



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108137550 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680058347.9

(22)申请日 2016.08.10

(30)优先权数据

62/203,128 2015.08.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/046318 2016.08.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/027571 EN 2017.02.16

(71)申请人 达纳-法伯癌症研究所有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 K·波利亚克 S·舒

J·E·布拉德内尔 C·Y·林

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

代理人 萧辅宽

(51)Int.Cl.

C07D 401/14(2006.01)

A61K 31/517(2006.01)

C07D 239/91(2006.01)

权利要求书4页 说明书61页

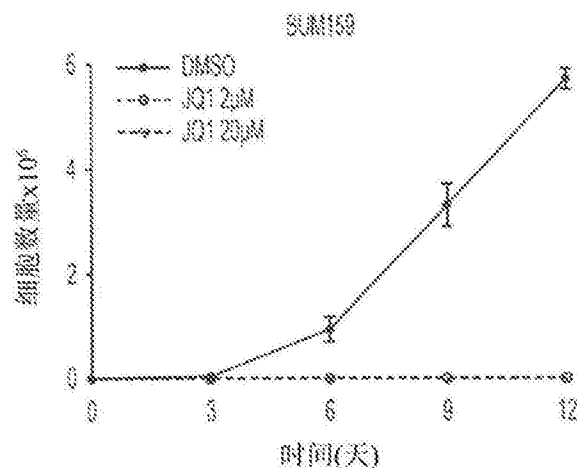
序列表7页 附图43页

(54)发明名称

对BET溴结构域抑制剂的抗性的机理

(57)摘要

本公开提供了包含BET抑制剂和蛋白磷酸酶2A PP2A活化剂、B细胞淋巴瘤-2 Bcl-2抑制剂、特大B细胞淋巴瘤Bcl-x1抑制剂、酪蛋白激酶2 CK2抑制剂和/或中介体复合物亚基1(MED1)的联合疗法,用来治疗癌症。与单一疗法相比,预期所述联合疗法在癌症治疗中是协同性的。还提供了用来鉴别患有对溴结构域和额外终端域BET抑制剂疗法具有抗性或者具有对其产生抗性的风险的癌症的受试者的方法。



1. 一种用来治疗癌症的方法,所述方法包含:
以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域BET抑制剂和蛋白磷酸酶2A PP2A活化剂。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症对仅使用所述BET抑制剂的治疗具有抗性。
3. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的方法,其中与单独使用所述BET抑制剂或单独使用所述PP2A活化剂相比,所述BET抑制剂和所述PP2A活化剂在治疗所述癌症中是协同性的。
4. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的方法,其中所述BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述BET抑制剂是小分子。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述BET抑制剂为JQ1或其衍生物。
7. 根据权利要求1至6中任一权利要求所述的方法,其中所述PP2A活化剂是小分子。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述PP2A活化剂为吩噻嗪化合物或FTY720。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述吩噻嗪化合物选自以下组成的群组:氯普鲁马嗪、美索达嗪、甲硫达嗪、乙酰非那嗪、氟非那嗪、佩吩嗪、三氟拉嗪以及其药学上可接受的盐和酯。
10. 根据权利要求1至9中任一权利要求所述的方法,其中所述BET抑制剂和所述PP2A活化剂是同时施用或依次施用。
11. 根据权利要求1至10中任一权利要求所述的方法,其进一步包含给所述受试者施用B细胞淋巴瘤-2 Bcl-2抑制剂、特大B细胞淋巴瘤Bcl-x1抑制剂、酪蛋白激酶2CK2抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。
12. 一种用来治疗癌症的方法,所述方法包含:
以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域BET抑制剂和特大B细胞淋巴瘤Bcl-x1抑制剂。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述癌症对仅使用所述BET抑制剂的治疗具有抗性。
14. 根据权利要求12至13中任一权利要求所述的方法,其中与仅使用所述BET抑制剂或仅使用所述Bcl-x1抑制剂相比,所述BET抑制剂和所述Bcl-x1抑制剂在治疗所述癌症中是协同性的。
15. 根据权利要求12至14中任一权利要求所述的方法,其中所述BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述BET抑制剂是小分子。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述BET抑制剂为JQ1或其衍生物。
18. 根据权利要求12至17中任一权利要求所述的方法,其中所述Bcl-x1抑制剂是小分子。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述Bcl-x1抑制剂为ABT 737、ABT-263、AT101、Sabutoclax或TW-37。
20. 根据权利要求12至19中任一权利要求所述的方法,其中所述BET抑制剂和所述Bcl-

x1抑制剂是同时施用或依次施用。

21. 根据权利要求12至20中任一权利要求所述的方法,其进一步包含给所述受试者施用蛋白磷酸酶2A PP2A活化剂、B细胞淋巴瘤-2 Bcl-2抑制剂、酪蛋白激酶2 CK2抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

22. 一种用来治疗癌症的方法,所述方法包含:

以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域BET抑制剂和酪蛋白激酶2 CK2抑制剂。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述癌症对仅使用所述BET抑制剂的治疗具有抗性。

24. 根据权利要求22至23中任一权利要求所述的方法,其中与仅使用所述BET抑制剂或仅使用所述CK2抑制剂相比,所述BET抑制剂和所述CK2抑制剂在治疗所述癌症中是协同性的。

25. 根据权利要求22至24中任一权利要求所述的方法,其中所述BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述BET抑制剂是小分子。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述BET抑制剂为JQ1或其衍生物。

28. 根据权利要求22至27中任一权利要求所述的方法,其中所述CK2抑制剂是小分子。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述CK2抑制剂为CX-4945、DMAT、鞣花酸或TTP22。

30. 根据权利要求22至29中任一权利要求所述的方法,其中所述BET抑制剂和所述CK2抑制剂是同时施用或依次施用。

31. 根据权利要求22至30中任一权利要求所述的方法,其进一步包含给所述受试者施用蛋白磷酸酶2A PP2A活化剂、B细胞淋巴瘤-2 Bcl-2抑制剂、特大B细胞淋巴瘤Bcl-x1抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

32. 一种用来治疗癌症的方法,所述方法包含:

以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域BET抑制剂和中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述癌症对仅使用所述BET抑制剂的治疗具有抗性。

34. 根据权利要求32至33中任一权利要求所述的方法,其中与单独使用所述BET抑制剂或单独使用所述MED1抑制剂相比,所述BET抑制剂和所述MED1抑制剂在治疗所述癌症中是协同性的。

35. 根据权利要求32至34中任一权利要求所述的方法,其中所述BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述BET抑制剂是小分子。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述BET抑制剂为JQ1或其衍生物。

38. 根据权利要求32至37中任一权利要求所述的方法,其中所述MED1抑制剂破坏MED1与BRD4之间的相互作用。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述MED1抑制剂是小分子、抗体、肽或反义化合

物。

40. 根据权利要求32至39中任一权利要求所述的方法,其中所述BET抑制剂和所述MED1抑制剂是同时施用或依次施用。

41. 根据权利要求32至40中任一权利要求所述的方法,其进一步包含给所述受试者施用蛋白磷酸酶2A PP2A活化剂、B细胞淋巴瘤-2 Bcl-2抑制剂、特大B细胞淋巴瘤Bcl-x1抑制剂和/或酪蛋白激酶2 CK2抑制剂。

42. 一种鉴别患有对溴结构域和额外终端域BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症的受试者的方法,所述方法包含:

进行化验以鉴别从接受BET抑制剂疗法的受试者获得的肿瘤样本中含溴结构域蛋白4 (BRD4) 的细胞内位置;以及

如果所述BRD4具有核定位,那么鉴别所述受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中如果所述BRD4具有胞质定位,那么鉴别所述受试者患有对BET抑制剂疗法不具有抗性的癌症。

44. 根据权利要求42所述的方法,其进一步包含通过将BET抑制剂与蛋白磷酸酶2A PP2A活化剂、B细胞淋巴瘤-2 Bcl-2抑制剂、特大B细胞淋巴瘤Bcl-x1抑制剂、酪蛋白激酶2 CK2抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 一起组合施用,对鉴别患有对BET抑制剂疗法具有抗性的癌症的所述受试者进行治疗。

45. 根据权利要求42至44中任一权利要求所述的方法,其中所述化验包含免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫分析、ELISA或FACS分析。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中BRD4的所述细胞内位置使用抗体连同免疫荧光来确定。

47. 一种鉴别患有对溴结构域和额外终端域BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症的受试者的方法,所述方法包含:

进行化验以确定从患有癌症的受试者获得的肿瘤样本中磷酸化的含溴结构域蛋白4 (pBRD4) 与未磷酸化的BRD4 (BRD4) 的比例;以及

如果与对照的pBRD4与BRD4的比例相比所述pBRD4与BRD4的比例增加,那么鉴别所述受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中如果与对照的pBRD4与BRD4的比例相比所述pBRD4与BRD4的比例降低或不变,那么鉴别所述受试者患有对BET抑制剂疗法不具有抗性的癌症。

49. 根据权利要求47所述的方法,其进一步包含通过将BET抑制剂与蛋白磷酸酶2A PP2A活化剂、B细胞淋巴瘤-2 Bcl-2抑制剂、特大B细胞淋巴瘤Bcl-x1抑制剂、酪蛋白激酶2 CK2抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 一起组合施用,对确认患有对BET抑制剂疗法具有抗性的癌症的所述受试者进行治疗。

50. 根据权利要求47至49中任一权利要求所述的方法,其中所述化验包含免疫印迹、免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫分析、ELISA或FACS分析。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述pBRD4与BRD4的比例通过免疫印迹确定。

52. 一种用来治疗癌症的方法,所述方法包含:

以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域BET抑制剂和B细胞淋巴瘤-2 Bcl-2抑制剂。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述癌症对仅使用所述BET抑制剂的治疗具有抗性。

54. 根据权利要求52至53中任一权利要求所述的方法, 其中与仅使用所述BET抑制剂或仅使用所述Bcl-2抑制剂相比, 所述BET抑制剂和所述Bcl-2抑制剂在治疗所述癌症中是协同性的。

55. 根据权利要求52至54中任一权利要求所述的方法, 其中所述BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其中所述BET抑制剂是小分子。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述BET抑制剂为JQ1或其衍生物。

58. 根据权利要求52至57中任一权利要求所述的方法, 其中所述Bcl-2抑制剂是小分子。

59. 根据权利要求58所述的方法, 其中所述Bcl-2抑制剂为ABT-199。

60. 根据权利要求52至59中任一权利要求所述的方法, 其中所述BET抑制剂和所述Bcl-2抑制剂是同时施用或依次施用。

61. 根据权利要求52至60中任一权利要求所述的方法, 其进一步包含给所述受试者施用蛋白磷酸酶2A PP2A活化剂、特大B细胞淋巴瘤Bcl-x1抑制剂、酪蛋白激酶2 CK2抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

对BET溴结构域抑制剂的抗性的机理

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 要求于2015年8月10日提交的美国临时申请第62/203,128号的优先权,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本专利是在美国国立卫生研究院授予的CA168504和CA103867下和美国国防部授予的CDMRP BC122003和CA120184下由政府支持完成的。政府具有本专利的某些权利。

背景技术

[0005] 三阴性乳腺癌 (TNBC) 是一种主要的乳腺癌亚型,其特征在于缺少雌激素受体 (ER) 和孕酮受体 (PR) 的表达,以及缺乏人类表皮生长因子受体2 (HER2) 扩增。由于5年复发风险高于任何其它亚型 (特别是在较远部位), TNBC患者的临床转归不佳。关注TNBC的癌症基因组测序研究未能找到新的重复突变的促癌基因,从而无法立即开发靶向治疗。TNBC还是一种异质性疾病,表明一种治疗可能不适合所有患者,并且需要多种新的治疗策略。因此, TNBC急需新的治疗选择。

[0006] 溴结构域和额外终端域 (BET) 蛋白 (BRD2、BRD3和BRD4) 通过双乙酰基赖氨酸识别模块 (溴结构域) 定位到启动子区和增强子区。在该处,它们通过募集正转录因子延伸复合物 (CDK9和细胞周期蛋白T; P-TEFb) 帮助转录延伸。BET溴结构域抑制剂 (BBI), 诸如JQ1, 对乙酰基赖氨酸的竞争性结合将BET从染色质移去,从而在血液恶性肿瘤和实体瘤模型中产生选择性的转录应答和抗增殖功效。但是,对BET抑制剂具有抗性的适应性疾病在普遍的关于BBI用于癌症的文献中是一个常见主题,然而仍完全缺乏对机理的理解。因此,需要找到用于对BBI具有抗性或者可能会对其产生抗性的癌症的新的治疗方法。

发明内容

[0007] 本公开的一些方面提供了用来治疗癌症的方法。所述方法包含以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂和蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂。

[0008] 在一些实施例中,癌症对仅使用BET抑制剂的治疗具有抗性。

[0009] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用PP2A活化剂相比, BET抑制剂和PP2A活化剂在癌症治疗中是协同性的。

[0010] 在一些实施例中, BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。在一些实施例中, BET抑制剂是小分子。在一些实施例中, BET抑制剂为JQ1或其衍生物。

[0011] 在一些实施例中, PP2A活化剂是小分子。在一些实施例中, PP2A活化剂为吩噻嗪化合物或FTY720。在一些实施例中, 吩噻嗪化合物选自由以下组成的群组: 氯普鲁马嗪、美索达嗪、甲硫达嗪、乙酰非那嗪、氟非那嗪、佩吩嗪、三氟拉嗪以及其药学上可接受的盐和酯。

[0012] 在一些实施例中, BET抑制剂和PP2A活化剂被同时施用或依次施用。

[0013] 在一些实施例中,所述方法进一步包含给受试者施用B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂、酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

[0014] 本公开的一些方面提供了用来治疗癌症的方法,所述方法包含:以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂和特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂。

[0015] 在一些实施例中,癌症对仅使用BET抑制剂的治疗具有抗性。

[0016] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用Bcl-x1抑制剂相比,BET抑制剂和Bcl-x1抑制剂在癌症治疗中是协同性的。

[0017] 在一些实施例中,BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。在一些实施例中,BET抑制剂是小分子。在一些实施例中,BET抑制剂为JQ1或其衍生物。

[0018] 在一些实施例中,Bcl-x1抑制剂是小分子。在一些实施例中,Bcl-x1抑制剂为ABT 737、ABT-263、AT101、Sabutoclax或TW-37。

[0019] 在一些实施例中,BET抑制剂和Bcl-x1抑制剂被同时施用或依次施用。

[0020] 在一些实施例中,所述方法进一步包含给受试者施用蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

[0021] 本公开的一些方面提供了用来治疗癌症的方法,所述方法包含:以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂和酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂。

[0022] 在一些实施例中,癌症对仅使用BET抑制剂的治疗具有抗性。

[0023] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用CK2抑制剂相比,BET抑制剂和CK2抑制剂在癌症治疗中是协同性的。

[0024] 在一些实施例中,BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。在一些实施例中,BET抑制剂是小分子。在一些实施例中,BET抑制剂为JQ1或其衍生物。

[0025] 在一些实施例中,CK2抑制剂是小分子。在一些实施例中,CK2抑制剂为CX-4945、DMAT、鞣花酸或TTP22。

[0026] 在一些实施例中,BET抑制剂和CK2抑制剂被同时施用或依次施用。

[0027] 在一些实施例中,所述方法进一步包含给受试者施用蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

[0028] 本公开的一些方面提供了用来治疗癌症的方法,所述方法包含:以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂和中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

[0029] 在一些实施例中,癌症对仅使用BET抑制剂的治疗具有抗性。

[0030] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用MED1抑制剂相比,BET抑制剂和MED1抑制剂在癌症治疗中是协同性的。

[0031] 在一些实施例中,BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。在一些实施例中,BET抑制剂是小分子。在一些实施例中,BET抑制剂为JQ1或其衍生物。

[0032] 在一些实施例中,MED1抑制剂破坏MED1与BRD4之间的相互作用。在一些实施例中,MED1抑制剂是小分子、抗体、肽或反义化合物。

[0033] 在一些实施例中,BET抑制剂和MED1抑制剂被同时施用或依次施用。

[0034] 在一些实施例中,所述方法进一步包含给受试者施用蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂和/或酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂。

[0035] 本公开的一些方面提供了一种用来确认患有对溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症的受试者的方法,所述方法包含:进行化验以确定从接受BET抑制剂疗法的受试者获得的肿瘤样本中含溴结构域蛋白4 (BRD4) 的细胞内位置;以及

[0036] 如果BRD4具有核定位,那么确认受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。

[0037] 在一些实施例中,如果BRD4具有细胞质定位,那么确认受试者患有对BET抑制剂疗法不具有抗性的癌症。

[0038] 在一些实施例中,所述方法进一步包含通过将BET抑制剂与蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂、酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 一起组合施用,对确认患有对BET抑制剂疗法具有抗性的癌症的受试者进行治疗。

[0039] 在一些实施例中,所述化验包含免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫分析、ELISA或FACS分析。在一些实施例中,BRD4的细胞内位置使用抗体连同免疫荧光来确定。

[0040] 本公开的一些方面提供了一种用来确认患有对溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症的受试者的方法,所述方法包含:进行化验以确定从患有癌症的受试者获得的肿瘤样本中磷酸化的含溴结构域蛋白4 (pBRD4) 与未磷酸化的BRD4 (BRD4) 的比例;并且如果与对照的pBRD4与BRD4的比例相比,所述pBRD4与BRD4的比例增加,那么确认受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。

[0041] 在一些实施例中,如果与对照的pBRD4与BRD4的比例相比,所述pBRD4与BRD4的比例减少或无变化,那么确认受试者患有对BET抑制剂疗法不具有抗性的癌症。

[0042] 在一些实施例中,所述方法进一步包含通过将BET抑制剂与蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂、酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 一起组合施用,对确认患有对BET抑制剂疗法具有抗性的癌症的受试者进行治疗。

[0043] 在一些实施例中,所述化验包含免疫印迹、免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫分析、ELISA或FACS分析。

[0044] 在一些实施例中,所述pBRD4与BRD4的比例通过免疫印迹确定。

[0045] 本公开的一些方面提供了用来治疗癌症的方法,所述方法包含:以有效治疗所述

癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂和B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂。

[0046] 在一些实施例中,癌症对仅使用BET抑制剂的治疗具有抗性。

[0047] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用Bcl-2抑制剂相比,BET抑制剂和Bcl-2抑制剂在癌症治疗中是协同性的。

[0048] 在一些实施例中,BET抑制剂为含溴结构域蛋白2 (BRD2) 抑制剂、含溴结构域蛋白3 (BRD3) 抑制剂或含溴结构域蛋白4 (BRD4) 抑制剂。在一些实施例中,BET抑制剂是小分子。在一些实施例中,BET抑制剂为JQ1或其衍生物。

[0049] 在一些实施例中,Bcl-2抑制剂是小分子。在一些实施例中,Bcl-2抑制剂为ABT-199。

[0050] 在一些实施例中,BET抑制剂和Bcl-2抑制剂被同时施用或依次施用。

[0051] 在一些实施例中,所述方法进一步包含给受试者施用蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂、酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

[0052] 本发明的每个实施例和每个方面可独立实施或者进行组合。另外,本文所使用的措词和术语是为了进行说明,不应被看作限制性的。使用“包括 (including)”、“包含 (comprising)”或者“具有 (having)”、“含有 (containing)”、“涉及 (involving)”以及其在本文中的变型意在包括其后所列项和其等同物以及附加项。

[0053] 本发明的这些方面和其它方面,以及各种优势和应用,通过参考具体实施方式将是显而易见的。本发明的每个方面可包括将会理解的各种实施例。

[0054] 本申请中确认的所有文件通过引用整体并入本文。

附图说明

[0055] 图1A至1G.乳腺癌中对BBI的应答。所有误差条表示SEM。图1A,在一组TNBC型、HER2⁺型和luminal型乳腺癌中和永生化基底乳腺上皮细胞系中BET抑制剂和作为阴性对照的无活性类似物 (JQ1R和阿普唑仑) 的平均IC₅₀的热图。IC₅₀值以比色等级计:非常敏感 (<0.01μM),敏感 (=1μM),具有抗性 (>20μM)。图1B,靶向BET溴结构域蛋白的siRNA转染4天后的细胞存活力。图1C,SUM159细胞的细胞周期图谱,所述SUM159细胞用100ng/mL的诺考达唑在G2/M中同步,接着重铺到新鲜的培养基中,在-1小时或释放后3小时添加DMSO或JQ1 (500nM)。在释放后不同的时间点 (0小时、6小时、12小时) 收集细胞。图1D,所指示的一组乳腺细胞系中的蛋白的免疫印迹分析。图1E,经JQ1 (500nM) 处理前和处理3日后TNBC系中的基底 (高分子量-HMW) 和luminal (低分子量-LMW和细胞角蛋白18) 细胞角蛋白的免疫荧光。比例尺显示20 μm。图1F,各箱线图描绘表达shBRD4的亲代的TET诱导型SUM159细胞被注射到乳房脂肪垫中28天后和60天后的异种移植重量;n表示小鼠数量/实验。从注射14天后 (SUM159) 开始,给小鼠施用JQ1 (50mg/kg,每日施用)、仅载体 (对照),进行14天,或者从注射21天后 (SUM159-shBRD4) 开始施用多西环素。图1G,在经JQ1处理或者未经JQ1处理的情况下SUM159异种移植植物中的基底 (HMW细胞角蛋白、细胞角蛋白17、pSTAT3和CD44) 和luminal (LMW细胞角蛋白、细胞角蛋白18和CD24) 标记物的苏木精-曙红染色和免疫荧光分析。针对H&E和免疫荧光的比例尺分别显示为100μm和50μm。

[0056] 图2A至2G.TNBC中的BRD4基因组结合和超级增强子相关的基因转录。图2A,显示启动子转录起始位点(TSS)区域和Bio-JQ1结合TSS远端增强子区(右侧)处的生物素化的JQ1(Bio-JQ1)、BRD4以及H3K27ac结合的热图。每行代表从TSS中心或增强子中心起的单独的基因组区域(+/-10kb)。针对Bio-JQ1、BRD4以及H3K27ac,基因组占用由结合强度表示为阴影,单位为每碱基对每百万读段数(rpm/bp)。图2B,显示在所有Bio-JQ1富集的结合区域BRD4与Bio-JQ1的基因组结合之间的关系(左侧)或者H3K27ac与Bio-JQ1的基因组结合之间的关系(右侧)的散布图。基因组占用的单位以rpm/bp计。简单的线性回归以黑色画出。还示出了皮尔逊相关统计数据。图2C,描绘位于HIF1A基因座的SUM159细胞中的Bio-JQ1、BRD4+DMSO以及BRD4+JQ1的基因轨迹。x轴显示沿具有以下所画基因结构的染色体的位置。y轴显示基因组占用,单位为rpm/bp。HIF1A超级增强子显示为粗线。图2D,显示SUM159中的Bio-JQ1结合区域处BRD4的log₂倍数变化+/-JQ1(左侧)或H3K27ac的log₂倍数变化+/-JQ1(右侧)的箱线图。通过递增Bio-JQ1结合将12,999个Bio-JQ1区域分级,并分成10个分离的区段(从左向右显示)。示出了最弱与最强的Bio-JQ1结合区域区段之间的平均BRD4log₂倍数变化的差别的统计显著性(韦尔奇t测试***p-值<1e-10)。图2E,通过递增Bio-JQ1信号(单位rpm)而分级的未经处理的SUM159细胞中定义的增强子的分级图。增强子定义为启动子中不包含的Bio-JQ1结合区域。将典型与超级增强子区别开的临界值显示为灰虚线。与TNBC特征基因相关的增强子被突出显示。图2F,显示经JQ1处理3小时后、12小时后以及24小时后所有活性基因或超级增强子(SE)相关的基因相对于DMSO对照的表达的log₂倍数变化的箱线图。所有活性基因与超级增强子相关的基因之间的表达变化的差别的统计显著性通过韦尔奇t-测试显示**p-值<1e-5,*p-值<1e-3)。图2G,SUM159细胞中最受JQ1诱导的基因表达变化影响的信号通路。

[0057] 图3A至3G.TNBC中获得的BBI抗性。图3A至3B,经不同剂量的JQ1处理的SUM159细胞(图3A)和SUM159R细胞(图3B)的活细胞数量。误差条代表SD。图3C至3D,经BBI(图3C)或者CXCR2抑制剂和JAK2抑制剂(图3D)处理的SUM159细胞和SUM159R细胞的细胞存活力。图3E,SUM159细胞和经不同剂量的JQ1处理的SUM159R细胞的细胞池和单独的细胞克隆的细胞存活力。图3F,来源于SUM159细胞和SUM159R细胞的异种移植物的肿瘤重量。分别从注射后第14天(SUM159)和第26天(SUM159R)开始给小鼠施用JQ1,分别进行14天和30天。图3G,经靶向溴结构域蛋白的siRNA转染的SUM159细胞和SUM159R细胞的细胞存活力。误差条在图3C至3G的各板块中代表SEM。

[0058] 图4A至4I.BBI抗性TNBC中的BRD4基因组结合和超级增强子。图4A,显示SUM159亲代或SUM159R中含有超级增强子(由Bio-JQ1结合定义)的所有基因组区域,通过Bio-JQ1基因组结合信号的log₂变化(亲代相对于抗性)进行分级。X轴显示Bio-JQ1信号的log₂倍数变化。Bio-JQ1水平的变化按照变化的强度给予不同颜色。图4B,显示抗性SUM159R细胞相对于亲代SUM159细胞中具有增加的、保存的或损失的(左侧、中心、右侧)Bio-JQ1结合的区域处的BRD4基因组占用的log₂倍数变化的箱线图。图4C,显示抗性SUM159R细胞相对于亲代SUM159细胞中具有增加的、保存的或损失的(左侧、中心、右侧)Bio-JQ1结合的区域近侧的基因处的表达的log₂倍数变化的箱线图。图4D,描绘SUM159R增加的BCL-xL基因座处的SUM159亲代(顶部)或SUM159R抗性(底部)细胞中的Bio-JQ1、BRD4以及H3K27ac的基因轨迹。X轴显示沿具有以下所画基因结构的染色体的位置。Y轴显示基因组占用,单位为rpm/bp。

BCL-xL超级增强子显示为棒。图4E,描绘Bio-JQ1结合SOD2基因座处的SUM159亲代(顶部)或SUM159R抗性(底部)细胞中的Bio-JQ1、BRD4+/-JQ1以及H3K27ac+/-JQ1的基因轨迹。X轴显示沿具有以下所画基因结构的染色体的位置。Y轴显示基因组占用,单位为rpm/bp。SOD2超级增强子显示为棒。图4F至4G,显示亲代SUM159(左侧)或抗性SUM159R(右侧)细胞中由Bio-JQ1结合的区域处的BRD4(图4F)或H3K27ac(图4G)基因组占用的log₂倍数变化的箱线图。图4H至4I,显示亲代SUM159细胞中经处理24小时后被JQ1相对于DMSO上调(图4H)或下调(图4I)的基因处的表达的log₂倍数变化的箱线图。针对亲代SUM159(左侧)或抗性SUM159R(右侧)细胞显示表达的log₂倍数变化。

[0059] 图5A至5E. TNBC中BBI抗性的机理。所有误差条代表SEM。图5A,描绘基于SILAC RIME的JQ1处理后SUM159细胞和SUM159R细胞中BRD4相关蛋白的变化的图。各轴代表log₁₀倍数变化(FC)。图5B, SUM159细胞和SUM159R细胞中的BRD4免疫沉淀物(顶图)和总的细胞裂解物(底图)的免疫印迹分析。图5C,同时敲减内源性BRD4的情况下表达外源性WT、BDmut、7A和7D突变的BRD4的SUM159细胞和SUM159R细胞的细胞存活力。图5D至5E,同时敲减内源性BRD4的情况下表达外源性WT或BDmut BRD4的SUM159(图5D)和SUM159R(图5E)细胞对JQ1的敏感性。

[0060] 图6A至6I. BRD4磷酸化的调节和意义。图6A,经指示计量的JQ1处理后SUM159细胞和SUM159R细胞中磷酸化的BRD4(pBRD4)、BRD4、MED1以及BRD3的免疫印迹分析。图6B,敲减PP2A-A亚基、PP2A-C亚基或这两种亚基之后SUM149细胞和SUM159细胞中的PP2A的亚基A和C、pBRD4以及BRD4的免疫印迹分析。图6C,对照以及经不同计量的JQ1处理的SUM149细胞和表达shPP2A-C的SUM149细胞的活细胞数量。误差条代表SEM。图6D,经不同计量的吩噻嗪处理3小时之后SUM159R细胞中的pBRD4和BRD4的免疫印迹分析。图6E,经JQ1、吩噻嗪或这两种化合物处理的SUM159R细胞的活细胞数量。误差条代表SD。图6F,经JQ1(5μM)和CK2抑制剂CX-4945(10μM)处理3小时之后SUM159R细胞的BRD4免疫沉淀物和总的细胞裂解物的免疫印迹分析。图6G,经JQ1(5μM)和吩噻嗪(20μM)处理3小时之后SUM159R细胞的BRD4免疫沉淀物和总的细胞裂解物的免疫印迹分析。图6H,经JQ1(5μM)处理3小时之后表达FLAG标记的WT或突变的(7A, 7D) BRD4突变蛋白的SUM159细胞的FLAG-BRD4免疫沉淀物和总的细胞裂解物的免疫印迹分析。图6I,表达外源性WT、7A或7D突变的BRD4的SUM159细胞和SUM159R细胞的JQ1敏感性。误差条代表SEM。

[0061] 图7A至7E. TNBC中的BET溴结构域蛋白和细胞生长。图7A,表达靶向BRD4的TET诱导型shRNA或lacZ shRNA的SUM159细胞和MDA-MB-231细胞的细胞存活力。图7B,转染siRNA四天之后BET溴结构域蛋白的免疫印迹分析。图7C,在释放SUM159细胞后不同的时间点(0小时、3小时、6小时、12小时)所指示的蛋白的免疫印迹分析,所述SUM159细胞使用100ng/mL诺考达唑同步,接着重新铺板到新鲜的培养基,在释放前1小时或者释放后3小时添加DMSO或JQ1(500nM)。图7D,经JQ1(500nM)处理72小时后或使用TET诱导型shRNA下调BRD4 72小时之后SUM159细胞的细胞周期分析。图7E,经JQ1(500nM)处理72小时之后或使用TET诱导型shRNA下调BRD4 72小时之后SUM159细胞的Annexin V染色。所有误差条代表SEM。

[0062] 图8A至8G. TNBC中对BBI的响应。图8A,在经JQ1处理(500nM)之后不同的时间点SUM159细胞中(顶部)所指示的蛋白的免疫印迹分析,以及在不同的JQ1剂量下处理24小时之后SUM159和MDA-MB-436细胞中(底部)所指示的蛋白的免疫印迹分析。图8B,在经JQ1处理

(500nM) 后不同时间点SUM149细胞、SUM159细胞以及MDA-MB-231细胞中所指示的蛋白的免疫印迹分析。图8C, 经JQ1处理3天之后SUM159细胞的H&E染色。图8D, 经JQ1处理3天之后SUM159细胞和MDA-MB-231细胞的细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色。比例尺显示100 μ m。图8E, 各箱线图描绘将MDA-MB-231 (2×10^6 个) 和IDC50X (2×10^5 个) 细胞注射到NOG小鼠的腹股沟乳房脂肪垫中30天之后异种移植物的重量; n表示小鼠数量/实验。从注射16天 (MDA-MB-231) 或10天 (IDC50X) 后 (肿瘤达到可触及的大小之后) 开始, 给小鼠施用JQ1 (50mg/kg, 每天施用) 或仅载体 (对照), 进行14天。对于EL12-58 XPD, 将测量为1x3x3mm的数片组织移植到小鼠的腹股沟乳房脂肪垫中, 并从注射21天后 (肿瘤达到可触及的大小之后), 开始每天给小鼠施用JQ1 (50mg/kg), 进行14天。图8F, 在经JQ1处理或未经JQ1处理的情况下EL12-58异种植物的溴脱氧尿苷 (BrdU) 以及luminal低分子量 (低MW CK) 和基底高分子量 (高MW CK) 细胞角蛋白的染色。比例尺显示50 μ m。图8G, 表达靶向BRD4的TET诱导型shRNA的SUM159细胞的肿瘤体积。从注射21天后 (肿瘤达到可触及的大小之后) 开始, 给小鼠施用多西环素或仅载体 (对照), 进行39天。所有误差条代表SEM。

[0063] 图9A至9G. SUM149的JQ1响应。图9A, 显示SUM149中BRD4结合区域处的BRD4的 $\log_2$ 倍数变化+/-JQ1 (左侧) 或SUM149中BRD4结合区域处的H3K27ac的 $\log_2$ 倍数变化+/-JQ1 (右侧) 的箱线图。通过递增扣除背景后的BRD4结合将5,696个结合BRD4结合的区域分级, 并分成10个分离的区段 (从左向右显示)。显示出最弱与最强的BRD4结合区域区段之间的平均BRD4 $\log_2$ 倍数变化的差别的统计显著性 (韦尔奇t-测试***p-值 $<1e-10$)。图9B, 通过递增BRD4信号 (单位为rpm) 而分级的未经处理的SUM149细胞中定义的增强子的分级图。增强子定义为启动子中不包含的BRD4结合区域。通常区别于将典型与超级增强子区别开的临界值显示为灰虚线。与TNBC特征基因相关的增强子被突出显示。图9C, 显示在经JQ1处理12小时的情况下SUM149 (y轴) 与SUM159 (x轴) 中的基因表达的 $\log_2$ 倍数变化之间的关系散布图。简单的线性回归被画出。还示出了皮尔逊相关数据。图9D, 显示在经JQ1处理12小时后所有活性基因或超级增强子 (SE) 相关的基因的相对于DMSO对照的表达的 $\log_2$ 倍数变化的箱线图。所有活性基因与超级增强子相关的基因之间的表达变化的差别的统计显著性通过韦尔奇t-测试示出*p-值 $<1e-3$)。图9E至9F, 显示亲代SUM149细胞中经处理12小时之后被JQ1相对于DMSO上调 (图9E) 或下调 (图9F) 的基因处的表达的 $\log_2$ 倍数变化的箱线图。针对亲代SUM149 (左侧) 细胞或抗性SUM149R (右侧) 细胞示出了 $\log_2$ 表达倍数变化。图9G, 经不同计量的JQ1 (2 μ M, 10 μ M) 处理的SUM149 (左侧) 和SUM149R (右侧) 的活细胞数量。误差条代表SD。

[0064] 图10A至10D. SUM159R细胞的表征。图10A, SUM159细胞和SUM159R细胞中ABC转运蛋白的表达。29种ABC转运蛋白的表达基于两个细胞系的RNA-seq数据进行了分析。图10B, 基于用荧光MDR基体标记的细胞的显微镜检查 (左侧) 和FACS (右侧) 对经单独的JQ1处理或经JQ1和维拉帕米一起处理的SUM159细胞和SUM159R细胞中的MDR (多抗药性) 泵进行化验。图10C, 在对指示的蛋白进行免疫印迹之后不同的时间点经JQ1处理的SUM159细胞和SUM159R细胞中的生物素化的JQ1 (Bio-JQ1) 的免疫沉淀分析。图10D, 表达靶向BRD4的TET诱导型shRNA或lacZ shRNA的SUM159R细胞的细胞存活力。所有误差条代表SEM。

[0065] 图11A至11D. SUM159R细胞中的BRD4结合。图11A, 经JQ1处理之前或经JQ1处理3小时之后 (500nM) SUM159细胞和SUM159R细胞中的BCL-XL表达的免疫印迹分析。图11B, 显示经处理24小时之后亲代SUM159细胞中被JQ1相对于DMSO上调或下调的基因的表达的箱线图。

针对亲代SUM159 (左侧) 细胞或抗性SUM159R (右侧) 细胞在用DMSO处理和用JQ1处理的条件下表达以单位FPKM显示。示出了经DMSO处理与经JQ1处理的细胞之间的SUM159的基因表达分布的差别的统计显著性 ($p < 0.01$)。所有其它分布之间的差别被看作是非显著的 (N.S)。示出了SUM159 DMSO基因表达分布与所有其它分布之间的差别的统计显著性 (* p -值 $< 1e-3$)。所有其它分布之间的差别被看作是非显著的。图11C, SUM159细胞和SUM159R细胞中的luminal和基底细胞特异性基因以及MYC的实例。示出了RNA-seq轨迹。图11D, SUM159R异种移植物中的luminal (CK18和HMW) 和基底 (CK17和LMW) 细胞角蛋白以及luminal (VIM和CD24) 和基底 (CDH1、CD44以及pSTAT3) 细胞标记物的H&E染色和免疫荧光分析。所有误差条代表SEM。比例尺分别显示100 μ m (针对H&E) 和50 μ m (针对IF)。

[0066] 图12A至12D. 其它乳腺癌细胞系中的JQ1响应。图12A至12B, 描绘BCL-xL (图12A) 或SOD2 (图12B) 基因座处的多种TNBC细胞中的BRD4+DMSO和BRD4+JQ1的基因轨迹。x轴显示沿具有以下所画基因结构的染色体的位置。y轴显示基因组占用, 单位为rpm/bp。BCL-xL和SOD2超级增强子在顶部显示为棒。图12C, 显示多种TNBC的每个细胞系中的所有BRD4结合区域的BRD4占用log₂倍数变化+/-JQ1的箱线图。细胞系通过其JQ1 (IC₅₀) 进行排序, 并按照其敏感性给予不同的颜色。图12D, 描绘SUM149亲代细胞或SUM149R抗性细胞中BCL-xL基因座处的H3K27AC占用的基因轨迹。x轴显示沿具有以下所画基因结构的染色体的位置。y轴显示基因组占用, 单位为rpm/bp。所有误差条代表SEM。

[0067] 图13A至13H. BBI抗性的机理。图13A, 在经JQ1处理 (5 μ M, 3h) 或未经JQ1处理的情况下所指示的细胞系中针对MED1的BRD4免疫沉淀物的免疫印迹分析。图13B, 转染siRNA后长形 (BRD4L) 和短形 (BRD4S) BRD4的免疫印迹分析。图13C, SUM159细胞和SUM159R细胞中指示的外源性表达的FLAG标记的BRD4蛋白的免疫印迹分析。图13D, 经指示计量的CK2、PI3K以及MEK抑制剂处理2小时的SUM159细胞和SUM159R细胞中的磷酸-BRD4 (pBRD4) 和BRD4的免疫印迹分析。图13E, 在经JQ1处理或未经JQ1处理的情况下所指示的细胞系中的pBRD4、BRD4、MED1以及ACTB的免疫印迹分析。图13F, 经CK2抑制剂 (CX-4945, 10 μ M) 处理3小时的SUM159细胞和SUM159R细胞中的CK2基体的免疫印迹分析。图13G, 经不同计量的吩噻嗪处理6小时的所指示的细胞系中的pBRD4和BRD4的免疫印迹分析。图13H, 在经JQ1处理 (5 μ M, 3小时) 或未经JQ1处理的情况下SUM159细胞中的外源性FLAG标记的BRD4蛋白 (WT、BD、7D以及7A) 的免疫荧光分析。比例尺显示20 μ m。

[0068] 图14A至14C. 克服BBI抗性。图14A至14C, JQ1与ABT737 (BCL-xL和BCL-2抑制剂) (图14A)、CX-4945 (CK2抑制剂) (图14B) 和佩吩嗪 (PP2A活化剂) (图14C) 的协同作用研究。各点代表针对协同作用评估的药物浓度的成对值。对角线表示药物的加成性。所述线以上的各点代表对抗性药物组合, 而其下的各点则代表协同性药物组合。

[0069] 图15A和图15B. BBI联合疗法对来源于BBI抗性细胞的异种移植物的肿瘤重量的作用。带有肿瘤的小鼠具有来源于SUM149细胞 (图15A) 或SUM159细胞 (图15B) 的肿瘤, 给所述小鼠施用载体 (对照)、单一疗法 (JQ1、JAK2I、ABT 263或ABT 199) 或BBI联合疗法 (JAK2I+JQ1、ABT 263+JQ1或ABT 199+JQ1)。

[0070] 图16A至16D. 经载体、单一疗法或BBI联合疗法处理的BBI抗性SUM159异种移植物的H&E染色。从带有肿瘤的小鼠获得图像, 所述小鼠具有来源于SUM159R细胞的肿瘤, 并经作为对照的载体 (图16A, 顶图)、JQ1 (图16A, 底图)、ABT 199 (图16B, 顶图)、ABT 263 (图16B, 底

图)、INC424 (图16C, 顶图)、ABT 199+JQ1 (图16C, 底图)、ABT 263+JQ1 (图16D, 顶图)、INC424+JQ1 (图16D, 底图) 处理。

[0071] 图17. 经Bcl-x1小鼠抗体染色的BBI敏感性和BBI抗性的SUM159异种移植物的细胞荧光成像。将来源于BBI敏感性SUM159细胞 (顶部) 和BBI抗性SUM159细胞 (底部) 的异种移植物染色, 以确定Bcl-x1的相对存在。

具体实施方式

[0072] 本公开提供了确认对使用BET溴结构域抑制剂 (BBI) 的疗法具有抗性或者可能会变得对使用BBI的疗法具有抗性的受试者并进行治疗的方法。本公开的一些方面涉及使用联合疗法治疗这种癌症。

[0073] 根据本发明, 发现对BBI具有抗性的癌症仍然依赖于野生型BRD4, 其以独立于溴结构域的方式支持转录和细胞增殖。在抗性细胞中, BRD4由于其超磷酸化而被吸收到染色质, 其超磷酸化可归因于降低的蛋白磷酸酶2A (PP2A; 目前确认为主要的BRD4丝氨酸磷酸酶) 活性和增强的与中介体复合物亚基1 (MED1) 的结合。使用BRD4磷酸化调节剂, 诸如酪蛋白激酶II (CK2) 抑制剂或PP2A活化剂, 抑制抗性细胞中的BRD4磷酸化在BRD4免疫沉淀实验中引起MED1丰度的降低, 表明磷酸化的BRD4 (pBRD4) 比未磷酸化的BRD4更有效地与MED1结合。

[0074] 此外, 差别超级增强子 (SE) 分析发现抗性细胞中SE数目的显著增加, 这与结合到这些基因组基因座的BRD4的富集相关, 还与相关基因的转录增加相关。增加最多的超级增强子是BCL-xL基因座处的H3K27ac富集的上游和基因内区域。特别地, 从表达谱来看BCL-xL和Bcl-2属于抗性细胞中的少数几种高度上调的基因, 这一发现分别由免疫印迹和荧光成像确认。在不期望被任何特定理论所限制的条件下, 预期这些抗细胞凋亡因子的失调的增加的表达在长期BBI治疗中会赋予细胞凋亡抗性。结合起来, 这些发现为预期并克服BBI抗性的联合策略 (例如与PP2A活化剂、CK2抑制剂、Bcl-2抑制剂、BCL-xL抑制剂或MED1抑制剂结合) 提供基本原理。

[0075] 重要的是, 在BET溴结构域抑制剂JQ1与靶向BCL-XL的分子 (ABT737)、CK2抑制剂 (CX-4945)、JAK2抑制剂 (INC 424)、Bcl-x1/Bcl-2抑制剂 (ABT 263)、Bcl-2抑制剂 (ABT 199) 以及PP2A活化剂 (佩吩嗪; PPZ) 之间观察到显著的协同作用, 表明这些药物组合在抗性细胞中实现更高的效力。

[0076] 治疗方法

[0077] 因此, 本公开的各方面提供了一种用来治疗癌症的方法, 所述方法包含以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂和蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂。

[0078] 本公开的一些方面提供了用来治疗癌症的方法, 所述方法包含以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用含溴结构域蛋白抑制剂和B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂。

[0079] 本公开的一些方面提供了用来治疗癌症的方法, 所述方法包含以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用含溴结构域蛋白抑制剂和特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂。

[0080] 本公开的一些方面提供了用来治疗癌症的方法, 所述方法包含以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用含溴结构域蛋白抑制剂和酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂。

[0081] 本公开的一些方面提供了用来治疗癌症的方法,所述方法包含以有效治疗所述癌症的量给有此需要的受试者施用含溴结构域蛋白抑制剂和中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。

