



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103261890 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 21

(21) 申请号 201180054109. 8
 (22) 申请日 2011. 09. 12
 (30) 优先权数据
 61/381, 684 2010. 09. 10 US
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2013. 05. 09
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/US2011/051258 2011. 09. 12
 (87) PCT申请的公布数据
 W02012/034132 EN 2012. 03. 15
 (71) 申请人 EPIZYME 股份有限公司
 地址 美国马萨诸塞州
 (72) 发明人 R·A·科普兰德 V·M·瑞创
 M·D·斯克特 C·J·斯尼林格
 K·W·孔特斯 S·K·奈特森
 R·M·波洛克
 (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
 司 31100

代理人 韦东
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/50 (2006. 01)
 G01N 33/68 (2006. 01)
 G01N 33/53 (2006. 01)
 A61K 38/17 (2006. 01)
 C07D 473/34 (2006. 01)
 A61P 35/00 (2006. 01)

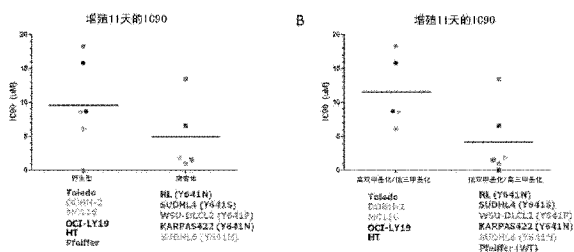
权利要求书4页 说明书50页 附图15页

(54) 发明名称

人 EZH2 抑制剂及其应用方法

(57) 摘要

本发明涉及对人组蛋白甲基转移酶 EZH2 的野生型和某些突变形式的抑制, 所述 EZH2 是 PRC2 复合物的催化亚基, 所述 PRC2 复合物催化组蛋白 H3 上赖氨酸 27 (H3-K27) 的单 - 至三 - 甲基化。在一个实施方式中, 所述抑制对于所述 EZH2 的突变形式是选择性的, 从而抑制与某些癌症相关的 H3-K27 的三甲甲基化。可以使用所述方法来治疗癌症, 包括滤泡性淋巴瘤和弥散性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)。本发明还提供用于鉴定 EZH2 突变形式的小分子选择性抑制剂的方法, 以及用于测定对象内对 EZH2 抑制剂响应性的方法。



1. 一种方法,所述方法包括
 - a) 从对象获取组织样品;
 - b) 若所述组织样品中存在 H3-K27 的二甲基化 (me2),检测所述 H3-K27 的二甲基化 (me2) 水平,并将所述二甲基化 (me2) 水平与对照二甲基化 (me2) 水平作比较;
 - c) 若所述组织样品中存在 H3-K27 的三甲甲基化 (me3),检测所述 H3-K27 的三甲甲基化 (me3) 水平,并将所述三甲甲基化 (me3) 水平与对照三甲甲基化 (me3) 水平作比较,其中,在所述二甲基化 (me2) 水平缺失或低于所述对照二甲基化 (me2) 水平时,或在所述三甲甲基化 (me3) 水平等于或高于所述对照三甲甲基化 (me3) 水平且所述二甲基化 (me2) 水平缺失或低于所述对照二甲基化 (me2) 水平时,所述对象响应 EZH2 抑制剂。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括
 - d) 获取所述组织样品中 H3-K27 的二甲基化 (me2) 水平与三甲甲基化 (me3) 水平的比率,以获得测试比率,并将所述测试比率与对照比率作比较;其中,在所述测试比率低于所述对照比率时,所述对象响应 EZH2 抑制剂。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述对象患有癌症。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述检测由选自 Western 印迹分析、免疫组化 (IHC)、免疫荧光 (IF) 和质谱 (MS) 的试验进行。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述检测包括使所述组织样品接触特异性结合二甲基化 H3-K27 和 / 或三甲甲基化 H3-K27 的试剂。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述试剂是抗体、多肽、适体或其片段。
7. 一种治疗需要的对象的癌症的方法,所述方法包括向已由前述权利要求中任一项所述的方法测定为响应 EZH2 抑制剂的对象给药。
8. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述癌症选自滤泡性淋巴瘤和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)。
9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述对象表达 EZH2 多肽的 Y641 突变体。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述 Y641 突变体选自 Y641F、Y641H、Y641N 和 Y641S。
11. 一种方法,所述方法包括向表达 EZH2 多肽的 Y641 突变体的对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂。
12. 一种方法,所述方法包括使表达 EZH2 多肽的 Y641 突变体的细胞接触有效量的 EZH2 抑制剂。
13. 一种方法,所述方法包括若在来自对象的样品中存在 EZH2 多肽的 Y641 突变体,检测所述 EZH2 多肽的 Y641 突变体;其中,所述 Y641 突变体的存在指示所述对象是采用 EZH2 抑制剂治疗的候选者。
14. 如权利要求 11-13 中任一项所述的方法,其特征在于,所述抑制剂抑制 EZH2 多肽的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。
15. 如权利要求 14 所述的方法,其特征在于,所述抑制是选择性抑制。
16. 如权利要求 11-15 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 EZH2 多肽的 Y641 突变体具有选自 Y641F、Y641H、Y641N 和 Y641S 的突变。

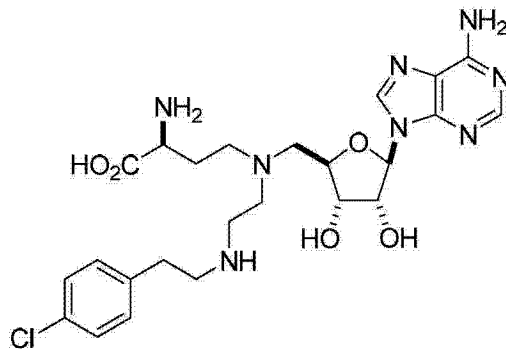
17. 如权利要求 11-16 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 EZH2 的 Y641 突变体的检测通过以下实施:

- a. 全基因组重测序,
- b. 检测编码所述 EZH2 多肽的 Y641 突变体的核酸的目标区域重测序,
- c. 特异性结合具有所述 EZH2 多肽的 Y641 突变体特征的多肽或其片段的抗体 ;或
- d. 与编码具有所述 EZH2 多肽的 Y641 突变体特征的多肽或其片段的核酸杂交的核酸探针。

18. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述对象患有癌症。

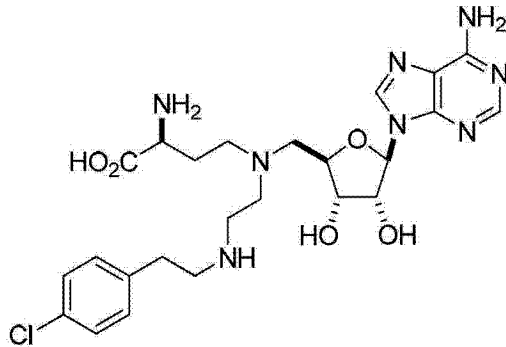
19. 如权利要求 18 所述的方法,其特征在于,所述癌症选自滤泡性淋巴瘤和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)。

20. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述 EZH2 抑制剂是 S. 腺苷. L. 高半胱氨酸或其药学上可接受的盐,或



或其药学上可接受的盐。

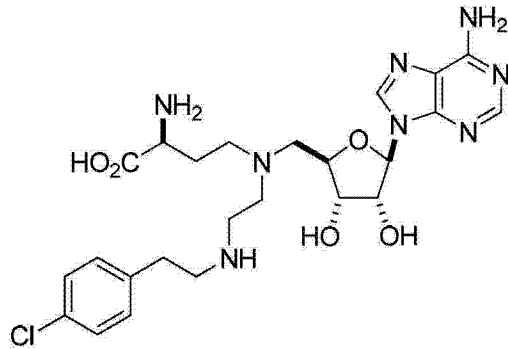
21. 一种化合物



或其药学上可接受的盐。

22. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求 21 所述的化合物。

23. 化合物



或其药学上可接受的盐在治疗滤泡性淋巴瘤或弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 中的应用。

24. 一种方法,所述方法包括

混合经分离的 EZH2 多肽的 Y641 突变体与组蛋白底物、甲基基团供体和测试化合物以形成测试混合物,其中,所述组蛋白底物包括选自下组的 H3-K27 形式:未甲基化 H3-K27、单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27 及其任意组合;和

检测所述组蛋白底物中 H3-K27 的甲基化,从而在所述测试化合物存在下的 H3-K27 甲基化少于不存在所述测试化合物时的 H3-K27 甲基化时,鉴定所述测试化合物为 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂。

25. 如权利要求 24 所述的方法,所述方法还包括

检测所述组蛋白底物中三甲甲基化 H3-K27 的形成,从而在所述测试化合物存在下的三甲甲基化 H3-K27 形成少于不存在所述测试化合物时的三甲甲基化 H3-K27 形成时,鉴定所述测试化合物为 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂。

26. 如权利要求 25 所述的方法,所述方法还包括

混合经分离的野生型 EZH2 与组蛋白底物、甲基基团供体和测试化合物以形成对照混合物,其中,所述组蛋白底物包含选自下组的 H3-K27 形式:单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27,以及单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 的组合;

检测所述测试混合物和所述对照混合物各自的组蛋白底物的三甲甲基化;

计算 (a) 采用 EZH2 的 Y641 突变体加所述测试化合物的三甲甲基化 (M⁺) 对 (b) 采用 EZH2 的 Y641 突变体不加所述测试化合物的三甲甲基化 (M⁻) 的比率;

计算 (c) 采用野生型 EZH2 加所述测试化合物的三甲甲基化 (WT⁺) 对 (d) 采用野生型 EZH2 不加所述测试化合物的三甲甲基化 (WT⁻) 的比率;

比较所述比率 (a)/(b) 与所述比率 (c)/(d);和

在所述比率 (a)/(b) 小于所述比率 (c)/(d) 时,鉴定所述测试化合物为 EZH2 的 Y641 突变体的选择性抑制剂。

27. 如权利要求 24-26 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 EZH2 多肽的 Y641 突变体具有选自 Y641F、Y641H、Y641N 和 Y641S 的突变。

28. 如权利要求 24-27 所述的方法,其特征在于,所述检测包括测量掺入的经标记甲基基团。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其特征在于,所述标记的甲基基团是同位素标记的甲基基团。

30. 如权利要求 24-26 中任一项所述的方法,其特征在于,所述检测包括使所述组蛋白底物接触特异性结合三甲基化 H3-K27 的抗体。

人 EZH2 抑制剂及其应用方法

[0001] 相关引用

[0002] 本申请要求 2010 年 9 月 10 日提交的 U. S. S. N 61/381, 684 的优先权及权益, 其通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及人组蛋白甲基转移酶 EZH2 的野生型和某些突变形式的抑制, 所述 EZH2 是 PRC2 复合物的催化亚基, 其催化在组蛋白 H3 上第 27 位赖氨酸 (H3-K27) 的单 - 至三 - 甲基化, 还涉及用于治疗癌症的方法, 所述癌症包括滤泡性淋巴瘤和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL), 以及用于测定对象中 EZH2 抑制剂响应的方法。

[0004] 背景

[0005] 在真核细胞中, DNA 由组蛋白包装以形成染色质。约 150 个碱基对的 DNA 在组蛋白的八聚体 (各两个组蛋白 2A、2B、3 和 4) 上缠绕两圈以形成核小体——染色质的基本单位。染色质的有序结构变化能引起关联基因转录中的改变。该过程高度受控, 因为基因表达模式深度影响基础细胞过程, 诸如分化、增殖和凋亡。通过共价修饰组蛋白, 最特别是其 N 端尾部来介导对染色质结构变化 (和因有的转录) 的控制。这些修饰通常指表观遗传学修饰, 因为它们能造成基因表达中的可遗传改变, 但不影响所述 DNA 本身的序列。氨基酸侧链的共价修饰 (例如, 甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化) 是酶促介导的。

[0006] 通过称为组蛋白甲基转移酶 (HMT) 的独特酶家族作用来控制向组蛋白上特定氨基酸位点选择性添加甲基基团。具体基因的表达水平受相关的组蛋白位点处一个或多个甲基基团的存在与否影响。位于具体组蛋白位点的甲基基团的特定作用持续至所述甲基基团被组蛋白去甲基化酶移除, 或持续至所述修饰的组蛋白通过核小体转换而被取代。以类似的方式, 其它酶类能够用其它化学物质修饰 DNA 和组蛋白, 并且其它酶也能移除这些物质来控制基因表达。

[0007] 必须严格控制转录调节后生化系统的协调收集, 以使细胞生长和分化最优进行。当这些控制受到负责 DNA 和组蛋白修饰的酶的异常表达和 / 或活性扰乱时, 产生疾病状态。在人癌症中, 例如, 越来越多的证据提示, 失调的表观遗传酶活性造成与癌症相关的细胞增殖失控, 及其它癌症相关表型例如增强的细胞迁移和入侵。除了癌症外, 有越来越多的证据显示表观遗传酶在众多其它人疾病中的作用, 包括代谢疾病 (例如糖尿病)、炎症疾病 (例如克罗恩氏病 (Crohn's disease))、神经变性疾病 (例如阿尔茨海默病) 和心血管疾病。因此, 选择性调节表观遗传酶的异常作用对治疗一定范围的疾病有广泛前景。

[0008] 组蛋白甲基转移酶 EZH2

[0009] 已知多梳组 (PcG) 和三胸组 (trxG) 蛋白是细胞记忆系统的部分。Francis 等. (2001) Nat Rev Mol Cell Biol 2:409-21; Simon 等. (2002) Curr Opin Genet Dev 12:210-8。这两组蛋白都涉及保持同源异形框 (Hox) 基因表达的空间模式, 其在胚胎发育早期由瞬时表达的分节基因建立。一般而言, PcG 蛋白是保持“关闭状态”的转录抑制子, 而 trxG 蛋白是保持“启动状态”的转录激活子。因为 PcG 和 trxG 蛋白的成员包含固有的

组蛋白甲基转移酶 (HMTase) 活性,所以 PcG 和 trxG 蛋白可通过核心组蛋白的甲基化来参与细胞记忆。Beisel 等. (2002) *Nature* 419:857-62 ;Cao 等. (2002) *Science* 298:1039-43 ; Czermin 等. (2002) *Cell* 111:185-96 ;Kuzmichev 等. (2002) *Genes Dev* 16:2893-905 ; Milne 等. (2002) *Mol Cell* 10:1107-17 ;Muller 等. (2002) *Cell* 111:197-208 ;Nakamura 等. (2002) *Mol Cell* 10:1119-28。

[0010] 生化和基因研究提供证据显示果蝇 (*Drosophila*) PcG 蛋白在至少两个不同蛋白复合物中起作用,所述蛋白复合物为多梳抑制复合物 1 (PRC1) 和 ESC-E (Z) 复合物 (也称作多梳抑制复合物 2 (PRC2)),尽管所述复合物的组成可为动态。Otte 等. (2003) *Curr Opin Genet Dev* 13:448-54. 果蝇 (*Drosophila*) 中的研究 (Czermin 等. (同上); Muller 等. (同上)) 和哺乳动物细胞中的研究 (Cao 等. (同上); Kuzmichev 等. (同上)) 证明,ESC-E (Z) / EED-EZH2 (即 PRC2) 复合物具有固有的组蛋白甲基转移酶活性。尽管由不同组分离的复合物组成略有不同,其一般包括 EED、EZH2、SUZ12 和 RbAp48 或其果蝇 (*Drosophila*) 同源物。然而,仅包括 EED、EZH2 和 SUZ12 的重建复合物对组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸保留组蛋白甲基转移酶活性。美国专利 7,563,589 (通过引用纳入本文)。在构成 PRC2 复合物的各种蛋白中,EZH2 (Zeste 增强子同源物 2) 是催化亚基。EZH2 的催化位点进而存在于 SET 结构域,所述 SET 结构域是在若干染色质相关蛋白质 (包括三胸组和多梳组的成员) 中发现的高度保守序列基序 (以 Su (var) 3-9 命名,Zeste 增强子,三胸)。SET 结构域是除 H3-K79 甲基转移酶 DOT1 以外所有已知组蛋白赖氨酸甲基转移酶的特征。

[0011] 除 Hox 基因沉默以外,显示 PRC-2 介导的组蛋白 H3-K27 甲基化还参与 X 灭活。Plath 等. (2003) *Science* 300:131-5 ;Silva 等. (2003) *Dev Cell* 4:481-95。募集 PRC2 复合物至 Xi 以及随后组蛋白 H3-K27 上的三甲基化在 X 灭活的起始阶段出现,并且依赖 Xist RNA。此外,发现 EZH2 和其相关组蛋白 H3-K27 甲基转移酶活性区别标记多能外胚层细胞和分化的滋养外胚层。Erhardt 等. (2003) *Development* 130:4235-48)。

[0012] 与 EZH2 维持多能外胚层细胞的表观遗传修饰模式的作用一致,Cre 介导的 EZH2 去除引起细胞中组蛋白 H3-K27 甲基化的缺失。Erhardt 等. (同上)。此外,前列腺和乳腺癌细胞系和组织的研究显示 EZH2 和 SUZ12 水平之间的强烈相关性,以及这些癌症的侵袭性 (Bracken 等. (2003) *EMBO J* 22:5323-35 ;Kirmizis 等. (2003) *Mol Cancer Ther* 2:113-21 ; Kleeer 等. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11606-11 ;Varambally 等. (2002) *Nature* 419:624-9), 指示 RRC2 复合物的功能障碍可能引起癌症。

[0013] 近期,报道 EZH2 第 641 位酪氨酸 (Y641F、Y641N、Y641S 和 Y641H) 的体细胞突变与滤泡性淋巴瘤 (FL) 和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 的生发中心 B 细胞样 (GCB) 亚型相关。Morin 等. (2010) *Nat Genet* 42:181-5。在所有情况中,发现突变 EZH2 基因的出现是杂合的,并且通过转录组测序在所述突变样品中检测到野生型和突变等位基因的表达。还证明 EZH2 的所有突变形式都可纳入多蛋白 PRC2 复合物,但所形成的复合物缺失催化肽底物的 H3-K27 等价残基甲基化的能力。因此,总结来说,EZH2 的 Tyr641 处的疾病相关变化导致 EZH2 催化 H3-K27 甲基化方面的功能缺失。

发明内容

[0014] 本发明的一个方面涉及调节野生型和突变组蛋白甲基转移酶 EZH2 的活性,所

述 EZH2 是 PRC2 复合物的催化亚基,所述 PRC2 复合物催化组蛋白 H3 上第 27 位赖氨酸 (H3-K27) 单 - 至三 - 甲基化。例如,本发明涉及抑制 EZH2 的某些突变形式的活性。EZH2 的突变形式包括用其它氨基酸残基替换野生型 EZH2 的第 641 位酪氨酸 (Y641, 以及 Tyr641)。

[0015] 本发明的另一个方面涉及根据双甲基化的 H3-K27me₂ 水平,或优选根据双甲基化的 H3-K27me₂ 和三甲基化的 H3-K27me₃ 水平来测定患者对 EZH2 抑制子的响应。例如,有低水平或不可检测水平的双甲基化 H3-K27me₂ 的细胞或有低 H3-K27me₂/me₃ 比例的细胞对 EZH2 抑制子的抗增殖效果的响应比有典型更高 H3-K27me₂/me₃ 比例的细胞多许多。

[0016] 本发明的一个方面是在对象内抑制 H3-K27 向三甲基化 H3-K27 转换的方法。所述方法包括以下步骤:向表达 EZH2 的 Y641 突变体的对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂,其中,所述抑制剂抑制 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性,从而抑制所述对象中 H3-K27 向三甲基化 H3-K27 转换。

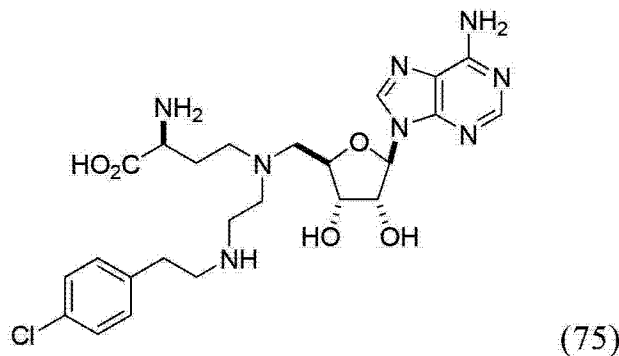
[0017] 在本发明的这个和其它方面,在一个实施方式中,所述抑制剂抑制 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。

[0018] 在本发明的这个和其它方面,在一个实施方式中,所述抑制剂选择性抑制 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。

[0019] 在本发明的这个和其它方面,在一个实施方式中,所述 EZH2 的 Y641 突变体选自 Y641F、Y641H、Y641N 和 Y641S。

[0020] 在本发明的这个和其它方面,在一个实施方式中,所述 EZH2 的抑制剂是 S-腺苷-L-高半胱氨酸或是其药学上可接受的盐。

[0021] 在本发明的这个和其它方面,在一个实施方式中,所述 EZH2 的抑制剂是化合物 75 [0022]



[0023] 或其药学上可接受的盐。

[0024] 本发明的一个方面是在对象内抑制 H3-K27 向三甲基化 H3-K27 转换的方法。所述方法包括以下步骤:实行分析以检测来自对象的样品中 EZH2 的 Y641 突变体;以及向表达 EZH2 的 Y641 突变体的对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂,其中,所述抑制剂抑制 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性,从而抑制所述对象中 H3-K27 向三甲基化 H3-K27 转换。

[0025] 在本发明的方面和其它方面,在一个实施方式中,实行用于检测 EZH2 的 Y641 突变体的分析包括检测 EZH2 的 Y641 突变体编码核酸的全基因组重测序或目标区域重测序。

[0026] 在本发明的这个和其它方面,在一个实施方式中,实行用于检测 EZH2 的 Y641 突变体的分析包括使所述样品接触抗体,所述抗体特异性结合有 EZH2 的 Y641 突变体特点的多肽或其片段。

[0027] 在本发明的这个和其它方面,在一个实施方式中,实行用于检测 EZH2 的 Y641 突变体的分析包括使所述样品在高严谨条件下接触核酸探针,所述核酸探针与编码有 EZH2 的 Y641 突变体特点的多肽或其片段的核酸杂交。

[0028] 本发明的一个方面是抑制 H3-K27 向三甲基化 H3-K27 转换的方法。所述方法包括以下步骤:使 EZH2 的 Y641 突变体接触含 H3-K27 的组蛋白底物和有效量的 EZH2 抑制剂,其中,所述抑制剂抑制 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性,从而抑制 H3-K27 向三甲基化 H3-K27 转换。

[0029] 本发明的一个方面是鉴定对象为 EZH2 抑制剂处理的候选者的方法。所述方法包括以下步骤:实行分析以检测来自对象的样品中 EZH2 的 Y641 突变体;并鉴定表达 EZH2 的 Y641 突变体的对象作为用 EZH2 抑制剂处理的候选者,其中,所述抑制剂抑制 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性。

[0030] 本发明的一个方面是鉴定 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂的方法。所述方法包括以下步骤:组合经分离 EZH2 的 Y641 突变体和组蛋白底物、甲基基团供体和测试化合物,其中所述组蛋白底物包括选自下组的一种 H3-K27 形式:未甲基化 H3-K27、单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27,及其任意组合;和实行分析以检测所述组蛋白底物内的 H3-K27 甲基化,从而在所述测试化合物存在下的 H3-K27 甲基化少于所述测试化合物缺失下的 H3-K27 甲基化时,鉴定所述测试化合物为 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂。

[0031] 在一个实施方式中,进行实验以检测所述组蛋白底物中的 H3-K27 甲基化,所述分析包括检测经标记甲基基团的掺入。

[0032] 在一个实施方式中,所述标记的甲基基团是同位素标记的甲基基团。

[0033] 在一个实施方式中,实行分析以检测所述组蛋白底物中的 H3-K27 甲基化,所述分析包括使所述组蛋白底物接触特异性结合三甲基化 H3-K27 的抗体。

[0034] 本发明的一个方面是鉴定 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂的方法。所述方法包括以下步骤:组合经分离 EZH2 的 Y641 突变体和组蛋白底物、甲基基团供体和测试化合物,其中,所述组蛋白底物包含选自下组的一种 H3-K27 形式:未甲基化 H3-K27、单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27 及其任意组合;和实行分析以检测所述组蛋白底物中的三甲基化 H3-K27 的形成,从而在所述测试化合物存在下的三甲基化 H3-K27 形成少于所述测试化合物缺失下的三甲基化 H3-K27 形成时,鉴定所述测试化合物为 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂。

[0035] 在一个实施方式中,实行分析以检测组蛋白底物中三甲基化 H3-K27 的形成,所述分析包括检测经标记甲基基团的掺入。

[0036] 在一个实施方式中,所述标记的甲基基团是同位素标记的甲基基团。

[0037] 在一个实施方式中,实行分析以检测组蛋白底物中三甲基化 H3-K27 的形成,所述分析包括使所述组蛋白底物接触特异性结合三甲基化 H3-K27 的抗体。

[0038] 本发明的一个方面是鉴定 EZH2 的 Y641 突变体的选择性抑制剂的方法。

[0039] 所述方法包括以下步骤:组合经分离 EZH2 的 Y641 突变体和组蛋白底物、甲基基团供体和测试化合物,其中,所述组蛋白底物包括选自下组的一种 H3-K27 形式:单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27,以及单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 的组合,从而形成测试混合物;组合经分离野生型 EZH2 和组蛋白底物、甲基基团供体和测试化合物,其中,所述组蛋白底物包含选自下组的一种 H3-K27 形式:单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27,以及单甲

基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 的组合,从而形成对照混合物;实行分析以检测各测试混合物和对照混合物中组蛋白底物的三甲基化;计算 (a) 采用 EZH2 的 Y641 突变体加测试化合物的三甲基化 (M+) 对 (b) 采用 EZH2 的 Y641 突变体不加测试化合物的三甲基化 (M-) 的比例;计算 (c) 采用野生型 EZH2 加测试化合物的三甲基化 (WT+) 对 (d) 采用野生型 EZH2 不加测试化合物的三甲基化 (WT-) 的比例;比较比例 (a)/(b) 和比例 (c)/(d);当比例 (a)/(b) 少于比例 (c)/(d) 时,鉴定所述测试化合物为 EZH2 的 Y641 突变体的选择性抑制剂。

[0040] 本发明的一个方面是治疗癌症的方法。所述方法包括以下步骤:向患有表达 EZH2 的 Y641 突变体的癌症的对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂,其中,所述抑制剂抑制 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性,从而治疗所述癌症。

[0041] 在本发明的这个和其它方面,在一个实施方式中,所述癌症选自滤泡性淋巴瘤和具有生发中心 B 细胞样 (GCB) 亚型的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)。

[0042] 本发明的一个方面是治疗癌症的方法。所述方法包括以下步骤:向患有表达 EZH2 的 Y641 突变体的癌症的对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂,其中,所述抑制剂选择性抑制 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性,从而治疗所述癌症。

[0043] 本发明的一个方面是治疗癌症的方法。所述方法包括以下步骤:实行分析以检测样品中 EZH2 的 Y641 突变体,所述样品包含来自患癌对象的癌细胞;以及向表达 EZH2 的 Y641 突变体的对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂,其中,所述抑制剂抑制 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性,从而治疗所述癌症。

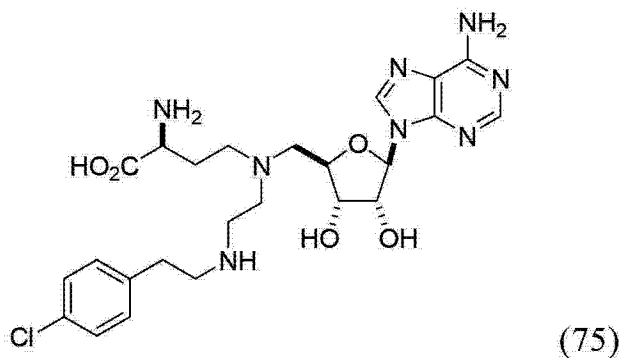
[0044] 本发明的另一个方面是测定对象内对 EZH2 抑制剂的响应的的方法。在一个实施方式中,所述方法包括从所述对象分离组织样品;检测所述组织样品中 H3-K27 的双甲基化 (me2) 水平;比较所述双甲基化 (me2) 水平和对照双甲基化 (me2) 水平;以及,当所述双甲基化 (me2) 水平缺失或低于所述对照双甲基化 (me2) 水平时,鉴定所述对象响应所述 EZH2 抑制剂。在一个实施方式中,所述方法还包括检测所述组织样品内 H3-K27 的三甲基化 (me3) 水平;比较所述三甲基化 (me3) 水平和对照三甲基化 (me3) 水平,并比较所述双甲基化 (me2) 水平和对照双甲基化 (me2) 水平;以及,当所述三甲基化 (me3) 水平等同于或高于所述对照三甲基化 (me3) 水平并且所述双甲基化 (me2) 水平缺失或低于所述对照双甲基化 (me2) 水平时,鉴定所述对象响应所述 EZH2 抑制剂。在另一个实施方式中,所述方法还包括获得所述组织样品中 H3-K27 的双甲基化 (me2) 水平与三甲基化 (me3) 水平的比例;获得所述对照双甲基化 (me2) 水平与对照三甲基化 (me3) 水平的比例;比较所述比例与所述对照比例;以及,在所述比例低于所述对照比例时,鉴定所述对象响应所述 EZH2 抑制剂。在一个优选实施方式中,所述对象患癌。在一个实施方式中,所述癌症是滤泡性淋巴瘤。或者,所述癌症是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)。在另一个优选实施方式中,所述对象表达 EZH2 的 Y641 突变体。在一个优选实施方式中,所述 Y641 突变体是 Y641F、Y641H、Y641N 或 Y641S。

