

(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2013-543114

(P2013-543114A)

(43) 公表日 平成25年11月28日(2013.11.28)

(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 D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4 B O 6 3
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4 C O 5 7
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 C O 8 6
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	

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2013-528375 (P2013-528375)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月12日 (2011. 9. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月1日 (2013. 5. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/051258
 (87) 国際公開番号 W02012/034132
 (87) 国際公開日 平成24年3月15日 (2012. 3. 15)
 (31) 優先権主張番号 61/381, 684
 (32) 優先日 平成22年9月10日 (2010. 9. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513057795
 エピザイム インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
 ンブリッジ テクノロジー スクエア 4
 O O 4階
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

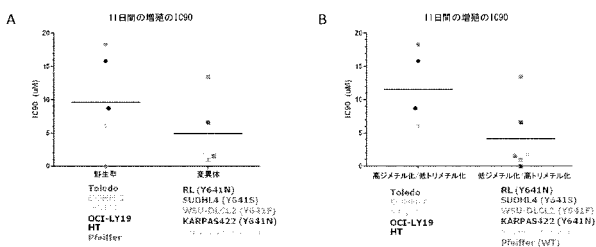
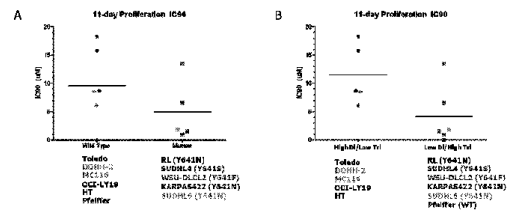
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトEZH2の阻害剤、およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、ヒストンH3のリジン27 (H3-K27)のモノメチル化からトリメチル化までを触媒するPRC2複合体の触媒サブユニットである、ヒトヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2の野生型およびある特定の変異型の阻害に関する。1つの態様において、阻害は、ある特定のがんに関連するH3-K27のトリメチル化が阻害されるように、EZH2の変異型に選択的である。本方法を用いて、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)を含むがんを処置することができる。また、EZH2の変異型に対する選択的小分子阻害剤を特定するための方法、および対象においてEZH2阻害剤に対する反応性を判定するための方法も提供する。

FIG. 14



【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 対象から組織サンプルを得る段階；
 b) 該組織サンプルにおけるH3-K27の、存在すればそのジメチル化(me2)レベルを検出する段階、および該ジメチル化(me2)レベルを対照のジメチル化(me2)レベルと比較する段階；

c) 任意で、該組織サンプルにおけるH3-K27の、存在すればそのトリメチル化(me3)レベルを検出する段階、および該トリメチル化(me3)レベルを対照のトリメチル化(me3)レベルと比較する段階

を含む方法であって、

10

該ジメチル化(me2)レベルが存在しないかもしくは該対照のジメチル化(me2)レベルよりも低い場合に、または該トリメチル化(me3)レベルが該対照のトリメチル化(me3)レベルと同じかもしくは該対照のトリメチル化(me3)レベルよりも高くかつ該ジメチル化(me2)レベルが存在しないかもしくは該対照のジメチル化(me2)レベルよりも低い場合に、該対象がEZH2阻害剤に対して反応性である、
 前記方法。

【請求項2】

d) 組織サンプルにおけるH3-K27のジメチル化(me2)レベルとトリメチル化(me3)レベルの比率を得て、試験比率を得る段階、および該試験比率を対照比率と比較する段階をさらに含み、

20

該試験比率が該対照比率よりも低い場合に、該対象がEZH2阻害剤に対して反応性である、
 請求項1記載の方法。

【請求項3】

対象が、がんを有する、請求項1記載の方法。

【請求項4】

検出する段階が、ウエスタンブロット分析、免疫組織化学(IHC)、免疫蛍光(IF)、および質量分析(MS)より選択されるアッセイによって行われる、請求項1記載の方法。

【請求項5】

検出する段階が、組織サンプルを、ジメチル化H3-K27および/またはトリメチル化H3-K27に特異的に結合する薬剤と接触させることを含む、請求項1記載の方法。

30

【請求項6】

薬剤が、抗体、ポリペプチド、アプタマー、またはそれらの断片である、請求項5記載の方法。

【請求項7】

前記請求項のいずれか一項記載の方法によりEZH2阻害剤に対して反応性であると判定されている対象に投与する段階を含む、その必要がある対象においてがんを処置する方法。

【請求項8】

がんが、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)より選択される、請求項3記載の方法。

40

【請求項9】

対象がY641変異EZH2ポリペプチドを発現する、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

Y641変異体が、Y641F、Y641H、Y641N、およびY641Sより選択される、請求項9記載の方法。

【請求項11】

EZH2ポリペプチドのY641変異体を発現している対象に、治療的有効量のEZH2阻害剤を投与する段階を含む方法。

50

【請求項 1 2】

EZH2ポリペプチドのY641変異体を発現している細胞を、治療的有効量のEZH2阻害剤と接触させる段階を含む方法。

【請求項 1 3】

対象由来のサンプルにおけるEZH2ポリペプチドの、存在すればそのY641変異体を検出する段階

を含む方法であって、

Y641変異体の存在は、対象がEZH2阻害剤による処置の候補であることを示す、前記方法。

10

【請求項 1 4】

阻害剤がY641変異EZH2ポリペプチドのヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する、請求項11～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 5】

阻害が選択的阻害である、請求項14記載の方法。

【請求項 1 6】

EZH2ポリペプチドのY641変異体が、Y641F、Y641H、Y641N、およびY641Sからなる群より選択される変異を有する、請求項11～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 7】

EZH2のY641変異体を検出する段階が

20

- a. 全ゲノム再配列決定、
 - b. EZH2ポリペプチドのY641変異体をコードする核酸を検出する標的領域再配列決定、
 - c. EZH2ポリペプチドのY641変異体に特徴的なポリペプチドもしくはその断片に特異的に結合する抗体、または
 - d. EZH2ポリペプチドのY641変異体に特徴的なポリペプチドもしくはその断片をコードする核酸とハイブリダイズする核酸プローブ
- によるものである、請求項11～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 8】

対象が、がんを有する、請求項11記載の方法。

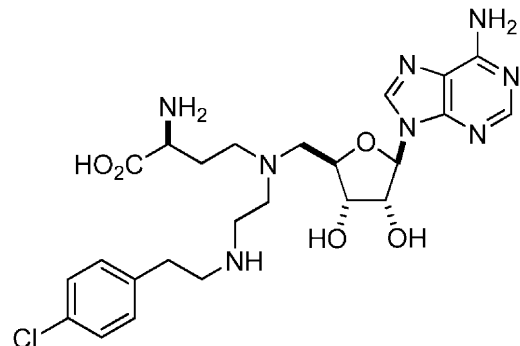
【請求項 1 9】

30

がんが、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)からなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項 2 0】

EZH2阻害剤が、S-アデノシル-L-ホモシステインもしくはその薬学的に許容される塩、または

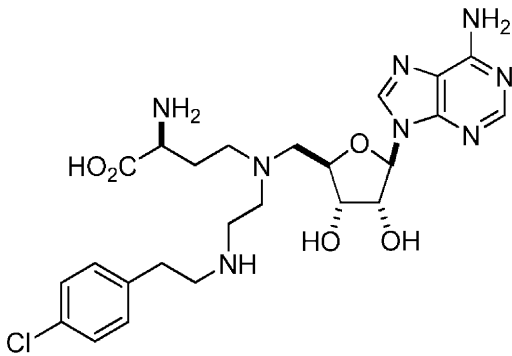


40

もしくはその薬学的に許容される塩である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 1】

化合物



10

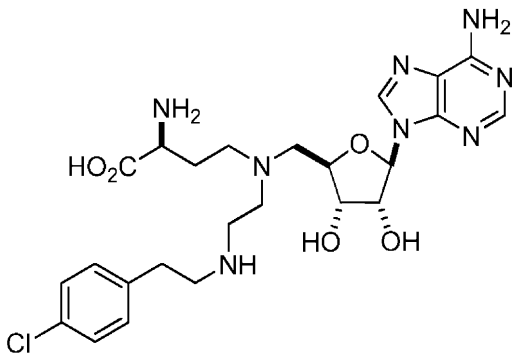
またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 2 2】

請求項21記載の化合物を含む、薬学的組成物。

【請求項 2 3】

濾胞性リンパ腫またはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)の処置における、



20

またはその薬学的に許容される塩の使用。

【請求項 2 4】

非メチル化H3-K27、モノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるH3-K27の形態を含むヒストン基質、メチル基供与体、ならびに試験化合物と、単離されたEZH2ポリペプチドのY641変異体とを混ぜ合わせて、試験混合物を形成させる段階；および

30

ヒストン基質におけるH3-K27のメチル化を検出し、それによって、試験化合物の存在下でのH3-K27のメチル化が試験化合物の非存在下でのH3-K27のメチル化よりも少ない場合に、試験化合物をEZH2のY641変異体の阻害剤と特定する段階を含む方法。

【請求項 2 5】

ヒストン基質におけるトリメチル化H3-K27の形成を検出し、それによって、試験化合物の存在下でのトリメチル化H3-K27の形成が試験化合物の非存在下でのトリメチル化H3-K27の形成よりも少ない場合に、試験化合物をEZH2のY641変異体の阻害剤と特定する段階をさらに含む、請求項24記載の方法。

40

【請求項 2 6】

モノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27、およびモノメチル化H3-K27とジメチル化H3-K27との組み合わせからなる群より選択されるH3-K27の形態を含むヒストン基質、メチル基供与体、ならびに試験化合物と、単離された野生型EZH2とを混ぜ合わせ、それによって対照混合物を形成させる段階；

試験混合物および対照混合物のそれぞれにおけるヒストン基質のトリメチル化を検出する段階；

(a) 試験化合物ありでのEZH2のY641変異体(M+)によるトリメチル化と(b) 試験化合物なしでのEZH2のY641変異体(M-)によるトリメチル化の比率を算出する段階；

(c) 試験化合物ありでの野生型EZH2(WT+)によるトリメチル化と(d) 試験化合物なしでの

50

野生型EZH2(WT-)によるトリメチル化の比率を算出する段階；

比率(a)/(b)を比率(c)/(d)と比較する段階；ならびに

比率(a)/(b)が比率(c)/(d)未満である場合に、試験化合物をEZH2のY641変異体の選択的阻害剤と特定する段階

をさらに含む、請求項25記載の方法。

【請求項27】

EZH2ポリペプチドのY641変異体が、Y641F、Y641H、Y641N、およびY641Sからなる群より選択される変異を有する、請求項24～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

検出する段階が、標識されたメチル基の取り込みを測定することを含む、請求項24～27記載の方法。 10

【請求項29】

標識されたメチル基が同位体で標識されたメチル基である、請求項28記載の方法。

【請求項30】

検出する段階が、ヒストン基質を、トリメチル化H3-K27に特異的に結合する抗体と接触させることを含む、請求項24～26のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する参照 20

本出願は、2010年9月10日付で出願されたU.S.S.N 61/381,684の優先権、および恩典を主張するものであり、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、ヒストンH3のリジン27 (H3-K27)のモノメチル化からトリメチル化までを触媒するPRC2複合体の触媒サブユニットである、ヒトヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2の野生型およびある特定の変異型の阻害、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)を含むがんを処置するための方法ならびに対象においてEZH2阻害剤に対する反応性を判定するための方法に関する。

【背景技術】 30

【0003】

背景

真核細胞内では、DNAはヒストンとともにパッケージされてクロマチンを形成する。およそ150塩基対のDNAが、ヒストンのオクタマー(ヒストン2A、2B、3および4がそれぞれ2つずつ)の周囲に2回巻きついて、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームを形成する。クロマチンの規則正しい構造の変化は、関連する遺伝子の転写の改変につながる可能性がある。この過程は高度に制御される。というのは、遺伝子発現パターンの変化が、分化、増殖およびアポトーシスなどの、基本的な細胞過程に多大な影響を与えうるからである。クロマチン構造の変化の(ゆえに転写の)制御はヒストン、最も顕著にはN末端尾部に対する共有結合修飾によって媒介される。これらの修飾は、遺伝子発現の遺伝的变化をもたら 40
しうるが、DNA自体の配列には影響を与えないので、後成的といわれることも多い。アミノ酸の側鎖の共有結合修飾(例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化およびユビキチン化)は、酵素によって媒介される。

【0004】

ヒストンの特定のアミノ酸部位へのメチル基の選択的付加は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)として知られる独特の酵素ファミリーの作用によって制御される。特定の遺伝子の発現レベルは、関連するヒストン部位での1つまたは複数のメチル基の有無によって影響を受ける。特定のヒストン部位でのメチル基の特異的効果は、ヒストンデメチラーゼによってメチル基が除去されるまで、またはヌクレオソーム代謝回転を通じて修飾ヒストンが置き換えられるまで持続する。同じ方法で、他の酵素類はDNAおよびヒストン 50

を他の化学種で修飾することができ、さらに他の酵素はこれらの種を除去して、遺伝子発現の制御をもたらすことができる。

【0005】

転写調節の背後にある生化学系の組織的集合体は、細胞増殖および分化を最適に進行させるために厳しく制御されなければならない。これらの制御が、DNAおよびヒストン修飾に関わる酵素の異常な発現および/または活性によって妨げられる場合に、疾患状態が生じる。例えば、ヒトがんでは、後成的な酵素活性の調節不全が、がんに関連する細胞増殖の制御不能、ならびに細胞移動および浸潤の増強のような他のがん関連表現型に寄与することを示唆する証拠が相次いでいる。がんを超えて、代謝性疾患(糖尿病のような)、炎症性疾患(クローン病のような)、神経変性疾患(アルツハイマー病のような)、および心血管疾患を含む、いくつかの他のヒト疾患における後成的酵素の役割に関する証拠が増えている。それゆえ、後成的酵素の異常な作用を選択的に調節することは、さまざまな範囲の疾患の処置にかなり有望である。

【0006】

ヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2

ポリコーム群(PcG)およびトライソラクス群(trxG)タンパク質は、細胞記憶システムの一部であることが知られている。Francis et al. (2001) Nat Rev Mol Cell Biol 2:409-21 (非特許文献1); Simon et al. (2002) Curr Opin Genet Dev 12:210-8 (非特許文献2)。両群のタンパク質は、一過性に発現される体節遺伝子によって胚発生初期に確立される、ホメオティックボックス(Hox)遺伝子発現の空間的パターンの維持に参与している。一般に、PcGタンパク質は、「オフ状態」を維持する転写リプレッサーであり、trxGタンパク質は、「オン状態」を維持する転写アクチベーターである。PcGおよびtrxGタンパク質の成員は、固有のヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMTase)活性を含むので、PcGおよびtrxGタンパク質はコアヒストンのメチル化を通じて細胞記憶に参与しうる。Beisel et al. (2002) Nature 419:857-62 (非特許文献3); Cao et al. (2002) Science 298: 1039-43 (非特許文献4); Czermin et al. (2002) Cell 111 :185-96 (非特許文献5); Kuzmichev et al. (2002) Genes Dev 16:2893-905 (非特許文献6); Milne et al. (2002) Mol Cell 10: 1107-17 (非特許文献7); Muller et al. (2002) Cell 111:197-208 (非特許文献8); Nakamura et al. (2002) Mol Cell 10: 1119-28 (非特許文献9)。

【0007】

生化学的および遺伝的研究から、ショウジョウバエ(Drosophila) PcGタンパク質が、複合体の組成は動的でありうるものの、少なくとも2つの異なるタンパク質複合体、つまりポリコーム抑制複合体1 (PRC1)およびESC-E(Z)複合体(ポリコーム抑制複合体2 (PRC2)としても公知)において機能するという証拠が提供されている。Otte et al. (2003) Curr Opin Genet Dev 13:448-54 (非特許文献10)。ショウジョウバエ(Czermin et al. (前記); Muller et al. (前記))および哺乳類細胞(Cao et al. (前記); Kuzmichev et al. (前記))での研究から、ESC-E(Z)/EED-EZH2 (すなわち、PRC2)複合体が固有のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有することが実証されている。異なるグループにより単離された複合体の組成は、わずかに異なるが、それらには概ね、EED、EZH2、SUZ12およびRbAp48、またはそのショウジョウバエ相同体が含まれる。しかしながら、EED、EZH2およびSUZ12しか含んでいない再構成された複合体が、ヒストンH3のリジン27に対するヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を保持している。米国特許第7,563,589号(特許文献1)(参照により組み入れられる)。

【0008】

PRC2複合体を構成する各種タンパク質のなかで、EZH2 (Zeste相同体2のエンハンサー(E nhancer of Zeste Homolog 2))が触媒サブユニットである。次にEZH2の触媒部位は、トライソラクス群およびポリコーム群の両方の成員を含めて、いくつかのクロマチン結合タンパク質に見出される高度に保存された配列モチーフ(Su(var)3-9、Zesteのエンハンサー(E nhancer of Zeste)、トライソラクス(TriThorax)にちなんで名付けられた)である、SETドメインのなかに存在する。SETドメインは、H3-K79メチルトランスフェラーゼDOT1を除く

10

20

30

40

50

、全ての公知のヒストンリジンメチルトランスフェラーゼに特徴的である。

【0009】

Hox遺伝子サイレンシングに加えて、PRC2を介したヒストンH3-K27のメチル化がX-不活化に関与することが示されている。Plath et al. (2003) *Science* 300: 131-5 (非特許文献11); Silva et al. (2003) *Dev Cell* 4:481-95 (非特許文献12)。XiへのPRC2複合体の動員およびその後のヒストンH3-K27でのトリメチル化は、X-不活化の初期段階中に起こり、Xist RNAに依存する。さらに、EZH2および関連するそのヒストンH3-K27メチルトランスフェラーゼ活性は、多能性胚盤葉上層細胞および分化した栄養外胚葉を示差的に特徴付けることが見出された。Erhardt et al. (2003) *Development* 130:4235-48 (非特許文献13))。

10

【0010】

多能性胚盤葉上層細胞の後成的修飾パターンの維持におけるEZH2の役割と一致して、Creを介したEZH2の欠失が細胞におけるヒストンH3-K27メチル化の喪失を引き起こす。Erhardt et al. (前記)。さらに、前立腺および乳がん細胞株および組織における研究から、EZH2およびSUZ12のレベルとこれらのがんの侵襲性との間の強い相関関係が明らかにされており(Bracken et al. (2003) *EMBO J* 22:5323-35 (非特許文献14); Kirmizis et al. (2003) *Mol Cancer Ther* 2:113-21 (非特許文献15); Kleer et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11606-11 (非特許文献16); Varambally et al. (2002) *Nature* 419:624-9 (非特許文献17))、PRC2複合体の機能不全が、がんに寄与する可能性のあることが示唆される。

20

【0011】

最近になって、EZH2のチロシン641の体細胞変異(Y641F、Y641N、Y641SおよびY641H)は、濾胞性リンパ腫(FL)および胚中心B細胞様(GCB)サブタイプのびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)と関連していることが報告された。Morin et al. (2010) *Nat Genet* 42: 181-5 (非特許文献18)。いかなる場合でも、変異EZH2遺伝子の出現は、ヘテロ接合性であることが分かり、野生型および変異体の両方の対立遺伝子の発現が、トランスクリプトーム配列決定によりプロファイルした変異体サンプルにおいて検出された。EZH2の変異型の全てが多タンパク質PRC2複合体に取り込まれること、しかし、結果的に生じる複合体は、ペプチド基質のH3-K27等価残基のメチル化を触媒する能力に欠けることも実証された。ゆえに、EZH2のTyr641での、疾患に関連した変化は、EZH2が触媒するH3-K27のメチル化に関する機能の喪失をもたらすものと結論付けられた。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】米国特許第7,563,589号

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Francis et al. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:409-21

【非特許文献2】Simon et al. (2002) *Curr Opin Genet Dev* 12:210-8

【非特許文献3】Beisel et al. (2002) *Nature* 419:857-62

40

【非特許文献4】Cao et al. (2002) *Science* 298:1039-43

【非特許文献5】Czermin et al. (2002) *Cell* 111:185-96

【非特許文献6】Kuzmichev et al. (2002) *Genes Dev* 16:2893-905

【非特許文献7】Milne et al. (2002) *Mol Cell* 10:1107-17

【非特許文献8】Muller et al. (2002) *Cell* 111:197-208

【非特許文献9】Nakamura et al. (2002) *Mol Cell* 10:1119-28

【非特許文献10】Otte et al. (2003) *Curr Opin Genet Dev* 13:448-54

【非特許文献11】Plath et al. (2003) *Science* 300:131-5

【非特許文献12】Silva et al. (2003) *Dev Cell* 4:481-95

【非特許文献13】Erhardt et al. (2003) *Development* 130:4235-48

50

【非特許文献14】Bracken et al. (2003) EMBO J 22:5323-35

【非特許文献15】Kirmizis et al. (2003) Mol Cancer Ther 2:113-21

【非特許文献16】Kleer et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100: 11606-11

【非特許文献17】Varambally et al. (2002) Nature 419:624-9

【非特許文献18】Morin et al. (2010) Nat Genet 42:181-5

【発明の概要】

【0014】

本発明の1つの局面は、ヒストンH3のリジン27 (H3-K27)のモノメチル化からトリメチル化までを触媒するPRC2複合体の触媒サブユニットである、野生型ヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2および変異ヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2の活性を調節することに関する。例えば、本発明は、EZH2のある特定の変異型の活性を阻害することに関する。EZH2の変異型は、野生型EZH2のチロシン641 (Y641、同様にTyr641)を別のアミノ酸残基に置き換えることを含む。

10

【0015】

本発明の別の局面は、ジメチル化H3-K27me2レベルによって、または好ましくはジメチル化H3-K27me2およびトリメチル化H3-K27me3のレベルによってEZH2阻害剤に対する患者の反応性を判定することに関する。例えば、低いもしくは検出不能なレベルのジメチル化H3-K27me2を有する細胞または低い比率のH3-K27me2/me3を有する細胞は、典型的なさらに高いH3-K27me2/me3比を有する細胞よりもEZH2阻害剤の抗増殖効果に対してはるかに反応性が高い。

20

【0016】

本発明の1つの局面は、トリメチル化H3-K27へのH3-K27の変換を対象において阻害する方法である。本方法は、EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するEZH2阻害剤の治療的有効量を、EZH2のY641変異体を発現している対象に投与し、それによって対象におけるトリメチル化H3-K27へのH3-K27の変換を阻害する段階を含む。

【0017】

本発明のこの局面および他の局面において、1つの態様では、阻害剤はEZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する。

【0018】

本発明のこの局面および他の局面において、1つの態様では、阻害剤はEZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を選択的に阻害する。

30

【0019】

本発明のこの局面および他の局面において、1つの態様では、EZH2のY641変異体は、Y641F、Y641H、Y641N、およびY641Sからなる群より選択される。

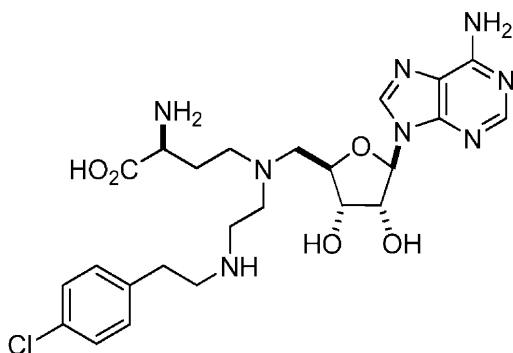
【0020】

本発明のこの局面および他の局面において、1つの態様では、EZH2阻害剤はS-アデノシル-L-ホモシステインまたはその薬学的に許容される塩である。

【0021】

本発明のこの局面および他の局面において、1つの態様では、EZH2阻害剤は化合物75

40



(75)

またはその薬学的に許容される塩である。

50

【0022】

本発明の1つの局面は、トリメチル化H3-K27へのH3-K27の変換を対象において阻害する方法である。本方法は、対象由来のサンプルにおけるEZH2のY641変異体を検出するためのアッセイを行う段階；およびEZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するEZH2阻害剤の治療的有効量を、EZH2のY641変異体を発現している対象に投与し、それによって対象におけるトリメチル化H3-K27へのH3-K27の変換を阻害する段階を含む。

【0023】

本発明のこの局面および他の局面において、1つの態様では、EZH2のY641変異体を検出するためのアッセイを行う段階は、EZH2のY641変異体をコードする核酸を検出する全ゲノム再配列決定または標的領域再配列決定を含む。

10

【0024】

本発明のこの局面および他の局面において、1つの態様では、EZH2のY641変異体を検出するためのアッセイを行う段階は、サンプルを、EZH2のY641変異体に特徴的なポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する抗体と接触させる段階を含む。

【0025】

本発明のこの局面および他の局面において、1つの態様では、EZH2のY641変異体を検出するためのアッセイを行う段階は、サンプルを、EZH2のY641変異体に特徴的なポリペプチドまたはその断片をコードする核酸とハイブリダイズする核酸プローブと、高度にストリジェントな条件の下で接触させる段階を含む。

【0026】

本発明の1つの局面は、トリメチル化H3-K27へのH3-K27の変換を阻害する方法である。本方法は、EZH2のY641変異体を、H3-K27を含むヒストン基質およびEZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するEZH2阻害剤の有効量と接触させ、それによってトリメチル化H3-K27へのH3-K27の変換を阻害する段階を含む。

20

【0027】

本発明の1つの局面は、EZH2阻害剤による処置の候補として対象を特定する方法である。本方法は、対象由来のサンプルにおけるEZH2のY641変異体を検出するためのアッセイを行う段階；およびEZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するEZH2阻害剤による処置の候補として、EZH2のY641変異体を発現している対象を特定する段階を含む。

【0028】

本発明の1つの局面は、EZH2のY641変異体の阻害剤を特定する方法である。本方法は、非メチル化H3-K27、モノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるH3-K27の形態を含むヒストン基質、メチル基供与体、ならびに試験化合物と、単離されたEZH2のY641変異体とを混ぜ合わせる段階；およびヒストン基質におけるH3-K27のメチル化を検出するためのアッセイを行い、それによって、試験化合物の存在下でのH3-K27のメチル化が試験化合物の非存在下でのH3-K27のメチル化よりも少ない場合に、試験化合物をEZH2のY641変異体の阻害剤と特定する段階を含む。

30

【0029】

1つの態様において、ヒストン基質におけるH3-K27のメチル化を検出するためのアッセイを行う段階は、標識されたメチル基の取り込みを測定する段階を含む。

40

【0030】

1つの態様において、標識されたメチル基は同位体で標識されたメチル基である。

【0031】

1つの態様において、ヒストン基質におけるH3-K27のメチル化を検出するためのアッセイを行う段階は、ヒストン基質を、トリメチル化H3-K27に特異的に結合する抗体と接触させる段階を含む。

【0032】

本発明の1つの局面は、EZH2のY641変異体の阻害剤を特定する方法である。本方法は、非メチル化H3-K27、モノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるH3-K27の形態を含むヒストン基質、メチル基供与体、な