[0082] 术语“癌症”是指其特征在于以下的一类疾病:产生异常细胞,其会不受控制地增殖,并且具有侵入并破坏正常的身体组织的能力。参见,例如,《斯特德曼医学词典 (Stedman's Medical Dictionary) 》,第25版;Hensyl编辑;Williams&Wilkins:《费城 (Philadelphia) 》,1990。示例性的癌症包括(但不限于)血液恶性肿瘤。术语“血液恶性肿瘤”是指会影响血液、骨髓和/或淋巴结的肿瘤。示例性的血液恶性肿瘤包括(但不限于):白血病,例如急性淋巴细胞白血病(ALL)(例如B-细胞ALL、T-细胞ALL)、急性髓细胞白血病(AML)(例如B-细胞AML、T-细胞AML)、慢性髓细胞白血病(CML)(例如B-细胞CML、T-细胞CML)以及慢性淋巴细胞白血病(CLL)(例如B-细胞CLL、T-细胞CLL);淋巴瘤,例如何杰金氏淋巴瘤(HL)(例如B-细胞HL、T-细胞HL)和非何杰金氏淋巴瘤(NHL)(例如B-细胞NHL,诸如弥漫大细胞淋巴瘤(DLCL)(例如弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL,例如活化B-细胞(ABC)DLBCL(ABC-DLBCL)))、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤(CLL/SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区B细胞淋巴瘤(例如粘膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、沃尔丹斯特伦巨球蛋白血症(WM,淋巴浆细胞淋巴瘤)、毛细胞白血病(HCL)、免疫大细胞淋巴瘤、前体B淋巴细胞淋巴瘤、中枢神经系统(CNS)淋巴瘤(例如原发性CNS淋巴瘤和继发性CNS淋巴瘤);以及T-细胞NHL,例如前体T-淋巴细胞淋巴瘤/白血病、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)(例如皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)(例如蕁样霉菌病、塞扎莱综合征)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、肠病型T细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤以及间变性大细胞淋巴瘤);免疫特权位点淋巴瘤(例如大脑淋巴瘤、眼淋巴瘤、胎盘淋巴瘤、胎儿淋巴瘤、睾丸淋巴瘤);如上所述白血病/淋巴瘤中的一或多种的混合物;脊髓发育不良;以及多发性骨髓瘤(MM)。另外的示例性的癌症包括(但不限于):肺癌(例如支气管癌、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌);肾癌(例如肾胚胎细胞瘤,还称作韦尔姆斯氏瘤、肾细胞癌);听觉神经瘤;腺癌;肾上腺癌;肛门癌;血管肉瘤(例如淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、血管内皮瘤);阑尾癌;良性单株丙种球蛋白病;胆管癌(例如胆管细胞癌);膀胱癌;乳癌(例如乳腺腺癌、乳腺乳头状癌、三阴性乳腺癌、乳腺癌、乳腺髓样癌);脑癌(例如脑膜瘤、神经胶质瘤、神经胶质瘤(例如星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤)、髓母细胞瘤);支气管癌;类癌;宫颈癌(例如宫颈腺癌);绒毛膜癌;脊索瘤;颅咽管瘤;结直肠癌(例如结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌);结缔组织癌;上皮癌;室管膜瘤;内皮肉瘤(例如卡波西肉瘤、多发性特发性出血性肉瘤);子宫内膜癌(例如子宫癌、子宫肉瘤);食管癌(例如食道腺癌、巴雷特腺癌);尤因氏肉瘤;眼癌(例如眼内黑素瘤、视网膜母细胞瘤);常见嗜酸球增多症;胆囊癌;胃癌(例如胃腺癌);胃肠道基质肿瘤(GIST);生殖细胞癌;头颈癌(例如头颈部鳞状细胞癌、口腔癌(例如口腔鳞状细胞癌)、咽喉癌(例如喉癌、咽癌、鼻咽癌、口咽癌));重链病(例如 α 链病、 γ 链病、 μ 链病);成血管瘤;下咽癌;炎性成肌纤维细胞瘤;免疫细胞淀粉样变;肝癌(例如肝细胞癌(HCC)、恶性肝细胞瘤);平滑肌肉瘤(LMS);肥大细胞增多症(例如系统性肥大细胞增生症);肌肉癌;脊髓发育不良综合征(MDS);间皮瘤;骨髓增生性疾病(MPD)(例如真性红细胞增多症(PV)、特发性血小板增多症(ET)、原因不明骨髓组织异生(AMM)(还称作骨髓纤维化

症(MF))、慢性特发性髓样化生、慢性髓细胞白血病(CML)、慢性中性粒细胞性白血病(CNL)、嗜酸细胞过多综合征(HES))；成神经细胞瘤；神经纤维瘤(例如1型或2型神经纤维瘤(NF)、神经鞘瘤)；神经内分泌瘤(例如胃肠胰腺神经内分泌瘤(GEP-NET)、类癌瘤)；骨肉瘤(例如骨癌)；卵巢癌(例如囊腺癌、卵巢胚胎性癌、卵巢腺癌)；乳头状腺癌；胰腺癌(例如肺腺腺癌、胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(IPMN)、胰岛细胞瘤)；阴茎癌(例如阴茎阴囊Paget病)；松果体瘤；原始神经外胚层肿瘤(PNT)；浆细胞瘤；类肿瘤综合征；上皮内瘤变；前列腺癌(例如前列腺腺癌)；直肠癌；横纹肌肉瘤；唾液腺癌；皮肤癌(例如鳞状细胞癌(SCC)、角化棘皮瘤(KA)、黑素瘤、基底细胞癌(BCC))；小肠癌(例如阑尾癌)；软组织肉瘤(例如恶性纤维组织细胞瘤(MFH)、脂肪肉瘤、恶性周围神经鞘膜瘤(MPNST)、内生软骨肉瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤)；皮脂腺癌；小肠癌；汗腺癌；良性滑膜瘤；睾丸癌(例如精原细胞瘤、睾丸胚胎癌)；甲状腺癌(例如甲状腺乳头状癌、乳头状甲状腺癌(PTC)、甲状腺髓样癌)；尿道癌；阴道癌；以及外阴癌(例如外阴Paget病)。在一些实施例中，癌症为乳腺癌。在一些实施例中，癌症为三阴性乳腺癌。

[0083] 在一些实施例中，所述癌症对使用BET抑制剂的治疗具有抗性。对BET抑制剂具有抗性的癌症意味着所述癌症对这种抑制剂没有响应，这可由(例如)持续的增殖以及持续增加的肿瘤生长和负荷证明。在一些情况下，所述癌症可能最初对使用这种抑制剂的治疗(在本文中称作在先施用的疗法)具有响应，但是在一段时间之后可能会产生抗性。在一些情况下，所述癌症可能从未对使用这种抑制剂的治疗产生响应。

[0084] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”和“治疗(treating)”是指逆转、缓解癌症、延迟癌症发作或抑制癌症发展。在一些实施例中，可在产生或观察到疾病的一或多个信号或症状之后施用治疗。在其它实施例中，可在缺少疾病的信号或症状的情况下施用治疗。例如，可在症状发作之前对易患受试者进行治疗(例如根据症状历史和/或根据接触的病原体)。可在症状消退之后继续治疗，以(例如)延迟和/或防止复发。

[0085] 术语“抑制(inhibition)”、“抑制(inhibiting)”、“抑制(inhibit)”或“抑制剂(inhibitor)”是指与载体相比，化合物减少、减慢、阻止和/或防止细胞中某一生物过程的活性的能力。在一些实施例中，“抑制”、“阻碍”、“压制”或“防止”意思是被抑制、阻碍、压制或防止的活性与对照的活性(例如在不存在抑制剂的情况下的活性)相比被减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在一些实施例中，“抑制”、“阻碍”、“压制”或“防止”意思是与对照的表达(例如在不存在抑制剂的情况下的表达)相比，抑制剂的靶点(例如含溴结构域蛋白)的表达被减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%。

[0086] “有效量”是指足以引起期望的生物响应(即治疗癌症)的量。本领域普通技术人员应理解，本文所述的化合物的有效量可根据诸如期望的生物终点、化合物的药代动力学、所治疗的状况、给药方式以及受试者的年龄和健康状况等因素而改变。有效量包括(但不限于)减缓、减少、抑制、改善或逆转一或多个与癌症相关的症状需要的量。例如，在癌症治疗中，这种术语可以指肿瘤大小的减小。

[0087] 在给受试者施用两种或更多种抑制剂的情况下，有效量可以是组合的有效量。当其第二种和任选地第三种抑制剂一起使用时，第一种抑制剂的有效量可能是不同的。当

两种或更多种抑制剂一起使用时,每种的有效量可与它们单独使用时的有效量相同。

[0088] 或者,由于在更小的剂量下获得所期望的效果,每种的有效量可比它们单独使用时的有效量更小。或者,再一次,每种的有效量可比它们单独使用时的有效量更大,这是由于受试者能够更好地耐受一或多种抑制剂,于是便可以以更大的剂量施用所述抑制剂,只要这种更大的剂量会提供更多的治疗益处。

[0089] 化合物的有效量在单次或多次给药中可为从约0.001mg/kg至约1000mg/kg,进行一日或多日(取决于给药方式)。在某些实施例中,有效量为从约0.001mg/kg至约1000mg/kg、从约0.01mg/kg至约750mg/kg、从约0.1mg/kg至约500mg/kg、从约1.0mg/kg至约250mg/kg以及从约10.0mg/kg至约150mg/kg。本领域普通技术人员将能够凭经验确定适当的治疗有效量。

[0090] 如在全文中所使用,术语“受试者”或“患者”旨在包括易患癌症或者直接或间接涉及癌症的任何疾患或者易受其折磨的人类和动物。受试者的实例包括哺乳动物,例如人、狗、母牛、马、猪、绵羊、山羊、猫、小鼠、兔、大鼠以及转基因非人类动物。在一些实施例中,受试者包括伴侣动物,例如狗、猫、兔以及大鼠。在一些实施例中,受试者包括家畜,例如母牛、猪、绵羊、山羊以及兔。在一些实施例中,受试者包括完全饲养动物或展示动物,例如马、猪、母牛以及兔。在重要的实施例中,受试者为人类,例如患有癌症的人类、面临患上癌症的风险的人类或者可能易患癌症的人类。

[0091] “有治疗需要的受试者”为确认患有癌症的受试者,即经医师诊断患有癌症的受试者(例如使用本领域众所周知的方法)。在一些实施例中,有治疗需要的受试者为怀疑患有癌症或者怀疑患上癌症的受试者,例如呈现指示癌症的一或多种症状的受试者。术语“有治疗需要的受试者”进一步包括曾经患有癌症但是其症状已经改善的人。癌症的一或多种症状或临床特征取决于肿瘤的类型和位置。例如,肺肿瘤可能会导致咳嗽、气短或胸痛。结肠肿瘤可导致失重、腹泻、便秘、缺铁性贫血以及便血。大部分肿瘤会发生以下症状:发冷、疲劳、发烧、食欲不振、全身乏力、盗汗以及失重。如本文使用的术语“施用(administer)”、“施用(administering)”或“给药(administration)”是指植入、吸收、摄取、注射或吸入一或多种治疗剂。

[0092] 在一些实施例中,进一步使用一或多种另外的抗肿瘤疗法对受试者进行治疗。例如,受试者可进行手术、放疗、化疗、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、辅佐疗法、免疫疗法或其组合。

[0093] 本文所述化合物可以任何顺序给受试者施用。第一种治疗剂,诸如BET抑制剂,可在给患癌受试者施用本文所述的第二种治疗剂,诸如PP2A活化剂、Bcl-2抑制剂、Bcl-x1抑制剂、CK2抑制剂或MED1抑制剂之前(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之前)、同时或之后(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之后)施用。因此,BET抑制剂可与本文所述的第二种治疗剂,诸如PP2A活化剂、Bcl-2抑制剂、Bcl-x1抑制剂、CK2抑制剂或MED1抑制剂分别、依次或同时施用。

[0094] 本文所述化合物可通过任何途径施用,包括肠内(例如口服)、肠胃外、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、皮下、心室内、经皮、皮内、直肠、阴道内、腹膜内、局部(作为粉末、软

膏、霜剂和/或滴剂)、经粘膜、经鼻、口含、舌下;通过气管内滴注、支气管滴注和/或吸入;并且/或者作为口喷剂、鼻喷剂和/或气雾剂。特别考虑的途径为口服给药、静脉内给药(例如系统性静脉内注射)、通过血液供应和/或淋巴供应的区域性给药以及/或者给患部的直接给药。一般而言,最适当的给药途径将取决于各种因素,包括药物性质(例如其在胃肠道环境中的稳定性)和/或受试者的状况(例如受试者是否能够耐受口服给药)。

[0095] 获得有效量需要的化合物的确切的量将随着受试者的不同而变化,这取决于(例如)受试者的物种、年龄和总体状况、副作用或疾患的严重程度、特定化合物的特征、给药方式等。期望的剂量可以是每日施用3次,每日2次,每日1次,每两日1次,每三日1次,每周1次,每两周1次,每三周1次,或每四周1次。在某些实施例中,期望的剂量可使用多次给药(例如两次给药、三次给药、四次给药、五次给药、六次给药、七次给药、八次给药、九次给药、十次给药、十一次给药、十二次给药、十三次给药、十四次给药或更多次给药)施用。

[0096] 在某些实施例中,每日向70kg成年人给药一次或多次的化合物的有效量可包含每个单位剂量形式约0.0001mg至约3000mg、约0.0001mg至约2000mg、约0.0001mg至约1000mg、约0.001mg至约1000mg、约0.01mg至约1000mg、约0.1mg至约1000mg、约1mg至约1000mg、约1mg至约100mg、约10mg至约1000mg或约100mg至约1000mg化合物。

[0097] 在某些实施例中,本文提供的化合物可每日一次或多次以足以递送从约0.001mg/kg至约100mg/kg、从约0.01mg/kg至约50mg/kg、优选地从约0.1mg/kg至约40mg/kg、优选地从约0.5mg/kg至约30mg/kg、从约0.01mg/kg至约10mg/kg、从约0.1mg/kg至约10mg/kg以及更优选地从约1mg/kg至约25mg/kg的受试者体重每天的剂量水平施用,以获得期望的治疗效果。

[0098] 应认识到,如本文所述的剂量范围为向成人给药所提供的药物组合物提供指导。给(例如)儿童或青少年施用的量可由医疗人员或本领域技术人员确定,并且可比给成人施用的量更低或相同。

[0099] 溴结构域抑制剂

[0100] 溴结构域抑制剂在本领域是已知的。溴结构域抑制剂为可部分或全部防止或抑制至少一种溴结构域与蛋白的乙酰基赖氨酸残基结合(例如与组蛋白的乙酰基赖氨酸残基结合)的任何分子或化合物。溴结构域抑制剂可以是如上所述的抑制溴结构域的任何分子或化合物,包括核酸(诸如DNA和RNA)、反义寡核苷酸、siRNA和shRNA、小肽、抗体或抗体片段以及小分子,诸如小化合物。应理解,溴结构域抑制剂可抑制仅一种含溴结构域蛋白,或者它可以抑制一种以上或所有的含溴结构域蛋白。

[0101] 在以下文献中描述了溴结构域抑制剂的实例:JP2009028043、JP2009183291、W02011054843、W02011054848、W02009/084693A1、W02009084693、W02011054844、W02011054846、US2012028912、Filippakopoulos等人《生物有机化学与医药化学(Bioorg Med Chem.)》20(6):1878-1886,2012;Chung等人《药物化学杂志(J Med Chem.)》54(11):3827-38,2011;以及Chung等人《生物分子筛选杂志(J Biomol Screen.)》16(10):1170-85,2011,其通过引用并入本文。

[0102] 在一些实施例中,溴结构域抑制剂为1-[2-(1/-/-苯并咪唑-2-基硫基)乙基]-1,3-二氢-3-甲基-2H-苯并咪唑-2-硫酮(JP2008-156311)、阿普唑仑(Sigma-Aldrich)、咪达唑仑(Sigma-Aldrich,GW841819X(BZD,GlaxoSmithKline)、表1中的化合物(W0

2011054843) 或者本文所述的任何其它溴结构域抑制剂化合物。

[0103] 表1: 溴结构域抑制剂的实例

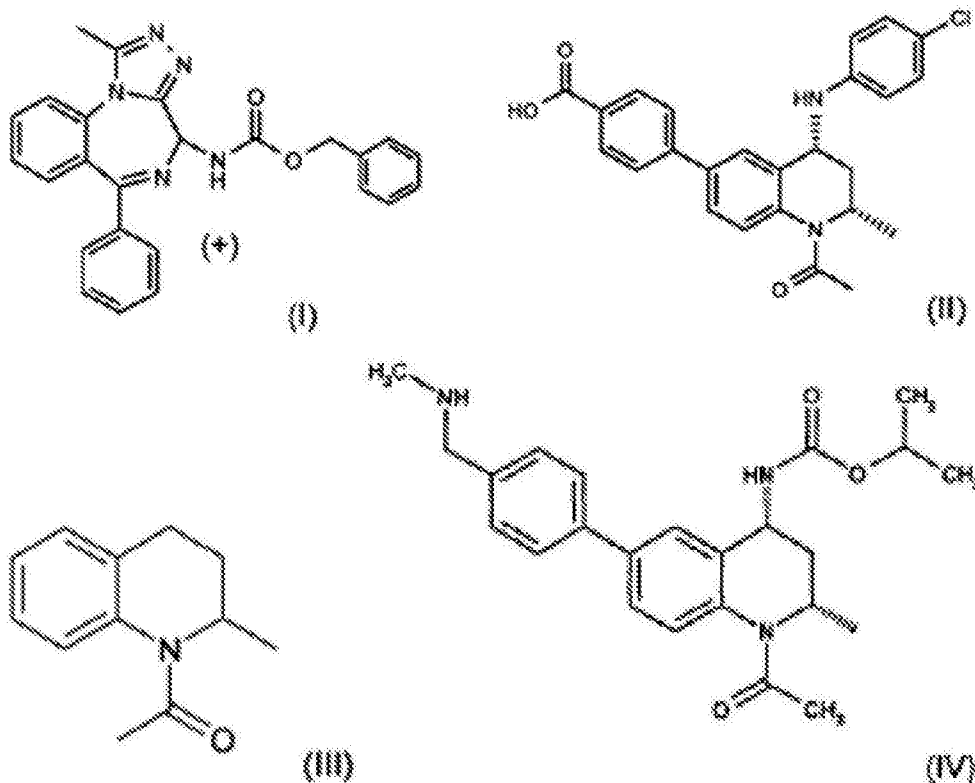
[0104]

	名称	结构
实例 1	((2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-乙酰基-2-甲基-6-{4-[(甲基氨基)甲基]苯基}-1,2,3,4-四氢-4-喹啉基)氨基甲酸 1-甲基乙酯	
实例 2	2-[(4 <i>S</i>)-6-(4-氯苯基)-1-甲基-8-(甲氧基)-4 <i>H</i> -[1,2,4]三唑并[4,3- <i>a</i>][1,4]苯二氮平-4-基]- <i>N</i> -乙基乙酰胺	
实例 3	7-(3,5-二甲基-4-异噁唑基)-8-(甲氧基)-1-[(1 <i>R</i>)-1-(2-吡啶基)乙基]-1,3-二氢-2 <i>H</i> -咪唑并[4,5- <i>c</i>]喹啉-2-酮	
实例 4	7-(3,5-二甲基-4-异噁唑基)-8-(甲氧基)-1-[(1 <i>R</i>)-1-苯基乙基]-2-(四氢-2 <i>H</i> -吡喃-4-基)-1 <i>H</i> -咪唑并[4,5- <i>c</i>]喹啉	
实例 5	4-{(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-乙酰基-4-[(4-氯苯基)氨基]-2-甲基-1,2,3,4-四氢-6-喹啉基}苯甲酸	
实例 6	<i>N</i> -{1-甲基-7-[4-(1-哌啶基甲基)苯基][1,2,4]三唑并[4,3- <i>a</i>]喹啉-4-基}脲	

[0105] 在一些实施例中, 溴结构域抑制剂为BET抑制剂。BET抑制剂为可防止或抑制至少一个BET家族成员的溴结构域与蛋白质的乙酰基-赖氨酸残基结合的任何分子或化合物。BET抑制剂可以是如上所述的抑制BET的任何分子或化合物, 包括核酸 (诸如DNA和RNA适体)、反义寡核苷酸、siRNA和shRNA、小肽、抗体或抗体片段以及小分子, 诸如小化合物。

[0106] BET抑制剂的实例在US2011143651、W02009/084693A1、W02011143669、W02011143660、W02011054851以及JP2008156311中进行了描述, 其通过引用并入本文。应理解, BET抑制剂可抑制仅一个BET家族成员, 或者它可以抑制一个以上或所有的BET家族成员。本领域已知的BET抑制剂的实例包括 (但不限于) RVX-208 (Resverlogix)、PFI-1

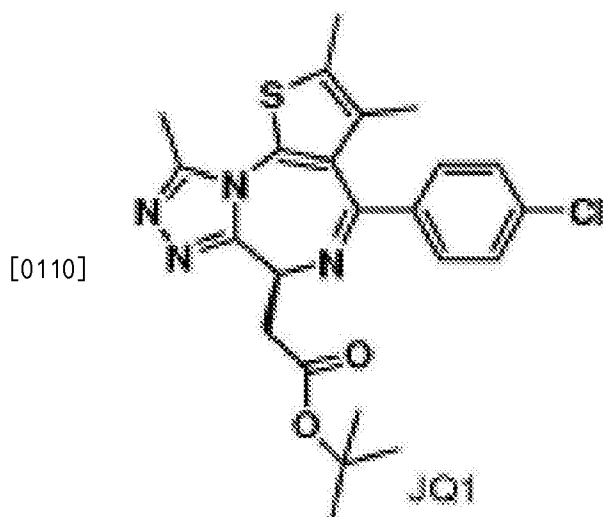
(Structural Genomics Consortium)、OTX015 (Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation)、BzT-7、GSK525762A (iBET, GlaxoSmithKline) 以及以下化合物 (W02011054851, GlaxoSmithKline):



[0107]

[0108] 在一些实施例中, BET抑制剂为与BET家族成员 (例如BRD1、BRD2、BRD3、BRD4、BRD7、BRDT; 参见W02011143669) 的第一溴结构域的结合口袋结合的小分子化合物 (例如JQ1或其衍生物和式I-XXII化合物或本文所述的任何其它化合物)。

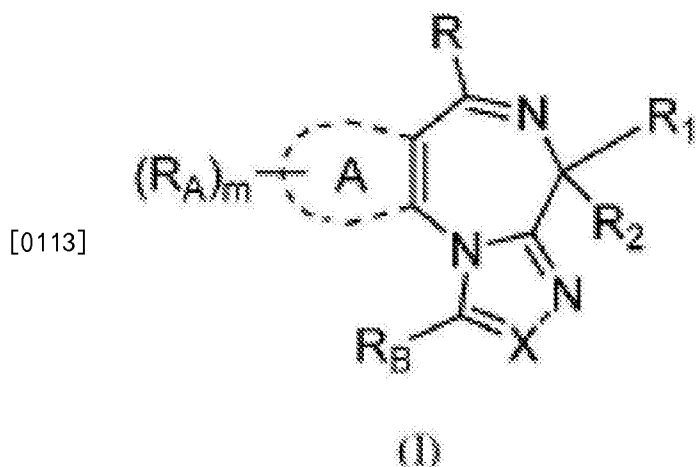
[0109] 在一些重要的实施例中, BET抑制剂为JQ1, 并具有以下化学式:



[0110]

[0111] 在一些实施例中, BET抑制剂具有式I-XXII结构或如下所述的任何其它化合物的结构。这些结构在本领域中是已知的 (W02011143660, 其通过引用并入本文)。

[0112] 在一些实施例中, 溴结构域或BET抑制剂为式I化合物:



[0114] 其中X为N或CR₅;R₅为H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;R_B为H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤代烷基、羟基、烷氧基或-COO-R₃,其各自任选地被取代;环A为芳基或杂芳基;每个R_A独立地为烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;或者任何两个R_A跟与其连接的原子一起可形成稠合的芳基或杂芳基;R为烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基;其各自任选地被取代;

[0115] R₁为-(CH₂)_n-L,其中n为0至3,L为H、-COO-R₃、-CO-R₃、-CO-N(R₃R₄)、-S(O)₂-R₃、-S(O)₂-N(R₃R₄)、N(R₃R₄)、N(R₄)C(O)R₃、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;

[0116] R₂为H、D(氘)、卤素或任选取代的烷基;

[0117] 每个R₃独立地选自由以下组成的群组:

[0118] (i) H、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基;

[0119] (ii) 杂环烷基或取代的杂环烷基;

[0120] (iii) -C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基或-C₂-C₈炔基,每个含有0个、1个、2个或3个选自O、S或N的杂原子;-C₃-C₁₂环烷基、取代的-C₃-C₁₂环烷基、-C₃-C₁₂环烯基或取代的-C₃-C₁₂环烯基,其各自可任选地被取代;以及

[0121] (iv) NH₂、N=CR₄R₆;

[0122] 每个R₄独立地为H、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;

[0123] 或者R₃和R₄跟与其连接的氮原子一起形成4至10元环;

[0124] R₆为烷基、烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;

或者R₄和R₆跟与其连接的碳原子一起形成4至10元环;

[0125] m为0、1、2或3;

[0126] 条件是

[0127] (a) 如果环A为噻吩基,X为N,R为苯基或取代的苯基,R₂为H,R_B为甲基,并且R₁为-(CH₂)_n-L,其中n为1且L为-CO-N(R₃R₄),那么R₃和R₄不跟与其连接的氮原子一起形成吗啉环;

[0128] (b) 如果环A为噻吩基,X为N,R为取代的苯基,R₂为H,R_B为甲基,并且R₁为-(CH₂)_n-L,其中n为1且L为-CO-N(R₃R₄),并且R₃和R₄中的一个为H,那么R₃和R₄中的另一个不是甲基、羟基乙基、烷氧基、苯基、取代的苯基、吡啶基或取代的吡啶基;以及

[0129] (c) 如果环A为噻吩基,X为N,R为取代的苯基,R₂为H,R_B为甲基,并且R₁为-(CH₂)_n-L,其中n为1且L为-COO-R₃,那么R₃不是甲基或乙基;

[0130] 或其盐、溶剂化物或水合物。

[0131] 在某些实施例中, R为芳基或杂芳基, 其各自任选地被取代。

[0132] 在某些实施例中, L为H、 $-\text{COO}-\text{R}_3$ 、 $-\text{CO}-\text{N}(\text{R}_3\text{R}_4)$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}_3$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R}_3\text{R}_4)$ 、 $\text{N}(\text{R}_3\text{R}_4)$ 、 $\text{N}(\text{R}_4)\text{C}(\text{O})\text{R}_3$ 或任选取代的芳基。在某些实施例中, 每个 R_3 独立地选自由以下组成的群组: H、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基(其任选地被取代, 含有0个、1个、2个或3个选自O、S或N的杂原子)或者 NH_2 、 $\text{N}=\text{CR}_4\text{R}_6$ 。

[0133] 在某些实施例中, R_2 为H、D、卤素或甲基。

[0134] 在某些实施例中, R_B 为烷基、羟基烷基、卤代烷基或烷氧基; 其各自任选地被取代。

[0135] 在某些实施例中, R_B 为甲基、乙基、羟基甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、 COOH 、 COOMe 、 COOEt 或 $\text{COOCH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 。

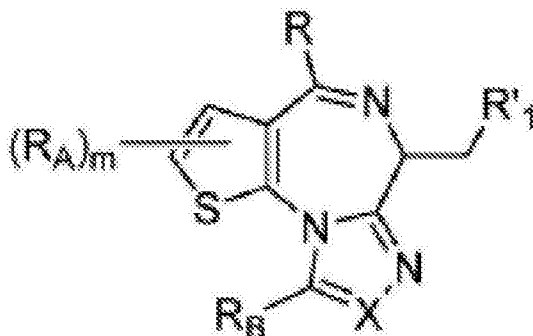
[0136] 在某些实施例中, 环A为5元或6元芳基或杂芳基。在某些实施例中, 环A为硫代呋喃基、苯基、萘基、联苯基、四氢萘基、茚满基、吡啶基、呋喃基、吡咯基、噻吩基、吡嗪基、咪唑基、恶唑基、噻吩基、噻唑基、三唑基、异恶唑基、喹啉基、吡咯基、吡啶基或5,6,7,8-四氢异喹啉基。

[0137] 在某些实施例中, 环A为苯基或噻吩基。

[0138] 在某些实施例中, m为1或2, 并且至少一次出现的 R_A 为甲基。

[0139] 在某些实施例中, 每个 R_A 独立地为H、任选取代的烷基, 或者任意两个 R_A 可跟与其连接的原子一起形成芳基。

[0140] 在一些实施例中, 溴结构域或BET抑制剂为式II化合物:



[0141]

(II)

[0142] 其中X为N或 CR_5 ; R_5 为H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基, 其各自任选地被取代; R_B 为H、烷基、羟基烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤代烷基、羟基、烷氧基或 $-\text{COO}-\text{R}_3$, 其各自任选地被取代;

[0143] 每个 R_A 独立地为烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基, 其各自任选地被取代; 或者任意两个 R_A 可跟与其连接的原子一起形成稠合的芳基或杂芳基;

[0144] R为烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基, 其各自任选地被取代;

[0145] R'_1 为H、 $-\text{COO}-\text{R}_3$ 、 $-\text{CO}-\text{R}_3$ 、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;

[0146] 每个 R_3 独立地选自由以下组成的群组:

[0147] (i) H、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基;

[0148] (ii) 杂环烷基或取代的杂环烷基;

[0149] (iii) $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基,每个含有0个、1个、2个或3个选自O、S或N的杂原子; $-C_3-C_{12}$ 环烷基、取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烷基; $-C_3-C_{12}$ 环烯基或取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烯基;其各自可任选地被取代;

[0150] m为0、1、2或3;

[0151] 条件是如果 R'_1 为 $-COO-R_3$,X为N,R为取代的苯基,并且 R_B 为甲基,那么 R_3 不是甲基或乙基;

[0152] 或其盐、溶剂化物或水合物。

[0153] 在某些实施例中,R为芳基或杂芳基,其各自任选地被取代。在某些实施例中,R为苯基或吡啶基,其各自任选地被取代。在某些实施例中,R为p-C1-苯基、o-C1-苯基、m-C1-苯基、p-F-苯基、o-F-苯基、m-F-苯基或吡啶基。

[0154] 在某些实施例中, R'_1 为 $-COO-R_3$ 、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基; R_3 为 $-C_1-C_8$ 烷基,其含有0个、1个、2个或3个选自O、S或N的杂原子,并且其可任选地被取代。在某些实施例中, R'_1 为 $-COO-R_3$, R_3 为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基或叔丁基;或者 R'_1 为H或任选取代的苯基。

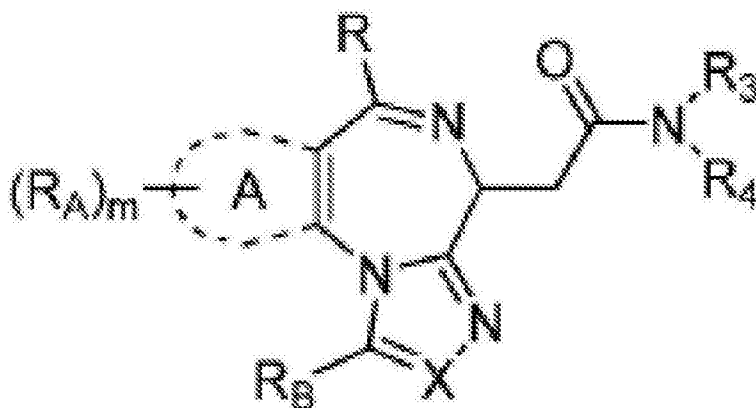
[0155] 在某些实施例中, R_B 为甲基、乙基、羟基甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、 $COOEt$ 、 $COOCH_2OC(O)CH_3$ 。

[0156] 在某些实施例中, R_B 为甲基、乙基、羟基甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、 $COOEt$ 、或 $COOCH_2OC(O)CH_3$ 。

[0157] 在某些实施例中,每个 R_A 独立地为任选取代的烷基,或者任意两个 R_A 可跟与其连接的原子一起形成稠合的芳基。

[0158] 在某些实施例中,每个 R_A 为甲基。

[0159] 在一些实施例中,溴结构域或BET抑制剂为式III化合物:



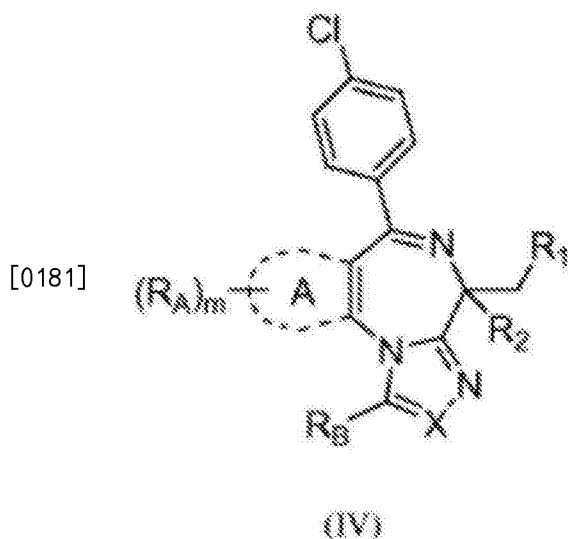
[0160]

(III)

[0161] 其中

[0162] X为N或 CR_5 ; R_5 为H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代; R_B 为H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤代烷基、羟基、烷氧基或 $-COO-R_3$,其各自任选地被取代;环A为芳基或杂芳基;每个 R_A 独立地为烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;或者任意两个 R_A 可跟与其连接的原子一起形成稠合的芳基或杂芳基;

- [0163] R为烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;
- [0164] 每个 R_3 独立地选自由以下组成的群组:
- [0165] (i) H、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基;
- [0166] (ii) 杂环烷基或取代的杂环烷基;
- [0167] (iii) $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基,每个含有0个、1个、2个或3个选自O、S或N的杂原子; $-C_3-C_{12}$ 环烷基、取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烷基、 $-C_3-C_{12}$ 环烯基或取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烯基,其各自可任选地被取代;以及
- [0168] (iv) NH_2 、 $N=CR_4R_6$;
- [0169] 每个 R_4 独立地为H、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;或者 R_3 和 R_4 跟与其连接的氮原子一起形成4至10元环;
- [0170] R_6 为烷基、烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;或者 R_4 和 R_6 跟与其连接的碳原子一起形成4至10元环;
- [0171] m为0、1、2或3;
- [0172] 条件是:
- [0173] (a) 如果环A为噻吩基,X为N,R为苯基或取代的苯基, R_B 为甲基,那么 R_3 和 R_4 不跟与其连接的氮原子一起形成吗啉环;并且
- [0174] (b) 如果环A为噻吩基,X为N,R为取代的苯基, R_2 为H, R_B 为甲基,并且 R_3 和 R_4 中的一个为H,那么 R_3 和 R_4 中的另一个不是甲基、羟基乙基、烷氧基、苯基、取代的苯基、吡啶基或取代的吡啶基;
- [0175] 或其盐、溶剂化物或水合物。
- [0176] 在某些实施例中,R为芳基或杂芳基,其各自任选地被取代。在某些实施例中,R为苯基或吡啶基,其各自任选地被取代。
- [0177] 在某些实施例中,R为p-C1-苯基、o-C1-苯基、m-C1-苯基、p-F-苯基、o-F-苯基、m-F-苯基或吡啶基。在某些实施例中, R_3 为H、 NH_2 或 $N=CR_4R_6$ 。
- [0178] 在某些实施例中,每个 R_4 独立地为H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基;其各自任选地被取代。
- [0179] 在某些实施例中, R_6 为烷基、烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代。
- [0180] 在一些实施例中,溴结构域或BET抑制剂为式IV化合物:



[0182] 其中X为N或CR₅;R₅为H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;

[0183] R₆为H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤代烷基、羟基、烷氧基或-COO-R₃,其各自任选地被取代;

[0184] 环A为芳基或杂芳基;

[0185] 每个R_A独立地为烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;或者任意两个R_A可跟与其连接的原子一起形成稠合的芳基或杂芳基;

[0186] R₁为-(CH₂)_n-L,其中n为0至3,L为H、-COO-R₃、-CO-R₃、-CO-N(R₃R₄)、-S(O)₂-R₃、-S(O)₂-N(R₃R₄)、N(R₃R₄)、N(R₄)C(O)R₃、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;

[0187] R₂为H、D、卤素或任选取代的烷基;

[0188] 每个R₃独立地选自由以下组成的群组:

[0189] (i) H、芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基;

[0190] (ii) 杂环烷基或取代的杂环烷基;

[0191] (iii) -C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基或-C₂-C₈炔基,每个含有0个、1个、2个或3个选自O、S或N的杂原子;-C₃-C₁₂环烷基、取代的-C₃-C₁₂环烷基、-C₃-C₁₂环烯基或取代的-C₃-C₁₂环烯基,其各自可任选地被取代;以及

[0192] (iv) NH₂、N=CR₄R₆;

[0193] 每个R₄独立地为H、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;

[0194] 或者R₃和R₄跟与其连接的氮原子一起形成4至10元环;

[0195] R₆为烷基、烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其各自任选地被取代;或者R₄和R₆跟与其连接的碳原子一起形成4至10元环;

[0196] m为0、1、2或3;

[0197] 条件是:

[0198] (a) 如果环A为噻吩基,X为N,R₂为H,R₆为甲基,并且R₁为-(CH₂)_n-L,其中n为0,L为-CO-N(R₃R₄),那么R₃和R₄不跟与其连接的氮原子一起形成吗啉环;

[0199] (b) 如果环A为噻吩基,X为N,R₂为H,R₆为甲基,并且R₁为-(CH₂)_n-L,其中n为0,L为-

CO-N(R₃R₄), 并且R₃和R₄中的一个为H, 那么R₃和R₄中的另一个不是甲基、羟基乙基、烷氧基、苯基、取代的苯基、吡啶基或取代的吡啶基; 以及

[0200] (c) 如果环A为噻吩基, X为N, R₂为H, R_B为甲基, 并且R₁为-(CH₂)_n-L, 其中n为0, L为-COO-R₃, 那么R₃不是甲基或乙基; 或其盐、溶剂化物或水合物。

[0201] 在某些实施例中, R₁为-(CH₂)_n-L, 其中n为0至3, L为-COO-R₃、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基; 并且R₃为-C₁-C₈烷基, 其含有0个、1个、2个或3个选自O、S或N的杂原子, 并且其可任选地被取代。在某些实施例中, n为1或2, L为烷基或-COO-R₃, R₃为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基或叔丁基; 或者n为1或2, L为H或任选取代的苯基。

[0202] 在某些实施例中, R₂为H或甲基。

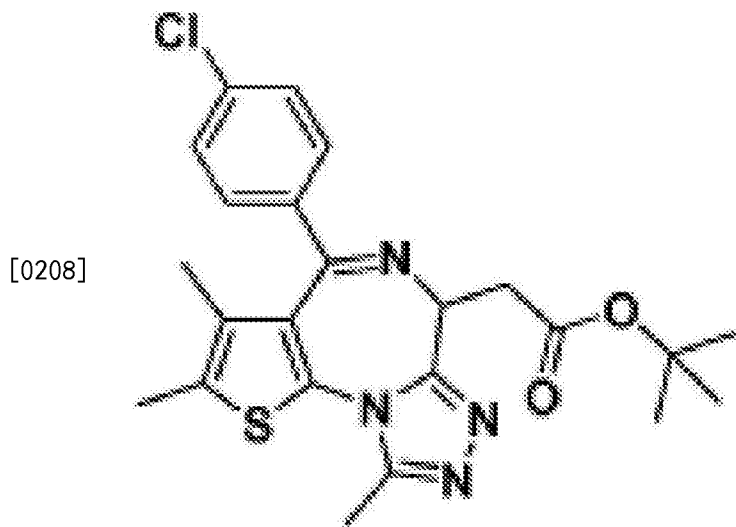
[0203] 在某些实施例中, R_B为甲基、乙基、羟基甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、COOH、COOMe、COOEt、COOCH₂OC(O)CH₃。

[0204] 在某些实施例中, 环A为苯基、萘基、联苯基、四氢萘基、茚满基、吡啶基、呋喃基、吡咯基、噻吩基、哒嗪基、吡嗪基、咪唑基、恶唑基、噻吩基、噻唑基、三唑基、异恶唑基、喹啉基、吡咯基、吡唑基或5,6,7,8-四氢异喹啉基。

[0205] 在某些实施例中, 每个R_A独立地为任选取代的烷基, 或者任意两个R_A可跟与其连接的原子一起形成芳基。

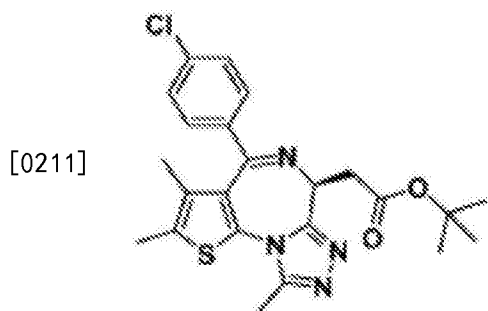
[0206] 本发明还提供了式V-XXII化合物, 以及本文所述的任何化合物。

[0207] 在一些实施例中, 溴结构域或BET抑制剂为:



[0209] 其盐、溶剂化物或水合物。

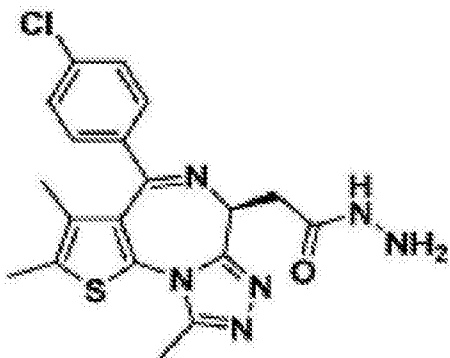
[0210] 在某些实施例中, 所述化合物为(+)-JQ1:



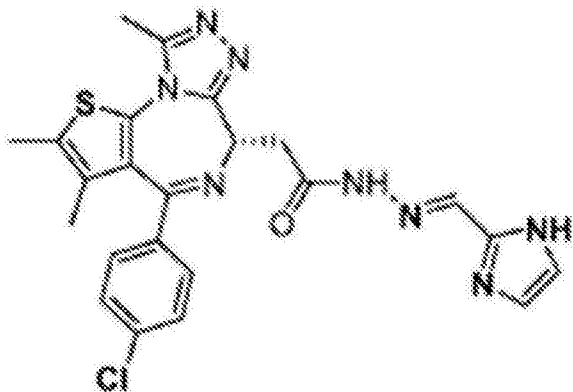
[0212] 或其盐、溶剂化物或水合物。

[0213] 在一些实施例中,溴结构域或BET抑制剂为下式所示的化合物:

[0214]

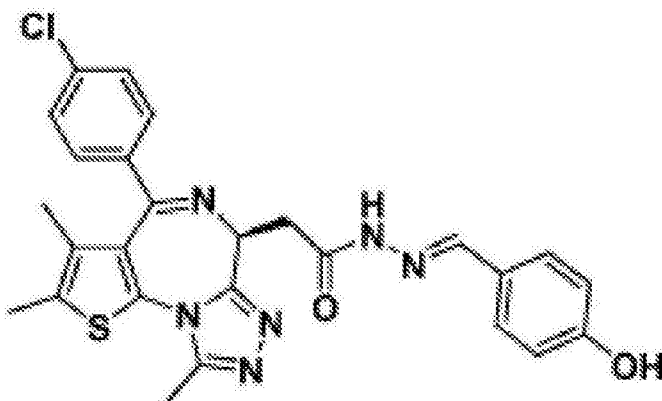
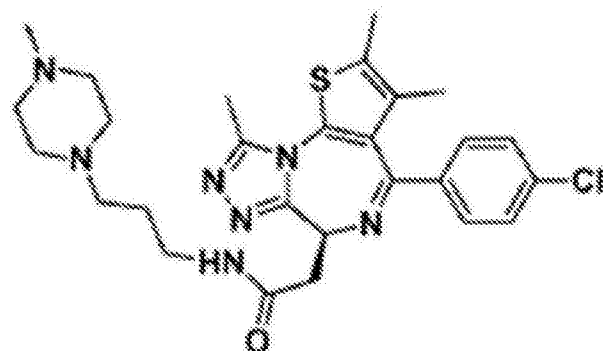