[0045] 本发明的一个方面是选择用于患癌对象的治疗的方法。所述方法包括通过双甲基化 H3-K27 水平或优选通过双甲基化 H3-K27 水平和三甲基化 H3-K27 水平来测定所述对象对 EZH2 抑制剂的响应;以及在所述对象响应所述 EZH2 抑制剂时向所述对象提供所述 EZH2 抑制剂。在一个实施方式中,所述癌症是滤泡性淋巴瘤。或者,所述癌症是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)。在另一个优选实施方式中,所述对象表达 EZH2 的 Y641 突变体。在一个优

选实施方式中,所述 Y641 突变体是 Y641F、Y641H、Y641N 或 Y641S。

[0046] 本发明的一个方面是化合物 75

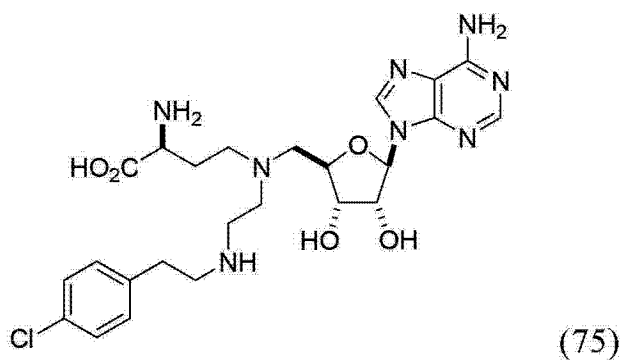
[0047]



[0048] 或其药学上可接受的盐。

[0049] 本发明的一个方面是某一药物组合物,所述药物组合物包含化合物 75

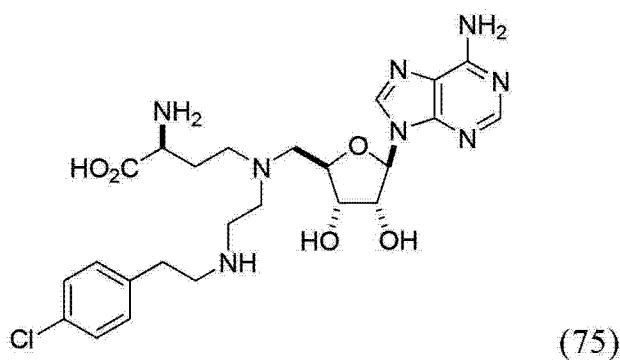
[0050]



[0051] 或其药学上可接受的盐。

[0052] 本发明的一个方面是化合物 75

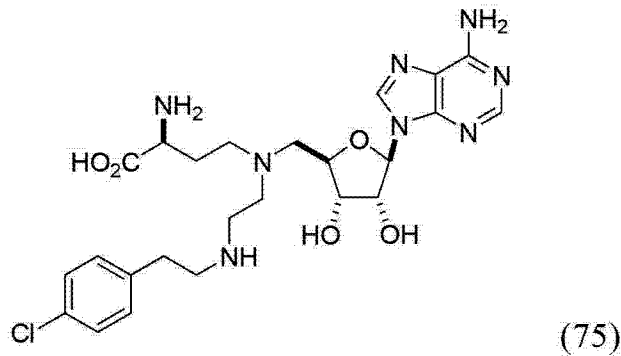
[0053]



[0054] 或其药学上可接受的盐在治疗滤泡性淋巴瘤中的应用。

[0055] 本发明的一个方面是化合物 75

[0056]



[0057] 或其药学上可接受的盐在治疗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 中的应用。

[0058] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员通常所理解的同样含义。在说明书中,单数形式也包含多数形式,除非上下文另有明确说明。虽然在本发明的实施或测试中可以采用类似于或等同于本文所述的那些方法和材料,但是下面描述了合适的方法和材料。本文提到的所有出版物、专利申请、专利或其它参考文献均通过引用纳入。本文引用的文献并非承认是所要求权利的发明的在先技术。在抵触的情况下,以本说明书(包括定义在内)为准。此外,材料、方法和实施例都仅是说明性,并不意在构成限制。

[0059] 从以下发明详述和所附权利要求书很容易了解本发明的其他特征和优点。

附图说明

[0060] 图 1 的两幅图确定 B 细胞淋巴瘤相关的 EZH2 突变体是活性组蛋白甲基转移酶。以 (A) 使用肽 (H3 21-44) 为底物的甲基转移反应,和 (B) 使用禽类核小体为底物的甲基转移反应检测包含野生型和 EZH2 的多种 Y641 突变体的 PRC2 复合物的体外甲基转移酶活性。符号:野生型 (•)、Y641F(o)、Y641H(□)、Y641N(■) 和 Y641S(▲)。CPM 是每分钟的计数,指作为 ³H 辐射结果的闪烁计数。

[0061] 图 2 的四幅图确定包含突变 EZH2 的 PRC2 复合物优先催化组蛋白 H3-K27 的双甲基化和三甲基化。(A) 突变和野生型 (WT) 复合物对未甲基化肽 (空心柱)、单甲基化肽 (散点柱) 和双甲基化肽 (实心柱) 的甲基转移酶活性。(B) 就包含野生型 (o)、Y641F(•)、Y641H(□)、Y641N(■) 和 Y641S(▲) 的 PRC2 复合物而言在所有肽甲基化状态中,由 $K_{1/2}$ 判断的肽底物亲和度相似。应注意所有底物和所有酶形式间的 $K_{1/2}$ 值变化少于 3.5 倍。对于底物的任何特定甲基化状态, $K_{1/2}$ 值的变化少于 2 倍。(C) 就 EZH2 的野生型和 Y641 突变体而言酶转换数 (k_{cat}) 以相反的方式随底物甲基化状态而变化。就 EZH2 的野生型 (o) 而言 k_{cat} 随 K27 甲基化状态增加而降低,但就 EZH2 的 Y641F(•)、Y641H(□)、Y641N(■) 和 Y641S(▲) 突变体而言 k_{cat} 随 K27 甲基化状态增加而增加。(D) 就 EZH2 的野生型 (o) 而言催化效率 ($k_{cat}/K_{1/2}$) 随 K27 甲基化状态增加而减少,但就 EZH2 的 Y641F(•)、Y641H(□)、Y641N(■) 和 Y641S(▲) 突变体而言 ($k_{cat}/K_{1/2}$) 随 K27 甲基化状态增加而增加。在图 B-D 中,连接数据点的线不旨在提示任何数学关系,而是仅起到视觉辅助的作用。

[0062] 图 3A 的三张图显示就包含不同 EZH2 突变体的细胞而言 H3-K27me3 (上图)、H3-K27me2 (中图) 和 H3-K27me1 (下图) 的预测相对水平。用表 1 所示的偶联酶稳态速度方程和所述稳态动力学参数来实施模拟。所有值是相对于包含纯合 WT EZH2 的细胞,假定

饱和浓度的胞内 SAM, 相对于 Km, 且胞内核小体浓度类似 Km。

[0063] 图 3B 是对 WT EZH2 纯合或对所示 EZH2 Y641 突变杂合的淋巴瘤细胞系的 H3-K27 甲基化状态相对模式的一系列 Western 印迹分析。从顶至底的图描述用对以下物质特异的抗体探测的结果: 总 EZH2、H3-K27me3、H3-K27me2、H3-K27me1; 总组蛋白 H3 为加样对照。

[0064] 图 4 显示所选提出的导致癌症中组蛋白 H3-K27 上异常高水平三甲基化的机制。这些机制包括: a) EZH2 中 Y641 突变导致底物优先性变化, 优先性从无甲基化组蛋白 H3-K27 至单甲基化和双甲基化组蛋白 H3-K27; b) EZH2 过表达; c) UTX 内灭活酶功能的突变, 导致 H3-K27me3 的去甲基化降低; 以及 d) PRC2 复合物亚基 PHF19/PCL3 过表达, 引起对特定基因的 PRC2 复合物的募集增加以及组蛋白 H3-K27 三甲基化增加。在所有四个模型中, 变化导致基因近端启动子区域中异常的组蛋白 H3-K27 三甲基化, 造成癌症中关键基因的转录抑制。

[0065] 图 5 的 SDS-PAGE 胶显示各所述 5 组分 PRC2 复合物的表达水平与突变和野生型 EZH2 相似。

[0066] 图 6 的一对表格显示突变和野生型 (WT) PRC2 复合物表现出对含 H3-K27 的肽的强底物优先性。针对覆盖全 H3 和 H4 的重叠 15 聚体肽组测试各个酶。以速度 (CPM/分钟) 测量活性, 而报告值代表各反应的两个独立测定的均值。所有复合物中, 最有利的肽是 H3:16-30。对于该肽, WT 复合物的活性比其它任何突变复合物高出 6 倍。

[0067] 图 7 显示 S-腺苷-L-高半胱氨酸 (SAH) 对 EZH2 WT 和 EZH2 的 Y641 突变体的抑制效力。X 轴显示 SAH 的 log 浓度; Y 轴显示抑制百分比。

[0068] 图 8 显示化合物 75 对 EZH2 WT 和 EZH2 的 Y641 突变体的抑制效力。X 轴显示化合物 75 的 log 浓度; Y 轴显示抑制百分比。

[0069] 图 9 显示细胞系组中 H3-K27me1、me2 和 me3 的相对水平的 Western 印迹分析, 所述细胞系包括表达 WT 或 Y641 突变 EZH2 的多种 DLBCL 细胞系。a) 从所示细胞系提取组蛋白, 通过 SDS-PAGE 用 4-20% 的胶分级分离, 转至硝化纤维素膜, 并用抗组蛋白 H3、H3-K27me1、me2 或 me3 的抗体探测。通过从所示细胞系制备全细胞裂解物, 如上所述处理并用抗 EZH2 的抗体探测, 来测定 EZH2 水平。b) 从所示细胞系提取组蛋白, 并如上所述处理, 除了 EZH2 水平未测定。

[0070] 图 10 显示在 WT 和 Y641 突变淋巴瘤细胞系组中 H3 和 H3-K27me3 水平的免疫细胞化学分析。固定来自所示细胞系的细胞团并石蜡包埋。制作切片并使用抗组蛋白 H3 或 H3-K27me3 的抗体通过免疫细胞化学评估 H3 和 H3-K27me3 的水平。

[0071] 图 11 显示在 WT 和 Y641 突变淋巴瘤细胞系组中 H3 和 H3-K27me2 水平的免疫细胞化学分析。固定来自所示细胞系的细胞团并石蜡包埋。制作切片并使用抗组蛋白 H3 或 H3-K27me2 的抗体通过免疫细胞化学评估 H3 和 H3-K27me2 的水平。

[0072] 图 12 显示在 Y641 突变 WSU-DLCL2 细胞中通过 EZH2 抑制剂处理对总 H3-K27me3 水平的抑制作用。用所示浓度的 EZH2 抑制剂 A 或 B 处理 WSU-DLCL2 细胞 4 天。在化合物处理后, 提取组蛋白, 通过 SDS-PAGE 在 4-20% 胶上分级分离, 转至硝化纤维素膜上, 并用抗组蛋白 H3 或 H3-K27me3 的抗体探测。

[0073] 图 13 显示 EZH2 抑制剂能够阻断 Y641 突变 WSU-DLCL2 细胞增殖, 但对非 Y641 突变 OCI-LY19 细胞几乎没有影响。在存在递增浓度的 EZH2 抑制剂 A 或 B 情况下孵育细胞 11 天。纳入载剂处理的 (DMSO) 细胞作为对照。在 Guava EasyCyte Plus 仪器中用 Guava

Viacount 分析测定细胞数和活力。细胞每 3-4 天分裂,并补充培养基和化合物。

[0074] 图 14 显示 EZH2 (Y641) 突变存在和 / 或高 H3-K27me3 和低 H3-K27me2 水平预测对 EZH2 抑制剂的敏感性。在递增浓度的一种 EZH2 抑制剂 (至多 25 μ M) 存在下维持细胞系。处理 11 天后,用活细胞计数来获得 IC₉₀ 值。对采用根据 EZH2 突变状态分离的细胞系 (A) 或根据 H3-K27me2 和 H3-K27me3 水平分离的细胞系 (B) 的结果作图。在两张图中,直线显示来自所示细胞系组的 IC₉₀ 均值。

具体实施方式

[0075] 染色质结构在基因调节和表观遗传中是重要的。建立和维持染色质高级结构涉及组蛋白的翻译后修饰;例如,对某些核心组蛋白的尾部通过乙酰化、甲基化、磷酸化、核糖基化和 / 或泛素化修饰。

[0076] EZH2 是组蛋白甲基转移酶,其是 PRC2 复合物的催化亚基,催化组蛋白 H3 上第 27 位赖氨酸 (H3-K27) 的单 - 至三 - 甲基化。组蛋白 H3-K27 的三甲基化是抑制位于组蛋白修饰位点近端的特定基因转录的机制。已知所述三甲基化是癌症如前列腺癌中表达变化的癌症标志 (参见例如,美国专利申请公开号 2003/0175736;其通过引用全文纳入本文)。EZH2 属于多梳家族蛋白 (PcG)。所述多梳家族蛋白通过靶基因的转录抑制来协助维持细胞特性。Jacobs 等. (1999) *Semin Cell Dev Biol* 10(2):227-35; Jacobs 等. (2002) *Biochim Biophys Acta* 1602(2):151-61。DNA 微阵列鉴定 EZH2 在激素抵抗性转移性前列腺癌中上调。Dhanasekaran 等. (2001) *Nature* 412(6849):822-6; Varambally 等. (2002) *Nature* 419(6907):624-9。EZH2 在侵袭性乳腺癌中上调,并且是促侵入表型的调节物。Kleer 等. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100(20):11606-11。永生化的乳腺上皮细胞系中 EZH2 过表达促进锚定非依赖性生长和细胞入侵。Kleer 等. (同上)。EZH2 介导的细胞入侵需要完整 SET 结构域和组蛋白脱乙酰基酶活性。前期研究提供失控 EZH2 表达、转录抑制和肿瘤转化之间功能性连接的证据。Varambally 等. (同上); Kleer 等. (同上)。

[0077] 本发明的一个方面涉及抑制 EZH2 活性,包括 EZH2 某些突变形式。在一个实施方式中,本发明涉及选择性抑制某些 EZH2 突变形式的活性。

[0078] 已报道 EZH2 的单个氨基酸残基 (Tyr641,本文中称作 Y641) 处的 EZH2 基因点突变与人 B 细胞淋巴瘤亚组相关。Morin 等. (2010) *Nat Genet* 42:181-5。特别地, Morin 等报道 EZH2 的酪氨酸 641 (Y641F、Y641H、Y641N 和 Y641S) 的体细胞突变与滤泡性淋巴瘤 (FL) 和弥散性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 的生发中心 B 细胞样 (GCB) 亚型相关。发现所述突变等位基因总与疾病细胞中的野生型等位基因 (杂合的) 相关,并且据报道所述突变消除 PRC2 复合物使未修饰肽底物甲基化的酶活性。

[0079] 现在出乎意料地发现,所述野生型 (WT) EZH2 酶对 H3-K27 的零甲基化至单甲基化反应显示最强的催化功效 (kcat/K),并对后续 (单甲基化至双甲基化,双甲基化至三甲基化) 反应显示较弱的催化功效;因而,与此形成鲜明对比的是,所述疾病相关的 Y641 突变对进行第一次甲基化反应显示非常有限的的能力,但就相对于野生型酶的后续反应而言具有增强的催化功效。这些结果指示,疾病的恶性表型利用了 H3-K27 单甲基化酶 (含 WTEZH2 或 EZH1 的 PRC2) 和含突变 EXH2 的 PRC2 的联合活性来增加 H3-K27 向所述三甲基化形式 (H3-K27me3) 转换。

[0080] 但是,不旨在由任何一个理论束缚,假设 EZH2 中 Y641 突变为苯丙氨酸 (F)、组氨酸 (H)、天冬酰胺 (N) 或丝氨酸 (S) 可以通过影响所述双底物酶三元复合物的活性位点中的氢键构型和 / 或空间位阻来促进多轮 H3-K27 甲基化,影响用于去质子化所述反应赖氨酸的合适水通道形成。Zhang 等. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5728-32。由类推至晶体学和分子动力模拟结果得出该推论,所述结果见于相关蛋白赖氨酸甲基转移酶 LSMT、Dim-5 和 SET7/9 中的酪氨酸突变。

[0081] 例如,当重组 SET7/9 的第 245 位酪氨酸突变为丙氨酸时观察到底物特异性的改变。Dillon 等. (2005) *Genome Biol* 6:227。Y245A 突变 SET7/9 使未修饰的 20 残基肽 (代表 H3-K4 周围序列) 甲基化的能力降低至 WT 酶的约 20%。Xiao 等. (2003) *Nature* 421:652-6。同时,Y245A 突变体使 H3-K4me1 和 H3-K4me2 肽进一步甲基化的能力相对 WT 酶有显著提高 (分别提高约 7 倍和 5 倍)。然而,与本公开关于 EZH2 的 Y641 突变相反,SET7/9Y245 突变为苯丙氨酸不增强所述肽段的单 - 双甲基化,也不增强所述肽段的双 - 三甲基化;反而,SET7/9 的 Y245F 突变对所有肽底物表现出最小催化活性。相似地,所述野生型酶 G9a 能使 H3-K9 双甲基化,但无法进行双 - 三甲基化反应。不过,当 G9a 的第 1067 位酪氨酸 (类似 EZH2 的 Y641) 突变为苯丙氨酸时,所述酶即刻获得使 H3-K9 三甲基化的能力。Wu, H. 等. (2010) *PLoS One* 5, e8570, doi:10.1371/journal.pone.0008570)。

[0082] 前期对人 EZH2 核酸和多肽已有描述。参见例如 Chen 等. (1996) *Genomics* 38:30-7 [746 个氨基酸]、Swiss-Prot 登录号 Q15910 [746 个氨基酸]、GenBank 登录号 NM_004456 和 NP_004447 (同种型 a [751 个氨基酸]) 以及 GenBank 登录号 NM_152998 和 NP_694543 (同种型 b [707 个氨基酸]),其各自均通过引用全文纳入本文。

[0083]

人EZH2的氨基酸序列(Swiss-Prot登录号Q15910) (SEQ ID NO:1)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
 MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGK VHGDR ECGF INDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDGDDPEEREKQKDL EDRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTABEL
 KEKYKELTEQQLP GALPPECTPNIDGPN AKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPH
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYOHLEGAKEFAAALTAERIKT PPKRPGGRRRGR LPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTDS DREAGTETGGENNDKEEEEKKDETS SSSEANSRCQTP IKM
 KPNIEPPENVEW SGAEASMFVLI GTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEF RVKESSI IAPA
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCNTKQCP CYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
 CKNC SIQRGSKHLL LAPS DVAGWGI FIKDPVQKNEFI SEYCGEI ISQDEADRRGKVYDK
 YMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0084]

人EZH2的mRNA序列，转录本变体1(GenBank登录号NM_004456)(SEQ ID NO:2)

ggcggcgcttgattgggctgggggggccaataaaaagcgatggcgattgggctgcgcgct
 ttggcgctcggtcgggtcgcgtccgacaccgggtgggactcagaaggcagtgagccccg
 gcggcggcggcggcggcgcgcgggggcgacgcgcgggaacaacgcgagtcggcgcgcggg
 acgaagaataatcatgggcccagactgggaagaaatctgagaagggaccagtttggtggcg
 gaagcgtgtaaaatcagagtacatgcgactgagacagctcaagagggttcagacgagctga
 tgaagtaaagagtatgttttagttccaatcgtcagaaaattttggaagaacggaaaatcct
 aaaccaagaatggaaacagcgaaggatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc

[0085]

```

attgogcgggactagggagtggttcgggtgaccagtgacttggattttccaacacaagtcatt
cccattaaagactctgaatgcagttgcttcagtaccataatgtattcttgggtctccct
acagcagaatttttatggtggaagatgaaactgttttacataacattccttatatggggaga
tgaagtttttagatcaggatggtactttcattgaagaactaataaaaaattatgatgggaa
agtacacggggatagagaatgtgggttttataaatgatgaatttttgtggagttggtgaa
tgcccttgggtcaatataatgatgatgacgatgatgatggagacgatcctgaagaaag
agaagaaaagcagaaagatctggaggatcacggagatgataaagaaaagccgccacctcg
gaatttctctctgataaatttttgaagccattctcaatgtttccagataagggcac
agcagaagaactaaaggaaaaatataaagaactcacggaacagcagctcccaggcgcact
tctcctgaatgtacccccacatagatggaccaatgctaaatctgttcagagagagca
aagcttacactctttcatacgttttctgtaggcgatgttttaaatatgactgcttct
acatcgtaagtgcaattattcttttcatgcaacccccaacacttataagcgggaagaacac
agaaacagctctagacaacaaactgtggaccacagtgttaccagcatttggaggggagc
aaaggagttttgctgctgctctcacogctgagcggataaagacccccacaaaacgtccagg
aggccgcagaagaggacggcttccccaaataacagtagcaggcccagcccccaccattaa
tgtgctggaatcaaaggatacagacagtgatagggaaagcagggactgaaacggggggaga
gaacaatgataaagaagaagaagagaagaaagatgaaacttcgagctcctctgaagcaaa
ttctcgggtgtcaaacaccaataaagatgaagccaatattgaacctcctgagaatgtgga
gtggagtggtgctgaagcctcaatgttttagagtctcattggcacttactatgacaattt
ctgtgccattgctaggttaattgggaccaaaacatgtagacaggtgtatgagttttagagt
caaagaatctagcatcatagctccagctcccogctgaggatgtggatactcctccaaggaa
aaagaagaggaaacaccggttgtgggctgcacactgcagaaagatacagctgaaaaagga
cggctcctctaaccatgttttacaactatcaaccctgtgatcatccacggcagccttgtga
cagttctgtgcccttgtgtgatagcaaaaattttttgtgaaaagttttgtcaatgtagttc
agagtgtcaaaaccgtttccgggatgcogctgcaaagcacagtgcaacaccaagcagtg
cccgtgctacctggctgtccgagagtgtgaccctgacctctgtcttacttgtggagccgc
tgaccattgggacagtaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagtattcagcggggctccaa
aaagcatctattgctggcaccatctgacgtggcaggctgggggattttttatcaaagatcc
tgtgcagaaaaatgaattcctoagaatactgtggagagatttttctcaagatgaagc
tgacagaagagggaaagtgtatgataaatacatgtgcagcttttctgttcaacttgaacaa

```

[0086]


```

gctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgcagaaaaa
tgaattcatctcagaatactgtggagagattatctcaagatgaagctgacagaagagg
gaaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaacttgaacaatgattttgtggt
ggatgcaacccgcaagggtaacaaaattcgttttgcaaatacattcggtaaatccaaactg
ctatgcaaaagttatgatgggtaacgggtgatcacaggataggtatttttgccaaagagagc
catccagactggcgaagagctgttttttgattacagatacagccaggetgatgccectgaa
gtatgtcggcatcgaaagagaaatggaaatcccttgacatctgctacotcctccccctc
ctctgaaacagctgccttagcttcaggaacctcgagtactgtgggcaatttagaaaaaga
acatgcagtttgaaattctgaatttgcaaagtactgtaagaataatttatagtaatgagt
ttaaaaatcaactttttattgccttctcaccagctgcaaagtgtttgtaccagtgaatt
tttgcaataatgcagtatggtacatttttcaactttgaataaagaatacttgaacttgtc
cttgttgaatc

```

[0091]

EZH2的全氨基酸，同种型b(GenBank登录号NP_694543) (SEQ ID NO:5)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKIL
ERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTREVEDETVLHNI PYMGDEVL
DQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDD
GDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAE
LKEKYKELTEQQLP GALPPECTPNIDGPN AKSVQREQSLHSFHTLFCRR
FKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALT
AERIKTPPKRPGRRRGR LPNNSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETG
GENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTP IKMKPNIEPPENVEWSGAEASM
FRVLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPAPAEDVDTPP
RKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVIA
QNFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCN TKQCPCYLAVRECDPDLCLTCG
AADHWDSKNVSKNC SIQRGSKHLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFIS
EYCGEII SQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNDFVVDATRKG NKIRFANH
SVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGI
EREMEIP

```

[0092] 如上所述,确信 EZH2 的催化位点位于所述蛋白的保守结构域,所述结构域已知是 SET 结构域。所述 EZH2 的 SET 结构域的氨基酸序列由下列跨 Swiss-Prot 登录号 Q15910 (SEQ ID NO:1) 氨基酸残基 613-726 的部分序列提供:

[0093] HLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNDFVVDATRKG
NKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDY

[0094] (SEQ ID NO:6).

[0095] SEQ ID NO:6 中下划线显示的酪氨酸 (Y) 残基是 Swiss-Prot 登录号 Q15910 (SEQ ID NO:1) 中的 Tyr641 (Y641)。

[0096] GenBank 登录号 NP_004447 (SEQ ID NO:3) 的 SET 结构域跨氨基酸残基 618-731, 并且和 SEQ ID NO:6 一致。对应于 Swiss-Prot 登录号 Q15910 中的 Y641, 在 SEQ ID NO:6 中标有下划线的酪氨酸残基是 GenBank 登录号 NP_004447 (SEQ ID NO:3) 中的 Tyr646 (Y646)。

[0097] GenBank 登录号 NP_694543 (SEQ ID NO:5) 的 SET 结构域跨氨基酸残基 574-687, 并且和 SEQ ID NO:6 一致。对应于 Swiss-Prot 登录号 Q15910 中的 Y641, 在 SEQ ID NO:6 中标有下划线的酪氨酸残基是 GenBank 登录号 NP_694543 (SEQ ID NO:5) 中的 Tyr602 (Y602)。

[0098] 编码 GenBank 登录号 NP_004447 的 SET 结构域的核苷酸序列是

[0099] catctattgctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgcagaaaaat
gaattcatctcagaatactgtggagagattatttctcaagatgaagctgacagaagaggaaagtgtatgataaata
catgtgcagctttctgttcaacttgaacaatgattttgtggtggatgcaaccgcaagggttaacaaaattcgttttg
caaatcattcggtaaatccaaactgctatgcaaaagttagatggttaacggtgatcacaggataggtatttttgcc
aagagagccatccagactggcgaagagctgttttttgattac

[0100] (SEQ ID NO: 7),

[0101] 其中编码 Y641 的密码子以下划线显示。

[0102] 为了本申请目的,应理解人 EZH2 的氨基酸残基 Y641 指作为或对应于 Swiss-Prot 登录号 Q15910 中 Y641 的酪氨酸残基。

[0103]

EZHZ的Y641突变体的全氨基酸序列(SEQ ID NO:8)

MGQTGKKSEKGPVCRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
 MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGK VHGDR ECGF INDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRRCFKYDCFLHFFH
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKT PPKRPGGRRRGRLEPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYNDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGS SNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
 CKNCSIQRGSKKHL L LAPS DVAGWGI FIKDPVQKNEFISEXCGEIIISQDEADRRRGKVYDK
 YMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

其中，x可以是酪氨酸(Y)以外的任何氨基酸残基

[0104] 为了本申请目的，还应理解人 EZH2 的 Y641 突变体（等同地，EZH2 的 Y641 突变体）指某一人 EZH2，其中对应于野生型人 EZH2 的 Y641 的氨基酸残基被酪氨酸以外的氨基酸残基取代。

[0105] 在一个实施方式中，所述 EZH2 的 Y641 突变体的氨基酸序列与野生型人 EZH2 的氨基酸序列的区别仅在于对应于野生型人 EZH2 中 Y641 的单个氨基酸残基被酪氨酸以外的氨基酸残基取代。

[0106] 在一个实施方式中，所述 EZH2 的 Y641 突变体的氨基酸序列与野生型人 EZH2 的氨基酸序列的区别仅在于对应于野生型人 EZH2 中 Y641 的单个氨基酸残基被苯丙氨酸 (F) 取代。根据该实施方式，所述 EZH2 的 Y641 突变体在本文中称为 Y641F 突变体，或等同地，称为 Y641F。

[0107]

Y641F (SEQ ID NO: 9)

MGQTGKKSEKGPVCRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW

[0108]

