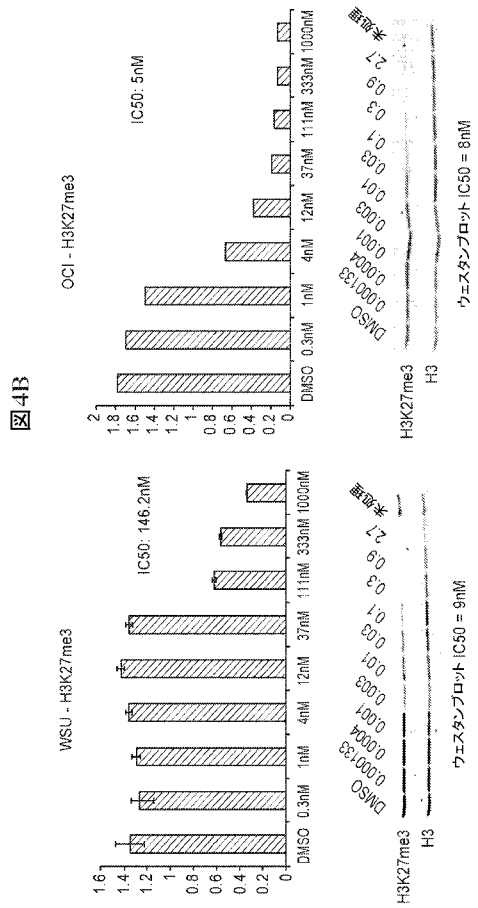


【 図 4 A - 2 】

図4A 続き

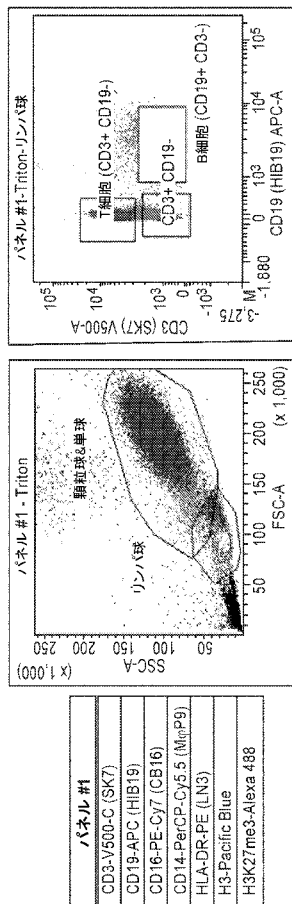


【 図 4 B 】



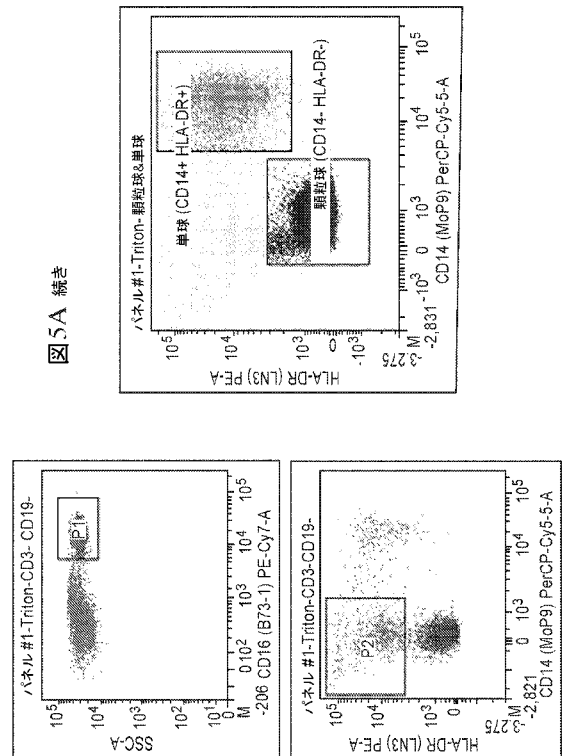
【 図 5 A - 1 】

図5A



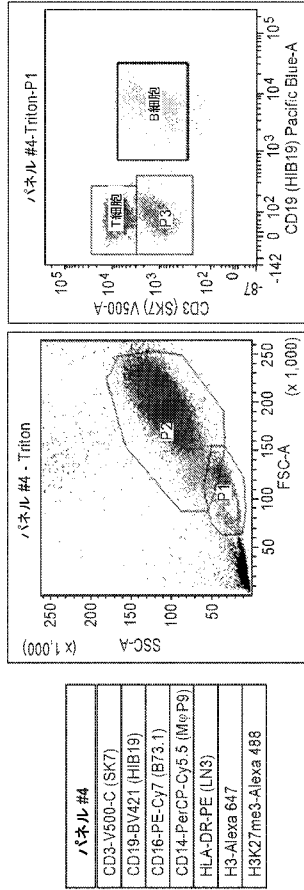
【 図 5 A - 2 】

図5A 続き



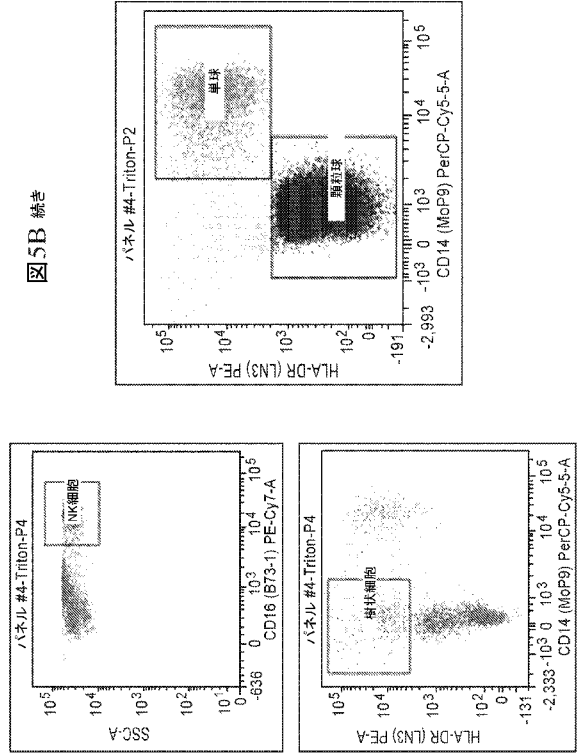
【 図 5 B - 1 】

図 5B



【 図 5 B - 2 】

図 5B 続き



【 図 5 C - 1 】

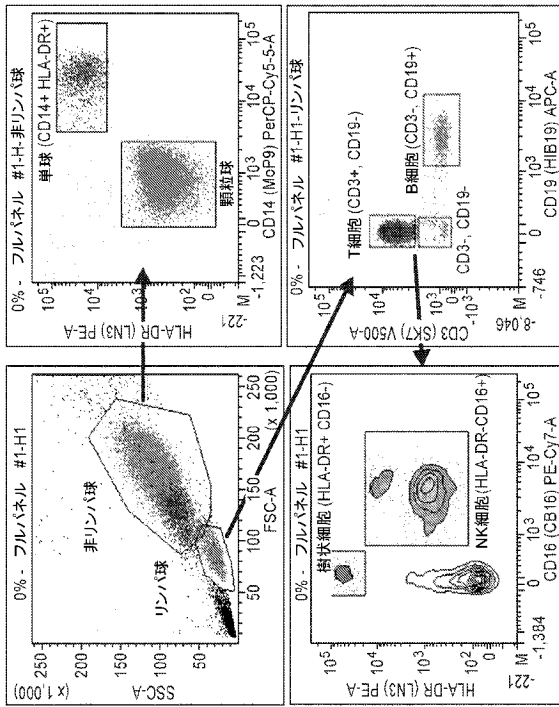
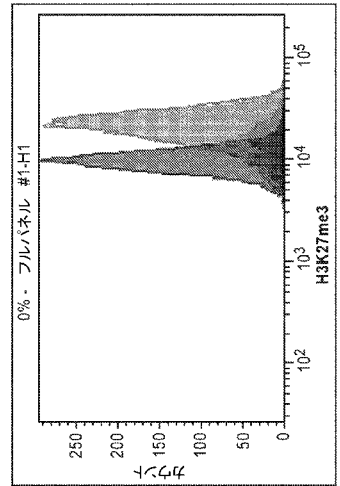


