



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104540500 B

(45)授权公告日 2019.02.22

(21)申请号 201380024734.7

(22)申请日 2013.03.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104540500 A

(43)申请公布日 2015.04.22

(30)优先权数据

13/418,242 2012.03.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.11.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/030565 2013.03.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/138361 EN 2013.09.19

(73)专利权人 EPIZYME股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 K·W·孔特斯 S·K·纳特森

T·J·N·威格尔

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 杨昀

(51)Int.Cl.

A61K 31/444(2006.01)

A61K 31/5377(2006.01)

A61K 31/551(2006.01)

A61K 31/4412(2006.01)

A61K 31/4162(2006.01)

A61K 31/497(2006.01)

A61K 31/52(2006.01)

C12Q 1/68(2018.01)

G01N 33/50(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 103987842 A, 2014.08.13, 说明书第6至12、14页.

审查员 卢立明

权利要求书39页 说明书118页 附图15页

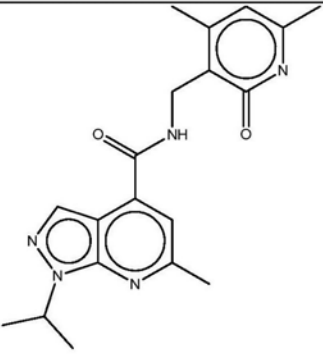
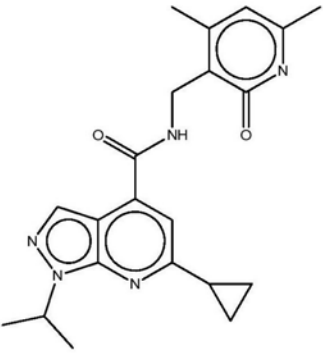
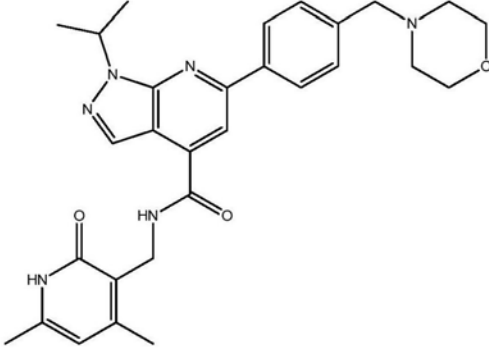
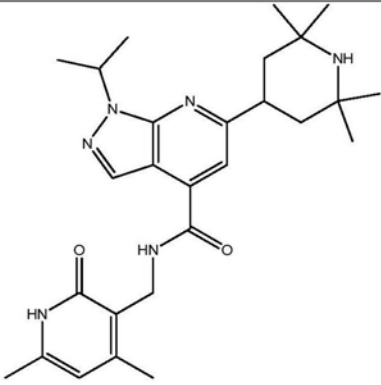
(54)发明名称

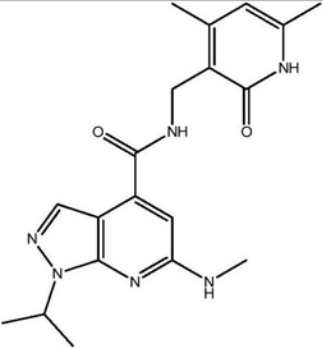
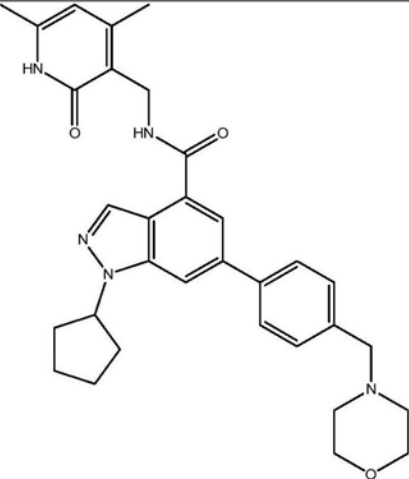
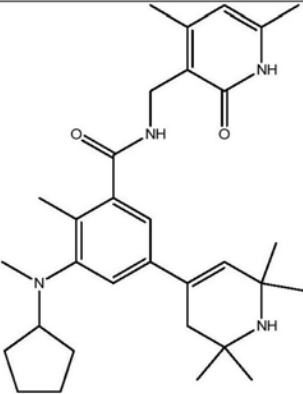
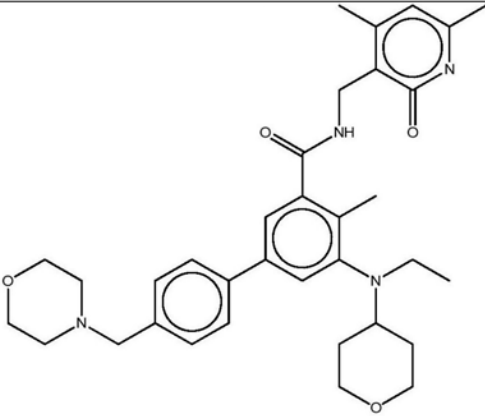
人EZH2抑制剂及其应用方法

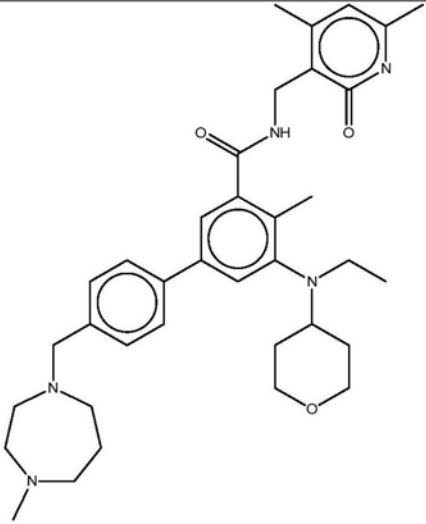
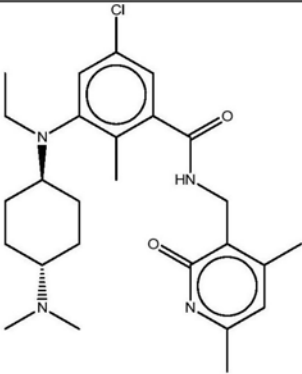
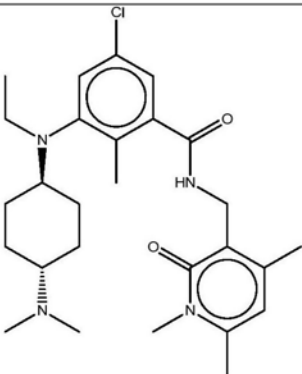
(57)摘要

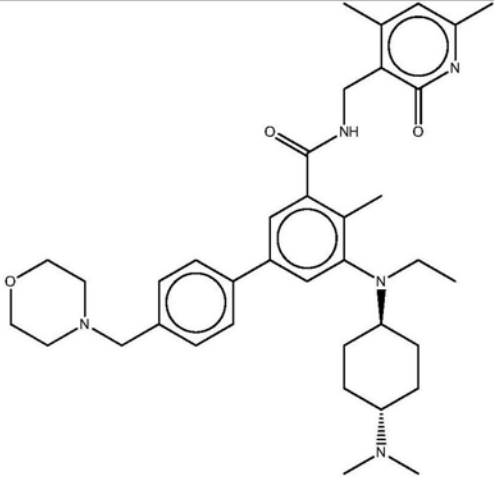
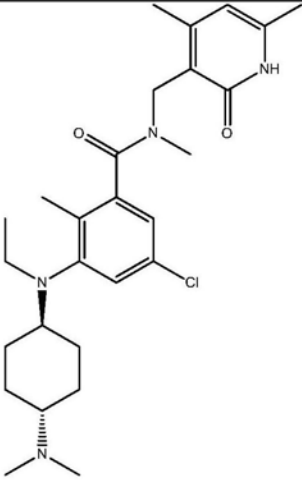
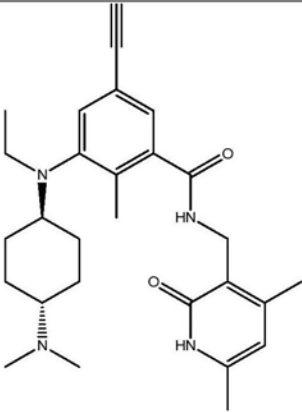
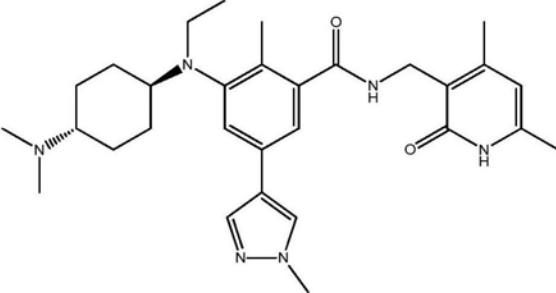
本发明涉及对人组蛋白甲基转移酶EZH2的野生型和某些突变形式的抑制,所述EZH2是PRC2复合物的催化亚基,所述PRC2复合物催化组蛋白H3上赖氨酸27(H3-K27)的单-至三-甲基化。在一个实施方式中,所述抑制对于所述EZH2的突变形式是选择性的,从而抑制与某些癌症相关的H3-K27的三甲基化。可以使用所述方法来治疗癌症,包括滤泡性淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。本发明还提供用于鉴定EZH2突变形式的小分子选择性抑制剂的方法,以及用于测定对象内对EZH2抑制剂响应性的方法。

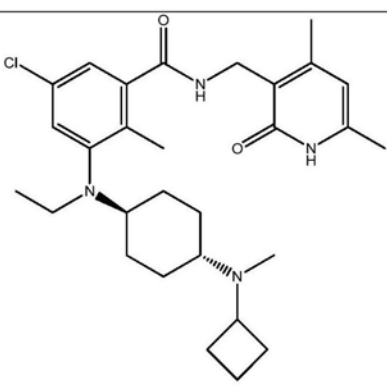
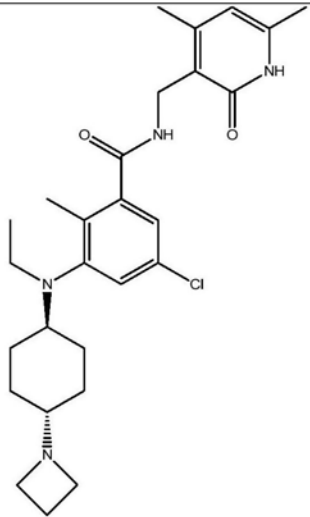
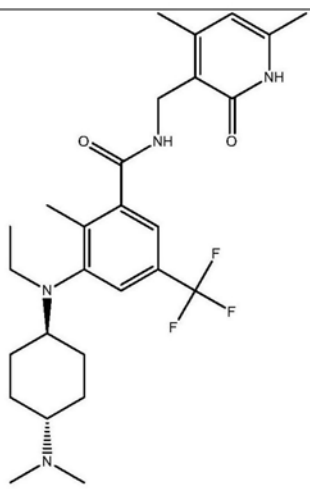
1. 选自下表的EZH2抑制剂

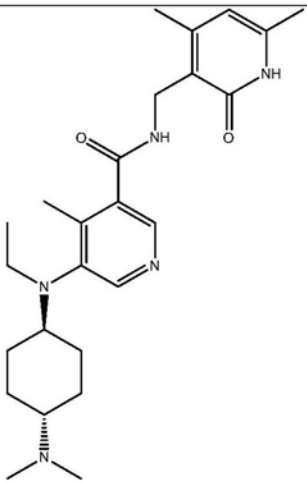
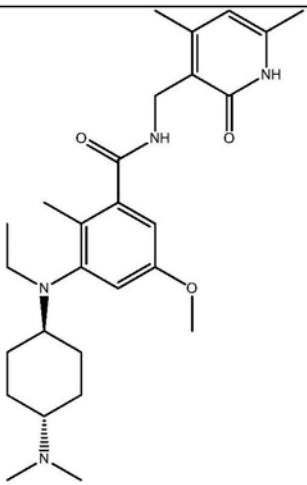
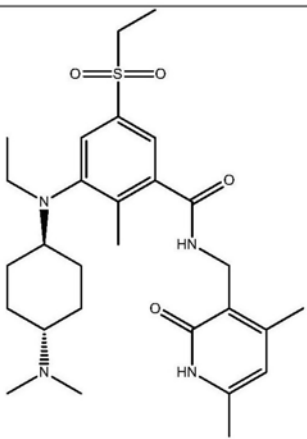
2	
3	
4	
5	

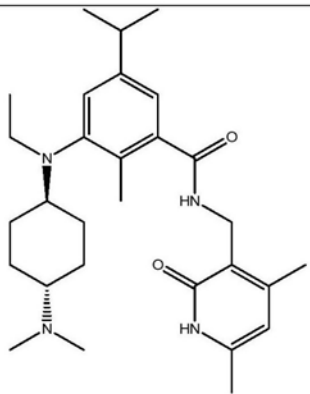
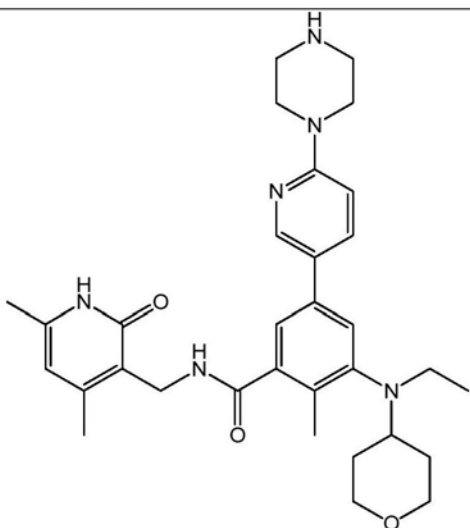
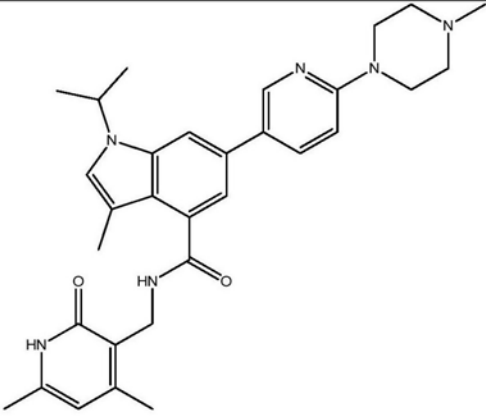
6	
7	
8	
9	

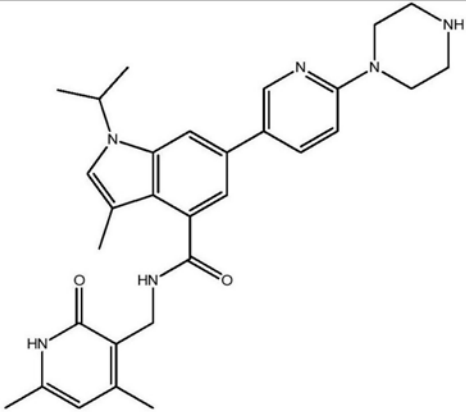
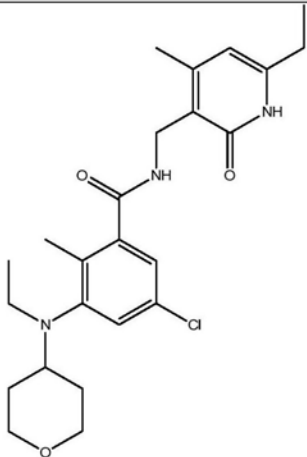
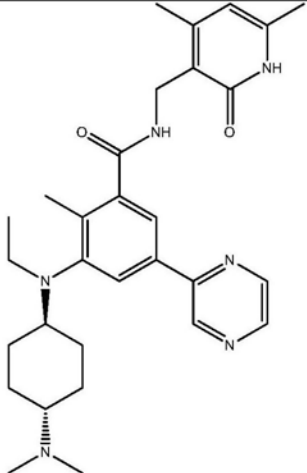
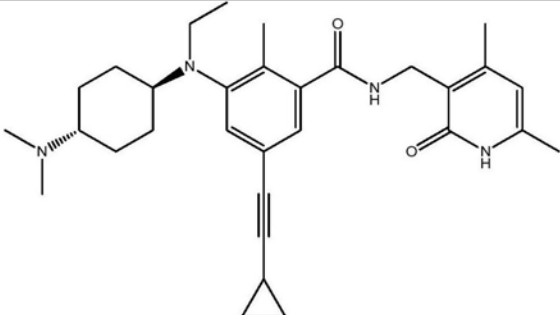
10	
11	
12	

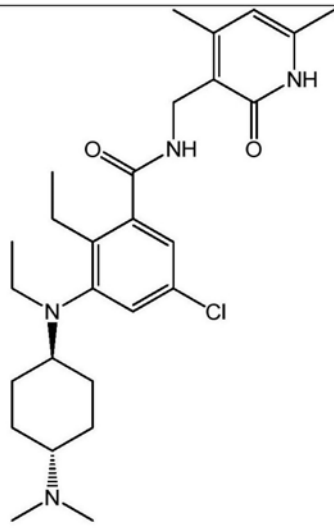
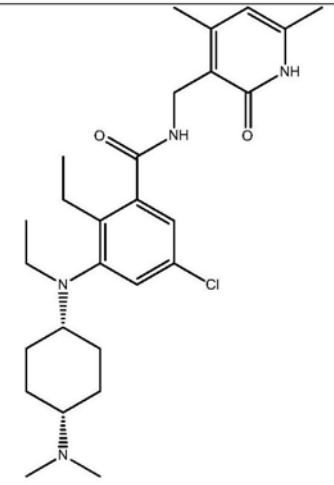
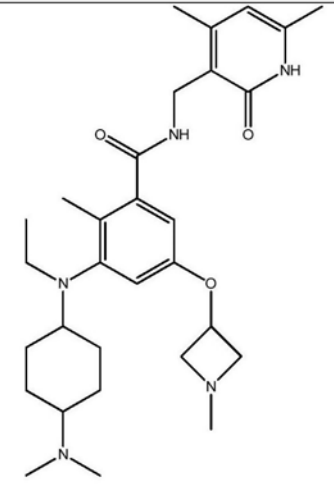
13	
14	
15	
16	

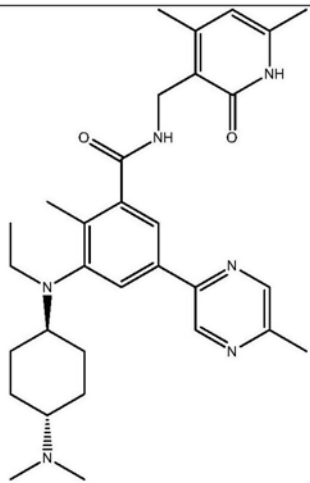
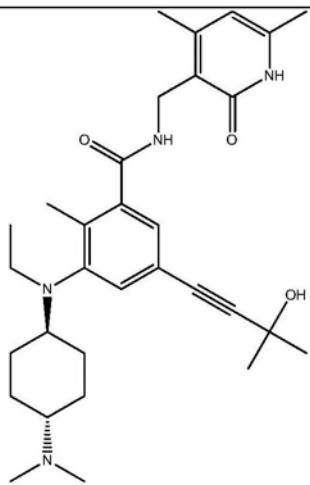
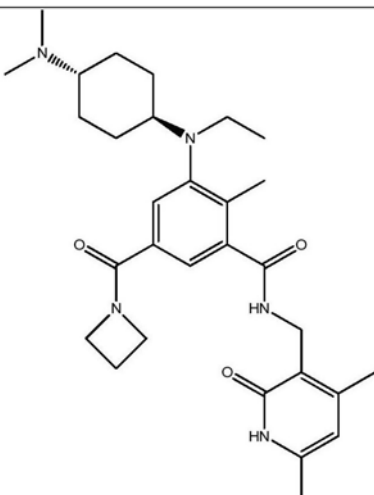
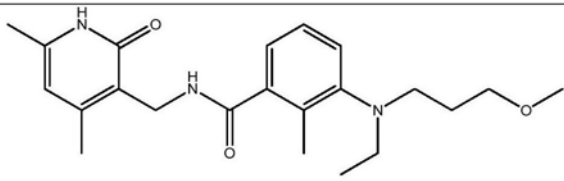
17	
18	
19	

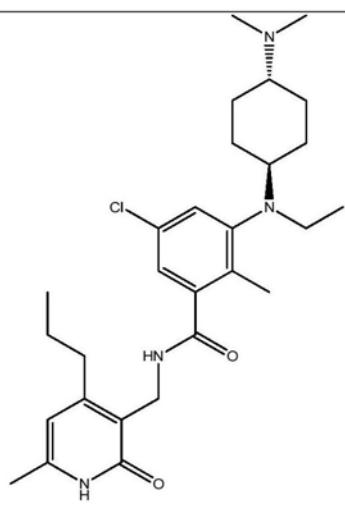
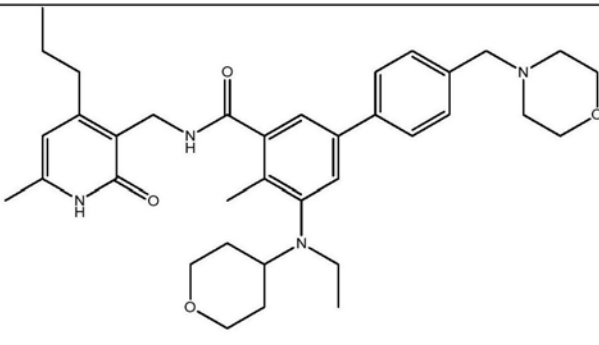
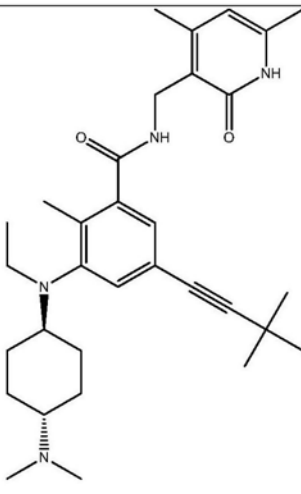
20	
21	
22	

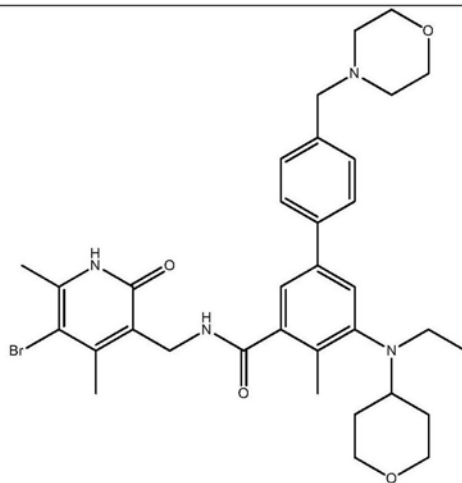
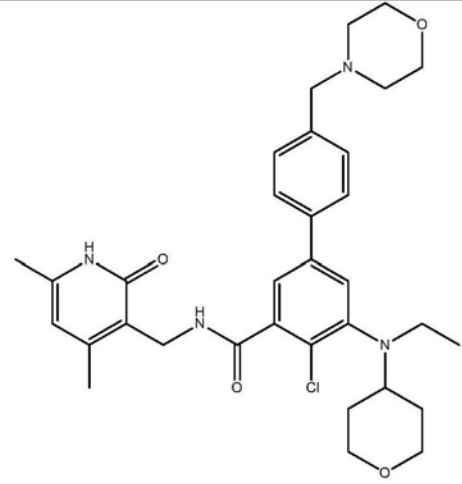
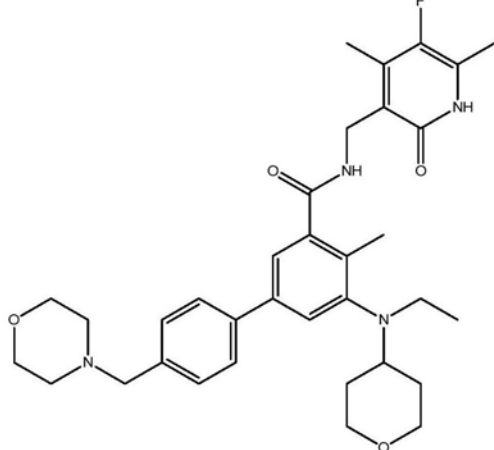
23	
24	
25	

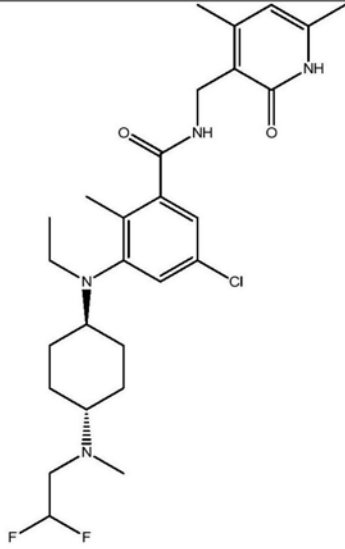
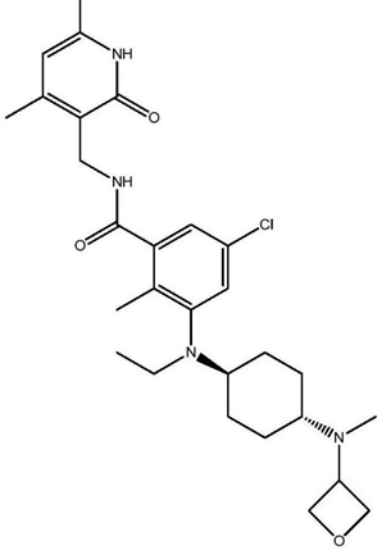
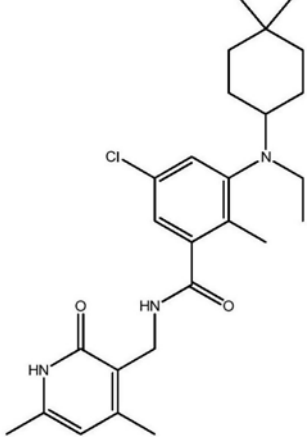
26	
27	
28	
29	

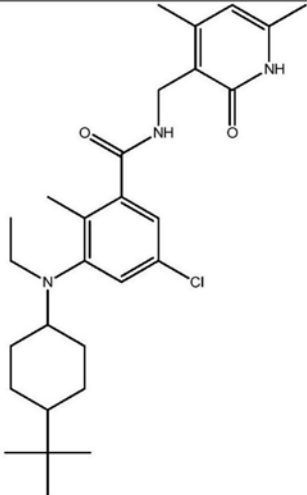
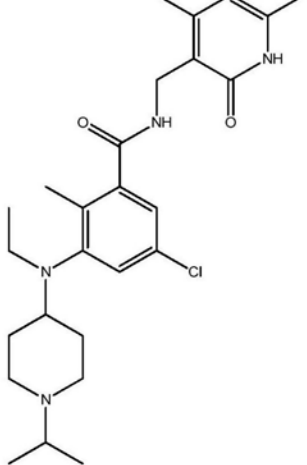
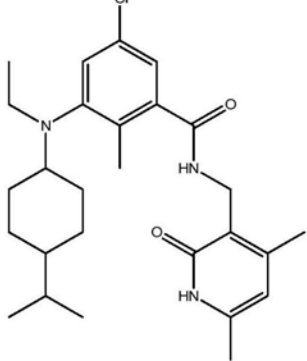
30	
31	
32	

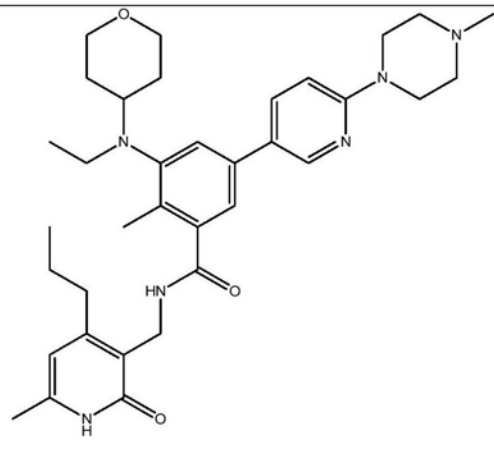
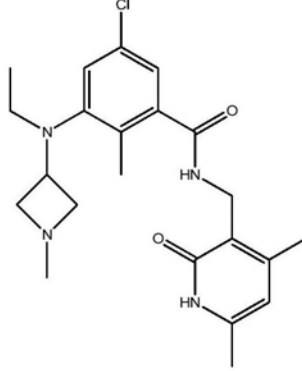
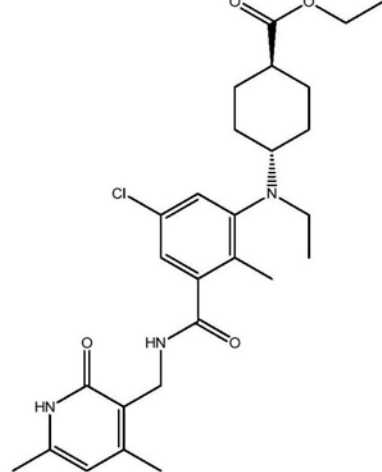
33	
34	
35	
36	

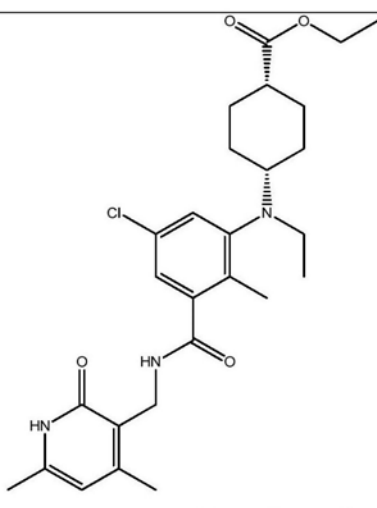
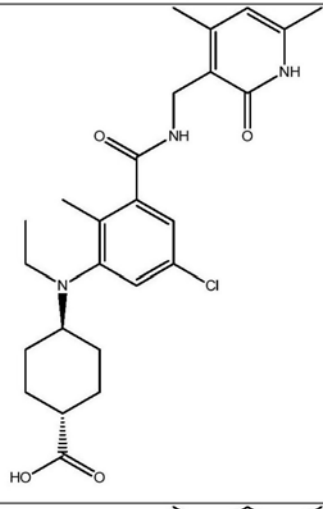
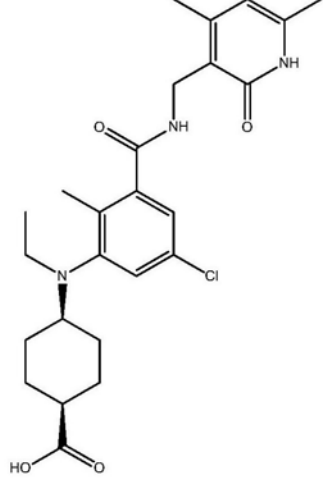
37	
38	
39	

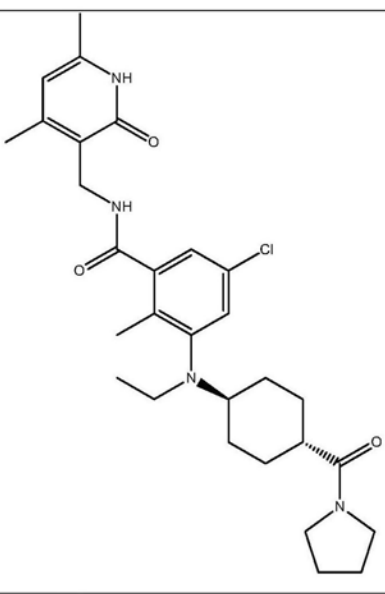
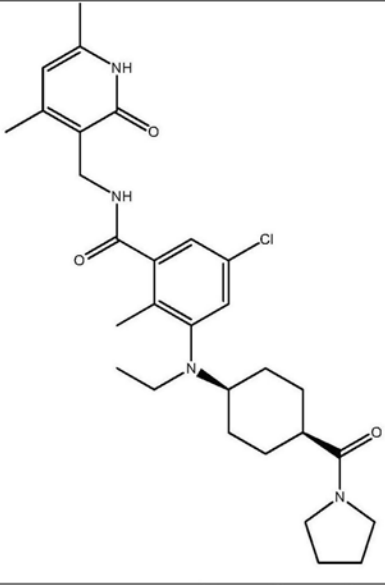
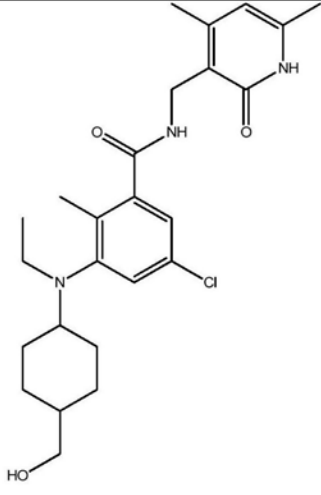
40	
41	
42	

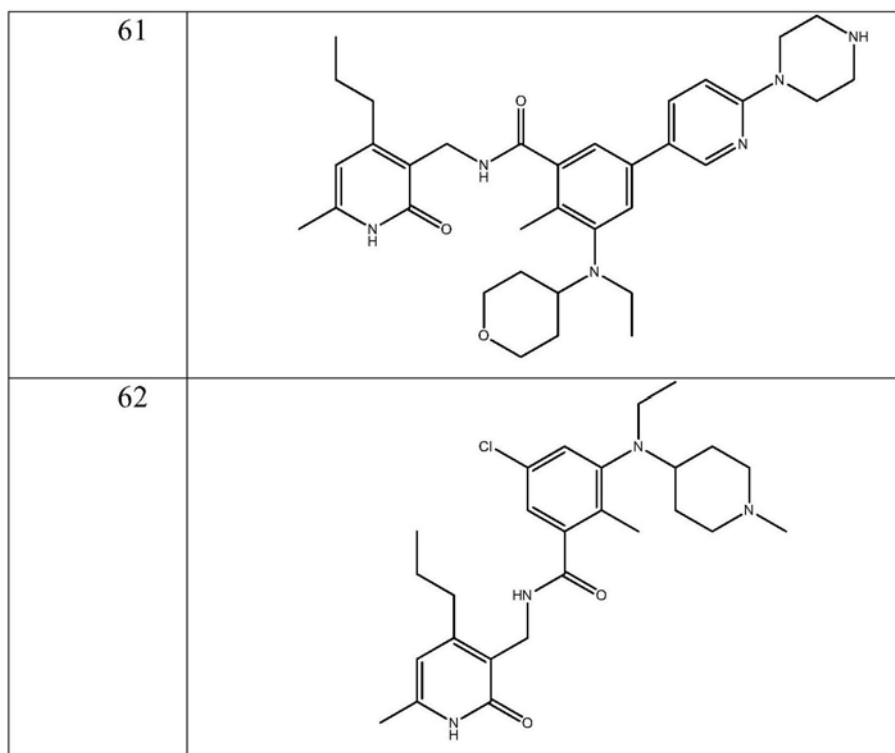
46	 <chem>CCN(CC1CCCCC1N(C)CC(F)F)C2=CC(=CC(=C2)C(=O)NCC3=C(N)C(=O)C=C3C)C(Cl)=C</chem>
47	 <chem>CCN(CC1CCCCC1N(C)CC2=CC=CC=C2C(=O)NCC3=C(N)C(=O)C=C3C)C(Cl)=C</chem>
48	 <chem>CCN(CC1CCCCC1N(C)CC2=CC=CC=C2C(=O)NCC3=C(N)C(=O)C=C3C)C(Cl)=C</chem>

49	 <chem>CCN(CC1CCCCC1C(C)(C)C)C2=CC(=CC(=C2)C(C)=CC(=C2)Cl)C(=O)NCc3c(C)c[nH]c3=O</chem>
50	 <chem>CCN(CC1CCN(C(C)C)CC1)C2=CC(=CC(=C2)C(C)=CC(=C2)Cl)C(=O)NCc3c(C)c[nH]c3=O</chem>
51	 <chem>CCN(CC1CCCCC1C(C)C)C2=CC(=CC(=C2)C(C)=CC(=C2)Cl)C(=O)NCc3c(C)c[nH]c3=O</chem>

52	
53	
54	

55	 <chem>CC1(C)C(=O)NC(=O)C1C(=O)NC(=O)c2cc(Cl)cc(N(CC)C[C@H]3CCCC[C@@H]3C(=O)OCC)c2</chem>
56	 <chem>CC1(C)C(=O)NC(=O)C1C(=O)NC(=O)c2cc(Cl)cc(N(CC)C[C@H]3CCCC[C@@H]3C(=O)OCC)c2</chem>
57	 <chem>CC1(C)C(=O)NC(=O)C1C(=O)NC(=O)c2cc(Cl)cc(N(CC)C[C@H]3CCCC[C@@H]3C(=O)OCC)c2</chem>

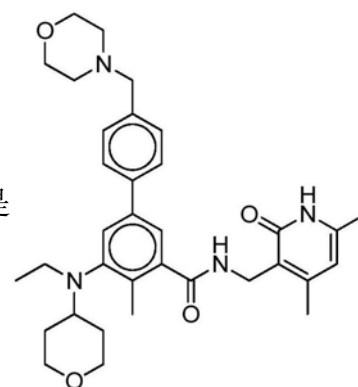
58	 <chem>CC1=CNC(=O)C=C1CNC(=O)c2cc(Cl)cc(C)c2N(CC)[C@H]3CCCC[C@@H]3C(=O)N4CCCC4</chem>
59	 <chem>CC1=CNC(=O)C=C1CNC(=O)c2cc(Cl)cc(C)c2N(CC)[C@@H]3CCCC[C@H]3C(=O)N4CCCC4</chem>
60	 <chem>CC1=CNC(=O)C=C1CNC(=O)c2cc(Cl)cc(C)c2N(CC)[C@H]3CCCC[C@@H]3CO</chem>



及其药学上可接受的盐在制备治疗或减轻表达突变型EZH2的对象中的癌症或骨髓增生异常综合征 (MDS, 先前被称作白血病前期) 的药物中的应用, 其中, 所述突变型EZH2在SEQ ID NO:1的氨基酸位置677、687或641处包含取代突变。

2. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述突变型EZH2在SEQ ID NO:1的氨基酸位置677、687或641处包含多于一个取代突变。

3. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述EZH2抑制剂是



或其药学上可接受的盐。

4. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述癌症是淋巴瘤、白血病或黑素瘤。

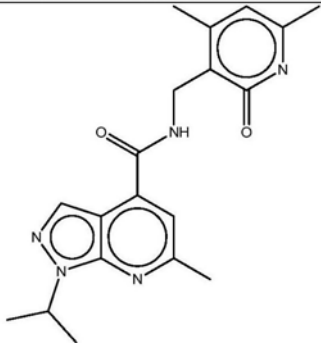
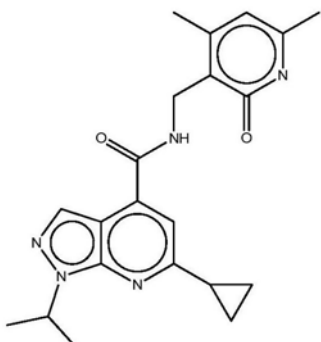
5. 如权利要求4所述的应用, 其特征在于, 所述淋巴瘤选自下组: 非霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤和弥散性大B细胞淋巴瘤。

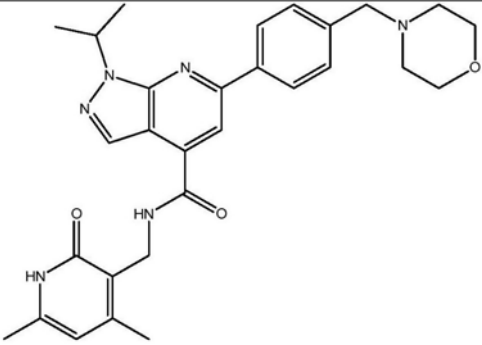
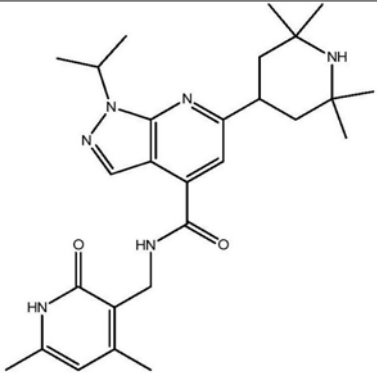
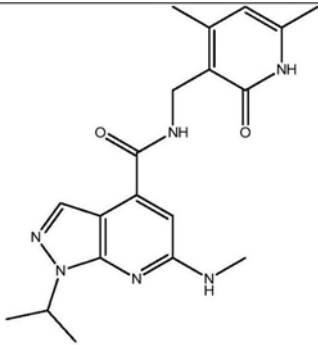
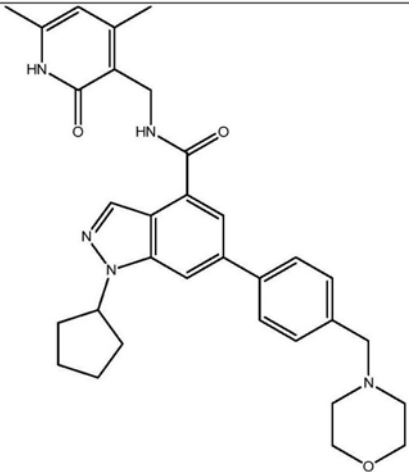
6. 如权利要求4所述的应用, 其特征在于, 所述白血病是慢性骨髓性白血病 (CML)。

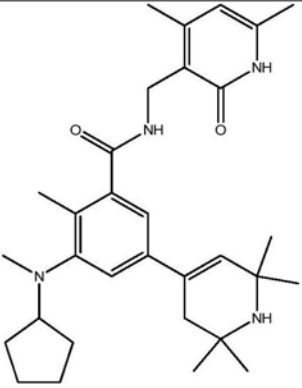
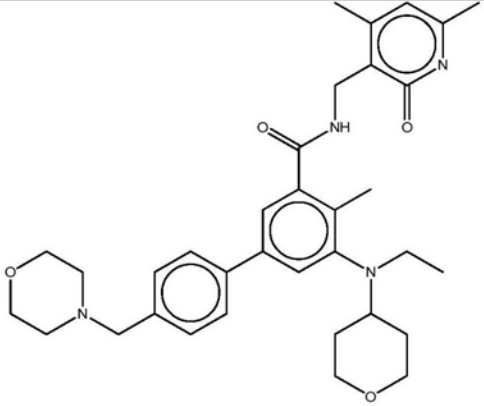
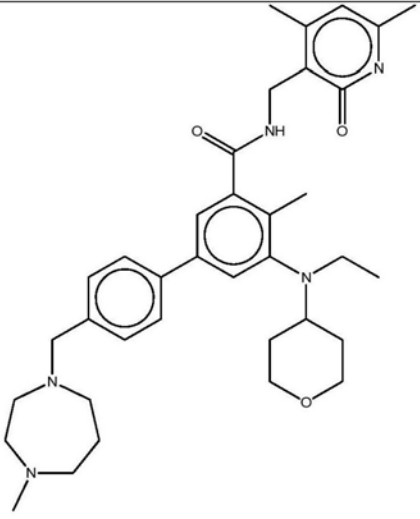
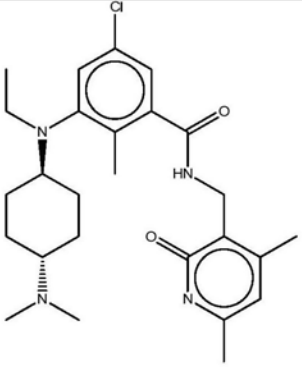
7. 如权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述突变选自下组: 甘氨酸 (G) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸 (A) (A677G); 缬氨酸 (V) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸 (A) (A687V); 苯丙氨酸 (F) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸 (Y) (Y641F); 组氨酸 (H) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野

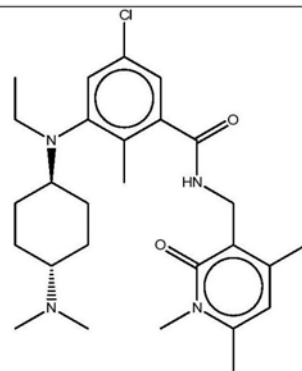
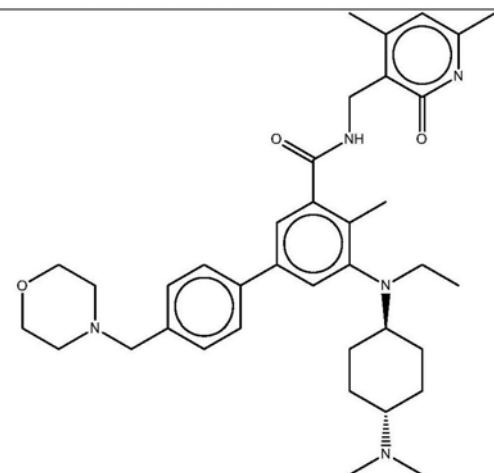
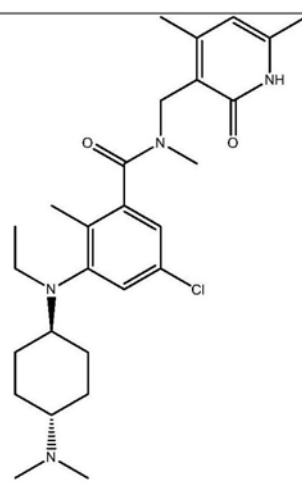
生型残基酪氨酸(Y) (Y641H) ;天冬酰胺(N)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641N) ;丝氨酸(S)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641S) ;和半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641C) 。

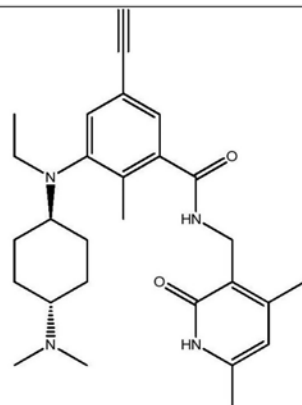
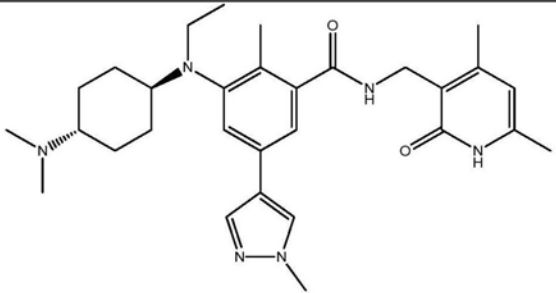
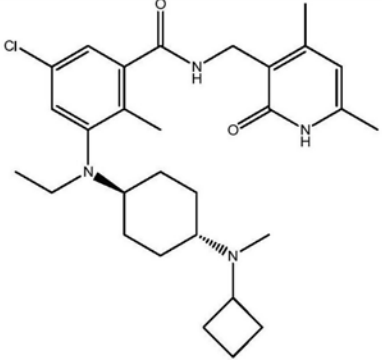
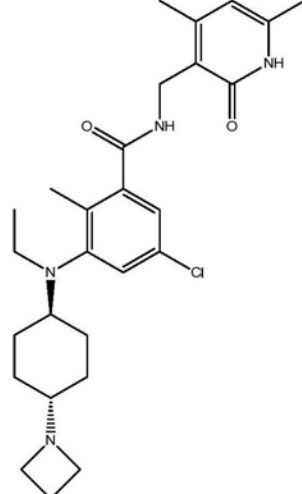
8. 一种测定患有癌症或骨髓增生异常综合征(MDS, 先前被称作白血病前期) 的对象对选自下表所列的EZH2抑制剂:

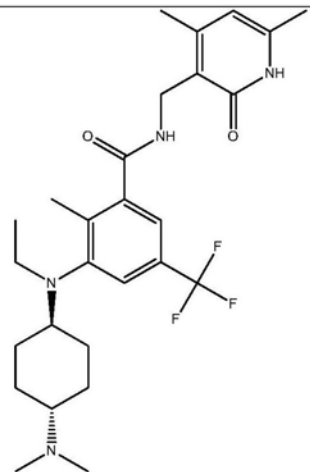
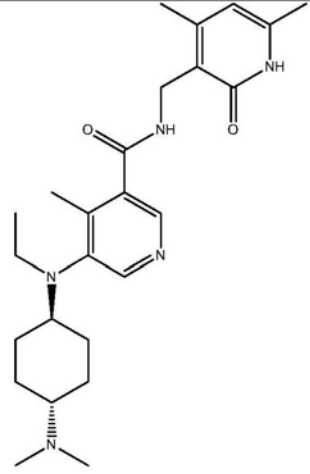
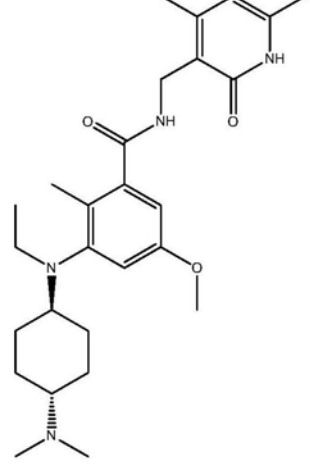
2	
3	

