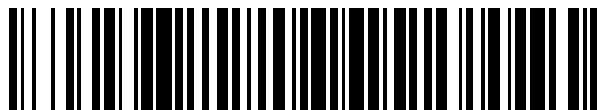


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 718 900**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
A61K 31/4162 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2008.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2013 PCT/US2013/030565**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138361**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2013 E 13711265 (2)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2825161**

(54) Título: **Inhibidores de EZH2 humana y métodos de uso de los mismos**

(30) Prioridad:

12.03.2012 US 201213418242

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2019

(73) Titular/es:

EPIZYME, INC. (100.0%)
400 Technology Square, 4th Floor
Cambridge, MA 02139, US

(72) Inventor/es:

KUNTZ, KEVIN, WAYNE;
KNUTSON, SARAH, KATHLEEN y
WIGLE, TIMOTHY JAMES, NELSON

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 718 900 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de EZH2 humana y métodos de uso de los mismos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere a la inhibición de formas de tipo natural y ciertas formas mutantes de la metiltransferasa de histonas humana EZH2, la subunidad catalítica del complejo PRC2 que cataliza la monometilación a trimetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3-K27), a métodos para tratar cánceres que incluyen el linfoma folicular y el linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) y a métodos para determinar la sensibilidad en un sujeto frente a un inhibidor de EZH2.

ANTECEDENTES

10 En las células eucariotas el ADN se compacta con histonas para formar la cromatina. Aproximadamente 150 pares base de ADN se enrollan dos veces alrededor de un octámero de histonas (dos de cada una de las histonas 2A, 2B, 3 y 4) para formar un nucleosoma, la unidad básica de la cromatina. Cambios en la estructura ordenada de la cromatina pueden conducir a alteraciones en la transcripción de genes asociados. Este proceso está altamente controlado debido a que los cambios en los patrones de expresión génica pueden afectar profundamente a procesos celulares fundamentales, tales como la diferenciación, la proliferación y la apoptosis. El control de cambios en la estructura de la cromatina (y, por lo tanto, de la transcripción) está mediado por modificaciones covalentes en histonas, más especialmente de sus colas N-terminales. Estas modificaciones se denominan frecuentemente epigenéticas debido a que pueden conducir a cambios heredables en la expresión génica, pero no afectan a la secuencia del propio ADN. Las modificaciones covalentes (por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación y ubicitinación) de las cadenas laterales de los aminoácidos están mediadas por enzimas.

15 La adición selectiva de grupos metilo a sitios de aminoácidos específicos sobre las histonas se controla por la acción de una única familia de enzimas conocidas como metiltransferasas de histonas (HMTs). El nivel de expresión de un gen particular está influido por la presencia o ausencia de uno o varios grupos metilo en un sitio relevante de la histona. El efecto específico de un grupo metilo en un sitio particular de la histona persiste hasta que el grupo metilo se 20 elimina mediante una desmetilasa de histonas o hasta que la histona modificada se reemplaza a través del recambio del nucleosoma. De una forma similar, otras clases de enzimas pueden ataviar el ADN y las histonas con otras especies químicas y todavía otras enzimas pueden retirar esas especies para proporcionar un control de la expresión génica.

25 La colección orquestada de sistemas bioquímicos que subyace a la regulación transcripcional se debe controlar estrechamente con el fin de que la diferenciación y el crecimiento celular procedan óptimamente. Los estados de enfermedad se presentan cuando estos controles se interrumpen mediante una expresión y/o una actividad aberrantes de las enzimas responsables de la modificación del ADN y las histonas. En los cánceres humanos, por ejemplo, existe un creciente número de pruebas que sugiere que una actividad de las enzimas epigenéticas mal regulada contribuye a la proliferación celular descontrolada asociada con el cáncer, así como también a otros fenotipos relevantes del cáncer tales como una migración e invasión celular incrementadas. Además del cáncer, existe una mayor evidencia de un papel de las enzimas epigenéticas en una serie de otras enfermedades humanas, que incluyen enfermedades metabólicas (tales como la diabetes), enfermedades inflamatorias (tales como la enfermedad de Crohn), enfermedades neurodegenerativas (tales como la enfermedad de Alzheimer) y enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, una modulación selectiva de la acción aberrante de las enzimas epigenéticas constituye una gran promesa para el tratamiento de una serie de enfermedades.

Metiltransferasa de histonas EZH2

30 Se sabe que las proteínas del grupo Polycomb (PcG) y el grupo trithorax (trxG) forman parte del sistema de memoria celular. Francis et al. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:409-21; Simon et al. (2002) *Curr Opin Genet Dev* 12:210-8. Ambos grupos de proteínas están implicados en el mantenimiento de los patrones espaciales de la expresión génica 35 de la caja homeótica (Hox), que se establecen de forma temprana en el desarrollo embrionario mediante genes de segmentación expresados transitoriamente. En general, las proteínas PcG son represores transcripcionales que mantienen el estado "desactivado" y las proteínas trxG son activadores transcripcionales que mantienen el estado "activado". Debido a que miembros de las proteínas PcG y trxG contienen una actividad intrínseca de metiltransferasa de histonas (HMTasa), las proteínas PcG y trxG pueden participar en la memoria celular a través de la metilación 40 de las histonas del núcleo. Beisel et al. (2002) *Nature* 419:857-62; Cao et al. (2002) *Science* 298:1039-43; Czernin et al. (2002) *Cell* 111:185-96; Kuzmichev et al. (2002) *Genes Dev* 16:2893-905; Milne et al. (2002) *Mol Cell* 10:1107-17; Muller et al. (2002) *Cell* 111:197-208; Nakamura et al. (2002) *Mol Cell* 10:1119-28.

45 Estudios genéticos y bioquímicos han proporcionado una evidencia de que las proteínas PcG de *Drosophila* actúan en por lo menos dos complejos proteicos distintos, el complejo 1 represor Polycomb (PRC1) y el complejo ESC-E(Z) (también conocido como el complejo 2 represor Polycomb (PRC2)), aunque las composiciones de los complejos 50 pueden ser dinámicas. Otte et al. (2003) *Curr Opin Genet Dev* 13:448-54. Estudios en *Drosophila* (Czernin et al. (supra), Muller et al. (supra)) y células de mamífero (Cao et al. (supra), Kuzmichev et al. (supra)) han demostrado que los complejos ESC-E(Z)/EED-EZH2 (es decir, PRC2) tienen una actividad intrínseca de metiltransferasa de

histonas. Aunque las composiciones de los complejos aislados en diferentes grupos son ligeramente diferentes, contienen generalmente EED, EZH2, SUZ12 y RbAp48 o sus homólogos en *Drosophila*. Sin embargo, un complejo reconstituido que comprende solo EED, EZH2 y SUZ12 conserva la actividad metiltransferasa de histonas para la lisina 27 de la histona H3. Documento de Patente de EE.UU. 7.563.589.

5 Entre las diversas proteínas que constituyen los complejos PRC2, EZH2 (Potenciador del Homólogo 2 de Zeste) es la subunidad catalítica. El sitio catalítico de EZH2 a su vez está presente dentro de un dominio SET, un motivo de secuencia altamente conservado (el nombre proviene de Su(var)3-9, Potenciador de Zeste, Trithorax) que se encuentra en diversas proteínas asociadas con la cromatina, incluyendo miembros del grupo Trithorax y el grupo Polycomb. El dominio SET es característico de todas las metiltransferasas de lisina de histonas conocidas excepto la metiltransferasa de H3-K79, DOT1.

10 Además de silenciar al gen Hox, se ha mostrado que la metilación de la histona en H3-K27 mediada por PRC2, participa en la inactivación de X. Plath et al. (2003) Science 300:131-5; Silva et al. (2003) Dev Cell 4:481-95. El reclutamiento del complejo PRC2 a X y la trimetilación posterior de la histona en H3-K27 tiene lugar durante el estadio 15 de iniciación de la inactivación de X y es dependiente del ARN de Xist. Adicionalmente, se ha observado que EZH2 y su actividad metiltransferasa de la histona en H3-K27 asociada marca de forma diferencial las células pluripotenciales del epiblasto y del trofectodermo diferenciado. Erhardt et al. (2003) Development 130:4235-48).

20 De acuerdo con una función de EZH2 en el mantenimiento de los patrones de modificación epigenética de las células del epiblasto pluripotenciales, la delección de EZH2 mediada con Cre da lugar a una pérdida de la metilación de la histona en H3-K27 en las células. Erhardt et al. (*supra*). Adicionalmente, estudios en líneas celulares y en tejidos de 25 cáncer de próstata y de mama han revelado una fuerte correlación entre los niveles de EZH2 y SUZ12 y la invasividad de esos cánceres (Bracken et al. (2003) EMBO J 22: 5323-35; Kirmizis et al. (2003) Mol Cancer Ther 2:113-21; Kleer et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:11606-11; Varambally et al. (2002) Nature 419:624-9), lo que indica que una disfunción del complejo PRC2 puede contribuir al cáncer.

30 Recientemente, se ha notificado que mutaciones somáticas de EZH2 están asociadas con el linfoma folicular (FL) y el subtipo similar a linfocitos B del centro germinal (GCB) del linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL). Morin et al. (2010) Nat Genet 42:181-5. En todos los casos, se ha encontrado que la aparición del gen mutante EZH2 es heterocigótica y la expresión de los alelos mutantes y de tipo natural se detectó en las muestras mutantes caracterizadas por secuenciación del transcriptoma. Actualmente, la norma asistencial para el tratamiento de la mayoría de los casos de DLBCL es el régimen de R-CHOP. Sin embargo, el resultado de este régimen está lejos de ser satisfactorio. Por lo tanto, existe una gran necesidad médica de identificar terapias nuevas y eficaces, opcionalmente basadas en los perfiles genéticos del sujeto.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención se basa en el descubrimiento de que las células que expresan ciertos mutantes de EZH2 son más sensibles a los inhibidores de EZH2 que las células que expresan EZH2 de tipo natural.

35 La invención presenta un inhibidor de EZH2 seleccionado a partir del compuesto 2 hasta el compuesto 62 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para uso en un método de tratamiento del cáncer o síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como preleucemia) en un sujeto que expresa una EZH2 mutante, en donde la EZH2 mutante comprende una mutación por sustitución en la posición de los aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID No: 1.

40 La invención también presenta un método para determinar la sensibilidad de un sujeto que tiene cáncer o síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como preleucemia) frente a un inhibidor de EZH2 seleccionado a partir del compuesto 2 hasta el compuesto 62, que detecta una mutación en EZH2 en una muestra obtenida a partir del sujeto, en donde la mutación es o se expresa como una mutación por sustitución en la posición de los aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID No: 1, en donde la presencia de dicha mutación indica que el sujeto es sensible al 45 inhibidor de EZH2.

En este documento se describe un uso de un inhibidor de EZH2 en una cantidad terapéuticamente eficaz en la preparación de un medicamento para tratar o aliviar un síntoma de cáncer o de afección precancerosa en un sujeto que expresa una EZH2 mutante que comprende una mutación en el dominio de bolsillo de unión al sustrato tal y como se define en SEQ ID NO: 6.

50 La invención proporciona además un uso de una mutación en el dominio de bolsillo de unión al sustrato de EZH2 tal y como se define en SEQ ID NO: 6, para determinar la sensibilidad de un sujeto que tiene cáncer o una afección precancerosa frente a un inhibidor de EZH2.

55 La EZH2 mutante de la presente invención es un polipéptido EZH2 mutante o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante. La EZH2 mutante comprende una mutación en la posición de los aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la mutación se selecciona a partir del grupo que consiste en una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del ami-

5 noácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); y una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C).

10 El objeto de la presente invención incluye cualquier sujeto humano que ha sido diagnosticado, tiene síntomas o tiene riesgo de desarrollar un cáncer o síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como preleucemia). Por ejemplo, el cáncer es linfoma, leucemia o melanoma. Preferiblemente, el linfoma es linfoma no Hodgkin, linfoma folicular o linfoma difuso de linfocitos B grandes. Alternativamente, la leucemia es leucemia mieloide crónica (LMC).

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen el plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Aunque se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o ensayos de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Las referencias citadas en este documento no se admite que sean técnica anterior de la invención reivindicada. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, dominará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

20 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 La **Figura 1** consiste en dos gráficas que establecen que los mutantes de EZH2 asociados con el linfoma de linfocitos B son metiltransferasas de histonas activas. La actividad metiltransferasa *in vitro* de complejos PRC2 que contienen EZH2 de tipo natural y diversos mutantes Y641 de EZH2 se midió como (A) reacciones de metiltransferasa utilizando un péptido (H3 21-44) como sustrato y (B) reacciones de metiltransferasa usando nucleosomas aviares como sustrato. Símbolos: tipo natural (●), Y641F (○), Y641H (□), Y641N (■) y Y641S (▲). CPM es cuentas por minuto, haciendo referencia al recuento de centelleo como resultado de una radiación con ³H.

30 La **Figura 2** consiste en cuatro gráficas que establecen que los complejos PRC2 que contienen EZH2 mutante catalizan preferentemente la dimetilación y trimetilación de la histona en H3-K27. (A) Actividad metiltransferasa de complejos mutantes y de tipo natural (WT) sobre péptido no metilado (barras blancas), péptido monometilado (barras sombreadas) y péptido dimetilado (barras negras). (B) La afinidad hacia sustratos peptídicos según se evalúa con $K_{1/2}$ es similar en todos los estados de metilación del péptido hacia complejos PRC2 que contienen EZH2 de tipo natural (○), Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■) y Y641S (▲). Obsérvese que la variación de los valores de $K_{1/2}$ en todos los sustratos y todas las formas enzimáticas es menor que un múltiplo de 3,5. Para cualquier estado de metilación particular del sustrato, la variación del valor de $K_{1/2}$ es inferior a un múltiplo de 2. (C) El número de recambios de la enzima (k_{cat}) varía con el estado de metilación del sustrato de forma opuesta para WT y los mutantes Y641 de EZH2. El k_{cat} disminuye con el aumento de los estados de metilación de K27 para el tipo natural (○), pero aumenta para los mutantes de EZH2 Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■) y Y641S (▲). (D) La eficacia catalítica ($k_{cat}/K_{1/2}$) disminuye con el aumento de los estados de metilación de K27 para el tipo natural (○), pero aumenta para los mutantes de EZH2, Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■) y Y641S (▲). En los paneles B-D, las líneas dibujadas para conectar los puntos de datos no pretenden implicar ninguna relación matemática; más bien, simplemente están destinadas a servir como ayuda visual.

45 La **Figura 3A** consiste en un trío de gráficas que representan los niveles relativos previstos de H3-K27me3 (panel superior), H3-K27me2 (panel medio) y H3-K27me1 (panel inferior) para células que contienen diferentes mutantes de EZH2. Las simulaciones se realizaron usando una ecuación de la velocidad en estado estacionario de la enzima acoplada y los parámetros cinéticos en estado estacionario mostrados en la Tabla 2. Todos los valores son en relación con las células que contienen EZH2 WT homocigotas y se asumen concentraciones de saturación de SAM intracelular, en relación con la K_m y concentraciones de nucleosoma intracelular similares a K_m .

50 La **Figura 3B** consiste en una serie de análisis de transferencia Western de patrones relativos de un estado de metilación de H3-K27 para líneas celulares de linfoma homocigotas para EZH2 WT o heterocigotas para la mutación Y641 de EZH2 indicada. Los paneles desde el superior al inferior representan los resultados de ensayos con anticuerpos específicos para los siguientes: EZH2 total; H3-K27me3; H3-K27me2; H3-K27me1; e histona H3 total, como control de carga.

55 La **Figura 4** representa mecanismos propuestos seleccionados que conducen a niveles aberrantemente altos de trimetilación de la histona en H3-K27 en el cáncer. Estos incluyen: a) mutación de Y641 en EZH2 que da lu-

gar a un cambio en la preferencia de sustrato de la histona en H3-K27 no metilada a la monometilada y dimetilada; b) expresión en exceso de EZH2; c) mutaciones en *UTX* que inactivan la función enzimática, provocando una disminución de la desmetilación de H3-K27me3; y d) expresión en exceso de la subunidad PHF19/PCL3 del complejo PRC2 que conduce a un incremento en el reclutamiento del complejo PRC2 de genes específicos y un aumento de la trimetilación de la histona en H3-K27. En los cuatro modelos la alteración conduce a una trimetilación aberrante de la histona en H3-K27 en las regiones promotoras proximales de genes lo que da lugar a una represión transcripcional de genes clave en el cáncer.

La **Figura 5** representa un gel SDS-PAGE que muestra que los niveles de expresión de cada uno de los complejos PRC2 de cinco componentes son similares con la EZH2 mutante y de tipo natural.

La **Figura 6** es un par de tablas que muestran que los complejos PRC2 mutante y de tipo natural (WT) muestran una fuerte preferencia hacia un sustrato con péptidos que contienen H3-K27. Cada enzima se sometió a ensayo frente a un panel de péptidos de 15-meros solapantes que incluían todas las H3 y H4. La actividad se midió como la velocidad (CPM por minuto) y el valor indicado representa la media de dos determinaciones independientes para cada reacción. Para todos los complejos, el péptido más favorecido era H3:16-30. El complejo WT tenía una actividad que era superior a más de 6 veces frente a ese péptido que en cualquiera de los complejos de mutantes.

La **Figura 7** consiste en una gráfica que representa la potencia inhibidora de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) frente a EZH2 WT y mutantes Y641 de EZH2. El eje X muestra la concentración logarítmica de SAH; el eje Y muestra el porcentaje de inhibición.

La **Figura 8** consiste en una gráfica que representa la potencia inhibidora del Compuesto 75 frente a EZH2 WT y mutantes Y641 de EZH2. El eje X muestra la concentración logarítmica del Compuesto 75; el eje Y muestra el porcentaje de inhibición.

La **Figura 9** representa un análisis de transferencia Western de los niveles relativos de H3-K27me1, me2 y me3 en un panel de líneas celulares, incluyendo múltiples líneas DLBCL que expresan WT o el mutante Y641 de EZH2. Las histonas se extrajeron a partir de las líneas celulares que se muestran, se fraccionaron por SDS-PAGE sobre un gel al 4-20%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a ensayo con anticuerpos para las histonas H3, H3-K27me1, me2 o me3.

La **Figura 10** representa un análisis inmunocitoquímico de los niveles de H3 y H3-K27me3 en un panel de líneas celulares de linfoma WT y mutantes Y641. Los sedimentos celulares de las líneas celulares indicadas se fijaron y se embebieron en parafina. Se prepararon portaobjetos y se evaluaron los niveles de H3 y H3-K27me3 mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos para la histona H3 o H3-K27me3.

La **Figura 11** representa un análisis inmunocitoquímico de los niveles de H3 y H3-K27me2 en un panel de líneas celulares de linfoma WT y mutantes Y641. Los sedimentos celulares de las líneas celulares indicadas se fijaron y se embebieron en parafina. Se prepararon portaobjetos y se evaluaron los niveles de H3 y H3-K27me2 mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos para la histona H3 o H3-K27me2.

La **Figura 12** consiste en una gráfica que representa la inhibición de los niveles globales de H3-K27me3 mediante el tratamiento con un inhibidor de EZH2 en células WSU-DLCL2 mutantes en Y641. Las células WSU-DLCL2 se trataron durante 4 días con las concentraciones indicadas de inhibidor de EZH2, A o B. Despues del tratamiento con el compuesto, se extrajeron las histonas, se fraccionaron mediante SDS-PAGE sobre un gel al 4-20%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a ensayo con anticuerpos para la histona H3 o H3-K27me3.

La **Figura 13** consiste en una gráfica que muestra que los inhibidores de EZH2 pueden bloquear la proliferación de células WSU-DLCL2 mutantes en Y641, pero tienen poco efecto sobre las células OCI-LY19 no mutantes en Y641. Las células se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de inhibidor de EZH2, A o B durante once días. Las células tratadas con vehículo (DMSO) se incluyeron como controles. Se determinó el número de células y la viabilidad usando el ensayo Guava ViaCount en un instrumento Guava EasyCyte Plus. Las células se dividieron y el medio y el compuesto se repusieron cada 3-4 días.

La **Figura 14** consiste en una gráfica que muestra que la presencia de una mutación de EZH2 (Y641) y/o niveles elevados de H3-K27me3 y niveles bajos de H3-K27me2, predicen una sensibilidad frente a los inhibidores de EZH2. Las líneas celulares se mantuvieron en presencia de concentraciones crecientes de un inhibidor de EZH2 de hasta 25 μ M. Los recuentos de las células viables se utilizaron para obtener los valores de CI_{90} después de 11 días de tratamiento. Los resultados se representan gráficamente con líneas celulares segregadas de acuerdo con el estado de la mutación de EZH2 (A) o segregadas de acuerdo con los niveles de H3-K27me2 y H3-K27me3 (B). En ambos diagramas, la línea muestra los valores promedio de CI_{90} del grupo de la línea celular indicada.

La **Figura 15** es un panel de gráficas que muestra la velocidad frente a la concentración enzimática medida para EZH2 de tipo natural, A677G o A687V. Péptidos biotinilados que representan los residuos 21-44 de la histo-

5 na H3 que contienen no metil, monometil, dimetil o trimetil lisina 27 (H3K27me0 hasta H3K27me3) se sometieron a ensayo con una concentración fija con una serie de diluciones de la enzima EZH2 indicada. Se tomaron muestras en distintos momentos en el transcurso de 90 minutos y la incorporación de 3H-SAM en la lisina 27 del péptido H3, se midió mediante la captura del péptido en una placa Flashplate y mediante la lectura de las cuentas por minuto (CPM). Una regresión lineal del transcurso del tiempo producía la velocidad de la enzima en CPM por minuto (CPM/min), que se representaba como una función de la concentración de enzima.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 La estructura de la cromatina es importante en la regulación génica y la herencia epigenética. Modificaciones post-traduccionales de las histonas, como la metilación, están implicadas en el establecimiento y el mantenimiento de la estructura de la cromatina de orden superior.

MUTANTES DE EZH2

EZH2 es una metiltransferasa de histonas que es la subunidad catalítica del complejo PRC2 que cataliza la mono-metilación a trimetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3-K27).

15 Se ha descrito que mutaciones puntuales del gen de EZH2 en un solo residuo de aminoácido (por ejemplo, Tyr641, en el presente documento denominado Y641) de EZH2 están ligadas a subconjuntos de linfoma de linfocitos B humano. Morin et al. (2010) Nat Genet 42(2):181-5. En particular, Morin et al. informaron de que mutaciones somáticas de la tirosina 641 (Y641F, Y641H, Y641N e Y641S) de EZH2 se asociaban con el linfoma folicular (FL) y el subtipo similar a linfocitos B del centro germinal (GCB) del linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL). El alelo mutante siempre se encuentra asociado con un alelo de tipo natural (heterocigoto) en las células de la enfermedad y se informó que las mutaciones producían una ablación de la actividad enzimática del complejo PRC2 para metilar un sustrato de péptido sin modificar.

20 La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que las células que expresan un mutante de EZH2 son más sensibles a los inhibidores de EZH2 de la presente invención que las células que expresan EZH2 de tipo natural. Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos para tratar o aliviar un 25 síntoma de cáncer o una afección precancerosa en un sujeto mediante la administración a un sujeto que expresa una EZH2 mutante, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de EZH2. La EZH2 mutante de la presente invención se refiere a un polipéptido EZH2 mutante o a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante. La EZH2 mutante comprende una mutación por sustitución en la posición de los aminoácidos 25 677, 687 o 641 de SEQ ID NO: 1, tal como, pero no limitada a, una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID 30 NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); o una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C).

35 La mutación de la presente invención también puede incluir una sustitución con serina (S) de la asparagina (N) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 322 de SEQ ID NO: 3 (N322S), una sustitución con glutamina (Q) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 288 de SEQ ID NO: 3 (R288Q), una sustitución con isoleucina (I) de la treonina (T) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 573 de SEQ ID NO: 3 (T573I), una sustitución con ácido glutámico (E) del ácido aspártico (D) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 664 de SEQ ID NO: 3 (D664E), una sustitución con glutamina (Q) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 458 de SEQ ID NO: 5 (R458Q), una sustitución con lisina (K) 40 del ácido glutámico (E) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 249 de SEQ ID NO: 3 (E249K), una sustitución con cisteína (C) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 684 de SEQ ID NO: 3 (R684C), una sustitución con histidina (H) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 628 de SEQ ID NO: 21 (R628H), una sustitución con histidina (H) de la glutamina (Q) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 501 de SEQ ID NO: 5 (Q501H), una sustitución con asparagina (N) del ácido aspártico (D) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 192 de SEQ ID NO: 3 (D192N), una sustitución con valina (V) del ácido aspártico (D) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 664 de SEQ ID NO: 3 (D664V), una sustitución con leucina (L) de la valina (V) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 704 de SEQ ID NO: 3 (V704L), una sustitución con serina (S) de la prolina (P) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 132 de SEQ ID NO: 3 (P132S), una sustitución con lisina (K) del ácido glutámico (E) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 669 de SEQ ID NO: 21 (E669K), una sustitución con treonina (T) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 255 de SEQ ID NO: 3 (A255T), una sustitución con valina (V) del ácido glutámico (E) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 726 de SEQ ID NO: 3 (E726V), una sustitución con tirosina (Y) de la cisteína (C) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 571 de SEQ ID NO: 3 (C571Y), una sustitución con cisteína (C) de la fenilalanina (F) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 145 de SEQ ID NO: 3 (F145C), una sustitución con treonina (T) de la as-

paragina (N) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 693 de SEQ ID NO: 3 (N693T), una sustitución con serina (S) de la fenilalanina (F) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 145 de SEQ ID NO: 3 (F145S), una sustitución con histidina (H) de la glutamina (Q) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 109 de SEQ ID NO: 21 (Q109H), una sustitución con cisteína (C) de la fenilalanina (F) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 622 de SEQ ID NO: 21 (F622C), una sustitución con arginina (R) de la glicina (G) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 135 de SEQ ID NO: 3 (G135R), una sustitución con glutamina (Q) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 168 de SEQ ID NO: 5 (R168Q), una sustitución con arginina (R) de la glicina (G) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 159 de SEQ ID NO: 3 (G159R), una sustitución con cisteína (C) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 310 de SEQ ID NO: 5 (R310C), una sustitución con histidina (H) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 561 de SEQ ID NO: 3 (R561H), una sustitución con histidina (H) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 634 de SEQ ID NO: 21 (R634H), una sustitución con arginina (R) de la glicina (G) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 660 de SEQ ID NO: 3 (G660R), una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 181 de SEQ ID NO: 3 (Y181C), una sustitución con arginina (R) de la histidina (H) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 297 de SEQ ID NO: 3 (H297R), una sustitución con serina (S) de la cisteína (C) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 612 de SEQ ID NO: 21 (C612S), una sustitución con tirosina (Y) de la histidina (H) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 694 de SEQ ID NO: 3 (H694Y), una sustitución con alanina (A) del ácido aspártico (D) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 664 de SEQ ID NO: 3 (D664A), una sustitución con treonina (T) de la isoleucina (I) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 150 de SEQ ID NO: 3 (I150T), una sustitución con arginina (R) de la isoleucina (I) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 264 de SEQ ID NO: 3 (I264R), una sustitución con leucina (L) de la prolina (P) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 636 de SEQ ID NO: 3 (P636L), una sustitución con treonina (T) de la isoleucina (I) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 713 de SEQ ID NO: 3 (I713T), una sustitución con prolina (P) de la glutamina (Q) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 501 de SEQ ID NO: 5 (Q501P), una sustitución con glutamina (Q) de la lisina (K) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 243 de SEQ ID NO: 3 (K243Q), una sustitución con ácido aspártico (D) del ácido glutámico (E) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 130 de SEQ ID NO: 5 (E130D), una sustitución con glicina (G) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 509 de SEQ ID NO: 3 (R509G), una sustitución con histidina (H) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 566 de SEQ ID NO: 3 (R566H), una sustitución con histidina (H) del ácido aspártico (D) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 3 (D677H), una sustitución con asparagina (N) de la lisina (K) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 466 de SEQ ID NO: 5 (K466N), una sustitución con histidina (H) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 78 de SEQ ID NO: 3 (R78H), una sustitución con metionina (M) de la lisina (K) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 1 de SEQ ID NO: 6 (K6M), una sustitución con leucina (L) de la serina (S) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 538 de SEQ ID NO: 3 (S538L), una sustitución con glutamina (Q) de la leucina (L) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 149 de SEQ ID NO: 3 (L149Q), una sustitución con valina (V) de la leucina (L) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 252 de SEQ ID NO: 3 (L252V), una sustitución con valina (V) de la leucina (L) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 674 de SEQ ID NO: 3 (L674V), una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 656 de SEQ ID NO: 3 (A656V), una sustitución con ácido aspártico (D) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 731 de SEQ ID NO: 3 (Y731D), una sustitución con treonina (T) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 345 de SEQ ID NO: 3 (A345T), una sustitución con ácido aspártico (D) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 244 de SEQ ID NO: 3 (Y244D), una sustitución con triptófano (W) de la cisteína (C) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 576 de SEQ ID NO: 3 (C576W), una sustitución con lisina (K) de la asparagina (N) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 640 de SEQ ID NO: 3 (N640K), una sustitución con lisina (K) de la asparagina (N) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 675 de SEQ ID NO: 3 (N675K), una sustitución con tirosina (Y) del ácido aspártico (D) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 579 de SEQ ID NO: 21 (D579Y), una sustitución con isoleucina (I) de la asparagina (N) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 693 de SEQ ID NO: 3 (N693I) y una sustitución con lisina (K) de la asparagina (N) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 693 de SEQ ID NO: 3 (N693K).

La EZH2 mutante de la presente invención puede incluir un desplazamiento de marco en las posiciones de aminoácidos 730, 391, 461, 441, 235, 254, 564, 662, 715, 405, 685, 64, 73, 656, 718, 374, 592, 505, 730 o 363 de SEQ ID NO: 3, 5 o 21 o la posición del nucleótido correspondiente de la secuencia de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 3, 5 o 21. La EZH2 mutante también puede incluir una inserción de un ácido glutámico (E) entre las posiciones de aminoácidos 148 y 149 de SEQ ID NO: 3, 5 o 21. Otro ejemplo de mutación de EZH2 es una delección de ácido glutámico (E) y leucina (L) en las posiciones de aminoácidos 148 y 149 de SEQ ID NO: 3, 5 o 21. La EZH2 mutante puede comprender además una mutación sin sentido en las posiciones de aminoácidos 733, 25, 317, 62, 553, 328, 58, 207, 123, 63, 137 o 60 de SEQ ID NO: 3, 5 o 21.

También se ha descubierto inesperadamente que la enzima EZH2 de tipo natural (WT) muestra la mayor eficacia catalítica (kcat/K) para la reacción de ninguna metilación a monometilación de H3-K27 y menor eficacia para las reacciones posteriores (monometilación a dimetilación y dimetilación a trimetilación); mientras que, por el contrario, las mutaciones Y641 asociadas a una enfermedad muestran una capacidad muy limitada para llevar a cabo la pri-

mera reacción de metilación pero tienen una eficacia catalítica mejorada para las reacciones posteriores, en relación con la enzima de tipo natural. Estos resultados implican que el fenotipo maligno de una enfermedad explota las actividades combinadas de una enzima que monometila H3-K27 (PRC2 que contiene EZH2 WT o EZH1) junto con un PRC2 que contiene EZH2 mutante para una conversión incrementada de H3-K27 a la forma trimetilada (H3-

K27me3). Por lo tanto, un aspecto de la presente descripción se refiere a la inhibición de la actividad de EZH2, incluyendo ciertas formas mutantes de EZH2. La presente descripción también se refiere a la inhibición selectiva de la actividad de ciertas formas mutantes de EZH2.

Aunque no se pretende estar ligado a ninguna teoría, se plantea la hipótesis de que la mutación de EZH2 en su dominio de bolsillo de unión al sustrato puede facilitar múltiples rondas de metilación de H3-K27 al impactar el patrón de enlace de H y/o el amontonamiento estérico en el sitio activo del complejo ternario de enzima-bisustrato, lo que afecta a la formación de un canal de agua adecuado para la desprotonación de la lisina que reacciona.

Se han descrito previamente ácidos nucleicos y polipéptidos de EZH2 humana. Véanse, por ejemplo, Chen et al. (1996) Genomics 38:30-7 [746 aminoácidos]; Swiss-Prot nº de orden Q15910 [746 aminoácidos]; GenBank nº de orden NM_004456 y NP_004447 (isoforma a [751 aminoácidos]); y GenBank nº de orden NM_152998 y NP_694543 (isoforma b [707 aminoácidos]).

Secuencia de aminoácidos de EZH2 humana (Swiss-Prot nº de orden Q15910) (SEQ ID NO: 1)

MQGTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMLRQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDDLPQTQVILPLTNAVASVPIMYSWSPLOQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTIEELIKNYDGKVHGDRREGFINDEIFVELVNALGQ
YNDLDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEL
KEKYKELTEQQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLSLHSFHTLCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRNNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKREGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKTDSDREAGTETGGENNNDKEEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEMSRFLVRLIGTYYDNFCATARLIGTKTCRQVYEFRVKESSIIAP
PAEDVDTPPRKKKKRKHRLWAACRKIQLKKDGCSNHHVINYQPCDHPRQPCDSSCPVCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCLAVRECDPLCLTCGAADHWDSDKNVS
CKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIDKPVQKNEFISEYCGEIISQDEARRGKVDK
YMCSTFLMNNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

Secuencia de ARNm de EZH2 humana, variante de transcripto 1 (GenBank nº de orden NM_004456) (SEQ ID NO: 2)

ES 2 718 900 T3

Aminoácidos completos de EZH2, isoforma a (GenBank nº de orden NP_004447) (SEQ ID NO: 3)

MGQTGKSEKGPCWKRKVKSEYMLRQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDLDFPTQVPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDGDDPEEREEKQKDLEDHRRDKESRPERKFPSSDKIFEFAISSMFPDKGTAAEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFTLFCRRCFKYDCFLHRKC
NYSFHATPTNTYKRKNTETALDNKECPGQCQYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRR
GRLPNNSRSPSTPTINVLESKDTDSRDREAGETTGGENNDKEEEEKKDETSSSEANSRCQ
TPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFRRVLIGTYYDNCATIARLIGTKTCRQVYEFRKESS
IIATAPAPAEDVTPPRKKKKRHLWAACRKIQLKKDGSNSHVNYQPCDHPRQPCDSSCP
CVIAQNFCEKFCQCSCSEQNRFPGCRCKAQCNKTQCPYLAVERCDPDLCLTCGAADHWD
SKNVSKNCISIQRGSKKHLLAPSDVAGWGFITKDPVQKNEFISEYCGEIISQDEADRRG
KVDKYMCSFLFNLNNDFVVDATRKGKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRA
IQTGEELFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

Secuencia de ARNm de EZH2 humana, variante de transcripto 2 (GenBank nº de orden NM_152998) (SEQ ID NO: 4)

ggcggcgcttgtatggctggggggccaaataaaaagcgatggcattggctggcggt
ttggcgctcggtccggtecgccggacaccgggtggactcagaaggcagtggagccccgg
gg
acgaaagaataatcatgggccaagactggaaagaaatctgagaagggaccagttttttgggg

Aminoácidos completos de EZH2, isoforma b (GenBank nº de orden NP_694543) (SEQ ID NO: 5)

MGQTGKKSEKGPCWKRKVKSEYMLRQLKRFRRADEVKSMSFSNRQKIL
ERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTRVEDETVLHNIPYMGDEVL
DQDGTFIEELIKNYDGKVGHDRECGLINDEIFVELVNALGQYNNDDDDDD
GDDPEEREKQKDLEDHRRDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMPDKGTAEE
LKEKYKELTEQQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLSHFSHTLFCRRC
FKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCQYQHLEGAKEFAAALT
AERIKTPPKRPGGRRGRRLPNNSRPSTPTINVLESKDTDSDREAGTETG
GENNDKEEEKKDETSSSEANSRCQTP1KMKPNIEPPENVEWSGAEASM
FRVLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRVKESSIIAPAPAEVDVTPP
RKKKRKRHLWAACRKLQQLKKGDSNNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPVCVIA
QNFCEKFCQCSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCG
AADHWDSKNVSKNCISQRGSSKKLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFIS
EYCGEIISQDEADRRGKVKYDYMCSFLFNLNNDFVVDATRKGNKIRFANH
SVNPNCYAKMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVG

EREME IP

Aminoácidos completos de EZH2, isoforma e (GenBank nº de orden NP_001190178.1) (SEQ ID NO: 21)

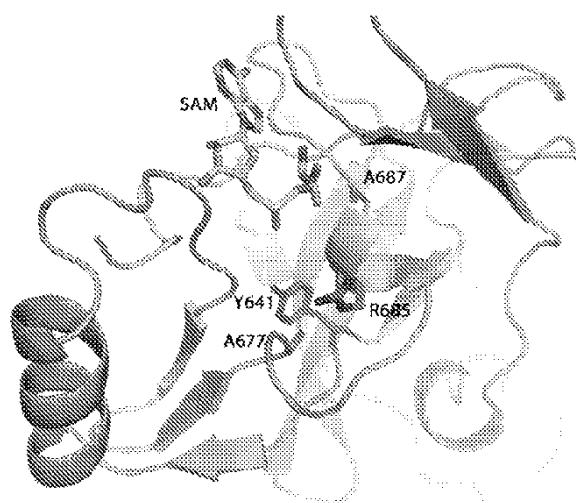
MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEWKQRRIQPVHI
 LTSCSVTSDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLOQQNFMVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFIEEL
 IKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDGDPPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFP
 SDKIFEAISSMFPDKGTAEELKEKYKELTEQQILPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFHTLFCCRRC
 FKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKFEEAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLP
 NNSSRPSTPTINVLESKDTDSDREAGTEGGENNDEEKEKDETSSSEANSRQTPIKMKPNIEPPEN
 VEWGAEASMRVRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRVKESIIAPAPAEDVDTPRKKRKHRLW
 AAHCRKIQLKKGQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCLVARECDPDLCLTCGAADHWDSKNVSKNCIQRGSK
 KHLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCFLFNLNNDFVVDATRKG
 NKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

Potenciador de Homo sapiens del homólogo 2 de zeste (Drosophila) (EZH2), variante de transcripto 5, ARNm (Gen-Bank nº de orden NM_001203249.1) (SEQ ID NO: 22)

GACGACGTTCCGGCGGGAACTCGGAGTAGCTTCGCCCTCTGACGTTCCCCACGACGCCACCCGAAATC
 CCCCTGAGCTCCGGCGTCGGCTGCCCTGCCGCTGGCTGGCTTATGCTAAGTTGAGGGAAAGA
 GTCGAGCTGCTCTGCTCTATTGATGTGTTCTGGAGGGCGCTGGTAATTCCCACCTCATTGTT
 ACATCCCCCTCCGGTCCCCCCTTAAAGCTGTGCCACAGGGTTACTTTGAAAGCAGGGAGGAATCGAGAA
 GCACGATTTGGAAAACCTGGTGAACGCCCTAAATAATCATGGCCACAGACTGGGAAGAAATCTGAGAAG
 GGACCGATTGTTGGCGGAAGCGTGTAAATCAGAGTACATGCGACTGAGACAGCTCAAGAGGTTAGAC
 GAGCTGATGAAGTAAAGAGTATGTTAGTCAATCGTCAGAAAATTGGAAAGAACGGAAATCTTAA
 CCAAGAATGAAACAGCGAAGGATAACAGCTGTGCACATCTGACTCTGTTGGTGAACATGACCTG
 GATTTCAACACAAGTCATCCCATTAAAGACTCTGAATGCAAGTTGCTTCAGTACCCATAATGATTCTT
 GGTCTCCCCTACAGCAGAATTGTTGGAAAGATGAAACTGTTTACATAACATCCTTATGGAGA
 TGAAGTTTATGATCAGGATGGTACTTCATTGAAAGAACTAATAAAAAATTATGATGGGAAAGTACACGGG
 GATAGAGAATGTTGGTTTATAATGATGAAATTGGTGGAGTTGGTAATGCCCTGGTCAATATAATG
 ATGATGACGATGATGATGGAGACGATCCTGAAGAAAGAGAACAGAGAAAGAACAGGAGATCA
 CCGAGATGATAAAGAACGCCACCTCGGAAATTCTCTGATAAAATTGGAGCCATTCTCA
 ATGTTCCAGATAAGGGCACAGCAGAAGAACTAAAGAAAAATATAAGAACTCACCGAACAGCAGCTCC
 CAGCGCACTCTCTCTGAATGTACCCCCAACATAGATGGACCAAATGCTAAATCTGTTAGAGAGAGCA
 AAAGCTTACACTCTTACAGCTTCTGAGGCGATGTTAAATATGACTGCTCTACATCCTT
 CATGCAACACCAACACTTAAAGCGGAAGAACACAGAAAAGCTCTAGACAACAAACCTTGGACCC
 AGTGTACCCAGCATGGGGAGCAAGGGAGTTGCTGCTCTCACCGCTGAGCGATAAAGACCC
 ACCAAAACGTCAGGAGGCCGAGAAGAGGACGGCTCCAAATAACAGTAGCAGGCCAGCACCCCC
 ATTAATGTGCTGGATCAAAGGATAACAGACAGTGAAGGGAGCAGGGACTGAAACGGGGAGAGAAC
 ATGATAAAAGAAGAAGAAGAGAACAGTGAAGAAACTTGTGAGCTCTGAGAAAGATAACAGCTGAA
 ACCAATAAAAGATGAAGCCAAATTGAAACCTCTGAGAATGTGGAGTGGAGTGGTGTGAAGCCTCAATG
 TTAGAGTCCTCATGGCACTTACTATGACAATTCTGTGCCATTGCTAGGTTAATTGGGACAAACAT
 GTAGACAGGTGTAGTGTAGGTTAGACTCAAAGATCTAGCATCATAGCTCCAGCTCCGCTGAGGATGTGGA
 TACTCCTCCAAGGAAAAGAAGAGAACACCGGGTGTGGCTGCACACTGCAAGAAAGATAACAGCTGAA
 AAGGGTCAAACCGTTCCGGATGCCGCTGCAAAGCACAGTGCAACACCAAGCAGTGCCGTGCTACC
 TGGCTGTCGAGAGTGTGACCTCTGCTCTACTTGTGGAGGCCGCTGACCATGGGACAGTAAAAAA
 TGTGTCCTGCAAGAACTGCACTGAGTATTCAAGGGGGCTCCAAAAGCATCTATTGCTGGACCATCTGACGTG
 GCAGGCTGGGGATTTTATCAAAGATCTGTGCAAGAAAATGAATTCTCAGAATACTGTGGAGAGA
 TTATTCTCAAGATGAAGCTGACAGAGAGGGAAAGTGTATGATAAAATACATGTCAGCTTCTGTTCAA
 CTGAAACAATGATTGTTGGGATGCAACCCGCAAGGGTAACAAAATTGGTTGCAAAATCTGGTAA
 AATCCAAACTGCTATGCAAAGATTGATGGTTAACGGTGATCACAGGATAGGTTTIGCCAAGAGAG
 CCATCCAGACTGGCGAAGAGCTGTTTGATTACAGATAACGCCAGGCTGATGCCCTGAAGTATGTCGG
 CATCGAAAGAGAAATGGAATCCCTGACATCTGCTACCTCTCCCCCTCTGAAACAGCTGCC
 GCTTCAGGAACCTCGAGTACTGTGGCAATTAGAAAAGAACATGCACTTGAATTGCAA
 AGTACTGTAAGAATAATTAGTAATGAGTTAAAATCAACTTTTATGCTCTCACCAGCTGCAA
 AGTGTGTTGACCAACTGCAATAATGCACTGTTGCAACTTGAATAAAAGAACAT

TTGAACCTGCTTGTGAATC

Un modelo de estructura de la proteína EZH2 parcial basado en la cadena A de la proteína 1 del dominio SET de unión al receptor nuclear (NSD1) se proporciona a continuación. Este modelo se corresponde con los residuos de aminoácidos 533-732 de la secuencia de EZH2 de SEQ ID NO: 1.



La secuencia de aminoácidos correspondiente de este modelo de estructura se proporciona a continuación. Los residuos en el dominio de bolsillo de unión al sustrato están subrayados. Los residuos en el dominio SET se muestran en cursiva.

SCPCVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLA VRECDPDLC LTCGAA
 DHWDSKNVSCKNCISIQRGSKKHLLLAPS DVAGWG FIKDPVQKNEFISEY⁶⁴¹ CGEIIISQDEA
 DRRGK VYDKYMC SFL LNNNDFY⁶⁷⁴ YDA⁶⁷⁷ TRKGNK IR⁶⁸⁵ EA⁶⁸⁷ NHSVNPNCYAKVMMVNGD
 HR/GIFAKRAIQTGEELF~~FDY~~ RYSQAD (SEQ ID NO: 6)

5

El sitio catalítico de EZH2 se cree que reside en un dominio conservado de la proteína conocido como el dominio SET. La secuencia de aminoácidos del dominio SET de EZH2 se proporciona mediante la siguiente secuencia parcial que incluye los residuos de aminoácidos 613-726 de Swiss-Prot nº de orden Q15910 (SEQ ID NO: 1):

HLLLAPS DVAGWG FIIKDPVQKNEFISEY CGEIIISQDEA DRRGK VYDKYMC SFL LNNNDFVVD
 ATRKGNK IRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDY (SEQ ID NO: 7).

10 El residuo de tirosina (Y) que se muestra subrayado en SEQ ID NO: 7 es Tyr641 (Y641) en Swiss-Prot nº de orden Q15910 (SEQ ID NO: 1).

El dominio SET de GenBank nº de orden NP_004447 (SEQ ID NO: 3) incluye los residuos de aminoácidos 618-731 y es idéntico a SEQ ID NO: 6. El residuo de tirosina correspondiente a Y641 en Swiss-Prot nº de orden Q15910 que se muestra subrayado en SEQ ID NO: 7, es Tyr646 (Y646) en GenBank nº de orden NP_004447 (SEQ ID NO: 3).

15 El dominio SET de GenBank nº de orden NP_694543 (SEQ ID NO: 5) incluye los residuos de aminoácidos 574-687 y es idéntico a SEQ ID NO: 7. El residuo de tirosina correspondiente a Y641 en Swiss-Prot nº de orden Q15910 que se muestra subrayado en SEQ ID NO: 7, es Tyr602 (Y602) en GenBank nº de orden NP_694543 (SEQ ID NO: 5).