[0215]



[0216] 或者

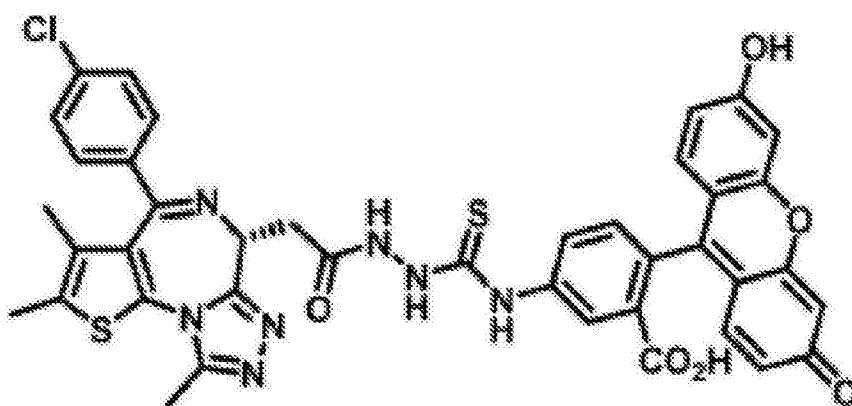
[0217]



[0218] 其盐、溶剂化物或水合物。

[0219] 在一些实施例中,溴结构域或BET抑制剂为下式所示的化合物:

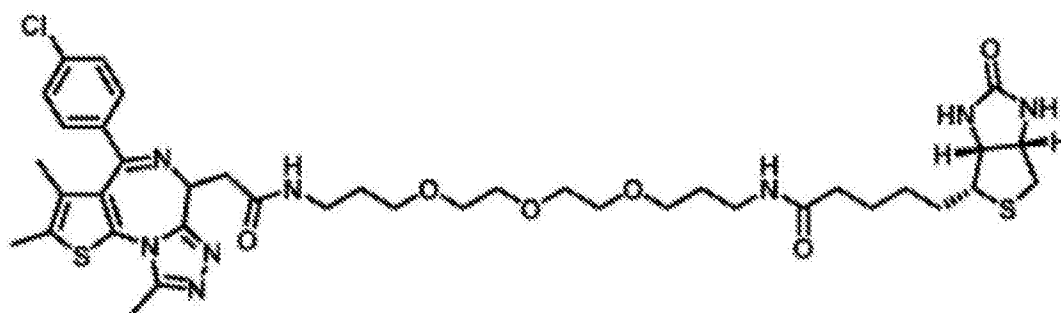
[0220]



[0221]

或者

[0222]



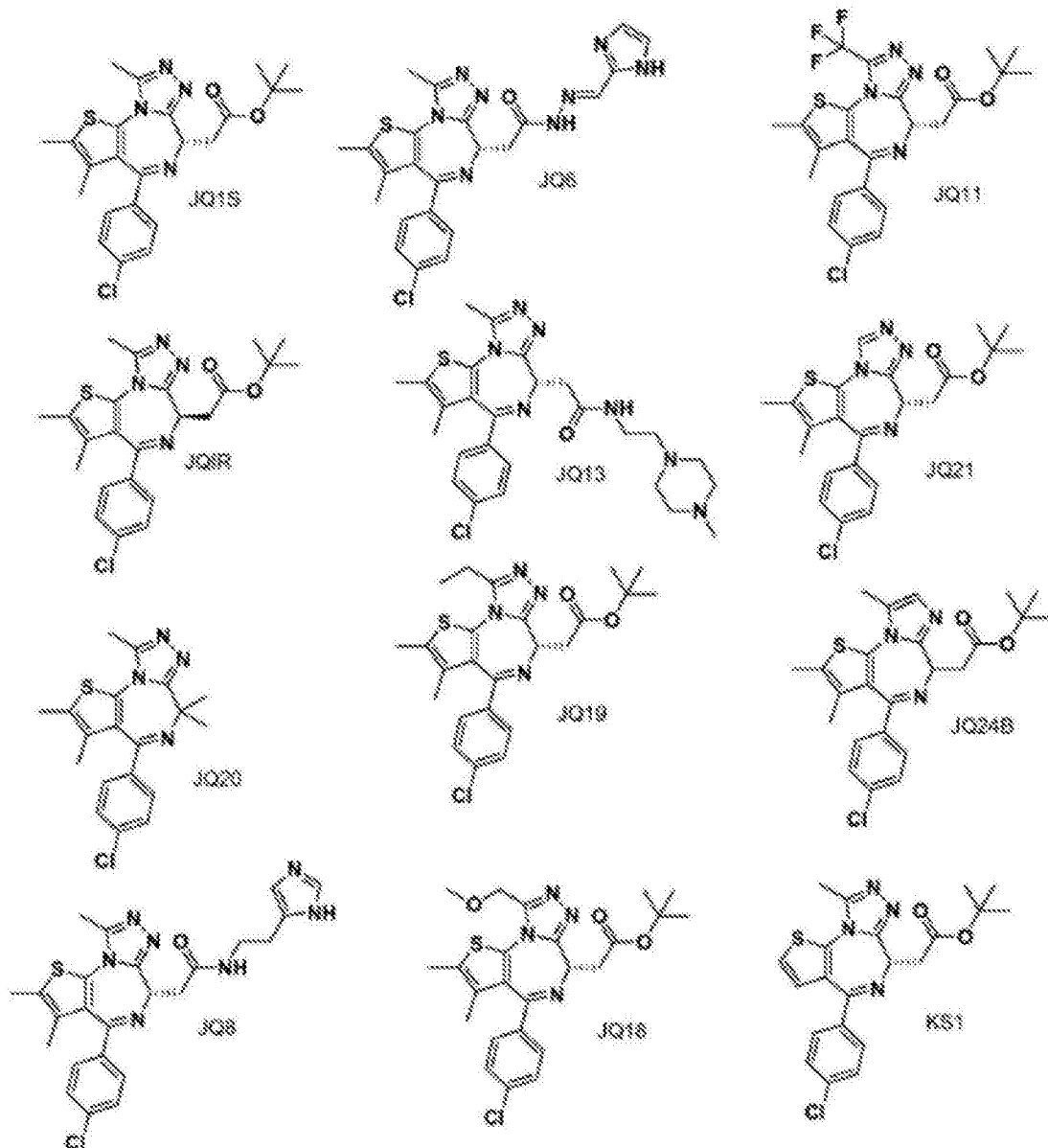
[0223]

其盐、溶剂化物或水合物。

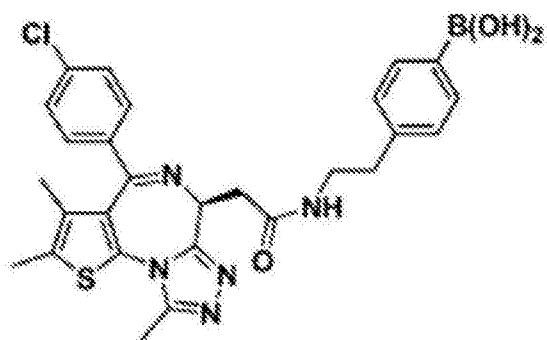
[0224]

在一些实施例中,溴结构域或BET抑制剂为任何以下化学式所示的化合物:

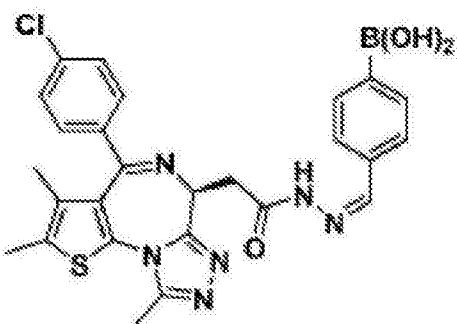
[0225]



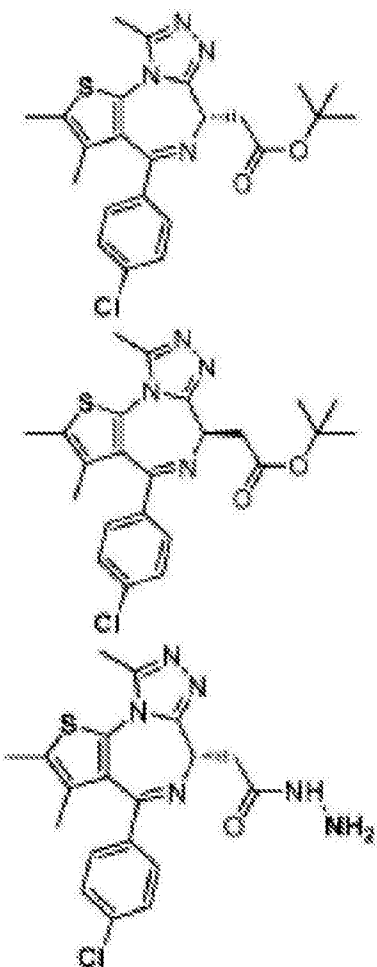
[0226] 或其盐、溶剂化物或水合物。在一些实施例中，溴结构域或BET抑制剂为任一以下化学式所示的化合物：



[0227]

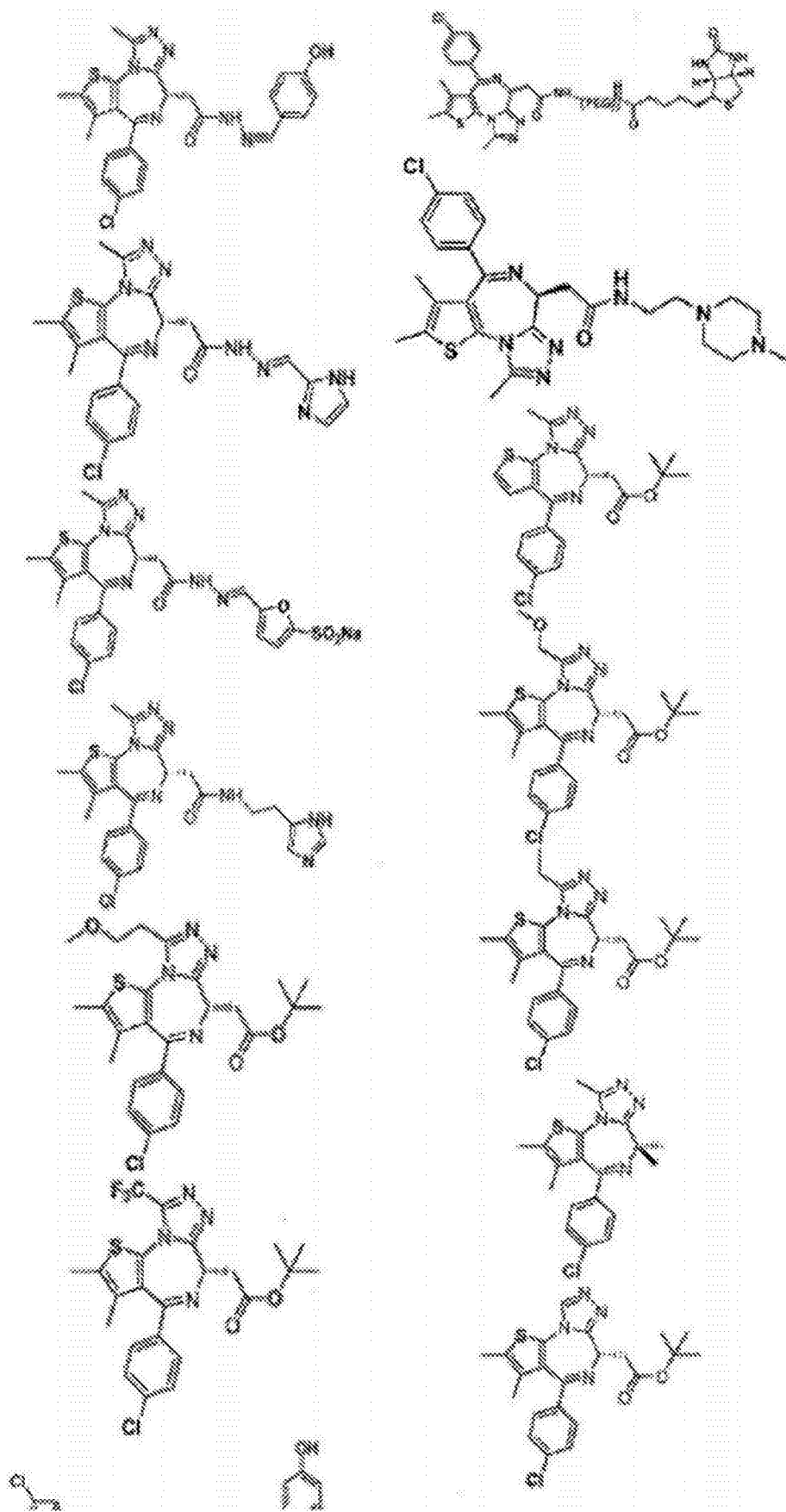


[0228] 其盐、溶剂化物或水合物。在一些实施例中，溴结构域或BET抑制剂为任何以下结构所示的化合物：

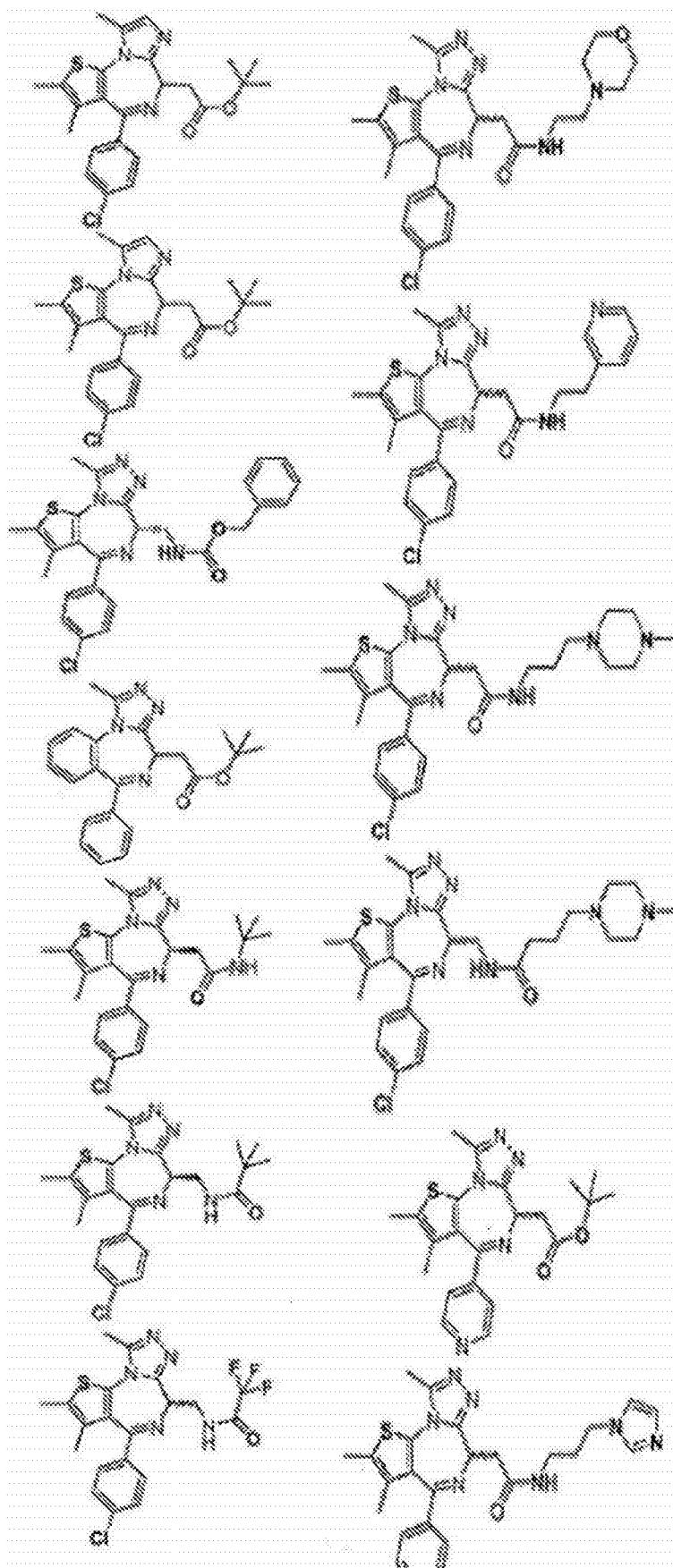


[0229]

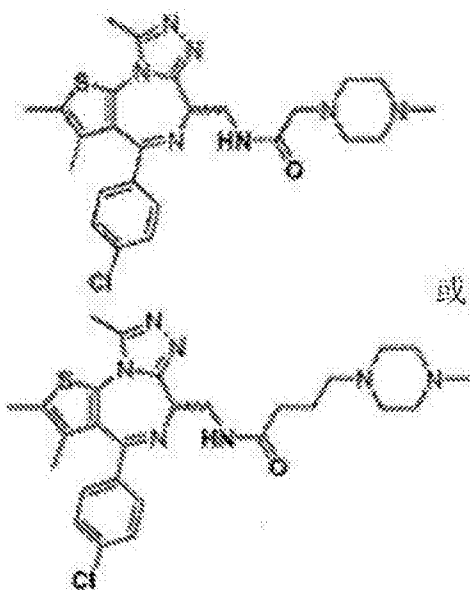
[0230]



[0231]

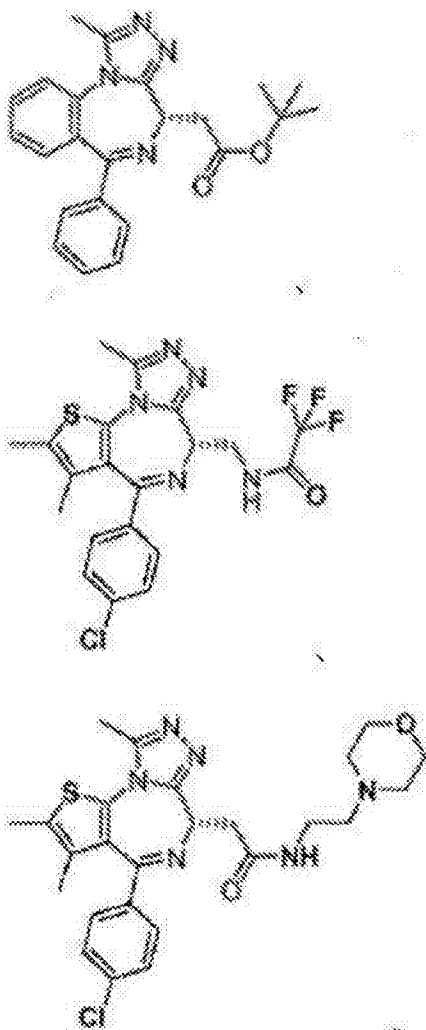


[0232]

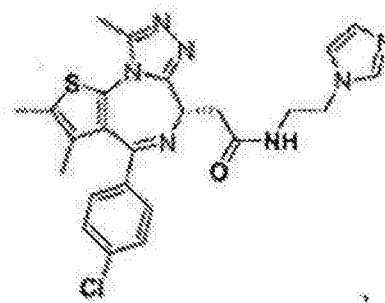
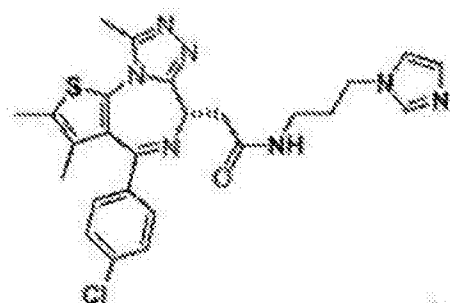
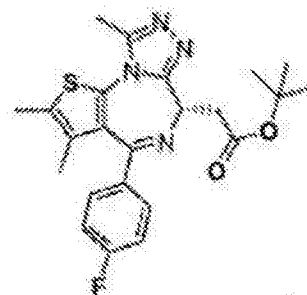
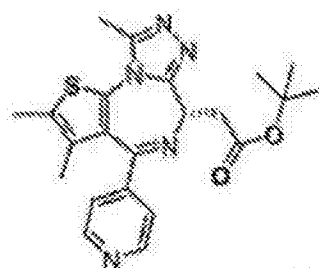
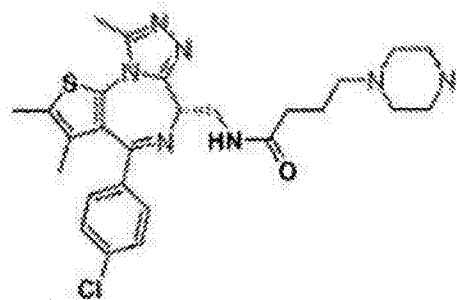
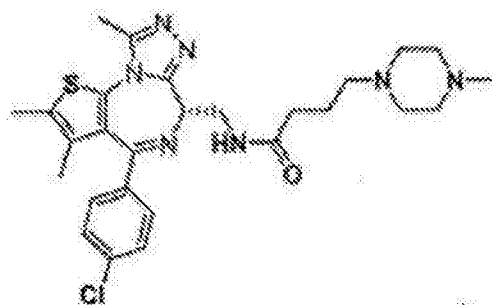
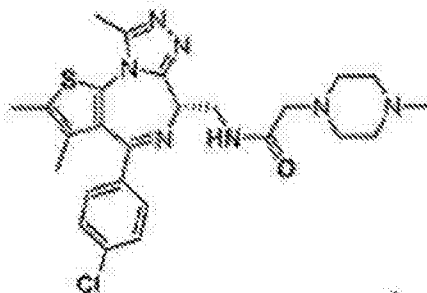
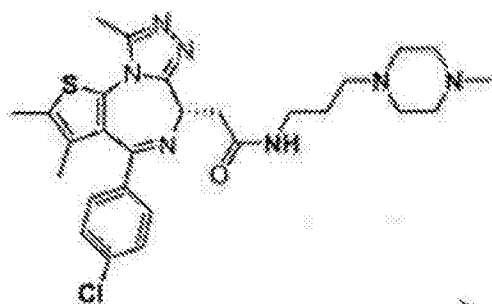
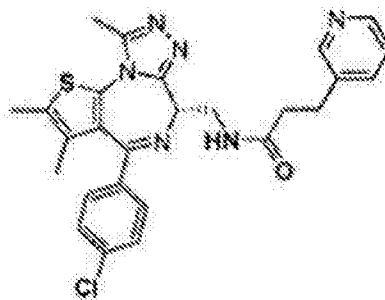
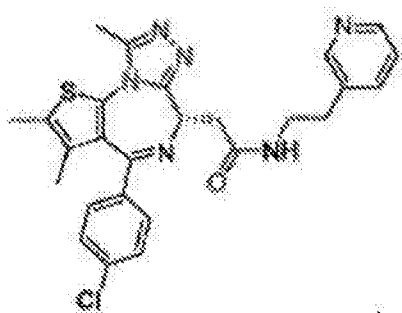


[0233] 或其盐、溶剂化物或水合物。在一些实施例中,溴结构域或BET抑制剂可以是以下结构之一:

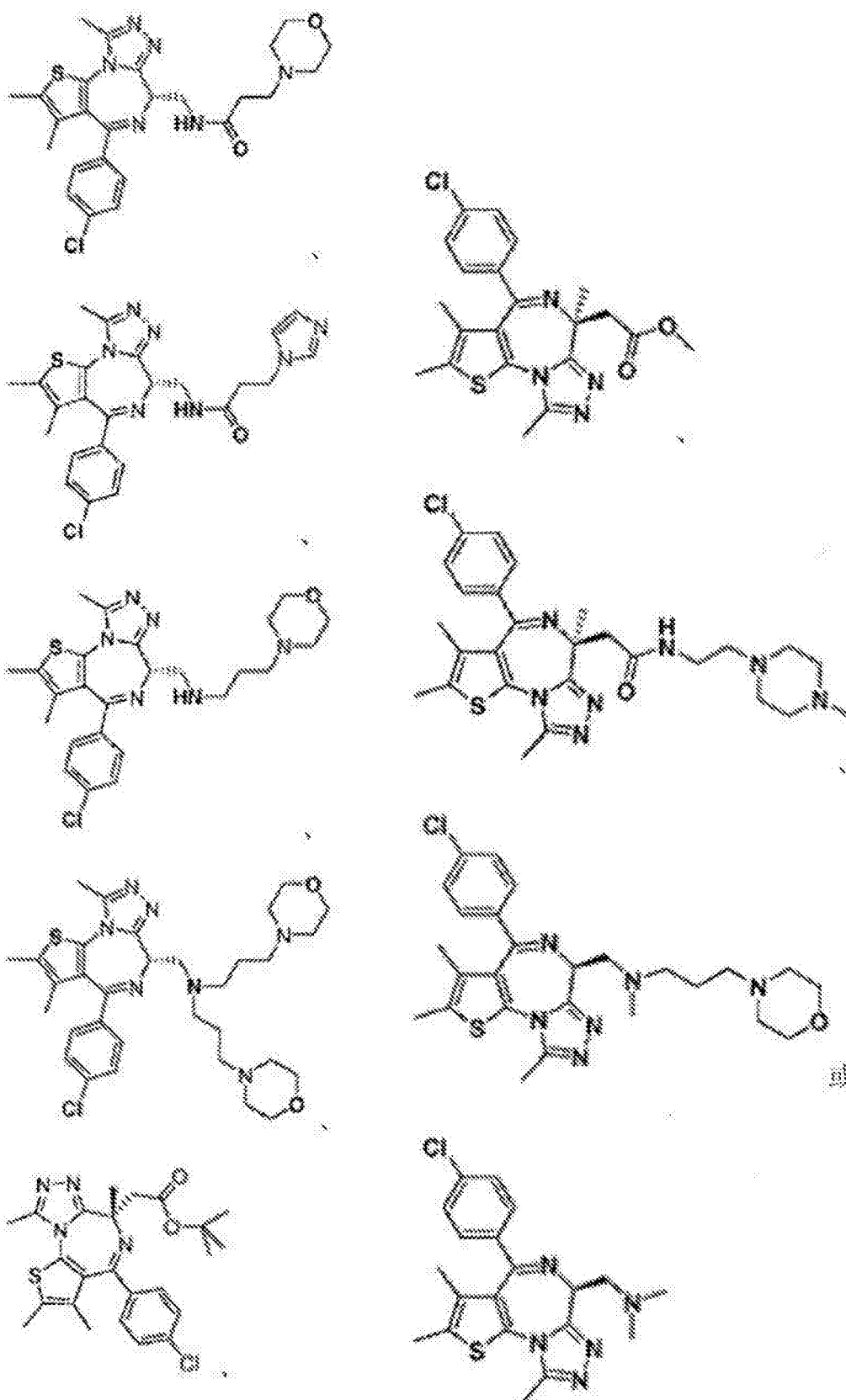
[0234]



[0235]



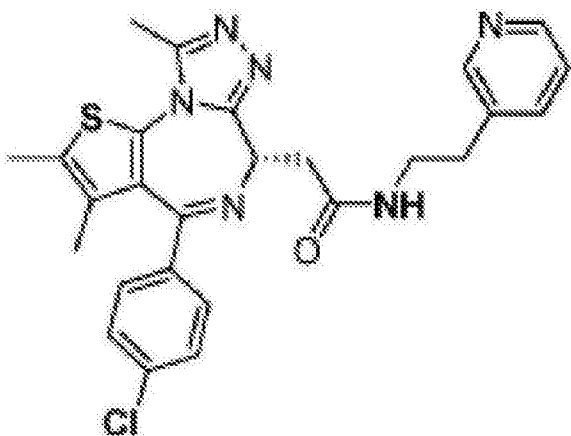
[0236]



[0237] 其盐、溶剂化物或水合物。

[0238] 在一些实施例中,溴结构域或BET抑制剂为以下结构所示的化合物:

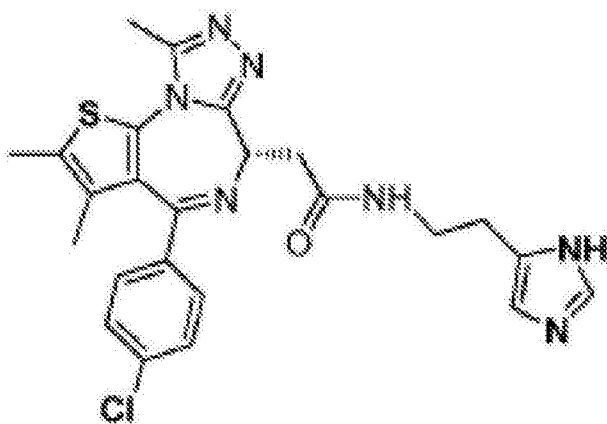
[0239]



;

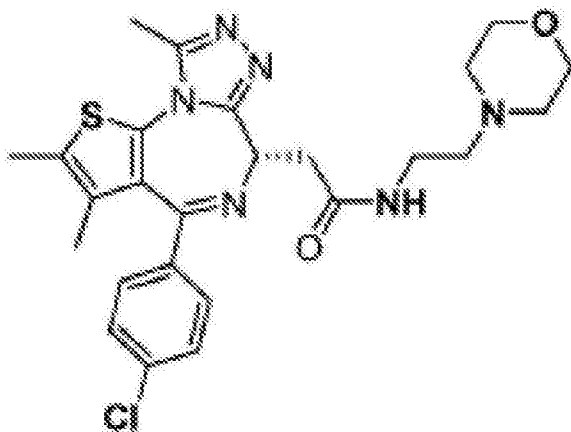
[0240] 或其盐、溶剂化物或水合物。在一些实施例中，溴结构域或BET抑制剂为以下结构所示的化合物：

[0241]

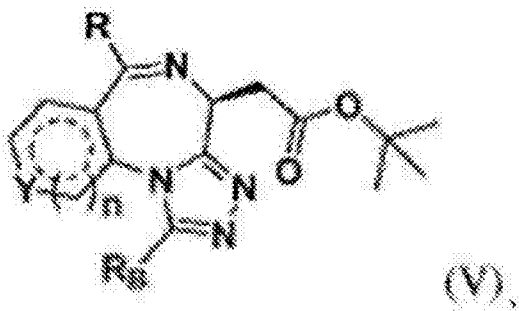


[0242] 或其盐、溶剂化物或水合物。在一些实施例中，溴结构域或BET抑制剂为以下结构所示的化合物：

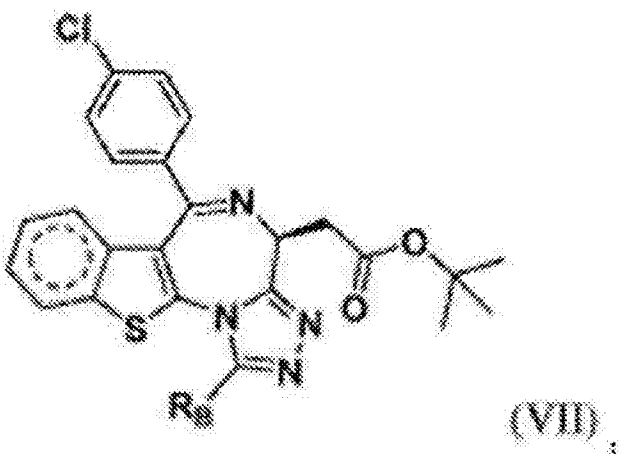
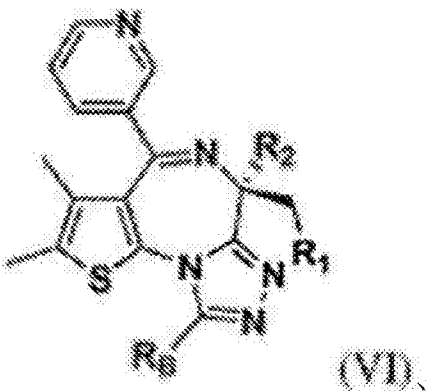
[0243]



[0244] 或其盐、溶剂化物或水合物。在一些实施例中，溴结构域或BET抑制剂为具有与本文所示任何化合物相反手性的化合物。在一些实施例中，溴结构域或BET抑制剂为式(V)、式(VI)或式(VII)所示的化合物：



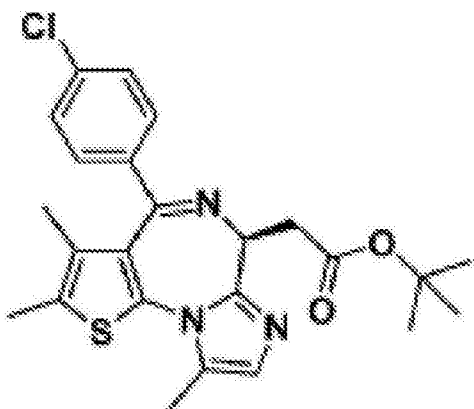
[0245]



[0246] 其中R、R₁和R₂以及R_B具有与式(I)中相同的释义；Y为O、N、S或CR₅，其中R₅具有与式(I)中相同的释义；n为0或1；并且式(VII)中的虚线圆圈表示芳香环或非芳香环；或其盐、溶剂化物或水合物。

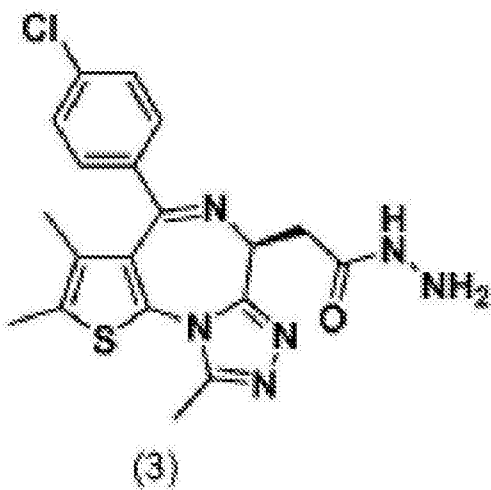
[0247] 在一些实施例中，溴结构域或BET抑制剂为下式所示的化合物：

[0248]

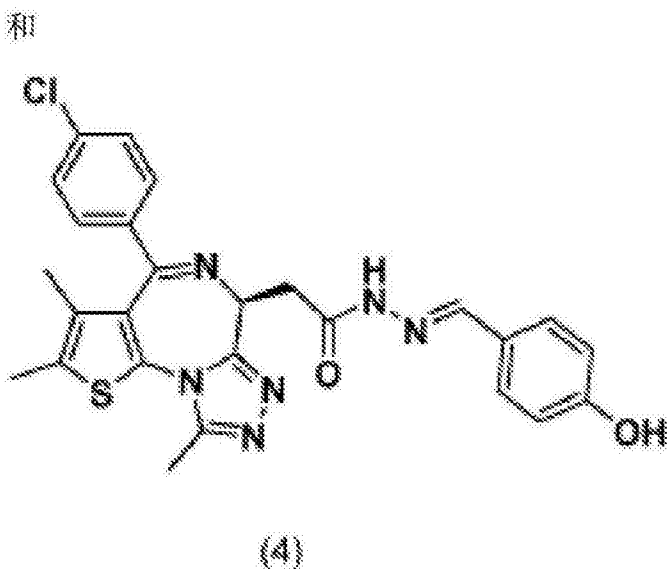


(VIII),

[0249] 或其盐、溶剂化物、或水合物。在一些实施例中,溴结构域或BET抑制剂为(外消旋的)JQ1;在某些实施例中,化合物为(+)-JQ1。在一些实施例中,溴结构域或BET抑制剂为选自以下组成的群组的化合物:



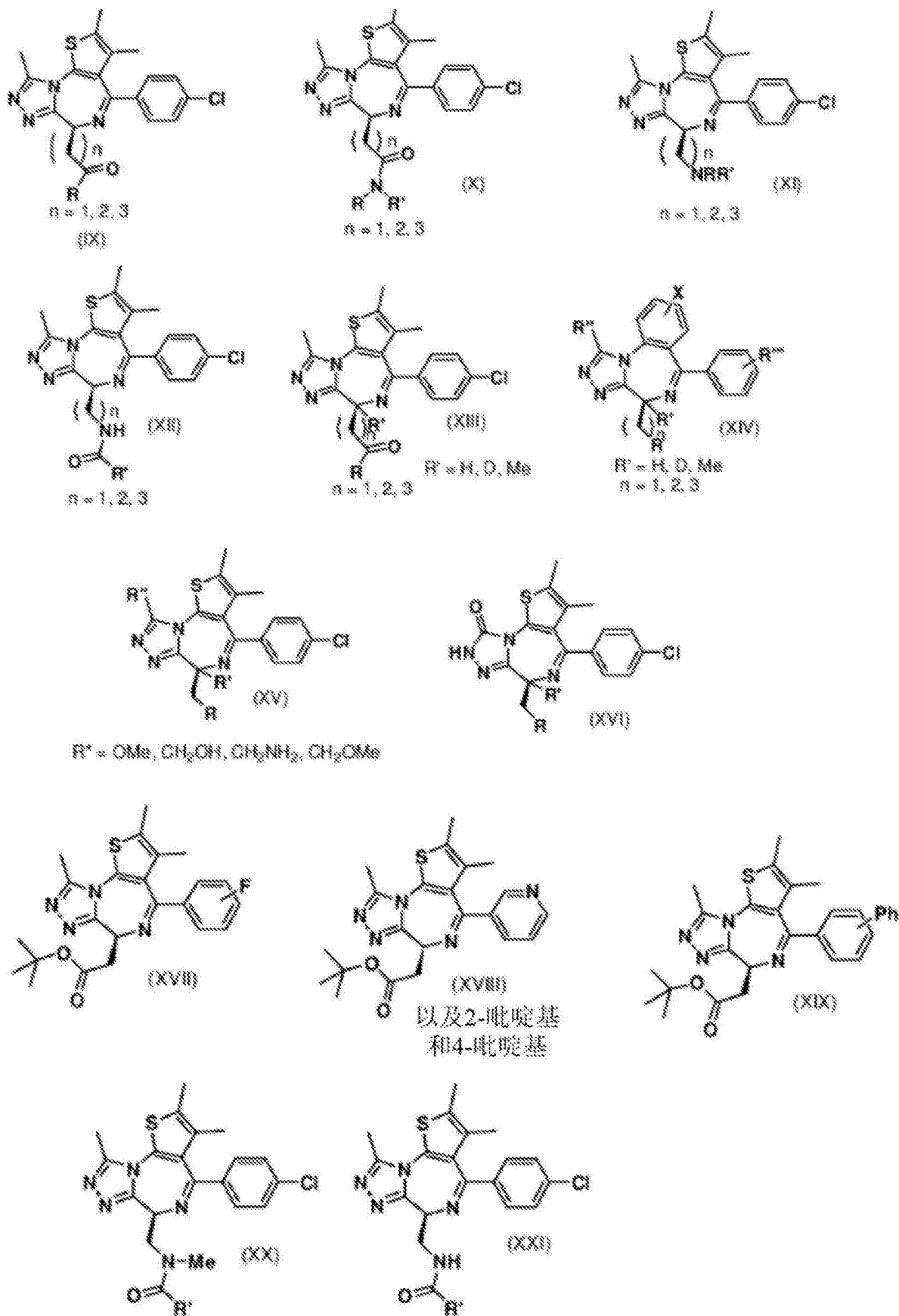
[0250]

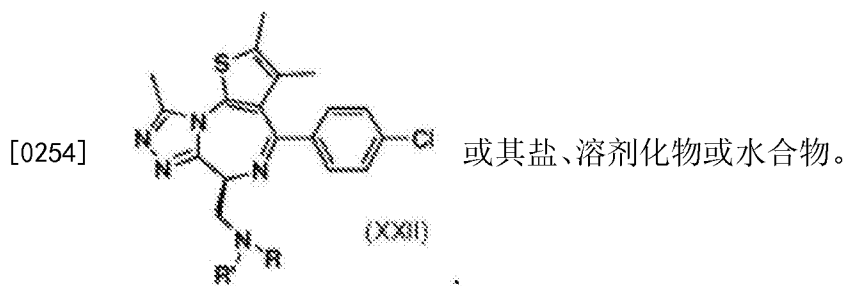


[0251] 或其盐、溶剂化物、或水合物。

[0252] 另外的化合物实例包括根据任何以下化学式的化合物:

[0253]





[0255] ;或其盐、溶剂化物或水合物。

[0256] 在式IX-XXII中,R和R'可以是(例如)H、芳基、取代的芳基、杂芳基、杂芳基、杂环烷基、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-C₃-C₁₂环烷基、取代的-C₃-C₁₂环烷基、-C₃-C₁₂环烯基或取代的-C₃-C₁₂环烯基,其各自可任选地被取代。在式XIV中,X可以是如本文所述的芳基的任何取代基。

[0257] 本文所述化合物可使用现有技术中众所周知的方法制备(参见(例如)W0011143669,其通过引用整体并入本文)。

[0258] 如本文所使用,术语“芳香环”或“芳基”意思是包含碳原子和氢原子的单环或多环芳香族的环或环基团。合适的芳基的实例包括(但不限于)苯基、甲苯基、苊基、茚基、茚基、甘菊环基和萘基,以及苯并稠合的碳环基团,诸如5,6,7,8-四氢萘基。芳基可以是未取代的,或者任选地被一或多个取代基取代,例如如本文所述的烷基的取代基(包括但不限于烷基(优选被一或多个卤素取代的低级烷基或烷基)、羟基、烷氧基(优选低级烷氧基)、烷硫基、氰基、卤素、氨基、硼酸(-B(OH)₂)以及硝基)。在某些实施例中,芳基为单环,其中所述环包含6个碳原子。

[0259] 如本文所使用,术语“烷基”意思是通常具有1至10个碳原子的饱和直链或支链非环状烃。代表性的饱和直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基和正癸基;而饱和支链烷基则包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基丁基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基戊基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、2-甲基-4-乙基戊基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2-甲基-4-乙基己基、2,2-二乙基戊基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基、3,3-二乙基己基等。本专利的化合物中包括的烷基可以是未取代的,或者任选地被一或多个取代基取代,例如氨基、烷基氨基、芳基氨基、杂芳基氨基、烷氧基、烷硫基、氧代、卤素、酰基、硝基、羟基、氰基、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、芳氧基、杂芳氧基、芳硫基、杂芳硫基、芳基氨基、杂芳基氨基、碳环基、碳环氧基、碳环硫基、碳环氨基、杂环基、杂环基氧基、杂环基氨基、杂环基硫基等。本专利的化合物通常优选为低级烷基。

[0260] 术语“非对映异构体”是指具有两个或更多个不对称中心并且其各分子不互为镜像的立体异构体。

[0261] 术语“对映结构体”是指互为不能重叠的镜像的化合物的两种立体异构体。两种对映结构体的等摩尔混合物称作“外消旋混合物”或“外消旋体”。

[0262] 术语“卤素”表示-F、-Cl、-Br或-I。

[0263] 术语“卤代烷基”旨在包括如上所定义的烷基,其被卤素单取代、二取代或多取代,例如氟代甲基和三氟甲基。

[0264] 术语“羟基”意思是-OH。

[0265] 如本文所使用的术语“杂原子”意思是碳和氢之外的任何元素的原子。优选杂原子为氮、氧、硫和磷。

[0266] 术语“杂芳基”是指5至8元单环、8至12元双环或11至14元三环的芳香环系统,如果是单环其具有1至4个环杂原子,如果是双环其具有1至6个环杂原子,或者如果是三环其具有1至9个环杂原子,所述杂原子选自O、N或S,并且剩余环原子为碳。杂芳基可任选地被如针对芳基的一或多个取代基所取代。杂芳基的实例包括(但不限于)吡啶基、呋喃基、苯并间二氧杂环戊烯基、噻吩基、吡咯基、恶唑基、恶二唑基、咪唑基噻唑基、异恶唑基、喹啉基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、噻二唑基、异喹啉基、吲唑基、苯并恶唑基、苯并呋喃基、吲嗪基、咪唑并吡啶基、四唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并恶二唑基和吲哚基。

[0267] 如本文所使用的术语“杂环基”是指环结构内含有至少一个碳之外的原子(例如S、O、N)的有机化合物。这些有机化合物中的环结构可以是芳香族的或非芳香族的。杂环基团的一些实例包括(不限于)吡啶、嘧啶、吡咯烷、呋喃、四氢呋喃、四氢噻吩以及二氧六环。