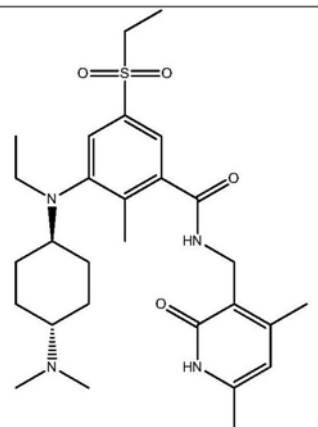
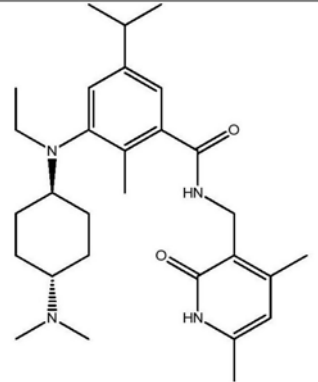
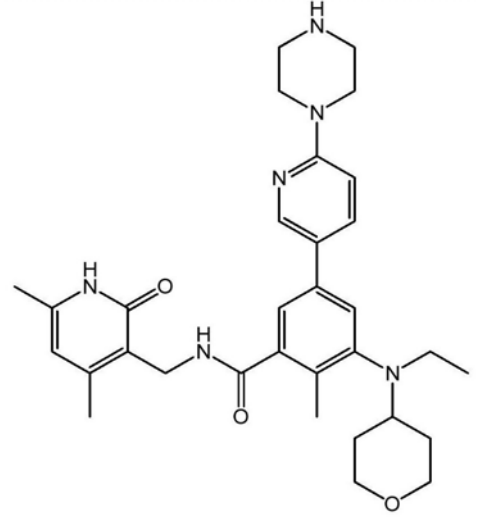
4	
5	
6	
7	

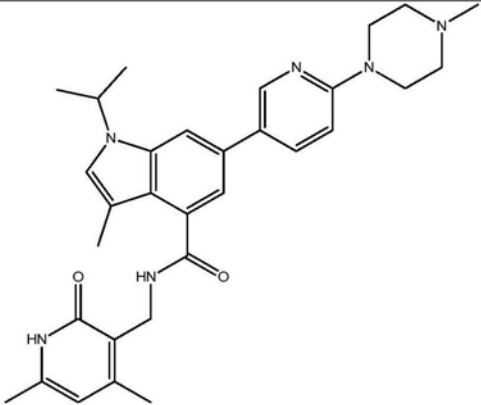
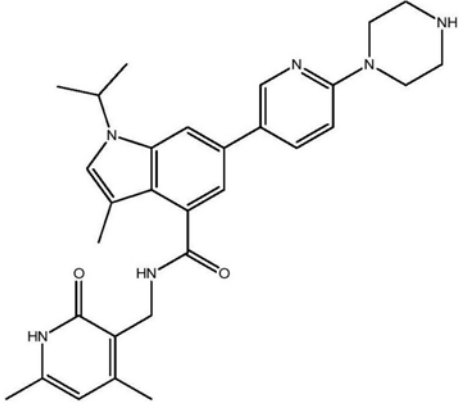
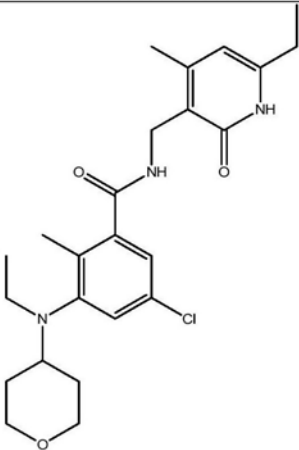
8	
9	
10	
11	

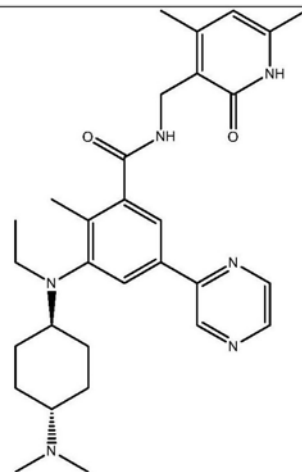
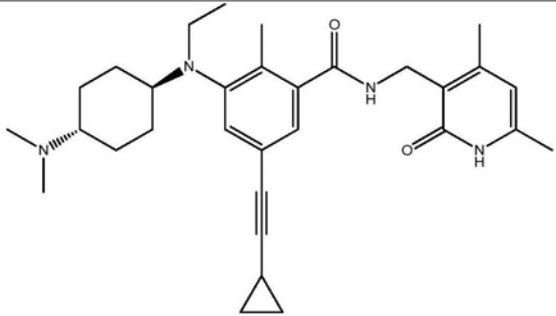
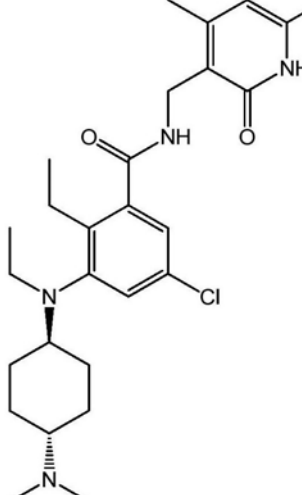
12	
13	
14	

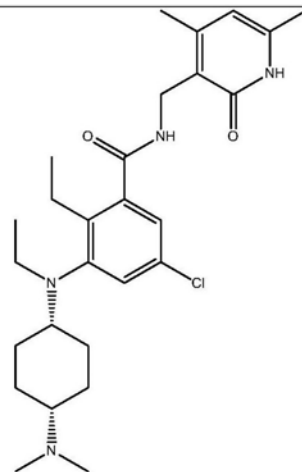
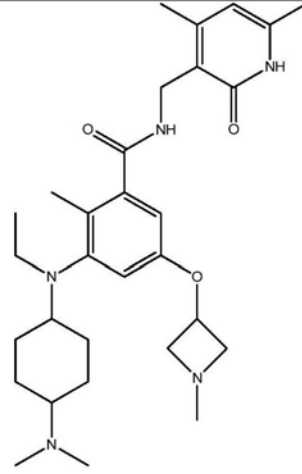
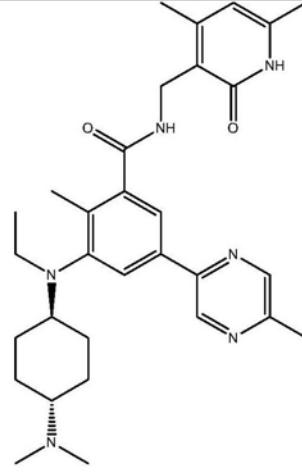
15	
16	
17	
18	

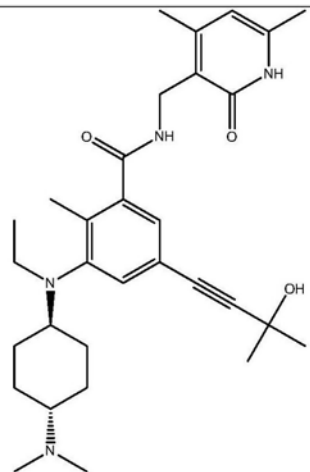
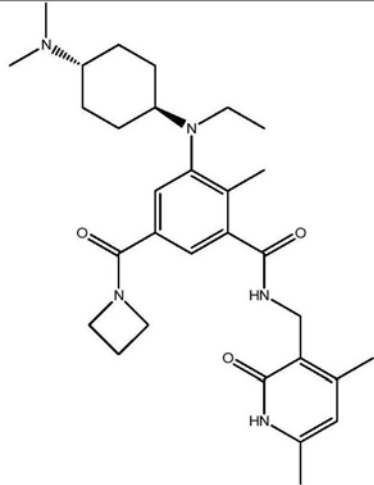
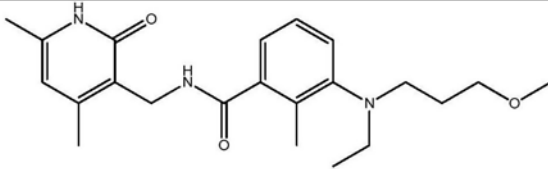
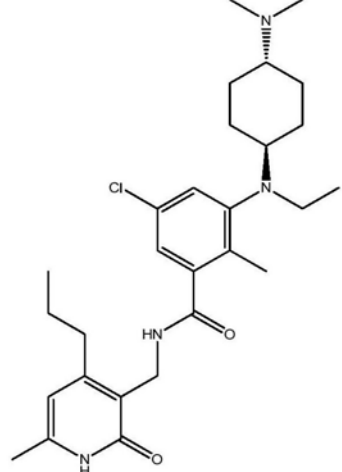
19	 <chem>CCN(CC)[C@H]1CCCC[C@@H]1N(C)C</chem> is attached to a benzene ring at the 4-position. The benzene ring has methyl groups at the 2 and 6 positions, a trifluoromethyl group (CF_3) at the 5 position, and is connected at the 1 position to a $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ group. This amide group is further connected to a pyrimidine ring at the 4-position. The pyrimidine ring has methyl groups at the 2 and 6 positions, a carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$) at the 5 position, and an NH group at the 1 position.
20	 <chem>CCN(CC)[C@H]1CCCC[C@@H]1N(C)C</chem> is attached to a pyridine ring at the 4-position. The pyridine ring has methyl groups at the 2 and 6 positions and is connected at the 1 position to a $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ group. This amide group is further connected to a pyrimidine ring at the 4-position. The pyrimidine ring has methyl groups at the 2 and 6 positions, a carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$) at the 5 position, and an NH group at the 1 position.
21	 <chem>CCN(CC)[C@H]1CCCC[C@@H]1N(C)C</chem> is attached to a benzene ring at the 4-position. The benzene ring has methyl groups at the 2 and 6 positions, a methoxy group (OCH_3) at the 3 position, and is connected at the 1 position to a $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ group. This amide group is further connected to a pyrimidine ring at the 4-position. The pyrimidine ring has methyl groups at the 2 and 6 positions, a carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$) at the 5 position, and an NH group at the 1 position.

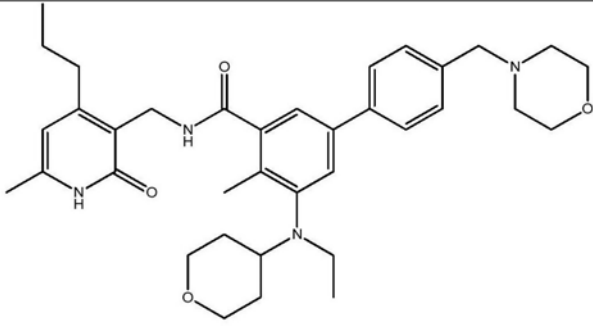
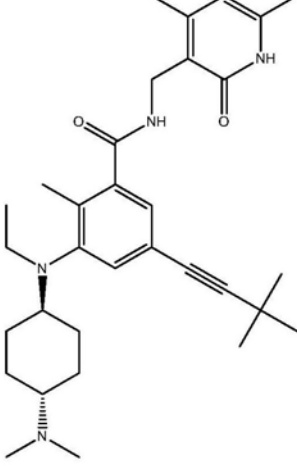
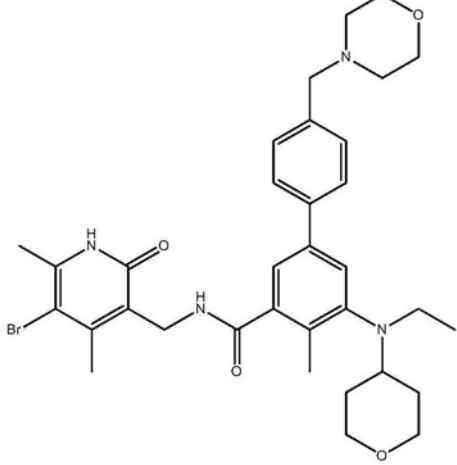
22	
23	
24	

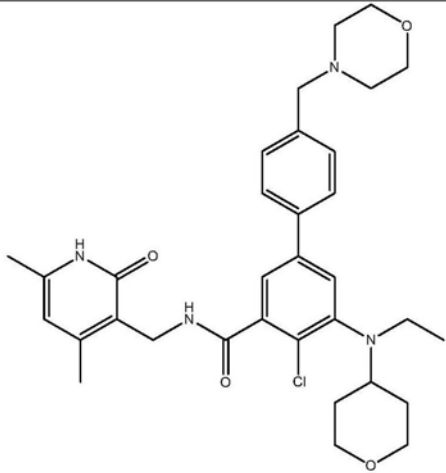
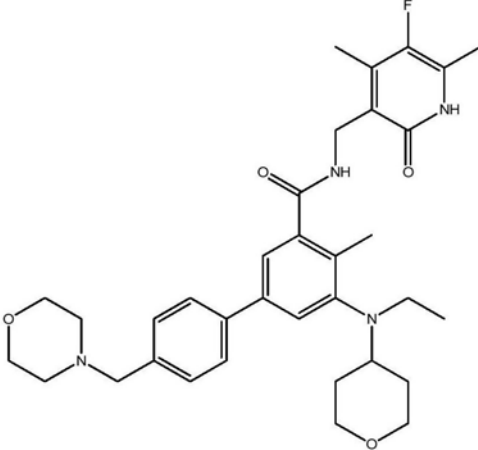
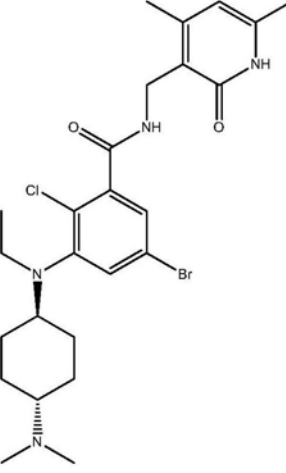
25	
26	
27	

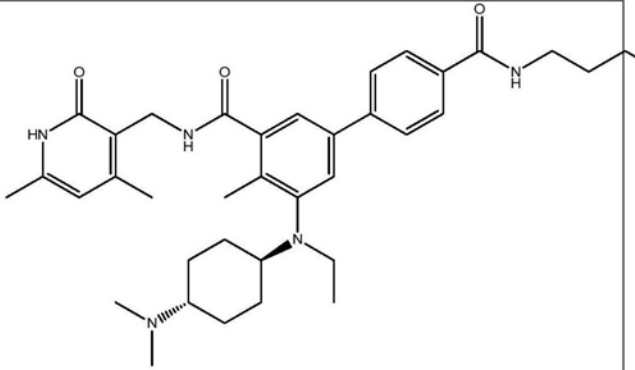
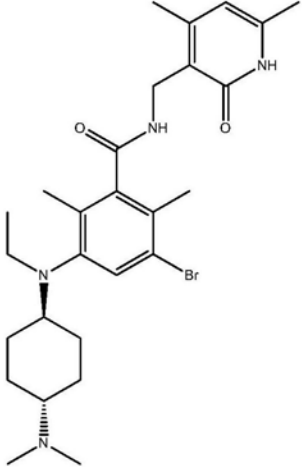
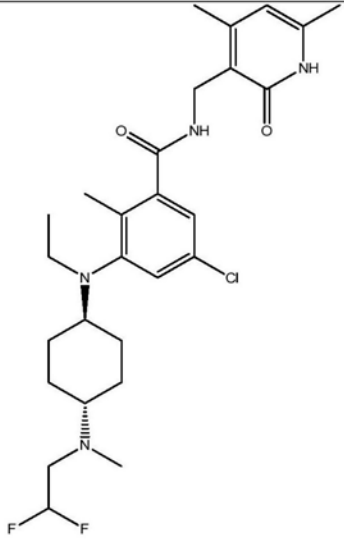
28	 <chem>CCN(CC)C1CCCCC1[C@H](N(CC)c2cc(C)cc(CNC(=O)Cc3c(C)c(C)c(=O)[nH]3)c2)c4cc(C)cc(Cn5ccnc6c(C)c(C)cc56)c4</chem>
29	 <chem>CCN(CC)C1CCCCC1[C@H](N(CC)c2cc(C)cc(C#CC3CC3)C(=O)Nc4c(C)c(C)c(=O)[nH]4)c2</chem>
30	 <chem>CCN(CC)C1CCCCC1[C@H](N(CC)c2cc(Cl)cc(CNC(=O)Cc3c(C)c(C)c(=O)[nH]3)c2)c4cc(C)cc(Cn5ccnc6c(C)c(C)cc56)c4</chem>

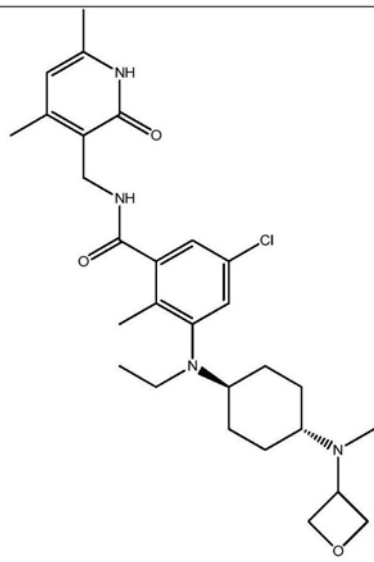
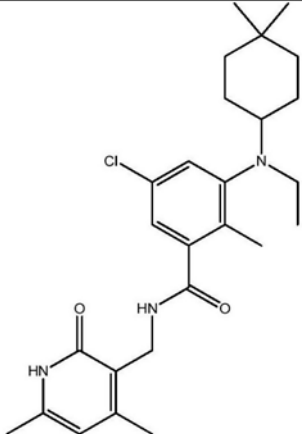
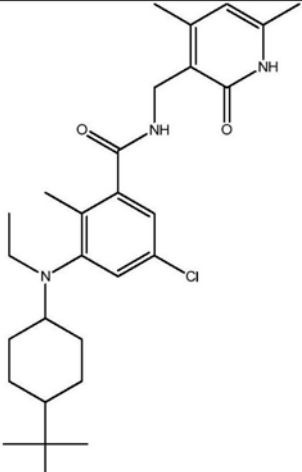
31	 <chem>Cc1c(C)c(C)c(NC(=O)NCC2=CC(=C(C)C=C2C(=O)NCC3=CC(=C(C)C=C3N(C)CC4CCCCC4C5CCCCC5N(C)CC)C)C)C</chem>
32	 <chem>Cc1c(C)c(C)c(NC(=O)NCC2=CC(=C(C)C=C2C(=O)NCC3=CC(=C(C)C=C3N(C)CC4CCCCC4C5CCCCC5N(C)CC)C)C)C</chem>
33	 <chem>Cc1c(C)c(C)c(NC(=O)NCC2=CC(=C(C)C=C2C(=O)NCC3=CC(=C(C)C=C3N(C)CC4CCCCC4C5CCCCC5N(C)CC)C)C)C</chem>

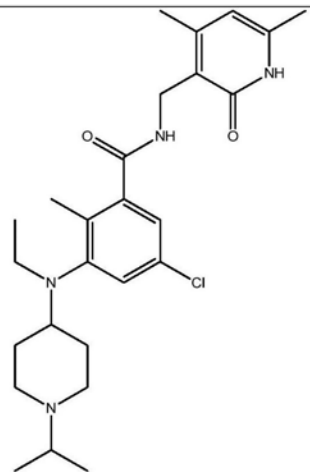
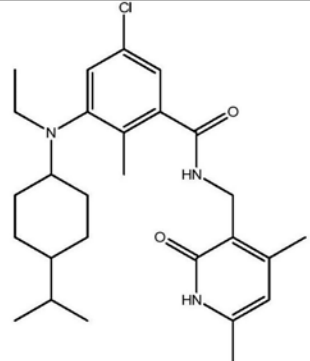
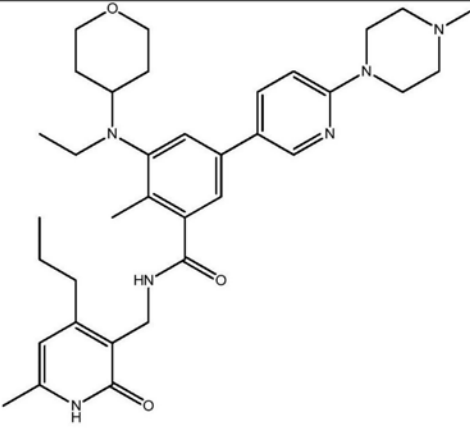
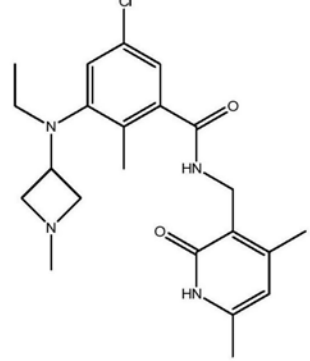
34	
35	
36	
37	

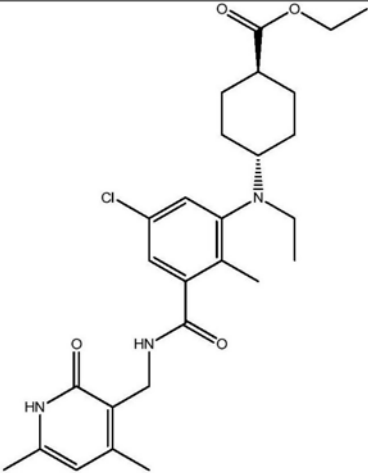
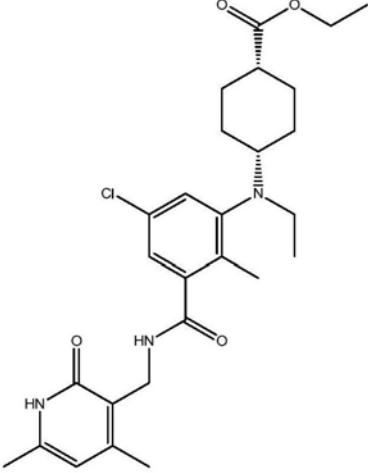
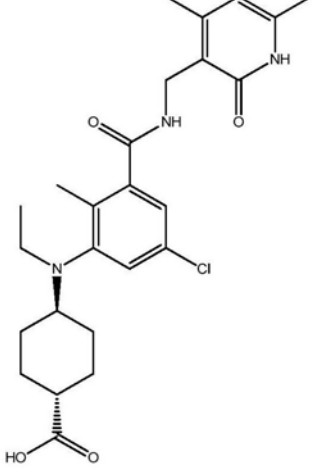
38	
39	
40	

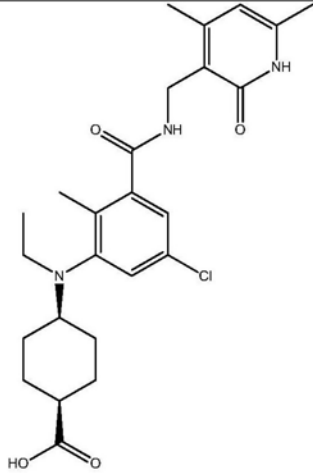
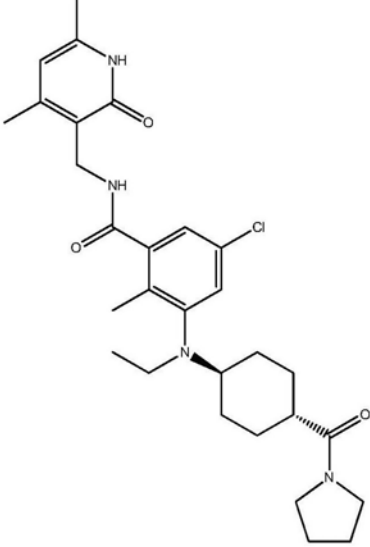
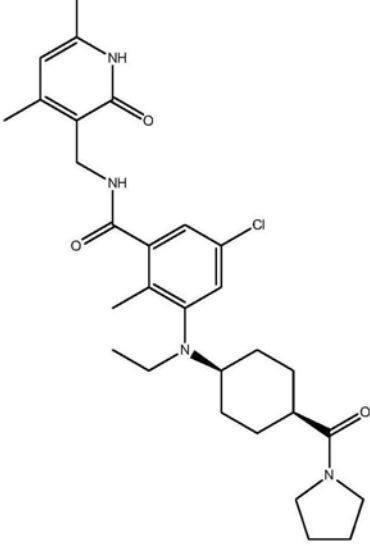
41	
42	
43	

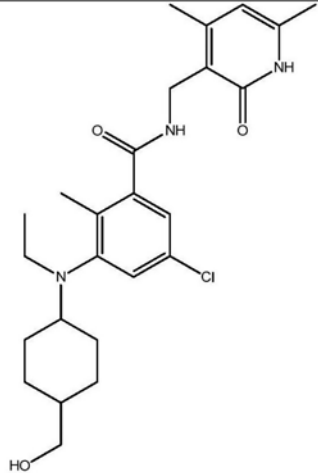
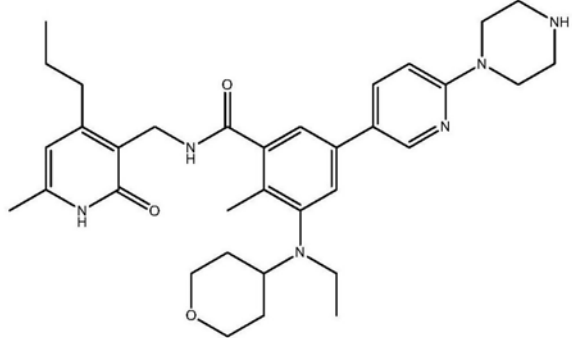
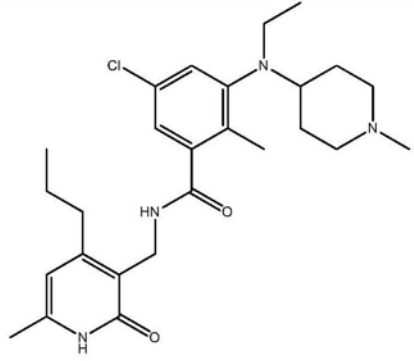
44	
45	
46	

47	 <chem>CC1=CC=C(C=C1C2=NC(=O)NC(=O)C2)CNC(=O)C3=CC=C(C=C3C4=CC=CC=C4N(CCC)C5CCCCC5N(C)C6OC6)C</chem>
48	 <chem>CC1=CC=C(C=C1C2=NC(=O)NC(=O)C2)CNC(=O)C3=CC=C(C=C3C4=CC=CC=C4N(CCC)C5CCCCC5N(C)C6OC6)C</chem>
49	 <chem>CC1=CC=C(C=C1C2=NC(=O)NC(=O)C2)CNC(=O)C3=CC=C(C=C3C4=CC=CC=C4N(CCC)C5CCCCC5N(C)C6OC6)C</chem>

50	
51	
52	
53	

54	
55	
56	

57	
58	
59	

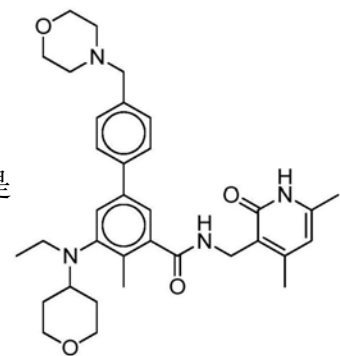
60	
61	
62	

及其药学上可接受的盐的响应性的方法,所述方法包括,

检测获自对象的样品中的EZH2中突变的存在,其中突变型EZH2在SEQ ID NO:1的氨基酸位置677、687或641处包含取代突变,并且其中所述突变的存在指示所述对象响应所述EZH2抑制剂。

9.如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述方法包括检测SEQ ID NO:1的氨基酸位置677、687或641处的多于一个的取代突变的存在。

10. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述EZH2抑制剂是



或其药学上可接受的盐。

11. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述癌症是淋巴瘤、白血病或黑素瘤。

12. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述淋巴瘤选自下组:非霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤。

13. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述白血病是慢性骨髓性白血病(CML)。

14. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述突变选自下组:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);苯丙氨酸(F)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641F);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641H);天冬酰胺(N)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641N);丝氨酸(S)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641S);和半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641C)。

人EZH2抑制剂及其应用方法

[0001] 相关引用

[0002] 本申请要求2012年3月12日提交的美国专利申请号13/418,242的优先权,其全文通过引用纳入本文。

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对EZH2抑制剂响应性的方法。

[0004] 背景

[0005] 在真核细胞中,DNA与组蛋白包装形成染色质。约150碱基对的DNA在组蛋白的八聚体(组蛋白2A、2B、3和4各两个)上缠绕两圈形成核小体——染色质的基本单位。染色质有序结构的变化能引起关联基因转录中的改变。该过程高度受控,因为基因表达模式的改变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,最显著是其N端尾部来介导对染色质结构(并因而对转录)变化的控制。这些修饰通常称为表观遗传学修饰,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] 向组蛋白上的特定氨基酸位点选择性添加甲基基团受到被称为组蛋白甲基转移酶(HMT)的独特酶家族作用的控制。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。具体组蛋白位点处的甲基基团的特定作用持续直至所述甲基基团被组蛋白去甲基化酶移除,或持续直至所述修饰的组蛋白通过核小体转换被替代。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幕后的生化系统有序体系,从而最优化地进行细胞生长和分化。当这些控制被负责DNA和组蛋白修饰的酶的异常表达和/或活性干扰时,产生疾病状态。例如,在人癌症中,越来越多的证据提示表观遗传酶活性失调导致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(invasion)。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))、神经退行性疾病(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就一定范围疾病的治疗而言具有广泛前景。

[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 Dev12:210-8.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的重建复合物保留对组蛋白H3第27位赖氨酸的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)。

[0011] 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。

[0012] 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上的三甲基化发生在X灭活的起始阶段,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)。

[0013] 与EZH2维持多能外胚层细胞的表现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,前列腺和乳腺癌系和组织的研究显示EZH2和SUZ12水平与这些癌症的侵袭性之间的强烈相关性 (Bracken等.(2003) EMBO J 22:5323-35;Kirmizis等.(2003) Mol Cancer Ther 2:113-21;Kleer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。

[0014] 近期,报道EZH2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。目前,关于治疗大多数DLBCL的治疗标准是R-CHOP方法。然而,该方法的结果远不能令人满意。因此,医疗上急需鉴定新型且有效的治疗方法,其任选地视对象的遗传概况而定。

发明内容

[0015] 本发明基于如下发现:表达某些EZH2突变型的细胞比表达野生型EZH2的细胞对

EZH2抑制剂更具响应性。

[0016] 本发明涉及一种治疗或减轻对象的癌或癌前病症症状的方法,向表达突变型EZH2(该突变型EZH2包含SEQ ID NO:6所示的底物口袋结构域(substrate pocket domain)中的突变)的对象给予治疗有效量的EZH2抑制剂。

[0017] 本发明还涉及一种测定患有癌症或癌前病症的对象对EZH2抑制剂的响应性的方法(或体外方法),该方法通过如下方式进行:提供来自该对象的样品;和检测SEQ ID NO:6所示的EZH2底物口袋结构域中的突变;而所述突变的存在指示该对象响应所述EZH2抑制剂。

[0018] 本发明还提供治疗有效量的EZH2抑制剂在制备治疗或减轻对象中癌症或癌前病症的症状的药物中的应用,所述对象表达包含SEQ ID NO:6中定义的底物口袋结构域中突变的突变型EZH2。

[0019] 本发明的突变型EZH2是突变型EZH2多肽或编码突变型EZH2多肽的核酸序列。优选地,所述突变型EZH2包含在SEQ ID NO:1的氨基酸第677、687、674、685或641位的突变。更优选地,突变选自下组:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);甲硫氨酸(M)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第674位的野生型残基缬氨酸(V) (V674M);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685H);半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685C);苯丙氨酸(F)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641F);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641H);天冬酰胺(N)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641N);丝氨酸(S)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641S);和半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641C)。

[0020] 本发明的对象包括已被诊断患有癌症或癌前病症、具有癌症或癌前病症的症状或具有发展癌症或癌前病症的风险的任何人类对象。例如,所述癌症是淋巴瘤、白血病或黑素瘤。优选地,所述淋巴瘤是非霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤或弥漫性大B细胞淋巴瘤。或者,所述白血病是慢性骨髓性白血病(CML)。所述癌前病症是骨髓增生异常综合征(MDS,先前被称作白血病前期)。

[0021] 本发明方法优选的EZH2抑制剂选自表1中所列的化合物。

[0022] 除非另外定义,否则,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,但下文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。

[0023] 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

[0024] 图1的两幅图确定B细胞淋巴瘤相关的EZH2突变型是活性组蛋白甲基转移酶。(A)使用肽(H321-44)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,来检测包含野生型和EZH2的多种Y641突变型的PRC2复合物的体外甲基转移酶活性。标志:野生型(●)、Y641F(○)、Y641H(□)、Y641N(■)和Y641S(▲)。CPM是每分钟的计数,指³H辐射导致的闪烁计数。

[0025] 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的二甲基化和三甲基化。(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)和二甲基化肽(实心柱)的甲基转移酶活性。(B)包含野生型(o)、Y641F(●)、Y641H(□)、Y641N(■)和Y641S(▲)型EZH2的PRC2复合物对于所有肽甲基化状态,由 $K_{1/2}$ 判断的肽底物亲和度都相似。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突变型而言,酶转换数(k_{cat})以相反的方式随底物甲基化状态而变化。EZH2的野生型(o)的 k_{cat} 随K27甲基化状态增加而降低,但EZH2的Y641F(●)、Y641H(□)、Y641N(■)和Y641S(▲)突变型的 k_{cat} 则增加。(D)EZH2的野生型(o)的催化效率($k_{cat}/K_{1/2}$)随K27甲基化状态的增加而减少,但EZH2的Y641F(●)、Y641H(□)、Y641N(■)和Y641S(▲)突变型则增加。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。

[0026] 图3A的三张图显示就包含不同EZH2突变型的细胞而言H3-K27me3(上图)、H3-K27me2(中图)和H3-K27me1(下图)的预测相对水平。用表2所示的偶联酶稳态速率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 K_m ,且胞内核小体浓度类似 K_m 。

[0027] 图3B是对WT EZH2纯合或对所示EZH2Y641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。

[0028] 图4显示选出的对导致癌症中组蛋白H3-K27上异常高水平三甲基化所提出的机制。这些机制包括:a)EZH2中Y641突变导致底物优先性从无甲基化组蛋白H3-K27转变至单甲基化和二甲基化组蛋白H3-K27;b)EZH2过表达;c)UTX内的突变灭活酶功能,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。

[0029] 图5的SDS-PAGE胶显示带突变和野生型EZH2的各5组分PRC2复合物的表达水平相似。

[0030] 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。以速率(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复合物的活性是其它任何突变复合物的大于6倍。

[0031] 图7显示S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)对EZH2WT和EZH2的Y641突变型的抑制效力。X轴显示SAH的log浓度;Y轴显示抑制百分比。

[0032] 图8显示化合物75对EZH2WT和EZH2的Y641突变型的抑制效力。X轴显示化合物75的

log浓度;Y轴显示抑制百分比。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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(DMSO)的细胞作为对照。在GuavaEasyCyte Plus仪器中用Guava Viacount分析测定细胞数和活力。细胞每3-4天分养,并补充培养基和化合物。

[0038] 图14的图显示EZH2(Y641)突变的存在和/或高H3-K27me3和低H3-K27me2水平预示对EZH2抑制剂的敏感性。细胞系维持在递增浓度的一种EZH2抑制剂(至多25 μ M)存在下。处理11天后,用活细胞计数来获得IC₉₀值。结果对采用根据EZH2突变状态分组细胞系(A)或根据H3-K27me2和H3-K27me3水平分组细胞系(B)来作图。在两张图中,直线显示所示细胞系组的IC₉₀均值。

[0039] 图15是显示对野生型、A677G或A687V EZH2测量的速率对比酶浓度的关系图。代表组蛋白H3残基21-44的包含无甲基、单甲基、二甲基或三甲基赖氨酸27(H3K27me0~H3K27me3)的生物素化肽以固定浓度采用系列稀释度的所示EZH2酶进行分析。在90分钟的进程中对时间点取样,并通过在闪盘(Flashplate)中捕获所述肽并读取每分钟的记数(CPM)来检测H3肽的赖氨酸27处的3H-SAM纳入。时程的线性回归产生以CPM/分钟(CPM/min)计的酶速率,就其与酶浓度的关系作图。

[0040] 详细描述

[0041] 染色质结构在基因调节和表观遗传中是重要的。组蛋白的翻译后修饰,例如甲基化,参与较高级染色质结构的建立和维持。

[0042] EZH2突变型

[0043] 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。

[0044] 据报道EZH2的单个氨基酸残基(例如,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。

[0045] 本发明部分基于如下惊人发现: 相较于表达野生型EZH2的细胞而言, 表达EZH2突变型的细胞对本发明的EZH2抑制剂更加敏感。因此, 本发明的一方面涉及用于治疗或减轻对象中癌症或癌前病症症状的方法, 所述方法通过给予表达突变型EZH2的对象治疗有效量的EZH2抑制剂来实施。本发明的突变型EZH2指突变型EZH2多肽或编码突变型EZH2多肽的核酸序列。优选地, 所述突变型EZH2包含如SEQ ID NO:6定义的底物口袋结构域中的一个或多个突变。例如, 所述突变可以是取代、点突变、无义突变、错义突变、缺失或插入。示例性的氨基酸取代突变包括在SEQ ID NO:1的氨基酸第677、687、674、685或641位的取代, 例如但不限于: 甘氨酸 (G) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸 (A) (A677G); 缬氨酸 (V) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸 (A) (A687V); 甲硫氨酸 (M) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第674位的野生型残基缬氨酸 (V) (V674M); 组氨酸 (H) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸 (R) (R685H); 半胱氨酸 (C) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸 (R) (R685C); 苯丙氨酸 (F) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸 (Y) (Y641F); 组氨酸 (H) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸 (Y) (Y641H); 天冬酰胺 (N) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸 (Y) (Y641N); 丝氨酸 (S) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸 (Y) (Y641S); 或半胱氨酸 (C) 取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸 (Y) (Y641C)。

[0046] 本发明的突变还可包括: 丝氨酸 (S) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第322位的野生型残基天冬酰胺 (N) (N322S), 谷氨酰胺 (Q) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第288位的野生型残基精氨酸 (R) (R288Q), 异亮氨酸 (I) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第573位的野生型残基苏氨酸 (T) (T573I), 谷氨酸 (E) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第664位的野生型残基天冬氨酸 (D) (D664E), 谷氨酰胺 (Q) 取代SEQ ID NO:5的氨基酸第458位的野生型残基精氨酸 (R) (R458Q), 赖氨酸 (K) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第249位的野生型残基谷氨酸 (E) (E249K), 半胱氨酸 (C) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第684位的野生型残基精氨酸 (R) (R684C), 组氨酸 (H) 取代SEQ ID NO:21的氨基酸第628位的野生型残基精氨酸 (R) (R628H), 组氨酸 (H) 取代SEQ ID NO:5的氨基酸第501位的野生型残基谷氨酰胺 (Q) (Q501H), 天冬酰胺 (N) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第192位的野生型残基天冬氨酸 (D) (D192N), 缬氨酸 (V) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第664位的野生型残基天冬氨酸 (D) (D664V), 亮氨酸 (L) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第704位的野生型残基缬氨酸 (V) (V704L), 丝氨酸 (S) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第132位的野生型残基脯氨酸 (P) (P132S), 赖氨酸 (K) 取代SEQ ID NO:21的氨基酸第669位的野生型残基谷氨酸 (E) (E669K), 苏氨酸 (T) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第255位的野生型残基丙氨酸 (A) (A255T), 缬氨酸 (V) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第726位的野生型残基谷氨酸 (E) (E726V), 酪氨酸 (Y) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第571位的野生型残基半胱氨酸 (C) (C571Y), 半胱氨酸 (C) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第145位的野生型残基苯丙氨酸 (F) (F145C), 苏氨酸 (T) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第693位的野生型残基天冬酰胺 (N) (N693T), 丝氨酸 (S) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第145位的野生型残基苯丙氨酸 (F)

(F145S), 组氨酸(H) 取代SEQ ID NO:21的氨基酸第109位的野生型残基谷氨酰胺(Q) (Q109H), 半胱氨酸(C) 取代SEQ ID NO:21的氨基酸第622位的野生型残基苯丙氨酸(F) (F622C), 精氨酸(R) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第135位的野生型残基甘氨酸(G) (G135R), 谷氨酰胺(Q) 取代SEQ ID NO:5的氨基酸第168位的野生型残基精氨酸(R) (R168Q), 精氨酸(R) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第159位的野生型残基甘氨酸(G) (G159R), 半胱氨酸(C) 取代SEQ ID NO:5的氨基酸第310位的野生型残基精氨酸(R) (R310C), 组氨酸(H) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第561位的野生型残基精氨酸(R) (R561H), 组氨酸(H) 取代SEQ ID NO:21的氨基酸第634位的野生型残基精氨酸(R) (R634H), 精氨酸(R) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第660位的野生型残基甘氨酸(G) (G660R), 半胱氨酸(C) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第181位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y181C), 精氨酸(R) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第297位的野生型残基组氨酸(H) (H297R), 丝氨酸(S) 取代SEQ ID NO:21的氨基酸第612位的野生型残基半胱氨酸(C) (C612S), 酪氨酸(Y) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第694位的野生型残基组氨酸(H) (H694Y), 丙氨酸(A) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第664位的野生型残基天冬氨酸(D) (D664A), 苏氨酸(T) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第150位的野生型残基异亮氨酸(I) (I150T), 精氨酸(R) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第264位的野生型残基异亮氨酸(I) (I264R), 亮氨酸(L) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第636位的野生型残基脯氨酸(P) (P636L), 苏氨酸(T) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第713位的野生型残基异亮氨酸(I) (I713T), 脯氨酸(P) 取代SEQ ID NO:5的氨基酸第501位的野生型残基谷氨酰胺(Q) (Q501P), 谷氨酰胺(Q) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第243位的野生型残基赖氨酸(K) (K243Q), 天冬氨酸(D) 取代SEQ ID NO:5的氨基酸第130位的野生型残基谷氨酸(E) (E130D), 甘氨酸(G) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第509位的野生型残基精氨酸(R) (R509G), 组氨酸(H) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第566位的野生型残基精氨酸(R) (R566H), 组氨酸(H) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第677位的野生型残基天冬氨酸(D) (D677H), 天冬酰胺(N) 取代SEQ ID NO:5的氨基酸第466位的野生型残基赖氨酸(K) (K466N), 组氨酸(H) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第78位的野生型残基精氨酸(R) (R78H), 甲硫氨酸(M) 取代SEQ ID NO:6的氨基酸第1位的野生型残基赖氨酸(K) (K6M), 亮氨酸(L) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第538位的野生型残基丝氨酸(S) (S538L), 谷氨酰胺(Q) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第149位的野生型残基亮氨酸(L) (L149Q), 缬氨酸(V) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第252位的野生型残基亮氨酸(L) (L252V), 缬氨酸(V) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第674位的野生型残基亮氨酸(L) (L674V), 缬氨酸(V) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第656位的野生型残基丙氨酸(A) (A656V), 天冬氨酸(D) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第731位的野生型残基丙氨酸(A) (Y731D), 苏氨酸(T) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第345位的野生型残基丙氨酸(A) (A345T), 天冬氨酸(D) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第244位的野生型残基丙氨酸(A) (Y244D), 色氨酸(W) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第576位的野生型残基半胱氨酸(C) (C576W), 赖氨酸(K) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第640位的野生型残基天冬酰胺(N) (N640K), 赖氨酸(K) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第675位的野生型残基天冬酰胺(N) (N675K), 酪氨酸(Y) 取代SEQ ID NO:21的氨基酸第579位的野生型残基天冬氨酸(D) (D579Y), 异亮氨酸(I) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第693位的野生型残基天冬酰胺(N) (N693I), 以及赖氨酸(K) 取代SEQ ID NO:3的氨基酸第693位的野生型残基天冬酰胺(N) (N693K)。

[0047] 本发明的突变可以是在SEQ ID NO:3、5或21的氨基酸第730、391、461、441、235、254、564、662、715、405、685、64、73、656、718、374、592、505、730或363的框移突变,或编码SEQ ID NO:3、5或21的核酸序列的对应核苷酸位置的框移突变。EZH2的突变也可以是SEQ ID NO:3、5或21的氨基酸第148位和第149位之间的谷氨酸(E)插入。EZH2突变的另一个示例是SEQ ID NO:3、5或21的氨基酸第148位和第149位处的谷氨酸(E)和亮氨酸(L)的缺失。突变型EZH2还可包含在SEQ ID NO:3、5或21的氨基酸第733、25、317、62、553、328、58、207、123、63、137或60位处的无义突变。

[0048] 还出乎意料地发现,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(单甲基化至二甲基化,二甲基化至三甲基化)反应显示较弱的催化功效;而与此形成鲜明对比的是,所述疾病相关的Y641突变对进行第一甲基化反应显示非常有限的能力,但相对于野生型酶而言对后续反应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WT EZH2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。因此,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。

[0049] 在无意受任何一个理论束缚的前提下,假设EZH2在其底物口袋结构域中的突变可通过影响所述酶-双底物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。

[0050] 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。

[0051]

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

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIELIKNYDGKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFDPKGTAEEEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVLIPTYNDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS

[0052]

CKNCSIQRGSKKHL~~LL~~LAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNNDVFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0053]

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

```
ggcggcgcttgattgggctgggggggccaataaaagcgatggcgattgggctgccgcgt
ttggcgctcgggccggtcgcgccgacacccgggtgggactcagaaggcagtgagccccg
gcggcgccggcgccggcgccggggcgacgcgcgggaacacgcgagtcggcgcgccggg
acgaagaataatcatgggcccagactgggaagaaatctgagaagggaccagtttgttgccg
gaagcgtgtaaaatcagagtacatgcgactgagacagctcaagagggttcagacgagctga
tgaagtaaagagtatgtttagttccaatcgtcagaaaattttggaaagaacggaaatctt
aaaccaagaatggaaacagcgaaggatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc
attgcgcgggactagggagtggtcggtgaccagtgacttggattttccaacacaagtcac
ccattaaagactctgaatgcagttgcttcagtaccataatgtattcttggtctccct
acagcagaattttatgggtggaagatgaaactgttttacataacattccttatatgggaga
tgaagtttttagatcaggatggtagctttcattgaagaactaataaaaaattatgatgggaa
agtacacggggatagagaatgtgggtttataaatgatgaaattttggtagtggtgaa
tgcccttggtcaatataatgatgatgacgatgatgatggagacgatcctgaagaaag
agaagaaaagcagaagatctggaggatcaccgagatgataaagaaagccgcccacctcg
gaaatttccttctgataaaaattttgaagccatttcctcaatgtttccagataagggcac
agcagaagaactaaaggaaaaatataaagaactcaccgaacagcagctcccaggcgact
tcctcctgaatgtaccccccaacatagatggaccaaatactaaatctgttcagagagagca
aagcttacactcctttcatagcgttttctgtaggcgatgttttaaatatgactgcttct
acatcgtaagtgaattattcttttcatgcaacacccaacacttataagcggagaagaacac
agaaacagctctagacaacaaaccttgtggaccacagtggtaccagcatttggagggagc
aaaggagtttgctgctgctctcaccgctgagcggataaagacccccacaaaacgtccagg
aggccgcagaagaggacggcttcccaataacagtagcaggccagcaccacccaccattaa
tgtgctggaatcaaaggatacagacagtgataggggaagcagggactgaaacgggggggaga
gaacaatgataaagaagaagaagagaagaaagatgaaacttcgagctcctctgaagcaaa
ttctcggtgtcaaacaccaataaagatgaagccaaatattgaacctcctgagaatgtgga
```