La secuencia de nucleótidos que codifica el dominio SET de GenBank nº de orden NP_004447 es
 catctattgctggcaccatctgacgtggcaggctggggattttatcaaagatcctgtgcaga
 aaaatgaattcatctcagaatactgtggagagattattctcaagatgaagctgacagaagagg
 gaaagtgtatgataaatacatgtcagcttctgtcaacttgaacaatgatttggatggat
 gcaaccgcaggtaacaaaattcgttcaaatcattcgtaaatccaaactgctatgcaa
 aagttatgatggtaacggtgatcacaggataggtattttgcacagagccatccagactgg
 cgaagagctttttgattac

(SEQ ID NO: 8),

20 en donde el codón que codifica Y641 se muestra subrayado.

Para los fines de esta solicitud, el residuo de aminoácido Y641 de EZH2 humana se debe entender que se refiere al residuo de tirosina que es o que se corresponde con Y641 en Swiss-Prot nº de orden Q15910.

Secuencia completa de aminoácidos del mutante Y641 de EZH2 (SEQ ID NO: 9)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVAVPIMYSWSPLQQNF
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTIEELIKNYDGKVGDRGCFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNQVREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
 ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMRVFLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYFRVKESSIIAPA
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAHCRKIQLKKDGSSNVYQPCDHPQCDSSCPVIAQ
 NFCEKFCQCSECQNRFPGRCKAQCNTRQCPYLAVERCDPDLCLTCGAADHWD SKNVS
 CKNCSIQRGSKKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEXCGEIISQDEADRRGKVYDK
 YMCSFLFNLNNDFVVDAIRKGKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

En donde X puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto de tirosina (Y)

También para los fines de esta solicitud, un mutante Y641 de EZH2 humana y, de manera equivalente, un mutante Y641 de EZH2, se debe entender que se refiere a una EZH2 humana en la que el residuo de aminoácido correspondiente a Y641 de EZH2 humana de tipo natural, está sustituido por un residuo de aminoácido distinto de tirosina.

5 En una realización, la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural solamente por la sustitución de un solo residuo de aminoácido correspondiente a Y641 de EZH2 humana de tipo natural, con un residuo de aminoácido distinto de tirosina.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural solamente por la sustitución con fenilalanina (F) del residuo de un solo aminoácido correspondiente a Y641 de EZH2 humana de tipo natural. El mutante Y641 de EZH2 según esta realización se denomina en este documento mutante Y641F o, equivalentemente, Y641F.

Y641F (SEQ ID NO: 10)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVAVPIMYSWSPLQQNF
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTIEELIKNYDGKVGDRGCFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNQVREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
 ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMRVFLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYFRVKESSIIAPA
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAHCRKIQLKKDGSSNVYQPCDHPQCDSSCPVIAQ
 NFCEKFCQCSECQNRFPGRCKAQCNTRQCPYLAVERCDPDLCLTCGAADHWD SKNVS
 CKNCSIQRGSKKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEXCGEIISQDEADRRGKVYDK
 YMCSFLFNLNNDFVVDAIRKGKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

15 En una realización, la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural solamente por la sustitución con histidina (H) del residuo de un solo aminoácido correspondiente a Y641 de EZH2 humana de tipo natural. El mutante Y641 de EZH2 según esta realización se denomina en este documento mutante Y641H o, equivalentemente, Y641H.

Y641H (SEQ ID NO: 11)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRRLQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDDQDGTFFIELIKNYDGKVGDRGCFINDEIFVELVNALGQ
YNNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAFIASSMFPDKGTAEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVILGTTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAHCRKIQQLKKGSSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTRKQCPGYLAVERCDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPMQKNEFISENCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCFLFNLNNDFVVDATRKGKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

```

En una realización, la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural solamente por la sustitución con asparagina (N) del residuo de un solo aminoácido correspondiente a Y641 de EZH2 humana de tipo natural. El mutante Y641 de EZH2 según esta realización se denomina en este documento mutante Y641N o, equivalentemente, Y641N.

5

Y641N (SEQ ID NO: 12)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRRLQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDDQDGTFFIELIKNYDGKVGDRGCFINDEIFVELVNALGQ
YNNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAFIASSMFPDKGTAEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVILGTTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAHCRKIQQLKKGSSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTRKQCPGYLAVERCDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPMQKNEFISENCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCFLFNLNNDFVVDATRKGKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

```

10

En una realización, la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural solamente por la sustitución con serina (S) del residuo de un solo aminoácido correspondiente a Y641 de EZH2 humana de tipo natural. El mutante Y641 de EZH2 según esta realización se denomina en este documento mutante Y641S o, equivalentemente, Y641S.

Y641S (SEQ ID NO: 13)

```

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRRLQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDDQDGTFFIELIKNYDGKVGDRGCFINDEIFVELVNALGQ
YNNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAFIASSMFPDKGTAEL

KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVILGTTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAHCRKIQQLKKGSSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTRKQCPGYLAVERCDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPMQKNEFISESGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCFLFNLNNDFVVDATRKGKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

```

En una realización, la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural solamente por la sustitución con cisteína (C) del residuo de un solo aminoácido correspondiente a Y641 de EZH2 humana de tipo natural. El mutante Y641 de EZH2 según esta realización se de-

nomina en este documento mutante Y641C o, equivalentemente, Y641C.

Y641C (SEQ ID NO: 14)

```
MGQTGKKSEKGPCWRKRVKSEYMRRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSSDLDFPTQVIPLTLNAVAVSPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEL
KEKYKELTEQQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGLPN
NSSRPSTPTINVLESKTDSDREAGTETGGENNDEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
KPNIIEPPENVIEWSGAEASMFRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAHCRKIQLKKDGSSNHVNYQPCDHPQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNTRQCPYLAVERCDPDLCLTCGAADHWD SKNVS
CKNCSIQRGSKKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCFLFNLNNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP
```

En una realización, la secuencia de aminoácidos de un mutante A677 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural solamente por la sustitución con un aminoácido que no es alanina, preferiblemente glicina (G), del residuo de un solo aminoácido correspondiente a A677 de EZH2 humana de tipo natural. El mutante A677 de EZH2 según esta realización se denomina en este documento mutante A677 y preferiblemente un mutante A677G o, equivalentemente, A677G.

A677 (SEQ ID NO: 15)

```
MGQTGKKSEKGPCWRKRVKSEYMRRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSSDLDFPTQVIPLTLNAVAVSPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEL
KEKYKELTEQQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGLPN
NSSRPSTPTINVLESKTDSDREAGTETGGENNDEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
KPNIIEPPENVIEWSGAEASMFRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRVKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAHCRKIQLKKDGSSNHVNYQPCDHPQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNTRQCPYLAVERCDPDLCLTCGAADHWD SKNVS
CKNCSIQRGSKKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIISQDEADRRGKVYDK
YMCFLFNLNNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP
```

En donde X es preferiblemente una glicina (G).

En una realización, la secuencia de aminoácidos de un mutante A687 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural solamente por la sustitución con un aminoácido que no es alanina, preferiblemente valina (V), del residuo de un solo aminoácido correspondiente a A687 de EZH2 humana de tipo natural. El mutante A687 de EZH2 según esta realización se denomina en este documento mutante A687 y preferiblemente un mutante A687V o, equivalentemente, A687V.

A687 (SEQ ID NO: 16)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRRLQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSIDLDFPTQVIPKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLQDGTIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDPPEEREEKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFHTLCRRCFKYDCFLHPFH
 ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTEGGENNDKEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRVKESSIIAPA
 PAEDVTPPRKKRKHRLWAACRQKIQLKDGSNNHVNQPCDHPRQCDSSCPVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNKQCPYLAVERCDPDLCLTCGAADHWD SKNVS
 CKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIISQDEADRRGKVYDK
 YMCSFLFNLNNDFVVDATRKGNKIRFXNHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

En donde X es preferiblemente una valina (V).

La secuencia de aminoácidos de un mutante R685 de EZH2 puede diferir de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural solamente por la sustitución con un aminoácido que no es arginina, preferiblemente histidina (H) o cisteína (C), del residuo de un solo aminoácido correspondiente a R685 de EZH2 humana de tipo natural. El mutante R685 de EZH2 se denomina en este documento mutante R685 y preferiblemente un mutante R685C o un mutante R685H o, equivalentemente, R685H o R685C.

5

A685 (SEQ ID NO: 17)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRRLQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSIDLDFPTQVIPKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLQDGTIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDPPEEREEKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFHTLCRRCFKYDCFLHPFH
 ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTEGGENNDKEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRVKESSIIAPA

PAEDVTPPRKKRKHRLWAACRQKIQLKDGSNNHVNQPCDHPRQCDSSCPVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNKQCPYLAVERCDPDLCLTCGAADHWD SKNVS
 CKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIISQDEADRRGKVYDK
 YMCSFLFNLNNDFVVDATRKGNKIXFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

En donde X es preferiblemente una cisteína (C) o una histidina (H).

La secuencia de aminoácidos de un mutante de EZH2 puede diferir de la secuencia de aminoácidos de EZH2 humana de tipo natural en uno o varios residuos de aminoácidos en su dominio de bolsillo de unión al sustrato tal y como se define en SEQ ID NO: 6. Este mutante de EZH2 se denomina en este documento mutante EZH2.

10

EZH2 mutante que comprende una o varias mutaciones en el dominio de bolsillo de unión al sustrato (SEQ ID NO: 18)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRRLQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSIDLDFPTQVIPKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLQDGTIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDPPEEREEKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQSLHSFHTLCRRCFKYDCFLHPFH
 ATPNTYKRKNTEALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTEGGENNDKEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFRVKESSIIAPA
 PAEDVTPPRKKRKHRLWAACRQKIQLKDGSNNHVNQPCDHPRQCDSSCPVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNKQCPYLAVERCDPDLCLTCGAADHWD SKNVS
 CKNCSIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEXCGEIISQDEADRRGKVYDK
 YMXXXLXNLNNDFXXDXTRKGNKXXXXHSVNPNCYAKVMMVNGDHRXGIFAKRAIQTGE
 ELFXDXRYSXADALKYVGIEREMEIP

En donde X puede ser cualquier aminoácido excepto el correspondiente al del residuo de tipo natural.

Las implicaciones de los presentes resultados para una enfermedad humana se explican por los datos resumidos en la **Tabla 2** (véase el Ejemplo 5). Las células heterocigotas para EZH2 se espera que muestren un fenotipo maligno debido a la formación eficaz de H3-K27me1 a través de la enzima WT y, la posterior transición eficaz de esta especie progenitora a H3-K27me2 y, especialmente, H3-K27me3, a través de la o las formas de enzimas mutantes.

5 Se ha descrito que la formación de H3-K27me1 no depende exclusivamente de la catálisis de WT-EZH2. Estudios con EZH2 desactivada y de otra subunidad de PRC2, EED, han demostrado que la formación de H3-K27me1 se puede catalizar por complejos PRC2 que contienen ya sea EZH2 o la proteína relacionada EZH1 como subunidad catalítica. Shen, X. et al. (2008) *Cell Mol* 32: 491-502. Por lo tanto, un acoplamiento catalítico entre las especies de

10 EZH2 mutantes y complejos PRC2 que contienen o bien WT-EZH2 o WT-EZH1 sería suficiente para aumentar la formación de H3-K27me2/3 y por lo tanto para producir el fenotipo maligno consiguiente. Por tanto, los datos sugieren que el fenotipo maligno de linfoma folicular (FL) y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) del subtipo de

15 linfocito B del centro germinal (GCB), asociado con la expresión de formas mutantes de EZH2, es el resultado de una ganancia general de función con respecto a la formación de la forma trimetilada de H3-K27. Esta interpretación de los datos también ayuda a reconciliar la existencia de una expresión en exceso de EZH2 o proteínas asociadas con PRC2 asociada con el cáncer (por ejemplo, PHF19/PCL3) y también genotipos de pérdida de función para *UTX* desmetilasa en H3-K27 de la histona. La pérdida de actividad UTX sería enzimáticamente equivalente a una ganancia de función para EZH2, en cualquier situación que da lugar a mayores niveles de estado estacionario de H3-K27 trimetilada en las células cancerosas (**Figura 4**).

20 Los estados de monometilación, dimetilación y trimetilación en H3-K27 de la histona están asociados con diferentes funciones en el control transcripcional. La monometilación en H3-K27 de la histona se asocia con una transcripción activa de genes que están preparados para la transcripción. Cui et al. *Stem Cell* (2009) *Cell* 4:80-93; Barski (2007) *Cell* 129: 823-37. En contraste, la trimetilación en H3-K27 de la histona está asociada o bien con genes reprimidos para la transcripción o genes que están preparados para la transcripción cuando la trimetilación en H3-K27 de la histona está en *cis*. Cui et al. (*supra*); Kirmizis et al. (2007) *Genes Dev* 18:1592-1605; Bernstein et al. (2006) *Cell* 125:315-26. En conjunto, las alteraciones de la actividad del complejo PRC2 descritas en el cáncer, incluyendo la mutación Y641 de EZH2, se prevé que darán lugar a un aumento en el estado trimetilado en H3-K27 de la histona y, por lo tanto, darán como resultado una represión transcripcional.

30 Otro descubrimiento de la presente invención es que las células que expresan una EZH2 mutante que comprende una mutación en el dominio de bolsillo de unión al sustrato tal y como se define en SEQ ID NO: 6, son en general más sensibles a los inhibidores de EZH2 de molécula pequeña que las células que expresan EZH2 de tipo natural (WT). Específicamente, las células que expresan el mutante Y641 de EZH2 muestran una reducción del crecimiento, la división o la proliferación o incluso sufren apoptosis o necrosis después del tratamiento con los inhibidores de EZH2. En contraposición, las células que expresan EZH2 WT no son sensibles al efecto antiproliferativo de los inhibidores de EZH2 (**Figuras 13 y 14**). En particular, las células que expresan una mutación por sustitución en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1, muestran una mayor sensibilidad frente a los inhibidores de EZH2 que las células que expresan otros mutantes de EZH2 (Ejemplo 17).

35 Se ha sugerido que EZH2 y otras proteínas metiltransferasas son dianas atractivas para el descubrimiento de fármacos. Copeland et al. (2009) *Nat Rev Drug Discov* 8:724-32; Copeland et al. (2010) *Curr Opin Chem Biol* 14(4):505-10; Pollock et al. (2010) *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 6(1):71-9. Los presentes datos también sugieren una estrategia experimental para el desarrollo de fármacos específicos para el linfoma FL y GCB. Como las diferencias en el reconocimiento del sustrato entre WT y los mutantes asociados a una enfermedad se obtienen por las interacciones del estado de transición, los inhibidores de molécula pequeña que imitan selectivamente el estado de transición de la EZH2 mutante sobre el de la enzima WT, deben demostrar que son eficaces en el bloqueo de la metilación de H3-K27 en las células portadoras de la mutación. Se espera que los inhibidores de este tipo muestren un índice terapéutico elevado, ya que la toxicidad mediada por la diana sería mínima para cualquier célula que sea portadora solamente de la enzima WT. Un mimetismo del estado de transición ha demostrado ser una estrategia eficaz para el diseño de fármacos en muchas áreas de enfermedad. Véase, por ejemplo, Copeland, R.A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. 2^a ed, (Wiley, 2000).

40 50 Los presentes resultados apuntan a una dependencia no reconocida previamente, sorprendente del acoplamiento enzimático entre enzimas que realizan la monometilación de H3-K27 y ciertas formas mutantes de EZH2 para la patogénesis en el linfoma folicular y el linfoma difuso de linfocitos B grandes. Aunque no se pretende estar ligado a ninguna teoría, se cree que los datos constituyen el primer ejemplo de una enfermedad humana que depende de un acoplamiento de ese tipo de la actividad catalítica entre enzimas normales (WT) y mutantes asociadas con la enfermedad (tal como Y641).

55 En este documento se describe un método para tratar o aliviar un síntoma de cáncer o de una afección precancerosa en un sujeto mediante la administración a un sujeto que expresa una EZH2 mutante que comprende una mutación en el dominio de bolsillo de unión al sustrato tal y como se define en SEQ ID NO: 6, de una cantidad terapéuti-

icamente eficaz de un inhibidor de EZH2.

En este documento se describe un método para inhibir en un sujeto la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilada. La inhibición puede implicar la inhibición en un sujeto de la conversión de H3-K27 no metilada a H3-K27 monometilada, la conversión de H3-K27 monometilada a H3-K27 dimetilada, la conversión de H3-K27 dimetilada a H3-K27 trimetilada o cualquier combinación de las mismas, incluyendo, por ejemplo, la conversión de H3-K27 monometilada a H3-K27 dimetilada y la conversión de H3-K27 dimetilada a H3-K27 trimetilada. Tal y como se usa en este documento, H3-K27 no metilada se refiere a la histona H3 sin un grupo metilo unido covalentemente al grupo amino de la lisina 27. Tal y como se usa en este documento, H3-K27 monometilada se refiere a la histona H3 con un único grupo metilo unido covalentemente al grupo amino de la lisina 27. H3-K27 monometilada también se denomina en este documento H3-K27me1. Tal y como se usa en el presente documento, H3-K27 dimetilada se refiere a la histona H3 con dos grupos metilo unidos covalentemente al grupo amino de la lisina 27. H3-K27 dimetilada también se denomina en este documento H3-K27me2. Tal y como se usa en el presente documento, H3-K27 trimetilada se refiere a la histona H3 con tres grupos metilo unidos covalentemente al grupo amino de la lisina 27. H3-K27 trimetilada también se denomina en este documento H3-K27me3.

La histona H3 es una proteína de 136 aminoácidos de longitud, cuya secuencia es conocida. Véase, por ejemplo, GenBank nº de orden CAB02546. Tal y como se describe adicionalmente en este documento, además de la histona H3 de longitud completa, fragmentos peptídicos de la histona H3 que comprenden el residuo de lisina correspondiente a K27 de la histona H3 de longitud completa, se pueden utilizar como sustrato para EZH2 (y lo mismo para las formas mutantes de EZH2) para evaluar la conversión de H3-K27m1 a H3-K27m2 y la conversión de H3-K27m2 a H3-K27m3. Ese fragmento peptídico se puede corresponder a los residuos de aminoácidos 21-44 de la histona H3. Ese fragmento peptídico tiene la secuencia de aminoácidos LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO: 19).

En el presente documento se describe un método que implica administrar a un sujeto que expresa una EZH2 mutante una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad metiltransferasa en la histona de EZH2, inhibiendo de esta manera la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilada en el sujeto y tratando de ese modo o aliviando un síntoma de cáncer o trastornos asociados con niveles anormales de metilación de la histona en el sujeto.

Un sujeto que expresa una EZH2 mutante de la presente invención se refiere a un sujeto que tiene una cantidad detectable de un polipéptido EZH2 mutante. Preferiblemente, el polipéptido EZH2 mutante comprende una o varias mutaciones en su dominio de bolsillo de unión al sustrato como se define en SEQ ID NO: 6. La mutación incluye una sustitución en la posición de los aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID NO: 1, tal como, pero no se limita a, una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); o una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C). Más preferiblemente, el sujeto tiene una cantidad detectable de un polipéptido EZH2 mutante que comprende una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V).

Alternativamente, un sujeto que expresa una EZH2 mutante de la presente invención se refiere a un sujeto que tiene una cantidad detectable de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante. Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante comprende una o varias mutaciones en su dominio de bolsillo de unión al sustrato tal y como se define en SEQ ID NO: 6. La mutación incluye una sustitución en la posición de los aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID NO: 1, tal como, pero que no se limita a, una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); o una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C). Más preferiblemente, el sujeto tiene una cantidad detectable de secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante que comprende una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V).

DETECCIÓN DE MUTANTES DE EZH2

Un polipéptido EZH2 mutante se puede detectar usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, un polipéptido EZH2 mutante se puede detectar utilizando un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido EZH2 mutante o a un fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante. Un fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante puede incluir, por ejemplo, un dominio SET tal y como se proporciona en

- 5 SEQ ID NO: 7, a excepción de la sustitución de uno o varios residuos en el dominio de bolsillo de unión al sustrato como se define en SEQ ID NO: 6 por un residuo de aminoácido distinto del residuo de tipo natural. En otra realización, un fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante puede incluir, por ejemplo, un fragmento de 10-113 aminoácidos del dominio SET, tal y como se proporciona en SEQ ID NO: 7, excepto por una sustitución de uno o varios residuos en el dominio de bolsillo de unión al sustrato tal y como se define en SEQ ID
- 10 NO: 6 por un residuo de aminoácido distinto del residuo de tipo natural, siempre que el fragmento incluya el residuo de aminoácido que corresponde a una mutación de EZH2. Un anticuerpo se considera que se une específicamente al polipéptido EZH2 mutante o a un fragmento peptídico que es característico del polipéptido EZH2 mutante, si se une a ese polipéptido EZH2 mutante o a ese fragmento de péptido del mismo, pero no al polipéptido EZH2 de tipo natural correspondiente o a un fragmento peptídico del mismo. En una realización, un anticuerpo de ese tipo se
- 15 considera que se une específicamente al polipéptido EZH2 mutante o a un fragmento peptídico que es característico del polipéptido EZH2 mutante, si se une a ese polipéptido EZH2 mutante o a ese fragmento peptídico del mismo con una afinidad que es al menos aproximadamente 100 veces mayor que la correspondiente al polipéptido EZH2 de tipo natural o a un fragmento peptídico del mismo. En una realización, un anticuerpo de ese tipo se considera que se une específicamente al polipéptido EZH2 mutante o a un fragmento peptídico que es característico del polipéptido
- 20 EZH2 mutante, si se une a ese polipéptido EZH2 mutante o a un fragmento peptídico del mismo con una afinidad que es al menos aproximadamente 1000 veces mayor que la correspondiente al polipéptido EZH2 de tipo natural o a un fragmento peptídico del mismo. El anticuerpo se puede utilizar, por ejemplo, en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o en un ensayo de transferencia Western. El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal, químérico o un fragmento de anticuerpo. La etapa de detectar el producto de reacción se puede llevar a cabo con
- 25 cualquier inmunoensayo adecuado.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal se puede preparar de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256(5517):495-7.

A modo de otro ejemplo, un polipéptido EZH2 mutante se puede detectar utilizando espectrometría de masas (MS), 30 por ejemplo, ionización por electrospray acoplada con tiempo-de-vuelo (ESI-TOF) o desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo-de-vuelo (MALDI-TOF). Tales métodos son bien conocidos en la técnica. El análisis implicará la identificación de uno o varios fragmentos peptídicos que comprenden la mutación de interés, por ejemplo, un péptido de 12 a 24 aminoácidos de longitud que comprende una secuencia que incluye el aminoácido correspondiente a una mutación en EZH2 de tipo natural.

- 35 Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante o un fragmento peptídico que es característico del polipéptido EZH2 mutante se puede detectar usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante se puede detectar utilizando una resecuenciación del genoma completo o una resecuenciación de la región diana (esta última también conocida como resecuenciación dirigida) utilizando fuentes adecuadamente seleccionadas de ADN y cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bentley (2006) *Curr Opin Genet Dev.* 16:545-52 y Li et al. (2009) *Genome Res* 19:1124-1132. El método implica típica y generalmente las etapas de purificación de ADN genómico, amplificación con PCR para amplificar la región de interés, secuenciación con ciclos, limpieza de la reacción de secuenciación, electroforesis capilar y análisis de datos. Los cebadores de calidad elevada para la PCR para cubrir una región de interés se diseñan usando herramientas de diseño de cebadores *in silico*. La secuenciación con ciclos es un método simple en el que sucesivas rondas de desnaturización, reasociación y extensión en un termociclador dan lugar a una amplificación lineal de los productos de extensión. Los productos normalmente terminan con un marcador fluorescente que identifica la base del nucleótido terminal como G, A, T o C. Los terminadores de colorantes marcadores y las sales que pueden competir para una inyección electroforética capilar se eliminan por lavado. Durante la electroforesis capilar, los productos de la reacción de secuenciación por ciclos migran a través de los capilares cargados con polímero. Los fragmentos de ADN cargados negativamente se separan por el tamaño a medida que se mueven a través de los capilares hacia el electrodo positivo. Después de la electroforesis, el programa informático de recogida de datos crea un archivo de la muestra de los datos sin purificar. Con el uso de aplicaciones de programas informáticos aguas abajo, se realiza un análisis de datos adicional para traducir las imágenes de los datos con color recogidos, en las bases de nucleótidos correspondientes. Alternativamente o además, el método puede incluir el uso de una captura y/o secuenciación de ADN genómico de una región diana basándose en micromatrices. Los kits, reactivos y métodos para seleccionar cebadores apropiados para la PCR y la realización de una resecuenciación, están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Applied Biosystems, Agilent y NimbleGen (Roche Diagnostics GmbH). Métodos como estos se han utilizado para detectar mutaciones en JAK2 y el gen de la leucemia mieloproliferativa (MPL) y para diagnosticar policitemia vera, 55 trombocitemia esencial y mielofibrosis idiopática. Para el uso en la presente invención, los cebadores de PCR se pueden seleccionar de modo que amplifiquen, por ejemplo, al menos una porción relevante de SEQ ID NO: 8 (arriba).
- 60 Alternativamente o además, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante se puede

19

- detectar utilizando una transferencia Southern, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En una realización, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido EZH2 mutante se detecta usando una hibridación de ácidos nucleicos que se realiza en condiciones altamente rigurosas. Una sonda de ácido nucleico se selecciona de tal manera que su secuencia sea complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana que incluye un codón para el aminoácido mutante correspondiente a una mutación de EZH2 de tipo natural. Esa mutación incluye cualquier mutación de EZH2, preferiblemente una o varias mutaciones en el dominio de bolsillo de unión al sustrato tal y como se define en SEQ ID NO: 6 de EZH2, tales como, pero sin limitarse a, una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con metionina (M) de la valina (V) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 674 de SEQ ID NO: 1 (V674M); una sustitución con histidina (H) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 685 de SEQ ID NO: 1 (R685H); una sustitución con cisteína (C) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 685 de SEQ ID NO: 1 (R685C); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); o una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C).
- Una sonda específica de secuencia se combina con una muestra que se va a someter a ensayo en condiciones altamente rigurosas. La expresión "condiciones altamente rigurosas", tal y como se usa en este documento, se refiere a parámetros con los que la técnica está familiarizada. Los parámetros para la hibridación de ácidos nucleicos se pueden encontrar en referencias que recopilan tales métodos, por ejemplo, J. Sambrook, et al., compiladores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 o F.M. Ausubel, et al., compiladores, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Más específicamente, unas condiciones altamente rigurosas, tal y como se usan en este documento, se refieren, por ejemplo, a una hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5 x SSC, 0,02% de Ficoll, 0,02% de polivinilpirrolidona, 0,02% de albúmina de suero bovino (BSA), NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), 0,5% de SDS, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,015 M, pH 7; SDS es dodecilsulfato sódico; y EDTA es ácido etilendiamintetraacético. Después de la hibridación, la membrana sobre la que se transfiere el ADN, se lava, por ejemplo, en 2 x SSC a temperatura ambiente y luego a 0,1-0,5 x SSC/0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68°C. Hay otras condiciones, reactivos, etc. que se pueden utilizar, que dan lugar a un grado de rigor similar. El experto en la técnica estará familiarizado con tales condiciones y por lo tanto no se ofrecen en este documento. Se entenderá, sin embargo, que el experto en la materia será capaz de manipular las condiciones de una manera que se permita una identificación clara de los ácidos nucleicos asociados con EZH2 de la invención, incluyendo, en particular, los ácidos nucleicos que codifican mutantes de EZH2 (por ejemplo, mediante el uso de condiciones menos rigurosas). El experto en la materia también está familiarizado con la metodología para el escrutinio de células y genotecas en busca de la expresión de tales moléculas, que después se aíslan de forma rutinaria, siguiendo con un aislamiento de la molécula de ácido nucleico pertinente y una secuenciación.
- Al sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de EZH2. Tal y como se usa en el presente documento, un inhibidor de EZH2 se refiere, en general, a una molécula pequeña, es decir, una molécula de peso molecular menor de aproximadamente 1,5 kilodaltons (kDa), que es capaz de interferir con la actividad enzimática de la metiltransferasa de histonas de EZH2.
- En una realización, el inhibidor de EZH2 inhibe la actividad metiltransferasa de histonas de EZH2 de tipo natural. En una realización, el inhibidor de EZH2 inhibe la actividad metiltransferasa de histonas de la EZH2 mutante. En una realización, el inhibidor de EZH2 inhibe la actividad metiltransferasa de histonas de EZH2 de tipo natural y la actividad metiltransferasa de histonas de la EZH2 mutante. En una realización, el inhibidor de EZH2 inhibe selectivamente la actividad metiltransferasa de histonas de la EZH2 mutante.
- Tal y como se describe en este documento, ciertos mutantes de EZH2 (tales como Y641) son catalizadores relativamente mediocres para la conversión de H3-K27 no metilada a H3-K27me1 y también catalizadores inesperadamente eficaces para la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. Ciertos mutantes de EZH2 (tales como A687) prefieren un sustrato de monometil H3-K27. Por el contrario, ciertos mutantes de EZH2 (tales como A677) muestran la misma preferencia entre H3-K27 no metilada, monometilada y dimetilada. A la inversa, EZH2 de tipo natural es un catalizador relativamente eficaz para la conversión de H3-K27 no metilada a H3-K27me1 y un catalizador todavía inesperadamente ineficaz para la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. Esto es importante porque los estados de monometilación, dimetilación y trimetilación de H3-K27 muestran diferentes funciones en el control transcripcional. Por ejemplo, H3-K27me1 se asocia con una transcripción activa de genes que están listos para la transcripción, mientras que H3-K27me3 se asocia con genes reprimidos para la transcripción o genes que están listos para la transcripción cuando la trimetilación de H3-K4 está en *cis*. Por tanto, una inhibición selectiva de la actividad metiltransferasa de las histonas del mutante de EZH2 afecta a una inhibición selectiva de la producción de las diferentes formas metiladas de H3-K27, modificando de ese modo la transcripción asociada con los niveles de metilación de H3-K27.

Un inhibidor la EZH2 "inhibe selectivamente" la actividad metiltransferasa de histonas de la EZH2 mutante cuando se inhibe la actividad metiltransferasa de histonas de la EZH2 mutante más efectivamente de lo que se inhibe la actividad metiltransferasa de histonas de EZH2 de tipo natural. Por ejemplo, en una realización, el inhibidor selectivo tiene una CI50 para la EZH2 mutante que es al menos 40 por ciento menor que la CI50 para la EZH2 de tipo natural. En una realización, el inhibidor selectivo tiene una CI50 para la EZH2 mutante que es al menos 50 por ciento menor que la CI50 para la EZH2 de tipo natural. En una realización, el inhibidor selectivo tiene una CI50 para la EZH2 mutante que es al menos 60 por ciento menor que la CI50 para la EZH2 de tipo natural. En una realización, el inhibidor selectivo tiene una CI50 para la EZH2 mutante que es al menos 70 por ciento menor que la CI50 para la EZH2 de tipo natural. En una realización, el inhibidor selectivo tiene una CI50 para la EZH2 mutante que es al menos 80 por ciento menor que la CI50 para la EZH2 de tipo natural. En una realización, el inhibidor selectivo tiene una CI50 para la EZH2 mutante que es al menos 90 por ciento menor que la CI50 para la EZH2 de tipo natural.

En una realización, el inhibidor selectivo de una EZH2 mutante no ejerce esencialmente ningún efecto inhibidor sobre EZH2 de tipo natural.

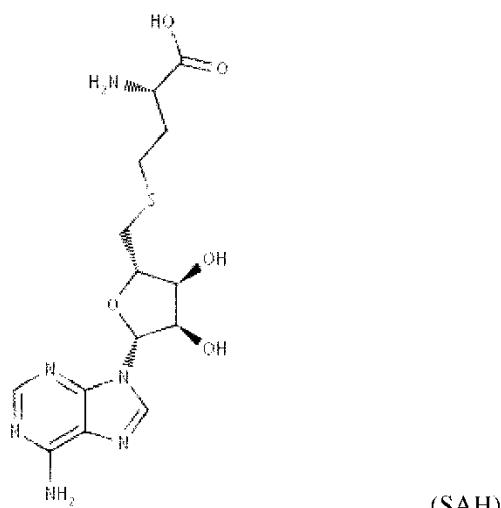
El inhibidor inhibe la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. En una realización, el inhibidor se dice que inhibe la trimetilación de H3-K27. Ya que la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 precede a la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3, un inhibidor de la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 naturalmente también inhibe la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3, es decir, inhibe la trimetilación de H3-K27. También es posible inhibir la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3 sin inhibir la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2. Una inhibición de este tipo también daría lugar a una inhibición de la trimetilación de H3-K27, aunque sin inhibir la dimetilación de H3-K27.

En una realización, el inhibidor inhibe la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 y la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. Un inhibidor de ese tipo puede inhibir directamente solo la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2. Alternativamente, ese inhibidor puede inhibir directamente tanto la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 como la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3.

El inhibidor inhibe la actividad metilasa de histonas. La inhibición de la actividad metilasa de histonas se puede detectar usando cualquier método adecuado. La inhibición se puede medir, por ejemplo, ya sea en términos de tasa de actividad metilasa de histonas o como un producto de la actividad metilasa de histonas. Métodos adecuados para cualquiera de estas lecturas, se incluyen en los Ejemplos a continuación.

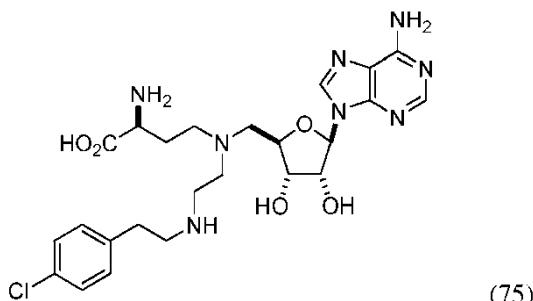
La inhibición es una inhibición medible en comparación con un control negativo adecuado. En una realización, la inhibición es al menos un 10 por ciento de inhibición en comparación con un control negativo adecuado. Es decir, la tasa de actividad enzimática o la cantidad de producto con el inhibidor es menor o igual al 90 por ciento de la tasa correspondiente o la cantidad producida sin el inhibidor. En otras diversas realizaciones, la inhibición es al menos 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 o 95 por ciento de inhibición en comparación con un control negativo adecuado. En una realización, la inhibición es una inhibición de al menos 99 por ciento en comparación con un control negativo adecuado. Es decir, la tasa de actividad enzimática o la cantidad de producto con el inhibidor es menor o igual al 1 por ciento de la tasa correspondiente o la cantidad producida sin el inhibidor.

En el presente documento se describe el inhibidor S-adenosil-L-homocisteína (SAH). SAH tiene la fórmula estructural



y está disponible comercialmente con una serie de proveedores, incluyendo, por ejemplo, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. SAH se ha descrito como un inhibidor de la transmetilación mediante metiltransferasas dependientes de S-adenosilmetionina.

En el presente documento se describe el Compuesto inhibidor 75



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas realizaciones, la invención comprende la etapa de realizar un ensayo para detectar un mutante de EZH2 en una muestra de un sujeto. Los ensayos de este tipo se han descrito anteriormente. Tal y como se usa en este documento, una "muestra de un sujeto" se refiere a cualquier muestra adecuada que contiene células o componentes de las células obtenidos o derivados de un sujeto. En una realización, la muestra incluye células sospechosas de expresar EZH2 mutante, por ejemplo, células de cáncer. En una realización, la muestra es una muestra de sangre. En una realización, la muestra es una muestra de una biopsia obtenida a partir de, por ejemplo, un tejido linfático (por ejemplo, ganglio linfático) o médula ósea. En una realización, la muestra es una muestra de una biopsia obtenida a partir de un tejido distinto o además de un tejido linfático (por ejemplo, ganglio linfático) o médula ósea. Por ejemplo, en una realización, la muestra es una biopsia de un cáncer, por ejemplo, un tumor compuesto por células cancerosas. Las células en la muestra se pueden aislar de otros componentes de la muestra. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se pueden aislar como una capa de leucocitos a partir de una muestra de sangre que se ha centrifugado de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Cuando el resultado del ensayo en una muestra procedente de un sujeto indica que una EZH2 mutante está presente en la muestra, se dice que el sujeto expresa una EZH2 mutante. De hecho, en una realización, cuando el resultado del ensayo en una muestra de un sujeto indica que una EZH2 mutante está presente en la muestra, el sujeto se identifica como un candidato para el tratamiento con un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe selectivamente la actividad metiltransferasa de histonas de la EZH2 mutante.

Cuando el resultado del ensayo en una muestra de un cáncer indica que una EZH2 mutante está presente en el cáncer, se dice que el cáncer expresa la EZH2 mutante.

Del mismo modo, cuando el resultado del ensayo en una muestra que comprende células cancerosas de un sujeto que tiene un cáncer, indica que una EZH2 mutante está presente en la muestra, se dice que el sujeto expresa la EZH2 mutante.

La detección de H3-K27 dimetilada o H3-K27 trimetilada se puede realizar usando cualquier método adecuado en la técnica. En una realización, el nivel de metilación se detecta utilizando anticuerpos específicos para H3-K27 dimetilada o H3-K27 trimetilada. Por ejemplo, el tejido aislado se fija con formalina y se embebe en bloques de parafina para una conservación a largo plazo. Los bloques se pueden utilizar para preparar portaobjetos para una tinción inmunohistoquímica o una tinción fluorescente con anticuerpos contra H3-K27 metilada. Alternativamente, lisados de células completas o extractos de histonas se pueden preparar a partir de la muestra de tejido aislada y posteriormente utilizar para una tinción inmunohistoquímica, análisis de transferencia Western o tinción fluorescente. En otra realización, el nivel de metilación se detecta usando un polipéptido o un aptámero específico para H3-K27 dimetilada o H3-K27 trimetilada. En otra realización, el nivel de metilación se detecta empleando espectrometría de masas (MS).

Una H3-K27 dimetilada de control o una H3-K27 trimetilada de control se puede establecer a partir de una muestra de control, por ejemplo, un tejido no tumoral adyacente aislado a partir del sujeto o un tejido sano procedente de un sujeto sano. Alternativamente, el nivel de metilación de control de H3-K27me2 o H3-K27me3 puede ser establecido por un patólogo con métodos conocidos en la técnica.

40 MÉTODOS DE ESCRUTINIO

En este documento se describe un método para identificar un compuesto de ensayo como un inhibidor de una EZH2 mutante. El método puede incluir la combinación de una EZH2 mutante aislada con un sustrato de histonas, un donante de grupos metilo (por ejemplo, S-adenosil metionina (SAM)) y un compuesto de ensayo, en donde el sustrato de histonas comprende una forma de H3-K27 seleccionada entre el grupo que consiste en H3-K27 no metilada, H3-K27 monometilada, H3-K27 dimetilada y cualquier combinación de las mismas; y la realización de un ensayo para detectar la metilación de H3-K27 en el sustrato de histonas, identificando de este modo el compuesto de ensayo como un inhibidor de la EZH2 mutante cuando la metilación de H3-K27 en presencia del compuesto de ensayo es menor que la metilación de H3-K27 en ausencia del compuesto de ensayo. El ensayo para detectar la metilación de

H3-K27 se puede seleccionar para medir la tasa de metilación, el grado de metilación o ambos, la tasa y el grado de metilación.

La EZH2 mutante se aísla en forma de un complejo PRC2 o un equivalente funcional del mismo. Tal y como se utiliza en este documento, el término "aislado" significa sustancialmente separado de otros componentes con los que el complejo se puede encontrar tal y como está presente en la naturaleza. Un compuesto se puede aislar sin que esté necesariamente purificado. El mutante de EZH2 se puede aislar como un complejo de una EZH2 mutante junto con EED y SUZ12. El mutante de EZH2 se puede aislar como un complejo de una EZH2 mutante junto con EED, SUZ12 y RbAp48. En condiciones apropiadas, un complejo PRC2 o un equivalente funcional del mismo muestra actividad metiltransferasa de histonas con H3-K27. El complejo puede estar compuesto por polipéptidos de componentes expresados de forma recombinante, por ejemplo, EZH2, EED, SUZ12, con o sin RbAp48.

La EZH2 mutante aislada se combina con un sustrato de histonas. Un sustrato de histonas incluye cualquier fuente adecuada de polipéptidos de histonas o fragmentos de los mismos que pueden servir como sustrato para EZH2. El sustrato de histonas puede incluir histonas aisladas a partir de un sujeto. Las histonas se pueden aislar a partir de células de un sujeto usando cualquier método adecuado; tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica y no se tienen que especificar adicionalmente en este documento. Véase, por ejemplo, Fang et al. (2004) Methods Enzymol 377:213-26. El sustrato de histonas se puede proporcionar como nucleosomas. El sustrato de histonas se puede proporcionar como nucleosomas de eritrocitos aviares (pollo).

El sustrato de histonas proporcionado de este modo puede incluir una mezcla por adición de estados de modificación de histonas, incluyendo diversos estados de metilación de H3-K27, tal y como se determinan por transferencia Western con anticuerpos específicos del estado de metilación de H3-K27. El sustrato de histonas se puede proporcionar como una histona H3 purificada de longitud completa. Una histona H3 purificada de longitud completa de este tipo se puede proporcionar como una preparación homogénea con respecto a estados de metilación de H3-K27 o como una mezcla por adición de diversos estados de metilación de H3-K27. Las preparaciones homogéneas de histona H3 aislada respecto a los estados de metilación de H3-K27, se pueden preparar en parte mediante pasos por una columna de inmunoafinidad cargada con anticuerpos adecuados específicos del estado de metilación de H3-K27 o por inmunoprecipitación utilizando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos adecuados específicos del estado de metilación de H3-K27. Alternativamente o además, el estado de metilación de H3-K27 se puede caracterizar como parte de la realización del ensayo. Por ejemplo, el sustrato de histonas de material de partida se podría caracterizar como que contiene 50 por ciento de H3-K27 no metilada, 40 por ciento de H3-K27 monometilada, 10 por ciento de H3-K27 dimetilada y 0 por ciento de H3-K27 trimetilada.

El sustrato de histonas puede incluir un banco de péptidos o un péptido adecuado que comprende una o varias secuencias de aminoácidos relacionadas con la histona H3, incluyendo, en particular, una secuencia que incluye H3-K27. El sustrato de histonas puede ser un fragmento de péptido que se corresponde con los residuos de aminoácidos 21-44 de la histona H3. Ese fragmento peptídico tiene la secuencia de aminoácidos LATKAARK-SAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO: 19). El banco de péptidos o el péptido se puede preparar mediante síntesis peptídica de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica y, eventualmente se pueden modificar, así como incorporar cualquier grado deseado de metilación de la lisina correspondiente a H3-K27. Tal y como se describe en los Ejemplos a continuación, tales péptidos también se pueden modificar para incorporar un marcador, tal como biotina, útil en la realización de ensayos aguas abajo. El marcador se puede añadir al extremo amino N-terminal del o de los péptidos. El marcador se puede añadir al extremo carboxi C-terminal del o de los péptidos.

Los anticuerpos específicos de la metilación de H3-K27 están disponibles a partir de una variedad de fuentes comerciales, incluyendo, por ejemplo, Cell Signaling Technology (Danvers, MA) y Active Motif (Carlsbad, CA).

La EZH2 mutante aislada se combina con un compuesto de ensayo. Tal y como se usa en este documento, un "compuesto de ensayo" se refiere a una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 1,5 kDa. Un compuesto de ensayo puede ser un compuesto conocido. Un compuesto de ensayo puede de ser un compuesto novedoso. Un compuesto de ensayo se puede proporcionar como parte de un banco de tales compuestos, en donde el banco incluye, por ejemplo, decenas, cientos, miles o incluso más compuestos. Un banco de compuestos se puede escrutar ventajosamente en un ensayo de escrutinio de alto rendimiento, por ejemplo, usando matrices de compuestos de ensayo y una manipulación robótica de acuerdo con métodos generales bien conocidos en la técnica.

Un compuesto de ensayo puede ser un compuesto que es un derivado de SAH o un derivado del Compuesto 75.

La detección de la metilación de H3-K27 se puede realizar usando cualquier método adecuado. La fuente de grupos metilo donantes puede incluir grupos metilo que están marcados con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un marcador isotópico, por ejemplo, tritio. Otros tipos de marcadores pueden incluir, por ejemplo, marcadores fluorescentes.

La detección de una formación de H3-K27 trimetilada se puede realizar usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, la detección de una formación de H3-K27 trimetilada se puede lograr usando un ensayo para detectar la incorporación de grupos metilo marcados, tal y como se ha descrito anteriormente, opcionalmente en combinación

con un método cromatográfico o de otro tipo para separar los productos marcados por el tamaño, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), electroforesis capilar (CE) o cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Alternativamente o además, la detección de una formación de H3-K27 trimetilada se puede realizar utilizando anticuerpos que son específicos de H3-K27 trimetilada.

5 La detección de una conversión de H3-K27 monometilada a H3-K27 dimetilada se puede realizar usando cualquier método adecuado. La conversión se puede medir usando anticuerpos específicos de H3-K27 monometilada y H3-K27 dimetilada. Por ejemplo, se pueden determinar las cantidades o concentraciones de partida de H3-K27 monometilada y H3-K27 dimetilada usando anticuerpos apropiados, específicos de H3-K27 monometilada y H3-K27 dimetilada. Después de la combinación de la enzima, el sustrato, el donante de grupos metilo y el compuesto de ensayo se pueden determinar entonces, las cantidades o concentraciones resultantes de H3-K27 monometilada y H3-K27 dimetilada usando anticuerpos apropiados, específicos de H3-K27 monometilada y H3-K27 dimetilada. Las cantidades o concentraciones iniciales y resultantes de H3-K27 monometilada y H3-K27 dimetilada se pueden comparar a continuación. Alternativamente o además, las cantidades o concentraciones iniciales y resultantes de H3-K27 monometilada y H3-K27 dimetilada se pueden comparar entonces con cantidades de concentraciones correspondientes de un control negativo. Una reacción de control negativo, en la que no se incluye ningún agente de ensayo en el ensayo, se puede ejecutar en paralelo o como un control histórico. Los resultados de esa reacción de control se pueden restar opcionalmente de los resultados correspondientes de la reacción experimental antes o junto con la realización de la comparación mencionada anteriormente.

20 Ya que la forma dimetilada de H3-K27 se puede metilar adicionalmente en el mismo ensayo, una reducción de la cantidad o la concentración de H3-K27 monometilada puede parecer que no se corresponde directamente con un aumento de H3-K27 dimetilada. En ese caso, se puede suponer, sin embargo, que una reducción de la cantidad o la concentración de H3-K27 monometilada es, por sí misma, un reflejo de la conversión de H3-K27 monometilada a H3-K27 dimetilada.

