



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

化合物が免疫調節性であるか否かを決定する方法であって、

- (a) 第1の細胞を該化合物と接触させること；
- (b) 工程(a)の該第1の細胞から第1の試料を得ること；
- (c) 該第1の試料中のCRBN関連タンパク質のレベルを決定すること；及び
- (d) 工程(c)の該CRBN関連タンパク質のレベルを基準試料から得られた同じタンパク質のレベルと比較することを含み、該基準と比較したレベルの変化が免疫調節化合物としての該化合物の効能を示す、前記方法。

**【請求項 2】**

工程(a)における前記接触がインピトロである、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

工程(a)における前記接触がインピボである、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 4】**

前記第1の細胞が、末梢血単核細胞、B細胞、T細胞、単球、又は顆粒球である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 5】**

前記基準が、前記化合物と接触していない第2の細胞を使用して調製され、該第2の細胞が前記第1の細胞と同じ種類である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 6】**

疾患又は障害を治療する際の化合物の効能を評価する方法であって、

- (a) 該疾患又は障害を有する対象に化合物を投与すること；
- (b) 該対象から第1の試料を得ること；
- (c) 該第1の試料中のCRBN関連タンパク質のレベルを決定すること；及び
- (d) 工程(c)の該CRBN関連タンパク質のレベルを、基準試料から得られた同じタンパク質のレベルと比較することを含み、該基準と比較したレベルの変化が、該疾患又は障害を治療する際の該化合物の効能を示す、前記方法。

**【請求項 7】**

前記第1の試料が、腫瘍生検材料、節の生検材料、又は骨髄、脾臓、肝臓、脳、若しくは乳房からの生検材料から得られる、請求項 6 記載の方法。

**【請求項 8】**

前記基準が、前記化合物の前記対象への投与の前に、該対象から得られる第2の試料を使用して調製され、該第2の試料が前記第1の試料と同じ源由来である、請求項 6 又は 7 記載の方法。

**【請求項 9】**

前記基準が、前記疾患又は障害を有さない健康な対象から得られる第2の試料を使用して調製され、該第2の試料が前記第1の試料と同じ源由来である、請求項 6 又は 7 記載の方法。

**【請求項 10】**

前記疾患又は障害が癌又は炎症性疾患である、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 11】**

前記疾患又は障害が、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、又は全身性強皮症である、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 12】**

工程(c)が、

- (i) 工程(b)の前記第1の試料内の前記タンパク質を、免疫特異的にCRBN関連タンパク質に結合する第1の抗体と接触させること；
- (ii) 該第1の抗体に結合した該タンパク質を、免疫特異的に該CRBN関連タンパク質に結合

10

20

30

40

50

する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なる該CRBN関連タンパク質上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する前記第2の抗体と接触させること；

(iii) 該タンパク質に結合した第2の抗体の存在を検出すること；及び

(iv) 該第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、該CRBN関連タンパク質の量を決定することを含む、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

工程(c)が、

(i) 前記第1の試料内のRNAを、該RNAに特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、該RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生じさせること；

(ii) 該CRBN関連タンパク質をコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増幅させること；及び

(iii) 該増幅されたDNAの量に基づいて、該CRBN関連タンパク質のRNAレベルを決定することを含む、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

前記化合物が、前記基準と比較した前記CRBN関連タンパク質のレベルを低下させる、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

前記化合物が、サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミド、3-(5-アミノ-2-メチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオン、又は3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオン、その立体異性体、又はその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、水和物、共結晶、クラスレート、若しくは多形体である、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

前記CRBN関連タンパク質が、DDB1、PABPC1、HNRNPR、RPL19、SYNCRIP、H2AFX、HSPA8、ALDOA、HIST1H2AA、HSPA1A、XRCC6、RPL12、RPL18A、RPL4、HNRNPA2B1、HNRNPC、RPS2、SEC24C、RPL9、USP15、SEC24A、CTPS、ABCE1、EEF1A1、IPO5、CPSF6、KCNAB2、C7ORF42、SMC4、GNB3、H2AFZ、HIST1H1C、HIST1H1D、HIST1H1E、ACTB、CSNK2A1、CRBN、DDX21、DXH9、DNAJC1、G3BP1、HSPA1B、IGF2BP2、RPL10A、RPL13A、RPL14、RPL15、RPL21、RPL3、RPL30、RPL7、RPL7A、RPLP1、RPLP2、MYH10、ILF3、NCL、RPS13、RPS16、RPS19、RPS6、SND1、EIF2S2、HNRNPH2、UBB、EEF1G、TBL1XR1、NACA、EIF4A1、FASN、PPAT、G3BP2、TUBA1A、UBAP2L、MCM2、UAP1、TUBA1C、EIF2S1、EIF3J、PRKDC、MCM7、RPL11、TUBA1B、STAT3、PTRH2、PABPC4、PTRC、MACF1、UBE20、DUT、GNB2L1、NUP88、H2AFJ、SEC23B、PDXK、ACY、ARID1A、GBE1、HSPA9、DDX17、FUBP1、FBXO21、EWSR1、IFI16、YWHAE、UBA52、COPS6、GNAS、UBE2Q1、FERMT3、NAP1L2、TPD52、VAPA、EEF1AL3、DDIT4、NEDD8、HIST1H1A、HIST1H1B、PCM1、IKZF1、又はIKZF3である、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

前記CRBN関連タンパク質がIKZF3(Aiolos)である、請求項1～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

前記IKZF3が58kDaのタンパク質分子量を有する、請求項17記載の方法。

【請求項19】

前記IKZF3が42kDaのタンパク質分子量を有する、請求項17記載の方法。

【請求項20】

前記CRBN関連タンパク質がIKZF1(Ikaros)である、請求項1～16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】

(1 優先権の主張)

2012年6月29日及び2012年9月4日にそれぞれ出願された、どちらも「セレブロン関連タ

10

20

30

40

50

ンパク質を利用して薬物効能を決定する方法(Methods for Determining Drug Efficacy Using Cereblon-Associated Proteins)」という名称の米国仮特許出願第61/666,703号及び第61/696,752号に基づく優先権が本明細書において主張される。上述の出願は、引用によりその全体として本明細書に組み込まれる。

#### 【0002】

##### (2 分野)

免疫調節化合物の効能を決定する方法が本明細書に与えられる。セレブロン関連タンパク質(cereblon-associated proteins)を、癌及び炎症性疾患に対する臨床的感度並びに薬物に対する患者の応答のバイオマーカーとして使用する方法も本明細書に提供される。該方法を実施するためのキットがさらに与えられる。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

##### (3 背景)

##### (3.1 癌の病理生物学)

癌は、主に、ある正常な組織から誘導された異常な細胞の数の増加、これら異常な細胞による隣接組織の浸潤、又は悪性細胞の所属リンパ節及び遠位部位へのリンパ性若しくは血行性の広がり(転移)により特徴づけられる。臨床データ及び分子生物学的試験は、癌が小さな新生物発生前の変化で始まる多段階のプロセスであり、それが特定の条件下で新生物形成に進行し得ることを示している。新生物性病変はクローン的に発生し、特に新生細胞が宿主の免疫監視機構を免れる条件下では、浸潤、増殖、転移、及び異質性の能力を増加し得る。Roitt, I., Brostoff, J及びKale, D.の文献(Immunology, 17.1-17.12 (第3版, Mosby, St. Louis, Mo., 1993)。

#### 【0004】

医学文献に詳細に記載される莫大な種類の癌がある。例には、肺、結腸、直腸、前立腺、乳房、脳、血液、及び腸の癌がある。癌の発生率は、人口全体が年をとるにつれ、新しい癌が発生するにつれ、罹患しやすい個体群(例えば、AIDSに感染している人々又は日光に過度に曝されている人々)が増えるにつれ、上昇し続けている。しかし、癌の治療の選択肢は限られている。例えば、血液癌(例えば、多発性骨髄腫)の症例では、従来の化学療法がうまくいかず、骨髄移植が選択肢でない場合は特に、利用できる治療選択肢はほとんどない。したがって、癌患者の治療に利用できる新しい方法及び組成物が大いに必要とされている。

#### 【0005】

多くの種類の癌が、血管新生として知られるプロセスである新しい血管の形成に関連している。腫瘍により誘発された血管新生に関与する機構のいくつかは解明されている。これらの機構の最も直接的なものは、腫瘍細胞による血管新生性を有するサイトカインの分泌である。これらのサイトカインの例には、酸性及び塩基性線維芽細胞増殖因子(a,b-FGF)、アンジオゲニン、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、及びTNF- $\alpha$ がある。或いは、腫瘍細胞は、プロテアーゼの産生及びいくつかのサイトカインが貯蔵されている(例えば、b-FGF)細胞外マトリックスのその後の破壊により血管新生ペプチドを放出できる。血管新生は、炎症細胞(特にマクロファージ)の動員及び引き続いた炎症細胞による血管新生サイトカイン(例えば、TNF- $\alpha$ 、b-FGF)の放出によっても間接的に誘導され得る。

#### 【0006】

リンパ腫は、リンパ系に生じる癌を意味する。リンパ腫は、リンパ球-Bリンパ球及びTリンパ球(すなわち、B細胞及びT細胞)の悪性新生物により特徴づけられる。リンパ腫は、一般に、リンパ節又は胃若しくは腸を含むがこれらに限定されない器官のリンパ組織の集合体で発生する。リンパ腫は、場合によっては骨髄及び血液に関係し得る。リンパ腫は、体のある部位から他の部分に広がり得る。

#### 【0007】

種々の形態のリンパ腫の治療が、例えば、引用により全体として本明細書に組み込まれる米国特許第7,468,363号に記載されている。そのようなリンパ腫には、ホジキンリンパ

10

20

30

40

50

腫、非ホジキンリンパ腫、皮膚B細胞リンパ腫、活性化B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、濾胞中心リンパ腫、形質転換性リンパ腫、中間分化型リンパ球性リンパ腫、中間型リンパ球性リンパ腫(ILL)、びまん性低分化型リンパ球性リンパ腫(PDL)、中心細胞リンパ腫、びまん性小分割細胞性リンパ腫(DSCCL)、末梢T細胞リンパ腫(PTCL)、皮膚T細胞リンパ腫、及びマントル帯リンパ腫、並びに低悪性度濾胞性リンパ腫があるが、これらに限定されない。

【0008】

非ホジキンリンパ腫(NHL)は、米国において、男性と女性の両方で5番目によくみられる癌であり、2007年には63,190の新しい症例及び18,660の死亡が推定された。Jemal Aらの文献(CA Cancer J Clin 2007; 57(1):43-66)。NHLにかかる確率は年齢と共に増加し、高年齢者のNHLの発生率は過去10年間に着実に増加しており、米国人口の高齢化傾向に懸念が生じている。同上。Clarke C Aらの文献(Cancer 2002; 94(7):2015-2023)。

10

【0009】

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)は、非ホジキンリンパ腫のおよそ3分の1を占めている。DLBCL患者には従来の化学療法で治癒する者もいるが、残りは該疾患で死亡する。抗癌剤は、おそらくは成熟したT細胞及びB細胞における直接的なアポトーシス誘導により、迅速で持続性のリンパ球枯渇を起こす。K. Stahnkeらの文献(Blood 2001, 98:3066-3073)を参照されたい。リンパ球絶対数(ALC)は、濾胞性非ホジキンリンパ腫における予後因子であることが示されており、最近の結果は、診断時のALCがびまん性大細胞型B細胞リンパ腫における重要な予後因子であることを示唆した。

20

【0010】

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)は、その遺伝子プロファイリングパターンにより、異なる分子サブタイプ:胚中心B細胞様DLBCL(GCB-DLBCL)、活性化B細胞様DLBCL(ABC-DLBCL)、及び縦隔原発B細胞リンパ腫(PMBL)、又は分類不能型に分類することができる。これらのサブタイプは、生存、化学応答性、及びシグナル伝達経路依存性、特に、NF- $\kappa$ B経路の明白な違いによって特徴付けられる。D. Kimらの文献(Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part 1, Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 8082)を参照されたい。Bea Sらの文献(Blood 2005; 106: 3183-90); Ngo V. N.らの文献(Nature 2011; 470: 115-9)を参照されたい。そのような違いは、DLBCLにおけるより効果的かつサブタイプ特異的な治療戦略の探索を促進している。

30

【0011】

白血病は、血液形成組織の悪性新生物を意味する。種々の形態の白血病が、例えば、全体として引用により本明細書に組み込まれている米国特許第7,393,862号及び2002年5月17日に出願された米国仮特許出願60/380,842号に記載されている。動物においてウイルスがいくつかの形態の白血病を起こすと報告されているが、ヒトの白血病の原因は大部分が不明である。メルクマニュアル(The Merck Manual) 944-952 (第17版、1999年)。悪性腫瘍への形質転換は、典型的には、その後の増殖及びクローン増殖を伴う2以上のステップを経て単一の細胞で生じる。いくつかの白血病では、特定の染色体転座が、一貫性のある白血病細胞形態及び特別な臨床的特徴を伴って同定されている(例えば、慢性骨髄球性白血病における9番及び22番の転座、並びに急性前骨髄球性白血病における15番及び17番の転座)。急性白血病は、大半が未分化な細胞集団であり、慢性白血病は、より成熟した細胞形態である。

40

【0012】

急性白血病は、リンパ芽球性(ALL)及び非リンパ芽球性(ANLL)のタイプに分けられる。メルクマニュアル(The Merck Manual) 946-949 (第17版、1999年)。それらは、仏-米-英(FAB)分類に従って、又はその種類及び分化度に従って、その形態学的及び細胞化学的な外観により、さらに細分化することができる。B細胞及びT細胞抗原並びに骨髄系抗原の特異的モノクローナル抗体の使用は、分類のために最も役に立つ。ALLは、主に、検査所見及び骨髄検査によって確定される小児期疾患である。ANLLは、急性骨髄性(myelogenous)白血病又は急性骨髄性(myeloid)白血病(AML)としても知られ、全ての年齢層で生じ、成人の

50

中でより一般的な急性白血病であり；それは、通常は、原因因子としての放射線照射と関連した形態である。

【0013】

慢性白血病は、リンパ球性(CLL)又は骨髄球性(CML)と記載される。メルクマニュアル(The Merck Manual) 949-952 (第17版 1999)。CLLは、血液、骨髄、及びリンパ系器官における成熟したリンパ球の出現により特徴づけられる。CLLの顕著な特徴は、持続した絶対的なリンパ球増加( $>5,000/\mu\text{L}$ )及び骨髄におけるリンパ球の増加である。ほとんどのCLL患者は、B細胞の特徴を有するリンパ球のクローン増殖も有する。CLLは、中年又は老年の疾患である。CMLでは、独特な特徴は、血液、骨髄、肝臓、脾臓、及び他の器官において、全分化段階の顆粒球細胞が優勢であることである。診断時に徴候を示す患者では、全白血球(WBC)数は、通常約 $200,000/\mu\text{L}$ であるが、 $1,000,000/\mu\text{L}$ に達することもある。CMLは、フィラデルフィア染色体の存在のために比較的診断が容易である。

10

【0014】

骨髄間質細胞は、CLL疾患の進行及び化学療法に対する抵抗性を支持することがよく知られている。CLL細胞と間質細胞の間の相互作用を妨げることは、CLL化学療法のさらなる目標である。

【0015】

急性及び慢性の分類に加えて、新生物も、そのような障害を起こす細胞に基づいて、前駆性又は末梢性に分類される。例えば、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれている、米国特許公開第2008/0051379号を参照されたい。前駆新生物は、ALL及びリンパ芽球性リンパ腫を含み、リンパ球がT細胞かB細胞のいずれかに分化する前にリンパ球に生じる。末梢新生物は、T細胞かB細胞のいずれかに分化したリンパ球に生じるものである。そのような末梢新生物には、B細胞CLL、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、粘膜関連リンパ系組織型節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、有毛細胞白血病、形質細胞種、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、及びパーキットリンパ腫があるが、これらに限定されない。CLL症例の95パーセント超において、クローン増殖は、B細胞系統のものである。「癌：腫瘍学の原理及び実践(Cancer: Principles & Practice of Oncology)」(第3版)(1989)(1843-1847ページ)を参照されたい。CLL症例の5パーセント未満において、腫瘍細胞は、T細胞表現型を有する。しかしながら、これらの分類にもかかわらず、正常な造血の病理学的機能障害が、全ての白血病の顕著な特徴である。

20

30

【0016】

多発性骨髄腫(MM)は、骨髄における形質細胞の癌である。通常、形質細胞は抗体を産生し、免疫機能において主要な役割を果たす。しかし、これらの細胞が制御されずに増殖すると、骨痛及び骨折、貧血、感染症、及び他の合併症を引き起こす。多発性骨髄腫は、2番目によくみられる血液悪性腫瘍であるが、多発性骨髄腫の正確な原因は依然として不明である。多発性骨髄腫は、血液、尿、及び器官中に、M-タンパク質及び他の免疫グロブリン(抗体)、アルブミン、並びに $\kappa$ -2-ミクログロブリンがあるがこれらに限定されない高レベルのタンパク質を生じさせる。M-タンパク質は、モノクローナルタンパクの略であり、パラプロテインとしても知られるが、骨髄腫形質細胞により産生される特に異常なタンパク質であり、多発性骨髄腫のほとんど全ての患者の血液又は尿の中に見出すことができる。

40

【0017】

骨痛を含む骨格の症状は、多発性骨髄腫の最も臨床的に重要な症状の1つである。悪性形質細胞は、カルシウムを骨から浸出させて溶解性病変を引き起こす破骨細胞刺激因子(IL-1、IL-6、及びTNFを含む)を放出する。高カルシウム血症は別な症状である。破骨細胞刺激因子は、サイトカインとも称されるが、アポトーシス、すなわち骨髄腫細胞の死を防ぎ得る。患者の50パーセントは、X線で検出可能な骨髄腫関連骨格病変を診断時に有する。多発性骨髄腫の他の一般的な臨床症状としては、多発性神経障害、貧血、過粘稠、感染症、及び腎不全が挙げられる。

50

## 【0018】

骨髄間質細胞は、多発性骨髄腫の疾患進行及び化学療法に対する抵抗性を支持することがよく知られている。多発性骨髄腫細胞と間質細胞との間の相互作用を妨げることは、多発性骨髄腫化学療法のさらなる目標である。

## 【0019】

骨髄異形成症候群(MDS)は、多様な造血幹細胞疾患群である。MDSは、無効な血球産生に起因する、形態及び成熟の障害(骨髄造血不全)を有する細胞性骨髄(cellular marrow)、末梢血血球減少、及び急性白血病に進行する変動リスクとにより特徴づけられる。メルクマニユアル(The Merck Manual)、953(第17版、1999)、及びListらの文献(1990, J Clin. Oncol. 8:1424)を参照されたい。免疫調節化合物を用いたMDSの治療は、その全体が引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許公開第2004/0220144号に記載されている。

10

## 【0020】

固形腫瘍は、嚢胞又は液体部分を含み得るが、通常は含まない異常な組織塊である。固形腫瘍は、良性(癌でない)にも悪性(癌)にもなり得る。様々な種類の固形腫瘍が、それらを形成する細胞の種類によって命名されている。固形腫瘍の種類の中には、悪性メラノーマ、副腎癌、乳癌、腎細胞癌、膵臓癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、及び原発不明癌があるが、これらに限定されない。様々な種類又はステージの固形腫瘍の患者に通常投与される薬物には、セレプレックス、エトポシド、シクロホスファミド、ドセタキセル、アペシタビン(apecitabine)、IFN、タモキシフェン、IL-2、GM-CSF、又はこれらの組み合わせがあるが、これらに限定されない。

20

## 【0021】

最初の療法の後で完全な寛解を達成する患者は、良好な治癒の見込みを有するが、応答しない又は再発する患者は、その10%未満しか、治癒又は3年より長く続く応答を達成しない。Cerny Tらの文献(Ann Oncol 2002; 13 Suppl 4:211-216)を参照されたい。

## 【0022】

リツキシマブは、正常な宿主B細胞を枯渇させることが知られている。M. Akliluらの文献(Annals of Oncology 15: 1109-1114, 2004)を参照されたい。リツキシマブによるB細胞枯渇の長期免疫作用及びリンパ腫患者における再構成B細胞プールの特性は、この療法が広く使用されているにもかかわらず、十分に定義されていない。Jennifer H. Anolikらの文献(Clinical Immunology, 第122巻, 第2号, 2007年2月, 139-145ページ)を参照されたい。

30

## 【0023】

再発性又は難治性の疾患を有する患者に対する手法は、実験的治療とそれに続く幹細胞移植に大きく依存しているが、それは、低パフォーマンスステータス又は高齢の患者には適切でないことがある。したがって、NHL患者を治療するために利用できる新しい方法に対して多大な需要がある。

## 【0024】

癌と変化した細胞代謝の間の関連は十分に確立されている。Cairns, R.A.らの文献(Nature Rev., 2011, 11:85-95)を参照されたい。腫瘍細胞の代謝とその関連する遺伝子変化を理解すれば、癌治療の向上した方法を特定し得る。同上。例えば、増加したグルコース代謝による腫瘍細胞の生存及び増殖はPIK3経路に関連しており、それによりPTENなどの腫瘍抑制因子遺伝子における突然変異が腫瘍細胞代謝を活性化する。同上。AKT1(別名、PKB)は、PFKFB3、ENTPD5、mTOR、及びTSC2(別名、ツベリン)との種々の相互作用により腫瘍細胞成長に関連するグルコース代謝を刺激する。同上。

40

## 【0025】

転写因子HIF1及びHIF2は、しばしば腫瘍に関連する低酸素状態に対する細胞応答に大きな役割を果たす。同上。いったん活性化されると、HIF1は、解糖を行う腫瘍細胞の能力を高める。同上。そのため、HIF1の阻害は、腫瘍細胞代謝を減速又は反転させ得る。HIF1の活性化は、PI3K、VHLなどの腫瘍抑制因子タンパク質、コハク酸デヒドロゲナーゼ(SDH)、

50

及びフマル酸ヒドラーゼに関連している。同上。発癌性転写因子MYCも、腫瘍細胞代謝、具体的には解糖に関連している。同上。MYCは、グルタミン代謝経路による細胞増殖も促進する。同上。

【0026】

AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)は、腫瘍細胞が増殖するために克服しなければならない代謝チェックポイントとして機能する。同上。腫瘍細胞においてAMPKシグナル伝達を抑制する突然変異がいくつか特定されている。Shackelford, D.B.及びShaw, R.J.の文献(Nature Rev. Cancer, 2009, 9: 563-575)を参照されたい。STK11は、AMPKの役割に関連した腫瘍抑制因子遺伝子として特定されている。Cairns, R.A.らの文献(Nature Rev., 2011, 11 :85-95)を参照されたい。

10

【0027】

腫瘍抑制因子である転写因子p53も、細胞代謝の制御において重要な役割を有する。同上。腫瘍細胞におけるp53の喪失は、解糖経路に至る腫瘍細胞代謝の変化の重大な寄与因子であり得る。同上。化学療法薬の別な潜在的標的であるOCT1転写因子は、腫瘍細胞代謝の制御においてp53と協同する。同上。

【0028】

ピルビン酸キナーゼ(kinate)M2(PKM2)は、細胞増殖の支持により癌細胞に代謝上の利益を与える細胞代謝の変化を促進する。同上。例えば、PKM1よりもPKM2を発現する肺癌細胞がそのような利益を有することが見出されている。同上。臨床において、PKM2は、いくつかの癌の種類において過剰発現されることが確認されている。同上。したがって、PKM2は、腫瘍の早期検出のための有用なバイオマーカーになり得る。

20

【0029】

イソクエン酸デヒドロゲナーゼIDH1及びIDH2における突然変異は、具体的には膠芽腫及び急性骨髄性白血病における腫瘍形成に関連している。Mardis, E.R.らの文献(N. Engl. J. Med, 2009, 361 : 1058-1066); Parsons, D.W.らの文献(Science, 2008, 321 :1807-1812)を参照されたい。

【0030】

癌の発生率は、人口全体が年をとるにつれ、新しい癌が発生するにつれ、罹患しやすい個体群(例えば、AIDSに感染している人々又は日光を過度に曝される人々)が増えるにつれ、上昇し続けている。したがって、リンパ腫、NHL、多発性骨髄腫、AML、白血病、及び固形腫瘍を含むがこれらに限定されない癌の患者の治療に利用できる新しい方法、治療、及び組成物に対して多大な需要がある。

30

【0031】

種々の他の疾患及び障害も、望ましくない血管新生に関連しているか、又はそれにより特徴づけられる。例えば、増大した又は制御されない血管新生は、眼内血管新生疾患、脈絡膜血管新生疾患、網膜血管新生疾患、ルベオシス(隅角の血管新生)、ウイルス性疾患、遺伝性疾患、炎症性疾患、アレルギー性疾患、線維症、関節炎、及び自己免疫疾患を含むがこれらに限定されないいくつかの疾患及び病状に関与している。そのような疾患及び病状の例には、糖尿病性網膜症;未熟児網膜症;角膜の移植片拒絶;血管新生緑内障;後水晶体繊維増殖症;及び増殖性硝子体網膜症があるが、これらに限定されない。

40

【0032】

したがって、望ましくない血管新生を制御及び/若しくは阻害するか、且つ/又はTNF-を含む特定のサイトカインの産生を阻害できる化合物は、種々の疾患及び障害の治療及び予防に有用になり得る。

【0033】

(3.2 炎症性疾患)

炎症は、宿主の防御及び免疫媒介性疾患の進行において基本的な役割を果たしている。炎症反応は、損傷(例えば、外傷、虚血、及び外来粒子)及び感染(例えば、細菌又はウイルス感染)に反応して、化学伝達物質(例えば、サイトカイン及びプロスタグランジン)及び炎症細胞(例えば、白血球)を含む複雑な事象のカスケードにより開始される。炎症反応

50

は、血流の増加、毛細血管透過性の増加、及び食細胞の流入を特徴とする。これらの事象は、損傷又は感染の部位で腫脹、発赤、熱感(ヒートパターンの変化)、及び化膿を生じさせる。

【0034】

サイトカイン及びプロスタグランジンは炎症反応を制御し、秩序ある自己限定性のカスケードで血液又は罹患組織に放出される。サイトカイン及びプロスタグランジンのこのような放出は、損傷又は感染の領域への血流を増加させ、発赤及び熱感を起こすことがある。これらの化学物質の一部は、組織への流体の漏出を起こし、腫脹を生じさせる。この保護プロセスは神経を刺激して疼痛を起こすことがある。これらの変化は、関連する領域で限定された期間起こる場合は、体の利益になるように作用する。

10

【0035】

腫瘍壊死因子 (TNF-) は、免疫促進物質に応答して主に単核貪食細胞により放出されるサイトカインである。TNF- は、分化、動員、増殖、及びタンパク質分解などのほとんどの細胞プロセスを増強することができる。低レベルでは、TNF- は、病原体、腫瘍、及び組織損傷に対する防御を付与する。しかし、TNF- は、多くの疾患においても役割を有する。動物又はヒトに投与されると、TNF- は、炎症、発熱、心血管作用、出血、凝固、並びに急性感染及びショック状態の間に見られるものと類似の急性期反応を起こし得るか、又は悪化させる。増大された又は制御されないTNF- 産生は、いくつかの疾患及び病状、例えば、固形腫瘍及び血液腫瘍などの癌;鬱血性心不全などの心臓病;並びにウイルス性疾患、遺伝性疾患、炎症性疾患、アレルギー性疾患、及び自己免疫疾患に關与している。

20

【0036】

アデノシン3',5'-環状一リン酸(cAMP)も、限定はされないが喘息及び炎症、並びに他の病態などの多くの疾患及び病態で役割を果たしている(Lowe及びChengの文献(Drugs of the Future, 17(9), 799-807, 1992))。炎症性白血球中のcAMPの上昇が、それらの活性化及びその後のTNF- 及びNF- Bを含む炎症メディエーターの放出を阻害することが示されている。cAMPのレベル増加は、気道平滑筋の緩和も起こす。

【0037】

炎症応答における体液性免疫要素と細胞免疫要素との間の均衡のとれた微妙な相互作用により、有害な因子の排除及び損傷組織の修復の開始が可能となる。この均衡のとれた微妙な相互作用が壊されると、炎症反応は、正常な組織に多大な損傷を起こし、反応を開始した元の障害よりも有害になり得る。これらの制御されない炎症反応の場合、組織の損傷及び器官の機能不全を防ぐために、臨床的介入が必要である。乾癬、関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎、クローン病、喘息、アレルギー、又は炎症性腸疾患などの疾患は、慢性の炎症という特徴を有する。関節炎、関連する関節炎状態(例えば、変形性関節症、関節リウマチ、及び乾癬性関節炎)、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、敗血症、乾癬、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、及び慢性閉塞性肺疾患、慢性炎症性肺疾患などの炎症性疾患も、よく起こり問題のある病気である。増大した、又は制御されないTNF- 産生は、炎症反応において中心的役割を果たし、それらの拮抗剤を投与すると、炎症性疾患の動物モデルにおいて慢性及び急性の反応が遮断される。

30

【0038】

関節炎は、身体関節への損傷を伴う一群の疾病を意味し得る全身性自己免疫疾患である。100を超える様々な形態の関節炎がある。最もよくみられる形態は変形性関節症(変性性関節疾患)であり、他の関節炎形態は、関節リウマチ、乾癬性関節炎、及び狼瘡及び痛風などの関連する自己免疫疾患である。関節リウマチは、関節の慢性炎症により特徴づけられる。滑膜組織と滑液のどちらも、サイトカイン産生をもたらす炎症細胞に侵される。関節を浸潤するT細胞及び単球は、1型及び2型免疫応答マーカーの活性化増大を示す。

40

【0039】

乾癬性関節炎は、皮膚と、関節と、腱、靭帯、及び筋膜の挿入部位とを冒す慢性炎症性関節炎病態である。Gladmanの文献(Current Opinion in Rheumatology, 「乾癬性関節炎における最新の概念(Current concepts in psoriatic arthritis)」、2002, 14:361-366

50

)及びRuddyらの文献(「リウマチ学(Rheumatology)」,第2巻,71章,1071ページ,第6版,2001)。乾癬性関節炎は、通常乾癬に付随する。同上。乾癬患者のおよそ7%が乾癬性関節炎にかかる。メルクマニュアル(The Merck Manual)、448(第17版,1999)。乾癬性関節炎は、種々の臨床パターンで現れ得る。乾癬性関節炎には5つの一般的なパターンがある:遠位指骨間関節の関節炎、破壊性関節炎、関節リウマチと区別できない対称性多発性関節炎、非対称性少関節炎、及び脊椎関節症。Ruddyらの文献(1073ページ)。乾癬は、患者の60~80%において乾癬性関節炎の発症に先立って現れる。時として、関節炎と乾癬は同時に現れる。皮膚発疹より関節症が先行することもある。

#### 【0040】

乾癬は、皮膚に現れる慢性全身性自己免疫疾患である。5つのタイプの乾癬がある:尋常性乾癬、滴状乾癬、逆位乾癬、膿疱性乾癬、及び乾癬性紅皮症。最もよくみられる形態、尋常性乾癬は、表皮の上部第一層に現れる赤色及び白色の落屑斑として通常見られる。しかし、皮膚症状が全くない患者もいる。尋常性乾癬において、皮膚はこれらの部位で急速に蓄積し、銀白色の外観を呈す。肘及び膝の皮膚ではプラークが頻発するが、頭皮、掌及び足の裏、並びに生殖器を含む、あらゆる部分を冒し得る。湿疹とは対照的に、乾癬は、関節の外側に見られることが多い。該疾患は、小さな局所的な斑から完全に全身を覆うものまで様々な重症度の慢性の再発性病態である。手の爪及び足指の爪は冒されることが多く(乾癬性爪ジストロフィー)、単発症状として見られることがある。乾癬は関節の炎症も起こすことがあり、乾癬性関節炎として知られている。乾癬において、1つの仮説は、T細胞が活性になり、真皮に移動して、サイトカイン、とりわけTNF- $\alpha$ の放出を引き起こし、それにより炎症及びケラチン生成細胞の急速な増殖が起こるというものである。

#### 【0041】

##### (3.3 セレブロン)

セレブロン(CRBN)は、植物からヒトまで保存されている442-アミノ酸タンパク質である。ヒトでは、CRBN遺伝子は、常染色体劣性非症候群性精神遅滞(ARNSMR)の候補遺伝子として特定されてきた。Higgins, J.J.らの文献(Neurology, 2004, 63:1927-1931)を参照されたい。CRBNは、最初に、ラットの脳においてカルシウム活性化カリウムチャネルタンパク質(SLO1)と相互作用するRGSを含有する新規のタンパク質として特性化され、後に、AMPK7及びDDB1と共に網膜において電位依存型クロライドチャネル(CIC-2)と相互作用することが示された。Jo, S.らの文献(J. Neurochem, 2005, 94:1212-1224);Hohberger B.らの文献(FEBS Lett, 2009, 583:633-637);Angers S.らの文献(Nature, 2006, 443:590-593)を参照されたい。DDB1は、最初、損傷DNA結合タンパク質2(DDB2)と会合するヌクレオチド除去修復タンパク質として特定された。その活性欠損は、色素性乾皮症相補群E(XPE)を有する患者において修復欠損を引き起こす。DDB1は、ユビキチン化、及びその後の標的タンパク質のプロテアソーム分解を媒介する多くの異なるDCX(DDB1-CUL4-X-ボックス)E3ユビキチン-タンパク質リガーゼ複合体の構成要素として機能するようにも見える。CRBNは、大脳皮質の疾患に対する治療剤の開発の標的としても特定されている。WO2010/137547A1号を参照されたい。

#### 【0042】

セレブロンは、先天的欠損症を起こすサリドマイドに結合する主要な分子標的として最近特定された。Ito, T.らの文献(Science, 2010, 327:1345-1350)を参照されたい。DDB1は、CRBNと相互作用することがわかっており、そのためサリドマイドと間接的に関連づけられた。さらに、サリドマイドは、インビトロでCRBNの自己ユビキチン化を阻害することができ、サリドマイドがE3ユビキチン-リガーゼ阻害剤であることが示唆される。同上。重要なことに、この活性は、野生型細胞ではサリドマイドにより阻害されたが、サリドマイド結合を妨げる突然変異したCRBN結合部位を持つ細胞では阻害されなかった。同上。サリドマイド結合部位は、CRBN中の高度に保存されたC-末端104アミノ酸領域に位置付けられた。同上。CRBN中の個別の点突然変異体、Y384AとW386Aはどちらもサリドマイド結合を欠損しており、二重点突然変異体は最低のサリドマイド結合活性を有する。同上。CRBNとサリドマイドの催奇形作用の間の関連は、ゼブラフィッシュ及びニワトリ胚の動物モデル

で確認された。同上。

【 0 0 4 3 】

CRBN、CRBN E3ユビキチン-リガーゼ複合体、又はCRBNの1つ以上の基質への結合が、サリドマイド及び他の薬物の有益な効果に必要であるかどうかは、まだ立証されていない。サリドマイド及び他の薬物標的との相互作用を理解すれば、効能及び/又は毒性の分子機構の定義が可能となり、向上した効能及び毒性プロファイルを有する薬物がもたらされ得る。

【 0 0 4 4 】

(3.4化合物)

異常なTNF- 産生と関連する疾患を治療するために安全かつ効果的に使用することができる化合物を提供する目的で多くの研究が実施されている。例えば、Marriott, J.B.らの文献(Expert Opin. Biol. Ther., 2001, 1(4):1-8); G.W. Mullerらの文献(J Med Chem., 1996, 39(17): 3238-3240);及びG.W. Mullerらの文献(Bioorg & Med Chem Lett., 1998, 8: 2669-2674)を参照されたい。いくつかの研究は、LPS刺激されたPBMCによるTNF- 産生を強力に阻害する能力について選択された化合物群に集中している。L.G. Corralらの文献(Ann. Rheum. Dis., 1999, 58:(Suppl 1)1107-1113)。これらの化合物は、TNF- の強力な阻害だけでなく、LPS誘導性の単球IL1 及びIL12産生の顕著な阻害も示す。LPS誘導性IL6も、部分的だが、そのような化合物によって阻害される。これらの化合物は、LPS誘導性IL10の強力な刺激因子である。同上。

【 0 0 4 5 】

本明細書に提供される方法のための化合物には、どちらもG.W. Mullerらに付与された米国特許第6,281,230号及び同第6,316,471号に記載された置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)フタルイミド及び置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-1-オキソインドールがあるが、これらに限定されない。本明細書に開示されるさらに他の具体的な化合物は、それぞれが引用により本明細書に組み込まれている米国特許第6,395,754号、同第6,555,554号、同第7,091,353号、米国特許公開第2004/0029832号、及び国際公開W098/54170号に開示されているイソインドール-イミドのクラスに属する。

【 0 0 4 6 】

サリドマイド、レナリドミド、及びボマリドミドは、多発性骨髄腫、リンパ腫、及び他の血液学的疾患、例えば骨髄異形成症候群の患者に顕著な応答を示した。Galustian Cらの文献(Expert Opin Pharmacother., 2009, 10: 125-133)を参照されたい。これらの薬物は、抗血管新生特性、炎症促進性サイトカインの調節、T細胞の共刺激、NK細胞毒性の増大、直接的な抗腫瘍効果、及び幹細胞分化の調節を含む、幅広い活性を示す。

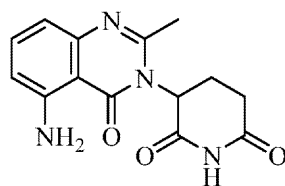
【 0 0 4 7 】

例えば、サリドマイド及びレナリドミドは、新規に診断された患者、化学療法又は移植が成功しなかった進行疾患の患者、及び再発性又は難治性多発性骨髄腫の患者において、多発性骨髄腫の治療の重要な選択肢として浮上してきた。デキサメタゾンと組み合わせたレナリドミドは、少なくとも1つの事前療法を受けた多発性骨髄腫患者の治療に対して承認されている。ボマリドミドをデキサメタゾンと組み合わせて投与することもできる。その開示が完全として本明細書中に組み込まれている、米国特許公開第2004/0029832A1号には、多発性骨髄腫の治療が開示されている。

【 0 0 4 8 】

本明細書に提供される別な化合物は、以下の構造を有する3-(5-アミノ-2-メチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオン(「化合物A」)又はそのエナンチオマー若しくはエナンチオマーの混合物;又はその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、水和物、共結晶、クラスレート、若しくは多形体である:

## 【化1】



A

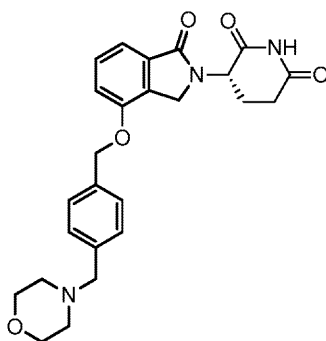
## 【0049】

化合物Aは、本明細書に提供される実施例に記載される方法に従って、又はその開示が全体として引用により本明細書に組み込まれる米国特許第7,635,700号に記載の通りに調製できる。該化合物は、本明細書の教示に基づいて当業者に明らかである他の方法に従っても合成できる。特定の実施態様において、化合物Aは、引用により全体として本明細書に組み込まれる2011年3月11日に出願された米国仮特許出願第61/451,806号に記載の結晶形態である。いくつかの実施態様において、化合物Aの塩酸塩が本明細書に提供される方法で使用される。化合物Aを利用して癌及び他の疾患を治療、予防、及び/又は管理する方法は、引用により全体として本明細書に組み込まれる、2011年3月11日に出願された米国仮特許出願第61/451,995号に記載されている。

## 【0050】

特定の実施態様において、3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンが本明細書に提供される。一実施態様において、3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンの(S)立体異性体(「化合物B」)が本明細書に提供される。ラセミの3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオン、他の4'-アリアルメトキシイソインドリン化合物、及びそれらの製造方法は、引用により全体として本明細書に組み込まれる米国特許公開第2011/0196150号に報告されている。化合物Bは以下の構造を有する：

## 【化2】



B

## 【0051】

免疫調節化合物の効果を評価する従来の方法は、生細胞アッセイ又は長い臨床的エンドポイントを必要とする。これらの細胞試験は煩わしく、種々の刺激物質(例えば、リポ多糖又は抗CD3抗体)の使用が必要であることが多い。サイトカイン産生などの間接的なエンドポイントが評価されるが、それは多数の経路により影響を受け得る。さらに、これらの化合物の臨床的な効能は、患者の応答という点でしか測定できず、それには通常最低でも数か月の治療が必要であるため、正しく予測することはできない。従来の方法の欠陥を考慮すると、免疫調節化合物の薬力学活性を検出、定量化、及び特性化するための効率が高く、感度がよく、正確な方法を開発する必要がある。

## 【発明の概要】

## 【0052】

## (4 発明の概要)

一実施態様において、化合物が免疫調節性であるか否かを決定する方法であって、(a) 第1の細胞を該化合物と接触させること;(b)工程(a)の該第1の細胞から第1の試料を得ること;(c)該第1の試料中のCRBN関連タンパク質のレベルを決定すること;及び(d)工程(c)のCRBN関連タンパク質のレベルを基準試料から得られた同じタンパク質のレベルと比較することを含む方法であって、基準と比較したレベルの変化が免疫調節化合物としての該化合物の効能を示す方法が本明細書に提供される。特定の実施態様において、工程(a)における接触はインピットロで実施される。他の実施態様において、工程(a)における接触はインピボで実施される。一実施態様において、細胞は、該化合物と、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、若しくは55分、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、若しくは24時間、又は2若しくは3日以上以上の期間、接触させられる。いくつかの実施態様において、細胞は、末梢血単核細胞、B細胞、T細胞、単球、又は顆粒球である。他の実施態様において、細胞は、腫瘍細胞又は癌細胞、例えば、リンパ腫、骨髄腫、又は白血病である。一実施態様において、腫瘍又は癌細胞は細胞系から得られる。

10

## 【0053】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)工程(b)の第1の試料内のタンパク質を、免疫特異的にCRBN関連タンパク質に結合する第1の抗体と接触させること;(ii)第1の抗体に結合した該タンパク質を、免疫特異的にCRBN関連タンパク質に結合する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なるCRBN関連タンパク質上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する第2の抗体と接触させること;(iii)該タンパク質に結合した第2の抗体の存在を検出すること;及び(iv)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、CRBN関連タンパク質の量を決定することを含む。

20

## 【0054】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)第1の試料内のRNAを、該RNAに特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、該RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生じさせること;(ii)CRBN関連タンパク質をコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増幅させること;及び(iii)該増幅されたDNAの量に基づいて、CRBN関連タンパク質のRNAレベルを決定することを含む。

30

## 【0055】

特定の実施態様において、基準と比較したCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が低下する場合、該化合物は免疫調節性である。特定の実施態様において、基準と比較したCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が上昇する場合、該化合物は免疫調節性である。一実施態様において、基準は、該化合物と接触していない第2の細胞を使用して調製されるが、その場合、該第2の細胞は該第1の細胞と同じ種類である。

## 【0056】

別な実施態様において、疾患又は障害を治療する際の化合物の効能を評価する方法であって、(a)該疾患又は障害を有する対象に化合物を投与すること;(b)該対象から第1の試料を得ること;(c)該第1の試料中のCRBN関連タンパク質のレベルを決定すること;及び(d)工程(c)のCRBN関連タンパク質のレベルを、基準試料から得られた同じタンパク質のレベルと比較することを含む方法であって、基準と比較したレベルの変化が、該疾患又は障害を治療する際の該化合物の効能を示す方法が本明細書に提供される。特定の実施態様において、該疾患又は障害は、癌(例えば、以下の5.2.3節に記載される固形腫瘍又は血液癌)、又は全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性強皮症などの炎症性疾患、他の炎症性疾患若しくは自己免疫疾患、又は上記2.2節で記載された炎症性疾患である。特定の実施態様において、該疾患又は障害は、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、

40

50

又は全身性強皮症である。いくつかの実施態様において、試料は、腫瘍生検材料、節の生検材料、又は骨髄、脾臓、肝臓、脳、若しくは乳房からの生検材料から得られる。

【0057】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)工程(b)から得た第1の試料内のタンパク質を、免疫特異的にCRBN関連タンパク質に結合する第1の抗体と接触させる工程;(ii)第1の抗体に結合したタンパク質を、免疫特異的にCRBN関連タンパク質に結合する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なるCRBN関連タンパク質上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する第2の抗体に接触させる工程;(iii)該タンパク質に結合した第2の抗体の存在を検出すること;及び(iv)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、CRBN関連タンパク質の量を決定することを含む。

10

【0058】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)第1の試料内のRNAを、該RNAに特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、該RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生じさせること;(ii)CRBN関連タンパク質をコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増幅させること;及び(iii)該増幅されたDNAの量に基づいて、CRBN関連タンパク質のRNAレベルを決定することを含む。

【0059】

特定の実施態様において、基準と比較したCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が低下する場合、該化合物は該疾患又は障害を治療する際に恐らく有効だろう。特定の実施態様において、基準と比較したCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が上昇する場合、該化合物は該疾患又は障害を治療する際に恐らく有効だろう。一実施態様において、基準は、対象に該化合物を投与する前に該対象から得られた第2の試料を使用して調製されるが、その場合、該第2の試料は第1の試料と同じ源から得られる。別な実施態様において、基準は、該疾患又は障害を有さない健康な対象から得られた第2の試料を使用して調製されるが、その場合、該第2の試料は第1の試料と同じ源から得られる。

20

【0060】

本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、該化合物は、以下の5.3節に与えられる化合物である。本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、免疫調節化合物は、サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミド、3-(5-アミノ-2-メチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオン、又は3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオン、その立体異性体、若しくはその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、水和物、共結晶、クラスレート、若しくは多形体である。一実施態様において、該化合物は、基準と比較して CRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を低下させる。別な実施態様において、該化合物は、基準と比較して CRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を上昇させる。

30

【0061】

本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、CRBN関連タンパク質は、DNA損傷結合タンパク質1(DDB1);ポリアデニル酸結合タンパク質1(PABPC1);ヘテロ核リボヌクレオタンパク質R(HNRNPR);リボソームタンパク質L19(RPL19);シナプトタグミン結合性、細胞質RNA相互作用性タンパク質(SYNCRIP);H2Aヒストンファミリー、メンバーX(H2AFX);70kDa熱ショックタンパク質8(HSPA8);アルドラーゼA、フルクトース-ビスリン酸(ALDOA);ヒストンクラスター1、H2aa(HIST1H2AA);70kDa熱ショックタンパク質1A(HSPA1A);X線修復クロス捕捉タンパク質6(XRCC6);リボソームタンパク質L12(RPL12);リボソームタンパク質18A(RPL18A);リボソームタンパク質L4(RPL4);ヘテロ核リボヌクレオタンパク質A2/B1(HNRNP A2B1);ヘテロ核リボヌクレオタンパク質C(HNRNPC);リボソームタンパク質S2(RPS2);SEC24ファミリーメンバーC(SEC24C);リボソームタンパク質L9(RPL9);ユビキチン特異的ペプチダーゼ15(USP15);SEC24ファミリー、メンバーA(SEC24A);CTPシンターゼ(CTPS);ATP結合カセット、サブファミリーE(OABP)メンバー1(ABCE1);真核生物翻訳伸長因子1 1(EEF1A1);

