



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/00 (2013.01); C12Q 1/6886 (2013.01); C12N 9/1007 (2013.01); C12Q 2600/156 (2013.01)

(21)(22) Заявка: 2014141045, 12.03.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
12.03.2013

Дата регистрации:  
28.10.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
12.03.2012 US 13/418,242

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2016 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 28.10.2019 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 13.10.2014

(86) Заявка РСТ:  
US 2013/030565 (12.03.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2013/138361 (19.09.2013)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение  
3, ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КУНТЦ Кевин Уэйн (US),  
НАТСОН Сара Кейтлин (US),  
ВИГЛ Тимоти Джеймс Нельсон (US)

(73) Патентообладатель(и):  
ЭПИЗАЙМ, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: YAP DAMIAN B. et al. Somatic  
mutations at EZH2 Y641 act dominantly through  
a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic  
activity, to increase H3K27 trimethylation, Blood.,  
24.02.2011, 117(8), pp.2451-2459. CHANG C-J et  
al. The role of EZH2 in tumour progression, Br  
J Cancer., 17.01.2012, 106(2), pp.243-247. WO  
2008101118 A2, 21.08.2008. RU (см. прод.)

(54) ИНГИБИТОРЫ EZH2 ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии,  
в частности к способу лечения рака,  
экспрессирующего мутантную EZH2. Изобретение

позволяет эффективно лечить рак,  
ассоциированный с экспрессией мутантной EZH2.  
2 н. и 13 з.п. ф-лы, 17 пр., 7 табл., 15 ил.

(56) (продолжение):  
2426786 C2, 20.08.2011.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*A61K 31/00* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*C12Q 1/68* (2006.01)*C12N 9/10* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 31/00 (2013.01); C12Q 1/6886 (2013.01); C12N 9/1007 (2013.01); C12Q 2600/156 (2013.01)*(21)(22) Application: **2014141045, 12.03.2013**(24) Effective date for property rights:  
**12.03.2013**Registration date:  
**28.10.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**12.03.2012 US 13/418,242**(43) Application published: **10.05.2016 Bull. № 13**(45) Date of publication: **28.10.2019 Bull. № 31**(85) Commencement of national phase: **13.10.2014**(86) PCT application:  
**US 2013/030565 (12.03.2013)**(87) PCT publication:  
**WO 2013/138361 (19.09.2013)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,  
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i  
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KUNTTS Kevin Uejn (US),  
NATSON Sara Kejtlin (US),  
VIGL Timoti Dzhejms Nelson (US)**

(73) Proprietor(s):

**EPIZAJM, INK. (US)**(54) **HUMAN EZH2 INHIBITORS AND METHODS FOR USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry,  
in particular to a method of treating cancer expressing  
mutant EZH2.EFFECT: invention provides effective treatment of  
cancer associated with expression of mutant EZH2.

15 cl, 17 ex, 7 tbl, 15 dwg

## ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая заявка испрашивает приоритет заявки на патент США №13/418242, поданной 12 марта 2012 г., которая полностью включена в это описание путем ссылки.

## ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

5 Настоящее изобретение относится к ингибированию форм дикого типа и определенных мутантных форм метилтрансферазы гистонов EZH2 человека, каталитической субъединицы комплекса PRC2, который катализирует от моно- до триметилирования лизина 27 на гистоне H3 (H3-K27), к способам лечения злокачественных заболеваний, включая фолликулярную лимфому и диффузную  
10 крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), и к способам определения способности индивида отвечать на лечение ингибитором EZH2.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

ДНК эукариотических клеток упаковывается гистонами для образования хроматина. Приблизительно 150 пар оснований ДНК дважды оборачиваются вокруг октамера  
15 гистонов (каждых двух из гистонов 2A, 2B, 3 и 4) для образования нукleosомы, основной единицы хроматина. Изменения упорядоченной структуры хроматина могут привести к изменениям транскрипции ассоциированных генов. Этот процесс является высоко регулируемым, потому что изменения типов генной экспрессии могут оказывать глубокое воздействие на фундаментальные клеточные процессы, такие как  
20 дифференциация, пролиферация и апоптоз. Регуляция изменений структуры хроматина (и, следовательно, транскрипции) опосредуется ковалентными модификациями гистонов, наиболее существенно, их N-концевых хвостов. Эти модификации часто именуются эпигенетическими, потому что они могут привести к наследуемым изменениям генной экспрессии, но они не воздействуют на последовательность самой ДНК. Ковалентные  
25 модификации (например, метилирование, ацетилирование, фосфорилирование и убиквитинация) боковых цепей аминокислот являются ферментативно опосредованными.

Селективное добавление метильных групп к определенным аминокислотным сайтам на гистонах регулируется действием уникального семейства ферментов, известного как метилтрансферазы гистона (HMT). На уровень экспрессии определенного гена влияет  
30 присутствие или отсутствие одной или нескольких метильных групп в релевантном сайте гистона. Специфический эффект метильной группы в определенном сайте гистона сохраняется до тех пор, пока метильная группа ни будет удалена гистон-деметилазой, или до тех пор, пока модифицированный гистон не будет замещен посредством обновления нукleosом. Подобным образом, другие классы ферментов могут  
35 декорировать ДНК и гистоны другими химическими видами, а еще одни ферменты могут удалять эти виды для обеспечения регуляции генной экспрессии.

Координированная коллекция биохимических систем в основе транскрипционной регуляции должна тщательно контролироваться для оптимального протекания роста и дифференциации клеток. Патологические состояния развиваются в результате  
40 разрушения этих механизмов регуляции аберрантной экспрессией и/или активности ферментов, ответственных за модификацию ДНК и гистонов. Например, при злокачественных заболеваниях у людей все больше данных свидетельствует о том, что нарушение эпигенетической регуляции ферментной активности способствует неконтролируемой клеточной пролиферации, связанной с онкологическими  
45 заболеваниями, а также другим релевантным для онкологических заболеваний фенотипам, таким как усиленная клеточная миграция и инвазия. Кроме раковых заболеваний, все больше данных свидетельствуют о роли эпигенетических ферментов при ряде других заболеваний у людей, включая метаболические заболевания (такие

как сахарный диабет), воспалительные заболевания (такие как болезнь Крона), нейродегенеративные заболевания (такие как болезнь Альцгеймера) и сердечно-сосудистые заболевания. Поэтому селективная модуляция аберрантного действия эпигенетических ферментов весьма перспективна для лечения целого диапазона

5 заболеваний.

#### Метилтрансфераза гистона EZH2

Известно, что белки группы поликомб (PcG) и группы триторакс (trxG) являются частью системы клеточной памяти (Francis et al. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 409-21; Simon et al. (2002) *Curr Opin Genet Dev* 12: 210-8). Обе группы белков участвуют в

10 поддержании пространственных типов экспрессии гомеотических бокс генов (Нох), которые устанавливаются на ранних стадиях эмбрионального развития транзиторно экспрессируемыми генами сегментации. В целом, белки PcG являются транскрипционными репрессорами, которые поддерживают «состояние выключения», а белки trxG являются транскрипционными активаторами, которые поддерживают

15 «состояние включения». Поскольку члены групп белков PcG и trxG содержат эндогенную активность метилтрансферазы гистонов (HMTase), то белки PcG и trxG могут участвовать в клеточной памяти посредством метилирования коровых гистонов (Beisel et al. (2002) *Nature* 419: 857-62; Cao et al. (2002) *Science* 298: 1039-43; Czermin et al. (2002) *Cell* 111: 185-96; Kuzmichev et al. (2002) *Genes Dev* 16: 2893-905; Milne et al. (2002) *Mol Cell* 10: 1107-17;

20 Muller et al. (2002) *Cell* 111: 197-208; Nakamura et al. (2002) *Mol Cell* 10: 1119-28.

Биохимические и генетические исследования обеспечили доказательства того, что белки PcG дрозофилы функционируют, по меньшей мере, в двух различных белковых комплексах, Polycomb репрессивном комплексе 1 (PRC1) и комплексе ESC-E(Z) (также известном как Polycomb репрессивный комплекс 2 (PRC2)), хотя композиции комплексов

25 могут быть динамичными. Otte et al. (2003) *Curr Opin Genet Dev* 13: 448-54. Studies in *Drosophila* (Czermin et al. (см. выше); Muller et al. (см. выше)) и клетки млекопитающих (Cao et al. (выше); Kuzmichev et al. (см. выше)) продемонстрировали, что комплексы ESC-E(Z)/EED-EZH2 (т.е., PRC2) обладают эндогенной активностью метилтрансферазы гистонов. Хотя композиции комплексов, выделенные различными группами, являются

30 несколько различными, они в целом содержат EED, EZH2, SUZ12 и RbAp48 или их гомологи дрозофилы. Однако восстановленный комплекс, содержащий только EED, EZH2 и SUZ12, сохраняет активность метилтрансферазы гистонов в отношении лизина 27 гистона H3 (патент США №7563589 (включенный путем ссылки)).

Из различных белков, составляющих комплексы PRC2, EZH2 (энхансер гомолога-2 белка Zeste) является каталитической субъединицей. Каталитический сайт EZH2, в свою очередь присутствующий в пределах домена SET, представляет собой высоко консервативный мотив последовательности (названный Su(var)3-9, энхансер белка Zeste, Trithorax), который обнаруживается в нескольких ассоциированных с хроматином

35 белках, включая членов и группы Trithorax, и группы Polycomb. Домен SET характерен для всех известных лизин-метилтрансфераз гистонов, за исключением H3-K79 метилтрансферазы DOT1.

Было показано, что в дополнение к сайленсингу гена Нох, опосредованное PRC2 метилирование гистона H3-K27 участвует в X-инактивации (Plath et al. (2003) *Science* 300: 131-5; Silva et al. (2003) *Dev Cell* 4 :481-95). Рекрутирование комплекса PRC2 в Xi и

45 последующее триметилирование в гистоне H3-K27 происходит в течение стадии инициации X-инактивации и зависит от РНК Xist. Кроме того, было обнаружено, что активность EZH2 и его ассоциированной метилтрансферазы гистона H3-K27 дифференциально метит плюрипотентные эпибластные клетки и дифференцированную



трофеэктодерму (Erhardt et al. (2003) Development 130: 4235-48).

Согласованно с ролью EZH2 в поддержании типов эпигенетической модификации плюрипотентных эпибластных клеток, опосредованная Cre делеция EZH2 приводит к утрате метилирования гистона H3-K27 в клетках (Erhardt et al. (см. выше)).

5 Дополнительно, исследования на линиях клеток и тканях рака предстательной железы и молочной железы выявили сильную корреляцию между уровнями EZH2 и SUZ12 и инвазивностью этих форм рака (Bracken et al. (2003) EMBO J 22: 5323-35; Kirmizis et al. (2003) Mol Cancer Ther 2:113-21; Kleer et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100: 11606-11; Varambally et al. (2002) Nature 419: 624-9), указывая на то, что дисфункция комплекса  
10 может способствовать развитию рака.

Недавно появилось сообщение о том, что соматические мутации EZH2 связаны с фолликулярной лимфомой (FL) и зародышевым центром подобного В-клеточному (GCB) подтипа диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) (Morin et al. (2010) Nat Genet 42: 181-5). Во всех случаях было обнаружено, что появление  
15 мутантного гена EZH2 является гетерозиготным, и экспрессия аллелей и дикого типа, и мутантных выявлялась в мутантных образцах, профилированных секвенированием транскриптомы. В настоящее время стандартом ухода для лечения большинства случаев DLBCL является схема химиотерапии R-CHOP (ритуксимаб-циклофосфамид, гидроксидаунорубин, онковорин, преднизон). Однако исход этой схемы лечения  
20 далек от удовлетворительного. Поэтому существует большая медицинская потребность в идентификации новых и эффективных способов лечения, необязательно основанных на генетических профилях индивида.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение основано на открытии того, что клетки, экспрессирующие определенные  
25 мутанты EZH2, больше реагируют на ингибиторы EZH2, чем клетки, экспрессирующие EZH2 дикого типа.

Изобретение относится к способу лечения или облегчения симптома рака или предракового состояния у индивида введением индивиду, экспрессирующему мутантную EZH2, содержащую мутацию в домене субстрат-связывающего кармана, как определено  
30 в SEQ ID NO: 6, терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2.

Изобретение также относится к способу (или к способу *in vitro*) определения способности страдающего раком или предраковым состоянием индивида реагировать на ингибитор EZH2 путем получения образца у индивида, и выявления мутации в домене субстрат-связывающего кармана, как определено в SEQ ID NO: 6, и присутствие  
35 указанной мутации указывает на то, что индивид реагирует на ингибитор EZH2.

Изобретение также относится к применению ингибитора EZH2 в терапевтически эффективном количестве для производства лекарственного препарата для лечения или облегчения симптома рака или предракового состояния у индивида, экспрессирующего мутантную EZH2, содержащую мутацию в домене субстрат-связывающего кармана,  
40 как определено в SEQ ID NO: 6.

Мутантная EZH2 по настоящему изобретению представляет собой полипептид мутантной EZH2 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид мутантной EZH2. Предпочтительно, мутантная EZH2 содержит мутацию в аминокислотном положении 677, 687, 674, 685 или 641 SEQ ID NO: 1. предпочтительнее,  
45 мутация выбрана из группы, состоящей из замещения глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1

(A687V); замещения метионином (М) остатка дикого типа валина (V) в аминокислотном положении 674 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (V674M); замещения гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); замещения цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C); замещения фенилаланином (F) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641F); замещения гистидином (H) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641H); замещения аспарагином (N) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641N); замещения серином (S) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641S); и замещения цистеином (C) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641C).

Индивид по настоящему изобретению включает любого человека, у которого было диагностировано онкологическое заболевание, который имеет его симптомы или риск развития онкологического заболевания или предракового состояния. Например, онкологическое заболевание представляет собой лимфому, лейкоз или меланому.

Предпочтительно, лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому, фолликулярную лимфому или диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому. Альтернативно, лейкоз представляет собой хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ). Предраковое состояние представляет собой синдромы миелодисплазии (MDS, ранее известные как предлейкоз).

Предпочтительный ингибитор EZH2 для способов по настоящему изобретению выбран из соединений, перечисленных в таблице 1.

Пока нет других определений, все используемые здесь технические и научные термины имеют такое же значение, которое общепонятно среднему специалисту в данной области, для которого предназначено настоящее изобретение. Пока контекст ясно не диктует иного, в описании формы единственного числа также включают формы множественного числа. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны здесь, можно применять при осуществлении или тестировании настоящего изобретения, пригодные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указанные в настоящем описании, включены в него путем ссылки. Приведенные здесь ссылки не допускаются в качестве уровня техники, предшествующего заявляемому изобретению. В случае конфликта преимущественную силу имеет настоящее описание, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1 представляет собой два графика, устанавливающие, что связанные с В-клеточной лимфомой мутанты EZH2 являются активными метилтрансферазами гистонов. Метилтрансферазную активность *in vitro* комплексов PRC2, содержащих EZH2 дикого типа и ее различные мутанты EZH2 по Y641, измеряли как (A) реакции переноса метила с использованием пептида (H3 21-44) в качестве субстрата, и (B) реакции переноса метила с использованием птичьих нуклеосом в качестве субстрата. Символы: дикий

тип (○), Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■) и Y641S (▲). СРМ представляет собой импульсы в минуту, относящиеся к подсчету сцинтилляций в результате излучения  $^3\text{H}$ .

Фиг. 2 представляет собой четыре графика, устанавливающих, что комплексы PRC2, содержащие мутантную EZH2, предпочтительно катализируют ди- и триметилирование гистона H3-K27. (А) Метилтрансферазная активность и комплексы дикого типа (WT) на неметилированном пептиде (белые столбики), монометилированном пептиде (заштрихованные столбики) и диметилированном пептиде (закрашенные столбики). (В) Аффинность к пептидным субстратам, по данным величин  $K_{1/2}$ , которые одинаковы по всем состояниям метилирования пептида для комплексов PRC2, содержащих дикий тип (○), Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■) и Y641S (▲) EZH2. Следует отметить, что изменение величин  $K_{1/2}$  по всем субстратам и всем ферментным формам является меньше чем 3,5-кратным. Для каждого конкретного состояния метилирования изменение величины  $K_{1/2}$  является меньше чем двухкратным. (С) Число оборота фермента ( $k_{\text{cat}}$ ) варьируется в зависимости от состояния метилирования субстрата противоположными путями для WT и мутантов Y641 EZH2.  $k_{\text{cat}}$  уменьшается с увеличением состояний метилирования K27 для дикого типа (○), но увеличивается для мутантов Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■) и Y641S (▲) EZH2. (D) Каталитическая эффективность ( $k_{\text{cat}}/K_{1/2}$ ) уменьшается с увеличением состояний метилирования K27 для дикого типа (○), но увеличивается для мутантов Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■) и Y641S (▲) EZH2. На панелях В-D линии, начерченные для соединения точек данных, не предназначены для обозначения любой математической связи; скорее, они просто предназначены для того, чтобы служить визуальными вспомогательными ориентирами.

Фиг. 3А представляет собой трио графиков, изображающих прогнозируемые относительные уровни H3-K27me3 (верхняя панель), H3-K27me2 (средняя панель) и H3-K27me1 (нижняя панель) для клеток, содержащих различные мутанты EZH2. Имитации выполняли, используя уравнение скорости сопряженного фермента в стационарном состоянии и кинетические параметры стационарного состояния, показанные в таблице 2. Все величины являются относительными в отношении клеток, содержащих гомозиготную EZH2 WT, и допускают насыщающие концентрации внутриклеточного SAM (S-аденозилметионина), относительно  $K_m$ , и концентрации внутриклеточных нуклеосом, подобные  $K_m$ .

Фиг. 3В представляет собой серию вестерн блот-анализов относительных типов состояния метилирования H3-K27 для линий клеток лимфомы, гомозиготных в отношении WT EZH2 или гетерозиготных в отношении указанной мутации EZH2 по Y641. Панели сверху вниз изображают результаты исследования антителами, специфичными в отношении следующих вариантов: вся EZH2; H3-K27me3; H3-K27me2; H3-K27me1 и общий гистон H3 в качестве контроля загрузки.

Фиг. 4 изображает выбранные предлагаемые механизмы, ведущие к aberrантно высоким уровням триметилирования в гистоне H3-K27 при раке. Они включают: а) мутацию Y641 в EZH2, приводящую к изменению субстратного предпочтения от неметилированного к моно- и диметилированному гистону H3-K27; б) сверхэкспрессию EZH2; в) мутации в UTX (повсеместно транскрибированном тетраатрикопептидном повторе гена в X хромосоме), которые инактивируют ферментную функцию, вызывая уменьшение деметилирования H3-K27me3; и d) сверхэкспрессию субъединицы PHF19/PCCL3 комплекса PRC2, которая ведет к увеличению рекрутирования комплекса PRC2 в определенные гены и увеличению триметилирования гистона H3-K27. На всех четырех моделях изменение ведет к aberrантному триметилированию гистона H3-K27 в

проксимальных промоторных областях генов, приводящему к транскрипционной регрессии ключевых генов при раке.

Фиг. 5 изображает гель SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия), показывающий, что уровни экспрессии каждого из пятикомпонентных комплексов PRC2 одинаковы в мутантной EZH2 и в EZH2 дикого типа.

Фиг. 6 представляет собой пару таблиц, показывающую, что мутантные комплексы PRC2 и комплексы PRC2 дикого типа (WT) проявляют сильное субстратное предпочтение в отношении содержащих H3-K27 пептидов. Каждый фермент тестировали относительно набора перекрывающихся 15-мерных пептидов, покрывающих все из H3 и H4. Активность измеряли как скорость (СРМ (импульсы в минуту)), и приведенная величина представляет среднюю величину двух независимых определений для каждой реакции. Для всех комплексов самым предпочтительным пептидом был H3: 16-30. Комплекс дикого типа имел более чем в 6 раз большую активность против этого пептида, чем любой из мутантных комплексов.

Фиг. 7 представляет собой график, изображающий ингибиторную активность S-аденозил-1-гомоцистеина (SAH) против EZH2 дикого типа и мутантов EZH2 по Y641. Ось X показывает логарифм концентрации SAH; ось Y показывает процент ингибирования.

Фиг. 8 представляет собой график, изображающий ингибиторную активность соединения 75 против EZH2 дикого типа и мутантов EZH2 по Y641. Ось X показывает логарифм концентрации соединения 75; ось Y показывает процент ингибирования.

На фиг. 9 показаны результаты анализа методом вестерн блоттинга относительных уровней H3-K27me1, me2 и me3 на панели для линий клеток, включающей множественные линии DLBCL, экспрессирующие EZH2 WT или EZH2, мутантную по Y641. Гистоны экстрагировали из показанных линий клеток, фракционировали SDS-PAGE на 4-20% геле, переносили на нитроцеллюлозные мембраны и исследовали антителами к гистону H3, H3-K27me1, me2 или me3.

На фиг. 10 показаны результаты иммуноцитохимического анализа уровней H3 и H3-K27me3 на панели линий клеток лимфомы WT и мутантных по Y641. Клеточные осадки после центрифугирования указанных линий клеток фиксировали и заливали в парафин. Готовили предметные стекла, и уровни H3 и H3-K27me3 оценивали иммуноцитохимически, используя антитела к гистону H3 или H3-K27me3.

На фиг. 11 показаны результаты иммуноцитохимического анализа уровней H3 и H3-K27me2 на панели линий клеток лимфомы WT и мутантных по Y641. Клеточные осадки после центрифугирования указанных линий клеток фиксировали и заливали в парафин. Готовили предметные стекла, и уровни H3 и H3-K27me2 оценивали иммуноцитохимически, используя антитела к гистону H3 или H3-K27me2.

Фиг. 12 представляет собой график, показывающий ингибирование глобальных уровней H3-K27me3 обработкой ингибитором EZH2 в клетках WSU-DLCL2, мутантных по Y641. Клетки WSU-DLCL2 обрабатывали в течение 4 дней указанными концентрациями ингибитора EZH2 A или B. После обработки соединением гистоны экстрагировали, фракционировали SDS-PAGE на 4-20% геле, переносили на нитроцеллюлозные мембраны и исследовали антителами к гистону H3 или H3-K27me3.

Фиг. 13 представляет собой график, показывающий, что ингибиторы EZH2 могут блокировать пролиферацию клеток WSU-DLCL2, мутантных по Y641, но оказывают небольшой эффект на клетки OCI-LY19, не мутантные по Y641. Клетки инкубировали в присутствии увеличивающихся концентраций ингибитора EZH2 A или B в течение 11

дней. Обработанные носителем (DMSO) клетки были включены в качестве контролей. Число и жизнеспособность клеток оценивали, используя анализ Guava Viacount в приборе Guava EasyCyte Plus. Клетки расщепляли, и среду и соединение восполняли через каждые 3-4 дня.

Фиг. 14 представляет собой график, показывающий присутствие мутации EZH2 (Y641) и/или высокие уровни H3-K27me3 и низкие уровни H3-K27me2 прогнозируют чувствительность к ингибиторам EZH2. Линии клеток поддерживали в присутствии увеличивающихся концентраций одного ингибитора EZH2 до 25 мкМ. Количество жизнеспособных клеток использовали для выведения величин IC<sub>90</sub> (концентрации, ингибирующей на 90%) после 11 дней обработки. Результаты нанесены на график при разделении линий клеток в соответствии с мутационным статусом EZH2 (A), или разделяли в соответствии с уровнями H3-K27me2 и H3-K27me3 (B). На обоих графиках линия показывает средние величины IC<sub>90</sub> по указанной группе клеточных линий.

Фиг. 15 представляет собой набор графиков, показывающих зависимость скорости от концентрации фермента, измеренной для EZH2 дикого типа, A677G или A687V. Биотинилированные пептиды, представляющие остатки 21-44 гистона H3, содержащие не-, моно-, ди- или триметиллизин 27 (с H3K27me0 по H3K27me3), анализировали при фиксированной концентрации серией разведений указанного фермента EZH2. Выбирали точки времени для взятия образцов в течение периода 90 минут, и включение 3H-SAM на лизине 27 пептида H3 измеряли захватом пептида во флэш-планшете и считыванием количества импульсов в минуту (CPM). Линейная регрессия с течением времени давала скорость фермента в CPM в минуту (CPM/мин), которую наносили на график как функцию концентрации фермента.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Структура хроматина важна в регуляции активности генов и эпигенетическом наследовании. Посттрансляционные модификации гистонов, такие как метилирование, вовлечены в становление и поддержание структуры хроматина высшего порядка.

#### МУТАНТЫ EZH2

EZH2 представляет собой метилтрансферазу гистонов, которая является каталитической субъединицей комплекса PRC2, который катализирует от моно- до триметилирование лизина 27 в гистоне H3 (H3-K27).

Сообщалось, что точечные мутации гена EZH2 в одном аминокислотном остатке (например, Y641, именуемом здесь Y641) EZH2 связаны с субпопуляциями лимфоцитов человеческой В-клеточной лимфомы (Morin et al. (2010) Nat Genet 42(2): 181-5). В частности, Morin et al. сообщили, что соматические мутации тирозина 641 (Y641F, Y641H, Y641N и Y641S) EZH2 были связаны с фолликулярной лимфомой (FL) и подобным В-клеткам подтипом зародышевого центра (GCB) диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL). Мутантный аллель всегда обнаруживается связанным с аллелем дикого типа (гетерозиготным) в патологических клетках, и сообщалось, что мутации прекращают ферментную активность комплекса PRC2 для метилирования не модифицированного пептидного субстрата.

Настоящее изобретение частично основано на удивительном открытии того, что клетки, экспрессирующие мутант EZH2, более чувствительны к ингибиторам EZH2 по настоящему изобретению, чем клетки, экспрессирующие EZH2 дикого типа.

Соответственно, один аспект настоящего изобретения относится к способам лечения или облегчения симптома рака или предракового состояния у индивида введением индивиду, экспрессирующему мутантную EZH2, терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2. Мутантная EZH2 по настоящему изобретению относится

к полипептиду или мутантной EZH2 или к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид мутантной EZH2. Предпочтительно, мутантная EZH2 содержит одну или несколько мутаций в домене субстрат-связывающего кармана, как определено в SEQ ID NO: 6. Например, мутация может представлять собой замещение, точечную

5 мутацию, бессмысленную мутацию, миссенс-мутацию, делецию или вставку. Иллюстративная аминокислотная мутация в виде замещения включает замещение аминокислотного остатка в положении 677, 687, 674, 685 или 641 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, такое как без ограничения замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в положении 677 аминокислотной

10 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в положении 687 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V); замещение метионином (M) остатка дикого типа валина (V) в положении 674 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (V674M); замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в

15 положении 685 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 685 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C); замещение фенилаланином (F) остатка дикого типа тирозина (Y) в положении 641 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641F); замещение гистидином (H)

20 остатка дикого типа тирозина (Y) в положении 641 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641H); замещение аспарагином (N) остатка дикого типа тирозина (Y) в положении 641 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641N); замещение серином (S) остатка дикого типа тирозина (Y) в положении 641 аминокислотной последовательности, представленной

25 SEQ ID NO: 1 (Y641S); или замещение цистеином (C) остатка дикого типа тирозина (Y) в положении 641 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641C).

Мутация по настоящему изобретению может также включать замещение серином (S) остатка дикого типа аспарагина (N) в положении 322 аминокислотной

30 последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (N322S), замещение глутамином (Q) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 288 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (R288Q), замещение изолейцином (I) остатка дикого типа треонина (T) в положении 573 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (T573I), замещение глутаминовой

35 кислотой (E) остатка дикого типа аспарагиновой кислоты (D) в положении 664 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (D664E), замещение глутамином (Q) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 458 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 5 (R458Q), замещение лизином (K) остатка дикого типа глутаминовой кислоты (E) в положении 249 аминокислотной

40 последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (E249K), замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 684 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (R684C), замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 628 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 21 (R628H), замещение гистидином (H) остатка дикого типа глутамина (Q)

45 в положении 501 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 5 (Q501H), замещение аспарагином (N) остатка дикого типа аспарагиновой кислоты (D) в положении 192 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (D192N), замещение валином (V) остатка дикого типа аспарагиновой кислоты (D) в

положении 664 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (D664V), замещение лейцином (L) остатка дикого типа валина (V) в положении 704 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (V704L), замещение серином (S) остатка дикого типа пролина (P) в положении 132 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (P132S), замещение лизином (K) остатка дикого типа глутаминовой кислоты (E) в положении 669 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 21 (E669K), замещение треонином (T) остатка дикого типа аланина (A) в положении 255 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (A255T), замещение валином (V) остатка дикого типа глутаминовой кислоты (E) в положении 726 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (E726V), замещение тирозином (Y) остатка дикого типа цистеина (C) в положении 571 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (C571Y), замещение цистеином (C) остатка дикого типа фенилаланина (F) в положении 145 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (F145C), замещение треонином (T) остатка дикого типа аспарагина (N) в положении 693 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (N693T), замещение серином (S) остатка дикого типа фенилаланина (F) в положении 145 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (F145S), замещение гистидином (H) остатка дикого типа глутамина (Q) в положении 109 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 21 (Q109H), замещение цистеином (C) остатка дикого типа фенилаланина (F) в положении 622 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 21 (F622C), замещение аргинином (R) остатка дикого типа глицина (G) в положении 135 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (G135R), замещение глутамином (Q) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 168 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 5 (R168Q), замещение аргинином (R) остатка дикого типа глицина (G) в положении 159 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (G159R), замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 310 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 5 (R310C), замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 561 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (R561H), замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 634 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 21 (R634H), замещение аргинином (R) остатка дикого типа глицина (G) в положении 660 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (G660R), замещение цистеином (C) остатка дикого типа тирозина (Y) в положении 181 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (Y181C), замещение аргинином (R) остатка дикого типа гистидина (H) в положении 297 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (H297R), замещение серином (S) остатка дикого типа цистеина (C) в положении 612 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 21 (C612S), замещение тирозином (Y) остатка дикого типа гистидина (H) в положении 694 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (H694Y), замещение аланином (A) остатка дикого типа аспарагиновой кислоты (D) в положении 664 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (D664A), замещение треонином (T) остатка дикого типа изолейцина (I) в положении 150 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (I150T), замещение аргинином (R) остатка дикого типа изолейцина (I) в положении 264 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (I264R), замещение лейцином (L)

остатка дикого типа пролина (P) в положении 636 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (P636L), замещение треонином (T) остатка дикого типа изолейцина (I) в положении 713 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (I713T), замещение пролином (P) остатка дикого типа глутамина (Q) в

5 положении 501 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 5 (Q501P), замещение глутамином (Q) остатка дикого типа лизина (K) в положении 243 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (K243Q), замещение аспарагиновой кислотой (D) остатка дикого типа глутаминовой кислоты (E) в положении 130 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 5 (E130D),

10 замещение глицином (G) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 509 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (R509G), замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 566 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (R566H), замещение гистидином (H) остатка дикого типа аспарагиновой кислоты (D) в положении 677 аминокислотной

15 последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (D677H), замещение аспарагином (N) остатка дикого типа лизина (K) в положении 466 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 5 (K466N), замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в положении 78 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (R78H), замещение метионином (M)

20 остатка дикого типа лизина (K) в положении 1 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 6 (K6M), замещение лейцином (L) остатка дикого типа серина (S) в положении 538 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (S538L), замещение глутамином (Q) остатка дикого типа лейцина (L) в положении 149 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3

25 (L149Q), замещение валином (V) остатка дикого типа лейцина (L) в положении 252 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (L252V), замещение валином (V) остатка дикого типа лейцина (L) в положении 674 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (L674V), замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в положении 656 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (A656V), замещение аспарагиновой кислотой (D) остатка дикого типа аланина (A) в положении 731 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (Y731D), замещение треонином (T) остатка дикого типа аланина (A) в положении 345 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (A345T), замещение аспарагиновой кислотой (D) остатка дикого типа

35 аланина (A) в положении 244 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (Y244D), замещение триптофаном (W) остатка дикого типа цистеина (C) в положении 576 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (C576W), замещение лизином (K) остатка дикого типа аспарагина (N) в положении 640 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (N640K), замещение

40 лизином (K) остатка дикого типа аспарагина (N) в положении 675 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (N675K), замещение тирозином (Y) остатка дикого типа аспарагиновой кислоты (D) в положении 579 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 21 (D579Y), замещение изолейцином (I) остатка дикого типа аспарагина (N) в положении 693 аминокислотной

45 последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (N693I), и замещение лизином (K) остатка дикого типа аспарагина (N) в положении 693 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 (N693K).

Мутация по настоящему изобретению может представлять собой сдвиг рамки в



положениях 730, 391, 461, 441, 235, 254, 564, 662, 715, 405, 685, 64, 73, 656, 718, 374, 592, 505, 730 или 363 аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 3, 5 или 21, или соответствующем нуклеотидном положении последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные последовательности,

- 5 представленные SEQ ID NO: 3, 5 или 21. Мутация EZH2 может также представлять собой вставку глутаминовой кислоты (E) между положениями 148 и 149 аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 3, 5 или 21. Другой пример мутации EZH2 представляет собой делецию глутаминовой кислоты (E) и лейцина (L) в положениях 148 и 149 аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 3, 5 или
- 10 21. Мутантная EZH2 может дополнительно содержать бессмысленную мутацию в положении 733, 25, 317, 62, 553, 328, 58, 207, 123, 63, 137 или 60 аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 3, 5 или 21.

- Неожиданно было также обнаружено, что фермент дикого типа (WT) EZH2 проявляет наибольшую каталитическую эффективность (kcat/K) в отношении реакции от нулевого до монометилирования H3-K27 и меньшую эффективность в отношении последующих
- 15 реакций (от моно- до ди- и от ди- до триметилирования); тогда как, резко отличаясь от этого, связанные с патологией мутации Y641 проявляют очень ограниченную способность выполнять первую реакцию метилирования, но обладают повышенной каталитической эффективностью, проявляющейся в последующих реакциях,
- 20 относительно фермента дикого типа. Эти результаты дают основание полагать, что злокачественный фенотип заболевания использует комбинированные активности монометилирующего фермента H3-K27 (PRC2, содержащий WT EZH2 или EZH1) вместе с PRC2, содержащим мутантную EZH2, для увеличенного превращения H3-K27 в триметилированную форму (H3-K27me3). Поэтому один аспект настоящего изобретения
- 25 относится к ингибированию активности EZH2, включая определенные мутантные формы EZH2. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к селективному ингибированию активности определенных мутантных форм EZH2.

- Хотя и без намерения быть связанными какой-либо теорией, заявители высказывают гипотезу, что мутация EZH2 в ее домене субстратного кармана может содействовать
- 30 множественным циклам метилирования H3-K27 воздействием на тип Н-связи и/или стерическую скученность в активном сайте тройного фермент-бисубстратного комплекса, влияя на образование должного водного канала для депротонирования вступающего в реакцию лизина.

- Нуклеиновые кислоты и полипептиды EZH2 человека были описаны ранее. См., например, Chen et al. (1996) Genomics 38:30-7 [746 amino acids]; Swiss-Prot Accession No. (Номер доступа в Швейцарской базе данных белковых последовательностей Q15910 [746 аминокислот]; GenBank Accession Nos. (Номера доступа генного банка) NM\_004456 и NP\_004447 (изоформа a [751 аминокислот]) и GenBank Accession Nos. (Номера доступа
- 35 генного банка) NM\_152998 и NP\_694543 (изоформа b [707 аминокислот]), каждый из
- 40 которых полностью включен в настоящее описание путем ссылки.

Аминокислотная последовательность EZH2 человека (Номер доступа в Швейцарской базе данных белковых последовательностей Q15910) (SEQ ID NO: 1)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW  
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
YNDDDDDDDGDDPEEREKQKDLDDHRRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
KEKYKELTEQQLPALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH  
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN  
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
KPNIEPPENVEWSGAEASMFRVLIGTYIDNFCIAIRLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
PAEDVDTPPRKKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPCVIAQ  
NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDK  
YMCSFLFLNNDNFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

Последовательность мРНК EZH2 человека, вариант 1 транскрипта  
(Номер доступа геномного банка NM\_004456) (SEQ ID NO: 2)

ggcggcgcttgattgggctgggggggccaataaaaagcgatggcgattgggctgccgcgt  
ttggcgctcggtccggtcggtccgacacccggtgggactcagaaggcagtgagaccccg  
gcgggcgcgcgggcgcgcgggggcgacgcgcgggaacaacgcgagtcggcgcgcggg  
acgaagaataatcatgggccagactgggaagaaatctgagaaggaccagtttggtggcg  
gaagcgtgtaaaatcagagtacatgcgactgagacagctcaagaggttcagacgagctga  
tgaagtaaagagtatgttttagttccaatcgctcagaaaattttgaaagaacggaatcct  
aaaccaagaatggaaacagcgaaggatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc  
attgcgcgggactagggagtgttcgggtgaccagtgacttggattttccaacacaagtcac  
cccattaaagactctgaatgcagttgcttcagtaaccataatgtattccttggtctccct  
acagcagaattttatggtggaagatgaaactgttttacataacattccttatatgggaga  
tgaagtttagatcaggatggtactttcattgaagaactaataaaaaattatgatgggaa  
agtacacggggatagagaatgtgggtttataaatgatgaaattttggagggttggtgaa  
tgcccttggtcaatataatgatgatgacgatgatgatgatggagacgatcctgaagaaag

5

10

15

20

25

30

35

45

agaagaaaagcagaaagatctggaggatcaccgagatgataaagaaagccgcccacctcg  
 gaaatttccttctgataaaaattttgaagccatttctcaatgtttccagataagggcac  
 agcagaagaactaaaggaaaaatataaagaactcaccgaacagcagctcccaggcgact  
 tcctcctgaatgtaccccccaacatagatggaccaaatgctaaatctgttcagagagagca  
 aagcttacactcctttcatagcttttctgtaggcgatgttttaaatatgactgcttcct  
 acatcgtaagtgcgaattattcttttcatgcaacacccaacacttataagcggagaacac  
 agaaacagctctagacaacaaaccttgtggaccacagtggtaccagcatttggaggaggc  
 aaaggagtttgctgctgctctcaccgctgagcggataaagaccccacaaaacgtccagg  
 aggccgcagaagaggacggcttcccaataacagtagcagggccagcacccccaccattaa  
 tgtgctggaatcaaaggatacagacagtgatagggaagcagggactgaaacggggggaga  
 gaacaatgataaagaagaagaagagaagaaagatgaaacttcgagctcctctgaagcaaa  
 ttctcgggtgtcaaacaccaataaagatgaagccaaatattgaacctcctgagaatgtgga  
 gtggagtggtgctgaagcctcaatgttttagagtcctcattggcacttactatgacaattt  
 ctgtgccattgtcagggttaattgggacaaaacatgtagacaggtgtatgagtttagagt  
 caaagaatctagatcatagctccagctcccgtgaggatgtggatactcctccaaggaa  
 aaagaagaggaaaacaccggttgtgggctgcacactgcagaaagatacagctgaaaaagga  
 cggctcctctaaccatgtttacaactatcaaccctgtgatcatccacggcagccttgtga  
 cagttcgtgcccttgtgtgatagcacaataattttgtgaaaagttttgtcaatgagttc  
 agagtgtcaaaaccgctttccgggatgccgctgcaaagcacagtgcacaccaagcagtg  
 cccgtgctacctggctgtccgagagtgtgacctgacctctgtcttacttgtggagccgc  
 tgaccattgggacagtaaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagtattcagcggggctccaa  
 aaagcatctattgctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaatgaccc  
 tgtgcagaaaaatgaattcatctcagaataactgtggagagattatttctcaaatgaagc  
 tgacagaagagggaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaacttgaacaa  
 tgattttgtggtggatgcaaccgcgaagggtacaaaattcgttttgcaaatcattcgggt  
 aatccaaactgctatgcaaaagtattgatggttaacgggtgatcacaggataggtatttt  
 tgccaagagagccatccagactggcgaagagctgttttttgattacagatacagccaggc  
 tgatgccctgaagtatgtcggcatcgaaagagaatggaaatcccttgacatctgctacc  
 tcctccccctcctctgaaacagctgccttagcttcaggaacctcgagtactgtgggcaa  
 tttagaaaaagaacatgcagtttgaaattctgaatttgcaaagtactgtaagaataattt  
 atagtaatgagtttaaaaatcaactttttattgccttctcaccagctgcaaagtgttttg  
 taccagtgaaatttttgcaataatgcagtatggtacatttttcaactttgataaagaata  
 cttgaacttgccttgttgaatc

**Полная аминокислота EZH2, изоформа а (Номер доступа генного банка NP\_004447) (SEQ ID NO: 3)**

MGQTGKKSEKGPVCRKRKSEYMRLRQLKRRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW  
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRRECSVTSDLDFPTQVPLKTLNVAASVPIMYSWSPLQQNF  
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
 YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
 KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRRCFKYDCFLHRKC  
 NYSFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRR  
 GRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQ  
 TPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESS  
 IIAAPAEDVDTPPRKKRKRHLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCP  
 CVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWD  
 SKNVSCKNCSIQRGSKKHLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRG  
 KVDKYMCSFLNLFNNDVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMVNGDHRIGIFAKRA  
 IQTGEELFFDYRSQADALKYVGIEREMEIF

**Последовательность мРНК EZH2 человека, вариант 2 транскрипта  
 (Номер доступа генного банка NM\_152998) (SEQ ID NO: 4)**

ggcggcgcttgattgggctgggggggccaataaaaagcgatggcgattgggctgccgcgt  
 ttggcgctcgggtccggctcgctccgacaccgggtgggactcagaaggcagtgaggccccg  
 gcggcgggcgggcgggcgcgcgggggcgacgcgcgggaacaacgcgagtcggcgcgcggg  
 acgaagaataatcatgggcccagactgggaagaaatctgagaagggaccagtttgttggcg

5

10

15

20

25

30

35

40

45

gaagcgtgtaaaatcagagtacatgcgactgagacagctcaagagggttcagacgagctga  
 tgaagtaaaagatggttttagttccaatcgtcagaaaaattttgaaaagaacggaaatctt  
 aaaccaagaatggaaaacagcgaaggatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc  
 attgcgcgggactaggagggtggaagatgaaactgttttacataaacattccttatatggg  
 agatgaagtttttagatcaggatgggtactttcattgaagaactaataaaaaattatgatgg  
 gaaagtacacgggatagagaatgtgggtttataaatgatgaaatttttgtggagttggt  
 gaatgcccttggtcaatataatgatgatgacgatgatgatgatggagacgatcctgaaga  
 aagagaagaaaagcagaaagatctggaggatcaccgagatgataaagaaagccgcccacc  
 tcggaattttccttctgataaaaattttgaagccatttctcaatgtttccagataaggg  
 cacagcagaagaactaaaggaaaaatataaagaactcaccgaacagcagctcccaggcgc  
 acttctctcctgaatgtaccccccaacatagatggaccaaagtctaaatctgttcagagaga  
 gcaaagcttacactcctttcatacgttttctgtaggcgatgttttaaatatgactgctt  
 cctacatcctttcatgcaacacccaacacttataagcggagaacacagaacacagctct  
 agacaacaaaccttgtggaccacagtgttaccagcatttggagggagcaaaaggagtttgc  
 tgctgctctcaccgctgagcgggataaagacccccacaaaacgtccaggaggccgcagaag  
 aggacggcttcccaataacagtagcaggccagcacccccaccattaatgtgctggaatc  
 aaaggtattacaactataaccctgtgatccacggcagccttgtgacagtgacaatgataa  
 agaagaagaagagaagaaagatgaaacttcgagctcctctgaagcaaattctcggtgtca  
 aacaccaataaagatgaagccaaatattgaacctcctgagaatgtggagtggagtgggtgc  
 tgaagcctcaatgttttagagtcctcattggcacttactatgacaatttctgtgccattgc  
 taggttaattgggaccaaacaatgtagacaggtgtatgagtttagagtcaaagaatctag  
 catcatagctccagctcccgtgaggtatgtggatactcctccaaggaagaaagaggaa  
 acaccgggtgtgggtgcacactgcagaaagatacagctgaaaagggacggctcctctaa  
 ccagtgtttacaactataaccctgtgatccacggcagccttgtgacagttcgtgcc  
 ttgtgtgatagcacaaaatttttgtgaaaagttttgtcaatgtagttcagagtgtcaaaa  
 ccgctttccgggatgccgctgcaaagcacagtgcacaccaagcagtgcccgctgctacct  
 ggctgtccgagagtgtgaccctgacctctgtcttacttgtggagccgctgaccattggga  
 cagtaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagatttcagcggggctccaaaagcatctatt  
 gctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgcagaaaaa  
 tgaattcatctcagaatactgtggagagattatttctcaagatgaagctgcagaagagg  
 gaaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaactgacaatgattttgtggt  
 ggatgcaaccgcgaagggttaacaaaattcgttttgcaaatcattcggtaaatccaaactg  
 ctatgcaaaaagtattatgatggttaacgggtgatcacaggataggtatttttgccaagagagc  
 catccagactggcgaagagctgtttttgattacagatacagccaggctgatgccctgaa  
 gtatgtcggcatcgaaagagaaatgaaatcccttgacatctgctacctcctccccctc  
 ctctgaaacagctgccttagcttcaggaacctcgagtactgtgggcaatttagaaaaaga  
 acatgcagtttgaaattctgaatttgcaaagtactgtaagaataatttatagtaaatgagt  
 ttaaaaatcaactttttattgccttctcaccagctgcaaagtgttttgtagcagtgaaat  
 tttgcaataatgcagtatggtacatttttcaactttgaataaagaatacttgaacttgct  
 cttgttgaatc

**Полная аминокислота EZH2, изоформа b (Номер доступа генного банка NP\_694543) (SEQ ID NO: 5)**

MGQTGKKSEKGPVCRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKIL  
 ERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTREVEDETVLHNIIPYMGDEVL  
 DQDGTFIIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDD  
 GDDPEEREKQKDLDRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
 LKEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRR  
 FKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALT  
 AERIKTPPKRPGRRRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETG  
 GENNDKEEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASM  
 FRVLIGTYIDNFCIAIRLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPAPAEDVDTPP  
 RKKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIA  
 QNFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCLTCG  
 AADHWDSKNVSKNCSIQRGSKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFIS  
 EYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANH  
 SVNPNCYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGI

EREMEIP

Полная аминокислота EZH2, изоформа е (Номер доступа генного банка NP\_001190178.1) (SEQ ID NO: 21)

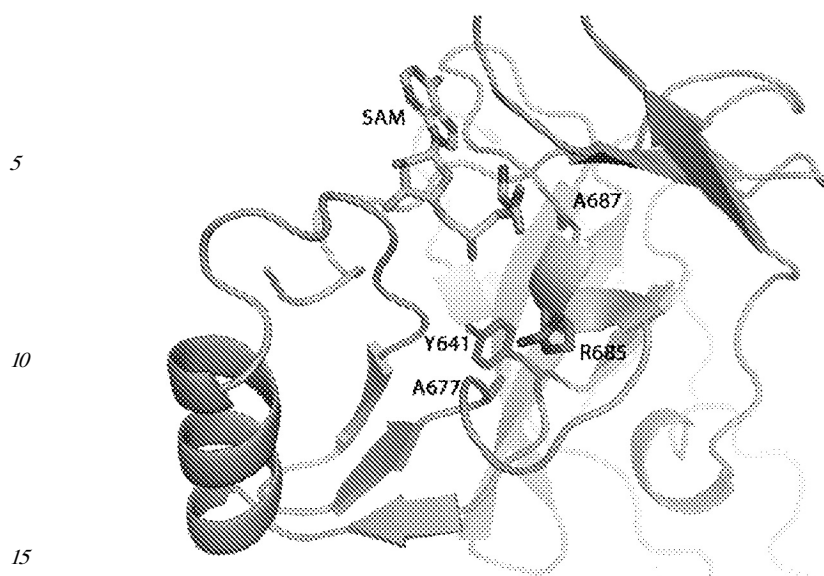
MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEWKQRRIQPVHI  
 LTSCSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIIMYSWSPLQQNFMVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEEL  
 IKNYDGKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDDDDDPEEREKQKDLERDDKESRPPRKFP  
 SDKIFEAISSMFPDKGTAEELKEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRRC  
 FKYDCFLHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLP  
 NNSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPEN  
 VEWGSAEASMFVRLIGTYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPAPAEDVDTPPRKKRKHRLW  
 AAHCRKIQLKKGQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDKSNVSCKNCSIQRGSK  
 KHLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCNFLNLNDFVVDATRKG  
 NKIRFANHSVNPNCYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRSQADALKYVGIEREMEIP

Человеческий энхансер гомолога-2 белка Zeste (Дрозофила) (EZH2), вариант 5 транскрипта, мРНК (Номер доступа генного банка NM\_001203249.1) (SEQ ID NO: 22)

GACGACGTTTCGCGCGGGGAACTCGGAGTAGCTTCGCTCTGACGTTTCCCCACGACGACCCCCGAAATC  
 CCCCTGAGCTCCGCGGGTTCGCGGGCTGCCCTCGCGCGCTGGTCTGGCTTTATGCTAAGTTTGAGGGAAGA  
 GTCGAGCTGCTCTGCTCTCTATTGATTGTGTTTCTGGAGGGCGTCTGTTGAATTCCTACTTCATTGTGT  
 ACATCCCTTCCGTTCCCCCAAAATCTGTGCCACAGGGTTACTTTTGAAGCGGGAGGAATCGAGAA  
 GCACGATCTTTTGGAAACTTGGTGAACGCCATAATAATCATGGGCCAGACTGGGAAGAAATCTGAGAAG  
 GGACCACTTGTGGCGGAAGCGTGTAATCAGAGTACATGCGACTGAGACAGCTCAAGAGGTTTCAGAC  
 GAGCTGATGAAGAAAGAGTATGTTTAGTTCCAATCGTCAGAAAATTTTGAAAGAACGGAATCTTAA  
 CCAAGAAATGGAAACAGCGAAGGATACAGCCTGTGCACATCCTGACTTCTTGTTCGGTGACCAGTGACTTG  
 GATTTTCCAACACAAGTCATCCCATTAAGACTCTGAATGCAGTTGCTTCAGTACCCATAATGTATTCTT  
 GGTCTCCCTACAGCAGAAATTTATGGTGGAAGTGAAGTGTTCATATAACATTCTTATATGGGAGA  
 TGAAGTTTATGATCAGGATGGTACTTTCATTGAAGAACTAATAAAAAATATGATGGGAAAGTACACGGG  
 GATAGAGAATGTGGGTTTATAAATGATGAAATTTTGTGGAGTTGGTGAATGCCCTTGGTCAATATAATG  
 ATGATGACGATGATGATGATGGAGACGATCCTGAAGAAAGAGAAGAAAAGCAGAAAGATCTGGAGGATCA  
 CCGAGATGATAAAGAAAGCGCCACCTCGGAAATTTCTTCTGATAAAATTTTGAAGCCATTTCCTCA  
 ATGTTTCCAGATAAGGGCACAGCAGAAAGAACTAAAGGAAAAATATAAAGAACTACCGAACAGCAGCTCC  
 CAGGCGCACTTCTCTGATGTACCCCCAACATAGATGGACCAATGTAAATCTGTTTCAGAGAGAGCA  
 AAGCTTACACTCCTTTTACATCGCTTTTCTGTAGGCGATGTTTTAAATATGACTGCTTCTACATCCTTTT  
 CATGCAACACCCAACTTATAAGCGGAAGAACACAGAAACAGCTCTAGACAACAACTTGTGGACCAC  
 AGTGTATACCAGCATTTGGAGGGAGCAAAGGAGTTTGCTGCTGCTCTACCGCTGAGCGGATAAAGACCCC  
 ACCAAAACGTCCAGGAGGCCGAGAAAGAGGACGGCTTCCCAATAACAGTAGCAGGCCAGCACCCCCACC  
 ATTAATGTCTGGAATCAAAGGATACAGACAGTATAGGAAGCAGGGACTGAAACGGGGGAGAGAAACA  
 ATGATAAAGAAAGAAAGAGAAAGATGAAACTTCGAGCTCCTCTGAAGCAAATTTCTCGGTGTCAAAC  
 ACCAATAAAGATGAAGCCAAATATTGAACCTCTGAGAATGTGGAGTGGAGTGGTGTGAAGCCTCAATG  
 TTTAGAGTCTCATTGGCACTTACTATGACAAATTTCTGTGCCATTGCTAGGTAAATTGGGACCAAAACAT  
 GTAGACAGGTGTATGATTTAGAGTCAAAGAACTAGCATCATAGCTCCAGCTCCCGCTGAGGATGTGGA  
 TACTCTCCAAGGAAAAAGAGAGAAACACCGGTTGTGGGCTGCACACTGCAGAAAGATACAGCTGAAA  
 AAGGGTCAAAACCGCTTTCCGGGATGCCGCTGCAAAGCACAGTGCAACACCAAGCAGTGCCCGTGCTACC  
 TGGTGTCCGAGAGTGTGACCCTGACCTCTGTCTTACTTGTGGAGCCGCTGACCATTGGGACAGTAAAAA  
 TGTCTCTGCAAGAAGTGCAGTATTACGCGGGCTCCAAAAGCATCTATTGCTGGCACCATCTGACGTG  
 GCAGGCTGGGGGATTTTATCAAAGATCCTGTGCAGAAAAATGAATTCATCTCAGAATACTGTGGAGAGA  
 TTATTTCTCAAGATGAAGCTGACAGAAGAGGGAAAGTGTATGATAAATACATGTGCAGCTTTCTGTTCAA  
 CTTGAACAATGATTTTGTGGTGGATGCAACCCGCAAGGGTAACAAATTCGTTTTGCAATCATTCCGTA  
 AATCCAACTGCTATGCAAAAGTTATGATGGTTAACGGTGATCACAGGATAGGTATTTTGCCAAGAGAG  
 CCATCCAGACTGGCGAAGAGCTGTTTTTTGATTACAGATACAGCCAGGCTGATGCCCTGAAGTATGTCGG  
 CATCGAAAGAGAAATGGAAATCCCTTGACATCTGCTACCTCTCCCCCTCTCTGAAACAGCTGCCTTA  
 GCTTCAGGAACCTCGAGTACTGTGGCAATTTAGAAAAAGAACATGCAGTTTGAAATCTGAATTTGCAA  
 AGTACTGTAAGAATAATTTATAGTAATGAGTTTAAAAATCAACTTTTATTGCCTTCTACCAGCTGCAA  
 AGTGTTTTGTACCAGTGAATTTTGAATAATGCAGTATGGTACATTTTCAACTTTGAATAAAGAATAC

TTGAACTTGTCTTGTGTAATC

Ниже представлена структурная модель частичного белка EZH2 на основании цепи А ядерного рецептора домен SET-связывающего белка 1 (NSD1). Эта модель соответствует аминокислотным остаткам 533-732 последовательности EZH2, представленной SEQ ID NO: 1.



Ниже представлена соответствующая аминокислотная последовательность данной структурной модели. Подчеркнуты остатки в домене субстратного кармана. Остатки в домене SET показаны курсивом.

SCPCVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAA  
 DHWDSKNVSCKNCSIQRGSKK<sup>641</sup>HLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEY<sup>641</sup>CGEIISQDEA  
 DRRGKVYDKYMC<sup>674</sup>SFLN<sup>677</sup>LNDFY<sup>677</sup>YDA<sup>677</sup>TRKGNKIR<sup>685</sup>EA<sup>687</sup>NHSVNPNCYAKVMMVNGD  
 HRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQAD (SEQ ID NO: 6)

Считают, что каталитический сайт EZH2 находится в консервативном домене белка, известном как домен SET. Аминокислотная последовательность домена SET EZH2 представлена следующей частичной последовательностью, охватывающей аминокислотные остатки 613-726, Номер доступа в Швейцарской базе данных белковых последовательностей Q15910 (SEQ ID NO: 1):

HLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEY<sup>641</sup>CGEIISQDEADRRGKVYDKYMC<sup>674</sup>SFLN<sup>677</sup>LNDFVVD  
 ATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDY (SEQ ID NO: 7).

Остаток тирозина (Y), показанный подчеркнутым с последовательности, представленной SEQ ID NO: 7, представляет собой Tyr641 (Y641) в Швейцарской базе данных белковых последовательностей Q15910 (SEQ ID NO: 1).

Домен SET под номером доступа в генном банке NP\_004447 (SEQ ID NO: 3) охватывает аминокислотные остатки 618-731 и идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO: 6. Остаток тирозина, соответствующий Y641 под номером доступа в генном банке Q15910, показанный подчеркнутым в последовательности, представленной SEQ ID NO: 7, представляет собой Tyr646 (Y646) под номером доступа в генном банке NP\_004447 (SEQ ID NO: 3).

Домен SET под номером доступа в генном банке NP\_694543 (SEQ ID NO: 5) охватывает аминокислотные остатки 574-687 и идентичен последовательности, представленной SEQ ID NO: 7. Остаток тирозина, соответствующий Y641 под номером доступа в генном банке Q15910, показанный подчеркнутым в последовательности, представленной SEQ ID NO: 7, представляет собой Tyr602 (Y602) под номером доступа в генном банке NP\_694543 (SEQ ID NO: 5).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая домен SET, под номером доступа в генном банке NP\_004447 представляет собой

catctattgctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgcaga  
 aaaatgaattcatctcagaatactgtggagagattattttctcaagatgaagctgacagaagagg  
 gaaagtgtatgataaatacatgtgcagcttttctgttcaacttgaacaatgattttgtggtggat  
 5 gcaacccgcaagggtaacaaaattcggttttgcaaatacttcggtaaatccaaactgctatgcaa  
 aagttatgatggttaacgggtgatcacaggataggtatttttgccaagagagccatccagactgg  
 cgaagagctgttttttgattac

(SEQ ID NO: 8),

где кодон, кодирующий Y641, показан подчеркнутым.

С точки зрения настоящей заявки, следует понимать, что аминокислотный остаток Y641 EZH2 человека относится к остатку тирозина, который представляет собой или соответствует Y641 номеру доступа в Швейцарской базе данных белковых  
 15 последовательностей Q15910.

Полная аминокислотная последовательность Мутантной по Y641 EZH2, (SEQ ID NO: 9)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTTEILNQEW  
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFTI EELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
 20 YNDDDDDDGDDPEEREKQKQDLEDHRDDKESRPPKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
 KEKYKELTEQQLPALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH  
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRRLPN  
 NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYIDNFCIAIRLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
 PAEDVDTPPRKKKKRHLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNKQPCYLAVERCDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
 CKNCISIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEXCGEIIISQDEADRRGKVYDK  
 25 YMCSTFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHVNPNKYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

где x может представлять собой любой аминокислотный остаток, кроме тирозина (Y)

Также, с точки зрения настоящей заявки, следует понимать, что мутантная по Y641  
 30 EZH2 человека и, эквивалентно, мутантной по Y641 EZH2, относятся к EZH2 человека, в которой аминокислотный остаток, соответствующий Y641 EZH2 человека дикого типа, замещен аминокислотным остатком, отличным от тирозина.

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность мутантной по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека  
 35 дикого типа замещением только одного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 человека дикого типа, аминокислотным остатком, отличным от тирозина.

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность мутантной по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека  
 40 дикого типа только замещением фенилаланином (F) одного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 человека дикого типа. Мутантная по Y641 EZH2 в соответствии с настоящим вариантом осуществления именуется здесь мутантом Y641F или, эквивалентно, Y641F.

## Y641F (SEQ ID NO: 10)

MGQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW  
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
 YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
 KEKYKELTEQQPLGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPFH  
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN  
 NSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVIGTYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
 CKNCISIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEFCGEIISQDEADRRGKVYDK  
 YMCSTFLNLLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность мутантная по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека дикого типа только замещением гистидином (H) одного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 человека дикого типа. Мутантная по Y641 EZH2 в соответствии с настоящим вариантом осуществления именуется здесь мутантом Y641H или, эквивалентно, Y641H.

## Y641H (SEQ ID NO: 11)

MGQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW  
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
 YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
 KEKYKELTEQQPLGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPFH  
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN  
 NSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVIGTYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
 CKNCISIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEHCGEIIISQDEADRRGKVYDK  
 YMCSTFLNLLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность мутантной по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека дикого типа только замещением аспарагином (N) одного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 человека дикого типа. Мутантная по Y641 EZH2 в соответствии с настоящим вариантом осуществления именуется здесь мутантом Y641N или, эквивалентно, Y641N.