25 La detección de la conversión de H3-K27 dimetilada a H3-K27 trimetilada se puede realizar usando cualquier método adecuado. La conversión se puede medir usando anticuerpos específicos de H3-K27 dimetilada y H3-K27 trimetilada. Por ejemplo, las cantidades o concentraciones de partida de H3-K27 dimetilada y H3-K27 trimetilada se pueden determinar utilizando anticuerpos adecuados específicos para H3-K27 dimetilada y H3-K27 trimetilada. Después de la combinación de la enzima, el sustrato y el compuesto de ensayo se pueden determinar entonces, las cantidades o concentraciones resultantes de H3-K27 dimetilada y H3-K27 trimetilada utilizando anticuerpos adecuados, específicos de H3-K27 dimetilada y H3-K27 trimetilada. Las cantidades o concentraciones iniciales y resultantes de H3-K27 dimetilada y H3-K27 trimetilada se pueden comparar a continuación. Alternativamente o además, las cantidades o concentraciones iniciales y resultantes de H3-K27 dimetilada y H3-K27 trimetilada se pueden comparar entonces con cantidades de concentraciones correspondientes de un control negativo. Una reacción de control negativo, en la que no se incluye ningún agente de ensayo en el ensayo, se puede ejecutar en paralelo o como un control histórico. Los resultados de esa reacción de control se pueden restar opcionalmente de los resultados correspondientes de la reacción experimental antes o junto con la realización de la comparación mencionada anteriormente.

35 Un agente de ensayo se identifica como un inhibidor de la EZH2 mutante cuando la metilación de H3-K27 con el compuesto de ensayo es menor que la metilación de H3-K27 sin el compuesto de ensayo. Un agente de ensayo se puede identificar como un inhibidor de la EZH2 mutante, cuando la formación de H3-K27 trimetilada en presencia del compuesto de ensayo es menor que la formación de H3-K27 trimetilada en ausencia del compuesto de ensayo.

40 En este documento se describe un método para identificar un inhibidor selectivo de una EZH2 mutante. El método puede incluir la combinación de una EZH2 mutante aislada con un sustrato de histonas, un donante de grupos metilo (por ejemplo, SAM) y un compuesto de ensayo, en donde el sustrato de histonas comprende una forma de H3-K27 seleccionada a partir del grupo que consiste en H3-K27 monometilada, H3-K27 dimetilada y una combinación de H3-K27 monometilada y H3-K27 dimetilada, formando de este modo una mezcla de ensayo; la combinación de una EZH2 de tipo natural aislada con un sustrato de histonas, un donante de grupos metilo (por ejemplo, SAM) y un compuesto de ensayo, en donde el sustrato de histonas comprende una forma de H3-K27 seleccionada a partir del grupo que consiste en H3-K27 monometilada, H3-K27 dimetilada y una combinación de H3-K27 monometilada y H3-K27 dimetilada, formando de este modo una mezcla de control; la realización de un ensayo para detectar la trimetilación del sustrato de histonas en cada una de las mezclas de ensayo y la mezcla de control; el cálculo de la relación de (a) la trimetilación con la EZH2 mutante y el compuesto de ensayo (M+) con (b) la trimetilación con la EZH2 mutante sin el compuesto de ensayo (M-); el cálculo de la relación de (c) la trimetilación con EZH2 de tipo natural y el compuesto de ensayo (WT+) con (d) la trimetilación con EZH2 de tipo natural sin el compuesto de ensayo (WT-); la comparación de la relación (a)/(b) con la relación (c)/(d); y la identificación del compuesto de ensayo como un inhibidor selectivo de la EZH2 mutante cuando la relación (a)/(b) es menor que la relación (c)/(d). El método puede incluir, además, tener en cuenta un control negativo sin compuesto de ensayo para una o ambas mezclas de ensayo y la mezcla control.

45 La presente invención también proporciona una relación sorprendente, no reconocida previamente de la sensibilidad de un paciente frente a un inhibidor de EZH2. Por consiguiente, un aspecto de la invención es un método para determinar la sensibilidad de un sujeto que tiene cáncer o síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos

como preleucemia) frente a un inhibidor de EZH2 seleccionado a partir del compuesto 2 al compuesto 62. El método implica detectar la presencia de una mutación en EZH2 en una muestra obtenida a partir de un sujeto, en donde la mutación es o se expresa como una mutación por sustitución en la posición de aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID NO: 1, en donde la presencia de dicha mutación indica que el sujeto es sensible al inhibidor de EZH2. Una mutación por sustitución de aminoácido preferida incluye una sustitución en la posición de aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID NO: 1, tal como, pero no limitada a una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); o una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C).

15 En una realización preferida, el sujeto tiene cáncer o una afección cancerosa. Por ejemplo, el cáncer es linfoma, leucemia o melanoma. Preferiblemente, el linfoma es linfoma no Hodgkin, linfoma folicular o linfoma difuso de linfocitos B grandes. Alternativamente, la leucemia es leucemia mieloide crónica (LMC).

20 En otra realización preferida, el polipéptido EZH2 mutante o la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido EZH2 mutante de la presente invención comprende una sustitución en una posición de los aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID NO: 1, tal como, pero no limitada a una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); o una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C).

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

30 Uno o varios antagonistas de EZH2 se pueden administrar solos a un paciente humano o en composiciones farmacéuticas en donde se mezclan con vehículos o excipiente(s) adecuados en dosis para tratar o mejorar una enfermedad o una afección, tal y como se describe en este documento. Las mezclas de esos antagonistas de EZH2 también se pueden administrar al paciente como una mezcla simple o en composiciones farmacéuticas formuladas adecuadas. Por ejemplo, un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de un antagonista de EZH2 o una sal, un hidrato, un enantiómero o un estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo; y un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las técnicas para la formulación y administración de antagonistas de EZH2 pueden encontrarse en referencias bien conocidas por una persona de experiencia ordinaria en la técnica, tales como Remington, "The Science y Practice of Pharmacy", 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins 2005.

40 Las vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal o intestinal; la administración parenteral, incluyendo una inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o intramedular, así como una inyección intratecal, intraventricular directa o intraocular; la administración tópica, incluyendo gotas para los ojos y transdérmica; e intranasal y otra administración a través de la mucosa.

45 Alternativamente, se puede administrar un antagonista de EZH2 en de una forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de una inyección del antagonista de EZH2 directamente en un sitio edematoso, frecuentemente en una formulación de depósito o de liberación sostenida.

Un antagonista de EZH2 se puede administrar mediante una inyección directa en un tumor o nódulo linfático.

Además, se puede administrar un antagonista de EZH2 en un sistema de administración dirigida de fármacos, por ejemplo, en un liposoma recubierto con anticuerpo específico de las células del cáncer.

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, producción de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

55 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse por tanto de una manera convencional usando uno o varios vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los antagonistas de EZH2 activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Una formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Para una inyección, los agentes de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración a través de la mucosa, se emplean agentes penetrantes en la formulación, apropiados para la barrera que se va a permear. Tales agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

- 5 Para la administración oral, los antagonistas de EZH2 se pueden formular fácilmente combinando los antagonistas de EZH2 activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los antagonistas de EZH2 de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para ingestión oral en un paciente que se va a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando el antagonista de EZH2 activo con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir compuestos auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de pataña, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinil pirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

10 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden emplear soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para una identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de antagonistas activos de EZH2.

15 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden emplear oralmente incluyen cápsulas de ajuste a presión a base de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas a base de gelatina y un agente plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados por adición con una carga tal como lactosa, agentes aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los antagonistas de EZH2 activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores.

20 Para la administración bucal, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

25 Para la administración por inhalación, los antagonistas de EZH2 para uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, díclorodifluorometano, triclorofluorometano, díclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos, por ejemplo, de gelatina para el uso en un inhalador o insuflador, se pueden formular de forma que contienen una mezcla en polvo del antagonista de EZH2 y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

30 Los antagonistas de EZH2 se pueden formular para una administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden estar en formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

35 Las formulaciones farmacéuticas para una administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los antagonistas de EZH2 activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los antagonistas de EZH2 activos se pueden preparar como suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los antagonistas de EZH2 para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

40 Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para una reconstitución antes del uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos.

45 Los antagonistas de EZH2 se pueden formular también en forma de composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

50 Además de las formulaciones descritas previamente, los antagonistas de EZH2 se pueden formular también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante la implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular o mediante inyección intramuscular). De este modo,

por ejemplo, los antagonistas de EZH2 se pueden formular con materiales adecuados poliméricos o hidrófobos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados escasamente solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de administración para los antagonistas de EZH2 farmacéuticos hidrófobos. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos de vehículos o soportes para la administración de fármacos hidrófobos. Ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido también se pueden emplear. Además, los antagonistas de EZH2 se pueden suministrar usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación sostenida y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida, dependiendo de su naturaleza química, pueden liberar los antagonistas de EZH2 desde durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros, tales como polietilenglicoles.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

En este documento se describen procedimientos para tratar, prevenir o aliviar un síntoma de afecciones y enfermedades, tales como cánceres y afecciones precancerosas, cuyo curso se puede influir mediante la modulación del estado de metilación de las histonas u otras proteínas, en donde dicho estado de metilación está mediado al menos en parte por la actividad de EZH2. La modulación del estado de metilación de las histonas puede influir a su vez sobre el nivel de expresión de genes diana activados mediante una metilación, y/o genes diana suprimidos mediante una metilación.

En este documento se describe un método para tratar o aliviar un síntoma de cáncer o una afección precancerosa. El método comprende la etapa de administrar a un sujeto que tiene cáncer o una afección precancerosa y que expresa una EZH2 mutante, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de EZH2. Preferiblemente, un polipéptido EZH2 mutante o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante comprende una mutación en su dominio de bolsillo de unión al sustrato tal y como se define en SEQ ID NO: 6. Más preferiblemente, un polipéptido EZH2 mutante o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante comprende una mutación por sustitución en la posición de aminoácidos 677, 687, 674, 685 o 641 de SEQ ID NO: 1, tal como, pero sin limitarse a una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con metionina (M) de la valina (V) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 674 de SEQ ID NO: 1 (V674M); una sustitución con histidina (H) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 685 de SEQ ID NO: 1 (R685H); una sustitución con cisteína (C) de la arginina (R) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 685 de SEQ ID NO: 1 (R685C); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); o una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C).

El inhibidor puede inhibir la actividad metiltransferasa de histonas de la EZH2 mutante. El inhibidor puede inhibir selectivamente la actividad metiltransferasa de histonas de la EZH2 mutante. Opcionalmente, el cáncer es un linfoma. Preferiblemente, el cáncer es un linfoma no Hodgkin, un linfoma folicular o un linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL). Alternativamente, el cáncer es leucemia (por ejemplo, LMC) o melanoma. La afección precancerosa incluye, pero no se limita a, síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como preleucemia).

Enfermedades tales como cánceres y enfermedades neurológicas se pueden tratar mediante la administración de moduladores de la metilación de una proteína (por ejemplo, una histona), por ejemplo, moduladores de la metiltransferasa de histonas o de la actividad de la enzima desmetilasa de histonas. Se ha descrito que la metilación de las histonas está implicada en una expresión aberrante de ciertos genes en los cánceres y en el silenciamiento de genes neuronales en células no neuronales. Los moduladores descritos en este documento se pueden usar para tratar tales enfermedades, es decir, para inhibir la metilación de histonas en las células afectadas.

Basándose al menos en el hecho de que se ha encontrado que la metilación anormal de una histona está asociada con ciertos tipos de cáncer y afecciones precancerosas, un método para tratar el cáncer o una afección precancerosa con una EZH2 mutante en un sujeto, comprende la administración al sujeto que lo requiere de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe la metilación o que restaura la metilación a aproximadamente su nivel en las células normales homólogas. Tal y como se describe en este documento, un método para tratar el cáncer o una afección precancerosa en un sujeto comprende la administración al sujeto que lo requiere de una cantidad

terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe la conversión de H3-K27 no metilada a H3-K27 monometilada (H3-K27me1). Tal y como se describe en este documento, un método para tratar el cáncer o una afección precancerosa en un sujeto comprende la administración al sujeto que lo requiere de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe la conversión de H3-K27 monometilada (H3-K27me1) a H3-K27 dimetilada (H3-K27me2).

5 Tal y como se describe en este documento, un método para tratar el cáncer o una afección precancerosa en un sujeto comprende la administración al sujeto que lo requiere de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe la conversión de H3-K27me2 a H3-K27 trimetilada (H3-K27me3). Tal y como se describe en este documento, un método para tratar el cáncer o una afección precancerosa en un sujeto comprende la administración al sujeto que lo requiere de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe tanto la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 como la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. Es importante tener en cuenta que un aumento específico de la enfermedad de la metilación puede tener lugar en la cromatina en loci genómicos clave en ausencia de un aumento global de los niveles celulares de metilación de histonas o de proteínas. Por ejemplo, es posible que tenga lugar una hipermetilación aberrante en genes claves, relevantes para una enfermedad frente a un contexto de hipometilación global de histonas o de proteínas.

10

15 Los moduladores de la metilación se pueden utilizar para modular la proliferación celular, en general. Por ejemplo, en algunos casos una proliferación excesiva se puede reducir con agentes que disminuyen la metilación, mientras que una proliferación insuficiente se puede estimular con agentes que aumentan la metilación. En consecuencia, las enfermedades que se pueden tratar incluyen enfermedades hiperproliferativas, tales como un crecimiento celular benigno y un crecimiento celular maligno (cáncer).

20 Cánceres ejemplares que se pueden tratar incluyen linfomas, incluyendo linfoma no Hodgkin, linfoma folicular (FL) y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL); melanoma; y leucemia, incluyendo LMC. Una afección precancerosa ejemplar incluye el síndrome mielodisplásico (MDS; anteriormente conocido como preleucemia).

Otros cánceres incluyen Leucemia Linfoblástica Aguda; Leucemia Mieloide Aguda; Carcinoma Adrenocortical; Cánceres Relacionados con SIDA; Linfoma Relacionado con SIDA; Cáncer Anal; Astrocitoma Cerebeloso Infantil; Astro-25 citoma, Cerebral Infantil; Carcinoma de Células Basales, véase Cáncer de Piel (diferente a Melanoma); Cáncer del Conducto Billar, Extrahepático; Cáncer de Vejiga; Cáncer Óseo, osteosarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno; Gloma de Tallo Cerebral; Tumor Cerebral; Tumor Cerebral, Astrocytoma Cerebelar; Tumor Cerebral, Astrocytoma Cerebral/Glioma Maligno; Tumor Cerebral, Ependimoma; Tumor Cerebral, Meduloblastoma; Tumor Cerebral, Tumores Neuroectodérmicos Supratentoriales Primitivos; Tumor Cerebral, Glioma de Ruta Visual e Hipotalámico; Cáncer de 30 Mama; Adenomas Bronquiales/Carcinoides; Linfoma de Burkitt; Tumor Carcinoide; Tumor Carcinoide, Gastrointestinal; Carcinoma Primario Desconocido; Linfoma del Sistema Nervioso Central, Primario; Astrocytoma Cerebelar; Cáncer Cervical; Cánceres Infantiles; Leucemia Linfocítica Crónica; Leucemia Mielógena Crónica; Leucemia Mielógena Crónica, Célula Pilosa; Trastornos Mieloproliferativos Crónicos; Cáncer de Colon; Cáncer Colorrectal; Linfoma Cutáneo de Linfocitos T, véase Micosis Fungoides y Síndrome de Sezary; Cáncer Endometrial; Cáncer Esofágico; Familia de Tumores de Ewing; Cáncer del Conducto Billar Extrahepático; Cáncer Ocular, Melanoma Intraocular; Cáncer Ocular, Retinoblastoma; Cáncer de Vesícula Billar; Cáncer Gástrico (Estómago); Tumor Carcinoide Gastrointestinal; Tumor de Célula Germinal, Extracraneal; Tumor de Célula Germinal, Extragonadal; Tumor de Célula Germinal, Ovario; Tumor Trofoblástico Gestacional; Glioma; Glioma, Tallo Cerebral Infantil; Glioma, Astrocytoma Cerebral Infantil; Glioma, Ruta Visual Infantil e Hipotalámico; Leucemia de Célula Pilosa; Cáncer de Cabeza y Cuello; Cáncer Hepatocelular (Hígado), Adulto (Primario); Cáncer Hepatocelular (Hígado), Infantil (Primario); Linfoma de Hodgkin; Linfoma de Hodgkin Durante el Embarazo; Cáncer Hipofaríngeo; Glioma de la Ruta Hipotalámica y Visual; Melanoma Intraocular; Carcinoma de Célula del Islote (Páncreas Endocrino); Sarcoma de Kaposi; Cáncer Renal (Célula Renal); Cáncer Renal; Cáncer de Laringe; Leucemia; Cáncer de la Cavidad Oral y Labios; Cáncer Hepático, Adulto (Primario); Cáncer Hepático, Infantil (Primario); Cáncer Pulmonar, No Microcítico; Cáncer Pulmonar, Microcítico; Linfoma, Sistema Nervioso Central Primario; Macroglobulinemia, de Waldenstrom; Histiocitoma Maligno Fibroso de Hueso/Osteosarcoma; Meduloblastoma; Melanoma; Carcinoma de Célula de Merkel; Mesotelioma; Mesotelioma, Maligno Adulto; Cáncer de Cuello Escamoso Metastásico Primario Oculto; Síndrome de Neoplasia Endocrina Múltiple; Mieloma Múltiple; Mieloma Múltiple/Fungoides de Micosis de Neoplasia de Célula de Plasma; Síndromes Mielodisplásicos; Enfermedades Mielodisplásicas/Mieloproliferativas; Leucemia Mieloide, Aguda Adulto; Leucemia Mieloide, Aguda Infantil; Trastornos Mieloproliferativos, Crónicos; Cáncer del Seno Paranasal y Cavidad Nasal; Cáncer Nasofaríngeo; Neuroblastoma; Linfoma No Hodgkin; Linfoma No Hodgkin Durante el Embarazo; Cáncer Oral; Cáncer de la Cavidad Oral, Cáncer Orofaríngeo y de Labios; Osteosarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno de Hueso; Cáncer de Ovario; Cáncer Epitelial de Ovario; Tumor Potencial Maligno Bajo de Ovario; Cáncer Pancreático; Cáncer Pancreático, Célula del Islote; Cáncer de Seno Paranasal y Cavidad Nasal; Cáncer Paratiroides; Cáncer de Pene; Feocromocitoma; Pineoblastoma y Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Supratentoriales; Tumor Pituitario; Neoplasia de Célula de Plasma/Mieloma Múltiple; Blastoma Pleuropulmonar; Cáncer de Mama y Embarazo; Cáncer de Próstata; Cáncer Rectal; Retinoblastoma; Rabdomiosarcoma; Cáncer de Glándula Salivar; Sarcoma, Familia de Tumores de Ewing; Sarcoma, Tejido Blando; Sarcoma, Uterino; Síndrome de Sezary; Cáncer de Piel; Cáncer de Piel (diferente a Melanoma); Cáncer de Intestino Delgado; Sarcoma de Tejido Blando; Carcinoma de Célula Escamosa, véase Cáncer de Piel (diferente a Melanoma); Cáncer de Cuello Escamoso Primario Oculto, Metastásico; Cáncer de Estómago (Gástrico); Cáncer Testicular; Timoma; Timoma y Carcinoma Tímico; Cáncer de Tiroides; Cáncer de Célula Transicional de la Pelvis Renal y Uretra; Tumor Trofoblástico, Gestacional; Cáncer de Sitio Primario Desconocido, Cáncer de; Cánceres Inusuales Infantiles; Cáncer Uretral; Cáncer Uterino, Endometrial; Sarcoma Uterino; Cáncer Vaginal;

Glioma Hipotalámico y de Ruta Visual; Cáncer Vulvar; Macroglobulinemia de Waldenstrom; Tumor de Wilms; y Cánceres Femeninos.

Cualquier otra enfermedad en la que una metilación epigenética, que está mediada por EZH2, tiene una función, se puede tratar o evitar utilizando los compuestos y métodos descritos en este documento.

- 5 Por ejemplo, las enfermedades neurológicas que se pueden tratar incluyen epilepsia, esquizofrenia, trastorno bipolar u otros trastornos sicológicos y/o siquiátricos, neuropatías, atrofia del músculo esquelético y enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa. Las enfermedades neurodegenerativas a modo de ejemplo incluyen: enfermedad de Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) y enfermedad de Parkinson. Otra clase de enfermedades neurodegenerativas incluye enfermedades provocadas, al menos en parte, por una agregación de poli-glutamina. Las enfermedades de esa clase incluyen: Enfermedades de Huntington, Atrofia Muscular Espinalbulbar (SBMA o Enfermedad de Kennedy), Atrofia Dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA), Ataxia 1 Espinocebral (SCA1), Ataxia 2 Espinocerebelar (SCA2), Enfermedad de Machado-Joseph (MJD; SCA3), Ataxia 6 Espino-cerebelar (SCA6), Ataxia 7 Espinocerebelar (SCA7) y Ataxia 12 Espinocerebelar (SCA12).
- 10

TERAPIA DE COMBINACIÓN

- 15 En un aspecto de la invención, un antagonista de EZH2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede utilizar en combinación con otro agente terapéutico para tratar enfermedades tales como el cáncer y/o trastornos neurológicos. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico que está reconocido en la técnica por ser útil para tratar la enfermedad o la afección que se va a tratar con el compuesto de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica (por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición).
- 20

La terapia de combinación contemplada por la invención incluye, por ejemplo, la administración de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y agent(es) adicional(es) en una formulación farmacéutica única, así como la administración de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y agent(es) adicional(es) en formulaciones farmacéuticas distintas. En otras palabras, la coadministración se entiende como la administración de al menos dos agentes a un sujeto con el fin de proporcionar los efectos beneficiosos de la combinación de ambos agentes. Por ejemplo, los agentes se pueden administrar simultánea o secuencialmente durante un periodo de tiempo.

- 25
- 30 Los agentes que se exponen a continuación son para fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Las combinaciones, que forman parte de esta invención, pueden ser los compuestos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado a partir de la lista más abajo. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función prevista.

35 Por ejemplo, un aspecto de la invención se refiere a un antagonista de EZH2 para uso en combinación con otro agente para el tratamiento del cáncer y/o un trastorno neurológico. En una realización, un agente adicional es un agente anticancerígeno que es un compuesto que afecta a modificaciones de las histonas, tal como un inhibidor de HDAC. En ciertas realizaciones, un agente anticancerígeno adicional se selecciona a partir del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos (tales como 2CdA, 5-FU, 6-mercaptopurina, 6-TG, Abraxane™, Accutane®, actinomicina-D, Adriamycin®, Alimta®, ácido retinoico todo trans, ametopterina, Ara-C, azacitidina, BCNU, Blenoxane®, Camptosar®, CeeNU®, clofarabina, Clolar™, Cytoxan®, clorhidrato de daunorrubicina, DaunoXome®, Dacogen®, DIC, Doxil®, Ellence®, Eloxatin®, Emcyt®, fosfato de etopósido, Fludara®, FUDR®, Gemzar®, Gleevec®, hexametilmelamina, Hycamtin®, Hydrea®, Idamycin®, Ifex®, ixabepilona, Ixempra®, L-asparaginasa, Leukeran®, Ara-C liposómica, L-PAM, lisodren, Matulane®, mitracina, mitomicina-C, Myleran®, Navelbine®, Neutrexin®, nilotinib, Nipent®, mostaza de nitrógeno, Novantrone®, Oncaspar®, Panretin®, Paraplatin®, Platinol®, prolfeprospan 20 con implante de carmustina, Sandostatin®, Targretin®, Tasigna®, Taxotere®, Temodar®, TESPA, Trisenox®, Valstar®, 40 Velban®, Vidaza™, sulfato de vincristina, VM 26, Xeloda® y Zanosar®); agentes biológicos (tales como interferón alfa, bacilo de Calmette-Guerin, Bexxar®, Campath®, Ergamisol®, erlotinib, Herceptin®, interleucina-2, Iressa®, lenalidomida, Mylotarg®, Ontak®, Pegasys®, Revlimid®, Rituxan®, Tarceva™, Thalomid®, Velcade® y Zevalin™); moléculas pequeñas (tales como Tykerb®); corticosteroides (tales como fosfato sódico de dexametasona, Deltasone® y Delta-Cortef®); terapias hormonales (tales como Arimidex®, Aromasin®, Casodex®, Cytadren®, Eligard®, 45 Eulexin®, Evista®, Faslodex®, Femara®, Halotestin®, Megace®, Nilandron®, Nolvadex®, Plenaxis™ y Zoladex®); y agentes radiofarmacéuticos (como Iodotope®, Metastron®, Phosphocol® y samario SM-153).

50

DOSIFICACIÓN

Tal y como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un antagonista de EZH2 o una combinación de dos o más de tales compuestos, que inhibe, total o parcialmente, la progresión de la afección o que alivia, al menos parcialmente, uno o varios síntomas de la afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede ser una cantidad que es profilácticamente eficaz. La cantidad que es terapéuticamente eficaz dependerá del tamaño y el sexo del paciente, la afección a tratar, la gravedad de la afección y el resultado buscado. En una realización, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a

aquella cantidad de los antagonistas de EZH2 que da lugar a una mejoría de los síntomas en un paciente. Para un paciente dado, una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los antagonistas de EZH2 se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la dosis máxima tolerada (MTD) y la DE_{50} (dosis efectiva para una respuesta máxima del 50%). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación entre MTD y DE_{50} . Los datos obtenidos a partir de esos ensayos de cultivo celular y estudios animales se pueden emplear para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación también se puede guiar realizando un seguimiento del efecto del antagonista de EZH2 sobre marcadores farmacodinámicos de inhibición enzimática (por ejemplo, la metilación de la histona o la expresión del gen diana) en tejido enfermo o experimental. El cultivo de células o los experimentos con animales se pueden usar para determinar la relación entre las dosis requeridas para cambios en los marcadores farmacodinámicos y las dosis requeridas para la eficacia terapéutica que se pueden determinar en un cultivo celular o en experimentos con animales o ensayos clínicos de fase temprana. La dosificación de tales antagonistas de EZH2 está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de ese intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual de cara a la afección del paciente. En el tratamiento de crisis, la administración de un bolo agudo o una infusión que se acerca a la MTD puede ser necesaria para obtener una respuesta rápida.

La cantidad de dosificación y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que sean suficientes para mantener los efectos moduladores de la metiltransferasa o la concentración efectiva mínima (MEC) durante el período de tiempo requerido para lograr una eficacia terapéutica. La MEC variará para cada antagonista de EZH2, pero se puede estimar a partir de datos *in vitro* en animales de experimentos. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Sin embargo, ensayos con cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o bioensayos se pueden utilizar para determinar las concentraciones plasmáticas.

30 Los intervalos de dosificación también se pueden determinar utilizando el valor de MEC. Los antagonistas de EZH2 se deben administrar usando un régimen que mantenga los niveles en plasma por encima de la MEC durante el 10-90% del tiempo, preferiblemente entre 30-90% y lo más preferiblemente entre 50-90% hasta que se consigue la mejora deseada de los síntomas. Alternativamente, los diferentes niveles en plasma de MEC se pueden mantener para diferentes cantidades de tiempo. En los casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

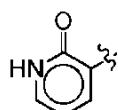
35 Un experto en la técnica puede seleccionar a partir de una variedad de régímenes de administración, y la cantidad de antagonista de EZH2 administrada será, por supuesto, dependiente del sujeto que está siendo tratado, del peso del sujeto, la gravedad del padecimiento, la forma de administración y el criterio del médico encargado.

COMPUESTOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

40 Unos aspectos de la invención se refieren a compuestos que son útiles de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Esos compuestos se denominan en este documento "inhibidores de EZH2" y, de forma equivalente, "antagonistas de EZH2". Los compuestos se pueden presentar como los propios compuestos, sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos o como composiciones farmacéuticas.

Otros compuestos se describen en el documento PCT/US2012/026953, presentado el 28 de febrero, 2012; Solicitud Provisional de EE.UU. con número de serie: 61/474821, presentada el 13 de abril, 2011; 61/474825, presentada el 13 de abril, 2011; 61/499595, presentada el 21 de junio, 2011; y 61/505676, presentada el 8 de julio, 2011.

45 Los compuestos inhibidores de EZH2 a modo de ejemplo de la presente invención se muestran en la Tabla 1. En la tabla siguiente, cada aparición de



debe interpretarse como

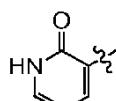
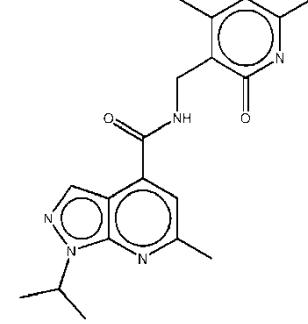
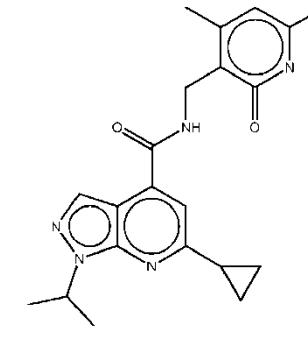
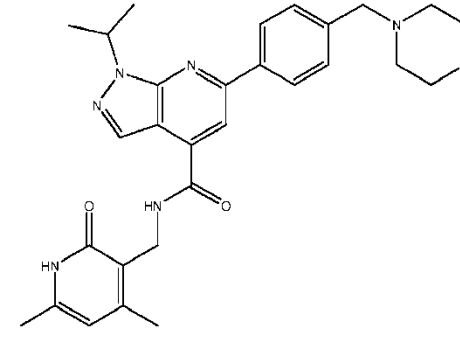
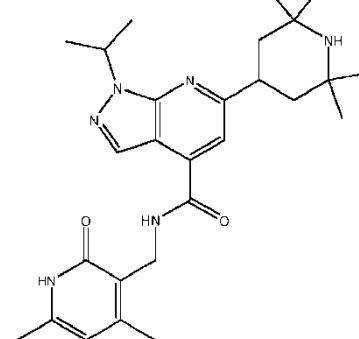
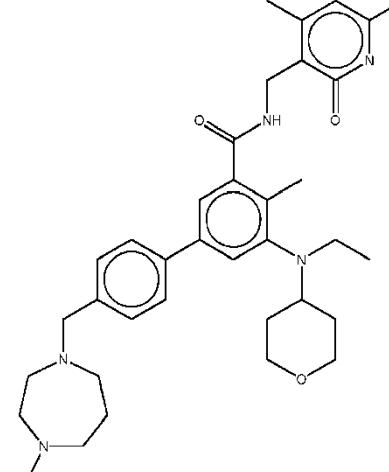
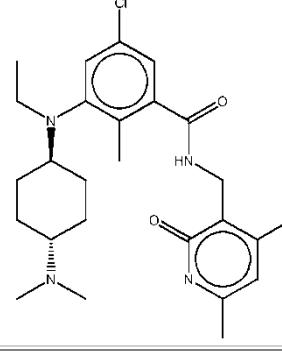
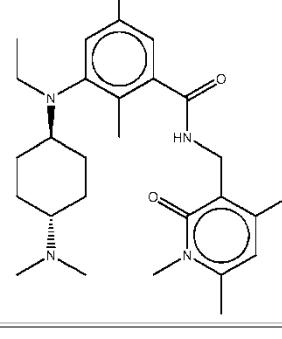
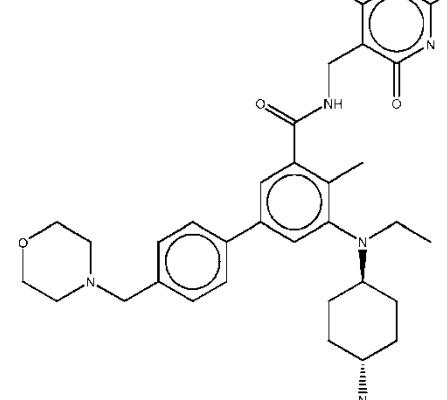
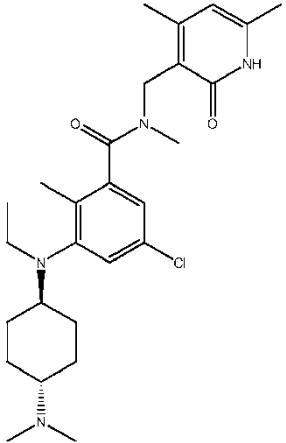
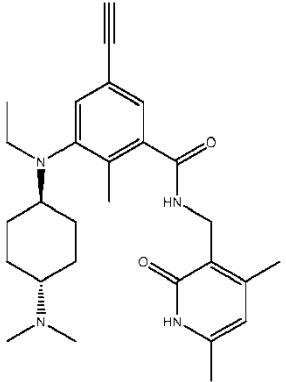
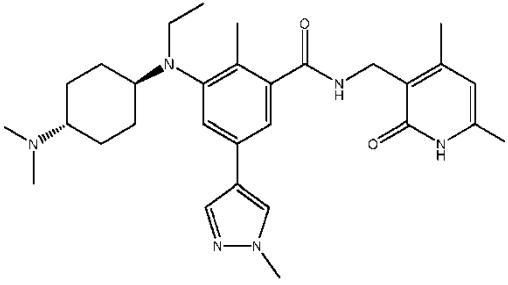
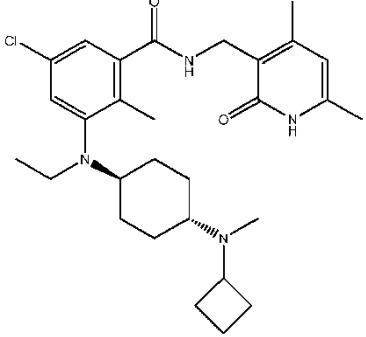


Tabla 1

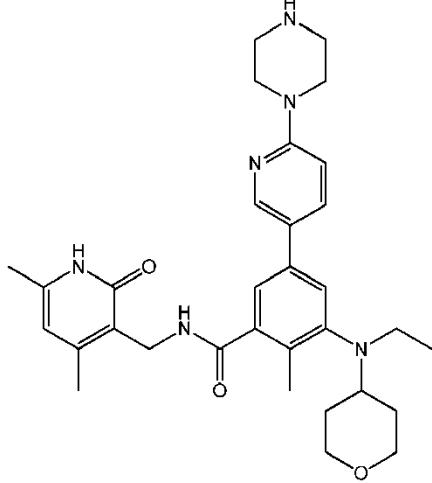
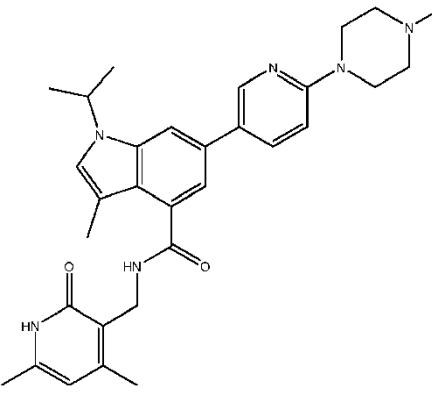
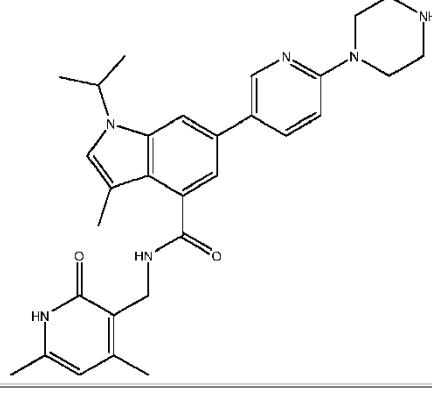
Número de compuesto	Estructura
2	
3	
4	
5	
6	

Número de compuesto	Estructura
	
11	
12	
13	

Número de compuesto	Estructura
14	
15	
16	
17	
18	

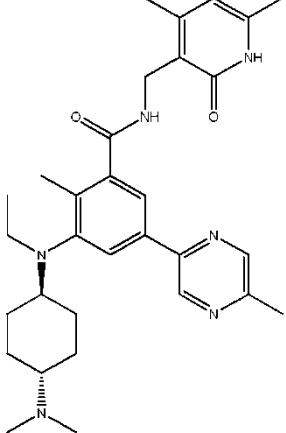
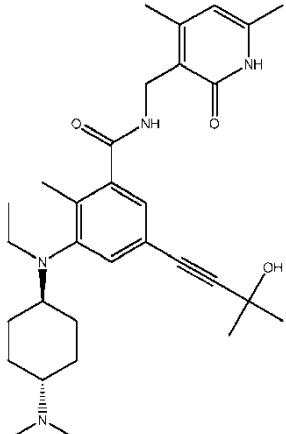
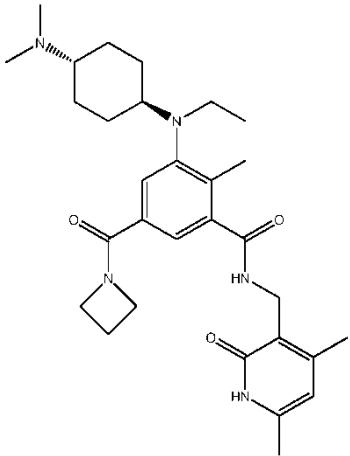
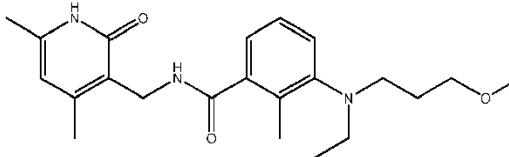
Número de compuesto	Estructura
19	
20	
21	

Número de compuesto	Estructura
22	
23	
24	

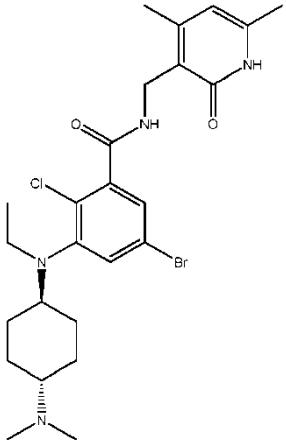
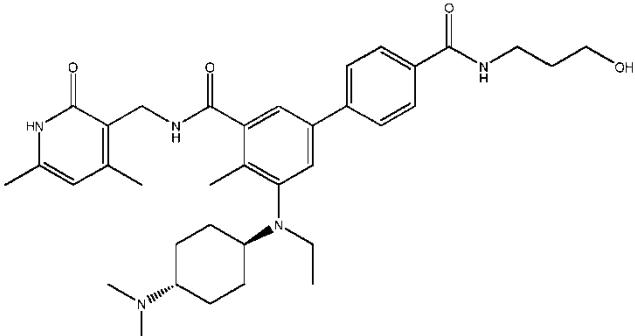
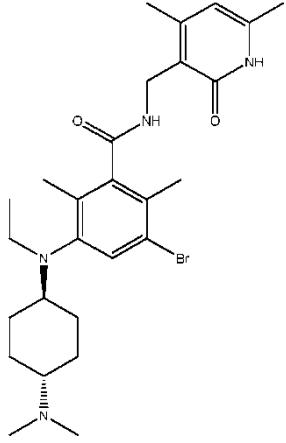
Número de compuesto	Estructura
	
25	
26	
27	

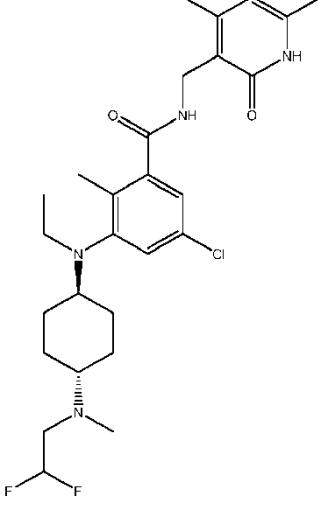
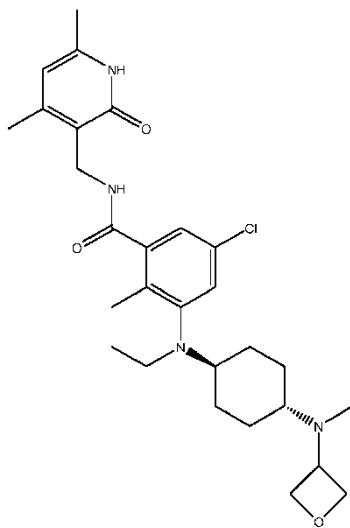
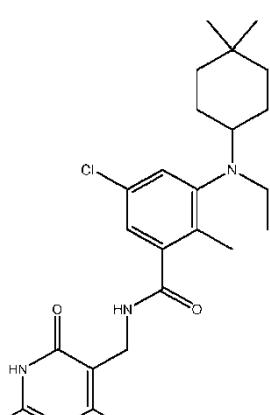
Número de compuesto	Estructura
28	
29	
30	

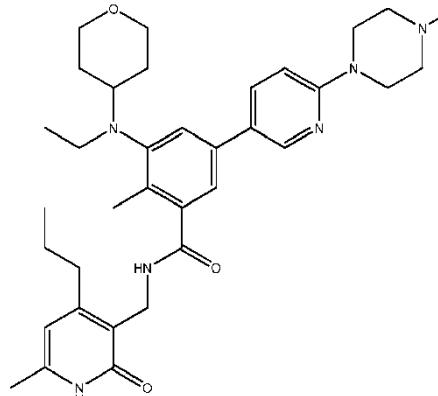
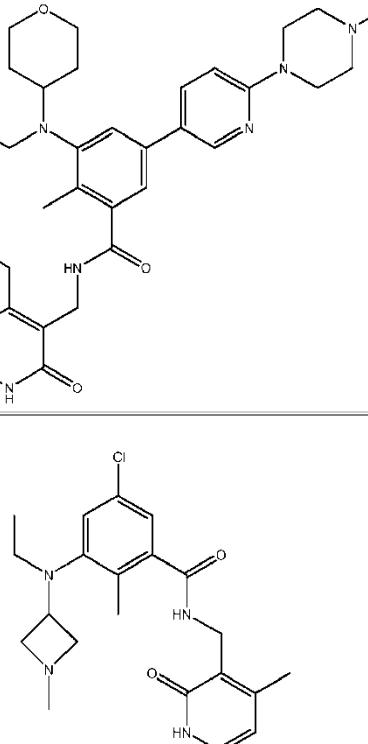
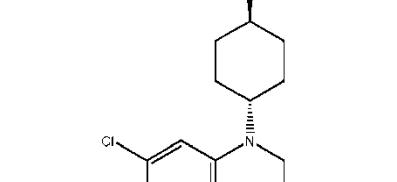
Número de compuesto	Estructura
31	
32	
33	

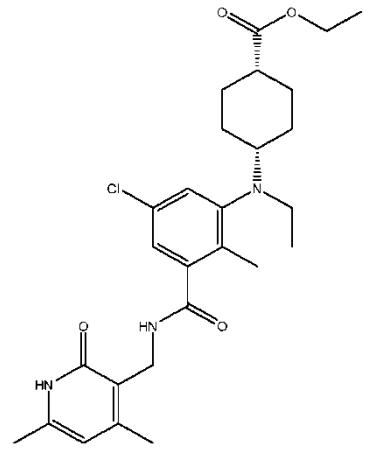
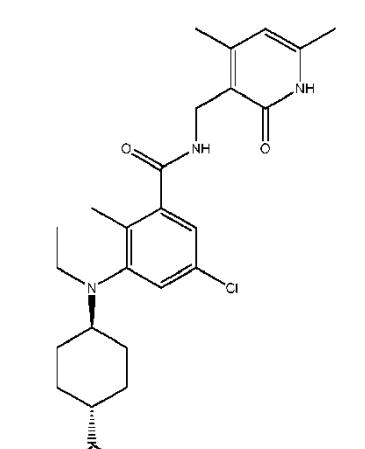
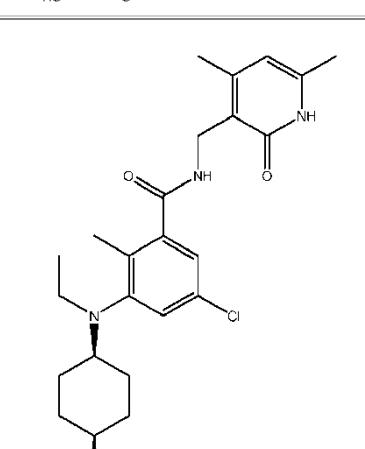
Número de compuesto	Estructura
	
34	
35	
36	
37	

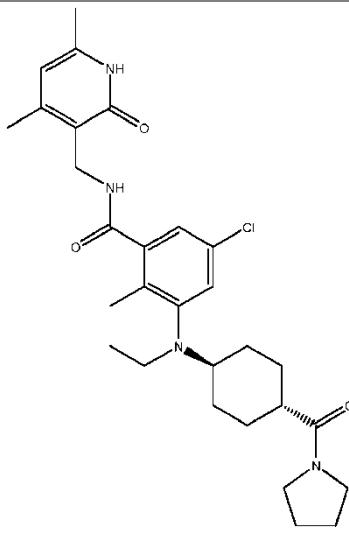
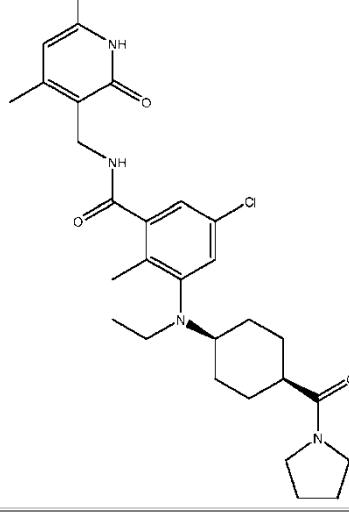
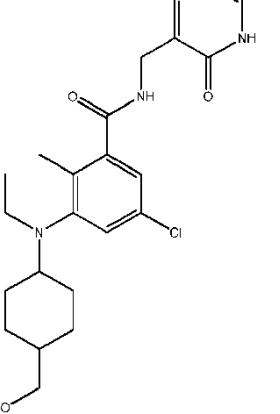
Número de compuesto	Estructura
38	
39	
40	

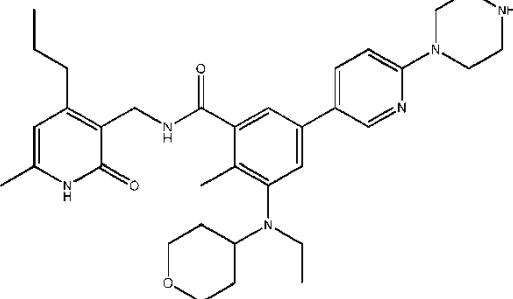
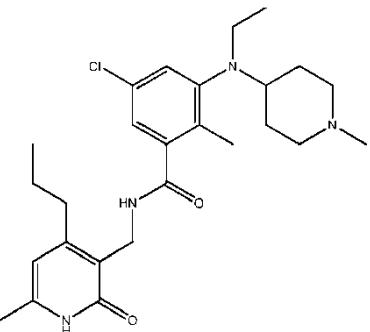
Número de compuesto	Estructura
	
44	
45	
46	

Número de compuesto	Estructura
	
47	
48	
49	

Número de compuesto	Estructura
	
53	
54	
55	

Número de compuesto	Estructura
	
56	
57	
58	

Número de compuesto	Estructura
	
59	
60	
61	

Número de compuesto	Estructura
	
62	

Una "cantidad eficaz" significa aquella cantidad de fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscada, por ejemplo, por un investigador o un médico. Además, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado un tratamiento mejorado, curación, prevención o mejora de una enfermedad, un trastorno o un efecto secundario, o una disminución de la tasa de avance de una enfermedad o un trastorno. La expresión también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar una función fisiológica normal.

