(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-543138
(P2024-543138A)
(43)公表日　令和6年11月19日(2024.11.19)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/68 (2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/68		４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｑ	*1/6869(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6869	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6851(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6851	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6874(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6874	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6883(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6883	Ｚ	

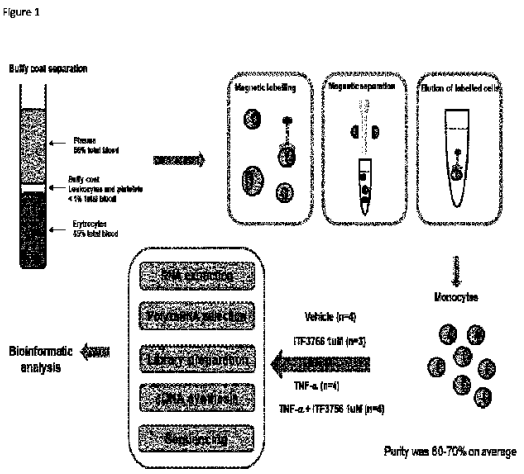
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全49頁）

(21)出願番号　特願2024-531107(P2024-531107)
(86)(22)出願日　令和4年11月22日(2022.11.22)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月23日(2024.5.23)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/082762
(87)国際公開番号　WO2023/094365
(87)国際公開日　令和5年6月1日(2023.6.1)
(31)優先権主張番号　102021000029558
(32)優先日　令和3年11月23日(2021.11.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
イタリア(IT)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　591279294
イタルファルマコ ソシエタ ペル アチオニ
ＩＴＡＬＦＡＲＭＡＣＯ ＳＯＣＩＥＴＡ ＰＥＲ ＡＺＩＯＮＩ
イタリア共和国、２０１２６ ミラノ、ビアレ フルビオ テスチ ３３０
(74)代理人　110001243
弁理士法人谷・阿部特許事務所
(72)発明者　ジャンルカ フォサーティ
イタリア アイ－２０１４６ ミラノ ミラノ ヴィア コスタンツァ ２２
(72)発明者　キアラ リパモンティ
イタリア アイ－２０９００ モンツァ エ ブリアンツァ モンツァ ヴィア グエッ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＲＮＡバイオマーカーの検出方法

(57)【要約】
本発明は、癌に罹患した患者の臨床的処置中に、化合物Ｎ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミドなどのヒストン脱アセチル化酵素６（ＨＤＡＣ６）の阻害剤の有効用量および／または生物学的活性を定義するために使用することができるｍＲＮＡバイオマーカーに基づく方法に関する。より詳細には、本発明は、化合物Ｎ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミドなどのＨＤＡＣ６阻害剤の臨床効果を評価する方法において、「遺伝子発現シグネチャー」として、ヒト単球における特定のバイオマーカーの遺伝子発現の変動の解析を指向する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）　患者の生物学的サンプルにおいて、ＨＤＡＣ６阻害剤によって調節され、かつＣＤ８４、ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａ、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ２、ＳＴＡＢ１、ＣＤ１６３、ＣＤ２０４／ＭＳＲ１、ＣＤ２０６／ＭＲＣ１、ＭＭＰ９、ＮＢＥＡＬ２、ＬＴＢＰ４、ＡＮＸＡ６、ＦＡＴＰ１／ＳＬＣ２７ａ１、ＡＤＡ、ＣＤ２７６、ＣＤ４０またはＩＲＦ６遺伝子から選択される少なくとも１つのＲＮＡバイオマーカーの発現レベルを決定する工程と
ｂ）　前記発現レベルを基準サンプルの発現レベルと比較する工程と
を含む、ＨＤＡＣ６阻害剤の有効用量および／または生物学的活性を評価する方法。
【請求項２】
ＨＤＡＣ６阻害剤の有効用量および／または生物学的活性が、癌に罹患した患者の治療的処置中または治療的処置後に評価される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ｃ）　患者を治療的処置に対する応答性または非応答性として分類する工程
をさらに含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
治療的処置に対する応答性または非応答性としての患者の分類が、少なくとも１つのＲＮＡバイオマーカーの発現値が閾値発現値を超えるかまたはそれ未満であるかに基づく、請求項１から３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏ法であることを特徴とする、請求項１から４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
ＲＮＡバイオマーカーＮＢＥＡＬ２、ＬＴＢＰ４、ＡＮＸＡ６、ＦＡＴＰ１／ＳＣＬ２７ａ１、ＣＤ４０またはＩＲＦ６の発現レベルが、ＨＤＡＣ６阻害剤によってアップレギュレートされ、
ＲＮＡバイオマーカーＣＤ８４、ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａ、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ２、ＳＴＡＢ１、ＣＤ１６３、ＣＤ２０４／ＭＳＲ１、ＣＤ２０６／ＭＲＣ１、ＡＤＡ、ＣＤ２７６またはＭＭＰ９の発現レベルが、ＨＤＡＣ６阻害剤によってダウンレギュレートされる
請求項１から５のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
少なくともＲＮＡバイオマーカーＳＴＡＢ１、ＣＤ８４、ＣＤ２０６／ＭＲＣ１、ＭＭＰ９、ＣＤ１６３、ＣＤ４０およびＩＲＦ６の発現レベルが評価され、好ましくは、少なくともＲＮＡバイオマーカーＭＭＰ９、ＣＤ４０およびＩＲＦ６の発現レベルが評価される、請求項１から６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
ＨＤＡＣ６阻害剤は、ツバシン、ツバスタチン、ネクスツラスタット、ＡＣＹ－１２１５、ＡＣＹ－７３８、ＡＣＹ－１０８３、ＫＡ２５０７、Ｔ５１８、ＳＷ１００またはＮ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミド（ＩＴＦ３７５６）から選択され、好ましくは、前記ＨＤＡＣ６阻害剤は、化合物Ｎ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミドである、請求項１から７のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
生物学的サンプルが組織サンプルまたは体液であり、好ましくは、前記組織サンプルが腫瘍生検または血球であり、好ましくは、前記体液が血液、血清または血漿である、請求項１から８のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】

工程ａ）における少なくとも１つのＲＮＡバイオマーカーの発現レベルは、ＲＮＡ配列決定、定量的ＲＴ－ＰＣＲ、デジタルＰＣＲ、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘマイクロアレイ、カスタムマイクロアレイまたはナノストリングテクノロジーによって検出される、請求項１から９のいずれかに記載の方法。

【請求項１１】

前記癌は、副腎皮質細胞癌、肛門癌、星状細胞腫、皮膚の基底細胞癌、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、原発不明癌、心臓腫瘍、子宮頸癌、胆管癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、眼内黒色腫、卵管癌、胆嚢癌、胃癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、胚細胞腫瘍、精巣癌、頭頸部癌、肝細胞癌、島細胞腫瘍、膵神経内分泌腫瘍、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、白血病、肺癌（非小細胞、小細胞、胸膜芽腫および気管気管支腫瘍）、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、ＮＵＴ遺伝子変化を伴う正中線管がん、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍、骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性新生物、神経芽腫、卵巣癌、膵癌、パラガングリオーマ、副甲状腺癌、陰茎癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、原発性腹膜癌、前立腺癌、腎細胞癌、網膜芽細胞腫、肉腫、皮膚の扁平上皮癌、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺癌、腎盂尿管移行細胞癌、子宮癌、膣癌、血管腫瘍、外陰癌およびウィルムス腫瘍から選択され；好ましくは、前記癌は、黒色腫、腎細胞癌、非小細胞肺癌または大腸癌である、請求項３に記載の方法。

【請求項１２】

マルチウェルプレートと、請求項１に記載のＲＮＡバイオマーカーの少なくとも１つの発現レベルを決定するための適切なプライマーおよび／またはプローブとを含む、ＨＤＡＣ６阻害剤の有効用量および／または生物学的活性の評価に使用するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ＲＮＡバイオマーカーの検出方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

真核細胞の遺伝物質は、ＤＮＡおよびタンパク質からなるクロマチンと呼ばれる複雑かつ動的な構造で組織化されている。クロマチンの主なタンパク質成分はヒストンという塩基性タンパク質であり、ヒストンはＤＮＡと相互作用してクロマチンの構造単位であるヌクレオソームを、核内に第１のレベルの染色体コンパクションを形成する。塩基性ヒストン残基とＤＮＡの酸性リン酸主鎖との相互作用は、ヌクレオソームの凝縮、ならびに複製および転写を調節する分子複合体のアクセス性を決定する上で極めて重要である。この相互作用は、主として、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、アセチル化など、コアヒストンのＮ末端配列の複数の翻訳後修飾によって影響を受ける。ヒストンＮ末端リジン残基の脱アセチル化は、アミン基のプロトン化を可能にし、このアミン基は正電荷を持つことにより、ＤＮＡに含まれる負電荷と相互作用する。このような相互作用は、よりコンパクトな状態のクロマチンをもたらし、遺伝子発現の抑制につながる。

【０００３】

逆に、同残基のアセチル化は、イオン結合の形成を阻害し、コンパクトな形態に乏しい状態のクロマチンをもたらし、これはＤＮＡの露出を高め、遺伝子転写を活性化する高分子複合体との相互作用を可能にする。

【０００４】

このような物理化学的な結果に加え、翻訳後修飾された残基はまた、ブロモドメインまたはクロモドメインを含む「リーダー」タンパク質であって、メチル化またはアセチル化マーク（ｍａｒｋｓ）を認識し、抑制または活性化されたクロマチン状態の安定化に関与するものによって特異的に認識される。

【０００５】

ヒストンのアセチル化の程度は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（ＨＡＴ）およびヒストン脱アセチル化酵素（ＨＤＡＣ）という２種類の酵素の活性バランスによって制

御される。この微妙なバランスの変化は、がん、神経疾患、炎症、および自己免疫疾患を含む、さまざまなヒト疾患に共通して見出される細胞の恒常性の喪失をもたらしうる。

【０００６】

ヒストン脱アセチル化酵素は、ヒストンのＮ末端リジン残基のアミン基の脱アセチル化を触媒するものとして分類されている。ヒストン尾部のリジンに関するこの酵素活性は、ＨＡＴ酵素が「書き込み（writers）」と呼ばれるのとは対照的に、ヒストン脱アセチル化酵素を「消去（erasers）」に分類した。結果として、ＨＡＴ酵素の基質であるＮ－アセチル－リジンを含む非ヒストンタンパク質基質についても活性が発揮されることから、これらの酵素の基質が多数存在することが見出されている。これらの基質には、転写調節因子、ＤＮＡ修復酵素、その他の多くの核および細胞質タンパク質が含まれる。

【０００７】

ヒトＨＤＡＣファミリーは１８の酵素からなり、Ｚｎ依存性ＨＤＡＣと、サーチュイン（クラスＩＩＩ）としても知られているＮＡＤ依存性ＨＤＡＣの２つのグループに分けられる。亜鉛依存性ＨＤＡＣは、４つのクラス：１）主に核内に存るユビキタスなアイソザイムであるＨＤＡＣ１、２、３および８を含むクラスＩ；２）核および細胞質の両方に存るアイソザイムであるＨＤＡＣ４、５、７および９を含むクラスＩＩａ；３）主に細胞質に存るＨＤＡＣ６とＨＤＡＣ１０を含むクラスＩＩｂ；ならびに４）ＨＤＡＣ１１のみを含むクラスＩＶに更に分類される。クラスＩのＨＤＡＣとは異なり、クラスＩＩａとある程度のクラスＩＩｂは組織特異的な発現を有する。

【０００８】

遺伝子発現を制御し、ヒストンおよび転写調節因子に作用することによって、これらの酵素が無数の細胞機能に関与していることは明らかである。加えて、多くのタンパク質基質に作用することにより、これらの酵素は、シグナル伝達および細胞骨格の再編成のような他の多くのプロセスに関与している。

【０００９】

過去２０年間にいくつかのＨＤＡＣ阻害剤が開発され、ヒトのがん治療薬として５分子（ボリノスタット、ロミデプシン、ベリノスタット、パノビノスタット、チダミド）が承認されている。これらの分子はすべて、正常組織でも役割を果たしている複数のＨＤＡＣサブタイプを阻害する。そのため、血小板減少、消化管毒性、疲労などの毒性によって治療可能性が制限されている。

【００１０】

そのため、科学界の関心は、より優れた薬理学的能力を持つ分子の開発を目指し、個々のＨＤＡＣアイソフォームに対する選択的阻害剤の合成および研究に集中している。

【００１１】

特定のＨＤＡＣアイソフォーム、特にＨＤＡＣ６に対する選択的阻害剤は、増殖障害およびタンパク質の蓄積、免疫系障害、呼吸器疾患、神経疾患、神経変性疾患、例えば、脳卒中、ハンチントン病、ＡＬＳ、アルツハイマー病に関連する病態の治療に特に有用である可能性がある。ＨＤＡＣ６は、Ｚｎ依存性ヒストン脱アセチル化酵素ファミリーのメンバーであり、異なる触媒活性およびおそらく異なる生物学的役割を有する２つの活性部位の存在などの、いくつかのユニークで際立った特徴を有する。ＨＤＡＣ６の基質は、α－チューブリン、Ｈｓｐ９０（熱ショックタンパク質９０）、コルタクチン、β－カテニンを含む。

【００１２】

ＨＤＡＣ６によるこれらのタンパク質のアセチル化状態の調節は、免疫応答（Wangら、Nat. Drug Disc. (2009), 8(12), 969-981（非特許文献１）；Kalin JHら、J. Med. Chem. (2012), 55, 639-651（非特許文献２）；de Zoeten EFら、Mol. Cell. Biol. (2011), 31(10), 2066-2078（非特許文献３））、細胞移動と細胞－細胞相互作用を含む微小管ダイナミクスの制御（Aldana-Masangkayら、J. Biomed. Biotechnol. (2011), ID 875824（非特許文献４））、および誤って折り畳まれた（misfolded）タンパク質の分解などのいくつかの重要なプロセスと相関している。ＨＤ

ＡＣ６は、大多数の生体組織で構成的に発現しており、核内区画でも活性を発揮するにもかかわらず、細胞質基質（cytosolic）に広く局在している。ＨＤＡＣ６の活性は、がん、神経疾患、呼吸器疾患、自己免疫疾患などの病態で変化する（Li, T., Zhang, C., Hassan, S., Liu, X., Song, F., Chen, K., Zhang, W., and Yang, J. (2018)；「癌におけるヒストン脱アセチル化酵素６（Histone deacetylase 6 in cancer.）」、Journal of Hematology & Oncology 11, 111（非特許文献５）；Prior, R., Van Helleputte, L., Klingl, Y.E., and Van Den Bosch, L. (2018)、「末梢神経障害の潜在的治療標的としてのＨＤＡＣ６（HDAC6 as a potential therapeutic target for peripheral nerve disorders.）」、Expert Opinion on Therapeutic Targets 22, 993-1007（非特許文献６））。

【００１３】

がんに関連して、ＨＤＡＣ６は、免疫細胞および腫瘍細胞におけるＰＤ－Ｌ１の発現を調節することによって抗腫瘍免疫応答を制御する、腫瘍微小環境の機能の重要な調節因子として認識されている。また、ＨＤＡＣ６は、特に様々なタイプの白血病（Fiskusら、Blood (2008), 112(7), 2896-2905（非特許文献７）；Rodriguez-Gonzales、Blood (2008), 112(11), abstract 1923（非特許文献８））および多発性骨髄腫（Hideshimaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005), 102(24), 8567-8572（非特許文献９））のような、特に血液学的腫瘍における腫瘍性タンパク質（oncoprotein）の発現の調節に関与する。ＨＤＡＣ６によるα－チューブリンのアセチル化の制御は、細胞運動性が重要な役割を果たす転移の開始に関与している可能性がある（Sakamotoら、J. Biomed. Biotechnol. (2011), 875824（非特許文献１０））。

【００１４】

さらに、用量制限毒性の難点を有する非選択的ＨＤＡＣ阻害剤で行われる前臨床観察および臨床観察とは明瞭に相違して、ＨＤＡＣ６阻害剤は、何れの明らかな毒性徴候も示さない。また、ＨＤＡＣ６ノックアウトマウスは、生存可能で、正常に発育し、病理学的変化の明らかな徴候を示さない。これは、他のＨＤＡＣサブタイプの発現の消失時に観察される事象とは対照的である。

【００１５】

結論として、ＨＤＡＣ６の選択的阻害剤は、非常に良好な忍容性を有すると同時に、かなりの治療的可能性を有することが期待される。

【００１６】

国際特許出願公開第２０１８／１８９３４０号（ＷＯ２０１８／１８９３４０（特許文献１））は、抗腫瘍免疫応答の調節において顕著な活性が見出された、特に有効なＨＤＡＣ６阻害剤であるＮ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミドを開示している。ＨＤＡＣ６阻害剤の公知の優れた忍容性と一致して、この分子はラット、マウス、イヌにおいて良好な許容性（１０００ｍｇ／ｋｇ）を示し、ヒトにおいても良好な許容性を示すことが示唆される。

【００１７】

この仮説は、ＨＤＡＣ６阻害剤、リコリノスタットおよびＫＡ２５０７で得られた臨床データによってさらに支持され、ＨＤＡＣ６阻害剤は患者において非常に良好な許容性が示された（Amengual JEら、Oncologist (2021) 3:184-e366（非特許文献１１）；Tsimberidou AMら、Clin Cancer Res (2021) 27:3584-3594（非特許文献１２））

【００１８】

しかしながら、薬剤にとって非常に望ましいことではあるが、毒性副作用がないことは、その臨床開発に課題をもたらす。

【００１９】

伝統的に、腫瘍学の第Ｉ相臨床プロトコルでは、最大耐性用量に達するまで用量の段階的増加が計画される。通常、コホートはこの用量レベルで展開され、推奨される第ＩＩ相用量は許容性、ＰＫおよび有効性の初期徴候に関する情報から導き出される。何れの毒性