## Y641N (SEQ ID NO: 12)

MGQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW  
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
 YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
 KEKYKELTEQQPLGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPFH  
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN  
 NSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFRLVIGTYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
 CKNCISIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISENCGEIIISQDEADRRGKVYDK  
 YMCSTFLNLLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность мутантной по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека



дикого типа только замещением серином (S) одного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 человека дикого типа. Мутантная по Y641 EZH2 в соответствии с настоящим вариантом осуществления именуется здесь мутантом Y641S или, эквивалентно, Y641S.

#### Y641S (SEQ ID NO: 13)

MGQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW  
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
YNDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL

KEKYKELTEQQLPALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHFPFH  
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN  
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYDNCFAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
CKNCISIQRGSKKHLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISECCGEIISQDEADRRGKVYDK  
YMCSEFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность мутантной по Y641 EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека дикого типа только замещением цистеином (C) одного аминокислотного остатка, соответствующего Y641 EZH2 человека дикого типа. Мутантная по Y641 EZH2 в соответствии с настоящим вариантом осуществления именуется здесь Y641C мутантом или, эквивалентно, Y641C.

#### Y641C (SEQ ID NO: 14)

MGQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW  
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
YNDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
KEKYKELTEQQLPALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHFPFH  
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN  
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYDNCFAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
NFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
CKNCISIQRGSKKHLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISECCGEIISQDEADRRGKVYDK  
YMCSEFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность A677 мутантной EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека дикого типа только замещением аминокислотой (но не анилином), предпочтительно глицином (G), одного аминокислотного остатка, соответствующего A677 EZH2 человека дикого типа. A677 мутант EZH2 в соответствии с настоящим вариантом осуществления именуется здесь мутантом A677, а предпочтительно мутантом A677G или, эквивалентно, A677G.

#### A677 (SEQ ID NO: 15)

MGQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW  
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
YNDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
KEKYKELTEQQLPALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHFPFH  
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN  
NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYDNCFAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA

PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
 NFCEKFCQCSSECCQNRFPGRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
 CKNCISIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEII SQDEADRRGKVYDK  
 YMCSEFLNLDNFVVDXTRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

где x предпочтительно представляет собой глицин (G)

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность A687 мутантной EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека дикого типа только замещением аминокислотой (но не аланином), предпочтительно валином (V), одного аминокислотного остатка, соответствующего A687 EZH2 человека дикого типа. Мутант A687 EZH2 в соответствии с настоящим вариантом осуществления именуется здесь мутантом A687, а предпочтительно мутантом A687V или, эквивалентно, A687V.

#### A687 (SEQ ID NO: 16)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEVKSMSFSSNRQKILERTEILNQEW  
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSTVSDLDFTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
 YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
 KEKYKELTEQQPLGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH  
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRGRLPN  
 NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
 NFCEKFCQCSSECCQNRFPGRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
 CKNCISIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEII SQDEADRRGKVYDK  
 YMCSEFLNLDNFVVDATRKGNKIRFXNHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

где X представляет собой предпочтительно валин (V)

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность R685 мутантной EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека дикого типа только замещением аминокислотой (но не аргинином), предпочтительно гистидином (H) или цистеином (C), одного аминокислотного остатка, соответствующего R685 EZH2 человека дикого типа. Мутант R685 EZH2 в соответствии с настоящим вариантом осуществления именуется здесь мутантом R685, а предпочтительно мутантом R685C или мутантом R685H или, эквивалентно, R685H или R685C.

#### A685 (SEQ ID NO: 17)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADEVKSMSFSSNRQKILERTEILNQEW  
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSTVSDLDFTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
 MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
 YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
 KEKYKELTEQQPLGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH  
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRGRLPN

NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
 NFCEKFCQCSSECCQNRFPGRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
 CKNCISIQRGSKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEII SQDEADRRGKVYDK  
 YMCSEFLNLDNFVVDATRKGNKIXFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE  
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

где X представляет собой предпочтительно цистеин (C) или гистидин (H)

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность мутантной EZH2 отличается от аминокислотной последовательности EZH2 человека дикого типа одним или несколькими аминокислотными остатками в его домене субстратного

кармана, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6. Мутант EZH2 в соответствии с настоящим вариантом осуществления именуется здесь мутантной EZH2.

Мутантная EZH2, содержащая одну или несколько мутаций в домене субстратного кармана (SEQ ID NO: 8)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW  
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRCSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF  
MVEDETVLHNIPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ  
YNDDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL  
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHFPFH  
ATPNTYKRRKNTETALDNKPCGPGQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRGRRLPN  
NSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM  
KPNIEPPEENVESGAEASMFRLIGTYDYNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA  
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ  
NFCEKFCQCSSECQNRFGCRCAQCNTKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS  
CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEXCGEIIISQDEADRRGKVYDK  
YMXXXLXNLNNDFFXXDXTRKGNKXXXXHNVNPNKYAKVMMVNGDHRXGIFAKRAIQTGE  
ELFXDXRYSXADALKYVGIEREMEIP

где X представляет собой любую аминокислоту, кроме соответствующего остатка дикого типа

Значения настоящих результатов применительно заболеваний у людей становятся ясными из данных, суммированных в таблице 2 (см. пример 5). Следовало бы ожидать, что клетки, гетерозиготные в отношении EZH2, должны проявлять злокачественный фенотип вследствие эффективного образования H3-K27me1 ферментом дикого типа и эффективного, последующего перехода этого вида-предшественника в H3-K27me2 и, в частности, H3-K27me3, под действием мутантной формы (форм) фермента.

Сообщалось, что образование H3-K27me1 не зависит исключительно от катализа WT-EZH2. Исследование нокаута EZH2 и другой субъединицы PRC2, EED, продемонстрировало, что образование H3-K27me1 может катализироваться комплексами PRC2, содержащими или EZH2, или родственным белком EZH1 в качестве каталитической субъединицы (Shen, X. et al. (2008) Mol Cell 32:491-502). Следовательно, каталитическая связь между видами мутантной EZH2 и комплексами PRC2, содержащими или WT-EZH2, или WT-EZH1, была бы достаточной для увеличения образования H3-K27me2/3, и, таким образом, продуцировать сопровождающий злокачественный фенотип. Поэтому полученные данные свидетельствуют о том, что злокачественный фенотип фолликулярной лимфомы (FL) и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) подтипа В-клеток зародышевого центра (GCB), связанных с экспрессией мутантных форм EZH2, является результатом общей прибавки функции в отношении образования триметилированной формы H3-K27. Эта интерпретация данных также помогает совмещать существование связанной с раком сверхэкспрессией EZH2 или связанных с PRC2 белками (например, PHF19/PCL3), а также генотипами утраты функции для UTX H3-K27-деметилазы гистона. Утрата активности UTX была бы ферментативно эквивалентной приобретению функции для EZH2, в любой ситуации приводя к более высоким уровням в стационарном состоянии триметилированного H3-K27 в раковых клетках (фиг. 4).

Состояния моно-, ди- и триметилирования гистона H3-K27 связаны с различными функциями в транскрипционном контроле. Монометилирование гистона H3-K27 связано с активной транскрипцией генов, которые стабилизируются для транскрипции (Cui et al. (2009) Cell Stem Cell 4:80-93; Barski (2007) Cell 129:823-37). Напротив, триметилирование гистона H3-K27 связано или с транскрипционно репрессированными генами или генами, которые стабилизируются для транскрипции, когда триметилирование гистона H3-K4

находится в цис-положении (Cui et al. (см. выше); Kirmizis et al. (2007) *Genes Dev* 18: 1592-1605; Bernstein et al. (2006) *Cell* 125: 315-26). Взятые вместе, изменения активности комплекса PRC2, о которых сообщалось при раке, включая Y641 мутацию EZH2, по прогнозам, приводят к увеличению состояния триметилирования гистона H3-K27 и, таким образом, приводят к транскрипционной репрессии.

Другое открытие настоящего изобретения состоит в том, что клетки, экспрессирующие мутантную EZH2, содержащую мутацию в домене субстратного кармана, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6, в целом, более чувствительны к низкомолекулярным ингибиторам EZH2, чем клетки, экспрессирующие EZH2 дикого типа (WT). В частности, клетки, экспрессирующие EZH2, мутантную по Y641, проявляют уменьшенный рост, деление или пролиферацию или даже подвергаются апоптозу или некрозу после обработки ингибиторами EZH2. Напротив, клетки, экспрессирующие EZH2 WT, не реагируют на антипролиферативное воздействие ингибиторов EZH2 (Фиг. 13 и 14). В частности, клетки, экспрессирующие мутацию замещения в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, проявляют большую чувствительность к ингибиторам EZH2, чем клетки, экспрессирующие другие мутанты EZH2 (пример 19).

Предполагалось, что EZH2 и другие протеин-метилтрансферазы являются привлекательными мишенями для изыскания новых лекарственных средств (Copeland et al. (2009) *Nat Rev Drug Discov* 8:724-32; Copeland et al. (2010) *Curr Opin Chem Biol* 14(4):505-10; Pollock et al. (2010) *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 6(1):71-9).

Представленные в настоящем описании данные также предлагают экспериментальную стратегию для разработки лекарственных средств, специфичных для FL и GCB лимфомы. Поскольку различия субстратного распознавания между WT и связанными с заболеванием мутантами происходят из взаимодействий переходных состояний, низкомолекулярные ингибиторы, которые селективно имитируют переходное состояние мутантной EZH2 относительно состояния фермента WT, должны оказаться эффективными в блокировании метилирования H3-K27 в несущих мутацию клетках. Следовало бы ожидать, что ингибиторы этого типа проявят большой терапевтический индекс, поскольку опосредованная мишенью токсичность была бы минимальной для любых клеток, несущих только фермент WT. Оказалось, что мимикрия переходного состояния является эффективной стратегией для конструирования лекарственных средств во многих областях патологии. См., например, руководство Copeland, R.A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. 2nd ed, (Wiley, 2000).

Представленные в настоящем описании результаты указывают на ранее нераспознанную, удивительную зависимость от ферментативной связи между ферментами, которые выполняют монометилирование H3-K27, и определенными мутантными формами EZH2 для патогенеза при фолликулярной лимфоме и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме. Хотя и без намерения быть связанными любой теорией, заявители считают, что представленные данные являются первым примером заболевания человека, которое зависит от такой связи каталитической активности между нормальными (WT) и связанными с заболеванием мутантными (такими как Y641) ферментами.

Одним аспектом настоящего изобретения является способ лечения или облегчения симптома рака или предракового состояния у индивида введением индивиду, экспрессирующему мутантную EZH2, содержащую мутацию в домене субстратного кармана, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6,

терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2.

Другим аспектом настоящего изобретения является способ ингибирования у индивида превращения H3-K27 в триметилированный H3-K27. Ингибирование может включать ингибирование у индивида превращения неметилированного H3-K27 в  
 5 монометилированный H3-K27, превращение монометилированного H3-K27 в диметилированный H3-K27, превращение диметилированного H3-K27 в триметилированный H3-K27 или любую их комбинацию, включая, например, превращение монометилированного H3-K27 в диметилированный H3-K27 и превращение диметилированного H3-K27 в триметилированный H3-K27. Используемый здесь термин  
 10 неметилированный H3-K27 относится к гистону H3 без метильной группы, ковалентно связанной с аминокислотной группой лизина 27. Используемый здесь термин монометилированный H3-K27 относится к гистону H3 с одной метильной группой, ковалентно связанной с аминокислотной группой лизина 27. Монометилированный H3-K27 также относится к описываемому здесь гистону H3-K27me1. Используемый здесь термин диметилированный  
 15 H3-K27 относится к гистону H3 с двумя метильными группами, ковалентно связанными с аминокислотной группой лизина 27. Диметилированный H3-K27 также относится к описываемому здесь гистону H3-K27me2. Используемый здесь термин триметилированный H3-K27 относится к гистону H3 с тремя метильными группами, ковалентно связанными с аминокислотной группой лизина 27. Триметилированный H3-K27 также относится к описываемому  
 20 здесь гистону H3-K27me3.

Гистон H3 представляет собой белок длиной 136 аминокислот, последовательность которых известна. См., например, номер доступа в генном банке CAB02546, содержание которого включено сюда путем ссылки. Как раскрыто здесь далее, в дополнение к гистону H3 полной длины, пептидные фрагменты гистона H3, содержащие остаток  
 25 лизина, соответствующий K27 гистона H3 полной длины, можно использовать в качестве субстрата для EZH2 (и аналогичным образом для мутантных форм EZH2) для оценки превращения H3-K27m1 в H3-K27m2 и превращения H3-K27m2 в H3-K27m3. В одном варианте осуществления такой пептидный фрагмент соответствует аминокислотным остаткам 21-44 гистона H3. Такой пептидный фрагмент имеет аминокислотную  
 30 последовательность LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO: 19).

Способ по настоящему изобретению включает введение индивиду, экспрессирующему мутантную EZH2, терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2, причем ингибитор ингибирует активность метилтрансферазы гистона EZH2, посредством этого ингибируя превращение H3-K27 в триметилированный H3-K27 у индивида и, таким  
 35 образом, обеспечивая лечение или облегчение симптома рака или расстройств, связанных с патологическими уровнями метилирования гистона у индивида.

Индивид, экспрессирующий мутантную EZH2 по настоящему изобретению, относится к индивиду, имеющему выявляемое количество полипептида мутантной EZH2. Предпочтительно, полипептид мутантной EZH2 содержит одну или несколько мутаций  
 40 в ее домене субстратного кармана, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6. Иллюстративная мутация включает замещение в аминокислотном положении 677, 687, 674, 685 или 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, такое как без ограничения замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности,  
 45 представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V); замещение метионином (M) остатка дикого типа валина (V) в аминокислотном положении 674 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1

(V674M); замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C); замещение фенилаланином (F) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641F); замещение гистидином (H) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641H); замещение аспарагином (N) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641N); замещение серином (S) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641S); или замещение цистеином (C) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641C). Предпочтительнее, индивид имеет выявляемое количество полипептида мутантной EZH2, содержащего замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V); замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); или замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C).

Альтернативно, индивид, экспрессирующий мутантную EZH2 по настоящему изобретению, относится к индивиду, имеющему выявляемое количество

последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид мутантной EZH2. Предпочтительно, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид мутантной EZH2, содержит одну или несколько мутаций в ее домене субстратного кармана, как определено в SEQ ID NO: 6. Иллюстративная мутация включает замещение в аминокислотном положении 677, 687, 674, 685 или 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, такое как без ограничения замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V); замещение метионином (M) остатка дикого типа валина (V) в аминокислотном положении 674 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (V674M); замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C); замещение фенилаланином (F) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641F); замещение гистидином (H) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641H); замещение аспарагином (N) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641N); замещение серином (S) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641S); или замещение цистеином (C) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1

(Y641C). Предпочтительнее, индивид имеет выявляемое количество последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид мутантной EZH2, содержащей замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V); замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); или замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C).

#### ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАНТОВ EZH2

Полипептид мутантной EZH2 можно выявить, используя любой пригодный способ. Например, полипептид мутантной EZH2 можно выявить, используя антитело, которое специфически связывается с полипептидом мутантной EZH2 или с пептидным фрагментом, который характерен для полипептида мутантной EZH2. Пептидный фрагмент, который характерен для полипептида мутантной EZH2, может включать, например, домен SET, представленный в последовательности, представленной SEQ ID NO: 7, за исключением замещения одного или нескольких остатков в домене субстратного кармана, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6, аминокислотным остатком, отличным от остатка дикого типа. В другом варианте осуществления пептидный фрагмент, который характерен для полипептида мутантной EZH2, может включать, например, фрагмент 10-113 аминокислот домена SET, представленный в последовательности, представленной SEQ ID NO: 7, за исключением замещения одного или нескольких остатков в домене субстратного кармана, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6, аминокислотным остатком, отличным от остатка дикого типа, при условии, что фрагмент включает аминокислотный остаток, соответствующий мутации EZH2. Считают, что антитело специфически связывается с полипептидом мутантной EZH2 или с пептидным фрагментом, который характерен для полипептида мутантной EZH2, если он связывается с этим полипептидом мутантной EZH2 или его пептидным фрагментом, но не с соответствующим полипептидом EZH2 дикого типа или его пептидным фрагментом. В одном варианте осуществления считают, что такое антитело специфически связывается с полипептидом мутантной EZH2 или с пептидным фрагментом, который характерен для полипептида мутантной EZH2, если он связывается с этим полипептидом мутантной EZH2 или его пептидным фрагментом с аффинностью, который, по меньшей мере, приблизительно в 100 раз больше, чем с соответствующим полипептидом EZH2 дикого типа или его пептидным фрагментом. В одном варианте осуществления считают, что такое антитело специфически связывается с полипептидом мутантной EZH2 или с пептидным фрагментом, который характерен для полипептида мутантной EZH2, если он связывается с этим полипептидом мутантной EZH2 или его пептидным фрагментом с аффинитетом, который, по меньшей мере, приблизительно в 1000 раз больше, чем с соответствующим полипептидом EZH2 дикого типа или его пептидным фрагментом. Это антитело можно использовать, например, в ферментном иммуносорбентном анализе (ELISA) или анализе вестерн-блоттинга. Антитело может быть моноклональным, поликлональным, химерным или представлять собой фрагмент антитела. Стадию выявления продукта реакции можно проводить любым пригодным иммуноанализом.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. Моноклональное антитело можно получить в соответствии с обычными

способами, хорошо известными в данной области. См., например, публикацию Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256 (5517):495-7.

В качестве другого примера, полипептид мутантной EZH2 можно выявить, используя масс-спектрометрию (MS), например, электрораспылительной ионизацией в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией (ESTTOF) или лазерной десорбцией/ионизацией с использованием вспомогательной матрицы в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF). Такие способы хорошо известны в данной области. Анализ включает идентификацию одного или нескольких пептидных фрагментов, содержащих представляющую интерес мутацию, например, пептид длиной от 12 до 24 аминокислот, содержащий последовательность, охватывающую аминокислоту, соответствующую мутации в EZH2 дикого типа.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид мутантной EZH2 или пептидный фрагмент, который характерен для полипептида мутантной EZH2, можно выявить, используя любой подходящий способ. Например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид мутантной EZH2, можно выявить, используя ресеквенирование всего генома или ресеквенирования области-мишени (последнее также известно, как прицельное ресеквенирование) с использованием подходящим образом выбранных источников ДНК и праймеров полимеразной цепной реакции (ПЦР), в соответствии со способами, хорошо известными в данной области. См., например, публикации Bentley (2006) *Curr Opin Genet Dev.* 16:545-52 и Li et al. (2009) *Genome Res* 19: 1124-32. Этот способ обычно и в целом предусматривает стадии очистки геномной ДНК, ПЦР амплификацию для амплификации представляющей интерес области, циклического секвенирования, очистки реакции секвенирования, капиллярного электрофореза и анализа данных. Высококачественные праймеры ПЦР для охвата представляющей интерес области конструируют, используя инструменты компьютерного моделирования конструирования праймеров. Циклическое секвенирование представляют собой простой способ, при котором последовательные циклы денатурации, отжига и достройки в термоциклере приводят к линейной амплификации продуктов достройки. Продукты обычно заканчиваются флуоресцентной меткой, которая идентифицирует концевое основание нуклеотида как G, A, T или C. Не включенные красители-терминаторы и соли, которые могут конкурировать за капиллярную электрофоретическую инъекцию, удаляют промыванием. Во время капиллярного электрофореза продукты реакции циклического секвенирования мигрируют через капилляры, заполненные полимером. Отрицательно заряженные фрагменты ДНК отделяют по размеру по мере их движения через капилляры в сторону положительного электрода. После электрофореза программное обеспечение сбора данных создает файл-пример необработанных данных. Используя применение программного обеспечения передачи данных по направлению основного трафика, выполняют дальнейший анализ данных для трансляции собранных данных цветных изображений в соответствующие нуклеотидные основания. Альтернативно или в дополнение, способ может включать использование основанных на микрочипе захвата и/или секвенирования геномной ДНК целевой области. Наборы, реагенты и способы отбора соответствующих праймеров ПЦР и инструкции по выполнению ресеквенирования имеются в продаже, например, из руководства Applied Biosystems, Agilent, and NimbleGen (Roche Diagnostics GmbH). Способы, такие как эти, использовали для выявления мутаций JAK2 и гена миелопролиферативного лейкоза (MPL) и для диагностики истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии и идиопатического миелофиброза. Для применения в настоящем изобретении, праймеры ПЦР можно выбрать с тем, чтобы амплифицировать,



например, по меньшей мере, релевантную часть последовательности, представленной SEQ ID NO: 8 (см. выше).

Альтернативно или в дополнение, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид мутантной EZH2, можно выявить, используя Саузерн-  
 5 блоттинг, в соответствии со способом, хорошо известным в данной области. В одном варианте осуществления последовательность ДНК, кодирующая полипептид мутантной EZH2, выявляют, используя гибридизацию последовательности нуклеиновой кислоты, выполняемую в высоко строгих условиях. Зонд нуклеиновой кислоты выбирают так, чтобы его последовательность была комплементарной последовательности нуклеиновой  
 10 кислоты-мишени, которая включает кодон для мутантной аминокислоты, соответствующей мутации EZH2 дикого типа. Такая мутация включает любую мутацию EZH2, предпочтительно одну или несколько мутаций в домене субстратного кармана, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6 EZH2, такую как без ограничения замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в  
 15 аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V); замещение метионином (M) остатка дикого типа валина (V) в аминокислотном положении 674 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (V674M); замещение гистидином  
 20 (H) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C); замещение фенилаланином (F) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности,  
 25 представленной SEQ ID NO: 1 (Y641F); замещение гистидином (H) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641H); замещение аспарагином (N) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641N); замещение серином (S) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном  
 30 положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641S); или замещение цистеином (C) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641C).

Последовательность-специфический зонд комбинируют с подлежащим тестированию образцом в высоко строгих условиях. Используемый здесь термин «высоко строгие  
 35 условия» относится к параметрам, которые известны в данной области. Параметры гибридизации нуклеиновой кислоты можно найти в ссылках, в которых описаны такие способы, например, в руководствах J. Sambrook, et al., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или F. M. Ausubel, et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &  
 40 Sons, Inc., New York. Конкретнее, используемый здесь термин «высоко строгие условия» относится, например, к гибридизации при 65°C в гибридизационном буфере (3,5×SSC, 0,02% Фиколл, 0,02% поливинилпирролидон, 0,02% бычий сывороточный альбумин (BSA), 2,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7), 0,5% SDS, 2 mM EDTA). SSC представляет собой 0,15 M хлорид натрия/0,015 M цитрат натрия, pH 7; SDS представляет собой додецилсульфат  
 45 натрия; и EDTA представляет собой этилендиаминтетрауксусную кислоту. После гибридизации мембрану, на которой переносят ДНК, промывают, например, в 2×SSC при комнатной температуре и затем в 0,1-0,5×SSC/0,1×SDS при температурах до 68°C.

Существуют другие условия, реагенты и т.д., которые можно использовать, что

приводит к подобной степени строгости. Специалисту в данной области известны такие условия, и поэтому они не приводятся в настоящем описании. Однако следует понимать, что специалист сможет манипулировать условиями таким образом, чтобы обеспечить возможность четкой идентификации связанных с EZH2 нуклеиновых кислот по изобретению, включая, в частности, нуклеиновые кислоты, кодирующие мутанты EZH2 (например, использованием менее строгих условий). Специалист в данной области также знаком с методологией скрининга клеток и библиотек для экспрессии таких молекул, которые затем изолируют обычным образом с последующим выделением молекулы соответствующей нуклеиновой кислоты и секвенированием.

Индивиду вводят терапевтически эффективное количество ингибитора EZH2. Используемый здесь термин ингибитор EZH2 относится в целом к небольшой молекуле, т.е. молекуле с молекулярной массой менее чем примерно 1,5 килодальтон (кДа), которая способна препятствовать ферментативной активности метилтрансферазы гистона EZH2.

В одном варианте осуществления ингибитор EZH2 ингибирует активность метилтрансферазы гистона EZH2 дикого типа. В одном варианте осуществления ингибитор EZH2 ингибирует активность метилтрансферазы гистона мутантной EZH2. В одном варианте осуществления ингибитор EZH2 ингибирует активность метилтрансферазы гистона EZH2 дикого типа и активность метилтрансферазы гистона мутантной EZH2. В одном варианте осуществления ингибитор EZH2 селективно ингибирует активность метилтрансферазы гистона мутантной EZH2.

Как раскрыто в настоящем описании, определенные мутанты EZH2 (такие как Y641) являются относительно слабыми катализаторами для превращения неметирированного H3-K27 в H3-K27me1 и в то же время неожиданно эффективными катализаторами для превращения H3-K27me2 в H3-K27me3. Определенные мутанты EZH2 (такие как A687) предпочитают субстрат монометил H3-K27. В отличие от этого, определенные мутанты EZH2 (такие как A677) проявляют равное предпочтение среди неметирированного, монометирированного и диметирированного H3-K27. Напротив, EZH2 дикого типа является относительно эффективным катализатором превращения неметирированного H3-K27 в H3-K27me1 и в то же время неожиданно неэффективным катализатором превращения H3-K27me2 в H3-K27me3. Это важно, потому что моно-, ди- и триметирированное состояния H3-K27 проявляют различные функции в транскрипционной регуляции. Например, H3-K27me1 связан с активной транскрипцией генов, которые готовы к транскрипции, тогда как H3-K27me3 связан с транскрипционно репрессированными генами или с генами, которые готовы к транскрипции, когда триметирирование H3-K4 находится в цис-положении. Таким образом, селективное ингибирование активности метилтрансферазы гистона мутанта EZH2 воздействует на селективное ингибирование продукции различных метилированных форм H3-K27, посредством этого модифицируя транскрипцию, связанную с уровнями метилирования H3-K27.

Ингибитор EZH2 «селективно ингибирует» активность метилтрансферазы гистона мутантной EZH2, когда он ингибирует активность метилтрансферазы гистона мутантной EZH2 эффективнее, чем он ингибирует активность метилтрансферазы гистона EZH2 дикого типа. Например, в одном варианте осуществления селективный ингибитор имеет IC50 в отношении мутантной EZH2, которая, по меньшей мере, на 40% ниже, чем IC50 в отношении EZH2 дикого типа. В одном варианте осуществления селективный ингибитор имеет IC50 в отношении мутантной EZH2, которая, по меньшей мере, на 50% ниже, чем IC50 в отношении EZH2 дикого типа. В одном варианте осуществления

селективный ингибитор имеет IC50 в отношении мутантной EZH2, которая, по меньшей мере, на 60% ниже, чем IC50 в отношении EZH2 дикого типа. В одном варианте осуществления селективный ингибитор имеет IC50 в отношении мутантной EZH2, которая, по меньшей мере, на 70% ниже, чем IC50 в отношении EZH2 дикого типа. В одном варианте осуществления селективный ингибитор имеет IC50 в отношении мутантной EZH2, которая, по меньшей мере, на 80% ниже, чем IC50 в отношении EZH2 дикого типа. В одном варианте осуществления селективный ингибитор имеет IC50 в отношении мутантной EZH2, которая, по меньшей мере, на 90% ниже, чем IC50 в отношении EZH2 дикого типа.

В одном варианте осуществления селективный ингибитор мутантной EZH2 по существу не оказывает ингибиторного эффекта на EZH2 дикого типа.

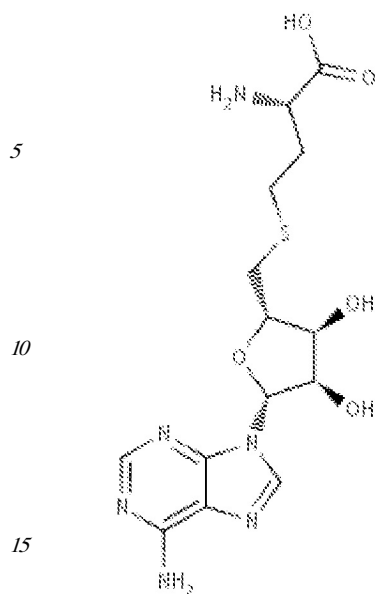
Ингибитор ингибирует превращение H3-K27me2 в H3-K27me3. В одном варианте осуществления считают, что ингибитор ингибирует триметилирование H3-K27. Поскольку превращение H3-K27me1 в H3-K27me2 предшествует превращению H3-K27me2 в H3-K27me3, то ингибитор превращения H3-K27me1 в H3-K27me2 естественно также ингибирует превращение H3-K27me2 в H3-K27me3, т.е. он ингибирует триметилирование H3-K27. Можно также ингибировать превращение H3-K27me2 в H3-K27me3 без ингибирования превращения H3-K27me1 в H3-K27me2. Ингибирование этого типа привело бы также к ингибированию триметилирования H3-K27, хоть и без ингибирования диметилирования H3-K27.

В одном варианте осуществления ингибитор ингибирует превращение H3-K27me1 в H3-K27me2 и превращение H3-K27me2 в H3-K27me3. Такой ингибитор может непосредственно ингибировать превращение H3-K27me1 в H3-K27me2 отдельно. Альтернативно, такой ингибитор может непосредственно ингибировать превращение H3-K27me1 в H3-K27me2 и превращение H3-K27me2 в H3-K27me3.

Ингибитор ингибирует активность гистон-метилазы. Ингибирование активности гистон-метилазы можно выявить, используя любой подходящий способ. Ингибирование можно измерить, например, или в отношении частоты активности гистон-метилазы, или как продукт активности гистон-метилазы. Способы, пригодные для любого из этих считываний данных, включены в представленные ниже примеры.

Ингибирование представляет собой измеряемое ингибирование, по сравнению с подходящим отрицательным контролем. В одном варианте осуществления ингибирование представляет собой ингибирование, по меньшей мере, на 10%, по сравнению с подходящим отрицательным контролем. То есть, частота ферментативной активности или количество продукта с ингибитором меньше или равно 90% соответствующей частоты или количества, полученного без ингибитора. В различных других вариантах осуществления ингибирование представляет собой ингибирование, по меньшей мере, на 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 или 95%, по сравнению с отрицательным контролем. В одном варианте осуществления ингибирование представляет собой ингибирование, по меньшей мере, на 99% по сравнению с отрицательным контролем. То есть, частота ферментативной активности или количество продукта с ингибитором меньше чем или равно 1% соответствующей частоты или количества, полученного без ингибитора.

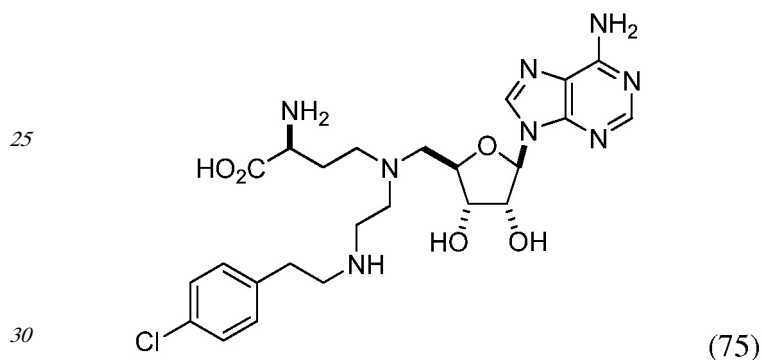
В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой S-аденозил-1-гомоцистеин (SAH). SAH имеет структурную формулу



(SAM)

и имеется в продаже от ряда поставщиков, включая, например, компании Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. SAM был описан в качестве ингибитора трансметилирования S-аденозилметионин-зависимыми метилтрансферазами.

В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой соединение 75



или его фармацевтически приемлемую соль.

В определенных вариантах осуществления изобретение включает стадию выполнения анализа для выявления мутанта EZH2 в образце, полученном у индивида. Анализ этого типа описан выше. Используемый здесь термин «образец, полученный у индивида» относится к любому подходящему образцу, содержащему клетки или компоненты клеток, полученных или происходящих из организма индивида. В одном варианте осуществления образец включает клетки, подозрительные в отношении экспрессии мутантной EZH2, например, раковые клетки. В одном варианте осуществления образец представляет собой образец крови. В одном варианте осуществления образец представляет собой биоптат, полученный, например, из лимфатической ткани (например, лимфоузла) или костного мозга. В одном варианте осуществления образец представляет собой биоптат, полученный из ткани, отличной от лимфатической ткани (например, лимфоузла) или костного мозга, или в дополнение к нему. Например, в одном варианте осуществления образец представляет собой биоптат из раковой опухоли, например, опухоли, состоящей из раковых клеток. Клетки в образце могут быть выделены из других компонентов образца. Например, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) могут быть выделены в виде лейкоцитарной пленки из образца крови, который центрифугировали в соответствии со способами,

известными специалистам в данной области.

Когда результат анализа образца, полученного у индивида, указывает на то, что мутантная EZH2 присутствует в образце, то считают, что индивид экспрессирует мутантную EZH2. Действительно, в одном варианте осуществления, когда результат анализа образца, полученного у индивида, указывает на то, что мутантная EZH2 присутствует в образце, то индивид идентифицируется как кандидат на лечение ингибитором EZH2, причем ингибитор селективно ингибирует активность метилтрансферазы гистона мутантной EZH2.

Когда результат анализа образца, полученного из раковой опухоли, указывает на то, что мутантная EZH2 присутствует в раковой опухоли, считают, что раковая опухоль экспрессирует мутантную EZH2.

Аналогичным образом, когда результат анализа содержащего раковые клетки образца, полученного у индивида, указывает на то, что мутантная EZH2 присутствует в образце, то считают, что индивид экспрессирует мутантную EZH2.

Выявление диметилированного H3-K27 или триметилированного H3-K27 может осуществляться с использованием любого подходящего в данной области способа. В одном варианте осуществления уровень метилирования выявляют с использованием антител, специфичных в отношении диметилированного H3-K27 или триметилированного H3-K27. Например, выделенную ткань фиксируют в формалине и заливают в парафиновые блоки для длительного сохранения. Блоки можно использовать для получения препаратов на предметных стеклах для иммуногистохимического окрашивания или флуоресцентного окрашивания антителами против метилированного H3-K27. Альтернативно, лизаты цельных клеток или гистоновые экстракты можно получить из изолированных образцов ткани и в последующем использовать для иммуногистохимического окрашивания, Вестерн-блот анализа или флуоресцентного окрашивания. В другом варианте осуществления уровень метилирования выявляют, используя полипептид или аптамер, специфичные для метилированного H3-K27 или триметилированного H3-K27. В другом варианте осуществления уровень метилирования выявляют, используя масс-спектрометрию (MS).

Контрольный диметилированный H3-K27 или контрольный триметилированный H3-K27 можно установить по контрольному образцу, например, прилегающей не опухолевой ткани, выделенной у индивида, или здоровой ткани от здорового индивида. Альтернативно, патоморфолог может установить контрольный уровень метилирования H3-K27me2 или H3-K27me3 способами, хорошо известными в данной области.

#### СПОСОБЫ СКРИНИНГА

Один аспект изобретения относится к способу идентификации тестируемого соединения в качестве ингибитора мутантной EZH2. В одном варианте осуществления способ включает объединение изолированной мутантной EZH2 с гистоновым субстратом, донором метильной группы (таким как S-аденозилметионин (SAM)) и тестируемым соединением, причем гистоновый субстрат содержит форму H3-K27, выбранную из группы, состоящей из неметилированного H3-K27, монометилированного H3-K27, диметилированного H3-K27 и их комбинации; и выполнение анализа для выявления метилирования H3-K27 в гистоновом субстрате, посредством этого идентифицируя тестируемое соединение в качестве ингибитора мутантной EZH2, когда метилирование H3-K27 в присутствии тестируемого соединения меньше, чем метилирование H3-K27 в отсутствие тестируемого соединения. Анализ для выявления метилирования H3-K27 можно выбрать для измерения частоты метилирования, степени метилирования или и частоты, и степени метилирования.

Мутантную EZH2 выделяют в виде комплекса PRC2 или его функционального эквивалента. Используемый здесь термин «изолированный» означает по существу отделенный от других компонентов, с которыми комплекс может быть обнаружен, как это происходит в природе. Соединение можно выделить без необходимости очистки.

5 В одном варианте осуществления мутант EZH2 выделяют в виде комплекса мутантной EZH2 вместе с EED и SUZ12. В другом варианте осуществления мутант EZH2 выделяют в виде комплекса мутантной EZH2 вместе с EED, SUZ12 и RbAp48. В соответствующих условиях комплекс PRC2 или его функциональный эквивалент проявляет активность метилтрансферазы гистона в отношении H3-K27. В одном варианте осуществления  
10 комплекс состоит из рекомбинантно экспрессированных компонентных полипептидов, например, EZH2, EED, SUZ12 с RbAp48 или без него.

Изолированную мутантную EZH2 комбинируют с гистоновым субстратом.

Гистоновый субстрат включает любой пригодный источник гистоновых полипептидов или их фрагментов, которые могут служить в качестве субстрата для EZH2. В одном  
15 варианте осуществления гистоновый субстрат включает гистоны, выделенные у индивида. Гистоны можно выделить из клеток индивида, используя любой подходящий способ; такие способы хорошо известны специалистам в данной области и не требуют дополнительного уточнения в настоящем описании. См., например, публикацию Fang et al. (2004) *Methods Enzymol* 377: 213-26. В соответствии с приведенными ниже примерами,  
20 в одном варианте осуществления гистоновый субстрат представлен в виде нуклеосом. В соответствии с приведенными ниже примерами, в одном варианте осуществления гистоновый субстрат представлен в виде птичьих (куриных) эритроцитарных нуклеосом.

Представленный таким образом гистоновый субстрат может включать смесь состояний модификации гистона, включая различные состояния метилирования H3-  
25 K27, по данным суждения с использованием Вестерн-блоттинга с антителами, специфичными к состоянию метилирования H3-K27. В одном варианте осуществления гистоновый субстрат может быть представлен в виде очищенного гистона H3 полной длины. Такой очищенный гистон H3 полной длины может быть представлен в виде  
30 гомогенного препарата в отношении состояний метилирования H3-K27 или в виде смеси различных состояний метилирования H3-K27. Гомогенные в отношении состояний метилирования H3-K27 препараты гистона H3 можно получить частично пропуская через иммуноаффинную колонку, загруженную подходящими специфичными в отношении состояния метилирования H3-K27 антителами. Альтернативно или в  
35 дополнение, состояние метилирования H3-K27 можно охарактеризовать как часть выполнения анализа. Например, исходный материал гистоновый субстрат можно характеризовать как содержащий 50% неметилированного H3-K27, 40% монометилированного H3-K27, 10% диметилированного H3-K27 и 0% триметилированного H3-K27.

В одном варианте осуществления гистоновый субстрат включает подходящий пептид,  
40 включающий одну или несколько аминокислотных последовательностей, связанных с гистонем H3, включая, в частности, последовательность, которая охватывает H3-K27. Например, в одном варианте осуществления гистоновый субстрат представляет собой пептидный фрагмент, которому соответствуют аминокислотные остатки 21-44 гистона H3. Такой пептидный фрагмент имеет аминокислотную последовательность  
45 LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO: 19). Пептидную библиотеку или пептид можно получить в соответствии с технологиями, хорошо известными в данной области, и, необязательно, модифицированными с тем, чтобы включать любую желаемую степень метилирования лизина, соответствующую H3-K27. Как описано в примерах ниже, такие

пептиды можно также модифицировать для включения метки, такой как биотин, используемый при выполнении анализов экспрессии генов ниже по ходу транскрипции. В одном варианте осуществления метку подвешивают к амино (N)-концу пептида (пептидов). В одном варианте осуществления метку подвешивают к карбокси (C)-концу пептида (пептидов).

Специфичные в отношении состояния метилирования H3-K27 антитела доступны из разнообразных коммерческих источников, включая, например, Cell Signaling Technology (Danvers, MA) и Active Motif (Carlsbad, CA).

Изолированную мутантную EZH2 комбинируют с тестируемым соединением.

Используемый здесь термин «тестируемое соединение» относится к мелкой органической молекуле, имеющей молекулярную массу меньше, чем примерно 1,5 кДа. В одном варианте осуществления тестируемое соединение представляет собой известное соединение. В одном варианте осуществления тестируемое соединение представляет собой новое соединение. В одном варианте осуществления тестируемое соединение может быть предоставлено в виде части библиотеки таких соединений, причем библиотека включает, например, десятки, сотни, тысячи или даже больше соединений. Скрининг библиотеки соединений можно проводить в высокопроизводительном скрининговом анализе, например, используя наборы тестируемых соединений и роботизированных манипуляций в соответствии с общими технологиями, хорошо известными в данной области.

В определенных вариантах осуществления тестируемое соединение представляет собой соединение, которое является производным SAH или производным соединения 75.

Выявление метилирования H3-K27 можно осуществить, используя любой пригодный способ. В одном варианте осуществления источник донорских метильных групп включает метильные группы, которые являются меченными выявляемой меткой. Выявляемая метка в одном варианте осуществления представляет собой изотопную метку, например, тритий. Другие типы меток могут включать, например, флуоресцентные метки.

Выявление образования триметилированного H3-K27 можно осуществить, используя любой пригодный способ. Например, выявление образования триметилированного H3-K27 можно осуществить, используя анализ для выявления включения меченых метильных групп, такого как описано выше, необязательно в комбинации с хроматографическим или другим способом для разделения меченых продуктов по размеру, например, электрофорез на полиакриламидном геле (PAGE), капиллярный электрофорез (CE) или высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC, ВЭЖХ). Альтернативно или в дополнение, выявление образования триметилированного H3-K27 можно осуществить, используя антитела, которые специфичны в отношении триметилированного H3-K27.

Выявление превращения монометилированного H3-K27 в диметилированный H3-K27 можно осуществить, используя любой подходящий способ. В одном варианте осуществления превращение измеряют, используя антитела, специфичные в отношении монометилированного H3-K27 и диметилированного H3-K27. Например, исходные количества или концентрации монометилированного H3-K27 и диметилированного H3-K27 можно определить, используя соответствующие антитела, специфичные в отношении монометилированного H3-K27 и диметилированного H3-K27. После объединения фермента, субстрата, донора метильной группы и тестируемого соединения, затем можно определить полученные в результате количества или концентрации

монометилированного НЗ-К27 и диметилированный НЗ-К27, используя соответствующие антитела, специфичные в отношении монометилированного НЗ-К27 и диметилированного НЗ-К27. Затем можно сравнить начальные и итоговые количества или концентрации монометилированного НЗ-К27 и диметилированного НЗ-К27.

- 5 Альтернативно или в дополнение, начальные и итоговые количества или концентрации монометилированного НЗ-К27 и диметилированного НЗ-К27 можно затем сравнить с соответствующими количествами или концентрациями из отрицательного контроля. Реакцию отрицательного контроля, при которой в анализ не включено тестируемое средство, можно проводить параллельно или в качестве анамнестического контроля.
- 10 Результаты такой контрольной реакции можно необязательно вычесть из соответствующих результатов экспериментальной реакции перед или в сочетании с проведением указанного выше сравнения.

- Поскольку диметилированную форму НЗ-К27 можно дополнительно метилировать в одном и том же анализе, может оказаться, что уменьшение количества или
- 15 концентрации монометилированного НЗ-К27 прямо не соответствует увеличению диметилированного НЗ-К27. Однако в этом случае можно предположить, что уменьшение количества или концентрации монометилированного НЗ-К27 само по себе отражает превращение монометилированного НЗ-К27 в диметилированный НЗ-К27.

- Выявление превращения диметилированного НЗ-К27 в триметилированный НЗ-К27
- 20 можно осуществить, используя любой подходящий способ. В одном варианте осуществления превращение измеряют, используя антитела, специфичные в отношении диметилированного НЗ-К27 и триметилированного НЗ-К27. Например, начальные количества или концентрации диметилированного НЗ-К27 и триметилированного НЗ-К27 можно определить, используя соответствующие антитела, специфичные в отношении
- 25 диметилированного НЗ-К27 и триметилированного НЗ-К27. После объединения фермента, субстрата и тестируемого соединения полученные в результате количества или концентрации диметилированного НЗ-К27 и триметилированного НЗ-К27 можно затем определить, используя соответствующие антитела, специфичные в отношении диметилированного НЗ-К27 и триметилированного НЗ-К27. Начальные и итоговые
- 30 количества или концентрации диметилированного НЗ-К27 и триметилированного НЗ-К27 можно затем сравнить. Альтернативно или в дополнение, начальные и итоговые количества или концентрации диметилированного НЗ-К27 и триметилированного НЗ-К27 можно затем сравнить с соответствующими количествами или концентрациями из отрицательного контроля. Реакцию отрицательного контроля, при которой в анализ
- 35 не включено тестируемое средство, можно проводить параллельно или в качестве анамнестического контроля. Результаты такой контрольной реакции можно необязательно вычесть из соответствующих результатов экспериментальной реакции перед или в сочетании с проведением указанного выше сравнения.

- Тестируемое средство идентифицируют в качестве ингибитора мутантной EZH2, когда метилирование НЗ-К27 тестируемым соединением меньше, чем метилирование
- 40 НЗ-К27 без тестируемого соединения. В одном варианте осуществления тестируемое средство идентифицируют в качестве ингибитора мутантной EZH2, когда образование триметилированного НЗ-К27 в присутствии тестируемого соединения меньше, чем образование триметилированного НЗ-К27 в отсутствие тестируемого соединения.

- 45 Один аспект изобретения относится к способу идентификации селективного ингибитора мутантной EZH2. В одном варианте осуществления способ включает объединение изолированной мутантной EZH2 с гистоновым субстратом, донором метильной группы (например, SAM) и тестируемым соединением, причем гистоновый



субстрат содержит форму H3-K27, выбранную из группы, состоящей из монометилированного H3-K27, диметилированного H3-K27 и комбинации монометилированного H3-K27 и диметилированного H3-K27, посредством этого образуя тестируемую смесь; объединение изолированной EZH2 дикого типа с гистоновым субстратом, донором метильной группы (например, SAM) и тестируемым соединением, причем гистоновый субстрат содержит форму H3-K27, выбранную из группы, состоящей из монометилированного H3-K27, диметилированного H3-K27 и комбинации монометилированного H3-K27 и диметилированного H3-K27, посредством этого образуя контрольную смесь; выполнение анализа для выявления триметилирования гистонового субстрата в каждой из тестируемой смеси и контрольной смеси; расчет отношения (a) триметилирования мутантной EZH2 и тестируемым соединением (M+) к (b) триметилированию мутантной EZH2 без тестируемого соединения (M-); расчет отношения (c) триметилирования EZH2 дикого типа и тестируемым соединением (WT+) к (d) триметилированию EZH2 дикого типа без тестируемого соединения (WT-); сравнение отношения (a)/(b) с отношением (c)/(d) и идентификацию тестируемого соединения в качестве селективного ингибитора мутантной EZH2, когда отношение (a)/(b) меньше, чем отношение (c)/(d). В одном варианте осуществления способ дополнительно включает учет отрицательного контроля без тестируемого соединения для каждой или обеих из тестируемой смеси и контрольной смеси.

Настоящее изобретение также относится к ранее нераспознанной, удивительной корреляции чувствительности пациента к ингибитору EZH2. Соответственно, один аспект изобретения относится к способу определения чувствительности к ингибитору EZH2 у индивида, страдающего раком или предраковым состоянием. Способ в целом включает выявление мутации в домене субстратного кармана EZH2, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6. Например, мутация может представлять собой замещение, точечную мутацию, бессмысленную мутацию, миссенс-мутацию, делецию или вставку, описанные выше. Предпочтительная мутация замещением аминокислоты включает замещение аминокислоты в положении 677, 687, 674, 685 или 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, такое как без ограничения замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V); замещение метионином (M) остатка дикого типа валина (V) в аминокислотном положении 674 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (V674M); замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C); замещение фенилаланином (F) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641F); замещение гистидином (H) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641H); замещение аспарагином (N) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641N); замещение серином (S) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641S); или замещение цистеином (C) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641C).

В предпочтительном варианте осуществления индивид страдает раком или предраковым заболеванием. Например, злокачественное заболевание представляет собой лимфому, лейкоз или меланому. Предпочтительно, лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому, фолликулярную лимфому или диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому. Альтернативно, лейкоз представляет собой хронический миелогенный лейкоз (CML). Предраковое состояние представляет собой синдромы миелодисплазии (MDS, ранее известный как предлейкозный синдром).

В другом предпочтительном варианте осуществления полипептид мутантной EZH2 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид мутантной EZH2 по настоящему изобретению, содержит одну или несколько мутаций в домене субстратного кармана EZH2, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6. Предпочтительнее, полипептид мутантной EZH2 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид мутантной EZH2 по настоящему изобретению, содержит замещение в аминокислотном положении 677, 687, 674, 685 или 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, такое как без ограничения замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V); замещение метионином (M) остатка дикого типа валина (V) в аминокислотном положении 674 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (V674M); замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C); замещение фенилаланином (F) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641F); замещение гистидином (H) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641H); замещение аспарагином (N) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641N); замещение серином (S) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641S); или замещение цистеином (C) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641C).

#### **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ**

Один или несколько антагонистов EZH2 можно вводить человеку-пациенту отдельно или в фармацевтической композиции, где они смешаны с подходящими носителями или эксципиентом (эксципиентами), в дозах, обеспечивающих лечение или облегчение течения заболевания или состояния, как описано здесь. Смеси этих антагонистов EZH2 можно также вводить пациенту в виде простой смеси или в подходящих составленных фармацевтических композициях. Например, один аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективную дозу антагониста EZH2 или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата, энантиомера или стереоизомера и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

Технологии получения препаративных форм и методики введения антагонистов EZH2 можно найти в ссылках, хорошо известных среднему специалисту в данной области, таких как руководство Remington's "The Science and Practice of Pharmacy," 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins 2005.

Подходящие пути введения могут, например, включать пероральное, ректальное или кишечное введение; парентеральную доставку, включая внутривенные, внутримышечные, внутривагинальные, подкожные инъекции, а также подоболочечные, прямые внутрижелудочковые или внутриглазные инъекции; топическую доставку, включая глазные капли и трансдермальные средства, и интраназальную и другие виды трансмукозальной доставки.

Альтернативно, можно вводить антагонист EZH2 местно, а не системным образом, например, посредством инъекции антагониста EZH2 непосредственно в отечный участок, часто в препаративной форме в виде депо или препарата пролонгированного высвобождения.

В одном варианте осуществления антагонист EZH2 вводят прямой инъекцией в опухоль или лимфатический узел.

Кроме того, антагонист EZH2 можно вводить в системе прицельной доставки лекарственного средства, например, в липосоме, покрытой специфическим антителом против раковых клеток.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно получить, например, способами обычного смешивания, растворения, гранулирования, производства драже, отмучивания, эмульгирования, инкапсуляции, захвата или лиофилизации.

Таким образом, фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением можно составлять обычным образом с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, содержащих эксципиенты и вспомогательные средства, которые содействуют переработке активных антагонистов EZH2 в препараты, которые можно применять фармацевтически. Должная препаративная форма зависит от выбранного пути введения.

Для инъекции средства по изобретению можно составлять в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или буферный раствор на основе физиологического солевого раствора. Для трансмукозального введения в препаративных формах используют усилители проникновения, целесообразные для подлежащего проникновению барьера. Такие усилители проникновения в целом известны в данной области.

Для перорального введения антагонисты EZH2 могут легко составляться в препаративную форму объединением активных антагонистов EZH2 с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области. Такие носители обеспечивают возможность включать антагонисты EZH2 по изобретению в такие препаративные формы, как таблетки, пилюли, драже, капсулы, жидкости, гели, сиропы, пасты, суспензии и тому подобные, для приема внутрь подлежащим лечению пациентом. Фармацевтические препараты для перорального применения можно получить объединением активного антагониста EZH2 с твердым эксципиентом, необязательно измельчением полученной смеси и переработкой смеси гранул после добавления при желании подходящих вспомогательных компонентов для получения таблеток или сердцевин драже. Пригодные эксципиенты включают наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, маисовый крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, смола трагаканта, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия и/или поливинилпирролидон (PVP). При желании, можно добавить разрыхлители, такие как поперечно сшитый поливинилпирролидон, или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия.

Сердцевины драже снабжены подходящими покрытиями. С этой целью можно использовать концентрированные растворы сахара, которые могут необязательно содержать аравийскую камедь, тальк, поливинилпирролидон, гель карбопол, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лака и подходящие органические растворители или смеси растворителей. Красители или пигменты можно добавить в таблетки или покрытия драже для идентификации или для характеристики различных комбинаций доз активного антагониста EZH2.

Фармацевтические препараты, которые можно применять перорально, включают твердые желатиновые капсулы, а также мягкие, запаянные капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Твердые капсулы могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связывающими агентами, такими как крахмалы, и/или смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат магния, и необязательно стабилизаторы. В мягких капсулах активные антагонисты EZH2 могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли. Кроме того, можно добавить стабилизаторы.

Для буккального введения композиции могут принимать форму таблеток или пастилок, составленных обычным образом.

Для введения путем ингаляции антагонисты EZH2 для применения в соответствии с настоящим изобретением можно подходящим образом доставлять в форме подачи аэрозольного спрея из упаковок, находящихся под избыточным давлением, или распылителя с использованием пригодного пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого пригодного газа. В случае сжатого аэрозоля единицу дозировки можно определить обеспечением клапана для подачи отмеренной дозы. Капсулы и кассеты, например, из желатина, для применения в ингаляторе или инсуффляторе могут состоять с содержанием порошковой смеси из антагониста EZH2 и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Антагонисты EZH2 могут быть включены в состав препаративной формы для парентерального введения инъекцией, например, болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Препаративные формы для инъекции могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавленным консервантом. Композиции могут принимать такие формы как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Фармацевтические препаративные формы для парентерального введения включают водные растворы активных антагонистов EZH2 в растворимой в воде форме. Кроме того, суспензии активных антагонистов EZH2 могут быть получены в виде соответствующих масляных инъекционных суспензий. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Водные инъекционные суспензии могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. Необязательно, суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые увеличивают растворимость антагонистов EZH2, для обеспечения возможности получения высококонцентрированных растворов.

Альтернативно, активный ингредиент может быть представлен в порошковой форме

для восстановления влагосодержания перед применением растворением в пригодном носителе, например, стерильной беспиrogenной воде.

Антагонисты EZH2 можно также включать в состав ректальных композиций, таких как суппозитории или удерживаемые клизмы, например, содержащие обычные основы суппозиторий, такие как масло какао или другие глицериды.

В дополнение к препаративным формам, описанным ранее, антагонисты EZH2 можно также составлять в виде депо-препарата. Такие длительно действующие препаративные формы можно вводить имплантацией (например, подкожно или внутримышечно или внутримышечной инъекцией). Так, например, антагонисты EZH2 можно включать в состав препаративной формы с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами, или в виде умеренно растворимых производных (например, в виде умеренно растворимой соли).

Альтернативно, можно использовать другие системы доставки для гидрофобных фармацевтических антагонистов EZH2. Липосомы и эмульсии являются примерами основ или носителей доставки для гидрофобных лекарственных средств. Можно также использовать определенные органические растворители, такие как диметилсульфоксид. Кроме того, антагонисты EZH2 можно доставлять, используя систему пролонгированного высвобождения, такую как полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих терапевтическое средство. Были внедрены и хорошо известны специалистам в данной области различные материалы пролонгированного высвобождения. Капсулы пролонгированного высвобождения могут в зависимости от их химической природы высвобождать антагонисты EZH2 в течение периода от нескольких недель до более чем 100 дней. В зависимости от их химической природы и биологической устойчивости терапевтического реагента, можно использовать дополнительные стратегии для стабилизации белка.

Фармацевтические композиции могут также содержать подходящие носители или эксципиенты в твердой или гелевой форме. Примеры таких носителей или эксципиентов включают без ограничения карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин и полимеры, такие как полиэтиленгликоли.

## СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам лечения, предотвращения или облегчения симптома состояний и заболеваний, таких как различные формы рака и предраковые состояния, на течение которых можно влиять модулированием статуса метилирования гистонов или других белков, причем указанный статус метилирования опосредуется, по меньшей мере, частично активностью EZH2. Модуляция статуса метилирования гистонов может в свою очередь влиять на уровень экспрессии генов-мишеней, активированных метилированием, и/или генов-мишеней, супрессированных метилированием.

Например, один аспект изобретения относится к способу лечения или облегчения симптома рака или предракового состояния. Способ включает стадию введения индивиду, страдающему раком или предраковым состоянием и экспрессирующему мутантную EZH2, терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2. Предпочтительно, полипептид мутантной EZH2 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид мутантной EZH2, содержит мутацию в ее домене субстратного кармана, как определено в последовательности, представленной SEQ ID NO: 6. Предпочтительнее, полипептид мутантной EZH2 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид мутантной EZH2, содержит мутацию

в виде замещения в аминокислотном положении 677, 687, 674, 685 или 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, такого как без ограничения замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G); замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V); замещение метионином (M) остатка дикого типа валина (V) в аминокислотном положении 674 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (V674M); замещение гистидином (H) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685H); замещение цистеином (C) остатка дикого типа аргинина (R) в аминокислотном положении 685 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (R685C); замещение фенилаланином (F) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641F); замещение гистидином (H) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641H); замещение аспарагином (N) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641N); замещение серином (S) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641S); или замещение цистеином (C) остатка дикого типа тирозина (Y) в аминокислотном положении 641 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (Y641C).

В одном варианте осуществления ингибитор ингибирует активность метилтрансферазы гистона мутантной EZH2. В одном варианте осуществления ингибитор селективно ингибирует активность метилтрансферазы гистона мутантной EZH2. Необязательно, злокачественное заболевание представляет собой лимфому. Предпочтительно, злокачественное заболевание представляет собой неходжкинскую лимфому, фолликулярную лимфому или диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). Альтернативно, злокачественное заболевание представляет собой лейкоз (такой как CML, ХМЛ) или меланома. Предраковое состояние включает без ограничения синдромы миелодисплазии (MDS, ранее известной, как предлейкозный синдром).

Такие заболевания, как различные формы рака и неврологические заболевания, можно лечить введением модуляторов метилирования белка (например, гистона), например, модуляторов активности ферментов метилтрансферазы гистона или гистон-деметилазы. Сообщалось, что метилирование гистона вовлечено в aberrantную экспрессию определенных генов при различных формах рака и в сайленсинг нейронных генов на нейронных клетках. Описанные здесь модуляторы можно применять для лечения таких заболеваний, т.е. для ингибирования метилирования гистонов в пораженных клетках.

На основании, по меньшей мере, того факта, что, как было обнаружено, патологическое метилирование гистона связано с определенными формами рака или предраковыми состояниями, способ лечения рака или предракового состояния мутантной EZH2 у индивида включает введение нуждающемуся в нем индивиду терапевтически эффективного количества соединения, которое ингибирует метилирование, или восстанавливает метилирование грубо до его уровня в эквивалентных нормальных клетках. В одном варианте осуществления способ лечения рака или предракового состояния у индивида включает введение нуждающемуся в нем индивиду терапевтически эффективного количества соединения, которое ингибирует

превращение неметилированного H3-K27 в монометилированный H3-K27 (H3-K27me1). В одном варианте осуществления способ лечения рака или предракового состояния у индивида включает введение нуждающемуся в нем индивиду терапевтически эффективного количества соединения, которое ингибирует превращение

5 монометилированного H3-K27 (H3-K27me1) в диметилированный H3-K27 (H3-K27me2). В одном варианте осуществления способ лечения рака или предракового состояния у индивида включает введение нуждающемуся в нем индивиду терапевтически эффективного количества соединения, которое ингибирует превращение H3-K27me2 в

10 триметилированный H3-K27 (H3-K27me3). В одном варианте осуществления способ лечения рака или предракового состояния у индивида включает введение нуждающемуся в нем индивиду терапевтически эффективного количества соединения, которое ингибирует и превращение H3-K27me1 в H3-K27me2, и превращение H3-K27me2 в H3-K27me3. Важно отметить, что специфичное для заболевания увеличение метилирования может происходить в хроматине в ключевых геномных локусах в отсутствие глобального

15 увеличения клеточных уровней метилирования гистона или белка. Например, aberrantное гиперметилирование в ключевых релевантных для заболевания генах может происходить на фоне глобального гипометилирования гистона или белка.