[0268] 术语“异构体”或“立体异构体”是指具有相同化学组成但原子或基团在空间排列上不同的化合物。

[0269] 术语“同位素衍生物”包括其中化合物中的一或多个原子被所述原子的相应的同位素替代的化合物的衍生物。例如,含有碳原子(C^{112})的化合物的同位素衍生物将是其中化合物的碳原子被 C^{13} 同位素替代的同位素衍生物。

[0270] 如本文所使用的术语“光学异构体”包括彼此恰好为不可重叠镜像的分子,也称作手性分子。

[0271] 术语“多环”或“多环基团”是指具有两个或更多个环的基团(例如环烷基、环烯基、环炔基、芳基和/或杂环基),其中两个相邻的环共用两个或更多个碳,例如其为“稠合环”的环。通过非相邻原子连接在一起的环称作“桥连”环。多环的每个环可被如上所述的取代基取代,例如卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰氧基、芳氧基羰氧基、羧酸酯基、烷基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷硫基羰基、烷氧基、磷酸酯基、膦酰氧基、亚膦酸基、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基以及烷基芳基氨基)、酰基氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基以及脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸酯基、硫酸酯基、磺酸基、氨磺酰基、磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基、烷基芳基或者芳香族或杂芳香族基团。

[0272] 术语“巯基(sulphydryl)”或“巯基(thiol)”意思是-SH。

[0273] 本文中的变量的任何定义中提及的一系列化学基团包括该变量的定义作为任何单独的基团或所列基团的组合。针对本文的变量或方面提及的实施例包括该实施例作为任何单独的实施例或者与任何其它实施例或其部分的组合。

[0274] 术语“小分子”是指具有较低分子量的天然存在的或人工产生的(例如通过化学合成)分子。通常,小分子为有机化合物(即其含有碳)。小分子可含有多个碳碳键、立体中心和其它官能团(例如胺、羟基、羰基和杂环基环等)。在某些实施例中,小分子的分子量不大于

约1,000g/mol、不大于约900g/mol、不大于约800g/mol、不大于约700g/mol、不大于约600g/mol、不大于约500g/mol、不大于约400g/mol、不大于约300g/mol、不大于约200g/mol或不大于约100g/mol。在某些实施例中,小分子的分子量为至少约100g/mol、至少约200g/mol、至少约300g/mol、至少约400g/mol、至少约500g/mol、至少约600g/mol、至少约700g/mol、至少约800g/mol或至少约900g/mol或至少约1,000g/mol。以上范围(例如至少约200g/mol且不大于约500g/mol)的组合也是可能的。在某些实施例中,小分子为治疗活性剂,例如药物(例如美国食品与药品管理局根据联邦法规汇编(C.F.R.)批准的分子)。所述小分子还可与一或多种金属原子和/或金属离子络合。在这种情况下,小分子还称作“小有机金属分子”。优选的小分子具有生物活性,因为它们在动物、优选哺乳动物、更优选人类中产生生物作用。小分子包括(但不限于)放射性核素和成像剂。在某些实施例中,小分子为药物。优选地,尽管并非必须,所述药物为已经由适当的政府机构或管理实体确认对于人类或动物使用为安全且有效的药物。例如,批准用于人类使用的药物由FDA在21 C.F.R. §§330.5、331至361和440至460下列出,其通过引用并入本文;用于兽医使用的药物由FDA在21 C.F.R. §§500至589下列出,其通过引用并入本文。根据本发明,所有列出的药物被认为可以使用。

[0275] 在一些实施例中,溴结构域抑制剂为减少或阻止含BRD蛋白的表达的任何分子或化合物。这种抑制剂的实例包括靶向一或多种含BRD蛋白的siRNA、shRNA、dsRNA、低聚模拟物和蛋白酶。

[0276] 用来产生如上所述抑制剂的方法在本领域中是众所周知的(参见(例如): Sambrook, Fritsch和Maniatis,《分子克隆:实验手册(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL)》, (现行版);《分子生物学中的现代方法(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)》(F.M. Ausubel等人编辑, (现行版));《酶学中的方法(METHODS IN ENZYMOLOGY)》系列(学术出版社(Academic Press, Inc.)): PCR2:《实用方法(PRACTICAL APPROACH)》(现行版)、《抗体,实验手册和动物细胞培养(ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL and ANIMAL CELL CULTURE)》(R.I. Freshney编辑(1987))。《DNA克隆:实用方法(DNA Cloning: A Practical Approach)》, 第I卷和第II卷(D. Glover编辑);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(N. Gait编辑, 现行版);《核酸杂交(Nucleic Acid Hybridization)》(B. Hames&S. Higgins, 编辑, 现行版);《转录和翻译(Transcription and Translation)》(B. Hames&S. Higgins编辑, 现行版);《基础病毒学(Fundamental Virology)》, 第2版, 第I卷和第II卷(B.N. Fields和D.M. Knipe编辑)。

[0277] 蛋白磷酸酶2A (PP2A)

[0278] 人类基因组含有约107种酪氨酸蛋白磷酸酶(Alonso等人(2004)《细胞(Cell)》17: 699-711), 但是只含有几种丝氨酸-苏氨酸(Ser/Thr)蛋白磷酸酶。Ser/Thr蛋白磷酸酶被分成3个结构不同的家族: PPM、PPP和FCP/SCP。蛋白磷酸酶2A (PP2A) 属于PPP家族, 并且是一种可涉及细胞功能和调节的许多重要方面的主要Ser/Thr磷酸酶(Janssens V&Goris J (2001)《生物化学杂志(Biochem J)》353:417-439; Virshup D (2000)《细胞生物学近论(Curr Opin Cell Biol)》12:180-185; Lechward K等人(2001)《生化与分子生物学(Acta Biochim Pol)》48:921-933)。根据某些估计, PP2A可能占哺乳动物细胞中所有Ser/Thr磷酸酶活性的大多数。PP2A在细胞周期调节、细胞生长控制、发育、多种信号转导通路的调节、细胞骨架动力学和细胞运动性中起主要作用。PP2A的重要功能通过PP2A的催化亚基是各种物种间最保守的

酶之一 (Cohen P等人 (1990)《欧洲生化学会联合会快报 (FEBS Lett)》268:355-359) 这一事实得到反映。

[0279] PP2A活化剂在本领域是已知的。PP2A活化剂是对PP2A表达或PP2A磷酸酶活性具有任何可检测的阳性效应的任何分子或化合物。在一些实施例中,与对照的活性(例如在不存在活化剂的情况下的活性)相比,PP2A活化剂如上所述将PP2A活化至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少300%、至少500%或更多。PP2A活化剂可以是小分子、核酸、蛋白、肽、抗体或抗体片段。

[0280] PP2A活化剂的实例在US2010/0267673、W02009/117769、W02013181488中进行了描述,其通过引用并入本文。在一些实施例中,PP2A活化剂为吩噻嗪化合物,包括(但不限于)氯普鲁马嗪、美索达嗪、甲硫达嗪、乙酰非那嗪、氟非那嗪、佩吩嗪、三氟拉嗪及其药学上可接受的盐和酯(参见W02008/119109,其通过引用并入本文)。在一些实施例中,PP2A活化剂为FTY720((2-氨基-2-[2-(4-辛基苯基)乙基]丙烷1,3-二醇盐酸盐;芬戈莫德/GilenyaTM;参见W02007/143081,其通过引用并入本文)。

[0281] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用PP2A活化剂相比,BET抑制剂和PP2A活化剂在癌症治疗中是协同性的。在一些实施例中,BET抑制剂和PP2A活化剂与本文所述的B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂、酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂一起施用。

[0282] B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂

[0283] Bcl-2蛋白在癌细胞和正常细胞中均起重要的细胞凋亡调节剂作用。Bcl-2蛋白用作对细胞凋亡的检查,以容许健康和有用的细胞存活下来。该蛋白家族包括抗细胞凋亡蛋白,诸如Bcl-2、Bcl-xL以及Mcl-1并包括Bid、Bim、Bad、Bak和Bax在内的促细胞凋亡分子。Bcl-2和Bcl-xL蛋白通过与促细胞凋亡Bcl-2家族蛋白,诸如Bak、Bax、Bim、Bid、Puma以及Bad的异源二聚化来抑制细胞凋亡。

[0284] 如本文所使用,“Bcl-x1抑制剂”是指可部分或整体上阻止或抑制Bcl-x1的促存活功能的任何分子或化合物。Bcl-x1抑制剂可以是任何分子或化合物,包括核酸(诸如DNA和RNA适体)、反义寡核苷酸、siRNA和shRNA、小肽、抗体或抗体片段以及小分子,诸如小化合物。应理解,Bcl-x1抑制剂可仅抑制Bcl-x1,或者它可抑制一种以上或所有的Bcl-2抗细胞凋亡蛋白。

[0285] 如本文所使用,“Bcl-2抑制剂”是指可部分或整体上阻止或抑制Bcl-2的促存活功能的任何分子或化合物。Bcl-2抑制剂可以是任何分子或化合物,包括核酸(诸如DNA和RNA适体)、反义寡核苷酸、siRNA和shRNA、小肽、抗体或抗体片段以及小分子,诸如小化合物。应理解,Bcl-2抑制剂可仅抑制Bcl-2,或者它可抑制一种以上或所有的Bcl-2抗细胞凋亡蛋白。在一些实施例中,Bcl-2抑制剂抑制Bcl-x1。

[0286] Bcl-x1和Bcl-2抑制剂在本领域是已知的。在以下文献中描述了Bcl-x1和Bcl-2抑制剂的实例:W02012/103059、US8309582、US8557812、US8865901、W02012071374以及Cang等人(《血液与肿瘤学杂志 (J Hematol Oncol)》2015 8:129),其通过引用并入本文。本文所述方法可用于任何已知的或此后开发的Bcl-x1抑制剂。

[0287] 在一些实施例中,Bcl-x1抑制剂包括(但不限于):

[0288] ABT-737 (4-[4-[[2-(4-氯苯基)苯基]甲基]哌嗪-1-基]-N-[4-[(2R)-4-(二甲基

氨基)-1-苯基硫烷基丁烷-2-基]氨基]-3-硝基苯基]磺酰基苯甲酰胺;上海拜力生物科技(Santa Cruz Biotechnology)、ABT-263(4-[4-[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基环己烯-1-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-[4-[[(2R)-4-吗啉-4-基-1-苯基硫烷基丁烷-2-基]氨基]-3-(三氟甲基磺酰基)苯基]磺酰基苯甲酰胺;Navitoclax-APeXBio)、AT101((-)-1,1',6,6',7,7'-六羟基-3,3'-二甲基-5,5'-双(1-甲基乙基)-[2,2'-联二萘]-8,8'-二羧醛)、Sabutoclax(2,3,5-三羟基-7-甲基-N-[(2R)-2-苯基丙基]-6-[1,6,7-三羟基-3-甲基-5-[[2-(2R)-2-苯基丙基]氨基甲酰基]萘-2-基]萘-1-甲酰胺;TOCRIS)和TW37(N-[4-[2-(1,1-二甲基乙基)苯基]磺酰基]苯基]-2,3,4-三羟基-5-[2-(1-甲基乙基)苯基]甲基]苯甲酰胺;TOCRIS)。在一些实施例中,Bcl-2抑制剂包括(但不限于)ABT-199(4-[4-[2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己烯-1-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-[3-硝基-4-(四氢吡喃-4-基甲基氨基)苯基]磺酰基-2-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-5-基氧基)苯甲酰胺)。

[0289] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用Bcl-x1抑制剂相比,BET抑制剂和Bcl-x1抑制剂在癌症治疗中是协同性的。在一些实施例中,BET抑制剂和Bcl-x1抑制剂与本文所述的蛋白磷酸酶2A(PP2A)活化剂、酪蛋白激酶2(CK2)抑制剂和/或中介体复合物亚基1(MED1)抑制剂一起给受试者施用。

[0290] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用Bcl-2抑制剂相比,BET抑制剂和Bcl-2抑制剂在癌症治疗中是协同性的。在一些实施例中,BET抑制剂和Bcl-2抑制剂与本文所述的Bcl-x1、蛋白磷酸酶2A(PP2A)活化剂、酪蛋白激酶2(CK2)抑制剂和/或中介体复合物亚基1(MED1)抑制剂一起给受试者施用。

[0291] 酪蛋白激酶2(CK2)抑制剂

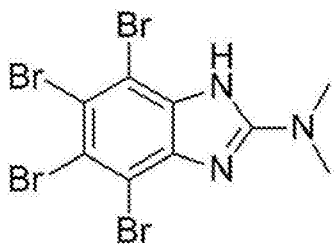
[0292] 酪蛋白激酶2(CK2)是普遍存在的蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶,其涉及细胞中的多种功能,包括细胞生长和增殖、以及细胞凋亡的调节(参见(例如)Tawfic等人,2001,《组织学和病理组织学(Histol.Histopathol)》,16:573-82)。CK2是一种高度保守的酶,并且已经表明它对细胞生存很重要。所述激酶是一种异源四聚体,由两个催化亚基(α 和/或 α')与两个 β 亚基络合在一起构成。CK2调节细胞生长的一种方式是通过细胞核中的信号传导,在细胞核中核基质和染色质似乎是其优先靶点。CK2抑制剂可以是任何分子或化合物,包括核酸(诸如DNA和RNA适体)、反义寡核苷酸、siRNA和shRNA、小肽、抗体或抗体片段以及小分子,诸如小化合物。

[0293] CK2抑制剂在本领域是已知的。在以下文献中描述了CK2抑制剂的实例:US2011/0207789、US6607916、US2010/0256217以及W02006.065724,其通过引用并入本文。本文所述方法可用于任何已知的或此后开发的CK2抑制剂。

[0294] 在一些实施例中,CK2抑制剂包括(但不限于):CX-4945(5-(3-氯苯胺基)苯并[c][2,6]萘啶-8-甲酸;Silmitasertib;APeXBio)、DMAT(MCE MedChem Express)、鞣花酸(MCE MedChem Express)、TTP22(MCE MedChem Express)。

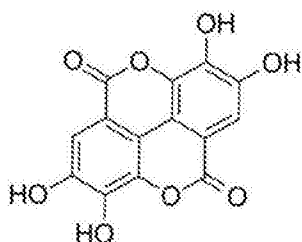
[0295] DMAT的化学结构为:

[0296]



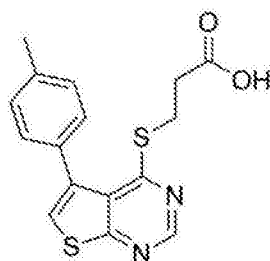
[0297] 鞣花酸的化学结构为：

[0298]



[0299] TTP22的化学结构为：

[0300]



[0301] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用CK2抑制剂相比,BET抑制剂和CK2抑制剂在癌症治疗中是协同性的。在一些实施例中,BET抑制剂和CK2抑制剂与本文所述的蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂一起给受试者施用。

[0302] 中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂

[0303] 基因转录的激活是一个通过识别DNA中的转录增强子位点的因子触发的多步骤过程。这些因子与共激活剂一起作用,以指导RNA聚合酶II装置启动转录。RNA聚合酶II转录亚基1 (MED1) 蛋白中介体为CRSP (SP1激活需要的辅因子) 复合物的亚基,其与TFIID一起是SP1有效激活所必需的。该蛋白还是其它多亚基复合物(例如甲状腺激素受体 (TR) 相关的蛋白,其与TR相互作用,并与启动因子和辅因子一起促进TR在DNA模板上的作用)的组分。它还调节p53-依赖性细胞凋亡,并且它对于脂肪形成很重要。已知该蛋白具有自我寡聚化的能力。

[0304] CK2抑制剂可以是任何分子或化合物,包括核酸(诸如DNA和RNA适体)、反义寡核苷酸、siRNA和shRNA、小肽、抗体或抗体片段以及小分子,诸如小化合物。在一些实施例中,MED1抑制剂破坏MED1与BRD4之间的相互作用。

[0305] 在一些实施例中,与仅使用BET抑制剂或仅使用MED1抑制剂相比,BET抑制剂和MED1抑制剂在癌症治疗中是协同性的。在一些实施例中,BET抑制剂和MED1抑制剂与本文所述的蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂和/或酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂一起给受试者施用。

[0306] 药物组合物

[0307] 本公开的一个方面涉及药物组合物,其包含BET抑制剂以及蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂、酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 抑制剂。本文所述的药物组合物可用于治疗和/或预防有此需要的受试者的癌症,例如对BET抑制剂具有抗性或者具有对其产生抗性的风险的癌症。本文所述的药物组合物还可用于降低、延迟和/或防止有此需要的受试者的癌症对BET抑制剂治疗的抗性。

[0308] 本文所述的药物组合物可通过药理学领域中已知的任何方法制备。一般而言,这种制备方法包括以下步骤:将本文所述活性成分,诸如BET抑制剂和/或PP2A活化剂与载体或赋形剂和/或一或多种其它辅助成分结合,然后,如果必要和/或需要的话,将产品成型和/或包装为期望的单剂量单位或多剂量单位。药物组合物可以散装、单一单位剂量和/或多个单位剂量的形式进行制备、包装和/或销售。如本文所使用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的独立的量的药物组合物。活性成分的量通常等于将给受试者施用的活性成分的剂量,和/或这种剂量合宜的一部分,例如这种剂量的一半或三分之一。

[0309] 本发明的药物制剂可包括或稀释于药学上可接受的载体。如本文所使用的术语“药学上可接受的载体”意思是适合给人类或其它哺乳动物,诸如狗、猫或马施用的一或多种相容的填料、稀释剂或其它这种物质。术语“载体”表示天然或合成的有机或无机成分,活性成分与其结合以帮助应用。所述载体能够以一种方式与本发明的制剂混合且彼此混合,并使得不存在会实质上损害期望的药物有效性或稳定性的相互作用。适合口服、皮下、静脉内、肌内等制剂的载体可见于宾夕法尼亚州伊斯顿的Mack Publishing Company的《雷明登氏药学全书(Remington's Pharmaceutical Sciences)》。

[0310] 治疗诊断方法

[0311] 本公开的一些方面提供了鉴别患有对溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症的受试者的方法。在一些实施例中,所述方法包含进行化验以确定从接受BET抑制剂疗法的受试者获得的肿瘤样本中含溴结构域蛋白4 (BRD4) 的细胞内位置;以及,如果BRD4具有核定位,那么鉴别受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。

[0312] 本文所述的方法帮助确定或指示(即鉴别)受试者是否患有对溴结构域和额外终端域 (BET) 抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。如本文所使用,“对BET抑制剂疗法具有抗性的癌症”意思是所述癌症对这种抑制剂没有响应,如由(例如)持续的增殖和增加的肿瘤生长和负荷证明。在一些实施例中,所述癌症可能最初对使用这种抑制剂的治疗(在本文中称作在先施用疗法)具有响应,但是在一段时间之后可能会产生抗性(即所述癌症具有对BET抑制剂疗法产生抗性的风险)。在一些实施例中,所述癌症可能从未对使用这种抑制剂的治疗产生响应。

[0313] 受试者由医师诊断(例如使用本领域众所周知的方法)为患有癌症,并使用BET抑制剂疗法进行治疗。

[0314] BRD4在从受试者获得的肿瘤样本中的细胞内位置可使用本领域已知的化验来确定。例如,BRD4的细胞内位置可通过免疫组织化学、免疫荧光、免疫印迹、放射免疫分析、ELISA或FACS分析来确定。在一些实施例中,BRD4的细胞内位置使用抗体连同免疫荧光来确

定。

[0315] 如果BRD4具有核定位,那么鉴别受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。或者,如果BRD4具有细胞质定位,那么鉴别受试者患有对BET抑制剂疗法不具有抗性的癌症。如果鉴别受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症,那么受试者可通过将BET抑制剂与蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂、酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或中介体复合物亚基1 (MED1) 一起组合施用来进行治疗。因此,本文所述的方法还帮助鉴别可能会受益于使用联合疗法的治疗而非使用BET抑制剂的单一疗法的受试者。

[0316] 在一些实施例中,所述方法包含进行化验以确定从患有癌症的受试者获得的肿瘤样本中磷酸化的含溴结构域蛋白4 (pBRD4) 与未磷酸化的BRD4 (BRD4) 的比例;并且如果与对照的pBRD4与BRD4的比例相比所述pBRD4与BRD4的比例增加,那么确认受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。

[0317] 受试者由医师诊断(例如使用本领域众所周知的方法)患有癌症。在一些实施例中,受试者使用BET抑制剂疗法进行治疗。在一些实施例中,受试者尚未接受BET抑制剂治疗,但正在考虑进行BET抑制剂治疗。

[0318] 肿瘤样本中磷酸化的含溴结构域蛋白4 (pBRD4) 与未磷酸化的BRD4 (BRD4) 的比例可通过免疫印迹、免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫分析、ELISA或FACS分析来确定。在一些实施例中,使用多色免疫荧光来确定pBRD4与BRD4的比例。在一些实施例中,pBRD4与BRD4的比例通过免疫印迹来确定。

[0319] 如果与对照的pBRD4与BRD4的比例相比所述pBRD4与BRD4的比例增加,那么确认受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。或者,如果跟对照的pBRD4与BRD4的比例相比所述pBRD4与BRD4的比例降低或者不变,那么确认受试者患有对BET抑制剂疗法不具有抗性的癌症。对照的pBRD4与BRD4的比例可被确定,或者可以是预先存在的比例。在一些实施例中,对照的比例为从患有对BRD4抑制剂疗法不具有抗性的癌症的受试者获得的肿瘤样本中pBRD4与BRD4的比例。在一些实施例中,对照的比例为从未患癌症的受试者获得的组织样品中pBRD4与BRD4的比例。

[0320] 受试者的pBRD4与BRD4的比例与对照的比例之间的差别的大小可能会有所变化。例如,如果所述pBRD4与BRD4的比例高于对照的比例至少1%、至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少100%、至少250%、至少500%或至少1000%,那么可确认受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。在一些实施例中,如果所述pBRD4与BRD4的比例高于对照的比例至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍或更多倍,那么可确认受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症。显著的差别可使用适当的统计测试来确认。统计显著性的测试在本领域是众所周知的,并在1999再版的Petruccelli、Chen以及Nandram的《工程师与科学家的应用统计学 (Applied Statistics for Engineers and Scientists)》中进行了举例说明。

[0321] 如果确认受试者患有对BET抑制剂疗法具有抗性或具有对其产生抗性的风险的癌症,那么所述受试者可通过将BET抑制剂与蛋白磷酸酶2A (PP2A) 活化剂、B细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 抑制剂、特大B细胞淋巴瘤 (Bcl-x1) 抑制剂、酪蛋白激酶2 (CK2) 抑制剂和/或中介体

复合物亚基1 (MED1) 一起组合施用来进行治疗。因此,本文所述的方法还帮助确认可能受益于使用联合疗法的治疗受益而非使用BET抑制剂的单一疗法的受试者。

[0322] 本发明通过以下实例进行了进一步的说明,所述实例绝不应被理解为进行进一步的限制。在整个本申请中引用的所有参考资料(包括参考文献、授权的专利、公布的专利申请以及共同未决专利申请)的全部内容在此通过引用明确地并入本文。

[0323] 实例

[0324] 乳腺癌对BET溴结构域抑制的敏感性

[0325] BBI的作用首先在一组反映根据转录定义的亚型(luminal型、HER2⁺型以及TNBC型(基底和间充质亚群两者))的乳腺癌细胞中进行评估^{3,22}。除了JQ1之外,还制备了结构不同的化学探针样品(iBET151、PFI-1)、所研究的药物(iBET, GSK-762; Y803, OTX-015)以及无活性类似物(阿普唑仑和无活性的JQ1对映结构体, R-JQ1)。大部分TNBC细胞系的增殖以与效力成比例的方式被显著抑制, IC₅₀在低nM范围内, 而luminal细胞系则相对具有抗性(图1A)。TNBC细胞对BET溴结构域的依赖性由RNA干扰确认, 这显示BRD4的下调始终表型复为BBI(图1B和图7A至7B)。

[0326] 为了理解BBI对TNBC增殖的作用, 对JQ1在细胞周期的不同阶段的作用进行了表征。首先用诺考达唑将SUM159细胞同步于G2/M。释放前1小时或释放后3小时施用JQ1, 并通过流式细胞仪评估细胞周期。释放前经JQ1处理的细胞在G1早期停滞, 具有高的细胞周期蛋白D1水平, 而从G2/M停滞释放3小时后添加JQ1则具有较不明显的作用, 并容许实质性进展到S期和G2/M期(图1C和图7C至7D)。这些数据与已报道的BRD4在G2/M期到G1期的进展中的作用一致^{12,23}。随着同步化的细胞进展到G1/S, 检测到BRD4蛋白水平的降低, 其被JQ1处理进一步加重, 可能使BBI的作用更加突出(图7C)。通过亚G1比例的增加和Annexin-V染色估量(图7D至7E), 长时间暴露于JQ1(48至72小时)引起细胞凋亡响应。通过BRD4敲减观察到G1早期停滞和晚期细胞凋亡的类似诱导, 进一步支持该共活化剂在TNBC中的关键作用(图7D至7E)。

[0327] 为了研究对BBI的敏感性是否与目标BET蛋白的丰度、描述为介导JQ1抗癌效果的因子或者之前确认TNBC生长需要的信号通路的生化标记物相关²⁴, 在一组细胞系中进行了免疫印迹分析。在具有高JQ1敏感性的分离的TNBC系中(例如SUM159), 升高了类似的MYC和BRD4的表达和类似的pSTAT3和pJAK2的丰度, 但是总体上这些测量未显示与JQ1敏感性的明确关联(图1D)。在经JQ1处理的SUM159细胞中进行的对这些因子的动力学研究显示, 12小时后pSTAT3和pJAK2的减少, 以及24小时后MYC的剂量响应降低(图8A至8B)。这些数据与T-细胞急性成淋巴细胞性白血病中报道的JAK-STAT信号传导的作用一致²⁵, 但是与血液恶性肿瘤的先前研究有分歧, 其中BBI迅速耗尽MYC^{8,9}。这些研究一起表明, TNBC对BBI的响应可能在机理上和表型上与先前的报道不同。

[0328] 实际上, 当用JQ1培养TNBC细胞时观察到显著的形态变化, 表明了BET抑制对细胞状态具有作用(图8C)。为了测定对细胞衰老的作用, 将TNBC细胞(SUM159和MDA-MB-231)用JQ1处理, 并进行β-半乳糖苷酶染色。BET溴结构域的抑制显著增加酸性β-半乳糖苷酶的活性, 这与细胞衰老的强烈诱导一致(图8D)。为了评估对分化状态的影响, 对基底标记物和luminal标记物进行免疫荧光显微镜检查。JQ1处理导致luminal细胞的低分子量(LMW)细胞角蛋白和细胞角蛋白18(CK18)特征增加, 且同时基底细胞的高分子量(HMW)细胞角蛋白特

征降低,意味着转化为更多的luminal上皮表型(图1E)。这些早期对细胞衰老和分化的强烈作用与对癌症中的BBI的先前研究^{8,14,18}以及新兴的作为细胞状态的动力学中介体的BET溴结构域的生物学²⁶产生共鸣。

[0329] 为了扩大这些发现的推进意义,评估了JQ1在体内对4个人类乳腺癌的鼠异种移植模型中的乳腺癌生长进行抑制的能力。两周的JQ1治疗有效地抑制了来源于SUM159和MDA-MB-231TNBC细胞系的所建立的肿瘤的生长,以及来源于患者的原代人类TNBC异种移植物的生长(图1F和图8E至8F)。然后在SUM159模型中使用两种独立的TET诱导型shRNA建立对BRD4的体内特异性依赖性。发现BRD4的下调具有甚至更显著的作用,引起完全的肿瘤消退,并且即使在终止多西环素治疗之后也无法再生长(图1F和图8G)。通过由免疫荧光显微镜检查进行的基底(降低的HMW细胞角蛋白和pSTAT3)和Luminal(增加的LMW细胞角蛋白和CD24)标记物的药效学测量,BBI诱导的基底到Luminal的分化证据在体内得到确认(图1G和图8F)。

[0330] TNBC中BBI的转录靶点

[0331] 接下来,使用综合表观基因组学分析来确认TNBC中BBI的直接转录靶点。报道了能够在表观基因组中在空间上将染色质活性小分子定位到离散的作用位点的技术,其通过将预先固定的和碎片化的核染色质的配体亲和性色谱与大规模平行DNA测序(Chem-seq)搭配进行²⁷。Chem-seq使用可回收的生物素化的JQ1衍生物(Bio-JQ1)²⁷和BBI敏感性TNBC细胞系(SUM159)进行。通过将富集序列的读段数与人类基因组比对并与启动子(组蛋白3赖氨酸4三甲基化;H3K4me3)、增强子(组蛋白3赖氨酸27乙酰化;H3K27ac)以及BRD4共活化剂的ChIP-seq数据进行局部和全局对比来映射BBI的功能位点。溴结构域抑制剂结合在活性启动子和增强子区确认(图2A),几乎完美的共同定位到BRD4富集位点,并强烈富集在全基因组的活性增强子(图2B)。如所预期的,发现在经处理的TNBC细胞中BBI有效地将染色质结合BRD4移去(图2C)。通过Chem-seq发现该作用在展现出升高的Bio-JQ1富集的基因组区域更显著(图2D),从而支持增强的最富集位点处的BRD4结合的破坏。SUM149细胞(第二种BBI敏感性TNBC系)中的BRD4ChIP-seq研究确认了这些发现(图9A)。

[0332] 为了确认SUM159细胞和SUM149细胞中BBI的生物学上相关的直接靶点,对Bio-JQ1和BRD4全基因组的结合进行了定量,并且分别于219个和159个超级增强子发现强烈富集(SE;图2E和图9B)^{6,16-18}。已经发现,超级增强子更有效地被JQ1耗尽BRD4,从而解释了对SE相关的基因表达的选择性作用^{6,16-18}。SUM159中与SE最相关的基因是POU5F1B/MYC²⁸、IRX2^{29,30}、HIF1 α ³¹、在发育和乳腺癌中具有已知作用的TF以及CD180(RP105)(一种涉及肥胖、炎症以及动脉粥样硬化的TLR4辅助分子³²(图9B)。POU5F1B/MYC²⁸和HIF1 α 也是SUM149细胞中与SE最相关的基因。在经JQ1处理后,在不同的时间点通过RNA-seq分析两种细胞系中的基因表达变化显示出对基因表达的一致的成比例的作用(图9C),并确认与所有活性基因相比与SE相关的基因明显更可能被下调(图2F和图9D)。经处理24小时后被JQ1相对于DMSO上调或下调的基因的表达在处理3小时、12小时以及24小时进行。上调的基因包括DHRS2、HEXIM以及CDKN1A,下调的基因包括CD180、PTPN22以及HNF4G。最早在经JQ1处理后3小时观察到基因表达的变化,并且如所预期的,紧跟在SE破坏之后,更多的基因被显著下调而不是上调(图9D至9F)。重要的是,大部分下调的基因都是直接的BRD4靶点而上调的基因则不是,并且这一差别在经JQ1处理后的早期时间点最为显著(数据未显示)。在SUM159细胞CD180中,PTPN22、HNF4G以及KRT17是被下调最多的基因,而已知被BET溴结构域抑制剂上调的HEXIM

基因以及DHRS2和CDKN1A则是被上调最多的基因。使用Metacore套装对受JQ1影响的目标通路进行的无人监督的功能分析³³显示抗细胞凋亡、骨重塑、WNT以及JAK/STAT信号通路中调控基因和效应基因的下调(图2G)。总之,这些研究支持SE相关的基因被JQ1选择性地破坏,从而导致涉及细胞增殖、侵入以及存活的协作转录通路的失调。

[0333] 依赖于BET的TNBC中对溴结构域抑制的抗性

[0334] 获得的抗性是一个几乎不可避免的靶向疗法特征。详解对靶向疗法的抗性对于阐明药物和靶点的作用机理很重要,并且对于提出处理或预期患者的药物抗性的方法也很重要。因此,通过在递增剂量的JQ1中长期培养SUM159和SUM149细胞建立了BBI抗性的TNBC细胞系。

[0335] 亲代SUM159和SUM149细胞系的增殖被低(0.5 μ M)剂量和高(2.0 μ M)剂量的JQ1严重影响,并且活细胞数在处理6天之后降低(图3A和图9G)。相比之下,分离的JQ1抗性细胞(SUM159R和SUM149R)继续随着时间线性增殖,甚至在高浓度(高达20 μ M)的JQ1的情况下(图3B和图9G)。BBI-抗性并不归因于药物输出,这是由于结构不同的抑制剂与JQ1一样是无活性的(图3C),MDR1和其它转运蛋白未被转录上调(图10A),并且与MDR1抑制剂,诸如维拉帕米共培养没有效果(图10B)。由施用Bio-JQ1以及配体色谱和免疫印迹所示,通过等价约束敏感细胞和抗性细胞中的BRD4提供了进一步的支持(图10C)。在短期培养中观察到弱但清楚的所有BBI对ATP含量的剂量变化影响(图3C),并且除了JQ1之外,EC50与削弱敏感系中的细胞增殖需要的浓度一致(图1A)。肩顶这些短期剂量响应曲线支持抗药性增殖的表型,且不会伴随在长期培养中随着时间明确地观察到的细胞死亡(图3A)。敏感和抗性的TNBC细胞对不同药物类别的化合物(例如已知靶向TNBC细胞的CXCR2和JAK2抑制剂)同样敏感³⁴;因此在其它靶向药物中,对于BET抑制剂的抗性是特异性的(图3D)。适应性药物抗性并不归因于少量细胞亚群的长出,这是由于10个独立的单独的来源于细胞的克隆显示出与SUM159R细胞池相同的抗性图谱(图3E)。由于来源于SUM159R细胞的异种移植物在敏感TNBC细胞的平行研究中对JQ1处理没有响应,体内获得类似的结果(图3F)。

[0336] 对靶向疗法的抗性通常通过编码目标蛋白的基因的体细胞改变来介导,如同酪氨酸激酶的所谓的“把关人(gatekeeper)”变异一样³⁵。在研究的所有抗性TNBC群体中,外显子组测序未能确认对BET溴结构域编码基因的改变。对靶向疗法的适应性抗性通常还由旁路通路的激活引起,使细胞依赖于新的信号传导因子且不再依赖于药物靶点,如同在肺癌中产生EGFR抑制剂抗性之后激活MET一样³⁶。与此相比,外显子组测序未能确认可表明平行通路激活的选择的或突现的已知驱动基因中的改变。令人惊讶的是,如RNA干扰实验所确定的, SUM159R细胞保持对BRD4的依赖进行细胞生长(图3G和图10D)。

[0337] 抗性TNBC中独立于溴结构域的BRD4定位

[0338] 对BRD4的持久依赖和遗传学解释的缺乏促使对药物抗性的表观基因组机理进行考察。在SUM159R中进行了染色质结构、BRD4以及JQ1定位的全基因组测量,容许与SUM159成对比较。如在关于巨噬细胞和内皮细胞中的炎性转变的一个研究中所述,已经证明差别SE分析是研究可归因于BRD4功能的细胞状态的动态变化的一个强有力工具²⁶。为了对推定的依赖于BRD4的细胞状态变化进行表征,对敏感细胞和抗性细胞的Bio-JQ1 Chem-seq图谱进行了对比。差别SE分析发现抗性SUM159R细胞中SE数量的显著增加,以及较不显著的较少SE的损失(图4A)。Bio-JQ1 SE的增加与结合到这些基因组基因座的BRD4的富集相关(图4B),

还与相关基因的转录的增加相关(图4C)。在SUM159细胞中增加最多的超级增强子是在BCL-xL基因座的H3K27ac富集的上游和基因内区域(图4D)。应该注意的是,从表达谱来看,BCL-xL是抗性细胞中少数高度上调的基因之一,这一发现由免疫印迹所确认(图11A)。该抗细胞凋亡因子的失调的增加的表达可在经JQ1长期处理过程中赋予细胞凋亡抗性。

[0339] 据假设,对JQ1的表观基因组抗性可通过以独立于溴结构域的方式将BRD4募集到SE基因座来产生。BRD4 ChIP-seq在暴露于或未暴露于JQ1的情况下在敏感细胞和抗性细胞上进行。这些研究确认了在SUM159R细胞中经JQ1处理后BRD4未从染色质移去的这一关键的机理发现(图4E)。在Chem-seq定义的SE区域, SUM159细胞耗尽BRD4, 而SUM159R细胞则保留染色质结合的BRD4(图4F)。在功能上,抗性细胞的JQ1处理未能影响H3K27ac(图4G)或全局转录(图11B),即使在SUM159中最动态地JQ1上调的和下调的转录物中(图4H至4I)。应该注意的是,包括FOX A1(一种关键的luminal转录因子)^{37,38}、CD24以及luminal细胞角蛋白在内的几种luminal标记物在细胞培养物和体内的SUM159R细胞中均具有较高水平,而包括CD44、FOX A2、pSTAT3以及基底细胞角蛋白在内的基底细胞标记物的表达则被降低(图11C和11D)。跟确认JQ1与BRD4直接结合的以上拉下(pull-down)数据和展示在抗性TNBC细胞中与BRD4共同定位的Chem-seq数据一起,这些数据支持通过必需地将BRD4募集回染色质(但是以独立于溴结构域的方式)产生抗性的这一模型。在SUM149R细胞中并且甚至在具有固有JQ1抗性的细胞系中得到基本上相同的观察结果(图9E至9G和6A至6D),表明一种更一般的对BET抑制的表观基因组抗性的机理。

[0340] JQ1抗性的NBC中pBRD4的积聚

[0341] 除了双溴结构域之外, BRD4还具有另外的结构特征,即将所定义的基因调控因子结合。实际上, BRD4最初由Kornberg确认为中介体相关的因子³⁹。更近的蛋白质体研究显示额外终端域与ATAD5、CHD4、GLTSCR1、JMJD6以及NSD3的亲合结合⁴⁰,以及远端羧基末端与CDK9和细胞周期蛋白-T1的亲合结合⁴¹。许多这些因子拥有自己的表观遗传学读取模块,并且它们在其中起作用的更大的大分子复合物可能有助于BRD4独立于溴结构域的募集。为了公开敏感SUM159细胞与抗性SUM159细胞之间BRD4相关的复合物中的可能差别,使用RIME(内源性蛋白的快速免疫沉淀质谱)⁴²在存在或不存在JQ1的情况下进行了无偏蛋白质组分析。

[0342] 富集于抗性细胞相对于亲代细胞中的BRD4相关蛋白的分析确认了MED1和BRD3。BRD4甚至在JQ1的存在下亲和地结合到这些蛋白(图5A至5B和表1)。通过进行BRD4免疫沉淀接着进行MED1和BRD3免疫印迹分析对RIME数据的观察结果进行了探求。在敏感细胞中JQ1有效地将BRD4从MED1移去,但是在抗性细胞中没有这种作用,其中确认具有增加的MED1与BRD4的结合(图5C)。这些发现在SUM149细胞和BBI抗性的SUM149R细胞中,以及在展现出对BBI的固有抗性的TNBC和Luminal细胞系中得到确认(图13A)。通过免疫印迹未确认SUM159R细胞中增加的BRD4和BRD3的结合(图5C),尽管观察到升高的BRD3丰度(图5D)。

[0343] 为了在功能上评估由MED1增加BRD4到染色质的募集是否是JQ1抗性的基础,产生了编码溴结构域失活突变体(BDmut)的BRD4表达构建体。在稳定细胞系中对这些构建体挽救敲减内源性BRD4的作用的能力进行了评估(图13B至13C)。内源性BRD4的下调在亲代SUM159细胞和抗性SUM159R细胞中均降低了细胞生长,其被野生型BRD4的强化表达挽救(图5D)。BDmut BRD4的表达未能挽救亲代SUM159细胞,但是支持JQ1抗性的SUM159R的生长,从

而在功能上确认独立于溴结构域的募集的假设(图5D)。接下来,对表达BDmut BRD4的细胞对JQ1的敏感性进行了评估。在亲代SUM159细胞中,外源性表达的BDmut BRD4显著影响了对JQ1的敏感性(图5E)。相比之下,SUM159R细胞中BDmut BRD4的表达挽救了JQ1的抗增殖作用(图5F)。总之,这些研究表明,BBI抗性与以不受JQ1影响的独立于溴结构域的方式增加BRD4与MED1的结合相关。

[0344] BBI抗性中BRD4的超磷酸化

[0345] 最近的一个研究报道,BRD4的稳定性和核定位会随着通过酪蛋白激酶II (CK2) 的磷酸化而增加⁴³。为了研究BRD4磷酸化对BBI-抗性的贡献,在亲代细胞和抗性细胞中进行免疫印迹分析,并发现在抗性细胞中磷酸-BRD4 (pBRD4) 显著增加(图6A和图13D)。小分子抑制CK2降低了SUM159细胞和SUM159R细胞中的BRD4磷酸化(图13E)。这些结果意味着由于通过CK2的磷酸化增加或者另外由于通过尚未确认的BRD4磷酸酶的去磷酸化降低而使得BRD4在抗性细胞中被超磷酸化。为了研究这些选项,首先通过进行pan-CK2基体免疫印迹法在亲代细胞和抗性细胞中分析CK2活性。与将CK2描述为组成型活性激酶的先前数据一致⁴⁴,未检测到敏感细胞系与抗性细胞系之间CK2活性的显著差异(图13F)。

[0346] 已经显示,PP2A肿瘤抑制基因的失活是乳腺癌中的一个常见事件,并且它与疗法抗性和不良预后相关⁴⁵。此外,PP2A是一种高产丝氨酸磷酸酶,其经常会妨碍CK2功能^{46,47}。因此,对PP2A是否可能是一种BRD4磷酸酶和降低的PP2A活性是否可能在BBI抗性中起作用进行了研究。敲减SUM149细胞和SUM159细胞中PP2A的A亚基和C亚基引起BRD4磷酸化的增加,从而确认PP2A为先前未认识到的BRD4磷酸酶。为了强化PP2A活性与BBI抗性之间的关联,在敲减PP2A的C亚基之后测试SUM149细胞的JQ1敏感性,并确定下调PP2A降低了JQ1的敏感性(图6C)。最近的一个研究确认吩噻嗪化合物为PP2A酶活性的活化剂⁴⁸。因此,在用吩噻嗪 (PTZ) 短期处理后分析SUM159R、SUM149R以及其它细胞系中的pBRD4水平,并检测到迅速的BRD4的去磷酸化(图6D和图13G)。与之相符,用PTZ和JQ1组合处理克服了SUM159R细胞中的BBI抗性(图6E)。为了研究BRD4超磷酸化促成BBI抗性的分子基础,对BRD4磷酸化是否影响MED1结合进行了分析。实际上,经CK2抑制剂或PTZ处理的SUM159R细胞均导致BRD4免疫沉淀实验中MED1丰度的降低,表明pBRD4与MED1的结合比BRD4更有效(图6F至6G)。

[0347] 为了进一步在功能上评估BRD4磷酸化在BBI抗性和MED1结合中的作用,产生了编码不能被CK2磷酸化的突变体(7丝氨酸取代为丙氨酸;“7A突变体”)或模拟组成型磷酸化的突变体(7丝氨酸取代为天门冬氨酸;“7D突变体”)的BRD4表达构建体。对这些构建体在稳定细胞系中挽救敲减内源性BRD4的作用的能力(图13B至13C)进行了评估,并且发现7D突变体的表达支持亲代SUM159细胞和JQ1-抗性SUM159R细胞两者的生长,而7A突变体则具有较弱的作用,特别是在SUM159细胞中(图5D)。接着,7A突变体和7D突变体的MED1结合和亚细胞定位在存在或不存在JQ1的情况下进行了分析。发现与WT BRD4相比7A突变体显示较弱的MED1结合,并且在JQ1之后完全分离,而7D突变体则似乎具有较高的MED1亲和力,其不受JQ1处理的影响(图6H和图13H)。

[0348] 最后,对表达7A突变或7D突变的BRD4的细胞对JQ1的敏感性进行了评估。在亲代SUM159细胞中,外源性表达的7D突变的BRD4降低了对JQ1的敏感性,而7A突变体则轻微增加了敏感性(图6I)。相比之下,在SUM159R细胞中7A突变的BRD4的表达恢复了JQ1敏感性,而7D突变体则适度地将其降低,甚至更多(图6I)。这些结果强烈支持这样的假说:由于BBI抗性