[0054]

```
gtggagtgggtgctgaagcctcaatgttttagagtcctcattggcacttactatgacaattt
ctgtgccattgctaggttaattgggacccaaaacatgtagacaggtgtatgagtttagagt
caaagaatctagcatcatagctccagctcccgtgaggatgtggatactcctccaaggaa
aaagaagaggaaacaccggttgtgggctgcacactgcagaaagatacagctgaaaaagga
cggctcctctaaccatgtttacaactatcaaccctgtgatcatccacggcagccttgtga
cagttcgtgcccttgtgtgatagcacaaaatttttgtgaaaagttttgtcaatgtagttc
agagtgtcaaaaccgctttccgggatgccgtgcaaagcacagtgcacaaccaagcagtg
cccgtgctacctggctgtccgagagtgtgacctgacctctgtcttacttgtggagccgc
tgaccattgggacagtaaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagtattcagcggggctccaa
aaagcatctattgtctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcc
tgtgcagaaaaatgaattcatctcagaatactgtggagagattatcttcaagatgaagc
tgacagaagaggggaaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaacttgaacaa
tgattttgtggtggatgcaacccgcaagggtaacaaaattcgttttgcaaattcattcgggt
aatccaaactgctatgcaaaaagtatgatgggttaacgggtgatcacaggataggatattt
tgccaagagagccatccagactggcgaagagctgttttttgattacagatacagccaggc
tgatgcctgaagtatgtcggcatcgaaagagaaatggaaatcccttgacatctgctacc
tcctccccctcctctgaaacagctgccttagcttcaggaacctcgagtactgtgggcaa
tttagaaaaagaacatgcagtttgaaattctgaatttgcaaagtactgtaagaataattt
atagtaatgagtttaaaaatcaactttttattgccttctcaccagctgcaaagtgttttg
taccagtgaatttttgcaataatgcagtatggtacatttttcaactttgaataaagaata
cttgaacttgtccttgttgaatc
```

[0055]

EZH2的全氨基酸，同种型a(GenBank登录号NP_004447) (SEQ ID NO:3)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHRKC
NYSFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRR
GRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSSEANSRCQ
TPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFRVLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESS

[0056]

IIAPAPAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCP
CVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCLTCGAADHWD
SKNVSCKNCSIQRGSKHLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRG
KVYDKYMCSFLFNLNNDFFVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRA
IQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0057]

人EZH2的mRNA序列，转录本变体2(GenBank登录号NM_152998)(SEQ ID NO:4)

```
ggcgccgcttgattgggctgggggggccaataaaagcgatggcgattgggctgccgcgt
ttggcgctcggccggtcgcgccgacacccgggtgggactcagaaggcagtgagccccg
gcggcgccggcgccggcgcgcgggggcgacgcgcgggaacaacgcgagtcggcgcgcggg
acgaagaataatcatgggcccagactgggaagaaatctgagaagggaccagtttgttgccg
gaagcgtgtaaaatcagagtacatgcgactgagacagctcaagagggttcagacgagctga
tgaagtaaagagtatgtttagttccaatcgtcagaaaattttggaaagaacggaaatctt
aaaccaagaatggaaacagcgaaggatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc
attgcgcgggactagggagggtggaagatgaaactgttttacataacattccttatatggg
agatgaagtttttagatcaggatggtactttcattgaagaactaataaaaaattatgatgg
gaaagtacacggggatagagaatgtgggtttataaatgatgaaatttttgtggagttggt
gaatgcccttggtcaatataatgatgatgacgatgatgatgatggagacgatcctgaaga
aagagaagaaaagcagaaagatctggaggatcacccgagatgataaagaagccgccccacc
tcggaaatttccttctgataaaatttttgaagccatttcctcaatgtttccagataaggg
cacagcagaagaactaaaggaaaaatataaagaactcacccaacagcagctcccaggcgc
acttcctcctgaatgtaccccccaacatagatggaccaaatgctaaatctgttcagagaga
gcaaagcttacactcctttcatagcgttttctgtaggcgatgttttaaatatgactgctt
cctacatccttttcatgcaacacccaacacttataagcggagaacacagaaacagctct
agacaacaaaaccttgtggaccacagtgttaccagcatttggagggagcaaaggagtttgc
tgctgctctcaccgctgagcggataaagacccccacaaaacgtccaggaggccgcagaag
aggacggcttccaataacagtagcaggcccagcaccaccaccattaatgtgctggaatc
aaaggatacagacagtgataggggaagcagggactgaaacggggggagagaacaatgataa
agaagaagaagagaagaaagatgaaacttcgagctcctctgaagcaaattctcggtgtca
aacaccaataaagatgaagccaaatattgaacctcctgagaatgtggagtggagtgggtgc
```

[0058]

```
tgaagcctcaatgttttagagtcctcattggcacttactatgacaatttctgtgccattgc  
taggttaattgggacccaaaacatgtagacaggtgtatgagtttagagtcaaagaatctag  
catcatagctccagctcccgtgaggatgtggatactcctccaaggaaaaagaaggaa  
acaccggttgtgggctgcacactgcagaaagatacagctgaaaaaggacggctcctctaa  
ccatgtttacaactatcaaccctgtgatcatccacggcagccttgtgacagttcgtgcc  
ttgtgtgatagcacaaaatttttgtgaaaagttttgtcaatgtagttcagagtgtaaaa  
ccgctttccgggatgccgtgcaaagcacagtgcaacaccaagcagtgcccggtgctacct  
ggctgtccgagagtgtgaccctgacctctgtcttacttgtggagccgctgaccattggga  
cagtaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagtattcagcggggctccaaaagcatctatt  
gctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgcagaaaaa  
tgaattcatctcagaatactgtggagagattatttctcaagatgaagctgacagaagg  
gaaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaacttgaacaatgattttgtggt  
ggatgcaaccgcgaagggttaacaaaattcgttttgcaaattcattcggtaaatccaaactg  
ctatgcaaaaagttagtgatgggttaacgggtgatcacaggataggatttttgccaagagagc  
catccagactggcgaagagctgttttttgattacagatacagccaggctgatgcctgaa  
gtatgtcggcatcgaaagagaaatggaaatcccttgacatctgctacctcctccccctc  
ctctgaaacagctgccttagcttcaggaacctcgagtactgtgggcaatttagaaaaaga  
acatgcagtttgaaattctgaatttgcaaagtactgtaagaataatttatagtaatgagt  
ttaaaaatcaactttttattgccttctcaccagctgcaaagtgtttgtaccagtgaatt  
tttgcaataatgcagtatggtacatttttcaactttgaataaagaatacttgaacttgtc  
cttgttgaatc
```

[0059]

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

mgqtgkksekpgpvcwrkrvkseymrlrqkrfradevksmfssnrqkil
erteilnqewkqrriqpvhiltsvsslrgtrevedetvlhnpymgdevl
dqdgtfieeliknydgkvhgdrecgfindeifvelvnalgqynddddddd
gddpeereekqkdledhrddkesrpprkfpdkifeaissmfpdkgtaee
lkeykelteqqlpgalppectpnidgpnaksvqreqslhsfhtlfcrrc
fkydcflhpfhatpntykrkntetaldnkpcgpqcyqhlegakefaaalt
aeriktppkrpgrrrrgrlpnnssrpstptinvleskdttdsdreagtetg
genndkeeeekdetsssseansrcqtpikmkpnieppenviewsgaeasm

[0060]

frvligtyydnfcaiarligtktcrqvyefrvkessiiapapaedvdtpp
rkkkrkhrlwaahcrkiqlkkgssnhvynyqpcdhprqpcdsscpvia
qnfcckfcqcssecqnrfgcrckaqcntkqpcylavrecdpdlcltcg
aadhwdsknvscnkncsiqrgskkhlllpsdvagwgifikdpvqknefis
eycgeiisqdeadrrgkvdydkymcsflfnlnndfvvdatrkgnkirfanh
svnpncyakvmmvngdhrigifakraigtgeelffdyrysqadalkyvgi
eremeip

[0061]

EZH2的全氨基酸，同种型e(GenBank登录号NP_001190178.1) (SEQ ID NO:21)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEWKQRRIQPVHIL
TSCSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNFMVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFIGEEL
IKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDGDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPRKFP
SDKIFEAISSMFPDKGTAEELKEYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCL
FKYDCFLHPPHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRRGRLP
NNSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPEN
VIEWSGAEASMFVRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPAPAEDVDTPPRKKKRKHRLW
AAHCRKIQLKKGQNRFPGCRCKAQCNTKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVSCNKNCISQRGSK
KHLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEISQDEADRGRGVYDKYMCSFLFNLNDFVVDATRKG
NKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0062]

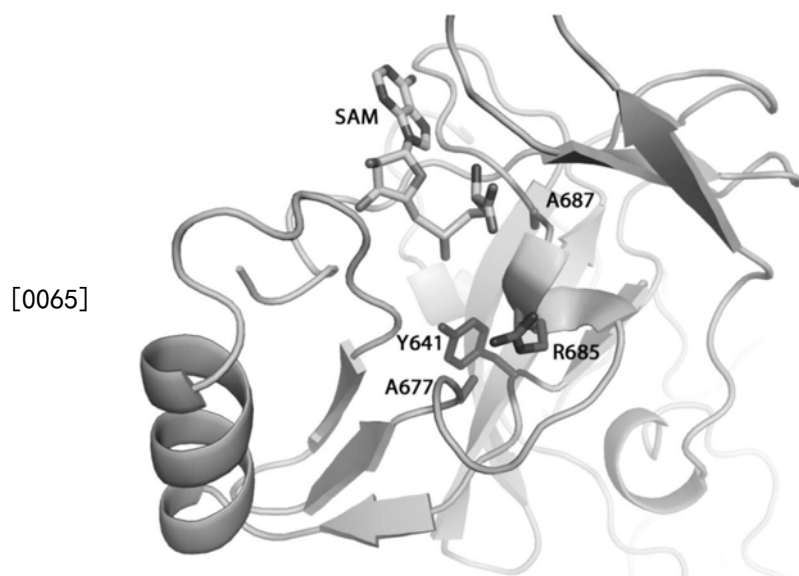
智人zeste增强子同源物2 (果蝇) (EZH2), 转录本变体5, mRNA (GenBank登录号NM_001203249.1) (SEQ ID NO: 22)

```
GACGACGTTTCGCGGCGGGGAAC TCGGAGTAGCTTCGCCTCTGACGTTTCCCCACGACGCACCCCGAAATC
CCCCTGAGCTCCGGCGGTTCGCGGGCTGCCCTCGCCGCCTGGTCTGGCTTTATGCTAAGTTTGAGGGAAGA
GTCGAGCTGCTCTGCTCTCTATTGATTGTGTTTCTGGAGGGCGTCCTGTTGAATCCCACCTTCATTGTGT
ACATCCCCTTCCGTTCCCCCAAAAATCTGTGCCACAGGGTTACTTTTTTGAAAGCGGGAGGAATCGAGAA
GCACGATCTTTTGAAAACTTGGTGAACGCCTAAATAATCATGGGCCAGACTGGGAAGAAATCTGAGAAG
GGACCAGTTTGTGTCGGAAGCGTGTAATAATCAGAGTACATGCGACTGAGACAGCTCAAGAGGTTTCAGAC
GAGCTGATGAAGTAAAGAGTATGTTTAGTTCCAATCGTCAGAAAATTTTGAAAAGAACGGAAATCTTAAA
CCAAGAATGGAAACAGCGAAGGATACAGCCTGTGCACATCCTGACTTCTTGTTTCGGTGACCAGTGACTTG
```

[0063]

```
GATTTTCCAACACAAGTCATCCCATTAAGACTCTGAATGCAGTTGCTTCAGTACCCATAATGTATTCTT
GGTCTCCCCTACAGCAGAATTTTATGGTGAAGATGAAACTGTTTTACATAACATTCTTATATGGGAGA
TGAAGTTTTAGATCAGGATGGTACTTTCATTGAAGAACTAATAAAAAATTATGATGGGAAAGTACACGGG
GATAGAGAATGTGGGTTTATAAATGATGAAATTTTTGTGGAGTTGGTGAATGCCCTTGGTCAATATAATG
ATGATGACGATGATGATGATGGAGACGATCCTGAAGAAAGAGAAGAAAAGCAGAAAGATCTGGAGGATCA
CCGAGATGATAAAGAAAAGCCGCCACCTCGGAAATTTCTTCTGATAAAATTTTTGAAGCCATTTCTCTCA
ATGTTTCCAGATAAGGGCACAGCAGAAGAACTAAAGGAAAAATATAAAGAACTCACCGAACAGCAGCTCC
CAGGCGCACTTCCTCCTGAATGTACCCCCAACATAGATGGACCAAATGCTAAATCTGTTTCAGAGAGAGCA
AAGCTTACACTCCTTTCATACGCTTTTCTGTAGGCGATGTTTTAAATATGACTGCTTCCTACATCCTTTT
CATGCAACACCCAACTTATAAGCGGAAGAACACAGAAACAGCTCTAGACAACAACTTGTGGACCAC
AGTGTTACCAGCATTTGGAGGGAGCAAAGGAGTTTGCTGCTGCTCTCACCGCTGAGCGGATAAAGACCCC
ACCAAAACGTCCAGGAGGCCGAGAAGAGGACGGCTTCCCAATAACAGTAGCAGGCCCAGCACCCCCACC
ATTAATGTGCTGGAATCAAAGGATACAGACAGTGATAGGGAAGCAGGGACTGAAACGGGGGGAGAGAACA
ATGATAAAGAAGAAGAAGAGAAGAAAGATGAAACTTCGAGCTCCTCTGAAGCAAATTCTCGGTGTCAAAC
ACCAATAAAGATGAAGCCAAATATTGAACCTCCTGAGAATGTGGAGTGGAGTGGTGCTGAAGCCTCAATG
TTTAGAGTCCTCATTTGGCACTTACTATGACAATTTCTGTGCCATTGCTAGGTTAATTGGGACCAAAACAT
GTAGACAGGTGTATGAGTTTAGAGTCAAAGAATCTAGCATCATAGCTCCAGCTCCCGCTGAGGATGTGGA
TACTCCTCCAAGGAAAAAGAAGAGGAAACACCGGTTGTGGGCTGCACACTGCAGAAAGATACAGCTGAAA
AAGGGTCAAAACCGCTTCCGGGATGCCGCTGCAAAGCACAGTGCAACACCAAGCAGTGCCCGTGCTACC
TGGCTGTCCGAGAGTGTGACCCTGACCTCTGTCTTACTTGTGGAGCCGCTGACCATTGGGACAGTAAAAA
TGTGTCCTGCAAGAACTGCAGTATTCAGCGGGGCTCAAAAAGCATCTATTGCTGGCACCATCTGACGTG
GCAGGCTGGGGGATTTTTATCAAAGATCCTGTGCAGAAAAATGAATTCATCTCAGAATACTGTGGAGAGA
TTATTTCTCAAGATGAAGCTGACAGAAGAGGGAAAGTGATGATAAATACATGTGCAGCTTTCTGTTCAA
CTTGAAACAATGATTTTGTGGTGGATGCAACCCGCAAGGGTAACAAAATTCTGTTTGCAAATCATTGCGTA
AATCCAACTGCTATGCAAAAGTTATGATGGTTAACGGTGATCACAGGATAGGTATTTTGGCCAAGAGAG
CCATCCAGACTGGCGAAGAGCTGTTTTTTGATTACAGATACAGCCAGGCTGATGCCCTGAAGTATGTCGG
CATCGAAAGAGAAATGGAAATCCCTTGACATCTGCTACCTCCTCCCCCTCCTCTGAAACAGCTGCCTTA
GCTTCAGGAACCTCGAGTACTGTGGGCAATTTAGAAAAAGAACATGCAGTTTGAAATTCTGAATTTGCAA
AGTACTGTAAGAATAATTTATAGTAATGAGTTTAAAAATCAACTTTTTATTGCCTTCTCACCAGCTGCAA
AGTGTTTTGTACCAGTGAATTTTTGCAATAATGCAGTATGGTACATTTTTCAACTTTGAATAAAGAATAC
TTGAACTTGTCTTGTGAATC
```

[0064] 如下所示为基于核受体A链结合SET结构域蛋白1 (NSD1) A链的部分EZH2蛋白的结构模型。该模型对应于SEQ ID NO:1的EZH2序列的氨基酸残基533-732。



[0066] 该结构模型的对应氨基酸序列如下所示。所述底物口袋结构域中的残基有下划线。SET结构域中的残基以斜体显示。

[0067]

SCPCVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVSCKNCSIQRG
SKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEY⁶⁴¹CGEIISQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNDFV⁶⁷⁴VDA⁶⁷⁷TRK
GNKIR⁶⁸⁵FA⁶⁸⁷NHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQAD (SEQ ID NO:6)

[0068] 据信EZH2的催化位点位于所述蛋白称作SET结构域的保守结构域。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：

[0069]

hlllapsdvagwgifikdpvqknefiseycgeiisqdeadrrgkvdydkymcsflfnlnndfvvdatrkgnkirfanh
svnpncyakvmmvngdhrigifakraiqtgeelffdy (SEQ ID NO:7) .

[0070] SEQ ID NO:7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) 。

[0071] 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:7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) 。

[0072] 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:7一致。对应于Swiss-Prot登录号Q15910中的Y641, 在SEQ ID NO:7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) 。

[0073] 编码GenBank登录号NP_004447的SET结构域的核苷酸序列是

[0074]

catctattgctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgcagaaaaatgaattcat
ctcagaatactgtggagagattattttctcaagatgaagctgacagaagagggaagtgtatgataaatacatgtgca
gcttttctgttcaacttgaacaatgattttgtggtggatgcaacccgcaagggttaacaaaattcgtttttgcaaatcat

tcggtaaatccaaactgctatgcaaaagttatgatgggtaacggtgatcacaggataggtatttttgcgaagagagc
catccagactggcgaagagctgttttttgattac

[0075] (SEQ ID NO:8),

[0076] 其中编码Y641的密码子以下划线显示。

[0077] 为了本申请目的,应理解人EZH2的氨基酸残基Y641指Swiss-Prot登录号Q15910中的Y641或与之对应的酪氨酸残基。

[0078]

EZH2的全氨基酸序列(SEQ ID NO:9)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLIGTYNDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNC SIQRGSKKHL L LAPSDVAGWGI FIKDPVQKNEFISEXCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNND FVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0079]

其中, x可以是酪氨酸(Y)以外的任何氨基酸残基

[0080] 为了本申请目的,还应理解人EZH2的Y641突变型(等同地, EZH2的Y641突变型)指某一EZH2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。

[0081] 在一个实施方式中,所述EZH2的Y641突变型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。

[0082] 在一个实施方式中,所述EZH2的Y641突变型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突变型在本文中称为Y641F突变型,或等同地,称为Y641F。

[0083]

Y641F (SEQ ID NO: 10)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDSDREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEFCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNNDVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0084] 在一个实施方式中,所述EZH2的Y641突变型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突变型在本文中称为Y641H突变型,或等同地,称为Y641H。

[0085]

Y641H (SEQ ID NO: 11)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDSDREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVIGTYNDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEHCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0086] 在一个实施方式中,所述EZH2的Y641突变型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突变型在本文中称为Y641N突变型,或等同地,称为Y641N。

[0087]

Y641N (SEQ ID NO: 12)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKQDLEDHRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNI EPPENVEWSGAEASMFRLVIGTYNDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS

[0088]

CKNC SIQRGSKKHL L LAPS DVAGW G I F I K D P V Q K N E F I S E N C G E I I S Q D E A D R R G K V Y D K
Y M C S F L F N L N D F V V D A T R K G N K I R F A N H S V N P N C Y A K V M M V N G D H R I G I F A K R A I Q T G E
E L F F D Y R Y S Q A D A L K Y V G I E R E M E I P

[0089] 在一个实施方式中,所述EZH2的Y641突变型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突变型在本文中称为Y641S突变型,或等同地,称为Y641S。

[0090]

Y641S (SEQ ID NO: 13)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDSDREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLIGTYNDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCN TKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNC SIQRGSKHLL LAPSDVAGW GIFI KDPVQKNEFISE SCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNND FVVDATRG NKIRFANHSVNPN CYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0091] 在一个实施方式中,所述EZH2的Y641突变型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半胱氨酸(C)取代。根据该实施方式,所述EZH2的Y641突变型在本文中称为Y641C突变型,或等同地,称为Y641C。

[0092]

Y641C (SEQ ID NO: 14)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ

[0093]

```
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH  
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN  
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSSEANSRCQTPIKM  
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRVLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFrvkESSIIAPA  
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
CKNCSIQRGSKHLLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISECCGEIISQDEADRRGKVYDK  
YMCSFLFNLNNDVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP
```

[0094] 在一个实施方式中,所述EZH2的A677突变型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A677的单个氨基酸残基被非丙氨酸的氨基酸取代,优选被甘氨酸(G)取代。根据该实施方式,EZH2的A677突变型在本文中称为A677突变型,优选A677G突变型,或等同地,A677G。

[0095]

A677 (SEQ ID NO: 15)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKQDLEDHRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLP GALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLIGTYNDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCN TKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNC SIQRGSKKHL L LAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNND FVVDXTRKGNKIRFANH SVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0096]

其中X优选是甘氨酸(G)。

[0097] 在一个实施方式中,所述EZH2的A687突变型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A687的单个氨基酸残基被非丙氨酸的氨基酸取代,优选被缬氨酸(V)取代。根据该实施方式,EZH2的A687突变型在本文中称为A687突变型,优选A687V突变型,或等同地,A687V。

[0098]

A687 (SEQ ID NO: 16)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDEDDDDGDDPEEREKQKQDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVIGTYNDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCISIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFXNHVSVPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

其中X优选是缬氨酸(V)。

[0099] 在一个实施方式中,所述EZH2的R685突变型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R685的单个氨基酸残基被非精氨酸的氨基酸取代,优选被组氨酸(H)或半胱氨酸(C)取代。根据该实施方式,EZH2的R685突变型在本文中称为R685突变型,优选R687C突变型或R685H突变型,或等同地,R685H或R685C。

[0100]

A685 (SEQ ID NO: 17)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW

[0101]

KQRRIQPVHILTSVSSLRGTTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFP SDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLP GALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRVLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFP GCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHL L LAPS DVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDK
YMCSFLFNLNND FVVDATRKGNKIXFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

其中X优选是半胱氨酸(C)或组氨酸(H)。

[0102] 在一个实施方式中,EZH2突变型的氨基酸序列与野生型人EZH2的氨基酸序列的区别在于SEQ ID NO:6中定义的其底物口袋结构域中一个或多个氨基酸残基处的不同。根据该实施方式的EZH2突变型在本文中称作EZH2突变型。

[0103]