副作用もない場合は、用量を決定するために他のパラメータを使用する必要がある。
【００２０】
バイオマーカーは、生物学的有効用量を決定する上で非常に有用である。
【００２１】
米国特許出願公開第２０１２／１７６０７６号明細書（ＵＳ２０１２／１７６０７６（特許文献２））は、多発性骨髄腫を有する被験体におけるヒストン脱アセチル化酵素６阻害剤（ＨＤＡＣ６）の治療効果を決定するためのキットであって、ｍｉＲＮＡ（配列番号１～２３）、ｍＲＮＡ（配列番号２４～２５）および低分子非コードＲＮＡ（配列番号２６～２７）から選択されるＨＤＡＣ６バイオマーカーＲＮＡに特異的に結合する検出剤を含むキットを開示している。タンパク質をコードするｍＲＮＡ配列は、ホモサピエンス低酸素誘導因子１サブユニットα（ＨＩＦ１Ａ）、転写バリアント２　ｍＲＮＡに対応する配列番号２４、およびホモサピエンスタンパク質チロシンホスファターゼ受容体Ｕ型（ＰＴＰＲＵ）、転写バリアント２　ｍＲＮＡに対応する配列番号２５のみである。
【００２２】
ＨＤＡＣ６阻害剤に関して、チューブリンアセチル化レベルの増加を読み出し値として用いることができる。たとえば、ＨＤＡＣ６阻害剤の所定量を投与された患者は、薬剤投与後の異なる時間点で採血を行い、ウェスタンブロット分析を用いてＰＢＭＣ中のアセチルチューブリンを測定することができる。比較的に直接的ではあるが、この方法は定性的または半定量的であり、抗腫瘍活性とは直接関係のない薬動力学的マーカーを測定するものである。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００２３】
【特許文献１】国際特許出願公開第２０１８／１８９３４０号
【特許文献２】米国特許出願公開第２０１２／１７６０７６号明細書
【非特許文献】
【００２４】
【非特許文献１】Wang et al, Nat. Drug Disc. (2009), 8(12), 969-981
【非特許文献２】Kalin JH, et al., J. Med. Chem. (2012), 55, 639-651
【非特許文献３】de Zoeten EF, et al., Mol. Cell. Biol. (2011), 31(10), 2066-2078
【非特許文献４】Aldana-Masangkay et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), ID 875824
【非特許文献５】Li, T., Zhang, C., Hassan, S., Liu, X., Song, F., Chen, K., Zhang, W., and Yang, J. (2018). Histone deacetylase 6 in cancer. Journal of Hematology & Oncology 11, 111)
【非特許文献６】Prior, R., Van Helleputte, L., Klingl, Y.E., and Van Den Bosch, L. (2018). HDAC6 as a potential therapeutic target for peripheral nerve disorders. Expert Opinion on Therapeutic Targets 22, 993-1007
【非特許文献７】Fiskus et al., Blood (2008), 112(7), 2896-2905
【非特許文献８】Rodriguez-Gonzales、Blood (2008), 112(11), abstract 1923
【非特許文献９】Hideshima et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005), 102(24), 8567-8572
【非特許文献１０】Sakamoto et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), 875824
【非特許文献１１】Amengual JE, et al., Oncologist (2021) 3:184-e366
【非特許文献１２】Tsimberidou AMら、Clin Cancer Res (2021) 27:3584-3594
【非特許文献１３】TrimGalore http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
【非特許文献１４】Kallisto (Bray et al, 2016)
【非特許文献１５】Love et al, 2014

【非特許文献１６】Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method. K J Livak et al, Methods 25, 402-408 (2001)
【非特許文献１７】Shi et al., 2018
【非特許文献１８】Liao et al., (2019) Cancer Cell 35:559-572
【非特許文献１９】Nishiyama et al. (2018) International Immunopharmacology 55, 205-215
【非特許文献２０】Larionova et al., 2020
【非特許文献２１】http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc
【非特許文献２２】Honda and Taniguchi, 2006

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２５】
したがって、ＨＤＡＣ６阻害剤、特にＮ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミドの薬理学的活性用量を評価するために使用できる、患者サンプルにおいて評価可能な生物学的マーカーに基づく定量的方法が必要とされている。
【図面の簡単な説明】
【００２６】
【図１】ＲＮＡｓｅｑによる遺伝子発現データを得るために行った実験手順のスキームを示す図である。
【図２Ａ】サンプル間距離分析を示す図である。
【図２Ｂ】主成分分析を示す図である。
【図３Ａ】特定の処理によって選択的または共通にアップレギュレーションされる遺伝子の数を示すヴェン図である。ヴェンの図を用いてリストを比較するための対話型ツールであるヴェニー（Venny）のツール、Oliveros, J.C. (2007-2015)（https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html）で作成した。
【図３Ｂ】特定の処理によって選択的または共通にアップレギュレーションされる遺伝子の数を示すヴェン図である。ヴェンの図を用いてリストを比較するための対話型ツールであるヴェニー（Venny）のツール、Oliveros, J.C. (2007-2015)（https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html）で作成した。
【図４】精製されたヒト単球を指示通りに処理し、ＲＮＡｓｅｑデータからＣＤ２７４／ＰＤ－Ｌ１の発現を分析したことを示す図である。
【図５Ａ】ＩＴＦ３７５６処理によりヒト単球がＣＤ８４の発現をダウンレギュレートしたことを示す図である。
【図５Ｂ】ＣＤ８４の概略構造を示す図である。
【図５Ｃ】免疫細胞の発現を示す図である。
【図６】ＩＴＦ３７５６が、ＴＮＦ－αと同程度のＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａの強力なダウンレギュレーションを誘導することを示す図である。
【図７Ａ】ＩＴＦ３７５６が、ヒト単球におけるＣＸＣＬ２の発現を低下させたことを示す図である。
【図７Ｂ】ＩＴＦ３７５６が、ヒト単球におけるＣＸＣＬ３の発現を低下させたことを示す図である。
【図８】ＩＴＦ３７５６が、単独およびＴＮＦ－αとの併用において、ＳＴＡＢ１遺伝子の発現を強く低下させたことを示す図である。
【図９】ＩＴＦ３７５６が、単独およびＴＮＦ－αとの併用において、ＮＢＥＡＬ２の発現を増加させたことを示す図である。
【図１０】ＩＴＦ３７５６が、ＬＴＢＰ４の発現をアップレギュレートすることを示す図である。

【図１１】ヒト単球におけるＦＡＴＰ１／ＳＬＣ２７Ａ１の発現に対するＩＴＦ３７５６の効果、およびＦＡＴＰ１／ＳＬＣ２７Ａ１の発現に対するＩＴＦ３７５６およびＴＮＦ－αの相反する効果を示す図である。
【図１２】ＩＴＦ３７５６単独が、ＩＲＦ６発現の調節を誘導し、一方で、ＴＮＦ－αまたはその併用は影響を及ぼさなかったことを示す図である。
【図１３】ＩＴＦ３７５６が、単独で、またはＴＮＦ－αの存在下で明らかに相乗的に、ＡＮＸＡ６遺伝子の発現をアップレギュレートしたことを示す図である。
【図１４】ＩＴＦ３７５６が、ＣＤ４０遺伝子発現をアップレギュレートし、ＴＮＦ－αとの併用時に、ＴＮＦ－α単独で誘導されたＣＤ４０発現のアップレギュレーションをわずかに増加させることを示す図である。
【図１５】Ｍ２マクロファージマーカーＣＤ１６３が、ＩＴＦ３７５６単独およびＴＮＦ－αの存在下で下方調節されたことを示す図である。
【図１６】Ｍ２マクロファージマーカーＣＤ２０４／ＭＳＲ１が、ＩＴＦ３７５６単独で下方調節され、ＴＮＦ－αの存在下で強く下方調節されたことを示す図である。
【図１７】Ｍ２マクロファージマーカーＣＤ２０６／ＭＲＣ１が、ＩＴＦ３７５６単独で、およびＴＮＦ－αの存在下で強く下方調節されたことを示す図である。
【図１８】Ｍ２マクロファージマーカーＭＭＰ９が、ＩＴＦ３７５６によって下方調節されたことを示す図である。未処理の対照標準と比較して、細胞をＴＮＦ－αまたはＩＴＦ３７５６およびＴＮＦ－αで処理した場合に調節は観察されなかったことを示す図である。
【図１９】Ｍ２マクロファージマーカーＡＤＡが、ＩＴＦ３７５６によって下方調節されたことを示す図である。ＴＮＦ－αおよびその組み合わせは、ＡＤＡ遺伝子発現のアップレギュレーションを誘導することを示す図である。
【図２０Ａ】１μＭのＩＴＦ３７５６で処理したＰＢＭＣにおけるＳＴＡＢ１遺伝子の下方調節を示す図である。
【図２０Ｂ】１μＭのＩＴＦ３７５６で処理したＰＢＭＣにおけるＩＲＦ６遺伝子のアップレギュレーションを示す図である。
【図２１Ａ】ＩＴＦ３７５６がｉｎ　ｖｉｖｏで持続的なチューブリンのアセチル化を誘導することを示す図であり、アセチルチューブリンとチューブリンのバンドを示すウェスタンブロットを示す図である。
【図２１Ｂ】ＩＴＦ３７５６がｉｎ　ｖｉｖｏで持続的なチューブリンのアセチル化を誘導することを示す図であり、バンド強度を定量し、総チューブリン含量に対して正規化されたチューブリンアセチル化の増加倍率を計算した図である。
【図２２Ａ】腫瘍を有する動物がＩＴＦ３７５６処置に対して異なる反応をすることを示す図であり、ＩＴＦ３７５６で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。ビヒクル群と比較したＩＴＦ３７５６群（腫瘍体積の平均値±ＳＥＭ）を示す図である。
【図２２Ｂ】腫瘍を有する動物がＩＴＦ３７５６処置に対して異なる反応をすることを示す図であり、ＩＴＦ３７５６で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。例示の４群における試験中の単一動物の腫瘍体積の変動を示す図である。
【図２２Ｃ】腫瘍を有する動物がＩＴＦ３７５６処置に対して異なる反応をすることを示す図であり、ＩＴＦ３７５６で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。例示の４群における試験中の単一動物の腫瘍体積の変動を示す図である。
【図２２Ｄ】腫瘍を有する動物がＩＴＦ３７５６処置に対して異なる反応をすることを示す図であり、ＩＴＦ３７５６で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。例示の４群における試験中の単一動物の腫瘍体積の変動を示す図である。
【図２２Ｅ】腫瘍を有する動物がＩＴＦ３７５６処置に対して異なる反応をすることを示す図であり、ＩＴＦ３７５６で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。例示の４群における試験中の単一動物の腫瘍体積の変動を示す図である。
【図２３Ａ】腫瘍を有する動物が抗ＰＤ－１処置に対して異なる反応をすることを示す図

であり、抗ＰＤ－１で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。ビヒクル対照群およびアイソタイプ対照群と比較した抗ＰＤ－１群（腫瘍体積の平均値±ＳＥＭ）を示す図である。
【図２３Ｂ】腫瘍を有する動物が抗ＰＤ－１処置に対して異なる反応をすることを示す図であり、抗ＰＤ－１で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。例示の４群における試験中の単一動物の腫瘍体積の変動を示す図である。
【図２３Ｃ】腫瘍を有する動物が抗ＰＤ－１処置に対して異なる反応をすることを示す図であり、抗ＰＤ－１で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。例示の４群における試験中の単一動物の腫瘍体積の変動を示す図である。
【図２３Ｄ】腫瘍を有する動物が抗ＰＤ－１処置に対して異なる反応をすることを示す図であり、抗ＰＤ－１で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。例示の４群における試験中の単一動物の腫瘍体積の変動を示す図である。
【図２３Ｅ】腫瘍を有する動物が抗ＰＤ－１処置に対して異なる反応をすることを示す図であり、抗ＰＤ－１で処置された動物は、３種の異なるグループにクラス分けされうる。例示の４群における試験中の単一動物の腫瘍体積の変動を示す図である。
【図２４Ａ】レスポンダー（ｒｅｓｏｎｄｅｒｓ）マウスによる、腫瘍微小環境におけるＭＭＰ９のダウンレギュレーションの相関関係を示す図である。全動物を考慮した場合、ノンレスポンダーとの比較において、ＭＭＰ９発現の統計的に有意な減少を示す相関関係が存在しなかったことを示す。
【図２４Ｂ】レスポンダーマウスにより、腫瘍微小環境におけるＭＭＰ９のダウンレギュレーションの相関関係を示す図である。ノンレスポンダーとの比較において、ＩＴＦ３７５６で処置したＣＴ２６を有するマウスがＭＭＰ９発現を統計的に有意に減少させたことを示す。
【図２４Ｃ】レスポンダーマウスによる、腫瘍微小環境におけるＭＭＰ９のダウンレギュレーションの相関関係を示す図である。抗ＰＤ－１で処置した動物を考慮した場合、ノンレスポンダーとの比較において、ＭＭＰ９発現の統計的に有意な減少を示す相関関係が存在しなかったことを示す。
【図２５Ａ】レスポンダーマウスによる、腫瘍微小環境におけるＩＲＦ６のアップレギュレーションの相関関係を示す図である。全動物を考慮した場合、ノンレスポンダーとの比較において、ＩＲＦ６発現のアップレギュレーションが存在しなかったことを示す。
【図２５Ｂ】レスポンダーマウスによる、腫瘍微小環境におけるＩＲＦ６のアップレギュレーションの相関関係を示す図である。ノンレスポンダーとの比較において、ＩＴＦ３７５６で処置したレスポンダーマウスは、ＩＲＦ６発現の顕著なアップレギュレーションを示す。
【図２５Ｃ】レスポンダーマウスによる、腫瘍微小環境におけるＩＲＦ６のアップレギュレーションの相関関係を示す図である。抗ＰＤ－１で処置した動物を考慮した場合、ノンレスポンダーとの比較において、ＩＲＦ６発現のアップレギュレーションを示す相関関係が存在しなかったことを示す。
【図２６Ａ】レスポンダーマウスによる、腫瘍微小環境におけるＣＤ４０のアップレギュレーションの相関関係を示す図である。全動物を考慮した場合、ノンレスポンダーとの比較において、ＣＤ４０発現のアップレギュレーションを示す相関関係が存在しなかったことを示す。
【図２６Ｂ】レスポンダーマウスによる、腫瘍微小環境におけるＣＤ４０のアップレギュレーションの相関関係を示す図である。ノンレスポンダーとの比較において、ＩＴＦ３７５６で処置したレスポンダーマウスは、ＣＤ４０発現の統計的に有意なアップレギュレーションを示す。
【図２６Ｃ】レスポンダーマウスによる、腫瘍微小環境におけるＣＤ４０のアップレギュレーションの相関関係を示す図である。抗ＰＤ－１で処置した動物を考慮した場合、ノンレスポンダーとの比較において、ＣＤ４０発現のアップレギュレーションを示す相関関係が存在しなかったことを示す。

【発明を実施するための形態】
【００２７】
（定義）
別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語、表記および他の科学用語は、本開示が属する技術分野の通常の知識を有する者によって一般的に理解される意味を有することが意図される。いくつかの場合、一般的に理解される意味を有する用語は、明確化および／または即時参照のために、本明細書において定義される。したがって、本明細書のそれらの定義を、当該技術分野において一般的に理解される意味を越えて実質的な相違を表すと解釈されるべきではない。
【００２８】
用語「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」および「含有する(containing)」は、オープンエンドの用語（「含むが、それらに限定されない」という意味）として理解されるべきであり、「本質的にからなる(essentially consist of)」、「本質的にからなる(essentially consisting of)」、「からなる(consist of)」または「からなる(consisting of)」のような用語のサポートとして考慮されるべきである。
【００２９】
「本質的にからなる(essentially consist of）」、「本質的にからなる(essentially consisting of)」という用語は、本発明の新規特性に影響を及ぼす他の成分が含まれないことを意味するセミクロースエンドの用語として理解されるべきである（したがって、任意の賦形剤を含むことができる）。
【００３０】
「からなる(consist of)」、「からなる(consisting of)」という用語は、クローズエンドの用語として理解される。
【００３１】
本明細書において「遺伝子発現シグネチャー」という用語は、バイオマーカーとして使用されるいくつかのｍＲＮＡまたはＲＮＡ（すなわち転写産物）の組み合わせから誘導される発現パターンを指示する。
【００３２】
本発明によれば、「ＲＮＡバイオマーカーの発現レベル」という用語は、特定の遺伝子（バイオマーカー）のＲＮＡまたはｍＲＮＡの検出および／または定量を指し、たとえば、対照との比較におけるＲＮＡまたはｍＲＮＡの過剰発現または過小発現の決定および／または定量、サンプル中のＲＮＡまたはｍＲＮＡの存在または非存在の決定、ＲＮＡの配列の決定、ＲＮＡの任意の修飾の決定、またはＲＮＡの任意の突然変異または変異の検出を指す。ＲＮＡレベルは、存在または不存在であること、対照より多いまたは少ないこと、あるいは１マイクロリットルあたりのＲＮＡのコピーなどのＲＮＡの量の数値を得ることで決定することができる。ＲＮＡの発現レベルは、絶対定量または相対定量によって定量することができる。絶対定量は、既知濃度の１種または複数種の標的核酸の含有、および既知標的核酸と未知核酸のハイブリダイゼーション強度を参照すること（たとえば、標準曲線の作成を通して）により、達成できる。あるいはまた、２種以上の遺伝子間で、または処理物／未処理物の間でハイブリダイゼーションシグナルを比較して相対的定量化を行い、ハイブリダイゼーション強度の変化を定量化することもできる。
【００３３】
本明細書において、「バイオマーカー」（生物学的マーカーの略）という用語は、何らかの生物学的状態もしくは状態の生物学的指標（たとえば転写物、すなわちｍＲＮＡ）および／または測定値を指す。
【００３４】
本発明によれば、癌に罹患している患者は、治療剤との接触の結果、治療剤との接触がない場合の成長と比較して、腫瘍の大きさまたは癌の成長速度が阻害される場合、治療剤に対して「応答性（responsive）」である。癌の成長は種々の方法で測定することがで

きる。たとえば、腫瘍の大きさ、又は腫瘍の種類に適した腫瘍マーカーの発現を測定することである。

【００３５】

癌に罹患した患者は、治療剤との接触がない場合の成長と比較して、治療剤との接触の結果として、腫瘍の大きさまたは癌の成長速度が阻害されないか、または非常に低い程度に阻害される場合、治療剤に対して「非応答性（non-responsive）」である。前述のように、癌の成長は、たとえば、腫瘍の大きさ、またはその腫瘍の種類に適切な腫瘍マーカーの発現の測定など、様々な方法で測定することができる。

【００３６】

治療薬に対して非応答性であるという特徴は、非常に変化しやすいものであり、異なる癌は、異なる条件下で、所与の治療薬に対して異なるレベルの「非応答性」を示す。さらに、非応答性の尺度は、患者のＱＯＬおよび転移の程度など（これらに限定されるものではない）、腫瘍の成長サイズ以外の付加的な基準を用いて評価することができる。

【００３７】

本発明によれば、「アップレギュレーション（up-regulation）」、「アップレギュレートされた（up-regulated）」、「過剰発現」、およびそれらの任意の変形の用語は互換的に使用され、健常人または正常人からの同様の生物学的サンプル中で典型的に検出されるバイオマーカーの値またはレベル（または値またはレベルの範囲）よりも大きい、生物学的サンプル中のバイオマーカーの値またはレベルを指す。また、この用語は、特定の疾患の異なる段階で検出することができるバイオマーカーの値またはレベル（または値またはレベルの範囲）よりも大きい、生物学的サンプル中のバイオマーカーの値またはレベルを指してもよい。

【００３８】

本発明によれば、用語「ダウンレギュレーション（down-regulation）」、「ダウンレギュレートされた（down-regulated）」、「過少発現(under-expression)」、「過少発現された(under-expressed)」、およびそれらの変形は互換的に使用され、健康な個体または正常な個体からの同様の生物学的サンプル中で通常検出されるバイオマーカーの値またはレベル（または値またはレベルの範囲）よりも低い、生物学的サンプル中のバイオマーカーの値またはレベルを指す。また、この用語は、特定の疾患の異なる段階で検出されうるバイオマーカーの値またはレベル（または値またはレベルの範囲）よりも低い、生物学的サンプル中のバイオマーカーの値またはレベルを指してもよい。

【００３９】

さらに、過剰発現または過小発現のいずれかであるバイオマーカーは、個体における正常なプロセスまたは疾患もしくは他の症状の非存在を示す兆候であるバイオマーカーの「正常」発現レベルまたは値と比較して、「識別的発現(differential expression)」または「識別的レベル(differential level)」もしくは「識別的値(differential value)」と称することもできる。したがって、バイオマーカーの「識別的発現」は、バイオマーカーの「正常」発現レベルからの変動と呼ぶこともできる。