Модуляторы метилирования можно применять для модуляции клеточной пролиферации в целом. Например, в некоторых случаях избыточную пролиферацию

20 можно снизить средствами, которые уменьшают метилирование, в то время как недостаточную пролиферацию можно стимулировать средствами, которые увеличивают метилирование. Соответственно, заболевания, которые можно лечить, включают гиперпролиферативные заболевания, такие как доброкачественный клеточный рост и злокачественный клеточный рост (рак).

Иллюстративные злокачественные заболевания, которые можно лечить, включают лимфомы, включая неходжкинскую лимфому, фолликулярную лимфому (FL) и

25 диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL); меланому и лейкоз, включая ХМЛ. Иллюстративное предраковое состояние включает миелодиспластический синдром (MDS; ранее известный как предлейкоз).

30 Другие злокачественные заболевания включают острый лимфобластный лейкоз; острый миелоидный лейкоз; карциному коры надпочечников; связанные со СПИД злокачественные заболевания; связанную со СПИД лимфому; рак анального канала; астроцитому мозжечка у детей; астроцитому мозга у детей; базальноклеточную карциному, см. рак кожи (не меланом); рак желчных протоков, внепеченочный; рак

35 мочевого пузыря; рак костей, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому; глиому ствола мозга; опухоль мозга; опухоль мозга, астроцитому мозжечка; опухоль мозга, астроцитому мозга/злокачественную глиому; опухоль мозга, эпендимому; опухоль мозга, медуллобластому; опухоль мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли; опухоль мозга, глиому зрительных путей и

40 гипоталамуса; рак молочных желез; бронхиальные аденомы/карциномы; лимфому Буркитта; карциноидную опухоль; карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта; карциному с неизвестной первичной локализацией; первичную лимфому центральной нервной системы; мозжечковую астроцитому; рак шейки матки; злокачественные опухоли детского возраста; хронический лимфоцитарный лейкоз;

45 хронический миелогенный лейкоз; хронический миелогенный лейкоз, волосатоклеточный; хронические миелопролиферативные расстройства; рак ободочной кишки; колоректальный рак; кожную Т-клеточную лимфому, см. фунгоидный микоз и синдром Сезари; эндометриальный рак; рак пищевода; опухоли семейства саркомы

Юинга; рак внепеченочных желчных протоков; внутриглазную меланому; рак глазного яблока; ретинобластому; рак желчного пузыря; рак желудка; карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта; зародышевоклеточную опухоль, внечерепную; зародышевоклеточную опухоль, внегонадную; зародышевоклеточную опухоль

5 яичников; гестационную трофобластическую опухоль; глиому; глиому ствола мозга у детей; глиому, астроцитому мозга у детей; глиому зрительных путей и гипоталамуса детского возраста; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; гепатоцеллюлярный рак (печени) у взрослых (первичный); гепатоцеллюлярный рак (печени) у детей (первичный); лимфому Ходжкина; лимфому Ходжкина во время беременности;

10 гипофарингеальный рак; глиому гипоталамуса и зрительных путей; внутриглазную меланому; островковоклеточную карциному (эндокринной поджелудочной железы); саркому Капоши; рак почек (почечноклеточный); рак почек; рак гортани; лейкоз; рак губ и ротовой полости; рак печени у взрослых (первичный); рак печени у детей (первичный); рак легких, немелкоклеточный; рак легких, мелкоклеточный; первичную

15 лимфому центральной нервной системы; макроглобулинемию Вальденстрема; злокачественную фиброзную гистиоцитому костей/остеосаркому; медуллобластому; меланому; карциному из клеток Меркеля; мезотелиому; злокачественную мезотелиому взрослых; метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытой первичной локализацией; синдром множественной эндокринной неоплазии; множественную

20 миелому; множественную миелому/фунгоидный микоз с неоплазмой из плазматических клеток; синдромы миелодисплазии; миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания; острый миелоидный лейкоз у взрослых; острый миелоидный лейкоз у детей; хронические миелопролиферативные расстройства; рак носовой полости и околоносовых пазух; рак носоглотки; нейробластому; неходжкинскую лимфому;

25 неходжкинскую лимфому во время беременности; рак ротовой полости; рак ротовой полости и губ; ротоглоточный рак; остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костей; рак яичников; эпителиальный рак яичников; опухоль яичников с низким злокачественным потенциалом; рак поджелудочной железы; островковоклеточный рак поджелудочной железы; рак околоносовых пазух и носовой

30 полости; рак паращитовидной железы; рак полового члена; феохромоцитому; пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли; опухоль гипофиза; неоплазму из плазматических клеток/множественную миелому; плевропульмональную бластому; беременность и рак молочных желез; рак предстательной железы; рак прямой кишки; ретинобластому; рабдомиосаркому; рак

35 слюнных желез; саркому, опухоли семейства Юинга; саркому мягких тканей; саркому матки; синдром Сезари; рак кожи; рак кожи (не меланому); рак тонкого кишечника; саркому мягких тканей; плоскоклеточную карциному, см. рак кожи (не меланому); метастатический плоскоклеточный рак шеи с невыявленной первичной локализацией; рак желудка; рак яичек; тимому; тимому и карциному тимуса; рак щитовидной железы;

40 переходноклеточный рак почечной лоханки и мочеточника; гестационную трофобластическую опухоль; рак с неизвестной первичной локализацией; необычные формы рака у детей; рак уретры; эндометриальный рак матки; саркому матки; рак влагалища; глиому зрительных путей и гипоталамуса; рак вульвы; макроглобулинемию Вальденстрема; опухоль Вильмса; и различные формы рака у женщин.

45 Любые другие заболевания, при которых играет роль эпигенетическое метилирование, опосредованное EZH2, можно лечить или проводить профилактику с использованием описанных здесь соединений и способов.

Например, неврологические заболевания, которые можно лечить, включают



эпилепсию, шизофрению, биполярное расстройство или другие психологические и/или психиатрические расстройства, нейропатии, атрофию скелетных мышц и нейродегенеративные заболевания, например, нейродегенеративное заболевание.

Иллюстративные нейродегенеративные заболевания включают болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS) и болезнь Паркинсона. Другой класс нейродегенеративных заболеваний включает заболевания, вызванные, по меньшей мере, частично, агрегацией полиглутамина. Заболевания этого класса включают болезнь Хантингтона, спинально-бульбарную мышечную атрофию (SBMA или болезнь Кеннеди), дентаторубропаллидолуизианскую атрофию (DRPLA), спиноцеребеллярную атаксию 1 (SCA1), спиноцеребеллярную атаксию 2 (SCA2), болезнь Мачадо-Джозефа (MJD; SCA3), спиноцеребеллярную атаксию 6 (SCA6), спиноцеребеллярную атаксию 7 (SCA7) и спиноцеребеллярную атаксию 12 (SCA12).

### КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

В одном аспекте изобретения антагонист EZH2 или его фармацевтически приемлемую соль можно применять с другим терапевтическим средством для лечения таких заболеваний, как рак и/или неврологические расстройства. Например, дополнительное средство может представлять собой терапевтическое средство, которое признано в данной области как полезное для лечения заболевания или состояния, которое лечат соединением по настоящему изобретению. Дополнительное средство может также представлять собой средство, которое придает благоприятное свойство терапевтической композиции (например, средство, которое воздействует на вязкость композиции).

Комбинированная терапия, предусмотренная изобретением, включает, например, введение соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного средства (средств) в одной фармацевтической препаративной форме, а также введение соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного средства (средств) в отдельных фармацевтических препаративных формах. Другими словами, под совместным введением понимают введение индивиду, по меньшей мере, двух средств с тем, чтобы обеспечить благоприятные эффекты комбинации обоих средств. Например, средства можно вводить одновременно или последовательно в течение периода времени.

Средства, представленные ниже, служат только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения. Комбинации, которые являются частью настоящего изобретения, могут представлять собой соединения по настоящему изобретению и, по меньшей мере, одно дополнительное средство, выбранное из приведенных ниже списков. Комбинация может также включать несколько дополнительных средств, например, два или три дополнительных средства, если комбинация является такой, что образованная композиция может выполнять предназначенную ей функцию.

Например, один аспект изобретения относится к применению антагониста EZH2 в комбинации с другим средством для лечения рака и/или неврологического расстройства. В одном варианте осуществления дополнительное средство представляет собой противораковое средство, которое представляет собой соединение, воздействующее на модификации гистонов, такое как ингибитор HDAC. В определенных вариантах осуществления дополнительное противораковое средство выбрано из группы, состоящей из химиотерапевтических средств (таких как 2CdA, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, Abraxane™, Accutane®, актиномицин-D, адриамицин®, Alimta®, полностью трансретиноевая кислота, аметоптерин, Ara-C, азацитадин, BCNU, бленоксан®, Camptosar®, CeeNU®, клофарабин, Clolar™, Cytoxan®, даунорубицина гидрохлорид, DaunoXome®, Dacogen®, DIC, Doxil®, Ellence®, Eloxatin®, Emcyт®, этопозида фосфат,

Fludara®, FUDR®, Gemzar®, Gleevec®, гексаметилмеламин, Hycamtin®, Hydrea®, Idamycin®, Ifex®, иксабепилон, Ixempra®, L-аспарагиназа, Leukeran®, липосомальный Ara-C, L-PAM, лизодрен, Matulane®, митрацин, митомицин-С, Myleran®, Navelbine®, Neutrexin®, нилотиниб, Nipent®, азотистый иприт, Novantrone®, Oncaspar®, Panretin®, Paraplatin®, Platinol®, пролифепроспан 20 с имплантатом кармустина, Sandodtatin®, Targretin®, Tasigna®, Taxotere®, Temodar®, TESPА, Trisenox®, Valstar®, Velban®, Vidaza™, винкристина сульфат, VM 26, Xeloda® и Zanosar®); биологические препараты (такие как альфа-интерферон, бацилла Кальметта-Герена, Bexxar®, Capath®, Ergamisol®, эрлотиниб, Herceptin®, интерлейкин-2, Iressa®, леналидомид, Mylotarg®, Ontak®, Pegasys®, Revlimid®, Rituxan®, Tarceva™, Thalomid®, Velcade® и Zevalin™); кортикостероиды (такие как дексаметазон фосфат натрия, DeltaSone® и Delta-Cortef®); средства гормональной терапии (такие как Arimidex®, Aromasin®, Casodex®, Cytadren®, Eligard®, Eulexin®, Evista®, Faslodex®, Femara®, Halotestin®, Megace®, Nilandron®, Nolvadex®, Plenaxis™ и Zoladex®); и радиофармацевтические препараты (такие как Iodotope®, Metastron®, Phosphocol® и самарий SM-153).

### ДОЗИРОВКА

Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» или терапевтически эффективная доза» представляет собой количество антагониста EZH2 или комбинации двух или более таких соединений, которое полностью или частично ингибирует прогрессирование состояния или облегчает, по меньшей мере, частично, один или несколько симптомов состояния. Терапевтически эффективное количество может также представлять собой количество, которое является профилактически эффективным. Количество, которое является терапевтически эффективным, зависит от размера и пола пациента, состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния и искомого результата. В одном варианте осуществления терапевтически эффективная доза относится к количеству антагонистов EZH2, которое приводит к облегчению симптомов у пациента. Для данного пациента терапевтически эффективное количество можно определить способами, известными специалистам в данной области.

Токсичность и терапевтическую эффективность антагонистов EZH2 можно определить стандартными фармацевтическими процедурами в клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, для определения максимальной переносимой дозы (MTD) и ED<sub>50</sub> (дозы, эффективной для обеспечения 50% максимального ответа на лечение). Отношение доз, вызывающих токсический и терапевтический эффекты, представляет собой терапевтический индекс, и он может быть выражен в виде отношения MTD к ED<sub>50</sub>. Данные, полученные в этих анализах клеточных культур и в экспериментальных исследованиях на животных, можно использовать при составлении диапазона дозировок для применения у людей. Дозировку также можно определить путем мониторинга эффекта антагониста EZH2 на фармакодинамические маркеры ингибирования фермента (например, метилирования гистонов или экспрессии гена-мишени) в пораженной ткани или заместительной ткани. Эксперименты на культуре клеток или на животных можно использовать для определения взаимосвязи между дозами, требуемыми для изменения фармакодинамических маркеров, и дозами, требуемыми для достижения терапевтической эффективности, и их можно определить в клеточной культуре или в экспериментах на животных или на ранней стадии клинических испытаний. Дозировка таких антагонистов EZH2 предпочтительно находится в диапазоне концентраций в циркулирующей крови, которые включают ED<sub>50</sub> с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьировать в пределах этого

диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Определенную препаративную форму, путь введения и дозировку может выбрать любой лечащий врач в зависимости от состояния пациента. При лечении кризов может потребоваться тактика в форме неотложного болюсного введения или инфузии в дозах, приближающихся к МТД, для получения быстрого ответа.

Уровень дозировки и интервал между введениями можно подбирать индивидуально для обеспечения уровней активного компонента в плазме, которые достаточны для поддержания эффектов модулирования метилтрансферазы или минимальной эффективной концентрации (МЕС) в течение требуемого периода времени для достижения терапевтической эффективности. МЕС варьируется для каждого антагониста EZH2, но ее можно оценить по данным *in vitro* и экспериментам на животных. Дозировки, необходимые для достижения МЕС, зависят от индивидуальных характеристик и пути введения. Однако для определения концентраций в плазме можно использовать анализы с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или биоанализов.

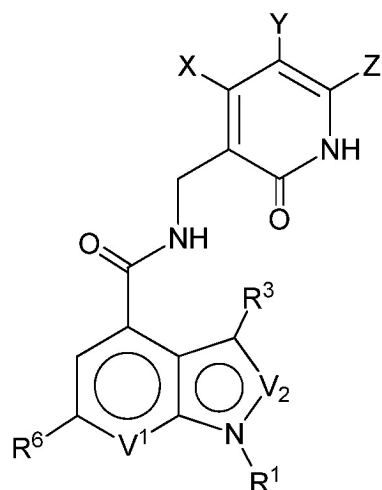
Интервалы между введениями также можно определить, используя величину МЕС. В определенных вариантах осуществления антагонисты EZH2 следует вводить с использованием схемы, которая поддерживает уровни в плазме выше МЕС в течение 10-90% времени, предпочтительно 30-90% и наиболее предпочтительно 50-90%, до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое облегчение симптомов. В других вариантах осуществления различные уровни МЕС в плазме можно поддерживать в течение различных периодов времени. В случаях местного введения или селективного захвата эффективная локальная концентрация лекарственного средства может быть не связана с его концентрацией в плазме.

Специалист в данной области может выбрать различные схемы введения, и вводимое количество антагониста EZH2 конечно зависит от получающего лечение индивида, его массы тела, тяжести поражения, пути введения и суждения лечащего врача.

#### СОЕДИНЕНИЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

Аспекты изобретения относятся к соединениям, которые приемлемы для применения в соответствии со способом по изобретению. Эти соединения именуются в настоящем описании «ингибиторами EZH2» и, эквивалентно, «антагонистами EZH2». Соединения могут быть представлены в виде соединений как таковых, фармацевтически приемлемых солей соединений или в виде фармацевтических композиций.

Соединения, пригодные для применения в способе по настоящему изобретению, включают соединения формулы (I):



(I),

где

V<sup>1</sup> обозначает N или CR<sup>7</sup>;

V<sup>2</sup> обозначает N или CR<sup>2</sup>, при условии, что когда V<sup>1</sup> обозначает N, то V<sup>2</sup> обозначает N;

X и Z независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенила, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинила, незамещенного или замещенного (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, незамещенного или замещенного (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила или -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенила, незамещенного или замещенного (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, незамещенного или замещенного (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила or -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенила, (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)бициклоалкила, незамещенного или замещенного гетероциклоалкила, незамещенного или замещенного гетероциклоалкил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила или -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенила, незамещенного или замещенного арила, незамещенного или замещенного арил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила или -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенила, незамещенного или замещенного гетероарила, незамещенного или замещенного гетероарил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила или -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенила, галогена, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup> и -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>;

Y обозначает H или галоген;

R<sup>1</sup> обозначает (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенил, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинил, незамещенный или замещенный (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил, незамещенный или замещенный (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил или -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенил, незамещенный или замещенный (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенил, незамещенный или замещенный (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил или -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенил, незамещенный или замещенный (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)бициклоалкил, незамещенный или замещенный гетероциклоалкил или -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенил, незамещенный или замещенный

гетероциклоалкил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, незамещенный или замещенный арил, незамещенный или замещенный арил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил или -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенил, незамещенный или замещенный гетероарил, незамещенный или замещенный гетероарил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил или

5 -(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенил, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>;

R<sup>2</sup> обозначает водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, трифторметил, алкокси или галоген, в котором указанный (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил необязательно замещен одной-двумя группами, выбранными из amino и (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкиламино;

10 R<sup>7</sup> обозначает водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил или алкокси;

R<sup>3</sup> обозначает водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, циано, трифторметил, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> или галоген;

R<sup>6</sup> выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенила, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинила, незамещенного или замещенного (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, незамещенного или замещенного (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, незамещенного или замещенного (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, незамещенного или замещенного (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)бициклоалкила, незамещенного или замещенного гетероциклоалкила, незамещенного или замещенного гетероциклоалкил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, незамещенного или замещенного арила, незамещенного или замещенного арил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, незамещенного или замещенного гетероарила, незамещенного или замещенного гетероарил-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>;

где любая (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильная, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенильная, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинильная, циклоалкильная, циклоалкенильная, бициклоалкильная, гетероциклоалкильная, арильная или гетероарильная группа необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из группы, состоящей из -O(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил(R<sup>c</sup>)<sub>1-2</sub>, -S(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил(R<sup>c</sup>)<sub>1-2</sub>, -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил(R<sup>c</sup>)<sub>1-2</sub>, -(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил-гетероциклоалкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил-гетероциклоалкила, галогена, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)галогеналкила, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup>, OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, арил(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила и гетероарил(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила;

где любая арильная или гетероарильная составляющая указанного арила, гетероарила, арил(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила или гетероарил(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)галогеналкила, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>,

$-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ ,  $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{R}^b$ ,  $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-\text{OR}^a$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^a$  и  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^a\text{R}^b$ ;

каждый из  $\text{R}^a$  и  $\text{R}^b$  независимо обозначает водород,  $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ алкил,  $(\text{C}_2\text{-C}_8)$ алкенил,  $(\text{C}_2\text{-C}_8)$ алкинил,  $(\text{C}_3\text{-C}_8)$ циклоалкил,  $(\text{C}_5\text{-C}_8)$ циклоалкенил,  $(\text{C}_6\text{-C}_{10})$ бициклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил, где указанная  $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ алкильная,  $(\text{C}_2\text{-C}_8)$ алкенильная,  $(\text{C}_2\text{-C}_8)$ алкинильная, циклоалкильная, циклоалкенильная, бициклоалкильная, гетероциклоалкильная, арильная или гетероарильная группа необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из галогена, гидроксильной,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкокси, amino,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкиламино,  $((\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкил) $((\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкил) amino,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{CO}_2(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкила,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONH}(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкила,  $-\text{CON}((\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкил) $((\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкил),  $-\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкила,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкила и  $\text{SO}_2\text{N}((\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкил) $((\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкил);

или  $\text{R}^a$  и  $\text{R}^b$ , взятые вместе с атомом азота, к которому они присоединены, представляют 5-8-членное насыщенное или ненасыщенное кольцо, необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из кислорода, азота и серы, причем указанное кольцо необязательно замещено 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкила,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ галогеналкила, amino,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкиламино,  $((\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкил) $((\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкил) amino, гидроксильной, оксо,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкокси и  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкокси $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкила, причем указанное кольцо необязательно конденсировано с  $(\text{C}_3\text{-C}_8)$ циклоалкильным, гетероциклоалкильным, арильным или гетероарильным кольцом;

или  $\text{R}^a$  и  $\text{R}^b$ , взятые вместе с атомом азота, к которому они присоединены, представляют 6-10-членную мостиковую бициклическую кольцевую систему, необязательно конденсированную с  $(\text{C}_3\text{-C}_8)$ циклоалкильным, гетероциклоалкильным, арильным или гетероарильным кольцом;

каждый  $\text{R}^c$  независимо обозначает  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ алкиламино,  $-\text{NR}^a\text{SO}_2\text{R}^b$ ,  $-\text{SOR}^a$ ,  $-\text{SO}_2\text{R}^a$ ,  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ ,  $-\text{NR}^a\text{R}^b$  или  $-\text{CO}_2\text{R}^a$ ;

или их соль.

Подгруппы соединений, охватываемых общей структурой формулы (I), представлены следующим образом:

Подгруппа А соединений формулы (I)

X и Z выбраны из группы, состоящей из  $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ алкила,  $(\text{C}_3\text{-C}_8)$ циклоалкила,

гетероциклоалкила, арила, гетероарила,  $-\text{NR}^a\text{R}^b$  и  $-\text{OR}^a$ ;

Y обозначает H или F;

$\text{R}^1$  выбран из группы, состоящей из  $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ алкила,  $(\text{C}_3\text{-C}_8)$ циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила;

$\text{R}^2$  обозначает водород,  $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ алкил, трифторметил, алкокси или галогена, в котором указанный  $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ алкил необязательно замещен одной-двумя группами, выбранными из amino и  $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ алкиламино;

$\text{R}^7$  обозначает водород,  $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ алкил или алкокси;

$R^3$  выбран из группы, состоящей из водорода,  $(C_1-C_8)$ алкила, циано, трифторметила,  $-NR^aR^b$  и галогена;

$R^6$  выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, циано, трифторметила, 5 амина,  $(C_1-C_8)$ алкила,  $(C_3-C_8)$ циклоалкила, арила, гетероарила, ациламино,

$(C_2-C_8)$ алкинила, арилалкинила, гетероарилалкинила,  $-SO_2R^a$ ,  $-SO_2NR^aR^b$  и  $-NR^aSO_2R^b$ ;

где любая  $(C_1-C_8)$ алкильная,  $(C_3-C_8)$ циклоалкильная,  $(C_2-C_8)$ алкинильная, 10 арилалкинильная, гетероарилалкинильная группа необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из  $-O(C_1-C_6)$ алкил $(R^c)_{1-2}$ ,  $-S(C_1-C_6)$ алкил $(R^c)_{1-2}$ ,  $-(C_1-C_6)$ алкил $(R^c)_{1-2}$ ,  $-(C_1-C_8)$ алкил-гетероциклоалкила,  $(C_3-C_8)$ циклоалкил-гетероциклоалкила, галогена,  $(C_1-C_6)$ алкила,  $(C_3-C_8)$ циклоалкила,  $(C_5-C_8)$ циклоалкенила,

15  $(C_1-C_6)$ галогеналкила, циано,  $-COR^a$ ,  $-CO_2R^a$ ,  $-CONR^aR^b$ ,  $-SR^a$ ,  $-SOR^a$ ,  $-SO_2R^a$ ,  $-SO_2NR^aR^b$ , нитро,  $-NR^aR^b$ ,  $-NR^aC(O)R^b$ ,  $-NR^aC(O)NR^aR^b$ ,  $-NR^aC(O)OR^a$ ,  $-NR^aSO_2R^b$ ,  $-NR^aSO_2NR^aR^b$ ,  $-OR^a$ ,  $-OC(O)R^a$ ,  $-OC(O)NR^aR^b$ , гетероциклоалкила, арила, гетероарила, арил $(C_1-C_4)$ алкила и гетероарил $(C_1-C_4)$ алкила;

20 каждый из  $R^a$  и  $R^b$  представляет независимо водород,  $(C_1-C_8)$ алкил,  $(C_2-C_8)$ алкенил,  $(C_2-C_8)$ алкинил,  $(C_3-C_8)$ циклоалкил,  $(C_5-C_8)$ циклоалкенил,  $(C_6-C_{10})$ бициклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил, где указанная  $(C_1-C_8)$ алкильная,  $(C_2-C_8)$ алкенильная,  $(C_2-C_8)$ алкинильная, циклоалкильная, циклоалкенильная, 25 бициклоалкильная, гетероциклоалкильная, арильная или гетероарильная группа необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из галогена, гидроксила,  $(C_1-C_4)$ алкокси, амина,  $(C_1-C_4)$ алкиламино,  $((C_1-C_4)$ алкил) $((C_1-C_4)$ алкил) амина,  $-CO_2H$ ,  $-CO_2(C_1-C_4)$ алкила,  $-CONH_2$ ,  $-CONH(C_1-C_4)$ алкила,  $-CON((C_1-C_4)$ алкил)  $((C_1-C_4)$ алкил),  $-SO_2(C_1-C_4)$ алкила,  $-SO_2NH_2$ ,  $-SO_2NH(C_1-C_4)$ алкила и  $-SO_2N((C_1-C_4)$ алкил)  $((C_1-C_4)$ алкил);

или  $R^a$  и  $R^b$ , взятые вместе с атомом азота, к которому они присоединены, 35 представляют 5-8-членное насыщенное или ненасыщенное кольцо, необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из кислорода, азота и серы, причем указанное кольцо необязательно замещено 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из  $(C_1-C_4)$ алкила,  $(C_1-C_4)$ галогеналкила, амина,  $(C_1-C_4)$ алкиламино,  $((C_1-C_4)$ алкил) $((C_1-C_4)$ алкил)амино, гидроксила, оксо,  $(C_1-C_4)$ алкокси и  $(C_1-C_4)$ алкокси $(C_1-C_4)$ алкила, причем указанное кольцо необязательно конденсировано 40 с  $(C_3-C_8)$ циклоалкильным, гетероциклоалкильным, арильным или гетероарильным кольцом;

или  $R^a$  и  $R^b$ , взятые вместе с атомом азота, к которому они присоединены, 45 представляют 6-10-членную мостиковую бициклическую кольцевую систему, необязательно конденсированную с  $(C_3-C_8)$ циклоалкильным, гетероциклоалкильным, арильным или гетероарильным кольцом. Арильная или гетероарильная группа в этой конкретной подгруппе А независимо выбрана из группы, состоящей из фурана, тиафена, пиррола, оксазола, тиазола, имидазола, пиразола, оксадиазола, тиадиазола, триазола,

тетразола, бензофурана, бензотиофена, бензоксазола, бензотиазола, фенила, пиридина, пиридазина, пиримидина, пиазина, триазина, тетразина, хинолина, циннолина, хиназолина, хиноксалина и нафтиридина или другой арильной или гетероарильной группы из указанных ниже:

5

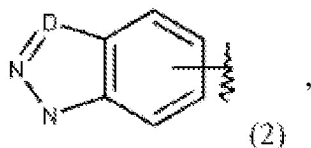


где в формуле (1)

10

A обозначает O, NH или S; B обозначает CH или N, и C обозначает водород или C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил; или

15

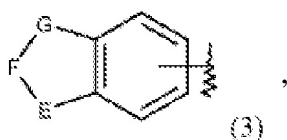


где в формуле (2)

D обозначает N или C, необязательно замещенные водородом или C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилом;

или

20

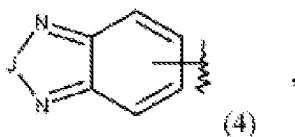


где в формуле (3)

25

E обозначает NH или CH<sub>2</sub>, F обозначает O или CO; и G обозначает NH или CH<sub>2</sub>; или

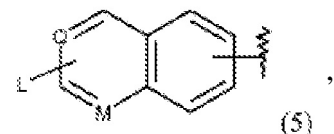
30



где в формуле (4)

J обозначает O, S или CO; или

35



где в формуле (5)

Q обозначает CH или N,

40

M обозначает CH или N, и

L/(5) обозначает водород, галоген, амино, циано, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил,

-COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>,

-NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> или -OR<sup>a</sup>,

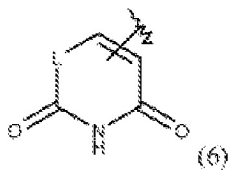
45

где любая (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильная или (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкильная группа необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила,

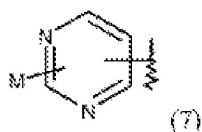
(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)галогеналкила, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>,



-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>,  
 -NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup> и -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>; где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup>  
 представляют собой, как определено выше; или



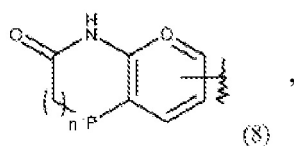
где в формуле (6)  
 L/(6) обозначает NH или CH<sub>2</sub>; или



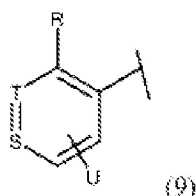
где в формуле 7

M/(7) обозначает водород, галоген, амино, циано, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил,  
 гетероциклоалкил, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>,  
 -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>  
 или -OR<sup>a</sup>,

где любая из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильной, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкильной или гетероциклоалкильной  
 группы необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из  
 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)галогеналкила, циано,  
 -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>,  
 -NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup> и -OC(O)  
 NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> определены, как указано выше; или



где в формуле (8)  
 P обозначает CH<sub>2</sub>, NH, O или S; Q/(8) обозначает CH или N; и n=0-2; или



где в формуле (9)  
 S/(9) и T/(9) обозначают S, или S/(9) обозначает S и T/(9) обозначает N, или S/(9)  
 обозначает N и T/(9) обозначает S;  
 R обозначает водород, амино, метил, трифторметил или галоген;

U обозначает водород, галоген, амино, циано, нитро, трифторметил, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup> или 4-(1H-пиразол-4-ил),

где любая из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильной или (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкильной группы необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила,

(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)галогеналкила, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup> и -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> определены, как указано выше.

Подгруппа В формулы (I)

X и Z независимо выбраны из группы, состоящей из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила,

(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> и -OR<sup>a</sup>;

Y обозначает H;

R<sup>1</sup> обозначает (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил или гетероциклоалкил;

R<sup>2</sup> обозначает водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил или галоген, в котором указанный (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил необязательно замещен одной-двумя группами, выбранными из амино и (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкиламино;

R<sup>7</sup> обозначает водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил или алкокси;

R<sup>3</sup> обозначает водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил или галоген;

R<sup>6</sup> обозначает водород, галоген, циано, трифторметил, амино, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил, арил, гетероарил, ациламино, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинил, арилалкинил,

гетероарилалкинил, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> или -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>;

где любая из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильной, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоальной, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинильной, арилалкинильной или гетероарилалкинильной группы необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из галогена, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила,

(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)галогеналкила, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>,

гетероциклоалкила, арила, гетероарила, арил(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила и гетероарил(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила;

R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> каждый независимо обозначает водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенил, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенил, (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)бициклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил, где указанная (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильная,

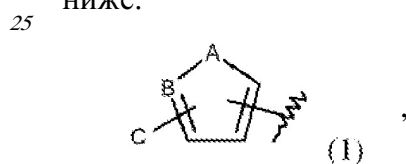
(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенильная, (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинильная, циклоалкильная, циклоалкенильная,

бициклоалкильная, гетероциклоалкильная, арильная или гетероарильная группа необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из галогена, гидроксила, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкокси, амино, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкиламино, ((C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил)((C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил)

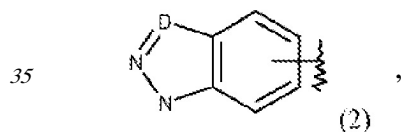
амино,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{CO}_2(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкила}$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONH}(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкила}$ ,  $-\text{CON}((\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкил})((\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкил})$ ,  $-\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкила}$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкила}$  и  $-\text{SO}_2\text{N}((\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкил})((\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкил})$ ;

5 или  $\text{R}^a$  и  $\text{R}^b$ , взятые вместе с атомом азота, к которому они присоединены, представляют 5-8-членное насыщенное или ненасыщенное кольцо, необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из кислорода, азота и серы, причем указанное кольцо необязательно замещено 1, 2 или 3 группами, независимо  
10 выбранными из  $(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкила}$ ,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{галогеналкила}$ , амино,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкиламино}$ ,  $((\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкил})((\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкил})\text{амино}$ , гидроксила, оксо,  $(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкокси}$  и  $(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкокси}(\text{C}_1\text{-C}_4)\text{алкила}$ , причем указанное кольцо необязательно конденсировано с  $(\text{C}_3\text{-C}_8)\text{циклоалкильным}$ , гетероциклоалкильным, арильным или гетероарильным кольцом;

15 или  $\text{R}^a$  и  $\text{R}^b$ , взятые вместе с атомом азота, к которому они присоединены, представляют 6-10-членную мостиковую бициклическую кольцевую систему, необязательно конденсированную с  $(\text{C}_3\text{-C}_8)\text{циклоалкильным}$ , гетероциклоалкильным, арильным или гетероарильным кольцом. Арил и гетероарил в этом определении  
20 выбраны из группы, состоящей из фурана, тиафена, пиррола, оксазола, тиазола, имидазола, пиразола, оксадиазола, тиadiaзола, триазола, тетразола, бензофурана, бензотиафена, бензоксазола, бензотиазола, фенила, пиридина, пиридазина, пиримидина, пиазина, триазина, тетразина, хинолина, циннолина, хиназолина, хиноксалина и нафтиридина или соединения другой арильной или гетероарильной группы, как указано ниже:



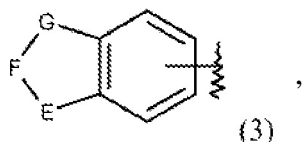
30 где в формуле (1)  
А обозначает О, NH или S, В обозначает CH или N, и С обозначает водород или  $\text{C}_1\text{-C}_8$  алкил; или



где в формуле (2)

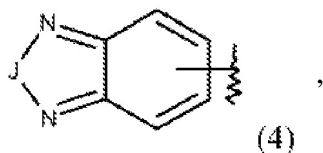
Д обозначает N или С, необязательно замещенные водородом или  $\text{C}_1\text{-C}_8$  алкилом;

40 или



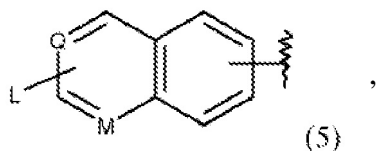
45 где в формуле (3)

Е обозначает NH или  $\text{CH}_2$ , F обозначает О или CO, и G обозначает NH или  $\text{CH}_2$ ; или



где в формуле (4)

J обозначает O, S или CO; или



где в формуле (5)

Q обозначает CH или N,

M обозначает CH или N, и

L/(5) обозначает водород, галоген, amino, циано, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил,

-COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>,

-NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> или -OR<sup>a</sup>,

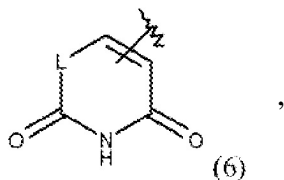
где любая из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильной, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкильной группы необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила,

(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)галогеналкила, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>,

-CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>,

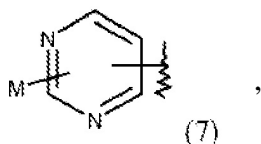
-NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup> и -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>,

где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> определены, как указано выше; или



где в формуле (6)

L/(6) обозначает NH или CH<sub>2</sub>; или



где в формуле (7)

M/(7) обозначает водород, галоген, amino, циано, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил,

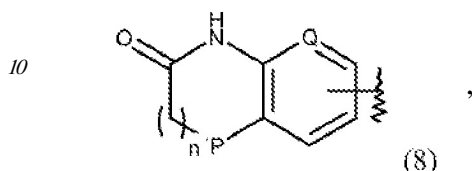
гетероциклоалкил, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>,

-NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>

или -OR<sup>a</sup>,

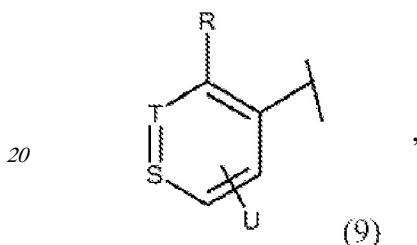
где любая из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильной, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкильной, гетероциклоалкильной групп

необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)галогеналкила, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> определены, как указано выше; или



где в формуле (8)

15 R обозначает CH<sub>2</sub>, NH, O или S, Q/(8) обозначает CH или N, и n=0-2; или



где в формуле (9)

25 S/(9) и T/(9) обозначают C, или S/(9) обозначает C и T/(9) обозначает N, или S/(9) обозначает N и T/(9) обозначает C;

R обозначает водород, amino, метил, трифторметил, галоген;

U обозначает водород, галоген, amino, циано, нитро, трифторметил, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкил, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup> или 4-(1H-пиразол-4-ил), где любая из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильной или (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкильной группы необязательно замещена 1, 2 или 3 группами, независимо выбранными из (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила,

35 (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкенила, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)галогеналкила, циано, -COR<sup>a</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -CONR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, нитро, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>C(O)OR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup> и -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> определены, как указано выше.

40 Подгруппа C формулы (I)

X обозначает метил, этил, н-пропил, изопропил, циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил, фенил, трифторметил, тетрагидропиран, гидроксиметил, метоксиметил или бензил;

Y обозначает H;

45 Z обозначает метил, этил, н-пропил, изопропил, трифторметил или бензил;

R<sup>1</sup> обозначает изопропил, трет-бутил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил, (1-метилэтил)циклопропил, 1,1-диоксо-тетрагидротиофен-3-ил, 1-метил-пиперидин-4-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидропиран-4-ил, N,N-диметил-1-пропанаминил, бензил

или 4-пиридил;

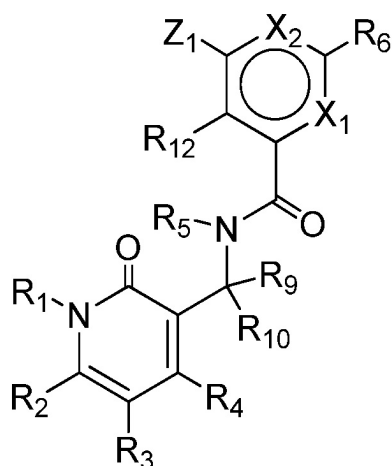
$R^2$  обозначает водород,  $(C_1-C_3)$ алкил или галоген, в котором указанный  $(C_1-C_3)$ алкил необязательно замещен одной-двумя группами, выбранными из amino и  $(C_1-C_3)$ алкиламино;

$R^7$  обозначает водород,  $(C_1-C_3)$ алкил или алкокси;

$R^3$  обозначает H, метил или Br; и

$R^6$  обозначает метил, бис(1,1-диметилэтил), бис(1-метилэтил), циклопропил, пропил, диметиламино, этиламино, (2-гидроксиэтил)амино, 2-пропен-1-иламино, 1-пиперазинил, 1-пиперидинил, 4-морфолинил, 4-пиперидиниламино, тетрагидро-2H-пиран-4-иламино, фениламино, (фениламетил)амино, (4-пиридинилметил)амино, [2-(2-пиридиниламино)этил]амино, 2-(диметиламино)этил]амино, 4-пиридиниламино, 4-(аминокарбонил)фенил]амино, 3-гидрокси-3-метил-1-бутин-1-ил, 4-пиридинилэтинил, фенилэтинил, 2-фуранил, 3-тиенил; 1H-пиразол-4-ил, 1H-пиразол-5-ил, 1H-индазол-6-ил, 3-метил-1H-индазол-5-ил, 1H-1,2,3-бензотриазол-5-ил, 2-оксо-2,3-дигидро-1H-бензимидазол-5-ил, 2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5-ил, 2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-6-ил, 2,1,3-бензоксадиазол-5-ил, 2-амино-6-хиназолинил, 2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидро-5-пиримидинил, 2-амино-5-пиримидинил, 7-оксо-1,5,6,7-тетрагидро-1,8-нафтиридин-3-ил, фенил, 2-метилфенил, 2-нитрофенил, 2-фенилэтил, 3-аминофенил, 4-аминофенил, 4-хлорфенил, 4-фторфенил, 4-(метилокси)фенил, 3-(ацетиламино)фенил, 4-(ацетиламино)фенил, 4-(аминокарбонил)фенил, 4-(1H-пиразол-4-ил)фенил, 4-(аминосульфони)фенил, 4-(метилсульфони)фенил, 4-[(диметиламино)сульфони]фенил, 4-[(метиламино)карбонил]фенил, 4-[(метиламино)сульфони]фенил, 4-[(метилсульфони)амино]фенил, 3-пиридинил, 4-пиридинил, 2-(4-морфолинил)-4-пиридинил, 2-амино-4-пиридинил, 5-(метилокси)-3-пиридинил, 5-(метилсульфони)-3-пиридинил, 5-[(циклопропилсульфони)амино]-6-(метилокси)-3-пиридинил, 5-[(фенилсульфони)амино]-3-пиридинил, 6-(4-метил-1-пиперазинил)-3-пиридинил, 6-(4-морфолинил)-3-пиридинил, 6-(ацетиламино)-3-пиридинил, 6-(диметиламино)-3-пиридинил, 6-(метилокси)-3-пиридинил, 6-[(метиламино)карбонил]-3-пиридинил, 6-[(метиламино)сульфони]-3-пиридинил, 6-метил-3-пиридинил или 4-пиридинилокси. (См., например, международные патенты WO 2011/140325; WO 2011/140324 и WO 2012/005805, каждый из которых во всей полноте включен в настоящее описание посредством ссылки.)

Соединения, пригодные для применения в способе по настоящему изобретению, также включают соединения формулы (II):



(II),

где

$X_1$  обозначает N или  $CR_{11}$ ;

$X_2$  обозначает N или  $CR_{13}$ ;

$Z_1$  обозначает  $NR_7R_8$ ,  $OR_7$ ,  $SR_7$  или  $CR_7R_8R_{14}$ ;

каждый из  $R_1$ ,  $R_5$ ,  $R_9$  и  $R_{10}$  независимо обозначает H или  $C_1$ - $C_6$ алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила,  $COOH$ ,  $C(O)O$ - $C_1$ - $C_6$ алкила, циано,  $C_1$ - $C_6$ алкоксила, амина, моно- $C_1$ - $C_6$ алкиламино, ди- $C_1$ - $C_6$ алкиламино,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкила,  $C_6$ - $C_{10}$ арила, 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила;

каждый из  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо обозначает  $-Q_1-T_1$ , в котором  $Q_1$  обозначает связь или  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер, необязательно замещенный галогеном, циано, гидроксидом или  $C_1$ - $C_6$ алкокси, и  $T_1$  обозначает H, галоген, гидроксил,  $COOH$ , циано или  $R_{S1}$ , где  $R_{S1}$  обозначает  $C_1$ - $C_3$ алкил,  $C_2$ - $C_6$ алкенил,  $C_2$ - $C_6$ алкинил,  $C_1$ - $C_6$ алкоксил,  $C(O)O$ - $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил,  $C_6$ - $C_{10}$ арил, амина, моно- $C_1$ - $C_6$ алкиламино, ди- $C_1$ - $C_6$ алкиламино, 4-12-членный гетероциклоалкил или 5- или 6-членный гетероарил, и  $R_{S1}$  необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, оксо,  $COOH$ ,  $C(O)O$ - $C_1$ - $C_6$ алкила, циано,  $C_1$ - $C_6$ алкоксила, амина, моно- $C_1$ - $C_6$ алкиламино, ди- $C_1$ - $C_6$ алкиламино,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкила,  $C_6$ - $C_{10}$ арила, 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила;

$R_6$  обозначает  $C_6$ - $C_{10}$ арил или 5- или 6-членный гетероарил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими  $-Q_2-T_2$ , где  $Q_2$  обозначает связь или  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер, необязательно замещенный галогеном, циано, гидроксидом или  $C_1$ - $C_6$ алкокси, и  $T_2$  обозначает H, галоген, циано,  $-OR_a$ ,  $-NR_aR_b$ ,  $-(NR_aR_bR_c)^+A^-$ ,  $-C(O)R_a$ ,  $-C(O)OR_a$ ,  $-C(O)NR_aR_b$ ,  $-NR_bC(O)R_a$ ,  $-NR_bC(O)OR_a$ ,  $-S(O)_2R_a$ ,  $-S(O)_2NR_aR_b$  или  $R_{S2}$ , в которых каждый из  $R_a$ ,  $R_b$  и  $R_c$  независимо обозначает H или  $R_{S3}$ ,  $A$  обозначает фармацевтически приемлемый анион, каждый из  $R_{S2}$  и  $R_{S3}$  независимо обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил,  $C_6$ - $C_{10}$ арил, 4-12-членный гетероциклоалкил или 5- или

6-членный гетероарил, или  $R_a$  и  $R_b$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 4-12-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее 0 или 1 дополнительный гетероатом, и каждый из  $R_{S2}$ ,  $R_{S3}$  и 4-12-членного гетероциклоалкильного кольца, образованного  $R_a$  и  $R_b$ , необязательно замещены одним или несколькими  $-Q_3-T_3$ , где  $Q_3$  обозначает связь или  $C_1-C_3$ алкильный линкер, каждый необязательно замещенный галогеном, циано, гидроксилом или  $C_1-C_6$ алкокси, и  $T_3$  выбран из группы, состоящей из галогена, циано,  $C_1-C_6$ алкила,  $C_3-C_8$ циклоалкила,  $C_6-C_{10}$ арила, 4-12-членного гетероциклоалкила, 5- или 6-членного гетероарила,  $OR_d$ ,  $COOR_d$ ,  $-S(O)_2R_d$ ,  $-NR_dR_e$  и  $-C(O)NR_dR_e$ , причем каждый из  $R_d$  и  $R_e$  независимо обозначает H или  $C_1-C_6$ алкил, или  $-Q_3-T_3$  обозначает оксо; или любые два соседних  $-Q_2-T_2$  вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют 5- или 6-членное кольцо, необязательно содержащее 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S, и необязательно замещенных одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила,  $COOH$ ,  $C(O)O-C_1-C_6$ алкила, циано,  $C_1-C_6$ алкоксила, amino, моно- $C_1-C_6$ алкиламино, ди- $C_1-C_6$ алкиламино,  $C_3-C_8$ циклоалкила,  $C_6-C_{10}$ арила, 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила; при условии, что  $-Q_2-T_2$  не обозначает H;

$R_7$  обозначает  $-Q_4-T_4$ , в котором  $Q_4$  обозначает связь,  $C_1-C_4$ алкильный линкер или  $C_2-C_4$ алкенильный линкер, каждый линкер необязательно замещен галогеном, циано, гидроксилом или  $C_1-C_6$ алкокси, и  $T_4$  обозначает H, галоген, циано,  $NR_fR_g$ ,  $-OR_f$ ,  $-C(O)R_f$ ,  $-C(O)OR_f$ ,  $-C(O)NR_fR_g$ ,  $-C(O)NR_fOR_g$ ,  $-NR_fC(O)R_g$ ,  $-S(O)_2R_f$  или  $R_{S4}$ , в которых каждый из  $R_f$  и  $R_g$  независимо обозначает H или  $R_{S5}$ , каждый из  $R_{S4}$  и  $R_{S5}$  независимо обозначает  $C_1-C_6$ алкил,  $C_2-C_6$ алкенил,  $C_2-C_6$ алкинил,  $C_3-C_8$ циклоалкил,  $C_6-C_{10}$ арил, 4-12-членный гетероциклоалкил или 5- или 6-членный гетероарил, и каждый из  $R_{S4}$  и  $R_{S5}$  необязательно замещен одним или несколькими  $-Q_5-T_5$ , где  $Q_5$  обозначает связь,  $C(O)$ ,  $C(O)NR_k$ ,  $NR_kC(O)$ ,  $S(O)_2$  или  $C_1-C_3$ алкильный линкер, причем  $R_k$  обозначает H или  $C_1-C_6$ алкил, и  $T_5$  обозначает H, галоген,  $C_1-C_6$ алкил, гидроксил, циано,  $C_1-C_6$ алкоксил, amino, моно- $C_1-C_6$ алкиламино, ди- $C_1-C_6$ алкиламино,  $C_3-C_8$ циклоалкил,  $C_6-C_{10}$ арил, 4-12-членный гетероциклоалкил, 5- или 6-членный гетероарил, или  $S(O)_qR_q$ , в котором  $q$  обозначает 0, 1 или 2 и  $R_q$  обозначает  $C_1-C_6$ алкил,  $C_2-C_6$ алкенил,  $C_2-C_6$ алкинил,  $C_3-C_8$ циклоалкил,  $C_6-C_{10}$ арил, 4-12-членный гетероциклоалкил, или 5- или 6-членный гетероарил, и  $T_5$  необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена,  $C_1-C_6$ алкила, гидроксила, циано,  $C_1-C_6$ алкоксила, amino, моно- $C_1-C_6$ алкиламино, ди- $C_1-C_6$ алкиламино,  $C_3-C_8$ циклоалкила,  $C_6-C_{10}$ арила, 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила, за исключением случаев, когда  $T_5$  обозначает H, галоген, гидроксил или циано; или  $-Q_5-T_5$  обозначает оксо; при условии, что  $R_7$  не представляет собой H;

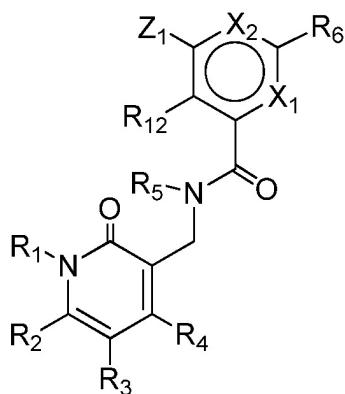
каждый из  $R_8$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$  и  $R_{13}$  независимо обозначает H, галоген, гидроксил,  $COOH$ , циано,  $R_{S6}$ ,  $OR_{S6}$  или  $COOR_{S6}$ , в которых  $R_{S6}$  обозначает  $C_1-C_6$ алкил,  $C_2-C_6$ алкенил,  $C_2-C_6$ алкинил,  $C_3-C_8$ циклоалкил, 4-12-членный гетероциклоалкил, amino, моно- $C_1-C_6$ алкиламино или ди- $C_1-C_6$ алкиламино, и  $R_{S6}$  необязательно замещен одним



или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила,  $\text{COOH}$ ,  $\text{C(O)O-C}_1\text{-C}_6\text{алкила}$ , циано,  $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкоксила}$ , amino, моно- $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкиламино}$  и ди- $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкиламино}$ ; или  $\text{R}_7$  и  $\text{R}_8$ , вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 4-11-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее от 0 до 2 дополнительных гетероатомов, или  $\text{R}_7$  и  $\text{R}_8$  вместе с атомом C, к которому они присоединены, образуют  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{циклоалкил}$  или 4-11-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее от 1 до 3 гетероатомов, и каждое из 4-11-членных гетероциклоалкильных колец или  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{циклоалкил}$ , образованные из  $\text{R}_7$  и  $\text{R}_8$ , необязательно замещены одним или несколькими  $-\text{Q}_6\text{-T}_6$ , где  $\text{Q}_6$  обозначает связь, C(O),  $\text{C(O)NR}_m$ ,  $\text{NR}_m\text{C(O)}$ ,  $\text{S(O)}_2$  или  $\text{C}_1\text{-C}_3\text{алкильный линкер}$ , причем  $\text{R}_m$  обозначает H или  $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкил}$ , и  $\text{T}_6$  обозначает H, галоген,  $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкил}$ , гидроксил, циано,  $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкоксил}$ , amino, моно- $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкиламино}$ , ди- $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкиламино}$ ,  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{циклоалкил}$ ,  $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ , 4-12-членный гетероциклоалкил, 5- или 6-членный гетероарил, или  $\text{S(O)}_p\text{R}_p$ , в котором  $p=0, 1$  или  $2$  и  $\text{R}_p$  обозначает  $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкил}$ ,  $\text{C}_2\text{-C}_6\text{алкенил}$ ,  $\text{C}_2\text{-C}_6\text{алкинил}$ ,  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{циклоалкил}$ ,  $\text{C}_6\text{-C}_{10}\text{арил}$ , 4-12-членный гетероциклоалкил или 5- или 6-членный гетероарил, и  $\text{T}_6$  необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена,  $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкила}$ , гидроксила, циано,  $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкоксила}$ , amino, моно- $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкиламино}$ , ди- $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкиламино}$ ,  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{циклоалкила}$ ,  $\text{C}_6\text{-C}_{10}\text{арила}$ , 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила, за исключением случаев, когда  $\text{T}_6$  обозначает H, галоген, гидроксил или циано; или  $-\text{Q}_6\text{-T}_6$  обозначает оксо; и

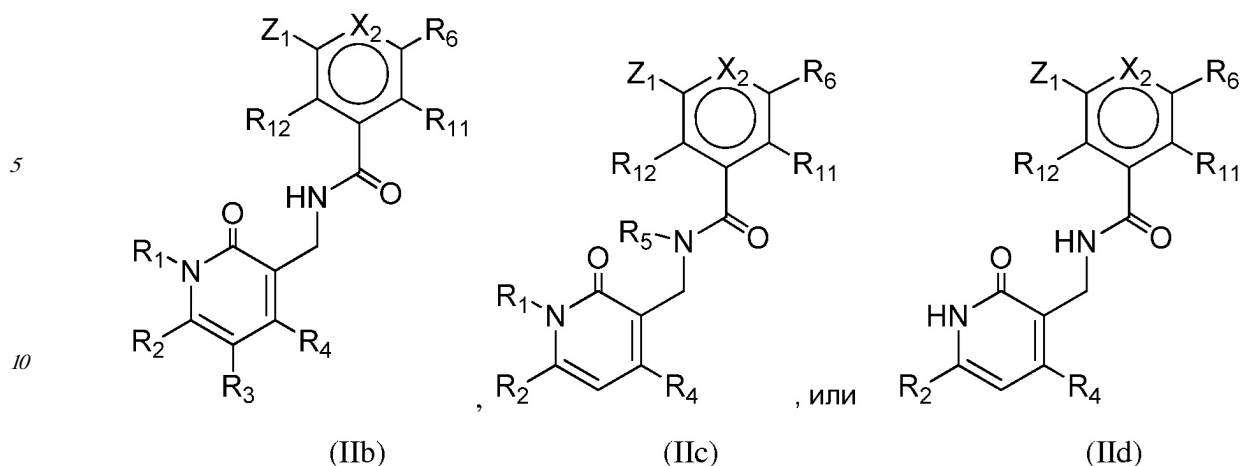
$\text{R}_{14}$  отсутствует, H или  $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкил}$  необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила,  $\text{COOH}$ ,  $\text{C(O)O-C}_1\text{-C}_6\text{алкила}$ , циано,  $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкоксила}$ , amino, моно- $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкиламино}$ , ди- $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкиламино}$ ,  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{циклоалкила}$ ,  $\text{C}_6\text{-C}_{10}\text{арила}$ , 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила.

Одна подгруппа соединений формулы (II) включает соединения формулы (IIa):



(IIa).

Другая подгруппа соединений формулы (II) включает соединения формулы (IIb), (IIc) или (IId):



Соединения формул (II), (IIIa), (IIb), (IIc) и (IId) могут включать один или несколько из следующих признаков:

Например,  $X_1$  обозначает  $CR_{11}$ , и  $X_2$  обозначает  $CR_{13}$ .

Например,  $X_1$  обозначает  $CR_{11}$ , и  $X_2$  обозначает N.

Например,  $X_1$  обозначает N, и  $X_2$  обозначает  $CR_{13}$ .

Например,  $X_1$  обозначает N, и  $X_2$  обозначает N.

Например,  $Z_1$  обозначает  $NR_7R_8$ .

Например,  $Z_1$  обозначает  $CR_7R_8R_{14}$ .

Например,  $Z_1$  обозначает  $OR_7$ .

Например,  $Z_1$  обозначает  $SR_7$ .

Например,  $R_6$  обозначает фенил, замещенный одним или несколькими  $-Q_2-T_2$ .

Например,  $R_6$  обозначает 5-6-членный гетероарил, содержащий 1-3 дополнительных гетероатома, выбранных из N, O и S, и необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_2-T_2$ .

Например,  $R_6$  обозначает пиридинил, пирозолил, пиримидинил, хинолинил, тетразолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, фурил или тиенил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими  $-Q_2-T_2$ .

Например,  $Q_2$  обозначает связь.

Например,  $Q_2$  обозначает незамещенный  $C_1-C_3$  алкильный линкер.

Например,  $T_2$  обозначает  $C_1-C_6$  алкил или  $C_6-C_{10}$  арил, каждый необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_3-T_3$ .

Например,  $T_2$  обозначает незамещенный или замещенный прямоцепочечный  $C_1-C_6$  или разветвленный  $C_3-C_6$  алкил, включая без ограничения метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, втор-пентил и н-гексил.

Например,  $T_2$  обозначает фенил.

Например,  $T_2$  обозначает галоген (например, фтор, хлор, бром и йод).

Например,  $T_2$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пирозолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, тиазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, тетрагидро-2Н-тиопиран, морфолинил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-

азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептанил и тому подобные), необязательно замещенный одним или несколькими -Q<sub>3</sub>-T<sub>3</sub>.

Например, T<sub>2</sub> обозначает -OR<sub>a</sub>, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -(NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>R<sub>c</sub>)<sup>+</sup>A<sup>-</sup>, -C(O)R<sub>a</sub>, -C(O)OR<sub>a</sub>, -C(O)NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>,  
5 -NR<sub>b</sub>C(O)R<sub>a</sub>, -NR<sub>b</sub>C(O)OR<sub>a</sub>, -S(O)<sub>2</sub>R<sub>a</sub> или -S(O)<sub>2</sub>NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>.

Например, T<sub>2</sub> обозначает -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub> или -C(O)NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, в которых каждый из R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо обозначает H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, или R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 4-7-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее 0  
10 или 1 дополнительный гетероатом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, и причем 4-7-членное гетероциклоалкильное кольцо необязательно замещено одним или несколькими -Q<sub>3</sub>-T<sub>3</sub>.

Например, Q<sub>2</sub> обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>алкильный линкер, необязательно замещенный галогеном или гидроксилом.

Например, Q<sub>2</sub> обозначает связь или метильный линкер, и T<sub>2</sub> обозначает H, галоген,  
15 -OR<sub>a</sub>, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -(NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>R<sub>c</sub>)<sup>+</sup>A<sup>-</sup> или -S(O)<sub>2</sub>NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>.

Например, каждый из R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub> и R<sub>c</sub> независимо обозначает H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, необязательно замещенный одним или несколькими -Q<sub>3</sub>-T<sub>3</sub>.

Например, один из R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub> и R<sub>c</sub> обозначает H.

Например, R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 4-7-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее 0 или 1 дополнительный гетероатом к атому N (например, азетидинил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, пиперидинил, 1,2,3,6-  
20 тетрагидропиридинил, пиперазинил, морфолинил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептанил и тому подобные), и кольцо необязательно замещено одним или несколькими -Q<sub>3</sub>-T<sub>3</sub>.

Например, -Q<sub>3</sub>-T<sub>3</sub> обозначает оксо.

Например, T<sub>2</sub> обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил или C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил, и  
30 один или несколько -Q<sub>3</sub>-T<sub>3</sub> обозначает оксо.

Например, Q<sub>3</sub> обозначает связь или незамещенный или замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>алкильный линкер.

Например, T<sub>3</sub> обозначает H, галоген, 4-7-членный гетероциклоалкил, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>алкил,  
35 OR<sub>d</sub>, COOR<sub>d</sub>, -S(O)<sub>2</sub>R<sub>d</sub> или -NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>.

Например, один из R<sub>d</sub> и R<sub>e</sub> обозначает H.

Например, R<sub>7</sub> обозначает -C(O)R<sub>f</sub>.

Например, R<sub>7</sub> обозначает -C(O)R<sub>f</sub>, в котором R<sub>f</sub> обозначает C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил.

Например, R<sub>7</sub> обозначает C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арил, замещенный одним или несколькими -Q<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>.  
40

Например, R<sub>7</sub> обозначает фенил, необязательно замещенный одним или несколькими -Q<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>.

Например, R<sub>7</sub> обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, необязательно замещенный одним или  
45 несколькими -Q<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>.

Например, R<sub>7</sub> обозначает C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил, необязательно замещенный одним или несколькими -Q<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>.

Например,  $R_7$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, 5 тетрагидро-2Н-тиопиран и морфолинил и тому подобные), необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5-T_5$ .

