

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：096106615

※申請日期：96/02/27

※IPC 分類：

A61K 31/52
A61K 31/519
A61P 35/00

一、發明名稱：

用於癌症治療和幹細胞調制之方法/

Methods For Cancer Therapy And Stem Cell Modulation

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：新加坡科技研究局/

Agency for Science, Technology and Research

代表人：蘇瑞山 薩奇/ Suresan Sachi

住居所或營業所地址：新加坡 138668 珊卓 #07-01 拜爾波里道 20 號/

20 Biopolis Way, #07-01 Centros, Singapore 138668

國 籍：新加坡/ Singapore

三、發明人：(共3人)

姓 名： 1. 游慶/ YU Qiang

2. 丁俊/ TAN Jing

3. 顏秀俊/ YANG Xiao Jing

國 籍： 1. 加拿大/ Canada

2-3. 中國/ P.R. China

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. US Provisional、2006/03/02、No. 60/778,532

2. PCT、2006/11/15、PCT/SG2006/000350

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

本申請案主張 2006 年 3 月 2 日提出申請的美國臨時申請案 60/778,532 和 2006 年 11 月 15 日提出申請的 PCT 申請案 PCT/SG2006/000350 之權益，彼等的整個內容都為所有目的以引用方式納入本文。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於經由誘導腫瘤細胞的凋亡(apoptosis)以用於癌症的治療和預防之方法，包括化合物和組成物；本發明也關於用於調制幹細胞(stem cell)/祖細胞(progenitor cell) (包括癌幹細胞)的多能性及/或自我更生特性所用之方法、化合物和組成物。

【先前技術】

癌症為一項世界性的主要死亡肇因，為已開發國家中的第二領先死亡肇因且甚至為在例如，澳大利亞、日本、韓國、新加坡中以及在英聯合王國(UK)和西班牙的男性族群中之第一位死亡肇因。每年罹患癌症的人口數目正逐漸增加著。

有遞增的證據指出外遺傳性變更(epigenetic alterations)在癌症形成中的重要角色。此等包括 DNA 過度甲基化(hypermethylation)以及染色質改質(chromatin modifications)諸如組織蛋白(histone)甲基化(methylation)和脫乙酰基化(deacetylation) (有關其評論請參閱 Feinberg, A. P., et al., *Nature Reviews Genetics* (2005) 7, 21-33)。許多腫瘤抑制基因業經發現會經由外遺傳性機制而被緘默化(silenced)。不同於載有可導致基因突變成為失能的基因者，經外遺傳性地緘默化的腫瘤抑制基因可被再活化且引起細胞走入凋亡或老化。此特性使得外遺傳性改質成為用於癌症治療性介入的理想標的。業經顯示者，DNA 甲基化的特異性抑制劑，5-氮雜胞苷(5-azacytidine)，及

其脫氧類似物，5-氮雜-2'-脫氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine)可以抑制 DNA-依賴性甲基轉移酶(the DNA-dependent methyltransferase) (DNMT)的活性，逆反腫瘤抑制基因(tumour suppressor genes)的緘默化且業經證明可用來治療血液學惡質性(haematological malignancies)。對於可干擾會改質組織蛋白的酵素之藥劑，諸如組織蛋白脫乙酰基酶(deacetylase)抑制劑也有臨床實驗進行著。

類似的外遺傳性變更諸如 DNA 甲基化和組織蛋白改質顯然都有涉及在幹細胞的維持、增生和分化之中。一生物所含各種組織的成熟細胞都源自祖細胞，其擁有寬廣的發育潛能和複製能力，例如：周圍血液包含可分化成內皮細胞或血管平滑肌細胞之祖細胞。祖細胞轉而源自幹細胞，其也在大部份組織中鑑定出。幹細胞為完全未分化的細胞，其可分化成任何種成熟的功能性細胞，諸如心臟細胞、肝臟細胞、腦細胞等，同時保留無限地增生之能力。DNA 的甲基化與脫甲基化係已知可在哺乳動物的生殖細胞發育中、在受精與胚囊形成(blastocyst formation)之間，及早期發育之中調節轉錄狀態(transcriptional states) (有關其評論請參閱例如，Santos, F., and Dean, W., *Reproduction* (2004) 127, 643-651)。

對於外遺傳性變更在幹細胞維持中的作用之證據有例如下述觀察結果：胚胎幹細胞培養物的晚期傳代顯示出多種株系 DNA 變更(clonal DNA alterations)，諸如，其中特別者(inter alia)，推定的腫瘤抑制基因 RASSF1 所含啟動子區(promoter region)的差別甲基化(Maitra et al., *Nature Genetics* (2005) 37, 10, 1099-1103)。祖細胞的外遺傳性干擾業經進一步推測為癌症進展的關鍵決定因素(Feinberg, A. P., et al., 2005, 前文)。

現行地，癌症治療包括外科或聚焦於與細胞變成惡質性細胞的轉化相

關聯的機能性或基因性變化。理想的抗癌症藥物應該可選擇性地殺死，或至少抑制，快速增生的癌性細胞，而讓非癌細胞不受到影響。最近的作法包括使用針對所選癌細胞類型的標誌物(markers)之抗體的免疫治療法(例如，美國專利申請 2005/0244417)，針對可在某些類型的癌細胞上表現的受體之拮抗劑的應用(美國專利申請 2006/0147456)，包含干擾素的脫乙酰殼多糖-脂質粒子(chitosan-lipid particles)之應用(美國專利申請 2005/0266093)，以及經由未知機制作用而為某些類型的前列腺癌細胞之胞毒性藥劑的化合物之應用(美國專利申請 2005/0245559)。

於最近數年內，研究精力係著重於開發出外遺傳性癌症治療法，因為對於癌細胞中 DNA 甲基化的異常模式係知悉有超過 20 年之故(有關其總評可參閱例如，Brown, R. and Strathdee, G., *Trends in Molecular Medicine* (2002) 8, 4 (Suppl.), S43-S48，或 Yoo, C. B. and Jones, P. A., *Nature Reviews Drug Discovery* (2006) 5, 1, 37-50)。但是仍然只有兩種 DNA 甲基轉移酶抑制劑，5-氮雜胞苷(Vidaza™)和地西他濱(decitabine) (Dacogen™)上市。彼等業經認可用於治療骨髓發育不良徵候群(myelodysplastic syndrome)，一種血液學狀況，也稱為“白血病前期(preleukemia)”。所以在技藝中仍然有需要一種新穎的可優先殺死快速增生的癌性細胞之化合物和組成物以用於治療或預防癌症或贅瘤疾病(neoplastic disease)。

針對幹細胞的調制而言，胚胎幹細胞容易分化的能力持續造成主要的實際挑戰。為了將胚胎幹細胞維持在多能力型狀態，必須防止彼等在處置與在培養液中的生長過程中的分化。為此理由，彼等在傳統上係在胎牛血清(fetal calf serum)存在的環境中與一層飼養細胞(feeder cell)一同培養(參閱例如，美國專利第 5,843,780 號和第 6,090,622 號)，或在成纖維細胞調理過

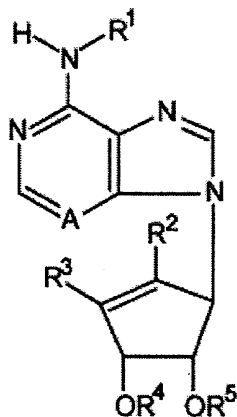
的培養基(CM)中培養。然而，即使在小心控制的條件之下，於試管內繁殖(in-vitro propagation)之中，胚胎幹細胞仍可能進行自發性分化。白血病抑制因子，一種在小鼠胚胎幹細胞內媒介自我更新的因子，也已經被發現會抑制小鼠胚胎幹細胞的分化，不過其仍不能取代飼養細胞在防止人類胚胎幹細胞的分化中之角色。所以，維持胚胎幹細胞的多能性及/或自我更生特性之手段將成為朝向實現幹細胞治療法完全商業化可能性的實質成就。

幹細胞也在多種組織(通常為睪丸和卵巢)中被稱為畸胎瘤(teratoma)的腫瘤內被發現，該畸胎瘤會產生由二層或更多胚胎層所組成的組織。此等癌的惡質形式也稱為畸胎癌(teratocarcinoma)。幹細胞在鼠類畸胎瘤中的發育相似於在正常胚胎中者。彼等的存在可以解釋化學療法時常移除腫瘤團塊的主體而不能防止腫瘤復發之事實(Chambers, I. Smith, A., *Oncogene* (2004), 23, 7150-7160)。更進一步者，幹細胞業經推測為固體型腫瘤中的癌細胞來源，包括乳癌和腦癌。白血病業經證實係由有限數目的異源性白血病幹細胞所產生(Passegue, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003), 100, 11842-11849)。所以，能消除此等腫瘤中的幹細胞所具多能性及/或自我更生特性之手段將典型地成為永久性移除此等癌之先決條件。

據此，本發明的一項目的為提供一種方法，以及化合物和組成物，彼等能夠優先殺死癌細胞而不會影響非癌細胞。本發明的另一項目的為提供一種調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法。

【發明內容】

於一方面中，本發明係關於一種化合物在誘導腫瘤細胞凋亡及/或用以調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性所用醫藥品的製造中之用途。該化合物為具有通式(I)者



(I)

於式 (I) 中 A 為 C 或 N； R^1 、 R^4 和 R^5 各自獨立地選自下列所組成的群組：
H 和脂族、環脂族、芳香族、芳基脂族與芳基環脂族烴基，該等基包含選自 N、O、S、Si 所組成的群組中之雜原子； R^4 和 R^5 可視需要地聯結以定義一脂族烴橋聯； R^2 為選自 H 和鹵素(F、Cl、Br 或 I)所組成的群組。 R^3 為 H 或一脂族或芳基脂族烴基，其包含 1-8 個主鏈碳原子和 0-3 個選自由 N、O、S、Si 所組成的群組中的雜原子，和鹵素(Cl、F、Br、I)；於某些具體實例中， R^2 為 F 或 Cl；於某些具體實例中， R^3 (獨立地或與 R^2 同時地) 也可為 F 或 Cl。

於另一方面中，本發明提供一種用以誘導腫瘤細胞凋亡的方法以及一種調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，該等方法包括投予個別細胞一種如上面所定義的化合物。

於又另一方面中，本發明提供一種醫藥組成物用以誘導腫瘤細胞凋亡及/或用以調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性；該醫藥組成物包括一種如上文所定義的化合物或其藥學上可接受的鹽；醫藥組成物可進一步包括載劑或稀釋劑。

於又另一方面中，本發明提供一種用於調制細胞內的基因表現之方

法，該個別細胞可表現多梳型抑制複合體(polycomb repressive complex)的諸成分，該方法包括投予該細胞一種通式(I)化合物(參閱上文)。

本發明提供一種誘導腫瘤細胞凋亡和調制幹/祖細胞多能性及/或自我更生特性方法，凋亡為一種程式化的細胞死亡且典型地為多細胞生物移除非所欲細胞之機制，於細胞所具進行或起始凋亡的能力受損或徹底破壞之情況中，一受傷的細胞細胞就能夠以未受檢查的方式增生，由是漸漸形成癌細胞，凋亡性細胞會顯示出特性形態學性質，藉由此性質可在顯微鏡下予以鑑別出來。

眾多種細胞諸如人類或動物體的細胞都是透過分化程序產生的，此種細胞程序涉及許多信號傳遞途徑，一生物的各种組織所含成熟細胞都源自於祖細胞，祖細胞擁有廣泛的發育潛能與複製能力，例如：周圍血液包含可分化成內皮細胞或血管平滑肌細胞之祖細胞。祖細胞轉而源自幹細胞，幹細胞也已經在大部份組織內鑑定出，幹細胞為完全未分化的細胞，能夠分化成任何種成熟的功能細胞，諸如心臟、肝臟、腦等的細胞，同時保留其無限增生之能力。

已知會調節幹細胞和分化特異性的基因，諸如：Wnt、TGF β 、FGF 和 Notch 等蛋白質及 hedgehog 信號傳導途徑之某些因子都是多梳型-壓制性複合體，例如：多梳型-壓制性複合體 1 或多梳型-壓制性複合體 2 之蛋白質 (Bracken, A. P. et al., *Genes Dev.* (2006) 20, 1123-1136)。

經由誘導腫瘤細胞凋亡，可以使用根據本發明的方法作為治療或預防癌症的治療法；於某些具體實例中，個別的腫瘤細胞可為例如乳癌細胞；於某些具體實例中，個別的腫瘤細胞可為經培養者；作為示範例子者，腫瘤細胞可為人類乳房癌細胞系，諸如 MCF-7、MB-468、SK-BR-3、和 T47D

的細胞；腫瘤細胞也可能得自哺乳動物；於其他具體實例中，腫瘤細胞系可包括在哺乳動物內，諸如貓、牛、豬、和人類。

雖然幹細胞諸如胚胎幹細胞可以在受控制的方式下分化，例如在神經生長因子和視黃酸的存在中分化成神經元(Schuldiner et al. (2001) *Br. Res.* 913, 201-205)，不過彼等順利分化的能力業已引起主要的實際挑戰；為了將胚胎幹細胞維持在多能力性狀態，必須防止彼等在處置中與在培養液內生長之過程中的分化作用；為此理由之故，彼等在傳統上係於一層飼養細胞上於胎牛血清的存在中培養(參閱例如，美國專利第 5,843,780 和 No. 6,090,622)或是在經成纖維細胞調理過的培養基(CM)內培養；雖然如此，即使在經小心控制的條件下，胚胎幹細胞也可能在試管內繁殖之過程中經歷自發性分化。白血病抑制因子(LIF)，一種媒介小鼠胚胎幹細胞自我更新的因子，也經發現會抑制小鼠胚胎幹細胞的分化，但是其不會取代飼養細胞在防止人類胚胎幹細胞的分化中之角色；所以，熟諳此技藝者都可體會到該調制，包括維持，幹細胞的多能性及/或自我更生特性之方法為一種顯著的改良。

成人幹細胞，雖然不像胚胎幹細胞一樣具有多能力性，不過業經顯示能夠自我更新且具有使彼等的發育能力可與較不成熟的多能力性胚胎幹細胞所具者相比之可塑性；舉例而言，成人幹細胞能夠分化成不同於其來源組織的細胞系。

本發明用於調制多能力性及/或自我更生特性之方法適合用於任何幹細胞、祖細胞、畸胎瘤細胞或從彼等所衍生的任何細胞；典型地，個別細胞能夠表現出至少一種多梳型抑制複合體的成分(也請參閱下文)；作為示範例子者，任何多能力性人類胚胎幹細胞或個別細胞系都可能用於個別方法

中。衍生一群此等細胞的手段都是技藝中已經良好地建立者(請參閱例如，Thomson, J. A., et al. [1998] *Science* 282, 1145-1147 或 Cowan, C.A., et al. [2004] *N. Engl. J. Med.* 350, 1353-1356)。更進一步者，例如，已知有 71 獨立的人類胚胎幹細胞系存在，其中有 11 細胞系可用於研究目的(請參閱例如，the NIH Human Embryonic Stem Cell Registry，於 <http://stemcells.nih.gov/research/registry/eligibilityCriteria.asp>)，諸如 GE01、GE09、BG01、BG02、TE06 或 WA09。成人幹細胞可例如離析自與彼等相關聯因而為所謂的“衛星細胞(satellite cell)”之來自生產後留下的的胎盤和臍帶之血液，或自肌纖維(myofibers)(Collins, C.A., et al. [2005] *Cell* 122, 289-301，也請參閱 Rando, T.A., [2005] *Nature Medicine* 11, 8, 829 - 831)。

術語“幹細胞”，於用於本文中時係指稱任何幹細胞且也包括所謂的癌幹細胞；許多類型的癌症都已經被發現包含此等癌幹細胞，彼等的特徵在於彼等所具的自我更生能力和分化能力；有一廣範圍的研究顯示出大部份癌症都是無性繁殖系(clonal)且可能代表有賦予維持腫瘤生長的能力之單一癌幹細胞的後代。Krivtsov 等人 (*Nature* (2006) 442, 818-822) 已經純化出例如經高度增濃祖代-衍生(progenitor-derived)的白血病幹細胞之細胞族群且經由基因表現型態分析(profiling)鑑定彼等，他們報告出此等細胞類似於產生彼等細胞之祖代，但是表現出通常在造血性幹細胞中表現出的自我更新-相關聯程式(出處同上)。

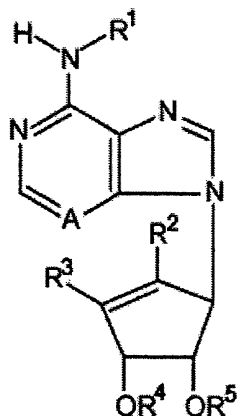
惡質腫瘤可以看成為一種異常器官，其中單一癌幹細胞或其小族群逃逸過正常的自我更新限制，由是產生會助成腫瘤進展和生長的異常地分化之癌細胞；此等癌幹細胞的根除經認定為是任何成功的抗-癌症治療法之關鍵部份，且也解釋為何傳統癌症治療法時常只能有效地減低腫瘤負荷，而

不具治癒性之故。調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性可包括例如誘導幹細胞，諸如癌幹細胞之分化，該分化例如可透過組織蛋白甲基化的抑制來進行(也請參閱下文)。經由調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性，根據本發明的方法可據此為例如治療或預防癌症所用的治療法。

幹細胞也出現於多種組織(通常為睪丸和卵巢)中被稱為畸胎瘤(teratoma)的腫瘤內，該畸胎瘤會產生由二層或更多胚胎層所組成的組織；此等癌的惡質形式也稱為畸胎癌(teratocarcinoma)；經由調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性，根據本發明的方法可據此也為例如治療或預防畸胎瘤之治療法；幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之調制可包括，例如，維持此等多能性及/或自我更生特性，且因而也抑制幹/祖細胞，特別是可能對活體內(in vivo)或試管內(in vitro)用途有益處的“健康”幹細胞之分化。

在該方法打算要用於祖細胞(亦即產生成熟體細胞之細胞)之情況中，任何祖細胞都可用於本發明方法中；適當的祖細胞之例子包括，但是不限定於，神經元祖細胞、內皮祖細胞、紅血球(erythroid)祖細胞、心臟祖細胞、寡突細胞(oligodendrocyte)祖細胞、視網膜(retinal)祖細胞或造血性祖細胞。獲得祖細胞的方法都是技藝中熟知者；作為兩個示範例子者，一種業經在美國專利申請 2005/0176142 中揭示的取得巨核細胞(megakaryocyte)祖細胞之方法及一種業經由 Li 等人所述的獲得小鼠肝祖細胞系之方法((2005) *Stem Cell Express*, doi: 10.1634/stemcells. 2005-0108)。

根據本發明的方法包括投予個別的腫瘤細胞或個別的幹/祖細胞具有下面通式(I)的化合物：



(I)