El término "opcionalmente" significa que el o los eventos descritos posteriormente pueden tener lugar o no, e incluye tanto evento(s), que se producen como eventos que no se producen.

En este documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto objeto y muestran efectos toxicológicos no deseados mínimos. Estas sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación final del compuesto o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre o de base libre con una base o un ácido adecuado, respectivamente.

Bajo el término "coadministración" y sus derivados tal como se usan en este documento, se entiende o bien una administración simultánea o cualquier manera de administración secuencial separada de uno o varios más compuestos farmacéuticamente activos adicionales, ya sea para el tratamiento del cáncer, de los efectos secundarios del cáncer o una terapia del cáncer, o de alguna otra enfermedad. Preferiblemente, si la administración no es simultánea, los compuestos se administran en momentos próximos entre sí. Además, no importa si los compuestos se administran en la misma forma de dosificación, por ejemplo, un compuesto se puede administrar por vía tópica y otro compuesto se puede administrar por vía oral.

Los compuestos descritos en este documento incluyen los propios compuestos, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, sus solvatos, sus N-óxidos y sus profármacos, si es aplicable. En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden contener un grupo funcional ácido, lo suficientemente ácido para formar sales. Las sales representativas incluyen sales de metales farmacéuticamente aceptables tales como sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, aluminio y zinc; carbonatos y bicarbonatos de sales de metales farmacéuticamente aceptables tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, aluminio y zinc; aminas primarias, secundarias y terciarias orgánicas farmacéuticamente aceptables que incluyen aminas alifáticas, aminas aromáticas, diaminas alifáticas e hidroxi alquilaminas tales como metilamina, etilamina, 2-hidroxietilamina, dietilamina, trietilamina, etilendiamina, dietanolamina y ciclohexilamina.

En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden contener un grupo funcional básico y son por lo tanto capaces de formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables mediante tra-

tamiento con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados incluyen ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables y ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables representativas incluyen clorhidrato, bromhidrato, nitrato, metilnitrato, sulfato, bisulfato, sulfamato, fosfato, acetato, hidroxiacetato, fenilacetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, maleato, hidroximaleato, acrilato, fumarato, 5 malato, tartrato, citrato, salicilato, *p*-aminosalicilato, glicolato, lactato, heptanoato, ftalato, oxalato, succinato, benzoato, o-acetoxibenzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, mandelato, tanato, formato, estearato, ascorbato, palmitato, oleato, piruvato, pamoato, malonato, laurato, glutarato, glutamato, estolato, metanosulfonato (mesilato), etanosulfonato (esilato), 2-hidroxietanosulfonato, bencenosulfonato (besilato), *p*-aminobencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato (tosilato) y naftalen-2-sulfonato.

10 Los compuestos de la presente invención que contienen nitrógenos se pueden convertir en N-óxidos mediante tratamiento con un agente oxidante (por ejemplo, ácido 3-cloroperoxibenzoico (*m*CPBA) y/o peróxidos de hidrógeno) para proporcionar otros compuestos de la presente invención. Por lo tanto, todos los compuestos que contienen nitrógeno mostrados y reivindicados se consideran, cuando lo permite la valencia y la estructura, que incluyen tanto el compuesto tal y como se muestra como su derivado N-óxido (que se puede indicar como N → O o N⁺-O⁻). Además, en otros casos, los nitrógenos en los compuestos de la presente invención se pueden convertir en compuestos N-hidroxi o N-alcoxi. Por ejemplo, los compuestos N-hidroxi se pueden preparar por oxidación de la amina original mediante un agente oxidante tal como *m*-CPBA. Todos los compuestos que contienen nitrógeno mostrados y reivindicados también se consideran, cuando lo permite la valencia y la estructura, que incluyen tanto el compuesto tal y como se muestra como sus derivados N-hidroxi (es decir, N-OH) y N-alcoxi (es decir, N-OR, en donde R es alquilo C₁-C₆, alquenilo C₁-C₆, alquinilo C₁-C₆, carbociclo de 3-14 miembros o heterociclo de 3-14 miembros sustituido o no sustituido).

15

20 En la presente memoria descriptiva, la fórmula estructural del compuesto representa un cierto isómero por conveniencia en algunos casos, pero la presente invención incluye todos los isómeros, tales como isómeros geométricos, isómeros ópticos basados en un carbono asimétrico, estereoisómeros, tautómeros y similares. Además, un polimorfismo cristalino puede estar presente en los compuestos representados por la fórmula. Se observa que cualquier forma cristalina, mezcla de formas cristalinas o sus anhídridos o hidratos están incluidos en el alcance de la presente invención. Además, el denominado metabolito que se produce mediante una degradación del presente compuesto *in vivo*, está incluido en el alcance de la presente invención.

25 "Isomería" significa compuestos que tienen fórmulas moleculares idénticas pero que difieren en la secuencia de 30 unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio. Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes especulares uno de otro se denominan "diastereoisómeros" y los estereoisómeros que no son imágenes especulares superponibles entre sí se denominan "enantiómeros" o algunas veces isómeros ópticos. Una mezcla que contiene cantidades iguales de formas enantioméricas individuales con quiralidad opuesta, se denomina una "mezcla racémica".

35 Un átomo de carbono unido a cuatro sustituyentes no idénticos se denomina un "centro quiral".

40 "Isómero quiral" significa un compuesto con al menos un centro quiral. Los compuestos con más de un centro quiral pueden existir ya sea como un diastereómero individual o como una mezcla de diastereómeros, denominada "mezcla diasterómera". Cuando está presente un centro quiral, un estereoisómero se puede caracterizar por la configuración absoluta (R o S) de ese centro quiral. La configuración absoluta se refiere a la disposición en el espacio de los 45 sustituyentes fijados al centro quiral. Los sustituyentes fijados al centro quiral en consideración, se clasifican de acuerdo con la *Regla de Secuencia* de Cahn, Ingold y Prelog. Cahn et al., Angew. Chem. Inter. Edit. 1966, 5, 385; errata 511; Cahn et al., Angew. Chem. 1966, 78, 413; Cahn e Ingold, J. Chem. Soc. 1951 (Londres), 612; Cahn et al., Experientia 1956, 12, 81; Cahn, J. Chem. Educ. 1964, 41, 116).

45 "Isómero geométrico" significa los diastereómeros que deben su existencia a una rotación impedida alrededor de dobles enlaces o un enlazador cicloalquilo (por ejemplo, 1,3-ciclobutilo). Estas configuraciones se diferencian en sus 50 nombres por los prefijos cis y trans o Z y E, que indican que los grupos están en el mismo lado o en el lado opuesto del doble enlace en la molécula según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog.

Ha de entenderse que los compuestos de la presente invención se pueden representar como diferentes isómeros quirales o isómeros geométricos. También debe entenderse que cuando los compuestos tienen formas isoméricas quirales o isoméricas geométricas, todas las formas isoméricas se entiende que están incluidas en el alcance de la presente invención y la denominación de los compuestos no excluye ninguna forma isomérica.

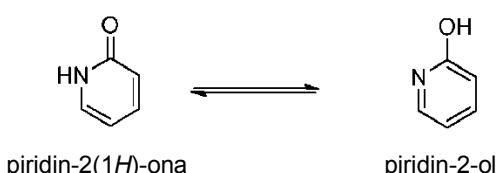
55 Además, las estructuras y otros compuestos descritos en esta invención incluyen todos los isómeros atrópicos de los mismos. "Isómeros atrópicos" son un tipo de estereoisómero en el que los átomos de dos isómeros están dispuestos de manera diferente en el espacio. Los isómeros atrópicos deben su existencia a una rotación restringida causada por un impedimento de la rotación de grandes grupos alrededor de un enlace central. Tales isómeros atrópicos existen típicamente como una mezcla, sin embargo, como resultado de recientes avances en técnicas de cromatografía, ha sido posible separar mezclas de dos isómeros atrópicos, en casos seleccionados.

"Tautómero" es uno de los dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y que se convierte fácilmente

de una forma isomérica a otra. Esta conversión da como resultado la migración formal de un átomo de hidrógeno acompañada por un intercambio de dobles enlaces conjugados adyacentes. Los tautómeros existen como una mezcla de un conjunto tautómero en solución. En las soluciones en las que es posible una tautomerización, se alcanzará un equilibrio químico de los tautómeros. La proporción exacta de los tautómeros depende de varios factores, incluyendo la temperatura, el disolvente y el pH. El concepto de tautómeros que son interconvertibles mediante tautomerizaciones se llama tautomería.

De los diversos tipos posibles de tautomería, dos se observan comúnmente. En la tautomería ceto-enol tiene lugar un desplazamiento simultáneo de electrones y un átomo de hidrógeno. La tautomería de anillo de la cadena surge como resultado de la reacción del grupo aldehído ($-CHO$) en una molécula de una cadena de azúcar con uno de los grupos hidroxi ($-OH$) en la misma molécula para darle una forma cíclica (en forma de anillo) como muestra la glucosa.

Las parejas tautómeras comunes son: tautomería cetona-enol, amida-nitrilo, lactama-lactima, amida-ácido imídico en anillos heterocíclicos (por ejemplo, en nucleobases tales como guanina, timina y citosina), imina-enamina y enamina-enamina. Un ejemplo de equilibrios ceto-enol es entre piridin-2(1H)-onas y los correspondientes piridin-2-oles, como se muestra a continuación.



Se ha de entender que los compuestos de la presente invención se pueden representar como tautómeros diferentes. También se debe entender que cuando los compuestos tienen formas tautómeras, todas las formas tautómeras, incluyendo mezclas de las mismas, se entiende que están incluidas en el alcance de la presente invención y la denominación de los compuestos no excluye ninguna forma tautómera.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden preparar en forma cristalina o no cristalina y, si es cristalina, opcionalmente pueden estar solvatados, por ejemplo, como el hidrato. Esta invención incluye dentro de su alcance solvatos estequiométricos (por ejemplo, hidratos) así como compuestos que contienen cantidades variables de disolvente (por ejemplo, agua).

Algunos de los compuestos descritos en este documento pueden contener uno o varios átomos quirales o ser capaces de otra manera de existir como dos enantiómeros. Los compuestos reivindicados a continuación incluyen mezclas de enantiómeros así como enantiómeros purificados o mezclas enantioméricamente enriquecidas. También se incluyen dentro del alcance de la invención los isómeros individuales de los compuestos descritos en el presente documento o reivindicados a continuación, así como cualquier mezcla equilibrada total o parcialmente de los mismos. La presente invención también incluye los isómeros individuales de los compuestos reivindicados como mezclas con isómeros de los mismos, en los que uno o varios centros quirales están invertidos.

Cuando hay diferentes formas isómeras, éstas se pueden separar una de la otra o determinar por métodos convencionales, o cualquier isómero dado se puede obtener por métodos sintéticos convencionales o por síntesis estereoespecífica o asimétrica.

Si bien es posible, para uso en terapia, que un compuesto descrito en el presente documento, así como sales, solvatos, N-óxidos y similares, se pueda administrar como una preparación pura, es decir, sin un vehículo adicional, la práctica más habitual es presentar el ingrediente activo preparado junto con un vehículo o diluyente. De acuerdo con ello, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto descrito en el presente documento y sales, solvatos y similares, y uno o varios vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos descritos en este documento y las sales, solvatos, N-óxidos, etc., son como se han descrito anteriormente. El o los vehículos, diluyentes o excipientes deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos. En este documento se describe también un procedimiento proporcionado para la preparación de una formulación farmacéutica que incluye la mezcla por adición de un compuesto descrito en este documento, o sales, solvatos, N-óxidos, etc., con uno o varios vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los expertos en la técnica apreciarán que ciertos derivados protegidos de compuestos descritos en el presente documento, que se pueden preparar antes de una etapa de desprotección final, puede que no posean actividad farmacológica por sí mismos, pero se pueden administrar, en ciertos casos, por vía oral o parenteral y después de ello metabolizarse en el cuerpo para formar compuestos de la invención que son farmacológicamente activos. Por tanto, tales derivados se pueden describir como "profármacos". Además, ciertos compuestos de la invención pueden actuar como profármacos de otros compuestos de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán además, que ciertos restos, conocidos por los expertos en la técnica como "pro-restos", se pueden colocar en funcionalidades apropiadas cuando tales funcionalidades están presentes dentro de los compuestos de la invención. Los profármacos

cos preferidos para los compuestos de la invención incluyen: ésteres, ésteres de carbonato, semiésteres, ésteres de fosfato, ésteres de nitrógeno, ésteres de sulfato, sulfóxidos, amidas, carbamatos, compuestos azo, fosfamidas, glicósidos, éteres, acetales y cetales.

5 Adicionalmente, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, las sales de los compuestos, pueden existir en forma hidratada o no hidratada (anhidra) o como solvatos con otras moléculas de disolvente. Ejemplos no limitantes de hidratos se incluyen monohidratos, dihidratos, etc. Ejemplos no limitantes de solvatos incluyen solvatos de etanol, solvatos de acetona, etc.

10 "Solvato" significa formas de adición de disolvente que contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienen una tendencia a atrapar una relación molar fija de moléculas de disolvente en estado sólido cristalino, formando así un solvato. Si el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato; y si el disolvente es alcohol, el solvato formado es un alcoholato. Los hidratos se forman por la combinación de una o varias moléculas de agua con una molécula de la sustancia en la que el agua conserva su estado molecular como H₂O.

15 Tal y como se utiliza en este documento, el término "análogo" se refiere a un compuesto químico que es estructuralmente similar a otro, pero difiere ligeramente en la composición (tal como en la sustitución de un átomo por un átomo de un elemento diferente o en presencia de un grupo funcional particular o la sustitución de un grupo funcional por otro grupo funcional). Por lo tanto, un análogo es un compuesto que es similar o comparable en su función y aspecto, pero no en su estructura u origen, con el compuesto de referencia.

20 Tal y como se define en el presente documento, el término "derivado" se refiere a compuestos que tienen una estructura central común y están sustituidos con varios grupos, tal y como se describe en el presente documento.

25 El término "bioisóster" se refiere a un compuesto resultante del intercambio de un átomo o de un grupo de átomos con otro átomo o grupo de átomos bastante similar. El objetivo de una sustitución bioisostérica es crear un nuevo compuesto con propiedades biológicas similares a las del compuesto original. La sustitución bioisostérica puede tener una base fisicoquímica o topológica. Ejemplos de bioisósteros de ácido carboxílico incluyen, pero no se limitan a, sulfonimidas de acilo, tetrazoles, sulfonatos y fosfonatos. Véase, por ejemplo, Patani y LaVoie, Chem. Rev. 96, 3147-3176, 1996.

30 La presente invención se entiende que incluye todos los isótopos de átomos que aparecen en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio, y los isótopos de carbono incluyen C-13 y C-14.

35 Un antagonista de EZH2 y opcionalmente otros agentes terapéuticos, se pueden administrar por sí mismos (puro) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

40 45 Los compuestos útiles de acuerdo con la invención se pueden proporcionar como sales con contraiones farmacéuticamente compatibles (es decir, sales farmacéuticamente aceptables). Una "sal farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal no tóxica que, después de la administración a un receptor, es capaz de proporcionar, ya sea directa o indirectamente, un compuesto o un profármaco de un compuesto útil de acuerdo con esta invención. Un "contraíon farmacéuticamente aceptable" es una porción iónica de una sal que no es tóxica cuando se libera de la sal después de la administración a un sujeto. Las sales farmacéuticamente compatibles se pueden formar con muchos ácidos, incluyendo pero no limitados a ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico y succínico. Las sales tienden a ser más solubles en agua o en otros disolventes próticos que sus formas de base libre correspondientes. La presente invención incluye el uso de esas sales.

50 55 Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con ácidos minerales tales como ácido clorhídrico y ácido bromhídrico y también las formadas con ácidos orgánicos tales como ácido maleico. Por ejemplo, los ácidos comúnmente empleados para formar sales farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como bisulfuro de hidrógeno, ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico y fosfórico, así como ácidos orgánicos tales como ácido para-toluensulfónico, salicílico, tartárico, bitartárico, ascórbico, maleico, besílico, fumárico, glucónico, glucurónico, fórmico, glutámico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, láctico, oxálico, para-bromofenilsulfónico, carbónico, succínico, cítrico, benzoico y acético, y ácidos inorgánicos y orgánicos relacionados. Por tanto, tales sales farmacéuticamente aceptables incluyen sulfato, pirosulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caprato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butin-1,4-dioato, hexin-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, tereftalato, sulfonato, xilensulfonato, fenillaceta, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, β-hidroxibutirato, glicolato, maleato, tartrato, metanosulfonato, propenosulfonato, naftalen-1-sulfonato, naftalen-2-sulfonato, mandelato y similares.

Las bases adecuadas para formar sales farmacéuticamente aceptables con grupos funcionales ácidos incluyen, pero

no se limitan a, hidróxidos de metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio; hidróxidos de metal alcalinotérreo tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y zinc; amoníaco y aminas orgánicas, tales como monoalquilaminas, dialquilaminas o trialquilaminas no sustituidas o sustituidas con hidroxi, dici-clohexilamina; tributil amina; piridina; N-metil,N-ethylamina; dietilamina; trietilamina; mono-, bis- o tri-(2-hidroxi-aminas de alquilo inferior), tales como mono-, bis- o tri-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina o tri-(hidroximetil)metilamina, N,N-dialquil-N-(hidroxi alquil)aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amina o tri-(2-hidroxietil)amina; N-metil-D-glucamina; y aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

Ciertos compuestos útiles de acuerdo con la invención y sus sales pueden existir en más de una forma cristalina (es decir, polimorfas); la presente invención incluye el uso de cada una de las formas cristalinas y mezclas de las mismas.

Ciertos compuestos útiles de acuerdo con la invención pueden contener uno o varios centros quirales y existir en diferentes formas ópticamente activas. Cuando los compuestos útiles de acuerdo con la invención contienen un centro quiral, los compuestos existen en dos formas enantioméricas y la presente invención incluye el uso de ambos enantiómeros y mezclas de enantiómeros, tales como mezclas racémicas de los mismos. Los enantiómeros se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, los enantiómeros se pueden determinar por la formación de sales de diastereoisómeros que se pueden separar, por ejemplo, mediante cristalización; la formación de derivados o complejos de diastereoisómeros que se pueden separar, por ejemplo, mediante cristalización, cromatografía gas-líquida o líquida; la reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico del enantiómero, por ejemplo, a través de una esterificación enzimática; o cromatografía gas-líquida o líquida en un entorno quiral, por ejemplo, sobre un soporte quiral (por ejemplo, sílice con un ligando quiral unido) o en presencia de un disolvente quiral. Cuando el enantiómero deseado se convierte en otra entidad química mediante uno de los procedimientos de separación descritos anteriormente, se puede emplear una etapa adicional para liberar el enantiómero purificado deseado. Alternativamente, los enantiómeros específicos se pueden sintetizar mediante síntesis asimétrica usando reactivos, sustratos, catalizadores o disolventes ópticamente activos o convirtiendo un enantiómero en el otro mediante una transformación asimétrica.

Cuando un compuesto útil de acuerdo con la invención contiene más de un centro quiral, puede existir en formas diastereoisoméricas. Los compuestos diastereoisoméricos se pueden separar por métodos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, cromatografía o cristalización) y los enantiómeros individuales se pueden separar como se ha descrito anteriormente. La presente invención incluye el uso de varios diastereoisoméricos de compuestos útiles de acuerdo con la invención y mezclas de los mismos. Los compuestos útiles de acuerdo con la invención pueden existir en diferentes formas tautoméricas o como diferentes isómeros geométricos y la presente invención incluye el uso de cada tautómero y/o isómero geométrico de compuestos útiles de acuerdo con la invención y mezclas de los mismos. Los compuestos útiles de acuerdo con la invención pueden existir en forma de ion híbrido. La presente invención incluye el uso de cada forma de ion híbrido de compuestos útiles de acuerdo con la invención, y mezclas de los mismos.

KITS

Un antagonista de EZH2, si se desea, se puede presentar en un kit (por ejemplo, un envase o un dispositivo dispensador) que puede contener una o varias formas de dosificación unitarias que contienen el antagonista de EZH2. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase blister. El envase o el dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones para la administración. Las composiciones que comprenden un antagonista de EZH2 de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada. También se pueden proporcionar instrucciones de uso.

También se proporciona en el presente documento kits que comprenden una pluralidad de reactivos de detección de la metilación que detectan H3-K27 metilada. Por ejemplo, el kit incluye reactivos de detección de H3-K27 monometilada, H3-K27 dimetilada y H3-K27 trimetilada. El reactivo de detección es, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos, un polipéptido o aptámeros.

Un kit también puede incluir un reactivo de detección de un mutante de EZH2, por ejemplo, ácidos nucleicos que identifican específicamente una secuencia de ácido nucleico de EZH2 mutante por tener secuencias de ácido nucleico homólogas, tales como secuencias de oligonucleótidos, complementarias a una porción de la secuencia de ácido nucleico de EZH2 mutante o anticuerpos para proteínas codificadas por los ácidos nucleicos de EZH2 mutante, envasados juntos en forma de un kit. Los oligonucleótidos pueden ser fragmentos del gen de EZH2. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden tener una longitud de 200, 150, 100, 50, 25, 10 nucleótidos o menos. El kit puede contener en recipientes separados un aptámero o un anticuerpo, formulaciones de control (positivo y/o negativo), y/o un marcador detectable tal como fluoresceína, proteína verde fluorescente, rodamina, colorantes de cianina, colorantes Alexa, luciferasa, radiomarcadores, entre otros. Las instrucciones (por ejemplo, por escrito, una casete, VCR, CD-ROM, etc.) para llevar a cabo el ensayo pueden estar incluidas en el kit. El ensayo puede estar, por ejemplo, en forma de un análisis de transferencia Western, inmunohistoquímico (IHC), de inmunofluorescencia (IF), secuenciación y espectrometría de masas (MS), como se conoce en la técnica.

DEFINICIONES

Por conveniencia, ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas se recogen en este documento. Todas las definiciones, tal y como se definen y se utilizan en el presente documento, sustituyen a las definiciones de un diccionario, definiciones en documentos incorporados como referencia y/o significados corrientes de los términos definidos.

5 Los artículos "un" y "uno" se utilizan en este documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, por lo menos a uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

10 La expresión "y/o", tal y como se utiliza en este documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, cabe entender que significa "cualquiera o ambos" de los elementos así reunidos, es decir, elementos que están presentes conjuntivamente en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Múltiples elementos enumerados con "y/o" se deben interpretar de la misma forma, es decir, "uno o más" de los elementos así reunidos. Otros elementos pueden estar presentes opcionalmente de forma diferente a los elementos específicamente identificados por la cláusula "y/o", relacionados o no con aquellos elementos específicamente identificados. De esta forma, a modo de 15 un ejemplo no limitante, una referencia a "A y/o B", cuando se utiliza junto con una forma indefinida tal como "que comprende", se puede referir, en una realización, a A solo (opcionalmente incluyendo elementos diferentes de B); en otra realización, a B solo (opcionalmente incluyendo elementos diferentes de A); en todavía otra realización, a A y a B (opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

20 Tal y como se utiliza en este documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "o" debe entenderse que tiene el mismo significado que "y/o" como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan elementos en una lista, "o" o "y/o" se deben interpretar como inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero incluyendo también más de uno, de un número o una lista de elementos, y, opcionalmente, elementos no enumerados adicionales. Solamente los términos que indican claramente lo contrario, como "solo uno de" o 'exactamente uno de', o, cuando se utilizan en las reivindicaciones, 'que consiste en', se refieren a la inclusión de exactamente un 25 elemento de un número o una lista de elementos. En general, el término "o" tal y como se utiliza en este documento se debe interpretar solamente como una indicación de alternativas exclusivas (es decir, "uno o el otro, pero no ambos") cuando está precedido por términos de exclusividad, como "o bien", "uno de", "solo uno de" o "exactamente uno de". "Que consiste esencialmente en", cuando se utiliza en las reivindicaciones, tendrá su significado ordinario tal y como se utiliza en el campo de la ley de patentes.

30 Tal y como se utiliza en este documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "al menos uno", en referencia a una lista de uno o varios elementos, debe entenderse que significa al menos un elemento seleccionado a partir de uno cualquiera o más de los elementos en la lista de elementos, pero que no incluye necesariamente al menos uno de cada uno y todos los elementos indicados específicamente en la lista de elementos y que no excluye ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que puedan 35 estar presentes opcionalmente elementos distintos de los elementos identificados específicamente dentro de la lista de elementos a la que se refiere la frase "al menos uno", ya sea relacionados o no relacionados con los elementos identificados específicamente. Por lo tanto, a modo de un ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, equivalentemente, "al menos uno de A o B" o, el equivalente, "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en una realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, A, sin que B esté presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B, sin que 40 A esté presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en todavía otra realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A y al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, B (y que incluye opcionalmente otros elementos); etc.

45 También debe entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquiera de los métodos descritos en este documento que incluyen más de una etapa o acción, el orden de las etapas o acciones del método no se limita necesariamente al orden en el cual se indican las etapas o las acciones del método.

50 En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, todas las expresiones de transición, tales como "que comprende", "que incluye", "que es portador", "que tiene", "que contiene", "que implica", "que sostiene", "complemento de" y similares, deben entenderse como indefinidas, es decir, en el sentido de que incluye, pero no limitadas a. Solo las expresiones de transición "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" deberán ser expresiones de transición definidas o semidefinidas, respectivamente, tal y como se establece en el Manual de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos de Procedimientos de Examinación de Patentes, Sección 2111.03.

55 Los términos "coadministración" y "coadministrar" se refieren tanto a la administración concurrente (administración de dos o más agentes terapéuticos al mismo tiempo) como a la administración que varía en el tiempo (administración de uno o varios agentes terapéuticos en un momento diferente al de la administración de un agente o agentes terapéuticos adicionales), siempre y cuando los agentes terapéuticos estén presentes en el paciente en cierta medida al mismo tiempo.

La expresión "afección precancerosa" o "afección premaligna" se refiere a una enfermedad, un síndrome o una de-

tección que, si no se trata, puede conducir a un cáncer. Es un estado generalizado asociado con un aumento significativo del riesgo de cáncer.

El término "tratar" tal y como se usa en este documento, se refiere a aliviar al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección. El término incluye la administración y/o la aplicación de uno o varios compuestos descritos en este documento, a un sujeto, con el fin de proporcionar un control o un remedio de una afección. El "tratamiento" para los fines de esta descripción, puede proporcionar una cura, pero no tiene por qué; más bien, el "tratamiento" puede estar en forma de un control de la afección. Cuando los compuestos descritos en el presente documento se usan para tratar células proliferantes no deseadas, incluyendo cánceres, el "tratamiento" incluye una destrucción parcial o total de las células proliferantes no deseables con efectos destructivos mínimos sobre las células normales. Un mecanismo deseado para tratar las células que proliferan rápidamente no deseadas, incluyendo las células cancerosas, a nivel celular, es la apoptosis.

El término "prevenir" tal y como se usa en este documento, incluye o bien prevenir o ralentizar por completo la aparición de la progresión de una enfermedad clínicamente evidente o prevenir o ralentizar la aparición de un estadio precínicamente evidente de una enfermedad en individuos con riesgo. Esto incluye un tratamiento profiláctico de los individuos con riesgo de desarrollar una enfermedad.

El término "sujeto" tal y como se usa en este documento para fines de tratamiento, incluye cualquier sujeto humano que ha sido diagnosticado, tiene síntomas o tiene riesgo de desarrollar un cáncer o una afección precancerosa. Para los métodos de prevención, el sujeto es cualquier sujeto humano. Para ilustrar, con fines de prevención, un sujeto puede ser un sujeto humano que tiene riesgo o está predisposto genéticamente a adquirir un trastorno caracterizado por una proliferación celular no deseada, rápida, como el cáncer. El sujeto puede tener riesgo debido a una exposición a agentes carcinógenos, estando predisposto genéticamente a trastornos caracterizados por una proliferación celular no deseada, rápida y así sucesivamente.

Salvo que se indique lo contrario, se pueden emplear métodos convencionales para la producción de polipéptidos recombinantes y sintéticos, proteínas de fusión, anticuerpos o fragmentos que se unen a antígeno de los mismos, la manipulación de secuencias de ácido nucleico, la producción de células transformadas y similares. Tales técnicas son conocidas para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a ed. (Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001); F.M. Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

La expresión "polipéptido EZH2" incluye fragmentos funcionales de polipéptidos de longitud completa y equivalentes funcionales de cualquiera de los anteriores que tienen secuencias de aminoácidos sustancialmente similares o sustancialmente idénticas (al menos aproximadamente un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o más de similitud o identidad de secuencia de aminoácidos), en donde el fragmento funcional o el equivalente funcional conserva una o varias de las propiedades funcionales del polipéptido natural.

Por "funcional" se entiende que el polipéptido (o el ácido nucleico) tiene la misma actividad o sustancialmente una actividad similar con respecto a una o varias de las propiedades biológicas del polipéptido natural (o el ácido nucleico), por ejemplo, al menos aproximadamente 50%, 75%, 85%, 90%, 95% o 98% o más de la actividad del polipéptido natural (o ácido nucleico).

El término "modular" (y equivalentes gramaticales) se refiere a un aumento o una disminución de la actividad. El término "aumentar" o "mejorar" (y equivalentes gramaticales) puede significar un aumento de al menos aproximadamente 25%, 50%, 75%, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más. Los términos "disminuir" o "reducir" (y equivalentes gramaticales) significan una disminución de al menos aproximadamente 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o más. La actividad, la sustancia u otro parámetro indicados pueden no ser detectables. Específicamente se proporcionan antagonistas de EZH2.

La expresión "marcador farmacodinámico" se refiere a un marcador molecular de la respuesta a un fármaco que se puede medir en pacientes que reciben el fármaco. El marcador debe ser una medida directa de modulación de la diana del fármaco y ser capaz de mostrar cambios cuantitativos como respuesta a la dosis. Un marcador farmacodinámico potencial de los antagonistas de EZH2 podría ser los niveles de metilación en H3-K27 de las histonas en un tejido enfermo o experimental.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "capacidad de respuesta" es intercambiable con los términos "que responde", "sensible" y "sensibilidad" y se entiende que en un sujeto que muestra una respuesta terapéutica cuando se administra un inhibidor de EZH, por ejemplo, las células tumorales o los tejidos tumorales del sujeto experimentan apoptosis y/o necrosis, y/o muestran un crecimiento, división o proliferación reducidos.

El término "control" o "referencia" se refiere a los niveles de metilación (por ejemplo, nivel de monometilación, nivel de dimetilación o nivel de trimetilación) detectados en un tejido no tumoral adyacente, aislado del sujeto, detectado en un tejido sano de un sujeto sano o establecido por un patólogo con los métodos convencionales en la técnica.

Por "muestra" se entiende cualquier muestra biológica obtenida a partir del sujeto, incluye pero no se limita a, células, muestras de tejidos y fluidos corporales (incluyendo, pero no limitados a, mucosidad, sangre, plasma, suero,

orina, saliva y semen).

En toda la descripción, cuando se describen composiciones que tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, se contempla que las composiciones también consisten esencialmente en o consisten en, los componentes citados. Asimismo, cuando se describen métodos o procedimientos que tienen, incluyen o comprenden etapas específicas del procedimiento, los procedimientos también consisten esencialmente en o consisten en, las etapas citadas del procedimiento. Además, se debe entender que el orden de las etapas o el orden para realizar ciertas acciones, es indiferente siempre que la invención siga siendo realizable. Por otra parte, dos o más etapas o acciones se pueden realizar simultáneamente.

5 Los procedimientos sintéticos de la invención puede tolerar una amplia variedad de grupos funcionales; por lo tanto, se pueden emplear diversos materiales de partida sustituidos. Los procedimientos generalmente proporcionan el compuesto final deseado al terminar o cerca del fin del procedimiento en general, aunque puede ser deseable en ciertos casos convertir adicionalmente el compuesto en una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar a través de una variedad de maneras, usando materiales de partida disponibles comercialmente, compuestos conocidos en las publicaciones o intermedios preparados fácilmente, mediante el empleo de métodos y procedimientos sintéticos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica o que serán evidentes para el experto en la materia de cara a las enseñanzas del presente documento. Los métodos y procedimientos sintéticos convencionales para la preparación de moléculas orgánicas y transformaciones y manipulaciones de grupos funcionales se pueden obtener a partir de publicaciones científicas relevantes o de libros de texto convencionales en ese campo. Aunque no se limita a una cualquiera o a varias fuentes, textos clásicos tales como Smith, M. B., March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5^a edición, John Wiley & Sons: New York, 2001; y Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3^a edición, John Wiley & Sons: New York, 1999, son libros de texto de síntesis orgánica de referencia, útiles y reconocidos, conocidos por los expertos en la materia. Las siguientes descripciones de métodos sintéticos se diseñan para ilustrar, pero no para limitar, los procedimientos generales para la preparación de compuestos de la presente invención.

15 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar convenientemente mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los compuestos de esta invención con cada una de las fórmulas descritas en este documento, se pueden preparar de acuerdo con los siguientes procedimientos a partir de materiales de partida disponibles comercialmente o materiales de partida que se pueden preparar utilizando procedimientos de publicaciones. Esos procedimientos muestran la preparación de compuestos representativos de esta invención.

20 Los compuestos diseñados, seleccionados y/u optimizados por métodos descritos anteriormente, una vez producidos, se pueden caracterizar usando una variedad de ensayos conocidos por los expertos en la técnica para determinar si los compuestos tienen actividad biológica. Por ejemplo, las moléculas se pueden caracterizar mediante ensayos convencionales, incluyendo pero no limitados a los ensayos descritos a continuación, para determinar si tienen una actividad prevista, actividad de unión y/o especificidad de unión.

25 Además, se puede emplear un escrutinio de alto rendimiento para acelerar el análisis usando tales ensayos. Como resultado, es posible escrutar rápidamente las moléculas descritas en la presente memoria en busca de actividad, usando métodos conocidos en la técnica. Metodologías generales para la realización de un escrutinio de alto rendimiento se describen, por ejemplo, en Devlin (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker; y en el documento de Patente de EE.UU. nº 5.763.263. Los ensayos de alto rendimiento pueden emplear una o varias técnicas de ensayo diferentes, incluyendo, pero no limitadas a, las descritas a continuación.

30 La mención de publicaciones y documentos de patente no pretende ser una admisión de que alguno sea una técnica anterior pertinente, ni constituye una admisión en cuanto al contenido o fecha de los mismos. Ahora, una vez que se ha descrito la invención por medio de una descripción escrita, los expertos en la técnica reconocerán que la invención se puede poner en práctica con una variedad de realizaciones y que la descripción anterior y los ejemplos siguientes tienen un fin ilustrativo y no de limitación de las reivindicaciones que siguen.

Ejemplos

35 La invención una vez que se ha descrito ahora de forma general, se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención y que no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1 - Complejo PRC2 recombinante de cinco componentes

40 EZH2 de tipo natural (GenBank nº de orden NM_004456) o mutantes Tyr641 se coexpresan con AEBP2 de tipo natural (GenBank nº de orden NM_153207), EED (GenBank nº de orden NM_003797), SUZ12 (GenBank nº de orden NM_015355) y RbAp48 (GenBank nº de orden NM_005610) en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) utilizando un sistema de expresión de baculovirus. Un marcador FLAG N-terminal en el EED se usó para purificar el complejo PRC2 activo a partir de lisados celulares (BPS Bioscience, número de catálogo 51004). La pureza de las pre-

paraciones finales de PRC2 se evaluó mediante SDS-PAGE con tinción con azul Coomassie.

Ejemplo 2 - Panel peptídico de H3, H4

Un banco que consistía en 44 péptidos de 15 aminoácidos se sintetizó cada uno mediante 21st Century Biochemicals (Marlboro, MA). Este panel peptídico incluía todos los aminoácidos de las histonas H3 y H4 humanas con 5 residuos que se solapan entre secuencias de péptidos consecutivos. El extremo N-terminal de cada péptido se añadió con biotina y los extremos C-terminales estaban representados como la amida. La pureza (>95%) y la identidad se confirmaron por análisis de cromatografía líquida/espectro de masas.

Para el estudio de dependencia del estado de metilación de H3-K27 de la actividad enzimática, los péptidos se sintetizaron representando la secuencia de aminoácidos de H3 humana a partir de los residuos 21-44 (H3:21-44), en donde la lisina 27 se representaba como la amina de la cadena lateral no modificada, monometilada, dimetilada o trimetilada. Estos péptidos se adquirieron en New England Peptide (Gardner, MA) con biotina añadida al extremo C-terminal de cada péptido.

Ejemplo 3 - Evaluación del estado de metilación de H3-K27 en las células

Las líneas celulares OCI-LY19 (ACC 528), KARPAS-422 (ACC 32) y WSU-DLCL2 (ACC 575) se obtuvieron a partir de DSMZ. Las líneas celulares DB (CRL-2289) y SU-DHL6 (CRL-2959) se obtuvieron a partir de ATCC. Las líneas celulares OCI-LY19, WSU-DLCL2 y DB se cultivaron en medio RPMI-1640 con 10% de FBS y las líneas celulares KARPAS-422 y SU-DHL6 se cultivaron en RPMI-1640 más 20% de FBS. Las células se cultivaron hasta una densidad de 1,5-2 x 10⁶ células/ml y 1 x 10⁷ células se recogieron por centrifugación a 264 x g, se lavaron en PBS enfriado con hielo y se lisaron mediante resuspensión en 10X un volumen de sedimento de tampón de lisis RIPA que contenía Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 0,25% de DOC, 1% de NP-40 y EDTA 1 mM (Millipore nº 20-188), más 0,1% de SDS y comprimidos inhibidores de proteasa (Roche nº 1836153). Los lisados se sometieron a ultrasonidos mediante 2 rondas de 10 ráfagas de 1 segundo en configuración 3 con un Misonix XL-2000, para asegurar una extracción eficaz de las histonas y se aclararon por centrifugación a 4°C utilizando una centrífuga de mesa a 14.000 rpm durante 10 minutos. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo BCA (Pierce). Cuatro microgramos de cada lisado se fraccionó en un gel de 4-20% de Tris-glicina (Invitrogen), se transfirieron a PVDF y se sometieron a ensayo con los siguientes anticuerpos en tampón de bloqueo Odyssey: de ratón anti-EZH2 (CST 3147; dilución 1:2000), de conejo anti-H3-K27me3 (CST 9733; dilución 1:10000), de conejo anti-H3-K27me2 (CST 9755; dilución 1:5000), de conejo anti-H3-K27me1 (Active Motif 39377; dilución 1:5000) y de ratón anti-H3 total (CST 3638; dilución 1:20000). Despues de la incubación con el Ac primario, las membranas se sometieron a ensayo con Ac secundario de IgG de burro anti-ratón IRDye 800CW (LICOR nº 926-32212) o IgG de cabra anti-conejo Alexa Fluor 680 (Invitrogen nº A-21076) y se formaron imágenes utilizando el sistema LICOR Odyssey.

Ejemplo 4 - Enzimología

Como se ha señalado anteriormente, previamente se había llegado a la conclusión de que los cambios asociados a la enfermedad en Tyr641 daban lugar a una pérdida de función con respecto a la metilación de H3-K27 catalizada por EZH2. Sin embargo, una presunta reducción de la tasa de metilación de H3-K27 debida a la heterocigosidad de la enzima era difícil de racionalizar como la base de un fenotipo maligno, especialmente de cara a los datos anteriores que indicaban que una sobreexpresión de EZH2, mutaciones de pérdida de función en la desmetilasa correspondiente de H3-K27, UTX o una sobreexpresión de componentes del PRC2, tales como PHF19/PCL3, implicaban un aumento de la trimetilación de H3-K27, todo ello dando como resultado fenotipos malignos en cánceres humanos específicos. Morin et al. (2010) Nat Genet 42:181-5; Martinez-Garcia et al. (2010) Nat Genet 42:100-1; Bracken et al. (2003) EMBO J 22:5323-35; Kleer et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:11606-11; Varambally et al. (2002) Nature 419:624-9; Simon et al. (2008) Mutat Res 647:21-9; van Haaften et al. (2009) Nat Genet 41:521-3; Wang et al. (2004) Gene 343:69-78; Cao et al. (2008) Mol Cell Biol 28:1862-72; y Sarma et al. (2008) Mol Cell Biol 28:2718-31). Por lo tanto, la enzimología de esas mutaciones se exploró con mayor detalle.

Los complejos PRC2 recombinantes se prepararon con versiones WT y mutantes Tyr641 de EZH2 humana (véase el Ejemplo 1 anterior; Cao et al (2004) Mol Cell. 15:57-67). Concentraciones iguales (nominalmente 8 nM, basadas en determinaciones proteicas) de cada complejo se sometieron a ensayo inicialmente para estudiar la capacidad de catalizar la transferencia de ³H-metilo desde S-adenosil metionina (SAM) marcada a un péptido no modificado que representaba la secuencia de aminoácidos que rodea H3-K27 (H3:21-44) o a oligonucleosomas de eritrocitos aviares naturales. Como se ha informado anteriormente (Morin et al. (2010) Nat Genet. 42: 181-5), se encontró que la enzima WT mostraba una actividad fuerte para la transferencia de metilo a ese sustrato peptídico no metilado, pero ninguna de las enzimas mutantes mostraba una actividad metiltransferasa significativa (**Figura 1A**). En contraposición con los datos indicados anteriormente y los de la Fig. 1A, se encontró que todas las estructuras artificiales de EZH2 mutantes eran metiltransferasas activas frente al sustrato de nucleosoma aviar (**Figura 1B**). Los nucleosomas aislados a partir de la fuente natural aviar representan una mezcla por adición de estados de modificación de histonas, incluyendo diversos estados de metilación de H3-K27 tal y como se interpreta mediante la transferencia Western con anticuerpos específicos de una metilación de H3-K27.

Existen diversas explicaciones posibles para la actividad discordante de los complejos PRC2 mutantes sobre sustra-

tos peptídicos y de nucleosoma. Una posibilidad es que los sitios de reconocimiento de sustrato distales al sitio activo de la enzima (es decir, los exositos) son determinantes importantes de la unión al sustrato y el recambio; estos sitios involucrarían elementos de reconocimiento complementarios sobre el nucleosoma que no están disponibles sobre los pequeños sustratos peptídicos. Sin embargo, cuando la histona H3 humana recombinante, expresada en

5 *E. coli* se sometió a ensayo como un sustrato para los complejos PRC2 WT y mutantes, el patrón resultante de la actividad era idéntico al observado para el sustrato peptídico; es decir, la enzima WT mostraba una actividad metiltransferasa fuerte frente al sustrato H3, el mutante Y641F mostraba 7% de la actividad del complejo WT y todos los demás mutantes representaban $\leq 1\%$ de la actividad del complejo WT. Por lo tanto, involucrar un exosito parece una explicación poco probable para los resultados actuales. El nucleosoma presenta muchos residuos de lisina además de H3-K27 como sitios potenciales de metilación que no estarían presentes en el sustrato peptídico pequeño. Por lo tanto, otra posibilidad es que la mutación Y641 altera la especificidad de sustrato de EZH2 para dar como resultado una metilación de residuos de lisina distintos de H3-K27. Esta posibilidad es poco probable dada la concordancia excelente entre la actividad del mutante sobre los sustratos peptídicos pequeños y la proteína H3 recombinante.

10 La discordancia aparente entre los resultados actuales y los indicados previamente se resolvió cuando la actividad enzimática de los complejos PRC2 WT y mutantes se sometió a ensayo frente a un panel de sustratos peptídicos que representan todos los posibles residuos de lisina (K) de la histona H3 y la histona H4 (véase el Ejemplo 2 más arriba). Todas las formas de la enzima mostraban una actividad significativa solo frente a los péptidos que contenían el equivalente al residuo H3-K27. La actividad específica de los mutantes, sin embargo, se reducía considerablemente en relación a WT en el orden WT >> Y641F > Y641S ~ Y641H > Y641N, de nuevo compatible con los hallazgos indicados anteriormente.

Ejemplo 5 - Enzimología

15 Para entender mejor la actividad enzimática de esos mutantes y reconciliar la aparente discrepancia entre la actividad frente a los sustratos peptídicos y del nucleosoma, se estudió la capacidad de las formas enzimáticas para catalizar adicionalmente la metilación de diversos estados de metilación de H3-K27 en el contexto del péptido H3:21-44.

20 25 Tal y como se había indicado anteriormente, se encontró que todas las enzimas mutantes eran catalizadores deficientes de una metilación del péptido H3-K27 sin modificar, en relación con la enzima WT. Sorprendentemente, sin embargo, se encontró que todas las enzimas mutantes eran superiores a la enzima WT para catalizar adicionalmente la metilación de los péptidos H3-K27 monometilados, y especialmente los dimetilados (**Figura 2**). Por lo tanto, los datos sugieren que la enzima WT es más eficaz en la catalización de la reacción desde ninguna metilación a monometilación. Las enzimas mutantes son defectuosas para catalizar esta etapa inicial, pero son más eficientes que la enzima WT para catalizar las etapas posteriores que conducen desde H3-K27 monometilada a H3-K27 dimetilada y H3-K27 trimetilada.