```

KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLP GALPPECTPNIDGPN AKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPEH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGR LPN
NSSRPSTPTINVLESKDTDS DREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTP IKM
KPNIEPPENVEW SGAEASMFV LIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEF RVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGS SNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKHLLLAPSDVAGWGI FIKDPVQKNEFISEFCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMC SFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRI GIFA KRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

```

[0109] 在一个实施方式中,所述 EZH2 的 Y641 突变体的氨基酸序列与野生型人 EZH2 的氨基酸序列的区别仅在于对应于野生型人 EZH2 中 Y641 的单个氨基酸残基被组氨酸 (H) 取代。根据该实施方式,所述 EZH2 的 Y641 突变体在本文中称为 Y641H 突变型,或等同地,称为 Y641H。

[0110]

Y641H (SEQ ID NO: 10)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLP GALPPECTPNIDGPN AKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPEH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGR LPN
NSSRPSTPTINVLESKDTDS DREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTP IKM
KPNIEPPENVEW SGAEASMFV LIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEF RVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGS SNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKHLLLAPSDVAGWGI FIKDPVQKNEFISEHCGEIIISQDEADRRGKVYDK

```

[0111]

```

YMC SFLFNLNND FVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

```

[0112] 在一个实施方式中,所述 EZH2 的 Y641 突变体的氨基酸序列与野生型人 EZH2 的氨基酸序列的区别仅在于对应于野生型人 EZH2 中 Y641 的单个氨基酸残基被天冬酰胺 (N) 取代。根据该实施方式,所述 EZH2 的 Y641 突变体在本文中称为 Y641N 突变体,或等同地,称为 Y641N。

[0113]

Y641N (SEQ ID NO: 11)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTABEL
KEKYKELTEQQLP GALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPGQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKT PPKRPGGRRRGR LPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEW SGAEASMFVRLIGTYD NFC AIARLIGTKTCRQVYEF RVKESSI IAPA
PAEDVDT PPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHL LAPS DVAGWGI FIKDPVQKNEFISENCGE IISQDEADRRGKVYDK
YMC SFLFNLNND FVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

```

[0114] 在一个实施方式中,所述 EZH2 的 Y641 突变体的氨基酸序列与野生型人 EZH2 的氨基酸序列的区别仅在于对应于野生型人 EZH2 中 Y641 的单个氨基酸残基被丝氨酸 (S) 取代。根据该实施方式,所述 EZH2 的 Y641 突变体在本文中称为 Y641S 突变型,或等同地,称为 Y641S。

[0115]

Y641S (SEQ ID NO: 12)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ

```

[0116]

```

YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHFPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPGQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWVSGAEASMFVRLIGTYDYNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIKIDFPVQKNEFISESCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

```

[0117] 对 EZH2 中含多种 Y641 突变的耐受提示指出,空间位阻拥挤的释放可允许更多使用合适排列更大二甲基赖氨酸作为所述双 - 三甲基化反应底物的二甲基赖氨酸有更多合适的排列。所述蛋白甲基化转移酶 SET7/9 和 G9a 的晶体学分析揭示,所述活性位点酪氨酸残基的侧链羟基直接参与和甲基受体赖氨酸中的胺的氢键相互作用,或通过插入水分子而间接地参与。虽然所述 Y641 突变体型的较大活性位点在双和三甲基化方面占优势,但是酪氨酸羟基氢键受体的缺失可能就初始甲基转移至所述赖氨酸的胺而言引起不利的活性位点方向。

[0118] 表 1 中总结的数据清楚显示目前人疾病结果的含义(见下)。预计就 EZH2 杂合的细胞会显示恶性表型,这归因于由野生型酶有效形成 H3-K27me1,该祖种向 H3-K27 有效的后续转换,特别是通过突变酶形式的 H3-K27me3。

[0119] 已报道 H3-K27me1 的形成并不专一依赖 WT-EZH2 催化。EZH2 和其它 PRC2 亚基——EED 的敲除研究证明,H3-K27me1 的形成可由包含 EZH2 或作为催化亚基的相关蛋白 EZH1 的 PRC2 复合物催化。Shen, X. 等. (2008) *Mol Cell* 32:491-502. 因此,突变 EZH2 种类和包含 WT-EZH2 或 WT-EZH1 的 PRC2 复合物之间的催化偶联足以增强 H3-K27me2/3 形成,并因此产生伴随的恶性表型。因此,数据提示滤泡性淋巴瘤 (FL) 和具有生发中心 B 细胞 (GCB) 亚型的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 的恶性表型与 EZH2 突变形式的表达相关,是在 H3-K27 的三甲基化形式形成方面的总体功能获得的结果。对于数据的这种解释还帮助调和存在癌症相关 EZH2 或 PRC2 相关蛋白(例如,PHF19/PCL3)过表达,以及组蛋白 H3-K27 去甲基化酶 UTX 的功能缺失基因型。UTX 活性缺失在酶学上等同于 EZH2 功能获得,任一情况下都引起癌细胞中更加稳态水平的三甲基化 H3-K27(图 4)。

[0120] 组蛋白 H3-K27 的单 -、双 - 和三 - 甲基化状态与转录控制中的不同功能相关。组蛋白 H3-K27 的单甲基化与准备转录的基因的活性转录相关。Cui 等. (2009) *Cell Stem Cell* 4:80-93;Barski (2007) *Cell* 129:823-37. 相反,组蛋白 H3-K27 的三甲基化在组蛋白 H3-K4 顺式三甲基化时与抑制转录的基因或准备转录的基因相关联。Cui 等. (同上); Kirmizis 等. (2007) *Genes Dev* 18:1592-1605;Bernstein 等. (2006) *Cell* 125:315-26. 总而言之,预计癌症中报道的 PRC2 复合物活性的变化(包括 EZH2 的 Y641 突变)造成组蛋白

H3-K27 的三甲基化状态的增加,并因此造成转录抑制。

[0121] 本发明的另一个发现是,一般而言,表达 EZH2 的 Y641 突变体的细胞比表达 WT EZH2 的细胞对小分子 EZH2 抑制剂更敏感。具体来说,表达 EZH2 的 Y641 突变体的细胞显示下降的生长、分裂或增殖,或甚至在用 EZH2 抑制剂处理后经历凋亡或坏死。与之相反,表达 WT EZH2 的细胞不响应所述 EZH2 抑制剂的抗增殖效果(图 13 和 14)。本发明的另一个令人吃惊的发现是,表达 WT EZH2 的细胞有可能显示与表达 Y641 EZH2 的细胞相似的组蛋白 H3-K27 甲基化状态,而该甲基化状态也能与对 EZH2 抑制剂的敏感性关联,无关 EZH2 的突变状态。一般而言,含 Y641 突变体的细胞系中的总 H3-K27me₃ 水平类似于或高于表达 WT EZH2 的细胞系;然而,EZH2Y641 突变细胞系和某些野生型细胞系(例如 Pfeiffer 细胞系)中的 H3-K27me₂ 水平显著低于其它野生型细胞系(图 9、10 和 11)。因此,Y641 突变细胞系和 Pfeiffer 细胞系中的 H3-K27me₂/me₃ 信号比相较其它 WT 细胞系中观察到的低得多。该数据还证明,相对于典型的表达 WT EZH2 的细胞系,有低 H3-K27me₂ 信号和相似或较高 H3-K27me₃ 信号的细胞系对小分子 EZH2 抑制剂更敏感。具体而言,有低 H3-K27me₂ 信号和正常或高 H3-K27me₃ 信号的细胞在用 EZH2 抑制剂处理后停止分裂,或甚至死亡(图 9、10、11、13 和 14)。相反,有较高 H3-K27me₂/me₃ 信号比的细胞不响应所述 EZH2 抑制剂的抗增殖效果(图 9、10、11、13 和 14)。本发明提供先前未知和预料之外的结果,通过在患者内使用能用于鉴定哪些患者会响应 EZH2 抑制剂处理的技术例如 western 印迹、MS 或 IHC,鉴定患者肿瘤内 EZH2 Y641 突变,和 / 或检测相对于对照的低 H3-K27me₂ 水平和正常或高 H3-K27me₃ 水平。

[0122] 已表明 EZH2 和其它蛋白甲基转移酶是就药物开发而言有吸引力的靶标。Copeland 等. (2009) *Nat Rev Drug Discov* 8:724-32; Copeland 等. (2010) *Curr Opin Chem Biol* 14(4):505-10; Pollock 等. (2010) *Drug Discovery Today:Therapeutic Strategies* 6(1):71-9。该数据还提示用于开发 FL 和 GCB 淋巴瘤特异性药物的实验策略。由于 WT 和疾病相关突变体之间的底物识别差异源自过渡态相互反应,选择性模拟所述突变 EZH2 过渡态超过所述 WT 酶的小分子抑制剂应证明在含突变细胞中有效阻断 H3-K27 甲基化。由于对于仅含所述 WT 酶的任何细胞,目标介导的毒性会是最小,预计该类型的抑制剂会显示高治疗指数。过渡态模拟证明是用于众多疾病区中药物设计的有效策略。参见例如, Copeland R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis* (《酶:实用结构、机制和数据分析入门》) 第二版, (威利出版公司 (Wiley), 2000)。

[0123] 该结果指出先前期未认识到的,在实施 H3-K27 单甲基化的酶和用于滤泡性淋巴瘤和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤发病机理的某些 EZH2 突变形式之间酶偶联的令人吃惊的依赖。尽管不意在受任何一种理论束缚,相信所述数据是构成依赖所述正常 (WT) 酶和疾病相关突变 (Y641) 酶之间催化活性偶联的人疾病的第一个例子。

[0124] 本发明的一个方面是用于在对象内抑制 H3-K27 向三甲基化 H3-K27 转换的方法。所述抑制可以涉及在对象内抑制未甲基化的 H3-K27 向单甲基化的 H3-K27 转换,单甲基化的 H3-K27 向双甲基化的 H3-K27 转换,双甲基化的 H3-K27 向三甲基化的 H3-K27 转换,或其任意结合,包括例如,单甲基化的 H3-K27 向双甲基化的 H3-K27 转换和双甲基化的 H3-K27 向三甲基化的 H3-K27 转换。如本文所用,“未甲基化的 H3-K27”指不含与第 27 位赖氨酸氨基基团共价相连的甲基基团的组蛋白 H3。如本文所用,“单甲基化的 H3-K27”指含一个与第

27 位赖氨酸氨基基团共价相连的甲基基团的组蛋白 H3。单甲基化的 H3-K27 在本文中也称作 H3-K27me1。如本文所用,“双甲基化的 H3-K27”指含两个与第 27 位赖氨酸氨基基团共价相连的甲基基团的组蛋白 H3。双甲基化的 H3-K27 在本文中也称作 H3-K27me2。如本文所用,“三甲基化的 H3-K27”指含三个与第 27 位赖氨酸氨基基团共价相连的甲基基团的组蛋白 H3。三甲基化的 H3-K27 在本文中也称作 H3-K27me3。

[0125] 组蛋白 H3 是长 136 个氨基酸的蛋白,其序列已知。参见例如,GenBank 登录号 CAB02546,其内容通过引用纳入本文。如本文进一步公开的,除全长组蛋白 H3 以外,可使用含有对应于全长组蛋白 H3 中 K27 的赖氨酸残基的组蛋白 H3 肽段作为 EZH2 (和就 EZH2 突变形式而言类似) 的底物,来评估 H3-K27m1 向 H3-K27m2 的转换和 H3-K27m2 向 H3-K27m3 的转换。在一个实施方式中,所述肽段对应于组蛋白 H3 的氨基酸残基 21-44。所述肽段具有氨基酸序列 LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO:13)。

[0126] 所述方法涉及:向表达 EZH2 的 Y641 突变体的对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂,其中,所述抑制剂抑制 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性,从而抑制所述对象中 H3-K27 向三甲基化 H3-K27 转换。在一个实施方式中,表达 EZH2 的 Y641 突变体的对象指具有可检测量的 Y641 突变 EZH2 多肽的对象。在一个实施方式中,表达 EZH2 的 Y641 突变体的对象指具有可检测量的 Y641 突变 EZH2 多肽编码核酸的对象。

[0127] Y641 突变 EZH2 多肽可使用任何合适的方法检测。例如,可以使用特异性结合所述 Y641 突变 EZH2 多肽或特异性结合有 Y641 突变 EZH2 多肽特点的肽段的抗体检测 Y641 突变 EZH2 多肽。有所述 Y641 突变 EZH2 多肽特点的肽段可包括例如,SEQ ID NO:6 中提供的 SET 结构域,除了由非酪氨酸的氨基酸残基替代 Y641。在另一个实施方式中,有所述 Y641 突变 EZH2 特点的肽段可包括例如,SEQ ID NO:6 中提供的 SET 结构域的 10 ~ 113 个氨基酸片段,除了由非酪氨酸的氨基酸残基替代 Y641,前提是所述片段包括对应于 Y641 的氨基酸残基。预计所述抗体的抗原包括对应于野生型 EZH2 的 Y641 的氨基酸残基。认为抗体特异性结合 Y641 突变 EZH2 多肽或有 Y641 突变 EZH2 多肽特点的肽段,条件是其结合所述突变 EZH2 多肽或其肽段,但不结合相应的野生型 EZH2 多肽或其肽段。在一个实施方式中,认为所述抗体特异性结合 Y641 突变 EZH2 多肽或有 Y641 突变 EZH2 多肽特点的肽段,条件是所述抗体结合所述突变 EZH2 多肽或其肽段的亲和性比相应野生型 EZH2 多肽或其肽段高至少约 100 倍。在一个实施方式中,认为所述抗体特异性结合 EZH2 多肽的 Y641 突变体或有 EZH2 多肽的 Y641 突变体特点的肽段,条件是所述抗体结合所述突变 EZH2 多肽或其肽段的亲和性比相应野生型 EZH2 多肽或其肽段高至少约 1000 倍。可在例如酶联免疫吸附实验 (ELISA) 或 Western 印迹实验中使用所述抗体。

[0128] 在一个实施方式中,所述抗体是单克隆抗体。可以按照本领域熟知的传统方法准备单克隆抗体。参见例如,Köhler 和 Milstein (1975) Nature 256 (5517):495-7。

[0129] 作为另一示例,可以使用质谱 (MS) 检测 Y641 突变 EZH2 多肽,例如电喷雾电离-飞行时间 (ESI-TOF) 或基体辅助激光解吸/电离-飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱。所述方法是本领域众所周知的。所述分析可涉及鉴定包含感兴趣突变的一个或多个肽段,例如,长 12 ~ 24 个氨基酸的肽,其包含跨对应于野生型 EZH2 中 Y641 的氨基酸的序列。

[0130] 编码 Y641 突变 EZH2 多肽或有 Y641 突变 EZH2 多肽特点的肽段的核酸可使用任何合适的方法检测。例如编码 Y641 突变 EZH2 多肽的核酸可使用合适选定来源的 DNA

和多聚酶链式反应 (PCR) 引物依照本领域熟知的方法,用全基因组重测序或目标区域重测序(后者也称为靶向重新测序)来检测。参见例如, Bentley(2006) *Curr Opin Genet Dev.* 16:545-52 和 Li 等. (2009) *Genome Res* 19:1124-32。所述方法通常一般包括以下步骤:基因组 DNA 纯化、PCR 扩增以扩增感兴趣的区域、循环测序、测序反应清除、毛细管电泳和数据分析。用于覆盖感兴趣区域的高质量 PCR 引物使用计算机模拟引物设计工具来设计。循环测序是一种简单方法,其中热循环仪内连续数轮变性、退火和延伸会产生延伸产物的线性扩增。所述产物通常以鉴定末端核苷酸碱基 G、A、T 或 C 的荧光标签终止。

[0131] 清洗移除可能竞争毛细管电泳注射的未掺入染料终止剂和盐。在毛细管电泳期间,循环测序反应的产物在充满聚合物的毛细管内迁移。带负电的 DNA 片段在其通过所述毛细管向正电极移动时按尺寸分离。电泳后,数据收集软件创建原始数据的样品文件。使用下游应用软件,运行进一步数据分析以将收集的色彩数据图像转换成相应的核苷酸碱基。替代地或此外,所述方法可包括使用基于微阵列的目标区域基因组 DNA 捕获和/或测序。用于选择合适 PCR 引物和进行重测序的试剂盒、试剂和方法市售可得,例如来自应用生物系统公司 (Applied Biosystems)、安捷伦 (Agilent) 和 NimbleGen (罗氏诊断公司 (Roche Diagnostics GmbH))。已使用诸如此类的方法来检测 JAK2 和骨髓增殖白血病基因 (MPL) 突变,并诊断真性红细胞增多症、原发性血小板增多症和特发性骨髓纤维变性。对于本发明的应用,可选择 PCR 引物来扩增例如至少相关部分的 SEQ ID NO:7 (上述)。

[0132] 替代地或此外,编码 Y641 突变 EZH2 多肽的核酸可以用 Southern 印迹依照本领域熟知方法来检测。在一个实施方式中,编码 Y641 突变 EZH2 多肽的 DNA 序列使用高严谨条件下的核酸杂交来检测。选择核酸探针,使其序列与靶核酸序列互补,所述靶核酸序列包括对应于野生型 EZH2 中 Y641 的突变氨基酸的密码子。

[0133] 在高严谨条件下使序列特异性探针结合待测样品。本文所用的术语“高严格严谨条件”指本领域常用的参数。核酸杂交参数可见于汇编所述方法的参考文献,例如, J. Sambrook 等编, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (《分子克隆:实验室手册》), 第二版, 纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989, 或 F. M. Ausubel 等编, *Current Protocols in Molecular Biology* (《新编分子生物学实验指南》), 纽约的约翰威立父子出版公司 (John Wiley & Sons, Inc.)。更具体地,本文所用的“高严谨条件”指,例如,在杂交缓冲液 (3.5×SSC、0.02% Ficoll、0.02% 聚乙烯吡咯烷酮、0.02% 牛血清白蛋白 (BSA)、2.5 mM NaH_2PO_4 (pH 7)、0.5% SDS、2 mM EDTA) 中 65° C 杂交。SSC 是 0.15 M 氯化钠 / 0.015 M 柠檬酸钠、pH 7; SDS 是十二烷基磺酸钠; EDTA 是乙二胺四乙酸。杂交后,清洗其上转移了所述 DNA 的膜,例如,在 2×SSC 中室温清洗,然后在 0.1-0.5×SSC/0.1×SDS 中至多 68° C 清洗。

[0134] 还能使用其它条件、试剂等,其产生相似程度的严谨性。本领域技术人员熟悉所述条件,因而不在此处给出所述条件。但是应理解,本领域技术人员可以能清楚鉴定本发明 EZH2 相关核酸的方式操作所述条件(例如,通过使用较低严谨性的条件),所述 EZH2 相关核酸特定包括编码 EZH2 的 Y641 突变体的核酸。本领域技术人员还熟悉筛选用于表达所述分子的细胞和库的方法,随后可将其常规分离,然后分离相关核酸分子并测序。

[0135] 向所述对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂。本文所用的“EZH2 抑制剂”一般指小分子,即分子量小于约 1.5 千道尔顿 (kDa) 的分子,其能够干扰 EZH2 的组蛋白甲基转移酶

酶促活性。

[0136] 在一个实施方式中,所述 EZH2 抑制剂会抑制野生型 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述 EZH2 抑制剂会抑制 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述 EZH2 抑制剂会抑制野生型 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性和 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述 EZH2 抑制剂选择性抑制 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。

[0137] 本文公开的 EZH2 的某些 Y641 突变体是在将未甲基化的 H3-K27 转换成 H3-K37me1 方面相对欠佳的催化剂,不过其出乎预料地在将 H3-K27me2 转换成 H3-K27me3 方面是有效催化剂。相反地,野生型 EZH2 在将未甲基化的 H3-K27 转换成 H3-K27me1 方面是相对有效的催化剂,但出乎预料地在将 H3-K27me2 转换成 H3-K27me3 方面是无效催化剂。这是重要的,因为 H3-K27 的单、双和三甲基化状态在转录控制中显示不同功能。例如,H3-K27me1 与准备转录的基因的活性转录相关联,而 H3-K27me3 与转录抑制基因或在 H3-K4 三甲基化为顺式时准备转录的基因相关联。因此,选择性抑制所述 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性会影响 H3-K27 三甲基化形式生成的选择性抑制,从而有利于 H3-K27me1 相关转录,而不利于 H3-K27 相关转录抑制。

[0138] 当 EZH2 抑制剂对 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性抑制比其对野生型 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性抑制更有效时,Ezh2 的抑制剂“选择性抑制”EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。例如,在一个实施方式中,所述选择性抑制剂对 EZH2 的 Y641 突变体的 IC50 比对野生型 EZH2 的 IC50 低至少 40%。在一个实施方式中,所述选择性抑制剂对 EZH2 的 Y641 突变体的 IC50 比对野生型 EZH2 的 IC50 低至少 50%。在一个实施方式中,所述选择性抑制剂对 EZH2 的 Y641 突变体的 IC50 比对野生型 EZH2 的 IC50 低至少 60%。在一个实施方式中,所述选择性抑制剂对 EZH2 的 Y641 突变体的 IC50 比对野生型 EZH2 的 IC50 低至少 70%。在一个实施方式中,所述选择性抑制剂对 EZH2 的 Y641 突变体的 IC50 比对野生型 EZH2 的 IC50 低至少 80%。在一个实施方式中,所述选择性抑制剂对 EZH2 的 Y641 突变体的 IC50 比对野生型 EZH2 的 IC50 低至少 90%。

[0139] 在一个实施方式中,所述 EZH2 的 Y641 突变体的选择性抑制剂对野生型 EZH2 基本不起抑制作用。

[0140] 所述抑制剂抑制 H3-K27me2 向 H3-K27me3 的转换。在一个实施方式中,所述抑制剂据称抑制 H3-K27 的三甲基化。由于 H3-K27me1 向 H3-K27me2 的转换先于 H3-K27me2 向 H3-K27me3 的转换,抑制 H3-K27me1 向 H3-K27me2 转换的抑制剂自然也抑制 H3-K27me2 向 H3-K27me3 的转换,即,其抑制 H3-K27 的三甲基化。也有可能抑制 H3-K27me2 向 H3-K27me3 的转换,而不抑制 H3-K27me1 向 H3-K27me2 的转换。这种类型的抑制也造成 H3-K27 三甲基化的抑制,尽管不抑制 H3-K27 的双甲基化。

[0141] 在一个实施方式中,所述抑制剂抑制 H3-K27me1 向 H3-K27me2 的转换和 H3-K27me2 向 H3-K27me3 的转换。所述抑制剂可直接单独抑制 H3-K27me1 向 H3-K27me2 的转换。或者,所述抑制剂可直接抑制 H3-K27me1 向 H3-K27me2 的转换以及 H3-K27me2 向 H3-K27me3 的转换。

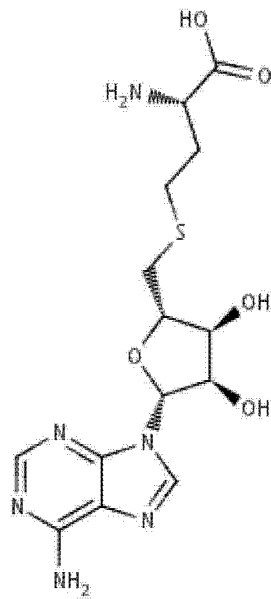
[0142] 所述抑制剂抑制组蛋白甲基酶活性。组蛋白甲基酶活性的抑制可以用任何合适的方法检测。例如,可以组蛋白甲基酶活性速率或组蛋白甲基酶活性的产物形式来测量所述

抑制。适用于这些读取的方法包括在下面的实施例中。

[0143] 所述抑制与合适阴性对照相比是可测的抑制。在一个实施方式中,抑制是与合适阴性对照相比至少 10% 的抑制。即,用所述抑制剂的酶促活性速率或产物量少于或等于 90% 的不用所述抑制剂产生的相应速率或量。在多种其它实施方式中,抑制是与合适阴性对照相比至少 20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90% 或 95% 的抑制。在一个实施方式中,抑制是与合适阴性对照相比至少 99% 的抑制。即,用所述抑制剂的酶促活性速率或产物量少于或等于 1% 的不用所述抑制剂产生的相应速率或量。

[0144] 在一个实施方式中,所述抑制剂是 S-腺苷-L-高半胱氨酸 (SAH)。SAH 具有结构式

[0145]

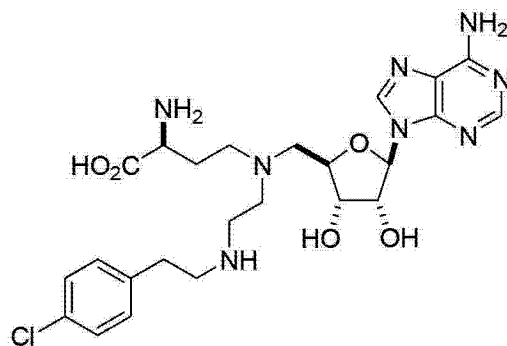


(SAH)

[0146] 且从多个供应商市售可得,包括例如,密苏里州圣路易斯的西格玛-艾尔德里奇公司 (Sigma-Aldrich)。SAH 描述成由 S-腺苷甲硫氨酸依赖性甲基转移酶作用的转甲基抑制剂。

[0147] 在一个实施方式中,所述抑制剂是化合物 75

[0148]



(75)

[0149] 或其药学上可接受的盐。

[0150] 在某些实施方式中,本发明包括进行分析以检测来自对象的样品中 EZH2 的 Y641 突变体的步骤。该类分析如上所述。本文所用的“来自对象的样品”指含有获自或源自对

象的细胞或细胞成分的任何合适样品。在一个实施方式中,所述样品包括怀疑表达 EZH2 的 Y641 突变体的细胞,例如,癌细胞。在一个实施方式中,所述样品是血液样品。在一个实施方式中,所述样品是活检样品,所述活检样品来自例如淋巴腺组织(例如淋巴结)或骨髓。在一个实施方式中,所述样品是活检样品,所述活检样品获自非淋巴腺组织(例如淋巴结)或骨髓或者除此以外的组织。例如,在一个实施方式中,所述样品是来自癌(例如由癌细胞构成的肿瘤)的活检物。所述样品中的细胞可以与所述样品的其它成分分离。例如,按照本领域技术人员熟悉的方法,外围血单核细胞(PBMC)作为暗黄层可以从已经离心的血液样品分离。

[0151] 当来自对象的样品的分析结果指示所述样品中存在 EZH2 的 Y641 突变体时,称所述对象表达所述 EZH2 的 Y641 突变体。实际上,在一个实施方式中,当来自对象的样品的分析结果指示所述样品中存在所述 EZH2 的 Y641 突变体时,鉴定所述对象为用 EZH2 抑制剂处理的候选者,其中,所述抑制剂选择性抑制所述 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。

[0152] 当来自癌的样品的分析结果指示所述癌中存在 EZH2 的 Y641 突变体时,称所述癌表达所述 EZH2 的 Y641 突变体。

[0153] 相似地,当来自患癌对象的包含癌细胞的样品分析结果指示所述样品中存在 EZH2 的 Y641 突变体时,称所述对象表达所述 EZH2 的 Y641 突变体。

[0154] 本发明还提供患者对 EZH2 抑制剂的响应与 H3-K27me2 水平或优选 H3-K27me 和 H3-K27me3 水平间先前未认识到、令人吃惊的相关性。例如,相对于对照具有低 H3-K27me2 和正常或高 me3 水平的细胞对 EZH2 抑制剂的抗增殖作用的响应比具有正常 H3-K27me2 和 me3 水平的细胞多得多。

[0155] 本发明的一个方面是测定对象内对 EZH2 抑制剂响应的方法。在一个实施方式中,所述方法包括从所述对象分离组织样品;检测所述组织样品中 H3-K27 的双甲基化(me2)水平;比较所述双甲基化(me2)水平和对照双甲基化(me2)水平;以及,当所述双甲基化(me2)水平缺失或低于所述对照双甲基化(me2)水平时,鉴定所述对象响应所述 EZH2 抑制剂。在一个实施方式中,所述方法还包括检测所述组织样品内 H3-K27 的三甲甲基化(me3)水平;比较所述三甲甲基化(me3)水平和对照三甲甲基化(me3)水平,并比较所述双甲基化(me2)水平和对照双甲基化(me2)水平;以及,当所述三甲甲基化(me3)水平等同于或高于所述对照三甲甲基化(me3)水平并且所述双甲基化(me2)水平缺失或低于所述对照双甲基化(me2)水平时,鉴定所述对象响应所述 EZH2 抑制剂。在另一个实施方式中,所述方法还包括获得所述组织样品中 H3-K27 的双甲基化(me2)水平与三甲甲基化(me3)水平的比例;获得所述对照双甲基化(me2)水平与对照三甲甲基化(me3)水平的对照比例;比较所述比例与所述对照比例;以及,在所述比例低于所述对照比例时,鉴定所述对象响应所述 EZH2 抑制剂。在一个优选实施方式中,所述对象患癌。在一个实施方式中,所述癌症是滤泡性淋巴瘤。或者,所述癌症是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)。在另一个优选实施方式中,所述对象表达 EZH2 的 Y641 突变体。在一个优选实施方式中,所述 Y641 突变体是 Y641F、Y641H、Y641N 或 Y641S。

