



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월02일

(11) 등록번호 10-2061353

(24) 등록일자 2019년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) **G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7009166

(22) 출원일자(국제) 2011년09월12일

심사청구일자 2016년09월09일

(85) 번역문제출일자 2013년04월10일

(65) 공개번호 10-2014-0019770

(43) 공개일자 2014년02월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/051258

(87) 국제공개번호 WO 2012/034132

국제공개일자 2012년03월15일

(30) 우선권주장

61/381,684 2010년09월10일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Nat Genet., Vol(42), pp.181-185(2010.08.01.)*

Mol Cancer Ther., Vol(8), 2009*

Mol. Cell. Biol., Vol(28), pp.2718-2731,
2008*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

에피자임, 인코포레이티드

미국 02139 메사추세츠주 캠프리지 4th 플로어 테
크놀로지 스퀘어 400

(72) 발명자

코프랜드 로버트 알렌

미국 02421 메사추세츠주 렉싱턴 스미스 팜 레인
10

리송 빅토리아 마리

미국 02481 메사추세츠주 웰슬리 웨어랜드 로드 5
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희

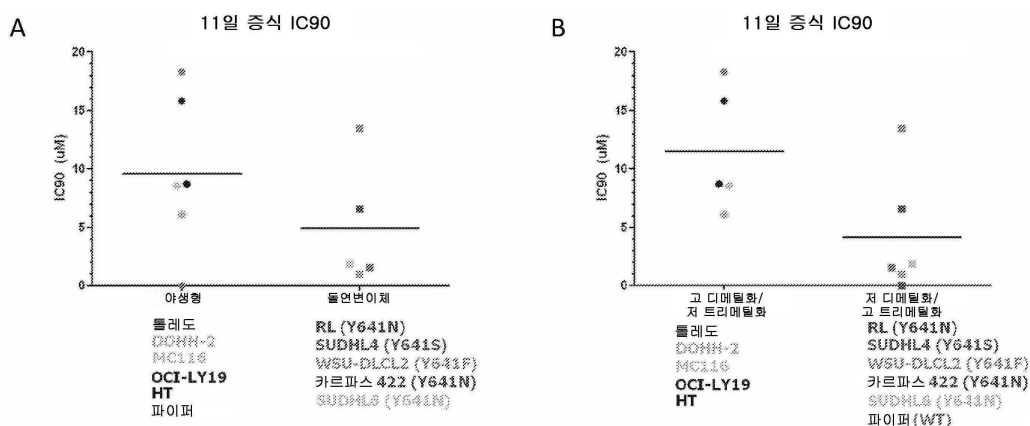
전체 청구항 수 : 총 26 항

심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 인간 EZH2의 억제제 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 히스톤 H3 상의 리신 27(H3-K27)의 모노메틸화 내지 트리메틸화를 촉진하는 PRC2 복합체의 촉매 서브 유닛인 인간 히스톤 메틸트랜스퍼라제 EZH2의 야생형 및 특정 돌연변이형의 억제에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 억제는 EZH2의 돌연변이형에 대해 선택적이어서, 특정 암과 연관된 H3-K27의 트리메틸화가 억제된다. 본 방법은 여포성 림프종 및 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)을 포함하는 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또한, EZH2의 돌연변이형의 선택적 소분자 억제제를 동정하는 방법과 또한 대상 내 EZH2 억제제에 대한 반응성을 판단하는 방법도 제공된다.

대표도

(72) 발명자

스콧 마가렛 데이비스

미국 01915 메사추세츠주 비벌리 페더럴 스트리트
36

스니아링거 크리스토퍼 존

미국 02142 메사추세츠주 캠브리지 씨드 스트리트
285 아파트먼트 #327

쿤츠 케빈 웨인

미국 01801 메사추세츠주 워번 뉴 빌리지 로드 8

넛슨 사라 캐슬린

미국 02138 메사추세츠주 캠브리지 유닛 22 베이
스테이트 로드 24

폴록 로이 맥팔레인

미국 02155 메사추세츠주 메드포드 바나드 로드 7

명세서

청구범위

청구항 1

a) 대상으로부터 조직 샘플을 얻는 단계; 및

b) H3-K27의 디메틸화(me2) 수준을, 상기 조직 샘플 내에 존재한다면 검출하고, 상기 디메틸화(me2) 수준을 대조 디메틸화(me2) 수준과 비교하는 단계

를 포함하며, 상기 디메틸화(me2) 수준이 부재하거나 상기 대조 디메틸화(me2) 수준보다 낮을 때, 상기 대상은 EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체를 발현하는 것이고, EZH2의 억제제에 대해 반응성인 것이며,

상기 Y641 돌연변이체가 Y641F, Y641H, Y641N 및 Y641S로부터 선택되는 것인

대상 내 EZH2의 억제제에 대한 반응성을 판단하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

c) H3-K27의 트리메틸화(me3) 수준을, 상기 조직 샘플 내에 존재한다면 검출하고, 상기 트리메틸화(me3) 수준을 대조 트리메틸화(me3) 수준과 비교하는 단계; 및

d) 상기 조직 샘플 내의 H3-K27의 디메틸화(me2) 수준 대 트리메틸화(me3) 수준의 비를 구하여 시험 비를 얻고, 시험 비를 대조 비와 비교하는 단계

를 추가로 포함하며, 상기 트리메틸화(me3) 수준이 상기 대조 트리메틸화(me3) 수준과 같거나 더 높고, 상기 디메틸화(me2) 수준이 부재하거나 상기 대조 디메틸화(me2) 수준보다 낮을 때, 또는 상기 시험 비가 상기 대조 비보다 낮을 때, 상기 대상이 EZH2의 억제제에 대해 반응성인 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 대상이 흑색종, 여포성 림프종 및 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)으로 이루어진 군에서 선택되는 암을 앓는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 검출을 웨스턴 블롯 분석, 면역조직화학법(IHC), 면역형광법(IF) 및 질량분석법(MS)으로부터 선택되는 검정에 의해 수행하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 검출은 상기 조직 샘플을 디메틸화된 H3-K27에 특이적으로 결합하는 작용물질과 접촉시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 검출은 상기 조직 샘플을 트리메틸화된 H3-K27에 특이적으로 결합하는 작용물질과 접촉시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 작용물질이 항체, 폴리펩티드, 압타머 또는 이들의 단편인 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 작용물질이 항체, 폴리펩티드, 압타머 또는 이들의 단편인 것인 방법.

청구항 9

EZH2의 억제제를 포함하는, 암 치료가 필요한 대상에서 암을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 대상은 EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체를 발현하는 것이고, 상기 Y641 돌연변이체가 Y641F, Y641H, Y641N 및 Y641S로부터 선택되는 것이며, 상기 암은 흑색종, 여포성 림프종 및 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 약학적 조성물.

청구항 10

EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체를 발현하는 세포를 유효량의 EZH2의 억제제와 접촉시키는 것을 포함하며, 상기 Y641 돌연변이체가 Y641F, Y641H, Y641N 및 Y641S로부터 선택되는 것인, H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 억제제는 EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 억제는 선택적 억제인 것인 방법.

청구항 13

EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체를, 대상으로부터의 샘플 내에 존재한다면 검출하는 것을 포함하는 방법으로서, Y641 돌연변이체의 존재는 대상이 EZH2의 억제제를 이용한 치료의 후보임을 나타내는 것이며, 상기 Y641 돌연변이체가 Y641F, Y641H, Y641N 및 Y641S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, EZH2의 억제제를 이용한 치료의 후보를 동정하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 억제제가 EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 억제는 선택적 억제인 것인 방법.

청구항 16

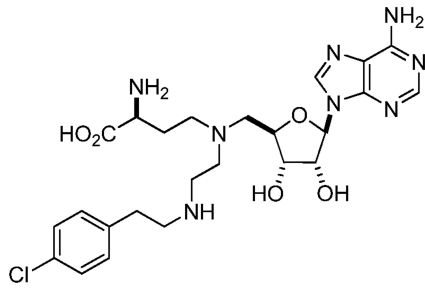
제13항에 있어서, EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체를 검출하는 것이

- a. 전체 게놈 리시퀀싱,
- b. EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체를 코딩하는 핵산을 검출하는 표적 영역 리시퀀싱,
- c. EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체에 특징적인 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 또는
- d. EZH2 폴리펩티드의 Y641 돌연변이체에 특징적인 폴리펩티드 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산에 혼성화하는 핵산 프로브

에 의한 것인 방법.

청구항 17

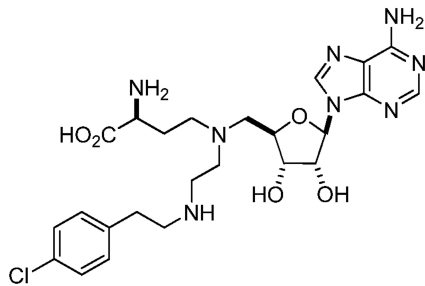
제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EZH2의 억제제가 S-아데노실-L-호모시스테인 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는



또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 것인 방법.

청구항 18

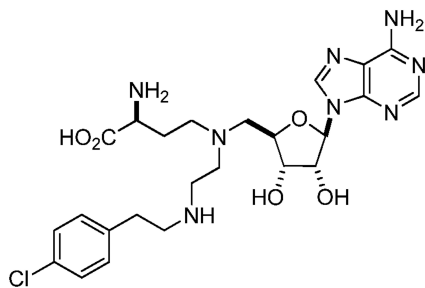
제9항에 있어서, 상기 EZH2의 억제제가 S-아데노실-L-호모시스테인 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는



또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 것인 약학적 조성물.

청구항 19

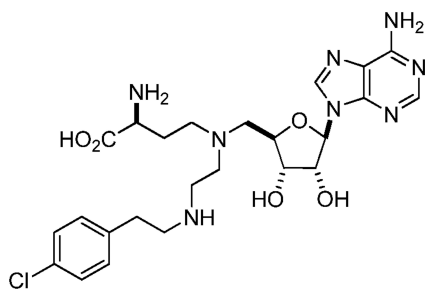
제10항에 있어서, 상기 EZH2의 억제제가 S-아데노실-L-호모시스테인 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는



또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 것인 방법.

청구항 20

제13항에 있어서, 상기 EZH2의 억제제가 S-아데노실-L-호모시스테인 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는



또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 것인 방법.

청구항 21

EZH2 폴리펩티드의 단리된 Y641 돌연변이체를 히스톤 기질, 메틸기 도너, 및 시험 화합물과 배합함으로써 시험 혼합물을 형성하는 단계로서, 히스톤 기질은 비메틸화된 H3-K27, 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 H3-K27의 형태를 포함하는 것인 단계; 및

히스톤 기질 내의 H3-K27의 메틸화를 검출함으로써, 시험 화합물의 존재 하에서의 H3-K27의 메틸화가 시험 화합물의 부재 하에서의 H3-K27의 메틸화보다 적을 때, 시험 화합물을 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제로서 동정하는 단계

를 포함하며, 상기 Y641 돌연변이체가 Y641F, Y641H, Y641N, 및 Y641S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제를 동정하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

히스톤 기질 내의 트리메틸화된 H3-K27의 형성을 검출함으로써, 시험 화합물의 존재 하에서의 트리메틸화된 H3-K27의 형성이 시험 화합물의 부재 하에서의 트리메틸화된 H3-K27의 형성보다 적을 때, 시험 화합물을 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제로서 동정하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

단리된 야생형 EZH2를 히스톤 기질, 메틸기 도너, 및 시험 화합물과 배합함으로써 대조 혼합물을 형성하는 단계로서, 히스톤 기질은 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27, 및 모노메틸화된 H3-K27과 디메틸화된 H3-K27의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 H3-K27의 형태를 포함하는 것인 단계;

각각의 시험 혼합물 및 대조 혼합물 내의 히스톤 기질의 트리메틸화를 검출하는 단계;

(a) EZH2의 Y641 돌연변이체 및 시험 화합물에 의한(M+) 트리메틸화 대 (b) 시험 화합물 없이 EZH2의 Y641 돌연변이체에 의한(M-) 트리메틸화의 비를 계산하는 단계;

(c) 야생형 EZH2 및 시험 화합물에 의한(WT+) 트리메틸화 대 (d) 시험 화합물 없이 야생형 EZH2에 의한(WT-) 트리메틸화의 비를 계산하는 단계;

비 (a)/(b)를 비 (c)/(d)와 비교하는 단계; 및

비 (a)/(b)가 비 (c)/(d)보다 작을 때, 시험 화합물을 EZH2의 Y641 돌연변이체의 선택적 억제제로서 동정하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출은 표지된 메틸기의 도입을 측정하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 표지된 메틸기가 동위원소로 표지된 메틸기인 것인 방법.

청구항 26

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출이 히스톤 기질을 트리메틸화된 H3-K27에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본원은 전문이 본원에 참조로 인용되는, 2010년 9월 10일에 출원된 U.S.S.N 61/381,684에 대한 우선권 및 이의 이익을 주장한다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본 발명은 히스톤 H3 상의 리신 27(H3-K27)의 모노메틸화 내지 트리메틸화를 촉진하는 PRC2 복합체의 촉매 서브 유닛인 인간 히스톤 메틸트랜스퍼라제 EZH2의 야생형 및 특정 돌연변이형의 억제, 여포성 림프종 및 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)을 포함하는 암의 치료 방법, 및 대상에서의 EZH2 억제제에 대한 반응성을 판단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 진핵생물 세포에서, DNA는 히스톤과 함께 패키징되어 크로마틴을 형성한다. 대략 150개의 염기쌍의 DNA는 히스톤의 옥타머 주위에 2회 래핑되어(히스톤 2A, 2B, 3 및 4의 각 2개), 크로마틴의 기본 단위인 뉴클레오솜을 형성한다. 크로마틴의 질서있는 구조의 변화는 연관 유전자의 전사의 변경을 초래할 수 있다. 이 프로세스는, 유전자 발현 패턴의 변화가 기본적 세포내 프로세스, 예컨대 분화, 증식 및 아포토시스에 깊이 영향을 미칠 수 있기 때문에, 고도로 제어된다. 크로마틴 구조의 변화의 제어(및 이에 따른 전사의 제어)는 가장 특히 N-말단 꼬리의, 히스톤으로의 공유적 변형에 의해 매개된다. 이 변형은 유전자 발현의 유전적 변화를 초래할 수 있으나 DNA 자체의 서열에는 영향을 미치지 않기 때문에, 종종 후생적으로 칭해진다. 아미노산의 측쇄의 공유적 변형(예를 들어, 메틸화, 아세틸화, 인산화 및 유비퀴틴화)은 효소에 의해 매개된다.

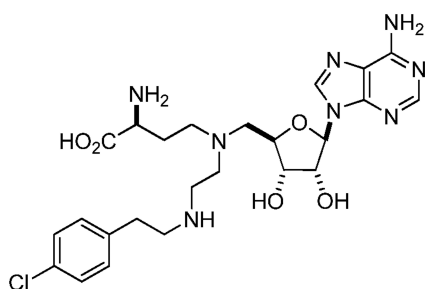
[0006] 히스톤 상의 특정 아미노산 부위의 메틸기의 선택적 부가는 히스톤 메틸트랜스퍼라제(HMT)로 알려져 있는 특유 계열의 효소의 작용에 의해 조절된다. 특별한 유전자의 발현 수준은 관련 히스톤 부위에 있는 하나 이상의 메틸기의 존재 또는 부재에 의해 영향을 받는다. 특별한 히스톤 부위에 있는 메틸기의 특정 효과는 메틸기가 히스톤 디메틸라제에 의해 제거될 때까지, 또는 변형된 히스톤이 뉴클레오솜 반전을 통해 치환될 때까지 지속된다. 마찬가지로 방식으로, 다른 효소 부류는 DNA 및 히스톤을 다른 화학종으로 수식할 수 있고, 또 다른 효소는 이러한 종을 제거함으로써 유전자 발현을 제어할 수 있다.

[0007] 전사적 조절의 배후의 생화학적 시스템의 조직화된 집합은 세포 성장 및 분화가 최적으로 진행되도록 면밀히 제어되어야 한다. 이 질환 상태는, 이러한 제어가 DNA 및 히스톤 변형의 원인이 되는 효소의 이상 발현 및/또는 활성에 의해 방해될 때 초래된다. 예를 들어, 인간 암에서, 결핍제한 후생적 효소 활성이 암과 연관된 조절 장애 세포 증식뿐만 아니라 증진된 세포 이동 및 침입과 같은 기타 암 관련 표현형에 기여한다는 것을 제시하는 증거체가 증가하고 있다. 암 외에도, 다수의 기타 인간 질환, 예컨대 대사 질환(예컨대, 당뇨병), 염증 질환(예컨대, 크론병), 신경퇴행성 질환(예컨대, 알츠하이머병), 및 심혈관 질환에서의 후생적 효소의 역할에 대한 증거가 증가하고 있다. 그러므로, 후생적 효소의 이상 작용을 선택적으로 조절하는 것은 다양한 범위의 질환들의 치료에 대한 전망을 밝게 한다.

- [0008] 히스톤 메틸트랜스퍼라제 EZH2
- [0009] 폴리콤 군(PcG) 및 트리토락스 군(trxG) 단백질은 세포 기억 체계의 부분인 것으로 알려져 있다. 문헌[Francis et al. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:409-21]; 문헌[Simon et al. (2002) *Curr Opin Genet Dev* 12:210-8]. 양 군의 단백질 모두는 일시적으로 발현되는 분절 유전자에 의해 배아 발달 시에 초기 확립되는 항상성 박스(Hox) 유전자 발현의 공간 패턴의 유지에 관여한다. 일반적으로, PcG 단백질은 "분리(off) 상태"를 유지하는 전사 리프레서이고, trxG 단백질은 "부착(on) 상태"를 유지하는 전사 액티베이터이다. PcG 및 trxG 단백질의 구성원은 고유의 히스톤 메틸트랜스퍼라제(HMTase) 활성을 보유하기 때문에, PcG 및 trxG 단백질은 코어 히스톤의 메틸화를 통해 세포 기억에 참여할 수 있다. 문헌[Beisel et al. (2002) *Nature* 419:857-62]; 문헌[Cao et al. (2002) *Science* 298:1039-43]; 문헌[Czermin et al. (2002) *Cell* 111:185-96]; 문헌[Kuzmichev et al. (2002) *Genes Dev* 16:2893-905]; 문헌[Milne et al. (2002) *Mol Cell* 10:1107-17]; 문헌[Muller et al. (2002) *Cell* 111:197-208]; 문헌[Nakamura et al. (2002) *Mol Cell* 10:1119-28].
- [0010] 생화학적 및 유전학적 연구는 *드로소필라(Drosophila)* PcG 단백질이 적어도 2개의 구분된 단백질 복합체, 즉 폴리콤 억제 복합체 1(PRC1) 및 ESC-E(Z) 복합체(폴리콤 억제 복합체 2(PRC2)로도 알려짐)에서, 이 복합체들의 조성이 역학적일 수 있으나 작용한다는 증거를 제공하였다. 문헌[Otte et al. (2003) *Curr Opin Genet Dev* 13:448-54]. *드로소필라*(문헌[Czermin et al.(이하의 상기와 동일함)]; 문헌[Muller et al.(이하의 상기와 동일함)] 및 포유동물 세포(문헌[Cao et al.(이하의 상기와 동일함)]; 문헌[Kuzmichev et al.(이하의 상기와 동일함)])에서의 연구는 ESC-E(Z)/EED-EZH2(즉, PRC2) 복합체가 고유 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 갖는다는 것을 입증하였다. 상이한 기들에 의해 단리된 복합체의 조성이 약간 상이하나, 일반적으로 EED, EZH2, SUZ12, 및 RbAp48 또는 이의 *드로소필라* 동족체를 포함한다. 그러나, EED, EZH2, 및 SUZ12만을 포함하는 재구성된 복합체는 히스톤 H3의 리신 27에 대한 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 보유한다. 미국 특허 제7,563,589호(본원에 참조로 인용됨).
- [0011] PRC2 복합체를 구성하는 각종 단백질들 중, EZH2(Zeste 동족체 2의 인핸서)는 촉매 서브유닛이다. 이에 EZH2의 촉매작용 부위도 트리토락스 군 및 폴리콤 군 모두의 구성원을 포함하는 수개의 크로마틴 연관 단백질에서 발견되는 매우 보존된 서열 모티프인 SET 도메인(Zeste의 Su(var)3-9, 인핸서 및 트리토락스를 따라 명명됨) 내에 존재한다. SET 도메인은 H3-K79 메틸트랜스퍼라제 DOT1을 제외한 모든 알려진 히스톤 리신 메틸트랜스퍼라제의 특징이다.
- [0012] Hox 유전자 침묵에 부가하여, PRC2-매개 히스톤 H3-K27 메틸화는 X-불활성화에 관여하는 것으로 나타났다. 문헌[Plath et al. (2003) *Science* 300: 131-5]; 문헌[Silva et al. (2003) *Dev Cell* 4:481-95]. 히스톤 H3-K27에서의 PRC2 복합체의 Xi로의 보충 및 후속 트리메틸화의 도입은 X-불활성화의 초기 단계 동안에 일어나고, Xist RNA에 의존한다. 또한, EZH2 및 이의 연관 히스톤 H3-K27 메틸트랜스퍼라제 활성은 다능성 외배엽 세포 및 분화된 영양외배엽을 상이하게 표시하는 것으로 나타났다. 문헌[Erhardt et al. (2003) *Development* 130:4235-48)].
- [0013] 다능성 외배엽 세포의 후생적 변형 패턴을 유지함에 있어서의 EZH2의 역할과 연관되게, EZH2의 Cre-매개 결실은 세포 내 히스톤 H3-K27 메틸화의 상실을 초래한다. 문헌[Erhardt et al.(이하의 상기와 동일함)]. 또한, 전립선 및 유방 암 세포주 및 조직에 있어서의 연구는, EZH2 및 SUZ12의 수준과 이들 암의 침입성 간의 강한 상관성을 보여주었고(문헌[Bracken et al. (2003) *EMBO J* 22:5323-35]; 문헌[Kirmizis et al. (2003) *Mol Cancer Ther* 2:113-21]; 문헌[Kleer et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11606-11]; 문헌[Varambally et al. (2002) *Nature* 419:624-9]), 이는 PRC2 복합체의 이상기능이 암에 기여할 수 있음을 나타낸다.
- [0014] 최근, EZH2의 티로신 641(Y641F, Y641N, Y641S 및 Y641H)의 체세포 돌연변이가 여포성 림프종(FL) 및 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)의 배종심 B 세포-유사(GCB) 서브타입과 연관됨이 보고되었다. 문헌[Morin et al. (2010) *Nat Genet* 42:181-5]. 모든 경우들에서, 돌연변이체 EZH2 유전자의 발현은 이형성인 것으로 나타났고, 야생형 및 돌연변이체 대립유전자 모두의 발현은 전사체 시퀀싱에 의해 분석되는 돌연변이체 샘플에서 검출되었다. 또한, 모든 EZH2의 돌연변이형들은 다중-단백질 PRC2 복합체 내로 도입될 수 있으나, 생성되는 복합체는 펩티드성 기질의 H3-K27 상당 잔기의 메틸화를 촉진하는 능력이 결여되어 있음도 입증되었다. 따라서, EZH2의 Tyr641에서의 질환 연관 변화는 EZH2로 촉매된 H3-K27 메틸화에 대해 기능이 상실되도록 하였다는 결론이 내려졌다.