於式(I)中，A 為 C 或 N；R¹、R⁴和 R⁵可為 H 或各自獨立地選自下列所組成的群組：脂族、環脂族、芳香族、芳基脂族與芳基環脂族烴基，其包含 0 至 6 個，於某些具體實例中，0-4 個，且於某些具體實例中，0-3 個選自 N、O、P、S、Se 和 Si 所組成的群組中之雜原子；於某些具體實例中，R⁴和 R⁵可為相同者。於某些具體實例中，R⁴和 R⁵可相聯結以定義一脂族烴橋聯；個別的烴橋聯可包括例如 1-12 個，於某些具體實例中為 2-10 個，且於某些具體實例中，2-8 個主鏈碳原子且包含 1-5 個，於某些具體實例中為 1-4 個，且於某些具體實例中為 1-3 個選自 N、O、P、S、Se 和 Si 所組成的群組中之雜原子；R²可為 H 或鹵素原子，諸如 F、Cl、Br 或 I；於某些具體實例中，R²為 F 或 Cl。R³可為 H 或脂族、環脂族、芳香族、芳基脂族或芳基環脂族烴基；此烴基可包括 1-12 個，於某些具體實例中為 1-8 個，且於某些具體實例中為 1-4 個，主鏈碳原子及 0-4 個，諸如 0-3 個或 0-2 個選自 N、O、P、S、Se 和 Si 所組成的群組中之雜原子及鹵素，諸如 F 或 Cl。

術語“脂族”，除非另外有不同的表明，否則意指直鏈型或支鏈型烴鏈，其可為飽和者或為單-或多-不飽和者；不飽和脂族基包含一或多個雙鍵及/或叁鍵；烴鏈的支鏈可包含直線型鏈以及非芳香性環元素；烴鏈，除非另

外有不同的表明，否則可具有任何長度，且可包含任何數目的支鏈；主鏈和支鏈兩者都可進一步包含雜原子例如 N、O、S、Se 或 Si。

術語“脂環族”，除非另外有不同的表明，否則意指非芳香族環烴部份體，其可能為飽和者或單-或多-不飽和者；該環烴部份體可經非芳香族環元素和鏈元素所取代；環烴部份體的主鏈，除非另外有不同的表明，否則可具有任何長度且可包含任何數目的非芳香族環和鏈元素；環烴部份體及環和鏈取代基可進一步包含雜原子，例如 N、O、S、Se 或 Si。

術語“芳香族”，除非另外有不同的表明，否則意指具有共軛雙鍵的平面環烴部份體，其可為單環或可包含多個經稠合或經共價鍵聯的環；環烴部份體的主鏈，除非另外有不同的表明，否則可具有任何長度且包含任何數目的雜原子，例如 N，O 和 S。

術語“芳基脂族”意指一烴部份體，其中一或更多個芳基係連接到一或更多個脂族基或為在一或更多個脂族基上的取代基；如此，術語“芳基脂族”包括例如烴部份體，其中二或更多個芳基係通過一或更多個具有任何長度的脂族鏈或多個鏈例如亞甲基連接。

術語“脂族”、“脂環族”、“芳香族”和“芳基脂族”於用於本文中時分別意指同時包括個別的部份體的經取代和未經取代兩種形式；取代基可為任何官能基，例如，但是不限定於，胺基、醯胺基、疊氮基、羰基、羧基、氰基、異氰基、二硫環己烷(dithiane)、鹵素、羥基、硝基、有機金屬、有機硼、硒基(seleno)、矽烷基、矽氧烷基(silano)、磺醯基、硫基、硫氰基、三氟甲基磺醯基、對-甲苯磺醯基、溴苯磺醯基、硝基苯磺醯基和甲烷磺醯基。

於某些具體實例中，本發明係關於具有上面的式子之化合物用於誘導腫瘤細胞凋亡及/或用以調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之用

途；個別的用途可為例如用於此目的的醫藥品之製造。

圖 2 中示出許多種適當的化合物，所繪示出的化合物可稱為腺嘌呤核苷(adenosine)類似物(部份碳環類似物)；舉例而言，於一具體實例中，該化合物為 3-去氮奈普蘭諾辛(請參閱圖 2A)；舉另一例而言，於另一具體實例中，該化合物為奈普蘭諾辛 A (Neplanocin A) (請參閱圖 1K)。

此等化合物到目前為止係以彼等的廣譜抗病毒效應為人所知，諸如對第一型單純性疱疹病毒(the Herpes Simplex Type I virus)或伊波拉病毒(Ebola virus)之抑制(Tseng, C.K.H. et al., *J. Med. Chem.* (1989) 32, 1442-1446; Glazer, R.I. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1986) 135, 2, 688-694; De Clercq, E. et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1989) 33, 8, 1291-1297; 美國專利申請 4,968,690; 歐洲專利申請 0 510 260)。此種效應業經歸因於對酵素-腺苷基同半胱氨酸合成酶(S-adenosylhomocysteine synthase)之抑制作用，以及對宿主體內干擾素產生之增強作用(Glaser et al., 1986, 前文; Bray, M. et al., *Antiviral Research* (2002) 55, 1, 151-159)。先前曾經報導過個別的化合物在抗病毒上有效的濃度之下，對正常宿主細胞係無毒性者(De Clercq, E., *Clinical Microbiology Reviews* (2001) 14, 2, 382-397)。

綜上所述，本發明方法包括如上面所定義的化合物之用途，包括在醫藥品的製造中之用途；於一方面中，本發明也關於如上文所定義的化合物對於誘導腫瘤細胞凋亡及/或用以調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性上之用途；於此方面中，本發明也關於一種如上文所定義的化合物在誘導腫瘤細胞凋亡及/或用以調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性上之用途；要瞭解者前述和後面的解釋同樣適用於一個別的用途和該(等)應用所用的化合物。

於某些具體實例中，根據本發明的方法為一種外遺傳性治療法；該個別的方法可例如包括組織蛋白甲基化(一種在真核生物染色質中的重要外遺傳性改質，諸如組織蛋白 3 的離胺酸 27 之甲基化)之抑制作用；作為示範例子者，根據本發明的方法可包括在個別的腫瘤細胞，幹細胞或祖細胞耗盡掉多梳型抑制複合體；多梳型抑制複合體(PRC)蛋白質係已知分成兩種主要的分開的複合體(請參閱例如，Cao and Zhang, 2004)：第一種複合體，包括果蠅(*Drosophila*) esc 和 E(z)基因的同系物(同系物)，具有組織蛋白脫乙酰基酶活性；第二種 PcG 複合體(在果蠅中為 dPRC-1，在小鼠中為 mPRC1 和在人體中為 hPRC-H)包含果蠅 Pc、Psc、Ph、RING 和 Scm 基因的同系物，且可經由干擾 SWI/Snf (“切換/蔗糖非發酵性”(switch/sucrose nonfermenting)) 染色質重塑機器(remodelling machinery)、阻斷轉錄起始，以及額外緘默化活性的補充，而調控標的基因之緘默化。

本發明方法可例如包括將可歸類於上述第一複合體之下的多梳型抑制複合體耗盡；此等複合體的例子包括多梳型抑制複合體 2、多梳型抑制複合體 3 和多梳型抑制複合體 4；作為示範例子者：多梳型抑制複合體 2 的成分包括例如 EZH2，SUZ12，EED 和 RbAp48；作為其它示範性例子者：多梳型抑制複合體 3 的成分包括 EZH2、SUZ12、RbAp46/48 和 EED 的兩種較低分子量同功異形體(isoform)(Kuzmichev, A. et al., *Molecular Cell* (2004) 14, 2, 183-193)；作為又另一示範性例子者：多梳型抑制複合體 4 的成分包括，與其他一起者，EZH2 和 SIRT1 (Kuzmichev, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2005) 102, 6, 1859-1864)。

所選多梳型抑制複合體的任何成分都可在本發明方法中耗盡；熟諳此技藝者都知曉下述事實：一多梳型抑制複合體的成分之蛋白質含量部份決

定於該複合體所含的其他成分(請參閱圖 3E, 也請參閱例如 Pasini, D. et al., *EMBO Journal* (2004), 23, 4061-4071)。耗盡多梳型抑制複合體的一成分因而典型地也減低該個別的多梳型抑制複合體所含其他成分之含量；作為示範例子者：可將 SUZ12, EZH2 或 EED 的含量耗盡。

兩種上面所述主要多梳型-壓制性複合體都業經發現共同佔有胚胎幹細胞中一大基因組合的啟動子區(Boyer, L.A. et al., *Nature* (2006) 441, 349-353), 大部份的標的基因都是在多種發育程序中具有重要作用的轉錄因子；有多種此等轉錄因子在發育中擁有必要作用，諸如含同源結構域(homeodomain)-因子，其決定胚胎發育過程中的細胞命運。

多梳組基因也經進一步知悉為一組涉及在控制發育的表現樣式之維持(包括緘默化)之中的調節性蛋白質；多梳型群組(PcG)複合體係經由變更染色質結構且藉此變更 DNA 對需要基因轉錄的因子之可接近性(accessibility)而促成基因的長期緘默化(有關其總評請參閱 Sparmann, A., & van Lohuizen, M., *Nature Reviews Cancer* (2006) 6, 846-856)。多梳型群組(PcG)複合體係透過外遺傳性改質，諸如組織蛋白尾端的脫乙酰基化，以及經由抑制 ATP 依賴性染色質重塑而發生作用(Levine, S. S. et al., *Trends Biochem Sci* (2004) 29, 478-85; Lund, A.H., and van Lohuizen, M., *Curr Opin Cell Biol* (2004) 16, 239-46)；舉例而言，多梳型抑制複合體 2 (PRC2)為一種已知牽涉在外遺傳性緘默化的起始之中的蛋白質複合體，PRC2 常在人類癌症中過度表現(overexpressed)且因而被認為是一種癌症外遺傳性治療法的有希望之標的；多梳型群組蛋白質從果蠅到人類具有高度保守性(conserved)，且形成多種多梳型抑制複合體；多梳型抑制複合體的成分包含內在的組織蛋白甲基轉移酶(HMTase)活性且透過核心組織蛋白的甲基化來維持基因緘默化(Muller, J.

et al. *Cell* (2002) 111, 197-208 ; Cao, R. et al. *Science* (2002) 298, 1039-1043 ; Milne, T.A. et al. *Mol Cell* (2002) 10, 1107-17 ; Nakamura, T. et al., *Mol Cell* (2002) 10, 1119-1128 ; Beisel, C., et al. *Nature* (2002) 419, 857-62)。

於諸 PcG 蛋白質之中，多梳型抑制複合體 2 業經在先前關聯到幹細胞自我更新和癌症(Lee, T. I. et al., *Cell* (2006) 125, 301-313 ; Holden, C. *Science* (2006) 312, 349 ; Kamminga, L. M. et al. *Blood* (2006) 107, 2170-2179)。於失去 p16^{INK4A} 活性(腫瘤生成中的一早期事件)的人類乳房上皮細胞中，業經觀察到例如多梳型抑制複合體 2 的兩種成分之向上調節(up-regulation)(Reynolds, PA et al., *J Biol Chem* (2006) 281, 34, 24790-24802)。多梳型抑制複合體 2 包含三個核心成分：EZH2 (人類 Zeste 同系物(Zeste homolog)的增強子(enhancer))、SUZ12 (zeste 12 同系物的抑制子(suppressor))和 EED (胚胎外胚層發育(ectoderm development))；請參閱例如 Levine et al., 2004，前文)。EZH2 為具有組織蛋白甲基轉移酶活性的 PRC2 之活性成分(例如 Viré, E. et al., *Nature* (2006) 439, 16, 871-874)，且 SUZ12 和 EED 為在體細胞和幹細胞兩者之中的此種活性所需者(Schoeftner, S. et al., *EMBO Journal* (2006) 25, 3110-3122)。EZH2 會催化組織蛋白 H3 離胺酸-27 (H3-K27)的甲基化，且此酵素活性為 PRC2-媒介基因緘默化所需者(Muller, J. et al. *Cell* (2002) 111, 197-208 ; Cao, R. et al., *Science* (2002) 298, 1039-43 ; Milne, T. A. et al., *Molecular Cell* (2002) 10, 1107-17 ; Beisel, C. et al., *Nature* (2002) 419, 857-62 ; Chen, H. et al., *J. Biol. Chem* (2005) 280, 23, 22437-22444)。業經推測可維持基因緘默化的多梳型抑制複合體 1 能夠辨識離胺酸-27 經甲基化的組織蛋白 H3。

於果蠅(*Drosophila*)中，多梳型群組蛋白質係透過部位-特異性 DNA-結

合性蛋白質的交互作用而被招引到目標部位；於哺乳動物體內招引到標的基因之正確機制到目前為止尚未知悉；不過，已經知道組織蛋白甲基化會變更核體(nucleosome)(染色質的基本重複單位)所具性質，影響其與其他蛋白質的交互作用，其結果，使轉錄受到壓制；更進一步者，組織蛋白甲基化被認為係與 DNA 甲基化在染色質緘默化中協同地作用，與外遺傳性緘默化相關的另一種機制。

已經有跡象表明在組織蛋白甲基化與 DNA 甲基化之間的直接聯繫；舉例而言，組織蛋白 H3 經甲基化的離胺酸-27 係用為招引其他蛋白質的錨定點(anchorage point)；更進一步者，EZH2 會結合到 DNA 甲基轉移酶且與此等酵素一起結合到其標的基因的啟動子(Viré et al., 2006, 前文)，因而引起標的基因的啟動子之甲基化及隨後的此等基因之緘默化。綜上所述，EZH2 和 SUZ12 的上調業經發現與 DNA 甲基轉移酶的增濃，許多基因座的 DNA 甲基化及組織蛋白 H3 的離胺酸-27 之甲基化同時發生(Reynolds et al., 2006, 前文)。在 EZH2 耗盡之後，但不在 EZH2 和 DNA 甲基轉移酶結合到啟動子之時，會發生 RNA 聚合酶對啟動子的結合(Viré, et al., 2006, 前文)。

人類 EZH2 及其所相關聯的 H3-離胺酸-27 甲基轉移酶活性，業經關聯到癌症且經發現會在晚期前列腺癌症和乳癌中過度表現(Saramäki, O.R. et al., *Genes, Chromosomes & Cancer* (2006) 45, 639-645)，EZH2 的表現水平和蛋白質含量也經發現例如在轉移型激素頑抗性前列腺癌中，比在原發性未經處理的腫瘤中者較為高。除了 EZH2 之外，SUZ12 (PRC2 複合體的另一種成分)也經發現會在數種人類腫瘤，包括結腸、乳房和肝的腫瘤中向上調節(Kirmizis, A. et al., *Molecular Cancer Therapeutics* (2003) 2, 113-121；Kirmizis, A. et al., *Genes & Development* (2004) 18, 1592-1605)。

雖然 DNA 甲基化，就其本身而論，為體細胞存活所必需者，不過其在將胚胎幹細胞維持在未分化狀態上並沒有起必要作用；不過，在胚胎幹細胞中由 PRC1 和 PRC2 所佔據的基因同樣地經報導富含著組織蛋白 H3 的甲基化離胺酸-27 (Boyer et al., 2006, 前文)。更進一步者，此組織蛋白的甲基化離胺酸也與接近個別基因之轉錄起始部位的探器有關。Boyer 等人的數據可推測出在胚胎幹細胞中，多梳型群組蛋白質的結合會直接緘默化基因，且此等基因的活化與分化和多能性的喪失有關。

多梳型抑制複合體 2 的成分 EED，更進一步地，知悉可經由其對雌性哺乳動物中早期小鼠胚胎細胞和滋養層幹細胞(trophoblast stem)和祖細胞的非活性 X-染色體之增濃作用而助成未分化細胞的緘默化。於 EED 不存在之環境中，分化會誘導父本 X-染色體(paternal X-chromosome)的再活化(Kalantry, S. et al., *Nature Cell Biol.* (2006) 8, 2, 195-202)。EED 也經發現為在非活性 X-染色體上形成 PRC2 複合體以及在未分化細胞與滋養層幹細胞中的組織蛋白 H3 所含離胺酸-27 之甲基化所需者(出處同上，及 Schoeftner 等人(2006)，前文)。對於兩種蛋白質 Ezh2 和 Suz12，此等蛋白質的失去業經發現會導致細胞增生於內部細胞質量上之顯著損失及早期胚胎致死現象。

轉錄因子 Oct4 和 Nanog 兩者皆經鑑定為對細胞的分化狀態之一般性控制，以及對多能力性細胞的正常發育及/或在調制多能力性細胞狀態之中都具有重要性(例如：Nichols, J. et al. (1998) *Cell* 95, 379-391；Mitsui et al (2003) *Cell* 113, 631-642)，也都知悉與胚胎幹細胞中的組織蛋白 3 所含離胺酸-27 之低甲基化水平有關聯(Boyer et al., 2006, 前文)。PRC2 複合體蛋白質 SUZ12 經進一步證實為可調節許多種也會被 Oct4 所調節之基因(Squazzo, S.L. et al., *Genome Research* (2006) 16, 890-900)。經由 siRNA 將 Oct4 基因剔除，進一

步導致 SUZ12 從許多標的啟動子失去(出處同上)。此外，也有報導在人類胚胎細胞中，於有關聯於多能性因子 Oct4、Sox2 和 Nanog 的基因，與經鑑定為 PcG 標的基因之間有顯著相關聯性(Boyer et al., 2006, 前文, 增補)。45 個標的基因經發現被 Oct4、Sox2、Nanog 和 PcG 蛋白質所共同佔據(出處同上);此等發現闡明了 prc2 蛋白質整合到細胞分化的調節作用,以及 prc2 蛋白質整合到幹細胞多能力性狀態的維持作用此兩種現象。

根據本發明方法將多梳型抑制複合體 2、多梳型抑制複合體 3 或多梳型抑制複合體 4 的成分耗盡,可進一步導致組織蛋白 3 所含離胺酸 27 (H3-K27;請參閱圖 1A)的脫甲基化;此等多梳型抑制複合體皆已知可在活體內(in vivo)將組織蛋白 H3 所含離胺酸 27 三甲基化,及在試管內(in vitro)將組織蛋白 H1 所含離胺酸 26 三甲基化;根據本發明的方法之某些具體實例中,因而可以測定出組織蛋白 3 所含離胺酸 27 的甲基化狀態;此可為例如確定多梳型抑制複合體的耗盡所需者。

於需要的情況下,可進行對照測量,包括以其他的已知手段耗盡多梳型抑制複合體的成分,例如利用核酸分子。個別的核酸分子可為例如非編碼的核酸分子,諸如適合體(aptamer)或 Spiegelmer[®](載於 WO 01/92655 中)。非編碼的核酸分子也可為 nc-RNA 分子(請參閱例如 Costa, FF, *Gene* [2005], 357, 83-94 有關天然 nc-RNA 分子的介紹)。nc-RNA 分子的例子包括,但是不限定於,反義 RNA 分子、L-RNA Spiegelmer[®]、經緘默化的 r-RNA 分子(諸如雙股型神經元限制性緘默化元素(Neuron Restrictive Silencer Element))、微 RNA (micro RNA (miRNA))分子、短的髮夾 RNA (shRNA)分子、小型干擾性 RNA (si-RNA)分子或重複締合(repeat-associated)小型干擾性 RNA (rasiRNA)分子。