Например,  $R_7$  обозначает 5-6-членный гетероциклоалкил, необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5-T_5$ .

10 Например,  $R_7$  обозначает изопропил.

Например,  $R_7$  обозначает пирролидинил, пиперидинил, тетрагидропиран, тетрагидро-2Н-тиопиранил, циклопентил или циклогексил, циклогептил, каждый необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5-T_5$ .

15 Например,  $R_7$  обозначает циклопентил, циклогексил или тетрагидро-2Н-тиопиранил, каждый необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5-T_5$ .

Например, один или несколько  $-Q_5-T_5$  обозначает оксо.

Например,  $R_7$  обозначает 1-оксид-тетрагидро-2Н-тиопиранил или 1,1-диоксид-тетрагидро-2Н-тиопиранил.

20 Например,  $Q_5$  обозначает связь, и  $T_5$  обозначает amino, моно- $C_1-C_6$ алкиламино, ди- $C_1-C_6$ алкиламино.

Например,  $Q_5$  обозначает  $NHC(O)$ , и  $T_5$  обозначает  $C_1-C_6$ алкил или  $C_1-C_6$ алкокси.

25 Например,  $T_4$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил или  $C_3-C_8$ циклоалкил, и один или несколько  $-Q_5-T_5$  обозначает оксо.

Например,  $T_5$  обозначает Н, галоген,  $C_1-C_6$ алкил,  $C_1-C_6$ алкоксил,  $C_3-C_8$ циклоалкил,  $C_6-C_{10}$ арил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $Q_5$  обозначает связь, и  $T_5$  обозначает  $C_1-C_6$ алкил,  $C_3-C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

30 Например,  $Q_5$  обозначает  $CO$ ,  $S(O)_2$  или  $NHC(O)$ ; и  $T_5$  обозначает  $C_1-C_6$ алкил,  $C_1-C_6$ алкоксил,  $C_3-C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $T_5$  обозначает  $C_1-C_6$ алкил или  $C_1-C_6$ алкоксил, каждый необязательно 35 замещенный галогеном, гидроксилом, циано,  $C_1-C_6$ алкоксилом, amino, моно- $C_1-C_6$ алкиламино, ди- $C_1-C_6$ алкиламино или  $C_3-C_8$ циклоалкилом.

Например,  $Q_5$  обозначает  $C_1-C_3$ алкильный линкер, и  $T_5$  обозначает Н или  $C_6-C_{10}$ арил.

Например,  $Q_5$  обозначает  $C_1-C_3$ алкильный линкер, и  $T_5$  обозначает  $C_3-C_8$ циклоалкил, 40 4-7-членный гетероциклоалкил или  $S(O)_q R_q$ .

Например,  $R_{11}$  обозначает Н.

Например, каждый из  $R_2$  и  $R_4$  независимо обозначает Н или  $C_1-C_6$ алкил, необязательно замещенный amino, моно- $C_1-C_6$ алкиламино, ди- $C_1-C_6$ алкиламино или 45  $C_6-C_{10}$ арил.

Например, каждый из  $R_2$  и  $R_4$  независимо обозначает  $C_1-C_6$ алкил, необязательно замещенный  $C_1-C_6$ алкоксилом.

Например, каждый из  $R_2$  и  $R_4$  обозначает метил.

Например,  $R_1$  обозначает H.

Например,  $R_{12}$  обозначает H, метил, этил, этенил или галоген.

Например,  $R_1$  обозначает метил.

5 Например,  $R_{12}$  обозначает этил.

Например,  $R_{12}$  обозначает этенил.

Например,  $R_8$  обозначает H, метил, этил или этенил.

Например,  $R_8$  обозначает метил.

10 Например,  $R_8$  обозначает этил.

Например,  $R_8$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2H-пиранил, 3,6-дигидро-2H-пиранил, 15 тетрагидро-2H-тиопиран, морфолинил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил и тому подобные).

Например,  $R_8$  обозначает тетрагидропиран.

Например,  $R_8$  обозначает тетрагидропиран, и  $R_7$  обозначает  $-Q_4-T_4$ , в котором  $Q_4$  обозначает связь или  $C_1-C_4$ алкильный линкер, и  $T_4$  обозначает H,  $C_1-C_6$ алкил, 20  $C_3-C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $Z_1$  обозначает  $NR_7R_8$  или  $CR_7R_8R_{14}$ , где  $R_7$  и  $R_8$  вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 4-11-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее от 1 до 3 гетероатомов (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, 25 пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2H-пиранил, 3,6-дигидро-2H-пиранил, тетрагидро-2H-тиопиран и морфолинил и тому подобные) или  $C_3-C_8$ циклоалкил, каждый необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_6-T_6$ .

30 Например, кольцо, образованное  $R_7$  и  $R_8$ , выбрано из группы, состоящей из азетидинила, пирролидинила, пиперидинила, морфолинила, пиперазинила и циклогексенила, каждый необязательно замещенный одним  $-Q_6-T_6$ .

Например,  $-Q_6-T_6$  обозначает оксо.

35 Например,  $T_6$  обозначает H, галоген,  $C_1-C_6$ алкил,  $C_1-C_6$ алкоксил,  $C_3-C_8$ циклоалкил,  $C_6-C_{10}$ арил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $Q_6$  обозначает связь, и  $T_6$  обозначает  $C_1-C_6$ алкил,  $C_3-C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

40 Например,  $Q_6$  обозначает CO,  $S(O)_2$  или  $NHC(O)$ ; и  $T_6$  обозначает  $C_1-C_6$ алкил,  $C_1-C_6$ алкоксил,  $C_3-C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $T_6$  обозначает  $C_1-C_6$ алкил,  $C_1-C_6$ алкоксил, каждый необязательно замещенный галогеном, гидроксильной группой, циано,  $C_1-C_6$ алкоксил, амино, моно- $C_1-C_6$  45 алкиламино, ди- $C_1-C_6$ алкиламино или  $C_3-C_8$ циклоалкилом.

Например,  $Q_6$  обозначает  $C_1-C_3$ алкильный линкер и  $T_6$  обозначает H или  $C_6-C_{10}$ арил.

Например,  $Q_6$  обозначает  $C_1-C_3$ алкильный линкер и  $T_6$  обозначает  $C_3-C_8$ циклоалкил, 4-7-членный гетероциклоалкил или  $S(O)_pR_p$ .

Например, каждый из  $R_p$  и  $R_q$  независимо обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил.

Например,  $R_{13}$  обозначает H или метил.

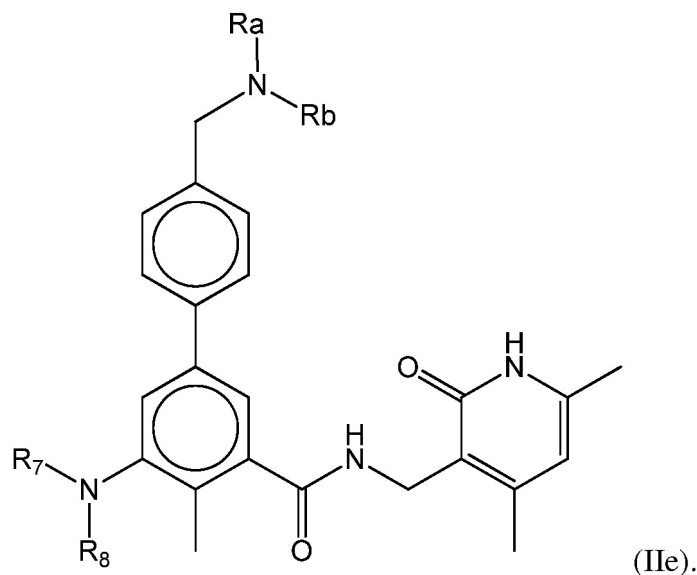
Например,  $R_{13}$  обозначает H.

Например,  $R_3$  обозначает H.

Например,  $A^-$  обозначает  $Br^-$ .

Например, каждый из  $R_5$ ,  $R_9$  и  $R_{10}$  обозначает H.

Другая подгруппа соединений формулы (II) включает соединения формулы (IIe):



Соединения формулы (IIe) могут включать один или несколько из следующих признаков:

Например, каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо обозначает H или  $C_1$ - $C_6$ алкил, необязательно замещенный одним или несколькими  $Q_3$ - $T_3$ .

Например, один из  $R_a$  и  $R_b$  обозначает H.

Например,  $R_a$  и  $R_b$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 4-7-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее 0 или 1 дополнительный гетероатом к атому N (например, азетидинил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, морфолинил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептанил и тому подобные), и кольцо необязательно замещено одним или несколькими  $-Q_3$ - $T_3$ .

Например,  $R_a$  и  $R_b$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют азетидинил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил или морфолинил, и кольцо необязательно замещено одним или несколькими  $-Q_3$ - $T_3$ .

Например, один или несколько  $-Q_3$ - $T_3$  обозначают оксо.

Например,  $Q_3$  обозначает связь или незамещенный или замещенный  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер.

Например,  $T_3$  обозначает H, галоген, 4-7-членный гетероциклоалкил,  $C_1$ - $C_3$ алкил,  $OR_d$ ,  $COOR_d$ ,  $-S(O)_2R_d$  или  $-NR_dR_e$ .

Например, один из  $R_a$  и  $R_e$  обозначает H.

Например,  $R_7$  обозначает  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил, каждый необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5-T_5$ .

Например,  $R_7$  обозначает пиперидинил, тетрагидропиран, тетрагидро-2H-тиопиранил, цикlopентил, циклогексил, пирролидинил или циклогептил, каждый необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5-T_5$ .

Например,  $R_7$  обозначает цикlopентил, циклогексил или тетрагидро-2H-тиопиранил, каждый необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5-T_5$ .

Например,  $Q_5$  обозначает  $NHC(O)$ , и  $T_5$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил или  $C_1$ - $C_6$  алкокси.

Например, один или несколько  $-Q_5-T_5$  обозначает оксо.

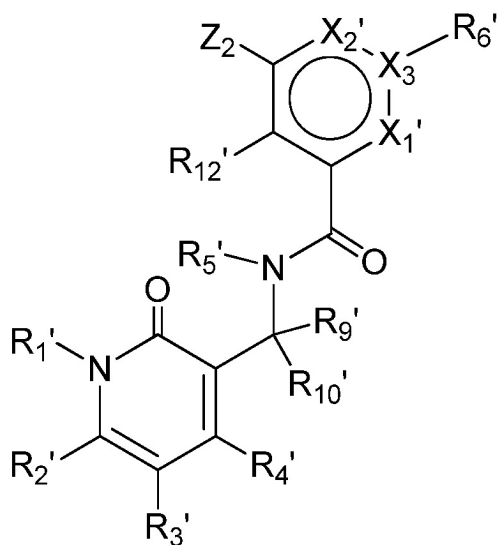
Например,  $R_7$  обозначает I-оксид-тетрагидро-2H-тиопиранил или 1,1-диоксид-тетрагидро-2H-тиопиранил.

Например,  $Q_5$  обозначает связь, и  $T_5$  обозначает amino, моно- $C_1$ - $C_6$ алкиламино, ди- $C_1$ - $C_6$ алкиламино.

Например,  $Q_5$  обозначает  $CO$ ,  $S(O)_2$  или  $NHC(O)$ ; и  $T_5$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_1$ - $C_6$ алкоксил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $R_8$  обозначает H, метил или этил.

Соединения, пригодные для применения в способе по настоящему изобретению, также включают соединения формулы (III):



(III),

или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир. В формуле (III):

$X_1'$  обозначает N или  $CR_{11}'$ ;

$X_2'$  обозначает N или  $CR_{13}'$ ;

$X_3$  обозначает N или C, и когда X обозначает N,  $R_6'$  отсутствует;

$Z_2$  обозначает  $NR_7'R_8'$ ,  $OR_7'$ ,  $S(O)_a'R_7'$  или  $CR_7'R_8'R_{14}'$ , в которых  $a'=0, 1$  или  $2$ ;

каждый из  $R_1'$ ,  $R_5'$ ,  $R_9'$  и  $R_{10}'$  независимо обозначает H или  $C_1$ - $C_6$ алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила,  $COOH$ ,  $C(O)O-C_1-C_6$ алкила, циано,  $C_1$ - $C_6$ алкоксила, amino, моно- $C_1$ - $C_6$ алкиламино, ди- $C_1$ - $C_6$ алкиламино,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкила,  $C_6$ - $C_{10}$ арила, 4-12-

членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила;

каждый из  $R_2'$ ,  $R_3'$  и  $R_4'$  независимо обозначает  $-Q_1'-T_1'$ , в котором  $Q_1'$  обозначает связь или  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер, необязательно замещенный галогеном, циано, гидроксильной группой или  $C_1$ - $C_6$ алкокси, и  $T_1'$  обозначает H, галоген, гидроксил, COOH, циано, азидо, или  $R_{S1}'$ , в котором  $R_{S1}'$  обозначает  $C_1$ - $C_3$ алкил,  $C_2$ - $C_6$ алкенил,  $C_2$ - $C_6$ алкинил,  $C_1$ - $C_6$ алкоксил,  $C(O)O$ - $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил,  $C_6$ - $C_{10}$ арил, amino, моно- $C_1$ - $C_6$ алкиламино, ди- $C_1$ - $C_6$ алкиламино, 4-12-членный гетероциклоалкил или 5- или 6-членный гетероарил, и  $R_{S1}'$  необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксильной группы, оксо, COOH,  $C(O)O$ - $C_1$ - $C_6$ алкила, циано,  $C_1$ - $C_6$ алкоксильной группы, amino, моно- $C_1$ - $C_6$ алкиламино, ди- $C_1$ - $C_6$ алкиламино,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкила,  $C_6$ - $C_{10}$ арила, 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила;

$R_6'$  обозначает H, галоген, циано, азидо,  $OR_a'$ ,  $-NR_a'R_b'$ ,  $-C(O)R_a'$ ,  $-C(O)OR_a'$ ,  $-C(O)NR_a'R_b'$ ,  $-NR_b'C(O)R_a'$ ,  $-S(O)_bR_a'$ ,  $-S(O)_bNR_a'R_b'$  или  $R_{S2}'$ , в котором  $R_{S2}'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_2$ - $C_6$ алкенил,  $C_2$ - $C_6$ алкинил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил или 4-12-членный гетероциклоалкил,  $b'=0, 1$  или  $2$ , каждый из  $R_a'$  и  $R_b'$  независимо обозначает H или  $R_{S3}'$ , и  $R_{S3}'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_2$ - $C_6$ алкенил,  $C_2$ - $C_6$ алкинил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил,  $C_6$ - $C_{10}$ арил, 4-12-членный гетероциклоалкил или 5- или 6-членный гетероарил; или  $R_a'$  и  $R_b'$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 4-12-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее 0 или 1 дополнительный гетероатом; и каждый из  $R_{S2}'$ ,  $R_{S3}'$  и 4-12-членного гетероциклоалкильного кольца, образованного  $R_a'$  и  $R_b'$ , необязательно замещен одним или несколькими  $-Q_2'-T_2'$ , где  $Q_2'$  обозначает связь или каждый  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер необязательно замещен галогеном, циано, гидроксильной группой или  $C_1$ - $C_6$ алкокси, и  $T_2'$  обозначает H, галоген, циано,  $-OR_c'$ ,  $-NR_c'R_d'$ ,  $-C(O)R_c'$ ,  $-C(O)OR_c'$ ,  $-C(O)NR_c'R_d'$ ,  $-NR_d'C(O)R_c'$ ,  $-NR_d'C(O)OR_c'$ ,  $-S(O)_2R_c'$ ,  $-S(O)_2NR_c'R_d'$  или  $R_{S4}'$ , в которых каждый из  $R_c'$  и  $R_d'$  независимо обозначает H или  $R_{S5}'$ , каждый из  $R_{S4}'$  и  $R_{S5}'$  независимо обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил,  $C_6$ - $C_{10}$ арил, 4-12-членный гетероциклоалкил или 5- или 6-членный гетероарил, или  $R_c'$  и  $R_d'$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 4-12-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее 0 или 1 дополнительный гетероатом, и каждый из  $R_{S4}'$ ,  $R_{S5}'$  и 4-12-членное гетероциклоалкильное кольцо, образованное  $R_c'$  и  $R_d'$ , необязательно замещены одним или несколькими  $-Q_3'-T_3'$ , где  $Q_3'$  обозначает связь или каждый  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер необязательно замещен галогеном, циано, гидроксильной группой или  $C_1$ - $C_6$ алкокси, и  $T_3'$  выбран из группы, состоящей из галогена, циано,  $C_1$ - $C_6$ алкила,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкила,  $C_6$ - $C_{10}$ арила, 4-12-членного гетероциклоалкила, 5- или 6-членного гетероарила,  $OR_e'$ ,  $COOR_e'$ ,  $-S(O)_2R_e'$ ,  $-NR_e'R_f'$  и  $-C(O)NR_e'R_f'$ , причем каждый из  $R_e'$  и  $R_f'$  независимо обозначает H или  $C_1$ - $C_6$ алкил, или  $-Q_3'-T_3'$  обозначает оксо; или  $-Q_2'-T_2'$  обозначает оксо; при условии, что  $-Q_2'-T_2'$  не обозначает H;

$R_7'$  обозначает  $-Q_4'-T_4'$ , в котором  $Q_4'$  обозначает связь,  $C_1$ - $C_4$ алкильный линкер или  $C_2$ - $C_4$ алкенильный линкер, причем каждый линкер необязательно замещен галогеном,



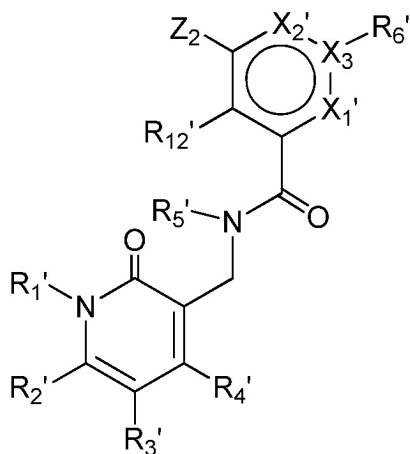
циано, гидроксилом или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкокси, и T<sub>4</sub>' обозначает Н, галоген, циано, NR<sub>g</sub>'R<sub>h</sub>',  
 -OR<sub>g</sub>', -C(O)R<sub>g</sub>', -C(O)OR<sub>g</sub>', -C(O)NR<sub>g</sub>'R<sub>h</sub>', -C(O)NR<sub>g</sub>'OR<sub>h</sub>', -NR<sub>g</sub>'C(O)R<sub>h</sub>', -S(O)<sub>2</sub>R<sub>g</sub>' или R<sub>S6</sub>',  
 в которых каждый из R<sub>g</sub>' и R<sub>h</sub>' независимо обозначает Н или R<sub>S7</sub>', каждый из R<sub>S6</sub>' и R<sub>S7</sub>'  
 5 независимо обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкинил, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил,  
 C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арил, 4-12-членный гетероциклоалкил, или 5- или 6-членный гетероарил, и каждый  
 из R<sub>S6</sub>' и R<sub>S7</sub>' необязательно замещен одним или несколькими -Q<sub>5</sub>'-T<sub>5</sub>', где Q<sub>5</sub>' обозначает  
 связь, C(O), C(O)NR<sub>k</sub>', NR<sub>k</sub>'C(O), S(O)<sub>2</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>алкильный линкер, причем R<sub>k</sub>' обозначает  
 10 Н или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, и T<sub>5</sub>' обозначает Н, галоген, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, гидроксил, циано,  
 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксил, amino, моно-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, ди-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил,  
 C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арил, 4-12-членный гетероциклоалкил, 5- или 6-членный гетероарил или S(O)<sub>q</sub>'R<sub>q</sub>',  
 в котором q'=0, 1 или 2, и R<sub>q</sub>' обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкинил,  
 15 C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арил, 4-12-членный гетероциклоалкил или 5- или 6-членный  
 гетероарил, и T<sub>5</sub>' необязательно замещен одним или несколькими заместителями,  
 выбранными из группы, состоящей из галогена, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкила, гидроксила, циано,  
 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксила, amino, моно-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, ди-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкила,  
 C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арила, 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила, за  
 20 исключением случаев, когда T<sub>5</sub> обозначает Н, галоген, гидроксил или циано; или -Q<sub>5</sub>'-T<sub>5</sub>'  
 обозначает оксо, при условии, что R<sub>7</sub>' не обозначает Н;

каждый из R<sub>8</sub>', R<sub>11</sub>', R<sub>12</sub>' и R<sub>13</sub>' независимо обозначает Н, галоген, гидроксил, COOH,  
 циано, R<sub>S8</sub>', OR<sub>S8</sub>' или COOR<sub>S8</sub>', в которых R<sub>S8</sub>' обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенил,  
 25 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкинил, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил, 4-12-членный гетероциклоалкил, amino,  
 моно-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино или ди-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, и R<sub>S8</sub>' необязательно замещен одним  
 или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена,  
 гидроксила, COOH, C(O)O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкила, циано, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксила, amino,  
 30 моно-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино и ди-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино; или R<sub>7</sub>' и R<sub>8</sub>' вместе с атомом N, к  
 которому они присоединены, образуют 4-12-членное гетероциклоалкильное кольцо,  
 имеющее от 0 до 2 дополнительных гетероатомов, или R<sub>7</sub>' и R<sub>8</sub>' вместе с атомом C, к  
 которому они присоединены, образуют C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил или 4-12-членное  
 35 гетероциклоалкильное кольцо, имеющее от 1 до 3 гетероатомов, и каждое из 4-12-  
 членных гетероциклоалкильных колец или C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкила, образованных R<sub>7</sub>' и R<sub>8</sub>',  
 необязательно замещен одним или несколькими -Q<sub>6</sub>'-T<sub>6</sub>', где Q<sub>6</sub>' обозначает связь, C  
 (O), C(O)NR<sub>m</sub>', NR<sub>m</sub>'C(O), S(O)<sub>2</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>алкильный линкер, причем R<sub>m</sub>' обозначает Н  
 или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, и T<sub>6</sub>' обозначает Н, галоген, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, гидроксил, циано,  
 40 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксил, amino, моно-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, ди-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил,  
 C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арил, 4-12-членный гетероциклоалкил, 5- или 6-членный гетероарил или S(O)<sub>p</sub>'R<sub>p</sub>',  
 в которых p'=0, 1 или 2, и R<sub>p</sub>' обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкинил,  
 C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арил, 4-12-членный гетероциклоалкил или 5- или 6-членный  
 45 гетероарил, и T<sub>6</sub>' необязательно замещен одним или несколькими заместителями,  
 выбранными из группы, состоящей из галогена, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкила, гидроксила, циано,  
 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксила, amino, моно-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, ди-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкила,

С<sub>6</sub>-С<sub>10</sub>арила, 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила, за исключением случаев, когда Т<sub>6</sub>' обозначает Н, галоген, гидроксил или циано; или -Q<sub>6</sub>'-Т<sub>6</sub>' обозначает оксо; и

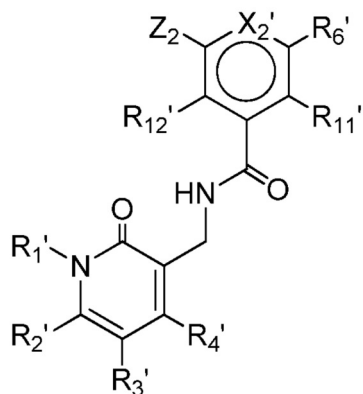
5 R<sub>14</sub>' отсутствует, представляет собой Н или С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> алкил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, СООН, С(О)О-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкила, циано, С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкоксила, амина, моно-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино, ди-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино, С<sub>3</sub>-С<sub>8</sub>циклоалкила, С<sub>6</sub>-С<sub>10</sub>арила, 4-12-членного гетероциклоалкила и 5- или 6-членного гетероарила.

10 Одна подгруппа соединений формулы (III) включает соединения формулы (IIIa):

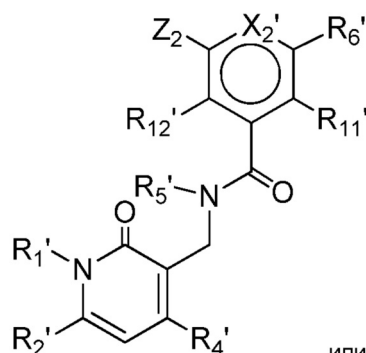


(IIIa).

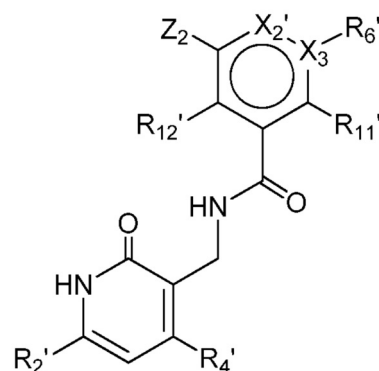
25 Другая подгруппа соединений формулы (III) включает соединения формулы (IIIb), (IIIc) или (IIId):



(IIIb)



(IIIc)



(IIIId)

Соединения формул (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId) могут включать один или несколько из следующих признаков:

Например, соединения формулы (III) не представляют собой

N-(5-(((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)карбамоил)-2-метилфенил)фуран-2-карбоксамид,

N,N'-(5-(((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)карбамоил)-1,3-фенилен)диацетамид,

N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-3-пиваламидобензамид, 3-(3,4-дигидро-2Н-бензо[b][1,4]диоксепин-7-сульфонамидо)-N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)бензамид,

N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-3,5-диметоксибензамид,  
 N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-3,4,5-триметоксибензамид,  
 3-аллил-N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-4,5-  
 диметоксибензамид,

4-(2-амино-2-оксоэтокси)-3-хлор-N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)  
 метил)-5-метоксибензамид,

3-хлор-N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-4-гидрокси-5-  
 метоксибензамид или

3-бром-N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-5-метокси-4-  
 пропоксibenзамид.

Например,  $X_1'$  обозначает  $CR_{11}'$ , и  $X_2'$  обозначает  $CR_{13}'$ .

Например,  $X_1'$  обозначает  $CR_{11}'$ , и  $X_2'$  обозначает N.

Например,  $X_1'$  обозначает N, и  $X_2'$  обозначает  $CR_{13}'$ .

Например,  $X_1'$  обозначает N, и  $X_2'$  обозначает N.

Например,  $X_3$  обозначает C.

Например,  $X_3$  обозначает N, и  $R_6'$  отсутствует.

Например,  $Z_2$  обозначает  $NR_7'R_8'$ .

Например,  $Z_2$  обозначает  $CR_7'R_8'R_{14}'$ .

Например,  $Z_2$  обозначает  $OR_7'$ .

Например,  $Z_2$  обозначает  $S(O)_a'R_7'$ , в котором  $a'=0, 1$  или  $2$ .

Например,  $R_6'$  обозначает H.

Например,  $R_6'$  обозначает галоген (например, фтор, хлор, бром и йод).

Например,  $R_6'$  обозначает  $C_1$ - $C_3$ алкил, необязательно замещенный одним или  
 несколькими  $-Q_2'$ - $T_2'$ .

Например,  $R_6'$  обозначает  $CF_3$ .

Например,  $R_6'$  обозначает  $C_2$ - $C_6$ алкенил,  $C_2$ - $C_6$ алкинил или  $C_3$ - $C_6$ циклоалкил, каждый  
 необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_2'$ - $T_2'$ .

Например,  $R_6'$  обозначает этенил.

Например,  $R_6'$  обозначает этинил.

Например,  $R_6'$  обозначает этинил, замещенный одним или несколькими  $-Q_2'$ - $T_2'$ , в  
 которых  $Q_2'$  обозначает связь или  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер, и  $T_2'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  
 $C_3$ - $C_6$ циклоалкил или 4-12-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил,  
 тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил,  
 изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-  
 тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2H-пиранил, 3,6-дигидро-2H-пиранил,  
 тетрагидро-2H-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]  
 гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные)  
 необязательно замещенные одним или несколькими  $-Q_3'$ - $T_3'$ .

Например,  $R_6'$  обозначает циано.

Например,  $R_6'$  обозначает азидо.

Например,  $R_6'$  обозначает  $C(O)H$ .

Например,  $R_6'$  обозначает  $OR_a'$  или  $-C(O)R_a'$ .

Например,  $R_a'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил или 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, тетрагидро-2Н-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные), который необязательно замещен одним или несколькими  $-Q_2'-T_2'$ .

Например,  $R_6'$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, тетрагидро-2Н-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные), необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_2'-T_2'$ .

Например,  $R_6'$  обозначает пиперидинил, 2,2,6,6-тетраметил-пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, 2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, морфолинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил или пирролидинил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими  $-Q_2'-T_2'$ .

Например,  $R_6'$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил, необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_2'-T_2'$ , и  $-Q_2'-T_2'$  обозначает оксо, или  $Q_2'$  обозначает связь, и  $T_2'$  обозначает  $-OR_c'$ ,  $-NR_c'R_d'$ ,  $-C(O)R_c'$ ,  $-C(O)OR_c'$ ,  $-S(O)_2R_c'$ ,  $C_1$ - $C_6$ алкил или 4-7-членный гетероциклоалкил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими  $-Q_3'-T_3'$ , когда  $R_c'$  или  $R_d'$  не обозначает Н.

Например,  $R_6'$  обозначает  $-NR_a'R_b'$ ,  $-C(O)R_a'$ ,  $-C(O)OR_a'$ ,  $-C(O)NR_a'R_b'$ ,  $-NR_b'C(O)R_a'$ ,  $-SR_a'$ ,  $-S(O)_2R_a'$  или  $-S(O)_2NR_a'R_b'$ .

Например, каждый из  $R_a'$  и  $R_b'$  независимо обозначает Н,  $C_1$ - $C_6$ алкил или  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил, необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_2'-T_2'$ .

Например, один из  $R_a'$  и  $R_b'$  обозначает Н.

Например,  $R_a'$  и  $R_b'$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 4-7-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее 0 или 1 дополнительный гетероатом к атому N (например, азетидинил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные), и кольцо необязательно замещено одним или несколькими  $-Q_2'-T_2'$ .

Например,  $-Q_2'-T_2'$  обозначает оксо.

Например,  $Q_2'$  обозначает связь.

Например,  $Q_2'$  обозначает незамещенный  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер.

Например,  $T_2'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил или  $C_6$ - $C_{10}$ арил, каждый необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_3'-T_3'$ .

Например,  $T_2'$  обозначает незамещенный или замещенный прямоцепочечный  $C_1$ - $C_6$  или разветвленный  $C_3$ - $C_6$ алкил, включая без ограничения метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, втор-пентил и н-гексил.

Например,  $T_2'$  обозначает фенил.

Например,  $T_2'$  обозначает галоген (например, фтор, хлор, бром и йод).

Например,  $T_2'$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, тетрагидро-2Н-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные),

необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_3'-T_3'$ .

Например,  $T_2'$  обозначает  $-OR_c'$ ,  $-NR_c'R_d'$ ,  $-C(O)R_c'$ ,  $-C(O)OR_c'$  или  $-S(O)_2R_c'$ .

Например,  $R_c'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил или 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, тетрагидро-2Н-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные), который необязательно замещен одним или несколькими  $-Q_3'-T_3'$ .

Например, каждый из  $R_c'$  и  $R_d'$  независимо обозначает Н или  $C_1$ - $C_6$ алкил, необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_3'-T_3'$ .

Например,  $R_c'$  обозначает Н.

Например,  $R_d'$  обозначает Н.

Например,  $R_c'$  и  $R_d'$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют 4-7-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее 0 или 1 дополнительный гетероатом к атому N (например, азетидинил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные), и кольцо необязательно замещено одним или несколькими  $-Q_3'-T_3'$ .

Например,  $Q_2'$  обозначает связь, и  $T_2'$  обозначает  $-OR_c'$ ,  $-NR_c'R_d'$ ,  $-C(O)R_c'$ ,  $-C(O)OR_c'$ ,  $-S(O)_2R_c'$ ,  $C_1$ - $C_6$ алкил или 4-7-членный гетероциклоалкил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими  $-Q_3'-T_3'$ , когда  $R_c'$  или  $R_d'$  не обозначает Н.

Например,  $-Q_3'-T_3'$  обозначает оксо.

Например,  $T_2'$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил или  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил, и один или несколько  $-Q_3'-T_3'$  обозначает оксо.

Например,  $Q_3'$  обозначает связь или незамещенный или замещенный  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер.

Например,  $T_3'$  обозначает Н, галоген, 4-7-членный гетероциклоалкил,  $C_1$ - $C_3$ алкил,  $OR_e'$ ,  $COOR_e'$ ,  $-S(O)_2R_e'$ ,  $-NR_e'R_f'$  или  $-C(O)NR_e'R_f'$ .

Например, один из  $R_d'$  и  $R_e'$  обозначает Н.

Например,  $Q_3'$  обозначает связь или  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер, и  $T_3'$  выбран из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_3$ алкила, галогена,  $OR_e'$ ,  $-S(O)_2R_e'$ ,  $-NR_e'R_f'$  и  $-C(O)NR_e'R_f'$ .

Например,  $Q_3'$  обозначает связь или  $C_1$ - $C_3$ алкильный линкер, и  $T_3'$  выбран из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_3$ алкила,  $OR_e'$ ,  $-S(O)_2R_e'$  или  $-NR_e'R_f'$ .

Например,  $R_e'$  обозначает H.

5 Например,  $R_f'$  обозначает H.

Например,  $R_7'$  обозначает  $-C(O)R_g'$ .

Например,  $R_7'$  обозначает  $-C(O)R_g'$ , в котором  $R_g'$  обозначает  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил, 4-7-членный гетероциклоалкил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил.

10 Например,  $R_7'$  обозначает  $C_6$ - $C_{10}$ арил, замещенный одним или несколькими  $-Q_5'$ - $T_5'$ .

Например,  $R_7'$  обозначает фенил, необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5'$ - $T_5'$ .

15 Например,  $R_7'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил, необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5'$ - $T_5'$ .

Например,  $R_7'$  обозначает  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил, необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5'$ - $T_5'$ .

20 Например,  $R_7'$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2H-пиранил, 3,6-дигидро-2H-пиранил, тетрагидро-2H-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные), необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5'$ - $T_5'$ .

25 Например,  $R_7'$  обозначает 5-6-членный гетероциклоалкил, необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_5'$ - $T_5'$ .

Например,  $R_7'$  обозначает изопропил.

30 Например,  $R_7'$  обозначает пирролидинил, пиперидинил, тетрагидропиран, циклопентил или циклогексил, циклогептил, каждый необязательно замещенный одним  $-Q_5'$ - $T_5'$ .

Например,  $R_7'$  обозначает циклопентил или циклогексил, каждый необязательно замещенный одним  $-Q_5'$ - $T_5'$ .

35 Например,  $Q_5'$  обозначает  $NHC(O)$ , и  $T_5'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил или  $C_1$ - $C_6$ алкокси.

Например,  $-Q_5'$ - $T_5'$  обозначает оксо.

Например,  $T_4'$  обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил или  $C_6$ - $C_{10}$ арил, и один или несколько  $-Q_5'$ - $T_5'$  обозначают оксо.

40 Например,  $R_7'$  обозначает 1-оксид-тетрагидро-2H-тиопиранил или 1,1-диоксид-тетрагидро-2H-тиопиранил.

Например,  $R_7'$  обозначает циклогексанонил, например, циклогексанон-4-ил.

45 Например,  $T_5'$  обозначает H, галоген,  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_1$ - $C_6$ алкоксил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил,  $C_6$ - $C_{10}$ арил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $Q_5'$  обозначает связь, и  $T_5'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $Q_5'$  обозначает связь, и  $T_5'$  обозначает 5- или 6-членный гетероарил, амина,

моно-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино, ди-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино, причем Т<sub>5</sub>' необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкоксила или С<sub>3</sub>-С<sub>8</sub>циклоалкила.

Например, Q<sub>5</sub>' обозначает СО, S(O)<sub>2</sub> или NHC(O); и Т<sub>5</sub>' обозначает С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкил, С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкоксил, С<sub>3</sub>-С<sub>8</sub>циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например, Т<sub>5</sub>' обозначает С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкил или С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкоксил, каждый необязательно замещен галогеном, гидроксильной группой, циано, С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкоксильной группой, амино, моно-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино, ди-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино или С<sub>3</sub>-С<sub>8</sub> циклоалкилом.

Например, Q<sub>5</sub>' обозначает С<sub>1</sub>-С<sub>3</sub>алкильный линкер, и Т<sub>5</sub>' обозначает Н или С<sub>6</sub>-С<sub>10</sub>арил.

Например, Q<sub>5</sub>' обозначает С<sub>1</sub>-С<sub>3</sub>алкильный линкер, и Т<sub>5</sub>' обозначает С<sub>3</sub>-С<sub>8</sub>циклоалкил, 4-7-членный гетероциклоалкил или S(O)<sub>q</sub>'R<sub>q</sub>'.

Например, R<sub>6</sub>' обозначает галоген (например, фтор, хлор, бром и йод), и Z<sub>2</sub> обозначает S(O)<sub>a</sub>'R<sub>7</sub>', в котором a=0, 1 или 2, и R<sub>7</sub>' обозначает С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкил (например, метил, этил, н-пропил, изопропил, бутил или трет-бутил), С<sub>3</sub>-С<sub>8</sub>циклоалкил (например, циклопентил, циклогексил или циклогептил) или 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, тетрагидро-2Н-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные), и R<sub>7</sub>' необязательно замещен одним или несколькими -Q<sub>5</sub>'-Т<sub>5</sub>'.

Например, R<sub>6</sub>' обозначает галоген (например, фтор, хлор, бром и йод), и Z<sub>2</sub> обозначает OR<sub>7</sub>', в котором R<sub>7</sub>' обозначает 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, тетрагидро-2Н-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные), и R<sub>7</sub>' необязательно замещен одним или несколькими -Q<sub>5</sub>'-Т<sub>5</sub>'.

Например, R<sub>11</sub>' обозначает Н.

Например, каждый из R<sub>2</sub>' и R<sub>4</sub>' независимо обозначает Н или С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкил, необязательно замещенный азидо, галогеном, амино, моно-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино, ди-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино или С<sub>6</sub>-С<sub>10</sub>арилом.

Например, каждый из R<sub>2</sub>' и R<sub>4</sub>' независимо обозначает С<sub>1</sub>-С<sub>3</sub>алкил, необязательно замещенный С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкоксильной группой.

Например, каждый из R<sub>2</sub>' и R<sub>4</sub>' обозначает метил.

Например, R<sub>1</sub>' обозначает Н.

Например, R<sub>1</sub>' обозначает С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкил, необязательно замещенный азидо, галогеном, амино, моно-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино, ди-С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкиламино или С<sub>6</sub>-С<sub>10</sub>арилом.

Например, R<sub>12</sub>' обозначает Н, метил, этил, этенил или галоген.

Например, R<sub>12</sub>' обозначает метил.

Например,  $R_{12}'$  обозначает этил.

Например,  $R_{12}'$  обозначает этенил или пропенил.

Например,  $R_{12}'$  обозначает метоксил.

5 Например,  $R_8'$  обозначает H, метил, этил или этенил.

Например,  $R_8'$  обозначает метил.

Например,  $R_8'$  обозначает этил.

Например,  $R_8'$  обозначает пропил.

10 Например,  $R_8'$  обозначает этенил или пропенил.

Например,  $R_8'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил, замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена (например, F, Cl или Br), гидроксильной группы или  $C_1$ - $C_6$ алкоксильной группы.

15 Например,  $R_8'$  обозначает 4-7-членный необязательно замещенный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2H-пиранил, 3,6-дигидро-2H-пиранил, тетрагидро-2H-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и 20 тому подобные).

Например,  $R_8'$  обозначает пиперидинил.

Например,  $R_8'$  обозначает 4-7-членный, необязательно замещенный гетероциклоалкил, и  $R_7'$  обозначает  $-Q_4'-T_4'$ , в которых  $Q_4'$  обозначает связь или  $C_1$ - $C_4$ алкильный линкер, 25 и  $T_4'$  обозначает H,  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $Z_2$  обозначает  $NR_7'R_8'$  или  $CR_7'R_8'R_{14}'$ , где  $R_7'$  и  $R_8'$  вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 4-11-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее от 1 до 3 гетероатомов (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, 30 пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2H-пиранил, 3,6-дигидро-2H-пиранил, тетрагидро-2H-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дiazабицикло[2.2.1]гептанил, морфолинил и тому подобные), или  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил, 35 каждый необязательно замещенный одним или несколькими  $-Q_6'-T_6'$ .

Например, кольцо, образованное  $R_7'$  и  $R_8'$ , выбрано из группы, состоящей из азетидинила, пирролидинила, пиперидинила, морфолинила, пиперазинила и циклогексена, каждый необязательно замещенный одним  $-Q_6'-T_6'$ .

40 Например,  $-Q_6'-T_6'$  обозначает оксо.

Например,  $T_6'$  обозначает H, галоген,  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_1$ - $C_6$ алкоксил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил,  $C_6$ - $C_{10}$ арил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $Q_6'$  обозначает связь, и  $T_6'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

45 Например,  $Q_6'$  обозначает CO,  $S(O)_2$  или  $NHC(O)$ ; и  $T_6'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_1$ - $C_6$ алкоксил,  $C_3$ - $C_8$ циклоалкил,  $C_6$ - $C_{10}$ арил или 4-7-членный гетероциклоалкил.

Например,  $T_6'$  обозначает  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_1$ - $C_6$ алкоксил, каждый необязательно



замещенный галогеном, гидроксилом, циано, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксил, амина, моно-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино, ди-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкиламино или C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил.

Например, Q<sub>6</sub>' обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>алкильный линкер, и T<sub>6</sub>' обозначает H или C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арил.

Например, Q<sub>6</sub>' обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>алкильный линкер, и T<sub>6</sub>' обозначает C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил, 4-7-членный гетероциклоалкил или S(O)<sub>p</sub>'R<sub>p</sub>'.

Например, каждый из R<sub>p</sub>' и R<sub>q</sub>' независимо обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил.

Например, R<sub>6</sub>' обозначает -S(O)<sub>b</sub>'R<sub>a</sub>' или азидо, в котором b' обозначает 0, 1 или 2, и R<sub>a</sub>' обозначает C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил или C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил; и Z<sub>2</sub> обозначает NR<sub>7</sub>'R<sub>8</sub>', в котором R<sub>7</sub>' обозначает C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил (например, циклопентил, циклогексил или циклогептил) или 4-7-членный гетероциклоалкил (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, тетрагидро-2Н-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептанил и морфолинил и тому подобные), каждый необязательно замещенный одним или несколькими -Q<sub>5</sub>'-T<sub>5</sub>', и R<sub>8</sub>' обозначает H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил (например, метил, этил, н-пропил, изопропил, бутил или трет-бутил).

Например, R<sub>6</sub>' обозначает галоген (например, фтор, хлор, бром и йод), и Z<sub>2</sub> обозначает NR<sub>7</sub>'R<sub>8</sub>' или CR<sub>7</sub>'R<sub>8</sub>'R<sub>14</sub>', где R<sub>7</sub>' и R<sub>8</sub>' вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 4-11-членное гетероциклоалкильное кольцо, имеющее от 1 до 3 гетероатомов (например, азетидинил, оксетанил, тиетанил, пирролидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперазинил, тетрагидро-2Н-пиранил, 3,6-дигидро-2Н-пиранил, тетрагидро-2Н-тиопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептанил, морфолинил и тому подобные), или C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкил, каждый необязательно замещенный одним или

несколькими -Q<sub>6</sub>'-T<sub>6</sub>'.

Например, R<sub>13</sub>' обозначает H или метил.

Например, R<sub>13</sub>' обозначает H.

Например, R<sub>3</sub>' обозначает H.

Например, каждый из R<sub>5</sub>', R<sub>9</sub>' и R<sub>10</sub>' обозначает H.

Другие соединения, пригодные для способов по изобретению, описаны в заявке на патент США № PCT/US2012/026953, поданной 28 февраля 2012 г.; во временных заявках на патенты США №№ 61/474821, поданной 13 апреля 2011 г.; 61/474825, поданной 13 апреля 2011 г.; 61/499595, поданной 21 июня 2011 г., и 61/505676, поданной 8 июля 2011 г., полные содержания которых включены в настоящее описание путем ссылки.

Иллюстративные соединения-ингибиторы EZH2 по настоящему изобретению показаны в таблице 1. В представленной ниже таблице каждый случай представления

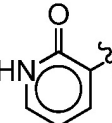
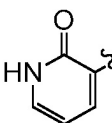
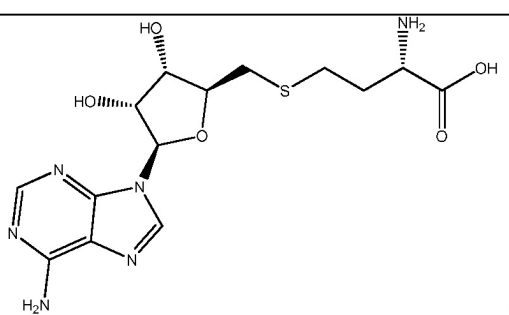
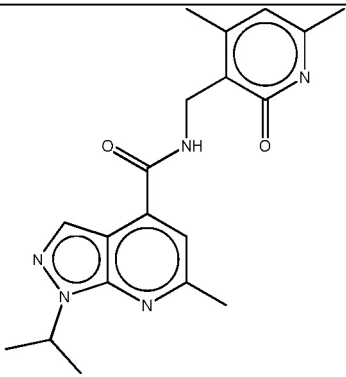
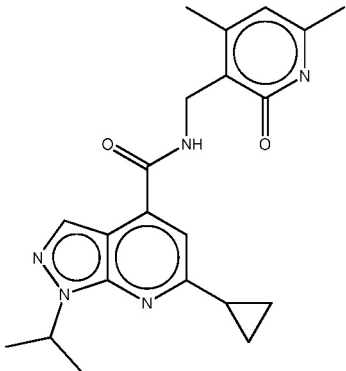
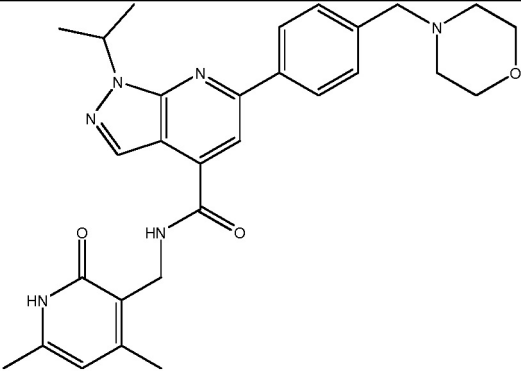
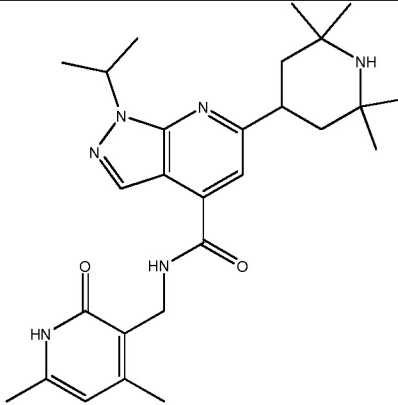
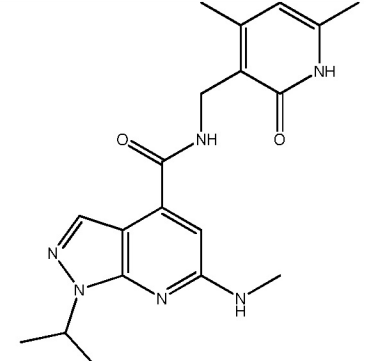
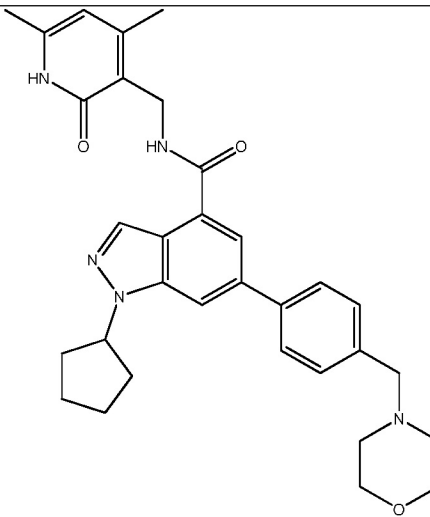
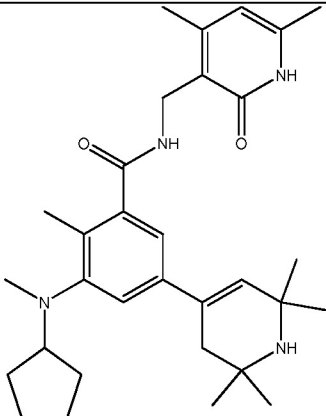
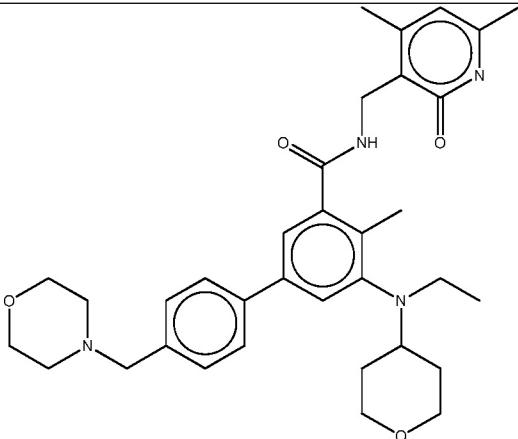
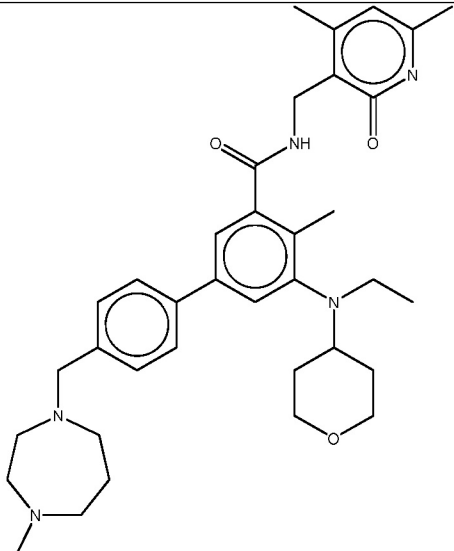
формулы  следует рассматривать как .

Таблица 1

Соединение номер	Структура
1	 <p>(“SAM”)</p>

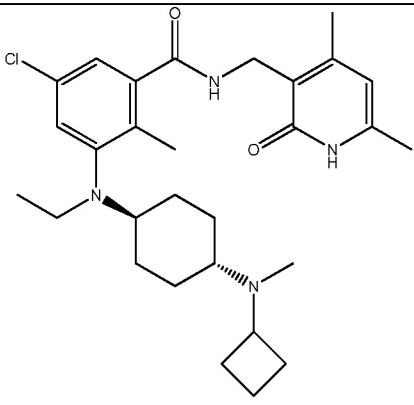
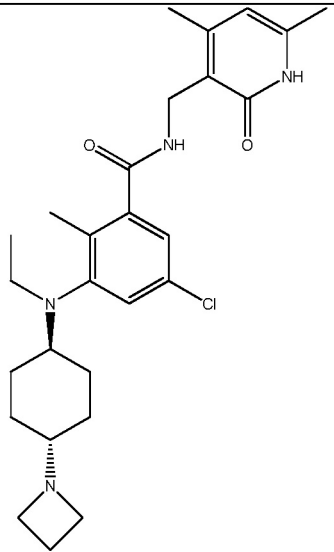
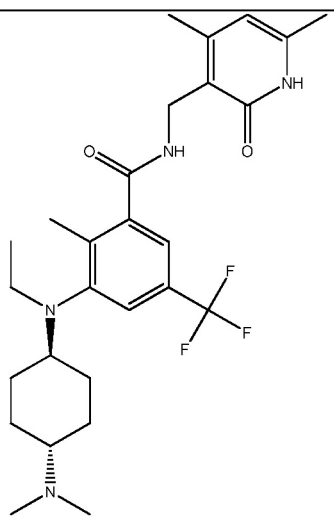
Соединение номер	Структура
2	
3	
4	

Соединение номер	Структура
5	
6	
7	

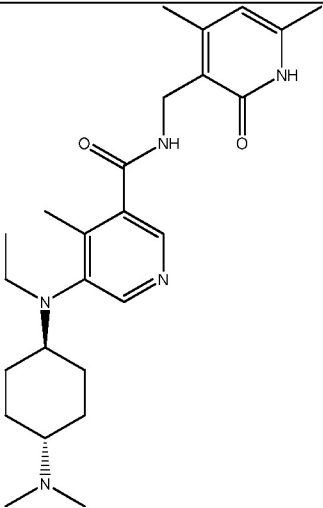
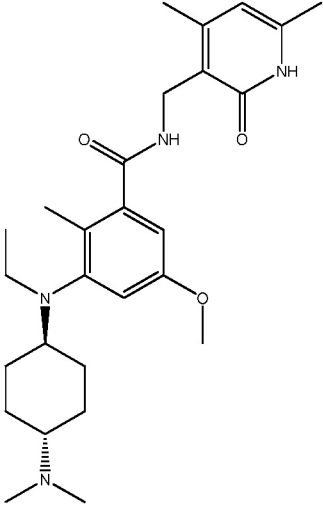
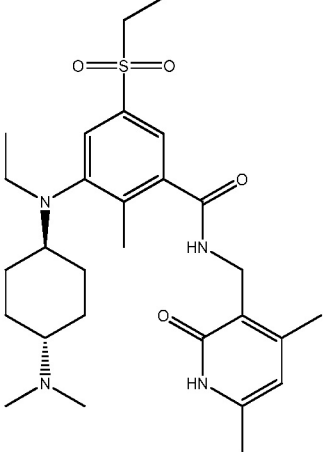
Соединение номер	Структура
8	
9	
10	

Соединение номер	Структура
11	 <chem>CCN(CC)[C@H]1CCCC[C@@H]1N(C)C</chem> <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)NCC2=CC(=O)N=C(C)C2</chem> <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)NCC2=CC(=O)N=C(C)C2</chem>
12	 <chem>CCN(CC)[C@H]1CCCC[C@@H]1N(C)C</chem> <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)NCC2=CC(=O)N=C(C)C2</chem> <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)NCC2=CC(=O)N=C(C)C2</chem>
13	 <chem>CCN(CC)[C@H]1CCCC[C@@H]1N(C)C</chem> <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)NCC2=CC(=O)N=C(C)C2</chem> <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)NCC2=CC(=O)N=C(C)C2</chem>

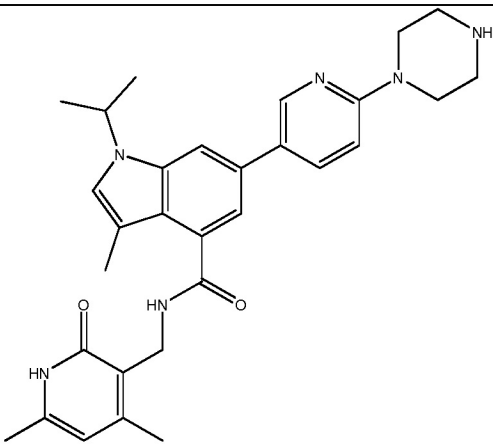
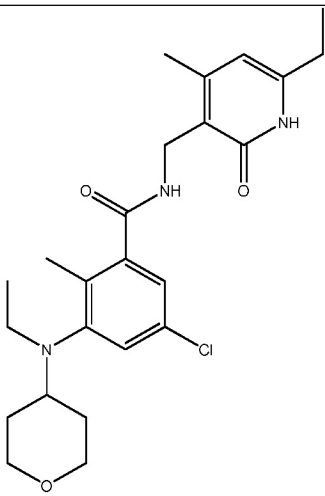
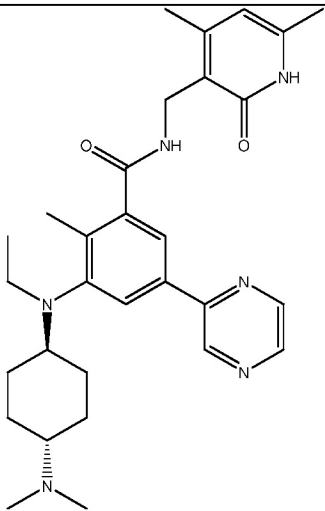
Соединение номер	Структура
14	 <chem>CCN(CC)C1=CC=C(C=C1C(=O)N(C)CC2=NC(=O)C=C2C)C3=CC=C(Cl)C=C3N(CC)C4CCCCC4N(C)C</chem>
15	 <chem>CCN(CC)C1=CC=C(C=C1C(=O)N(C)CC2=NC(=O)C=C2C)C3=CC=C(Cl)C=C3N(CC)C4CCCCC4N(C)C</chem>
16	 <chem>CCN(CC)C1=CC=C(C=C1C(=O)N(C)CC2=NC(=O)C=C2C)C3=CC=C(Cl)C=C3N(CC)C4CCCCC4N(C)C</chem>

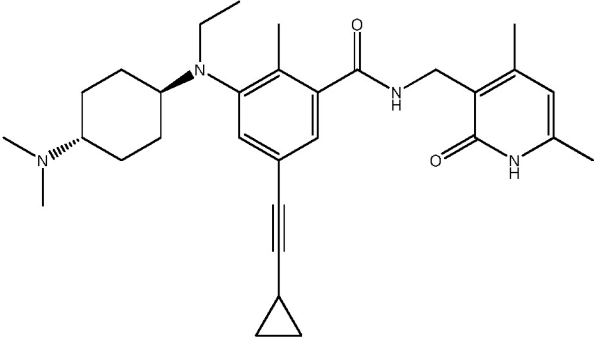
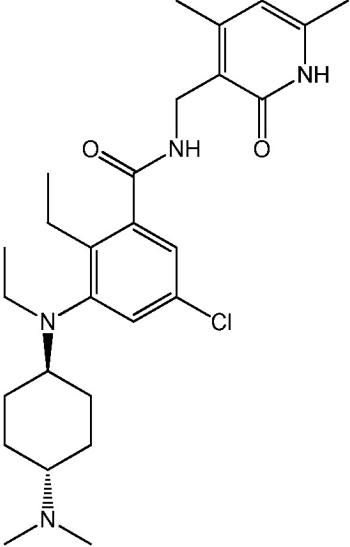
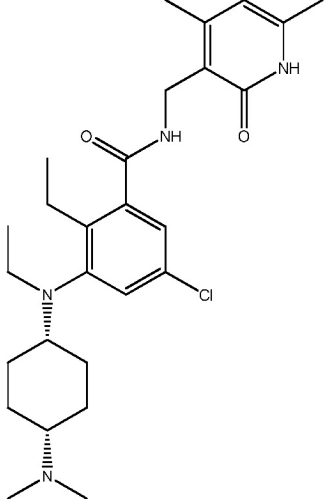
Соединение номер	Структура
17	
18	
19	

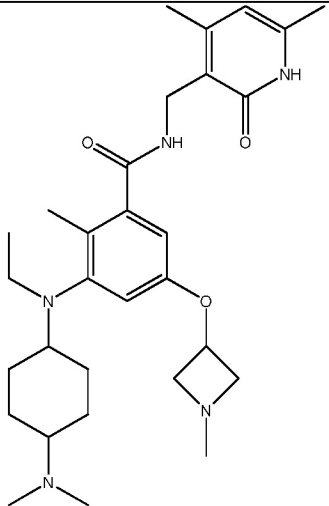
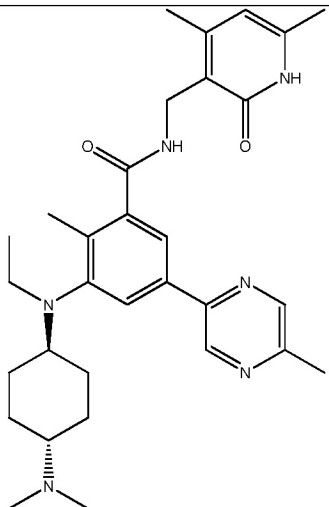
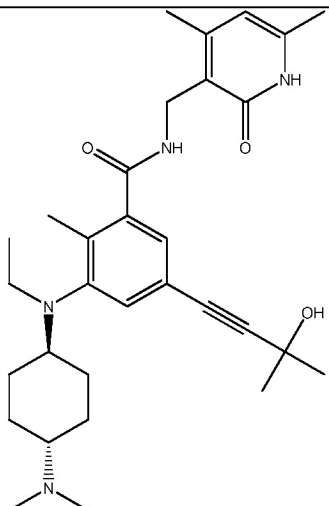


