



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110914457 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201880029857.2

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22)申请日 2018.03.14

11105

代理人 曹立莉

(30)优先权数据

62/471,903 2017.03.15 US

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.05

A61K 31/7105(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/022437 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/170129 EN 2018.09.20

(71)申请人 卫材研究发展管理有限公司

地址 日本东京都

(72)发明人 M.沃姆斯 X.普扬 T.藤 P.朱

权利要求书5页 说明书47页 附图27页

(54)发明名称

剪接体突变及其用途

(57)摘要

本发明描述了剪接体突变,包括PHF5A和SF3B1亚基中的突变。本申请还描述了检测剪接体中突变的存在和/或不存在,以及诊断对剪接调节剂治疗的具有反应性的方法、治疗肿瘤性疾病的方法以及基于突变状态监测或改变治疗的方法。

1. 治疗患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法,包括:
 - a) 检测到受试者中不存在PHF5A突变;和
 - b) 将剪接调节剂施用至缺少PHF5A突变的受试者。
2. 治疗患有肿瘤性疾病的受试者的方法,包括:
 - a) 检测到PHF5A突变;和
 - b) 向受试者施用不靶向剪接体的肿瘤性疾病的替代疗法。
3. 治疗患有肿瘤性疾病的受试者的方法,包括:
 - a) 从受试者获得生物样品;
 - b) 确定该受试者在样品中不具有PHF5A突变;和
 - c) 向受试者施用治疗有效量的剪接调节剂。
4. 鉴定患有或怀疑患有对剪接调节剂有抗性的肿瘤性疾病的患者的方法,包括:
 - a) 从受试者获得样品;和
 - b) 检测样品中的PHF5A突变,其中当在样品中检测到PHF5A突变时,所述患者被鉴定为患有治疗抗性肿瘤性疾病。
5. 鉴定患有或怀疑患有对剪接调节剂有响应的肿瘤性疾病的患者的方法,包括:
 - a) 从受试者获得样品;和
 - b) 检测样品中PHF5A突变的存在或不存在,其中当在样品中未检测到PHF5A突变时,所述患者鉴定为患有治疗响应性肿瘤性疾病。
6. 对患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者确定治疗方案的方法,包括鉴定PHF5A突变的存在或不存在,且当突变不存在时确定用剪接调节剂治疗,或当突变存在时用不靶向剪接体的替代疗法治疗。
7. 鉴定适合用剪接调节剂治疗的患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法,包括:
 - a) 从受试者获得样品;
 - b) 检测样品中PHF5A突变的存在或不存在;和
 - c) 当PHF5A突变不存在时,鉴定该受试者适合用剪接调节剂治疗。
8. 在患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者中监测剪接调节剂治疗功效的方法,包括:
 - a) 将剪接调节剂施用至受试者;
 - b) 在施用剪接调节剂后检测PHF5A突变的存在或不存在;
 - c) 如果突变不存在则施用额外剂量的剪接调节剂;和
 - d) 继续重复步骤a) -c) 直到检测到PHF5A突变。
9. 治疗患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法,包括:
 - a) 检测受试者中不存在PHF5A突变;
 - b) 将剪接调节剂施用至缺少PHF5A突变的受试者;
 - c) 在给药剪接调节剂后测定PHF5A突变的存在或不存在;和
 - d) 如果突变不存在则施用额外剂量的剪接调节剂。
10. 检测患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者中PHF5A突变的方法,包括:
 - a) 从受试者获得肿瘤样品;
 - b) 将样品与剪接调节剂接触;
 - c) 在与剪接调节剂接触后测量肿瘤的生长或体积;和

- d) 与已知PHF5A状态的对照肿瘤样品比较,
其中肿瘤生长或体积相比于对照样品的存在变化或缺乏变化指示存在突变。
11. 权利要求5-7和10任一项所述的方法,进一步包括向缺少突变的受试者施用剪接调节剂。
12. 权利要求4-6和10任一项所述的方法,进一步包括向具有突变的受试者施用不靶向剪接体的替代化合物。
13. 权利要求10所述的方法,其中所述对照肿瘤样品具有PHF5A突变。
14. 权利要求10所述的方法,其中所述对照肿瘤样品不具有PHF5A突变。
15. 权利要求1、2、6、8、或9任一项所述的方法,进一步包括从受试者获得生物样品。
16. 前述权利要求任一项的方法,其中所述剪接调节剂包括SF3b复合物调节剂。
17. 权利要求16所述的方法,其中所述剪接调节剂包括SF3B1复合物调节剂。
18. 权利要求16或17所述的方法,其中所述剪接调节剂包括PHF5A调节剂。
19. 权利要求16-18任一项所述的方法,其中所述SF3b复合物调节剂为普拉地内酯或衍生物。
20. 权利要求19所述的方法,其中所述普拉地内酯或衍生物包括E7107、普拉地内酯B、或普拉地内酯D。
21. 权利要求16-18任一项所述的方法,其中所述SF3b复合物调节剂为herboxidiene或衍生物。
22. 权利要求21所述的方法,其中所述herboxidiene或衍生物包括6-nor herboxidiene。
23. 权利要求16-18任一项的方法,其中所述SF3b复合物调节剂为剪接抑素或衍生物。
24. 权利要求16-18任一项所述的方法,其中所述SF3b复合物调节剂为sudemycin或衍生物。
25. 前述权利要求任一项的方法,其中所述PHF5A突变位于PHF5A-SF3B1界面内或接近PHF5A-SF3B1界面。
26. 前述权利要求任一项的方法,其中所述PHF5A突变包括PHF5A中的Y36突变。
27. 前述权利要求任一项的方法,其中所述PHF5A突变包括PHF5A中的Y36突变,其选自Y36C突变、或Y36A、Y36C、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E、或Y36R突变。
28. 权利要求27所述的方法,其中所述Y36突变位于PHF5A-SF3B1界面中或接近PHF5A-SF3B1界面。
29. 前述权利要求任一项的方法,其中向所述缺少PHF5A突变的受试者施用herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、sudemycin、其衍生物、或其组合。
30. 权利要求2所述的方法,其中向所述受试者施用细胞毒素剂、细胞生长抑制剂或蛋白酶体抑制剂。
31. 权利要求27或28所述的方法,其中Y36突变指示该受试者对herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、或sudemycin,其衍生物、或其组合有抗性。
32. 前述权利要求任一项的方法,进一步包括确定该受试者是否具有SF3B1突变。
33. 权利要求32所述的方法,其中所述受试者缺少SF3B1和PHF5A突变且该受试者施用普拉地内酯或衍生物。

34. 权利要求33所述的方法,其中所述普拉地内酯或衍生物包括E7107。

35. 权利要求32-34任一项所述的方法,进一步包括确定该受试者是否患有肿瘤性疾病,其通过鉴定选自以下一种或多种的SF3B1突变而确定:E622D、E622K、E622Q、E622V、Y623C、Y623H、Y623S、R625C、R625G、R625H、R625L、R625P、R625S、R1074H、N626D、N626H、N626I、N626S、N626Y、H662D、H662L、H662Q、H662R、H662Y、T663I、T663P、K666E、K666M、K666N、K666Q、K666R、K666S、K666T、K700E、V701A、V701F、V701I、I704F、I704N、I704S、I704V、G740E、G740K、G740R、G740V、K741N、K741Q、K741T、G742D、D781E、D781G和D781N。

36. 权利要求35所述的方法,其中所述受试者进一步包含在R1074H的SF3B1突变。

37. 前述权利要求任一项的方法,其中所述肿瘤性疾病为血液恶性肿瘤、实体瘤、或软组织肉瘤。

38. 前述权利要求任一项的方法,其中所述肿瘤性疾病为血液恶性肿瘤。

39. 权利要求38所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤为骨髓增生异常综合征、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒单核细胞白血病、或急性骨髓性白血病。

40. 权利要求15所述的方法,包括从受试者获得样品,所述样品选自血液、血液级分、或获自血液或血液级分的细胞。

41. 前述权利要求任一项的方法,包括通过与野生型核酸或蛋白质序列比较来检测突变的存在或不存在。

42. 前述权利要求任一项的方法,其中测定或鉴定PHF5A突变包括在患者的样品中测序编码PHF5A的基因,和/或测定或鉴定SF3B1突变包括在患者的样品中测序编码SF3B1的基因。

43. 权利要求42所述的方法,其中测序包括在样品中对PHF5A和/或SF3B1基因的PCR扩增、样品中的原位PCR、桑格测序、全外显子组测序、单核苷酸多态性分析、深度测序、靶向基因测序、或其任意组合。

44. 权利要求42或43所述的方法,其中测序包括PHF5A和/或SF3B1基因的PCR扩增、实时-PCR或靶向基因测序。

45. 一种试剂盒,其包含:

- a) 检测PHF5A突变的试剂;和
- b) 用于检测突变的说明书。

46. 权利要求45的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含用于检测SF3B1突变的试剂。

47. 权利要求46的试剂盒,其中所述突变为PHF5A中的Y36C突变和/或SF3B1中的K1071、R1074或V1078突变。

48. 权利要求23所述的方法,其中所述剪接抑素包括FR901464或剪接抑素A。

49. 权利要求24所述的方法,其中所述sudemycin包括sudemycin D6。

50. 权利要求27所述的方法,其中所述PHF5A突变包括Y36C突变。

51. 权利要求29所述的方法,其中对所述受试者施用剪接抑素A。

52. 权利要求29所述的方法,其中对所述受试者施用sudemycin D。

53. 权利要求30所述的方法,其中所述替代疗法为蛋白酶体抑制剂。

54. 权利要求53所述的方法,其中所述蛋白酶体抑制剂为硼替佐米。

55. 权利要求32所述的方法,其中所述受试者缺少SF3B1和PHF5A突变且对该受试者施

用herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、sudemycin、其衍生物、或其组合。

56. 权利要求32所述的方法, 其中所述受试者具有SF3B1和/或PHF5A突变且对该受试者施用不靶向剪接体的肿瘤性疾病的治疗。

57. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述受试者患有癌症, 该癌症在SF3B1中的位置K1071、R1074和V1078的一处或多处包含突变。

58. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述受试者患有癌症, 该癌症包含一个或多个以下突变: SF3B1中的K1071E突变、R1074H突变和V1078A或V1078I突变。

59. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述受试者患有癌症, 该癌症包含PHF5A中的Y36C突变和SF3B1中的一个或多个以下突变: K1071E突变、R1074H突变和V1078A或V1078I突变。

60. 权利要求55所述的方法, 其中所述sudemycin包括sudemycin D6。

61. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述受试者不包含选自K1071、R1074和V1078突变的SF3B1的一个或多个突变, 且该受试者不包含PHF5A突变, 且对该受试者施用剪接体抑制剂。

62. 权利要求61所述的方法, 其中所述PHF5A突变为Y36突变。

63. 权利要求62所述的方法, 其中PHF5A中的Y36突变选自Y36A、Y36C、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E或Y36R突变。

64. 权利要求61-63任一项所述的方法, 其中对所述受试者施用herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、sudemycin、其衍生物、或其组合。

65. 权利要求32所述的方法, 其中所述SF3B1突变包括选自以下的一个或多个突变: SF3B1中的K1071、R1074和V1078突变。

66. 权利要求65所述的方法, 其中对所述受试者施用不靶向剪接体的肿瘤治疗。

67. 治疗患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法, 包括向缺少PHF5A突变的受试者施用剪接调节剂。

68. 权利要求67所述的方法, 其中所述受试者不具有PHF5A中的Y36突变。

69. 权利要求67或68所述的方法, 其中所述受试者不具有SF3B1突变。

70. 权利要求67-69任一项所述的方法, 其中所述受试者不具有SF3B1中的K1071、R1074或V1078突变。

71. 权利要求67-70任一项所述的方法, 其中对所述受试者施用herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、sudemycin、其衍生物、或其组合。

72. 治疗患有肿瘤性疾病的受试者的方法, 包括:

- a) 从受试者获得生物样品;
- b) 测定样品中PHF5A突变的存在或不存在; 和
- c) 当不存在PHF5A突变时向该受试者施用治疗有效量的剪接调节剂, 或当存在PHF5A突变时施用不靶向剪接体的肿瘤性疾病的替代疗法。

73. 治疗患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法, 包括:

- a) 检测到受试者中不存在SF3B1突变; 和
- b) 将剪接调节剂施用至缺少SF3B1突变的受试者。

74. 治疗患有肿瘤性疾病的受试者的方法, 包括:

- a) 从受试者获得生物样品；
- b) 确定该受试者在样品中不具有SF3B1突变；和
- c) 向受试者施用治疗有效量的剪接调节剂。

75. 鉴定适合用剪接调节剂治疗的患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法，包括：

- a) 从受试者获得样品；
- b) 检测样品中SF3B1突变的存在或不存在；和
- c) 当不存在SF3B1突变时，鉴定该受试者适合用剪接调节剂治疗。

76. 治疗患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法，包括向缺少SF3B1突变的受试者施用剪接调节剂。

77. 治疗患有肿瘤性疾病的受试者的方法，包括：

- a) 从受试者获得生物样品；
- b) 测定样品中SF3B1突变的存在或不存在；和
- c) 当不存在SF3B1突变时向该受试者施用治疗有效量的剪接调节剂，或当存在SF3B1突变时施用不靶向剪接体的肿瘤性疾病的替代疗法。

78. 权利要求73-77任一项所述的方法，其中所述SF3B1突变包括选自以下的一个或多个突变：SF3B1中的K1071、R1074和V1078突变。

79. 权利要求73-78任一项所述的方法，其中所述受试者不具有PHF5A突变。

80. 权利要求79所述的方法，其中所述受试者不具有PHF5A中的Y36突变。

81. 权利要求73-80任一项所述的方法，其中所述剪接调节剂包括herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、sudemycin、其衍生物、或其组合。

剪接体突变及其用途

[0001] 本申请要求2017年3月15日提交的美国临时申请62/471,903的优先权的权益,其全部内容通过引用合并于此。

[0002] 本发明提供了用于诊断、预测、监测和治疗患有肿瘤性疾病的受试者的方法。具体而言,本发明公开的方法涉及在患有肿瘤性疾病的受试者中检测剪接体突变(例如PHF5A突变)的存在和/或不存在,以及由此选择合适的治疗方案的方法。本发明还描述了基于其突变状态治疗患有肿瘤性疾病的受试者的方法,以及基于突变状态监测治疗功效的方法。

[0003] RNA剪接由剪接体催化,剪接体是由五个小核RNA(snRNA U1、U2、U4、U5和U6)和相关蛋白组成的动态多蛋白-RNA复合物。剪接体在pre-mRNA上组装以建立多种RNA和蛋白质相互作用的动态级联,其催化内含子的切除和外显子的连接(Matera和Wang,Nature reviews.Molecular cell biology 15,108-21(2014))。越来越多的证据将人类疾病与影响许多基因的RNA剪接失调联系起来(Scotti和Swanson,Nature reviews.Genetics 17,19-32(2016))。

[0004] 除了五个snRNA之外,剪接体的多蛋白-RNA复合物还包括一系列蛋白亚基,例如SF1-SF3复合物、U2AF1和SRSF2。一个这样的单元,即剪接因子SF3b,本身就是一种多蛋白复合物,包括亚基,例如SF3B1、SF3B3和PHF5A。SF3b复合体是U2 snRNA、剪接因子SF3a和SF3b以及其他相关蛋白组装而成的U2 snRNA-蛋白质复合体(snRNP)的一部分。它们一起形成17S U2 snRNP,其以ATP依赖性方式在内含子的3'侧组装形成A复合物(Bonnal等人,Nature reviews.Drug discovery 11,847-59(2012))。SF3b核心复合体包含几个剪接体相关蛋白(SAP),包括SF3B1/SAP155、SF3B2/SAP145、SF3B3/SAP130、SF3B4/SAP49、SF3B5/SAP10、SF3B6/SAP14a和PHF5A/SAP14b。

[0005] 最近的研究已经将诸如SF3B1、U2AF1和SRSF2之类的剪接因子牵涉到包括慢性淋巴细胞白血病和骨髓增生异常综合征在内的血液系统恶性肿瘤中(Bonnal等人,Nature reviews.Drug discovery 11,847-59(2012))。因此,最近的努力致力于开发调节剪接的小分子或寡核苷酸作为治疗这些疾病的治疗方法。其中一些已经或正在接受针对癌症和严重神经肌肉疾病的临床试验测试(Eskens等人,Clinical Cancer Research 19,6296-304(2013);Hong等人,Investigational new drugs 32,436-44(2014);Naryshkin等人,Science345,688-93(2014);Palacino等人,Nature chemical biology 11,511-7(2015))。然而,患者对这些剪接调节剂的反应一直是不一致的。Kaida等人,Nature chemical biology 3,570-5(2007);Kotake等人,Nature chemical biology 3,570-5(2007);Hasegawa等人,ACS chemical biology 6,229-33(2011)。

[0006] 表型抗性克隆分析已用于鉴定SF3B1中的单个氨基酸取代(R1074H),其几乎完全消除了普拉地内酯(pladienolide)B和E7107的剪接调节和抗增殖作用(Yokoi等人,The FEBS journal 278,4870-80(2011))。但是,尚不清楚确切的抑制机理和SF3b复合物其他成分的作用。了解SF3b复合物及其成分的功能和分子机理可有助于指导下一代剪接体抑制剂的开发,并为更有可能对剪接调节化合物或其他肿瘤干预策略产生反应的患者提供靶向治疗。

[0007] 因此,本发明部分提供了基于特定剪接体突变,特别是带来对剪接调节抗性的PHF5A和/或SF3B1,在患者中检测、诊断、预测、治疗和监测治疗功效的新方法。另外,本发明公开了使用突变状态治疗和鉴定肿瘤性疾病的方法。

[0008] 在各种实施方案中,提供治疗患有肿瘤性疾病或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括检测受试者中PHF5A突变的存在或不存在。在一些实施方案中,所述方法还包括检测受试者中SF3B1突变的存在或不存在。在一些实施方案中,该方法包括将剪接调节剂施用至缺少PHF5A和/或SF3B1突变的受试者。在一些实施方案中,该方法包括检测受试者中PHF5A和/或SF3B1突变的存在且施用不靶向剪接体的替代疗法。在一些实施方案中,所述方法可包括从受试者获得生物样品。

[0009] 在各种实施方案中,提供了鉴定患有或怀疑患有抵抗或响应于剪接调节剂的肿瘤性疾病的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括从受试者获得样品,并检测PHF5A突变的存在或不存在。在一些实施方案中,该方法还包括从受试者获得样品并检测SF3B1突变的存在或不存在。在一些实施方案中,当在样品中检测到PHF5A和/或SF3B1的突变时,将患者鉴定为患有治疗抗性肿瘤性疾病。在一些实施方案中,当在样品中未检测到PHF5A和/或SF3B1的突变时,将患者鉴定为患有治疗响应性肿瘤性疾病。

[0010] 在各种实施方案中,提供了确定患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的治疗方案的方法。在一些实施方案中,该方法包括鉴定PHF5A和/或SF3B1突变的存在或不存在。在一些实施方案中,当突变不存在时,用剪接调节剂治疗受试者。在一些实施方案中,当存在突变时,用不靶向剪接体的替代疗法来治疗受试者。在一些实施方案中,所述方法可包括从受试者获得生物样品。

[0011] 在各种实施方案中,提供了鉴定患有或怀疑患有适合用剪接调节剂治疗的肿瘤性疾病的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括从受试者获得样品,并检测PHF5A和/或SF3B1中突变的存在或不存在。在一些实施方案中,当不存在PHF5A和/或SF3B1突变时,将受试者鉴定为适合用剪接调节剂治疗。在一些实施方案中,本发明提供了鉴定患有或怀疑患有适合用剪接调节剂治疗的肿瘤性疾病的受试者的方法,包括,从受试者获得样品,检测在PHF5A和/或SF3B1中突变的存在或不存在,并在不存在突变时将该受试者鉴定为适合使用剪接调节剂治疗。

[0012] 在各种实施方案中,提供了在患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者中监测剪接调节剂治疗功效的方法。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用剪接调节剂,在施用剪接调节剂之后检测PHF5A和/或SF3B1中突变的存在或不存在,以及如果不存在突变则施用额外剂量的剪接调节剂。在一些实施方案中,可以重复该方法,直到检测到PHF5A和/或SF3B1突变。

[0013] 在各种实施方案中,本发明提供了在患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者中检测PHF5A和/或SF3B1的突变的方法。在一些实施方案中,该方法包括从受试者获得肿瘤样品,使样品与剪接调节剂接触,以及在与剪接调节剂接触后测量肿瘤的生长或体积。

[0014] 在各种实施方案中,本发明提供的方法可以进一步包括向缺乏突变的受试者施用剪接调节剂。在各种实施方案中,可以向缺乏突变的受试者施用herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素(spliceostatin)、sudemycin或其衍生物或组合。在一些实施方案中,向受试者施用剪接抑素A。在一些实施方案中,向受试者施用sudemycin D。

[0015] 在一些实施方案中,所述剪接调节剂包括SF3b复合物调节剂。在一些实施方案中所述剪接调节剂包括SF3B1调节剂。在一些实施方案中,所述剪接调节剂包括PHF5A调节剂。在一些实施方案中,所述SF3b调节剂为普拉地内酯或衍生物。在一些实施方案中,所述普拉地内酯或衍生物包括E7107、普拉地内酯B、或普拉地内酯D。在一些实施方案中,所述SF3b调节剂为herboxidiene或衍生物。在一些实施方案中,所述SF3b调节剂为剪接抑素或衍生物。在一些实施方案中,所述剪接抑素包括FR901464或剪接抑素A。在一些实施方案中,所述SF3b调节剂为sudemycin或衍生物。在一些实施方案中,所述sudemycin包括sudemycin D6。

[0016] 在各种实施方案中,本发明提供的方法可包括施用不靶向剪接体的替代疗法。在一些实施方案中,所述治疗可包括细胞毒素剂、细胞生长抑制剂或蛋白酶体抑制剂。在一些实施方案中,所述替代疗法为蛋白酶体抑制剂。在一些实施方案中,所述蛋白酶体抑制剂为硼替佐米。

[0017] 在各种实施方案中,所述PHF5A突变位于或接近PHF5A-SF3B1界面。在一些实施方案中,所述位于或接近PHF5A-SF3B1界面的突变为PHF5A中Y36位的突变,和/或在SF3B1中选自K1071、R1074和V1078的位置的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述PHF5A突变包括Y36C突变,或Y36A、Y36C、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E、或Y36R突变。在一些实施方案中,所述PHF5A突变包括Y36C突变。在一些实施方案中,SF3B1中的突变包括K1071E突变、R1074H突变和/或V1078A或V1078I突变中的一个或多个。在一些实施方案中,PHF5A中的Y36突变和/或SF3B1中的K1071、R1074和V1078突变指示该受试者对herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、或sudemycin、或其衍生物或组合的治疗有抗性。在一些实施方案中,突变的缺失指示该受试者可对herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、或sudemycin、或其衍生物或组合的治疗有响应。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法可进一步包括确定该受试者是否患有肿瘤性疾病,其通过鉴定选自以下的一个或多个的SF3B1突变:E622D、E622K、E622Q、E622V、Y623C、Y623H、Y623S、R625C、R625G、R625H、R625L、R625P、R625S、R1074H、N626D、N626H、N626I、N626S、N626Y、H662D、H662L、H662Q、H662R、H662Y、T663I、T663P、K666E、K666M、K666N、K666Q、K666R、K666S、K666T、K700E、V701A、V701F、V701I、I704F、I704N、I704S、I704V、G740E、G740K、G740R、G740V、K741N、K741Q、K741T、G742D、D781E、D781G和D781N。

[0019] 在各种实施方案中,所述肿瘤性疾病可为血液恶性肿瘤、实体瘤或软组织肉瘤。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病为血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述血液恶性肿瘤为骨髓增生异常综合征、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒单核细胞白血病或急性骨髓性白血病。

[0020] 在一些实施方案中,本发明提供的方法包括从受试者获得样品。在一些实施方案中,所述样品可以来自血液、血液级分或从血液或血液级分获得的细胞。在一些实施方案中,所述样品可为实体瘤样品。

[0021] 在各种实施方案中,本发明提供的方法包括通过与PHF5A和/或SF3B1的野生型蛋白质或核酸序列比较来检测突变的存在或不存在。在一些实施方案中,例如使用PCR扩增、样品中的原位PCR、桑格测序、全外显子组测序、单核苷酸多态性分析、深度测序、靶向基因测序中的一种或多种或其任意组合,确定或鉴定对核酸测序的突变。在一些实施方案中,测序包括PCR扩增、实时PCR或PHF5A和/或SF3B1基因的靶向基因测序。

[0022] 在各种实施方案中,提供了试剂盒,其包含检测PHF5A和/或SF3B1中的突变的试剂。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括用于检测突变的说明书。

[0023] 序列表的简单描述

[0024] SEQ ID NO 1:人SF3B1蛋白质的氨基酸序列。

[0025] SEQ ID NO 2:人PHF5A蛋白质的氨基酸序列。

[0026] SEQ ID NO 3:Ad2-衍生的核酸序列。

[0027] SEQ ID NO 4:Ad2正向引物。

[0028] SEQ ID NO 5:Ad2反向引物。

[0029] SEQ ID NO 6:Ad2反向探针。

[0030] SEQ ID NO 7:Ftz正向引物

[0031] SEQ ID NO 8:Ftz反向引物

[0032] SEQ ID NO 9:Ftz探针

[0033] SEQ ID NO 10:MCL1-L正向引物

[0034] SEQ ID NO 11:MCL1-L探针

[0035] SEQ ID NO 12:MCL1-L反向引物

[0036] SEQ ID NO 13:MCL1-S正向引物

[0037] SEQ ID NO 14:MCL1-S探针

[0038] SEQ ID NO 15:MCL1-S反向引物

[0039] SEQ ID NO 16:MCL1内含子1正向引物

[0040] SEQ ID NO 17:MCL1内含子1探针

[0041] SEQ ID NO 18:MCL1内含子1反向引物

[0042] SEQ ID NO 19:MCL1内含子2正向引物

[0043] SEQ ID NO 20:MCL1内含子2探针

[0044] SEQ ID NO 21:MCL1内含子2反向引物

[0045] SEQ ID NO 22:泛MCL1正向引物

[0046] SEQ ID NO 23:泛MCL1探针

[0047] SEQ ID NO 24:泛MCL1反向引物

[0048] SEQ ID NO 25:人SF3B1蛋白质的核酸序列。

[0049] SEQ ID NO 26:人PHF5A蛋白质的核酸序列。

[0050] 附图简述

[0051] 附图不一定按比例或详尽。相反,通常将重点放在说明本文所述发明的原理上。构成本说明书一部分的附图示出了与本发明一致的几个实施方案,并且与说明书一起用于解释本发明的原理。在附图中:

[0052] 图1A描绘了E7107和herboxidiene抗性克隆的产生和全外显子组测序(WXS)分析。图1B描绘了E7107和herboxidiene抗性克隆中的频发突变。图1C-1G显示了响应于所示化合物的代表性抗性克隆72小时生长抑制谱(CellTiter-Glo细胞活力测定)。误差条表示标准偏差。对于E7107、herboxidiene和硼替佐米,n=4;对于剪接抑素A和sudemycin D6,n=2。

[0053] 图2A显示了亲本、表达PHF5A WT和表达PHF5A Y36C的HCT116细胞中PHF5A水平的蛋白质印迹分析。GAPDH显示为加载对照。图2B显示了通过Incucyte成像系统所测量的,亲

本、表达WT PHF5A或表达Y36CPHF5A的HCT116细胞的增殖。X轴表示接种后小时数,y轴表示融合的百分比。误差条表示标准偏差,n=5。图2C显示了在从含有WT或Y36C PHF5A的核提取物中下调抗SF3B1后,指示的SF3b复合蛋白水平的蛋白质印迹分析。图2D描绘了响应于指示的剪接调节剂的,亲本的、表达PHF5A WT和表达PHF5A Y36C的HCT116细胞的72小时生长抑制谱(CellTiter-Glo细胞活力测定)。误差条表示标准偏差,n=2。

[0054] 图3A描述了在含有WT或Y36C PHF5A的核提取物中在指定的剪接调节剂存在下的体外剪接测定。误差条表示标准偏差,n=4。图3B显示了用指定剪接调节剂处理的表达WT或Y36C PHF5A的细胞中成熟SLC25A19mRNA水平和EIF4A1 pre-mRNA水平的Taqman基因表达分析。将所有数据点归一化为相应的DMSO处理的对照样品,并以对数标度显示在y轴上。误差条表示标准偏差,n=2。

[0055] 图4A示出了与DMSO对照相比每个指示的治疗组中差异剪接事件的计数(左图)和分数(右图)的堆叠条形图。图4B描述了与DMSO对照相比,指示的治疗组中差异剪接事件的计数和log₂倍数变化的总结。图4C显示了来自E7107诱导的内含子-保留连接的保留的内含子和下游外显子内的平均GC含量的图。每个内含子被归一化为100bins,而每个外显子被归一化为50bins。深色线表示每个bin的平均GC含量;阴影区域表示95%置信区间。图4D描绘了E7107诱导的外显子跳跃结点的跳跃外显子内以及上游(左)和下游(右)内含子的平均GC含量图。每个内含子被归一化为100bins,而每个外显子被归一化为50bins(有关详细信息,请参见方法)。深色线表示每个bin的平均GC含量;阴影区域表示95%置信区间。图4E显示了在E7107处理的PHF5A Y36C(顶部)和WT(底部)细胞中3883个结点的3'结点使用的瀑布图。根据E7107处理的Y36C线中每个结点的ES PSI(剪接百分比)值(从大到小)对两个面板上的X轴进行排序。在Y轴上,显示了同一3'结点的外显子跳跃(ES)或内含子保留(IR)的PSI。每个结点的外显子跳跃事件、内含子保留事件和外显子包含事件(图中未显示)的PSI加起来为每个连接点100。PSI计算方案如下瀑布图所示。

[0056] 图5A显示了在来自WT或Y36C PHF5A过表达细胞的指定治疗下,不同MCL1亚型的产生的代表性sashimi图。每个踪迹的总读取量显示在左侧。图5B描述了在WT(左图)或Y36C(右图)中指示的MCL1亚型的Taqman基因表达分析。用剪接调节剂处理表达PHF5A的细胞。误差条表示标准偏差,n=2。

[0057] 图6A示出了PHF5A(PDB:5SYB)的带状图。锌原子显示为灰色球,并形成近似等边三角形的顶点。形成三叶结侧面的二级结构元素(α :螺旋, η :310螺旋, β :股)按其一级结构顺序排列。N和C末端被标记。半胱氨酸残基显示为棒,Y36残基也显示为棒。图6B显示了酵母B^{act}复合物中PHF5A的模型。酵母PHF5A、SF3B5和SF3B1形成了复合物,该复合物与由U2 snRNA和分支点序列(BPS)碱基配对的RNA双链以及BPS下游的单链内含子RNA形成接触。图6C显示了HEAT重复序列15和16的序列比对,其中Hsh155的该部分与Rds3形成腺嘌呤结合位点。图6D显示了PHF5A与Rds3的序列比对。序列同一性是56%。图6E描述了人腺嘌呤结合位点的潜在构型,显示了PHF5A、SF3B1和内含子RNA之间的相互作用。图6F示出了由SF3B1、PHF5A和SF3B3组成的潜在的调节剂结合位点的表面图。显示了抗药性残基。

[0058] 图7A显示了用于闪烁亲近测定的含有PHF5A-WT或PHF5A-Y36C的重组四蛋白微型复合物的考马斯亮蓝染色。图7B示出了非放射性剪接调节剂对结合至WT四蛋白复合物的³H标记的普拉地内酯类似物(10nM)的竞争性滴定曲线。图7C显示了模型化的C36覆盖在WT上

的整体表面视图 (Y36在青色棒中显示), 以及在Y36和C36处放大的PHF5A表面视图。通过APBS计算出表面电势, 着色如下: 红色: -8kBT/e , 蓝色: $+8\text{kBT/e}$ 和白色: 0kBT/e 。图7D描绘了与含有WT或Y36C PHF5A的蛋白质复合物结合的 ^3H 标记的普拉地内酯类似物 (10nM和1nM) 的闪烁亲近测定。误差条表示标准偏差, $n=2$ 。图7E显示了在亲本和指示的表达PHF5A变体的HCT116细胞中PHF5A水平的蛋白质印迹分析。GAPDH显示为加载对照。图7F描绘了与WT细胞系相比, 指示的表达PHF5A变体的细胞系之间的 IC_{50} 转变的无监督聚类热图。该转变显示为倍数变化, 并且是根据从图7G中的剂量响应曲线提取的 IC_{50} 值计算得出的。每一行代表指示的PHF5A变体, 每列代表指示的化合物。彩色键显示在图7G的右上角。亲本和指示的表达PHF5A变体的HCT116细胞对指定化合物的反应的72小时生长抑制分析 (CellTiter-Glo细胞活力测定)。误差条表示标准偏差, $n=3$ 。