50

らびに試験化合物と、単離されたEZH2のY641変異体とを混ぜ合わせる段階；およびヒストン基質におけるトリメチル化H3-K27の形成を検出するためのアッセイを行い、それによって、試験化合物の存在下でのトリメチル化H3-K27の形成が試験化合物の非存在下でのトリメチル化H3-K27の形成よりも少ない場合に、試験化合物をEZH2のY641変異体の阻害剤と特定する段階を含む。

【0033】

1つの態様において、ヒストン基質におけるトリメチル化H3-K27の形成を検出するためのアッセイを行う段階は、標識されたメチル基の取り込みを測定する段階を含む。

【0034】

1つの態様において、標識されたメチル基は同位体で標識されたメチル基である。

10

【0035】

1つの態様において、ヒストン基質におけるトリメチル化H3-K27の形成を検出するためのアッセイを行う段階は、ヒストン基質を、トリメチル化H3-K27に特異的に結合する抗体と接触させる段階を含む。

【0036】

本発明の1つの局面は、EZH2のY641変異体の選択的阻害剤を特定する方法である。本方法は、モノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27、およびモノメチル化H3-K27とジメチル化H3-K27との組み合わせからなる群より選択されるH3-K27の形態を含むヒストン基質、メチル基供与体、ならびに試験化合物と、単離されたEZH2のY641変異体とを混ぜ合わせ、それによって試験混合物を形成させる段階；モノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27、およびモノメチル化H3-K27とジメチル化H3-K27との組み合わせからなる群より選択されるH3-K27の形態を含むヒストン基質、メチル基供与体、ならびに試験化合物と、単離された野生型EZH2とを混ぜ合わせ、それによって対照混合物を形成させる段階；試験混合物および対照混合物のそれぞれにおけるヒストン基質のトリメチル化を検出するためのアッセイを行う段階；(a)試験化合物ありでのEZH2のY641変異体(M+)によるトリメチル化と(b)試験化合物なしでのEZH2のY641変異体(M-)によるトリメチル化の比率を算出する段階；(c)試験化合物ありでの野生型EZH2(WT+)によるトリメチル化と(d)試験化合物なしでの野生型EZH2(WT-)によるトリメチル化の比率を算出する段階；比率(a)/(b)と比率(c)/(d)とを比較する段階；ならびに比率(a)/(b)が比率(c)/(d)未満である場合に、試験化合物をEZH2のY641変異体の選択的阻害剤と特定する段階を含む。

20

30

【0037】

本発明の1つの局面は、がんを処置する方法である。本方法は、EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するEZH2阻害剤の治療的有効量を、EZH2のY641変異体を発現しているがんを有する対象に投与し、それによってがんを処置する段階を含む。

【0038】

本発明のこの局面および他の局面において、1つの態様では、がんは、濾胞性リンパ腫および胚中心B細胞様(GCB)サブタイプのびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)からなる群より選択される。

【0039】

本発明の1つの局面は、がんを処置する方法である。本方法は、EZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を選択的に阻害するEZH2阻害剤の治療的有効量を、EZH2のY641変異体を発現しているがんを有する対象に投与し、それによってがんを処置する段階を含む。

40

【0040】

本発明の1つの局面は、がんを処置する方法である。本方法は、がんを有する対象由来のがん細胞を含むサンプルにおけるEZH2のY641変異体を検出するためのアッセイを行う段階；およびEZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するEZH2阻害剤の治療的有効量を、EZH2のY641変異体を発現している対象に投与し、それによってがんを処置する段階を含む。

【0041】

50

本発明の別の局面は、対象においてEZH2阻害剤に対する反応性を判定するための方法である。1つの態様において、本方法は、対象から組織サンプルを単離する段階；組織サンプルにおけるH3-K27のジメチル化(me2)レベルを検出する段階；ジメチル化(me2)レベルを対照のジメチル化(me2)レベルと比較する段階；およびジメチル化(me2)レベルが存在しないかまたは対照のジメチル化(me2)レベルよりも低い場合に、対象がEZH2阻害剤に対して反応性であると特定する段階を含む。1つの態様において、本方法は、組織サンプルにおけるH3-K27のトリメチル化(me3)レベルを検出する段階；トリメチル化(me3)レベルを対照のトリメチル化(me3)レベルと比較し、かつジメチル化(me2)レベルを対照のジメチル化(me2)レベルと比較する段階；ならびにトリメチル化(me3)レベルが対照のトリメチル化(me3)レベルと同じかまたは対照のトリメチル化(me3)レベルよりも高く、かつジメチル化(me2)レベルが存在しないかまたは対照のジメチル化(me2)レベルよりも低い場合に、該対象がEZH2阻害剤に対して反応性であると特定する段階をさらに含む。別の態様において、本方法は、組織サンプルにおけるH3-K27のジメチル化(me2)レベルとトリメチル化(me3)レベルの比率を得る段階；対照のジメチル化(me2)レベルと対照のトリメチル化(me3)レベルの対照の比率を得る段階；該比率を該対照の比率と比較する段階；および該比率が該対照の比率よりも低い場合に、対象が該EZH2阻害剤に対して反応性であると特定する段階をさらに含む。好ましい態様において、対象はがんを有する。1つの態様において、がんは濾胞性リンパ腫である。あるいは、がんはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)である。別の好ましい態様において、対象はY641変異EZH2を発現する。好ましい態様において、Y641変異体はY641F、Y641H、Y641N、またはY641Sである。

10

20

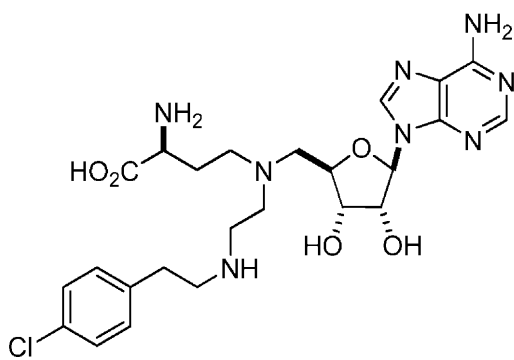
【0042】

本発明の1つの局面は、がんを有する対象に対する処置を選択するための方法である。本方法は、ジメチル化H3-K27レベルによって、または好ましくはジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27のレベルによってEZH2阻害剤に対する対象の反応性を判定する段階；ならびに対象がEZH2阻害剤に反応性である場合にEZH2阻害剤を対象に提供する段階を含む。1つの態様において、がんは濾胞性リンパ腫である。あるいは、がんはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)である。別の好ましい態様において、対象はY641変異EZH2を発現する。好ましい態様において、Y641変異体はY641F、Y641H、Y641N、またはY641Sである。

30

【0043】

本発明の1つの局面は、化合物75

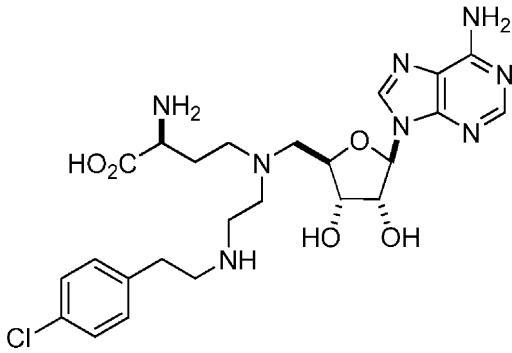


40

またはその薬学的に許容される塩である。

【0044】

本発明の1つの局面は、化合物75



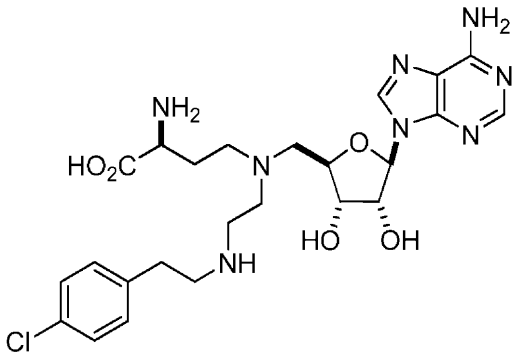
(75)

10

またはその薬学的に許容される塩を含む薬学的組成物である。

【0045】

本発明の1つの局面は、濾胞性リンパ腫の処置における、化合物75



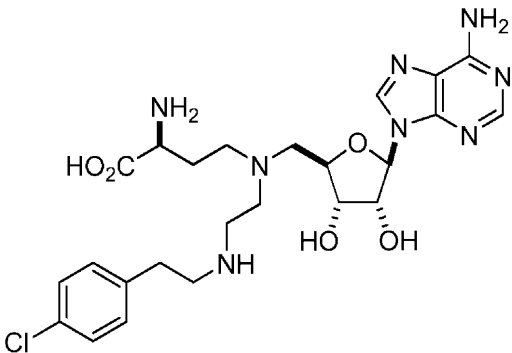
(75)

20

またはその薬学的に許容される塩の使用である。

【0046】

本発明の1つの局面は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)の処置における、化合物75



(75)

30

またはその薬学的に許容される塩の使用である。

【0047】

他に定義されていなければ、本明細書において用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において、文脈上別段の明確な記載がない限り、単数形は複数形も含む。本発明の実践または試験において本明細書に記述したものと類似または同等の方法および材料を用いることができるが、適した方法および材料を以下に記述する。本明細書において言及した全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照により組み入れられる。本明細書において引用される参考文献は、主張する発明に対する先行技術であるものと承認されるものではない。矛盾する場合には、定義を含めて、本明細書が優先される。さらに、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定するものであると意図されない。

40

【0048】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかに

50

なると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】 EZH2のB細胞性リンパ腫関連変異体が、活性なヒストンメチルトランスフェラーゼであることを確認する、2つのグラフである。EZH2の野生型および各種Y641変異体を含んだPRC2複合体のインビトロでのメチルトランスフェラーゼ活性を、(A) 基質としてペプチド(H3 21-44)を用いたメチル転移反応として、および(B) 基質として鳥類ヌクレオソームを用いたメチル転移反応として測定した。記号: 野生型(), Y641F(), Y641H(), Y641N()およびY641S()。CPMはカウント毎分であり、³H放射線の結果としてのシンチレーション計数をいう。

10

【図2】 変異EZH2を含んだPRC2複合体がヒストンH3-K27のジメチル化およびトリメチル化を選択的に触媒することを確認する4つのグラフである。(A) 非メチル化ペプチド(白バー)、モノメチル化ペプチド(ハッシュバー)およびジメチル化ペプチド(黒バー)に対する変異体および野生型(WT)複合体のメチルトランスフェラーゼ活性。(B) $K_{1/2}$ によって判断した場合のペプチド基質に対する親和性は、野生型(), Y641F(), Y641H(), Y641N()およびY641S() EZH2を含んだPRC2複合体に対し全てのペプチドメチル化状態にわたって類似である。全ての基質および全ての酵素形態にわたって $K_{1/2}$ 値のバラツキが3.5倍未満であることに留意されたい。基質のいずれかが特定のメチル化状態に対し、 $K_{1/2}$ 値のバラツキは2倍未満である。(C) 酵素代謝回転数(k_{cat})は、EZH2のWTおよびY641変異体に対して反対に基質メチル化状態で異なる。 k_{cat} は、野生型()の場合にはK27メチル化状態の増加とともに減少するが、しかしEZH2のY641F(), Y641H(), Y641N()およびY641S()変異体の場合には増加する。(D) 触媒効率($k_{cat}/K_{1/2}$)は野生型()の場合にはK27メチル化状態の増加とともに減少するが、しかしEZH2のY641F(), Y641H(), Y641N()およびY641S()変異体の場合には増加する。パネルB~Dにおいて、データ点を結び付けるように描かれた線は、何ら数学的関係を意味するよう意図されるものではない; むしろ、それらは視覚資料として役立つよう意図されるにすぎない。

20

【図3】 図3Aは、異なるEZH2変異体を含んだ細胞に対して予測される相対的なH3-K27me3(上パネル)、H3-K27me2(中パネル)およびH3-K27me1(下パネル)のレベルを示す3つのグラフである。共役酵素定常状態速度式および表1に示されている定常状態反応速度パラメータを用いて、模擬実験を行った。全ての値は、ホモ接合性WT EZH2を含んだ細胞と相対的であり、 K_m に対しての、細胞内SAMの飽和濃度、および K_m と相似の細胞内ヌクレオソーム濃度を前提としている。図3Bは、WT EZH2についてホモ接合性、または表示のEZH2 Y641変異についてヘテロ接合性のリンパ腫細胞株に対するH3-K27メチル化状態の相対的パターンに関する一連のウエスタンプロット分析である。上から下へとパネルは、全EZH2に特異的な抗体; H3-K27me3に特異的な抗体; H3-K27me2に特異的な抗体; H3-K27me1に特異的な抗体; および添加対照として全ヒストンH3に特異的な抗体でプローブした結果を示す。

30

【図4】 がんでのヒストンH3-K27に対する異常に高いトリメチル化レベルにつながる選択し提唱した機構を示す。これらには、a) 非メチル化ヒストンH3-K27からモノメチル化ヒストンH3-K27およびジメチル化ヒストンH3-K27への基質選好性の変化をもたらすEZH2におけるY641の変異; b) EZH2の過剰発現; c) H3-K27me3の脱メチルの減少を引き起こす、酵素機能を不活化するUTXにおける変異; ならびにd) 特異的遺伝子へのPRC2複合体の動員の増加およびヒストンH3-K27トリメチル化の増加につながるPRC2複合体サブユニットPHF19/PCL3の過剰発現が含まれる。全4つのモデルにおいて、改変は、がんでの重要な遺伝子の転写抑制を引き起こす、遺伝子の近位プロモーター領域における異常なヒストンH3-K27トリメチル化をもたらす。

40

【図5】 5成分PRC2複合体の各々の発現レベルが変異EZH2および野生型EZH2で類似していることを示したSDS-PAGEゲルを示す。

【図6】 変異体および野生型(WT) PRC2複合体がH3-K27含有ペプチドに対して強い基質選好性を呈することを示した一対の表。H3およびH4の全てを網羅した重複する15merのペプチドのパネルに対して、各酵素を試験した。活性は速度(CPM/分)として測定されており、

50

報告値は各反応に対する2回の独立した定量の平均に相当する。複合体の全てに対して、最も好適なペプチドはH3:16-30であった。WT複合体はこのペプチドに対して、変異体複合体のいずれよりも6倍超高い活性を有していた。

【図7】EZHZ WTおよびEZHZ2のY641変異体に対するS-アデノシル-L-ホモシステイン(SAH)の阻害効力を示すグラフである。X軸はSAHのlog濃度を示し; Y軸は%阻害を示す。

【図8】EZHZ WTおよびEZHZ2のY641変異体に対する化合物75の阻害効力を示すグラフである。X軸は化合物75のlog濃度を示し; Y軸は%阻害を示す。

【図9A】WTまたはY641変異EZHZ2を発現する複数のDLBCL系列を含む、細胞株パネル(panel)でのH3-K27me1、me2およびme3の相対レベルのウエスタンブロット分析を示す。a) ヒストンを表示の細胞株から抽出し、4~20%ゲルでのSDS-PAGEによって分画し、ニトロセルロース膜に転写し、ヒストンH3、H3-K27me1、me2またはme3に対する抗体でプローブした。表示の細胞株から全細胞溶解物を調製し、上記のように処理し、EZHZ2に対する抗体でプローブすることによって、EZHZ2レベルを判定した。

【図9B】WTまたはY641変異EZHZ2を発現する複数のDLBCL系列を含む、細胞株パネル(panel)でのH3-K27me1、me2およびme3の相対レベルのウエスタンブロット分析を示す。b) ヒストンを表示の細胞株から抽出し、上記a)のように処理したが、ただしEZHZ2レベルは判定しなかった。

【図10】WTおよびY641変異体リンパ腫細胞株のパネルにおけるH3およびH3-K27me3レベルの免疫細胞化学分析を示す。表示した細胞株由来の細胞ペレットを固定し、パラフィン包埋した。スライドを調製し、ヒストンH3またはH3-K27me3に対する抗体を用いた免疫細胞化学によってH3およびH3-K27me3のレベルを評価した。

【図11】WTおよびY641変異体リンパ腫細胞株のパネルにおけるH3およびH3-K27me2レベルの免疫細胞化学分析を示す。表示した細胞株由来の細胞ペレットを固定し、パラフィン包埋した。スライドを調製し、ヒストンH3またはH3-K27me2に対する抗体を用いた免疫細胞化学によってH3およびH3-K27me2のレベルを評価した。

【図12】Y641変異体WSU-DLCL2細胞におけるEZHZ2阻害剤での処理による全体的なH3-K27me3レベルの阻害を示す図である。WSU-DLCL2細胞を表示濃度のEZHZ2阻害剤AまたはBで4日間処理した。化合物での処理の後、ヒストンを抽出し、4~20%ゲルでのSDS-PAGEによって分画し、ニトロセルロース膜に転写し、ヒストンH3またはH3-K27me3に対する抗体でプローブした。

【図13】EZHZ2阻害剤はY641変異体WSU-DLCL2細胞の増殖を遮断できるが、しかし非Y641変異体OCI-LY19細胞にはほとんど効果を及ぼさないことを示したグラフである。細胞を11日間、漸増濃度のEZHZ2阻害剤AまたはBの存在下でインキュベートした。媒体(DMSO)処理細胞を対照として含めた。Guava EasyCyte Plus機器でのGuava Viacountアッセイを用いて、細胞数および生存性を判定した。細胞は分割し、培地および化合物は3~4日ごとに補充した。

【図14】EZHZ2 (Y641)変異の存在ならびに/または高H3-K27me3レベルおよび低H3-K27me2レベルによってEZHZ2阻害剤に対する感受性が予測されることを示したグラフである。細胞株を最大25 μMまでの漸増濃度の1つのEZHZ2阻害剤の存在下で維持した。生存細胞のカウントを用いて、処理11日後のIC₉₀値を導出した。EZHZ2変異状態にしたがって分けた(A)、またはH3-K27me2およびH3-K27me3レベルにしたがって分けた(B)細胞株で、結果をプロットしてある。両プロットにおいて、直線は、表示した細胞株の群由来の平均IC₉₀値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

詳細な説明

クロマチン構造は、遺伝子調節および後成的遺伝において重要である。ヒストンの翻訳後修飾は高次クロマチン構造の確立および維持に関わっている; 例えば、ある特定のコアヒストンの尾部はアセチル化、メチル化、リン酸化、リボシル化および/またはユビキチン化によって修飾される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

EZH2は、ヒストンH3のリジン27 (H3-K27)のモノメチル化からトリメチル化までを触媒するPRC2複合体の触媒サブユニットである、ヒストンメチルトランスフェラーゼである。ヒストンH3-K27トリメチル化は、ヒストン修飾の部位の近位にある特異的遺伝子の転写を抑制するための機構である。このトリメチル化は、前立腺がんのような、がんにおいて発現の変化を伴うがんマーカーであることが知られている(例えば、米国特許出願公開第2003/0175736号を参照のこと; その全体が参照により本明細書に組み入れられる)。EZH2はポリコーム群タンパク質ファミリー(PcG)に属する。ポリコーム群タンパク質は、標的遺伝子の転写抑制による細胞同一性の維持に役立つ。Jacobs et al. (1999) *Semin Cell Dev Biol* 10(2): 227-35; Jacobs et al. (2002) *Biochim Biophys Acta* 1602(2): 151-61。DN Aマイクロアレイにより、EZH2は、ホルモン抵抗性の転移性前立腺がんにおいて上方制御されていると特定された。Dhanasekaran et al. (2001) *Nature* 412(6849): 822-6; Varambally et al. (2002) *Nature* 419(6907): 624-9。EZH2は浸潤性乳房腫瘍において上方制御されており、浸潤促進性の表現型のメディエータである。Kleer et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100(20): 11606-11。不死化されたヒト乳房上皮細胞株におけるEZH2の過剰発現は、足場非依存性の増殖および細胞浸潤を促進する。Kleer et al. (前記)。EZH2を介した細胞浸潤には、無傷のSETドメインおよびヒストンデアセチラーゼ活性が必要とされた。過去の研究から、EZH2発現の調節不全、転写抑制および悪性形質転換の間の機能的な関連性の証拠が提供された。Varambally et al. (前記); Kleer et al (前記)。

10

【 0 0 5 2 】

本発明の1つの局面は、EZH2のある特定の変異型を含む、EZH2の活性を阻害することに関する。1つの態様において、本発明は、EZH2のある特定の変異型の活性を選択的に阻害することに関する。

20

【 0 0 5 3 】

EZH2の単一のアミノ酸残基(Tyr641、本明細書においてY641といわれる)でのEZH2遺伝子の点突然変異は、ヒトB細胞性リンパ腫のサブセットと関連していることが報告されている。Morin et al. (2010) *Nat Genet* 42(2): 181-5。具体的には、Morinらは、EZH2のチロシン641の体細胞変異(Y641F、Y641H、Y641N、およびY641S)が濾胞性リンパ腫(FL)および胚中心B細胞様(GCB)サブタイプのびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)と関連していることを報告した。変異対立遺伝子は疾患細胞において野生型対立遺伝子と結び付けられて常に見出され(ヘテロ接合性)、変異は、非修飾ペプチド基質をメチル化するためのPRC2複合体の酵素活性を取り除くと報告された。

30

【 0 0 5 4 】

今回、野生型(WT) EZH2酵素は、H3-K27の非メチル化からモノメチル化反応の場合には最も高い触媒効率(kcat/K)を示し、後続(モノメチル化からジメチル化およびジメチル化からトリメチル化)の反応の場合には低い効率を示し; その一方で、全く対照的に、疾患に関連するY641変異は、最初のメチル化反応を行う能力が非常に限られていることを示すものの、しかし野生型酵素と比べて後続の反応に対して増強された触媒効率を有することが意外にも発見された。これらの結果から、疾患の悪性表現型では、トリメチル化形態(H3-K27me3)へのH3-K27の変換の増大のために、変異EZH2を含んだPRC2とともにH3-K27モノメチル化酵素(WT EZH2またはEZH1を含んだPRC2)の複合活性が利用されることが暗示される。

40

【 0 0 5 5 】

いずれかの1つの理論によって束縛されることを意図するわけではないが、EZH2におけるフェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)、アスパラギン(N)またはセリン(S)へのY641の変異は、酵素-二基質三重複合体の活性部位でのH結合パターンおよび/または立体的な組み合わせに影響を与え、反応性リジンの脱プロトン化に適した水チャネルの形成に影響を及ぼすことによって複数ラウンドのH3-K27メチル化を促進するという仮説が立てられている。Zhang et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5728-32。この推定は、関連するタンパク質リジンメチルトランスフェラーゼLSMT、Dim-5およびSET7/9におけるチロシン変

50

異で認められる結晶学のおよび分子動力学の結果に例えて導き出される。

【 0 0 5 6 】

例えば、組換えSET7/9のチロシン245がアラニンに変異された場合、基質特異性の変化が認められた。Dillon et al. (2005) *Genome Biol* 6:227. H3-K4の周辺配列に相当する、20残基の非修飾ペプチドをメチル化するY245A変異SET7/9の能力は、WT酵素の約20%まで低減された。Xiao et al. (2003) *Nature* 421:652-6. 同時に、H3-K4me1およびH3-K4me2ペプチドをさらにメチル化するY245A変異体の能力は、WT酵素と比べて大いに増大された(それぞれ、約7倍および5倍)。しかしながら、EZH2のY641の変異に関する本開示とは対照的に、フェニルアラニンへのSET7/9 Y245の変異はペプチドのモノメチル化からジメチル化もジメチル化からトリメチル化も増強しなかった; むしろ、SET7/9のY245F変異体は全
10
てのペプチド基質に対して最小限の触媒活性を示した。同様に、野生型酵素G9aはH3-K9をジメチル化できるが、しかしジメチル化からトリメチル化への反応を行うことができない。しかし、G9aのチロシン1067 (EZH2のY641に類似)がフェニルアラニンに変異される場合、この酵素は、今度は、H3-K9をトリメチル化する能力を獲得する。Wu, H. et al. (2010) *PLoS One* 5, e8570, doi: 10.1371/journal.pone.0008570)。

【 0 0 5 7 】

ヒトEZH2の核酸およびポリペプチドはこれまでに記述されている。例えば、Chen et al. (1996) *Genomics* 38:30-7 [746アミノ酸]; Swiss-Protアクセッション番号Q15910 [746アミノ酸]; GenBankアクセッション番号NM_004456およびNP_004447 (アイソフォームa [751アミノ酸]); ならびにGenBankアクセッション番号NM_152998およびNP_694543 (アイソ
20
フォームb [707アミノ酸])を参照されたく、これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

ヒトEZH2のアミノ酸配列 (Swiss-Protアクセッション番号Q15910) (SEQ ID NO: 1)

```

MGQTGKKSEKGPVWCWRKRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPIYMGDEVLDQDGTGFIEELIKNYDGKVVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRRCFKYDCFLHPPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRGRRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEEKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRVLIIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCISIQRGSKHLLAPSDVAGWGFIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

```

ヒトEZH2、転写産物バリエーション1のmRNA配列 (GenBankアクセッション番号NM_004456) (SEQ ID NO: 2)