발명의 내용

- [0015] 본 발명의 한 측면은 히스톤 H3 상의 리신 27(H3-K27)의 모노메틸화 내지 트리메틸화를 촉진하는 PRC2 복합체의 촉매 서브유닛인 인간 히스톤 메틸트랜스퍼라제 EZH2의 야생형 및 특정 돌연변이형의 억제에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명은 EZH2의 특정 돌연변이형 활성의 억제에 관한 것이다. EZH2의 돌연변이형은 야생형 EZH2의 티로신 641(Y641, 또한 Tyr641)을 또 다른 아미노산 잔기로 치환하는 것을 포함한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 측면은 디메틸화된 H3-K27me2 수준에 따라, 또는 바람직하게는 디메틸화된 H3-K27me2 및 트리메틸화된 H3-K27me3의 수준에 따라, 환자의 EZH2 억제제에 대한 반응성을 판단하는 것에 관한 것이다. 예를 들어, 디메틸화된 H3-K27me2의 수준이 낮거나 검출불가능한 세포 또는 H3-K27me2/me3의 비가 낮은 세포는 H3-K27me2/me3 비가 보다 전형적으로 더 높은 세포보다 EZH2 억제제의 항증식성 효과에 대해 더욱 더 반응성이다.
- [0017] 본 발명의 한 측면은 대상에서의 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제하는 방법이다. 상기 방법은 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 대상에게 치료 유효량의 EZH2의 억제제를 투여하는 단계(여기서, 억제제는 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제함으로써, 대상에서의 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제함)를 포함한다.
- [0018] 본 발명의 상기 측면 및 기타 측면에서, 한 실시양태에서, 억제제는 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제한다.
- [0019] 본 발명의 상기 측면 및 기타 측면에서, 한 실시양태에서, 억제제는 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 선택적으로 억제한다.
- [0020] 본 발명의 상기 측면 및 기타 측면에서, 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체는 Y641F, Y641H, Y641N, 및 Y641S로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0021] 본 발명의 상기 측면 및 기타 측면에서, 한 실시양태에서, EZH2의 억제제는 S-아데노실-L-호모시스테인 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.
- [0022] 본 발명의 상기 측면 및 기타 측면에서, 한 실시양태에서, EZH2의 억제제는 화합물 75:



(75)

- [0023] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.
- [0024] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.
- [0025] 본 발명의 한 측면은 대상에서의 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제하는 방법이다. 상기 방법은 대상으로부터의 샘플 내의 EZH2의 Y641 돌연변이체를 검출하기 위한 검정을 수행하는 단계; 및 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 대상에게 치료 유효량의 EZH2의 억제제를 투여하는 단계(여기서 억제제는 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제함으로써, 대상 내 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제함)를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 상기 측면 및 기타 측면에서, 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체를 검출하기 위한 검정의 수행은 EZH2의 Y641 돌연변이체를 코딩하는 핵산을 검출하는 전체 게놈 리시퀀싱 또는 표적 영역 리시퀀싱을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 상기 측면 및 기타 측면에서, 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체를 검출하기 위한 검정의 수행은 샘플을 EZH2의 Y641 돌연변이체에 특징적인 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 상기 측면 및 기타 측면에서, 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체를 검출하기 위한 검정의 수행은 매우 엄격한 조건 하의 샘플을 EZH2의 Y641 돌연변이체에 특징적인 폴리펩티드 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산과 혼성화하는 핵산 프로브와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 한 측면은 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제하는 방법이다. 상기 방법은 EZH2의 Y641 돌연변이체를 H3-K27 및 유효량의 EZH2의 억제제(여기서 억제제는 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제

함으로써, H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제함)를 포함하는 히스톤 기질과 접촉시키는 단계를 포함한다.

- [0030] 본 발명의 한 측면은 대상을 EZH2의 억제제를 이용한 치료를 위한 후보로서 동정하는 방법이다. 상기 방법은 대상으로부터의 샘플 내의 EZH2의 Y641 돌연변이체를 검출하기 위한 검정을 수행하는 단계; 및 Y641 돌연변이체를 발현하는 대상을 EZH2의 억제제(여기서 억제제는 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제함)를 이용한 치료를 위한 후보로서 동정하는 단계를 포함한다.
- [0031] 본 발명의 한 측면은 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제를 동정하는 방법이다. 상기 방법은 EZH2의 단리된 Y641 돌연변이체를 히스톤 기질, 메틸기 도너, 및 시험 화합물과 배합하는 단계(여기서, 히스톤 기질은 비메틸화된 H3-K27, 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 H3-K27의 한 형태를 포함함); 및 히스톤 기질 내 H3-K27의 메틸화를 검출하기 위한 검정을 수행함으로써, 시험 화합물의 존재 하에서의 H3-K27의 메틸화가 시험 화합물의 부재 하에서의 H3-K27의 메틸화보다 적을 때, 시험 화합물을 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제로서 동정하는 단계를 포함한다.
- [0032] 한 실시양태에서, 히스톤 기질 내 H3-K27의 메틸화를 검출하기 위한 검정의 수행은 표지된 메틸기의 도입을 측정하는 것을 포함한다.
- [0033] 한 실시양태에서, 표지된 메틸기는 동위원소로 표지된 메틸기이다.
- [0034] 한 실시양태에서, 히스톤 기질 내 H3-K27의 메틸화를 검출하기 위한 검정의 수행은 히스톤 기질을 트리메틸화된 H3-K27에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 한 측면은 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제를 동정하는 방법이다. 상기 방법은 EZH2의 단리된 Y641 돌연변이체를 히스톤 기질, 메틸기 도너, 및 시험 화합물과 배합하는 단계(여기서, 히스톤 기질은 비메틸화된 H3-K27, 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27, 및 이의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 H3-K27의 한 형태를 포함함); 및 히스톤 기질 내의 트리메틸화된 H3-K27의 형성을 검출하기 위한 검정을 수행하여, 시험 화합물의 존재 하에서의 H3-K27의 트리메틸화가 시험 화합물의 부재 하에서의 H3-K27의 트리메틸화보다 적을 때, 시험 화합물을 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제로서 동정하는 단계를 포함한다.
- [0036] 한 실시양태에서, 히스톤 기질 내의 트리메틸화된 H3-K27의 형성을 검출하기 위한 검정의 수행은 표지된 메틸기의 도입을 측정하는 것을 포함한다.
- [0037] 한 실시양태에서, 표지된 메틸기는 동위원소로 표지된 메틸기이다.
- [0038] 한 실시양태에서, 히스톤 기질 내의 트리메틸화된 H3-K27의 형성을 검출하기 위한 검정의 수행은 히스톤 기질을 트리메틸화된 H3-K27에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0039] 본 발명의 한 측면은 EZH2의 Y641 돌연변이체의 선택적 억제제를 동정하는 방법이다. 상기 방법은 EZH2의 단리된 Y641 돌연변이체를 히스톤 기질, 메틸기 도너, 및 시험 화합물과 배합함으로써(여기서, 히스톤 기질은 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27, 및 모노메틸화된 H3-K27과 디메틸화된 H3-K27의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 H3-K27의 한 형태를 포함함), 시험 혼합물을 형성하는 단계; 단리된 야생형 EZH2를 히스톤 기질, 메틸기 도너, 및 시험 화합물과 배합함으로써(여기서, 히스톤 기질은 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27, 및 모노메틸화된 H3-K27과 디메틸화된 H3-K27의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 H3-K27의 한 형태를 포함함), 대조 혼합물을 형성하는 단계; 각각의 시험 혼합물 및 대조 혼합물에서 히스톤 기질의 트리메틸화를 검출하기 위한 검정을 수행하는 단계; (a) EZH2의 Y641 돌연변이체 및 시험 화합물을 이용한(M+) 트리메틸화 대 (b) 시험 화합물 없이 EZH2의 Y641 돌연변이체를 이용한(M-) 트리메틸화의 비를 계산하는 단계; (c) 야생형 EZH2 및 시험 화합물을 이용한(WT+) 트리메틸화 대 (d) 시험 화합물 없이 야생형 EZH2를 이용한(WT-) 트리메틸화의 비를 계산하는 단계; 비 (a)/(b)를 비 (c)/(d)와 비교하는 단계; 및 비 (a)/(b)가 비 (c)/(d)보다 작을 때, 시험 화합물을 EZH2의 Y641 돌연변이체의 선택적 억제제로서 동정하는 단계를 포함한다.
- [0040] 본 발명의 한 측면은 암을 치료하는 방법으로서, EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 암을 앓는 대상에게 치료 유효량의 EZH2의 억제제(여기서 억제제는 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제함)를 투여함으로써, 암을 치료하는 단계를 포함하는 방법이다.
- [0041] 본 발명의 상기 측면 및 기타 측면에서, 한 실시양태에서, 암은 여포성 림프종, 및 배아 중심 B 세포 유사(GCB) 서브타입의 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

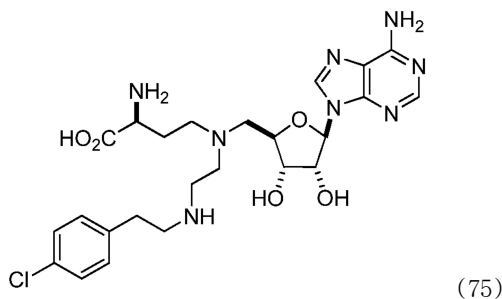
[0042] 본 발명의 한 측면은 암을 치료하는 방법으로서, EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 암을 앓는 대상에게 치료 유효량의 EZH2의 억제제를 투여하는 단계(여기서, 억제제는 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 선택적으로 억제함으로써, 암을 치료함)를 포함하는 방법이다.

[0043] 본 발명의 한 측면은 암을 치료하는 방법으로서, 암을 앓는 대상으로부터의 암 세포를 포함하는 샘플 내의 EZH2의 Y641 돌연변이체를 검출하기 위한 검정을 수행하는 단계; 및 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 대상에게 치료 유효량의 EZH2의 억제제를 투여함으로써(여기서 억제제는 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제함), 암을 치료하는 단계를 포함하는 방법이다.

[0044] 본 발명의 또 다른 측면은 대상 내 EZH2 억제제에 대한 반응성을 판단하는 방법이다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상으로부터 조직 샘플을 단리하는 단계; 조직 샘플 내의 H3-K27의 디메틸화(me2) 수준을 검출하는 단계; 디메틸화(me2) 수준을 대조 디메틸화(me2) 수준과 비교하는 단계; 및 디메틸화(me2) 수준이 부재하거나 대조 디메틸화(me2) 수준보다 낮을 때, 대상을 상기 EZH2 억제제에 대해 반응성인 것으로 동정하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 또한 조직 샘플 내의 H3-K27의 트리메틸화(me3) 수준을 검출하는 단계; 트리메틸화(me3) 수준을 대조 트리메틸화(me3) 수준과 비교하고 디메틸화(me2) 수준을 대조 디메틸화(me2) 수준과 비교하는 단계; 및 트리메틸화(me3) 수준이 대조 트리메틸화(me3) 수준과 동일하거나 그보다 더 높고 디메틸화(me2) 수준이 부재하거나 대조 디메틸화(me2) 수준보다 낮을 때, EZH2 억제제에 대해 반응성인 것으로 동정하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 또한 조직 샘플 내의 H3-K27의 디메틸화(me2) 수준 대 트리메틸화(me3) 수준의 비를 구하는 단계; 대조 디메틸화(me2) 수준 대 대조 트리메틸화(me3) 수준의 대조 비를 구하는 단계; 상기 비를 상기 대조 비와 비교하는 단계; 및 상기 비가 상기 대조 비보다 낮을 때, 대상이 상기 EZH2 억제제에 대해 반응성인 것으로 동정하는 단계를 포함한다. 한 바람직한 실시양태에서, 대상은 암을 앓는다. 한 실시양태에서, 암은 여포성 림프종이다. 대안적으로, 암은 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 대상은 Y641 돌연변이체 EZH2를 발현한다. 한 바람직한 실시양태에서, Y641 돌연변이체는 Y641F, Y641H, Y641N 또는 Y641S이다.

[0045] 본 발명의 한 측면은 암을 앓는 대상의 치료법을 선택하는 방법이다. 상기 방법은 디메틸화된 H3-K27 수준 또는 바람직하게는 디메틸화된 H3-K27 및 트리메틸화된 H3-K27의 수준에 의해 EZH2 억제제에 대한 대상의 반응성을 판단하는 단계; 및 대상이 EZH2 억제제에 대해 반응성일 때, 대상에게 EZH2 억제제를 제공하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 암은 여포성 림프종이다. 대안적으로, 암은 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 대상은 Y641 돌연변이체 EZH2를 발현한다. 한 바람직한 실시양태에서, Y641 돌연변이체는 Y641F, Y641H, Y641N 또는 Y641S이다.

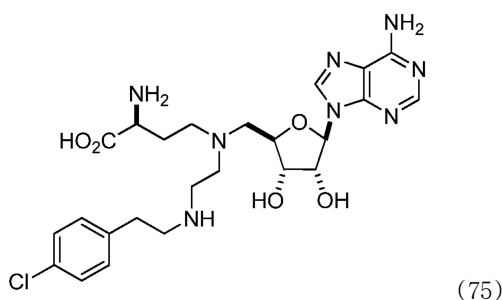
[0046] 본 발명의 한 측면은 화합물 75:



[0047] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0048]

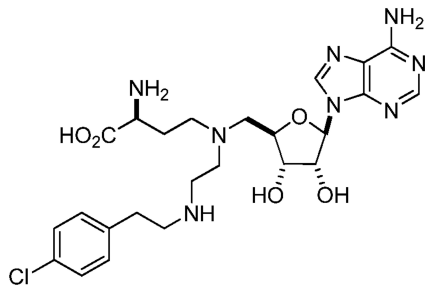
[0049] 본 발명의 한 측면은 화합물 75:



[0050]

[0051] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약학적 조성물이다.

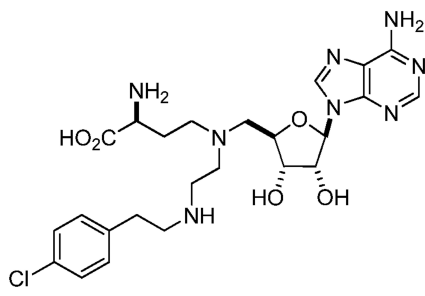
[0052] 본 발명의 한 측면은 여포성 림프종의 치료에서의 화합물 75:



[0053] (75)

[0054] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도이다.

[0055] 본 발명의 한 측면은 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)의 치료에 있어서의 화합물 75:



[0056] (75)

[0057] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도이다.

[0058] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 숙련가에 의해 통상 이해되어지는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서, 문맥상 명백히 달리 지시되지 않는 한, 단일 형태는 복수 형태도 또한 포함한다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 균등한 방법 및 물질이 본 발명의 수행 또는 시험에 사용될 수 있으나, 적당한 방법 및 물질이 이하에 기재되어 있다. 본원에 언급된 모든 공보, 특허출원 및 기타 참조문헌은 참조로 인용된다. 본원에 인용된 참조문헌은 청구 발명에 대한 선행 기술로 인정되는 것은 아니다. 상충하는 경우, 본 명세서가 우선한다. 또한, 상기 물질, 방법 및 예는 단지 예시적이며, 제한적이지 않은 것으로 한다.

[0059] 본 발명의 다른 특성 및 이점은 하기 상세한 설명 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 EZH2의 B-세포 림프종 연관 돌연변이체가 활성 히스톤 메틸트랜스퍼라제라는 것을 확립하는 2개의 그래프이다. EZH2의 야생형 및 각종 Y641 돌연변이체를 함유하는 PRC2 복합체의 시험관내 메틸트랜스퍼라제 활성을 (A) 펩티드(H3 21-44)를 기질로 이용하는 메틸 전달 반응, 및 (B) 조류 뉴클레오솜을 기질로 이용하는 메틸 전달 반응으로서 측정하였다. 기호: 야생형(●), Y641F(○), Y641H(□), Y641N(■), 및 Y641S(▲). CPM은 분당 계수이며, 이는 ³H 방사선의 결과로서의 섬멸 계수를 칭한다.

도 2는 돌연변이체 EZH2를 함유하는 PRC2 복합체가 히스톤 H3-K27의 디메틸화 및 트리메틸화를 우선적으로 촉매한다는 것을 확립하는 4개의 그래프이다. (A) 비메틸화된 펩티드(열린 형 막대), 모노메틸화된 펩티드(해시형 막대), 및 디메틸화된 펩티드(닫힌 형 막대)에 대한 돌연변이체 및 야생형(WT) 복합체의 메틸트랜스퍼라제 활성. (B) K_{1/2}에 의해 판단되는 펩티드 기질에 대한 친화성은 야생형(○), Y641F(●), Y641H(□), Y641N(■), 및 Y641S(▲) EZH2를 함유하는 PRC2 복합체에 대한 모든 펩티드 메틸화 상태 전반에 걸쳐 유사하다. 모든 기질 및 모든 효소 형태 전반에 걸친 K_{1/2} 값의 변동은 3.5배 미만이라는 것을 주목한다. 기질의 어떠한 특별한 메틸화 상태에 대해서도, K_{1/2} 값의 변동은 2배 미만이다. (C) 효소 반전 수(k_{cat})는 EZH2의 WT 및 Y641 돌연변이체에 대해 반대되는 방식으로 기질 메틸화 상태에 따라 변동한다. k_{cat}은 야생형(○)에 대한 K27 메틸화 상태의 증가에 따라 감소하나, EZH2의 Y641F(●), Y641H(□), Y641N(■), 및 Y641S(▲) 돌연변이체에 대해서는 증가한다.

(D) 촉매 효율($k_{cat}/K_{1/2}$)은 야생형(○)에 대한 K27 메틸화 상태의 증가에 따라 감소하나, EZH2의 Y641F(●), Y641H(□), Y641N(■), 및 Y641S(▲) 돌연변이체에 대해서는 증가한다. 패널 B-D에서, 데이터 점을 연결하여 그려진 선은 어떠한 수학적 관계를 의미하고자 함은 아니고; 오히려 단지 시각적 보조 수단으로 작용하고자 함이다.

도 3A는 상이한 EZH2 돌연변이체를 함유하는 세포에 대한 H3-K27me3(상단 패널), H3-K27me2(중간 패널), 및 H3-K27me1(하단 패널)의 예측된 상대 수준을 나타내는 3중 그래프이다. 표 1에 나타난 결합 효소 정지 상태 속도 방정식 및 정지 상태 동역학 매개변수를 이용하여 모의를 수행하였다. 모든 값들은 동종성 WT EZH2 함유 세포에 대해 상대적이며, 세포내 SAM의 농도가 Km에 대해 포화이고 세포내 뉴클레옴 농도가 Km과 유사한 것으로 가정한다.

도 3B는 WT EZH2에 대해 동종성이거나 표시된 EZH2 Y641 돌연변이에 대해 이중성인 림프종 세포주에 대한 H3-K27 메틸화 상태의 상대 패턴의 일련의 웨스턴 블롯 분석이다. 상단에서 하단까지의 패널은 하기에 대해 특이적인 항체로 프로빙한 것에 대한 결과를 나타낸다: 총 EZH2; H3-K27me3; H3-K27me2; H3-K27me1; 및 (하중 대조로서의) 총 히스톤 H3.

도 4는 암에 있어 이상적으로 높은 수준의 히스톤 H3-K27에 대한 트리메틸화를 초래하는 선택된 제안 기작을 나타낸다. 이에는, a) 비메틸화 내지 모노메틸화 및 디메틸화된 히스톤 H3-K27으로부터의 기질 선호도의 변화를 초래하는 EZH2에서의 Y641의 돌연변이; b) EZH2의 과발현; c) 효소 기능을 불활성시켜 deH3-K27의 메틸화 me3의 감소를 유발하는 UTX에서의 돌연변이; 및 d) 특정 유전자에 대한 PRC2 복합체의 보충 증가 및 히스톤 H3-K27 트리메틸화의 증가를 초래하는 PRC2 복합체 서브유닛 PHF19/PCL3의 과발현이 포함된다. 4가지 모든 모델들에서, 상기 변경은 암에 있어 핵심 유전자의 전사 억제를 초래하는 유전자의 근위 프로모터 영역에서의 이상 히스톤 H3-K27 트리메틸화를 초래한다.

도 5는 각각의 5-성분 PRC2 복합체의 발현 수준이 돌연변이체 및 야생형 EZH2와 유사함을 보여주는 SDS-PAGE 겔을 나타낸다.

도 6은 돌연변이체 및 야생형(WT) PRC2 복합체가 H3-K27 함유 펩티드에 대한 강한 기질 선호도를 나타냄을 도시하는 한 쌍의 표이다. 각 효소를 H3 및 H4 모두를 커버하는 중첩 15량체 펩티드의 패널에 대해 시험하였다. 활성을 속도(분당 CPM)로서 측정하였고, 보고된 값은 각 반응에 대한 2가지 독립적인 결정값의 평균을 나타낸다. 모든 복합체들에 대해, 가장 선호되는 펩티드는 H3: 16-30였다. WT 복합체는 돌연변이체 복합체 중 어떠한 것보다 상기 펩티드에 대해 6배 초과로 더 큰 활성을 가졌다.

도 7은 EZH2의 EZH2 WT 및 Y641 돌연변이체에 대한 S-아데노실-L-호모시스테인(SAH) 억제 효능을 나타내는 그래프이다. X 축은 SAH의 로그 농도를 나타내고; Y 축은 억제율 %을 나타낸다.

도 8은 EZH2의 EZH2 WT 및 Y641 돌연변이체에 대한 화합물 75의 억제 효능을 나타내는 그래프이다. X 축은 화합물 75의 로그 농도를 나타내고; Y 축은 억제율 %을 나타낸다.

도 9는 WT 또는 Y641 돌연변이체 EZH2를 발현하는 다중 DLBCL 세포주를 포함하는 세포주 패널에서의 H3-K27me1, me2 및 me3의 상대 수준의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. a) 히스톤을 도시된 세포주로부터 추출하여, 4 내지 20% 겔 상의 SDS-PAGE에 의해 분별하여, 니트로스 셀룰로스 막으로 전달하고, 히스톤 H3, H3-K27me1, me2, 또는 me3에 대한 항체로 프로빙하였다. 도시된 세포주로부터 전체 세포 용해물을 제조하고, 상기과 같이 처리하여, 항체를 이용하여 EZH2로 프로빙함으로써 EZH2 수준을 측정하였고; b) 히스톤을 나타낸 세포주로부터 추출하고, EZH2 수준을 측정하지 않은 것을 제외하고는 상기과 같이 처리하였다.

도 10은 WT 및 Y641 돌연변이체 림프종 세포주의 패널에서의 H3 및 H3-K27me3 수준의 면역세포화학 분석을 나타낸다. 나타낸 세포주로부터의 세포 펠렛을 고정하고, 파라핀 중에 포매하였다. 슬라이드를 제조하고, 히스톤 H3 또는 H3-K27me3에 대한 항체를 이용하여 면역세포화학에 의해 H3 및 H3-K27me3의 수준을 평가하였다.

도 11은 WT 및 Y641 돌연변이체 림프종 세포주의 패널에서의 H3 및 H3-K27me2 수준의 면역세포화학 분석을 나타낸다. 나타낸 세포주로부터의 세포 펠렛을 고정하고, 파라핀 중에 포매하였다. 슬라이드를 제조하고, 히스톤 H3, 또는 H3-K27me2에 대한 항체를 이용하여 면역세포화학에 의해 H3 및 H3-K27me2의 수준을 평가하였다.

도 12는 Y641 돌연변이체 WSU-DLCL2 세포에서의 EZH2 억제제 처리에 의한 전반적 H3-K27me3 수준의 억제를 나타내는 그래프이다. WSU-DLCL2 세포를 4일 동안 표시된 농도의 EZH2 억제제 A 또는 B로 처리하였다. 화합물 처리 후, 히스톤을 추출하고, 4 내지 20% 겔 상의 SDS-PAGE에 의해 분별하여, 니트로스 셀룰로스 막으로 전달하고,

히스톤 H3 또는 H3-K27me3에 대한 항체로 프로빙하였다.

도 13은 EZH2 억제제가 Y641 돌연변이체 WSU-DLCL2 세포의 증식을 차단할 수 있으나, 비-Y641 돌연변이체 OCI-LY19 세포에 대해서는 효과가 극미하였음을 보여주는 그래프이다. 세포를 7일 동안 농도를 점차 증가시킨 EZH2 억제제 A 또는 B의 존재 하에 인큐베이션하였다. 비히클 처리(DMSO) 세포를 대조로서 포함시켰다. 구아바 이지 사이트 플러스(Guava EasyCyte Plus) 기기에서 구아바 바이아카운트(Guava Viacount) 검정을 이용하여 세포수 및 생존율을 측정하였다. 세포를 분할하고, 배지 및 화합물을 3 내지 4일마다 재충원하였다.