30 35 Los orígenes de las diferentes especificidades de sustrato entre EZH2 WT y mutante se exploraron a través de la cinética enzimática en estado estacionario. Como se resume en la **Tabla 2**, las mutaciones tienen efectos mínimos sobre el reconocimiento del sustrato en estado fundamental, como se demuestra por los valores similares de K_m

35 40 45 para el nucleosoma y de $K_{1/2}$ para sustratos peptídicos. En todos los casos, los sustratos peptídicos muestran un comportamiento de unión sigma; por lo tanto, la concentración de péptido que da lugar a la velocidad media-máxima se indica ahí como $K_{1/2}$ en lugar de la constante de Michaelis, K_m que es más común. Copeland (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists, Wiley. La K_m de SAM asimismo mostraba una variación mínima entre las formas de la enzima, que variaban desde 208 ± 50 a 304 ± 64 nM. En su lugar, las diferencias en la utilización del sustrato parecen tener su origen en el reconocimiento del estado de transición, como se demostró por las diferencias en los valores de k_{cat} entre las enzimas para diversos sustratos (**Tabla 2**). Como resultado, la eficacia catalítica, cuantificada como la relación k_{cat}/K (en donde K es o bien K_m o $K_{1/2}$, en función de la identidad del sustrato; véase más arriba), varía entre las enzimas WT y mutantes para diferentes estados de metilación de H3-K27 (**Tabla 2**).

Tabla 2. Parámetros cinéticos en estado estacionario para reacciones de metilación catalizadas por PRC2 que contiene EZH2 de tipo natural o mutantes Y641 de EZH2.

Enzima	Estado de metilación de H3-K27 en el sustrato	K (nM)	k_{cat} ($\text{h}^{-1} \times 10^{-2}$)	k_{cat}/K ($\text{h}^{-1} \cdot \text{nM}^{-1} \times 10^{-4}$)
WT	0	184 ± 10	$84,0 \pm 3,0$	$45,7 \pm 3,0$
	1	436 ± 42	$65,4 \pm 5,8$	$15,0 \pm 2,0$
	2	178 ± 16	$6,0 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,3$
	Nucleosoma	141 ± 31	$42,6 \pm 2,6$	$30,2 \pm 6,9$
Y641F	0	240 ± 19	$4,8 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$
	1	404 ± 124	$15,0 \pm 4,3$	$3,7 \pm 1,6$
	2	191 ± 10	$84,0 \pm 2,8$	$44,0 \pm 2,7$
	Nucleosoma	176 ± 19	$65,4 \pm 2,0$	$37,2 \pm 4,2$

Enzima	Estado de metilación de H3-K27 en el sustrato	K (nM)	k_{cat} ($h^{-1} \times 10^{-2}$)	k_{cat}/K ($h^{-1} \cdot nM^{-1} \times 10^{-4}$)
Y641H	0	- ^a	-	-
	1	319 ± 57	$28,2 \pm 3,7$	$8,8 \pm 2,0$
	2	148 ± 9	$22,8 \pm 0,9$	$15,4 \pm 1,1$
	Nucleosoma	140 ± 22	$23,4 \pm 1,0$	$16,7 \pm 2,7$
Y641N	0	-	-	-
	1	280 ± 11	$23,4 \pm 0,8$	$8,4 \pm 0,4$
	2	157 ± 11	$96,0 \pm 4,0$	$61,1 \pm 5,0$
	Nucleosoma	191 ± 34	$23,4 \pm 1,3$	$12,3 \pm 2,3$
Y641S	0	-	-	-
	1	249 ± 8	$27,6 \pm 0,8$	$11,1 \pm 0,5$
	2	136 ± 8	$59,4 \pm 2,0$	$43,7 \pm 3,0$
	Nucleosoma	137 ± 28	$23,4 \pm 1,4$	$17,1 \pm 3,6$

^a Actividad demasiado baja para la medición.

Ejemplo 6 - Enzimología

Los parámetros de la cinética en estado estacionario indicados en la **Tabla 2** permitieron calcular los niveles esperados de diferentes de metilación de H3-K27 en células heterocigotas para las diversas formas de EZH2 mutantes, en relación con células homocigotas para la enzima WT. Para realizar esas simulaciones, se establecieron una serie de premisas para simplificar: (1) que la cinética enzimática en estado estacionario es relevante para la metilación de H3-K27 catalizada con PRC2 en el contexto celular y que todas las mediciones se realizan en el mismo punto de tiempo en el crecimiento celular; (2) que la enzima mutante y WT se expresan a niveles iguales en células heterocigotas y que el nivel total de EZH2 es igual en todas las células; (3) que la concentración celular de SAM, en relación a su K_m es saturante y no cambia entre las células; (4) que la concentración celular del nucleosoma es similar a su K_m y del mismo modo no cambia entre las células; (5) que la metilación catalizada por EZH1 de H3-K27 era insignificante y constante entre las células; y (6) que cualquier actividad desmetilasa de H3-K27 también era constante entre las células.

Con esas premisas en marcha, se obtuvieron las predicciones ilustradas en la **Figura 3A** para niveles relativos de H3-K27me3 (panel superior), H3-K27me2 (panel medio) y H3-K27me1 (panel inferior). Un patrón claro surge a partir de estas simulaciones. El nivel de H3-K27me3 aumenta en relación con las células WT en todas las células que albergan mutantes, oscilando desde un aumento del 30% para el mutante Y641H hasta >400% para el mutante Y641N. Al mismo tiempo, los niveles de H3-K27me2 disminuyen hasta <50% de WT en todos los mutantes y los niveles de H3-K27me1 se reducen aproximadamente a la mitad en todos los mutantes, en relación a WT.

Los niveles relativos de los estados de metilación de H3-K27 en líneas celulares de linfoma de linfocitos B que se sabe que son homocigotas para WT EZH2 (OCI-LY19) o heterocigotas para EZH2 Y641N (DB, KARPAS 422 y SU-DHL-6) o EZH2 Y641F (WSU-DLCL2) se midieron después mediante transferencia Western (**Figura 3B**). El patrón de estados de metilación relativos de H3-K27 observado en la Figura 3b coincide totalmente con los resultados de las simulaciones basadas en parámetros cinéticos en estado estacionario *in vitro*, a pesar de las premisas empleadas en las simulaciones y el uso de un péptido experimental no fisiológico como sustrato.

Por lo tanto, se observó un aumento de H3-K27me3 en todas las células que albergan mutantes Y641 en relación con WT, una disminución de H3-K27me2 se observó en todas las células mutantes que albergan mutantes Y641 en relación con WT y una disminución de H3-K27me1 se observó en al menos dos de las cuatro líneas celulares mutantes. Los niveles casi comparables de H3-K27me1 en las células WT y KARPAS 422 y SU-DHL-6 pueden reflejar diferentes niveles de expresión de EZH2 WT y mutante, diferentes contribuciones de EZH1 u otros factores no considerados en las simulaciones. Sin embargo, la concordancia entre los patrones previstos y experimentales del estado de metilación de H3-K27 es notable y apoya la opinión de que el acoplamiento enzimático entre EZH2 WT y mutante conduce a un aumento de H3-K27me3, lo que da lugar al fenotipo maligno de las células que son heterocigotas para esos mutantes.

Ejemplo 7 - Ensayos *in vitro* de la actividad metiltransferasa de PRC2

Ensayo en placa Flashplate con sustrato peptídico. Para una comparación inicial de EZH2 WT y mutantes Y641 de EZH2, el péptido H3:21-44 de la histona biotinilada que contenía K27 no metilada (New England Peptide), K27 monometilada (Millipore) o K27 dimetilada (Millipore) a una concentración de 800 nM, se combinó con una mezcla de S-

adenosilmetionina-Cl (SAM) 1700 nM y SAM tritiada 300 nM (Perkin Elmer). Esta combinación de sustratos se añadió después a PRC2 en tampón de ensayo (BICINE 20 mM, DTT 1 mM, 0,002% de Tween 20, 0,005% de gelatina de piel bovina (BSG), pH 7,6). Las reacciones se dejaron proceder durante el intervalo de tiempo indicado y después se inactivaron por adición de un exceso de SAM fría (600 μ M de concentración final). Las mezclas de reacción inactivadas se transfirieron a una placa Flashplate recubierta con estreptavidina (Perkin Elmer, número de catálogo SMP410), se permitió la unión durante una hora y luego se detectó en un aparato para recuento de centelleo y luminiscencia TopCount NXT HTS (Perkin Elmer). Cada punto de tiempo representaba el promedio de seis reacciones individuales. Los parámetros cinéticos en estado estacionario se determinaron en condiciones de reacción idénticas, excepto que la concentración de péptido o SAM variaba, mientras que el otro sustrato estaba en condiciones de saturación. La velocidad se representó como una función de la concentración de sustrato variada y los datos se ajustaron a la versión no transformada de la ecuación de Michaelis-Menten o a la versión no transformada de una ecuación cinética sigmoidea para calcular los valores de K y k_{cat} . Los errores estándar de parámetros ajustados se indican en la **Tabla 2** y se utilizaron para construir las barras de error ilustradas en la **Figura 2** en los paneles B y C. El error asociado con k_{cat}/K (**Tabla 2**) se calculó de acuerdo con métodos convencionales de propagación de errores; el error fraccional de k_{cat}/K se determinó como:

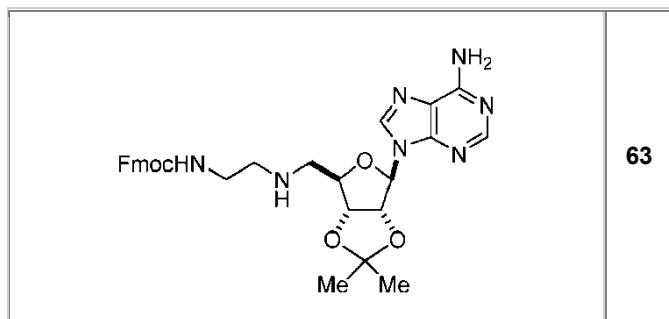
$$\mu \frac{k_{cat}}{K} = \sqrt{\left(\frac{\mu k_{cat}}{k_{cat}} \right)^2 + \left(\frac{\mu K}{K} \right)^2} \quad (1)$$

en donde μk_{cat} es el error estándar de k_{cat} y μK es el error estándar de K .

Ensayo en placa filtrante con oligonucleosoma. Oligonucleosomas de eritrocitos de pollo se purificaron como se ha descrito previamente. Fang y col. (2004) Methods Enzymol 377:213-26. Los nucleosomas se combinaron con una mezcla de SAM y SAM tritiada y se añadieron a PRC2 en tampón de ensayo (BICINE 20 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, 0,002% de Tween 20, 0,005% de BSG, pH 7,6). Las reacciones se realizaron y se inactivaron como anteriormente. La mezcla de reacción inactivada se transfirió a una placa filtrante de fibra de vidrio (Millipore, número de catálogo MSFBN6B) y se lavó tres veces con ácido tricloroacético al 10% y se dejó secar. Se añadió Microscint Zero (30 μ L) y se detectó la incorporación de tritio en un aparato de recuento de centelleo y luminiscencia TopCount. Los parámetros en estado estacionario se determinaron con condiciones de reacción idénticas, excepto que la concentración de nucleosoma o de SAM variaba mientras que el otro sustrato estaba en condiciones de saturación. La velocidad se representó como una función de la concentración de sustrato variada y se ajustó a la versión no transformada de la ecuación de Michaelis-Menten para derivar los valores de K_m y k_{cat} como se ha descrito anteriormente.

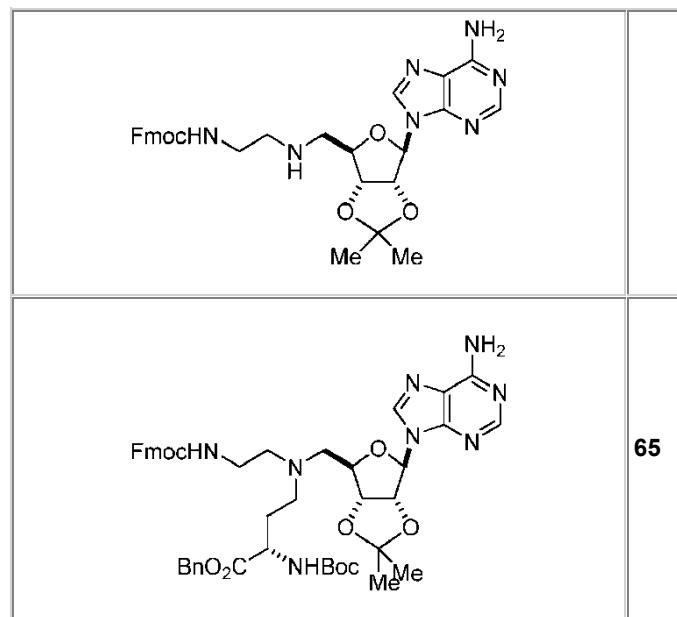
Ejemplo 8 - Preparación del Compuesto

30 A. PREPARACIÓN DEL COMPUESTO DE REFERENCIA 63



A una solución de 9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(aminomethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-9H-purin-6-amina (Townsend, A. P. et al. (2009) Org. Lett. 11:2976-2979) (3,05 g, 9,96 mmol) en DCE (250 mL) se añadió (2-oxoetil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (2,8 g, 9,96 mmol) y NaB(OAc)₃H (2,96 g, 13,95 mmol), la mezcla se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. Se añadió una solución de K₂CO₃ a pH a 8-9. Se añadió DCM, la capa orgánica se secó con Na₂SO₄, se concentró y se purificó por SGC (DCM: MeOH = 30:1) para proporcionar **63** (2,9 g, rendimiento: 50,9%).

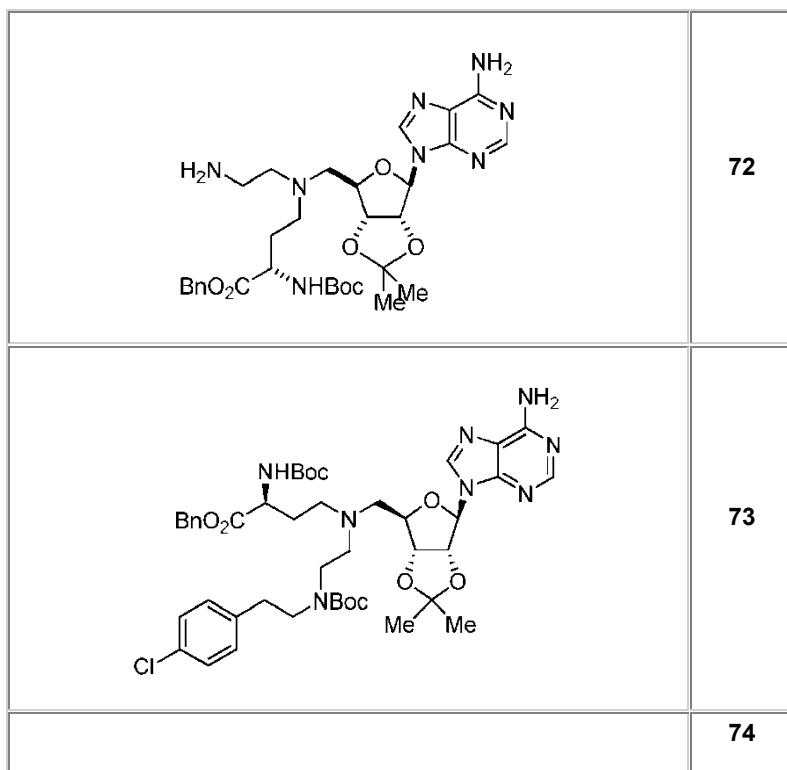
B. PREPARACIÓN DEL COMPUESTO DE REFERENCIA 65

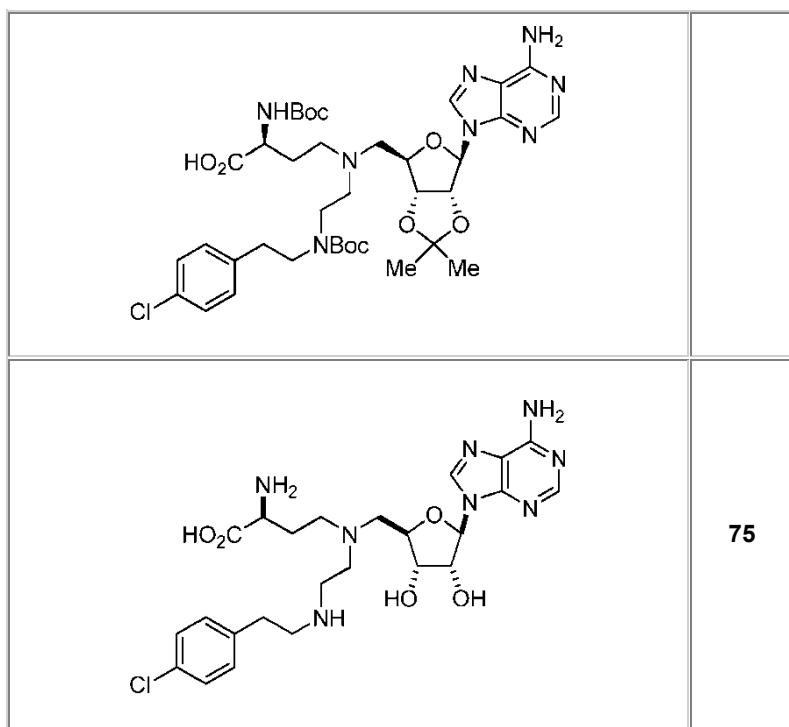


A una solución de **63** (2,9 g, 5,08 mmol) en DCE (250 ml), se añadió 2-((terc-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoato de (S)-bencilo (1,56 g, 5,08 mmol) y NaB(OAc)₃H (1,51 g, 7,11 mmol), la mezcla se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. Se añadió una solución de K₂CO₃ a pH 8-9. Se añadió DCM, la capa orgánica se secó con Na₂SO₄, se concentró y se purificó con SGC (DCM: MeOH = 100:1) para proporcionar **65** (2,8 g, rendimiento: 63,9%).

5

C. PREPARACIÓN DEL COMPUESTO DE REFERENCIA 75





Etapa 1. A una solución de **65B** (2,2 g, 2,55 mmol) en DCM (10 ml), se añadió Et₂NH (1,1 g, 15,3 mmol), la mezcla se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentró para proporcionar **72** bruto (2,2 g).

Etapa 2. A una solución agitada de **72** (167 mg, 0,26 mmol) en MeOH (4 ml), se añadió 2-(4-clorofenil) acetaldehído (40 mg, 0,26 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Después se añadieron Na(OAc)₃BH (83 mg, 0,39 mmol) y HOAc (0,4 ml) y se agitaron durante la noche. Después se añadió NaHCO₃ (ac) y se extrajo con DCM (25 ml x 3), se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄ y se concentró. El producto bruto se purificó por TLC preparativa (DCM / MeOH = 10:1) para proporcionar **73** (30 mg, rendimiento: 14%) como un polvo blanco. LC/MS (m/z): 779,7 [M+1]⁺.

Etapa 3. Una mezcla de **73** (30 mg, 0,038 mmol) y 10% de Pd/C (15 mg) en MeOH (2 ml) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de H₂ durante la noche. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purificó por TLC preparativa (DCM / MeOH = 8:1) para proporcionar **74** (20 mg, rendimiento: 69%) como un polvo blanco. LC/MS (m/z): 689,7 [M+1]⁺.

Etapa 4. Una solución de **74** (20 mg, 0,028 mmol) en 90% de TFA (1 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se concentró como un sólido para eliminar TFA para proporcionar el compuesto **75** (sal de TFA) como un aceite incoloro sin purificación. LC/MS (m/z): 549,7 [M+1]⁺.

Ejemplo de Referencia 9 - Inhibición de EZH2 de tipo natural y mutantes Y641 mediante SAH

S-adenosil-L-homocisteína (SAH) se diluyó en serie 3 veces en DMSO para 10 puntos y 1 µl se sembró en una placa de microtitulación de 384 pocillos. El control positivo (100% de patrón de inhibición) tenía una concentración final de 100 µM de SAH y el control negativo (0% de patrón de inhibición) contenía 1 µl de DMSO. A continuación se incubó SAH durante 30 minutos con 40 µl por pocillo de EZH2 de tipo natural y mutantes a 8 nM en tampón de ensayo a pH 7,6 (BICINE 20 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, 0,002% de Tween 20, 0,005% de BSG). Se añadió una mezcla de sustrato a 10 µl por pocillo que contenía S-adenosilmetionina-Cl (SAM) a 150 nM y SAM tritiada a 100 nM y oligonucleosoma biotinilado a 150 nM en tampón de ensayo a pH 7,6. La reacción enzimática inactivada se transfirió a una placa Flashplate (Perkin Elmer, número de catálogo SMP410) recubierta con estreptavidina, se permitió la unión durante una hora y se detectó en un aparato TopCount NXT HTS (Perkin Elmer).

Los resultados se muestran en la **Figura 7**. Los valores de IC₅₀ se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Inhibición de EZH2 WT y mutantes Y641 de EZH2 mediante SAH.

	WT	Y641H	Y641S	Y641N	Y641F
IC ₅₀ µM	0,467	0,263	0,283	0,380	4,80

Ejemplo de Referencia 10 - Inhibición de EZH2 de tipo natural y mutantes Y641 mediante el Compuesto 75

El Compuesto 75 se diluyó en serie 3 veces en DMSO para 10 puntos y 1 μ l se sembró en una placa de microtitulación de 384 pocillos. El control positivo (100% de patrón de inhibición) tenía una concentración final de 100 μ M de SAH y el control negativo (0% de patrón de inhibición) contenía 1 μ l de DMSO. A continuación se incubó el Compuesto 75 durante 30 minutos con 40 μ l por pocillo de EZH2 de tipo natural y mutantes a 8 nM en tampón de ensayo a pH 7,6 (BICINE 20 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, 0,002% de Tween 20, 0,005% de BSG). Se añadió una mezcla de sustrato a 10 μ L por pocillo que contenía S-adenosilmetionina-Cl (SAM) a 150 nM y SAM tritiatada a 100 nM y oligonucleosoma biotinilado a 150 nM en tampón de ensayo a pH 7,6. La reacción enzimática inactivada se transfirió a una placa Flashplate (Perkin Elmer, número de catálogo SMP410) recubierta con estreptavidina, se permitió la unión durante una hora y se detectó en un aparato TopCount NXT HTS (Perkin Elmer).

Los resultados se muestran en la **Figura 8**. Los valores de CI50 se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Inhibición de la EZH2 WT y mutantes Y641 de EZH2 con el compuesto 75.

	WT	Y641S	Y641N	Y641F	Y641H
CI50 μ M	8,95	2,50	4,10	7,18	7,56

Ejemplo 11 - Relaciones entre H3-K27me2/me3 predicen la sensibilidad frente a un inhibidor de EZH2

Las líneas de células tumorales heterocigotas para la mutación de EZH2 (Y641) muestran un aumento de los niveles de H3-K27me3, el estado de metilación de H3-K27 que se cree que es importante en la tumorigénesis. Se evaluaron los niveles de las formas monometiladas (H3-K27me1), dimetiladas (H3-K27me2) o trimetiladas (H3-K27me3) de H3-K27 en un panel de líneas celulares que eran WT para EZH2 o heterocigotas para las mutaciones de EZH2 (Y641). Las líneas celulares utilizadas se indican en la Tabla 5. La mayoría de las líneas son líneas de linfoma de linfocitos B, sin embargo también se incluyeron dos líneas de melanoma. IGR1 es una línea de melanoma que se ha encontrado recientemente que contiene una mutación Y641N en EZH2 y se incluyeron células A375 como una línea de control de melanoma con EZH2 WT. Las Figuras 9A y B muestran los resultados de análisis de transferencia Western de las histonas aisladas a partir de este panel de líneas celulares que se sometieron a ensayo con anticuerpos que reconocían H3-K27me1, H3-K27me2 o H3-K27me3. En general, los niveles globales de H3-K27me3 son más altos en las líneas celulares que contienen el mutante Y641 que en líneas celulares que expresan EZH2 WT exclusivamente. La excepción son las células Farage, en donde los niveles de H3-K27me3 eran similares a los de las líneas WT. Más sorprendentes son los niveles mucho más bajos de H3-K27me2 en líneas celulares mutantes Y641 de EZH2 en relación con las líneas celulares de tipo natural. Se observó una señal baja o ninguna de H3-K27me2 en la transferencia Western de las histonas extraídas a partir de líneas celulares mutantes Y641, mientras que la señal observada con el mismo anticuerpo en líneas de células WT era más intensa que la observada con el anticuerpo específico de H3-K27me3. En general, en las líneas de células WT, la señal de la transferencia Western con un anticuerpo de HK27me2 era mayor que la señal observada con el anticuerpo de H3-K27me3, mientras que lo contrario era cierto en las líneas celulares de mutante Y641. Por tanto, la relación entre la señal de HK27me3/me2 en las líneas Y641 es mayor que la observada en las líneas WT.

El estado de metilación de H3-K27 también se puede examinar por espectrometría de masas (MS), un método independiente que no depende de reactivos de anticuerpos. El análisis MS demostró que los niveles de H3-K27me3 son más altos en las líneas de células mutantes Y641 y Pfeiffer (A677G) que en las otras líneas WT, mientras que lo contrario es cierto para los niveles de H3-K27me2. En las líneas de células mutantes Y641 y Pfeiffer (A677G), los niveles de H3-K27me3 eran más altos que los niveles de H3-K27me2, mientras que lo contrario era cierto en las otras líneas WT. Estos resultados son compatibles con los observados por análisis de transferencia Western en la Figura 9A y B.

Las diferencias en el estado de metilación de H3-K27 se detectaron también por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra H3-K27me2 o H3-K27me3. Este ensayo de inmunohistoquímica se usa para detectar relaciones aberrantes entre H3-K27me2/3 asociadas con EZH2 mutante Y641 en muestras de tejidos de tumores de pacientes fijadas con formalina y embebidas en parafina. Un panel de cinco sedimentos de líneas celulares de linfoma WT y cinco mutantes Y641 se fijaron y se embebieron en bloques de parafina y se tiñeron con anticuerpos anti-H3-K27me2 o anti-H3-K27me3. Un anticuerpo para la histona H3 se incluyó como control positivo, ya que todas las células debían contener la histona H3 nuclear. La Figura 10 muestra que todas las líneas celulares eran positivas en el 100% de las células tanto para la tinción de H3-K27me3 como de H3. En esas condiciones, no se observó ninguna diferencia clara en la intensidad de la tinción de H3-K27me3 entre las líneas de células WT y mutantes Y641. Esto puede reflejar el intervalo dinámico limitado de la tinción inmunocitoquímica cromogénica en comparación con otros métodos de detección. Sin embargo, como se muestra en la Figura 11, las líneas celulares se podían separar claramente en las que se teñían de forma positiva o negativa para H3-K27me2. Todas las líneas celulares WT se teñían de forma positiva para H3-K27me2, mientras que todas las líneas celulares mutantes Y641 y las células Pfeiffer (A677G) no mostraron ninguna tinción con el anticuerpo de H3-K27me2. Estos resultados son compatibles con los obtenidos por análisis Western y MS.

Sin desear estar ligado a una teoría, el aumento de los niveles de H3-K27me3 asociados con la ganancia de mutaciones funcionales de EZH2 (Y641) puede hacer que las células que son portadoras de mutaciones de EZH2 sean más sensibles a inhibidores de molécula pequeña de EZH2. Para evaluar si el aumento de los niveles de H3-K27me3 y/o la disminución de los niveles de H3-K27me2 observados en las células Pfeiffer en ausencia de una

- 5 mutación Y641 de EZH2 también se correlacionan con la sensibilidad frente a los inhibidores de EZH2, se sometieron a ensayo dos compuestos que demostraban una potente inhibición de EZH2 en ensayos bioquímicos con CI50s de 85 y 16 nM, respectivamente. El tratamiento de las células WSU-DLCL2 con cualquiera de los compuestos conducía a una inhibición de los niveles globales de H3-K27me3, confirmando su capacidad para entrar en las células e inhibir la actividad metiltransferasa celular de EZH2 (Figura 12).
- 10 La sensibilidad de un panel de líneas celulares WT y mutantes Y641 para cada compuesto se evaluó en ensayos de proliferación. Debido a que la actividad antiproliferativa de los inhibidores de EZH2 tarda varios días en manifestarse, los compuestos se evaluaron en ensayos de proliferación de 11 días. La Figura 13 muestra las curvas de crecimiento representativas para WT (OCI-LY19) o para las líneas de células mutantes Y641 (WSU-DLCL2) tratadas con los compuestos del ensayo. Ambos compuestos demostraron una actividad antiproliferativa contra las células WSU-
15 DLCL2, pero poca actividad contra las células OCI-LY19. El inhibidor A era un inhibidor más potente de la proliferación de WSU-DLCL2 que el inhibidor B y esto es compatible con que el inhibidor A sea un inhibidor más potente de EZH2 en los ensayos bioquímicos. Los ensayos de proliferación se realizaron en un panel de líneas celulares de linfoma WT y mutantes Y641, con inhibidor B y se obtuvieron los valores de CI90 el día 11. La Figura 14A muestra los valores de CI90 de las líneas celulares de linfoma agrupadas por el estado de EZH2 Y641. En general, las líneas celulares mutantes Y641 demostraron un aumento de la sensibilidad frente a los inhibidores de EZH2 en relación
20 con las líneas de células WT, aunque las células RL y SUDHL4 eran significativamente menos sensibles que otras líneas mutantes. Las células Pfeiffer (A677G) demuestran niveles elevados de H3-K27me3 y niveles bajos de H3-K27me2 y de este modo la agrupación de líneas celulares de acuerdo con H3-K27me3 elevada y H3-K27me2 baja ofrece una mejor discriminación de la sensibilidad del inhibidor de EZH2, como se muestra para el inhibidor B en la
25 Figura 14B. Por lo tanto, niveles elevados de H3-K27me3 y niveles bajos de H3-K27me2 se pueden utilizar para predecir la sensibilidad frente a inhibidores de EZH2, independiente del conocimiento del estado de la mutación.

Estos resultados demuestran que la identificación de mutaciones Y641 de EZH2 en tumores de pacientes y/o la detección de niveles bajos de H3-K27me2 con relación a H3-K27me3 mediante el uso de técnicas tales como transferencia Western, MS o IHC en un paciente, se pueden utilizar para identificar qué paciente responderá a un tratamiento con inhibidor de EZH2.

Tabla 5. Líneas celulares utilizadas en este estudio.

<u>Cáncer</u>	<u>Estado de EZH2</u>	<u>Línea celular</u>
Linfoma: DLBCL (linfoma difuso de linfocitos B grandes) y otro linfoma de linfocitos B	Tipo natural	OCI-LY19 HT MC116 BC-1 BC-3 Toledo DOHH-2 Farage SR
		NU-DHL-1 NU-DUL-1
	Mutación Y641	SU-DHL-10 (Y641F) DB (Y641N) KARPAS 422 (Y641N) SU-DHL-6 (Y641N) WSU-LDCG-2 (Y641F)

<u>Cáncer</u>	<u>Estado de EZH2</u>	<u>Línea celular</u>
		RL (Y641N)
		SU-DHL-4 (Y641S)
Melanoma	Tipo natural Mutación Y641	A375 IGR-1 (Y641N)

Ejemplo 12 - Complejos PRC2 recombinantes de 4 componentes

EZH2 de tipo natural (WT) (GenBank nº de orden NM_004456) o mutantes A677G y A687V se coexpresaron con EED de tipo natural (GenBank nº de orden NM_003797), SUZ12 (GenBank nº de orden NM_015355) y RbAp48 (GenBank nº de orden NM_005610) en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) utilizando un sistema de expresión de baculovirus. Un marcador FLAG N-terminal en EED se usó para purificar el complejo PRC2 activo a partir de lisados celulares. La pureza de las preparaciones finales de PRC2 se evaluó por SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie y la concentración de proteínas se determinó usando una curva patrón de albúmina de suero bovino en un ensayo Bradford.

10 Ejemplo 13 - Ensayos *in vitro* de la actividad metiltransferasa de PRC2

Procedimiento estándar para el ensayo *Flashplate con sustratos peptídicos*. La actividad de los complejos PRC2 que contenían EZH2 de tipo natural o mutante se investigó usando una serie de cuatro péptidos que representaban la secuencia de aminoácidos de H3 humana desde los residuos 21-44 (H3:21-44) con la lisina 27 representada como la amina de la cadena lateral no modificada, monometilada, dimetilada o trimetilada, que consistía en la siguiente secuencia, en donde la lisina H3-K27 sujeta a modificación está subrayada, ATKAARK-SAPATGGVKKPHRYRPGG[K-Ahx-Biot]-amida (SEQ ID NO: 20). La biotina (Biot) se añadió a un residuo de lisina C-terminal (K) a través de un enlazador aminoálico (AHX) fijado a la amina de cadena lateral de lisina (21st Century Biochemicals). Para la comparación del mutante y la actividad de EZH2 WT y mutante, los péptidos H3:21-44 de la histona biotinilada se combinaron con una mezcla de S-adenosilmetionina (SAM; Sigma-Aldrich) y SAM tritiatada (³H-SAM; American Radiolabeled Chemicals) y PRC2 recombinante de 4 componentes en tampón de ensayo (BICINE 20 mM, DTT 1 mM, 0,002% de Tween 20, 0,005% de gelatina de piel bovina (BSG), pH 7,6). Las reacciones se dejaron proceder durante el intervalo de tiempo indicado y después se inactivaron mediante la adición de un exceso de SAM fría (100 µM de concentración final). Las mezclas de reacción inactivadas se transfirieron a una Flashplate recubierta con estreptavidina (Perkin Elmer, número de catálogo SMP410) y se permitió la unión durante una hora antes de lavar las placas en una lavadora de placas Biotek EL-405x y se hizo una lectura del centelleo y la luminiscencia en un TopCount NXT HTS (Perkin Elmer).

Ejemplo 14 - Enzimología

Los complejos PRC2 recombinantes de 4 componentes se prepararon con EZH2 de tipo natural y versiones de mutantes A677G o A687V de EZH2 (véase el Ejemplo 12 anteriormente; Cao et al (2004) Mol Cell 15:57-67). En cada complejo se sometió a ensayo inicialmente la capacidad para catalizar la transferencia de ³H-metilo desde la S-adenosil metionina (SAM) marcada a cada uno de los cuatro péptidos H3:21-44. La enzima se diluyó en serie y se añadió una mezcla de péptido (200 nM) y SAM (³H-SAM 200 nM y SAM no marcada 800 nM). Las reacciones se inactivaron a intervalos de 15 minutos mediante la adición de un exceso de SAM no marcada y la velocidad de la reacción se calculó basándose en la regresión lineal de los recuentos en bruto por minuto (CPM) frente al tiempo. Como se muestra en la Figura 15, las enzimas mutantes mostraban un patrón de actividad diferente que el de la enzima de tipo natural. Los mutantes A677G y A687V tenían una actividad fuerte sobre todos los péptidos H3:21-44 no metilados, monometilados y dimetilados, mientras que la enzima de tipo natural solo mostraba una actividad fuerte sobre los péptidos no metilados y monometilados. El péptido de control, que contenía H3-K27 completamente trimetilada no estaba metilado en el ensayo, lo que indica que H3-K27 era la lisina diana.

40 Ejemplo 15 - Enzimología

Para entender mejor la actividad enzimática de esos mutantes, los orígenes de las especificidades de sustrato diferenciales de EZH2 de tipo natural y mutante se exploraron a través de la cinética enzimática en estado estacionario. Se realizaron reacciones que contenían una valoración de los péptidos H3-K27 con una enzima fijada (4 nM) y SAM (³H-SAM 200 nM y SAM no marcada 800 nM). En todos los casos, los sustratos peptídicos mostraban un comportamiento de unión sigma; por lo que la concentración de péptido que daba lugar a la velocidad media-máxima se indica en ese caso como $K_{1/2}$ en lugar de la constante más común de Michaelis-Menten, K_m (Copeland (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists, Wiley). Como se resume en la Tabla 6, las mutaciones tienen un efecto sobre el reconocimiento del sustrato en estado fundamental, tal y como se demuestra por una $K_{1/2}$ más baja para los sustratos peptídicos no metilados y valores de $K_{1/2}$ más elevados para los sustratos peptídicos dimetilados. Además, las velocidades máximas de las enzimas están afectadas por las mutaciones. La mutación A677G conduce a incrementos de 2,9, 3,7 y 22 veces de k_{cat} sobre los sustra-

tos respectivos del péptido H3-K27 no metilado, monometilado y dimetilado, mientras que la mutación A687V da lugar a una reducción de 3 veces en la k_{cat} sobre el péptido H3-K27 no metilado, pero produce incrementos respectivos de 3,5 y 2,5 veces de k_{cat} sobre los péptidos H3-K27 monometilados y dimetilados. La K_m de SAM mostraba una variación mínima entre las formas de la enzima, 403 ± 64 nM a 899 ± 89 nM en el sustrato que contenía el estado de metilación preferido en el residuo de H3-K27.

5

Tabla 6. Resumen de las cinéticas enzimáticas en estado estacionario para enzimas EZH2 WT y mutantes

Enzima	Estado de metilación de H3-K27 sobre sustrato peptídico	$K_{1/2}$ (nM)	k_{cat} (h ⁻¹)	$k_{cat}/K_{1/2}$ (h ⁻¹ ·nM ⁻¹ × 10 ⁻⁴)
*WT	0	154 ± 12	$4,80 \pm 0,20$	305 ± 26
	1	337 ± 26	$3,33 \pm 0,21$	99 ± 9
	2	144 ± 11	$1,08 \pm 0,04$	75 ± 6
A677G	0	88 ± 6	$14,05 \pm 0,54$	1590 ± 120
	1	222 ± 51	$12,25 \pm 1,67$	570 ± 150
	2	522 ± 117	$23,85 \pm 3,60$	450 ± 120
A687V	0	43 ± 3	$1,58 \pm 0,08$	370 ± 30
	1	176 ± 13	$11,49 \pm 0,50$	650 ± 60
	2	352 ± 155	$2,70 \pm 0,65$	80 ± 40

*Los datos del tipo natural se publicaron anteriormente en Wigle et al., Febs Lett (2011) oct 3; 585(19):3011-4 usando EZH2 de 4 componentes.

Ejemplo 16 - Inhibición de EZH2 de tipo natural y EZH2 mutantes mediante inhibidores de EZH2

Los compuestos del ensayo se diluyeron en serie 3 veces en DMSO en una curva de 10 puntos y 1 μ L se colocó en una microplaca de 384 pocillos por duplicado utilizando un PlateMate Plus equipado con un cabezal de 384 canales (Thermo Scientific). La concentración superior final de compuestos de ensayo en el ensayo era de 10 μ M. El control positivo (100% de patrón de inhibición) tenía una concentración final de 1 mM de SAH y el control negativo (0% de patrón de inhibición) contenía 1 μ L de DMSO. Los compuestos del ensayo se incubaron después durante 30 minutos con 40 μ L por pocillo de EZH2 de tipo natural (la concentración final era de 4 nM), EZH2 Y641F (la concentración final era de 0,1 nM) y EZH2 A677G y A687V (para cada uno, la concentración final era de 2 nM) y el péptido en tampón de ensayo IX (BICINE 20 mM pH = 7,6, DTT 1 mM, 0,002% de Tween 20, 0,005% de BSG). Para los ensayos de EZH2 de tipo natural y EZH2 A677G, estaba presente péptido biotinilado H3:21-44 con K27 sin metilar a una concentración final de 200 nM, mientras que en el ensayo de EZH2 A687V, el péptido biotinilado H3:21-44 con K27 monometilada, estaba presente a una concentración final de 200 nM y en el ensayo de EZH2 Y641F, el péptido biotinilado H3:21-44 con K27 dimetilada, estaba presente a una concentración final de 200 nM. Para iniciar la reacción que contenía la enzima EZH2 de tipo natural, se añadió una mezcla de sustrato de 10 μ L por pocillo que contenía SAM sin marcar (la concentración final era de 1800 nM) y ³H-SAM (la concentración final era de 200 nM) en tampón de ensayo IX. Para iniciar la reacción que contenía la enzima EZH2 Y641F, se añadió una mezcla de sustrato de 10 μ L por pocillo que contenía SAM sin marcar (la concentración final era de 700 nM) y ³H-SAM (la concentración final era de 300 nM) en tampón de ensayo IX. Para iniciar las reacciones que contenían EZH2 A677G o A687V, se añadió una mezcla de sustrato de 10 μ L por pocillo que contenía SAM sin marcar (la concentración final era de 400 nM) y ³H-SAM (la concentración final era de 100 nM). Las reacciones prosiguieron durante 90 min, a continuación, se inactivaron con un exceso de SAM sin marcar (167 μ M), a continuación, se transfirieron a una Flashplate recubierta con estreptavidina (Perkin Elmer, número de catálogo SMP410), se permitió la unión durante una hora y se detectó en un TopCount NXT HTS (Perkin Elmer). Los valores de CI_{50} se obtienen a partir de ajustes de 4 parámetros del % de inhibición de la actividad enzimática y se tabulan en la Tabla 7. Las fórmulas utilizadas para derivar los valores de CI_{50} se indican a continuación.

Cálculo del % de inhibición

$$\% \text{ inh} = 100 - \left(\frac{dpm_{cmpd} - dpm_{min}}{dpm_{max} - dpm_{min}} \right) \times 100$$

35 en donde dpm = desintegraciones por minuto, cmpd = señal en el pocillo del ensayo, y mínimo y máximo son los respectivos controles de señal mínima y máxima.

Ajuste de CI_{50} de cuatro parámetros

$$Y = \frac{Inferior + \frac{(Superior - Inferior)}{(1 + (\frac{X}{CI_{50}})^{Coeficiente\ de\ Hill})}}{}}$$

en donde el valor superior y el valor inferior son los que normalmente se permite que varíen, pero se pueden fijar a 100 o 0, respectivamente, en un ajuste de 3 parámetros. El coeficiente de Hill permitía normalmente la variación, pero también se puede fijar en 1 en un ajuste de 3 parámetros. Y es el % de inhibición y X es la concentración del compuesto.

5

Tabla 7. Inhibición de EZH2 de tipo natural y mutante mediante inhibidores de EZH2

Número de compuesto	Inhibidor de EZH2	WT (uM)	Y641F (uM)	A677G (uM)	A687V (uM)
1. (referencia)	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
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

Número de compuesto	Inhibidor de EZH2	WT (uM)	Y641F (uM)	A677G (uM)	A687V (uM)
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
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

Ejemplo 17 - El mutante A677 muestra la mayor sensibilidad frente a los inhibidores de EZH2

Las células Pfeiffer se obtuvieron en la ATCC (CRL-2632). Las células WSU-DLCL2 (ACC 575) y OCI-Ly19 (ACC 528) se obtuvieron a partir de DSMZ. Todas las células se conservaron en RPMI + 10% de FBS. Para el análisis de

5 la proliferación celular, las células Pfeiffer, WSU-DLCL2 u OCI-Ly19 con crecimiento exponencial se sembraron por triplicado, en placas de 96 pocillos con una densidad de 1×10^5 células/ml, 5×10^4 células/ml o $2,5 \times 10^5$ células/ml (respectivamente) en un volumen final de 150 μ l. Las células se incubaron con el Compuesto nº 7 con concentraciones finales que oscilaban de 0,011 a 25 μ M para la determinación de la IC_{50} durante un curso de tiempo de 11 días. Las células se incubaron con el Compuesto nº 13 con concentraciones finales que oscilaban desde 0,00004 a 10 μ M para la determinación de la IC_{50} durante un curso de tiempo de 11 días. Cada 3-4 días, se determinó el número de células viables usando el ensayo Guava ViaCount (Millipore nº 4000-0040) y se analizaron en un instrumento

10 Guava EasyCyte Plus. Despues de los recuentos de células, el medio de crecimiento y el inhibidor de EPZ2 (Compuesto nº 7 o Compuesto nº 13) fueron sustituidos y las células se dividieron de nuevo hasta tener la densidad de las placas originales. Se usó el número final ajustado por las divisiones de células viables/ml desde el día 11 del curso de tiempo para calcular los valores de IC_{50} de la proliferación utilizando el programa informático Graphpad Prism.

15 La línea celular Pfeiffer, que contiene la mutación heterocigota A677G de EZH2, muestra que es sensible a la inhibi-

ción de EZH2 con un Compuesto nº 7 inhibidor de molécula pequeña. La inhibición de la proliferación se observa ya 96 h después del tratamiento con inhibidor. La IC_{50} de la proliferación después de 11 días para las células Pfeiffer tratadas con el Compuesto nº 7 es 5,2 nM, en comparación con las células WSU-DLCL2, que contienen la mutación heterocigota Y641F y tienen una IC_{50} de 270 nm o las células OCI-Ly19, que son WT para EZH2 y tienen una IC_{50} de 3000 nm. Estos resultados muestran que en un contexto celular, la sensibilidad de EZH2 WT y mutante frente a una inhibición con un inhibidor de molécula pequeña, es A677G >>> Y641F >> WT, medida mediante proliferación.