10

20

30


```

ggcggcgcttgattgggctgggggggccaataaaagcgatggcgattgggctgccgct
ttggcgctcgggtccgggtcgcgtccgacaccgggtgggactcagaaggcagtgaggccccg
gcgggcgggcgggcgggcgggggggcgagcgcggggaacaacgcgagtcggcgcgcgggg
acgaagaataatcatgggcccagactgggaagaaatctgagaaggaccagtttgttggcg
gaagcgtgtaaaatcagagtacatgcgactgagacagctcaagaggttcagacgagctga
tgaagtaaagagtatgttttagttccaatcgtcagaaaattttgaaagaacggaaatctt
aaaccaagaatggaaacagcgaaggatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc
attgcgcgggactagggagtgttcgggtgaccagtgacttggattttccaacacaagtcac
cccattaaagactctgaatgcagttgcttcagtagccataatgtattcttgggtctcccct
acagcagaattttatgggtggaagatgaaactgttttacataacattccttatatgggaga
tgaagtttttagatcaggatggtactttcattgaagaactaataaaaaattatgatgggaa
agtacacggggatagagaatgtgggtttataaatgatgaaatttttgtggagttggtgaa
tgcccttgggtcaatataatgatgatgacgatgatgatgatggagacgatcctgaagaaag
agaagaaaagcagaaagatctggaggatcaccgagatgataaagaaagccgccacctcg
gaaatctccttctgataaaaattttgaagccatttctcaatgtttccagataagggcac
agcagaagaactaaaggaaaaatataaagaactcaccgaacagcagctcccaggcgcact
tctcctgaatgtaccccccaacatagatggaccaaatgctaaatctgttcagagagagca
aagcttacactcctttcatagcgttttctgtaggcgatgttttaaatatgactgcttctc
acatcgtaagtgaattattcttttcatgcaacacccaacttataagcggaagaacac
agaaacagctctagacaacaaaccttgtggaccacagtggtaccagcatttggaggggagc
aaaggagtgtgctgctcctcaccgctgagcggataaagacccccacaaaacgtccagg
aggccgcagaagaggacggcttcccataacagtagcaggcccagcaccaccaccattaa
tgtgctggaatcaaaggatacagacagtgatagggaaagcagggactgaaacggggggaga
gaacaatgataaagaagaagaagagaagaaagatgaaacttcgagctcctctgaagcaaa
ttctcgggtgtcaaaccacaataaagatgaagccaaatattgaacctcctgagaatgtgga
gtggagtggtgctgaagcctcaatgttttagagtcctcattggcacttactatgacaatct
ctgtgccattgctaggttaattgggaccaaaacatgtagacaggtgtatgagtttagagt
caaagaatctagcatcatagctccagctcccgtgaggatgtggatactcctccaaggaa
aaagaagaggaaacaccgggttgtgggctgcacactgcagaaagatacagctgaaaaagga
cggctcctctaaccatgtttacaactatcaacctgtgatcatccacggcagccttgtgga
cagttcgtgcccttgtgtgatagcacaataattttgtgaaaagttttgtcaatgtagttc
agagtgtcaaaaccgctttccgggatgcccgtgcaaagcacagtgcaacaccaagcagtg
cccgtgctacctggctgtccgagagtgtagccctgacctctgtcttacttgtggagccgc
tgaccattgggacagtaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagtagttcagcggggctcca
aaagcatctattgtgtggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcc
tgtgcagaaaaatgaattcactctcagaatctgtggagagattatttctcaagatgaagc
tgacagaagagggaaagtgtatgataaaatcacatgtgcagctttctgttcaactgaacaa
tgattttgggtggatgcaaccgcgaagggttaacaaaattcgttttgcaaatcattcgggt
aaatccaaactgctatgcaaaagtattatgatggttaacgggtgatcacaggataggtatctt
tgccaagagagccatccagactggcgaagagctgttttttgattacagatacagccaggc
tgatgccctgaagtatgtcggcatcgaaagagaaatggaaatcccttgacatctgctacc
tctccccctcctctgaaacagctgccttagcttcaggaaacctcgagtactgtgggcaa
tttagaaaaagaacatgcagtttgaaattctgaatttgcaaagtactgtaagaataatctt
atagtaatgagtttaaaaatcaactttttattgccttctcaccagctgcaaagtgttttg
taccagtgaatttttgcaataatgcagtaggtacatttttcaactttgaataaagaata
cttgaacttgccttgttgaatc

```

10

20

30

EZH2、アイソフォームaの全アミノ酸 (GenBankアクセッション番号NP_004447) (SEQ ID NO : 3)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KORRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGVKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHRKC
NYSFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTTPPKRPGGRRR
GRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQ
TPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESS
IIAPAPAEDVDTPPRKKRKRHLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCP
CVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWD
SKNVSCKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGFIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRG
KVYDKYMC SFLFNLNDFVVDATRKGKNI RFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRA
IQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEI P

```

40

50

ヒトEZH2、転写産物バリエーション2のmRNA配列 (GenBankアクセッション番号NM_152998) (SEQ ID NO: 4)

```

ggcggcgcttgattgggctgggggggccaataaaaagcgatggcgattgggctgccgcgt
ttggcgctcgggtccggctcgcgtccgacaccgggtgggactcagaaggcagtgaggcccg
gcgggcgggcgggcgggcgcgcggggggagcgcgcgggaacaacgcgagtcggcgcgcggg
acgaagaataatcatgggcccagactgggaagaaatctgagaagggaccagtttgttggcg
gaagcgtgtaaaaatcagagatcacatgacgactgagacagctcaagaggttcagacgagctga
tgaagtaagagatggtttagttccaatcgtcagaaaatTTTggaaagaacggaaatcct
aaaccaagaatggaaacagcgaaggatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc
attgcgcgggactagggaggtggaagatgaaactgttttacataacattccttatatggg
agatgaagtttttagatcaggatgggtactttcattgaagaactaataaaaaattatgatgg
gaaagtacacggggatagagaatgtgggtttataaatgatgaaatTTTgtggagtgggt
gaatgcccttgggtcaatataatgatgatgacgatgatgatggagacgatcctgaaga
aagagaagaaaagcagaaagatctggaggatcacggagatgataaagaaagccgccacc
tcggaaatTTTccttctgataaaaatTTTgaagccatttctcaatgtttccagataaggg
cacagcagaagaactaaaggaaaaatataaagaactcaccgaacagcagctcccaggcgc
acttctcctgaatgtacccccaacatagatggaccaaatgctaaatctgttcagagaga
gcaaagcttacactcctttcatacgcttttctgtaggcgatgttttaaatatgactgctt
cctacatccttttcatgcaacacccaacacttataagcggagaacacagaaacagctct
agacaacaaacctgtggaccacagtggtaccagcatttggaggaggcaaaggagtttgc
tgctgctctcaccgctgagcggataaaagacccccacaaaacgtccaggaggccgcagaag
aggacggcttcccaataacagtagcaggcccagcacccccaccattaatgtgctggaatc
aaaggatacagacagtgataggggaagcagggactgaaacggggggagagaacaatgataa
agaagaagaagagaagaagaacttcgagctcctctgaagcaaattctcgggtgtca
aacaccaataaagatgaaagccaaatattgaaacctcctgagaatgtggagtggagtgggtgc
tgaagcctcaatgttttagagctcctcattggcacttactatgacaatttctgtgccattgc
taggttaattgggacaaaacatgtagacaggtgtatgagtttagagtcaaagaatctag
catcatagctccagctcccgtgaggatgtggatactcctccaaggaaaaagaaggaa
acaccgggttggtgggctgcacactgcagaaagatacagctgaaaaaggacggctcctctaa
ccatgtttacaactatcaacctgtgatccacggcagccttgtgacagttcgtgccc
ttgtgtgatagcacaaaatTTTgtgaaaagtTTTgtcaatgtagttcagagtgtcaaaa
ccgctttccgggatgcccgtgcaaagcacagtgcaacaccaagcagtgcccgtgctacct
ggctgtccgagagtgtgacctgacctctgtcttacttgtggagccgctgaccattggga
cagtaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagtatcagcggggctccaaaagcatctatt
gctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgcagaaaaa
tgaattcatctcagaatactgtggagagattatTTTctcaagatgaagctgcagaaagagg
gaaagtgtatgataaaatcacatgtgcagctttctgttcaacttgaacaatgattttgtgggt
ggatgcaaccgcgaagggttaacaaaattcgttttgcaaatcattcggtaaatccaaactg
ctatgcaaaagtTtatgatggttaacgggtgatcacaggataggatTTTtggcaagagagc
catccagactggcgaagagctgtTTTTtgattacagatacagccaggctgatgccctgaa
gtatgtcggcatcgaaagagaaatggaaatcccttgacatctgctacctcctccccctc
ctctgaaacagctgccttagcttcaggaacctcgagtaactgtgggcaatttagaaaaaga
acatgcagtttgaaattctgaatttgcaaagtactgtaagaataatttatagtaatgagt
ttaaaaatcaactTTTTtattgccttctcaccagctgcaaagtgttttgtaccagtgaatt
tttgcaataatgcagtatggtacatttttcaactttgaataaagaatacttgaacttgtc
cttgttgaatc

```

10

20

30

EZH2、アイソフォームbの全アミノ酸 (GenBankアクセッション番号NP_694543) (SEQ ID NO : 5)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKIL
ERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTTREVEDETVLHNI PYMGDEVL
DQDGTFFIEELIKNYDGKVVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDDDD
GDDPEEREKQKQDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAAE
LKEKYKELTEQQLPALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRC
FKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALT
AERIKTPPKRPGRRRRGRLPNSSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETG
GENNDKEEEEKDETSSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPENVEWVSGAEASM
FRVLIGTYYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPAPAEDVDTPP
RKKKRKHLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPCVIA
QNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNKQPCYLA VRECDPDLCLTCG
AADHWDSKNVSCNKCSIQRGSKKHL LAPS DVAGWGIFIKDPVQKNEFIS
EYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNDFVVDATRKG NKIRFANH
SVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGI
EREMEIP

```

10

【 0 0 5 8 】

上記のように、EZ_{H2}の触媒部位は、SETドメインとして知られるタンパク質の保存ドメインにあるものと考えられる。EZ_{H2}のSETドメインのアミノ酸配列は、Swiss-Protアクセッション番号Q15910 (SEQ ID NO: 1)のアミノ酸残基番号613~726にわたる以下の部分配列によって提供される:

```

HLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNDFV
VDATRKG NKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDY

```

20

(SEQ ID NO:6)

。SEQ ID NO: 6において下線を引いて示したチロシン(Y)残基は、Swiss-Protアクセッション番号Q15910 (SEQ ID NO: 1)におけるTyr641 (Y641)である。

【 0 0 5 9 】

GenBankアクセッション番号NP_004447 (SEQ ID NO: 3)のSETドメインは、アミノ酸残基番号618~731にわたり、SEQ ID NO:6と同一である。SEQ ID NO: 6において下線を引いて示したSwiss-Protアクセッション番号Q15910におけるY641に対応するチロシン残基は、GenBankアクセッション番号NP_004447 (SEQ ID NO: 3)におけるTyr646 (Y646)である。

30

【 0 0 6 0 】

GenBankアクセッション番号NP_694543 (SEQ ID NO: 5)のSETドメインは、アミノ酸残基番号574~687にわたり、SEQ ID NO:6と同一である。SEQ ID NO: 6において下線を引いて示したSwiss-Protアクセッション番号Q15910におけるY641に対応するチロシン残基は、GenBankアクセッション番号NP_694543 (SEQ ID NO: 5)におけるTyr602 (Y602)である。

【 0 0 6 1 】

GenBankアクセッション番号NP_004447のSETドメインをコードするヌクレオチド配列は

```

catctattgctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgca
gaaaaatgaattcatctcagaataactgtggagagattatctcaagatgaagctgacagaa
gaggaaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaactgaacaatgattttgtg
gtggatgcaaccgcaagggttaacaaaattcgttttgcaaatacattcggtaaatccaaactg
ctatgcaaaagttatgatgggttaacgggtgatcacaggataggtatTTTTGccaagagagcca
tccagactggcgaagagctgttttttgattac

```

40

(SEQ ID NO: 7)

であり、ここでY641をコードするコドンに下線を引いて示した。

【 0 0 6 2 】

本出願の目的上、ヒトEZ_{H2}のアミノ酸残基Y641は、Swiss-Protアクセッション番号Q159

50

10におけるY641であるか、またはそれに対応するチロシン残基をいうものと理解されたい。

Y641変異EZH2の全アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 8)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGVKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YND DDDDDDDGDDPEEREKQKDL EDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKT PPKRPGGRRRRGR LPN
NSSR PSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTP I KM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYD N FCAIARLIGTKTCRQVYEFVRVKESS I IAPA
PAEDVDTPPRK K K K RHLWAAHCRKIQLK K D G S S N H V Y N Y Q P C D H P R Q P C D S S C P C V I A Q
N F C E K F C Q S S E C Q N R F P G C R C K A Q C N T K Q C P C Y L A V R E C D P D L C L T C G A A D H W D S K N V S
C K N C S I Q R G S K K H L L L A P S D V A G W G I F I K D P V Q K N E F I S E X C G E I I S Q D E A D R R G K V Y D K
Y M C S F L F N L N N D F V V D A T R K G N K I R F A N H S V N P N C Y A K V M M V N G D H R I G I F A K R A I Q T G E
E L F F D Y R Y S Q A D A L K Y V G I E R E M E I P

```

10

配列中、Xはチロシン(Y)以外の任意のアミノ酸残基でありうる

【0063】

また、本出願の目的上、ヒトEZH2のY641変異体、および、等しく、EZH2のY641変異体は、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ているヒトEZH2をいうものと理解されたい。

20

【0064】

1つの態様において、EZH2のY641変異体のアミノ酸配列は、チロシン以外のアミノ酸残基による、野生型ヒトEZH2のY641に対応する単一のアミノ酸残基の置換によってのみ野生型ヒトEZH2のアミノ酸配列と異なる。

【0065】

1つの態様において、EZH2のY641変異体のアミノ酸配列は、野生型ヒトEZH2のY641に対応する単一のアミノ酸残基の代わりにフェニルアラニン(F)を用いることによるのみ野生型ヒトEZH2のアミノ酸配列と異なる。この態様に対応するEZH2のY641変異体は、本明細書においてY641F変異体または、等しく、Y641Fといわれる。

30

Y641F (SEQ ID NO: 9)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGVKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YND DDDDDDDGDDPEEREKQKDL EDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKT PPKRPGGRRRRGR LPN
NSSR PSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTP I KM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYD N FCAIARLIGTKTCRQVYEFVRVKESS I IAPA
PAEDVDTPPRK K K K RHLWAAHCRKIQLK K D G S S N H V Y N Y Q P C D H P R Q P C D S S C P C V I A Q
N F C E K F C Q S S E C Q N R F P G C R C K A Q C N T K Q C P C Y L A V R E C D P D L C L T C G A A D H W D S K N V S
C K N C S I Q R G S K K H L L L A P S D V A G W G I F I K D P V Q K N E F I S E F C G E I I S Q D E A D R R G K V Y D K
Y M C S F L F N L N N D F V V D A T R K G N K I R F A N H S V N P N C Y A K V M M V N G D H R I G I F A K R A I Q T G E
E L F F D Y R Y S Q A D A L K Y V G I E R E M E I P

```

40

【0066】

1つの態様において、EZH2のY641変異体のアミノ酸配列は、野生型ヒトEZH2のY641に対応する単一のアミノ酸残基の代わりにヒスチジン(H)を用いることによるのみ野生型ヒトEZH2のアミノ酸配列と異なる。この態様に対応するEZH2のY641変異体は、本明細書においてY641H変異体または、等しく、Y641Hといわれる。

Y641H (SEQ ID NO: 10)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLOQNF
 MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPFH
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRGRRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYD NFC AIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPA
 PAEDVDTPPRKKKRKRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCN TKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
 CKNC SIQRGSKKHL L LAPS DVAGW G I F I K D P V Q K N E F I S E H C G E I I S Q D E A D R R G K V Y D K
 YMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

10

【0067】

1つの態様において、EZ2のY641変異体のアミノ酸配列は、野生型ヒトEZ2のY641に対応する単一のアミノ酸残基の代わりにアスパラギン(N)を用いることによるのみ野生型ヒトEZ2のアミノ酸配列と異なる。この態様に対応するEZ2のY641変異体は、本明細書においてY641N変異体または、等しく、Y641Nといわれる。

Y641N (SEQ ID NO: 11)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLOQNF
 MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPFH
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRGRRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYD NFC AIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPA
 PAEDVDTPPRKKKRKRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCN TKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
 CKNC SIQRGSKKHL L LAPS DVAGW G I F I K D P V Q K N E F I S E N C G E I I S Q D E A D R R G K V Y D K
 YMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

20

【0068】

1つの態様において、EZ2のY641変異体のアミノ酸配列は、野生型ヒトEZ2のY641に対応する単一のアミノ酸残基の代わりにセリン(S)を用いることによるのみ野生型ヒトEZ2のアミノ酸配列と異なる。この態様に対応するEZ2のY641変異体は、本明細書においてY641S変異体または、等しく、Y641Sといわれる。

30

Y641S (SEQ ID NO: 12)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLOQNF
 MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPFH
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRGRRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYD NFC AIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPA
 PAEDVDTPPRKKKRKRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCN TKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
 CKNC SIQRGSKKHL L LAPS DVAGW G I F I K D P V Q K N E F I S E S C G E I I S Q D E A D R R G K V Y D K
 YMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

40

【0069】

EZ2における複数のY641変異に対する寛容から、立体的な込み合いの解放がジメチル化からトリメチル化への反応の基質として適した、より大きなジメチルリジンのアライメントに対するさらに高いアクセスを可能にすることが示唆される。タンパク質メチルトラ

50

ンスフェラーゼSET7/9およびG9aの結晶学的解析から、活性部位のチロシン残基の側鎖ヒドロキシルがメチル受容性リジンのアミンと直接的に、または介在する水分子を通じて間接的にH結合性相互作用に関わることが明らかにされている。Y641変異体のさらに大きな活性部位はジメチル化およびトリメチル化に好都合であるが、チロシンヒドロキシル水素結合アクセプタの喪失は、リジンアミンへの初期メチル転移には不都合な配向の活性部位をもたらさう。

【0070】

ヒト疾患に対する本結果の含意は、表1（以下参照）にまとめられたデータによって明らかにされる。EZH2についてヘテロ接合性の細胞は、WT酵素によるH3-K27me1の効率的な形成と、変異酵素形態による、H3-K27me2および、とりわけ、H3-K27me3へのこの前駆体種の効率的な後続の遷移に起因して、悪性表現型を示すものと予想されよう。

10

【0071】

H3-K27me1の形成はWT-EZH2触媒に依るだけではないことが報告されている。EZH2の、および別のPRC2サブユニットEEDのロックアウト研究から、H3-K27me1の形成が、触媒サブユニットとしてEZH2または関連タンパク質EZH1のどちらかを含んだPRC2複合体によって触媒されることが実証されている。Shen, X. et al. (2008) Mol Cell 32:491-502。ゆえに、変異EZH2種とWT-EZH2またはWT-EZH1のどちらかを含んだPRC2複合体との間の触媒的連関は、H3-K27me2/3の形成を増大するのに、かくして、付随する悪性表現型を生み出すのに十分であると考えられる。それゆえ、このデータから、EZH2の変異型の発現と関連した、濾胞性リンパ腫(FL)および胚中心B細胞(GCB)サブタイプのびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)の悪性表現型は、H3-K27のトリメチル化形態の形成に関する全体的な機能獲得の結果であることが示唆される。このデータ解釈は、EZH2もしくはPRC2関連タンパク質(例えば、PHF19/PCL3)のがんに関連した過剰発現の存在と、また、ヒストンH3-K27デメチラーゼUTXに対する機能喪失遺伝子型を調和させる手助けにもなる。UTX活性の喪失は、EZH2に対する機能獲得と酵素的に等価であり、どちらの状況でも、がん細胞におけるトリメチル化H3-K27のさらに高い定常状態レベルをもたらすと考えられる(図4)。

20

【0072】

ヒストンH3-K27のモノメチル化、ジメチル化およびトリメチル化の状態は、転写制御での異なる機能と関連している。ヒストンH3-K27のモノメチル化は、転写の態勢にある遺伝子の活性な転写と関連している。Cui et al. (2009) Cell Stem Cell 4:80-93; Barski (2007) Cell 129:823-37。対照的に、ヒストンH3-K27のトリメチル化は、ヒストンH3-K4のトリメチル化がシス状態にある場合、転写の態勢にある転写的に抑制された遺伝子と関連している。Cui et al. (前記); Kirmizis et al. (2007) Genes Dev 18: 1592-1605; Bernstein et al. (2006) Cell 125:315-26。総合すれば、EZH2のY641変異を含めて、がんで報告されたPRC2複合体活性の変化は、ヒストンH3-K27のトリメチル化状態の増加をもたらし、かくして、転写抑制をもたらすものと予測される。

30

【0073】

本発明の別の発見は、Y641変異EZH2を発現する細胞が、概して、WT EZH2を発現する細胞よりも小分子EZH2阻害剤に対して感受性であることである。具体的には、Y641変異EZH2を発現する細胞は、成長、分裂もしくは増殖の低減を示し、またはEZH2阻害剤での処理後にアポトーシスもしくはネクローシスを起こしさえする。対照的に、WT EZH2を発現する細胞は、EZH2阻害剤の抗増殖効果に対して反応性ではない(図13および14)。本発明の別の驚くべき発見は、WT EZH2を発現する細胞が、Y641 EZH2を発現する細胞と類似のヒストンH3-K27メチル化状態を示すことが可能であるということ、およびこのメチル化状態が、EZH2変異状態とは無関係にEZH2阻害剤に対する感受性とも相関しうることである。概して、全体的なH3-K27me3レベルは、WT EZH2を発現する細胞株におけるよりもY641変異体を含んだ細胞株においてさらに高いかまたは類似しており；しかしながら、H3-K27me2のレベルは他の野生型細胞株におけるよりもPfeiffer細胞株のような、ある特定の野生型細胞株およびEZH2 Y641変異体細胞株において劇的に低い(図9、10および11)。したがって、Y641変異体系列およびPfeiffer細胞株におけるH3-K27me2/me3シグナルの比率は、他のWT系列に

40

50

において認められたものよりもはるかに低い。本データは、典型的なWT EZH2発現細胞株と比べて低いH3-K27me2シグナルおよび類似のまたはさらに高いH3-K27me3シグナルを有する細胞株が小分子EZH2阻害剤に対していっそう感受性であることをさらに実証する。具体的には、低いH3-K27me2シグナルおよび通常のまたは高いH3K27me3シグナルを有する細胞は、分裂を停止し、またはEZH2阻害剤での処理後に死滅しさえする(図9、10、11、13および14)。対照的に、いっそう高い比率のH3-K27me2/me3シグナルを有する細胞は、EZH2阻害剤の抗増殖効果に対して反応性ではない(図9、10、11、13および14)。本発明は、患者でのウエスタンブロット、MSまたはIHCのような技法の使用を通じた、患者腫瘍におけるEZH2 Y641変異の特定ならびに/または対照と比べて低いH3-K27me2レベルおよび通常のもしくは高いH3-K27me3レベルの検出を用いて、どの患者がEZH2阻害剤での処置に反応するかを特定できるという、これまで知られていなかった予想外の結果を提供する。

10

【0074】

EZH2および他のタンパク質メチルトランスフェラーゼは、創薬のために魅力的な標的であることが示唆されている。Copeland et al. (2009) Nat Rev Drug Discov 8:724-32; Copeland et al. (2010) Curr Opin Chem Biol 14(4):505-10; Pollock et al. (2010) Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 6(1):71-9。本データはまた、FLおよびGC Bリンパ腫特異的な薬物の開発のための実験戦略を示唆する。WTと疾患に関連する変異体との間の基質認識の差異は遷移状態相互作用に由来するので、変異EZH2の遷移状態を、WT酵素の遷移状態と比べて選択的に模倣する小分子阻害剤は、変異を保持している細胞でのH3-K27メチル化の遮断において有効であることが分かるはずである。この種の阻害剤は、標的を介した毒性がWT酵素しか保持していないどの細胞に対しても最小限であるので、大きな治療指数を示すものと予想されよう。遷移状態の擬態は、多くの疾患分野において薬物デザインのために有効な戦略であることが分かっている。例えば、Copeland, R. A. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. 2nd ed, (Wiley, 2000)を参照されたい。

20

【0075】

本結果は、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫の病因に対しての、H3-K27モノメチル化を行う酵素とEZH2のある特定の変異型との間の酵素的連関への、これまでに認識されていない、驚くべき依存を指摘する。いずれかの1つの理論によって束縛されることを意図するわけではないが、このデータは、正常(WT)酵素と疾患に関連した変異(Y641)酵素との間の触媒活性の、そのような連関に依存するヒト疾患の最初の実例を構成するものと考えられる。

30

【0076】

本発明の1つの局面は対象において、トリメチル化H3-K27へのH3-K27の変換を阻害するための方法である。阻害は対象において、モノメチル化H3-K27への非メチル化H3-K27の変換、ジメチル化H3-K27へのモノメチル化H3-K27の変換、トリメチル化H3-K27へのジメチル化H3-K27の変換、または、例えば、ジメチル化H3-K27へのモノメチル化H3-K27の変換およびトリメチル化H3-K27へのジメチル化H3-K27の変換を含めた、それらの任意の組み合わせを阻害することを伴うことができる。本明細書において用いられる場合、非メチル化H3-K27は、リジン27のアミノ基に共有結合されているメチル基を持たないヒストンH3をいう。本明細書において用いられる場合、モノメチル化H3-K27は、リジン27のアミノ基に共有結合されている単一のメチル基を持つヒストンH3をいう。モノメチル化H3-K27は本明細書においてH3-K27me1ともいわれる。本明細書において用いられる場合、ジメチル化H3-K27は、リジン27のアミノ基に共有結合されている2つのメチル基を持つヒストンH3をいう。ジメチル化H3-K27は本明細書においてH3-K27me2ともいわれる。本明細書において用いられる場合、トリメチル化H3-K27は、リジン27のアミノ基に共有結合されている3つのメチル基を持つヒストンH3をいう。トリメチル化H3-K27は本明細書においてH3-K27me3ともいわれる。

40

【0077】

ヒストンH3は136アミノ酸長のタンパク質であり、その配列は公知である。例えば、Gen

50

Bankアクセス番号CAB02546を参照されたく、その内容は参照により本明細書に組み入れられる。本明細書においてさらに開示されるように、全長ヒストンH3に加えて、全長ヒストンH3のK27に対応するリジン残基を含むヒストンH3のペプチド断片をEZH2に対する(および同様にEZH2の変異型に対する)基質として用い、H3-K27m2へのH3-K27m1の変換およびH3-K27m3へのH3-K27m2の変換を評価することができる。1つの態様において、そのようなペプチド断片は、ヒストンH3のアミノ酸残基番号21~44に対応する。そのようなペプチド断片は、アミノ酸配列

LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO: 13)

を有する。

10

【0078】

本方法は、EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するEZH2阻害剤の治療的有効量を、EZH2のY641変異体を発現している対象に投与し、それによって対象におけるトリメチル化H3-K27へのH3-K27の変換を阻害する段階を伴う。1つの態様において、EZH2のY641変異体を発現している対象は、検出可能な量のY641変異EZH2ポリペプチドを有する対象をいう。1つの態様において、EZH2のY641変異体を発現している対象は検出可能な量の、Y641変異EZH2ポリペプチドをコードする核酸を有する対象をいう。

【0079】

Y641変異EZH2ポリペプチドは、任意の適当な方法を用いて検出することができる。例えば、Y641変異EZH2ポリペプチドは、Y641変異EZH2ポリペプチドに特異的に、またはY641変異EZH2ポリペプチドに特有であるペプチド断片に特異的に結合する抗体を用いて検出することができる。Y641変異EZH2ポリペプチドに特有であるペプチド断片は、例えば、チロシン以外のアミノ酸残基によるY641の置換を除き、SEQ ID NO: 6に示されるSETドメインを含みうる。別の態様において、Y641変異EZH2ポリペプチドに特有であるペプチド断片は、例えば、チロシン以外のアミノ酸残基によるY641の置換を除き、SEQ ID NO: 6に示されるSETドメインの10~113アミノ酸の断片を含みうるが、ただしこの断片は、Y641に対応するアミノ酸残基を含むことを条件とする。そのような抗体に対するエピトープは、野生型EZH2のY641に対応するアミノ酸残基を含むものと予想される。抗体は、その変異EZH2ポリペプチドまたはそのペプチド断片に結合するが、しかし対応する野生型EZH2ポリペプチドまたはそのペプチド断片に結合しない場合、Y641変異EZH2ポリペプチドに特異的に、またはY641変異EZH2ポリペプチドに特有であるペプチド断片に特異的に結合するものと考えられる。1つの態様において、そのような抗体は、その変異EZH2ポリペプチドまたはそのペプチド断片に、対応する野生型EZH2ポリペプチドまたはそのペプチド断片に対するよりも少なくとも約100倍を超える親和性で結合する場合、Y641変異EZH2ポリペプチドに特異的に、またはY641変異EZH2ポリペプチドに特有であるペプチド断片に特異的に結合するものと考えられる。1つの態様において、そのような抗体は、その変異EZH2ポリペプチドまたはそのペプチド断片に、対応する野生型EZH2ポリペプチドまたはそのペプチド断片に対するよりも少なくとも約1000倍を超える親和性で結合する場合、Y641変異EZH2ポリペプチドに特異的に、またはY641変異EZH2ポリペプチドに特有であるペプチド断片に特異的に結合するものと考えられる。抗体は、例えば、酵素免疫測定法(ELISA)またはウエスタンブロット法において用いることができる。