小型干擾性 RNAs、短髮夾 RNA 和微 RNA 的使用已經變成“降低表現”(“knock down”)特定性基因所用工具；其係利用透過 RNA 干擾(RNAi)的基因緘默化或基因抑制(gene suppression)，係發生於後轉錄階段(posttranscriptional level)且涉及 mRNA 降解(mRNA degradation)。RNA 干擾代表一種保護基因組的細胞機制；SiRNA 和 miRNA 分子係經由將 siRNA 與多種酵素複合體締合形成所謂的 RNA-誘導緘默化複合體(RISC)而媒介彼等的互補 RNA 之降解。siRNA 或 miRNA 變成 RISC 的一部份且經目標導引到互補 RNA 物種，然後將其切分(cleaved)，將 siRNAs 完全地鹼配對到對應的互補股，而 miRNA 雙鏈體則經不完全配對，RISC 的活化導致個別基因的表現之減損(有關簡短的總評可參閱 Zamore, PD, Haley, B *Science* (2005) 309, 1519-1524)。業經觀察到者，最強的緘默化係發生於不會形成二級結構的序列(Patzel, V. et al. *Nature Biotech.* (2005) 23, 1440-1444)。熟諳此技藝者因而典型地避免使用例如已知會形成環圈(loop)的序列。此可經由用所選鹼與仍可與標的序列形成擺動配對(wobble pairing)的鹼交換而完成(Patzel, V. et al., 前文)。siRNA/miRNA 技術業經例如應用來緘默化寄生(parasitic) DNA 序列，諸如 HIV RNA 的切分，如在美國專利申請 2005/0191618 中所揭示者。

個別的 siRNA/shRNA/miRNA 分子可直接合成或在標的細胞內表現(包括做為微生物或動物的一部份之細胞)，例如利用載體(vector)在可誘導性或組成性(constitutive)啟動子的控制之下表現；此外，也可以將其導引到個別細胞之內及/或遞送到個別細胞；於活體內將 siRNA、shRNA 或 miRNA 分子遞送到所選細胞內之一個示範性例子為，將其非共價結合到含重鏈抗體片段(F_{ab})和核酸結合性蛋白質(魚精蛋白(protamin))的融合蛋白質(Song, E.

et al., *Nature Biotech.* (2005) 23, 6, 709-717)。在活體內將 siRNA 分子遞送到所選細胞內的另一示範性例子為將其包囊(encapsulation)到微脂粒(liposome)之內(Morrissey et al. *Nature Biotech.* (2005) 23, 8, 1002-1007)。例如，使用穩定的核酸-脂質-粒子，塗覆著聚乙二醇-脂質綴合物(conjugate)，以形成供靜脈內投藥所用的微脂粒。於需要應用奈米粒子來遞送 siRNA 或 miRNA 之情況中，彼等的細胞-特異性目標導引之適當作法業經 Weissleder 等人所說明過(*Nature Biotech.* (2005) 23, 11, 1418-1423)。將 siRNA、shRNA 或 miRNA 分子遞送到所選標的細胞的又另一例子為，使用生物媒劑(biological vehicle)諸如包括個別的核酸分子之細菌或病毒。Xiang 等人(*Nature Biotech.* (2006), 24, 6, 697-702)業已使用此種作法例如經由投予細菌大腸桿菌(*E. coli*)，其可從質體轉錄，與其他一起者，shRNA 和 invasin 兩者，如此促成其進入哺乳動物細胞之內且隨後在其內將基因緘默化。

圖 3I 和圖 3J 繪示出 siRNA 分子的一個示範例子。

於根據本發明的方法之某些具體實例中，耗盡多梳型抑制複合體會引起在該多梳型抑制複合體與腫瘤抑制基因之間的複合體之釋出；於某些此等具體實例中，腫瘤抑制基因會被再活化藉而造成該個別細胞之凋亡。本案發明人發現 FBX032 為一個別的腫瘤基因之例子(請參閱例如圖 6B 和 6D-6H)。FBX032 編碼泛素連接酶(ubiquitin ligase) (名稱相同)，其係已知會目標導引特定蛋白質而在蛋白酶體(proteasome)上進行蛋白分解(proteolysis)。FBX032 到目前為止業經認為對於肌肉發育係一種重要的基因；FBX032 的例子包括，但是不限定於，有 UniProtKB/Swiss-Prot 登錄號碼 Q969P5 的包含 355 個胺基酸之人類蛋白質、有 UniProtKB/Swiss-Prot 登錄號碼 Q9CPU7 的包含 355 胺基酸之小鼠蛋白質，或有

UniProtKB/Swiss-Prot 登錄號碼 Q91Z62 的包含 350 胺基酸之大鼠蛋白質。個別的基因的一個示範例子為可轉錄具有 EMBL 核苷酸序列資料庫登錄號碼 BC024030，以及 EMBL 登錄號碼 BC120963 和 BC120964 的序列之 mRNA 的人類基因。舉另一例而言，豬 FBX032 基因也已經基因定位且定序過(Yu, J. et al. *Animal Genetics* (2005) 36, 5, 451-452)。

熟諳此技藝者都了解本發明方法可優先地誘導癌細胞凋亡(請參閱例如圖 3a)。在腫瘤細胞中，典型地可觀察到時間-相關性細胞死亡回應；個別的腫瘤細胞可經，例如培養。其可為例如一細胞系的一細胞，諸如 MCF-7、MB-468、SK-Br-3、T47D、HCT116、RKO 或 SW480。於某些具體實例中，一個別的腫瘤細胞可得自哺乳動物；於其他具體實例中，一個別的腫瘤細胞可包括在哺乳動物體內；腫瘤細胞可屬任何類型的腫瘤，諸如乳癌細胞。

於合宜的情況中，可監測腫瘤細胞中的凋亡進展，例如以碘化丙錠染色(propidium iodide staining)或流式細胞分析法(請參閱圖 3A)，粒線體功能障礙(mitochondrial dysfunction) (JC-1 染色)或凋亡蛋白酶 3 活化(請參閱例如圖 3B 和 3D)。如從此等實例可推斷者，本發明方法通常可觸發凋亡性細胞死亡回應，其中涉及粒線體崩潰和凋亡蛋白酶活化。此等實例也證實非癌細胞，諸如 MCF10 細胞和正常初級結腸上皮 CC33D 細胞，只顯示若有任何者之時，也是微小的細胞死亡回應(也請參閱圖 3D)。除了測定個別細胞中的凋亡之外，於某些具體實例中，根據本發明的方法可包括測定個別細胞的細胞存活力。個別的方法都是技藝中已經良好地建立者。

於某些具體實例中，根據本發明的方法包括令個別細胞接觸預定量的通式(I)化合物(參閱上文)，諸如腫瘤細胞、幹細胞或祖細胞；於某些具體實例中，係使用至少兩種不同預定量的通式(I)化合物；於某些此等具體實例

中，使用至少一第一種和一第二種腫瘤細胞；該第一種腫瘤細胞係接觸兩種預定量中的較低量，且該第二種腫瘤細胞係接觸兩種預定量中的較高量；個別具體實例可為例如篩選檢定、胞毒性檢驗或劑量/回應曲線之測定。

於某些具體實例中，該第一種腫瘤細胞和該第二種腫瘤細胞係得自相同的病患。此種方法可為例如一種預測一病患或一動物對一通式(I)化合物的個別回應之方法。單一核苷酸的多型現象(polymorphisms)和基因表現中的個別差異經常會引起諸病患之間對於所投予的化合物的回應之個別差異；舉例而言，FBX032 基因的單一核苷酸多型現象業經偵測出(Yu et al., 2005, 前文)。於某些具體實例中，個別的本發明方法也可為一種鑑定可影響一病患對式(I)化合物的回應之遺傳變異的方法。典型地，作為藥物施用於一動物或一病患的化合物之效應係由許多種蛋白質所決定，使得在偶合著非遺傳因子的多重基因中之複合遺傳多態性可決定對一化合物的回應。一種個別的本發明方法因而可為一種測定一病患的基因型(genotype)之方法，例如用以確定於最低不良作用下的最大效力。

如上面指示出者，一種本發明方法為一種用於調制細胞內的基因表現之方法；該方法包括投予個別細胞通式(I)化合物(參閱上文)。任何細胞都可用於本發明方法中。作為示範例子者，可以使用幹/祖細胞，包括胚胎幹細胞或初發胚胎細胞(primordial germ cell)。也可能需要用到非-癌細胞，以避免使本發明方法顯示出因其對內源性細胞成分的作用所致之凋亡效應。由於式(I)化合物對癌細胞而不對正常組織的選擇性作用(請參閱下文和例如圖 3F)所致，本發明方法於另一方面特別適合用於正常細胞。

可表現多梳型抑制複合體的諸成分之任何細胞都可以使用；於某些具體實例中，該細胞包括一內源性具功能活性的多梳型抑制複合體；於某些

此等具體實例中，該個別的細胞為幹細胞或祖細胞。可用於本發明方法中的幹細胞之例子包括，但是不限定於，胚胎幹細胞、滋養層幹細胞和胚胎外幹細胞。於本發明方法的某些具體實例中，因而可以使用胚胎幹細胞，諸如人類來源的胚胎幹細胞，亦即人類胚胎幹細胞；於其他具體實例中，該細胞為一祖細胞(參閱上文)；於又其他的具體實例中，該細胞為癌細胞(參閱上文)；於其他具體實例中，該內源性多梳型抑制複合體係不具功能活性者；於某些此等具體實例中，係選用已確立的真核生物細胞系之任何細胞，諸如例如 HEK、COS、CHO、CRE、MT4、DE (鴨子胚胎)、QF (鵪鶉纖維肉瘤(quail fibrosarcoma))、NS0、BHK、Sf9、PC12 或 High 5；於又其他具體實例中，係利用重組技術導入一或更多個編碼個別的多梳型抑制複合體之成分的外源性基因，例如利用攜載該個別的基因之載體。

所選的細胞更進一步包括一個別的多梳型抑制複合體之標的基因，或至少其啟動子；個別的標的基因之一示範例子為 FBX032 基因；於某些具體實例中，所選的標的基因(或其功能性片段)係經內源地表現者，其量為足供本發明方法的實行所用者；於其他具體實例中，所選的轉錄因子大部份或整個地不存在於該細胞的蛋白質組(proteome)之中；於任一情況中，該個別的標的基因，或其功能性片段，可經由利用一或更多種包括編碼所欲標的基因的基因之重組載體而導引到該細胞之內。典型地，但非必定者，個別的基因係在活性啟動子或可方便地經由外部刺激予以活化的啟動子之控制之下。

在需要在目標細胞中包括入一個別的標的基因或完全的標的基因之啟動子的其他複本(copies)(亦即除了個別細胞的內源性基因之外)之情況中，此可同樣地利用重組載體予以達成(例如，Kawataba, K et al., 前文)。也可以有

利地將包含個別的啟動子之載體導引到細胞內用以幫助啟動子(不論是內源性或外源性來源者)的活化；此外，也可能需要排空一標的基因的啟動子以表現一外源性基因，例如用以得到一蛋白質；於此情況中，典型地，要選用包含在標的基因的啟動子之控制下的所欲外源性基因之載體。為此目的，可將任何所欲基因的序列包括在一個別的載體之內。熟諳此技藝者都知曉，在也需要在本發明方法所用細胞內進行後轉譯改質一經個別地轉錄之蛋白質的情況中，可能需要共表現額外的酵素。

● 可用於本發明方法中在標的基因的啟動子的控制之下的外源性基因之例子包括，但是不限定於，報導基因(reporter gene)、抗藥性基因、凋亡基因(所謂的“死亡(death)”基因)或可在個別細胞內令人滿意地表現的任何其他基因。於某些具體實例中，個別的基因也可編碼一目標蛋白質；於此一情況中，可以使用本發明方法來表現且獲得該個別的蛋白質。於在標的基因的啟動子控制之下的基因為一凋亡基因之情況中，可以使用本發明方法來例如從一組織消去多能力性細胞。

● 本文所述的化合物，或其藥學上可接受的鹽，可就其本身來使用，或用於一醫藥組成物之中，於此可將其混合其他的活性成分，如在組合式治療法中者，或混合適當的載劑或稀釋劑。於此方面，本發明也關於一種醫藥組成物，其係用以誘導腫瘤細胞凋亡及/或用以調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性。

個別的醫藥組成物可包括例如胞毒性劑諸如 Taxol[®]、酪胺酸激酶(tyrosine kinase)抑制劑諸如吉菲特尼(Gefitinib)(Iressa[®])或 Gleevec[®]、(重組)生長因子諸如間白素-11 或干擾素- α -2b 和間白素-2、胸苷酸合成酶抑制劑(thymidylate synthase inhinator)，諸如 Raltitrexed[®]，或單株抗體諸如利妥昔

單抗(Rituximab)(MabThera[®])或西妥昔單抗(Cetuximab)(Erbix[®])。如上文所述的化合物可以例如與外遺傳性治療法中所使用的化合物組合施用(有關其總評請參閱例如 Peedicayil, J., *Indian J Med Res* (2006) 123, 17-24), 且一個別的醫藥組成物可以包括此等化合物。作為示範例子者, 根據本發明的醫藥組成物可以包括 DNA 甲基轉移酶抑制劑、DNA 脫甲基化劑, 及/或組織蛋白-脫乙酰基酶抑制劑。

DNA 甲基轉移酶抑制劑的例子包括, 但是不限定於, 5-氮雜胞苷、地西他濱(decitabine)(5-氮雜-2'-脫氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine))、5-氟-2'-脫氧胞苷(5-fluoro-2'-deoxycytidine)、5,6-二氫-5-氮雜胞苷和 zebularine (1-(β -d-呋喃核糖基)-1,2-二氫嘓啶-2-酮 (1-(β -d-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one)。DNA 脫甲基化劑的例子包括, 但是不限定於, 肼苯達嗪(hydralazine)、普魯卡因醯胺(procainamide)、普魯卡因(procaine)、(-)-表兒茶酸-3-棓酸鹽((-)-epigallocatechin-3-gallate)(EGCG)、psammaplin A、低聚脫氧核苷酸 MB98 以及 2-(1,3-二酮基-1,3-二氫-2H-異吲哚-2-基)-3-(1H-吲哚-3-基)丙酸 (2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)-3-(1H-indol-3-yl)propionic acid) (MG98)。組織蛋白-脫乙酰基酶抑制劑的例子包括, 但是不限定於, 丁酸鹽、苯基丁酸鹽、丙基戊酸(valproic acid)、間-羧基肉桂酸雙羥肟酸(m-carboxycinnamic acid bishydroxyamic acid)(CBHA)、oxamflatin、PDX-101、MS-275、酯肽(depsipeptide)、pyroxamide、scriptaid、辛二醯替苯胺羥肟酸(suberoylanilide hydroxyamic acid)(SAHA)、曲古抑菌素(TSA)、NVP-LAQ824、LBH589、apicidin、CHAP、trapoxin、N-乙酰基地那林(N-acetyldinaline)以及 MS-275。

包含本發明化合物的醫藥組成物可以使用本身為已知的方式予以製

造，例如，利用習用的混合、溶解、造粒、糖衣藥丸製造、加液研磨(levigating)、乳化、包囊(encapsulating)、截留(entrapping)或冷凍乾燥(lyophilising)等程序。

要根據本發明使用的醫藥組成物因而可以用習用方式使用一或更多種生理學上可接受的載劑予以調配，該載劑包含賦形劑和輔助劑以幫助將活性化合物處理成藥學上可以使用的製劑；恰當的調配物係取決於所選的投藥途徑。

個別的化合物或醫藥組成物的範例投藥途徑包括經口、透皮和非經腸(parenteral)遞送。適當的投藥途徑可包括，例如，藥物載體(depot)，經口、經直腸、透黏膜或經腸投藥；非經腸遞送，包括肌肉內注射、皮下注射、靜脈內注射、髓內注射以及鞘內注射(intrathecal)、直接腦室內注射、腹腔內注射、鼻內注射或眼球內注射。也可以用局部方式而非系統方式投予該化合物或醫藥組成物，例如，通過將化合物直接注射到固體型腫瘤之內，諸如在藥物載體或持續釋放型調配物內。更進一步者，個別的化合物或醫藥組成物可用於經目標導向的藥物遞送系統中，例如，在塗覆著腫瘤-特異性抗體的微脂粒內；此等微脂粒可經例如目標導向到腫瘤且為腫瘤所選擇性地攝取。

作為示範例子者，用於注射時，根據本發明的化合物或醫藥組成物可經調配在水溶液之內，較佳者在生理可相容的緩衝液之內，諸如 Hanks's 溶液、Ringer's 溶液或生理食鹽水緩衝液。用於透黏膜投藥之時，在調配物中典型地使用對要穿透的障壁為恰當之穿透劑(penetrants)；此等穿透劑通常為技藝中已知者。

用於經口投藥之時，可經由將活性化合物與技藝中熟知的藥學上可接

受之載劑混配而輕易地調配個別的化合物或醫藥組成物；此等載劑可促成將本發明化合物調配成錠劑、丸劑、糖衣錠、膠囊、液體、凝膠、糖漿、漿液、懸浮液和類似者，供要治療的病患經口攝入。

供經口服用的醫藥製劑可經由添加固體賦形劑，視需要研磨所得之混合物，且在需要時，於添加適當的輔助劑之後，處理顆粒混合物，而得到錠劑或糖衣錠核。適當的賦形劑為，特別者，填充劑諸如糖類，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇；纖維素製備物諸如，玉黍蜀澱粉、小麥澱粉、稻米澱粉、馬鈴薯澱粉、明膠、黃耆膠、甲基纖維素、羥基丙基甲基-纖維素、羧甲基纖維素鈉、及/或聚乙烷基吡咯烷酮(PVP)；需要時，可加入崩解劑，諸如經交聯的聚乙烷基吡咯烷酮、瓊脂或海藻酸或其鹽諸如海藻酸鈉。

可以經口使用的醫藥組成物包括，但是不限定於，由明膠製造成的推入配合式膠囊，以及用明膠和增塑劑，諸如甘油或山梨糖醇製成的軟質密封性膠囊；該推入配合式膠囊可包含活性化合物與填充劑諸如乳糖、黏合劑諸如澱粉、及/或潤滑劑諸如滑石或硬脂酸鎂及，視需要者，安定劑等的混合物；於軟質膠囊中，該(等)化合物可經溶解或懸浮於適當的液體之內，諸如脂肪酸、液體石蠟或液體聚乙二醇之中；此外，可添加安定劑。所有用於經口投藥的調配物都應該為具有適合此等投藥所用的劑量。

對於經頰投予，個別的醫藥組成物可採取以習用方式調配成的錠劑或菱形錠(lozenge)之形式。

用於經吸入投藥之時，要根據本發明使用的醫藥組成物可以方便地以氣霧噴劑之形式從加壓包裝件或噴霧器(nebuliser)使用適當的氣霧劑基質(propellant)，例如二氯二氟甲烷、三氯一氟甲烷、二氯二氟乙烷、二氧化碳或其他的適當氣體呈現出而遞送。於壓縮氣霧劑的情況中，可經由加裝一

閥以遞送一經計量的量而決定劑量單位。要用於吸入器(inhaler)或吹入器(insufflator)中的由例如，明膠製成的膠囊和短藥筒(cartridges)可經調配成包含化合物和適當的粉末基質諸如乳糖或澱粉之粉末混合料。