细胞中PP2A活性的降低而将BRD4超磷酸化,这会增加BRD4募集到MED1,并降低对BBI的响应性。

[0349] 为了扩大这些发现的推进意义,使用JQ1和靶向BCL-XL的分子(ABT737)、SUM159R细胞中获得的超级增强子以及BRD4磷酸化调节剂、CK2抑制剂CX-4945和PP2A活化剂佩吩嗪(PPZ)进行了协同作用筛选。在JQ1与ABT737、CX-4945、以及另外PPZ之间观察到显著的协同作用(图14),这意味着这些药物组合在TNBC中可能会获得比单独的BBI甚至更高的效力。

[0350] 继协同作用筛选实验,检测了不同的BBI联合疗法对来源于BBI抗性细胞的肿瘤的作用。给带有来源于BBI抗性的SUM149细胞的肿瘤(图15A)或来源于BBI-抗性的SUM159细胞的肿瘤(图15B)的小鼠施用载体、单一疗法或BBI联合疗法。单一疗法包括施用BET抑制剂(JQ1)、JAK2抑制剂(INC424,或“JAK2I”)、Bcl-x1/Bcl-2抑制剂(ABT 263)或Bcl-2抑制剂(ABT 199)。联合疗法包括施用JQ1以及INC424、ABT 263或ABT 199。在两种异种移植模型中,每种BBI联合疗法均比相应的单一疗法和单独的JQ1更大程度地减少了肿瘤重量。

[0351] 经作为对照的载体(图16A,顶图)、JQ1(图16A,底图)、ABT 199(图16B,顶图)、ABT 263(图16B,底图)、INC424(图16C,顶图)、ABT 199+JQ1(图16C,底图)、ABT 263+JQ1(图16D,顶图)、INC424+JQ1(图16D,底图)处理后将来源于BBI抗性的SUM159细胞(SUM159R)的异种移植体进行H&E染色。如图所示,组合处理后的细胞数量相对于相应的单一疗法被显著降低。总之,以上结果确认,某些联合疗法在TNBC中会获得比单独的BBI更高的效力。

[0352] 为了进一步研究Bcl-x1在BBI抗性中的作用,通过用小鼠Bcl-x1抗体染色(1:50,过夜)将来自异种移植体的亲代SUM159细胞(BBI-敏感)和SUM159R细胞(BBI-抗性)针对Bcl-x1进行染色。荧光成像表明,Bcl-x1在BBI抗性的SUM159细胞中(图17,底部)存在的程度远大于在BBI敏感性SUM159细胞中(图17,顶部)。该证据与抗细胞凋亡蛋白Bcl-x1的过度表达可能是对BBI抗性起作用的因素的假设一致。

[0353] 讨论

[0354] 三阴性乳腺癌是仅有的一种缺乏有效的靶向疗法的主要的乳腺癌亚型⁴。尽管一部分早期TNBC患者会很好地响应化疗,但是大部分患者会迅速复发并带有转移性疾病,对其治疗选择是有限的。因此迫切需要新的治疗策略。TNBC癌症基因组测序研究未能确认可对其考察以用于治疗基因改变的²,这使得寻找非遗传靶点作为未认识到的依赖物成为必需。BET抑制的基本原理在TNBC中确认,以预期对核心调控回路的坚定理解。

[0355] BET抑制已经在迅速扩展的文献中的不同肿瘤模型中显示出有效性。尽管如在此在TNBC中所观察到的,在大部分的这些报道中具有明显的抗性,但是尚未报道BET抑制剂抗性的机理。综合表观基因组学、蛋白质组学以及化学生物学中的方法,提供了通过表观遗传学机理的表观遗传学药物抗性的实例,其中BRD4被以独立于溴结构域的方式募集到染色质,这要归因于由于其超磷酸化而与MED1的结合增加,所述超磷酸化是抗性细胞中PP2A活性降低的结果。该研究显示组合策略(诸如与BCL-xL抑制剂(例如ABT-737)或CK2抑制剂结合)会预期并克服BBI抗性,并指导开发会通过正交生物物理或生化作用破坏BET功能的第二代BET抑制剂。更立即地,临床前模型中观察到的强的效力支持在仅TNBC中和与基于机理的靶向疗法结合的TNBC中产生BET抑制。

[0356] 材料和方法

[0357] 细胞系和乳腺癌组织

[0358] 乳腺细胞系从ATCC和密歇根州安阿伯市密歇根大学的Steve Ethier博士获得(SUM系列)。细胞在提供者建议的培养基中培养,其身份通过STR分析确认,并定期测试支原体。乳腺癌样本使用经DF/HCC机构审查委员会(DF/HCC Institutional Review Board)批准的方案收集。将肿瘤用剃刀片切碎,并通过在37℃下搅拌3至4小时消化于具有2mg/mL BSA、2mg/mL IV型胶原蛋白酶以及2mg/mL透明质酸酶的DMEM/F12中。消化后,将细胞通过500-微米的筛孔过滤,在具有5%FBS的DMEM/F12中洗涤,在具有5%FBS和10%DMSO的DMEM/F12中冷冻,并储存于液氮中,以用于随后的异种移植研究。

[0359] 乳腺细胞系组中BET溴结构域抑制剂的高通量筛选

[0360] 基本上如所描述使用半自动筛选以384-孔的格式2,000个细胞每孔在29个人类乳腺细胞系中测试了一组化合物(在Bradner实验室中合成)⁸。72小时的细胞存活力使用ATPlite(Perkin Elmer)评估。

[0361] 协同作用研究

[0362] 使用自动配药系统(BioTek EL406)将SUM149、SUM149R、SUM159以及SUM159R细胞以1,000个细胞每孔在50μl培养基中接种在无菌、白色、不透明的384孔微量滴定板中(Thermo)。通过JANUS工作站(100nl)的机械手臂针传送在DMSO中递送各药物,以获得每种化合物成对的剂量响应培养的矩阵,每对一式八份。培养72小时之后,测定经处理的细胞和载体对照(ATPlite,PerkinElmer)的ATP水平。数据通过载体对照标准化。合用指数使用Chou和Talalay的半数效应原则⁴⁹(CalcuSyn软件)确定。等效线图使用GraphPad Prism软件产生。各点代表针对协同作用评估的药物浓度的成对值。对角线表示药物的加成性。所述线以上的各点代表对抗性药物组合,而其下的各点则代表协同性药物组合。协同作用化验一式三份进行,并重复2至3次。

[0363] 异种移植物化验

[0364] 对于异种移植物化验,从Taconic购买了5至6周龄的雌性CrTac:NCr-Foxn1tm和NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/JicTac小鼠。通过双侧原位乳房脂肪垫注射DMEM/F12或Medium171中的50%Matrigel(BD Biosciences)中的1x10⁶个细胞诱导肿瘤(IDC50-X细胞除外,其与Medium 171中的3%FBS和4mg/ml胶原蛋白凝胶一起注射)。动物实验按照由丹娜法伯癌症研究院动物保健和使用委员会(Dana-Farber Cancer Institute Animal Care and Use Committee)批准的11-023方案进行。对于所有的异种移植研究,每组(5至10只小鼠)的样本大小在各图中示出。

[0365] 细胞存活力、细胞衰老以及MDR化验

[0366] 细胞存活力和生长化验(图1A至1B、图3A至3E、3G、图5D至5F、图6C、6E、6I、图7A、图10D、图14A至14C)、周期、细胞凋亡以及MDR化验一式三份进行2至3次。对于细胞增殖化验,细胞以500个细胞每孔铺在96孔板中,并在次日用抑制剂、DMSO或多西环素(500ng)处理。将细胞在37℃下用5%CO₂在如上所述的培养基中培养,并在处理3日后使用CellTiter-Glo测量细胞存活力。对于细胞生长化验,将细胞以5000个(SUM159)或20000个(SUM149)细胞每孔铺在6孔板中,并在次日用抑制剂处理。每3天通过细胞计数器对细胞进行计数。细胞凋亡用APC AnnexinV/7AAD Apoptosis Detection试剂盒(BD Pharmingen)进行分析。AnnexinV/7AAD评估和细胞周期图形使用用于Windows的V7.6.1FlowJo软件(Tree Star)产生。细胞衰老β-gal染色使用Cell Signaling的细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒进行。简而言之,经

JQ1处理 (500nM) 72小时后, SUM159和MDA-MB-231细胞用固定液 (Fixative Solution) 固定15分钟, 接着在37℃下用 β -半乳糖苷酶溶液培养过夜。在显微镜下检查染色是否产生蓝色。多耐药性化验使用艾美捷科技 (Cayman Chemical) 的MDR化验试剂盒 (600370) 进行。简而言之, SUM159细胞和SUM159R细胞用JQ1或DMSO在SUM培养基中处理30分钟。维拉帕米在1:1000稀释下用作阳性对照。之后添加Calcein AM/Hoechst Dye染色溶液, 并将细胞在37℃下培养15分钟。细胞通过荧光显微镜和FACS分析。

[0367] 经JQ1处理或者使用多西环素下调BRD4 72小时之后使用碘化丙啶 (PI) 染色进行细胞周期分析。将细胞重新悬浮于补充有2 μ g/ml PI (生命科技 (Life Technologies)) 作为最终浓度的1ml生长培养基中。在37℃下在黑暗中保持60分钟之后, 在FACS AriaII细胞仪 (BD Biosciences) 上进行分析。排除双峰后将细胞周期绘制为直方图。细胞同步化步骤。将SUM159细胞用诺考达唑 (200ng/mL) 处理12小时, 然后轻敲细胞以将其从板脱离。用PBS洗涤2次之后, 在胶原蛋白包被的板中具有JQ1或者不具有JQ1的情况下将细胞重新铺板。在0小时、3小时、6小时、12小时的时间点收集细胞, 以用于FACS和免疫印迹分析。

[0368] 免疫荧光染色

[0369] 用于免疫荧光的抗体为CK18 (Dako, M7010)、CK17 (Dako, M7046)、HMW (Dako, M0630)、LMW (Dako, M0631)、CD44 (NeoMarkers, MS-668-P1)、CD24 (NeoMarkers, MS-1279-P1)、p-STAT3 (Cell Signaling, 9145S)、VIM (Dako, M073501)、CDH1 (BD Biosciences, 610181)、FLAG (Sigma, F1804)、BrdU (Roche, 11170376001)。免疫荧光实验在培养细胞中进行, 或者在福尔马林固定石蜡包埋的 (FFPE) 异种移植肿瘤的全切片中进行。染色如所描述进行⁵⁰。抗体稀释度如下: pSTAT3 (1:25)、CD44 (1:100)、CD24 (1:100)、CK18 (1:200)、CK17 (1:200)、HMK (1:200)、LMK (1:200)、VIM (1:100)、CDH1 (1:100)、FLAG (1:50)、BrdU (1:200)。

[0370] siRNA和慢病毒shRNA和表达构建体

[0371] 对于siRNA转染, 细胞以2,000个细胞每孔铺在96孔板中, 并在37℃下用5%的C02在培养基中培养。第二天, 细胞用针对目标基因的siGENOME SMARTpools转染, 或者用使用DharmaFECT 1 (Dharmacon) 的“非靶向siRNA”对照转染, 各一式三份。SMARTpools中的siRNA序列列于表2中。转染3天后使用CellTiter-Glo (普洛麦格 (Promega)) 测量细胞存活力, 将在每个细胞系上每次siRNA处理的效果与无siRNA的效果进行对比。

[0372] 使用Lipofectamin (生命科技 (Life Technologies)) 将含有质粒PLK0.1以及辅助质粒pCMV-dR8.91和pMD2.G-VSV-G的慢病毒发夹共转染到HEK293T细胞中来封装TET诱导型pLK0-TET-ON慢病毒构建体。通过优化离心感染细胞法 (spinoculation) 在1000g下转导30分钟小时并用1 μ g/ml的嘌呤霉素筛选72小时 (密苏里州圣路易斯市西格玛公司) 之后, 通过蛋白质印迹法确定敲减的有效性, 如上所述接种细胞用于增殖化验。所用shRNA序列列于表2中。

[0373] pCDNA3中的全长BRD4为来自哈佛大学医学院附属布列根和妇女医院的French博士的赠品。BRD4BD1 (N140A) 和BD2 (N433A) 溴结构域突变、7A和7D突变体使用Quickchange Multi Site-Directed Mutagenesis试剂盒 (安捷伦科技 (Agilent Technologies)) 使用表2中列出的引物产生, 并随后通过测序验证。

[0374] 免疫印迹和免疫沉淀实验

[0375] 用RIPA缓冲液中的siRNA转染5天后将细胞裂解。蛋白在SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (4%

至12%)中分解,并使用Tris-甘氨酸缓冲液系统转移到PVDF膜。用在0.1%的PBS中的Tween20(PBS-T)中的5%的奶粉将膜在室温下封闭1小时,接着用在2.5%的牛奶PBS-T中以1:1000稀释的第一抗体培养。对于免疫沉淀,核提取物如下制备:将 10×10^6 个细胞重新悬浮于5ml缓冲液A中:10mM Tris pH7.9、1.5mM $MgCl_2$ 、10mM KCl、0.05%NP-40、1mM DTT以及蛋白酶和磷酸酶抑制剂。细胞在冰上培养15分钟,每5分钟轻轻涡旋一次。在2,000g下离心5分钟之后,将沉淀悬浮于0.3ml缓冲液B(20mM Tris pH7.9、25%丙三醇、0.42mM NaCl、1.5mM $MgCl_2$ 、1mM KCl、0.5%NP40、0.2mM EDTA、1mM DTT以及蛋白酶和磷酸酶抑制剂)中,并在冰上培养5分钟。在4℃下裂解物在14g下离心10分钟之后,用0.6ml缓冲液A稀释上清液,添加NP-40至最终为0.5%并用脱氧核糖核酸酶I处理。然后使用以1:100稀释的BRD4或Flag抗体将样品在4℃下培养过夜,免疫沉淀物在Dynabeads Protein G上收集2小时。将珠粒用含有150mM NaCl和0.5%NP-40的缓冲液B洗涤3次,然后重新悬浮于凝胶加样缓冲液中。免疫印迹和免疫沉淀实验重复2至3次。

[0376] 抗体和抑制剂

[0377] 用于免疫印迹、免疫沉淀以及ChIP-seq的抗体如下:BRD4(BETHYL,A301-985A)、MED1(BETHYL,A300-793a)、BRD3(BETHYL,A302-368A)、BRD2(BETHYL,A302-583A)、MYC(SantaCruz,sc764)、p-STAT3(Cell Signaling,9145S)、STAT3(Cell Signaling,4904)、p-STAT5(Cell Signaling,9351)、p-JAK2(Cell Signaling,3771)、CYCLIND1(Cell Signaling,2922)、p-H3(Cell Signaling,12201)、CK2基体(Cell Signaling,8738)、PP2A-A(Cell Signaling,2039)、PP2A-C(Cell Signaling,2038)、p-BRD4是来自德克萨斯大学西南医学中心的Chiang博士的赠品。用于ChIP-seq的抗体为BRD4(Bethyl)组蛋白H3K27ac(Abcam,ab4729)。CXCR2抑制剂(239819)和CK2抑制剂(218860)来自CalBiochem,JAK2抑制剂(INC424)、MEK抑制剂(GSK1120212,S2673)和PI3K抑制剂(BKM120,S2247)来自Selleckchem,吩噻嗪(1525707)和佩吩嗪(1511000)来自西格玛(Sigma),ABT-737(s1002)来自Selleckchem。

[0378] SILAC-RIME实验和数据分析

[0379] SUM159细胞和SUM159R细胞在缺乏R/K的SILAC DMEM(paa;E15-086)、10%透析过的血清(西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich);F0392)中生长,对于标记为“重的”的培养基用800μM的L-赖氨酸 $^{13}C_6^{15}N_2$ 盐酸盐和482μM的L-精氨酸 $^{13}C_6^{15}N_4$ 盐酸盐(美国剑桥同位素实验室(Cambridge Isotope lab))补充,或者对于标记为“轻的”的培养基用800μM的L-赖氨酸 $^{12}C_6^{14}N_2$ -盐酸盐和482μM的L-精氨酸 $^{12}C_6^{14}N_4$ 盐酸盐补充。在SILAC标记后,RIME如所描述的进行⁴²。

[0380] 体外Chem-seq、ChIP-seq以及RNA-seq

[0381] Chem-seq基本上如所描述的进行²⁷。ChIP-seq:SUM159细胞和SUM159R细胞(4×10^7 个)在SUM培养基中生长。然后除去所述培养基,替换为含有1%甲醛(EM级;TEBU-BIO)的培养基并交联8分钟。交联通过添加甘氨酸至0.2M的最终浓度来结束。细胞用冰冷的PBS洗涤,收集到PBS中,并用PBS洗涤细胞沉淀。核部分通过以下方式提取:首先将沉淀在4℃下于10ml LB1缓冲液(50mM HEPES-KOH[pH7.5]、140mM NaCl、1mM EDTA、10%丙三醇、0.5%NP-40或Igepal CA-630以及0.25%TritonX-100)中重新悬浮10分钟。将细胞沉淀,重新悬浮于10ml的LB2缓冲液(10mM Tris-HCL[pH8.0]、200mM NaCl、1mM EDTA以及0.5mM EGTA)中,并

混合5分钟。将细胞沉淀,重新悬浮于300 μ l的LB3缓冲液(10mM Tris-HCl[pH8]、100mM NaCl、1mM EDTA、0.5mM EGTA、0.1%脱氧胆酸钠以及0.5%N-月桂酰肌氨酸)中,并在covaris超声波破碎仪中超声10分钟。总共添加30 μ l的10%TritonX-100,并将裂解物在20,000rcf下离心10分钟,以将碎片纯化。然后上清液用预先与20 μ g的BRD4抗体(Bethyl,A301-985A)结合的100 μ l磁性珠粒(生命科技(Life Technologies))培养,并在冷室中过夜进行免疫沉淀(IP)。将珠粒在1ml的RIPA缓冲液中洗涤10次,在100mM的碳酸氢铵(AMBIC)溶液中洗涤两次。DNA在洗脱缓冲液(50mM Tris-HCl pH8、10mM EDTA以及1%SDS)中洗脱。65℃下过夜后交联被反转。RNA和蛋白用0.2mg/mL的核糖核酸酶消化2小时,接着用0.2mg/mL的蛋白酶K消化1小时。通过苯酚氯仿进行萃取和乙醇进行沉淀来纯化DNA。用于Illumina测序的库使用Rubicon ThruPLEX-FD试剂盒制备10至12个循环。

[0382] RNA-seq:将SUM159和SUM159R在500nM的JQ1或DMSO处理下培养3小时、12小时以及24小时,生物重复两次。使用标准的QIAGEN RNeasy试剂盒(74106)提取总的RNA。测量RNA浓度,并在生物分析仪(Bioanalyzer)上进行质量控制,使用Illumina True-Seq RNA试剂盒利用SciClone NGSx工作站制作RNA-Seq库。

[0383] 所有RNA-seq和ChIP-seq实验(图2、4、9以及12)均进行两次。

[0384] 基因组数据分析

[0385] 读取该打印文件中产生的数据。本公开物中产生的所有的ChIP-seq、Chem-seq以及RNA-seq数据可在与GEO Publication Reference ID GSE63584相关的网址(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)找到。基因集和注释。所有分析使用RefSeq(NCBI37/HG19)人类基因注释进行。

[0386] RNA-seq数据处理和基因表达的定量。利用从ccb.jhu.edu/software/tophat/igenomes.shtml获取的Tophat2⁵²(2.0.11版)使用Illumina iGenomes NCBI37/HG19 UCSC转录组构建体将所有RNA-Seq数据集与转录组比对。比对使用缺省参数进行。转录表达的定量使用具有缺省参数的Cufflinks⁵³(2.2.0版)进行,以产生基因表达值,以FPKM为单位。

[0387] ChIP-seq和Chem-seq数据处理。所有的ChIP-seq和Chem-seq数据集使用Bowtie2⁵⁴(2.2.1版)进行比对,以建立NCBI37/HG19版的人类基因组,或者建立NCBI37/MM9版的小鼠基因组。比对使用以下条件进行:-k 1,所有其它参数设为缺省值。这些标准仅保留唯一映射至基因组而没有任何错配的读取数。

[0388] 计算读取密度。ChIP-seq或Chem-seq数据集的标准化读取密度在任何区域中使用Bamliquidator(0.9版)读取密度计算器计算(github.com/BradnerLab/pipeline/wiki/bamliquidator)。简而言之,ChIP-Seq读段数与区域的比对被延伸200bp,并计算每个碱基对(bp)的读段数的密度。每个区域中的读段数的密度被标准化为百万映射读段数的总数产生的读取密度,单位是每bp每百万映射读段数的读段数(rpm/bp)。

[0389] 识别ChIP-seq和Chem-seq富集区域。1.4.2版本的MACS(基于模型的ChIP-Seq分析)⁵⁵峰查找算法被用来识别相对于背景的ChIP-Seq富集区域。1e-9富集的p-值阈值用于所有数据集。

[0390] 创建ChIP-seq占用的热图表象。如所描述的产生针对各种因子的ChIP-seq占用热图⁵⁶。为所有转录起始位点(TSS)侧翼的+/-10kb区域创建热图,或者为所有TSS远端BET溴结构域结合的增强子侧翼的+/-10kb区域创建热图。每行标绘特定的TSS或增强子区。各行按

根据Bio-JQ1 Chem-seq信号确定的峰值BET溴结构域占用进行分级(图2A)。

[0391] 将BRD4和H3K27ac占用与Bio-JQ1相关联。在SUM159细胞中所有的Bio-JQ1富集区域BRD4和H3K27ac的占用与Bio-JQ1占用相关联。显示了皮尔逊相关统计数据(图2B)。为了对经JQ1处理时的BRD4或H3K27ac占用变化进行定量,所有Bio-JQ1富集区域在SUM159细胞中进行分级,然后分成多个区段($n=10$)。针对每个区段显示BRD4或H3K27ac相应的 $\log_2$ 倍数变化 $\pm$ JQ1的箱线图(图2D)。

[0392] 使用Bio-JQ1占用或BRD4对增强子和超级增强子作图。增强子和超级增强子(SE)使用在(younglab.wi.mit.edu/super_enhancer_code.html)所述的^{16,17}且可从其获得的ROSE软件包作图。在SUM159细胞和SUM159R细胞中,Bio-JQ1Chem-Seq富集区域被用来对增强子和SE作图(图2E)。在SUM149细胞中,BRD4ChIP-seq富集区域被用来对增强子和SE作图(图9A至9G)。

[0393] 对SE近侧基因的基因表达变化进行定量。SUM159或SUM149中SE的50kb内的基因针对表达状态(任何样品中 >1 FPKM表达)进行鉴定和过滤,并过滤以除去非聚腺苷酸化的转录物(例如微RNA)。对于SUM159,SE相关的基因或所有表达的基因上的基因表达 $\log_2$ 倍数变化在经JQ1处理后3小时、12小时以及24小时进行对比(图2F)。对于SUM149,在经JQ1处理12小时后进行对比(扩展数据图3B)。还使用韦尔奇双尾t测试评估了变化分布之间的差别的统计显著性。

[0394] 对经JQ1处理时差别表达的基因进行确认。为了确认SUM159或SUM149细胞中经JQ1处理差别调节的基因,所有具有 $>$ 表达 $\log_2$ 倍数变化的基因按24小时的倍数变化 $\pm$ JQ1(对于SUM159)或12小时的倍数变化 $\pm$ JQ1(对于SUM149)进行排序。针对每个基因的 $\log_2$ 行中位数标准化的倍数变化示于图4H至4I中(SUM159)和图9D中(SUM149)。对于随后的基因集和通路分析,使用在12小时和24小时经DMSO和JQ1处理的表达值之间的韦尔奇双尾t测试来选择具有恒定和统计学上显著改变的表达的SUM159基因。

[0395] 对SUM159与SUM159R之间增加的/损失的SE进行确认。SE差别区域如布朗等人在2014年所定义²⁶。简而言之,为了对两个条件之间的超级增强子变化进行定量,在所有增强子区在至少一个条件下被看作是超级的设定下,计算扣除背景的ChIP-Seq信号。增加的/损失的超级增强子被确定为在任一方向具有大于 $\log_2$ 倍数变化的信号的那些。所有分级排序的含SE区域Bio-JQ1占用的 $\log_2$ 倍数变化示于图4A中。SE区域被分类为增加的、保存的或损失的。增加的/损失的区域被分类为在任一方向具有 $>1\log_2$ 倍数变化的那些。保存区域被分类为在任一方向具有 $<0.25\log_2$ 倍数变化的那些。BRD4或近侧(在区域的50kb内)基因表达的 $\log_2$ 倍数变化示于图4B至4C中。

[0396] 在SUM159或SUM159R细胞中在Bio-JQ1区域对经JQ1处理时的BRD4和H3K27ac占用的变化进行定量。BRD4或H3K27ac的 $\log_2$ 倍数变化在其相应的细胞系中的Bio-JQ1富集区域进行定量,并示于图4F至4G中。

[0397] 对作为Bio-JQ1或BRD4占用的函数的BRD4和H3K27ac的变化进行定量。通过递增水平对SUM159中的Bio-JQ1富集区域或SUM149中的BRD4富集区域进行分级,然后分到10个区段。BRD4或H3K27ac的 $\log_2$ 倍数变化在每个区段区域中进行定量,并显示为箱线图(图2D和图9A)。

[0398] 对所有TNBC中经JQ1处理时的BRD4占用的变化进行定量。经JQ1治疗时的BRD4的

log₂倍数变化在每个相应的细胞系中的BRD4富集区域进行定量图12C。

[0399] 与基因组和转录组分析相关的所有编码可在github.com/BradnerLab/TNBC找到。

[0400] 表1.通过RIME确认的BRD4相关的肽的列表。

[0401]

样品名称	因子	细胞系	处理	SILAC 重标记	SILAC 轻标记	数据类型
S1	BRD4	Sum159	JQ1 相对于 DMSO	DMSO 处理	JQ1	未过滤结果
S2	BRD4	Sum159 相对 于 Sum159-R	未经处理	Sum159	Sum159-R	未过滤结果
S3	BRD4	Sum159-R	JQ1 相对于 DMSO	DMSO 处理	JQ1	未过滤结果
S1_Filt	BRD4	Sum159	JQ1 相对于 DMSO	DMSO 处理	JQ1	过滤结果
S2_Filt	BRD4	Sum159 相对 于 Sum159-R	未经处理	Sum159	Sum159-R	过滤结果
S3_Filt	BRD4	Sum159-R	JQ1 相对于 DMSO	DMSO 处理	JQ1	过滤结果

[0402] 表2.siRNA、BDmut、7A和7D引物以及shRNA序列的列表。

[0403]

序列名称	序列标注	SEQIDNO:	序列
si_BRD4_短异构体 2_正义	3UTR	1	rGrGrArCrCrArArArUrGrGrCrArGrCrCrUrGrArUrUrArCCA
si_BRD4_短异构体 1_正义	3UTR	2	rGrCrArCrCrArGrCrUrGrGrCrUrGrUrGrGrGrUrCrCrUrGAG
si_BRD4_长异构体 2_正义	3UTR	3	rCrUrGrGrCrArCrUrGrArCrUrUrUrGrCrCrUrUrGrArArCAG
si_BRD4_长异构体 1_正义	3UTR	4	rCrCrUrCrCrArGrArCrArCrArArUrGrGrCrArCrUrGrCrUTA
siBRD3_1		5	rCrArGrArUrGrArCrArUrArGrUrGrCrUrArA
siBRD3_2		6	rGrCrUrUrUrGrUrCrArArCrArCrGrCrArUrU
siBRD2_1		7	rCrCrArUrGrUrUrCrArCrCrArArCrUrGrUrU
siBRD2_2		8	rGrCrArArUrGrGrCrArCrGrArArArGrCrUrA
siBRD4_1		9	rGrCrUrCrArArGrArCrArCrUrArUrGrGrArA
siBRD4_2		10	rUrGrArUrCrArCrArArUrCrArArGrUrCrUrA
BRD4N140A	BD1 突变体	11	CTATGTTTACAAATTGTTACATCTACGCCAAGCCTGGAGATGACATAGTCTT
BRD4N433A	BD2 突变体	12	GTTCTCCAAGTCTGCTATAAGTACGCCCTCCTGACCAATGAG
shBRD4-1		13	CCTGGAGATGACATAGTCTTA
shBRD4-2		14	CCAACCAAAGTCAGTTCCTTC

[0404]

BRD4-CK2-4A-5	7A 突变体第一个 4A 位点	15	GCCCCGCCCCGCATCCAGCGAC GCCAGCAGCGATGCCTCCGC GGACAGTGAC
BRD4-CK2-4A-3	7A 突变体第一个 4A 位点	16	GTCAGTGTCCGCGGAGGCATC GCTGCTGGCGTCGCTGGATGC GGGCGGGGC
BRD4-CK2-3A-5	7A 突变体其它 3A 位点	17	TCCGCGGACAGTGACGCTGC GACTGATGACGCTGAGGAGG AGCGAGCC
BRD4-CK2-3A-3	7A 突变体其它 3A 位点	18	GGCTCGCTCCTCCTCAGCGTC ATCAGTCGCAGCGTCACTGTC CGCGGA
BRD4-CK2-4D-5	7D 突变体第一个 4D 位点	19	GCCCCGCCCCGATTCCAGCGAC GACAGCAGCGATGACTCCGA CGACAGTGAC
BRD4-CK2-4D-3	7D 突变体第一个 4D 位点	20	GTCAGTGTCTCGTCGGAGTCATC GCTGCTGTCTCGTCGCTGGAATC GGGCGGGGC
BRD4-CK2-3D-5	7D 突变体其它 3D 位点	21	TCCGACGACAGTGACGATGA CACTGATGACGATGAGGAGG AGCGAGCC
BRD4-CK2-3D-3	7D 突变体其它 3D 位点	22	GGCTCGCTCCTCCTCATCGTC ATCAGTGTATCGTCACTGTC GTCGGA
shPP2A-C	PP2A-C 敲减	23	CCCATGTTGTTCTTTGTTATT

[0405] 参考

[0406] 1.Vaz-Luis,I.等人,《患有小淋巴结阴性乳腺癌的女性中的肿瘤亚型和治疗模式的结果:一个多机构研究(Outcomes by tumor subtype and treatment pattern in women with small,node-negative breast cancer:a multi-institutional study)》。《临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol)》32,2142-2150,(2014)。

[0407] 2.Shah,S.P.等人,《原发性三阴性乳腺癌的克隆和突变演变系列(The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers)》。《自然(Nature)》,(2012)。

[0408] 3.Lehmann,B.D.等人,《确认人类三阴性乳腺癌亚型和临床前模型以选择靶向治疗(Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies)》。《临床研究杂志(J Clin Invest)》121,(2011)。

[0409] 4.Metzger-Filho,O.等人,《详解三阴性乳腺癌的异质性(Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer)》。《临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol)》,1879-1887,(2012)。

[0410] 5.Higgins,M.J.&Baselga,J.《乳腺癌的靶向治疗(Targeted therapies for breast cancer)》。《临床研究杂志(J Clin Invest)》121,3797-3803,(2011)。

- [0411] 6.Hnisz,D.等人,《细胞身份和疾病控制中的超级增强子(Super-enhancers in the control of cell identity and disease)》。《细胞(Cell)》155,934-947,(2013)。
- [0412] 7.Smith,E.&Shilatifard,A.《增强子生物学和增强子疾病(Enhancer biology and enhanceropathies)》。《自然结构与分子生物学(Nature structural&molecular biology)》21,210-219,(2014)。
- [0413] 8.Delmore,J.E.等人,《BET溴结构域抑制作为靶向c-Myc的治疗策略(BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc)》。《细胞(Cell)》146,904-917,(2011)。
- [0414] 9.Zuber,J.等人,《RNAi筛选确认Brd4为急性髓细胞性白血病中的治疗靶点(RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia)》。《自然(Nature)》478,524-528,(2011)。
- [0415] 10.Belkina,A.C.&Denis,G.V.《肥胖、炎症和癌症中的BET域共调节剂(BET domain co-regulators in obesity,inflammation and cancer)》。《自然癌症综述(Nat Rev Cancer)》12,465-477,(2012)。
- [0416] 11.Wu,S.Y.&Chiang,C.M.《双含溴结构域染色质接头Brd4和转录调节(The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation)》。《生物化学杂志(J Biol Chem)》282,13141-13145,(2007)。
- [0417] 12.Yang,Z.,He,N.&Zhou,Q.《在有丝分裂后期Brd4将P-TEFb募集到染色体以促进G1基因的表达和细胞周期的进程(Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression)》。《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》28,967-976,(2008)。
- [0418] 13.Yang,Z.等人,《募集P-TEFb刺激溴结构域蛋白Brd4的转录延伸(Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4)》。《分子细胞(Mol Cell)》19,535-545,(2005)。
- [0419] 14.Filippakopoulos,P.等人,《BET溴结构域的选择性抑制(Selective inhibition of BET bromodomains)》。《自然(Nature)》468,1067-1073,(2010)。
- [0420] 15.Puissant,A.等人,《通过BET溴结构域抑制靶向成神经细胞瘤中的MYCN(Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition)》。《癌症发现(Cancer Discov)》3,308-323,(2013)。
- [0421] 16.Whyte,W.A.等人,《主要转录因子和中介体在关键细胞身份基因建立超级增强子(Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes)》。《细胞(Cell)》153,307-319,(2013)。
- [0422] 17.Loven,J.等人,《通过破坏超级增强子选择性抑制肿瘤致癌基因(Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers)》。《细胞(Cell)》153,320-334,(2013)。
- [0423] 18.Chapuy,B.等人,《弥散性大B细胞淋巴瘤中超级增强子相关的依赖性的发现和表征(Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma)》。《癌细胞(Cancer Cell)》24,777-790,(2013)。
- [0424] 19.Heiser,L.M.等人,《对乳腺癌中的抗癌化合物的亚型和通路特异性响应

(Subtype and pathway specific responses to anticancer compounds in breast cancer)》。《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》,(2011)。

[0425] 20.Nagarajan,S.等人,《溴结构域蛋白BRD4对于雌激素受体依赖性增强子的激活和基因转录是必需的(Bromodomain protein BRD4 is required for estrogen receptor-dependent enhancer activation and gene transcription)》。《细胞报告(Cell reports)》8,460-469,(2014)。

[0426] 21.Shi,J.等人,《破坏BRD4与二乙酰化Twist的相互作用抑制基底细胞样型乳腺癌中的肿瘤发生(Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer)》。《癌细胞(Cancer Cell)》25,210-225,(2014)。

[0427] 22.Perou,C.M.等人,《人类乳腺癌的分子图谱(Molecular portraits of human breast tumours)》。《自然(Nature)》406,747-752.,(2000)。

[0428] 23.Dey,A.,Nishiyama,A.,Karpova,T.,McNally,J.&Ozato,K.《Brd4标记有丝分裂染色质上的选择基因并引导有丝分裂后的转录(Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription)》。《分子细胞生物学(Mol Biol Cell)》20,4899-4909,(2009)。

[0429] 24.Marotta,L.L.等人,《JAK2/STAT3信号传导通路对于人类肿瘤中CD44CD24类干细胞乳腺癌细胞的生长是必需的(The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44CD24 stem cell-like breast cancer cells in human tumors)》。《临床研究杂志(J Clin Invest)》121,2723-2735,(2011)。

[0430] 25.Ott,C.J.等人,《BET溴结构域抑制在高风险急性成淋巴细胞性白血病中靶向c-Myc和IL7R(BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia)》。《血液(Blood)》120,2843-2852,(2012)。

[0431] 26.Brown,J.D.等人,《NF-κB引导炎症和动脉粥样硬化中活跃的超级增强子的形成(NF-kappaB Directs Dynamic Super Enhancer Formation in Inflammation and Atherogenesis)》。《分子细胞(Mol Cell)》56,219-231,(2014)。

[0432] 27.Anders,L.等人,《小分子的全基因组定位(Genome-wide localization of small molecules)》。《自然生物技术(Nat Biotechnol)》32,92-96,(2014)。

[0433] 28.Hayashi,H.等人,《OCT4假基因POU5F1B被扩增并促进胃癌中的侵袭性表型(The OCT4pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer)》。《致癌基因(Oncogene)》,(2013)。

[0434] 29.Liu,T.等人,《IRX2的敲减通过AKT/MMP9信号传导通路抑制骨肉瘤细胞的增殖和侵入(Knockdown of IRX2 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by the AKT/MMP9 signaling pathway)》。《分子医学报告(Molecular medicine reports)》10,169-174,(2014)。

[0435] 30.Choy,S.W.等人,《串联的irx1a和irx2a控制视网膜发生过程中的shh表达(A cascade of irx1a and irx2a controls shh expression during retinogenesis)》。《发育动力学(Dev Dyn)》239,3204-3214,(2010)。

[0436] 31.Semenza,G.L.《HIF-1介导对肿瘤内缺氧和致癌突变的代谢响应(HIF-1

mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations)》。《临床研究杂志(J Clin Invest)》123,3664-3671, (2013)。

[0437] 32.Watanabe,Y.,Nagai,Y.&Takatsu,K.《肥胖引起的脂肪组织炎症和胰岛素抗性中模式识别受体的激活和调节(Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance)》。《营养(Nutrients)》5,3757-3778, (2013)。

[0438] 33.Bessarabova,M.等人,《受普通人类癌症中的遗传变化影响的功能性协同作用但不同的调节因子(Functional synergies yet distinct modulators affected by genetic alterations in common human cancers)》。《癌症研究(Cancer Res)》71,3471-3481, (2011)。

[0439] 34.Marotta,L.L.等人,《JAK2/STAT3信号传导通路对于人类肿瘤中CD44(+)CD24(-)类干细胞乳腺癌细胞的生长是必需的(The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-)stem cell-like breast cancer cells in human tumors)》。《临床研究杂志(J Clin Invest)》121,2723-2735, (2011)。

[0440] 35.Arteaga,C.L.&Engelman,J.A.《ERBB受体:从致癌基因的发现到基础科学到基于机理的癌症治疗(ERBB receptors:from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics)》。《癌细胞(Cancer Cell)》25,282-303, (2014)。

[0441] 36.Engelman,J.A.等人,《MET扩增通过激活ERBB3信号传导导致肺癌中的吉非替尼抗性(MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling)》。《科学(Science)》316,1039-1043, (2007)。

[0442] 37.Bernardo,G.M.等人,《FOXA1抑制基底乳腺癌细胞的分子表型(FOXA1 represses the molecular phenotype of basal breast cancer cells)》。《致癌基因(Oncogene)》32,554-563, (2013)。

[0443] 38.Bernardo,G.M.等人,《FOXA1是ER α 表达和乳腺导管形态形成的重要决定因素(FOXA1 is an essential determinant of ER α expression and mammary ductal morphogenesis)》。《发育(Development)》137,2045-2054, (2010)。

[0444] 39.Jiang,Y.W.等人,《哺乳动物的转录调节中介体和其作为信号转导通路端点的可能作用(Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways)》。《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》95,8538-8543, (1998)。

[0445] 40.Rahman,S.等人,《通过募集包括NSD3在内的多种蛋白Brd4额外终端域使得转录激活不依赖于pTEFb(The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins,including NSD3)》。《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》31,2641-2652, (2011)。

[0446] 41.Schroder,S.等人,《与含溴结构域蛋白4的两方面结合从无活性核糖核蛋白复合物释放正转录延伸因子b(Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes)》。《生物化学杂志(J Biol Chem)》287,1090-1099, (2012)。

- [0447] 42.Mohammed,H.等人,《内源性纯化显示作为关键雌激素受体调控因子的GREB1 (Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor)》。《细胞报告 (Cell reports)》3,342-349, (2013)。
- [0448] 43.Wu,S.Y.,Lee,A.Y.,Lai,H.T.,Zhang,H.&Chiang,C.M.《磷交换触发针对基因特异性靶向的Brd4染色质结合和活化剂募集 (Phosphoswitch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting)》。《分子细胞 (Mol Cell)》49,843-857, (2013)。
- [0449] 44.Choudhury,S.等人,《人类乳腺的分子表达谱将乳腺癌风险与具有祖细胞特征的p27 (+) 细胞群体相关联 (Molecular Profiling of Human Mammary Gland Links Breast Cancer Risk to a p27 (+) Cell Population with Progenitor Characteristics)》。《细胞干细胞 (Cell stem cell)》13,117-130, (2013)。
- [0450] 45.Mellacheruvu,D.等人,《CRAPome:用于亲和纯化-质谱数据的杂质值储库 (The CRAPome:a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data)》。《自然方法学 (Nat Methods)》10,730-736, (2013)。
- [0451] 46.Trapnell,C.,Pachter,L.&Salzberg,S.L.《TopHat:使用RNA-Seq发现剪接连接点 (TopHat:discovering splice junctions with RNA-Seq)》。《生物信息学 (Bioinformatics)》25,1105-1111, (2009)。
- [0452] 47.Trapnell,C.等人,《通过RNA-Seq的转录物组装和定量显示细胞分化过程中未注释的转录本和异构体的转换 (Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation)》。《自然生物技术 (Nat Biotechnol)》28,511-515, (2010)。
- [0453] 48.Langmead,B.,Trapnell,C.,Pop,M.&Salzberg,S.L.《短DNA序列与人类基因组的超快和记忆高效比对 (Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome)》。《基因组生物学 (Genome Biol)》10,R25, (2009)。
- [0454] 49.Zhang,Y.等人,《基于模型的ChIP-Seq分析 (MACS) (Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS))》。《基因组生物学 (Genome Biol)》9,R137, (2008)。
- [0455] 50.Lin,C.Y.等人,《随着升高的c-Myc肿瘤细胞中的转录扩增 (Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc)》。《细胞 (Cell)》151,56-67, (2012)。
- [0456] 49.Chou,T.C.&Talalay,P.《剂量效用关系的定量分析:多种药物或酶抑制剂的组合效用 (Quantitative analysis of dose-effect relationships:the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors)》。《酶调节进展 (Advances in enzyme regulation)》22,27-55, (1984)。
- [0457] 50.Choudhury,S.等人,《人类乳腺的分子表达谱将乳腺癌风险与具有祖细胞特征的p27 (+) 细胞群体相关联 (Molecular Profiling of Human Mammary Gland Links Breast Cancer Risk to a p27 (+) Cell Population with Progenitor Characteristics)》。《细胞干细胞 (Cell stem cell)》13,117-130, (2013)。
- [0458] 51.Mellacheruvu,D.等人,《CRAPome:一种用于亲和纯化-质谱数据的杂质值储库 (The CRAPome:a contaminant repository for affinity purification-mass

spectrometry data)》。《自然方法学 (Nat Methods)》10,730-736, (2013)。

[0459] 52. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. 《TopHat: 使用 RNA-Seq 发现剪接点 (TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq)》。《生物信息学 (Bioinformatics)》25,1105-1111, (2009)。

[0460] 53. Trapnell, C. 等人, 《通过 RNA-Seq 的转录物组装和定量显示细胞分化过程中未注释的转录本和异构体的转换 (Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation)》。《自然生物技术 (Nat Biotechnol)》28,511-515, (2010)。

[0461] 54. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. 《短 DNA 序列与人类基因组的超快和记忆高效比对 (Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome)》。《基因组生物学 (Genome Biol)》10,R25, (2009)。

[0462] 55. Zhang, Y. 等人, 《基于模型的 ChIP-Seq 分析 (MACS) (Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS))》。《基因组生物学 (Genome Biol)》9,R137, (2008)。

[0463] 56. Lin, C. Y. 等人, 《随着升高的 c-Myc 肿瘤细胞中的转录扩增 (Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc)》。《细胞 (Cell)》151,56-67, (2012)。

[0464] 本领域技术人员将认识到或者能够使用不超过常规实验来确定本文所述的特定实施例的许多等同物。本文所示的本发明实施例的范围并非旨在被限制于以上说明书, 而是由所附权利要求书给出。本领域普通技术人员应理解, 可在不偏离如以下权利要求书中所界定的本发明的精神或范围的情况下对本说明进行各种改变和修改。