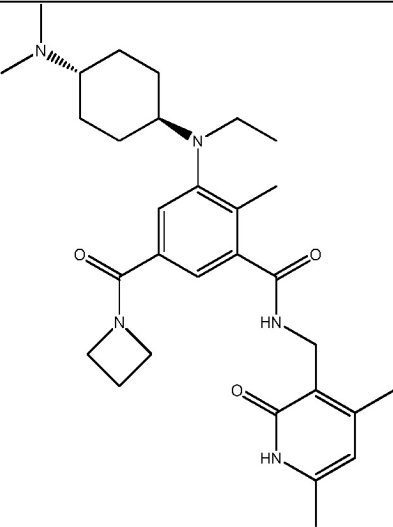
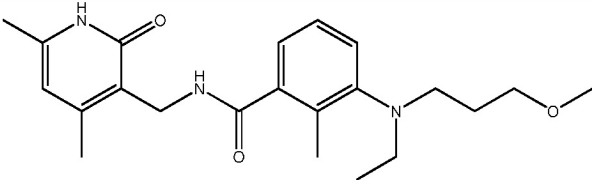
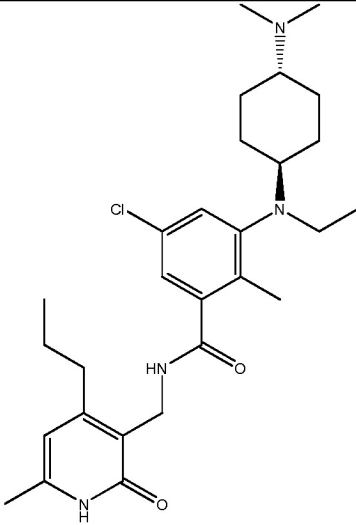
Соединение номер	Структура
20	
21	
22	

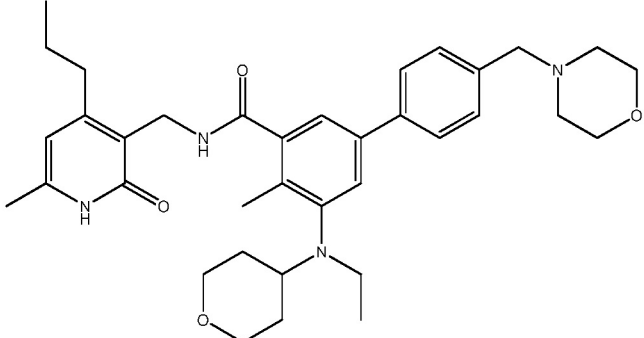
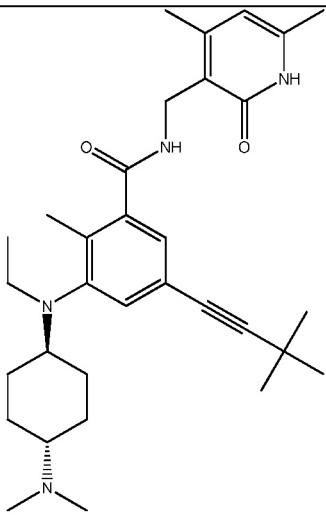
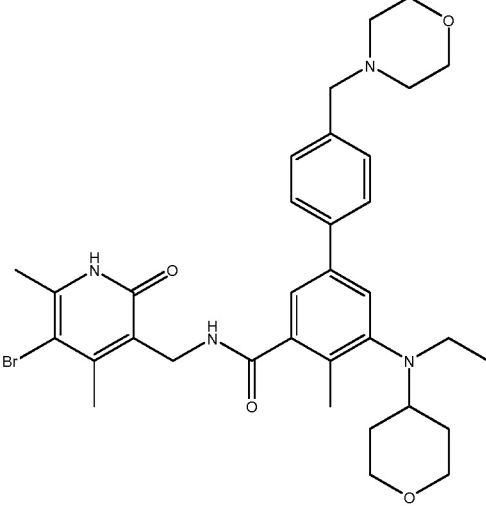
Соединение номер	Структура
23	 <chem>CC1(C)C(C(=O)NCC2=C(C)C(=O)NC=C2C)C=C(C)C(C1)N(CC)C3CCCCC3N(C)C</chem>
24	 <chem>CCN(CC)C1CCCCO1c2cc(C)c(cc2C(=O)NCC3=C(C)C(=O)NC=C3C)c4ccc(cc4N5C=CC=CC5N6CCCCC6)N7CCCCC7</chem>
25	 <chem>CCN1CCCCC1c2cc(C)c(cc2C(=O)NCC3=C(C)C(=O)NC=C3C)c4ccc(cc4C5=C(C)C(=CN5)C6CCCCC6)N7CCCCC7</chem>

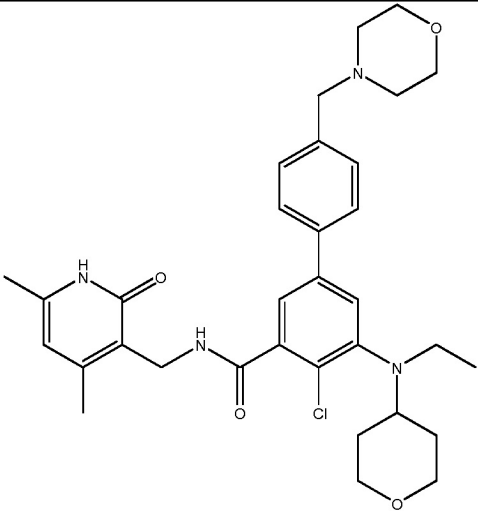
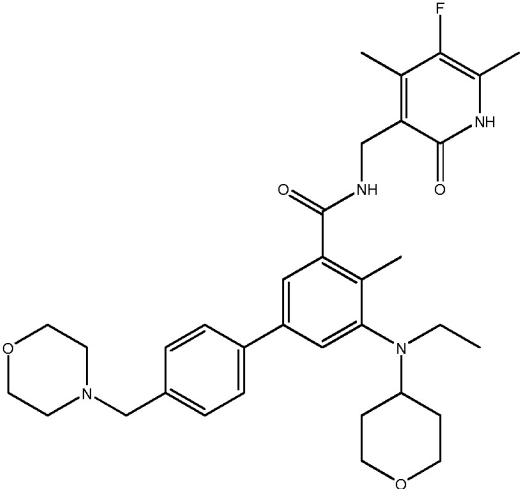
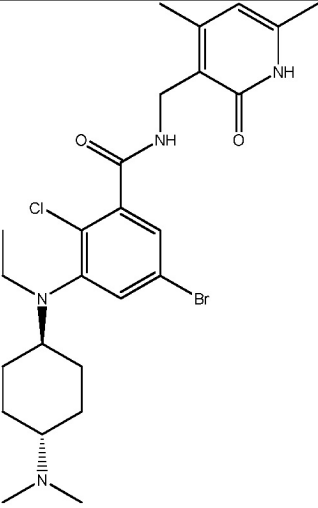
Соединение номер	Структура
26	
27	
28	

Соединение номер	Структура
29	
30	
31	

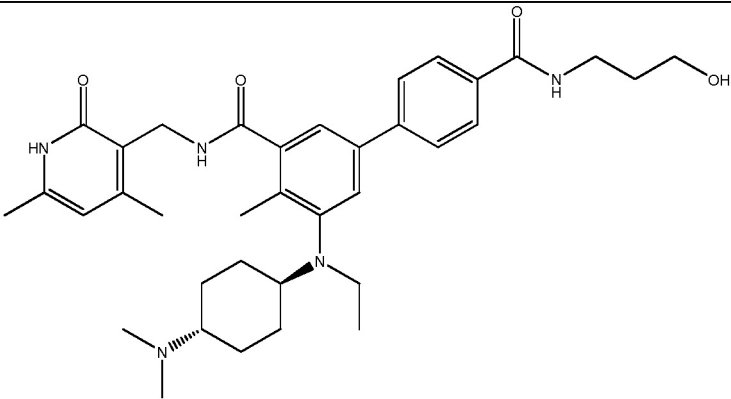
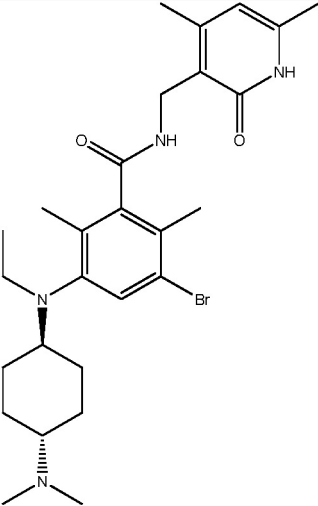
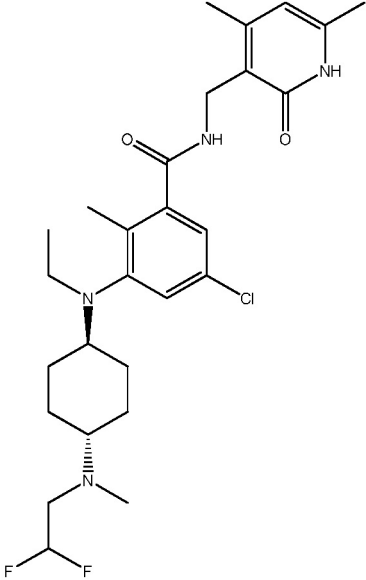
Соединение номер	Структура
32	
33	
34	

Соединение номер	Структура
35	
36	
37	

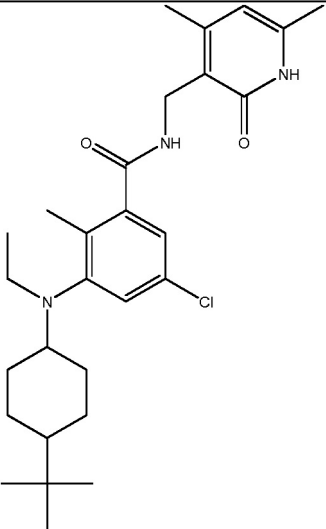
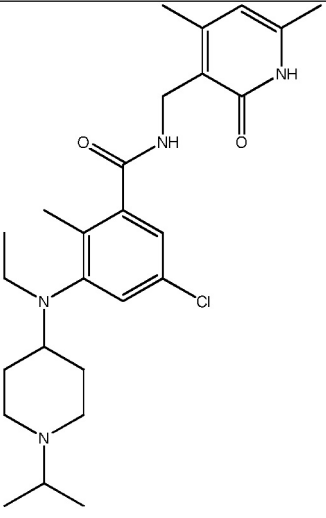
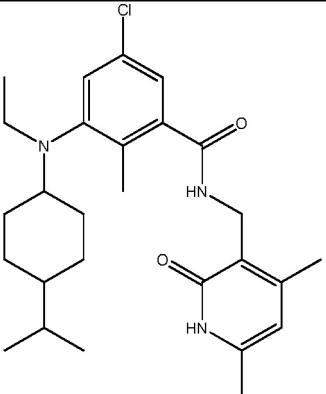
Соединение номер	Структура
38	
39	
40	

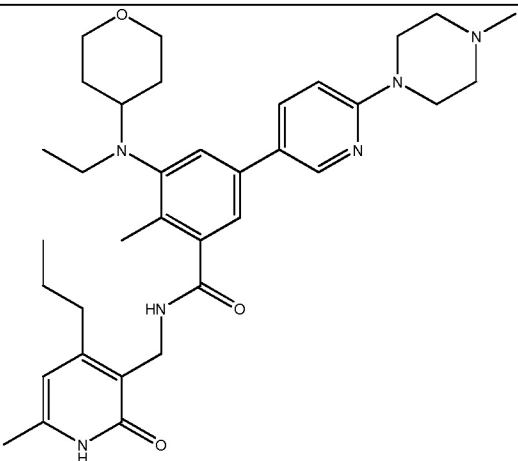
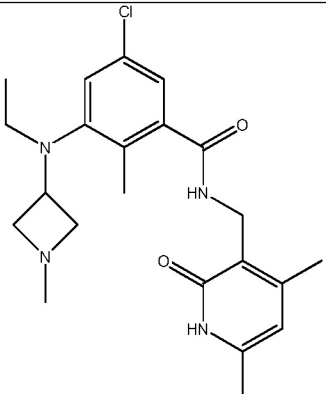
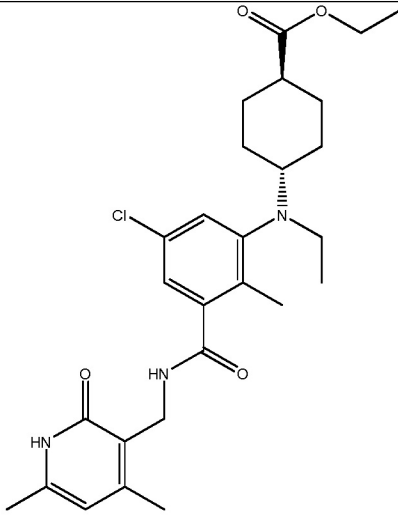
Соединение номер	Структура
41	
42	
43	

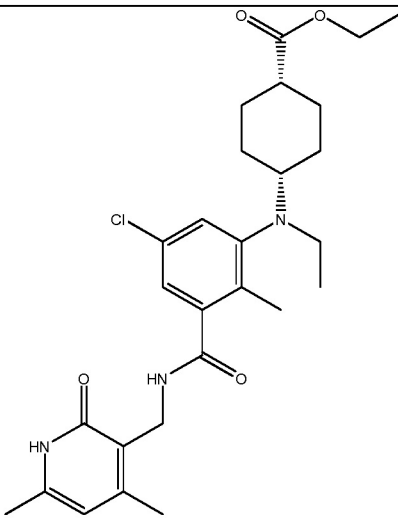
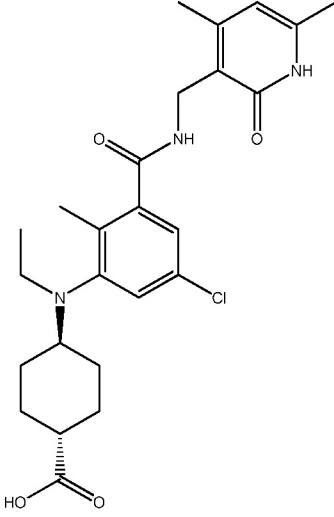
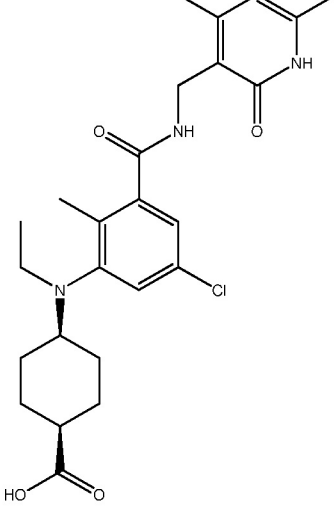


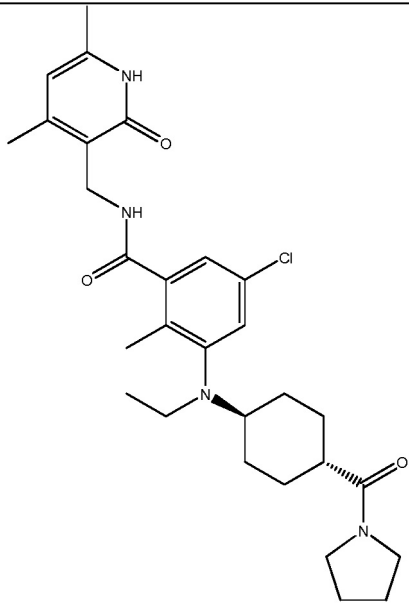
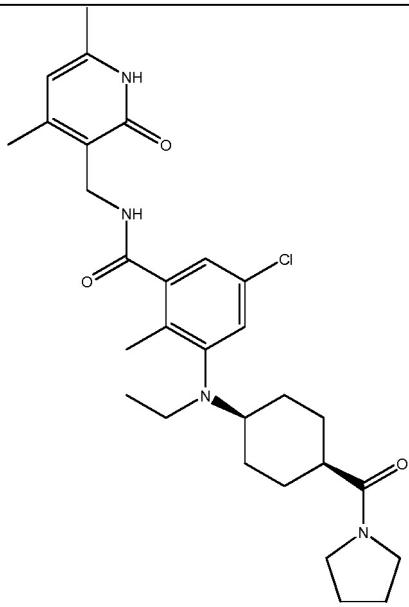
Соединение номер	Структура
44	
45	
46	

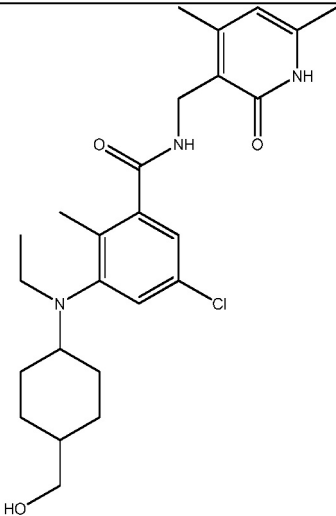
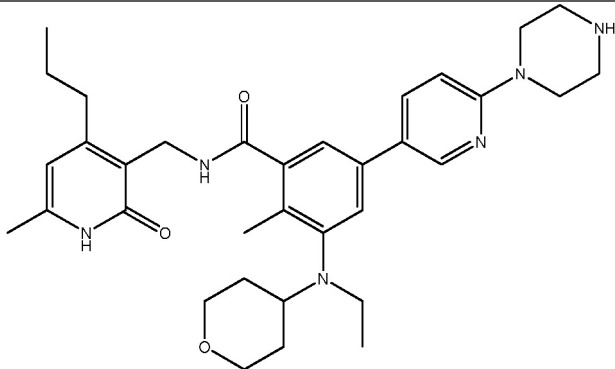
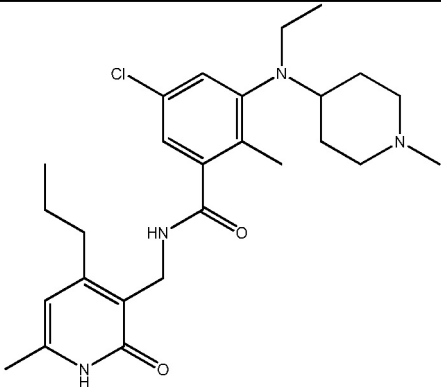
Соединение номер	Структура
47	 <chem>CC1=CC=C(C(=O)N1C)CCNC(=O)c2cc(Cl)cc(C)c2N(CC)C3CCCCC3C(N(C)C)CC4OCC4</chem>
48	 <chem>CC1=CC=C(C(=O)N1C)CCNC(=O)c2cc(Cl)cc(C)c2N(CC)C3CCCCC3C(N(C)C)CC4OCC4</chem>

Соединение номер	Структура
49	
50	
51	

Соединение номер	Структура
52	
53	
54	

Соединение номер	Структура
55	
56	
57	

Соединение номер	Структура
58	 <p>Chemical structure of compound 58: A 4-methyl-2-pyrimidinone ring is connected via a methylene group to an amide linkage (-NH-CO-). This amide is connected to a 3-chloro-4-methylphenyl ring. The phenyl ring is further substituted with an ethyl group and a cyclohexyl ring at the 1-position. The cyclohexyl ring is connected to a pyrrolidine-2-one ring via a carbonyl group, with the connection being a dashed bond indicating stereochemistry.</p>
59	 <p>Chemical structure of compound 59: A 4-methyl-2-pyrimidinone ring is connected via a methylene group to an amide linkage (-NH-CO-). This amide is connected to a 3-chloro-4-methylphenyl ring. The phenyl ring is further substituted with an ethyl group and a cyclohexyl ring at the 1-position. The cyclohexyl ring is connected to a pyrrolidine-2-one ring via a carbonyl group, with the connection being a solid wedge bond indicating stereochemistry.</p>

Соединение номер	Структура
60	
61	
62	

Пока нет других указаний, термин «замещенный» означает замещенный одной или несколькими определенными группами. В случае, где группы можно выбрать из ряда альтернативных групп, выбранные группы могут быть одинаковыми или различными.

Термин «независимо» значит, что когда из ряда возможных заместителей выбирают несколько заместителей, то эти заместители могут быть одинаковыми или различными.

«Эффективное количество» означает то количество лекарственного препарата или фармацевтического средства, которое вызовет биологический или медицинский ответ ткани, системы, животного или человека, искомый, например, исследователем или клиницистом. Кроме того, термин «терапевтически эффективное количество» означает любое количество, которое по сравнению с соответствующим индивидом, который не

получал такое количество, приводит к улучшенному лечению, заживлению, предотвращению или облегчению течения заболевания, расстройства или побочного эффекта, или к уменьшению скорости прогрессирования заболевания или расстройства. Термин также включает в пределы своего объема количества, эффективные для усиления

нормальной физиологической функции.  
Используемый здесь термин «алкил», «C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> или C<sub>6</sub> алкил» или «C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил» предназначен для включения C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> или C<sub>6</sub> прямоцепочечных (линейных) насыщенных алифатических углеводородных групп и C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> или C<sub>6</sub>

разветвленных насыщенных алифатических углеводородных групп. Например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил предназначен для включения C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> и C<sub>6</sub> алкильных групп.

Примеры алкила включают части, имеющие от одного до шести атомов углерода, такие как без ограничения метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, втор-пентил или н-гексил.

В определенных вариантах осуществления прямоцепочечный или разветвленный алкил имеет шесть или менее атомов углерода (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> для прямой цепи, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> для разветвленной цепи), а в другом варианте осуществления прямоцепочечный или разветвленный алкил имеет четыре или менее атомов углерода.

Используемый здесь термин «циклоалкил» относится к насыщенной или ненасыщенной неароматической углеводородной моно- или мультикольцевой (например, конденсированным, мостиковым или спиро кольцам) системе, имеющей от 3 до 30 атомов углерода (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>). Примеры циклоалкила включают без ограничения циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклопентенил, циклогексенил, циклогептенил и адамантил. Пока нет других определений, термин «гетероциклоалкил» относится к насыщенной или ненасыщенной, неароматической 3-8-членной моноциклической, 7-12-членной бициклической (конденсированные, мостиковые или спиро кольца) или 11-14-членной трициклической кольцевой системе (конденсированные, мостиковые или спиро кольца), имеющей один или несколько гетероатомов (таких как O, N, S или Se). Примеры гетероциклоалкильных групп включают без ограничения пиперидинил, пиперазинил, пирролидинил, диоксанил, тетрагидрофуранил, изоиндолинил, индолинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, тетрагидрофуранил, оксиранил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, пиранил, морфолинил, 1,4-диазепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептанил и тому подобные.

Термин «необязательно замещенный алкил» относится к незамещенному алкилу или алкилу, имеющему обозначенные заместители, заменяющие один или несколько атомов водорода, на одном или нескольких атомах углерода углеводородной основной цепи. Такие заместители могут включать, например, алкил, алкенил, алкинил, галоген, гидроксил, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, алкоксикарбонилокси, арилоксикарбонилокси, карбоксилат, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, фосфат, фосфонато, фосфинато, amino (включая алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (включая алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрил, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонато, сульфоамил, сульфонамидо, нитро, трифторметил, циано, азидо, гетероциклил, алкиларил или ароматическую или гетероароматическую составляющую.



«Арилалкильная» или «аралкильная» часть представляет собой алкил, замещенный арилом (например, фенилметил (бензил)). «Алкиларильная» часть представляет собой арил, замещенный алкилом (например, метилфенил).

Используемый здесь термин «алкильный линкер» предназначен для включения  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$  или  $C_6$  прямоцепочечных (линейных) насыщенных дивалентных алифатических углеводородных групп и  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$  или  $C_6$  разветвленных, насыщенных, алифатических углеводородных групп. Например,  $C_1$ - $C_6$  алкильный линкер предназначен для включения  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$  и  $C_6$  алкильных линкерных групп. Примеры алкильных линкеров включают части, имеющие от одного до шести атомов углерода, такие как без ограничения метил ( $-CH_2-$ ), этил ( $-CH_2CH_2-$ ), н-пропил ( $-CH_2CH_2CH_2-$ ), изопропил ( $-CH(CH_3)CH_2-$ ), н-бутил ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ), втор-бутил ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2-$ ), изобутил ( $-C(CH_3)_2CH_2-$ ), н-пентил ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ), втор-пентил ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2-$ ) или н-гексил ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ).

«Алкенил» включает ненасыщенные алифатические группы, аналогичные по длине и являющиеся возможным замещением описанных выше алкилов, но которые содержат, по меньшей мере, одну двойную связь. Например, термин «алкенил» включает прямоцепочечные алкенильные группы (например, этенил, пропенил, бутенил, пентенил, гексенил, гептенил, октенил, ноненил, деценил) и разветвленные алкенильные группы. В определенных вариантах осуществления прямоцепочечная или разветвленная алкенильная группа имеет шесть или менее атомов углерода в своей основной цепи (например,  $C_2$ - $C_6$  для прямой цепи,  $C_3$ - $C_6$  для разветвленной цепи). Термин « $C_2$ - $C_6$ » включает алкенильные группы, содержащие от двух до шести атомов углерода. Термин « $C_3$ - $C_6$ » включает алкенильные группы, содержащие от трех до шести атомов углерода.

Термин «необязательно замещенный алкенил» относится к незамещенному алкенилу или алкенилу, имеющему обозначенные заместители, заменяющие один или несколько атомов водорода на одном или нескольких атомах углерода углеводородной цепи. Такие заместители могут включать, например, алкил, алкенил, алкинил, галоген, гидроксил, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, карбоксилат, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, фосфат, фосфонат, фосфинат, амино (включая алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (включая алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрил, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонат, сульфоамид, сульфонамид, нитро, трифторметил, циано, гетероцикл, алкиларил или ароматическую или гетероароматическую часть.

«Алкинил» включает ненасыщенные алифатические группы аналогичные по длине и являющиеся возможным замещением описанных выше алкилов, но которые содержат, по меньшей мере, одну тройную связь. Например, «алкинил» включает прямоцепочечные алкинильные группы (например, этинил, пропирил, бутирил, пентинил, гексинил, гептинил, октинил, нонинил, децинил) и разветвленные алкинильные группы. В определенных вариантах осуществления прямоцепочечная или разветвленная алкинильная группа имеет шесть или менее атомов углерода в своей основной цепи (например,  $C_2$ - $C_6$  для прямоцепочечной,  $C_3$ - $C_6$  для разветвленной цепи). Термин « $C_2$ - $C_6$ » включает алкинильные группы, содержащие от двух до шести атомов углерода. Термин

«C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>» включает алкинильные группы, содержащие от трех до шести атомов углерода.

Термин «необязательно замещенный алкинил» относится к незамещенному алкинилу или алкинилу, имеющему обозначенные заместители, заменяющие один или несколько атомов водорода на одном или нескольких атомах углерода углеводородной основной цепи. Такие заместители могут включать, например, алкил, алкенил, алкинил, галоген, гидроксил, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, алкоксикарбонилокси, арилоксикарбонилокси, карбоксилат, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, фосфат, фосфонато, фосфинато, amino (включая алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (включая алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрил, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонато, сульфоамил, сульфонамидо, нитро, трифторметил, циано, азидо, гетероцикллил, алкиларил или ароматическую или гетероароматическую часть.

Другие необязательно замещенные части (такие как необязательно замещенный циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил) включают и незамещенные части, и части, имеющие один или несколько из обозначенных заместителей. Например, замещенный гетероциклоалкил включает те части, которые замещены одной или несколькими алкильными группами, такими как 2,2,6,6-тетраметил-пиперидинил и 2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,6-тетрагидропиридинил.

«Арил» включает группы с ароматичностью, включая «конъюгированные» или мультициклические системы, по меньшей мере, с одним ароматическим кольцом, и не содержат никакого гетероатома в кольцевой структуре. Примеры включают фенил, бензил, 1,2,3,4-тетрагидронафталенил и т.д.

«Гетероарильные» группы представляют собой арильные группы, как определено выше, за исключением наличия от одного до четырех гетероатомов в кольцевой структуре, и могут также именоваться «арильными гетероциклами» или «гетероароматическими» соединениями. Используемый здесь термин «гетероарил» предназначен для включения подходящего 5-, 6- или 7-членного моноциклического или 7-, 8-, 9-, 10-, 11- или 12-членного бициклического ароматического гетероциклического кольца, которое состоит из атомов углерода и одного или нескольких гетероатомов, например, 1 или 1-2 или 1-3 или 1-4 или 1-5 или 1-6 гетероатомов, или, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 гетероатомов, независимо выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы. Атом азота может быть замещенным или незамещенным (т.е., N или NR, где R обозначает H или другие заместители, в соответствии с определением). Гетероатомы азота и серы могут быть необязательно окисленными (т.е., N→O и S(O)<sub>p</sub>, где p=1 или 2). Следует отметить, что общее число атомов S и O в ароматическом гетероцикле составляет не более чем 1.

Примеры гетероарильной группы включают пиррол, фуран, тиофен, тиазол, изотиазол, имидазол, триазол, тетразол, пиазол, оксазол, изоксазол, пиридин, пиазин, пиридазин, пиримидин и тому подобные.

Кроме того, термины «арил» и «гетероарил» включают мультициклические арильные и гетероарильные группы, например, трициклические, бициклические, например, нафталин, бензоксазол, бензодиоксазол, бензотиазол, бензоимидазол, бензотиофен, метилendioксифенил, хинолин, изохинолин, нафтиридин, индол, бензофуран, пурин, бензофуран, деазапурин, индолизин.

В случае мультициклических ароматических колец, только одно из колец должно быть ароматическим (например, 2,3-дигидроиндол), хотя все кольца могут быть

ароматическими (например, хинолин). Второе кольцо может также быть конденсированным или мостиковым.

Циклоалкильное, гетероциклоалкильное, арильное или гетероарильное кольцо может быть замещенным в одном или нескольких положениях кольца (например, образующем  
 5 кольцо углерода или гетероатоме, таком как N) такими заместителями, как описано выше, например, алкилом, алкенилом, алкинилом, галогеном, гидроксилом, алкокси, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, алкоксикарбонилокси, арилоксикарбонилокси, карбоксилатом, алкилкарбониллом, алкиламинокарбониллом, аралкиламинокарбониллом, алкениламинокарбониллом, алкилкарбониллом, арилкарбониллом, аралкилкарбониллом,  
 10 алкенилкарбониллом, алкоксикарбониллом, аминакарбониллом, алкилтиокарбониллом, фосфатом, фосфонато, фосфинато, амино (включая алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (включая алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрилом, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилатом, сульфатами, алкилсульфинилом, сульфонато,  
 15 сульфоамидом, сульфонамидом, нитро, трифторметилом, циано, азидо, гетероциклилом, алкиларилом или ароматической или гетероароматической частью. Арильная и гетероарильная группы могут также быть конденсированными или соединенными мостиковой связью с алициклическими или гетероциклическими кольцами, которые не являются ароматическими, с тем, чтобы образовать мультициклическую систему  
 20 (например, тетралин, метилендиоксифенил).

Используемый здесь термин «карбоцикл» или «карбоциклическое кольцо» предназначен для включения любого устойчивого моноциклического, бициклического или трициклического кольца, имеющего определенное число атомов углерода, любое из которых может быть насыщенным, ненасыщенным или ароматическим. Карбоцикл  
 25 включает циклоалкил и арил. Например, а C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>карбоцикл предназначен для включения моноциклического, бициклического или трициклического кольца, имеющего 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 атомов углерода. Примеры карбоциклов включают без ограничения циклопропил, циклобутил, циклобутенил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил, циклогептенил, адамантил, циклооктил,  
 30 циклооктенил, циклооктадиенил, флуоренил, фенил, нафтил, инданил, адамантил и тетрагидронафтил. Мостиковые кольца также включены в определение карбоцикла, включая, например, [3.3.0]бициклооктан, [4.3.0]бициклононан, [4.4.0]бициклодекан и [2.2.2]бициклооктан. Мостиковое кольцо возникает, когда один или несколько атомов углерода связывают два не соседних атома углерода. В одном варианте осуществления  
 35 мостиковые кольца содержат один или два атома углерода. Следует отметить, что мостиковая связь всегда превращает моноциклическое кольцо в трициклическое кольцо. Когда кольцо является мостиковым, то заместители, приведенные для кольца, могут также присутствовать на мостиковой связи. Включены также конденсированные (например, нафтил, тетрагидронафтил) и спиро кольца.

Используемый здесь термин «гетероцикл» или «гетероциклическая группа» включает любую кольцевую структуру (насыщенную, ненасыщенную или ароматическую), которая содержит, по меньшей мере, один кольцевой гетероатом (например, N, O или S). Гетероцикл включает гетероциклоалкил и гетероарил. Примеры гетероциклов  
 40 включают без ограничения морфолин, пирролидин, тетрагидротиофен, пиперидин, пиперазин, оксетан, пиран, тетрагидропиран, азетидин и тетрагидрофуран.

Примеры гетероциклических групп включают без ограничения акридинил, азоцинил, бензимидазолил, бензофуранил, бензотиофуранил, бензотиофенил, бензоксазолил, бензоксазолинил, бензтиазолил, бензтриазолил, бензтетразолил, бензизоксазолил,

бензизотиазолил, бензимидазолинил, карбазолил, 4aH-карбазолил, карболинил, хроманил, хроменил, циннолинил, декагидрохинолинил, 2H,6H-1,5,2-дитиазинил, дигидрофуро[2,3-b]тетрагидрофуран, фуранил, фуразанил, имидазолидинил, имидазолинил, имидазолил, 1H-индазолил, индоленил, индолинил, индолизинил, индолил, 3H-индолил, изатиноил, изобензофуранил, изохроманил, изоиндазолил, изоиндолинил, изоиндолил, изохинолинил, изотиазолил, изоксазолил, метилендиоксифенил, морфолинил, нафтиридилил, октагидроизохинолинил, оксадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазол5(4H)-он, оксазолидинил, оксазолил, оксиндолил, пиримидинил, фенантридинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, феноксатинил, феноксазинил, фталазинил, пиперазинил, пиперидинил, пиперидонил, 4-пиперидонил, пиперонил, птеридинил, пуринил, пиранил, пиразинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиразолил, пирадизинил, пиридооксазол, пиридоимидазол, пиридоутиазол, пиридинил, пиридил, пиримидинил, пирролидинил, пирролинил, 2H-пирролил, пирролил, хиназолинил, хинолинил, 4H-хинолизинил, хиноксалинил, хинуклидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидроизохинолинил, тетрагидрохинолинил, тетразолил, 6H-1,2,5-тиадиазинил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, тиантренил, тиазолил, тиенил, тиенотиазолил, тиенооксазолил, тиеноимидазолил, тиофенил, триазилил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, 1,2,5-триазолил, 1,3,4-триазолил и ксантенил.

Используемый здесь термин «замещенный» означает, что любой один или несколько атомов водорода на обозначенном атоме заменен заместителем, выбранным из указанной группы, при условии, что не превышает обычная валентность обозначенного атома, и что замещение приводит к получению устойчивого соединения. Когда заместитель представляет собой оксо или кето (т.е., =O), то на атоме заменяются 2 атома водорода. Кето-заместители не присутствуют на ароматических частях. Используемые здесь кольцевые двойные связи представляют собой двойные связи, которые образуются между двумя соседними кольцевыми атомами (например, C=C, C=N или N=N). Термины «устойчивое соединение» и «устойчивая структура» предназначены для указания соединения, которое достаточно прочное для того, чтобы сохраниться после выделения до полезной степени чистоты из реакционной смеси и включения в состав эффективного терапевтического средства.

Когда связь с заместителем показана пересекающей связью, соединяющую два атома в кольце, то такой заместитель может быть связан с любым атомом в кольце. Когда заместитель включен в перечень без указания атома, посредством которого такой заместитель связан с остальным соединением данной формулы, то такой заместитель может быть связан посредством любого атома в такой формуле. Комбинации заместителей и/или переменных составляющих допустимы, но только, если такие комбинации приводят к получению устойчивых соединений.

Когда любая переменная составляющая (например, R<sub>1</sub>) появляется более одного раза в любом компоненте или структурной формуле соединения, ее определение в каждом случае не зависит от определения в каждом другом случае. Так, например, если показано, что группа замещена 0-2 составляющими R<sub>1</sub>, то группа может быть необязательно замещена составляющими R<sub>1</sub> в количестве до двух радикалов, и R<sub>1</sub> в каждом случае выбран независимо от определения R<sub>1</sub>. Также допустимы комбинации и/или переменные составляющие, но только, если такие комбинации приводят к получению устойчивых соединений.

Термин «гидрокси» или «гидроксил» включает группы с -ОН или -O<sup>-</sup>.

Используемый здесь термин «гало» или «галоген» относится к фтор-, хлор-, бром- и йод-. Термин «пергалогенированный» в целом относится к части, где все атомы водорода заменены атомами галогена. Термин «галогеналкил» или «галогеналкоксил» относится к алкилу или алкоксилу, замещенному одним или несколькими атомами галогена.

Термин «карбонил» включает соединения и части, которые содержат атом углерода, соединенный двойной связью с атомом кислорода. Примеры частей, содержащих карбонил, включают без ограничения альдегиды, кетоны, карбоновые кислоты, амиды, сложные эфиры, ангидриды и т.д.

Термин «карбоксил» относится к -COOH или его сложному C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкиловому эфиру.

«Ацил» включает части, которые содержат ацильный радикал (R-C(O)-) или карбонильную группу. «Замещенный ацил» включает ацильные группы, где один или несколько из атомов водорода заменены, например, алкильными группами, алкинильными группами, галогеном, гидроксильной группой, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, алкоксикарбонилокси, арилоксикарбонилокси, карбоксилатом, алкилкарбонилом, арилкарбонилом, алкоксикарбонилом, аминокарбонилом, алкиламинокарбонилом, диалкиламинокарбонилом, алкилтиокарбонилом, алкоксилем, фосфатом, фосфонатом, фосфинатом, аминок (включая алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (включая алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрилом, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилатом, сульфатами, алкилсульфинилом, сульфонатом, сульфоамидом, сульфонамидом, нитро, трифторметилом, циано, азидо, гетероциклом, алкиларилом или ароматической или гетероароматической частью.

«Ароил» включает части с арильной или гетероароматической составляющей, связанной с карбонильной группой. Примеры ароильной группы включают фенилкарбокси, нафтилкарбокси и т.д.

«Алкоксиалкил», «алкиламиноалкил» и «тиоалкоксиалкил» включают алкильные группы, как описано выше, где атомы кислорода, азота или серы заменяют один или несколько атомов углерода углеводородной основной цепи.

Термин «алкокси» или «алкоксил» включает замещенную и незамещенную алкильную, алкенильную и алкинильную группы, ковалентно связанные с атомом кислорода. Примеры алкокси групп или алкоксильных радикалов включают без ограничения метокси, этокси, изопропилокси, пропокси, бутокси и пентокси группы. Примеры замещенных алкокси групп включают галогенированные алкокси группы. Алкокси группы могут быть замещены такими группами, как алкенил, алкинил, галоген, гидроксил, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, алкоксикарбонилокси, арилоксикарбонилокси, карбоксилат, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, фосфат, фосфонат, фосфинат, аминок (включая алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (включая алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрил, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонат, сульфоамид, сульфонамид, нитро, трифторметил, циано, азидо, гетероцикл, алкиларил или ароматические или гетероароматические части. Примеры замещенных галогеном алкокси групп включают без ограничения фторметокси, дифторметокси, трифторметокси, хлорметокси, дихлорметокси и трихлорметокси.

Термин «простой эфир» или «алкокси» включает соединения или части, которые содержат кислород, связанный с двумя атомами углерода или гетероатомами. Например,

термин включает «алкоксиалкил», который относится к алкильной, алкенильной или алкинильной группе, ковалентно связанной с атомом кислорода, который ковалентно связан с алкильной группой.

Термин «сложный эфир» включает соединения или части, которые содержат атом углерода или гетероатом, связанный с атомом кислорода, который связан с углеродом карбонильной группы. Термин «сложный эфир» включает алкоксикарбокси группы, такие как метоксикарбонил, этоксикарбонил, пропоксикарбонил, бутоксикарбонил, пентоксикарбонил и т.д.

Термин «тиоалкил» включает соединения или части, которые содержат алкильную группу, соединенную с атомом серы. Тиоалкильные группы могут быть замещены такими группами, как алкил, алкенил, алкинил, галоген, гидроксил, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, алкоксикарбонилокси, арилоксикарбонилокси, карбоксилат, карбоновая кислота, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, аминоксид (включая алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (включая алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрил, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонато, сульфоамид, сульфонамидо, нитро, трифторметил, циано, азидо, гетероцикл, алкиларил или ароматическая или гетероароматическая части.

Термин «тиокарбонил» или «тиокарбокси» включает соединения и части, которые содержат атом углерода, соединенный двойной связью с атомом серы.

Термин «тиоэфир» включает части, которые содержат атом серы, связанный с двумя атомами углерода или гетероатомами. Примеры тиоэфиров включают без ограничения алктиоалкилы, алктиоалкенилы и алктиоалкинилы. Термин «алктиоалкилы» включает части с алкильной, алкенильной или алкинильной группой, связанной с атомом серы, который связан с алкильной группой. Аналогичным образом, термин «алктиоалкенилы» относится к части, где алкильная, алкенильная или алкинильная группа связана с атомом серы, который ковалентно связан с алкенильной группой; и термин «алктиоалкинилы» относится к части, где алкильная, алкенильная или алкинильная группа связана с атомом серы, который ковалентно связан с алкинильной группой.

Используемый здесь термин «амин» или «амино» относится к незамещенной или замещенной группе  $-NH_2$ . «Алкиламино» включает группы соединений, где азот  $-NH_2$  связан, по меньшей мере, с одной алкильной группой. Примеры алкиламино группы включают бензиламино, метиламино, этиламино, фенэтиламино и т.д. «Диалкиламино» включает группы, где азот  $-NH_2$  связан, по меньшей мере, с двумя дополнительными алкильными группами. Примеры диалкиламино группы включают без ограничения диметиламино и диэтиламино. «Ариламино» и «диариламино» включают группы, где азот связан, по меньшей мере, с одной или двумя арильными группами, соответственно. «Аминоарил» и «аминоарилокси» относятся к арилу и арилокси, замещенным аминоксидом. «Алкилариламино», «алкиламиноарил» или «ариламиноалкил» относится к аминоксидной группе, которая связана, по меньшей мере, с одной алкильной группой и, по меньшей мере, с одной арильной группой. «Алкаминоалкил» относится к алкильной, алкенильной или алкинильной группе, связанной с атомом азота, который также связан с алкильной группой. «Ациламино» включает группы, где азот связан с ацильной группой. Примеры ациламино включают без ограничения алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоильную и уреидо группы.

Термин «амид» или «аминокарбокси» включает соединения или части, которые содержат атом азота, который связан с углеродом карбонильной или тиокарбонильной

группы. Термин включает «алкаминокарбоксы» группы, которые включают алкильную, алкенильную или алкинильную группы, связанные с аминогруппой, которая связана с углеродом карбонильной или тиокарбонильной группы. Он также включает «ариламинокарбоксы» группы, которые включают арильную или гетероарильную части, связанные с аминогруппой, которая связана с углеродом карбонильной или тиокарбонильной группы. Термины «алкиламинокарбоксы», «алкениламинокарбоксы», «алкиниламинокарбоксы» и «ариламинокарбоксы» включают части, где алкильная, алкенильная, алкинильная и арильная части, соответственно, связаны с атомом азота, который в свою очередь связан с углеродом карбонильной группы. Амиды могут быть замещены такими заместителями как прямоцепочечный алкил, разветвленный алкил, циклоалкил, арил, гетероарил или гетероцикл. Заместители на амидных группах могут быть дополнительно замещены.

Термин «необязательно» означает, что описанное в последующем событие (события) может происходить или не происходить, и термин включает и событие (события), которые происходят, и события, которые не происходят.

В настоящем описании термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к солям, которые сохраняют желаемую биологическую активность обсуждаемого соединения и проявляют минимальные нежелательные токсические эффекты. Эти фармацевтически приемлемые соли могут быть получены *in situ* во время конечного выделения и очистки соединения или отдельного взаимодействия очищенного соединения в его форме свободной кислоты или свободного основания соответственно с подходящим основанием или кислотой.

Под используемым здесь термином «совместное введение» и его производными подразумевают или одновременное введение или любой способ отдельного последовательного введения одного или нескольких дополнительных фармацевтически активных соединений или для лечения рака, побочных эффектов рака или лечения рака, или некоторых других заболеваний. Предпочтительно, если введение не является одновременным, то соединения вводят через очень короткий промежуток времени друг от друга. Кроме того, не имеет значения, вводят ли соединения в одинаковой лекарственной форме, например, одно соединение можно вводить топически, а другое соединение можно вводить перорально.

Соединения формул (I)-(III) включают сами соединения, а также, если это возможно, их соли, их сольваты, их N-оксиды и их пролекарства. В определенных вариантах осуществления соединения в соответствии с формулами (I)-(III) могут содержать кислотную функциональную группу, достаточно кислотную для образования солей. Репрезентативные соли включают фармацевтически приемлемые соли металлов, таких как соли натрия, калия, лития, кальция, магния, алюминия и цинка; карбонаты и бикарбонаты фармацевтически приемлемых солей металлов, таких как натрий, калий, литий, кальций, магний, алюминий и цинк; фармацевтически приемлемые органические первичные, вторичные и третичные амины, включая алифатические амины, ароматические амины, алифатические диамины и гидроксикаламины, такие как метиламин, этиламин, 2-гидроксиэтиламин, диэтиламин, триэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтаноламин и циклогексиламин.

В определенных вариантах осуществления соединения в соответствии с формулами (I)-(III) могут содержать основную функциональную группу и поэтому способны образовывать фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли обработкой подходящей кислотой. Подходящие кислоты включают фармацевтически приемлемые неорганические кислоты и фармацевтически приемлемые органические кислоты.

Репрезентативные фармацевтически приемлемые кислотнo-аддитивные соли включают гидрохлорид, гидробромид, нитрат, метилнитрат, сульфат, бисульфат, сульфамат, фосфат, ацетат, гидроксиацетат, фенилацетат, пропионат, бутират, изобутират, валерат, малеат, гидроксималеат, акрилат, фумарат, малат, тартрат, цитрат, салицилат, п-аминосалицилат, гликолла́т, лактат, гептаноат, фталат, оксалат, сукцинат, бензоат, о-ацетоксибензоат, хлорбензоат, метилбензоат, динитробензоат, гидроксibenзоат, метоксибензоат, манделат, таннат, формиат, стеарат, аскорбат, пальмитат, олеат, пируват, памоат, малонат, лаурат, глутарат, глутамат, эстолат, метансульфонат (месилат), этансульфонат (эсилат), 2-гидроксиэтансульфонат, бензолсульфонат (бесилат), п-аминобензолсульфонат, п-толуолсульфонат (тосилат) и нафталин-2-сульфонат.

Соединения по настоящему изобретению, которые содержат атомы азота, могут быть превращены в N-оксиды обработкой окисляющим агентом (например, 3-хлорпероксибензойной кислотой (mCPBA) и/или пероксидами водорода) для получения других соединений по настоящему изобретению. Таким образом, считают, что когда это позволяет валентность и структура, все показанные и заявленные содержащие азот соединения включают и показанное соединение, и его N-оксидное производное (которое может быть обозначено как  $N \rightarrow O$  или  $N^+-O^-$ ). Кроме того, в других случаях азотные составляющие в соединениях по настоящему изобретению могут быть превращены в N-гидрокси или N-алкокси соединения. Например, N-гидрокси соединения могут быть получены окислением материнского амина окислением такого агента, как m-CPBA. Когда это позволяет валентность и структура, все показанные и заявленные содержащие азот соединения охватывают и показанное соединение, и его N-гидрокси (т.е., N-OH), и N-алкокси (т.е., N-OR, где R обозначает замещенный или незамещенный  $C_1$ - $C_6$ алкил,  $C_1$ - $C_6$ алкенил,  $C_1$ - $C_6$ алкинил, 3-14-членный карбоцикл или 3-14-членный гетероцикл) производные.

В настоящем описании в некоторых случаях для удобства структурная формула соединения представляет определенный изомер, но настоящее изобретение включает все изомеры, такие как геометрические изомеры, оптические изомеры на основе асимметричного углерода, стереоизомеры, таутомеры и тому подобные. Кроме того, полиморфизм кристалла может присутствовать для соединения, представленного структурной формулой. Следует отметить, что любая форма кристалла, смесь форм кристалла или его ангидрида или гидрата включена в объем настоящего изобретения. Кроме того, так называемый метаболит, который продуцируется разрушением настоящего соединения *in vivo*, включен в объем настоящего изобретения.

«Изомеризм» означает соединения, которые имеют идентичные молекулярные формулы, но отличаются последовательностью связи их атомов или расположением их атомов в пространстве. Изомеры, которые отличаются расположением их атомов в пространстве, именуется «стереоизомерами». Стереоизомеры, которые не являются зеркальными изображениями друг друга, именуется «диастереоизомерами», а стереоизомеры, которые являются не налагаемыми зеркальными изображениями друг друга, именуется «энантиомерами» или иногда оптическими изомерами. Смесь, содержащая равные количества отдельных энантиомерных форм противоположной хиральности, именуется «рацемической смесью».

Атом углерода, связанный с четырьмя не идентичными заместителями, именуется «хиральным центром».

«Хиральный изомер» означает соединение, по меньшей мере, с одним хиральным центром. Соединения с несколькими хиральными центрами может существовать или в



виде отдельного диастереомера, или в виде смеси диастереомеров, именуемых «диастереомерной смесью». Когда присутствует один хиральный центр, то стереоизомер может характеризоваться абсолютной конфигурацией (R или S) этого хирального центра. Абсолютная конфигурация относится к расположению в пространстве заместителей, присоединенных к хиральному центру. Рассматриваемые заместители, присоединенные к хиральному центру, ранжируют в соответствии с правилом последовательности Кана, Ингольда и Прелога (Cahn et al., Angew. Chem. Inter. Edit. 1966, 5, 385; errata 511; Cahn et al., Angew. Chem. 1966, 78, 413; Cahn and Ingold, J. Chem. Soc. 1951 (London), 612; Cahn et al., Experientia 1956, 12, 81; Cahn, J. Chem. Educ. 1964, 41, 116).

«Геометрический изомер» означает диастереомеры, которые обязаны своим существованием затрудненному вращению вокруг двойных связей или циклоалкильного линкера (например, 1,3-циклобутил). Эти конфигурации дифференцируются по их названиям префиксами цис и транс или Z и E, которые указывают на то, что группы находятся на той же или противоположной стороне двойной связи в молекуле в соответствии с правилами Кана-Ингольда-Прелога.

Следует понимать, что соединения по настоящему изобретению могут быть изображены в виде различных хиральных изомеров или геометрических изомеров. Следует также понимать, что когда соединения имеют хиральную изомерную или геометрическую изомерную формы, то все изомерные формы предназначены для включения в объем настоящего изобретения, и наименование соединений не исключает любые изомерные формы.

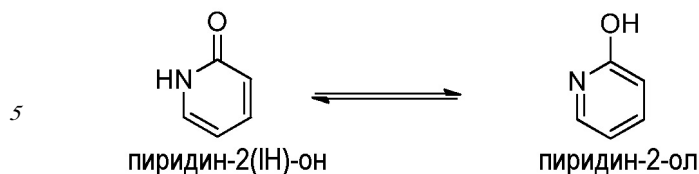
Кроме того, структуры и другие соединения, обсуждаемые в настоящем изобретении, включают все их атропические изомеры. «Атропические изомеры» представляют собой тип стереоизомеров, в которых атомы двух изомеров расположены различным образом в пространстве. Атропические изомеры обязаны своим существованием ограниченному вращению, вызванному затруднением вращения крупных групп вокруг центральной связи. Такие атропические изомеры обычно существуют в виде смеси, однако в результате последних достижений в хроматографических технологиях, в определенных случаях было возможно разделение двух атропических изомеров.

«Таутомер» представляет собой один из двух или более структурных изомеров, которые существуют в равновесии, и легко превращается из одной изомерной формы в другую. Это превращение приводит к формальной миграции атома водорода, сопровождаемой включением соседних конъюгированных двойных связей. Таутомеры существуют в виде смеси таутомерного набора в растворе. В растворах, где возможна таутомеризация, будет достигнуто равновесие таутомеров. Точное соотношение таутомеров зависит от нескольких факторов, включая температуру, растворитель и pH. Концепция таутомеров, которые являются взаимопревращающимися таутомеризациями, называется таутомерией.

Из различных возможных типов таутомерии обычно наблюдаются два. При кето-енольной таутомерии происходит одновременный сдвиг электронов и атома водорода. Кольце-цепная таутомерия возникает в результате взаимодействия альдегидной группы (-CHO) в молекулы сахарной цепи с одной из гидроксигрупп (-OH) в той же молекуле для придания ей циклической (кольцевидной) формы, как проявляется глюкозой.

Обычными таутомерными парами являются: таутомерия пар кетон-енол, амид-нитрил, лактам-лактим, амид-имидовая кислота в гетероциклических кольцах (например, в нуклеосидных основаниях, таких как гуанин, тимин и цитозин), имин-енамин и енамин-енамин. Пример кето-енольного равновесия находится между пиридин-2(1H)-онами и

соответствующими пиридин-2-олами, как показано ниже.



Следует понимать, что соединения по настоящему изобретению могут быть изображены в виде различных таутомеров. Следует понимать, что когда соединения имеют таутомерные формы, то все таутомерные формы, включая их смеси, предназначены для включения в объем настоящего изобретения, и наименование соединений не исключает любую таутомерную форму.

Соединения формул (I)-(III) можно получить в кристаллической или не кристаллической форме, и если в кристаллической, то они могут необязательно быть сольватированными, например, в виде гидрата. Настоящее изобретение включает в пределы своего объема стехиометрические сольваты (например, гидраты), а также соединения, содержащие переменные количества растворителя (например, воды).

Определенные из описанных здесь соединений могут содержать один или несколько хиральных атомов или могут иначе быть способны к существованию в виде двух энантиомеров. Заявленные ниже соединения включают смеси энантиомеров, а также очищенные энантиомеры или энантиомерно обогащенные смеси. В объем изобретения также включены отдельные изомеры соединений, представленных формулами (I)-(III), или заявленных ниже, а также полностью или частично уравновешенные их смеси. Настоящее изобретение также охватывает отдельные изомеры заявленных соединений в виде смесей с их изомерами, в которых один или несколько хиральных центров являются инвертированными.

Когда имеются различные изомерные формы, то их можно разделить или отделить одну форму от другой обычными способами, или любой данный изомер можно получить обычными синтетическими способами или методами стереоспецифического или асимметричного синтеза.

Хотя возможно, что для применения в лечении соединение формул (I)-(III), а также соли, сольваты, N-оксиды и тому подобные можно вводить в виде чистого препарата, т.е. без дополнительного носителя, обычный активный ингредиент представлен в виде препарата, включающего носитель или разбавитель. Соответственно, изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, которые включают соединение формул (I)-(III) и соли, сольваты и тому подобные и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. Соединения формул (I)-(III) и соли, сольваты, N-оксиды и тому подобные представляют собой, как описано выше. Носитель (носители), разбавитель или эксципиент(ы) должны быть приемлемы в смысле совместимости с другими ингредиентами препаративной формы и безвредности для ее реципиента. В соответствии с другим аспектом, изобретение также относится к способу получения препарата или фармацевтической препаративной формы, включающему смешивание соединения формул (I)-(III) или солей, сольватов, N-оксидов и тому подобных и т.д. с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами.

Специалистам в данной области понятно, что определенные защищенные производные соединений формул (I)-(III), которые можно получить перед конечной стадией снятия защиты, как таковые могут не обладать фармакологической

активностью, но в некоторых случаях они могут вводиться перорально или парентерально и затем метаболизироваться в организме для образования соединений по изобретению, которые являются фармакологически активными. Поэтому такие производные можно описать как «пролекарства». Кроме того, определенные соединения по изобретению могут действовать в качестве пролекарств других соединений по изобретению. Все защищенные производные и пролекарства соединений по изобретению включены в объем изобретения. Далее, специалистам в данной области понятно, что определенные части, известные специалистам в данной области как «про-части», могут быть помещены на соответствующие функциональные группы, когда такие функциональные группы присутствуют внутри соединений по изобретению. Предпочтительные пролекарства для соединений по изобретению включают сложные эфиры, эфиркарбонаты, гемиефиры, эфирфосфаты, нитроэфиры, эфирсульфаты, сульфоксиды, амиды, карбаматы, азосоединения, фосфамиды, гликозиды, простые эфиры, ацетали и кетали.

Кроме того, соединения по настоящему изобретению, например, соли соединений могут существовать в их гидратированной или негидратированной (безводной) форме или в виде сольватов с молекулами других растворителей. Неограничивающие примеры гидратов включают моногидраты, дигидраты и т.д. Неограничивающие примеры сольватов включают сольваты этанола, сольваты ацетона и т.д.

«Сольват» означает формы присоединения растворителя, которые содержат или стехиометрические, или не стехиометрические количества растворителя. Некоторые соединения имеют тенденцию захватывать фиксированное молярное отношение молекул растворителя в кристаллическом твердом состоянии, образуя так сольват. Если растворитель представляет собой воду, то образованный сольват представляет собой гидрат; а если растворитель представляет собой спирт, то образованный сольват представляет собой алкоголь. Гидраты образуются комбинацией одной или нескольких молекул воды с одной молекулой вещества, в которых вода сохраняет свое молекулярное состояние как  $H_2O$ .

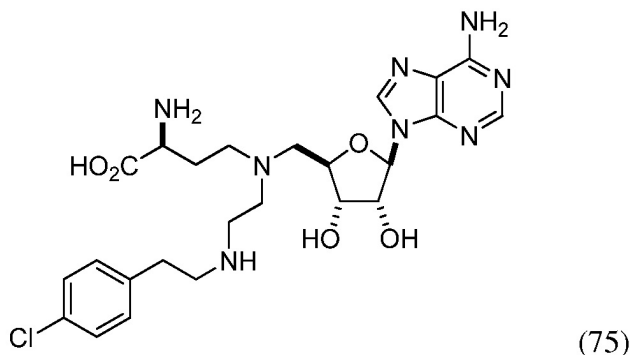
Используемый здесь термин «аналог» относится к химическому соединению, которое структурно сходно с другим, но немного отличается по композиции (как при замещении одного атома атомом другого элемента или в присутствии конкретной функциональной группы или замещении функциональной группы другой функциональной группой). Таким образом, аналог представляет собой соединение, которое сходно или сравнимо по функции и внешнему виду, но не по структуре или происхождению с эталонным соединением.

Как определено здесь, термин «производное» относится к соединениям, которые имеют общую структуру ядра и замещены различными группами, как описано здесь. Например, все из соединений, представленных формулой (I), являются замещенными арилом или гетероарилом бензольными соединениями и имеют формулу (I) в качестве общего ядра.

Термин «биоизостер» относится к соединению, полученному в результате обмена атома или группы атомов на другой, сходный в широком смысле, атом или группу атомов. Целью биоизостерического замещения является создание нового соединения с биологическими свойствами, сходными с материнским соединением. Биоизостерическое замещение может быть физико-химически или топологически обоснованным. Примеры биоизостеров карбоновой кислоты включают без ограничения ацилсульфонимиды, тетразолы, сульфонаты и фосфонаты. См., например, публикацию Patani and LaVoie, Chem. Rev. 96, 3147-3176, 1996.