20

30

40

【0080】

1つの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、当技術分野において周知の従来の方法によって調製することができる。例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256 (5517):495-7を参照されたい。

【0081】

別の例として、Y641変異EZH2ポリペプチドは、質量分析(MS)、例えば、飛行時間と一体となったエレクトロスプレーイオン化(ESI-TOF)または飛行時間と一体となったマトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI-TOF)を用いて検出することができる。そのような方法は当技術分野において周知である。この分析では、関心対象の変異を含む1つまたは

50

複数のペプチド断片、例えば、野生型EZH2でのY641に対応するアミノ酸にまたがる配列を含んだ12~24アミノ酸長のペプチドの特定を伴うと考えられる。

【0082】

Y641変異EZH2ポリペプチドまたはY641変異EZH2ポリペプチドに特有であるペプチド断片をコードする核酸は、任意の適当な方法を用いて検出することができる。例えば、Y641変異EZH2ポリペプチドをコードする核酸は、当技術分野において周知の方法にしたがって適切に選択されたDNA供給源およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマーを用い全ゲノム再配列決定または標的領域再配列決定(後者は標的化再配列決定としても公知)によって検出することができる。例えば、Bentley (2006) *Curr Opin Genet Dev.* 16:545-52、およびLi et al. (2009) *Genome Res* 19: 1124-32を参照されたい。この方法は、典型的および一般的には、ゲノムDNA精製、関心対象の領域を増幅させるためのPCR増幅、サイクル配列決定、配列決定反応クリーンアップ、キャピラリー電気泳動、およびデータ分析の段階を伴う。コンピュータ内でのプライマーデザインツールを用いて、関心対象の領域を網羅する高品質のPCRプライマーをデザインする。サイクル配列決定は、サーマルサイクラー内での連続的なラウンドの変性、アニーリングおよび伸長が伸長産物の線形増幅をもたらす簡単な方法である。産物は、典型的には、末端ヌクレオチド塩基をG、A、TまたはCとして特定する蛍光タグで終結される。キャピラリー電気泳動注入液に競合する可能性がある、取り込まれていない色素ターミネータおよび塩を、洗浄によって除去する。キャピラリー電気泳動中に、サイクル配列決定反応の産物は、重合体で満たされたキャピラリーを通過して移動する。負に帯電したDNA断片は、正極の方へキャピラリーを通過して移動するので、サイズにより分離される。電気泳動後、データ収集ソフトウェアによって生データのサンプルファイルが作成される。下流のソフトウェア・アプリケーションを用い、さらなるデータ分析を行って、収集された色データ画像を、対応するヌクレオチド塩基に変換する。あるいはまたはさらに、この方法はマイクロアレイに基づく標的化領域のゲノムDNA捕捉および/または配列決定の使用を含みうる。適切なPCRプライマーの選択および再配列決定の実施のためのキット、試薬ならびに方法は、例えば、Applied Biosystems、AgilentおよびNimbleGen (Roche Diagnostics GmbH)から市販されている。これらのような方法は、JAK2および骨髄増殖性白血病遺伝子(MPL)の変異を検出するために、ならびに真性赤血球増加症、本態性血小板血症および特発性骨髄線維症を診断するために用いられている。本発明で用いる場合、PCRプライマーは、例えば、SEQ ID NO: 7の少なくとも関連性のある部分を増幅するように選択されうる(上記)。

【0083】

あるいはまたはさらに、Y641変異EZH2ポリペプチドをコードする核酸は、当技術分野において周知の方法によりサザンブロットを用いて検出されうる。1つの態様において、Y641変異EZH2ポリペプチドをコードするDNA配列は、高度にストリンジェントな条件の下で行われる核酸ハイブリダイゼーションを用いて検出される。核酸プローブは、その配列が、野生型EZH2のY641に対応する変異アミノ酸に対するコドンを含む標的核酸配列に相補的であるように選択される。

【0084】

配列特異的なプローブを、高度にストリンジェントな条件の下で試験されるサンプルと混ぜ合わせる。本明細書において用いられる「高度にストリンジェントな条件」という用語は、当技術分野で熟知されているパラメータをいう。核酸ハイブリダイゼーションのパラメータは、そのような方法を集めた参考文献、例えば、J. Sambrook, et al., eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989、またはF.M. Ausubel, et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkの中で見出すことができる。より具体的には、本明細書において用いられる、高度にストリンジェントな条件は、例えば、ハイブリダイゼーション用緩衝液(3.5×SSC、0.02% Ficoll、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン(BSA)、2.5 mM NaH₂PO₄ (pH 7)、0.5% SDS、2 mM EDTA)中65 °Cでのハイブリダイゼーションをいう。SSCは0.15 M塩化ナ

10

20

30

40

50

トリウム/0.015 Mクエン酸ナトリウム, pH 7であり; SDSはドデシル硫酸ナトリウムであり; およびEDTAはエチレンジアミン四酢酸である。ハイブリダイゼーション後、DNAが転写されている膜を、例えば、 $2 \times \text{SSC}$ 中にて室温で、その後、 $0.1 \sim 0.5 \times \text{SSC}/0.1 \times \text{SDS}$ にて最大68 までの温度で洗浄する。

【0085】

同程度のストリンジェンシーをもたらす、使用可能な他の条件、試薬などが存在する。当業者はそのような条件を熟知しているものと考えられ、したがって、本明細書ではそれらを示さない。しかしながら、当業者は、特に、EZH2のY641変異体をコードする核酸を含む、本発明のEZH2に関連する核酸の明確な特定を可能とするように(例えば、より低いストリンジェンシー条件を用いることにより)条件を操作することができるものと理解されよう。当業者はまた、そのような分子の発現に向けて細胞およびライブラリをスクリーニングするための方法論を熟知しており、その後、それらは定法により単離され、引き続き関連のある核酸分子の単離および配列決定が行われる。

10

【0086】

治療的有効量のEZH2阻害剤を対象に投与する。本明細書において用いられる場合、EZH2阻害剤は、一般に、EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ酵素活性を妨害できる、小分子、すなわち、約1.5キロダルトン(kDa)未満の分子量の分子をいう。

【0087】

1つの態様において、EZH2阻害剤は、野生型EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する。1つの態様において、EZH2阻害剤は、EZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する。1つの態様において、EZH2阻害剤は、野生型EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性およびEZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する。1つの態様において、EZH2阻害剤は、EZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を選択的に阻害する。

20

【0088】

本明細書において開示される場合、EZH2のある特定のY641変異体は、H3-K27me1への非メチル化H3-K27の変換には比較的不十分な触媒であるが、意外にも、H3-K27me3へのH3-K27me2の変換には有効な触媒である。逆に、野生型EZH2は、H3-K27me1への非メチル化H3-K27の変換には比較的有効な触媒であるが、意外にも、H3-K27me3へのH3-K27me2の変換には無効な触媒である。これは、H3-K27のモノメチル化、ジメチル化およびトリメチル化状態が転写制御において異なる機能を示すので、重要である。例えば、H3-K27me1は、転写の態勢にある遺伝子の活性化転写と関連しているが、H3-K27me3は、H3-K4トリメチル化がシスである場合に転写の態勢にある転写抑制された遺伝子と関連している。したがって、EZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性の選択的阻害は、H3-K27のトリメチル化体の産生の選択的阻害をもたらし、それによって、H3-K27me1と関連する転写に有利に働き、H3-K27me3と関連する転写抑制に不利に働く。

30

【0089】

EZH2阻害剤は、野生型EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するよりも効果的にEZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する場合に、EZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を「選択的に阻害する」。例えば、1つの態様において、選択的阻害剤は、野生型EZH2に対するIC50よりも少なくとも40パーセント低いEZH2のY641変異体に対するIC50を有する。1つの態様において、選択的阻害剤は、野生型EZH2に対するIC50よりも少なくとも50パーセント低いEZH2のY641変異体に対するIC50を有する。1つの態様において、選択的阻害剤は、野生型EZH2に対するIC50よりも少なくとも60パーセント低いEZH2のY641変異体に対するIC50を有する。1つの態様において、選択的阻害剤は、野生型EZH2に対するIC50よりも少なくとも70パーセント低いEZH2のY641変異体に対するIC50を有する。1つの態様において、選択的阻害剤は、野生型EZH2に対するIC50よりも少なくとも80パーセント低いEZH2のY641変異体に対するIC50を有する。1つの態様において、選択的阻害剤は、野生型EZH2に対するIC50よりも少なくとも90パーセント低いEZH2のY641変異体に対するIC50を有する。

40

50

【0090】

1つの態様において、EZH2のY641変異体の選択的阻害剤は、野生型EZH2に阻害効果を実質的に及ぼさない。

【0091】

阻害剤はH3-K27me3へのH3-K27me2の変換を阻害する。1つの態様において、阻害剤はH3-K27のトリメチル化を阻害するといわれる。H3-K27me2へのH3-K27me1の変換はH3-K27me3へのH3-K27me2の変換に先行するので、H3-K27me2へのH3-K27me1の変換の阻害剤は、必然的に、H3-K27me3へのH3-K27me2の変換も阻害し、すなわち、その阻害剤はH3-K27のトリメチル化を阻害する。H3-K27me2へのH3-K27me1の変換の阻害なしにH3-K27me3へのH3-K27me2の変換を阻害することも可能である。この種の阻害はまた、H3-K27のジメチル化の阻害がないとはいえ、H3-K27のトリメチル化の阻害を引き起こすと考えられる。

10

【0092】

1つの態様において、阻害剤はH3-K27me2へのH3-K27me1の変換およびH3-K27me3へのH3-K27me2の変換を阻害する。そのような阻害剤はH3-K27me2へのH3-K27me1の変換だけを直接阻害しうる。あるいは、そのような阻害剤はH3-K27me2へのH3-K27me1の変換およびH3-K27me3へのH3-K27me2の変換の両方を直接阻害しうる。

【0093】

阻害剤はヒストンメチラーゼ活性を阻害する。ヒストンメチラーゼ活性の阻害は、任意の適当な方法を用いて検出することができる。阻害は、例えば、ヒストンメチラーゼ活性の比率に関してまたはヒストンメチラーゼ活性の産物として測定することができる。これらの読み出しのどちらかに適した方法は、以下の実施例に含まれている。

20

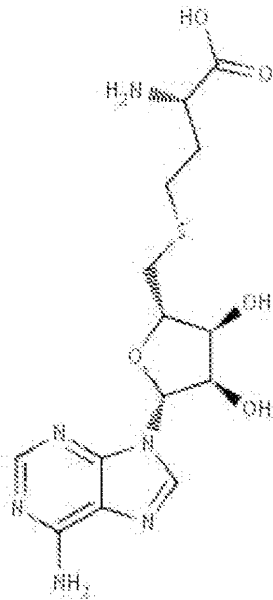
【0094】

阻害は適当な陰性対照と比べて測定可能な阻害である。1つの態様において、阻害は適当な陰性対照と比べて少なくとも10パーセントの阻害である。すなわち、酵素活性の比率または阻害剤による生成物の量は、対応する比率または阻害剤なしで作出された量の90パーセント未満または90パーセントに等しい。さまざまな他の態様において、阻害は適当な陰性対照と比べて少なくとも20、25、30、40、50、60、70、75、80、90、または95パーセントの阻害である。1つの態様において、阻害は適当な陰性対照と比べて少なくとも99パーセントの阻害である。すなわち、酵素活性の比率または阻害剤による生成物の量は、対応する比率または阻害剤なしで作出された量の1パーセント未満または1パーセントに等しい。

30

【0095】

1つの態様において、阻害剤はS-アデノシル-L-ホモシステイン(SAH)である。SAHは構造式



(SAH)

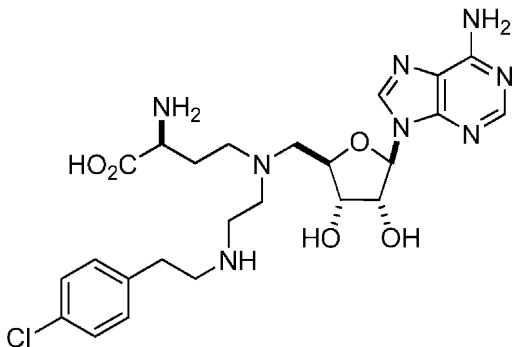
10

を有し、例えば、Sigma-Aldrich, St. Louis, MOを含む、いくつかの供給業者から市販されている。SAHはS-アデノシルメチオニン依存的なメチルトランスフェラーゼによるメチル基移転の阻害剤として記述されている。

20

【0096】

1つの態様において、阻害剤は化合物75



(75)

30

またはその薬学的に許容される塩である。

【0097】

ある特定の態様において、本発明は、対象由来のサンプルにおけるEZH2のY641変異体を検出するためのアッセイを行う段階を含む。この種のアッセイは前述されている。本明細書において用いられる場合、「対象由来のサンプル」は、対象から得られたまたは対象に由来する細胞または細胞の成分を含有する任意の適当なサンプルをいう。1つの態様において、サンプルは、EZH2のY641変異体を発現することが疑われる細胞、例えば、がん細胞を含む。1つの態様において、サンプルは血液サンプルである。1つの態様において、サンプルは、例えば、リンパ組織(例えば、リンパ節)または骨髄から得られた生検サンプルである。1つの態様において、サンプルは、リンパ組織(例えば、リンパ節)もしくは骨髄以外のまたはリンパ組織(例えば、リンパ節)もしくは骨髄の他の組織から得られた生検サンプルである。例えば、1つの態様において、サンプルはがん、例えば、がん細胞から構成される腫瘍由来の生検である。サンプル中の細胞は、サンプルの他の成分から単離することができる。例えば、末梢血単核細胞(PBMC)は、当業者に熟知されている方法にしたがって遠心分離された血液サンプル由来のパフィーコートとして単離することができる。

40

【0098】

対象由来のサンプルに関するアッセイの結果から、EZH2のY641変異体がサンプル中に存在することが示される場合、対象はEZH2のY641変異体を発現するものといわれる。実際に

50

、1つの態様において、対象由来のサンプルに関するアッセイの結果から、EZH2のY641変異体がサンプル中に存在することが示される場合、対象は、EZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を選択的に阻害するEZH2阻害剤による処置の候補として特定される。

【0099】

がん由来のサンプルに関するアッセイの結果から、EZH2のY641変異体が、がん中に存在することが示される場合、がんは、EZH2のY641変異体を発現するものといわれる。

【0100】

同様に、がんを有する対象由来のがん細胞を含むサンプルに関するアッセイの結果から、EZH2のY641変異体がサンプル中に存在することが示される場合、対象は、EZH2のY641変異体を発現するものといわれる。

10

【0101】

本発明はまた、EZH2阻害剤に対する患者の反応性とH3-K27me₂レベルとの、または好ましくはH3-K27me₂およびH3-K27me₃のレベルとの、これまでに認識されていない、驚くべき相関を提供する。例えば、対照と比べて低いH3-K27me₂レベルおよび通常のまたは高いH3-K27me₃レベルを有する細胞は、通常のH3-K27 me₂およびme₃レベルを有する細胞よりもEZH2阻害剤の抗増殖効果に対してはるかに反応性が高い。

【0102】

本発明の1つの局面は、対象においてEZH2阻害剤に対する反応性を判定するための方法である。1つの態様において、本方法は、対象から組織サンプルを単離する段階；組織サンプルにおけるH3-K27のジメチル化(me₂)レベルを検出する段階；ジメチル化(me₂)レベルを対照のジメチル化(me₂)レベルと比較する段階；およびジメチル化(me₂)レベルが存在しないかまたは対照のジメチル化(me₂)レベルよりも低い場合に、対象がEZH2阻害剤に対して反応性であると特定する段階を含む。1つの態様において、本方法は、組織サンプルにおけるH3-K27のトリメチル化(me₃)レベルを検出する段階；トリメチル化(me₃)レベルを対照のトリメチル化(me₃)レベルと比較し、かつジメチル化(me₂)レベルを対照のジメチル化(me₂)レベルと比較する段階；ならびにトリメチル化(me₃)レベルが対照のトリメチル化(me₃)レベルと同じかまたは対照のトリメチル化(me₃)レベルよりも高く、かつジメチル化(me₂)レベルが存在しないかまたは対照のジメチル化(me₂)レベルよりも低い場合に、該対象がEZH2阻害剤に対して反応性であると特定する段階をさらに含む。別の態様において、本方法は、組織サンプルにおけるH3-K27のジメチル化(me₂)レベルとトリメチル化(me₃)レベルの比率を得る段階；対照のジメチル化(me₂)レベルと対照のトリメチル化(me₃)レベルの対照の比率を得る段階；該比率を該対照の比率と比較する段階；および該比率が該対照の比率よりも低い場合に、対象が該EZH2阻害剤に対して反応性であると特定する段階をさらに含む。好ましい態様において、対象はがんを有する。1つの態様において、がんは濾胞性リンパ腫である。あるいは、がんはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)である。別の好ましい態様において、対象はY641変異EZH2を発現する。好ましい態様において、Y641変異体はY641F、Y641H、Y641N、またはY641Sである。

20

30

【0103】

ジメチル化H3-K27またはトリメチル化H3-K27の検出は、当技術分野における任意の適当な方法を用いて達成することができる。1つの態様において、メチル化レベルはジメチル化H3-K27またはトリメチル化H3-K27に特異的な抗体を用いて検出される。例えば、単離された組織は長期保存のためにホルマリン固定され、パラフィンブロックに包埋される。このブロックを用いて、メチル化H3-K27に対する抗体での免疫組織化学染色または蛍光染色のためのスライドを調製することができる。あるいは、全細胞溶解物またはヒストン抽出物を、単離された組織サンプルから調製し、その後、免疫組織化学染色、ウエスタンブロット分析または蛍光染色のために用いることができる。別の態様において、メチル化レベルは、ジメチル化H3-K27またはトリメチル化H3-K27に特異的なポリペプチドまたはアプターを用いて検出される。別の態様において、メチル化レベルは、質量分析(MS)を用いて検出される。

40

50

【0104】

対照のジメチル化H3-K27または対照のトリメチル化H3-K27は対照サンプル、例えば、対象から単離された隣接する非腫瘍組織または健常対象由来の健常組織から確立することができる。あるいは、H3-K27me2またはH3-K27me3の対照メチル化レベルは、当技術分野において公知の方法で病理学者により確立されてもよい。

【0105】

スクリーニング方法

本発明の1つの局面は、EZH2のY641変異体の阻害剤としての試験化合物を特定するための方法である。1つの態様において、本方法は、非メチル化H3-K27、モノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるH3-K27の形態を含むヒストン基質、メチル基供与体(S-アデノシルメチオニン(SAM)のような)、ならびに試験化合物と、単離されたEZH2のY641変異体とを混ぜ合わせる段階；およびヒストン基質におけるH3-K27のメチル化を検出するためのアッセイを行い、それによって、試験化合物の存在下でのH3-K27のメチル化が試験化合物の非存在下でのH3-K27のメチル化よりも少ない場合に、試験化合物をEZH2のY641変異体の阻害剤と特定する段階を含む。H3-K27のメチル化を検出するためのアッセイは、メチル化の比率、メチル化の程度、またはメチル化の比率および程度の両方を測定するように選択することができる。

【0106】

EZH2のY641変異体はPRC2複合体またはその機能的等価体として単離される。本明細書において用いられる場合、「単離された」という用語は、複合体が、天然に存在する際に見出されうる他の成分から実質的に分離されていることを意味する。化合物は、必ずしも精製されていなくても、単離されることができる。1つの態様において、EZH2の変異体は、EEDおよびSUZ12とともにEZH2のY641変異体の複合体として単離される。別の態様において、EZH2の変異体は、EED、SUZ12およびRbAp48とともにEZH2のY641変異体の複合体として単離される。適切な条件の下で、PRC2複合体またはその機能的等価体は、H3-K27に対するヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を示す。1つの態様において、複合体は、組換えにより発現された成分ポリペプチド、例えば、RbAp48有りまたは無しでEZH2、EED、SUZ12から構成される。

【0107】

単離されたEZH2のY641変異体をヒストン基質と混ぜ合わせる。ヒストン基質は、EZH2に対する基質として働きうるヒストンポリペプチドまたはその断片の任意の適当な供給源を含む。1つの態様において、ヒストン基質は対象から単離されたヒストンを含む。ヒストンは任意の適当な方法を用いて対象の細胞から単離することができる；そのような方法は当業者に周知であり、本明細書でさらに明記する必要はない。例えば、Fang et al. (2004) Methods Enzymol 377:213-26を参照されたい。以下の実施例によれば、1つの態様において、ヒストン基質はヌクレオソームとして提供される。以下の実施例によれば、1つの態様において、ヒストン基質は鳥類(ニワトリ)赤血球ヌクレオソームとして提供される。

【0108】

そのようにして提供されたヒストン基質は、H3-K27メチル化状態特異的な抗体でのウエスタンブロッティングによって判断した場合に、さまざまなH3-K27メチル化状態を含む、ヒストン修飾状態の混和物を含みうる。1つの態様において、ヒストン基質は、精製された全長ヒストンH3として提供されうる。そのような精製された全長ヒストンH3は、H3-K27メチル化状態に関して均質な調製物として、またはさまざまなH3-K27メチル化状態の混和物として提供されうる。H3-K27メチル化状態に関して単離されたヒストンH3の均質な調製物は、一つには、適当なH3-K27メチル化状態特異的な抗体を添加した免疫親和性カラムに通すことにより、または適当なH3-K27メチル化状態特異的な抗体でコーティングした磁気ビーズを用いた免疫沈降により調製されうる。あるいはまたはさらに、H3-K27のメチル化状態は、アッセイを行う一環として特徴付けることができる。例えば、出発材料のヒストン基質は、50パーセントの非メチル化H3-K27、40パーセントのモノメチル化H3-K27、10パーセントのジメチル化H3-K27、および0パーセントのトリメチル化H3-K27を含有すると特

徴付けられうる。

【0109】

1つの態様において、ヒストン基質は、特に、H3-K27を包含する配列を含めて、ヒストンH3に関連する1つまたは複数のアミノ酸配列を含んだペプチドライブラリまたは適当なペプチドを含む。例えば、1つの態様において、ヒストン基質は、ヒストンH3のアミノ酸残基番号21~44に対応するペプチド断片である。そのようなペプチド断片はアミノ酸配列LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO: 13)

を有する。ペプチドライブラリまたはペプチドは、当技術分野において周知の技法によるペプチド合成によって調製されることができ、H3-K27に対応するリジンの任意の所望とされるメチル化度を取り込むように任意で修飾されてもよい。以下の実施例において記述されるように、そのようなペプチドは下流のアッセイの実施において有用な、ビオチンなどの、標識を取り込むように修飾されてもよい。1つの態様において、標識はペプチドのアミノ(N)末端に付加される。1つの態様において、標識はペプチドのカルボキシ(C)末端に付加される。

【0110】

H3-K27メチル化特異的な抗体は、例えば、Cell Signaling Technology (Danvers, MA) およびActive Motif (Carlsbad, CA)を含む、種々の市販の供給源から入手可能である。

【0111】

単離されたEZH2のY641変異体を試験化合物と混ぜ合わせる。本明細書において用いられる場合、「試験化合物」は、約1.5 kDa未満の分子量を有する有機小分子をいう。1つの態様において、試験化合物は公知の化合物である。1つの態様において、試験化合物は新規の化合物である。1つの態様において、試験化合物は、例えば、何十もの、何百もの、何千もの、またはさらに多くの化合物を含む、そのような化合物のライブラリの一部として提供することができる。化合物のライブラリは、例えば、当技術分野において周知の一般的技法により試験化合物のアレイおよびロボット操作を用いて、高速大量処理スクリーニングアッセイで好都合にスクリーニングされうる。

【0112】

ある特定の態様において、試験化合物は、SAHの誘導体または化合物75の誘導体である化合物である。

【0113】

H3-K27のメチル化の検出は、任意の適当な方法を用いて達成することができる。1つの態様において、供与体メチル基の供給源は、検出可能な標識で標識されているメチル基を含む。検出可能な標識は1つの態様において、同位体標識、例えば、トリチウムである。他の種類の標識は、例えば、蛍光標識を含みうる。

【0114】

トリメチル化H3-K27の形成の検出は、任意の適当な方法を用いて達成することができる。例えば、トリメチル化H3-K27の形成の検出は、クロマトグラフィー法またはサイズによって標識産物を分離する他の方法、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、キャピラリー電気泳動(CE)または高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)と任意で組み合わせられてもよい、上記のような、標識されたメチル基の取り込みを検出するアッセイを用いて達成することができる。あるいはまたはさらに、トリメチル化H3-K27の形成の検出は、トリメチル化H3-K27に特異的である抗体を用いて達成することができる。

【0115】

ジメチル化H3-K27へのモノメチル化H3-K27の変換の検出は、任意の適当な方法を用いて達成することができる。1つの態様において、変換は、モノメチル化H3-K27およびジメチル化H3-K27に特異的な抗体を用いて測定される。例えば、モノメチル化H3-K27およびジメチル化H3-K27の出発の量または濃度は、モノメチル化H3-K27およびジメチル化H3-K27に特異的な適切な抗体を用いて決定されうる。酵素、基質、メチル基供与体、および試験化合物を組み合わせた後に、結果として生じたモノメチル化H3-K27およびジメチル化H3-K27の量または濃度がその後、モノメチル化H3-K27およびジメチル化H3-K27に特異的な適切な抗

10

20

30

40

50

体を用いて決定されうる。モノメチル化H3-K27およびジメチル化H3-K27の最初のおよび結果の量または濃度を次いで、比較することができる。あるいはまたはさらに、モノメチル化H3-K27およびジメチル化H3-K27の最初のおよび結果の量または濃度を次いで、陰性対照由来の対応する量または濃度と比較することができる。アッセイに試験薬剤が含まれていない、陰性対照反応を並行してまたは既存対照として行うことができる。そのような対照反応の結果は、上記の比較を行う前にまたは行うと同時に、実験反応の対応する結果から任意で差し引かれてもよい。

【0116】

H3-K27のジメチル化形態は同じアッセイにおいてさらにメチル化されうるので、モノメチル化H3-K27の量または濃度の低減がジメチル化H3-K27の増加に直接対応しないように見えることもある。しかしながら、この場合には、モノメチル化H3-K27の量または濃度の低減が、それ自体で、ジメチル化H3-K27へのモノメチル化H3-K27の変換を反映するものと推定することができる。