個別的醫藥組成物可經調配成供非經腸投藥所用，例如，經由快速注射(bolus injection)或連續注輸(continuous infusion)。注射用的調配物可呈現為單位劑型，例如，在安瓿(ampules)中或在多劑容器中，其中含有加入的防腐劑；該組成物可採取諸如在油性媒劑或水性媒劑中之下列形式：懸浮液、溶液或乳液，且可包含調配劑諸如懸浮劑、安定劑及/或分散劑。

供非經腸投藥所用的醫藥調配物包括呈水可溶形式的活性化合物之水溶液；此外，活性化合物的懸浮液可視恰當地經製備成油性注射懸浮液。適當的親水性溶劑或媒劑包括脂肪酸諸如芝麻油(sesame oil)或合成脂肪酸酯類，諸如油酸乙酯、甘油三酸酯類或微脂粒。水性注射懸浮液可包含可增加懸浮液所具黏度之物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇或葡聚糖(dextran)。視需要懸浮液也可包含適當的安定劑或可增加化合物的溶解度以促成高度濃縮的溶液的製備之藥劑。

於某些具體實例中，活性成分，諸如上文所述的化合物，可為粉末形式，供在使用之前，以適當的媒劑例如無菌無熱原(sterile pyrogen-free)水予以調製。

個別的醫藥組成物也可經調配成經直腸組成物諸如栓藥(suppositories)或留置灌腸劑(retention enemas)，例如，包含習用的栓藥基質諸如可可豆脂或其他甘油脂肪酸酯者。

除了前文中所敘述的調配物之外，該化合物也可經調配成藥物載體製備物；此種長期作用性調配物可經植入(諸如皮下植入或肌肉內植入)或經由

肌肉內注射來投藥；如此，該化合物可經使用適當的聚合物型材料或疏水性材料(例如調配成為在可接受的油中之乳液之形式)或離子交換樹脂(ion exchange resins)予以調配，或調配成微溶性衍生物之形式，例如，成為微溶性鹽形式。

為了使本發明可被輕易地了解且付諸實際效用，至此要用下列非限制性實施例說明其特別的具體實例。

【實施方式】

實施例

細胞和藥物處理

此等實施例中所用的細胞都是購自”美國培養物菌種收集中心”(the American Type Culture Collection) (Manassas, VA)。細胞都經維持在增補 10 % 胎牛血清、穀胺醯胺、青黴素、和鏈黴素的 DMEM 之中。用於藥物處理之時，在藥物處理之前一天，接種細胞。細胞係用 5 μ M 3-去氮奈普蘭諾辛 A 或 2 μ M 5-氮雜-2'-脫氧胞苷 (5-AzaC; Sigma) 處理 72 小時且用 100 nM 曲古抑菌素 A (TSA; Sigma) 處理 24 小時。在用 5-AzaC 和 TSA 共同處理細胞之時，係添加 5-Aza 48 小時且接著添加 TSA 24 小時。

siRNA

特異性 siRNA 低聚核苷酸目標導引性 EZH2、SUZ12 和 EED mRNAs 都是先前敘述過者(Cao, R. and Zhang, Y., *Mol Cell* (2004) 15, 57-67; Bracken, A. P. et al, *EMBO J.* (2006) 22, 5323-35)。Bracken 等人使用兩種低聚核苷酸以產生可目標導引 SUZ12 的莖-環 RNA (stem-loop RNA)，彼等低聚核苷酸為：5'-GATCCCCGTCGCAACGGACCAGTTAATTCAAGAGATTAAGTGTCCGTTGCGACTTTTTGGAAA-3' (SEQ ID NO: 1)和 5'-TCGATTTC

AAAAAGTCGCAACGGACCAGTTGATCTCTTGAATTAAGTGGTCCGTTG
CGACGGG-3' (SEQ ID NO: 2)。Cao and Zhang 對 EZH2 使用低聚核苷酸
5'-AAGACTCTGAA TGCAGTTGCT-3' (SEQ ID NO: 3)，且對 EED 使用低
聚核苷酸 5'-AAGCACTATGTTGGCCATGGA-3' (SEQ ID NO: 4)。所選 PRC2
標的基因物和非目標導向對照物之 Smartpool siRNA 雙鏈體係購自
Dharmacon (Lafayette, CO)。得自 Sigma-Proligo 的 FBXO32 siRNA 係目標導
向到下述序列: 5'-GTCACATCCTTTCCTGGAA-3' (SEQ ID NO: 5)。細胞係
以 50 nM 最後濃度的 siRNA 雙鏈體使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)採
用製造商的指示予以轉殖。

西方點漬分析

先將細胞沉丸置於 RadioImmuno Precipitation Assay (RIPA) 緩衝液中
溶裂，該緩衝液包括含有 25 mM Tris-HCl pH 7.6、150 mM NaCl、1%
Nonidet-P 40 (NP-40)、1% 脫氧膽酸鈉(sodium deoxycholate)和 0.1 %十二烷
基硫酸鈉(SDS)之水溶液，然後使用一組織勻化器進一步超音波處理以釋放
出所有的蛋白質；在 SDS-聚丙烯醯胺凝膠上分離出等量的蛋白質且轉移到
聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。使用針對: EED (07-368)、SUZ12 (07-379)、
SUV39H1 (07-550)、BMI1 (05-637)、經三甲基化的 H3-K27 (07-449)、經三
甲基化的 H3-K9 (07-442)和乙醯基-組織蛋白 H3 (06-599)，且都是購自
Upstate 之抗體來探測(probed)漬點(blots); EZH2 (AC22)和組織蛋白 H3 (3H1)
都是得自 Cell Signaling。針對 DNA 甲基-轉移酶的抗體 DNMT1 和 DNMT3B
都是購自 Alexis Biochemicals。

流式細胞儀分析

將細胞用胰蛋白酶處理(trypsinised)且用 PBS 洗滌並固定在 70 %乙醇

中，然後予以處理供進行碘化丙錠染色和 FACS 分析所用。對於凋亡蛋白酶 3 活性檢定和粒線體膜電位偵測，係用抗-活性凋亡蛋白酶 3 和 JC-1，分別地，根據製造商的指示(BD Bioscience)將細胞染色。

微陣列分析和訂量式實時 PCR

使用 Trizol (Invitrogen)從細胞系分離出總 RNA 且使用 RNA Amplification 套組(Ambion)轉化成 cDNA。使用 Illumina Gene Expression BeadChip (Illumina)實施微陣列雜交(microarray hybridisation) 且使用得自 Agilent Technologies 的 GeneSpring 軟體實施數據分析。正常樣品和原發性乳房腫瘤的基因表現係使用 Affymetrix U133A GeneChips (Affymetrix, Santa Clara, CA) 採用製造商的指示實施。將得自個別陣列的基因表現數據經由中位數對心(median centering) 予以標準化且使用 Cluster and Treeview 軟體 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>)完成平均值環繞階層式分群(average linkage hierarchical clustering)。定量式實時 PCR 係在 PRISM 7900 定序偵測器(Applied Biosystems)上使用 TaqMan 探器(Applied Biosystems)實施。樣品皆相對於 18S 核糖體 RNA 含量而標準化。

染色質免疫沉澱 (ChIP)

ChIP 檢定法係按照先前所述者實施，MCF-7 細胞經用或不用 3-去氮奈普蘭諾辛(5 μ M)處理 48 小時，將 MCF-7 細胞接種到 6-洞板中達 30 %匯聚率且用或不用 3-去氮奈普蘭諾辛(5 μ M)處理 48 小時；將細胞置於 1x 磷酸鹽-緩衝食鹽水(PBS)中洗滌一次，然後用 1%甲醛在 PBS 中於 37 °C 下處理 10 分鐘，接著添加甘油到 0.125 M 的最後濃度 5 分鐘；之後，將細胞刮到冰上且以 1500 rpm 在 4°C 下離心 5 分鐘，於使用 PBS 洗滌之後，將細胞沈澱再懸浮於 1 毫升冷的溶裂緩衝液中(10 mM HEPES pH 7.5、1 mM EDTA pH

8.0、400 mM NaCl、10 %甘油、0.5 % NP-40、0.5 mM 氟化苯基甲基磺醯基和蛋白酶抑制劑 [1 mM 苯甲脒(benzamidine)、3 毫克/毫升亮肽素(leupeptin)、0.1 毫克/毫升桿菌肽(bacitracin)、1 毫克/毫升巨球蛋白(macroglobulin)]；接著，在一微型離心機內以 11,500 rpm 在 4°C 下離心 5 分鐘以移除未經交聯到染色質之蛋白質；然後將所得之沈澱再度懸浮於 1 毫升冷的溶裂緩衝液中，且用 Heat Systems-Ultrasonics, Inc. 的 W-220 超音波處理器，在 20 %輸出率處理總計 2 分鐘之時間(脈衝: 30 秒開/30 秒關)；將所得之溶液在一微型離心機內以最大速度在 4°C 下離心 10 分鐘予以澄清；於此點，採取 5 %該溶液且貯存於-20°C 以用為輸入染色質樣品；使用 80 微升的 50%蛋白質 A/G Sepharose 珠粒(Pharmacia)漿液將該染色質溶液預澄清 2-4 小時。

將得自 2×10^7 MCF7 細胞的經預澄清過之染色質，使用經剪切處理過的鮭魚精子 DNA (0.3 毫克/毫升)和 BSA (1 毫克/毫升) 在 4°C 下預封阻整個晚上予以免疫沉澱，且接著與 5 微克抗-SUZ12 抗體(07-379, Upstate)，5 微克抗-RNA 聚合酶 II (sc-899, Santa Cruz)和 5 微克非特異性 IgG (sc-2027, Santa Cruz)溫置；免疫沉澱係在 4°C 下實施整個晚上，免疫複合體係經由添加 75 微升溶析緩衝液(50 mM Tris pH 8.0、1 % SDS、10 mM EDTA pH 8.0)且在 65 °C 加熱 10 分鐘而從該等珠粒溶析出來；溶析係經實施兩次且將溶析液合併；然後，經由將溶析液與 5 %在溶析緩衝液中稀釋(1:4)過之經交聯的完整-細胞萃取樣品一起放置於 65°C 整個晚上，以逆反交聯而產生輸入染色質樣品；之後，使用 Qiagen QIAquick PCR 純化該 DNA，且使用 the Expand High Fidelity PCR 系統(Roche Biochemicals)實施 PCR；最後引子濃度為 0.5 μ M；於每一反應中，使用約 1 %的該輸入染色質樣品和 10 %的 ChIP

樣品作為模板；首先將反應混合物在 94 °C 熔化 5 分鐘，接著為 27 週期的 94 °C/30 秒鐘、56 °C/1 分鐘、72 °C/1 分鐘，及最後 72 °C 7 分鐘的延展反應；染色體擴大區(Amplicons)都是在 150-300 bp 範圍內；將各樣品在包含溴化乙錠(ethidium bromide)的 3 %瓊脂凝膠上拆分(resolved)。所用引子為具有下列序列者：

TGFBI： 前向 5'-ATGTCACCTTGCCTCCACCCATC-3' (SEQ ID NO: 6) 和
反向 5'-ACCTGCTCTGAGGCCTGAAAG-3' (SEQ ID NO: 7)。

IGFBP3： 前向 5'-TTCA CCCAAGGCTTCGTGCTG-3' (SEQ ID NO: 8)和
反向 5'-TCCGCGGGAGGAGAC TTTCC-3' (SEQ ID NO: 9)。

KRT17： 前向 5'-AACCCATTTCCTCCACAGACAGG-3' (SEQ ID NO: 10)和
反向 5'-AAATCCTCGTGCTGAGTGCCG-3' (SEQ ID NO: 11)。

FBXO32： 前向 5'-GCAGGTGGGCATTGTGGAGC-3' (SEQ ID NO: 12)和
反向 5'-TGATGTACCCAGGGCCAATGC-3' (SEQ ID NO: 13)。

LAMB3： 前向 5'-GCAG GTGGGCATTGTGGAGC-3' (SEQ ID NO: 14)和
反向 5'-TCCAGATCGCCTGA AAGCTCC-3' (SEQ ID NO: 15)。

ANXA8： 前向 5'-GAATGATGAAAATGGGCTGG GTG-3' (SEQ ID NO: 16)和
反向 5'-GAAATTCTTAGCTCCAGCCTGCG-3' (SEQ ID NO: 17)。

TENS1： 前向 5'-TGGCCTGGGAGCTTTCTTTACC-3' (SEQ ID NO: 18)和
反向 5'-TCTGGGCCAACGTTGCTTTG-3' (SEQ ID NO: 19)。

PLAU： 前向 5'-GGA AGCACCAACAGTTTATGCCC-3' (SEQ ID NO: 20)和
反向 5'-ATCAGAGGGGGA AAG GCAAGG-3' (SEQ ID NO: 22)。

3-去氮奈普蘭諾辛 A (DZNep) 耗盡 PRC2 蛋白質與抑制 H3-K27 的甲基化
如西方點漬分析(圖 1A)所顯示者，使用 5 μ M 3-去氮奈普蘭諾辛處理

HCT116 或 MCF-7 細胞 48 和 72 小時導致 PRC2 成分 SUZ12、EZH2 和 EED 的蛋白質含量之鉅幅減低；據此，組織蛋白 3 在離胺酸 27 (H3-K27)的三甲基化會被 3-去氮奈普蘭諾辛所強烈地減低；相異者，組織蛋白 H3 在離胺酸 9 (H3-K9)的甲基化不受 3-去氮奈普蘭諾辛處理所影響。此結果與 H3-K27 為 PRC2 組織蛋白甲基轉移酶的特異性受質，而 H3-K9 的甲基化時常受到 Suv39h1 甲基轉移酶所媒介之先前發現一致；據此，經發現 Suv39h1 蛋白質含量不受 3-去氮奈普蘭諾辛所影響；此外，3-去氮奈普蘭諾辛處理不會影像組織蛋白乙醯基化且不會造成 DNMT1 或 DNMT3B 蛋白質表現的改變，此係已知會被 DNMT 抑制劑諸如 5-AzaC 和 Zebularine 所耗盡者；不過，每一 PRC2 蛋白質的 mRNA 含量，如以反轉錄-聚合酶鏈型反應(RT-PCR)所測量者，則在 3-去氮奈普蘭諾辛處理之後，保留沒有改變(圖 1B)，可以推測 PRC2 成分的減低係發生在蛋白質層次且不是因彼等的轉錄受到抑制所導致者。

先前業經報導過者 PRC2 蛋白質的穩定性係透過蛋白質解體-媒介機制所調節；因此之故乃檢驗 3-去氮奈普蘭諾辛將 PRC2 蛋白質耗盡是否因蛋白質的降解所導致：使用 3-去氮奈普蘭諾辛在有或無三種個別蛋白質解體抑制劑 MG132、LLNL 和 MG115 之環境下，處理 MCF-7 細胞以檢驗此等處理是否會奪回 3-去氮奈普蘭諾辛-誘導的 PRC2 耗盡。如圖 1C 中所顯示者，用每一種蛋白質解體抑制劑處理可防止 EZH2 和 SUZ12 蛋白質含量對應於 3-去氮奈普蘭諾辛之向下調節(downregulation)；此等結果證實 3-去氮奈普蘭諾辛係透過增加蛋白質降解而耗盡 PRC2 蛋白質。

3-去氮奈普蘭諾辛優先誘導癌細胞中的凋亡

3-去氮奈普蘭諾辛經發現能夠誘導細胞死亡；經觀察到 5 μ M 的 3-去氮

奈普蘭諾辛於 48 小時可誘導 25 % 細胞死亡率且於 72 小時可誘導出 45 % 細胞死亡率，如以碘化丙錠(PI)染色和流式細胞分析法所測定者(圖 3A)；5 μ M 的 3-去氮奈普蘭諾辛也可在多種其他的癌細胞系中誘導出明顯的細胞死亡，包括乳癌 MB-468 細胞，結直腸腺癌 HCT116、RKO 和 SW480 細胞。

為了闡明 3-去氮奈普蘭諾辛誘導細胞死亡所憑藉的機制，乃使用流式細胞分析法分析在 3-去氮奈普蘭諾辛處理之後，MCF-7 和 HCT116 細胞中粒線體膜電位的減損($\Delta\Psi_m$)(圖 3B 及 3C)；3-去氮奈普蘭諾辛誘導出具有較低 $\Delta\Psi_m$ 的細胞之百分比的顯著增加，表明在 3-去氮奈普蘭諾辛處理後此等細胞內的粒線體傷害；在 3-去氮奈普蘭諾辛-處理過的細胞中也可以容易地偵測到凋亡蛋白酶的切分，和聚(ADP-核糖)聚合酶(poly(ADP-ribose) polymerase)(PARP)(圖 3D)；此等結果顯示 3-去氮奈普蘭諾辛可觸發凋亡性細胞死亡回應，其中包含粒線體功能障礙和凋亡蛋白酶活化。

為了判定 3-去氮奈普蘭諾辛是否優先地誘導癌細胞的凋亡，乃針對不同的期間比較在 MCF-7 細胞與非癌性乳房上皮 MCF10 細胞之間的凋亡誘導。雖然 3-去氮奈普蘭諾辛處理可導致 MCF-7 細胞的漸進性且顯著的凋亡，不過在 3-去氮奈普蘭諾辛處理長達 96 小時後於 MCF10 細胞卻沒有誘導出明顯的凋亡(圖 3F)；此外，正常初級結腸上皮 CC33D 細胞，如 MCF10 細胞，相較於結直腸腺癌 HCT116 細胞，也會抗拒 3-去氮奈普蘭諾辛處理，如以顯微術檢驗所評定者(圖 3G 及 3H)；所以，3-去氮奈普蘭諾辛可優先誘導癌細胞的凋亡。

為了判定 3-去氮奈普蘭諾辛-誘導凋亡是否可歸因於 PRC2 蛋白質的耗盡，乃經由用小型干擾性 RNA (siRNA)低聚核苷酸處理 MCF-7 細胞以直接個別地降低表現 PRC2 蛋白質(EZH2、EED 和 SUZ12)且檢驗彼等誘導凋亡

的能力。經 siRNA-處理 MCF-7 細胞的西方點漬分析確定該降低表現的效率(圖 3I)；顯著地，每一種 PRC2 蛋白質的降低表現導致其他兩種成分之向下調節，一種與先前對於 PRC2 成分的蛋白質含量與該複合體的其他成員之存在有關聯的發現相一致之結果；如 PRC2 降低表現所預期的結果者，組織蛋白 H3-K27 三甲基化也顯著地減低，而 H3-K9 的三甲基化則保留為相同。PARP 切分的誘導在此等條件下係明顯者(圖 3I)且用每一種 PRC2 siRNAs 個別地處理過之細胞顯示出實質的凋亡(圖 3J)；因此，3-去氮奈普蘭諾辛-誘導凋亡係，至少部份地，透過其耗盡 PRC2 複合體與抑制相關聯的組織蛋白 H3-K27 甲基化之能力而媒介成者。