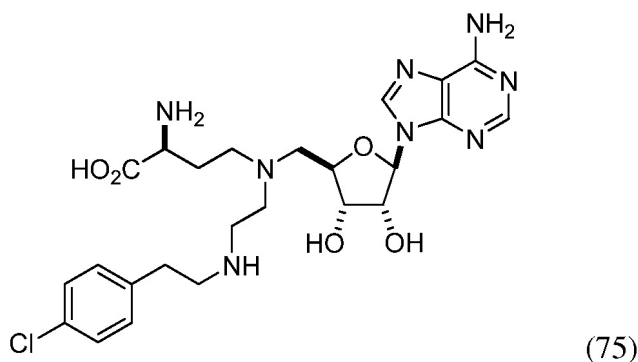
Настоящее изобретение также предназначено для включения всех изотопов атомов, встречающихся у настоящих соединений. Изотопы включают те атомы, которые имеют одинаковый атомный номер, но разные массовые числа. В качестве общего примера и без ограничения изотопы водорода включают тритий и дейтерий, а изотопы углерода

Такие соединения также включают соединение 75



и его фармацевтически приемлемые соли.

Изобретение дополнительно включает фармацевтическую композицию, содержащую соединение 75



и его фармацевтически приемлемые соли.

Антагонист EZH2 и необязательно другие терапевтические средства можно вводить перорально (в чистом виде) или в форме фармацевтически приемлемой соли. При использовании в лекарственном препарате соли должны быть фармацевтически приемлемыми, но фармацевтически неприемлемые соли могут подходящим образом использоваться для получения их фармацевтически приемлемых солей.

Соединения, полезные в соответствии с изобретением, могут быть представлены в виде солей с фармацевтически совместимыми противоионами (т.е., фармацевтически приемлемых солей). «Фармацевтически приемлемая соль» означает любую нетоксичную соль, которая после введения реципиенту способна обеспечить, или непосредственно, или опосредованно, соединение или пролекарство соединения, полезного в соответствии с настоящим изобретением. «Фармацевтически приемлемый противоион» представляет собой ионную часть соли, которая является нетоксичной при высвобождении из соли после введения индивиду. Фармацевтически приемлемые соли могут быть образованы со многими кислотами, включая без ограничения хлористоводородную, серную, уксусную, молочную, винную, яблочную и янтарную кислоты. Соли имеют тенденцию быть более растворимыми в воде или других протонных растворителях, чем их соответствующие формы свободного основания. Настоящее изобретение включает применение таких солей.

Фармацевтически приемлемые кислотнo-аддитивные соли включают те, которые образованы с минеральными кислотами, такими как хлористоводородная кислота и бромистоводородная кислота, а также те, которые образованы с органическими кислотами, такими как малеиновая кислота. Например, кислоты, обычно используемые для образования фармацевтически приемлемых солей, включают неорганические кислоты, такие как хлористоводородная, бромистоводородная, йодистоводородная, серная и фосфорная кислота, а также органические кислоты, такие как пара-толуолсульфоновая, салициловая, винная, бивинная, аскорбиновая, малеиновая, безиловая, фумаровая, глюконовая, глюкуроновая, муравьиная, глутаминовая, метансульфоновая, этансульфоновая, бензолсульфоновая, молочная, щавелевая, пара-бромфенилсульфоновая, карбоновая, янтарная, лимонная, бензойная и уксусная кислота, и родственные неорганические и органические кислоты. Такие фармацевтически приемлемые соли включают сульфат, пиросульфат, бисульфат, сульфит, бисульфит, фосфат, моногидрофосфат, дигидрофосфат, метафосфат, пирофосфат, хлорид, бромид, йодид, ацетат, пропионат, деканоат, каприлат, акрилат, формиат, изобутират, капрат, гептаноат, пропионат, оксалат, малонат, сукцинат, суберат, себакат, фумарат, малеат, бутин-1,4-диоат, гексин-1,6-диоат, бензоат, хлорбензоат, метилбензоат, динитробензоат, гидроксibenзоат, метоксибензоат, фталат, терефталат, сульфонат, ксиленсульфонат, фенилацетат, фенилпропионат, фенилбутират, цитрат, лактат,  $\beta$ -гидроксibuтират, гликолат, малеат, тартрат, метансульфонат, пропансульфонат, нафталин-1-сульфонат, нафталин-2-сульфонат, манделат и тому подобные.

Подходящие основания для образования фармацевтически приемлемых солей с кислотными функциональными группами включают без ограничения гидроксиды щелочных металлов, таких как натрий, калий и литий; гидроксиды щелочноземельных металлов, таких как кальций и магний; гидроксиды других металлов, таких как алюминий и цинк; аммиак и органические амины, такие как незамещенные или гидроксизамещенные моно-, ди- или триалкиламины; дициклогексиламин; трибутиламин; пиридин; N-метил-N-этиламин; диэтиламин; триэтиламин; моно-, бис- или трис-(2-гидрокси-низшие алкиламины), такие как моно-, бис- или трис-(2-гидроксиэтил)амин, 2-гидрокси-трет-бутиламин или трис-(гидроксиметил)метиламин, N,N-диалкил-N-(гидроксиалкил)амины, такие как N,N-диметил-N-(2-гидроксиэтил)амин или три-(2-гидроксиэтил)амин; N-метил-D-глюкамин; и аминокислоты, такие как аргинин, лизин и тому подобные.

Определенные соединения, полезные в соответствии с изобретением, и их соли могут существовать в нескольких кристаллических формах (т.е., полиморфах); настоящее изобретение включает применение каждой из кристаллических форм и их смесей.

Определенные соединения, полезные в соответствии с изобретением, могут содержать один или несколько хиральных центров и существовать в различных оптически активных формах. Когда соединения, полезные в соответствии с изобретением, содержат один хиральный центр, то соединения существуют в двух энантиомерных формах, и настоящее изобретение включает применение обоих энантиомеров и смесей энантиомеров, таких как рацемические смеси. Энантиомеры можно разделить способами, известными специалистам в данной области; например, энантиомеры можно разделить образованием диастереоизомерных солей, которые можно разделить, например, кристаллизацией; образованием диастереоизомерных производных или комплексов, которые могут быть разделены, например, кристаллизацией, газовой-жидкостной хроматографией; селективным взаимодействием энантиомера со специфическим для энантиомера реагентом, например, посредством ферментативной эстерификации; или газовой-

жидкостной хроматографии в хиральной среде, например, на хиральной подложке (например, диоксиде кремния со связанным хиральным лигандом) или в присутствии хирального растворителя. Когда желаемый энантиомер превращается в другое химическое соединение одной из описанных выше процедур разделения, можно использовать дополнительную стадию для освобождения желаемого очищенного энантиомера. Альтернативно, определенные энантиомеры можно синтезировать асимметричным синтезом с использованием оптически активных реагентов, субстратов, катализаторов или растворителей или превращением одного энантиомера в другой асимметричной трансформацией.

Когда соединение, полезное в соответствии с изобретением, содержит несколько хиральных центров, то оно может существовать в диастереоизомерных формах. Диастереоизомерные соединения можно разделить способами, известными специалистам в данной области, (например, хроматографией или кристаллизацией), и отдельные энантиомеры можно разделить, как описано выше. Настоящее изобретение включает применение различных диастереоизомеров соединений, полезных в соответствии с изобретением, и их смесей. Соединения, полезные в соответствии с изобретением, могут существовать в различных таутомерных формах или в виде различных геометрических изомеров, и настоящее изобретение включает применение каждого таутомера и/или геометрического изомера соединения, полезного в соответствии с изобретением, и их смесей. Соединения, полезные в соответствии с изобретением, могут существовать в цвиттерионной форме. Настоящее изобретение включает применение каждой цвиттерионной формы соединений, полезных в соответствии с изобретением, и их смесей.

## НАБОРЫ

При желании, антагонист EZH2 может быть представлен в наборе (например, упаковке или раздаточном устройстве), который может содержать одну или несколько стандартных лекарственных форм, содержащих антагонист EZH2. Упаковка может, например, состоять из металлической или пластиковой фольги, такая как блистерная упаковка. Упаковка или раздаточное устройство могут включать сопровождающие инструкции по введению. Композиции, содержащие антагонист EZH2 по изобретению, включенный в состав препаративной формы в совместимом фармацевтическом носителе, могут быть также получены, помещены в соответствующий контейнер и маркированы, как предназначенные для лечения указанного состояния. Могут быть также обеспечены инструкции по применению.

Изобретение также относится к наборам, содержащим множество реагентов выявления метилирования, которые выявляют метилированный H3-K27. Например, набор включает реагенты выявления метилированного H3-K27, диметилированного H3-K27 и триметилированного H3-K27. Реагент выявления представляет собой, например, антитела или их фрагменты, полипептид или аптамеры.

Набор может также включать реагент выявления мутантной EZH2, например, нуклеиновые кислоты, которые специфически идентифицируют последовательность нуклеиновой кислоты мутантной EZH2 по наличию гомологичных последовательностей нуклеиновых кислот, таких как олигонуклеотидные последовательности, комплементарные части последовательности нуклеиновой кислоты мутантной EZH2, или антитела к белкам, кодируемым нуклеиновыми кислотами мутантной EZH2, упакованные вместе в форме набора. Олигонуклеотиды могут представлять собой фрагменты гена EZH2. Например, олигонуклеотиды могут иметь длину 200, 150, 100, 50, 25, 10 или менее нуклеотидов. Набор может содержать в отдельных контейнерах аптамер или антитело, контрольные препаративные формы (положительные и/или

отрицательные) и/или выявляемую метку, такую как, наряду с другими, флуоресцеин, зеленый флуоресцентный белок, родамин, цианиновые красители, красители Alexa, люцифераза, радиоактивные метки. В набор могут быть включены инструкции (например, письменные, печатные, VCR (на видео-регистрирующих устройствах), CD-ROM (ПЗУ на компакт-диске) и т.д.) по проведению анализа. Анализ может, например, быть в форме вестерн-блот анализа, иммуногистохимического (ИНС) анализа, анализа иммунофлуоресценции (IF), секвенирования и масс-спектрометрии (MS), как известно в данной области.

### ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для удобства, здесь собраны определенные термины, используемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Все определения, охарактеризованные и используемые здесь, отменяют и заменяют словарные определения, определения в документах, включенных путем ссылки, и/или обычные значения определенных терминов.

Неопределенные артикли, обозначающие «некий» и «некие», используются во всем тексте для обозначения одного или более чем одного (т.е., по меньшей мере, одного) грамматического объекта артикля. В качестве примера, «некий элемент» означает один элемент или более чем один элемент.

Используемую в описании и в формуле изобретения фразу «и/или» следует понимать как обозначающую «любой из двух или оба вместе» из сочетающихся таким образом элементов, т.е. элементы, которые в некоторых случаях присутствуют совместно, а в других случаях присутствуют отдельно. Множественные элементы, перечисленные с использованием условия «и/или», следует рассматривать в таком же ключе, т.е. «один или несколько» сочетающихся таким образом элементов. Необязательно, могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно идентифицированных условием «и/или», или связанные, или не связанные с конкретно идентифицированными элементами. Так, в качестве неограничивающего примера, ссылка на «А и/или В» при использовании в сочетании с допускающей изменения формулировкой, такой как «содержащий», может в одном варианте осуществления относиться только к А (необязательно, включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления – только к В (необязательно, включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления – и к А, и к В (необязательно, включая другие элементы), и т.д.

Используемый в описании и в формуле изобретения союз «или» следует понимать как имеющий такое же значение, как определенное выше значение союза «и/или». Например, при разделении пунктов в перечне с использованием союзов «или» или «и/или», их следует трактовать как являющихся включающими, т.е. определяющими включение, по меньшей мере, одного, но также включая более чем один из ряда или перечня элементов, и, необязательно, дополнительные не перечисленные элементы. Только термины, ясно указывающие на противоположное, такие как «только один из» или «точно один из», или при использовании в формуле изобретения термин «состоящий из» должны относиться к включению точно одного элемента из ряда или перечня элементов. В целом, используемый здесь термин «или» должен трактоваться только как указывающий исключительные альтернативы (т.е. «один или другой, но не оба»), когда ему предшествуют термины исключительности, такие как «любой», «один из», «только один из» или «точно один из». Фраза «состоящий по существу из» при использовании в формуле изобретения должна иметь ее обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемую в настоящем описании и в формуле изобретения фразу «по меньшей мере, один» при ссылке на перечень из одного или нескольких элементов следует понимать как означающую, по меньшей мере, один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но необязательно, включая, по меньшей мере, один из каждого и любого элемента, конкретно включенного в перечень элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что необязательно могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно идентифицированных в пределах перечня элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере, один», или связанных, или не связанных с теми элементами, которые конкретно идентифицированы. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, фраза «по меньшей мере, один из А и В» (или, эквивалентно, «по меньшей мере, один из А или В», или, эквивалентно, «по меньшей мере, один из А и/или В») может относиться, в одном варианте осуществления, по меньшей мере, к одному А, необязательно, включая более чем один А, без присутствия В (и, необязательно, включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления, по меньшей мере, к одному В, необязательно, включая более чем один В, без присутствия А (и, необязательно, включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления, по меньшей мере, к одному А, необязательно, включая более чем один А, и, по меньшей мере, к одному В, необязательно, включая более чем один В (и, необязательно, включая другие элементы) и т.д.

Следует также понимать, что, пока ясно не указано на противоположное, в любых заявленных здесь способах, которые включают более чем одну стадию или действие, порядок стадий или действий способа необязательно ограничивается порядком, в котором приведены стадии или действия способа.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как «содержащие», «включающие», «несущие», «имеющие», «состоящие из», «вовлекающие», «удерживающие», «составленные из» и тому подобные следует понимать как являющиеся неограничивающими, т.е. предназначенные для обозначения включающих без ограничения. Только переходные фразы «состоящие из» и «состоящие по существу из» должны быть закрытыми или полужакрытыми переходными фразами, соответственно, как изложено в разделе 2111.03 Руководства Патентного ведомства США по процедурам патентной экспертизы.

Термины «совместное введение» и «сочетанное введение» относятся и к одновременному введению (введению двух или более терапевтических средств в одно и то же время) и введению в различное время (введению одного или нескольких терапевтических средств во время, отличное от времени введения дополнительного терапевтического средства или средств), пока терапевтические средства присутствуют в организме пациента в некоторой степени в одно и то же время.

Термин «предраковое состояние» или «предзлокачественное состояние» относится к заболеванию, синдрому или данным обследования, которые в случае отсутствия лечения могут привести к раку. Это генерализованное состояние, связанное со значительно повышенным риском рака.

Используемый здесь термин «лечение» относится к облегчению, по меньшей мере, одного симптома заболевания, расстройства или состояния. Этот термин охватывает введение и/или применение у индивида одного или нескольких описанных здесь соединений с целью проведения лечения или в качестве лекарственного средства по поводу состояния. «Лечение» с точки зрения настоящего описания может, но не должно, обеспечить излечение; скорее, «лечение» может проводиться в форме тактики ведения



пациента, страдающего состоянием. Когда описанные здесь соединения применяют для лечения с целью подавления нежелательных пролиферирующих клеток, включая различные формы рака, «лечение» включает частичное или полное разрушение нежелательных пролиферирующих клеток с минимальными деструктивными воздействиями на нормальные клетки. Желательным механизмом лечения с целью подавления нежелательных быстро пролиферирующих клеток, включая раковые клетки, на клеточном уровне является апоптоз.

Используемый здесь термин «предотвращение» в совокупности включает или предотвращение, или замедление начала клинически очевидного прогрессирования заболевания, или предотвращение или замедление начала преклинически очевидной стадии заболевания у индивидов с риском его развития. Это включает профилактическое лечение индивидов с риском развития заболевания.

Используемый здесь термин «индивид» с точки зрения лечения включает любого человека, у которого был диагностирован рак или предраковое состояние, имеются их симптомы или риск развития рака или предракового состояния. Для способов предотвращения индивид представляет собой любого человека. Для иллюстрации, с точки зрения предотвращения, индивидом может быть человек, у которого имеется риск, или который генетически предрасположен к развитию расстройства, характеризованного нежелательной, быстрой клеточной пролиферацией, такого как рак. У индивида может быть риск вследствие воздействия канцерогенных агентов, ввиду его генетической предрасположенности к расстройствам, характеризованным нежелательной, быстрой клеточной пролиферацией, и т.д.

За исключением наличия иных указаний, для получения рекомбинантных и синтетических полипептидов, слитых белков, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, манипуляции последовательностями нуклеиновой кислоты, продукции трансформированных клеток и тому подобного можно использовать стандартные способы. Такие технологии известны специалистам в данной области. См., например, руководства Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor, N.Y., 2001); F. M. Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York).

Термин «полипептид EZH2» охватывает функциональные фрагменты полипептидов полной длины и функциональные эквиваленты любого из указанных выше фрагментов, которые имеют по существу сходные или по существу идентичные аминокислотные последовательности (сходство или идентичность аминокислотных последовательностей, по меньшей мере, примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или более), где функциональный фрагмент или функциональный эквивалент сохраняет одно или несколько из функциональных свойств нативного полипептида.

Под термином «функциональный» подразумевается, что полипептид (или нуклеиновая кислота) имеет такую же или по существу сходную активность в отношении одного или нескольких биологических свойств нативного полипептида (или нуклеиновой кислоты), например, по меньшей мере, примерно 50%, 75%, 85%, 90%, 95% или 98% или более активности нативного полипептида (или нуклеиновой кислоты).

Термин «модулировать» (и его грамматические эквиваленты) относится к повышению или снижению активности. В конкретных вариантах осуществления термин «увеличивать» или «усиливать» (и его грамматические эквиваленты) означает подъем, по меньшей мере, примерно на 25%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 15 раз, 20 раз или более. В конкретных вариантах осуществления термины «уменьшать» или «снижать» (и его грамматические эквиваленты) означают уменьшение, по меньшей

мере, примерно на 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или более. В некоторых вариантах осуществления указанная активность, вещество или другой параметр не поддаются выявлению. Изобретение, в частности, относится к антагонистам EZH2.

5 Термин «фармакодинамический маркер» относится к молекулярному маркеру ответа на лечение лекарственным средством, который можно измерить у пациентов, получающим лекарственное средство. Маркер должен представлять собой прямой показатель модулирования мишени лекарственного средства и быть способен показать количественные изменения в ответ на введение его дозы. Потенциальным  
10 фармакодинамическим маркером для антагонистов EZH2 могут быть уровни метилирования H3-K27 гистонов в пораженной или заместительной ткани.

Используемый в настоящем описании термин «способность отвечать на лечение» является взаимозаменяемым с терминами «отвечающий на лечение», «чувствительный» и «чувствительность», и это означает, что индивид проявляет ответ на лечение при  
15 введении ингибитора EZH, например, опухолевые клетки или опухолевые ткани индивида подвергаются апоптозу и/или некрозу, и/или проявляют сниженный рост, деление или пролиферацию.

Термин «контроль» или «эталон» относится к уровням метилирования (например, к уровню монометилирования, уровню диметилирования или уровню  
20 триметилирования), выявляемым в прилегающей неопухолевой ткани, выделенной у индивида, выявляемым в здоровой ткани у здорового индивида или установленным патологоанатомом с помощью стандартных способов, принятых в данной области.

Под термином «образец» подразумевают любой биологический образец, полученный у индивида, включая без ограничения образцы клеток, тканей и биологических жидкостей  
25 (включая без ограничения слизь, кровь, плазму, сыворотку, мочу, слюну и семенную жидкость).

По всему описанию, где композиции описываются как имеющие, включающие или содержащие определенные компоненты, предусматривается, что композиции также состоят по существу из или состоят из приведенных компонентов. Аналогичным  
30 образом, когда способы или процессы описываются как имеющие, включающие или содержащие определенные стадии процесса, то процессы также состоят по существу из или состоят из приведенных стадий переработки. Дополнительно, следует понимать, что порядок стадий или порядок выполнения определенных действий является несущественным, пока изобретение может быть осуществлено. Кроме того, две или  
35 более стадии или действия можно проводить одновременно.

Способы синтеза по изобретению могут быть толерантны к широкому разнообразию функциональных групп; поэтому можно использовать различные замещенные исходные материалы. Способы в целом обеспечивают получение желаемого конечного соединения в конце или почти в конце всего процесса, хотя в определенных случаях может быть  
40 желательно осуществление дополнительного превращения соединения в его фармацевтически приемлемую соль, сложный эфир или пролекарство.

Соединения по настоящему изобретению могут быть получены разнообразными путями с использованием имеющихся в продаже исходных материалов, соединений, известных в литературе, или из легко получаемых промежуточных соединений путем  
45 использования стандартных способов и процедур синтеза или известных специалистам в данной области, или которые очевидны для специалиста в данной области в свете изложенных здесь положений. Стандартные способы и процедуры синтеза для получения органических молекул и трансформаций и манипуляций функциональных групп и

манипуляций ими можно найти в релевантной научной литературе или в стандартных руководствах в данной области. Хотя и без ограничения любым одним или несколькими источниками, такие классические руководства как Smith, M. B., March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons: New York, 2001; и Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3 edition, John Wiley & Sons: New York, 1999, включенные в настоящий текст путем ссылки, представляют собой полезные и признанные эталонные руководства по органическому синтезу, известные специалистам в данной области. Следующие описания способов синтеза предназначены для иллюстрации, но не ограничения, общих процедур получения соединений по настоящему изобретению.

Соединения по настоящему изобретению можно подходящим образом получить разнообразными способами, знакомыми специалистам в данной области. Соединения по настоящему изобретению с каждой из описанных здесь формул можно получить в соответствии со следующими процедурами из имеющихся в продаже исходных материалов или исходных материалов, которые можно получить, используя описанные в литературе процедуры. Эти процедуры демонстрируют получение репрезентативных соединений по настоящему изобретению.

После получения соединений, сконструированных, выбранных и/или оптимизированных описанными выше способами, можно охарактеризовать с использованием разнообразных анализов, известных специалистам в данной области, для определения наличия биологической активности у соединений. Например, молекулы можно охарактеризовать обычными анализами, включая без ограничения те анализы, которые описаны ниже, для определения наличия у них прогнозируемой активности, активности связывания и/или специфичности связывания.

Кроме того, высокопроизводительный скрининг можно использовать для ускорения проведения анализа при использовании таких анализов. В результате, можно быстро провести скрининг описанных здесь молекул для выявления активности с использованием методик, известных в данной области. Общие методологии для выполнения высокопроизводительного скрининга описаны, например, в руководстве Devlin (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker и в патенте США № 5763263. В высокопроизводительных анализах можно использовать одну или несколько методик анализа, включая без ограничения те, которые описаны ниже.

Все публикации и патентные документы, приведенные здесь, включены в настоящую заявку путем ссылки, как если бы каждая публикация или документ были конкретно и индивидуально включены в настоящую заявку посредством ссылки. Ссылка на публикации и патентные документы не предназначена быть допущением того, что любая из них является прототипом заявляемого изобретения, и не составляет какого-либо допущения относительно ее содержания или даты. Теперь, когда изобретение было представлено путем письменного изложения, специалистам в данной области станет понятно, что изобретение можно исполнить на практике в разнообразных вариантах осуществления, и что предшествующее описание и приведенные ниже примеры предназначены для иллюстрации, а не ограничения следующей формулы изобретения.

## ПРИМЕРЫ

Теперь, когда изобретение было описано в целом, его легче будет понять со ссылкой на следующие примеры, которые включены просто с целью иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1 - Рекомбинантный пятикомпонентный комплекс PRC2

EZH2 дикого типа (номер доступа в GenBank NM 004456) или мутанты по Tyr641 коэкспрессировали с AEBP2 дикого типа (номер доступа в GenBank NM\_153207), EED (номер доступа в GenBank NM\_003797), SUZ12 (номер доступа в GenBank NM\_015355) и RbAp48 (номер доступа в GenBank NM\_005610) в клетках *Spodoptera frugiperda* (Sf9) с использованием бакуловирусной экспрессирующей системы. N-концевую FLAG-метку на EED (BPS Bioscience, каталожный номер 51004) использовали для очистки активного комплекса PRC2 из клеточных лизатов. Чистоту конечных препаратов PRC2 оценивали с помощью SDS-PAGE окрашиванием кумасси синим.

#### Пример 2 - Панель пептидов H3, H4

Библиотеку, состоящую из 44 пептидов по 15 аминокислот в каждом, синтезировали в аппарате 21<sup>st</sup> Century Biochemicals (Marlboro, MA). Данная панель пептидов охватывала все аминокислоты гистонов H3 и H4 человека с перекрыванием 5 остатков между последовательными пептидными последовательностями. К N-концу каждого пептида присоединяли биотин, и C-концы были представлены в виде амида. Чистоту (>95%) и идентичность подтверждали жидкостной хроматографией/масс-спектральным анализом.

Для исследования зависимости статуса метилирования H3-K27 от активности фермента синтезировали пептиды, представляющие аминокислотную последовательность H3 человека из остатков 21-44 (H3:21-44), где лизин 27 представлен в виде немодифицированного, монометилованного, диметилованного или триметилованного амина боковой цепи. Эти пептиды закупали у компании New England Peptide (Gardner, MA) с биотином, присоединенным к C-концу каждого пептида.

#### Пример 3 - Оценка статуса метилирования H3-K27 в клетках

Клеточные линии OCI-LY19 (ACC 528), KARPAS-422 (ACC 32) и WSU-DLCL2 (ACC 575) получали из коллекции DSMZ. Клеточные линии DB (CRL-2289) и SU-DHL2 (CRL-2959) получали из коллекции ATCC. Клеточные линии OCI-LY19, WSU-DLCL2 и DB выращивали в среде RPMI-1640 с 10% FBS (фетальной телячьей сывороткой), и клеточные линии KARPAS-422 и SU-DHL2 выращивали в RPMI-1640 с 20% FBS. Клетки выращивали до плотности  $1,5-2 \times 10^6$  клеток/мл и  $1 \times 10^7$  клеток собирали центрифугированием при 264×g, промывали ледяным PBS (солевым раствором с фосфатным буфером) и лизировали ресуспендированием в 10X объеме осадка лизирующим буфером RIPA, содержащим 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,25% DOC, 1% NP-40 и 1 mM EDTA (Millipore #20-188), с добавлением 0,1% SDS и таблетками ингибиторов протеаз (Roche # 1836153). Лизаты подвергали 2 циклам обработки ультразвуком пачками из 10 импульсов по 1 секунде при установке 3 аппарата Misonix XL-2000 для обеспечения эффективной экстракции гистонов, и очищали центрифугированием при 4°C с использованием настольной центрифуги при 14000 об/мин в течение 10 минут. Концентрацию белка определяли анализом BCA (Pierce). 4 мкг каждого лизата фракционировали на 4-20% Tris-глициновом геле (Invitrogen), переносили на PVDF и исследовали следующими антителами в блокирующем буфере Odyssey: мышинные антитела против EZH2 (CST 3147; разведение 1:2000), кроличьи антитела против H3-K27me3 (CST 9733; разведение 1:10000), кроличьи антитела против H3-K27me2 (CST 9755; разведение 1:5000), кроличьи антитела против H3-K27me1 (Active Motif 39377; разведение 1:5000) и мышинные антитела против всего H3 (CST 3638; разведение 1:20000). После первичной инкубации Ab, мембраны исследовали с помощью вторичных Ab: IRDye 800CW-антитело осли против IgG мыши (LiCOR #926-32212) или Alexa Fluor 680-антитело козы против IgG кролика (Invitrogen #A-21076) и визуализировали с использованием системы LiCOR Odyssey.

#### Пример 4 - Энзимология

Как указано выше, ранее был сделан вывод, что связанные с заболеванием изменения

в Tug641 приводили к потере функции в отношении катализируемого EZH2 метилирования H3-K27. Однако предполагаемое снижение частоты метилирования H3-K27 вследствие гетерозиготности фермента было трудно обосновать в качестве основы для злокачественного фенотипа, особенно в свете предшествующих данных, указывающих на то, что все факторы -сверхэкспрессия EZH2, мутации с утратой функции в соответствующей деметилазе H3-K27 UTX или сверхэкспрессия компонентов PRC2, таких как PHF19/PCL3, вовлеченные в увеличение триметилирования H3-K27 - приводят к злокачественным фенотипам при определенных типах рака у людей. Morin et al. (2010) Nat Genet 42: 181-5; Martinez-Garcia et al. (2010) Nat Genet 42: 100-1; Bracken et al. (2003) EMBO J 22: 5323-35; Kleer et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100: 11606-11; Varambally et al. (2002) Nature 419: 624-9; Simon et al. (2008) Mutat Res 647: 21-9; van Haaften et al. (2009) Nat Genet 41: 521-3; Wang et al. (2004) Gene 343: 69-78; Cao et al. (2008) Mol Cell Biol 28: 1862-72; и Sarma et al. (2008) Mol Cell Biol 28: 2718-31). Поэтому более детально исследовали энзимологию этих мутаций.

Рекомбинантные комплексы PRC2 получали с WT и мутантными по Tug641 вариантами EZH2 человека (см. пример 1 выше; Cao et al. (2004) Mol Cell 15:57-67). Равные концентрации (номинально 8 нМ, на основе определения белков) каждого комплекса первоначально тестировали на способность катализировать перенос <sup>3</sup>H-метила с меченого S-аденозилметионина (SAM) на немодифицированный пептид, представляющий аминокислотную последовательность, окружающую H3-K27 (H3:21-44), или на нативные олигонуклеосомы эритроцитов птиц. Как сообщалось ранее (Morin et al. (2010) Nat Genet 42:181-5), было обнаружено, что фермент WT проявляет выраженную активность в отношении переноса метильной группы в отношении этого неметилированного пептидного субстрата, но что ни один из мутантных ферментов не проявляет существенной метилтрансферазной активности (фиг.1А). В отличие от ранее опубликованных данных и данных, представленных на фиг.1А, было обнаружено, что все мутантные конструкции EZH2 представляли собой активные метилтрансферазы в отношении субстрата в виде нуклеосом птиц (фиг.1В). Нуклеосомы, выделенные из природного источника у птиц, представляют собой смесь состояний модификаций гистонов, включая различные состояния метилирования H3-K27, судя по данным вестерн-блоттинга с антителами, специфичными в отношении метилирования H3-K27.

Существует несколько возможных объяснений противоречивой активности мутантных комплексов PRC2 в отношении пептидных и нуклеосомных субстратов. Одной из возможностей является то, что участки распознавания субстрата дистальнее активного центра (т.е. экзоучастки) являются важными детерминантами связывания и обновления субстрата; эти участки могут связываться с комплементарными элементами распознавания на нуклеосоме, которые недоступны на небольших пептидных субстратах. Однако, когда экспрессируемый *E. coli* рекомбинантный гистон H3 человека тестировали в качестве субстрата для WT и мутантных комплексов PRC2, полученный профиль активности был идентичен профилю, наблюдаемому для пептидного субстрата; т.е. фермент WT продемонстрировал устойчивую активность метилтрансферазы в отношении субстрата H3, мутант Y641F проявил 7% активности комплекса WT, и все другие мутанты проявляли  $\leq 1\%$  активности комплекса WT. Следовательно, связывание экзоучастка представляется маловероятным объяснением данных результатов. Нуклеосома представляет множество остатков лизина, помимо H3-K27, в качестве потенциальных участков метилирования, которые не присутствовали бы в небольшом пептидном субстрате. Таким образом, другая возможность состоит в том, что мутация Y641 изменяет субстратную специфичность EZH2, что приводит к метилированию

остатков лизина, отличных от остатков H3-K27. Эта возможность является маловероятной с учетом высокой согласованности между активностью мутанта в отношении субстратов в виде малых пептидов и рекомбинантного белка H3.

Видимое расхождение между представленными и ранее описанными результатами было разрешено, когда ферментативную активность WT и мутантных комплексов PRC2 тестировали против ряда пептидных субстратов, которые представляют все возможные остатки лизина (K) гистона H3 и гистона H4 (см. представленный выше пример 2). Все формы фермента проявили значительную активность только против пептидов, содержащих эквивалент остатка H3-K27. Однако удельная активность мутантов была значительно снижена относительно WT в порядке WT >> Y641F > Y641S ~ Y641H > Y641N, что снова согласуется с ранее опубликованными данными.

#### Пример 5 - Энзимология

Для углубленного понимания ферментативной активности этих мутантов и для устранения видимого противоречия между активностью в отношении пептидных и нуклеосомных субстратов, исследовали способность форм фермента катализировать дальнейшее метилирование различных состояний метилирования H3-K27 в контексте пептида H3:21-44. Как указано выше, было обнаружено, что все мутантные ферменты были недостаточными катализаторами метилирования немодифицированного пептида H3-K27 относительно фермента WT. Однако примечательно, что, как было обнаружено, все мутантные ферменты превосходили фермент WT в отношении катализа дальнейшего метилирования моно- и особенно диметилированных пептидов H3-K27 (фиг.2). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что фермент WT является наиболее эффективным в отношении катализа реакции от нулевого до монометилирования. Мутантные ферменты являются дефектными в отношении катализа этой первоначальной стадии, но они более эффективны, чем фермент WT, в отношении катализа последующих стадий, ведущих от монометилированного к ди- и триметилированному H3-K27.

Источники дифференциальной субстратной специфичности WT и мутантной EZH2 исследовали с помощью ферментативной кинетики стационарного состояния. Как обобщенно представлено в таблице 2, мутации оказывают минимальные эффекты на распознавание субстрата в основном состоянии, как продемонстрировано сходными величинами  $K_m$  для нуклеосомных субстратов и  $K_{1/2}$  для пептидных субстратов. Во всех случаях пептидные субстраты проявляли сигмоидальное поведение связывания; следовательно, концентрация пептида, приводящая к половине максимальной скорости, представлена в настоящем описании как  $K_{1/2}$  вместо более распространенной константы Михаэлиса,  $K_m$ . Copeland (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists, Wiley. Величина  $K_m$  SAM аналогичным образом проявляла минимальное варьирование среди форм фермента, находясь в диапазоне от  $208 \pm 50$  до  $304 \pm 64$  нМ. Вместо этого, происхождением различия в утилизации субстрата являлось распознавание переходного состояния, как продемонстрировано по различиям величин  $k_{cat}$  среди ферментов в отношении различных субстратов (таблица 2). В результате, каталитическая эффективность, количественно определяемая как отношение  $k_{cat}/K$  (где K представляет собой либо  $K_m$ , либо  $K_{1/2}$ , в зависимости от идентичности субстрата; см. выше), варьирует между WT и мутантными ферментами для различных состояний метилирования H3-K27 (таблица 2).

Таблица 2

Кинетические параметры стационарного состояния для реакций метилирования, катализируемых PRC2, содержащим EZH2 дикого типа или мутанты EZH2 по Y641

Фермент	Состояние метилирования субстрата H3-K27	K (нМ)	$k_{cat}$ ( $\mu^{-1} \times 10^{-2}$ )	$k_{cat}/K$ ( $\mu^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1} \times 10^{-4}$ )
WT	0	$184 \pm 10$	$84.0 \pm 3.0$	$45.7 \pm 3.0$
	1	$436 \pm 42$	$65.4 \pm 5.8$	$15.0 \pm 2.0$
	2	$178 \pm 16$	$6.0 \pm 0.3$	$3.4 \pm 0.3$
	Нуклеосома	$141 \pm 31$	$42.6 \pm 2.6$	$30.2 \pm 6.9$
Y641F	0	$240 \pm 19$	$4.8 \pm 0.3$	$2.0 \pm 0.2$
	1	$404 \pm 124$	$15.0 \pm 4.3$	$3.7 \pm 1.6$
	2	$191 \pm 10$	$84.0 \pm 2.8$	$44.0 \pm 2.7$
	Нуклеосома	$176 \pm 19$	$65.4 \pm 2.0$	$37.2 \pm 4.2$
Y641H	0	- <sup>a</sup>	-	-
	1	$319 \pm 57$	$28.2 \pm 3.7$	$8.8 \pm 2.0$
	2	$148 \pm 9$	$22.8 \pm 0.9$	$15.4 \pm 1.1$
	Нуклеосома	$140 \pm 22$	$23.4 \pm 1.0$	$16.7 \pm 2.7$
Y641N	0	-	-	-
	1	$280 \pm 11$	$23.4 \pm 0.8$	$8.4 \pm 0.4$
	2	$157 \pm 11$	$96.0 \pm 4.0$	$61.1 \pm 5.0$
	Нуклеосома	$191 \pm 34$	$23.4 \pm 1.3$	$12.3 \pm 2.3$
Y641S	0	-	-	-
	1	$249 \pm 8$	$27.6 \pm 0.8$	$11.1 \pm 0.5$
	2	$136 \pm 8$	$59.4 \pm 2.0$	$43.7 \pm 3.0$
	Нуклеосома	$137 \pm 28$	$23.4 \pm 1.4$	$17.1 \pm 3.6$

<sup>a</sup> Активность слишком низкая для измерения.

#### Пример 6 - Энзимология

Параметры кинетики в стационарном состоянии, приведенные в таблице 2, дают возможность рассчитать ожидаемые уровни различных состояний метилирования H3-K27 для клеток, гетерозиготных по различным мутантным формам EZH2, относительно клеток, гомозиготных по ферменту WT. Для проведения такого моделирования был сделан ряд упрощающих допущений: (1) что кинетика фермента в стационарном состоянии релевантна катализируемому PRC2 метилированию H3-K27 в клеточном контексте, и что все измерения проводят в одну и ту же точку времени при росте клеток; (2) что мутантный и WT ферменты экспрессируются на равных уровнях в гетерозиготных клетках, и что общий уровень EZH2 является равным во всех клетках; (3) что клеточная концентрация SAM относительно его  $K_m$  является насыщающей и не изменяется среди клеток; (4) что клеточная концентрация нуклеосомы сходна с ее  $K_m$  и аналогичным образом не изменяется среди клеток; (5) что катализируемое EZH1 метилирование H3-K27 было незначительным и постоянным среди клеток; и (6) что любая активность деметилазы H3-K27 также была постоянной среди клеток.

С учетом этих допущений, были получены прогнозы, иллюстрируемые на фиг.3А, для относительных уровней H3-K27me3 (верхняя панель), H3-K27me2 (средняя панель) и H3-K27me1 (нижняя панель). Из таких моделирований выявляется четкий тип. Уровень

H3-K27me3 возрастает относительно клеток WT для всех содержащих мутант клеток, находясь в диапазоне от увеличения на 30% для мутанта Y641N до >400% для мутанта Y641N. В то же время уровни H3-K27me2 снижены до <50% относительно WT для всех мутантов, и уровни H3-K27me1 снижены приблизительно наполовину для всех мутантов относительно WT.

Затем с помощью вестерн-блоттинга измеряли относительные уровни состояний метилирования H3-K27 в клеточных линиях В-клеточной лимфомы, которые, как известно, являются гомозиготными по WT EZH2 (OCI-LY19) или гетерозиготными по EZH2 Y641N (DB, KARPAS 422 и SU-DHL-6) или EZH2 Y641F (WSU-DLCL2) (фиг.3B). Профиль относительных состояний метилирования H3-K27, наблюдаемый на фиг.3B, превосходно согласуется с результатами моделирования на основе кинетических параметров в стационарном состоянии *in vitro*, несмотря на допущения, использованные при моделировании, и использовании не физиологического пептидного заместителя в качестве субстрата.

Таким образом, увеличение H3-K27me3 наблюдали для всех клеток, содержащих мутант по Y641, относительно WT, снижение H3-K27me2 наблюдали для всех клеток, содержащих мутант по Y641, относительно WT, и снижение H3-K27me1 наблюдали, по меньшей мере, для двух из четырех мутантных клеточных линий. Почти сравнимые уровни H3-K27me1 в клетках WT и KARPAS 422 и SU-DHL-6 могли отражать различные уровни экспрессии WT и мутантного EZH2, различный вклад EZH1 или другие факторы, не учитываемые при моделировании. Тем не менее, соответствие между прогнозируемыми и экспериментальными профилями статуса метилирования H3-K27 является существенным и подтверждает точку зрения, что ферментативное сопряжение между WT и мутантной EZH2 приводит к увеличению H3-K27me3, что, таким образом, приводит к увеличению уровня злокачественного фенотипа клеток, которые являются гетерозиготными по этим мутантам.

#### Пример 7 - Анализы активности метилтрансферазы PRC2 *in vitro*

Анализ на флэш-планшете с пептидным субстратом. Для первоначального сравнения WT и мутантов EZH2 по Y641, биотинилированный пептид гистона H3:21-44, содержащий неметилированный K27 (New England Peptides), монометилированный K27 (Millipore) или диметилированный K27 (Millipore) в концентрации 800 нМ, комбинировали со смесью S-аденозилметионин-C1 (SAM) в концентрации 1700 нМ и тритированного SAM в концентрации 300 нМ (Perkin Elmer). Затем данную комбинацию субстратов добавляли к буферу для анализа PRC2 (20 mM BICINE, 1 mM DTT, 0,002% Tween 20, 0,005% желатин бычьей кожи (BSG), pH 7,6). Реакциям давали возможность протекать в течение указанного интервала времени и затем гасили добавлением избытка холодного SAM (конечная концентрация 600 мкМ). Реакционные смеси после гашения переносили в покрытый стрептавидином флэш-планшет (Perkin Elmer, каталожный номер SMP410), давали возможность связываться в течение одного часа и затем выявляли на сцинтилляционном и люминесцентном счетчике TopCount NXT HTS (Perkin Elmer). Каждая точка времени представляла среднюю величину шести отдельных реакций. Параметры кинетики в стационарном состоянии определяли в идентичных условиях реакции, за исключением того, что концентрацию пептида или SAM изменяли, тогда как другой субстрат находился в насыщающих условиях. Скорость наносили на график в виде функции варьирующейся концентрации субстрата, и данные приводили в соответствие с непреобразованной версией уравнения Михаэлиса-Ментен или непреобразованной версией уравнения сигмоидальной кинетики для расчета величин K и  $k_{cat}$ . Стандартные ошибки приведенных в соответствие параметров приведены в



таблице 2 и их использовали для построения «усов», иллюстрируемых на фиг.2, панелях В и С. Ошибки, связанные с  $k_{cat}/K$  (таблица 2), рассчитывали в соответствии со стандартными способами распространения ошибок; относительную погрешность  $k_{cat}/K$  определяли как:

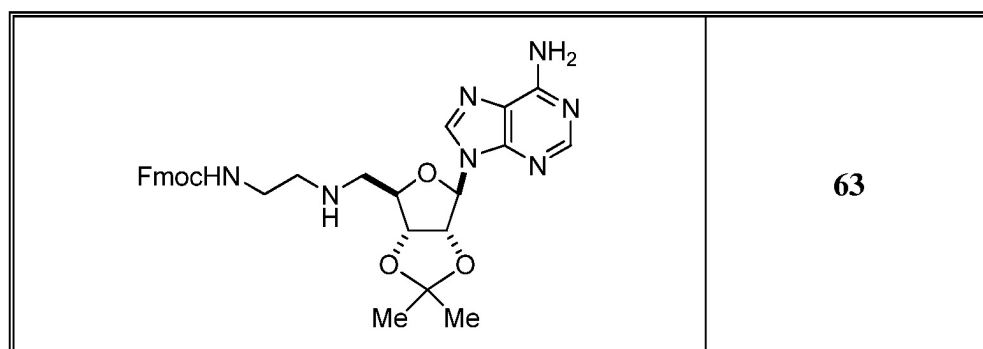
$$\mu \frac{k_{cat}}{K} = \sqrt{\left(\frac{\mu k_{cat}}{k_{cat}}\right)^2 + \left(\frac{\mu K}{K}\right)^2}, \quad (1)$$

где  $\mu k_{cat}$  представляет собой стандартную ошибку  $k_{cat}$ , и  $\mu K$  представляет собой стандартную ошибку  $K$ .

Анализ с олигонуклеосомами на фильтровальных планшетах. Олигонуклеосомы куриных эритроцитов очищали, как описано ранее. Fang et al. (2004) Methods Enzymol 377:213-26. Нуклеосомы комбинировали со смесью SAM и тритированного SAM и добавляли к PRC2 в буфере для анализа (20 mM BICINE, 100 mM KC1, 1 mM DTT, 0,002% Tween 20, 0,005% BSG, pH 7,6). Реакции проводили и гасили, как описано выше. Реакционную смесь после гашения переносили в стекловолоконный фильтровальный планшет (Millipore, каталожный номер MSFBN6B) и промывали три раза 10% трихлоруксусной кислотой и давали возможность высохнуть. Добавляли Microscint Zero (30 мкл) и включение трития выявляли на сцинтилляционном и люминесцентном счетчике TopCount. Параметры в стационарном состоянии определяли в идентичных условиях реакции, за исключением того, что концентрацию нуклеосом или SAM изменяли в насыщающих условиях другого субстрата. Величину скорости наносили на график как функцию варьирующейся концентрации субстрата в соответствии с непреобразованной версией уравнения Михаэлиса-Ментена для выведения величин  $K_m$  и  $k_{cat}$ , как описано выше.

#### Пример 8 - Получение соединения

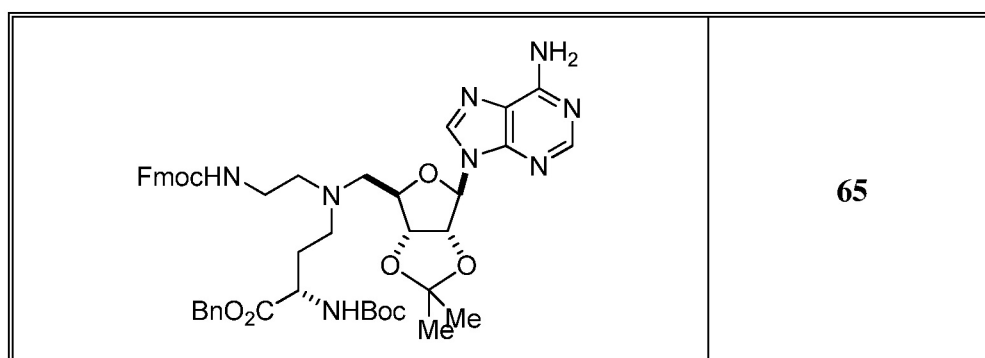
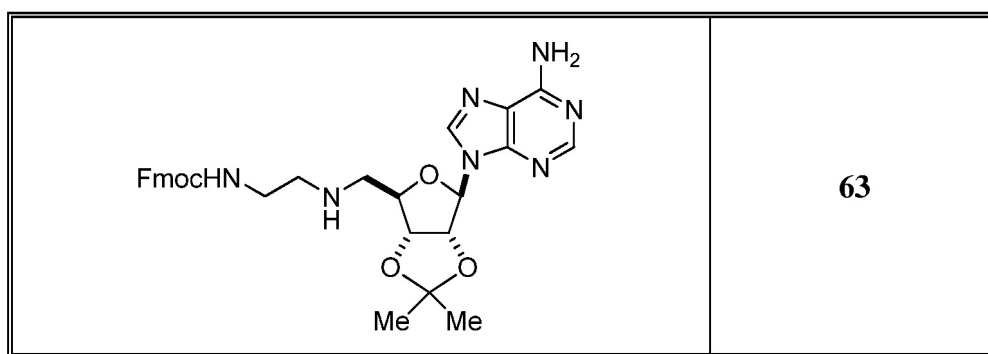
##### А. Получение соединения 63



К раствору 9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(аминометил)-2,2-диметилтетрагидрофтор[3,4-d][1,3]диоксол-4-ил)-9H-пурин-6-амин (Townsend, A. P. et al. (2009) Org. Let. 11:2976-2979) (3,05 г, 9,96 ммоль) в DCE (дихлорэтилен) (250 мл) добавляли (9H-флуорен-9-ил)метил-(2-оксоэтил)карбамат (2,8 г, 9,96 ммоль) и NaB(OAc)<sub>3</sub>H (2,96 г, 13,95 ммоль), смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Добавляли раствор K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до pH 8-9. Добавляли DCM (дихлорметан), органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали и очищали SGC (DCM:MeOH=30:1) для получения соединения 63 (2,9

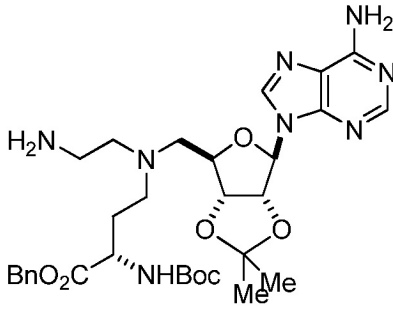
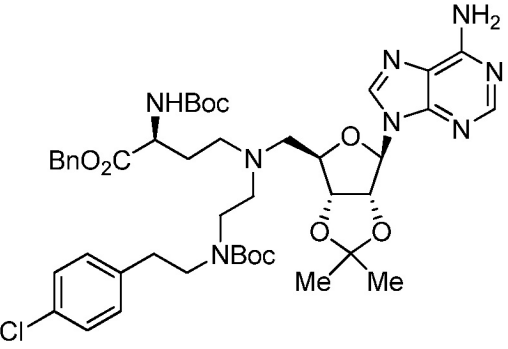
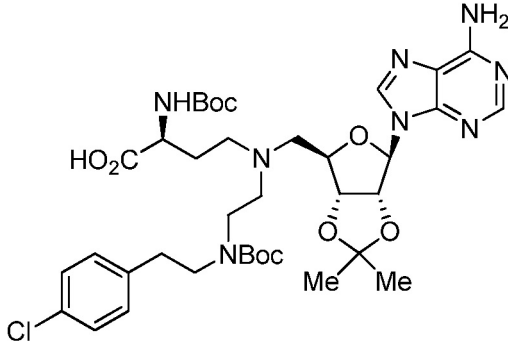
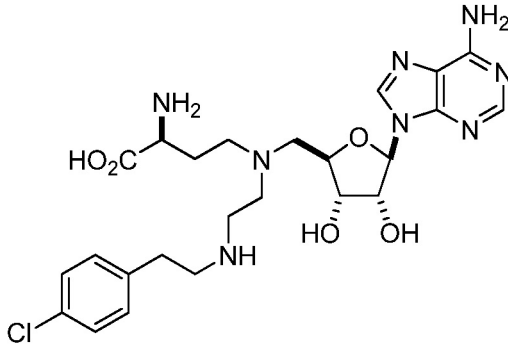
г, выход: 50,9%).

### В. Получение соединения 65



К раствору соединения 63 (2,9 г, 5,08 ммоль) в DCE (250 мл) добавляли (S)-бензил 2-  
 ((трет-бутоксикарбонил)амино)-4-оксобутаноат (1,56 г, 5,08 ммоль) и NaB(OAc)<sub>3</sub>H (1,51  
 г, 7,11 ммоль), смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Добавляли  
 раствор K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до pH 8-9. Добавляли DCM, органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
 концентрировали и очищали SGC (DCM:MeOH=100:1), с получением соединения 65 (2,8  
 г, выход: 63,9%).

### С. Получение соединения 75

5		72
10		
15		73
20		
25		74
30		
35		75
40		

Стадия 1. К раствору соединения 65В (2,2 г, 2,55 ммоль) в DCM (10 мл) добавляли Et<sub>2</sub>NH (1,1 г, 15,3 ммоль), смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре.

Смесь концентрировали для получения неочищенного соединения 72 (2,2 г).

Стадия 2. К перемешанному раствору соединения 72 (167 мг, 0,26 ммоль) в MeOH (4 мл) добавляли 2-(4-хлорфенил)ацетальдегид (40 мг, 0,26 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем добавляли Na(OAc)<sub>3</sub>BH (83 мг, 0,39

ммоль) и НОАс (0,4 мл) и перемешивали в течение ночи. Затем добавляли  $\text{NaHCO}_3$  (водн.) и экстрагировали DCM (25 мл  $\times$  3), промывали насыщенным солевым раствором, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали. Неочищенный продукт очищали препаративной ТСХ (DCM/MeOH=10:1) для получения соединения 73 (30 мг, выход: 14%) в виде белого порошка. ЖХ/МС (m/z): 779,7  $[\text{M}+1]^+$ .

Стадия 3. Смесь соединения 73 (30 мг, 0,038 ммоль) и 10% Pd/C (15 мг) в MeOH (2 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере  $\text{H}_2$  в течение ночи. Смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали для получения неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали препаративной ТСХ (DCM/MeOH=8:1) для получения соединения 74 (20 мг, выход: 69%) в виде белого порошка. ЖХ/МС (m/z): 689,7  $[\text{M}+1]^+$ .

Стадия 4. Раствор соединения 74 (20 мг, 0,028 ммоль) в 90% TFA (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и концентрировали до получения твердого вещества для удаления TFA, получая соединение 75 (соль трифторуксусной кислоты) в виде бесцветного масла без очистки. ЖХ/МС (m/z): 549,7  $[\text{M}+1]^+$ .

Пример 9 - Ингибирование с применением SAN EZH2 дикого типа и мутантов по Y641

S-Аденозил-1-гомоцистеин (SAN) серийно разводили в 3 раза в DMSO на 10 точек, и 1 мкл наносили в 384-луночный титровочный микропланшет. Положительный контроль (стандарт со 100% ингибированием) представлял собой SAN в конечной концентрации 100 мкМ, и отрицательный контроль (стандарт с 0% ингибированием) содержал 1 мкл DMSO. Затем SAN инкубировали в течение 30 минут с 40 мкл на лунку EZH2 дикого типа и мутантами в концентрации 8 нМ в аналитическом буфере при pH 7,6 (20 mM BICINE, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,002% Tween 20, 0,005% BSG). Добавляли 10 мкл на лунку смеси субстратов, которая содержала S-аденозилметионин-Cl (SAM) в концентрации 150 нМ, тритированный SAM в концентрации 100 нМ и биотинилированную олигонуклеосому в концентрации 150 нМ в аналитическом буфере при pH 7,6. Ферментативную реакционную смесь после гашения переносили в покрытый стрептавидином флэш-планшет (Perkin Elmer, каталожный номер SMP410), давали возможность связываться в течение одного часа и проводили выявление на приборе TopCount NXT HTS (Perkin Elmer).

Результаты представлены на фиг.7. Величины  $\text{IC}_{50}$  представлены в таблице 3.

Таблица 3

Ингибирование с использованием SAN WT EZH2 и мутантов EZH2 по Y641

	WT	Y641H	Y641S	Y641N	Y641F
$\text{IC}_{50}$ , мкМ	0.467	0.263	0.283	0.380	4.80

Пример 10 - Ингибирование соединением 75 EZH2 дикого типа и мутантов по Y641

Соединение 75 серийно разводили в 3 раза в DMSO на 10 точек, и 1 мкл наносили в 384-луночный титровочный микропланшет. Положительный контроль (стандарт со 100% ингибированием) представлял собой SAN в конечной концентрации 100 мкМ, и отрицательный контроль (стандарт с 0% ингибированием) содержал 1 мкл DMSO. Затем соединение 75 инкубировали в течение 30 минут с 40 мкл на лунку EZH2 дикого типа и мутантами в концентрации 8 нМ в аналитическом буфере при pH 7,6 (20 mM BICINE,

100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,002% Tween 20, 0,005% BSG). Добавляли 10 мкл на лунку смеси субстратов, которая содержала S-аденозилметионин-Cl (SAM) в концентрации 150 нМ, тритированный SAM в концентрации 100 нМ и биотинилированную олигонуклеосому в концентрации 150 нМ в аналитическом буфере при pH 7,6.

- 5 Ферментативную реакцию смесь после гашения переносили в покрытый стрептавидином флэш-планшет (Perkin Elmer, каталожный номер SMP410), давали возможность связываться в течение одного часа и проводили выявление на приборе TopCount NXT HTS (Perkin Elmer).

Результаты представлены на фиг.8. Величины IC<sub>50</sub> представлены в таблице 4.

10

Таблица 4

Ингибирование с использованием соединения 75 WT EZH2 и мутантов EZH2 по Y641

15

	WT	Y641S	Y641N	Y641F	Y641H
IC <sub>50</sub> , мкМ	8.95	2.50	4.10	7.18	7.56

Пример 11 - Отношения H3-K27me<sub>2</sub>/me<sub>3</sub> прогнозируют чувствительность к ингибитору EZH2

20

Линии опухолевых клеток, гетерозиготных по мутации (Y641) EZH2, проявляют повышенные уровни H3-K27me<sub>3</sub>, состояние метилирования H3-K27, которое, как считают, играет важную роль в канцерогенезе. Оценивали уровни моно-(H3-K27me<sub>1</sub>), ди-(H3-K27me<sub>2</sub>) или триметилированных (H3-K27me<sub>3</sub>) форм H3-K27 на панели линий

25

клеток, которые были WT по EZH2 или гетерозиготными по мутациям (Y641) EZH2. Перечень использованных линий клеток представлен в таблице 5. Большинство линий представляют собой линии В-клеточной лимфомы, однако были также включены две линии меланомы. IGR1 представляет собой линию клеток меланомы, которая, как недавно было обнаружено, содержит мутацию Y641N в EZH2, и клетки A375 были включены в качестве контрольной линии клеток меланомы с EZH2 WT. На фиг.9А и В показаны результаты вестерн-блот анализа гистонов, выделенных из этой панели линий клеток, исследованной с использованием антител, распознающих H3-K27me<sub>1</sub>, H3-K27me<sub>2</sub> или H3-K27me<sub>3</sub>. В целом, глобальные уровни H3-K27me<sub>3</sub> выше в клеточных линиях, содержащих мутант по Y641, чем в клеточных линиях, экспрессирующих исключительно WT EZH2. Исключением являются клетки Farage, где уровни H3-K27me<sub>3</sub> были сходными с уровнями в линиях WT. Более удивительными являются значительно более низкие уровни H3-K27me<sub>2</sub> в линиях клеток, экспрессирующих мутантную по Y641 EZH2, относительно клеточных линий дикого типа. При вестерн-блот анализе гистонов, экстрагированных из мутантных по Y641 линий клеток, наблюдали небольшой или отсутствующий сигнал H3-K27me<sub>2</sub>, в то время как сигнал, наблюдаемый с тем же антителом в линиях клеток WT, был более интенсивным, чем сигнал, наблюдавшийся с антителом, специфичным в отношении H3-K27me<sub>3</sub>. В целом, в клеточных линиях WT сигнал вестерн-блота с антителом к H3-K27me<sub>2</sub> был более высоким, чем сигнал, наблюдавшийся с антителом к H3-K27me<sub>3</sub>, в то время как противоположное было действительным в линиях клеток, мутантных по Y641. Таким образом, отношение сигнала H3-K27me<sub>3</sub>/me<sub>2</sub> в мутантных по Y641 клеточных линиях выше, чем отношение, наблюдавшееся в линиях WT.

45

Состояние метилирования H3-K27 также можно исследовать масс-спектрометрией (МС), независимым способом, который не основан на антительных реагентах. Анализ

МС продемонстрировал, что уровни H3-K27me3 выше в линиях, мутантных по Y641, и Pfeiffer (A677G), чем в других линиях WT, в то время как для уровней H3-K27me2 действительно противоположное. В линиях, мутантных по Y641 и Pfeiffer (A677G), уровни H3-K27me3 были выше, чем уровни H3-K27me2, в то время как в других клеточных линиях WT действительно противоположное. Эти результаты согласуются с результатами, наблюдавшимися в вестерн-блот анализе, представленными на фиг.9А и В.

Различия в состоянии метилирования H3-K27 также можно выявить иммуноцитохимическими методами с использованием антител к H3-K27me2 или H3-K27me3. Этот иммуногистохимический анализ используют для выявления aberrантных отношений H3-K27me2/3, связанных с мутантом по Y641 EZH2, в фиксированных формалином залитых в парафин образцах опухолевой ткани пациента. Панель из пяти WT и пяти мутантных по Y641 осадков после центрифугирования линий клеток лимфомы фиксировали и заливали в парафиновые блоки и окрашивали антителами против H3-K27me2 или против H3-K27me3. Антитело к гистону H3 включали в качестве положительного контроля, поскольку все клетки должны содержать ядерный гистон H3. На фиг.10 показано, что все линии клеток были положительными в 100% клеток по окрашиванию и на H3-K27me3, и на H3. В этих условиях не были выявлены четкие различия интенсивности окрашивания на H3-K27me3 между WT и мутантными по Y641 линиями клеток. Это может отражать ограниченный динамический диапазон хромогенного иммуноцитохимического окрашивания по сравнению с другими способами выявления. Однако, как показано на фиг.11, клеточные линии можно было четко разделить на клеточные линии, положительно или отрицательно окрашивающиеся на H3-K27me2. Все линии клеток WT окрашивались положительно на H3-K27me2, в то время как все мутантные по Y641 клеточные линии и клетки Pfeiffer (A677G) не проявляли окрашивания антителом против H3-K27me2. Эти результаты согласуются с результатами, полученными с вестерн-блот и МС-анализами.