図 5C

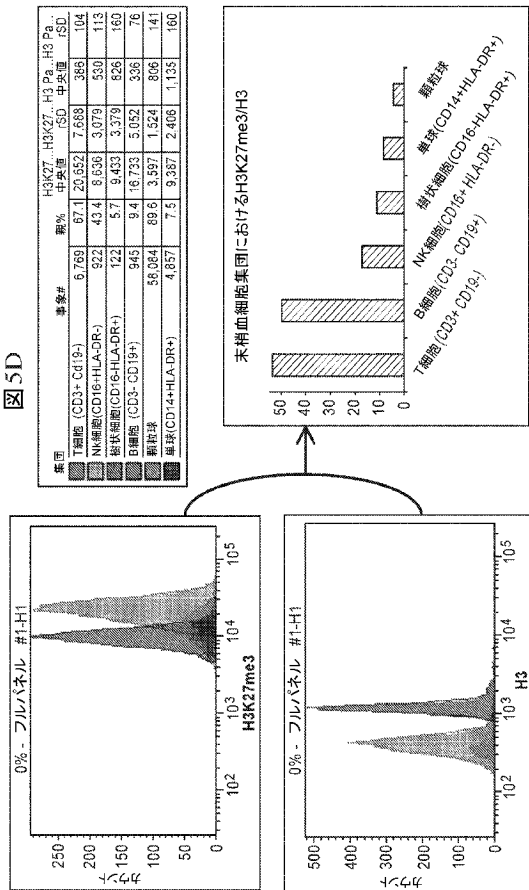
【 図 5 C - 2 】

図 5C 続き

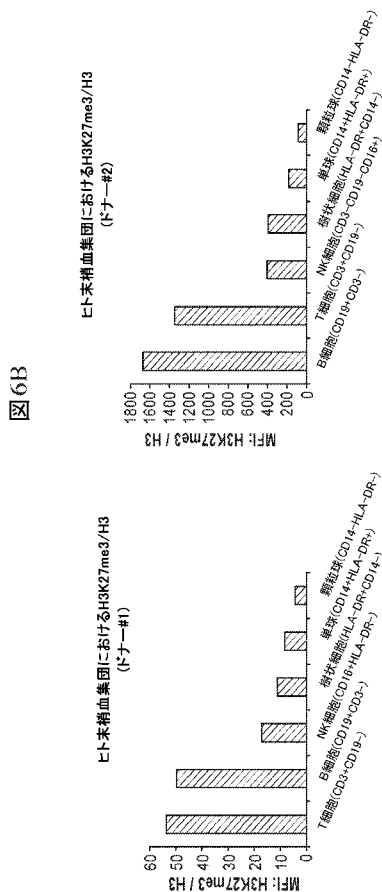
集団	事象#	割合%	中央値	rSD	中央値	rSD
T細胞 (CD3+ CD19-)	6,769	67.1	20,652	7,688	386	104
NK細胞 (CD16+ HLA-DR-)	922	43.4	8,636	3,079	530	113
樹状細胞 (CD16- HLA-DR+)	122	5.7	9,433	3,379	826	160
B細胞 (CD3- CD19+)	945	9.4	16,733	5,052	336	76
顆粒球	58,084	89.6	3,597	1,524	805	141
単核球 (CD14+ HLA-DR+)	4,857	7.5	9,387	2,406	1,135	160