10

【0117】

トリメチル化H3-K27へのジメチル化H3-K27の変換の検出は、任意の適当な方法を用いて達成することができる。1つの態様において、変換は、ジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27に特異的な抗体を用いて測定される。例えば、ジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27の出発の量または濃度は、ジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27に特異的な適切な抗体を用いて決定されうる。酵素、基質、および試験化合物を組み合わせた後に、結果として生じたジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27の量または濃度がその後、ジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27に特異的な適切な抗体を用いて決定されうる。ジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27の最初のおよび結果の量または濃度を次いで、比較することができる。あるいはまたはさらに、ジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27の最初のおよび結果の量または濃度を次いで、陰性対照由来の対応する量または濃度と比較することができる。アッセイに試験薬剤が含まれていない、陰性対照反応を並行してまたは既存対照として行うことができる。そのような対照反応の結果は、上記の比較を行う前にまたは行うと同時に、実験反応の対応する結果から任意で差し引かれてもよい。

20

【0118】

試験薬剤は、試験化合物ありでのH3-K27のメチル化が試験化合物なしでのH3-K27のメチル化よりも少ない場合に、EZH2のY641変異体の阻害剤と特定される。1つの態様において、試験薬剤は、試験化合物の存在下でのトリメチル化H3-K27の形成が試験化合物の非存在下でのトリメチル化H3-K27の形成よりも少ない場合に、EZH2のY641変異体の阻害剤と特定される。

30

【0119】

本発明の1つの局面は、EZH2のY641変異体の選択的阻害剤を特定するための方法である。1つの態様において、本方法は、モノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27、およびモノメチル化H3-K27とジメチル化H3-K27との組み合わせからなる群より選択されるH3-K27の形態を含むヒストン基質、メチル基供与体(例えば、SAM)、ならびに試験化合物と、単離されたEZH2のY641変異体とを混ぜ合わせ、それによって試験混合物を形成させる段階; モノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27、およびモノメチル化H3-K27とジメチル化H3-K27との組み合わせからなる群より選択されるH3-K27の形態を含むヒストン基質、メチル基供与体(例えば、SAM)、ならびに試験化合物と、単離された野生型EZH2とを混ぜ合わせ、それによって対照混合物を形成させる段階; 試験混合物および対照混合物のそれぞれにおけるヒストン基質のトリメチル化を検出するためのアッセイを行う段階; (a)試験化合物ありでのEZH2のY641変異体(M+)によるトリメチル化と(b)試験化合物なしでのEZH2のY641変異体(M-)によるトリメチル化の比率を算出する段階; (c)試験化合物ありでの野生型EZH2(WT+)によるトリメチル化と(d)試験化合物なしでの野生型EZH2(WT-)によるトリメチル化の比率を算出する段階; 比率(a)/(b)を比率(c)/(d)と比較する段階; ならびに比率(a)/(b)が比率(c)/(d)未満である場合に、試験化合物をEZH2のY641変異体の選択的阻害剤と特定する

40

50

段階を含む。1つの態様において、本方法は、試験混合物および対照混合物の一方または両方に対して試験化合物なしの陰性対照を考慮する段階をさらに含む。

【0120】

薬学的組成物

1つまたは複数のEZH2アンタゴニストをヒト患者に単独で、または本明細書において記述される疾患もしくは状態を処置もしくは改善するための用量でそれらを適当な担体もしくは賦形剤と混合した薬学的組成物中で投与することができる。これらのEZH2アンタゴニストの混合物を患者に、単純混合物としてまたは適当な配合化された薬学的組成物中で投与することもできる。例えば、本発明の1つの局面は治療的有効用量のEZH2アンタゴニスト、またはその薬学的に許容される塩、水和物、鏡像異性体もしくは立体異性体；および薬学的に許容される希釈剤または担体を含む薬学的組成物に関する。

10

【0121】

EZH2アンタゴニストの配合および投与のための技法はRemingtonの「The Science and Practice of Pharmacy」, 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins 2005のような、当業者に周知の参考文献の中で見出されうる。

【0122】

適当な投与経路は、例えば、経口投与、直腸投与または腸内投与；静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射または髄内注射、および髄膜注射、直接脳室内注射または眼内注射を含む、非経口送達；点眼薬および経皮送達を含む、局所送達；ならびに鼻腔内送達および他の経粘膜送達を含みうる。

20

【0123】

あるいは、EZH2アンタゴニストを全身の様式ではなく局所の様式で、例えば、多くの場合、デポー配合物または持続放出配合物中で、浮腫部位に直接的にEZH2アンタゴニストを注射することによって投与してもよい。

【0124】

1つの態様において、EZH2アンタゴニストは腫瘍またはリンパ節への直接的な注射によって投与される。

【0125】

さらに、EZH2アンタゴニストを標的薬物送達システムで、例えば、がん細胞特異的な抗体でコーティングされたりポソーム中で投与してもよい。

30

【0126】

本発明の薬学的組成物は、例えば、従来混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、包括化または凍結乾燥の過程によって製造されうる。

【0127】

本発明によって用いるための薬学的組成物はしたがって、薬学的に使用できる調製物への活性なEZH2アンタゴニストの加工処理を容易にする賦形剤および補助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容される担体を用い従来の様式で配合されうる。適切な配合は、選択した投与経路に依存する。

【0128】

注射の場合、本発明の薬剤は水溶液中で、好ましくは、ハックス溶液、リンゲル溶液または生理的食塩緩衝液のような生理学的に適合する緩衝液中で配合されうる。経粘膜投与の場合、透過されるバリアに適した浸透剤が配合に用いられる。そのような浸透剤が当技術分野において一般に知られている。

40

【0129】

経口投与の場合、EZH2アンタゴニストは、活性なEZH2アンタゴニストを当技術分野において周知の薬学的に許容される担体と混ぜ合わせることによって容易に配合することができる。そのような担体は、本発明のEZH2アンタゴニストが、処置される患者によって経口摂取されるための錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、溶液、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして配合されることを可能にする。経口用の薬学的調製物は、活性なEZH2アンタゴニストを固体賦形剤と混ぜ合わせ、得られた混合物を任意で粉碎し、顆粒の混合物を

50

、錠剤または糖衣錠コアを得るために、必要なら、適当な補助剤を加えた後で、加工処理することによって得ることができる。適切な賦形剤は、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む、糖のような増量剤；例えば、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース調製物；および/またはポリビニルピロリドン(PVP)を含む。必要なら、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムのようなその塩などの、崩壊剤が加えられてもよい。

【0130】

糖衣錠コアには、適当なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液が用いられてもよく、これはアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコールおよび/または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適当な有機溶媒または有機溶媒混合物を任意で含有してもよい。活性なEZH2アンタゴニストの用量の特定のために、または活性なEZH2アンタゴニストの用量のさまざまな組み合わせを特徴付けるために、染料または色素が錠剤または糖衣錠コーティングに加えられてもよい。

10

【0131】

経口的に使用できる薬学的調製物は、ゼラチンで作られている押し込み型のカプセル、ならびにゼラチンおよび可塑剤、例えばグリセロールまたはソルビトールで作られている密封された軟質カプセルを含む。押し込み型のカプセルは、有効成分をラクトースのような増量剤、デンプンのような結合剤、および/またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤ならびに、任意で、安定剤との混和物で含有することができる。軟質カプセルでは、活性なEZH2アンタゴニストは脂肪油、流動パラフィンまたは液状ポリエチレングリコールなどの、適当な液体に溶解または懸濁されてもよい。さらに、安定剤が加えられてもよい。

20

【0132】

口内投与の場合、組成物は、従来の様式で配合される錠剤またはトローチ剤の形態を取ってよい。

【0133】

吸入による投与の場合、本発明によって用いるためのEZH2アンタゴニストは、好都合には、適当な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当なガスを用いて、加圧パックまたは噴霧器からのエアロゾルスプレイ提示物の形態で送達される。加圧エアロゾルの場合、投与量単位は、一定の量を送達するためのバルブを提供することによって決定されうる。EZH2アンタゴニストおよびラクトースまたはデンプンなどの適当な粉末基剤の粉末混合物を含有する、例えば、吸入器または注入器で用いるゼラチンのカプセルおよびカートリッジを配合することができる。

30

【0134】

EZH2アンタゴニストは、注射による非経口投与のために、例えば、ボラス注射または連続注入による非経口投与のために配合することができる。注射用の配合物は、保存剤が添加された単位投与量形態で、例えば、アンプル中または多用量容器中で提示されうる。組成物は、油性媒体または水性媒体における懸濁液、溶液または乳濁液のような形態を取ってよく、懸濁化剤、可溶化剤および/または分散化剤のような配合剤を含有してもよい。

40

【0135】

非経口投与のための薬学的配合物は、水溶性形態での活性なEZH2アンタゴニストの水溶液を含む。さらに、活性なEZH2アンタゴニストの懸濁液を適切な油性の注射用懸濁液として調製してもよい。適当な親油性溶媒または親油性媒体は、ゴマ油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、あるいはリポソームを含む。水性の注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビ

50

トールまたはデキストランのような、懸濁液の粘度を増大させる物質を含有してもよい。任意で、懸濁液はまた、適当な安定剤、または高濃度溶液の調製を可能にするためにEZH2アンタゴニストの溶解性を増大させる適当な薬剤を含有してもよい。

【0136】

あるいは、有効成分は、適当な媒体、例えば、無菌の発熱性物質除去水で使用前に再構成される粉末形態であってもよい。

【0137】

EZH2アンタゴニストはまた、例えば、カカオ脂または他のグリセリドなどの、従来の坐薬基剤を含んだ、坐薬または停留浣腸剤のような、直腸用組成物に配合されてもよい。

【0138】

前述の配合物に加えて、EZH2アンタゴニストはまた、デポー調製物として配合されてもよい。そのような長時間作用性配合物は埋め込みにより(例えば、皮下にもしくは筋肉内にまたは筋肉内注射により)投与されうる。したがって、例えば、EZH2アンタゴニストは、(例えば、許容される油中の乳濁液として)適当な重合体材料もしくは疎水性材料とともに、またはイオン交換樹脂とともに、あるいは難溶性の誘導体として(例えば、難溶性の塩として)配合されうる。

【0139】

あるいは、疎水性の薬学的EZH2アンタゴニストのための他の送達システムが利用されてもよい。リポソームおよび乳濁液は、疎水性薬物のための送達媒体または担体の例である。ジメチルスルホキシド(dimethylsulfoxide)のような、ある特定の有機溶媒も利用されてよい。あるいは、EZH2アンタゴニストは、治療剤を含有する固体の疎水性重合体の半透過性マトリックスのような、持続放出システムを用いて送達されてもよい。さまざまな持続放出材料が確立されており、当業者によって周知である。持続放出カプセルは、その化学的性質に依存して、EZH2アンタゴニストを数週間から100日を超えるまで放出しうる。治療試薬の化学的性質および生物学的安定性に依存して、タンパク質安定化のためのさらなる方策が利用されてもよい。

【0140】

薬学的組成物はまた、適当な固相またはゲル相の担体または賦形剤を含んでもよい。そのような担体または賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、さまざまな糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールのような重合体が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0141】

処置の方法

本明細書において提供されるのは、ヒストンまたは他のタンパク質のメチル化状態を調節することによって経過に影響が出る可能性のある、状態および疾患を処置または予防する方法であり、ここで該メチル化状態は、少なくともある程度は、EZH2の活性によって媒介される。順に、ヒストンのメチル化状態の調節が、メチル化によって活性化される標的遺伝子および/またはメチル化によって抑制される標的遺伝子の発現のレベルに影響を及ぼしうる。

【0142】

例えば、本発明の1つの局面は、がんを処置するための方法に関する。本方法は、EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するEZH2阻害剤の治療的有効量を、EZH2のY641変異体を発現しているがんを有する対象に投与し、それによってがんを処置する段階を含む。1つの態様において、阻害剤はEZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する。1つの態様において、阻害剤はEZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を選択的に阻害する。1つの態様において、がんは濾胞性リンパ腫である。1つの態様において、がんはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)である。

【0143】

本発明の1つの局面は、がんを処置するための方法に関する。本方法は、がんを有する

10

20

30

40

50

対象由来のがん細胞を含むサンプルにおけるEZH2のY641変異体を検出するためのアッセイを行う段階；およびEZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害するEZH2阻害剤の治療的有効量を、EZH2のY641変異体を発現している対象に投与し、それによってがんを処置する段階を含む。1つの態様において、阻害剤はEZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する。1つの態様において、阻害剤はEZH2のY641変異体のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を選択的に阻害する。1つの態様において、がんは濾胞性リンパ腫である。1つの態様において、がんはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)である。

【0144】

がんおよび神経疾患のような疾患をタンパク質(例えば、ヒストン)メチル化の調節因子、例えば、ヒストンメチルトランスフェラーゼまたはヒストンデメチラーゼ酵素活性の調節因子の投与によって処置することができる。ヒストンメチル化は、がんにおけるある特定の遺伝子の異常な発現に関わること、および非ニューロン細胞におけるニューロン遺伝子のサイレンシングに関わるということが報告されている。本明細書において記述される調節因子を用いて、そのような疾患を処置すること、すなわち、病的細胞においてヒストンのメチル化を阻害することができる。

10

【0145】

少なくとも、ヒストンメチル化の増大がある特定のがんと関連していることが判明したという事実に基づき、対象においてがんを処置するための方法は、それを必要としている対象に、メチル化を阻害するまたはメチル化を正常対応細胞における大体そのレベルまで回復する化合物の治療的有効量を投与する段階を含む。1つの態様において、対象においてがんを処置するための方法は、それを必要としている対象に、モノメチル化H3-K27 (H3-K27me1)への非メチル化H3-K27の変換を阻害する化合物の治療的有効量を投与する段階を含む。1つの態様において、対象においてがんを処置するための方法は、それを必要としている対象に、ジメチル化H3-K27 (H3-K27me2)へのモノメチル化H3-K27 (H3-K27me1)の変換を阻害する化合物の治療的有効量を投与する段階を含む。1つの態様において、対象においてがんを処置するための方法は、それを必要としている対象に、トリメチル化H3-K27 (H3-K27me3)へのH3-K27me2の変換を阻害する化合物の治療的有効量を投与する段階を含む。1つの態様において、対象においてがんを処置するための方法は、それを必要としている対象に、H3-K27me2へのH3-K27me1の変換およびH3-K27me3へのH3-K27me2の変換の両方を阻害する化合物の治療的有効量を投与する段階を含む。メチル化の疾患特異的な増加は、ヒストンまたはタンパク質メチル化の細胞レベルでの全体的な増加なしに重要なゲノム遺伝子座のクロマチンで起こりうることに留意することが重要である。例えば、重要な疾患関連遺伝子での異常な高メチル化は、ヒストンまたはタンパク質全体での低メチル化を背景にして起こることが可能である。

20

30

【0146】

一般的に、細胞増殖を調節するためにメチル化の調節因子を用いることができる。例えば、場合によっては、メチル化を減少させる薬剤で過剰な増殖が低減されてもよく、その一方、メチル化を増加させる薬剤で不十分な増殖が刺激されてもよい。したがって、処置される疾患は、良性細胞増殖および悪性細胞増殖(がん)のような、過剰増殖性疾患を含む。

40

【0147】

処置される例示的ながんには、濾胞性リンパ腫(FL)および、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)を含む、リンパ腫が含まれる。

【0148】

他のがんには、急性リンパ性白血病；急性骨髄性白血病；副腎皮質がん；エイズによるがん；エイズによるリンパ腫；肛門がん；星細胞腫、小児小脳；星細胞腫、小児大脳；基底細胞がん、皮膚がん(非黒色腫)参照；胆管がん、肝外；膀胱がん；骨がん、骨肉腫/悪性線維性組織球腫；脳幹グリオーマ；脳腫瘍；脳腫瘍、小脳星細胞腫；脳腫瘍、大脳星細胞腫/悪性神経膠腫；脳腫瘍、上衣腫；脳腫瘍、髄芽腫；脳腫瘍、テント上原始神経外胚

50

葉腫瘍;脳腫瘍、視経路および視床下部膠腫;乳がん;気管支腺腫/カルチノイド;パーキンソンリンパ腫;カルチノイド腫瘍;カルチノイド腫瘍、胃腸;原発不明がん;中枢神経系リンパ腫、原発性;小脳星細胞腫;子宮頸がん;小児がん;慢性リンパ球性白血病;慢性骨髄性白血病;慢性骨髄性白血病、毛様細胞;慢性骨髄増殖性疾患;結腸がん;結腸直腸がん;皮膚T細胞性リンパ腫、菌状息肉腫およびセザリー症候群参照;子宮内膜がん;食道がん;ユーイングファミリーの腫瘍;肝外胆管がん;眼がん、眼内黒色腫;眼がん、網膜芽細胞腫;胆嚢がん;胃がん;消化管カルチノイド腫瘍;胚細胞腫瘍、頭蓋外;胚細胞腫瘍、性腺外;胚細胞腫瘍、卵巣;妊娠性絨毛腫瘍;神経膠腫;神経膠腫、小児脳幹;神経膠腫、小児大脳星細胞腫;神経膠腫、小児視経路および視床下部;有毛細胞白血病;頭頸部がん;肝細胞(肝臓)がん、成人(原発性);肝細胞(肝臓)がん、小児(原発性);ホジキンリンパ腫;妊娠中のホジキンリンパ腫;下咽頭がん;視経路および視床下部膠腫;眼内黒色腫;島細胞がん(内分泌性膵臓);カボジ肉腫;腎臓(腎細胞)がん;腎臓がん;喉頭がん;白血病;口唇がんおよび口腔がん;肝臓がん、成人(原発性);肝臓がん、小児(原発性);肺がん、非小細胞;肺がん、小細胞;リンパ腫、原発性中枢神経系;マクログロブリン血症、ヴァルデンストレーム;骨悪性線維性組織球腫/骨肉腫;髄芽腫;黒色腫;メルケル細胞がん;中皮腫;中皮腫、成人悪性;原発不明の転移性頸部扁平上皮がん;多発性内分泌腫瘍症候群;多発性骨髄腫;多発性骨髄腫/形質細胞腫 菌状息肉腫;骨髄異形成症候群;骨髄異形成/骨髄増殖性疾患;骨髄性白血病、成人急性;骨髄性白血病、小児急性骨髄増殖性疾患、慢性;副鼻腔および鼻腔がん;鼻咽腔がん神経芽細胞腫;非ホジキンリンパ腫;妊娠中の非ホジキンリンパ腫;口腔がん;口腔がん、口唇および;口腔咽頭がん;骨肉腫/骨悪性線維性組織球腫;卵巣がん;上皮性卵巣がん;卵巣低悪性度腫瘍;膵臓がん;膵臓がん、島細胞;副鼻腔および鼻腔がん;副甲状腺がん;陰茎がん;褐色細胞腫;松果体芽細胞腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍;下垂体部腫瘍;形質細胞腫/多発性骨髄腫;膜肺芽腫;妊娠および乳がん;前立腺がん;直腸がん;網膜芽細胞腫;横紋筋肉腫;唾液腺がん;肉腫、ユーイング腫瘍;肉腫、軟組織;肉腫、子宮;セザリー症候群;皮膚がん;皮膚がん(非黒色腫);小腸がん;軟部組織肉腫;扁平上皮がん、皮膚がん(非黒色腫)参照;原発不明の頸部扁平上皮がん、転移性;胃がん;睾丸がん;胸腺腫;胸腺腫および胸腺がん;甲状腺がん;腎盂および尿管の移行上皮がん;絨毛性腫瘍、妊娠性;原発部位不明、のがん(Cancer of);小児の珍しいがん;尿道がん;子宮がん、子宮内膜;子宮肉腫;膣がん;小児視経路および視床下部膠腫;外陰がん;ヴァルデンストレームマクログロブリン血症;ウィルムス腫瘍;ならびに女性のがんが含まれる。

【0149】

EZH2によって媒介される、後成的なメチル化が関与する他の任意の疾患は、本明細書において記述される化合物および方法を用いて処置可能または予防可能でありうる。

【0150】

例えば、処置されうる神経疾患は、てんかん、統合失調症、双極性障害または他の心理的および/もしくは精神的障害、神経障害、骨格筋萎縮、ならびに神経変性疾患、例えば、神経変性疾患を含む。例示的な神経変性疾患としては、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、およびパーキンソン病が挙げられる。別のクラスの神経変性疾患は、少なくとも部分的には、ポリグルタミンの凝集によって引き起こされる疾患を含む。このクラスの疾患は、ハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症(Spinalbulbar Muscular Atrophy; SBMAまたはケネディー病)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、脊髄小脳性失調症1 (SCA1)、脊髄小脳性失調症2 (SCA2)、マシャド・ジョセフ病(MJD; SCA3)、脊髄小脳性失調症6 (SCA6)、脊髄小脳性失調症7 (SCA7)、および脊髄小脳性失調症12 (SCA12)を含む。

【0151】

本明細書において同様に提供されるのは、がんを有する対象に対する処置を選択するための方法である。本方法は、ジメチル化H3-K27レベルによって、好ましくはジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27のレベルによってEZH2阻害剤に対する対象の反応性を判定する段階;ならびに対象がEZH2阻害剤に反応性である場合にEZH2阻害剤を対象に提供する段階を含む。1つの態様において、がんは濾胞性リンパ腫である。あるいは、がんはびま

10

20

30

40

50

ん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)である。別の好ましい態様において、対象はY641変異EZH2を発現する。好ましい態様において、Y641変異体はY641F、Y641H、Y641N、またはY641Sである。

【0152】

併用療法

本発明の1つの局面において、EZH2アンタゴニスト、またはその薬学的に許容される塩を別の治療剤と併用して、がんおよび/または神経障害などの疾患を処置することができる。例えば、さらなる薬剤は、本発明の化合物によって処置される疾患または状態を処置するのに有用であると当技術分野において認識されている治療剤でありうる。さらなる薬剤はまた、治療用組成物に有益な特性を与える薬剤(例えば、組成物の粘度に影響を与える薬剤)でありうる。

10

【0153】

本発明によって企図される併用療法は、例えば、単一の薬学的配合物中での本発明の化合物、またはその薬学的に許容される塩、およびさらなる薬剤の投与、ならびに別個の薬学的配合物中での本発明の化合物、またはその薬学的に許容される塩、およびさらなる薬剤の投与を含む。言い換えれば、共投与は、両薬剤の併用の有益な効果を提供するように対象に少なくとも2つの薬剤を投与することを意味するものとする。例えば、薬剤は、同時にまたはある時間にわたって順次投与されてもよい。

【0154】

以下に記載される薬剤は、例示を目的としており、限定することを意図するものではない。本発明の一部である、併用は、本発明の化合物および以下の一覧から選択される少なくとも1つのさらなる薬剤であることができる。併用は、形成される組成物はその意図した機能を果たすことができるようなものであるなら、併用は2つ以上のさらなる薬剤、例えば、2つまたは3つのさらなる薬剤を含むこともできる。

20

【0155】

例えば、本発明の1つの局面は、がんおよび/または神経障害の処置のための別の薬剤と併せてEZH2アンタゴニストを用いることに関する。1つの態様において、さらなる薬剤は、HDAC阻害剤のような、ヒストンメチル化に影響を与える化合物である抗がん剤である。ある特定の態様において、さらなる抗がん剤は、化学療法薬(2CdA、5-FU、6-メルカプトプリン、6-TG、Abraxane(商標)、Accutane(登録商標)、アクチノマイシン-D、Adriamycin(登録商標)、Alimta(登録商標)、全トランス型レチノイン酸、アメトプテリン、Ara-C、アザシチジン、BCNU、Blenoxane(登録商標)、Camptosar(登録商標)、CeeNU(登録商標)、クロファラビン、Clolar(商標)、Cytosan(登録商標)、塩酸ダウノルピシン、DaunoXome(登録商標)、Dacogen(登録商標)、DIC、Doxil(登録商標)、Ellence(登録商標)、Eloxatin(登録商標)、Emcyt(登録商標)、リン酸エトポシド、Fludara(登録商標)、FUDR(登録商標)、Gemzar(登録商標)、Gleevec(登録商標)、ヘキサメチルメラミン、Hycamtin(登録商標)、Hydrea(登録商標)、Idamycin(登録商標)、Ifex(登録商標)、イクサベピロン、Ixempra(登録商標)、L-アスパラギナーゼ、Leukeran(登録商標)、リボソームAra-C、L-PAM、リソドレン、Matulane(登録商標)、ミトラシン、マイトマイシン-C、Myleran(登録商標)、Navelbine(登録商標)、Neutrexin(登録商標)、ニロチニブ、Nipent(登録商標)、ナイトロジエンマスタード、Novantrone(登録商標)、Oncaspar(登録商標)、Panretin(登録商標)、Paparlatin(登録商標)、Platinol(登録商標)、カルムスチンインプラントを伴うプロリフェプロスパン20、Sandostatina(登録商標)、Targretin(登録商標)、Tasigna(登録商標)、Taxotere(登録商標)、Temodar(登録商標)、TESPA、Trisenox(登録商標)、Valstar(登録商標)、Velban(登録商標)、Vidaza(商標)、硫酸ピンクリスチン、VM26、Xeloda(登録商標)およびZanosar(登録商標)のような); 生物製剤(アルファインターフェロン、カルメット-ゲラン桿菌、Bexxar(登録商標)、Campath(登録商標)、Ergamisol(登録商標)、エルロチニブ、Herceptin(登録商標)、インターロイキン-2、Iressa(登録商標)、レナリドマイド、Mylotarg(登録商標)、Ontak(登録商標)、Pegasys(登録商標)、Revlimid(登録商標)、Rituxan(登録商標)、Tarceva(商標)、Thalomid(登録商標)、Tykerb(登録商標)、Velcade(登録商標)

30

40

50

)およびZevalin(商標)のような); コルチコステロイド(リン酸デキサメタゾンナトリウム、DeltaSone(登録商標)およびDelta-Cortef(登録商標)のような); ホルモン療法(Arimidex(登録商標)、Aromasin(登録商標)、Casodex(登録商標)、Cytadren(登録商標)、Eligard(登録商標)、Eulexin(登録商標)、Evista(登録商標)、Faslodex(登録商標)、Femara(登録商標)、Halotestin(登録商標)、Megace(登録商標)、Nilandron(登録商標)、Nolvadex(登録商標)、Plenaxis(商標)およびZoladex(登録商標)のような); ならびに放射性医薬品(Iodotope(登録商標)、Metastron(登録商標)、Phosphocol(登録商標)およびサマリウムSM-153のような)からなる群より選択される。

【0156】

投与量

本明細書において用いられる場合、「治療的有効量」または「治療的有効用量」は、状態の進行を完全にもしくは部分的に阻害するか、または状態の1つもしくは複数の症状を少なくとも部分的に軽減する、EZH2アンタゴニストまたは2つもしくはそれ以上のそのような化合物の組み合わせの量である。治療的有効量は、予防的に有効な量であることもできる。治療的に有効な量は、患者のサイズおよび性別、処置される状態、状態の重症度および求められる結果に依存すると考えられる。1つの態様において、治療的有効用量は、患者における症状の軽減をもたらすEZH2アンタゴニストのその量をいう。所与の患者について、治療的有効量は、当業者に公知の方法により判定されうる。