도 14는 EZH2(Y641) 돌연변이 및/또는 높은 H3-K27me3 및 낮은 H3-K27me2 수준의 존재가 EZH2 억제제에 대한 감도를 예측함을 보여주는 그래프이다. 세포주를 25 μ M까지 점차 증가하는 농도의 한 EZH2 억제제의 존재 하에 유지시켰다. 생존 세포 계수(counts)를 사용하여, 11일간의 처리 후의 IC₉₀ 값을 유도하였다. 결과를 EZH2 돌연변이 상태에 따라 격리된 세포주(A), 또는 H3-K27me2 및 H3-K27me3 수준에 따라 격리된 세포주(B)에 대비하여 플로팅하였다. 양 플롯 모두에서, 선은 표시된 세포주 군으로부터의 평균 IC₉₀ 값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0061] 크로마틴 구조는 유전자 제어 및 후생적 유전(inheritance)에서 중요하다. 히스톤의 전사후 변형은 차원이 더 높은 크로마틴 구조의 확립 및 유지에 관여하며; 예를 들어, 특정 코어 히스톤의 상서는 아세틸화, 메틸화, 인산화, 리보실화 및/또는 유비퀴틴화에 의해 변형된다.
- [0062] EZH2는 히스톤 H3 상의 리신 27(H3-K27)의 모노메틸화 내지 트리메틸화를 촉진하는 PRC2 복합체의 촉매 서브유닛인 인간 히스톤 메틸트랜스퍼라제이다. 히스톤 H3-K27 트리메틸화는 히스톤 변형 부위에 인접한 특정 유전자의 전사를 억제하는 기작이다. 이 트리메틸화는 암, 예컨대 전립선 암에서의 변경된 발현이 있는 암 마커인 것으로 알려져 있다(예를 들면, 미국 특허출원 공개 제2003/0175736호 참조; 전문이 본원에 참조로 인용됨). EZH2는 폴리콤 군 단백질 계열(PcG)에 속한다. 폴리콤 군 단백질은 표적 유전자의 전사 억제에 의한 세포내 실체를 유지하는 것을 돕는다. 문헌[Jacobs et al. (1999) *Semin Cell Dev Biol* 10(2):227-35]; 문헌[Jacobs et al.(2002) *Biochim Biophys Acta* 1602(2): 151-61]. DNA 마이크로어레이는 EZH2를 호르몬 회절 전이 체장암에서 상향 조절되는 것으로 규명하였다. 문헌[Dhanasekaran et al. (2001) *Nature* 412(6849):822-6]; 문헌[Varambally et al. (2002) *Nature* 419(6907):624-9]. EZH2는 공격형 유방암에서 상향 조절되고, 침습 지향 표현형의 매개자이다. 문헌[Kleer et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100(20): 11606-11]. 불멸화 인간 유선 상피 세포주 내 EZH2의 과발현은 부착 비의존성 성장 및 세포 침입을 촉진한다. 문헌[Kleer et al.(이하의 상기와 동일함)]. EZH2-매개 세포 침입은 비변형 SET 도메인 및 히스톤 데아세틸라제 활성을 필요로 하였다. 이전 연구들은 결핍 제한 EZH2 발현, 전사 억제, 및 신생물형성 변환 간의 기능적 연결에 대한 증거를 제공하였다. 문헌[Varambally et al.(이하의 상기와 동일함)]; 문헌[Kleer et al(이하의 상기와 동일함)].
- [0063] 본 발명의 한 측면은 EZH2의 특정 돌연변이형을 포함한 EZH2의 활성의 억제에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 EZH2의 특정 돌연변이형의 활성의 선택적 억제에 관한 것이다.
- [0064] EZH2의 단일 아미노산 잔기(Tyr641, 본원에서 Y641로 칭해짐)에 있는 EZH2 유전자의 점 돌연변이는 인간 B-세포 림프종의 서브세트에 연결되는 것으로 보고되었다. 문헌[Morin et al. (2010) *Nat Genet* 42(2): 181-5]. 특히, Morin 등은 EZH2의 티로신 641(Y641F, Y641H, Y641N, 및 Y641S)의 체세포 돌연변이는 여포성 림프종(FL), 및 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)의 배아 중심 B 세포 유사(GCB) 서브타입과 연관됨을 보고하였다. 돌연변이체 대립유전자는 항상 질환 세포에서의 야생형 대립유전자와 연관된 것으로 밝혀졌고(이형성), 돌연변이는 비변형 펩티드 기질을 메틸화하기 위한 PRC2 복합체의 효소 활성을 제거하는 것으로 보고되었다.
- [0065] 야생형(WT) EZH2 효소는 H3-K27의 제로메틸화 내지 모노메틸화 반응에 대한 가장 큰 촉매 효능(kcat/K)과 후속(모노메틸화 내지 디메틸화 및 디메틸화 내지 트리메틸화) 반응에 대한 보다 낮은 효능을 나타내고; 반면 극명히 대조적으로, 질환 연관 Y641 돌연변이는 첫 번째 메틸화 반응을 수행하는 매우 제한된 능력을 나타내나, 야생형 효소에 대한 후속 반응에 대해서는 증진된 촉매 효능을 가짐이 이제 놀랍게도 밝혀졌다. 이 결과는 악성 표현형의 질환은 H3-K27의 트리메틸화된 형태(H3-K27me3)로의 증강된 전환을 위한 돌연변이체 EZH2 함유의 PRC2와 함께 H3-K27 모노메틸화 효소(WT EZH2 또는 EZH1 함유의 PRC2)가 조합된 활성을 이용함을 의미한다.
- [0066] 어떠한 이론에도 국한시키고자 함은 아니나, EZH2에서의 Y641의 페닐알라닌(F), 히스티딘(H), 아스파라긴(N), 또는 세린(S)으로의 돌연변이는 효소-2기질의 삼원 중합체의 활성 부위에서의 H-결합 패턴 및/또는 입체 과밀에 영향을 미침으로써 다중 회수의 H3-K27 메틸화를 도모할 수 있고, 이는 반응하는 리신의 탈양자화를 위한 적절

한 수로의 형성에 영향을 미치는 것이라는 가설이 설립된다. 문헌[Zhang et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5728-32]. 이 추론은 관련 단백질 리신 메틸트랜스퍼라제 LSMT, Dim-5 및 SET7/9에서의 티로신 돌연변이에 대해 나타난 결정학적 및 분자 동역학적 모의에 대한 유추에 의해 유도된다.

[0067]

예를 들어, 재조합 SET7/9의 티로신 245가 알라닌으로 돌연변이화될 때, 기질 특이성의 변화가 관찰되었다. 문헌[Dillon et al. (2005) *Genome Biol* 6:227]. H3-K4를 둘러싸는 서열을 나타내는, 비변형 20-잔기 펩티드를 메틸화하는 Y245A 돌연변이체 SET7/9의 능력은 WT 효소의 약 20%로 감소되었다. 문헌[Xiao et al. (2003) *Nature* 421:652-6]. 이와 동시에, H3-K4me1 및 H3-K4me2 펩티드도 추가로 메틸화하는 Y245A 돌연변이체의 능력이 WT 효소에 비해 매우 증강되었다(각기 약 7배 및 5배). 그러나, EZH2의 Y641의 돌연변이에 관한 본 개시내용과 대조적으로, SET7/9 Y245의 페닐알라닌으로의 돌연변이는 펩티드의 모노메틸화 내지 디메틸화 및 디메틸화 내지 트리메틸화를 증진시키지 않았고; 오히려 SET7/9의 Y245F 돌연변이체는 모든 펩티드성 기질에 대해 최소의 촉매 활성을 나타냈다. 이와 마찬가지로, 야생형 효소 G9a는 H3-K9를 디메틸화할 수 있으나, 디메틸화 내지 트리메틸화 반응을 수행할 수 없다. 그러나, G9a의 티로신 1067(EZH2의 Y641와 유사함)이 페닐알라닌으로 돌연변이화될 때, 효소는 비로소 H3-K9를 트리메틸화하는 능력을 얻게 된다. 문헌[Wu, H. et al. (2010) *PLoS One* 5, e8570, doi: 10.1371/journal.pone.0008570)].

[0068]

인간 EZH2 핵산 및 폴리펩티드가 과거 기재되었다. 예를 들어, 각기 전문이 본원에 참조로 인용되는, 문헌[Chen et al. (1996) *Genomics* 38:30-7 [746개 아미노산]]; 문헌[스위스-Prot 등록 번호 제Q15910호[746개 아미노산]]; 유전자은행 등록 번호 제NM_004456호 및 제NP_004447호(아형 a[751개 아미노산]); 및 유전자은행 등록 번호 제NM_152998호 및 제NP_694543호(아형 b [707개 아미노산])를 참조한다.

인간 EZH2의 아미노산 서열(스위스-Prot 등록 번호 제Q15910호)(서열 번호 1)
MGQTGKKSEKGPVCRKRKVKSEYMRLRLQLKRRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW KQRIQIPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF MVEDETVLHNIPLYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLDEHRDDKESRPPKPFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKASVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHFPFH ATPNTYKRNKTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRLPLN NSRPSTPTINVLKSDTDSREAGTETGGENNDEKEEEKKDETSSSEANSRCQTPIMK KPNIEPPENVEWSGAESMFRVLIGTYDNCFAIARLIGTKRCRQVVEFRVKESSIIAPA PAEDVDTPPRKKRKRHLWAAHCRKIQLKKDSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVIAQ NFCEKFCQCSSECCNRFPGCRCKAQCNKQPCPYLAVRECDPDLCTCGAADHWDKSNVS CKNCISIQGSKKHLPLPSDVAGWGIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDK YMCSEFLNLDNFVVDATRGKNGKIRFANHSVNPNCYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

인간 EZH2의 mRNA 서열, 전사 변이체 1(유전자은행 등록 번호 제NM_004456호)(서열 번호 2)
ggcgcgcttgattgggctggggggccaaataaaagcgatggcgattgggctgccgcgt ttggcgctcggtccggtcggtccgacaccggtgggactcagaaggcagtgagccccg gcggcgcgcgcgcgcgcgcgcgggggcgacgcgcgggaacaacgcgagtcggcgcgcg acgaagaataatcatggccagactgggaagaatctgagaaggaccagtttggcg gaagcgtgtaaaatcagagtacatgcgactgagacagctcaagaggttcagacgagctga tgaagtaagagtagtatttagttccaatcgtcagaaattttggaaagacggaatctt aaaccaagaatggaacacggaagatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc attgcgcgggactagggagtggttcggtgaccagtgacttggtttccaacacagtcac ccattaaagactctgaatgcagttgcttcagtaaccataatgtattcttggtctccct acagcagaatttatggtggaagatgaaactgtttacataacattccttatatgggaga tgaagtttagatcagagtggtactttcattgaagaactaataaaaaattatgatgggaa agtacacgggagatagagaatgtgggtttataaatgatgaaattttggagtggtgaa tgcccttggtcaataatgatgatgacgatgatgatggagacgacacctgaagaaag agaagaaagcagaaagatctggaggatcaccgagatgataagaaagccgccacctcg gaaatttcctctgataaaaattttgaagccatttctcaatgtttccagataaaggcac agcagaagaactaaaggaaaaataaagaactcaccgaacagcagctcccaggcgact tcctcctgaatgtaccccaacatagatggacaaatgctaaatctgttcagagagagca aagcttacactcctttcatagcgttttctgtaggcgatgttttaaatgactgcttct acatcgtaagtgcgaattattcttttcatgcaacacccaacttataagcggaagaacac agaaacagctctagacaacaaccttgggaccacagtggtaccagcatttgaggaggagc aaaggagtttgcgtgctgtcaccgctgagcggataaagacccacacaaacgtccagg aggcgcgagaagaggacggcttcccaataacagtagcaggccagcaccgccaccattaa tgcgtggaatcaaaagatacagacagtgatagggaagcaggagactgaaacgggggaga gaacaatgataaagaagaagaagaagaagaatgaaacttcgagctcctctgaagcaaa ttctcggtgtcaaacaccaataaagatgaagccaaatattgaacctcctgagaatgtgga gtggagtggtgctgaagcctcaatgttttagagtctcattggcacttactatgacaattt ctgtgccattgtcaggttaattgggaccaaacaatgttagacaggtgtatgagtttagagt caaagaatctagcatcatagctccagctcccgctgaggatgtggatactcctccaaggaa aaagaagaggaaacaccgggtgtgggctgcacactgcagaaagatacagctgaaaaagga

[0069]

cggtcctcctaaccatgtttacaactatcaaccctgtgatccacggcagccttgta
cagttcgtgccttgtgtgtagcacaataatgttgtaaaagtgttgtaagtgttc
agagtgtcaaaacgcgtttccgggagtcgctgcaaacacagtgcaacacacagcgtg
ccgtgtcactcgtgctcgagagtgtagccctgacctctgtctacttgggagccgc
tgaccttgggacagtaaaatgtgctcgcgaagactgcagattcagcggggtccaa
aaagcatctattgtcggcaccatctgacgtggcaggctggggattttatcaaatcc
tgtgcagaaaaatgaattcatctcagaatactgtggagagattttctcaagtgaagc
tgacagaagagggaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaactgaacaa
tgattttgtgtggatgcaaccgcgaagggttaacaaaatctgtttgcaaatcattcggg
aaatccaaactgctatgcaaaagtgtatggttaacgggtgatcacaggataggatttt
tgccaagagagccatccagactggcgaagagctgtttttgattacagatacagccaggc
tgatgccctgaagtatgtcgccatcgaaagagaaatggaaatcccttgacatctgtacc
tctccccctcctctgaaacagctgccttagcttcaggaaacctcgagtactgtgggcaa
tttagaaaaagaacatgcagtttgaaattctgaatttgcaaaagtactgaagaataattt
atagtaagtgttttaaaatcaactttttattgcttctcaccagctgcaaaagtgtttg
taccagtgaatttttgcataatgcagtaggtacattttcaactttgaataaagaata
cttgaactgtccttgttgaatc

EZH2의 전장 아미노산, 아형 a(유전자은행 등록 번호 제NP_004447호) (서열 번호 3)

MGQTGKKSEKGFVCKWRKRVKSEYMLRQLKFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETIVLHNPYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDDGGDPEEREKQKDLDRDDKESRPPKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNKSVQREQSLHSFHTLFCRRCKFYDCFLHRKC
NYSFHATPNTYKRNKTETALDNKPCGPGQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRR
GRLPNNSRPSTPTINVLKSDTDSREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQ
TPIKMKPNIEPPENVEWSGAESMFRVLIGTYDNECAIARLIGTKTCRQVYEFVRKES
IIAPAPAEDVDTPPRKKRKHRLWAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRPDCDSSCP
CVIAQNFCEKFCQSSSECQNRFPGRCKAQCNKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWD
SKNVCKNCISIQGSKKHLALLAPSDVAGWGFIFKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRG
KYVDKYMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMVMNGDHRIGIFAKRA
IQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

인간 EZH2의 mRNA 서열, 전사 변이체 2(유전자은행 등록 번호 제NM_152998호) (서열 번호 4)

ggcggcgcttgattgggctgggggggccaataaaagcgatggcgattgggctgccgcgt
ttggcgctcggtcggtcggtccgacacccgggtgggactcagaaggcagtgagccccc
gcggcgccggcgccggcgcgccggggcgacgcgcgggaacaacgcgagtcggcgcgccggg
acgaagaataatcatggccagactgggaagaaatctgagaaggagaccagtttgggtggcg
gaagcgtgtataaatcagagtacatgcgactgagacagctcaagagggttcagacgagctga
tgaagttaaagagtattgttagttccaatcgtcagaaaaattttgaaagaacggaaatctt
aaaccaagaatggaaacagcgaaggatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc
attgcgcgggactaggagggtggaagatgaaactgtttacataacattccttatatggg
agatgaagtttttagatcaggatggtagtttcatgaagaactaataaaaaattatgatgg
gaaagtacacgggtagagaaatgtgggtttataaatgatgaaatttttgtggagtgtgt
gaatgcccttggtcaatataatgatgatgacgatgatgatggagacgatcctgaaga
aagagaagaaaagcagaaagatctggaggatcaccgagatgataaagaaagccgccacc
tcggaatattcctctgataaaattttgaaagccatttctcaatgtttccagataaggg
cacagcagaagaactaaaggaaaaataaaagaactcaccgaacagcagctccaggcgcc
acttctcctgaatgtacccccaacatagatggaccaaatgctaattctgttcagagaga
gcaaagcttacactcctttcatacgtttttctgtaggcgatgttttaaatatgactgctt
cctacatccttttcatgcaacacccaacacttataagcgggaagaacacagaaacagctct
agacaaacaaacttgggaccacagtggtaccagcatttgaggaggcgaaggagtttgc
tgctgctctcaccgctgagcggataaagaccccccacaaaacgtccaggaggccgcagaag
aggacggcttcccaataacagtagcaggccagcaccacccattaatgtgctggaatc
aaaggatacagacagtgatagggaagcaggactgaaacgggggagagaacaatgataa
agaagaagaagagaagaaagatgaaacttcgagctcctctgaagcaaatctcgggtgca
aacaccaataaagatgaagccaaatattgaacctcctgagaatgtggagtggagtgtgc

[0070]

```
tgaagcctcaatgttttagagtcctcattggcacttactatgacaatttctgtgccattgc
taggttaattgggacaaaacatgtagacaggtgtatgagtttagagtcagaagaatctag
catcatagctccagctcccgctgaggatgtggatactcctccaaggaaaaagaggaa
acaccggttgtggctgcacactgcagaaagatagctgaaaaaggacggctcctctaa
ccatgtttacaactatcaacctgtgatccacggcagccttgtgacagttcgtgccc
ttgtgtgatagcacaattttttgtgaaaagttttgtcaatgtagtccagagtgtcaaaa
ccgctttccggagtgccgctgcaaagcacagtgcacaccaagcagtgcccgctgctacct
ggctgtccgagagtgtagacctgacctctgtcttacttggagccgctgaccttggga
cagtaaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagatttcagcggggctccaaaaagcatctatt
gctggcaccatctgacgtggcaggtgtggggattttatcaaagatcctgtgcagaaaaa
tgaattcatctcagaataactgtggagagattatttctcaagatgaagctgacagaagg
gaaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaacttgaacaatgattttgtgt
ggatgcaacccgcgaagggttaacaaaattcgttttgcaaatcattcggtaaatccaaactg
ctatgcaaaagtattgatggttaacggtgatcacaggataggtatttttgccaagagagc
catccagactggcgaagagctgtttttgattacagatacagccaggtgtatgcccgtgaa
gtatgtcggcatcgaaagagaaatggaaatcccttgacatctgctacctcctccccctc
ctctgaaacagctgccttagcttcaggaaacctcgagtactgtgggcaatttagaaaaaga
acatgcagtttgaaattctgaatttgcaaagtactgtaagaataatttatagtaatgagt
ttaaaaaatcaactttttattgccttctcaccagctgcaaagtgtttgtaccagtgaatt
tttgcaataatgcagtatggtacatttttcaactttgaataaagaataacttgaactgtc
cttgttgaatc
```

EZH2의 전장 아미노산, 아형 b(유전자은행 등록 번호 제NP_694543호) (서열 번호 5)
MQQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMLRLQLKFRFRRADEVKSMFSSNRQKIL ERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTRVEDETVLHNIPYMGDEVL DQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDEDDDD GDDPEEREKQKDLDRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAE LKEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGNKSVQREQSLHSFHTLFCRRC FKYDCLFHPFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALT AERIKTPPKRPGRRRGRRLPNNSRSTPTINVLESKDTSDREAGTETG GENNDKEEEKKDETSSSEANSRCQTPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASM FRVLIGTYNDNFCIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPAPAEDVDTPP RKKRKHRLWAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVIA QNFCEKFCQCSSECONRFPGRCKAQCNTRKQPCYLAVERCEDPDLCLTCG AADHWDKSNVSKNCSIQRGSKHLLAPSDVAGWGFIFKDPVQKNEFIS EYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCSEFLNLNNDFFVDATRKGNKIRFANH SVNPNCYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELEFFDYRYSQADALKYVGI EREIMEIP

[0071]

[0072]

상기 언급된 바와 같이, EZH2의 촉매작용 부위는 SET 도메인으로 알려진 단백질의 보존된 도메인 내에 있는 것으로 판단된다. EZH2의 SET 도메인의 아미노산 서열은 스위스-Prot 등록 번호 제Q15910호(서열 번호 1)의 아미노산 잔기 613-726에 걸쳐 있는 하기 부분 서열에 의해 제공된다:

```
HLLAPSDVAGWGFIFKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCSEFLNLNNDFFV
VDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELEFFDY
(서열 번호 6)
```

[0073]

[0074]

서열 번호 6에 밑줄로 표시된 티로신(Y) 잔기는 스위스-Prot 등록 번호 제Q15910호(서열 번호 1)에서의 Tyr641(Y641)이다.

[0075]

유전자은행 등록 번호 제NP_004447호(서열 번호 3)의 SET 도메인은 아미노산 잔기 618-731에 걸쳐 있고, 서열 번호 6과 동일하다. 서열 번호 6에 밑줄로 표시된 스위스-Prot 등록 번호 제Q15910호에서의 Y641에 상응하는 티로신 잔기는 유전자은행 등록 번호 제NP_004447호(서열 번호 3)에서의 Tyr646(Y646)이다.

[0076]

유전자은행 등록 번호 제NP_694543호(서열 번호 5)의 SET 도메인은 아미노산 잔기 574-687에 걸쳐 있고, 서열 번호 6과 동일하다. 서열 번호 6에 밑줄로 표시된 스위스-Prot 등록 번호 제Q15910호에서 Y641에 상응하는 티로신 잔기는 유전자은행 등록 번호 제NP_694543호(서열 번호 5)에서의 Tyr602(Y602)이다.

[0077]

유전자은행 등록 번호 제NP_004447호의 SET 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은

```
catctattgtctggcaccatctgacgtggcaggtgtggggatttttatcaaagatcctgtgca
gaaaaatgaattcatctcagaaatctgtggagagattatttctcaagatgaagctgacagaa
gagggaaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaacttgaacaatgattttgtg
gtggatgcaacccgcgaagggttaacaaaattcgttttgcaaatcattcggtaaatccaaactg
ctatgcaaaagtattgatggttaacggtgatcacaggataggtatttttgccaagagagcca
tccagactggcgaagagctgttttttgattac
```

(서열 번호 7),

[0078]

[0079] (여기서, Y641을 코딩하는 코돈은 밑줄로 표시됨)이다.

[0080] 본원의 목적을 위해, 인간 EZH2의 아미노산 잔기 Y641은 스위스-Prot 등록 번호 제Q15910호에서의 Y641이거나 이에 상응하는 티로신 잔기를 지칭하는 것으로 이해된다.

Y641 돌연변이체 EZH2의 전장 아미노산 서열 (서열 번호 8)
MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF MVEDETVLHNIPIYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLDRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPH ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM KPNIEPPENVWESGAEASMFVRLIGTYYNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA PAEDVDTPPRKKKRKRLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPCVIAQ NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEXCGEIIISQDEADRRGKVYDK YMCSEFLNLDNFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP (여기서, x는 티로신(Y) 외의 임의의 아미노산 잔기일 수 있음).

[0081]

[0082] 역시 본원의 목적을 위해, 인간 EZH2의 Y641 돌연변이체 및 이와 균등하게 EZH2의 Y641 돌연변이체는 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 아미노산 잔기가 티로신 외의 아미노산 잔기로 치환된 인간 EZH2를 지칭하는 것으로 이해된다.

[0083] 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체의 아미노산 서열은 단지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기가 티로신 외의 아미노산 잔기로 치환된 것이 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다.

[0084] 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체의 아미노산 서열은 단지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기가 페닐알라닌(F)으로 치환된 것이 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 실시양태에 따른 EZH2의 Y641 돌연변이체는 본원에서 Y641F 돌연변이체 또는 이와 균등하게는 Y641F로 칭해진다.

Y641F (서열 번호 9)
MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF MVEDETVLHNIPIYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLDRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPH ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM KPNIEPPENVWESGAEASMFVRLIGTYYNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA PAEDVDTPPRKKKRKRLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPCVIAQ NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEFCGEIIISQDEADRRGKVYDK YMCSEFLNLDNFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0085]

[0086] 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체의 아미노산 서열은 단지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기가 히스티딘(H)으로 치환된 것이 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 실시양태에 따른 EZH2의 Y641 돌연변이체는 본원에서 Y641H 돌연변이체 또는 이와 균등하게는 Y641H로 칭해진다.

Y641H (서열 번호 10)
MGQTGKKSEKGPVCWRKRVKSEYMRLRQLKRFRRADDEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF MVEDETVLHNIPIYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLDRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNNAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPH ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM KPNIEPPENVWESGAEASMFVRLIGTYYNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA PAEDVDTPPRKKKRKRLWAAHCRKIQLKKDGSSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPCVIAQ NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEHCGEIIISQDEADRRGKVYDK YMCSEFLNLDNFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0087]

[0088] 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체의 아미노산 서열은 단지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기가 아스파라긴(N)으로 치환된 것이 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 실시양태에 따른 EZH2의 Y641 돌연변이체는 본원에서 Y641N 돌연변이체 또는 이와 균등하게는 Y641N으로 칭해진다.