[0059] 图8描绘了蛋白质复合物SF3B1、PHF5A和SF3B3的分子表面表示。标记了内含子RNA和分支点腺苷 (BPA)。常见的剪接调节剂结合位点由星号指示, 其周围残基的大致位置已鉴定出抗性突变。该图是使用酵母B^{act}复合物坐标生成的。示意性模型表明内含子序列的GC含量与其抗剪接调节之间呈负相关。具体来说, 高GC含量的内含子底物是较弱的底物, 其对剪接调节剂显示出更高的灵敏度或更低的抵抗力。

[0060] 图9是显示PHF5A Y36C和R1074H克隆中G150移位的图。X轴是以对数标度的携带PHF5A Y36C突变的克隆与相同化合物的亲本系之间的GI50比。Y轴是以对数标度的携带SF3B1 R1074H突变的克隆与亲本系之间的GI50比。与亲本线相比, 45°斜线处的线表示两个抗性克隆中相同化合物的GI50位移相等。

[0061] 图10是显示在PANC0504细胞中PHF5A Y36C过表达产生对剪接调节剂E7107的部分抗性表型, 但对蛋白酶体抑制剂硼替佐米没有。

[0062] 图11A示出了闪烁亲近测定法 (SPA)。图11B是闪烁亲近测定法的图, 示出与抗SF3B1或模拟免疫沉淀的SF3b复合物结合的 ^3H -标记的普拉地内酯类似物 (10nM), 该抗SF3B1或模拟免疫沉淀的SF3b复合物来自包含WT或Y36C PHF5A的核提取物。指示时包括未标记化合物 (10 μM) 的预处理。

[0063] 示例性实施方案的详述

[0064] 本文提供了本发明的示例性详细描述。说明书内的实施方案不应解释为限制本发明的范围。

[0065] 本发明内容中引用的所有出版物和专利均通过引用全文纳入本发明。如果通过引用并入的材料与本说明书矛盾或不一致, 则本说明书将取代任何此类材料。本发明中任何参考文献的引用并不意味着承认这些参考文献是本发明的现有技术。当表达值的范围时, 其包括使用该范围内的任何特定值的实施方案。此外, 对以范围陈述的值的引用包括该范围内的每个值。所有范围都包括其端点并且可以组合。当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时, 将理解的是, 特定值形成另一实施方案。除非上下文另外明确指出, 否则对特定数值的引用至少包括该特定值。除非另有说明, 否则“或”的使用表示“和/或”。

[0066] 在整个说明书和权利要求书中都使用了与说明书方面有关的各种术语。除非另外指出, 否则将给这些术语其在本领域中的普通含义。其他特定定义的术语将以与本发明提供的定义一致的方式解释。

[0067] 如在此使用的, 单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数形式, 除非上下文另外明

确指出。

[0068] 除非另外指出,否则在一系列元素或范围之前的术语“至少”、“小于”和“大约”或类似术语应理解是指该系列或范围中的每个元素。仅使用常规实验,本领域技术人员就将认识到或能够确定本发明所述的本发明的特定实施方案的许多等同方案。这些等同方案旨在由所附权利要求书涵盖。

[0069] 术语“受试者”和“患者”在此可互换使用,是指任何动物,如任何哺乳动物,包括但不限于人、非人灵长类、啮齿类等。在一些实施方案中,所述哺乳动物为小鼠。在一些实施方案中,所述哺乳动物为人。

[0070] 术语“肿瘤性疾病”和“癌症”在本发明中可互换使用,是指存在的细胞具有典型的致癌细胞特征,例如不受控制的增殖、永生、转移潜能、快速生长和增殖速率、和/或一些形态特征。癌细胞通常可以是肿瘤或块状,但此类细胞可以单独存在于受试者体内,也可以作为独立细胞(例如白血病或淋巴瘤细胞)在血流中循环。术语“肿瘤性疾病”和“癌症”包括所有类型的癌症和癌转移,包括血液系统恶性肿瘤、实体瘤、肉瘤、癌以及其他实体瘤和非实体瘤。

[0071] 本发明所用的术语“有效量”和“治疗有效量”是指足以实现预期结果的本发明所述化合物(例如,剪接调节剂或替代疗法)的量,该结果包括但不限于疾病治疗,如下所示。在一些实施方案中,“治疗有效量”是对肿瘤细胞的生长或扩散、肿瘤的大小或数量和/或癌症的水平、阶段、进展和/或严重程度的其他度量的可检测到的杀伤、减少和/或抑制。在一些实施方案中,“治疗有效量”是指全身、局部或原位施用的量(例如,在受试者中原位产生的化合物的量)。治疗有效量可根据预期应用(体外或体内)或所治疗的受试者和疾病状况而变化,例如,受试者的体重和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式和等等,这可以由本领域普通技术人员容易地确定。该术语还适用于将在靶细胞中诱导特定反应,例如减少细胞迁移的剂量。具体剂量可以根据例如特定的药物组合物、受试者及其年龄和现有的健康状况或健康状况的风险、要遵循的施用方案、疾病的严重性、是否与其他药物联合施用、施用时间、施用的组织以及携带其的物理递送系统而变化。。

[0072] 如本发明所使用,术语“治疗”和语法相关术语是指疾病的任何体征、症状或后果的任何改善,例如延长的生存、较少的发病率和/或减轻副作用,这些副作用是替代疗法方式的副产物,例如肿瘤细胞生长、癌细胞增殖和/或转移。如本领域中容易理解的,完全根除疾病是优选的,但不是治疗的要求。在各种实施方案中,本发明所用的“治疗”是指对患有肿瘤性疾病的受试者例如患者施用剪接调节剂或替代疗法。治疗可以是治愈、痊愈、缓解、减轻、减少、改变、补救、改善、缓和、促进或影响该疾病、该疾病的症状或该疾病的易感性,例如肿瘤性疾病。

[0073] 如本发明所用,术语“剪接调节剂(splice modulator)”或“剪接调节剂(splicing modulator)”是指通过与剪接体的组分相互作用而具有抗肿瘤活性的化合物。在一些实施方案中,剪接调节剂改变靶细胞中剪接的速率或形式。例如,充当抑制剂的剪接调节剂能够减少不受控制的细胞增殖。特别地,在一些实施方案中,剪接调节剂可通过抑制剪接体的SF3b亚基,例如通过靶向SF3B1和/或PHF5A亚基而起作用。这样的调节剂可以是天然化合物或合成化合物。剪接调节剂的非限制性实例和此类调节剂的种类包括普拉地内酯、普拉地内酯衍生物、herboxidiene、herboxidiene衍生物、剪接抑素、剪接抑素衍生物、sudemycin、

或sudemycin衍生物。如本发明所用,术语“衍生物”和“类似物”在涉及剪接调节剂等时,是指与原始化合物保留基本相同、相似或增强的生物学功能或活性但化学或生物结构改变的任何此类化合物。

[0074] 如本发明所用,“剪接体”是指核糖核蛋白复合物,其从一个或多个RNA片段,例如pre-mRNA片段中去除内含子。

[0075] 如本发明所用,术语“治疗抗性肿瘤性疾病”是指对剪接调节剂无反应的肿瘤性疾病(即,癌症)。

[0076] 术语“检测”包括确定在SF3b复合物中例如在PHF5A和/或SF3B1中是否存在突变。另外,“评估”包括将可以成功使用剪接调节剂治疗的患者与未成功治疗的患者区分开。

[0077] A. SF3B1和PHF5A和其中的突变

[0078] 本发明部分地涉及影响编码剪接体组分的基因的突变,所述突变导致有缺陷的剪接。在各个实施方案中,所述突变在PHF5A亚基中。在各个实施方案中,突变在SF3B1亚基中。剪接体中突变的存在可以指示受试者对剪接调节剂的反应性或缺乏反应性。例如,携带特定PHF5A基因突变的受试者对剪接调节剂的敏感性可降低。

[0079] 在大多数真核生物中共存两种独特的剪接体:U2依赖性剪接体,其催化U2型内含子的去除;和不那么丰富的U12依赖性剪接体,其仅存在于一部分真核生物中,并且剪接罕见的U12型内含子种类。独立的剪接体由U1、U2、U5和U4/U6 snRNP和许多非snRNP蛋白组装而成。在剪接体组装的第一个ATP依赖性步骤中,招募了具有两个弱结合蛋白亚基SF3a和SF3b的U2 snRNP。SF3b由7种保守蛋白组成;包括PHF5A、SF3M55、SF3M45、SF3b130、SF3b49、SF3b14a和SF3M0 (Will等人,EMBO J.27,4978,2002)。

[0080] 含PHD指状结构域的蛋白质5A(也称为PHF5A)包含植物同源结构域(PHD)-指状结构域,其侧翼为高度碱性的氨基和羧基末端;因此,PHF5A属于PHD指超家族,但它也可以作为与染色质相连的蛋白。PHF5A蛋白将U2 snRNP与U2AF1(U2AF65-U2AF35异二聚体)桥接,U2AF1与内含子3'端和RNA解旋酶DDX1相连(Rzymiski等人,Cytogenet.Genome Res.121,232,2008)。稳定的U2 snRNP添加通常是备用pre-mRNA剪接中的一个调控步骤。在一些实施方案中,野生型人PHF5A蛋白如SEQ ID NO:2所示(GenBank登录号NP_032758,版本NP_032758.3)。在一些实施方案中,通过不同于SEQ ID NO:2中提供的人野生型PHF5A蛋白的氨基酸序列或SEQ ID NO:26中所述的编码核酸(GenBank登录号NM_032758版本NM_032758.3),和通过所得的癌症表型(即,它们不是天然的与受试者的癌症无关的等位基因变体),鉴定PHF5A中的突变。

[0081] SF3B1是剪接体的组成部分,并形成U2 snRNP复合体的一部分,该复合体在包含分支点位的区域与pre-mRNA结合,并参与3'剪接位点(3' ss)的剪接体的早期识别和稳定。在一些实施方案中,野生型人SF3B1蛋白SEQ ID NO:1(GenBank Accession Number NP_036565,Version NP_036565.2)(Bonnal等人,Nature Review Drug Discovery 11,847-59(2012))或SEQ ID NO:25(GenBank Accession Number NM_012433,Version NM_012433.3)所示。编码SF3B1蛋白的基因突变与许多癌症有关,例如血液系统恶性肿瘤和实体瘤(Scott等人,JNCI 105,20,1540-1549(2013))。在一些实施方案中,SF3B1中的突变通过不同于SEQ ID NO:1中提供的人野生型SF3B1蛋白的氨基酸序列或SEQ ID NO:25中所述的编码核酸,和通过所得的癌症表型(即,它们不是天然的与受试者的癌症无关的等位基因变体)鉴定。

[0082] 在一些实施方案中,受试者具有携带一种或多种PHF5A突变和/或一种或多种SF3B1突变的肿瘤或癌细胞,或测试受试者这种突变的存在或不存在。

[0083] 在一些实施方案中,一种或多种PHF5A和/或SF3B1突变可以包括点突变(例如,错义或无义突变)、插入和/或缺失。在其他实施方案中,一种或多种PHF5A和/或SF3B1突变可包括体细胞突变。在其他实施方案中,一种或多种PHF5A和/或SF3B1突变可包括杂合突变或纯合突变。在一些实施方案中,PHF5A突变与SF3B1突变组合存在。在其他实施方案中,PHF5A突变和/或SF3B1突变是互斥的。

[0084] 在各种实施方案中,PHF5A和/或SF3B1中存在的一种或多种突变在来自受试者的肿瘤或癌细胞中,或测试受试者这种突变的存在或不存在。在一些实施方案中,PHF5A突变可以位于PHF5A-SF3B1界面中或附近。在一些实施方案中,PHF5A突变可以位于PHF5A-SF3B1界面中。在一些实施方案中,PHF5A突变可以位于PHF5A-SF3B1界面附近。

[0085] 在各种实施方案中,一种或多种PHF5A突变包括在PHF5A的位置Y36处的突变。在一些实施方案中,位置Y36处的突变是PHF5A中的唯一突变,而在其他实施方案中,在PHF5A中存在另外的突变。在一些实施方案中,位置Y36的突变伴随SF3B1中的一种或多种突变(例如,位置K1071、R1074和V1078中的一处或多处的突变)。在一些实施方案中,位置Y36处的突变不伴有在SF3B1中的任何突变。

[0086] 在各种实施方案中,PHF5A中的Y36突变选自Y36C、Y36A、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E和Y36R突变。在一些实施方案中,所述PHF5A突变为Y36C。

[0087] 在一些实施方案中,SF3B1中的一种或多种突变选自K1071E突变、R1074H突变和/或V1078A或V1078I突变中的一个或多个。在各种实施方案中,SF3B1中存在其他突变。在一些实施方案中,在位置K1071、R1074和/或V1078处不存在突变。在一些实施方案中,在SF3B1中位置K1071、R1074和V1078之外存在替代突变。

[0088] 在一些实施方案中,一种或多种其它突变存在于SF3B1中。在一些实施方案中,所述其它突变为E622D、E622K、E622Q、E622V、Y623C、Y623H、Y623S、R625C、R625G、R625H、R625L、R625P、R625S、N626D、N626H、N626I、N626S、N626Y、H662D、H662L、H662Q、H662R、H662Y、T663I、T663P、K666E、K666M、K666N、K666Q、K666R、K666S、K666T、K700E、V701A、V701F、V701I、I704F、I704N、I704S、I704V、G740E、G740K、G740R、G740V、K741N、K741Q、K741T、G742D、D781E、D781G、或D781N突变中的一种或多种。在一些实施方案中,这些突变用于鉴定患有癌症的患者。在一些实施方案中,SF3B1突变可包括K700E、K666N、R625C、G742D、R625H、E622D、H662Q、K666T、K666E、K666R、G740E、Y623C、T663I、K741N、N626Y、T663P、H662R、G740V、D781E、或R625L中的一种或多种。在一些实施方案中,SF3B1中的突变可包括E622D、R625H、H662D、K666E、K700E、G742D、和/或K700E。其它SF3B1突变包括,但不限于,例如,Papaemmanuil等人,N.Engl.J.Med.365:1384-1395(2011)和Furney等人,Cancer Discov.,3(10):1122-1129(2013)中所述的那些。

[0089] 剪接体调节剂通常以基因/突变特异性方式优先作用于肿瘤细胞(Fan等人,ACS Chem.Biol.6,582-589(2011))。在各个实施方案中,PHF5A突变和/或SF3B1突变带来对剪接调节剂的癌症治疗的抗性。在其他实施方案中,PHF5A和/或SF3B1中的突变导致剪接调节剂的活性降低或活性改变。在一些实施方案中,单独的PHF5A中的突变带来对使用剪接调节剂的治疗的抗性。在一些实施方案中,PHF5A中的突变和SF3B1中的突变蛋白带来对使用剪接

调节剂的治疗的抗性。

[0090] 在一些实施方案中,与患有缺乏这种突变的癌症受试者相比,PHF5A中的突变可以带来或增加对普拉地内酯或普拉地内酯衍生物、herboxidiene或herboxidiene衍生物、剪接抑素或剪接抑素衍生物、和/或sudemycin或sudemycin衍生物的抗性。在一些实施方案中,PHF5A中Y36位的突变可带来或增强对普拉地内酯或普拉地内酯衍生物、herboxidiene或herboxidiene衍生物、剪接抑素或剪接抑素衍生物和sudemycin或sudemycin衍生物的抗性。在一些实施方案中,该突变是Y36C突变。在一些实施方案中,PHF5A中的Y36C突变可以带来或增强对E7107、FR901464、herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素A、和/或sudemycin D的抗性。

[0091] 在一些实施方案中,PHF5A中的Y36C突变可以带来或增强对E7107的抗性。在一些实施方案中,PHF5A中的Y36C突变可带来或增强对herboxidiene的抗性。在一些实施方案中,PHF5A中的Y36C突变可以带来或增强对FR901464的抗性。在一些实施方案中,PHF5A中的Y36C突变可以带来或增强对普拉地内酯的抗性。在一些实施方案中,PHF5A中的Y36C突变可以带来或增强对剪接抑素A的抗性。在一些实施方案中,PHF5A中的Y36C突变可以带来或增强对sudemycin D的抗性。

[0092] 在各种实施方案中,与患有缺乏这种突变的组合的癌症受试者相比,PHF5A中的突变与SF3B1中的一个或多个突变的组合可带来或增加对普拉地内酯或普拉地内酯衍生物、herboxidiene或herboxidiene衍生物、剪接抑素或剪接抑素衍生物、和/或sudemycin或sudemycin衍生物的抗性。在一些实施方案中,PHF5A突变包括在位置Y36处的突变,而SF3B1突变包括在位置K1071、R1074和V1078中的一处或多处的突变。在一些实施方案中,位置Y36处的突变是Y36C、Y36A、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E、或Y36R突变。在一些实施方案中,位置K1071、R1074和V1078中的一个或多个的突变包括K1071E突变、R1074H突变和/或V1078A或V1078I突变。

[0093] 在一些实施方案中,受试者的癌症不具有PHF5A中的Y36突变,但是在SF3B1中在位置K1071、R1074和V1078的一个或多个位置具有一个或多个突变。在一些实施方案中,位置K1071、R1074和V1078中的一个或多个的突变包括K1071E突变、R1074H突变和/或V1078A或V1078I突变。在一些实施方案中,与具有缺乏该突变的受试者相比,SF3B1中的突变可以带来或增加对普拉地内酯或普拉地内酯衍生物、herboxidiene或herboxidiene衍生物、剪接抑素或剪接抑素衍生物、和/或sudemycin或sudemycin衍生物的抗性。

[0094] B. 剪接调节剂

[0095] 多种剪接调节剂化合物是本领域已知的(参见,例如, Lee和Abdel-Wahab, Nature Medicine 7, 976-86 (2016)), 且可根据本发明所述的方法使用(例如,施用患有包含或缺乏PHF5A和/或SF3B1中所有或一些突变的癌症的患者)。例如,已显示细菌衍生的产物及其类似物靶向SF3b复合物。这些化合物可用于治疗肿瘤性疾病。在一些实施方案中所述剪接调节剂为SF3B1调节剂。在一些实施方案中所述剪接调节剂为PHF5A调节剂。在一些实施方案中,可使用调节剂的组合。

[0096] 在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为普拉地内酯或普拉地内酯衍生物。“普拉地内酯衍生物”是指在结构上与称为普拉地内酯的天然产物家族的成员有关并且保留起始化合物的一种或多种生物学功能的化合物。最初在细菌平板链球菌 (*Streptomyces*

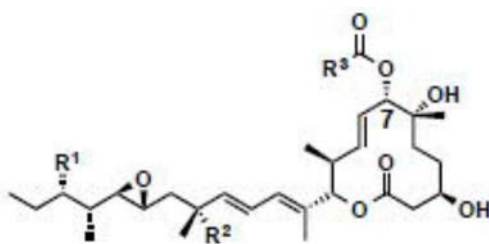
platensis) (Mizui等人, The Journal of Antibiotics. 57, 188-96 (2004)) 中鉴定出普拉地内酯具有强的细胞毒性, 并导致细胞周期停留在细胞周期的G1和G2/M期(例如, Bonnal等人, Nature Reviews, Drug Discovery 11, 847-59 (2012))。存在七种天然存在的普拉地内酯, 普拉地内酯A-G (Mizui等人, The Journal of Antibiotics. 57, 188-96 (2004); Sakai等人, The Journal of Antibiotics, 57, 180-7 (2004))。

[0097] 这些化合物中的一种, 普拉地内酯B, 已显示靶向SF3b剪接体以抑制剪接且改变基因表达的方式 (Kotake等人, Nature Chemical Biology 3:570-575 (2007))。一些普拉地内酯B类似物描述于, 例如, WO 2002/060890; WO 2004/011459; WO 2004/011661; WO 2004/050890; WO 2005/052152; WO 2006/009276; 和WO 2008/126918。

[0098] 美国专利7,884,128和7,816,401描述了合成普拉地内酯B和D的方法。普拉地内酯B和D的合成也可使用Kanada等人, Angew. Chem. Int. Ed., 46, 4350-4355 (2007); 美国专利7,550,503, 和国际公开WO 2003/099813 (描述了从普拉地内酯D (11107D) 合成E7107 (化合物45; 普拉地内酯B的合成的尿烷衍生物) 的方法) 中所述的方法进行。

[0099] 在一些实施方案中所述剪接调节化合物为普拉地内酯B、普拉地内酯D、或E7107。在一些实施方案中, 所述调节化合物为普拉地内酯B。在其它实施方案中, 所述调节化合物为普拉地内酯D。在其它实施方案中, 所述SF3B1调节剂为E7107。

[0100] 在一些实施方案中, 所述剪接调节化合物为具有如下所示结构的普拉地内酯化合物:



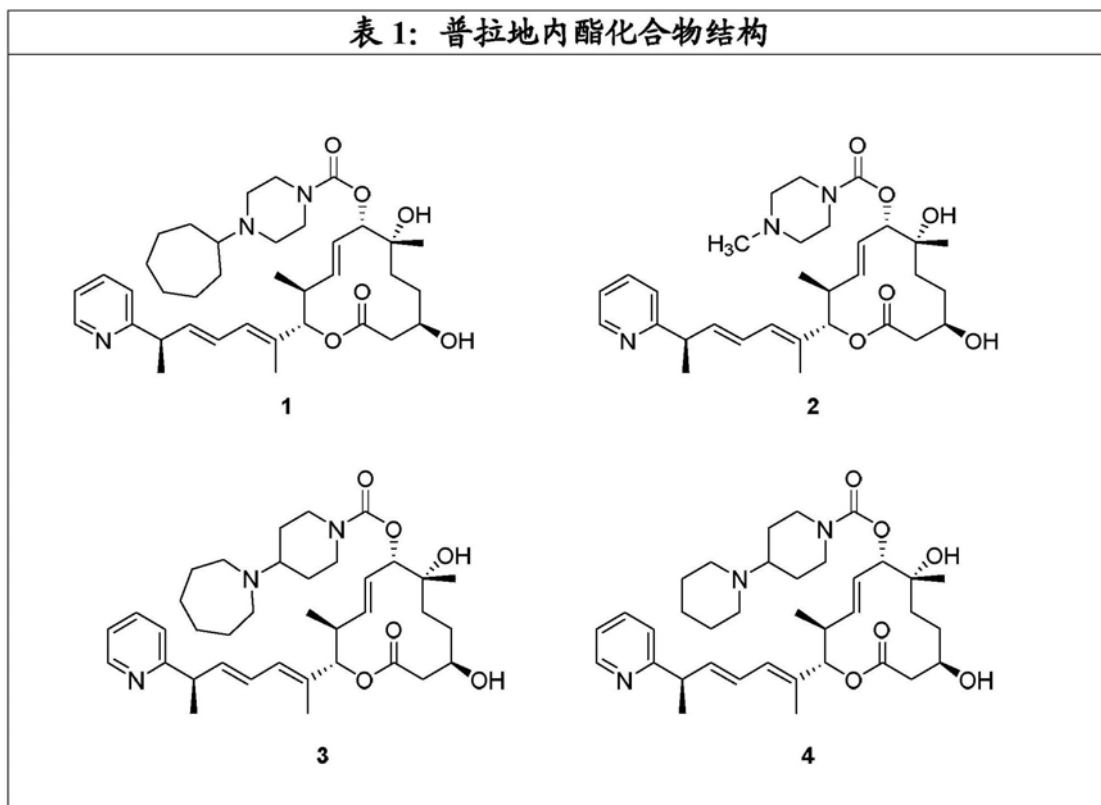
[0101]

化合物		R ¹	R ²	R ³
普拉地内酯	B	OH	H	Me
	D	OH	OH	Me
	E7107	OH	OH	
	FD-895	OH	H	Me

[0102] 在一些实施方案中, 所述剪接调节化合物为美国公开20150329528中所述的化合物。在一些实施方案中, 所述调节化合物为具有表1中所述式1-4任一种的普拉地内酯化合物。

表 1: 普拉地内酯化合物结构

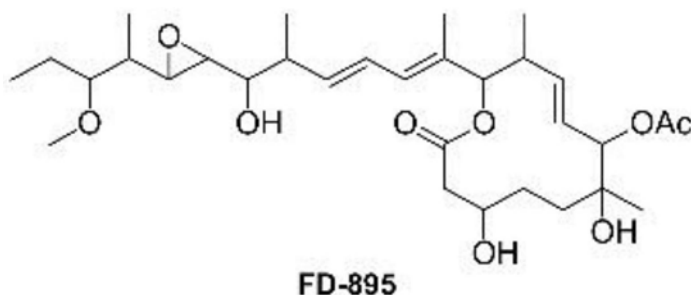
[0103]



[0104] 在一些实施方案中,所述剪接调节化合物可为FD-895。FD-895为普拉地内酯样成员(Kashyap等人,Haematological,100,945-954(2015))。其衍生自吸水链霉菌(*Sireptomycetes hygrosopicus*) A-9561(参见,例如,Seki-Asano等人,Journal of Antibiotics,47,1395-401(1994))。

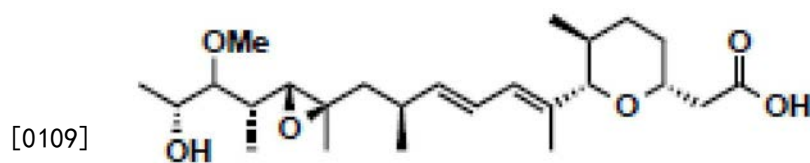
[0105] 在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为具有如下所示结构的FD-895化合物:

[0106]



[0107] 在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为herboxidiene或herboxidiene衍生物。Herboxidiene为GEX1A的一种形式。“herboxidiene衍生物”是指在结构上与herboxidiene或GEX1A家族的成员有关并且保留起始化合物的一种或多种生物学功能的化合物。Herboxidiene类似物还包括其他GEX家族成员。Herboxidiene首先在色褐链霉菌(*Sireptomycetes chromofuscus*) A7847中鉴定出来(Sakai等人,Journal of Antibiotics (Tokyo), 55,855-62(2002);Hasegawa等人,ACS Chemical Biology,18,229-33(2011))。通过靶向SF3b复合物(例如干扰pre-mRNA的剪接),Herboxidiene及其衍生物可提供抗肿瘤活性,同上。可以使用Lagisetti等人,ACS Chemical Biology,9,643-648(2014)中描述的方法进行herboxidiene的合成。美国专利5,719,179也描述了制备herboxidiene的方法。本领域技术人员将容易理解其他合成herboxidiene或herboxidiene衍生物的技术。

[0108] 在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为具有如下所示结构的herboxidiene化合物:



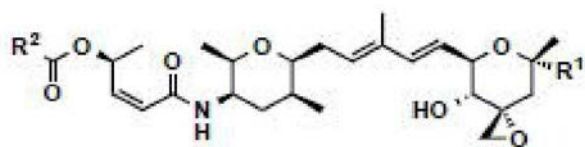
herboxidiene 的结构

[0110] 在其它实施方案中,所述herboxidiene衍生物为6-nor herboxidiene (Lagisetti 等人,ACS Chemical Biology,9,643-648 (2014))。

[0111] 在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为剪接抑素或剪接抑素衍生物。“剪接抑素衍生物”是指与已知剪接抑素家族的成员在结构上相关并且保留起始化合物的一种或多种生物学功能的化合物。剪接抑素最初源自假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) No.2663,并且据报道是靶向SF3b的有效细胞毒剂 (Lee和Abdel-Wahab,Nature Medicine 7,976-86 (2016))。美国专利9,504,669提供了制备剪接抑素及其衍生物的方法。本领域技术人员将容易认识到合成剪接抑素和衍生物的其他技术。

[0112] 示例性剪接抑素化合物包括,但不限于,FR901463、FR901464、FR901465、meayamycin、meayamycin B、剪接抑素A (FR901464的甲基化衍生物) 和thailanstatin。在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为FR901463。在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为FR901464。在其它实施方案中,所述剪接调节化合物为FR901465。在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为meayamycin。在另一实施方案中,所述剪接调节化合物为meayamycin B。在其它实施方案中,所述剪接调节化合物为剪接抑素A。

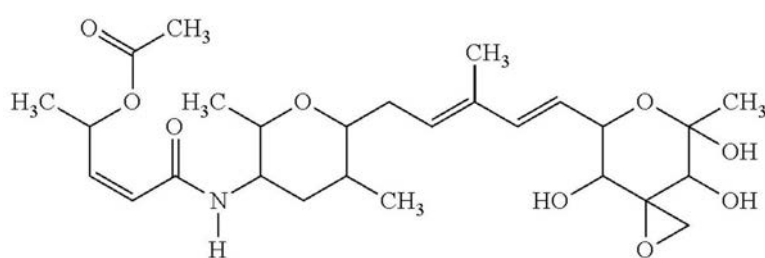
[0113] 在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为具有如下所示结构的剪接抑素化合物:



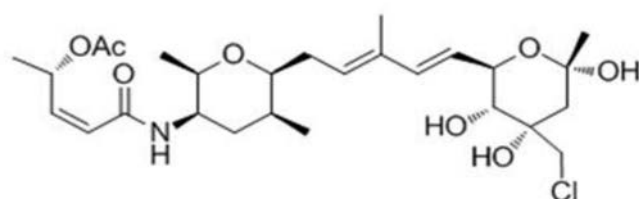
化合物	R ¹	R ²
FR901464	OH	Me
meayamycin	Me	Me
meayamycin B	Me	吗啉
剪接抑素 A	OMe	Me

FR901465

[0114]



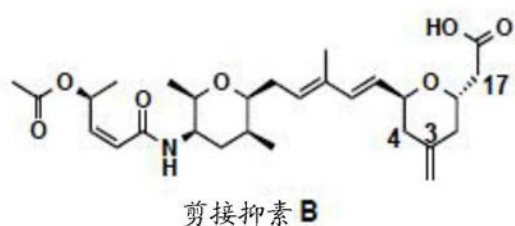
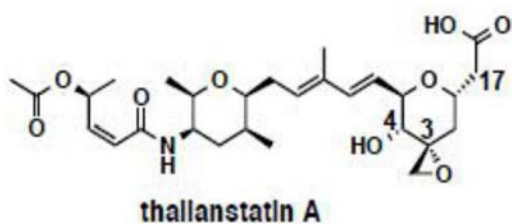
FR901463



[0115] 在各种实施方案中,所述剪接调节化合物为thailanstatin或thailanstatin衍生物。“thailanstatin衍生物”是指与已知的thailanstatin家族的成员在结构上相关的化合物。Thailanstatin首先在Burkholderia thailandensis MSMB43中鉴定。三种thailanstatin已从thailanstatin分离(Liu等人,Journal of Natural Products,76,685-93(2013)。在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为thailanstatin A、thailanstatin B或thailanstatin C。在其它实施方案中,所述剪接调节化合物为thailanstatin A。在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为thailanstatin B。在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为thailanstatin C。

[0116] 在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为具有如下所示结构的剪接抑素化合物:

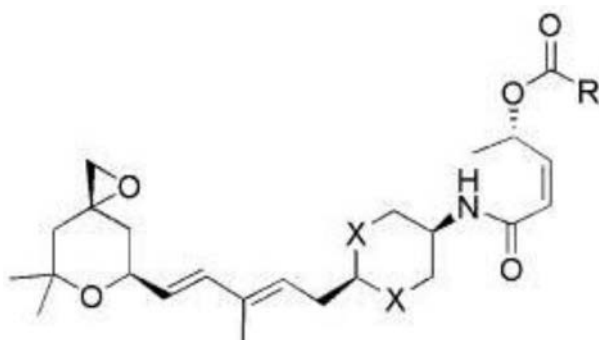
[0117]



[0118] 在一些实施方案中,剪接调节化合物是sudemycin或sudemycin衍生物。“sudemycin衍生物”是指与已知sudemycin家族的成员在结构上相关并且保留了起始化合物的一种或多种生物学功能的化合物。Sudemycin可以从普拉地内酯B和FR901464的衍生物合成(参见,例如,Fan等人,ACS Chem.Biol.,6 582-9 (2011))。Sudemycin显示出与其他天然剪接体调节剂相同的作用,包括:在体外无细胞剪接测定中抑制剪接,在基于细胞的双报告子测定中抑制剪接,细胞周期停滞和改变SF3b剪接因子的细胞定位。同上。Sudemycin可以按照Lagiseti等人,J.Med.Chem.,52,6979-90,(2009);和Lagiseti等人,J.Med.Chem.,51:6220-24 (2008) 所述合成。本领域技术人员将容易地认识到合成sudemycin和衍生物的其他技术。