【００４０】

本発明によれば、ＨＤＡＣ６阻害剤の「生物学的活性」という用語は、本発明において記載される任意の遺伝子の発現の調節／変動を指す。

【００４１】

本発明によれば、用語「有効用量（efficacious dose）」とは、患者における癌の治療に有効であると考えられるＨＤＡＣ６阻害剤の投与量をいう。

【００４２】

（発明の開示）

驚くべきことには、本発明者らは、本発明者らの選択的ＨＤＡＣ６阻害剤であるＮ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミド（ＩＴＦ３７５６とも呼称される）が、炎症促進性（pro-inflammatory）刺激により活性化された骨髄性細胞における異なる遺伝子の発現をアップレギュ

レートおよび／またはダウンレギュレートすることができ、未刺激ヒト単球およびＴＮＦ－α処理されたヒト単球の両方において、遺伝子発現に対してより広範な効果を有することを見出した。

【００４３】

特に、ＴＮＦ－αで刺激されたヒト単球はＰＤ－Ｌ１遺伝子を強くアップレギュレートすること、ならびに、ＰＤ－Ｌ１の表面発現とこれらのアップレギュレーションがＩＴＦ３７５６によって阻害されることを観察した。

【００４４】

さらに、実験セクションで報告されたｉｎ　ｖｉｔｒｏのデータは、ＩＴＦ３７５６によるヒト単球の処理が、ＮＢＥＡＬ２、ＦＡＴＰ１／ＳＣＬ２７Ａ１、ＬＴＢＰ４、ＣＤ４０、ＡＮＸＡ６およびＩＲＦ６遺伝子の発現をアップレギュレートし、ＣＤ８４、ＣＤ２７６、ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａ、ＣＸＣＬ２、ＣＸＣＬ３、ＣＤ１６３、ＣＤ２０４／ＭＳＲ１、ＣＤ２０６／ＭＲＣ１、ＡＤＡ、ＭＭＰ９およびＳＴＡＢ１遺伝子の発現をダウンレギュレートすることを例証する。

【００４５】

したがって、本発明者らによって得られた結果は、ＨＤＡＣ６阻害剤、より具体的にはＩＴＦ３７５６分子によって直接調節することができ、このクラスの分子の臨床開発にとって最も重要な遺伝子発現シグネチャーとして使用することができる、遺伝子パネル（「遺伝子発現シグネチャー」とも呼ばれる）の同定に繋がる。

【００４６】

さらに、このデータは、ｉｎ　ｖｉｖｏで得られた実験データからも確認されており、ＣＴ２６を有する動物では、ＩＴＦ３６５６処置群のレスポンダー（respnders）動物と相関するＭＭＰ９遺伝子の有意なダウンレギュレーションおよびＩＲＦ６およびＣＤ４０遺伝子のアップレギュレーションが観察され、これは、前述の遺伝子の発現レベルが、治療動物におけるＨＤＡＣ６阻害剤の効果に厳密に関連していることを実証する。

【００４７】

したがって、本発明の１つの実施形態は：

ａ）　生物学的サンプルにおいて、ＨＤＡＣ６阻害剤によって調節され、ＣＤ８４、ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａ、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ２、ＳＴＡＢ１、ＣＤ１６３、ＣＤ２０４／ＭＳＲ１、ＣＤ２０６／ＭＲＣ１、ＭＭＰ９、ＮＢＥＡＬ２、ＬＴＢＰ４、ＡＮＸＡ６、ＦＡＴＰ１／ＳＬＣ２７ａ１、ＡＤＡ、ＣＤ２７６、ＣＤ４０またはＩＲＦ６遺伝子から選択される少なくとも１種のＲＮＡバイオマーカーの発現レベルを決定する工程と；

ｂ）　前記発現レベルを参照サンプルの発現レベルと比較する工程と

を含む、ＨＤＡＣ６阻害剤の有効用量および／または生物学的活性を評価するための方法である。

【００４８】

好ましい実施形態によれば、前記方法は、癌に罹患した患者の臨床治療中のＨＤＡＣ６阻害剤の有効用量および／または生物学的活性を評価する。

【００４９】

さらなる好ましい実施形態において、前記方法は、癌に罹患した患者の臨床治療後に、ＨＤＡＣ６阻害剤の有効用量および／または生物学的活性を評価する。これは、治療後の患者の状態を評価するのに有用であり得る。

【００５０】

さらなる好ましい実施形態によれば、前記方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏの方法である。

【００５１】

好ましくは、前記参照サンプルは、ＨＤＡＣ阻害剤で治療されていない健常被験体標本、ＨＤＡＣ阻害剤で治療されていない癌に罹患した被験体標本、またはＨＤＡＣ阻害剤による治療の開始時（ｔ＝０）の被験体に由来する。

【００５２】
好ましい実施形態によれば、前記ＨＤＡＣ阻害剤は、ツバシン、ツバスタチン、ネクスツラスタット(nexturastat)、ＡＣＹ－１２１５、ＡＣＹ－７３８、ＡＣＹ－１０８３、ＫＡ２５０７、Ｔ５１８、ＳＷ１００またはＮ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミド（ＩＴＦ３７５６）から選択され、好ましくは、前記ＨＤＡＣ阻害剤は、化合物Ｎ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミドである。
【００５３】
好ましい実施形態によれば、本発明の方法は、ｃ）臨床治療に対する応答性または非応答性として被験体を分類する工程をさらに含む。
【００５４】
好ましくは、癌に罹患した患者は、少なくとも１つのＲＮＡバイオマーカーの発現値が発現値の閾値以上であるか以下であるかに基づいて、臨床治療に対する応答性または非応答性として分類される。
【００５５】
１つの例示的な実施形態において、発現値の閾値より大きいサンプルの発現値は、抗癌治療に応答する患者を示す。別の例示的な実施形態において、発現値の閾値未満のサンプルの発現値は、抗癌治療に対して非応答性の患者を示す。
【００５６】
別の例示的な実施形態において、発現値の閾値より大きいサンプルの発現値は、抗癌治療処置に非応答性の患者を示す。別の例示的な実施形態において、発現値の閾値未満のサンプルの発現値は、抗癌治療に対して応答性である患者を示す。たとえば、ＭＭＰ９のダウンレギュレーション、ＩＲＦ６およびＣＤ４０のアップレギュレーションは、レスポンダー動物と相関することが、実施例において実証されている。
【００５７】
さらなる例示的な実施形態において、発現値の閾値未満のサンプルの発現値は、患者がＨＤＡＣ６阻害剤に非応答性である癌種を有すること、または非応答性癌種を発症する危険性があることを示す。別の例示的な実施形態において、発現値の閾値より大きいサンプルの発現値は、患者がＨＤＡＣ６阻害剤に応答性である癌種を有すること、または応答性癌種を発症する危険性があることを示す。別の例示的な実施形態において、閾値スコアより大きいサンプル発現スコアは、患者が臨床的予後が良好な癌サブタイプを有することを示す。別の例示的な実施形態では、閾値スコアを下回るサンプル発現スコアは、臨床的予後不良の癌サブタイプを有する患者を示す。
【００５８】
さらなる好ましい実施形態によれば、本発明の方法において、バイオマーカーＮＢＥＡＬ２、ＬＴＢＰ４、ＡＮＸＡ６、ＦＡＴＰ１／ＳＣＬ２７ａ１．ＣＤ４０またはＩＲＦ６の発現レベルは、ＨＤＡＣ６阻害剤によってアップレギュレートされ、ＲＮＡバイオマーカーＣＤ８４、ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａ、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ２、ＳＴＡＢ１、ＣＤ１６３、ＣＤ２０４／ＭＳＲ１、ＣＤ２０６／ＭＲＣ１、ＡＤＡ、ＣＤ２７６またはＭＭＰ９の発現レベルは、ＨＤＡＣ６阻害剤によってダウンレギュレートされる。
【００５９】
好ましい実施形態によれば、本発明の方法において、少なくともＲＮＡバイオマーカーＳＴＡＢ１、ＣＤ８４、ＣＤ２０６／ＭＲＣ１、ＭＭＰ９、ＣＤ１６３、ＣＤ４０およびＩＲＦ６の発現レベルを評価し、好ましくは、少なくともＲＮＡバイオマーカーＭＭＰ９、ＣＤ４０およびＩＲＦ６の発現レベルを評価する。
【００６０】
さらに好ましい実施形態によれば、前述の癌は、副腎皮質細胞癌、肛門癌、星状細胞腫、皮膚の基底細胞癌、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、原発不明癌、心臓腫瘍、子宮頸癌、胆管癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、眼内黒色腫、卵管癌、胆嚢癌、胃癌、消化管カルチノイ

ド腫瘍、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、胚細胞腫瘍、精巣癌、頭頸部癌、肝細胞癌、島細胞腫瘍、膵神経内分泌腫瘍、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、白血病、肺癌（非小細胞、小細胞、胸膜芽腫および気管気管支腫瘍）、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、ＮＵＴ遺伝子変化を伴う正中線管がん、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍、骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性新生物、神経芽腫、卵巣癌、膵癌、パラガングリオーマ、副甲状腺癌、陰茎癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、原発性腹膜癌、前立腺癌、腎細胞癌、網膜芽細胞腫、肉腫、皮膚の扁平上皮癌、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺癌、腎盂尿管移行細胞癌、子宮癌、膣癌、血管腫瘍、外陰がんおよびウィルムス腫瘍から選択される。

【００６１】

好ましくは、前記癌は、黒色腫、腎細胞癌、非小細胞肺癌および結腸直腸癌から選択される。

【００６２】

好ましくは、生物学的サンプルは組織サンプルまたは体液であり、好ましくは、前記組織サンプルは腫瘍生検材料または血球であり、好ましくは、前記体液は血液、血清または血漿である。

【００６３】

より好ましくは、前記血液細胞は、単球または末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。

【００６４】

本発明によれば、前記単球は、癌に罹患した患者から単離され得るか、または単球の細胞培養物がＨＤＡＣ６阻害剤で処理されたｉｎ　ｖｉｔｒｏプレートによって単離され得る。

【００６５】

好ましい実施形態によれば、バイオマーカーはＲＮＡ転写物である。本明細書で使用される場合、「ＲＮＡ転写物」は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、交互スプライシングされたｍＲＮＡ、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、小核ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、およびアンチセンスＲＮＡを含む、コードＲＮＡおよび非コードＲＮＡの両方を指す。生物学的サンプル中のｍＲＮＡの測定は、生物学的サンプル中の対応するタンパク質および遺伝子のレベルの検出の代用として使用することができる。したがって、本明細書に記載のバイオマーカーまたはバイオマーカーパネルのいずれも、適切なＲＮＡを検出することによって検出することもできる。

【００６６】

好ましい実施形態によれば、ステップａ）におけるバイオマーカーの発現レベルは、ＲＮＡ配列決定、定量的ＲＴ－ＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）、デジタルＰＣＲ、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘマイクロアレイ、カスタムマイクロアレイまたはナノストリングテクノロジーによって検出される。

【００６７】

バイオマーカー発現プロファイリングの方法は、定量的ＰＣＲ、ＮＧＳ、ノーザンブロット、サザンブロット、マイクロアレイ、ＳＡＧＥ、または特定のバイオマーカーのＲＮＡ、ｍＲＮＡ、またはタンパク質レベルを測定できる他の技術を含むが、それらに限定されない。

【００６８】

出発物質の量の違い、抽出および増幅反応の効率の変化を補正するために、当業者に公知の方法を用いて、所与のサンプルの全体的な発現データを正規化することができる。

【００６９】

好ましい実施形態によれば、本発明の方法の工程ａ）は、以下のサブ工程：

（ｉ）　ＰＢＭＣおよび／または単球を単離する工程；

（ｉｉ）　ＲＮＡサンプルを抽出する工程；

（ｉｉｉ）　ＣＤ８４、ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａ、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ２、ＳＴＡＢ１、ＣＤ１６３、ＣＤ２０４／ＭＳＲ１、ＣＤ４０、ＣＤ２０６／ＭＣＲ１、ＭＭＰ

９、ＮＢＥＡＬ２、ＬＴＢＰ４、ＡＮＸＡ６、ＦＡＴＰ１／ＳＬＣ２７ａ１、ＡＤＡ、ＣＤ２７６およびＩＲＦ６遺伝子から選択される少なくとも１種のＲＮＡバイオマーカーを定量する工程；
（ｉｖ）　定量化されたＲＮＡバイオマーカーのバイオインフォマティクス解析により、発現量の異なるバイオマーカーを評価する工程；および
（ｖ）　ポイント（ｉｖ）から得られた結果を、レスポンダーまたは非レスポンダー患者と相関させる工程
を実施する。
【００７０】
本発明のさらなる実施形態は、ＨＤＡＣ６阻害剤の有効用量および／または生物学的活性を評価するためのキットであって、マルチウェルプレートと、検出されるＲＮＡバイオマーカーそれぞれの発現レベルを決定するための適切なプライマーおよび／またはプローブとを含むキットである。
【００７１】
好ましくは、前記ＲＮＡバイオマーカーは、ＣＤ８４、ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａ、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ２、ＳＴＡＢ１、ＣＤ１６３、ＣＤ２０４／ＭＳＲ１、ＣＤ４０、ＣＤ２０６／ＭＣＲ１、ＭＭＰ９、ＮＢＥＡＬ２、ＬＴＢＰ４、ＡＮＸＡ６、ＦＡＴＰ１／ＳＬＣ２７ａ１、ＡＤＡ、ＣＤ２７６およびＩＲＦ６遺伝子から選択される。
【００７２】
さらに好ましい実施形態は、ＨＤＡＣ６阻害剤の有効用量および／または生物学的活性の評価に使用するためのキットであって、マルチウェルプレートと、ＣＤ８４、ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａ、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ２、ＳＴＡＢ１、ＣＤ１６３、ＣＤ２０４／ＭＳＲ１、ＣＤ４０、ＣＤ２０６／ＭＣＲ１、ＭＭＰ９、ＮＢＥＡＬ２、ＬＴＢＰ４、ＡＮＸＡ６、ＦＡＴＰ１／ＳＬＣ２７ａ１、ＡＤＡ、ＣＤ２７６およびＩＲＦ６遺伝子から選択される少なくとも１種のＲＮＡバイオマーカーの発現レベルを決定するための適切なプライマーおよび／またはプローブとを含むキットである。
【実施例】
【００７３】
（材料と方法）
（単球精製とＴＮＦ－α活性化）
実験に使用したＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ勾配（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ）上で分離された健常ドナーのバフィーコート（Buffy Coats）（すべてのサンプルは輸血に必要な伝染性疾患が陰性であると判断された）から得た。
【００７４】
単球は、製造者の指示に従ってＰａｎ　Ｍｏｎｏｃｙｔｅｓ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　（Ｍｉｌｔｅｎｙ）を用いて、１００×１０^{6}個のＰＢＭＣからネガティブセレクションにより精製した。Ｐａｎ　Ｍｏｎｏｃｙｔｅ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔにより、ヒトＰＢＭＣから無傷の単球を単離し、典型的単球（ＣＤ１４$^{++}$ＣＤ１６$^{-}$）、非典型的単球（ＣＤ１４$^{+}$ＣＤ１６$^{++}$）および中間的単球（ＣＤ１４$^{++}$ＣＤ１６$^{+}$）の同時濃縮を達成する。Ｔ細胞、ＮＫ細胞、Ｂ細胞、樹状細胞、好塩基球などの非単球は、ビオチン複合体形成された抗体と抗ビオチンマイクロビーズ（MicroBeads）のカクテルを用いて間接的に磁性標識される。簡潔には、４００μＬの緩衝液（ＰＢＳ　１Ｘ、０，５％ＢＳＡ、および２ｍＭのＥＤＴＡ）、１００μＬのＦｃＲ遮断薬（FcR Blocking Reagent）、および１００μＬのビオチン抗体カクテル（Biotin-Antibody Cocktail）を、ＰＢＭＣ（５分間にわたる３００×ｇの遠心によりＰＢＳで予め洗浄した）に添加し、冷蔵庫（２℃～８℃）で５分間にわたって混合およびインキュベートする。インキュベーション後、３００μＬの緩衝液と２００μＬの抗ビオチンマイクロビーズを細胞に添加し、冷蔵庫で１０分間さらに混合およびインキュベートする。インキュベーション後、細胞を引き続く磁気細胞分離で処理した。細胞懸濁液をカラム上に塗布し、富化された単球に相当する非標識細胞を含有する流分（フロースルー（flow-through））を集めた

。精製された単球を、５分間３００×ｇの遠心により緩衝液（Buffer）で洗浄し、ＰＢＳ中で計数した。精製した単球（１，０×１０^{6}／ｍｌ）を、１２ウェルプレート中、最終容量１ｍｌの完全培地（ＲＰＭＩ（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ）、ＦＣＳ１０％、およびペニシリン／ストレプトマイシン１ｘ（Ｓｉｇｍａ））中で、２時間、１μＭのＩＴＦ３７５６またはＤＭＳＯ（０．００５％）で前処理した。その後、細胞を、４時間、ＴＮＦ－α（１００ｎｇ／ｍＬ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）で刺激したか、または刺激しなかった。ＩＴＦ３７５６およびＴＮＦ－αを用いてインキュベートした後、細胞を集め、５分間、３００×ｇの遠心によりＰＢＳで洗浄し、－８０℃で保存した。

【００７５】

２分間かけてサンプルをベンチ上で解凍し、製造者の指示に従って、Ｔｒｉｚｏｌ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて全ＲＮＡを抽出した。簡潔には、Ｔｒｉｚｏｌ試薬（５～１０×１０^{6}細胞あたり０．７５ｍｌのＴｒｉｚｏｌ）をサンプルに加え、サンプルを室温（ＲＴ）で５分間インキュベートした。インキュベーション後、クロロホルム（０．７５ｍＬのＴｒｉｚｏｌあたり１５０μＬ）を加え、室温（ＲＴ）で３分間インキュベートした後、１４分間にわたって１２０００×ｇ、４℃においてサンプルを遠心した。遠心後、混合物は３相に分離し、ＲＮＡは水相に残る。各サンプル毎に水相を取り出して新しいチューブに入れ、イソプロパノール（０．７５ｍＬのＴｒｉｚｏｌあたり０．３７５ｍＬ）を各チューブに加えた。サンプルを冷蔵庫（２～８℃）で３０分間インキュベートした。上清を除去し、７５％エタノール（０．７５ｍｌのＴｒｉｚｏｌあたり０．７５ｍＬ）を加えた。５分間にわたって、７５００×ｇ、４℃で遠心し、上清を廃棄した。５～１０分間ベンチ上でＲＮＡを風乾した。次いで、ＲＮＡサンプルを水（１０～５０μＬ）に再懸濁させた。

【００７６】

ＮａｎｏＤｒｏｐ １０００ ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて２６０ｎｍの吸光度を測定することにより、ＲＮＡ濃度を決定した。２８０ｎｍの吸光度も測定することで、ＲＮＡ汚染の程度を推定することも可能である。２６０ｎｍ／２８０ｎｍの吸光度比は、タンパク質の混入の同定を可能にする。２６０ｎｍ／２８０ｎｍの吸光度比が約２であれば、サンプルは十分に純粋であるとみなされた。

【００７７】

Ａｇｉｌｅｎｔ ＲＮＡ ６０００ Ｐｉｃｏキット（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を備えるＡｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ装置（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いるキャピラリー電気泳動により、抽出されたＲＮＡの完全性を評価した。このシステムは、濃度既知の高純度ＲＮＡラダーを基準として使用し、最大１２サンプルの同時分析を可能にする。プロトコルは、全てのサンプルおよびＲＮＡラダーを７０℃で２分間変性させる工程と、蛍光インターカレーターを含む実行用ゲル（ラン・ゲル（run gel））を用いてチップを準備する工程を含む。ＲＮＡ分子はインターカレーター分子と結合し、電気泳動によって分離された分子の蛍光を装置によって検出する。