序列表

<110> 达纳-法伯癌症研究所有限公司
<120> 对BET溴结构域抑制剂的抗性的机理
<130> D0504.70103W000
<140> 尚未分配
<141> 与此同时
<150> US 62/203,128
<151> 2015-08-10
<160> 23
<170> PatentIn版本3.5
<210> 1
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多聚核苷酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (1) .. (23)
<223> 被r修饰
<400> 1
ggaccaaau ggcagccugau uacca
<210> 2
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多聚核苷酸
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (1) .. (23)
<223> 被r修饰
<400> 2
gcaccagcug gcuguggguc cugag
<210> 3
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列

25

25

<220>	
<223>	合成多聚核苷酸
<220>	
<221>	尚未归类的特性
<222>	(1) .. (23)
<223>	被r修饰
<400>	3
cuggcacuga cuuugccuug aacag	25
<210>	4
<211>	25
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成多聚核苷酸
<220>	
<221>	尚未归类的特性
<222>	(1) .. (23)
<223>	被r修饰
<400>	4
ccuccagaca caauggcacu gcuta	25
<210>	5
<211>	18
<212>	RNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成多聚核苷酸
<220>	
<221>	尚未归类的特性
<222>	(1) .. (18)
<223>	被r修饰
<400>	5
cagaugacau agugcuaa	18
<210>	6
<211>	18
<212>	RNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成多聚核苷酸
<220>	

〈221〉	尚未归类的特性	
〈222〉	(1) .. (18)	
〈223〉	被r修饰	
〈400〉	6	
	gcuuugucac cacgcauu	18
〈210〉	7	
〈211〉	18	
〈212〉	RNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	合成多聚核苷酸	
〈220〉		
〈221〉	尚未归类的特性	
〈222〉	(1) .. (18)	
〈223〉	被r修饰	
〈400〉	7	
	ccauguucac caacuguu	18
〈210〉	8	
〈211〉	18	
〈212〉	RNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	合成多聚核苷酸	
〈220〉		
〈221〉	尚未归类的特性	
〈222〉	(1) .. (18)	
〈223〉	被r修饰	
〈400〉	8	
	gcaauggcac gaaagcua	18
〈210〉	9	
〈211〉	18	
〈212〉	RNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	合成多聚核苷酸	
〈220〉		
〈221〉	尚未归类的特性	
〈222〉	(1) .. (18)	
〈223〉	被r修饰	

<400> 9	
gcucaagaca cuauggaa	18
<210> 10	
<211> 18	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成多聚核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特性	
<222> (1) .. (18)	
<223> 被r修饰	
<400> 10	
ugaucacaau caagucua	18
<210> 11	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成多聚核苷酸	
<400> 11	
ctatgtttac aaattgttac atctacgcca agcctggaga tgacatagtc tt	52
<210> 12	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成多聚核苷酸	
<400> 12	
gttctccaac tgctataagt acgcccctcc tgaccatgag	40
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成多聚核苷酸	
<400> 13	
cctggagatg acatagtctt a	21
<210> 14	

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	14	
	ccaaccaaaag tcagttcctt c	21
<210>	15	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	15	
	gccccgccccg catccagcga cgccagcagc gatgcctccg cggacagtga c	51
<210>	16	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	16	
	gtcactgtcc gcggaggcat cgctgctggc gtcgctggat gcgggcgggg c	51
<210>	17	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	17	
	tccgcggaca gtgacgctgc gactgatgac gctgaggagg agcgagcc	48
<210>	18	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	18	
	ggctcgtcc tcctcagcgt catcagtcgc agcgtcactg tccgcgga	48

<210>	19	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	19	
gccccgccccg attccagcga cgacagcagc gatgactccg acgacagtga c		51
<210>	20	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	20	
gtcactgtcg tcggagtcac cgctgctgtc gtcgctggaa tcgggcgggg c		51
<210>	21	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	21	
tccgacgaca gtgacgatga cactgatgac gatgaggagg agcgagcc		48
<210>	22	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	22	
ggctcgtcc tcctcatcgt catcagtgtc atcgteactg tcgtcgga		48
<210>	23	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多聚核苷酸	
<400>	23	

cccatgttgt tctttgttat t

21

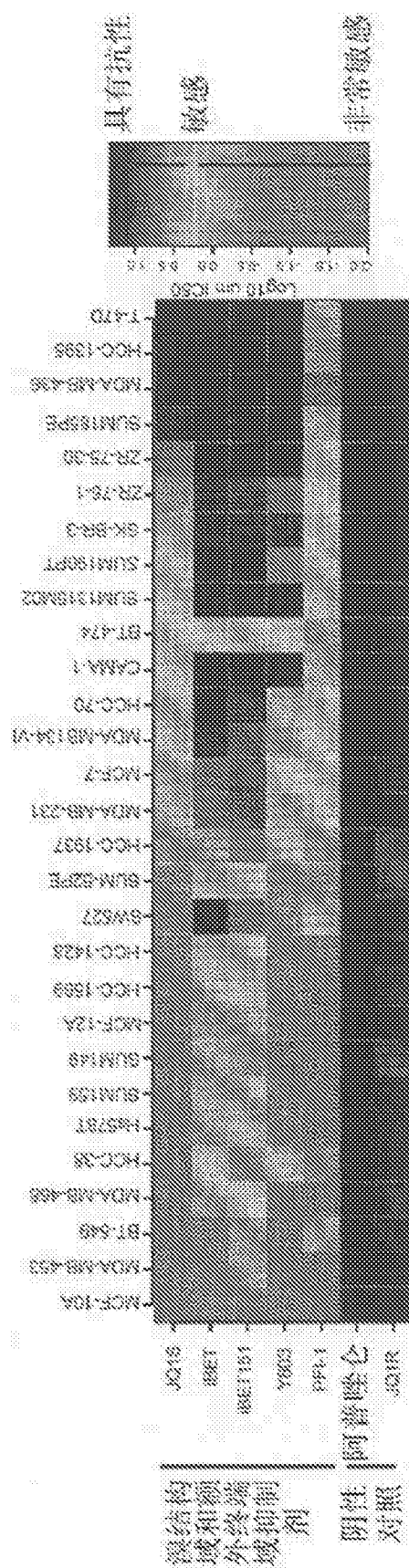


图1A

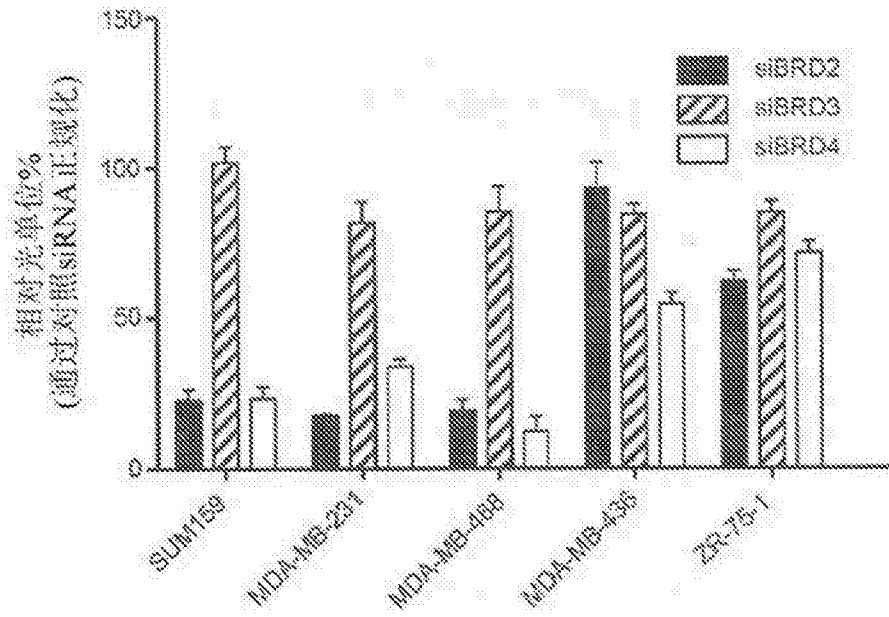


图1B

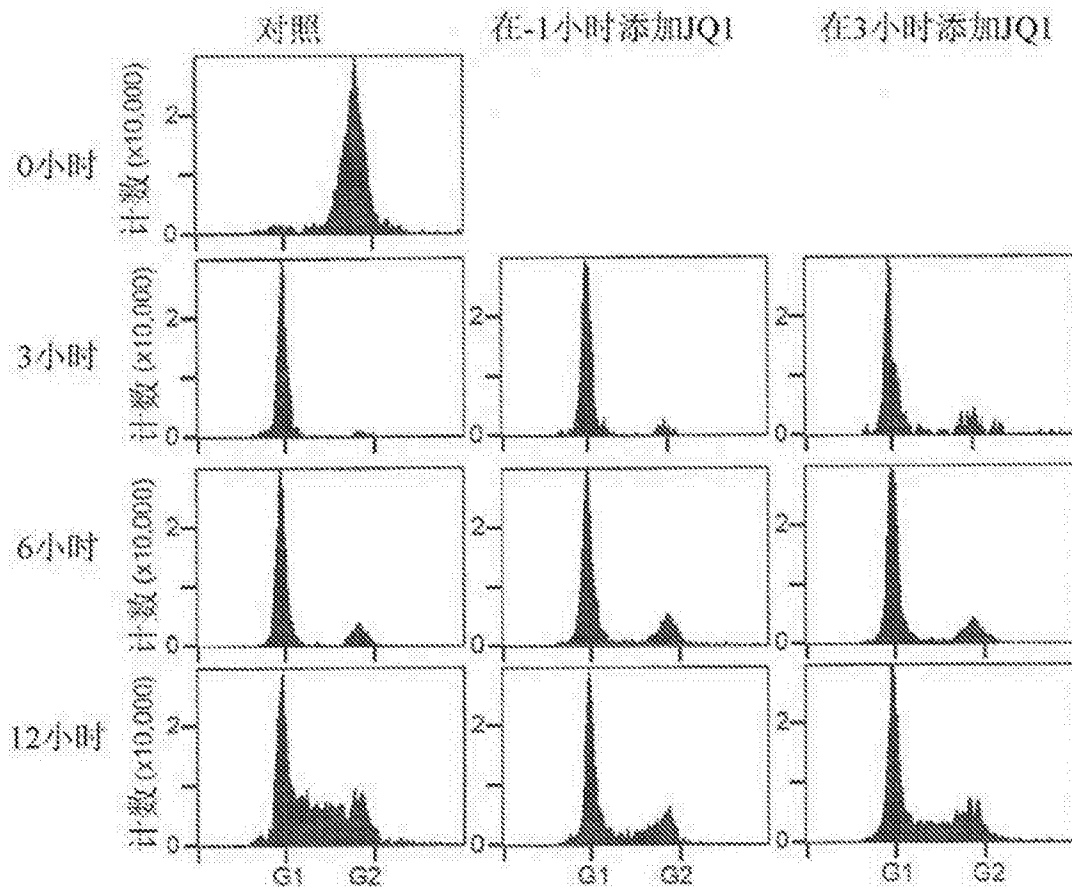


图1C

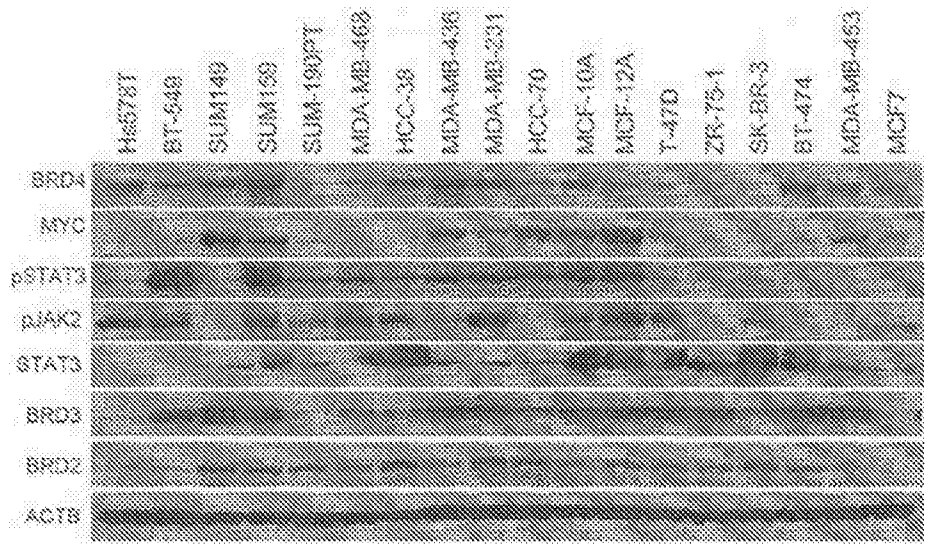


图1D

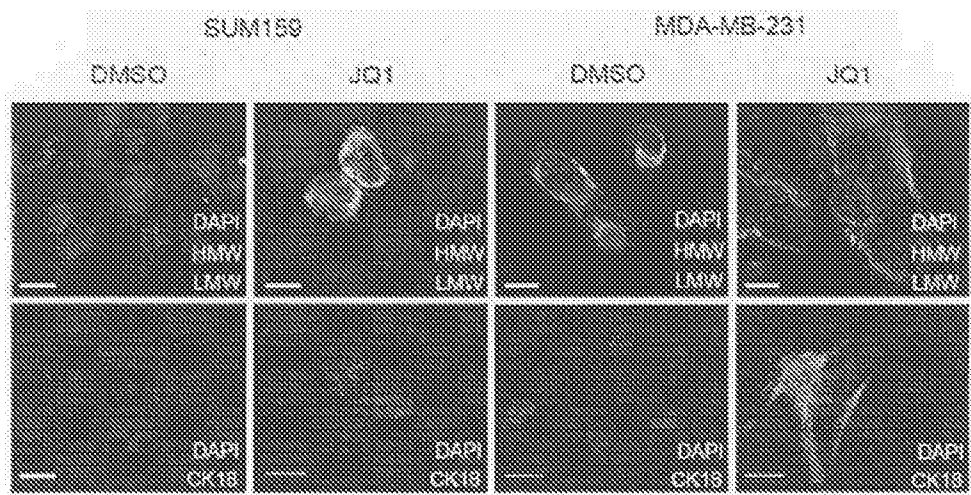


图1E

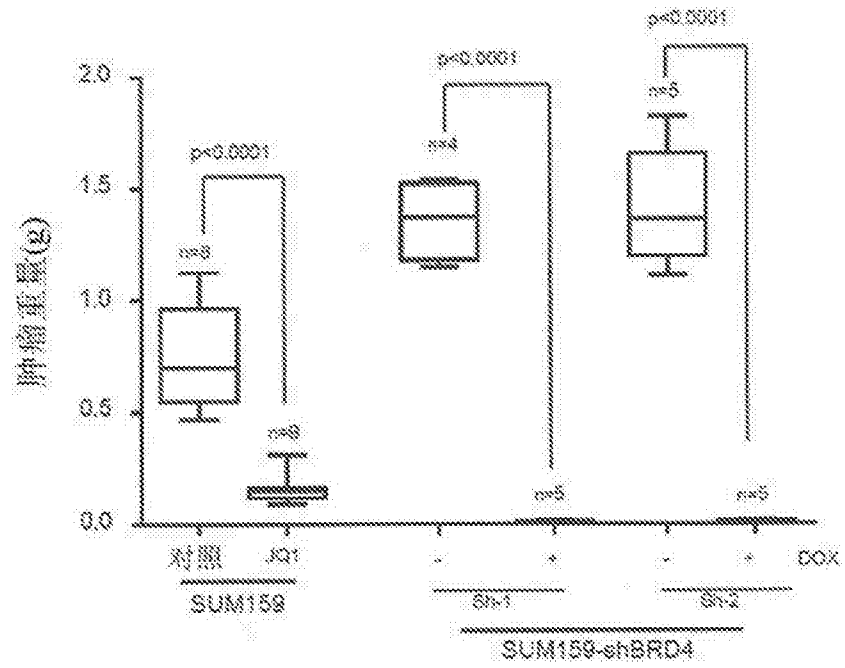


图1F

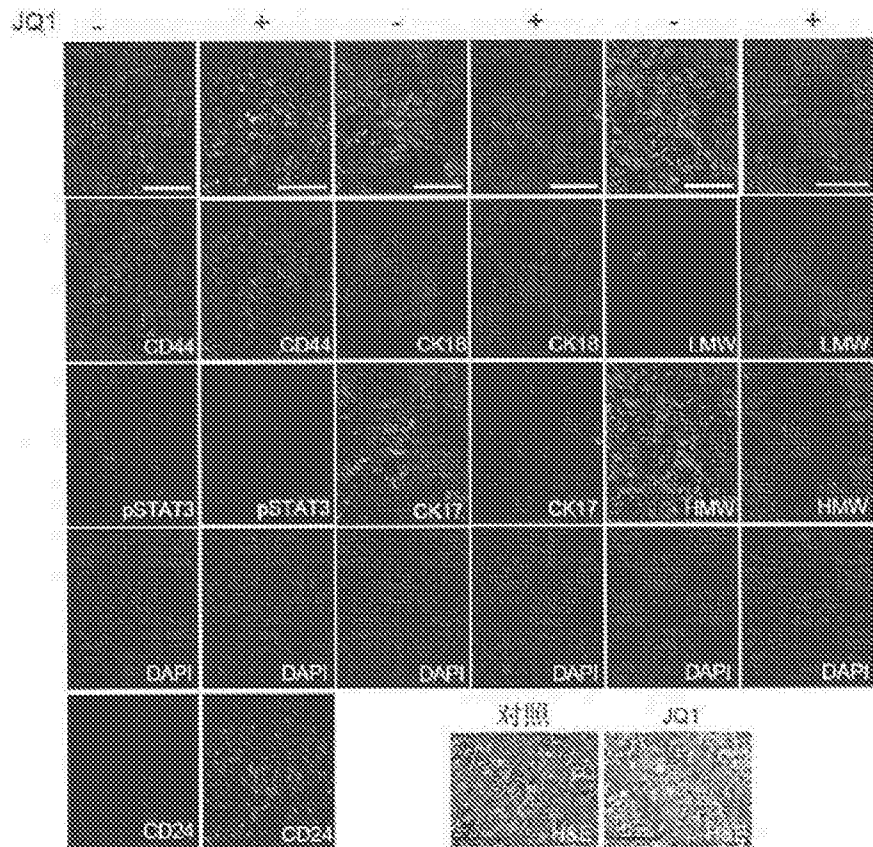


图1G

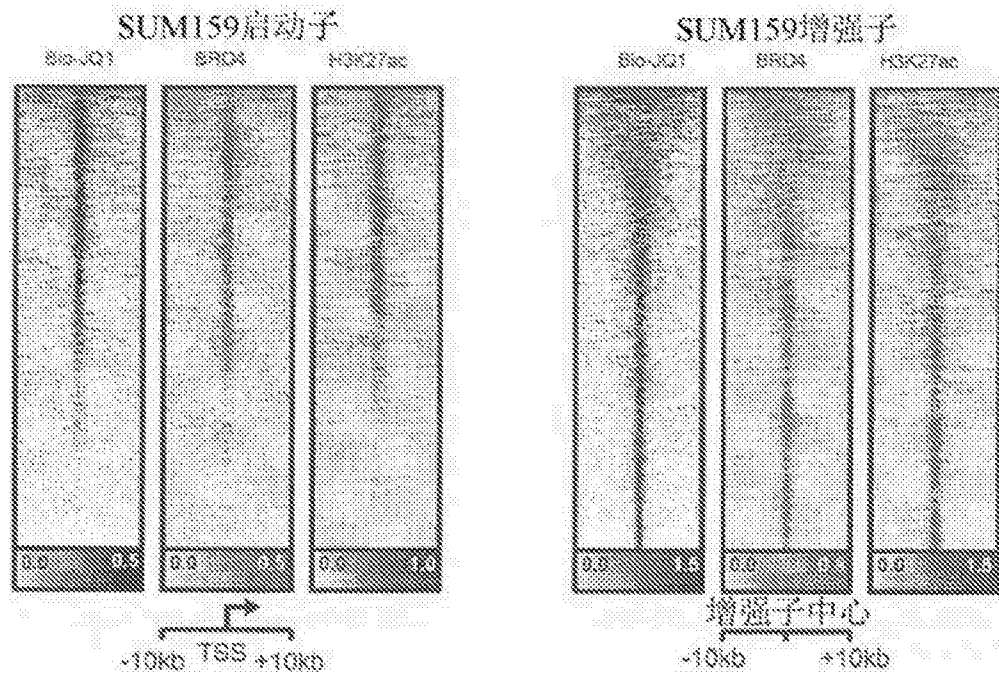


图2A

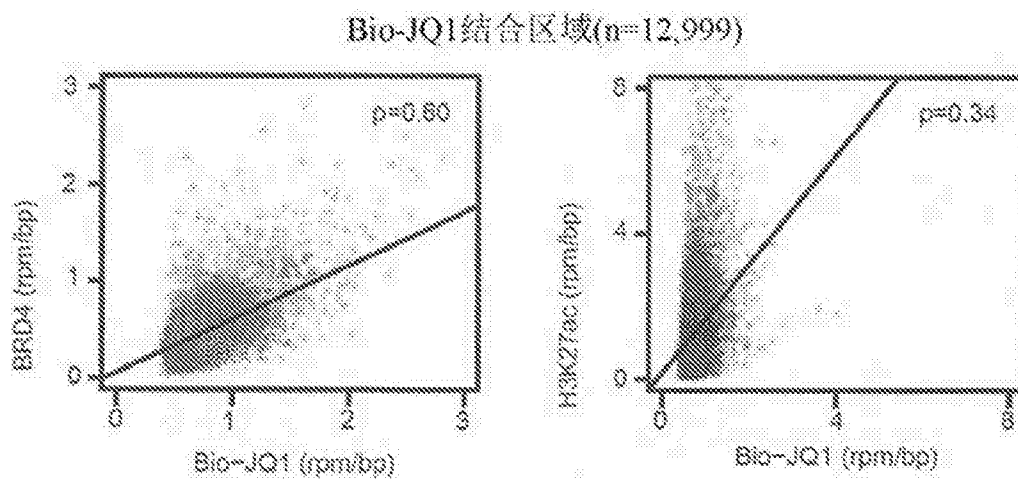


图2B

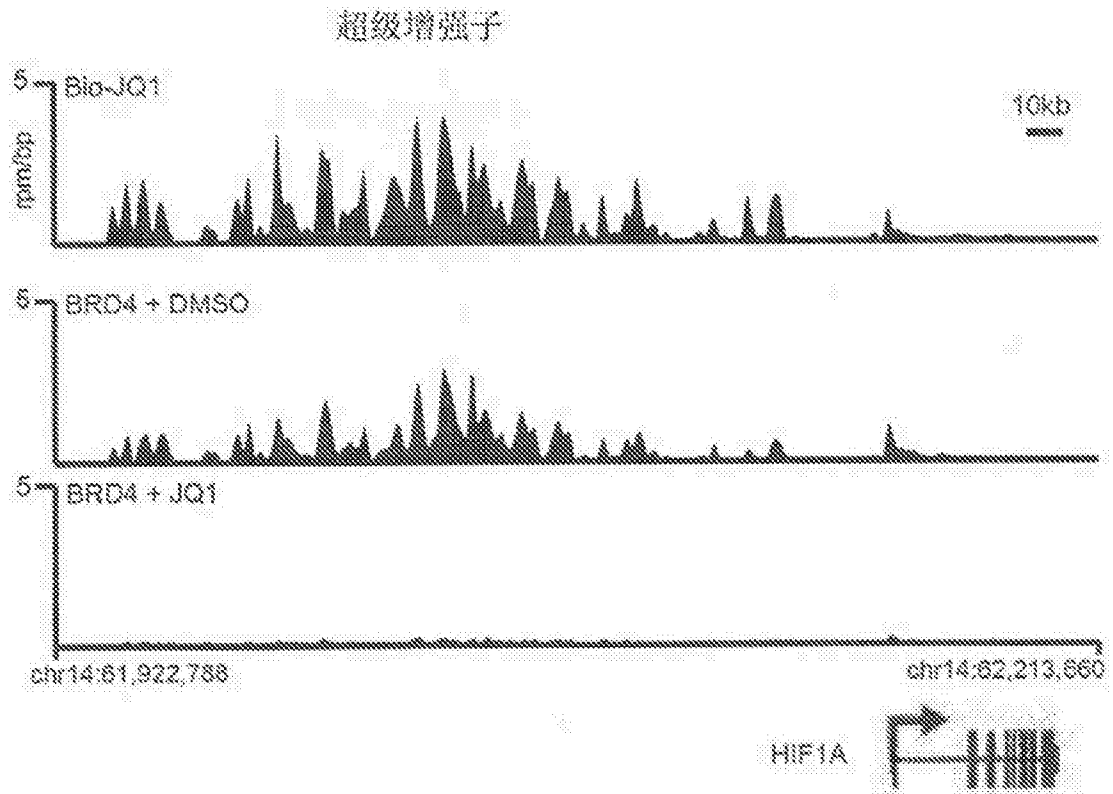


图2C

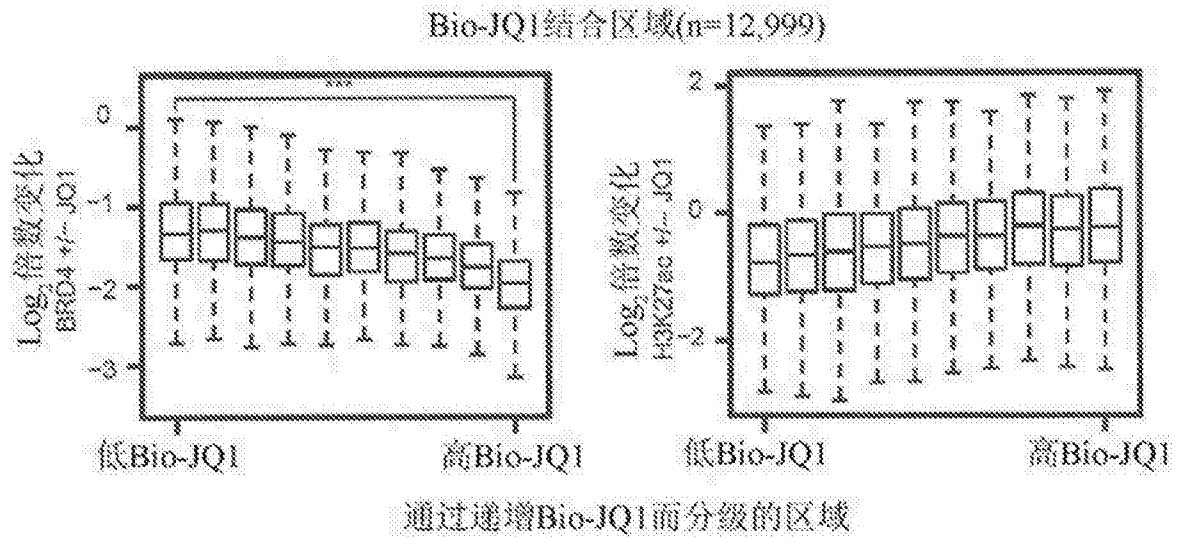


图2D

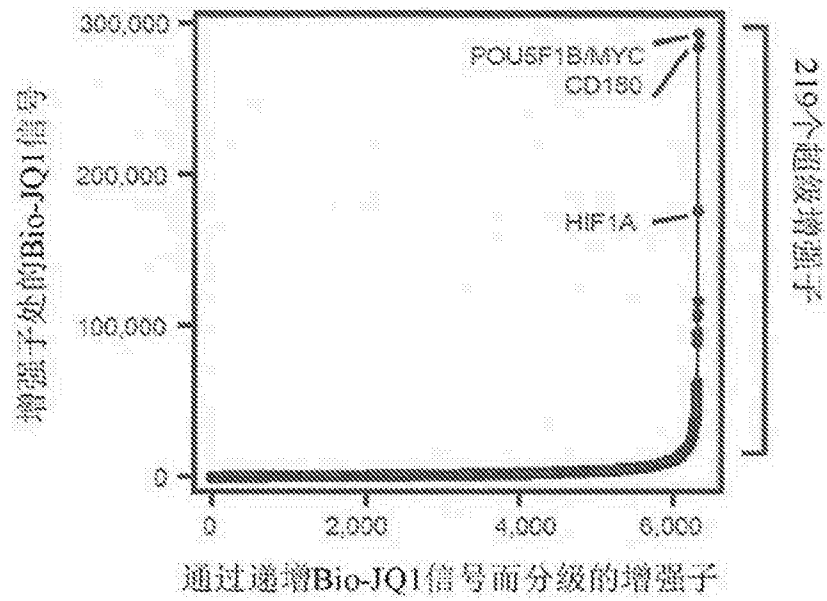


图2E

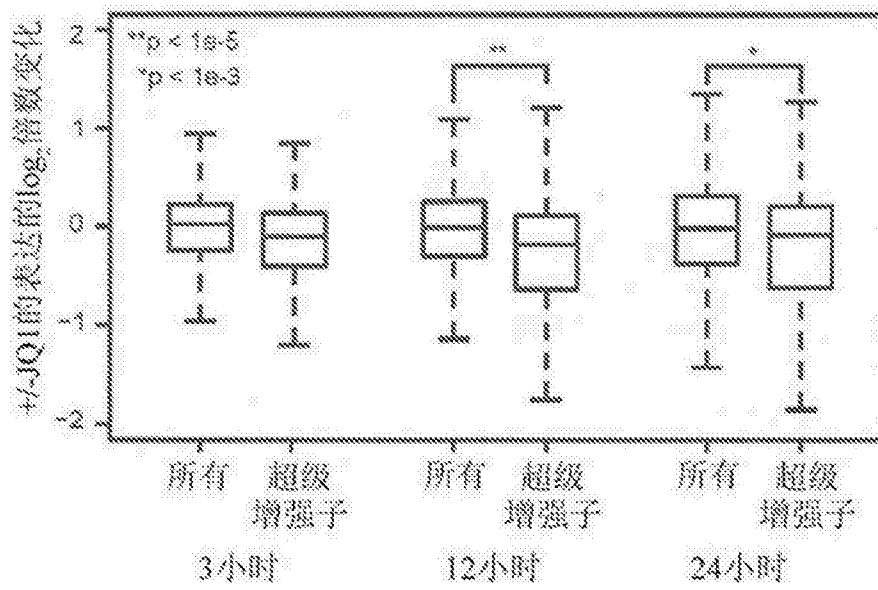


图2F

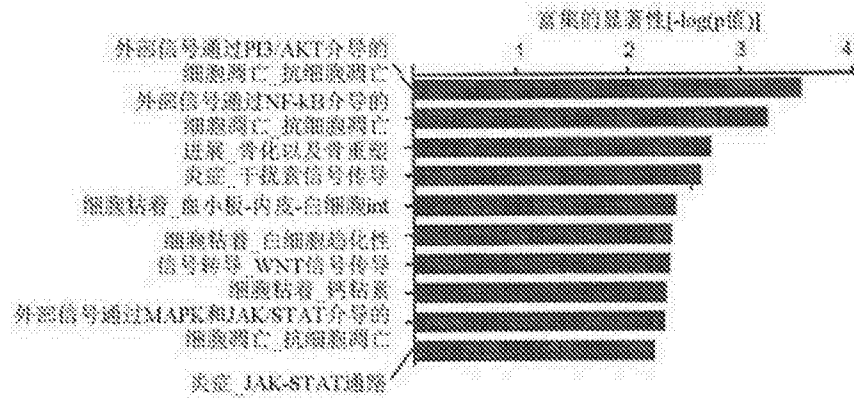


图2G

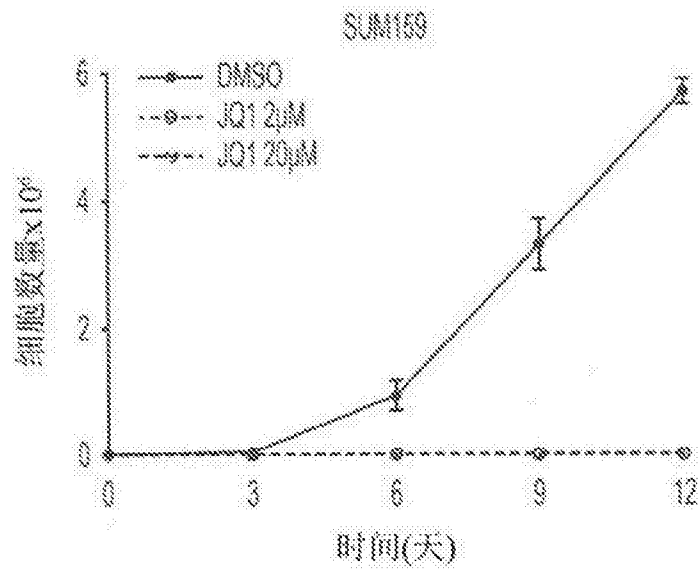


图3A

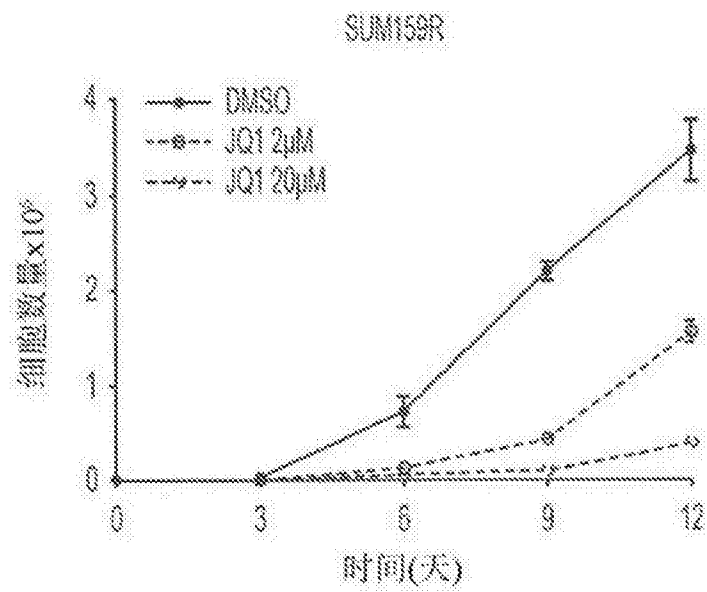


图3B

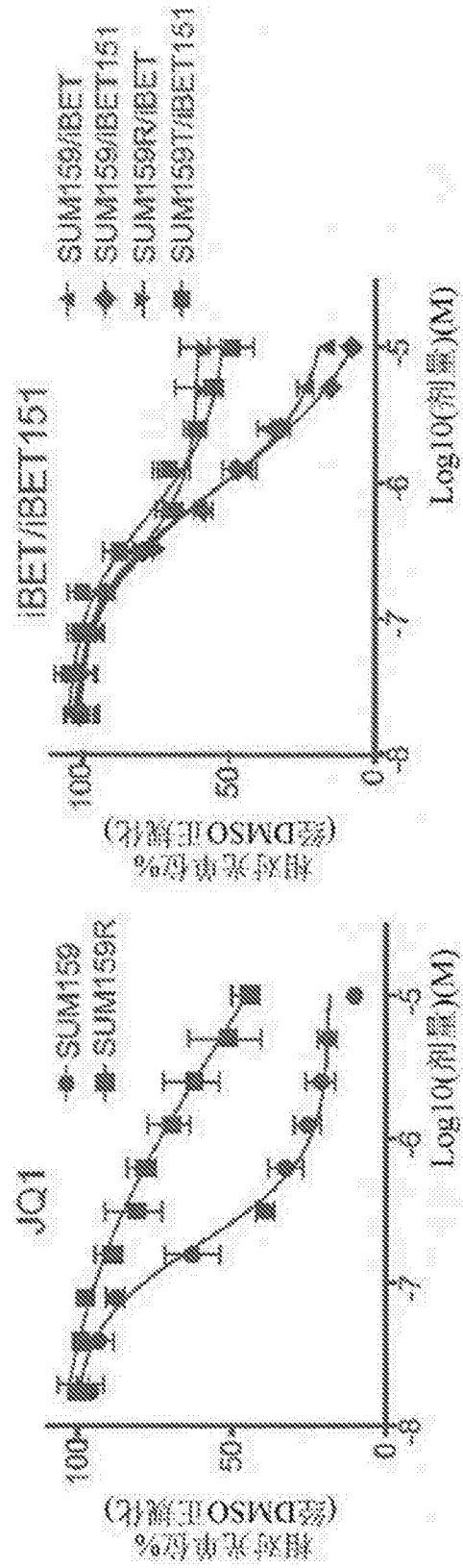


图3C

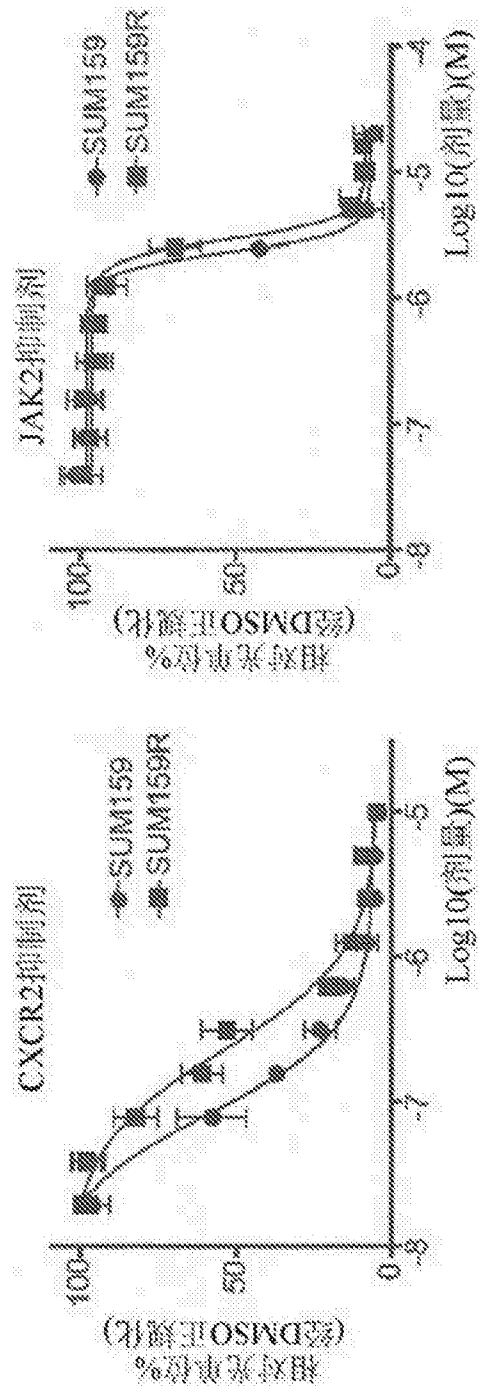


图3D

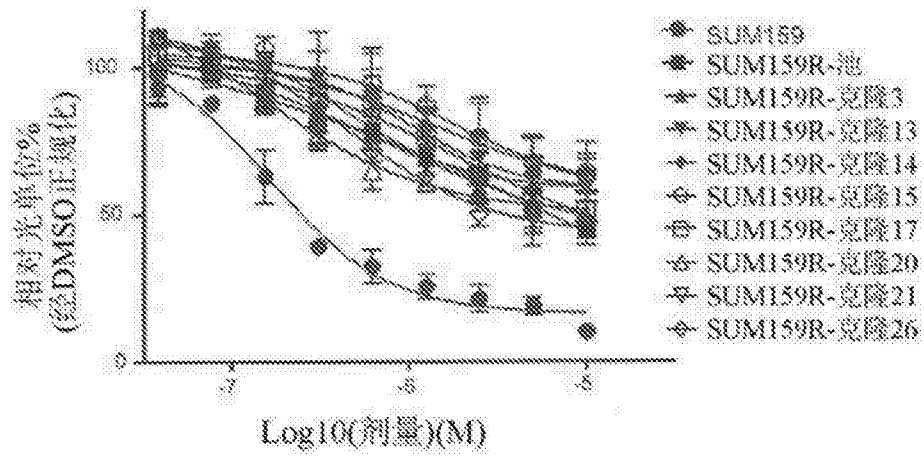


图3E

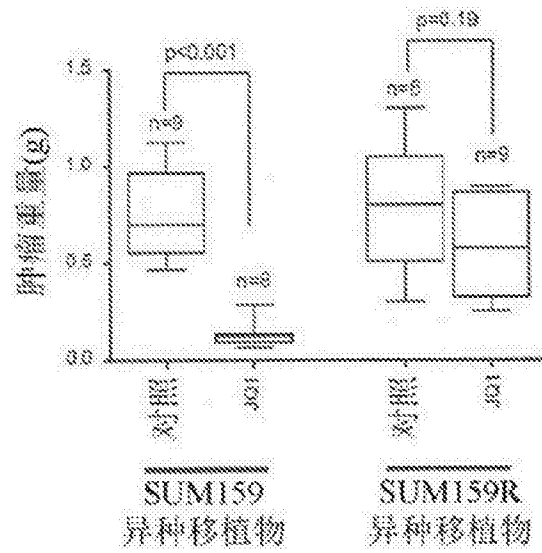


图3F

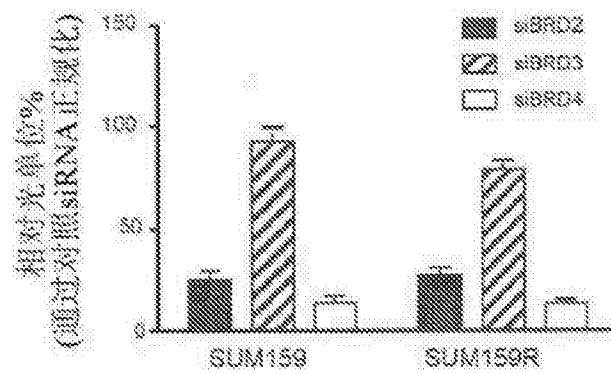


图3G

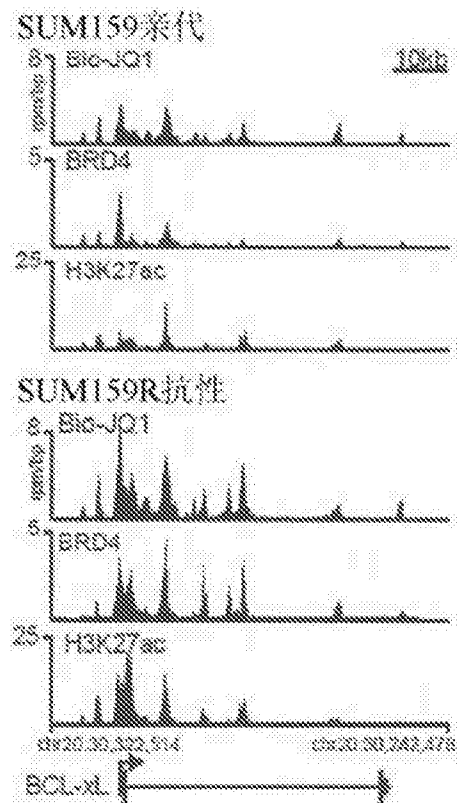
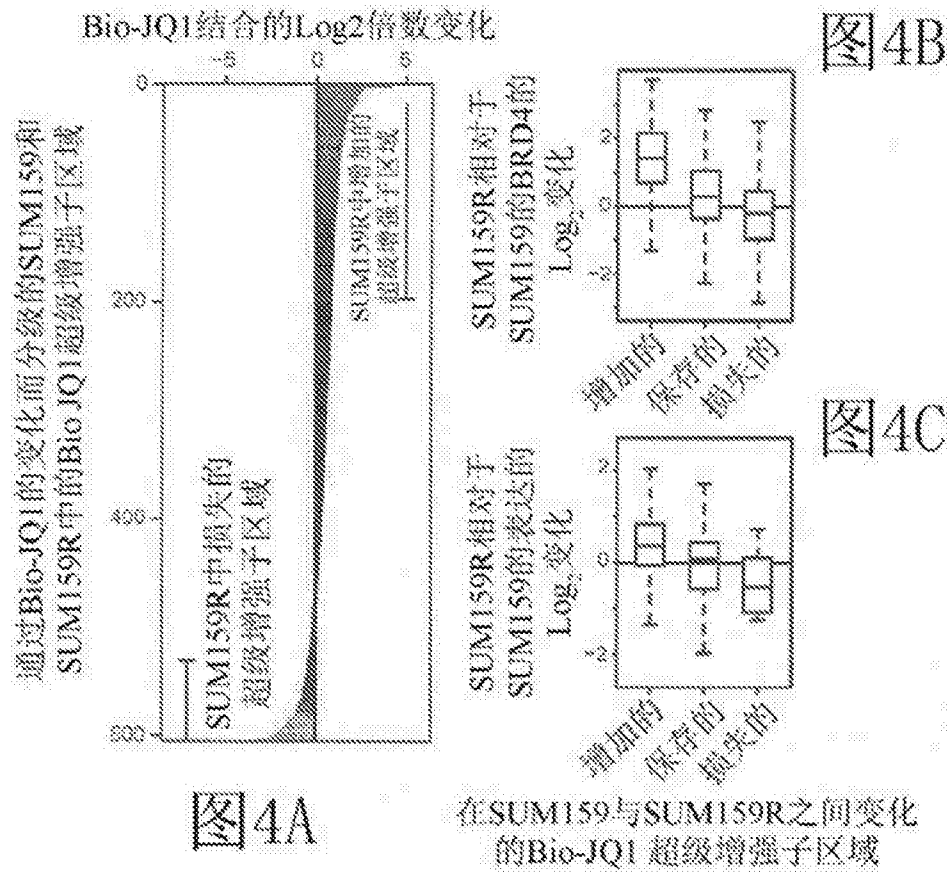