40

50

インポーチン5(IPO5);切断・ポリアデニル化特異的因子6(CPSF6);カリウム電位開口型チャネルメンバー2(KCNAB2);染色体7オープンリーディングフレーム42(C7ORF42);染色体構造維持4(SMC4);グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)、ポリペプチド3(GNB3);H2Aヒストンファミリー、メンバー-Z(H2AFZ);ヒストンクラスター1、H1c(HIST1H1C);ヒストンクラスター1、H1d(HIST1H1D);ヒストンクラスター1、H1e(HIST1H1E);アクチン、(ACTB);カゼインキナーゼ2、1ポリペプチド(CSNK2A1);セレブロン(CRBN);DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド21(DDX21);DEAH(Asp-Glu-Ala-His)ボックスポリペプチド9(DHX9);DnaJ(Hsp40)ホモログ、サブファミリーC、メンバー1(DNAJC1);GTPアーゼ活性化タンパク質(SH3ドメイン)結合タンパク質1(G3BP1);70kDa熱ショックタンパク質1B(HSPA1B);インスリン様成長因子2 mRNA結合タンパク質2(IGF2BP2);リボソームタンパク質L10a(RPL10A);リボソームタンパク質L13a(RPL13A);リボソームタンパク質L14(RPL14);リボソームタンパク質L15(RPL15);リボソームタンパク質L21(RPL21);RPL3;リボソームタンパク質L30(RPL30);リボソームタンパク質L7(RPL7);リボソームタンパク質L7a(RPL7A);リボソームタンパク質、ラージ、P1(RPLP1);リボソームタンパク質、ラージ、P2(RPLP2);ミオシン、重鎖10、非筋(MYH10);インターロイキンエンハンサー結合因子3、90kDa(ILF3);ヌクレオリン(NCL);リボソームタンパク質S13(RPS13);リボソームタンパク質S16(RPS16);リボソームタンパク質S19(RPS19);リボソームタンパク質S6(RPS6);ブドウ球菌ヌクレアーゼ及びチューダドメイン含有(staphylococcal nuclease and tudor domain containing)1(SND1);真核生物翻訳開始因子2、サブユニット2、38kDa(EIF2S2);ヘテロ核リボヌクレオタンパク質H2(H') (HNRNPH2);ユビキチンB(UBB);真核生物翻訳伸長因子1 (EEF1G);トランスデュシン(ベータ)-様1X-連結型受容体1(TBL1XR1);新生ポリペプチド結合複合体サブユニット(NACA);真核生物翻訳開始因子4A、アイソフォーム1(EIF4A1);脂肪酸シターゼ(FASN);ホスホリボシルピロリン酸アミドトランスフェラーゼ(PPAT);GTPアーゼ活性化タンパク質(SH3ドメイン)結合タンパク質2(G3BP2);チューブリン、1a(TUBA1A);ユビキチン結合タンパク質2様(UBAP2L);ミニ染色体維持複合体成分2(MCM2);UDP-N-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼ1(UAP1);チューブリン、1c(TUBA1C);真核生物翻訳開始因子2、サブユニット1、35kDa(EIF2S1);真核生物翻訳開始因子3、サブユニットJ(EIF3J);プロテインキナーゼ、DNA活性化触媒ポリペプチド(DNA-activated, catalytic polypeptide)(PRKDC);ミニ染色体維持複合体成分7(MCM7);リボソームタンパク質L11(RPL11);チューブリン、1b(TUBA1B);シグナル伝達兼転写活性化因子3(STAT3);ペプチジル-tRNAヒドロラーゼ2(PTRH2);ポリ(A)結合タンパク質、細胞質4(PABPC4);プロテインチロシンホスファターゼ、受容体C型(PTPRC);微小管アクチン架橋因子1(MACF1);ユビキチン結合酵素E20(UBE20);デオキシウリジントリホスファターゼ(DUT);グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)、ポリペプチド2-様1(GNB2L1);ヌクレオポリン88kDa(NUP88);H2Aヒストンファミリー、メンバー-J(H2AFJ);Sec23ホモログB(S.セレビスエ(S.cerevisiae))(SEC23B);ピリドキサル(ピリドキシン、ビタミンB6)キナーゼ(PDXK);ATPクエン酸リアーゼ(ACLY);ATリッチインターラクティブドメイン1A(SWI-様)(ARID1A);グルカン(1,4- )、分枝酵素1(GBE1);70kDa熱ショックタンパク質9(モルタリン)(HSPA9);DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド17(DDX17);超上流要素(far upstream element)(FUSE)結合タンパク質1(FUBP1);Fボックスタンパク質21(FBXO21);ユースイング肉腫ブレイクポイント領域(breakpoint region)1(EWSR1);インターフェロン、-誘導タンパク質16(IFI16);チロシン3-モノオキシゲナーゼ/トリプトファン5-モノオキシゲナーゼ活性化タンパク質、イブシロンポリペプチド(YWHAE);ユビキチンA-52残基リボソームタンパク質融合産物1(UBA52);COP9恒常的光形態形成ホモログサブユニット6(シロイヌナズナ(Arabidopsis))(COPS6);GNAS複合座(GNAS);ユビキチン結合酵素E2Qファミリーメンバー1(UBE2Q1);フェルミチン(fermitin)ファミリーメンバー3(FERMT3);ヌクレオソーム集合タンパク質1-様2(NAP1L2);腫瘍タンパク質D52(TPD52);VAMP(小胞結合膜タンパク質)-結合タンパク質A、33kDa(VAPA);真核生物翻訳伸長因子1-様3(EEF1AL3);DNA損傷誘導性転写4(DDIT4);発現し、発生的に下方制御される神経前駆細胞(neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated)8(NEDD8);ヒストンクラスター1、H1a(HIST1H1A);ヒストンクラスター1、H

1b(HIST1H1B); 中心小体周辺物質1(PCM1)イカロスジンクフィンガータンパク質1(IKZF1、Ikaros)、又はイカロスジンクフィンガータンパク質3(IKZF3、Aiolos)である。

【0062】

本明細書に提供される方法の一実施態様において、CRBN関連タンパク質は、IKZF3(「Aiolos」としても知られる)である。本明細書に提供される方法の別な実施態様において、CRBN関連タンパク質は、58kDaの分子量を有するIKZF3である。本明細書に提供される方法の別な実施態様において、CRBN関連タンパク質は、42kDaの分子量を有するIKZF3である。別な実施態様において、本明細書に提供される化合物は、Aiolos発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)を下方制御する。別な実施態様において、該化合物はポマリドミドであり、Aiolos発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。別な実施態様において、該化合物はレナリドミドであり、Aiolos発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。別な実施態様において、該化合物は3-(5-アミノ-2-メチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオンであり、Aiolos発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。別な実施態様において、該化合物は、3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンであり、Aiolos発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。別な実施態様において、該化合物は、3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンの(S)立体異性体であり、Aiolos発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。

10

【0063】

本明細書に提供される方法の別な実施態様において、CRBN関連タンパク質はIKZF1(「Ikaros」としても知られる)である。別な実施態様において、本明細書に提供される化合物は、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)を下方制御する。別な実施態様において、該化合物はポマリドミドであり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。別な実施態様において、該化合物はレナリドミドであり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。別な実施態様において、該化合物は3-(5-アミノ-2-メチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオンであり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。別な実施態様において、該化合物は3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンであり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。別な実施態様において、該化合物は、3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンの(S)立体異性体であり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子の発現)が下方制御される。

20

30

【0064】

別な実施態様において、本明細書に提供される方法を実施するためのキットが本明細書に提供される。

【図面の簡単な説明】

【0065】

(5 図面の簡単な説明)

40

【図1】図1は、リンパ球(左のパネル)、顆粒球(上部パネル)、及び単球(右のパネル)集団中のAiolos発現の阻害における化合物Bの作用を、DMSO対照のパーセンテージとして、 $n=3$ で示す。

【0066】

【図2】図2は、CD20+B細胞中のAiolos発現を有意に阻害する化合物Bを、DMSO対照のパーセンテージとして、 $n=3$ で示す。

【0067】

【図3】図3は、CD3+T細胞中のAiolos発現を有意に阻害する化合物Bを、DMSO対照のパーセンテージとして、 $n=3$ で示す。

【0068】

50

【図4】図4は、化合物B非ヒト霊長類投与計画試験におけるPDサンプリングを示す。

【0069】

【図5】図5は、サルT依存性抗体応答(TDAR)投与スケジュール設定試験における化合物Bを示す。上部パネルは、種々の治療、ビヒクル、1日1回、隔日、2回/週、及び4日投薬3日投薬なしの力価を示す。下部概略図は、投与スケジュール設定を示す。

【0070】

【図6】図6は、カニクイザル試験における処置群1~4を示す。

【0071】

【図7】図7は、ヒト全血におけるAiolosウェスタンブロッティングを示す。全血試料を、化合物又はDMSOで250nMで18時間処理し、次いで、PBMC調製及びIBに供した。

10

【0072】

【図8】図8は、サルPBMCにおけるAiolosウェスタンブロッティングを示す。モーリシャスサルPBMCを、DMSO又は化合物Bで2nM及び200nMで処理した。左のパネルは0時間での処理であり、右のパネルは18時間での処理である。

【0073】

【図9】図9は、カニクイザル試験、第1群、ビヒクル対照におけるAiolosウェスタンブロッティングを示す。

【0074】

【図10】図10は、カニクイザル試験、第1群、ビヒクル対照における、Aiolos 58kD発現(左のパネル)及び42kD発現(右のパネル)のグラフ表示を示す。

20

【0075】

【図11】図11は、カニクイザル試験、第2群、化合物Bの1日1回投薬におけるAiolosウェスタンブロッティングを示す。化合物Bは、数匹のサルにおいてAiolos 58kDを減少させ、Aiolos 42kDを増加させた。

【0076】

【図12】図12は、カニクイザル試験、第2群、化合物Bの1日1回投薬における、Aiolos 58kD発現(左のパネル)及び42kD発現(右のパネル)のグラフ表示を示す。

【0077】

【図13】図13は、カニクイザル試験、第3群、化合物Bの隔日投薬におけるAiolosウェスタンブロッティングを示す。化合物Bは、数匹のサルにおいてAiolos 58kDを減少させ、Aiolos 42kDを増加させた。

30

【0078】

【図14】図14は、カニクイザル試験、第3群、化合物Bの隔日投薬における、Aiolos 58kD発現(左のパネル)及び42kD発現(右のパネル)のグラフ表示を示す。

【0079】

【図15】図15は、カニクイザル試験、第4群、化合物Bの4日/週投薬における、Aiolosウェスタンブロッティングを示す。化合物Bは、数匹のサルにおいてAiolos 58kDを減少させ、Aiolos 42kDを増加させた。

【0080】

【図16】図16は、カニクイザル試験、第4群、化合物Bの4日/週投薬における、Aiolos 58kD発現(左のパネル)及び42kD発現(右のパネル)のグラフ表示を示す。

40

【0081】

【図17】図17は、サリドマイドの免疫調節性誘導体(IMiD化合物)がT細胞における分解により転写因子Aiolosを制御することを示す。化合物Aは、臨床的に重要な濃度で、濃度依存的にAiolosタンパク質発現を阻害する。

【0082】

【図18】図18は、Aiolosタンパク質に対するIMiDの差示的な作用を示す。該作用は、骨髄腫細胞における化合物の抗増殖活性と相関しているようである。ポマリドミド、化合物A、及び化合物Bは、骨髄腫細胞でのAiolosタンパク質阻害においてレナリドミドよりも高い効力を有する。

50

【0083】

【図19】図19は、IMiDによるAiolosの制御を示す。該制御は、低CRBN発現を有する細胞系において妨げられている。左のパネルは、4時間でのボマリドミドによる用量反応を示す。右のパネルは、5日後の細胞増殖を示す(n=3-7)。

【0084】

【図20】図20は、CRBNタンパク質の喪失がレナリドミド及びボマリドミドによるAiolosの下方制御を防止することを示す。ラナリドミド(lanalidomide)又はボマリドミドによるAiolos発現の減少にはCRBNタンパク質が必要である。

【0085】

【図21】図21は、Aiolosノックダウンが、p21発現を誘発し、IRF4を減少させ、S期にある細胞数を減少させるIMiD治療に類似であることを示す。Aiolosは、U266細胞でのIRF4発現及び細胞周期進行に必要である。

10

【0086】

【図22】図22は、IMiDが、健康なドナーのB細胞及びCLL中のAiolosタンパク質レベルに影響を与えることを示す。Aiolos発現は、健康なドナーからのB細胞より、B-CLL細胞において高い。IMiD処理は、B-CLL患者細胞中でAiolosを阻害する。

【0087】

【図23】図23は、IMiDが、MCL(Rec-1)及びDLBCLリンパ腫(U2932、OCI-LY19)細胞系でAiolosタンパク質発現を阻害することを示す。

【0088】

【図24】図24は、Aiolosのノックダウンがp21発現を誘発することを示す。

20

【0089】

【図25】図25は、炎症性乳癌細胞系AU565及びヒト癌腫細胞系ZR 75-1における内因性Aiolosのレベルに対する化合物Aの作用を示す。

【0090】

【図26】図26は、AU565細胞中のAiolosのレベルに対する化合物Aの作用及び抗flag抗体及び抗myc抗体を使用する検出パターンを示す。

【0091】

【図27】図27は、化合物AによるAiolosの阻害の時間経過及びMF-132によるそのような阻害の救済を示す。

30

【0092】

【図28】図28は、トリプルネガティブ(「TN」;EP<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/Her2<sup>-</sup>)細胞と比較した、Her2<sup>+</sup>細胞中のaiolsのレベルに対する化合物Aの作用を示す。

【0093】

【図29】図29は、OCI-Ly10異種移植片リンパ腫におけるレナリドミドによるAiolos発現の阻害を示す。

【0094】

【図30】図30は、OCI-Ly10異種移植片リンパ腫における化合物AによるAiolos発現の阻害を示す。

【0095】

【図31】図31は、OCI-Ly10異種移植片リンパ腫における化合物AのR異性体によるAiolos発現の阻害を示す。

40

【0096】

【図32】図32は、OCI-Ly10異種移植片リンパ腫における化合物AのS異性体によるAiolos発現の阻害を示す。

【0097】

【図33A】図33Aは、化合物A又は化合物Bによる全血の処理後1.5時間でのリンパ球中のAiolos発現の阻害に関するFACS分析結果を示す。

【0098】

【図33B】図33Bは、化合物A又は化合物Bによる全血の処理後1.5時間でのT細胞及びB細胞

50

胞中のAiolos発現の阻害を示す。

【0099】

【図34A】図34Aは、化合物A又は化合物Bによる全血の処理後5時間でのリンパ球中のAiolos発現の阻害に関するFACS分析結果を示す。

【0100】

【図34B】図34Bは、化合物A又は化合物Bによる全血の処理後5時間でのT細胞及びB細胞中のAiolos発現の阻害を示す。

【0101】

【図35A】図35Aは、化合物A又は化合物Bによる処理後1.5時間での全血から調製した生存可能に凍結した(viably frozen)PMBCにおけるAiolos発現の阻害に関するFACS分析結果を示す。

10

【0102】

【図35B】図35Bは、化合物A又は化合物Bによる処理後1.5時間での全血から調製した生存可能に凍結したT細胞及びB細胞におけるAiolos発現の阻害を示す。

【0103】

【図36A】図36Aは、化合物A又は化合物Bによる処理後5時間での全血から調製した生存可能に凍結したPMBCにおけるAiolos発現の阻害に関するFACS分析結果を示す。

【0104】

【図36B】図36Bは、化合物A又は化合物Bによる処理後5時間での全血から調製した生存可能に凍結したT細胞及びB細胞におけるAiolos発現の阻害を示す。

20

【0105】

【図37】図37は、ボマリドミド、レナリドミド、化合物A、及び化合物Bによる処理後6時間でのAiolos及びIkaros発現の阻害を示す。

【0106】

【図38】図38は、多発性骨髄腫細胞における、レナリドミド及びボマリドミドによるリジン203を含むAiolosペプチドの検出増強を示す。

【0107】

【図39A】図39Aは、多発性骨髄腫細胞、T細胞、及びB細胞における、濃度依存的及びプロテアソーム依存的な、レナリドミド及びボマリドミドによるAiolos及びIkarosの分解を示す。

30

【0108】

【図39B】図39Bは、多発性骨髄腫細胞における、濃度依存的な、レナリドミド及びボマリドミドによるAiolosの分解を示す。

【0109】

【図39C】図39Cは、多発性骨髄腫細胞における、濃度依存的及びプロテアソーム依存的な、レナリドミド及びボマリドミドによるIkarosの分解を示す。

【0110】

【図40】図40は、レナリドミド及びボマリドミドが、MM細胞、T細胞、及びB細胞において、薬物処理の時間内に、時間依存的にAiolos及びIkarosを破壊することを示す。

【0111】

40

【図41】図41は、レナリドミド及びボマリドミドが、シクロヘキシミド、及びタンパク質合成の阻害剤の存在下でAiolosの破壊を誘導することを示す。

【0112】

【図42A】図42Aは、レナリドミド及びボマリドミドによるAiolos及びIkarosの分解がCRBN依存적であることを示す。

【0113】

【図42B】図42Bは、siCRBNがCRBN遺伝子発現を低下させることを示す。

【0114】

【図43A】図43Aは、AiolosがT細胞においてIL-2の負の調節因子であることを示す。

【0115】

50

【図43B】図43Bは、Aiolosのサイレンシングがレナリドミド治療によく似ていることを示す。

【0116】

【図43C】図43Cは、siAiolosがAiolosレベルを低下させることを示す。

【0117】

【図43D】図43Dは、Aiolosのサイレンシングがボマリドミド治療によく似ていることを示す。

【0118】

【図44A】図44Aは、マウスのH929 MM細胞に対するレナリドミドの抗腫瘍活性を示す。

【0119】

【図44B】図44Bは、免疫組織化学により測定して、レナリドミドが、マウスのH929 MM細胞においてAiolos及びIkarosの分解を誘発することを示す。

【0120】

【図44C】図44Cは、レナリドミドによるインビボ抗腫瘍活性が、Aiolos及びIkarosの分解に相関していることを示す。

【0121】

【図45】図45は、多発性骨髄腫細胞におけるAiolos及びIkarosの分解が、本明細書に提供される化合物に独特であることを示す。

【0122】

【図46】図46は、マウスのOCI-Ly10リンパ腫腫瘍におけるIkaros及びAiolosに対する化合物Aのインビボ作用を示す。

【0123】

【図47A】図47Aは、Aiolos阻害が、癌患者において、時間及び投与量により、T細胞中の化合物A曝露に相関していることを示す。

【0124】

【図47B】図47Bは、Aiolos阻害が、癌患者において、時間及び投与量により、B細胞中の化合物A曝露に相関していることを示す。

【0125】

【図48A】図48Aは、免疫調節化合物が、T細胞においてIkarosの発現に影響することを示す。

【0126】

【図48B】図48Bは、化合物Aが、T細胞においてAiolosの発現に影響することを示す。

【0127】

【図49】図49は、化合物Aが、ジャーカット細胞において内因性Aiolosと過剰発現されたAiolosの両方を分解することを示す。多数のリジンのユビキチン化が、化合物Aが媒介するAiolos分解には必要であり、IMiD-誘発性Aiolos分解がAiolosユビキチン化によるものであることを証明する。化合物AによるIkarosタンパク質分解は、ジャーカット細胞においてAiolos非依存性である。

【0128】

【図50A】図50Aは、初代ヒトT細胞のAiolosウェスタンブロットティングを示す。ゲルは、6時間での初代T細胞中のAiolos分解に対するIMiD化合物の比較を示す。

【0129】

【図50B】図50Bは、6時間での初代T細胞中のAiolos分解に対する、本明細書に提供される化合物の定量化比較を示す。

【0130】

【図50C】図50Cは、初代ヒトT細胞のAiolosウェスタンブロットティングを示す。ゲルは、24時間での初代T細胞中のAiolos分解に対する、本明細書に提供される化合物の比較を示す。

【0131】

【図50D】図50Dは、24時間での初代T細胞中のAiolos分解に対する、本明細書に提供さ

10

20

30

40

50

れる化合物の定量化比較を示す。

【0132】

【図51A】図51Aは、健康なボランティアにおける、種々の投与量の化合物Bに反応したB細胞中のAiolosの減少を示す。

【0133】

【図51B】図51Bは、健康なボランティアにおける、種々の投与量の化合物Bに反応したT細胞中のAiolosの減少を示す。

【0134】

【図52】図52は、B細胞において化合物BがIkaros及びAiolosタンパク質レベルを低下させることを示す。

【0135】

【図53A】図53Aは、SSc及びSLEにおけるセレプロンの過剰発現を示す。

【0136】

【図53B - E】図53B~Eは、SSc及びSLEにおけるIkarosの過剰発現を示す。

【0137】

【図53F】図53Fは、SSc及びSLEにおけるHeliosの過剰発現を示す。

【0138】

【図53G】図53Gは、SSc及びSLEにおけるAiolosの過剰発現を示す。

【0139】

【図54】図54は、種々の投与量の化合物Bにより処置された32匹のサルから得たPBMC試料のIkarosレベルを示す。

【0140】

【図55A】図55Aは、雄及び雌のサルのPBMCにおけるIkarosレベルに対する化合物Bの作用を示す。

【0141】

【図55B】図55Bは、雌のサルのPBMCにおけるIkarosレベルに対する化合物Bの作用を示す。

【0142】

【図55C】図55Cは、雄のサルのPBMCにおけるIkarosレベルに対する化合物Bの作用を示す。

【0143】

【図56A】図56Aは、CLL細胞における主要な増殖及び生存タンパク質のウェスタンブロットを利用して、本明細書に提供される化合物による処理の作用を示す。

【0144】

【図56B】図56Bは、CLL細胞における主要な増殖及び生存タンパク質の定量化により、本明細書に提供される化合物による処理の作用を示す。

【0145】

【図56C】図56Cは、3名の異なるB-CLL患者共培養試料における、ボマリドミド、レナリドミド、化合物A、及び化合物BによるAiolosの用量依存性阻害を示す。

【0146】

【図57A】図57Aは、DMSO、ボマリドミド、レナリドミド、化合物A、又は化合物Bにより処理された対照細胞及びCRBNノックダウンB-CLL細胞中のAiolosの定量化を示す。

【0147】

【図57B】図57Bは、DMSO、ボマリドミド、レナリドミド、化合物A、又は化合物Bにより処理された対照細胞及びCRBNノックダウンB-CLL細胞中のAiolosタンパク質のフローサイトメトリー測定定の定量化を示す。

【0148】

【図57C】図57Cは、DMSO、ボマリドミド、レナリドミド、化合物A、又は化合物Bにより処理された対照細胞及びCRBNノックダウンB-CLL細胞において検出されたIkarosアイソフォームの定量化を示す。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0149】

(6 発明の詳細な説明)

## (6.1 定義)

本明細書では、特記されない限り、「治療する(treat)」、「治療する(treating)」、及び「治療」という用語は、患者が特定の癌に罹患している間に行なわれる行為であって、癌の重症度を軽減するか、又は癌の進行を遅延化若しくは緩徐化する行為を意味する。

## 【0150】

化合物による治療に関して言及される場合の「感受性」及び「感受性のある」という用語は、腫瘍又は治療中の疾患の進行を軽減又は減少させる際の該化合物の有効性の程度を指す相対的な用語である。例えば、化合物と関連した細胞又は腫瘍の治療に関して使用される場合の「感受性の増加」という用語は、腫瘍治療の有効性の少なくとも5%、又はそれを上回る増加を意味する。

10

## 【0151】

本明細書では、用語「免疫調節化合物」又は「免疫調節薬」は、一般的に、何らかの方法で免疫応答を変えられることができる分子又は薬剤を意味する。免疫調節化合物の非限定的な例には、以下の5.3節で開示されているものがある。

## 【0152】

本明細書では、特記されない限り、化合物の「治療上有効な量」という用語は、癌の治療若しくは管理において治療的利益をもたらすか、又は癌の存在と関連する1つ以上の症状を遅延若しくは最低限にするのに十分な量である。化合物の治療上有効な量は、癌の治療又は管理における治療的利益をもたらす、単独の又は他の療法と組み合わせた、治療剤の量を意味する。「治療上有効な量」という用語は、療法全体を改善するか、癌の症状若しくは原因を軽減若しくは回避するか、又は別の治療剤の治療効能を増強する量を包含することができる。

20

## 【0153】

本明細書では、「効果的な患者腫瘍応答」は、患者にとっての治療的利益の増加を意味する。「効果的な患者腫瘍応答」は、例えば、腫瘍の進行速度の5%、10%、25%、50%、又は100%の減少であり得る。「効果的な患者腫瘍応答」は、例えば、癌の身体症状の5%、10%、25%、50%、又は100%の減少であり得る。「効果的な患者腫瘍応答」は、例えば、任意の好適な手段、例えば、遺伝子発現、細胞数、アッセイ結果などによって測定される、患者の応答の5%、10%、25%、50%、100%、200%、又はそれを上回る増加であり得る。

30

## 【0154】

「可能性」という用語は、通常、事象の確率の増加を意味する。患者腫瘍応答の有効性に関して使用される場合の「可能性」という用語は、通常、腫瘍進行又は腫瘍細胞成長の速度が減少する確率の増加を企図している。患者腫瘍応答の有効性に関して使用される場合の「可能性」という用語は、通常、腫瘍の治療の進展の増大の証拠となり得る、mRNA又はタンパク質発現などの、指標の増大も意味し得る。

## 【0155】

「予測する」という用語は、通常、事前に決定するか又は言及することを意味する。癌治療の有効性を「予測する」ために使用される場合、例えば、「予測する」という用語は、癌治療の転帰の可能性を、治療が始まる前に、又は治療期間が実質的に進む前に、最初に決定することができることを意味する。

40

## 【0156】

本明細書での用語「モニターする」は、一般的に、活性の監視、監督、調節、観察、追跡、又は調査を指す。例えば、「化合物の有効性をモニターする」という用語は、患者における又は腫瘍細胞培養物における癌治療の有効性を追跡することを意味する。同様に、「モニタリング」は、個々に、又は臨床試験において、患者コンプライアンスとの関連において使用される場合、患者が実際に被験薬物を処方された通りに服用していることを追

50

跡又は確認することを指す。モニタリングは、例えば、mRNA又はタンパク質バイオマーカーの発現を追跡することによって実施できる。

【0157】

癌又は癌関連疾患の改善は、完全寛解又は部分寛解として特徴付けることができる。「完全寛解」は、何らかの過去の異常なX線検査、骨髄、及び脳脊髄液(CSF)、又は異常な単クローン性タンパク質の測定値の正常化を伴う、臨床的に検出可能な疾患がないことを意味する。「部分寛解」は、新たな病巣の非存在下の、全ての測定可能な腫瘍組織量(すなわち、対象に存在する悪性細胞の数、又は腫瘍塊の測定体積若しくは異常な単クローン性タンパク質量)の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%の減少を意味する。「治療」という用語は、完全寛解と部分寛解の両方を企図する。

10

【0158】

「腫瘍」は、本明細書では、悪性か良性かを問わず、全ての新生物性細胞成長及び増殖、並びに全ての前癌性及び癌性の細胞及び組織を意味する。「新生物性」は、本明細書では、悪性か良性かを問わず、異常な組織成長をもたらす、全ての形態の調節不全又は制御されていない細胞成長を意味する。そのため、「新生細胞」は、調節不全又は制御されていない細胞成長を有する悪性細胞及び良性細胞を含む。

【0159】

本明細書では、用語「セレブロン関連タンパク質」又は「CRBN関連タンパク質」は、直接又は間接的にCRBNと相互作用又は結合するタンパク質を意味する。特定の実施態様において、「セレブロン関連タンパク質」又は「CRBN関連タンパク質」は、CRBNの基質、例えば、CRBNを含むE3ユビキチンリガーゼ複合体のタンパク質基質、又はその下流基質である。一実施態様において、本明細書に提供されるCRBN関連タンパク質は、「Aiolos」としても知られるIKZF3又は「Ikaros」としても知られるIKZF1などのCRBNの基質である。特定の実施態様において、「セレブロン関連タンパク質」又は「CRBN関連タンパク質」はCRBNの結合タンパク質である。

20

【0160】

「調節する」は、本明細書では、活性又は機能の増強又は減弱など、分子の活性又は生物学的機能の制御を意味する。

【0161】

用語「癌」及び「癌性」は、典型的には制御されない細胞成長により特徴づけられる、哺乳動物の生理学的状態を意味するか、又は該状態を言い表す。癌の例には、血液性腫瘍(例えば、多発性骨髄腫、リンパ腫、及び白血病)、及び固形腫瘍があるが、これらに限定されない。

30

【0162】

用語「難治性又は抵抗性」は、患者が、集中治療の後でさえ、残存する癌細胞(例えば、白血病又はリンパ腫細胞)をそのリンパ系、血液、及び/又は造血組織(例えば、骨髄)に有する状況を意味する。

【0163】

本明細書では、本明細書で互換的に使用される用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、ペプチド結合により連結した3つ以上のアミノ酸が連続して並ぶアミノ酸のポリマーを意味する。用語「ポリペプチド」は、タンパク質、タンパク質断片、タンパク質アナログ、オリゴペプチドなどを含む。本明細書での用語ポリペプチドは、ペプチドも意味し得る。ポリペプチドを構成するアミノ酸は、天然由来でも、合成されたものでもよい。ポリペプチドは、生体試料から精製できる。

40

【0164】

用語「抗体」は最も広い意味で本明細書において使用され、完全に組み立てられた抗体、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体断片(例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、及び他の断片)、単鎖抗体、ダイアボディ、抗体キメラ、ハイブリッド抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体などに及ぶ。用語「抗体」は、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両

50

方に及ぶ。用語「抗体」及び「免疫グロブリン」又は「Ig」は、本明細書において互換的に使用できる。用語「CRBN抗原に免疫特異的に結合する抗体」、「CRBNエピトープに免疫特異的に結合する抗体」、「CRBN抗体」、「抗CRBN抗体」、及び類似の用語は本明細書において互換的に使用され、CRBNポリペプチド、例えばCRBN抗原又はエピトープ(例えば、【化3】

#### EEFHGRTLHDDD (配列番号:1)

又はペプチド65-76ヒトCRBN(配列番号:12))に特異的に結合する抗体及びその断片を意味する。CRBNポリペプチドに特異的に結合する、修飾抗体(すなわち修飾されたIgG(例えば、IgG1)定常ドメインを含む抗体)及び未修飾抗体(すなわち修飾されたIgG(例えば、IgG1)定常ドメインを含まない抗体)をどちらも含む抗体。CRBN抗原に免疫特異的に結合する抗体又はその断片は、関連抗原と交差反応性であることがある。特定の実施態様において、CRBN抗原に免疫特異的に結合する抗体又はその断片は、他の抗原と交差反応しない。CRBN抗原に免疫特異的に結合する抗体又はその断片は、例えば、免疫アッセイ、BIAcore、又は当業者に公知である他の技術により同定できる。抗体又はその断片は、ラジオイムノアッセイ(RIA)及び酵素結合免疫吸着法(ELISA)などの実験技術を利用して決定して、どの交差反応性抗原に対してよりも高い親和性でCRBN抗原に結合する場合に、CRBN抗原に特異的に結合する。典型的には、特異的又は選択的な反応は、バックグラウンドシグナル又はノイズの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの10倍以上である。抗体の特異性に関する議論には、例えば、Paul編の文献(1989,「基礎免疫学(Fundamental Immunology)」、第2版、Raven Press, New York、332-336ページ)を参照されたい。

#### 【0165】

本明細書に提供される抗体には、合成抗体、モノクローナル抗体、遺伝子組み換えにより産生された抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、細胞内発現抗体、単鎖Fv(scFv)(例えば、単一特異性、二重特異性などを含む)、ラクダ化抗体、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド連結Fv(sdFv)、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、及び上記のいずれかのエピトープ結合断片があるが、これらに限定されない。とりわけ、本明細書に提供される抗体は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわちCRBN抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位(例えば、抗CRBN抗体の1つ以上の相補性決定領域(CDR))を含む抗原結合ドメイン又は分子を含む。本明細書に提供される抗体は、免疫グロブリン分子のどのようなタイプでも(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、どのようなクラスでも(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)、どのようなサブクラスでも(例えば、IgG2a及びIgG2b)でもよい。いくつかの実施態様において、抗CRBN抗体は、完全ヒトモノクローナルCRBN抗体などの完全ヒトである。特定の実施態様において、本明細書に提供される抗体は、IgG抗体、又はそのクラス(例えば、ヒトIgG1又はIgG4)又はサブクラスである。

#### 【0166】

用語「抗原結合ドメイン」、「抗原結合領域」、「抗原結合断片」という用語、及び類似の用語は、抗原と相互作用し、結合因子に、該抗原に対するその特異性及び親和性を付与するアミノ酸残基を含む抗体の部分(例えば、CDR)を意味する。抗原結合領域は、齧歯類(例えば、ウサギ、ラット、又はハムスター)及びヒトなどの任意の動物種から誘導できる。いくつかの実施態様において、抗原結合領域は、ヒト由来のものである。

#### 【0167】

抗体の「定常領域」又は「定常ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、種々のエフェクター機能、例えばFc受容体との相互作用を示す、軽鎖及び重鎖のカルボキシ末端部分を意味する。該用語は、免疫グロブリンのもう一方の部分、抗原結合部位を含む可変領域より保存されたアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子の部分の意味する。定常ドメインは、重鎖のCH1、CH2、及びCH3ドメイン並びに軽鎖のCLドメインを含む。

#### 【0168】

本明細書での用語「エピトープ」は、抗体の1つ以上の抗原結合領域に結合可能であり

、哺乳動物(例えば、ヒト)などの動物において抗原性又は免疫原性活性を有し、免疫応答を惹起することが可能である、CRBNポリペプチド又はCRBNポリペプチド断片など抗原の表面上の局所領域を意味する。免疫原性活性を有するエピトープは、動物において抗体応答を惹起するポリペプチドの一部である。抗原性活性を有するエピトープは、当分野に周知である方法により、例えば、本明細書に記載される免疫アッセイにより決定される、抗体が免疫特異的に結合するポリペプチドの一部である。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。エピトープは、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面群からなり、特定の三次元構造特性並びに特定の電荷特性を有する。エピトープに寄与するポリペプチドの領域は、該ポリペプチドの連続的アミノ酸であってよく、或いは、エピトープは、該ポリペプチドの2つ以上の非連続的領域から生じるものでよい。エピトープは、抗原の三次元表面特性であっても、そうでなくてもよい。本明細書に提供されるCRBNの例示的なエピトープは、

10

【化4】

### EEFHGRTLHDDD (配列番号:1)

又はCRBNのペプチド65-60(配列番号:13)である。

【0169】

用語「完全ヒト抗体」又は「ヒト抗体」は本明細書において互換的に使用され、ヒト可変領域及び、いくつかの実施態様において、ヒト定常領域を含む抗体を意味する。具体的な実施態様において、該用語は、ヒト由来の可変領域及び定常領域を含む抗体を意味する。「完全ヒト」抗CRBN抗体は、特定の実施態様において、CRBNポリペプチドに結合し、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン核酸配列の天然の体細胞変異体である核酸配列によりコードされる抗体も包含し得る。具体的な実施態様において、本明細書に提供される抗CRBN抗体は、完全ヒト抗体である。用語「完全ヒト抗体」は、Kabatらの文献(「免疫学的に関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」, 第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242, 1991)に記載されている、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に対応する可変領域及び定常領域を有する抗体を含む。完全ヒト抗体を産生する例示的な方法は、例えば、本明細書の実施例に与えられるが、当分野に公知である任意の方法を利用できる。

20

【0170】

「組換え型ヒト抗体」という句は、組換え手段によって調製、発現、作製、又は単離されたヒト抗体、例えば、宿主細胞内にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現された抗体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子について遺伝子導入及び/若しくは染色体導入された動物(例えば、マウス若しくはウシ)から単離された抗体(例えば、Taylor, L. D.らの文献((1992) Nucleic Acids Res. 20:6287-6295)参照)、又はヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製、発現、作製、若しくは単離された抗体を含む。そのような組換え型ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から誘導された可変領域及び定常領域を有し得る。Kabatらの文献((1991)「免疫学的に関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」, 第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242)を参照されたい。しかし、特定の実施態様において、そのような組換え型ヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発(又は、ヒトIg配列に関して遺伝子導入された動物が利用される場合、インビボ体細胞性突然変異誘発)を起こしやすく、そのため、組換え型抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系VH及びVL配列から誘導されて、該配列に関連するが、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリーに天然には存在し得ることがない配列である。

30

40

【0171】

抗体に関連して使用される場合の用語「重鎖」は、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、アルファ(  $\alpha$  )、デルタ(  $\delta$  )、イプシロン(  $\epsilon$  )、ガンマ(  $\gamma$  )、及びミュー(  $\mu$  )

50

と呼ばれる5つの別な種類を意味する。重鎖のこれらの別な種類は周知であり、それぞれ、IgGの4つのサブクラス、すなわちIgG1、IgG1、IgG3、及びIgG4を含む、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMの5つのクラスの抗体を生み出す。いくつかの実施態様において、重鎖はヒト重鎖である。

【0172】

用語「カバット付番」及び類似の用語は当分野において認められており、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域又はその抗原結合部分において、他のアミノ酸残基よりもより可変である(すなわち超可変)であるアミノ酸残基に番号付けをするシステムを意味する。Kabatらの文献((1971) *Ann. ny Acad. Sci.* 190:382-391)及びKabatらの文献((1991)「免疫学的に関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」, 第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242)。重鎖可変領域に関して、超可変領域は、典型的には、CDR1ではアミノ酸位置31から35、CDR2ではアミノ酸位置50から65、及びCDR3ではアミノ酸位置95から102にわたる。軽鎖可変領域に関しては、超可変領域は、典型的には、CDR1ではアミノ酸位置24から34、CDR2ではアミノ酸位置50から56、及びCDR3ではアミノ酸位置89から97にわたる。他の付番方式は、当業者により容易に理解されるだろう。

10

【0173】

用語「軽鎖」は、抗体に関連して使用される場合、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )又はラムダ( )と呼ばれる2つの異なる種類を意味する。軽鎖アミノ酸配列は当分野に周知である。特定の実施態様において、軽鎖はヒト軽鎖である。

20

【0174】

用語「モノクローナル抗体」は、均質又は実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を意味し、各モノクローナル抗体は、典型的には、抗原上の単一のエピトープを認識する。いくつかの実施態様において、本明細書での「モノクローナル抗体」は、単一のハイブリドーマ又は他の細胞により産生された抗体であって、例えば、ELISA又は当分野において公知であるか、若しくは本明細書に提供される実施例にある他の抗原結合若しくは競合結合アッセイにより決定されて、免疫特異的にCRBNエピトープにのみ結合する抗体である。用語「モノクローナル」は、抗体を製造するなどの特定の方法にも限定されない。例えば、本明細書に提供されるモノクローナル抗体は、Kohlerらの文献(*Nature*, 256:495 (1975))に記載されるハイブリドーマ法により製造でき、又は、例えば本明細書に記載される技術を利用してファージライブラリーから単離できる。クローン細胞系及びそれにより発現されるモノクローナル抗体の調製のための他の方法は、当分野に周知である。例えば、「分子生物学のショートプロトコル(Short Protocols in Molecular Biology)」, (2002) 第5版、Ausubelら編、John Wiley and Sons, New Yorkの第11章を参照されたい。他のモノクローナル抗体を産生する他の例示的な方法は、本明細書の実施例に与えられている。

30

【0175】

本明細書での「ポリクローナル抗体」は、多くのエピトープを有するタンパク質に対する免疫原性応答において生じた抗体集団を意味し、そのため、該タンパク質内の同じエピトープ又は異なるエピトープに対する種々の異なる抗体を含む。ポリクローナル抗体の産生方法は当分野に公知である。例えば、「分子生物学のショートプロトコル(Short Protocols in Molecular Biology)」, (2002) 第5版、Ausubelら編、John Wiley and Sons, New Yorkの第11章を参照されたい。

40

【0176】

用語「セレブロン」又は「CRBN」及び類似の用語は、任意のCRBN、例えばヒトCRBNタンパク質(例えば、それぞれが引用により全体として本明細書に組み込まれているヒトCRBNアイソフォーム1、GenBank受託番号NP\_057386(配列番号:12);又はヒトCRBNアイソフォーム2、GenBank受託番号NP\_001166953(配列番号:13))のアミノ酸配列を含むポリペプチド(「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は本明細書において互換的に使用される)、並びに関連するポリペプチドを、そのSNP変異体を含めて意味する。関連するCRBNポリペプチドには、対立遺伝子変異体(例えば、SNP変異体);スプライス変異体;断片;誘

50

導体;置換、欠失、及び挿入変異体;融合ポリペプチド;及び種間ホモログがあり、これらは、特定の実施態様において、CRBN活性を保持し、且つ/又は抗CRBN免疫応答を発生させるのに充分である。

【0177】

用語「CRBN抗原」は、抗体が免疫特異的に結合するCRBNポリペプチドの部分を意味する。CRBN抗原は、抗体が免疫特異的に結合するCRBNポリペプチド又はその断片のアナログ若しくは誘導体も意味する。免疫応答を惹起することが可能なCRBN抗原の表面上の局所領域は、CRBN「エピトープ」である。エピトープに寄与するCRBNポリペプチドの領域は、該ポリペプチドの連続的なアミノ酸であってよく、又は、エピトープは、ポリペプチドの2つ以上の不連続領域から生じるものであってもよい。エピトープは、抗原の三次元表面特性であっても、そうでなくもよい。特定の実施態様において、CRBNエピトープは、

10

【化5】

EEFHGRTLHDDD (配列番号:1)

又はヒトCRBNのペプチド65-76(配列番号:12)である。

【0178】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体間で配列が大幅に異なり、各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合及び特異性に使用される軽鎖及び重鎖の一部、典型的には重鎖のアミノ末端の約120から130アミノ酸、及び軽鎖の約100から110アミノ酸を意味する。配列の可変性が相補性(complimentarily)決定領域(CDR)と呼ばれるこれらの領域に集中している一方、可変領域においてより高度に保存されている領域はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。軽鎖及び重鎖のCDRは、主に、抗体の抗原との相互作用を担っている。本明細書で使用されるアミノ酸位置の付番は、Kabatらの文献((1991)「免疫学的に関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」, 第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242)にあるEUインデックスに従う。いくつかの実施態様において、可変領域は、ヒト可変領域である。

20

【0179】

本明細書での用語「発現された」又は「発現」は、遺伝子からの転写により、該遺伝子の2つの核酸鎖の一方のある領域に少なくとも部分的に相補的であるRNA核酸分子が生じることを意味する。本明細書での用語「発現された」又は「発現」は、RNA分子からの翻訳により、タンパク質、ポリペプチド、又はその一部が生じることも意味する。

30

【0180】

「上方制御される」mRNAは、一般に、ある処置又は条件で増加する。「下方制御される」mRNAは、一般に、ある処置又は条件に反応したmRNAの発現レベルの低下を意味する。状況によっては、mRNAレベルは、ある処置又は条件で変わらないままのことがある。

【0181】

患者試料由来のmRNAは、薬物で処理されると、非処理の対照に比べて「上方制御され」得る。この上方制御は、例えば、比較対照mRNAレベルの約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、90%、100%、200%、300%、500%、1,000%、5,000%、又はそれより多い増加であり得る。

40

【0182】

或いは、mRNAは、特定の化合物又は他の薬剤の投与に反応して、「下方制御され」得る、すなわち、より低レベルで発現され得る。下方制御されるmRNAは、例えば、比較対照mRNAレベルの約99%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、1%、又はそれより低いレベルで存在し得る。

【0183】

同様に、患者試料由来のポリペプチド又はタンパク質バイオマーカーレベルは、薬物により処理されると、未処理の対照に比べて、増加し得る。この増加は、比較対照タンパク質レベルの約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、90%、100%、200%、300%、500%、

50

1,000%、5,000%、又はそれより多くなり得る。

【0184】

或いは、タンパク質バイオマーカーのレベルは、特定の化合物又は他の薬剤の投与に  
10 答して、減少し得る。この減少は、例えば、比較対照タンパク質レベルの約99%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、1%、又はそれより低いレベルで存在し得る。

【0185】

本明細書での「決定する」、「測定する」、「評価する(evaluating)」、「評価する(assessing)」、及び「検定する」という用語は、一般的に、任意の形態の測定を意味し、  
10 ある要素が存在するか否かを決定することを含む。これらの用語は、定量的決定及び/又は定性的決定の両方を含む。評価する(Assessing)は、相対的なものであっても、絶対的なものであってもよい。「の存在を評価すること(Assessing the presence of)」は、存在する何らかのものの量を決定すること、並びにそれが存在するか存在しないかを決定することを含み得る。

【0186】

用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又は合成された化合物で構成された任意の長さのポリマーを表すように本明細書において互換的に使用され、それは、2つの天然の核酸のものと同様に配列特異的に天然の核酸とハイブリダイズでき、例えば、ワトソン-クリック塩基対形成相互作用に  
20 関与できる。本明細書では、ポリヌクレオチド配列と関連して、用語「塩基(bases)」（又は「塩基」(base)）は、「ヌクレオチド(nucleotides)」（又は「ヌクレオチド」(nucleotide)）、すなわちポリヌクレオチドのモノマーサブユニットと同義である。用語「ヌクレオシド」及び「ヌクレオチド」は、公知のプリン及びピリミジン塩基だけでなく、修飾された他の複素環塩基も含有する部分を含むものとする。そのような修飾には、メチル化されたプリン若しくはピリミジン、アシル化されたプリン若しくはピリミジン、アルキル化されたリボース、又は他の複素環が含まれる。さらに、「ヌクレオシド」及び「ヌクレオチド」という用語は、従来のリボース及びデオキシリボース糖だけでなく、他の糖も同様に含有する部分を含む。修飾されたヌクレオシド又はヌクレオチドは、例えば、ヒドロキシル基の1つ又は複数が、ハロゲン原子若しくは脂肪族基と置換  
30 されているか、又はエーテル、アミンなどとして官能化されている、糖部分上の修飾も含む。「アナログ」は、類似構造を有するミメティクス、誘導体、又は他の同類語として文献において認識される構造特徴を有する分子を意味し、例えば、非天然ヌクレオチドを組み込んだポリヌクレオチド、2'-修飾ヌクレオシドなどのヌクレオチドミメティクス、ペプチド核酸、オリゴマーヌクレオシドホスホネート、及び保護基又は連結部分などの付加置換基を有する任意のポリヌクレオチドを含む。