乳癌中 PRC2 表現基因之鑑定即彼等被 3-去氮奈普蘭諾辛的再活化

PRC2 具有壓抑其標的基因的表現之功能，因此，以 3-去氮奈普蘭諾辛耗盡 PRC2 經預期會導致彼等的再表現。要定出經 3-去氮奈普蘭諾辛-活化的 PRC2 標的基因，有需要鑑定出被 PRC2 壓抑的推定之標的基因。本實施例係專注於乳癌細胞，係因為 PRC2 成分 EZH2 和 SUZ12 業經報導會在乳房腫瘤中過度表現之故(Kirmizis et al., 2003, 前文；Kirmizis et al., 2004, 前文)。使用 siRNA 來個別地降低表現 MCF-7 細胞中的 PRC2 所含三種核心成分(EZH2、SUZ12 和 EED)；對基因表現的影響係使用 Illumina Gene Expression BeadChip 予以分析，數據分析揭露出在 EZH2、EED 或 SUZ12 siRNA 處理之後，分別有 708、684 和 572 個基因上調 ≥ 2 倍；圖 4A 顯示出在至少兩種 siRNA 條件中上調的 450 個基因與在三種 siRNA 實驗中上調的 95 個基因之重疊($p < 0.0001$ ，對兩種條件重疊與對三種條件重疊)。總而言之，有 1402 個基因的表現係在三種 PRC2 蛋白質中的至少一種耗盡之後增加；為了後續的分析中之包含性，乃將所有 1402 個基因都視為潛在的 PRC2

標的基因。

更進一步者，實施陣列分析以鑑定出被 3-去氮奈普蘭諾辛上調的基因；用 3-去氮奈普蘭諾辛處理 MCF-7 細胞 72 小時導致 750 個基因上調 ≥ 2 倍。為了鑑定出經 3-去氮奈普蘭諾辛-上調的 PRC2 標的基因，乃將 3-去氮奈普蘭諾辛可誘導的 750 個基因與 1402 個候選 PRC2 標的基因相比對，結果鑑定出有 140 個基因($p < 0.0001$ ，圖 4B)重疊；此等重疊基因都是其表現可被 3-去氮奈普蘭諾辛活化的候選 PRC2 標的基因。

因為 3-去氮奈普蘭諾辛可相較於非癌性 MCF10 細胞優先地誘導 MCF-7 之凋亡，所以 PRC2 標的基因可能在癌性細胞與非癌性細胞之間有差別地表現；為了鑑定出會在乳癌細胞中特異地表現之 PRC2 標的基因，乃以基因集群分析比較 140 個推定的 PRC2 標的基因在 MCF-7 細胞與在 MCF10 細胞中的表現型態(expression profile)(圖 4C)；此分析導致從 140 個基因中鑑定出其在 MCF-7 細胞中的表現，相對於在 MCF10 細胞中者較低至少 2 倍之一組 47 個基因；而其餘的推定之 PRC2 標的基因不是在兩細胞類型中以類似的水平表現，就是在 MCF-7 細胞中以甚至更高的水平表現(圖 4C，左格)。

3-去氮奈普蘭諾辛處理或 siRNA 降低表現 PRC2 蛋白質都導致彼等在 MCF-7 細胞中的重新-表現(圖 4C，右格)。為了驗證基因陣列數據的可靠性，乃對該 47 個基因組中隨機選出的 10 基因實施半定量式 RT-PCR (圖 4D)。於每一情況中，候選基因都在 MCF10 細胞中高度地表現，不過在 MCF-7 細胞中則有低或不能偵測的表現。3-去氮奈普蘭諾辛處理或 siRNA 耗盡 PRC2 蛋白質都導致彼等在 MCF-7 細胞中的重新表現。

經由使用此等嚴密準則，揭發出可在乳癌中特異地表現之一群 PRC2 標的基因；基因本體(GO)分析已經接露出此等基因顯著地增加彼等在生長

抑制或凋亡中的作用，如在 TGFBI 和 IGFBP3 中所看到者(圖 4E)；因此，此等基因都可能成為在乳癌中經外遺傳性緘默化或被 PRC2 壓制的惡質表現型(phenotype)之推定的腫瘤抑制子。此外，在 MCF-7 細胞中被 PRC2 高度壓制的基因可為 3-去氮奈普蘭諾辛所優先地再活化；令人驚訝的是，此點對於 MCF10 細胞則大不相同，在該細胞中此等基因已經以高度水平表現且不會經歷進一步誘導(圖 4F)；此點也可以用來解釋 MCF10 細胞對於 3-去氮奈普蘭諾辛處理的回應敏感性之缺乏，且暗示著 3-去氮奈普蘭諾辛的癌症選擇性可能在於癌細胞中經 PRC2-壓制的基因之優先再活化。

更進一步者，對由 28 個原發性乳房腫瘤樣品和 9 個正常乳房組織的收集所組成的數據組進行基因表現分析；其中也將該 47 個癌症特異性 PRC2-壓制基因，與 EZH2、SUZ12 和 EED 一起包括進去分析。非教導型(Unsupervised)集群分析指示出在此 Affymetrix 陣列數據組中所含的 34 個獨特探器明確地分開腫瘤樣品與正常樣品(圖 4G)。— 17 個基因子集(集群 I)顯示出乳房腫瘤中相對於在正常乳房組織中有較低的表現，該正常乳房組織如所預期者，係與較高的 EZH2 和 SUZ12 表現有關；此數據顯示出此 PRC2 標的基因子集都是在原發性人類乳癌中被壓抑的臨床上相關聯者。其餘的基因則為在腫瘤或正常組織之間較不可區別者(集群 II)或甚至在腫瘤中有更高水平的表現者(集群 III)。因此，此等基因可能不能反映出在原發性腫瘤中的經 PRC2 媒介的外遺傳性變化。

在經由藥理學分析、基因分析和功能分析的引導之下，因而鑑定出推定的臨床相關性 PRC2 標的基因群組。試管內研究和活體內研究的整合促成 PRC2 標的基因表單對原發性乳房腫瘤內相干的基因之顯著配對；例如，PLAU 和 DUSP4 & 10 在 MCF-7 細胞中被緘默化，但是實際上卻被發現在

原發性腫瘤樣品中以相對於在正常組織中較高的水平表現；透過此現象可以反映出在癌細胞系細胞和原發性乳癌細胞之間的基本差異，此等“不一致 (discordant)”基因(例如，PLAU 和 DUSP4 &10)的表現同樣地可能係因原發性腫瘤的非癌性成分諸如巨噬細胞(macrophages)、脈管細胞成分和基質細胞(stromal cell)所致者。即使如此，透過此選擇，本案發明人鑑定出一組臨床相關性 PRC2 標的基因，彼等在原發性乳房腫瘤中的表現一致地相對於正常乳房組織被向下調節；許多經 PRC2 壓抑之標的基因，諸如 TGFBI、IGFBP3 和 PPPIR15A 都已知在生長抑制或凋亡中具有功能，可使人聯想到彼等作為推定的腫瘤抑制子之潛在作用；此等基因的重新表現全體地可能促成經 3-去氮奈普蘭諾辛誘導的凋亡。

3-去氮奈普蘭諾辛對於 PRC2 標的基因啟動子被 PRC2 和 RNA 聚合酶 II 佔有之影響

使用染色質免疫沉澱(ChIP)來測定 PRC2 是否會結合到其推定的標的基因啟動子，及此結合是否會被 3-去氮奈普蘭諾辛處理所影響。更進一步地，也分析 RNA 聚合酶 II (RNA Pol II)的結合，因為 RNA Pol II 和 PRC2 係以互相排斥的方式結合到基因啟動子(Vire et al., 2006, 前文)。PRC2 被 3-去氮奈普蘭諾辛的耗盡，經推論會導致增加的 RNA Pol II 被招引到 PRC2 標的基因啟動子上。設計出在 8 個候選 PRC2 標的基因核心啟動子區內之 ChIP PCR 引子，係因為先前發現有 95 % PRC2 結合部位都在有或無 CpG 島的轉錄起始部位之 1 kb 內之故(Lee et al., 2006, 前文)(圖 5A)。如經由使用 SUZ12 和 RNA Pol II 抗體實施的 ChIP 分析所證明者，未經處理的 MCF-7 細胞顯示出 SUZ12 對所探討的 PRC2 標的基因啟動子之堅強結合，而在非特異性 IgG 或 RNA Pol II 沉澱樣品中只偵測到背景或極少的結合(圖 5B)。於用 3-

去氮奈普蘭諾辛處理之後，結合到此等啟動子的 SUZ12 顯著地減少，而 RNA Pol II 的結合則增加。在將經 3-去氮奈普蘭諾辛耗盡 PRC2 後此等基因的重新表現之事實一起考慮之下，此等發現確定出 PRC2 對此等基因啟動子之結合係彼等的轉錄壓抑所需者。PRC2 蛋白質被 3-去氮奈普蘭諾辛的瓦解會減低此種結合，導致增加的 RNA Pol II 被招引，以及 PRC2 標的基因啟動子之活化。

經 PRC2-壓抑之標的基因被 3-去氮奈普蘭諾辛再活化不是 DNA 甲基化被抑制之結果

由於 3-去氮奈普蘭諾辛抑制 AdoHyc 水解酶(AdoHyc hydrolase)活性，且間接地造成一般甲基化反應之抑制，因此有可能是經 3-去氮奈普蘭諾辛媒介的 PRC2 標的基因之再活化為 DNA 甲基化不足之結果。所以，乃試驗使用 DNA 脫甲基化劑 5-氮雜-2'-脫氧胞苷(5-aza-2'-deoxy-cytidine)(5-AzaC)或配合組織蛋白脫乙酰基酶抑制劑曲古抑菌素 A (TSA)處理 MCF-7 細胞，以測試是否能夠活化此等基因。在用 5-AzaC 單獨地或配合 TSA 處理過的 MCF-7 細胞中實施陣列分析。將 140 個經先前鑑定過的 PRC2 標的基因之表現型態，與使用 3-去氮奈普蘭諾辛處理過的 MCF-7 細胞相比較；圖 5C (I) 顯示出上述諸處理不會導致一般 PRC2 標的基因相較於 3-去氮奈普蘭諾辛處理者之顯著再活化。於 140 個 PRC2 標的基因中，只有 13 個基因(~10%)顯示出在 5-AzaC 和 TSA 的組合處理之後有 ≥ 3 倍之誘導(諸如 ANAX8 和 DLX2)，令人聯想到對於某些 PRC2 標的基因，3-去氮奈普蘭諾辛可能因為 DNA 脫甲基化之結果增加彼等的表現；該等陣列結果也進一步由對代表性 PRC2 標的基因之即時 RT-PCR (real-time PCR)予以確定，諸如 TGFBI、KRT17 和 FBX032 等基因只會被 3-去氮奈普蘭諾辛所誘導，但是不會被有

或無 TSA 的 5-AzaC 所誘導(圖 5C, II)。不過, ANXA8 和 DLX2 的表現, 會被 3-去氮奈普蘭諾辛及被 5-AzaC 和 TSA 的共處理兩者所活化(圖 5C, III); 此等數據證實 PRC2 標的基因被 3-去氮奈普蘭諾辛所再活化不是一般性 DNA 甲基化不足之結果, 雖則對於某些 PRC2 標的基因諸如 ANXA8 和 DLX2 可能會有例外。對於此等基因, PRC2 可能將 DNMT 招引到彼等的啟動子上且協調地壓制彼等的表現, 如由最近的研究所推測者(Vire et al., 2006, 前文)。

與對 3-去氮奈普蘭諾辛的細胞敏感性相關聯的 PRC2 標的基因之鑑定

為了擴大在 MCF-7 細胞中所看到的觀察結果, 乃篩選額外的乳癌細胞系, 包括 MB-468、SK-BR-3、MB-231、T47D 和 BT549。於一時程分析中的凋亡回應揭露出所收集的乳癌細胞系展現出對 3-去氮奈普蘭諾辛的多變敏感度。類似於 MCF-7 細胞者, MB-468、SK-BR-3 和 T47D 細胞都對 3-去氮奈普蘭諾辛-誘導的細胞死亡有高度敏感性; 與此相異者, MB-231 和 BT-549 細胞, 與 MCF10A 一起, 都對 3-去氮奈普蘭諾辛處理有高度抗拒性(圖 6A)。為了鑑定出與對 3-去氮奈普蘭諾辛的細胞敏感性相關聯的 PRC2 標的基因, 乃在 3-去氮奈普蘭諾辛處理之前和之後, 於此等乳癌細胞系中實施陣列分析且定出 47 個經鑑定出的 PRC2 標的基因之表現型態。經推論某些 PRC2 標的基因可能在敏感性細胞系和抗拒性細胞系之間有差別性表現, 此可能賦予對 3-去氮奈普蘭諾辛的明顯敏感性。基因集群分析揭露出有一子集的 PRC2 標的基因 (22 個基因) 在抗拒性細胞系(MCF10A、MB-231 和 BT549)中有一致高水平的表現, 但是在敏感性細胞系(MCF-7、MB-468、SK-BR-3 和 T47D)中卻以較低的水平表現(圖 6B)。於此基因集之中, 有 4 個基因: FBXO32、LAMB3、PLAU 和 PPP1R15A 經發現可在所有四種敏

感性細胞系中被 3-去氮奈普蘭諾辛共同地誘導，而四種額外的基因 (TGFB1、IGFBP3、TNS3 和 KRT17)在四種敏感性細胞系中的三種中被誘導。不過，在抗拒性細胞系(MCF10A、MB-231 和 BT549)中，此等基因都已經高度地表現(除了 LAMB3 在 BT549 中為例外)且在 3-去氮奈普蘭諾辛處理之後不會經歷顯著的進一步誘導。該 4 基因之即時 RT-PCR (real-time PCR)分析和一般的 RT-PCR 分析兩者都確定該陣列數據(圖 6D 及 6E)。所以，此等基因被 3-去氮奈普蘭諾辛壓制的表現與彼等的誘導程度顯得與對 3-去氮奈普蘭諾辛的細胞敏感度相關聯。不過，顯著地，PRC2 標的基因的表現水平都不是經常與 PRC2 蛋白質含量有相關聯；例如，於似乎可表現較高 EZH2 蛋白質含量的 MB-231 細胞中，許多 PRC2 標的基因都不一定會受到壓制(圖 6E，下格)。此點指示出在此等細胞內，EZH2 可能沒有功能或者可能需要額外的因子諸如 DNMT 和 HDAC 來幫助建立和維持對此等基因的外遺傳性控制。

為了測定出上述 PRC2 標的基因在 3-去氮奈普蘭諾辛-誘導凋亡中的功能角色，乃使用 siRNAs 來防止與 3-去氮奈普蘭諾辛回應相關聯的 7 個 PRC2 標的基因之誘導，且評估彼等對於 3-去氮奈普蘭諾辛凋亡誘導之影響。只有 FBXO32 siRNA 處理會減低對 3-去氮奈普蘭諾辛的凋亡回應。導向其他 6 個 PRC2 標的基因的其餘 siRNA 低聚核苷酸顯然不能抑制 3-去氮奈普蘭諾辛-誘導凋亡(圖 6F)。為了消除 siRNA 的脫標的效應(the off-target effect)，乃附加地使用不同的 FBXO32 siRNA。經確定者，FBXO32 誘導的抑制會導致 3-去氮奈普蘭諾辛凋亡誘導之顯著衰減(圖 6G)。類似的結果也在 MB-468 細胞和 T47D 細胞中觀察到(數據沒有顯示出)。此等實驗從已經鑑定出的 PRC2 標的基因中鑑定出 FBXO32，作為在乳癌細胞內媒介 3-去氮

奈普蘭諾辛-誘導凋亡之關鍵效應物(effector)。所以，FBXO32 在乳癌細胞內的緘默化狀態及其被 3-去氮奈普蘭諾辛所再活化顯然為 3-去氮奈普蘭諾辛回應的重要決定因素。再者，FBXO32 作為潛在的腫瘤抑制子之功能角色也由其影響群落形成的能力獲得進一步的支持。圖 6H 顯示出將 FBXO32 轉殖到 MCF-7 細胞造成所形成的細胞群落(colonies)數目，相較於轉殖對照載體的細胞之細胞群落(colonies)數目，實質上要減少許多。

在不希望受到理論或上述諸實施例所約束之下，可注意到者，3-去氮奈普蘭諾辛，作為 AdoHcy 水解酶抑制劑時，會干擾 AdoMet-AdoHcy 代謝且可能引起減低的甲基化反應(Glazer, R.I. et al., *Biochem Biophys. Res. Commun.* (1986) 135, 2, 688-694)。不同於 DNA 低甲基化劑，諸如 5-氮雜-2'-脫氧胞苷或 zebularine 等會耗盡 DNMTs 者，此化合物顯然對於 DNMTs 沒有影響，但是會誘導 PRC2 蛋白質的有效耗盡及相關聯的組織蛋白-H3K27 甲基化。3-去氮奈普蘭諾辛對 PRC2 的影響顯然具有選擇性，因為其對於 Suv39h1 或對相關聯的 H3-K9 甲基化沒有影響。在 3-去氮奈普蘭諾辛處理之後，PRC2 蛋白質的耗盡不是透過轉錄抑制而達成者，因為 3-去氮奈普蘭諾辛處理不會影響彼等的 mRNA 含量。取而代之者，其係透過蛋白質解體降解(proteosomal degradation)而進行，因為蛋白質解體抑制劑可以回復蛋白質表現之故。不同於 5-AzaC 和 Zebularine 等經由透過彼等的摻加到 DNA 內因而將酵素截留到經取代 DNA 來耗盡 DNMTs 者(Cheng et al., 2004, 前文)，3-去氮奈普蘭諾辛不經磷酸化且不被摻加到 DNA 內(Glazer et al., 1986; Tseng et al., 1989)。因此，3-去氮奈普蘭諾辛似乎高度不可能是透過類似的機制來耗盡 PRC2 蛋白質者。業經報導者，此複合體的整體性(integrity)係決定於每一種成分的存在且其中一種成分的降低表現(knockdown)會導致其

他成分的蛋白質向下調節(downregulation)(Pasini, D. et al., *EMBO Journal* (2004) 23, 4061-4071)。考慮到以 3-去氮奈普蘭諾辛將 PRC2 蛋白質的所有三種成分都有效耗盡之下，有可能為 3-去氮奈普蘭諾辛主要係影響一種成分，其隨後導致其他成分的向下調節。或者，有可能是 S-腺苷甲硫胺酸(S-adenosyl-methionine)在組織蛋白 H3-K27 中的摻加受到抑制而可能減低 PRC2 蛋白質對染色質的結合且因而影響到其穩定性。

透過對一群對 3-去氮奈普蘭諾辛具敏感性或抗拒性的乳癌細胞系進行之基因表現分析，本案發明人已經能夠界定出最可能與對 3-去氮奈普蘭諾辛的細胞回應相關聯之 PRC2 標的基因。此小組基因可以用為代理標誌以預測乳癌細胞中的 3-去氮奈普蘭諾辛回應，且在未來用以導引該小組乳癌病患對於 PRC2-目標導向治療法之選擇。再者，使用 RNA 干擾所做的進一步功能性分析鑑定出編碼 F-box 蛋白質 32 的 FBXO32 之重新表現可至少部份地助成 3-去氮奈普蘭諾辛的凋亡回應。其作為腫瘤抑制子的潛在功能受到其壓制細胞生長和細胞群落形成(colony formation)之能力所進一步支持。重要者，FBXO32 業經確定在原發性乳房腫瘤中相對於在正常組織內會被強力壓抑。所以，在人類乳房癌而不在正常組織中，某些潛在性腫瘤抑制子被 PRC2 的選擇性壓抑，及其被 PRC2 目標導向劑的有效逆反，都指向可以導致腫瘤細胞相對於非-腫瘤細胞被優先殺死的新穎治療取向。