【0157】

EZH2アンタゴニストの毒性および治療効果は、例えば、最大耐量(MTD)およびED₅₀ (50%最大反応のための有効用量)を判定するための、細胞培養物または実験動物における標準の薬学的手順によって判定することができる。毒性効果と治療効果との用量比が治療指数であり、これはMTDとED₅₀との比として表すことができる。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトで用いるためのある範囲の投与量を配合するのに用いることができる。投与量は、病変組織または代用組織における酵素阻害の薬力学的マーカー(例えば、ヒストンメチル化または標的遺伝子発現)に及ぼすEZH2アンタゴニストの効果をモニタリングすることによってガイドされてもよい。細胞培養または動物実験を用いて、薬力学的マーカーの変化に必要な用量と治療効果に必要な用量との関係を判定することができる。そのようなEZH2アンタゴニストの投与量は、好ましくは、ほとんどまたは全く毒性なくED₅₀を含む血中濃度の範囲内にある。投与量は、採用される投与量形態および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変わってもよい。的確な配合、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択されうる。危機状態の処置においては、MTDに近づく緊急のボラスまたは注入の施行が、急速な反応を得るために必要とされうる。

【0158】

投与量および間隔は、メチルトランスフェラーゼ調節効果、または最小限の有効濃度(MEC)を、治療効果の達成に必要なとされる時間、維持するのに十分な活性部分の血漿レベルを提供するために個々に調節されてもよい。MECはEZH2アンタゴニストごとに変わると考えられるが、インビトロでのデータおよび動物実験から推定することができる。MECを達成するために必要な投与量は、投与の個々の特徴および経路に依存すると考えられる。しかしながら、高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)アッセイまたはバイオアッセイを用いて血漿濃度を判定することができる。

【0159】

投与間隔は、MEC値を用いて判定することもできる。ある特定の態様において、EZH2アンタゴニストは、症状の所望の改善が達成されるまで、10~90%、好ましくは30~90%および最も好ましくは50~90%の時間にMECを超える血漿レベルを維持する投薬計画を用いて投与されるべきである。他の態様において、さまざまな時間、さまざまなMEC血漿レベルが維持されよう。局所投与または選択的摂取の場合、薬物の有効局所濃度は、血漿濃度に関連しなくてもよい。

10

20

30

40

50

【0160】

当業者は、種々の投与計画から選択することができ、投与されるEZH2アンタゴニストの量は、もちろん、処置される対象に依存するであろうし、対象の体重、苦痛の重症度、投与の方法および処方医師の判断に依存すると考えられる。

【0161】

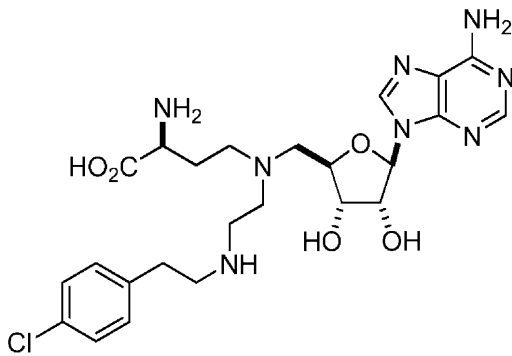
化合物および薬学的組成物

本発明の局面は、本発明の方法によって有用である化合物に関する。これらの化合物は、本明細書において「EZH2阻害剤」および、等しく、「EZH2アンタゴニスト」といわれる。化合物は、化合物それ自体、化合物の薬学的に許容される塩として、または薬学的組成物として提示されてもよい。

10

【0162】

そのような化合物は化合物75



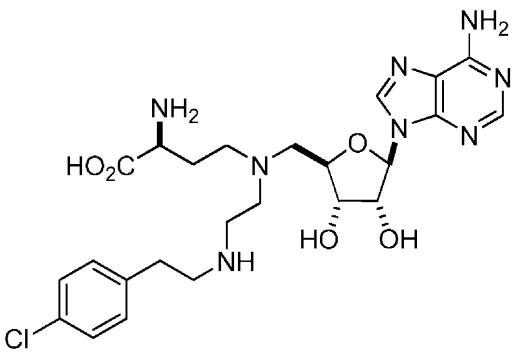
(75)

20

およびその薬学的に許容される塩を具体的に含む。

【0163】

本発明は、化合物75



(75)

30

またはその薬学的に許容される塩を含む薬学的組成物をさらに含む。

【0164】

EZH2アンタゴニストおよび任意で他の治療用物質は、それ自体(そのまま)でまたは薬学的に許容される塩の形態で投与することができる。医学の分野で用いられる場合、塩は薬学的に許容されるべきであるが、薬学的に許容されない塩を好都合に用いて、その薬学的に許容される塩を調製することができる。

40

【0165】

本発明によって有用な化合物は塩として、薬学的に適合する対イオン(すなわち、薬学的に許容される塩)で提供されてもよい。「薬学的に許容される塩」は、レシピエントへの投与により、直接的にまたは間接的に、本発明によって有用な化合物または化合物のプロドラッグを提供できる任意の無毒性の塩を意味する。「薬学的に許容される対イオン」は、対象への投与によって塩から放出された場合に無毒性である塩のイオン性部分である。薬学的に適合する塩は、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、およびコハク酸を含むが、これらに限定されない、多くの酸と形成されうる。塩は、その対応する遊離塩基形態よりも水または他のプロトン性溶媒に可溶性である傾向がある。本発明はそのよう

50

な塩の使用を含む。

【0166】

薬学的に許容される酸付加塩には、塩酸および臭化水素酸のような鉱酸と形成されるもの、ならびにまた、マレイン酸のような有機酸と形成されるものが含まれる。例えば、薬学的に許容される塩を形成するためによく利用される酸には、二硫化水素、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸およびリン酸のような無機酸、ならびにパラトルエンスルホン酸、サリチル酸、酒石酸、重酒石酸、アスコルビン酸、マレイン酸、ベシル酸、フマル酸、グルコン酸、グルクロン酸、ギ酸、グルタミン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、乳酸、シュウ酸、パラプロモフェニルスルホン酸、炭酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸および酢酸のような有機酸、ならびに関連する無機酸および有機酸が含まれる。そのような薬学的に許容される塩にはしたがって、硫酸塩、ピロ硫酸塩、硫酸水素塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、リン酸塩、リン酸一水素塩、リン酸二水素塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソ酪酸塩、カプリン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオール酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン-1,4-二酸塩、ヘキシン-1,6-二酸塩、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、テレフタル酸塩、スルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、 α -ヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、プロパンスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、マンデル酸塩などが含まれる。

10

20

【0167】

酸性官能基と薬学的に許容される塩を形成させるのに適した塩基には、ナトリウム、カリウムおよびリチウムのようなアルカリ金属の水酸化物；カルシウムおよびマグネシウムのようなアルカリ土類金属の水酸化物；アルミニウムおよび亜鉛のような他の金属の水酸化物；アンモニア、および無置換またはヒドロキシ置換モノアルキルアミン、ジアルキルアミンもしくはトリアルキルアミンのような有機アミン；ジシクロヘキシルアミン；トリブチルアミン；ピリジン；N-メチル、N-エチルアミン；ジエチルアミン；トリエチルアミン；モノ-(2-ヒドロキシエチル)アミン、ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミンもしくはトリ-(2-ヒドロキシエチル)アミンのようなモノ-(2-ヒドロキシ-低級アルキルアミン)、ビス-(2-ヒドロキシ-低級アルキルアミン)もしくはトリ-(2-ヒドロキシ-低級アルキルアミン)、2-ヒドロキシ-tert-ブチルアミン、またはN,N-ジメチル-N-(2-ヒドロキシエチル)アミンもしくはトリ-(2-ヒドロキシエチル)アミンのような、トリ-(ヒドロキシメチル)メチルアミン、N,N-ジアルキル-N-(ヒドロキシアルキル)-アミン；N-メチル-D-グルカミン；ならびにアルギニン、リジンなどのようなアミノ酸が含まれるが、これらに限定されることはない。

30

【0168】

本発明によって有用なある特定の化合物およびその塩は、2種以上の結晶形態(すなわち、多形体)で存在してもよい；本発明は結晶形態の各々およびその混合物の使用を含む。

40

【0169】

本発明によって有用なある特定の化合物は、1つまたは複数のキラル中心を含有してもよく、種々の光学的に活性な形態で存在してもよい。本発明によって有用な化合物が1つのキラル中心を含有する場合、化合物は2つの鏡像異性形態で存在し、本発明は鏡像異性体および鏡像異性体の混合物、例えばそのラセミ混合物の両方の使用を含む。鏡像異性体は当業者に公知の方法によって分割されうる；例えば、鏡像異性体は、例えば、結晶化によって分離されうるジアステレオ異性体塩の形成；例えば、結晶化、気体-液体もしくは液体クロマトグラフィーによって分離されうるジアステレオ異性体の誘導体もしくは錯体の形成；例えば、酵素的エステル化による、一方の鏡像異性体と鏡像異性体特異的試薬との選択的反応；またはキラル環境中での、例えば、キラル支持体(例えば、結合したキラ

50

ルリガンドを有するシリカ)上でのもしくはキラル溶媒の存在下での気体-液体もしくは液体クロマトグラフィーによって分割されうる。所望の鏡像異性体が上記の分離手順のうちの1つによってもう1つの化学的実体に変換される場合、所望の精製された鏡像異性体を遊離するためには、さらなる段階が必要になることがある。あるいは、特定の鏡像異性体は、光学的に活性な試薬、基質、触媒もしくは溶媒を用いた不斉合成により、または不斉転換によって一方の鏡像異性体を他方に変換することにより合成されうる。

【0170】

本発明によって有用な化合物が2つ以上のキラル中心を含有する場合、化合物はジアステレオ異性形態で存在してもよい。ジアステレオ異性化合物は当業者に公知の方法(例えば、クロマトグラフィーまたは結晶化)によって分離されてもよく、個々の鏡像異性体が上記のように分離されてもよい。本発明は、本発明によって有用な化合物のさまざまなジアステレオ異性体、およびその混合物の使用を含む。本発明によって有用な化合物は、種々の互変異性形態でまたは種々の幾何異性体として存在してもよく、本発明は、本発明によって有用な化合物の各互変異性体および/または幾何異性体、ならびにその混合物の使用を含む。本発明によって有用な化合物は、両性イオンの形態で存在してもよい。本発明は、本発明によって有用な化合物の各両性イオンの形態、およびその混合物の使用を含む。

10

【0171】

キット

EZH2アンタゴニストは、必要なら、EZH2アンタゴニストを含有する1つまたは複数の単位投与量形態を含んでよいキット(例えば、包装または分注装置)中で与えられてもよい。包装は、例えば、プリスタ包装のような、金属箔またはプラスチック箔を含んでもよい。包装または分注装置には投与のための使用説明書が付随していてもよい。適合する薬学的担体中に配合された本発明のEZH2アンタゴニストを含む組成物を、調製し、適切な容器中に配し、適応される状態の処置についてラベル付けしてもよい。使用説明書が提供されてもよい。

20

【0172】

本明細書において同様に提供されるのは、メチル化H3-K27を検出する複数のメチル化検出試薬を含むキットである。例えば、キットはモノメチル化H3-K27、ジメチル化H3-K27およびトリメチル化H3-K27検出試薬を含む。検出試薬は、例えば、抗体もしくはその断片、ポリペプチドまたはアプタマーである。キットは個別の容器中に、特に、アプタマーもしくは抗体、対照配合物(陽性および/もしくは陰性)、ならびに/または検出可能な標識、例えばフルオレセイン、緑色蛍光タンパク質、ローダミン、シアニン色素、アレクサ(Alexa)色素、ルシフェラーゼ、放射性標識を含んでもよい。アッセイを行うための使用説明書(例えば、書面、テープ、VCR、CD-ROMなど)がキット中に含まれてよい。アッセイは、例えば、当技術分野において公知のようにウエスタンブロット分析、免疫組織化学(IHC)、免疫蛍光(IF)、および質量分析(MS)の形態であってよい。

30

【0173】

定義

便宜上、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲内で利用される特定の用語をここに集める。本明細書において定義され使用される、全ての定義は、辞書的定義、参照により組み入れられる文章中の定義、および/または定義される用語の通常の意味に優先する。

40

【0174】

冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」は、この冠詞の文法上の対象の1つをまたは2つ以上を(すなわち、少なくとも1つを)いうように本明細書において用いられる。例として、「1つの要素(an element)」は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

【0175】

「および/または」という語句は、本明細書においておよび特許請求の範囲において用いられる場合、そのように等位接続される要素、すなわち、ある場合には接続的に存在し

50

、他の場合には離接的に存在する要素の「一方または両方」を意味すると理解されるべきである。「および/または」を用いて列挙される複数の要素は、同じように、すなわち、要素の「1つまたは複数」がそのように等位接続されていると解釈されるべきである。具体的に特定される要素に関係しているか関係していないかを問わず、「および/または」節によって具体的に特定される要素以外の、他の要素が任意で存在してもよい。したがって、非限定的な例として、「Aおよび/またはB」への言及は、「含む(comprising)」のような制約がない言語と連結して用いられる場合、1つの態様においては、Aのみ(B以外の要素を任意で含んでもよい)をいうことができ；別の態様においては、Bのみ(A以外の要素を任意で含んでもよい)をいうことができ；さらに別の態様においては、AおよびBの両方(他の要素を任意で含んでもよい)などをいうことができる。

10

【0176】

本明細書においておよび特許請求の範囲において用いられる場合、「または」は、上に定義されたような「および/または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、一覧において項目を分離する場合、「または」または「および/または」は包括的である、すなわち、いくつかの要素または一覧の要素、および、任意で、一覧に載っていないさらなる項目の、少なくとも1つの包含であるが、それらの2つ以上をまた包むと解釈されるものとする。「の1つだけ」もしくは「の厳密に1つ」または特許請求の範囲において用いられる場合、「からなる」のような、それとは反対であることが明確に示された用語だけが、いくつかの要素または一覧の要素の厳密に1つの要素の包含をいう。一般に、本明細書において用いられる「または」という用語は、「どちらか」、「の1つ」、「の1つだけ」または「の厳密に1つ」のような、排他性の用語に先行される場合、排他的な別の可能性(すなわち、「1つまたはその他、しかし両方ではない」)を示唆すると解釈されるにすぎないものとする。「から本質的になる」は、特許請求の範囲において用いられる場合、特許法の分野において用いられるようなその普通の意味を有するものとする。

20

【0177】

本明細書においておよび特許請求の範囲において用いられる場合、「少なくとも1つ」という語句は、1つまたは複数の要素の一覧に関連して、要素の一覧における要素の任意の1つまたは複数から選択されるが、要素の一覧内に具体的に列挙されたありとあらゆる要素の少なくとも1つを必ずしも含む必要はなく、そして要素の一覧中の要素の任意の組み合わせを排除しない、少なくとも1つの要素を意味すると理解されるべきである。この定義はまた、具体的に特定される要素に関係しているか関係していないかを問わず、「少なくとも1つ」という語句が言及する要素の一覧内で具体的に特定される要素以外の要素が、任意で存在してもよいことを可能にする。したがって、非限定的な例として、「AおよびBの少なくとも1つ」(または、同等に、「AまたはBの少なくとも1つ」または、同等に「Aおよび/またはBの少なくとも1つ」)は、1つの態様においては、Bがまったく存在せずに(およびB以外の要素を任意で含んでもよい)、2つ以上を任意で含んでもよい、少なくとも1つのAをいうことができ；別の態様においては、Aがまったく存在せずに(およびA以外の要素を任意で含んでもよい)、2つ以上を任意で含んでもよい、少なくとも1つのBをいうことができ；さらに別の態様においては、2つ以上を任意で含んでもよい、少なくとも1つのA、および2つ以上を任意で含んでもよい(および他の要素を任意で含んでもよい)、少なくとも1つのBなどをいうことができる。

30

40

【0178】

それとは反対であることが明確に示されない限り、2つ以上の段階または行為を含む本明細書において主張される任意の方法において、この方法の段階または行為の順番が、この方法の段階または行為が列挙される順番に必ずしも限定されないことも理解されるべきである。

【0179】

上記の本明細書においてだけでなく、特許請求の範囲において、「含む(comprising)」、「含む(including)」、「保有する(carrying)」、「有する(having)」、「含有する(Containing)」、「伴う(involving)」、「保持する(holding)」、「から構成される(compos

50

ed of)」などのような全ての移行句は、制約がないこと、すなわち、含むが限定されないことを意味するものと理解されるべきである。「からなる(consisting of)」、「から本質的になる(consisting essentially of)」という移行句だけは、United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Section 2111.03に記載されているように、それぞれ、制限されたまたは半ば制限された移行句であるものとする。

【0180】

「共投与」および「共投与する」という用語は、治療剤が患者の体内に同時にある程度、存在する限りは、同時投与(2種類またはそれ以上の治療剤を同時に投与すること)および異なる時間での投与(1種類または複数の治療剤をさらなる治療剤の投与時間とは異なる時間に投与すること)の両方をいう。

10

【0181】

本明細書において用いられる「処置する」という用語は、疾患、障害または状態の少なくとも1つの症状の軽減をいう。この用語は、状態の管理、または状態の治療を提供するという目的のための、対象への、本明細書において記述される1つまたは複数の化合物の投与および/または塗布を包含する。本開示の目的のための「処置」は、治療を提供してもよいが、提供しなければならないわけではなく;むしろ「処置」は状態の管理の形態にあってもよい。本明細書において記述される化合物が、がんを含む、望ましくない増殖性細胞を処置するために用いられる場合、「処置」は、正常細胞に及ぼす破壊的影響は最小限で、望ましくない増殖性細胞の部分的または全面的破壊を含む。細胞レベルでの、がん細胞を含む、望ましくない急速増殖性細胞の処置の所望の機構はアポトーシスである。

20

【0182】

本明細書において用いられる「予防する」という用語は、臨床的に明らかな疾患進行の開始を完全に防ぐこともしくは遅らせること、またはリスクのある個体において前臨床的に明らかな疾患段階の開始を防ぐこともしくは遅らせることのどちらかを含む。これには、疾患を発症するリスクがあるものの予防的処置が含まれる。

【0183】

処置の目的のために本明細書において用いられる「対象」という用語は、障害と診断されている、障害の症状を有する、または障害を発症するリスクがある任意のヒト対象を含む。予防の方法の場合、対象は任意のヒト対象である。予防の目的上、例示するために、対象は、がんのような、望ましくない急速な細胞増殖によって特徴付けられる障害のリスクがある、または障害にかかる遺伝的素因があるヒト対象であってもよい。対象は、発がん物質への暴露、望ましくない急速な細胞増殖によって特徴付けられる障害にかかる遺伝的素因があることなどに起因したリスクがあってもよい。

30

【0184】

特に指定のない限り、組換えおよび合成ポリペプチド、融合タンパク質、抗体またはその抗原結合断片の産生、核酸配列の操作、形質転換細胞の作出などのために標準的な方法を用いることができる。そのような技法は当業者に公知である。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor, N.Y., 2001); F.M. Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York)を参照されたい。

40

【0185】

「EZHZ2ポリペプチド」という用語は、全長ポリペプチドの機能的断片、および実質的に類似のまたは実質的に同一のアミノ酸配列(少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上のアミノ酸配列類似性または同一性)を有する前記のどちらかの機能的等価体を包含し、ここで機能的断片または機能的等価体は天然ポリペプチドの機能的特性の1つまたは複数保持している。

【0186】

「機能的」とは、ポリペプチド(または核酸)が天然ポリペプチド(または核酸)の生物学的特性の1つまたは複数に関して同じまたは実質的に類似の活性、例えば、天然ポリペプチド(または核酸)の少なくとも約50%、75%、85%、90%、95%もしくは98%またはそれ以上の

50

活性を有することを意味する。

【0187】

「調節する」という用語(および文法的な相当語句)は、活性の増加または減少をいう。特定の態様において、「増加させる」または「増強する」という用語(および文法的な相当語句)は、少なくとも約25%、50%、75%、2倍、3倍、5倍、10倍、15倍、20倍またはそれ以上の上昇を意味する。特定の態様において、「減少させる」または「低減する」という用語(および文法的な相当語句)は、少なくとも約25%、40%、50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の縮減を意味する。いくつかの態様において、示される活性、物質または他のパラメータは検出可能ではない。具体的に提供されるのは、EZH2のアンタゴニストである。

10

【0188】

「薬力学的マーカー」という用語は、薬物の投与を受けている患者において測定される薬物反応の分子マーカーをいう。このマーカーは、薬物標的の調節の直接的尺度でなければならず、用量に対する反応の定量的変化を示すことが可能でなければならない。EZH2アンタゴニストに対する潜在的な薬力学的マーカーは、疾患組織または代用組織でのヒストンH3-K27メチル化のレベルでありうる。

【0189】

本明細書において用いられる場合、「反応性」という用語は、「反応性の」、「感受性の」および「感受性」という用語と互換的であり、EZH阻害剤の投与時に治療反応を示す対象、例えば、対象の腫瘍細胞または腫瘍組織がアポトーシスおよび/もしくはネクローシスを起こし、ならびに/または成長、分裂もしくは増殖の低減を示すことを意味する。

20

【0190】

「対照」または「参照基準」という用語は、対象から単離された隣接する非腫瘍組織において検出された、健常対象由来の健常組織において検出された、または当技術分野における標準的な方法で病理学者によって確立されたメチル化レベル(例えば、モノメチル化レベル、ジメチル化レベルまたはトリメチル化レベル)をいう。

【0191】

「サンプル」とは、対象に由来する任意の生体サンプルを意味し、細胞、組織サンプルおよび体液(粘液、血液、血漿、血清、尿、唾液および精液を含むが、これらに限定されない)を含むが、これらに限定されることはない。

30

【実施例】

【0192】

本発明を一般的に記述してきたが、本発明のある特定の局面および態様を例示する目的で単に含まれ、本発明を限定することを意図するものではない、以下の実施例を参照することによって、本発明はさらに容易に理解されよう。

【0193】

実施例1 - 組換え5成分PRC2複合体

バキュロウイルス発現システムを用いスポドプテラ・フルギベルダ(*Spodoptera frugiperda*) (Sf9)細胞において、野生型EZH2 (GenBankアクセッション番号NM_004456)またはTy r641変異体を野生型AEBP2 (GenBankアクセッション番号NM_153207)、EED (GenBankアクセッション番号NM_003797)、SUZ12 (GenBankアクセッション番号NM_015355)およびRbAp48 (GenBankアクセッション番号NM_005610)と共発現させた。EED上のN末端FLAGタグを用いて、細胞溶解物から活性なPRC2複合体を精製した(BPS Bioscience、カタログ番号51004)。最終のPRC2調製物の純度をSDS-PAGEにより、クマシーブルー染色で評価した。

40

【0194】

実施例2 - H3、H4ペプチドパネル

21st Century Biochemicals (Marlboro, MA)により、各15アミノ酸の44種のペプチドからなるライブラリを合成した。このペプチドパネルには、連続的なペプチド配列の間で5残基が重複するようにして、ヒトヒストンH3およびH4のアミノ酸の全てが包含された。各ペプチドのN末端にビオチンを付加し、C末端はアミドとして表した。液体クロマトグラフ

50

イ-質量スペクトル分析によって、純度(>95%)および同一性を確認した。

【0195】

酵素活性のH3-K27メチル化状態依存に関する研究のため、非メチル化、モノメチル化、ジメチル化またはトリメチル化側鎖アミンとしたリジン27を有する残基番号21~44のヒトH3 (H3:21-44)のアミノ酸配列に相当する、ペプチドを合成した。これらのペプチドは、各ペプチドのC末端にビオチンを付加させた状態でNew England Peptide (Gardner, MA)から購入した。

【0196】

実施例3 - 細胞におけるH3-K27メチル化状態の評価

細胞株OCI-LY19 (ACC 528)、KARPAS-422 (ACC 32)およびWSU-DLCL2 (ACC 575)はDSMZから入手した。細胞株DB (CRL-2289)およびSU-DHL2 (CRL-2959)はATCCから入手した。OCI-LY19、WSU-DLCL2およびDB細胞株は、10% FBSを含むRPMI-1640中で増殖させ、KARPAS-422およびSU-DHL2細胞株は、20% FBSを加えたRPMI-1640中で増殖させた。細胞を細胞 $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mLの密度まで増殖させ、細胞 1×10^7 個を264 x gでの遠心分離によって収集し、氷冷PBS中で洗浄し、50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.25% DOC、1% NP-40および1 mM EDTA (Millipore #20-188)に加えて0.1% SDSおよびプロテアーゼ阻害剤錠剤(Roche # 1836153)を含有する10 x ペレット容量のRIPA溶解緩衝液に再懸濁することによって溶解させた。溶解物を、設定3でMisonix XL-2000を用い2ラウンドの101秒のバーストによって超音波処理し、効率的なヒストン抽出を確実にし、卓上遠心分離機を10分間14,000 rpmで用い4 での遠心分離によって清澄化した。タンパク質濃度をBCAアッセイ(Pierce)によって決定した。各溶解物4マイクログラムを4~20%のTris-Glycineゲル(Invitrogen)上で分画し、PVDFに転写し、Odysseyブロッキング緩衝液中の以下の抗体: マウス抗EZH2 (CST 3147; 2000分の1に希釈)、ウサギ抗H3-K27me3 (CST 9733; 10000分の1に希釈)、ウサギ抗H3-K27me2 (CST 9755; 5000分の1に希釈)、ウサギ抗H3-K27me1 (Active Motif 39377; 5000分の1に希釈)、およびマウス抗Total H3 (CST 3638; 20000分の1に希釈)でプローブした。一次Abインキュベーションの後、膜をIRDye 800CWロバ抗マウスIgG (LiCOR #926-32212)またはAlexa Fluor 680ヤギ抗ウサギIgG (Invitrogen #A-21076)二次Abでプローブし、LiCOR Odysseyシステムを用いて画像化した。

【0197】

実施例4 - 酵素学

上記のように、Tyr641での、疾患に関連した変化は、EZH2が触媒するH3-K27のメチル化に関する機能の喪失をもたらすものとこれまでに結論付けられた。しかし、酵素のヘテロ接合性によるH3-K27メチル化の比率の推定的低減は、殊のほか、H3-K27トリメチル化の増大に関わる、EZH2の過剰発現、対応するH3-K27デメチラーゼUTXにおける機能喪失型変異、またはPHF19/PCL3のような、PRC2成分の過剰発現が、どれも、特定のヒトがんにおいて悪性の表現型をもたらすことを示す過去のデータを考慮すると、悪性の表現型の根拠として理論的に説明することが困難であった。Morin et al. (2010) Nat Genet 42: 181-5; Martinez-Garcia et al. (2010) Nat Genet 42:100-1; Bracken et al. (2003) EMBO J 22:5323-35; Kleer et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100: 11606-11; Varambally et al. (2002) Nature 419:624-9; Simon et al. (2008) Mutat Res 647:21-9; van Haften et al. (2009) Nat Genet 41:521-3; Wang et al. (2004) Gene 343:69-78; Cao et al. (2008) Mol Cell Biol 28: 1862-72; およびSarma et al. (2008) Mol Cell Biol 28: 2718-31)。それゆえ、これらの変異の酵素学をさらに詳細に探った。