【0187】

用語「相補的な」は、ポリヌクレオチドの配列に基づくポリヌクレオチド間の特異的結合を指す。本明細書では、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドは、それらがストリンジェントな条件下のハイブリダイゼーションアッセイで互いに結合する場合、  
40 例えば、それらがハイブリダイゼーションアッセイで所定のレベル又は検出可能なレベルのシグナルを生じさせる場合、相補的である。ポリヌクレオチドの部分は、それらが、例えば、AがT(又はU)と対合し、GがCと対合するという従来の塩基対合則に従う場合、互いに相補的であるが、ミスマッチ配列、挿入配列、又は欠失配列の(例えば、約3塩基未満の)小領域が存在していてもよい。

【0188】

2つの核酸配列の状況における「配列同一性」又は「同一性」は、特定の比較域にわたり最大に一致するように整列させたときに同じである2つの配列中の残基を意味し、付加、欠失、及び置換を考慮に入れることができる。

【0189】

ポリヌクレオチドとの関連におけるその様々な文法的形態の「実質的同一性」又は「相  
50

同な」という用語は、一般的に、ポリヌクレオチドが、参照配列と比較して、所望の同一性、例えば、少なくとも60%の同一性、好ましくは少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、及びなおさらにより好ましくは少なくとも95%を有する配列を含むことを意味する。ヌクレオチド配列が実質的に同一であることの別の指標は、2つの分子がストリンジエントな条件下で互いにハイブリダイズするかどうかである。

【0190】

用語「単離された」及び「精製された」は、物質(mRNA、抗体、又はタンパク質など)が、該物質が存在する試料の相当な部分を構成する、すなわち、該物質が、その自然な又は単離されていない状態で通常見出されるよりも多いような、該物質の単離を指す。典型的には、該試料の相当な部分は、例えば、該試料の1%超、2%超、5%超、10%超、20%超、50%超、又はそれよりも多く、通常、最大約90%~100%を構成する。例えば、単離されたmRNAの試料は、典型的には、全mRNAの少なくとも約1%を含み得る。ポリヌクレオチドを精製するための技術は当分野において周知であり、例えば、ゲル電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、フローソーティング、及び密度による沈降がある。

10

【0191】

本明細書での用語「試料」は、必ずしも流体形態とは限らないが典型的には流体形態である、対象とする1つ以上の成分を含有する材料又は材料の混合物に関する。

【0192】

本明細書での「生体試料」は、インビボ又はインサイチュで得られるか、触れられるか、又は収集される、生物学的組織又は流体由来の試料を含む、生物学的対象から得られる試料を意味する。生体試料には、前癌細胞若しくは前癌組織又は癌細胞若しくは癌組織を含む生物学的対象の領域に由来する試料が含まれる。そのような試料は、哺乳動物から単離される器官、組織、画分、及び細胞であり得るが、これらに限定されない。例示的な生体試料には、細胞溶解物、細胞培養物、細胞株、組織、口腔組織、胃腸組織、器官、細胞小器官、生物学的流体、血液試料、尿試料、皮膚試料などがあるが、これらに限定されない。好ましい生体試料には、全血、部分精製血液、PBMC、組織生検などがあるが、これらに限定されない。

20

【0193】

本明細書での用語「捕捉剤」は、均一混合物由来のmRNA又はタンパク質に結合し、それらを濃縮することを可能にするのに十分な相互作用により、該mRNA又はタンパク質に結合する薬剤を指す。

30

【0194】

本明細書での用語「プローブ」は、特定の標的mRNAバイオマーカー配列に対する捕捉剤を指す。したがって、プローブセットの各プローブは、それぞれの標的mRNAバイオマーカーを有する。プローブ/標的mRNA二重鎖は、プローブをその標的mRNAバイオマーカーにハイブリダイズさせることによって形成される構造である。

【0195】

「核酸」又は「オリゴヌクレオチドプローブ」という用語は、1種類以上の化学結合によって、通常、相補的な塩基対合によって、通常、水素結合形成によって、本明細書に提供されるmRNAバイオマーカーなどの、相補的配列の標的核酸と結合することができる核酸を意味する。本明細書では、プローブは、天然塩基(例えば、A、G、C若しくはT)、又は修飾塩基(7-デアザグアノシン、イノシンなど)を含み得る。さらに、プローブの塩基は、ハイブリダイゼーションを妨げない限り、ホスホジエステル結合以外の結合によって接続されていてもよい。プローブが、ハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーに応じて、プローブ配列との完全な相補性を欠く標的配列に結合し得ることが当業者によって理解されるであろう。プローブは、同位体、例えば、発色団、発光団(lumiphore)、色素原で直接的に標識されているか、又はストレプトアビジン複合体が後に結合し得るビオチンで間接的に標識されていることが好ましい。プローブの有無について検定することにより

40

50

、対象とする標的mRNAバイオマーカーの有無を検出することができる。

【0196】

用語「ストリンジェントなアッセイ条件」は、アッセイで所望の特異性レベルを提供するのに十分な相補性の核酸、例えば、プローブ及び標的mRNAの結合対を生じさせるのに適合するが、通常、所望の特異性を提供するのに十分でない相補性の結合メンバー間の結合対の形成には適合しない条件を指す。ストリンジェントなアッセイ条件という用語は、通常、ハイブリダイゼーション条件と洗浄条件の組合せを意味する。

【0197】

核酸に関する「標識」又は「検出可能な部分」は、核酸と連結させたときに、該核酸を、例えば、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、又は化学的手段によって検出可能にする組成物を指す。例示的な標識には、放射性同位体、磁気ビーズ、金属ビーズ、コロイド粒子、蛍光色素、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、ハプテンなどがあるが、これらに限定されない。「標識された核酸又はオリゴヌクレオチドプローブ」は、通常、核酸又はプローブの存在を、該核酸又はプローブに結合した標識の存在を検出することによって検出することができるように、リンカー若しくは化学結合を介して共有結合的に、又はイオン結合、ファンデルワールス力、静電引力、疎水性相互作用、若しくは水素結合を介して非共有結合的に、標識に結合している核酸又はオリゴヌクレオチドプローブである。

【0198】

本明細書での「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR」という用語は、通常、例えば、Mullisに付与された米国特許第4,683,195号に記載されているような、少量の核酸、RNA、及び/又はDNAが増幅される手順を指す。通常、オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができ、これらのプライマーが、増幅すべき鋳型の反対の鎖と配列が同一であるか又は類似するものとなるように、対象とする領域の両端又はそれを越える部分からの配列情報が利用可能である必要がある。2つのプライマーの5'末端のヌクレオチドは、増幅された材料の端と一致していてもよい。PCRを用いて、特定のRNA配列、全ゲノムDNA由来の特定のDNA配列、及び全細胞RNA、バクテリオファージ、又はプラスミド配列から転写されるcDNAなどを増幅させることができる。一般に、Mullisらの文献(Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263(1987)); Erlich編の文献(「PCR技術(PCR Technology)」(Stockton Press, NY,1989))を参照されたい。

【0199】

PCR法に関して本明細書で使用される「サイクル数」又は「CT」という用語は、蛍光レベルが所与の設定閾値レベルを超えるPCRサイクル数を指す。CT測定値を用いて、例えば、元の試料中のmRNAのレベルを概算することができる。CT測定値は、1つの核酸のCTを別の核酸のCTから差し引く場合に、「dCT」又は「CTの差」スコアの観点から使用されることが多い。

【0200】

本明細書では、特記されない限り、「光学的に純粋な」という用語は、化合物の1つの光学異性体を含み、且つその化合物の他の異性体を実質的に含まない組成物を意味する。例えば、1つのキラル中心を有する化合物の光学的に純粋な組成物は、該化合物の反対のエナンチオマーを実質的に含まない。2つのキラル中心を有する化合物の光学的に純粋な組成物は、該化合物の他のジアステレオマーを実質的に含まない。典型的な光学的に純粋な化合物は、約80重量%を超える該化合物の1つのエナンチオマー及び約20重量%未満の該化合物の他のエナンチオマー、より好ましくは、約90重量%を超える該化合物の1つのエナンチオマー及び約10重量%未満の該化合物の他のエナンチオマー、さらにより好ましくは、約95重量%を超える該化合物の1つのエナンチオマー及び約5重量%未満の該化合物の他のエナンチオマー、より好ましくは、約97重量%を超える該化合物の1つのエナンチオマー及び約3重量%未満の該化合物の他のエナンチオマー、及び最も好ましくは、約99重量%を超える該化合物の1つのエナンチオマー及び約1重量%未満の該化合物の他のエナンチオマーを含む。

【0201】

本明細書では、特記されない限り、用語「医薬として許容し得る塩」は、該用語が指す化合物の無毒の酸及び塩基付加塩を包含する。許容し得る無毒の酸付加塩は、当分野で公知の有機及び無機の酸又は塩基から誘導されるものを含み、これには、例えば、塩化水素酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸、メタンスルホン酸、酢酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、マレイン酸、ソルビン酸、アコニット酸、サリチル酸、フタル酸、エンボル酸(embolic acid)、エナント酸などが含まれる。

【0202】

性質が酸性である化合物は、様々な医薬として許容し得る塩基と塩を形成することが可能である。そのような酸性化合物の医薬として許容し得る塩基付加塩を調製するために使用できる塩基は、無毒の塩基付加塩を形成するもの、すなわち、薬理的に許容し得る陽イオン、例えば、限定されないが、アルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩を含む塩、及び特に、カルシウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、又はカリウム塩である。好適な有機塩基としては、N,N-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルマイン(N-メチルグルカミン)、リジン、及びプロカインが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0203】

本明細書では、特記されない限り、用語「溶媒和物」は、非共有結合的分子間力によって結合した化学量論的又は非化学量論的量の溶媒をさらに含む、本明細書に提供される化合物又はその塩を意味する。溶媒が水である場合、溶媒和物は、水和物である。

【0204】

本明細書では、特記されない限り、用語「立体異性体的に純粋」は、化合物の1つの立体異性体を含み、且つその化合物の他の立体異性体を実質的に含まない組成物を意味する。例えば、1つのキラル中心を有する化合物の立体異性体的に純粋な組成物は、該化合物の反対のエナンチオマーを実質的に含まない。2つのキラル中心を有する化合物の立体異性体的に純粋な組成物は、該化合物の他のジアステレオマーを実質的に含まない。典型的な立体異性体的に純粋な化合物は、約80重量%を超える該化合物の1つの立体異性体及び約20重量%未満の該化合物の他の立体異性体、より好ましくは、約90重量%を超える該化合物の1つの立体異性体及び約10重量%未満の該化合物の他の立体異性体、さらにより好ましくは、約95重量%を超える該化合物の1つの立体異性体及び約5重量%未満の該化合物の他の立体異性体、及び最も好ましくは、約97重量%を超える該化合物の1つの立体異性体及び約3重量%未満の該化合物の他の立体異性体を含む。本明細書では、特記されない限り、「立体異性体的に濃縮された」という用語は、約60重量%を超える化合物の1つの立体異性体、好ましくは、約70重量%を超える、より好ましくは、約80重量%を超える化合物の1つの立体異性体を含む組成物を意味する。本明細書では、特記されない限り、「エナンチオマー的に純粋な」という用語は、1つのキラル中心を有する化合物の立体異性体的に純粋な組成物を意味する。同様に、「立体異性体的に濃縮された」という用語は、1つのキラル中心を有する化合物の立体異性体的に濃縮された組成物を意味する。

20

30

【0205】

本明細書では、特記されない限り、用語「共結晶」は、結晶格子中に2以上の化合物を含有する結晶性形態を意味する。共結晶は、結晶格子中で非イオン性相互作用によって結合した2以上の非揮発性化合物の結晶性分子錯体を含む。本明細書では、共結晶は、結晶性分子錯体が治療化合物及び1以上の追加の非揮発性化合物(本明細書では、対分子と呼ばれる)を含有する医薬共結晶を含む。医薬共結晶中の対分子は、典型的には、無毒な医薬として許容し得る分子、例えば、食品添加物、防腐剤、医薬賦形剤、又は他のAPIなどである。いくつかの実施態様において、医薬共結晶は、薬品の特定の物理化学的特性(例えば、溶解性、溶出速度、バイオアベイラビリティ、及び/又は安定性)を、活性医薬成分(API)の化学構造完全性を損なわずに強化する。例えば、Jonesらの文献(「医薬共結晶:物理的特性強化の新たなアプローチ:(Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement)」, MRS Bulletin, 2006, 31, 875-879); Traskの文献(「知的財産としての医薬共結晶の概説(An Overview of Pharmaceutical Cocrystals

40

50

as Intellectual Property)」、Molecular Pharmaceutics, 2007, 4(3), 301-309); Schultzeiss及びNewmanの文献(「医薬共結晶及びその物理化学的特性(Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties)」、Crystal Growth & Design, 2009, 9(6), 2950-2967); Shan及びZaworotkoの文献(「医薬科学における共結晶の役割(The Role of Cocrystals in Pharmaceutical Science)」、Drug Discovery Today, 2008, 13(9/10), 440-446);及びVishweshwarらの文献(「医薬共結晶(Pharmaceutical Co-Crystals)」、J. Pharm. Sci., 2006, 95(3), 499-516)を参照されたい。

#### 【0206】

生物学的マーカー又は「バイオマーカー」は、その検出が、例えば、癌の存在などの、特定の生物学的状態を示す物質である。いくつかの実施態様において、バイオマーカーを個々に決定することも、いくつかのバイオマーカーを同時に測定することもできる。

10

#### 【0207】

いくつかの実施態様において、「バイオマーカー」は、疾患のリスク若しくは進行、又は所与の治療に対する疾患の感受性と相関し得るmRNA発現のレベルの変化を示す。いくつかの実施態様において、バイオマーカーは、mRNA又はcDNAなどの核酸である。

#### 【0208】

追加の実施態様において、「バイオマーカー」は、疾患のリスク、治療に対する感受性、又は進行と相関し得る、ポリペプチド又はタンパク質発現のレベルの変化を示す。いくつかの実施態様において、バイオマーカーは、ポリペプチド若しくはタンパク質、又はこれらの断片であり得る。特定のタンパク質の相対的レベルは、当分野で公知の方法によって決定することができる。例えば、抗体ベースの方法、例えば、イムノプロット、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、又は他の方法を利用することができる。

20

#### 【0209】

図示された構造とその構造に与えられている名前に矛盾がある場合、図示された構造により重きが置かれることになることに留意すべきである。さらに、構造又は構造の一部の立体化学が、例えば、太線又は破線で示されていない場合、該構造又は該構造の一部は、その全ての立体異性体を包含するものと解釈すべきである。

#### 【0210】

本発明に提供される実施態様の実施は、特記されない限り、分子生物学、微生物学、及び免疫学の従来技術を利用し、該技術は、当業者の能力の範囲内である。そのような技術は、文献において十分に説明されている。参照用の特に好適なテキストの例としては、以下のものが挙げられる: Sambrookらの文献((1989)「分子クローニング; 実験マニュアル(Molecular Cloning; A Laboratory Manual)」(第2版)); D.N Glover編の文献((1985)「DNAクローニング(DNA Cloning)」, I巻及びII巻); M.J. Gait編の文献((1984)「オリゴヌクレオチド合成(Oligonucleotide Synthesis)」); B.D. Hames及びS.J. Higgins編の文献((1984)「核酸ハイブリダイゼーション(Nucleic Acid Hybridization)」); B.D. Hames及びS.J. Higgins編の文献((1984)「転写及び翻訳(Transcription and Translation)」); R. I. Freshney編の文献((1986)「動物細胞培養; 固定化細胞及び酵素(Animal Cell Culture; Immobilized Cells and Enzymes)」(IRL Press, 1986)); 「細胞の免疫化学法及び分子生物学(Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology)」(Academic Press, London); Scopesの文献(1987)「タンパク質精製: 原理及び実践(Protein Purification: Principles and Practice)」(第2版; Springer Verlag, N.Y.); 並びにD.M. Weir及びC. C. Blackwell編の文献((1986)「実験免疫学のハンドブック(Handbook of Experimental Immunology)」, I巻~IV巻)。

30

40

#### 【0211】

(6.2化合物の効能を評価する方法)

一実施態様において、化合物が免疫調節性であるか否かを決定する方法であって、(a)第1の細胞を該化合物と接触させること;(b)工程(a)の該第1の細胞から第1の試料を得ること;(c)該第1の試料中のCRBN関連タンパク質のレベルを決定すること;及び(d)工程(c)のCRBN関連タンパク質のレベルを基準試料から得られた同じタンパク質のレベルと比較するこ

50

とを含む方法であって、基準と比較したレベルの変化が免疫調節化合物としての該化合物の効能を示す方法が本明細書に提供される。特定の実施態様において、工程(a)における接触はインビトロで実施される。他の実施態様において、工程(a)における接触はインビボで実施される。一実施態様において、細胞は、該化合物と、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、若しくは55分、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、若しくは24時間、又は2若しくは3日以上この期間、接触させられる。いくつかの実施態様において、細胞は、末梢血単核細胞、B細胞、T細胞、単球、又は顆粒球である。他の実施態様において、細胞は、腫瘍細胞又は癌細胞、例えば、リンパ腫、骨髄腫、又は白血病である。一実施態様において、腫瘍又は癌細胞は細胞系から得られる。

10

**【0212】**

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)工程(b)の第1の試料内のタンパク質を、免疫特異的にCRBN関連タンパク質に結合する第1の抗体と接触させること；(ii)第1の抗体に結合した該タンパク質を、免疫特異的にCRBN関連タンパク質に結合する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なるCRBN関連タンパク質上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する第2の抗体と接触させること；(iii)該タンパク質に結合した第2の抗体の存在を検出すること；及び(iv)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、CRBN関連タンパク質の量を決定することを含む。

**【0213】**

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)第1の試料内のRNAを、該RNAに特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、該RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生じさせること；(ii)CRBN関連タンパク質をコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増幅させること；及び(iii)該増幅されたDNAの量に基づいて、CRBN関連タンパク質のRNAレベルを決定することを含む。

20

**【0214】**

特定の実施態様において、基準と比較したCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が低下する場合、該化合物は免疫調節性である。特定の実施態様において、基準と比較したCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が上昇する場合、該化合物は免疫調節性である。一実施態様において、基準は、該化合物と接触していない第2の細胞を使用して調製されるが、その場合、該第2の細胞は該第1の細胞と同じ種類である。

30

**【0215】**

別な実施態様において、疾患又は障害を治療する際の化合物の効能を評価する方法であって、(a)該疾患又は障害を有する対象に化合物を投与すること；(b)該対象から第1の試料を得ること；(c)該第1の試料中のCRBN関連タンパク質のレベルを決定すること；及び(d)工程(c)のCRBN関連タンパク質のレベルを、基準試料から得られた同じタンパク質のレベルと比較することを含む方法であって、基準と比較したレベルの変化が、該疾患又は障害を治療する際の該化合物の効能を示す方法が本明細書に提供される。特定の実施態様において、該疾患又は障害は、癌(例えば、以下の5.2.3節に記載される固形腫瘍又は血液癌)又は全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性強皮症などの炎症性疾患、他の炎症性疾患若しくは自己免疫疾患、又は上記2.2節に記載された炎症性疾患である。特定の実施態様において、該疾患又は障害は、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、又は全身性強皮症である。いくつかの実施態様において、試料は、腫瘍生検材料、節の生検材料、又は骨髄、脾臓、肝臓、脳、若しくは乳房からの生検材料から得られる。

40

**【0216】**

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)工程(b)から得た第1の試料内のタンパク質を、免疫特異的にCRBN関連タンパク質に結合する第1の抗体と接触させる工程；(ii)第1の抗体に結合したタンパク質を、免疫特異的にCRBN関連タンパク質に結合する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なるCRBN関連タンパク質上のエピトープに免疫特異的に結合す

50

る、検出可能な標識を有する第2の抗体に接触させる工程;(iii)該タンパク質に結合した第2の抗体の存在を検出すること;及び(iv)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、CRBN関連タンパク質の量を決定することを含む。

【0217】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)第1の試料内のRNAを、該RNAに特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、該RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生じさせること;(ii)CRBN関連タンパク質をコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増幅させること;及び(iii)該増幅されたDNAの量に基づいて、CRBN関連タンパク質のRNAレベルを決定することを含む。

【0218】

特定の実施態様において、基準と比較したCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が低下する場合、該化合物は該疾患又は障害を治療する際に恐らく有効だろう。特定の実施態様において、基準と比較したCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が上昇する場合、該化合物は該疾患又は障害を治療する際に恐らく有効だろう。一実施態様において、基準は、対象に該化合物を投与する前に該対象から得られた第2の試料を使用して調製されるが、その場合、該第2の試料は第1の試料と同じ源から得られる。別な実施態様において、基準は、該疾患又は障害を有さない健康な対象から得られた第2の試料を使用して調製されるが、その場合、該第2の試料は第1の試料と同じ源から得られる。

【0219】

本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、該化合物は、以下の5.3節に与えられる化合物である。本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、免疫調節化合物は、サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミド、3-(5-アミノ-2-メチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオン、又は3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオン、その立体異性体、若しくはその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、水和物、共結晶、クラスレート、若しくは多形体である。一実施態様において、該化合物は、基準と比較してCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を低下させる。別な実施態様において、該化合物は、基準と比較してCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を上昇させる。

【0220】

本明細書に提供される方法は、本明細書に提供される化合物などの特定の薬物の抗増殖活性にCRBNが関連しているという発見に一部基づいている。CRBN又はCRBN関連タンパク質を、本明細書に提供される化合物による疾病治療の有効性又は進行を示すバイオマーカーとして利用できる。そのため、特定の実施態様において、本明細書に提供される方法は、対象が免疫調節化合物(例えば、以下の5.3節に与えられる化合物)の治療を受ける前、その間、又はその後、対象の疾患又は障害を特性化するのに有用である。

【0221】

特定の理論には拘束されないが、CRBN結合は、本明細書に提供される化合物などの特定の化合物の抗増殖活性又は他の活性に寄与し、必要ですらあり得る。特定の実施態様において、本明細書に提供される化合物は、CRBN又は1種以上のCRBN関連タンパク質を標的とする。一実施態様において、本明細書に提供される化合物は、CRBN-DDB1及び/又はCRBN E3ユビキチン-リガーゼ複合体に直接結合する。CRBNにおける突然変異は、本明細書に提供される化合物に対する耐性に関連し得る。

【0222】

例えば、CRBNのレベルは、ポマリドミド抵抗性細胞系DF15R及びレナリドミド抵抗性細胞、H929 R10-1、H929 R10-2、H929 R10-3、H929 R10-4、及びMM1/Rにおいて、匹敵する親系統に比べて著しく低かった。さらに、レナリドミドに対する獲得耐性を有する骨髓腫系統の1つのCRBN遺伝子に興味深い突然変異が見出されたが、親系統においてCRBN遺伝子は野生型であった。この変異は、CRBNのDDB1結合ドメインに位置した。したがって、特定

10

20

30

40

50

の実施態様において、癌細胞、例えば、骨髄腫細胞、又は癌を有する患者の、本明細書に提供される化合物による療法に対する感受性はCRBN発現に関連する。

【0223】

再発性又は難治性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)において、活性型B細胞様(ABC)サブタイプにおいて、胚中心B細胞様サブタイプより高い応答が見られた。本明細書に提供される通り、DLBCL細胞系を利用して、レナリドミド治療が、インビトロでABC-DLBCL細胞の増殖を優先的に抑制し、ヒト腫瘍異種移植片モデルにおいて、非ABC-DLBCL細胞に対する作用を最低にしながら腫瘍成長を遅延させることが示された。この殺腫瘍作用は、ABC-DLBCL細胞の顕著な特徴であるインターフェロン調節因子4(IRF4)の下方制御に関連していた。

10

【0224】

レナリドミドによるIRF4阻害は、B細胞受容体(BCR)依存性NF- $\kappa$ B活性化の下方制御を起こした。IRF4特異的siRNAは、レナリドミドがNF- $\kappa$ B活性化を低下させる効果を模倣したが、IRF4過剰発現はNF- $\kappa$ B活性化を増強し、レナリドミドに対する耐性を付与した。さらに、レナリドミド誘導性のIRF4下方制御にはCRBNの発現が必要であった。特定の理論には拘束されないが、これらのデータは、レナリドミドが、IRF4発現及びBCR-NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路をCRBN依存的な方法で遮断することにより、DLBCL細胞、優先的にはABC-DLBCL細胞に対する直接的な抗腫瘍性活性を有し得ることを示している。

【0225】

CRBNタンパク質が、DDB1とのその相互作用を介してCuI4-E3-リガーゼ複合体の基質受容体として機能することが提案されている。本明細書に提供される通り、インビボのユビキチン化が多発性骨髄腫細胞における薬物応答と関連するか否かが検討されてきた。H929細胞において、本明細書に提供される化合物は、30分処理の後、K48関連の全ポリユビキチン化を低下させるが、K-63関連ユビキチン化は減少させない。現在、二十数種のタンパク質が、CuI4-DDB1リガーゼ2により分解されると報告されている。いくつかの研究は、コアヒストン、DNA修復タンパク質、細胞周期調節因子、及び重要なシグナル伝達経路分子のCuI4/DDB1依存性ユビキチン化を示した。mTORC1シグナル伝達には、プロテアソーム機能及びCUL4-DDB1ユビキチンE3リガーゼの関与が必要である。CST Ubiscan技術を利用して、短時間(1~4時間)の処理の後で本明細書に提供される化合物により顕著に調節される162の独特なユビキチン-ペプチドが同定された。対応するタンパク質は、ヌクレアソーム(nucleosome)及びクロマチン機能、タンパク質-DNAアセンブリ、及びヒストンH2Aに關与する。本明細書に提供される化合物の作用様式における初期の修飾の関連性及びCRBNとCUL4/DB1活性との関係が検討されている。

20

30

【0226】

特定の実施態様において、本明細書に提供される方法は、免疫調節化合物(例えば、以下の5.3節に与えられる化合物)による治療に対する臨床的感度及び患者の応答を評価するのに有用である。一実施態様において、本明細書に提供される免疫調節化合物は、CRBN又は1種以上のCRBN関連タンパク質を制御する(例えば、下方制御、又は減少させる)。別な実施態様において、本明細書に提供される免疫調節化合物は、CRBN-DDB1に直接結合する。

40

【0227】

本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、該CRBN関連タンパク質は、DDB1、DDB2、GSK3B、CUL4A、CUL4B、XBP-1、FAS1、RANBP6、DUS3L、PHGDH、AMPK、IRF4、又はNF- $\kappa$ Bである。本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、該CRBN関連タンパク質は、DDB1、PABPC1、HNRNPR、RPL19、SYNCRIP、H2AFX、HSPA8、ALDOA、HIST1H2AA、HSPA1A、XRCC6、RPL12、RPL18A、RPL4、HNRNPA2B1、HNRNPC、RPS2、SEC24C、RPL9、USP15、SEC24A、CTPS、ABCE1、EEF1A1、IPO5、CPSF6、KCNAB2、C7ORF42、SMC4、GNB3、H2AFZ、HIST1H1C、HIST1H1D、HIST1H1E、ACTB、CSNK2A1、CRBN、DDX21、DHX9、DNAJC1、G3BP1、HSPA1B、IGF2BP2、RPL10A、RPL13A、RPL14、RPL15、RPL21、RPL3、RPL30、RPL7、RPL7A、RPLP1、RPLP2、MYH10、ILF3、NCL、RPS13、RPS16、RPS19、RPS6、SND1、EIF2S2、HNRNPH2、U

50

BB、EEF1G、TBL1XR1、NACA、EIF4A1、FASN、PPAT、G3BP2、TUBA1A、UBAP2L、MCM2、UAP1、TUBA1C、EIF2S1、EIF3J、PRKDC、MCM7、RPL11、TUBA1B、STAT3、PTRH2、PABPC4、PTPRC、MACF1、UBE20、DUT、GNB2L1、NUP88、H2AFJ、SEC23B、PDXK、ACLY、ARID1A、GBE1、HSPA9、DDX17、FUBP1、FBXO21、EWSR1、IFI16、YWHAE、UBA52、COPS6、GNAS、UBE2Q1、FERMT3、NAP1L2、TPD52、VAPA、EEF1AL3、DDIT4、NEDD8、HIST1H1A、HIST1H1B、PCM1、イカロスジンクフィンガータンパク質1(IKZF1)、又はイカロスジンクフィンガータンパク質3(IKZF3)である。

【0228】

本明細書に提供される方法の一実施態様において、該CRBN関連タンパク質はIKZF3(「Aiolos」としても知られる)である。本明細書に提供される方法の一実施態様において、該CRBN関連タンパク質は、58kDaのタンパク質分子量を有するIKZF3である。本明細書に提供される方法の一実施態様において、該CRBN関連タンパク質は、42kDaのタンパク質分子量を有するIKZF3である。別な実施態様において、本明細書に提供される免疫調節化合物は、IKZF3(Aiolos)発現(例えば、タンパク質発現)を下方制御する。別な実施態様において、本明細書に提供される免疫調節化合物は、IL-2発現を下方制御する。別な実施態様において、本明細書に提供されるIMiDは、Aiolos発現(例えば、タンパク質又は遺伝子発現)を下方制御する。別な実施態様において、ボマリドミドはAiolos発現(例えば、タンパク質又は遺伝子発現)を下方制御する、別な実施態様において、レナリドミドはAiolos発現(例えば、タンパク質又は遺伝子発現)を下方制御する。

【0229】

IKZF3は、「Aiolos」としても知られ、ジンクフィンガータンパク質のIkarosファミリーのメンバーである。IKZF3は、リンパ球発生(例えば、Bリンパ球の増殖及び分化)の制御に關与する造血特異的転写因子である。IKZF3のDNA結合ドメインは、GGGAのコアモチーフを認識する。IKZF3は、クロマチン再構成に關与し、Belファミリーメンバーを制御し、T細胞中のHDAC、mSin3、Mi-2に結合し、転写抑制因子として作用することが示された。Aiolos-Foxp3相互作用は、ヒトT細胞中のIL-2発現をサイレンシングすることが示された。

【0230】

本明細書に提供される方法の一実施態様において、該CRBN関連タンパク質はIKZF1(「Ikaros」としても知られる)である。別な実施態様において、本明細書に提供される化合物はIkaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子発現)を下方制御する。別な実施態様において、該化合物はボマリドミドであり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子発現)は下方制御される。別な実施態様において、該化合物はレナリドミドであり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子発現)は下方制御される。別な実施態様において、該化合物は、3-(5-アミノ-2-メチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオンであり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子発現)は下方制御される。別な実施態様において、該化合物は、3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンであり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子発現)は下方制御される。別な実施態様において、該化合物は、3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンの(S)立体異性体であり、Ikaros発現(例えば、タンパク質又は遺伝子発現)は下方制御される。

【0231】

一実施態様において、化合物が免疫調節性であるか否かを決定する方法であって、(a)第1の細胞を該化合物と接触させること;(b)工程(a)の該第1の細胞から第1の試料を得ること;(c)該第1の試料中のAiolosのレベルを決定すること;及び(d)工程(c)のAiolosのレベルを基準試料から得たAiolosのレベルと比較することを含む方法であって、基準と比較したレベルの変化が免疫調節化合物としての該化合物の効能を示す方法が本明細書に提供される。特定の実施態様において、工程(a)における接触はインピトロで実施される。他の実施態様において、工程(a)における接触はインピボで実施される。一実施態様において、細胞は、該化合物と、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、若しくは55分

、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、若しくは24時間、又は2若しくは3日以上の間、接触させられる。いくつかの実施態様において、細胞は、末梢血単核細胞、B細胞、T細胞、単球、又は顆粒球である。他の実施態様において、細胞は、腫瘍細胞又は癌細胞リンパ腫、例えば、骨髄腫、又は白血病である。一実施態様において、腫瘍又は癌細胞は細胞系から得られる。

#### 【0232】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)工程(b)の第1の試料内のタンパク質を、免疫特異的にAiolosに結合する第1の抗体と接触させること；(ii)第1の抗体に結合した該タンパク質を、免疫特異的にAiolosに結合する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なるAiolos上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する第2の抗体と接触させること；(iii)該タンパク質に結合した第2の抗体の存在を検出すること；及び(iv)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、Aiolosの量を決定することを含む。

10

#### 【0233】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)第1の試料内のRNAを、該RNAに特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、該RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生じさせること；(ii)Aiolosをコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増幅させること；及び(iii)該増幅されたDNAの量に基づいて、AiolosのRNAレベルを決定することを含む。

#### 【0234】

特定の実施態様において、基準と比較したAiolosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が低下する場合、該化合物は免疫調節性である。特定の実施態様において、基準と比較したAiolosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が上昇する場合、該化合物は免疫調節性である。一実施態様において、基準は、該化合物と接触していない第2の細胞を使用して調製されるが、その場合、該第2の細胞は該第1の細胞と同じ種類である。

20

#### 【0235】

別な実施態様において、疾患又は障害を治療する際の化合物の効果を評価する方法であって、(a)該疾患又は障害を有する対象に化合物を投与すること；(b)該対象から第1の試料を得ること；(c)該第1の試料中のAiolosのレベルを決定すること；及び(d)工程(c)のAiolosのレベルを、基準試料から得られた同じタンパク質のレベルと比較することを含む方法であって、基準と比較したレベルの変化が、該疾患又は障害を治療する際の該化合物の効果を示す方法が本明細書に提供される。特定の実施態様において、該疾患又は障害は、癌(例えば、以下の5.2.3節に記載される固形腫瘍又は血液癌)又は全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性強皮症などの炎症性疾患、他の炎症性疾患若しくは自己免疫疾患、又は上記2.2節で記載された炎症性疾患である。特定の実施態様において、該疾患又は障害は、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、又は全身性強皮症である。いくつかの実施態様において、試料は、腫瘍生検材料、節の生検材料、又は骨髄、脾臓、肝臓、脳、若しくは乳房からの生検材料から得られる。

30

#### 【0236】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)工程(b)から得た第1の試料内のタンパク質を、免疫特異的にAiolosに結合する第1の抗体と接触させる工程；(ii)第1の抗体に結合したタンパク質を、免疫特異的にAiolosに結合する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なるAiolos上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する第2の抗体に接触させる工程；(iii)該タンパク質に結合した第2の抗体の存在を検出すること；及び(iv)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、Aiolosの量を決定することを含む。

40

#### 【0237】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)第1の試料内のRNAを、該RNAに特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、該RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生じさせること；(ii)Aiolosをコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増幅させること；及び(iii)該増幅されたDNAの量に基づいて、AiolosのRNAレベルを決定することを含む。

50

む。

【0238】

一実施態様において、化合物が免疫調節性であるか否かを決定する方法であって、(a)第1の細胞を該化合物と接触させること；(b)工程(a)の該第1の細胞から第1の試料を得ること；(c)該第1の試料中のIkarosのレベルを決定すること；及び(d)工程(c)のIkarosのレベルを基準試料から得たIkarosのレベルと比較することを含む方法であって、基準と比較したレベルの変化が免疫調節化合物としての該化合物の効能を示す方法が本明細書に提供される。特定の実施態様において、工程(a)における接触はインピトロで実施される。他の実施態様において、工程(a)における接触はインピボで実施される。一実施態様において、細胞は、該化合物と、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、若しくは55分、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、若しくは24時間、又は2若しくは3日以上の間、接触させられる。いくつかの実施態様において、細胞は、末梢血単核細胞、B細胞、T細胞、単球、又は顆粒球である。他の実施態様において、細胞は、腫瘍細胞又は癌細胞、例えば、リンパ腫、骨髄腫、又は白血病である。一実施態様において、腫瘍又は癌細胞は細胞系から得られる。

10

【0239】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)工程(b)の第1の試料内のタンパク質を、免疫特異的にIkarosに結合する第1の抗体と接触させること；(ii)第1の抗体に結合した該タンパク質を、免疫特異的にIkarosに結合する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なるIkaros上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する第2の抗体と接触させること；(iii)該タンパク質に結合した第2の抗体の存在を検出すること；及び(iv)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、Ikarosの量を決定することを含む。

20

【0240】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)第1の試料内のRNAを、該RNAに特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、該RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生じさせること；(ii)Ikarosをコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増幅させること；及び(iii)該増幅されたDNAの量に基づいて、IkarosのRNAレベルを決定することを含む。

【0241】

特定の実施態様において、基準と比較したIkarosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が低下する場合、該化合物は免疫調節性である。特定の実施態様において、基準と比較したIkarosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が上昇する場合、該化合物は免疫調節性である。一実施態様において、基準は、該化合物と接触していない第2の細胞を使用して調製されるが、その場合、該第2の細胞は該第1の細胞と同じ種類である。

30

【0242】

別な実施態様において、疾患又は障害を治療する際の化合物の効能を評価する方法であって、(a)該疾患又は障害を有する対象に化合物を投与すること；(b)該対象から第1の試料を得ること；(c)該第1の試料中のIkarosのレベルを決定すること；及び(d)工程(c)のIkarosのレベルを、基準試料から得られた同じタンパク質のレベルと比較することを含む方法であって、基準と比較したレベルの変化が、該疾患又は障害を治療する際の該化合物の効能を示す方法が本明細書に提供される。特定の実施態様において、該疾患又は障害は、癌(例えば、以下の5.2.3節に記載される固形腫瘍又は血液癌)又は全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性強皮症などの炎症性疾患、他の炎症性疾患若しくは自己免疫疾患、又は上記2.2節で記載された炎症性疾患である。特定の実施態様において、該疾患又は障害は、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、又は全身性強皮症である。いくつかの実施態様において、試料は、腫瘍生検材料、節の生検材料、又は骨髄、脾臓、肝臓、脳、若しくは乳房からの生検材料から得られる。

40

【0243】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)工程(b)から得た第1の試料内のタンパク質を

50

、免疫特異的にIkarosに結合する第1の抗体と接触させる工程;(ii)第1の抗体に結合したタンパク質を、免疫特異的にIkarosに結合する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なるIkaros上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する第2の抗体に接触させる工程;(iii)該タンパク質に結合した第2の抗体の存在を検出すること;及び(iv)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、Ikarosの量を決定することを含む。

【0244】

特定の実施態様において、工程(c)は、(i)第1の試料内のRNAを、該RNAに特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、該RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生じさせること;(ii)Ikarosをコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増幅させること;及び(iii)該増幅されたDNAの量に基づいて、IkarosのRNAレベルを決定することを含む。

10

【0245】

特定の実施態様において、基準と比較したAiolos又はIkarosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が低下する場合、該化合物は該疾患又は障害を治療する際に恐らく有効だろう。特定の実施態様において、基準と比較したAiolos又はIkarosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)が上昇する場合、該化合物は該疾患又は障害を治療する際に恐らく有効だろう。一実施態様において、基準は、対象に該化合物を投与する前に該対象から得られた第2の試料を使用して調製されるが、その場合、該第2の試料は第1の試料と同じ源から得られる。別な実施態様において、基準は、該疾患又は障害を有さない健康な対象から得られた第2の試料を使用して調製されるが、その場合、該第2の試料は第1の試料と同じ源から得られる。

20

【0246】

本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、該化合物は、以下の5.3節に与えられる化合物である。本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、免疫調節化合物は、サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミド、3-(5-アミノ-2-メチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオン、又は3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオン、その立体異性体、若しくはその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、水和物、共結晶、クラスレート、若しくは多形体である。一実施態様において、該化合物は、基準と比較してCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を低下させる。別な実施態様において、該化合物は、基準と比較してCRBN関連タンパク質のレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を上昇させる。一実施態様において、該化合物は、基準と比較してAiolos又はIkarosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を低下させる。別な実施態様において、該化合物は、基準と比較してAiolos又はIkarosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を上昇させる。別な実施態様において、該化合物は、基準と比較して42kDaのタンパク質分子量を有するAiolosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を低下させる。別な実施態様において、該化合物は、基準と比較して42kDaのタンパク質分子量を有するAiolosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を上昇させる。別な実施態様において、該化合物は、基準と比較して58kDaのタンパク質分子量を有するAiolosのレベル(例えば、タンパク質又はRNAレベル)を低下させる。

30

40

【0247】

本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、該疾患又は障害は癌又は炎症性疾患である。本明細書に提供される方法の種々の実施態様において、該疾患又は障害は、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、又は全身性強皮症である。

【0248】

(6.2.1セレブロン又はセレブロン関連タンパク質を検出及び定量化する方法)

特定の実施態様において、生体試料からのCRBN又はCRBN関連タンパク質のタンパク質レベルを検出及び定量化する方法であって、(a)該試料を、免疫特異的にCRBN又はCRBN関連タンパク質に結合する第1の抗体と接触させること;(b)第1の抗体に結合した該試料を、免

50

疫特異的にCRBN又はCRBN関連タンパク質に結合する第2の抗体であって、該第1の抗体とは異なるCRBN又はCRBN関連タンパク質上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する第2の抗体と接触させること；(c)該試料に結合した第2の抗体の存在を検出すること；及び(d)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、CRBN又はCRBN関連タンパク質のタンパク質レベルを決定することを含む方法が本明細書に提供される。

【0249】

特定の実施態様において、生体試料からのCRBN又はCRBN関連タンパク質のRNA(例えば、mRNA)レベルを検出及び定量化する方法であって、(a)該試料からRNAを得ること；(b)該RNAを、該RNA中の配列に特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、前記RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生成させること；(c)CRBN又はCRBN関連タンパク質をコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増殖させること；及び(d)増幅させたDNAの量に基づいて、CRBN又はCRBN関連タンパク質のRNAレベルを決定することを含む方法が本明細書に提供される。

10

【0250】

特定の実施態様において、CRBN関連タンパク質は、DDB1、DDB2、GSK3B、CUL4A、CUL4B、XBP-1、FAS1、RANBP6、DUS3L、PHGDH、AMPK、IRF4、又はNF Bである。特定の実施態様において、CRBN関連タンパク質は、DDB1、PABPC1、HNRNPR、RPL19、SYNCRIP、H2AFX、HSPA8、ALDOA、HIST1H2AA、HSPA1A、XRCC6、RPL12、RPL18A、RPL4、HNRNPA2B1、HNRNPC、RPS2、SEC24C、RPL9、USP15、SEC24A、CTPS、ABCE1、EEF1A1、IPO5、CPSF6、KCNAB2、C7ORF42、SMC4、GNB3、H2AFZ、HIST1H1C、HIST1H1D、HIST1H1E、ACTB、CSNK2A1、CRBN、DDX21、DHX9、DNAJC1、G3BP1、HSPA1B、IGF2BP2、RPL10A、RPL13A、RPL14、RPL15、RPL21、RPL3、RPL30、RPL7、RPL7A、RPLP1、RPLP2、MYH10、ILF3、NCL、RPS13、RPS16、RPS19、RPS6、SND1、EIF2S2、HNRNPH2、UBB、EEF1G、TBL1XR1、NACA、EIF4A1、FASN、PPAT、G3BP2、TUBA1A、UBAP2L、MCM2、UAP1、TUBA1C、EIF2S1、EIF3J、PRKDC、MCM7、RPL11、TUBA1B、STAT3、PTRH2、PABPC4、PTPRC、MACF1、UBE20、DUT、GNB2L1、NUP88、H2AFJ、SEC23B、PDXK、ACLY、ARID1A、GBE1、HSPA9、DDX17、FUBP1、FBXO21、EWSR1、IFI16、YWHAE、UBA52、COPS6、GNAS、UBE2Q1、FERMT3、NAP1L2、TPD52、VAPA、EEF1AL3、DDIT4、NEDD8、HIST1H1A、HIST1H1B、PCM1、又はIKZF3である。一実施態様において、CRBN関連タンパク質はIKZF3である。

20

【0251】

一実施態様において、生体試料からのAiolosのタンパク質レベルを検出及び定量化する方法であって、(a)該試料を、免疫特異的にAiolosに結合する第1の抗体と接触させること；(b)第1の抗体に結合した該試料を、免疫特異的にAiolosに結合する第2の抗体であって、第1の抗体とは異なるAiolos上のエピトープに免疫特異的に結合する、検出可能な標識を有する第2の抗体と接触させること；(c)該試料に結合した第2の抗体の存在を検出すること；及び(d)第2の抗体中の検出可能な標識の量に基づいて、Aioosのタンパク質レベルを決定することを含む方法が本明細書に提供される。

30

【0252】

別な実施態様において、生体試料からのAiolosのRNA(例えば、mRNA)レベルを検出及び定量化する方法であって、(a)該試料からRNAを得ること；(b)該RNAを、該RNA中の配列に特異的に結合する配列を含むプライマーと接触させて、前記RNAに相補的な配列を有する第1のDNA分子を生成させること；(c)Aiolosをコードする遺伝子のセグメントに相当するDNAを増殖させること；及び(d)増幅させたDNAの量に基づいて、AiolosのRNAレベルを決定することを含む方法が本明細書に提供される。

40

【0253】

本明細書に提供される種々の方法の特定の実施態様において、2つ以上の工程が連続的に実施される。本明細書に提供される方法の他の実施態様において、2つ以上の工程が並行に(例えば、同時に)実施される。

【0254】

CRBN又はCRBN関連タンパク質のタンパク質レベルを検出及び定量化する方法のための本

50

明細書に提供される例示的なアッセイは、ウェスタンブロット分析などの免疫アッセイ、及び酵素結合免疫吸着法(ELISA)(例えば、サンドイッチELISA)である。CRBN又はCRBN関連タンパク質のRNAレベルを検出及び定量化する方法のための本明細書に提供される例示的なアッセイは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、例えば、定量PCR又はqPCRである。

#### 【0255】

##### (6.2.2 対象及び試料)

特定の実施態様において、本明細書に提供される種々の方法は、対象又は個体(例えば、患者)からの試料(例えば、生体試料)を利用する。対象は、患者、例えば、多発性骨腫瘍、白血病、若しくはリンパ腫などの血液癌;炎症又は微少残存病変の患者であり得る。対象は、哺乳動物、例えば、ヒトであり得る。対象は、男性でも女性でもよく、成人でも小児でも乳児でもよい。試料は、疾患若しくは障害の活動期の間の時間でも、疾患又は障害が非活動性である時にでも分析できる。特定の実施態様において、対象から2つ以上の試料を得ることができる。

10

#### 【0256】

特定の実施態様において、本明細書に提供される方法に利用される試料は、対象からの体液を含む。体液の非限定的な例には、血液(例えば、末梢全血、末梢血)、血液血漿、羊水、房水、胆汁、耳垢、カウパー腺液、前射精液、乳び、キームス、女性の潮、間質液、リンパ液、月経、母乳、粘液、胸膜液、膿、唾液、皮脂、精液、血清、汗、涙液、尿、膈分泌液、嘔吐物、分泌液、大便、体内液、例えば、脳及び脊髄を取り巻く脳脊髄液、骨関節を取り巻く滑液、細胞内部の液である細胞内液、及び眼球内の液体である硝子体液がある。いくつかの実施態様において、該試料は血液試料である。該血液試料は、例えば、Innisら(編者)の文献(「PCRプロトコル(PCR Protocols)」(Academic Press, 1990))に記載の従来技術を利用して得ることができる。白血球は、従来技術又は市販のキット、例えば、RosetteSepキット(Stein Cell Technologies社製, Vancouver, Canada)を利用して血液試料から分離できる。白血球の亜集団、例えば、単核細胞、B細胞、T細胞、単球、顆粒球、又はリンパ球は、従来技術、例えば、磁気活性化細胞選別(MACS)(Miltenyi Biotec社, Auburn, California)又は蛍光活性化細胞選別(FACS)(Becton Dickinson社, San Jose, California)を利用してさらに単離できる。