最近已經有報導 PRC2 可透過與 DNMT 的交互作用而直接控制 DNA 甲基化(Vire et al., 2006, 前文)。雖然 3-去氮奈普蘭諾辛可能抑制所有的甲基化反應，不過我們卻發現其活化經 PRC2-壓制的基因之能力與一般性 DNA 甲基化之可能抑制沒有關聯。不過，我們確實發現小部份的 PRC2 標的基因(~ 10 %)之表現可能經由使用 5'-AzaC 和 TSA 的處理予以增強，此令

人聯想到對於此等基因，PRC2 可能需要 DNMT 來控制彼等的表現。所以，3-去氮奈普蘭諾辛有別於其他的染色質重塑劑(remodelling agents)諸如 DNMT 和 HDAC 的抑制劑，且顯然為到目前為止可以經由調制 PRC2 與相關聯的組織蛋白甲基化來再活化基因表現之第一種化合物。直到目前為止，3-去氮奈普蘭諾辛業經探究用於抗病毒性治療(De Clercq, E.D. et al., *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* (1989) 33, 8, 1291-1297)且經證實具有極微小的活體內毒性。不管其真實機制為何，其在癌細胞內的激發凋亡活性，如本研究中所描述者，加上其所影響的重要癌症途徑，使其成為用於抗癌症治療的有希望之藥物候選者。再者，除了其作為新穎抗癌症化合物的潛在用途之外，3-去氮奈普蘭諾辛也可以用為外遺傳性研究的有用工具。

在此說明書中先前公開的文件之表列或討論必須不視為該文件為先前技藝狀況的一部分或為一般常識之承認。

於本文中闡述地說明過之本發明可以不用到沒有在本文中特定地揭示出之任何要素或多要素，限制或多限制之下適當地實施。因此，例如，對於術語“包含(comprising)”、“包括(including)”、“含有(containing)”等，係以可擴張且無限制的方式予以解讀。此外，於本文中所用到的術語和表達係用為描述性術語而非限制性術語，且在此等術語和表達的使用中，無意排除所顯示和所描述的特徵或其部份之等效物，反而要承認有多種修改係可能落於所主張的本發明之範圍之內。因此，應該理解者，雖然本發明業經以示範具體實例和選用特徵予以特定地揭示出，不過仍可由熟諳此技藝者對於本文中所述中體現的本發明做出修飾和變異，且此等修飾和變異都視為落在本發明範圍之內。

本發明業經在本文中廣義且概括地說明，落於該總揭示內的每一較窄

物種和次總群集也都形成本發明的部份。此包括本發明總體描述中，以限制條件或負面限制從總屬去除任何內容者，不論被切除的內容是否為有在本文中具體地敘述過者。

其他的具體實例都在後面的申請專利範圍之內；此外，在根據馬庫西群組(Markush groups)描述本發明諸特徵(features)或方面(aspects)之情況中，熟諳此技藝者都認許本發明也藉此根據馬庫西群組的任何個別成員或成員子群(subgroup of members)予以描述。

【圖式簡單說明】

本發明可經參照詳細說明部份配合非限制性實施例與所附圖式一起思考獲得更佳的了解，其中：

圖 1A 繪示出用 5 μ M 3-去氮奈普蘭諾辛(3-deazaneplanocin)(DZNep)處理 48 和 72 小時，與沒有 DZNep 處理(對照組)的 HCT116 (左)和 MCF-7 細胞(右)之西方點漬分析(Western blot analysis)；PRC2 成分 SUZ12、EZH2 和 EED 的蛋白質含量都有巨幅地減低；沒有觀察到對於 Suv39h1 和 Blim 1 表現水平的影響；媒介 DNA 甲基化的 DNA 甲基-轉移酶 DNMT1 和 DNMT3b 之含量都不受影響；不過，對於組織蛋白 3 的離胺酸 27 (H3-K27)之三甲基化，則有強烈地減少，而沒有觀察到對於組織蛋白 H3 所含離胺酸 9 (H3-K9)的甲基化之影響。

圖 1B 繪示出在 3-去氮奈普蘭諾辛處理之前(-)和之後(+)經由反轉錄 PCR (RT-PCR)所得 PRC2 蛋白質 EZH2、SUZ12 和 EED 之 mRNA 含量分析；按照(a)中所述處理 HCT116 細胞且分離出總 RNA 以供 RT-PCR 分析所用，使用 GAPDH 作為對照組。

圖 1C 繪示出在蛋白質解體抑制劑(proteasome inhibitor)的存在中 3-去

氮奈普蘭諾辛對於 EZH2 和 SUZ12 蛋白質含量之影響；使用 3-去氮奈普蘭諾辛處理 MCF-7 細胞 18 小時，接著添加蛋白酶體抑制劑(proteasome inhibitor) MG132 (5 μ M)、LLNL (50 μ M)、MG115 (20 μ M)和(10 μ M) 8 小時；收穫細胞供 EZH2 和 SUZ12 的西方點漬分析所用。

圖 2 顯示出可以用來誘導腫瘤細胞凋亡之化合物的示範例子所具結構：A：3-去氮奈普蘭諾辛 A，5-(4-胺基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)-3-(羥基甲基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-3-(hydroxymethyl)-3-cyclopentene-1,2-diol) ， Chemical Abstracts No. 102052-95-9； B：5-(4-胺基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)-3-(1-羥基乙基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-3-(1-hydroxyethyl)-3-cyclopentene-1,2-diol) ， Chemical Abstracts No. 146424-81-9； C：5-(4-胺基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)-3-(1,1-二羥基丙基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-3-(1,1-dihydroxypropyl)-3-cyclopentene-1,2-diol) ， CAS-No. 851071-63-1； D：5-(4-胺基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)-3-[1-羥基-2-丙烯基]-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-3-[1-hydroxy-2-propenyl]-3-cyclopentene-1,2-diol) ， CAS-No. 851071-61-9； E：5-(4-胺基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)-4-氟-3-(羥基甲基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-4-fluoro-3-(hydroxy methyl)-3-cyclopentene-1,2-diol) ， CAS-No. 127828-67-5； F：5-(4-胺基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)-3-(2-丙烯基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-3-(2-propenyl)-3-cyclopentene-1,2-diol) ， CAS-No. 851071-58-4； G：5-(4-胺基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)-3-甲基-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(4-amino-

1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-3-methyl-3-cyclopentene-1,2-diol) , CAS-No. 224453-13-8 ; H : 5-(4-胺基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-3-cyclopentene-1,2-diol) , CAS-No. 111005-71-1 ; I : 5-(4-胺基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-1-基)-4-氯-3-環戊烯-1,2-二 醇 (5-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)-4-chloro-3-cyclopentene-1,2-diol) , CAS-No. 127828-64-2 ; J : 5-(6-胺基-9H-嘌呤-9-基)-3-(羥基甲基)-3-環戊烯-1,2-二 醇 (5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-(hydroxymethyl)-3-cyclopentene-1,2-diol) , CAS-No. 88824-06-0 ; K : 5-(6-胺基-9H-嘌呤-9-基)-3a,6a-二 氫 -2,2-二 甲 基 -4H-環戊并-1,3-二 氧 雜 環 戊 烷 -6-甲 醇 (4-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3a,6a-dihydro-2,2-dimethyl-4H-cyclopenta-1,3-dioxole-6-methanol) , CAS-No. 88824-08-2 ; L : N-[9-[5-(乙 醯 氧 基)-4-羥基-3-(羥基 甲 基)-2-環戊烯-1 基]-9H-嘌呤-6-基]-苯 甲 醯 胺 (N-[9-[5-(acetyloxy)-4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-1-yl]-9H-purin-6-yl]-benzamide) , CAS-No. 83844-33-1 ; M : 5-(6-胺基-9H-嘌呤-9-基)-3-(甲 氧 基 甲 基)-3-環戊烯-1,2-二 醇 (5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-(methoxymethyl)-3-cyclopentene-1,2-diol) , CAS-No. 138571-48-9 ; N : 4-甲基-苯甲酸[3-(6-胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-羥基-5-[(4-甲基 苯 甲 醯 基) 氧 基]-1-環戊烯-1-基]甲 基 酯 (4-methyl-benzoic acid [3-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-[(4-甲 基 benzoyl)oxy]-1-cyclopenten-1-yl] methyl ester) , CAS-No. 142888-07-1 ; O : 5-(6-胺基-2-氟-9H-嘌呤-9-基)-3-(羥基 甲 基)-3-環戊烯-1,2-二 醇 (鹽 酸 鹽) (5-(6-amino-2-fluoro-9H-purin-9-yl)-3-(hydroxymethyl)-3-cyclopentene-1,2-diol (hydrochloride)) , CAS-No. 138660-07-8 ; P : 5-(6-胺基-8-氯-9H-嘌呤-9-

基)-4-氯-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(6-amino-8-chloro-9H-purin-9-yl)-4-chloro-3-cyclopentene-1,2-diol), CAS-No. 127828-72-2; Q: 3-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4,5-二羥基-1-環戊烯-1-羧酸 (3-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4,5-dihydroxy-1-cyclopentene-1-carboxylic acid), CAS-No. 179929-29-4; R: 5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-丙基-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-propyl-3-cyclopentene-1,2-diol), CAS-No. 851071-49-3; S: 5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-(氟甲基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-(fluoromethyl)-3-cyclopentene-1,2-diol), CAS-No. 303964-14-9; T: 5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-3-(氟甲基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-3-(fluoromethyl)-3-cyclopentene-1,2-diol), CAS-No. 805245-51-6; U: 5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-3-(巯基甲基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-3-(mercaptomethyl)-3-cyclopentene-1,2-diol), CAS-No. 805245-54-9; V: 5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-(1-羥基-2-丙炔基)-3-環戊烯-1,2-二醇 (5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-(1-hydroxy-2-propynyl)-3-cyclopentene-1,2-diol), CAS-No. 141794-36-7。

圖 3A 繪示出在暴露於 3-去氮奈普蘭諾辛 (DZNep) 之後，相較於未處理對照組細胞(DMSO，二甲亞砜)的多種癌細胞之細胞死亡率的偵測；用 5 μ M 3-去氮奈普蘭諾辛處理乳癌 MCF-7 和 MB-468 細胞、結直腸腺癌 (colorectal) HCT116、RKO 和 SW480 細胞 48 和 72 小時，且利用碘化丙錠 (PI) 染色和流式細胞儀分析(flow cytometry analysi)偵測細胞死亡率；所示者為三個獨立實驗的平均值。

圖 3B 繪示出經由使用染料，碘化 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基-苯并咪

唑羰花青 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzamidazolocarbocyanin iodide)(JC-1)染色後，對 HCT116 胞的粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)之偵測；細胞經暴露於 3-去氮奈普蘭諾辛(DZNep)而導致粒線體膜電位之流失(右側)，此指示出凋亡。

圖 3C 比較 HCT116 細胞中的凋亡率(右側，圖 3B 的數據)與 MCF-7 細胞中的凋亡率(左側)。

圖 3D 繪示出對於以 3-去氮奈普蘭諾辛(DZNep，右側)活化 HCT116 細胞中的凋亡蛋白酶 3 (caspases)之電位的偵測，此係在凋亡中發生者。

圖 3E 繪示出凋亡蛋白酶活化的西方點漬分析；使用 5 μ M 3-去氮奈普蘭諾辛(“DZNep”)處理 MCF-7 和 HCT16 細胞 48 和 72 小時之後進行全細胞萃取物分析；在 3-去氮奈普蘭諾辛處理之後偵測凋亡蛋白酶和聚(ADP-核糖)聚合酶(poly(ADP-ribose) polymerase)(“PARP”)的活化；使用 β -肌動蛋白(Actin)作為裝載對照組(loading control)。

圖 3F 顯示出 FACS 分析數據的標繪圖，其中包含 MCF-7 和非癌性乳房上皮 MCF10 細胞之凋亡；細胞係經用 5 μ M 3-去氮奈普蘭諾辛(DZNep，黑色條)處理所示之時間，雖然 3-去氮奈普蘭諾辛處理導致 MCF-7 細胞的漸進性且顯著的凋亡，不過卻沒有在 MCF10 細胞中誘導出明顯的凋亡。

圖 3G 顯示出 3-去氮奈普蘭諾辛(DZNep)對於乳癌 MCF-7 細胞和非癌性 MCF-10A 乳房上皮細胞的影響之比較；3-去氮奈普蘭諾辛-誘發的細胞死亡率在 MCF10 細胞中僅為極微小者，而在 MCF-7 細胞中則偵測到明顯的形態學上的變化。

圖 3H 顯示出 3-去氮奈普蘭諾辛對於結直腸腺癌 HCT116 細胞的影響，相對於對 CC33D 初級結腸上皮細胞之比較；再度地，3-去氮奈普蘭諾

辛可在 HCT116 細胞中誘導出明顯的形態學上的變化，而在 CC33D 細胞中則幾乎觀察不到任何細胞死亡。

圖 3I 繪示出以小型干擾性 RNA (siRNA) 轉殖 48 小時之後，對於 MCF-7 細胞中個別 PRC2 蛋白質 EED、EZH2 和 SUZ12 的耗盡之西方點漬分析；在所有的樣品中都存在著非特異性(NS)信號。

圖 3J 繪示出 MCF-7 細胞中的凋亡之偵測，其中將 PRC2 蛋白質 EED、EZH2 和 SUZ1 中之一者利用 siRNA 予以耗盡(比較圖 3E)；細胞死亡率係以 PI 染色和 FACS 分析予以測量；在每一種個別蛋白質的基因剔除之後，觀察到實質的凋亡誘導。

圖 4 示意地示出在乳癌中被壓制且以 3-去氮奈普蘭諾辛活化的 PRC2 標的基因之鑑定；蛋白質 EZH2、SUZ12 和 EED 都是利用 siRNA 予以個別地剔除；使用 Illumina Gene Expression BeadChip，將有上調(up-regulated) ≥ 2 倍的基因鑑定出且核驗重疊性(圖 4A)；有 1402 個基因經現有上調，其中 95 個基因可經所有三種 siRNA 處理而上調；使用 DZNep 處理 MCF-7 細胞 72 小時導致鑑定出經上調至少 2 倍的 750 個基因，其中 140 個種基因經發現為候選 PRC2 標的基因(圖 4B)；此等 140 個基因在 MCF-7 細胞和 MCF10 細胞中的表現型態(expression profiles)係以基因集群分析(gene cluster analysis)予以分析，以定出在乳癌中被特異地壓制之候選 PRC2 標的基因(圖 4C)；經鑑定出含 45 個基因的集群，彼等在 MCF-7 細胞中的表現相較於在 MCF10 細胞中都較低至少 2 倍；其餘推定的 PRC2 標的基因都在兩種類型細胞內以相似的水平表現或甚至在 MCF-7 細胞中以較高的水平表現(圖 4C，左格)；3-去氮奈普蘭諾辛(DZNep)處理或 PRC2 蛋白質的 siRNA 基因剔除(knockdown)都導致彼等在 MCF-7 細胞中的重新表現(圖 4C，右格)；10

個經隨機選出的基因之半定量式 RT-PCR 形成 47 個基因組合(圖 4D)，其顯示出在每一情況中，於 MCF10A 中有高度表現的候選基因在 MCF-7 細胞都不能偵測到；3-去氮奈普蘭諾辛(DZNep)處理或 PRC2 蛋白質的 siRNA 耗盡都導致彼等在 MCF-7 細胞中的重新表現；基因本體(Gene ontology)(GO)分析(圖 4E)顯示出實質數目的此等基因在生長抑制或凋亡上起作用，諸如 TGFBI 和 IGFBP3；相對於此等 47 個 PRC2 標的基因都在其中以高水平表現(圖 4E，上格)且不能進行進一步誘導(圖 4E，下格)的 MCF10 細胞而言，此結果有令人訝異地差異；從 28 個原發性乳房腫瘤樣品和 9 個正常乳房組織收集所組成的數據組合之基因表現分析，其中包括 47 個癌症特異性 PRC2 壓制基因，顯示出此 PRC2 標的基因子集相對於在原發性人類乳癌中被壓制者有臨床相關性(圖 4F)；在此 Affymetrix 陣列數據組中所含的 34 種獨特探器(probe)清晰地分離出腫瘤樣品和正常樣品(圖 4G)；圖 4G 表明 PRC2 標的基因在原發性乳房腫瘤(T)和正常乳房組織(N)中的階層式分群(Hierarchical clustering)：I、II 和 III 代表有顯示出區別性表現樣式的基因子集；一個有 17 個基因的子集(集群 I)在乳房腫瘤中顯示出相對於在正常乳房組織中較低的表現，該正常乳房組織如所預料者，與較高的 EZH2 和 SUZ12 表現有相關聯。

圖 5A 繪示 8 個候選 PRC2 標的基因所含 5'區之示意性表示；箭號指出轉錄起始部位，垂直條指示出 CpG 部位，經由 PCR 分析出的區係於底部以黑條顯示出，ChIP PCR 引子係經設計成坐落於所分析的基因之核心啟動子區之上。

圖 5B 繪示以染色質免疫沉澱(chromatin immunoprecipitation)(ChIP)對結合到頂端候選 PRC2 標的基因啟動子的 PRC2 所做分析；使用 SUZ12 和

RNA Pol II 抗體之下，未經處理的細胞顯示出 SUZ12 對於所選頂端 PRC2 標的基因啟動子之強烈結合，而對於非特異性 IgG 或經 RNA Pol II 沉澱的樣品則只有偵測到背景或最小的結合；用 3-去氮奈普蘭諾辛處理(+)會顯著地減低 SUZ12 對此等啟動子的結合，而 RNA Pol II 的結合則會增加；對於非特異性 IgG 或經 RNA Pol II 沉澱的樣品則只有偵測到背景或最小的結合。

圖 5C 繪示出 3-去氮奈普蘭諾辛、5-氮雜胞苷和組織蛋白脫乙酰基酶抑制劑曲古抑菌素 A (trichostatin A)對於 PRC2 標的基因表現之影響；I:MCF-7 細胞，其為未經處理者或經使用 3-去氮奈普蘭諾辛(DZNep)、5-氮雜胞苷(5-AzaC)或 5-氮雜胞苷和曲古抑菌素 A (AZA+TSA)的組合處理過者，且離析出 RNA 供基因表現分析所用，顯示出 140 個 PRC2 標的基因之平均表現水平，使用單獨的 5-氮雜胞苷處理或其與曲古抑菌素 A 的組合處理時相較於 3-去氮奈普蘭諾辛處理，整體而言沒有導致 PRC2 標的基因之明顯再活化；II：以 3-去氮奈普蘭諾辛活化但沒有用 5-氮雜胞苷單獨地或與曲古抑菌素 A 組合地來活化 PRC2 標的基因 TGF I、KRT17 和 FBXO32，如經由即時 PCR(real-time PCR)測量且使用 18S rRNA 表現予以標準化(normalized)所得者；III：PRC2 標的基因 ANXA8 和 DLX2 則經同時用 3-去氮奈普蘭諾辛和單獨的 5-氮雜胞苷或其與曲古抑菌素 A 組合者予以活化，如經由即時 PCR(real-time PCR)測量且使用 18S rRNA 表現予以標準化所得者；此等數據顯示出 3-去氮奈普蘭諾辛對 PRC2 標的基因之再活化不是建基於一般的 DNA 甲基化不足(hypomethylation)；彼等進一步顯示出只有對於某些 PRC2 標的基因諸如 ANXA8 和 DLX2，才可能發生此等甲基化不足現象；對於此等基因，PRC2 可能招收 DNA 甲基轉移酶到彼等的啟動子且協調地壓抑彼等的表現，如由最近的研究所推測者(Viré, E. et al., *Nature* (2006) 439, 16,