在底物口袋结构域中包含一个或多个突变的突变型EZH2(SEQ ID NO: 18)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKQDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDSDREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVIGTYNDNFCIAIRLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCISIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEXCGEIIISQDEADRRGKVYDK
YMXXXLXNLNNDFFXXDXTRKGNKXXXXXSVNPNCYAKVMMVNGDHRXGIFAKRAIQTGE

```

[0104]

ELFXDXRYSXADALKYVGIEREMEIP

其中X可以是除对应野生型残基以外的任何氨基酸。

[0105] 表2中总结的数据清楚显示本发明的结果对人疾病的含义(见实施例5)。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,以及该前体物质通过突变酶形式有效的后续转换成H3-K27me2,以及特别是H3-K27me3。

[0106] 已报道H3-K27me1的形成并不排它性依赖WT-EZH2催化。EZH2和另一PRC2亚基——EED的敲除研究证明,H3-K27me1的形成可由包含EZH2或相关蛋白EZH1作为催化亚基的PRC2复合物催化。Shen, X. 等. (2008) Mol Cell 132:491-502. 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,所述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。对于所述数据的这种解释还帮助调和EZH2或PRC2相关蛋白(例如,PHF19/PCL3)的癌症相关过表达的存在,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三甲基化H3-K27的更高稳态水平(图4)。

[0107] 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顺式三甲基化时与转录上抑制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。

[0108] 本发明的另一个发现是,相较于表达野生型(WT)EZH2的细胞而言,表达的突变型EZH2包含SEQ ID NO:6中定义的底物口袋结构域中的突变的那些细胞一般对小分子EZH2抑制剂更敏感。具体来说,表达Y641突变EZH2的细胞显示生长、分裂或增殖减缓,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)。具体而言,相较于表达其它EZH2突变型的细胞而言,表达在SEQ ID NO:1的氨基酸第677位有取代突变的细胞显示对EZH2抑制剂的更大敏感性(实施例19)。

[0109] 已提出EZH2和其它蛋白甲基转移酶是吸引药物开发的靶标。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。本发明的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和疾病相关突变型之间的底物识别差异源自过渡态相互反应,会证明选择性模拟所述突变EZH2过渡态超过所述WT酶的小分子抑制剂在含突变细胞中能有效阻断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。已证明过渡态模拟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:结构、机制和数据分析实用入门》) 第二版, (威利出版公司(Wiley), 2000)。

[0110] 本发明的结果指出先前未认识到的,在实施H3-K27单甲基化的酶和用于滤泡性淋巴瘤和弥散性大B细胞淋巴瘤发病机理的某些EZH2突变形式之间酶促偶联的惊人依赖性。尽管无意受任何一种理论束缚,相信所述数据是人疾病依赖所述正常(WT)酶和疾病相关突变(例如Y641)酶之间催化活性偶联的第一个例子。

[0111] 本发明的一方面是一种治疗或减轻对象的癌或癌前病症症状的方法,该方法通过向表达突变型EZH2(该突变型EZH2在SEQ ID NO:6所示的底物口袋结构域中包含突变)的对象给予治疗有效量的EZH2抑制剂来进行。

[0112] 本发明的另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向二甲基化的H3-K27转换,二甲基化的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向二甲基化的H3-K27转换和二甲基化的H3-K27向三甲基化的H3-K27转换。本文所用,“未甲基化的H3-K27”指组蛋白H3无甲基基团与第27位赖氨酸氨基基团共价相连。本文所用,“单甲基化的H3-K27”指组蛋白H3含单个甲基基团与第27位赖氨酸氨基基团共价相连。单甲基化的H3-K27在本文中也称作H3-K27me1。本文所用,“二甲基化的H3-K27”指组蛋白H3含两个甲基基团与第27位赖氨酸氨基基团共价相连。二甲基化的H3-K27在本文中也称作H3-K27me2。本文所用,“三甲基化的H3-K27”指组蛋白H3含三个甲基基团与第27位赖氨酸氨基基团共价相连的。三甲基化的H3-K27在本文中也称作H3-K27me3。

[0113] 组蛋白H3是长136个氨基酸的蛋白质,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的(并类似作为EZH2突变形式的)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:19)。

[0114] 本发明方法涉及给予表达突变型EZH2的对象治疗有效量的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,由此抑制该对象中H3-K27向三甲基化H3K27的转化,并从而治疗或减轻该对象中与异常组蛋白甲基化水平相关联的癌症或疾病的症状。

[0115] 本发明的表达突变型EZH2的对象指具有可检测量的突变型EZH2多肽的对象。优选地,所述突变型EZH2多肽在其如SEQ ID NO:6定义的底物口袋结构域中包含一个或多个突变。示例性的氨基酸取代突变包括在SEQ ID NO:1的氨基酸第677、687、674、685或641位的取代,例如但不限于:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);甲硫氨酸(M)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第674位的野生型残基缬氨酸(V) (V674M);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685H);半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685C);苯丙氨酸(F)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641F);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641H);天冬酰胺(N)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641N);丝氨酸(S)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641S);或半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641C)。更优选地,所述对象所具有的可检测量的突变型EZH2多肽包含:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型精氨酸(R) (R685H);或半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685C)。

[0116] 或者,本发明的表达突变型EZH2的对象指具有可检测量的编码突变型EZH2多肽核酸序列的对象。优选的核酸序列编码的突变型EZH2多肽在其如SEQ ID NO:6定义的底物口袋结构域中包含一个或多个突变。示例性的氨基酸取代突变包括在SEQ ID NO:1的氨基酸第677、687、674、685或641位的取代,例如但不限于:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);甲硫氨酸(M)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第674位的野生型残基缬氨酸(V) (V674M);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685H);半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685C);苯丙氨酸(F)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641F);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641H);天冬酰胺(N)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641N);丝氨酸(S)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641S);或半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641C)。更优选地,所述对象具

有可检测量的编码突变型EZH2多肽的核酸序列,所述突变型EZH2多肽包含:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型精氨酸(R) (R685H);或半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685C)。

[0117] EZH2突变型的检测

[0118] 突变型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突变型EZH2多肽或特异性结合突变型EZH2多肽的特征性肽段的抗体检测突变型EZH2多肽。所述突变型EZH2多肽的特征性肽段可包括,例如,SEQ ID NO:7所示的SET结构域,不同之处在于SEQ ID NO:6定义的底物口袋结构域中的一个或多个残基被野生型残基以外的氨基酸残基取代。在另一个实施方式中,所述突变型EZH2多肽的特征性肽段可包括,例如,SEQ ID NO:7中所示SET结构域的10-113氨基酸片段,不同之处在于SEQ ID NO:6中所示的底物口袋结构域中的一个或多个残基被野生型残基以外的氨基酸残基取代,限制条件是该肽段包括对应于EZH2突变的氨基酸残基。

[0119] 抗体被认为特异性结合突变EZH2多肽或突变EZH2多肽的特征性肽段的条件是: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,所述抗体被认为特异性结合突变EZH2多肽或突变EZH2多肽的特征性肽段的条件是:所述抗体结合所述突变EZH2多肽或其肽段的亲和性是结合相应野生型EZH2多肽或其肽段的亲和性的至少约100倍。在一个实施方式中,所述抗体被认为特异性结合突变EZH2多肽或突变EZH2多肽的特征性肽段的条件是:所述抗体结合所述突变EZH2多肽或其肽段的亲和性是结合相应野生型EZH2多肽或其肽段的亲和性的至少约1000倍。所述抗体可用于例如酶联免疫吸附实验(ELISA)或Western印迹实验中。抗体可以是单克隆、多克隆、嵌合抗体或抗体片段。检测反应产物的步骤可采用任何合适的免疫测定法进行。

[0120] 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。

[0121] 作为另一示例,突变EZH2多肽的检测可以使用质谱(MS),例如电喷雾电离-飞行时间(ESI-TOF)或基质辅助激光解吸/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,其包含的序列跨过对应于野生型EZH2中突变的氨基酸。

[0122] 编码突变EZH2多肽或突变EZH2多肽的特征性肽段的核酸序列可使用任何合适的方法检测。例如编码突变EZH2多肽的核酸序列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。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装有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。使用下游软件应用,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。替代或补充地,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SEQ ID NO:8(上述)的相关部分。

[0123] 替代或补充地,编码突变EZH2多肽的核酸序列可以用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突变的突变氨基酸的密码子。此类突变包括EZH2的任何突变,优选SEQ ID NO:6定义的EZH2的底物口袋结构域中的一个或多个突变,例如但不限于:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);甲硫氨酸(M)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第674位的野生型残基缬氨酸(V) (V674M);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685H);半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685C);苯丙氨酸(F)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641F);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641H);天冬酰胺(N)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641N);丝氨酸(S)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641S);或半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641C)。

[0124] 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)、2.5mM NaH₂PO₄ (pH 7)、0.5%SDS、2mM EDTA)中65℃杂交。SSC是0.15M氯化钠/0.015M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℃清洗。

[0125] 还能使用产生相似程度严谨性的其它条件、试剂等。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,本领域技术人员操纵所述条件以使能清楚鉴定本发明EZH2相关核酸,特别是包括编码EZH2突变型的核酸(例如,通过使用较低严谨性的条件)。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。

[0126] 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活性。

[0127] 在一个实施方式中,所述EZH2抑制剂抑制野生型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述EZH2抑制剂抑制突变型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述EZH2抑制剂抑制野生型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性和突变型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性。在一个实施方式中,所述EZH2抑制剂选择性地抑制突变型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性。

[0128] 本文公开的EZH2的某些突变型(例如Y641)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,不过在将H3-K27me2转换成H3-K27me3方面是出乎意料的有效催化剂。EZH2的某些突变型(例如A687)偏好单甲基H3-K27底物。相反,EZH2的某些突变型(例如A677)显示在未甲基化、单甲基化和二甲基化的H3-K27之间的同等偏向。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,但在将H3-K27me2转换成H3-K27me3方面是出乎预料的无效催化剂。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在H3-K4三甲基化为顺式时与转录上抑制的基因或准备转录的基因相关联。因此,突变型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性的选择性抑制影响对H3-K27的不同甲基化形式的生成的选择性抑制,由此改变与H3-K27甲基化水平相关联的转录。

[0129] 当EZH2抑制剂对突变型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性的抑制比其对野生型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性的抑制更有效时,Ezh2的抑制剂“选择性抑制”突变型EZH2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突变型EZH2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突变型EZH2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突变型EZH2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突变型EZH2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突变型EZH2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突变型EZH2的IC₅₀比对野生型EZH2的IC₅₀低至少90%。

[0130] 在一个实施方式中,所述突变型EZH2的选择性抑制剂对野生型EZH2基本不起抑制作用。

[0131] 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的二甲基化。

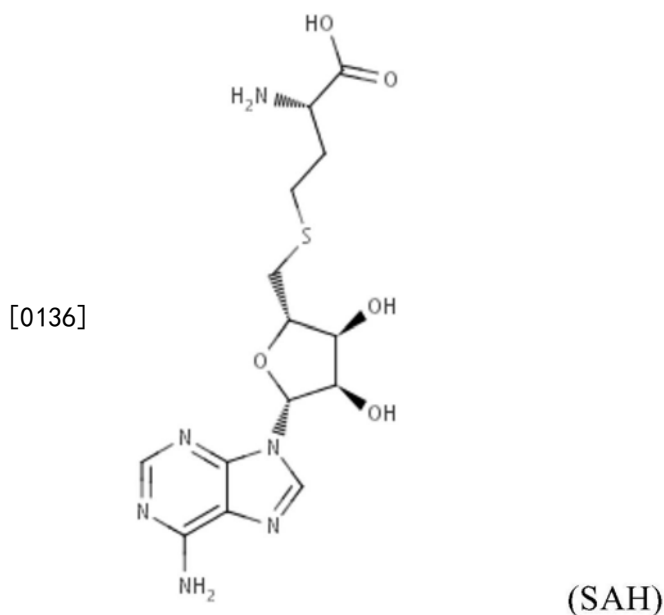
[0132] 在一个实施方式中,所述抑制剂抑制H3-K27me1向H3-K27me2的转换和H3-K27me2向H3-K27me3的转换。所述抑制剂可直接单独抑制H3-K27me1向H3-K27me2的转换。或者,所述抑制剂可直接抑制H3-K27me1向H3-K27me2的转换以及H3-K27me2向H3-K27me3的转换。

[0133] 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。

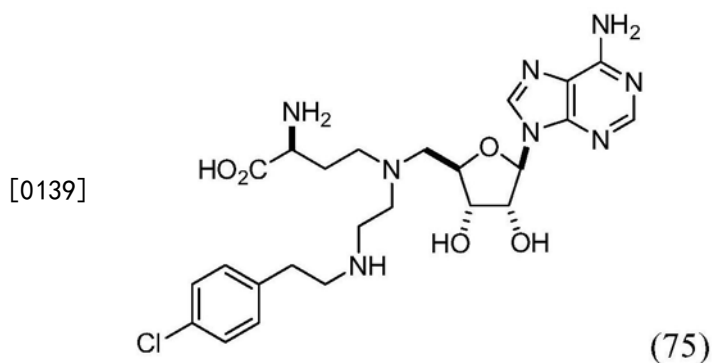
[0134] 所述抑制是与合适阴性对照相比可测的抑制。在一个实施方式中,抑制是与合适阴性对照相比至少10%的抑制。即,用所述抑制剂的酶促活性速率或产物量少于或等于90%的不用所述抑制剂产生的相应速率或量。在多种其它实施方式中,抑制是与合适阴性对照相比至少20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或95%的抑制。在一个实施方式中,抑制是与合适阴性对照相比至少99%的抑制。即,用所述抑制剂的酶促活性速率或产物量少于或等于1%的不用所述抑制剂产生的相应速率或量。

[0135] 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



[0137] 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进行转甲基的抑制剂。

[0138] 在一个实施方式中,所述抑制剂是化合物75



[0140] 或其药学上可接受的盐。

[0141] 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突变型EZH2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突变型EZH2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,获得所述活检样品的组织并非淋巴腺组织(例如淋巴结)或骨髓,或是这些组织的补充。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)可以从已经离心的血液样品作为暗黄层分离得到。

[0142] 当来自对象的样品的分析结果指示所述样品中存在突变型EZH2时,称所述对象表达突变型EZH2。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突变型EZH2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突变型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性。

[0143] 当来自癌的样品的分析结果指示所述癌中存在突变型EZH2时,称该癌表达所述突变型EZH2。

[0144] 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突变型EZH2时,称所述对象表达所述突变型EZH2。

[0145] 二甲基化H3-K27或三甲基化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,使用二甲基化H3-K27或三甲基化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在石蜡块内以供长期保存。所述蜡块可用于制备切片以使用抗甲基化H3-K27的抗体来进行荧光染色或免疫组化染色。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,使用二甲基化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。

[0146] 可以从对照样品建立对照二甲基化H3-K27或对照三甲基化H3-K27,所述对照样品例如,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,可以由病理学家用本领域已知的方法建立所述H3-K27me2或H3-K27me3的对照甲基化水平。

[0147] 筛选方法

[0148] 本发明的一个方面是用于鉴定测试化合物为突变型EZH2的抑制剂的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:合并分离的突变型EZH2与组蛋白底物、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、二甲基化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突变型EZH2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。

[0149] 所述突变型EZH2作为PRC2复合物或其功能性等价物分离。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。化合物可以是分离的而不必定是纯化的。在一个实施方式中,EZH2的突变型分离为突变型EZH2与EED和SUZ12的复合物。在另一个实施方式中,EZH2的突变型分离为突变型EZH2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。

[0150] 分离的突变型EZH2与组蛋白底物合并。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。

[0151] 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可以按H3-K27甲基化状态而言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按H3-K27甲基化状态而言的经分离组蛋白H3的均质制备物。替代或补充地,可鉴定H3-K27的甲基化状态作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%二甲基化的H3-K27和0%三甲基化的H3-K27。

[0152] 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:19)。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,这些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。

[0153] 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)。

[0154] 分离的突变型EZH2与测试化合物合并。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此类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。化合物库可以有利地高通量筛选分析中筛选,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。

[0155] 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。

[0156] 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。

[0157] 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)。替代或补充地,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。

[0158] 检测单甲基化H3-K27向二甲基化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和二甲基化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和二甲基化H3-K27特异性抗体来测定单甲基化H3-K27和二甲基化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合并后,使用合适的单甲基化H3-K27和二甲基化H3-K27特异性抗体测定单甲基化H3-K27和二甲基化H3-K27的所得量或浓度。然后,可以比较单甲基化H3-K27和二甲基化H3-K27的起始和所得量或浓度。替代或补充地,此后可以将单甲基化H3-K27和二甲基化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。可选在进行上述比较之前或与所述比较一同,从所述实验反应的相应结果减去所述对照反应的结果。

[0159] 由于H3-K27的二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二甲基化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向二甲基化H3-K27的转换。

[0160] 检测二甲基化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,使用二甲基化H3-K27和三甲基化H3-K27特异性抗体来测量所述转换。例如,可以使用合适的二甲基化H3-K27和三甲基化H3-K27特异性抗体来测定二甲基化H3-K27和三甲基化H3-K27的起始量或浓度。在酶、底物和测试化合物合并后,使用合适的二甲基化H3-K27和三甲基化H3-K27特异性抗体测定二甲基化H3-K27和三甲基化H3-K27的所得量或浓度。然后,可以比较二甲基化H3-K27和三甲基化H3-K27的起始和所得量或浓度。替代或补充地,此后可将二甲基化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。可选在进行上述比较之前或与所述比较一同,从所述实验反应的相应结果减去所述对照反应的结果。

[0161] 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,鉴定测试试剂为突变型EZH2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形成少于所述测试化合物缺失下的三甲基化H3-K27形成时,鉴定测试试剂为突变型EZH2的抑制剂。

[0162] 本发明的一个方面是用于鉴定突变型EZH2的选择性抑制剂的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:合并分离的突变型EZH2与组蛋白底物、甲基基团供体(例如,SAM)和测试化合物,其中,所述组蛋白底物包括选自下组的一种H3-K27形式:单甲基化H3-K27、二甲基化H3-K27,以及单甲基化H3-K27和二甲基化H3-K27的组合,从而形成测试混合物;合并分离的野生型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、二甲基化H3-K27,以及单甲基化H3-K27和二甲基化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;计算采用突变型EZH2加测试化合物(M⁺)的三甲基化(a)对采用突变型EZH2不加测试化合物(M⁻)的三甲基化(b)的比例;计算采用野生型EZH2加测试化合物(WT⁺)的三甲基化(c)对采用野生型EZH2不加测试化合物(WT⁻)的三甲基化(d)

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突变型的选择性抑制剂。在一个实施方式中,所述方法还包括就所述测试混合物和所述对照混合物之一或两者考虑没有测试化合物的阴性对照。

[0163] 本发明还提供先前未发现的,患者对EZH2抑制剂的响应性的惊人关联。因此,本发明的一方面是确定患有癌症或癌前病症的患者对EZH2抑制剂的响应性的方法。所述方法一般涉及检测SEQ ID NO:6中定义的EZH2底物口袋结构域中的突变。例如,所述突变可以是取代、点突变、无义突变、错义突变、缺失或插入,如上所述。优选的氨基酸取代突变包括在SEQ ID NO:1的氨基酸第677、687、674、685或641位的取代,例如但不限于:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);甲硫氨酸(M)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第674位的野生型残基缬氨酸(V) (V674M);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685H);半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685C);苯丙氨酸(F)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641F);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641H);天冬酰胺(N)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641N);丝氨酸(S)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641S);或半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641C)。

[0164] 在一个优选实施方式中,所述对象患有癌症或癌前病症。例如,所述癌症是淋巴瘤、白血病或黑素瘤。优选地,所述淋巴瘤是非霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤或弥漫性大B细胞淋巴瘤。或者,所述白血病是慢性骨髓性白血病(CML)。所述癌前病症是骨髓增生异常综合征(MDS,先前被称作白血病前期)。

[0165] 在另一个优选实施方式中,本发明所述突变型EZH2多肽或编码所述突变型EZH2多肽的核酸序列在SEQ ID NO:6所示的EZH2底物口袋结构域中包含一个或多个突变。更优选地,本发明的突变型EZH2多肽或编码所述突变型EZH2多肽的核酸序列包括在SEQ ID NO:1的氨基酸第677、687、674、685或641位的取代,例如但不限于:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);甲硫氨酸(M)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第674位的野生型残基缬氨酸(V) (V674M);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685H);半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685C);苯丙氨酸(F)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641F);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641H);天冬酰胺(N)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641N);丝氨酸(S)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641S);或半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641C)。

[0166] 药物组合物

[0167] 可将一种或多种EZH2拮抗剂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剂或运载体。

[0168] 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，LWW出版社 (Lippincott Williams&Wilkins) 2005。

[0169] 合适的给药途径可以包括，例如口腔、直肠或肠内给予；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。

[0170] 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。

[0171] 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。

[0172] 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。

[0173] 例如，可通过常规的混合、溶解、造粒、制造糖衣丸、水飞、乳化、封装、包封或冻干工艺制造本发明的药物组合物。

[0174] 因此，本发明使用的药物组合物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，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。

[0175] 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，在适合于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。

[0176] 对于口腔给药，通过合并所述活性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，以供待治疗的患者口服摄取。可通过以下方法获得口服用途的药物制剂：合并所述活性EZH2拮抗剂与固体赋形剂，任选研磨所得混合物，必要时在加入合适的辅助剂后加工颗粒混合物，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；纤维素制品例如玉米淀粉、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。

[0177] 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。

[0178] 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) 制成的密封软胶囊。推入式胶囊可含有活性成分，该活性成分可混合填充剂如乳糖、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。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。

[0179] 就含服给药而言,该组合可采取常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0180] 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。

[0181] 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,其添加有防腐剂。这些组合可采取的形式诸如含悬浮剂、溶液剂或油性或水性载剂中的乳液,并且可含有配制剂,例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0182] 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剂包括脂肪油如芝麻油,或合成的脂肪酸酯,例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。

[0183] 或者,活性成分可以是供使用前用合适的载剂(如无菌无热原的水)重建的粉末形式。

[0184] 所述EZH2拮抗剂也可配制成直肠组合,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。

[0185] 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,可接受油中的乳剂)或离子交换树脂配制,或者作为微溶性衍生物(例如,微溶性盐)。

[0186] 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剂或载体示例。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经建立且为本领域技术人员熟知。持续释放胶囊可根据其化学性质释放所述EZH2拮抗剂数周,至多超过100天。取决于所述治疗试剂的化学性质和生物稳定性,可使用额外的蛋白质稳定策略。

[0187] 药物组合还可包含合适的固体或凝胶相载体或赋形剂。所述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。

[0188] 治疗方法

[0189] 本文提供治疗、预防或减轻病症和疾病(例如癌症和癌前病症)的症状的方法,所述病症和疾病的进程可受到调节组蛋白或其它蛋白的甲基化状态的影响,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。

[0190] 例如,本发明的一方面涉及治疗或减轻癌症或癌前病症的症状的方法。该方法包括向患有癌症或癌前病症并表达突变型EZH2的对象给予治疗有效量的EZH2抑制剂的步骤。优选地,突变型EZH2多肽或编码突变型EZH2多肽的核酸序列在其如SEQ ID NO:6定义的底

物口袋结构域中包含突变。更优选地,突变型EZH2多肽或编码突变型EZH2多肽的核酸序列包括在SEQ ID NO:1的氨基酸第677、687、674、685或641位的取代突变,例如但不限于:甘氨酸(G)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第677位的野生型残基丙氨酸(A) (A677G);缬氨酸(V)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第687位的野生型残基丙氨酸(A) (A687V);甲硫氨酸(M)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第674位的野生型残基缬氨酸(V) (V674M);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685H);半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第685位的野生型残基精氨酸(R) (R685C);苯丙氨酸(F)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641F);组氨酸(H)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641H);天冬酰胺(N)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641N);丝氨酸(S)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641S);或半胱氨酸(C)取代SEQ ID NO:1的氨基酸第641位的野生型残基酪氨酸(Y) (Y641C)。

[0191] 在一个实施方式中,所述抑制剂抑制突变型EZH2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突变型EZH2的组蛋白甲基转移酶活性。任选地,所述癌症是淋巴瘤。优选地,所述癌症是非霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤或弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。或者,所述癌症是白血病(例如CML)或黑素瘤。所述癌前病症包括但不限于骨髓增生异常综合征(MDS,先前被称作白血病前期)。

[0192] 疾病诸如癌症和神经疾病可通过给予蛋白(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参与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这些疾病,即,抑制受影响细胞中的组蛋白甲基化。

[0193] 已发现异常的组蛋白甲基化与某些癌症或癌前病症相关联,至少基于这个事实,治疗对象中具有突变型EZH2的癌症或癌前病症的方法包括向有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,用于治疗对象内癌症或癌前病症的方法包括向有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,用于治疗对象内癌症或癌前病症的方法包括向有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) 向二甲基化H3-K27 (H3-K27me2) 转换。在一个实施方式中,用于治疗对象内癌症或癌前病症的方法包括向有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,用于治疗对象内癌症或癌前病症的方法包括向有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H3K27me3的转换。重要的是要注意,甲基化的疾病特异性增加会出现在染色质中关键基因座处,而组蛋白或蛋白质甲基化在细胞水平没有全面增加。例如,在全组蛋白或蛋白的低甲基化背景下,可能在关键疾病相关基因处出现异常高甲基化。

[0194] 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,而增殖不足可采用增加甲基化的试剂进行刺激。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)。

[0195] 可治疗的示例性癌症包括淋巴瘤,包括非霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤(FL)和

弥散性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) ; 黑素瘤; 和白血病, 包括CML。示例性癌前病症包括骨髓增生异常综合征 (MDS, 先前被称作白血病前期)。

[0196] 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、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌 (内分泌胰腺)、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、浆细胞恶性肿瘤和多发性骨髓瘤、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 (非黑素瘤)、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌 (参见皮肤癌 (非黑素瘤))、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。

[0197] 由EZH2介导的表观遗传甲基化起作用的任何其它疾病, 可能是使用本文所述的化合物和方法可治疗的或可预防的疾病。

[0198] 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、骨骼肌萎缩和神经退行性疾病, 例如, 神经退行性疾病。示例性的神经退行

性疾病包括：阿尔茨海默病、肌肉萎缩侧索硬化 (ALS) 和帕金森病。另一类神经退行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)。

[0199] 联合治疗

[0200] 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公认为有助于治疗由本发明化合物治疗的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)。

[0201] 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化合物或其药学上可接受盐和一种或多种其它试剂，以及以分开药剂的形式给予本发明化合物或其药学上可接受盐和一种或多种其它试剂。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，这些试剂可以同时给予或在一段时间内依序给予。

[0202] 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的至少一种其他试剂。所述组合还可以包括多于一种其它试剂，例如，两种或三种其它试剂，条件是所述组合使所形成的组合物能够行使其预期功能。

[0203] 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/或神经疾病中的联用。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，额外的抗癌剂选自化疗剂 (例如2CdA、5-FU、6-巯基嘌呤、6-TG、AbraxaneTM、Accutane[®]、放线菌素D、Adriamycin[®]、Alimta[®]、全反式视黄酸、氨甲蝶呤、Ara-C、阿扎胞苷 (Azacitidine)、BCNU、Blenoxane[®]、Camptosar[®]、CeeNU[®]、氯法拉滨 (Clofarabine)、ClolarTM、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prolifeprospan 20、Sandostatin[®]、Targretin[®]、Tasigna[®]、Taxotere[®]、Temodar[®]、TESPA、Trisenox[®]、Valstar[®]、Velban[®]、VidazaTM、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™；小分子(如Tykerb®)；皮质类固醇(诸如地塞美松磷酸钠、DeltaSone®和Delta-Cortef®)；激素治疗剂(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)。