[0156] 双甲基化 H3-K27 或三甲甲基化 H3-K27 的检测可以使用本领域的任何合适方法完成。在一个实施方式中,使用双甲基化 H3-K27 或三甲甲基化 H3-K27 特异性抗体检测甲基化水平。例如,分离的组织经福尔马林固定并包埋石蜡块内以供长期保存。所述蜡块可用

于制备切片以进行免疫组化染色或使用抗甲基化 H3-K27 的抗体来荧光染色。或者,可以从所分离的组织样品准备全细胞裂解物或组蛋白提取物,并后续用于免疫组化染色、western 印迹分析或荧光染色。在另一个实施方式中,使用双甲基化 H3-K27 或三甲基化 H3-K27 特异性的多肽或适体检测甲基化水平。在另一个实施方式中,所述甲基化水平用质谱 (MS) 检测。

[0157] 可以从对照样品建立对照二甲甲基化 H3-K27 或对照三甲甲基化 H3-K27,例如,分离自所述对象的相邻非肿瘤组织,或分离自健康对象的健康组织。或者,可以用本领域已知的方法通过病理学家建立所述 H3-K27me2 或 H3-K27me3 的对照甲基化水平。

[0158] 筛选方法

[0159] 本发明的一个方面是用于鉴定测试化合物作为 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:使经分离 EZH2 的 Y641 突变体联合组蛋白底物、甲基基团供体(例如 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)) 和测试化合物,其中所述组蛋白底物包括选自下组的一种 H3-K27 形式:未甲基化 H3-K27、单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27,及其任意组合;以及实行分析以检测所述组蛋白底物内的 H3-K27 甲基化,从而在所述测试化合物存在下的 H3-K27 甲基化少于所述测试化合物缺失下的 H3-K27 甲基化时,鉴定所述测试化合物为 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂。检测 H3-K27 甲基化的分析可选择成测量甲基化速率、甲基化程度或甲基化的速率和程度。

[0160] 所述 EZH2 的 Y641 突变体作为 PRC2 复合物或其功能等价物分离。本文所用的术语“分离”指基本与所述复合物天然出现时可一起发现的其它成分分离。化合物能分离而不必定要纯化。在一个实施方式中,EZH2 的突变体分离为 EZH2 的 Y641 突变体与 EED 和 SUZ12 的复合物。在另一个实施方式中,EZH2 的突变体分离为 EZH2 的 Y641 突变体与 EED、SUZ12 和 RbAp48 的复合物。在合适的条件下,PRC2 复合物或其功能等价物显示对 H3-K27 的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述复合物由重组表达的成分多肽构成,例如 EZH2、EED、SUZ12,有或没有 RbAp48。

[0161] 分离的 EZH2 的 Y641 突变体联合组蛋白底物。组蛋白底物包括可作为 EZH2 底物的组蛋白多肽或其片段的任何合适来源。在一个实施方式中,所述组蛋白底物包括分离自对象的组蛋白。可以使用任何合适的方法从对象的细胞分离所述组蛋白;所述方法为本领域技术人员熟知,从而在本文中不需进一步说明。参见例如, Fang 等.(2004) *Methods Enzymol* 377:213-26。与下文的实施例一致,在一个实施方式中,所述组蛋白底物以核小体形式提供。与下文的实施例一致,在一个实施方式中,所述组蛋白底物以禽类(鸡)红细胞核小体形式提供。

[0162] 如此提供的组蛋白底物可包括组蛋白修饰状态的混合物,包括用 H3-K27 甲基化状态特异性抗体由 Western 印迹判断的各种 H3-K27 甲基化状态。在一个实施方式中,所述组蛋白底物可以纯化的全长组蛋白 H3 形式提供。所述纯化的全长组蛋白 H3 可以涉及 H3-K27 甲基化状态的均质制备物形式提供,或者以多种 H3-K27 甲基化状态的混合物形式提供。可通过装载有合适 H3-K27 甲基化状态特异性抗体的免疫亲和柱或使用包被合适 H3-K27 甲基化状态特异性抗体的磁珠进行免疫沉淀来部分制备涉及 H3-K27 甲基化状态的经分离组蛋白 H3 的均质制备物。替代地或此外, H3-K27 的甲基化状态可鉴定为进行所述分析的一部分。例如,起始材料组蛋白底物可以鉴定为含有 50% 未甲基化的 H3-K27、40% 单

甲基化的 H3-K27、10% 双甲基化的 H3-K27 和 0% 三甲基化的 H3-K27。

[0163] 在一个实施方式中,所述组蛋白底物包括肽库或包含一种或多种组蛋白 H3 相关氨基酸序列的合适肽,所述氨基酸序列特定包括涵盖 H3-K27 的序列。例如,在一个实施方式中,所述组蛋白底物是对应于组蛋白 H3 氨基酸残基 21-44 的肽段。所述肽段具有氨基酸序列 LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO:13)。可以按照本领域熟知的技术通过肽合成来制备所述肽库或肽,且可选地修饰所述肽库或肽,从而掺入任何所需程度的对应于 H3-K27 的赖氨酸甲基化。如下文的实施例中所述,该肽还能经修饰以纳入用于进行下游分析的标签(例如生物素)在一个实施方式中,所述标签附加在所述一种或多种肽的氨基(N)端。在一个实施方式中,所述标签附加在所述一种或多种肽的羧基(C)端。

[0164] H3-K27 甲基化特异性抗体可从多个市售来源获得,所述市售来源包括例如,细胞信号转导技术公司(Cell Signaling Technology)(马萨诸塞州丹弗斯市)和 Active Motif(加利福尼亚州卡尔斯巴德市)。

[0165] 经分离 EZH2 的 Y641 突变体联合测试化合物。本文所用的“测试化合物”指分子量少于约 1.5kDa 的有机小分子。在一个实施方式中,测试化合物是已知化合物。在一个实施方式中,测试化合物是新化合物。在一个实施方式中,测试化合物可以作为所述化合物的库部分来提供,其中,所述库包括例如,数十、数百、数千或甚至更多化合物。可以在高通量筛选分析中有利地筛选化合物库,例如,使用测试化合物阵列并按照本领域熟知的一般技术进行机器人操作。

[0166] 在某些实施方式中,测试化合物是 SAH 的衍生物或化合物 75 的衍生物。

[0167] H3-K27 甲基化的检测可以使用任何合适的方法完成。在一个实施方式中,甲基基团供体源包括标记有可检测标签的甲基基团。在一个实施方式中,所述可检测的标签是同位素标签,例如氘。其它类型的标签可包括例如,荧光标签。

[0168] 对三甲基化 H3-K27 形成的检测可以使用任何合适的方法完成。例如,对三甲基化 H3-K27 形成的检测可以使用以下分析完成:如上所述检测标记甲基基团的掺入,可选地联合色谱法或其它方法来根据尺寸分离标记产物,例如,聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),毛细管电泳(CE)或高压液相色谱(HPLC)。替代地或此外,对三甲基化 H3-K27 形成的检测可以使用三甲基化 H3-K27 特异性抗体来完成。

[0169] 检测单甲基化 H3-K27 向双甲基化 H3-K27 的转换可以使用任何合适的方法完成。在一个实施方式中,使用单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 特异性抗体来测量所述转换。例如,可以使用合适的单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 特异性抗体来测定单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 的起始量或浓度。在酶、底物、甲基基团供体和测试化合物组合后,使用合适的单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 特异性抗体测定单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 的所得量或浓度。然后,可以比较单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 的起始和所得量或浓度。替代地或此外,然后,可以将单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 的起始和所得量或浓度与阴性对照的相应量或浓度作比较。阴性对照反应能平行运行或作为历史对照,所述分析中不包括测试试剂。可选从所述实验反应的相应结果减去所述对照反应的结果,其先于上述比较或与上述比较联用。

[0170] 由于 H3-K27 的双甲基化形式能在同一试验中进一步甲基化,单甲基化 H3-K27 的量或浓度减少可能不显现为直接对应于双甲基化 H3-K27 的增加。然而,在这种情况下,可

以推测单甲基化 H3-K27 的量或浓度减少本身反映了单甲基化 H3-K27 向双甲基化 H3-K27 的转换。

[0171] 检测双甲基化 H3-K27 向三甲基化 H3-K27 的转换可以使用任何合适的方法来完成。在一个实施方式中,使用双甲基化 H3-K27 和三甲基化 H3-k27 特异性抗体来测量所述转换。例如,可以使用合适的双甲基化 H3-K27 和三甲基化 H3-K27 特异性抗体来测定双甲基化 H3-K27 和三甲基化 H3-K27 的起始量或浓度。在酶、底物和测试化合物组合后,使用合适的双甲基化 H3-K27 和三甲基化 H3-K27 特异性抗体测定双甲基化 H3-K27 和三甲基化 H3-K27 的所得量或浓度。然后,可以比较双甲基化 H3-K27 和三甲基化 H3-K27 的起始和所得量或浓度。替代地或此外,随后可将双甲基化 H3-K27 和三甲基化 H3-K27 的起始和所得量或浓度与阴性对照的相应量或浓度作比较。阴性对照反应能平行运行或作为历史对照,所述分析中不包括测试试剂。可选从所述实验反应的相应结果减去所述对照反应的结果,其先于上述比较或与上述所做比较联用。

[0172] 采用测试化合物的 H3-K27 甲基化少于不用所述测试化合物的 H3-K27 甲基化时,鉴定所述测试试剂为 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂。在一个实施方式中,当测试化合物存在下的三甲基化 H3-K27 形成少于不存在所述测试化合物时的三甲基化 H3-K27 形成时,鉴定所述测试试剂为 EZH2 的 Y641 突变体的抑制剂。

[0173] 本发明的一个方面是用于鉴定 EZH2 的 Y641 突变体的选择性抑制剂的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:组合经分离 EZH2 的 Y641 突变体与组蛋白底物、甲基基团供体(例如, SAM) 和测试化合物,其中,所述组蛋白底物包括选自下组的一种 H3-K27 形式:单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27,以及单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 的组合,从而形成测试混合物;组合分离的野生型 EZH2 与组蛋白底物、甲基基团供体(例如, SAM) 和测试化合物,其中,所述组蛋白底物包含选自下组的一种 H3-K27 形式:单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27,以及单甲基化 H3-K27 和双甲基化 H3-K27 的组合,从而形成对照混合物;实行分析以检测各测试混合物和对照混合物中组蛋白底物的三甲基化;计算 (a) 采用 EZH2 的 Y641 突变体加测试化合物 (M+) 的三甲基化对 (b) 采用 EZH2 的 Y641 突变体不加测试化合物 (M-) 的三甲基化的比例;计算 (c) 采用野生型 EZH2 加测试化合物 (WT+) 的三甲基化对 (d) 采用野生型 EZH2 不加测试化合物 (WT-) 的三甲基化的比例;比较比例 (a)/(b) 和比例 (c)/(d);当比例 (a)/(b) 小于比例 (c)/(d) 时,鉴定所述测试化合物为 EZH2 的 Y641 突变体的选择性抑制剂。在一个实施方式中,所述方法还包括就所述测试混合物之一或两者和所述对照混合物考虑阴性对照而没有测试化合物。

[0174] 药物组合物

[0175] 一种或多种 EZH2 拮抗剂可单独或以药物组合物形式向人患者给予,其中所述 EZH2 拮抗剂与合适的运载体或一种或多种赋形剂以治疗或改善本文所述疾病或病症的剂量混合。这些 EZH2 拮抗剂的混合物还能作为简单混合物或合适配制的药物组合物给予所述患者。例如,本发明的一方面涉及药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效剂量的 EZH2 拮抗剂或其药学上可接受的盐、水合物、对映体或立体异构体;以及药学上可接受的稀释液或运载体。

[0176] EZH2 拮抗剂的配制和给药技术可参见本领域普通技术人员的熟知参考文献,例如 Remington 的“*The Science and Practice of Pharmacy*(《药物科学与实践》),”第 21 版,

Lippincott Williams & Wilkins 2005。

[0177] 合适的给药途径可以包括,例如口腔、直肠或肠内注射;胃肠外递送,包括静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下或髓内注射,以及鞘内、直接心室内或眼内注射;局部递送,包括滴眼剂和透皮剂;以及鼻内和其它跨黏膜递送。

[0178] 或者,可以局部而不是系统方式对个体给予 EZH2 拮抗剂,例如,通过将所述 EZH2 拮抗剂直接注射进入水肿位点,所述 EZH2 拮抗剂通常是长效或持续释放制剂。

[0179] 在一个实施方式中,通过直接注射入肿瘤或淋巴结来给予 EZH2 拮抗剂。

[0180] 此外,可以通过靶向药物递送系统例如在包被有癌细胞特异性抗体的脂质体内,给予 EZH2 拮抗剂。

[0181] 可制造本发明的药物组合物,例如,通过常规的混合、溶解、造粒、制造糖衣丸、水飞、乳化、封装、包封或冻干工艺。

[0182] 因此,可以使用一种或多种生理上可接受的运载体以传统方式配制根据本发明使用的药物组合物,所述运载体包含有利于加工所述活性 EZH2 拮抗剂成为药学上可用制品的赋形剂和助剂。适当的制剂依赖于所选的给药途径。

[0183] 就注射而言,本发明的试剂可配制在水溶液中,优选生理相容性缓冲液,如汉克斯(Hank's)溶液、林格(Ringer's)溶液或生理盐水缓冲液。就经粘膜给药而言,在适合待渗透屏障的制剂中采用渗透剂。本领域通常已知此类渗透剂。

[0184] 对于口腔给药,通过组合所述活性 EZH2 拮抗剂与本领域熟知的药学上可接受运载体可以容易地配制所述 EZH2 拮抗剂。此类载体使本发明的 EZH2 拮抗剂能配制为片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、浆液、混悬剂等,以供治疗患者口服摄取。可通过以下方法获得口服用途的药物制剂:组合所述活性 EZH2 拮抗剂与固体赋形剂,任选研磨所得混合物,需要在加入合适的辅助剂后加工颗粒混合物以获得片剂或糖衣丸芯。合适的赋形剂包括填充剂如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可加入崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或藻酸或其盐如藻酸钠。糖衣丸芯具有合适包衣。出于此目的,可使用浓缩糖溶液,其可选地含有阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可将染料或颜料加入片剂或糖衣丸包衣中,用于标识或表征活性 EZH2 拮抗剂剂量的不同组合。

[0185] 可口服使用的药物制剂包括明胶制成的推入式(push-fit)胶囊,以及明胶和增塑剂(如甘油或山梨糖醇)制成的密封胶囊。推入式胶囊可含有活性成分,该活性成分可与填充剂如乳糖、粘合剂如淀粉、和/或润滑剂如滑石粉或硬脂酸镁以及任选的稳定剂混合。在软胶囊中,活性 EZH2 拮抗剂可溶解或悬浮于合适液体如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。此外,可加入稳定剂。

[0186] 就含服给药而言,该组合物可采用常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0187] 就吸入给药而言,使用合适推进剂(如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体)从加压包装或喷雾器中以气溶胶喷雾形式方便地递送根据本发明使用的 EZH2 拮抗剂。在加压气溶胶的情况下,可通过提供阀门递送计量用量,来确定剂量单位。用于吸入或吹入器的胶囊和药筒(例如,明胶)可配制成含有 EZH2 拮抗剂

和合适粉末基料如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0188] 可以配制通过注射,如推注或连续输注进行胃肠外给药的 EZH2 拮抗剂。用于注射的制剂可以单位剂型存在,例如装在安瓿或多剂量容器中,添加有防腐剂。该组合物可采用诸如油性或水性载体中悬浮剂、溶液剂或乳剂的形式,可含有配方试剂,如助悬剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0189] 用于肠胃外给药的药物制剂包括水溶性形式的活性 EZH2 拮抗剂的水溶液。此外,活性 EZH2 拮抗剂的悬液可制备为合适的油性注射悬液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油如芝麻油,或合成脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯,或脂质体。水性注射悬液可包含增加悬液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或右旋糖苷。悬液可选还包含合适的稳定剂或增加 EZH2 拮抗剂溶解度以制备高浓缩溶液的试剂。

[0190] 或者,活性成分可以是使用合适的载体如无菌无热原水前用于重建的粉末形式。

[0191] 所述 EZH2 拮抗剂也可配制成直肠组合物,例如栓剂或滞留灌肠剂,例如含有常规栓剂基料,如可可油或其他甘油酯。

[0192] 除了前述制剂外,所述 EZH2 拮抗剂也可配制成长效制剂。这种长效制剂可通过植入(例如,皮下或肌肉内或肌肉内注射)给药。因此,例如,所述 EZH2 拮抗剂也可用合适的聚合物材料或疏水材料(例如,溶于可接受油的乳剂)或离子交换树脂配制,或者配制成微溶性衍生物(例如,微溶性盐)。

[0193] 或者,可以使用用于疏水药物 EZH2 拮抗剂的其它递送系统。脂质体和乳剂是用于疏水药物的递送载体或运载体的例子。还可以使用某些有机溶剂例如二甲亚砜。另外,可以使用持续释放系统例如包含所述治疗剂的固体疏水聚合物的半透性基质来递送所述 EZH2 拮抗剂。许多持续释放材料已建立并且为本领域技术人员熟知。持续释放胶囊根据其化学性质,可释放所述 EZH2 拮抗剂数周,至多超过 100 天。取决于所述治疗性试剂的化学性质和生物稳定性,可以使用其它蛋白稳定策略。

[0194] 药物组合物还能包括合适的固体或凝胶相运载体或赋形剂。这些运载体或赋形剂的例子包括但不限于:碳酸钙,磷酸钙,各种糖,淀粉,纤维素衍生物,明胶,和聚合物如聚乙二醇。

[0195] 治疗方法

[0196] 本文提供治疗或预防病症和疾病的方法,所述病症和疾病的进程可通过调节组蛋白或其它蛋白的甲基化状态来影响,其中,所述甲基化状态至少部分由 EZH2 活性介导。所述组蛋白甲基化状态的调节能进而影响由甲基化激活的靶基因和 / 或由甲基化抑制的靶基因的表达水平。

[0197] 例如,本发明的一个方面涉及用于治疗癌症的方法。所述方法包括以下步骤:向患有表达 EZH2 的 Y641 突变体的癌症的对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂,其中,所述抑制剂抑制 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性,从而治疗所述癌症。在一个实施方式中,所述抑制剂抑制 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述抑制剂选择性抑制 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述癌症是滤泡性淋巴瘤。在一个实施方式中,所述癌症是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)。

[0198] 本发明的一个方面涉及用于治疗癌症的方法。所述方法包括以下步骤:实行分析以检测样品中 EZH2 的 Y641 突变体,所述样品包含来自患癌对象的癌细胞;以及向表达

EZH2 的 Y641 突变体的对象给予治疗有效量的 EZH2 抑制剂,其中,所述抑制剂抑制 EZH2 的组蛋白甲基转移酶活性,从而治疗所述癌症。在一个实施方式中,所述抑制剂抑制 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述抑制剂选择性抑制 EZH2 的 Y641 突变体的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述癌症是滤泡性淋巴瘤。在一个实施方式中,所述癌症是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)。

[0199] 诸如癌症和神经疾病的疾病能通过给予蛋白(例如组蛋白)甲基化调节剂来治疗,所述调节剂例如组蛋白甲基转移酶调节剂或组蛋白去甲基化酶活性调节剂。已报道组蛋白甲基化涉及癌症中某些基因的异常表达和非神经元细胞中神经元基因的沉默。本文所述的调节剂能用于治疗所述疾病,即,抑制受影响细胞中的组蛋白甲基化。

[0200] 已发现增加的组蛋白甲基化与某些癌症相关联,至少基于这个事实,用于在对象内治疗癌症的方法包括向需要的对象给予治疗有效量的化合物,所述化合物抑制甲基化或恢复其甲基化水平到大致对应正常细胞中的水平。在一个实施方式中,用于在对象内治疗癌症的方法包括向需要的对象给予治疗有效量的化合物,所述化合物抑制未甲基化 H3-K27 向单甲基化 H3-K27 (H3-K27me1) 转换。在一个实施方式中,用于在对象内治疗癌症的方法包括向需要的对象给予治疗有效量的化合物,所述化合物抑制单甲基化 H3-K27 (H3-K27me1) 向双甲基化 H3-K27 (H3-K27me2) 转换。在一个实施方式中,用于在对象内治疗癌症的方法包括向需要的对象给予治疗有效量的化合物,所述化合物抑制 H3-K27me2 向三甲基化 H3-K27 (H3-K27me3) 转换。在一个实施方式中,用于在对象内治疗癌症的方法包括向需要的对象给予治疗有效量的化合物,所述化合物抑制 H3-K27me1 向 H3-K27me2 的转换以及 H3-K27me2 向 H3-K27me3 的转换。重要的是要注意疾病特异性甲基化增加能在关键基因座中的染色质处出现,而组蛋白或蛋白质的甲基化在细胞水平没有全面增加。例如,针对全组蛋白或蛋白的低甲基化背景,可能在关键疾病相关基因处出现异常高甲基化。

[0201] 通常可以使用甲基化调节剂来调节细胞增殖。例如,在一些情况下,可以采用减少甲基化的试剂来降低过度增殖,而采用增加甲基化的试剂来促进不足的增殖。因此,可治疗的疾病包括过度增殖疾病,例如良性细胞生长和恶性细胞生长(癌症)。

[0202] 可治疗的示例性癌症包括淋巴瘤,包括滤泡性淋巴瘤 (FL) 和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)。

[0203] 其它癌症包括急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、肾上腺皮质癌、艾滋病相关癌症、艾滋病相关淋巴瘤、肛门癌、(儿童小脑)星形细胞瘤、(儿童脑)星形细胞瘤、基底细胞癌(参见皮肤癌(非黑色素瘤))、肝外胆管癌、膀胱癌、(骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤)骨癌、脑干胶质瘤、脑瘤、(小脑星形细胞瘤)脑瘤、(大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤)脑瘤、(脑室膜瘤)脑瘤、(成神经管细胞瘤)脑瘤、(幕上原始神经外胚层肿瘤)脑瘤、(视觉通路和下丘脑胶质瘤)脑瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌瘤、伯基特氏淋巴瘤、类癌瘤、(胃肠)类癌瘤、未知原发癌、(原发)中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、子宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、(毛细胞)慢性髓细胞性白血病、慢性骨髓/外骨髓增殖性疾病、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤 T 淋巴细胞瘤(参见蕈样肉芽肿和塞扎里(Sezary)综合症)、子宫内膜癌、食道癌、尤文氏(Ewing's)家族肿瘤、肝外胆管癌、(眼内黑色素瘤)眼癌、(成视网膜细胞瘤)眼癌、胆囊癌、胃部(胃)癌、胃肠道类癌瘤、(颅外)生

殖细胞瘤、(性腺外)生殖细胞瘤、(卵巢)生殖细胞瘤、妊娠性滋养层细胞瘤、神经胶质瘤、(儿童脑干)神经胶质瘤、(儿童脑星形细胞瘤)神经胶质瘤、(儿童视觉通路和下丘脑)神经胶质瘤、多毛细胞白血病、头颈癌、(成人(原发))肝细胞(肝)癌、(儿童(原发))肝细胞(肝)癌、霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤、孕期霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤、下咽癌、下丘脑和视神经胶质瘤、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤(内分泌腺)、卡波济(Kaposi's)肉瘤、肾(肾细胞)癌、肾癌、喉癌、血癌、唇和口腔癌、(成人(原发))肝癌、(儿童(原发))肝癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、(中枢神经系统原发)淋巴瘤、(瓦氏(Waldenstrom's))巨球蛋白血症、骨/骨肉瘤恶性纤维组织细胞瘤、成神经管细胞瘤、(恶性)黑色素瘤、梅克尔(Merkel)细胞癌、间皮瘤、成人恶性间皮瘤、隐匿原发转移性鳞状宫颈癌、多发性内分泌肿瘤综合症、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞恶性蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合症、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、成人急性髓细胞白血病、儿童急性髓细胞白血病、慢性骨髓增生性疾病、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤、孕期非霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤、口腔癌、(唇和口咽癌)口腔癌、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮性癌、卵巢低恶性潜能瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、鼻旁窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原发神经外胚层瘤、垂体瘤、浆细胞恶性瘤和多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、妊娠和乳癌、前列腺癌、直肠癌、(遗传性)眼癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、(尤文氏(Ewing's)肿瘤家族)肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤、塞扎里(Sezary)综合症、皮肤癌、皮肤癌(非黑色素瘤)、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌(参见皮肤癌(非黑色素瘤))、转移性隐匿原发鳞状宫颈癌、胃(胃部)癌、睾丸癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、妊娠期滋养叶瘤、未知原发位置的癌、儿童罕见癌症、尿道癌、子宫内膜子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑胶质瘤、外阴癌、瓦氏(Waldenstrom's)巨球蛋白血症、维尔姆斯(Wilms')瘤,以及女性癌症。

[0204] 其中由 EZH2 介导的表观遗传甲基化起作用的任何其它疾病,可以使用本文所述的化合物和方法成为可治疗的或可预防的疾病。

[0205] 例如,可治疗的神经疾病包括癫痫、精神分裂症、双向障碍或其它心理上和/或精神障碍、神经病、骨骼肌萎缩和神经变性疾病,例如,神经变性疾病。示例性的神经变性疾病包括:老年痴呆症、肌肉萎缩性一侧硬化(ALS)和帕金森病。另一类神经变性疾病包括至少部分由多聚谷氨酰胺聚集引起的疾病。该类疾病包括:亨廷顿氏(Huntington's)病、脊髓延髓性肌萎缩(SBMA或肯尼迪氏(Kennedy's)病)、齿状核红核苍白球丘脑下核萎缩(DRPLA)、1型脊髓小脑性共济失调(SCA1)、2型脊髓小脑性共济失调(SCA2)、马查多-约瑟夫(Machado-Joseph)病(MJD;SCA3)、6型脊髓小脑性共济失调(SCA6)、7型脊髓小脑性共济失调(SCA7)和12型脊髓小脑性共济失调(SCA12)。

[0206] 本文还提供选择用于治疗患癌对象的方法。所述方法包括通过双甲基化 H3-K27 水平,优选通过双甲基化 H3-K27 水平和三甲基化 H3-K27 水平来测定所述对象对 EZH2 抑制剂的响应;以及在所述对象响应所述 EZH2 抑制剂时向所述对象提供所述 EZH2 抑制剂。在一个实施方式中,所述癌症是滤泡性淋巴瘤。或者,所述癌症是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)。在另一个优选实施方式中,所述对象表达 EZH2 的 Y641 突变体。在一个优选实施方式中,所述 Y641 突变型是 Y641F、Y641H、Y641N 或 Y641S。

[0207] 联合治疗

[0208] 本发明的一个方面中, EZH2 拮抗剂或其药学上可接受的盐能与其它治疗剂联用来治疗疾病例如癌症和 / 或神经疾病。例如, 所述其它试剂可以是本领域已知用于治疗由本发明化合物所治疗疾病或病症的治疗剂。所述其它试剂还可以是为所述治疗组合物提供有益属性的试剂 (例如, 影响所述组合物粘性的试剂)。

[0209] 本发明考虑的联合治疗包括, 例如以单一药剂的形式给予本发明的化合物或其药学上可接受的盐和一种或多种其他试剂, 以及以分开药剂的形式给予本发明的化合物或其药学上可接受的盐和一种或多种其他试剂。换言之, 共给予应意味着向对象给予至少两种试剂, 以提供两种试剂组合的有益作用。例如, 可以同时或在一段时间内依序给予所述试剂。

[0210] 以下列出的试剂是用于说明目的, 而非意在限定。作为本发明一部分的所述组合可以是本发明的化合物和选自以下列表至少一种其他试剂的组合。所述组合还可以包括多于一种其他试剂, 例如, 两种或三种其他试剂, 条件是所述组合使所形成的组合物能够行使其预期功能。