871-874)。

圖 6A 繪示出在 120 小時時間框架內，5 μ M 3-去氮奈普蘭諾辛對乳癌細胞系 MCF-7、MB-468、SK-BR-3、MB-231、T47D 和 BT549 的凋亡效應之分析；細胞死亡率係以 FACS 分析測量，所呈現出的數據為三個獨立實驗的平均值；MCF-7 細胞、MB-468、SK-BR-3 和 T47D 細胞都對 3-去氮奈普蘭諾辛有高度敏感性，而 MB-231、BT549 與 MCF10A 一起，都不受使用彼的處理所影響或對其有高度抗性。

圖 6B 繪示在 3-去氮奈普蘭諾辛處理之前和之後，在此等乳癌細胞系 (MCF-7、MB-468、SK-BR-3 和 T47D 敏感性 / MCF10A、MB-231、BT549 抗拒性) 中的陣列分析結果；45 個 PRC2 標的基因之基因集群分析揭露出在所示乳房癌細胞系中的表現中，有一 PRC2 標的基因子集 (22 個基因) 在抗拒性細胞系 (MCF10A、MB-231 和 BT549) 中以一致的高水平表現，但是在敏感性細胞系 (MCF-7、MB-468、SK-BR-3 和 T47D) 中，則以較低的水平表現；以黑體字標出的基因都是在抗拒性細胞系中相對於在敏感性細胞系中較高度表現者。

圖 6C 繪示出在至少三種敏感性細胞系中會被 3-去氮奈普蘭諾辛上調的基因；於在圖 6B 中所分析的基因中，有四種基因 FBXO32、LAMB3、PLAU 和 PPP1R15A 經發現可在所有四種敏感性細胞系內為 DZNep 所共同地誘導；四種其他基因 (TGFB1、IGFBP3、TNS3 和 KRT17) 是在 4 種敏感性細胞系中的三種被誘導；此等基因都已經可在抗拒性細胞系 (MCF10A、MB-231 和 BT549) 中高度表現 (除了 LAMB3 在 BT549 以外者) 且在 3-去氮奈普蘭諾辛處理之後，不會再受到顯著的進一步誘導。

圖 6D 繪示出經確定的 PRC2 標的基因在暴露於 3-去氮奈普蘭諾辛

(DZNep)之前與之後，以定量式 RT-PCR 所做 MCF-7、MB-468、SK-BR-3 T47D、MB-231 和 BT549 等細胞中的表現水平之分析；於乳癌細胞系 MCF-7、MB-468、SK-BR-3 和 T47D 之中，基因 FBXO32、LAMB3、PLAU 和 PPP1R15A 的表現會被 3-去氮奈普蘭諾辛所活化。

圖 6E 繪示出以慣用的 RT-PCR 對經確定的 PRC2 標的基因 FBXO32、LAMB3、PLAU 以及 PPP1r15p 的表現水平之分析(上方)，以如 C 的方式處理細胞；再度地，FBXO32、LAMB3、PLAU 和 PPP1R15A 在敏感性乳癌細胞系(MCF-7、MB-468、SK-BR-3、T47D)內的表現受到壓制但是可被 3-去氮奈普蘭諾辛(DZNep)再活化；EZH2 和 SUZ12 的蛋白質含量係以西方點漬法(Western blotting)測定(下方)，如可以看出者，MB-231 細胞似乎可以表現出較高水平的 EZH2 蛋白質，不過許多種 PRC2 標的基因(上方)則沒有受到壓抑；PRC2 標的基因之表現水平因而沒事經常可由個別的 PRC2 蛋白質含量予以反映，此指示出有額外的因子諸如 DNA 甲基轉移酶和組織蛋白脫乙酰基酶牽涉到其中。

圖 6F 繪示出 PRC2 標的基因在 MCF-7 細胞內以 siRNA 耗盡對於以 3-去氮奈普蘭諾辛的凋亡誘導相較於非標的 siRNA 對照組(NC)之影響；將每一種所示的 siRNAs 轉殖到 MCF-7 細胞內 24 小時，接著以 5 μ M 3-去氮奈普蘭諾辛處理 72 小時；凋亡係以 FACS 分析測量，只有 FBXO32 siRNA 能夠誘導出對 3-去氮奈普蘭諾辛的凋亡回應。

圖 6G 顯示出使用不同的 FBXO32 siRNA 對 FBXO32 的影響之分析(參閱圖 6F)；FBXO32 siRNA 處理相較於非標的 siRNA 對照組(NC)可抑制在 MCF-7 細胞中的 3-去氮奈普蘭諾辛(DZNep)-誘導凋亡，所顯示者為三個獨立實驗的結果，該等結果確定 FBXO32 誘導的抑制導致 3-去氮奈普蘭諾

辛的凋亡誘導之明顯衰減。

圖 6H 顯示出 FBXO32 影響細胞群落(colonies)形成的能力；MCF-7 細胞係用編碼 FBXO32 的質體或空載體予以轉殖；細胞係以三重複選擇和檢定其群落形成存活力，FBXO32 轉殖造成所形成的細胞群落(colonies)之數目，相較於使用對照載體轉殖的細胞所形成者具有實質上的減少；此等數據可支持 FBXO32 作為潛在腫瘤壓抑劑之功能角色。

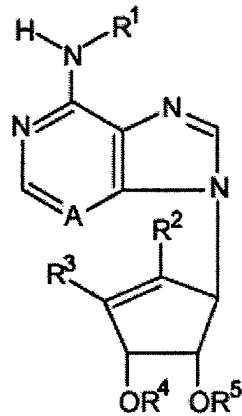
【主要元件符號說明】

● 無

●

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種誘導腫瘤細胞凋亡以及調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，該方法包括投予個別的細胞一種通式(I)化合物：

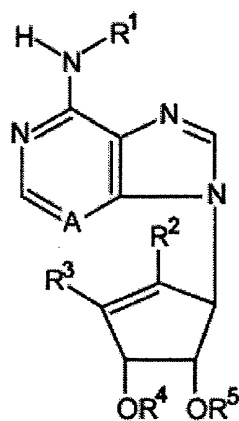


(I)

其中於式(I)中，A 為碳(C)或氮(N)；R¹，R⁴和 R⁵ 為，各自獨立地選自下列所組成的群組：氫(H)和脂族、環脂族、芳香族、芳基脂族與芳基環脂族烴基，彼等基包含 0-3 個選自 N、氧(O)、硫(S)和矽(Si)的群組中之雜原子；R⁴ 和 R⁵ 可視需要地聯結以定義一脂族烴橋聯；R² 係氫(H)或鹵素，諸如氟(F)或氯(Cl)；R³ 為 H 或一脂族或芳基脂族烴基，該基包含 1-8 個主鏈碳原子和 0-3 個為 N、O、S、Si 之雜原子，或鹵素諸如 Cl 或 F；本發明也提供一種用於誘導腫瘤細胞凋亡及/或調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之醫藥組成物，該醫藥組成物包含如上文所定義的化合物或其藥學上可接受的鹽和載劑或稀釋劑。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to a method of inducing apoptosis in a tumour cell as well as modulating pluripotency and/or self-renewing characteristics of a stem/progenitor cell. The method comprises administering to the respective cell a compound of the general formula (I)

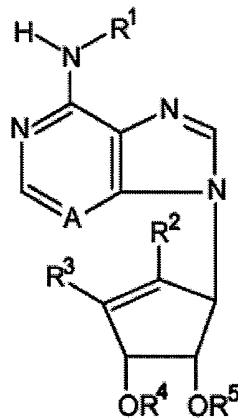


(I)

In the general formula A is C or N. R^1 , R^4 and R^5 are, independently selected, H or aliphatic, cycloaliphatic, aromatic, arylaliphatic, or arylcycloaliphatic hydrocarbyl groups, that comprise 0 - 3 heteroatoms being N, O, S, or Si. R^4 and R^5 may optionally be linked so as to define an aliphatic hydrocarbyl bridge. R^2 is H or a halogen, such as F or Cl. R^3 is H, or an aliphatic or arylaliphatic hydrocarbyl group comprising 1 - 8 main chain carbon atoms and 0 - 3 heteroatoms being N, O, S, Si, or a halogen such as Cl or F. Also provided is a pharmaceutical composition for inducing apoptosis in a tumour cell and/or modulating pluripotency and/or self-renewing characteristics of a stem/progenitor cell. The pharmaceutical composition comprises a compound as defined above or a pharmaceutically acceptable salt thereof and a carrier or diluent.

十、申請專利範圍：

1. 一種通式(I)化合物之用途，



(I)

其中於通式(I)中，

A 為 C 或 N；

R¹、R⁴和 R⁵各自獨立地選自下列所組成的群組：H 和脂族、環脂族、芳香族、芳基脂族與芳基環脂族烴基，該等基包含 0-3 個選自 N、O、S 和 Si 的群組中之雜原子；

其中 R⁴和 R⁵可視需要地聯結以定義一脂族烴橋聯；

R²係選自 H 和鹵素所組成的群組；且

R³為 H，或一脂族或芳基脂族烴基，該基包含 1-8 個主鏈碳原子和 0-3 個選自由 N、O、S、Si 所組成的群組中之雜原子和鹵素；

該化合物係用於誘導腫瘤細胞凋亡及/或用以調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性所用醫藥品之製造中。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該誘導腫瘤細胞凋亡及/或調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性，為一種治

療或預防癌症所用治療法。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性為一種治療或預防畸胎瘤所用治療法。
4. 如申請專利範圍第 2 或 3 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該治療法為一種外遺傳性治療法(epigenetic therapy)。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該誘導腫瘤細胞凋亡及/或調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性包含組織蛋白甲基化之抑制。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該組織蛋白甲基化之抑制包含組織蛋白 3 所含離胺酸 27 的甲基化之抑制。
7. 如申請專利範圍第 5 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該組織蛋白甲基化之抑制包含在個別的細胞內耗盡多梳型抑制複合體(polycomb repressive complex)。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該多梳型抑制複合體為多梳型抑制複合體 2、多梳型抑制複合體 3 和多梳型抑制複合體 4 中至少一者。
9. 如申請專利範圍第 7 或 8 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該耗盡該多梳型抑制複合體造成在該多梳型抑制複合體與一腫瘤抑制基因之間的一複合體之釋放出。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中係利用將腫瘤抑制基因再活化而達到該誘導凋亡。
11. 如申請專利範圍第 10 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該腫瘤抑

制基因為 FBX032。

- 12.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該腫瘤細胞為乳癌細胞。
- 13.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該腫瘤細胞係得自哺乳動物。
- 14.如申請專利範圍第 13 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該哺乳動物係選自貓、小鼠、牛、豬和人所組成的群組。
- 15.如申請專利範圍第 13 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中包含令該腫瘤細胞接觸預定量的通式(I)化合物。
- 16.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該腫瘤細胞係經培養者。
- 17.如申請專利範圍第 16 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該腫瘤細胞為選自細胞系 MCF-7、MB-468、SK-BR-3 和 T47D 所組成的群組中之細胞。
- 18.如申請專利範圍第 15 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中包含使用至少兩種不同預定量的通式(I)化合物及至少一第一種腫瘤細胞和一第二種腫瘤細胞，其中該第一種腫瘤細胞係接觸該兩種預定量中的較低量且該第二種腫瘤細胞係接觸該兩種預定量中的較高量。
- 19.如申請專利範圍第 18 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該第一種腫瘤細胞和該第二種腫瘤細胞係得自相同的病患。
- 20.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中進一步包含該腫瘤細胞中的凋亡。
- 21.如申請專利範圍第 18 或 20 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中係

用於預測一病患對通式(I)化合物的個別回應。

22.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該幹/祖細胞為一胚胎幹細胞。

23.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該化合物為 3-去氮奈普蘭諾辛(3-deazaneplanocin)。

24.一種醫藥組成物，其包含：

(a) 如申請專利範圍第 1 項所定義之化合物，或其藥學上可接受的鹽；

以及

(b) 載劑或稀釋劑；

該醫藥組成物係用於誘導腫瘤細胞凋亡及/或用以調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性。

25.如申請專利範圍第 24 項所述之醫藥組成物，其中進一步包含 DNA 甲基轉移酶抑制劑、DNA 脫甲基化劑及/或組織蛋白-脫乙酰基酶抑制劑。

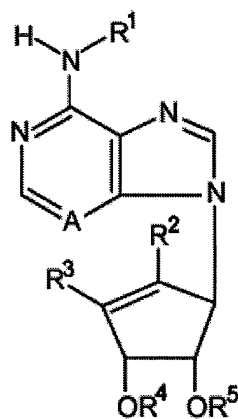
26.如申請專利範圍第 25 項所述之醫藥組成物，其中該 DNA 甲基轉移酶抑制劑係選自 5-氮雜胞苷、地西他濱(decitabine)(5-氮雜-2'-脫氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine))、5-氟-2'-脫氧胞苷(5-fluoro-2'-deoxycytidine)、5,6-二氫-5-氮雜胞苷和 zebularine (1-(β-d-呋喃核糖基)-1,2-二氫嘓啶-2-酮(1-(β-d-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one))所組成的群組。

27.如申請專利範圍第 25 或 26 項所述之醫藥組成物，其中該 DNA 脫甲基化劑係選自肼苯噻嗪(hydralazine)、普魯卡因醯胺(procainamide)、普魯卡因(procaine)、(-)-表兒茶酸-3-棓酸鹽((-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG))、psammaplin A、低聚脫氧核苷酸 MB98 和 2-(1,3-二酮基-1,3-二氫-2H-異吲哚-2-基)-3-(1H-吲哚-3-基)丙酸

(2-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)-3-(1H-indol-3-yl)propionic acid) (MG98)所組成的群組。

28.如申請專利範圍第 25 項所述之醫藥組成物，其中該組織蛋白-脫乙酰基酶抑制劑係選自丁酸鹽、苯基丁酸鹽、丙基戊酸(valproic acid)、間-羧基肉桂酸雙羥肟酸(m-carboxycinnamic acid bishydroxamic acid)(CBHA)、oxamflatin、PDX-101、MS-275、酯肽(depsipeptide)、pyroxamide、scriptaid、辛二醯替苯胺羥肟酸(suberoylanilide hydroxyamic acid)(SAHA)、曲古抑菌素(TSA)、NVP-LAQ824、LBH589、apicidin、CHAP、trapoxin、N-乙酰基地那林(N-acetyldinaline)，和 MS-275 所組成的群組。

29.一種活體外(ex vivo)誘導腫瘤細胞凋亡之方法，該方法包含投予該腫瘤細胞一種通式(I)化合物，



(I)

其中於通式(I)中，

A 為 C 或 N；

R¹、R⁴ 和 R⁵ 各自獨立地選自下列所組成的群組：H 和脂族、環脂族、芳香族、芳基脂族與芳基環脂族烴基，該等基包含 0-3 個選自 N、O、S 和

Si 的群組中之雜原子；

其中 R^4 和 R^5 可視需要地聯結以定義一脂族烴橋聯；

R^2 係選自 H 和鹵素所組成的群組；且

R^3 為 H，或一脂族或芳基脂族烴基，該基包含 1-8 個主鏈碳原子和 0-3 個選自由 N、O、S、Si 所組成的群組中之雜原子和鹵素。

30. 如申請專利範圍第 29 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該腫瘤細胞係經培養者。

31. 如申請專利範圍第 29 或 30 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該腫瘤細胞為乳癌細胞。

32. 如申請專利範圍第 29 或 30 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該細胞係選自 MCF-7、MB-468、SK-BR-3 和 T47D 所組成的細胞系群組中之細胞。

33. 如申請專利範圍第 29 或 30 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中進一步包含測定在該腫瘤細胞內的凋亡。

34. 如申請專利範圍第 29 或 30 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該腫瘤細胞係得自哺乳動物。

35. 如申請專利範圍第 34 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該哺乳動物係選自貓、小鼠、牛、豬和人所組成的群組。

36. 如申請專利範圍第 29 或 30 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其包含令該腫瘤細胞接觸預定量的該通式(I)化合物。

37. 如申請專利範圍第 29 或 30 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其包含使用至少兩種不同預定量的通式(I)化合物和至少一第一種腫瘤細胞和一第二種腫瘤細胞，其中該第一種腫瘤細胞係接觸該兩種預定量中

的較低量且該第二種腫瘤細胞係接觸該兩種預定量中的較高量。

38.如申請專利範圍第 37 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該第一種腫瘤細胞和該第二種腫瘤細胞係得自相同的病患。

39.如申請專利範圍第 38 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該方法為一種用於預測一病患對該通式(I)化合物的個別回應之方法。

40.如申請專利範圍第 29 或 30 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該方法為一種外遺傳性方法。

41.如申請專利範圍第 40 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中誘導腫瘤細胞凋亡包括組織蛋白甲基化之抑制。

42.如申請專利範圍第 41 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該組織蛋白甲基化之抑制包括對組織蛋白 3 上的離胺酸 27 之甲基化的抑制。

43.如申請專利範圍第 41 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該組織蛋白甲基化的抑制包括在個別的細胞內耗盡多梳型抑制複合體。

44.如申請專利範圍第 43 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中進一步包含測量該至少一種多梳型抑制複合體的至少一種成分之含量。

45.如申請專利範圍第 44 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其進一步包含將該至少一種多梳型抑制複合體所含該至少一種成分的含量之測量結果與一對照測量的結果相比較。

46.如申請專利範圍第 43 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中耗盡該多梳型抑制複合體釋放出在該多梳型抑制複合體與一腫瘤抑制基因之間的複合體。

47.如申請專利範圍第 46 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該

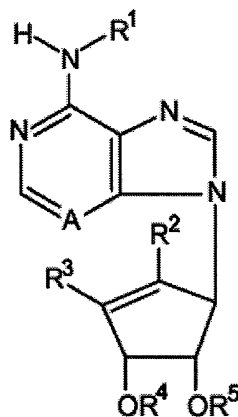
凋亡係利用腫瘤抑制基因的再活化而達成者。

48.如申請專利範圍第 47 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其中該腫瘤抑制基因為 FBX032。

49.如申請專利範圍第 48 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其進一步包含測量該 FBX032 在該個別細胞內之表現。

50.如申請專利範圍第 49 項所述之活體外誘導腫瘤細胞凋亡之方法，其進一步包含將 FBX032 表現的測量結果與一對照測量的結果相比較。

51.一種活體外(ex vivo)調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，該方法包含投予該幹/祖細胞一種通式(I)化合物，



(I)

其中於通式(I)中，

A 為 C 或 N；

R¹、R⁴ 和 R⁵ 各自獨立地選自下列所組成的群組：H 和脂族、環脂族、芳香族、芳基脂族與芳基環脂族烴基，該等基包含 0-3 個選自 N、O、S 和 Si 的群組中之雜原子；