20

#### 【0257】

一実施態様において、血液試料は、約0.1mL~約10.0mL、約0.2mL~約7mL、約0.3mL~約5mL、約0.4mL~約3.5mL、又は約0.5mL~約3mLである。別な実施態様において、血液試料は、約0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、又は10.0mLである。

30

#### 【0258】

いくつかの実施態様において、本方法に使用される試料は、生検材料(例えば、腫瘍生検材料)を含む。生検材料は、任意の器官又は組織、例えば、皮膚、肝臓、肺、心臓、結腸、腎臓、骨髄、歯、リンパ節、髪、脾臓、脳、乳房、又は他の器官由来でよい。当業者に知られている任意の生検材料技術を、例えば、開創生検、非切開生検、コア生検、切開生検、切除生検、又は穿刺吸引生検など、対象からの試料の単離に使用できる。

40

#### 【0259】

一実施態様において、本明細書に提供される方法に利用される試料は、対象が疾患又は障害の治療を受ける前に対象から得られる。別な実施態様において、試料は、対象が疾患又は障害の治療を受けている間に対象から得られる。別な実施態様において、試料は、対象が疾患又は障害の治療を受けた後で対象から得られる。種々の実施態様において、治療は、化合物(例えば、以下の5.3節に与えられる化合物)を対象に投与することを含む。

#### 【0260】

##### (6.2.3細胞の種類)

特定の実施態様において、本明細書に提供される方法に使用される試料は、複数の細胞を含む。そのような細胞は、あらゆる種類の細胞、例えば、幹細胞、血液細胞(ces11)(

50

例えば、末梢血単核細胞)、リンパ球、B細胞、T細胞、単球、顆粒球、免疫細胞、又は腫瘍細胞若しくは癌細胞を含み得る。腫瘍生検材料又は腫瘍外植片などの腫瘍細胞若しくは癌細胞又は腫瘍組織。T細胞(Tリンパ球)には、例えば、ヘルパーT細胞(エフェクターT細胞又はTh細胞)、細胞傷害性T細胞(CTL)、メモリーT細胞、及び制御性T細胞がある。一実施態様において、本明細書に提供される方法に使用される細胞は、例えば、フローサイトメトリーにより検出されるCD3<sup>+</sup>T細胞である。該方法に使用されるT細胞の数は、単一の細胞から約10<sup>9</sup>細胞の範囲になり得る。B細胞(Bリンパ球)には、例えば、血漿B細胞、メモリーB細胞、B1細胞、B2細胞、辺縁帯B細胞、及び濾胞性B細胞がある。B細胞は、免疫グロブリン(抗体、B細胞受容体)を発現し得る。一実施態様において、本明細書に提供される方法に使用される細胞は、例えば、フローサイトメトリーにより検出されるCD20<sup>+</sup>B細胞である。

10

#### 【0261】

具体的な細胞集団は、市販の抗体(例えば、Quest Diagnostic社(San Juan Capistrano, Calif); Dako社(Denmark))の組み合わせを利用して得ることができる。

#### 【0262】

本明細書に提供される方法における細胞は、細胞系から得ることができる。特定の実施態様において、該細胞系は、ポマリドミド抵抗性細胞系DF15Rである。他の実施態様において、該細胞系はレナリドミド抵抗性H929 R10-1、H929 R10-2、H929 R10-3、H929 R10-4、又はMM1/R細胞系である。特定の実施態様において、本明細書に提供される方法に使用される細胞系はリンパ腫細胞系である。特定の実施態様において、該細胞系は白血病細胞系である。特定の実施態様において、該細胞系は、ABC-DLBCL(活性化B細胞様びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)細胞系、例えば、U2932細胞系である。特定の実施態様において、該細胞系は、GCB-DLBCL(胚中心B細胞様びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)細胞系、例えば、OCI-LY19又はWSU-DLBCL2細胞系である。特定の実施態様において、該細胞系は、MCL細胞系、例えば、Rec-1、Mino、JeKo-1、又はGRanta-519細胞系である。特定の実施態様において、該細胞系は、MCL細胞系、例えば、U266細胞系である。一実施態様において、該細胞系は、U2932、OCI-LY19、WSU-DLBCL2、Rec-1、Mino、JeKo-1、GRanta-519、又はU266細胞系である。別な実施態様において、腫瘍細胞系又は癌細胞系は、下記の血液癌又は固形腫瘍の細胞系である。別な実施態様において、腫瘍組織は、癌、例えば、固形腫瘍又は血液癌を有する個体からのものである。

20

30

#### 【0263】

いくつかの実施態様において、癌は血液癌である。一実施態様において、血液癌は多発性骨髄腫である。別な実施態様において、血液癌は、慢性リンパ球性白血病(CLL)である。別な実施態様において、血液癌はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)である。別な実施態様において、血液癌は、骨髄異形成症候群、急性白血病、例えば、急性T細胞白血病、急性骨髄性白血病(AML)、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性巨核芽球性白血病、B前駆細胞急性リンパ芽球性白血病、T前駆細胞急性リンパ芽球性白血病、パーキット白血病(パーキットリンパ腫)、又は急性混合性白血病;慢性白血病、例えば、慢性骨髄性リンパ腫、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性単球性白血病、小リンパ球性リンパ腫、又はB細胞前リンパ球性白血病;有毛細胞リンパ腫;T細胞前リンパ球性白血病;又はリンパ腫、例えば、組織球性リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫(例えば、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症)、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞新生物(例えば、形質細胞骨髄腫、形質細胞腫、単クローン性免疫グロブリン沈着症、又は重鎖病)、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫(MALTリンパ腫)、節性辺縁帯B細胞リンパ腫(NMZL)、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦隔(胸腺)大細胞性B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、T細胞大顆粒リンパ球性白血病、アグレッシブNK細胞白血病、成人T細胞白血病/リンパ腫、鼻型節外NK/T細胞リンパ腫、腸症型T細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、芽球性NK細胞リンパ腫、菌状息肉腫(セザリー症候群)、原発性皮膚CD30陽性T細胞リンパ増殖性疾患(例えば、原発性皮膚未分化大細胞リンパ腫又はリンパ腫様丘疹症)、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、末梢T細胞リン

40

50

パ腫、分類不能未分化大細胞型リンパ腫、ホジキンリンパ腫、又は結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫である。

【0264】

他の実施態様において、癌は、固形腫瘍、例えば、癌腫、例えば腺癌、副腎皮質癌、結腸腺癌、結腸直腸腺癌、結腸直腸癌、胆管癌、肺癌、甲状腺癌、鼻咽頭癌、メラノーマ(例えば、悪性メラノーマ)、非メラノーマ皮膚癌、又は非特異型癌腫;類腱腫;線維形成性小円形細胞腫瘍;内分泌腫瘍;ユーイング肉腫;胚細胞腫瘍(例えば、精巣癌、卵巣癌、絨毛癌、内胚葉洞腫瘍、胚細胞腫など);肝芽腫;肝細胞癌;神経芽細胞腫;非横紋筋肉腫軟部肉腫;骨肉腫;網膜芽細胞腫;横紋筋肉腫;又はウィルムス腫瘍である。別な実施態様において、固形腫瘍は膀胱癌又は乳癌である。他の実施態様において、固形腫瘍は、聴神経腫;星状細胞腫(例えば、グレードI毛様細胞性星状細胞腫、グレードII低悪性度星状細胞腫;グレードIII未分化星状細胞腫;又はグレードIV多形膠芽細胞腫);脊索腫;頭蓋咽頭腫;グリオーマ(例えば、脳幹グリオーマ;脳室上衣腫;混合性神経膠腫;視神経グリオーマ;上衣下腫);膠芽腫;髓芽細胞腫;髓膜腫;転移性脳腫瘍;乏突起膠腫;松果体芽細胞腫;下垂体腫瘍;原始神経外胚葉性腫瘍;又は神経鞘腫である。別な実施態様において、癌は前立腺癌である。

10

【0265】

特定の実施態様において、腫瘍細胞は、腫瘍細胞系細胞である。他の実施態様において、腫瘍細胞は、腫瘍幹細胞又は癌幹細胞である。一実施態様において、腫瘍細胞は、中皮腫細胞、メラノーマ細胞、腺腫細胞、癌腫細胞、腺癌細胞、腺管癌細胞、白血病細胞、急性骨髄性白血病細胞、急性骨髄性白血病細胞、急性T細胞白血病細胞、急性リンパ芽球性白血病細胞、有毛細胞白血病細胞、急性前骨髄球性白血病細胞、リンパ腫細胞、パーキットリンパ腫細胞、B細胞慢性リンパ性白血病細胞、非ホジキンリンパ腫細胞、ホジキンリンパ腫細胞、又は多発性骨髄腫細胞、横紋筋肉腫細胞、骨肉腫細胞、神経芽細胞腫細胞、星状細胞腫細胞、又は膠芽腫細胞である。別な実施態様において、腫瘍細胞系は、5637(癌腫)、KHOS/NP(骨肉腫)、MNNG/HOS(骨肉腫)、Saos-2(骨肉腫)、U-2 OS(骨肉腫)、SJSA-1(骨肉腫)、CCF-STTG1(星状細胞腫)、DBTRG-05MG(膠芽腫)、U87 MG(膠芽腫)、T98G(膠芽腫)、SK-N-SH(神経芽細胞腫)、SK-N-AS(神経芽細胞腫)、MCF-7(腺癌)、MDA-MB-231(腺癌)、MDA-MB-436(腺癌)、SK-BR-3(腺癌)、BT-20(癌腫)、BT-474(癌腫)、CAMA-1(癌腫)、HCC2218(癌腫)、SW527(癌腫)、MDA-MB-453(癌腫)、MDA-MB-435S(癌腫)、T-47D(癌腫)、ZR-75-1(癌腫)、UACC-812(癌腫)、HCC1419(癌腫)、HeLa(腺癌)、Caco-2(腺癌)、COLO205(腺癌)、C OLO320/DM(腺癌)、DLD-1(腺癌)、HCT-15(腺癌)、SK-CO-1(腺癌)、SW48(腺癌)、SW480(腺癌)、HCT-8(腺癌)、RKO(癌腫)、LS411N(癌腫)、T84(癌腫)、AGS(腺癌)、KATO III(癌腫)、NCI-N87(癌腫)、SNU-16(癌腫)、769-P(腺癌)、786-O(腺癌)、ACHN(腺癌)、A-498(癌腫)、Caki-1(癌腫)、G-402(平滑筋芽腫)、CML-T1(白血病)、CTV-1(白血病)、JVM-2(白血病)、K562(白血病)、MHH-CALL2(白血病)、NALM-6(白血病)、8E5(白血病)、CCRF-SB(白血病)、CEM/C1(白血病)、CEM/C2(白血病)、CEM-CM3(白血病)、CCRF-HSB-2(白血病)、KG-1(白血病)、KG-1a(白血病)、CCRF-CEM(白血病)、MOLT-3(白血病)、SUP-B15(白血病)、TALL-104(白血病)、Loucy(白血病)、RS4;11(白血病)、REH(白血病)、AML-193(白血病)、THP-1(白血病)、MOLM-13(白血病)、Kasumi-1(白血病)、Kasumi-3(白血病)、BDCM(白血病)、HL-60(白血病)、I 2.1(白血病)、I 9.2(白血病)、J.gamma1.WT(白血病)、J.RT3-T3.5(白血病)、P116(白血病)、P116.c139[P116.c39](白血病)、D1.1(白血病)、J45.01(白血病)、MV-4-11(白血病)、Kasumi-4(白血病)、MEG-01(白血病)、KU812(白血病)、Mo(白血病)、JM1(白血病)、GDM-1(白血病)、CESS(白血病)、ARH-77(白血病)、SK-HEP-1(腺癌)、Bel-7402(癌腫)、Bel-7404(癌腫)、HEP-3B(癌腫)、HepG2(癌腫)、Calu-3(腺癌)、NCI-H1395(腺癌)、NCI-H1975(腺癌)、SK-LU-1(腺癌)、NCI-H2122(腺癌)、NCI-H727(カルチノイド)、A-427(癌腫)、A549(癌腫)、SW1573(癌腫)、NCI-H358(癌腫)、NCI-H460(癌腫)、NCI-H292(癌腫)、NCI-H82(癌腫)、NCI-H226(癌腫)、NCI-H526(癌腫)、又はMSTO-211H(中皮腫)である。

20

30

40

【0266】

特定の実施態様において、本明細書に提供される方法に使用される試料は、患部組織から、例えば、癌、炎症、又は造血疾患若しくは障害を有する個体からのものである。いくつ

50

かの実施態様において、癌は、上述の固形腫瘍又は血液癌である。他の実施態様において、造血疾患又は障害は、異常ヘモグロブリン症、免疫不全、又は微少残存病変である。特定の実施態様において、本明細書に提供される方法は、健康な個体からの細胞中の遺伝子再構成を検出するのに有用である。特定の実施態様において、本明細書に提供される方法に使用される細胞の数は、単一の細胞から約 $10^9$ 細胞の範囲になり得る。いくつかの実施態様において、本明細書に提供される方法に使用される細胞の数は、約 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、又は $5 \times 10^8$ である。

#### 【0267】

対象から収集された細胞の数及び種類は、例えば、フローサイトメトリー、細胞選別、免疫組織化学(例えば、組織特異性又は細胞マーカー特異性抗体による染色)、蛍光活性化細胞選別(FACS)、磁気活性化細胞選別(MACS)などの標準的な細胞検出技術を利用して形態及び細胞表面マーカーの変化を測定することにより、光学顕微鏡又は共焦点顕微鏡法を利用する細胞の形態の検査により、及び/又はPCR及び遺伝子発現プロファイリングなどの当分野に周知である技術を利用して遺伝子発現の変化を測定することによりモニターできる。これらの技術は、1種以上の特定のマーカーに陽性である細胞を特定することにも利用できる。蛍光活性化細胞選別(FACS)は、粒子の蛍光性に基づいて細胞を含む粒子を分離するための周知の方法である(Kamarchの文献(1987, Methods Enzymol, 151:150-165))。個々の粒子の蛍光部分のレーザー励起により小電荷が生じ、混合物からの正及び負の粒子の電磁気的な分離が可能となる。一実施態様において、細胞表面マーカー特異性抗体又はリガンドは、別個な蛍光標識により標識される。細胞はセルソーターを通過して処理され、使用される抗体に結合する能力に基づいた細胞の分離が可能となる。FACS選別された粒子は、96ウェル又は384ウェルプレートの個々のウェルに直接置いて、選別及びクローニングを促進することができる。

#### 【0268】

特定の実施態様において、細胞の部分集団が本明細書に提供される方法において使用される。細胞の特定の集団を選別し単離する方法は当分野に周知であり、細胞の大きさ、形態、又は細胞内若しくは細胞外マーカーに基づき得る。そのような方法には、フローサイトメトリー、流動選別、FACS、磁気細胞選別などのビーズに基づく分離、サイズに基づく分離(例えば、ふるい、多くの障害物、又はフィルター)、マイクロ流体工学装置中の選別、抗体系分離、沈降、アフィニティー吸着、アフィニティー抽出、密度勾配遠心分離、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションなどがあるが、これらに限定されない。

#### 【0269】

一実施態様において、RNA(例えば、mRNA)又はタンパク質は、腫瘍から精製され、バイオマーカーの有無が遺伝子又はタンパク質の発現分析により測定される。特定の実施態様において、バイオマーカーの有無は、定量的リアルタイムPCR(QRT-PCR)、マイクロアレイ、フローサイトメトリー、又は免疫蛍光法により測定される。他の実施態様において、バイオマーカーの有無は、酵素結合免疫吸着法系の方法(ELISA)又は当分野に公知である他の類似な方法により測定される。

#### 【0270】

(6.2.4 試料中のmRNAレベルを検出する方法)

mRNAレベルを検出又は定量化するいくつかの方法が当分野に公知である。例示的な方法には、ノーザンプロット、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ、PCR系の方法などがある。mRNA配列、例えば、CRBN若しくはCRBN関連タンパク質のmRNA又はその断片を使用して、少なくとも部分的に相補的であるプローブを調製できる。次いで、プローブを使用して、PCR系の方法、ノーザンプロットティング、ディップスティックアッセイなどの任意の好適なアッセイを利用して、試料中のmRNA配列を検出できる。

#### 【0271】

他の実施態様において、生体試料中の免疫調節活性の試験のための核酸アッセイを準備できる。アッセイは、典型的には固体担体及び該担体に接触している少なくとも1つの核酸を含み、該核酸は、患者の免疫調節性治療の間に発現を変化させた、CRBN又はCRBN関連

10

20

30

40

50

タンパク質のmRNAなどのmRNAの少なくとも一部分に対応する。該アッセイは、試料中のmRNAの変化した発現を検出する手段も有し得る。

【0272】

アッセイ方法は、望まれるmRNA情報の種類により変化し得る。例示的な方法には、ノーザンブロット及びPCR系の方法(例えば、qRT-PCR)があるが、これらに限定されない。qRT-PCRなどの方法は、試料中のmRNAの量も正確に定量できる。

【0273】

任意の好適なアッセイプラットフォームを利用して、試料中のmRNAの存在を決定できる。例えば、アッセイは、ディップスティック、メンブラン、チップ、ディスク、試験片、フィルター、微小球体、スライド、マルチウェルプレート、又は光ファイバーの形態であり得る。アッセイシステムは、mRNAに対応する核酸が付着している固体の担体を有し得る。固体の担体は、例えば、プラスチック、ケイ素、金属、樹脂、ガラス、メンブラン、粒子、沈殿物、ゲル、ポリマー、シート、球体、多糖、キャピラリー、フィルム、プレート、又はスライドを含み得る。アッセイ成分を調製し、mRNAを検出するためのキットとして共に包装できる。

【0274】

所望の場合、核酸を標識して、標識されたmRNAの集団を作ることができる。一般に、試料を、当分野に周知である方法を利用して標識できる(例えば、DNAリガーゼ、ターミナルトランスフェラーゼを利用して、又はRNA骨格を標識することにより;例えば、Ausubelらの文献(「分子生物学のショートプロトコル(Short Protocols in Molecular Biology)」, 第3版, Wiley & Sons 1995)及びSambrookらの文献(「分子クローニング;実験マニュアル(Molecular Cloning; A Laboratory Manual)」第3版、2001 Cold Spring Harbor, N. Y.)を参照されたい)。いくつかの実施態様において、試料は蛍光標識により標識される。例示的な蛍光染料には、キサンテン染料、フルオレセイン染料、ローダミン染料、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、6カルボキシフルオレセイン(FAM)、6カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、6カルボキシ4',5'ジクロロ2',7'ジメトキシフルオレセイン(JOE又はJ)、N,N,N',N'テトラメチル6カルボキシローダミン(TAMRA又はT)、6カルボキシXローダミン(ROX又はR)、5カルボキシローダミン6G(R6G5又はG5)、6カルボキシローダミン6G(R6G6又はG6)、及びローダミン110;シアニン染料、例えば、Cy3、Cy5、及びCy7染料;Alexa染料、例えば、Alexa-fluor-555;クマリン、ジエチルアミノクマリン、ウンベリフェロン;ベンズイミド染料、例えば、Hoechst 33258;フェナントリジン染料、例えば、Texas Red;エチジウム染料;アクリジン染料;カルバゾール染料;フェノキサジン染料;ポルフィリン染料;ポリメチン染料、BODIPY染料、キノリン染料、ピレン、フルオレセインクロロトリアジニル、R110、Eosin、JOE、R6G、テトラメチルローダミン、リサミン、ROX、ナフトフルオレセイン(Naphthofluorescein)などがあるが、これらに限定されない。

【0275】

いくつかの実施態様において、mRNA配列は、DDB1、PABPC1、HNRNPR、RPL19、SYNCRIP、H2AFX、HSPA8、ALDOA、HIST1H2AA、HSPA1A、XRCC6、RPL12、RPL18A、RPL4、HNRNPA2B1、HNRNPC、RPS2、SEC24C、RPL9、USP15、SEC24A、CTPS、ABCE1、EEF1A1、IPO5、CPSF6、KCNA B2、C7ORF42、SMC4、GNB3、H2AFZ、HIST1H1C、HIST1H1D、HIST1H1E、ACTB、CSNK2A1、CRB N、DDX21、DHX9、DNAJC1、G3BP1、HSPA1B、IGF2BP2、RPL10A、RPL13A、RPL14、RPL15、RPL21、RPL3、RPL30、RPL7、RPL7A、RPLP1、RPLP2、MYH10、ILF3、NCL、RPS13、RPS16、RPS19、RPS6、SND1、EIF2S2、HNRNPH2、UBB、EEF1G、TBL1XR1、NACA、EIF4A1、FASN、PPAT、G3BP2、TUBA1A、UBAP2L、MCM2、UAP1、TUBA1C、EIF2S1、EIF3J、PRKDC、MCM7、RPL11、TUBA1B、STAT3、PTRH2、PABPC4、PTRC、MACF1、UBE20、DUT、GNB2L1、NUP88、H2AFJ、SEC23B、PDXK、ACLY、ARID1A、GBE1、HSPA9、DDX17、FUBP1、FBXO21、EWSR1、IFI16、YWHAE、UBA52、COPS6、GNAS、UBE2Q1、FERMT3、NAP1L2、TPD52、VAPA、EEF1AL3、DDIT4、NEDD8、HIST1H1A、HIST1H1B、PCM1、若しくはIKZF3のmRNAからなる群から選択される少なくとも1つのmRNA、又はその断片を含む。核酸は、固体担体の上に、特異的に、アドレス可能な位

10

20

30

40

50

置に存在し得るが、それぞれが、細胞又は患者中で免疫調節化合物の治療時に差次的に発現するmRNA配列の少なくとも一部に対応している。

【0276】

典型的なmRNAアッセイ法は、1)表面に結合した対象のプロープを得る工程;2)特異的な結合を与えるのに十分な条件下で表面に結合したプロープへのmRNAの集団のハイブリダイゼーションの工程(3)ハイブリダイゼーション後の洗浄により、ハイブリダイゼーション中に結合しなかった核酸を除去する工程;及び(4)ハイブリダイズしたmRNAを検出する工程を含み得る。これらの工程のそれぞれに使用される試薬及びその使用条件は、特定の用途により様々になり得る。

【0277】

ハイブリダイゼーションは、好適なハイブリダイゼーション条件下で実施でき、望まれる通りストリンジェンシーが様々になり得る。典型的な条件は、固体表面上で、相補的結合要素の間に、すなわち、表面に結合した対象プロープと試料中の相補的mRNAの間にプロープ/標的複合体を生み出すのに充分である。特定の実施態様において、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が利用され得る。

【0278】

ハイブリダイゼーションは、典型的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で実施される。標準的なハイブリダイゼーション技術(例えば、試料中の標的mRNAのプロープへの特異的な結合を与えるのに十分な条件下)は、Kallioniemiらの文献(Science 258:818-821 (1992))及びWO93/18186に記載されている。一般的な技術のいくつかの指針、例えば、Tijssenの文献(「核酸プロープによるハイブリダイゼーション(Hybridization with Nucleic Acid Probes)」第I部及びII部(Elsevier, Amsterdam 1993))が利用できる。インサイチュハイブリダイゼーションに好適な技術の説明には、Gallらの文献(Meth. Enzymol., 21 :470-480 (1981));及びAngererらの文献(「遺伝子操作:原理と方法(Genetic Engineering: Principles and Methods)」(Setlow及びHollaender編)第7巻の中、43-65ページ(Plenum Press, New York 1985))を参照されたい。温度、塩濃度、ポリヌクレオチド濃度、ハイブリダイゼーション時間、洗浄条件のストリンジェンシーなどを含む適切な条件の選択は、試料の源、捕捉剤が何であるか、期待される相補性の程度を含む実験計画によるだろうが、当業者にはルーチンの実験の問題として決定できる。

【0279】

当業者は、別な、しかし同等なハイブリダイゼーション及び洗浄条件を利用して類似のストリンジェンシーの条件を与えられることを容易に認識するだろう。

【0280】

mRNAハイブリダイゼーション手順の後、表面に結合したポリヌクレオチドは、典型的には洗浄されて、未結合の核酸が除去される。洗浄は、任意の簡便な洗浄プロトコルを利用して実施できるが、その場合、洗浄条件は、典型的には上述のストリンジェントなものである。次いで、標的mRNAのプロープへのハイブリダイゼーションが、標準的な技術を利用して検出される。

【0281】

PCR系の方法などの他の方法も、CRBN又はCRB結合タンパク質の発現の追跡に利用できる。PCR法の例は、文献に見出される。PCRアッセイの例は、引用により全体として本明細書に組み込まれている米国特許第6,927,024号に見出すことができる。RT-PCR法の例は、引用により全体として本明細書に組み込まれている米国特許第7,122,799号に見出すことができる。蛍光インサイチュPCRの方法は、引用により全体として本明細書に組み込まれている米国特許第7,186,507号に記載されている。

【0282】

いくつかの実施態様において、リアルタイム逆転写-PCR(qRT-PCR)を、RNA標的の検出及び定量化の両方に利用できる(Bustinらの文献(2005, Clin. Sci., 109:365-379))。qRT-PCRにより得られた定量的結果は、一般に定性的なデータよりも情報価値がある。そのため、いくつかの実施態様において、qRT-PCR-系のアッセイは、細胞ベースのアッセイの間

10

20

30

40

50

にmRNAレベルを測定するのに有用になり得る。qRT-PCR法は、患者の療法をモニターするのにも有用である。qRT-PCR系の方法の例は、例えば、引用により全体として本明細書に組み込まれている米国特許第7,101,663号に見出すことができる。

【0283】

常用の逆転写酵素-PCR及びアガロースゲルによる分析とは対照的に、リアルタイムPCRは、定量的な結果を与える。リアルタイムPCRのさらなる利点は、相対的な容易さ及び使用の簡便さがある。Applied Biosystems 7500などのリアルタイムPCRの装置は市販されており、TaqMan Sequence Detectionケミストリーなどの試薬も同様である。例えば、TaqMan(登録商標)Gene Expression Assaysは、メーカーの説明に従って利用できる。これらのキットは、ヒト、マウス、及びラットのmRNA転写の迅速で信頼できる検出及び定量化のための事前に処方された遺伝子発現アッセイである。例示的なPCRプログラムは、例えば、50 で2分間、95 で10分間、95 で15秒間、次いで60 で1分間の40サイクルである。

10

【0284】

特定の複製産物の蓄積に関連する蛍光シグナルが閾値を交差するサイクル数(CTと称される)を決定するには、例えば、比較CT相対定量化計算法を利用する7500 Real-Time PCR System Sequence Detectionソフトウェアv1.3を利用してデータを分析できる。この方法を利用すると、産物は、発現レベルの増加倍率(fold-change)として表される。いくつかの実施態様において、閾値レベルは、ソフトウェアにより自動的に決定されるように選択され得る。いくつかの実施態様において、閾値レベルは、ベースラインより上だが、増殖曲線の指数増殖領域内にあるように充分低くなるように設定される。

20

【0285】

(6.2.5 試料中のポリペプチド又はタンパク質レベルを検出する方法)

タンパク質検出及び及び定量化のいくつかの方法を利用して、CRBN又はCRBN関連タンパク質のレベルを測定できる。任意の好適なタンパク質定量化方法を利用できる。いくつかの実施態様において、抗体系の方法が利用される。利用できる例示的な方法には、イムノブロットング(ウェスタンブロット)、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、免疫組織化学、フローサイトメトリー、サイトメトリックビーズアレイ、質量分析法などがあるがこれらに限定されない。直接ELISA、間接ELISA、及びサンドイッチELISAを含む数種のELISAが通常使用される。

30

【0286】

(6.3化合物)

本明細書に提供される方法のための化合物には、特定の癌を含む数種のヒトの疾患の治療に有用になり得る化合物の群である、「IMiD」(登録商標)(Celgene社)として知られる化合物を含む免疫調節化合物があるがこれらに限定されない。

【0287】

本明細書では、特記されない限り、用語「免疫調節化合物」は、LPS誘導性の単球TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-12、IL-6、MIP-1、MCP-1、GM-CSF、G-CSF、及びCOX-2産生を阻害する特定の有機小分子を包含し得る。これらの化合物は、合成により製造することも、商業的に得ることもできる。

【0288】

例示的な免疫調節化合物には、N-{{2-((2,6-ジオキソ(3-ピペリジル)-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)メチル)シクロプロピル-カルボキサミド;3-[[2-((2,6-ジオキソ-ピペリジン-3-イル)-1,3-ジオキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル)メチル]-1,1-ジメチル-尿素;(-)-3-((3,4-ジメトキシフェニル)-3-(1-オキソ-1,3-ジヒドロ-イソインドール-2-イル)-プロピオンアミド;(+)3-((3,4-ジメトキシフェニル)-3-(1-オキソ-1,3-ジヒドロ-イソインドール-2-イル)-プロピオンアミド;(-)-{2-[1-(3-エトキシ-4-メトキシフェニル)-2-メチルスルホニルエチル]-4-アセチルアミノイソインドリン-1,3-ジオン};(+)-{2-[1-(3-エトキシ-4-メトキシフェニル)-2-メチルスルホニルエチル]-4-アセチルアミノイソインドリン-1,3-ジオン};ジフルオロ-メトキシSeICID;1-フタルイミド-1-(3,4-ジエトキシフェニル)エタン;3-(3,4-ジメトキシフェニル)-3-(3,5-ジメトキシフェニル)ア

40

50

クリロニトリル;1-オキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-アミノイソインドリン;1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-アミノイソインドリン;4-アミノ-2-(3-メチル-2,6-ジオキソ-ピペリジン-3-イル)-イソインドール-1,3-ジオン;3-(3-アセトアミドフタルイミド)-3-(3-エトキシ-4-メトキシフェニル)-N-ヒドロキシプロピオンアミド;1-オキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-メチルイソインドリン;シクロプロピル-N-{2-[(1S)-1-(3-エトキシ-4-メトキシフェニル)-2-(メチルスルホニル)エチル]-3-オキソイソインドリン-4-イル}カルボキサミド;置換2-(3-ヒドロキシ-2,6-ジオキソピペリジン-5-イル)イソインドリン;N-[2-(2,6-ジオキソ-ピペリジン-3-イル)-1,3-ジオキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-5-イルメチル]-4-トリフルオロメトキシベンズアミド;(S)-4-クロロ-N-((2-(3-メチル-2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-1,3-ジオキソイソインドリン-5-イル)メチル)ベンズアミド;ピリジン-2-カルボン酸[2-[(3S)-3-メチル-2,6-ジオキソ-ピペリジン-3-イル]-1,3-ジオキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-5-イルメチル-アミド;(S)-N-((2-(3-メチル-2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-1,3-ジオキソイソインドリン-5-イル)メチル)-4-(トリフルオロメチル)ベンズアミド;3-(2,5-ジメチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオンなどがあるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0289】

炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ は、急性炎症の間にマクロファージ及び単球により産生され、細胞内で多様な種類のシグナル伝達事象を起こす。特定の理論により限定はされないが、本明細書に開示される免疫調節化合物により及ぼされる生物学的作用の1つは骨髄細胞TNF- $\alpha$ 産生の低下である。本明細書に開示される免疫調節化合物は、TNF- $\alpha$  mRNAの分解を増強し得る。

## 【0290】

さらに、理論により限定はされないが、本明細書に開示される免疫調節化合物は、T細胞の強力な共刺激分子であり、用量依存的に細胞増殖を劇的に増加させ得る。本明細書に開示される免疫調節化合物は、CD4+T細胞サブセットに対してよりもCD8+T細胞サブセットに対して大きい共刺激作用を有し得る。さらに、該化合物は、骨髄細胞応答に対して抗炎症性を有し、効率よくT細胞を共刺激してより多量のIL-2、IFN- $\gamma$ を産生し、T細胞増殖及びCD8+T細胞細胞毒性活性を増強させ得る。さらに、特定の理論により限定はされないが、本明細書に開示される免疫調節化合物は、サイトカイン活性化により間接的に作用することと、ナチュラルキラー(「NK」)細胞及びナチュラルキラーT(「NKT」)細胞に直接的に作用することのどちらも可能であり、NK細胞が、IFN- $\gamma$ などがあるがこれに限定されない有益なサイトカインを産生する能力を増加させ、NK細胞及びNKT細胞の細胞毒性活性を増強させ得る。

## 【0291】

免疫調節化合物の具体例には、米国特許第5,929,117号に開示されたものなどの置換スチレンのシアノ及びカルボキシ誘導体;米国特許第5,874,448号及び同第5,955,476号に記載されたものなどの1-オキソ-2-(2,6-ジオキソ-3-フルオロピペリジン-3-イル)イソインドリン及び1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソ-3-フルオロピペリジン-3-イル)イソインドリン;米国特許第5,798,368号に記載の四置換2-(2,6-ジオキソピペリジン(piperdin)-3-イル)-1-オキソイソインドリン;米国特許第5,635,517号、同第6,281,230号、同第6,316,471号、同第6,403,613号、同第6,476,052号、及び同第6,555,554号に開示のものを含むがこれらに限定されない1-オキソ及び1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)イソインドリン(例えば、サリドマイドの4-メチル誘導体)、置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)フタルイミド、並びに置換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-1-オキソイソインドール;米国特許第6,380,239号に記載のインドリン環の4位又は5位で置換されている1-オキソ及び1,3-ジオキソイソインドリン(例えば、4-(4-アミノ-1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)-4-カルバモイルブタン酸);米国特許第6,458,810号に記載の2位で2,6-ジオキソ-3-ヒドロキシピペリジン-5-イルにより置換されているイソインドリン-1-オン及びイソインドリン-1,3-ジオン(例えば、2-(2,6-ジオキソ-3-ヒドロキシ-5-フルオロピペリジン-5-

イル)-4-アミノイソインドリン-1-オン); 米国特許第5,698,579号及び同第5,877,200号に開示の、あるクラスの非ポリペプチド環状アミド; 並びに2003年3月6日に公開された米国特許公開第2003/0045552号、2003年5月22日に公開された米国特許公開第2003/0096841号及び国際出願PCT/US01/50401号(国際公開WO02/059106号)に記載のものなどのイソインドール-イミド化合物がある。米国特許公開第2006/0205787号は、4-アミノ-2-(3-メチル-2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-イソインドール-1,3-ジオン組成物を記載している。米国特許公開第2007/0049618号は、イソインドール-イミド化合物を記載している。本明細書に特定した特許及び特許出願のそれぞれの全体は引用により組み込まれる。一実施態様において、免疫調節化合物はサリドマイドを含まない。

【0292】

10

本明細書に開示される種々の免疫調節化合物は、1つ以上のキラル中心を有し、エナンチオマーのラセミ混合物又はジアステレオマーの混合物として存在し得る。そのため、そのような化合物の立体異性体的に純粋な形態の使用、並びにそれらの形態の混合物の使用も本明細書に提供される。例えば、特定の免疫調節化合物の等量又は非等量のエナンチオマーを含む混合物も利用できる。これらの異性体は、不斉合成することも、キラルカラム又はキラル分割剤などの標準的な技術を利用して分割することもできる。例えば、Jacques, J.らの文献(「エナンチオマー、ラセミ混合物、及び分割(Enantiomers, Racemates and Resolutions)」(Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H.らの文献(Tetrahedron 33:2725 (1977)); Eliel, E. L.の文献(「炭素化合物の立体化学(Stereochemistry of Carbon Compounds)」(McGraw-Hill, NY, 1962); 及び Wilen, S. H.の文献(「分割剤及び光学分割の表(Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions)」p. 268 (E.L. Eliel編, Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972))を参照されたい。

20

【0293】

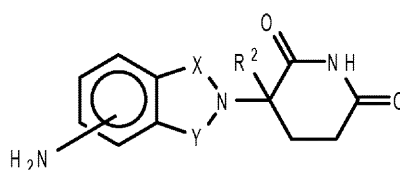
本明細書に提供される免疫調節化合物には、引用により本明細書に組み込まれる米国特許第5,635,517号に記載されるベンゾ環でアミノにより置換されている1-オキソ-及び1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)イソインドリンがあるが、これらに限定されない。

【0294】

これらの化合物は、構造Iを有する:

30

【化6】

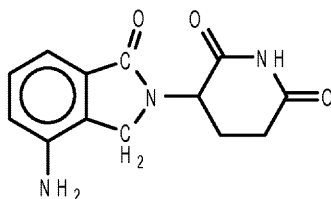


I

(式中、XとYの一方はC=Oであり、XとYの他方はC=O又はCH<sub>2</sub>であり、R<sup>2</sup>は水素又は低級アルキル、とりわけメチルである)。具体的な免疫調節化合物には下記があるがこれらに限定されない:

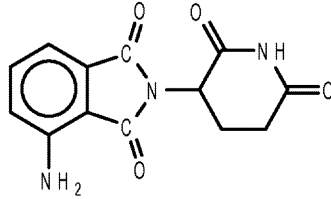
40

【化7】

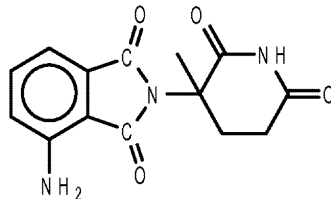


1-オキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-アミノイソインドリン;

## 【化 8】



1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-アミノイソインドリン;及び  
【化 9】



1,3-ジオキソ-2-(3-メチル-2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-アミノイソインドール、  
並びにその光学的に純粋な異性体。

## 【 0 2 9 5】

該化合物は、標準的な合成方法により得ることができる(例えば、引用により本明細書  
に組み込まれる米国特許第5,635,517号を参照されたい)。該化合物は、Celgene Corpora-  
tion, Warren, NJからも入手可能である。

## 【 0 2 9 6】

他の具体的な免疫調節化合物は、それぞれ引用により本明細書に組み込まれる米国特許  
第6,281,230号;同第6,316,471号;同第6,335,349号;及び同第6,476,052号、並びに国際特  
許出願PCT/US97/13375号(国際公開WO98/03502号)に記載されるものなど、あるクラスの置  
換2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)フタルイミド及び置換2-(2,6-ジオキソピペリジン  
-3-イル)-1-オキソイソインドールに属する。

代表的な化合物は下記の式のものである:

## 【化 1 0】



(式中、

XとYの一方はC=Oであり、XとYの他方はC=O又はCH<sub>2</sub>であり;

(i)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>のそれぞれは、互いに独立に、ハロ、1~4つの炭素原子のアルキ  
ル、又は1~4つの炭素原子のアルコキシであり、或いは(ii)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>の1つは-  
NHR<sup>5</sup>であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>の残りは水素であり;

R<sup>5</sup>は、水素又は1~8つの炭素原子のアルキルであり;

R<sup>6</sup>は、水素、1~8つの炭素原子のアルキル、ベンジル、又はハロであり;

但し、X及びYがC=Oであり、且つ(i)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>のそれぞれがフルオロであるか、  
又は(ii)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、若しくはR<sup>4</sup>の1つがアミノである場合、R<sup>6</sup>が水素以外であることを  
条件とする)。

## 【 0 2 9 7】

このクラスの代表的な化合物は下記の式のものである:

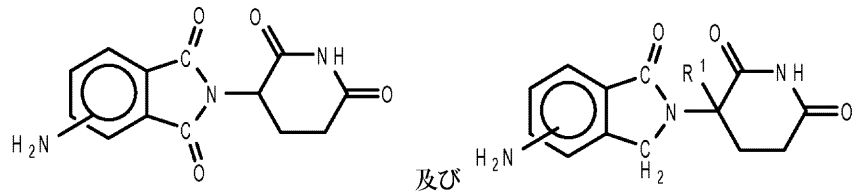
10

20

30

40

## 【化 1 1】



(式中、 $R^1$ は水素又はメチルである)。別な実施態様において、エナンチオマー的に純粋な形態(例えば、光学的に純粋な(R)又は(S)エナンチオマー)のこれらの化合物の使用が本明細書に提供される。

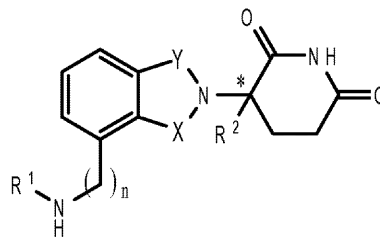
10

## 【0298】

本明細書に開示されるさらに他の具体的な免疫調節化合物は、それぞれ引用により本明細書に組み込まれた米国特許第7,091,353号、米国特許公開第2003/0045552号、及び国際出願PCT/US01/50401号(国際公開WO02/059106号)に開示されたイソインドール-イミドのクラスに属する。

代表的な化合物は、式IIのもの、並びにその医薬として許容し得る塩、水和物、溶媒和物、クラスレート、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ混合物、及び立体異性体の混合物である：

## 【化 1 2】



20

## II

(式中

XとYの一方はC=Oであり、他方は $CH_2$ 又はC=Oであり；

$R^1$ は、H、 $(C_1-C_8)$ アルキル、 $(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、 $(C_2-C_8)$ アルキニル、ベンジル、アリール、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_1-C_6)$ ヘテロシクロアルキル、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_2-C_5)$ ヘテロアリール、 $C(O)R^3$ 、 $C(S)R^3$ 、 $C(O)OR^4$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $N(R^6)_2$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $OR^5$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $C(O)OR^5$ 、 $C(O)NHR^3$ 、 $C(S)NHR^3$ 、 $C(O)NR^3R^{3'}$ 、 $C(S)NR^3R^{3'}$ 、又は $(C_1-C_8)$ アルキル- $O(CO)R^5$ であり；

30

$R^2$ は、H、F、ベンジル、 $(C_1-C_8)$ アルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、又は $(C_2-C_8)$ アルキニルであり；

$R^3$ 及び $R^{3'}$ は、独立に、 $(C_1-C_8)$ アルキル、 $(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、 $(C_2-C_8)$ アルキニル、ベンジル、アリール、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_1-C_6)$ ヘテロシクロアルキル、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_2-C_5)$ ヘテロアリール、 $(C_0-C_8)$ アルキル- $N(R^6)_2$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $OR^5$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $C(O)OR^5$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $O(CO)R^5$ 、又は $C(O)OR^5$ であり；

40

$R^4$ は、 $(C_1-C_8)$ アルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、 $(C_2-C_8)$ アルキニル、 $(C_1-C_4)$ アルキル- $OR^5$ 、ベンジル、アリール、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_1-C_6)$ ヘテロシクロアルキル、又は $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_2-C_5)$ ヘテロアリールであり；

$R^5$ は、 $(C_1-C_8)$ アルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、 $(C_2-C_8)$ アルキニル、ベンジル、アリール、又は $(C_2-C_5)$ ヘテロアリールであり；

$R^6$ の各出現は、独立に、H、 $(C_1-C_8)$ アルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、 $(C_2-C_8)$ アルキニル、ベンジル、アリール、 $(C_2-C_5)$ ヘテロアリール、又は $(C_0-C_8)$ アルキル- $C(O)O-R^5$ であるか、或いは $R^6$ 基は共にヘテロシクロアルキル基を形成でき；

nは、0又は1であり；且つ

\*は、キラル炭素中心を表す)。

50

## 【0299】

式IIの具体的な化合物において、nが0である場合、 $R^1$ は、 $(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、 $(C_2-C_8)$ アルキニル、ベンジル、アリール、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_1-C_6)$ ヘテロシクロアルキル、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_2-C_5)$ ヘテロアリール、 $C(O)R^3$ 、 $C(O)OR^4$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $N(R^6)_2$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $OR^5$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $C(O)OR^5$ 、 $C(S)NHR^3$ 、又は $(C_1-C_8)$ アルキル- $O(CO)R^5$ であり；

$R^2$ は、H又は $(C_1-C_8)$ アルキルであり；且つ

$R^3$ は、 $(C_1-C_8)$ アルキル、 $(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、 $(C_2-C_8)$ アルキニル、ベンジル、アリール、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_1-C_6)$ ヘテロシクロアルキル、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_2-C_5)$ ヘテロアリール、 $(C_5-C_8)$ アルキル- $N(R^6)_2$ ； $(C_0-C_8)$ アルキル- $NH-C(O)O-R^5$ ； $(C_1-C_8)$ アルキル- $OR^5$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $C(O)OR^5$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $O(CO)R^5$ 、又は $C(O)OR^5$ であり；他の変数は同じ定義を有する。

10

## 【0300】

式IIの他の具体的な化合物において、 $R^2$ は、H又は $(C_1-C_4)$ アルキルである。

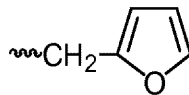
## 【0301】

式IIの他の具体的な化合物において、 $R^1$ は、 $(C_1-C_8)$ アルキル又はベンジルである。

## 【0302】

式IIの他の具体的な化合物において、 $R^1$ は、H、 $(C_1-C_8)$ アルキル、ベンジル、 $CH_2OCH_3$ 、 $CH_2CH_2OCH_3$ 、又は

## 【化13】



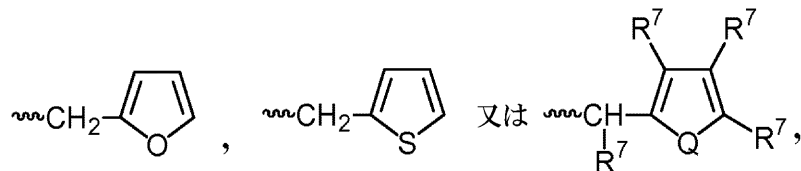
20

である。

## 【0303】

式IIの化合物の別な実施態様において、 $R^1$ は下記である：

## 【化14】



30

(式中、QはO又はSであり、 $R^7$ の各出現は、独立に、H、 $(C_1-C_8)$ アルキル、 $(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、 $(C_2-C_8)$ アルキニル、ベンジル、アリール、ハロゲン、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_1-C_6)$ ヘテロシクロアルキル、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_2-C_5)$ ヘテロアリール、 $(C_0-C_8)$ アルキル- $N(R^6)_2$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $OR^5$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $C(O)OR^5$ 、 $(C_1-C_8)$ アルキル- $O(CO)R^5$ 、又は $C(O)OR^5$ であり、 $R^7$ の隣接する出現は共に二環式のアルキル又はアリール環を形成できる)。

## 【0304】

式IIの他の具体的な化合物において、 $R^1$ は $C(O)R^3$ である。

40

## 【0305】

式IIの他の具体的な化合物において、 $R^3$ は、 $(C_0-C_4)$ アルキル- $(C_2-C_5)$ ヘテロアリール、 $(C_1-C_8)$ アルキル、アリール、又は $(C_0-C_4)$ アルキル- $OR^5$ である。