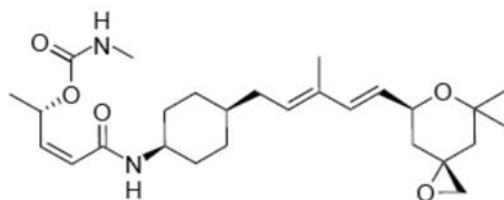
[0119] 示例性剪接调节化合物包括,但不限于sudemycin C、sudemycin C1、sudemycin D1、sudemycin D6、sudemycin E和sudemycin F1。在各种实施方案中,所述剪接调节化合物为sudemycin C。在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为sudemycin C1。在各种实施方案中,所述剪接调节化合物为sudemycin D1。在其它实施方案中,所述剪接调节化合物为sudemycin D6。在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为sudemycin E。在其它实施方案中,所述剪接调节化合物为sudemycin F1。

[0120] 在一些实施方案中,所述剪接调节化合物为具有如下所示结构的sudemycin化合物:



Sudemycin C: X=CH₂; R= Me
Sudemycin C1: X=CH₂; R= CH(CH₃)₂
Sudemycin E: X=O; R= CH(CH₃)₂
Sudemycin F1: X=O; R= N(CH₃)₂

[0121]



Sudemycin D6

[0122] 本发明所述的方法还可用于评估和鉴定另外的已知和新颖的剪接调节化合物,例如靶向剪接复合物的化合物,根据PHF5A和/或SF3B1突变的状态而使用。这些包括herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素A和sudemycin的替代衍生物和类似物。

[0123] C. 测序方法和样品

[0124] 本发明描述的方法的一些实施方案涉及鉴定、检测和/或确定PHF5A突变和/或SF3B1突变的存在。存在用于检测、定量和测序核酸或由此编码的蛋白质的多种方法,并且在本发明公开的实施方案中,每种方法都可以适用于检测PHF5A突变和/或SF3B1突变。示例性方法包括定量核酸的测定法,例如原位杂交、微阵列、核酸测序、基于PCR的方法包括实时PCR(RT-PCR)、全外显子组测序、单核苷酸多态性分析、深度测序、靶向基因测序、或其任意组合。在一些实施方案中,根据例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (2000))中描述的方法进行前述技术和程序。还参见Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,ed.,Greene Publishing and Wiley-Interscience,New York,1992(有定期更新)。

[0125] 在示例性的基于PCR的方法中,特定的PHF5A突变和/或SF3B1突变可通过特异性扩增含有或怀疑含有该突变的序列来检测。例如,该方法可涉及从患者获得肿瘤或癌细胞样品,分离基因组DNA,并扩增PHF5A和/或SF3B1基因或其可疑突变周围的一部分(例如,在PHF5A中包含Y36的区域)。

[0126] 在各种实施方案中,基于PCR的方法可以采用特别设计为与来自肿瘤样品的PHF5A或SF3B1基因的第一部分杂交的第一引物。该方法可以进一步使用第二反向引物(opposing primer),该第二反向引物与PHF5A或SF3B1基因中的其他地方和/或第一引物的PCR延伸产物的片段杂交,所述第一引物的PCR延伸产物的片段对应于基因中的另一序列,例如上游或下游位置的序列。在一些实施方案中,PCR引物可以与包含可疑突变的区域(例如,在PHF5A中包括Y36的区域)或不包括可疑突变位置的区域杂交。在各种实施方案中,PCR检测方法可以是定量(或实时)PCR。在定量PCR的一些实施方案中,使用核酸探针检测扩增的PCR产物,其中所述探针可包含一种或多种可检测的标记。

[0127] 在一些实施方案中,包括但不限于全基因组测序(WGS)和全外显子组测序(WES)的测序技术可用于检测、测量或分析样品中是否存在PHF5A突变和/或SF3B1突变。WGS(也称为全基因组测序、完整基因组测序或完全基因组测序)确定受试者或细胞样品的完整DNA序列。WGS检测样品中PHF5A突变和/或SF3B1突变的示例性方法可包括Ng和Kirkness在Methods Mol Biol.628,215-26(2010)中所述的方法。

[0128] WES(也称为外显子组测序或靶向外显子组捕获)允许分析许多基因,但是仅分析外显子。WES的示例性方法可以包括Gnirke等人,Nature Biotechnology 27,182-189(2009)描述的那些方法。

[0129] 在各种实施方案中,从含有癌细胞或肿瘤组织的人或非人动物受试者获得样品。“样品”是来自受试者的任何生物样品。该术语包括从多种生物学来源获得的样品。示例性样品包括但不限于细胞培养物、组织、活组织检查物、口腔组织、胃肠组织、器官、细胞器、生物液、血液样品、尿液样品、皮肤样品等。血液样本可以是全血、部分纯化的血液、或全部或部分纯化的血液的级分,例如外周血单核细胞(PBMC)。样品的来源可以是实体组织样品,例如肿瘤组织活检物。组织活检样品可以是来自例如乳腺组织、皮肤、肺或淋巴结的活检物。样品也可以是例如骨髓样品,包括骨髓穿刺物和骨髓活检样品。样品也可以是液体活检物,例如循环肿瘤细胞、无细胞的循环肿瘤DNA或外来体。

[0130] 在一些实施方案中,所述样品为人样品。在一些实施方案中,所述人样品包括血液癌细胞或实体瘤细胞。示例性血液癌症包括慢性淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性粒单核细胞白血病、急性单核细胞性白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤。示例性实体瘤包括癌,例如腺癌,并且可以选自乳腺癌、肺癌、肝癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌或肾癌。肿瘤样品可以直接得自患者或得自患者的样品,例如衍生自生物液或组织样品的培养细胞。样品可以是受试者直接获得的细胞或从患者获得的细胞衍生的细胞的存档样品,例如冷冻保存的样品。

[0131] D. 诊断方法

[0132] 在各个实施方案中,本发明提供了鉴定患有或怀疑患有适合用剪接调节剂治疗的肿瘤性疾病的受试者的方法。在一些实施方案中,鉴定患有或怀疑患有将得益于剪接调节剂治疗的肿瘤性疾病的受试者的方法可包括从该受试者获得生物学样品,并检测单独的PHF5A中存在或不存在突变(蛋白质中或编码该蛋白质的核酸中),或存在或不存在上述突变与SF3B1中的一个或多个突变的组合。

[0133] 在一些实施方案中,在不存在PHF5A突变的情况下,特别是在位置Y36不存在突变的情况下,将受试者鉴定为适合用剪接调节剂治疗的候选人。在一些实施方案中,受试者不具有Y36A、Y36C、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E或Y36R突变。在一些实施方案中,受试者不具有Y36C突变。PHF5A突变的不存在可表明该受试者对剪接调节剂的治疗没有耐药性。PHF5A突变的不存在可表明该受试者可受益于剪接调节剂的治疗。不存在PHF5A突变也可用于确认最初易受剪接调节剂治疗的肿瘤尚未发生突变以变得对治疗具有抗性(例如,通过在Y36位置形成突变)。因此,在一些实施方案中,PHF5A的突变状态可用于监测治疗过程中的治疗功效,并确定是否继续进行剪接调节剂治疗。

[0134] 在一些实施方案中,在不存在SF3B1突变的情况下,将受试者鉴定为适合用剪接调节剂治疗的候选者。例如,可以检查受试者在位置K1071、R1074和V1078中的一处或多处的突变(例如,K1071E突变、R1074H突变和/或V1078A或V1078I突变)。

[0135] 在一些实施方案中,PHF5A和/或SF3B1的突变状态可用于监测治疗过程中的治疗效力,并确定是否继续进行剪接调节剂治疗(例如,通过确认受试者在治疗期间在肿瘤细胞中在PHF5A的Y36位置没有出现突变)。

[0136] 在其他实施方案中,如果受试者中的癌症样品包含PHF5A突变,特别是在Y36位的突变(单独或与一种或多种SF3B1突变(例如,K1071E突变、R1074H突变、和/或V1078A或V1078I突变)组合),则该受试者被鉴定为不是使用剪接调节剂治疗的合适候选人。在一些实施方案中,所述受试者具有Y36A、Y36C、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E或Y36R突变。在一些实施方案中,所述受试者具有Y36C突变。PHF5A和/或SF3B1突变的存在可表明该受试者对剪接调节剂(包括herboxidiene,普拉地内酯,剪接抑素和sudemycin)的治疗有抗性。PHF5A和/或SF3B1突变的存在可表明该受试者不太可能受益于这种剪接调节剂的治疗。在一些实施方案中,PHF5A和/或SF3B1突变的存在可表明受试者更可能受益于不靶向剪接体的癌症的替代疗法。

[0137] 在E部分中(下文)提供了用于治疗患有肿瘤性疾病的受试者的方法的详细描述。

[0138] 在各种实施方案中,本发明提供了通过检测本发明所述的一种或多种突变的存在

或不存在来诊断患有对剪接调节剂有抗性的肿瘤性疾病的受试者的方法。在一些实施方案中,本发明提供了通过检测不存在本发明所述的一种或多种突变来诊断受试者患有对剪接调节剂有响应的肿瘤性疾病的方法。在一些实施方案中,诊断包括从受试者获得生物学样品并检测单独的或与SF3B1突变组合的PHF5A突变的存在或不存在。在一些实施方案中,PHF5A突变是Y36突变。在一些实施方案中,PHF5A突变的存在导致以下诊断,即所述受试者患有对剪接调节剂有抗性的肿瘤性疾病。在其他实施方案中,不存在PHF5A突变导致以下诊断,即受试者患有对剪接调节剂有响应的肿瘤性疾病。在一些实施方案中,SF3B1突变包括在位置K1071、R1074和V1078中的一处或多处的突变(例如,K1071E突变、R1074H突变和/或V1078A或V1078I突变)。

[0139] 在一些实施方案中,本发明提供在患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者中检测PHF5A和/或SF3B1突变的方法。此类方法可包括从受试者获得肿瘤样品,使肿瘤样品与剪接调节剂接触,以及在与剪接调节剂接触后测量肿瘤的生长、体积或大小。在一些实施方案中,与来自相同受试者的未处理的对照样品相比,肿瘤样品的生长、体积或大小的减少表明不存在PHF5A和/或SF3B1突变。在其他情况下,如果生长、体积或大小没有减少或增加,则表明存在PHF5A和/或SF3B1突变。

[0140] 在一些实施方案中,本发明提供的方法还包括基于突变的存在或不存在,对患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者施用治疗。治疗方法在E部分(以下)中描述。

[0141] 在一些实施方案中,测定或鉴定PHF5A突变可包括在患者的样品中测序PHF5A蛋白或编码PHF5A的基因。在一些实施方案中,测定或鉴定SF3B1突变包括在患者的样品中测序SF3B1蛋白质,或编码SF3B1的基因。

[0142] 在一些实施方案中,提供了一种鉴定能够克服PHF5A和/或SF3B1突变的剪接调节剂的方法,其包括提供来自受试者的肿瘤样品,该受试者被鉴定为在PHF5A中(特别是在位置Y36处的突变)和/或在SF3B1中(特别是K1071E突变、R1074H突变和/或V1078A或V1078I突变)具有突变,使样品与推定的剪接调节剂接触,并测量肿瘤样品的生长。如果肿瘤样品相对于未经处理的样品具有降低的生长,则鉴定出能够克服PHF5A和/或SF3B1突变的剪接调节剂。

[0143] E. 治疗方法

[0144] 在各种实施方案中,本发明提供治疗患有肿瘤性疾病或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法。在一些实施方案中,本发明提供治疗诊断为肿瘤性疾病的受试者的方法。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病可为血液恶性肿瘤、实体瘤或软组织肉瘤。在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病为与剪接体中的一种或多种突变相关的癌症。

[0145] 在一些实施方案中,所述肿瘤性疾病为血液恶性肿瘤。如本发明所述,术语“血液恶性肿瘤”是指增殖疾病如影响循环系统(例如,血液、骨髓和/或淋巴结)的癌症。血液恶性肿瘤的实例包括,但不限于,骨髓增生异常综合征、慢性淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性粒单核细胞白血病和急性骨髓性白血病。

[0146] 在一些实施方案中,肿瘤性疾病是实体瘤。如本发明所用,术语“实体瘤”是指在通常不包含囊或液体区域的组织中形成异常肿瘤块的诸如癌症的增殖性疾病,如肉瘤、癌和/或淋巴瘤。示例性疾病包括但不限于结肠癌、胰腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、乳腺癌、葡萄膜黑素瘤、胃癌、胆管癌和肺癌、或其任何亚组。

[0147] 在一些实施方案中,所述治疗的病症为骨髓增生异常综合征(MDS)或其它发育不良综合征。

[0148] 在一些实施方案中,肿瘤性疾病是软组织肉瘤。如本发明所用,术语“软组织肉瘤”是指起源于受试者身体的软组织的一种癌症。软组织可以包括肌肉、脂肪、血管、神经、纤维组织、包括腱的周围关节或深层皮肤组织。在这些区域中可发生多种肉瘤,并且它们可以在身体的任何部位发生。非限制性实例可包括平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、成纤维细胞肉瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤或其任何变体。

[0149] 在各个实施方案中,本发明提供了用于治疗患有或怀疑患有缺乏PHF5A突变的肿瘤性疾病的受试者的方法,以及用于治疗患有或怀疑患有具有PHF5A和/或SF3B1突变的肿瘤性疾病的受试者的方法。

[0150] 上文提供了PHF5A和SF3B1中突变的详细描述,以及检测蛋白质或编码它们的基因中突变的方法。

[0151] 在各种实施方案中,治疗方法包括检测PHF5A和/或SF3B1中的突变的存在或不存在。在一些实施方案中,该方法包括将剪接调节剂施用至缺少PHF5A突变的受试者。在一些实施方案中,该方法包括将剪接调节剂施用至缺少PHF5A和SF3B1中的突变的受试者。

[0152] 在一些实施方案中,使用剪接调节剂治疗被诊断为肿瘤性疾病的受试者。在其他实施方案中,本发明提供了用于治疗患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法,包括检测受试者中不存在PHF5A突变且将剪接调节剂施用至缺少PHF5A突变的受试者。在其他实施方案中,本发明提供了用于治疗患有肿瘤性疾病的受试者的方法,该方法包括:从该受试者获得生物学样品,确定该受试者的样品不包含PHF5A中的突变,以及向受试者施用治疗有效量的剪接调节剂。在一些实施方案中,确定样品在位置Y36处不具有突变。在一些实施方案中,所述样品不具有Y36A、Y36C、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E或Y36R突变。在一些实施方案中,所述受试者然后被施用剪接调节剂。在一些实施方案中,所述剪接调节剂为herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、sudemycin、或其衍生物或类似物。

[0153] 在一些实施方案中,在治疗之前,进一步评估来自受试者的样品以确定其是否在SF3B1中包含突变。例如,可以评估样品以确定在SF3B1中的位置K1071、R1074和V1078的一处或多处是否存在突变。在一些实施方案中,在位置K1071、R1074和V1078中的一处或多处不存在突变。在一些实施方案中,然后向受试者施用剪接调节剂。在一些实施方案中,所述剪接调节剂为herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、sudemycin、或其衍生物或类似物。

[0154] 在一些实施方案中,确定来自受试者的样品具有PHF5A中的Y36突变和/或在SF3B1中的位置K1071、R1074和V1078的一处或多处的突变。在一些实施方案中,PHF5A突变是Y36A、Y36C、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E或Y36R突变,并且SF3B1中的突变选自K1071E突变、R1074H突变和/或V1078A或V1078I突变中的一种或多种。在一些实施方案中,不向包含至少该突变模式的受试者施用剪接调节剂。在一些实施方案中,向受试者施用替代的癌症治疗(也称为替代的抗肿瘤剂),例如细胞毒性剂、抗体、细胞周期调节剂、凋亡剂、坏死剂或其他不靶向剪接体的试剂。

[0155] 在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗、监测和/或调节患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括在来自受试者的第一样品中检测不存在PHF5A中的突变,向缺乏PHF5A突变的受试者施用剪接调节剂,在第一次治疗后或几

轮治疗后从受试者获得另外的样品,在第二个样品中确定PHF5A中突变的存在与否,如果仍然不存在突变,则再施用进一步剂量的剪接调节剂。在一些实施方案中,PHF5A中的突变在位置Y36。在一些实施方案中,剪接调节剂选自herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、sudemycin、或其衍生物或类似物。

[0156] 在一些实施方案中,还检查样品中SF3B1中的突变。在一些实施方案中,检查样品中SF3B1中的位置K1071、R1074和V1078的一个或多个的突变。在一些实施方案中,在SF3B1中的这些位置中的一个或多个不存在突变(在PHF5A中的Y36位置也不存在),并且向受试者施用选自herboxidiene、普拉地内酯、剪接抑素、sudemycin、或其衍生物或类似物的剪接调节剂。

[0157] 在其他实施方案中,在施用剪接调节剂后,在第二个样品中检测到PHF5A突变。在一些实施方案中,突变在位置Y36。在一些实施方案中,PHF5A突变是Y36A、Y36C、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E、或Y36R突变。在一些实施方案中,在第二个样品中在K1071、R1074和V1078中一处或多处检测到突变。在这些实施方案中,停止剪接体治疗并且不向受试者施用额外剂量的剪接调节剂。在一些实施方案中,如果在施用剪接调节剂后检测到PHF5A中的突变,则向受试者施用不靶向剪接体的替代癌症治疗。

[0158] 在各种实施方案中,在整个治疗方案中,将获得样品并筛选PHF5A和/或SF3B1中的突变的过程再重复一次或多次。在一些实施方案中,继续治疗取决于根据上述方案在另外的样品中鉴定出的突变的存在或不存在。

[0159] 在一些实施方案中,本发明提供鉴定患有对剪接调节剂有响应的肿瘤性疾病的受试者的方法。在其它实施方案中,本发明提供鉴定对剪接调节剂有响应的患有肿瘤性疾病的受试者的方法,包括从受试者获得样品,和检测PHF5A和/或SF3B1突变的不存在。在另一实施方案中,当未检测到PHF5A和/或的突变时,所述受试者被鉴定为患有治疗响应性肿瘤性疾病。在其它实施方案中,所述缺少PHF5A突变的受试者被施用剪接调节剂。在一些实施方案中,所述缺少PHF5A和SF3B1突变的受试者被施用剪接调节剂。在一些实施方案中,本发明提供鉴定对剪接调节剂有响应的患有肿瘤性疾病的受试者的方法,包括从受试者获得样品,和检测PHF5A和/或SF3B1突变的不存在,其中当未检测到PHF5A和/或SF3B1突变时所述受试者被鉴定为患有治疗响应性肿瘤性疾病。该方法可进一步包括将剪接调节剂施用至受试者。

[0160] 在各种实施方案中,向缺少PHF5A突变的受试者施用一种或多种类型的剪接调节剂,单独施用或与不靶向剪接体的另一种癌症治疗组合施用。在一些实施方案中,向缺乏PHF5A突变的受试者施用一种、两种、三种、四种、五种或更多种剪接调节剂。技术人员可以根据患者和待治疗的肿瘤状况以及本领域公认的其他因素来选择合适的治疗有效剂量和施用方案。

[0161] 在一些实施方案中,所述缺少突变的受试者被施用SF3B1调节剂。在其它实施方案中,所述缺少突变的受试者被施用PHF5A调节剂。剪接调节剂的更详细描述参见上述B部分。

[0162] 在一些实施方案中,缺少PHF5A突变的受试者可被施用普拉地内酯或衍生物、剪接抑素或衍生物、herboxidiene或衍生物、thailanstatin或衍生物,或其任意组合。在一些实施方案中,确定缺少PHF5A突变的受试者可被施用普拉地内酯和/或剪接抑素、或herboxidiene、或thailanstatin。在其它实施方案中,确定缺少PHF5A突变的受试者可被施

用剪接抑素和/或普拉地内酯、或herboxidiene、或thailanstatin。在另一实施方案中,确定缺少PHF5A突变的受试者可被施用herboxidiene和/或剪接抑素、或普拉地内酯、或thailanstatin。

[0163] 在一些实施方案中,确定缺少PHF5A突变的受试者可被施用表1所示的普拉地内酯B、普拉地内酯D、E7107、或普拉地内酯调节剂、或其组合。在其它实施方案中,确定缺少PHF5A突变的受试者可被施用FR901463、FR901464、FR901465、meayamycin、meayamycin B、剪接抑素A、sudemyacin C、sudemyacin C1、sudemyacin D1、sudemyacin D6、sudemyacin E、或sudemyacin F、或其组合。在其它实施方案中,确定缺少PHF5A突变的受试者可被施用herboxidiene或衍生物。

[0164] 在其它实施方案中,缺少PHF5A突变的受试者被共施用剪接调节剂与一种或多种其它肿瘤治疗。

[0165] 在各种实施方案中,本发明提供的方法包括检测PHF5A中的突变。在一些实施方案中,所述受试者已被确定为具有PHF5A突变。在一些实施方案中,所述受试者已被确定为具有位于或接近PHF5A-SF3B1界面的突变。在一些实施方案中,具体的PHF5A突变包括Y36突变。在一些实施方案中,本发明提供的方法检测PHF5A中的Y36突变。在一些实施方案中,本发明提供的方法检测Y36A、Y36C、Y36S、Y36F、Y36W、Y36E或Y36R突变。在具体实施方案中,本发明提供的方法检测Y36C突变。

[0166] 在各种实施方案中,当检测到PHF5A突变(例如Y36突变)和/或SF3B1突变时,任何不靶向剪接体的抗肿瘤剂都可以用作肿瘤性疾病的替代疗法方法。另外,在缺乏PHF5A突变的受试者中,此类治疗可以用作用剪接调节剂治疗的辅助治疗。

[0167] 合适的替代疗法可单独或组合使用。在一些实施方案中,所述替代抗肿瘤剂可为细胞毒素剂和/或细胞生长抑制剂。细胞毒性和/或细胞生长抑制剂的非限制性实例包括阿那曲唑、硫唑嘌呤、Bcg、比卡鲁胺、氯霉素、环孢素、西多福韦、包含煤焦油的产品、秋水仙碱、达那唑、己烯雌酚、地诺前列酮、包含地蒽酚的产物、度他雄胺、雌二醇、依西美坦、非那雄胺、氟他胺、更昔洛韦、促性腺激素、绒毛膜戈舍瑞林(chorionic Goserelin)、包含干扰素的产品(包括聚乙二醇干扰素)、来氟米特、来曲唑、乙酸亮丙瑞林、甲羟孕酮、甲地孕酮、促生育素、米非司酮、霉酚酸酯、那法瑞林、包含雌激素的产品、催产素(包括syntocinon和麦角新碱)、Podophyllin、包含孕酮的产品、雷洛昔芬、Ribavarin、西罗莫司、链佐星、他克莫司、他莫昔芬、睾酮、沙利度胺、托瑞米芬、三氟尿苷、曲普瑞林、缬更昔洛韦和齐多夫定。

[0168] 在一些实施方案中,所述替代抗肿瘤剂可为蛋白酶体抑制剂。在一些实施方案中,所述蛋白酶体抑制剂可为泛细胞毒性抑制剂。蛋白酶抑制剂的非限制性实例包括硼替佐米(Velcade®)、卡非佐米(Kyprolis®)、艾沙佐米(Ninlaro®)、沙利度胺(Thalomid®)、泊马度胺(Pomalyst®)、双硫仑、表没食子儿茶精-3-没食子酸酯、marizomib(salinosporamide A)、oprozomib(ONX-0912)、delanzomib(CEP-18770)、环氧酶素、MG132和β-羟基β-甲基丁酸酯。

[0169] 在一些实施方案中,本发明公开的方法进一步包括在治疗之前测定该受试者是否具有癌症。在一些实施方案中,该测定通过鉴定以下SF3B1突变中的一种或多种进行: E622D、E622K、E622Q、E622V、Y623C、Y623H、Y623S、R625C、R625G、R625H、R625L、R625P、

R625S、N626D、N626H、N626I、N626S、N626Y、H662D、H662L、H662Q、H662R、H662Y、T663I、T663P、K666E、K666M、K666N、K666Q、K666R、K666S、K666T、K700E、V701A、V701F、V701I、I704F、I704N、I704S、I704V、G740E、G740K、G740R、G740V、K741N、K741Q、K741T、G742D、D781E、D781G、和/或D781N。在一些实施方案中,所述SF3B1突变包括K700E、K666N、R625C、G742D、R625H、E622D、H662Q、K666T、K666E、K666R、G740E、Y623C、T663I、K741N、N626Y、T663P、H662R、G740V、D781E、和/或R625L。在一些实施方案中,然后在根据上述方法治疗之前,筛选对剪接调节剂的抗性的被鉴定为患有癌症的受试者。在一些实施方案中,然后根据上述方法治疗被鉴定为患有癌症并且具有响应于剪接调节剂治疗的癌症的受试者。

[0170] 在各种实施方案中,本发明提供了用于确定患有或怀疑患有肿瘤性疾病的受试者的治疗方案的方法。在一些实施方案中,该方法包括鉴定PHF5A和/或SF3B1中突变的存在或不存在。在一些实施方案中,当不存在突变时指示包含剪接调节剂的治疗方案。在其他实施方案中,当存在突变时,指示替代的癌症治疗。

[0171] 在各种实施方案中,本发明提供了在肿瘤性疾病的治疗期间监测受试者的突变状态的方法。在一些实施方案中,所述方法包括在治疗之前或期间在受试者中检测不存在PHF5A中的突变。例如,在一些实施方案中,在治疗之前和/或期间在PHF5A中不存在突变表明该受试者可对剪接调节剂有反应。在其他实施方案中,在治疗之前和/或过程中突变的存在可表明需要不靶向剪接体的替代疗法。在一些实施方案中,本发明提供的方法包括在治疗之前检测PHF5A中突变的不存在,向受试者施用剪接调节剂,以及在治疗期间监测突变状态。在一些实施方案中,该方法进一步包括在用剪接调节剂治疗期间检测PHF5A突变的不存在并决定继续治疗。PHF5A突变不存在表明可以向受试者施用进一步剂量的剪接调节剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括在用剪接调节剂治疗期间检测PHF5A中突变的存在,并决定终止治疗和/或切换至替代的癌症治疗。例如,PHF5A中突变的存在可表明应终止使用剪接调节剂的治疗,并且应施用本发明所述的替代疗法。

[0172] 在一些实施方案中,本发明提供的方法包括在整个治疗过程中监测PHF5A中突变的存在或不存在。在一些实施方案中,本发明提供的方法还包括在整个治疗过程中监测SF3B1中突变的存在或不存在。在一些实施方案中,本发明提供的方法包括在用剪接调节剂的每个治疗周期后检查是否存在PHF5A和/或SF3B1中的突变。

[0173] 在各种实施方案中,本发明的公开内容提供了用于治疗肿瘤性疾病的剪接调节剂,其中当如先前指示存在或不存在PHF5A和/或SF3B1中的突变时,所述剪接调节剂被指示用于使用。在各种实施方案中,本发明的公开内容提供了用于制造用于治疗肿瘤性疾病的药物的剪接调节剂,其中当如先前指示存在或不存在PHF5A和/或SF3B1中的突变时,指示所述剪接调节剂用于使用。在各种实施方案中,本发明中的公开内容提供了用于治疗肿瘤性疾病的PHF5A和/或SF3B1中的突变,其中根据PHF5A和/或SF3B1中突变的存在或不存在来指示用于治疗剪接调节剂。

[0174] F. 试剂盒

[0175] 在各种实施方案中,本发明还公开了一种试剂盒,其包含检测PHF5A和/或SF3B1中的突变的试剂。本领域技术人员将认识到适于执行本发明的方法的试剂盒的组分。例如,试剂盒可包括一个或多个容器,每个容器适于容纳一种或多种试剂或其他用于检测PHF5A和/或SF3B1中的突变的物质,使用该试剂盒检测PHF5A和/或SF3B1中的突变的说明书,以及任

选的在鉴定出此类突变存在或不存在后进行本发明所述一种或多种方法的说明书。

[0176] 在一些情况下,试剂盒还可包括一个或多个小瓶、试管、瓶子、分配器等,其能够容纳实施本发明所需的一种或多种试剂。

[0177] 本发明的试剂盒的说明书可以被粘贴到包装材料上,被包括在包装说明书中,和/或由到网站的链接来标识。尽管说明书通常是书面或印刷材料,但不限于此。本发明考虑了能够存储这样的说明并将其传达给终端用户的任何介质。此类介质包括但不限于电子存储介质(例如磁盘,磁带,盒带,芯片),光学介质(例如CD ROM)等。如本发明所使用的,术语“说明书”可以包括提供说明的互联网站点的地址。这样的实例可以包括提供网址的试剂盒,在该网址中可以查看和/或从其下载说明书。在其他情况下,本发明的试剂盒可包括可用于实施本发明的方法的一个或多个计算机程序。例如,可以提供计算机程序,该计算机程序从微量读板器或实时PCR凝胶或读数中获取输出,并根据在孔、毛细管或凝胶中观察到的光密度制备校准曲线,并将这些光密度或其他定量读数与带有测试样品的孔、毛细管或凝胶中的光密度或其他定量读数比较。

[0178] 在一些实施方案中,所述试剂盒可包含用于检测突变的说明书。在其它实施方案中,所述试剂盒可包含检测PHF5A突变的试剂,和用于检测突变的说明书。该试剂盒可进一步包括用于检测SF3B1突变的试剂。在一些实施方案中,所述试剂盒用于检测PHF5A中的Y36C突变和/或SF3B1中的K1071、R1074或V1078突变,或其组合。在具体实施方案中,本发明所述试剂盒用于检测PHF5A中的Y36C突变和/或SF3B1中的K1071突变的存在或不存在。在另一具体实施方案中,本发明所述试剂盒用于检测PHF5A中的Y36C突变和/或SF3B1中的R1074突变的存在或不存在。在另一具体实施方案中,本发明所述试剂盒用于检测PHF5A中的Y36C突变和/或SF3B1中的V1078突变的存在或不存在。在其它实施方案中,所述试剂盒用于检测PHF5A中的Y36C突变的存在或不存在。在一些实施方案中,所述试剂盒用于检测SF3B1中的K1071突变的存在或不存在。在其它实施方案中,所述试剂盒用于检测SF3B1中R1074突变的存在或不存在。在其它实施方案中,所述试剂盒用于检测SF3B1中V1078突变的存在或不存在。

[0179] 等价物

[0180] 对本领域技术人员而言显而易见的是,本发明描述的本发明的方法的其他合适的修改和改型是显而易见的,并且可以在不脱离本发明或实施方案的范围的情况下使用合适的等同方式进行修改。现在已经详细描述了一些化合物和方法,通过参考以下实施例将更清楚地理解它们,其被包括在内仅出于说明的目的,而无意于进行限制。

实施例

[0181] 下列实施例用于举例说明而不以任何方式限制本发明。

[0182] 1. 方法

[0183] 1.1. 材料

[0184] 亲本HCT116细胞获自ATCC,并在补充有10%FBS的RPMI 1640培养基(Thermo Fisher,GIBCO#11875)中培养。亲本Panc0504细胞获自ATCC,并在添加了葡萄糖(终浓度为4.5g/L)、HEPES(终浓度为10mM)、丙酮酸钠(终浓度为1mM)、人胰岛素(终浓度为10μg/ml)和15%FBS的GIBCO RPMI 1640培养基(Thermo Fisher,GIBCO#11875)中培养。通过使用多态