Y641N (서열 번호 11)
MGQTGKKSEKGPVCKRVRKSEYMRLRLQLKRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW KQRRIQPVHILTSVSSSLRGTRCSTVSDLDFTQVPLKTLNVAASVPIMYSWSPLOQNF MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLDRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQLSHSFHTLFCRRCKFYDCFLHPPH ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRRLPN NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM KPNIEPPENVEWGAESMFRVLIGTYYNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESIIAPA PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPCVIAQ NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCAQCNTKQPCYLAVERCDPDLCLTCGAADHWDKSNVS CKNCSTQKSGKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISENCGEIISQDEADRRGKVYDK YMCSTFLNLDNFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0089]

[0090]

한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체의 아미노산 서열은 단지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기가 세린(S)으로 치환된 것이 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 실시양태에 따른 EZH2의 Y641 돌연변이체는 본원에서 Y641S 돌연변이체 또는 이와 균등하게는 Y641S로 칭해진다.

Y641S (서열 번호 12)
MGQTGKKSEKGPVCKRVRKSEYMRLRLQLKRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW KQRRIQPVHILTSVSSSLRGTRCSTVSDLDFTQVPLKTLNVAASVPIMYSWSPLOQNF MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLDRDDKESRPPRKFPSPDKIFEAISSMFPDKGTAEEL KEKYKELTEQQLPGALPPECTPNIDGPNAKSVQREQLSHSFHTLFCRRCKFYDCFLHPPH ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRRLPN NSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETSSSSEANSRCQTPIKM KPNIEPPENVEWGAESMFRVLIGTYYNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESIIAPA PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPQPCDSSCPCVIAQ NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCAQCNTKQPCYLAVERCDPDLCLTCGAADHWDKSNVS CKNCSTQKSGKKHLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISENCGEIISQDEADRRGKVYDK YMCSTFLNLDNFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

[0091]

[0092]

EZH2에서의 다중 Y641 돌연변이에 대한 내인성은, 입체 과밀의 해체가 디메틸화 내지 트리메틸화 반응을 위한 기질로서 보다 큰 디메틸 리신을 적절히 할당하는데 더 용이하도록 할 수 있음을 제시한다. 단백질 메틸트랜스퍼라제 SET7/9 및 G9a의 결정학 분석은, 활성 부위 티로신 잔기의 측쇄 하이드록실이 메틸-수용 리신의 아민과 직접적으로 또는 개입 물 분자를 통해 간접적으로 H-결합 상호작용에 관여함을 나타낸다. Y641 돌연변이체의 보다 큰 활성 부위가 디메틸화 내지 트리메틸화에 좋으나, 티로신 하이드록실 수소 결합 수용체의 상실은 리신 아민으로의 초기 메틸 전달을 위한 활성 부위의 바람직하지 못한 배향을 초래할 수 있다.

[0093]

인간 질환에 대한 본 결과의 의미는 표 1(이하 참조)에 요약된 데이터에 의해 명백해진다. EZH2에 대해 이형성인 세포는 WT 효소에 의한 H3-K27me1의 효율적 형성, 또한 돌연변이체 효소 형태(들)에 의해 상기 전구(progenitor) 종의 H3-K27me2, 특히 H3-K27me3으로의 효율적인 후속 전이에 의해, 악성 표현형을 표시할 것으로 예상된다.

[0094]

H3-K27me1 형성은 WT-EZH2 촉매작용에 단독으로 의존하지 않음이 보고되었다. EZH2 및 또 다른 PRC2 서브유닛인 EED의 녹아웃 연구는, H3-K27me1 형성이 촉매 서브유닛으로서 EZH2 또는 관련 단백질 EZH1을 함유하는 PRC2 복합체에 의해 촉매될 수 있음을 입증하였다. 문헌[Shen, X. et al. (2008) *Mol Cell* 32:491-502]. 따라서, 돌연변이체 EZH2 종과 WT-EZH2 또는 WT-EZH1 함유의 PRC2 복합체 간의 촉매 결합은 H3-K27me2/3 형성을 증강시키는 데 충분하고, 따라서 수반 악성 표현형을 생성하게 된다. 그러므로, 상기 데이터는 EZH2의 돌연변이형의 발현과 연관된 여포성 림프종(FL) 및 배아 중심 B 세포(GCB) 서브타입의 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)의 악성 표현형이 H3-K27의 트리메틸화된 형태의 형성에 대한 기능의 전반적 이득의 결과임을 제시한다. 이러한 데이터 해석은 또한 EZH2 또는 PRC2 연관 단백질(예를 들어, PHF19/PCL3)의 암 연관 과발현의 존재와 히스톤 H3-K27 디메틸라제 UTX에 대한 기능 상실 유전자형을 조화시키는 것을 돕는다. UTX 활성에 대한 상실은 EZH2의 기능에 대한 이득과 효소적으로 동등하고, 그 중 임의의 상황에서 암세포의 트리메틸화된 H3-K27의 보다 큰 정지 상태 수준을 초래한다(도 4).

[0095]

히스톤 H3-K27의 모노메틸화, 디메틸화 및 트리메틸화 상태는 전사 조절에 있어 상이한 기능과 연관된다. 히스톤 H3-K27 모노메틸화는 전사에 대해 취해진 유전자의 활성 전사와 연관된다. 문헌[Cui et al. (2009) *Cell Stem Cell* 4:80-93]; 문헌[Barski (2007) *Cell* 129:823-37]. 이와 대조적으로, 히스톤 H3-K27의 트리메틸화는 전사 억제 유전자 또는 히스톤 H3-K4 트리메틸화가 시스로 있을 때 전사에 대해 취해진 유전자와 연관된다. 문헌[Cui et al.(이하의 상기와 동일함)]; 문헌[Kirmizis et al. (2007) *Genes Dev* 18: 1592-1605]; 문헌

[Bernstein et al. (2006) *Cell* 125:315-26]. 이를 취합해 볼 때, EZH2의 Y641 돌연변이를 비롯한, 암에서 보고된 PRC2 복합체 활성의 변경이 암에서 히스톤 H3-K27의 트리메틸화된 상태의 증가를 초래하고, 이에 따라 전사 억제를 초래하는 것으로 예측된다.

[0096] 본 발명의 또 다른 발견은, Y641 돌연변이체 EZH2를 발현하는 세포가 일반적으로 WT EZH2를 발현하는 세포보다 소분자 EZH2 억제제에 대해 더욱 민감하다는 것이다. 구체적으로, Y641 돌연변이체 EZH2를 발현하는 세포는 EZH2 억제제의 처리 후에 성장, 분할 또는 증식의 감소를 나타내거나, 심지어 아포토시스 또는 괴사를 겪는다. 이와 대조적으로, WT EZH2를 발현하는 세포는 EZH2 억제제의 항증식성 효과에 대해 반응성이지 않다(도 13 및 14). 본 발명의 또 다른 놀라운 발견은, WT EZH2를 발현하는 세포가 Y641 EZH2를 발현하는 세포로서 히스톤 H3-K27의 유사한 메틸화 상태를 나타낼 수 있다는 것과, 이 메틸화 상태가 또한 EZH2 돌연변이 상태와 무관하게 EZH2 억제제에 대한 감도와 상관될 수 있다는 것이다. 일반적으로, 전반적 H3-K27me3 수준은 WT EZH2를 발현하는 세포주에서보다 Y641 돌연변이체를 함유하는 세포주에서 유사하거나 더 높거나; H3-K27me2의 수준은 다른 야생형 세포주에서보다 EZH2 Y641 돌연변이체 세포주 및 특정 야생형 세포주, 예컨대 파이프(Pfeiffer) 세포주에서 더 낮다(도 9, 10 및 11). 따라서, Y641 돌연변이체 세포주 및 파이프 세포주에서의 H3-K27me2/me3 신호의 비는 다른 WT 세포주에서 관찰되는 것보다 훨씬 더 낮다. 본 데이터는 또한 전형적 WT EZH2 발현 세포주 대비, 낮은 H3-K27me2 신호 및 유사하거나 더 높은 H3-K27me3 신호를 가지는 세포주가 소분자 EZH2 억제제에 대해 더 민감하다는 것을 입증한다. 구체적으로, 낮은 H3-K27me2신호 및 정상적이거나 높은 H3K27me3 신호를 가지는 세포는 EZH2 억제제를 이용한 처리 후에 분할을 정지하거나 심지어 사멸한다(도 9, 10, 11, 13, 및 14). 이와 대조적으로, H3-K27me2/me3 신호의 비가 더 높은 세포는 EZH2 억제제의 항증식성 효과에 반응성이지 않다(도 9, 10, 11, 13 및 14). 본 발명은 웨스턴 블롯, MS 또는 IHC와 같은 기법의 사용을 통한, 환자 종양에서의 EZH2 Y641 돌연변이의 동정 및/또는 대조 대비, H3-K27me2의 낮은 수준 및 H3-K27me3의 정상적이거나 높은 수준의 검출은, EZH2 억제제 처리에 반응할 환자를 동정하는 데 사용될 수 있는 과거 알려지지 않고 예상되지 않은 결과를 제공한다.

[0097] EZH2 및 기타 단백질 메틸트랜스퍼라제는 약물 발견을 위한 유익한 표적인 것으로 제시되었다. 문헌[Copeland et al. (2009) *Nat Rev Drug Discov* 8:724-32]; 문헌[Copeland et al. (2010) *Curr Opin Chem Biol* 14(4):505-10]; 문헌[Pollock et al. (2010) *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 6(1):71-9]. 본 데이터는 또한 FL 및 GCB 림프종에 대해 특이적인 약물의 개발을 위한 실험적 방법을 제시한다. WT 및 질환 연관 돌연변이체 간의 기질 인식의 차이가 전이 상태 상호작용으로부터 비롯될 경우, WT 효소의 전이 상태보다는 돌연변이체 EZH2의 전이 상태를 선택적으로 모방하는 소분자 억제제가 돌연변이 포함 세포에서의 H3-K27 메틸화를 차단하는 데 효과적인 것으로 입증될 것이다. 표적 매개 독성이 WT 효소만을 포함하는 임의의 세포에 대해 최소가 되므로, 상기 유형의 억제제는 대형 치료 색인을 표시하는 것으로 기대될 것이다. 전이 상태 모방은 많은 질환 영역들에서 약물 설계를 위한 효과적인 방법임이 입증되었다. 예를 들어, 문헌[Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. 2nd ed, (Wiley, 2000)]를 참조한다.

[0098] 본 결과는 여포성 림프종 및 미만성 거대 B-세포 림프종에서의 병인에 대한 EZH2의 특정 돌연변이형과 H3-K27 모노메틸화를 수행하는 효소들 간의 효소 결합에 대한, 과거 인식되지 못한 놀라운 의존성을 나타낸다. 어떠한 이론에도 국한시키고자 함은 아니나, 데이터는 정상(WT) 및 질환 연관 돌연변이체(Y641) 효소 간의 촉매 활성의 상기와 같은 결합에 의존하는 인간 질환의 첫 번째 예를 구성하는 것으로 판단된다.

[0099] 본 발명의 한 측면은 대상에서의 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제하는 방법이다. 상기 억제는 비메틸화된 H3-K27의 모노메틸화된 H3-K27로의 전환, 모노메틸화된 H3-K27의 디메틸화된 H3-K27로의 전환, 디메틸화된 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환, 또는 이의 임의의 조합, 예를 들어 모노메틸화된 H3-K27의 디메틸화된 H3-K27로의 전환 및 디메틸화된 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 수반할 수 있다. 본원에 사용되는 비메틸화된 H3-K27이란, 리신 27의 아미노기에 공유결합된 메틸기가 없는 히스톤 H3을 지칭한다. 본원에 사용되는 모노메틸화된 H3-K27이란, 리신 27의 아미노기에 공유결합된 단일 메틸기가 있는 히스톤 H3을 지칭한다. 모노메틸화된 H3-K27란 또한 본원에서 H3-K27me1로도 지칭된다. 본원에 사용되는 디메틸화된 H3-K27란 리신 27의 아미노기에 공유결합된 2개의 메틸기가 있는 히스톤 H3을 지칭한다. 디메틸화된 H3-K27은 또한 본원에서 H3-K27me2로도 지칭된다. 본원에 사용되는 트리메틸화된 H3-K27란, 리신 27의 아미노기에 공유결합된 3개의 메틸기가 있는 히스톤 H3을 지칭한다. 트리메틸화된 H3-K27은 또한 본원에서 H3-K27me3으로도 지칭된다.

[0100] 히스톤 H3은 서열이 알려진 136개 아미노산 길이의 단백질이다. 예를 들어, 내용이 본원에 참조로 인용되는 유전자은행 등록 번호 제CAB02546호를 참조한다. 본원에 또한 개시되어진 바와 같이, 전장 히스톤 H3에 부가하여,

전장 히스톤 H3의 K27에 상응하는 리신 잔기를 포함하는 히스톤 H3의 펩티드 단편은 H3-K27m1의 H3-K27m2로의 전환 및 H3-K27m2의 H3-K27m3로의 전환을 평가하기 위해 EZH2(및 마찬가지로 EZH2의 돌연변이형)용 기질로서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 그러한 펩티드 단편은 히스톤 H3의 아미노산 잔기 21-44에 상응한다. 그러한 펩티드 단편은 하기 아미노산 서열을 갖는다:

[0101] LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP(서열 번호 13).

[0102] 본 방법은 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 대상에게 치료 유효량의 EZH2의 억제제를 투여하는 단계(여기서 억제제는 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제함으로써, 대상 내 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제함)를 수반한다. 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 대상은 검출가능량의 Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드를 가지는 대상을 지칭한다. 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 대상은 Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드를 코딩하는, 검출가능량의 핵산을 가지는 대상을 지칭한다.

[0103] Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드는 임의의 적당한 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드는 Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드, 또는 Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드에 특징적인 펩티드 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 검출될 수 있다. Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드에 특징적인 펩티드 단편은 예를 들어 Y641이 티로신 외의 아미노산 잔기로 치환된 것을 제외하고는 서열 번호 6에 제공된 바와 같은 SET 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드에 특징적인 펩티드 단편은 예를 들어 Y641이 티로신 외의 아미노산 잔기로 치환된 것을 제외하고는 서열 번호 6에 제공된 바와 같은 SET 도메인의 10-113 아미노산 단편을 포함할 수 있고, 단 그 단편은 Y641에 상응하는 아미노산 잔기를 포함한다. 그러한 항체를 위한 에피토프는 야생형 EZH2의 Y641에 상응하는 아미노산 잔기를 포함하는 것으로 예상된다. 항체는, 그것이 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 이의 펩티드 단편에는 결합하나 상응하는 야생형 EZH2 폴리펩티드 또는 이의 펩티드 단편에는 결합하지 않을 경우, Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드에 특징적인 펩티드 단편에 특이적으로 결합하는 것으로 간주된다. 한 실시양태에서, 그러한 항체는, 그것이 상응하는 야생형 EZH2 폴리펩티드 또는 이의 펩티드 단편에 대해서보다 약 100배 이상 더 큰 친화도로 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 이의 펩티드 단편에 결합하는 경우, Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드에 특징적인 펩티드 단편에 특이적으로 결합하는 것으로 간주된다. 한 실시양태에서, 그러한 항체는, 그것이 상응하는 야생형 EZH2 폴리펩티드 또는 이의 펩티드 단편에 대해서보다 약 1000배 이상 더 큰 친화도로 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 이의 펩티드 단편에 결합하는 경우, Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드에 특징적인 펩티드 단편에 특이적으로 결합하는 것으로 간주된다. 항체는, 예를 들어 효소 결합 면역흡수 검정(ELISA) 또는 웨스턴 블롯 검정에 사용될 수 있다.

[0104] 한 실시양태에서, 항체는 모노클론 항체이다. 모노클론 항체는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256 (5517):495-7]을 참조한다.

[0105] 또 다른 예로서, Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드는 질량분석법(MS), 예를 들어 비행시간 결합 전기분무 이온화(ESI-TOF) 또는 비행시간 결합 기질 지원 탈착/이온화(MALDI-TOF)를 이용하여 검출될 수 있다. 그러한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 상기 분석은 관심 돌연변이, 예를 들어 야생형 EZH2 내의 Y641에 상응하는 아미노산에 걸친 서열을 포함하는 펩티드 12 내지 24개 아미노산 길이의 관심 돌연변이를 포함하는 하나 이상의 펩티드 단편을 동정하는 것을 수반할 것이다.

[0106] Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드에 특징적인 펩티드 단편을 포함하는 핵산은 임의의 적당한 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 당업계에 공지된 방법에 따라 적당히 선택된 출처의 DNA 및 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 이용하여 전체 게놈 리시퀀싱 또는 표적 영역 리시퀀싱(후자는 또한 표적 리시퀀싱으로도 알려짐)을 이용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Bentley (2006) *Curr Opin Genet Dev.* 16:545-52] 및 문헌[Li et al. (2009) *Genome Res* 19: 1124-32]를 참조한다. 상기 방법은 통상 또한 일반적으로 게놈 DNA 정제, 관심 영역을 증폭하기 위한 PCR 증폭, 사이클 시퀀싱, 시퀀싱 반응 클린업, 모세관 전기영동 및 데이터 분석의 단계를 수반한다. 관심 영역을 커버하기 위한 고품질의 PCR 프라이머는 컴퓨터 이용 프라이머 설계 도구를 이용하여 설계된다. 사이클 시퀀싱은 열 사이클러에서 연속 수행되는 불활성화, 어닐링 및 연장이 연장 산물의 선형 증폭을 초래하는 간단한 방법이다. 그 산물은 통상 G, A, T, 또는 C와 같은 말단 뉴클레오타이드 염기를 동정하는 형광 태그로 말단 지정된다. 모세관 전기영동 주입을 위해 경쟁할 수 있는 염 및 도입되지 않은 염료 터미네이터는 세정에 의해 제거된다. 모세관 전기영동 중에는, 사이클 시퀀싱 반응의 산물이 중합체로 충전된 모세관을 통해 이동한다. 음하전

DNA 단편은 양의 전극을 향해 모세관을 통과하여 이동할 때 크기에 의해 분리된다. 전기영동 후, 데이터 수집 소프트웨어는 원 데이터의 샘플 파일을 생성시킨다. 또한, 다운스트림 소프트웨어 애플리케이션을 이용하여, 추가 데이터 분석을 수행하여, 수집된 컬러 데이터 화상을 상응하는 뉴클레오티드 염기로 전환한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 상기 방법은 마이크로어레이 기재의 표적 영역 게놈 DNA 캡처 및/또는 시퀀싱의 사용을 포함할 수 있다. 적절한 PCR 프라이머를 선택하여 리시퀀싱을 수행하기 위한 키트, 시약 및 방법은, 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 아질런트(Agilent) 및 님블젠(NimbleGen)(로체 다이아그노스틱 게엠베하(Roche Diagnostics GmbH))으로부터 시중 입수가 가능하다. 이들과 같은 방법을 사용하여, *JAK2* 및 골수증식성 백혈병 유전자(*MPL*) 돌연변이를 검출하고 진성적혈구증가증, 본태성 혈소판 증가증, 및 특발성 골수 섬유증을 진단하였다. 본 발명에서의 용도를 위해, 예를 들어 서열 번호 7(상기)의 적어도 한 관련 부분을 증폭시키기 위해 PCR 프라이머를 선택할 수 있다.

[0107] 대안적으로 또는 부가적으로, Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 당업계에 공지된 방법에 따라 서던 블롯을 이용하여 검출될 수 있다. 한 실시양태에서, Y641 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열은 매우 엄격한 조건 하에 수행되는 핵산 혼성화를 이용하여 검출된다. 핵산 프로브는, 그 서열이 야생형 EZH2의 Y641에 상응하는 돌연변이체 아미노산에 대한 코돈을 포함하는 표적 핵산 서열에 상보적이라도록 선택된다.

[0108] 서열 특이적 프로브는 매우 엄격한 조건 하에 시험할 샘플과 조합된다. 본원에 사용되는 "매우 엄격한 조건"이라는 용어는 당업계에 자명한 매개변수를 지칭한다. 핵산 혼성화 매개변수는 상기 방법들이 편집되어 있는 참조 문헌, 예를 들어 문헌[J. Sambrook, et al, eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989] 또는 문헌[F. M. Ausubel, et al, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York]에서 찾아볼 수 있다. 보다 구체적으로, 본원에 사용되는 매우 엄격한 조건이란 예를 들어 혼성화 완충액(3.5×SSC, 0.02% 피콜(Ficoll), 0.02% 폴리비닐 피롤리돈, 0.02% 우태 혈청 알부민(BSA), 2.5 mM NaH_2PO_4 (pH 7), 0.5% SDS, 2 mM EDTA) 중에서 65°C에서 혼성화하는 것을 지칭한다. SSC는 0.15 M 염화나트륨/0.015 M 시트르산나트륨(pH 7)이고; SDS는 황산도데실나트륨이며; EDTA는 에틸렌디아민테트라세트산이다. 혼성화 후, DNA가 전달되는 막은, 예를 들어 실온에서 2×SSC로 세정한 후, 실온 내지 68°C에서 0.1 내지 0.5×SSC/0.1×SDS로 세정된다.

[0109] 유사한 엄격도를 초래하는, 사용가능한 다른 조건, 시약 등이 있다. 그러한 조건은 당업자에게 자명할 것이며, 따라서 본원에 제시되지 않는다. 그러나, 특히 당업자라면 (예를 들어, 보다 덜 엄격한 조건을 이용함으로써) EZH2의 Y641 돌연변이체를 코딩하는 핵산을 포함하는, 본 발명의 EZH2 연관 핵산을 명료히 동정하도록 하는 방식으로 상기 조건을 조작할 수 있음이 이해될 것이다. 또한 당업자에게 상기 분자의 발현을 위한 세포 및 라이브리리를 스크리닝하는 방법으로서, 그 분자를 그 후 통상적 방식으로 단리한 후, 관련 핵산 분자를 단리하고 시퀀싱하는 방법이 자명할 것이다.

[0110] 대상에게 치료 유효량의 EZH2의 억제제를 투여한다. 본원에 사용되는 EZH2의 억제제란 일반적으로 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 효소 활성을 간섭할 수 있는 소분자, 즉 분자량이 약 1.5 킬로달톤(kDa) 미만인 분자를 지칭한다.

[0111] 한 실시양태에서, EZH2의 억제제는 야생형 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제한다. 한 실시양태에서, EZH2의 억제제는 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제한다. 한 실시양태에서, EZH2의 억제제는 야생형 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성 및 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제한다. 한 실시양태에서, EZH2의 억제제는 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 선택적으로 억제한다.

[0112] 본원에 개시된, 특정 EZH2의 Y641 돌연변이체는 비메틸화된 H3-K27의 H3-K27me1로의 전환을 위한 촉매로서는 비교적 좋지 않으나, H3-K27me2의 H3-K27me3으로의 전환을 위한 촉매로서는 놀랍게도 효과적이다. 이와 반대로, 야생형 EZH2는 비메틸화된 H3-K27의 H3-K27me1로의 전환을 위한 촉매로서는 비교적 효과적이거나, H3-K27me2의 H3-K27me3로의 전환을 위한 촉매로서는 놀랍게도 비효과적이다. 이는 H3-K27의 모노메틸화, 디메틸화 및 트리메틸화 상태가 전사 조절에 있어 다른 기능을 나타내기 때문에 중요하다. 예를 들어, H3-K27me1은 전사를 위해 취해진 유전자의 활성 전사와 연관된 반면, H3-K27me3은 전사 억제 유전자 또는 H3-K4 트리메틸화가 시스일 때 전사에 취해지는 유전자이다. 따라서, EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성의 선택적 억제는 H3-K27의 트리메틸화된 형태의 생성을 선택적으로 억제하도록 하고, 이로써 H3-K27me1과 연관된 전사는 도모하나 H3-K27me3과 연관된 전사의 억제는 도모하지 않는다.

[0113] EZH2의 억제제는, 그것이 야생형 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하는 것보다 더 효과적으로 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제할 때, EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 "선택적으로 억제한다". 예를 들어, 한 실시양태에서, 선택적 억제제는 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 40% 이상 더 낮은 EZH2의 Y641 돌연변이체에 대한 IC50을 갖는다. 한 실시양태에서, 선택적 억제제는 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 50% 이상 더 낮은 EZH2의 Y641 돌연변이체에 대한 IC50을 갖는다. 한 실시양태에서, 선택적 억제제는 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 60% 이상 더 낮은 EZH2의 Y641 돌연변이체에 대한 IC50을 갖는다. 한 실시양태에서, 선택적 억제제는 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 70% 이상 더 낮은 EZH2의 Y641 돌연변이체에 대한 IC50을 갖는다. 한 실시양태에서, 선택적 억제제는 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 80% 이상 더 낮은 EZH2의 Y641 돌연변이체에 대한 IC50을 갖는다. 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 90% 이상 더 낮은 EZH2의 Y641 돌연변이체에 대한 IC50을 갖는다.