## 【0306】

式IIの他の具体的な化合物において、ヘテロアリールは、ピリジル、フリル、又はチエニルである。

## 【0307】

式IIの他の具体的な化合物において、 $R^1$ は $C(O)OR^4$ である。

## 【0308】

式IIの他の具体的な化合物において、 $C(O)NHC(O)$ のHは、 $(C_1-C_4)$ アルキル、アリール、

50

又はベンジルに置換され得る。

【0309】

このクラスの化合物のさらなる例には下記があるが、これらに限定されない：[2-(2,6-ジオキソ-ピペリジン-3-イル)-1,3-ジオキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イルメチル]-アミド；(2-(2,6-ジオキソ-ピペリジン-3-イル)-1,3-ジオキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イルメチル)-カルバミン酸tert-ブチルエステル；4-(アミノメチル)-2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-イソインドリン-1,3-ジオン；N-(2-(2,6-ジオキソ-ピペリジン-3-イル)-1,3-ジオキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イルメチル)-アセトアミド；N-{(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)メチル}シクロプロピル-カルボキサミド；2-クロロ-N-{(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)メチル}アセトアミド；N-(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)-3-ピリジルカルボキサミド；3-{1-オキソ-4-(ベンジルアミノ)イソインドリン-2-イル}ピペリジン-2,6-ジオン；2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-4-(ベンジルアミノ)イソインドリン-1,3-ジオン；N-{(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)メチル}プロパンアミド；N-{(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)メチル}-3-ピリジルカルボキサミド；N-{(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)メチル}ヘプタンアミド；N-{(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)メチル}-2-フリルカルボキサミド；{N-(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)カルバモイル}メチルアセテート；N-(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)ペンタンアミド；N-(2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル)-2-チエニルカルボキサミド；N-{{2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル}メチル}(ブチルアミノ)カルボキサミド；N-{{2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル}メチル}(オクチルアミノ)カルボキサミド；及びN-{{2-(2,6-ジオキソ(3-ピペリジル))-1,3-ジオキソイソインドリン-4-イル}メチル}(ベンジルアミノ)カルボキサミド。

10

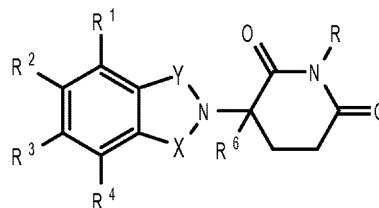
20

30

【0310】

本明細書に開示されるさらに他の具体的な免疫調節化合物は、それぞれ引用により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第US2002/0045643号、国際公開WO98/54170号、及び米国特許第6,395,754号に開示された、あるクラスのイソインドール-イミドに属する。代表的な化合物は、式IIIのもの、並びにその医薬として許容し得る塩、水和物、溶媒和物、クラスレート、エナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ混合物、及び立体異性体の混合物である：

【化15】



III

40

(式中、

XとYの一方はC=Oであり、他方はCH<sub>2</sub>又はC=Oであり；

Rは、H又はCH<sub>2</sub>OCOR'であり；

(i)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、又はR<sup>4</sup>のそれぞれは、互いに独立に、八口、1~4つの炭素原子のアルキル、又は1~4つの炭素原子のアルコキシであり、或いは(ii)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、又はR<sup>4</sup>の1つはニトロ又は-NHR<sup>5</sup>であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、又はR<sup>4</sup>の残りは水素であり；

R<sup>5</sup>は、水素又は1~8つの炭素のアルキルであり、

R<sup>6</sup>は、水素、1~8つの炭素原子のアルキル、ベンゾ、クロロ、又はフルオロであり；

50

R<sup>1</sup>はR<sup>7</sup>-CHR<sup>10</sup>-N(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)であり；

R<sup>7</sup>は、m-フェニレン又はp-フェニレン又は-(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)-であり、式中nは0~4の値を有し；

R<sup>8</sup>とR<sup>9</sup>のそれぞれは、互いに独立に、水素又は1~8つの炭素原子のアルキルであり、或いはR<sup>8</sup>とR<sup>9</sup>は共にテトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、又は-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-であり、式中X<sup>1</sup>は-O-、-S-、又は-NH-であり；

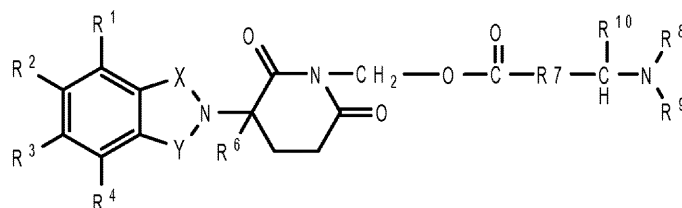
R<sup>10</sup>は、水素、8つの炭素原子のアルキル、又はフェニルであり；且つ

\*は、キラル炭素中心を表す）。

【0311】

他の代表的な化合物は、下記式のものである：

【化16】



10

(式中、

XとYの一方はC=Oであり、XとYの他方はC=O又はCH<sub>2</sub>であり；

(i)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、又はR<sup>4</sup>のそれぞれは、互いに独立に、八口、1~4つの炭素原子のアルキル、又は1~4つの炭素原子のアルコキシであり、或いは、(ii)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>の1つは-NHR<sup>5</sup>であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>の残りは水素であり；

20

R<sup>5</sup>は、水素又は1~8つの炭素原子のアルキルであり；

R<sup>6</sup>は、水素、1~8つの炭素原子のアルキル、ベンゾ、クロロ、又はフルオロであり；

R<sup>7</sup>は、m-フェニレン又はp-フェニレン又は-(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)-であり、式中nは0~4の値を有し；

R<sup>8</sup>とR<sup>9</sup>のそれぞれは、互いに独立に、水素又は1~8つの炭素原子のアルキルであり、或いはR<sup>8</sup>とR<sup>9</sup>は共に、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、又は-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-であり、式中X<sup>1</sup>は-O-、-S-、又は-NH-であり；且つ

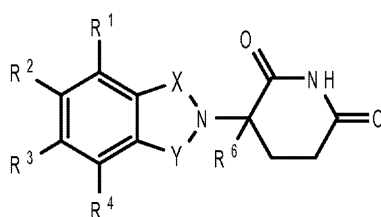
R<sup>10</sup>は、水素、8つの炭素原子のアルキル、又はフェニルである）。

【0312】

他の代表的な化合物は下記式のものである：

30

【化17】



(式中、

XとYの一方はC=Oであり、XとYの他方はC=O又はCH<sub>2</sub>であり；

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>のそれぞれは、互いに独立に、八口、1~4つの炭素原子のアルキル、又は1~4つの炭素原子のアルコキシであり、或いは(ii)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>の1つは、ニトロ又は保護されたアミノであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>の残りは水素であり；且つ

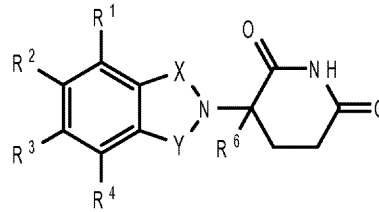
40

R<sup>6</sup>は、水素、1~8つの炭素原子のアルキル、ベンゾ、クロロ、又はフルオロである）。

【0313】

他の代表的な化合物は下記式のものである：

## 【化18】



(式中、

XとYの一方はC=Oであり、XとYの他方はC=O又はCH<sub>2</sub>であり；

(i)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>のそれぞれは、互いに独立に、ハロ、1~4つの炭素原子のアルキル、又は1~4つの炭素原子のアルコキシであり、或いは(ii)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>の1つは-NHR<sup>5</sup>であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>の残りは水素であり；

R<sup>5</sup>は、水素、1~8つの炭素原子のアルキル、又はCO-R<sup>7</sup>-CH(R<sup>10</sup>)NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>であり、式中、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、及びR<sup>10</sup>のそれぞれは本明細書で定義された通りであり；且つ

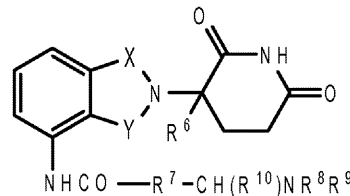
R<sup>6</sup>は、1~8つの炭素原子のアルキル、ベンゾ、クロロ、又はフルオロである)。

10

## 【0314】

化合物の具体的な例は下記式のものである：

## 【化19】



20

(式中、

XとYの一方はC=Oであり、XとYの他方はC=O又はCH<sub>2</sub>であり；

R<sup>6</sup>は、水素、1~8つの炭素原子のアルキル、ベンジル、クロロ、又はフルオロであり；

R<sup>7</sup>は、m-フェニレン、p-フェニレン、又は-(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)-であり、式中nは0~4の値を有し；

R<sup>8</sup>とR<sup>9</sup>のそれぞれは、互いに独立に、水素又は1~8つの炭素原子のアルキルであり、或いは、R<sup>8</sup>とR<sup>9</sup>は共に、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、又は-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sup>1</sup>C

30

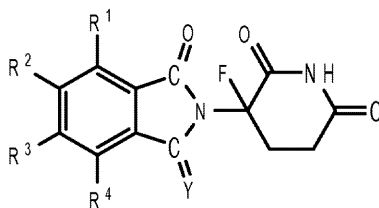
H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-であり、式中X<sup>1</sup>は-O-、-S-、又は-NH-であり；且つ

R<sup>10</sup>は、水素、1~8つの炭素原子のアルキル、又はフェニルである)。

## 【0315】

他の具体的な免疫調節化合物は、それぞれ引用により本明細書に組み込まれている米国特許第5,874,448号及び同第5,955,476号に記載されているものなど、1-オキソ-2-(2,6-ジオキソ-3-フルオロピペリジン-3-イル)イソインドリン及び1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソ-3-フルオロピペリジン-3-イル)イソインドリンである。代表的な化合物は下記式のものである：

## 【化20】



40

(式中、

Yは、酸素又はH<sub>2</sub>であり、且つ

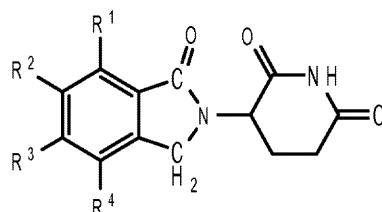
R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>のそれぞれは、互いに独立に、水素、ハロ、1~4つの炭素原子のアルキル、1~4つの炭素原子のアルコキシ、又はアミノである)。

## 【0316】

50

他の具体的な免疫調節化合物は、引用により本明細書に組み込まれる米国特許第5,798,368号に記載されている四置換2-(2,6-ジオキソピペリジン(piperidin)-3-イル)-1-オキソイソインドリンである。代表的な化合物は下記式のものである：

【化21】



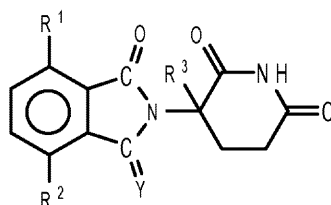
10

(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>のそれぞれは、互いに独立に、八口、1~4つの炭素原子のアルキル、又は1~4つの炭素原子のアルコキシである)。

【0317】

他の具体的な免疫調節化合物は、引用により本明細書に組み込まれる米国特許第6,403,613号に開示されている1-オキソ及び1,3-ジオキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)イソインドリンである。代表的な化合物は下記式のものである：

【化22】



20

(式中、Yは、酸素又はH<sub>2</sub>であり、

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>の第1は、八口、アルキル、アルコキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、シアノ、又はカルバモイルであり、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>の第2は、第1とは独立に、水素、八口、アルキル、アルコキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、シアノ、又はカルバモイルであり、且つ

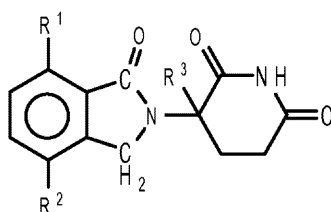
R<sup>3</sup>は、水素、アルキル、又はベンジルである)。

【0318】

30

該化合物の具体的な例は下記式のものである：

【化23】



40

(式中、

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>の第1は、八口、1~4つの炭素原子のアルキル、1~4つの炭素原子のアルコキシ、各アルキルが1~4つの炭素原子のものであるジアルキルアミノ、シアノ、又はカルバモイルであり；R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>の第2は、第1とは独立に、水素、八口、1~4つの炭素原子のアルキル、1~4つの炭素原子のアルコキシ、アルキルが1~4つの炭素原子のものであるアルキルアミノ、各アルキルが1~4つの炭素原子のものであるジアルキルアミノ、シアノ、又はカルバモイルであり；且つ

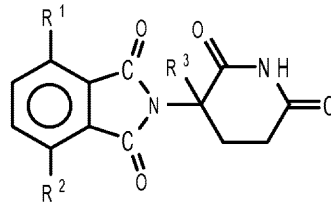
R<sup>3</sup>は、水素、1~4つの炭素原子のアルキル、又はベンジルである)。具体的な例には、1-オキソ-2-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-4-メチルイソインドリンがあるが、これに限定されない。

【0319】

50

他の代表的な化合物は下記式のものである：

## 【化24】



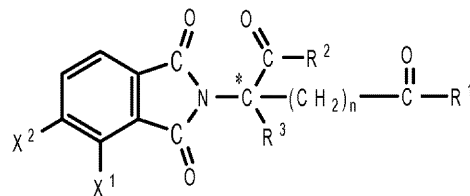
(式中、 $R^1$ 及び $R^2$ の第1は、ハロ、1~4つの炭素原子のアルキル、1~4つの炭素原子のアルコキシ、各アルキルが1~4つの炭素原子のものであるジアルキルアミノ、シアノ、又はカルバモイルであり; $R^1$ 及び $R^2$ の第2は、第1とは独立に、水素、ハロ、1~4つの炭素原子のアルキル、1~4つの炭素原子のアルコキシ、アルキルが1~4つの炭素原子のものであるアルキルアミノ、各アルキルが1~4つの炭素原子のものであるジアルキルアミノ、シアノ、又はカルバモイルであり;且つ

$R^3$ は、水素、1~4つの炭素原子のアルキル、又はベンジルである)。

## 【0320】

本明細書に開示される他の具体的な免疫調節化合物は、両方とも引用により本明細書に組み込まれる米国特許第6,380,239号及び米国特許第7,244,759号に記載されているインドリン環の4位又は5位で置換されている1-オキソ及び1,3-ジオキソイソインドリンである。代表的な化合物は下記式のもの及びその塩である:

## 【化25】

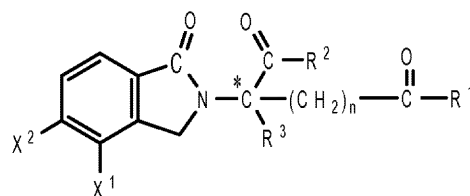


(式中、 $C^*$ で明示されている炭素原子はキラリティの中心を構成し( $n$ が零でなく、 $R^1$ が $R^2$ と同じでない場合); $X^1$ と $X^2$ の一方は、アミノ、ニトロ、1~6つの炭素のアルキル、又はNH-Zであり、 $X^1$ 又は $X^2$ の他方は水素であり; $R^1$ 及び $R^2$ のそれぞれは、互いに独立に、ヒドロキシ又はNH-Zであり; $R^3$ は、水素、1~6つの炭素のアルキル、ハロ、又はハロアルキルであり;Zは、水素、アリール、1~6つの炭素のアルキル、ホルミル、又は1~6つの炭素のアシルであり;且つ $n$ は、0、1、又は2の値を有し;但し、 $X^1$ がアミノであり、 $n$ が1又は2である場合、 $R^1$ と $R^2$ が両方ともヒドロキシということはないことを条件とする)。

## 【0321】

さらなる代表的な化合物は下記式のものである:

## 【化26】



(式中、 $n$ が零でなく、 $R^1$ が $R^2$ でない場合、 $C^*$ で明示されている炭素原子はキラリティの中心を構成し; $X^1$ と $X^2$ の一方は、アミノ、ニトロ、1~6つの炭素のアルキル、又はNH-Zであり、 $X^1$ 又は $X^2$ の他方は水素であり; $R^1$ 及び $R^2$ のそれぞれは、互いに独立に、ヒドロキシ又はNH-Zであり; $R^3$ は、1~6つの炭素のアルキル、ハロ、又は水素であり;Zは、水素、アリール、又は1~6つの炭素のアルキル若しくはアシルであり;且つ $n$ は0、1、又は2の値を有する)。

## 【0322】

具体的な例には、それぞれ下記の構造を有する2-(4-アミノ-1-オキソ-1,3-ジヒドロ-イ

10

20

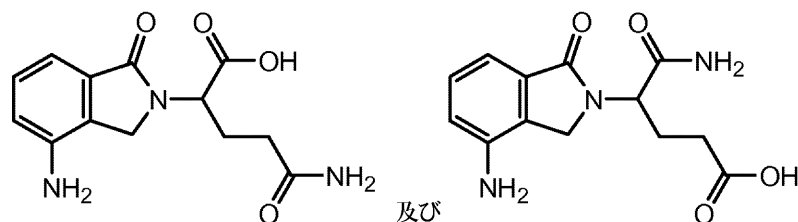
30

40

50

ソインドール-2-イル)-4-カルバモイル-酪酸及び4-(4-アミノ-1-オキソ-1,3-ジヒドロ-イソインドール-2-イル)-4-カルバモイル-酪酸、並びにその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、プロドラッグ、及び立体異性体があるが、これらに限定されない：

【化27】

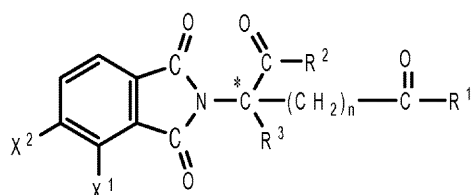


10

。【0323】

他の代表的な化合物は下記式のもの及びその塩である：

【化28】



20

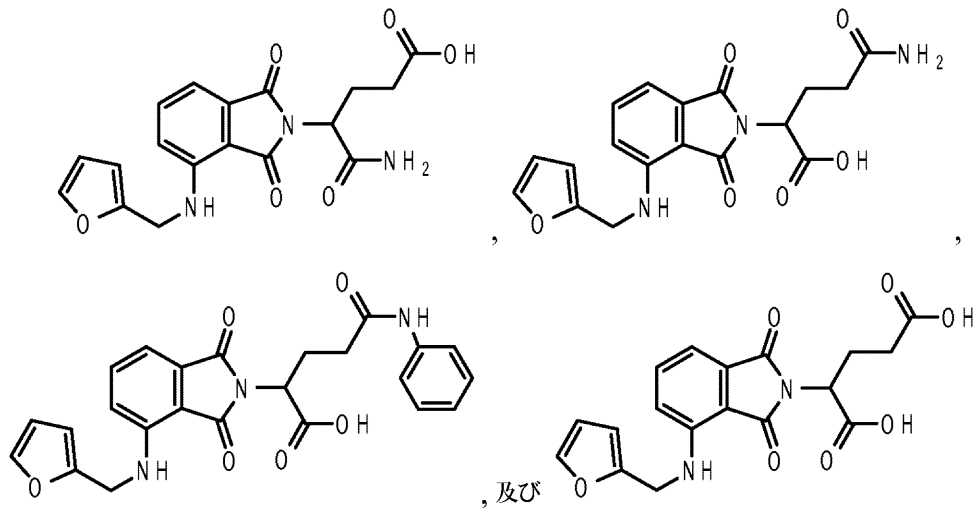
(式中、nが零でなく、R<sup>1</sup>がR<sup>2</sup>でない場合、C\*で明示されている炭素原子はキラリティの中心を構成し；X<sup>1</sup>とX<sup>2</sup>の一方は、アミノ、ニトロ、1~6つの炭素のアルキル、又はNH-Zであり、X<sup>1</sup>又はX<sup>2</sup>の他方は水素であり；R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>のそれぞれは、互いに独立に、ヒドロキシ又はNH-Zであり；R<sup>3</sup>は、1~6つの炭素のアルキル、ハロ、又は水素であり；Zは、水素、アリール、又は1~6つの炭素のアルキル若しくはアシルであり；且つnは、0、1、又は2の値を有する)。

【0324】

具体的な例には、それぞれ下記の構造を有する4-カルバモイル-4-{4-[(フラン-2-イル-メチル)-アミノ]-1,3-ジオキソ-1,3-ジヒドロ-イソインドール-2-イル}-酪酸、4-カルバモイル-2-{4-[(フラン-2-イル-メチル)-アミノ]-1,3-ジオキソ-1,3-ジヒドロ-イソインドール-2-イル}-酪酸、2-{4-[(フラン-2-イル-メチル)-アミノ]-1,3-ジオキソ-1,3-ジヒドロ-イソインドール-2-イル}-4-フェニルカルバモイル-酪酸、及び2-{4-[(フラン-2-イル-メチル)-アミノ]-1,3-ジオキソ-1,3-ジヒドロ-イソインドール-2-イル}-ペンタン二酸、並びにその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、プロドラッグ、及び立体異性体があるが、これらに限定されない：

30

## 【化29】

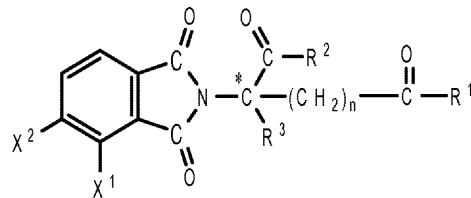


10

## 【0325】

化合物の他の具体的な例は下記式のものである：

## 【化30】



20

(式中、

$X^1$ と $X^2$ の一方は、ニトロ、又はNH-Zであり、 $X^1$ 又は $X^2$ の他方は水素であり；

$R^1$ 及び $R^2$ のそれぞれは、互いに独立に、ヒドロキシ又はNH-Zであり；

$R^3$ は、1~6つの炭素のアルキル、ハロ、又は水素であり；

Zは、水素、フェニル、1~6つの炭素のアシル、又は1~6つの炭素のアルキルであり；且つ

30

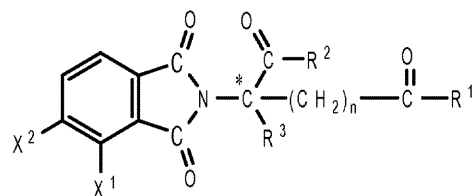
$n$ は、0、1、又は2の値を有し；且つ

-COR<sup>2</sup>と-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COR<sup>1</sup>が異なる場合、C\*と明示された炭素原子はキラリティの中心を構成する)。

## 【0326】

他の代表的な化合物は下記式のものである：

## 【化31】



40

(式中、

$X^1$ と $X^2$ の一方は1~6つの炭素のアルキルであり；

$R^1$ 及び $R^2$ のそれぞれは、互いに独立に、ヒドロキシ又はNH-Zであり；

$R^3$ は、1~6つの炭素のアルキル、ハロ、又は水素であり；

Zは、水素、フェニル、1~6つの炭素のアシル、又は1~6つの炭素のアルキルであり；且つ

$n$ は、0、1、又は2の値を有し；且つ

-COR<sup>2</sup>と-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COR<sup>1</sup>が異なる場合、C\*と明示された炭素原子はキラリティの中心を構成する)。

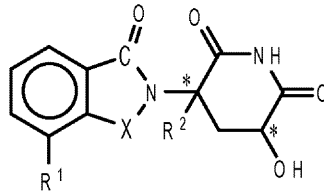
50

## 【0327】

さらに他の具体的な免疫調節化合物は、引用により本明細書に組み込まれる米国特許第6,458,810号に記載されている、2位で2,6-ジオキソ-3-ヒドロキシピペリジン-5-イルにより置換されているイソインドリン-1-オン及びイソインドリン-1,3-ジオンである。

代表的な化合物は下記式のものである：

## 【化32】



10

(式中、

\*で明示された炭素原子はキラリティの中心を構成し；

Xは、-C(O)-又は-CH<sub>2</sub>-であり；

R<sup>1</sup>は、1~8つの炭素原子のアルキル又は-NHR<sup>3</sup>であり；

R<sup>2</sup>は、水素、1~8つの炭素原子のアルキル、又はハロゲンであり；且つ

R<sup>3</sup>は、水素、

非置換若しくは1~8つの炭素原子のアルコキシ、ハロ、アミノ、若しくは1~4つの炭素原子のアルキルアミノにより置換された1~8つの炭素原子のアルキル、

20

3~18の炭素原子のシクロアルキル、

非置換若しくは1~8つの炭素原子のアルキル、1~8つの炭素原子のアルコキシ、ハロ、アミノ、若しくは1~4つの炭素原子のアルキルアミノにより置換されたフェニル、

非置換若しくは1~8つの炭素原子のアルキル、1~8つの炭素原子のアルコキシ、ハロ、アミノ、若しくは1~4つの炭素原子のアルキルアミノ、若しくは-COR<sup>4</sup>により置換されたベンジルであり、

式中、R<sup>4</sup>は、水素、

非置換若しくは1~8つの炭素原子のアルコキシ、ハロ、アミノ、若しくは1~4つの炭素原子のアルキルアミノにより置換された1~8つの炭素原子のアルキル、

3~18の炭素原子のシクロアルキル、

30

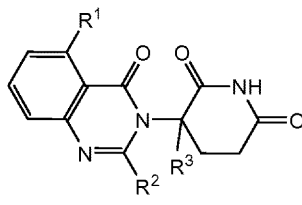
非置換若しくは1~8つの炭素原子のアルキル、1~8つの炭素原子のアルコキシ、ハロ、アミノ、若しくは1~4つの炭素原子のアルキルアミノに置換されたフェニル、又は

非置換若しくは1~8つの炭素原子のアルキル、1~8つの炭素原子のアルコキシ、ハロ、アミノ、若しくは1~4つの炭素原子のアルキルアミノに置換されたベンジルである)。

## 【0328】

本明細書に提供される他の具体的な化合物は、下記式のもの、並びにその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、及び立体異性体である：

## 【化33】



40

(式中、

R<sup>1</sup>は、水素；ハロ；-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH；1つ以上のハロにより任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル；1つ以上のハロにより任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ；又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NHR<sup>a</sup>であり

、

式中、R<sup>a</sup>は、水素；

1つ以上のハロにより任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル；

50

- $(\text{CH}_2)_n$ - (6~10員のアリール);  
 -C(O)- $(\text{CH}_2)_n$ - (6~10員のアリール)又は-C(O)- $(\text{CH}_2)_n$ - (6~10員のヘテロアリール) (ここで、該アリール又はヘテロアリールは、下記の1つ以上により任意に置換されている: 八口; -SCF<sub>3</sub>; それ自体1つ以上の八口により任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル; 又はそれ自体1つ以上の八口により任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ);  
 -C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル (ここで、該アルキルは、1つ以上の八口により任意に置換されている);  
 -C(O)- $(\text{CH}_2)_n$ - (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-シクロアルキル);  
 -C(O)- $(\text{CH}_2)_n$ -NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup> (ここで、R<sup>b</sup>及びR<sup>c</sup>は、それぞれ独立に:

水素;

1つ以上の八口により任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル;

1つ以上の八口により任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ; 又は

下記の1つ以上により任意に置換されている6~10員のアリールである: 八口; それ自体1つ以上の八口により任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル; 又はそれ自体1つ以上の八口により任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ);

-C(O)- $(\text{CH}_2)_n$ -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル; 又は

-C(O)- $(\text{CH}_2)_n$ -O- $(\text{CH}_2)_n$ - (6~10員のアリール)であり

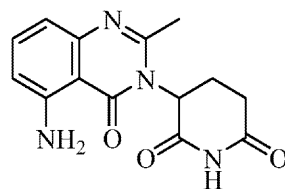
R<sup>2</sup>は、水素; - $(\text{CH}_2)_n$ OH; フェニル; -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル; 又は1つ以上の八口により任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり;

R<sup>3</sup>は、水素; 又は1つ以上の八口により任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり; 且つ nは、0、1、又は2である)。

【0329】

具体的な例には、下記の構造式を有する3-(5-アミノ-2-メチル-4-オキソ-4H-キナゾリン-3-イル)-ピペリジン-2,6-ジオン(「化合物A」)、又はそのエナンチオマー若しくはエナンチオマーの混合物; 又はその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、水和物、共結晶、クラスレート、若しくは多形体があるが、これに限定されない:

【化34】



A

。

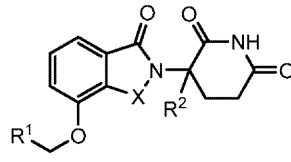
【0330】

化合物Aは、本明細書に提供される実施例に記載の方法により、又はその開示が全体として引用により本明細書に組み込まれる米国特許第7,635,700号に記載されるとおり、製造できる。該化合物は、本明細書の開示に基づいて当業者に明らかである他の方法によっても合成できる。特定の実施態様において、化合物Aは、その全体が引用により本明細書に組み込まれる2011年3月11日に出願された米国仮特許出願第61/451,806号に記載される結晶形態である。いくつかの実施態様において、化合物Aの塩酸塩が、本明細書に提供される方法に使用される。化合物Aを利用して癌及び他の疾患を治療、予防、及び/又は管理する方法は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる2011年3月11日に出願された米国仮特許出願第61/451,995号に記載されている。

【0331】

本明細書に提供される他の具体的な化合物は、下記式のもの、又はその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、若しくは立体異性体である:

## 【化35】



(式中、

Xは、C=O又はCH<sub>2</sub>であり；

R<sup>1</sup>は-Y-R<sup>3</sup>であり；

R<sup>2</sup>はH又は(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

Yは、それぞれが任意に1つ以上のハロゲンにより置換されていてよい6~10員のアリール、ヘテロアリール、若しくは複素環；又は結合であり；

R<sup>3</sup>は：-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-アリール、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-アリール、又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-アリール（ここで、該アリールは、任意に下記の1つ以上により置換されている：それ自体1つ以上のハロゲンにより任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル；それ自体1つ以上のハロゲンにより置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ；オキソ；アミノ；カルボキシル；シアノ；ヒドロキシル；ハロゲン；重水素；(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ、若しくはハロゲンの1つ以上により任意に置換されている6~10員のアリール若しくはヘテロアリール；-CONH<sub>2</sub>；又は-COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル（ここで、該アルキルは、1つ以上のハロゲンにより任意に置換されてよい））；

-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-複素環、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-複素環、又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-複素環（ここで、該複素環は、下記の1つ以上により任意に置換されている：それ自体1つ以上のハロゲンにより任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル；それ自体1つ以上のハロゲンにより置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ；オキソ；アミノ；カルボキシル；シアノ；ヒドロキシル；ハロゲン；重水素；(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ、若しくはハロゲンの1つ以上により任意に置換されている6~10員のアリール若しくはヘテロアリール；-CONH<sub>2</sub>；又は-COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル（ここで、該アルキルは、1つ以上のハロゲンにより任意に置換されてよい））；又は

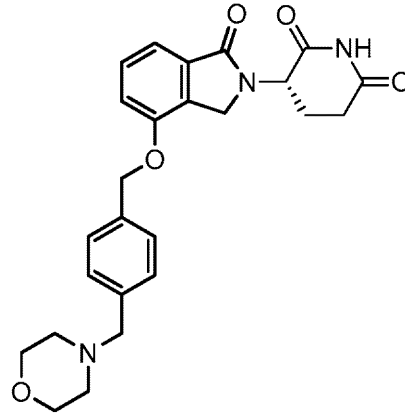
-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-ヘテロアリール、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-ヘテロアリール、又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-ヘテロアリール（ここで、該ヘテロアリールは、下記の1つ以上により任意に置換されている：それ自体1つ以上のハロゲンにより任意に置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル；それ自体1つ以上のハロゲンにより置換されている(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ；オキソ；アミノ；カルボキシル；シアノ；ヒドロキシル；ハロゲン；重水素；(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルコキシ、若しくはハロゲンの1つ以上により任意に置換されている6~10員のアリール若しくはヘテロアリール；-CONH<sub>2</sub>；若しくは-COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル（ここで、該アルキルは、1つ以上のハロゲンにより任意に置換されてよい））であり；且つ

nは、0、1、2、又は3である）。

## 【0332】

具体的な例には、3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンがあるが、これに限定されない。一実施態様において、例えば、本明細書に記載される方法に使用するための3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンの(S)立体異性体(「化合物B」)が本明細書に提供される。ラセミの3-(4-((4-(モルホリノメチル)ベンジル)オキシ)-1-オキソイソインドリン-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオン及びその製造方法は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる米国特許公開第2011/0196150号に報告されている。化合物Bは下記の構造を有する：

## 【化 3 6】



B

10

20

30

40

50

## 【 0 3 3 3 】

記載された全化合物は、商業的に購入できるか、又は本明細書に開示された特許又は特許公報に記載の方法に従って製造できる。さらに、光学的に純粋な化合物は、不斉合成できるか、公知の分割剤又はキラルカラム並びに他の標準的な合成有機化学技術を利用して分割できる。免疫調節化合物、その製造、及び使用についての追加の情報は、例えば、それぞれ引用により全体として本明細書に組み込まれている米国特許出願公開第2006018847号、同第20060205787号、及び同第20070049618号に見出すことができる。

## 【 0 3 3 4 】

該化合物は、分子量が約1,000g/mol未満である有機小分子のことがあり、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、又は他の高分子ではない。

## 【 0 3 3 5 】

描写された構造とその構造に与えられた名前の間に矛盾がある場合、描写された構造により重点が置かれるものとすることに留意されたい。さらに、ある構造又はある構造の一部の立体化学が、例えば、太線又は破線で示されていない場合、該構造又は該構造の一部はその立体異性体全てを包含すると解釈されるものとする。

## 【 0 3 3 6 】

## (6.4 キット)

本明細書に提供される方法を実施するためのキット及び組成物も企図される。特定の実施態様において、免疫調節化合物の効能を決定するのに有用なキットが本明細書に提供される。特定の実施態様において、化合物が免疫調節性であるか否かを決定するのに有用なキットが本明細書に提供される。特定の実施態様において、疾患又は障害の治療における化合物の効能(efficacy)を評価するのに有用なキットが本明細書に提供される。いくつかの実施態様において、免疫調節化合物の効果を決定するのに有用なキットが本明細書に提供される。特定の実施態様において、効果的なリンパ腫、白血病、多発性骨髄腫、固形腫瘍、非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、急性骨髄芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、又はメラノーマの治療の可能性を予測するのに有用なキット又は1種以上の化合物(例えば、薬物)による治療の有効性をモニターするのに有用なキットが本明細書に提供される。該キットは、固体担体、及び生体試料中の少なくとも1種のバイオマーカーのタンパク質発現を検出する手段を含む。そのようなキットは、例えば、ディップスティック、メンブラン、チップ、ディスク、試験片、フィルター、微小球体、スライド、マルチウェルプレート、又は光ファイバーを利用し得る。キットの固体担体は、例えば、プラスチック、ケイ素、金属、樹脂、ガラス、メンブラン、粒子、沈殿物、ゲル、ポリマー、シート、球体、多糖、キャピラリー、フィルム、プレート、又はスライドであり得る。生体試料は、例えば、細胞培養物、細胞系、組織、口腔組織、胃腸組織、器官、細胞小器官、生物学的流体、

血液試料、尿試料、又は皮膚試料であり得る。生体試料は、例えば、リンパ節生検、骨髓生検、又は末梢血腫瘍細胞の試料であり得る。

【0337】

別な実施態様において、キットは、固体担体、該担体と接触する核酸であって、mRNAの少なくとも20、50、100、200、350、又はそれを超える塩基に相補的である核酸、及び生体試料中のmRNAの発現を検出する手段を含む。

【0338】

特定の実施態様において、本明細書に提供されるキットは、定量的リアルタイムPCR(QRT-PCR)、マイクロアレイ、フローサイトメトリー、又は免疫蛍光法により、バイオマーカーの発現を検出する手段を利用する。他の実施態様において、バイオマーカーの発現は、ELISA系の方法又は当分野において公知である他の類似の方法により測定される。

10

【0339】

さらに他の実施態様において、本明細書に記載されるキットは、全身性エリテマトーデス、ANCA誘発性血管炎、糸球体腎炎、急性ウェゲナー肉芽腫症、重症筋無力症、シェーグレン症候群、抗リン脂質症候群(anti-phospholipid syndrome)、関節リウマチ、及び全身性強皮症などの線維症状態から選択される疾患又は障害の有効な治療の可能性を予測するのに有用である。

【0340】

一実施態様において、本明細書に提供されるキットは、本明細書に提供される化合物、又はその医薬として許容し得る塩、溶媒和物、若しくは水和物を含む。キットは、本明細書に開示されるのものがあがこれに限定されない追加の活性薬剤をさらに含み得る。

20

【0341】

本明細書に提供されるキットは、有効成分を投与するのに使用される装置をさらに含み得る。そのような装置の例には、シリンジ、ドリッパバッグ、パッチ、及び吸入器があが、これらに限定されない。

【0342】

キットは、移植用の細胞又は血液並びに1種以上の有効成分を投与するのに使用できる医薬として許容し得るビヒクルをさらに含み得る。例えば、有効成分が非経口投与のために再構成されなければならない固体形態で与えられる場合、キットは、有効成分を溶かして非経口投与に好適な粒のない滅菌溶液を形成できる好適なビヒクルの密閉された容器を含み得る。医薬として許容し得るビヒクルの例には、注射用水USP;塩化ナトリウム注射液、リンゲル液、ブドウ糖注射液、ブドウ糖塩化ナトリウム注射液、及び乳酸リンゲル液があがこれらに限定されない水性ビヒクル;エチルアルコール、ポリエチレングリコール、及びポリプロピレングリコールがあがこれらに限定されない水混和性ビヒクル;並びにコーン油、綿実油、落花生油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、及び安息香酸ベンジルがあがこれらに限定されない非水性ビヒクルがあが、これらに限定されない。

30

【0343】

本明細書に提供される方法及びキットの特定の実施態様において、固相の担体が、タンパク質の精製、試料の標識、又は固相アッセイの実施に使用される。本明細書に開示される方法の実施に好適な固相の例には、ビーズ、粒子、コロイド、単一の表面、チューブ、マルチウェルプレート、マイクロタイタープレート、スライド、メンブラン、ゲル、及び電極があが。該固相が粒状材料(例えば、ビーズ)である場合、一実施態様において、それは、マルチウェルプレートのウェルに分散されて、固相担体の並行処理が可能になる。

40

【0344】

例えば、1種以上の試薬、例えば非限定的に核酸プライマー、固体担体などに関して、上述の実施態様の任意の組み合わせも、本明細書に提供される種々の方法及び/又はキットに関連して企図されることが留意される。

【実施例】

【0345】

50

## (7 実施例)

本発明の特定の実施態様は、下記の非限定的な実施例により説明される。

## 【0346】

## (7.1 手順)

## (7.1.1 Aiolos抗体のコンジュゲーション及び試験)

この実施例は、Aiolos抗体と、本明細書に提供される方法の特定の実施態様において使用されるAlexa Fluor 647とのコンジュゲーション及びコンジュゲートされた抗体の試験を説明する。簡単に述べると、Aiolos 0-21 ウサギポリクローナル抗体(SantaCruz社製カタログ番号sc-101982)又は他の好適なポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体をAlexa Fluor 647に直接コンジュゲートし、次いで、陽性対照(末梢血)及び陰性対照細胞系での特異性を試験する。細胞を、BD Lyse/Fixと、それに続いてBD Perm Buffer Iにより固定化する。抗体の特異性を、被験化合物のある場合とない場合で実施する。

10

## 【0347】

最初に、100 µgの精製された抗体を、5 モル過剰(ME)及び10MEのAlexa Fluor 647とコンジュゲートして、最適なコンジュゲーション条件を決定する。コンジュゲーション後の特異性を、0.5 µgの各試験コンジュゲート及び精製された抗体を特異的なペプチドブロッカーと共に、別々にインキュベートして決定する。正常な全血球(陽性対照)及びHEK-293細胞(陰性対照)を処理し、コンジュゲートされた抗体と精製された抗体で(ブロッカーと共に、及びブロッカーなしで)別々に染色する。精製された試薬を、適切な抗種(anti-species)Alexa Fluor 647二次抗体で展開(develop)する。シグナル対ノイズ比及び特異的蛍光パーセンテージを決定する。コンジュゲートされた抗体と精製された抗体のシグナル対ノイズ比及び特異的蛍光パーセンテージが同等である場合、蛍光染料と抗体の最適なモル比を決定する。精製された抗体の残りを最適なモル比でコンジュゲートする。飽和決定のためにコンジュゲートされた抗体の完全な力価測定を、被験化合物で処理した、又は処理していない正常な全血球に対して実施する。

20

## 【0348】

## (7.1.2細胞のための固定化決定)

目的:PBMC中の表面マーカー発現を維持しながら対象とする全マーカーの検出のための最適な方法を決定する。PBMC又は新鮮な正常ドナー全血を、担体対照又は1マイクロモルの化合物Bで2時間処理し、次いで下記の通り処理する。未処理のMM-BMMCも使用する。

30

## 【0349】

凍結したPBMC(対照及び処理)、新鮮な正常ドナー全血(対照及び処理)、及び凍結したMM-BMMC(未処理のみ)を解凍し、次いで、下記の固定化/易透化法の1つで固定化する:(1)BD Lyse/Fix + Perm Buffer I; (2) BD Lyse/Fix + Perm Buffer II;又は(3) Esoterix Proprietary fixative。

## 【0350】

## (7.1.3 アッセイ安定性)

新鮮な正常ドナー全血試料の安定性を検討する。5つ(5)の正常ドナー全血試料(基本発現のみ)を抜き取り、先の実施例により決定した方法により固定化する。固定化された試料を2つのアリコートに分ける。1つのアリコートは4 で1時間置き、他方は-20 で1時間置く。これらの試料を直ちに(第0日)試験する。残りのアリコートを4 又は-20 で保存し、生体外で第1日、生体外で第2日、生体外で第3日に試験する。

40

## 【0351】

試料を、5名の異なるドナーからの正常全血中のAiolosの基本的差異の分析により生物学的変動性に関して試験する。

## 【0352】

## (7.1.4 アッセイ内の再現性及び操作者間の精度)

アッセイの繰り返し精度を決定するために、上記の安定性を試験した同じ5-NWB試料を、三連で1時点で試験する。これらの試料を、三連で、第0日4 調製試料で試験した。操作者間の精度を試験するために、同じ試料を、同じ日に第2の操作者により処理する。分

50

析には、CD19+a、CD3+、及び総CD45+リンパ球集団中のAiolosの定量的な発現レベルを含み、(MEFLで報告)する。平均、標準偏差、及び%CVを、反復実験間及び操作者間で計算する。

【0353】

(7.1.5 FACS分析による細胞系及びPBMC中のAiolos決定)

この実施例は、FACS分析を利用した細胞系及びPBMC中のAiolosの決定を表す。

【0354】

材料:BD Fix Buffer I(カタログ番号 55870);BD Perm Buffer III(カタログ番号558050);BD Stain Buffer(カタログ番号554657);抗IKZF3抗体(Santa Cruz社製、ロット番号 B1612)、及び二次抗体(BD FITCヤギ抗ウサギIg カタログ番号554020)。

10

【0355】

(アッセイ手順)

【0356】

Fix Buffer Iを、使用前に、インキュベーター又は水浴中で37℃に温めた。Perm Buffer IIIを、使用前に-20℃の冷凍庫中で冷却した。試験化合物による処理の最後に、細胞を回収した。1体積の事前に温めたFix Buffer Iを、1体積の細胞懸濁液と混合した。細胞懸濁液の体積が100µLを超える場合、細胞をスピンドウンし、100µLの培地又はPBSに再懸濁させた。緩衝液と細胞懸濁液をよく混合し、37℃の水浴中で10分間インキュベートした。細胞を250×gで10分間スピンドウンし、上清を吸引した。細胞を、BD Stain Bufferで1回洗浄した。ペレットをスピンドウンし、上清を除いた。細胞をボルテックスにかけてほぐし、ボルテックス又は混合しながら、冷Perm Buffer IIIをゆっくりと加えて透過処理した。その後、細胞を氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞をスピンドウンし、Stain Bufferで2回洗浄した。上清をスピンドウンし、吸引した。細胞を、少ない体積のStain Bufferに再懸濁させた(20万~100万細胞を含む50又は100µL)。抗IKZF3抗体を、1:1000希釈で細胞懸濁液に加え45分間4℃でインキュベートした。次いで、細胞をスピンドウンし、Stain Bufferで1回洗浄した。二次抗体を、1:5000希釈で細胞に加え、室温で20分間暗所でインキュベートした。FACSによる分析の前に、細胞をStain Bufferで1回洗浄した。

20

【0357】

(7.1.6 タンパク質及びmRNA分析のためのカニクイザル血液処理手順)

カニクイザル(M. ファスシキュラリス(M. fascicularis))血液から、2.5mlの全血あたりおよそ1000万( $10 \times 10^6$ )単核細胞(PBMC)が得られる(Non Human Primate Reagent Source, Bostonによるプロトコルに従う)。カニクイザルの血液からPBMCを単離した後、およそ $7 \times 10^6$ 細胞を、タンパク質分析用に小分けし、 $3 \times 10^6$ 細胞をmRNA分析用に使用した。

30

【0358】

(タンパク質分析のためのPBMC処理)

【0359】

下記の工程を氷上で実施し、遠心分離は4℃の冷蔵遠心分離機で実施した。RIPA溶解緩衝液(Pierce, カタログ番号89900)を、10µLのプロテイナーゼ阻害剤(Pierce, カタログ番号78443)を1mLのRIPA緩衝液に加えることにより、最初に調製した。その後、PBMCを、氷冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で1回洗浄した。次いで、PBMCを0.25mLのRIPA溶解緩衝液で溶解した。PBMCを氷上に30分間置き、10分ごとにボルテックスにかけた。溶解物を凍結させ、さらに処理する前に-80℃で保存した。

40

【0360】

溶解物をQIAshredderチューブ(QIAGEN社製, カタログ番号79656)中に置き、30秒間、最高速度(13200rpm)で、Eppendorfベンチトップ遠心分離機(5415 R型)でスピンドウンした。次いで、溶解物を1.5mLの透明なEppendorfチューブに移し、最高速度で10分スピンドウンした。細胞破壊片ペレットを乱さずに、上清を回収した。上清をドライアイスで凍結させ、分析の前に-80℃で保存した。

【0361】

上清中のタンパク質濃度を、BCAアッセイを利用して測定し、期待されるタンパク質収

50

率は約0.5~5 µg/µL又は全体で125~1250 µgであった。ヒトタンパク質に対する抗体を使用するウェスタンブロッティングには(IRF4、IKZF3など)、レーンあたりおよそ 10 µgのタンパク質をロードした。

【0362】

( mRNA分析のためのPBMC処理 )

【0363】

PBMCを0.35mLのRLT緩衝液(Qiagen社製 カタログ番号79216)中で溶解させ、ボルテックスにかけて均質にした。溶解物を凍結させ、さらに処理するまで-20 °Cで保存した。溶解物を室温で解凍した。Qiagen Rneasy Mini Kit(カタログ番号 74104)を使用して、手作業又はQIAcubeを使用してRNAを単離した。NanodropによりRNA濃度を得た。必要なRNA又はcDNA調製物は、約38.5 µLの総体積中で約500~1000ngのRNAであった。

10

【0364】

cDNA調製は、最初に、Tagman Reverse Transcription Reagents(Applied Biosys 番号N808-0234)のマスターミックス溶液を調製することにより実施した。61.5 µLのマスターミックスを38.5 µLのRNAに加えた(総体積=100 µL)。RNA/マスターミックスを直ちにサーマルサイクラーに入れた。

【0365】

カニクイザルcDNA cDNA及びカニクイザル配列特異的プライマーを利用するqRT-PCRプレートIRF4、BLIMP-1、BCL-6、IgJなどの調製は、最初に、Tagman Master mix、水、及びTagman遺伝子発現アッセイを準備することにより実施した。5 µLのcDNA試料を、三連でプレートに加えた。45 µLのマスターミックスを加えた。プレートをスピンス、実験のためにRT-PCRに入れた。