[0204] 剂量

[0205] 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性别、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，治疗有效量可以通过本领域技术人员已知的方法确定。

[0206] 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。还可以通过监测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。该剂量可根据所用的剂型和所用的给药途径在此范围内变化。确切的制剂、给药途径和剂量可以由单独医师根据患者的病症而选择。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。

[0207] 可以根据个体调整剂量和间隔，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。

[0208] 还可使用MEC值来确定剂量间隔。在某些实施方式中，给予EZH2拮抗剂所用的方案使血浆水平在所述时间的10~90%，优选为30~90%，最优选50~90%保持在MEC之上直至达到所需的症状改善。在其它实施方式中，不同的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。

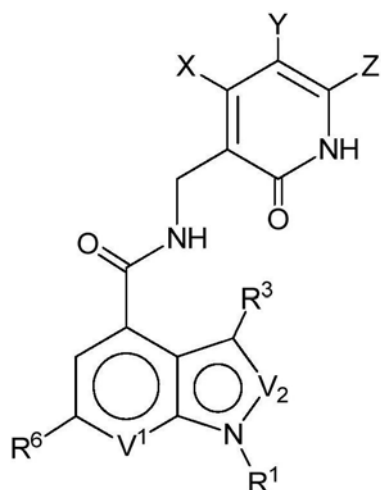
[0209] 本领域技术人员可以从众多给药方案中选择，而给予的EZH2拮抗剂的量当然取决于接受治疗的患者、所述对象的体重、病痛的严重度、给药的方式和处方医师的判断。

[0210] 化合物和药物组合物

[0211] 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”。所述化合物可以呈现为化合物本身、所述化合物的药学上可接受盐或药物组合物。

[0212] 适用于本发明方法的化合物包括式(I)化合物或其盐：

[0213]



(I),

[0214] 其中

[0215] V¹是N或CR⁷,[0216] V²是N或CR²,限制条件是当V¹是N时,V²是N,

[0217] X和Z独立地选自下组:氢、(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、未取代或经取代的(C₃-C₈)环烷基、未取代或经取代的(C₃-C₈)环烷基-(C₁-C₈)烷基或-(C₂-C₈)烯基、未取代或经取代的(C₅-C₈)环烯基、未取代或经取代的(C₅-C₈)环烯基-(C₁-C₈)烷基或-(C₂-C₈)烯基、(C₆-C₁₀)二环烷基、未取代或经取代的杂环烷基、未取代或经取代的杂环烷基-(C₁-C₈)烷基或-(C₂-C₈)烯基、未取代或经取代的芳基、未取代或经取代的芳基-(C₁-C₈)烷基或-(C₂-C₈)烯基、未取代或经取代的杂芳基、未取代或经取代的杂芳基-(C₁-C₈)烷基或-(C₂-C₈)烯基、卤素、氰基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-CONR^aNR^aR^b、-SR^a、-SOR^a、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、硝基、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aC(O)OR^a、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-NR^aNR^aR^b、-NR^aNR^aC(O)R^b、-NR^aNR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aNR^aC(O)OR^a、-OR^a、-OC(O)R^a和-OC(O)NR^aR^b;

[0218] Y是H或卤素;

[0219] R¹是(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、未取代或经取代的(C₃-C₈)环烷基、未取代或经取代的(C₃-C₈)环烷基-(C₁-C₈)烷基或-(C₂-C₈)烯基、未取代或经取代的(C₅-C₈)环烯基、未取代或经取代的(C₅-C₈)环烯基-(C₁-C₈)烷基或-(C₂-C₈)烯基、未取代或经取代的(C₆-C₁₀)二环烷基、未取代或经取代的杂环烷基或-(C₂-C₈)烯基、未取代或经取代的杂环烷基-(C₁-C₈)烷基、未取代或经取代的芳基、未取代或经取代的芳基-(C₁-C₈)烷基或-(C₂-C₈)烯基、未取代或经取代的杂芳基、未取代或经取代的杂芳基-(C₁-C₈)烷基或-(C₂-C₈)烯基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-CONR^aNR^aR^b;

[0220] R²是氢、(C₁-C₈)烷基、三氟甲基、烷氧基或卤素,其中所述(C₁-C₈)烷基任选地被选自氨基和(C₁-C₃)烷基氨基的一至两个基团取代;

[0221] R⁷是氢、(C₁-C₃)烷基或烷氧基;R³是氢、(C₁-C₈)烷基、氰基、三氟甲基、-NR^aR^b或卤素;

[0222] R⁶选自下组:氢、卤素、(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、未取代或经取代的(C₃-C₈)环烷基、未取代或经取代的(C₃-C₈)环烷基-(C₁-C₈)烷基、未取代或经取代的(C₅-C₈)环烯基、未取代或经取代的(C₅-C₈)环烯基-(C₁-C₈)烷基、(C₆-C₁₀)二环烷基、未取代或经取

代的杂环烷基、未取代或经取代的杂环烷基-(C₁-C₈)烷基、未取代或经取代的芳基、未取代或经取代的芳基-(C₁-C₈)烷基、未取代或经取代的杂芳基、未取代或经取代的杂芳基-(C₁-C₈)烷基、氰基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-CONR^aNR^aR^b、-SR^a、-SOR^a、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、硝基、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aC(O)OR^a、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-NR^aNR^aR^b、-NR^aNR^aC(O)R^b、-NR^aNR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aNR^aC(O)OR^a、-OR^a、-OC(O)R^a、-OC(O)NR^aR^b;

[0223] 其中任何(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、环烷基、环烯基、二环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基基团任选地被独立选自下组的1、2或3个基团取代:-O(C₁-C₆)烷基(R^c)₁₋₂、-S(C₁-C₆)烷基(R^c)₁₋₂、-(C₁-C₆)烷基(R^c)₁₋₂、-(C₁-C₈)烷基-杂环烷基、(C₃-C₈)环烷基-杂环烷基、卤素、(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₅-C₈)环烯基、(C₁-C₆)卤代烷基、氰基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-SR^a、-SOR^a、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、硝基、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aC(O)OR^a、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-OR^a、-OC(O)R^a、OC(O)NR^aR^b、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基(C₁-C₄)烷基和杂芳基(C₁-C₄)烷基;其中所述芳基、杂芳基、芳基(C₁-C₄)烷基或杂芳基(C₁-C₄)烷基的任何芳基或杂芳基部分任选地由独立选自下组的1、2或3个基团取代:卤素、(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₅-C₈)环烯基、(C₁-C₆)卤代烷基、氰基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-SR^a、-SOR^a、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、硝基、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aC(O)OR^a、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-OR^a、-OC(O)R^a和-OC(O)NR^aR^b;

[0224] R^a和R^b各自独立地是氢、(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、(C₃-C₈)环烷基、(C₅-C₈)环烯基、(C₆-C₁₀)二环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其中所述(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、环烷基、环烯基、二环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基基团任选地被独立地选自下组的1、2或3个基团取代:卤素、羟基、(C₁-C₄)烷氧基、氨基、(C₁-C₄)烷基氨基、((C₁-C₄)烷基)((C₁-C₄)烷基)氨基、-CO₂H、-CO₂(C₁-C₄)烷基、-CONH₂、-CONH(C₁-C₄)烷基、-CON((C₁-C₄)烷基)((C₁-C₄)烷基)、-SO₂(C₁-C₄)烷基、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₄)烷基和SO₂N((C₁-C₄)烷基)((C₁-C₄)烷基);

[0225] 或者R^a和R^b与其连接的氮一起形成5-8元的饱和或不饱和环,其任选地包含选自氧、氮和硫的其它杂原子,其中所述环任选地被独立地选自下组的1、2或3个基团取代:(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)卤代烷基、氨基、(C₁-C₄)烷基氨基、((C₁-C₄)烷基)((C₁-C₄)烷基)氨基、羟基、氧代、(C₁-C₄)烷氧基和(C₁-C₄)烷氧基(C₁-C₄)烷基,其中所述环任选地稠合至(C₃-C₈)环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

[0226] 或者R^a和R^b与其连接的氮一起形成6~10元的桥接二环系统,其任选地稠合至(C₃-C₈)环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;各R^c独立地是(C₁-C₄)烷基氨基、-NR^aSO₂R^b、-SOR^a、-SO₂R^a、-NR^aC(O)OR^a、-NR^aR^b或-CO₂R^a。

[0227] 由式(I)的通式结构涵盖的化合物的亚组如下所示:

[0228] 式(I)的亚组A

[0229] X和Z选自下组:(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、-NR^aR^b和-OR^a;

[0230] Y是H或F;

[0231] R¹选自下组:(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基;R²是氢、(C₁-C₈)烷基、三氟甲基、烷氧基或卤素,其中所述(C₁-C₈)烷基任选地被选自氨基和(C₁-C₃)烷基氨基的一至两个基团取代;

[0232] R^7 是氢、 (C_1-C_3) 烷基或烷氧基；

[0233] R^3 选自下组：氢、 (C_1-C_8) 烷基、氰基、三氟甲基、 $-NR^aR^b$ 和卤素；

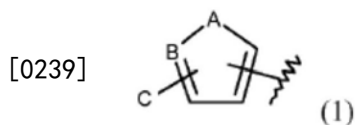
[0234] R^6 选自下组：氢、卤素、氰基、三氟甲基、氨基、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、芳基、杂芳基、芳基氨基； (C_2-C_8) 炔基、芳基炔基、杂芳基炔基、 $-SO_2R^a$ 、 $-SO_2NR^aR^b$ 和 $-NR^aSO_2R^b$ ；

[0235] 其中任何 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_2-C_8) 炔基、芳基炔基、杂芳基炔基基团任选地被独立地选自下组的1、2或3个基团取代： $-O(C_1-C_6)$ 烷基 $(R^c)_{1-2}$ 、 $-S(C_1-C_6)$ 烷基 $(R^c)_{1-2}$ 、 $-(C_1-C_6)$ 烷基 $(R^c)_{1-2}$ 、 $-(C_1-C_8)$ 烷基-杂环烷基、 (C_3-C_8) 环烷基-杂环烷基、卤素、 (C_1-C_6) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_5-C_8) 环烯基、 (C_1-C_6) 卤代烷基、氰基、 $-COR^a$ 、 $-CO_2R^a$ 、 $-CONR^aR^b$ 、 $-SR^a$ 、 $-SOR^a$ 、 $-SO_2R^a$ 、 $-SO_2NR^aR^b$ 、硝基、 $-NR^aR^b$ 、 $-NR^aC(O)R^b$ 、 $-NR^aC(O)NR^aR^b$ 、 $-NR^aC(O)OR^a$ 、 $-NR^aSO_2R^b$ 、 $-NR^aSO_2NR^aR^b$ 、 $-OR^a$ 、 $-OC(O)R^a$ 、 $-OC(O)NR^aR^b$ 、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基 (C_1-C_4) 烷基和杂芳基 (C_1-C_4) 烷基；

[0236] R^a 和 R^b 各自独立地是氢、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_5-C_8) 环烯基、 (C_6-C_{10}) 二环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基，其中所述 (C_1-C_8) 烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、环烷基、环烯基、二环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基基团任选地被独立地选自下组的1、2或3个基团取代：卤素、羟基、 (C_1-C_4) 烷氧基、氨基、 (C_1-C_4) 烷基氨基、 $((C_1-C_4)$ 烷基) $((C_1-C_4)$ 烷基)氨基、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2(C_1-C_4)$ 烷基、 $-CONH_2$ 、 $-CONH(C_1-C_4)$ 烷基、 $-CON((C_1-C_4)$ 烷基) $((C_1-C_4)$ 烷基)、 $-SO_2(C_1-C_4)$ 烷基、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1-C_4)$ 烷基和 $SO_2N((C_1-C_4)$ 烷基) $((C_1-C_4)$ 烷基)；

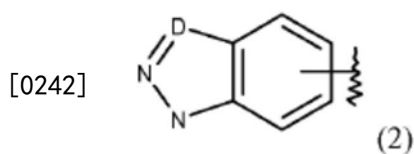
[0237] 或者 R^a 和 R^b 与其连接的氮一起形成5-8元的饱和或不饱和环，其任选地包含选自氧、氮和硫的其它杂原子，其中所述环任选地被独立地选自下组的1、2或3个基团取代： (C_1-C_4) 烷基、 (C_1-C_4) 卤素烷基、氨基、 (C_1-C_4) 烷基氨基、 $((C_1-C_4)$ 烷基) $((C_1-C_4)$ 烷基)氨基、羟基、氧代、 (C_1-C_4) 烷氧基和 (C_1-C_4) 烷氧基 (C_1-C_4) 烷基，其中所述环任选地稠合至 (C_3-C_8) 环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环；

[0238] 或者 R^a 和 R^b 与其连接的氮一起形成6~10元的桥接二环系统，其任选地稠合至 (C_3-C_8) 环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环。该特定亚组A中的任何芳基或杂芳基基团独立地选自下组：呋喃、噻吩、吡咯、噁唑、噻唑、咪唑、吡唑、噁二唑、噻二唑、三唑、四唑、苯并呋喃、苯并噻吩、苯并噁唑、苯并噻唑、苯基、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、三嗪、四嗪、喹啉、噌啉、喹唑啉、喹噁啉和蔡啶或如下其它芳基或杂芳基基团：



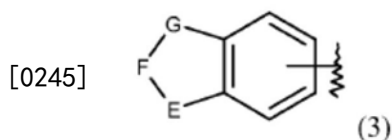
[0240] 其中在(1)中，

[0241] A是O、NH或S；B是CH或N，且C是氢或 C_1-C_8 烷基；或



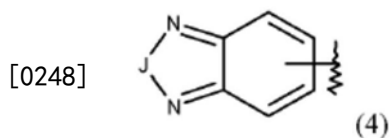
[0243] 其中在(2)中，

[0244] D是N或C任选地被氢或 C_1-C_8 烷基取代；或



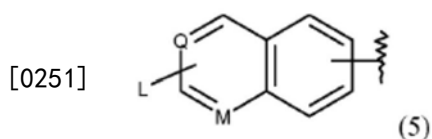
[0246] 其中在 (3) 中,

[0247] E 是 NH 或 CH₂; F 是 O 或 CO; 且 G 是 NH 或 CH₂; 或



[0249] 其中在 (4) 中,

[0250] J 是 O、S 或 CO; 或



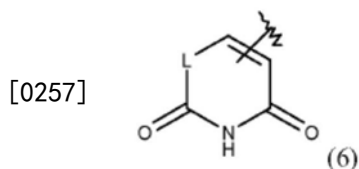
[0252] 其中在 (5) 中,

[0253] Q 是 CH 或 N;

[0254] M 是 CH 或 N; 和

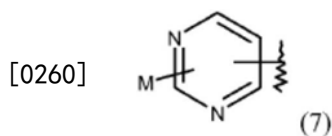
[0255] L/ (5) 是氢、卤素、氨基、氰基、(C₁-C₈) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-CONR^aNR^aR^b、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-NR^aNR^aR^b、-NR^aNR^aC(O)R^b、-NR^aNR^aC(O)NR^aR^b 或 -OR^a,

[0256] 其中任何 (C₁-C₈) 烷基或 (C₃-C₈) 环烷基基团任选地由独立选自下组的 1、2 或 3 个基团取代: (C₁-C₆) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基、(C₅-C₈) 环烯基、(C₁-C₆) 卤代烷基、氰基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-SR^a、-SOR^a、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、硝基、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aC(O)OR^a、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-OR^a、-OC(O)R^a 和 -OC(O)NR^aR^b; 其中 R^a 和 R^b 如上定义; 或



[0258] 其中在 (6) 中,

[0259] L/ (6) 是 NH 或 CH₂; 或

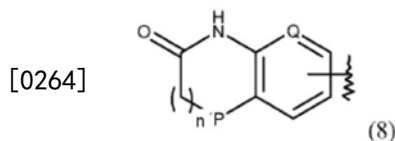


[0261] 其中在 7 中,

[0262] M/ (7) 是氢、卤素、氨基、氰基、(C₁-C₈) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基、杂环烷基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-CONR^aNR^aR^b、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-NR^aNR^aR^b、-NR^aNR^aC(O)R^b、-NR^aNR^aC(O)NR^aR^b 或 -OR^a,

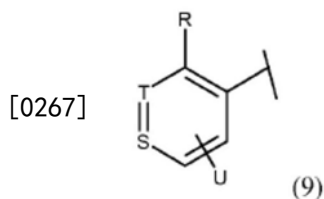
[0263] 其中任何 (C₁-C₈) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基或杂环烷基基团任选地由独立选自下组的 1、2 或 3 个基团取代: (C₁-C₆) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基、(C₅-C₈) 环烯基、(C₁-C₆) 卤代烷基、氰基、-

COR^a 、 $-\text{CO}_2\text{R}^a$ 、 $-\text{CONR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{SR}^a$ 、 $-\text{SOR}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、硝基、 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ 、 $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{OR}^a$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^a$ 和 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ ；其中 R^a 和 R^b 如上定义；或



[0265] 其中在 (8) 中，

[0266] P是 CH_2 、 NH 、 O 或 S ；Q/(8)是 CH 或 N ；且 n 是0-2；或



[0268] 其中在 (9) 中，

[0269] S/(9)和T/(9)是C，或S/(9)是C且T/(9)是N，或S/(9)是N且T/(9)是C；

[0270] R是氢、氨基、甲基、三氟甲基或卤素；

[0271] U是氢、卤素、氨基、氰基、硝基、三氟甲基、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、 $-\text{COR}^a$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^a$ 、 $-\text{CONR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ 、 $-\text{OR}^a$ 或4-(1H-吡唑-4-基)，

[0272] 其中任何 (C_1-C_8) 烷基或 (C_3-C_8) 环烷基基团任选地由独立选自下组的1、2或3个基团取代： (C_1-C_6) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_5-C_8) 环烯基、 (C_1-C_6) 卤代烷基、氰基、 $-\text{COR}^a$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^a$ 、 $-\text{CONR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{SR}^a$ 、 $-\text{SOR}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、硝基、 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ 、 $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{OR}^a$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^a$ 和 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ ；其中 R^a 和 R^b 如上定义。

[0273] 式(I)的亚组B

[0274] X和Z独立地选自下组： (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 和 $-\text{OR}^a$ ；

[0275] Y是H；

[0276] R^1 是 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基或杂环烷基；

[0277] R^2 是氢、 (C_1-C_3) 烷基或卤素，其中所述 (C_1-C_3) 烷基任选地被选自氨基和 (C_1-C_3) 烷基氨基的一至两个基团取代；

[0278] R^7 是氢、 (C_1-C_3) 烷基或烷氧基；

[0279] R^3 是氢、 (C_1-C_8) 烷基或卤素；

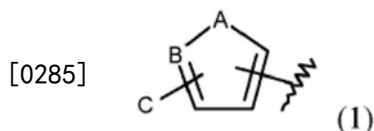
[0280] R^6 是氢、卤素、氰基、三氟甲基、氨基、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、芳基、杂芳基、芳基氨基、 (C_2-C_8) 炔基、芳基炔基、杂芳基炔基、 $-\text{SO}_2\text{R}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 或 $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{R}^b$ ；

[0281] 其中任何 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_2-C_8) 炔基、芳基炔基或杂芳基炔基基团任选地由独立选自下组的1、2或3个基团取代：卤素、 (C_1-C_6) 烷基、 (C_3-C_8) 环烷基、 (C_5-C_8) 环烯基、 (C_1-C_6) 卤代烷基、氰基、 $-\text{COR}^a$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^a$ 、 $-\text{CONR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{SR}^a$ 、 $-\text{SOR}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、硝基、 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ 、 $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{OR}^a$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^a$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ 、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基 (C_1-C_4) 烷基和杂芳基 (C_1-C_4) 烷基；

[0282] R^a 和 R^b 各自独立地是氢、(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、(C₃-C₈)环烷基、(C₅-C₈)环烯基、(C₆-C₁₀)二环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其中所述(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₂-C₈)炔基、环烷基、环烯基、二环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基基团任选地由独立地选自下组的1、2或3个基团取代:卤素、羟基、(C₁-C₄)烷氧基、氨基、(C₁-C₄)烷基氨基、((C₁-C₄)烷基)((C₁-C₄)烷基)氨基、-CO₂H、-CO₂(C₁-C₄)烷基、-CONH₂、-CONH(C₁-C₄)烷基、-CON((C₁-C₄)烷基)((C₁-C₄)烷基)、-SO₂(C₁-C₄)烷基、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₄)烷基和SO₂N((C₁-C₄)烷基)((C₁-C₄)烷基);

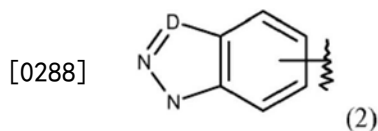
[0283] 或者 R^a 和 R^b 与其连接的氮一起形成5-8元的饱和或不饱和环,其任选地包含选自氧、氮和硫的其它杂原子,其中所述环任选地被独立地选自下组的1、2或3个基团取代:(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)卤素烷基、氨基、(C₁-C₄)烷基氨基、((C₁-C₄)烷基)((C₁-C₄)烷基)氨基、羟基、氧代、(C₁-C₄)烷氧基和(C₁-C₄)烷氧基(C₁-C₄)烷基,其中所述环任选地稠合至(C₃-C₈)环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环;

[0284] 或者 R^a 和 R^b 与其连接的氮一起形成6-~10-元的桥接二环系统,其任选地稠合至(C₃-C₈)环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基环。该定义中的芳基或杂芳基选自下组:呋喃、噻吩、吡咯、噁唑、噻唑、咪唑、吡唑、噁二唑、噻二唑重氮、三唑、四唑、苯并呋喃、苯并噻吩、苯并噁唑、苯并噻唑、苯基、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、三嗪、四嗪、喹啉、噌啉、喹唑啉、喹噁啉和萘啶或如下其它芳基或杂芳基基团的化合物:



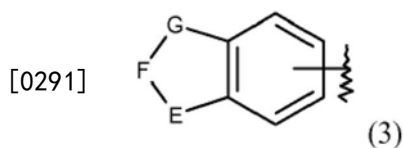
[0286] 其中在(1)中,

[0287] A是O、NH或S;B是CH或N,且C是氢或C₁-C₈烷基;或



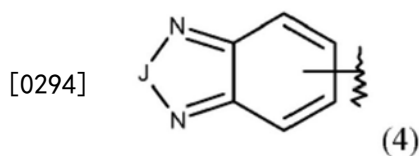
[0289] 其中在(2)中,

[0290] D是N或C任选地被氢或C₁-C₈烷基取代;或



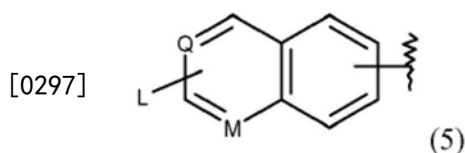
[0292] 其中在(3)中,

[0293] E是NH或CH₂;F是O或CO;且G是NH或CH₂;或



[0295] 其中在(4)中,

[0296] J是O、S或CO;或



[0298] 其中在 (5) 中,

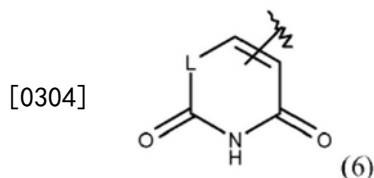
[0299] Q 是 CH 或 N;

[0300] M 是 CH 或 N; 和

[0301] L/ (5) 是氢、卤素、氨基、氰基、(C₁-C₈) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-CONR^aNR^aR^b、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-NR^aNR^aR^b、-NR^aNR^aC(O)R^b、-NR^aNR^aC(O)NR^aR^b或-OR^a,

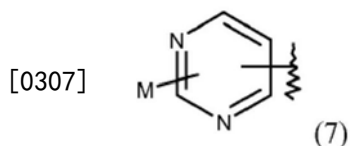
[0302] 其中任何 (C₁-C₈) 烷基或 (C₃-C₈) 环烷基基团任选地由独立选自下组的 1、2 或 3 个基团取代: (C₁-C₆) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基、(C₅-C₈) 环烯基、(C₁-C₆) 卤代烷基、氰基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-SR^a、-SOR^a、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、硝基、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aC(O)OR^a、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-OR^a、-OC(O)R^a和-OC(O)NR^aR^b,

[0303] 其中 R^a和 R^b如上定义;或



[0305] 其中在 (6) 中,

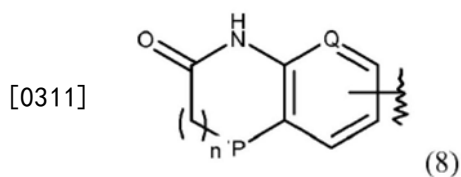
[0306] L/ (6) 是 NH 或 CH₂; 或



[0308] 其中在 (7) 中,

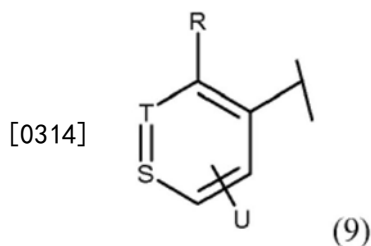
[0309] M/ (7) 是氢、卤素、氨基、氰基、(C₁-C₈) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基、杂环烷基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-CONR^aNR^aR^b、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-NR^aNR^aR^b、-NR^aNR^aC(O)R^b、-NR^aNR^aC(O)NR^aR^b或-OR^a,

[0310] 其中任何 (C₁-C₈) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基、杂环烷基基团任选地由独立选自下组的 1、2 或 3 个基团取代: (C₁-C₆) 烷基、(C₃-C₈) 环烷基、(C₅-C₈) 环烯基、(C₁-C₆) 卤代烷基、氰基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-SR^a、-SOR^a、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、硝基、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aC(O)OR^a、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-OR^a、-OC(O)R^a和-OC(O)NR^aR^b; 其中 R^a和 R^b如上定义;或



[0312] 其中在 (8) 中,

[0313] P是CH₂、NH、O或S；Q/(8)是CH或N；且n是0-2；或



[0315] 其中在(9)中，

[0316] S/(9)和T/(9)是C，或S/(9)是C且T/(9)是N，或S/(9)是N且T/(9)是C；

[0317] R是氢、氨基、甲基、三氟甲基、卤素；

[0318] U是氢、卤素、氨基、氰基、硝基、三氟甲基、(C₁-C₈)烷基、(C₃-C₈)环烷基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-NR^aNR^aR^b、-NR^aNR^aC(O)R^b、-OR^a或4-(1H-吡唑-4-基)，

[0319] 其中任何(C₁-C₈)烷基或(C₃-C₈)环烷基基团任选地由独立选自下组的1、2或3个基团取代：(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₅-C₈)环烯基、(C₁-C₆)卤代烷基、氰基、-COR^a、-CO₂R^a、-CONR^aR^b、-SOR^a、-SO₂R^a、-SO₂NR^aR^b、硝基、-NR^aR^b、-NR^aC(O)R^b、-NR^aC(O)NR^aR^b、-NR^aC(O)OR^a、-NR^aSO₂R^b、-NR^aSO₂NR^aR^b、-OR^a、-OC(O)R^a和-OC(O)NR^aR^b；其中R^a和R^b如上定义。

[0320] 式(I)的亚组C

[0321] X是甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、苄基、三氟甲基、四氢吡喃、羟甲基、甲氧基甲基或苄基；

[0322] Y是H；

[0323] Z是甲基、乙基、正丙基、异丙基、三氟甲基或苄基；

[0324] R¹是异丙基、叔丁基、环丁基、环戊基、环己基、(1-甲基乙基)环丙基、1,1-二氧化-四氢噻吩-3-基、1-Me-哌啶-4-基、四氢呋喃-3-基、四氢吡喃-4-基、N,N-二甲基-1-丙胺基(propanaminy1)、苄基或4-吡啶基；

[0325] R²是氢、(C₁-C₃)烷基或卤素，其中所述(C₁-C₃)烷基任选地被选自氨基和(C₁-C₃)烷基氨基的一至两个基团取代；

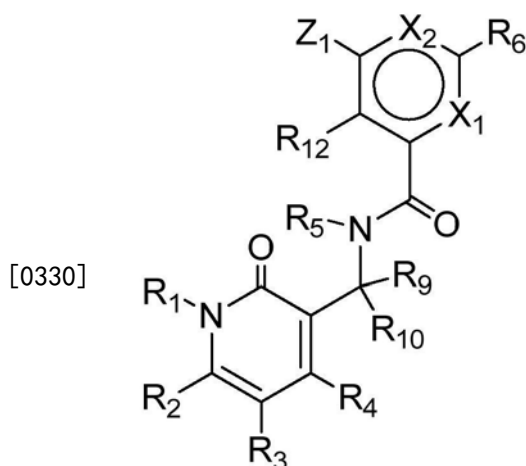
[0326] R⁷是氢、(C₁-C₃)烷基或烷氧基；

[0327] R³是H、甲基或Br；且

[0328] R⁶是甲基、二(1,1-二甲基乙基)、二(1-甲基乙基)、环丙基、丙基、二甲基氨基、乙基氨基、(2-羟基乙基)氨基、2-丙烯-1-基氨基、1-哌嗪基、1-哌啶基、4-吗啉基、4-哌啶基氨基、四氢-2H-吡喃-4-基氨基、苄基氨基、(苄基甲基)氨基、(4-吡啶基甲基)氨基、[2-(2-吡啶基氨基)乙基]氨基、2-(二甲基氨基)乙基]氨基、4-吡啶基氨基、4-(氨基羰基)苄基]氨基、3-羟基-3-甲基-1-丁炔-1-基、4-吡啶基乙炔基、苄基乙炔基、2-呋喃基、3-噻吩基、1H-吡唑-4-基、1H-吡唑-5-基、1H-吡唑-6-基、3-甲基-1H-吡唑-5-基、1H-1,2,3-苯并三唑-5-基、2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并咪唑-5-基、2-氧代-2,3-二氢-1H-咪唑-5-基、2-氧代-2,3-二氢-1H-咪唑-6-基、2,1,3-苯并氧杂二唑-5-基、2-氨基-6-喹啉基、2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢-5-嘧啶基、2-氨基-5-嘧啶基、7-氧代-1,5,6,7-四氢-1,8-萘啶-3-基、苄基、2-甲基苄基、2-硝基苄基、2-苄基乙基、3-氨基苄基、4-氨基苄基、4-氯苄基、4-氟苄基、4-(甲基氧基)苄基、3-(乙酰基氨基)苄基、4-(乙酰基氨基)苄基、4-(氨基羰基)苄基、4-(1H-吡唑-4-

基) 苯基、4-(氨基磺酰基) 苯基、4-(甲基磺酰基) 苯基、4-[(二甲基氨基) 磺酰基] 苯基、4-[(甲基氨基) 羰基] 苯基、4-[(甲基氨基) 磺酰基] 苯基、4-[(甲基磺酰基) 氨基] 苯基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-(4-吗啉基)-4-吡啶基、2-氨基-4-吡啶基、5-(甲氧基)-3-吡啶基、5-(甲基磺酰基)-3-吡啶基、5-[(环丙基磺酰基) 氨基]-6-(甲氧基)-3-吡啶基、5-[(苯基磺酰基) 氨基]-3-吡啶基、6-(4-甲基-1-哌嗪基)-3-吡啶基、6-(4-吗啉基)-3-吡啶基、6-(乙酰基氨基)-3-吡啶基、6-(二甲基氨基)-3-吡啶基、6-(甲氧基)-3-吡啶基、6-[(甲基氨基) 羰基]-3-吡啶基、6-[(甲基氨基) 磺酰基]-3-吡啶基、6-甲基-3-吡啶基或4-吡啶基氧基。(参见, 例如W02011/140325; W0 2011/140324; 和W0 2012/005805, 所述文献各通过引用其全文纳入本文。)

[0329] 适用于本发明方法的化合物还包括式(II)化合物:



(II),

[0331] 其中

[0332] X₁是N或CR₁₁;

[0333] X₂是N或CR₁₃;

[0334] Z₁是NR₇R₈、OR₇、SR₇或CR₇R₈R₁₄;

[0335] R₁、R₅、R₉和R₁₀各自独立地是H或C₁-C₆烷基, 其任选地被选自下组的一个或多个取代基取代: 卤素、羟基、COOH、C(O)O-C₁-C₆烷基、氰基、C₁-C₆烷氧基、氨基、单-C₁-C₆烷基氨基、二-C₁-C₆烷基氨基、C₃-C₈环烷基、C₆-C₁₀芳基、4~12元杂环烷基和5或6元杂芳基;

[0336] R₂、R₃和R₄各自独立地是-Q₁-T₁, 其中Q₁是键或C₁-C₃烷基接头, 其任选地被如下基团取代: 卤素、氰基、羟基或C₁-C₆烷氧基, 且T₁是H、卤素、羟基、COOH、氰基或R_{S1}, 其中R_{S1}是C₁-C₃烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、C₁-C₆烷氧基、C(O)O-C₁-C₆烷基、C₃-C₈环烷基、C₆-C₁₀芳基、氨基、单-C₁-C₆烷基氨基、二-C₁-C₆烷基氨基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基, 且R_{S1}任选地被选自下组的一个或多个取代基取代: 卤素、羟基、氧代、COOH、C(O)O-C₁-C₆烷基、氰基、C₁-C₆烷氧基、氨基、单-C₁-C₆烷基氨基、二-C₁-C₆烷基氨基、C₃-C₈环烷基、C₆-C₁₀芳基、4~12元杂环烷基和5~6元杂芳基;

[0337] R₆是C₆-C₁₀芳基或5或6元杂芳基, 其各自任选地被一个或多个-Q₂-T₂取代, 其中Q₂是键或C₁-C₃烷基接头, 其任选地被卤素、氰基、羟基或C₁-C₆烷氧基取代, 且T₂是H、卤素、氰基、-OR_a、-NR_aR_b、-(NR_aR_bR_c)⁺A⁻、-C(O)R_a、-C(O)OR_a、-C(O)NR_aR_b、-NR_bC(O)R_a、-NR_bC(O)OR_a、-S

(O) $2R_a$ 、 $-S(O)2NR_aR_b$ 或 RS_2 , 其中 R_a 、 R_b 和 R_c 各自独立地是H或 RS_3 , A^- 是药学上可接受的阴离子, RS_2 和 RS_3 各自独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基, 或 R_a 和 R_b 与其连接的N原子一起形成具有0或1个额外杂原子的4~12元杂环烷基环, 并且 RS_2 、 RS_3 和由 R_a 和 R_b 形成的4~12元杂环烷基环各自任选地被一个或多个 $-Q_3-T_3$ 取代, 其中 Q_3 是键或 C_1 - C_3 烷基接头, 其各自任选地被卤素、氰基、羟基或 C_1 - C_6 烷氧基取代, 并且 T_3 选自下组: 卤素、氰基、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基、5~6元杂芳基、 OR_d 、 $COOR_d$ 、 $-S(O)2R_d$ 、 $-NR_dR_e$ 和 $-C(O)NR_dR_e$, R_d 和 R_e 各自独立地是H或 C_1 - C_6 烷基, 或者 $-Q_3-T_3$ 是氧代; 或任何两个相邻的 $-Q_2-T_2$ 与其连接的原子形成5-6元环, 其任选包含选自N、O和S的1-4个杂原子并且任选地由选自下组的一个或多个取代基取代: 卤素、羟基、 $COOH$ 、 $C(O)O$ - C_1 - C_6 烷基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基和5或6元杂芳基; 限制条件是 $-Q_2-T_2$ 不是H;

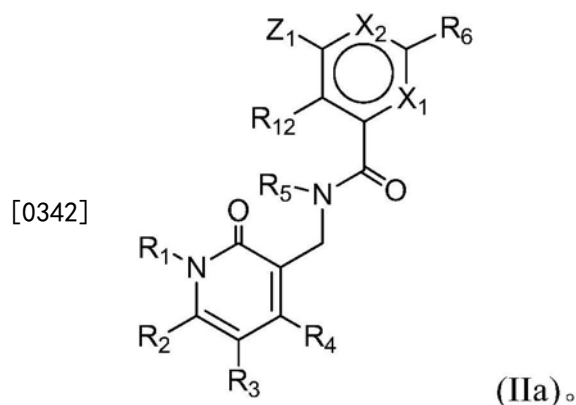
[0338] R_7 是 $-Q_4-T_4$, 其中 Q_4 是键、 C_1 - C_4 烷基接头或 C_2 - C_4 烯基接头, 各接头任选地被卤素、氰基、羟基或 C_1 - C_6 烷氧基取代, 并且 T_4 是H、卤素、氰基、 NR_fR_g 、 $-OR_f$ 、 $-C(O)R_f$ 、 $-C(O)OR_f$ 、 $-C(O)NR_fR_g$ 、 $-C(O)NR_fOR_g$ 、 $-NR_fC(O)R_g$ 、 $-S(O)2R_f$ 或 RS_4 , 其中 R_f 和 R_g 各自独立地是H或 RS_5 , RS_4 和 RS_5 各自独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基, 并且 RS_4 和 RS_5 各自任选地被一个或多个 $-Q_5-T_5$ 取代, 其中 Q_5 是键、 $C(O)$ 、 $C(O)NR_k$ 、 $NR_kC(O)$ 、 $S(O)_2$ 或 C_1 - C_3 烷基接头, R_k 是H或 C_1 - C_6 烷基, 并且 T_5 是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、羟基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基、5或6元杂芳基或 $S(O)_qR_q$, 其中 q 是0、1或2且 R_q 是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基, 并且 T_5 任选地被选自下组的一个或多个取代基取代: 卤素、 C_1 - C_6 烷基、羟基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基和5或6元杂芳基(不包括 T_5 是H、卤素、羟基或氰基时); 或 $-Q_5-T_5$ 是氧代; 限制条件是 R_7 不是H;

[0339] R_8 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 各自是H、卤素、羟基、 $COOH$ 、氰基、 RS_6 、 OR_{S6} 或 $COOR_{S6}$, 其中 RS_6 是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_8 环烷基、4~12元杂环烷基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基或二- C_1 - C_6 烷基氨基, 并且 RS_6 任选地由选自下组的一种或多种取代基取代: 卤素、羟基、 $COOH$ 、 $C(O)O$ - C_1 - C_6 烷基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基和二- C_1 - C_6 烷基氨基; 或 R_7 和 R_8 与其连接的N一起形成具有0~2个额外杂原子的4~11元杂环烷基环, 或 R_7 和 R_8 与其连接的C原子一起形成 C_3 - C_8 环烷基或具有1~3个杂原子的4~11元杂环烷基环, 并且所述由 R_7 和 R_8 形成的4~11元杂环烷基环或 C_3 - C_8 环烷基各自任选地被一个或多个 $-Q_6-T_6$ 取代, 其中 Q_6 是键、 $C(O)$ 、 $C(O)NR_m$ 、 $NR_mC(O)$ 、 $S(O)_2$ 或 C_1 - C_3 烷基接头, R_m 是H或 C_1 - C_6 烷基, 且 T_6 是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、羟基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基、5或6元杂芳基或 $S(O)_pR_p$, 其中 p 是0、1或2, 并且 R_p 是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基, 且 T_6 任选地由选自下组的一个或多个取代基取代: 卤素、 C_1 - C_6 烷基、羟基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基和5或6元杂芳基(不包括 T_6 是H、卤素、羟基或氰基时); 或 $-Q_6-T_6$ 是氧代; 和

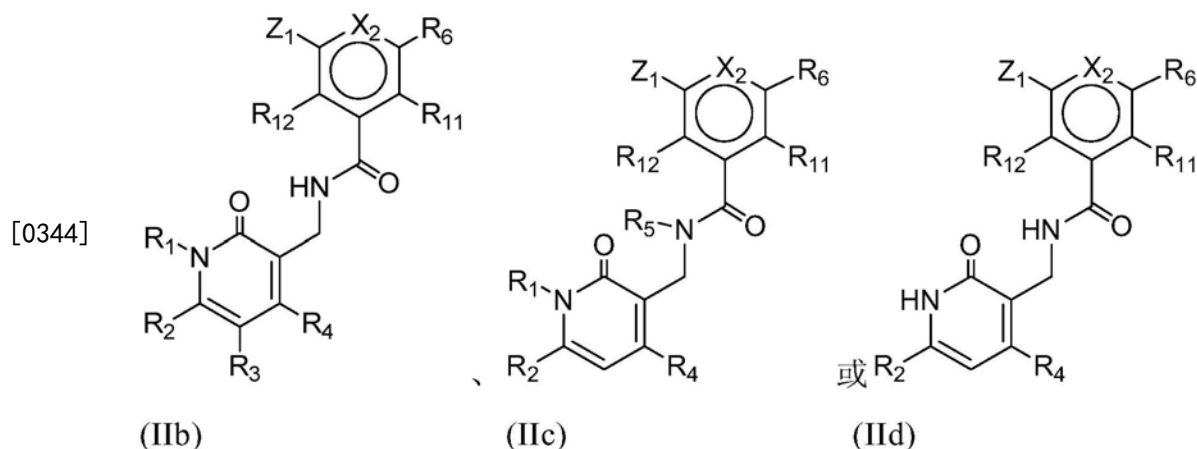
[0340] R_{14} 不存在, 或是H或 C_1 - C_6 烷基, 其任选地被选自下组的一个或多个取代基取代: 卤素、羟基、 $COOH$ 、 $C(O)O$ - C_1 - C_6 烷基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基

氨基、C₃-C₈环烷基、C₆-C₁₀芳基、4~12元杂环烷基和5或6元杂芳基。

[0341] 式(II)化合物的一个子集包括式(IIa)的那些化合物：



[0343] 式(II)化合物的另一子集包括式(IIb)、(IIc)或(IId)的那些：



[0345] 式(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)和(IId)的化合物可包括以下一个或多个特征：

[0346] 例如，X₁是CR₁₁且X₂是CR₁₃。

[0347] 例如，X₁是CR₁₁且X₂是N。

[0348] 例如，X₁是N且X₂是CR₁₃。

[0349] 例如，X₁是N且X₂是N。

[0350] 例如，Z₁是NR₇R₈。