性短串联重复 (STR) 基因座进行基因分析来实现细胞系认证 (ATCC)。所有细胞系均无支原体污染。用于慢病毒包装的细胞系Lenti-X-293T细胞 (Clontech Laboratories, Inc. 目录号632180) 保存在达尔伯克改良伊格尔培养基 (Thermo Fisher, GIBCO#11965) 中, 该培养基含有10%胎牛血清和4mM L-谷氨酰胺。WT PHF5A cDNA获自Genecopoeia, 并克隆到pDONR 221载体 (Thermo Fisher) 中。通过LR重组将经序列验证的阳性克隆克隆到pLenti6.3/V5载体 (Thermo Fisher) 中。按照制造商的建议, 使用PHF5A WT质粒, 使用Agilent Quickchange II试剂盒进行Y36和V37的诱变。使用安捷伦的QuikChange Primer Design工具设计了用于诱变的所有引物。使用X293T细胞将经过验证的PHF5A Y36或V37变体的阳性克隆用于慢病毒生产。然后用含有病毒的培养基感染亲本HCT116细胞和Panc0504细胞, 并以10 μ g/ml的杀稻瘟菌素S (Thermo Fisher) 进行选择一周。工程化的细胞系保持在没有抗生素的相同培养基中。在LI-COR缓冲液 (LI-COR) 中以1:1000稀释度使用以下一抗进行蛋白质印迹分析: α -SF3B1小鼠单克隆抗体 (MBL, D221-3)、 α -SF3B3兔多克隆抗体 (Protein Tech, 14577-1-AP)、 α -SF3B4山羊多克隆抗体 (Santa Cruz, 14276)、 α -SF3B6/p14兔多克隆抗体 (Protein Tech, 12379-1-AP)、 α -PHF5A兔多克隆抗体 (Protein Tech, 15554-1-AP)、 α -GAPDH兔多克隆抗体 (Sigma, G9545) 以1:10,000使用。抗兔和抗山羊IRDye-800CW二抗 (LI-COR) 以1:5000稀释度使用, 抗小鼠IRDye-680LT二抗 (LI-COR) 以1:20,000稀释度使用。蛋白质印迹使用Odyssey V3.0成像仪 (LI-COR) 成像。

[0185] 图5显示PHF5A-Y36C改变了剪接调节剂对MCL1剪接的作用。图5A描绘了由WT或Y36C PHF5A过表达细胞在指示的处理下产生不同MCL1亚型的代表性sashimi图。图5B显示了在WT (左图) 或Y36C (右图) 中指示的MCL1亚型的taqman基因表达分析。用剪接调节剂处理PHF5A过表达的细胞。误差条表示标准偏差, $n = 4$ 。

[0186] 1.2. 化合物

[0187] 硼替佐米 (PS-341) 购自LC实验室 (目录号B-1408, 批号BBZ-112)。E7107和³H标记的普拉地内酯探针由Eisai Co.Ltd. 提供, 其合成方法先前已有报道 (Kotake等人, The FEBS journal 278, 4870-80 (2011))。Eisai Co.Ltd. 还提供了Herboxidiene。按照既定程序在室内合成了剪接抑素A和Sudemycin D6 (Ghosh和Chen, Organic letters 15, 5088-91 (2013); Lagiseti等人, Journal of medicinal chemistry 56, 10033-44 (2013))。对于剪接调节剂, 通过LC/MS和质子NMR评估化合物的身份和纯度。使用Waters H类Acquity超高效液相色谱系统测定纯度, 且具有XSelect CSH C18、1.7 μ m 2.1x 50mm柱, 在20 $^{\circ}$ C下流速为0.8mL/min。进样量由1 μ L DMSO中的1mM样品组成, 梯度为在2.5分钟的时间内从5%乙腈和0.1%甲酸到90%乙腈和0.1%甲酸。从积分的UV吸收峰确定每种化合物的纯度。在阳离子扫描中检测质量, 并与通过其通式预测的质量相对应。检测器条件为: 毛细管电压3.25kV, 锥电压30V, 源温度150 $^{\circ}$ C, 去溶剂化温度500 $^{\circ}$ C, 去溶剂化气体1000L/hr, 锥孔气体100L/hr。单离子记录用于确定样品的定量。在0.2s从 $m/z = 100-1000$ 的扫描范围采集数据, 并使用QuanLynx软件进行处理。在Bruker Ascend 400MHz光谱仪上获取每种化合物的质子NMR光谱, 以进一步评估样品的身份和纯度。所示溶剂对应于先前出版物中使用的溶剂 (用于E7107的吡啶 (Kotake等人, Nature chemical biology 3, 570-5 (2007)), 用于剪接抑素A的氯仿 (Ghosh和Chen, Organic letters 15, 5088-91 (2013)) 和sudemycin D6 (Lagiseti等人, Journal of medicinal chemistry 56, 10033-44 (2013)) 和用于herboxidiene的甲醇

(Ghosh和Li, Organic letters 15, 5088-91 (2013))。采集的光谱与这些化合物报道的先前数据相符。

[0188] 1.3. 生成抗性克隆, 制备全外显子组测序样品, 数据处理和候选突变的鉴定

[0189] 将250万个HCT116细胞接种在每个10cm的培养皿中, 并用指定剂量的剪接调节剂处理2周。每4天更新一次化合物。需要时, 将汇合的培养皿按1:3比例分割, 让细胞恢复过夜, 而在重新接种后不进行剪接调节剂处理。在化合物选择期结束时, 挑选存活的单个克隆并将其转移到12孔板中。在不进行剪接调节剂处理的情况下, 进一步扩增了单个抗性克隆, 并使用Qiagen的DNeasy Blood&Tissue Kit将每个克隆的100万个细胞沉淀, 用于基因组DNA提取。全外显子组测序(WXS)库由Novogene Corporation使用Agilent SureSelect Human All Exon V6试剂盒生成, 并在Illumina HiSeq平台上测序。每个样品收集12G原始数据。然后通过BWA-MEM(Shi等人, Nature biotechnology 33, 661-7 (2015))将WXS读数与hg19进行比对, 用MuTect2鉴定了体细胞突变(Schenone等人, Nature chemical biology 9, 232-40 (2013)), 其通过Sentieon管道(Wacker等人, Nature Chemistry Biology 8, 235-7 (2012))将抗性克隆与亲本细胞系配对。由于选择了WXS的抗性克隆, 因此引起抗性的突变的等位基因频率应很高。重点关注等位基因频率高于0.2的非沉默突变(在H3调控的剪接体基因中)。

[0190] 1.4. 用于生长抑制分析的Cell Titer-Glo发光细胞活力测试

[0191] 为了进行CellTiter-Glo分析, 在添加化合物的前一天将500个细胞接种在384孔板的每个孔中。使用11份系列稀释液, 从10 μ M的最高最终剂量开始, 有另外十个剂量。始终保持DMSO百分比, 并且包括仅存在DMSO的对照。化合物添加后72小时; 将CellTiter-Glo试剂添加到培养基中, 孵育并在EnVision Multilabel Reader(PerkinElmer)上进行测定。将来自每个处理样品的发光值针对各个DMSO对照的平均值归一化。使用Graphpad Prism 6生成剂量响应曲线图, 并使用非线性回归分析和log(抑制剂)与响应-可变斜率(四个参数)进行拟合。对于IC₅₀位移的热图总结, 从剂量响应曲线中提取IC₅₀值且使用TIBCO Spotfire软件计算和绘制表达PHF5A变体的细胞系相对于WT细胞系的IC₅₀值的倍数变化。对于大于最高剂量的IC₅₀, 该值可任意设置为10 μ M。使用以下默认参数在TIBCO Spotfire中执行了无监督的聚类分析: 聚类方法: UPGMA; 测距: 欧几里得; 订购重量: 平均值; 归一化: (无); 空值替换: 常数值: 0。

[0192] 1.5. 细胞增殖测试

[0193] 将1000个指示基因型的细胞接种在96孔透明底板(Corning, #3904)中, 并使用IncuCyte ZOOM系统(Essen BioScience)每4小时用4X物镜捕获高清相衬图像。使用IncuCyte ZOOM软件(2016A)(Essen BioScience)分析收集的图像以计算融合百分比。分析的数据用Graphpad Prism 6作图, n=5。

[0194] 1.6. 免疫荧光

[0195] 将指定基因型的一百万个细胞接种在6孔板上的22mm Corning BioCoat纤连蛋白22mm盖玻片(Fisher Scientific 08-774-386)上。2天后, 将细胞在室温(RT)下用4%多聚甲醛/PBS固定20分钟。3X PBS洗涤后, 将细胞在室温下用0.1% Triton X-100/PBS渗透20分钟。3X PBS洗涤后, 将细胞在室温下用5% FBS/PBS封闭1小时, 并与 α -SF3B1小鼠单克隆抗体(MBL, D221-3)或 α -SC35小鼠单克隆抗体(Abcam, ab11826)以1:50稀释在冷室中于5% FBS/

PBS中孵育过夜。第二天,将盖玻片用PBS洗涤3次,并与Alexa Fluor 488抗小鼠二抗(Thermo Fisher Cat#:A-11029)以1:500稀释度在5%FBS/PBS中在室温下于黑暗中孵育1小时。然后将盖玻片用PBS洗涤3次,并使用带有DAPI的ProLong Gold Antifade Mountant(Thermo Fisher,P36935)进行封固。载玻片在Olympus IX-81倒置荧光显微镜上用10X物镜成像,并用Olympus的Metamorph捕获和处理。

[0196] 1.7. 细胞裂解和核提取物的制备

[0197] 为了进行蛋白质印迹分析,使用补充有蛋白酶体完全蛋白酶抑制剂混合物和PhosStop磷酸酶抑制剂混合物(Roche Life Science)的RIPA缓冲液提取细胞沉淀。然后将裂解物以最高速度离心10分钟;将上清液进行SDS-PAGE。对于核提取物制备,首先要洗涤细胞,然后将其刮入PBS中。离心后,将细胞沉淀重悬于5个填充细胞体积(PCV)的低渗缓冲液(10mM HEPES,pH7.9,1.5mM MgCl₂,10mM KCl,0.2mM PMSF,0.5mM DTT)中,并以3000rpm离心5分钟。将细胞沉淀重悬于3PCV的低渗缓冲液中,并在冰上溶胀10分钟。然后使用杜恩斯匀浆器裂解肿胀的细胞,并在4℃下以4000rpm旋转15分钟。沉淀含有细胞核,并用低盐缓冲液(20mM HEPES,pH7.9,1.5mM MgCl₂,20mM KCl,0.2mM EDTA,25%甘油,0.2mM PMSF,0.5mM DTT)的半堆积核体积(PNV)轻轻悬浮。然后加入一半的高盐缓冲液PNV(20mM HEPES,pH7.9,1.5mM MgCl₂,1.4M KCl,0.2mM EDTA,25%甘油,0.2mM PMSF,0.5mM DTT)并轻轻混合。将裂解物在冷室中摇动30分钟,然后在10,000rpm下于4℃离心30分钟。上清液含有核提取物,并使用具有30,000MWCO截留的Slide-A-Lyzer透析盒在透析缓冲液(20mM HEPES,pH7.9,0.2mM EDTA,20%甘油,0.2mM PMSF,0.5mM DTT)中透析4小时,2小时后更换缓冲液。然后将核提取物等分并快速冷冻。

[0198] 1.8. 体外剪接测定

[0199] 以下Ad2-衍生的(Pellizzoni等人,Cell 95,615-24(1998))和随后修饰的(Corrionero等人,Genes&development 25,445-59(2011))序列

actctcttccgcatcgctgtctgcgagggccagctgttgggggtgagtactccctctcaaaagcgggcatgacttctgcgctaaga

tgtcagtttccaaaaacgaggaggatttgatattcacctggcccgcggtgatgcctttgaggggtggccgcgtccatctggctag

[0200]

aaaagacaatcttttgttgcgaagctttgcacgtctagggcgcagtagtccagggtttccttgatgatgtcataactaatcctgtcc

cttttttccacagctcgcggttgaggacaaactcttcgcggtctttccagtactcttgatcggaacccgctcggcctccgaacg

[0201] (SEQ ID NO:3) (内含子为斜体和下划线)使用5'EcoRI和3'XbaI酶切位点克隆到pGEM-3Z载体中(Promega)。Ftz Δi质粒(Luo&Reed,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96,14937-42(1999))获自Robin Reed。分别使用XbaI和EcoRI将pGEM-3Z-Ad2.1和Ftz Δi质粒线性化、纯化、重悬于TE缓冲液中,并用作体外转录反应中的DNA模板。分别使用MEGAScript T7和MegaClear试剂盒(Invitrogen)生成并纯化Ad2.1 pre-mRNA和Ftz mRNA。使用80μg核提取物、20U RNasin核糖核酸酶抑制剂(Promega)、20ng Ad2.1 pre-mRNA和2ng Ftz mRNA(内部对照)制备20μL剪接反应液。与指定化合物预孵育15分钟后,添加活化缓冲液(0.5mM ATP,20mM磷酸肌酸,1.6mM MgCl₂)以引发剪接,并将反应液在30℃孵育90分钟。使用从RNeasy 96Kit(Qiagen)的改良方案提取RNA。剪接反应在350μL Buffer RLT Plus(Qiagen)中淬灭,并加入1.5体积

的乙醇。将混合物转移到RNeasy 96平板上,并按照试剂盒方案中的描述处理样品。用dH₂O将RNA稀释1/100。使用以下制备10μL RT-qPCR反应液:TaqMan RNA-to-CT1步试剂盒(Life Technologies)、2μL稀释的剪接反应,0.5μL Ad2(正向:ACTCTCTCCGCATCGCTGT (SEQ ID NO:4);反向:CCGACGGGTTTCCGATCCAA (SEQ ID NO:5);探针:CTGTTGGGCTCGCGTTG (SEQ ID NO:6)),和0.5μL Ftz(正向:TGGCATCAGATTGCAAAGAC (SEQ ID NO:7);反向:ACGCCGGGTGATGTATCTAT (SEQ ID NO:8);探针:CGAAACGC ACCCGTCAGACG (SEQ ID NO:9)) mRNA引物/探针组。Ad2 Ftz探针来自IDT,并用FAM受体和ZEN淬灭剂标记,而Ftz探针则用Hex和ZEN淬灭剂标记。

[0202] 1.9. 闪烁亲近测定法

[0203] 如下制备抗FLAG抗体(Sigma)到抗小鼠PVT SPA闪烁珠(PerkinElmer)的批量固定。对于每1.5mg的珠子,在150μL PBS中制备10μg抗体。抗体-珠混合物在室温下孵育30分钟,并以15,000RPM离心5分钟。每1.5mg抗体-珠混合物使用150μL PBS重悬。测试了前述的mini-SF3b复合物的³H标记的普拉地内酯探针(Kotake等人,Nature chemical biology, 570-5 (2007))结合。在缓冲液(20mM HEPES pH 8、200mM KCl,5%甘油)中,用50μL珠浆和0或50nM蛋白制备100μL结合反应物。将混合物孵育30分钟,并添加不同浓度的³H标记的普拉地内酯探针。将混合物孵育30分钟,并使用MicroBeta2 Plate Counter(PerkinElmer)读取发光信号。用WT mini-SF3b复合物进行化合物竞争研究。用50μL珠浆、缓冲液中的25nM蛋白和不同浓度的化合物制备100μL结合反应物。预孵育30分钟后,添加1nM ³H标记的普拉地内酯探针。将反应物孵育30分钟,并读取发光信号。

[0204] 先前制备的核提取物以2.5mg等分试样形式储存。每个等分试样足以用于三个SPA样品,并用磷酸酶和蛋白酶抑制剂稀释到1mL PBS的总体积中。将足够量的等分试样在4℃下以15,000RPM离心10分钟。将上清液移至干净的试管中并置于冰上。如上所述制备含有WT或Y36C PHF5A的重组蛋白复合物。如下制备抗SF3B1 (MBL) 抗体到抗小鼠PVT SPA闪烁珠(PerkinElmer)的批量固定。对于每2.5mg的核提取物,将5μg抗SF3B1抗体和1.5mg珠混合在150μL PBS中。抗体-珠混合物在室温下孵育30分钟,并以15,000RPM离心5分钟。将珠粒悬浮并加入制备的核提取物中。将该浆液在4℃温和混合下孵育2小时。通过以15,000RPM离心5分钟收集珠子,并用PBS+0.1%Triton X-100洗涤两次。在最后的离心步骤后,将每1.5mg的珠子与150μL PBS悬浮在一起。如下制备100μL结合反应物:50μL珠浆液,10μM的25μL冷竞争化合物,并在预孵育30分钟后,添加10nM ³H标记的普拉地内酯探针。将混合物孵育30分钟,并使用MicroBeta2 Plate Counter(PerkinElmer)读取发光信号。

[0205] 1.10. 质谱分析

[0206] 将富集的样品在56℃下用5mM DTT还原45分钟,并在室温下用20mM碘乙酰胺烷基化30分钟。样品在4-15%的Tris甘氨酸凝胶上运行,将凝胶切下,脱色并在30℃用胰蛋白酶消化过夜。依次用50μl缓冲液A、B和C提取肽(缓冲液A-1%甲酸和50%乙腈,B-100mM碳酸氢铵,C-100%乙腈)。使用冻干机将样品干燥,然后重悬于30μl运行缓冲液A(水中0.1%甲酸)中。样品通过纳米毛细管液相色谱串联质谱分析,其是在与QExactive质谱仪(Thermo Scientific)相连的easy-nLC 1000HPLC系统上,使用C18简单喷雾柱,粒度:3μm;150x0.075mm I.D.,并使用Proteome discoverer 1.4分析数据。

[0207] 1.11. PHF5A的克隆、蛋白质纯化和结晶

[0208] 合成了包含用于增强蛋白质稳定性的C40S突变的全长人PHF5A,并将其亚克隆在具有N末端His-MBP-TEV可切割标签的pET-28a的NdeI和EcoRI位点之间。蛋白在LB培养基中生长的BL21 (DE3) 星细胞中表达。细胞用补充了100 μ M ZnCl₂的0.5M IPTG在16 $^{\circ}$ C于OD₆₀₀=1.0过夜诱导。在HEPES pH 7.5、500mM NaCl、1mM TCEP中制备裂解液,将其上样到NTA柱上,并以最高500mM咪唑的梯度洗脱。合并峰级分,MBP标签在4 $^{\circ}$ C下被TEV蛋白酶裂解过夜。切碎的MBP和过量的TEV通过反向NTA柱除去。浓缩含有PH5A的流过级分,并加载到在100mM NaCl、25mM HEPES pH7.5、1mM TCEP中平衡的16/60Sephacryl-100柱上。通过在凝胶过滤缓冲液中平衡的HiTrap SP HP柱上进行离子交换而进一步纯化峰级分,并以最高1M NaCl的梯度洗脱。PHF5A在约300mM NaCl中洗脱且浓缩至10mg/ml,然后在液体N₂中速冻,以在-80 $^{\circ}$ C下储存。所得蛋白质未能结晶,但通过用胰凝乳蛋白酶(1:1000摩尔比)在室温进行有限消化2小时获得了蛋白水解稳定的结构域。一周后,在包含100mM CHES pH9.5、800mM柠檬酸钠和0.5%辛基- β -葡萄糖苷的储液中平衡的2 μ L+2 μ L悬滴中,立方状晶体生长至最终尺寸为50 $\times$ 50 $\times$ 50微米。晶体在补充有20%乙二醇的储液中冷冻。

[0209] 1.12. 结构测定

[0210] 通过Shamrock Structures LLC在APS光束线21D处收集锌边缘处的单波长反常衍射(SAD)数据。晶体衍射到2.0 $\text{\AA}$,且数据用iMosflm和xia2在立方空间群P2₁3 ($a=b=c=82.2\text{ \AA}$ 且 $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$)中(Winter等人,Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 69,1260-73 (2013); Battye等人,Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 67,271-81 (2011))处理,其表明溶剂含量为47%,假定在不对称单元中有两个分子。反常信号扩展到大约2.0 $\text{\AA}$,并使用SHELX C/D/E (Skubak&Pannu等人,Nature communications 4,2777 (2013); Sheldrick,Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66,479-85 (2010))用于定位六个高占用锌异常位点,确认两个分子在不对称单元中。此初始子结构方案的FOM为0.404,经过密度修改和手动测定后,FOM提高至0.76。Buccaneer和REFMAC5 (Murshudov等人,Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 53,240-55 (1997))对每种单体自动追踪76个残基,使用Coot构建了另外13个残基。使用该模型相对原始数据集细化至1.8 $\text{\AA}$,并经过数次重复的重建和细化,所得最终模型由分子A中的残基2-91和分子B中的3-92组成,最终统计量 $R=0.17$, $R_{\text{free}}=0.20$ 且 $FOM=0.86$ (Murshudov等人,Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 53,240-55 (1997); Emsley等人,Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66,486-501 (2010))。细化的座标存放在蛋白质数据库(PDB:5SYB)中。

[0211] 1.13. 重组蛋白质复合物的克隆和纯化

[0212] 为了重组调节剂结合位点,基于酵母低温-EM结构从SF3b复合物中选择了四种蛋白质。合成了截短的SF3B1、全长SF3B3、PHF5A和SF3B5,并将其亚克隆在pFastBac1载体的EcoRI和NcoI位点之间。在添加了N末端FLAG标签的情况下,仅克隆了SF3B1的残基454-1304的HEAT重复域。SF3B3和SF3B5具有N端His-tag。产生了四种病毒,并用于以约10:1的比例共感染SF21细胞。72小时后收获细胞,并在40mM HEPES pH8.0、500mM NaCl、10%甘油和1mM

TCEP中裂解。使用镍珠和FLAG珠,通过批次方法纯化复合物。浓缩洗脱液,并在20mM HEPES pH8.0、300mM NaCl、10%甘油和1mM TCEP缓冲液中的凝胶过滤柱(superdex 200)上运行。收集级分,浓缩至4mg/mL,并在液体N₂中快速冷冻以在-80℃下储存。含有PHF5A-Y36C突变的重组复合物的生产与WT重组复合物相同。

[0213] 1.14.RNA-Seq样品制备、数据处理和差异剪接连接的鉴定以及基因水平维恩图的产生和基因集富集

[0214] 用DMSO或E7107 (100nM和10μM)一式五份地将过表达PHF5A WT或Y36C突变体的细胞处理六小时,然后在TRIzol试剂(Thermo Fisher)中裂解。相分离后,使用MagMAX™-96总RNA分离试剂盒(Thermo Fisher, AM1830)进一步处理顶部水相,以提取RNA。使用带有RNA筛选带的安捷伦tapestation评估RNA质量。RNA-seq文库由北京基因组研究所(BGI)制备,并在Illumina HiSeq 4000上测序,每个样品6G的干净读数。按照STAR (Dobin等人, Bioinformatics 29,15-21 (2013))将RNA-seq读数与hg19进行比对,并使用STAR产生的原始结点计数来计算剪接的百分比(PSI),以定量相对于共享与之前所述相同的剪接位点的所有其他剪接结点的剪接结点使用(Darman等人, Cell report 13,1033-45 (2015))。使用Bioconductor中的limma软件包(Smyth, Statistical applications in genetics and molecular biology 3, Article3 (2004))中定义的矫正t检验评估一对样本组之间的差异PSI。使用Benjamini-Hochberg程序对统计p值进行了校正,并且q值小于或等于0.05被认为具有统计学显著性。使用在线工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>),将在E7107处理后与DMSO相比在PHF5A WT或Y36C细胞中与显著剪接变化相关的基因ID用于生成维恩图。然后,使用Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 路径数据库,对从维恩图分析中鉴定出的PHF5A WT或Y36C特定基因进行基因集富集分析(GSEA) (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/annotate.jsp>)。

[0215] 1.15.3383个结点的外显子跳跃与内含子保留PSI比较

[0216] 将覆盖不包括给定的盒式外显子的剪接点的读取数(外显子跳跃读取)与剪接读取数(其共享其3'剪接位点且具有毗邻盒式外显子的替代的5'剪接位点(外显子包含物读数))和在相同的3'剪接位点穿过外显子-内含子边界的读数(内含子保留读数)进行比较。将这些计数加起来,且它们的百分比剪接(PSI)分数分别用于在该基因座处的外显子跳跃事件、外显子包含事件和内含子保留事件。绘制了从PHF5A Y36C细胞中100nM E7107处理与相应的DMSO对照(3883事件)和同一基因座内含子保留结点的PSI之间的比较得出的所有显著外显子跳跃事件的PSI。对于所有其他处理,每个基因座的外显子跳跃结点和内含子保留结点的PSI均以相同顺序绘制。PSI是一式五份样品中的平均值。

[0217] 1.16.显著保留的内含子结点的GC含量计算

[0218] 所有显著的、治疗诱导的外显子跳跃结点的集合减少为具有至少100的序列长度的内含子(分别在其3'和5'末端与盒式外显子接界的内含子),其显著富集在未经处理的样本中,作为“外显子包含”事件且 $q < 0.05$,并且已知其3'和5'末端边界形成的中间序列空间是长度为至少50的RefSeq转录组注释中的外显子,以避免由跳跃多个外显子的事件引起的歧义。将每个内含子和外显子的序列分别分为100bin和50bin的等长度的条带,然后评估每个条带的GC含量(碱基分数“G”或“C”)。一旦所有内含子/外显子对都以这种方式挑选(binned)了序列内容,就使用100个数据引导程序(不超过内含子/外显子对的数量,进行替

换) 评估每个bin的所得均值和95%置信区间,并分别使用实线和透明间隔绘制。背景来自RefSeq的10,000个随机内含子/外显子对,它们满足相同的长度和边界要求。

[0219] 1.17. Taqman基因表达测试

[0220] 将指定基因型的8000个细胞接种在96孔板的每个孔中,并使其沉降过夜。在第二天,将11份连续稀释的指示化合物(始终为1:4倍稀释),最终剂量最高为10 μ M,添加到培养基中。加入化合物后4小时,倾析培养基并用PBS洗涤一次。然后从板上完全倒出PBS,并根据手册添加TaqMan基因表达细胞-CT试剂盒(Thermo Fisher,目录号AM1729)的裂解缓冲液(加DNase I)。在室温下在振荡器上孵育5分钟后,将终止溶液添加到每个孔中,并孵育2分钟。立即使用Cells-to-CT试剂盒建立逆转录,并使用Viia7(Thermo Fisher)将cDNA用于实时定量PCR分析。每个反应均与靶向特定靶基因剪接亚型的FAM标记探针和靶向18S rRNA的VIC标记探针(作为上样对照)多重复合(multiplexed)。因此,首先将每个孔中的FAM Ct值归一化为同一孔中的VIC Ct值,然后再进一步归一化为DMSO处理的对照样品的FAM/VIC比,以计算相对于DMSO的倍数变化。使用Graphpad Prism 6 (n=2)生成图形。这些测定法中使用的Taqman基因表达探针是:

[0221] 表2:基因探针

[0222]

<i>MCL1-L</i> 探针集	
正向引物	ATATGCCAAACCAGCTCCTAC (SEQ ID NO: 10)
探针	AGAACTCCACAAACCCATCCCAGC (SEQ ID NO: 11)
反向引物	AAGGACAAAACGGGACTGG (SEQ ID NO: 12)
<i>MCL1-S</i> 探针集	
正向引物	AAAGCCAATGGGCAGGT (SEQ ID NO: 13)
探针	TCCACAAACCCATCTTGGAAGGCC (SEQ ID NO: 14)
反向引物	CCACCTTCTAGGTCCTCTACAT (SEQ ID NO: 15)
<i>MCL1</i> 内含子 1 探针集	
正向引物	GACAAAGGAGGCCGTGAGGA (SEQ ID NO: 16)
探针	GTTTGTACGCCGTCGCTGAAA (SEQ ID NO: 17)
反向引物	TCAGGCATGCTTCGAAACTGGA (SEQ ID NO: 18)
<i>MCL1</i> 内含子 2 探针集	
正向引物	GCCCCGGGGTGAATAATAATTGGTTTACT (SEQ ID NO: 19)
探针	TTTCTAGGATGGGTTTGTGGAGTT (SEQ ID NO: 20)
反向引物	CCTGATGCCACCTTCTAGGTCCTCTAC (SEQ ID NO: 21)
泛 <i>MCL1</i> 探针集	
正向引物	GCCAAGGACACAAAGCCAAT (SEQ ID NO: 22)
探针	CTGGAGACCTTACGACGGGTGGG (SEQ ID NO: 23)
反向引物	AAGGCCGTCTCGTGGTT (SEQ ID NO: 24)
<i>SLC25A19</i> 成熟形式	Life Technologies Assay ID = Hs00222265_m1

	探针集	
[0223]	<i>EIF4A1</i> pre-mRNA 形式探针集	Life Technologies Assay ID = AJRR9DL

[0224] 1.18.统计

[0225] 如以上部分所述,进行了适当的统计方法和统计显著性的确定。

[0226] 2.结果

[0227] 2.1.化学基因组学分析确定了PHF5A和SF3B1中针对剪接调节剂的新抗性突变

[0228] 为了进一步研究靶向SF3b复合物的剪接调节剂的机制,通过在HCT116细胞中连续施用较低剂量的E7107 (4nM,约3X GI50) (一种普拉地内酯衍生物),或效力较低、结构上不同的剪接调节剂herboxidiene 20nM (约3X GI50),来探索具有较低应力水平的化合物产生抗性克隆的可能性(图1A)。相反,以前的方法使用逐步诱导剂量高达100nM的普拉地内酯B或E7107 (在WiDR细胞中约为130X GI50) 来分离抗性克隆(Yokoi等人,The FEBS journal 278,4870-80 (2011))。这种方法可以潜在地减轻高浓度下的脱靶活性,并增加了鉴定剪接调节剂的细微但常见机制的可能性。在选择两周后,扩增来自每种处理的六个抗性克隆,并进行全外显子组测序(WXS),以鉴定对剪接调节剂抗性的候选因果基因。与亲本系相比,总共鉴定出约11,000个单核苷酸变体(SNV)和插入缺失,其等位基因频率超过20%。但是,在与经过整理的剪接相关基因列表进行交叉对照并关注至少三个单独克隆中受影响的基因后,仅对两个基因中的突变进行了一致评分。六个E7107抗性克隆中的五个和六个herboxidiene抗性克隆中的两个在SF3B1中带有突变(图1B),包括先前确定的R1074H突变和两个新突变V1078A和V1078I,这进一步证明了该SF3B1区域涉及剪接调节剂作用。有趣的是,其余的E7107抗性克隆和四个herboxidiene抗性克隆带有PHF5A中的Y36C突变(图1B)。通过靶向桑格测序进一步证实了PHF5A和SF3B1中所有已鉴定的突变。此外,桑格测序表明,来自20nM herboxidiene处理的一个独立克隆是两个单独种群的集合,其中既包含PHF5A-Y36C,又包含SF3B1中的新的K1071E突变。虽然在抗性克隆中SF3B1或PHF5A突变发生的明显偏差(图1B)可暗示了普拉地内酯和herboxidiene骨架与SF3b复合物相互作用的方式存在差异,但这些数据表明这两种蛋白都是剪接调节剂的常见细胞靶标。

[0229] 不同抗性克隆的生长抑制分析显示,SF3B1-R1074H突变带来了E7107最强的抗性,而PHF5A-Y36C和SF3B1-V1078突变则较弱(图1C)。有趣的是,SF3B1-R1074H突变还带来了剪接抑素A和sudemycin D6更好的抗性,两者在化学上均与FR901464有关,而FR901464结构不同于普拉地内酯(图1D和1E)。相比之下,PHF5A-Y36C突变对herboxidiene处理产生了更大的抗性(图1F),这与选择herboxidiene后具有此突变的克隆的较高百分比一致(图1B)。SF3B1或PHF5A中的突变不会影响细胞株对硼替佐米(一种具有泛细胞毒性的蛋白酶体抑制剂)的敏感性,这突出了突变对剪接调节剂的特异性(图1G)。为了验证对不同骨架的明显偏爱,扩大了对其他化合物的CTG分析,直接比较了亲本系中SF3B1 R1074H克隆中GI50的变化与PHF5A Y36C克隆中GI50的变化。两种抗性突变均带来对所有检查的剪接调节剂的抗性。同样,化合物是基于其骨架而聚集,其中PHF5A Y36C显示出对herboxidiene类似物更好的抗性,而SF3B1 R1074H显示出对普拉地内酯和剪接抑素类似物的更好的抗性(图9)。