图4D

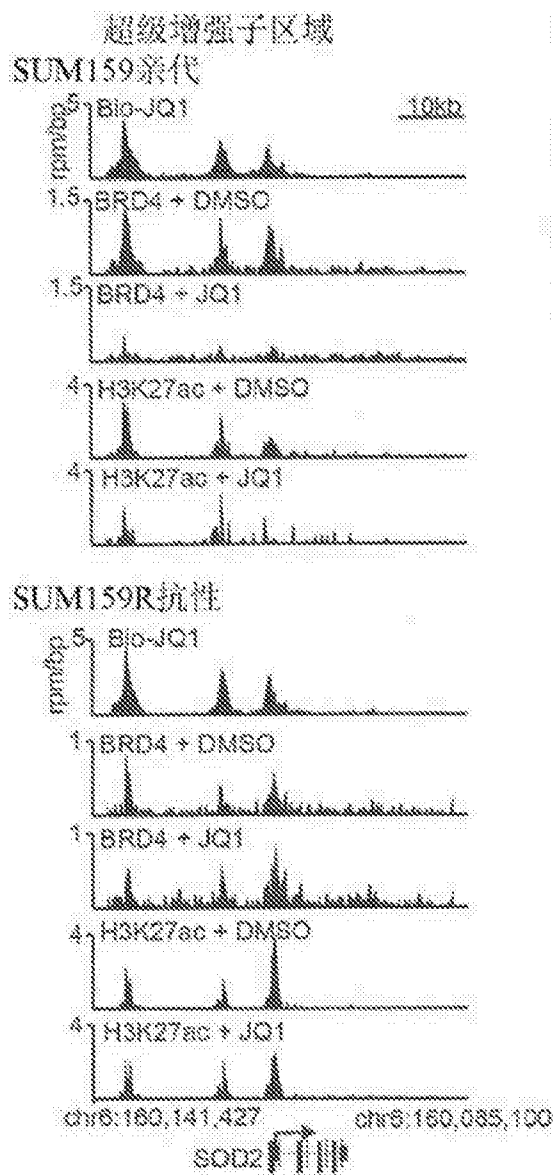


图4E

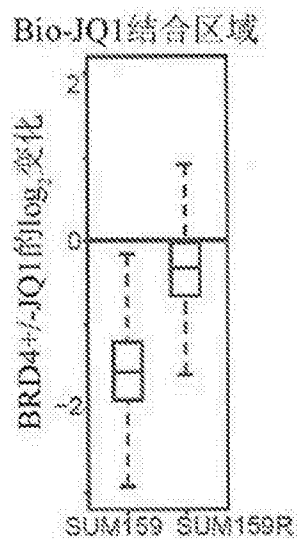


图4F

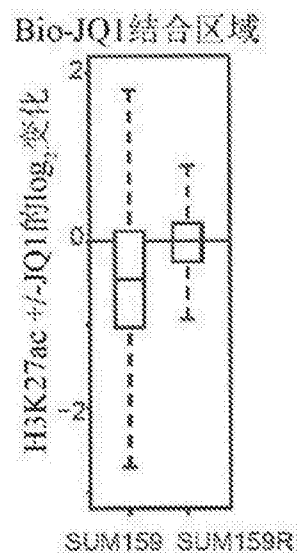


图4G

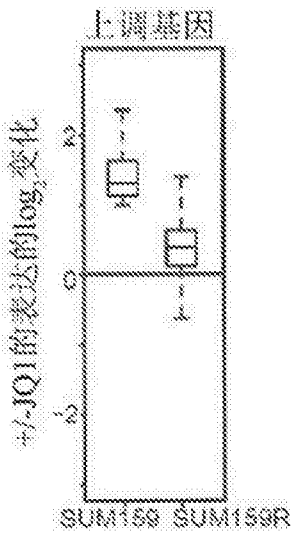


图4H

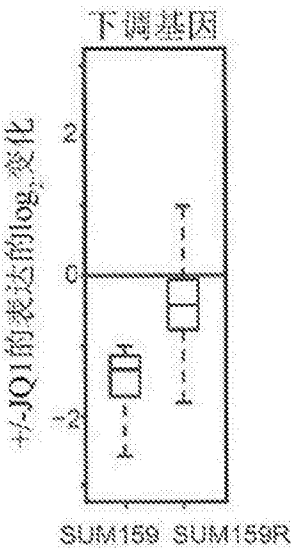


图4I

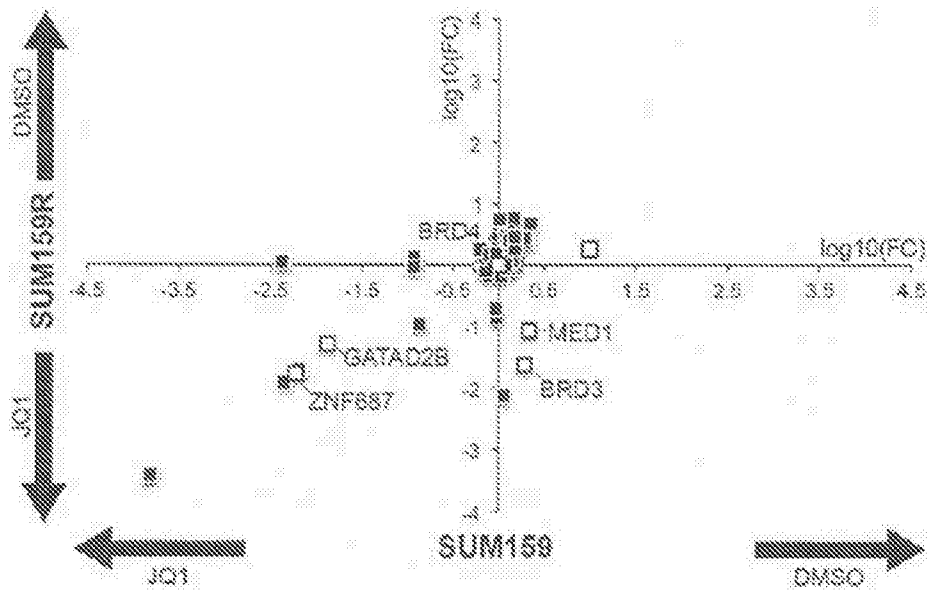


图5A

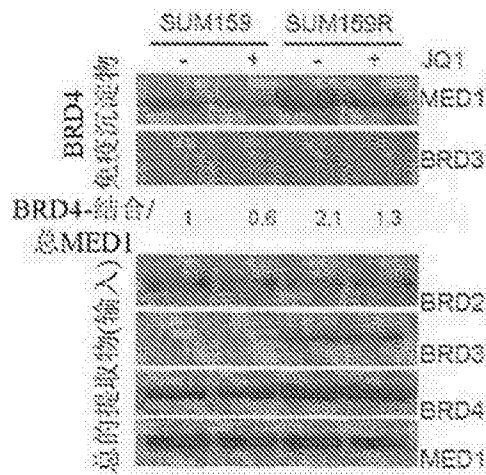


图5B

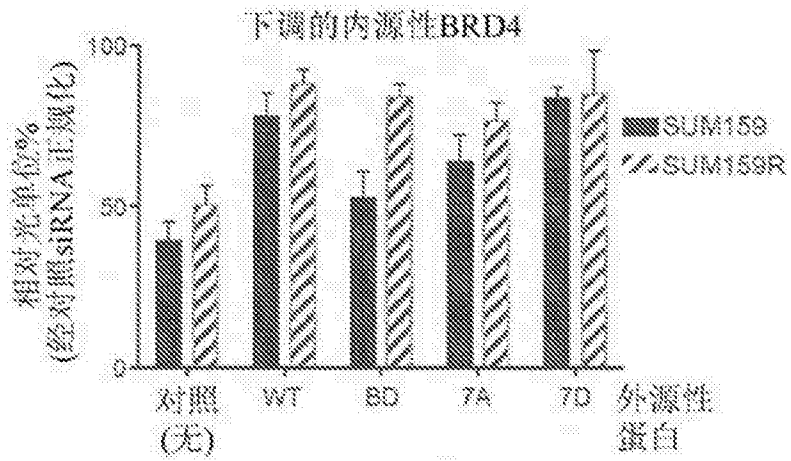


图5C

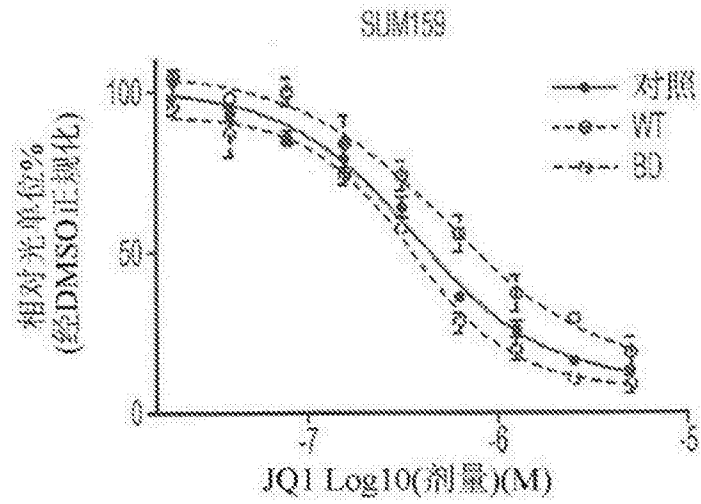


图5D

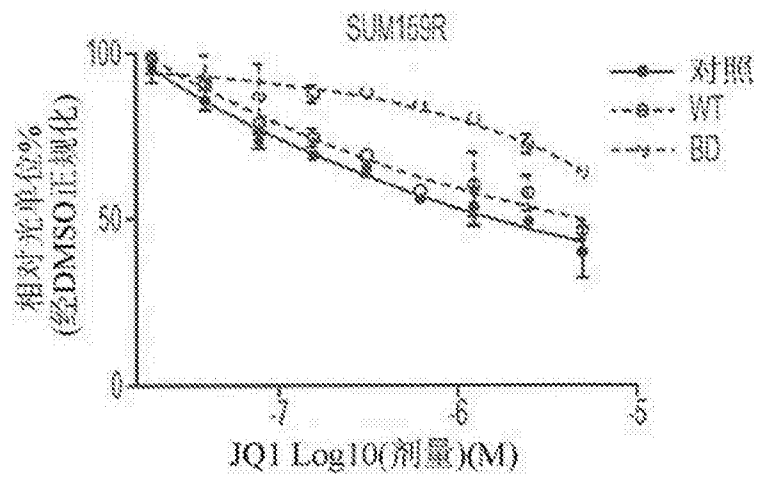


图5E

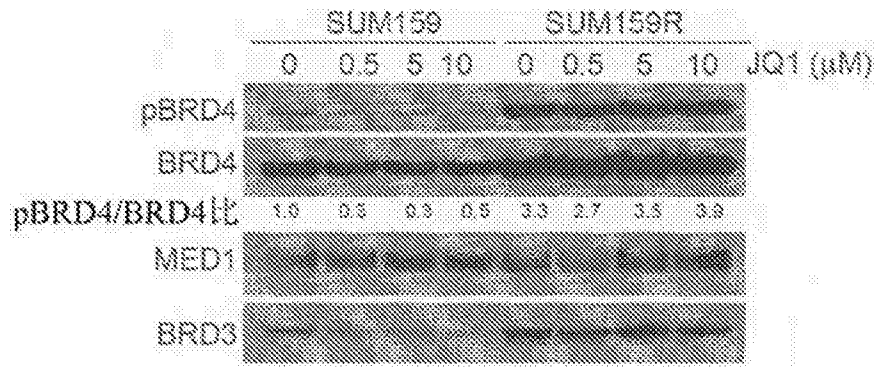


图6A

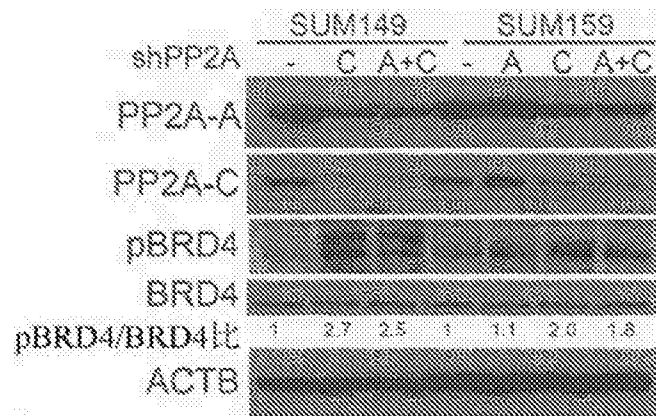


图6B

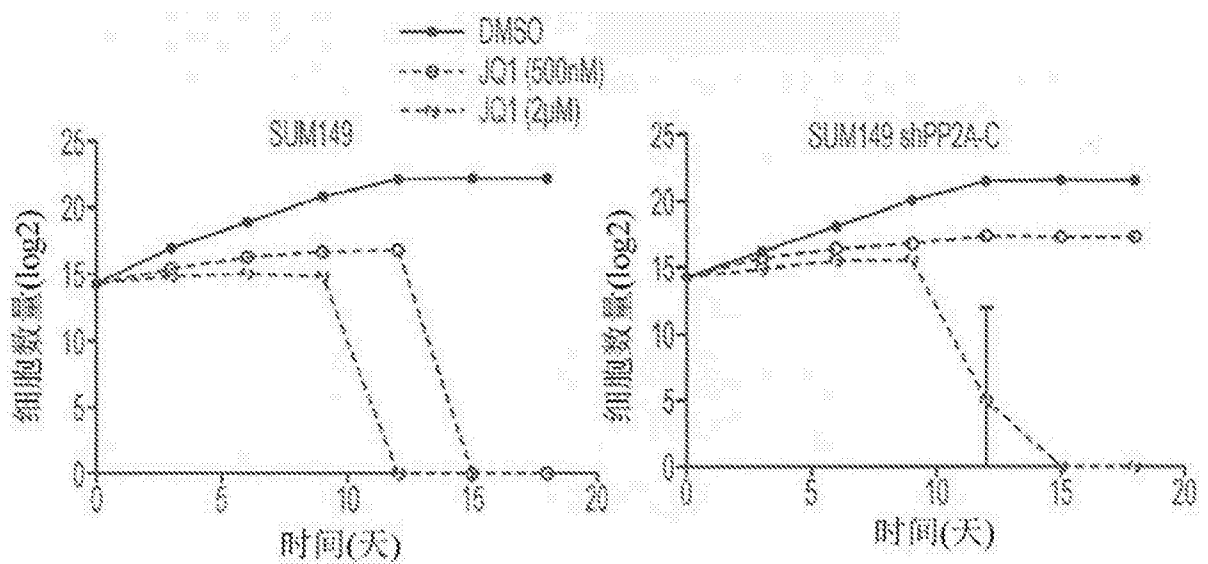


图6C

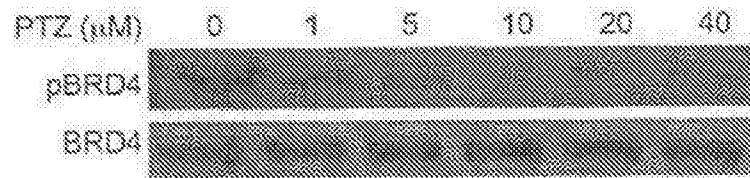


图6D

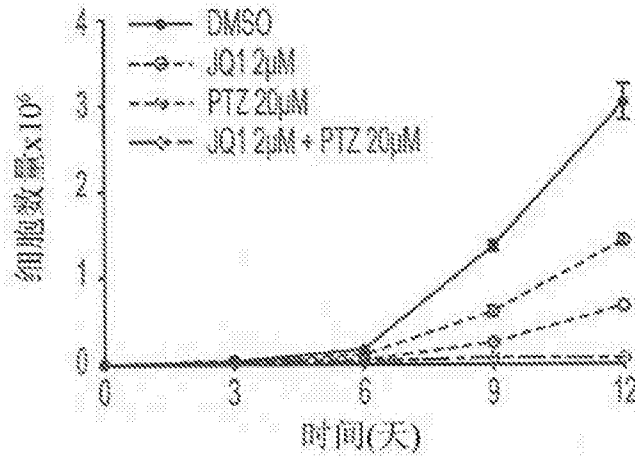


图6E

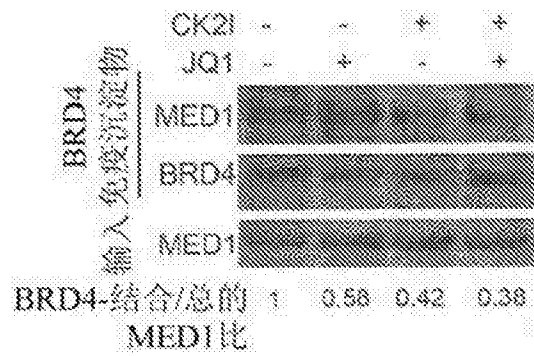


图6F

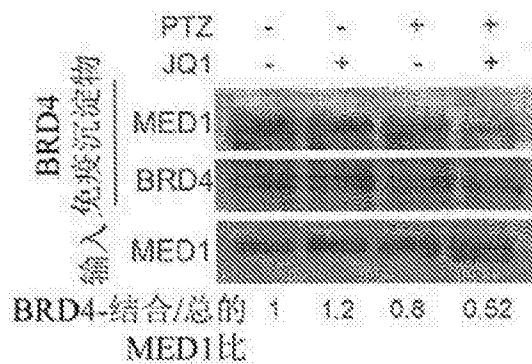


图6G

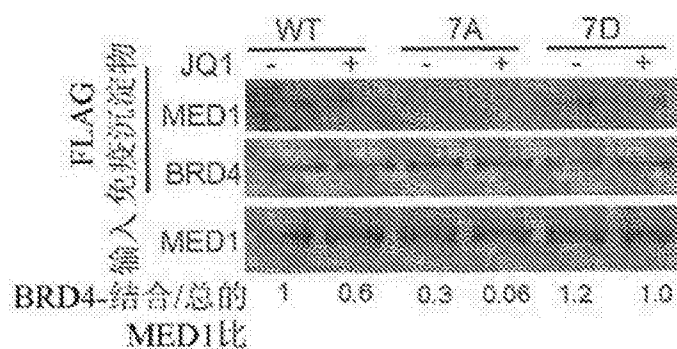


图6H

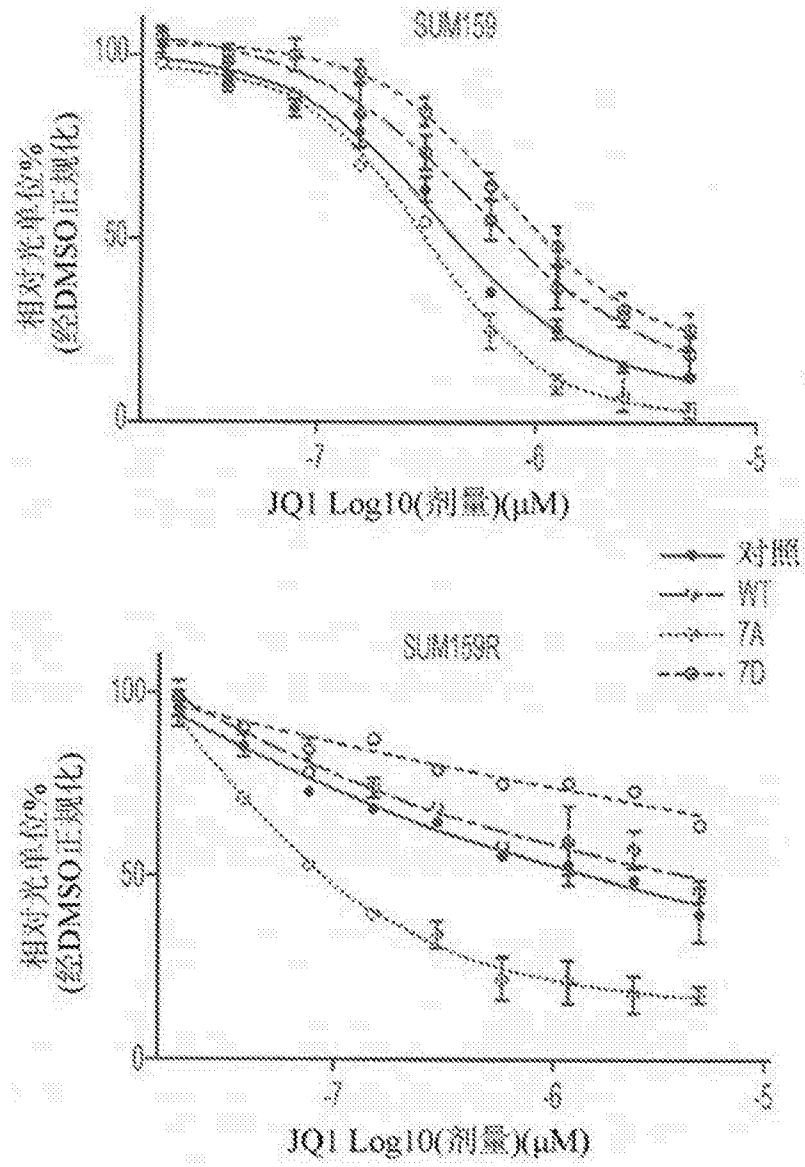


图6I

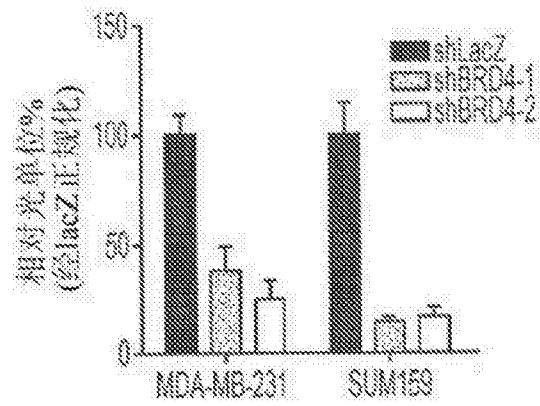


图7A

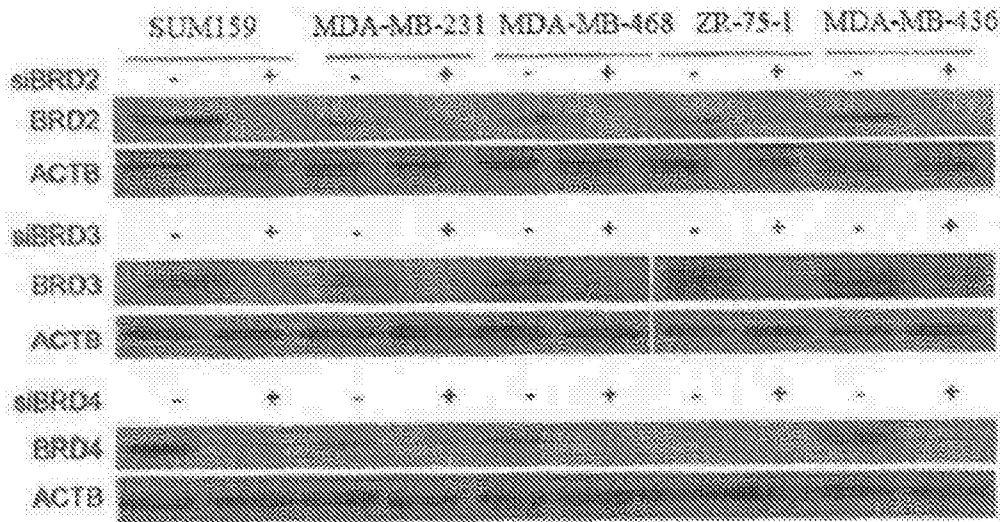


图7B

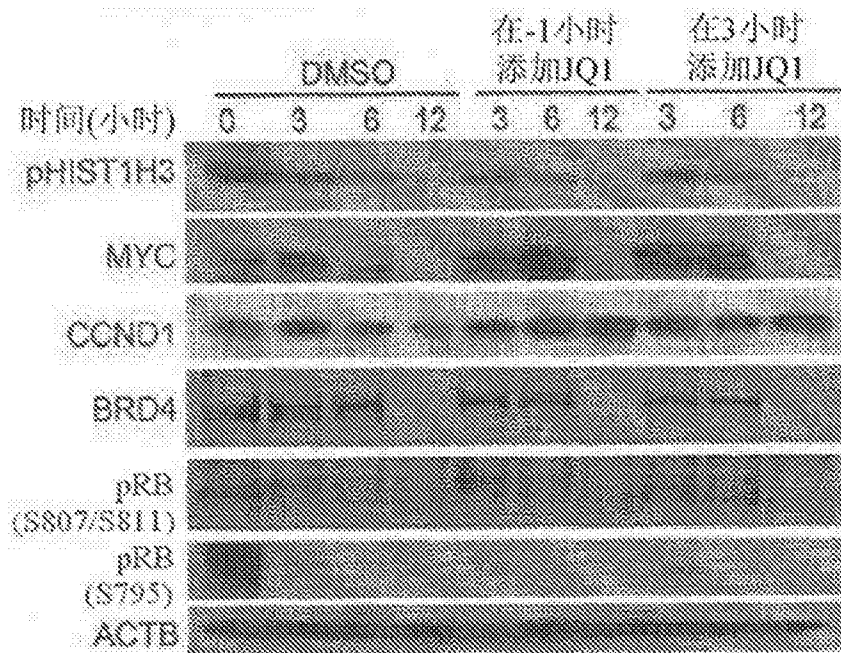


图7C

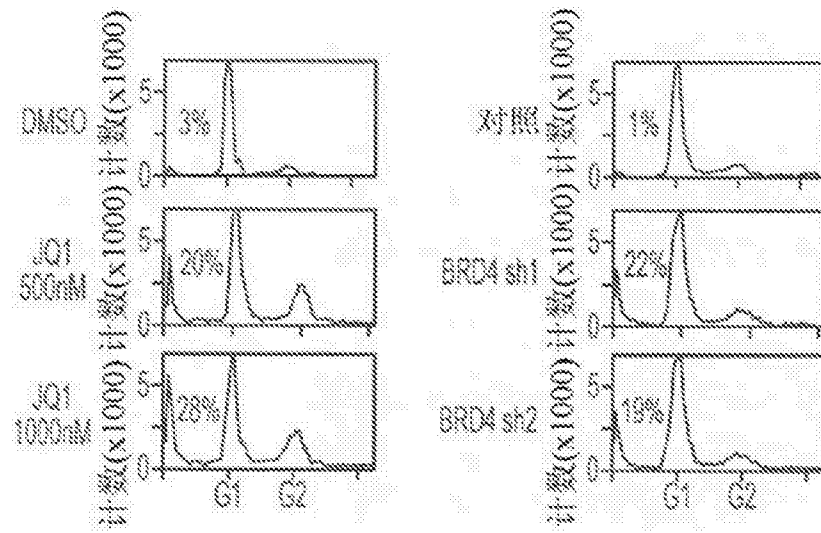


图7D

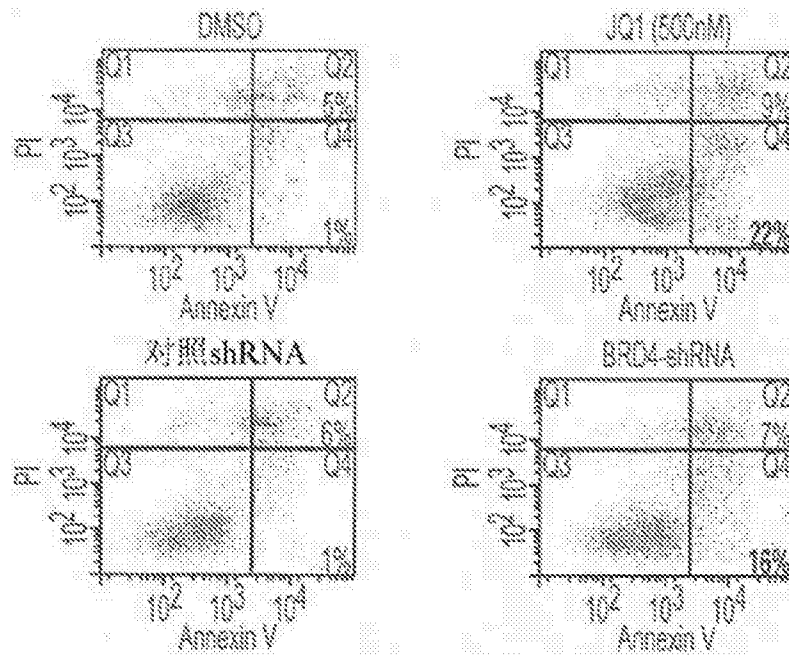


图7E

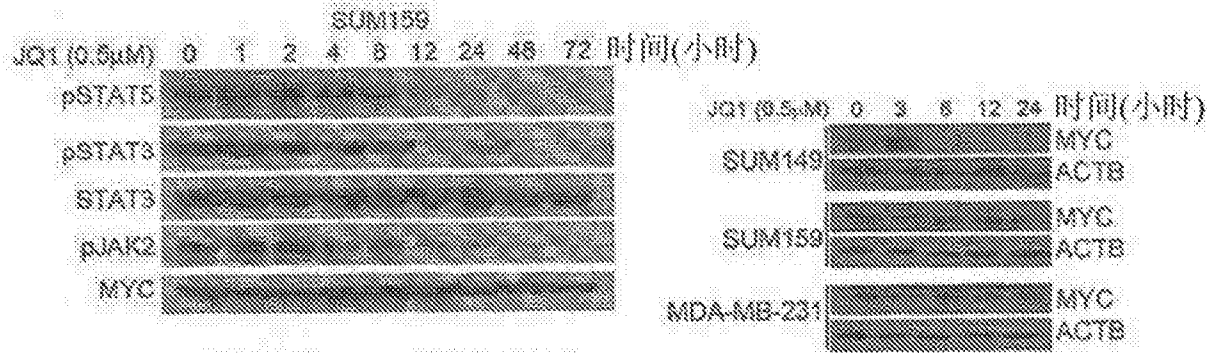


图8B

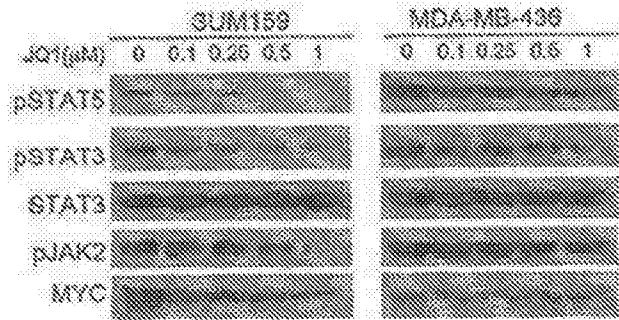


图8A

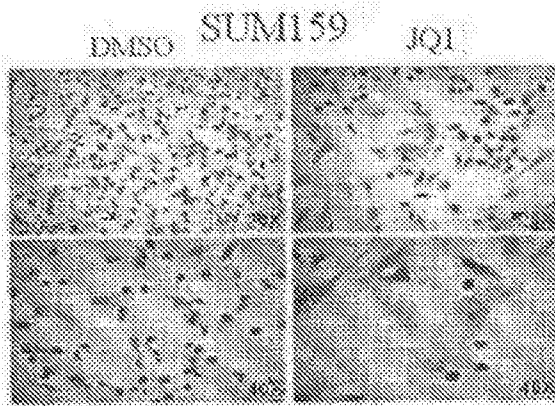


图8C

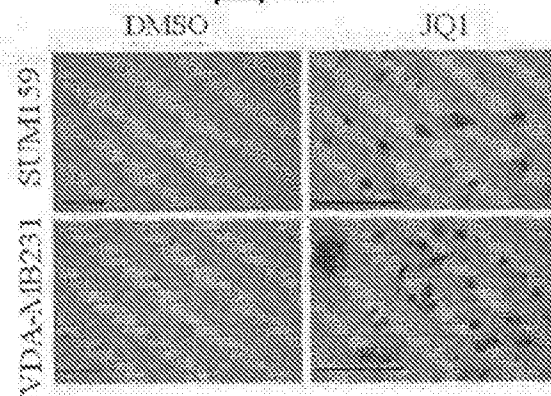


图8D

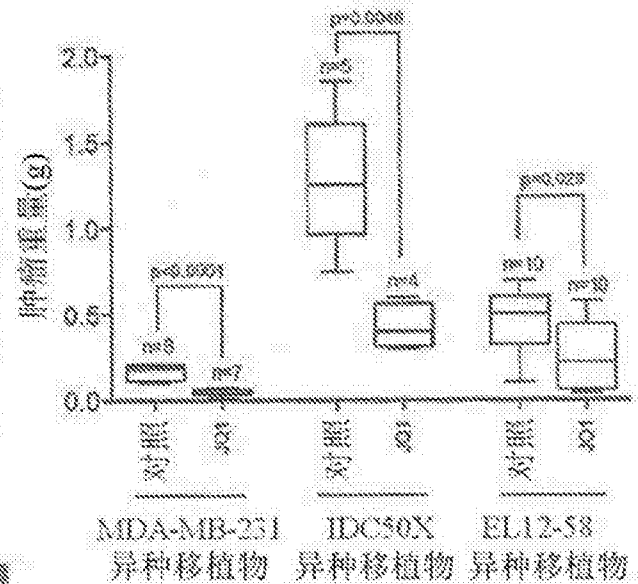


图8E

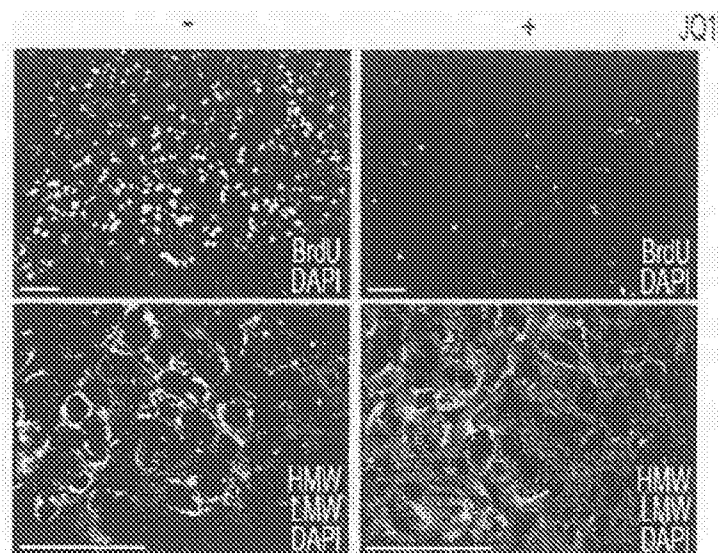


图8F

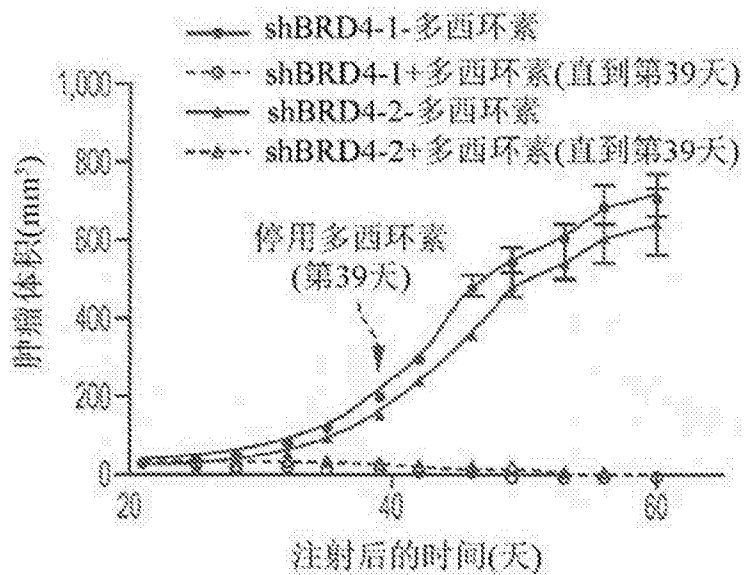


图8G

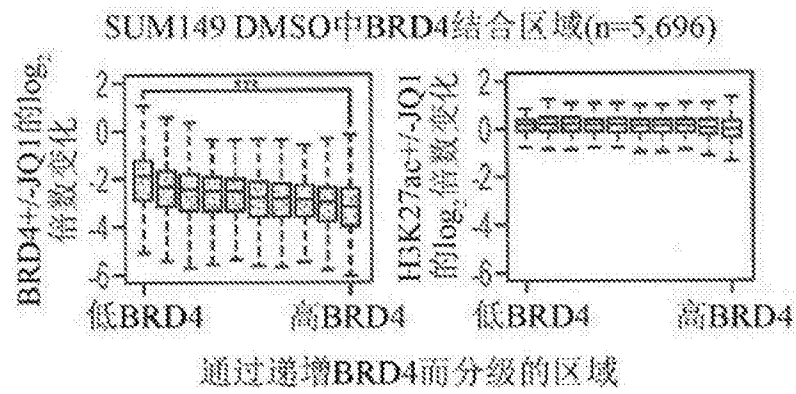


图9A

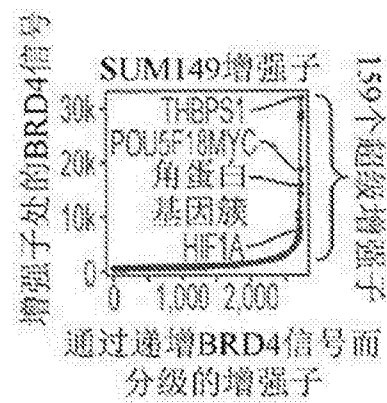


图9B

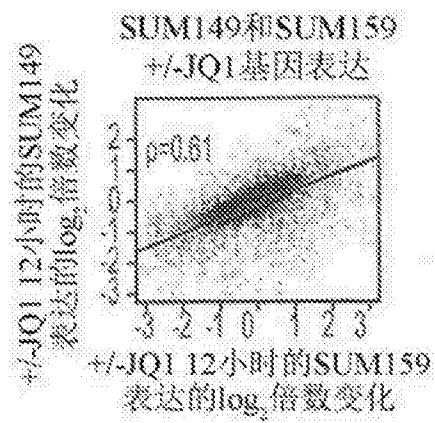