20

【0366】

( 7.1.7化合物B 非ヒト霊長類投与計画試験におけるPDサンプリング )

図4に示される通り、カニクイザルにおける試験を2相に分けた:第I相(試験物品、化合物B塩酸塩による7日の経口実施(doing))、それに続いて28日の試験物品無投薬期間、及び最後に第II相(試験物品による28日の経口投薬)。この試験の第I相の目的は、化合物Bの薬力学作用の始まり及び期間を決定することであった。この試験の第II相の目的は、化合物Bの薬力学作用と安全性/忍容性の関係を調査することであった。さらに、化合物Bの毒物動態特性を決定した。試験した化合物Bの投与量は、0.75mg/kg1日1回、隔日、又は4日投薬3日投薬なしであった。試験物品及び対照物品を、適切な動物に、強制経口投与により、上述の投与計画に従って、第I相の第1日から第7日及び第II相の第1日から第28日に投与した。第I相と第II相は、少なくとも28日の無投薬期間により分けた。各動物の投与体積は、直近の体重測定に基づいていた。経鼻胃/経口胃チューブを鼻腔(経鼻胃)又は口腔(経口胃)に通して挿入し、下部食道中に胃まで進めた。動物を、用量投与のために一時的に拘束し(例えば、手作業で)、鎮痛剤を使用しなかった。各動物/投与には、使い捨ての滅菌シリンジ及び経鼻胃/経口胃チューブを使用した。各投与の後に、およそ5mLの水道水を流した。投薬製剤を、用量投与の間に連続的に攪拌した。フローサイトメトリーにより分析した末梢血単核細胞サブセットは、CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup>であった。抗KLH抗体力価をELISAにより評価した(図5)。

30

40

【0367】

Aiolos/IKZF3のタンパク質レベルを、下記の通り末梢血単核細胞で測定した。カニクイザル(M. ファスシキュラリス(M. fascicularis))血液からは、2.5mlの全血あたりおよそ100万(10 × 10<sup>6</sup>)単核細胞(PBMC)が得られた(Non Human Primate Reagent Source, Bostonによるプロトコルに従う)。カニクイザルPBMC単離の後、各試料を2つの部分に分けた:タンパク質分析用の7 × 10<sup>6</sup>細胞及びmRNA分析用の3 × 10<sup>6</sup>細胞。全工程を氷上で実施し、遠心分離は全て4 °Cの冷蔵遠心分離機で行った。RIPA溶解緩衝液(Pierce, カタログ番号89900)を、10 µLのプロテイナーゼ阻害剤(Pierce, カタログ番号78443)を1mLのRIPA緩衝剤に加えることにより調製した。PBMCを氷冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で1回洗浄した。溶解緩

50

衝液 ( $7 \times 10^6$  PBMCあたり0.25mL RIPA溶解緩衝液使用)を加えた。チューブを氷上に30分間置き、10分ごとにボルテックスにかけた。溶解物を凍結させ、分析まで-80 で保存した。溶解物をQIAshredderチューブ(QIAGEN社製, カタログ番号79656)に入れ、最高速度(13200rpm)でEppendorfベンチトップ遠心分離機(5415 R型)で30秒間スピンドウンした。溶解物を、1.5mLの透明なEppendorfチューブに移し、最高速度で10分間スピンドウンした(QIAshredder回収チューブは乳白色であり、細胞破壊片ペレットを見るのが困難であるので、新しいチューブへの移動)。細胞破壊片ペレットを乱さずに、上清を回収した(RIPA試薬により、上清中に残る膜タンパク質、核タンパク質、及び細胞質タンパク質の抽出が可能である)。タンパク質溶解物をドライアイス上で凍結させ、分析まで-80 で保存した。BCAアッセイを利用してタンパク質濃度を測定した。タンパク質収率は、0.5~5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、又は全体で125~1250  $\mu\text{g}$ であると期待された。ヒトタンパク質に対する抗体を使用するIKZF3/Aiolosのウェスタンには、レーンあたりおよそ 10  $\mu\text{g}$ のタンパク質をロードした。

10

## 【0368】

## (7.1.8 U266、DF15 B、及びT細胞ウェスタンプロット)

U266細胞をATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)から得た。DF15細胞をJohn Shaughnessy (University of Arkansas, Little Rock, AR, USA)から得た。CD19+B細胞をHemaCare BioResearch Products社 (Van Nuys, CA)から得た。細胞を、10%(V/V)熱失活ウシ胎児血清(Gibco, Grand Island, NY, USA)を含み2mMのグルタミンを補ったRPMI-1640培地(Cellgro社製, Manassas, VA)で増殖させた。U266及びDF15細胞( $8 \times 10^5$ /ウェル)又はB細胞( $4 \times 10^5$ 細胞/ウェル)を6ウェルプレートに蒔き、種々の時間及び濃度でレナリドミドとポマリドミドのいずれかで処理した。初代T細胞を、「RosetteSep」プロトコル(Stem Cell Technologies社, Vancouver, Canada)に従って、Ficollによる遠心分離によりヒト白血球(Blood Center of New Jersey, East Orange, NJ)から単離した。精製されたT細胞を、抗CD3抗体(Ebioscience社製, San Diego, CA)により刺激し、種々の時間及び濃度でレナリドミドとポマリドミドのいずれかで処理した。デキサメタゾン(Sigma社製, St. Louis, MO)、メルファラン(Sigma社製, St. Louis, MO)、及びボルテゾミブ(Selleck Chemicals社製, Houston, TX)処理は6時間であった。最終DMSO濃度は0.1%である。薬物添加の前に、細胞を、10  $\mu\text{M}$ のMG-132(Calbiochem Biochemicals社製, Billerica, MA)により30分間事前処理した。細胞を収集し、PBS中で洗浄し、細胞溶解物をSDS-PAGEゲル(Bio-Rad社製, Hercules, CA)上で分離した。メンブランを、抗Aiolos抗体(Santa Cruz Biotechnology社製, Dallas, TX)、抗Ikaros抗体(Millipore社製, Billerica, MA)、及び抗アクチン抗体(Sigma社製, St. Louis, MO;又はLI-COR Biosciences社製, Lincoln, NE)、並びに二次抗体(LI-COR Biosciences社製, Lincoln, NE)によりイムノプロットした。プロットは、Odysseyイメージャー(LI-COR Biosciences社製, Lincoln, NE)により分析した。

20

30

## 【0369】

## (7.1.9 シクロヘキシミド実験方法)

ウェルあたり250万のU266多発性骨髄腫細胞(ATCC)を、6ウェルディッシュに蒔き、100mg/mLのシクロヘキシミド(Sigma社製, C4859)と共にインキュベートし、DMSO、10  $\mu\text{M}$ のレナリドミド、又は1  $\mu\text{M}$ のポマリドミドのいずれかで、0、1.5、3、又は6時間処理した。細胞溶解物を、10%TGX SDS-PAGEゲル(Bio-Rad社製)上で分離し、Aiolos(Santa Cruz社製, sc-10198)、Ikaros(Millipore社製, ABD16)、及びアクチン(Sigma社製, AC 15)用にプロットした。

40

## 【0370】

## (7.1.10 T細胞におけるCRBN及びAiolos siRNAトランスフェクション)

初代T細胞を、「RosetteSep」プロトコル(Stem Cell Technologies社, Vancouver, Canada)に従って、Ficollによる遠心分離によって、ヒト白血球(Blood Center of New Jersey, East Orange, NJ)から単離した。精製したT細胞を、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のPHA-L(Sigma社製, St. Louis, MO)で37 で 24時間処理し、次いで、プログラム2100、電圧+15、幅+2パルスでNeon Transfection System(Invitrogen社製, Grand Island, NY)を利用し、siCRBN又はsiAi

50

olos(Invitrogen社製)によりトランスフェクトした(200nM siRNA/100  $\mu$ L T 緩衝液/  $8 \times 10^6$ 細胞/ショット $\times$ 5ショット)。低GC含量siRNA(Invitrogen社製, Grand Island, NY)を陰性対照としてトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞をプールし、10% FBSを含む20ml RPMIを含む、OKT3(3  $\mu$ g/mL, eBioscience社製, San Diego, CA)被覆された10cmディッシュ中で、37  $^{\circ}$ Cで24時間培養した。細胞を、ウェスタンブロット(抗Aiolos: Santa Cruz社製, sc-10198, ロットC-0212)及びqRT-PCR(Applied Biosystem社製, 遺伝子発現CRBN Hs00372271\_ml ; IKZF3 ID番号:Hs00232635\_ml)により、CRBN又はAiolosノックダウン効率を測定するために回収した。細胞を、qRT-PCR(Applied Biosystem社製, 遺伝子発現ID番号:Hs00174114\_ml)によりIL-2 RNAを測定するためにも回収した。siCRBNにトランスフェクトされた細胞におけるAiolos発現には、残りのsiCRBNにトランスフェクトされた細胞を、OKT3を事前結合した(3  $\mu$ g/mL)12ウェルTCプレートに、 $15 \times 10^6$ 細胞/3mL/ウェルで播種し、DMSO又は薬物により37  $^{\circ}$ Cで24時間処理し、ついでウェスタン分析のために回収した。Aiolos及びIkarosタンパク質発現を、Aiolosに対する抗体(Santa Cruz社製, Dallas, TX)及びIkarosに対する抗体(Millipore社製, Billerica, MA)を使用してイムノブロット分析により決定した。siAiolosにトランスフェクトされた細胞におけるIL-2産生には、残りのトランスフェクトされた細胞を、OKT3を事前結合した(3  $\mu$ g/mL)96ウェルTCプレートに、ウェルあたり $2 \times 10^6$ 細胞で播種し、DMSO又は薬物により37  $^{\circ}$ Cで2日間処理した。上清を収集し、IL-2タンパク質をELISA(Thermo Scientific社製, Lafayette, CO)により検出した。

10

## 【0371】

20

## (7.1.11 H929 e211異種移植片法)

雌のSCIDマウス(Fox Chase SCID(登録商標), C.B-17/1cr-Prkdcscid, Charles River社製)(Wilmington, MA)の右脇腹に、50%マトリゲル(BD Biosciences社製)中の全部で $1 \times 10^7$ NCI-H929腫瘍細胞を皮下注射した。腫瘍が100~150mgの平均サイズに達すると、各群の10匹のマウスをビヒクル(脱イオン水中の0.5%のカルボキシメチルセルローズ:0.25% Tween 80)又は示される投与量の経口レナリドミドのいずれかにより毎日19日間処置した。健康状態並びに腫瘍の成長に関して、マウスをモニターした。全マウスの腫瘍をデジタルキャリパーにより測定し、体積を下記式により計算した:腫瘍体積( $\text{mm}^3$ )=長さ(mm) $\times$ 幅(mm) $^2$ 。サテライト群において、マウス(群あたり3匹)を、7日間、ビヒクル又は示された投与量の毎日の経口レナリドミドのいずれかにより処置し、腫瘍を摘出し、免疫組織化学分析のために急速冷凍した。

30

## 【0372】

## (7.1.12 免疫組織化学)

厚さ4ミクロンのホルマリン固定パラフィン包埋異種移植片腫瘍切片を、CRBNに対する抗体(ウサギモノクローナルCelgene CRBN65)、Aiolosに対する抗体(ウサギポリクローナル抗体;Santa Cruz社製, Dallas, Texas)、及びIkarosに対する抗体(ウサギポリクローナル抗体;Millipore社製, Billerica, MA)により、Bond-Max自動スライドストレイナー(strainer)(Leica Microsystems社製, Buffalo Grove, IL)及び関連するBond Polymer Refine Detection Kitを利用して染色した。抗原賦活化を、該装置上で、Epitope Retrieval 2(pH 9.0)により、20分間100  $^{\circ}$ Cで実施した。スライドを、内因性ペルオキシダーゼ活性に関して、Peroxide Blockにより5分間室温でブロックした。次いで、切片を、1:4000のCRBNに対する一次抗体、1:1000のAiolosに対する一次抗体、及び1:1000のIkarosに対する一次抗体と共に、15分間室温でインキュベートした。これらの一次抗体はウサギ宿主種であるので、一次抗体の後の工程は、マウス異種移植片成分に対する交差反応性を避けるためにプロトコルから除いた。陰性対照スライドには、Bond Primary Antibody Diluentを、一次抗体の代りに与えた。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識されたポリマーを、装置のデフォルト条件で適用し、ジアミノベンジジン四塩酸塩(DAB)を酵素基質として使用し、特異的な抗体局在化を可視化した。スライドをヘマトキシリンにより対比染色した。IHC染色強度を、0~3のスケールで点数化した(0=陰性、1=弱い、2=中間、3=強い)。特異的な免疫反応性を持つ細胞の範囲(<1%=0、1~25%=1、26~75%=2、及び>75%=3)を記録

40

50

した。免疫反応性強度の全体スコアを、強度と陽性細胞の範囲の積として計算した。

【0373】

(7.1.13 コホートによるAiolos阻害)

癌患者に、化合物Aを、0.5mg、1mg、1.5mg、2mg、2.5mg、3、又は3.5mgの投与量で投与した。血液試料を、投薬の直前並びに化合物Aの単一の投与の1.5時間後及び5時間後に採取した。末梢血単核細胞を、全血試料からficollにより単離し、DMSO中で生存可能に凍結した。細胞を、2mLの冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄し、2mLの冷BD Cytotfix/cytoperm Bufferを加えて透過処理し、氷上で15分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、BD perm/wash bufferで2回洗浄し、次いで、40  $\mu$ lのBD perm/wash bufferに再懸濁させた。細胞を、抗CD3抗体又は抗CD19抗体、及び20  $\mu$ lの抗Aiolos抗体(Santa Cruz Santa Cruz, ウサギポリクローナルIgG, カタログ番号sc-101982、染色緩衝液により1:200希釈)又は20  $\mu$ lの細胞に対する適切なアイソタイプ対照により染色した。細胞を完全に混合し、室温で30分間暗所でインキュベートし、BD perm/wash bufferで1回洗浄し、80  $\mu$ lのBD perm/wash bufferに再懸濁させ、フローサイトメーターでの分析の前に20  $\mu$ lの二次抗体を加えた。

10

【0374】

(7.1.14 T細胞における薬物処理)

3名のドナーからの初代T細胞を、ヒト白血球(Blood Center of New Jersey, East Orange, NJ)から、「RosetteSep」プロトコル(Stem Cell Technologies社, Vancouver, Canada)に従ってFicollによる遠心分離により単離した。精製されたT細胞を、抗CD3抗体(Ebioscience社製, San Diego, CA)により刺激し、6時間薬物処理し、収集し、Aiolos及びIkaro sタンパク質発現を、ブロッキングペプチドと共に、又はなしで、Aiolosに対する抗体(Santa Cruz社製, Dallas, TX)及びIkaro sによる抗体(Millipore社製, Billerica, MA)を使用してイムノプロット分析により決定した。

20

【0375】

(7.1.15 ジャーカット細胞におけるAiolosタンパク質分解)

ジャーカット細胞を、プログラム1350で電圧+10、幅+3パルスでNeon Transfection System(Invitrogen社製, Grand Island, NY)を利用して、野生型完全長Aiolos及び異なるリジン突然変異完全長Aiolos DNA(Origene社製, 5  $\mu$ g DNA/100  $\mu$ l R 緩衝液/ 2  $\times$  10<sup>6</sup>細胞/ ショット)によりトランスフェクトした。GFP対照DNA(Lonza社製)もトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、1mL RPMI+10% FBSを含む24ウェルプレートにおいて37  $^{\circ}$ Cで6時間培養し、次いで、DMSO又は薬物によりさらに48時間処理し、薬物処理細胞を、Aiolosに対する抗体(Santa Cruz社製, Dallas, TX)及びIkaro sに対する抗体(Millipore社製, Billerica, MA)によるウェスタンプロットによりAiolos及びIkaro sタンパク質発現を測定するために回収した。

30

【0376】

(7.1.16 B細胞及びT細胞におけるAiolosフローサイトメトリー)

健康なボランティアに、プラセボ(n=10)又は0.03mg、0.1mg、0.3mg、1mg、若しくは2mg(それぞれN=6)の投与量の化合物Bを投与した。1。血液試料を、投薬前、又は投薬後3時間、12時間、及び24時間に採取した。血液試料を溶解させ、1体積の血液を20体積の1  $\times$  Lyse /Fix Buffer(BD Biosciences社製、カタログ番号 558049)と混合し、チューブを数回反転して完全に混合することにより、直ちに固定化した。この試料混合物を、37  $^{\circ}$ Cの水浴中で10分間インキュベートし、細胞を、800  $\times$  gで5分間の遠心分離によりペレット化して、上清を吸引により除いた。細胞を、2mLの冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)により2回洗浄し、2 mLの冷BD Cytotfix/cytoperm Bufferを加えて透過処理し、氷上で15分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、次いでBD perm/wash bufferで2回洗浄し、40  $\mu$ lのBD perm/wash bufferに再懸濁させた。細胞を、抗CD3抗体又は抗CD19抗体、及び20  $\mu$ lの抗Aiolos抗体(Santa Cruz Santa Cruz, ウサギポリクローナルIgG, カタログ番号sc-101982:染色緩衝液により1:200で希釈)、又は20  $\mu$ lの細胞に対する適切なアイソタイプ対照により染色した。細胞を完全に混合し、室温で30分間暗所でインキュベートし、BD perm/wash bufferで1

40

50

回洗浄し、次いで、80  $\mu$ lのBD perm/wash bufferに再懸濁させ、フローサイトメーターでの分析の前に20  $\mu$ lの二次抗体を加えた。

【0377】

(7.1.17 正常なヒトCD19+ B細胞からのシンプルウェスタン電気泳動図)

ヒトB細胞を、StemCell Technologies社のB細胞単離キットを利用して、New Jersey Blood Centerから得た3名のドナーの全血から単離した。IKZFファミリータンパク質を、自動キャピラリー系Simple Western System Sally(Protein Simple)を利用して定量化した。100ngの細胞溶解物タンパク質又は組換え型タンパク質の段階希釈物を還元緩衝液中で、蛍光分子量(MW)標準と混合した。これらの試料を95 に5分間加熱した後、試料を、それぞれのキャピラリーチューブに充填し、タンパク質を、MWサイズに基づいて、スタッキングマトリックス及び分離マトリックスを通して40分間250ボルトで分離した。次いで、タンパク質を、最適な光活性化捕捉化学作用を利用してキャピラリー壁に固定化した。タンパク質固定化の後、キャピラリーを、ブロッキング試薬と共に23分間インキュベートし、標的タンパク質を、特異的一次抗体及び西洋ワサビペルオキシダーゼ-コンジュゲート抗ウサギ二次抗体により(ProteinSimple)により探索した。ルミノールとペルオキシドの混合物(ProteinSimple)を加え、生じた化学ルミネセンスシグナルをCCDカメラにより捉え、Sally用のCompass Software(ProteinSimple)を利用してシグナル強度を定量化して分析した。次いで、各試料中のIkarosファミリータンパク質を、ヒト組換え型タンパク質の標準的な曲線に基づいて計算した。B-アクチンも、内部規格化対照として使用した。

10

【0378】

20

(7.1.18 mRNA分析の手順)

PBMCを、正常なボランティア及び示された炎症疾患を有する患者の全血(Conversant Bio社製, Huntsville, Alabama)から単離した。次いで、細胞を、5%自己由来血清及び抗生物質を補ったRPMI-1640培地で24時間培養した。インキュベーションの後、 $1 \times 10^6$ 細胞を回収し、冷PBSで洗浄し、350  $\mu$ L RLT 緩衝液(Qiagen社製)により溶解した。細胞溶解物を、マイクロアレイによるRNA QC及び遺伝子発現分析のためにバーコード付きのチューブに移した。Affymetrix HG-U133 Plus 2.0アレイ実験を、The Covance Genomics Laboratory (Covance)で実施した。

【0379】

(7.1.19 カニクイザルPBMC試料の手順)

30

32匹のカニクイザルを、無作為に4群に分けた。各群は4匹の雌と4匹の雄(n=8)を有した。サル3つの群に、化合物Bを、それぞれ0.04、0.15、0.75mg/kgの投与量で経口投与した。残った群をビヒクル対照(脱イオン水中、0.5%カルボキシメチルセルロース:0.25% Tween 80)として使用した。1か月間の薬物による投薬の後、各サルからの全血をサンプリングし、PBMCを単離した。PBMC中のIkarosレベルを、上述の通り、自動キャピラリー系Simple Western System Sally(ProteinSimple)を利用して定量化した。複数の群の比較分析を、GraphPad Prism(登録商標)バージョン5.01(GraphPad Software社製, La Jolla, CA, USA)を利用して、一元分散分析と、それに続くダネットの事後検定により実施した。全ての分析で、 $P < 0.05$ の値を有意であるとみなした。

【0380】

40

(7.1.20 B-CLL細胞培養材料)

患者の試料から生存可能に凍結されたヒト初代B-CLL細胞を、AllCells社(Emeryville, California, USA)から入手し、10%ウシ胎児血清(FBS)(Invitrogen社製, Carlsbad, CA)を含むRoswell Park Memorial Institute(RPMI)-1640培地中で維持した。線維芽細胞を発現しているCD40L(Angela Pipernoからの寄贈, Rockefeller University, NY, NY)を20% FBSを補ったDMEM培地中で維持した。共培養の前に、CD40L線維芽細胞を、10  $\mu$ g/mLのマイトマイシンCにより3時間事前処理し、それに続いてPBSによる洗浄、及びAccutase解離を行った。次いで、細胞を、ウェル(プレートフォーマットあたり24ウェル)あたり $6 \times 10^5$ 細胞の密度で再播種し、一晚増殖させて、単層の形成を可能にした。解凍した生存可能な初代B-CLL患者細胞を、メーカーが供給したプロトコルに従ってCFSE試薬(Vibrant CFDA SE Ce

50

II Tracer Kit, Invitrogen社製, Carlsbad, CA, USA)により事前染色し、ウェルあたり $0.8 \sim 1 \times 10^6$ 細胞で、10% FBS、5ng/mL rh-IL4、及び10ng/mL rh-IL10(Peprotech社製, USA)を補ったRPMI1640培地中の事前形成した単層のCD40L線維芽細胞に蒔いた。長期間の培養では、培地の半分を、3日ごとに新しくした。或いは、他のアッセイでは、B-CLL細胞を、事前染色なしにCD40L上で共培養した。

#### 【0381】

(7.2 Aiolos発現に対する作用)

リンパ球(左のパネル)顆粒球(上部パネル)及び単球(右のパネル)における化合物BのAiolos発現の阻害における作用を図1に示す。それぞれ図2及び3に示される通り、化合物Bは、CD20+B細胞及びCD3+T細胞においてAiolos発現を有意に阻害した。図51A及びBに示される通り、化合物Bによる処理時にAiolosのいくらかの阻害がCD19+B細胞及びCD3+T細胞に観察されたが、0.3mgを超える投与量の化合物Bが有意なレベルでAiolos発現を阻害したことが見出された。

10

#### 【0382】

明示された化合物により250nMで18時間処理されたヒト全血のウェスタンブロット分析を図7に示し、モーリシャスサルPMBCに関する同じ分析を図8に示す。図8に示される通り、化合物Bは、処理の18時間後に、Aiolosの発現を阻害した。

#### 【0383】

化合物Bを使用するカニクイザルの試験を、図6に概要を示した処置計画に従って実施した。簡単に述べると、4つの処置群を割り当て、図6に明示した投薬スケジュール及び投与量に従ってそのそれぞれに化合物Bによる処置を与えた。群のそれぞれの結果を図9~16に示すが、化合物BのAiolos発現に対する作用が投与計画により様々になり得るが、化合物Bが全般的にAiolosの発現を阻害することを示す。

20

#### 【0384】

化合物A及びB、レナリドミド(「len」)及びボマリドミド(「pom」)のAiolos発現に対する作用も評価した。図17に示される通り、化合物Aがプロテアソーム阻害薬の非存在下でAiolosの発現を阻害することが示されたが、プロテアソーム阻害薬が存在する場合には阻害はほとんど観察されなかった。図18に示される通り、len、pom、化合物A、及び化合物Bは全て、Aiolos発現に対して阻害作用を示した。阻害作用は、骨髄腫細胞における化合物の抗増殖活性と相関があるようであった。図43A~Dに示される通り、AiolosはT細胞におけるIL-2の負の調節因子であり、AiolosのサイレンシングはIMiD治療によく似ている。図50A~Dに示される通り、レナリドミド、ボマリドミド、化合物A、及び化合物Bは、初代T細胞においてAiolos発現に対する阻害作用を示した。

30

#### 【0385】

Aiolos発現に関する試験を、種々の白血病細胞で実施した。Aiolosのレベルが、CLL患者から得たB細胞において、健康な対象から得たB細胞よりも高いことが見出された(図22)。len、pom、化合物A、及び化合物Bが、CLL患者並びに健康な対象から得られたB細胞においてAiolos発現を阻害することが示された(図22)。類似の作用が、リンパ腫細胞MCL及びDLBCLにおいても示された(図23)。注目すべきことに、セレブロン発現が低い細胞では、Aiolos発現の阻害がほとんど又は全く起こらないことが示され(図19)、同様に、セレブロンの喪失がAiolos発現の下方制御を防止することが示され(図20)、このプロセスへのセレブロンの関与が示唆される。最後に、Aiolosのノックダウンがp21発現を誘発し、IRF4を減少させ、S期にある細胞数を減少させることが示された(図21及び24)。

40

#### 【0386】

(7.3 セレブロン関連タンパク質の同定)

ユビキチン化されたタンパク質の質量分析法(Ubiscan):Cell Signaling Technology社のUbiScan(商標)プロテオミクスプラットフォームを利用して、プロテアソーム阻害薬MG132の存在下又は非存在下で、未処理(処理1)又は処理2若しくは処理3により処理された初代ヒトT細胞及び免疫調節化合物により処理されたMM細胞系におけるユビキチン化の違いを同定及び定量化した。UbiScan法は、CST社独自の免疫親和性精製法を利用するユビキ

50

チン化されたペプチドのプロテアーゼ消化タンパク質抽出物からの単離と、液体クロマトグラフィー、タンデム質量分析法(LC-MS/MS)によるペプチドの同定及び定量化を合わせたものである。ユビキチン化の定量化は、抗体免疫沈降法により回収されたユビキチン化されたペプチドの存在量に基づいている。各ユビキチン化されたペプチドの存在量又は強度情報は、MSIチャンネルで測定されたそのペプチドのピーク高さに基づいている。計算された増加倍率の信頼度は、いくつかの因子に依存するが、重要な因子は、ユビキチン化されたペプチドの強度又はピーク高さである。試料を、LC-MS/MSにより、Orbitrap Velos質量分析計により分析した。各試料中のペプチドイオンのクロマトグラフィーピーク頂点強度を、その対応する抽出されたイオンクロマトグラムから誘導した。標識のない定量化を、各試料中の同じペプチドイオンのピーク強度を比較して、その対応する増加倍率を発生させることにより実施した。定性的データ評価は、主に、自動化されたプロセスであった。SORCERERプラットフォームの特定のスコア付け基準を満たし、確立された実験パラメーター内に含まれるペプチド帰属を、試験の最終結果において保持した。帰属のさらなる信頼性は、特定のペプチドが、不完全なプロテアーゼ消化による重複する配列、還元型及び/又は酸化型のメチオニン残基の存在、又は複数の荷電状態のユビキチン化されたペプチドの存在などの、同じ部位の同定を支持する冗長なSORCERERからの多数の証拠の線を含んでいた場合に得られた。独立に複数回同定されたペプチドは、カウント1のペプチドに比べて正しく帰属された確率が高い。しかし、低カウントのペプチド帰属も、その対応するSORCERERスコア及びデータ品質メトリクス(metrics)により示される通りそれらが十分な実験的証拠を有する場合、自信を持って同定されると考えるべきである(XCorr, DeltaCn, PP確率, 及び質量誤差)。図38に示される通り、ポマリドミド及びレナリドミドは、リジン203を含むAiolosペプチドのユビキチン化を増強させることが見出された。結果により、レナリドミド及びポマリドミドがAiolosの分解を促進することが示される。

【0387】

(7.4反応性ファーマコフォアとの共有結合架橋を利用した化合物結合タンパク質の同定(Caprotec))

レナリドミド及び任意に1種の(1)前駆体分子ニトロ-レナリドミドを、3つ(3)異なるリンカー及び1つの(1)捕捉スカフォールドを利用して合成し、全部で6つ(6)のCapture Compounds(商標)を合成した。Capture compoundsは、ビオチン又は蛍光残基を引出し機能(pull-out function)として含み得る。これには、およそ24の合成工程が必要であった。4工程は、最適化されるリスクが中程度であった。20工程は、ルーチンの変換であり、最適化されるリスクが低かった。全てのCapture Compoundsを、精製及び分析して、構造上の同一性、純度、及び安定性を確認した。Capture Compoundsの光化学を、批判的に調査した。多発性骨髄腫細胞系溶解物を、最適化された捕捉条件を利用してCapture Compoundsと共にインキュベートし、明示された生物学的材料内の工程3の全Capture Compoundsのプロファイリングを実施した。適切な対照及びレナリドミドを利用する競合実験により、及び十分な量で与えられたおそらくは不活性なアナログにより、選択的な相互作用を確認した。この工程でのMS試料の数は、およそ100であった。工程6、工程4、及び工程5には、捕捉されたタンパク質の質量分析法分析と、それに続いて統計的及び定量的なLC-MSnデータ分析が伴った。これを基に、工程4でのアッセイの最適化を判断し、工程5での小分子と特異的に相互作用する全タンパク質のリストが生成するだろう。

【0388】

(7.5乳癌細胞中の内因性Aiolosに対する化合物Aの作用)

細胞系(AU565、ZR 75-1、BT-474、EFM-192A、HCC1954、HCC70、MB436、及びBT549)を、標準的な細胞培養技術を利用して維持した。内因性Aiolos発現には、細胞を、3mL体積の培地にウェルあたり $0.5 \times 10^6$ 細胞で6ウェルプレートに播種した。細胞を、一晚プレートに付着させた。細胞を、0、1、及び $10 \mu\text{M}$ の化合物Aに、明示された時間曝露させた。

【0389】

いくつかの実験において、細胞系を、リポフェクタミン試薬を使用してバッチ法でAiolos過剰発現ベクターによりトランスフェクトした。細胞を、ウェルあたり3mLの体積で12

10

20

30

40

50

ウェルプレートに $1 \times 10^5$ 細胞で播種した。明示される場合、細胞を $10 \mu\text{M}$ のMG132で1時間事前処理するか、又はDMSOを対照として加えた。事前処理の後、化合物Aを、明示された濃度で細胞培地に直接加えた。

#### 【0390】

細胞を収集し、Pierce 78442番の $2 \times$ プロテアーゼ阻害剤カクテルを含むPierce 89900番Ripa緩衝液に溶解させた。溶解物を、QiaShredderにアプライして、DNAを除いた。総タンパク収量を、BioRad DCタンパク質測定キット(カタログ番号500-0112)を使用して測定した。溶解物を、使用まで $-80^\circ\text{C}$ で保存した。ウェスタンブロット分析のために、試料をBioRad Criterion PreCast ゲル10% (Bio-Rad社製、345-0010番)にアプライし、Bio-Rad Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches (162-0233番)に移した。

10

#### 【0391】

図25に示される通り、処理後24時間で、化合物(Compound)Aは、ZR 75-1及びAU565の両細胞系においてAiolosのレベル(約60kDに現れているバンド)を減少させることが見出された。特定の実験において、flag-Aiolos-myc融合タンパク質がAU565細胞で過剰発現され、該細胞を化合物Aにより処理した。そのような場合、抗myc抗体を使用するウェスタンブロット分析は、1つのAiolosバンドを65KD付近に与えるが、同じ分析抗flag抗体は、複数のバンドを与えることが見出された(図26)。さらに、過剰発現されたAiolosの減少が、化合物Aによる処理の約5時間後に見え始まり(図27)、化合物AによるAiolosの阻害が、プロテアソーム阻害薬MG-132の添加により救済されることが見出された(図26及び27)。最後に、内因性Aiolosは、Her2<sup>+</sup>細胞(AU565、BT-474、EFM-192A、及びHCC1954)において化合物Aにより阻害されるが、トリプリネガティブ細胞(HCC70、MB436、及びBT549)においては阻害されないことが示された。これらの結果は、Aiolosが化合物Aに阻害され、そのため、化合物Aによる治療のバイオマーカーとして使用できることを示唆する。

20

#### 【0392】

(7.6 リンパ腫細胞におけるAiolosの発現)

リンパ腫OCI-LY10細胞からの異種移植片を、下記の実験に使用した。免疫組織化学を、Bond-Max自動スライド染色機(Leica Microsystems社製)で、関連するBond Polymer Refine Detection Kitを利用して実施した。厚さ4ミクロンのFFPE切片を該装置上で脱パラフィンした。抗原賦活化をEpitope Retrieval 2(pH 9.0)により20分間 $100^\circ\text{C}$ で実施した。スライドを、内因性ペルオキシダーゼ活性に関して、Peroxide Blockにより5分間室温でブロックした。次いで、切片を、 $1/1000$ 希釈のAiolosに対するウサギポリクローナル抗体(Santa Cruz社製、sc-101982)と共に、15分間室温でインキュベートし、それに続いてHRP標識ポリマーと共に8分間室温でインキュベートした。抗Aiolos抗体の酵素的検出を、過酸化水素基質及びジアミノベンジジン四塩酸塩(DAB)色素原により、室温で10分間実施した。スライドを、ヘマトキシリンにより5分間室温で対比染色した。

30

#### 【0393】

図29~32に示される通り、レナリドミド(図29)、化合物A(図30)、化合物AのR-異性体(図31)、及び化合物(Compound)AのS-異性体(図32)が全てリンパ腫細胞においてAiolosの発現を阻害することが示された。化合物処理腫瘍中のおよそのAiolosレベルは、化合物AのS-異性体<化合物A<化合物AのR-異性体<レナリドミドであったが、これらの化合物のいずれかで処理された腫瘍は、ビヒクル又はピンクリスチンで処理された腫瘍よりも低いAiolosレベルを示した。結果は、Aiolos発現が、試験された化合物のいずれかによる処理に関連して良好なバイオマーカーであり得ることを示唆する。

40

#### 【0394】

(7.7 リンパ球におけるAiolos発現に対する化合物A又は化合物Bの作用)

(7.7.1 FACSアッセイにより決定される全血における作用)

事前秤量した被験化合物を100% DMSOに溶解させ、 $100\text{mM}$ 又は $10\text{mM}$ ストック濃度をつくった。 $100\%$  DMSO中の化合物を、必要に応じて、 $10\text{mM}$ 、 $1\text{mM}$ 、 $0.1\text{mM}$ 、 $0.01\text{mM}$ 、 $0.001\text{mM}$ ストック濃度に希釈した。化合物を、必要に応じて $10 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、又は $0.1 \mu\text{M}$ の最終濃度で、ヘパリン処理されたヒト全血( $1:1000$ 希釈)に直接加えた。 $10(10)\text{ml}$ の全血を、 $50\text{mL}$ のコニカ

50

ルチューブに移し、被験化合物で処理した。最終DMSO濃度は0.1%であった。血液を、1.5時間又は5時間、37℃、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。各時点の後で、血液を、下記の通り、溶解/固定化し、透過処理し、洗浄し、Aiolosにより染色した。

#### 【0395】

BD Lyse/Fix Bufferを、蒸留水(又は脱イオン水)で5倍希釈した。使用前に、Lyse/Fix Bufferを37℃の水浴中で10分間事前に温めた。1体積の全血を20体積の1×Lyse/Fix Buffer(1mLの血液+化合物には、20mLの1×Lyse/Fix Bufferを加える)と混合することにより細胞を溶解させ直ちに固定化し、チューブを数回反転して完全に混合した。細胞溶解/固定及び血液混合物を、37℃の水浴中で10分間インキュベートした。細胞を、500×gで5分間の遠心分離によりペレット化し、上清を吸引により除いた。細胞を、5mLの冷PBSと懸濁させ、次いで、500×gで5分間の遠心分離によりペレット化し、上清を吸引により除いた。200(200)µLのPBSを細胞に加えた。FACSCanto HTSと共に使用するために、細胞をポリスチレンU型底96ウェルプレート(BD社製、カタログ番号353910)に移した。細胞を、200µLの冷PBSで洗浄し、500×gで5分間スピンし、プレートを軽くはじき、ペーパータオル上にやさしく弾ませて、過剰の緩衝液を除いた。細胞を、再懸濁させ、200µLの冷BD Perm/Wash Buffer Iを加えることにより透過処理し、氷上で30分間インキュベートした。500×gで5分間の遠心分離により細胞をペレット化し、緩衝液を除いた。細胞を、200µLのBD perm/wash bufferで1回洗浄し、再ペレット化し、緩衝液を除いた。

10

#### 【0396】

細胞ペレットを40µLのBD perm/wash bufferに再懸濁させた。20(20)µLの抗CD3-PE、抗CD20-APC、及び抗Aiolosウサギ抗体のそれぞれ、又は20µLの適切なアイソタイプ対照、又は20µLの1:400の正常ウサギIgG(Aiolosの対照)を、細胞に加えた。混合物を完全に混合し、室温で45分間暗所でインキュベートした。該混合物を遠心分離し、BD perm/wash bufferで1回500×gで5分間洗浄した。細胞ペレットを80µLのBD perm/wash bufferに再懸濁させ、20µLの二次ヤギ抗ウサギIgG AF488抗体(Perm/Wash Bufferで1:400希釈)を加え、該混合物を室温で30分間暗所でインキュベートした。アイソタイプ対照には二次抗体を加えなかった。該混合物を200µLのBD Stain Bufferで1回洗浄し、500×gで5分間遠心分離し、ペレット化した細胞を200µLの染色緩衝液に再懸濁させた。細胞を、HTSプラットフォームを利用してBD FACSCantoで分析した。細胞を、標準的な方法で分析した。細胞の読み取りをすぐにできない場合、プレートをホイルで覆って光から保護し、4℃で最長2日保存した。Tree Star社製のFlowJoを利用してデータ分析を実施して、平均蛍光強度及び細胞集団中のAiolosの阻害パーセントを評価した。

20

30

#### 【0397】

図33Aに示される通り、化合物Aと化合物Bはどちらも、処理後1.5時間でリンパ球中のAiolosの発現を有意に阻害したが、非リンパ球においては有意な作用は全く観察されなかった。リンパ球では、阻害作用は、T細胞とB細胞の両集団に観察された(図33B)。実質的に類似なパターンが処理後5時間で観察されたが、阻害の程度は1.5時間で観察されたものより著しかった(図34A及び34B)。

#### 【0398】

(7.7.2 生存可能に凍結されたPBMCに対する作用)

40

事前に秤量された被験化合物を100% DMSOに溶解させて100mM又は10mMストック濃度をつくった。100% DMSO中の化合物を、必要に応じて、10mM、1mM、又は0.1ストック濃度に希釈した。化合物を、必要に応じて10µM、1µM、又は0.1µLの最終濃度で、ヘパリン処理されたヒト全血(1:1000希釈)に直接加えた。7(7)mlの全血を50mLのコニカルチューブに移し、被験化合物により処理した。血液を、1.5時間又は5時間、37℃、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。各時点の後で、3.5mlの血液をBD Vacutainer CPT細胞調製チューブに移し、チューブを遺伝学的に(genetically)10回反転し、室温、1800 RCFで20分間遠心分離した。単核層を回収し、15mlコニカルチューブに移した(3×3.5mlのDMSO対照を3本のCPTチューブに加え、単核層を回収して、下記の工程のために合わせた)。チューブを冷PBSにより満たし、4℃、300 RCFで15分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞ペレットを2mlの凍結培

50

地 (10% DMSO+90% FBS) に再懸濁させた。細胞懸濁液をクライオバイアルに移し、Mr. Frosty (Fisher社製、カタログ番号15-350-50) に入れて、-80 °C の冷凍庫O/Nに放置した。

【0399】

細胞を37 °C の水浴中で解凍し、遠心分離し、凍結培地を除いた。細胞ペレットを1×冷PBSで洗浄した。1×Lyse/Fix Bufferを加えることにより細胞を溶解及び固定化し、チューブを数回反転することにより完全に混合した。細胞溶解/固定及び血液混合物を、37 °C の水浴中で10分間インキュベートした。細胞を、500×gで5分間の遠心分離によりペレット化し、上清を吸引により除いた。細胞を、1mLの冷PBSで懸濁させ、次いで500×gで5分間の遠心分離によりペレット化し、上清を吸引して除いた。200(200) µLのPBSを細胞に加えた。FACSCanto HTSと共に使用するために、細胞をポリスチレンU型底96ウェルプレート (BD社製、カタログ番号 353910) に移した。細胞を200 µLの冷PBSで洗浄し、500×gで5分間スピンし、プレートを軽くはじき、ペーパータオル上にやさしく弾ませて、過剰の緩衝液を除いた。細胞を、再懸濁させ、200 µLの冷BD Perm/Wash Buffer Iを加えることにより透過処理し、氷上で30分間インキュベートした。500×gで5分間の遠心分離により細胞をペレット化し、緩衝液を除いた。細胞を、200 µLのBD perm/wash bufferで1回洗浄し、再ペレット化し、緩衝液を除いた。

10

【0400】

細胞ペレットを40 µLのBD perm/wash bufferに再懸濁させた。20(20) µLの抗CD3-PE、抗CD20-APC、及び抗Aiolosウサギ抗体のそれぞれ、又は20 µLの適切なアイソタイプ対照、又は20 µLの1:400の正常ウサギIgG(Aiolosの対照)を細胞に加えた。該混合物を完全に混合し、室温で45分間暗所でインキュベートした。該混合物を遠心分離し、BD perm/wash bufferで500×gで5分間で1回洗浄した。細胞ペレットを80 µLのBD perm/wash bufferに再懸濁させ、20 µLの二次ヤギ抗ウサギIgG AF488抗体(Perm/wash bufferで1:400希釈)を加え、該混合物を室温で30分間暗所でインキュベートした。アイソタイプ対照には二次抗体を加えなかった。該混合物を200 µLのBD Stain Bufferで1回洗浄し、500×gで5分間遠心分離し、ペレット化した細胞を、200 µLの染色緩衝液に再懸濁させた。細胞を、HTSプラットフォームを利用してBD FACSCantoで分析した。細胞を、標準的な方法を利用して分析した。細胞の読み取りをすぐにできない場合、プレートをホイルで覆って光から保護し、4 °C で最長2日保存した。Tree Star社製のFlowJoを利用してデータ分析を実施して、平均蛍光強度及び細胞集団中のAiolosの阻害パーセントを評価した。

20

30

【0401】

図35Aに示される通り、化合物A及び化合物Bは、処理後1.5時間で凍結されたリンパ球においてAiolosの発現に対していくらかの阻害作用を示すが、非リンパ球には作用が全く観察されなかった。リンパ球において、阻害作用は、T細胞とB細胞の両集団に観察された(図35B)。処理後5時間で凍結されたリンパ球細胞において、化合物Aと化合物Bのどちらも著しい阻害作用を示すことが観察されたが、非リンパ球にはそのような作用は全く観察されなかった(図36A及び36B)。結果は、Aiolosレベルに関する実際の試験が起こる前に細胞を凍結できることを示し、そのため、ある期間の細胞の保存が試験前に必要とされる場合の細胞の凍結が実行可能な方法であり得ることを示唆する。

【0402】

40

(7.8 Aiolos及びIkarosの発現に対する化合物の作用)

被験化合物(ポマリドミド、レナリドミド、化合物A、及び化合物B)のAiolosの発現及びIkaros発現に対する作用を、上記図7に記載のウェスタンブロットティングに関連して利用された手順に類似の手順を利用して、化合物による処理後6時間でウェスタンブロット分析により評価した。図37に示される通り、程度は異なるが全ての化合物が、AiolosとIkarosの両方の発現を阻害することが示された。

【0403】

(7.8.1 レナリドミド及びポマリドミド)

U266、初代CD3+T細胞、及び初代CD19+B細胞中のAiolos及びIkaros発現の阻害におけるレナリドミド及びポマリドミドの作用を図39Aに示す。図39B及びCに示される通り、種々

50

の濃度のレナリドミド及びボマリドミドは、6つのMM細胞系(OPM-2、RPMI-8226、LP-1、U266、H929、及びJFN3)において、Aiolos及びIkaros発現を有意に阻害した。各バーは、二連で試験された6細胞系の平均を表し、エラーバーは、1標準偏差を表す。

【0404】

U266、DF15MM細胞、初代CD3+T細胞、及び初代CD19+B細胞中でのAiolos及びIkaros発現の阻害における10 $\mu$ Mのレナリドミド及び1 $\mu$ Mのボマリドミドの作用を図40に示す。10 $\mu$ Mのレナリドミド及び1 $\mu$ Mのボマリドミドにより処理されたシクロヘキシミド処理U266細胞の作用を図41に示す。結果は、レナリドミド及びボマリドミドが、試験されたそれぞれの細胞全てにおいてAiolos及びIkarosの発現を低減させることを示した。

【0405】

レナリドミド及びボマリドミドによるAiolos及びIkarosのレベルの低下がCRBN依存性であることも見出された。初代ヒトCD3+T細胞を、si対照又はsiCRBNにより24時間トランスフェクトし、次いで、明示された濃度でレナリドミド又はボマリドミドにより6/24時間処理した。細胞溶解物をSDS-PAGEゲル上で分離し、Aiolos、Ikaros、及びアクチンタンパク質発現に関してイムノプロットした。図42A及びBに示される通り、CRBNがノックダウンされている細胞において、Aiolos及びIkarosの発現を低減又は阻害するレナリドミド及びボマリドミドの作用は、CRBNのノックダウンが全くない対照細胞に比べて著しく低下した。

【0406】

図44Aは、レナリドミドのインビボ抗腫瘍活性を示し、図44B及びCは、同じ投与量のレナリドミドによるAiolos及びIkarosの発現の低下を示す。これら2つの図からわかるように、レナリドミドのインビボ抗腫瘍活性が、Aiolos及びIkarosレベルの低下と相関していることが見出された。さらに、図46に示される通り、この相関は、DLBCL異種移植片モデルで示されるレナリドミドの抗腫瘍活性にも及んだ。さらに、多発性骨髄腫(MM)の他の治療化合物を、レナリドミド及びボマリドミドと共に、Aiolos及びIkarosのレベルを低下させる能力に関して試験した。興味深いことに、MM細胞におけるAiolos及びIkarosレベルの低下が、本明細書に提供される免疫調節化合物、すなわちレナリドミド及びボマリドミドに独特であることが見出された(図45)。

【0407】

(7.8.2化合物A及び化合物B)

B細胞及びT細胞におけるAiolos発現に対する化合物Aの作用を、図47A及びBに示す。化合物A及び化合物Bを含む本明細書に提供される種々の化合物の、Aiolos及びIkarosに対する作用を図48A及びBに示す。結果は、化合物A及び化合物Bが、試験されたそれぞれの細胞全てにおいてAiolos及びIkarosの発現を低下させたことを示す。