[0230] 2.2.PHF5A-Y36C不会影响基础细胞功能,但可带来对剪接调节剂的抗性

[0231] 为了进一步证实PHF5A-Y36C是剪接调节抗性背后的机制,在亲本HCT116细胞系中以相似水平表达了野生型(WT) PHF5A或Y36C PHF5A(图2A)。尽管该酪氨酸残基通过进化而具有序列保守性(van Roon等人,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105,9621-6(2008)),但PHF5A-WT或Y36C的表达均对细胞生长(图2B)、SF3B1蛋白的定位或核斑点形成没有明显影响。考虑到PHF5A是SF3b复合物中的七个蛋白质之一,则检查了该突变是否会破坏与任何核心成分的相互作用并改变复合物的整体组成。对来自野生型和突变细胞系的抗SF3B1抗体进行免疫沉淀(IP' ed)的样品进行了蛋白质印迹和质谱分析,以定性评估其组成(图2C)。在包含WT或Y36C PHF5A的复合物的整体组成上没有观察到显著差异,这表明除了这种突变外,它们还是完整的和具有功能的。全转录组RNA-seq分析证实,在工程化的细胞系中PHF5A-Y36C的表达占总PHF5A mRNA的约92%,但与WT相比,对整体剪接或基因表达的影响最小(图8)。亲本细胞和表达WT PHF5A的细胞对剪接调节剂处理敏感,PHF5A-Y36C的表达带来一组剪接调节剂抗性(图2D),表型复制了自发的PHF5A Y36C抗性克隆(图1C-1F)。这种抗性表型似乎是普遍的,因为当将PHF5A-Y36C引入另一种细胞系时也观察到了这种现象(图10)。

[0232] 接下来检查了PHF5A-Y36C突变在生化水平上的行为。与细胞数据一致(图2D),使用外源性pre-mRNA底物的体外剪接测定显示Y36C突变体被保护免受不同骨架的剪接调节剂的抑制(图3A)。为了验证体内是否也存在相似的保护水平,使用定量实时PCR分析来测试先前在E7107的I期临床试验中使用的两个内源药效标记基因的剪接(Eskens等,Clinical Cancer Research,19,6296-304(2013)) (图3B)。与体外剪接测定中观察到的效果一致,Y36C突变还减少了对剪接的成熟SLC25A19 mRNA的产生的抑制作用,以及剪接调节剂引起的未剪接、未成熟的EIF4A1 pre-mRNA的积累(图3B)。PHF5A-Y36C可以防止剪接调节剂引起的错剪。

[0233] 2.3. PHF5A-Y36C在总体水平上改变E7107诱导的异常剪接

[0234] 为了检查剪接调节剂如何影响整体剪接,将全转录组RNA-seq分析应用于用100nM E7107处理的表达WT和Y36C PHF5A的细胞中。基于基因表达和剪接结点使用的主成分分析的无监督聚类证实,用E7107处理的Y36C细胞的聚簇不同于其野生型对应物,但接近DMSO处理的对照,表明Y36C突变削弱了E7107活性。详细的差异剪接分析进一步揭示了Y36C突变带来的定量和定性作用(图4A和4B)。具体而言,与各DMSO处理的对照相比,内含子保留(IR)事件在用E7107处理的WT细胞中占主导地位,如通过事件的数目和平均倍数变化测量(图4A和4B左图)。与Y36C的保护作用一致,用E7107处理的突变细胞中IR事件的总量及其平均倍数变化大大降低(图4A和4B右图)。出人意料的是,与E7107处理后的WT相比,突变细胞中化合物诱导的外显子跳跃(ES)事件的数量增加了(图4A和4B),这表明PHF5A-Y36C介导的对剪接抑制的抗性涉及在总体水平的差异响应。

[0235] 已知IR和ES事件的调节与外显子/内含子长度和核苷酸含量以及特定的染色质标记有关(Naftelberg等人,Annual review of biochemistry 84,165-98(2015)。特别是,相邻内含子和外显子之间GC含量的差异已经成为剪接机制的识别信号(Amit等人,Annual review of biochemistry 84,165-98(2015))。因此,本实验试图研究是否在剪接抑制下,内含子GC含量也会影响PHF5A-WT或Y36C细胞中的剪接位点识别(图4C和4D)。在WT细胞中,相比随机选择的背景内含子,E7107诱导的IR内含子具有更高的GC含量,并且与下游外显子

的差异较小(图4C)。有趣的是,用E7107处理的PHF5A Y36C细胞中的IR内含子/外显子与其WT对应物相比,显示GC组成高得多,且受影响的内含子和外显子之间的差异最小(图4C)。相反,尽管用化合物处理的WT细胞中的ES结点显示出比背景更低的GC组成,但用E7107处理的Y36C细胞中的ES结点处表现出更高的GC含量(图4D)。总的来说,这些数据表明内含子/外显子GC含量可有助于Y36C介导的剪接调节干扰。

[0236] 有趣的是,WT细胞中IR事件的内含子/外显子GC含量(图4C)与Y36C细胞中ES事件的内含子/外显子GC含量(图4D)相当。另外,E7107处理在PHF5A-Y36C细胞中诱导了更多的ES事件,但诱导了更少的IR事件(图4A和4B)。因此,假设在相同的E7107处理下,来自Y36C细胞的这些ES相关内含子中的一些可在WT细胞中被转换为IR。为此,计算了在PHF5A WT和Y36C中用于这些ES事件的单个3'内含子-外显子结点使用的百分比(剪接百分比,PSI)。从理论上讲,这些3'结点的结果是ES、IR或外显子包含(有关计算方案,请参见图4E和方法)。与ES/IR转换假设相一致,在用E7107处理的WT细胞中,这些3883个Y36C相关的ES结点中的2470个(约64%)显示出ES PSI降低和IR PSI升高(图4E)。这在总体水平上提供了进一步的证据,即PHF5A Y36C可以利用相邻内含子/外显子的进化形成的相对GC含量,通过定量和定性地调节特定内含子-外显子结点的使用来减弱剪接抑制剂的活性(Amit等人,Annual review of biochemistry 84,165-98(2015))。

[0237] 2.4. 在E7107存在的情况下,通过PHF5A-Y36C更改了MCL1的IR/ES转变

[0238] 尽管由E7107引发的剪接事件数量不同,但是来自WT或Y36细胞的受影响基因的总数是相当的,并且有很大的重叠。基因集富集分析(GSEA)还确定了与WT或Y36C特定基因中的途径相关的候选基因。为了验证总体差异剪接分析(该分析揭示了在PHF5A-Y36C细胞中剪接调节剂引发的IR/ES转变),评估了与DMSO对照相比与E7107处理的WT细胞中显著IR事件相关、但在化合物处理下与Y36C中显著ES事件相关的基因。大量的基因如MCL1、CDC25B、RBM5和CDK10属于该组,并且各个sashimi图验证了用E7107处理的WT和Y36C细胞之间的剪接行为差异(图5A)。MCL1以两种亚型MCL1-L和MCL1-S的形式存在,并且以前被报道为剪接调节剂如meayamycin B(Gao和KoideACS chemical biology 8,895-900(2013);Gao等人,Scientific reports 4,6098(2014))和sudemycin D1(Xargay-Torrent等人,Oncotarget 6,22734-49(2015))的主要靶标。有趣的是,相比GC富集的(51%)上游内含子,MCL1的第二个内含子的GC含量低(38%)。MCL1 RNA-seq数据的Sashimi图证实,在DMSO处理的对照样品中,WT和Y36C细胞中的ES和IR事件均以非常低的水平发生,从而导致规范性MCL1-L形式的主导性产生(图5A)。E7107处理后,IR是在WT细胞中观察到的主要事件。相反,在PHF5A Y36C表达后,E7107的作用发生了很大变化,并且主要观察到ES事件产生了MCL1-S形式(图5A)。

[0239] 接下来,将MCL1用作生物标记物,以将ES/IR转变的分析扩展至不同骨架和多种剂量的其他剪接调节剂。Taqman基因表达不仅证实了RNA-seq分析,而且还揭示了剪接调节剂的效力与ES和IR事件的相对诱导率之间的相关性。具体而言,在PHF5A WT细胞中,更强的剪接抑素A(HCT116中的GI50=0.76nM)导致剂量依赖性诱导MCL1 ES和IR事件的相似动力学,而E7107的效力稍弱(HCT116中的GI50=1.5nM),与较低剂量的IR事件相比,提供MCL1 ES事件的诱导作用“更早”。较弱的herboxidiene(HCT116中的GI50=7.6nM)显示出更明显的效果,最后用最弱的测试化合物sudemycin D6(HCT116中的GI50=149nM)未观察到IR事件(图5B左图)。这些数据加强了这样的观察,即在同一基因中,含有低GC的MCL1内含子2比具有较

高GC的内含子1具有更高的剪接抑制抗性。在这些剪接调节剂的存在下,PHF5A Y36C突变的表达延迟或阻断了MCL1 IR事件的发生(图5B右图)。有趣的是,与WT相比,随着E7107剂量的增加,代表ES事件的MCL1-S产生在PHF5A-Y36C细胞中提高到了更高的水平(图5b第二行)。总而言之,这些数据证实了以下观察结果:PHF5A Y36C控制了化合物诱导的IR事件和ES事件之间的转变。

[0240] 2.5. 人PHF5A的晶体结构, SF3b复合物的核心

[0241] 鉴于Y36C PHF5A对基础剪接无作用,但在阻碍和改变剪接调节剂对RNA剪接的作用中起作用,研究了PHF5A在三维结构中的作用。纯化了WT蛋白,确定了其1.8Å分辨率的晶体结构。最终模型包含总共110个残基中的2-93个残基。PHF5A形成一个蘑菇状的结构,带有一个三角形的帽子和一个由N和C末端的反平行链组成的茎(图6D)。盖子由左旋三角形深三叶形结形成,其中包含三个锌离子和5个CXXC基序,其在锌指之间排列。PHF5A包含13个Cys残基,其中12个在四面体几何结构中配位3个锌离子。剩余的半胱氨酸突变为丝氨酸(C40S)以增强可溶性蛋白的表达。有趣的是,PHF5A整合了三种不同类型的锌指。锌指1(ZnF1)折叠成gag指节,并具有第一个到第四个CXXC基序的C4配位。这些中的第一个具有短的螺旋转角(η 1),而第四个具有锌指节(Krishna等人, *Nucleic Acids research* 31,532-50 (2003))。锌指2(ZnF2)由第二个和第五个CXXC基序形成。这些基序中的第一个是锌指节,第二个来自螺旋 α 4,因此类似于高音谱号的GATA状锌指18。锌指3(ZnF3)由来自螺旋- η 2的第三个CXXC基序和来自连接蘑菇茎的第一个和最后一个 β 链的环的两个单独的半胱氨酸组成。第三个锌指类似于带有短螺旋的中断的经典 $\beta\beta\alpha$ 指(van Roon等人, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105,9621-6 (2008); Krishna等人, *Nucleic acids research* 31,532-50 (2003))。考虑到PHF5A-Y36在第二个锌指附近的表面上的位置,并且有证据表明它不会改变任何经过测试的细胞活性,因此可以预测,突变至Cys对整体折叠的影响最小,但是局部改变表面拓扑结构(图7C)。

[0242] 虽然被分类为PHD指,但是PHF5A与其他PHD指具有低序列同源性,并且不同于标准折叠。各种真核生物之间的高度序列同一性表明,其独特的三叶结拓扑结构很可能得以保留(图3D)。同时,与同一生物体内的其他序列相比,PHF5A具有非常低的序列同一性,表明在细胞中具有独特的生物学作用。但是,具有低序列同一性的蛋白质仍可以共享相似的三维结构并具有相似的功能。为了探索这种可能性,将该结构与PDB中所有其他可用结构进行了比较,并发现只有一种具有相似折叠的蛋白质Rds3,其为来自酵母的PHF5A同源物(Holm和Rosenstrom, *Nucleic acids research* 38,W545-9 (2010))。Rds3结构通过NMR解析,在N-和C-末端有80个残基和非结构化的圈,(van Roon等人, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105,9621-6 (2008))。它还具有三个锌指,和相同的三叶结折叠(Z分数12.6和RMSD2.2Å)(Holm和Rosenstrom, *Nucleic acids research* 38,W545-9 (2010))。

[0243] 最近在剪接体Bact复合物的低温-EM结构中以3.0-3.5 Å¹⁵的分辨率范围观察到全长Rds3蛋白。该结构表明Rds3/PHF5A是中央支架蛋白,与Hsh155/SF3B1、Rse1/SF3B3、Ysf3/SF3B5、U2 snRNA和内含子RNA相互作用(图6B)。此处, SF3B1 HEAT重复序列(HR)形成一个完整圈的右旋超螺旋螺旋,形成大约34 x 39Å的中心椭圆形腔(图6B)。PHF5A嵌套在

该空腔中,并沿其侧面与HR 2-3、6、15和17-20形成广泛接触(图6B)。在PHF5A中的总共110个残基中,有28个与SF3B1形成接触,掩埋了19% (1337 Å²) 的表面积和两个界面之间的高度序列保守性。SF3B5的C端HR-20螺旋和N端螺旋形成平行的螺旋-螺旋相互作用,完成了超螺旋旋转,同时与PHF5A(残基F6-L12)形成了额外的相互作用(图6B)。SF3B3位于沿着SF3B1-PHF5A复合体的顶面,与两者形成接触,而内含子RNA位于沿着复合体的底面。这些相互作用中的大多数是与磷酸二酯主链相互作用的,这由互补的正电表面证明。

[0244] 酵母和人PHF5A结构的重叠揭示了仅两个区域的结构差异,这两个区域均与内含子RNA形成相互作用。在PHF5A晶体结构中缺少的C末端的最后一个螺旋(G93-R110)包含位于SF3B1的HR-2和内含子U2 RNA双链体之间的保守碱性残基。这些碱性残基与BPA(位置0)下游的内含子核苷酸(+1-CACAUU)形成多个接触。在ZnF3附近的螺旋(η 2)-环-螺旋(η 3)(来自N50-R57)处存在较小差异,这里它的序列保守性较低,并且在Rds3溶液结构中也采用了多种构象,这表明分子的这一部分是柔性的。该区域与内含子的两个核苷酸(+9-AU)接触,且柔性可以适应不同内含子RNA的构象。

[0245] 2.6. PHF5A和SF3B1中抗性突变的结构分析

[0246] 近来,几种低温-EM结构已经提供了剪接反应中的预催化和催化步骤的快照(snapshot)。仅在预催化的Bact复合物中观察到SF3b复合物(Yan等人,Science 353,904-11(2016))。在下一步中,发生了重排,触发了SF3b复合物解离并形成C复合物,其中BPA的2'-OH与鸟苷的3'磷酸在5'-剪接位点处形成了磷酸二酯键(Folco等人,Genes&development 25,440-4(2011);Galej等人,Nature 537,197-201(2016);Wan等人,Science 353,895-904(2016))。引人注目的是,酵母B^{act}复合物低温-EM结构表明PHF5A和SF3B1之间的界面是分支点腺苷(BPA)结合的位置(图6E)。这些来自Sf3b复合物的蛋白质显然可以保护反应基团免受过早的亲核攻击。实际上,在此模型中,PHF5A-Y36与BPA形成直接接触,从而明显地暗示了分支点识别中的PHF5A。这种专门的生物学作用可解释其高序列保守性以及细胞中缺乏任何其他明显的对应物,这与其先前在胶质母细胞瘤干细胞中剪接调节和剪接调节剂敏感性中的作用的发现相一致(Hubert等人,Genes&development 27,1032-45(2013))。SF3B1的HEAT重复序列(定义了该结合口袋)(HR15-17)也高度保守(图6C)。有趣的是,在这项研究中鉴定出的抗性突变PHF5A-Y36C、SF3B1-K1071E、SF3B1-V1078A/I和先前报道的SF3B1-R1074H,都在该口袋周围聚集(图6E和6F)。此外,交联数据显示这些剪接调节剂直接与SF3B1和SF3B3相互作用(Kotake等人,Nature chemical biology 3,570-5(2007);Hasegawa等人,ACS chemical biology 6,229-33(2011)),它位于该口袋的正上方(图6F)。这些惊人的巧合提供了这一BPA结合口袋也是剪接调节剂结合的区域证据。尽管带来抗性,但显然这些突变对基础剪接无害,尽管这些突变与BPA接近。详细分析表明,SF3B1-K1071是一个保守残基(图6C),与BPA核糖的2'-羟基以及PHF5A-Y36的羟基形成H键,有助于这些残基在界面上的定位和定向(图6E)。由于这些残基中任一个的突变都会产生抗性,因此这种相互作用可与调节剂结合有关。PHF5A-Y36还与另一个保守残基SF3B1-R1075形成广泛的范德华相互作用,这也有助于使该侧链定向并改变结合口袋。基于Y36C模型,该突变不会对静电表面造成明显变化,但确实改变表面拓扑结构(图7C)。亲和力的丧失表明在该位置的芳族侧链参与剪接调节剂的结合。SF3B1-R1074H位于此结合口袋的底部(图6E)。它不会与RNA或PHF5A直接相互作用,但突变会改变结合口袋的形状,并可影响化合物结合,但不

会影响BPA相互作用(图6E和6F)。SF3B1-V1078A/I位于该口袋的顶部附近,在酵母和人之间不保守(图6C)。在酵母中,此残基与BPA腺苷形成H键,但在人类中,此残基可导致相对较细微的变化,并且实际上带来了最小的总体抗性。

[0247] 2.7. PHF5A-Y36C减少剪接调节剂的结合亲和力

[0248] 为了证明剪接调节剂结合位点在由SF3B1、PHF5A和SF3B3组成的界面上,设计了基于酵母B^{act}低温-EM结构的重组蛋白复合物(Yan等人, *Science* 353,904-11 (2016))。通过将这三种蛋白质与SF3B5共表达,可以重建一个稳定的250kDa复合物,该复合物可以分两步纯化(图7A)。为了验证这种重组复合物能否重现功能性调节剂结合位点,将其捕获在闪烁亲近测定(SPA)珠上并探测其与³H标记的普拉地内酯类似物的相互作用(Kotake等人, *Nature chemical biology* 3,570-5 (2007))。SPA测定显示与复合物结合的³H标记的普拉地内酯探针,且其他非放射性剪接调节剂能够与结合的探针竞争,证明了相互作用的特异性(图7B)。在该竞争试验中,滴定非放射性调节剂的信号降低,揭示了这三种化合物对复合物的相对亲和力,与普拉地内酯样类似物相比,并且与IVS试验(图3A)和细胞分析(图2D)中观察到的效价和等级排序一致。这证实了这四种蛋白质重构了剪接调节剂的功能性结合位点。

[0249] 接下来,产生包含PHF5A-Y36C的相应复合物,以检查观察到的抗性突变是否是剪接调节剂与SF3b复合物之间结合减少的结果。在SPA珠上捕获纯化的PHF5A-Y36C重组复合物,并使用相同的³H标记的示踪剂化合物(Kotake等人, *Nature chemical biology* 3,570-5 (2007))探究两种不同浓度(10nM和1nM)下的相互作用。SPA测定揭示,与背景相比,10nM ³H标记的探针与含有WT PHF5A的复合物的结合有大约5倍的诱导,而与PHF5A-Y36C复合物的结合与背景相等。这表明单个Y36C突变足以显著降低调节剂结合(图7D),并表明Y36与调节剂相互作用。在来自PHF5A-Y36C细胞核裂解物的IP'ed SF3b复合物中也观察到亲和力降低,证实该突变也能够降低生理相关蛋白复合物中的调节剂结合(图11)。

[0250] 3. 讨论

[0251] 剪接体经历了涉及许多snRNP的多个ATP依赖性构象变化,并且这种动态复杂性使得确定剪接调节剂结合的位置和时间具有挑战性。以前使用普拉地内酯和herboxidiene类似物进行的光交联研究将相互作用点缩小到SF3b复合物(U2 snRNP的亚基之一),特别是缩小到单独的蛋白质SF3B3和SF3B1(Kotake等人, *Nature chemical biology* 3,570-5 (2007); Hasegawa等人, *ACS chemical biology* 6,229-33 (2011))。在高剂量的普拉地内酯B和E7107下产生的抗性突变SF3B1-R1074H提供了SF3B1参与化合物结合的进一步证据(Yokoi等人, *FEBS journal* 278,4870-80 (2011))。通过应用低剂量的E7107和herboxidiene的基因组抗性作图方法,引发了新的抗性突变。这使得可以评估剪接调节剂结合口袋,并可进一步完善和解释一些内含子之间的作用机理。发现了一系列突变,包括PHF5A中的Y36C、SF3B1中的V1078A/I、K1071E和先前鉴定的R1074H(同上)。连同光交联数据(Kotake等人, *Nature chemical biology* 3,570-5 (2007); Hasegawa等人, *ACS chemical biology* 6,229-33 (2011)),将调节剂结合口袋精确定位在PHF5A、SF3B1和SF3B3之间的界面上(图8)。其他两种调节剂,剪接抑素A和sudemycin D,也显示出对Y36C克隆的抗性,表明这些化合物也与该位点相互作用(Kaida等人, *Nature chemical biology* 3,576-83 (2007); Xargay-Torren等人, *Oncotarget* 6,22734-49 (2015))。实际上,通过重新组成由PHF5A、SF3B1、SF3B3和SF3B5组成的功能性4蛋白复合物,证实了剪接调节剂与该共同的结

合口袋的结合(图7A)。此外,Y36C的单个氨基酸取代将普拉地内酯探针的结合降低至背景水平,表明抗性机理是由于剪接调节剂与结合袋的亲和力降低(图7C)。Y36的详细定点诱变表明,Y36残基上的芳香环和电荷均与剪接调节剂的活性有关(图7E-7G)。此外,Y36处的突变揭示了针对具有不同支架的这些调节剂的不同保护水平,表明这些调节剂在该共同结合口袋处的相互作用模式下可采取略有不同的姿势。Webb等人先前已假设了几种用于herboxidiene活性的药效基团特征,包括C8至C11之间的疏水基序(二烯基)(Lagiseti等人,ACS chemical biology 9,643-8(2014))。普拉地内酯和herboxidiene共享该二烯部分,表明其可在Y36附近结合。

[0252] 考虑到BPA结合位点周围的抗性突变的位置,一种可能的作用机理模型是剪接调节剂是BPA竞争性抑制剂(图8)。剪接调节剂结合口袋与BPA的这种紧密接近与以前的报道一致,即在肝素存在的情况下,剪接抑素和普拉地内酯均会损害U2 snRNA和pre-mRNA分支点区域之间的规范碱基配对(Folco等人,Genes&development 25,440-4(2011); Corrionero等人,Genes&development 25,445-59(2011))。Corrionero等人的研究表明,在肝素(5mg/mL)存在的情况下,剪接抑素A阻止U2 snRNP在pre-mRNA和U2snRNA之间建立规范的碱基配对,这阻止了U2 snRNP从pre-mRNA上的复合物A装配中分离(Corrionero等人,Genes&development 25,445-59(2011))。另外,发现剪接调节剂E7107和普拉地内酯B对U2 snRNP与pre-mRNA的结合具有类似的减弱作用(Folco等人,Genes&development 25,440-4(2011))。在这些研究中,过量带负电荷的肝素可通过破坏协同但非特异性的相互作用(帮助将它们束缚在蛋白质复合物中)来进一步削弱U2 snRNA与pre-mRNA之间的相互作用。因此,在不存在肝素的情况下,剪接调节剂可减弱但不能完全破坏U2 snRNA和pre-mRNA之间的相互作用(Corrionero等人,Genes&development 25,445-59(2011))。此外,体外剪接反应表明抑制作用取决于试剂添加的顺序,即必须在底物和ATP之前将化合物添加到核提取物中,否则反应将正常进行(Folco等人,Genes&development 25,440-4(2011))。这些数据表明,化合物在剪接体组装的早期就作用于U2 snRNP,而后是ATP依赖性转变(其中装载了底物pre-mRNA)。它还指出了不可逆的承诺步骤,一旦U2 snRNP组装到pre-mRNA上,就不能阻止该步骤。总而言之,这些观察结果导致了一个模型,其中剪接调节剂直接影响SF3B1分支位点识别的保真度,并因此影响3'剪接位点的识别(Corrionero等人,Genes&development 25,445-59(2011))。这种竞争性的绑定模型立即表明可以在整体剪接水平上检查的几种可能的功能性后果。具体而言,较弱的富含GC的内含子底物比较强的内含子序列更容易被抑制,并且这种差异可通过存在不同化合物时剪接偏好的变化而显现出来。

[0253] 与这种抑制模型一致,由于个体内含子“强度”的变化,在整体剪接中观察到非线性剂量响应。剪接调节是一种整体现象,其影响人类基因组中的超过200,000个内含子(Sakharkar等人,In silico biology 4,387-93(2004))。尽管在内含子和相邻外显子内有几个保守的特征,但是在剪接过程中单个内含子的调节既多样又复杂。这种变化和复杂性意味着小分子抑制将对剪接结点的使用产生不同的影响。在这里,在PHF5A中的保护性突变允许检查内含子在剪接调节后的单个细胞反应,这揭示了内含子保留(IR)和外显子跳跃(ES)事件之间的转变。

[0254] 已经提出,在进化过程中,低等真核生物中通常较短的、低GC含量的内含子在两种不同的途径下进化(Amit等人,Cell reports 1,543-56(2012)),一组内含子仍然短,但与

附近的外显子相比,GC的百分比明显增加,并且GC组成的差异较小。由于这些内含子的长度较短,它们更有可能被内含子定义的剪接机制识别。有趣的是,这些内含子在E7107处理后更易于保留内含子。而且,观察到当在PHF5A Y36C突变的存在下E7107的作用减弱时,IR事件相关内含子的平均GC组成明显较高,与下游外显子几乎没有或没有差异(图4C)。鉴于内含子与周围外显子之间GC组成的差异可有助于剪接机制的识别,因此可假设这些内含子种类天生就更难于被剪接机制识别,这反过来会使它们更容易被剪接调节剂抑制。还提出了BPA周围较高的GC含量可导致pre-mRNA的二级结构更稳定,因此GC含量会通过结构和空间机制影响pre-mRNA与剪接调节剂之间竞争的有效性(Zhang等人,BMC genomics 12,90 (2011))。

[0255] 相反,另一组内含子在进化过程中保持其低GC组成和与相邻外显子的大差异,但是长度显著增加,这可使它们脱离内含子定义的剪接范围,并将其转化为外显子定义的剪接机制。有趣的是,在E7107处理下,与增加的ES事件相关的内含子与较低的GC组成和较高的GC差异以及跳跃的外显子相关(图4D)。与在IR事件中观察到的相似,在Y36C存在下,化合物诱导的ES内含子的GC含量也比WT细胞的GC含量高(图4D)。内含子和外显子之间GC组成的更高差异与核小体占有率的增加以及与染色质的SF3B1缔合的富集有关,这可引发这些结点的共转录剪接(Amit等人,Cell reports 1,543-56 (2012);Kfir等人,Cell reports 11, 618-29 (2015))。对于与ES事件相关联的结点的基因组结构的进一步表征会产生对理解转录和剪接之间的复杂联系的更多见解。

[0256] 在此,观察到,根据PHF5A的基因型,在E7107处理后可以在IR和ES之间转变2470个结点,这加强了以下假设,即内含子对小分子抑制剂具有不同敏感性(图4E)。IR和ES事件影响同一个3'结点不是互斥的事实进一步揭示了剪接调控的可塑性以及使用单个结点的微调机制。具体而言,这些大约2470个结点显示出对剪接抑制的中等敏感性,并且可以根据剪接抑制的程度在IR和ES事件之间切换。可以想象,在PHF5A WT细胞中,E7107在这2470个结点处可有效地与规范性BPA竞争,并导致内含子保留事件。但是,在PHF5A Y36C表达后,由于该化合物与PHF5A-SF3B1界面的缔合被减弱但没有丢失,因此E7107在与这些结点竞争时效率较低,同时又保持了其与直接上游内含子的竞争能力,因此诱导了更多的外显子跳跃事件。这与其他较弱、高GC含量的内含子形成对比,后者即使在存在PHF5A Y36C突变的情况下也可以很容易地被E7107保留(图4A-4C)。有趣的是,在存在WT PHF5A的情况下,上述3883个与ES相关的结点中的一些与IR事件的增加不相关,这表明这些结点甚至可以更牢固且对剪接调节更具抵抗力(图4E)。此外,E7107仅在约20,000个内含子中诱导了异常剪接(图4A),表明存在更强的内含子,其可以在此剂量承受剪接调节,这与以前使用剪接抑素A仅影响选择性3'剪接位点的剪接敏感性微阵列的观察结果一致(Corrionero等人,Genes&development 25,445-59 (2011))。总的来说,这些来自细胞内含子的差异敏感性与剪接调节剂充当竞争性BPA抑制剂的模型一致,并可导致对不同剂量的剪接调节剂产生非线性反应。有趣的是,本研究中鉴定的一些结点是在细胞周期调节和RNA结合中的参与者,即RBM5,其已显示是剪接抑素A优先调节的官能团(Corrionero等人,Genes&development 25,445-59 (2011))。考虑到肿瘤发生途径中频繁的改变,对剪接机制如何促进正常和异常细胞周期调控的进一步分析可以为靶向癌细胞提供另一条途径。

[0257] 小分子文库的表型筛选是鉴定潜在药物的有效方法。然而,用于筛选命中的细胞

靶标鉴定一直是不懈的挑战。已经开发了几种无偏差方法来鉴定细胞靶标和作用机制,包括生物化学方法,例如亲和纯化与定量蛋白质组学结合,遗传相互作用方法,例如RNAi筛选和结构域聚焦的CRISPR筛选,以及计算推断方法(Shi等人,Nature biotechnology 33, 661-7 (2015);Schenone等人,Nature chemical biology 9,232-40 (2013))。最近,已使用基于下一代测序(NGS)的表型抗性细胞群的基因组或转录组谱分析(Adams等人,ACS chemical biology 9,2247-54 (2014);Korpál等人,Cancer discovery 3,1030-43 (2013);Wacker等人,Nature chemical biology 8,235-7 (2012))来鉴定独特的复发性单核苷酸变异(SNV)或表达变化,以阐明化合物的潜在细胞靶标。在此,进一步开发了通过筛选不同低浓度下与结构无关的化合物的方法,以:1)减轻高浓度下潜在的脱靶活性,以及2)增强识别化学探针的细微但通用机制的可能性。这样可以发现同一复合物中共存的编码蛋白质的多个突变/基因。有趣的是,除了证实先前报道的SF3B1-R1074,对PHF5A-Y36、SF3B1-V1078和K1071的抗性突变的发现还表明这些残基与剪接调节剂的作用位点接近。最近显示酵母中这些残基的相应氨基酸形成了一个容纳BPS中恒定腺苷的口袋的事实,表明该基因组分析策略可为候选化合物的作用提供可靠而有益的见解。因此,基因组谱分析方法的进一步扩展将可提供一种独特的方法,以利用“二维”基因组指纹解剖技术探索化合物的MoA(作用机理)。当不容易获得蛋白质结构和/或用纯化蛋白进行的生化测定时,这特别有价值,如复杂的和动态的剪接体在本研究中所举例说明的。

[0258] 总之,PHF5A被确定为小分子剪接调节剂的相互作用节点。结构分析指出了分支点腺苷结合袋周围的共同结合位点。而且,结果表明,对PHF5A Y36的单个氨基酸变化如何减弱剪接调节剂的抑制作用,并改变外显子跳跃事件和内含子保留事件之间的整体剪接模式。

[0259] 序列表

[0260]

SEQ ID NO:	序列表
1	Met Ala Lys Ile Ala Lys Thr His Glu Asp Ile Glu Ala Gln Ile Arg Glu Ile Gln Gly Lys Lys Ala Ala Leu Asp Glu Ala Gln Gly Val Gly Leu Asp Ser Thr Gly Tyr Tyr Asp Gln Glu Ile Tyr Gly Gly Ser Asp Ser Arg Phe Ala Gly Tyr Val Thr Ser Ile Ala Ala Thr Glu Leu Glu Asp Asp Asp Asp Asp Tyr Ser Ser Ser Thr Ser Leu Leu Gly Gln Lys Lys Pro Gly Tyr His Ala Pro Val Ala Leu Leu Asn Asp Ile Pro Gln Ser Thr Glu Gln Tyr Asp Pro Phe Ala Glu His Arg Pro Pro Lys Ile Ala Asp Arg Glu Asp Glu Tyr Lys Lys His Arg Arg Thr Met Ile Ile Ser Pro Glu Arg Leu Asp Pro Phe Ala Asp Gly Gly Lys Thr Pro Asp Pro Lys Met Asn Ala Arg Thr Tyr Met Asp Val Met Arg Glu Gln His Leu Thr Lys Glu Glu Arg Glu Ile Arg Gln Gln Leu Ala Glu Lys Ala Lys Ala Gly Glu Leu Lys Val Val Asn Gly Ala Ala Ala Ser Gln Pro Pro Ser Lys Arg Lys Arg Arg Trp Asp Gln Thr Ala Asp Gln Thr Pro Gly Ala Thr Pro Lys Lys Leu Ser Ser Trp Asp Gln Ala Glu Thr Pro

[0261]