[0114] 한 실시양태에서, EZH2의 Y641 돌연변이체의 선택적 억제제는 야생형 EZH2에 대한 억제 효과를 본질적으로 나타내지 않는다.

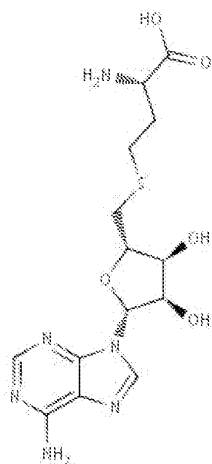
[0115] 억제제는 H3-K27me2의 H3-K27me3으로의 전환을 억제한다. 한 실시양태에서, 억제제는 H3-K27의 트리메틸화를 억제한다고 언급된다. H3-K27me1의 H3-K27me2으로의 전환이 H3-K27me2의 H3-K27me3으로의 전환보다 선행되기 때문에, H3-K27me1의 H3-K27me2으로의 전환의 억제제는 또한 H3-K27me2의 H3-K27me3으로의 전환을 자연적으로 억제하는데, 이는 즉 H3-K27의 트리메틸화를 억제한다. 또한, H3-K27me1의 H3-K27me2으로의 전환을 억제하지 않으면서 H3-K27me2의 H3-K27me3으로의 전환을 억제하는 것도 가능하다. 이러한 유형의 억제는 또한 비록 H3-K27의 디메틸화는 억제하지 않으나, H3-K27의 트리메틸화의 억제를 초래할 것이다.

[0116] 한 실시양태에서, 억제제는 H3-K27me1의 H3-K27me2으로의 전환 및 H3-K27me2의 H3-K27me3으로의 전환을 억제한다. 그러한 억제제는 H3-K27me1의 H3-K27me2으로의 전환만을 직접적으로 억제할 수 있다. 대안적으로, 그러한 억제제는 H3-K27me1의 H3-K27me2으로의 전환 및 H3-K27me2의 H3-K27me3으로의 전환 모두를 직접적으로 억제할 수 있다.

[0117] 상기 억제제는 히스톤 메틸라제 활성을 억제한다. 히스톤 메틸라제 활성의 억제는 임의의 적당한 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 상기 억제는 히스톤 메틸라제 활성 속도의 측면에서 또는 히스톤 메틸라제 활성의 산물로서 측정될 수 있다. 이 해독값 중 임의의 것에 대해 적당한 방법이 이후 실시예에 포함된다.

[0118] 상기 억제는 적당한 음성 대조와 대비하여 측정가능한 억제이다. 한 실시양태에서, 억제는 적당한 음성 대조 대비, 10% 이상의 억제이다. 즉, 억제제를 이용한 효소 활성의 속도 또는 산물의 양은 억제제를 이용하지 않았을 때의 상응하는 속도 또는 양의 90% 이하이다. 각종 다른 실시양태에서, 억제는 적당한 음성 대조와 대비하여 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 또는 95% 이상의 억제율 %이다. 한 실시양태에서, 억제는 적당한 음성 대조와 대비하여 99% 이상의 억제이다. 즉, 억제제를 이용한 효소 활성의 속도 또는 산물의 양은 억제제를 이용하지 않았을 때의 상응하는 속도 또는 양의 1% 이하이다.

[0119] 한 실시양태에서, 억제제는 S-아데노실-L-호모시스테인(SAH)이다. SAH는 하기 구조식:



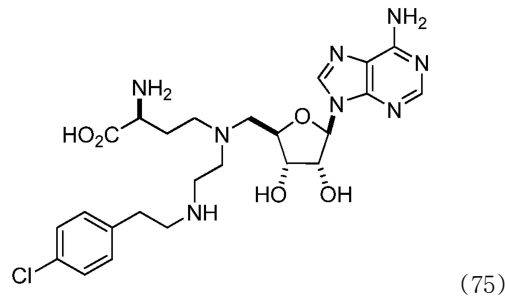
(SAH)

[0120]

[0121] 을 가지고, 예를 들어 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich; 미국 미주리주 세인트루이스 소재)를 비롯한 다수의 공급업체로부터 시중 입수가 가능하다. SAH는 S-아데노실메티오닌 의존성 메틸트랜스퍼라제에 의한 트랜스메틸화의

억제제로서 기재되었다.

[0122] 한 실시양태에서, 억제제는 화합물 75:



[0124] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0125] 특정 실시양태에서, 본 발명은 대상으로부터의 샘플 내의 EZH2의 Y641 돌연변이체를 검출하기 위한 검정을 수행하는 단계를 포함한다. 이러한 유형의 검정은 상기 기재되어 있다. 본원에 사용되는 "대상으로부터의 샘플"은 대상으로부터 얻어지거나 유도된 세포 또는 세포 성분을 포함하는 임의의 적당한 샘플을 지칭한다. 한 실시양태에서, 샘플은 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 것으로 의심되는 세포, 예를 들어 암 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 샘플은 혈액 샘플이다. 한 실시양태에서, 샘플은, 예를 들어 림프 조직(예를 들어, 림프절) 또는 골수로부터 얻은 생검 샘플이다. 한 실시양태에서, 샘플은 림프 조직(예를 들어, 림프절) 또는 골수 외의 조직 또는 이들에 부가적인 조직으로부터 얻은 생검 샘플이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 샘플은 암, 예를 들어 암 세포로 이루어진 종양으로부터의 생검이다. 샘플 내의 세포는 샘플의 다른 성분으로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 말초혈 단핵 세포(PBMC)는 당업계 숙련자에게 자명한 방법에 따라 원심분리된 혈액 샘플로부터 연막(buffy coat)으로서 분리될 수 있다.

[0126] 대상으로부터의 샘플에 대한 검정 결과가 EZH2의 Y641 돌연변이체가 샘플 내에 존재하는 것을 나타낼 때, 상기 대상은 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 것으로 언급된다. 실제로, 한 실시양태에서, 대상으로부터의 샘플에 대한 검정 결과가 EZH2의 Y641 돌연변이체가 샘플 내에 존재하는 것을 나타낼 때, 상기 대상은 EZH2의 억제제(여기서, 억제제는 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 선택적으로 억제함)를 이용한 치료를 위한 후보로서 동정된다.

[0127] 암으로부터의 샘플에 대한 검정 결과가 EZH2의 Y641 돌연변이체가 암 내에 존재하는 것을 나타낼 때, 상기 암은 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 것으로 언급된다.

[0128] 마찬가지로, 암을 앓는 대상으로부터의 암 세포를 포함하는 샘플에 대한 검정 결과가 EZH2의 Y641 돌연변이체가 암 내에 존재하는 것을 나타낼 때, 상기 대상은 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 것으로 언급된다.

[0129] 본 발명은 또한 EZH2 억제제에 대한 환자의 반응성과 H3-K27me2 수준 또는 바람직하게는 H3-K27me 및 H3-K27me3의 수준의 과거 인식되지 못한 놀라운 상관관계를 제공한다. 예를 들어, 대조와 대비하여 낮은 H3-K27me2 및 정상이거나 높은 me3 수준을 가지는 세포는 정상 H3-K27 me2 및 me3 수준을 가지는 세포보다 EZH2 억제제의 항증식성 효과에 대해 더욱 더 반응성이다.

[0130] 본 발명의 한 측면은 대상 내 EZH2 억제제에 대한 반응성을 판단하는 방법이다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상으로부터 조직 샘플을 분리하는 단계; 조직 샘플 내의 H3-K27의 디메틸화(me2) 수준을 검출하는 단계; 디메틸화(me2) 수준을 대조 디메틸화(me2) 수준과 비교하는 단계; 및 디메틸화(me2) 수준이 부재하거나 대조 디메틸화(me2) 수준보다 낮을 때 대상이 상기 EZH2 억제제에 대해 반응성인 것으로 동정하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 또한 조직 샘플 내의 H3-K27의 트리메틸화(me3) 수준을 검출하는 단계; 트리메틸화(me3) 수준을 대조 트리메틸화(me3) 수준과 비교하고 디메틸화(me2) 수준을 대조 디메틸화(me2) 수준과 비교하는 단계; 및 트리메틸화(me3) 수준이 대조 트리메틸화(me3) 수준과 동일하거나 그보다 더 높고 디메틸화(me2) 수준이 부재하거나 대조 디메틸화(me2) 수준보다 낮을 때, EZH2 억제제에 대해 반응성인 것으로 동정하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 또한 조직 샘플 내의 H3-K27의 디메틸화(me2) 수준 대 트리메틸화(me3) 수준의 비를 구하는 단계; 대조 디메틸화(me2) 수준 대 대조 트리메틸화(me3) 수준의 대조 비를 구하는 단계; 상기 비를 상기 대조 비와 비교하는 단계; 및 상기 비가 상기 대조 비보다 낮을 때, 대상이 상기 EZH2 억제제에 대해 반응성인 것으로 동정하는 단계를 포함한다. 한 바람직한 실시양태에서, 대상은 암을 앓는다. 한 실시양태에서, 암은 여포성 림프종이다. 대안적으로, 암은 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)이다. 또 다른 바

람직한 실시양태에서, 대상은 Y641 돌연변이체 EZH2를 발현한다. 한 바람직한 실시양태에서, Y641 돌연변이체는 Y641F, Y641H, Y641N 또는 Y641S이다.

[0131] 디메틸화된 H3-K27 또는 트리메틸화된 H3-K27의 검출은 당업계의 임의의 적당한 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 한 실시양태에서, 메틸화 수준은 디메틸화된 H3-K27 또는 트리메틸화된 H3-K27에 대해 특이적인 항체를 이용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 단리된 조직은 장기 보존을 위해 포르말린으로 고정하고 파라핀 블록에 포매한다. 블록은 메틸화된 H3-K27에 대한 항체를 이용한 형광 염색 또는 면역조직화학 염색을 위한 슬라이드 제작에 사용될 수 있다. 대안적으로, 전 세포 용해물 또는 히스톤 추출물은 단리된 조직 샘플로부터 제조된 후, 면역조직화학 염색, 웨스턴 블롯 분석 또는 형광 염색을 위해 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 메틸화 수준은 디메틸화된 H3-K27 또는 트리메틸화된 H3-K27에 대해 특이적인 폴리캡티드 또는 압타머를 이용하여 검출된다. 또 다른 실시양태에서, 메틸화 수준은 질량분석법(MS)을 이용하여 검출된다.

[0132] 대조 디메틸화된 H3-K27 또는 대조 트리메틸화된 H3-K27은 대조 샘플, 예를 들어 대상으로부터 단리된 인접 비종양 조직 또는 건강한 대상으로부터의 건강한 조직으로부터 확립될 수 있다. 대안적으로, H3-K27me2 또는 H3-K27me3의 대조 메틸화 수준은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 병리학자에 의해 확립될 수 있다.

[0133] 스크리닝 방법

[0134] 본 발명의 한 측면은 시험 화합물을 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제로서 동정하는 방법이다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 EZH2의 단리된 Y641 돌연변이체를 히스톤 기질, 메틸기 도너(예컨대, S-아데노실 메티오닌(SAM)), 및 시험 화합물과 조합하는 단계(여기서, 히스톤 기질은 비메틸화된 H3-K27, 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27, 및 이의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 H3-K27의 한 형태를 포함함); 및 히스톤 기질 내 H3-K27의 메틸화를 검출하기 위한 검정을 수행함으로써, 화합물의 존재 하에서의 H3-K27의 메틸화가 시험 화합물의 부재 하에서의 H3-K27의 메틸화보다 적을 때, 시험 화합물을 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제로서 동정하는 단계를 포함한다. H3-K27의 메틸화를 검출하는 검정은 메틸화의 속도, 메틸화의 정도, 또는 메틸화의 속도 및 정도 모두를 측정함으로써 선택될 수 있다.

[0135] EZH2의 Y641 돌연변이체는 PRC2 복합체 또는 이의 기능적 균등물로서 단리된다. 본원에 사용되는 "단리된"이란 용어는 실질적으로 다른 성분들로부터 분리되며 이로써 복합체가 본래 발생하는 그대로 발견될 수 있게 됨을 의미한다. 화합물은 반드시 정제될 필요없이 단리될 수 있다. 한 실시양태에서, EZH2의 돌연변이체는 EZH2의 Y641 돌연변이체와 EED 및 SUZ12와의 복합체로서 단리된다. 또 다른 실시양태에서, EZH2의 돌연변이체는 EZH2의 Y641 돌연변이체와 EED, SUZ12, 및 RbAp48의 복합체로서 단리된다. 적절한 조건하에서, PRC2 복합체 또는 이의 기능적 균등물은 H3-K27에 대해 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 나타낸다. 한 실시양태에서, 복합체는 재조합 발현 성분인 폴리캡티드, 예를 들어 EZH2, EED, SUZ12로 이루어지고, 이 때 RbAp48은 존재하거나 부재한다.

[0136] EZH2의 단리된 Y641 돌연변이체는 히스톤 기질과 조합된다. 히스톤 기질은 EZH2에 대한 기질로서 작용할 수 있는 임의의 적당한 출처의 히스톤 폴리캡티드 또는 이의 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, 히스톤 기질은 대상으로부터 단리된 히스톤을 포함한다. 히스톤은 임의의 적당한 방법을 이용하여 대상의 세포로부터 단리될 수 있고; 그러한 방법은 당업계의 숙련가에게 공지되어 있어 본원에 다시 명시될 필요가 없다. 예를 들어, 문헌[Fang et al. (2004) *Methods Enzymol* 377:213-26]을 참조한다. 이하 실시예에 따라, 한 실시양태에서, 히스톤 기질은 뉴클레오솜으로서 제공된다. 이하 실시예에 따라, 한 실시양태에서, 히스톤 기질은 조류(닭) 적혈구 뉴클레오솜으로서 제공된다.

[0137] 이와 같이 제공된 히스톤 기질은 H3-K27 메틸화 상태에 특이적인 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅함으로써 판단할 때, H3-K27 메틸화의 각종 상태를 비롯한, 히스톤 변형의 상태의 혼합물을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 히스톤 기질은 정제된 전장 히스톤 H3으로서 제공될 수 있다. 그러한 정제된 전장 히스톤 H3은 H3-K27 메틸화의 상태에 대한 균질 제제로서, 또는 H3-K27 메틸화의 각종 상태의 혼합물로서 제공될 수 있다. H3-K27 메틸화의 상태에 대한 단리된 히스톤 H3의 균질 제제는 부분적으로, 적당한 H3-K27 메틸화 상태에 특이적인 항체가 적재된 면역친화성 칼럼에 통과시킴으로써, 또는 적당한 H3-K27 메틸화 상태에 대해 특이적인 항체로 코팅된 자기 비드를 이용한 면역석출에 의해 제조될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, H3-K27의 메틸화 상태는 검정을 수행하는 부분인 것을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 출발 물질 히스톤 기질은 50% 비메틸화된 H3-K27, 40% 모노메틸화된 H3-K27, 10% 디메틸화된 H3-K27, 및 0% 트리메틸화된 H3-K27을 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0138] 한 실시양태에서, 히스톤 기질은, 특히 H3-K27을 포함한 서열을 비롯한, 히스톤 H3과 관련된 하나 이상의 아미

노산 서열을 포함하는 펩티드 라이브러리 또는 적당한 펩티드를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 히스톤 기질은 히스톤 H3의 아미노산 잔기 21-44에 상응하는 펩티드 단편이다. 그러한 펩티드 단편은 아미노산 서열 LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP(서열 번호 13)을 갖는다. 펩티드 라이브러리 또는 펩티드는 당업계에 공지된 기법에 따른 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있고, H3-K27에 상응하는 리신의 임의의 요망되는 메틸화도를 도입하도록 임의적으로 변형될 수 있다. 이하 실시예에 기재된 바와 같이, 그러한 펩티드는 다운스트림 검정을 수행하는 데 유용한 표지, 예컨대 비오틴을 도입하도록 변형될 수 있다. 한 실시양태에서, 표지는 펩티드(들)의 아미노 (N)-말단에 부착된다. 한 실시양태에서, 표지는 펩티드(들)의 카르복시 (C)-말단에 부착된다.

[0139] H3-K27 메틸화 특이적 항체는, 예를 들어 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology)(미국 메사추세츠주 덴버스 소재) 및 액티브 모티프(Active Motif)(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)를 비롯한 각종 상업적 출처들로부터 입수가 가능하다.

[0140] EZH2의 단리된 Y641 돌연변이체는 시험 화합물과 조합된다. 본원에 사용되는 "시험 화합물"이란 약 1.5 kDa 미만의 분자량을 가지는 유기 소분자를 지칭한다. 한 실시양태에서, 시험 화합물은 공지 화합물이다. 한 실시양태에서, 시험 화합물은 신규 화합물이다. 한 실시양태에서, 시험 화합물은 그러한 화합물의 라이브러리의 일부로서 제공될 수 있고, 여기서 라이브러리는, 예를 들어 수십개, 수백개, 수천개 또는 더 많은 화합물을 포함한다. 화합물의 라이브러리는 고출력 검정으로, 예를 들어 당업계에 공지된 일반 기법에 따라 시험 화합물의 어레이 및 로봇식 조작을 이용하여 유리하게 스크리닝된다.

[0141] 특정 실시양태에서, 시험 화합물은 SAH의 유도체 또는 화합물 75의 유도체인 화합물이다.

[0142] H3-K27의 메틸화의 검출은 임의의 적당한 방법을 이용하여 확립될 수 있다. 한 실시양태에서, 도너 메틸기의 출처는 검출가능한 표지로 표지된 메틸기를 포함한다. 한 실시양태에서, 검출가능한 표지는 동위원소 표지, 예를 들어 삼중수소이다. 다른 유형의 표지는, 예를 들어 형광 표지를 포함할 수 있다.

[0143] 트리메틸화된 H3-K27의 형성의 검출은 임의의 적당한 방법을 이용하여 확립될 수 있다. 예를 들어, 트리메틸화된 H3-K27의 형성의 검출은, 크기, 예를 들어 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE), 모세관 전기영동(CE), 또는 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 표지된 생성물을 분리하기 위한 크로마토그래피법 또는 기타 방법과 임의적으로 조합된, 표지된 메틸기, 예컨대 상기 기재된 것과 같은 표지된 메틸기의 도입을 검출하기 위한 검정을 이용하여 확립될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 트리메틸화된 H3-K27의 형성의 검출은 트리메틸화된 H3-K27에 대해 특이적인 항체를 이용하여 확립될 수 있다.

[0144] 모노메틸화된 H3-K27의 디메틸화된 H3-K27로의 전환의 검출은 임의의 적당한 방법을 이용하여 확립될 수 있다. 한 실시양태에서, 전환은 모노메틸화된 H3-K27 및 디메틸화된 H3-K27에 대해 특이적인 항체를 이용하여 측정된다. 예를 들어, 모노메틸화된 H3-K27 및 디메틸화된 H3-K27의 출발 양 또는 농도는 모노메틸화된 H3-K27 및 디메틸화된 H3-K27에 대해 특이적인 적절한 항체를 이용하여 측정될 수 있다. 효소, 기질, 메틸기 도너, 및 시험 화합물의 조합에 따라, 모노메틸화된 H3-K27 및 디메틸화된 H3-K27의 결과적 양 또는 농도가 이어서 모노메틸화된 H3-K27 및 디메틸화된 H3-K27에 대해 특이적인 적절한 항체를 이용하여 측정될 수 있다. 이어서, 모노메틸화된 H3-K27 및 디메틸화된 H3-K27의 초기 및 결과적 양 또는 농도를 비교할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 모노메틸화된 H3-K27 및 디메틸화된 H3-K27의 초기 및 결과적 양 또는 농도를 이어서 음성 대조로부터의 상응하는 양 또는 농도와 비교할 수 있다. 시험 물질이 검정에 포함되지 않은 음성 대조 반응은 병행 조절 또는 사적(historical) 조절로 수행될 수 있다. 그러한 조절 반응의 결과는 임의적으로 상기 비교를 수행하기 전 또는 그와 함께 실험 반응의 상응하는 결과로부터 차감될 수 있다.

[0145] H3-K27의 디메틸화된 형태는 또한 동일 검정으로 메틸화될 수 있기 때문에, 모노메틸화된 H3-K27의 양 또는 농도의 감소는 디메틸화된 H3-K27의 증가에 직접적으로 상응하는 것으로 보이지 않을 수 있다. 그러나, 이 예에서, 모노메틸화된 H3-K27의 양 또는 농도의 감소는 그것만으로 모노메틸화된 H3-K27의 디메틸화된 H3-K27로의 전환을 반영하는 것으로 추정될 수 있다.

[0146] 디메틸화된 H3-K27의 트리메틸화된 H3-K27로의 전환의 검출은 임의의 적당한 방법을 이용하여 확립될 수 있다. 한 실시양태에서, 디메틸화된 H3-K27 및 트리메틸화된 H3-K27에 대해 특이적인 항체를 이용하여 전환을 측정한다. 예를 들어, 디메틸화된 H3-K27 및 트리메틸화된 H3-K27의 출발 양 또는 농도는 디메틸화된 H3-K27 및 트리메틸화된 H3-K27에 특이적인 적절한 항체를 이용하여 측정될 수 있다. 효소, 기질 및 시험 화합물의 조합에 따라, 디메틸화된 H3-K27 및 트리메틸화된 H3-K27의 결과적 양 또는 농도가 이어서 디메틸화된 H3-K27 및 트리메틸화된 H3-K27에 대해 특이적인 적절한 항체를 이용하여 측정될 수 있다. 이어서, 디메틸화된 H3-K27 및 트리메

틸화된 H3-K27의 초기 및 결과적 양 또는 농도를 비교할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 디메틸화된 H3-K27 및 트리메틸화된 H3-K27의 초기 및 결과적 양 또는 농도를 이어서 음성 대조로부터의 상응하는 양 또는 농도와 비교할 수 있다. 시험 물질이 검정에 포함되지 않은 음성 대조 반응은 병행 조절 또는 사적 조절로 수행될 수 있다. 그러한 조절 반응의 결과는 임의적으로 상기 비교를 수행하기 전 또는 그와 함께 실험 반응의 상응하는 결과로부터 차감될 수 있다.

[0147] 시험 화합물을 이용한 H3-K27의 메틸화가 시험 화합물을 이용하지 않은 H3-K27의 메틸화보다 적을 때, 시험 물질은 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제로 동정된다. 한 실시양태에서, 시험 화합물의 존재 하에서의 H3-K27의 트리메틸화가 시험 화합물의 부재 하에서의 H3-K27의 트리메틸화보다 적을 때, 시험 물질은 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제제로 동정된다.

[0148] 본 발명의 한 측면은 EZH2의 Y641 돌연변이체의 선택적 억제제를 동정하는 방법이다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 EZH2의 단리된 Y641 돌연변이체를 히스톤 기질, 메틸기 도너(예를 들어, SAM), 및 시험 화합물과 배합함으로써(여기서, 히스톤 기질은 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27, 및 모노메틸화된 H3-K27과 디메틸화된 H3-K27의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 H3-K27의 한 형태를 포함함), 시험 혼합물을 형성하는 단계; 단리된 야생형 EZH2를 히스톤 기질, 메틸기 도너(예를 들어, SAM), 및 시험 화합물과 조합함으로써(여기서, 히스톤 기질은 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27, 및 모노메틸화된 H3-K27과 디메틸화된 H3-K27의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 H3-K27의 한 형태를 포함함), 대조 혼합물을 형성하는 단계; 각각의 시험 혼합물 및 대조 혼합물에서 히스톤 기질의 트리메틸화를 검출하기 위한 검정을 수행하는 단계; (a) EZH2의 Y641 돌연변이체 및 시험 화합물을 이용한(M+) 트리메틸화 대 (b) 시험 화합물 없이 EZH2의 Y641 돌연변이체를 이용한(M-) 트리메틸화의 비를 계산하는 단계; (c) 야생형 EZH2 및 시험 화합물을 이용한(WT+) 트리메틸화 대 (d) 시험 화합물 없이 야생형 EZH2를 이용한(WT-) 트리메틸화의 비를 계산하는 단계; 비 (a)/(b)를 비 (c)/(d)와 비교하는 단계; 및 비 (a)/(b)가 비 (c)/(d)보다 작을 때, 시험 화합물을 EZH2의 Y641 돌연변이체의 선택적 억제제로서 동정하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 또한 시험 혼합물 및 대조 혼합물 중 어느 하나 또는 양자 모두에 대해 시험 화합물이 없는 음성 대조를 고려하는 단계를 포함한다.