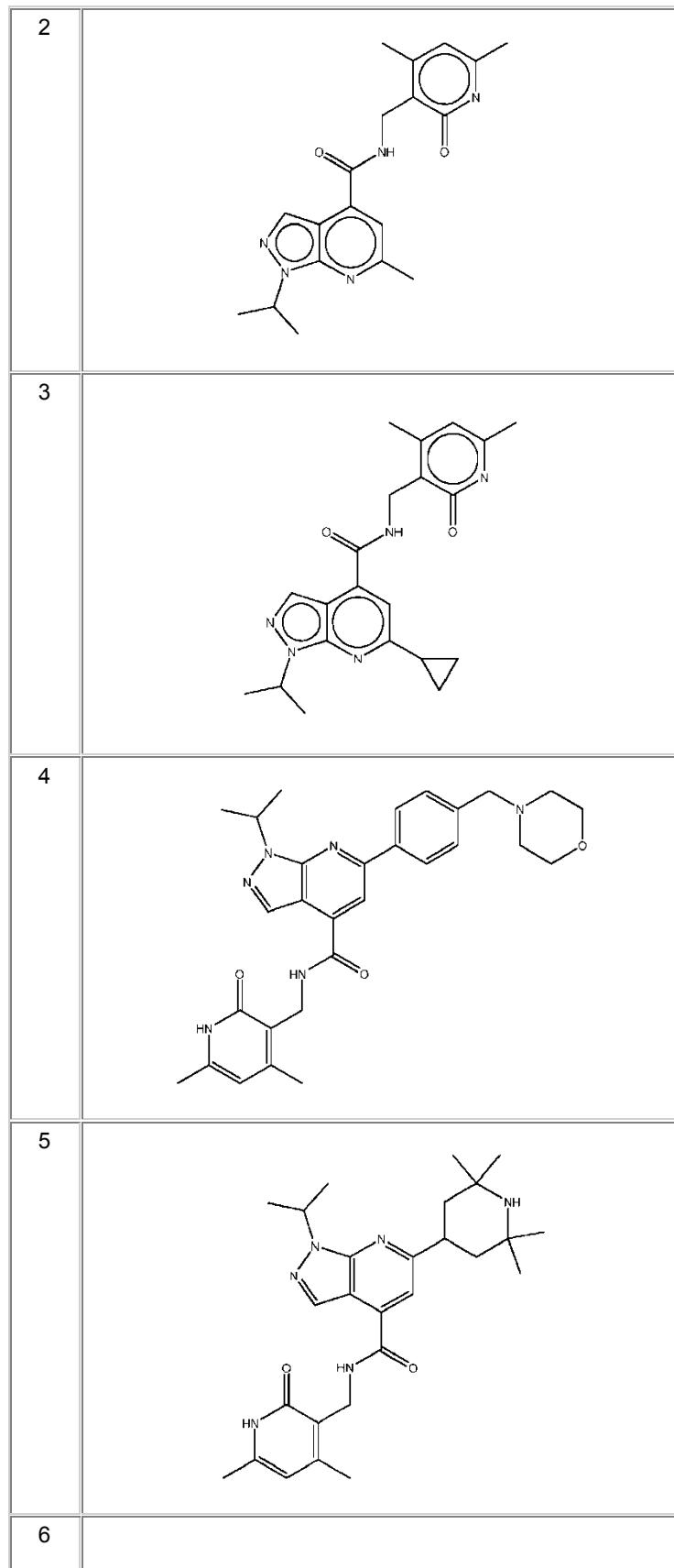
La línea celular Pfeiffer, que contiene la mutación heterocigota A677G de EZH2, muestra que es sensible a la inhibición de EZH2 con un Compuesto nº 13 inhibidor de molécula pequeña. La inhibición de la proliferación se observa ya 96 h después del tratamiento con inhibidor. La IC_{50} de la proliferación después de 11 días para las células Pfeiffer tratadas con el Compuesto nº 13 es 0,4 nM, en comparación con las células WSU-DLCL2, que contienen la mutación heterocigota Y641F y tienen una IC_{50} de 4,9 nM o las células OCI-Ly19, que son WT para EZH2 y tienen una IC_{50} de 430 nM. Estos resultados muestran que en un contexto celular, la sensibilidad de EZH2 WT y mutante frente a una inhibición con un inhibidor de molécula pequeña, es A677G >>> Y641F >> WT, medida mediante proliferación.

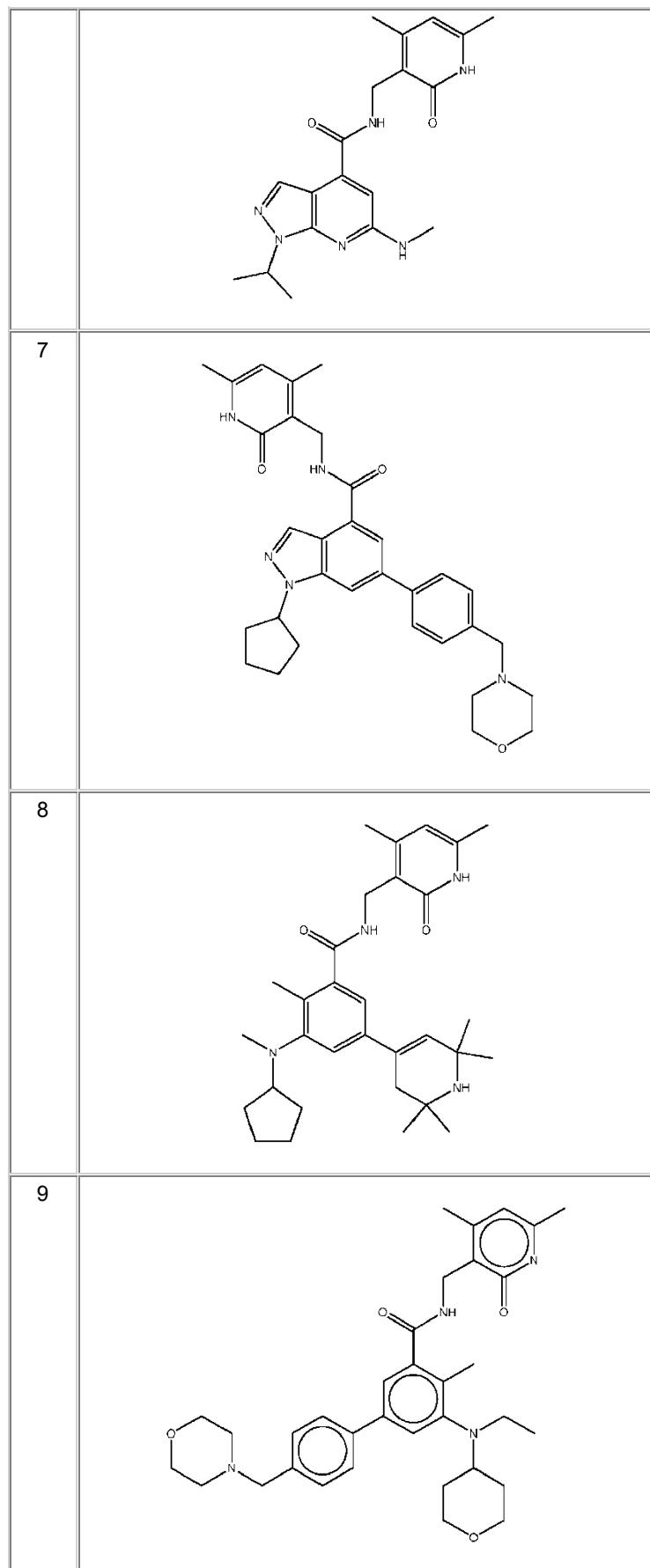
EQUIVALENTES

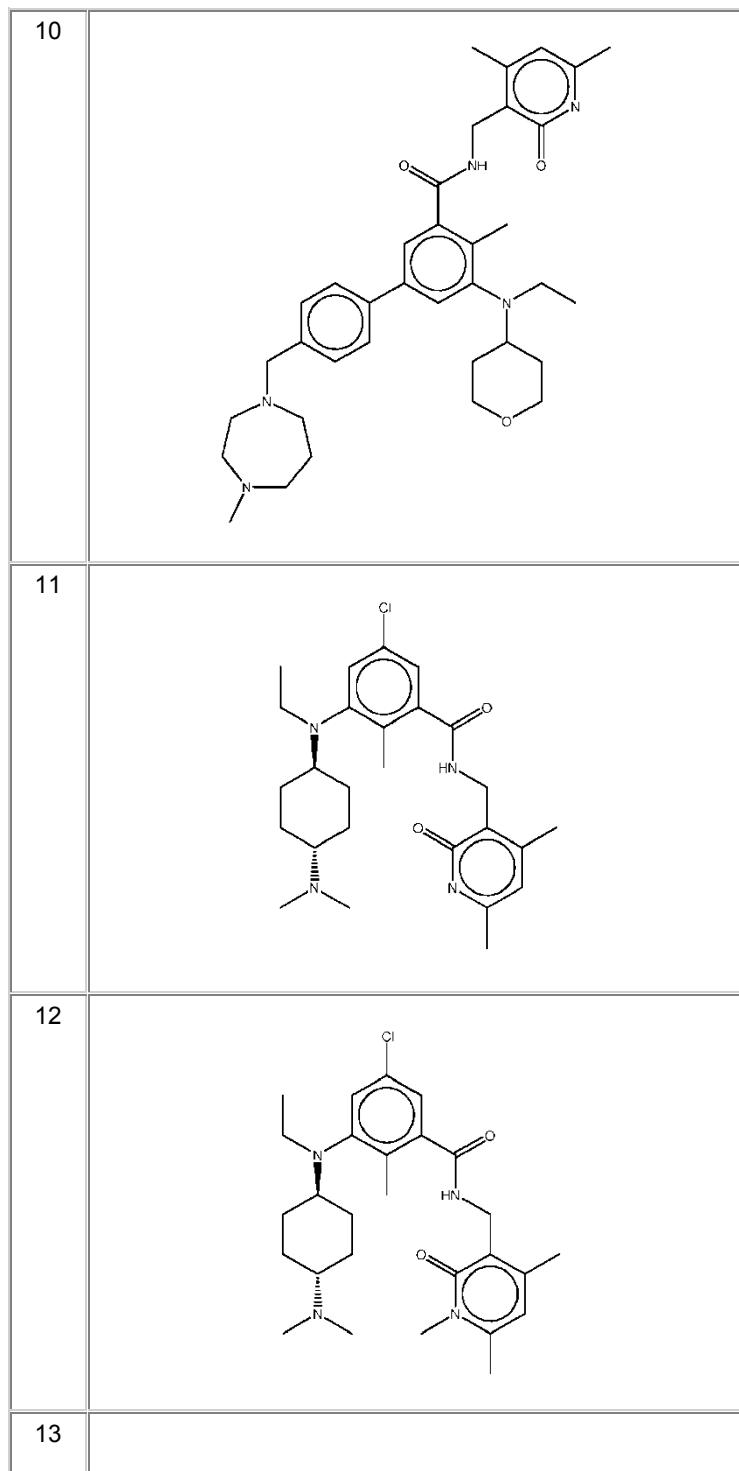
Aunque en este documento se han descrito e ilustrado diversas realizaciones de la presente invención, los expertos en la técnica fácilmente supondrán una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar las funciones y/u obtener los resultados y/o una o varias de las ventajas descritas en el presente documento. Más en general, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritas en este documento se entiende que son ejemplares y que los parámetros, dimensiones, materiales y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para las que se utilizan las enseñanzas de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar usando no más de una experimentación de rutina, muchos equivalentes para las realizaciones específicas de la invención, descritas en este documento. Por lo tanto, se debe entender que las realizaciones precedentes se presentan solamente a modo de ejemplo y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas, la invención se puede poner en práctica de otra manera que como se ha descrito específicamente. La presente invención se dirige a cada característica, sistema, artículo, el material, kit y/o método individual descrito en este documento. Además, cualquier combinación de dos o más de tales características, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos, si tales características, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos no son mutuamente incompatibles, se incluye dentro del alcance de la presente invención.

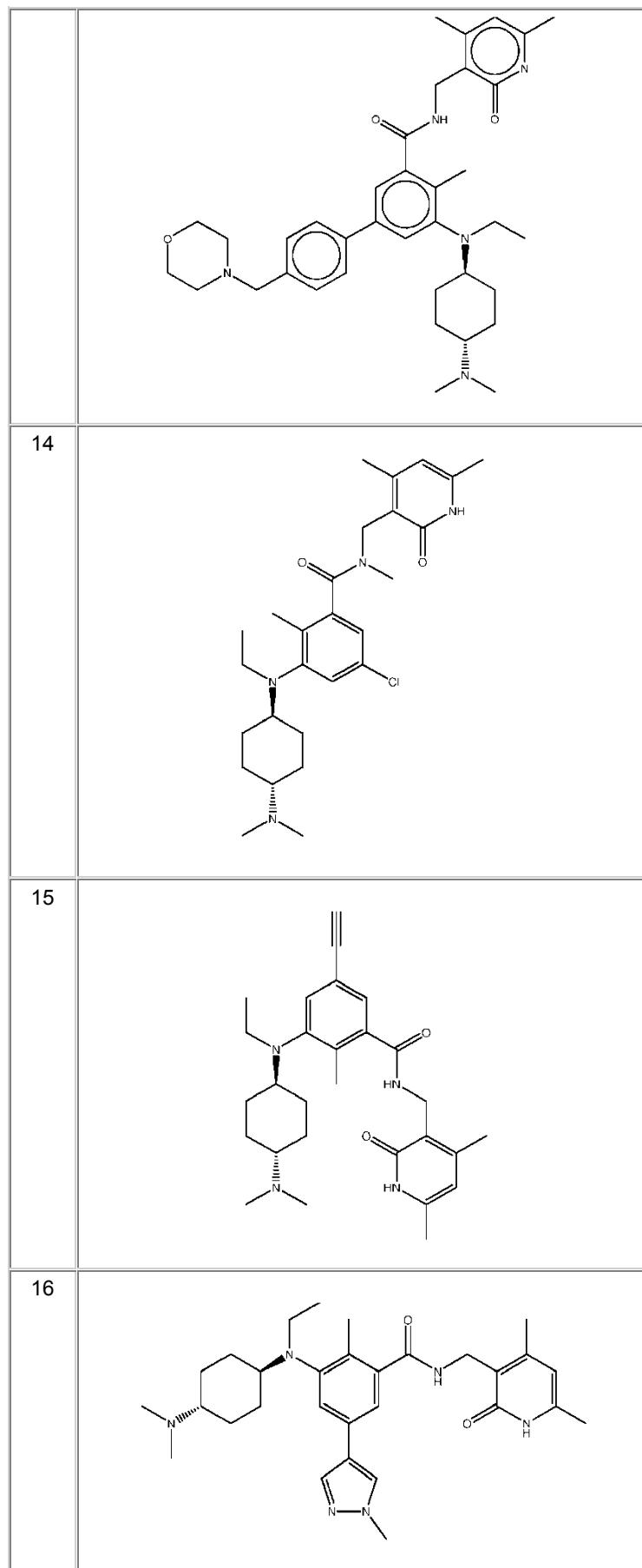
REIVINDICACIONES

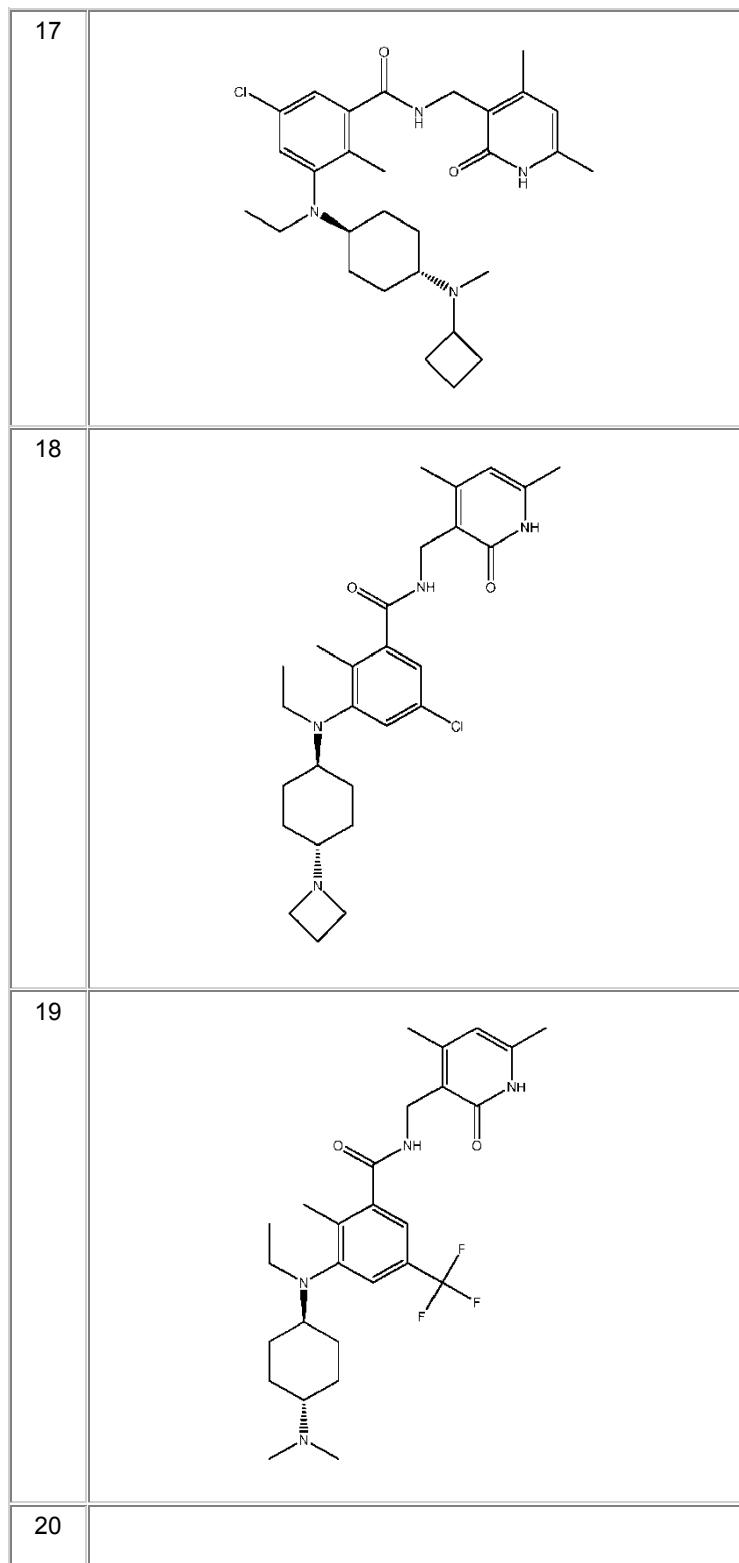
1. Un inhibidor de EZH2 seleccionado a partir del compuesto 2 hasta el compuesto 62,

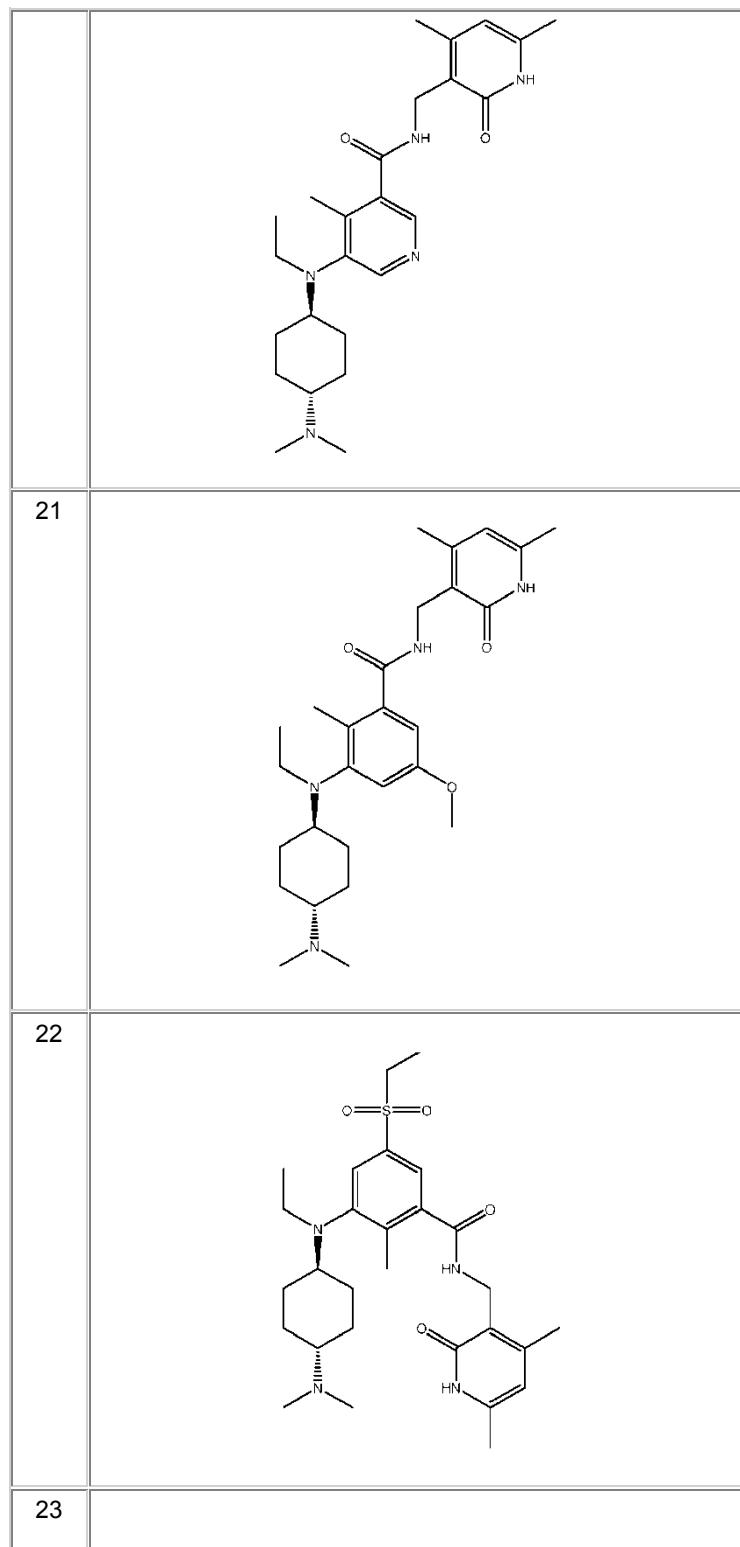


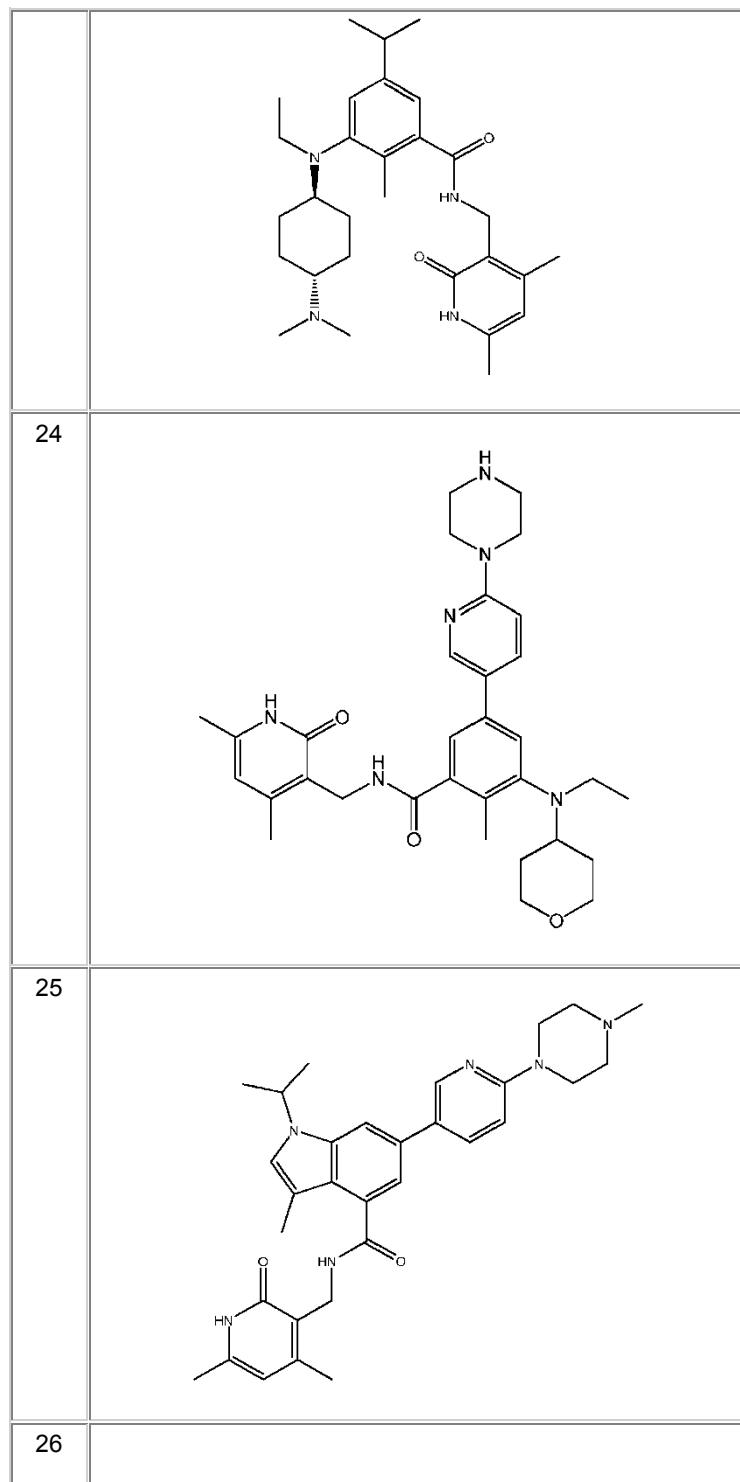


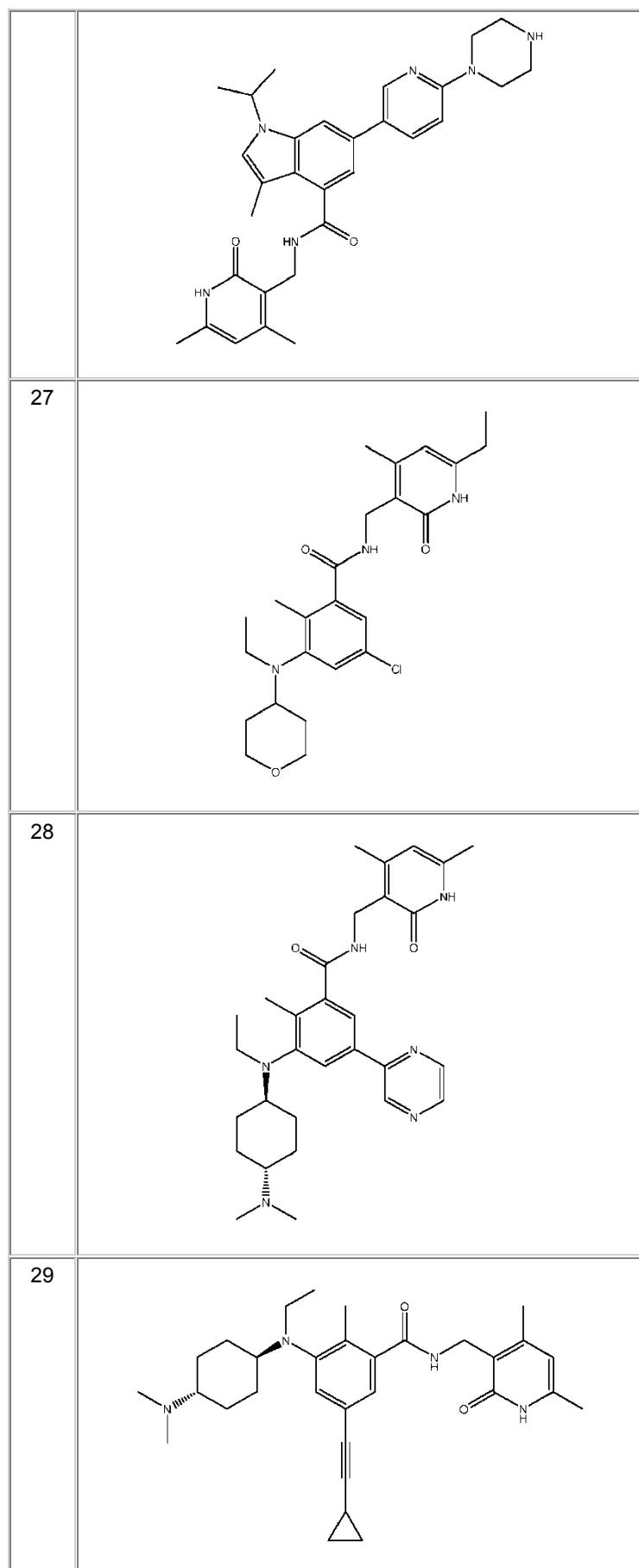


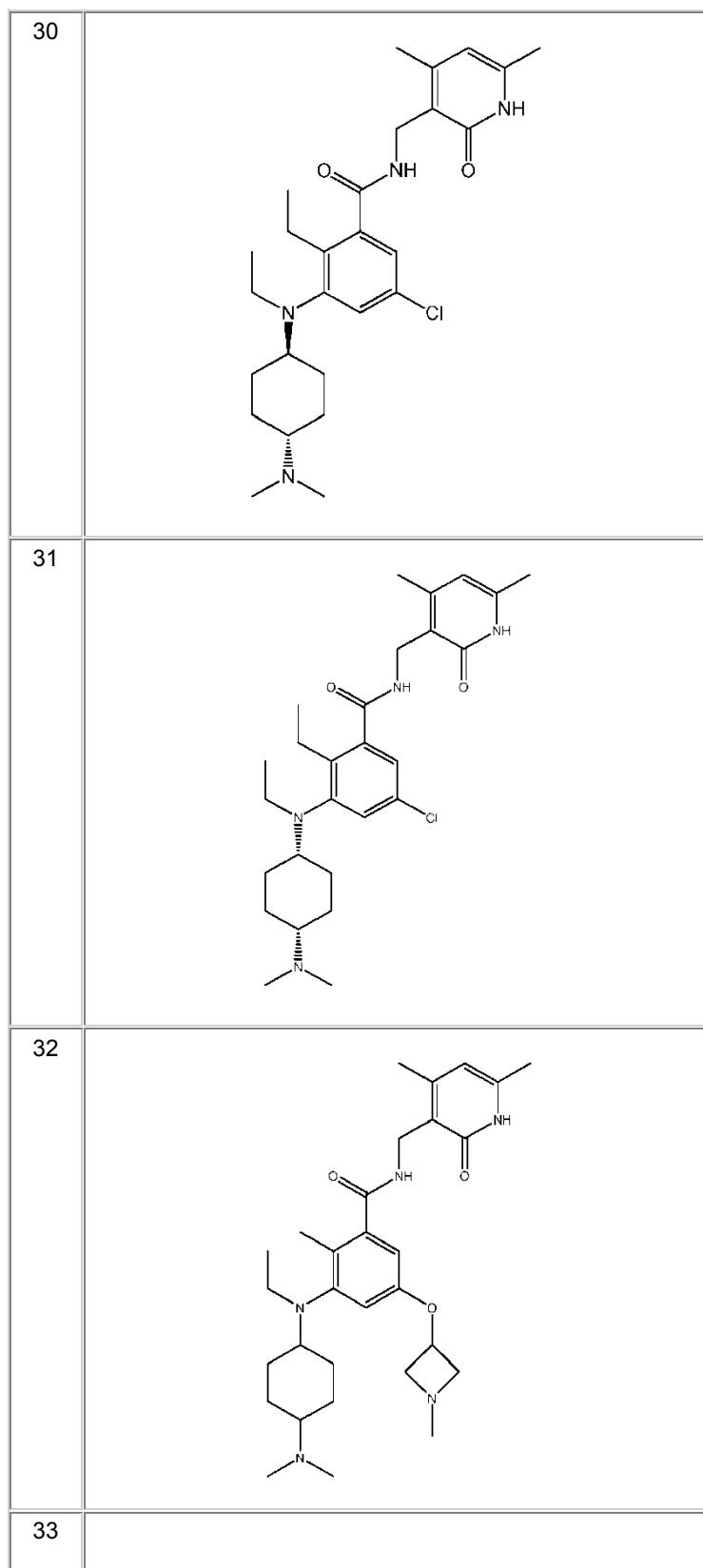


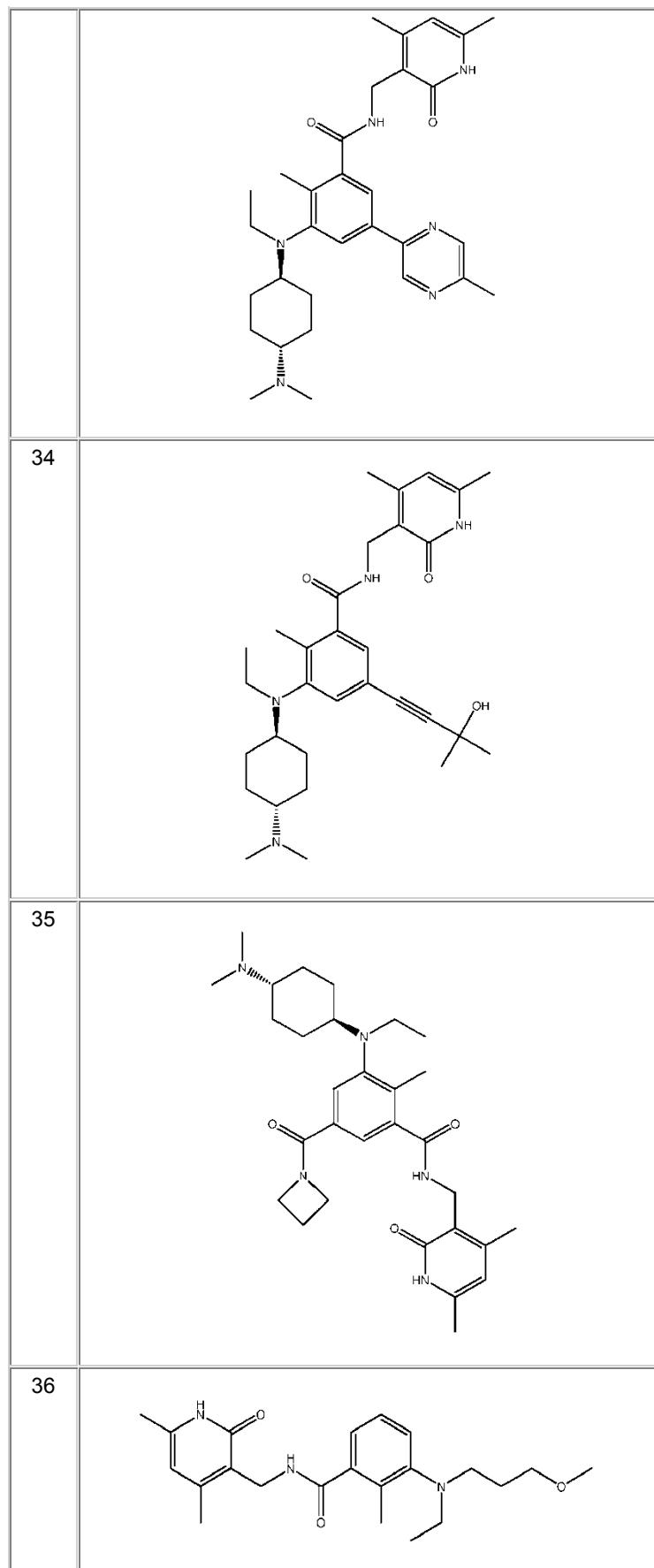


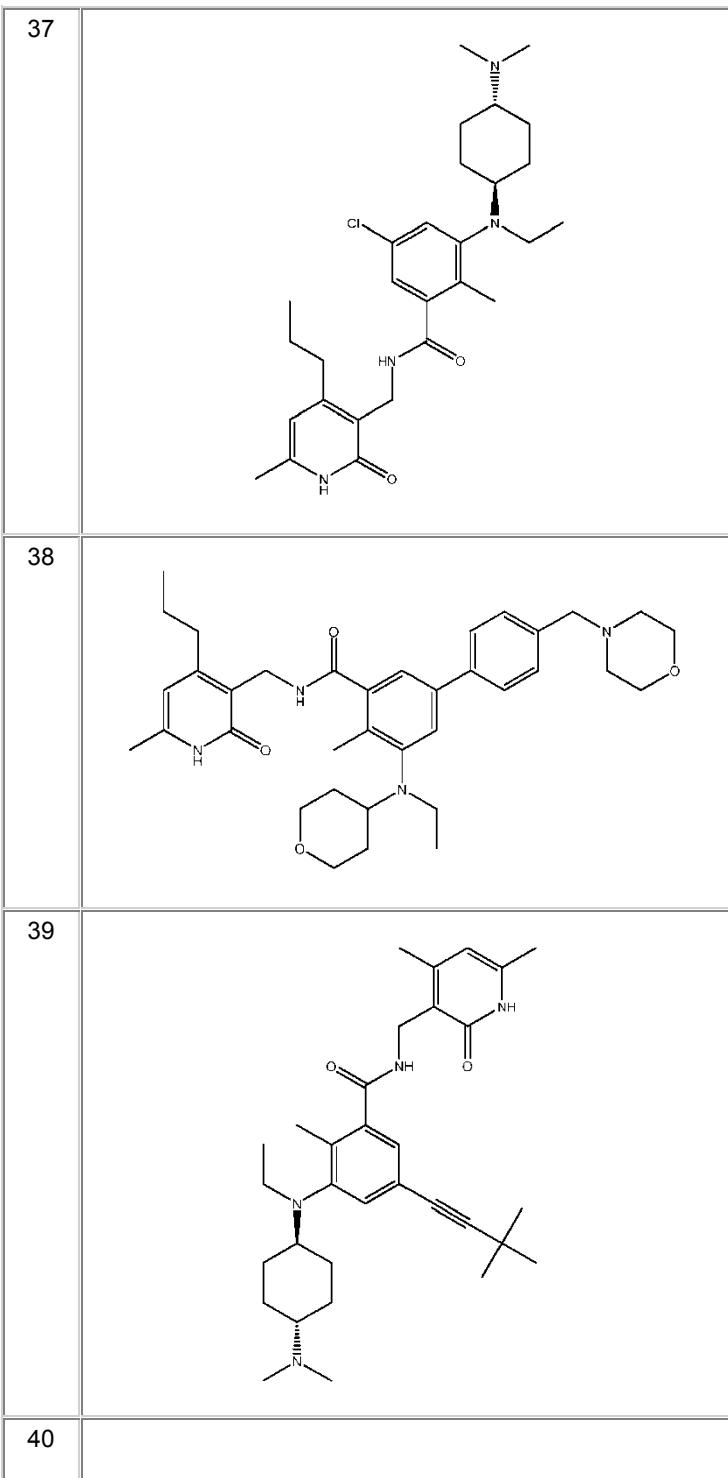


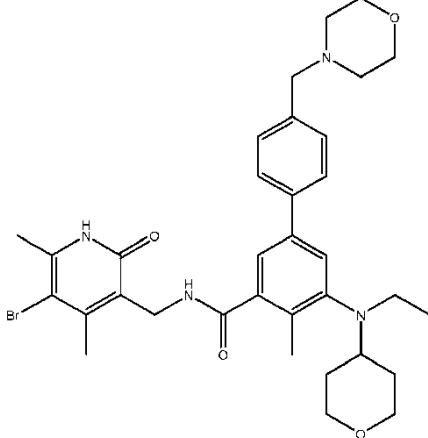
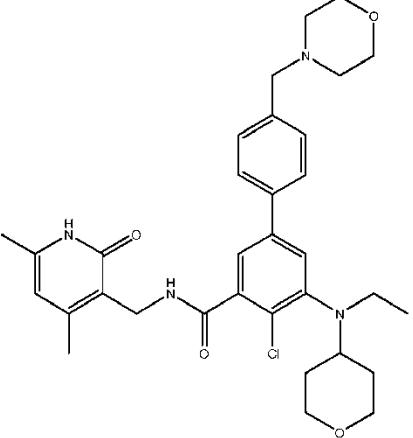
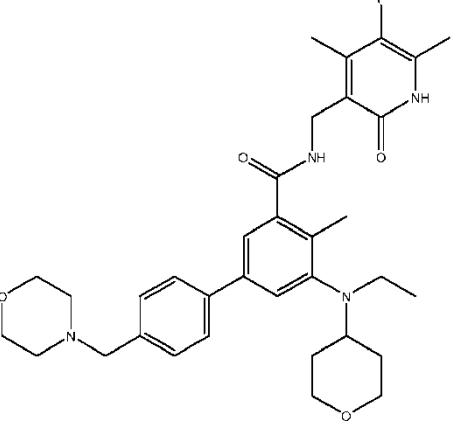




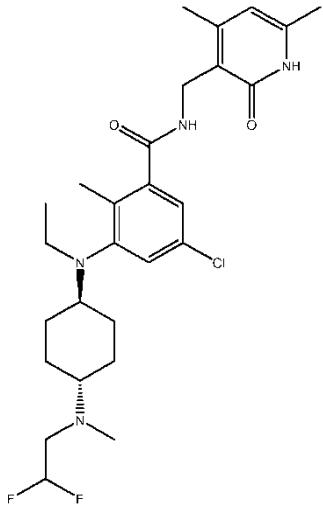
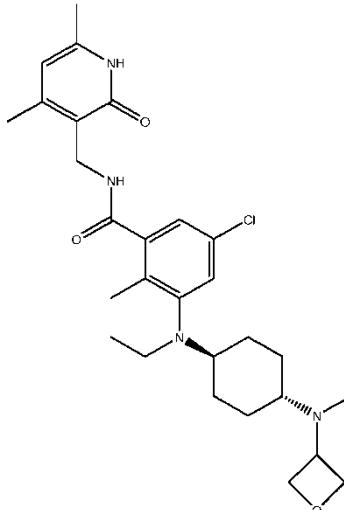
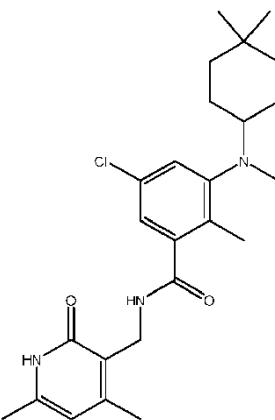


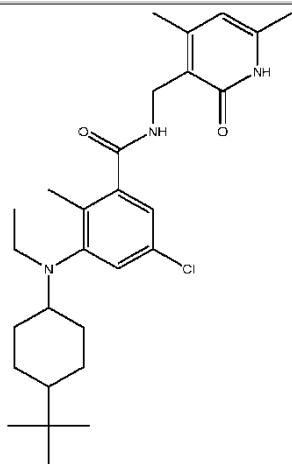




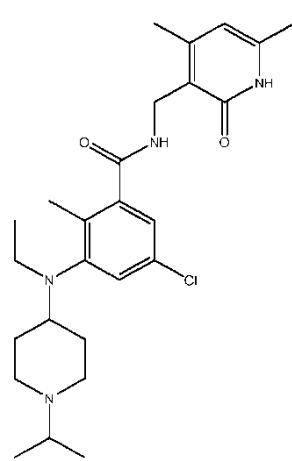
	
41	
42	
43	

44	
45	
46	

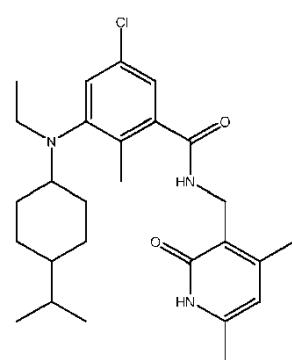
	
47	
48	
49	



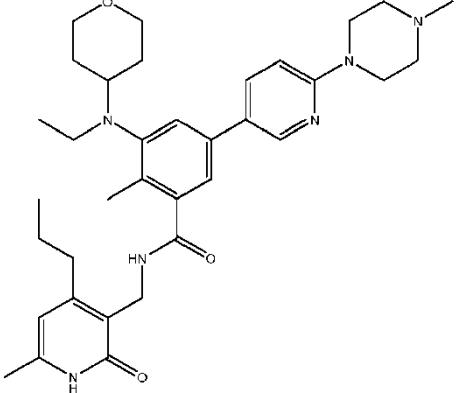
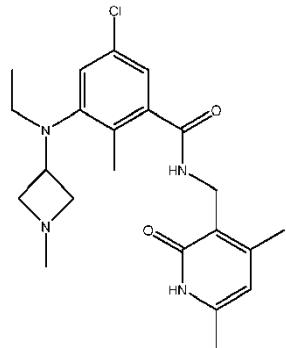
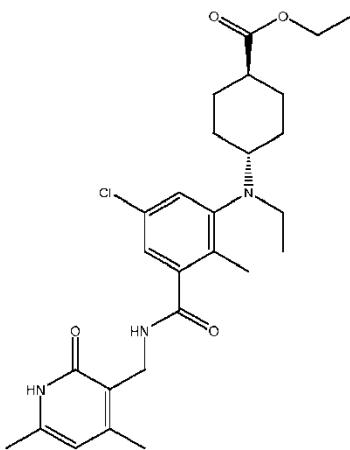
50

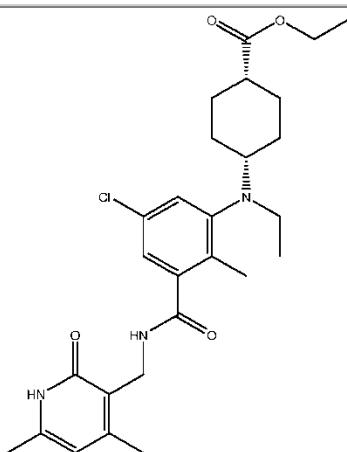


51

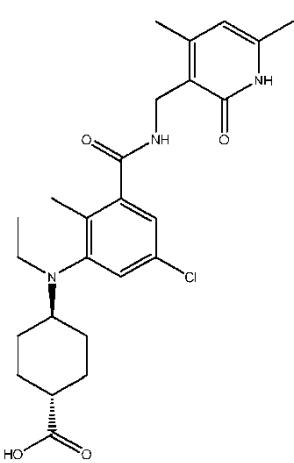


52

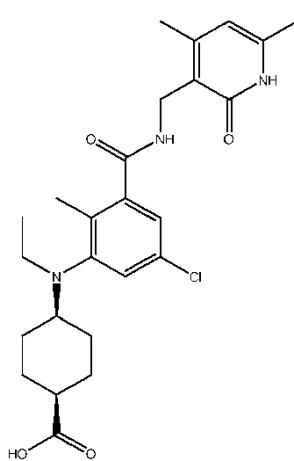
		
53		
54		
55		



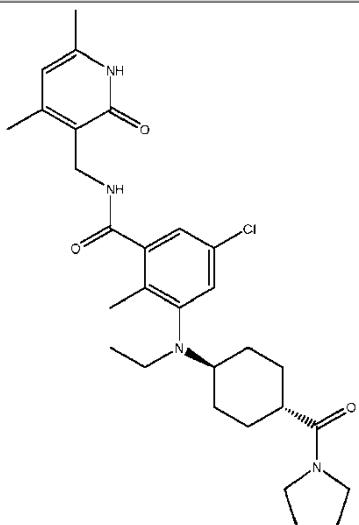
56



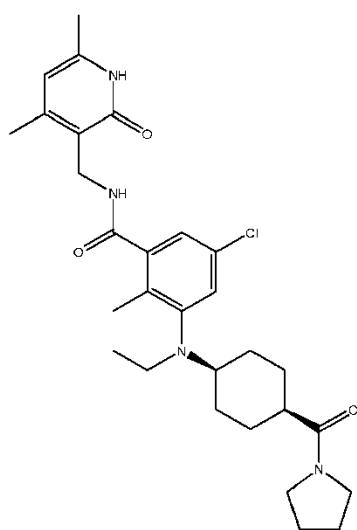
57



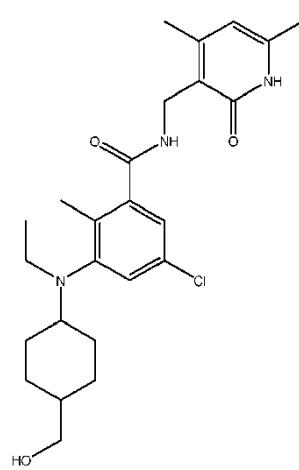
58



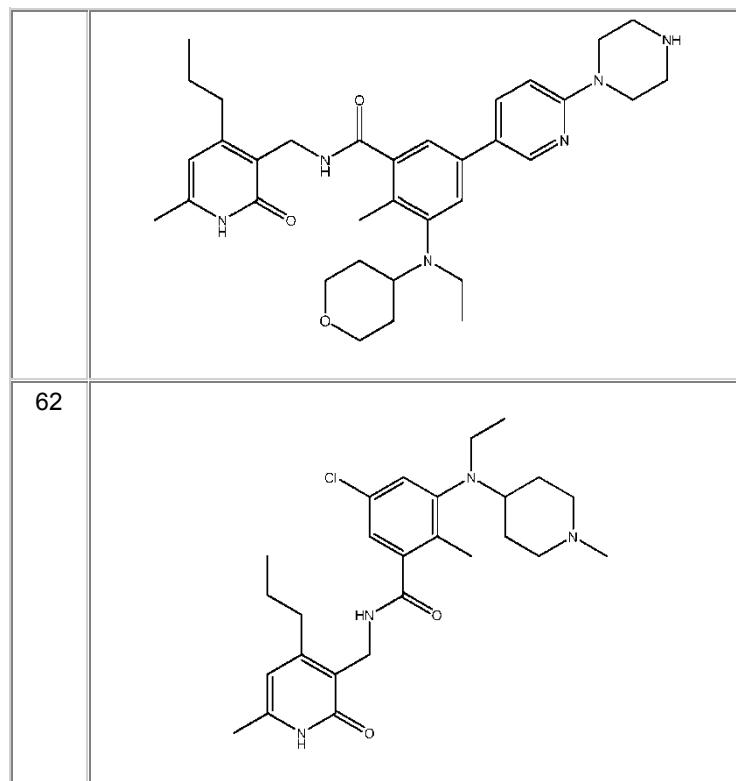
59



60

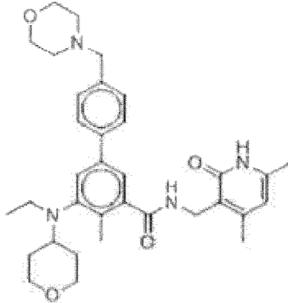


61



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en un método de tratamiento del cáncer o de síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como preleucemia) en un sujeto que expresa una EZH2 mutante, en donde la EZH2 mutante comprende una mutación por sustitución en la posición de los aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID No: 1.