Gly His Thr Pro Ser Leu Arg Trp Asp Glu Thr Pro Gly Arg Ala Lys
Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ala Thr Pro Gly Ser Lys Ile Trp Asp Pro
Thr Pro Ser His Thr Pro Ala Gly Ala Ala Thr Pro Gly Arg Gly Asp
Thr Pro Gly His Ala Thr Pro Gly His Gly Gly Ala Thr Ser Ser Ala
Arg Lys Asn Arg Trp Asp Glu Thr Pro Lys Thr Glu Arg Asp Thr Pro
Gly His Gly Ser Gly Trp Ala Glu Thr Pro Arg Thr Asp Arg Gly Gly
Asp Ser Ile Gly Glu Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Lys Arg Lys Ser
Arg Trp Asp Glu Thr Pro Ala Ser Gln Met Gly Gly Ser Thr Pro Val
Leu Thr Pro Gly Lys Thr Pro Ile Gly Thr Pro Ala Met Asn Met Ala
Thr Pro Thr Pro Gly His Ile Met Ser Met Thr Pro Glu Gln Leu Gln
Ala Trp Arg Trp Glu Arg Glu Ile Asp Glu Arg Asn Arg Pro Leu Ser
Asp Glu Glu Leu Asp Ala Met Phe Pro Glu Gly Tyr Lys Val Leu Pro
Pro Pro Ala Gly Tyr Val Pro Ile Arg Thr Pro Ala Arg Lys Leu Thr
Ala Thr Pro Thr Pro Leu Gly Gly Met Thr Gly Phe His Met Gln Thr
Glu Asp Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Asp Gln Pro Ser Gly Asn Leu
Pro Phe Leu Lys Pro Asp Asp Ile Gln Tyr Phe Asp Lys Leu Leu Val
Asp Val Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys
Ile Met Lys Leu Leu Leu Lys Ile Lys Asn Gly Thr Pro Pro Met Arg
Lys Ala Ala Leu Arg Gln Ile Thr Asp Lys Ala Arg Glu Phe Gly Ala
Gly Pro Leu Phe Asn Gln Ile Leu Pro Leu Leu Met Ser Pro Thr Leu
Glu Asp Gln Glu Arg His Leu Leu Val Lys Val Ile Asp Arg Ile Leu
Tyr Lys Leu Asp Asp Leu Val Arg Pro Tyr Val His Lys Ile Leu Val
Val Ile Glu Pro Leu Leu Ile Asp Glu Asp Tyr Tyr Ala Arg Val Glu
Gly Arg Glu Ile Ile Ser Asn Leu Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr

[0262]

Met Ile Ser Thr Met Arg Pro Asp Ile Asp Asn Met Asp Glu Tyr Val
 Arg Asn Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Val Val Ala Ser Ala Leu Gly
 Ile Pro Ser Leu Leu Pro Phe Leu Lys Ala Val Cys Lys Ser Lys Lys
 Ser Trp Gln Ala Arg His Thr Gly Ile Lys Ile Val Gln Gln Ile Ala
 Ile Leu Met Gly Cys Ala Ile Leu Pro His Leu Arg Ser Leu Val Glu
 Ile Ile Glu His Gly Leu Val Asp Glu Gln Gln Lys Val Arg Thr Ile
 Ser Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Ala Glu Ala Ala Thr Pro Tyr Gly
 Ile Glu Ser Phe Asp Ser Val Leu Lys Pro Leu Trp Lys Gly Ile Arg
 Gln His Arg Gly Lys Gly Leu Ala Ala Phe Leu Lys Ala Ile Gly Tyr
 Leu Ile Pro Leu Met Asp Ala Glu Tyr Ala Asn Tyr Tyr Thr Arg Glu
 Val Met Leu Ile Leu Ile Arg Glu Phe Gln Ser Pro Asp Glu Glu Met
 Lys Lys Ile Val Leu Lys Val Val Lys Gln Cys Cys Gly Thr Asp Gly
 Val Glu Ala Asn Tyr Ile Lys Thr Glu Ile Leu Pro Pro Phe Phe Lys
 His Phe Trp Gln His Arg Met Ala Leu Asp Arg Arg Asn Tyr Arg Gln
 Leu Val Asp Thr Thr Val Glu Leu Ala Asn Lys Val Gly Ala Ala Glu
 Ile Ile Ser Arg Ile Val Asp Asp Leu Lys Asp Glu Ala Glu Gln Tyr
 Arg Lys Met Val Met Glu Thr Ile Glu Lys Ile Met Gly Asn Leu Gly
 Ala Ala Asp Ile Asp His Lys Leu Glu Glu Gln Leu Ile Asp Gly Ile
 Leu Tyr Ala Phe Gln Glu Gln Thr Thr Glu Asp Ser Val Met Leu Asn
 Gly Phe Gly Thr Val Val Asn Ala Leu Gly Lys Arg Val Lys Pro Tyr
 Leu Pro Gln Ile Cys Gly Thr Val Leu Trp Arg Leu Asn Asn Lys Ser
 Ala Lys Val Arg Gln Gln Ala Ala Asp Leu Ile Ser Arg Thr Ala Val
 Val Met Lys Thr Cys Gln Glu Glu Lys Leu Met Gly His Leu Gly Val
 Val Leu Tyr Glu Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Glu Val Leu Gly Ser

[0263]

	Ile Leu Gly Ala Leu Lys Ala Ile Val Asn Val Ile Gly Met His Lys Met Thr Pro Pro Ile Lys Asp Leu Leu Pro Arg Leu Thr Pro Ile Leu Lys Asn Arg His Glu Lys Val Gln Glu Asn Cys Ile Asp Leu Val Gly Arg Ile Ala Asp Arg Gly Ala Glu Tyr Val Ser Ala Arg Glu Trp Met Arg Ile Cys Phe Glu Leu Leu Glu Leu Leu Lys Ala His Lys Lys Ala Ile Arg Arg Ala Thr Val Asn Thr Phe Gly Tyr Ile Ala Lys Ala Ile Gly Pro His Asp Val Leu Ala Thr Leu Leu Asn Asn Leu Lys Val Gln Glu Arg Gln Asn Arg Val Cys Thr Thr Val Ala Ile Ala Ile Val Ala Glu Thr Cys Ser Pro Phe Thr Val Leu Pro Ala Leu Met Asn Glu Tyr Arg Val Pro Glu Leu Asn Val Gln Asn Gly Val Leu Lys Ser Leu Ser Phe Leu Phe Glu Tyr Ile Gly Glu Met Gly Lys Asp Tyr Ile Tyr Ala Val Thr Pro Leu Leu Glu Asp Ala Leu Met Asp Arg Asp Leu Val His Arg Gln Thr Ala Ser Ala Val Val Gln His Met Ser Leu Gly Val Tyr Gly Phe Gly Cys Glu Asp Ser Leu Asn His Leu Leu Asn Tyr Val Trp Pro Asn Val Phe Glu Thr Ser Pro His Val Ile Gln Ala Val Met Gly Ala Leu Glu Gly Leu Arg Val Ala Ile Gly Pro Cys Arg Met Leu Gln Tyr Cys Leu Gln Gly Leu Phe His Pro Ala Arg Lys Val Arg Asp Val Tyr Trp Lys Ile Tyr Asn Ser Ile Tyr Ile Gly Ser Gln Asp Ala Leu Ile Ala His Tyr Pro Arg Ile Tyr Asn Asp Asp Lys Asn Thr Tyr Ile Arg Tyr Glu Leu Asp Tyr Ile Leu
2	MAKHHPDLIF CRKQAGVAIG RLCEKCDGKC VICDSYVRPC TLVRICDECN YGSYQGRCVI CGGPGVSDAY YCKECTIQEK DRDGCPKIVN LGSSKTDLFY ERKKYGFKKR

[0264]

3	<u>actctcttcgcgcgcgtgtctgcgagggccagctgttgggggagtagtaccctctcaaaaagcgggcatactt</u> <u>ctgcgcctaagattgtcagtttcaaaaaacgaggaggatttgatattcaccaggcccgcggtgatgcctttgagg</u> <u>gtggccgcgtccatctggtcagaaaagacaatcttttgggtgcaagccttgcacgtctagggcgagtagtcc</u> <u>agggtttccctgatgatgtcalactaatctgtcccttttttccacagctcgcggttgaggacaaactcttcgcg</u> tcttccagtactcttgatcggaaccgcgtcgccctccgaacg
4	ACTCTCTTCCGCATCGCTGT
5	CCGACGGGTTTCCGATCCAA
6	CTGTTGGGCTCGCGGTTG
7	TGGCATCAGATTGCAAAGAC
8	ACGCCGGGTGATGTATCTAT
9	CGAAACGC ACCCGTCAGACG
10	ATATGCCAAACCAGCTCCTAC
11	AGAACTCCACAAACCCATCCCAGC
12	AAGGACAAAACGGGACTGG
13	AAAGCCAATGGGCAGGT
14	TCCACAAACCCATCTTGGAAGGCC
15	CCACCTTCTAGGTCCTCTACAT
16	GACAAAGGAGGCCGTGAGGA
17	GTTTGTTACGCCGTCGCTGAAA
18	TCAGGCATGCTTCGGAAACTGGA
19	GCCCCGGGGTGAATAATAATTGGTTTACT
20	TTTCTAGGATGGGTTTGTGGAGTT
21	CCTGATGCCACCTTCTAGGTCCTCTAC
22	GCCAAGGACACAAAGCCAAT

[0265]

23	CTGGAGACCTTACGACGGGTTGGG
24	AAGGCCGTCTCGTGGTT
25	ATGGCGAAGATCGCCAAGACTCACGAAGATATTGAAGCACAGATTCGAGAAATT CAAGGCAAGAAGGCAGCTCTTGATGAAGCTCAAGGAGTGGGCCTCGATTCTACA GGTTATTATGACCAGGAAATTTATGGTGGAAGTGACAGCAGATTTGCTGGATACG TGACATCAATTGCTGCAACTGAACCTGAAGATGATGACGATGACTATTCATCATC TACGAGTTTGCTTGGTCAGAAGAAGCCAGGATATCATGCCCTGTGGCATTGCT TAATGATATACCACAGTCAACAGAACAGTATGATCCATTTGCTGAGCACAGACCT CCAAAGATTGCAGACCGGGAAGATGAATACAAAAGCATAGGCGGACCATGATA ATTTCCCCAGAGCGTCTTGATCCTTTTGCAGATGGAGGAAAAACCCCTGATCCTA AAATGAATGCTAGGACTTACATGGATGTAATGCGAGAACAACACTTGACTAAAG AAGAACGAGAAATTAGGCAACAGCTAGCAGAAAAAGCTAAAGCTGGAGAACTAA AAGTCGTCAATGGAGCAGCAGCGTCCCAGCCTCCATCAAAACGAAAACGGCGTT GGGATCAAAACAGCTGATCAGACTCCTGGTGCCACTCCCAAAAACTATCAAGTT GGGATCAGGCAGAGACCCCTGGGCATACTCCTTCCTTAAGATGGGATGAGACAC CAGGTCGTGCAAAGGGAAGCGAGACTCCTGGAGCAACCCAGGCTCAAAAAATAT GGGATCCTACACCTAGCCACACACCAGCGGGAGCTGCTACTCCTGGACGAGGT GATACACCAGGCCATGCGACACCAGGCCATGGAGGCGCAACTTCCAGTGCTCG TAAAAACAGATGGGATGAAACCCCCAAAACAGAGAGAGATACTCCTGGGCATGG AAGTGGATGGGCTGAGACTCCTCGAACAGATCGAGGTGGAGATTCTATTGGTGA AACACCGACTCCTGGAGCCAGTAAAGAAAATCACGGTGGGATGAAACACCAGC TAGTCAGATGGGTGGAAGCACTCCAGTTCTGACCCCTGGAAAGACACCAATTGG CACACCAGCCATGAACATGGCTACCCCTACTCCAGGTCACATAATGAGTATGACT CCTGAACAGCTTCAGGCTTGGCGGTGGGAAAGAGAAAATTGATGAGAGAAATCG CCCACTTTCTGATGAGGAATTAGATGCTATGTTCCAGAAGGATATAAGGTACTT CCTCCTCCAGCTGGTTATGTTCTATTGCAACTCCAGCTCGAAAGCTGACAGCTA CTCCAACACCTTTGGGTGGTATGACTGGTTTCCACATGCAAACTGAAGATCGAAC TATGAAAAGTGTTAATGACCAGCCATCTGGAAATCTTCCATTTTAAAACTGATG ATATTCAATACTTTGATAAACTATTGGTTGATGTTGATGAATCAACACTTAGTCCA GAAGAGCAAAAAGAGAGAAAAATAATGAAGTTGCTTTTAAAAATTAAGAATGGAA CACCACCAATGAGAAAGGCTGCATTGCGTCAGATTACTGATAAAGCTCGTGAATT TGGAGCTGGTCCTTTGTTAATCAGATTCTTCTCTGCTGATGTCTCTACACTTG AGGATCAAGAGCGTCATTTACTTGTGAAAGTTATTGATAGGATACTGTACAACTT GATGACTTAGTTCTGCCATATGTCATAAGATCCTCGTGCTCATTGAACCGCTAT TGATTGATGAAGATTACTATGCTAGAGTGGAAGGCCGAGAGATCATTTCTAATTT GGCAAAGGCTGCTGGTCTGGCTACTATGATCTCTACCATGAGACCTGATATAGAT AACATGGATGAGTATGTCCGTAACACAACAGCTAGAGCTTTTGCTGTTGTAGCCT CTGCCCTGGGCATTCTTCTTTATTGCCCTTCTTAAAGCTGTGTGCAAAAGCAA GAAGTCCTGGCAAGCGAGACACACTGGTATTAAGATTGTACAACAGATAGCTATT CTTATGGGCTGTGCCATCTTGCCACATCTTAGAAGTTTAGTTGAAATCATTGAAC ATGGTCTTGTTGGATGAGCAGCAGAAAGTTTCGGACCATCAGTGCTTTGGCCATTG CTGCCTTGGCTGAAGCAGCAACTCCTTATGGTATCGAATCTTTTGATTCTGTGTT AAAGCCTTTATGGAAGGGTATCCGCCAACACAGAGGAAAGGGTTTGGCTGCTTT CTTGAAGGCTATTGGGTATCTTATTCCTCTTATGGATGCAGAATATGCCAACTACT ATACTAGAGAAGTGATGTTAATCCTTATTCGAGAATTCCAGTCTCCTGATGAGGA AATGAAAAAATTGTGCTGAAGGTGGTAAACAGTGTTGTGGGACAGATGGTGTA GAAGCAAACTACATTAACACAGAGATTCTTCTCCCTTTTTTAAACACTTCTGGCA GCACAGGATGGCTTTGGATAGAAGAAATTACCGACAGTTAGTTGATACTACTGTG GAGTTGGCAAAACAAAGTAGGTGCAGCAGAAATTATATCCAGGATTGTGGATGAT CTGAAAGATGAAGCCGAACAGTACAGAAAAATGGTGATGGAGACAATTGAGAAA ATTATGGGTAATTTGGGAGCAGCAGATATTGATCATAAACTTGAAGAACAACCTGA TTGATGGTATTCTTTATGCTTTCCAAGAACAGACTACAGAGGACTCAGTAATGTT GAACGGCTTTGGCACAGTGGTTAATGCTCTTGGCAAACGAGTCAAACCACTT GCCTCAGATCTGTGGTACAGTTTTGTGGCGTTTAAATAACAACTGCTAAAGTT AGGCAACAGGCAGCTGACTTGATTTCTGAACTGCTGTTGTGATGAAGACTTGTG AAGAGGAAAAATTGATGGGACACTTGGGTGTTGATTGTATGAGTATTTGGGTGA

[0266]

	AGAGTACCCTGAAGTATTGGGCAGCATTCTTGGAGCACTGAAGGCCATTGTAAA TGTCATAGGTATGCATAAGATGACTCCACCAATTAAGATCTGCTGCCTAGACTA CCCCATCTTAAGAACAGACATGAAAAAGTACAAGAGAATTGTATTGATCTTGTT GGTCGTATTGCTGACAGGGGAGCTGAATATGTATCTGCAAGAGAGTGGATGAGG ATTTGCTTTGAGCTTTTAGAGCTCTTAAAGCCCACAAAAGGCTATTCGTAGAG CCACAGTCAACACATTTGGTTATATTGCAAAGGCCATTGGCCCTCATGATGTATT GGCTACACTTCTGAACAACCTCAAAGTTCAAGAAAGGCAGAACAGAGTTTGTACC ACTGTAGCAATAGCTATTGTTGCAGAAACATGTTACCCTTTACAGTACTCCCTG CCTTAATGAATGAATACAGAGTTCCTGAAGTGAATGTTCAAAATGGAGTGTTAAAA TCGCTTTCCTTCTTGTTTGAATATATTGGTGAAATGGGAAAAGACTACATTTATGC CGTAACACCGTTACTTGAAGATGCTTTAATGGATAGAGACCTTGTACACAGACAG ACGGCTAGTGCAAGTGGTACAGCACATGTCACCTGGGGTTTATGGATTTGGTTGT GAAGATTGCTGAATCACTTGTTGAAGTATGTATGGCCCAATGTATTTGAGACAT CTCCTCATGTAATTCAGGCAGTTATGGGAGCCCTAGAGGGCCTGAGAGTTGCTA TTGGACCATGTAGAATGTTGCAATATTGTTTACAGGGTCTGTTTACCCAGCCCG GAAAGTCAGAGATGTATATTGAAAATTTACAACCTCCATCTACATTGGTTCCAG GACGCTCTCATAGCACATTACCCAAGAATCTACAACGATGATAAGAACACCTATA TTCGTTATGAAGTGGACTATATCTTATAA
26	ATGGCTAAACATCATCCTGATTTGATCTTTGCCGCAAGCAGGCTGGTGTGGCCA TCGGAAGACTGTGTGAAAAATGTGATGGCAAGTGTGTGATTTGTGACTCCTATGT GCGTCCCTGCACTCTGGTGCGCATATGTGATGAGTGTAAGTATGGATCTTACCA GGGGCGCTGTGTGATCTGTGGAGGACCTGGGGTCTCTGATGCCTATTATTGTAA GGAGTGCACCATCCAGGAGAAGGACAGAGATGGCTGCCCAAAGATTGTCAATCT GGGGAGCTCTAAGACAGACCTCTTCTATGAACGCAAAAAATACGGCTTCAAGAA GAGGTGA

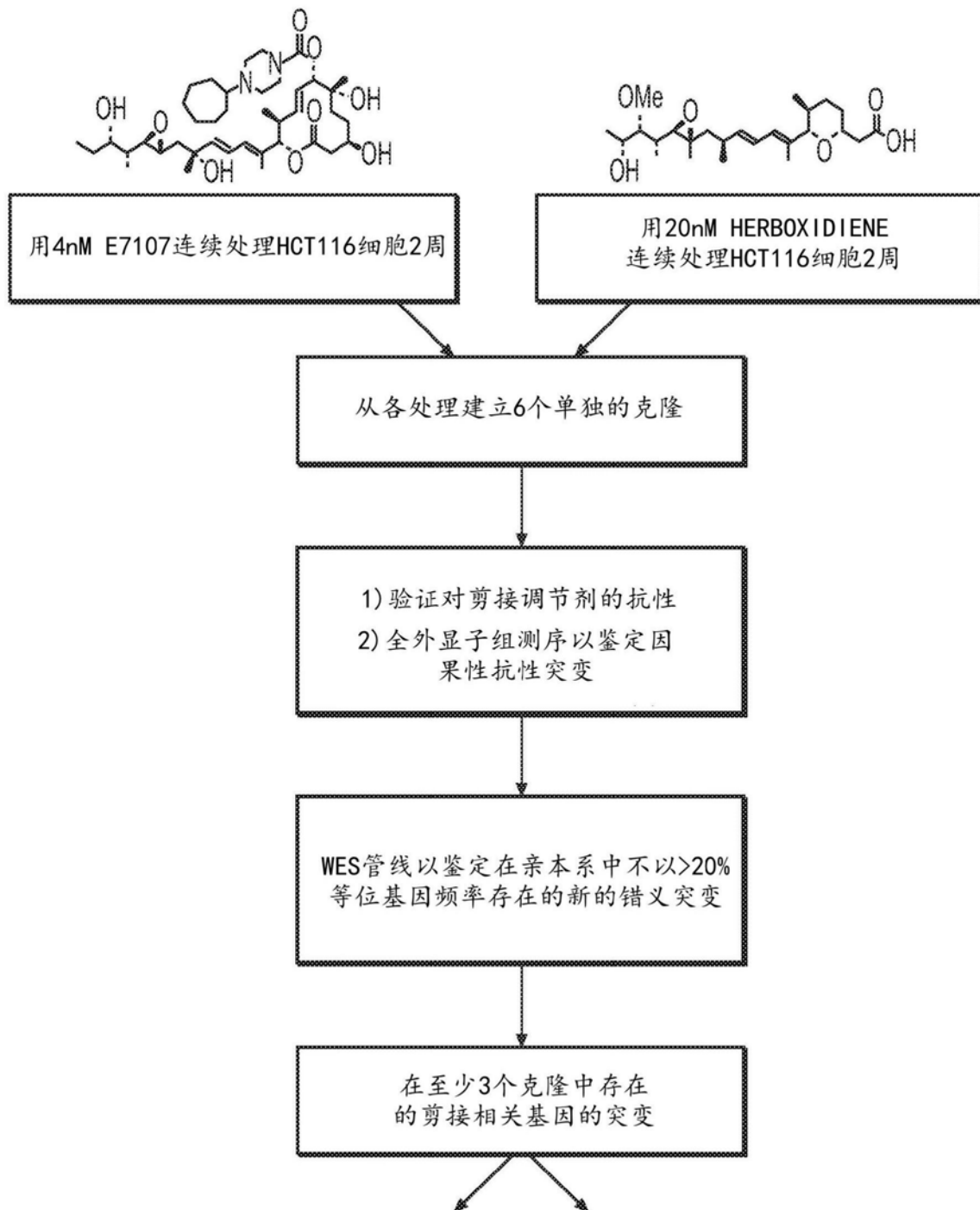


图1A

4nM E7107抗性克隆中的复发突变					
克隆 #	基因	编码变化	等位基因频率	AA变化	
1	SF3B1	t3233c	42.9%	V1078A	
3	PHF5A	a107g	47.0%	Y36C	
4	SF3B1	g3221a	33.3%	R1074H	
6	SF3B1	g3232a	48.1%	V1078I	
7	SF3B1	t3233c	40.0%	V1078A	
8	SF3B1	g3232a	46.9%	V1078I	

20nM HERBOXIDIENE抗性克隆中的复发突变					
克隆 #	基因	编码变化	等位基因频率	AA变化	
1	PHF5A	a107g	55.6%	Y36C	
2	PHF5A	a107g	56.6%	Y36C	
3	PHF5A	a107g	52.2%	Y36C	
5	PHF5A	a107g	36.8%	Y36C	
6	SF3B1	g3221a	41.4%	R1074H	
8	SF3B1	t3233c	60.0%	V1078A	