[0211] 例如, 本发明的一个方面涉及 EZH2 拮抗剂与其它试剂在治疗癌症和 / 或神经疾病中的应用。在一个实施方式中, 其他试剂是抗癌剂, 所述抗癌剂是影响组蛋白修饰的化合物, 例如 HDAC 抑制剂。在某些实施方式中, 其他抗癌剂选自化疗剂 (例如 2CdA、5-FU、6- 巯基嘌呤、6-TG、Abraxane™、Accutane®、放线菌素 D、Adriamycin®、Alimta®、全反式视黄酸、氨甲蝶呤、Ara-C、阿扎胞苷 (Azacitadine)、BCNU、Blenoxane®、Camptosar®、CeeNU®、氯法拉滨 (Clofarabine)、Clolar™、Cytosan®、盐酸柔红霉素、DaunoXome®、Dacogen®、DIC、Doxil®、Ellence®、Eloxatin®、Emcyt®、磷酸依托泊苷、Fludara®、FUDR®、Gemzar®、Gleevec®、六甲三聚氰胺、Hycamtin®、Hydrea®、Idamycin®、Ifex®、伊沙匹隆 (ixabepilone)、Ixempra®、左旋天门冬酰胺酶 (L-asparaginase)、Leukeran®、脂质体 Ara-C、L-PAM、Lysodren、Matulane®、光辉霉素 (mithracin)、丝裂霉素 C、Myleran®、Navelbine®、Neutrexin®、尼洛替尼 (nilotinib)、Nipent®、氮芥、Novantrone®、Oncaspar®、Panretin®、Paraplatin®、Platinol®、有卡氯芥植入的 prolifeprspan 20、Sandostatin®、Targretin®、Tasigna®、Taxotere®、Temodar®、TESPA、Trisenox®、Valstar®、Velban®、Vidaza™、硫酸醛基长春碱、VM 26、Xeloda® 和 Zanosar®); 生物制剂 (诸如 α 干扰素、卡介苗、Bexxar®、Campath®、Ergamisol®、厄洛替尼 (Erlotinib)、Herceptin®、白细胞介素 -2、Iressa®、来那度胺 (lenalidomide)、Mylotarg®、Ontak®、Pegasys®、Revlimid®、Rituxan®、Tarceva™、Thalomid®、Tykerb®、Velcade® 和 Zevalin™); 皮质类固醇、(诸如地塞美松磷酸钠、DeltaSone® 和 Delta-Cortef®); 激素疗法 (诸如 Arimidex®、Aromasin®、Casodex®、

Cytadren®、Eligard®、Eulexin®、Evista®、Faslodex®、Femara®、Halotestin®、Megace®、Nilandron®、Nolvadex®、Plenaxis™ 和 Zoladex®); 以及放射性药剂 (诸如 Iodotope®、Metastron®、Phosphocol®和钐 SM-153)。

[0212] 剂量

[0213] 本文所用的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是完全或部分抑制所述病症发展或至少部分减轻一种或多种病症症状的 EZH2 拮抗剂或两种或更多所述化合物组合的量。治疗有效量还可以是预防上有效的量。治疗有效的量取决于患者的体型和年龄、待治疗病症、所述病症的严重性和寻求的结果。在一个实施方式中,治疗有效剂量指引起患者内症状改善的 EZH2 拮抗剂的量。对于给定的患者,治疗有效量可以由本领域技术人员已知的方法决定。

[0214] EZH2 的毒性和治疗效力可以通过标准药理学程序在细胞培养物或实验动物内测定,例如,用于测定最大耐受剂量 (MTD) 和 ED₅₀ (引起 50% 最大响应的有效剂量)。毒性和疗效间的剂量比是治疗指数,可表示为 MTD 和 ED₅₀ 之比。获自这些细胞培养实验和动物研究的数据可用于配制一定范围的剂量以用于人体。还可以通过检测 EZH2 拮抗剂对患病或替代组织的酶抑药效标志物 (例如,组蛋白甲基化或靶基因表达) 的影响来指导剂量。可以使用细胞培养或动物实验来测定药效标志物变化所需剂量和治疗效力所需剂量之间的关系,可在细胞培养或动物实验或早期临床试验中予以测定。这类 EZH2 拮抗剂的剂量优选处于包括 ED₅₀ 在内的循环浓度范围内,毒性很小或无毒性。该剂量可根据所用剂型和所用给药途径在此范围内变化。精确制剂,给药途径和剂量可以由单独医师根据患者病症而选择。在危重症治疗中,可能需要使用急性推注或近似 MTD 的输注给药以获得快速响应。

[0215] 可以根据个体调整剂量和时间间隔,从而提供充足的活性部分血浆水平以维持所述甲基转移酶调节效果或所需时段的最小有效浓度 (MEC) 以达到治疗功效。所述 MEC 随各 EZH2 拮抗剂而不同,但可由体外数据和动物实验来估计。达到所述 MEC 必需的剂量将取决于个体特点和给药途径。然而,可以使用高压液相色谱 (HPLC) 分析或生物测定来检测血浆浓度。

[0216] 还可使用 MEC 值来确定剂量间隔。在某些实施方式中,应采用方案使给予的 EZH2 拮抗剂的血浆水平在 10 ~ 90% 的所述时间保持在 MEC 之上直至达到所需的症状改善,所述时间优选为 30 ~ 90%,最优选 50 ~ 90%。在其它实施方式中,MEC 血浆水平将维持不同的时间量。在局部给药或选择性摄取的情况下,药物的局部有效浓度可能与血浆浓度无关。

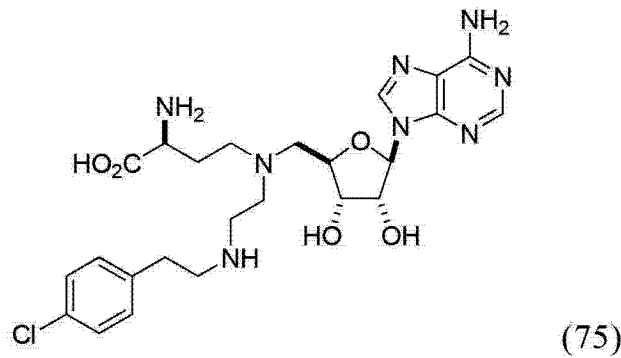
[0217] 本领域技术人员可以从众多给药方案中选择,而给予的 EZH2 拮抗剂的量当然取决于接受治疗的患者、所述对象的体重、病痛的严重度、给药的方式和处方医师的判断。

[0218] 化合物和药物组合物

[0219] 本发明的多个方面涉及根据本发明方法使用的化合物。本文中称这些化合物为“EZH2 抑制剂”,和等同的“EZH2 拮抗剂”。所述化合物可以作为化合物本身或所述化合物的药学上可接受盐或药物组合物的形式呈现。

[0220] 所述化合物具体包括化合物 75

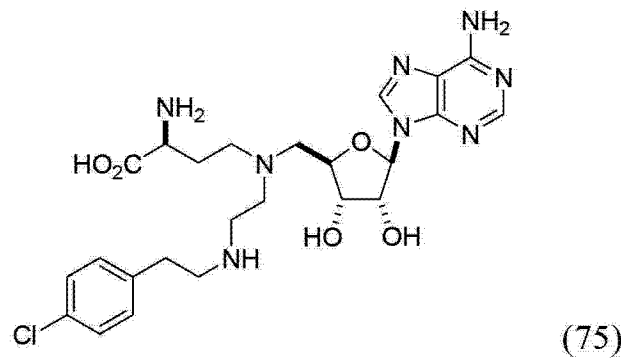
[0221]



[0222] 及其药学上可接受的盐。

[0223] 本发明还包括某一药物组合物,所述药物组合物包含化合物 75

[0224]



[0225] 或其药学上可接受的盐。

[0226] EZH2 拮抗剂和可选的其它治疗剂可以其本身(纯)或以药学上可接受盐的形式给药。应用于医学时,所述盐应是药学上可接受的,但是可以方便地使用非药学上可接受的盐来制备其在药学上可接受的盐。

[0227] 根据本发明使用的化合物可以有药学上相容性抗衡离子的盐形式提供(即,药学上可接受的盐)。“药学上可接受的盐”指的是任何非毒性盐,所述盐给予受体后能直接或间接地提供本发明所用的化合物或化合物的前药。“药学上可接受的抗衡离子”指盐的离子部分,所述离子部分在给予对象后从盐释放出时无毒。药学上相容性盐可以用多种酸形成,所述酸包括但不限于盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸和琥珀酸。在水或其它质子溶剂中盐比其对应的游离碱形式更易于溶解。本发明包括所述盐的应用。

[0228] 药学上可接受的酸加成盐包括那些由无机酸例如盐酸和氢溴酸形成的盐,以及那些由有机酸例如马来酸形成的盐。例如,常用于形成药学上可接受盐的酸包括无机酸例如二硫化氢酸、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸和磷酸,以及有机酸例如对甲苯磺酸、水杨酸、酒石酸、双酒石酸、抗坏血酸、马来酸、苯磺酸、富马酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、蚁酸、谷氨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、乳酸、草酸、对溴苯磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸和乙酸,以及相关的无机酸和有机酸。因此,这种药学上可接受的盐包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、重亚硫酸盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、醋酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、癸酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、延胡索酸盐、马来酸盐、1,4-丁炔二酸盐、1,6-己炔二酸盐、安息香酸盐、氯苯甲酸盐、苯甲酸甲盐、二硝基苯甲酸

盐、羟苯酸盐、甲氧基苯酸盐、邻苯二甲酸盐、对苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 β -羟基丁酸盐、羟乙酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、1-萘磺酸盐、2-萘磺酸盐、扁桃酸盐等。

[0229] 用于和酸性官能团形成药学上可接受盐的合适碱基包括但不限于，碱金属例如钠、钾和锂的氢氧化物；碱土金属例如钙和镁的氢氧化物；其它金属例如铝和锌的氢氧化物；氨和有机胺，例如未取代或羟基取代的单烷基胺、双烷基胺或三烷基胺；二环己基胺；三丁胺；吡啶；N-甲基，N-乙胺；二乙胺；三乙胺；单-、双-或三-(2-羟基低级烷基胺)，例如单-、双-或三-(2-羟乙基)胺、2-羟基叔丁胺，或三-(羟甲基)甲胺、N,N-二烷基-N-(羟烷基)-胺，例如N,N-二甲基-N-(2-羟乙基)胺或三-(2-羟乙基)胺；N-甲基-D-葡萄糖胺；以及氨基酸例如精氨酸、赖氨酸等。

[0230] 根据本发明使用的某些化合物及其盐可以多于一种晶体形式存在（例如，多晶形物）；本发明包括所述各晶体形式及其混合物的应用。

[0231] 根据本发明使用的某些化合物可包含一个或多个手性中心，并以不同的可选光学活性形式存在。当根据本发明使用的化合物包含一个手性中心时，所述化合物以两种对映体形式存在，且本发明包括使用两种对映体及对映体的混合物例如其外消旋混合物。通过本领域技术人员已知的方法可以拆分所述对映体；例如，拆分对映体可以通过形成可分离的非对映体的盐（例如通过结晶）；形成可分离的非对映体的衍生物或复合物（例如通过结晶、气液或液相色谱）；使一种对映体与对映体特异性试剂选择性反应（例如通过酶促酯化）；或在手性环境下采用气液或液相色谱，例如，在手性支持物上（例如含结合手性配体的硅）或在手性试剂存在下。当所需对映体通过上述分离方法之一转换成另一种化学实体时，可以使用其它步骤来释放所需的纯化对映体。或者，特定的对映体可以采用光学活性试剂、基质、催化剂或溶剂通过非对称合成来合成，或通过非对称转化将一种对映体转变成另一种对映体。

[0232] 当根据本发明使用的化合物包含多于一种手性中心时，其可以非对映体形式存在。所述非对映体结构的化合物可以通过本领域技术人员已知的方法分离（例如，色谱或结晶），而单独对映体可以如上所述分离。本发明包括根据本发明使用的多种非对映体化合物及其混合物的应用。根据本发明使用的化合物可以不同互变异构形式或以不同几何异构体形式存在，本发明包括根据本发明使用的化合物的各个互变异构体和/或几何异构体及其混合物的应用。根据本发明使用的化合物可以两性离子形式存在。本发明包括根据本发明使用的化合物的各个两性离子形式及其混合物的应用。

[0233] 试剂盒

[0234] 如果需要，可将 EZH2 拮抗剂装入试剂盒（例如包装或分配装置）中，所述试剂盒可包含一个或多个含有所述 EZH2 拮抗剂的单位剂型。例如，该包装可包括金属或塑料薄片，如泡罩包装。所述包装或分配装置可附有给药说明书。还可以制备配制在相容性药物运载体内的包含本发明 EZH2 拮抗剂的组合物，放置在合适的容器内，并就治疗所示病症进行标记。还可以提供使用说明书。

[0235] 本文还提供包含检测所述甲基化 H3-K27 的多种甲基化检测试剂的试剂盒。例如，所述试剂盒包括单甲基化 H3-K27、双甲基化 H3-K27 和三甲基化 H3-K27 检测试剂。所述检测试剂是例如抗体或其片段、多肽或适体。所述试剂盒可以在单独容器内包含适体或抗体，

对照制剂（阳性和 / 或阴性），和 / 或可检测的标签例如荧光素、绿色荧光蛋白、罗丹明、花青染料、Alexa 染料、荧光素酶、放射性标记等等。完成所述试验的说明书（如书面、磁带、VCR、CD-ROM 等）包含在试剂盒中。所述分析可以采用例如本领域已知的以下形式：Western 印迹分析、免疫组化（IHC）、免疫荧光（IF）和质谱（MS）。

[0236] 定义

[0237] 方便起见，将说明书、实施例和所附权利要求中使用的特定术语收集在此。本发明所定义和使用的定义都替代所定义术语在词典中的定义、通过引用纳入的参考文献中的定义、和 / 或一般含义。

[0238] 本发明使用冠词“一个”和“一种”表示一种或一种以上的（即至少一个）冠词受词。例如，“一个元件”表示一种元件或者一种以上的元件。

[0239] 本说明书中和权利要求中所用的短语“和 / 或”应理解为指相关联的所述元件“之一或两者”，即，在一些情况中存在关联性而在其它情况中无关联的元件。采用“和 / 或”列出的多种元件应以同一种方式构建，即“一种或多种”所述元件因而相关联。除了由所述“和 / 或”短句特定鉴定的元件以外，其它元件可选存在，不论是否与那些特定鉴定的元件相关。因此，作为一个非限定性例子，提及“A 和 / 或 B”，当与开放式语句例如“包括”联用时可以在一个实施方式中仅指 A（可选地包括除了 B 以外的元件）；而在其它实施方式中仅指 B（可选地包括除了 A 以外的元件）；而在另一实施方式中既指 A 又指 B（可选地包括其它元件）；等等。

[0240] 如本文所用，本说明书和权利要求中的“或”应理解为与如上定义的“和 / 或”有相同的含意。例如，当在一个列表中隔离项目时，“或”或者“和 / 或”应解释为包括性，即，包括至少一个，但也包括多于一个的一些元件或元件列表，以及可选的额外未列出项目。仅清楚指示相反的术语例如“其中仅一个”或“确定的一个”，或当在权利要求中使用时，“由……组成”指包含一些元件或元件列表中确定的一个元件。一般而言，当其之前有排他性术语时，例如“任一”、“其中之一”、“仅其中之一”或“明确的其中之一”，本文中所用的术语“或”应仅解释为指示专一的选择（即，“一个或另一个但非两者”）。“基本由……组成”用于权利要求中时，应具有其在专利法领域中使用的普通含意。

[0241] 如本文所用，本说明书和权利要求中参照一种或多种元件列表的短语“至少一种”应理解为指选自所述元件列表中任何一种或多种元件的至少一种元件，但不必包括所述元件列表中特定列出的每个元件中的至少一种，且不排除所述元件列表中的任何元件组合。该定义也允许除了短语“至少一种”所指的所述元件列表中特定鉴定的元件以外，元件可选存在，不论是否与特定鉴定的那些元件相关。因此，作为非限定性示例，“A 和 B 中的至少一种”（或，等同于“A 或 B 中的至少一种”或等同于“A 和 / 或 B 中的至少一种”）在一种实施方式中可以指至少一种，可选包括多于一种的 A，无 B 存在（并可选地包括 B 以外的元件）；在其它实施方式中指至少一种，可选地包括多于一种的 B，无 A 存在（并可选地包括 A 以外的其它元件）；在另一实施方式中，指至少一种，可选包括多于一种的 A，以及至少一种，可选地包括多于一种的 B（并可选地包括其它元件）；等等。

[0242] 还应理解，除非清楚表明相反，在本文要求权利的包括多于一个步骤或行动的任何方法中，所述方法的步骤或行动的顺序不必限定是如该方法描述的步骤或行为的顺序。

[0243] 在权利要求以及上述说明书中，所有连接词例如“包含”、“包括”、“带有”、“具有”、

“含有”、“涉及”、“保持”、“由……构成”等应被理解为是开放式的,即,指包括但不限于。如美国专利局的专利审查程序手册,2111.03 部分所列举,仅连接词“由……组成”和“基本由……组成”分别应是封闭或半封闭的连接词。

[0244] 所述术语“共给予”和“共同给予”指同时共同给予(同时给予两种或更多治疗剂),和不同时间给予(在与给予一种或多种额外治疗剂不同的时间给予一种或多种治疗剂),条件是所述治疗剂在所述患者内同时有一些程度的呈现。

[0245] 本文所用的术语“治疗”指缓解疾病、紊乱或病症的至少一种症状。术语包括向对象给药和/或应用一种或多种本文所述化合物以提供病症的管理或治疗。用于本公开目的的“治疗”可以但不必须提供治愈方法;相反,“治疗”可以是病症管理的形式。当本文所述的化合物用于处理不需要的增殖细胞(包括癌)时,“治疗”包括部分或完全破坏所述不需要的增殖细胞而对正常细胞的破坏影响最小。不需要的快速增殖细胞(包括癌细胞)的所需治疗机制在细胞水平上是凋亡。

[0246] 本文所用的术语“预防”包括共同预防或减缓临床上显著疾病发展的开始或在风险个体中减缓临床上显著疾病阶段的开始。这包括对有疾病发展风险的个人的预防性治疗。

[0247] 本文所用的出于治疗目的的术语“对象”包括任何诊断有疾病、有疾病症状或有发展疾病风险的人对象。对预防方法而言,所述对象是任何人对象。用于预防目的的说明,对象可以是有风险或遗传上倾向于患有表征为不需要、快速细胞增殖的疾病(例如癌)的人对象。所述对象可能因接触致癌剂、遗传上倾向于患有表征为不需要、快速细胞增殖等的疾病而面临风险。

[0248] 除非另有指示,可以使用标准方法来生成重组和合成多肽、融合蛋白、抗体或其抗原结合片段,操纵核酸序列,生成转化细胞等。此类技术是本领域技术人员已知的。参见例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (《分子克隆:实验室手册》), 第三版, (纽约冷泉港 (Cold Spring Harbor), 2001); F. M. Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology* (《新编分子生物学实验指南》), (纽约的格林出版联合公司和约翰威立父子出版公司 (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.))。

[0249] 所述术语“EZH2 多肽”包括所述全长多肽的功能片段和任一前述具有基本相似或基本相同氨基酸序列(至少约 75%、80%、85%、90%、95%、98% 或更高氨基酸序列相似性或相同性)的功能等同物,其中所述功能片段或功能等同物保留天然多肽的一种或多种功能性质。

[0250] “功能性”指所述多肽(或核酸)在天然多肽(或核酸)的一种或多种生物性质方面具有相同或基本相似的活性,例如天然多肽(或核酸)的至少约 50%、75%、85%、90%、95% 或 98% 或更多活性。

[0251] 所述术语“调节”(和语法等价物)指活性增加或减少。在特定的实施方式中,所述术语“增加”或“增强”(和语法等价物)指提高至少约 25%、50%、75%、2 倍、3 倍、5 倍、10 倍、15 倍、20 倍或更多。在特定的实施方式中,所述术语“下降”或“减少”(和语法等价物)指减弱至少约 25%、40%、50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或更多。在一些实施方式中,所示活性、底物或其它参数不可检测。特定提供 EZH2 拮抗剂。所述术语“药效标记物”指药物响应的分子标记物,其可在接受该药的患者内测得。所述标记物应是所述药物靶标调

节的直接量度,并且能够显示响应剂量的量变。EZH2 拮抗剂的可能药效标记物可以是疾病或替代组织中组蛋白 H3-K27 甲基化的水平。

[0252] 本文所用的术语“响应”与术语“响应的”、“敏感”和“敏感性”可互换,指给予 EZH 抑制剂时显示治疗响应的对象,如对象的肿瘤细胞或肿瘤组织经历细胞凋亡和 / 或坏死,和 / 或显示减少的生长、分裂或增殖。

[0253] 所述术语“对照”或“参照”指在分离自所述对象的相邻非肿瘤组织中、在来自健康对象的健康组织中检测到的,或由病理学家以本领域标准方法建立的甲基化水平(例如,单甲基化水平、双甲基化水平或三甲基化水平)。

[0254] “样品”指获自所述对象的任何生物样品,所述对象包括但不限于细胞、组织样品和体液(包括但不限于黏液、血液、血浆、血清、尿液、唾液和精液)。

[0255] 实施例

[0256] 现已总体描述了本发明,参考以下实施例更易于理解本发明,这些实施例只是用于说明本发明的某些方面与实施方式,而非意在限制本发明。

[0257] 实施例 1——重组五组分 PRC2 复合物

[0258] 野生型 EZH2(GenBank 登录号 NM_004456) 或 Tyr641 突变体与野生型 AEBP2(GenBank 登录号 NM_153207)、EED(GenBank 登录号 NM_003797)、SUZ12(GenBank 登录号 NM_015355) 和 RbAp48(GenBank 登录号 NM_005610) 在秋粘虫 (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 细胞中使用杆状病毒表达系统共表达。使用所述 EED 上的 N 末端 FLAG 标签来纯化来自细胞裂解液 (BPS 生物科学公司 (BPSBioscience), 目录号 51004) 的活性 PRC2 复合物。PRC2 最终制品的纯度由 SDS-PAGE 用考马斯蓝染色评定。

[0259] 实施例 2——H3、H4 肽组

[0260] 由各 15 个氨基酸的 44 个肽组成的库通过 21 世纪生化公司 (21st Century Biochemicals) (美国马萨诸塞州马尔伯勒) 合成。该肽组包含人组蛋白 H3 和 H4 的所有氨基酸,在连续的肽序列间有 5 个残基重叠。各肽的 N 末端附加生物素,其 C 末端以酰胺呈现。通过液相色谱 / 质谱光谱分析确定纯度 (>95%) 和特性。

[0261] 为研究 H3-K27 甲基化状态对酶活性的依赖性,用呈现未甲基化、单甲基化、双甲基化或三甲基化侧链胺的赖氨酸 27 合成具有来自残基 21-44 的人 H3 (H3:21-44) 的氨基酸序列的肽。这些肽购自 NEP 公司 (New England Peptide) (美国马萨诸塞州加德纳),所述各肽的 C 末端附加生物素。

[0262] 实施例 3——细胞中 H3-K27 甲基化状态的评价

[0263] 细胞系 OCI-LY19 (ACC 528)、KARPAS-422 (ACC 32) 和 WSU-DLCL2 (ACC 575) 获自 DSMZ。细胞系 DB (CRL-2289) 和 SU-DHL2 (CRL-2959) 获自 ATCC。OCI-LY19、WSU-DLCL2 和 DB 细胞系在含 10% FBS 的 RPMI-1640 中生长, KARPAS-422 和 SU-DHL2 细胞系在添加 20% FBS 的 RPMI-1640 中生长。细胞生长至 $1.5-2 \times 10^6$ 细胞 / mL 的密度,通过以 $264 \times g$ 离心收获 1×10^7 个细胞,在冰冷 PBS 中清洗并通过重悬于 $10 \times$ 沉淀体积的 RIPA 裂解缓冲液来裂解,所述 RIPA 裂解缓冲液包含 50 mM Tris-HCl、15.0 mM NaCl、0.25% DOC、1% NP-40 和 1 mM EDTA (密理博公司 (Millipore) #20-188),添加 0.1% SDS 和蛋白酶抑制剂片 (罗氏公司 (Roche) # 1836153)。通过两轮设置 3 的 101 秒突释用 Misonix XL-2000 对裂解液超声波处理,以确保组蛋白的有效提取,然后使用台式离心机在 4°C 以 14,000rpm 离心

10 分钟以澄清。由 BCA 实验 (皮尔斯公司 (Pierce)) 测定蛋白浓度。4 微克的各裂解液在 Tris-甘氨酸胶 (英杰公司 (Invitrogen)) 上分离,转移至 PVDF 并在 Odyssey 封闭缓冲液中用以下抗体探测:小鼠抗 -EZH2 (CST3147 ;1:2000 稀释)、兔抗 -H3-K27me3 (CST9733 ;1:10000 稀释)、兔抗 -H3-K27me2 (CST9755 ;1:5000 稀释)、兔抗 -H3-K27me1 (Active Motif 39377 ;1:5000 稀释) 以及小鼠抗 -总 H3 (CST3638 ;1:20000 稀释)。在一抗孵育后,用 IRDye800CW 驴抗小鼠 IgG (LiCOR#926-32212) 或 Alexa Fluor 680 山羊抗兔 IgG (英杰公司 (Invitrogen) #A-21076) 二抗探测,并用 LiCOR Odyssey 系统成像。

[0264] 实施例 4——酶学

[0265] 如上所述,先前已推断出 Tyr641 处的疾病相关变化造成涉及 EZH2 催化 H3-K27 甲基化的功能缺失。然而,难以解释归因于酶杂合性的 H3-K27 甲基化速率的假定性减少是恶性表型的基础,特别是根据先前指示 EZH2 过表达、对应 H3-K27 脱甲基酶 UTX 的功能缺失突变或 PRC2 成分 (例如 PHF19/PCL3) 过表达的数据涉及 H3-K27 三甲基化的增加,所述数据都导致特定人癌中的恶性表型。Morin 等. (2010) *Nat Genet* 42:181-5; Martinez-Garcia 等. (2010) *Nat Genet* 42:100-1; Bracken 等 (2003) *EMBO J* 22:5323-35; Kleer 等 (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11606-11; Varambally 等. (2002) *Nature* 419:624-9; Simon 等. (2008) *Mutat Res* 647:21-9; van Haaften 等. (2009) *Nat Genet* 41:521-3; Wang 等. (2004) *Gene* 343:69-78; Cao 等. (2008) *Mol Cell Biol* 28:1862-72; and Sarma 等. (2008) *Mol Cell Biol* 28:2718-31)。因此,更细致地探究这些突变的酶学。用人 EZH2 的 WT 和 Tyr641 突变形式制备重组 PRC2 复合物 (参见上述实施例 1; Cao 等 (2004) *Mol Cell* 15:57-67)。先测试等浓度的 (标称 8nM, 基于蛋白定量) 各复合物催化 ³H- 甲基从经标记 S-腺蛋氨酸 (SAM) 转移至具有 H3-K27 (H3:21-44) 周围氨基酸序列的未修饰肽或天然禽类红细胞寡聚核小体的能力。如先前所报道 (Morin 等 (2010) *Nat Genet* 42:181-5), 发现 WT 型酶显示转移甲基至该未甲基化肽底物的强活性,但是突变酶均不显示显著的甲基转移酶活性 (图 1A)。与先前报道的数据和图 1A 中的数据相反,发现所有突变 EZH2 构建体对禽类核小体底物是活性甲基转移酶 (图 1B)。分离自禽类天然来源的核小体代表组蛋白修饰的混合状态,包括 H3-K27 甲基化的各种状态,所述甲基化使用 H3-K27 甲基化特异性抗体由 Western 印迹判断。就突变 PRC2 复合物对肽和核小体底物的不协调活性有若干种可能的解释。一种可能是:所述酶活位点远端的底物识别位点 (即,外位点) 是底物结合与转换的重要决定因素;这些位点会参与核小体上的互补识别元件,而这在小肽底物上不可用。然而,在大肠杆菌表达时,重组人组蛋白 H3 作为 WT 和突变 PRC2 复合物的底物进行测试,所得活性模式与使用所述肽底物所见的相同;即,所述 WT 酶显示对所述 H3 底物有强甲基转移酶活性,所述 Y641F 突变体显示 7% 的 WT 复合物活性,而所有其它突变体显示 ≤ 1% 的 WT 复合物活性。因此,外位点参与似乎不可能解释现有结果。所述核小体呈现作为可能甲基化位点的许多 H3-K27 外赖氨酸残基,所述残基不会出现在所述小肽底物中。因此,另一个可能性是, Y641 的突变改变了 EZH2 的底物特异性,造成 H3-K27 以外的赖氨酸残基甲基化。这种可能性在小肽底物和重组 H3 蛋白底物上的突变活性之间不能给出极佳的一致性。

[0266] 当针对显示组蛋白 H3 和组蛋白 H4 所有可能赖氨酸 (K) 残基的肽底物组测试 WT 和突变 PRC2 复合物的酶活性时,解决了 resolve 现有结果和那些先前所报道结果之间明显的不协调 (参见上述实施例 2)。所有酶形式仅对包含残基 H3-K27 等同物的肽显示显著

活性。然而,所述突变体的特定活性相对于 WT 按以下顺序大幅降低:WT>>Y641F>Y641S ~ Y641H>Y641N,再次与先前报道的发现一致。

[0267] 实施例 5——酶学

[0268] 为了进一步理解这些突变体的酶活性,并调和对肽底物和核小体底物的活性之间的显著差异,研究所述酶形式催化 H3:21-44 肽环境下多种 H3-K27 甲基化状态进一步甲基化的能力。如上所述,发现所有突变酶相对于 WT 酶是未修饰 H3-K27 肽甲基化的缺陷型催化剂。然而,显然发现所有突变酶在催化单甲基化特别是双甲基化 H3-K27 肽的进一步甲基化上优于 WT 酶(图 2)。因此,所述数据提示 WT 酶在催化零-至单-甲基化反应中最有效。突变酶在催化该初始步骤中有缺陷,但在引起从单甲基至双甲基和三甲基 H3-K27 的后续步骤的催化中比 WT 酶更有效。