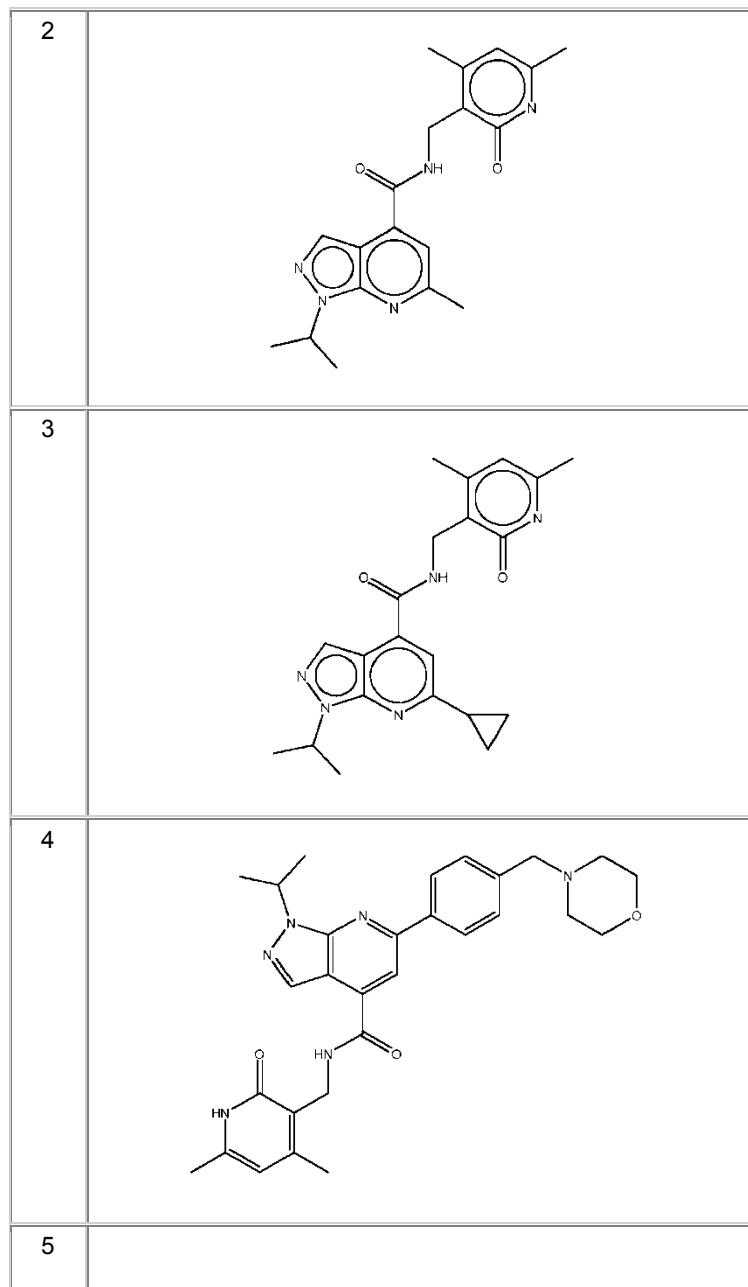
- 5 2. Un inhibidor de EZH2 para el uso según la reivindicación 1, en donde la EZH2 mutante comprende más de una mutación por sustitución en la posición de los aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID No: 1.
3. Un inhibidor de EZH2 para el uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de EZH2 es

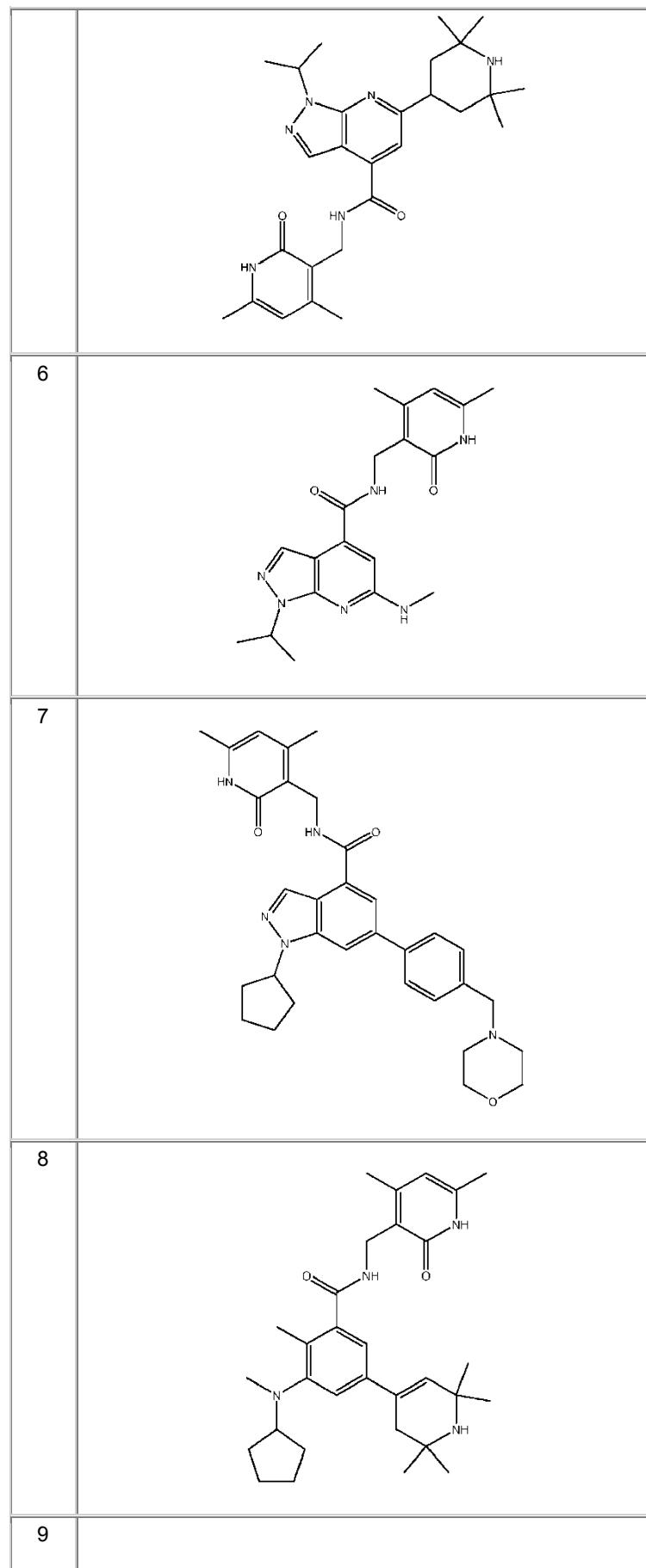


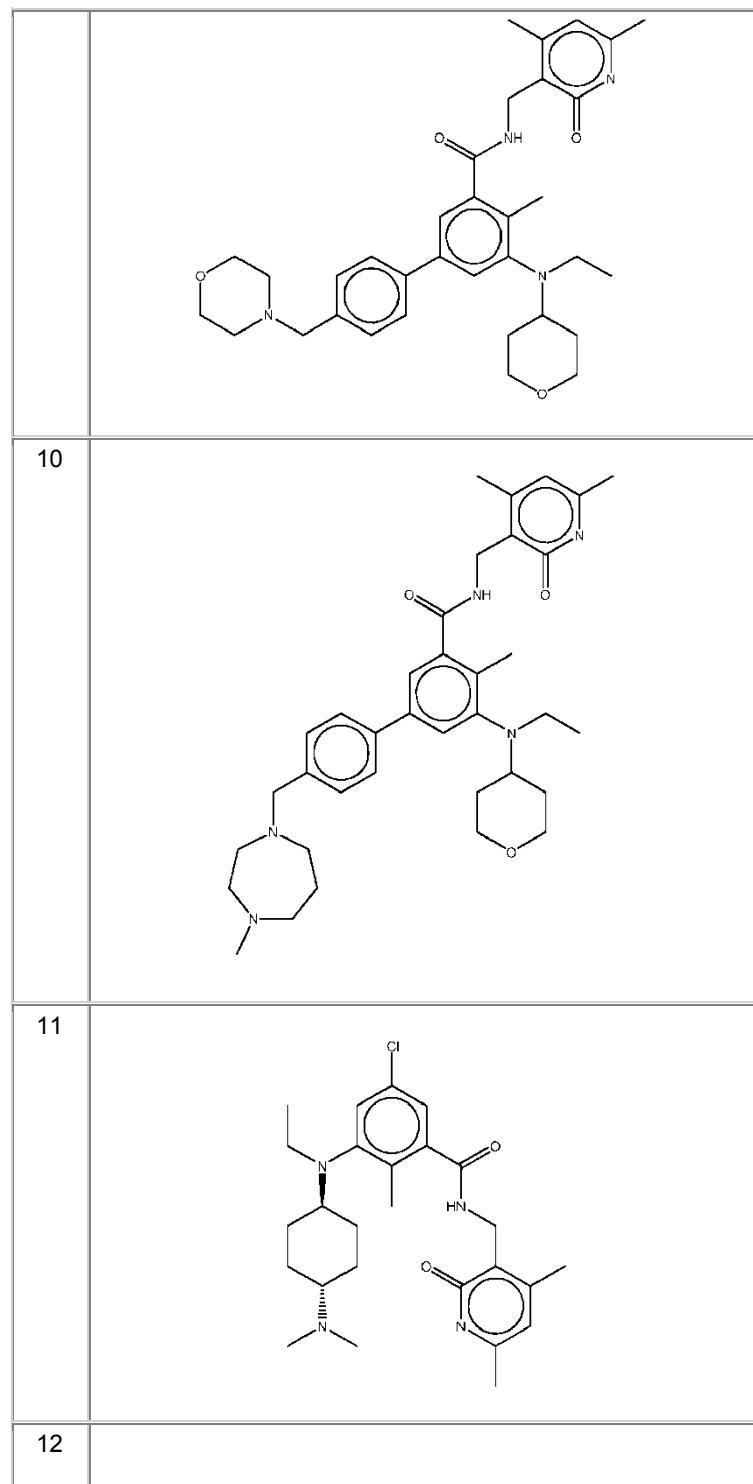
- 10 4. Un inhibidor de EZH2 para el uso según la reivindicación 1, en donde el cáncer se selecciona a partir de
- linfoma, opcionalmente en donde el linfoma se selecciona a partir del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, linfoma folicular y linfoma difuso de linfocitos B grandes, o
 - leucemia, opcionalmente en donde la leucemia es leucemia mieloide crónica (LMC),
 - melanoma.
- 15 5. Un inhibidor de EZH2 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicha mutación se selecciona a partir del grupo que consiste en una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una
- 20

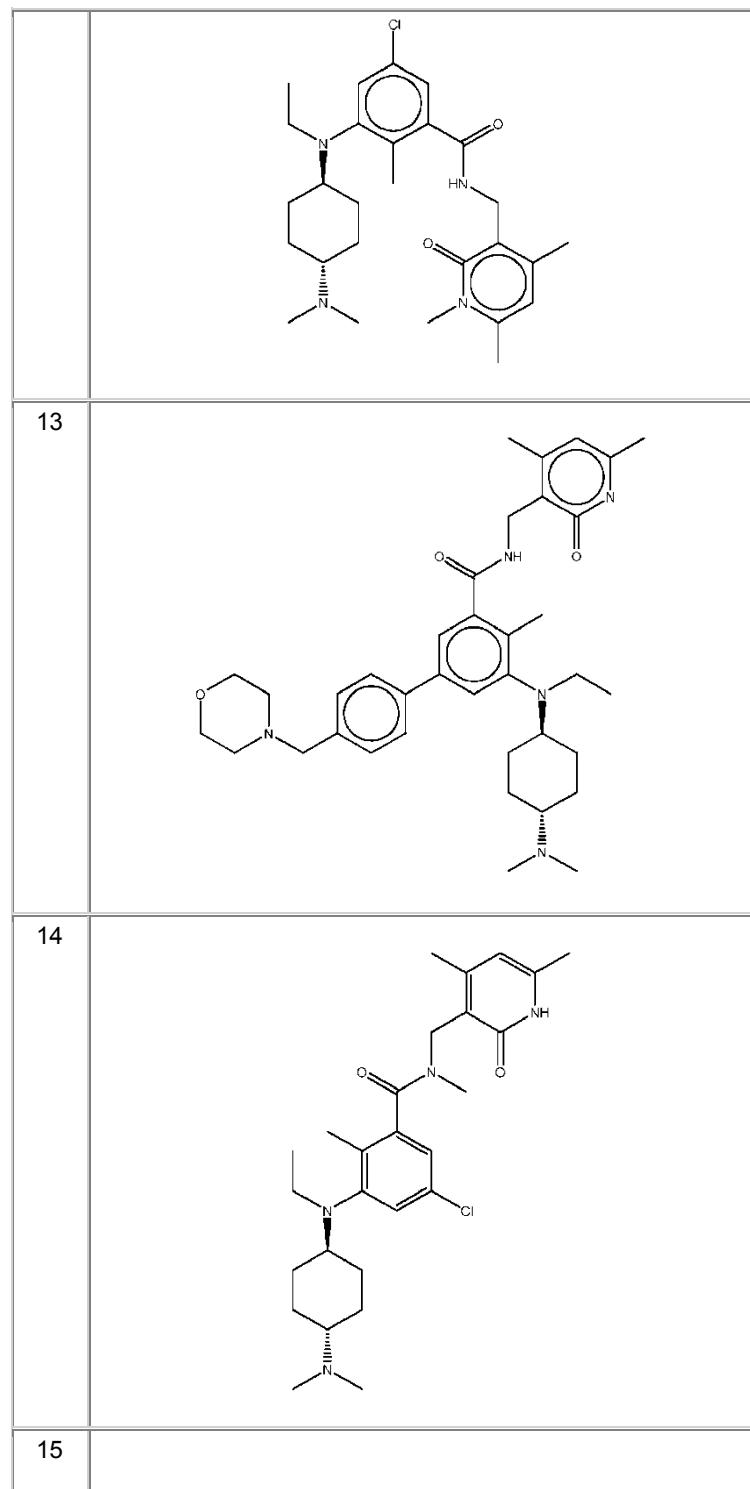
sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); y una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C).

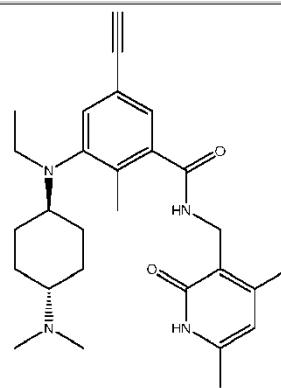
- 5 6. Un método para determinar *in vitro* la sensibilidad de un sujeto que tiene cáncer o síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como preleucemia), frente a un inhibidor de EZH2 seleccionado a partir del compuesto 2 al compuesto 62,



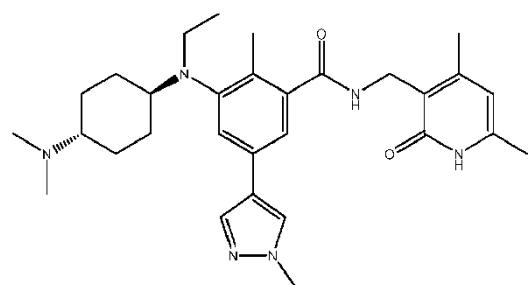




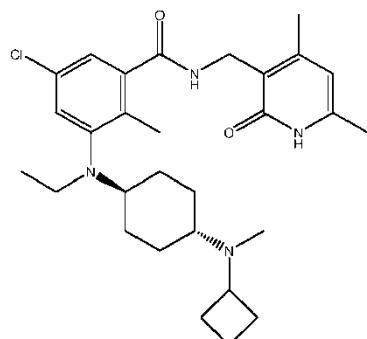




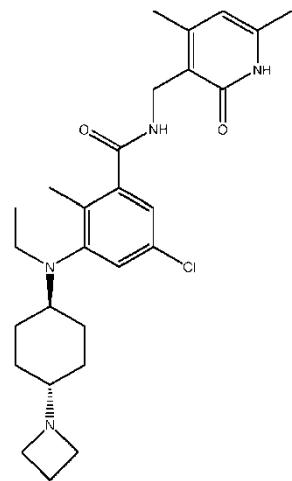
16



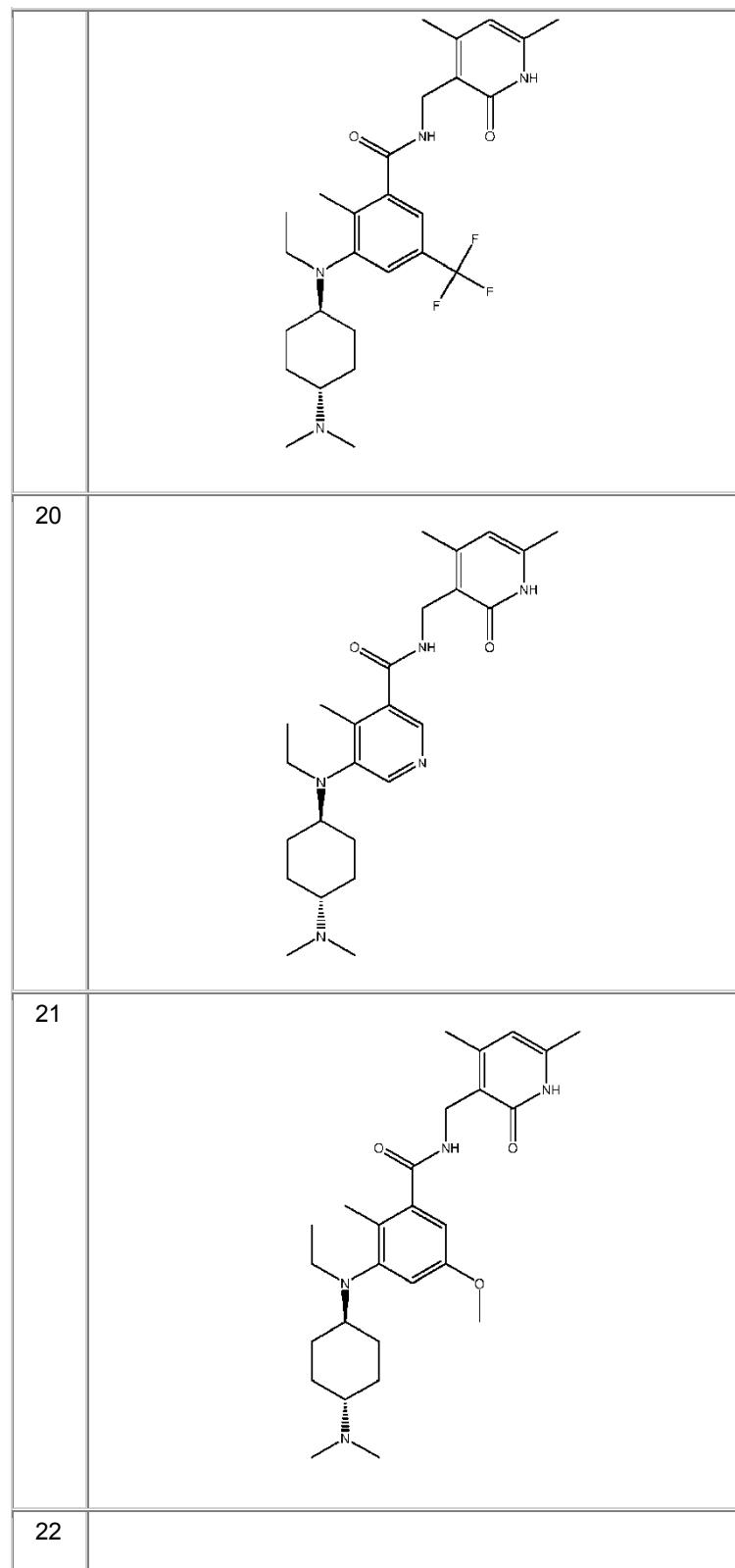
17

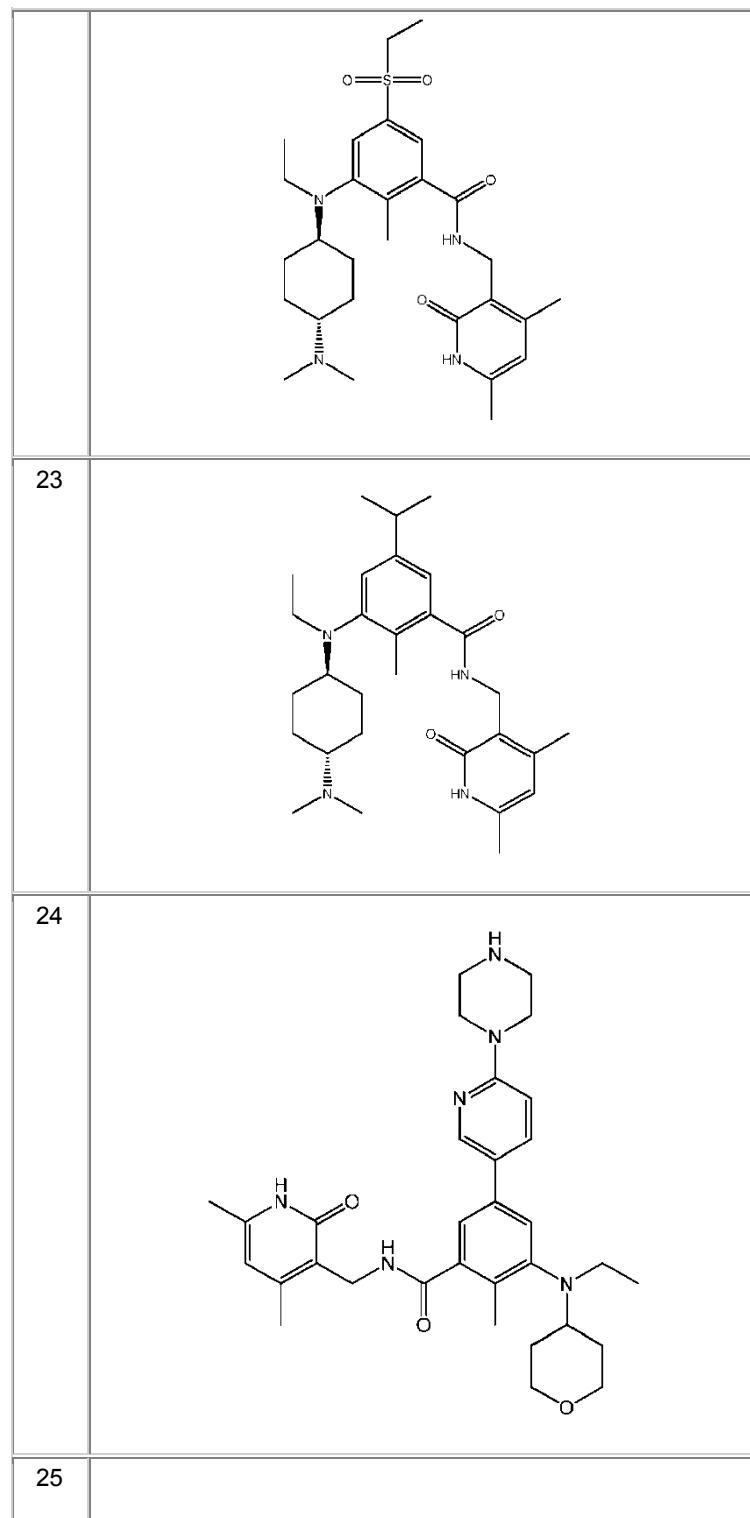


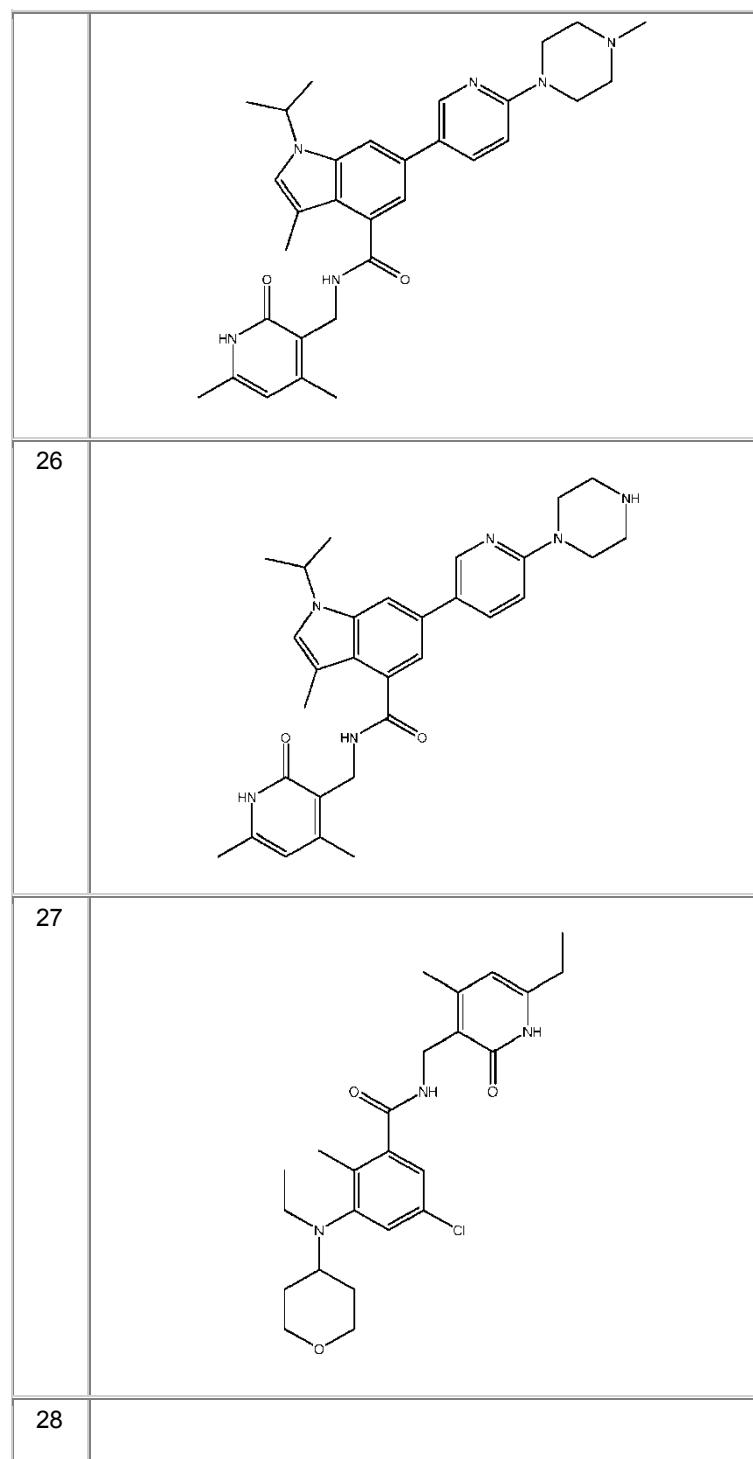
18

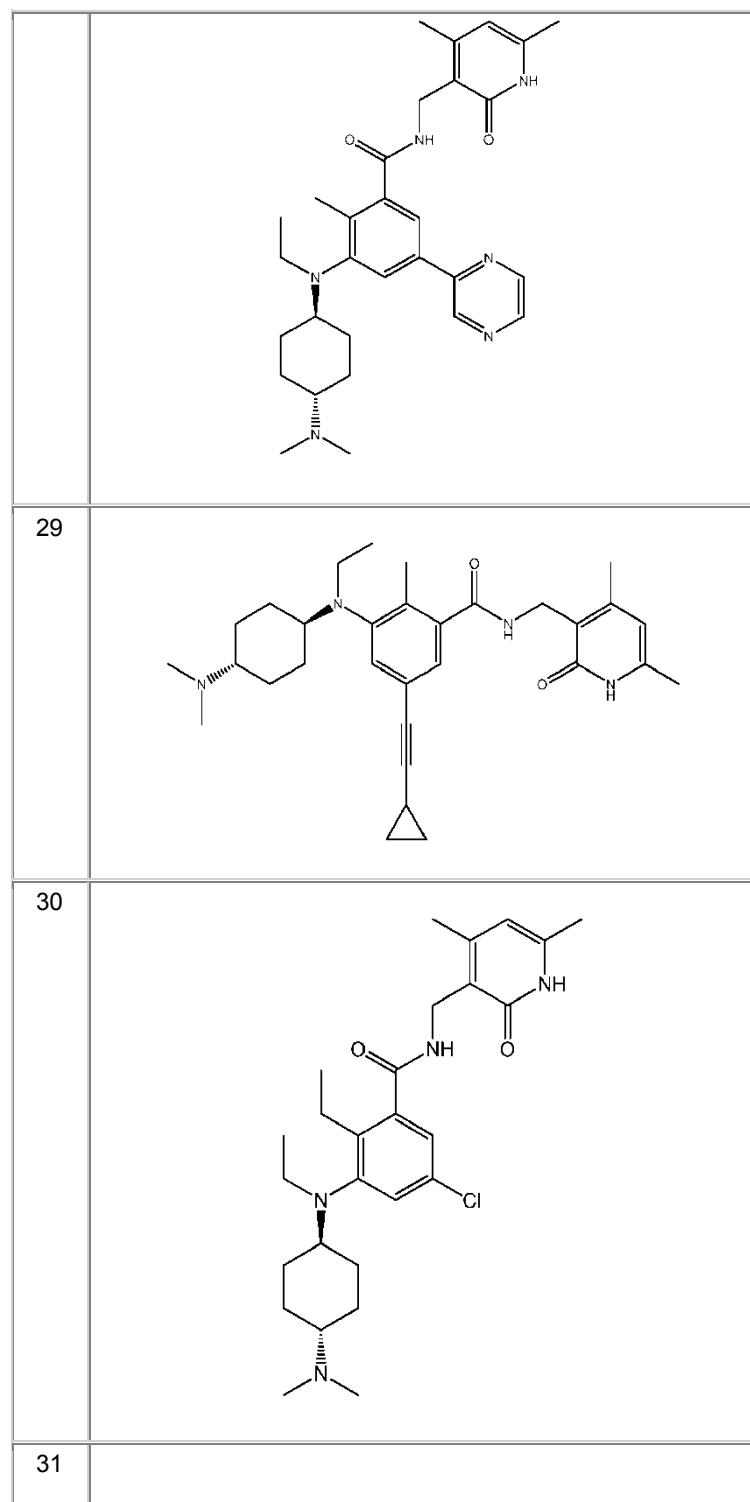


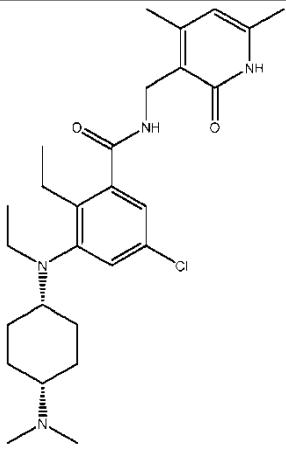
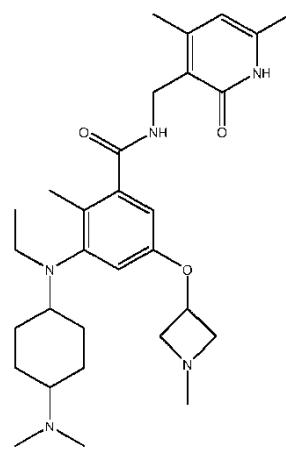
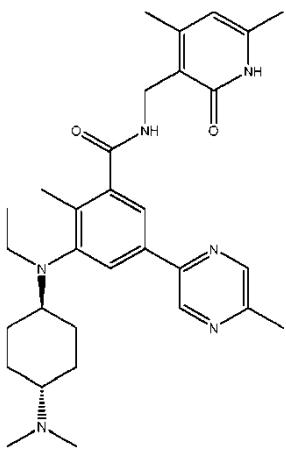
19

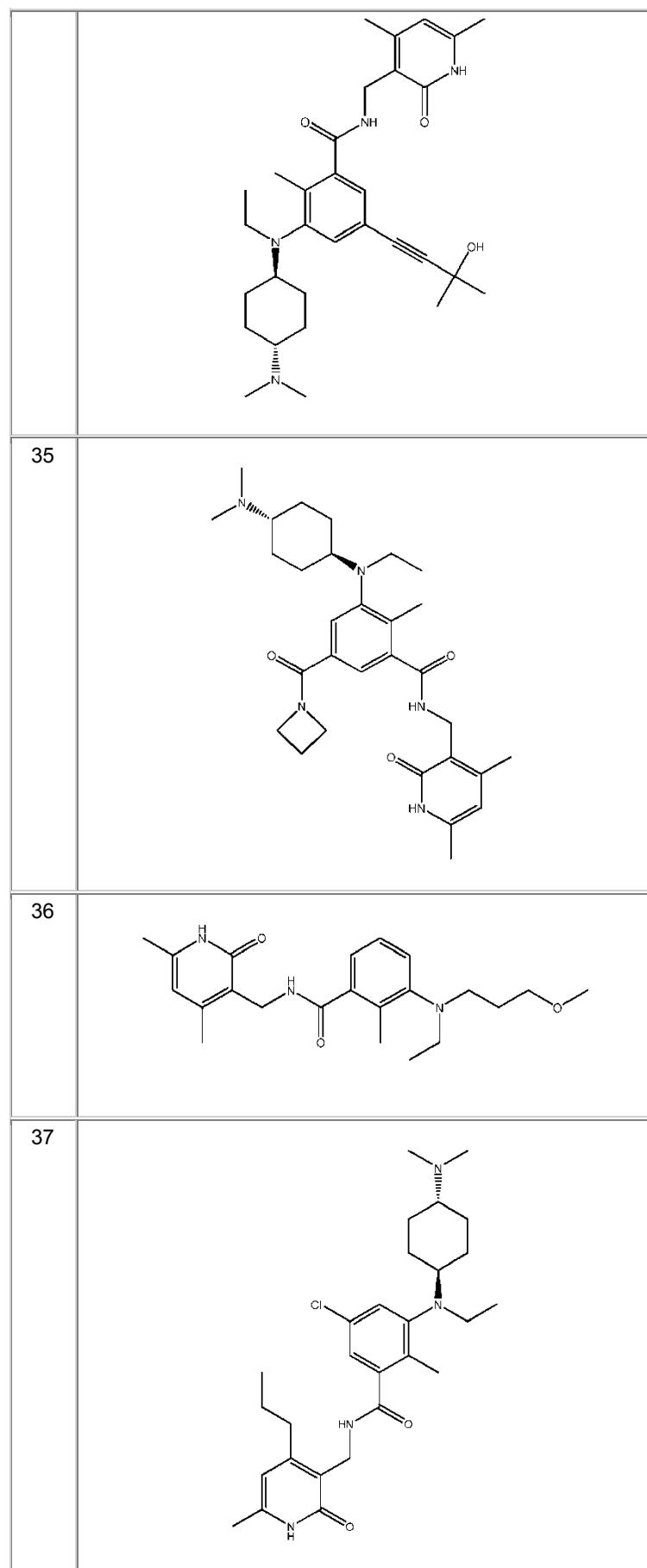


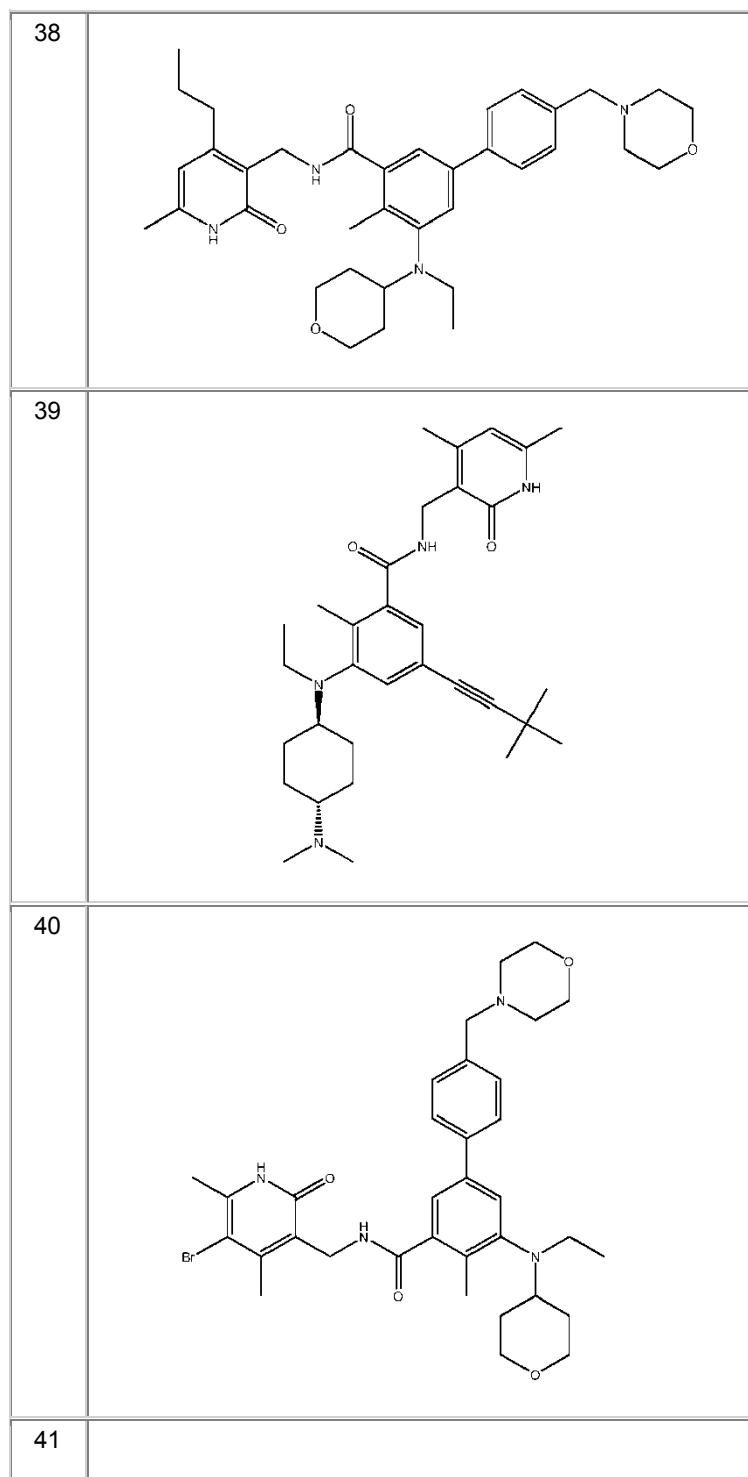


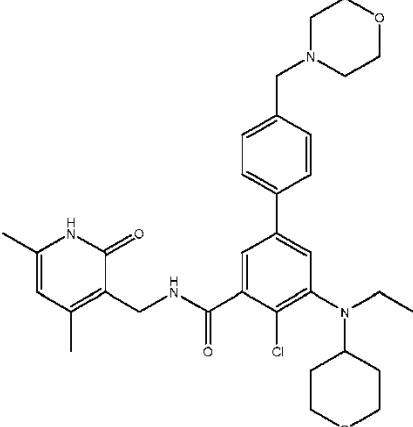
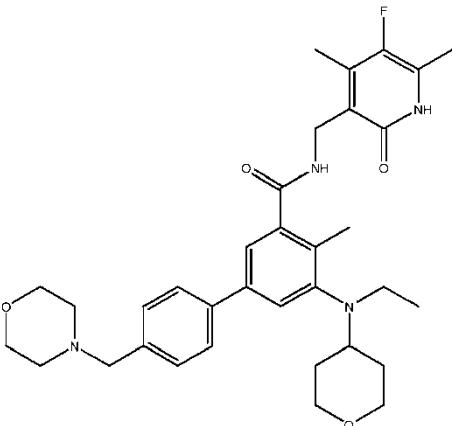
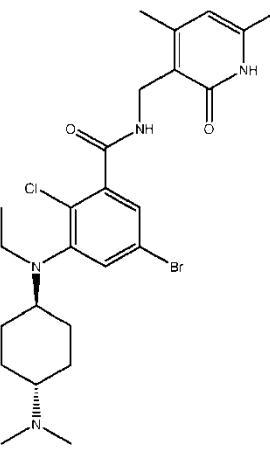


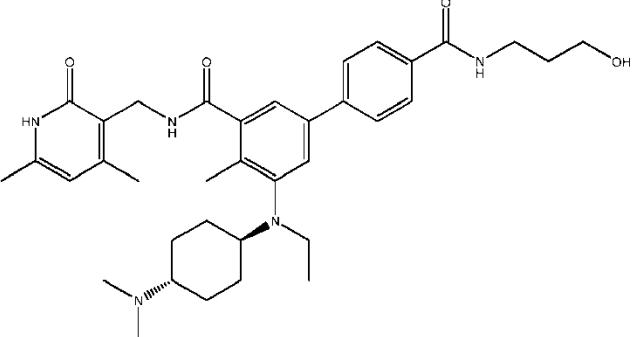
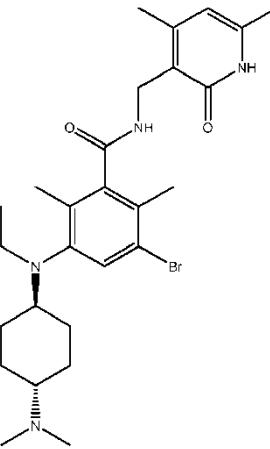
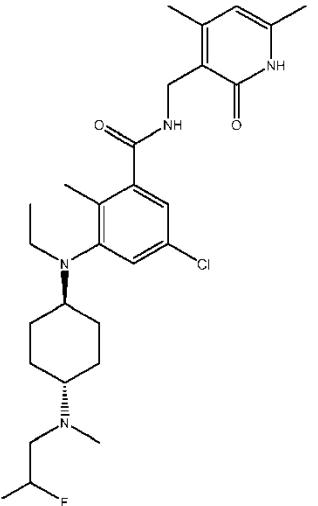