【００７８】

ゲルは、５５０μＬのＲＮＡゲルマトリックスをスピンフィルター（キットに付属）中にピペット分注して調製した。１０分間１５００×ｇで遠心した後、ろ過したゲルの６５μＬアリコートを調製した。ＲＮＡ染料濃縮液を３０分間ＲＴで平衡化した後、ボルテックス処理およびスピンダウン処理を実施して、６５μＬのろ過したゲルのアリコートに１μＬの染料を添加した。ゲル－色素混合物を混合し、１０分間１３０００×ｇで遠心した。新しいＲＮＡチップをチッププライミングステーションに配置し、割り当てられたウェルに９μＬのゲル－色素混合物をピペット分注し、プランジャーによってチップ中に分布させた。１１個のサンプルウェル全ておよびラダーウェルに、５μＬのＲＮＡマーカーを添加した。次に、ラダーウェル内のラダー１μＬと１１個のサンプルウェル内の各サンプル１μＬをチップに添加した。１分間、２４００ｒｐｍでチップをボルテックス処理し、

５分以内にＡｇｉｌｅｎｔ　２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ装置を実行した。

【００７９】

ソフトウェアは、ｒＲＮＡ　２８Ｓ／ｒＲＮＡ　１８Ｓの比の関数として各サンプルに１から１０までの値を割り当てるアルゴリズムに基づいて計算されるＲＮＡ品質指数（ＲＱＩ）を評価することにより、各サンプルの純度の推定値を得ることを可能にする。この指数が７．５以上である場合、サンプルは高純度であるとみなされる。

【００８０】

［ＲＮＡｓｅｑ］

ＲＮＡ配列データを作成するために行った実験手順のスキームを図１に示す。

【００８１】

（ＲＮＡ抽出）

ＲＮＡサンプルの量と完全性／純度を測定するため、最初にＲＮＡ　６０００　Ｌａｂ　Ｃｈｉｐ（登録商標）　ｋｉｔ　（Ａｇｉｌｅｎｔ＃５０６７－１５１１）を用いるＡｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒでチェックコントロールを行った。Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒは、マイクロ流体チップ、ゲル充填チャンネルでの電圧誘起サイズ分離、小型化したスケールにおけるレーザー誘起蛍光（ＬＩＦ）検出の組み合わせに基づくバイオ分析装置である。ＲＮＡ　Ｉｎｔｅｇｒｉｔｙ　Ｎｕｍｂｅｒ　（ＲＩＮ）ソフトウェアアルゴリズムは、１から１０までの番号付けシステム（１が最も劣化しており、１０が最も完全である）に基づいて、全ＲＮＡの格付けを実施することができる。ＲＩＮが７．５以下のサンプルはすべて廃棄され、その他のサンプルはライブラリー調製および配列決定のために処理された。

【００８２】

（ＰｏｌｙＡ　ｍＲＮＡの選択）

ＴｒｕＳｅｑ　ＲＮＡ　Ｓａｍｐｌｅ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎマニュアル（Ｉｌｌｕｍｉｎａ　＃　１５０１５０５０）で示唆されているように、２ラウンドの精製（ポジティブセレクション）を用いて、ポリＴオリゴ付着磁気ビーズを用いて、２００ｎｇの全ＲＮＡからｍＲＮＡを単離した。

【００８３】

（ライブラリー調製およびｃＤＮＡ合成）

精製したサンプルをＴｒｕＳｅｑ　ＲＮＡ－Ｓｅｑ　ｖ２　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｋｉｔを用いて処理した。簡潔には、Ｉｌｌｕｍｉｎａ専売の断片化緩衝液中、高温下で二価陽イオンを用いて化学的断片化を行った。ランダムなオリゴヌクレオチドとＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ＃　１８０６４－０１４）を用いて第１ストランドｃＤＮＡを合成した。引き続いて、ＤＮＡポリメラーゼＩおよびＲＮアーゼＨを用いて、第２ストランドを実施した。断片のサイズ選択を可能にするＡｇｅｎｃｏｕｒｔ　ＡＭＰｕｒｅ　ＸＰビーズ精製（Ｂｅｃｋｍａｎ＃Ａ６３８８２）の後、エキソヌクレアーゼ／ポリメラーゼ活性によりオーバーハングを鈍端に変換し、酵素を除去した。ＤＮＡ断片の３’末端をアデニル化し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＴｒｕＳｅｑ　ＰＥアダプターでインデックス化されたオリゴヌクレオチドをライゲーションし、二重精製し、ＰＣＲ反応でＩｌｌｕｍｉｎａ　ＰＣＲプライマーカクテルを用いて選択的に富化した。ＰＣＲライブラリー産物をＡＭＰｕｒｅ　ＸＰビーズで精製し、Ａｇｉｌｅｎｔ　２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒにおいて Ａｇｉｌｅｎｔ　ＤＮＡ　１０００アッセイ（Ａｇｉｌｅｎｔ＃５０６７－１５０４）を用いて定性的チェックを行い、Ｑｕｂｉｔ　２．０　Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｅｒ　ｗｉｔｈ　ｄｓＤＮＡ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅ　Ａｓｓａｙ　ｋｉｔ　（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ＃Ｑ３２８５０）を用いて定量した。等モル濃度の各サンプルを得るためにインデックス化された個々のライブラリーをプールし、クラスター生成のために処理した。

【００８４】

（配列決定）

ｃＢｏｔシステム（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）およびＴｒｕＳｅｑ　ＰＥ　Ｃｌｕｓｔｅｒ

Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｋｉｔ ｖ３（Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＃ ＰＥ－４０１－３００１）を用いて、プールしたライブラリーをシングルエンドフローセルに充填した。ＴｒｕＳｅｑテクノロジーは、独自の可逆的終端部位ベースのメソッド５（２０２１年３月１日）を用いた超並列シーケンスに対応しており、これは成長中のＤＮＡ鎖に組み込まれた１塩基の検出を可能とする。実施の終点において、ＴｒｕＳｅｑ ＳＢＳ ｖ３試薬（Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＃ ＦＣ－４０１－３００１）を使用して、ＨｉＳｅｑ２５００装置（イルミナ（Illumina））で、約３０Ｍの７５ｂｐシングルエンドリード（single-end reads）を作成した。最後に、Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｐｉｐｅｌｉｎｅデータ解析に従って、デマルチプレックスＦＡＳＴＱファイルを作成した。

【００８５】

（バイオインフォマティクス分析）

TrimGalore http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/（非特許文献１３）を用いて、シングルエンドリードから、低品質末端およびアダプターをトリミングした。転写量はKallisto (Bray et al, 2016)（非特許文献１４）を用いて推定し、ＤｅＳｅｑ２ Ｒ ｐａｃｋａｇｅ（Love et al, 2014（非特許文献１５））およびＦＤＲ補正ｐ値＜０．０５を用いて、識別的発現（ＤＥ）された遺伝子（differentially expressed genes（発現変動遺伝子））を同定した。

【００８６】

（定量的リアルタイムＰＣＲ）

（材料および方法）

（試験品）

【００８７】

【表１】

識別番号	ＩＴＦ３７５６
ロット／バッチ番号	９
純度	＞９５％
分子式	$C_{13}H_{11}N_5O_2S$
分子量	３０１．３２ ｇ／ｍｏｌ
有効期限／再試験日	１１／２０２１
保存条件	－２０℃
供給元および製造者	イタルファルマコ（Italfarmaco）ＳｐＡ
特別取扱注意事項	試験を実施するすべての人員の通常の保護（マスク、手袋、眼鏡）

【００８８】

（試験品作業溶液）

試験品をＤＭＳＯに溶解し、必要な最終濃度まで適切な培地中へと希釈した。

【００８９】

（実験デザイン）

また、本発明の実現可能性を拡大するために、１７遺伝子のｍＲＮＡ発現を調節するＩＴＦ３７５６の可能性をＰＢＭＣにおいても試験した。遺伝子発現は、処理細胞およびビヒクル処理細胞における上記遺伝子の発現を比較することにより決定された。

【００９０】

（試験品によるＰＢＭＣの処理）

１×１０^{6}細胞／ｍｌの密度において、ＰＢＭＣをＲＰＭＩ １６４０培地（ダッチ改変、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）にＰＢＭＣを再懸濁させた。細胞を６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に、３ｍｌ毎ウェルの量で平板培養した。４つの濃度（０．２５、０．５、１および２μＭ）のＩＴＦ３５７６で細胞を処理した。三重反復試験のために、各処

理濃度を３つのウェルで反復した。ビヒクル（ＤＭＳＯ　０．０５％）で処理した細胞も、同一密度および同一容量で平板培養した。４時間にわたって、３７℃、５％のCO_2において、プレートをインキュベートした。培養終了時に、全ＲＮＡ抽出のために細胞を集めた。

【００９１】

（ＲＮＡ抽出とレトロ転写（retro-transcription））

試験化合物による処理後、ＰＢＭＣを６ウェルプレートから抜き取り、１５ｍｌのチューブ（Ｆａｌｃｏｎ）に集めた。ウェルを１ｍＬのＰＢＳ　ｐＨ７．４（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）で１回洗浄し、洗浄液を集めた細胞懸濁液に加えた。細胞懸濁液を、１０分間にわたって１５００ｒｐｍで遠心した。上清を廃棄し、ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）の溶解バッファー３５０μＬを細胞ペレットに加えた。溶解した細胞を上下に１０回ピペッティングし、細胞デブリを分散させた。その後、ＤＮアーゼ工程を含むＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　ｋｉｔのプロトコルと同様に、ＲＮＡ抽出手順を実施した。

【００９２】

Ｎａｎｏ　Ｄｒｏｐ　１０００分光光度計を用いて、ＲＮＡ濃度を決定した。ＲＮＡをヌクレアーゼ不含水（Ａｍｂｉｏｎ）を用い、１６μＬの体積中で、ＲＮＡを５０ｎｇ／ｕｌに希釈した。以下に示すように、ＲＮＡに対してＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＶＩＬＯ　ＩＶ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加した。

【００９３】

【表２】

第１表　増幅用に９６ウェルプレートのウェルに添加した試薬

	容量／ウェル（μＬ）
Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＶＩＬＯ　ＩＶ	４
ｃＤＮＡ（５０ｎｇ／ｕＬ）	１６
全体積	２０

【００９４】

ｉＣｙｃｌｅｒ　ｉＱＴＭ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上の９６ウェルプレートにおいて、２５℃で１０分間、５０℃で１０分間、８５℃で５分間の熱サイクルを用いて、逆転写反応を行った。次に、得られたｃＤＮＡの２０μＬをＴＥバッファー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）４０μＬにより、最終理論濃度１３．３ｎｇ／μＬに希釈した。

【００９５】

（遺伝子発現の検出）

ＴａｑＭａｎ　２０ｘ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ａｓｓａｙ試薬（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を遺伝子転写産物の検出に用い、これを第２表に示した。

【００９６】

【表３】

第２表　ｑＰＣＲに使用したＴａｑＭａｎ分析の特徴

遺伝子名	分析名	スパン エキソン	アンプリコン長 （ｂｐ）
NBEAL2	Hs01035331_g1	イエス	７３
SLC27A1	Hs01587911_m1	イエス	１２０
LTBP4	Hs00943217_m1	イエス	６１
ANXA6	Hs01049082_m1	イエス	６８
IRF6	Hs00196213_m1	イエス	９３
STAB1	Hs00248439_m1	イエス	７９
CD84	Hs01547121_m1	イエス	７５
CD276/B7-H3	Hs00987207_m1	イエス	６５
RANK/TNFRSF11A	Hs00921372_m1	イエス	７５
CXCL2	Hs00601974_m1	イエス	１００
CXCL3	Hs00171061-m1	イエス	９９
PD-L1/CD274	Hs00204257_m1	イエス	７７
CD206/MRC1	Hs02832367_g1	イエス	８１
CD204/MSR1	Hs00234007_m1	イエス	６３
CD163	Hs00174705_m1	イエス	７２
ADA	Hs01110947_m1	イエス	７６
MMP-9	Hs00957555_m1	イエス	７９
ハウスキーピング遺伝子			
UBC	Hs00824723_m1	イエス	７１
B2M	Hs99999907_m1	イエス	７５
HPRT1	Hs99999909_m1	イエス	１００

【００９７】

ＣＦＸ　９６　Ｔｏｕｃｈ　Ｒｅａｌ　ｔｉｍｅ　ＰＣＲ検出器システム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に接続したＣＦＸ　Ｃ１０００ＴＭ接触サーマルサイクラーを用いて、リアルタイムＰＣＲを行った。９６ウェルプレート（Ｈａｒｄ　Ｓｈｅｌｌ　ＰＣＲ　ｐｌａｔｅｓ　Ｂｉｏ－Ｒａｄ）中で、ＡｍｐｌｉＴａｑ　Ｇｏｌｄ（登録商標）　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを含有するＵｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ試薬（Ａｐｐｌｉｅｄ社製）を用いて、ｑＰＣＲ反応を行った。４０ｎｇのテンプレートに相当する３μＬのｃＤＮＡをＰＣＲ反応試薬に加え、以下に示すように総量を１５μＬとした：

【００９８】

生データ収集のために、閾値サイクル（Ｃｔ）値を報告する自動エクセルレポートをエクスポートし、引き続いて発現調節の計算のために精緻化(elaborated)された。

【００９９】

（データ取得）

処理サンプルおよび非処理サンプル中のｍＲＮＡ濃度を比較して、ｍＲＮＡ発言調節のレベルを評価した。全てのデータを、対応するサンプルの３種のハウスキーピング遺伝子（基準遺伝子：ＵＢＣ、Ｂ２Ｍ、ＨＰＲＴ１）の平均発現シグナルに対して正規化した。

【０１００】

試験品の調節能力を決定するために、「$2^{-\Delta\Delta CT}$」法を用いた。

【０１０１】

各処理条件と各標的について、単一複製物として、$2^{-\Delta\Delta CT}$を計算した

$-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct, \text{処理} - \Delta Ct, \text{非処理})$

$\Delta Ct, \text{処理} = Ct\ \text{標的}\ \text{処理} - Ct\ \text{基準}\ \text{処理}$

ΔＣｔ，非処理 ＝ Ｃｔ 標的 非処理 － Ｃｔ 基準 非処理
Ｃｔ 標的 非処理は、３つの非処理複製物の平均とであることを意図する。
Ｃｔ 基準 処理は、３つのハウスキーピング遺伝子の単一複製物の平均値であることを意図する。
Ｃｔ 基準 非処理は、全ての非処理複製物に関する３つのハウスキーピング遺伝子のＣｔ値の平均値であることが意図されている。
１より小さい$2^{-\Delta\Delta CT}$値（下方調節）を示す処理サンプルについては、非処理の対照$2^{-\Delta\Delta CT}$値（１に相当、調節なし）と処理サンプル$2^{-\Delta\Delta CT}$値との間の比として倍率調節値を、報告し、下方調節を略述するためにマイナス記号を加えた。

【０１０２】

$2^{-\Delta\Delta CT}$値が１より大きい場合は上方調節である。非処理の対照$2^{-\Delta\Delta CT}$値（１に相当、調節なし）と処理サンプル$2^{-\Delta\Delta CT}$値との比として、倍率調節値を報告した。

【０１０３】

（コンピュータシステム）

この研究でデータを取得し定量化するために使用されたコンピュータシステムには、以下のシステムを含む。

【０１０４】

【表４】

システム名	機能
Ｓｐｙｌｏｇ ｖ １．１	冷蔵庫および冷凍庫の電子温度監視システム。 製造業者：ＡＨＳＩ
ＣＦＸ ９６ Ｔｏｕｃｈ	リアルタイムＰＣＲ検出器システム。 製造業者：Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ
ＮａｎｏＤｒｏｐ １０００	分光光度計 製造業者：ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ
ｉＣｙｃｌｅｒ ｉＱＴＭ	サーモサイクラー 製造業者：Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ

【０１０５】

（統計分析）

全てのデータを平均値±標準偏差で与えた。全てのデータは、３重反復実験の平均値であった。グループ間（処理サンプル対非処理サンプル）の統計的評価は、両側検定のステューデントのｔ検定を用いて行った。

【０１０６】

グラフ中、閾値ラインは、ビヒクル処理対照（１）からの±０．７（０．７は、全サンプルに関するハウスキーピング遺伝子の倍率変化の標準偏差（ＳＤ）の３倍である）に相当する。

【０１０７】

＊＊Ｐ値＜０．０５、＊Ｐ値＜０．１。

【０１０８】

（５．参考文献）

１． 「リアルタイム定量ＰＣＲと$2^{-\Delta\Delta CT}$法を用いた相対的遺伝子発現データの解析」、ＫＪ Livakら、Methods 25, 402-408 (2001)（非特許文献１６）。

【０１０９】

（結果）

（ＲＮＡｓｅｑ）

４時間の単球のインキュベート後、ＲＮＡｓｅｑ解析は、ＩＴＦ３７５６で処理されたサンプルにおいて、多数のｐａｄｊ＜０．０５を有する識別的発現された遺伝子を同定したが、ＴＮＦ－αによる処理、および、ＩＴＦ３７５６＋ＴＮＦ－αの組み合わせでは、ｐａｄｊ＜０．０５の調節は生じなかった。

【０１１０】

第３表は、指示された群における、各処理サンプルおよびビヒクル処理対照サンプル（ｄｏｎ）における上方調節および下方調節された遺伝子の数を示す。

【０１１１】

【表５】

第３表　単球の処理によって調節された遺伝子の数

	アップレギュレーションされた遺伝子	ダウンレギュレーションされた遺伝子
ＩＴＦ３７５６／ｄｏｎ	１４９９	１５０３
ＩＴＦ３７５６＿ＴＮＦ－α／ｄｏｎ	２２８２	２３２９
ＴＮＦ－α／ｄｏｎ　１５６３	１５６３	１６８８

【０１１２】

サンプル間距離分析および主成分分析（それぞれ、図２Ａおよび図２Ｂ）は、治療法によって４つの異なる集団が同定できることを示した。このことは、異なる集団における遺伝子発現が明らかに異なること、および治療によるサンプルの集積性を示している。全体として、両分析とも異なる治療に対して均質な応答を示す。異なる反応が異なるドナーから予想されるので、これは驚くべきことである。

【０１１３】

次に、ＴＮＦ－α、ＩＴＦ３７５６、ＩＴＦ３７５６＋ＴＮＦ－αによって選択的に上方調節または下方調節された遺伝子を同定した。図３Ａおよび図３Ｂは、それぞれ、対照に対してアップレギュレートまたはダウンレギュレートされた遺伝子のヴェン図（Ｖｅｎｎ ｄｉａｇｒａｍｓ）である。

【０１１４】

この図は、ＩＴＦ３７５６によって特異的にアップレギュレートされた遺伝子は５３７個あり、特異的にダウンレギュレートされた遺伝子は３８６個あることを示す。これらの遺伝子から、ＩＴＦ３７５６に対する特異的なシグネチャーを同定することができたので、本発明者らはこれらの遺伝子に特に興味を持った。