[0269] 通过稳态酶动力学探究 WT 和突变 EZH2 的差异底物特异性的起源。如表 1 所总结,由核小体的 K_m 和肽底物的 $K_{1/2}$ 相似值证明,所述突变对基态底物识别影响最小。在所有情况中,所述肽底物显示 S 形结合性质;因此,产生半最大速度的肽浓度在本文中以 $K_{1/2}$ 报告,以替代更常见的米氏常数 K_m 。Copeland(2005)Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery:A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists《药物开发中的酶抑制剂评价:药物化学家和药理学家指南》,威利出版公司(Wiley)。同样地,SAM K_m 在所述酶形式中显示最小变化,范围从 208 ± 50 到 304 ± 64 nM。相反,由用于不同底物的酶之间 k_{cat} 值差异证明,底物利用上的差异在过渡态识别中似乎有其起源(表 1)。结果显示,由比率 k_{cat}/K 量化的催化效率(其中 K 是 K_m 或 $K_{1/2}$,取决于底物特性;同上)在用于不同 H3-K27 甲基化状态的 WT 和突变酶之间不同。

[0270] 表 1. 由包含 EZH2 野生型或 Y641 突变体的 PRC2 催化的甲基化反应的稳态动力学参数。

[0271]

| 酶 | 底物 H3-K27甲基化 状态 | K (nM) | k_{cat} ($h^{-1} \times 10^{-2}$) | k_{cat}/K ($h^{-1} \cdot nM^{-1} \times 10^{-4}$) |
|-------|-----------------------|---------------|--|--|
| WT | 0 | 184 ± 10 | 84.0 ± 3.0 | 45.7 ± 3.0 |
| | 1 | 436 ± 42 | 65.4 ± 5.8 | 15.0 ± 2.0 |
| | 2 | 178 ± 16 | 6.0 ± 0.3 | 3.4 ± 0.3 |
| | 核小体 | 141 ± 31 | 42.6 ± 2.6 | 30.2 ± 6.9 |
| Y641F | 0 | 240 ± 19 | 4.8 ± 0.3 | 2.0 ± 0.2 |
| | 1 | 404 ± 124 | 15.0 ± 4.3 | 3.7 ± 1.6 |

[0272]

| | | | | |
|-------|-----|----------------|------------|------------|
| | 2 | 191 ± 10 | 84.0 ± 2.8 | 44.0 ± 2.7 |
| | 核小体 | 176 ± 19 | 65.4 ± 2.0 | 37.2 ± 4.2 |
| Y641H | 0 | - ^a | - | - |
| | 1 | 319 ± 57 | 28.2 ± 3.7 | 8.8 ± 2.0 |
| | 2 | 148 ± 9 | 22.8 ± 0.9 | 15.4 ± 1.1 |
| | 核小体 | 140 ± 22 | 23.4 ± 1.0 | 16.7 ± 2.7 |
| Y641N | 0 | - | - | - |
| | 1 | 280 ± 11 | 23.4 ± 0.8 | 8.4 ± 0.4 |
| | 2 | 157 ± 11 | 96.0 ± 4.0 | 61.1 ± 5.0 |
| | 核小体 | 191 ± 34 | 23.4 ± 1.3 | 12.3 ± 2.3 |
| Y641S | 0 | - | - | - |
| | 1 | 249 ± 8 | 27.6 ± 0.8 | 11.1 ± 0.5 |
| | 2 | 136 ± 8 | 59.4 ± 2.0 | 43.7 ± 3.0 |
| | 核小体 | 137 ± 28 | 23.4 ± 1.4 | 17.1 ± 3.6 |

[0273] ^a 活性过低无法检测。

[0274] 实施例 6——酶学

[0275] 表 1 中所列的稳态动力学参数能计算相对于 WT 酶杂合细胞,就不同突变 EZH2 形式而言杂合细胞的不同 H3-K27 甲基化状态的期望水平。为实施这些模拟,做了多种简化设想:(1) 稳态酶动力学与细胞环境内 PRC2 催化的 H3-K27 甲基化相关,并且在细胞生长的同一时间点进行所有测量;(2) 突变和 WT 酶在杂合细胞中以相等水平表达,并且所有细胞中的总 EZH2 水平相等;(3) 细胞 SAM 浓度,相对于其 K_m 是饱和的,且在细胞间不改变;(4) 细胞核小体浓度与其 K_m 相似,且同样地在细胞间不改变;(5) EZH1 催化的 H3-K27 甲基化不显著,且在细胞间恒定;和 (6) 任何 H3-K27 脱甲基酶活性在细胞间也恒定。

[0276] 利用这些适当的设想,就 H3-K27me3(顶图)、H3-K27me2(中图)和 H3-K27me1(底图)的相对水平得到图 3A 所示的预测。从这些模拟形成清晰模式。所有携带突变的细胞的 H3-K27me3 水平相对于 WT 细胞都有所增加,其范围从 Y641H 突变体增加 30% 至 Y641N 突变体增加 >400%。与此同时,所有突变体的 H3-K27me2 水平下降至 <50%WT 的水平,而所有突变体的 H3-K27me1 水平相对于 WT 降低约一半。

[0277] 然后,通过 Western 印迹检测 B 细胞淋巴瘤细胞系中 H3-K27 甲基化状态的相对水平(图 3B),已知 B 细胞淋巴瘤细胞系对于 WT EZH2(OCI-LY19)是纯合的,而对于 EZH2 Y641N(DB, KARPAS 422 和 SU-DHL-6)或 EZH2 Y641F(WSU-DLCL2)而言是杂合的。图 3B 所示的相对 H3-K27 甲基化状态模式与基于体外稳态动力学参数的模拟结果有极佳的一致性,尽管与所述模拟中使用的假设和使用非生理肽替代物作为底物无关。

[0278] 因此,在所有含 Y641 突变体的细胞中都观察到相对于 WT 增加的 H3-K27me3,在所有含 Y641 突变体的细胞中都观察到相对于 WT 减少的 H3-K27me2,而在所述四种突变细胞系的至少两种细胞系中观察到减少的 H3-K27me1。WT 和 KARPAS422 及 SU-DHL-6 细胞中几乎相当的 H3-K27me1 水平可以反映 WT 和突变 EZH2 的不同表达水平, EZH1 的不同贡献,或未计入所述模拟的其它因素。然而, H3-K27 甲基化状态的预测和实验模式之间的一致性显著,并且支持以下观点: WT 与突变 EZH2 之间的酶偶联引起 H3-K27me3 增加,因此产生就这些突变体而言杂合的恶性细胞表型。

[0279] 实施例 7——PRC2 甲基转移酶活性的体外实验

[0280] 肽底物的 flashplate 实验。

[0281] 对于 EZH2 的 WT 和 Y641 突变体的最初比较,含未甲基化 K27、单甲基化 K27(密理博公司 (Millipore)) 或双甲基化 K27(密理博公司)的生物素化组蛋白 H3:21-44 肽 (NEP 公司 (New England Peptide)) 以 800nM 浓度与 1,700nM S-腺苷甲硫氨酸-C1 (SAM) 和 300nM 氚标记 SAM(帕金埃尔默公司 (Perkin Elmer)) 组合。然后,向溶于实验缓冲液 (20mM BICINE、1mM DTT、0.002% 吐温 20、0.005% 牛皮明胶 (BSG), pH 7.6) 的 PRC2 添加所述底物组合。使反应推进所示时间间隔,然后由添加过量冷 SAM(终浓度 600 μM) 淬灭。转移淬灭的反应混合物至抗生蛋白链霉亲和菌素包被的闪盘 (Flashplate) (帕金埃尔默公司 (Perkin Elmer), 目录号 SMP410), 使其结合 1 小时,然后在 TopCount NXT HTS 闪烁发光计数器上检测。各时间点代表六个单独反应的平均值。在除了肽或 SAM 浓度变化而,其它底物都处于饱和条件的同一反应条件下测定稳态动力学参数。速度作为以不同底物浓度的函数功能作图,数据拟合至米氏 (Michaelis-Menten) 方程的未转化形式或 S 型动力学方程的未转化形式来计算 K 和 k_{cat} 的值。拟合参数的标准误差列于表 1,并用于建立图 2 中图 B 和图 C 所示的误差线。根据误差传递的标准方法计算 k_{cat}/K 相关误差 (表 1); k_{cat}/K 的分数误差测定如下:

$$[0282] \quad \mu \frac{k_{cat}}{K} = \sqrt{\left(\frac{\mu k_{cat}}{k_{cat}}\right)^2 + \left(\frac{\mu K}{K}\right)^2} \quad (1)$$

[0283] 其中, μk_{cat} 是 k_{cat} 的标准误差,而 μK 是 K 的标准误差。

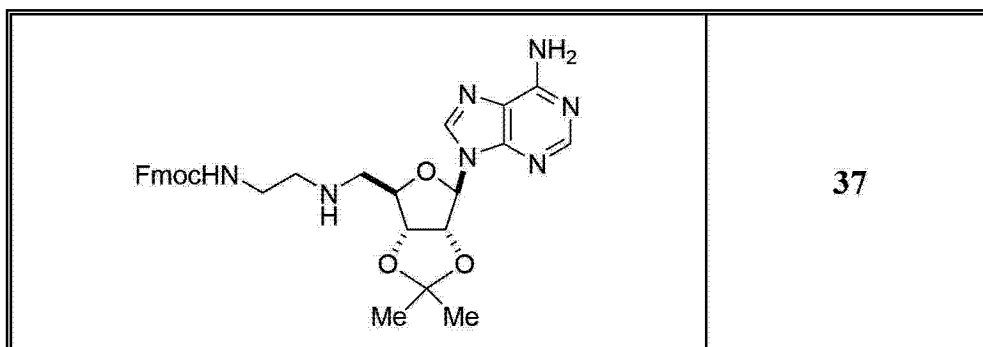
[0284] 使用寡聚核小体的滤板实验

[0285] 如上所述纯化鸡红血球寡聚核小体。Fang 等. (2004) Methods Enzymol 377:213-26. 使核小体组合 SAM 与经氚标记 SAM 的混合物,并添加至实验缓冲液 (20mM BICINE、100mM KCl、1mM DTT、0.002% 吐温 20、0.005% BSG, pH 7.6) 中的 PRC2。如上所述运行反应并淬灭。将淬灭的反应混合物转移至玻璃纤维滤板 (密理博公司 (Millipore), 目录号 MSFBN6B), 用 10% 的三氯乙酸清洗三次并干燥。添加 Microscint Zero (30 μL), 然后在 TopCount 闪烁发光计数器上检测氚掺入。在除了核小体或 SAM 浓度变化而其它底物都处于饱和条件的同一反应条件下测定稳态参数。速度作为不同底物浓度的函数作图,并拟合至米氏 (Michaelis-Menten) 方程的未转化形式,以得到如上所述的 K_m 和 k_{cat} 值。

[0286] 实施例 8——化合物 75 的制备

[0287] A. 化合物 37 的制备

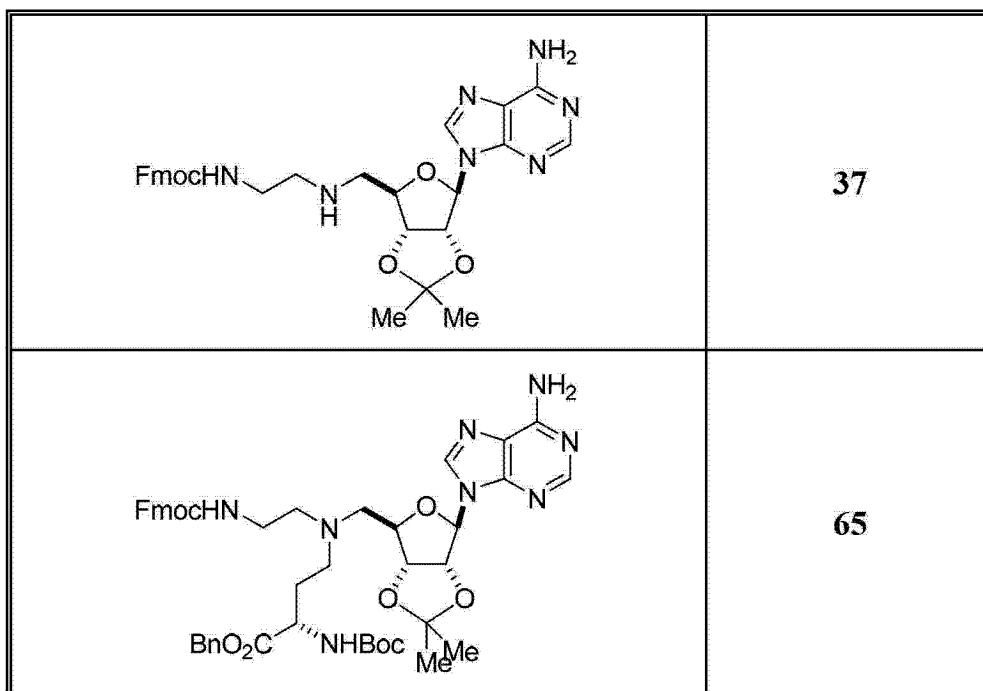
[0288]



[0289] 向 9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(氨基)-2,2-二甲基四氢咪喃 [3,4-d][1,3] 二氧代 -4-yl)-9H- 嘌呤 -6- 胺 (Townsend, A. P. 等 (2009) Org. Let. 11:2976-2979) (3.05g, 9.96mmol) 的 DCE (250mL) 溶液添加 (9H- 芴 -9- 基) 甲基 (2- 氧代乙基) 氨基甲酸酯 (2.8g, 9.96mmol) 和 $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$ (2.96g, 13.95mmol), 在室温搅拌所述混合物 4h。在 pH8 ~ 9 时添加 K_2CO_3 溶液。添加 DCM, 用 Na_2SO_4 干燥有机层, 用 SGC (DCM:MeOH=30:1) 浓缩并纯化, 以获得 37 (2.9g, 产量 :50.9%)。

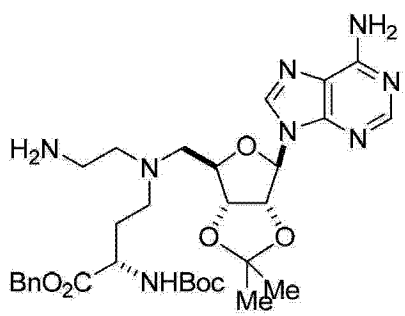
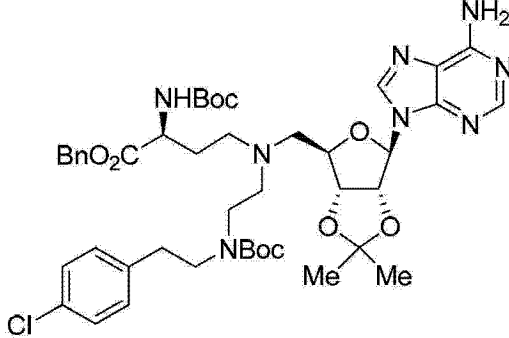
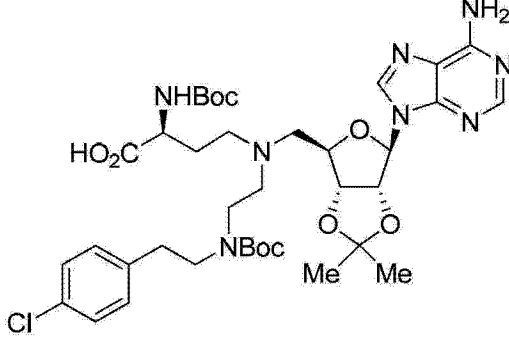
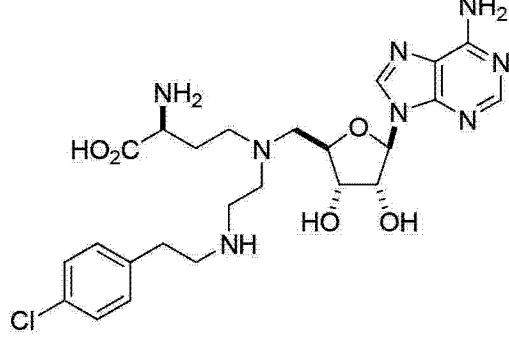
[0290] B. 化合物 65 的制备

[0291]



[0292] 向 37 (2.9g, 5.08mmol) 的 DCE (250mL) 溶液添加 (S)- 苄基 2-((叔丁氧基羰基) 胺)-4- 氧代丁酸酯 (1.56g, 5.08mmol) 和 $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$ (1.51g, 7.11mmol), 在室温下搅拌所述混合物 4h。在 pH8 ~ 9 时添加 K_2CO_3 溶液。添加 DCM, 用 Na_2SO_4 干燥有机层, 用 SGC (DCM:MeOH=100:1) 浓缩并纯化, 以获得 65 (2.8g, 产量 :63.9%)。

[0293] C. 化合物 75 的制备

| | | |
|--------|---|-----------|
| |  | 72 |
| |  | 73 |
| [0294] |  | 74 |
| |  | 75 |

[0295] 步骤 1. 向溶于 DCM(10mL) 的化合物 65B(2.2g, 2.55mmol) 溶液添加 Et_2NH (1.1g, 15.3mmol), 在室温下搅拌所述混合物 4h。浓缩该混合物以获得粗制品 72(2.2g)。

[0296] 步骤 2. 向溶于 MeOH(4mL) 的 72(167mg, 0.26mmol) 搅拌溶液添加 2-(4-氯苯基)乙醛(40mg, 0.26mmol), 并在室温下搅拌 20min。然后, 添加 $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$ (83mg, 0.39mmol) 和 HOAc(0.4mL) 并搅拌过夜。添加 NaHCO_3 (水溶液) 并用 DCM(25mL×3) 提取, 用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并浓缩。通过制备性 TLC(DCM/MeOH=10:1) 纯化该粗制产物以提供白色粉末 73(30mg, 产量:14%)。LC/MS(m/z):779.7[M+1]⁺。

[0297] 步骤 3. 溶于 MeOH(2mL) 的化合物 73(30mg, 0.038mmol) 和 10%Pd/C(15mg) 混合物在 H₂ 下室温搅拌过夜。过滤所述混合物, 浓缩所述滤液以获得粗制产物。通过制备性 TLC(DCM/MeOH=8:1) 纯化该粗制产物以提供白色粉末的 74(20mg, 产量:69%)。LC/MS(m/z):689.7[M+1]⁺。

[0298] 步骤 4. 溶于 90%TFA(1mL) 的化合物 74(20mg, 0.028mmol) 溶液在室温搅拌 1h, 并浓缩为固体形式以去除 TFA, 无需纯化即获得无色油状化合物 75(TFA 盐)。LC/MS(m/z):549.7[M+1]⁺。

[0299] 实施例 9——SAH 对 EZH2 野生型和 Y641 突变体的抑制

[0300] S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)在 DMSO 中连续稀释 3 倍(10 个点), 并取 1 μL 接种于 384 孔微量滴定板内。阳性对照(100%抑制标准)是 100 μM 终浓度的 SAH, 而阴性对照(0%抑制标准)含有 1 μL DMSO。然后, 使 SAH 和每孔 40 μL 的 EZH2 野生型和突变体(8nM)在 pH7.6 的实验缓冲液(20mM BICINE、100mM KCl、1mM DTT、0.002%吐温 20、0.005% BSG)中孵育 30 分钟。每孔添加 10 μL 底物混合物, 所述混合物在 pH7.6 的实验缓冲液中含有 150nM 的 S-腺苷甲硫氨酸-C1(SAM)、100nM 氚标记的 SAM 和 150nM 生物素化的寡聚核小体。转移淬灭的酶反应至链霉亲和素包被的 Flashplate(帕金埃尔默公司(Perkin Elmer), 目录号 SMP410), 使其结合 1 小时, 在 TopCount NXT HTS(帕金埃尔默公司)上检测。

[0301] 结果示于图 7。IC₅₀ 值示于表 2。

[0302] 表 2. SAH 对 WT EZH2 和 EZH2 的 Y641 突变体的抑制。

[0303]

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

[0304] 实施例 10——化合物 75 对 EZH2 野生型和 Y641 突变体的抑制

[0305] 化合物 75 在 DMSO 中连续稀释 3 倍(10 个点), 并取 1 μL 接种于 384 孔微量滴定板内。阳性对照(100%抑制标准)是 100 μM 终浓度的 SAH, 而阴性对照(0%抑制标准)含有 1 μL DMSO。然后, 使化合物 75 和每孔 40 μL 的 EZH2 野生型和突变体(8nM)在 pH 7.6 的实验缓冲液(20mM BICINE、100mM KCl、1mM DTT、0.002%吐温 20、0.005% BSG)中孵育 30 分钟。每孔添加 10 μL 添加底物混合物, 所述混合物在 pH7.6 的实验缓冲液中含有 150nM 的 S-腺苷甲硫氨酸-C1(SAM)、100nM 氚标记的 SAM 和 150nM 生物素化的寡聚核小体。转移淬灭的酶反应至链霉亲和素包被的 Flashplate(帕金埃尔默公司(Perkin Elmer), 目录号 SMP410), 使其结合 1 小时, 在 TopCount NXTHTS(帕金埃尔默公司)上检测。

[0306] 结果示于图 8。IC₅₀ 值示于表 3。

[0307] 表 3. 化合物 75 对 WT EZH2 和 EZH2 的 Y641 突变体的抑制。

[0308]

| | WT | Y641S | Y641N | Y641F | Y641H |
|-----------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| IC ₅₀ , μM | 8.95 | 2.50 | 4.10 | 7.18 | 7.56 |

[0309] 实施例 11——H3-K27me2/me3 比率预测对 EZH2 抑制剂的敏感性

[0310] 就 EZH2(Y641) 突变杂合的肿瘤细胞系显示 H3-K27me3 水平增加, 认为 H3-K27 的

甲基化状态在肿瘤发生中是重要的。评价作为 EZH2 的 WT 型或就 EZH2 (Y641) 突变杂合的一组细胞系中 H3-K27 的单 (H3-K27me1)、双 (H3-K27me2) 或三 (H3-K27me3) 甲基化形式的水平。所用的细胞系列于表 4。主要细胞系是 B 细胞淋巴瘤细胞系,但是也包括两种黑色素瘤细胞系。IGR1 是最近发现包含 EZH2 中 Y641N 突变的黑色素瘤细胞系,而包括 A375 细胞作为 WT EZH2 黑色素瘤对照细胞系。图 9A 和 B 显示分离自该细胞系组的组蛋白的 western 印迹分析结果,采用识别 H3-K27me1、H3-K27me2 或 H3-K27me3 的抗体。一般而言,含有 Y641 突变的细胞系中总 H3-K27me3 水平高于仅表达 WT EZH2 的细胞系。Farage 细胞和 Pfeiffer 细胞是两个例外,其中 H3-K27me3 水平与 WT 细胞系相似。更惊人的是相对于野生型细胞系,EZH2 Y641 突变细胞系中的 H3-K27me2 水平显著较低。在提取自 Y641 突变细胞系的组蛋白 western 印迹中没有或几乎没有观察到 H3-K27me2 信号,而在 WT 细胞系中使用相同抗体观察到的信号比使用 H3-K27me3 特异性抗体观察到的信号更强。总而言之,在 WT 细胞系中,使用 H3-K27me2 抗体的 western 印迹信号高于使用 H3-K27me3 抗体观察到的信号,而在 Y641 突变细胞系中却与之相反。因此,Y641 细胞系中的 H3-K27me3/me2 信号比高于 WT 细胞系中观察到的信号比。其一个例外是 Pfeiffer 细胞系,所述细胞系不包含 Y641 EZH2 突变,但具有高 H3-K27me3 信号,没有或几乎没有 H3-K27me2 信号。因此,Pfeiffer 细胞的 H3-K27me3/me2 比率与 Y641 突变细胞系相似。

[0311] 还可以通过质谱 (MS) 来检测 H3-K27 甲基化状态,MS 是一种不依赖抗体试剂的独立方法。MS 分析显示,Y641 突变细胞系和 Pfeiffer 细胞系中的 H3-K27me3 水平高于其它 WT 细胞系,而 H3-K27me2 水平却与之相反。在 Y641 突变细胞系和普费弗 (Pfeiffer) 细胞系中,H3-K27me3 水平高于 H3-K27me2 水平,而在其它 WT 细胞系中却与之相反。这些结果与在图 9A 和 B 中由 western 印迹分析观察到的那些结果一致。

[0312] 还通过免疫细胞化学,使用 H3-K27me2 或 H3-K27me3 的抗体测定 H3-K27 甲基化状态的差异。该免疫组化实验用于在福尔马林固定石蜡包埋的患者肿瘤组织样品中检测与 Y641 突变 EZH2 相关的异常 H3-K27me2/3 比率。将一组五种 WT 和五种 Y641 突变淋巴瘤细胞系团块固定并包埋在石蜡块中,并用抗 H3-K27me2 或 H3-K27me3 抗体染色。由于所有细胞都应包含核组蛋白 H3,包括针对组蛋白 H3 的抗体作为阳性对照。图 10 显示所有细胞系中的细胞就 H3-K27me3 和 H3 染色而言 100% 呈阳性。在这些条件下,在 WT 和 Y641 突变细胞系之间的 H3-K27me3 染色强度上没有观察到明显差异。这可以反映生色免疫细胞化学染色相比于其它检测方法的有限动力学范围。然而,如图 11 所示,可以清楚地将细胞系分为那些就 H3-K27me2 染色呈阳性或呈阴性的细胞系。所有 WT 细胞系(除了 Pfeiffer 细胞)都是 H3-K27me2 染色呈阳性,而所有 T641 突变细胞系和 Pfeiffer 细胞显示不被 H3-K27me2 抗体染色。这些结果与通过 western 和 MS 分析所得的那些结果一致。

[0313] 不希望受理论限制,与获得功能 HZH2 (Y641) 突变相关的 H3-K27me3 水平增加可使含 EZH2 突变的细胞对小分子 EZH2 抑制剂更加敏感。为了评价在 EZH2 Y641 突变缺失情况下 Pfeiffer 细胞中观察到的 H3-K27me3 水平增加和 / 或 H3-K27me2 水平减少是否也与对 EZH2 抑制剂的敏感度相关联,测试在生化实验中显示有效抑制 EZH2 的两种化合物,IC50 分别是 85 和 16 nM。用任一化合物处理 WSU-DLCL2 细胞导致抑制总体 H3-K27me3 水平,确证其进入细胞和抑制细胞 EZH2 甲基转移酶活性的能力 (图 12)。

[0314] 在增殖实验中评价一组 WT 和 Y641 突变细胞系对各化合物的敏感性。因为 EZH2

抑制剂的抗增殖活性需要数日才能显现,在 11 天增殖实验中评价化合物。图 13 显示用所述测试化合物处理的 WT (OCI-LY19) 或 Y641 突变 (WSU-DLCL2) 细胞系的代表性生长曲线。两种化合物都显示对 WSU-DLCL2 细胞的抗增殖活性,但对 OCI-LY19 细胞几乎没有活性。抑制剂 A 相比抑制剂 B 是更有力的 WSU-DLCL2 增殖抑制剂,这与生化实验中抑制剂 A 是 EZH2 的较强抑制剂一致。增殖实验在一组 WT 和 Y641 突变淋巴瘤细胞系中进行,使用抑制剂 B,得到第 11 天的 IC90 值。图 14A 显示由 EZH2 Y641 状态分组的淋巴瘤细胞系的 IC90 值。总体来看,Y641 突变细胞系相对于 WT 细胞系显示对 EZH2 抑制剂的敏感性增加,尽管 RL 和 SUDHL4 细胞的敏感性显著低于其它突变细胞系。Pfeiffer 细胞是个例外,由于它们是 WT 型,但对 IC90 在低或亚纳摩尔范围内的两种化合物的抗增殖作用高度敏感。Pfeiffer 细胞显示高 H3-K27me3 和低 H3-K27me2 水平,因此根据高 H3-K27me3 和低 H3-K27me2 对细胞系分组能良好区分 EZH2 抑制剂敏感性,如图 14B 中的抑制剂 B 所示。因此,高 H3-K27me3 和低 H3-K27me2 水平可以用于预测对 EZH2 抑制剂的敏感性,不依赖于对突变状态的认知。在 Pfeiffer 细胞中观察到的异常甲基化比率通过依赖 EZH2 活性的独立机制发生。

[0315] 这些结果显示,通过在患者内使用技术例如 western 印迹、MS 或 IHC,在患者肿瘤中鉴定 EZH2 Y641 突变和 / 或检测检测 H3-K27me2 相对于 H3-K27me3 的低水平可以用于鉴定哪些患者会响应 EZH2 抑制剂治疗。