图9C

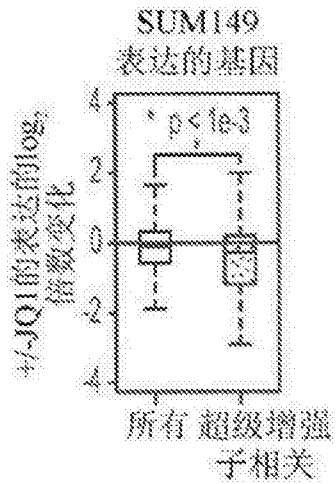


图9D

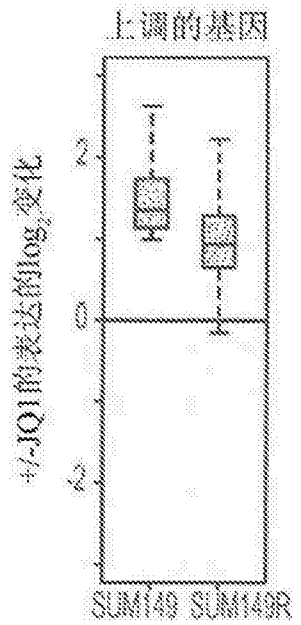


图9E

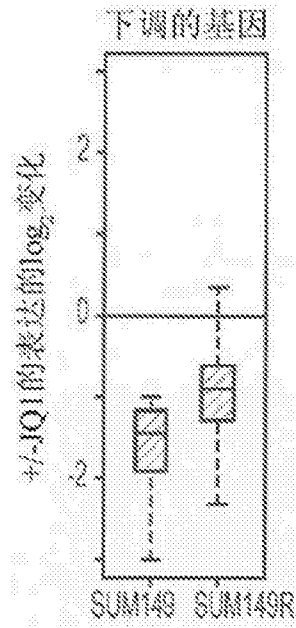


图9F

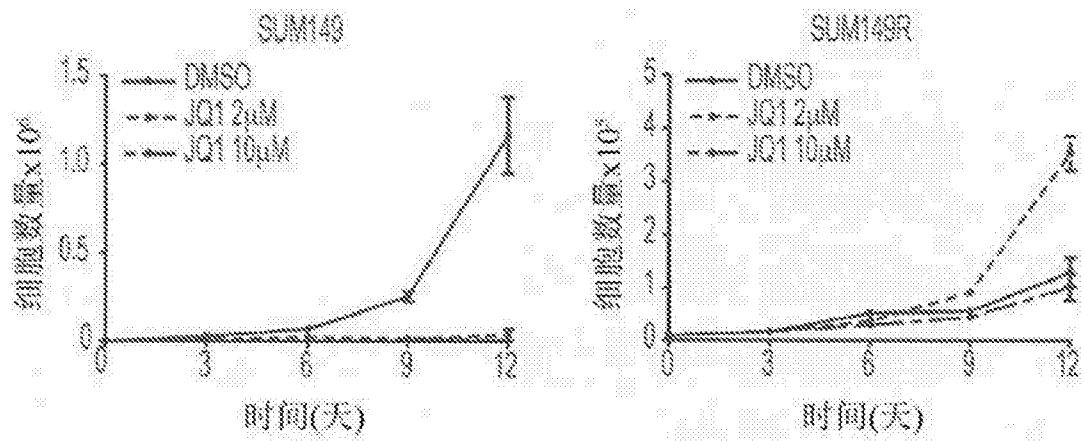


图9G

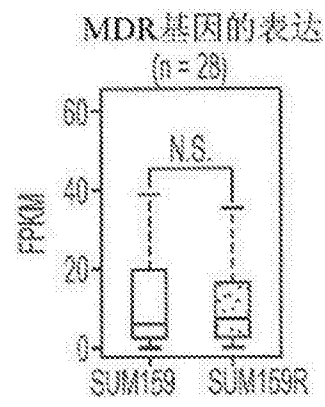


图10A

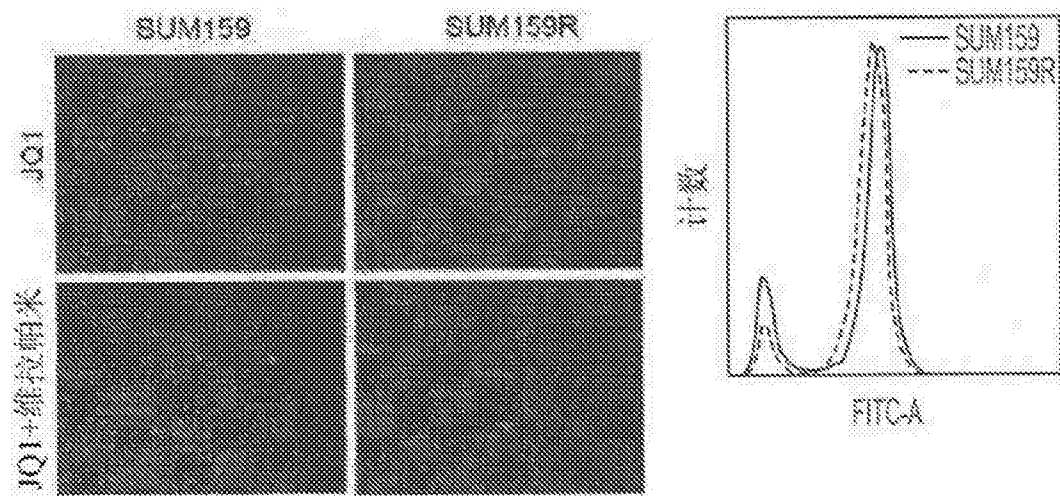


图10B

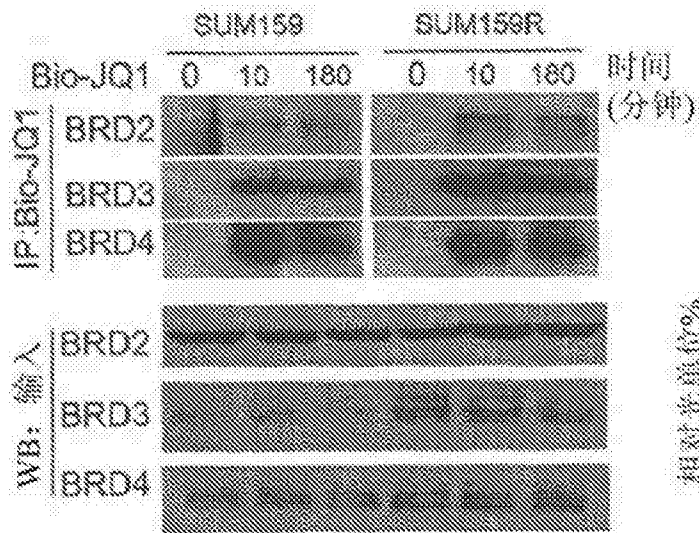


图10C

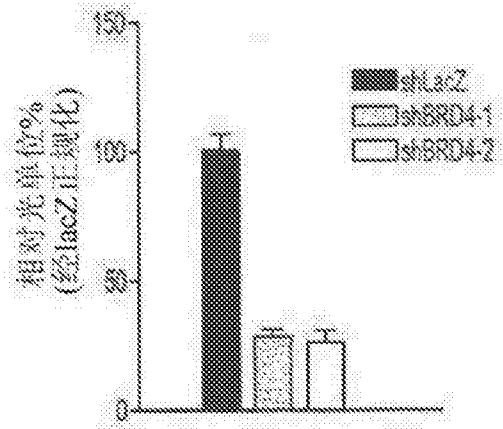


图10D

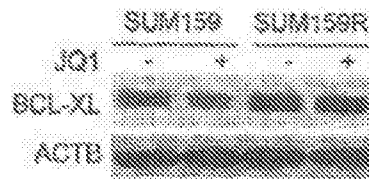


图11A

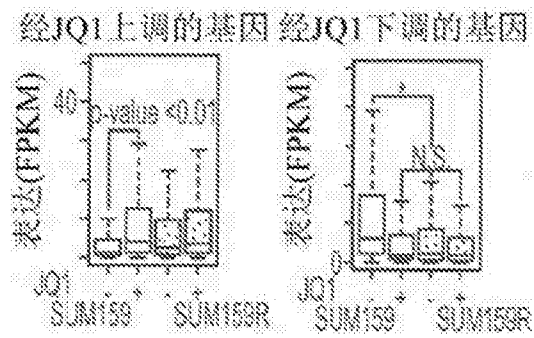


图11B

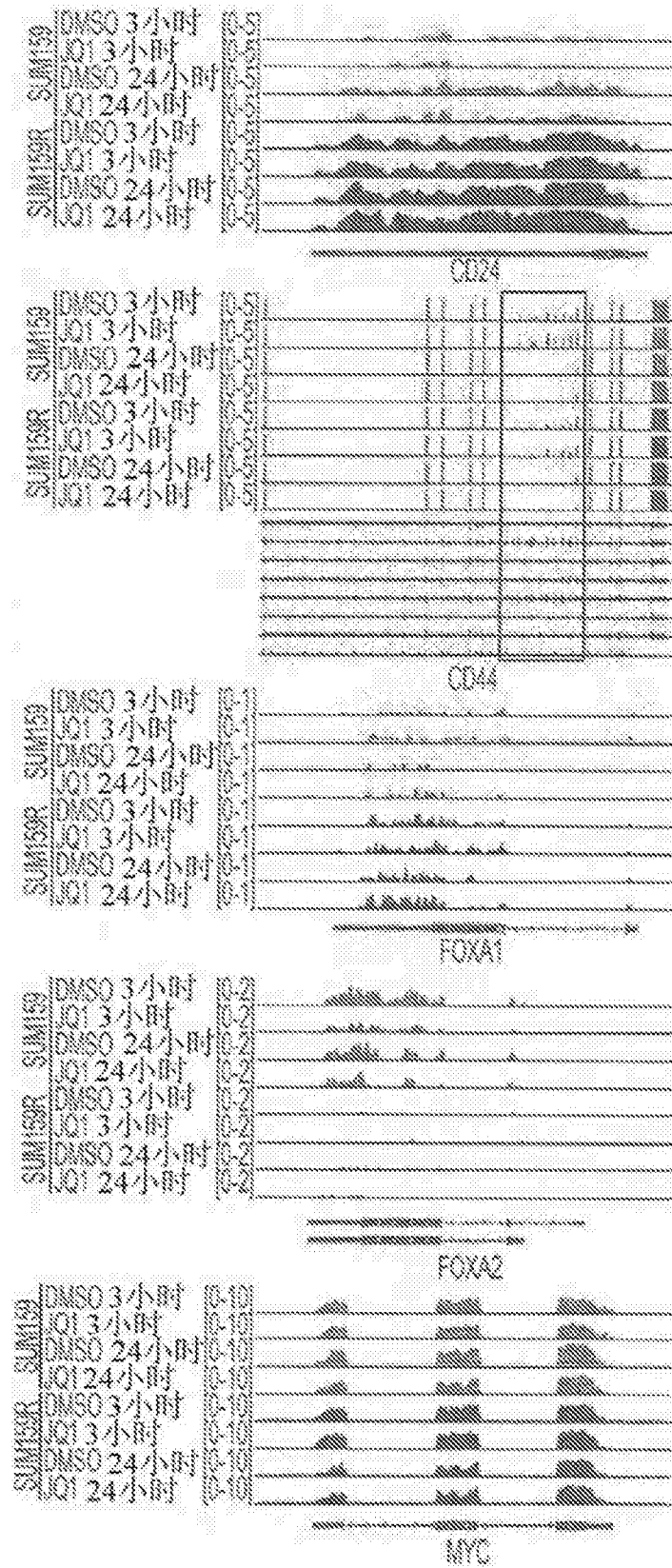


图11C

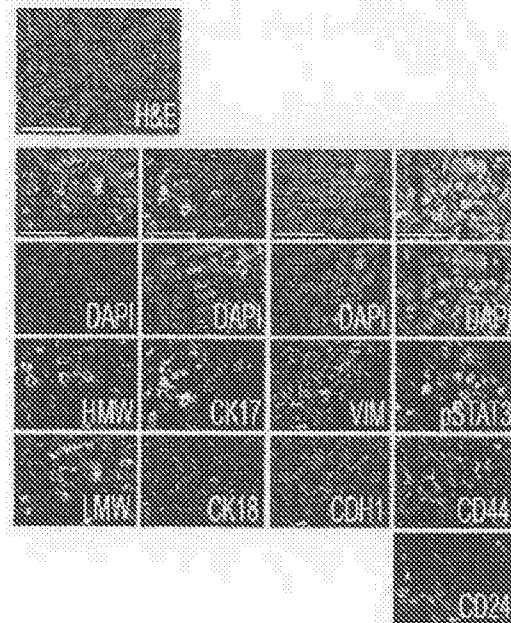


图11D

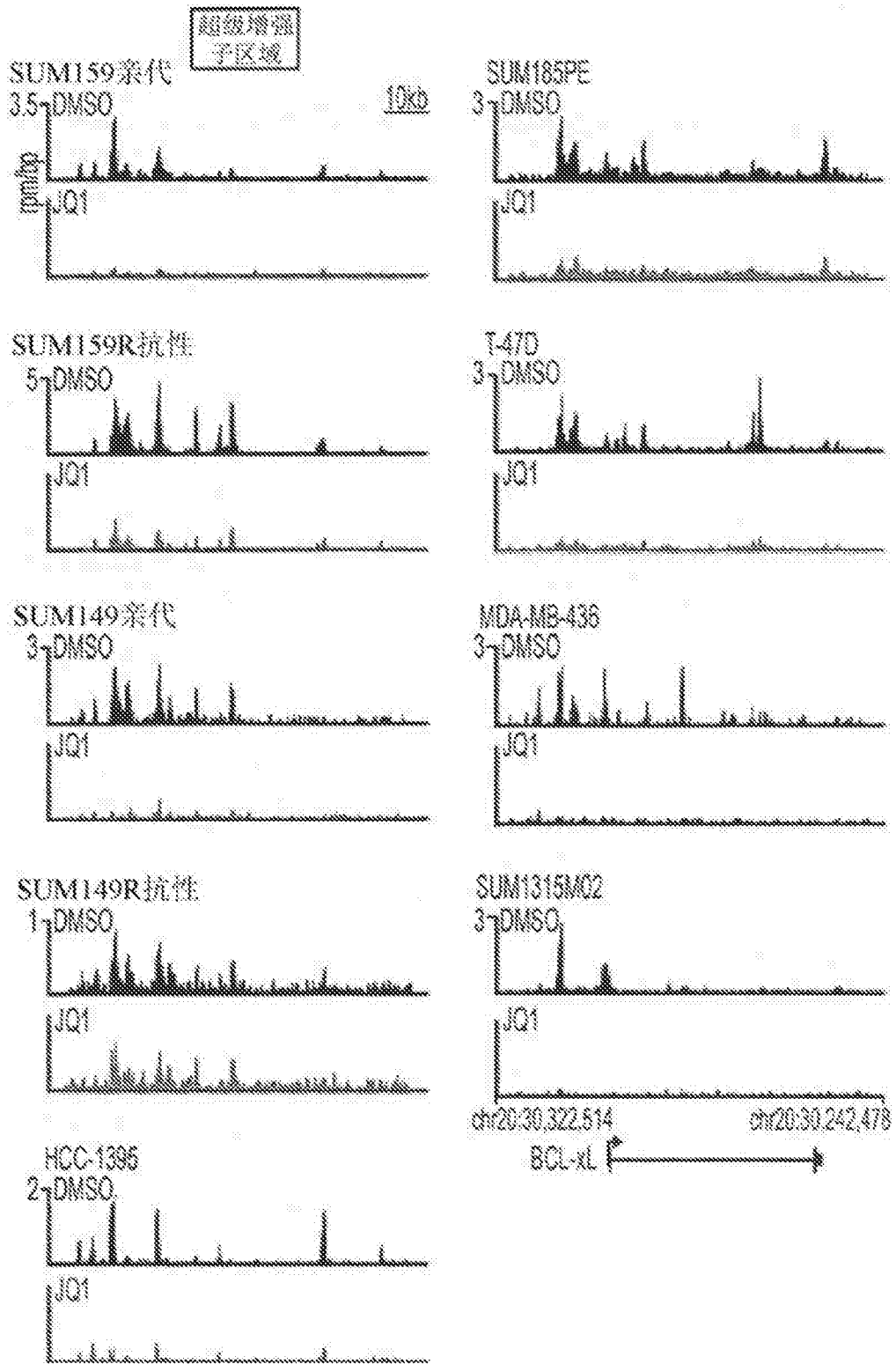


图12A

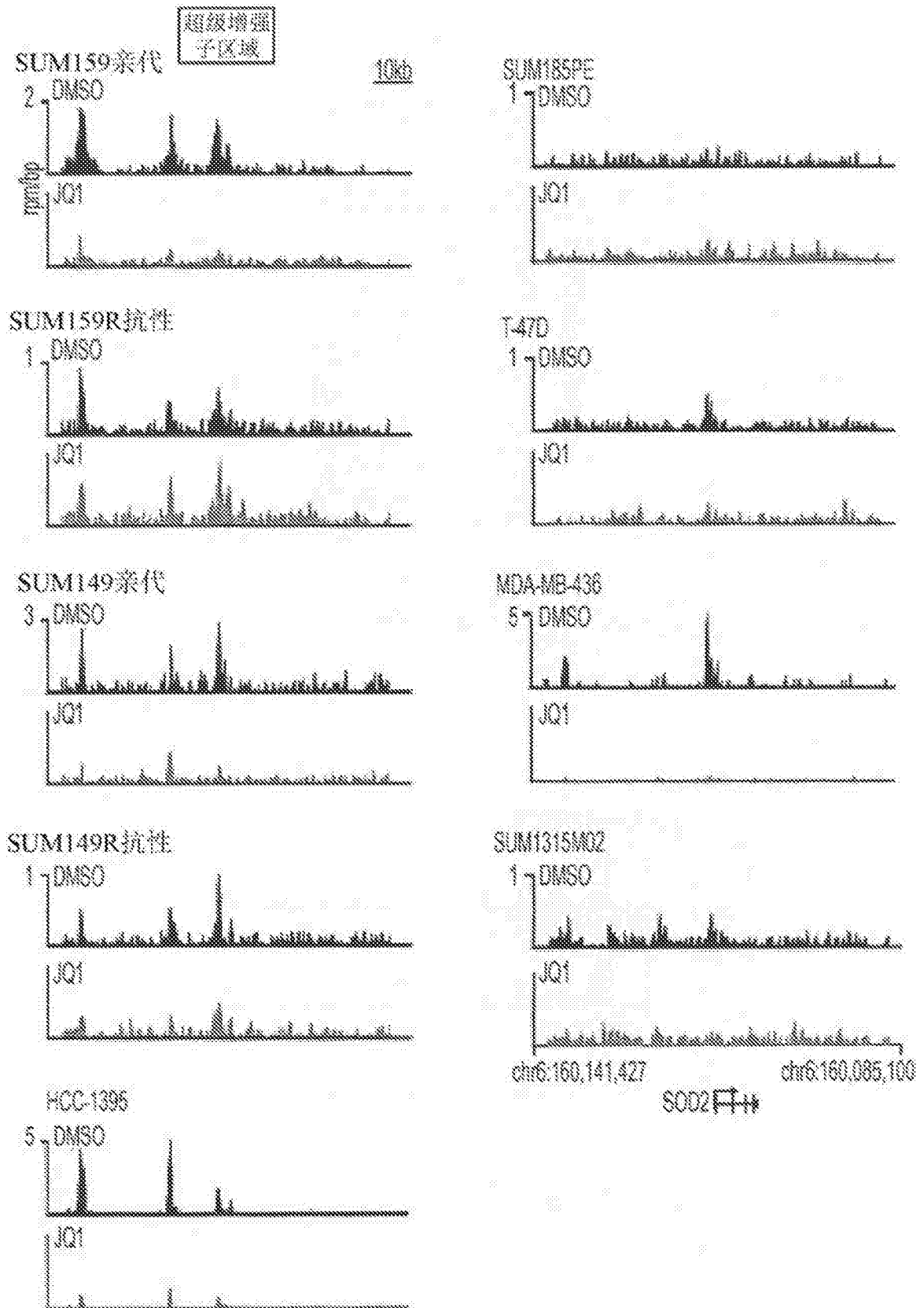


图12B

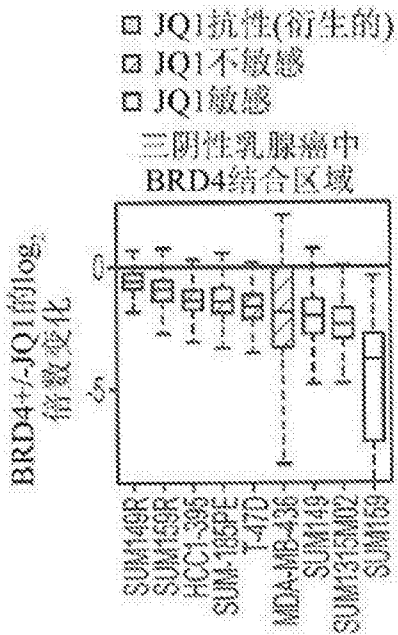


图12C

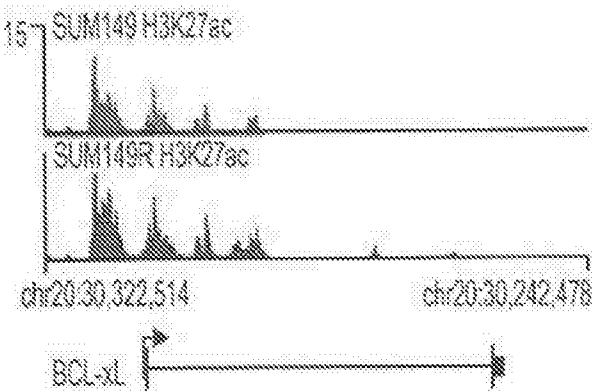


图12D

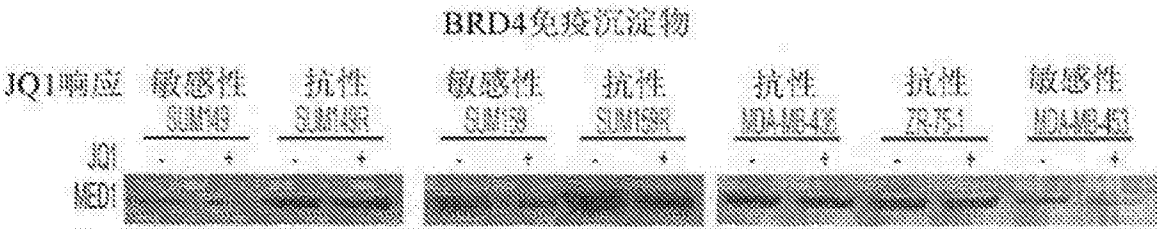


图13A

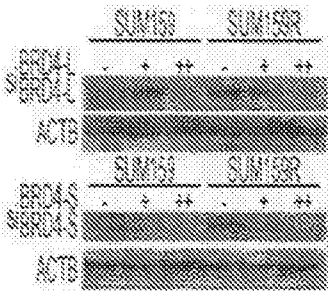


图13B

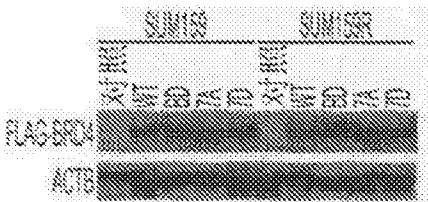


图13C

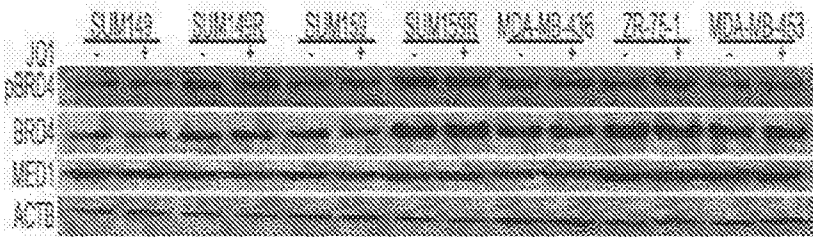


图13D

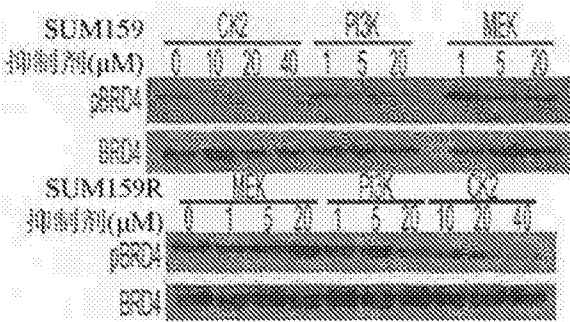


图13E

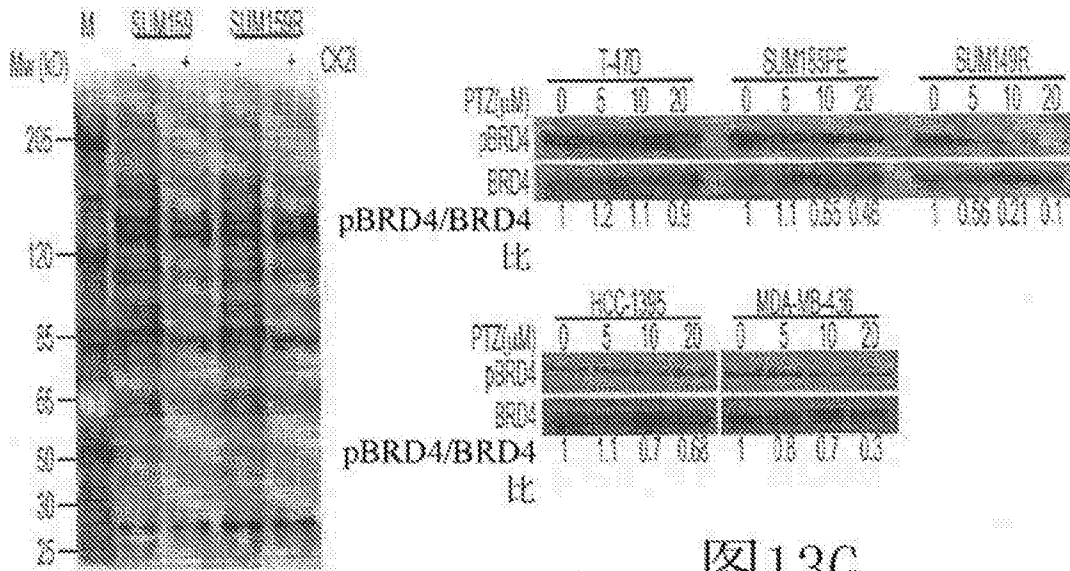


图13G

图13F

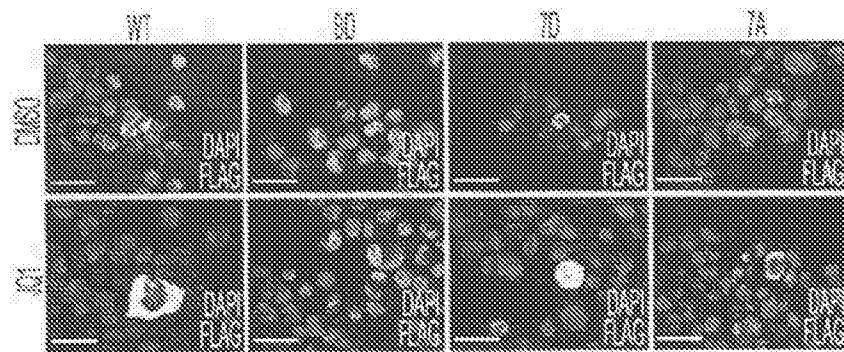


图13H

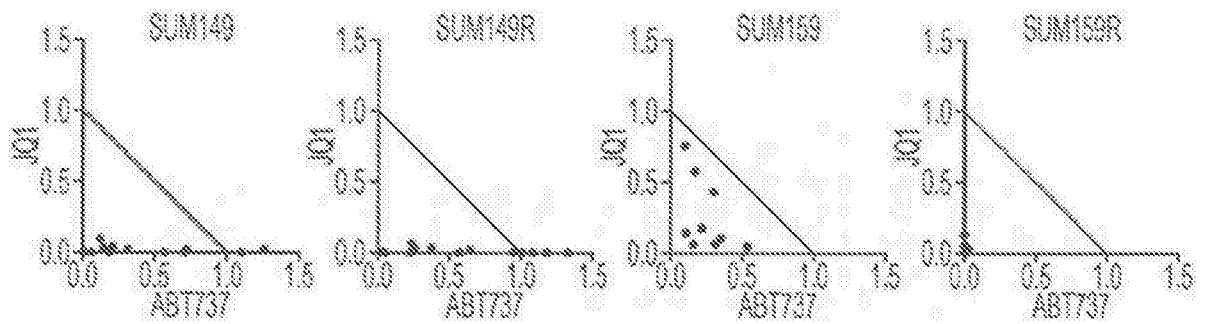


图14A

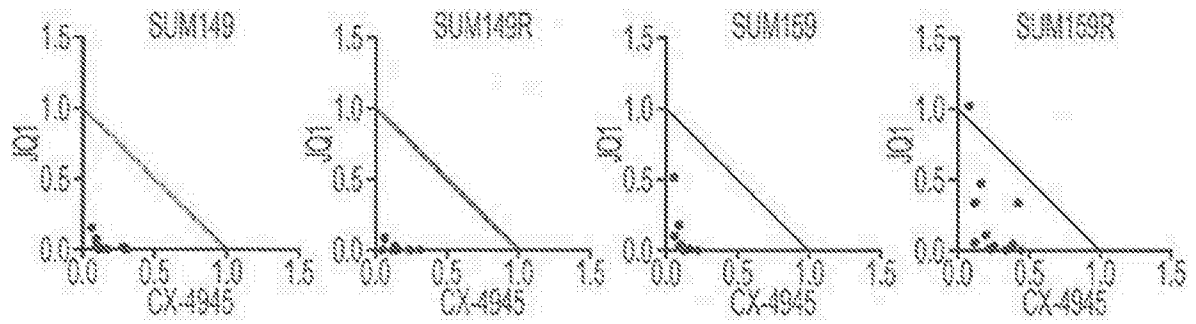


图14B

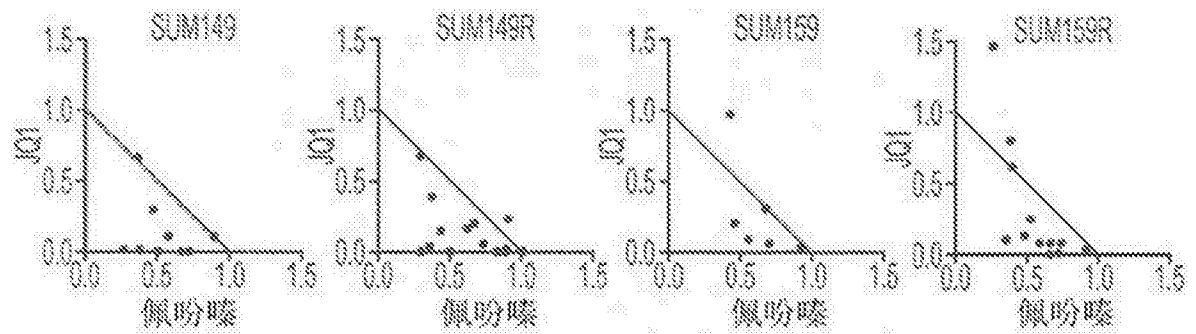


图14C

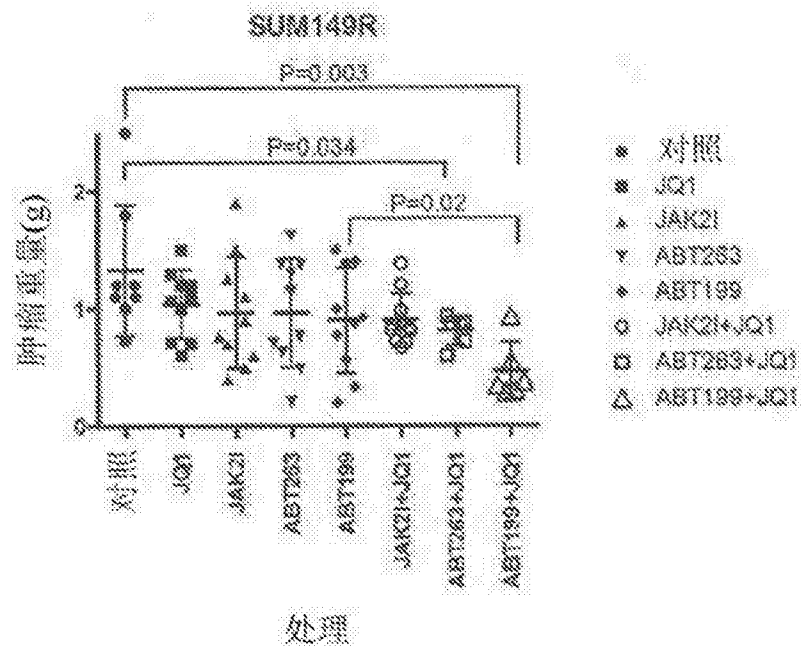


图15A

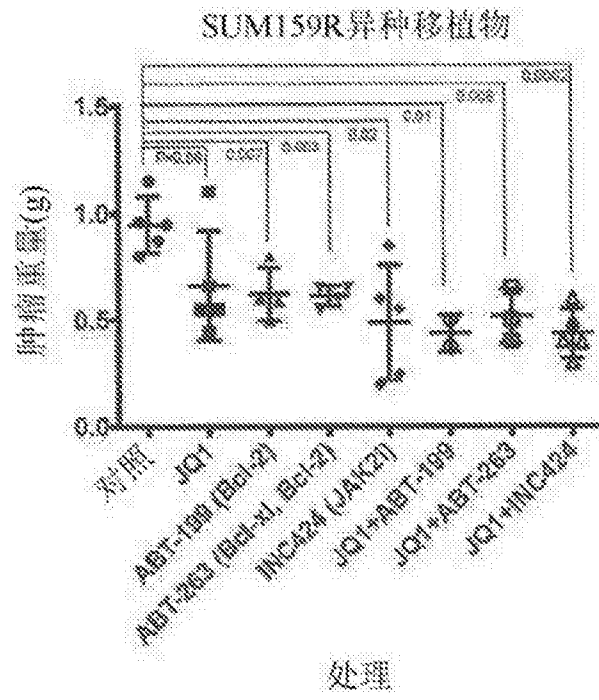


图15B

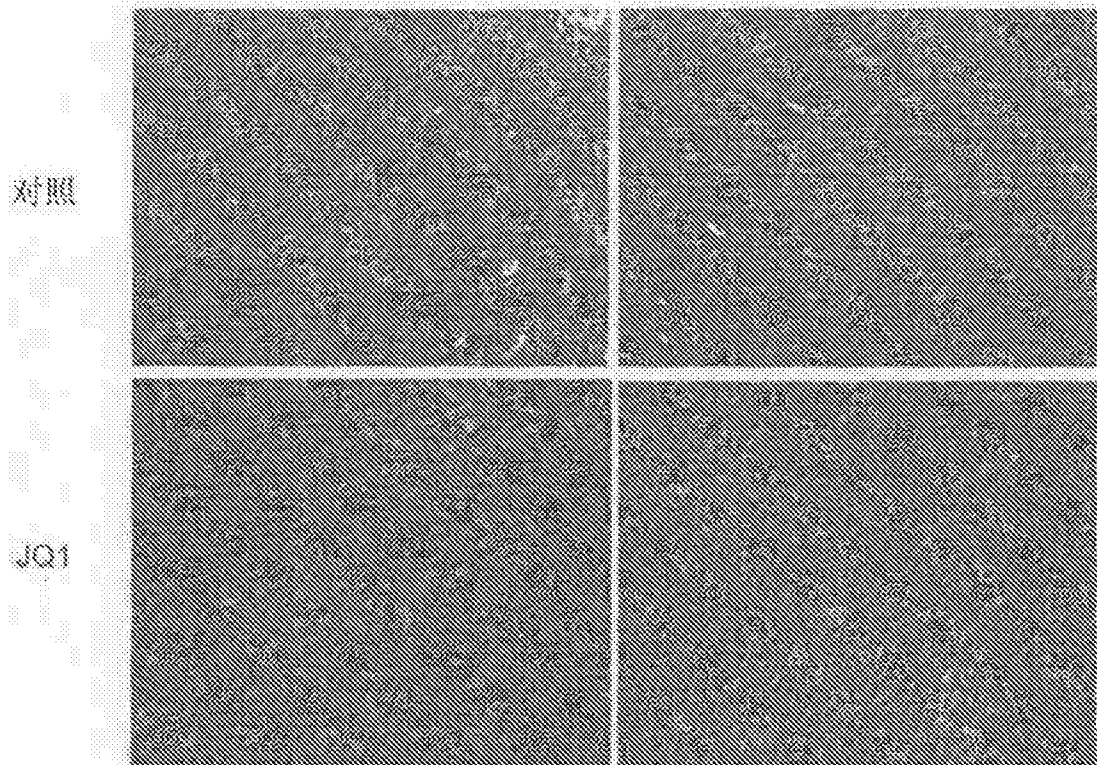


图16A

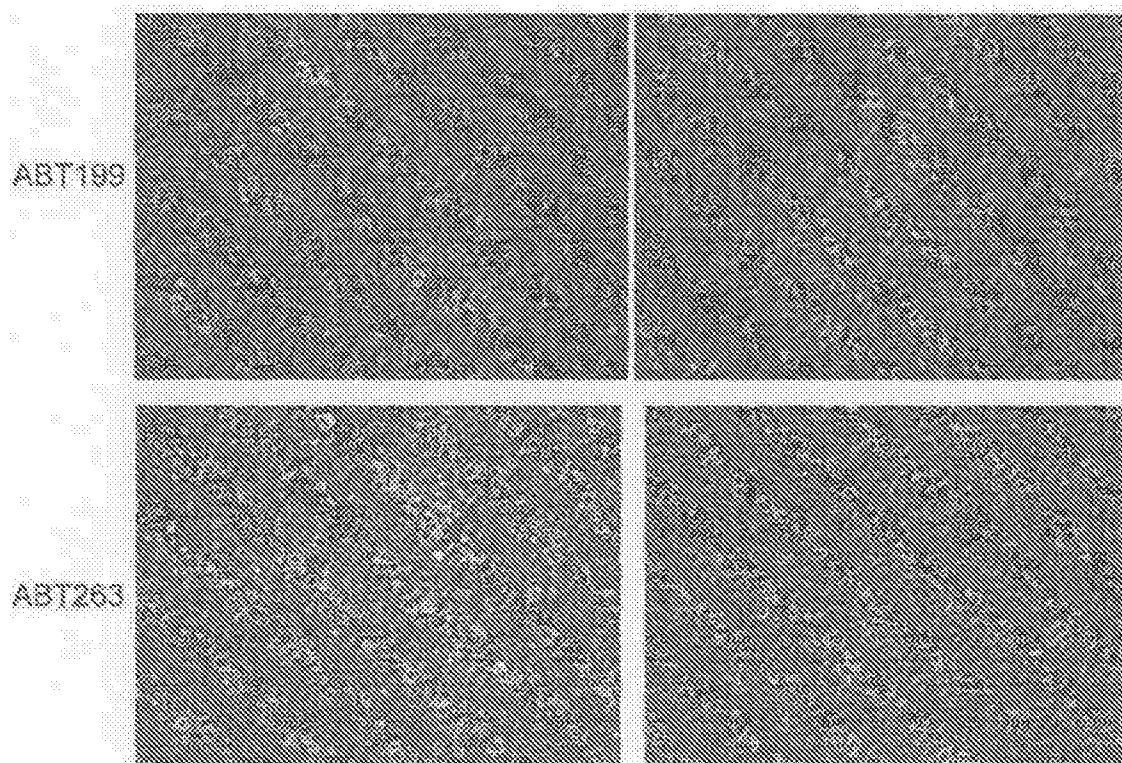


图16B

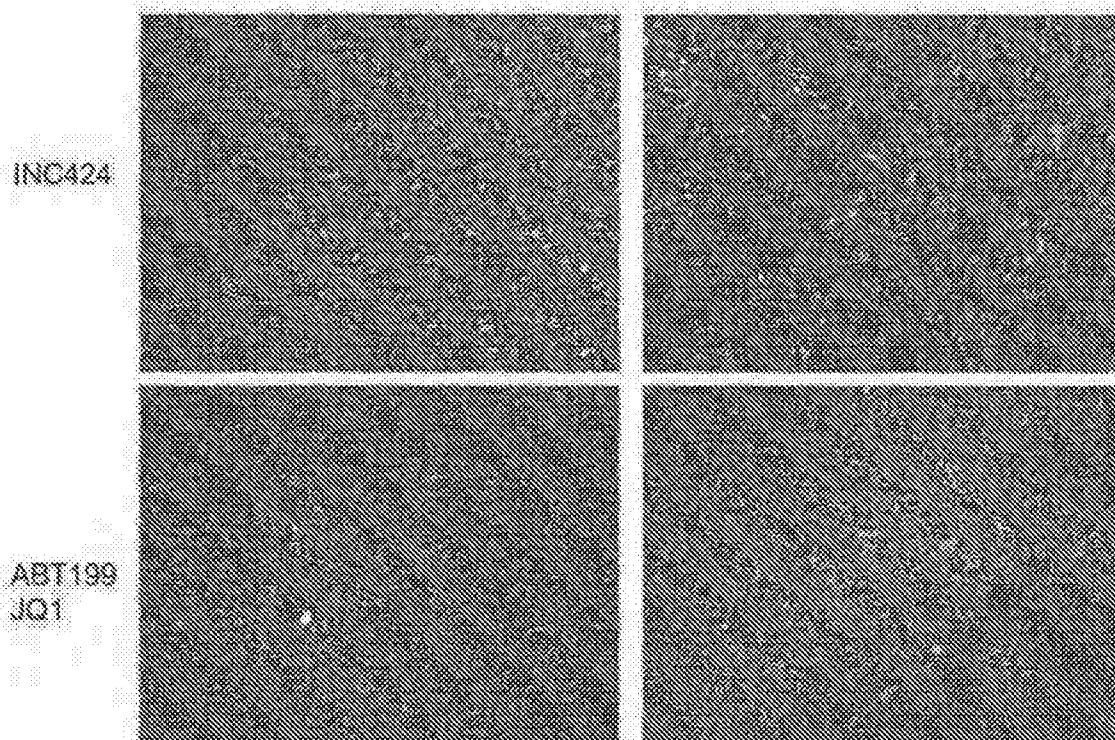


图16C

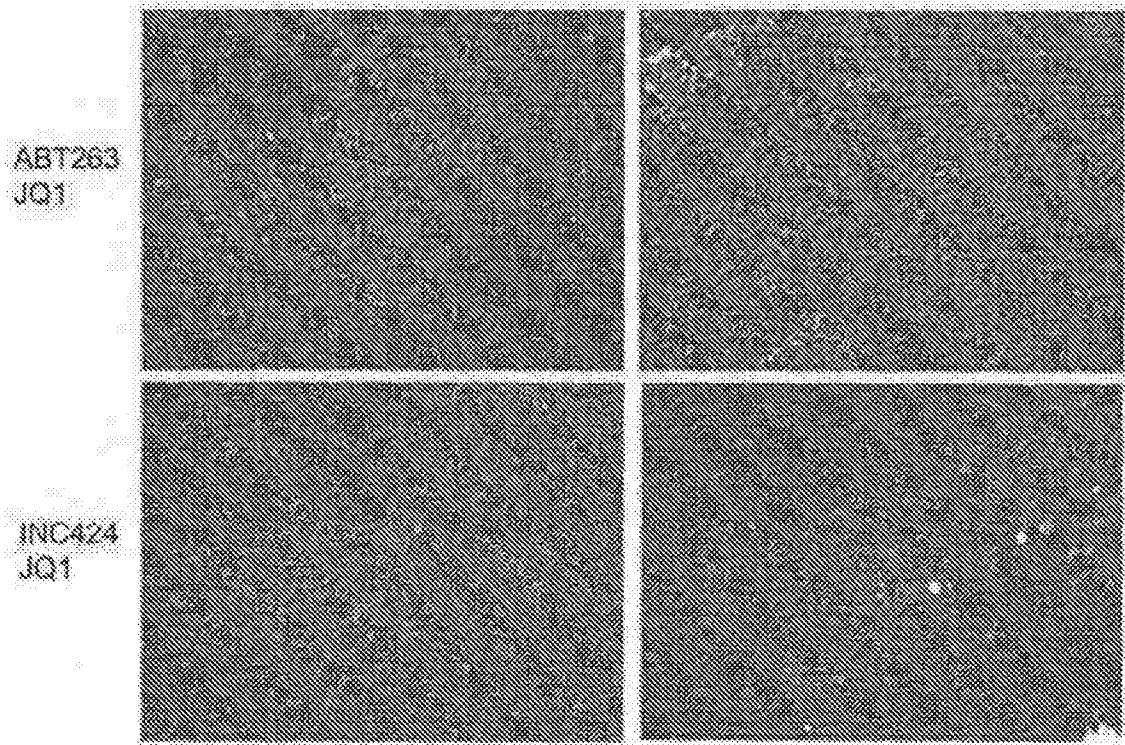


图16D

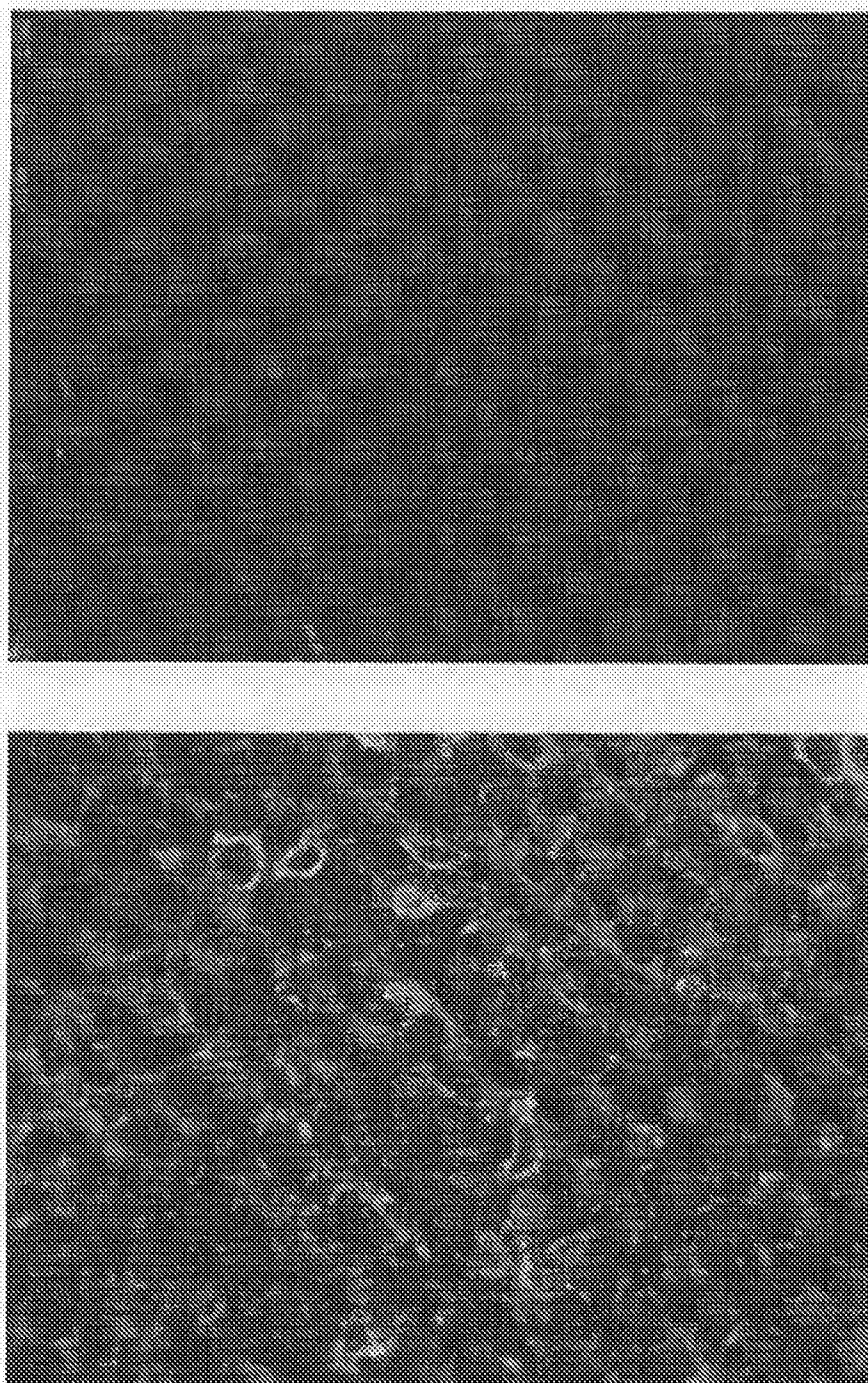


图17