【０１１５】

最初にＰＤ－Ｌ１（ＣＤ２７４）の発現を解析し、ＴＮＦ－αによる発現のアップレギュレーションおよびＩＴＦ３７５６による発現の阻害を確認した。図４は、ＴＮＦ－α＋ＩＴＦ３７５６で処理した細胞において、ＩＴＦ３７５６がＰＤ－Ｌ１遺伝子発現の強力なダウンレギュレーション（５９％）を誘導したことを示している。

【０１１６】

次に、上方調節または下方調節された遺伝子の中から、ＩＴＦ３７５６の生物学的活性に影響を与えうる遺伝子を探索した。第４表に選択した遺伝子をまとめた。

【０１１７】

【表６】

第４表　ＩＴＦ３７５６の生物学的活性に影響を与える可能性のある、選択された上方調節および下方調節された遺伝子

アップレギュレートされた遺伝子	ダウンレギュレートされた遺伝子	ＴＮＦ－αによりダウンレギュレートされた遺伝子
ＮＢＥＡＬ２	ＣＤ８４	ＣＤ２７４（ＰＤ－Ｌ１）
ＳＬＣ２７Ａ１	ＣＤ２７６	
ＬＴＢＰ４	ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａ	
ＡＮＸＡ６	ＣＸＣＬ２	
ＩＲＦ６	ＣＸＣＬ３	
ＣＤ４０	ＳＴＡＢ１	

【０１１８】

図５Ａに示すように、本発明者らの実験は、ＩＴＦ３７５６がＣＤ８４の発現を強くダウンレギュレートすることを明確に示している。１μＭのＩＴＦ３７５６で処理したヒト単球はＣＤ８４の発現をダウンレギュレートし、このダウンレギュレーションはＴＮＦ－αのような炎症促進性刺激の存在下でさらに増強される。図５Ｂおよび図５Ｃは、それぞれＣＤ８４の概略構造およびＣＤ８４の免疫細胞発現を示す。

【０１１９】

ＲＡＮＫ（ＴＮＦＲＳＦ１１Ａ）およびＲＡＮＫＬ（ＴＮＦＲＳＦ１１）はＴＮＦ受容体スーパーファミリーのメンバーである。ＲＡＮＫは、がん細胞、上皮細胞、腫瘍微小環境のマクロファージを含む、種々の種類の細胞で発現されうる。ＲＡＮＫＬとの相互作用は、腫瘍細胞の増殖および細胞遊走、血管新生、マクロファージの動員（リクルートメント（recruitment））およびＭ２分化をもたらす。ＩＴＦ３７５６は単球上でＲＡＮＫの強力なダウンレギュレーション（図６参照）を誘導し、Ｍ２／前腫瘍マクロファージ分化の阻害の可能性を示唆した。このことは、ＩＴＦ３７５６の存在下でのｉｎ　ｖｉｔｒｏ分化におけるＭ１マクロファージの増加を示した本発明者らのデータと一致している。また、細胞をＴＮＦ－αおよびＩＴＦ３７５６で処理すると、ＲＡＮＫ／ＴＮＦＲＳＦ１１ａのダウンレギュレーションが単独処理に比べて増加することも観察される。

【０１２０】

ケモカインは化学誘引性サイトカインの一群であり、細静脈を介した血液から組織への細胞遊走、あるいはその逆において重要な役割を果たす。ＣＸＣＬ２およびＣＸＣＬ３は、単球性ＭＤＳＣの動員（リクルートメント（recruitment））および生成に関与する２つのケモカインであり、それらの阻害は、ｍｏ－ＭＤＳＣ生成の減少および宿主の免疫学的監視の改善が提案されている（Shiら、2018（非特許文献１７））。図７Ａに示すように、ＩＴＦ３７５６はＣＸＣＬ２の発現を減少させ、ＴＮＦによるアップレギュレーションの誘導を回復させ、正常レベルの発現が確立される。

【０１２１】

ＣＸＣＬ３は、ヒト単球由来樹状細胞の分化および機能に影響を与え、それらを骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）様の表現型に向かわせる、別種のケモカインである。さらに、ＭＤＳＣ自身もＣＸＣＲ２受容体を発現しており、当該受容体は、ＣＸＣＬ３によって活性化され、ＫＲＡＳ変異結腸がんで記載されているような腫瘍微小環境への遊走を促進することができる（Liaoら、(2019) Cancer Cell 35:559-572（非特許文献１８））。図７Ｂに示すように、ＩＴＦ３７５６はこのケモカインＣＸＣＬ３の発現を減少させた。

【０１２２】

それら２種のケモカインに対する活性は、ＲＡＮＫ発現に対する効果とともに、ＩＴＦ３７５６が抑制性骨髄性細胞の表現型に関連する遺伝子の発現をダウンレギュレートすることを示唆している。

【０１２３】
ＳＴＡＢ１はＣｌｅｖｅｒ－１／Ｓｔａｂｉｌｉｎ－１としても知られ、マクロファージおよび単球の免疫抑制的表現型から炎症促進的表現型への表現型変化に関連する、別種の重要な遺伝子である。ＳＴＡＢ１はＩＴＦ３７５６によって強くダウンレギュレートされ、ＴＮＦ－αの存在下では相乗的に減少する（図８）。
【０１２４】
ＩＴＦ３７５６によってアップレギュレーションされる遺伝子のうち、顆粒の成長にリンクされるＢＥＡＣＨドメイン含有タンパク質であるＮＢＥＡＬ２（図９）と、細胞外腔に貯蔵されている間、ＴＧＦ－ａを潜伏状態に維持することによってＴＧＦ－ａの活性化を制御する形質転換成長因子β（ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２、ＴＧＦＢ３）の鍵となる制御因子であるＬＴＢＰ４とを選択した。ＬＴＢＰ４遺伝子はＴＮＦ－α（図１０参照）によって２倍ダウンレギュレートされる。
【０１２５】
本発明者らの結果は、ＩＴＦ３７５６がこのダウンレギュレーションに対抗することを示しているが、その効果は、さらなるアップレギュレーションのない、対照の正常レベルへの回復である。
【０１２６】
図１１は、ＦＡＴＰ１／ＳＬＣ２７Ａ１の発現に対するＩＴＦ３７５６の効果を示している。この遺伝子はマクロファージにおける炎症促進性応答に関与している（Nishiyamaら（２０１８）International Immunopharmacology 55, 205-215（非特許文献１９））ので、マクロファージによって媒介される可能性のある炎症促進性抗腫瘍応答に関与する遺伝子となる。ＩＴＦ３７５６は、ＴＮＦ－αと比較してこの遺伝子に反対の効果を示し、それら２種の組み合わせで細胞を処理すると、遺伝子の基礎発現は維持される。
【０１２７】
骨髄性細胞における炎症促進作用の媒介に関与している可能性のある別種の遺伝子は、インターフェロン調節因子６（ＩＲＦ６）である。ＩＲＦ６は、高度に保存されたヘリックス－ターン－ヘリックスＤＮＡ結合ドメインと、保存性の高くないタンパク質結合ドメインを共有する９つの転写因子のファミリーに属する。大抵のＩＲＦは、ウイルス感染後のインターフェロンの発現を制御している。他のＩＲＦメンバーもＩＴＦ３７５６によって調節されるが、ＩＲＦ６に対して遺伝子発現のより強い変化を及ぼす。
【０１２８】
図１２は、ＩＴＦ３７５６のみがＩＲＦ６発現の調節を誘導し、ＴＮＦ－αまたはその組み合わせは影響を及ぼさなかったことを示している。
【０１２９】
Ａｎｎｅｘｉｎ ６（ＡｎｘＡ６）は、ＩＴＦ３７５６処理により強固なアップレギュレーションを示す別の遺伝子である。図１３に示すように、ＴＮＦ－αの存在下では、アップレギュレーションはさらに強く、おそらく相乗的であろう。
【０１３０】
ＣＤ４０はＴＮＦ受容体スーパーファミリーの一員であり、単球／マクロファージおよび樹状細胞を含む様々な細胞型に発現される。天然のリガンドであるＣＤ４０ＬによるＣＤ４０への結合は、Ｔ細胞を活性化と、抗腫瘍マクロファージの誘導をもたらす。抗腫瘍免疫応答を誘導するためのＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ軸の活性化に対して、いくつかの方法がなされており、最近ではアゴニスト性抗ＣＤ４０抗体の使用がある。生物学的効果および臨床反応はＭＴＤ未満で観察されている。さらに、有害事象は臨床現場で容易に管理可能であるように思われる。ＩＴＦ３７５６によって得られるＣＤ４０遺伝子発現の誘導（図１４）は、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏの両方でこの化合物によって観察される全般的な抗腫瘍免疫刺激に寄与している可能性を示唆する。
【０１３１】
第３表に示すように、多くの遺伝子がＩＴＦ３７５６によって調節された。それらのい

くつかは、腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）の特異的マーカーとして同定されている。本解析は単球について実施されているが、これらの遺伝子の調節は、ヒト腫瘍の細胞量の大部分（最大５０％）を占める主要な自然免疫細胞であるＴＡＭの発生に関係している可能性がある。ＴＡＭは非常に不均質であり、組織特異的な常在マクロファージ、および化学誘引物質勾配による循環からリクルートされた単球から発生する。癌のタイプ、病期、腫瘍内の不均質性は、ＴＡＭ集団に強く影響する。ＴＡＭの大部分は、腫瘍微小環境によってプログラムされて原発性腫瘍の増殖および転移を支持する。それにもかかわらず、腫瘍微小環境はＴＡＭに影響を及ぼし、腫瘍の増殖と転移を制限することができる（Larionovaら、２０２０（非特許文献２０））。第５表に示すように、Ｍ２表現型を持つ腫瘍促進マクロファージは特異的なマーカーを発現し、それらマーカーの一部はＩＴＦ３７５６で処理した単球において強固にダウンレギュレートされ、単球が腫瘍組織にリクルートされた際に抗腫瘍表現型の誘導に関連する可能性を支持する。

【０１３２】

【表７】

第５表　ヒト単球におけるＩＴＦ３７５６によりダウンレギュレートされるＭ２関連遺伝子

Ｍ２マーカー	倍率変化
ＣＤ１６３	－４
ＣＤ２０４／ＭＳＲ１	－２．６
ＣＤ２０６／ＭＲＣ１	－１３．３
ＭＭＰ９	－３．６
ＳＴＡＢ１（stabilin-1／Clever-1）	－１４
ＡＤＡ	－１．９

図８（ｓｔａｂｉｌｉｎ－１）および図１５から図１９は、ＴＮＦ－αおよびＴＮＦ－α＋ＩＴＦ３７５６の組み合わせによってもたらされたものを含む、第５表の遺伝子の調節を示す。

【０１３３】

（ＩＴＦ３７５６はＰＢＭＣにおいてその遺伝子調節活性を発揮する）

末梢血単核球は、単球に比べて簡便かつ迅速な方法で単離することができる。そこで、定量的リアルタイムＰＣＲ法を用いて、この細胞集団に対するＩＴＦ３７５６の遺伝子調節活性を試験した。

【０１３４】

その結果、このアプローチで得られた結果が単球およびＲＮＡｓｅｑで得られた結果と一致することを示した。図２０は、ＳＴＡＢ１（図２０Ａ）とＩＲＦ６（図２０Ｂ）という２種の例示的遺伝子に関して得られた、ＩＴＦ３７５６によってそれぞれダウンモジュレートおよびアップレギュレートされた結果を示す。

【０１３５】

（抗腫瘍応答に関連するバイオマーカーとしてのＩＲＦ６、ＭＭＰ９、ＣＤ４０が同定された、腫瘍微小環境における転写物のｅｘ　ｖｉｖｏ遺伝子発現）

【０１３６】

（材料と方法）

（動物飼育）

（環境順化）

動物を実験室の環境に慣らすため、動物を受領してから処置を開始するまでの間に１４日間の最小順化期間を設けた。

【０１３７】

（飼育（ハウジング（Housing））

マウスを、格子状の鉄製カバーと、粉砕および滅菌した無塵敷料のおがくずを寝台架を

有するマクロロン製ケージ（２６．７×２０．７×ｈ１４ｃｍ）内に収容した（４～５匹／ケージ）。飼料および給水：飲料水は自由摂取とした。研究機関を通して、毎日、各マウスに完全ペレットマウス食（４ＲＦ２１、Ｍｕｃｅｄｏｌａ）を与えた。

【０１３８】

（環境条件）

動物を、温度および湿度を一定に維持した明暗サイクル下で飼育した。動物飼育室のパラメータは以下のように評価した：温度２２±２℃、相対湿度５５±１０％、約１５～２０の濾過空気換気／時間、１２時間の概日周期の人工光（午前７時～午後７時）。

【０１３９】

（環境順化）

動物を実験室の環境に慣らすため、動物を受領してから処置を開始するまでに最低１４日間の順化期間を設けた。

【０１４０】

（ＩＴＦ３７５６（Ｎ－ヒドロキシ－４－（（５－（チオフェン－２－イル）－１Ｈ－テトラゾール－１－イル）メチル）ベンズアミド）

ＩＴＦ３７５６はイタルファルマコ（Italfarmaco）ＳｐＡのＭｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｄｅｐｔ．で合成された。粉末であるバッチ８のＩＴＦ３７５６をＤＭＳＯに溶解し、－２０℃で保存した。

【０１４１】

（薬理学的処理）

【０１４２】

【表８】

第６表　使用されたＩＴＦ３７５６および薬理学的処理

識別表示	ＩＴＦ３７５６　バッチ　８
製剤の種類	ビヒクル中の溶液
用量濃度	５　ｍｇ／ｍｌ
調製の指示	適量の試験化合物を秤量し、１００ｍｇ／ｍＬのＤＭＳＯ溶液を作成する。この溶液をH_2O／ＰＥＧ（１：１）で希釈し、試験品の必要用量（５ｍｇ／ｍｌ溶液）とする。磁気撹拌下に保持する。
調製頻度	試験製剤は薬剤投与当日に調製した。
保存条件	室温
供給元および製造者	イタルファルマコ（Italfarmaco）ＳｐＡ
用量および経路	腹腔内注入による１０ｍｇ／ｋｇ
投与スケジュール	第１０日（月曜日）から第２０日まで毎日１回投与。土曜日および日曜日は薬剤の投与を行わなかった。計８回投与
体積	１０ｍＬ／ｋｇ（５０ｍｇ／ｋｇ）。個々の用量の体積は投与当日に記録された体重に基づいて算出した。

【０１４３】

【表９】

第７表　使用した抗ＰＤ－１抗体および薬理学的処理

識別表示	抗マウス　ＰＤ－１
ロット／バッチ番号	７３５０１９Ｏ１　および　７８６５２０Ｎ１Ｂ
製剤の種類	ＰＢＳ溶液
用量および経路	腹腔内注入による１０ｍｇ／ｋｇ
処理スケジュール	第１０日（月曜日）から第２０日まで隔日。土曜日および日曜日は薬剤投与を行わなかった。計５回投与
調製の指示	７．７ｍｇ／ｍＬ（ロット７３５０１９Ｏ１）または８．３１ｍｇ／ｍＬ（ロット７８６５２０Ｎ１Ｂ）の即時使用可能溶液。次いで、ＰＢＳ中で目標濃度に希釈した。
調製頻度	試験製剤は薬剤投与当日に調製した。
保存条件	＋４℃、遮光
供給元および製造者	ＢｉｏＸＣｅｌｌ

【０１４４】

【表１０】

第８表　使用したアイソタイプ抗体および薬理学的処理

識別表示	Ｒａｔ　ＩｇＧ２ｂ　アイソタイプ対照
ロット／バッチ番号	７０７１１９Ｄ１
製剤の種類	製剤
用量および経路	腹腔内注入による１０ｍｇ／ｋｇ
投与スケジュール	第１０日（月曜日）から第２０日まで隔日投与。土曜日および日曜日は薬剤投与しなかった。計５回投与
調製の指示	９．１６ｍｇ／ｍＬ即時使用可能溶液。次いでＰＢＳ中に目標濃度で希釈した。
調製頻度	試験製剤は投与当日に調製した。
保存条件	＋４℃、遮光
供給元および製造者	ＢｉｏＸＣｅｌｌ

【０１４５】

（研究設計）

成体のＢＡＬＢ／ｃマウスに１×１０^{6}のＣＴ２６腫瘍細胞（リン酸緩衝生理食塩水で１００μＬに希釈）を皮下（ｓ．ｃ．）注射し、腫瘍容積が７５～１００ｍｍ^{3}に達した時点で抗ＰＤ１またはＩＴＦ３７５６で処置し、ＲＮＡｓｅｑによって腫瘍微小環境における遺伝子の調節を調べた。ＩＴＦ３７５６はＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１軸に作用するので、このアプローチは、両処置に特異的且つ共通の遺伝子を同定することを可能にする。全体的なスケジュールを表９に示す。

【０１４６】

【表１１】

第９表　処置の全体的スケジュール

群	マウス	皮下注射ＣＴ２６	処置	頻度	注記
１	５	＋	無処置		
２	５	＋	ITF3756	月～金＋月～水８回投与	５０ｍｐｋ　ｏｓ；最終処置１時間後に屠殺。
３	５	＋	ITF3756	同上	５０　ｍｐｋ　ｏｓ；最終処置４時間後に屠殺。
４	５	＋	ITF3756	同上	５０　ｍｐｋ　ｏｓ；最終処置１８時間後に屠殺。
５	５	＋	ITF3756	同上	５０　ｍｐｋ　ｏｓ；最終処置２４時間後に屠殺。
６	５	＋	ビヒクル	同上	最終処置４時間後に屠殺。
７	５	＋	抗ＰＤ１	月－水－金＋月－水）５回投与	１０ｍｐｋ　ｉｐ；最終処置１時間後に屠殺。
８	５	＋	抗ＰＤ１	同上	１０ｍｐｋ　ｉｐ；最終処置４時間後に屠殺。
９	５	＋	抗ＰＤ１	同上	１０ｍｐｋ　ｉｐ；最終処置１８時間後に屠殺。
１０	５	＋	抗ＰＤ１	同上	１０　ｍｐｋ　ｉｐ；最終処置２４時間後に屠殺。
１１	５	＋	アイソタイプ　ＡＢ	同上	１０μｇ　ｉｐ；最終処置４時間後に屠殺。

【０１４７】

（イムノブロット分析）

マウスの脾臓を、プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を添加したトリトン緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、２５０ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのＮａＦ、１ｍＭのＥＤＴＡ　ｐＨ８、０．１％のＴｒｉｔｏｎ）で溶解して、全細胞抽出液を得た。タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、ＰＶＤＦ膜に移し、１時間、室温（ＲＴ）においてＰＢＳ－Ｔ（リン酸緩衝生理食塩水および５％脱脂乾燥乳を含有する０．１％のＴｗｅｅｎ－２０）でブロッキングした。２時間にわたって、室温における一次抗体とのインキュベーションを行い、続いて適切な西洋ワサビペルオキシダーゼと複合体形成した二次抗体とインキュベートした。検出にはＥＣＬ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ａｍｅｒｓｃｈａｍ）を用いた。使用した抗体は、マウス抗アセチル化チューブリン（Ｓｉｇｍａ、Ｔ６７９３）、マウス抗チューブリン（Ｓｉｇｍａ、Ｔ６０７４）、ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）－ＨＲＰ複合体（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、１７０６５１６）であった。