[0149] **약학적 조성물**

[0150] 하나 이상의 EZH2 길항제는 인간 환자에게 단독 투여되거나, 그것이 본원에 기재된 바와 같은 질환 또는 조건을 치료 또는 경감시키는 용량으로 적당한 담체 또는 부형제(들)와 혼합된 약학적 조성물로서 투여된다. 이들 EZH2 길항제의 혼합물은 또한 단순 혼합물로서 또는 적당한 제제화된 약학적 조성물로서 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 한 측면은 치료 유효량의 EZH2 길항제 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 거울 이성질체 또는 입체이성질체; 및 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0151] EZH2 길항제의 제제 및 투여 기법은 당업계의 숙련자에게 공지된 참조문헌, 예컨대 문헌[Remington's "The Science and Practice of Pharmacy," 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins 2005]에서 찾아볼 수 있다.

[0152] 적당한 투여 경로는, 예를 들어 경구, 직장 또는 장내 투여; 비경구 전달, 예컨대 정맥내, 근육내, 복강내, 피하 또는 골수내 주사, 및 척추강내, 직접적 심실내, 또는 안내 주사; 국소 전달, 예컨대 점안제 및 경피제; 및 비내 및 기타 경점막 전달을 포함할 수 있다.

[0153] 대안적으로, 예를 들어 부종 부위에 EZH2 길항제를 직접, 종종은 데포 또는 지속 방출형 제제의 형태로 주사함으로써, 전신 방식이 아닌 국소 방식으로 EZH2 길항제를 투여할 수 있다.

[0154] 한 실시양태에서, EZH2 길항제는 종양 또는 림프절 내로 직접적 주사에 의해 투여된다.

[0155] 또한, 표적 약물 전달제, 예를 들어 암 세포 특이적 항체로 코팅된 리포솜에 EZH2 길항제를 투여할 수 있다.

[0156] 본 발명의 약학적 조성물은, 예를 들어 통상적 혼합, 용해, 과립화, 드라제 제조, 분화(levigating), 유화, 캡슐화, 포괄법 또는 동결 건조 공정에 의해 제조될 수 있다.

[0157] 이와 같이 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학적 조성물은 약학적으로 사용될 수 있는 제제 내로 활성 EZH2 길항제를 가공하는 것을 용이하게 하는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체를 이용하여 통상적 방식으로 제제화될 수 있다. 적절한 제제는 선택된 투여 경로에 따라 달라진다.

[0158] 주사를 위해, 본 발명의 작용물질은 수용액, 바람직하게는 생리학적 적합성 완충액, 예컨대 헵크스액(Hanks' solution), 링거액(Ringer's solution), 또는 생리식염수 완충액 내에 제제화될 수 있다. 경점막 투여를 위해,

투과제가 투과될 배리어에 적당한 제제로 제제화될 수 있다. 그러한 투과제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.

- [0159] 경구 투여를 위해, EZH2 길항제는 활성 EZH2 길항제를 당업계에 공지된 약학적으로 허용되는 담체와 조합함으로써 용이하게 제제화될 수 있다. 그러한 담체는 본 발명의 EZH2 길항제가 치료받는 환자에 의해 경구 섭취되도록 하기 위해, 정제, 환약, 드라제, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제제화될 수 있도록 한다. 경구용 약학적 제제는 활성 EZH2 길항제를 고체 부형제와 조합하고, 임의적으로는 수득된 혼합물을 분쇄하며, 및 필요한 경우 적당한 보조제를 첨가한 후에 과립 혼합물을 처리하여 정제 또는 드라제 코어를 얻음으로써 얻을 수 있다. 적당한 부형제는 충전제, 예컨대 당, 예를 들어 락토스, 수크로스, 만니톨 또는 소르비톨과 같은 충전제; 셀룰로스 제제, 예를 들어 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검, 메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 및/또는 폴리비닐피롤리돈(PVP)을 포함한다. 필요에 따라, 붕해 제제, 예컨대 가교 폴리비닐 피롤리돈, 아가 또는 알긴산 또는 이의 염, 예컨대 알긴산나트륨을 첨가할 수 있다.
- [0160] 드라제 코어에 적당한 코팅이 제공될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 농축 아가 용액이 사용될 수 있고, 이는 임의적으로 아라비아검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카르보폴 겔, 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 이산화티탄, 락커 용액, 및 적당한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수 있다. 염료 또는 안료를 동정하기 위한 정제 또는 드라제 코팅에, 또는 활성 EZH2 길항제 투약의 상이한 조합물에 첨가할 수 있다.
- [0161] 경구 사용될 수 있는 약학적 제제는 젤라틴으로 제조된 밀어 맞추는(push-fit) 캡슐, 및 젤라틴 및 가소제, 예컨대 글리세롤 또는 소르비톨로 제조된 연질의 봉지 캡슐을 포함한다. 밀어 맞추는 캡슐은 락토스와 같은 충전제, 및/또는 탈크 또는 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제, 및 임의적으로 안정화제와 혼합되는 활성 성분을 함유할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 EZH2 길항제는 적당한 액체, 예컨대 지방 알코올, 액체 파라핀 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜에 용해 또는 현탁될 수 있다. 또한, 안정화제가 첨가될 수 있다.
- [0162] 협측(buccal) 투여를 위해, 조성물은 통상적 방식으로 제제화된 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.
- [0163] 흡입에 의한 투여를 위해, 본 발명에 따라 사용하기 위한 EZH2 길항제는 적당한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적당한 기체를 사용하면서, 가압 팩 또는 네블라이저로부터 에어로졸 스프레이 제공 형태로 편리하게 전달된다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하기 위해 밸브를 제공함으로써 결정된다. 예를 들어, 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 EZH2 길항제의 분말 믹스 및 락토스 또는 전분과 같은 적당한 분말 기재를 함유하도록 제제화될 수 있다.
- [0164] EZH2 길항제는 주사, 예를 들어 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여를 위해 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 부가된 보존제와 함께, 단위 투약 형태, 예를 들어 앰플 또는 다중 투약 용기 내에 제공될 수 있다. 상기 조성물은 유성 또는 수성 비히클 내의 현탁액, 용액 또는 유화액과 같은 형태를 취할 수 있고, 현탁, 안정화 및/또는 분산제와 같은 제제화 물질을 함유할 수 있다.
- [0165] 비경구 투여용 약학적 제제는 수용성 형태의 활성 EZH2 길항제의 수용액을 포함한다. 또한, 활성 EZH2 길항제의 현탁액은 적절한 유성 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적당한 친지성 용매 또는 비히클은 참깨 오일과 같은 지방 오일, 또는 합성 지방산 에스테르, 예컨대 올레산에틸 또는 트리글리세리드, 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨, 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 임의적으로, 현탁액은 또한 고농축 용액의 제조가 가능하도록 EZH2 길항제의 용해도를 증가시키는 작용물질 또는 적당한 안정화제도 함유할 수 있다.
- [0166] 대안적으로, 활성 성분은 적당한 비히클, 예를 들어 무균 발열원 불포함 물과 함께 사용하기 전에 재구성을 위한 분말 형태의 것일 수 있다.
- [0167] EZH2 길항제는 또한 직장용 조성물, 예컨대 좌약제 또는 정체 관장(retention enemas), 예를 들어 코코아 버터 또는 기타 글리세리드와 같은 통상적 조약 기재 내에 제제화될 수 있다.
- [0168] 전술된 제제에 부가하여, EZH2 길항제는 또한 데포 제제로서 제제화될 수도 있다. 그러한 장기 작용성 제제는 이식에 의해 (예를 들어, 피하 또는 경피 또는 근육내 또는 근육내 주사에 의해) 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어 EZH2 길항제는 적당한 중합체 또는 소수성 물질(예를 들어 허용가능한 오일 내 유화액으로서) 또는 이온 교환 수지, 또는 난용성 유도체(예를 들어, 난용성 염으로서)와 함께 제제화될 수 있다.

- [0169] 대안적으로, 소수성 약학적 EZH2 길항제를 위한 기타 전달계가 이용될 수 있다. 리포솜 및 유화액은 소수성 약물용 전달 비히클 또는 담체의 예이다. 디메틸술폭시드와 같은 특정 유기 용매도 이용될 수 있다. 또한, EZH2 길항제는 또한 지속 방출제, 예컨대 치료제를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 기질을 이용하여 전달될 수 있다. 각종 지속 방출 물질이 확립되었고 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다. 지속 방출 캡슐은, 그것의 화학 성질에 따라 수주 내지 100일 초과까지의 기간 동안 EZH2 길항제를 방출할 수 있다. 치료제의 화학 구조 및 생물학적 안정성에 따라, 단백질 안정화를 위한 추가적 방법이 이용될 수 있다.
- [0170] 약학적 조성물은 또한 적당한 고체 또는 겔 이동 담체 또는 부형제를 포함할 수도 있다. 그러한 담체 또는 부형제의 예에는 탄산칼슘, 인산칼슘, 각종 당류, 전분, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 및 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜이 포함되나 이에 국한되지 않는다.
- [0171] **치료 방법**
- [0172] 히스톤 또는 기타 단백질의 메틸화 상태(여기서, 상기 메틸화 상태는 EZH2의 활성화에 의해 적어도 부분적으로 매개됨)를 조절함으로써 영향받을 수 있는 상태 또는 질환 과정을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다. 이에 히스톤의 메틸화 상태의 조절은 메틸화에 의해 활성화되는 표적 유전자 및/또는 메틸화에 의해 억제되는 표적 유전자의 발현 수준에 영향을 미칠 수 있다.
- [0173] 예를 들어, 본 발명의 한 측면은 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 암을 앓는 대상에게 치료 유효량의 EZH2의 억제제를 투여함으로써(여기서 억제제는 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제함), 암을 치료하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 억제제는 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제한다. 한 실시양태에서, 억제제 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 선택적으로 억제한다. 한 실시양태에서, 암은 여포성 림프종이다. 한 실시양태에서, 암은 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)이다.
- [0174] 본 발명의 한 측면은 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 암을 앓는 대상으로부터의 암 세포를 포함하는 샘플 내의 EZH2의 Y641 돌연변이체를 검출하기 위한 검정을 수행하는 단계; 및 EZH2의 Y641 돌연변이체를 발현하는 대상에게 치료 유효량의 EZH2의 억제제를 투여함으로써(여기서 억제제는 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제함), 암을 치료하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 억제제는 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제한다. 한 실시양태에서, 억제제는 EZH2의 Y641 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 선택적으로 억제한다. 한 실시양태에서, 암은 여포성 림프종이다. 한 실시양태에서, 암은 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)이다.
- [0175] 암 및 신경성 질환과 같은 질환은 단백질(예를 들어, 히스톤) 메틸화의 조절제, 예를 들어 히스톤 메틸트랜스퍼라제 또는 히스톤 디메틸라제 효소 활성의 조절제의 투여에 의해 치료될 수 있다. 히스톤 메틸화는 암 내 특정 유전자의 이상 발현, 및 비신경 세포 내 신경 유전자의 침묵에 연관된 것으로 보고되었다. 본원에 기재된 조절제는 그러한 질환을 치료하기 위해, 즉 영향을 받는 세포에서의 히스톤을 억제하기 위해 사용될 수 있다.
- [0176] 증가된 히스톤 메틸화가 특정 암과 연관된 것으로 밝혀졌다는 사실에 적어도 근거하여, 대상에서 암을 치료하는 방법은 해당 처리를 필요로 하는 대상에게 메틸화를 억제하거나 메틸화를 상대 정상 세포에서의 대략적 그 수준으로 복원하는 정상 세포 치료 유효량의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 대상에서의 암을 치료하는 방법은 해당 처리를 필요로 하는 대상에게 비메틸화된 H3-K27의 모노메틸화된 H3-K27(H3-K27me1)로의 전환을 억제하는 치료 유효량의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 대상에서의 암을 치료하는 방법은 해당 처리를 필요로 하는 대상에게 모노메틸화된 H3-K27(H3-K27me1)의 디메틸화된 H3-K27(H3-K27me2)로의 전환을 억제하는 치료 유효량의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 대상에서의 암을 치료하는 방법은 해당 처리를 필요로 하는 대상에게 H3-K27me2의 트리메틸화된 H3-K27(H3-K27me3)로의 전환을 억제하는 치료 유효량의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 대상에서의 암을 치료하는 방법은 해당 처리를 필요로 하는 대상에게 H3-K27me1의 H3-K27me2으로의 전환 및 H3-K27me2의 H3-K27me3으로의 전환을 억제하는 치료 유효량의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 질환 특이적 메틸화의 증가는 히스톤 또는 단백질 메틸화의 세포내 수준의 전반적 증가의 부재 하에 핵심 게놈 좌에서의 크로마틴에서 일어날 수 있음을 주목하는 것이 중요하다. 예를 들어, 핵심 질환-관련 유전자에서의 이상 하이퍼메틸화가 전반적 히스톤 또는 단백질 하이퍼메틸화의 배경에 대해 일어날 가능성이 있다.
- [0177] 메틸화의 조절제는 일반적으로 세포 증식을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에 과도한 증식은 메틸화를 감소시키는 작용물질을 이용하여 감소될 수 있는 반면, 불충분한 증식은 메틸화를 증가시키는 작

용물질을 이용하여 자극될 수 있다. 따라서, 치료될 수 있는 질환은 과다증식성 질환, 예컨대 양성 세포 성장 및 악성 세포 성장(암)이 포함된다.

[0178] 치료될 수 있는 예시적 암에는 여포성 림프종(FL) 및 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)을 비롯한 림프종이 포함된다.

[0179] 기타 암에는 급성 림프모구 백혈병; 급성 골수양 백혈병; 부신피질 암종; AIDS 관련 암; AIDS 관련 림프종; 항문 암; 아동 소뇌 성상세포종; 아동 대뇌 성상세포종; 기저 세포 암종, 예컨대 피부 암(비흑색종); 간의 담도 암; 방광 암; 골 암, 골육종/악성 섬유성 조직구종; 뇌 줄기 신경교종; 뇌 종양; 소뇌 성상세포종 뇌 종양; 대뇌 성상세포종/악성 신경교종 뇌 종양; 상의세포종 뇌 종양; 수모세포종 뇌 종양; 미분화 신경 외배엽성 종양 뇌 종양; 소아 시교차 및 시상하부 신경교종 뇌 종양; 유방 암; 기관지 선종/유암종; 버킷 림프종; 유암 종양; 위장관 유암 종양; 미지의 원발성 암종; 원발성 중추신경계 림프종; 소뇌 성상세포종; 자궁경부 암; 아동 암; 만성 림프구성 백혈병; 만성 골수성 백혈병; 모(hair) 세포 만성 골수성 백혈병; 만성 골수증식성 장애; 결장 암; 대장 암; 피부 T-세포 림프종, 예컨대 균상 식육종 및 세자리 증후군; 자궁내막 암; 식도 암; 유잉계 종양; 간의 담도 암; 눈 암, 안구 흑색종; 망막모세포종 눈 암; 담낭 암; 위장(위) 암; 위장관 유암 종양; 두개의 생식 세포 종양; 고환외 생식 세포 종양; 난소 생식 세포 종양; 임신성 용모성 종양; 신경교종; 아동 뇌 줄기 신경교종; 아동 대뇌 성상세포종 신경교종; 아동 시신경로 및 시상하부 신경교종; 모 세포 백혈병; 두경부 암; 성인 (원발성) 간세포(간) 암; 아동 (원발성) 간세포(간) 암; 호지킨 림프종; 임신중 호지킨 림프종; 하인두 암; 시상하부 및 시신경로 신경교종; 안구 흑색종; 섬 세포 암종(내분비 체장암); 카포시 육종; 신장(신장 세포) 암; 신장 암; 후두 암; 백혈병; 입술 및 구강 암; 성인 (원발성) 간 암; 아동 (원발성) 간 암; 비소세포 폐 암; 소세포 폐 암; 원발성 중추신경계 림프종; 발덴스트롬 마크로글로블린혈증; 골 악성 섬유성 조직구종/골육종; 수모세포종; 흑색종; 머켈 세포 암종; 중피종; 성인 악성 중피종; 잠복 원발성 전이 경부 편평세포암; 다발성 내분비 샘종증 증후군; 다발성 골수종; 다발성 골수종/혈장 세포 신생물 균상식육종; 골수이형성 증후군; 골수이형성/골수증식성 질환; 급성 성인 골수양 백혈병; 급성 아동 골수양 백혈병; 만성 골수증식성 장애; 비강 및 부비동 암; 비인두 암; 신경아세포종; 비호지킨 림프종; 임신중 비호지킨 림프종; 경구 암; 구강 및 입술 암; 구인두 암; 골육종/악성 골 섬유성 조직구종; 난소 암; 난소 상피세포 암; 난소 경계성 종양; 체장 암; 체도세포 체장 암; 부비동 및 비강 암; 부갑상선 암; 음경 암; 갈색세포종; 송과체모세포종 및 미분화 신경 외배엽성 종양; 뇌하수체 종양; 혈장 세포 신생물/다발성 골수종; 흉막 폐 모세포종; 임신 및 유방 암; 전립선 암; 직장 암; 망막모세포종; 횡문근육종; 침샘 암; 유잉계 종양 육종; 연조직 육종; 난소; 세자리 증후군; 피부 암; 피부 암(비흑색종); 소장 암; 연조직 육종; 편평상피 암종, 예컨대 피부 암(비흑색종); 전이성 잠복 원발성 경부 편평세포암; 위(위장) 암; 고환 암; 흉선종; 흉선종 및 흉선 암종; 갑상선 암; 신우 및 요관 이행 세포 암; 임신성 용모 종양; 미지 원발성 부위의 암; 아동의 비통적 암; 요도 암; 자궁내막 자궁 암; 자궁 육종; 질 암; 시신경로 및 시상하부 신경교종; 외음부 암; 발덴스트롬 거대글로블린혈증; 율름 종양; 및 여성 암이 포함된다.

[0180] EZH2에 의해 매개되는 후생적 메틸화가 작용할 수 있는 임의의 기타 질환이 본원에 기재된 화합물 및 방법을 이용하여 치료되거나 예방될 수 있다.

[0181] 예를 들어, 치료될 수 있는 신경 질환에는 간질, 정신분열증, 양극 장애 또는 기타 생리학 및/또는 정신과적 장애, 신경병, 골격근 위축 및 신경퇴행성 질환, 예를 들어 신경퇴행성 질환이 포함된다. 예시적 신경퇴행성 질환에는 알츠하이머병, 근위축성 측색 경화증(ALS), 및 파킨슨병이 포함된다. 또 다른 부류의 신경퇴행성 질환에는 적어도 부분적으로 폴리글루타민의 응집에 의해 유발되는 질환이 포함된다. 이 부류의 질환에는 헌팅턴병, 척수성 근육 위축(SBMA 또는 케네디병), 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증(DRPLA), 척수소뇌 운동실조증 1(SCA1), 척수소뇌 운동실조증 2(SCA2), 마카도-조셉병(Machado-Joseph Disease)(MJD; SCA3), 척수소뇌 운동실조증 6(SCA6), 척수소뇌 운동실조증 7(SCA7), 및 척수소뇌 운동실조증 12(SCA12)이 포함된다.

[0182] 암을 앓는 대상에 대한 치료법을 선택하는 방법도 또한 본원에 기재된다. 상기 방법은 디메틸화된 H3-K27 수준, 바람직하게는 디메틸화된 H3-K27 및 트리메틸화된 H3-K27의 수준에 의해 EZH2 억제제에 대한 대상의 반응성을 판단하는 단계; 및 대상이 EZH2 억제제에 대해 반응성일 때, 대상에게 EZH2 억제제를 제공하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 암은 여포성 림프종이다. 대안적으로, 암은 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 대상은 Y641 돌연변이체 EZH2를 발현한다. 한 바람직한 실시양태에서, Y641 돌연변이체는 Y641F, Y641H, Y641N 또는 Y641S이다.

[0183] **병용 요법**

[0184] 본 발명의 한 측면에서, EZH2 길항제 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 또 다른 치료제와 병용되어, 암 및/

또는 신경 장애와 같은 질환을 치료할 수 있다. 예를 들어, 부가적 작용물질은 본 발명의 화합물에 의해 치료되는 질환 또는 상태를 치료하는 데 유용한 것으로 당업계에서 인식되고 있는 치료제일 수 있다. 상기 부가적 작용물질은 또한 치료용 조성물(예를 들어, 조성물의 점도에 영향을 미치는 작용물질)에 유익한 속성을 부여하는 작용물질일 수 있다.

[0185] 본 발명에 의해 구상되는 병용 요법은, 예를 들어 단일 약학적 제제 내의 본 발명의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 부가적 작용물질(들)의 투여 및 분리된 약학적 제제 내의 본 발명의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 부가적 작용물질(들)의 투여를 포함한다. 즉, 공동 투여는 양 작용물질 모두의 조합의 유익한 효과를 제공하기 위해 대상에게 2개 이상의 작용물질을 투여함을 의미할 것이다. 예를 들어, 상기 작용물질은 일정 시간에 걸쳐 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0186] 이하에 기재된 작용물질은 예시적 목적을 위한 것으로서 제한적이지 않도록 의도된다. 본 발명의 부분인 조합은 본 발명의 화합물 및 이하 목록에서 선택되는 하나 이상의 부가적 작용물질일 수 있다. 상기 조합은 또한 그 조합이 형성된 조성물이 그것의 의도된 기능을 수행할 수 있도록 되어진 경우, 하나 초과와 부가적 작용물질, 예를 들어 2개 또는 3개의 부가적 작용물질을 포함할 수 있다.