图1B

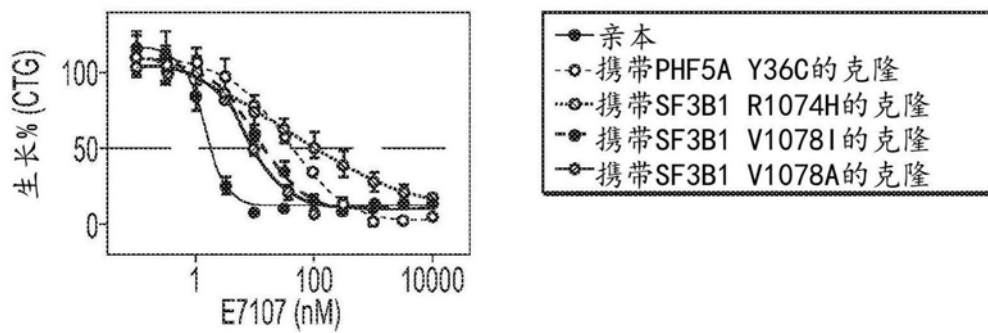


图1C

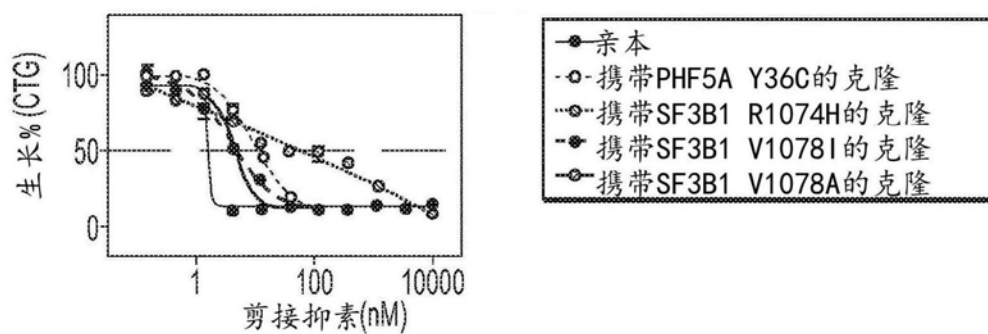


图1D

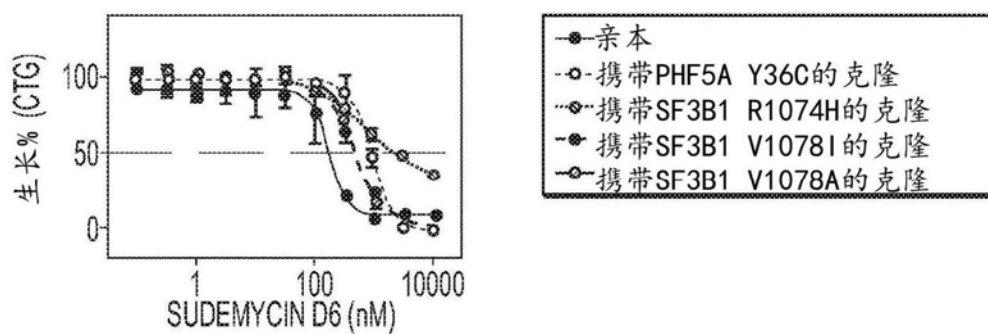


图1E

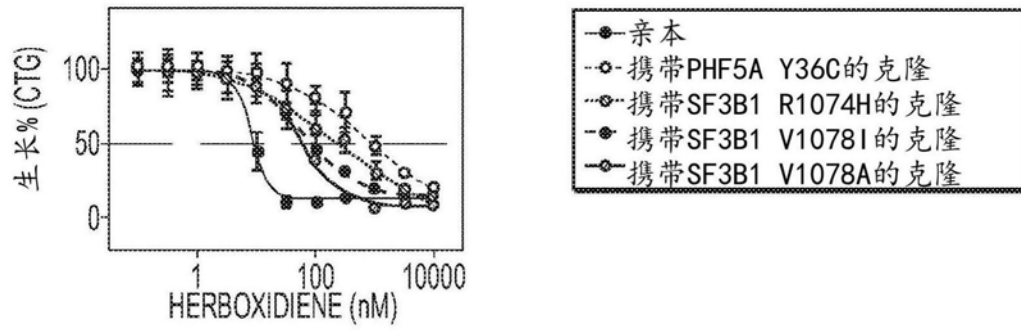


图1F

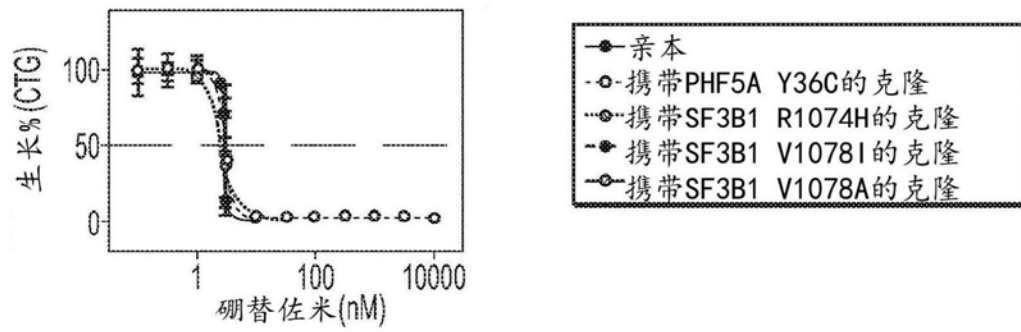


图1G

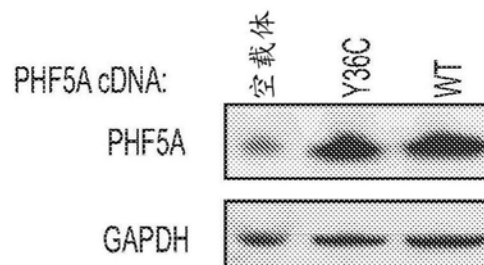


图2A

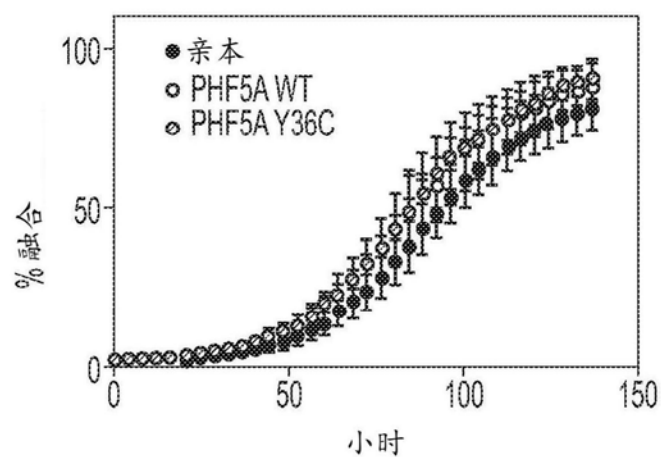


图2B

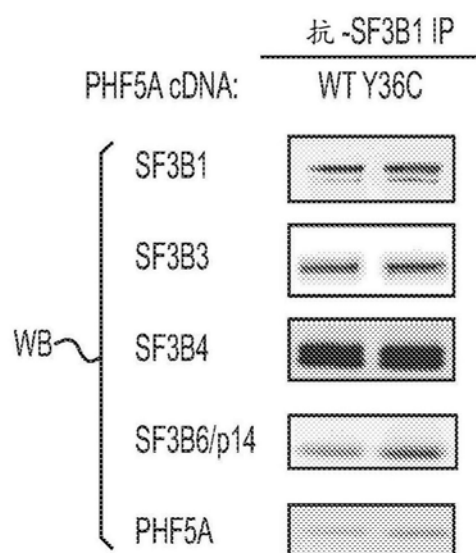


图2C

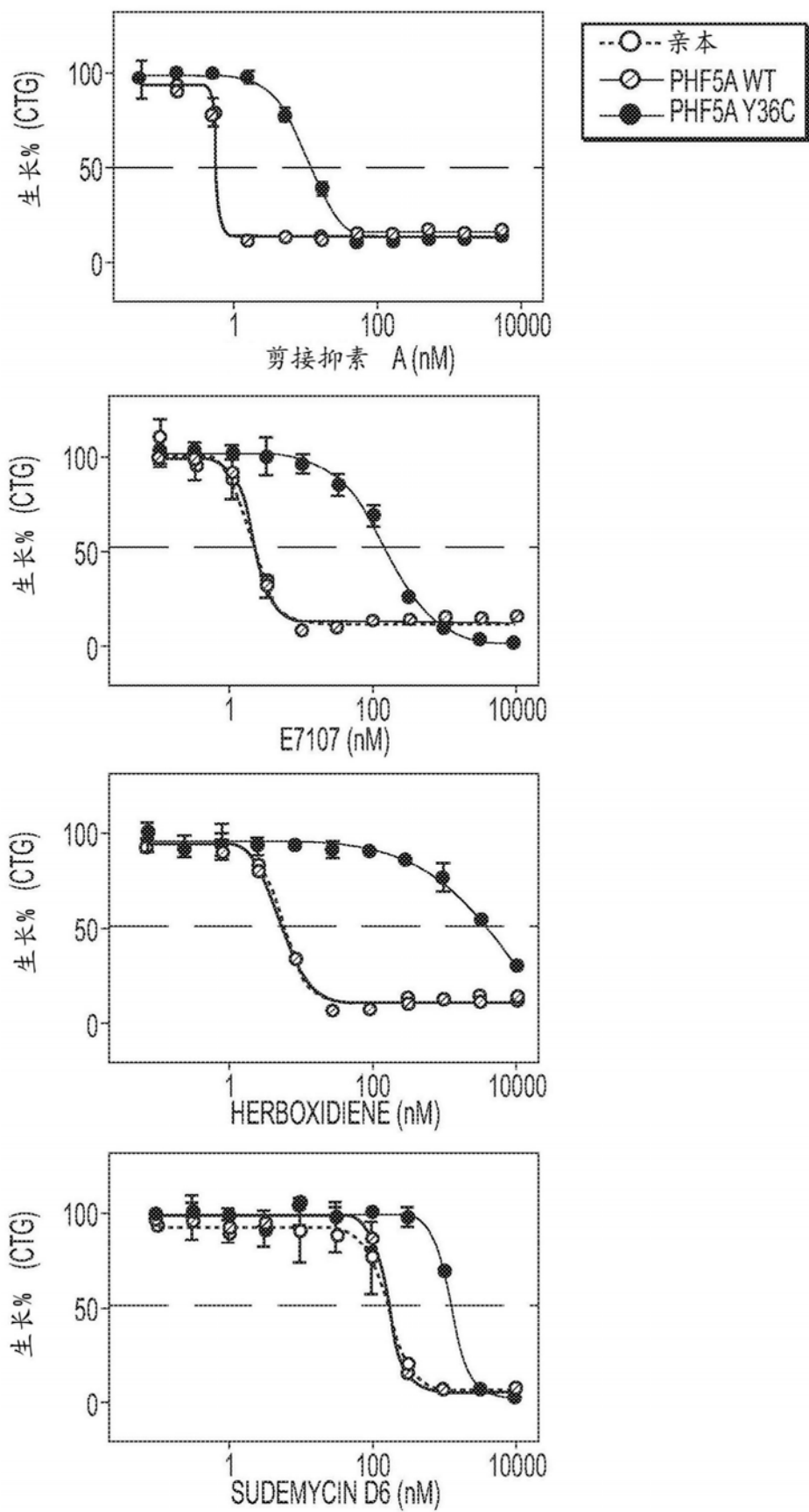


图2D

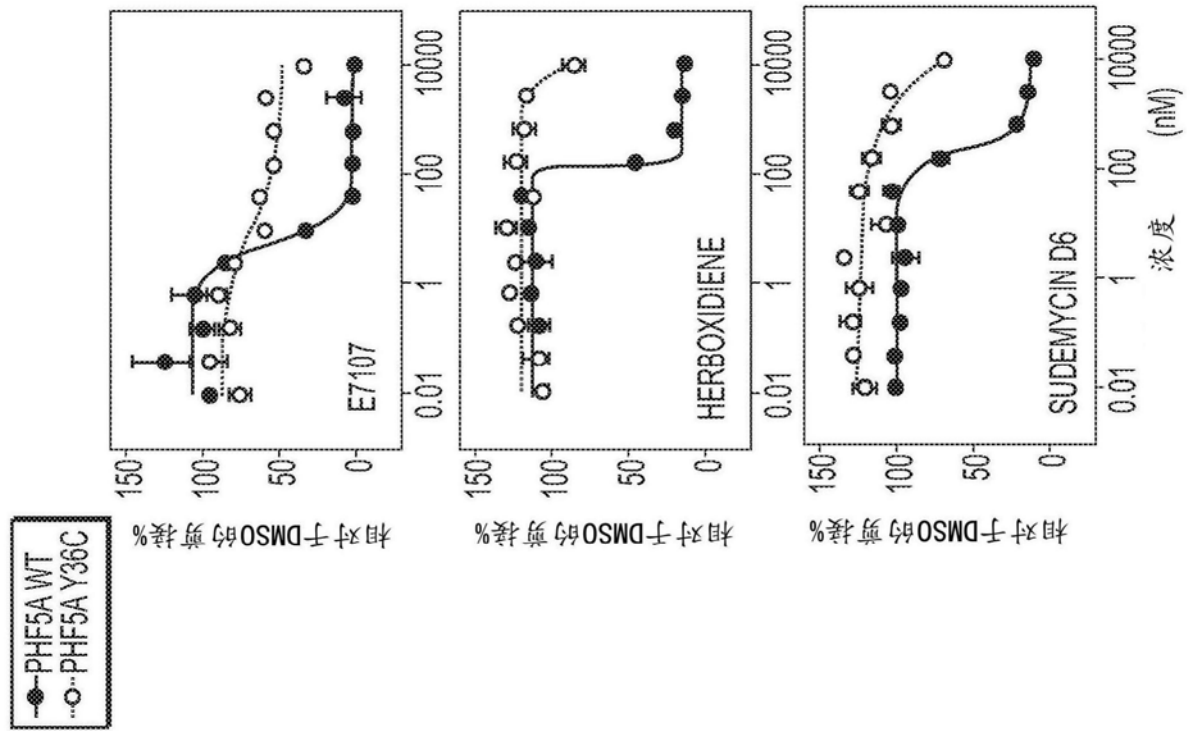


图3A

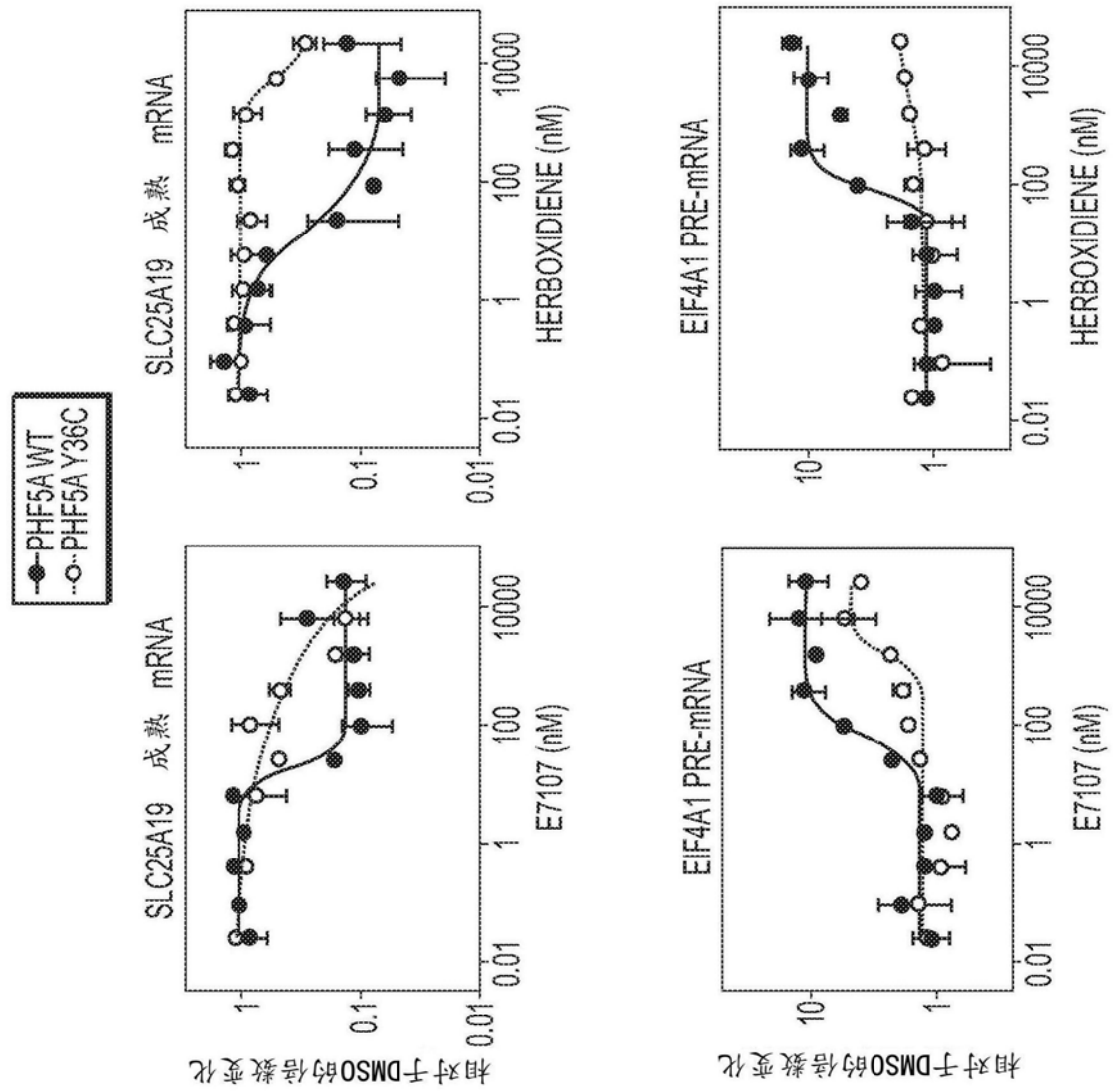


图3B

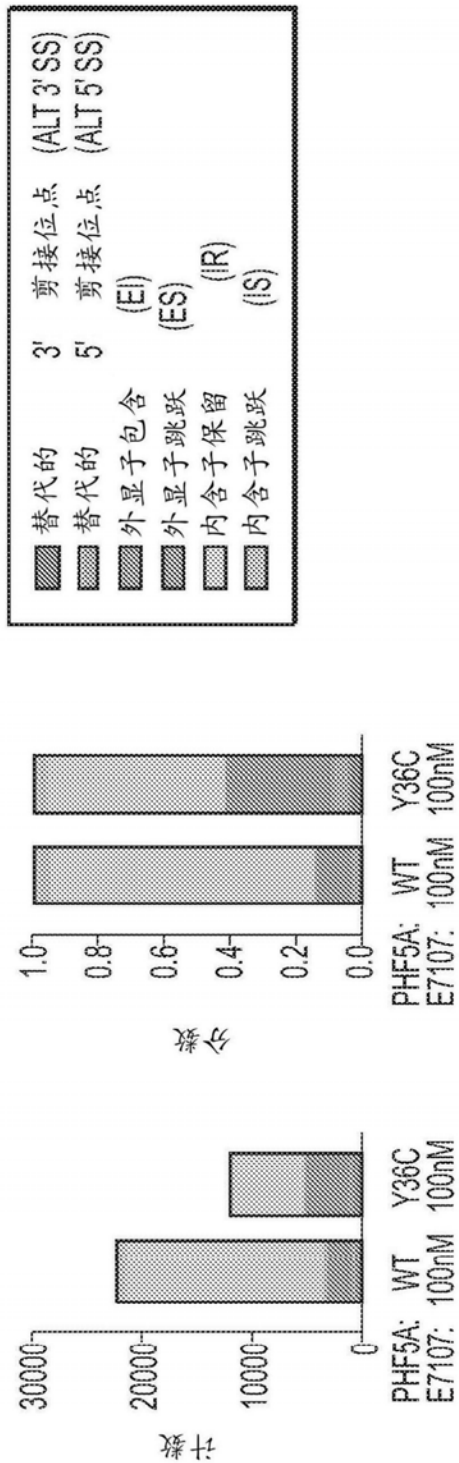


图 4A

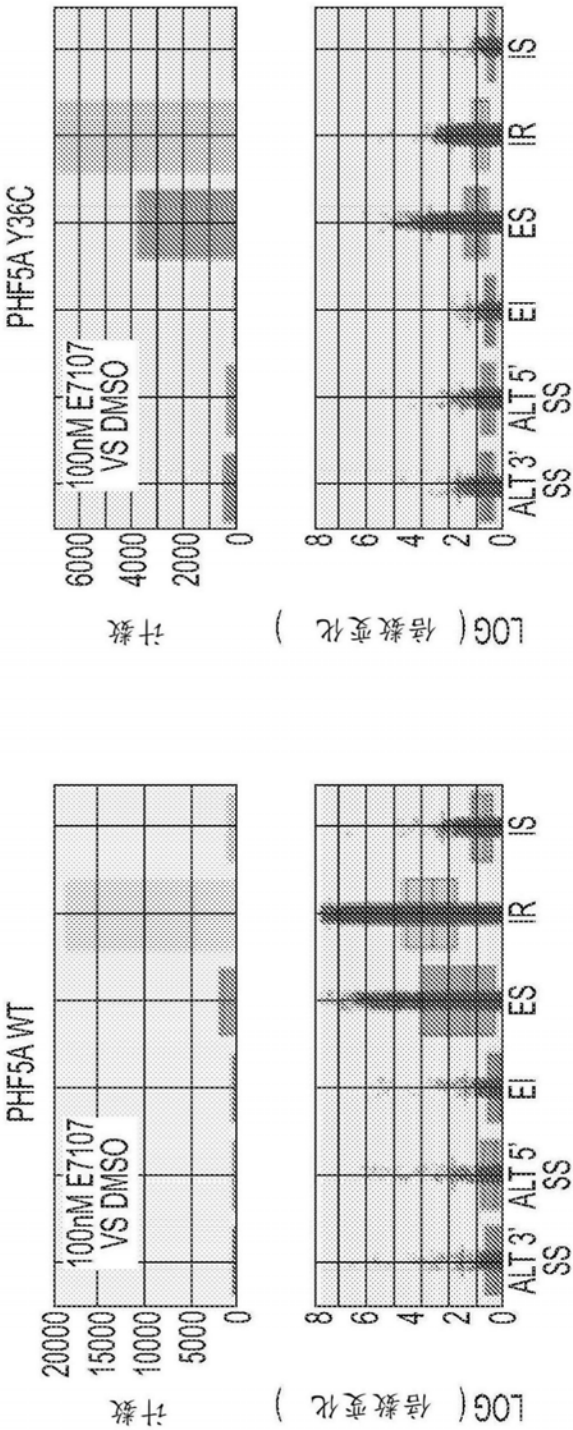


图 4B

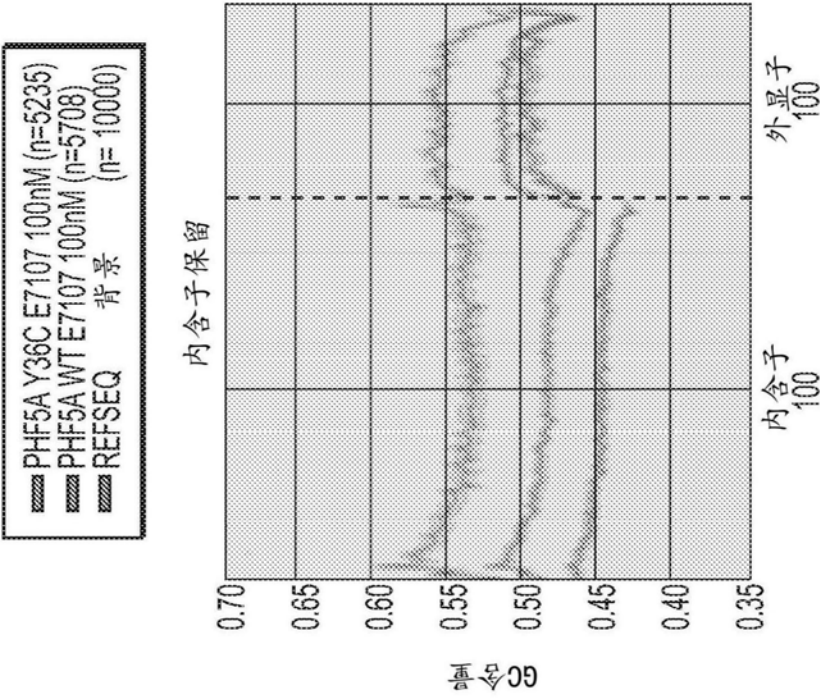


图4C

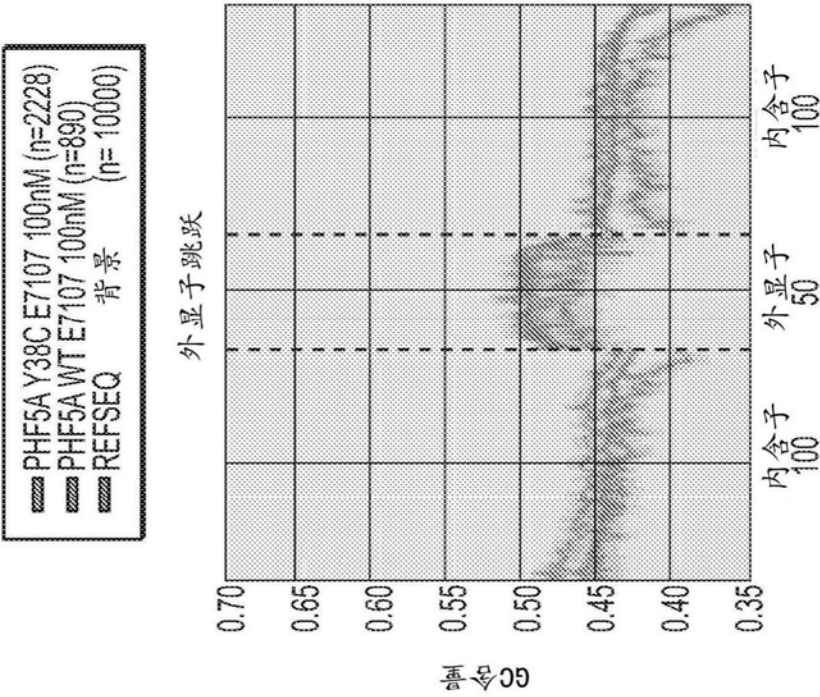


图4D

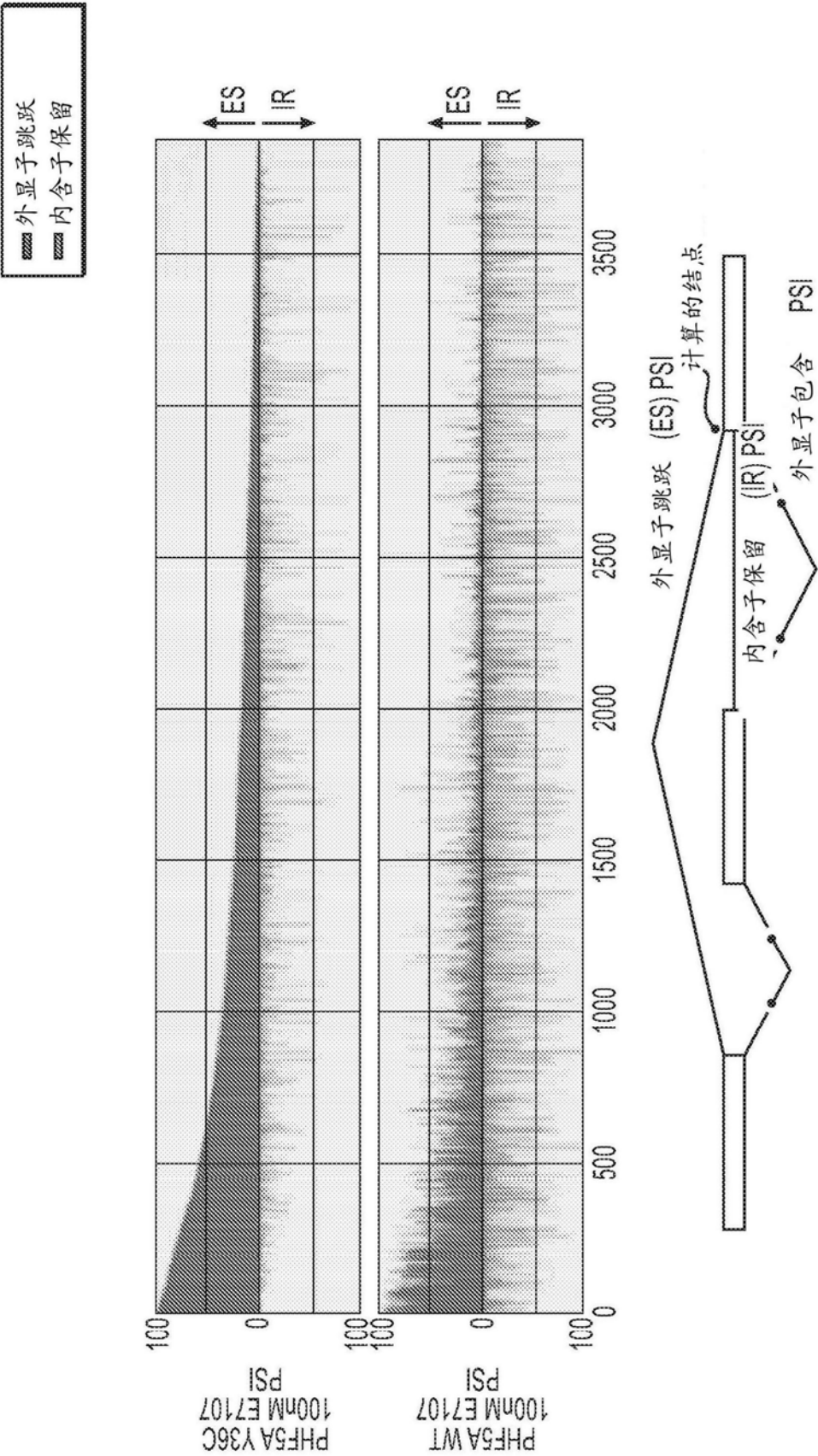


图4E

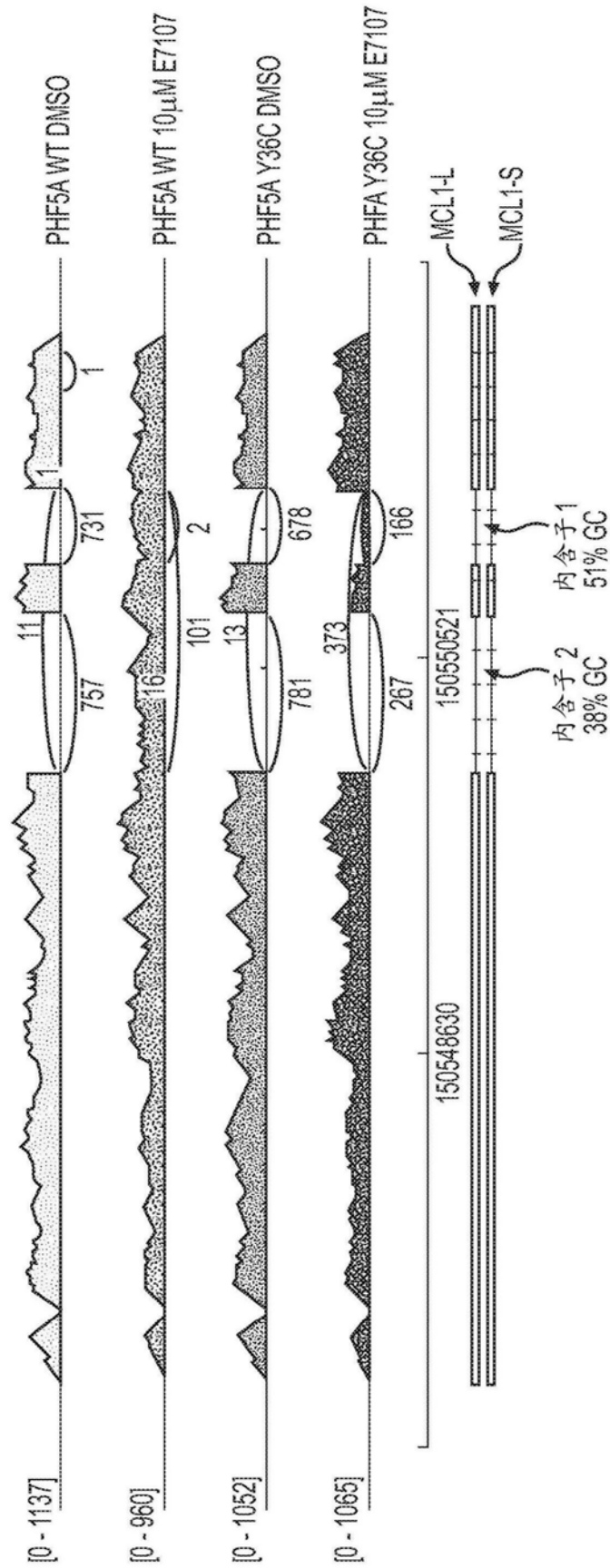


图5A

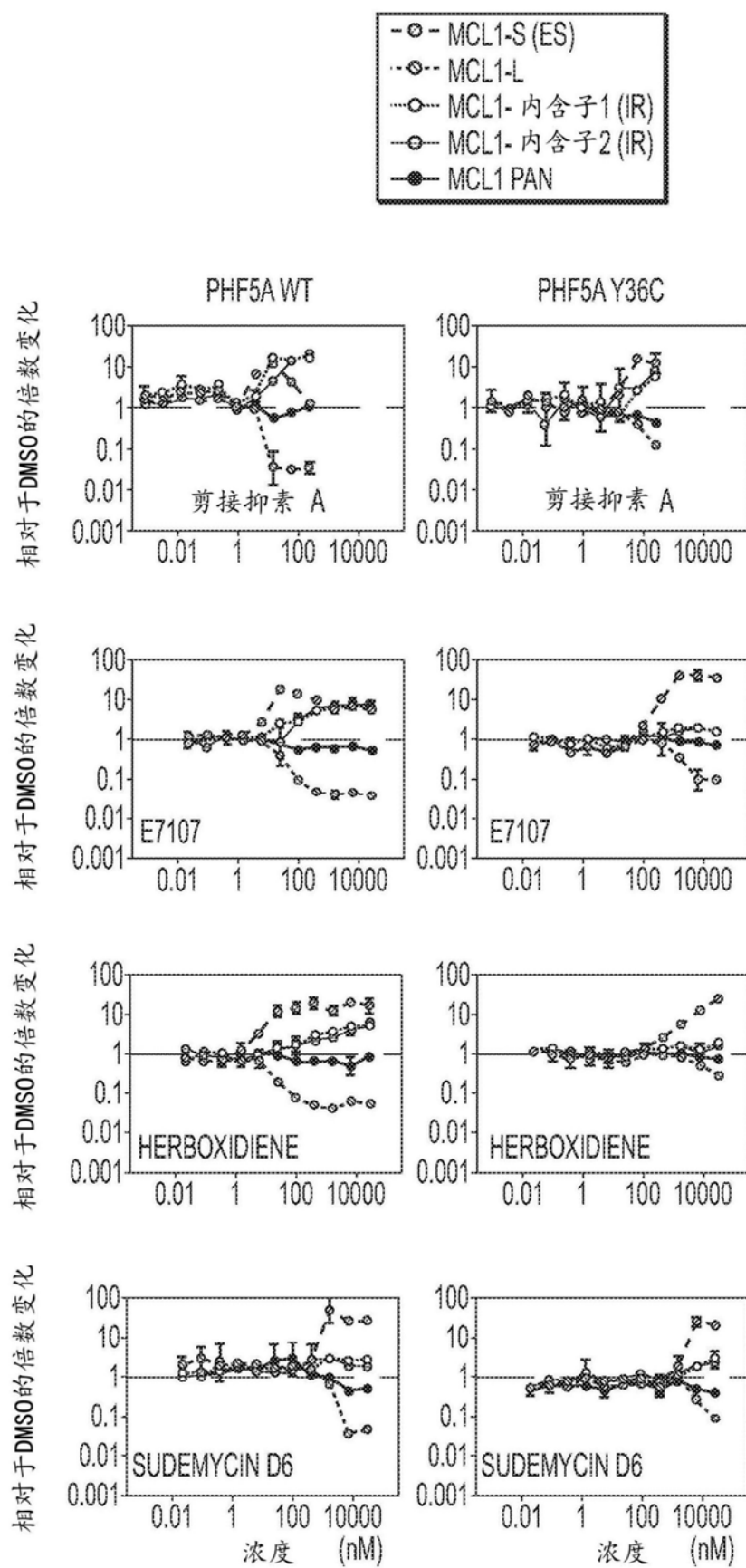