【０１４８】

ＩｍａｇｅＪソフトウェアを用いてデンシトメトリー解析を行った。

【０１４９】

（ＲＮＡｓｅｑ）

Ｑｉａｇｅｎ抽出キットを用いて瞬間凍結させた腫瘍（flash frozen tumors）からＲＮＡを抽出し、－８０℃で保存した。超高スループットシーケンシングのためにＤＮＡ断片の末端から短いリード（reads）を得るペアエンドシーケンシング（paired-end sequencing）を選択した。さらなる解析の前に、配列決定データの品質チェックを行っ

た。全てのサンプルは７５ヌクレオチド長（７５ｎｔ×２）の配列を含む。

【０１５０】

ＲＮＡ－Ｓｅｑ解析パイプラインにはいくつかの工程を伴う：

１．　リードの品質管理、

２．　低品質リードの除去、

３．　リードのスプライスドアライメント（spliced alignment）、

４．　トランスクリプトーム発現定量解析。

【０１５１】

（リードの品質管理）

品質管理は、統計および回帰グラフおよび表に基づいて生データの配列決定の品質をチェックし、問題が発生する可能性のある領域に関する情報を提供するために使用される方法である。

【０１５２】

この工程を実行するために、高スループットシーケンスデータ用のツールであるＦａｓｔＱＣツール（http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc（非特許文献２１）で入手可能）を使用した。ＦａｓｔＱＣツールは、生データの配列決定に関する情報を視覚化できるｈｔｍｌのレポートを返す。品質値の計算は「ｐｈｒｅｄスコア（phred score）」という履歴に基づいて行われる。

【０１５３】

ｐｈｒｅｄスコアの品質値（ｑ）は、塩基の誤った同定の推定確率（ｓ）を対数スケールに変換する数学的スケールを使用する：

ｑ＝－１０×ｌｏｇ１０（ｓ）。

【０１５４】

０．１（１０％）、０．０１（１％）、０．００１（０．１％）に等しい塩基の誤同定の確率は、それぞれ１０、２０、３０のｐｈｒｅｄスコア（ｑまたはＱ）の値を与える。

【０１５５】

ＦａｓｔＱＣツールは、サマリー判定（Summary judgement）（合格（緑のシンボル）、警告（オレンジのシンボル）、不合格（赤のシンボル））を提供する。ｐｈｒｅｄスコアはＱＣレポートの「Ｐｅｒ　Ｂａｓｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｑｕａｌｉｔｙ」モジュールに表示される。

【０１５６】

（低品質リードの除去）

Ｐｈｒｅｄ品質スコアの低いリードを除去するために、ＮＧＳＱＣＴｏｏｌ　ｋｉｔのツールを使用した。

【０１５７】

（リードのアライメント）

バイオインフォマティクスツールＳＴＡＲ（バージョン２．４．０ｄ）を用いて、ペアリード（paired reads）の標準パラメータを用い、サンプルを基準ハツカネズミ（Mus Musculus）ゲノム（ｍｍ１０）［４］にマッピングした。基準トラックは、Ｒｅｆｓｅｑから取得したアセンブリーｍｍ１０であった。以下の表は、各サンプルのマップされたリードの割合を示す。平均マッピング比率は９３％を超え、リボソーム含量は全サンプルで１％未満であった。

【０１５８】

（トランスクリプトーム発現の定量）

Ｃｕｆｆｌｉｎｋｓを用いて、各配列決定されたサンプルについて発現された転写産物の定量を行った。Ｃｕｆｆｌｉｎｋｓで使用される測定単位はＦＰＫＭ（１００万のマッピングされたリード当たりの、転写産物１０００塩基当たりの断片数）であり、ＲＮＡプール中の転写産物／遺伝子の相対的な存在量の尺度を意味するものである。ＦＰＫＭは識別的発現に使用されることを直接的に意図したものではないが、人間が読み取れることを目的としており、数百万のリードおよび遺伝子長などの主要な技術的交絡因子を考慮して

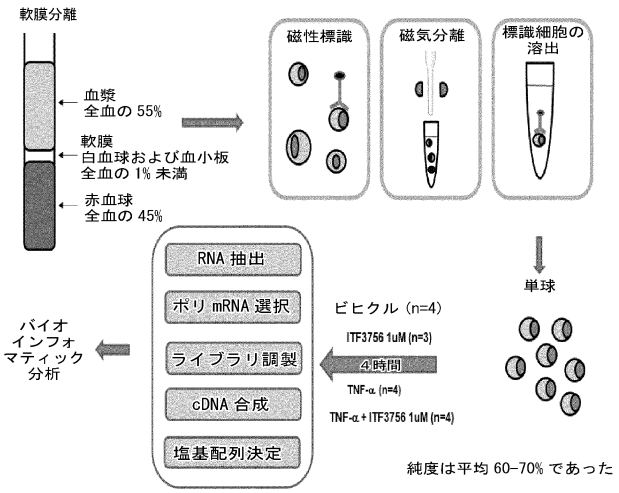
いる。
【０１５９】
（レスポンダーおよびノンレスポンダーの同定）
第２０日での腫瘍容積に基づいて、レスポンダーおよびノンレスポンダーを選択した。処理開始時（第１０日）の腫瘍体積は平均約７５ｍｍ^{3}であった。この腫瘍体積の値に基づいて、以下の基準に従って動物を分類した：
－ 腫瘍体積が７５ｍｍ^{3}以下の動物をレスポンダー（Ｒ）とした。
－ 腫瘍体積が７５ｍｍ^{3}を超える動物をノンレスポンダー（ＮＲ）とした。
【０１６０】
処置に無関係にＲおよびＮＲに関連しうる遺伝子を同定するために、すべてのＲおよびＮＲ（未処理動物を含む）を考慮に入れた。
【０１６１】
ＩＴＦ３７５６によって調節される特定の遺伝子を同定するために、この群および対応するビヒクル対照グループの全ての動物を、腫瘍応答との相関の可能性を同定するために考慮した。
【０１６２】
抗ＰＤ－１治療によって調節される特異的遺伝子を同定するために、この群およびアイソタイプ対照グループの全ての動物を、腫瘍反応との相関の可能性を同定するために考慮した。
【０１６３】
ＲＮＡｓｅｑデータの総カウント数を用いて、ＲおよびＮＲの間の遺伝子発現を比較した。
【０１６４】
統計学的有意性は、ＧｒａｐｈＰａｄソフトウェア（バージョン９）を用いた独立ｔ検定により決定し、０．０５以下のｐ値を有意とみなした。
【０１６５】
（結果）
（ＩＴＦ３７５６の標的作用：チューブリンのアセチル化の増加）
ＩＴＦ３７５６によるＨＤＡＣ６の阻害を確認するため、すべての　殺時点（１時間、４時間、１８時間、２４時間）で動物の脾臓を採取した。ウェスタンブロット法を用いて、チューブリンアセチル化および全チューブリンを検出した。
【０１６６】
腫瘍を有する動物を、最終投与後の種々の時点で　殺した。脾臓を採取し、全脾臓細胞懸濁液を調製した。ペレット化した細胞を溶解し、電気泳動で分離した際に全タンパク質抽出物解凍物を得た。特異的抗体を用いるウェスタンブロット法の後に、チューブリンおよびアセチル－チューブリンを検出した。
【０１６７】
図２１は、チューブリンのアセチル化が急速に起こったことを示している。最終処理後１時間の時点において、調べた動物は強い増加を示し、それは最終処理後４時間の時点まで維持された。より長い洗浄（wash-out）は、チューブリンのアセチル化を減少させるが、１８時間後でも依然として高く、かつ、一貫していた。２４時間の洗浄後に得られる結果は、チューブリンのアセチル化が依然として検出可能であるが、全ての動物で検出されたわけではない。なぜなら、３匹中１匹はベースレベルのアセチル－チューブリンであったためである。
【０１６８】
（抗ＰＤ－１処置とＩＴＦ３７５処置）
前臨床試験および臨床試験の両方から明らかなように、抗ＰＤ－１免疫療法は特に不均質な応答を示す。この不均質性は、免疫系の刺激に対する単一被験者の応答に依存している。ＩＴＦ３７５６の免疫依存性抗腫瘍活性と一致して、本発明者は抗ＰＤ－１で処置された動物と同様の不均質な応答を見出した。

【０１６９】
両方の処置において、腫瘍の縮小が異なる３つの動物群を同定することができた（図２２および図２３）：
－ 処置に応答しなかった動物（図２２のＩＴＦ３７５６　１；図２３の抗ＰＤ－１　ａ）；
－　第１０日と比較して、腫瘍が強くまたは完全に縮小した動物（図２２のＩＴＦ３７５６　２；図２３の抗ＰＤ－１　ｂ）；
－　腫瘍量（tumor mass）が安定しているか、処置開始時の腫瘍量（７５ｍｍ^3）をわずかに上回っている動物（図２２のＩＴＦ３７５６　３、図２３の抗ＰＤ－１　ｃ）。
【０１７０】
相関分析では、この群のうち、腫瘍量が７５ｍｍ^{3}以下の動物のみを考慮した。
【０１７１】
（ＭＭＰ９のダウンレギュレーション、ならびに、ＩＲＦ６およびＣＤ４０のアップレギュレーションはレスポンダーに相関する）
第３表に示すように、Ｍ２表現型を持つ腫瘍促進性マクロファージは特異的なマーカーを発現し、そのいくつかはＩＴＦ３７５６で処理した単球で強固にダウンレギュレートされている。ＭＭＰ９はこれらの遺伝子の１つであり、したがってマクロファージの腫瘍促進性表現型と関連している。
【０１７２】
本発明者らは、ＣＴ２６を有する動物の腫瘍微小環境におけるＭＭＰ９のダウンレギュレーションが、ＩＴＦ３７５６群のレスポンダー動物と有意に関連していることを発見した（図２４）。この関連は、全ての動物を考慮した場合、あるいは抗ＰＤ－１グループと相対的対照を考慮した場合には生じなかった。
【０１７３】
腫瘍微小環境における炎症の活性化および制御は、抗腫瘍免疫応答の適切な刺激のために極めて重要である。本発明者らは、ＴＭＥが非炎症性かつ免疫抵抗性状態から炎症性かつ免疫寛容性状態へとリモデリングする過程に関与する２種の遺伝子を同定した。１つの遺伝子はインターフェロン調節因子６（ＩＲＦ６）である。ＩＲＦ６は、高度に保存されたヘリックス－ターン－ヘリックスＤＮＡ結合ドメインと、保存性の高くないタンパク質結合ドメインを共有する９つの転写因子のファミリーに属する。大抵のＩＲＦは、ウイルス感染後のインターフェロンの発現を調節している。ＩＲＦ６は頭蓋顔面発生との関連でよく知られているが、ＩＲＦ１とともにＭｙＤ８８シグナル伝達に関与している可能性がある（Honda and Taniguchi, 2006（非特許文献２１））。図２５に示すように、ＩＴＦ３７５６はヒト単球のＩＲＦ６の発現をアップレギュレートし、本発明者はそのアップレギュレーションがＩＴＦ３７５６を投与したレスポンダー動物に関連することを発見した（ｐ＜０．１）。
【０１７４】
驚くべきことに、ＲＮＡｓｅｑデータからのＩＲＦ６に対するカウント数が最も高かった動物において、ＩＴＦ３７５６投与後に腫瘍が完全に縮小した。
【０１７５】
ＣＤ４０の役割は以前にも簡単に述べた。ＩＴＦ３７５６で処理したヒト単球はＣＤ４０の遺伝子発現の増加を示し、これはＴ細胞の共刺激および抗腫瘍マクロファージの誘導に直接関係している。この観察と一致して、本発明者はレスポンダーマウスが有意に高いＣＤ４０の遺伝子発現を有することを見出した（図２６Ｂ）。ＣＤ４０についても、全ての動物および抗ＰＤ－１抗体で治療した動物を考慮すると、レスポンダーマウスとの相関は認められなかった（図２６Ａ、図２６Ｃ）。