其中 R⁴ 和 R⁵ 可視需要地聯結以定義一脂族烴橋聯；

R^2 係選自 H 和鹵素所組成的群組；且

R^3 為 H，或一脂族或芳基脂族烴基，該基包含 1-8 個主鏈碳原子和 0-3 個選自由 N、O、S、Si 所組成的群組中之雜原子和鹵素。

52.如申請專利範圍第 51 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中該幹/祖細胞為胚胎幹細胞。

53.如申請專利範圍第 51 或 52 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中該幹/祖細胞為一畸胎瘤細胞。

54.如申請專利範圍第 51 或 52 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中該幹/祖細胞係經培養者。

55.如申請專利範圍第 51 或 52 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中該幹/祖細胞係得自哺乳動物。

56.如申請專利範圍第 55 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中該哺乳動物係選自貓、小鼠、牛、豬和人所組成的群組。

57.如申請專利範圍第 51 或 52 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中該方法為一種外遺傳性方法。

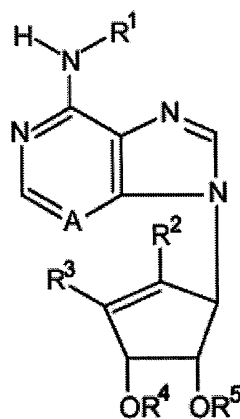
58.如申請專利範圍第 57 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中該幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之調制包括組織蛋白甲基化之抑制。

59.如申請專利範圍第 58 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其包含抑制在組織蛋白 3 上的離胺酸 27 之甲基化。

60.如申請專利範圍第 59 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中該組織蛋白甲基化之抑制包括在該細胞內耗盡多

梳型抑制複合體。

- 61.如申請專利範圍第 60 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中進一步包含測量該至少一種多梳型抑制複合體的至少一種成分之含量。
- 62.如申請專利範圍第 61 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中進一步包含將該至少一種多梳型抑制複合體所含該至少一種成分的含量之測量結果與一對照測量的結果相比較。
- 63.如申請專利範圍第 62 項所述之活體外調制幹/祖細胞的多能性及/或自我更生特性之方法，其中該多梳型抑制複合體為多梳型抑制複合體 2、多梳型抑制複合體 3 和多梳型抑制複合體 4 中的至少一種。
- 64.一種活體外(ex vivo)用於在一可表現多梳型抑制複合體所含諸成分的細胞內調制基因表現之方法，該方法包含投予該細胞一種通式(I)化合物，



(I)

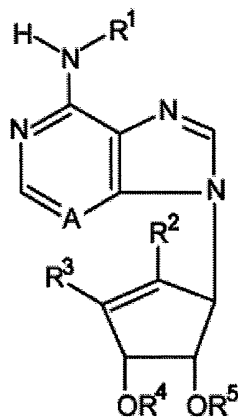
其中於通式(I)中，

A 為 C 或 N；

R^1 、 R^4 和 R^5 各自獨立地選自下列所組成的群組：H 和脂族、環脂族、芳

的任何一者。

70.一種通式(I)化合物之用途，



(I)

其中於通式(I)中，

A 為 C 或 N；

R¹、R⁴和 R⁵各自獨立地選自下列所組成的群組：H 和脂族、環脂族、芳香族、芳基脂族與芳基環脂族烴基，該等基包含 0-3 個選自 N、O、S 和 Si 的群組中之雜原子；

其中 R⁴和 R⁵可視需要地聯結以定義一脂族烴橋聯；

R²係選自 H 和鹵素所組成的群組；且

R³為 H，或一脂族或芳基脂族烴基，該基包含 1-8 個主鏈碳原子和 0-3 個選自由 N、O、S、Si 所組成的群組中之雜原子和鹵素；

其係用於在一表現多梳型抑制複合體所含諸成分的細胞中調制基因表現所用醫藥品之製造中。

71.如申請專利範圍第 70 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該多梳型抑制複合體為多梳型抑制複合體 2、多梳型抑制複合體 3 和多梳型抑制複合體 4 中的至少一種。

72.如申請專利範圍第 70 或 71 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該細胞為幹/祖細胞或初發胚胎細胞。

73.如申請專利範圍第 72 項所述之一種通式(I)化合物之用途，其中該幹細胞為胚胎幹細胞。

序列表

<110> 新加坡科技研究局

<120> 用於癌症治療和幹細胞調制之方法

<160> 21

<170> MS Word for Windows

<210> 1

<211> 64

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> oligonucleotide for SUZ12 siRNA

<400> 1

gatccccgctc gcaacggacc agttaattca agagattaac tggtcggttg	50
cgacttttttg gaaa	64

<210> 2

<211> 64

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> oligonucleotide for SUZ12 siRNA

<400> 2

tcgattttcca aaaagtcgca acggaccagt tgatctcttg aattaactgg	50
tccgttgcga cggg	64

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> oligonucleotide for EZH2 siRNA

<400> 3

aagactctga atgcagttgc t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> oligonucleotide for EZH2 siRNA

<400> 4

aagcactatg ttggccatgg a 21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> target sequence of FBX032 siRNA

<400> 5

GTCACATCCT TTCCTGGAA 19

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>
<221> misc_binding
<223> primer TGFBI

<400> 6

atgtcacttg cctccaccca tc

22

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<221> misc_binding
<223> primer TGFBI

<400> 7

acctgctctg aggcctgaaa g

21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<221> misc_binding
<223> primer IGFBP3

<400> 8

ttcacccaag gcttcgtgct g

21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<221> misc_binding
<223> primer IGFBP3

<400> 9

tccgcgggag gagactttcc 20

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造序列

● <220>
<221> misc_binding
<223> primer KRT17

<400> 10

aaccatttc cccaccagac agg 23

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

● <220>
<221> misc_binding
<223> primer KRT17

<400> 11

aaatcctcgt gctgagtgcc g 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding
<223> primer FBXO32

<400> 12

ttgttgaagg cctgcactgg g 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<221> misc_binding
<223> primer FBXO32

<400> 13

tgatgtaccc agggccaatg c 21

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<221> misc_binding
<223> primer LAMB3

<400> 14

gcaggtgggc attgtggagc 20

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<221> misc_binding

<223> primer LAMB3

<400> 15

tccagatcgc ctgaaagctc c 21

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> primer ANXA8

<400> 16

gaatgatgaa aatgggctgg gtg 23

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> primer ANXA8

<400> 17

gaaattctta gctccagcct gcg 23

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> primer TENS1

<400> 18

TGGCCTGGGA GCTTTCTTTA CC 22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> primer TENS1

<400> 19

tctgggccaa cgttgctttg 20

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> primer PLAU

<400> 20

GGAAGCACCA ACAGTTTATG CCC 23

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> misc_binding

<223> primer PLAU

200812590

<400> 21

ATCAGAGGGG GAAAGGCAAG G

21

十一、圖式：

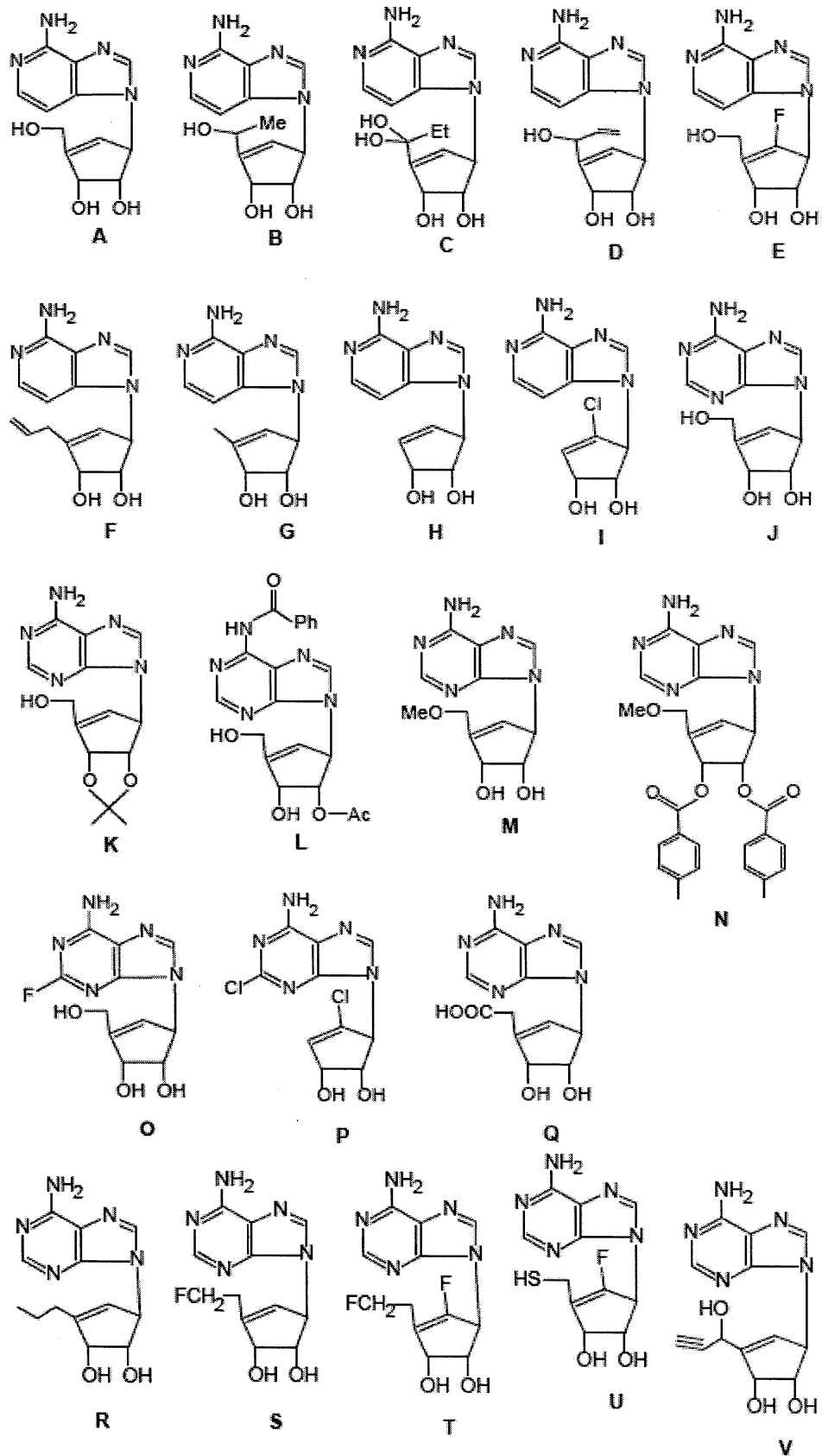
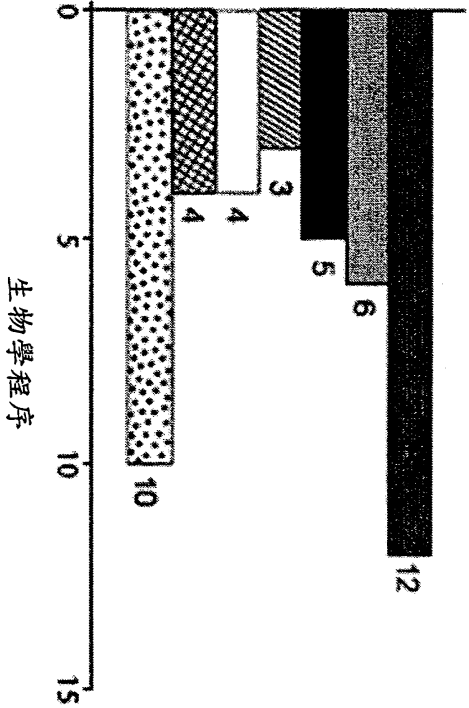


圖2

十一、圖式：



- 凋亡相關基因
- ▨ 發育程序
- 轉錄調節
- ▨ 細胞分裂
- 對刺激的回應
- ▨ 其他的生物學程
- ▨ 其他GO類項

TGFB1
IGFBP3
DUSP10
MAP3K14
GPNMB
DUSP4
TIMP3
P8
PPP1R15A
SOSTM1
SEL1L
NOTCH2

圖4E

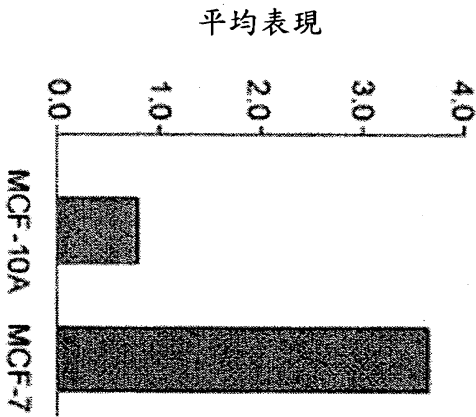
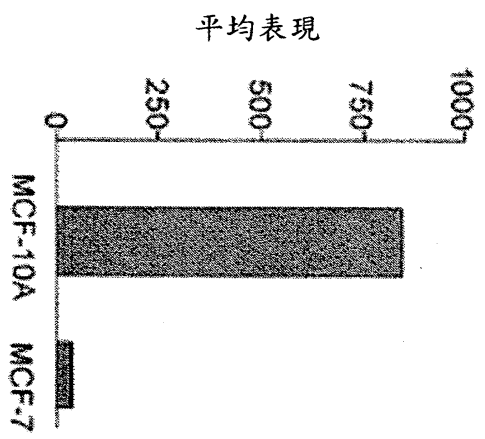


圖4F

十一、圖式：

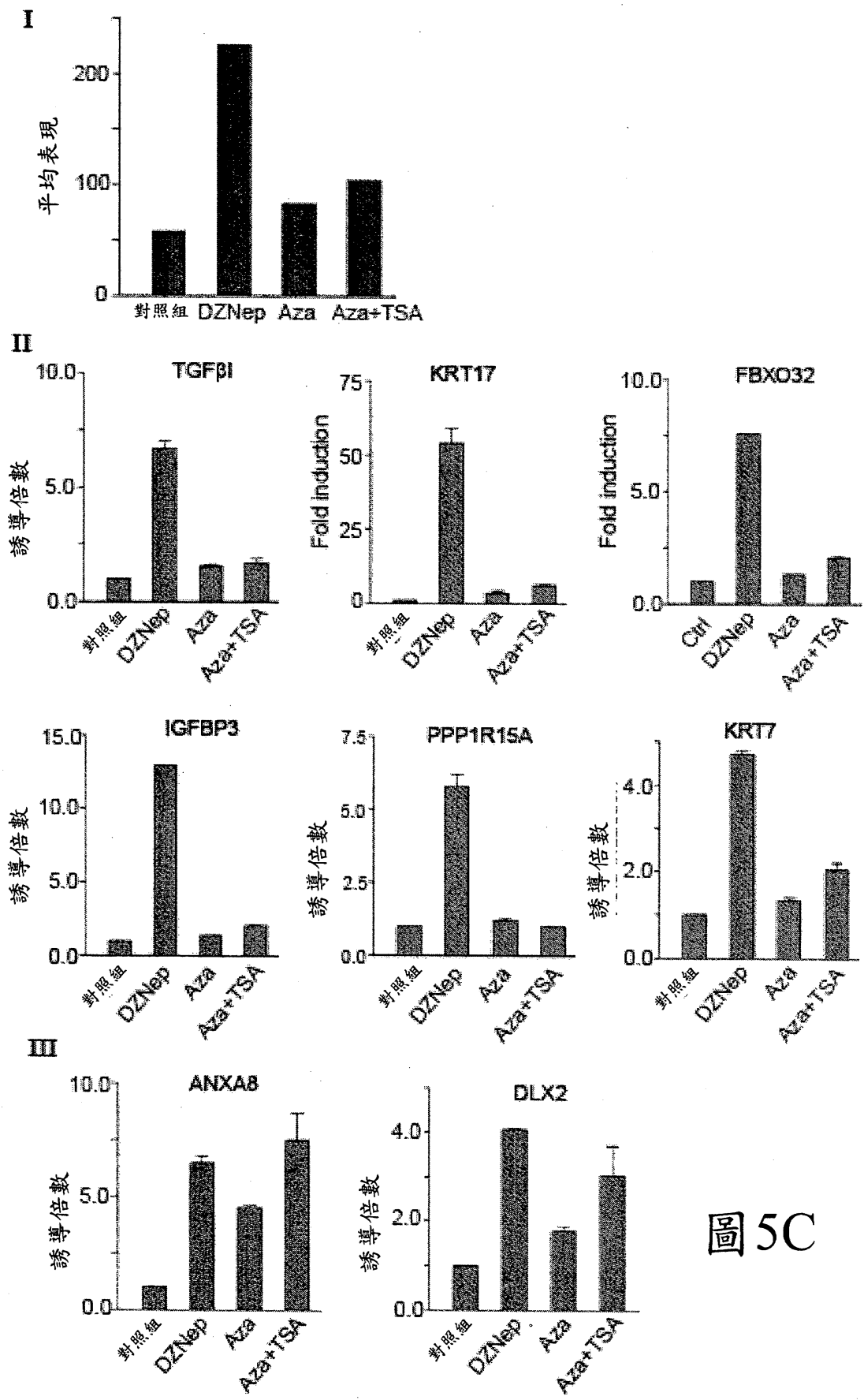


圖 5C

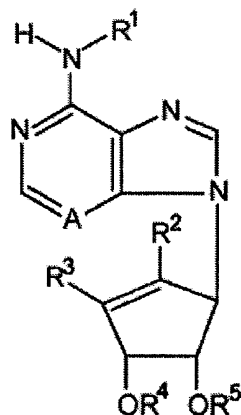
七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(3A)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



(I)

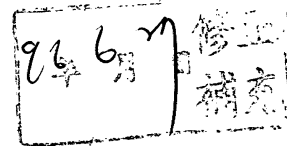
其中，A 為碳(C)或氮(N)；

R^1 , R^4 和 R^5 為，各自獨立地選自下列所組成的群組：氫(H)和脂族、環脂族、芳香族、芳基脂族與芳基環脂族烴基，彼等基包含 0-3 個選自 N、氧(O)、硫(S)和矽(Si)的群組中之雜原子； R^4 和 R^5 可視需要地聯結以定義一脂族烴橋聯；

R^2 係氫(H)或鹵素，諸如氟(F)或氯(Cl)；

R^3 為 H 或一脂族或芳基脂族烴基，該基包含 1-8 個主鏈碳原子和 0-3 個為 N、O、S、Si 之雜原子，或鹵素諸如 Cl 或 F。

發明專利說明書



(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：096106615

※ 申請日期：96.02.27

※IPC 分類：

一、發明名稱：

用於癌症治療和幹細胞調制之方法/

Methods For Cancer Therapy And Stem Cell Modulation

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：新加坡科技研究局/

Agency for Science, Technology and Research

代表人：蘇瑞山 薩奇/ Suresan Sachi

住居所或營業所地址：新加坡 138668 珊卓 #07-01 拜爾波里道 20 號/
20 Biopolis Way, #07-01 Centros, Singapore 138668

國 籍：新加坡/ Singapore

三、發明人：(共3人)

- 姓 名：
1. 于強/ YU Qiang
 2. 譚靜/ TAN Jing
 3. 楊曉靜/ YANG Xiao Jing

- 國 籍：
1. 加拿大/ Canada
 - 2-3. 中國/ P.R. China