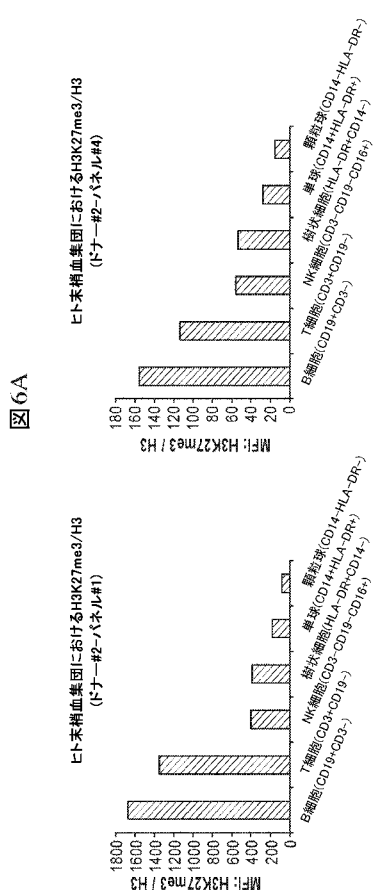
【 図 5 D 】



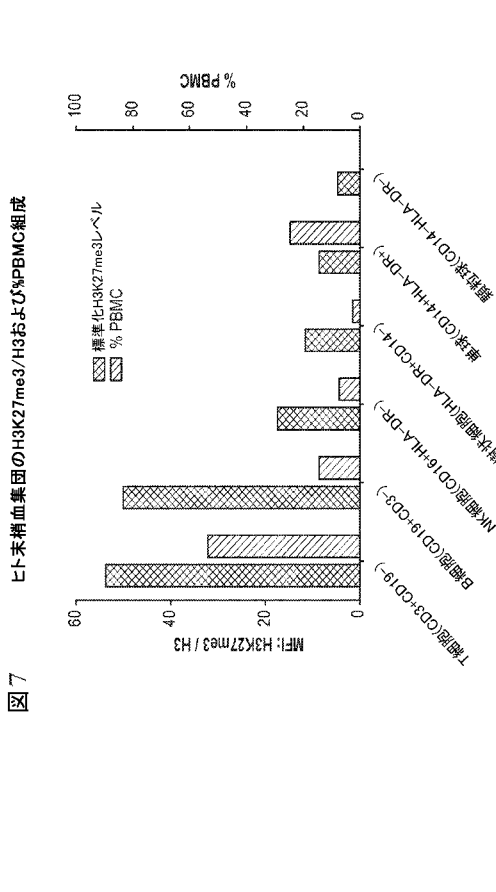
【 図 6 B 】



【 図 6 A 】



【 図 7 】



【 図 8 - 1 】

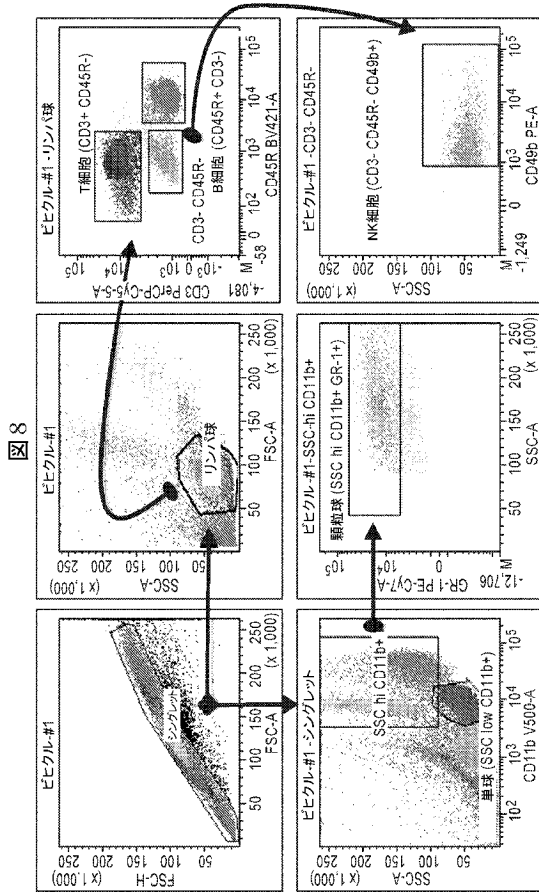
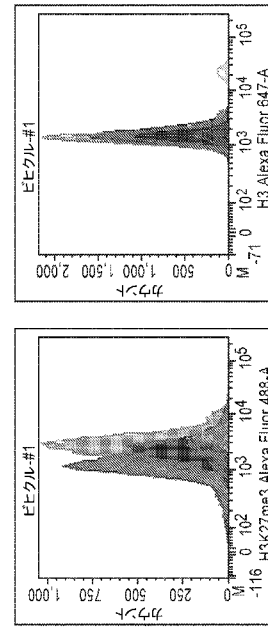