[0316] 表 4. 本研究中使用的细胞系。

| 癌症 | EZH2状态 | 细胞系 |
|--|--------|----------|
| [0317] 淋巴瘤: DLBCL(弥漫性大细胞B细胞淋巴瘤)和其它B细胞淋巴瘤 | 野生型 | OCI-LY19 |
| | | HT |
| | | MC116 |
| | | BC-1 |
| | | BC-3 |
| | | Pfeiffer |
| | | Toledo |
| | | DOHH-2 |

| | | |
|--------|--------|--------------------|
| [0318] | | Farage |
| | | SR |
| | | NU-DHL-1 |
| | | NU-DUL-1 |
| | Y641突变 | SU-DHL-10 (Y641F) |
| | | DB (Y641N) |
| | | KARPAS 422 (Y641N) |
| | | SU-DHL-6 (Y641N) |
| | | WSU-DLCL-2 (Y641F) |
| | | RL (Y641N) |
| 黑色素瘤 | 野生型 | A375 |
| | Y641突变 | IGR-1 (Y641N) |

[0319] 等同形式

[0320] 尽管已经描述并举例说明了本发明的一些实施方式,但是本领域的普通技术人员可以很容易地了解用来实施所述功能和 / 或得到所述结果和 / 或得到本文所述一种或多种优点的各种其它方式和 / 或结构,这些变化和 / 或改良都各自包括在本发明的范围内。更一般地,本领域的技术人员易理解,本文所述的所有参数、尺度、材料和结构都仅仅是示例性的,实际的参数、尺度、材料和 / 或结构将取决于本发明所教导的内容将要使用的一种或多种具体应用。本领域技术人员应了解或能够确定仅采用常规实验即可获得本文所述的本发明具体实施方式的许多等同形式。因此,应当理解,以上实施方式仅仅是示例性的,包括在所附权利要求书及其等价内容范围之内,可以通过本发明具体描述和要求以外的方式实施本发明。本发明涉及本文所述的各种独立的特征、体系、制品、材料、试剂盒和 / 或方法。另外,所述特征、体系、制品、材料、试剂盒和 / 或方法如果互不矛盾,则其中两种或更多种的任意组合都包括在本发明的范围之内。