[0187] 예를 들어, 본 발명의 한 측면은 암 및/또는 신경 장애의 치료를 위한, 또 다른 제제와 조합되는 EZH2 길항제의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 부가적 제제는 히스톤 변형에 영향을 미치는 화합물인 항암제, 예컨대 HDAC 억제제이다. 특정 실시양태에서, 부가적 항암 제제는 화학요법제(예컨대, 2CdA, 5-FU, 6-머캅토피린, 6-TG, 아브락산(Abraxane)TM, 아쿠탄(Accutane)[®], 악티노마이신(Actinomycin)-D, 아드리아마이신(Adriamycin)[®], 알림타(Alimta)[®], 올-트랜스 레티노산, 아메토프테린, Ara-C, 아자시타딘(Azacitadine), BCNU, 블레녹산(Blenoxane)[®], 캄포사르(Camptosar)[®], CeeNU[®], 클로파라빈(Clofarabine), 클로라르(Clolar)TM, 사이토산(Cytoxan)[®], 다우노루비신 염화물, 다우녹숨(DaunoXome)[®], 다코젠(Dacogen)[®], DIC, 독실(Doxil)[®], 엘렌스(Ellence)[®], 엘록사틴(Eloxatin)[®], 엠시트(Emcyt)[®], 에토포시드 인산염, 플루다라(Fludara)[®], FUDR[®], 겐자르(Gemzar)[®], 글리벡(Gleevec)[®], 핵사메틸멜라민, 하디캄틴(Hycamtin)[®], 하이드레아(Hydrea)[®], 이다마이신(Idamycin)[®], 이펙스(Ifex)[®], 익사베필론(ixabepilone), 이그젠프라(Ixempra)[®], L-아스파라기나제, 류케란(Leukeran)[®], 리포좀형 Ara-C, L-PAM, 라이소드렌(Lysodren), 마툴란(Matulane)[®], 미트라신(mithracin), 미토마이신(Mitomycin)-C, 마일레란(Myleran)[®], 나벨빈(Navelbine)[®], 뉴트렉신(Neutrexin)[®], 닐로티닙(nilotinib), 니펜트(Nipent)[®], 질소 머스타드, 노반트론(Novantrone)[®], 온카스파(Oncaspar)[®], 판트레틴(Panretin)[®], 파라플라틴(Paraplatin)[®], 플라티놀(Platinol)[®], 카르무스틴 임플란트를 갖는 프로리페프로스판(prolifeprospan) 20, 산도스타틴(Sandostatatin)[®], 타르그레틴(Targretin)[®], 타시그나(Tasigna)[®], 탁소테레(Taxotere)[®], 테모다르(Temodar)[®], TESP, 트리세녹스(Trisenox)[®], 발스타르(Valstar)[®], 벨반(Velban)[®], 비다자(Vidaza)TM, 빈크리스틴(vincristine) 황산염, VM 26, 젤로다(Xeloda)[®] 및 자노사르(Zanosar)[®]; 생물학제(예컨대, 알파 인터페론(Alpha Interferon), 바실러스 칼메트-구아린(Bacillus Calmette-Guerin), 벅사르(Bexsar)[®], 캄파쓰(Campath)[®], 에르가미솔(Ergamisol)[®], 에를로티닙(Erlotinib), 헤르셉틴(Herceptin)[®], 인터류킨-2, 이레사(Iressa)[®], 레날리도마이드(lenalidomide), 마일로타르그(Mylotarg)[®], 온타크(Ontak)[®], 페가사이스(Pegasys)[®], 레블리미드(Revlimid)[®], 리툭산(Rituxan)[®], 타르세바(Tarceva)TM, 탈로미드(Thalomid)[®], 타이케르브(Tykerb)[®], 벨케이드(Velcade)[®] 및 제발린(Zevalin)TM; 코르티코스테로이드류(예컨대, 텍사메타손 나트륨 인산염, 델타손(DeltaSone)[®] 및 델타-코르테르(Delta-Cortef)[®]); 호르몬 치료제(예컨대, 아리미덱스(Arimidex)[®], 아로마신(Aromasin)[®], 카소덱스(Casodex)[®], 사이타드렌(Cytadren)[®], 엘리가르드(Eligard)[®], 에울렉신(Eulexin)[®], 에비스타(Evista)[®], 파슬로덱스(Faslodex)[®], 페마라(Femara)[®], 할로테스틴(Halotestin)[®], 메게이스(Megace)[®], 닐라드론(Nilandron)[®], 놀바덱스(Nolvadex)[®], 플레나식스(Plenaxis)TM 및 졸라덱스(Zoladex)[®]); 및 방사능화합제(예컨대, 요오도프(Iodotope)[®], 메타스트론(Metastron)[®], 포스포콜(Phosphocol)[®] 및 사마륨(Samarium) SM-153)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0188] **투약량**

[0189] 본원에 사용되는 "치료 유효량" 또는 "치료 유효 용량"은 상태의 진전을 전체적으로 또는 부분적으로 억제하거나, 상태의 하나 이상의 증상을 적어도 부분적으로 경감시키는, EZH2 길항제 또는 2종 이상의 그러한 화합물의 조합의 양이다. 치료 유효량은 또한 예방적으로 효과적인 양일 수도 있다. 치료 유효한 양은 환자의 크기 및 성별, 치료 대상 상태, 상태의 심각도 및 추구하는 결과에 따라 달라질 것이다. 한 실시양태에서, 치료 유효 용량이란 환자에서의 증상의 경감을 초래하는 EZH2 길항제의 양을 지칭한다. 소정의 환자에 대해, 치료 유효량은 당업계의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0190] EZH2 길항제의 독성 및 치료 효능은, 예를 들어 최대 내인 용량(MTD) 및 ED₅₀(50% 최대 반응을 위한 유효 용량)을 측정하기 위한, 세포 배양액 또는 실험 동물 내에서의 표준 약학적 절차에 의해 측정될 수 있다. 독성 및 치료 효과 간의 용량 비는 치료 지수이고, 이는 MTD와 ED₅₀ 간의 비로 표현될 수 있다. 이 세포 배양액 검정 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에 사용하기 위한 용량 범위를 설정하기 위해 사용될 수 있다. 투약량은 또한 질환 조직 또는 대리 조직에 있어 효소 억제의 약역학 마커에 대한 EZH2 길항제의 효과(예를 들어, 히스톤 메틸화 또는 표적 유전자 발현)를 모니터링함으로써 지정될 수도 있다. 세포 배양액 또는 동물 실험은 약역학 마커의 변화에 필요한 용량 간의 관계를 결정하기 위해 사용될 수 있고, 치료 효능에 필요한 용량은 세포 배양액 또는 동물 실험 또는 조기 단계 임상 실험에서 결정될 수 있다. 그러한 EZH2 길항제의 투약량은 바람직하게 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED₅₀를 포함하는 일정 범위의 순환 농도 내에 있다. 상기 투약량은 이용되는 투약 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 변동될 수 있다. 정확한 제제에서, 투여 경로 및 투약량은 환자의 상태를 고려하여 개인 주치의에 의해 선택될 수 있다. 위기 처리 시에, 급속 반응을 얻기 위해, 급성 불루스 또는 MTD에 접근하는 주입의 투여가 필요할 수 있다.

[0191] 투약량 및 간격은 치료 효능을 달성하기 위해 필요 시간 동안 최소의 유효 농도(MEC) 또는 메틸트랜스퍼라제 조절 효과를 유지하는 데 충분한 활성 부분의 혈장 수준을 제공하기 위해 개별적으로 조절될 수 있다. MEC는 각 EZH2 길항제에 대해 변동될 것이나, 시험관내 데이터 및 동물 실험으로부터 평가될 수 있다. MEC를 달성하는 데 필요한 투약량은 개인 특징 및 투여 경로에 의존할 것이다. 그러나, 혈장 농도를 측정하기 위해 고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 검정 또는 생검정을 사용할 수 있다.

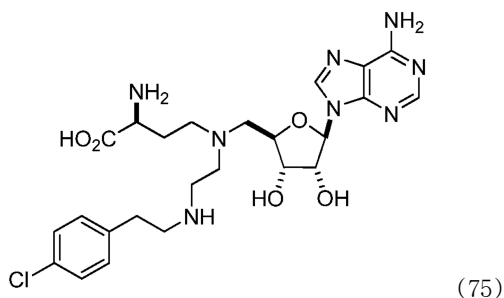
[0192] 투약 간격은 또한 MEC 값을 이용하여 결정될 수도 있다. 한 실시양태에서, EZH2 길항제는 시간의 10 내지 90% 동안, 바람직하게는 요망되는 증상 경감이 달성될 때까지 30 내지 90%, 가장 바람직하게는 50 내지 90% 동안 MEC를 초과하는 혈장 수준을 유지하는 레짐을 이용하여 투여되어야 한다. 기타 실시양태에서, 상이한 MEC 혈장 수준은 상이한 시간의 양 동안 유지될 것이다. 국소 투여 또는 선택적 흡수의 경우, 약물의 유효 국소 농도는 혈장 농도와 관련되지 않을 수 있다.

[0193] 당업계의 숙련가는 각종 투여 레짐으로부터 선택할 수 있고, 투여된 EZH2 길항제의 양은 물론 피치료 대상, 대상의 체중, 고통의 심각도, 투여 방식 및 처방 주치의의 판단에 의존할 것이다.

[0194] **화합물 및 약학적 조성물**

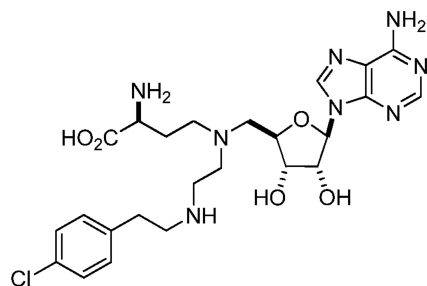
[0195] 본 발명의 측면은 본 발명의 방법에 따라 유용한 화합물에 관한 것이다. 이 화합물은 본원에서 "EZH2의 억제제" 및 이와 균등하게는 "EZH2 길항제"로 칭해진다. 상기 화합물은 화합물 그 자체, 화합물의 약학적으로 허용되는 염, 또는 약학적 조성물로서 제공될 수 있다.

[0196] 그러한 화합물은 구체적으로 화합물 75:



[0198] 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0199] 본 발명은 또한 화합물 75:



(75)

[0200] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.

[0201]

[0202] EZH2 길항제 및 임의적으로 기타 치료제는 그 자체로(순수) 또는 약학적으로 허용되는 염의 형태로 투여될 수 있다. 약에 사용될 때, 염은 약학적으로 허용가능하여야 하나, 약학적으로 허용가능하지 않은 염은 이의 약학적으로 허용되는 염을 제조하는 데 편리하게 사용될 수 있다.

[0203] 본 발명에 따라 유용한 화합물은 약학적으로 상용적인 짝이온을 가지는 염(즉, 약학적으로 허용되는 염)으로서 제공될 수 있다. "약학적으로 허용되는 염"은 수령인에게 투여 시에 화합물 또는 본 발명에 따라 유용한 화합물의 프로드러그를 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 임의의 비독성 염을 의미한다. "약학적으로 허용되는 짝이온"은 대상에게 투여 시, 염으로부터 방출될 때 독성이 아닌 염의 이온 부분이다. 약학적으로 상용적인 염은 염산, 황산, 아세트산, 락트산, 타르타르산, 말산 및 숙신산을 포함하나 이들에 국한되지 않는 많은 산들로 형성될 수 있다. 염은 물 또는 그 염의 상응하는 유리 염기 형태 외의 다른 프로틱 용매 중에 더 용해성이 큰 경향이 있다. 본 발명은 그러한 염의 사용을 포함한다.

[0204] 약학적으로 허용되는 산 부가 염에는 염산 및 브롬화수소산과 같은 무기 산으로 형성된 염, 및 말산과 같은 유기산으로 형성된 염이 포함된다. 예를 들어, 약학적으로 허용되는 염을 형성하는 데 통상 이용되는 산에는 이황화수소, 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산 및 인산과 같은 무기 산, 및 파라-톨루엔술포산, 살리실산, 타르타르산, 비타르타르산, 아스코르브산, 말레산, 베실산, 푸마르산, 글루콘산, 글루코론산, 포름산, 글루탐산, 메탄술포산, 에탄술포산, 벤젠술포산, 락트산, 옥살산, 파라-브로모페닐술포산, 카르본산, 숙신산, 시트르산, 벤조산 및 아세트산과 같은 유기산, 및 관련 무기 및 유기 산이 포함된다. 이에 따라 그러한 약학적으로 허용되는 염에는 황산염, 피로황산염, 이황산염, 아황산염, 이아황산염, 인산염, 일수소인산염, 이수소인산염, 메타인산염, 피로인산염, 염화물, 브롬화물, 요오드화물, 아세트산염, 프로피온산염, 테칸산염, 카프틸산염, 아크릴산염, 포름산염, 이소부티르산염, 카프르산염, 헵탄산염, 프로피온산염, 옥살산염, 말론산염, 숙신산염, 수베르산염, 세박산염, 푸마르산염, 말레산염, 부틴-1,4-디오산염, 헥신-1,6-디오산염, 벤조산염, 클로로벤조산염, 메틸벤조산염, 디니트로벤조산염, 하이드록시벤조산염, 메톡시벤조산염, 프탈산염, 테레프탈산염, 술포산염, 자일렌술포산염, 페닐아세트산염, 페닐프로피온산염, 페닐부티르산염, 시트르산염, 락트산염, β-하이드록시부티르산염, 글리콜산염, 말레산염, 타르타르산염, 메탄술포산염, 프로판술포산염, 나프탈렌-1-술포산염, 나프탈렌-2-술포산염, 만텔산염 등이 포함된다.

[0205] 산성 작용기를 가지는 약학적으로 허용되는 염을 형성하는 데 유용한 적당한 염기에는 나트륨, 칼륨 및 리튬과 같은 알칼리 금속의 수산화물; 칼슘 및 마그네슘과 같은 알칼리 토금속의 수산화물; 알루미늄 및 아연과 같은 기타 금속의 수산화물; 암모니아 및 유기 아민, 예컨대 비치환 또는 하이드록시-치환 모노-, 디-, 또는 트리알킬아민; 디시클로헥실아민; 트리부틸 아민; 피리딘; N-메틸, N-에틸아민; 디에틸아민; 트리에틸아민; 모노-, 비스-, 또는 트리스-(2-하이드록시-저급 알킬 아민), 예컨대 모노-, 비스-, 또는 트리스-(2-하이드록시에틸)아민, 2-하이드록시-tert-부틸아민, 또는 트리스-(하이드록시메틸)메틸아민, N,N-디알킬-N-(하이드록시 알킬)-아민, 예컨대 N,N-디메틸-N-(2-하이드록시에틸)아민, 또는 트리-(2-하이드록시에틸)아민; N-메틸-D-글루카민; 및 아르기닌, 리신 등과 같은 아미노산이 포함되나, 이에 국한되지 않는다.

[0206] 본 발명에 따라 유용한 특정 화합물 및 이의 염은 하나 초과와 결정형(즉, 다형)으로 존재할 수 있고; 본 발명은 각각의 결정형 및 이의 혼합물의 사용을 포함한다.

[0207] 본 발명에 따라 유용한 특정 화합물은 하나 이상의 키랄 중심을 포함할 수 있고, 상이한 광학 활성 형태로 존재할 수 있다. 본 발명에 따라 유용한 화합물이 하나의 키랄 중심을 포함할 때, 그 화합물은 2개의 거울이성질체 형태로 존재하고, 본 발명은 거울이성질체 및 거울이성질체들의 혼합물, 예컨대 라세미 혼합물 모두의 사용을

포함한다. 거울이성질체는 당업계의 숙련자에게 공지된 방법에 의해 분리될 수 있고; 예를 들어, 거울이성질체는 예를 들어 결정화에 의해 분리될 수 있는 부분입체이성질체의 형성; 예를 들어 결정화, 기체-액체 또는 액체 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있는 부분입체이성질체 유도체 또는 복합체의 형성; 예를 들어 효소 에스테르화를 통한, 한 거울이성질체의 거울이성질체 특이적 시약과의 선택적 반응; 또는 키랄 환경에서, 예를 들어 키랄 지지체(예를 들어, 결합된 키랄 리간드를 가지는 실리카) 상 또는 키랄 용매의 존재 하에서의 기체-액체 또는 액체 크로마토그래피에 의해 분석될 수 있다. 요망되는 거울이성질체가 상술된 분리 절차들 중 하나에 의해 또 다른 화학 실체로 전환되는 경우, 요망되는 정제된 거울이성질체를 방출하기 위해 다른 한 단계가 사용될 수 있다. 대안적으로, 특정 거울이성질체는 광학 활성 시약, 기질, 촉매 또는 용매를 이용한 비대칭 합성에 의해, 또는 비대칭 변형에 의해 한 거울이성질체를 다른 한 거울이성질체로 전환시킴으로써 합성될 수 있다.

[0208] 본 발명에 따라 유용한 화합물이 하나 초과와 키랄 중심을 포함할 때, 그것은 부분입체이성질체 형태로 존재할 수 있다. 부분입체이성질체 화합물은 당업계의 숙련자에게 공지된 방법(예를 들어, 크로마토그래피 또는 결정화)에 의해 분리될 수 있고, 개별 거울이성질체는 상술된 바와 같이 분리될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명에 따라 유용한 화합물의 각종 부분입체이성질체 및 이들의 혼합물의 사용을 포함한다. 본 발명에 따라 유용한 화합물은 상이한 호변이성질체 형태로 또는 상이한 기하학적 이성질체로 존재할 수 있고, 본 발명은 본 발명에 따라 유용한 화합물의 각 호변이성질체 및 이들의 혼합물의 사용을 포함한다. 본 발명에 따라 유용한 화합물은 쓰비티이온 형태로 존재할 수 있다. 본 발명은 본 발명에 따라 유용한 화합물의 각 쓰비티이온 형태 및 이들의 혼합물의 사용을 포함한다.

[0209] **키트**

[0210] EZH2 길항제는 요망될 경우, EZH2 길항제를 함유하는 하나 이상의 단위 투약 형태를 포함할 수 있는 키트(예를 들어, 팩 또는 디스펜서 장치) 내에 제공될 수 있다. 상기 팩은 예를 들어 블리스터 팩과 같이, 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치는 투여에 대한 설명서를 동반할 수 있다. 상용적 약학적 담체 내에 제제화된 본 발명의 EZH2 길항제를 포함하는 조성물이 또한 제조되어, 적절한 용기에 배치되며, 표시된 상태의 치료에 대해 표지될 수 있다. 사용에 대한 설명서가 또한 제공될 수도 있다.

[0211] 또한, 메틸화된 H3-K27을 검출하는 복수개의 메틸화 검출 시약을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 예를 들어, 상기 키트는 모노메틸화된 H3-K27, 디메틸화된 H3-K27 및 트리메틸화된 H3-K27 검출 시약을 포함한다. 검출 시약은 예를 들어 항체 또는 이의 단편, 폴리펩티드 또는 압타머이다. 키트는 무엇보다 분리된 용기에 압타머 또는 항체, 대조 제제(양성 및/또는 음성), 및/또는 검출가능한 표지, 예컨대 플루오레신, 녹색 형광 단백질, 로다민, 시아닌 염료, 알렉사 염료, 루시퍼라제, 방사능표지를 포함할 수 있다. 검정 수행을 위한 설명서(예를 들어, 기입된 형태, 테이프, VCR, CD-ROM 등)이 키트에 포함될 수 있다. 검정은 예를 들어 당업계에 공지된 바와 같은 웨스턴 블롯 분석, 면역조직화학법(IHC), 면역형광법(IF) 및 질량분석법(MS) 형태의 것일 수 있다.

[0212] **정의**

[0213] 편의상, 명세서, 실시예 및 첨부된 특허청구범위에 이용된 구체적 용어들이 여기에 집결되어 있다. 본원에 정의되고 사용되어진 모든 정의들은 사전적 정의, 참조로 인용된 문헌 내의 정의, 및/또는 정의된 용어의 일반 의미를 대체한다.

[0214] 단수 형태(영어 관사 "a" 및 "an"에 해당)는 관사의 문법상의 목적어 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.

[0215] 명세서 및 청구범위에 있어 본원에 사용되는 "및/또는"이란 어구는 이와 같이 연결된 요소들 중 "어느 하나 또는 양자 모두", 즉 일부의 경우에는 결합되어 존재하거나 다른 경우에는 해체되어 존재하는 요소를 의미하는 것으로 이해하여야 한다. "및/또는"으로 연결된 다중 요소도 동일한 방식으로 간주되어야 하며, 즉 요소들 중 "하나 이상"이 그와 같이 결합된 것이다. 다른 요소는 구체적으로 규명된 요소들과의 관련 여부와 상관없이 "및/또는"에 의해 구체적으로 규명된 요소 외에 임의적으로 존재할 수 있다. 따라서, 비제한적 예로서, "A 및/또는 B"란 "~을 포함하는"과 같은 한도가 없는 문구와 함께 사용될 때, 예를 들어 한 실시양태에서는 A만(B 외의 요소를 임의적으로 포함함); 또 다른 실시양태에서는 B만(A 외의 요소를 임의적으로 포함함); 또 다른 실시양태에서는 A 및 B 모두(임의적으로 기타 요소를 포함함); 등을 나타낸다.

[0216] 명세서 및 청구범위에 있어 본원에 사용되는 "또는"이란 상기 정의된 바와 같은 "및/또는"과 동일한 의미를 가지는 것으로 이해하도록 한다. 예를 들어, 목록에서 항목들을 분리할 때, "또는" 또는 "및/또는"은 포함적인 것으로 해석되어야 것이고, 즉 다수 또는 목록의 요소들 및 임의적으로는 열거되지 항목들 중 하나 이상, 또한 하

나 초과를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 그와 명백히 반대되는 단지라는 용어들, 예컨대 "∼ 중 단지 하나" 또는 "∼ 중 정확히 하나", 또는 청구범위에 사용될 때, "∼로 구성되는"은 다수 또는 목록의 요소들 중 정확히 하나의 요소만을 포함함을 의미한다. 일반적으로, 본원에 사용되는 "또는"이란 용어는, 배타적 용어, 예컨대 "어느 하나", "∼ 중 하나", "∼ 중 단지 하나" 또는 "∼ 중 정확히 하나"가 선행될 때 단지 배타적 택일(즉, "하나 또는 다른 하나, 단 양자 모두는 아님")을 나타내는 것으로 해석되어야 한다. "∼로 본질적으로 이루어진"은 청구범위에 사용될 때, 특허법 분야에 사용되는 통상의 의미를 가져야 한다.

[0217] 명세서 및 청구범위에 있어 본원에 사용되는, 하나 이상의 요소들의 목록과 관련한 "하나 이상"이란 어구는 요소들의 목록 내 요소들 중 임의의 하나 이상으로부터 선택되는 하나 이상의 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 하나, 반드시 요소들의 목록 내에 구체적으로 열거된 각 모든 요소들 중 하나 이상을 반드시 포함하는 것은 아니며, 다만 요소들의 목록 내 요소들의 어떠한 조합도 배제하지 않는다. 이 정의는 또한 "하나 이상"이라는 어구가 구체적으로 명시된 상기 요소들과의 관련 여부와 상관없이 지칭하는 요소들의 목록 내에 구체적으로 명시된 요소들 외의 요소도 임의적으로 존재할 수 있게 한다. 따라서, 비제한적 예로서, "A 및 B 중 하나 이상" (또는 이와 균등하게, "A 또는 B 중 하나 이상" 또는 이와 균등하게 "A 및/또는 B 중 하나 이상")은, 한 실시양태에서, 임의적으로는 하나 초과를 포함하는 하나 이상의 A를 포함하나 B는 존재하지 않음(또한 임의적으로 B 외의 요소를 포함함); 또 다른 실시양태는 임의적으로는 하나 초과를 포함하는 하나 이상의 B를 포함하나 A는 존재하지 않음(또한 임의적으로 A 외의 요소를 포함함); 또 다른 실시양태에서, 임의적으로는 하나 초과를 포함하는 하나 이상의 A를 포함하고 임의적으로는 하나 초과를 포함하는 하나 이상의 B를 포함함(또한 임의적으로 기타 요소를 포함함); 등을 지칭할 수 있다.

[0218] 또한, 반대로 명백히 표시되지 않는 한, 하나 초과와 단계 또는 행동을 포함하는 본원에 청구된 임의의 방법에서는, 그 방법의 단계 또는 행동의 순서가 그 방법의 단계 또는 행동이 인용되어진 순서에 반드시 제한되는 것은 아님을 이해하여야 한다.

[0219] 상기 청구범위 및 명세서에서, "∼을 포함하는", "∼을 내포하는", "∼을 지니는", "∼을 가지는", "∼을 함유하는", "∼을 수반하는", "∼을 보유하는", "∼로 된" 등과 같은 모든 이행 어구는 한계가 개방된 것으로, 즉 포함하되 그 요소들로 국한되지 않는 것으로 이해하도록 한다. 다만 "∼로 이루어진" 및 "∼로 본질적으로 이루어진"은 미국 특허청 특허심사절차 매뉴얼 섹션 2111.03에 나와 있는 바와 같이, 각기 한계가 닫혀 있거나 반정도 닫혀 있는 것으로 이해하도록 한다.

[0220] "공동 투여" 및 "공동 투여하는"이란 어구는 치료제가 동시에 어느 정도로 환자 내에 존재하는 한, 동시 투여(2종 또는 그 이상의 치료제를 동시에 투여함) 및 시간 변동 투여(하나 이상의 치료제를 부가적 치료제(들)의 투여 시간과 상이한 시간에 투여함) 모두를 지칭한다.

[0221] 본원에 사용되는 "치료하는 것"이란 용어는 질환, 장애 또는 상태의 하나 이상의 증상을 경감시키는 것을 지칭한다. 상기 용어는 상태의 관리 또는 치유를 목적으로, 대상에게 본원에 기재된 하나 이상의 화합물을 투여 및/또는 적용하는 것을 포괄한다. 본 개시내용의 목적을 위한 "치료"는 반드시는 아니나, 치유를 제공할 수 있고; "치료"는 상태의 관리의 형태의 것일 수 있다. 본원에 기재된 화합물을 사용하여 암을 포함하는 원치 않는 증식 세포를 치료하는 데 사용될 때, "치료"는 정상 세포에 대해서는 최소 파괴 효과를 가지면서 원치 않는 증식 세포의 부분 또는 전체 파괴를 포함한다. 세포내 수준에서의 암 세포를 포함한, 원치 않는 급속 증식 세포의 요망되는 치료 기작은 아포토시스이다.

[0222] 본원에 사용되는 "∼을 예방하는 것"이란 용어는 임상적으로 명백한 질환 진행의 개시를 함께 예방하거나 저속화하는 것, 또는 위험에 처한 개체의 질환의 임상전 명백한 단계의 개시를 예방 또는 저속화하는 것을 포함한다. 이는 질환이 발달할 위험에 처한 자들의 예방적 치료도 포함한다.