【0408】

ジャーカット細胞における内因性及び過剰発現されたAiolosに対する化合物Aの作用も評価した。図49に示される通り、複数のリジンのユビキチン化が、化合物Aが媒介するAiolosの分解に必要であった。ジャーカット細胞において、該化合物に誘発されるAiolos分解がAiolosユビキチン化によるものであり、化合物A誘発性Ikaros分解がAiolos非依存性であることが見出された。

【0409】

明示された濃度の化合物Bにより処理された正常なヒトCD19+B細胞のウェスタンブロット分析(溶解物の電気泳動図)を図52に示す。図に示される通り、化合物Bは、Helios、Pegasus、又は $\beta$ -アクチンに影響を与えずに、種々の濃度でIkaros及びAiolosの発現を阻害した。

【0410】

種々の疾患源から得られた細胞中の種々のタンパク質に対応する相対的なmRNAレベルを図53A~Gに示す。図に示される通り、Ikaros及びAiolosは、全身性強皮症(SSc)及び全身性エリテマトーデス(SLE)において過剰発現されている。

【0411】

化合物Bを使用して32匹のカニクイザルに関する試験を実施した。簡単に述べると、4つ

10

20

30

40

50

の処置群を割り当て、それぞれが、図54に明示された投与量に従い、化合物Bによる処置を受けた。図54及び55A~Cの結果は、化合物Bが全般的にIkarosのレベルを低下させることを示す。

#### 【0412】

(7.9 ウェスタンブロットにより測定したタンパク質レベルに対する化合物の作用)

B-CLL細胞を、先に述べたとおり、CD40L線維芽細胞と共培養し、それに続いて、DMSO、10  $\mu$ Mのレナリドミド、1  $\mu$ Mのポマリドミド、0.1  $\mu$ Mの化合物A、及び0.1  $\mu$ Mの化合物Bによる72時間の処理を行った。細胞を収集し、ウェスタンブロットにより分析した。CRBN、Aiolos、p21<sup>WAF-1</sup>、及びIRF4に対する化合物処理の作用を、3種の異なる患者細胞試料で評価した(図56A)。3つの患者試料は、CRBNタンパク質の類似の発現レベルを示す(図56Aの3つのウェスタンブロットのレーン1を比較せよ; 図中でゲルは3つの独立した写真として示されているが、試料は同じメンブランに流した)。化合物による処理は、CRBNタンパク質レベルに影響しないか、又はいくつかの試料において、CRBNレベルのわずかな増加を誘発する。評価された3つの患者試料において、CRBNの下流にある提案されるIMiDの標的である転写因子、Aiolos及びIRF4のタンパク質レベルは下方制御され(図56A)、p21<sup>WAF-1</sup>タンパク質レベルは、レナリドミド、ポマリドミド、化合物A、及び化合物Bによる処理により上方制御された。Aiolos特異的抗体(Santa Cruz社製)を使用する、3つの異なるB-CLL患者共培養物におけるフローサイトメトリーにより示される通り(図56B)、Aiolos減少に対する化合物の作用は用量依存性であった。p21、IRF4、及びAiolosに対する作用は、細胞周期停止及び化合物処理により観察される増殖の阻害と一致している。

10

20

#### 【0413】

(7.10 CRBNノックダウンはB-CLL細胞中のAiolos及びIkarosに対するIMiD化合物の作用を妨げる)

陰性対照siRNA又はCRBN特異的siRNAにより48時間トランスフェクトしたB-CLL細胞をCD40L線維芽細胞と共培養し、化合物により処理した。5日間の処理後、Aiolos及びIkarosタンパク質レベルを、フローサイトメトリーのウェスタンブロットにより測定した。3つの異なるB-CLL患者試料において、CRBNノックダウンは、Aiolos及びIkarosタンパク質レベルに対するIMiD化合物の作用を著しく低下させ、その分解を防止した(図57)。図57に示される通り、CRBNノックダウンが、CRBNの下流にある化合物の最も近い標的であるAiolos及びIkarosタンパク質レベルに対する化合物の阻害作用を低下させることが見出された。これらの結果は、骨髄腫及びT細胞における類似のデータと一致するものである。AiolosはB-CLL患者において過剰発現されており、それはB-CLLの生存能力に必要であり、Aiolos及びIkarosファミリーの転写因子の他のメンバーが、B-CLL細胞における良好な治療標的になり得ることを示唆している。

30

#### 【0414】

上記の実施例は、当業者に、特許請求された実施態様の作製方法及び使用方法の完全な開示及び説明を与えるために提供されており、本明細書に開示されている事物の範囲を限定するものではない。当業者に明白である修飾は、以下の特許請求の範囲の範囲内であるものとする。本明細書に引用されている刊行物、特許、及び特許出願は全て、そのような刊行物、特許、又は特許出願のそれぞれが具体的かつ個別的に引用により本明細書中に組み込まれることが示されているかのように、引用により本明細書中に組み込まれる。

40

【 図 1 A 】

リンパ球、単球、及び顆粒球集団における Aiolos発現の阻害における化合物Bの作用 (DMSO対照の%として表す、n=3)

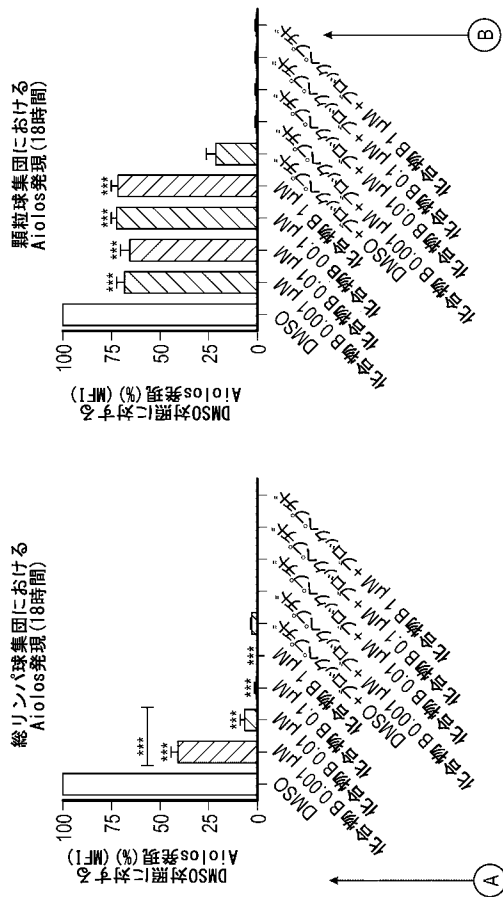


図 1A

【 図 1 B 】

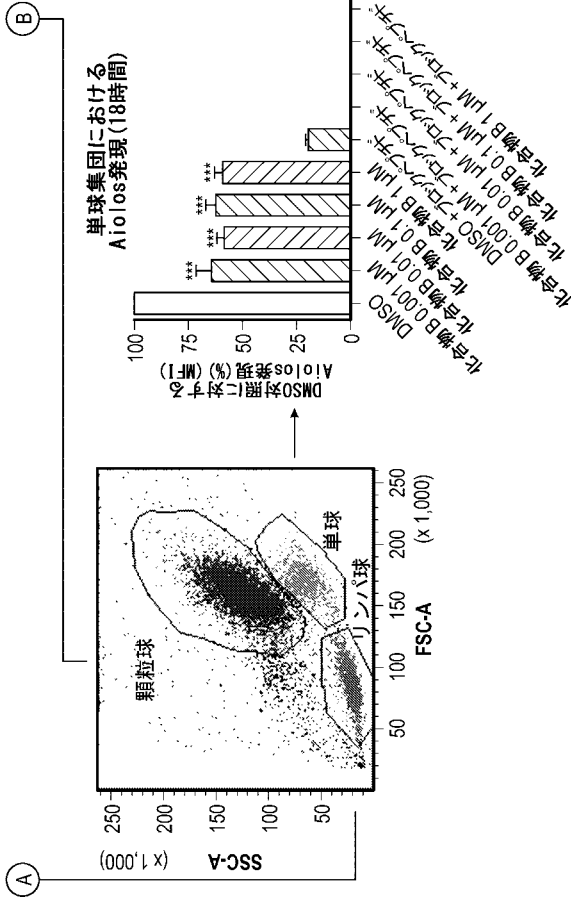


図 1B

【 図 2 A 】

化合物BはCD20+B細胞中の Aiolos発現を有意に阻害する (DMSO対照の%として表す、n=3)

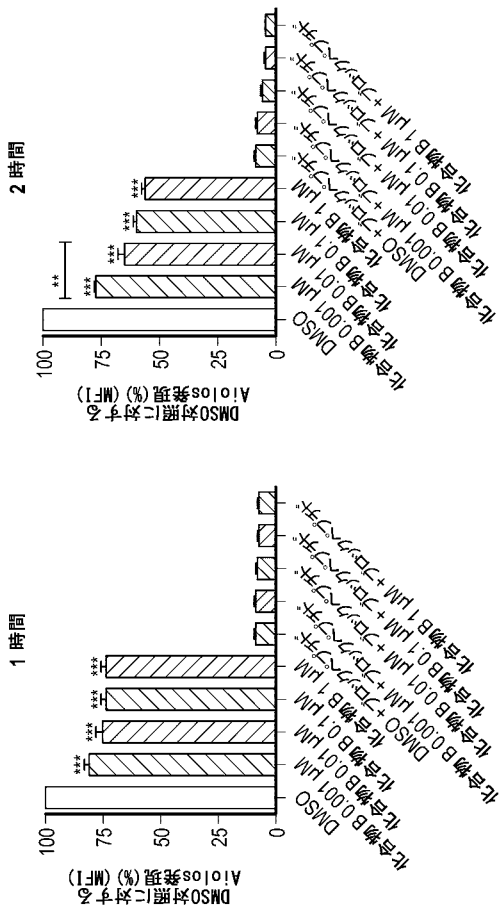


図 2A

【 図 2 B 】

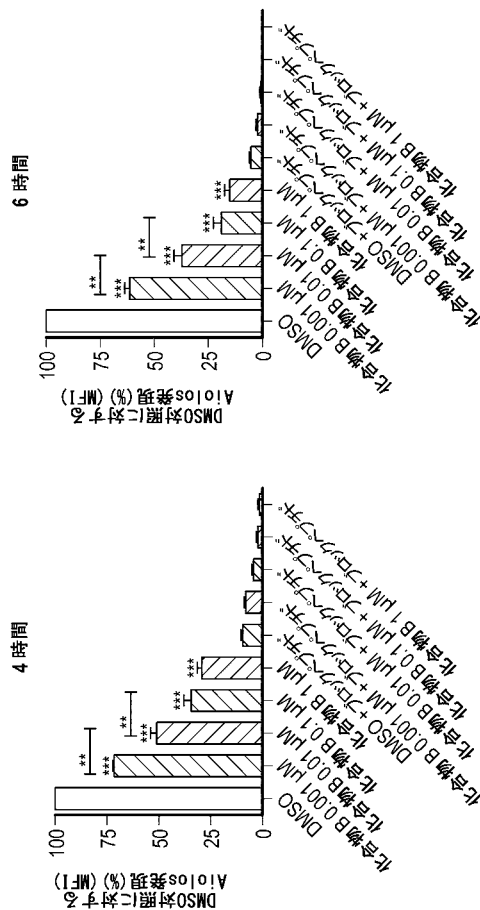


図 2B

【 図 2 C 】

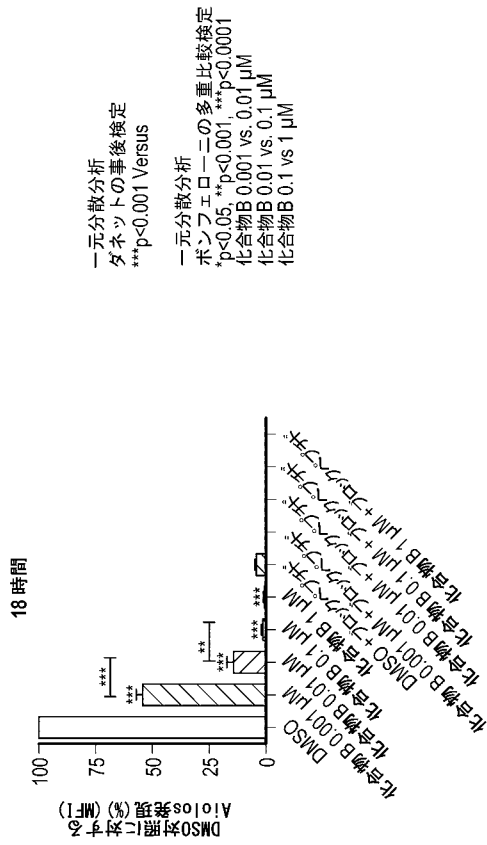


図 2C

【 図 3 A 】

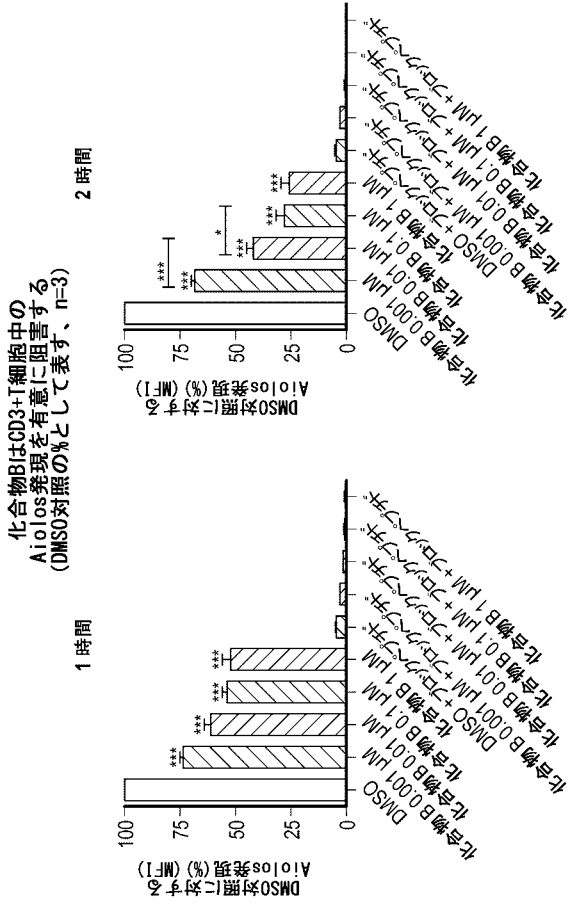


図 3A

【 図 3 B 】

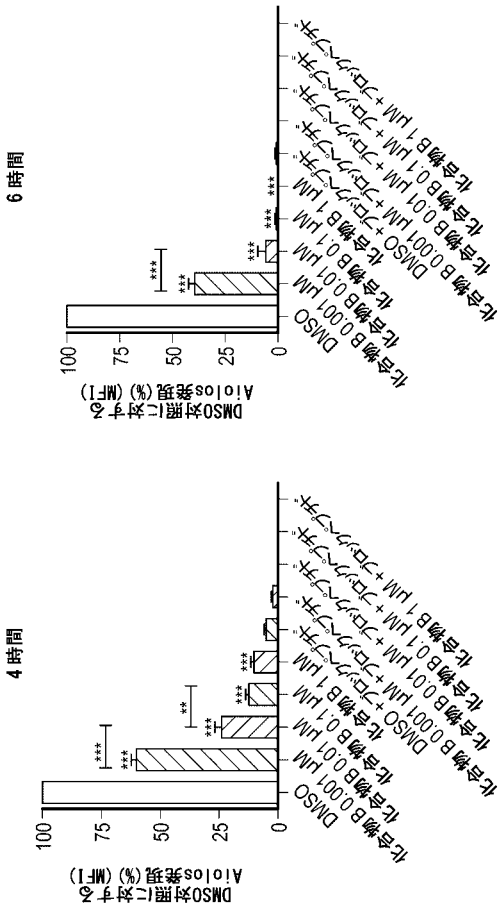


図 3B

【 図 3 C 】

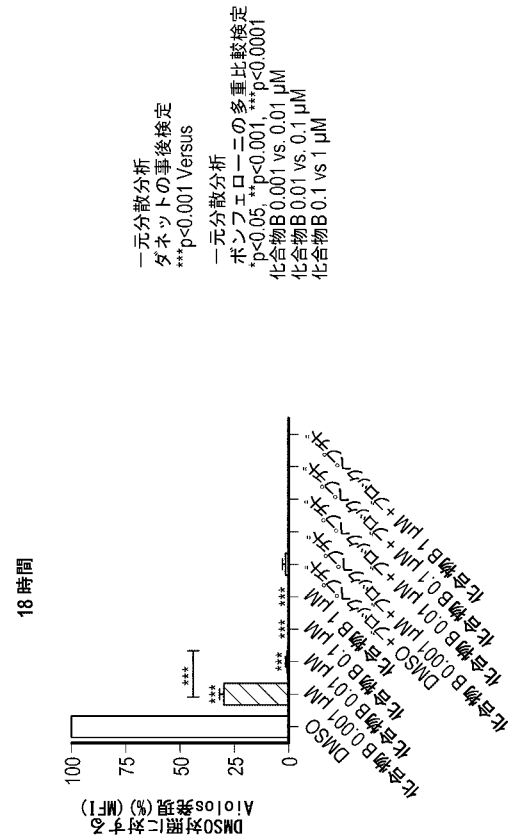


図 3C



【 8 】

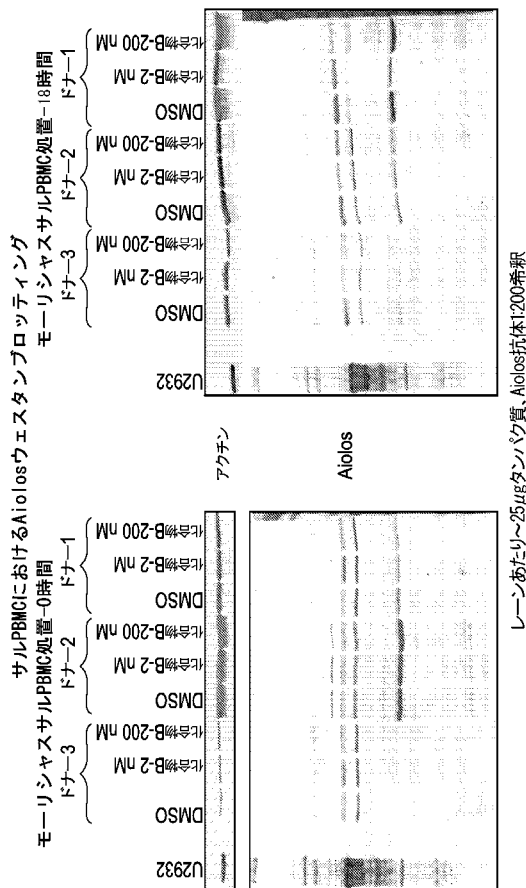


図 8

【 9 】

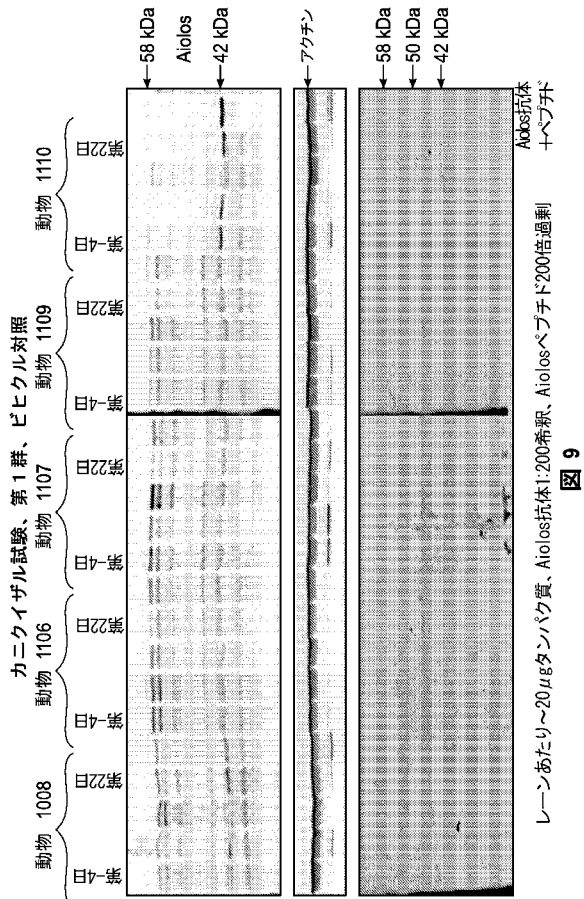


図 9

【 10 】

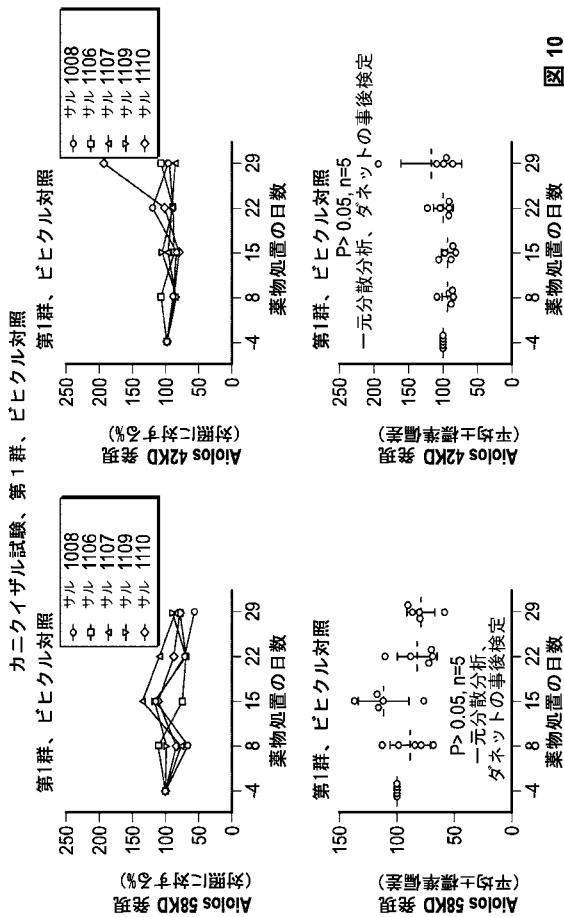


図 10

【 11 】

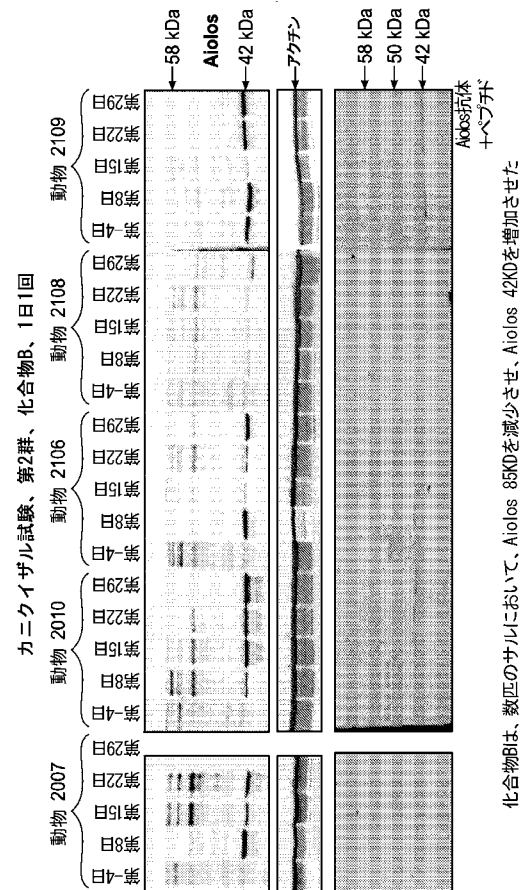


図 11





【 図 2 0 】

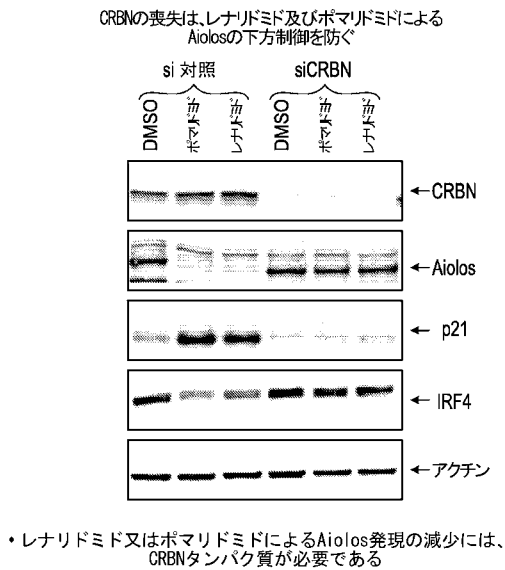


図 20

【 図 2 2 】

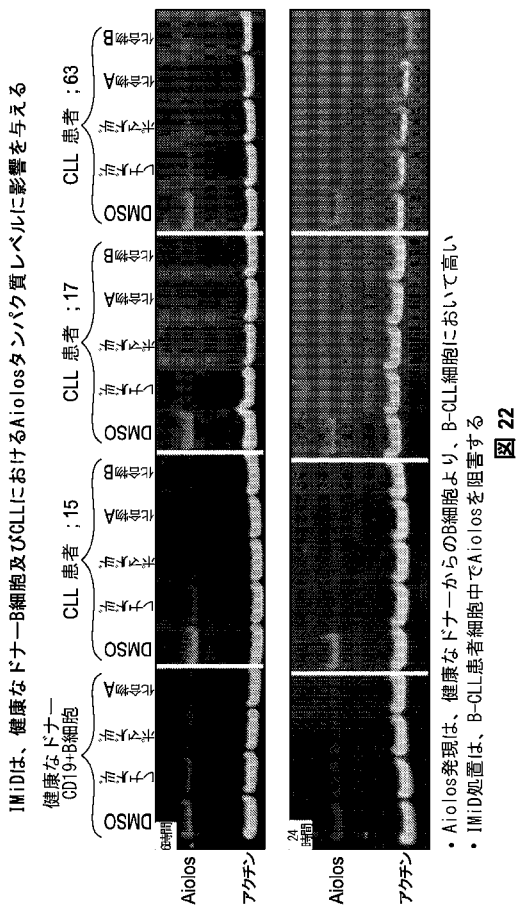


図 22

【 図 2 1 】

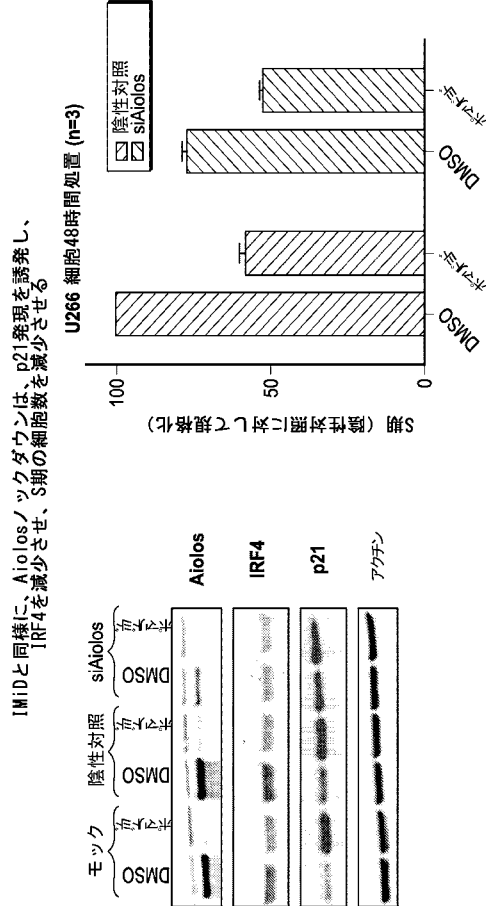


図 21

【 図 2 3 】

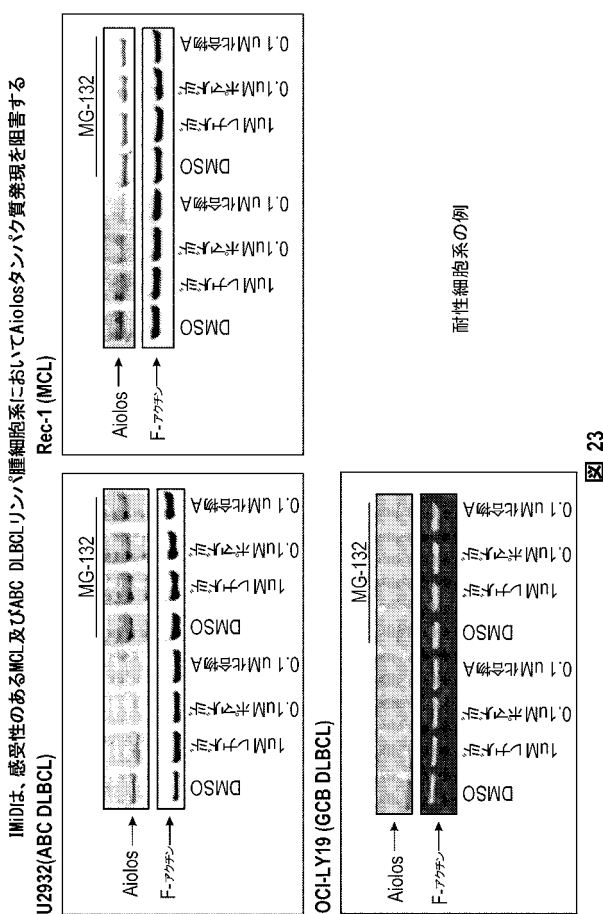


図 23

【 図 2 4 】

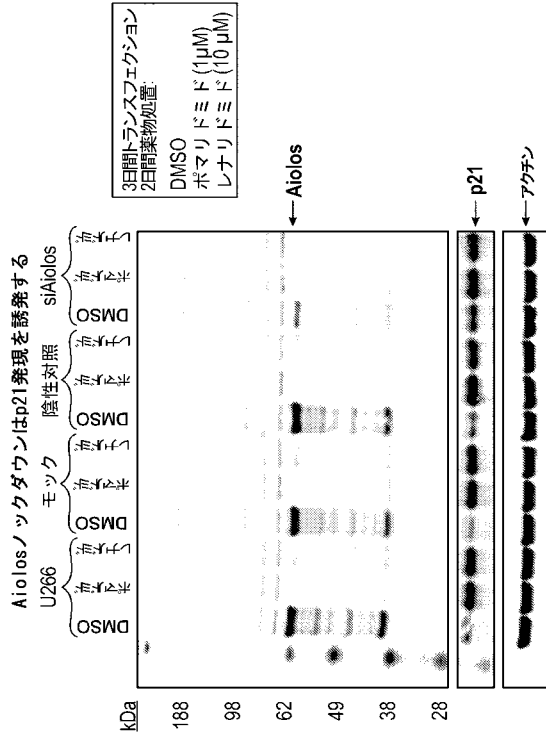


図 24

【 図 2 5 】

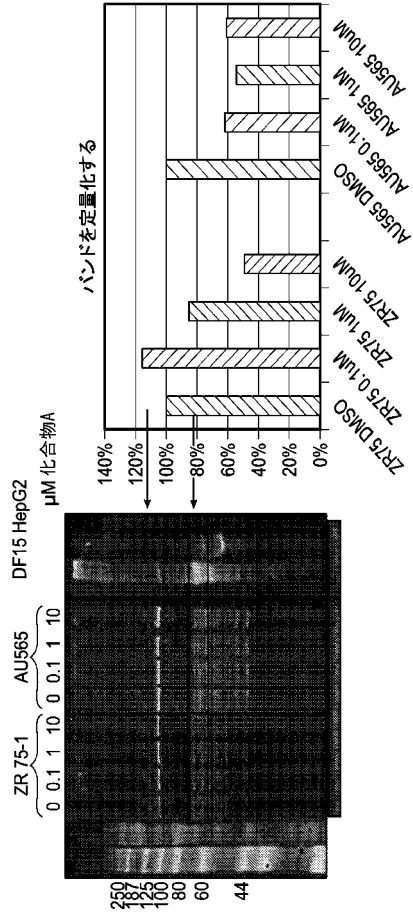


図 25

【 図 2 6 】

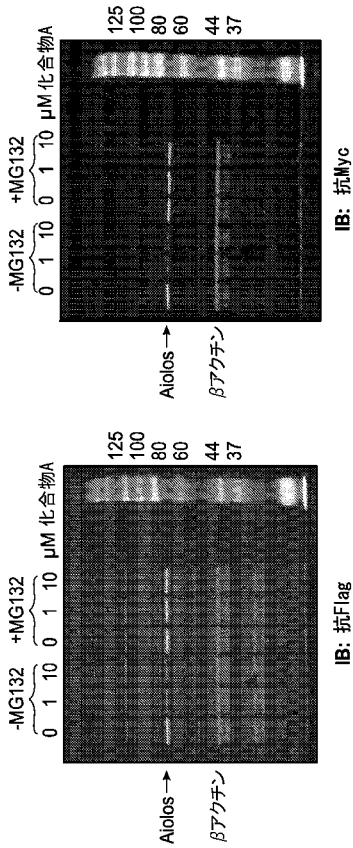


図 26

【 図 2 7 】

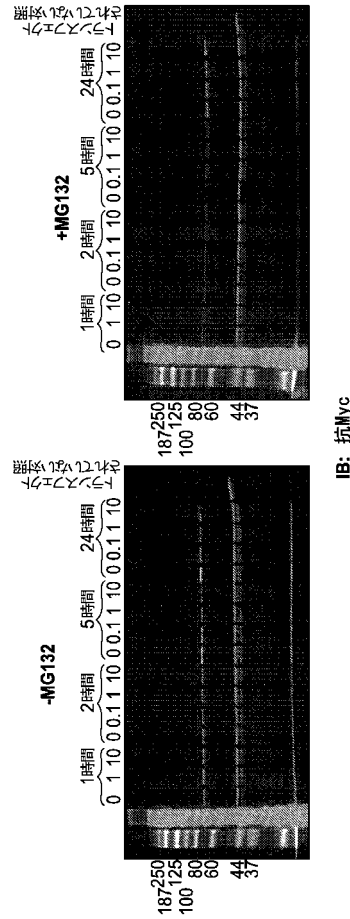


図 27

【 図 28 】

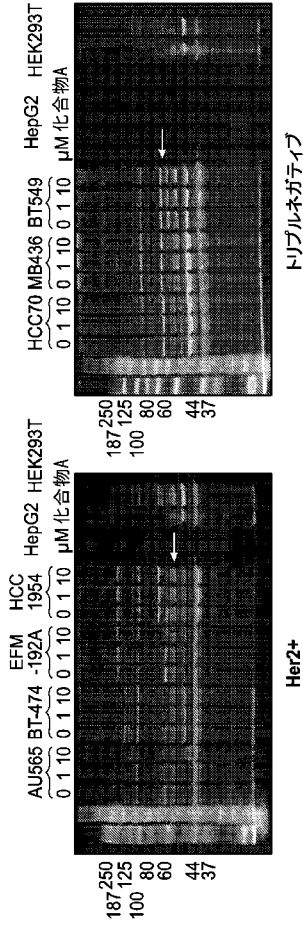


図 28

【 図 29 】

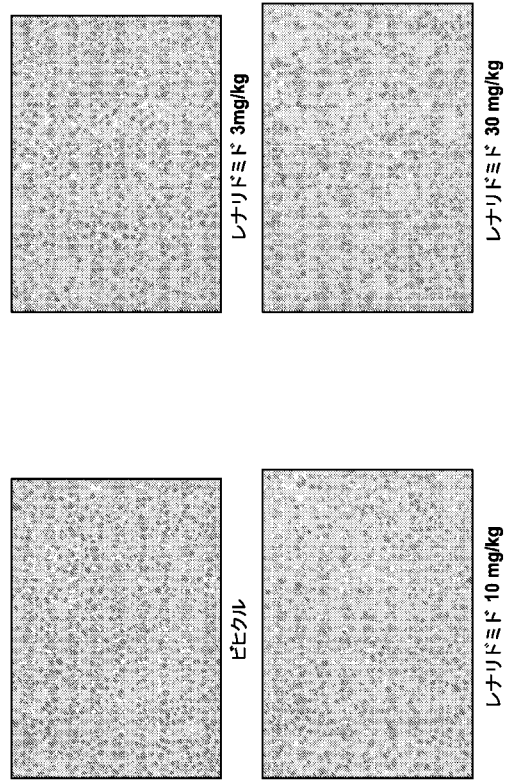


図 29

【 図 30 】

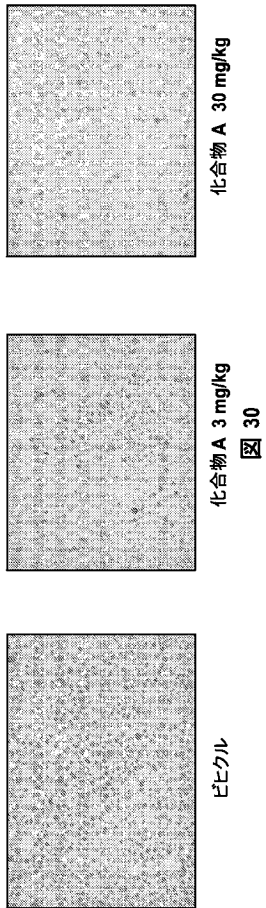


図 30

【 図 31 】

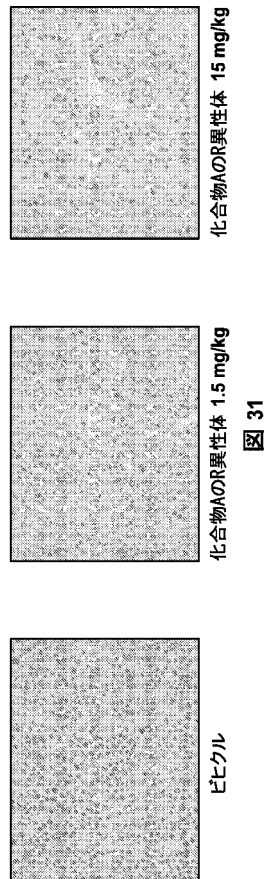


図 31

【 図 3 2 】

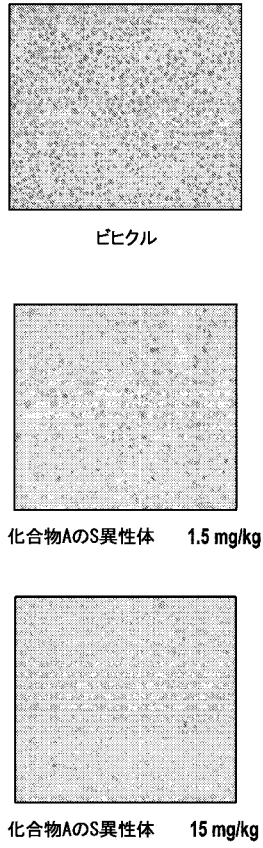


図 32

【 図 3 3 B 】

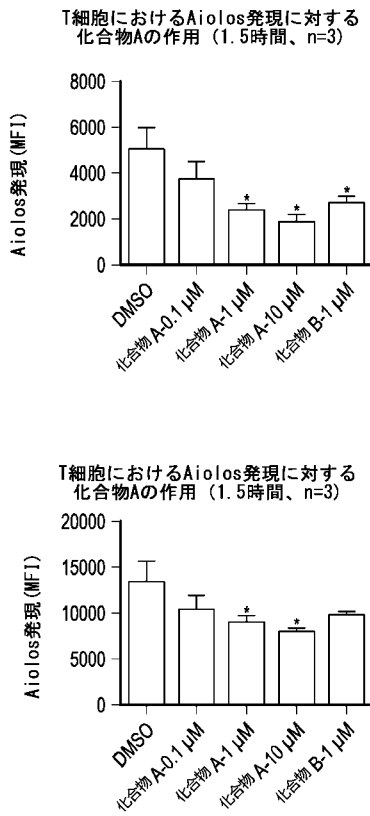


図 33B

【 図 3 3 A 】

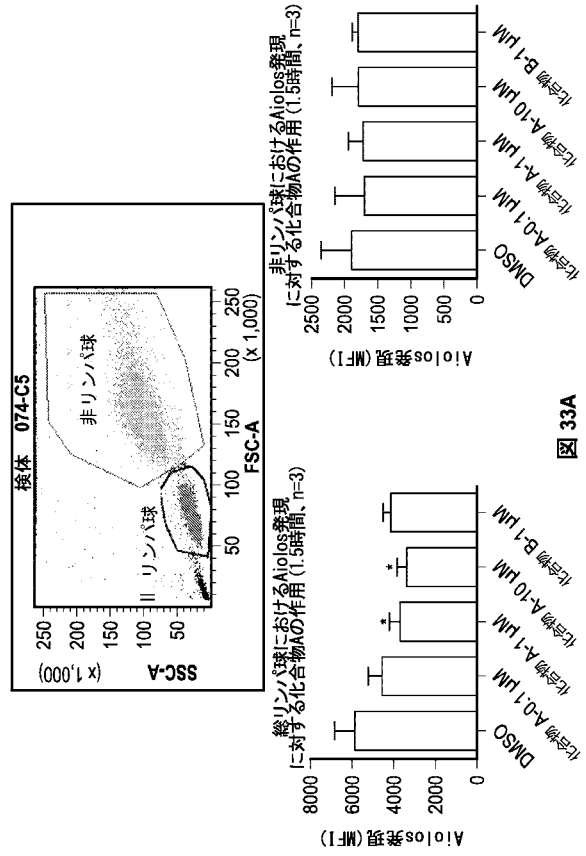


図 33A

【 図 3 4 A 】

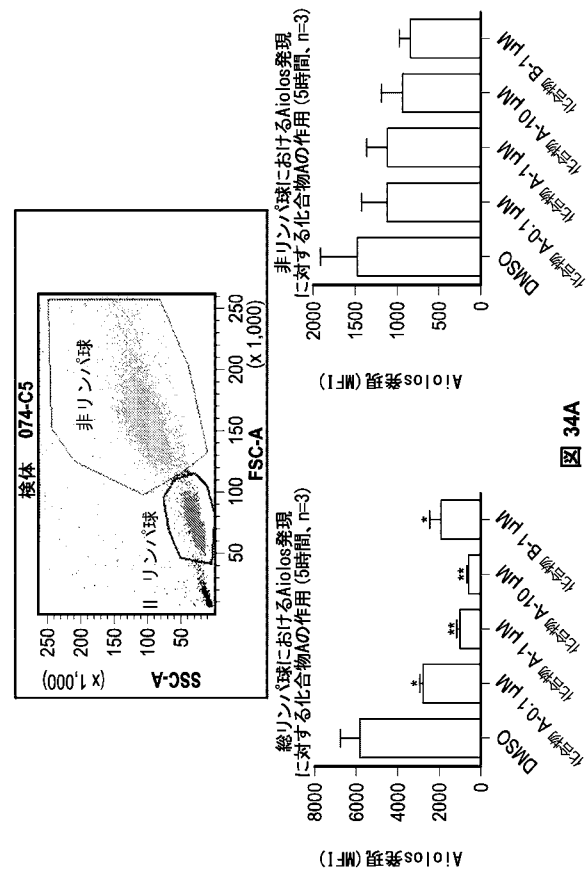


図 34A

【 図 3 4 B 】

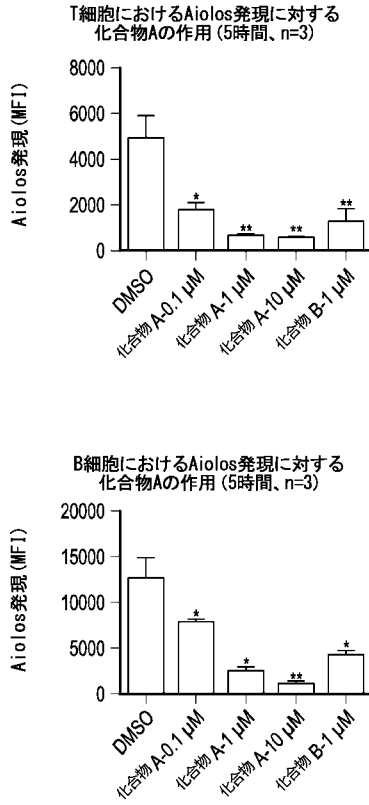


図 34B

【 図 3 5 B 】

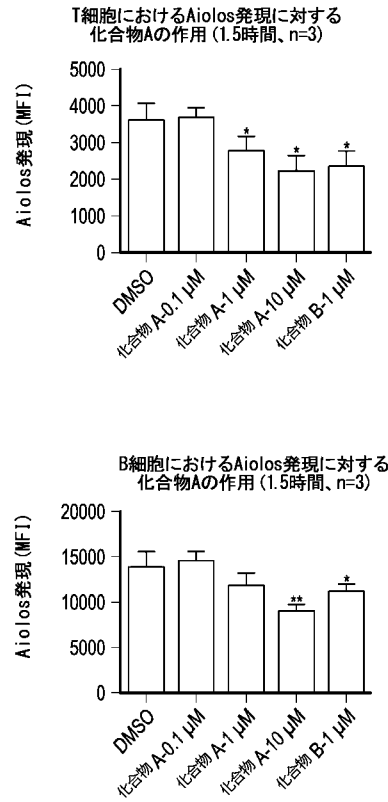


図 35B

【 図 3 5 A 】

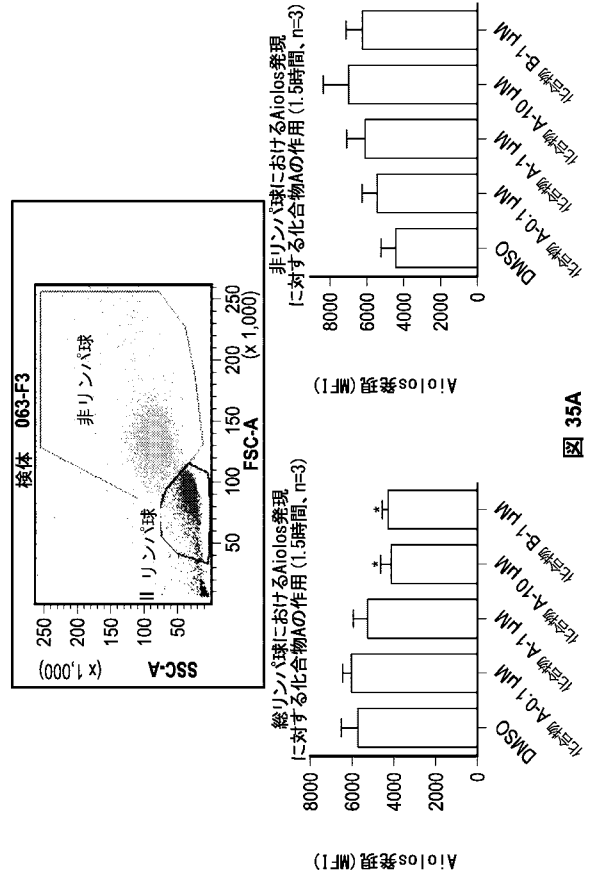


図 35A

【 図 3 6 A 】

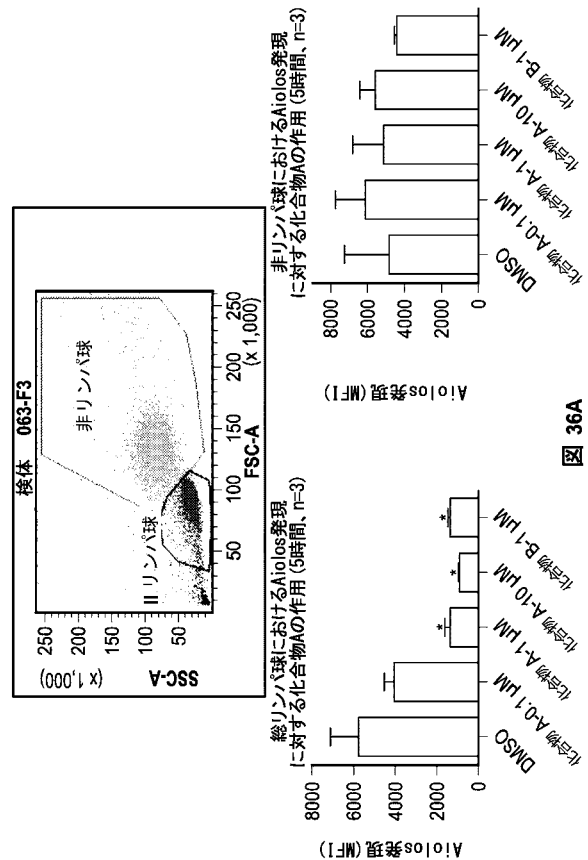


図 36A

【 図 3 6 B 】

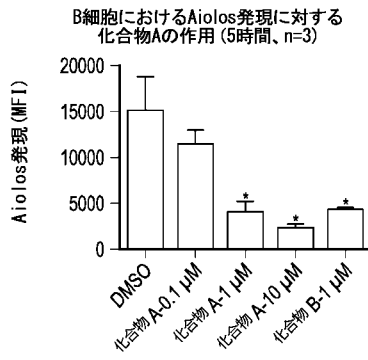
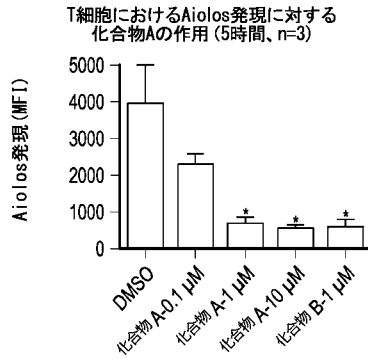