【0198】

組換えPRC2複合体をWTおよびTyr641変異体型のヒトEZH2で調製した(上記の実施例1; Cao et al. (2004) Mol Cell 15:57-67を参照のこと)。等しい濃度(タンパク質定量に基づき、名目上8 nM)の各複合体を、標識S-アデノシルメチオニン(SAM)からH3-K27周囲のアミノ酸配列(H3:21-44)に相当する非修飾ペプチドへのまたは天然の鳥類赤血球オリゴヌクレオソームへの³H-メチルの転移を触媒する能力について最初に試験した。これまでに報告されているように(Morin et al. (2010) Nat Genet 42: 181-5)、WT酵素はこの非メチル

化ペプチド基質へのメチル転移に対する強い活性を示すこと、しかし、変異酵素のどれも有意なメチルトランスフェラーゼ活性を示さないことが分かった(図1A)。過去に報告されたデータおよび図1Aにおけるデータとは対照的に、変異EZH2構築体の全てが鳥類ヌクレオソーム基質に対して活性なメチルトランスフェラーゼであることが分かった(図1B)。鳥類の天然源から単離されたヌクレオソームは、H3-K27メチル化特異的な抗体でのウエスタンブロッティングによって判断した場合に、さまざまなH3-K27メチル化状態を含む、ヒストン修飾状態の混和物に相当する。

【0199】

ペプチドおよびヌクレオソーム基質に対する変異体PRC2複合体の不一致な活性について可能な説明はいくつかある。1つの可能性は、酵素活性部位の遠位にある基質認識部位(すなわち、エキソサイト)が基質結合および代謝回転の重要な決定因子であり; これらの部位は、小さなペプチド基質では利用できない、ヌクレオソームの相補的認識要素に結合するということである。しかし、大腸菌(*E. coli*)で発現された組換えヒトヒストンH3をWTおよび変異体PRC2複合体の基質として試験した場合、得られた活性パターンはペプチド基質で見られたものと同一であった; つまり、WT酵素はH3基質に対して強いメチルトランスフェラーゼ活性を示し、Y641F変異体はWT複合体の活性の7%を示し、他の全ての変異体はWT複合体の活性の1%以下を呈した。ゆえに、エキソサイト結合が今回の結果の説明となる可能性は低いように見える。ヌクレオソームは、小さなペプチド基質に存在しないであろう潜在的なメチル化部位としてH3-K27を超える多くのリジン残基を提示する。したがって、別の可能性は、Y641の変異がEZH2の基質特異性を変化させて、H3-K27以外のリジン残基のメチル化をもたらすということである。小さなペプチド基質および組換えH3タンパク質基質に対する変異体の活性が極めて一致していることを考慮すると、この可能性は低い。

【0200】

本結果とこれまでに報告された結果との明らかな不一致は、WTおよび変異体PRC2複合体の酵素活性を、ヒストンH3およびヒストンH4の可能な全てのリジン(K)残基に相当するペプチド基質のパネルに対して試験した場合に解決された(上記の実施例2を参照のこと)。酵素形態の全てが、残基H3-K27の等価体を含んだペプチドに対してのみ有意な活性を示した。しかしながら、変異体の特異的活性は、やはり、過去に報告された所見と一致して、WT >> Y641F > Y641S ~ Y641H > Y641Nの順にWTと比べて大いに低減された。

【0201】

実施例5 - 酵素学

これらの変異体の酵素活性をさらに理解するために、およびペプチド基質に対する活性とヌクレオソーム基質に対する活性との明らかな矛盾に折り合いをつけるために、H3:21-44ペプチドに関連してさまざまなH3-K27メチル化状態のメチル化をさらに触媒する酵素形態の能力について調べた。上記のように、変異酵素の全てがWT酵素と比べて、非修飾H3-K27ペプチドメチル化の不十分な触媒であることが分かった。しかしながら、顕著には、変異酵素の全てが、モノメチル化H3-K27ペプチド、およびとりわけジメチル化H3-K27ペプチドのさらなるメチル化の触媒においてはWT酵素よりも優れていることが分かった(図2)。したがって、このデータから、WT酵素が、非メチル化からモノメチル化の反応の触媒では最も効率的であることが示唆される。変異酵素はこの初期段階の触媒において欠陥があるものの、モノメチルH3-K27からジメチルH3-K27およびトリメチルH3-K27に至る後続の段階の触媒においてはWT酵素よりも効率的である。

【0202】

WTおよび変異EZH2の示差的な基質特異性の由来を、定常状態酵素反応速度を通じて探した。表1にまとめられているように、変異は、ヌクレオソームに対する K_m の、およびペプチド基質に対する $K_{1/2}$ の類似値によって示される通り、基底状態の基質認識にわずかな影響を与える。いかなる場合でも、ペプチド基質はS字状の結合挙動を示した; ゆえに半最大速度をもたらすペプチド濃度を、より一般的なミカエリス定数 K_m の代わりに $K_{1/2}$ としてここに報告する。Copeland (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discover

10

20

30

40

50

y: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists, Wiley。SAMの K_m は同様に、 208 ± 50 から 304 ± 64 nMに及び、酵素形態の間で最小のパラッキを示した。代わりに、基質利用の差異は、さまざまな基質に対する酵素間の k_{cat} 値の差異によって示される通り、遷移状態認識に端を発するよう見える(表1)。結果として、 k_{cat}/K (ここで K は基質同一性に依り、 K_m または $K_{1/2}$ のどちらかである; 上記参照)比として定量化した触媒効率、異なるH3-K27メチル化状態についてWT酵素と変異酵素との間で異なる(表1)。

【0203】

(表1) EZH2の野生型またはY641変異体を含むPRC2によって触媒されるメチル化反応に対する定常状態反応速度パラメータ

酵素	基質 H3-K27の メチル化 状態	K (nM)	k_{cat} ($h^{-1} \times 10^{-2}$)	k_{cat}/K ($h^{-1} \cdot nM^{-1} \times 10^{-4}$)
WT	0	184 ± 10	84.0 ± 3.0	45.7 ± 3.0
	1	436 ± 42	65.4 ± 5.8	15.0 ± 2.0
	2	178 ± 16	6.0 ± 0.3	3.4 ± 0.3
	ヌクレオソーム	141 ± 31	42.6 ± 2.6	30.2 ± 6.9
Y641F	0	240 ± 19	4.8 ± 0.3	2.0 ± 0.2
	1	404 ± 124	15.0 ± 4.3	3.7 ± 1.6
	2	191 ± 10	84.0 ± 2.8	44.0 ± 2.7
	ヌクレオソーム	176 ± 19	65.4 ± 2.0	37.2 ± 4.2
Y641H	0	- ^a	-	-
	1	319 ± 57	28.2 ± 3.7	8.8 ± 2.0
	2	148 ± 9	22.8 ± 0.9	15.4 ± 1.1
	ヌクレオソーム	140 ± 22	23.4 ± 1.0	16.7 ± 2.7
Y641N	0	-	-	-
	1	280 ± 11	23.4 ± 0.8	8.4 ± 0.4
	2	157 ± 11	96.0 ± 4.0	61.1 ± 5.0
	ヌクレオソーム	191 ± 34	23.4 ± 1.3	12.3 ± 2.3
Y641S	0	-	-	-
	1	249 ± 8	27.6 ± 0.8	11.1 ± 0.5
	2	136 ± 8	59.4 ± 2.0	43.7 ± 3.0
	ヌクレオソーム	137 ± 28	23.4 ± 1.4	17.1 ± 3.6

^a活性が低すぎて測定できない。

【0204】

実施例6 - 酵素学

表1に記載されている定常状態反応速度パラメータにより、WT酵素についてホモ接合性の細胞と比べて、さまざまな変異EZH2の形態についてヘテロ接合性の細胞に対して種々のH3-K27メチル化状態の予想レベルを算出することが可能になった。これらの模擬実験を実施するため、(1) 定常状態酵素反応速度が細胞の状況においてPRC2により触媒されるH3-K27メチル化と関連しているという、および全ての測定が細胞増殖における同じ時点で行われるという; (2) 変異酵素およびWT酵素がヘテロ接合性細胞において等しいレベルで発現されるという、ならびに総EZH2レベルが全ての細胞において等しいという; (3) SAMの細胞濃度は、その K_m と比べて、飽和しており、細胞の間で変化しないという; (4) ヌクレオソームの細胞濃度は、その K_m と類似しており、同様に、細胞の間で変化しないという; (5) EZH1により触媒されるH3-K27のメチル化は重要ではなく、細胞の間で一定であったという; ならびに(6) いずれのH3-K27デメチラーゼ活性も細胞の間で一定であったという、いくつかの簡素化した仮定を立てた。

【0205】

10

20

30

40

50

適切にこのような仮定をすることで、図3Aに示されている予測をH3-K27me3（上パネル）、H3-K27me2（中パネル）およびH3-K27me1（下パネル）の相対レベルについて得た。これらの模擬実験から明らかなパターンが浮かび上がる。H3-K27me3のレベルは、変異体を持っている全ての細胞についてWT細胞と比べて増加し、Y641H変異体の場合30%の増加からY641N変異体の場合 > 400%に及ぶ。同時に、H3-K27me2のレベルは変異体の全てについてWTの < 50%まで減少し、H3-K27me1のレベルはWTと比べて、全ての変異体についておよそ半分に低減されている。

【0206】

WT EZH2についてホモ接合性であることが知られているB細胞性リンパ腫細胞株(OCI-LY19)またはEZH2 Y641Nについてヘテロ接合性であることが知られているB細胞性リンパ腫細胞株(DB、KARPAS 422およびSU-DHL-6)もしくはEZH2 Y641Fについてヘテロ接合性であることが知られているB細胞性リンパ腫細胞株(WSU-DLCL2)におけるH3-K27メチル化状態の相対レベルを次に、ウエスタンブロッティングによって測定した(図3B)。図3bにおいて見られる相対的なH3-K27メチル化状態のパターンは、模擬実験において用いた仮定および基質としての非生理的ペプチド代用物の使用にもかかわらず、インビトロでの定常状態反応速度パラメータに基づく模擬実験の結果と極めてよく一致している。

10

【0207】

このように、H3-K27me3の増加がWTと比べてY641変異体を持っている全ての細胞で認められ、H3-K27me2の減少がWTと比べてY641変異体を持っている全ての細胞で認められ、かつH3-K27me1の減少が4種の変異体細胞株のうちの少なくとも2種で認められた。WTならびにKARPAS 422およびSU-DHL-6細胞におけるH3-K27me1のほぼ同等のレベルは、WTおよび変異EZH2の異なる発現レベル、EZH1の異なる寄与、または模擬実験では説明されない他の要因を反映している可能性がある。とは言っても、H3-K27メチル化状態の予測パターンと実験パターンとの一致は注目に値し、WTと変異EZH2との間の酵素的連関がH3-K27me3の増加をもたらし、かくして、これらの変異体についてヘテロ接合性である細胞の悪性の表現型を引き起こすという考えを裏付けている。

20

【0208】

実施例7 - PRC2メチルトランスフェラーゼ活性のインビトロアッセイ

ペプチド基質を用いたフラッシュプレート・アッセイ

EZH2のWTおよびY641変異体の初期比較のため、800 nMの濃度で非メチル化K27 (New England Peptide)、モノメチル化K27 (Millipore)またはジメチル化K27 (Millipore)を含有するピオチン化ヒストンH3:21-44ペプチドを1,700 nMのS-アデノシルメチオニン-CI (SAM)および300 nMのトリチウム化SAM (Perkin Elmer)の混合物と混ぜ合わせた。この基質の組み合わせを次いで、アッセイ緩衝液(20 mM BICINE、1 mM DTT、0.002% Tween 20、0.005%ウシ皮膚ゼラチン(BSG)、pH 7.6)中のPRC2に加えた。反応を表示の時間間隔の間、進行させ、その後、過剰の非放射性SAM (600 μ Mの終濃度)の添加により反応停止した。反応停止された反応混合物をストレプトアビジンでコーティングされたフラッシュプレート(Perkin Elmer、カタログ番号SMP410)に移し、1時間結合させ、その後、TopCount NXT HTSシンチレーションおよび発光カウンタ(Perkin Elmer)にて検出した。各時点は6回の個別反応の平均を表した。ペプチドまたはSAMの濃度は変化させ、一方で他の基質は飽和条件としたことを除き、同一の反応条件の下で定常状態反応速度パラメータを決定した。速度をさまざまな基質濃度の関数としてプロットし、データを未変形ミカエリス・メンテン式または未変形S状反応速度式にあてはめて、 K および k_{cat} の値を算出した。あてはめたパラメータの標準誤差が表1に記載されており、これを用いて、図2パネルBおよびCに示したエラーバーを作図した。 k_{cat}/K に関連した誤差(表1)を標準的な誤差伝播法にしたがって算出した; k_{cat}/K の相対誤差(fractional error)は

30

40

$$\mu \frac{k_{cat}}{K} = \sqrt{\left(\frac{\mu k_{cat}}{k_{cat}}\right)^2 + \left(\frac{\mu K}{K}\right)^2} \quad (1)$$

として決定したが、ここで μk_{cat} は k_{cat} の標準誤差であり、 μK は K の標準誤差である。

【0209】

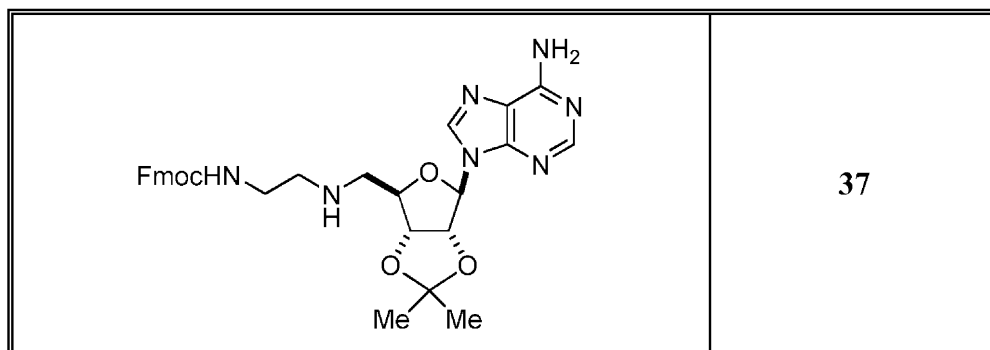
オリゴヌクレオソームを用いたフィルタプレート・アッセイ

ニワトリ赤血球オリゴヌクレオソームを既述のように精製した。Fang et al. (2004) *M* 10
ethods Enzymol 377:213-26。ヌクレオソームをSAMおよびトリチウム化SAMの混合物と混
 ぜ合わせ、アッセイ緩衝液(20 mM BICINE、100 mM KCl、1 mM DTT、0.002% Tween 20、0.
 005% BSG, pH 7.6)中のPRC2に加えた。上記のように反応を行い、反応停止した。反応停
 止された反応混合物をガラス繊維フィルタプレート(Millipore、カタログ番号MSFBN6B)に
 移し、10%トリクロル酢酸で3回洗浄し、乾燥させた。Microscint Zero (30 μ L)を加え、
 トリチウムの取り込みをTopCountシンチレーションおよび発光カウンタにて検出した。ヌ
 クレオソームまたはSAMの濃度は変化させ、一方で他の基質は飽和条件としたことを除き
 、同一の反応条件の下で定常状態パラメータを決定した。速度をさまざまな基質濃度の関
 数としてプロットし、これを未変形ミカエリス・メンテン式にあてはめて、上記のように
 K_m および k_{cat} の値を導き出した。 20

【0210】

実施例8 - 化合物75の調製

A. 化合物37の調製

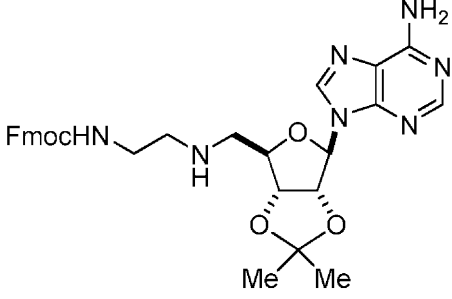
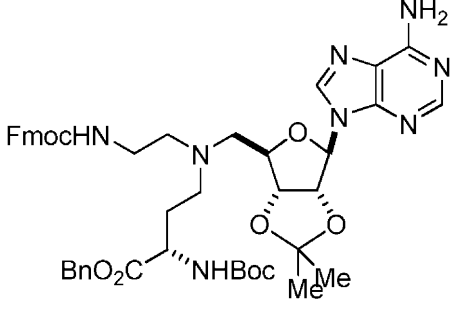


30

9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(アミノメチル)-2,2-ジメチルテトラヒドロフロ[3,4-d][1,3]ジ
 オキソール-4-イル)-9H-プリン-6-アミン(Townsend, A. P. et al. (2009) *Org. Let.* 11
 :2976-2979) (3.05 g, 9.96 mmol)のDCE (250 mL)溶液に、カルバミン酸(9H-フルオレン
 -9-イル)メチル(2-オキソエチル) (2.8 g, 9.96 mmol)およびNaB(OAc)₃H (2.96 g, 13.95
 mmol)を加え、混合物を室温で4時間攪拌した。K₂CO₃溶液を8~9のpHまで加えた。DCMを
 加え、有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濃縮し、SGC (DCM : MeOH = 30 : 1)により精製して
 、37 (2.9 g, 収率: 50.9%)を得た。 40

【0211】

B. 化合物65の調製

	37
	65

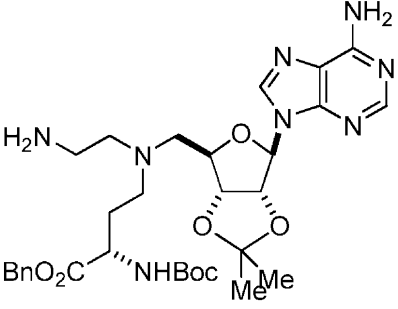
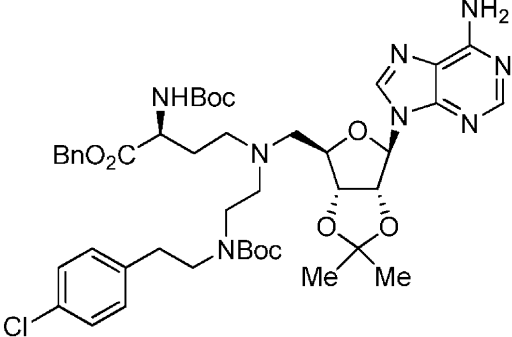
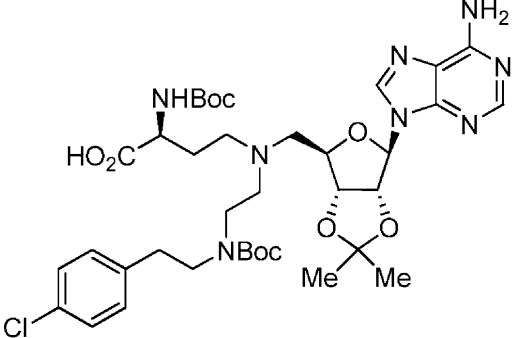
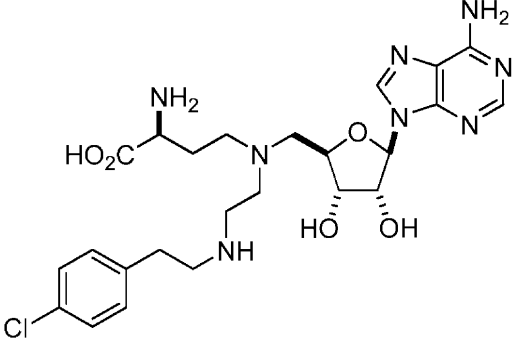
10

37 (2.9 g, 5.08 mmol) の DCE (250 mL) 溶液に、2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-4-オキソブタン酸(S)-ベンジル(1.56 g, 5.08 mmol) および NaB(OAc)₃H (1.51 g, 7.11 mmol) を加え、混合物を室温で4時間攪拌した。K₂CO₃ 溶液を8~9のpHまで加えた。DCMを加え、有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濃縮し、SGC (DCM : MeOH = 100 : 1)で精製して、65 (2.8 g, 収率: 63.9%)を得た。

20

【 0 2 1 2 】

C. 化合物75の調製

	72	10
	73	20
	74	30
	75	40

段階1.

65B (2.2 g, 2.55 mmol)のDCM (10 mL)溶液に、 Et_2NH (1.1 g, 15.3 mmol)を加え、混合物を室温で4時間攪拌した。混合物を濃縮して粗製物72 (2.2 g)を得た。

【0213】

段階2.

72 (167 mg, 0.26 mmol)のMeOH (4 mL)攪拌溶液に、2-(4-クロロフェニル)アセトアルデヒド (40 mg, 0.26 mmol)を加え、20分間室温で攪拌した。その後、 $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$ (83 mg, 0.39 mmol)およびHOAc (0.4 mL)を加え、終夜攪拌した。その後、 NaHCO_3 (aq)を加え、DCM (25 mL \times 3)で抽出し、塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濃縮した。粗生成物を分取TLC (DCM / MeOH = 10: 1)により精製して、73 (30 mg, 収率: 14%)を白色の粉末として得

た。LC/MS (m/z): 779.7 [M+1]⁺。

【 0 2 1 4 】

段階3.

73 (30 mg, 0.038 mmol) および10% Pd/C (15 mg) のMeOH (2 mL) 混合物を終夜H₂下、室温で撹拌した。混合物をろ過し、ろ液を濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を分取TLC (DCM / MeOH = 8: 1) により精製して、74 (20 mg, 収率: 69%) を白色の粉末として得た。LC /MS (m/z): 689.7 [M+1]⁺。

【 0 2 1 5 】

段階4.

74 (20 mg, 0.028 mmol) の90% TFA (1 mL) 溶液を1時間室温で撹拌し、固形物として濃縮し、TFAを除去して、化合物75 (TFA塩) を精製なしに無色の油状物として得た。LC/MS (m/z): 549.7 [M+1]⁺。

【 0 2 1 6 】

実施例9 - SAHによるEZH2野生型およびY641変異体の阻害

S-アデノシル-L-ホモシステイン(SAH)を10点についてDMSO中で連続的に3倍希釈し、1 μLを384ウェルマイクロタイタープレートに配した。陽性対照(100%阻害の標準物質)は終濃度100 μMのSAHとし、陰性対照(0%阻害の標準物質)にはDMSO 1 μLを含めた。SAHを次いで、pH 7.6のアッセイ緩衝液(20 mM BICINE、100 mM KCl、1 mM DTT、0.002% Tween 20、0.005% BSG)中8 nMのEZH2野生型および変異体40 μL/ウェルとともに30分間インキュベートした。pH 7.6のアッセイ緩衝液中150 nMのS-アデノシルメチオニン-Cl (SAM)および100 nMのトリチウム化SAMおよび150 nMのビオチン化オリゴヌクレオソームを含めた基質混合物を、10 μL/ウェルで加えた。反応停止された酵素反応液をストレプトアビジンでコーティングされたフラッシュプレート(Perkin Elmer、カタログ番号SMP410)に移し、1時間結合させ、TopCount NXT HTS (Perkin Elmer)にて検出した。

【 0 2 1 7 】

結果を図7に示す。IC₅₀値を表2に示す。

【 0 2 1 8 】

(表2) SAHによるWT EZH2およびEZH2のY641変異体の阻害

	WT	Y641H	Y641S	Y641N	Y641F
IC ₅₀ , μM	0.467	0.263	0.283	0.380	4.80

【 0 2 1 9 】

実施例10 - 化合物75によるEZH2野生型およびY641変異体の阻害

化合物75を10点についてDMSO中で連続的に3倍希釈し、1 μLを384ウェルマイクロタイタープレートに配した。陽性対照(100%阻害の標準物質)は終濃度100 μMのSAHとし、陰性対照(0%阻害の標準物質)にはDMSO 1 μLを含めた。化合物75を次いで、pH 7.6のアッセイ緩衝液(20 mM BICINE、100 mM KCl、1 mM DTT、0.002% Tween 20、0.005% BSG)中8 nMのEZH2野生型および変異体40 μL/ウェルとともに30分間インキュベートした。pH 7.6のアッセイ緩衝液中150 nMのS-アデノシルメチオニン-Cl (SAM)および100 nMのトリチウム化SAMおよび150 nMのビオチン化オリゴヌクレオソームを含めた基質混合物を、10 μL/ウェルで加えた。反応停止された酵素反応液をストレプトアビジンでコーティングされたフラッシュプレート(Perkin Elmer、カタログ番号SMP410)に移し、1時間結合させ、TopCount NXT HTS (Perkin Elmer)にて検出した。

【 0 2 2 0 】

結果を図8に示す。IC₅₀値を表3に示す。

【 0 2 2 1 】

(表3) 化合物75によるWT EZH2およびEZH2のY641変異体の阻害

	WT	Y641S	Y641N	Y641F	Y641H
IC50, μM	8.95	2.50	4.10	7.18	7.56

【 0 2 2 2 】

実施例11 - H3-K27me2/me3比はEZH2阻害剤に対する感受性を予測する

EZH2 (Y641)変異についてヘテロ接合性の腫瘍細胞株は、H3-K27me3のレベルの増加を示し、H3-K27のメチル化状態が腫瘍形成には重要であるものと考えられた。EZH2についてWTであった、またはEZH2 (Y641)変異についてヘテロ接合性であった細胞株のパネルにおけるH3-K27のモノメチル化(H3-K27me1)、ジメチル化(H3-K27me2)またはトリメチル化(H3-K27me3)形態のレベルを評価した。用いた細胞株は表4に記載されている。細胞株の大半はB細胞性リンパ腫系列であるが、しかし2種の黒色腫系列も含めた。IGR1は、EZH2におけるY641N変異を含むことが最近になって分かった黒色腫系列であり、A375細胞はWT EZH2の黒色腫対照系列として含めた。図9AおよびBは、H3-K27me1、H3-K27me2またはH3-K27me3を認識する抗体で、この細胞株パネルから単離されたヒストンをプローブしたウエスタンブロット分析の結果を示す。概して、WT EZH2を排他的に発現している細胞株でよりもY641変異体を含んだ細胞株で全体的なH3-K27me3レベルは高い。2つの例外はFarage細胞およびPfeiffer細胞であり、この場合にH3-K27me3レベルはWT系列におけるものと類似していた。より顕著なのは、野生型細胞株と比べてEZH2 Y641変異体細胞株におけるH3-K27me2の劇的に低いレベルである。Y641変異体細胞株から抽出されたヒストンのウエスタンブロットにおいてH3-K27me2シグナルは、ほとんどまたは全く認められなかったが、WT細胞株において同じ抗体で認められたシグナルは、H3-K27me3に特異的な抗体で認められたシグナルよりも強かった。全体としては、WT細胞株において、HK27me2抗体でのウエスタンブロット・シグナルはH3-K27me3抗体で認められたシグナルよりも高かったが、Y641変異体細胞株では逆のことが当てはまった。このように、Y641系列におけるH3-K27me3/me2シグナルの比率は、WT系列で認められたものよりも高い。これに対する1つの例外はPfeiffer細胞株であり、この細胞株はY641 EZH2変異を含まないが、しかし高いH3-K27me3シグナルを持ち、H3-K27me2シグナルをほとんどまたは全く持たない。Pfeiffer細胞は、それゆえ、Y641変異体細胞株と類似のH3-K27me3/me2比を有する。