【図面】

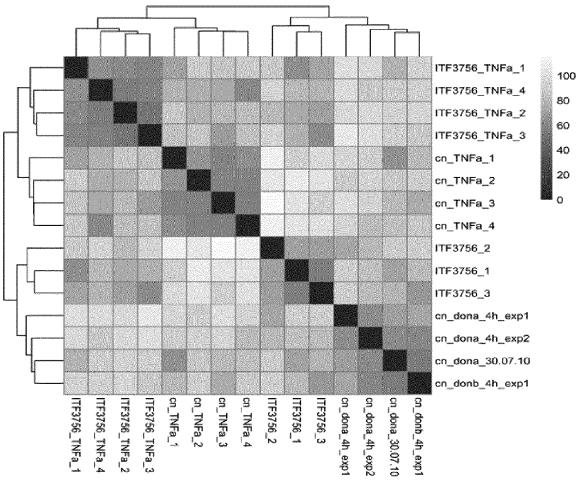
【図１】

Figure 1



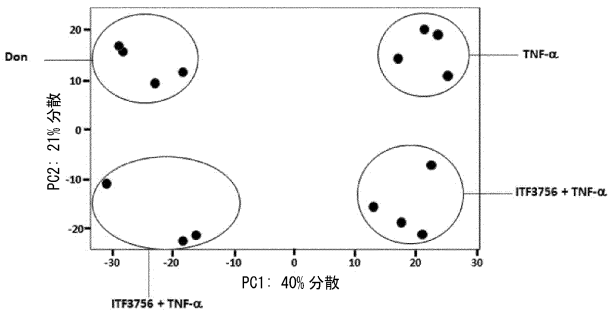
【図２Ａ】

Figure 2A



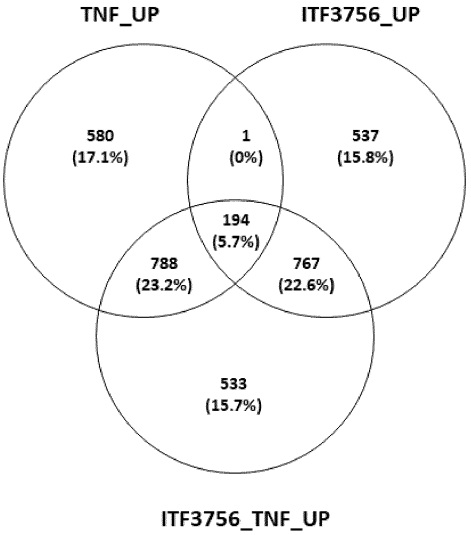
【図２Ｂ】

Figure 2B



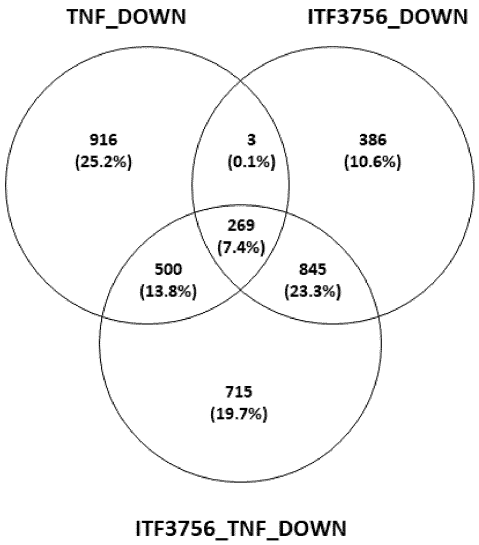
【図３Ａ】

Figure 3A



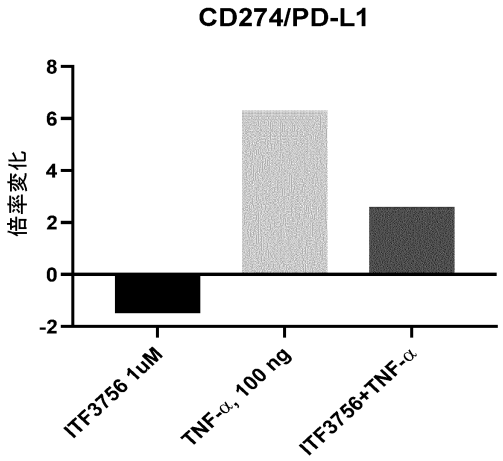
【図３Ｂ】

Figure 3B



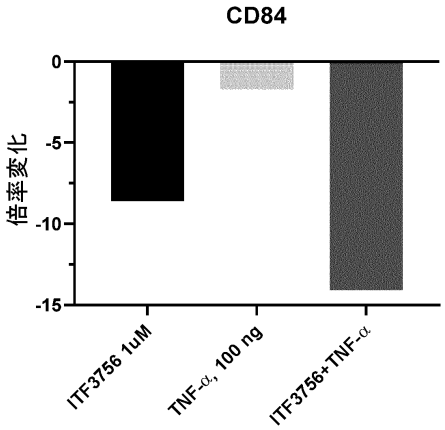
【図４】

Figure 4



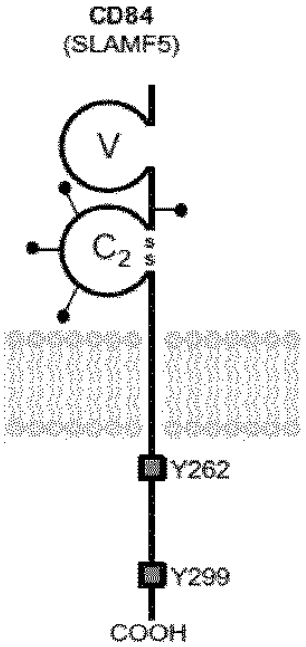
【図５Ａ】

Figure 5A



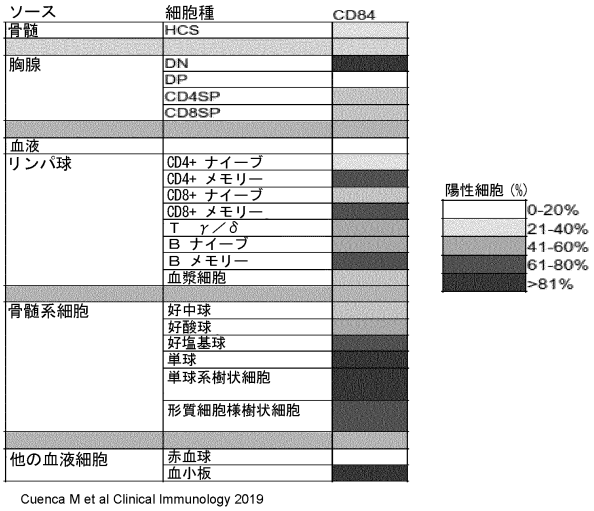
【図５Ｂ】

Figure 5B



【図５Ｃ】

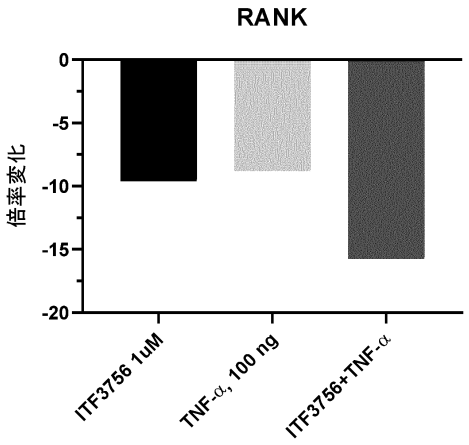
Figure 5C



Cuenca M et al Clinical Immunology 2019

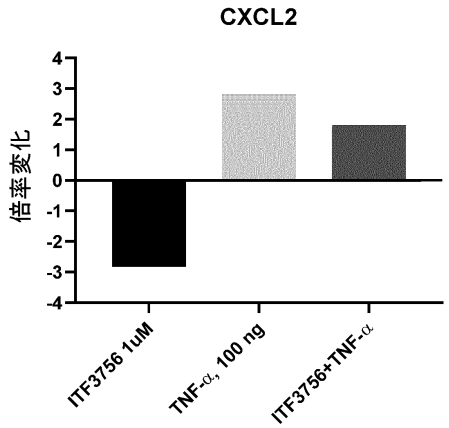
【図６】

Figure 6



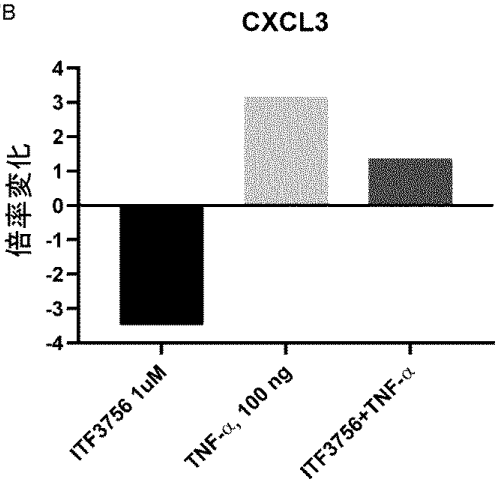
【図７Ａ】

Figure 7A



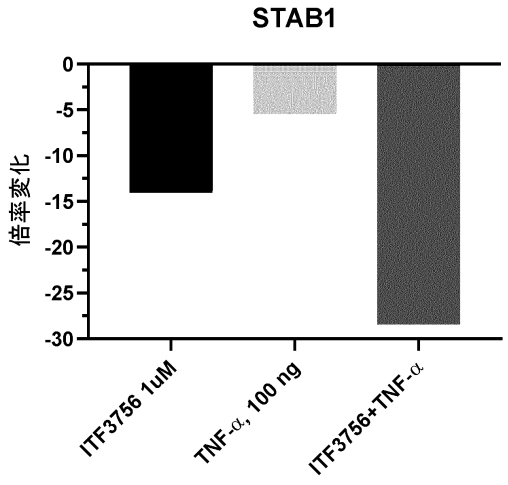
【図７Ｂ】

Figure 7B



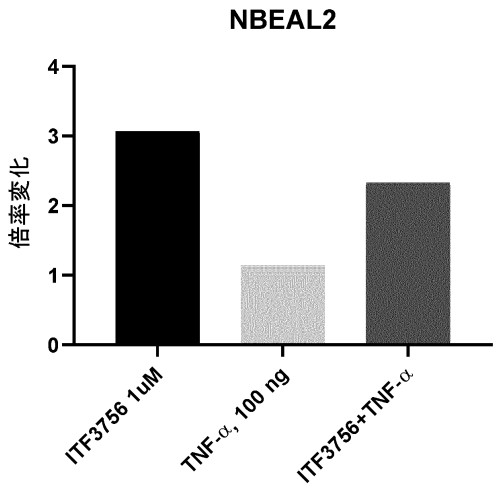
【図８】

Figure 8



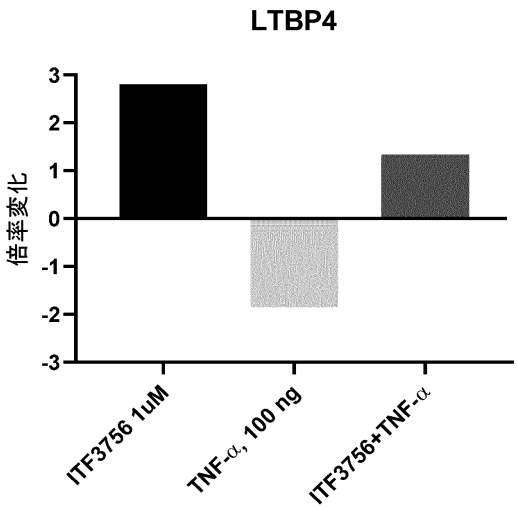
【図９】

Figure 9



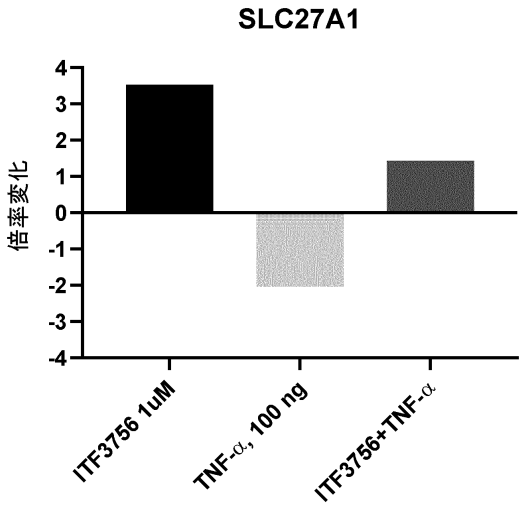
【図１０】

Figure 10



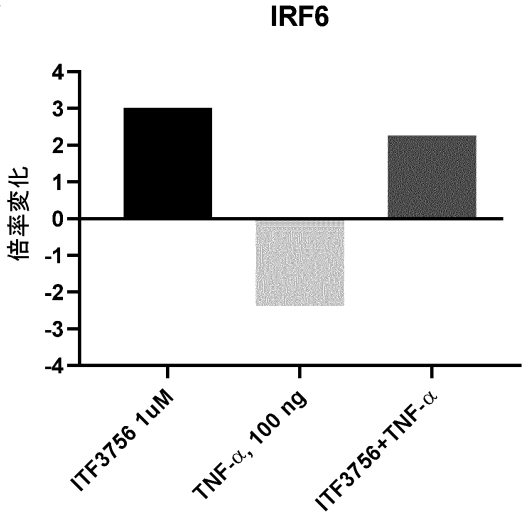
【図１１】

Figure 11



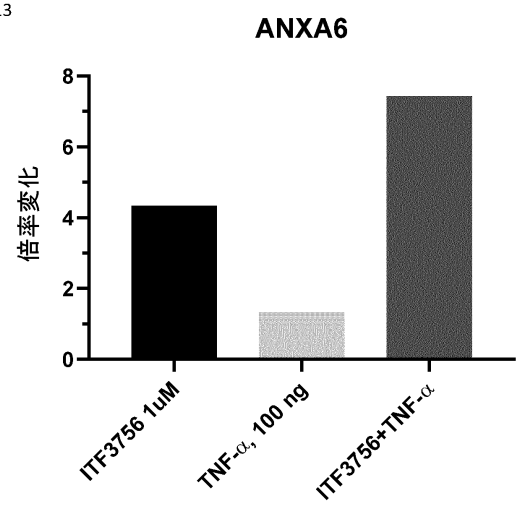
【図１２】

Figure 12



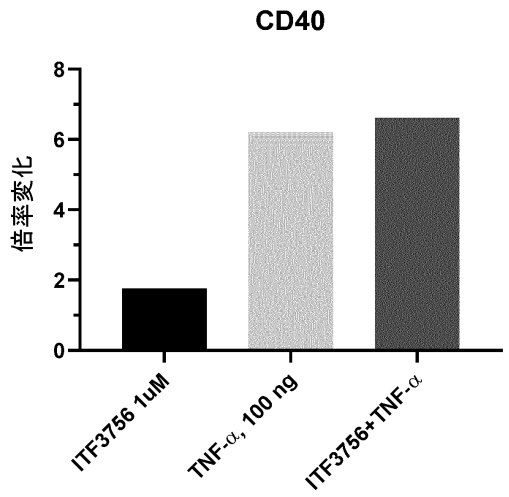
【図１３】

Figure 13



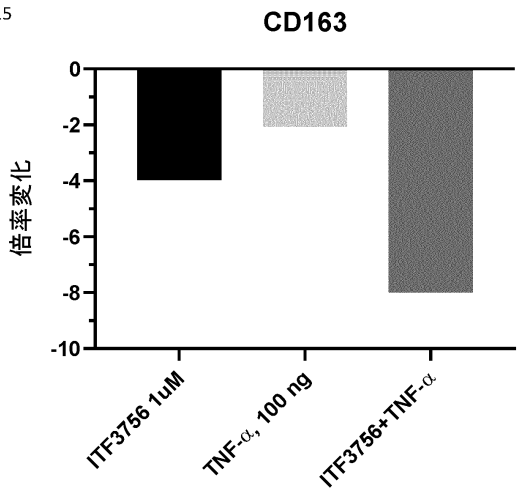
【図１４】

Figure 14



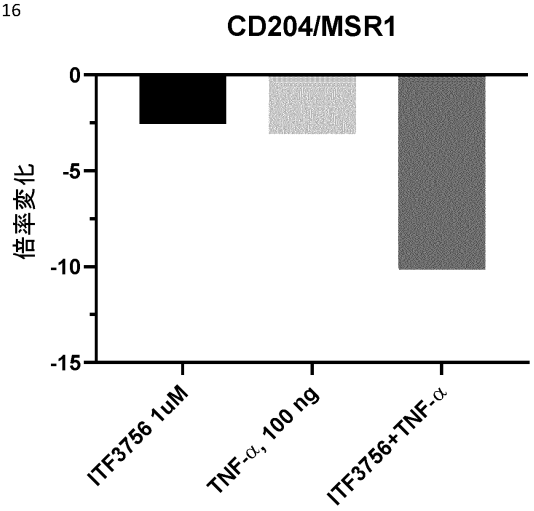
【図１５】

Figure 15



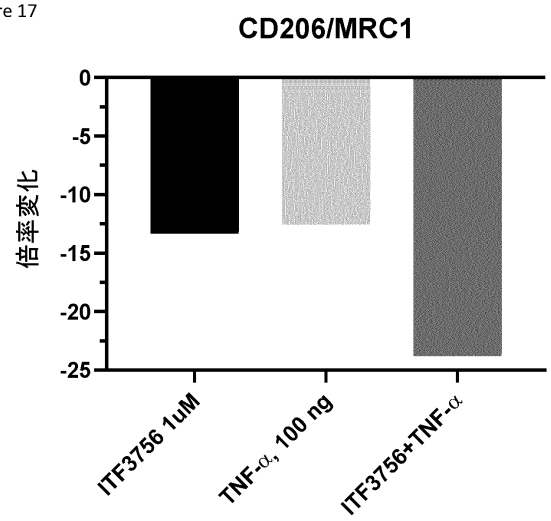
【図１６】

Figure 16



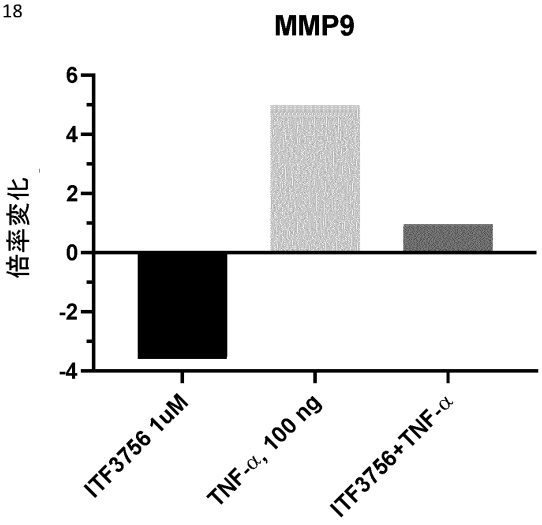
【図１７】

Figure 17



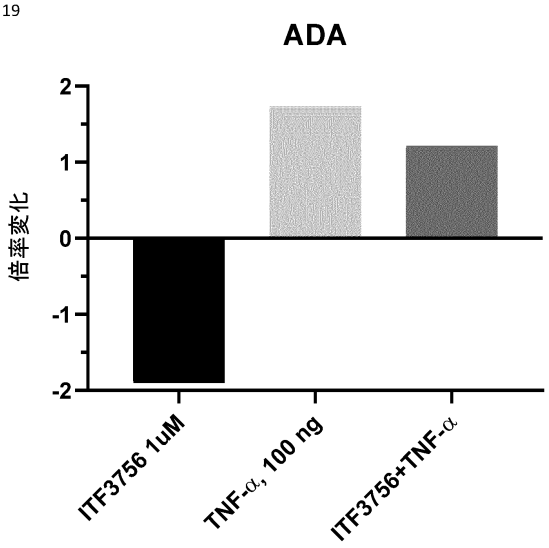
【図１８】

Figure 18



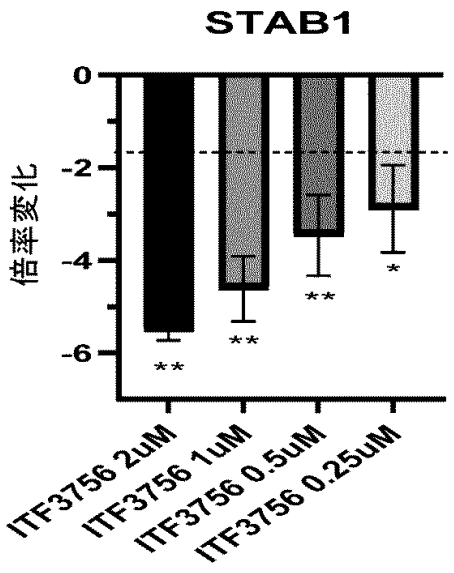
【図１９】

Figure 19



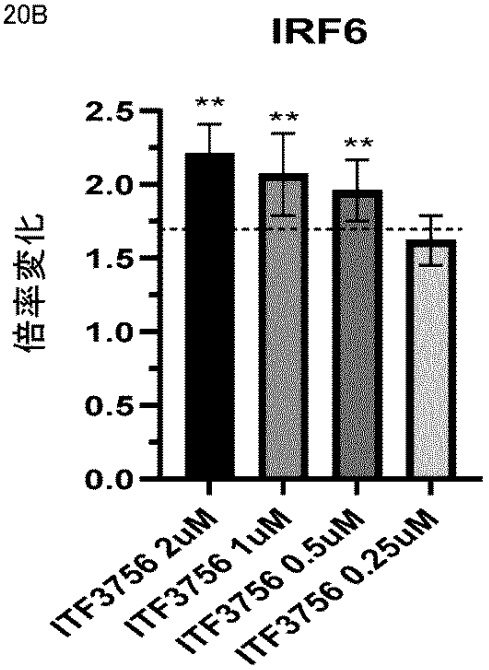
【図２０Ａ】

Figure 20A



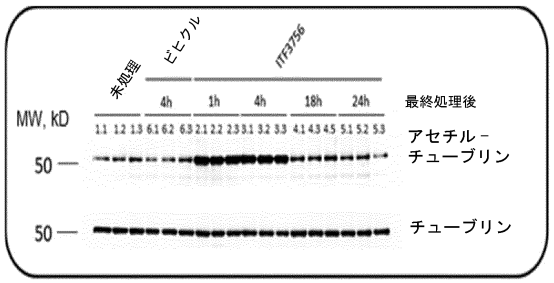
【図２０Ｂ】

Figure 20B



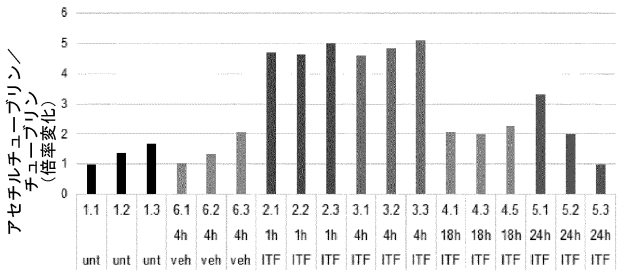
【図２１Ａ】

Figure 21A



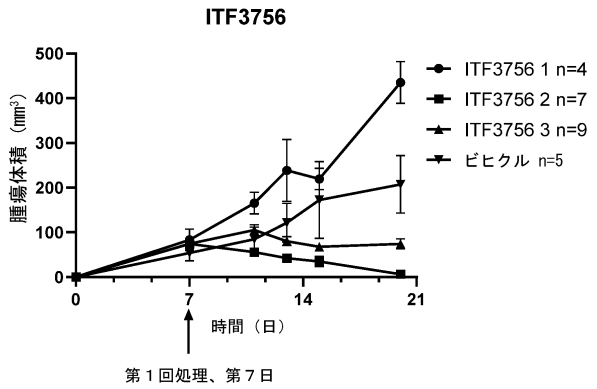
【図２１Ｂ】

Figure 21B



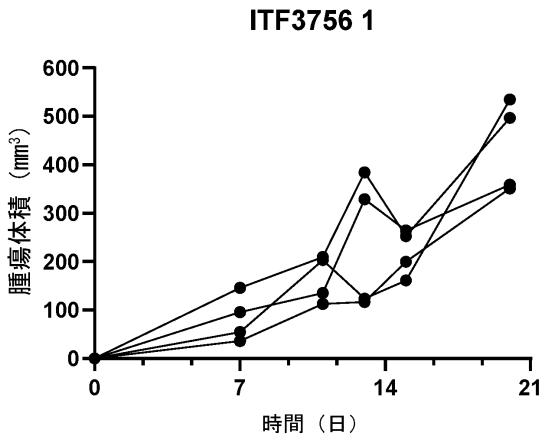
【図２２Ａ】

Figure 22A



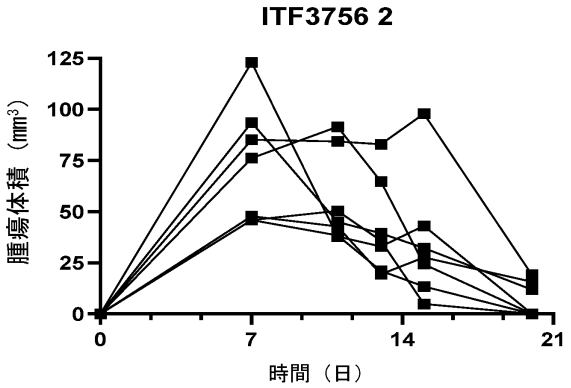
【図２２Ｂ】

Figure 22B



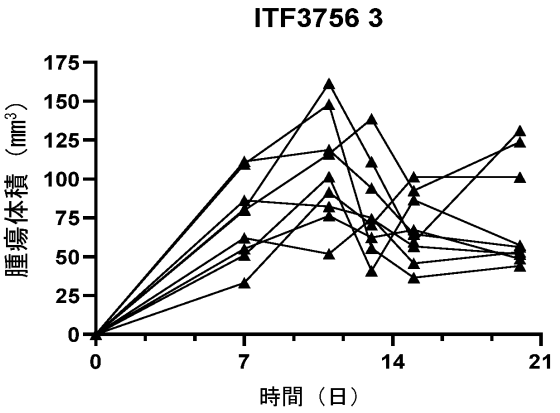
【図２２Ｃ】

Figure 22C



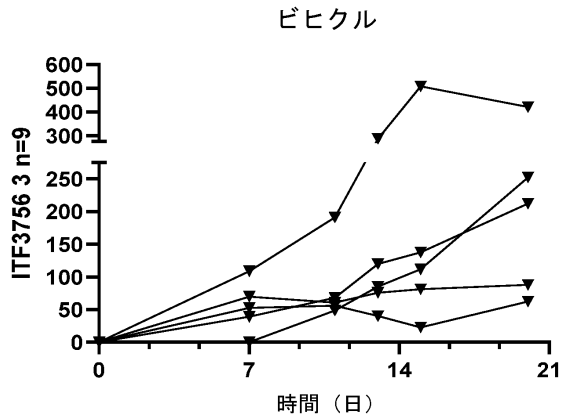
【図２２Ｄ】

Figure 22D



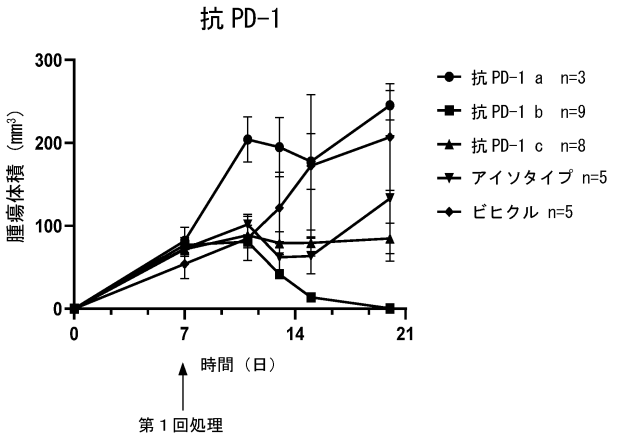
【図２２Ｅ】

Figure 22E



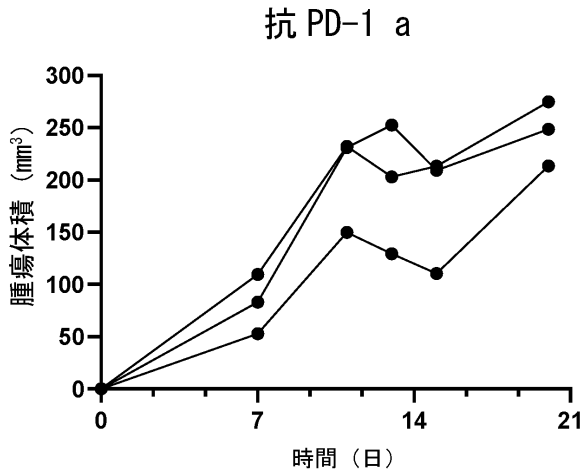
【図２３Ａ】

Figure 23A



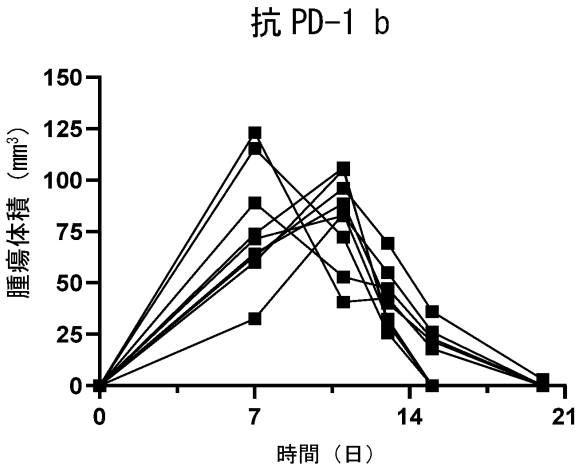
【図２３Ｂ】

Figure 23B



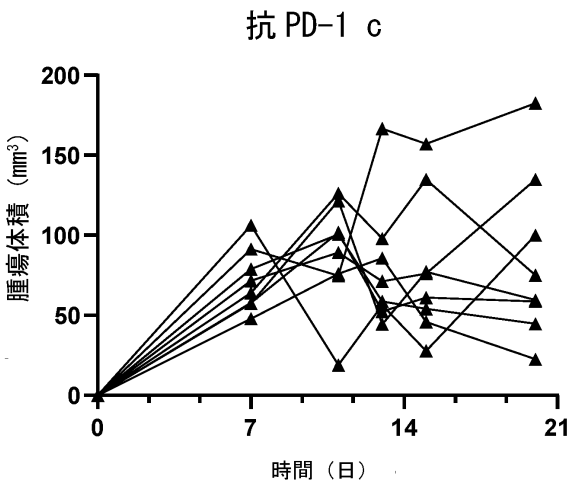
【図２３Ｃ】

Figure 23C



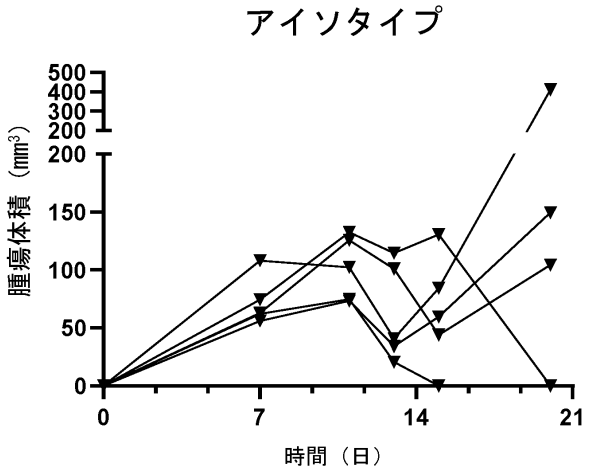
【図２３Ｄ】

Figure 23D



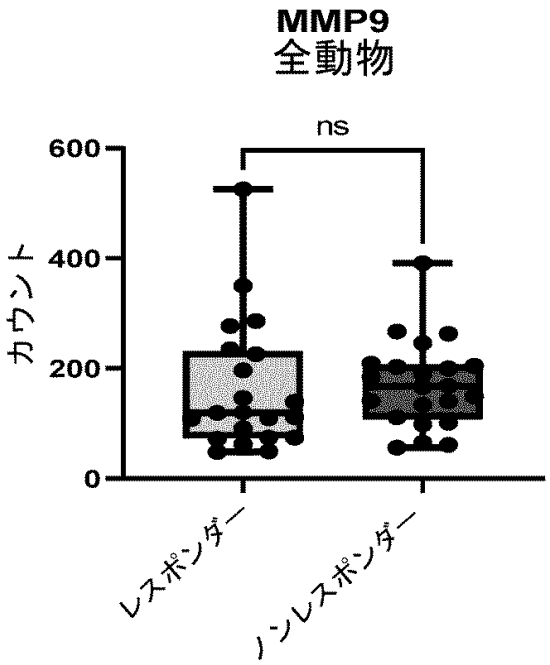
【図２３Ｅ】

Figure 23E



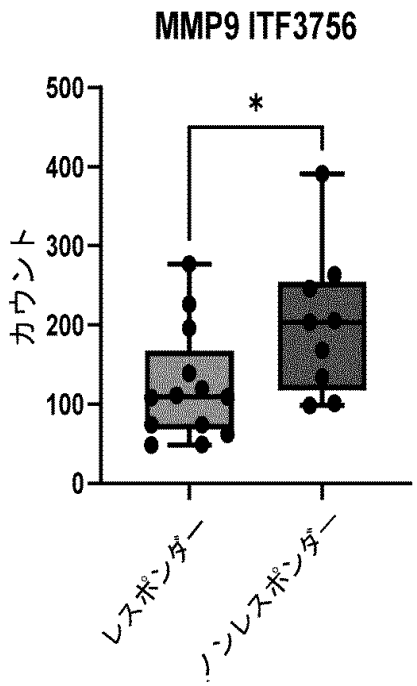
【図２４Ａ】

Figure 24A



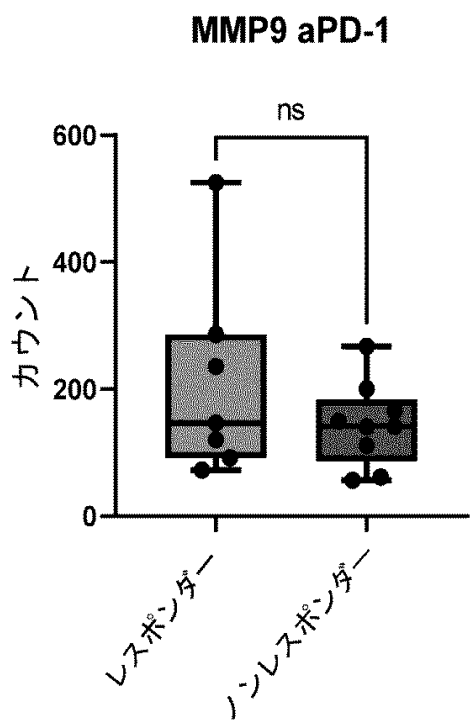
【図２４Ｂ】

Figure 24B



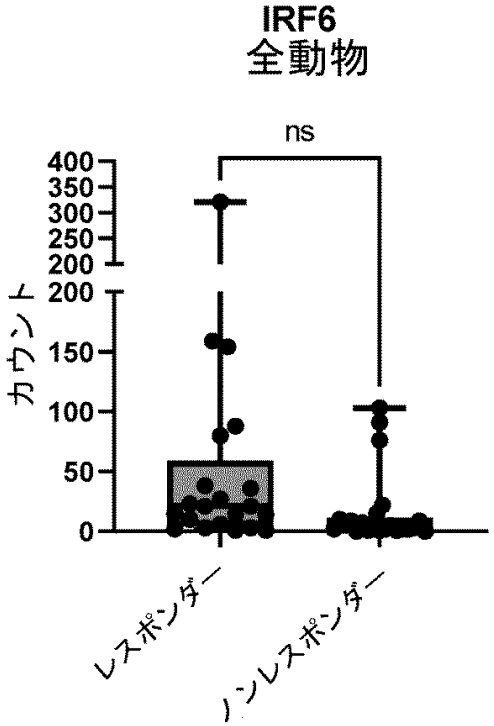
【図２４Ｃ】

Figure 24C



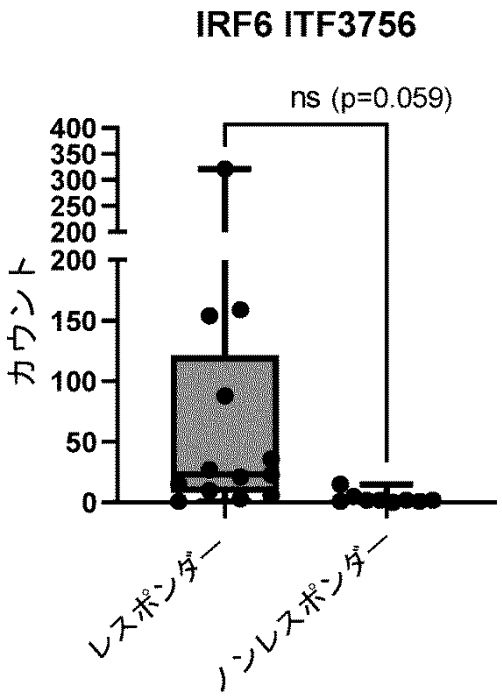
【図２５Ａ】

Figure 25A



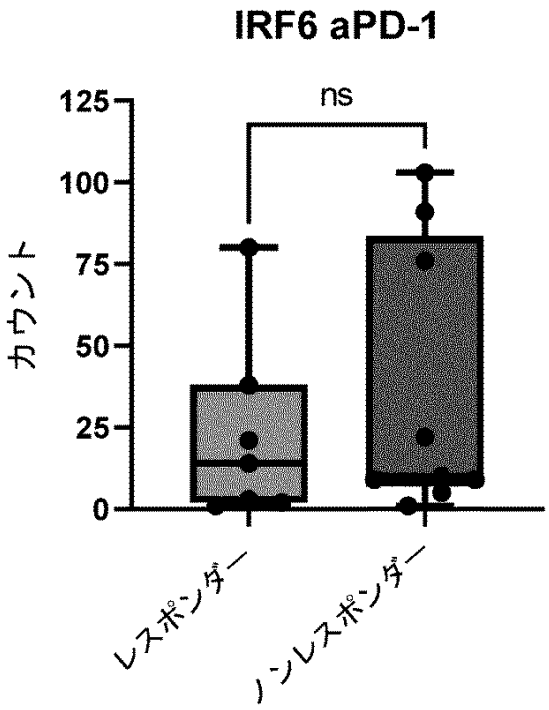
【図２５Ｂ】

Figure 25B



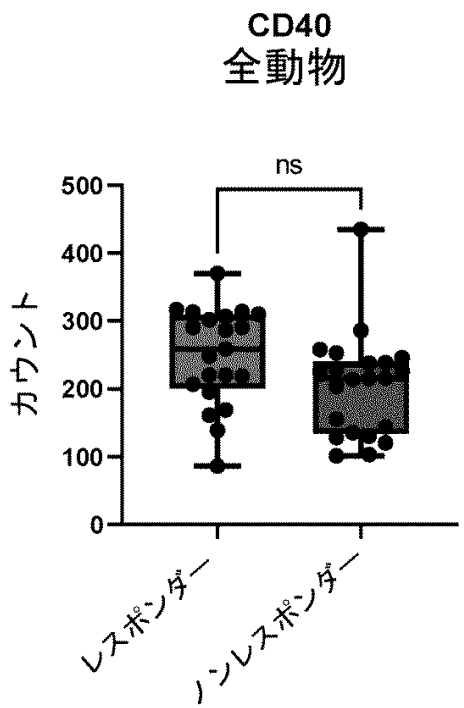
【図２５Ｃ】

Figure 25C



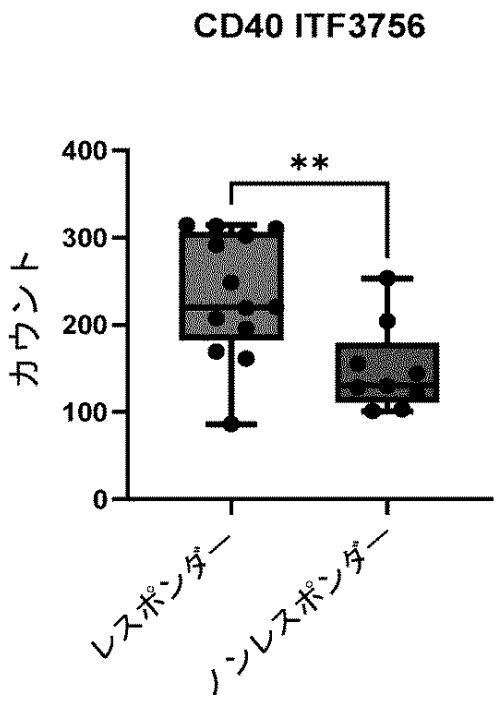
【図２６Ａ】

Figure 26A



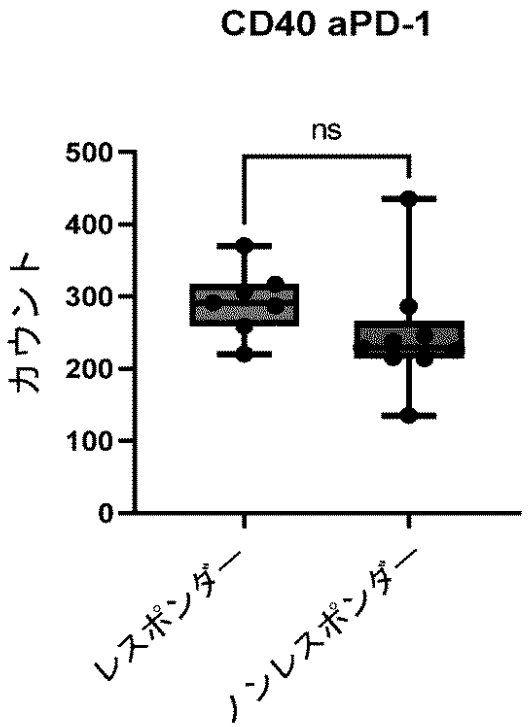
【図２６Ｂ】

Figure 26B



【図２６Ｃ】

Figure 26C



【国際調査報告】

International application No.
PCT/EP2022/082762

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

1-12 (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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/082762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6886
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

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, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015/176076 A1 (YANG MIN [US] ET AL) 25 June 2015 (2015-06-25) claim 16; table 1	1-11