図 8

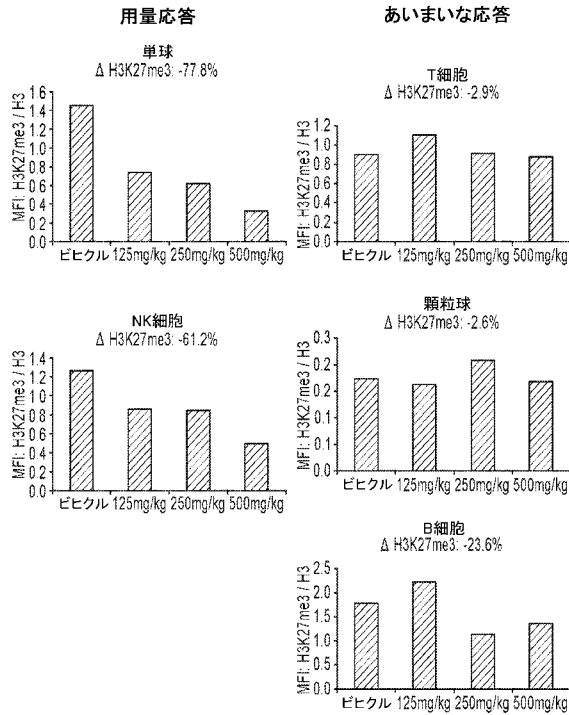
【 図 8 - 2 】

図 8 続き



【 図 9 】

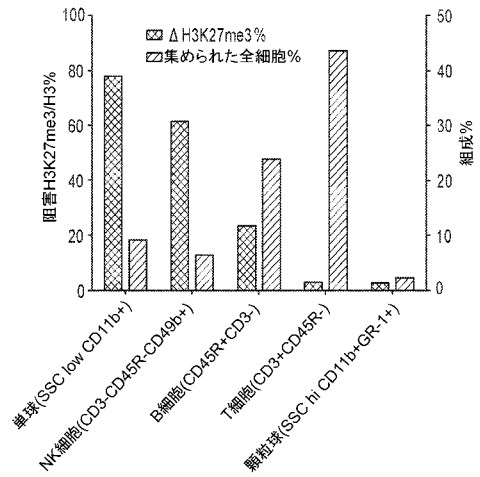
図 9



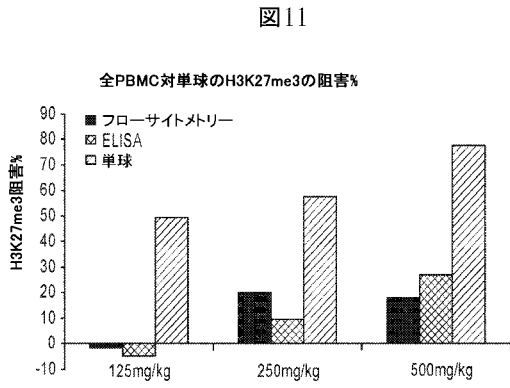
【 図 10 】

図 10

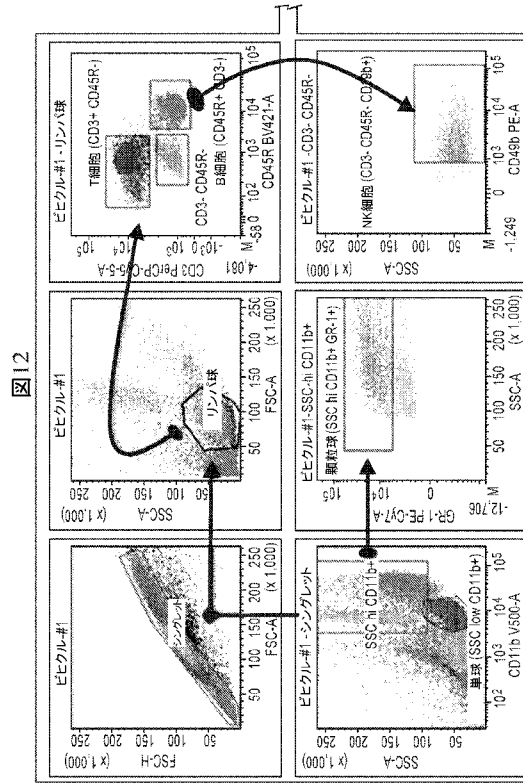
500mg/kg 6438処置マウスにおける標準化H3K27me3の阻害パーセント対集団組成パーセント