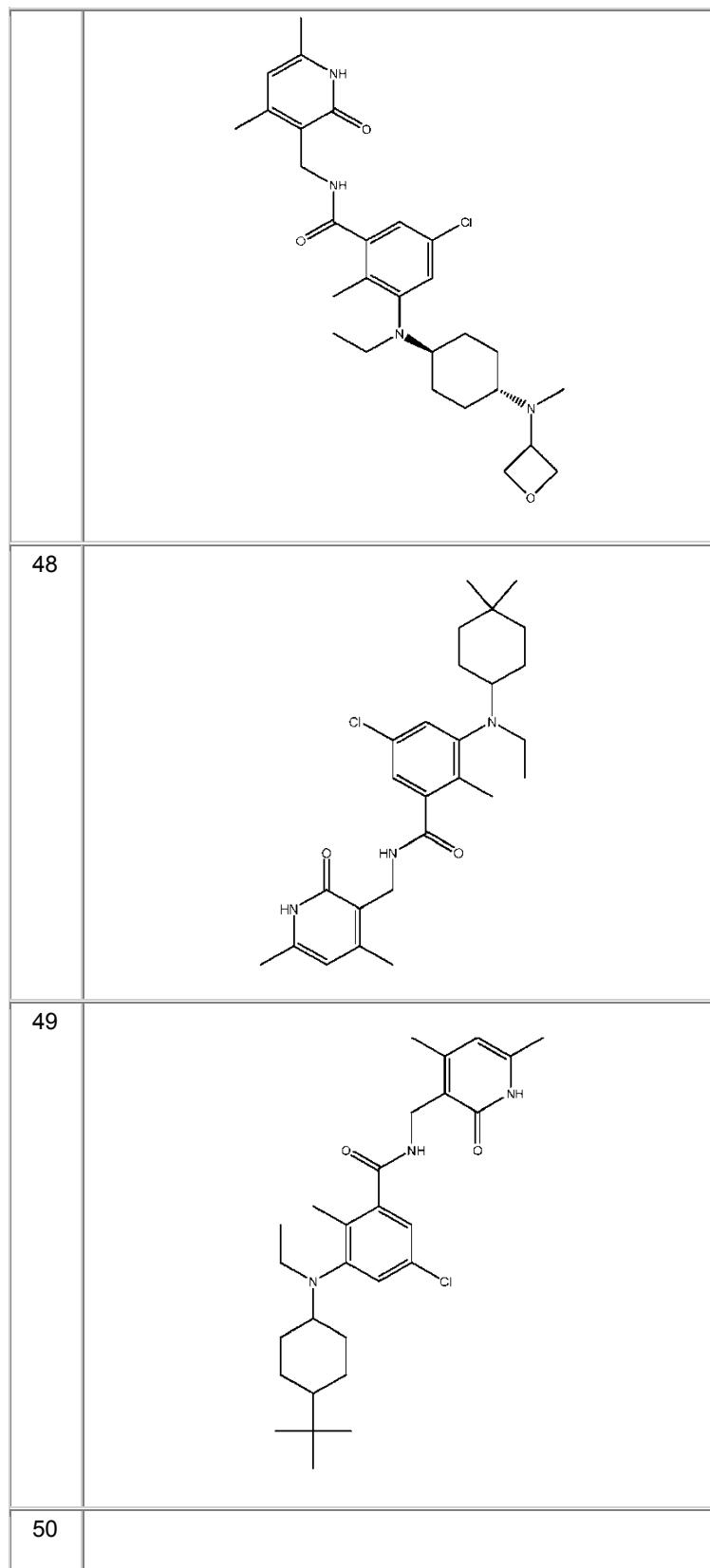
	
32	
33	
34	

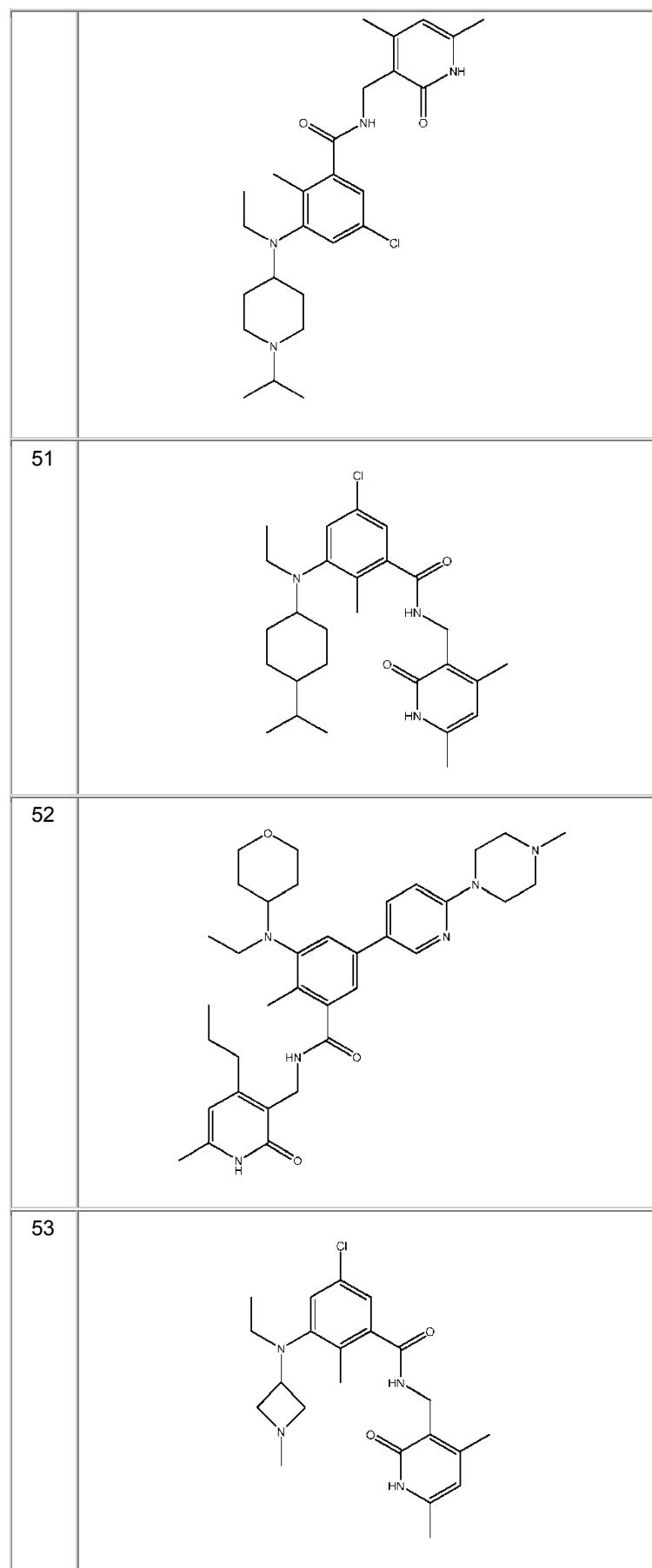


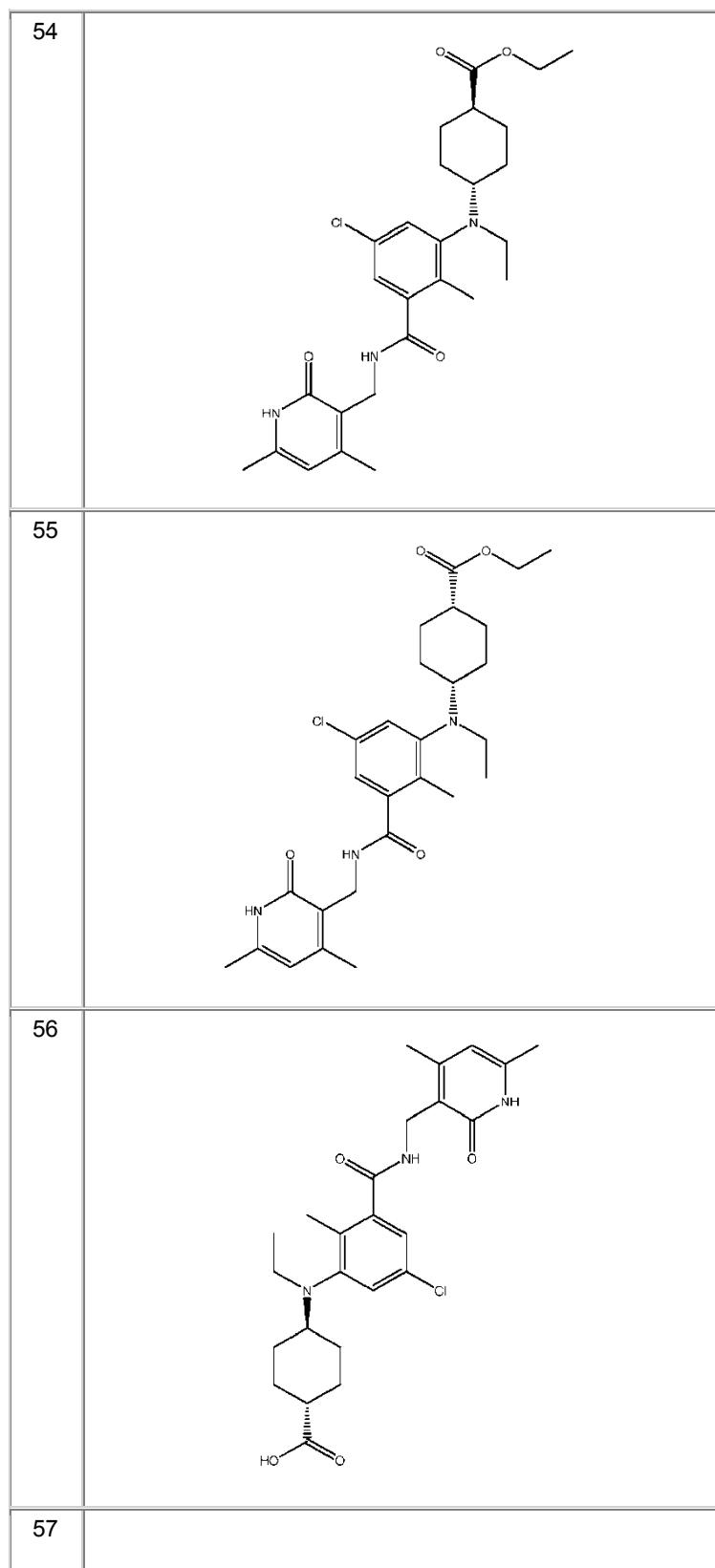


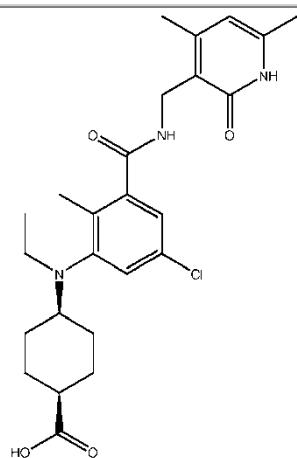
		
42		
43		
44		

	
45	
46	
47	

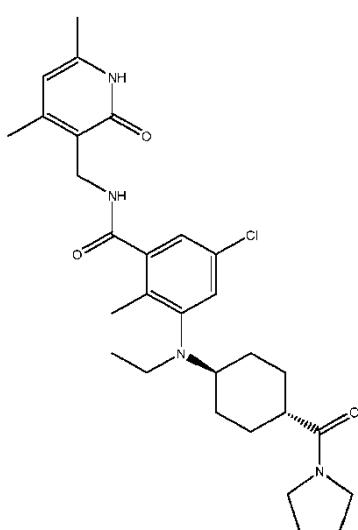




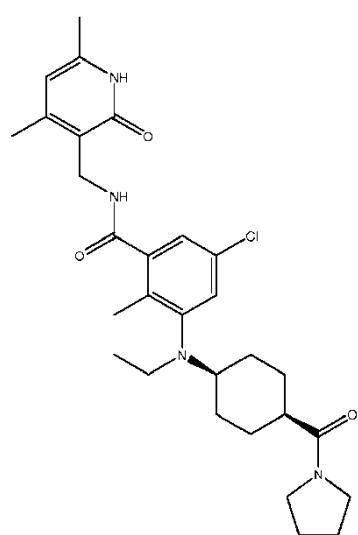




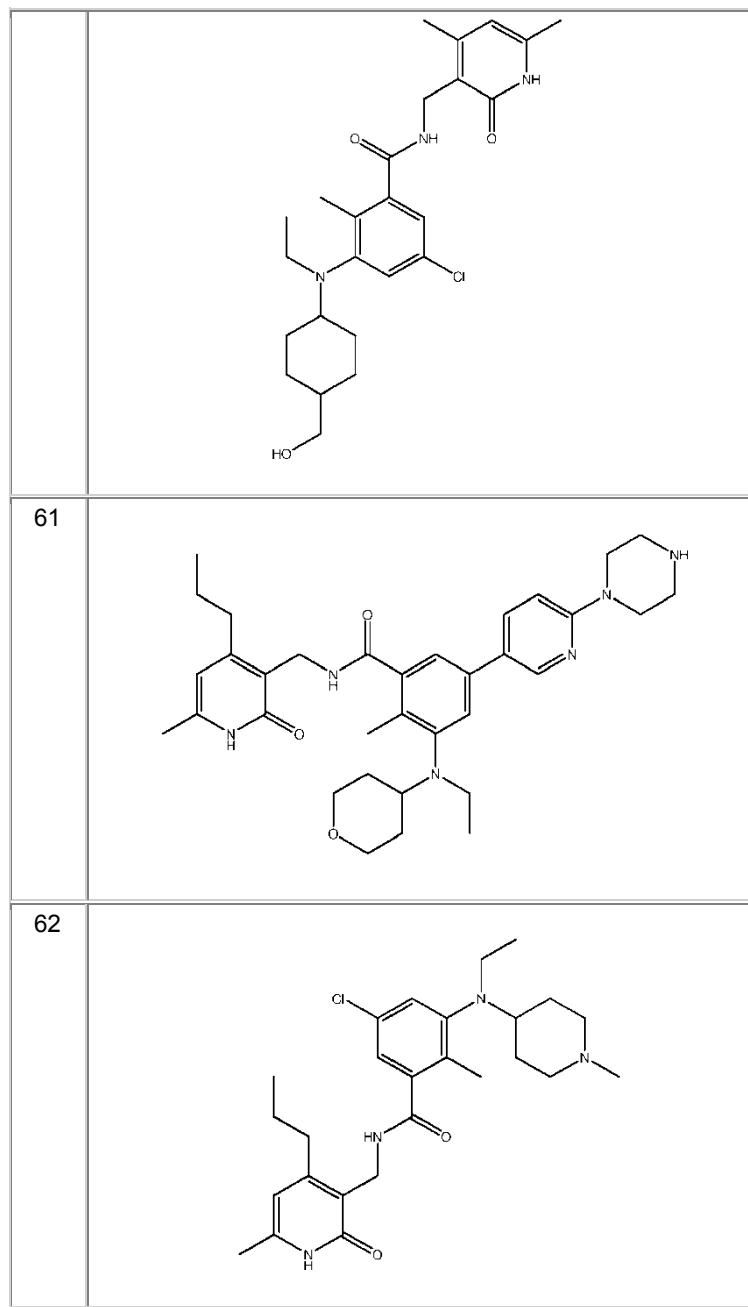
58



59



60



que comprende detectar la presencia de una mutación en EZH2 en una muestra obtenida a partir del sujeto, en donde la mutación es o se expresa como una mutación por sustitución en la posición de aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID No: 1, en donde la presencia de dicha mutación indica que el sujeto es sensible al inhibidor de EZH2.

- 5 7. Un método según la reivindicación 6, en donde el método incluye detectar la presencia de más de una mutación por sustitución en la posición de los aminoácidos 677, 687 o 641 de SEQ ID No: 1.
8. Un método según la reivindicación 6, en donde el cáncer se selecciona a partir de
- 10 a) linfoma, opcionalmente en donde el linfoma se selecciona a partir del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, linfoma folicular y linfoma difuso de linfocitos B grandes, o
- b) leucemia, opcionalmente en donde la leucemia es leucemia mieloide crónica (LMC), o
- c) melanoma.
9. Un método según la reivindicación 6, en donde dicha mutación se selecciona a partir del grupo que consiste en una sustitución con glicina (G) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 677 de SEQ

- 5 ID NO: 1 (A677G); una sustitución con valina (V) de la alanina (A) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 687 de SEQ ID NO: 1 (A687V); una sustitución con fenilalanina (F) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641F); una sustitución con histidina (H) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641H); una sustitución con asparagina (N) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641N); una sustitución con serina (S) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641S); y una sustitución con cisteína (C) de la tirosina (Y) del residuo de tipo natural en la posición del aminoácido 641 de SEQ ID NO: 1 (Y641C).

FIG. 1

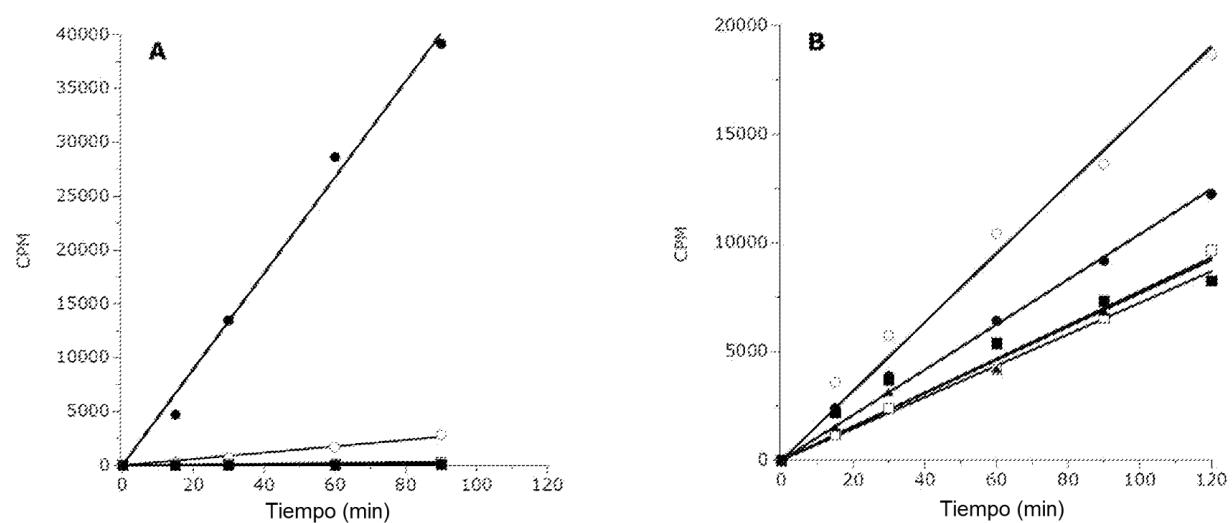


FIG. 2

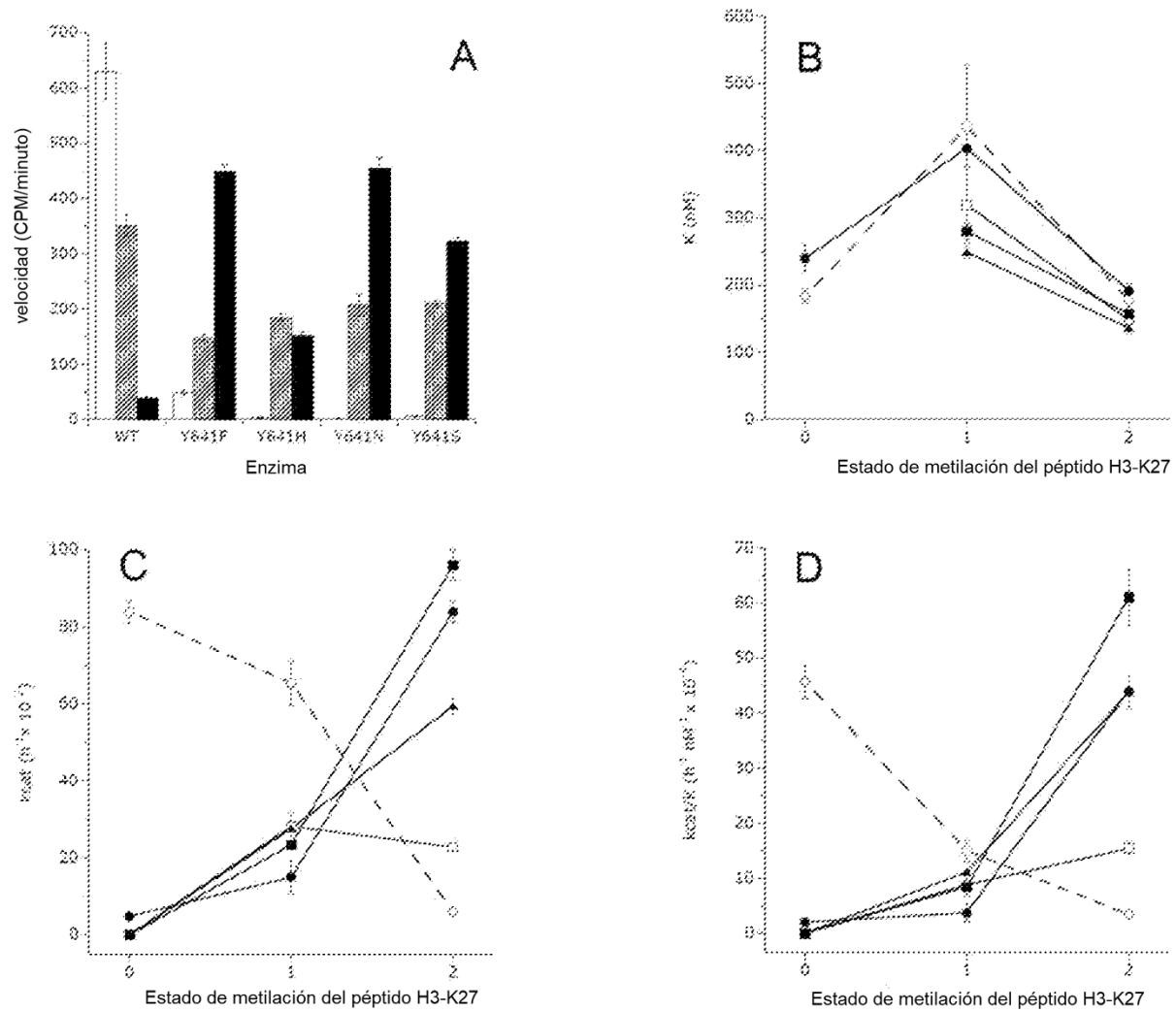
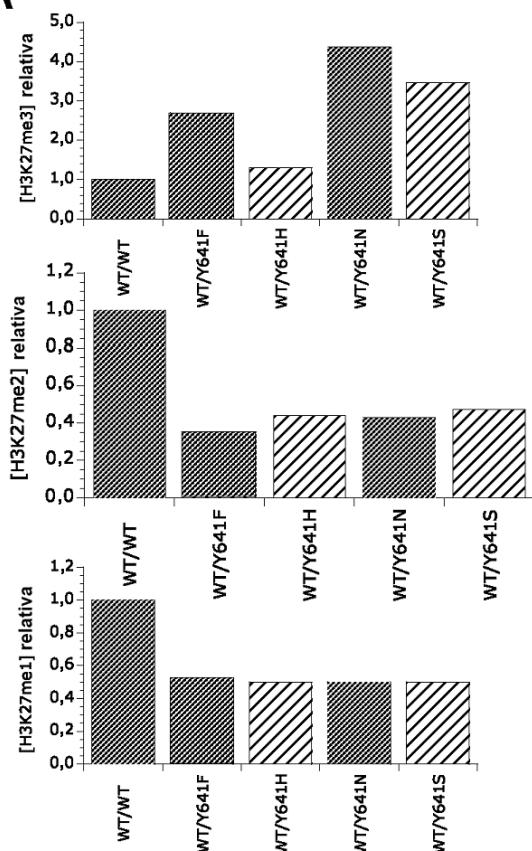


FIG. 3

A



B

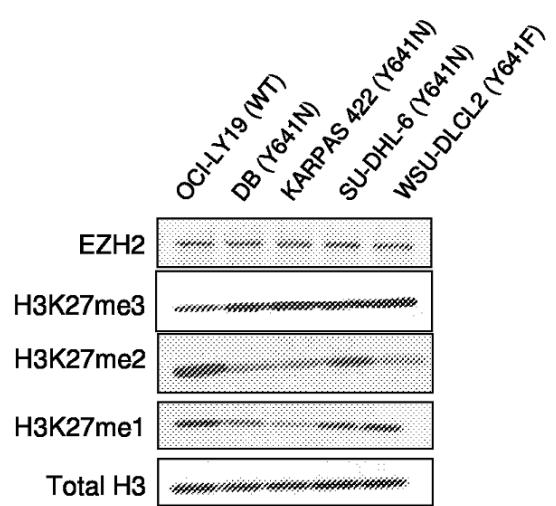
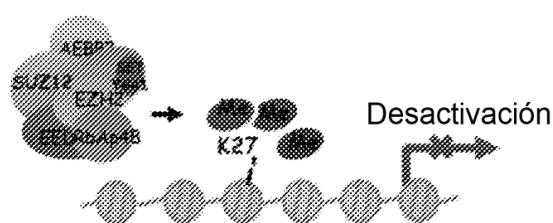
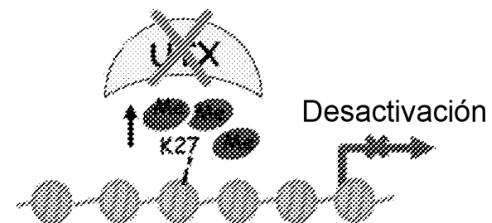
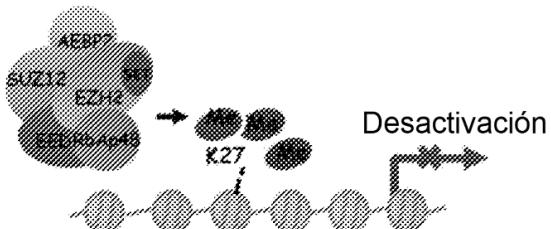


FIG. 4

a Mutación *EZH2*c Mutación *KDM6A/UTX*b Hiperexpresión de *EZH2*

d Hiperexpresión de PHF19/PCL3

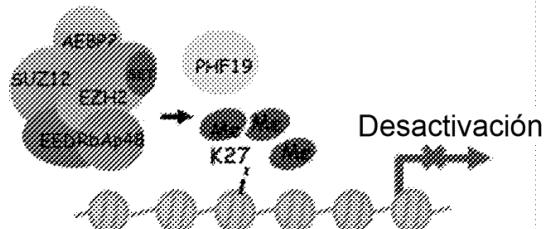


FIG. 5

LEYENDA

- 1 = marcador
- 2 = EZH2: WT
- 3 = EZH2: Y641F
- 4 = EZH2: Y641H
- 5 = EZH2: Y641N
- 6 = EZH2: Y641S

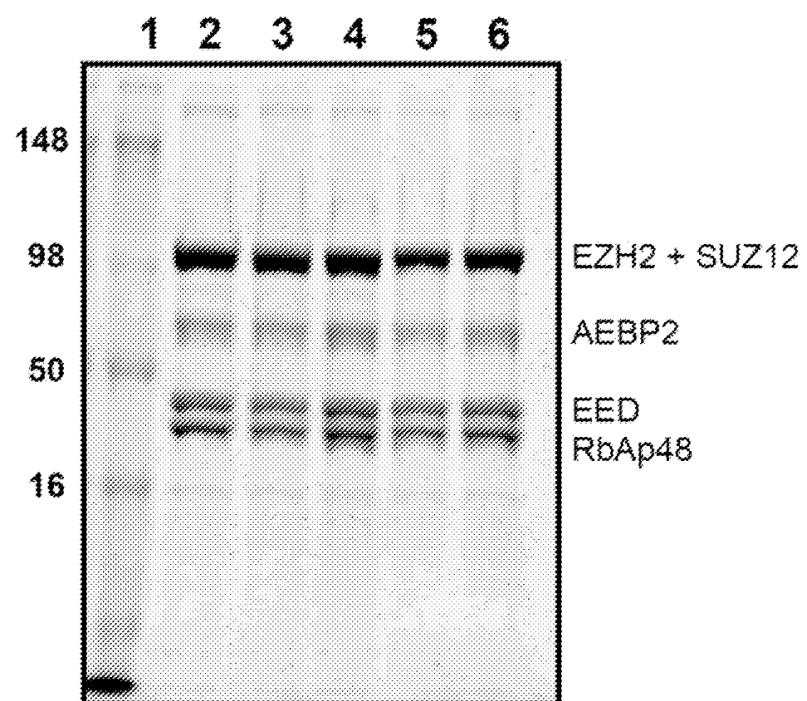
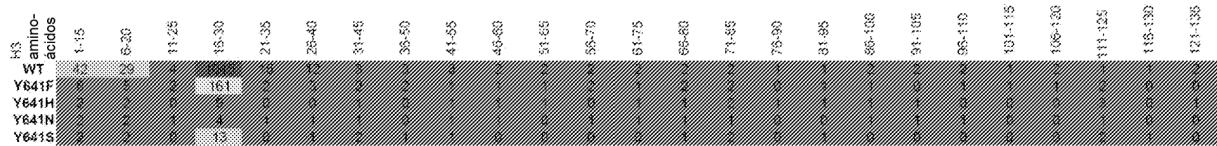


FIG. 6

Panel de péptidos de H3



Panel de péptidos de H4

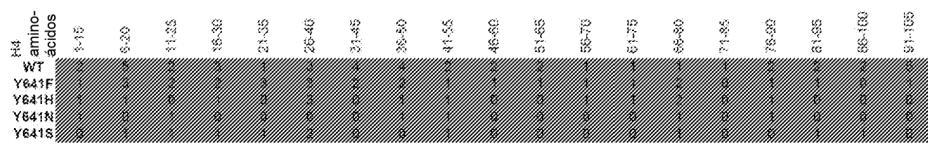


FIG. 7

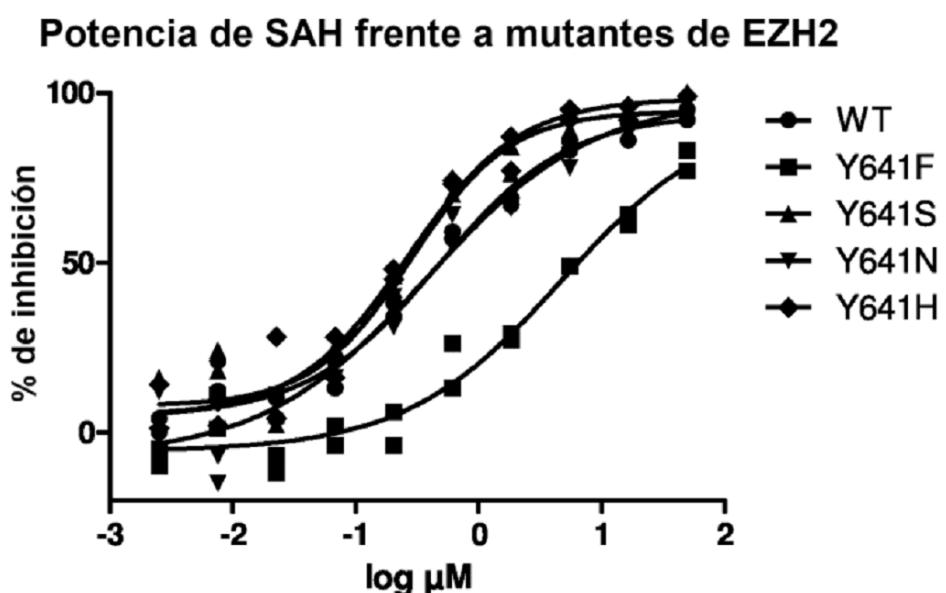


FIG. 8

Potencia del compuesto 75 frente a EZH2 WT y mutantes Y641

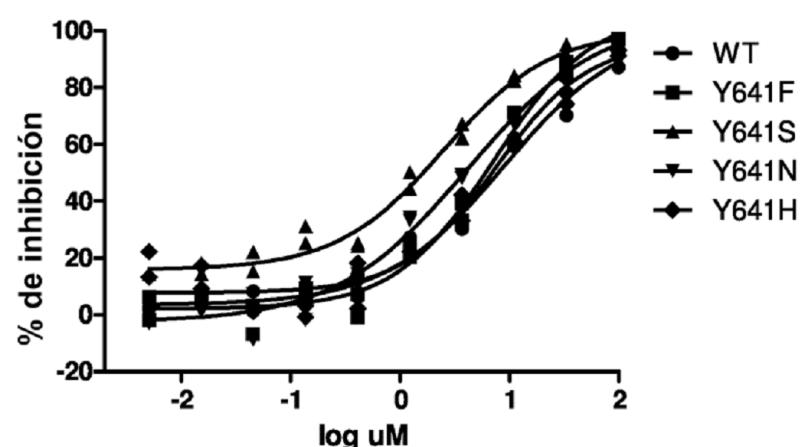


FIG. 9

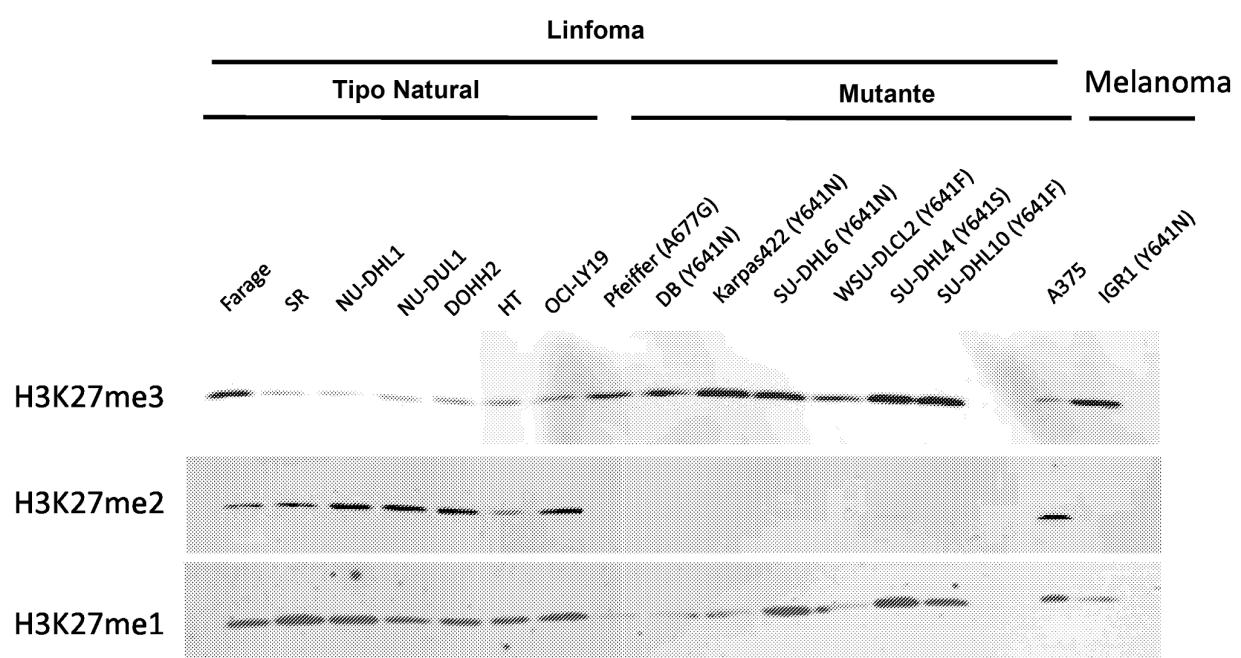


FIG. 10

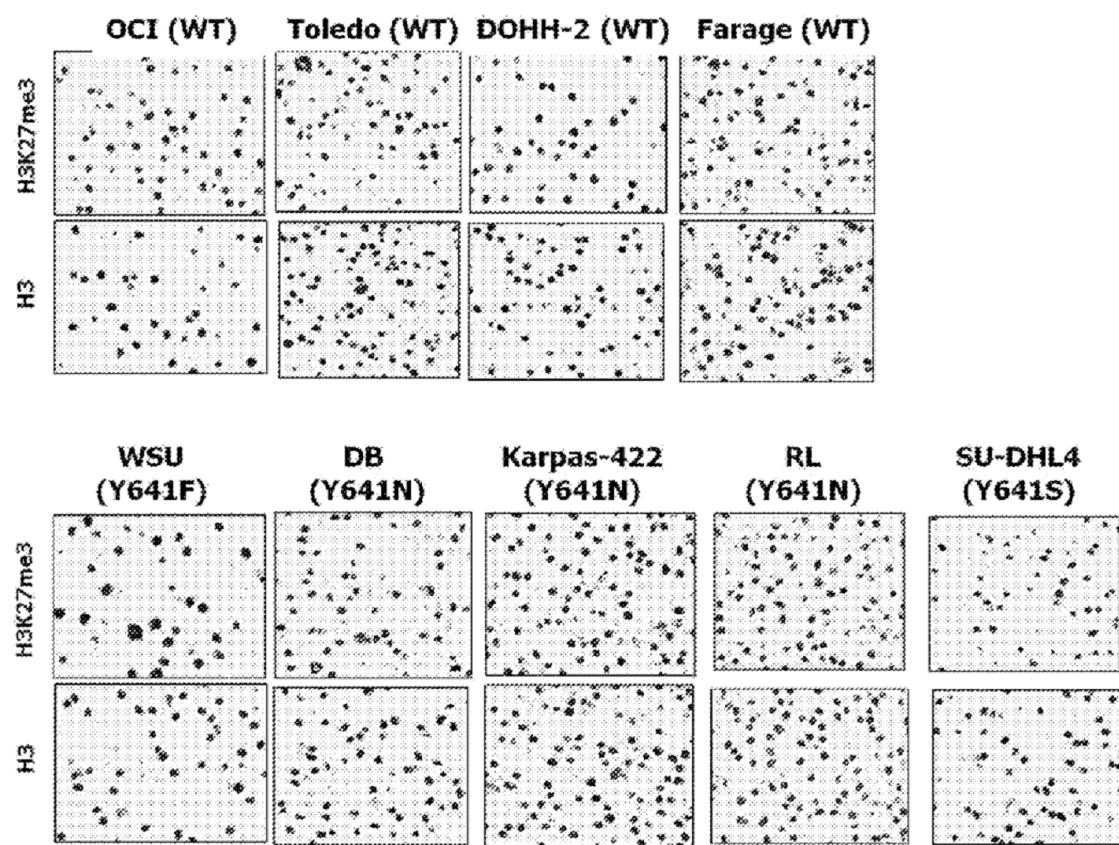


FIG. 11

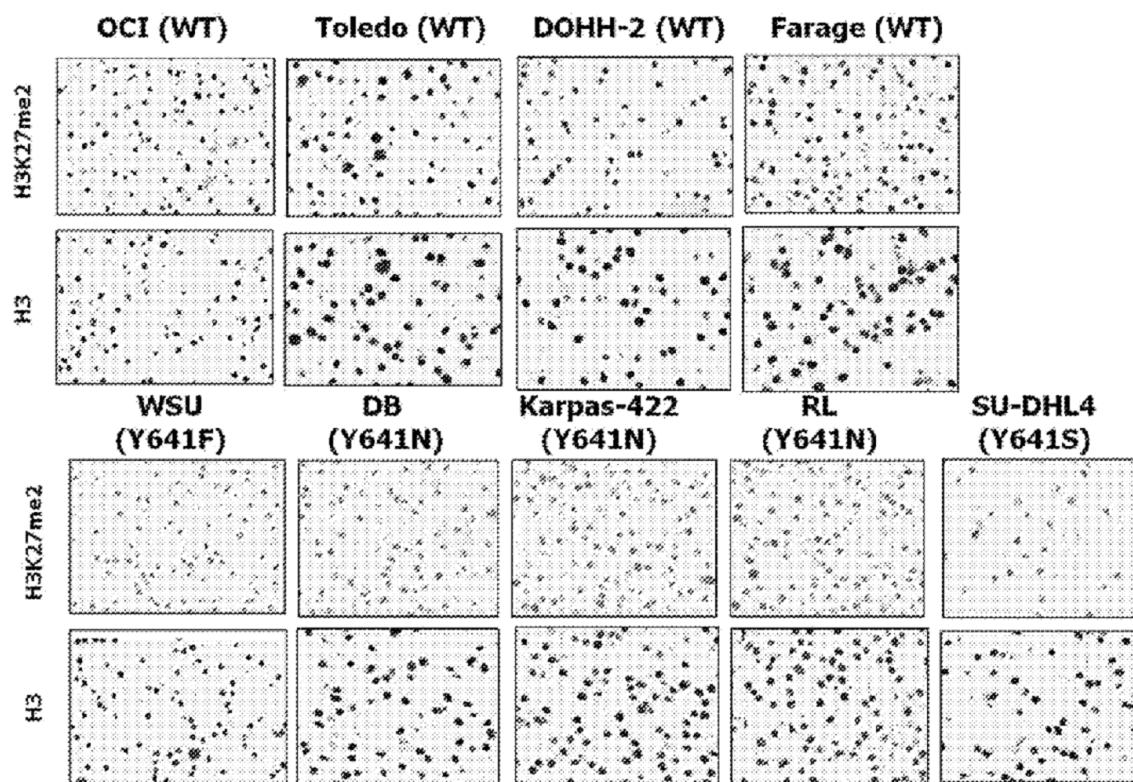


FIG. 12

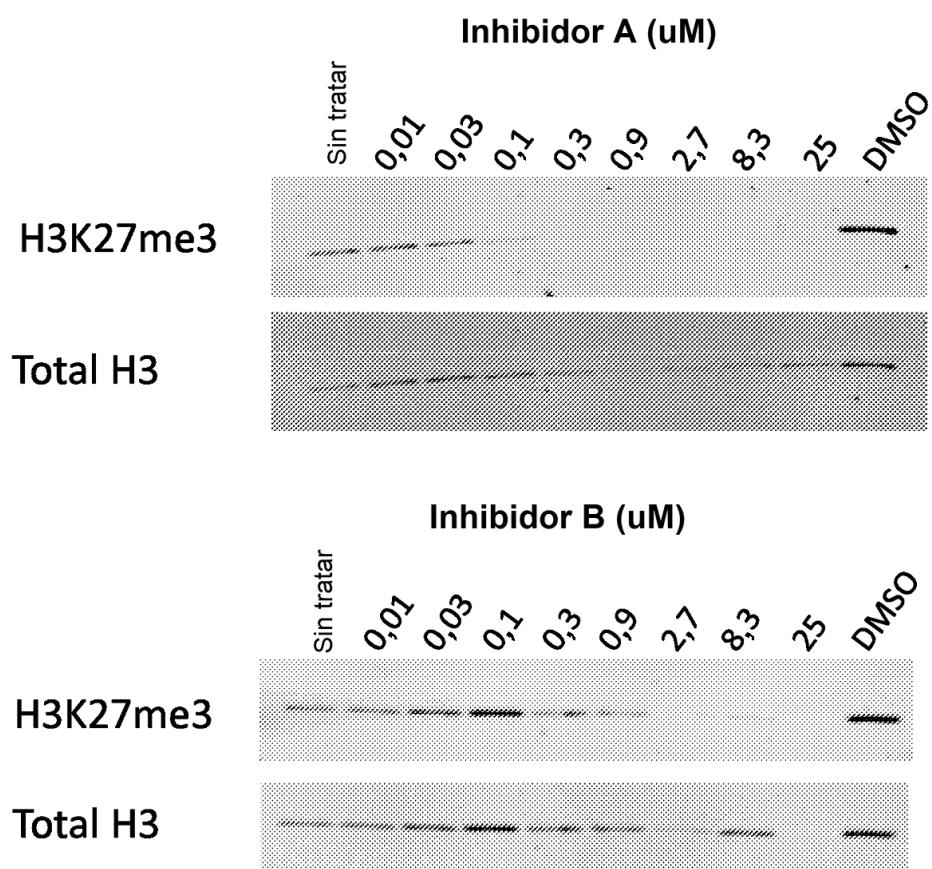
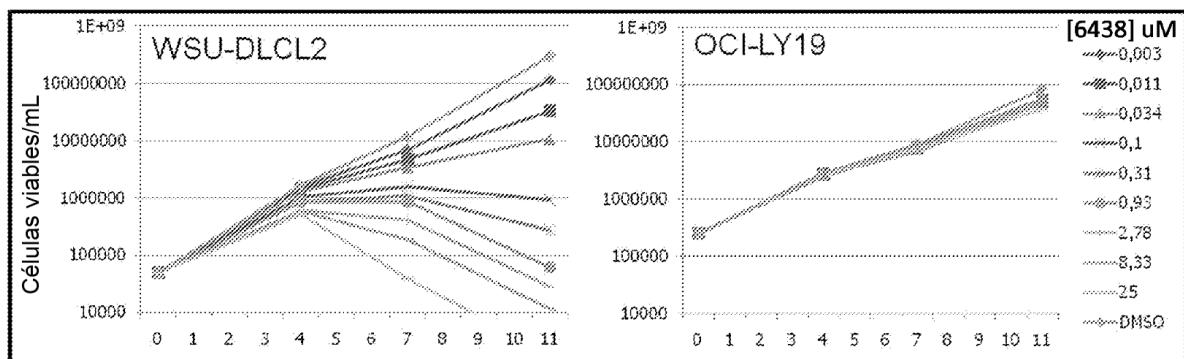
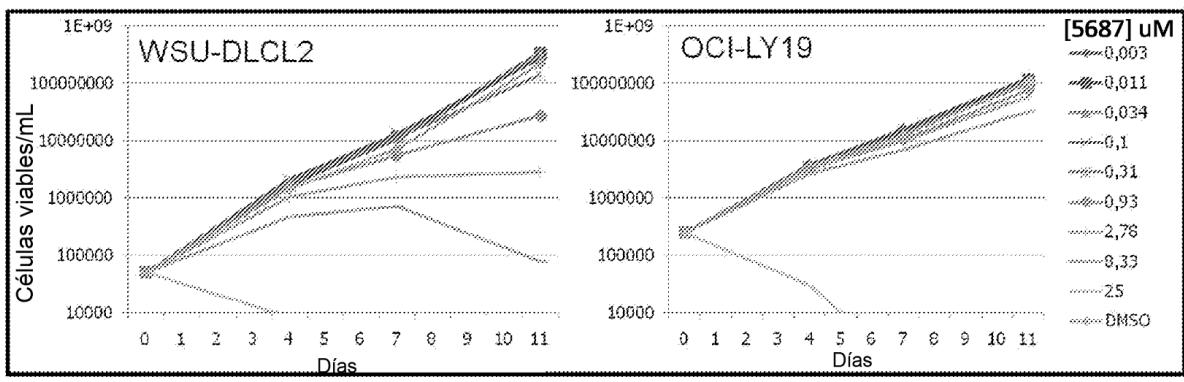


FIG. 13

Inhibidor A**Inhibidor B**

33

FIG. 14

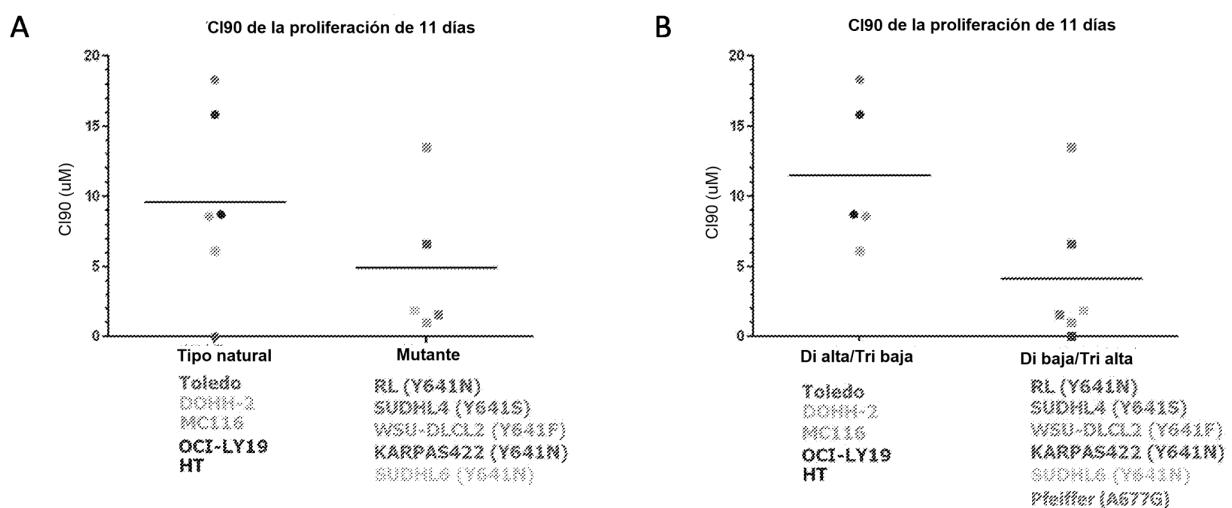


FIG. 15