A	WO 2012/018499 A2 (ACETYLON PHARMACEUTICALS [US]; JONES SIMON S [US] ET AL.) 9 February 2012 (2012-02-09) claims 6, 7; figure 4	1-11

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 February 2023	13/04/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Santagati, Fabio

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/082762

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Amaru Calzada Ariel: "Mechanism of action of Histone Deacetylase Inhibitor -Givinostat in Chronic Myeloproliferative Neoplasm - Chapter 2 - The HDAC inhibitor Givinostat modulates the hematopoietic transcription factors NF-E2 and C-MYB in JAK2(V617F) myeloproliferative neoplasm cells.", , 18 January 2013 (2013-01-18), XP055936382, Retrieved from the Internet: URL:https://boa.unimib.it/retrieve/handle/10281/44363/66536/phd_unimib_734692.pdf [retrieved on 2022-06-28] figure 4 -----	1-11
A	WO 2017/070441 A1 (ICAHN SCHOOL MED MOUNT SINAI [US]) 27 April 2017 (2017-04-27) the whole document -----	1-11
A	FLAVIO LEONI ET AL: "The Histone Deacetylase Inhibitor ITF2357 Reduces Production of Proinflammatory Cytokines in vitro and Systemic Inflammation in Vivo", MOLECULAR MEDICINE, vol. 11, no. 1-12, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 1-15, XP055383447, Washington , DC ISSN: 1076-1551, DOI: 10.2119/2006-00005.Dinarello the whole document -----	1-11
X	WO 2014/032899 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]) 6 March 2014 (2014-03-06) claims 1, 3, 10 -----	12
A	US 2017/046477 A1 (VAN OOIJEN HENDRIK JAN [NL]) 16 February 2017 (2017-02-16) paragraph [0148] -----	12

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/082762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015176076 A1	25-06-2015	EP 3084446 A1	26-10-2016
		ES 2936812 T3	22-03-2023
		JP 7017309 B2	08-02-2022
		JP 2017503492 A	02-02-2017
		JP 2021118747 A	12-08-2021
		US 2015176076 A1	25-06-2015
		US 2020405716 A1	31-12-2020
		WO 2015095632 A1	25-06-2015
WO 2012018499 A2	09-02-2012	US 2013225543 A1	29-08-2013
		WO 2012018499 A2	09-02-2012
WO 2017070441 A1	27-04-2017	NONE	
WO 2014032899 A1	06-03-2014	NONE	
US 2017046477 A1	16-02-2017	AU 2016309659 A1	12-04-2018
		BR 112018002848 A2	06-11-2018
		CA 2995520 A1	23-02-2017
		CN 108138237 A	08-06-2018
		DK 3334837 T3	15-02-2021
		EP 3334837 A1	20-06-2018
		ES 2861400 T3	06-10-2021
		JP 7028763 B2	02-03-2022
		JP 2018522575 A	16-08-2018
		US 2017046477 A1	16-02-2017
		WO 2017029215 A1	23-02-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/EP2022/082762

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-12(partially)

A method for evaluating the efficacious dose and/or the biological activity of a HDAC6 inhibitor, comprising the step of: a) determining the expression level of at least CD84 gene in a biological sample of a patient; b) comparing said expression level with that of a reference sample. A kit for use in evaluating the efficacious dose and/or the biological activity of a HDAC6 inhibitor, comprising a multi-well plate and suitable primers and/or probes for determining the expression level of at least said RNA biomarker.

2-17. claims: 1-12(partially)

The subject-matter of invention 1, except wherein the gene is
- inv. 2: RANK/TNFRSF11a
- inv. 3: CXCL3
.....
- inv. 17: IRF6

フロントページの続き

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,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

２．ＴＷＥＥＮ

ラッツィ ３５

(72)発明者 クリスティアン ステインクーラー

イタリア アイ－００１２８ ローマ ローマ ヴィア イー． バジーレ １１

Ｆターム（参考） 4B063 QA01 QA20 QQ03 QQ42 QQ53 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02