図 36B

【 図 3 7 】

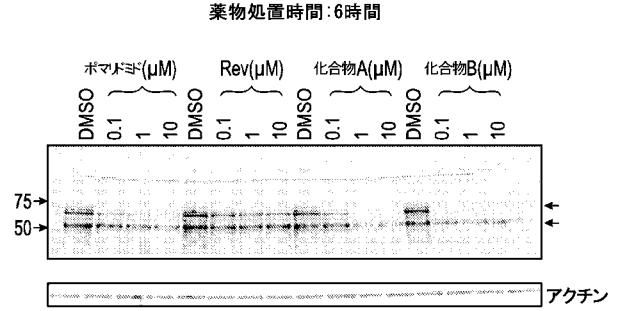


図 37

【 図 3 8 】

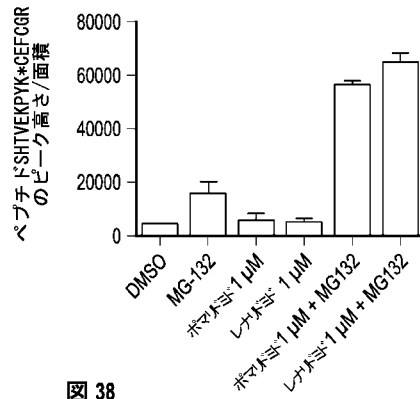


図 38

【 図 3 9 A 】

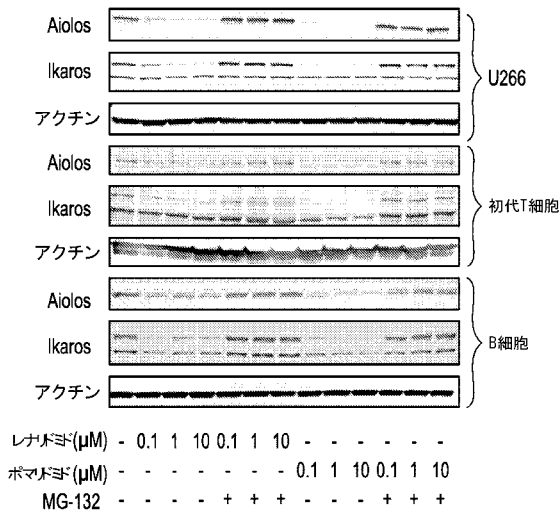


図 39A

【 図 3 9 B 】

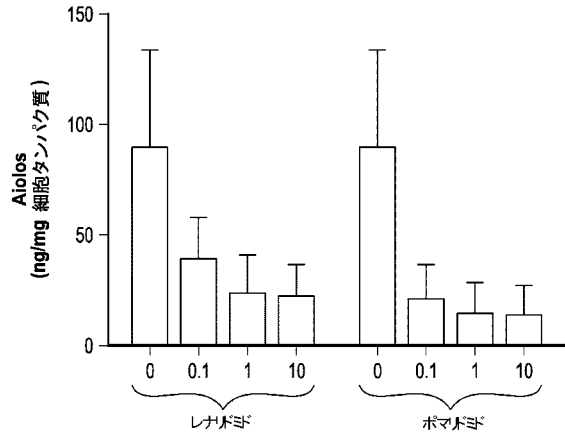


図 39B

【 図 3 9 C 】

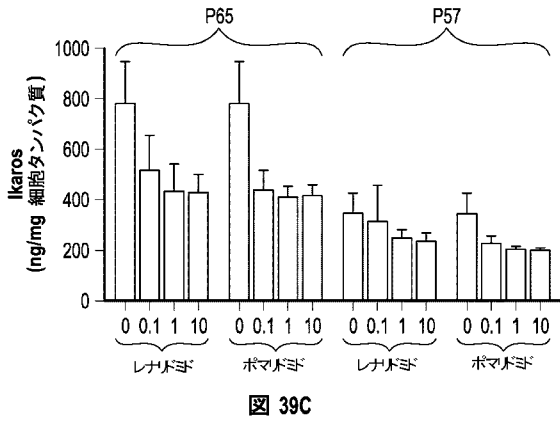


図 39C

【 図 4 0 】

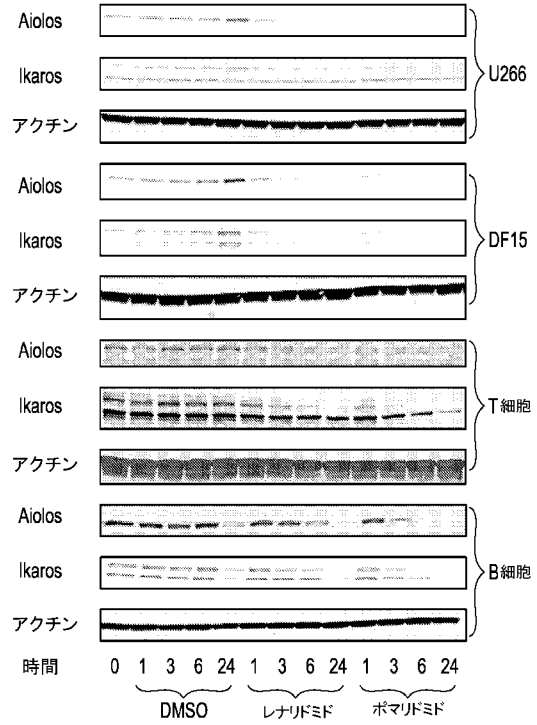


図 40

【 図 4 1 】

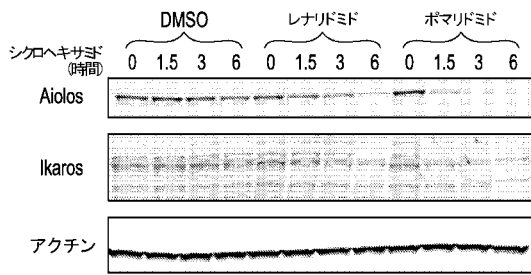


図 41

【 図 4 2 B 】

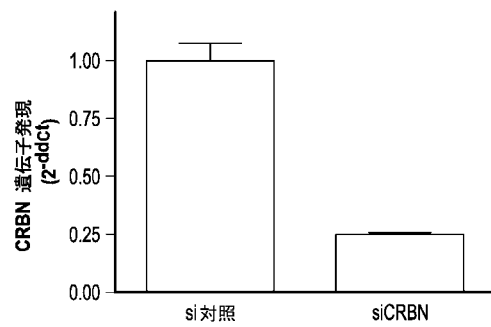


図 42B

【 図 4 2 A 】

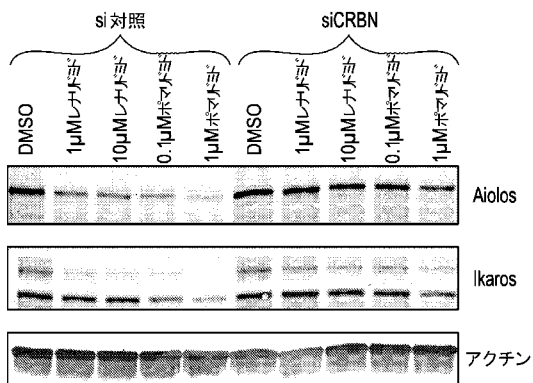
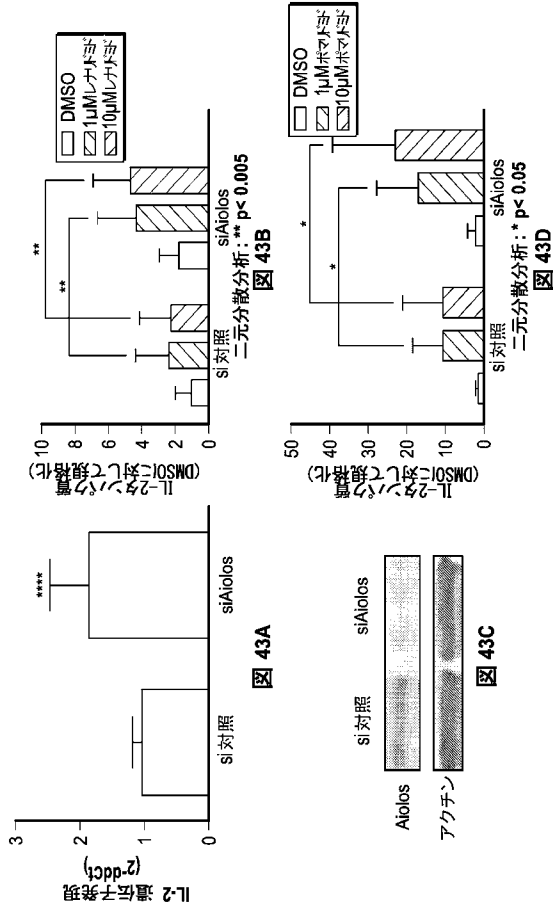
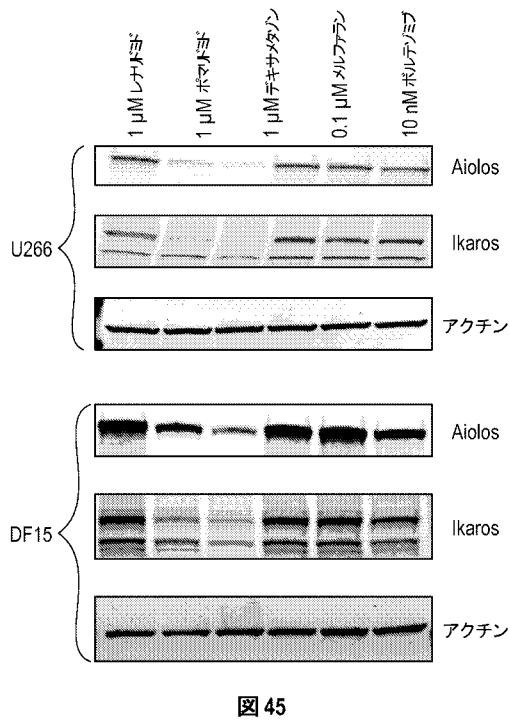


図 42A

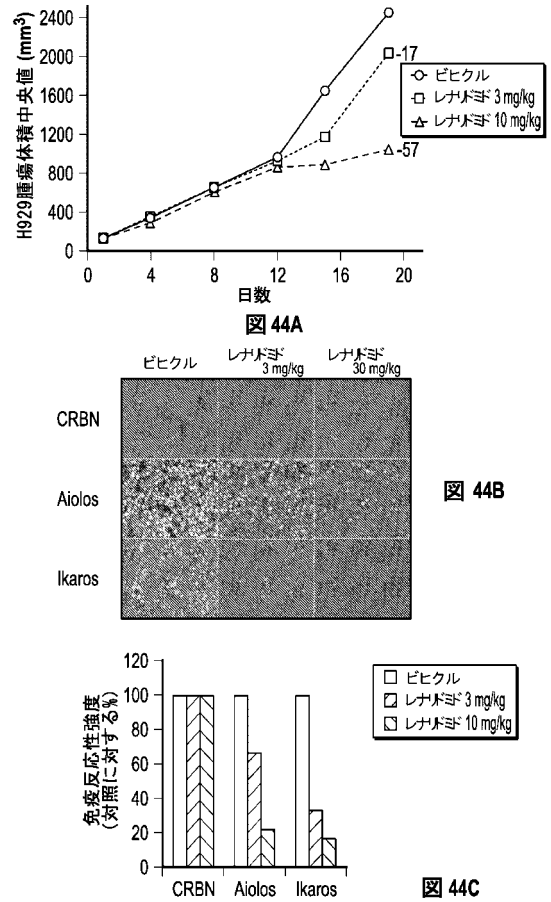
【 図 4 3 A - D 】



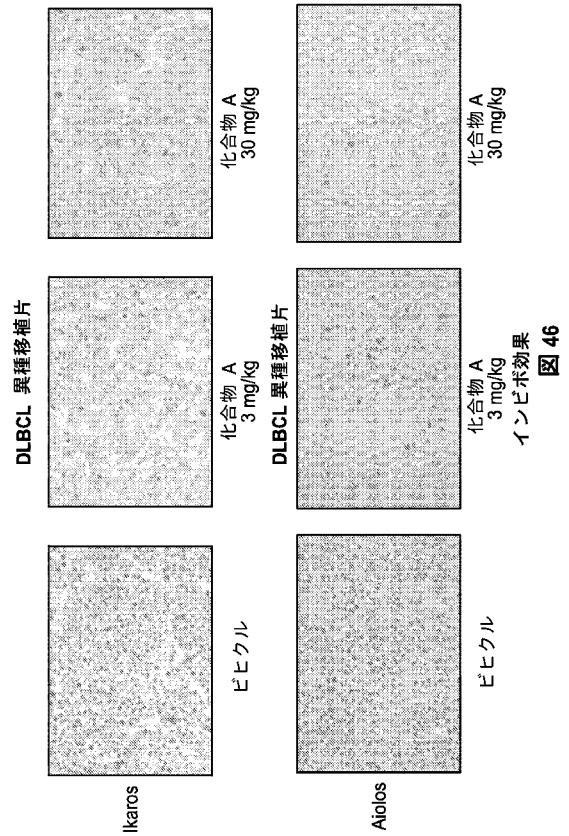
【 図 4 5 】



【 図 4 4 A - C 】



【 図 4 6 】



【 図 4 7 A 】

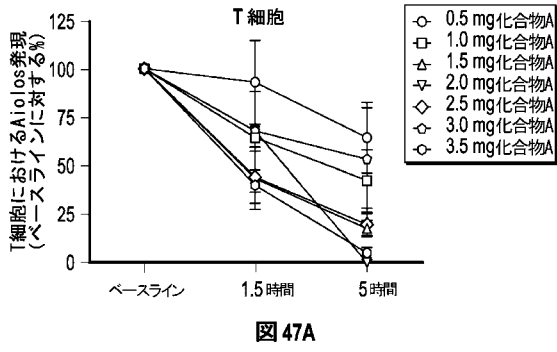


図 47A

【 図 4 7 B 】

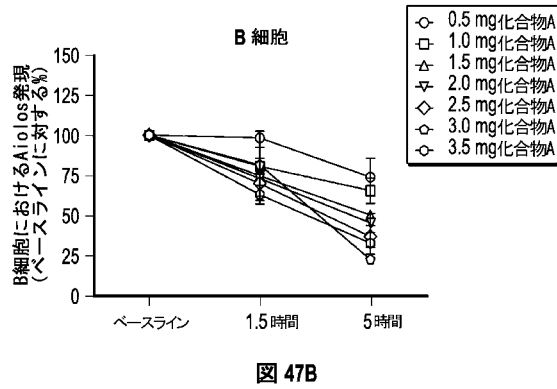


図 47B

【 図 4 9 】

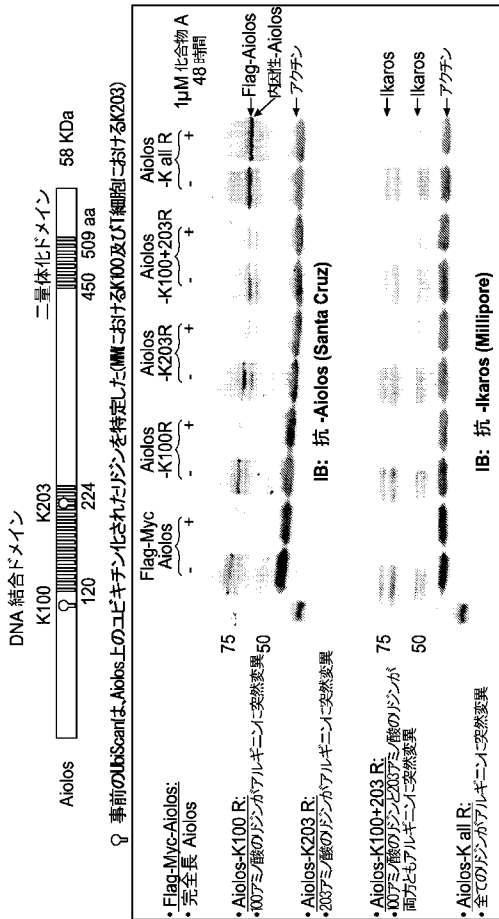


図 49

【 図 4 8 A - B 】

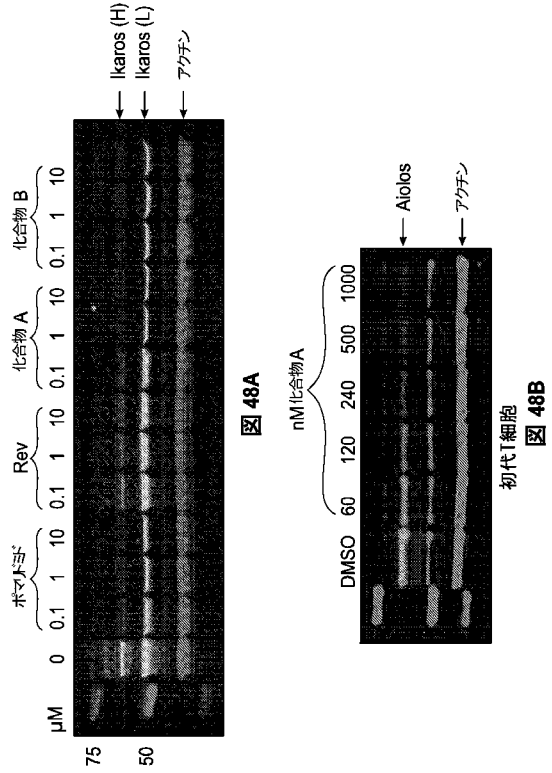


図 48A

図 48B

【 図 5 0 A - B 】

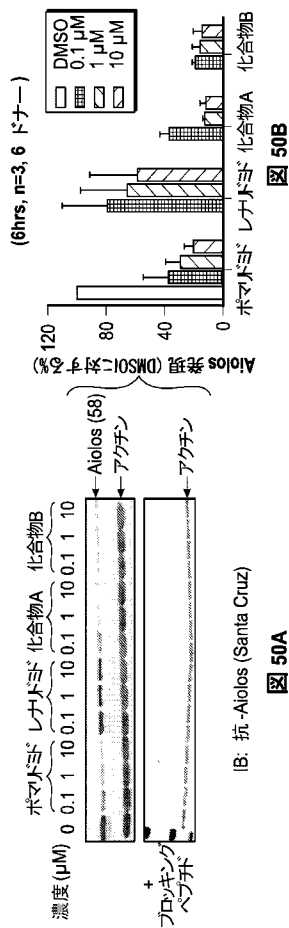


図 50A

図 50B

【 図 5 0 C - D 】

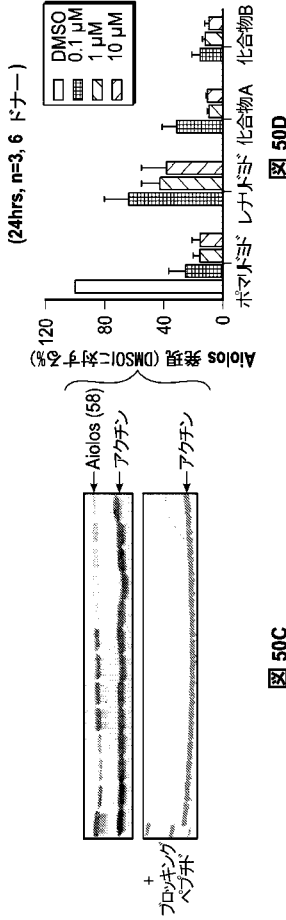
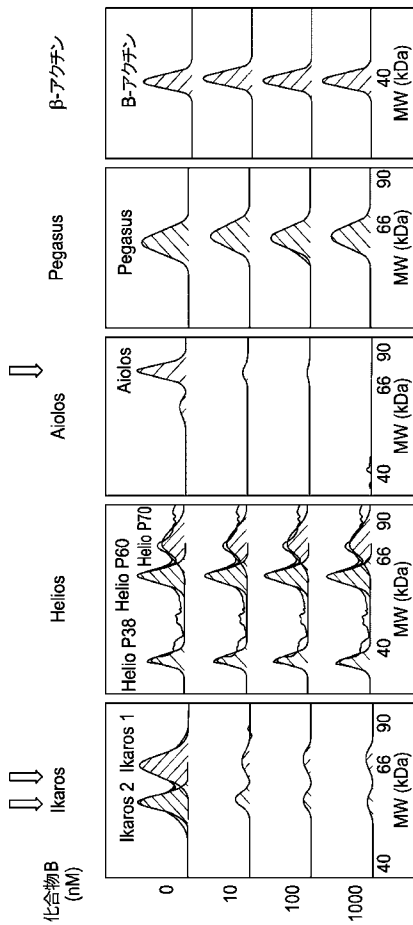


図 50C

図 50D

【 図 5 2 】



化合物Bで1日処置された正常なヒトCD19+B細胞からの溶解物のシンプルウエスタン電気泳動図。結果はn=3を示す。

図 52

【 図 5 1 A - B 】

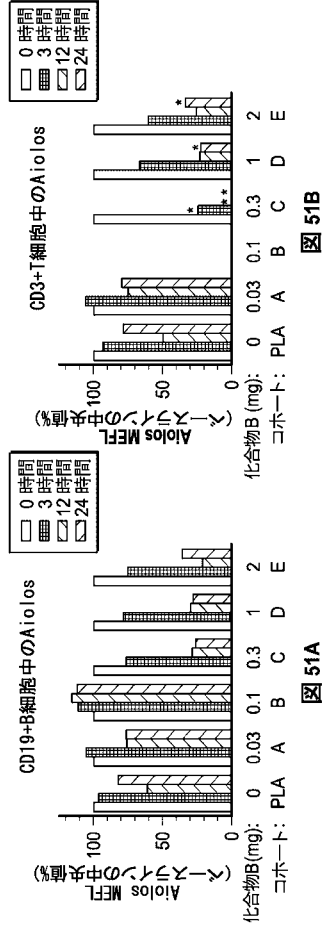


図 51A

図 51B

【 図 5 3 A - B 】

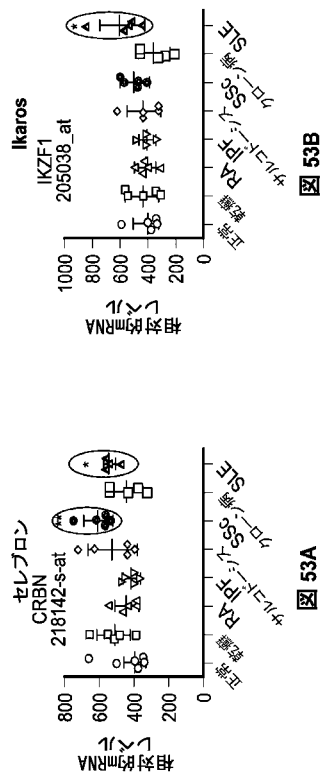
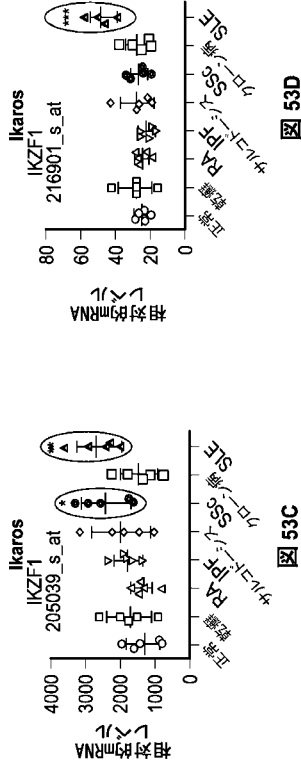


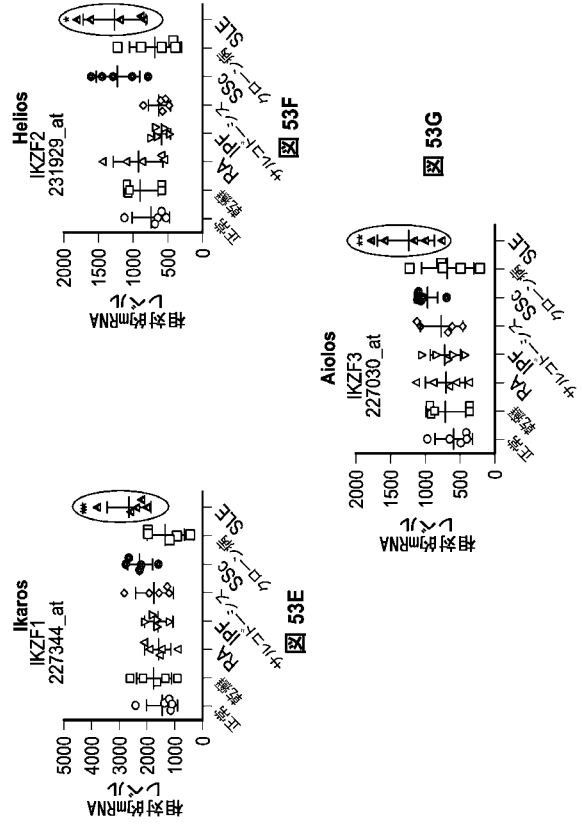
図 53A

図 53B

【 図 5 3 C - D 】



【 図 5 3 E - G 】



【 図 5 4 】

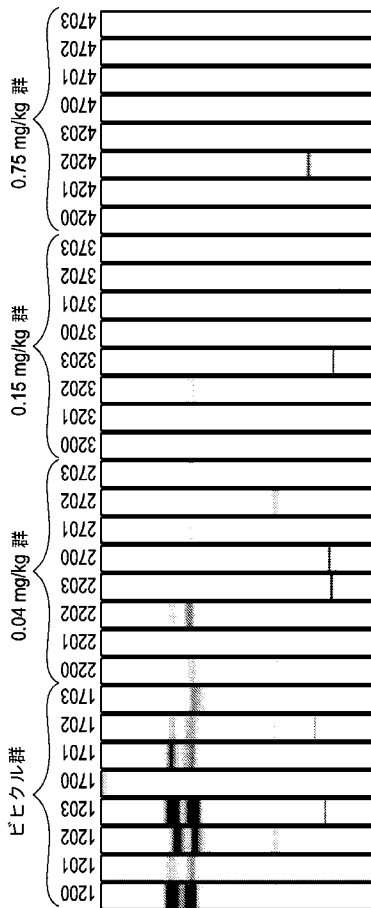


図 54

【 図 5 5 A - C 】

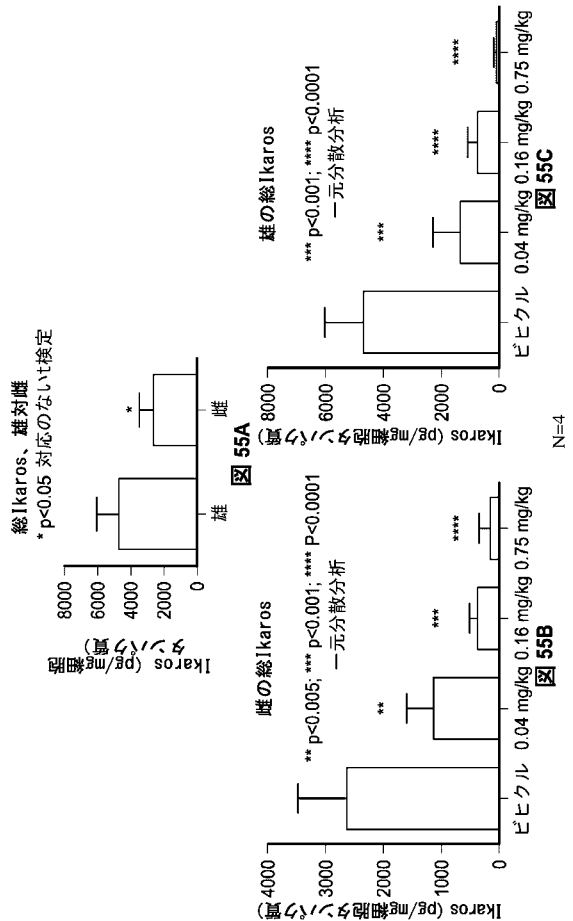


図 55A

図 55B

図 55C

N=4

【 図 5 6 A 】

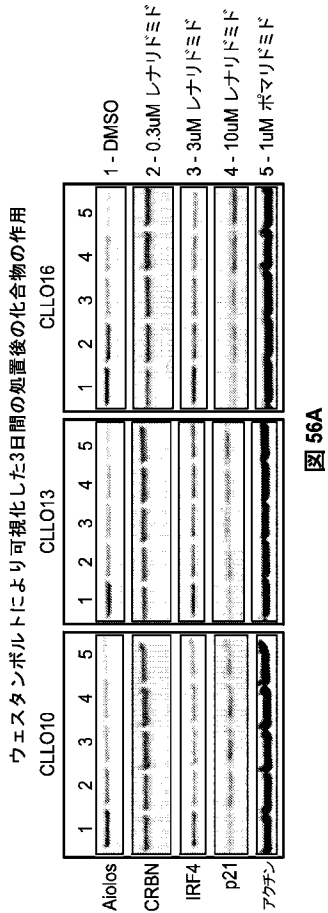


図 56A

【 図 5 6 B - 1 】

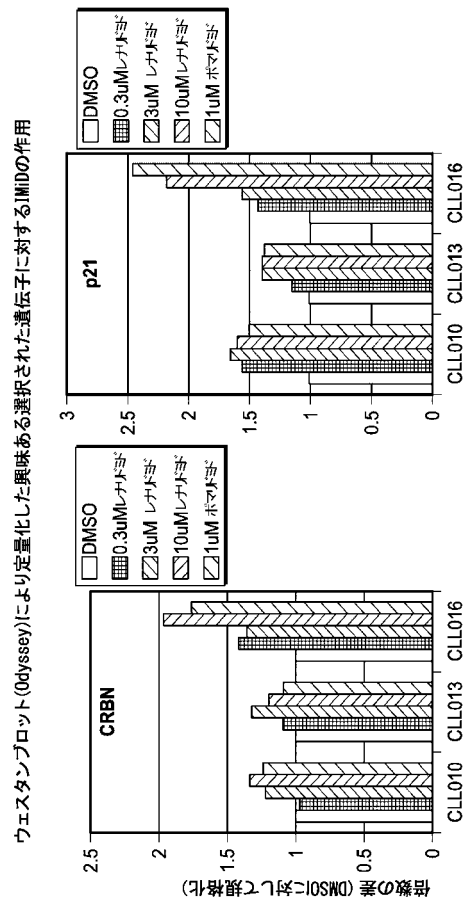


図 56B-1

【 図 5 6 B - 2 】

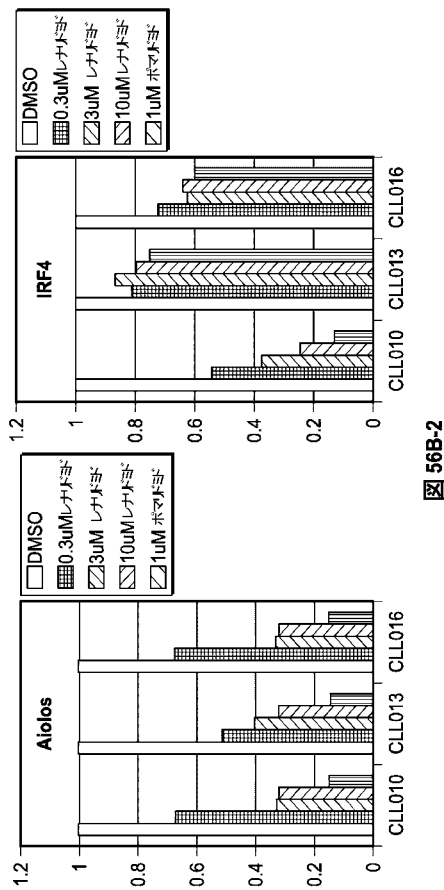


図 56B-2

【 図 5 6 C 】

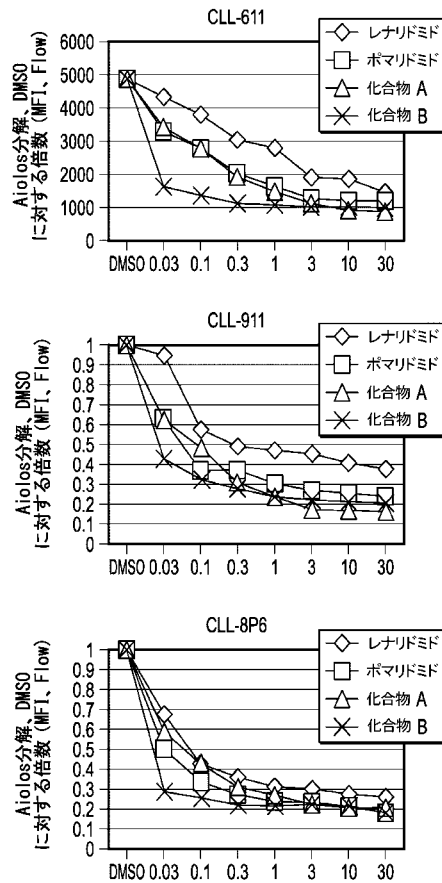


図 56C

【 図 5 7 A 】

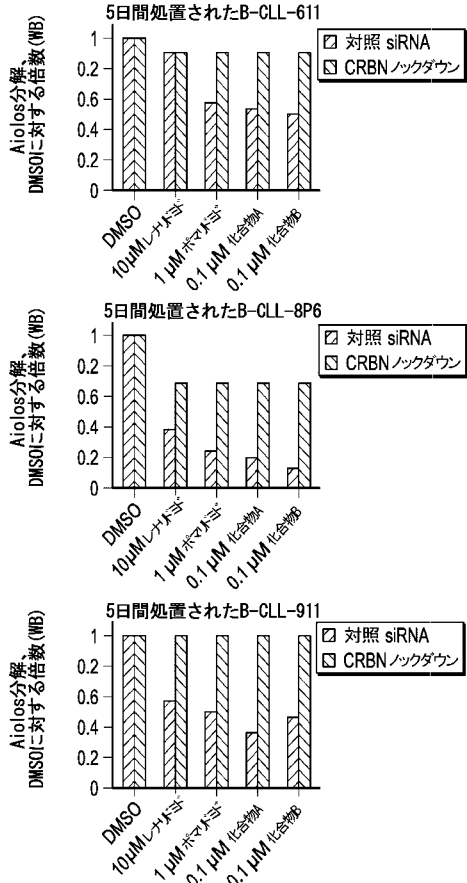


図 57A

【 図 5 7 B 】

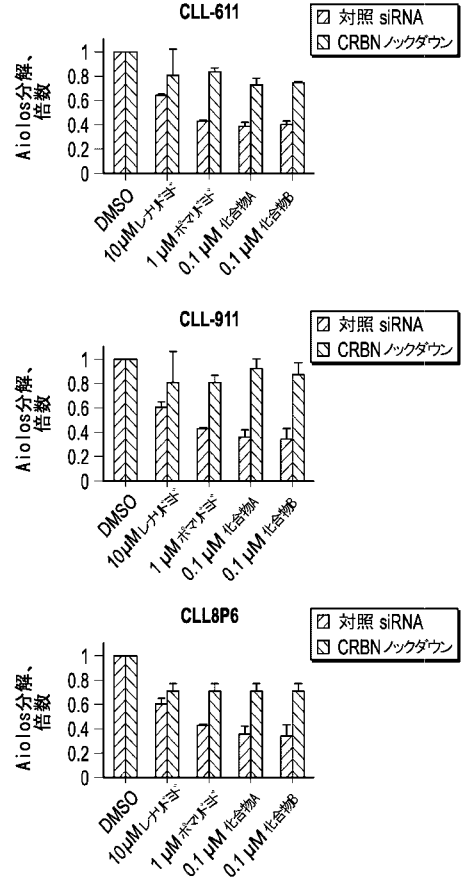


図 57B

【 図 5 7 C 】

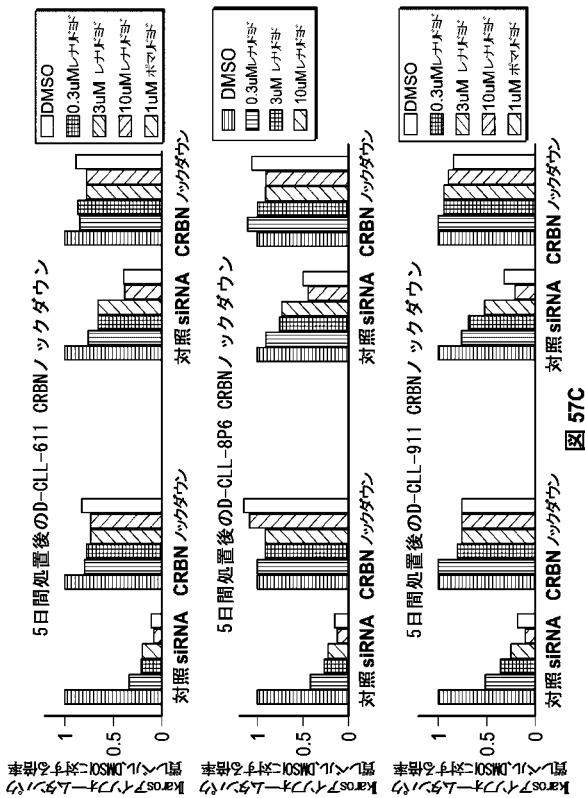


図 57C

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/048510
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A LOPEZ-GIRONA ET AL: "Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide", LEUKEMIA, vol. 26, no. 11, 3 May 2012 (2012-05-03), pages 2326-2335, XP055087163, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2012.119 abstract; fig. 2; p. 2327, col. 2, par. 2; fig. 3; fig. 4; p. 2330, col. 1; p. 2329, col. 2; the whole document ----- -/--	1,2,4,5, 12-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 November 2013		Date of mailing of the international search report 09/04/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schindler-Bauer, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/048510

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LOPEZ-GIRONA ANTONIA ET AL: "Direct Binding with Cereblon Mediates the Antiproliferative and Immunomodulatory Action of Lenalidomide and Pomalidomide", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 118, no. 21, 1 November 2011 (2011-11-01), page 335, XP009163747, ISSN: 0006-4971 [retrieved on 2011-11-18] abstract</p> <p>-----</p>	1,2,4,5, 12-16
Y	<p>T. ITO ET AL: "Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity", SCIENCE, vol. 327, no. 5971, 12 March 2010 (2010-03-12), pages 1345-1350, XP055062167, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1177319 the whole document</p> <p>-----</p>	1,2,4,5, 12-16
Y	<p>T. ITO ET AL: "Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity", SCIENCE, vol. 327, no. 5971, 12 March 2010 (2010-03-12), pages 1345-1350, XP055041158, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1177319 the whole document</p> <p>-----</p>	1,2,4,5, 12-16
X	<p>WO 2011/049043 A1 (TOKYO INST TECH [JP]; FUJIMOTO SEIYAKU KK [JP]; HANDA HIROSHI [JP]; AN) 28 April 2011 (2011-04-28) abstract the whole document</p> <p>-----</p>	1,2,4,5, 12-16
T	<p>WO 2012/125405 A2 (MAYO FOUNDATION [US]; STEWART ALEXANDER KEITH [US]; BERGSÄGEL PETER [U]) 20 September 2012 (2012-09-20)</p> <p>-----</p>	
A	<p>GUPTA D ET AL: "ADHERENCE OF MULTIPLE MYELOMA CELLS TO BONE MARROW STROMAL CELLS UPREGULATES VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR SECRETION: THERAPEUTIC APPLICATIONS", LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US, vol. 15, no. 12, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1950-1961, XP001188280, ISSN: 0887-6924 the whole document</p> <p>-----</p>	1,2,4,5, 12-16

-/--

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/US2013/048510

<b>(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
<b>Category*</b>	<b>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</b>	<b>Relevant to claim No.</b>
T	WO 2012/149299 A2 (CELGENE CORPORAITON [US]; SCHAFFER PETER [US]; LOPEZ-GIRONA ANTONIA [US] 1 November 2012 (2012-11-01) the whole document -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2013/048510**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

1-5(completely); 12-16(partially)

**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/US2013/048510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2011049043	A1	28-04-2011	AU 2010309035 A1	12-04-2012
			CA 2774871 A1	28-04-2011
			CN 102576023 A	11-07-2012
			EP 2492686 A1	29-08-2012
			KR 20120093852 A	23-08-2012
			RU 2012120710 A	27-11-2013
			US 2012192297 A1	26-07-2012
			WO 2011049043 A1	28-04-2011
-----				
WO 2012125405	A2	20-09-2012	AU 2012229333 A1	24-10-2013
			EP 2683412 A2	15-01-2014
			US 2014066480 A1	06-03-2014
			WO 2012125405 A2	20-09-2012
-----				
WO 2012149299	A2	01-11-2012	AU 2012249491 A1	14-11-2013
			CA 2834535 A1	01-11-2012
			CN 103688176 A	26-03-2014
			EP 2702410 A2	05-03-2014
			US 2012322073 A1	20-12-2012
			WO 2012149299 A2	01-11-2012
-----				

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 1-5(completely); 12-16(partially)

Method for determining whether a compound is "immunomodulatory", wherein the level of a CRBN-associated protein is determined with and without pre-established contact of the compound with a cell. The CRBN-associated protein is DDB1, or alternatively CRBN.  
---

2-120. claims: 17-20(completely); 16(partially)

Method for determining whether a compound is "immunomodulatory", wherein the level of a CRBN-associated protein is determined with and without pre-established contact of the compound with a cell. The CRBN-associated protein is one out of the list of 121 proteins claimed in claim 16, except DDB1 and CRBN (because they are already covered by invention 1).  
---

121. claims: 6-11(completely); 12-16(partially)

Method for determining the efficacy of a compound in treating a disease or disorder, wherein the level of a CRBN-associated protein is determined with and without pre-established contact of the compound with a cell.  
---

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A

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

(72)発明者 ローラ コラル  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 3 7 ラ ジョラ ブルーバード レーン 1 3 4 8

(72)発明者 マリア イングリン ワング  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サン ディエゴ # 5 0 4 コスタ ベルデ  
 ブルブド . 8 7 7 5

(72)発明者 ビルグリム ジャクソン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 2 0 4 サン ディエゴ ランディス スト . アプト  
 ディー 3 5 5 3

(72)発明者 アントニア ロペズ ギロナ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サン ディエゴ ジャンユアリー プレイス  
 8 9 5 9

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA25 AA26 AA40 BA13 BB20 CA11 CA18  
 CA19 CA20 CA21 CA25 CA26 CB01 CB02 CB03 CB04 CB07  
 CB09 CB11 CB12 CB14 CB15 CB26 DA14 DA36 FA37 FB01  
 FB02 FB03 FB08 FB12 GC12  
 4B063 QA01 QA20 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR55  
 QR62 QS25 QX02

专利名称(译)	使用脑相关蛋白测定药效的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015528112A</a>	公开(公告)日	2015-09-24
申请号	JP2015520555	申请日	2013-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	细胞基因公司		
申请(专利权)人(译)	Celgene公司		
[标]发明人	ピーターエイチスチャフエル ラジェシュチョプラ ローラコラル マリアイングリンワング ピルグリムジャクソン アントニアロベズギロナ		
发明人	ピーター エイチ.スチャフエル ラジェシュ チョプラ ローラ コラル マリア イングリン ワング ピルグリム ジャクソン アントニア ロベズ-ギロナ		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 C12Q1/02 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/5052 G01N33/5023 G01N33/5047 G01N33/57426 G01N2800/101 G01N2800/104 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/50.Z G01N33/15 G01N33/53.D C12Q1/02 C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CA11 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA20 2G045/CA21 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB09 2G045/CB11 2G045/CB12 2G045/CB14 2G045/CB15 2G045/CB26 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC12 4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX02		
代理人(译)	石川彻		
优先权	61/696752 2012-09-04 US 61/666703 2012-06-29 US		
其他公开文献	JP6318152B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

使用脑电相关蛋白作为临床对癌症，炎性疾病和药物治疗反应的敏感性的生物标志物。

(21) 出願番号	特願2015-520555 (P2015-520555)	(71) 出願人	509307635
(86) (22) 出願日	平成25年6月28日 (2013. 6. 28)		セルジーン コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月23日 (2015. 2. 23)		アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/048510		901, サミット, モリス アベニュー
(87) 国際公開番号	WO2014/004990		86
(87) 国際公開日	平成26年1月3日 (2014. 1. 3)	(74) 代理人	100097456
(31) 優先権主張番号	61/686, 752		弁理士 石川 徹
(32) 優先日	平成24年9月4日 (2012. 9. 4)	(72) 発明者	ピーター エイチ. スチャアエル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0
(31) 優先権主張番号	61/666, 703		8502 バレ メアド モンロエ アベ
(32) 優先日	平成24年6月29日 (2012. 6. 29)		. 237
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ラジェシュ チョブラ
			アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0
			7901 サミット エゲルス コート
			54

最終頁に続く