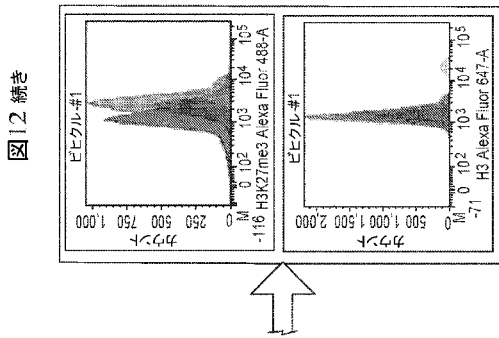
【 図 1 1 】



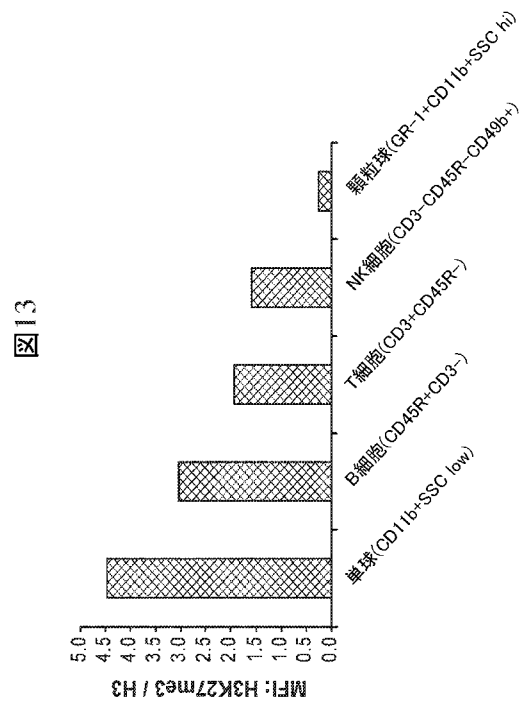
【 図 1 2 - 1 】



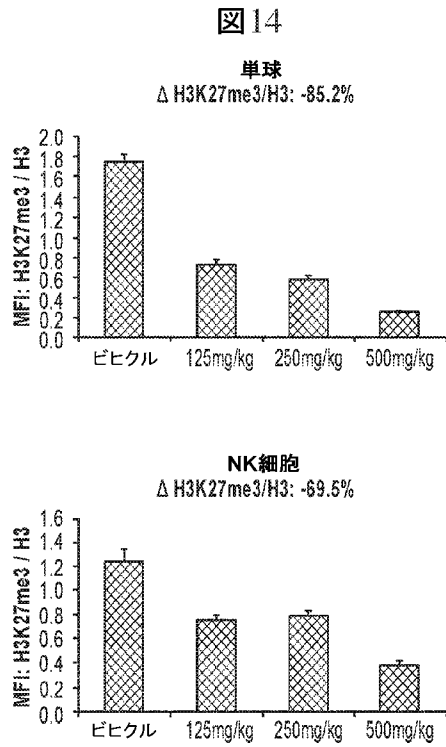
【 図 1 2 - 2 】



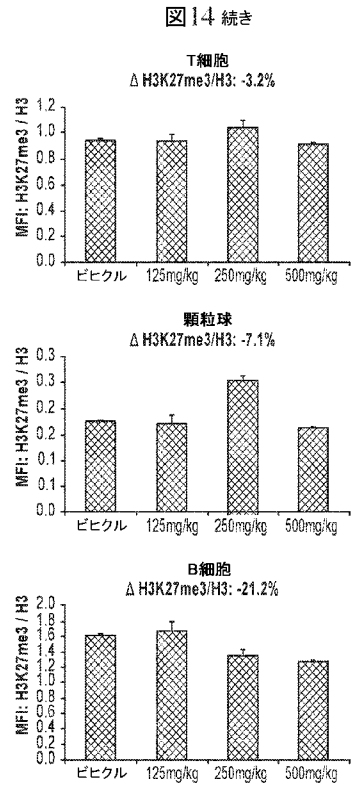
【 図 1 3 】



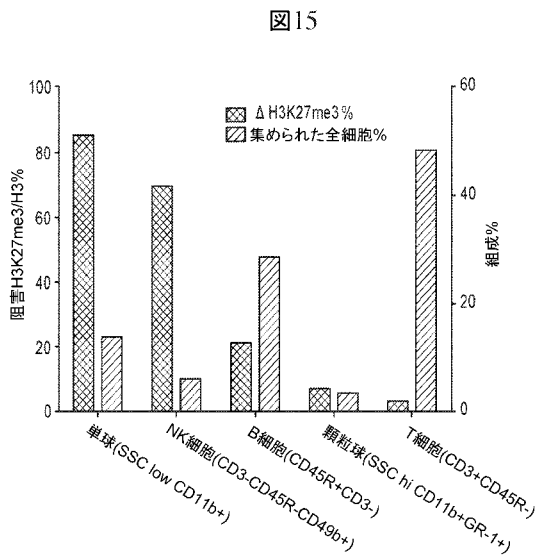
【 図 1 4 - 1 】



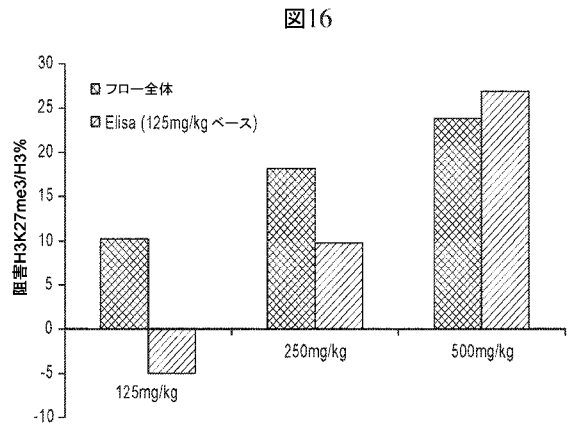
【 図 1 4 - 2 】



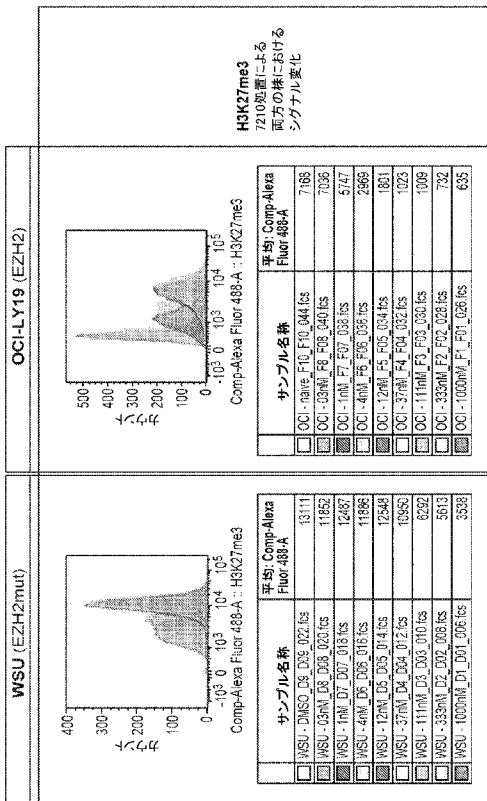
【 図 1 5 】



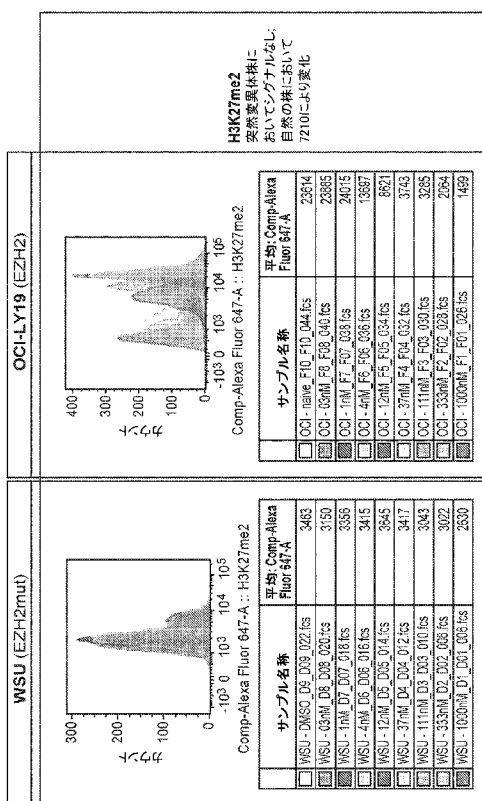
【 図 1 6 】



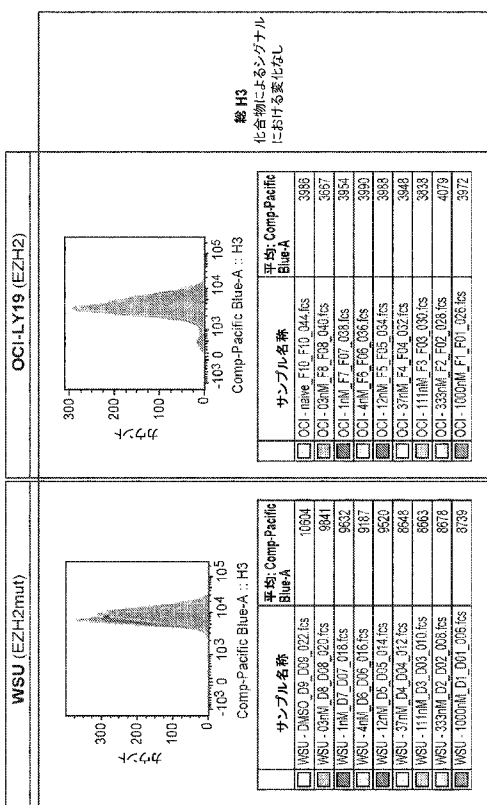
【 図 17 - 1 】



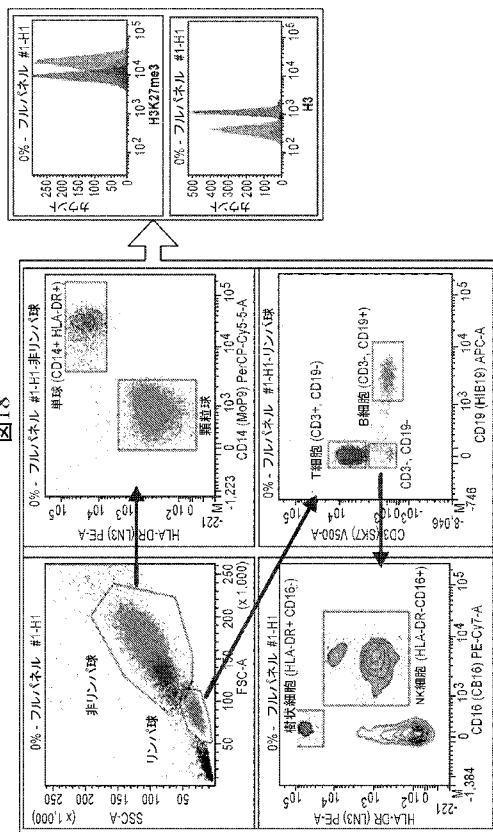