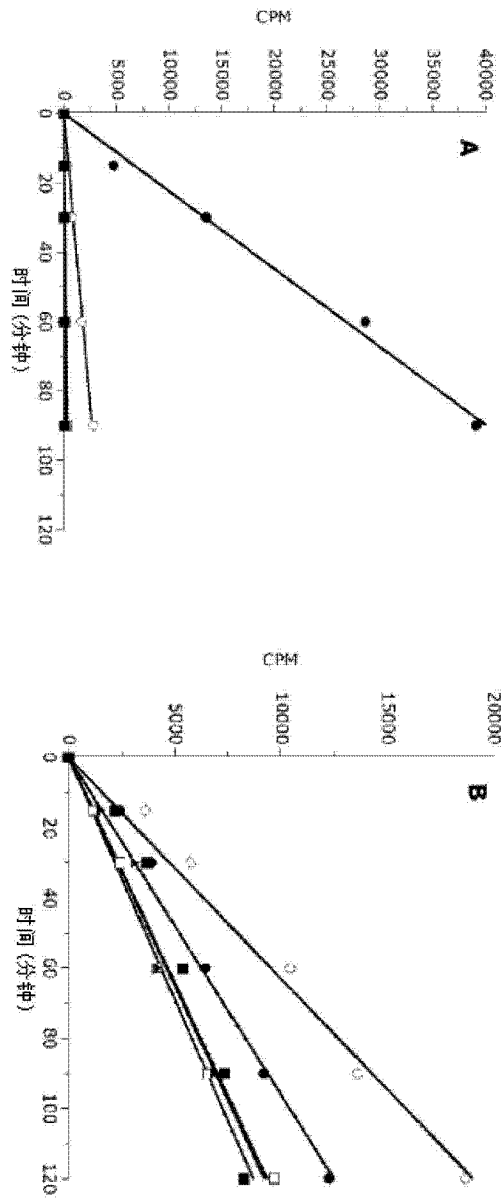


图 1

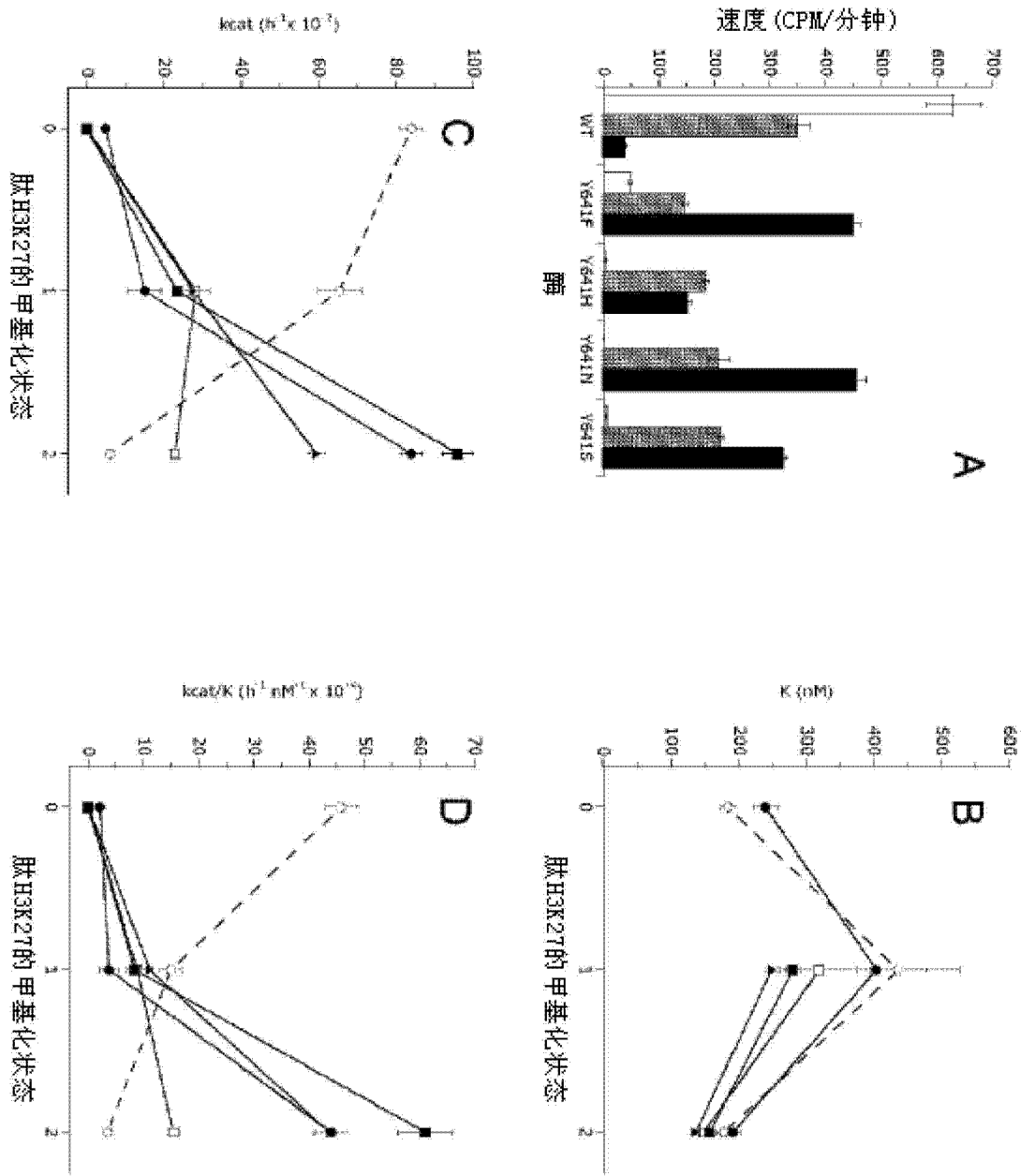


图 2

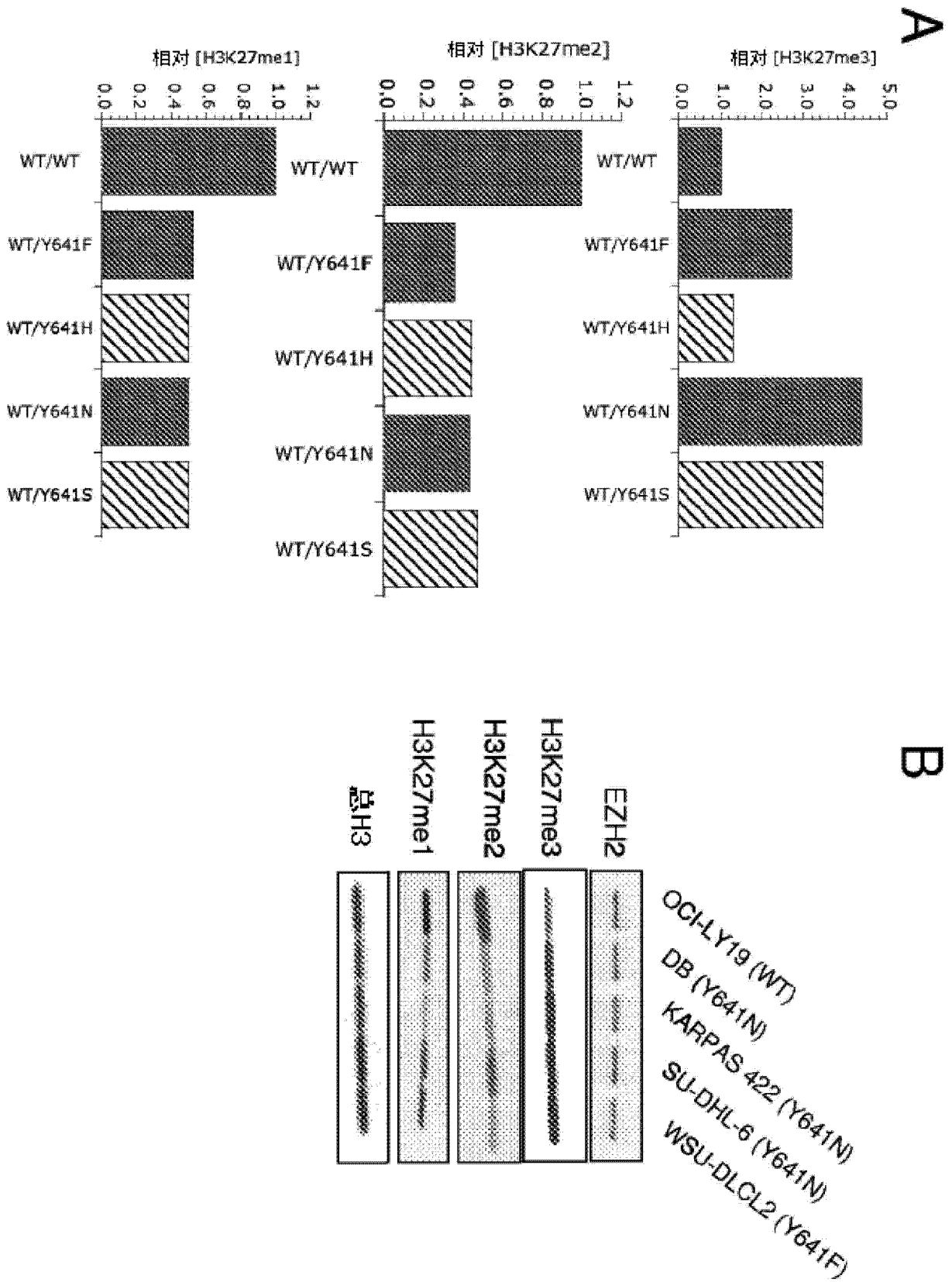


图 3

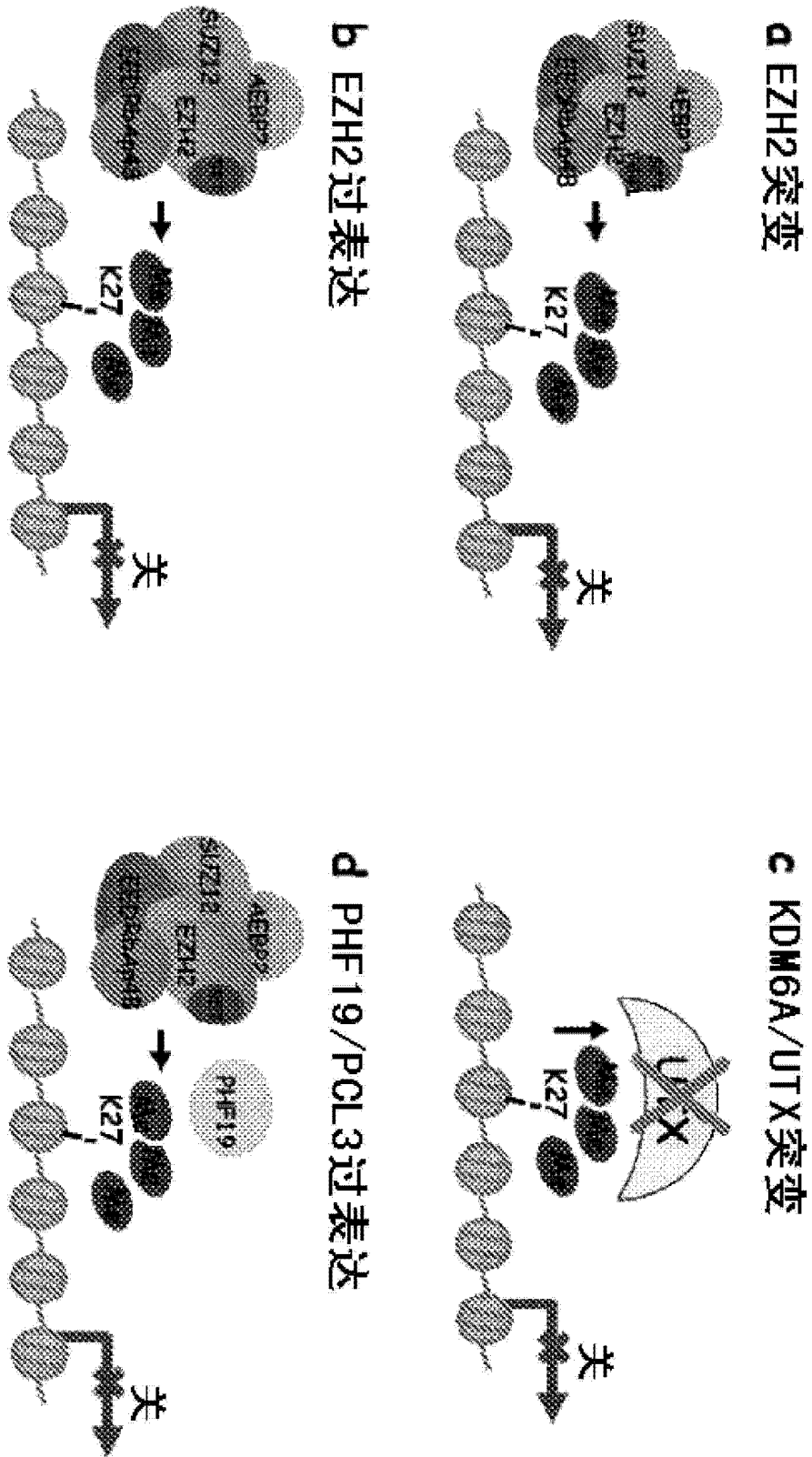


图 4

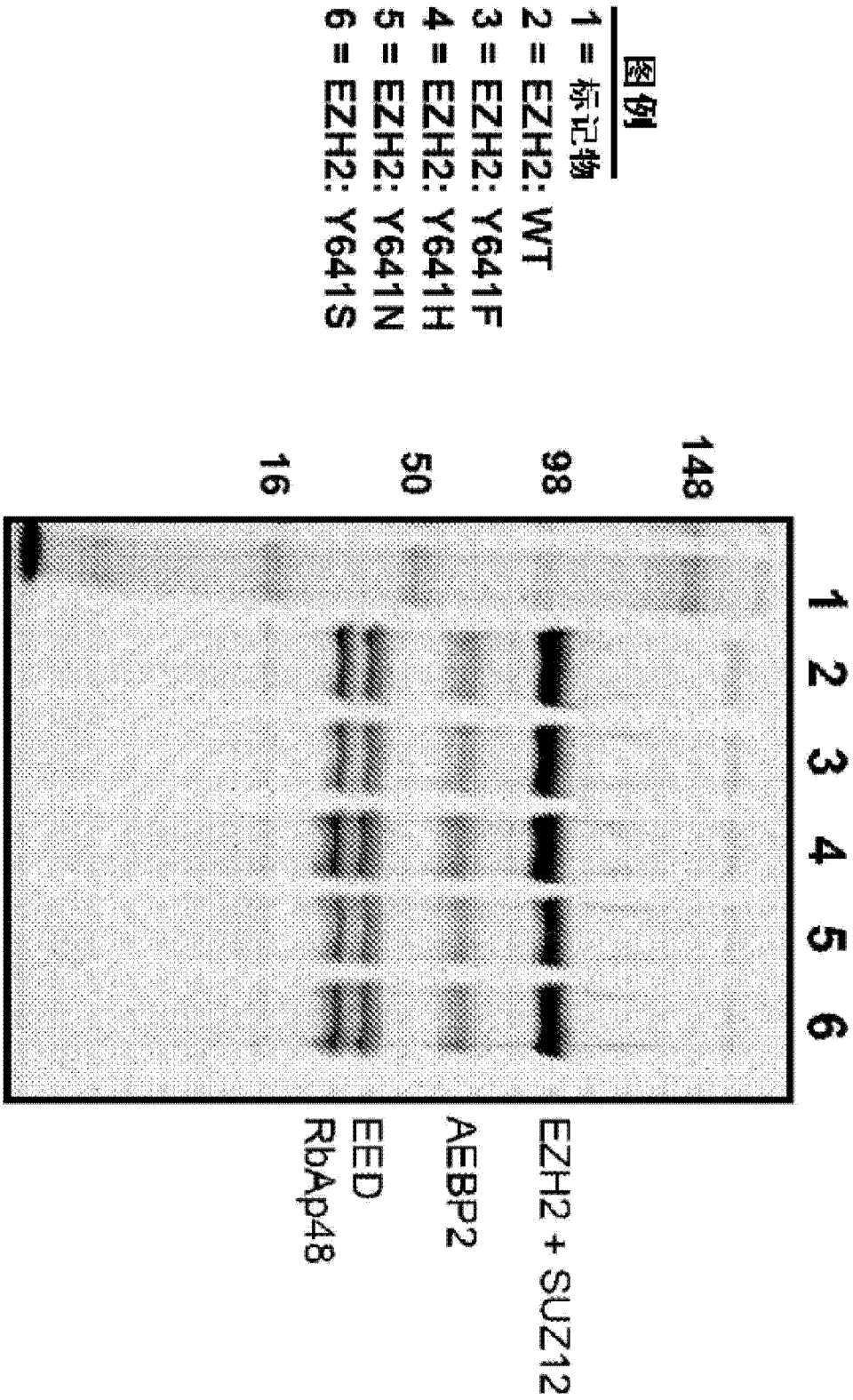


图 5

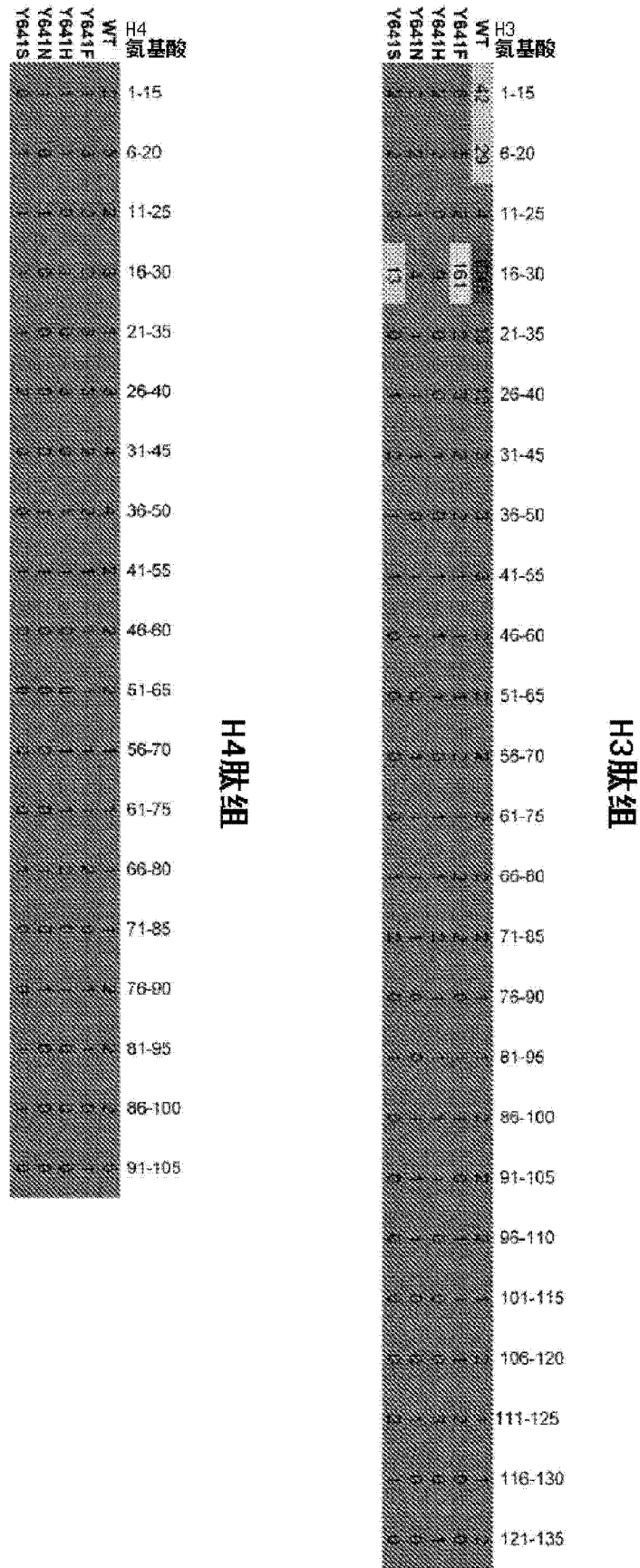


图 6

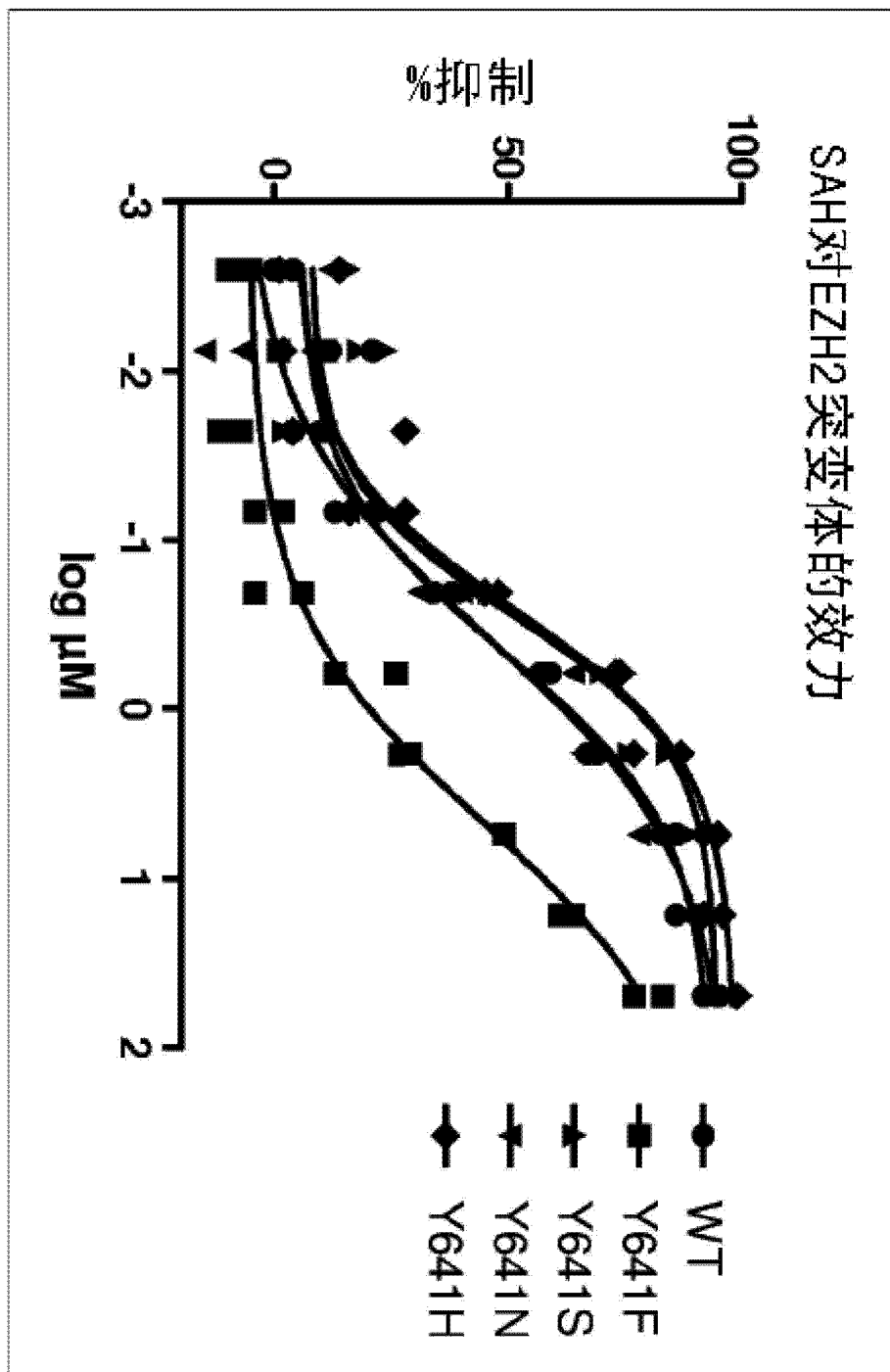


图 7

化合物75

针对EZH2 WT和Y641突变体的效力

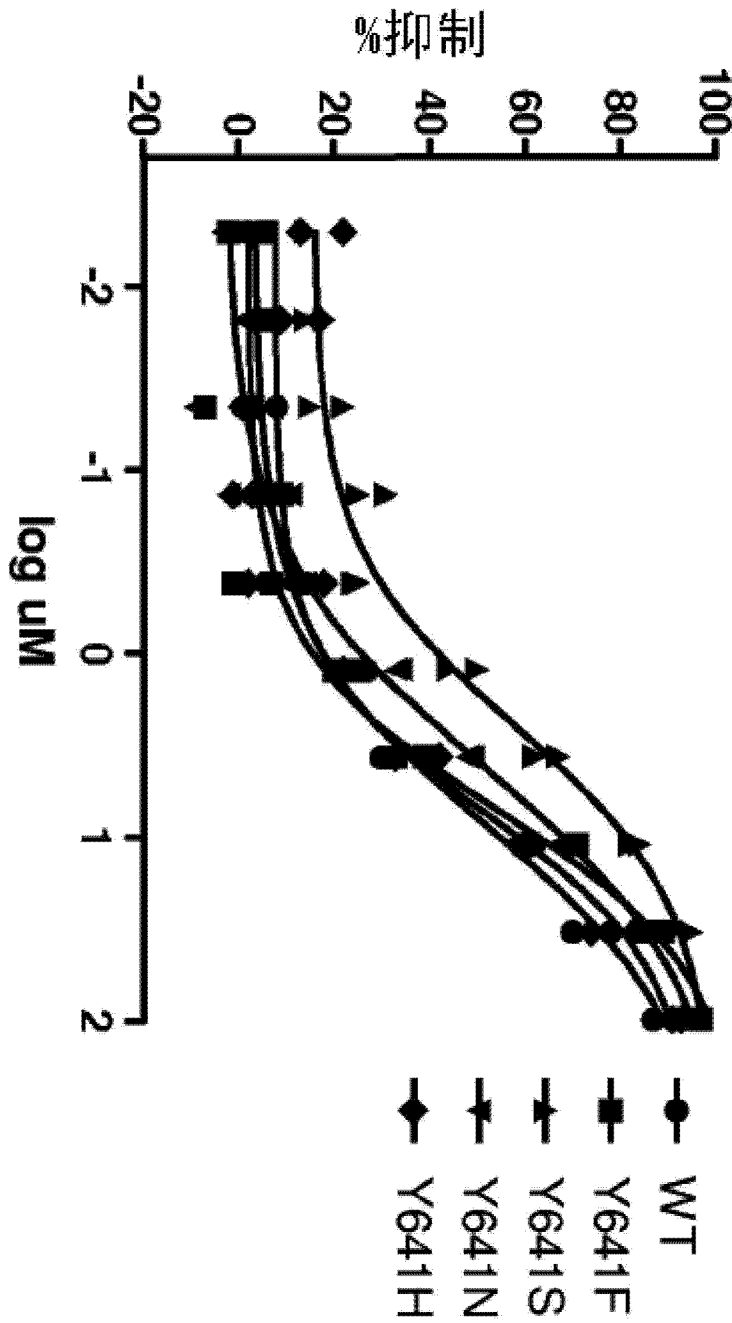


图 8

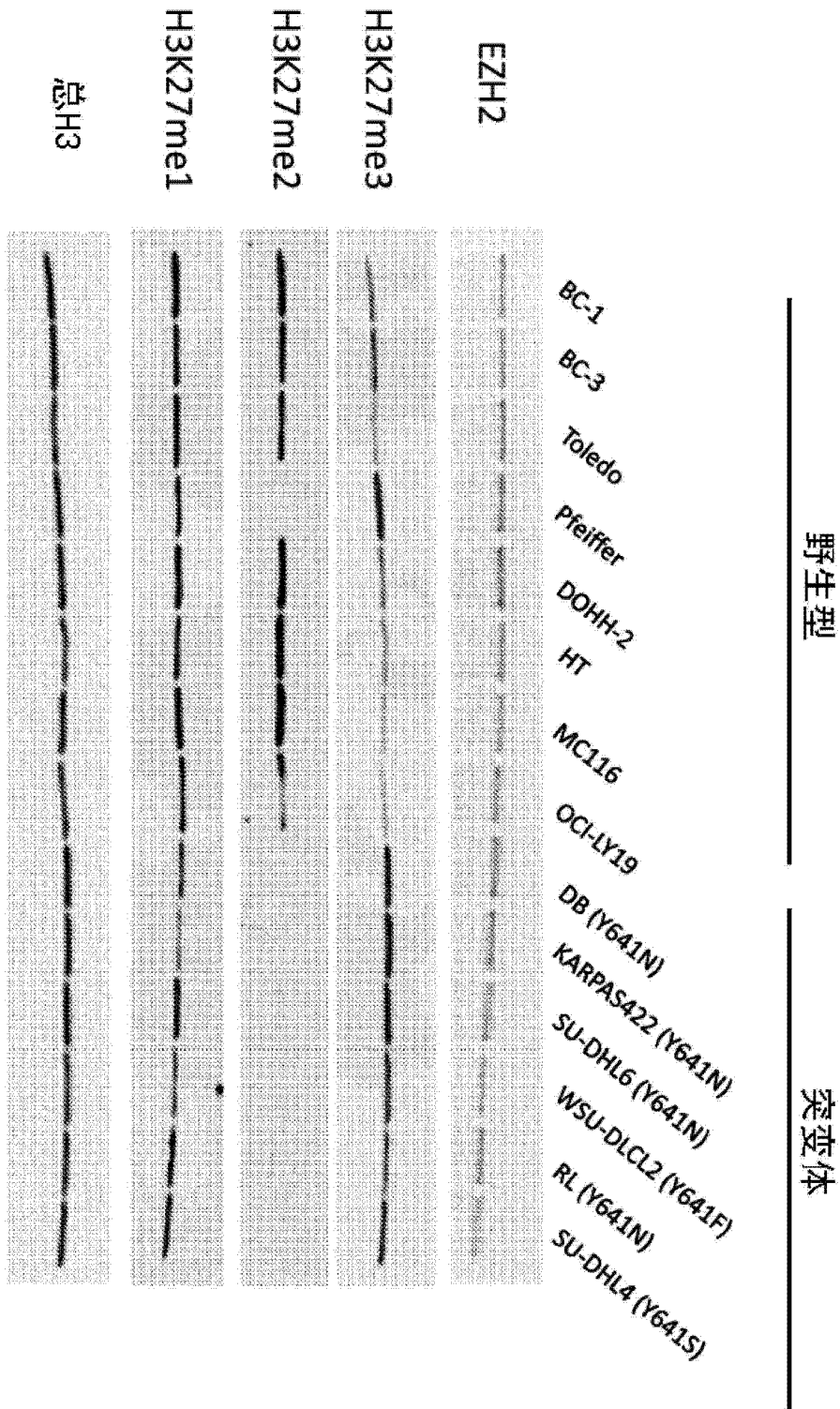


图 9A

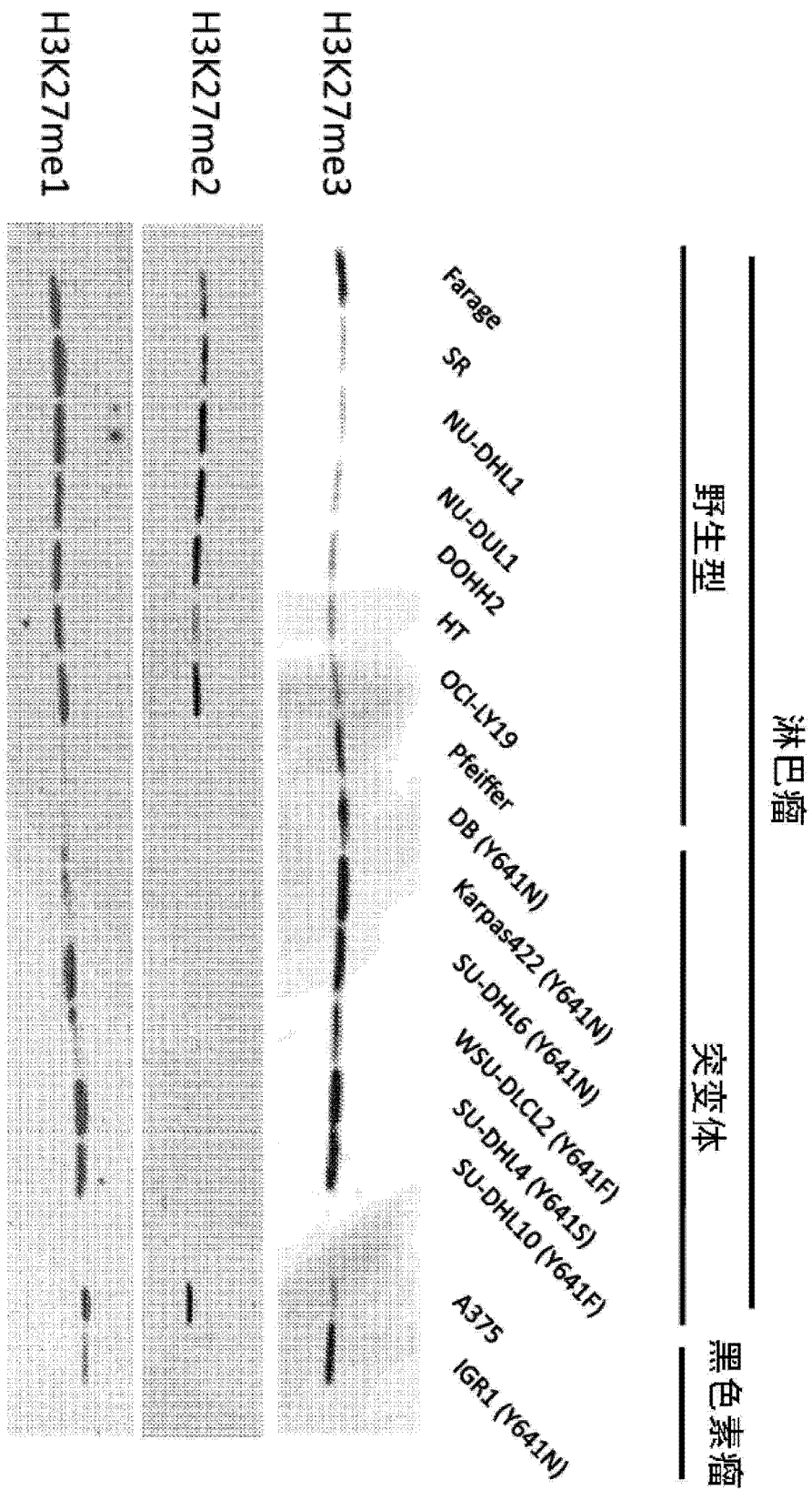


图 9B

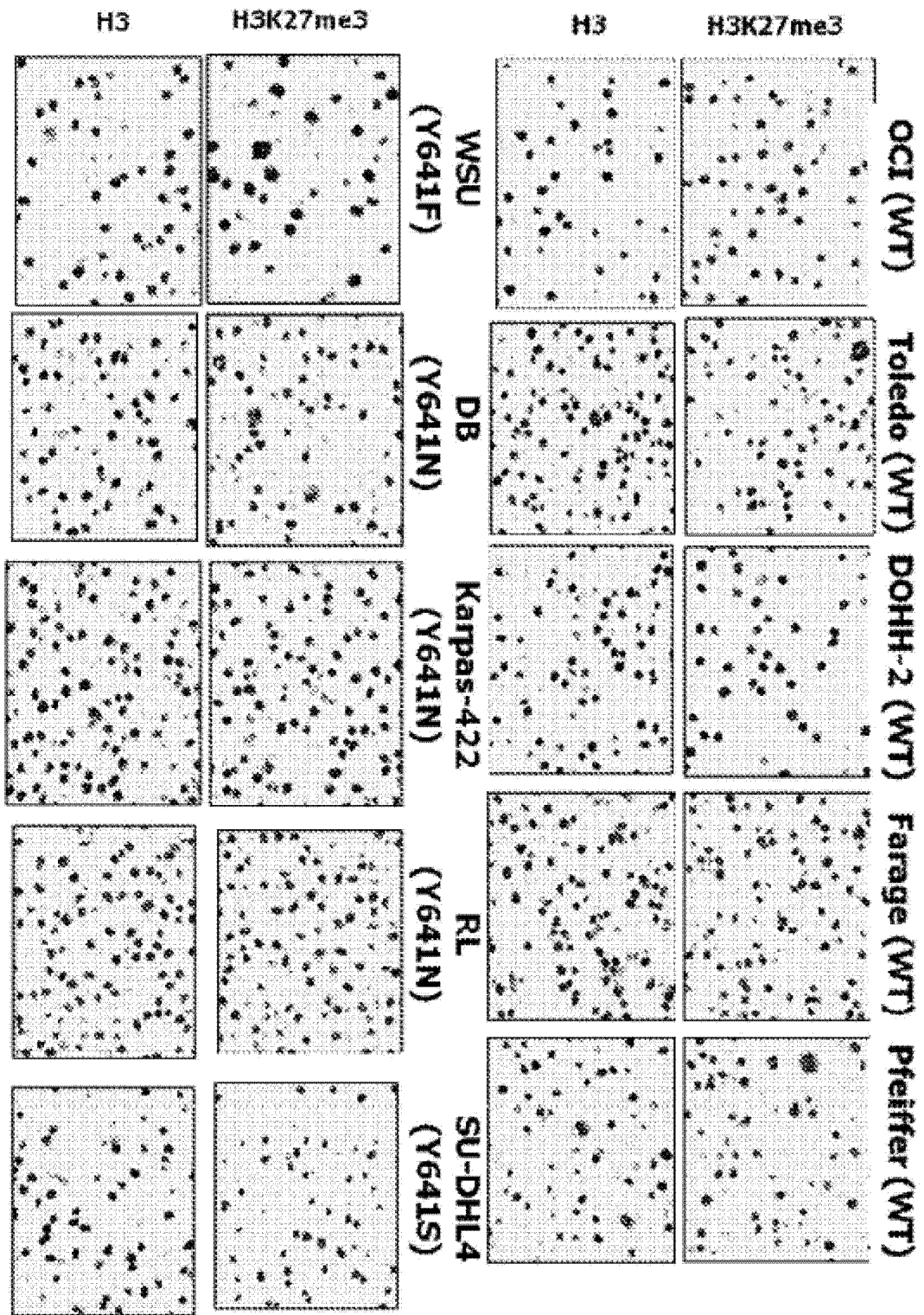


图 10

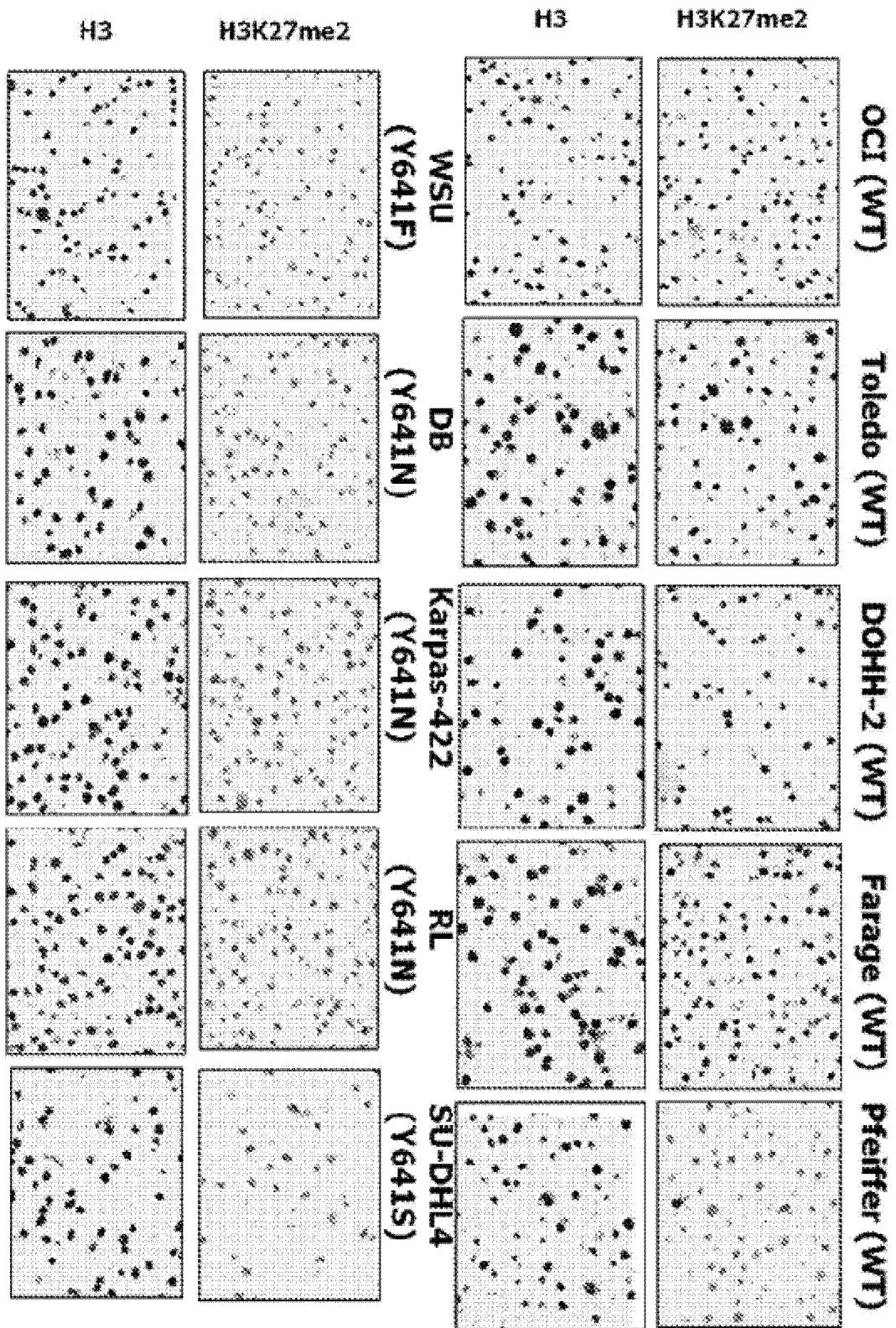


图 11

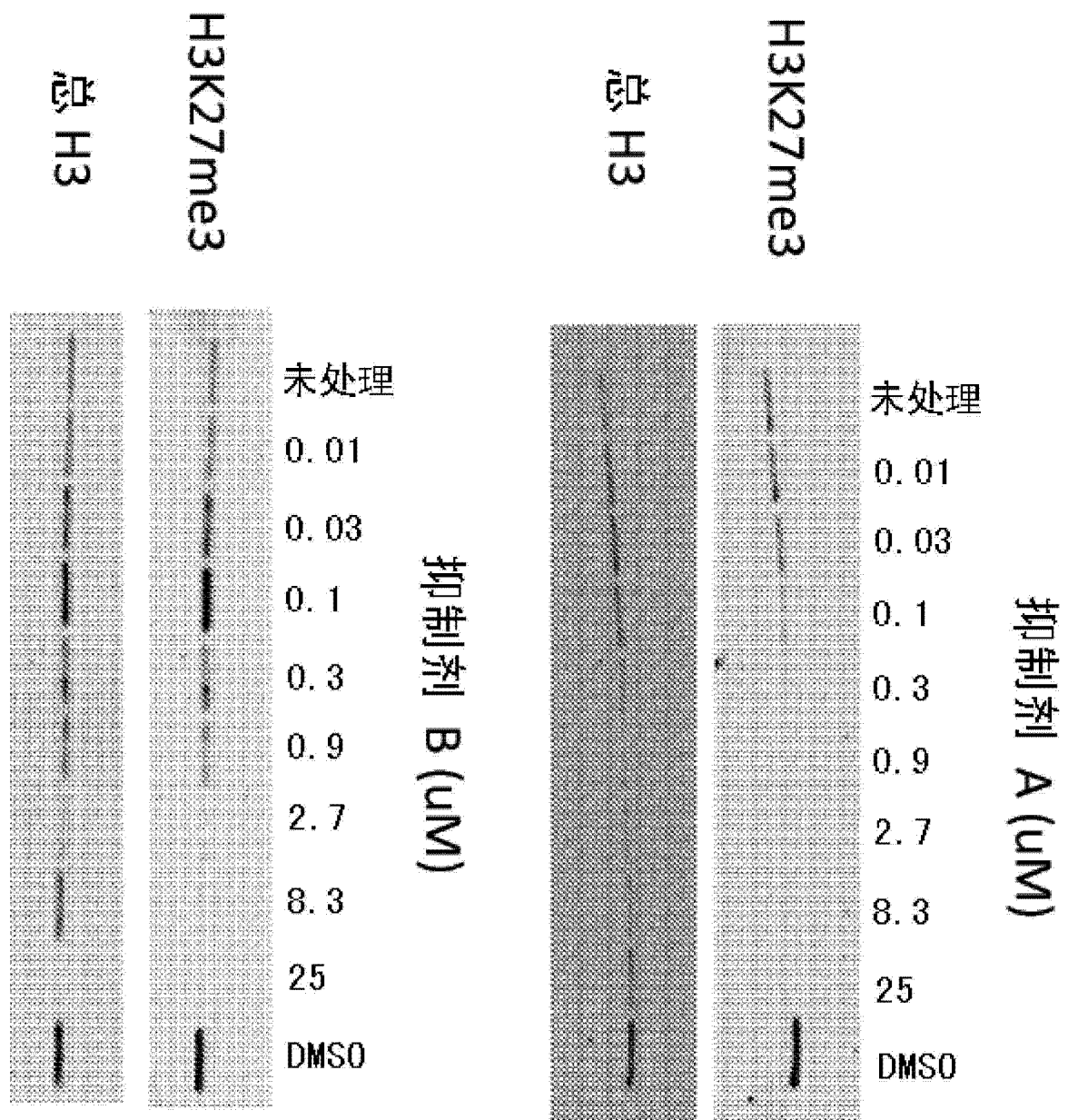
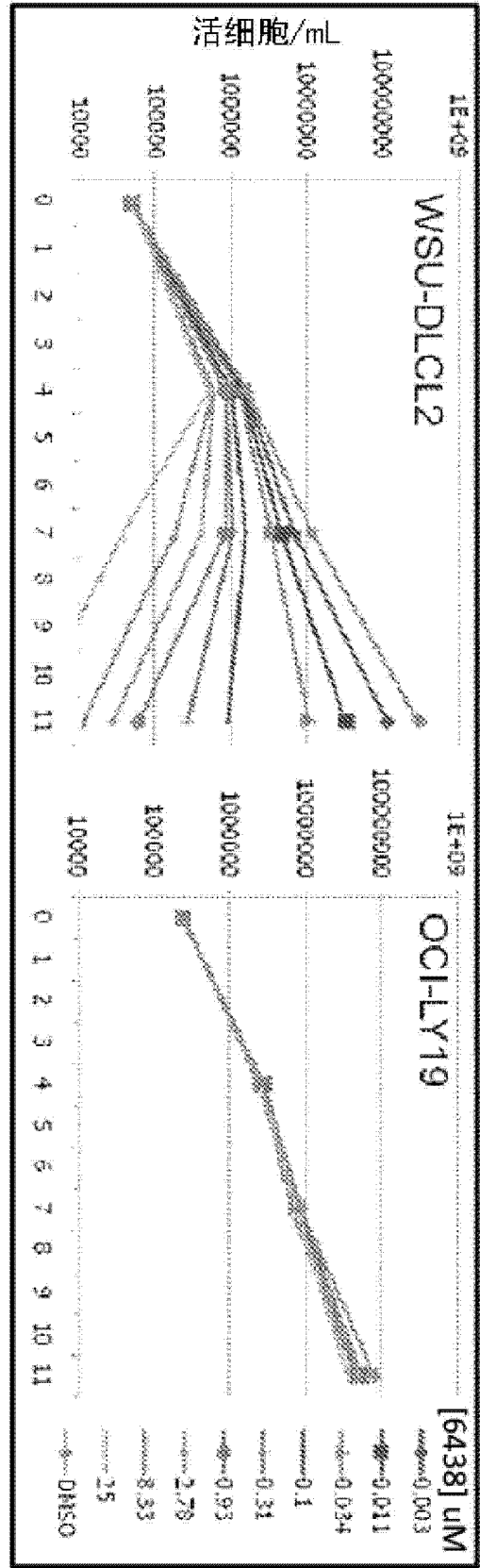


图 12

抑制剂 A



抑制剂 B

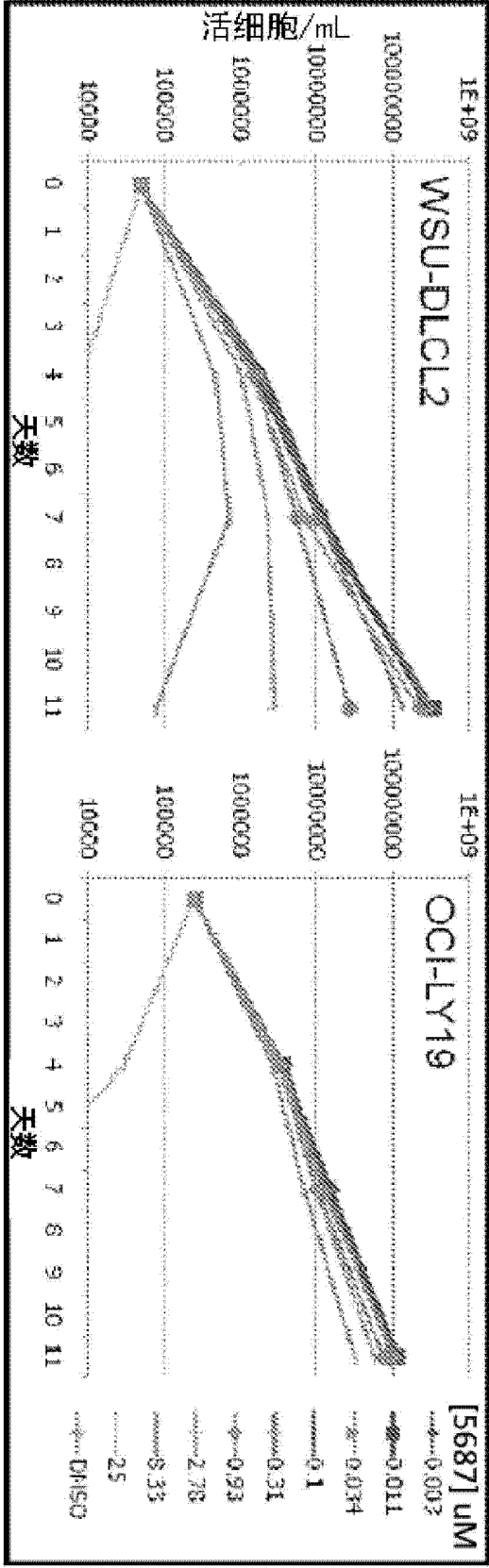


图 13

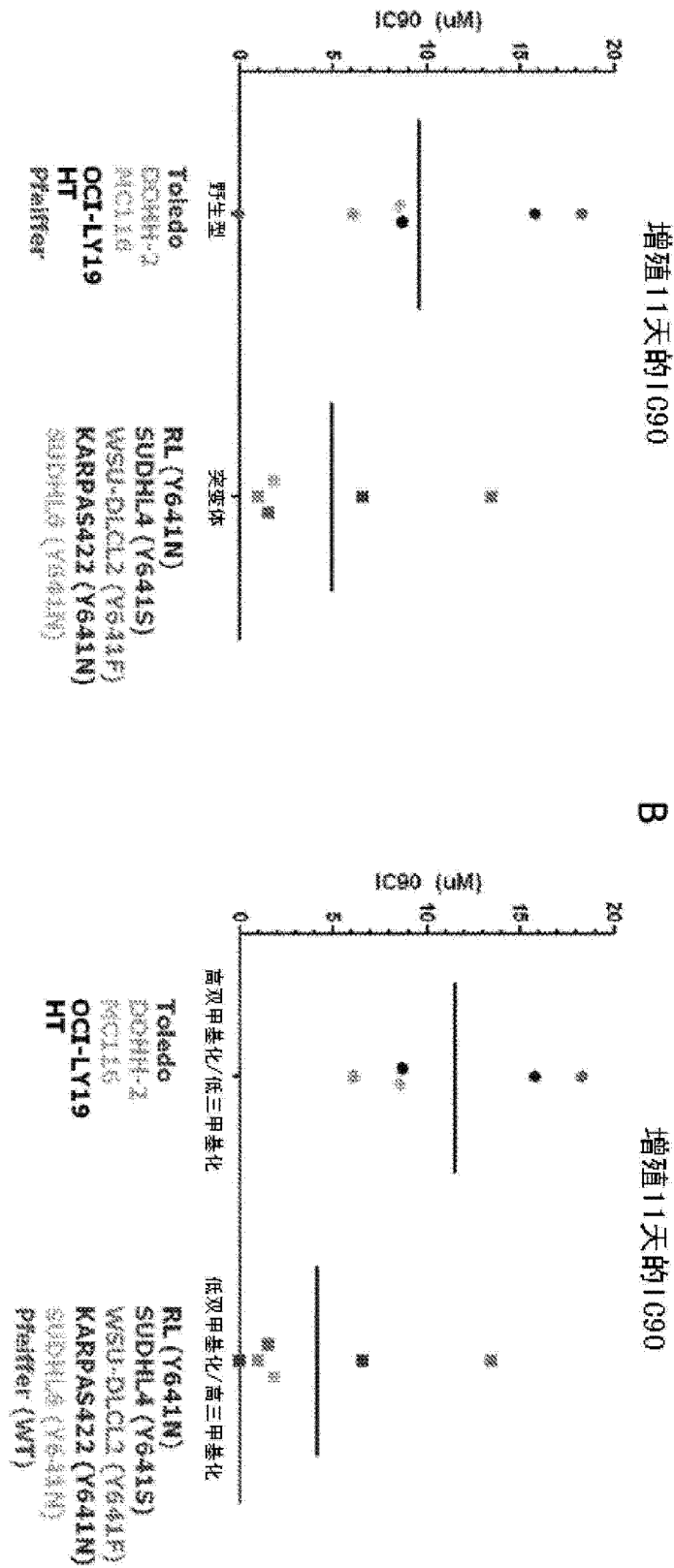


图 14

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 人EZH2抑制剂及其应用方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103261890A | 公开(公告)日 | 2013-08-21 |
| 申请号 | CN201180054109.8 | 申请日 | 2011-09-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 雅酶股份有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | EPIZYME股份有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | EPIZYME股份有限公司 | | |
| [标]发明人 | RA科普兰德 VM瑞创 MD斯克特 CJ斯尼林格 KW孔特斯 SK奈特森 RM波洛克 | | |
| 发明人 | R·A·科普兰德 V·M·瑞创 M·D·斯克特 C·J·斯尼林格 K·W·孔特斯 S·K·奈特森 R·M·波洛克 | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 A61K38/17 C07D473/34 A61P35/00 | | |
| CPC分类号 | A61K31/52 A61K45/00 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/156 G01N33/57426 G01N33/68 G01N2333/47 A61K31/7076 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07D473/34 C07D493/04 C12Q1/48 G01N33/5011 G01N2333/91011 A61K38/17 G01N33/50 C12Q1/6876 | | |
| 代理人(译) | 韦东 | | |
| 优先权 | 61/381684 2010-09-10 US | | |
| 其他公开文献 | CN103261890B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及对人组蛋白甲基转移酶EZH2的野生型和某些突变形式的抑制，所述EZH2是PRC2复合物的催化亚基，所述PRC2复合物催化组蛋白H3上赖氨酸27(H3-K27)的单-至三-甲基化。在一个实施方式中，所述抑制对于所述EZH2的突变形式是选择性的，从而抑制与某些癌症相关的H3-K27的三甲基化。可以使用所述方法来治疗癌症，包括滤泡性淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。本发明还提供用于鉴定EZH2突变形式的小分子选择性抑制剂的方法，以及用于测定对象内对EZH2抑制剂响应性的方法。