[0351] 例如，Z₁是CR₇R₈R₁₄。

[0352] 例如，Z₁是OR₇。

[0353] 例如，Z₁是SR₇。

[0354] 例如，R₆是由一个或多个-Q₂-T₂取代的苯基。

[0355] 例如，R₆是含有选自N、O和S的1-3个额外杂原子的5~6元杂芳基，并且任选地由一个或多个-Q₂-T₂取代。

[0356] 例如，R₆是吡啶基、吡唑基、嘧啶基、喹啉基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、呋喃基或噻吩基，其各自任选地被一个或多个-Q₂-T₂取代。

[0357] 例如，Q₂是键。

[0358] 例如，Q₂是未取代的C₁-C₃烷基接头。

[0359] 例如，T₂是C₁-C₆烷基或C₆-C₁₀芳基，其任选地被一个或多个-Q₃-T₃取代。

[0360] 例如, T_2 是未取代的取代的直链 C_1-C_6 或支链 C_3-C_6 烷基,包括但不限于,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、仲戊基和正己基。

[0361] 例如, T_2 是苯基。

[0362] 例如, T_2 是卤素(例如,氟、氯、溴和碘)。

[0363] 例如, T_2 是4~7元杂环烷基(例如,氮杂环丁烷基(azetidiny1)、氧杂环丁基(oxetany1)、硫杂环丁基(thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃、吗啉基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepany1)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基等),任选地被一个或多个 $-Q_3-T_3$ 取代。

[0364] 例如, T_2 是 $-OR_a$ 、 $-NR_aR_b$ 、 $-(NR_aR_bR_c)^+A^-$ 、 $-C(O)R_a$ 、 $-C(O)OR_a$ 、 $-C(O)NR_aR_b$ 、 $-NR_bC(O)R_a$ 、 $-NR_bC(O)OR_a$ 、 $-S(O)_2R_a$ 或 $-S(O)_2NR_aR_b$ 。

[0365] 例如, T_2 是 $-NR_aR_b$ 或 $-C(O)NR_aR_b$,其中 R_a 和 R_b 各自独立地是H或 C_1-C_6 烷基,或 R_a 和 R_b 与其连接的N原子一起形成具有0或1个额外杂原子的4~7元杂环烷基环,所述 C_1-C_6 烷基和4~7元杂环烷基环任选地被一个或多个 $-Q_3-T_3$ 取代。

[0366] 例如, Q_2 是 C_1-C_3 烷基接头,其任选地被卤素或羟基取代。

[0367] 例如, Q_2 是键或甲基接头,并且 T_2 是H、卤素、 $-OR_a$ 、 $-NR_aR_b$ 、 $-(NR_aR_bR_c)^+A^-$ 或 $-S(O)_2NR_aR_b$ 。

[0368] 例如, R_a 、 R_b 和 R_c 各自独立地是H或 C_1-C_6 烷基,其任选地被一个或多个 $-Q_3-T_3$ 取代。

[0369] 例如, R_a 、 R_b 和 R_c 之一是H。

[0370] 例如, R_a 和 R_b 与其连接的N原子形成除该N以外具有0或1个额外杂原子的4~7元杂环烷基环(例如,氮杂环丁烷基(azetidiny1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、吗啉基、1,4-二氮杂环庚烷基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepany1)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基等),并且该环任选地被一个或多个 $-Q_3-T_3$ 取代。

[0371] 例如, $-Q_3-T_3$ 是氧代。

[0372] 例如, T_2 是4~7元杂环烷基或 C_3-C_8 环烷基,并且一个或多个 $-Q_3-T_3$ 是氧代。

[0373] 例如, Q_3 是键,或未取代或经取代的 C_1-C_3 烷基接头。

[0374] 例如, T_3 是H、卤素、4~7元杂环烷基、 C_1-C_3 烷基、 OR_d 、 $COOR_d$ 、 $-S(O)_2R_d$ 或 $-NR_dR_e$ 。

[0375] 例如, R_d 和 R_e 之一是H。

[0376] 例如, R_7 是 $-C(O)R_f$ 。

[0377] 例如, R_7 是 $-C(O)R_f$,其中 R_f 是 C_3-C_8 环烷基。

[0378] 例如, R_7 是被一个或多个 $-Q_5-T_5$ 取代的 C_6-C_{10} 芳基。

[0379] 例如, R_7 是任选被一个或多个 $-Q_5-T_5$ 取代的苯基。

[0380] 例如, R_7 是任选被一个或多个 $-Q_5-T_5$ 取代的 C_1-C_6 烷基。

[0381] 例如, R_7 是任选被一个或多个 $-Q_5-T_5$ 取代的 C_3-C_8 环烷基。

[0382] 例如, R_7 是4~7元杂环烷基(例如,氮杂环丁烷基(azetidiny1)、氧杂环丁基(oxetany1)、硫杂环丁基(thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二

氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃和吗啉基等), 其任选地被一个或多个-Q₅-T₅取代。

[0383] 例如, R₇是任选被一个或多个-Q₅-T₅取代的5~6元杂环烷基。

[0384] 例如, R₇是异丙基。

[0385] 例如, R₇是吡咯烷基、哌啶基、四氢吡喃、四氢-2H-噻喃基、环戊基或环己基、环庚基, 其各自任选地被一个或多个-Q₅-T₅取代。

[0386] 例如, R₇是环戊基、环己基或四氢-2H-噻喃基, 其各自任选地被一个或多个-Q₅-T₅取代。

[0387] 例如, 一个或多个-Q₅-T₅是氧代。

[0388] 例如, R₇是1-氧化-四氢-2H-噻喃基或1,1-二氧化-四氢-2H-噻喃基。

[0389] 例如, Q₅是键且T₅是氨基、单-C₁-C₆烷基氨基、二-C₁-C₆烷基氨基。

[0390] 例如, Q₅是NHC(O) 且T₅是C₁-C₆烷基或C₁-C₆烷氧基。

[0391] 例如, T₄是4~7元杂环烷基或C₃-C₈环烷基, 并且一个或多个-Q₅-T₅是氧代。

[0392] 例如, T₅是H、卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₃-C₈环烷基、C₆-C₁₀芳基, 或4~7元杂环烷基。

[0393] 例如, Q₅是键且T₅是C₁-C₆烷基、C₃-C₈环烷基或4~7元杂环烷基。

[0394] 例如, Q₅是CO、S(O)₂或NHC(O); 且T₅是C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₃-C₈环烷基或4~7元杂环烷基。

[0395] 例如, T₅是C₁-C₆烷基或C₁-C₆烷氧基, 其各自任选地被卤素、羟基、氰基、C₁-C₆烷氧基、氨基、单-C₁-C₆烷基氨基、二-C₁-C₆烷基氨基或C₃-C₈环烷基取代。

[0396] 例如, Q₅是C₁-C₃烷基接头且T₅是H或C₆-C₁₀芳基。

[0397] 例如, Q₅是C₁-C₃烷基接头且T₅是C₃-C₈环烷基、4~7元杂环烷基或S(O)_qR_q。

[0398] 例如, R₁₁是H。

[0399] 例如, R₂和R₄各自独立地是H或C₁-C₆烷基, 其任选地被氨基、单-C₁-C₆烷基氨基、二-C₁-C₆烷基氨基或C₆-C₁₀芳基取代。

[0400] 例如, R₂和R₄各自独立地是C₁-C₃烷基, 其任选地被C₁-C₆烷氧基取代。

[0401] 例如, R₂和R₄各自是甲基。

[0402] 例如, R₁是H。

[0403] 例如, R₁₂是H、甲基、乙基、乙烯基或卤素。

[0404] 例如, R₁₂是甲基。

[0405] 例如, R₁₂是乙基。

[0406] 例如, R₁₂是乙烯基。

[0407] 例如, R₈是H、甲基、乙基或乙烯基。

[0408] 例如, R₈是甲基。

[0409] 例如, R₈是乙基。

[0410] 例如, T₈是4~7元杂环烷基(例如, 氮杂环丁烷基(azetidiny1)、氧杂环丁基(oxetany1)、硫杂环丁基(thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃、吗啉基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepany1)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基等)。

[0411] 例如, R_8 是四氢吡喃。

[0412] 例如, R_8 是四氢吡喃且 R_7 是 $-Q_4-T_4$, 其中 Q_4 是键或 C_1-C_4 烷基接头且 T_4 是 H 、 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_8 环烷基或 4~7 元杂环烷基。

[0413] 例如, Z_1 是 NR_7R_8 或 $CR_7R_8R_{14}$, 其中 R_7 和 R_8 与其连接的原子一同形成具有 1~3 个杂原子的 4~11 元杂环烷基环 (例如, 氮杂环丁烷基 (azetidiny1)、氧杂环丁基 (oxetany1)、硫杂环丁基 (thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃和吗啉基等) 或 C_3-C_8 环烷基, 其任选地被一个或多个 $-Q_6-T_6$ 取代。

[0414] 例如, 由 R_7 和 R_8 形成的环选自下组: 氮杂环丁烷基 (azetidiny1)、吡咯烷基、哌啶基、吗啉基、哌嗪基和环己烯基, 其各自任选地被一个 $-Q_6-T_6$ 取代。

[0415] 例如, $-Q_6-T_6$ 是氧代。

[0416] 例如, T_6 是 H 、卤素、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基, 或 4~7 元杂环烷基。

[0417] 例如, Q_6 是键且 T_6 是 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_8 环烷基或 4~7 元杂环烷基。

[0418] 例如, Q_6 是 CO 、 $S(O)_2$ 或 $NHC(O)$; 且 T_6 是 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、 C_3-C_8 环烷基或 4~7 元杂环烷基。

[0419] 例如, T_6 是 C_1-C_6 烷基或 C_1-C_6 烷氧基, 其各自任选地被卤素、羟基、氰基、 C_1-C_6 烷氧基、氨基、单- C_1-C_6 烷基氨基、二- C_1-C_6 烷基氨基或 C_3-C_8 环烷基取代。

[0420] 例如, Q_6 是 C_1-C_3 烷基接头且 T_6 是 H 或 C_6-C_{10} 芳基。

[0421] 例如, Q_6 是 C_1-C_3 烷基接头且 T_6 是 C_3-C_8 环烷基、4~7 元杂环烷基或 $S(O)_pR_p$ 。

[0422] 例如, R_p 和 R_q 各自独立地是 C_1-C_6 烷基。

[0423] 例如, R_{13} 是 H 或甲基。

[0424] 例如, R_{13} 是 H 。

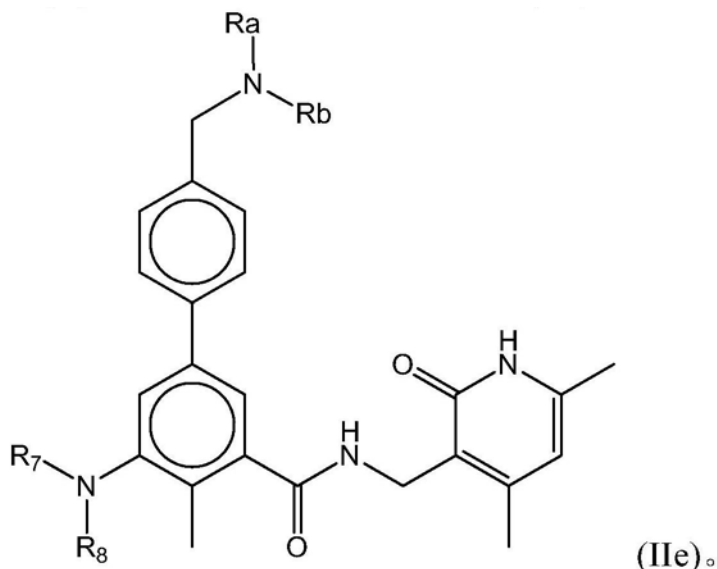
[0425] 例如, R_3 是 H 。

[0426] 例如, A^- 是 Br^- 。

[0427] 例如, R_5 、 R_9 和 R_{10} 各自是 H 。

[0428] 式 (II) 化合物的另一个子集包括式 (IIe) 的那些化合物:

[0429]



[0430] 式 (IIe) 的化合物可包括以下一项或多项特征：

[0431] 例如， R_a 和 R_b 各自独立地是H或 C_1 - C_6 烷基，其任选地被一个或多个-Q₃-T₃取代。

[0432] 例如， R_a 和 R_b 之一是H。

[0433] 例如， R_a 和 R_b 与其连接的N原子形成除该N以外具有0或1个的额外杂原子的4~7元杂环烷基环(例如，氮杂环丁烷基(azetidiny1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、吗啉基、1,4-二氮杂环庚烷基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepany1)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基等)，并且该环任选地被一个或多个-Q₃-T₃取代。

[0434] 例如， R_a 和 R_b 与其连接的N原子一同形成氮杂环丁烷基、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基或吗啉基，并且该环任选地被一个或多个-Q₃-T₃取代。

[0435] 例如，一个或多个-Q₃-T₃是氧代。

[0436] 例如，Q₃是键，或未取代或经取代的 C_1 - C_3 烷基接头。

[0437] 例如，T₃是H、卤素、4~7元杂环烷基、 C_1 - C_3 烷基、OR_d、COOR_d、-S(O)₂R_d或-NR_dR_e。

[0438] 例如， R_d 和 R_e 之一是H。

[0439] 例如，R₇是 C_3 - C_8 环烷基或4~7元杂环烷基，其任选地被一个或多个-Q₅-T₅取代。

[0440] 例如，R₇是哌啶基、四氢吡喃、四氢-2H-噻喃基、环戊基、环己基、吡咯烷基或环庚基，其各自任选地被一个或多个-Q₅-T₅取代。

[0441] 例如，R₇是环戊基、环己基或四氢-2H-噻喃基，其各自任选地被一个或多个-Q₅-T₅取代。

[0442] 例如，Q₅是NHC(O)且T₅是 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基。

[0443] 例如，一个或多个-Q₅-T₅是氧代。

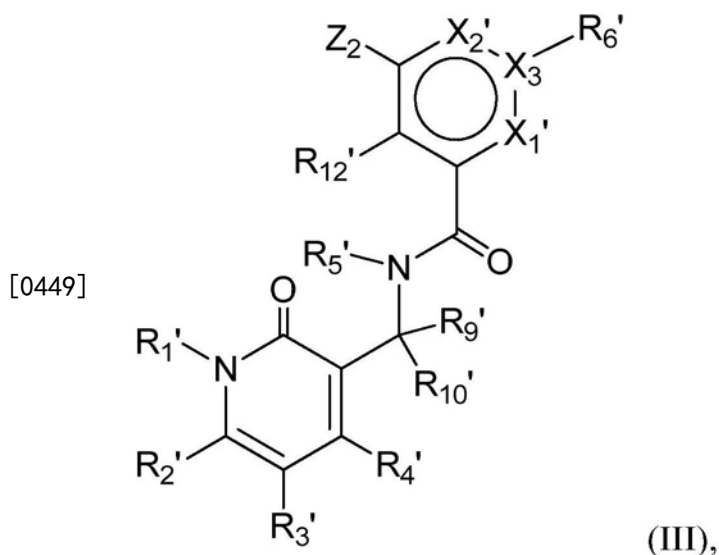
[0444] 例如，R₇是1-氧化-四氢-2H-噻喃基或1,1-二氧化-四氢-2H-噻喃基。

[0445] 例如，Q₅是键且T₅是氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基。

[0446] 例如，Q₅是CO、S(O)₂或NHC(O)；且T₅是 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_3 - C_8 环烷基或4~7元杂环烷基。

[0447] 例如，R₈是H、甲基或乙基。

[0448] 适用于本发明方法的化合物还包括式(III)化合物：



[0450] 或其药学上可接受的盐或酯。式 (III) 中：

[0451] X_1' 是N或 CR_{11}' ；

[0452] X_2' 是N或 CR_{13}' ；

[0453] X_3 是N或C, 且 X_3 是N时, R_6' 不存在；

[0454] Z_2 是 NR_7' R_8' 、 OR_7' 、 $S(O)_a$ R_7' 或 CR_7' R_8' R_{14}' ，其中 a' 是0、1或2；

[0455] R_1' 、 R_5' 、 R_9' 和 R_{10}' 各自独立地是H或 C_1 - C_6 烷基, 其任选地被选自下组的一个或多个取代基取代: 卤素、羟基、 $COOH$ 、 $C(O)O$ - C_1 - C_6 烷基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基和5或6元杂芳基；

[0456] R_2' 、 R_3' 和 R_4' 各自独立地是 $-Q_1'$ $-T_1'$ ，其中 Q_1' 是键或 C_1 - C_3 烷基接头, 其任选地被如下基团取代: 卤素、氰基、羟基或 C_1 - C_6 烷氧基, 且 T_1' 是H、卤素、羟基、 $COOH$ 、氰基、叠氮基或 RS_1' ，其中 RS_1' 是 C_1 - C_3 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_1 - C_6 烷氧基、 $C(O)O$ - C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基, 且 RS_1' 任选地被选自下组的一个或多个取代基取代: 卤素、羟基、氧代、 $COOH$ 、 $C(O)O$ - C_1 - C_6 烷基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基和5~6元杂芳基；

[0457] R_6' 是H、卤素、氰基、叠氮基、 OR_a' 、 $-NR_a'$ R_b' 、 $-C(O)R_a'$ 、 $-C(O)OR_a'$ 、 $-C(O)NR_a'$ R_b' 、 $-NR_b'$ $C(O)R_a'$ 、 $-S(O)_b$ R_a' 、 $-S(O)_b$ NR_a' R_b' 或 RS_2' ，其中 RS_2' 是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_8 环烷基或4~12元杂环烷基, b' 是0、1或2, R_a' 和 R_b' 各自独立地是H或 RS_3' ，且 RS_3' 是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基；或 R_a' 和 R_b' 与其相连的N原子一同形成具有0或1个额外杂原子的4~12元杂环烷基环；并且由 R_a' 和 R_b' 形成的所述4~12元杂环烷基环和 RS_2' 、 RS_3' 各自任选地被一个或多个 $-Q_2'$ $-T_2'$ 取代, 其中 Q_2' 是键或 C_1 - C_3 烷基接头, 其各自任选地被卤素、氰基、羟基或 C_1 - C_6 烷氧基取代, 并且 T_2' 是H、卤素、氰基、 $-OR_c'$ 、 $-NR_c'$ R_d' 、 $-C(O)R_c'$ 、 $-C(O)OR_c'$ 、 $-C(O)NR_c'$ R_d' 、 $-NR_d'$ $C(O)R_c'$ 、 $-NR_d'$ $C(O)OR_c'$ 、 $-S(O)_2R_c'$ 、 $-S(O)_2NR_c'$ R_d' 或 RS_4' ，其中 R_c' 和 R_d' 各自独立地是H或 RS_5' ， RS_4' 和 RS_5' 各自独立地是 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基, 或5或6元杂芳基, 或 R_c' 和 R_d' 与其相连的N原子一同形成具有0或1个额外杂原子的4~12元杂环烷基环, 并且由 R_c' 和 R_d' 形成的4~12元杂环烷基和 RS_4' 、 RS_5' 各自任选地被一个或多个 $-Q_3'$ $-T_3'$ 取

代,其中 Q_3' 是键或 C_1-C_3 烷基接头,其各自任选地被卤素、氰基、羟基或 C_1-C_6 烷氧基取代,并且 T_3' 选自下组:卤素、氰基、 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基、5或6元杂芳基、 OR_e' 、 $COOR_e'$ 、 $-S(O)_2R_e'$ 、 $-NR_e'R_f'$ 和 $-C(O)NR_e'R_f'$, R_e' 和 R_f' 各自独立地是H或 C_1-C_6 烷基,或 $-Q_3'-T_3'$ 是氧代;或 $-Q_2'-T_2'$ 是氧代;限制条件是 $-Q_2'-T_2'$ 不是H;

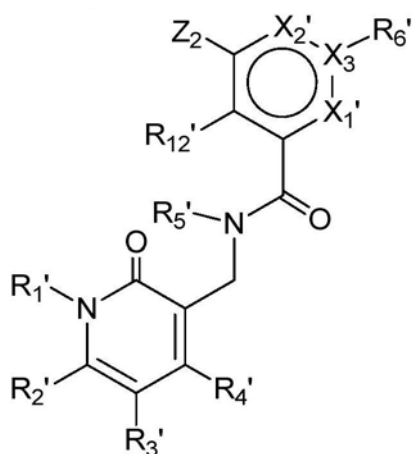
[0458] R_7' 是 $-Q_4'-T_4'$,其中 Q_4' 是键、 C_1-C_4 烷基接头或 C_2-C_4 烯基接头,各接头任选地被卤素、氰基、羟基或 C_1-C_6 烷氧基取代,并且 T_4' 是H、卤素、氰基、 $NR_g'R_h'$ 、 $-OR_g'$ 、 $-C(O)R_g'$ 、 $-C(O)OR_g'$ 、 $-C(O)NR_g'R_h'$ 、 $-C(O)NR_g'OR_h'$ 、 $-NR_g'C(O)R_h'$ 、 $-S(O)_2R_g'$ 或 RS_6' ,其中 R_h' 和 R_g' 各自独立地是H或 RS_7' , RS_6' 和 RS_7' 各自独立地是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基,并且 RS_6' 和 RS_7' 各自任选地被一个或多个 $-Q_5'-T_5'$ 取代,其中 Q_5' 是键、 $C(O)$ 、 $C(O)NR_k'$ 、 $NR_k'C(O)$ 、 $S(O)_2$ 或 C_1-C_3 烷基接头, R_k' 是H或 C_1-C_6 烷基,并且 T_5' 是H、卤素、 C_1-C_6 烷基、羟基、氰基、 C_1-C_6 烷氧基、氨基、单- C_1-C_6 烷基氨基、二- C_1-C_6 烷基氨基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基、5或6元杂芳基或 $S(O)_q'R_q'$,其中 q' 是0、1或2且 R_q' 是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基,并且 T_5' 任选地被选自下组的一个或多个取代基取代:卤素、 C_1-C_6 烷基、羟基、氰基、 C_1-C_6 烷氧基、氨基、单- C_1-C_6 烷基氨基、二- C_1-C_6 烷基氨基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基和5或6元杂芳基(不包括 T_5 是H、卤素、羟基或氰基时);或 $-Q_5'-T_5'$ 是氧代;限制条件是 R_7' 不是H;

[0459] R_8' 、 R_{11}' 、 R_{12}' 和 R_{13}' 各自独立地是H、卤素、羟基、 $COOH$ 、氰基、 RS_8' 、 OR_{S8}' 或 $COOR_{S8}'$,其中 RS_8' 是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_3-C_8 环烷基、4~12元杂环烷基、氨基、单- C_1-C_6 烷基氨基或二- C_1-C_6 烷基氨基,并且 RS_8' 任选地由选自下组的一种或多种取代基取代:卤素、羟基、 $COOH$ 、 $C(O)O-C_1-C_6$ 烷基、氰基、 C_1-C_6 烷氧基、氨基、单- C_1-C_6 烷基氨基和二- C_1-C_6 烷基氨基;或 R_7' 和 R_8' 与其连接的N一起形成具有0~2个额外杂原子的4~12元杂环烷基环,或 R_7' 和 R_8' 与其连接的C原子一起形成 C_3-C_8 环烷基或具有1~3个杂原子的4~12元杂环烷基环,并且所述由 R_7' 和 R_8' 形成的4~12元杂环烷基环或 C_3-C_8 环烷基任选地被一个或多个 $-Q_6'-T_6'$ 取代,其中 Q_6' 是键、 $C(O)$ 、 $C(O)NR_m'$ 、 $NR_m'C(O)$ 、 $S(O)_2$ 或 C_1-C_3 烷基接头, R_m' 是H或 C_1-C_6 烷基,且 T_6' 是H、卤素、 C_1-C_6 烷基、羟基、氰基、 C_1-C_6 烷氧基、氨基、单- C_1-C_6 烷基氨基、二- C_1-C_6 烷基氨基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基、5或6元杂芳基或 $S(O)_p'R_p'$,其中 p' 是0、1或2,并且 R_p' 是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基或5或6元杂芳基,且 T_6 任选地由选自下组的一个或多个取代基取代:卤素、 C_1-C_6 烷基、羟基、氰基、 C_1-C_6 烷氧基、氨基、单- C_1-C_6 烷基氨基、二- C_1-C_6 烷基氨基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基和5或6元杂芳基(不包括 T_6' 是H、卤素、羟基或氰基时);或 $-Q_6'-T_6'$ 是氧代;和

[0460] R_{14}' 不存在或是H或 C_1-C_6 烷基,其任选地被选自下组的一个或多个取代基取代:卤素、羟基、 $COOH$ 、 $C(O)O-C_1-C_6$ 烷基、氰基、 C_1-C_6 烷氧基、氨基、单- C_1-C_6 烷基氨基、二- C_1-C_6 烷基氨基、 C_3-C_8 环烷基、 C_6-C_{10} 芳基、4~12元杂环烷基和5或6元杂芳基。

[0461] 式(III)化合物的一个子集包括式(IIIa)的那些化合物:

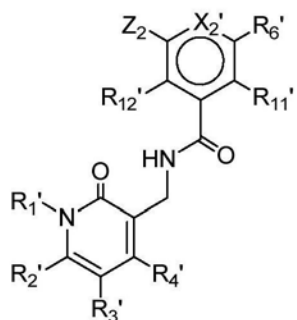
[0462]



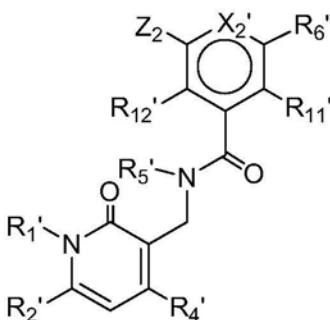
(IIIa)。

[0463] 式 (III) 化合物的另一子集包括式 (IIIb)、(IIIc) 或 (IIId) 的那些：

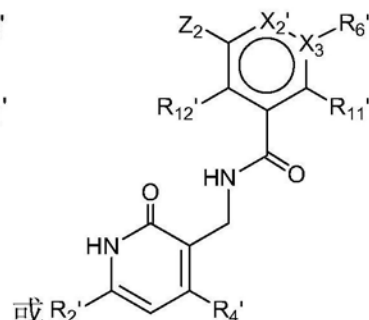
[0464]



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

[0465] 式 (III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc) 和 (IIId) 的化合物可包括以下一个或多个特征：

[0466] 例如，式 (III) 的化合物不是

[0467] N-(5-(((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)氨基甲酰基)-2-甲基苯基)呋喃-2-氨基甲酰、

[0468] N,N'-(5-(((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)氨基甲酰基)-1,3-亚苯基)二乙酰基胺、

[0469] N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-3-特戊酰胺基苯甲酰胺、

[0470] 3-(3,4-二氢-2H-苯并[b][1,4]二氧杂环庚-7-磺酰氨基)-N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)苯酰胺、

[0471] N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-3,5-二甲氧基苯酰胺、

[0472] N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-3,4,5-三甲氧基苯酰胺、

[0473] 3-烯丙基-N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-4,5-二甲氧基苯酰胺、

[0474] 4-(2-氨基-2-氧代乙氧基)-3-氯-N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-甲氧基苯酰胺、

[0475] 3-氯-N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-4-羟基-5-甲氧基苯酰胺、或

[0476] 3-溴-N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-甲氧基-4-丙氧基苯酰胺。

- [0477] 例如, X_1' 是 CR_{11}' 且 X_2' 是 CR_{13}' 。
- [0478] 例如, X_1' 是 CR_{11}' 且 X_2' 是 N。
- [0479] 例如, X_1' 是 N 且 X_2' 是 CR_{13}' 。
- [0480] 例如, X_1' 是 N 且 X_2' 是 N。
- [0481] 例如, X_3 是 C。
- [0482] 例如, X_3 是 N 且 R_6' 不存在。
- [0483] 例如, Z_2 是 $NR_7' R_8'$ 。
- [0484] 例如, Z_2 是 $CR_7' R_8' R_{14}'$ 。
- [0485] 例如, Z_2 是 OR_7' 。
- [0486] 例如, Z_2 是 $S(O)_a' R_7'$, 其中 a' 是 0、1 或 2。
- [0487] 例如, R_6' 是 H。
- [0488] 例如, R_6' 是卤素 (例如, 氟、氯、溴和碘)。
- [0489] 例如, R_6' 是任选被一个或多个 $-Q_2'-T_2'$ 取代的 C_1-C_3 烷基。
- [0490] 例如, R_6' 是 CF_3 。
- [0491] 例如, R_6' 是各自任选被一个或多个 $-Q_2'-T_2'$ 取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或 C_3-C_6 环烷基。
- [0492] 例如, R_6' 是乙烯基。
- [0493] 例如, R_6' 是乙炔基。
- [0494] 例如, R_6' 是由一个或多个 $-Q_2'-T_2'$ 取代的乙炔基, 其中 Q_2' 是键或 C_1-C_3 烷基接头且 T_2' 是 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_6 环烷基或 4~7 元杂环烷基 (例如, 氮杂环丁烷基 (azetidiny1)、氧杂环丁基 (oxetany1)、硫杂环丁基 (thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基 (1,4-oxazepany1)、2-氧杂-5-氮杂二环 [2.2.1] 庚基、2,5-二氮杂二环 [2.2.1] 庚基和吗啉基等), 任选地被一个或多个 $-Q_3'-T_3'$ 取代。
- [0495] 例如, R_6' 是氰基。
- [0496] 例如, R_6' 是叠氮基。
- [0497] 例如, R_6' 是 $C(O)H$ 。
- [0498] 例如, R_6' 是 OR_a' 或 $-C(O)R_a'$ 。
- [0499] 例如, R_a' 是 C_1-C_6 烷基或 4~7 元杂环烷基 (例如, 氮杂环丁烷基 (azetidiny1)、氧杂环丁基 (oxetany1)、硫杂环丁基 (thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基 (1,4-oxazepany1)、2-氧杂-5-氮杂二环 [2.2.1] 庚基、2,5-二氮杂二环 [2.2.1] 庚基和吗啉基等), 其任选地被一个或多个 $-Q_2'-T_3'$ 取代。
- [0500] 例如, R_6' 是 4~7 元杂环烷基 (例如, 氮杂环丁烷基 (azetidiny1)、氧杂环丁基 (oxetany1)、硫杂环丁基 (thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基 (1,4-

oxazepanyl)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等),任选地被一个或多个 $-Q_2'-T_2'$ 取代。

[0501] 例如, R_6' 是哌啶基、2,2,6,6-四甲基-哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、2,2,6,6-四甲基-1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、吗啉基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基或吡咯烷基,其各自任选地被一个或多个 $-Q_2'-T_2'$ 取代。

[0502] 例如, R_6' 是4~7元杂环烷基,其任选地被一个或多个 $-Q_2'-T_2'$ 取代,并且 $-Q_2'-T_2'$ 是氧代或 Q_2' 是键且 T_2' 是 $-OR_c'$ 、 $-NR_c'R_d'$ 、 $-C(O)R_c'$ 、 $-C(O)OR_c'$ 、 $-S(O)_2R_c'$ 、 C_1-C_6 烷基或4~7元杂环烷基,其在 R_c' 或 R_d' 不是H时各自任选地被一个或多个 $-Q_3'-T_3'$ 取代。

[0503] 例如, R_6' 是 $-NR_a'R_b'$ 、 $-C(O)R_a'$ 、 $-C(O)OR_a'$ 、 $-C(O)NR_a'R_b'$ 、 $-NR_b'C(O)R_a'$ 、 $-SR_a'$ 、 $-S(O)_2R_a'$ 或 $-S(O)_2NR_a'R_b'$ 。

[0504] 例如, R_a' 和 R_b' 各自独立地是H、 C_1-C_6 烷基或 C_3-C_8 环烷基,其任选地被一个或多个 $-Q_2'-T_2'$ 取代。

[0505] 例如, R_a' 和 R_b' 之一是H。

[0506] 例如, R_a' 和 R_b' 与其连接的N原子形成除该N以外具有0或1个的额外杂原子的4~7元杂环烷基环(例如,氮杂环丁烷基(azetidiny)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、1,4-二氮杂环庚烷基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepanyl)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等),并且该环任选地被一个或多个 $-Q_2'-T_2'$ 取代。

[0507] 例如, $-Q_2'-T_2'$ 是氧代。

[0508] 例如, Q_2' 是键。

[0509] 例如, Q_2' 是未取代的 C_1-C_3 烷基接头。

[0510] 例如, T_2' 是 C_1-C_6 烷基或 C_6-C_{10} 芳基,其任选地被一个或多个 $-Q_3'-T_3'$ 取代。

[0511] 例如, T_2' 是未取代的取代的直链 C_1-C_6 或支链 C_3-C_6 烷基,包括但不限于,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、仲戊基和正己基。

[0512] 例如, T_2' 是苯基。

[0513] 例如, T_2' 是卤素(例如,氟、氯、溴和碘)。

[0514] 例如, T_2' 是4~7元杂环烷基(例如,氮杂环丁烷基(azetidiny)、氧杂环丁基(oxetanyl)、硫杂环丁基(thietanyl)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepanyl)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等),任选地被一个或多个 $-Q_3'-T_3'$ 取代。

[0515] 例如, T_2' 是 $-OR_c'$ 、 $-NR_c'R_d'$ 、 $-C(O)R_c'$ 、 $-C(O)OR_c'$ 或 $-S(O)_2R_c'$ 。

[0516] 例如, R_c' 是 C_1-C_6 烷基或4~7元杂环烷基(例如,氮杂环丁烷基(azetidiny)、氧杂环丁基(oxetanyl)、硫杂环丁基(thietanyl)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepanyl)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等),其任选地被一个或多个 $-Q_3'-T_3'$ 取代。

- [0517] 例如, R_c' 和 R_d' 各自独立地是H或C₁-C₆烷基,其任选地被一个或多个-Q₃'-T₃'取代。
- [0518] 例如, R_c' 是H。
- [0519] 例如, R_d' 是H。
- [0520] 例如, R_c' 和 R_d' 与其连接的N原子形成除该N以外具有0或1个的额外杂原子的4~7元杂环烷基环(例如,氮杂环丁烷基(azetidiny1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、1,4-二氮杂环庚烷基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepany1)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等),并且该环任选地被一个或多个-Q₃'-T₃'取代。
- [0521] 例如, Q_2' 是键且 T_2' 是-OR_c'、-NR_c' R_d' 、-C(O)R_c'、-C(O)OR_c'、-S(O)₂R_c'、C₁-C₆烷基或4~7元杂环烷基,其在 R_c' 或 R_d' 不是H时各自任选地被一个或多个-Q₃'-T₃'取代。
- [0522] 例如, -Q₃'-T₃' 是氧代。
- [0523] 例如, T_2' 是4~7元杂环烷基或C₃-C₈环烷基,并且一个或多个-Q₃'-T₃' 是氧代。
- [0524] 例如, Q_3' 是键,或未取代或经取代的C₁-C₃烷基接头。
- [0525] 例如, T_3' 是H、卤素、4~7元杂环烷基、C₁-C₃烷基、OR_e'、COOR_e'、-S(O)₂R_e'、-NR_e' R_f' 或-C(O)NR_e' R_f' 。
- [0526] 例如, R_d' 和 R_e' 之一是H。
- [0527] 例如, Q_3' 是键或C₁-C₃烷基接头且 T_3' 选自下组: C₁-C₃烷基、卤素、OR_e'、-S(O)₂R_e'、-NR_e' R_f' 和-C(O)NR_e' R_f' 。
- [0528] 例如, Q_3' 是键或C₁-C₃烷基接头且 T_3' 选自下组: C₁-C₃烷基、OR_e'、-S(O)₂R_e' 或-NR_e' R_f' 。
- [0529] 例如, R_e' 是H。
- [0530] 例如, R_f' 是H。
- [0531] 例如, R_7' 是-C(O)R_f'。
- [0532] 例如, R_7' 是-C(O)R_g',其中 R_g' 是C₃-C₈环烷基、4~7元杂环烷基、C₃-C₈环烷基。
- [0533] 例如, R_7' 是被一个或多个-Q₅'-T₅'取代的C₆-C₁₀芳基。
- [0534] 例如, R_7' 是任选被一个或多个-Q₅'-T₅'取代的苯基。
- [0535] 例如, R_7' 是任选被一个或多个-Q₅'-T₅'取代的C₁-C₆烷基。
- [0536] 例如, R_7' 是任选被一个或多个-Q₅'-T₅'取代的C₃-C₈环烷基。
- [0537] 例如, R_7' 是4~7元杂环烷基(例如,氮杂环丁烷基(azetidiny1)、氧杂环丁基(oxetany1)、硫杂环丁基(thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepany1)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等),任选地被一个或多个-Q₅'-T₅'取代。
- [0538] 例如, R_7' 是任选被一个或多个-Q₅'-T₅'取代的5~6元杂环烷基。
- [0539] 例如, R_7' 是异丙基。
- [0540] 例如, R_7' 是吡咯烷基、哌啶基、四氢吡喃、环戊基或环己基、环庚基,其各自任选地被一个-Q₅'-T₅'取代。
- [0541] 例如, R_7' 是环戊基或环己基,其各自任选地被一个-Q₅'-T₅'取代。

- [0542] 例如, Q_5' 是NHC(O)且 T_5' 是 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基。
- [0543] 例如, $-Q_5'-T_5'$ 是氧代。
- [0544] 例如, T_4' 是4~7元杂环烷基、 C_3 - C_8 环烷基或 C_6 - C_{10} 芳基,并且一个或多个 $-Q_5'-T_5'$ 是氧基。
- [0545] 例如, R_7' 是1-氧化-四氢-2H-噻喃基或1,1-二氧化-四氢-2H-噻喃基。
- [0546] 例如, R_7' 是环己酮基,例如,环己酮-4-基。
- [0547] 例如, T_5' 是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基,或4~7元杂环烷基。
- [0548] 例如, Q_5' 是键且 T_5' 是 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 环烷基或4~7元杂环烷基。
- [0549] 例如, Q_5' 是键且 T_5' 是5或6元杂芳基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基, T_5' 任选地被选自下组的一个或多个取代基取代:卤素、羟基、 C_1 - C_6 烷氧基或 C_3 - C_8 环烷基。
- [0550] 例如, Q_5' 是CO、S(O)₂或NHC(O);且 T_5' 是 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_3 - C_8 环烷基或4~7元杂环烷基。
- [0551] 例如, T_5' 是 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基,其各自任选地被卤素、羟基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基或 C_3 - C_8 环烷基取代。
- [0552] 例如, Q_5' 是 C_1 - C_3 烷基接头且 T_5' 是H或 C_6 - C_{10} 芳基。
- [0553] 例如, Q_5' 是 C_1 - C_3 烷基接头且 T_5' 是 C_3 - C_8 环烷基、4~7元杂环烷基或S(O)_qR_q'。
- [0554] 例如, R_6' 是卤素(例如,氟、氯、溴和碘)且 Z_2 是S(O)_aR₇',其中a'是0、1或2且 R_7' 是 C_1 - C_6 烷基(例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基或叔丁基)、 C_3 - C_8 环烷基(例如,环戊基、环己基或环庚基)或4~7元杂环烷基(例如,氮杂环丁烷基、氧杂环丁基、硫杂环丁基、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-硫代吡喃基、1,4-二氮杂环庚烷基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等),并且 R_7' 任选地被一个或多个 $-Q_5'-T_5'$ 取代。
- [0555] 例如, R_6' 是卤素(例如,氟、氯、溴和碘)且 Z_2 是OR₇',其中 R_7' 是4~7元杂环烷基(例如,氮杂环丁烷基(azetidiny)、氧杂环丁基(oxetany)、硫杂环丁基(thietany)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚基(1,4-oxazepany)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等),且 R_7' 任选地被一个或多个 $-Q_5'-T_5'$ 取代。
- [0556] 例如, R_{11}' 是H。
- [0557] 例如, R_2' 和 R_4' 各自独立地是H或 C_1 - C_6 烷基,其任选地被叠氮基、卤素、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基或 C_6 - C_{10} 芳基取代。
- [0558] 例如, R_2' 和 R_4' 各自独立地是 C_1 - C_3 烷基,其任选地被 C_1 - C_6 烷氧基取代。
- [0559] 例如, R_2' 和 R_4' 各自是甲基。
- [0560] 例如, R_1' 是H。
- [0561] 例如, R_1' 是 C_1 - C_6 烷基,其任选地被叠氮基、卤素、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基或 C_6 - C_{10} 芳基取代。
- [0562] 例如, R_{12}' 是H、甲基、乙基、乙烯基或卤素。

- [0563] 例如, R_{12}' 是甲基。
- [0564] 例如, R_{12}' 是乙基。
- [0565] 例如, R_{12}' 是乙烯基或丙烯基。
- [0566] 例如, R_{12}' 是甲氧基。
- [0567] 例如, R_8' 是H、甲基、乙基或乙烯基。
- [0568] 例如, R_8' 是甲基。
- [0569] 例如, R_8' 是乙基。
- [0570] 例如, R_8' 是丙基。
- [0571] 例如, R_8' 是乙烯基或丙烯基。
- [0572] 例如, R_8' 是 C_1 - C_6 烷基, 其被选自下组的一个或多个取代基取代: 卤素(例如, F、Cl 或Br)、羟基或 C_1 - C_6 烷氧基。
- [0573] 例如, R_8' 是4~7元杂环烷基(例如, 氮杂环丁烷基(azetidiny1)、氧杂环丁基(oxetany1)、硫杂环丁基(thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基(1,4-oxazepany1)、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等)。
- [0574] 例如, R_8' 是哌啶基。
- [0575] 例如, R_8' 是4~7元的任选被取代的杂环烷基, 且 R_7' 是 $-Q_4'-T_4'$, 其中 Q_4' 是键或 C_1 - C_4 烷基接头且 T_4' 是H、 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 环烷基或4~7元杂环烷基。
- [0576] 例如, Z_2 是 $NR_7' R_8'$ 或 $CR_7' R_8' R_{14}'$, 其中 R_7' 和 R_8' 与其连接的原子一同形成具有1~3个杂原子的4~11元杂环烷基环(例如, 氮杂环丁烷基(azetidiny1)、氧杂环丁基(oxetany1)、硫杂环丁基(thietany1)、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚烷基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基、吗啉基等)或 C_3 - C_8 环烷基, 其各自任选地被一个或多个 $-Q_6'-T_6'$ 取代。
- [0577] 例如, 由 R_7' 和 R_8' 形成的环选自下组: 氮杂环丁烷基(azetidiny1)、吡咯烷基、哌啶基、吗啉基、哌嗪基和环己烯基, 其各自任选地被一个 $-Q_6'-T_6'$ 取代。
- [0578] 例如, $-Q_6'-T_6'$ 是氧代。
- [0579] 例如, T_6' 是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_6 - C_{10} 芳基, 或4~7元杂环烷基。
- [0580] 例如, Q_6' 是键且 T_6 是 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 环烷基或4~7元杂环烷基。
- [0581] 例如, Q_6' 是CO、S(O)₂或NHC(O); 且 T_6' 是 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_3 - C_8 环烷基或4~7元杂环烷基。
- [0582] 例如, T_6' 是 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基, 其各自任选地被卤素、羟基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、氨基、单- C_1 - C_6 烷基氨基、二- C_1 - C_6 烷基氨基或 C_3 - C_8 环烷基取代。
- [0583] 例如, Q_6' 是 C_1 - C_3 烷基接头且 T_6' 是H或 C_6 - C_{10} 芳基。
- [0584] 例如, Q_6' 是 C_1 - C_3 烷基接头且 T_6' 是 C_3 - C_8 环烷基、4~7元杂环烷基或S(O)_p R_p'。

[0585] 例如, R_p' 和 R_q' 各自独立地是 C_1 - C_6 烷基。

[0586] 例如, R_6' 是 $-S(O)_b R_a'$ 或叠氮基, 其中 b' 是 0、1 或 2 且 R_a' 是 C_1 - C_6 烷基或 C_3 - C_8 环烷基; 且 Z_2 是 $NR_7' R_8'$, 其中 R_7' 是 C_3 - C_8 环烷基 (例如, 环戊基、环己基或环庚基) 或 4~7 元杂环烷基 (例如, 氮杂环丁烷基、氧杂环丁基、硫杂环丁基、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-硫代吡喃基、1,4-二氮杂环庚烷基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基和吗啉基等), 其各自任选地被一个或多个 $-Q_5'$ $-T_5'$ 取代, 并且 R_8' 是 H 或 C_1 - C_6 烷基 (例如, 甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基或叔丁基)。