【 図 17 - 2 】



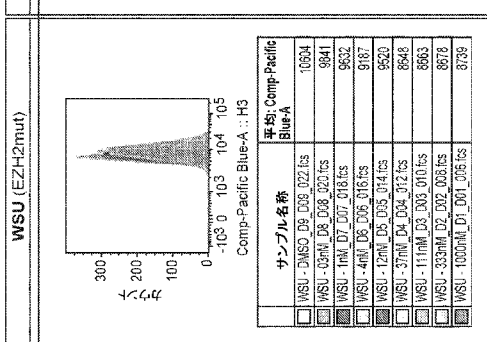
【 図 17 - 3 】



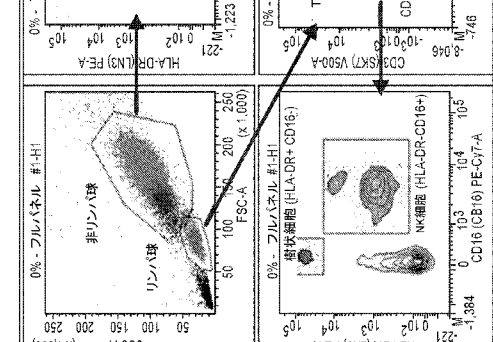
【 図 18 】



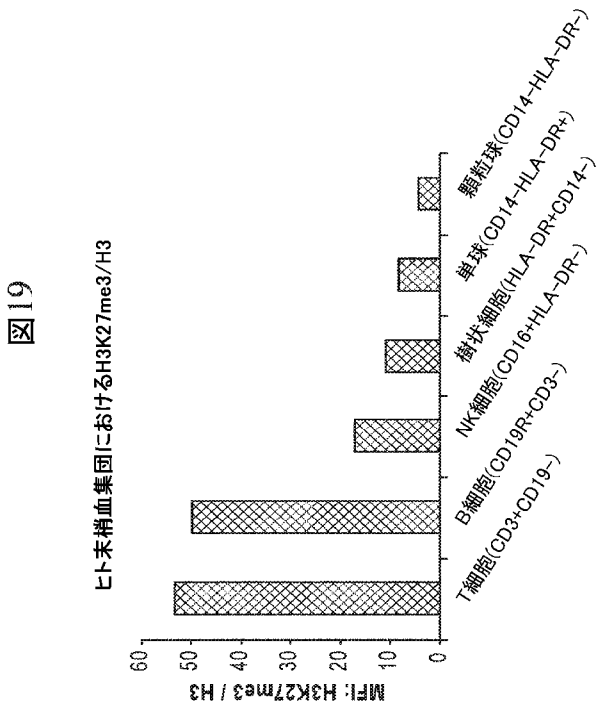
【 図 17 - 4 】



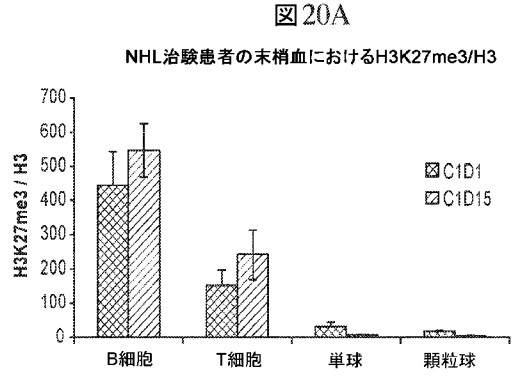
【 図 17 - 5 】



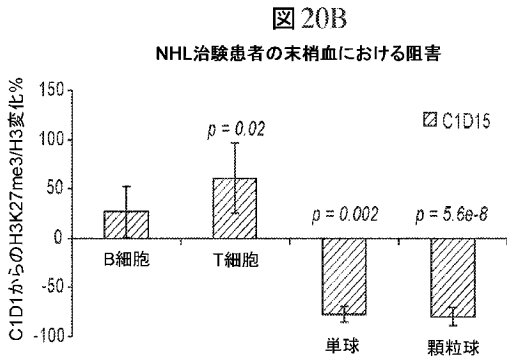
【 図 19 】



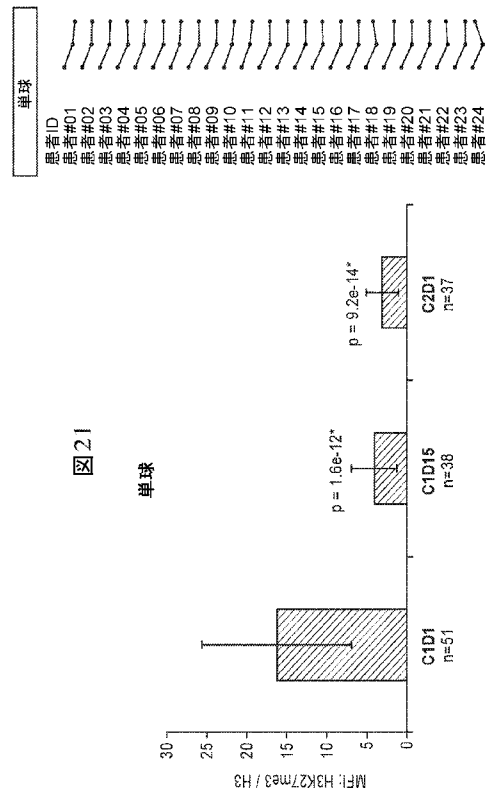
【 図 20 A 】



【 図 20 B 】



【 図 21 】



【 図 2 2 】

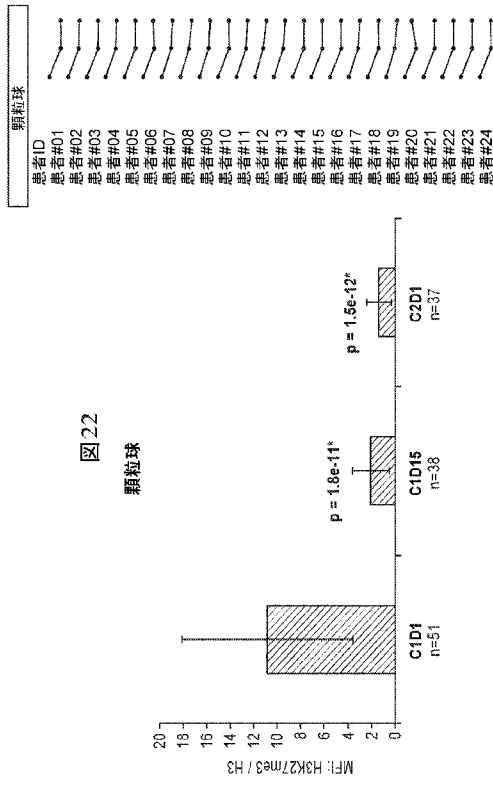


図 22

顆粒球

【 図 2 3 】

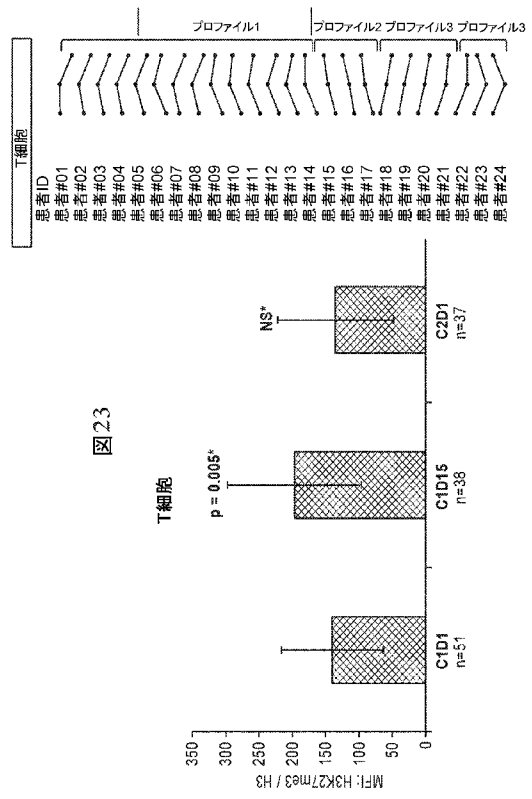


図 23

T細胞

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/060814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARIA WATSON ET AL: "The study of epigenetic mechanisms based on the analysis of histone modification patterns by flow cytometry", CYTOMETRY. PART A, vol. 85, no. 1, 26 August 2013 (2013-08-26), pages 78-87, XP055339755, US ISSN: 1552-4922, DOI: 10.1002/cyto.a.22344 see methods; page 80 ----- -/--	1-57
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 January 2017		06/02/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Hinchliffe, Philippe