Без связи с какой-либо теорией, увеличенные уровни H3-K27me3, связанные с прибавкой функции EZH2 (Y641), могут делать клетки, несущие мутации EZH2, более чувствительными к низкомолекулярным ингибиторам EZH2. Для оценки того, коррелируют ли также повышенные уровни H3-K27me3 и/или сниженные уровни H3-K27me2, наблюдаемые в клетках Pfeiffer в отсутствие мутации EZH2 по Y641, с чувствительностью к ингибиторам EZH2, тестировали два соединения, которые демонстрируют активное ингибирование EZH2 в биохимических анализах при IC<sub>50</sub> 85 и 16 нМ, соответственно. Обработка клеток WSU-DLCL2 любым из этих соединений приводила к ингибированию общих уровней H3-K27me3, подтверждая их способность входить в клетки и ингибировать активность клеточной метилтрансферазы EZH2 (фиг.12).

Чувствительность панели WT и мутантных по Y641 линий клеток к каждому соединению оценивали в анализах пролиферации. Поскольку период времени до проявления антипролиферативной активности ингибиторов EZH2 занимает несколько дней, соединения оценивали в 11-дневных анализах пролиферации. На фиг.13 показаны репрезентативные кривые роста для WT (OCI-LY19) или мутантных по Y641 (WSU-DLCL2) линий клеток, обработанных тестируемыми соединениями. Оба соединения продемонстрировали антипролиферативную активность против клеток WSU-DLCL2, но небольшую активность против клеток OCI-LY19. Ингибитор А был более мощным ингибитором пролиферации WSU-DLCL2, чем ингибитор В, и это согласуется с тем, что ингибитор А является более мощным ингибитором EZH2 в биохимических анализах.

Анализы пролиферации выполняли на панели WT и мутантных по Y641 линий клеток лимфомы с ингибитором B, и получали величины IC<sub>90</sub> на 11 день. На фиг.14А показаны величины IC<sub>90</sub> линий клеток лимфомы, сгруппированных по статусу Y641 EZH2. В

целом, мутантные по Y641 линии клеток продемонстрировали повышенную чувствительность к ингибиторам EZH2 относительно линий клеток WT, хотя клетки RL и SUDHL4 были значительно менее чувствительными, чем другие мутантные линии. Клетки Pfeiffer (A677G) демонстрируют высокие уровни H3-K27me3 и низкие уровни H3-K27me2, и, таким образом, группирование клеточных линий по высоким уровням H3-K27me3 и низким уровням H3-K27me2 дает лучшую дифференциацию чувствительности к ингибитору EZH2, как показано для ингибитора B на фиг.14В. Таким образом, высокие уровни H3-K27me3 и низкие уровни H3-K27me2 можно использовать для прогнозирования чувствительности к ингибиторам EZH2, независимо от информации о мутантном статусе.

Представленные результаты демонстрируют, что идентификацию мутаций Y641 EZH2 в опухолях пациента и/или выявление низких уровней H3-K27me2 относительно H3-K27me3 посредством использования таких методик, как вестерн-блоттинг, МС или ИНС у пациента, можно использовать для идентификации того, какой пациент будет отвечать на лечение ингибитором EZH2.

Таблица 5

Линии клеток, использованные в данном исследовании

Рак	Статус EZH2	Линия клеток
Лимфома: DLBCL (диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома) и другая В-клеточная лимфома	Дикий тип	OCI-LY19
		HT
		MC116
		BC-1
		BC-3
		Toledo
		DOHH-2
		Farage
		SR

5			NU-DHL-1
			NU-DUL-1
		Мутация Y641	SU-DHL-10 (Y641F)
			DB (Y641N)
			KARPAS 422 (Y641N)
			SU-DHL-6 (Y641N)
			WSU-DLCL-2 (Y641F)
			RL (Y641N)
			SU-DHL-4 (Y641S)
Меланома	Дикий тип	A375	
	Мутация Y641	IGR-1 (Y641N)	

### Пример 12 - Рекомбинантные 4-компонентные комплексы PRC2

EZH2 дикого типа (WT) (номер доступа в GenBank NM\_004456) или мутанты A677G и A687V коэкспрессировали с EED дикого типа (номер доступа в GenBank NM\_003797), SUZ12 (номер доступа в GenBank Accession NM\_015355) и RbAp48 (номер доступа в GenBank NM\_005610) в клетках *Spodoptera frugiperda* (Sf9), используя экспрессионную систему бакуловируса. N-концевую метку FLAG на EED использовали для очистки активного комплекса PRC2 из клеточных лизатов. Чистоту конечных препаратов PRC2 оценивали SDS-PAGE с окрашиванием Кумасси синим, и концентрацию белка определяли, используя стандартную кривую бычьего сывороточного альбумина в анализе Bradford.

### Пример 13 – Анализы *in vitro* активности метилтрансферазы PRC2

Стандартная процедура для анализа на флэш-планшете с пептидными субстратами. Активность комплексов PRC2, содержащих EZH2 дикого типа или ее мутантную форму, исследовали с использованием серии из четырех пептидов, представляющих

аминокислотную последовательность H3 человека из остатков 21-44 (H3:21-44) с лизином 27, представленным в виде немодифицированного, метилированного, диметилированного или триметилированного амина боковой цепи, состоящего из

следующей последовательности, с подчеркнутым подвергнутым модификации лизином H3-K27, ATKAAARKSAPATGGVKKPHRYRPGG[K-Ahx-Biot]-амид (SEQ ID NO: 20). Биотин (Biot) был присоединен к С-концевому остатку лизина (K) посредством аминокислотного

линкера (AHX), присоединенного к амину боковой цепи лизина (21<sup>st</sup> Century Biochemicals). Для сравнения активности мутанта WT и мутантной EZH2, биотинилированные пептиды гистона H3:21-44 комбинировали со смесью S-аденозилметионина (SAM; Sigma-Aldrich)

и тритиевого SAM (<sup>3</sup>H-SAM; American Radiolabeled Chemicals) и рекомбинантного 4-компонентного PRC2 в аналитическом буфере (20 mM BICINE, 1 mM DTT, 0,002% Tween 20, 0,005% желатин бычьей кожи (BSG), pH 7,6). Реакциям давали возможность протекать в течение указанного интервала времени и затем гасили добавлением избытка холодного SAM (конечная концентрация 100 мкМ). Реакционные смеси после гашения переносили

в покрытый стрептавидином флэш-планшет (Perkin Elmer, каталожный номер SMP410) и давали возможность связаться в течение одного часа перед промыванием планшетов в мойщике планшетов Biotek EL-405x, и считывание результатов проводили на

сцинтилляционном и люминесцентном счетчике TopCount NXT HTS (PerkinElmer).



#### Пример 14 - Энзимология

Рекомбинантные 4-компонентные комплексы PRC2 получали с EZH2 дикого типа и любым из мутантных вариантов A677G или A687V EZH2 (см. пример 12 выше; Cao et al. (2004) Mol Cell 15: 57-67). Каждый комплекс первоначально тестировали в отношении способности катализировать перенос Н-метила из меченного S-аденозилметионина (SAM) на каждый из четырех пептидов H3:21-44. Фермент серийно разбавляли, и добавляли смесь пептида (200 нМ) и SAM (200 нМ  $^3\text{H}$ -SAM и 800 нМ немеченого SAM). Реакции гасили через 15-минутные интервалы добавлением избытка немеченого SAM, и скорость реакции рассчитывали на основании линейной регрессии числа импульсов в минуту (CPM) без поправки как функции времени. Как показано на фиг.15, мутантные ферменты проявляли профиль активности, отличный от профиля активности фермента дикого типа. Мутанты A677G и A687V обладали стойкой активностью в отношении всех из неметилизованного, монометилизованного и диметилизованного пептидов H3:21-44, тогда как фермент дикого типа проявил стойкую активность только в отношении неметилизованного и монометилизованного пептидов. Контрольный пептид, содержащий полностью триметилованный H3-K27, не метилировался в анализе, указывая на то, что H3-K27 представлял собой лизин-мишень.

#### Пример 15 - Энзимология

Для более глубокого понимания ферментной активности данных мутантов, выполняли исследования истоков дифференциальных специфичностей в отношении субстратов EZH2 дикого типа и мутантной EZH2 посредством ферментной кинетики в стационарном состоянии. Реакционные смеси, содержащие титр пептидов H3-K27 с фиксированной концентрацией фермента (4 нМ) и SAM (200 нМ  $^3\text{H}$ -SAM и 800 нМ немеченого SAM). Во всех случаях пептидные субстраты проявили сигмоидальное поведение связывания, поскольку концентрацию пептида, приводящую к скорости, составляющей половину максимальной, в данном случае регистрировали в виде величины  $K_{1/2}$  вместо более распространенной константы Михаилиса-Ментена,  $K_m$  (Copeland (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists, Wiley). Как обобщено в таблице 6, мутации оказывают воздействие на распознавание субстрата в исходном состоянии, как демонстрируется более низкой величиной величины  $K_{1/2}$  для метилированных пептидных субстратов. Кроме того, мутации воздействуют на максимальные скорости ферментов. Мутация A677G ведет к увеличением  $k_{cat}$  в 2,9, 3,7 и 22 раза на соответствующих неметилованных, моно- и диметилованных H3-K27 пептидных субстратах, тогда как мутация A687V приводит к 3-кратному снижению  $k_{cat}$  на неметилованном пептиде H3-K27, но вызывает увеличение  $k_{cat}$  соответственно в 3,5 и 2,5 раза на моно- и диметилованных пептидах H3-K27. Величина  $K_m$  SAM проявила минимальные изменения среди форм фермента, от  $403 \pm 64$  нМ до  $899 \pm 89$  нМ на субстрате, содержащем предпочтительное состояние метилирования в остатке H3-K27.

Таблица 6

Обобщение кинетики ферментов в стационарном состоянии  
для ферментов EZH2 WT и мутантных

Фермент	Статус метилирования H3-K27 пептидного субстрата	$K_{1/2}$ (нМ)	$k_{cat}$ ( $\text{ч}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_{1/2}$ ( $\text{ч}^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1} \times 10^{-4}$ )
*WT	0	$154 \pm 12$	$4.80 \pm 0.20$	$305 \pm 26$
	1	$337 \pm 26$	$3.33 \pm 0.21$	$99 \pm 9$
	2	$144 \pm 11$	$1.08 \pm 0.04$	$75 \pm 6$
A677G	0	$88 \pm 6$	$14.05 \pm 0.54$	$1590 \pm 120$
	1	$222 \pm 51$	$12.25 \pm 1.67$	$570 \pm 150$
	2	$522 \pm 117$	$23.85 \pm 3.60$	$450 \pm 120$
A687V	0	$43 \pm 3$	$1.58 \pm 0.08$	$370 \pm 30$
	1	$176 \pm 13$	$11.49 \pm 0.50$	$650 \pm 60$
	2	$352 \pm 155$	$2.70 \pm 0.65$	$80 \pm 40$

\*Данные относительно дикого типа были ранее опубликованы в работе Wigle et al., Febs Lett (2011) Oct 3;585(19):3011-4 с использованием 4-компонентной EZH2.

Пример 16 - Ингибирование EZH2 дикого типа и мутантов EZH2 ингибиторами EZH2

Тестируемые соединения серийно разбавляли в 3 раза в DMSO на 10-точечной кривой, и 1 мкг вносили в 384-луночный микропланшет в двух повторениях с использованием устройства Platemate Plus, оборудованного 384-канальной головкой (Thermo Scientific). Конечная верхняя концентрация тестируемых соединений в анализе составила 10 мкМ. Положительный контроль (стандарт ингибирования 100%) представлял собой SAM в конечной концентрации 1 мМ, а отрицательный контроль (стандарт ингибирования 0%) содержал 1 мкл DMSO. Затем тестируемые соединения инкубировали в течение 30 минут с 40 мкл на лунку EZH2 дикого типа (конечная концентрация составила 4 нМ), Y641F EZH2 (конечная концентрация составила 0,1 нМ) и A677G и A687V EZH2 (для каждого конечная концентрация составила 2 нМ) и пептидом в аналитическом буфере 1X (20 мМ BICINE pH=7,6, 1 мМ DTT, 0,002% Tween 20, 0,005% BSG). Для анализов EZH2 дикого типа и A677G EZH2 биотинилированный пептид H3:21-44 с неметилованным K27 присутствовал в конечной концентрации 200 нМ, в то время как при анализе A687V EZH2 биотинилированный пептид H3:21-44 с монометилованным K27 присутствовал в конечной концентрации 200 нМ, и при анализе Y641F EZH2 биотинилированный пептид H3:21-44 с диметилованным K27 присутствовал в конечной концентрации 200 нМ. Для инициации реакции, содержащей фермент EZH2 дикого типа, добавляли субстратную смесь из 10 мкл на лунку, которая содержала немеченый SAM (конечная концентрация составила 1800 нМ) и  $^3\text{H}$ -SAM (конечная концентрация составила 200 нМ) в аналитическом буфере 1X. Для инициации реакции, содержащей фермент Y641F EZH2, добавляли субстратную смесь из 10 мкл на

лунку, которая содержала немеченый SAM (конечная концентрация составила 700 нМ) и  $^3\text{H}$ -SAM (конечная концентрация составила 300 нМ) в аналитическом буфере 1X. Для инициации реакции, содержащей A677G или A687V EZH2, добавляли субстратную смесь из 10 мкл на лунку, которая содержала немеченый SAM (конечная концентрация составила 400 нМ) и  $^3\text{H}$ -SAM (конечная концентрация составила 100 нМ). Реакции протекали в течение 90 мин, затем их гасили избытком немеченого SAM (167 мкМ), затем реакционные смеси переносили в покрытый стрептавидином флэш-планшет (PerkinElmer, каталожный номер SMP410), давали возможность связаться в течение одного часа и выявляли на приборе TopCount NXT HTS (PerkinElmer). Величины  $\text{IC}_{50}$  получали по 4-параметрическим подгонкам % ингибирования активности фермента, и они представлены в таблице 7. Формулы, использованные для выведения величин  $\text{IC}_{50}$ , указаны ниже.

Расчет % ингибирования

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

где dpm = разрушений в минуту, cmpd = сигнал в аналитической лунке, и min и max представляют соответственно минимальный и максимальный контроли сигналов.

4-параметрическая подгонка  $\text{IC}_{50}$

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{\left(1 + \left(\frac{X}{\text{IC}_{50}}\right)^{\text{Hill Coefficient}}\right)} ,$$

где обычно допускается плавающая запятая верхней и нижней величины, но они могут быть фиксированными на уровне 100 или 0, соответственно, при 3-параметрической подгонке. Обычно допускается плавающая запятая в коэффициенте Хилла, но он также может быть фиксирован на уровне 1 при 3-параметрической подгонке. Y представляет собой % ингибирования, и X представляет собой концентрацию соединения.

Таблица 7

Ингибирование EZH2 дикого типа и мутантной EZH2  
ингибиторами EZH2

Номер соединения	Ингибитор EZH2	WT (мкМ)	Y641F (мкМ)	A677G (мкМ)	A687V (мкМ)
1.	SAH	6.9082	16.6193	6.2379	5.9034
2.	EPZ004710	2.9758	3.7887	0.3187	0.5378
3.	EPZ004744	1.5203	0.7432	0.1128	0.1354
4.	EPZ005030	0.2600	0.1846	0.0418	0.0504
5.	EPZ005100	0.3579	0.2923	0.0316	0.0599
6.	EPZ005260	2.3755	1.5781	0.2130	0.3189
7.	EPZ005687	0.0950	0.0750	0.0113	0.0082
8.	EPZ006089	0.2300	0.3110	0.0190	0.0277
9.	EPZ006438	0.0062	0.0111	0.0022	0.0015
10.	EPZ006632	0.0025	0.0034	0.0040	0.0032
11.	EPZ007038	0.0099	0.0123	0.0060	0.0032
12.	EPZ007209	0.0065	0.0074	0.0086	0.0068
13.	EPZ007210	0.0043	0.0044	0.0038	0.0036
14.	EPZ007227	0.0143	0.0207	0.0122	0.0128
15.	EPZ007426	0.0181	0.0088	0.0034	0.0040
16.	EPZ007428	0.0014	0.0055	0.0019	0.0021
17.	EPZ007478	0.0088	0.0114	0.0042	0.0071
18.	EPZ007648	0.0025	0.0079	0.0058	0.0067

Номер соединения	Ингибитор EZH2	WT (мкМ)	Y641F (мкМ)	A677G (мкМ)	A687V (мкМ)
19.	EPZ007649	0.0094	0.0092	0.0096	0.0082
20.	EPZ007655	0.0125	0.0104	0.0192	0.0171
21.	EPZ007692	0.0100	0.0117	0.0116	0.0103
22.	EPZ007789	0.0108	0.0114	0.0048	0.0051
23.	EPZ007790	0.0169	0.0158	0.0073	0.0065
24.	EPZ008205	0.0129	0.0093	0.0112	0.0101
25.	EPZ008277	0.0333	0.0092	0.0023	0.0055
26.	EPZ008278	0.0384	0.0106	0.0093	0.0191
27.	EPZ008279	0.0223	0.0182	0.0022	0.0051
28.	EPZ008280	0.0067	0.0029	0.0028	0.0039
29.	EPZ008286	0.0043	0.0025	0.0015	0.0018
30.	EPZ008335	0.0065	0.0033	0.0015	0.0029
31.	EPZ008336	0.0057	0.0036	0.0013	0.0024
32.	EPZ008337	0.0087	0.0015	0.0008	0.0014
33.	EPZ008338	0.0120	0.0096	0.0031	0.0072
34.	EPZ008344	0.0124	0.0036	0.0016	0.0046
35.	EPZ008491	0.0091	0.0014	0.0029	0.0029
36.	EPZ008493	0.1320		0.0127	0.0882
37.	EPZ008494	0.0079	0.0046	0.0028	0.0038
38.	EPZ008495	0.0134	0.0104	0.0063	0.0084
39.	EPZ008496	0.0154	0.0104	0.0040	0.0076
40.	EPZ008497	> 10.0 μM	3.2876	0.9735	1.2184
41.	EPZ008592	0.0145	0.0051	0.0035	0.0075
42.	EPZ008623	0.2440	0.1835	0.0922	0.1067
43.	EPZ008630	0.0034	0.0029	0.0035	0.0032
44.	EPZ008681	0.0029	0.0015	0.0027	0.0047
45.	EPZ008686	0.0073	0.0055	0.0045	0.0096

Номер соединения	Ингибитор EZH2	WT (мкМ)	Y641F (мкМ)	A677G (мкМ)	A687V (мкМ)
46.	EPZ008989	0.0094	0.0069	0.0022	0.0028
47.	EPZ008990	0.0061	0.0067	0.0016	0.0017
48.	EPZ008991	0.0348	0.0293	0.0094	0.0193
49.	EPZ008992	0.3333	0.1678	0.0638	0.1188
50.	EPZ008994	0.0715	0.0275	0.0121	0.0205
51.	EPZ009090	0.0300	0.0111	0.0120	0.0227
52.	EPZ009097	0.0047	0.0039	0.0046	0.0036
53.	EPZ009099	0.0765	0.0255	0.0057	0.0222
54.	EPZ009152	0.0030	0.0031	0.0029	0.0033
55.	EPZ009153	0.0052	0.0032	0.0056	0.0037
56.	EPZ009154	0.0278	0.0420	0.0141	0.0438
57.	EPZ009155	0.0563	0.0524	0.0251	0.0623
58.	EPZ009156	0.0034	0.0217	0.0051	0.0132
59.	EPZ009157	0.0397	0.0443	0.0214	0.0436
60.	EPZ009158	0.0021	0.0016	0.0027	0.0027
61.	EPZ009161	0.0009		0.0008	0.0011
62.	EPZ009162	0.0657	0.0351	0.0146	0.0178

Пример 17 – Мутант A677 демонстрирует самую высокую чувствительность к ингибиторам EZH2

Клетки Pfeiffer получали из ATCC (CRL-2632). Клетки WSU-DLCL2 (ACC 575) и OCI-Lyl9 (ACC 528) получали из DSMZ. Все клетки поддерживали в среде RPMI+10% FBS. Для анализа пролиферации клеток, экспоненциально растущие клетки Pfeiffer, WSU-DLC2 или OCI-Lyl9 высевали в трех повторениях в 96-луночные планшеты при плотности  $1 \times 10^5$  клеток/мл,  $5 \times 10^4$  клеток/мл или  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл (соответственно) в конечном объеме 150 мкл. Клетки инкубировали с соединением №7 в конечных концентрациях в диапазоне от 0,011 до 25 мкМ для определения IC<sub>50</sub> в течение 11-дневного периода времени. Клетки инкубировали с соединением №13 в конечных концентрациях в диапазоне от 0,00004 до 10 мкМ для определения IC<sub>50</sub> в течение 11-дневного периода времени. Каждые 3-4 дня числа жизнеспособных клеток определяли, используя анализ Guava Viacount (Millipore #4000-0040), и анализировали на приборе Guava EasyCyte Plus. После подсчета клеток ростовую среду и ингибитор EPZ2 (соединение №7 или соединение №13) заменяли, и клетки снова разделяли до первоначальной плотности при высевании. Корректированное по разделению конечное число жизнеспособных клеток/мл с 11-го дня периода действия ингибитора использовали для расчета величин IC<sub>50</sub> пролиферации, применяя программное обеспечение Graphpad

Prism.

Показано, что линия клеток Pfeiffer, содержащих гетерозиготную мутацию A677G EZH2, чувствительна к ингибированию EZH2 мелкомолекулярным ингибитором соединением №7. Ингибирование пролиферации наблюдается уже через 96 часов после обработки ингибитором. IC<sub>50</sub> пролиферации после 11 дней для клеток Pfeiffer, обработанных соединением №7, составляет 5,2 нМ, по сравнению с клетками WSU-DLCL2, которые содержат гетерозиготную мутацию Y641F и имеют IC<sub>50</sub> 270 нМ, или клетками OCI-Ly19, которые являются клетками WT в отношении EZH2, и имеют IC<sub>50</sub> 3000 нМ. Эти результаты показывают, что в клеточном контексте чувствительность WT и мутантной EZH2 к ингибированию мелкомолекулярным ингибитором может быть представлена как A677G>>>Y641F>>WT, по данным измерения пролиферацией.

Продemonстрировано, что линия клеток Pfeiffer, содержащих гетерозиготную мутацию A677G EZH2, чувствительна к ингибированию EZH2 мелкомолекулярным ингибитором соединением №13. Ингибирование пролиферации наблюдается уже через 96 часов после обработки ингибитором. IC<sub>50</sub> пролиферации после 11 дней для клеток Pfeiffer, обработанных соединением №13, составляет 0,4 нМ, по сравнению с клетками WSU-DLCL2, которые содержат гетерозиготную мутацию Y641F и имеют IC<sub>50</sub> 4,9 нМ, или клетками OCI-Ly19, которые являются WT в отношении EZH2 и имеют IC<sub>50</sub> 430 нМ. Эти результаты демонстрируют, что в клеточном контексте, чувствительность WT и мутантной EZH2 к ингибированию мелкомолекулярным ингибитором может быть представлена как A677G>>>Y641F>>WT, по данным измерения пролиферацией.

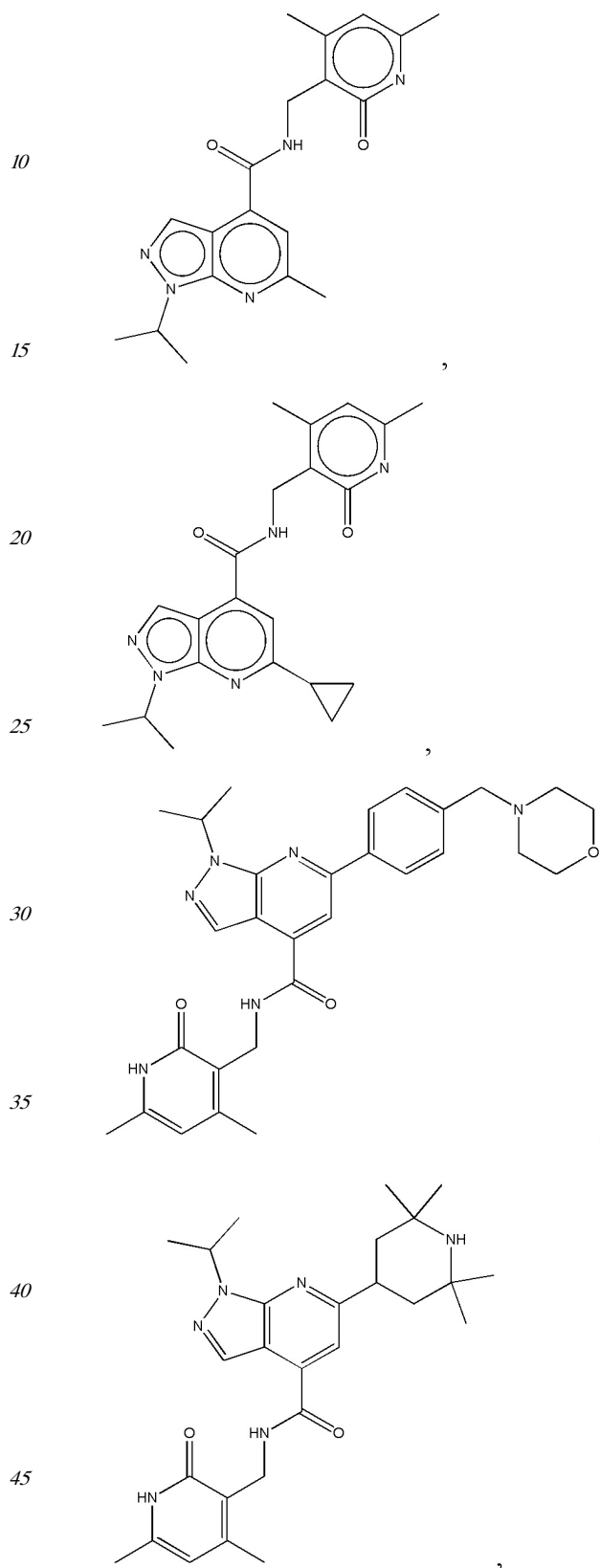
#### ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя здесь были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, средние специалисты в данной области смогут легко предусмотреть разнообразные другие средства и/или структуры для выполнения функций и/или получения результатов и/или одного или нескольких из описанных здесь преимуществ, и считается, что каждый из таких вариантов и/или модификаций входит в пределы объема настоящего изобретения. В более общем смысле, специалистам в данной области вполне понятно, что все описанные здесь параметры, размеры, материалы и конфигурации предназначены для иллюстрации, и что действительные параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от определенного применения или применений, для которых используются положения настоящего изобретения. Специалистам в данной области будет понятно или они смогут установить с использованием не более чем обычного экспериментирования многие эквиваленты определенных вариантов осуществления описанного здесь изобретения. Поэтому следует понимать, что описанные выше варианты осуществления представлены только в виде примера, и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов изобретение может на практике выполняться иным образом, отличным от конкретно описанного и заявленного. Настоящее изобретение направлено на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанный здесь. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несогласованными, включена в пределы объема настоящего изобретения.

#### (57) Формула изобретения

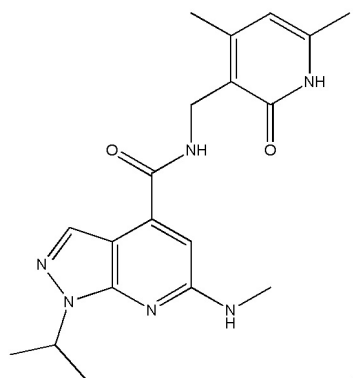
1. Способ лечения рака, экспрессирующего мутантную EZH2, содержащую

аминокислотную мутацию в домене субстратного кармана, как определено в SEQ ID NO:6, у индивида, включающий введение индивиду, имеющему рак, экспрессирующий мутантную EZH2, где мутантная EZH2 содержит мутацию замещения в аминокислотном положении 677 или 687 SEQ ID NO:1, терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2, где ингибитор EZH2 выбирают из:





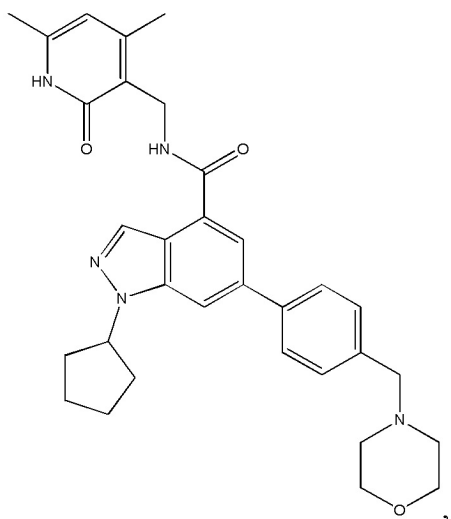
5



10

,

15

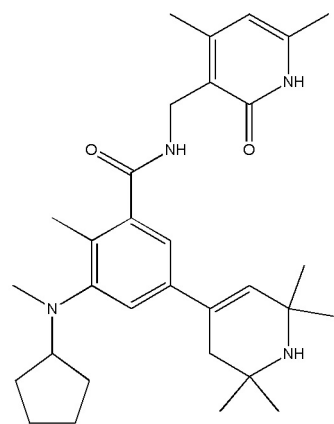


20

,

25

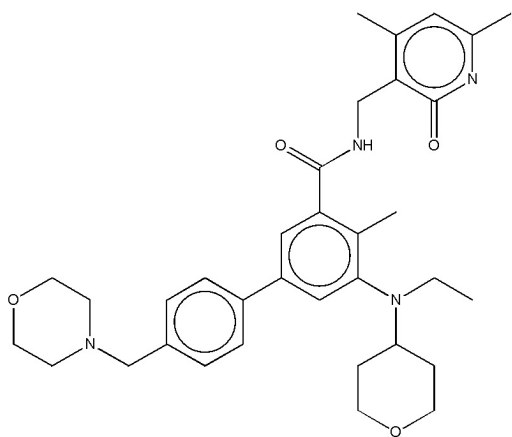
30



35

,

40



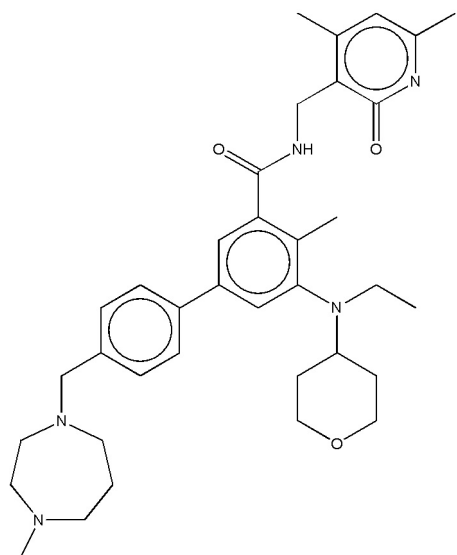
45

,

5

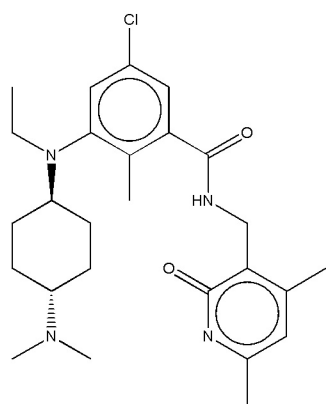
10

15



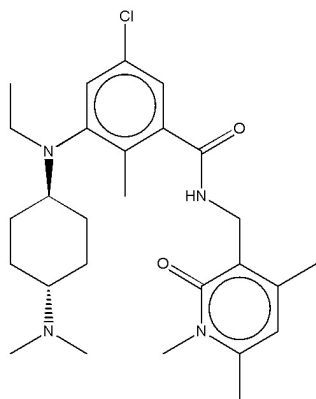
20

25



30

35



40

45

5

10

15

20

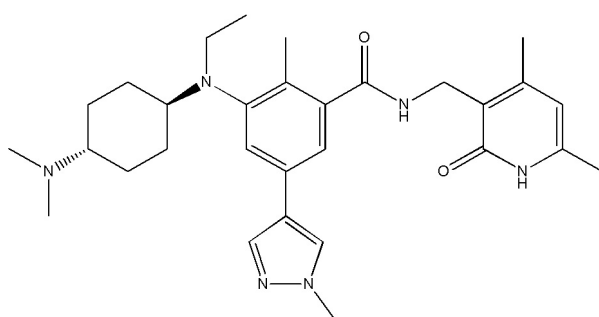
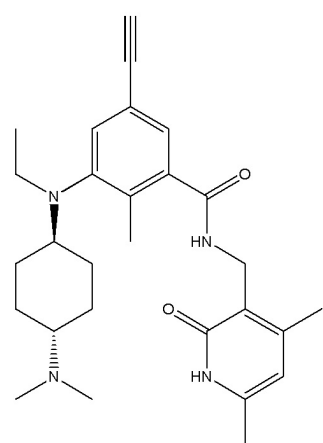
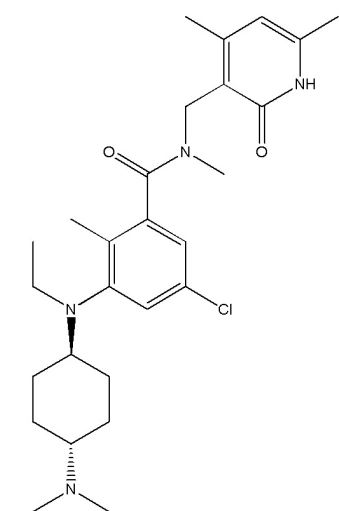
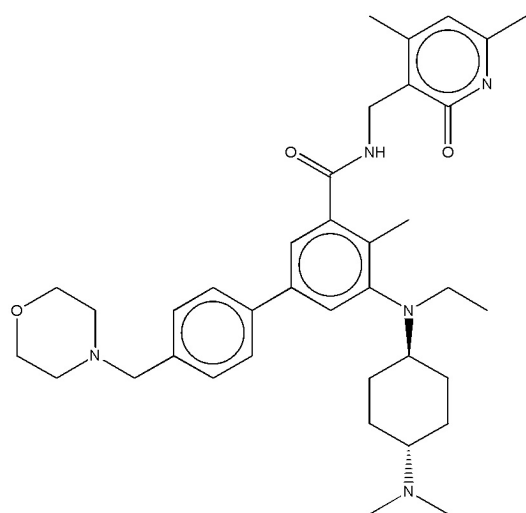
25

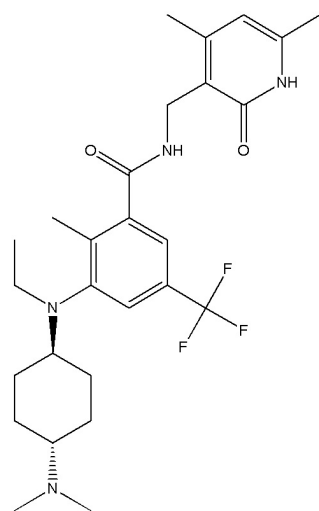
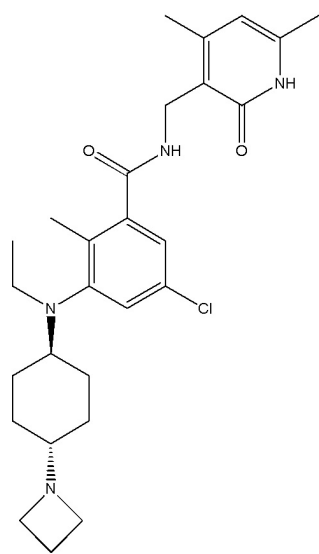
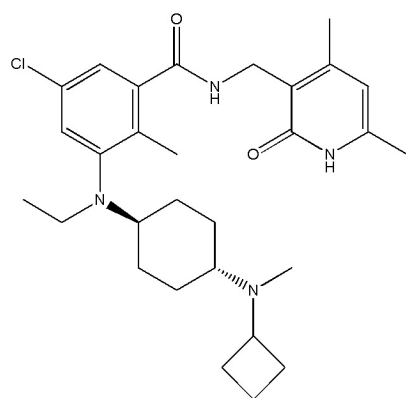
30

35

40

45





5

10

15

20

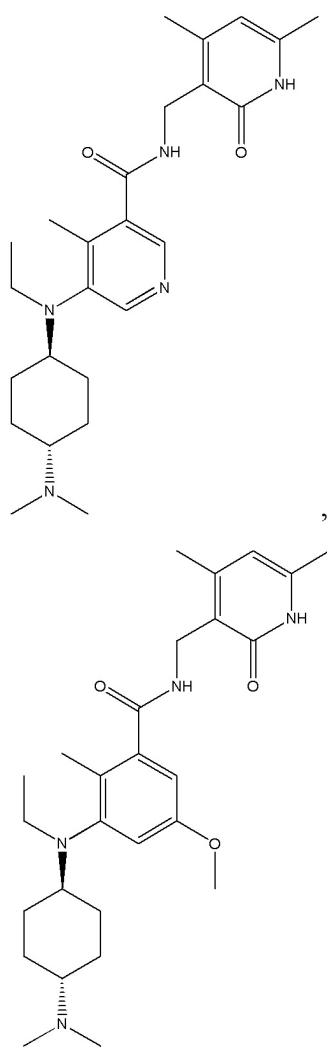
25

30

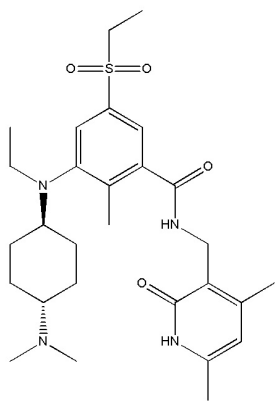
35

40

45

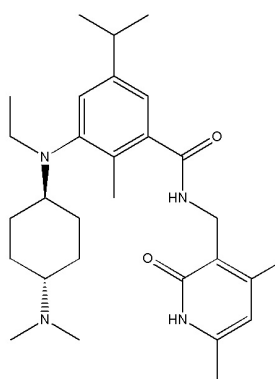


5



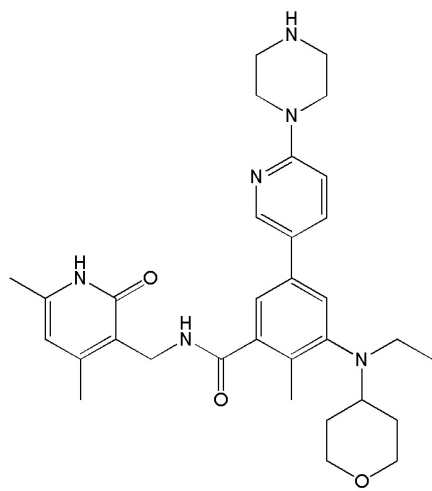
10

15



20

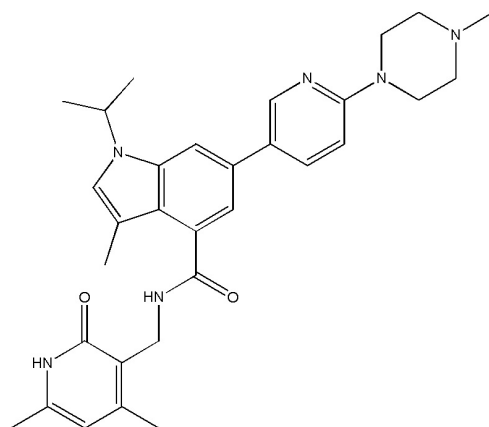
25



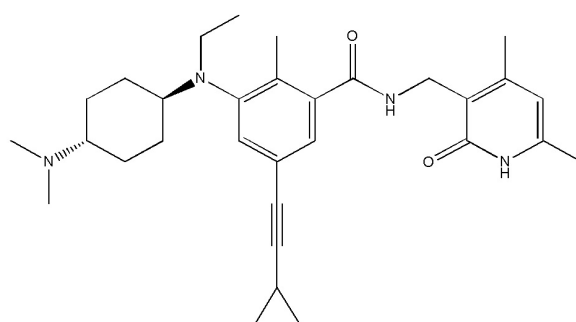
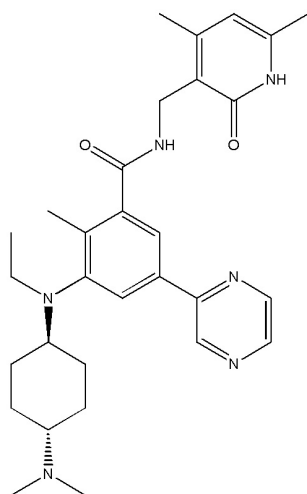
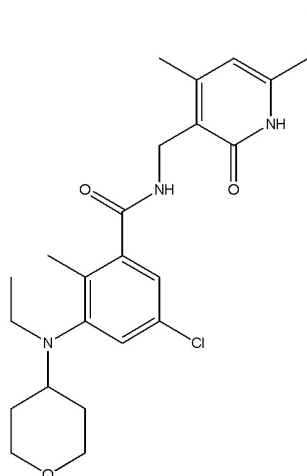
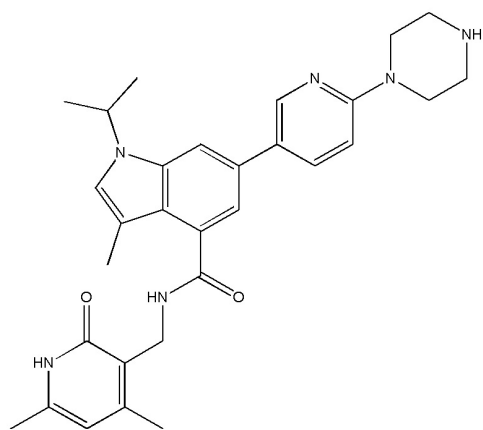
30

35

40



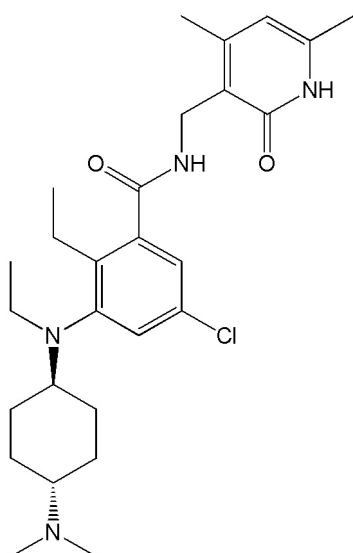
45



5

10

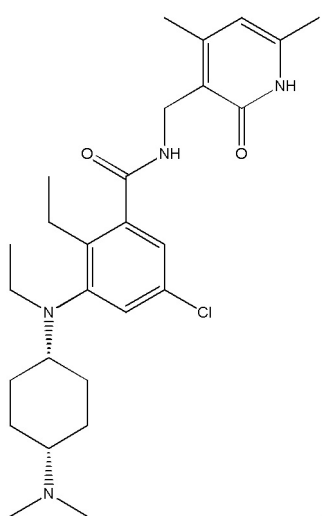
15



20

25

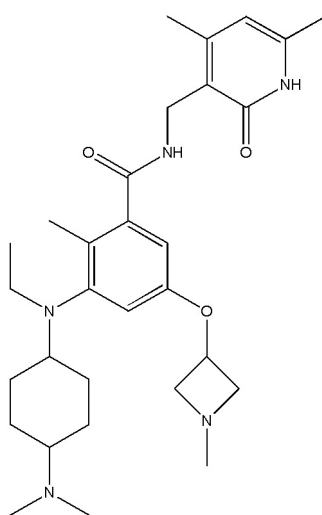
30



35

40

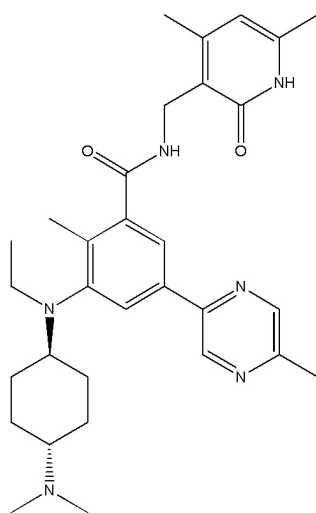
45





5

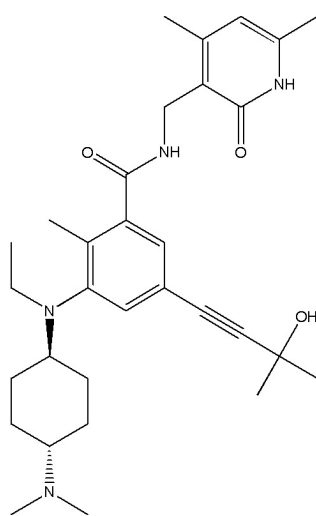
10



15

20

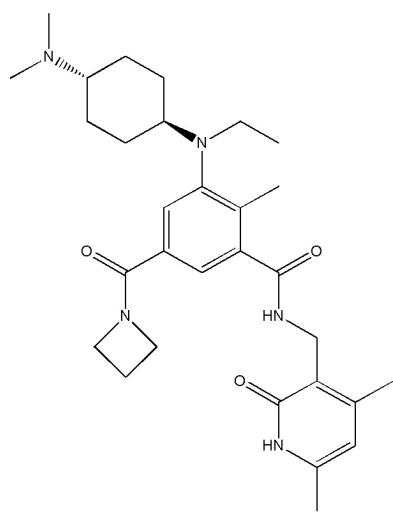
25



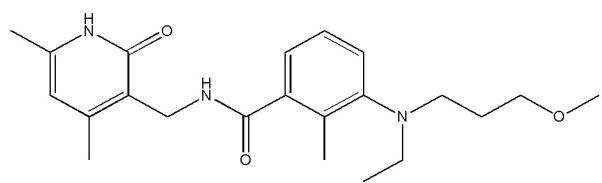
30

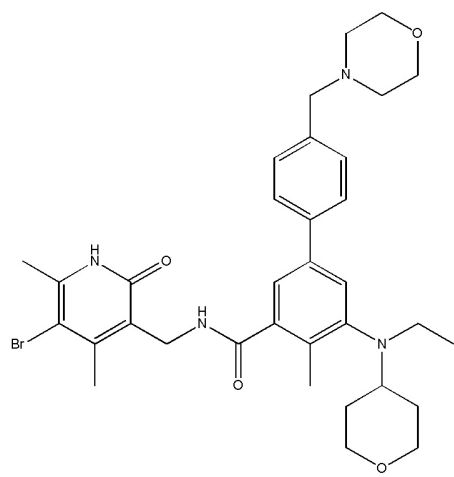
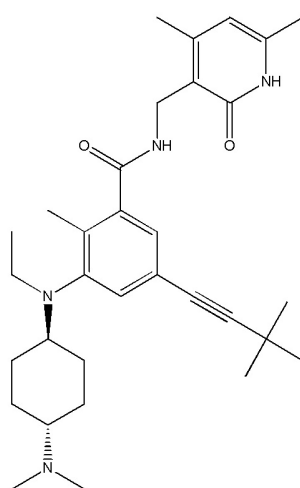
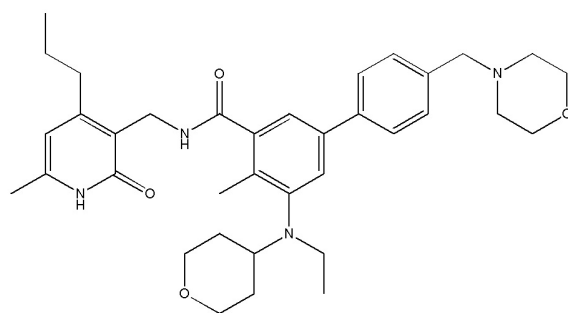
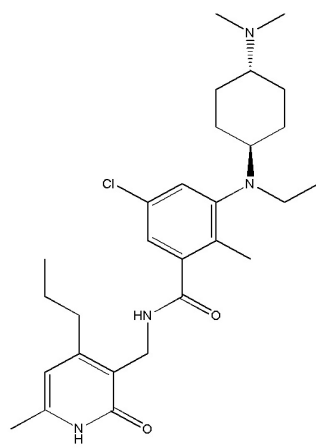
35

40



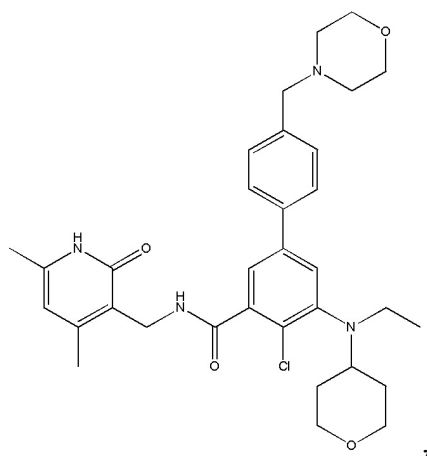
45





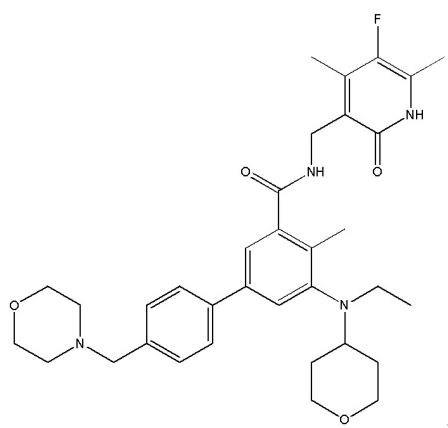
5

10



15

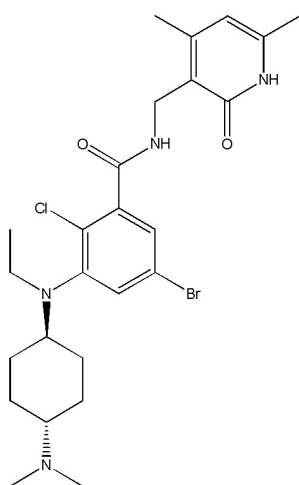
20



25

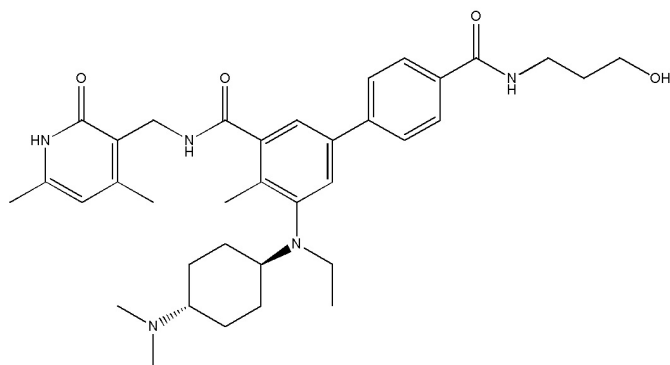
30

35



40

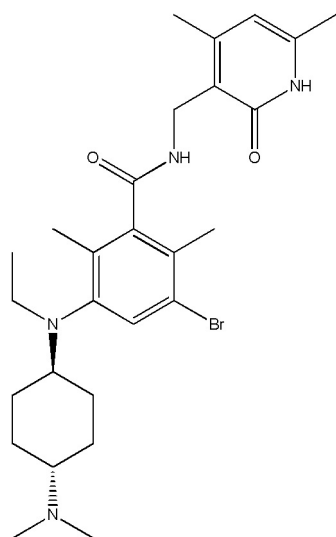
45



5

10

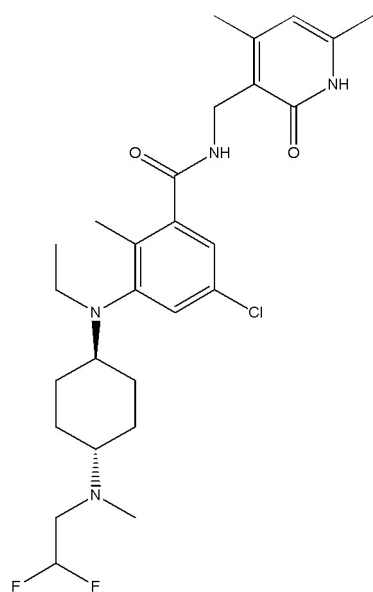
15



20

25

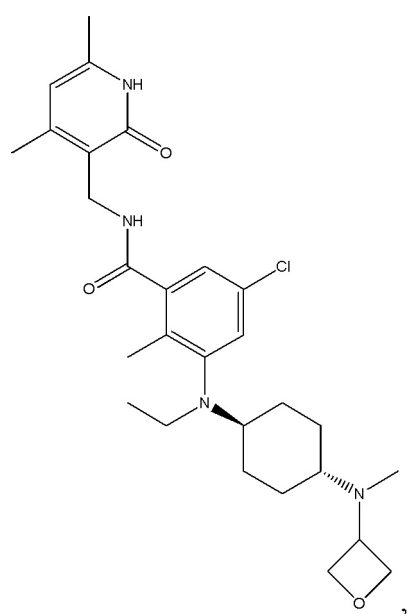
30



35

40

45



5

10

15

20

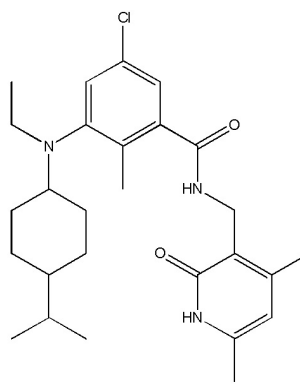
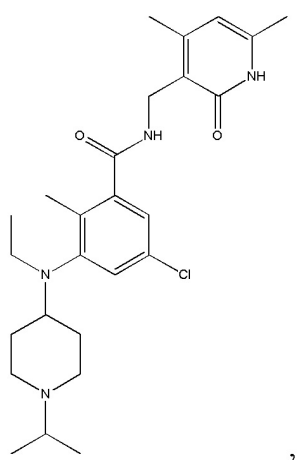
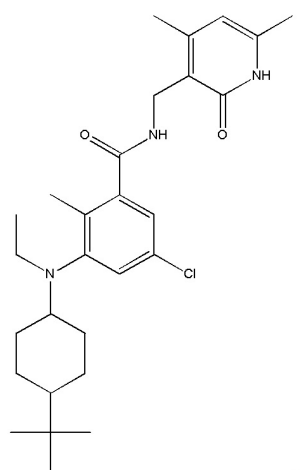
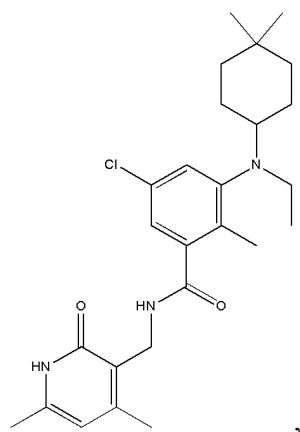
25

30

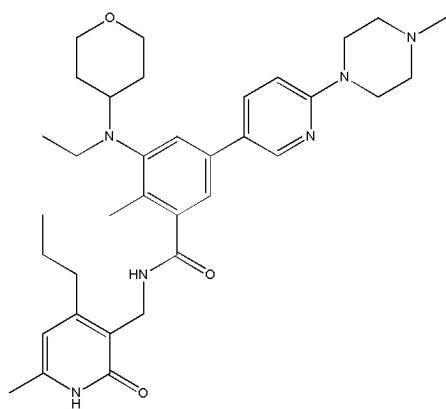
35

40

45



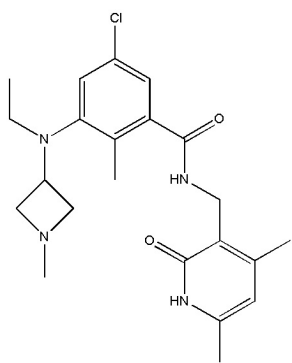
5



10

,

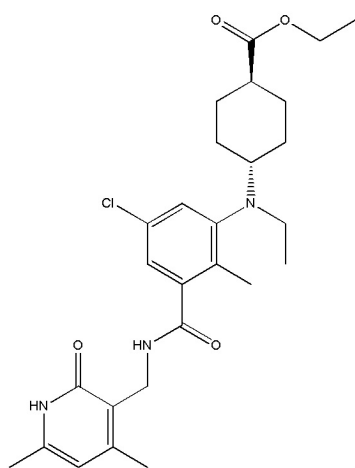
15



20

,

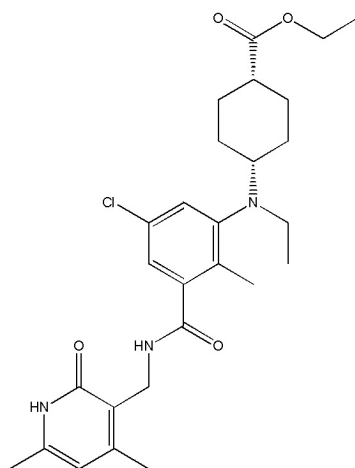
25



30

,

35

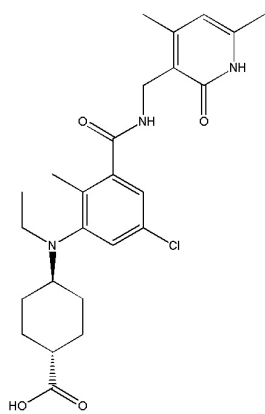


40

45

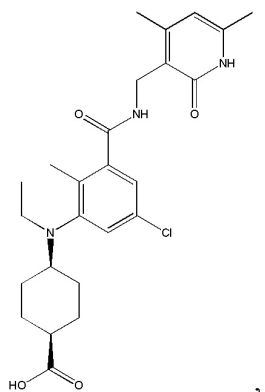
,

5



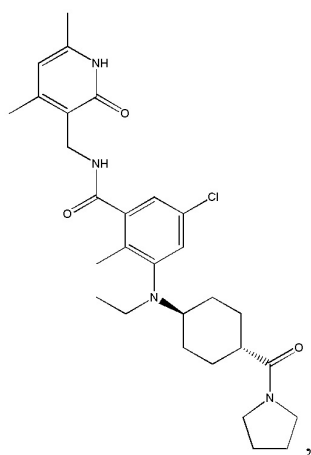
10

15



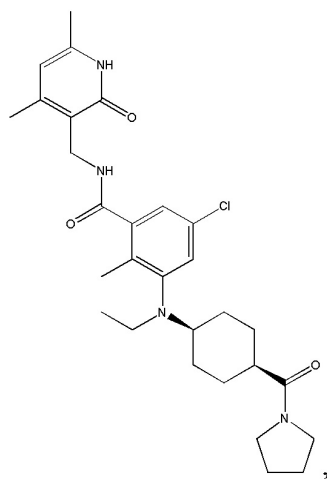
20

25



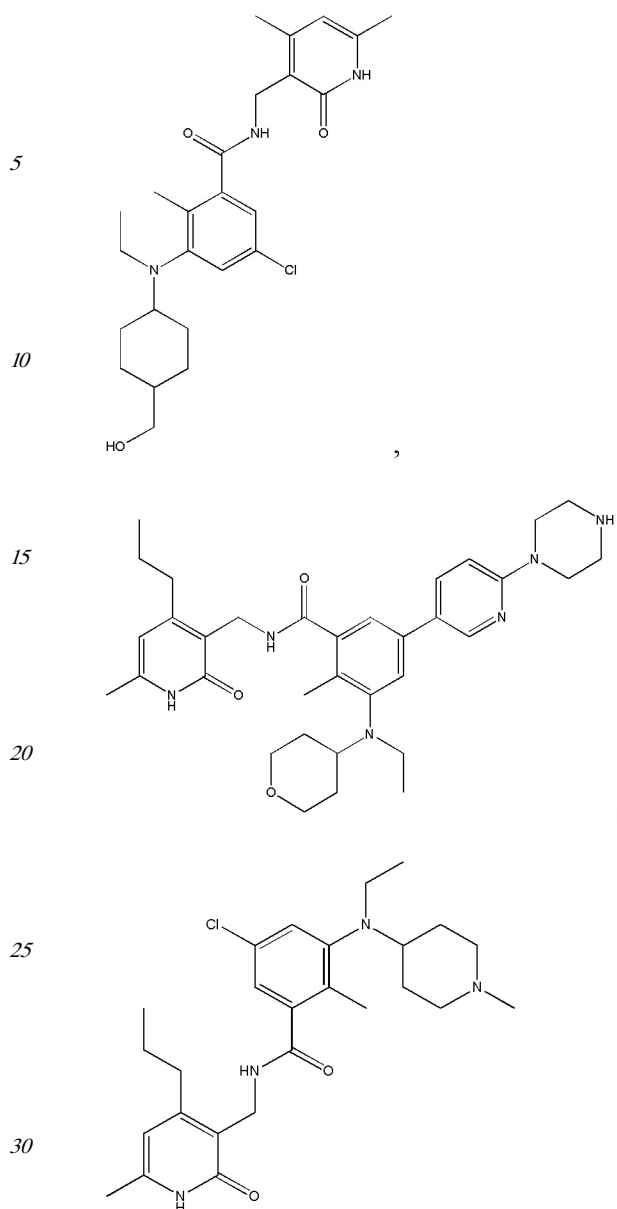
30

35



40

45



или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п. 1, где мутантная EZH2 представляет собой полипептид мутантной EZH2 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид мутантной EZH2.