[0587] 例如, R_6' 是卤素 (例如, 氟、氯、溴和碘) 且 Z_2 是 $NR_7' R_8'$ 或 $CR_7' R_8' R_{14}'$, 其中 R_7' 和 R_8' 与其连接的原子一同形成具有 1~3 个杂原子的 4~11 元杂环烷基环 (例如, 氮杂环丁烷基 (azetidiny), 氧杂环丁基 (oxetany), 硫杂环丁基 (thietany), 吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、哌啶基、1,2,3,6-四氢吡啶基、哌嗪基、四氢-2H-吡喃基、3,6-二氢-2H-吡喃基、四氢-2H-噻喃基、1,4-二氮杂环庚烷基、1,4-氧杂氮杂环庚烷基、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基、吗啉基等) 或 C_3 - C_8 环烷基, 其各自任选地被一个或多个 $-Q_6'$ $-T_6'$ 取代。

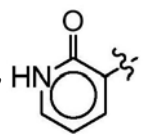
[0588] 例如, R_{13}' 是 H 或甲基。

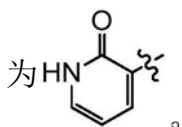
[0589] 例如, R_{13}' 是 H。

[0590] 例如, R_3' 是 H。

[0591] 例如, R_5' 、 R_9' 和 R_{10}' 各自是 H。

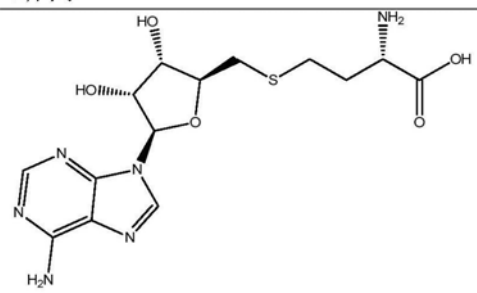
[0592] 适用于本发明的其它化合物见述于 2012 年 2 月 28 日提交的 PCT/US2012/026953; 以下美国临时申请: 2011 年 4 月 13 日提交的 61/474821; 2011 年 4 月 13 日提交的 61/474825; 2011 年 6 月 21 日提交的 61/499595; 和 2011 年 7 月 8 日提交的 61/505676, 其内容均通过引用全文纳入本文。

[0593] 本发明的示例性 EZH2 抑制剂化合物示于表 1。下表中,  的各次出现应解释

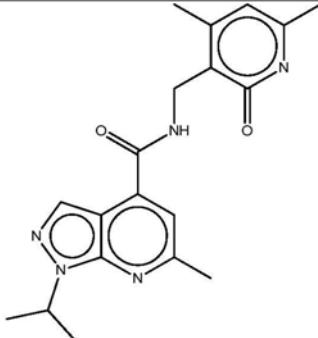
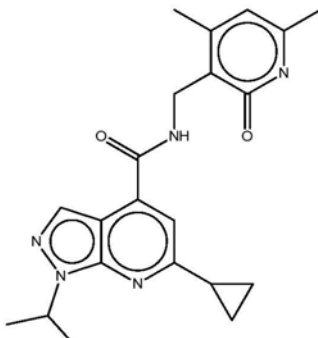
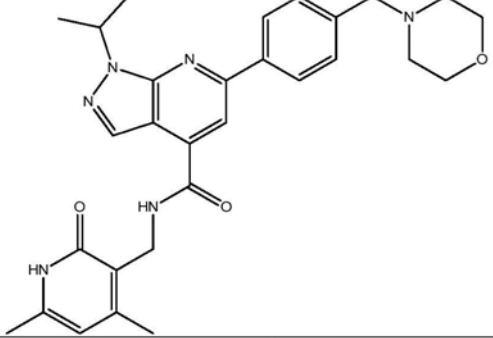
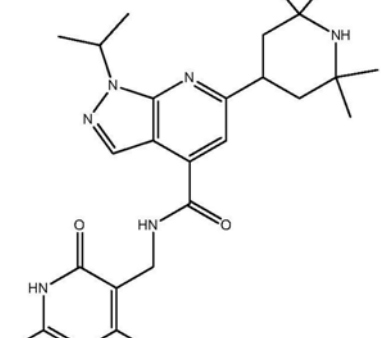


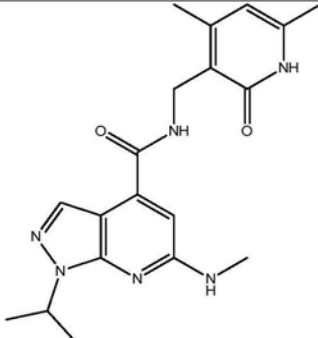
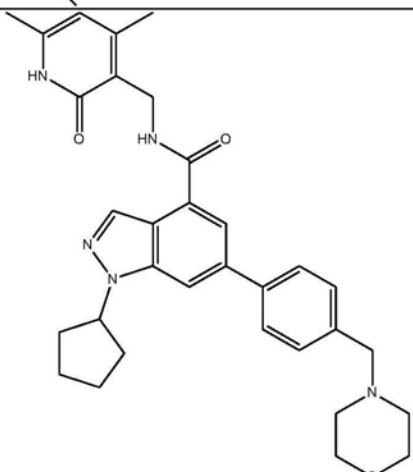
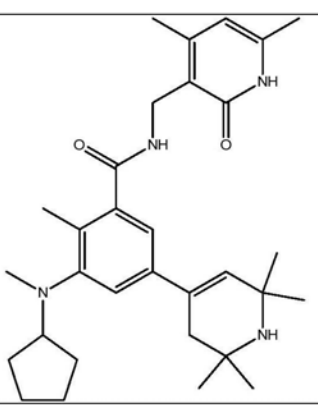
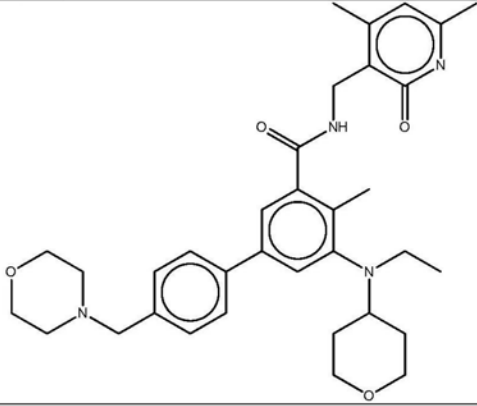
[0594] 表 1

[0595]

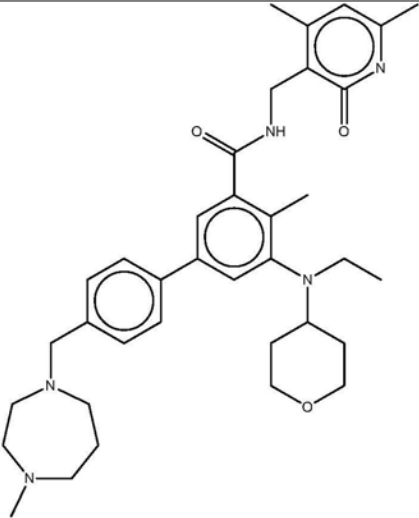
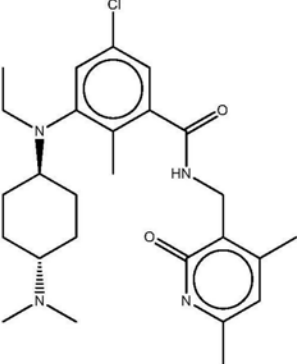
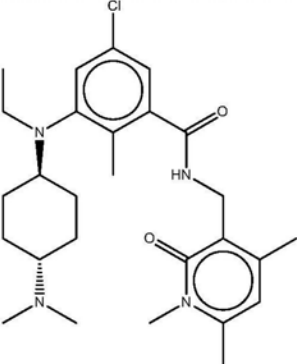
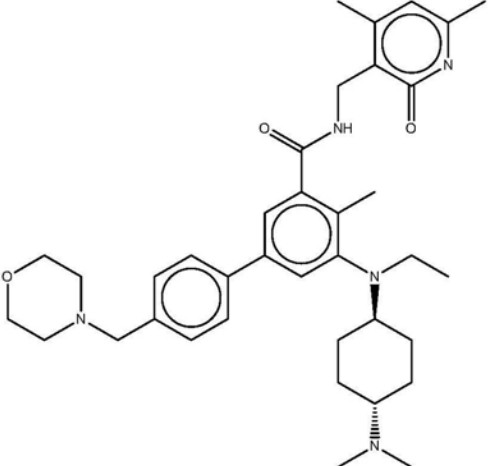
化合物编号	结构
1	 ("SAH")

[0596]

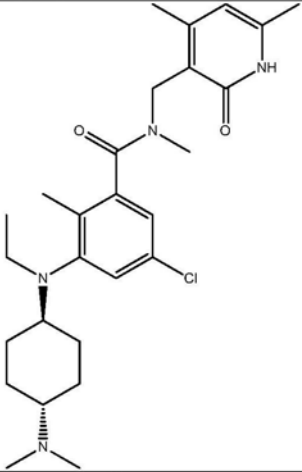
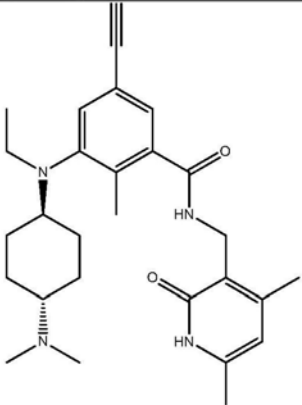
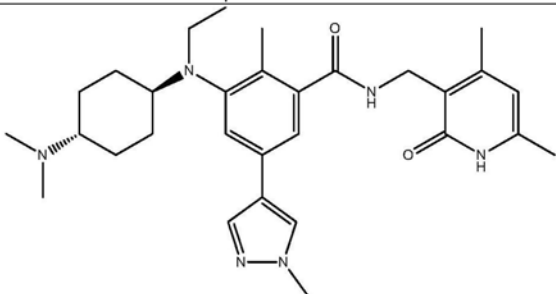
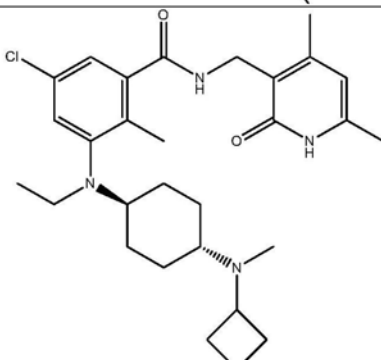
化合物编号	结构
2	
3	
4	
5	

化合物编号	结构
6	
7	
8	
9	

[0597]

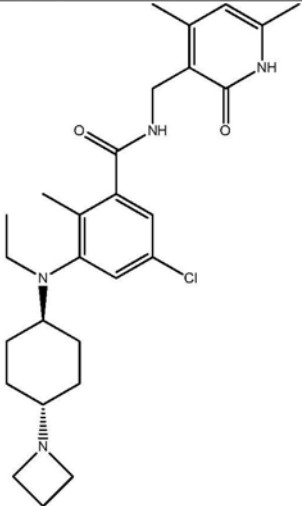
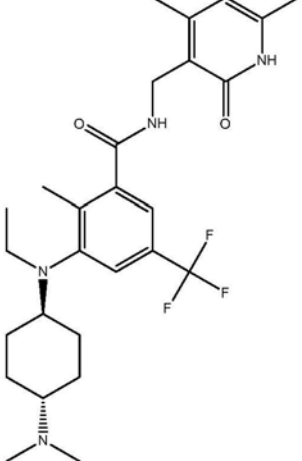
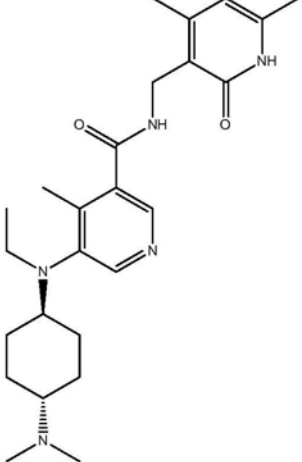
化合物编号	结构
10	
11	
12	
13	

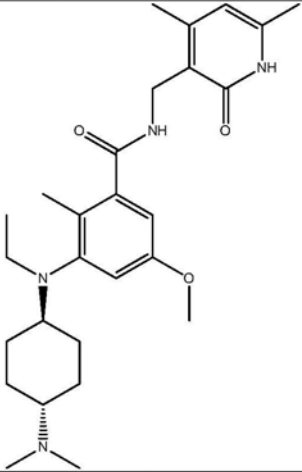
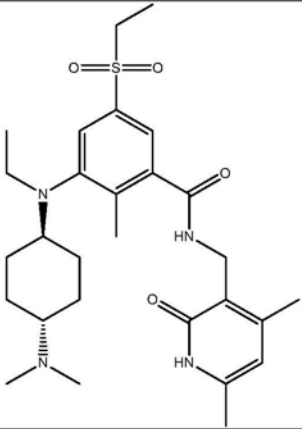
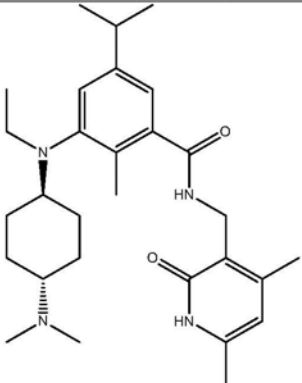
[0598]

化合物编号	结构
14	
15	
16	
17	

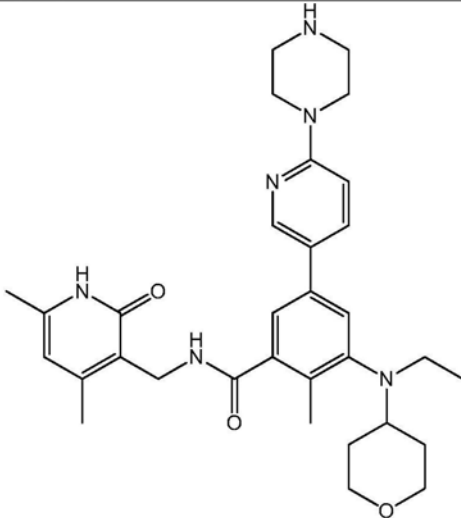
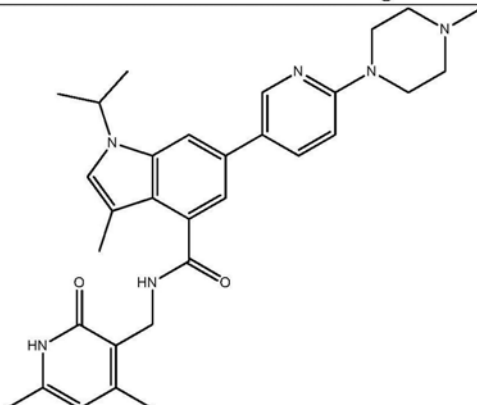
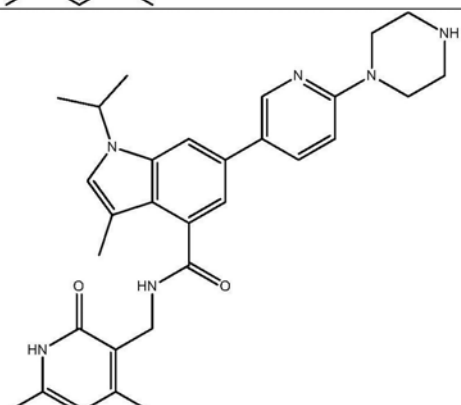
[0599]

[0600]

化合物编号	结构
18	
19	
20	

化合物编号	结构
21	
22	
23	

[0601]

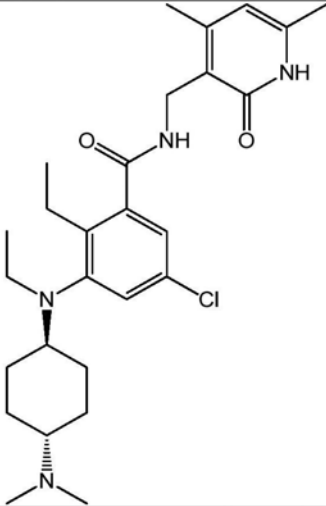
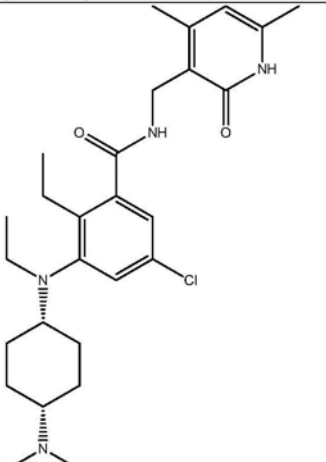
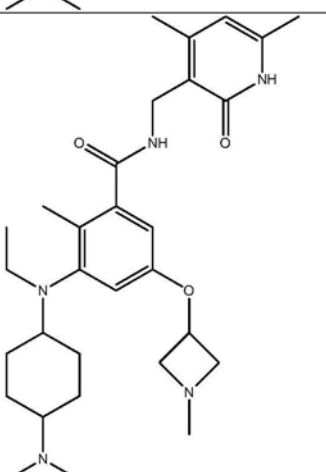
化合物编号	结构
24	
25	
26	

[0602]

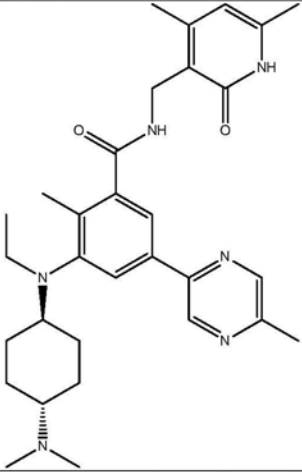
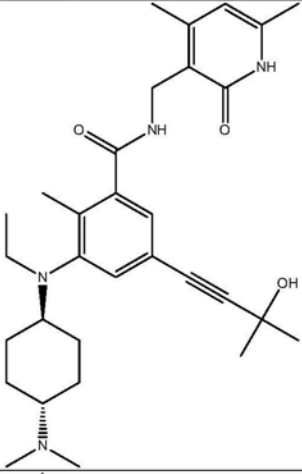
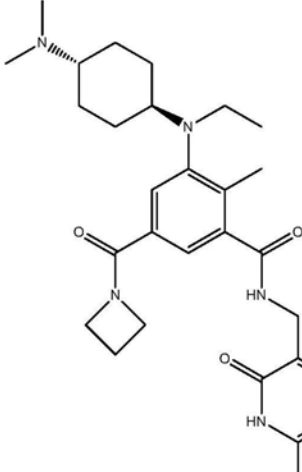
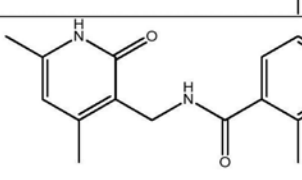
[0603]

化合物编号	结构
27	
28	
29	

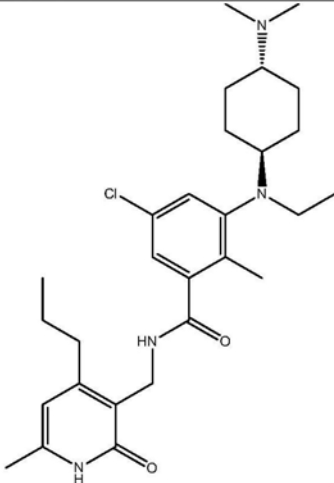
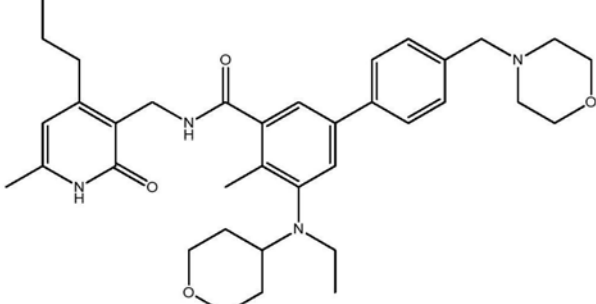
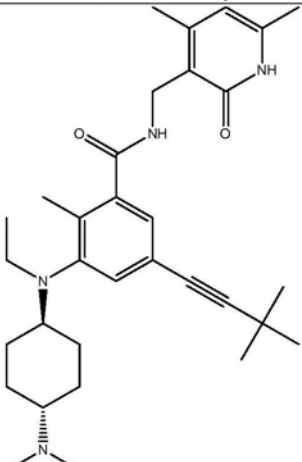
[0604]

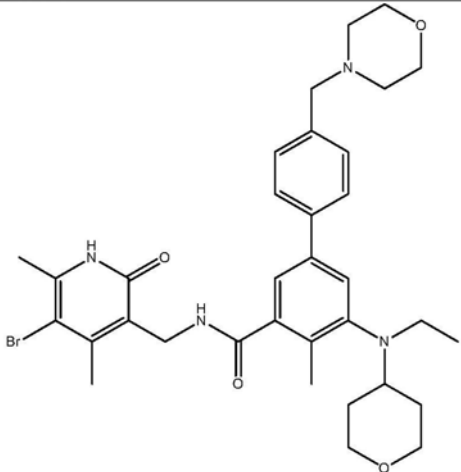
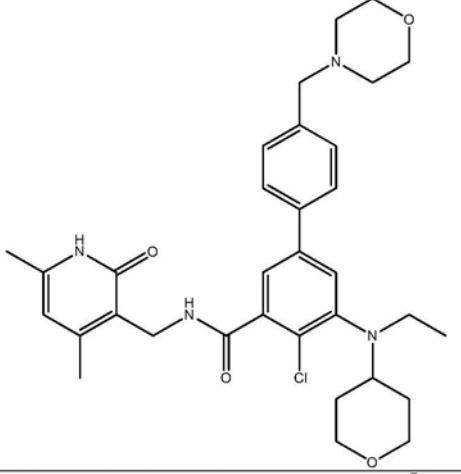
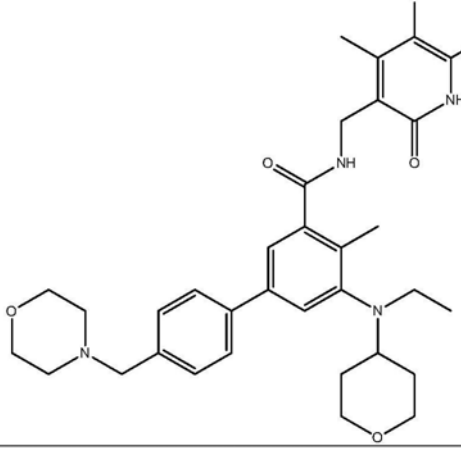
化合物编号	结构
30	
31	
32	

[0605]

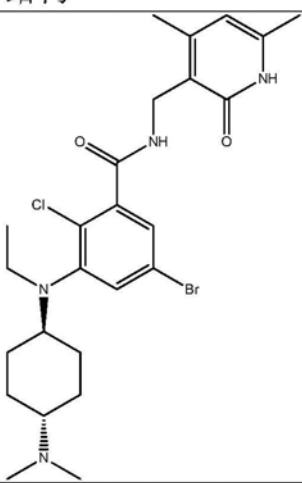
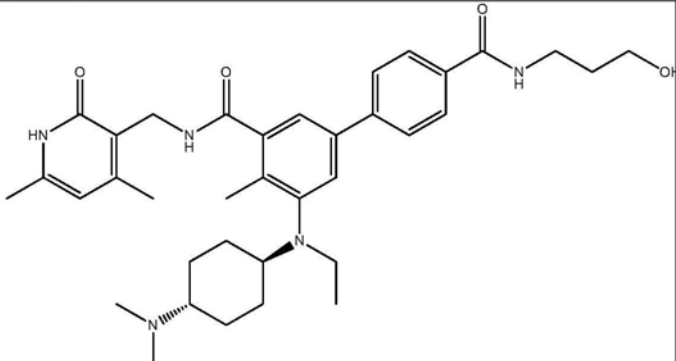
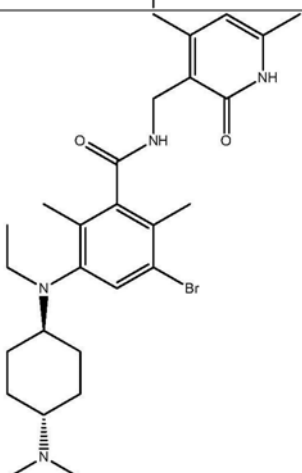
化合物编号	结构
33	
34	
35	
36	

[0606]

化合物编号	结构
37	
38	
39	

化合物编号	结构
40	
41	
42	

[0607]

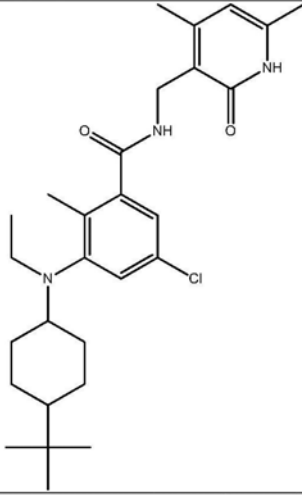
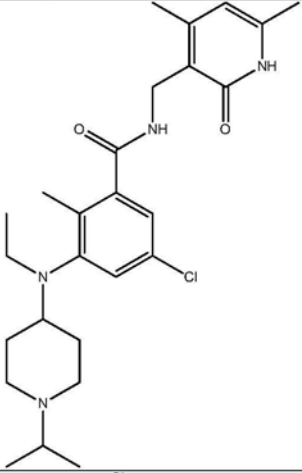
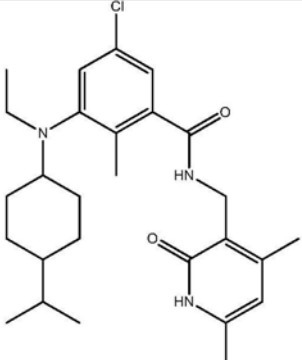
化合物编号	结构
43	
44	
45	

[0608]

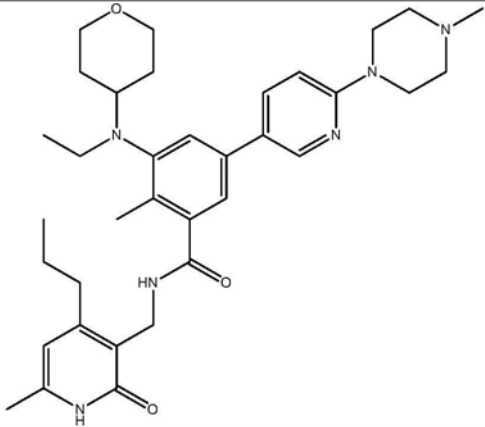
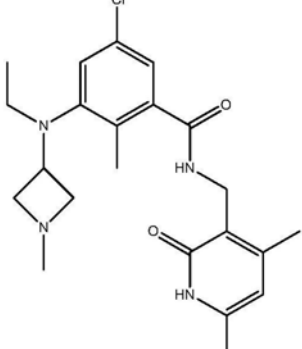
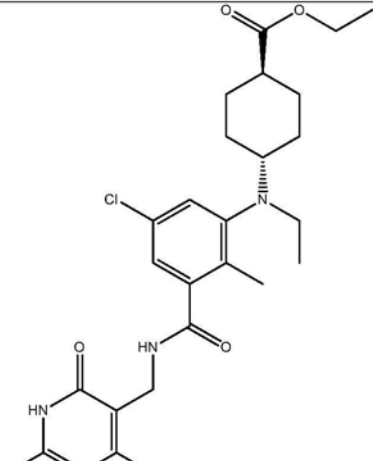
化合物编号	结构
46	 <chem>CCN(CC1CCCCC1C(=O)NCC2=CC(=C(C)C=C2Cl)C(=O)NCC3=CC(=C(C)C=C3NC(=O)O)C(=O)NCC(F)F)C(=O)NCC4=CC(=C(C)C=C4NC(=O)O</chem>
47	 <chem>CCN(CC1CCCCC1C(=O)NCC2=CC(=C(C)C=C2Cl)C(=O)NCC3=CC(=C(C)C=C3NC(=O)O)C(=O)NCC(F)F)C(=O)NCC4=CC(=C(C)C=C4NC(=O)O</chem>
48	 <chem>CCN(CC1CCCCC1C(=O)NCC2=CC(=C(C)C=C2Cl)C(=O)NCC3=CC(=C(C)C=C3NC(=O)O)C(=O)NCC(F)F)C(=O)NCC4=CC(=C(C)C=C4NC(=O)O</chem>

[0609]

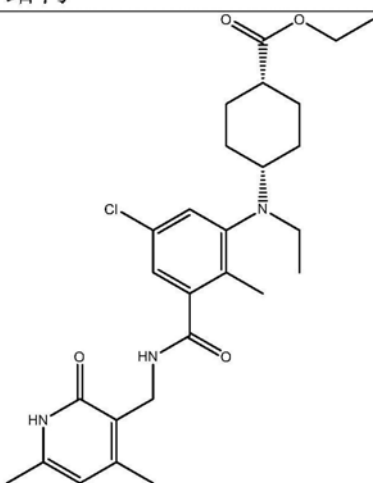
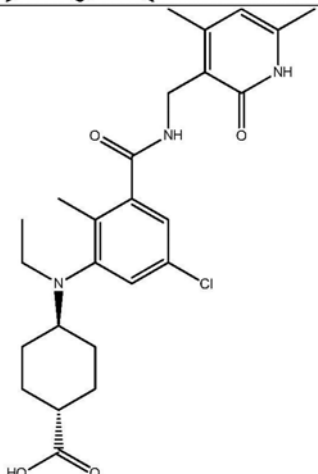
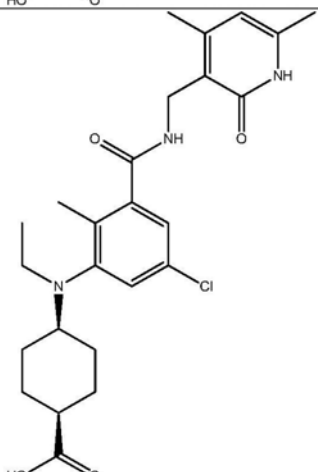
[0610]

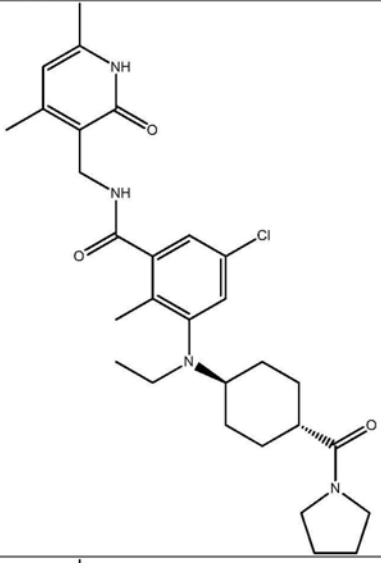
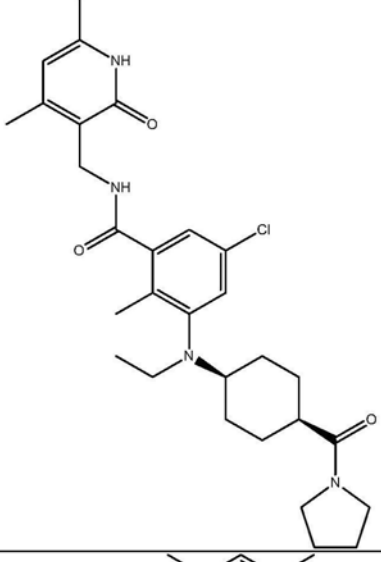
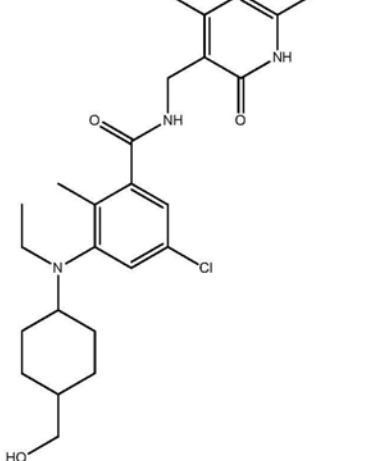
化合物编号	结构
49	
50	
51	

[0611]

化合物编号	结构
52	
53	
54	

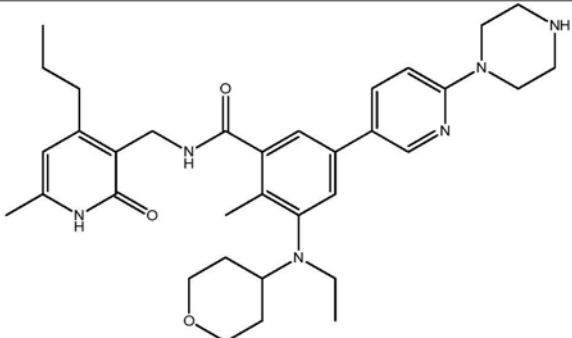
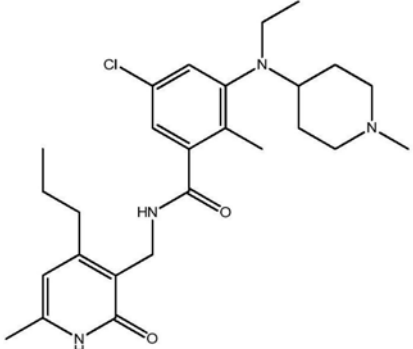
[0612]

化合物编号	结构
55	
56	
57	

化合物编号	结构
58	
59	
60	

[0613]

[0614]

化合物编号	结构
61	
62	

[0615] 除非另有说明,术语“取代的”指被一个或多个确定基团取代。当基团可选自多个替代性基团时,所选的基团可相同或不同。

[0616] 术语“独立地”指多于一个取代基选自多个可能的取代基时,那些取代基可相同或不同。

[0617] “有效量”指,将引发例如研究者或医师在研的组织、系统、动物或人的生物学或医学反应的药物或药制剂的量。此外,术语“治疗有效量”指与没有接受该量的相应对象相比,引起疾病、紊乱、或副作用改良的治疗、治愈、预防、或缓解、或者疾病或紊乱发展速率降低的任何量。该术语范围内还包括有效提高正常生理功能的量。

[0618] 本文中所用的“烷基”、“C₁、C₂、C₃、C₄、C₅或C₆烷基”或“C₁-C₆烷基”意图包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅或C₆直链(线性)饱和脂族烃基团和C₃、C₄、C₅或C₆支链饱和脂族烃基团。例如,C₁-C₆烷基意图包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅和C₆烷基基团。烷基的例子包括具有1~6个碳原子的部分,例如但不限于,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、仲戊基或正己基。

[0619] 在某些实施方式中,直链或支链烷基具有六个或更少碳原子(例如,针对直链为C₁-C₆,针对支链为C₃-C₆),在其它实施方式中,直链或支链烷基具有四个或更少碳原子。

[0620] 本文中所用的术语“环烷基”指的是饱和或不饱和非芳香烃单或多环(例如,具有3-30个碳原子(例如,C₃-C₁₀)的稠合、桥接或螺环)。环烷基的例子包括但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基和金刚烷基。术语“杂环烷基”除非另有说明,指的是具有一个或多个杂原子(例如O、N、S或Se)的饱和或不饱和非芳香3~8元单环的、7~12元双环(稠合、桥接或螺环)的或11~14元三环(稠合、桥接或螺环)的环系统。杂环烷基基团的示例包括但不限于,哌啶基、哌嗪基、吡咯烷基、二噁烷基、四氢呋喃基、异二氢吡啶基、二氢吡啶基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、三唑烷基、四氢呋喃基、环氧乙烷基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁基、硫杂环丁基、1,2,3,6-四氢吡啶

基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、吡喃基、吗啉基、1,4-二氮杂环庚烷基、1,4-二氮杂环庚基、2-氧杂-5-氮杂二环[2.2.1]庚基、2,5-二氮杂二环[2.2.1]庚基等。

[0621] 术语“任选地被取代的烷基”指的是未被取代的烷基或在烃主链的一个或多个碳原子上以指定取代基替代一个或多个氢原子的烷基。所述取代基可包括,例如,烷基、烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫羰基、烷氧基、磷酸酯、磷酸根合、亚磷酸根合、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰基氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、巯基羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氯甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分。

[0622] “芳基烷基”或“芳烷基”部分是被芳基取代的烷基(例如,苯基甲基(苄基))。“烷基芳基”部分是被烷基取代的芳基(例如,甲基苯基)。

[0623] 本文中所用的“烷基接头”意图包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅或C₆直链(线性)饱和二价脂族烃基团和C₃、C₄、C₅或C₆支化饱和脂族烃基团。例如,C₁-C₆烷基接头意图包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅和C₆烷基接头。烷基接头的例子包括具有1~6个碳原子的部分,例如但不限于甲基(-CH₂-)、乙基(-CH₂CH₂-)、正丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、异丙基(-CHCH₃CH₂-)、正丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)、仲丁基(-CHCH₃CH₂CH₂-)、异丁基(-C(CH₃)₂CH₂-)、正戊基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-)、仲戊基(-CHCH₃CH₂CH₂CH₂-)或正己基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-)。

[0624] “烯基”包括长度相近的不饱和脂族基团且可被上述烷基所取代,但其至少含有一个双键。例如,所用术语“烯基”包括直链烯基基团(例如,乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基)和支链烯基基团。在某些实施方式中,直链或支链烯基基团的主链上具有6个或更少的碳原子(例如,针对直链为C₂-C₆,针对支链为C₃-C₆)。术语“C₂-C₆”包括含有2~6个碳原子的烯基基团。术语“C₃-C₆”包括含有3~6个碳原子的烯基基团。

[0625] 术语“任选被取代的烯基”指的是未被取代的烯基或者在一个或多个烃主链碳原子上以指定的取代基替代一个或多个氢原子的烯基。所述取代基可包括,例如,烷基、烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫羰基、烷氧基、磷酸酯、磷酸根合、亚磷酸根合、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰基氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、巯基羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氯甲基、氰基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分。

[0626] “炔基”包括长度相近的不饱和脂族基团且可被上述烷基所取代,但其至少含有一个三键。例如,“炔基”包括直链炔基基团(例如,乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基、辛炔基、壬炔基、癸炔基)和支链炔基基团。在某些实施方案中,直链或支链炔基基团的主链上具有6个或更少的碳原子(例如,针对直链为C₂-C₆,针对支链为C₃-C₆)。术语“C₂-C₆”包括含有2~6个碳原子的炔基基团。术语“C₃-C₆”包括含有3~6个碳原子的炔基基团。

[0627] 术语“任选地被取代的炔基”指的是未被取代的炔基或者在烃主链的一个或多个

碳原子上以指定的取代基替代一个或多个氢原子的炔基。所述取代基可包括,例如,烷基、烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫羰基、烷氧基、磷酸酯、磷酸根合、亚磷酸根合、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰基氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脒基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、巯基羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氯甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分。

[0628] 其它任选被取代的部分(例如可任选取代的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基)包括未被取代的部分和具有一个或多个指定取代基的部分二者。例如,取代的杂环烷基包括被一个或多个烷基基团取代,例如2,2,6,6-四甲基-哌啶基和2,2,6,6-四甲基-1,2,3,6-四氢吡啶基。

[0629] “芳基”包括具有芳香性的基团,包括具有至少一个芳香环且在所述环结构中不含任何杂原子的“共轭”或多环系统。例子包括苯基、苄基、1,2,3,4-四氢萘基等。

[0630] “杂芳基”基团是在环结构中具有1~4个杂原子的如上定义的芳基基团,并且还可称为“芳基杂环”或“杂芳族”。本文中所用的术语“杂芳基”意图包括稳定的5、6或7元单环或7、8、9、10、11或12元双环芳族杂环,其由碳原子和一个或多个杂原子(例如1或1-2或1-3或1-4或1-5或1-6个杂原子,或例如1、2、3、4、5或6个杂原子)组成,所述杂原子独立地选自氮、氧和硫。所述氮原子可以是被取代或未取代的(即,N或NR,其中R是H或如上定义的其它取代基)。所述氮和硫杂原子可任选地被氧化(即, $N \rightarrow O$ 和 $S(O)_p$,其中 $p=1$ 或 2)。应注意,所述芳族杂环中S和O原子的总数不多于1。

[0631] 杂芳基基团的例子包括吡咯、呋喃、噻吩、噻唑、异噻唑、咪唑、三唑、四唑、吡唑、噁唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、哒嗪、嘧啶等。

[0632] 此外,术语“芳基”和“杂芳基”包括多环芳基和杂芳基基团,例如,三环、二环,例如萘、苯并噁唑、苯并二噁唑、苯并噻唑、苯并咪唑、苯并噻吩、亚甲二氧基苯基、喹啉、异喹啉、萘啶、吲哚、苯并呋喃、嘌呤、苯并呋喃、氮杂嘌呤、中氮茚。

[0633] 在多环芳族环的情况中,仅一个环必须是芳族环(例如,2,3-二氢吲哚),尽管可以所有环均是芳族环(例如,喹啉)。第二个环还可以是稠合的或桥接的。

[0634] 环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基芳族环可在一个或多个环位置(例如,形成环的碳或杂原子例如N)上被上述取代基取代,所述取代基例如烷基、烯基、炔基、卤素、羟基、烷氧基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、烷基氨基羰基、芳烷基氨基羰基、烯基氨基羰基、烷基羰基、芳基羰基、芳烷基羰基、烯基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基硫羰基、磷酸酯、磷酸根合、亚磷酸根合、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰基氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脒基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、巯基羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氯甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分。芳基和杂芳基基团还可与脂环或杂环稠合或桥接,因其不属于芳族所以形成多环系统(例如,萘满、亚甲二氧基苯基)。

[0635] 本文中所用的“碳环”或“碳环性环”意图包括任何稳定的具有特定数量的碳原子

的单环、二环或三环形环,所述碳原子中任何一个都可以是饱和的、不饱和的或芳族的。碳环包括碳烷基和芳基。例如,C₃-C₁₄碳环意图包括具有3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个碳原子的单环、二环或三环。碳环的例子包括但不限于,环丙基、环丁基、环丁烯基、环戊基、环戊烯基、环己基、环庚烯基、环庚基、环庚烯基、金刚烷基、环辛基、环辛烯基、环辛二烯基、芴基、苯基、萘基、茛满基、金刚烷基和四氢萘基。桥环也包括在碳环的定义内,包括,例如,[3.3.0]二环辛烷、[4.3.0]二环壬烷、[4.4.0]二环癸烷和[2.2.2]二环辛烷。当一个或多个碳原子连接两个非毗邻碳原子时产生桥环。在一个实施方式中,桥环是一个或两个碳原子。应注意,桥环常使单环转变成三环。当环桥接时,所述环上的取代基也可出现在桥接上。还包括稠合的环(例如,萘基、四氢萘基)和螺环。

[0636] 本文中所用的“杂环”或“杂环基团”包括含有至少一个环杂原子(例如,N、O或S)的任何环结构(饱和、不饱和或芳族的)。杂环包括杂环烷基和杂芳基。杂环的例子包括但不限于,吗啉、吡咯烷、四氢噻吩、哌啶、哌嗪、氧杂环丁烷、吡喃、四氢吡喃、氮杂环丁烷和四氢呋喃。

[0637] 杂环基团的例子包括但不限于:吡啶基、吡啶基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并硫呋喃基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噻唑啉基、苯并噻唑基、苯并三唑基、苯并四唑基、苯并异噻唑基、苯并异噻唑基、苯并咪唑啉基、呋唑基、4aH-呋唑基、呋啉基、苯并二氢吡喃基、色烯(苯并吡喃)基、噌啉基、十氢喹啉基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、二氢呋喃并[2,3-b]四氢呋喃、呋喃基、呋喃基、咪唑烷基、咪唑啉基、咪唑基、1H-吡唑基、假吡唑基、二氢吡唑基、中氮茛基、吡唑基、3H-吡唑基、靛红酰基、异苯并呋喃基、异苯并二氢吡喃基、异吡唑基、异二氢吡唑基、异吡唑基、异喹啉基、异噻唑基、异噻唑基、亚甲二氧基苯基、吗啉基、萘啶基、八氢异喹啉基、噁二唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、1,2,4-噁二唑5(4H)-酮、噁唑烷基、噁唑基、羟吡唑基、嘧啶基、菲啶基、菲咯啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、二苯并氧硫杂环己二烯基(phenoxathinyl)、吩噻嗪基、酞嗪基、哌嗪基、哌啶基、哌啶酮基、4-哌啶酮基、胡椒基、蝶啶基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡唑烷基、吡唑啉基、吡唑基、哒嗪基、吡啶并噻唑、吡啶并咪唑、吡啶并噻唑、啶基(pyridinyl)、吡啶基(pyridyl)、嘧啶基、吡咯烷基、吡咯啉基、2H-吡咯基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、4H-喹啉基、喹啉基、奎宁环基、四氢呋喃基、四氢异喹啉基、四氢喹啉基、四唑基、6H-1,2,5-噻二嗪基、1,2,3-噻二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,2,5-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、噻蒎基、噻唑基、噻吩基(thienyl)、噻吩并噻唑基、噻吩并噻唑基、噻吩并咪唑基、苯硫基、三嗪基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、1,2,5-三唑基、1,3,4-三唑基和咕吨基。

[0638] 本文所用的术语“取代的”表示指定原子上的任何一个或多个氢原子被指示基团替代,条件是不超过所述指定原子的正常化合价并且生成稳定化合物。当取代基是氧代或酮(即,=O)时,则所述原子上有两个氢原子被替代。在芳族部分不存在酮取代基。本文中所用的环双键是在两个毗邻环原子之间形成的双键(例如C=C、C=N或N=N)。“稳定化合物”和“稳定结构”意指具有充分强度而能从反应混合物分离成有用纯度、并且能配制成有效治疗剂的化合物。

[0639] 当连接取代基的键显示为跨过连接环内两个原子的键时,所述取代基可键合至所述环中的任何原子。当没有表示所列取代基通过哪个原子连接所给式的化合物的其它部分时,所述取代基可通过该式中的任何原子键合。只有当取代基和/或变量的组合产生稳定化

合物时,才允许该组合。

[0640] 当在化合物的任何组成或式中出现一次以上的任何变量时(例如 R_1),其每次出现的定义独立于各其它出现的定义。因此,例如,若显示一个基团被0-2个 R_1 部分取代,则该基团可任选地被至多两个 R_1 部分取代,且每次出现 R_1 都独立地选自 R_1 的定义。并且,只有取代基和/或变量的组合产生稳定的化合物时,才允许该组合。

[0641] 术语“羟基”或“氢氧基”包括带有-OH或-O-的基团。

[0642] 本文中所述的“卤”或“卤素”指的是氟基、氯基、溴基和碘基。术语“全卤代的”一般指的是所有氢原子被卤素原子替代的部分。术语“卤代烷基”或“卤代烷氧基”指的是被一个或多个卤素原子取代的烷基或烷氧基。

[0643] 术语“羰基”包括含有通过双键连接氧原子的碳的化合物和部分。含有羰基的部分的例子包括但不限于醛、酮、羧酸、酰胺、酯、酐等。

[0644] 术语“羧基”指的是-COOH或其 C_1 - C_6 烷基酯。

[0645] “酰基”指的是含有酰基基团($R-C(O)-$)或羰基基团的部分。“取代的酰基”包括其一个或多个氢原子被例如烷基基团、炔基基团、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸根合、亚膦酸根合、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰基氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、巯基羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氯甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分的取代基替代的酰基基团。

[0646] “芳酰基”包括芳基或杂芳族部分键合至羰基基团的部分。芳酰基基团的例子包括苯基羧基、萘基羧基等。

[0647] “烷氧基烷基”、“烷基氨基烷基”和“硫代烷氧基烷基”包括如上所述的烷基基团,其中氧、氮或硫原子替代一个或多个烃主链碳原子。

[0648] 术语“烷氧基的”或“烷氧基”包括共价连接氧原子的被取代或未取代的烷基、烯基和炔基基团。烷氧基基团的例子包括但不限于甲氧基、乙氧基、异丙氧基、丙氧基、丁氧基和戊氧基基团。取代的烷氧基基团的例子包括卤代烷氧基基团。所述烷氧基基团可被以下基团取代,例如,烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸根合、亚膦酸根合、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰基氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、巯基羧酸酯、硫酸、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氯甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷芳基、或者芳族或杂芳族部分。被卤素取代的烷氧基基团的例子包括但不限于,氟代甲氧基、二氟代甲氧基、三氟代甲氧基、氯代甲氧基、二氯代甲氧基和三氯代甲氧基。

[0649] 术语“醚”或“烷氧基”包括含有键合至两个碳原子或杂原子的氧的化合物或部分。例如,所述术语包括“烷氧基烷基”指的是共价键合至氧原子的烷基、烯基或炔基基团,而该氧原子共价键合至烷基基团。

[0650] 术语“酯”包括含有连接至氧原子的碳或杂原子的化合物或部分,所述氧原子键合

至羰基基团的碳。术语“酯”包括烷氧基羰基基团,例如,甲氧基羰基、乙氧基羰基、丙氧基羰基、丁氧基羰基、戊氧基羰基等。

[0651] 术语“硫代烷基”包括含有连接硫原子的烷基基团的化合物或部分。所述硫代烷基基团可被以下基团取代,例如,烷基、烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、羧酸、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫羰基、烷氧基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰基氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基)、脞基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、巯基羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氯甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分。

[0652] 术语“硫代羰基”或“硫代羧基”包括含有通过双键连接硫原子的碳的化合物和部分。

[0653] 术语“硫醚”包括含有键合至两个碳原子或杂原子的硫原子的部分。硫醚的例子包括但不限于烷基硫代烷基、烷基硫代烯基和烷基硫代炔基。术语“烷基硫代烷基”包括以烷基、烯基或炔基基团键合至硫原子的部分,而该硫原子键合至烷基基团。类似地,术语“烷基硫代烯基”指的是其中烷基、烯基和炔基基团键合至硫原子、且该硫原子共价键合至烯基基团的部分;而“烷基硫代炔基”指的是其中烷基、烯基或炔基基团键合至硫原子、且该硫原子共价键合至炔基基团的部分。

[0654] 本文中所述的“胺”或“氨基”指的是未被取代或取代的 $-NH_2$ 。“烷基氨基”包括其中 $-NH_2$ 的氮连接至少一个烷基基团的化合物的基团。烷基氨基基团的例子包括苄基氨基、甲基氨基、乙基氨基、苯乙基氨基等。“二烷基氨基”包括其中 $-NH_2$ 的氮连接至少两个其它烷基基团的基团。二烷基氨基基团的例子包括但不限于,二甲基氨基和二乙基氨基。“芳基氨基”和“二芳基氨基”包括其中N分别连接至少一个或两个芳基基团的基团。“氨基芳基”和“氨基芳氧基”的是被氨基取代的芳基和芳氧基。“烷基芳基氨基”、“烷基氨基芳基”或“芳基氨基烷基”指的是连接至少一个烷基基团和至少一个芳基基团的氨基基团。“烃氨基烷基(alkaminoalkyl)”指的是连接氮原子的烷基、烯基或炔基基团,所述氮原子还连接另一个烷基基团。“酰基氨基”包括其中氮原子连接酰基基团的基团。酰基氨基的例子包括但不限于,烷基羰基氨基、酰基羰基氨基、氨甲酰基和脲基基团。

[0655] 术语“酰胺”或“氨基羧基”包括含有连接至羰基或硫代羰基基团的碳原子的氮原子的化合物或部分。所述术语包括“烷基氨基羧基”基团,其包括连接至氨基基团的烷基、烯基或炔基基团,而该氨基基团连接至羰基或硫代羰基基团的碳。所述术语还包括“芳基氨基羧基”基团,其包括连接至氨基基团的芳基或杂芳基部分,而该氨基基团连接至羰基或硫代羰基基团的碳。术语“烷基氨基羧基”、“烯基氨基羧基”、“炔基氨基羧基”和“芳基氨基羧基”包括其中的烷基、烯基、炔基和芳基部分分别连接氮原子、且所述氮原子进而连接羰基基团上的碳的部分。酰胺可被例如直链烷基、支化烷基、环烷基、芳基、杂芳基或杂环的取代基取代。酰胺基团上的取代基可进一步被取代。

[0656] 术语“任选地”指后面描述的一个或多个事件可以或可以不发生,并且包括发生的事件和不发生的事件两者。

[0657] 本文术语“药学上可接受的盐”指的是保留主题化合物的所需生物学活性且显示

最小的不希望毒理学效应的盐。这些药学上可接受的盐可以在化合物的最终分离和纯化过程中原位制备,或通过单独使纯化化合物的游离酸或游离碱形式分别与合适的碱或酸反应来制备。

[0658] 本文所用的术语“共同给予”及其衍生词指同时给予或以任何方式分开顺次给予一种或多种其它药物活性化合物,以治疗癌症、癌症或癌症治疗的副作用或一些其它疾病。优选地,如果所述给予不是同时进行的,则多种化合物彼此以紧密相近的时间关系给予。此外,所述多种化合物是否以相同剂型给予并不重要,例如,一种化合物可以局部给予而另一种化合物可以口服给予。

[0659] 式(I)-(III)的化合物包括所述化合物本身及其盐、其溶剂合物、其N-氧化物及其可应用的前药。在某些实施方式中,式(I)-(III)的化合物可包含酸性官能团,其酸性足以成盐。代表性的盐包括药学上可接受的金属盐例如钠、钾、锂、钙、镁、铝和锌盐;药学上可接受的金属盐的碳酸盐和碳酸氢盐,例如钠、钾、锂、钙、镁、铝和锌;药学上可接受的有机伯胺、仲胺和叔胺,包括脂族胺、芳族胺、脂族二胺和羟基烷基胺例如甲胺、乙胺、2-羟乙胺、二乙胺、三乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺和环己胺。

[0660] 在某些实施方式中,式(I)-(III)的化合物可包含基本官能团并因而能够通过用合适的酸处理来形成药学上可接受的酸加成盐。合适的酸包括药学上可接受的无机酸和药学上可接受的有机酸。代表性的药学上可接受的酸加成盐包括盐酸盐、氢溴酸盐、硝酸盐、甲基硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、氨基磺酸盐、磷酸盐、乙酸盐、羟基乙酸盐、苯基乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、异丁酸盐、戊酸盐、马来酸盐、羟基马来酸盐、丙烯酸盐、延胡索酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、水杨酸盐、对氨基水杨酸盐、乙醇酸盐、乳酸盐、庚酸盐、邻苯二甲酸盐、草酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、邻乙酰氧基苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟苯酸盐、甲氧基苯甲酸盐、扁桃酸盐、丹宁酸盐、甲酸盐、硬脂酸盐、抗坏血酸盐、棕榈酸盐、油酸盐、丙酮酸盐、双羟萘酸盐、丙二酸盐、月桂酸盐、戊二酸盐、谷氨酸盐、丙酸酯月桂硫酸盐(estolate)、甲磺酸盐(methanesulfonate, mesylate)、乙磺酸盐(ethanesulfonate, esylate)、2-羟基乙磺酸盐、苯磺酸盐(benzenesulfonate, besylate)、对氨基苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐(甲苯磺酸盐)和萘-2-磺酸盐。

[0661] 本发明的含氮化合物可通过用氧化剂(例如,3-氯过氧苯甲酸(mCPBA)和/或过氧化氢)处理来转换成N-氧化物以提供本发明的其它化合物。因此,当化合价和结构允许时,所显示的和要求保护的含氮化合物均考虑包括所示化合物及其N-氧化衍生物(其可被指定为 $N \rightarrow O$ 或 N^+-O^-)。此外,在其它例子中,可将本发明化合物中的氮转化为N-羟基化合物或N-烷氧基化合物。例如,N-羟基化合物可通过由氧化剂(例如m-CPBA)氧化母体胺来制备。在化合价和结构允许时,所显示的和要求保护的含氮化合物均考虑涵盖所示化合物及其N-羟基衍生物(即,N-OH)和N-烷氧基衍生物(即,N-OR,其中R是取代或未取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烯基、 C_1 - C_6 炔基、3-14元碳环或3-14元杂环)。

[0662] 在本说明书中,在一些情况中为方便起见,化合物的结构式代表特定的异构体,但本发明包括所有异构体,例如几何异构体、基于不对称碳原子的光学异构体、立体异构体、互变异构体等。此外,所述式代表的化合物可具有结晶多晶型。应注意,本发明化合物的任何晶型、晶型混合物或其酐或水合物都包括在本发明的范围内。此外,在体内降解本发明化合物而生成代谢物包括在本发明的范围内。

[0663] “异构”指的是具有同样分子式但原子连接序列或其原子的空间排列不同的化合物。原子空间排列不同的异构体称为“立体异构体”。彼此不成镜像的立体异构体称为“非对映异构体”，而彼此成不可叠加镜像的异构体称为“对映异构体”或有时称为光学异构体。含有等量相对手性的各对映异构体形式的混合物称为“外消旋混合物”。

[0664] 连接四个不相同取代基的碳原子称为“手性中心”。

[0665] “手性异构体”指的是具有至少一个手性中心的化合物。具有多于一个手性中心的化合物可以个别非对映异构体形式或以非对映异构体的混合物(称为“非对映体混合物”)形式存在。当存在一个手性中心时，立体异构体的特征是该手性中心的绝对构型(R或S)。绝对构型指的是取代基连接手性中心的空间排列。根据Cahn、Ingold和Prelog的序列规则(Sequence Rule)来排序连接至手性中心的取代基。(Cahn等, Angew.Chem.Internat.Edit.1966,5,385;勘误表511;Cahn等,Angew.Chem.1966,78,413;Cahn和Ingold,J.Chem.Soc.1951(伦敦),612;Cahn等,Experientia 1956,12,81;Cahn,J.Chem.Educ.1964,41,116)。

[0666] “几何异构体”指的是因为绕其双键或环烷基连接基团(例如,1,3-环丁基)的受阻转动而存在的非对映异构体。这些构型通过前缀顺式和反式或Z和E而拥有不同的名称,根据Cahn-Ingold-Prelog规则,所述前缀表示所述基团在该分子中的双键相同侧或相对侧。

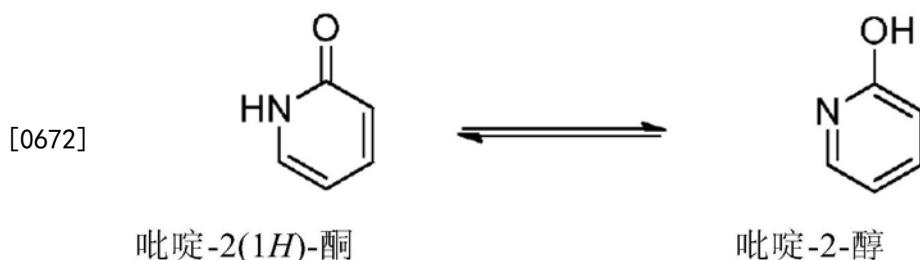
[0667] 应理解,本发明的化合物可描述为不同手性异构体或几何异构体。还应理解,当化合物具有手性异构或几何异构形式时,表示所有异构形式都意图包括在本发明的范围内,并且所述化合物的命名不排除任何异构形式。

[0668] 此外,本发明讨论的结构和其它化合物包括其所有阿托异构体(Atropic isomers)。“阿托异构体”是立体异构体的一种类型,其中两个异构体的原子空间排列不同。阿托异构体由于围绕中心键的大基团旋转的阻碍使其存在旋转限制。所述阿托异构体通常以混合物形式存在,然而,因近期在色谱技术领域的进步,已可在所选的情况中分离两种阿托异构体的混合物。

[0669] “互变异构体”是平衡存在的两种或更多种结构异构体之一,其易于从一种异构体形式转换成另一种异构体形式。这种转换造成伴随相邻共轭氢键转变的氢原子的形式迁移。互变异构体在溶液中以互变集合的混合物形式存在。在允许互变异构化的溶液中,互变异构体会达到化学平衡。所述互变体的精确比例取决于若干因素,包括温度、溶剂和pH。互变异构体可由互变异构化而相互转换的概念称为互变异构性。

[0670] 可能的各种互变异构性类型中,常见的有两种。在酮-烯醇互变异构中,电子和氢原子转移同时发生。环-链互变异构性源自糖链分子中的醛基团(-CHO)与相同分子中的一个羟基基团(-OH)反应生成用葡萄糖表示的环(环形)形式。

[0671] 常见的互变异构体对是:酮-烯醇、酰胺-腈、内酰胺-内酰亚胺、杂环中(例如,在核碱基例如鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶中)的酰胺-酰亚胺互变异构体,亚胺-烯胺和烯胺-烯胺。酮-烯醇平衡的一个示例是在吡啶-2(1H)-酮和对应的吡啶-2-醇之间的平衡,如下所示。



[0673] 应理解,本发明的化合物可描述为不同互变异构体。还应理解,当化合物具有互变异构形式时,意图将所有互变异构形式(包括其混合物)都包括在本发明的范围内,并且所述化合物的命名不排除任何互变异构形式。

[0674] 式(I)–(III)的化合物可以结晶或非结晶形式制备,若以结晶形式制备,则可任选地溶剂化,例如,为水合物。本发明范围包括化学计量的溶剂合物(例如,水合物)以及包含可变量溶剂(例如水)的化合物。

[0675] 本文所述的某些化合物可包含一个或多个手性原子,或可在其它情况下能够以两种对映异构体形式存在。下文要求保护的化合物包括对映异构体的混合物以及纯化的对映异构体或对映异构富集的混合物。本发明范围内还包括式(I)–(III)所示化合物和下文要求保护那些化合物的个体异构体,以及其任何完全或部分平衡的混合物。本发明还涵盖要求保护的化合物的个体异构体与其异构体的混合物,其中一个或多个手性中心是反转的。

[0676] 当有不同异构形式时,其可通过传统方法彼此分离或分辨,或任何给定的异构体可通过传统合成方法或通过立体特异性或不对称合成方法来获得。

[0677] 尽管在治疗应用中能够将式(I)–(III)的化合物及其盐、溶剂合物、N-氧化物等以净制剂形式给予(即不含额外运载体),但更常用的实践是一同配制活性成分与运载体或稀释剂。因此,本发明还提供药物组合物,其包括式(I)–(III)化合物及盐、溶剂合物等,以及一种或多种药学上可接受的运载体、稀释剂或赋形剂。式(I)–(III)的化合物及盐、溶剂合物、N-氧化物等如上所述。所述一种或多种运载体、稀释剂或一种或多种赋形剂必须是可接受的,这意味着它与该制剂的其它成分相容,并且对其受体无害。根据本发明的另一个方面,还提供制备药物制剂的方法,所述方法包括将式(I)–(III)的化合物或盐、溶剂合物、N-氧化物等与一种或多种药学上可接受的运载体、稀释剂或赋形剂混合。

[0678] 本领域技术人员应理解,式(I)–(III)化合物的某些受保护的衍生物(可在最终去保护阶段之前制得)可能不具有药理学活性,但在某些情况下,可口服或肠胃外给予并在这之后在体内代谢以形成具有药理学活性的本发明化合物。因此,此类衍生物可被称为“前药”。此外,本发明的某些化合物可作为本发明其它化合物的前药。本发明化合物的所有保护的衍生物和前药均包括在本发明范围内。本领域技术人员还应理解,当本发明化合物中存在某些官能度时,可将本领域技术人员称为“前体部分(pro-moiety)”的某些部分,置于合适的官能度上。本发明化合物的优选前药包括:酯、碳酸酯、半酯、磷酸酯、硝基酯、硫酸酯、亚砷、酰胺、氨基甲酸酯、含氮化合物、磷酰胺、糖苷、醚、乙缩醛和酮缩醇。

[0679] 此外,本发明的化合物,例如,所述化合物的盐,可以以水合或非水合(无水)形式或以与其它溶剂分子的溶剂合物形式存在。水合物的非限制性例子包括单水合物、二水合物等。溶剂合物的非限制性例子包括乙醇溶剂合物、丙酮溶剂合物等。

[0680] “溶剂合物”指的是含有化学计量或非化学计量溶剂的溶剂加成形式。一些化合物

趋于以晶状固态捕集固定摩尔比例的溶剂分子,从而形成溶剂合物。若溶剂是水,则形成的溶剂合物是水合物;若溶剂是醇,则形成的溶剂合物是醇化物。水合物通过使一个或多个水分子与所述物质的一个分子结合而形成,其中所述水保持其分子状态为H₂O。

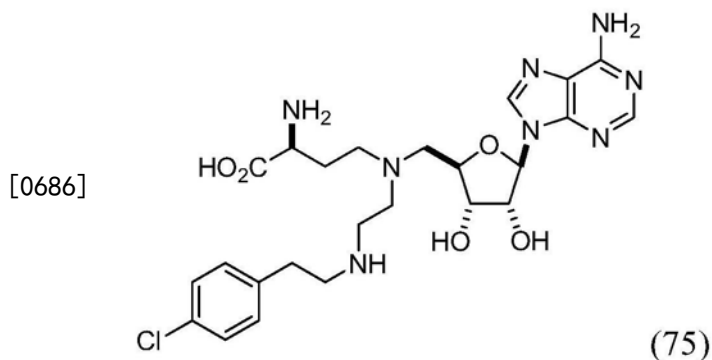
[0681] 本文中所用的术语“类似物”指的是结构上与一种化合物相似但组成上稍有不同的另一种化合物(比如一个原子由另一元素的原子替代,或存在特定官能团,或一个官能团由另一个官能团替代)。因此,类似物是与对照化合物在功能和外观上相似或相当,但结构或来源不同的化合物。

[0682] 本文中定义的术语“衍生物”指的是具有常规核心结构但被本文所述的不同基团取代的化合物。例如,式(I)代表的全部化合物都是经芳基或杂芳基取代的苯化合物,并确以式(I)作为常规核心结构。

[0683] 术语“生物电子等排体”指的是由原子或原子基团与另一种广义近似的原子或原子基团交换生成的化合物。生物电子等排替代的目的是生成具有与母体化合物生物性质相似的新型化合物。所述生物电子等排替代可以物理化学或拓扑学为基础。羧酸生物电子等排体的例子包括但不限于,酰基磺酰胺、四唑、磺酸盐和膦酸盐。参见例如,Patani和LaVoie,Chem.Rev.96,3147-3176,1996。

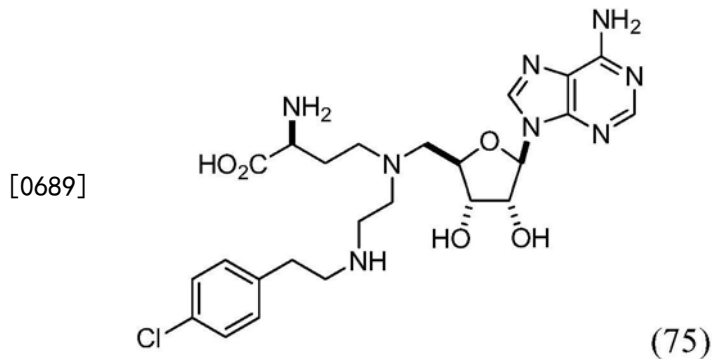
[0684] 本发明意在囊括提出的所有化合物中出现的原子的全部同位素。同位素包括具有相同原子序号但不同质量数的那些原子。通过一般实施例的非限制方式,氢的同位素包括氕和氘,碳的同位素包括C-13和C-14。

[0685] 所述化合物还包括化合物75



[0687] 及其药学上可接受的盐。

[0688] 本发明还包括药物组合物,所述药物组合物包含化合物75



[0690] 或其药学上可接受的盐。

[0691] 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。

[0692] 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所述盐释放出时无毒。药学上相容性盐可用许多酸形成,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。

[0693] 药学上可接受的酸加成盐包括用无机酸(例如盐酸和氢溴酸)形成的那些盐,以及用有机酸(例如马来酸)形成的那些盐。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。

[0694] 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)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。

[0695] 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。

[0696] 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,且本发明包括这两种对映体以及对映体混合物例如其外消旋混合物的使用。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、

底物、催化剂或溶剂通过不对称合成来合成,或通过不对称转化将一种对映体转化成另一种对映体。

[0697] 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。所述非对映体异构体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。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。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。

[0698] 试剂盒

[0699] 如果需要,EZH2拮抗剂可存在于试剂盒(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。

[0700] 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、二甲基化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。

[0701] 试剂盒还可包括EZH2突变型检测试剂,例如,以试剂盒形式一同包装的通过具有与突变型EZH2核酸序列的部分互补的同源核酸序列(例如寡核苷酸序列)而特异性鉴定突变型核酸序列的核酸,,或针对由突变型EZH2核酸所编码蛋白质的抗体。所述寡核苷酸可以是EZH2基因的片段。例如,所述寡核苷酸的长度可以是200、150、100、50、25、10或更少核苷酸。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、萤光素酶、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)可包含在试剂盒中。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)、测序和质谱(MS)。

[0702] 定义

[0703] 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。本文中定义和使用的定义都替代所定义术语的词典释义、通过引用纳入的参考文献中的定义和/或所定义术语的一般含义。

[0704] 本文使用冠词“一个”和“一种”表示一个或一个以上的(即至少一个)该冠词语法上的宾语。举例而言,“一种元件”表示一个元件或者一个以上的元件。

[0705] 本说明书中和权利要求中所用的短语“和/或”应理解为指相关联元件“之一或两者”,即,在一些情况中联合存在而在其它情况中非联合存在的元件。采用“和/或”列出的多种元件应以同一种方式解释,即如此连述的“一种或多种”所述元件。由“和/或”从句特定指出的元件以外的其它元件可选存在,不论是否与那些特定指出的元件相关。因此,作为一个非限定性例子,提及“A和/或B”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。