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/060814

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Maria Watson ET AL: "Whole Blood Measurement of Histone Modifications Linked to the Epigenetic Regulation of Gene Expression" In: "Current Protocols in Cytometry", 5 January 2015 (2015-01-05), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, XP055339934, ISBN: 978-0-471-14295-9 pages 6.36.1-6.36.9, DOI: 10.1002/0471142956.cy0636s71, the whole document</p> <p>-----</p>	1-57
X	<p>WO 2013/138361 A1 (EPIZYME INC [US]; KUNTZ KEVIN WAYNE [US]; KNUTSON SARAH KATHLEEN [US];) 19 September 2013 (2013-09-19) example 11</p> <p>-----</p>	27-29, 32-57
X	<p>NADINE OBIER ET AL: "Chromatin Flow Cytometry Identifies Changes in Epigenetic Cell States", CELLS TISSUES ORGANS, vol. 191, no. 3, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 167-174, XP055340048, ISSN: 1422-6405, DOI: 10.1159/000240247 see also results and discussion (SSEA1 marker); page 4, column 1; figure 1</p> <p>-----</p>	1-57
A	<p>STEPHANIE M.C. SMITH ET AL: "Cell-Type-Specific Jumonji Histone Demethylase Gene Expression in the Healthy Rat CNS: Detection by a Novel Flow Cytometry Method", ASN NEURO, vol. 6, no. 3, 27 March 2014 (2014-03-27), XP055339937, ISSN: 1759-0914, DOI: 10.1042/AN20130050 abstract</p> <p>-----</p>	1-57
T	<p>C Plescia ET AL: "Chromatin flow cytometry based quantification of cell type specific alterations in histone methylation states resulting from in vitro and in vivo EZH2 inhibitor treatment.", ASH symposium, 19 June 2016 (2016-06-19), XP055340119, Retrieved from the Internet: URL:http://www.epizyme.com/wp-content/uploads/2015/11/EZH2-Chromatin-Flow-Plescia-Final.pdf [retrieved on 2017-01-30]</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/060814

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013138361 A1	19-09-2013	AU 2013232229 A1	02-10-2014
		CA 2867282 A1	19-09-2013
		CN 104540500 A	22-04-2015
		EP 2825161 A1	21-01-2015
		HK 1205938 A1	31-12-2015
		JP 2015511603 A	20-04-2015
		KR 20140147836 A	30-12-2014
		RU 2014141045 A	10-05-2016
		WO 2013138361 A1	19-09-2013

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 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)		A 6 1 K	31/5377	

(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, DJ, 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, KW, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ79 QR06 QR48 QS02
 QS39 QX01
 4C084 AA17 MA52 NA20 ZB261 ZC201
 4C086 AA01 AA02 BC73 GA02 GA08 GA09 MA01 MA04 NA20 ZB26
 ZC20

专利名称(译)	用于监测组蛋白H3甲基化状态的流式细胞术		
公开(公告)号	JP2019500623A	公开(公告)日	2019-01-10
申请号	JP2018543078	申请日	2016-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	雅酶股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Epizaimu , Incorporated的 雷开球德		
[标]发明人	クリストファー プレシア		
发明人	クリストファー プレシア		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 G01N33/574 C12Q1/02 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00 A61K31/5377		
CPC分类号	A61K31/5377 A61P35/00 G01N33/574 G01N33/6875 G01N2333/4703 G01N2440/12 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/536.D G01N33/574.D C12Q1/02 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00.111 A61K31/5377		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063 /QR06 4B063/QR48 4B063/QS02 4B063/QS39 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/MA52 4C084/NA20 4C084/ZB261 4C084/ZC201 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC73 4C086/GA02 4C086/GA08 4C086 /GA09 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA20 4C086/ZB26 4C086/ZC20		
优先权	62/251322 2015-11-05 US 62/351877 2016-06-17 US		
其他公开文献	JP2019500623A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及用于检测组蛋白的表观遗传修饰的方法，包含人组蛋白甲基转移酶EZH2的抑制剂的组合物及其在治疗癌症中的用途。

(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2019-500623 (P2019-500623A) (43) 公表日 平成31年1月10日 (2019.1.10)
(5) Int.-Cl. G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/536 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01)	FI G01N 33/53 K 4B063 G01N 33/536 D 4C084 G01N 33/574 D 4C086 C12Q 1/02 A61K 45/00	ターマコード (参考) 4B063 4C084 4C086
(2) 出願番号 特願2018-543078 (P2018-543078)	(7) 出願人 513137330	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く
(8) (22) 出願日 平成28年11月7日 (2016.11.7)	エピザイム, インコーポレイテッド	
(85) 翻訳文提出日 平成30年6月26日 (2018.6.26)	アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, テクノロジースクエア 400, フォースフロア	
(86) 国際出願番号 PCT/US2016/060814	(74) 代理人 100169904	
(87) 国際公開番号 W02017/079738	弁理士 村井 康司	
(8) 国際公開日 平成28年5月11日 (2017.5.11)	(74) 代理人 100117422	
(31) 優先権主張番号 62/251,322	弁理士 堀川 かおり	
(32) 優先日 平成27年11月5日 (2015.11.5)	(72) 発明者	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	クリストファー プレシア	
(31) 優先権主張番号 62/351,877	アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, テクノロジースクエア 400, フォースフロア	
(32) 優先日 平成28年6月17日 (2016.6.17)		
(33) 優先権主張国 米国 (US)		
(54) 【発明の名称】 ヒストンH3メチル化ステータスをモニターするためのフローサイトメトリー		最終頁に続く