图5B

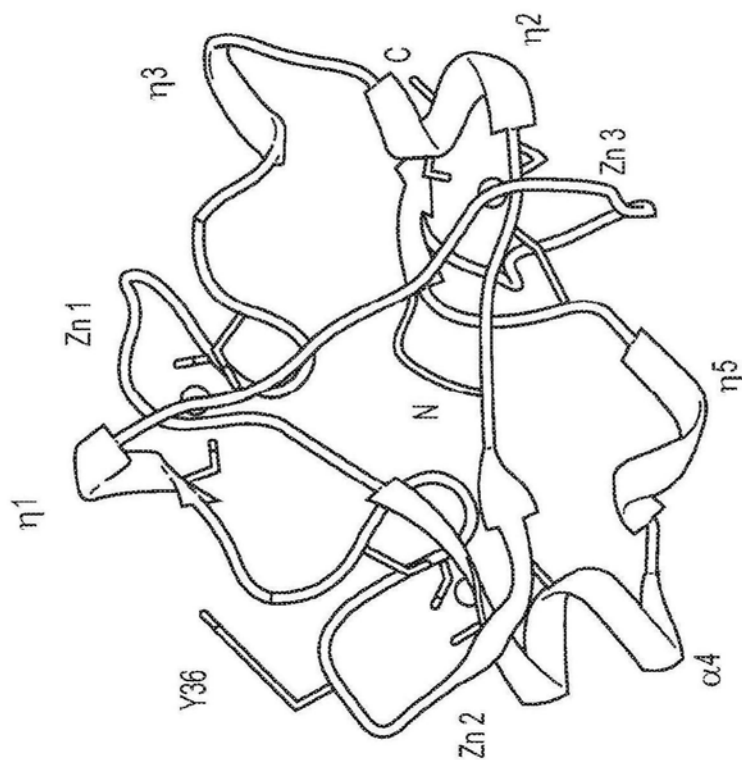


图6A

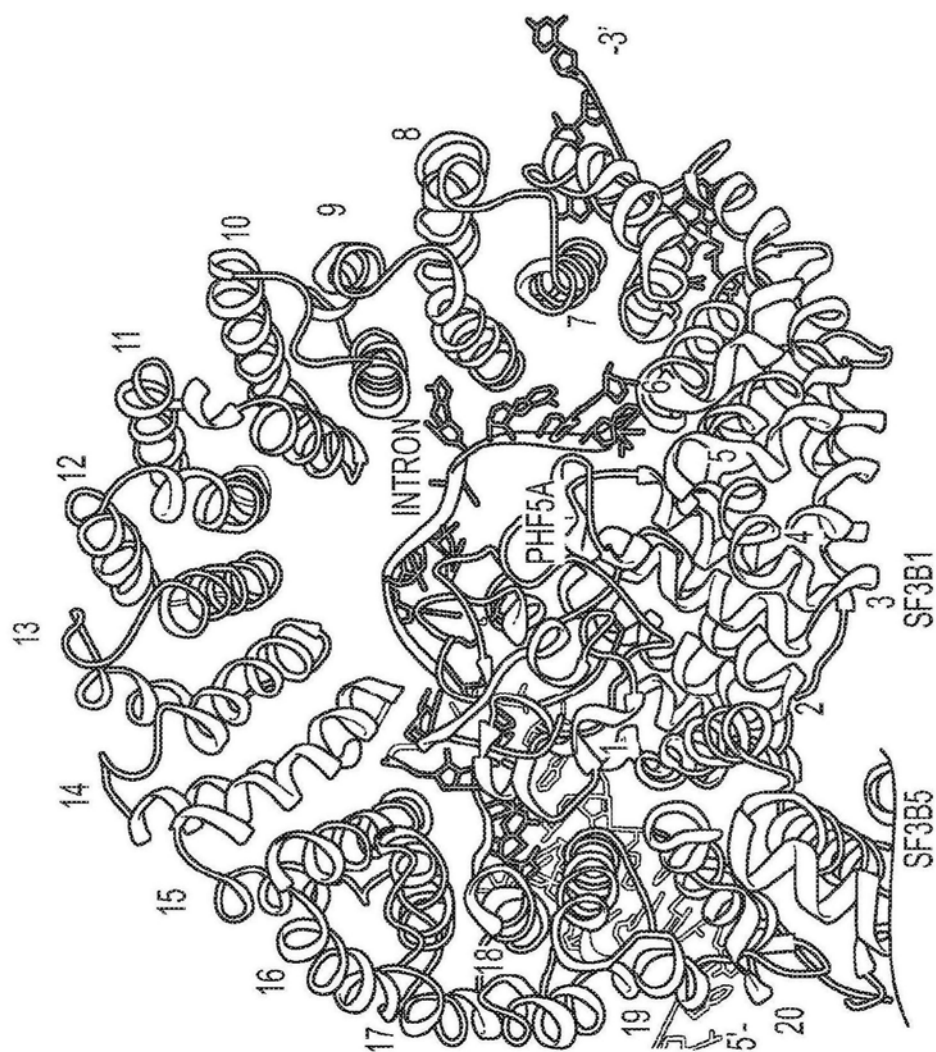


图6B

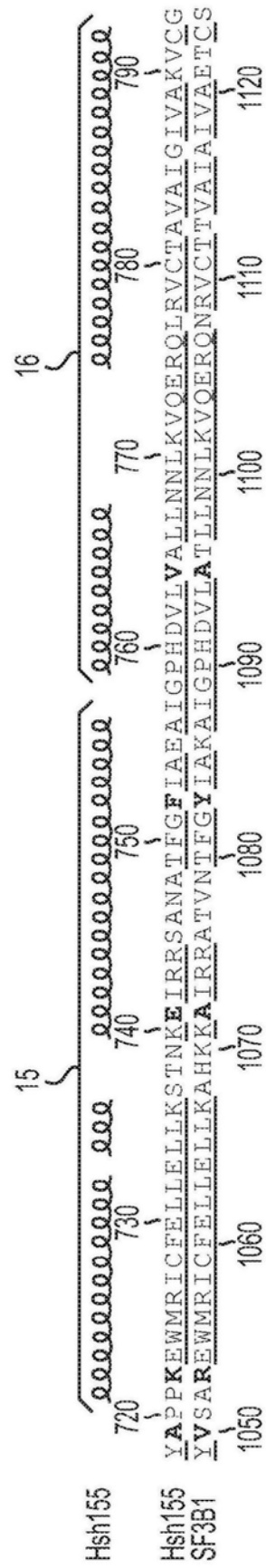


图6C

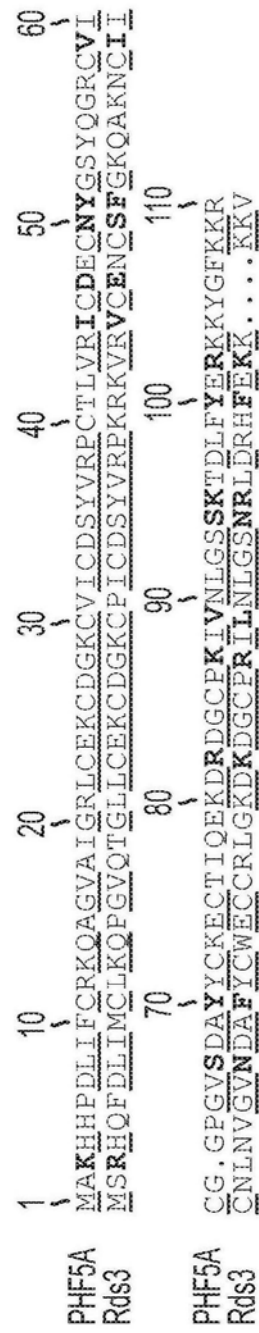


图6D

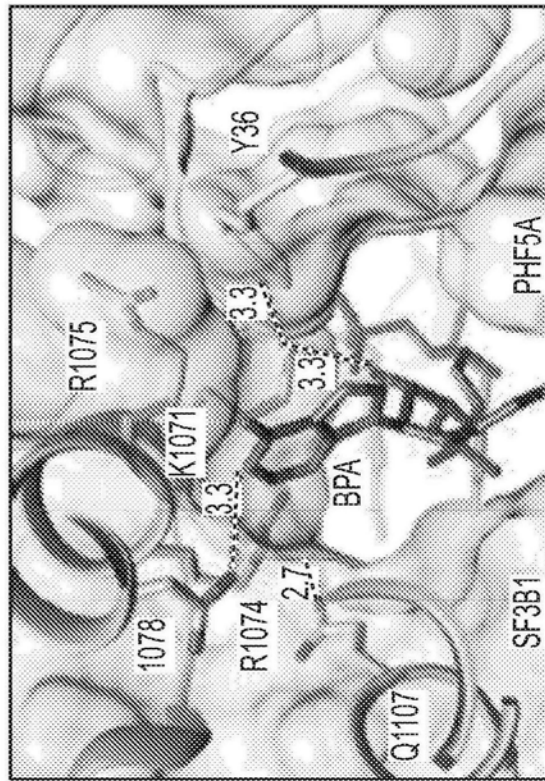


图6E

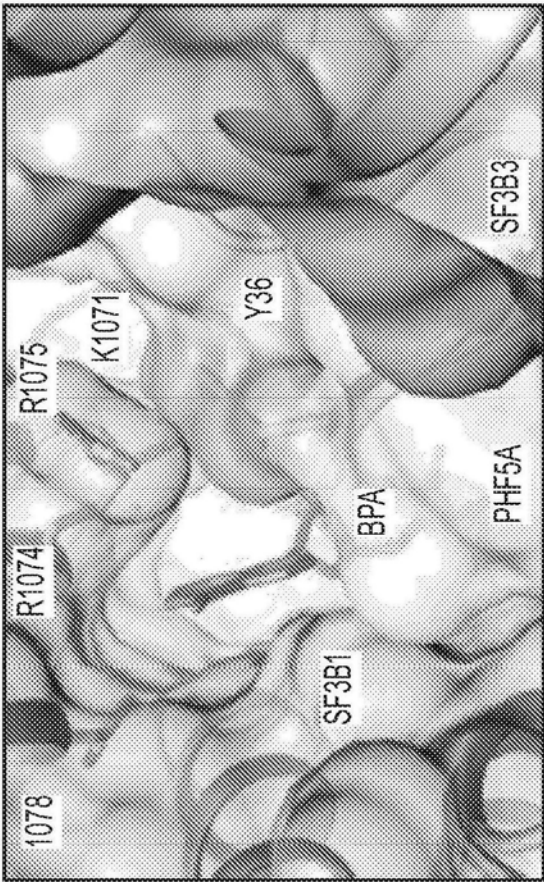


图6F

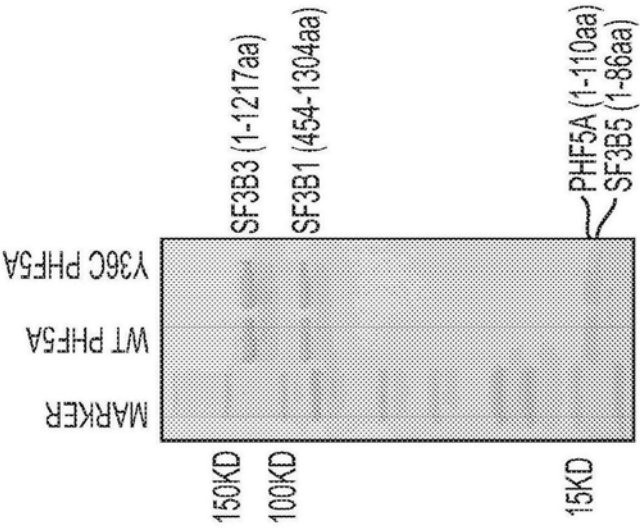


图7A

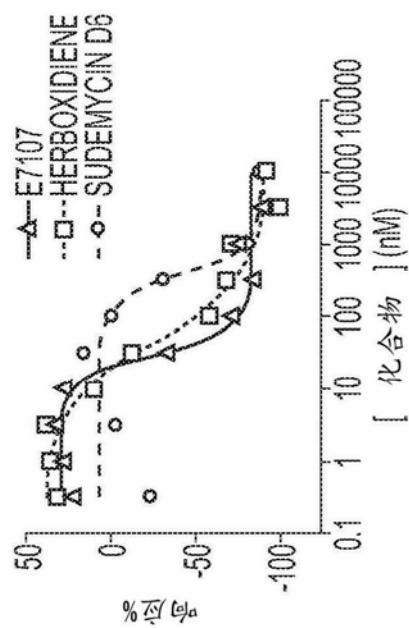


图7B

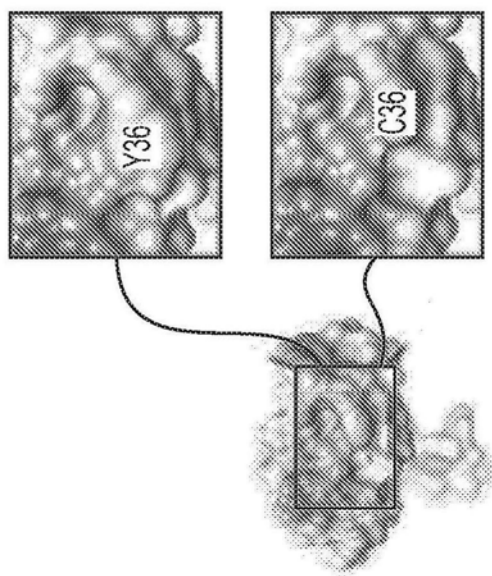


图7C

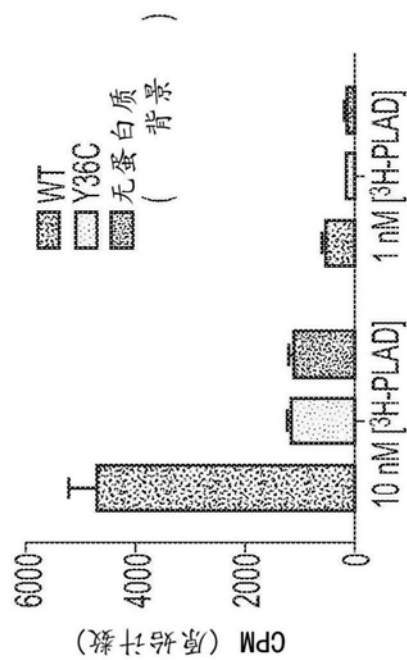


图7D

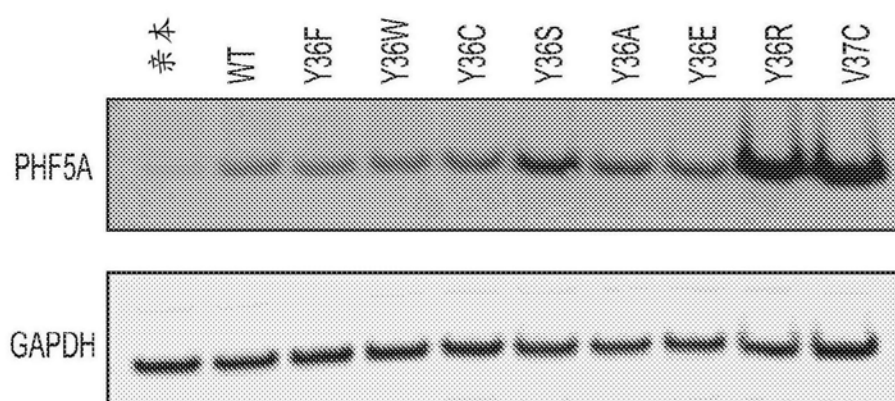


图7E

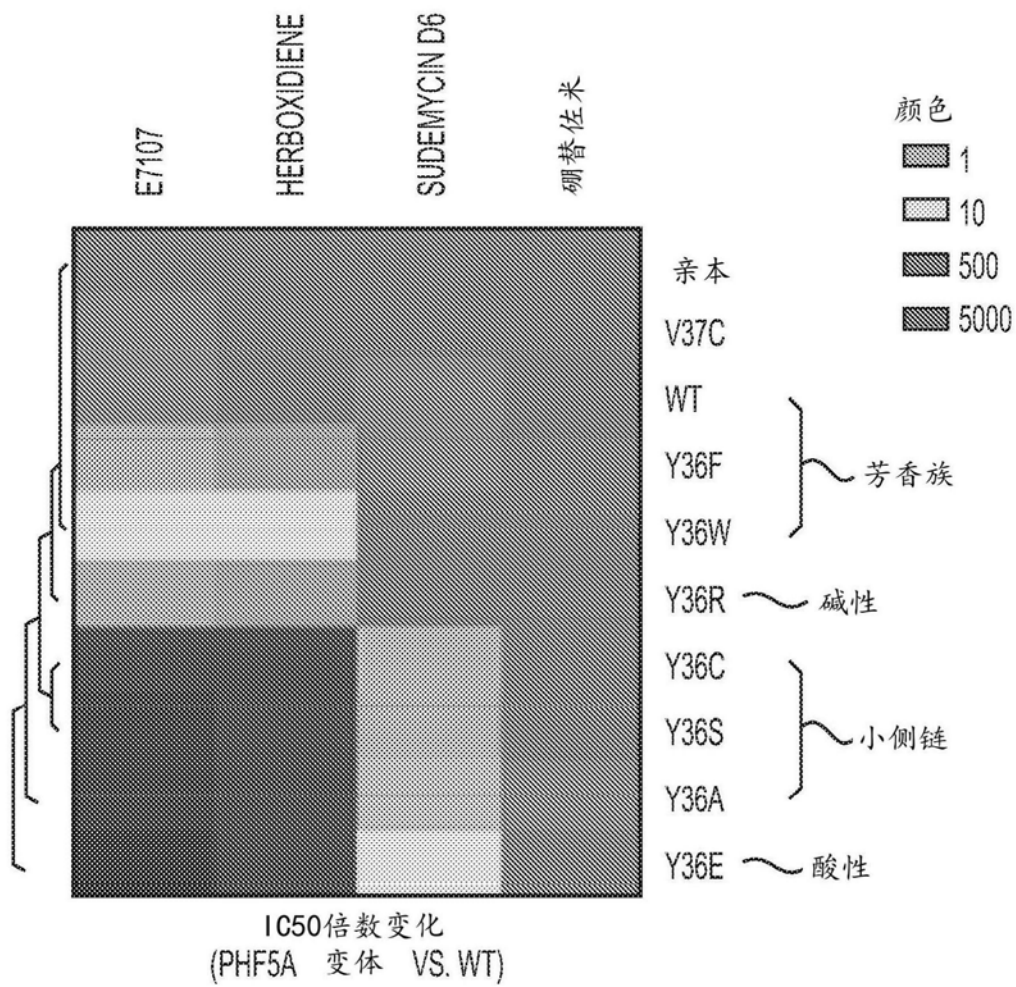


图7F

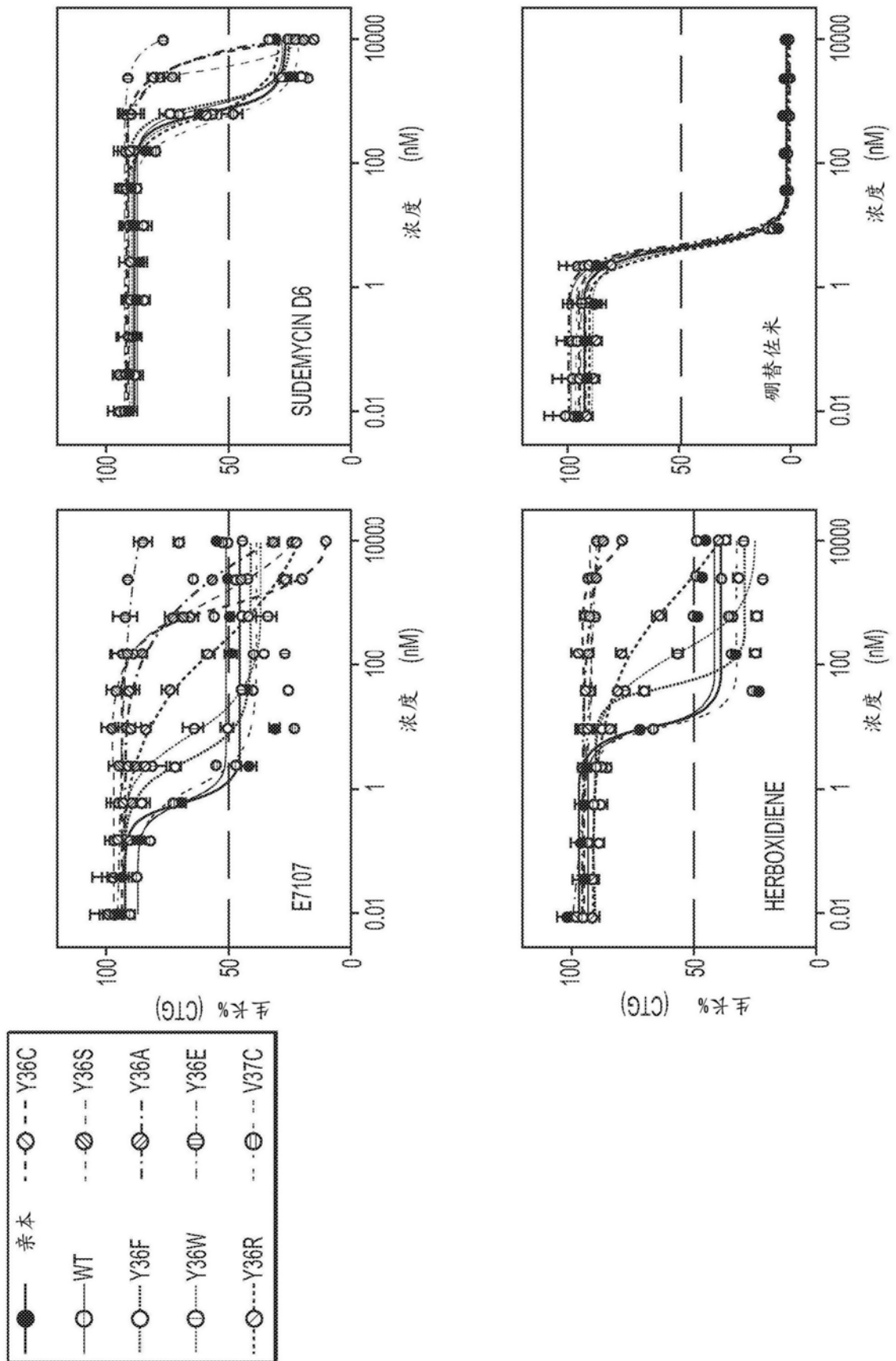


图7G

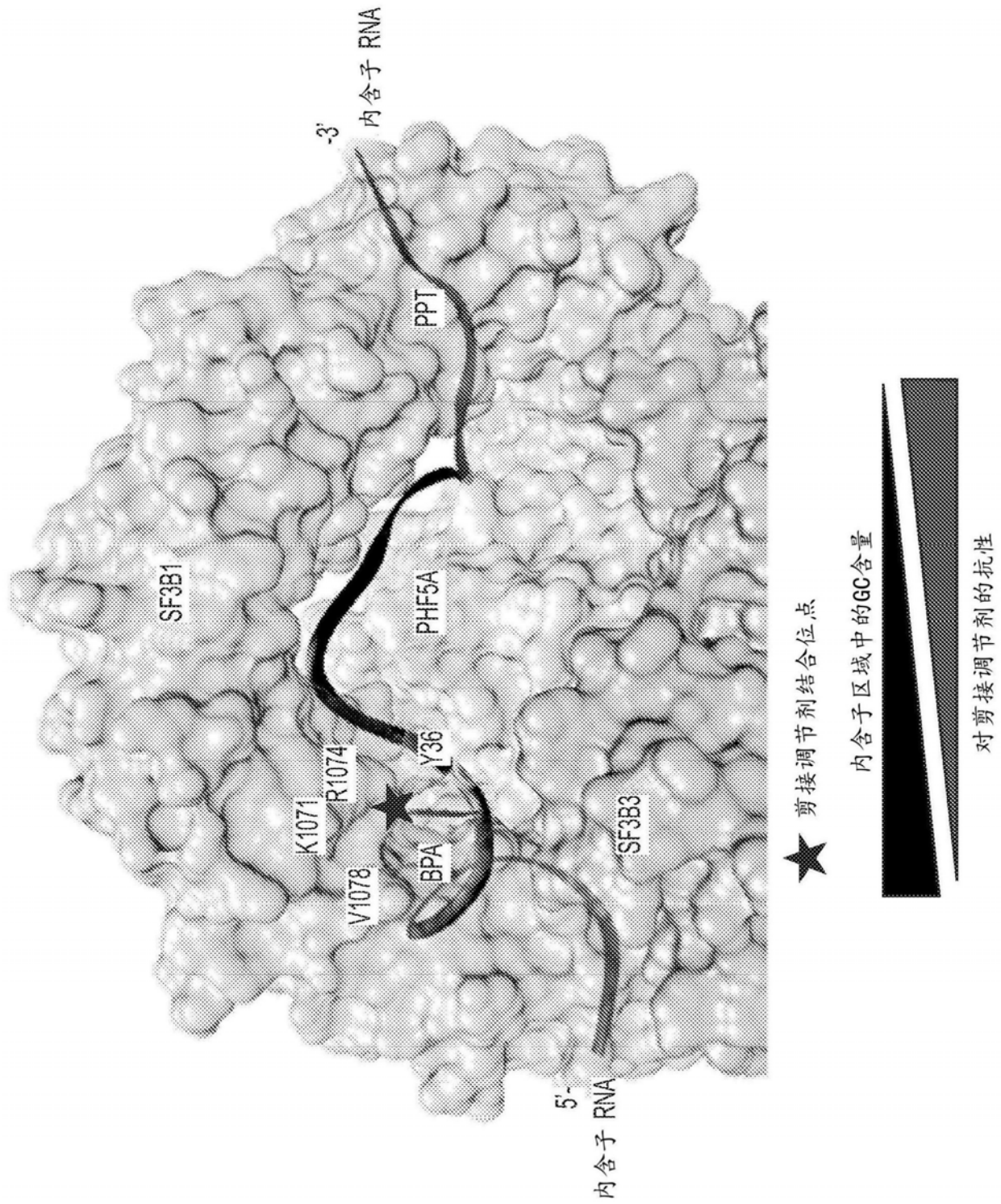


图8

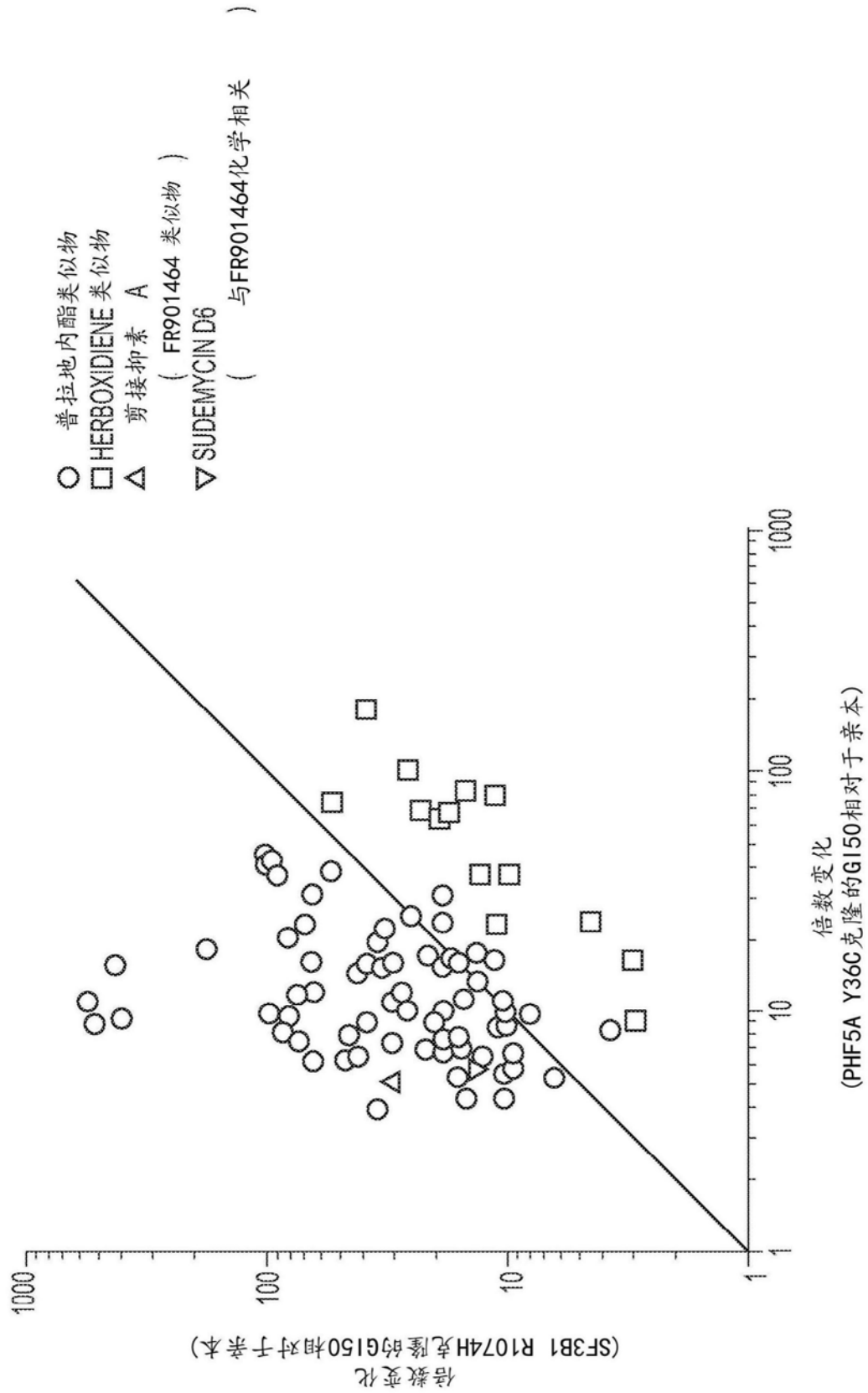


图9

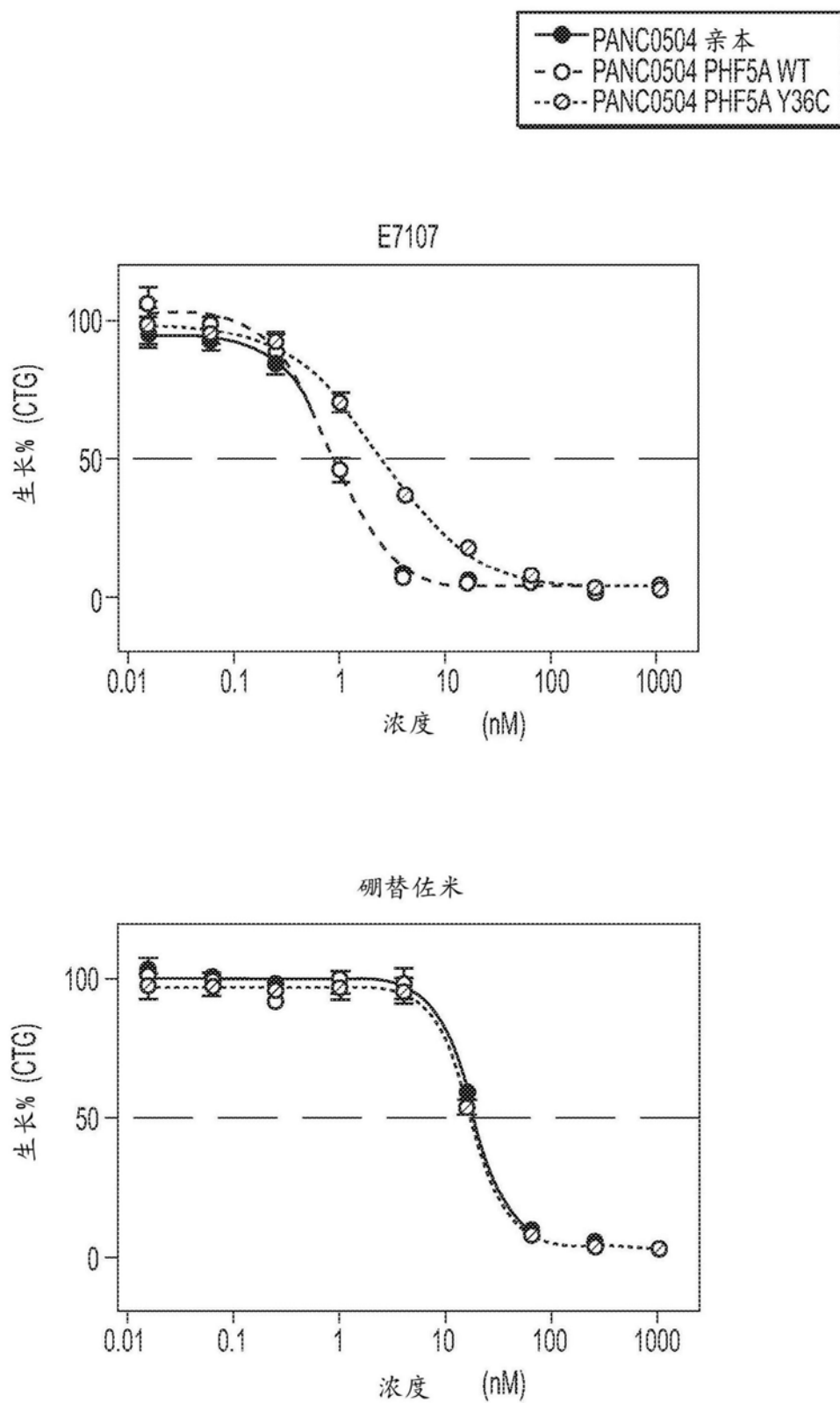


图10

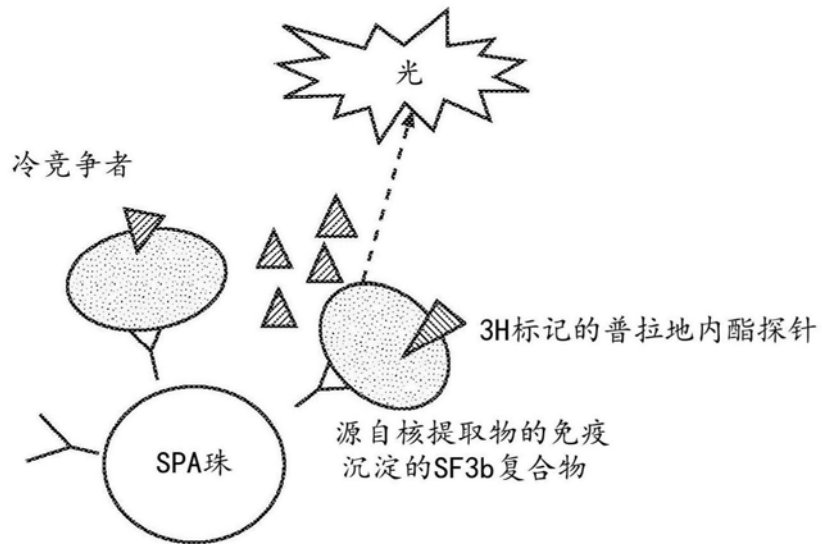


图11A

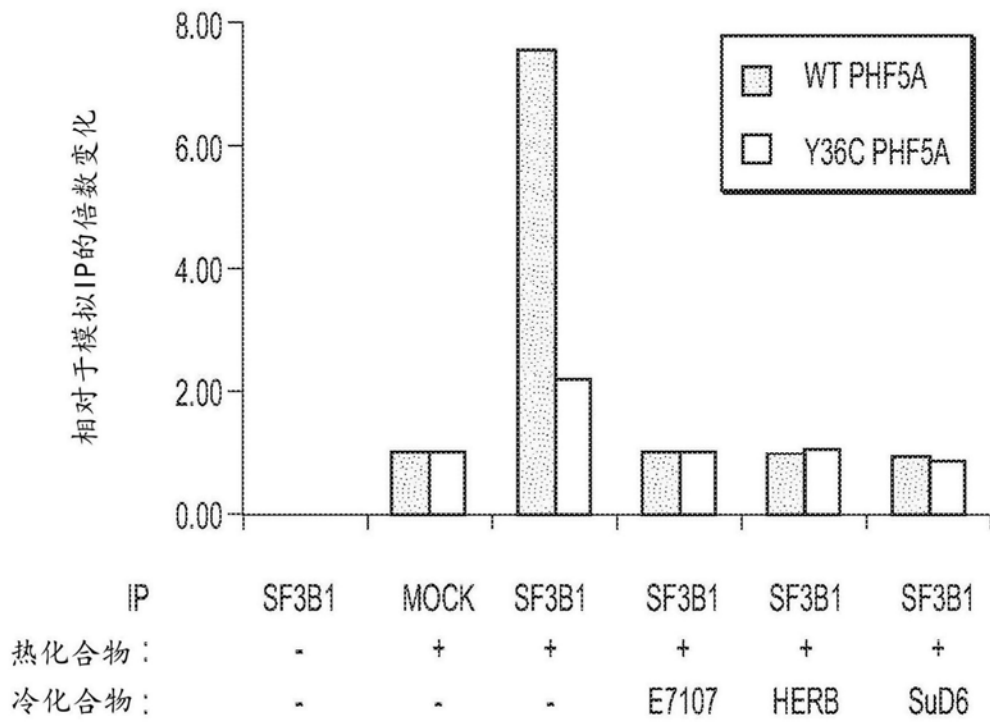


图11B