【 0 2 2 3 】

H3-K27メチル化状態を質量分析(MS)法、つまり抗体試薬に依らない独立した方法によって調べることもできる。MS分析から、H3-K27me3レベルは他のWT系列でよりもPfeiffer系列およびY641変異体系列で高いが、H3-K27me2レベルについてはこの逆が当てはまることが実証された。Y641変異体系列およびPfeiffer系列において、H3-K27me3レベルはH3-K27me2レベルよりも高かったが、他のWT系列では逆のことが当てはまった。これらの結果は、図9AおよびBにおけるウエスタンブロット分析により認められたものと一致する。

【 0 2 2 4 】

H3-K27メチル化状態の差異は、H3-K27me2またはH3-K27me3に対する抗体を用いた免疫細胞化学によっても検出された。この免疫細胞化学アッセイは、ホルマリン固定されパラフィン包埋された患者腫瘍組織サンプルにおけるY641変異EZH2と関連する異常なH3-K27me2/3比を検出するために用いられる。5種のWTおよび5種のY641変異体リンパ腫細胞株ペレットのパネルを固定し、パラフィンブロックに包埋し、抗H3-K27me2抗体または抗H3-K27me3抗体で染色した。全ての細胞が核ヒストンH3を含有するはずなので、ヒストンH3に対する抗体を陽性対照として含めた。図10は、H3-K27me3およびH3の両染色に対して細胞の100%で、全ての細胞株が陽性であったことを示す。これらの条件の下で、H3-K27me3染色強度の明らかな差異は、WT細胞株とY641変異体細胞株との間で認められなかった。これは、他の検出法と比べて、発色性の免疫細胞化学染色のダイナミックレンジが限定されていることを反映している可能性がある。しかしながら、図11に示されるように、細胞株は、H3-K27me2に対して陽性または陰性に染まるものに明らかに分けることができた。Pfeiffer細胞を除いて、全てのWT細胞株がH3-K27me2について陽性に染色されたのに対し、全てのY641

1変異体細胞株およびPfeiffer細胞がH3-K27me2抗体による染色を示さなかった。これらの結果は、ウエスタン分析およびMS分析によって得られた結果と一致している。

【0225】

理論によって束縛されることを望むわけではないが、機能獲得型EZH2 (Y641)変異と関連するH3-K27me3レベルの増加は、EZH2変異を持つ細胞を、小分子EZH2阻害剤に対していっそう感受性にしうる。EZH2 Y641変異なしのPfeiffer細胞において認められたH3-K27me3レベルの増加および/またはH3-K27me2レベルの減少がまた、EZH2阻害剤に対する感受性と関連しているかどうか評価するために、それぞれ85 nMおよび16 nMのIC50を有し、生化学的アッセイにおいてEZH2の強力な阻害を示す2種の化合物を試験した。どちらかの化合物でのWSU-DLCL2細胞の処理によって、全体的なH3-K27me3レベルの阻害につながり、細胞に侵入し、細胞のEZH2メチルトランスフェラーゼ活性を阻害するその能力が確認された(図12)。

10

【0226】

各化合物に対するWTおよびY641変異体細胞株のパネルの感受性を増殖アッセイにおいて評価した。EZH2阻害剤の抗増殖活性は顕在化するのに数日かかるので、11日間の増殖アッセイにおいて化合物を評価した。図13は、試験化合物で処理されたWT (OCI-LY19)、またはY641変異体(WSU-DLCL2)細胞株に対する代表的な増殖曲線を示す。両化合物は抗増殖活性を、WSU-DLCL2細胞に対して示したが、しかしOCI-LY19細胞に対してはほとんど示さなかった。阻害剤Aは阻害剤BよりもWSU-DLCL2増殖の、より強力な阻害剤であったが、これは、阻害剤Aが生化学的アッセイにおいて、より強力なEZH2阻害剤であることと一致している。増殖アッセイを阻害剤Bで、WTおよびY641変異体リンパ腫細胞株のパネルにて行い、11日目のIC90値を導出した。図14Aは、EZH2 Y641状態によって分類されたリンパ腫細胞株のIC90値を示す。全体としては、Y641変異体細胞株はWT細胞株と比べてEZH2阻害剤に対し感受性の増加を示したが、RLおよびSUDHL4細胞は他の変異体系列よりも感受性が顕著に低かった。Pfeiffer細胞はWTであるため、例外であるが、しかし両化合物の抗増殖効果に対し極めて感受性であり、低ナノモルまたはナノモル以下の範囲のIC90を有する。Pfeiffer細胞は高いH3-K27me3レベルおよび低いH3-K27me2レベルを示し、そのため、高いH3-K27me3および低いH3-K27me2にしたがって細胞株を分類することにより、図14Bで阻害剤Bに対して示されるようにEZH2阻害剤の感受性に関するさらに良好な識別が得られる。このように、高いH3-K27me3レベルおよび低いH3-K27me2レベルを用いて、変異状態に関する認識とは独立的に、EZH2阻害剤に対する感受性を予測することができる。Pfeiffer細胞において認められた異常なメチル化比は、EZH2活性に対する依存性をもたらす別の機構によって起こる。

20

30

【0227】

これらの結果は、患者腫瘍においてEZH2 Y641変異を特定すること、および/または患者においてウエスタンブロット、MSもしくはIHCのような技法を使ってH3-K27me3と比べH3-K27me2のレベルの低さを検出することを用いて、どの患者がEZH2阻害剤での処置に反応するかを特定できることを実証している。

【0228】

(表4)本研究において用いた細胞株

40

がん	EZH2 状態	細胞株
リンパ腫： DLBCL（びまん性大細胞型 B細胞性リンパ腫）および他の B細胞性リンパ腫	野生型	OCI-LY19
		HT
		MC116
		BC-1
		BC-3
		Pfeiffer
		Toledo
		DOHH-2
		Farage
		SR
		NU-DHL-1
		NU-DUL-1
	Y641 変異	SU-DHL-10 (Y641F)
		DB (Y641N)
		KARPAS 422 (Y641N)
		SU-DHL-6 (Y641N)
		WSU-DLCL-2 (Y641F)
		RL (Y641N)
	SU-DHL-4 (Y641S)	
黒色腫	野生型	A375
	Y641 変異	IGR-1 (Y641N)

10

20

【 0 2 2 9 】

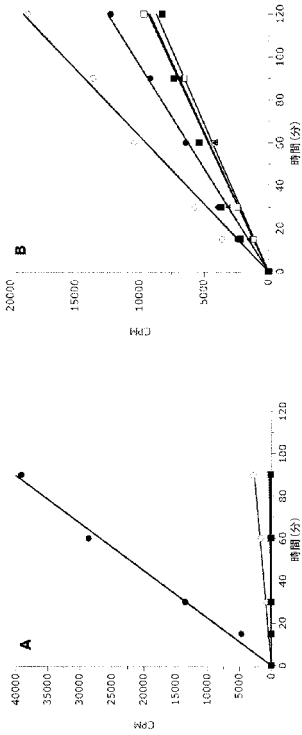
均等物

本発明のいくつかの態様を本明細書において記述し、例示してきたが、当業者は、機能を果たすための、ならびに/あるいは本明細書において記述される結果および/または利点の1つもしくは複数を得るための種々の他の手段および/または構造を容易に想定するものと考えられ、そのような変形および/または修正のそれぞれが本発明の範囲内にあると見なされる。より一般的には、当業者は、本明細書において記述される全てのパラメータ、寸法、材料および構成が例示的であると意図されること、ならびに実際のパラメータ、寸法、材料および/または構成は、本発明の教示が用いられる具体的な用途に依存することを容易に理解するであろう。当業者は、通常の実験を用いるだけで、本明細書において記述される本発明の具体的な態様の多くの均等物を認識するか、または均等物を確認することができるであろう。それゆえ、前述の態様は例として提示されているにすぎないこと、ならびに添付の特許請求の範囲およびそれらの均等物の範囲内で、本発明は、具体的に記述され、主張されるようなもの以外の別のやり方で実践されてもよいことが理解されるべきである。本発明は、本明細書において記述される各個々の特徴、システム、物品、材料、キットおよび/または方法に関する。さらに、2つまたはそれ以上のそのような特徴、システム、物品、材料、キットおよび/または方法の任意の組み合わせは、そのような特徴、システム、物品、材料、キットおよび/または方法が相互に矛盾していないなら、本発明の範囲内に含まれる。

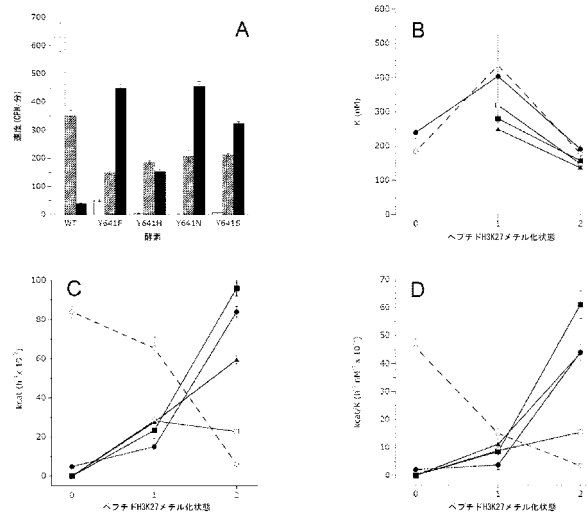
30

40

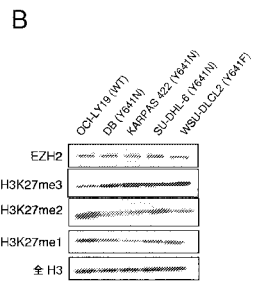
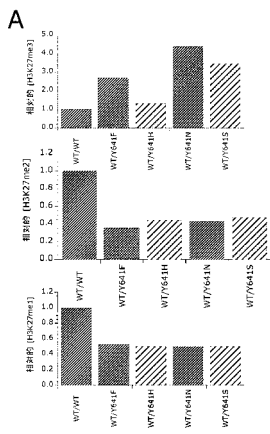
【図1】



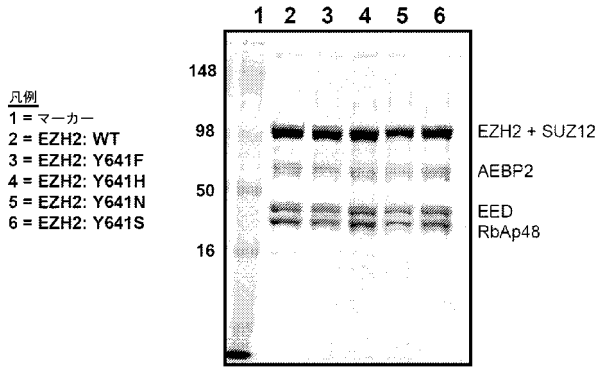
【図2】



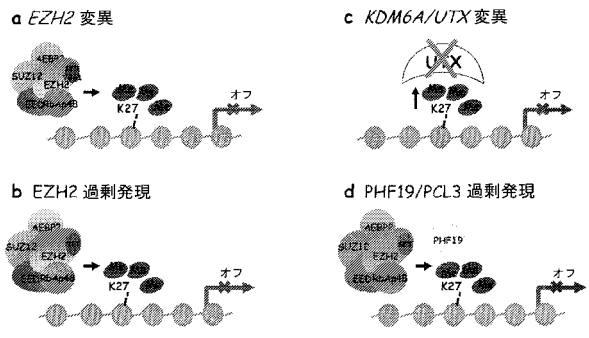
【図3】



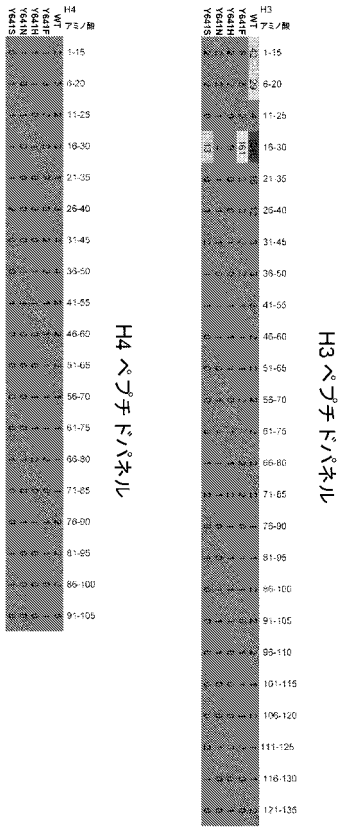
【図5】



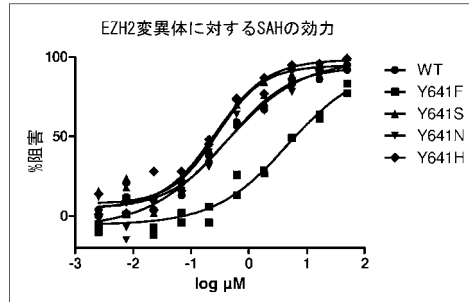
【図4】



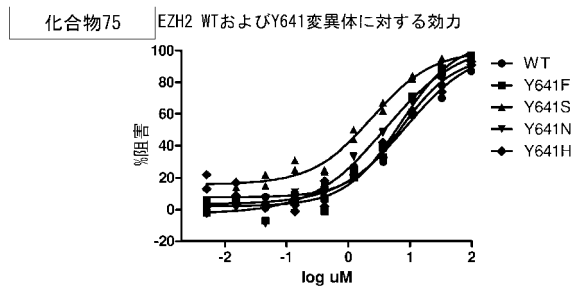
【 図 6 】



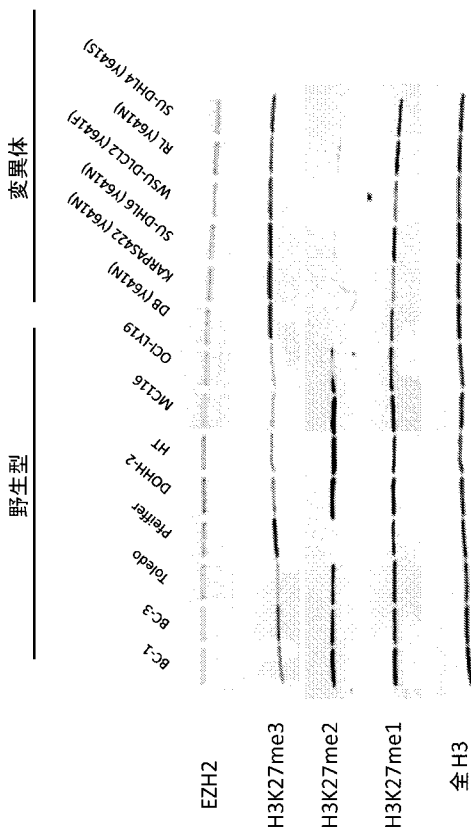
【 図 7 】



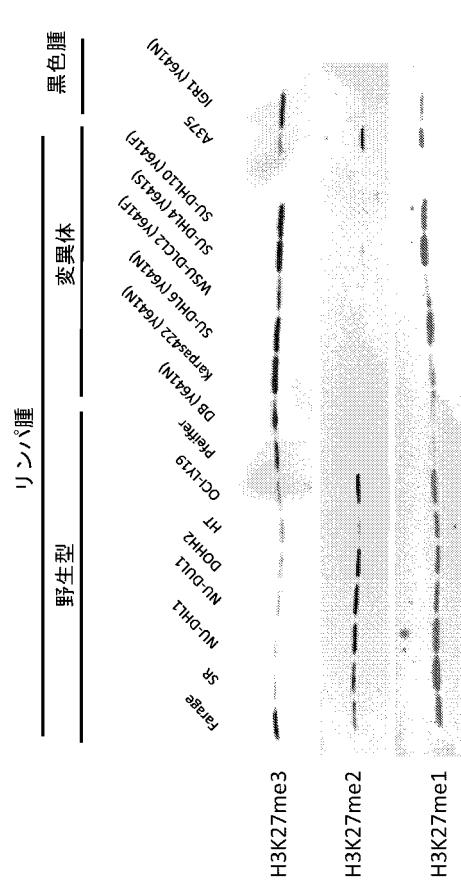
【 図 8 】



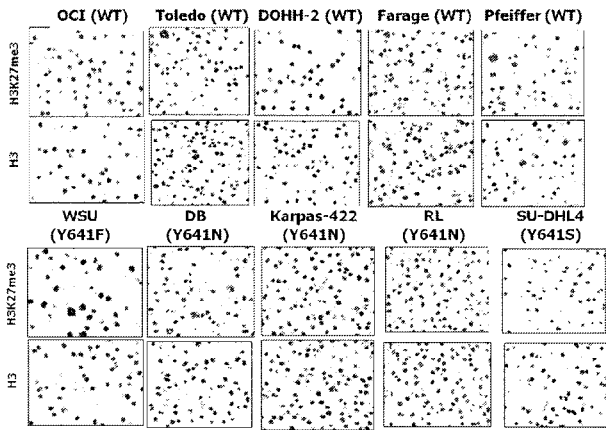
【 図 9 A 】



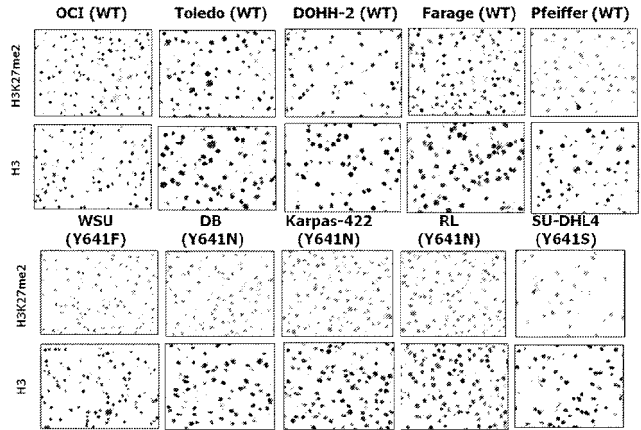
【 図 9 B 】



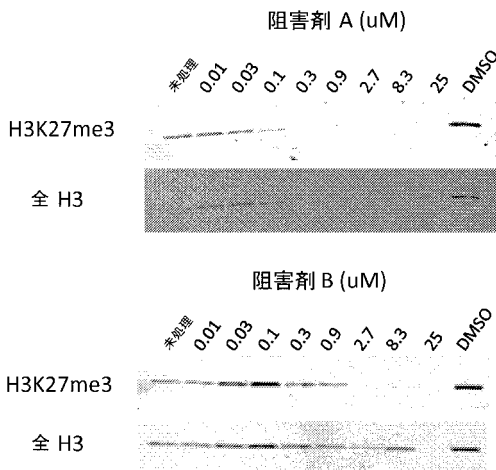
【 図 1 0 】



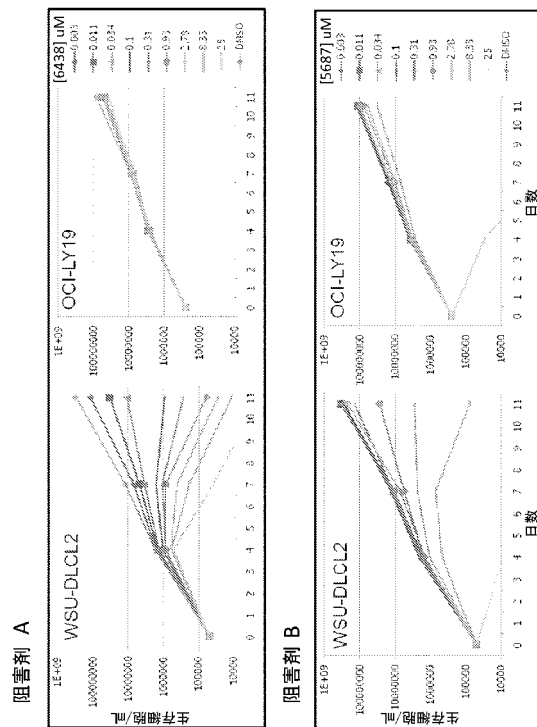
【 図 1 1 】



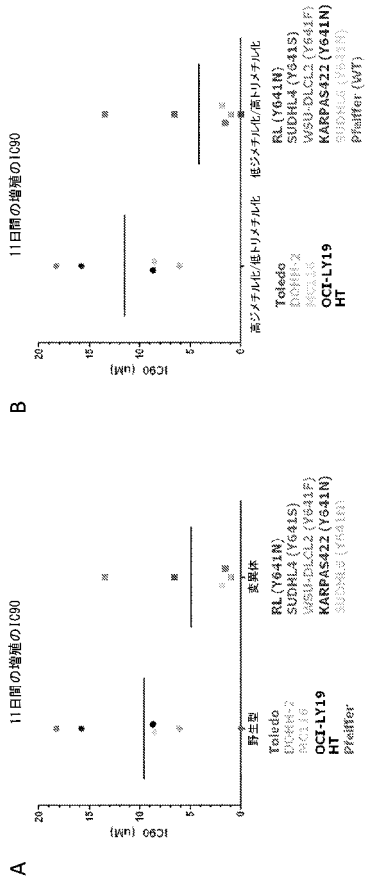
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 手続 補正書 】

【 提出日 】 平成25年5月9日 (2013.5.9)

【 手続 補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表



【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

201354311400001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2011/051258
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, C07D 473/34(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</i>		
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 33/50; C12N 5/00; A01K 67/00; C12N 5/06; A61K 31/7105; A61K 31/35; A61K 48/00; C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: cancer, dimethylation level, H3-K27, Y641, EZH2, mutant, and inhibitor		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0222741 A1 (CHINNAIYAN, ARUL M.) 11 September 2008 See abstract; paras. 9-16; claims 6-8,16,21-22.	13,21-27,30
A	MIRANDA, TINA B. et al., `DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation.` Mol Cancer Ther. published OnlineFirst 09 June 2009, Vol. 8, No. 6, pages 1579-1588 See abstract; page 1579, col. 2, para. 5 - page 1587, col. 1, para. 4.	13,21-27,30
A	US 2005-0266473 A1 (ZHANG, YI et al.) 01 December 2005 See abstract; paras. 10-15,60,72; claims 1,38,41.	13,21-27,30
A	US 2009-0012031 A1 (CHINNAIYAN, ARUL M. et al.) 08 January 2009 See abstract; paras. 9-11,75,103-104,115; claims 1-6.	13,21-27,30
A	WO 2009-124137 A2 (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF NEW YORK UNIVERSITY) 08 October 2009 See abstract; page 743, col. 2, para. 2 - page 747, col. 1, para. 2.	13,21-27,30
<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 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 17 APRIL 2012 (17.04.2012)		Date of mailing of the international search report 18 APRIL 2012 (18.04.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer BYUN, SUNG CHEAL Telephone No. 82-42-481-8262 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/051258

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	<p>YAP, DAMIAN B. et al., `Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3-K27 trimethylation.` Blood. Prepublished online 29 December 2010, Vol. 117, No. 8, pages 2451-2459.</p> <p>See abstract: page 2452, col. 1, para. 1 - page 2454, col. 2, para. 2.</p>	13,21-27,30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/051258

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

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

1. Claims Nos.: 1-12,14-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-12 and 14-20 pertain to methods or diagnostic methods for treatment of human body by surgery or therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search under Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv) PCT.
2. Claims Nos.: 29
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The claim refers to a multiple dependent claim that refers to other multiple dependent claims. Therefore, the meaning of the technical feature to which they refer is vague and unclear.
3. Claims Nos.: 16-17,20,28
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/051258

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008-0222741 A1	11.09.2008	AU 2002-355852 B2	18.01.2007
		AU 2002-355852 C1	18.01.2007
		CA 2456184 A1	13.02.2003
		EP 1511855 A2	09.03.2005
		EP 1511855 A4	15.02.2006
		EP 2003213 A2	17.12.2008
		EP 2003213 A3	18.02.2009
		JP 04251357 B2	08.04.2009
		JP 2005-518522 A	23.06.2005
		US 2003-0175736 A1	18.09.2003
		US 2005-0136493 A1	23.06.2005
		US 2006-0211017 A1	21.09.2006
		US 2010-0297657 A1	25.11.2010
		US 7229774 B2	12.06.2007
		US 7332290 B2	19.02.2008
		US 7700293 B2	20.04.2010
		US 7767393 B2	03.08.2010
		WO 03-012067 A2	13.02.2003
		WO 03-012067 A3	13.02.2003
		WO 2006-012646 A2	02.02.2006
WO 2006-012646 A3	02.02.2006		
US 2005-0266473 A1	01.12.2005	EP 1765994 A2	28.03.2007
		EP 1765994 B1	18.11.2009
		JP 2008-506367 A	06.03.2008
		US 2009-0298105 A1	03.12.2009
		US 7563589 B2	21.07.2009
		WO 2005-118796 A2	15.12.2005
WO 2005-118796 A3	15.12.2005		
US 2009-0012031 A1	08.01.2009	US 2010-0222420 A1	02.09.2010
		WO 2009-006577 A2	08.01.2009
		WO 2009-006577 A3	26.02.2009
WO 2009-124137 A2	08.10.2009	US 2011-0123511 A1	26.05.2011
		WO 2009-124137 A3	07.01.2010

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7076 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
C 0 7 H 19/167 (2006.01)	A 6 1 K 31/7076	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	C 0 7 H 19/167	C S P
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	C 1 2 Q 1/68	Z N A A
	C 1 2 Q 1/68	Z

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

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 コーブランド ロバート アレン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン スミス ファーム レーン 10

(72) 発明者 リッチョン ビクトリア マリー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウェルズリー ウェアランド ロード 5

(72) 発明者 スコット マーガレット デイビス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベバリー フェデラル ストリート 36

(72) 発明者 スニーリンガー クリストファー ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ サード ストリート 285 アパートメ
ント #327

(72) 発明者 カンツ ケビン ウェイン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウォバーン ニュー ビレッジ ロード 8

(72) 発明者 ヌットソン サラ キャサリン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ベイ ステート ロード 24 ユニット
22

(72) 発明者 ポロック ロイ マックファーレン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 メドフォード バーナード ロード 7

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 AA40 BA13 BB20 BB24 DA35 DA36 FB01 FB03

FB08 FB12

4B063	QA01	QA18	QQ42	QR08	QR42	QR55	QR62	QS25	QS36	QX02
4C057	AA03	AA18	BB02	CC03	DD01	DD02	DD03	LL29	LL41	
4C086	AA01	AA02	AA03	EA18	MA01	MA04	NA14	ZB26		