3. Способ по п. 1, где рак представляет собой лимфому, лейкоз или меланому.

4. Способ по п. 3, где лимфома выбрана из группы, состоящей из неходжкинской лимфомы, фолликулярной лимфомы и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы.

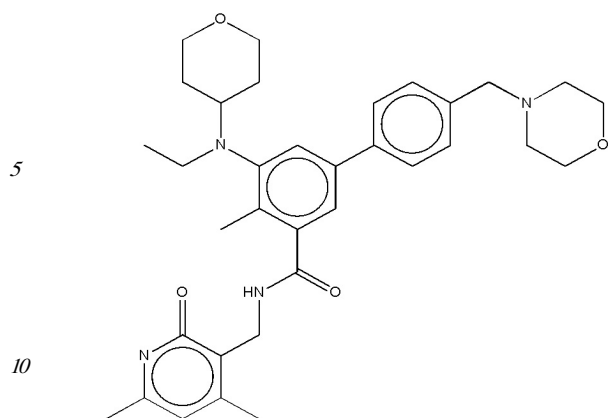
5. Способ по п. 3, где лейкоз представляет собой хронический миелогенный лейкоз (CML).

6. Способ по п. 1, где указанная мутация представляет собой замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G).

7. Способ по п. 1, где указанная мутация представляет собой замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V).

8. Способ по п. 1, где ингибитор EZH2 представляет собой





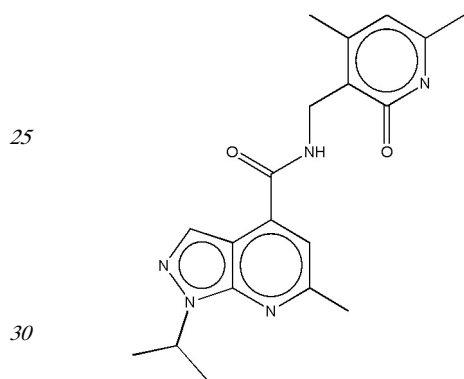
или его фармацевтически приемлемую соль.

9. Способ определения способности к ответу на лечение ингибитором EZH2 у индивида, имеющего рак, включающий

а) получение образца у индивида; и

б) выявление аминокислотной мутации EZH2 в образце, где указанная мутация содержит мутацию замещения в аминокислотном положении 677 или 687 SEQ ID NO: 1, где присутствие указанной мутации указывает на то, что индивид отвечает на лечение ингибитором EZH2,

где ингибитор EZH2 выбирают из

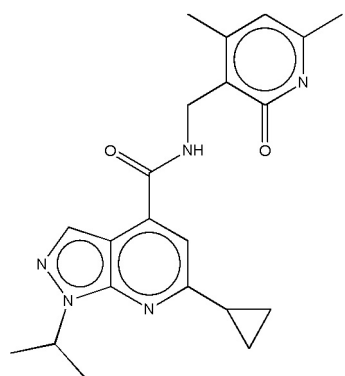


35

40

45

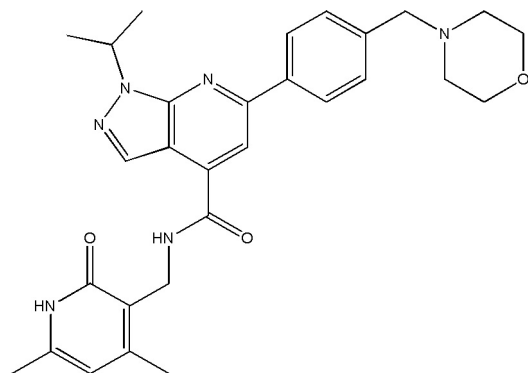
5



10

,

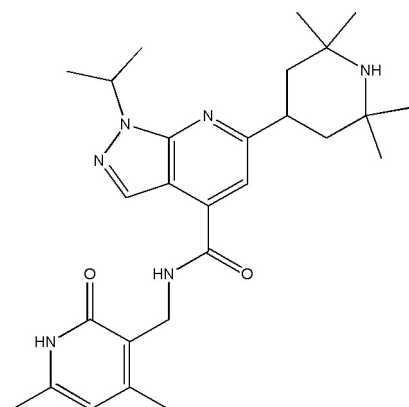
15



20

,

25

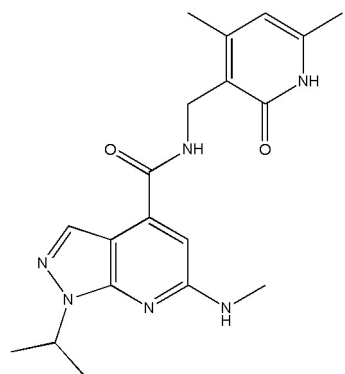


30

,

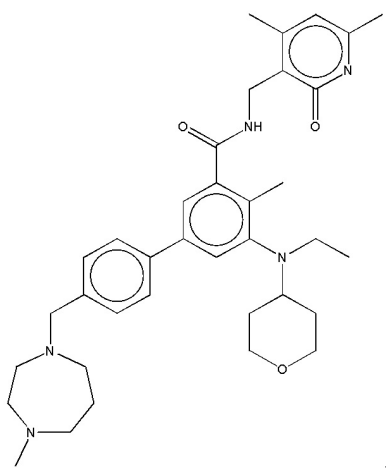
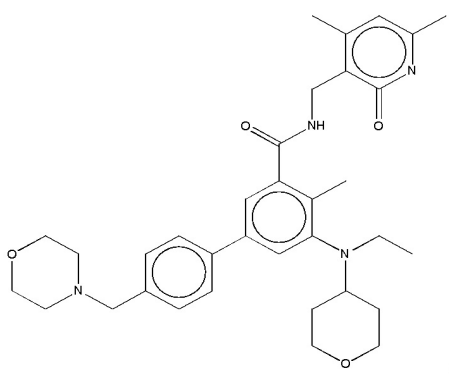
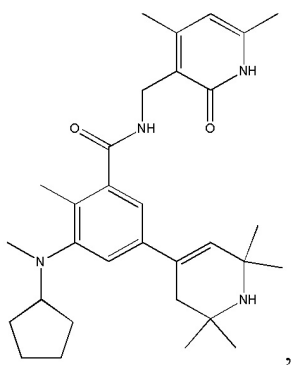
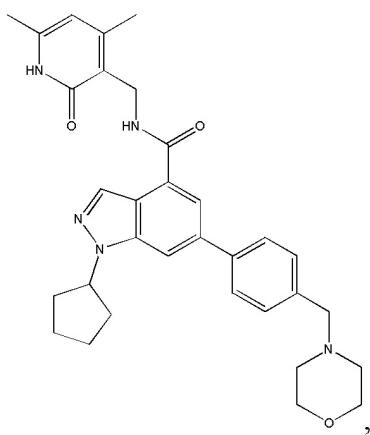
35

40

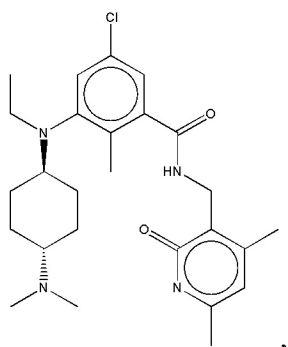


45

,

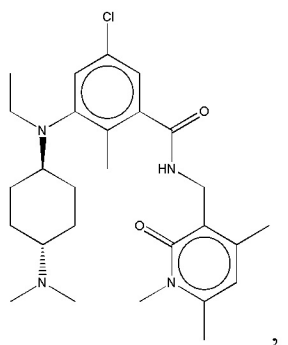


5



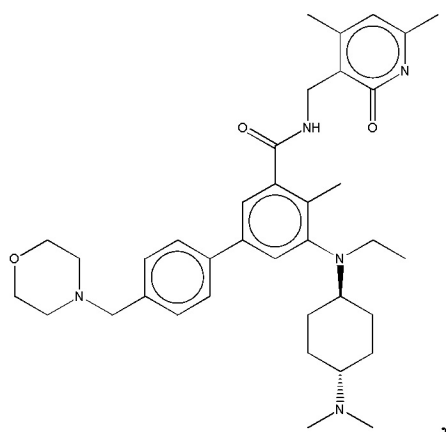
10

15



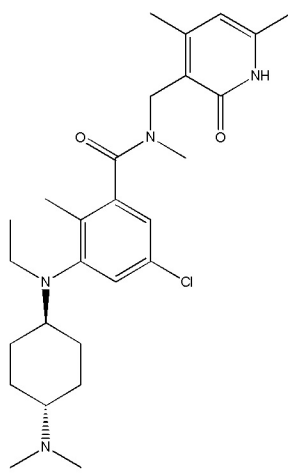
20

25



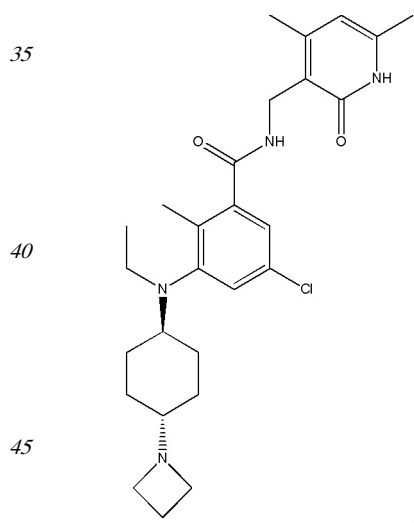
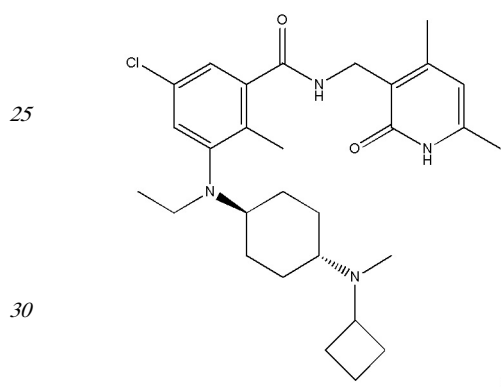
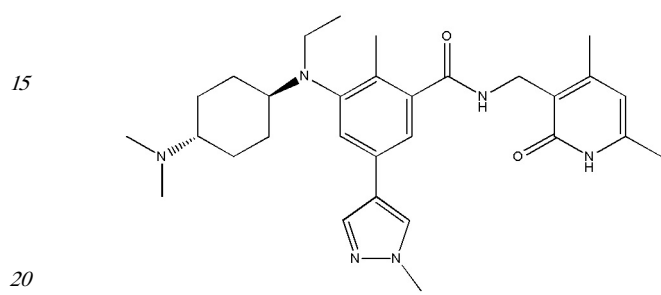
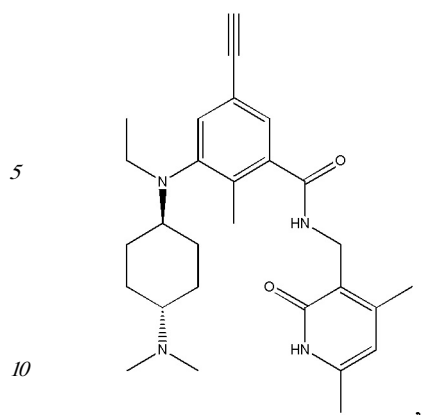
30

35



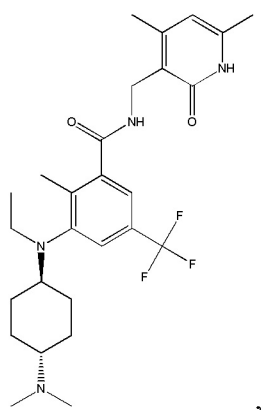
40

45



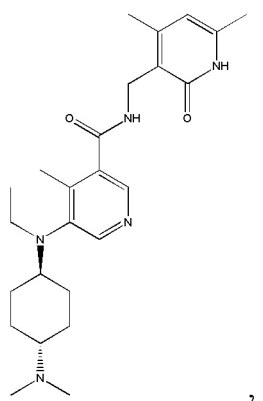
5

10



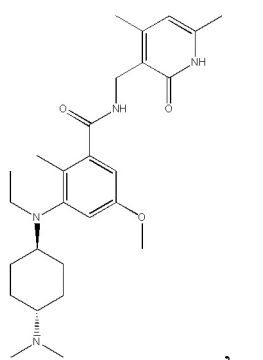
15

20



25

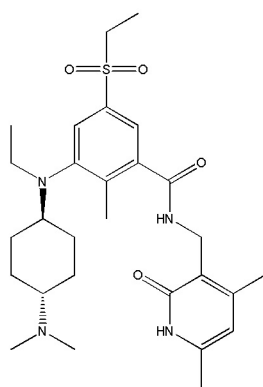
30



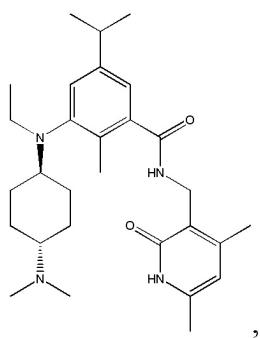
35

40

45

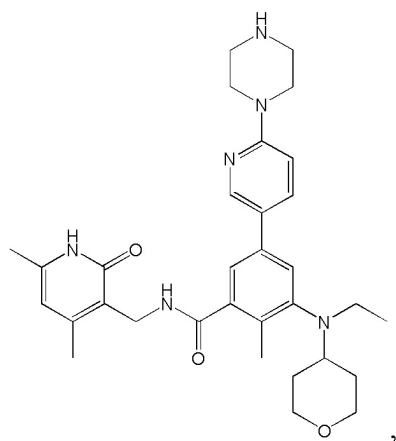


5



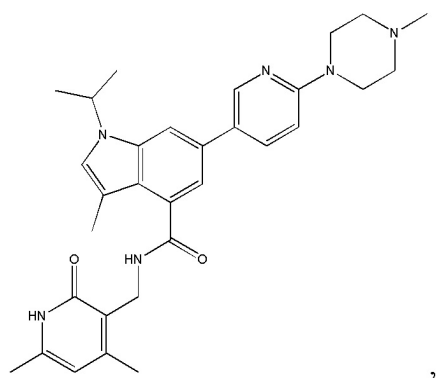
10

15



20

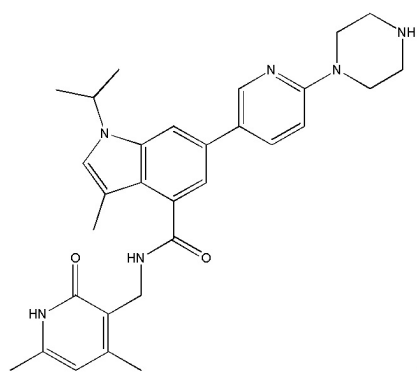
25



30

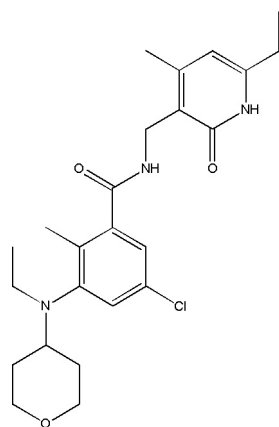
35

40



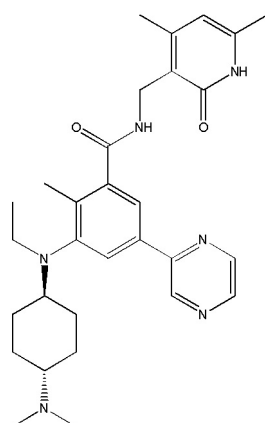
45

5



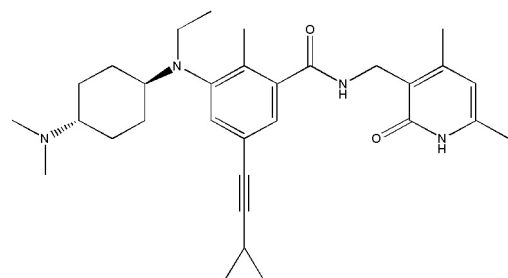
10

15



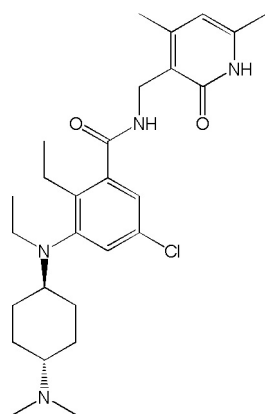
20

25



30

35

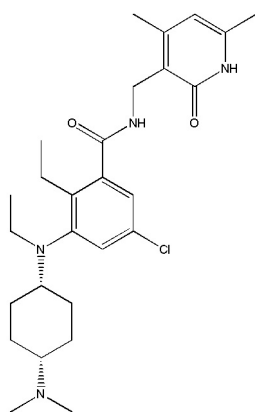


40

45

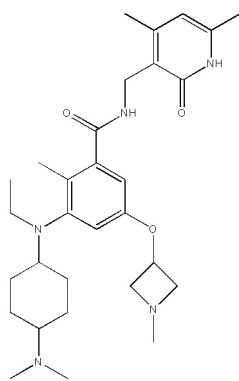


5



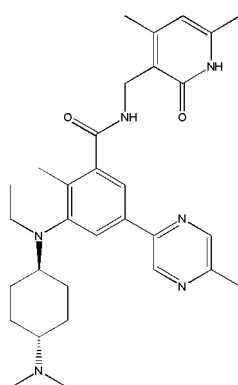
10

15



20

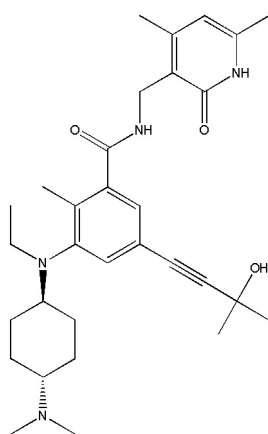
25



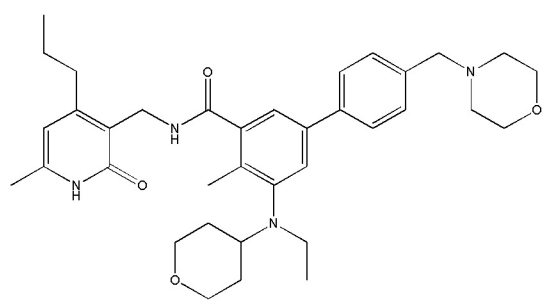
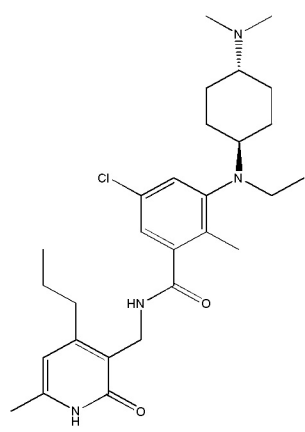
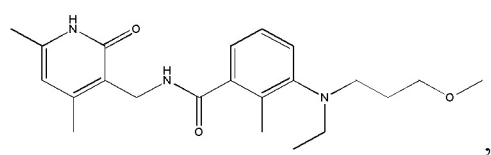
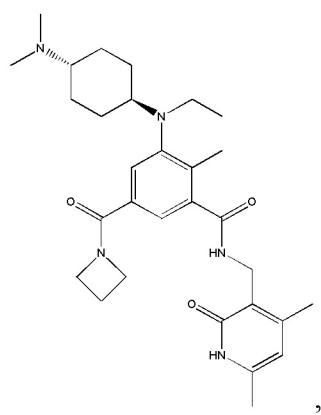
30

35

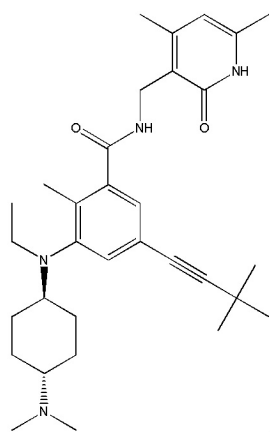
40



45

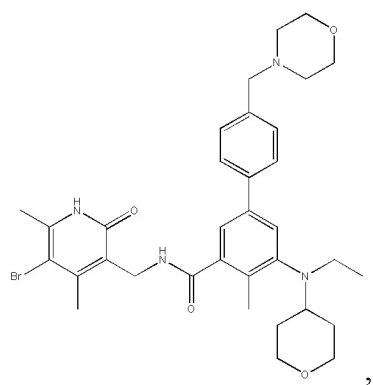


5



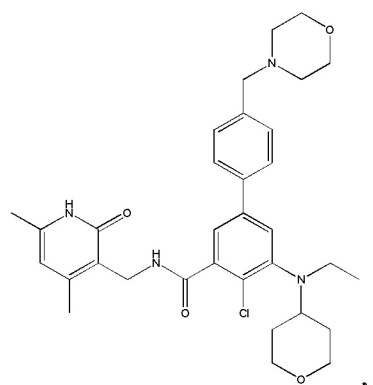
10

15



20

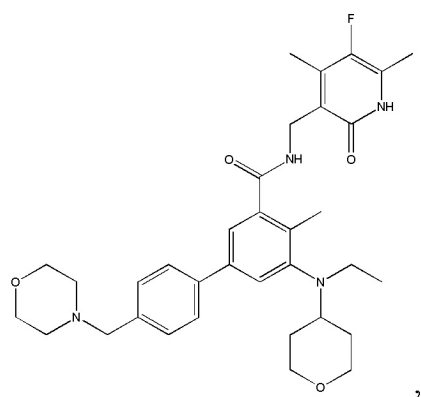
25



30

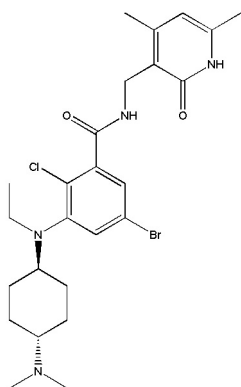
35

40



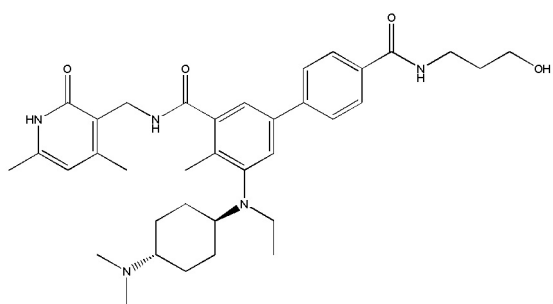
45

5



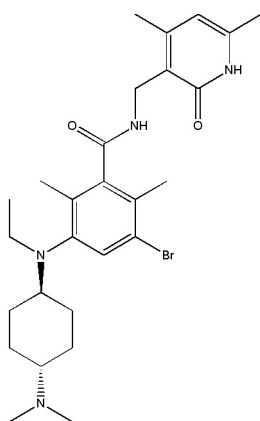
10

15



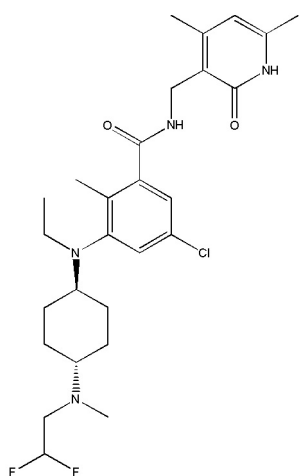
20

25



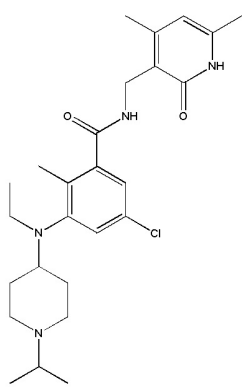
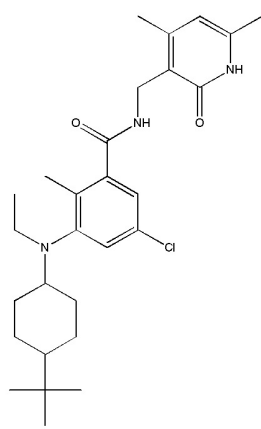
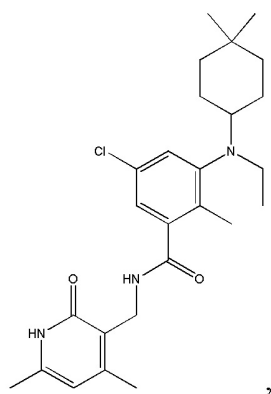
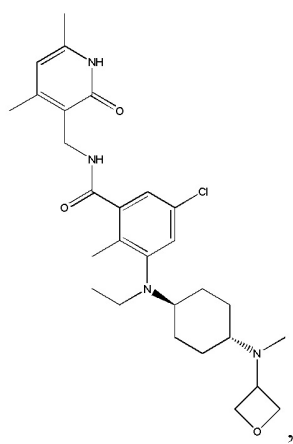
30

35

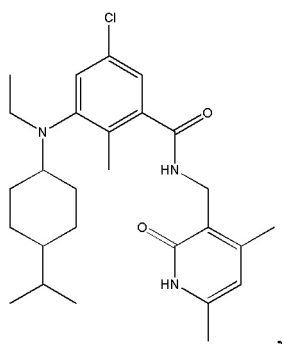


40

45

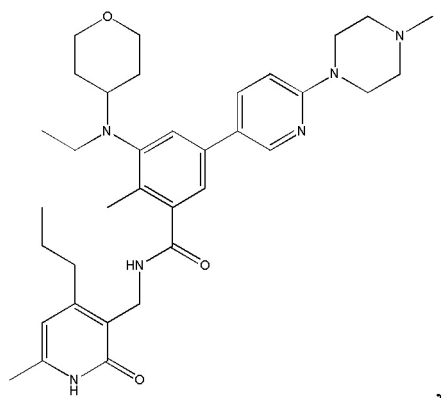


5



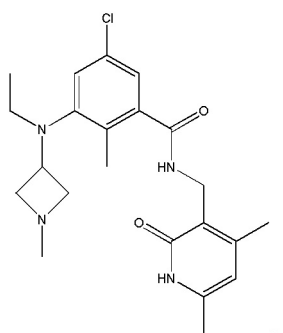
10

15



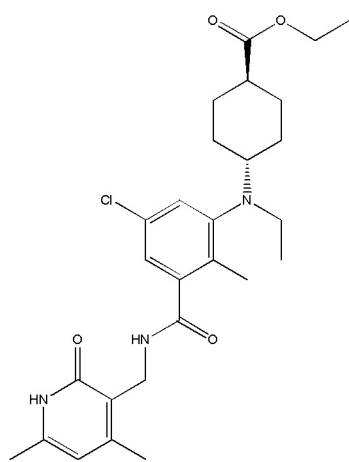
20

25



30

35

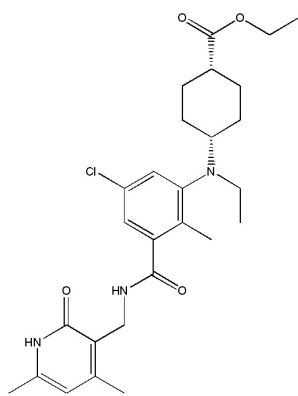


40

45

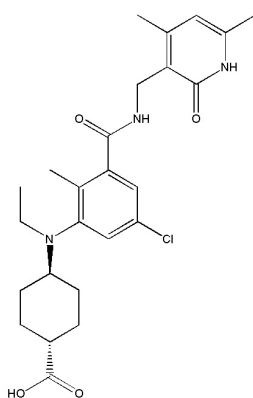
5

10



15

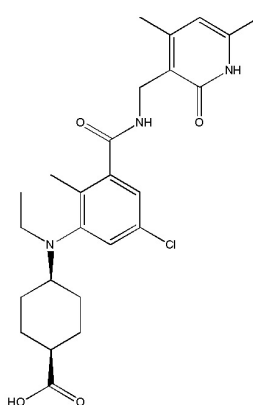
20



25

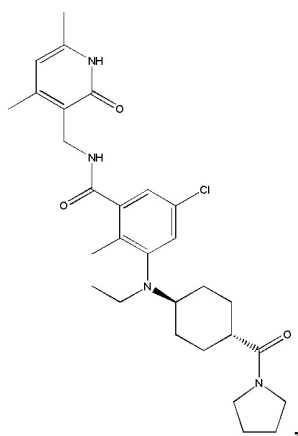
30

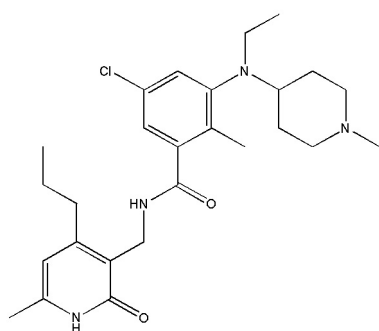
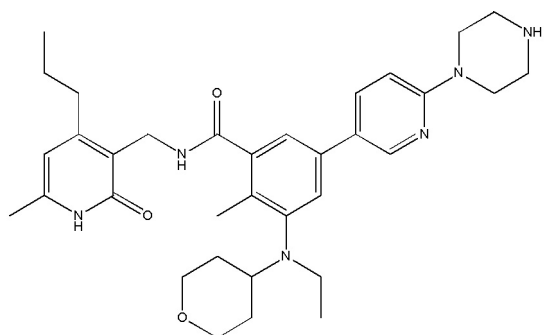
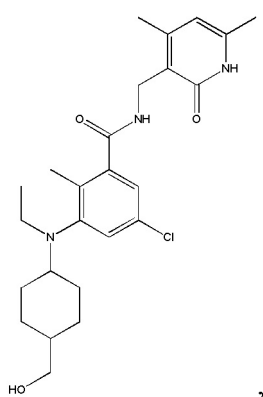
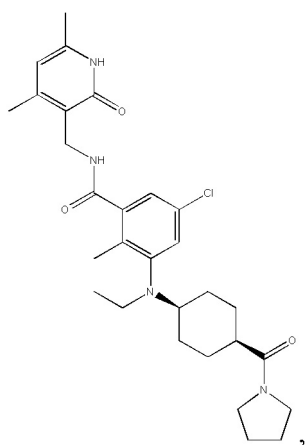
35



40

45





или его фармацевтически приемлемой соли.

10. Способ по п. 9, где рак представляет собой лимфому, лейкоз или меланому.

11. Способ по п. 10, где лимфома выбрана из группы, состоящей из неходжкинской лимфомы, фолликулярной лимфомы и диффузной крупноклеточной В-клеточной



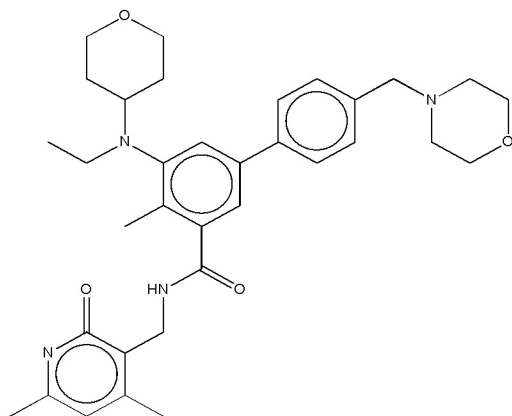
лимфомы.

12. Способ по п. 10, где лейкоз представляет собой хронический миелогенный лейкоз (CML).

13. Способ по п. 9, где указанная мутация представляет собой замещение глицином (G) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 677 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A677G).

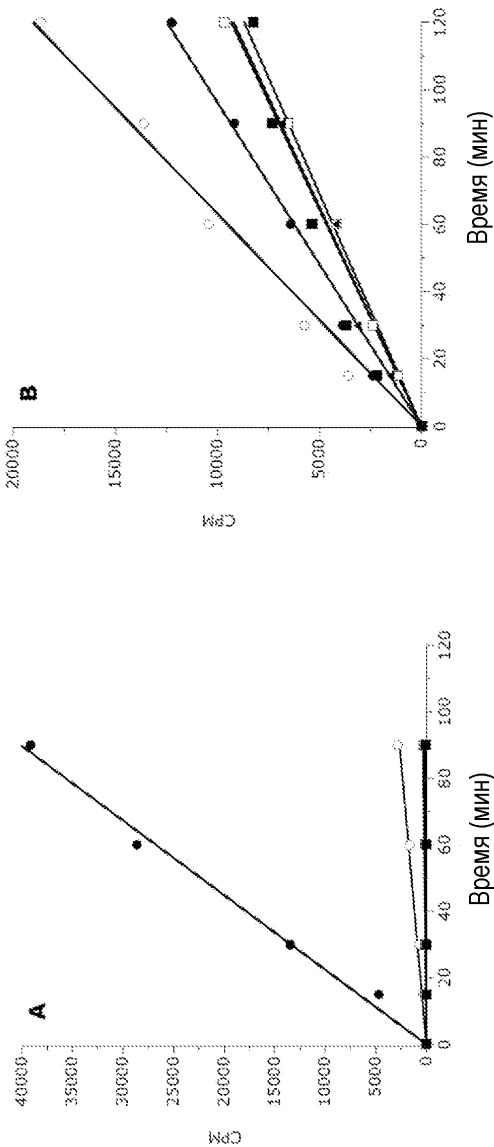
14. Способ по п. 9, где указанная мутация представляет собой замещение валином (V) остатка дикого типа аланина (A) в аминокислотном положении 687 последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 (A687V).

15. Способ по п. 9, где ингибитор EZH2 представляет собой

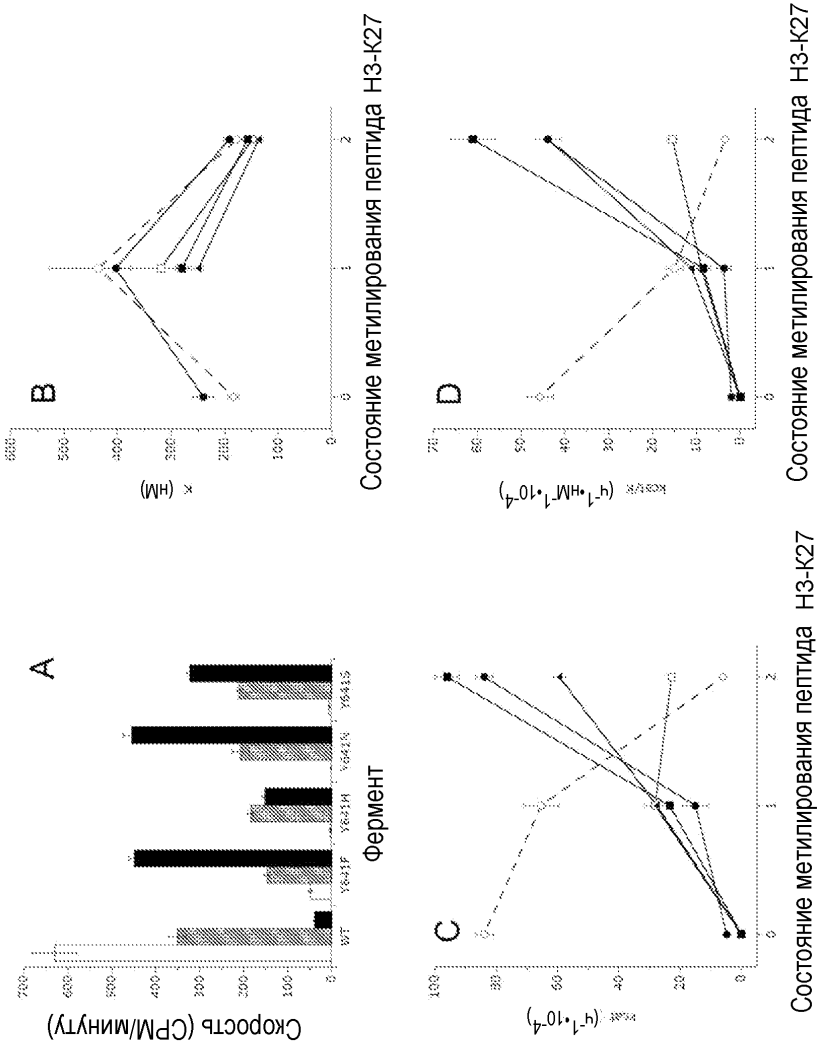


или его фармацевтически приемлемую соль.

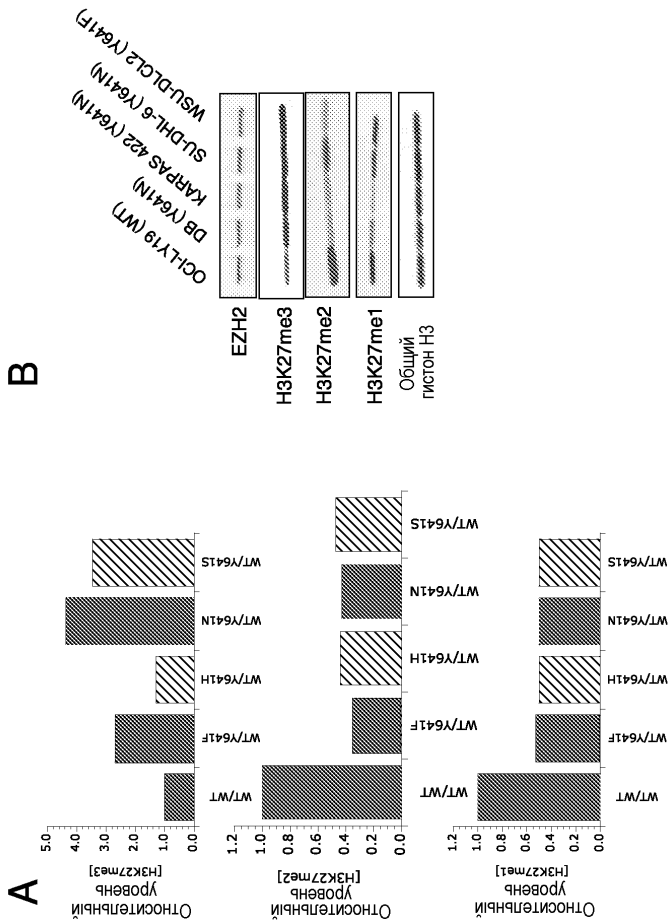
ФИГ. 1



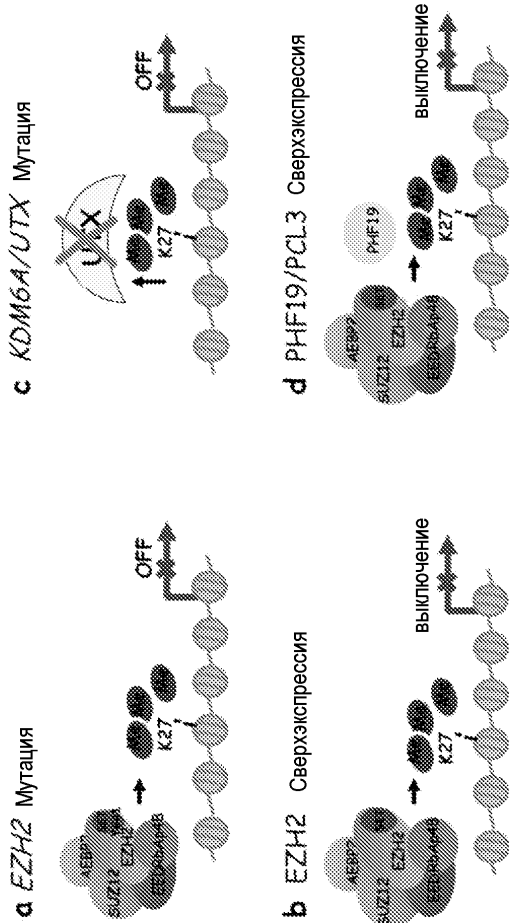
ФИГ. 2



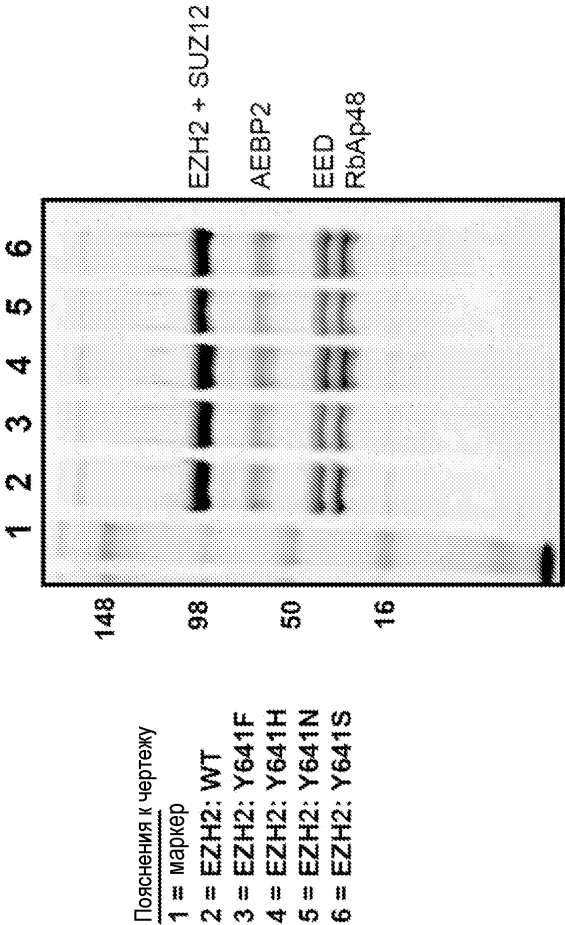
Фиг. 3



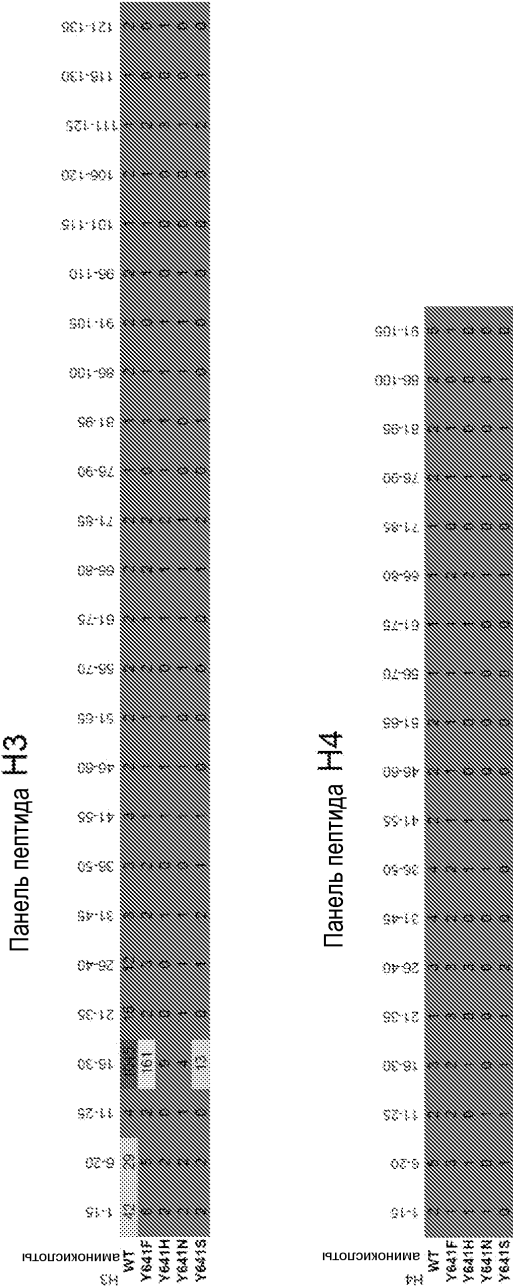
ФИГ. 4



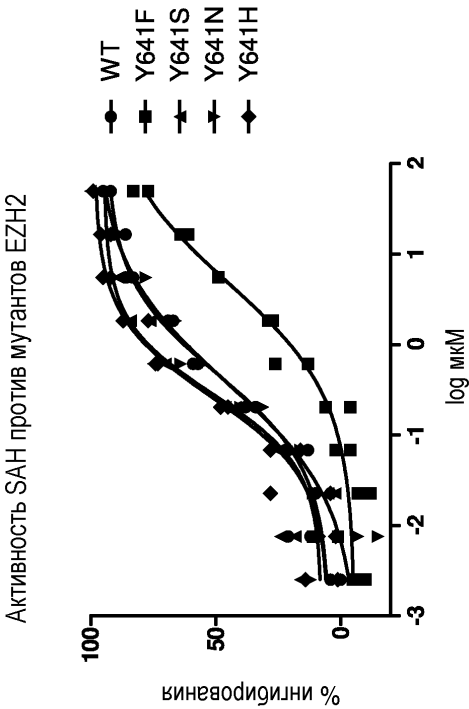
ФИГ. 5



Фиг. 6



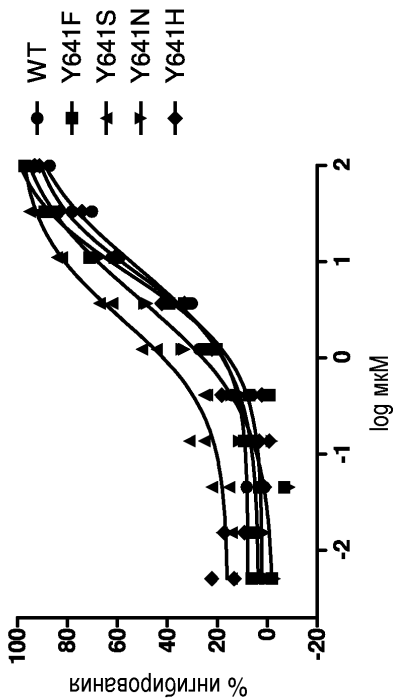
Фиг. 7



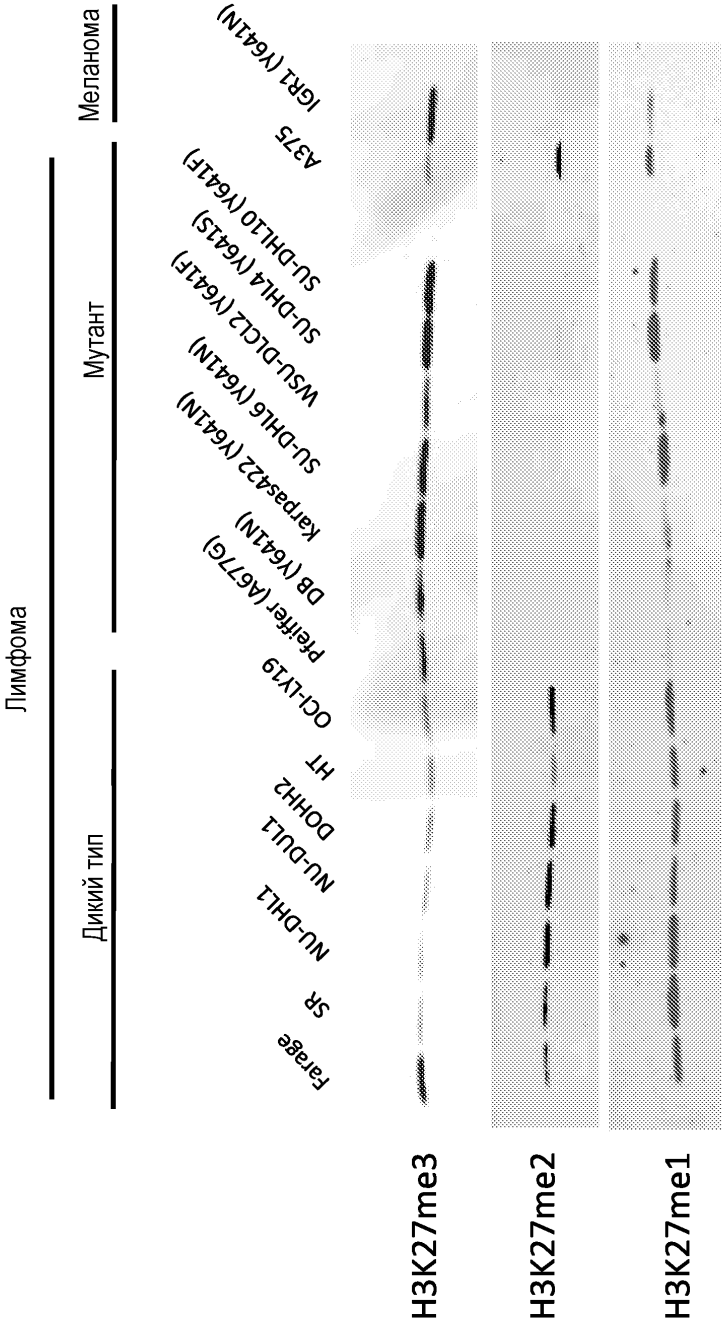


ФИГ. 8

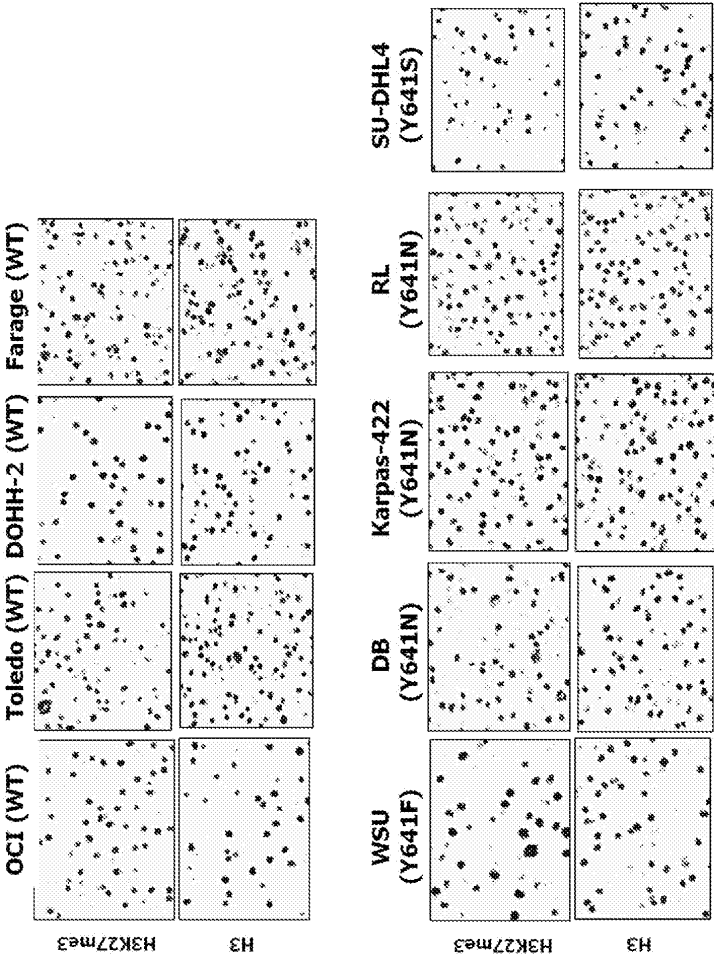
Активность соединения 75 против EZN2 WT и мутантов по Y641



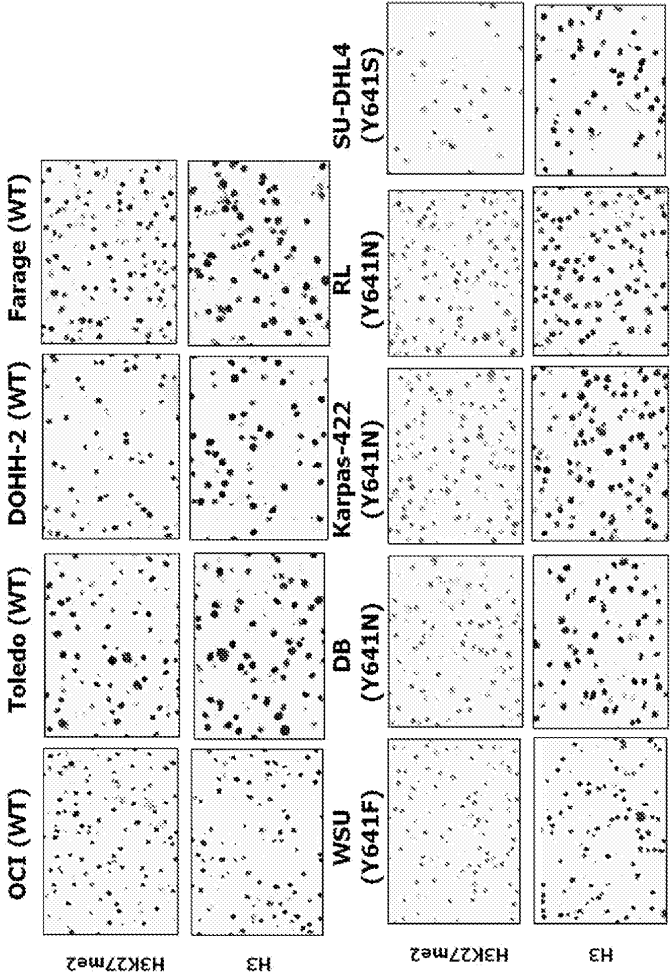
Фиг. 9



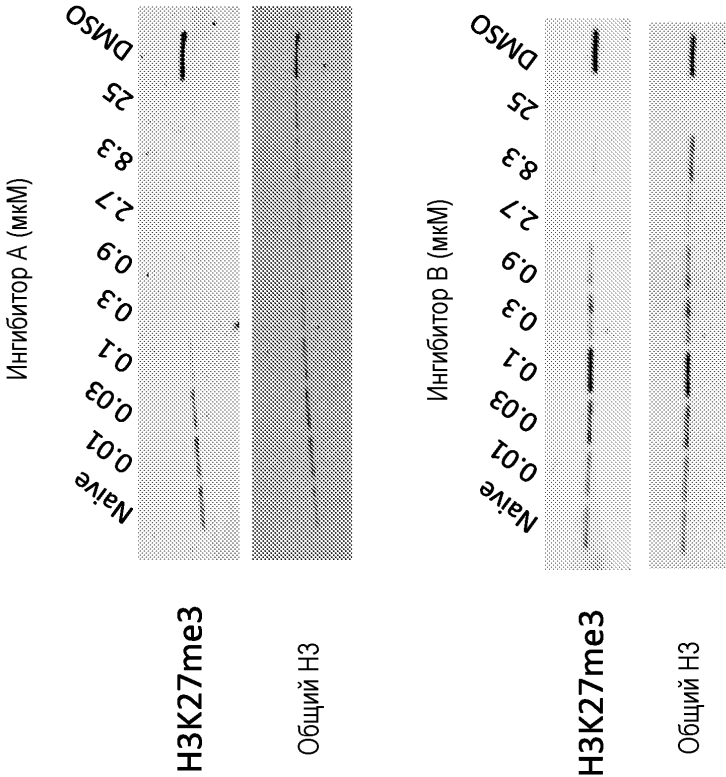
ФИГ. 10



Фиг. 11

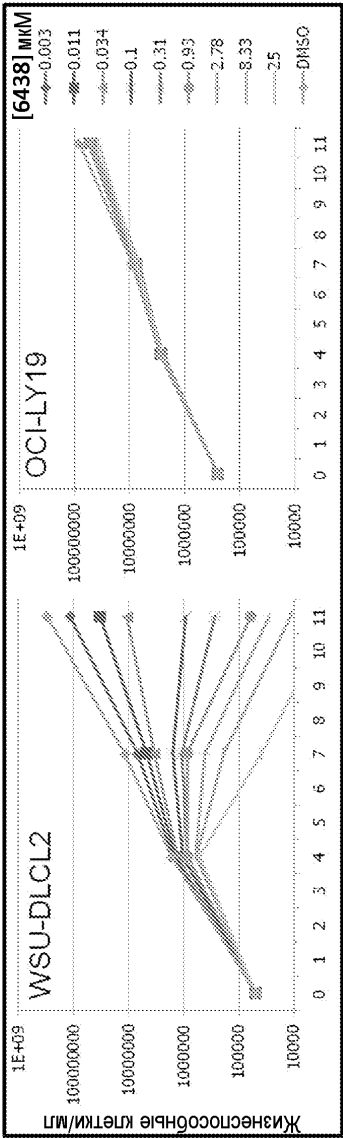


ФИГ. 12

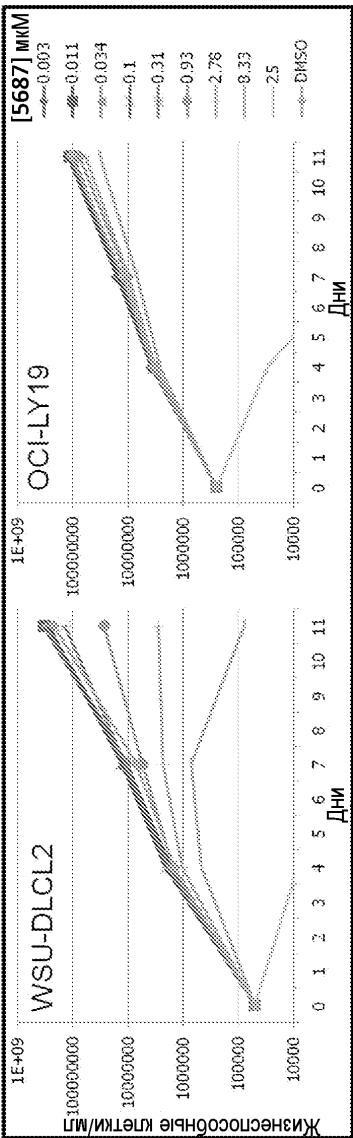


ФИГ. 13

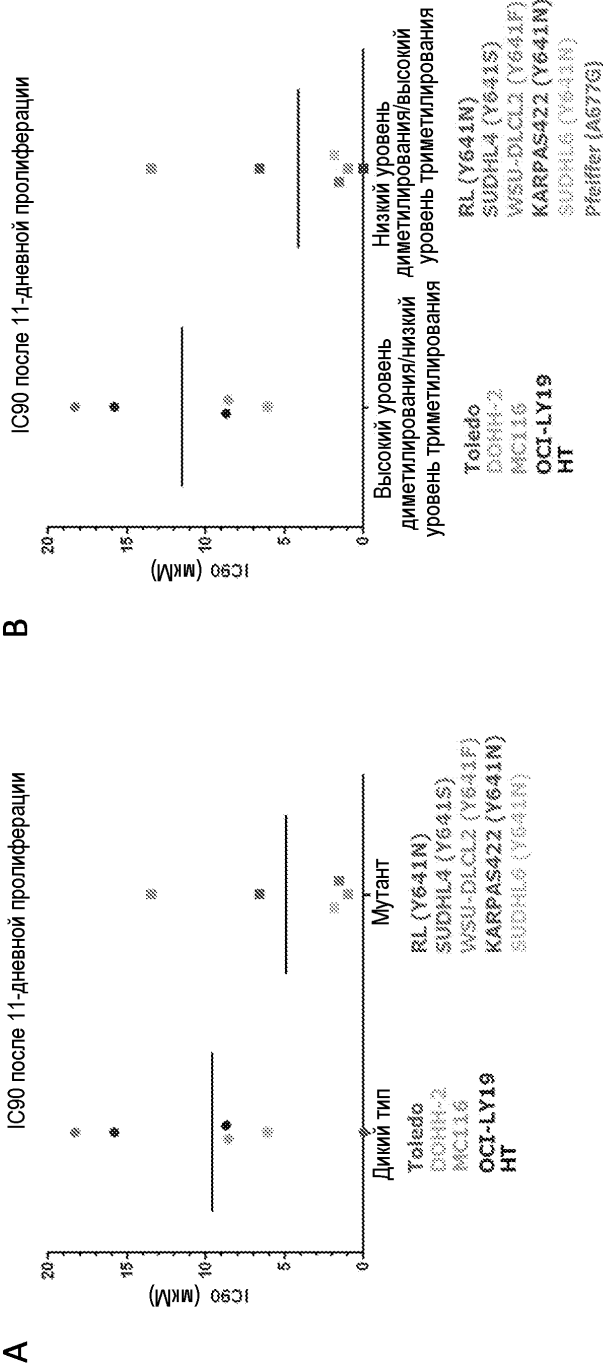
Ингибитор А



Ингибитор В



ФИГ. 14



ФИГ. 15