[0706] 本文的说明书和权利要求所用的“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”或在权利要求中使用时的“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”,本文所用的术语“或”应仅解释为指示排他性选择(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。

[0707] 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指出的元件以外,元件可选存在,不论是否与特定指出的那些元件相关。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”)在一个实施方式中可以指至少一种A,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B,可选包括多于一种的B,无A存在(并可选包括A以外的其它元件);在另一实施方式中,指至少一种A,可选包括多于一种的A,以及至少一种B,可选包括多于一种的B(并可选地包括其它元件);等等。

[0708] 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列举该方法步骤或行为的顺序。

[0709] 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”、“持有”、“有……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中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。

[0710] 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(给予一种或多种治疗剂的时间不同于给予一种或多种额外治疗剂的时间),只要这些治疗剂在所述患者内有一些程度的同时存在。

[0711] 术语“癌前病症”或“癌变前病症”指若不治疗即可导致癌症的疾病、综合征或结果。其为与显著增大的癌风险相关联的广义状态。

[0712] 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。该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;而是指,“治疗”可以是病症的管理形式。当本文所述化合物用于处理有害的增殖细胞(包括癌)时,“治疗”包括部分或完全破坏所述有害的增殖细胞,但对正常细胞的破坏影响最小。有害的快速增殖细胞(包括癌细胞)的所需处理机制在细胞水平上是凋亡。

[0713] 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者预防或减缓风险个体中的临床前显著疾病阶段的开始。这包括预防性治疗有疾病发展风险的个人。

[0714] 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癌症或癌前病症风险的人对象。对预防方法而言,所述对象是任何人对象。为了说明预防目的,对象可以是有风险或遗传上倾向于患有表征为有害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有害快速细胞增殖等的疾病而面临风险。

[0715] 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.))。

[0716] 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。

[0717] “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)活性的至少约50%、75%、85%、90%、95%或98%或更多。

[0718] 所述术语“调节”(和语法同义词)指活性增加或减少。在特定的实施方式中,术语“增加”或“增强”(和语法同义词)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,术语“下降”或“减少”(和语法同义词)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、底物或其它参数无法检测。特定提供EZH2拮抗剂。

[0719] 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。

[0720] 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。

[0721] 所述术语“对照”或“参比”所指甲基化水平(例如,单甲基化水平、二甲基化水平或三甲基化水平)是在分离自所述对象的相邻非肿瘤组织中测得、在来自健康对象的健康组织中检测到,或由病理学家以本领域标准方法建立的。

[0722] “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(包括但不限于粘液、血液、血浆、血清、尿液、唾液和精液)。

[0723] 说明书全文中,当描述组合物具有、包括或包含具体成分时,也意指所述组合物基本由或由所述成分组成。类似地,当描述方法或过程具有、包括、包含具体工艺步骤时,所述过程也基本由或由所述工艺步骤组成。此外,应理解,只要本发明保持可行,步骤的顺序或进行某些动作的顺序是不重要的。而且,可同时实施两个或更多个步骤或动作。

[0724] 本发明的合成过程可允许多种官能团,因此可使用多种被取代的起始材料。所述

过程一般在总体过程结束或接近结束时提供所需最终化合物,尽管在某些例子中希望将所得化合物进一步转换成药学上可接受的盐、酯或其药物前体。

[0725] 可使用市售可得的起始材料、文献中已知的化合物或由易制备的中间体,通过采用本领域技术人员已知的标准合成方法和过程或技术员按本文指导显而易见的合成方法和过程,通过不同方式制备本发明的化合物。用于有机分子制备和官能团转化与操控的标准合成方法和过程可获自相关科学文献或获自本领域的标准教材。尽管不限于任何一个或多个来源,经典教科书例如Smith, M.B., March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure (《马奇高等有机化学: 反应、机理和结构》), 第五版, 纽约的约翰威利父子公司 (John Wiley & Sons), 2001; 和Greene, T.W., Wuts, P.G.M., Protective Groups in Organic Synthesis (《有机合成中的保护基团》), 第三版, 纽约的约翰威利父子公司, 1999 (其通过引用纳入本文) 是有用且公认的本领域技术人员已知的关于有机合成的参考教科书。以下合成方法的描述旨在说明而非限制制备本发明化合物的一般方法。本发明的化合物可通过本领域技术人员熟悉的不同方法而方便地制备。具有本文所述各式的本发明的化合物可根据如下方法由市售可得的起始物质或可采用文献方法制备的起始物质制备。这些方法显示本发明代表性化合物的制备。

[0726] 通过上述方法设计、选择和/或最优化的化合物一旦生成, 即可用本领域技术人员已知的多种实验表征以确定所述化合物是否具有生物活性。例如, 所得分子可通过传统实验表征以确定其是否具有预测活性、结合活性和/或结合特异性, 所述传统实验包括但不限于下文所述的那些。

[0727] 此外, 可使用高通量筛选来加速所用实验的分析。因此, 使用本领域已知的技术能够快速筛选本文所述分子的活性。用于进行高通量筛选的一般方法论已有描述, 例如, Devlin (1998) High Throughput Screening (《高通量筛选》), Marcel Dekker; 和美国专利号5,763,263。高通量实验可使用一种或多种不同的实验技术, 包括但不限于下文所述的那些。

[0728] 本文引用的所有出版物和专利文献都通过引用纳入本文, 就好像每个所述出版物或文献都特定和单独表示通过引用纳入本文。对上述出版物和专利文献的引用并不表示承认上述任何内容是相关的在先技术, 也并不表示承认其内容或日期。现在, 本发明已以书面说明书方式描述, 本领域技术人员应认识到可以多种实施方式实践本发明, 而上文的说明书和下文的实施例旨在说明而非限制本发明的权利要求。

实施例

[0729] 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。

[0730] 实施例1——重组五组分PRC2复合物

[0731] 野生型EZH2 (GenBank登录号NM_004456) 或Tyr641突变型与野生型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 (BPS Bioscience), 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。

[0732] 实施例2——H3、H4肽组

[0733] 各肽有15个氨基酸的44肽文库由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,在相连肽序列间有5个残基重叠。各肽的N末端附接生物素,其C末端以酰胺呈现。通过液相色谱/质谱分析确定纯度(>95%) 和身份。

[0734] 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、二甲基化或三甲基化侧链胺的赖氨酸27合成具有人H3残基21-44 (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末端附接生物素。

[0735] 实施例3——细胞中H3-K27甲基化状态的评价

[0736] 细胞系OCI-LY19 (ACC 528)、KARPAS-422 (ACC 32) 和WSU-DLCL2 (ACC575) 获自DSMZ。细胞系DB (CRL-2289) 和SU-DHL6 (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-DHL6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50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.25%DOC、1%NP-40和1mM 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)。用Misonix XL-2000对裂解液超声波处理,设定为3进行2轮各10次1秒脉冲处理,以确保组蛋白的有效提取,然后使用台式离心机在4℃以14,000rpm离心10分钟以澄清。由BCA实验 (皮尔斯公司 (Pierce)) 测定蛋白质浓度。4微克的各裂解液在4-20%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 (CST 9733;1:10000稀释)、兔抗-H3-K27me2 (CST 9755;1:5000稀释)、兔抗-H3-K27me1 (Active Motif (活性基序) 39377;1:5000稀释) 以及小鼠抗-总H3 (CST 3638;1:20000稀释)。在一抗孵育后,用IRDye 800CW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。

[0737] 实施例4——酶学

[0738] 如上所述,先前已推断出Tyr641处的疾病相关变化造成就EZH2催化H3-K27甲基化而言的功能缺失。然而,难以解释由酶杂合性得出的H3-K27甲基化速率的假定性减少是恶性表型的基础,特别是考虑到先前有数据表明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) 过表达涉及H3-K27三甲基化的增加,这些结果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;和Sarma等. (2008) Mol Cell Biol 28:2718-31)。因此,更细致地探究这些突变的酶学。

[0739] 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(标称8nM,基于蛋白定量)的各复合物催化³H-甲基从经标记S-腺蛋氨酸(SAM)转移至代表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。

[0740] 就突变PRC2复合物对肽和核小体底物不一致的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;这些位点会配合核小体上的互补识别元件,而这在小肽底物上不成立。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突变型显示WT复合物活性的7%,而所有其它突变型显示WT复合物活性的<1%。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甲基化潜在位点的许多H3-K27外赖氨酸残基,这些残基不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。考虑到小肽底物和重组H3蛋白底物上突变活性之间的极佳一致性,这种可能性不太可能成立。

[0741] 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,解答了现有结果和那些先前所报道结果之间明显的不一致(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,那些突变型相对于WT的比活性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。

[0742] 实施例5——酶学

[0743] 为了进一步理解这些突变型的酶活性,并调和对肽底物和核小体底物的活性之间的显著差异,研究这些酶形式在H3:21-44肽情况下催化多种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。然而显著的是,发现所有突变酶在催化单甲基化以及特别是二甲基化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二甲基和三甲基H3-K27的后续步骤的催化中比WT酶更有效。

[0744] 通过稳态酶动力学探究WT和突变EZH2的差异底物特异性的源由。如表2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在这些酶形式间显示最小变化,范围从208±50到304±64nM。相反,由酶对不同底物的k_{cat}值之间的差异证明,底物利用上的差异看来源于过渡态识别(表2)。结果显示,由比率k_{cat}/K(其中K是

K_m 或 $K_{1/2}$,取决于底物身份;见上) 定量的催化效率在对于不同H3-K27甲基化状态在WT和突变酶之间有不同(表2)。

[0745] 表2. 由包含EZH2野生型或Y641突变型的PRC2催化的甲基化反应的稳态动力学参数。

[0746]

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
	2	191 ± 10	84.0 ± 2.8	44.0 ± 2.7
	核小体	176 ± 19	65.4 ± 2.0	37.2 ± 4.2

[0747]

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

[0748] ^a活性过低无法检测。

[0749] 实施例6——酶学

[0750] 表2中所列的稳态动力学参数使得能够相对于WT酶纯合细胞,计算不同突变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,做了多种简化假设:(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。

[0751] 利用这些假设,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。从这些模拟显现出清晰模式。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突变型的增加30%至Y641N突变型的增加>400%。与此同时,所有突变型的H3-K27me2水平下降至<50%WT的水平,而所有突变型的H3-K27me1水平相对于WT降低约一半。

[0752] 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),这些B细胞淋巴瘤细胞系已知是WT EZH2纯合的(OCI-LY19),或是EZH2Y641N杂合的(DB,KARPAS 422和SU-DHL-6)或EZH2Y641F杂合的(WSU-DLCL2)。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,尽管所述模拟中使用了假设和测试中使用了非生理肽替代物作为底物。

[0753] 因此,在所有含Y641突变型的细胞中都观察到H3-K27me3相对于WT增加,在所有含Y641突变型的细胞中都观察到H3-K27me2相对于WT减少,而在所述四种突变细胞系的至少两种细胞系中观察到H3-K27me1减少。WT和KARPAS422及SU-DHL-6细胞中几乎相当的H3-K27me1水平可能反映模拟中未考虑的WT和突变EZH2的不同表达水平,EZH1的不同贡献,或未其它因素。即便如此,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型而言杂合的恶性细胞表型。

[0754] 实施例7——PRC2甲基转移酶活性的体外实验

[0755] 肽底物的Flashplate实验。对于EZH2的WT和Y641突变型的最初比较,含未甲基化K27 (NEP公司(New England Peptide))、单甲基化K27(密理博公司(Millipore))或二甲基化K27(密理博公司)的生物素化组蛋白H3:21-44肽以800nM浓度与1,700nM S-腺苷甲硫氨酸-C1 (SAM) 和300nM氟化SAM(帕金埃尔默公司(Perkin Elmer))混合。然后,将该底物混合物加至含PRC2的实验缓冲液(20mM BICINE、1mM DTT、0.002%吐温20、0.005%牛皮明胶(BSG),pH 7.6)。使反应推进所示时间间隔,然后通过添加过量冷SAM(终浓度600 μ M)来终止。已终止的反应混合物转移至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 NXTHTS闪烁发光计数器(帕金埃尔默公司)上检测。各时间点代表六个单独反应的平均值。在肽或SAM浓度变化而其它底物都处于饱和条件的相同反应条件下测定稳态动力学参数。速度作图为不同底物浓度的函数,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2,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2); k_{cat}/K 的分数误差如下确

定:

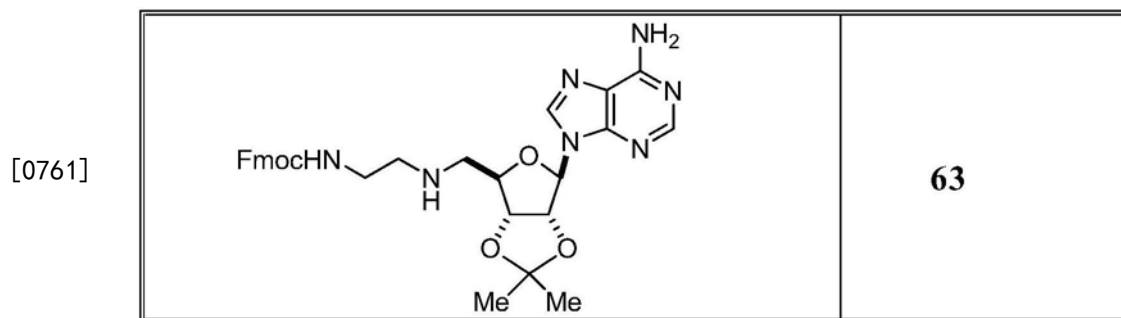
$$[0756] \quad \mu \frac{k_{cat}}{K} = \sqrt{\left(\frac{\mu k_{cat}}{k_{cat}} \right)^2 + \left(\frac{\mu K}{K} \right)^2} \quad (1)$$

[0757] 其中, μk_{cat} 是 k_{cat} 的标准误差, 而 μK 是 K 的标准误差。

[0758] 使用寡聚核小体的滤板实验。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和氘化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终止。已终止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 μ L), 然后在TopCount闪烁发光计数器上检测氘掺入。在核小体或SAM浓度变化而其它底物都处于饱和条件的相同反应条件下测定稳态参数。速度作图不同底物浓度的函数, 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。

[0759] 实施例8——化合物制备

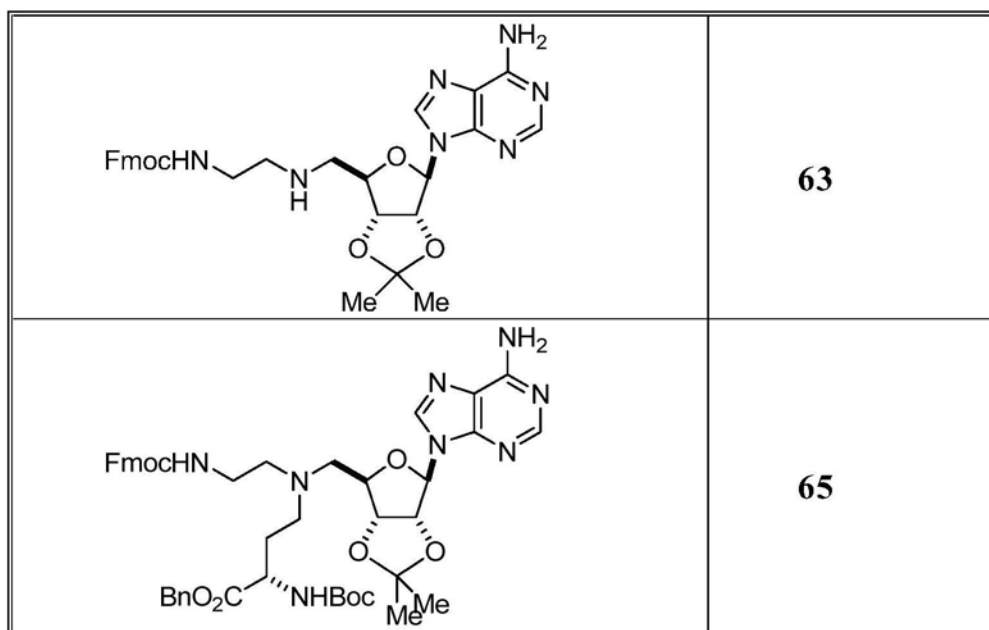
[0760] A. 化合物63的制备



[0762] 向9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(氨甲基)-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]二氧代-4-基)-9H-嘌呤-6-胺 (Townsend, A.P.等 (2009) Org. Let. 11:2976-2979) (3.05g, 9.96mmol) 的DCE溶液 (250mL) 添加 (9H-芴-9-基) 甲基 (2-氧代乙基) 氨基甲酸酯 (2.8g, 9.96mmol) 和NaB(OAc)₃H (2.96g, 13.95mmol), 所述混合物在室温搅拌4小时。添加K₂CO₃溶液至pH 8~9。添加DCM, 用Na₂SO₄干燥有机层, 用SGC (DCM:MeOH=30:1) 浓缩并纯化, 以获得63 (2.9g, 得率:50.9%)。

[0763] B. 化合物65的制备

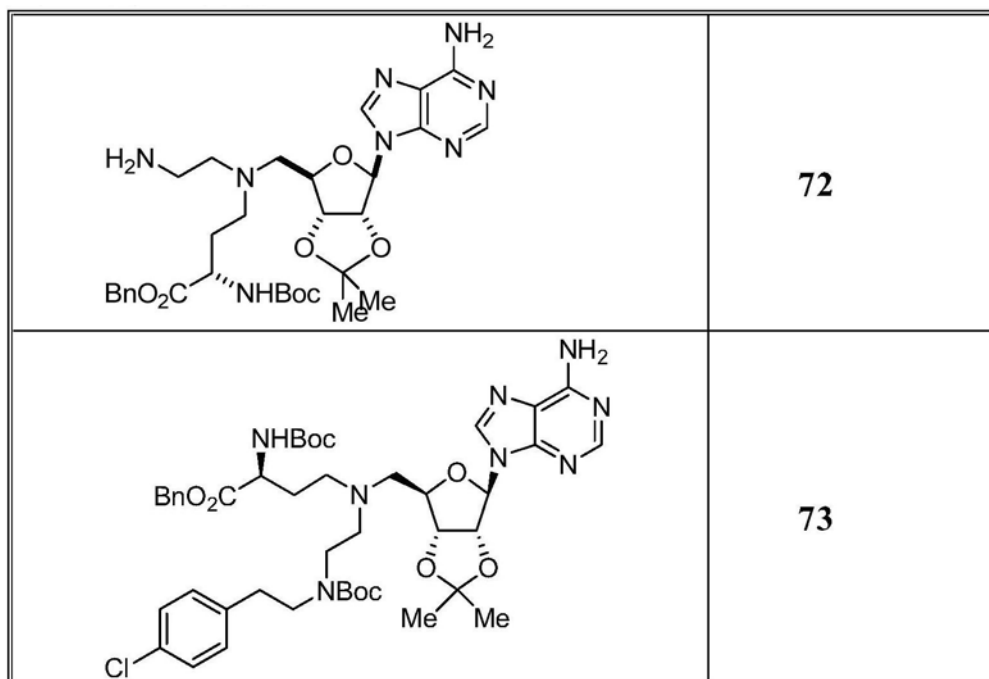
[0764]



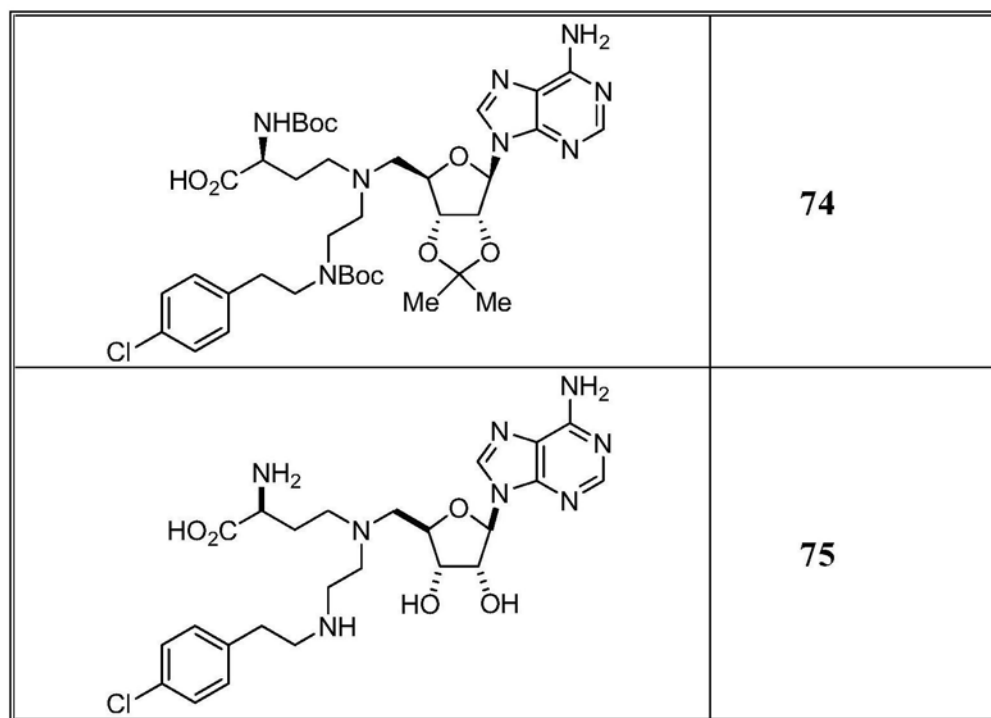
[0765] 向63 (2.9g, 5.08mmol) 的DCE溶液 (250mL) 添加(S)-苄基2-((叔丁氧基羰基) 胺)-4-氧代丁酸酯 (1.56g, 5.08mmol) 和NaB(OAc)₃H (1.51g, 7.11mmol), 所述混合物在室温下搅拌4小时。添加K₂CO₃溶液至pH 8~9。添加DCM, 用Na₂SO₄干燥有机层, 用SGC (DCM:MeOH=100:1) 浓缩并纯化, 以获得65 (2.8g, 得率:63.9%)。

[0766] C. 化合物75的制备

[0767]



[0768]



[0769] 步骤1. 向化合物65B (2.2g, 2.55mmol) 的DCM溶液 (10mL) 添加Et₂NH (1.1g, 15.3mmol), 所述混合物在室温下搅拌4小时。浓缩该混合物以获得粗制品72 (2.2g)。

[0770] 步骤2. 向72 (167mg, 0.26mmol) 的MeOH (4mL) 搅拌溶液添加2-(4-氯苯基) 乙醛 (40mg, 0.26mmol), 并在室温下搅拌20分钟。然后, 添加Na (OAc)₃BH (83mg, 0.39mmol) 和HOAc (0.4mL) 并搅拌过夜。添加NaHCO₃ (水溶液) 并用DCM (25mL × 3) 萃取, 用盐水洗涤, 用Na₂SO₄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, 得率: 14%)。LC/MS (m/z): 779.7 [M+1]⁺。

[0771] 步骤3. 化合物73 (30mg, 0.038mmol) 和10% Pd/C (15mg) 的MeOH混合物 (2mL) 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, 得率: 69%)。LC/MS (m/z): 689.7 [M+1]⁺。

[0772] 步骤4. 化合物74 (20mg, 0.028mmol) 的90% TFA溶液 (1mL) 在室温搅拌1小时, 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]⁺。

[0773] 实施例9——SAH对EZH2野生型和Y641突变型的抑制

[0774] S-腺苷-L-高半胱氨酸 (SAH) 在DMSO中3倍连续稀释 (10个点), 并取1μL接种于384孔微量滴定板内。阳性对照 (100%抑制标准) 是100μM终浓度的SAH, 而阴性对照 (0%抑制标准) 含有1μL DMSO。然后, 使SAH和每孔40μL的EZH2野生型和突变型 (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10μL底物混合物, 所述混合物在pH 7.6的实验缓冲液中含有150nM的S-腺苷甲硫氨酸-C1 (SAM)、100nM氘化SAM和150nM生物素化的寡聚核小体。已终止的酶反应转移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。

[0775] 结果见图7。IC₅₀值示于表3。

[0776] 表3.SAH对WT EZH2和EZH2的Y641突变型的抑制。

[0777]

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

[0778] 实施例10——化合物75对EZH2野生型和Y641突变型的抑制

[0779] 化合物75在DMSO中3倍连续稀释(10个点),并取1μL接种于384孔微量滴定板内。阳性对照(100%抑制标准)是100μM终浓度的SAH,而阴性对照(0%抑制标准)含有1μL DMSO。然后,使化合物75和每孔40μL的EZH2野生型和突变型(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10μL底物混合物,所述混合物在pH 7.6的实验缓冲液中含有150nM的S-腺苷甲硫氨酸-C1(SAM)、100nM氟化SAM和150nM生物素化的寡聚核小体。已终止的酶反应转移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。

[0780] 结果见图8。IC₅₀值示于表4。

[0781] 表4.化合物75对WT EZH2和EZH2的Y641突变型的抑制。

[0782]

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

[0783] 实施例11——H3-K27me2/me3比率预测对EZH2抑制剂的敏感性

[0784] 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5。主要细胞系是B细胞淋巴瘤细胞系,但是也包括两种黑素瘤细胞系。IGR1是最近发现包含EZH2中Y641N突变的黑素瘤细胞系,而A375细胞则纳入作为WTEZH2黑素瘤对照细胞系。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细胞是个例外,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,EZH2Y641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。总体上,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。

[0785] 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(A677G)中的H3-K27me3水平高于其它WT细胞系,而H3-K27me2水平则相反。在Y641突变细胞系和普费弗(Pfeiffer)细胞系(A677G)中,H3-K27me3水平高于H3-K27me2水平,而在其它WT细胞系中则相反。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。

[0786] 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检测福尔马林固定石蜡包埋的患者肿瘤组织样品中与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细胞系都是H3-K27me2染色阳性,而所有T641突变细胞系和Pfeiffer细胞(A677G)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。

[0787] 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EZH2Y641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16nM。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)。

[0788] 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显示按EZH2Y641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(A677G)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。

[0789] 这些结果显示,在患者中通过使用技术例如western印迹、MS或IHC,鉴定患者肿瘤中的EZH2Y641突变和/或检测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。

[0790] 表5. 本研究中使用的细胞系。

[0791]

癌症	EZH2状态	细胞系
淋巴瘤: DLBCL(弥散性大细胞B细胞淋巴瘤)和其它B细胞淋巴瘤	野生型	OCI-LY19
		HT
		MC116

[0792]	瘤	BC-1
		BC-3
		Toledo
		DOHH-2
		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)
		SU-DHL-4 (Y641S)
黑素瘤	野生型	A375
	Y641突变	IGR-1 (Y641N)

[0793] 实施例12——重组4组分PRC2复合物

[0794] 野生型 (WT) EZH2 (GenBank 登录号NM_004456) 或A677G和A687V突变型与野生型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的活性PRC2复合物。最终PRC2制备物的纯度通过SDS-PAGE采用考马斯蓝染色评估, 而蛋白质浓度在Bradford试验中采用牛血清白蛋白标准曲线来确定。

[0795] 实施例13——PRC2甲基转移酶活性的体外实验

[0796] 采用肽底物的闪盘 (Flashplate) 试验标准方法研究含野生型或突变型EZH2的PRC2复合物的活性, 该研究采用代表人H3的氨基酸序列的残基21-44 (H3:21-44) (其中赖氨酸27显示未修饰、单甲基化、二甲基化或三甲基化侧链胺) 的一系列四种肽进行, 所述肽由如下序列组成, 其中带修饰的H3-K27赖氨酸有下划线, ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGG [K-Ahx-Biot]-酰胺 (SEQ ID NO:20)。生物素 (Biot) 通过氨基己基接头 (AHX) 附至C-末端赖氨酸 (K) 残基, 该接头连至赖氨酸侧链胺 (21世纪生化公司)。为比较WT突变和突变型EZH2的活

性,使生物素化的组蛋白H3:21-44肽与内含S-腺苷甲硫氨酸(SAM;西格玛奥德里奇公司)和含氚SAM(^3H -SAM;美国放射标记化学品公司(American Radiolabeled Chemicals))和重组4-组分PRC2的试验缓冲液(20mM BICINE,1mM DTT,0.002%吐温20,0.005%牛皮肤明胶(BSG),pH 7.6)混合物合并。使反应以指示的时间间隔进行,然后通过添加过量冷SAM(终浓度100 μM)终止。已终止的反应混合物转移至链霉亲和菌素被覆的闪盘(Flashplate)(帕金埃尔默公司(Perkin Elmer),目录号SMP410),使其结合1小时,然后所述盘在Biotek EL-405x洗盘机上清洗,并在TopCount NXT HTS闪烁发光计数器(帕金埃尔默公司)上读数。

[0797] 实施例14——酶学

[0798] 用EZH2野生型和A677G或A687V突变形式来制备重组4-组分PRC2复合物(参见上述实施例12;Cao等.(2004) Mol Cell 15:57-67)。初始时,测试各复合物催化 ^3H -甲基从标记的S-腺苷甲硫氨酸(SAM)转移到各四种H3:21-44肽的能力。将酶连续稀释,并添加肽(200nM)和SAM(200nM ^3H -SAM与800nM未标记的SAM)的混合物。以15分钟的间隔通过添加过量的未标记的SAM来终止反应,基于粗记数/分钟(CPM)随时间变化的线性回归来计算反应速率。如图15所示,突变型酶显示与野生型酶不同的活性谱。A677G和A687V突变型对所有未甲基化、单甲基化、和二甲基化的H3:21-44肽具有强活性,而野生型酶仅显示对未甲基化和单甲基化的肽具有强活性。对照肽,包含完全三甲基化的H3-K27,在该试验中是未甲基化的,指示H3-K27是靶赖氨酸。

[0799] 实施例15——酶学

[0800] 为了进一步理解这些突变型的酶活性,通过稳态酶动力学来探索对野生型和突变型EZH2具有不同底物特异性的源由。进行包含H3-K27肽与固定酶(4nM)和SAM(200nM ^3H -SAM和800nM未标记的SAM)滴定的反应。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,而不是更常见的米氏常数 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))。如表6中总结,突变型有对基态底物识别的作用如未甲基化肽底物的较低 $K_{1/2}$ 和二甲基化的肽底物的较高 $K_{1/2}$ 值所示。此外,酶的最大速度受突变的影响。A677G突变型导致对无甲基、单甲基和二甲基H3-K27肽底物的 k_{cat} 分别增至2.9、3.7和22倍,而A687V突变型导致对无甲基H3-K27肽的 k_{cat} 减少3倍,但造成单甲基和二甲基H3-K27肽的 k_{cat} 分别增至3.5和2.5倍。SAM K_m 在这些酶形式间显示最小变化,对在H3-K27残基上含有优选甲基化状态的底物而言是 $403 \pm 64\text{nM}$ 至 $899 \pm 89\text{nM}$ 。

[0801] 表6.WT和突变型EZH2酶的稳态酶动力学总结

[0802]

酶	肽底物 H3-K27 甲基 化状态	$K_{1/2}$ (nM)	k_{cat} (h^{-1})	$k_{cat}/K_{1/2}$ ($h^{-1} \cdot nM^{-1}$ X 10^{-4})
*WT	0	154 ± 12	4.80 ± 0.20	305 ± 26
	1	337 ± 26	3.33 ± 0.21	99 ± 9
	2	144 ± 11	1.08 ± 0.04	75 ± 6
A677G	0	88 ± 6	14.05 ± 0.54	1590 ± 120
	1	222 ± 51	12.25 ± 1.67	570 ± 150
	2	522 ± 117	23.85 ± 3.60	450 ± 120
A687V	0	43 ± 3	1.58 ± 0.08	370 ± 30
	1	176 ± 13	11.49 ± 0.50	650 ± 60
	2	352 ± 155	2.70 ± 0.65	80 ± 40

[0803] *野生型数据先前在Wigle等, Febs Lett (2011) Oct 3; 585 (19): 3011-4中(采用4组分EZH2)公开。

[0804] 实施例16——EZH2抑制剂对EZH2野生型和EZH2突变型的抑制

[0805] 测试化合物在DMSO中以10点-曲线3倍连续稀释, 并采用装有384-通道头的Platamate Plus仪(热科学公司(Thermo Scientific))以一式两份形式将1 μ L点入384孔微板。该试验中测试化合物的最高终浓度为10 μ M。阳性对照(100%抑制标准)是1mM终浓度的SAH, 而阴性对照(0%抑制标准)含有1 μ L DMSO。然后将测试化合物与每孔40 μ L的野生型EZH2(终浓度为4nM)、Y641F EZH2(终浓度为0.1nM)和A677G与A687V EZH2(终浓度各为2nM)以及肽在1X试验缓冲液(20mM BICINE pH=7.6, 1mM DTT, 0.002%吐温20, 0.005%BSG)中孵育30分钟。就野生型EZH2和A677G EZH2试验而言, 含有未甲基化的K27的生物素化的肽H3:21-44以200nM的终浓度存在, 而在A687V EZH2试验中, 含有单甲基化K27的生物素化的肽H3:21-44以200nM的终浓度存在, 并且在Y641F EZH2试验中, 含有二甲基化的K27的生物素化的肽H3:21-44以200nM的终浓度存在。为了起始含有野生型EZH2酶的反应, 每孔添加10 μ L底物混合物, 所述底物混合物包含1X试验缓冲液中的未标记的SAM(终浓度1800nM)和³H-SAM(终浓度200nM)。为了起始含有Y641F EZH2酶的反应, 每孔添加10 μ L底物混合物, 所述底物混合物包含1X试验缓冲液中的未标记的SAM(终浓度700nM)和³H-SAM(终浓度300nM)。为了起始含有A677G或A687V EZH2的反应, 每孔添加10 μ L底物混合物, 所述底物混合物包含未标记的SAM(终浓度400nM)和³H-SAM(终浓度100nM)。反应进行90分钟, 然后用过量未标记的SAM(167 μ M)终止, 然后转移至链霉亲和素被覆的闪盘(帕金埃尔默公司, 目录号SMP410), 允许结合1小时, 然后在TopCount NXT HTS(帕金埃尔默公司)上检测。从%酶活性抑制的4参数拟合获得IC₅₀值, 并在表7中制表。用于得出IC₅₀值的算式如下所示。

[0806] %抑制计算

$$[0807] \quad \% \text{ 抑制} = 100 - \left(\frac{dpm_{cmpd} - dpm_{min}}{dpm_{max} - dpm_{min}} \right) \times 100$$

[0808] 其中dpm=分解/分钟,cmpd=测试孔中的信号,而min和max分别是最小和最大信号对照。

[0809] 四参数IC50拟合

$$[0810] \quad Y = \text{底值} + \frac{(\text{顶值}-\text{底值})}{(1 + (\frac{X}{IC_{50}})^{Hill系数})}$$

[0811] 其中顶值和底值一般允许浮动,但在3参数拟合中可分别固定在100或0。Hill系数一般允许浮动,但在3参数拟合中可固定在1。Y是%抑制,且X是化合物浓度。

[0812] 表7.EZH2抑制剂对野生型EZH2和突变型EZH2的抑制。

[0813]

化合物 编号	EZH2抑制剂	WT (uM)	Y641F (uM)	A677G (uM)	A687V (uM)
1.	SAH	6.9082	16.6193	6.2379	5.9034
2.	EPZ004710	2.9758	3.7887	0.3187	0.5378
3.	EPZ004744	1.5203	0.7432	0.1128	0.1354
4.	EPZ005030	0.2600	0.1846	0.0418	0.0504
5.	EPZ005100	0.3579	0.2923	0.0316	0.0599
6.	EPZ005260	2.3755	1.5781	0.2130	0.3189
7.	EPZ005687	0.0950	0.0750	0.0113	0.0082
8.	EPZ006089	0.2300	0.3110	0.0190	0.0277
9.	EPZ006438	0.0062	0.0111	0.0022	0.0015
10.	EPZ006632	0.0025	0.0034	0.0040	0.0032
11.	EPZ007038	0.0099	0.0123	0.0060	0.0032
12.	EPZ007209	0.0065	0.0074	0.0086	0.0068
13.	EPZ007210	0.0043	0.0044	0.0038	0.0036
14.	EPZ007227	0.0143	0.0207	0.0122	0.0128
15.	EPZ007426	0.0181	0.0088	0.0034	0.0040
16.	EPZ007428	0.0014	0.0055	0.0019	0.0021
17.	EPZ007478	0.0088	0.0114	0.0042	0.0071
18.	EPZ007648	0.0025	0.0079	0.0058	0.0067
19.	EPZ007649	0.0094	0.0092	0.0096	0.0082
20.	EPZ007655	0.0125	0.0104	0.0192	0.0171
21.	EPZ007692	0.0100	0.0117	0.0116	0.0103
22.	EPZ007789	0.0108	0.0114	0.0048	0.0051
23.	EPZ007790	0.0169	0.0158	0.0073	0.0065
24.	EPZ008205	0.0129	0.0093	0.0112	0.0101
25.	EPZ008277	0.0333	0.0092	0.0023	0.0055
26.	EPZ008278	0.0384	0.0106	0.0093	0.0191
27.	EPZ008279	0.0223	0.0182	0.0022	0.0051

[0814]

化合物 编号	EZH2抑制剂	WT (uM)	Y641F (uM)	A677G (uM)	A687V (uM)
28.	EPZ008280	0.0067	0.0029	0.0028	0.0039
29.	EPZ008286	0.0043	0.0025	0.0015	0.0018
30.	EPZ008335	0.0065	0.0033	0.0015	0.0029
31.	EPZ008336	0.0057	0.0036	0.0013	0.0024
32.	EPZ008337	0.0087	0.0015	0.0008	0.0014
33.	EPZ008338	0.0120	0.0096	0.0031	0.0072
34.	EPZ008344	0.0124	0.0036	0.0016	0.0046
35.	EPZ008491	0.0091	0.0014	0.0029	0.0029
36.	EPZ008493	0.1320		0.0127	0.0882
37.	EPZ008494	0.0079	0.0046	0.0028	0.0038
38.	EPZ008495	0.0134	0.0104	0.0063	0.0084
39.	EPZ008496	0.0154	0.0104	0.0040	0.0076
40.	EPZ008497	> 10.0 uM	3.2876	0.9735	1.2184
41.	EPZ008592	0.0145	0.0051	0.0035	0.0075
42.	EPZ008623	0.2440	0.1835	0.0922	0.1067
43.	EPZ008630	0.0034	0.0029	0.0035	0.0032
44.	EPZ008681	0.0029	0.0015	0.0027	0.0047
45.	EPZ008686	0.0073	0.0055	0.0045	0.0096
46.	EPZ008989	0.0094	0.0069	0.0022	0.0028
47.	EPZ008990	0.0061	0.0067	0.0016	0.0017
48.	EPZ008991	0.0348	0.0293	0.0094	0.0193
49.	EPZ008992	0.3333	0.1678	0.0638	0.1188
50.	EPZ008994	0.0715	0.0275	0.0121	0.0205
51.	EPZ009090	0.0300	0.0111	0.0120	0.0227
52.	EPZ009097	0.0047	0.0039	0.0046	0.0036
53.	EPZ009099	0.0765	0.0255	0.0057	0.0222
54.	EPZ009152	0.0030	0.0031	0.0029	0.0033

[0815]

化合物 编号	EZH2抑制剂	WT (μM)	Y641F (μM)	A677G (μM)	A687V (μM)
55.	EPZ009153	0.0052	0.0032	0.0056	0.0037
56.	EPZ009154	0.0278	0.0420	0.0141	0.0438
57.	EPZ009155	0.0563	0.0524	0.0251	0.0623
58.	EPZ009156	0.0034	0.0217	0.0051	0.0132
59.	EPZ009157	0.0397	0.0443	0.0214	0.0436
60.	EPZ009158	0.0021	0.0016	0.0027	0.0027
61.	EPZ009161	0.0009		0.0008	0.0011
62.	EPZ009162	0.0657	0.0351	0.0146	0.0178

[0816] 实施例17——A677突变型显示对EZH2抑制剂的最高敏感性。

[0817] Pfeiffer细胞获自ATCC (CRL-2632)。WSU-DLCL2 (ACC 575) 和OCI-Ly19 (ACC 528) 细胞获自DSMZ。所有细胞保持在RPMI+10%FBS中。为了细胞增殖分析,将指数生长的Pfeiffer、WSU-DLCL2或OCI-Ly19细胞以 1×10^5 细胞/mL、 5×10^4 细胞/mL或 2.5×10^5 细胞/mL的密度(分别)以三份重复铺在96孔板中,终体积150 μL 。细胞与化合物#7以0.011~25 μM 的终浓度孵育,用于11天时程的 IC_{50} 测定。细胞与化合物#13以0.00004~10 μM 的终浓度孵育,用于11天时程的 IC_{50} 测定。每3-4天,采用Guava Viacount试验(密理博公司#4000-0040)测定活细胞数量并在Guava EasyCyte Plus仪器上分析。在细胞记数之后,更换生长培养基和EZH2抑制剂(化合物#7或化合物#3),并将细胞传代回原始铺板密度。采用来自所述时程的第11天的最终传代经调节的活细胞数/mL,使用Graphpad Prism软件来计算增殖 IC_{50} 值。

[0818] 包含杂合EZH2突变型A677G的Pfeiffer细胞系显示对通过小分子抑制剂化合物#7的EZH2抑制敏感。早在抑制剂处理后96小时就观察到增殖抑制。11天后,用化合物#7处理的Pfeiffer细胞的增殖 IC_{50} 是5.2nM,相比之下,包含Y641F杂合突变的WSU-DLCL2细胞的 IC_{50} 为270nM,或者OCI-Ly19细胞(EZH2野生型)的 IC_{50} 为3000nM。这些结果显示,按增殖所检测,就细胞而言,WT和突变型EZH2对小分子抑制剂的抑制的敏感性是A677G>>>Y641F>>WT。

[0819] 包含杂合EZH2突变型A677G的Pfeiffer细胞系显示对通过小分子抑制剂化合物#13的EZH2抑制敏感。早在抑制剂处理后96小时就观察到增殖抑制。11天后,用化合物#13处理的Pfeiffer细胞的增殖 IC_{50} 是0.4nM,相比之下,包含Y641F杂合突变的WSU-DLCL2细胞的 IC_{50} 为4.9nM,或者OCI-Ly19细胞(EZH2野生型)的 IC_{50} 为430nM。这些结果显示,按增殖所检测,就细胞而言,WT和突变型EZH2对小分子抑制剂的抑制的敏感性是A677G>>>Y641F>>WT。

[0820] 等同形式

[0821] 尽管本文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,本领域技术人员易理解,本文所述的所有参数、尺度、材料和配置都仅仅是示例性的,实际的参数、尺度、材料和/或配置将取决于使用本发明所教导内容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(药盒)和/或方法。另外,所述特征、体系、制品、材料、试剂盒(药盒)和/或方法如果互不抵触,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。

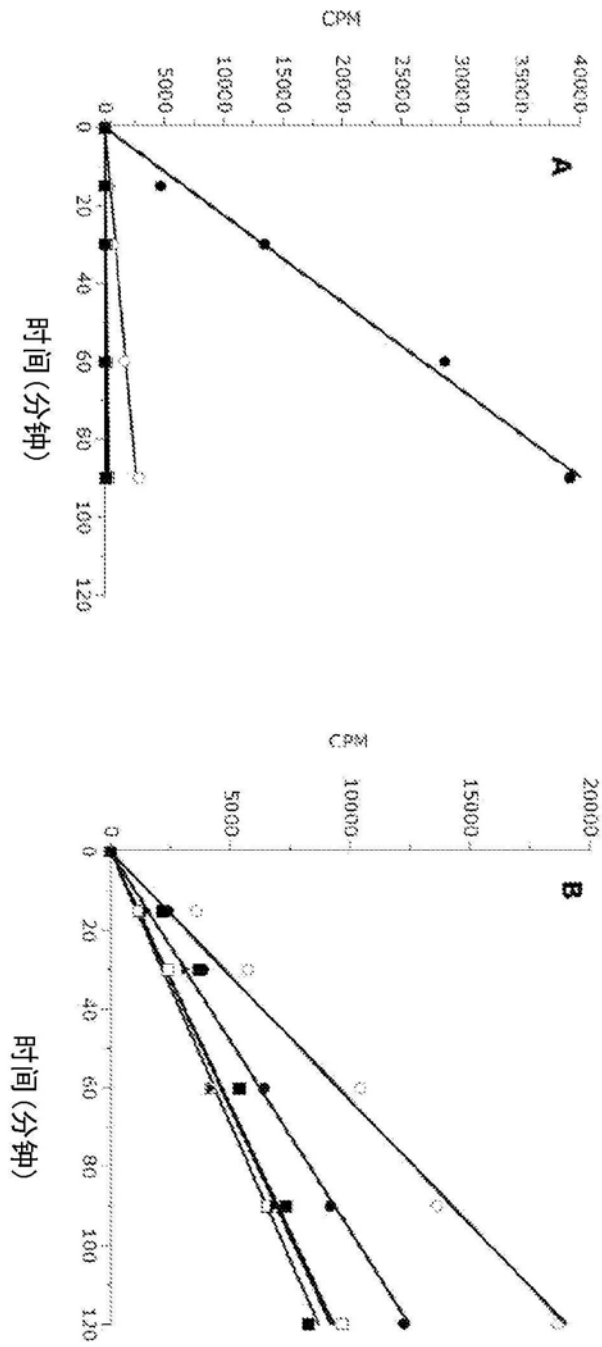


图1

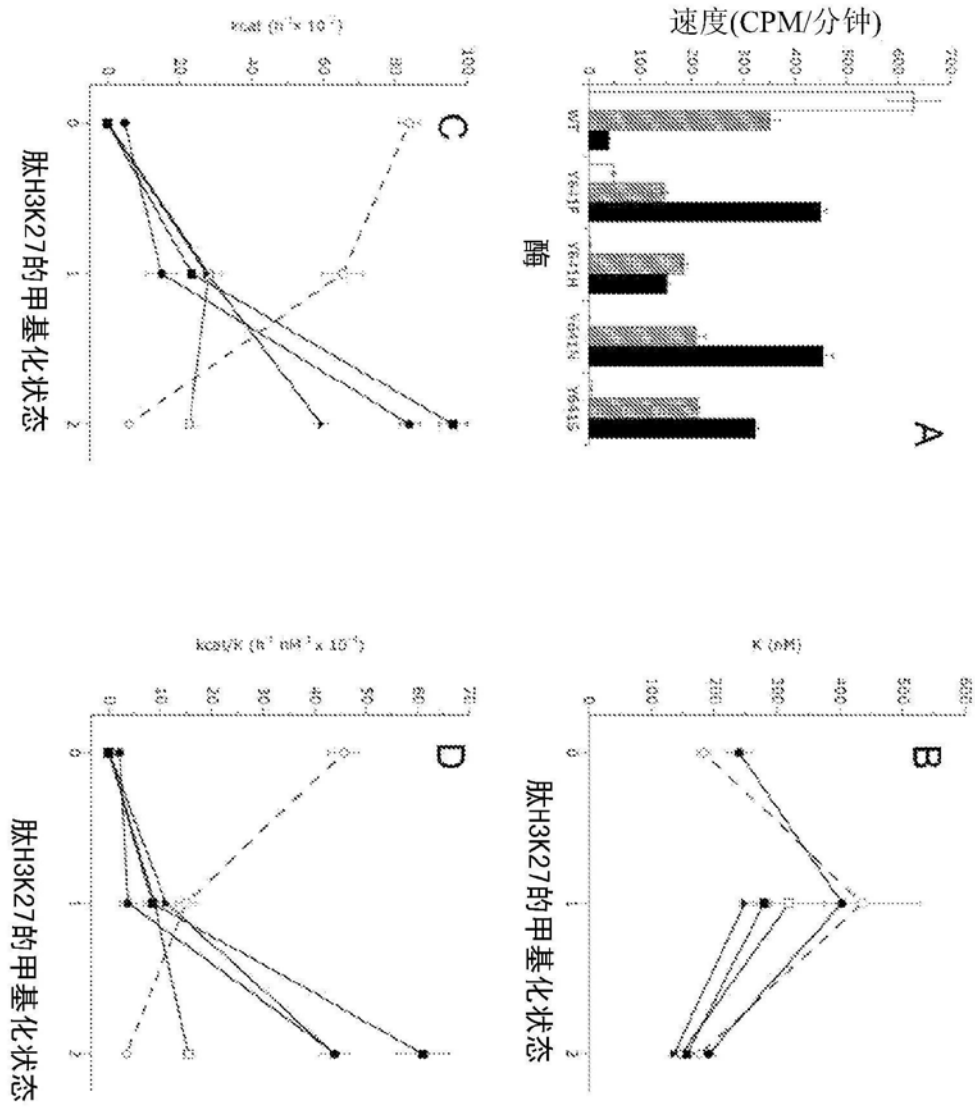


图2

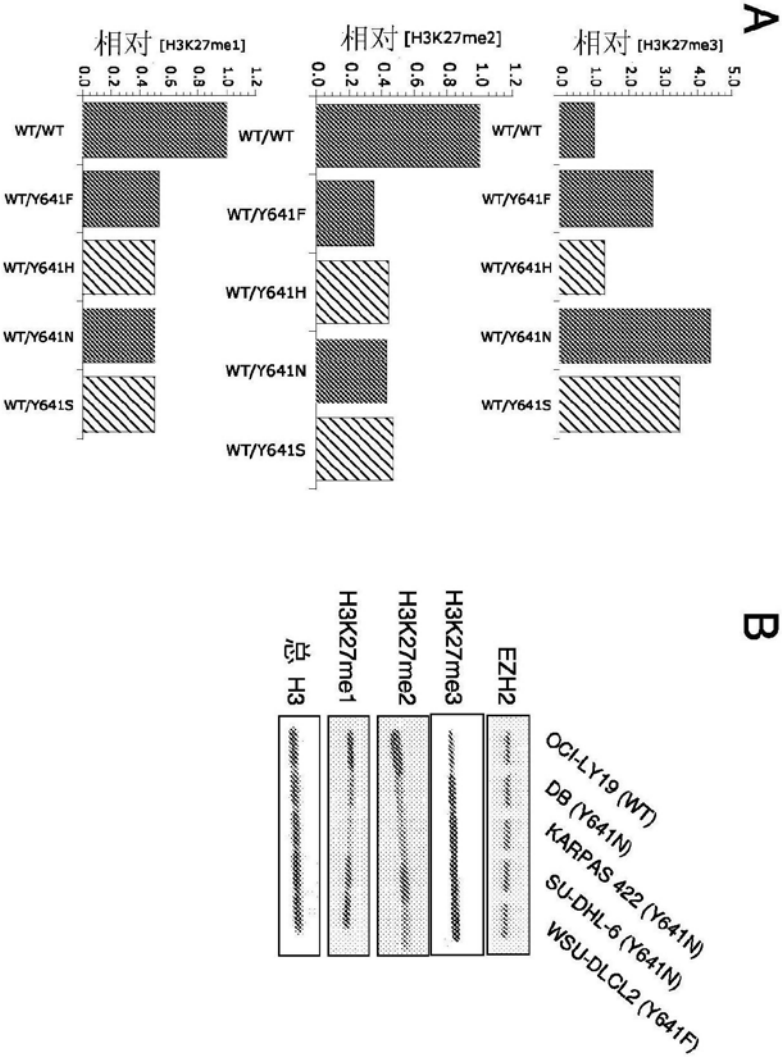


图3

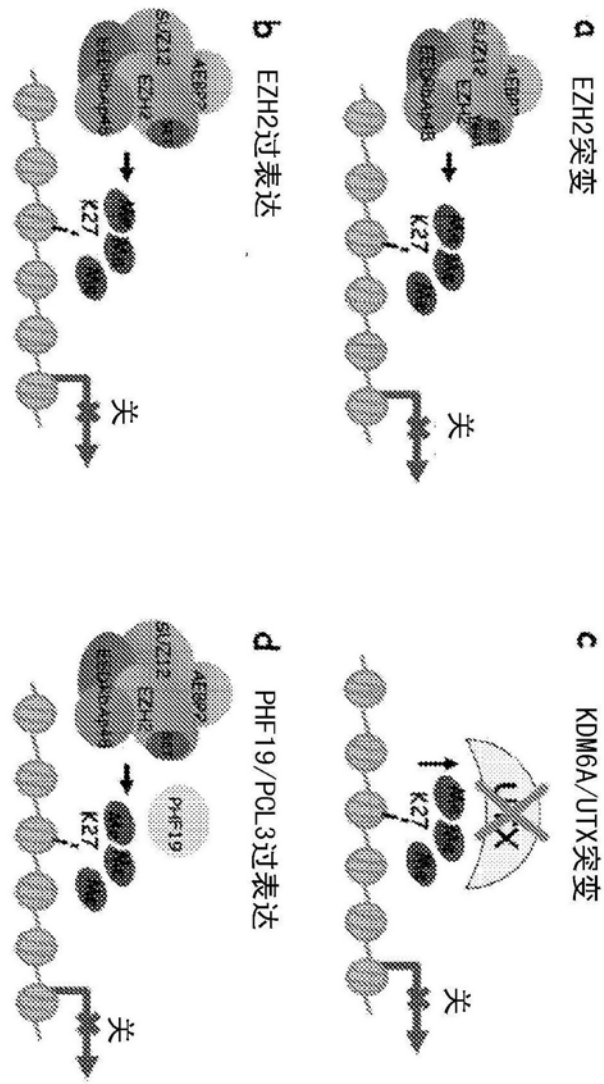


图4

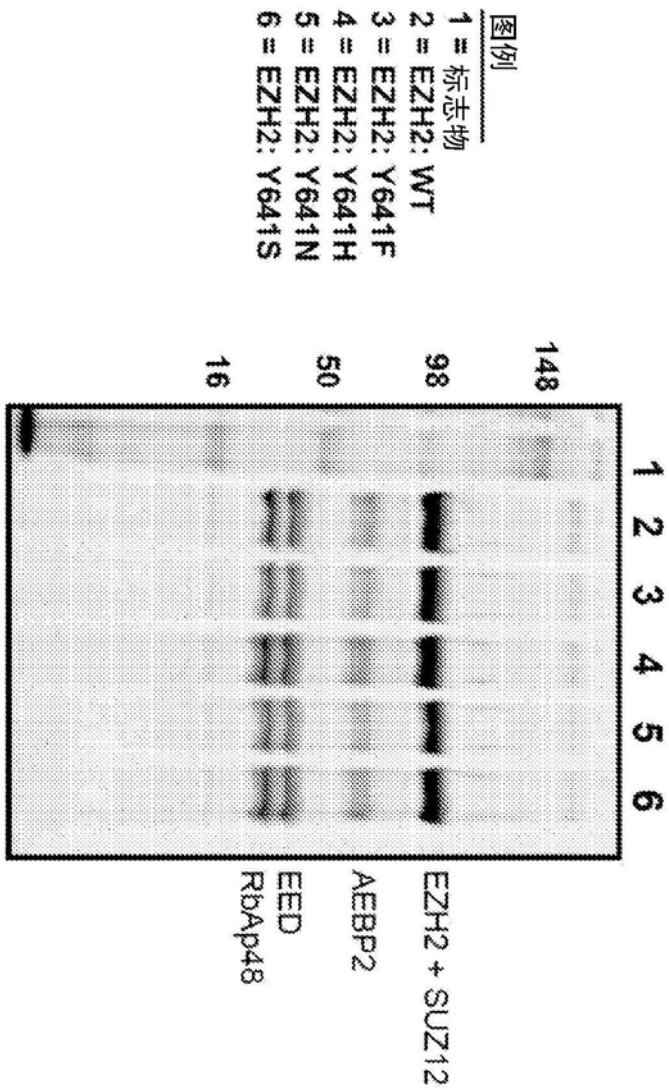


图5

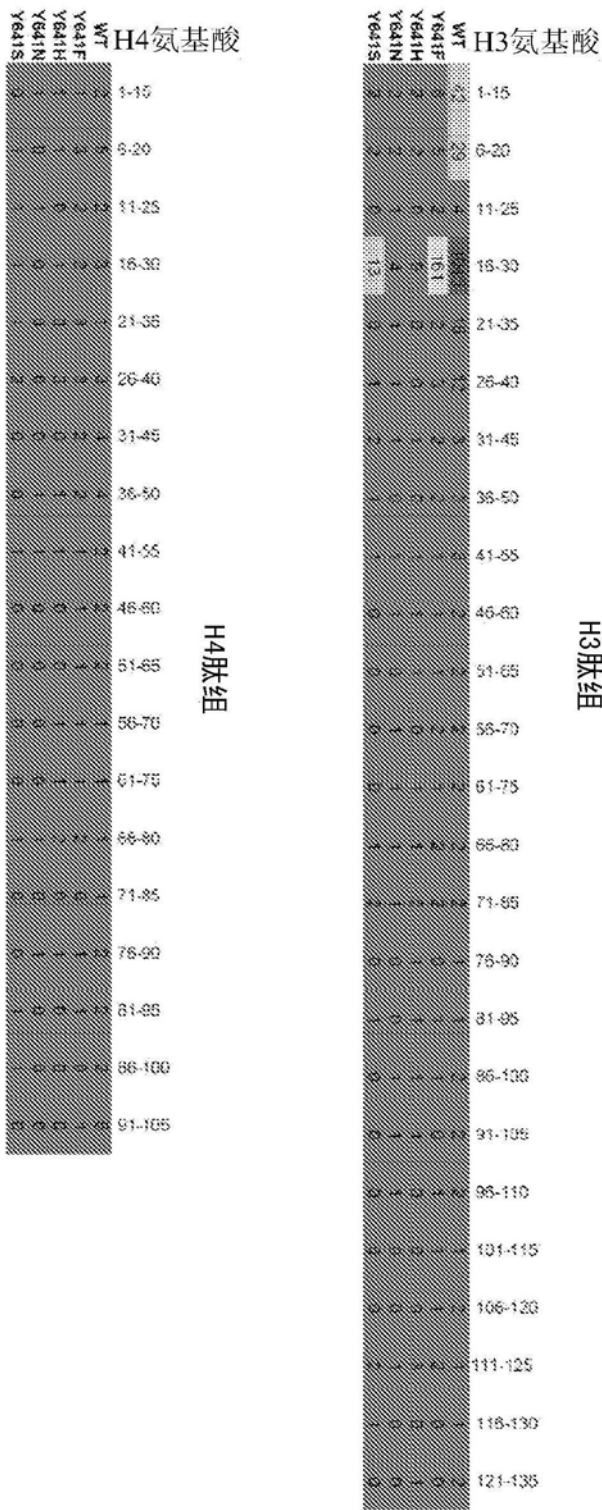


图6

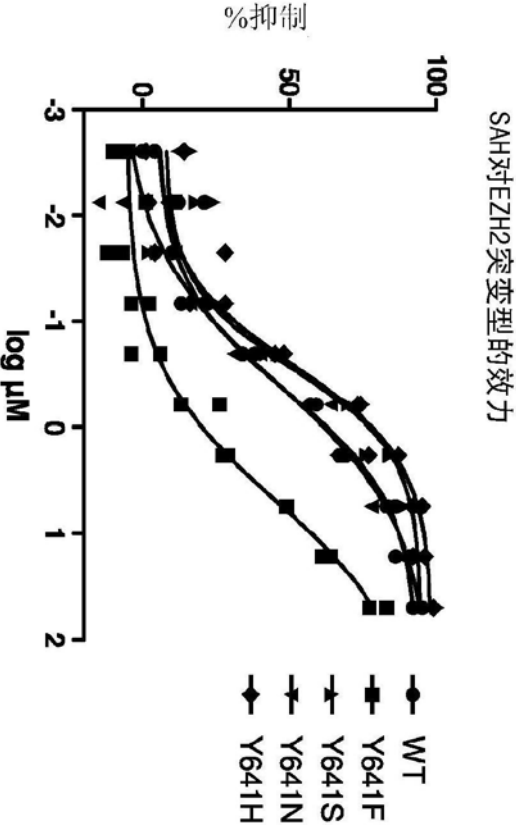


图7

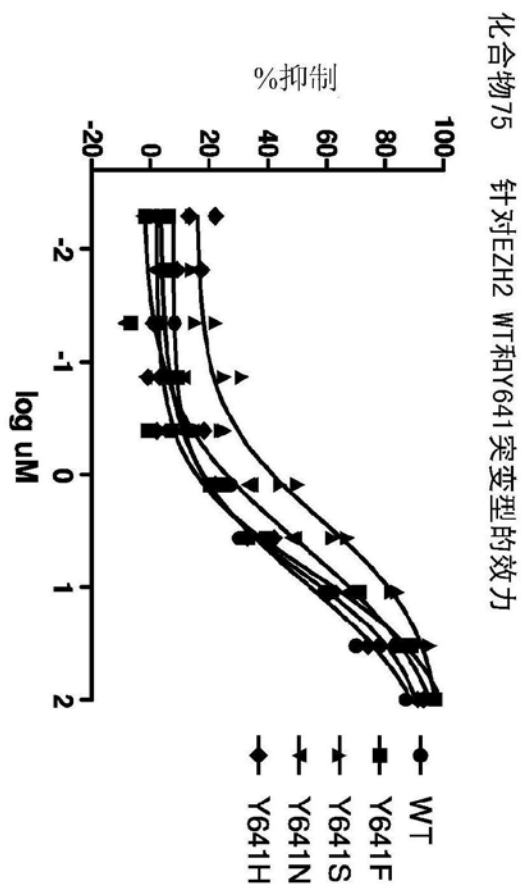


图8

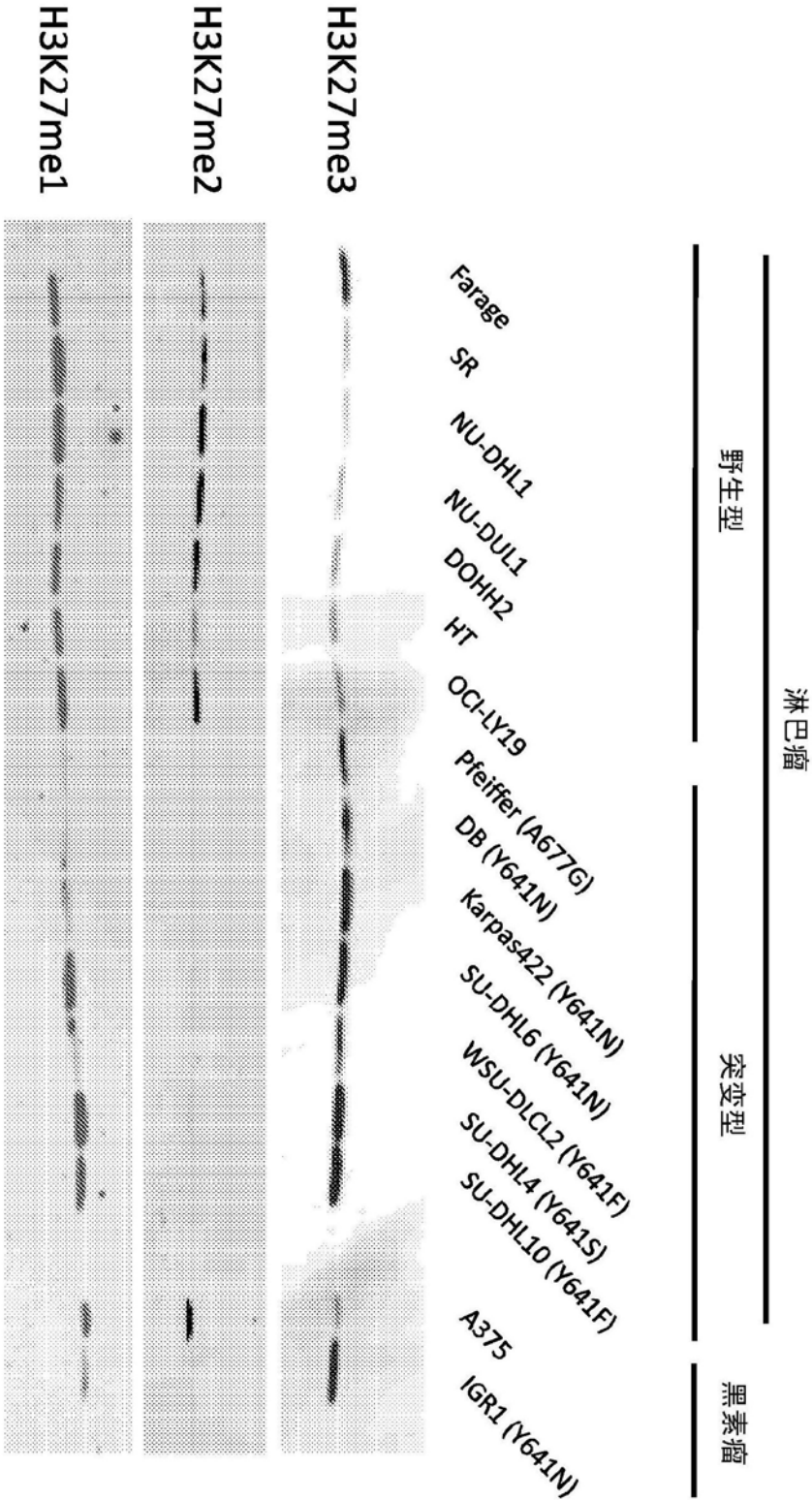


图9

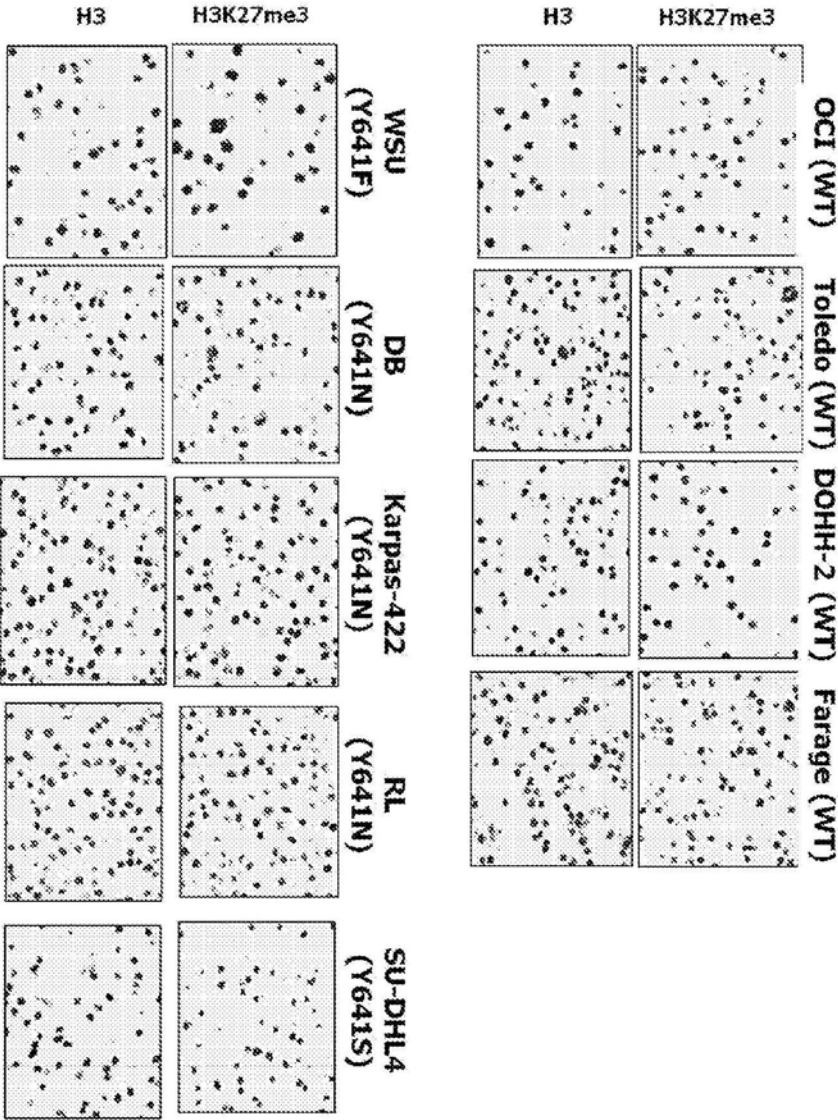


图10

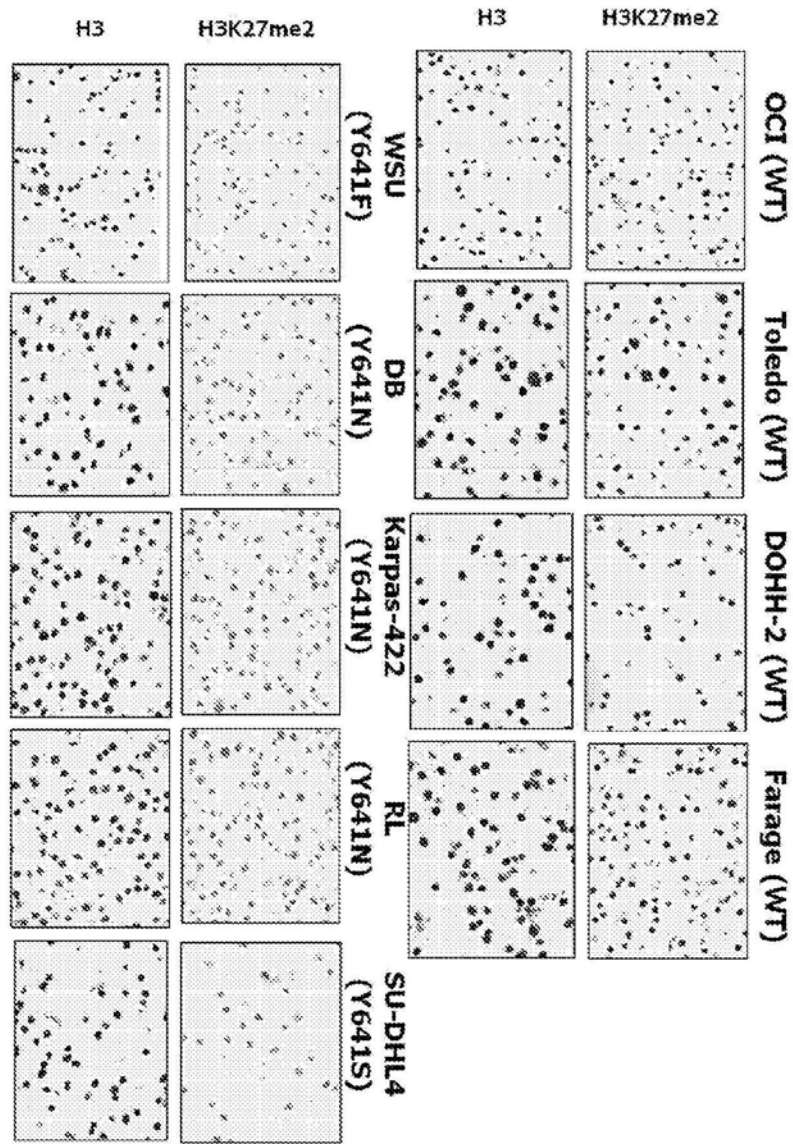


图11

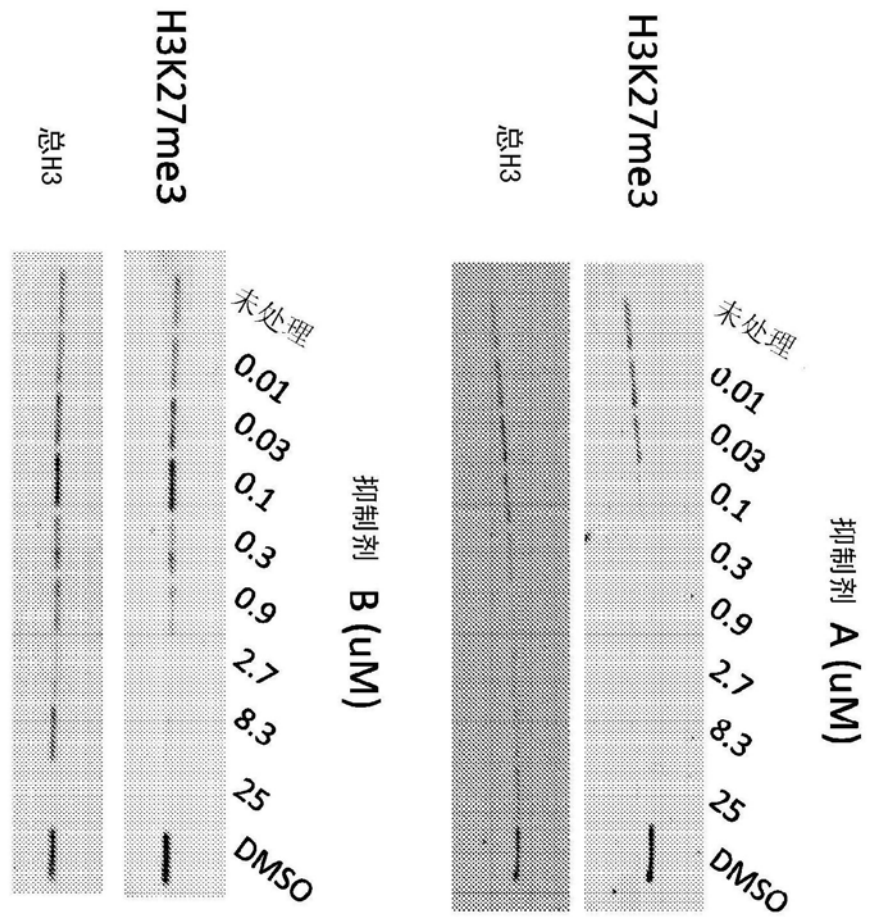


图12

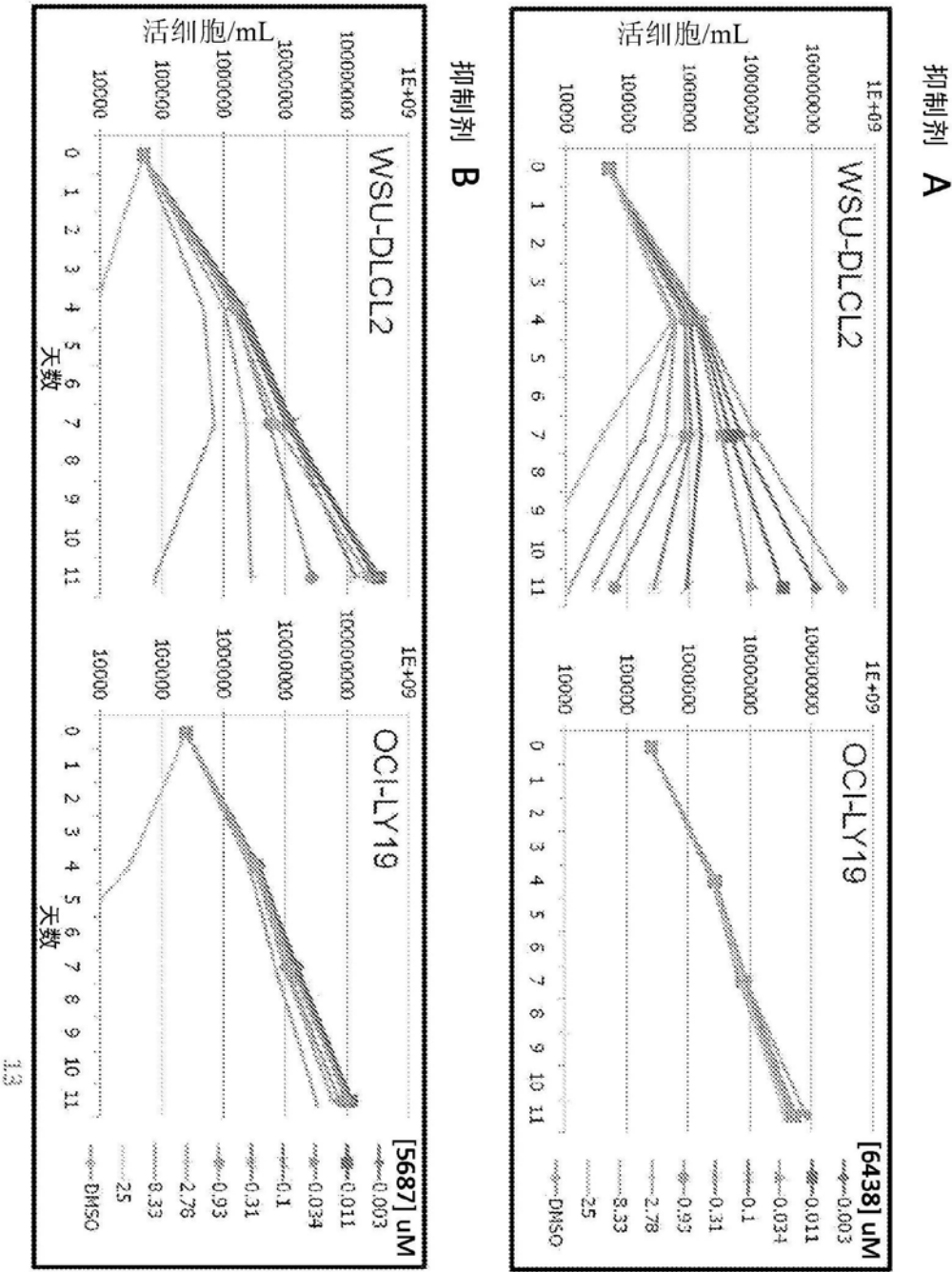


图13

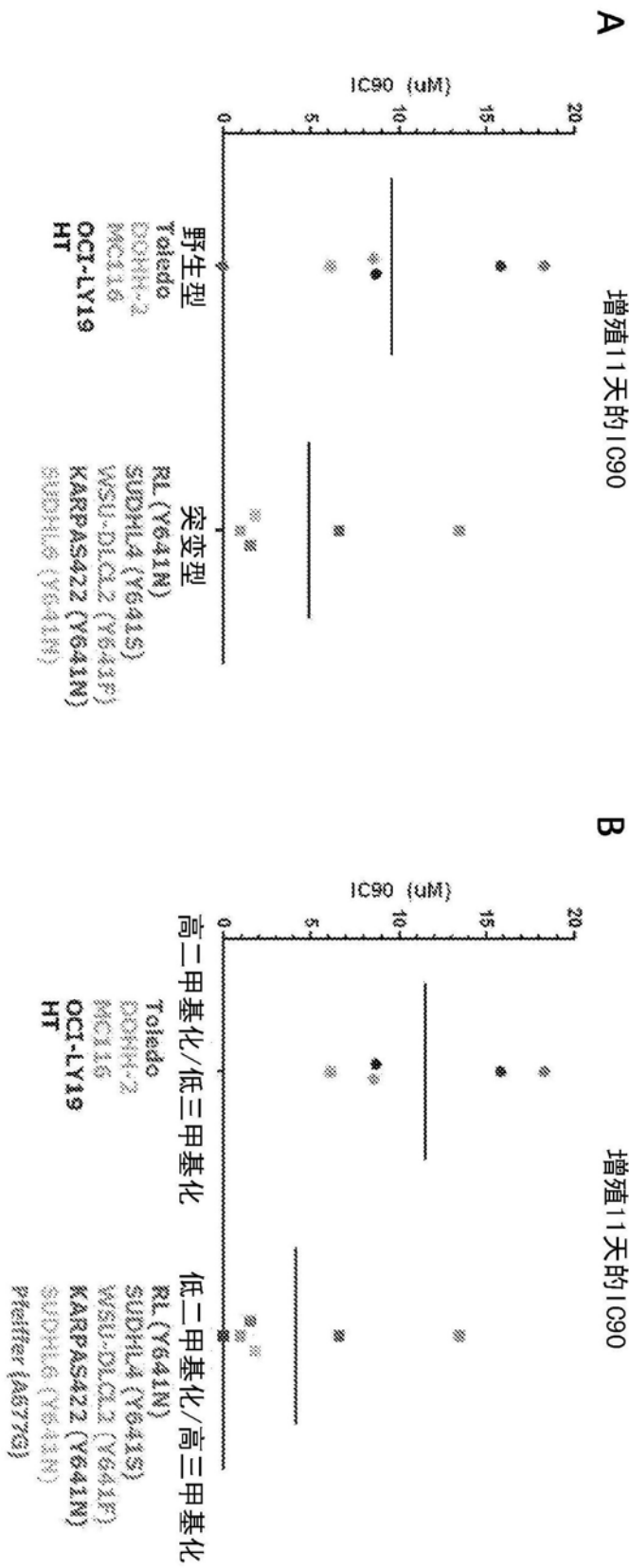


图14

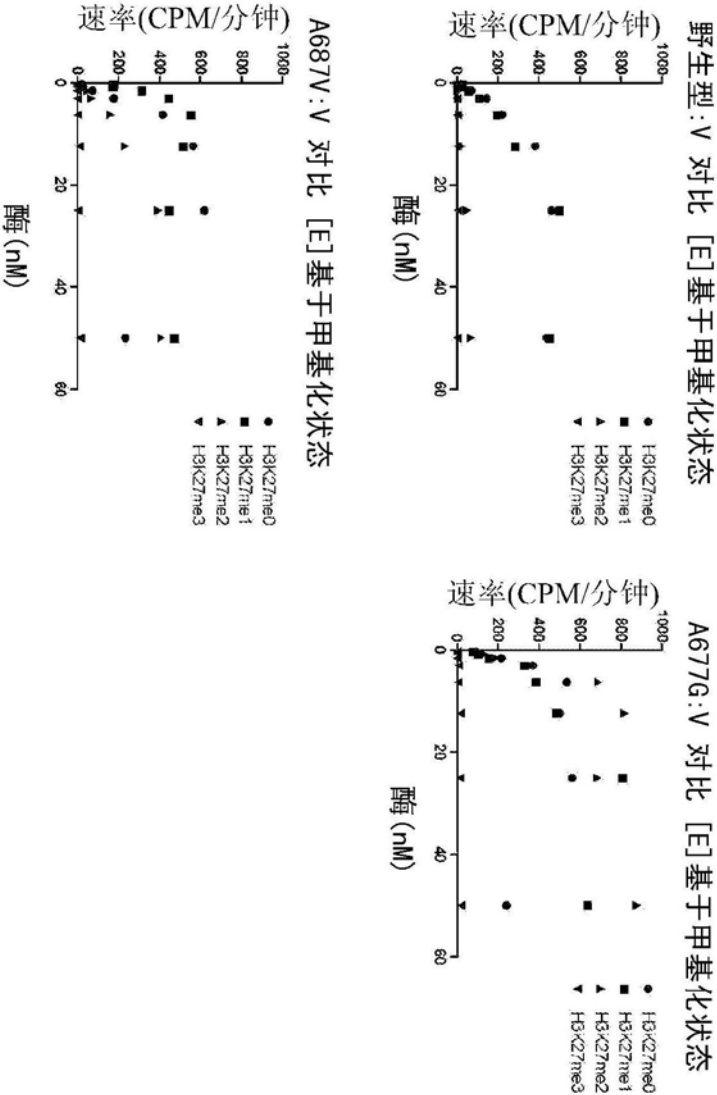


图15