[0223] 치료 목적으로 본원에 사용되는 "대상"이란 용어는 장애로 진단되었거나, 장애의 증상을 가지고 있거나, 장애가 발달될 위험에 처한 임의의 인간 대상을 포함한다. 대상의 예방 방법에 있어, 대상은 임의의 인간 대상이다. 예방의 목적으로 예시하자면, 대상은 암과 같은, 원치 않는 급속 세포 증식을 특징으로 하는 장애를 얻을 위험에 처해 있거나 그러한 장애를 가질 유전학적 편향을 가지는 인간 대상일 수 있다. 그 대상은 원치 않는 급속 세포 증식 등을 특징으로 하는 장애에 유전학적 편향을 가져, 발암성 제제에의 노출로 인해 위험에 처할 수 있다.

[0224] 달리 표시되는 경우를 제외하고는, 재조합 및 합성 폴리펩티드, 융합 단백질, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 핵산 서열의 조작, 형질전환 세포의 생성 등을 위해 표준 방법이 사용될 수 있다. 그러한 기법은 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed.

(Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)]; 문헌[F.M. Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York)]을 참조한다.

- [0225] "EZH2 폴리펩티드"란 용어는 기능적 단편 및 기능적 균등물이 네이티브 폴리펩티드의 기능적 성질들 중 하나 이상을 보유할 경우, 실질적으로 유사하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열(적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 98% 또는 그 이상의 아미노산 서열 유사성 또는 실체)을 가지는 상기 것들의 전장 폴리펩티드의 기능적 단편 및 이의 기능적 동등물을 포괄한다.
- [0226] "기능적"이란, 폴리펩티드 (또는 핵산)가 네이티브 폴리펩티드 (또는 핵산)의 생물학적 성질들 중 하나 이상에 대해 동일하거나 실질적으로 유사한 활성(예를 들어, 네이티브 폴리펩티드 (또는 핵산)의 활성의 적어도 약 50%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 또는 그 이상)을 가짐을 의미한다.
- [0227] "조절하다"(및 이의 문법적 균등어)라는 용어는 활성을 증가시키거나 감소시키는 것을 지칭한다. 특정 실시양태에서, "증가시키다" 또는 "증진시키다" (및 이의 문법적 균등어)이라는 용어는 적어도 약 25%, 50%, 75%, 2배, 3배, 5배, 10배, 15배, 20배 또는 그 이상이 상승함을 의미한다. 특정 실시양태에서, "감소" 또는 "감축"(및 이의 문법적 균등어)이라는 용어는 적어도 약 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 그 이상의 감소를 의미한다. 일부 실시양태에서, 표시된 활성, 물질 또는 기타 매개변수는 검출가능하지 않다. 구체적으로 EZH2의 길항제가 제공된다.
- [0228] "약역학 마커"란 용어는 약물을 수령한 환자에서 측정될 수 있는 약물 반응의 분자 마커를 지칭한다. 상기 마커는 약물 표적의 조절의 직접적 척도이어야 하고, 용량에 대한 반응의 정량적 변화를 보여줄 수 있어야 한다. EZH2 길항제에 대한 잠재적 약역학 마커는 질환 또는 대리 조직에서의 히스톤 H3-K27 메틸화의 수준일 수 있다.
- [0229] 본원에 사용되는 "반응성"이란 용어는 "반응성인", "민감한", 및 "감도"라는 용어들과 혼용가능하고, 이는 EZH 억제제의 투여 시에 치료 반응을 보이는 대상, 예를 들어 대상의 종양 세포 또는 종양 조직이 아포토시스 및/또는 괴사를 겪고/겪거나, 감소된 성장, 분할 또는 증식을 표시함을 의미한다.
- [0230] "대조" 또는 "기준"이란 용어는 대상으로부터의 단리된 인접 비종양 조직에서 검출되거나, 건강한 대상으로부터의 건강한 조직 내에 검출되거나, 또는 당업계의 표준 방법을 이용하여 병리학자에 의해 확립된 메틸화 수준(예를 들어, 모노메틸화 수준, 디메틸화 수준 또는 트리메틸화 수준)을 지칭한다.
- [0231] "샘플"이란 대상으로부터 유래된 임의의 생물학적 샘플을 의미하고, 이에선 세포, 조직, 샘플 및 체액(점액, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 침 및 정액이 포함되나 이들에 국한되지 않음)이 포함되나 이들에 국한되지 않는다.
- [0232] **실시예**
- [0233] 이제 본 발명이 일반적으로 기술되나, 본 발명은 단지 본 발명의 특정 측면 및 실시양태를 예시하기 위한 목적으로 포함되고 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는 하기 실시예를 참조로 하여 더욱 명백히 이해될 것이다.
- [0234] **실시예 1 - 재조합 5-성분 PRC2 복합체**
- [0235] 야생형 EZH2(유전자은행 등록 번호 제NM_004456호) 또는 Tyr641 돌연변이체를 바콜로바이러스 발현 시스템을 이용하여 *스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)*(Sf9) 세포에서, 야생형 AEBP2(유전자은행 등록 번호 제NM_153207호), EED(유전자은행 등록 번호 제NM_003797호), SUZ12(유전자은행 등록 번호 제NM_015355호) 및 RbAp48(유전자은행 등록 번호 제NM_005610호)과 함께 공동 발현시켰다. EED 상의 N-말단 FLAG 태그를 사용하여, 세포 용해물(BPS 바이오사이언스(BPS Bioscience), 카탈로그 번호 제51004호)로부터 활성 PRC2 복합체를 정제하였다. 쿠마씨(Coomassie) 청색 염색을 이용한 SDS-PAGE에 의해 최종 PRC2 제제의 순도를 평가하였다.
- [0236] **실시예 2 - H3, H4 펩티드 패널**
- [0237] 21st 세기 바이오케미칼즈(21st Century Biochemicals)(미국 메사추세츠주 말보로 소재)에 의해 각기 15개 아미노산의 44개 펩티드로 구성된 라이브러리를 합성하였다. 이 펩티드 패널은 구성 펩티드 서열들 간에 5개 잔기 중첩을 가지는 인간 히스톤 H3 및 H4의 아미노산 모두를 포괄하였다. 각 펩티드의 N-말단에 비오틴을 첨부하고, C-말단을 아마이드로 나타냈다. 순도(>95%) 및 실체를 액체 크로마토그래피/질량 분광 분석에 의해 확인하였다.
- [0238] 효소 활성의 H3-K27 메틸화 상태 의존성의 연구를 위해, 비변형, 모노메틸화, 디메틸화 또는 트리메틸화된 추출 아민으로서 나타낸 리신 27을 가지는 잔기 21-44(H3:21-44)로부터의 인간 H3의 아미노산 서열을 나타내는 펩티드를 합성하였다. 이 펩티드들은 뉴 잉글랜드 펩티드(New England Peptide)(미국 메사추세츠주 가드너 소재)로

부터 구매하였고, 거기에서 비오틴은 각 펩티드의 C-말단에 첨부되어 있다.

[0239] 실시예 3 - 세포 내 H3-K27 메틸화 상태의 평가

[0240] 세포주 OCI-LY19(ACC 528), KARPAS-422(ACC 32), 및 WSU-DLCL2(ACC 575)를 DSMZ로부터 입수하였다. 세포주 DB(CRL-2289) 및 SU-DHL2(CRL-2959)를 ATCC로부터 입수하였다. OCI-LY19, WSU-DLCL2, 및 DB 세포주를 10% FBS를 가지는 RPMI-1640 중에 성장시켰고, KARPAS-422 및 SU-DHL2 세포주를 20% FBS로 보충된 RPMI-1640 중에 성장시켰다. 세포를 $1.5-2 \times 10^6$ 세포/mL의 밀도까지 성장시켰고, $264 \times g$ 에서의 원심분리에 의해 1×10^7 개의 세포를 회수하였으며, 빙냉 PBS로 세정하고, 0.1% SDS 및 프로테아제 억제제 정제(로쉐(Roche) # 1836153)로 보충되고 50 mM 트리스-HCl, 150 mM NaCl, 0.25% DOC, 1% NP-40, 및 1 mM EDTA(밀리포어(Millipore) #20-188)를 함유하는 $10 \times$ 펠렛 체적의 RIPA 세포용해 완충액 중에 재현탁시킴으로써 세포용해시켰다. 세포용해물을 미소닉스(Misonix) XL-2000을 이용한 셋팅 3에서 2회의 101-초 버스트에 의해 초음파처리함으로써 효율적 히스톤 추출을 확실히 하였고, 10분 동안 14,000 rpm에서의 벤치 탑 원심분리를 이용하여 4°C에서 원심분리함으로써 소거하였다. BCA 검정(피어스(Pierce))에 의해 단백질 농도를 구하였다. 4 μg 의 각 세포용해물을 4 내지 20% 트리스-글리신 겔(인비트로젠(Invitrogen)) 상에서 분별하고, PVDF로 보내어, 오디세이(Odyssey) 블록 완충액 중에 하기 항체로 프로빙하였다: 마우스 항-EZH2(CST 3147; 1:2000 희석), 토끼 항-H3-K27me3(CST 9733; 1:10000 희석), 토끼 항-H3-K27me2(CST 9755; 1:5000 희석), 토끼 항-H3-K27me1(활성 모티프 39377; 1:5000 희석), 및 마우스 항-총 H3(CST 3638; 1:20000 희석). 원발성 항체의 인큐베이션 후에, 막을 IRDye 800CW 당나귀-항-마우스 IgG(LiCOR #926-32212) 또는 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 680 염소-항-토끼 IgG(인비트로젠 #A-21076) 2차 항체로 프로빙하고, 리코르(LiCOR) 오딧세이 시스템을 이용하여 촬영하였다.

[0241] 실시예 4 - 효소학

[0242] 상기 주목된 바와 같이, Tyr641에서의 질환 연관 변화는 EZH2 촉매작용 H3-K27 메틸화에 대한 기능이 상실되도록 하였음이 과거 결론내려졌다. 그러나, 효소 이형 접합성으로 인한 H3-K27 메틸화 속도의 추정상의 감소는, 특히 H3-K27 트리메틸화의 증가와 연관된, EZH2의 과발현, 상응하는 H3-K27 디메틸라제 UTX에서의 기능 상실 돌연변이, 또는 PRC2의 성분, 예컨대 PHF19/PCL3의 과발현이 모두 특정 인간 암에서의 악성 표현형을 초래함을 나타내는 과거 데이터를 비추어 볼 때, 악성 표현형에 대한 기초로서 합리화하는 것이 어려웠다. 문헌[Morin et al. (2010) *Nat Genet* 42: 181-5]; 문헌[Martinez-Garcia et al. (2010) *Nat Genet* 42:100-1]; 문헌[Bracken et al. (2003) *EMBO J* 22:5323-35]; 문헌[Kleer et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11606-11]; 문헌[Varambally et al. (2002) *Nature* 419:624-9]; 문헌[Simon et al. (2008) *Mutat Res* 647:21-9]; 문헌[van Haaften et al. (2009) *Nat Genet* 41:521-3]; 문헌[Wang et al. (2004) *Gene* 343:69-78]; 문헌[Cao et al. (2008) *Mol Cell Biol* 28: 1862-72]; 및 문헌[Sarma et al. (2008) *Mol Cell Biol* 28:2718-31]. 그러므로, 이들 돌연변이의 효소학은 보다 상세히 탐색되었다.

[0243] 인간 EZH2의 WT 및 Tyr641 돌연변이체 버전을 이용하여 재조합 PRC2 복합체를 제조하였다(상기 실시예 1; 문헌[Cao et al. (2004) *Mol Cell* 15:57-67] 참조). 동등한 농도(단백질 결정에 기초하여 명목상 8 nM)의 각 복합체를 먼저 표지된 S-아데노실 메티오닌(SAM)에서 H3-K27(H3:21-44)를 둘러싸는 아미노산 서열을 나타내는 비변형 펩티드 또는 네이티브 조류 적혈구 올리고뉴클레옴으로의 3H -메틸 전달을 촉진하는 능력에 대해 시험하였다. 과거 보고된 바와 같이(문헌[Morin et al. (2010) *Nat Genet* 42: 181-5]), WT 효소는 이 비메틸화된 펩티드성 기질의 메틸 전달을 위한 강한 활성을 나타냈으나, 돌연변이체 효소들 중 어느 것도 유의적 메틸트랜스퍼라제 활성을 나타냈지 않았음(도 1A)이 밝혀졌다. 과거 보고된 데이터 및 도 1A에서의 데이터와 대조적으로, 모든 돌연변이체 EZH2 구축물이 조류 뉴클레옴 기질에 대한 활성 메틸트랜스퍼라제임이 밝혀졌다(도 1B). 조류 천연 출처로부터 단리된 뉴클레옴은, H3-K27 메틸화 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 판단 시에 H3-K27 메틸화의 각종 상태를 포함한, 히스톤 변형 상태들의 혼합을 나타낸다.

[0244] 펩티드 및 뉴클레옴 기질에 대한 돌연변이체 PRC2 복합체의 부조화 활성에 대한 수가지 가능한 설명들이 있다. 한 가능성은, 효소 활성 부위(즉, 엑소사이트)에 대해 원위에 있는 기질 인식 부위가 기질 결합 및 반전에 대한 중요한 결정자이고; 이 부위는 소형 펩티드성 기질에 대해 이용가능하지 않은 뉴클레옴에 상보적 인식 요소를 결부시키게 된다는 것이다. 그러나, *E. 콜라이(E. coli)*-발현 재조합 인간 히스톤 H3을 WT 및 돌연변이체 PRC2 복합체에 대한 기질로서 시험하였을 때, 얻어진 활성 패턴이 펩티드 기질에 대해 보여지는 것과 동일하였고; 즉, WT 효소가 H3 기질에 대한 강한 메틸트랜스퍼라제 활성을 나타냈고, Y641F 돌연변이체는 WT 복합체의 활성에 대해 7%를 나타냈고, 모든 다른 돌연변이체는 WT 복합체의 활성의 $\leq 1\%$ 를 나타냈다. 이에 따라, 엑소사이트 결부는 현 결과에 대한 가능성이 별로 없는 설명인 것으로 보인다. 뉴클레옴은 소형 펩티드성 기질 내

에 존재하지 않을 메틸화의 잠재적 부위로서 H3-K27 외의 많은 리신 잔기들을 제시한다. 따라서, 또 다른 가능성은 Y641의 돌연변이가 H3-K27 외의 리신 잔기의 메틸화를 초래하도록 하는 EZH2의 기질 특이성을 변경시킨다는 것이다. 이 가능성은 소형 펩티드 및 재조합 H3 단백질 기질에 대한 돌연변이체 활성 간의 우수한 일치성이 있을 경우에는 가능성이 별로 없다.

[0245] 본 결과와 과거 보고된 결과 간의 명백한 부조화는, WT 및 돌연변이체 PRC2 복합체의 효소 활성을 히스톤 H3 및 히스톤 H4의 모든 가능한 리신(K) 잔기들을 나타내는 펩티드성 기질의 패널에 대해 시험하였을 때 해결되었다 (상기 실시예 2 참조). 모든 효소 형태들은 잔기 H3-K27의 균등물을 함유하는 펩티드에 대해서만 유의적인 활성을 나타냈다. 그러나, 돌연변이체의 특이적 활성은 WT>>Y641F>Y641S~Y641H>Y641N의 순으로 WT에 대해 크게 감소하였고, 이 역시 과거 보고된 결과와 일관된다.

[0246] **실시예 5 - 효소학**

[0247] 이들 돌연변이체의 효소 활성을 추가로 이해하고, 펩티드성 및 뉴클레오솜 기질에 대한 활성들간의 명백한 불일치를 해소하기 위해, H3:21-44 펩티드와 관련한 각종 H3-K27 메틸화 상태도 또한 촉진하는 효소 형태의 능력을 연구하였다. 상기 언급된 바와 같이, 모든 돌연변이체 효소들이 WT 효소 대비, 비변형 H3-K27 펩티드 메틸화의 결합 촉매임이 밝혀졌다. 그러나, 놀랍게도, 모든 돌연변이체 효소들은 모노메틸화된 H3-K27 펩티드, 및 특히 디메틸화된 H3-K27 펩티드의 메틸화를 추가로 촉매함에 있어 WT 효소보다 우수한 것으로 나타났다(도 2). 따라서, 데이터는 비메틸화 반응 내지 모노메틸화 반응을 촉매함에 있어 가장 효율적임을 제시한다. 돌연변이체 효소는 이 초기 단계를 촉진하는 데에는 결합이 있으나, 모노메틸 내지 디메틸 및 트리메틸 H3-K27에서 이어지는 후속 단계를 촉매함에 있어서는 WT 효소보다 더 효율적이다.

[0248] WT 및 돌연변이체 EZH2의 차등적 기질 특이성의 기원을 정지 상태 효소 동역학을 통해 탐색하였다. 표 1에 요약되어 있는 바와 같이, 돌연변이는 뉴클레오솜에 대한 K_m 및 펩티드 기질에 대한 $K_{1/2}$ 의 유사 값들에 의해 입증되는 바와 같이, 기저 상태의 기질 인식에 대한 최소의 효과를 갖는다. 모든 경우들에서, 펩티드성 기질은 S자형 결합거동을 나타내고; 따라서 최대 속도의 반을 초래하는 펩티드의 농도는 본원에서 더욱 통상적인 미카엘리스(Michaelis) 상수 K_m 대신에 $K_{1/2}$ 로 보고된다. 문헌[Copeland (2005) *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists*, Wiley]. 마찬가지로 SAM K_m 는 208 ± 50 내지 304 ± 64 nM의 범위에서 효소 형태들 간의 최소 변동을 나타냈다. 그 대신, 기질 이용에 있어서의 차이는 각종 기질에 대한 효소들 간의 k_{cat} 값의 차이에 의해 입증되는 바와 같이, 전이 상태인식에 그 기원을 가지는 것으로 보인다(표 1). 결과적으로, 비 k_{cat}/K (여기서, K는 기질 실체에 따라, K_m 또는 $K_{1/2}$ 임)으로 정량화되는 촉매 효율은 상이한 H3-K27 메틸화 상태로 인해 WT 효소와 돌연변이체 효소 간에 변동된다(표 1).

표 1

[0249] EZH2의 야생형 또는 Y641 돌연변이체를 함유하는 PRC2에 의해 촉매되는 메틸화 반응에 대한 정지 상태 동역학 매개변수.

효소	기질 H3-K27 메틸화 상태	K (nM)	k_{cat} ($h^{-1} \times 10^{-2}$)	k_{cat}/K ($h^{-1} \cdot nM^{-1} \times 10^{-4}$)
WT	0	184 ± 10	84.0 ± 3.0	45.7 ± 3.0
	1	436 ± 42	65.4 ± 5.8	15.0 ± 2.0
	2	178 ± 16	6.0 ± 0.3	3.4 ± 0.3
	뉴클레오솜	141 ± 31	42.6 ± 2.6	30.2 ± 6.9
Y641F	0	240 ± 19	4.8 ± 0.3	2.0 ± 0.2
	1	404 ± 124	15.0 ± 4.3	3.7 ± 1.6
	2	191 ± 10	84.0 ± 2.8	44.0 ± 2.7
	뉴클레오솜	176 ± 19	65.4 ± 2.0	37.2 ± 4.2
Y641H	0	— ^a	—	—
	1	319 ± 57	28.2 ± 3.7	8.8 ± 2.0
	2	148 ± 9	22.8 ± 0.9	15.4 ± 1.1
	뉴클레오솜	140 ± 22	23.4 ± 1.0	16.7 ± 2.7

Y641N	0	-	-	-
	1	280 ± 11	23.4 ± 0.8	8.4 ± 0.4
	2	157 ± 11	96.0 ± 4.0	61.1 ± 5.0
	뉴클레오솜	191 ± 34	23.4 ± 1.3	12.3 ± 2.3
Y641S	0	-	-	-
	1	249 ± 8	27.6 ± 0.8	11.1 ± 0.5
	2	136 ± 8	59.4 ± 2.0	43.7 ± 3.0
	뉴클레오솜	137 ± 28	23.4 ± 1.4	17.1 ± 3.6

^a 활성이 매우 낮아 측정불가함.

실시예 6 - 효소학

표 1에 열거된 정지 상태 동역학 매개변수로 인해, WT 효소에 대한 동종성인 세포 대비, 각종 돌연변이체 EZH2 형태에 대해 이형성인 세포에 대해 상이한 H3-K27 메틸화 상태의 예상 수준을 계산할 수 있게 되었다. 이 모의를 수행하기 위해, 다수의 단순화 가정이 수립되었다: (1) 정지 상태 효소 동역학은 세포내 영역에 있어 PRC2-촉매 H3-K27 메틸화와 관련되었고, 모든 측정들은 세포 성장에 있어 동일 시점에서 행해지며; (2) 돌연변이체 및 WT 효소는 이형성 세포에서 동등한 수준으로 발현되고, 총 EZH2 수준이 모든 세포들에서 동일하며; (3) SAM의 세포내 농도는 그것의 K_m 대비, 포화이고, 세포들 간에 변화하지 않으며; (4) 뉴클레오솜의 세포내 농도는 그것의 K_m 과 유사하며, 마찬가지로 세포들 간에 변화하지 않고; (5) H3-K27의 EZH1 촉매작용 메틸화는 유의적이지 않고, 세포들 간에 일정하며; (6) 임의의 H3-K27 디메틸라제 활성도 또한 세포들 간에 일정하였다.

이들 가정 하에, 도 3A에 도시된 예측들이 H3-K27me3(상단 패널), H3-K27me2(중간 패널) 및 H3-K27me1(하단 패널)의 상대 수준에 대해 얻어졌다. 이 모의들에서 한 명료한 패턴이 나온다. H3-K27me3의 수준은 모든 돌연변이체 잠복 세포들에 대해 WT 세포 대비 증가하고, 그 범위는 Y641H 돌연변이체에 대해 30% 증가 내지 Y641N 돌연변이체에 대해 >400%이다. 이와 동시에, H3-K27me2의 수준은 모든 돌연변이체들에 대해 WT의 <50%로 감소되고, H3-K27me1의 수준은 WT 대비, 모든 돌연변이체들에 대해 대략 절반 감소된다.

이어서, WT EZH2(OCI-LY19)에 대해서는 동종성이고 EZH2 Y641N(DB, KARPAS 422, 및 SU-DHL-6) 또는 EZH2 Y641F(WSU-DLCL2)에 대해서는 이종성인 것으로 알려진 B-세포 림프종 세포주 내 H3-K27 메틸화 상태의 상대 수준을 웨스턴 블로팅에 의해 측정하였다(도 3B). 도 3b에 나와 있는 상대 H3-K27 메틸화 상태의 패턴은 모의에 사용된 가정 및 기질로서의 비생리학적 펩티드 대리의 사용에도 불구하고 시험관내 정지 상태 동역학 매개변수에 기초한 모의의 결과와 우수하게 일치한다.

따라서, WT 대비, 모든 Y641 돌연변이체 잠복 세포에 대해서는 증가된 H3-K27me3이 관찰되었고, WT 대비, 모든 Y641 돌연변이체 잠복 세포에 대해서는 감소된 H3-K27me2가 관찰되었으며, 4개의 돌연변이체 세포주들 중 2개 이상에 대해 감소된 H3-K27me1이 관찰되었다. WT 및 KARPAS 422 및 SU-DHL-6 세포 내 H3-K27me1의 거의 필적할 만한 수준은 WT 및 EZH2 돌연변이체의 상이한 발현 수준, EZH1의 상이한 기여, 또는 모의에서 설명되지 않는 기타 요인들을 반영할 수 있다. 그럼에도 불구하고, H3-K27 메틸화 상태의 예측된 패턴과 실험 패턴 상의 일치성이 주목할만하고, WT와 돌연변이체 EZH2 간의 효소 결합이 H3-K27me3 증가를 초래한다는 견해를 지지하며, 이는 따라서 상기 돌연변이체에 대해 이형성인 악성 표현형의 세포를 초래한다.

실시예 7 - PRC2 메틸트랜스퍼라제 활성의 시험관내 검정

펩티드 기질을 이용한 플래쉬플레이트 검정. WT 및 EZH2의 Y641 돌연변이체의 초기 비교를 위해, 800 nM의 농도로 비메틸화된 K27(뉴 잉글랜드 펩티드), 모노메틸화된 K27(밀리포어) 또는 디메틸화된 K27(밀리포어)를 함유하는 비오틴화된 히스톤 H3:21-44 펩티드를 1,700 nM의 S-아테노실메티오닌-C1(SAM) 및 300 nM 삼중수소화 SAM(퍼킨 엘머(Perkin Elmer))의 혼합물과 조합하였다. 이어서, 이 기질 조합물을 검정 완충액(20 mM BICINE, 1 mM DTT, 0.002% 트윈(Tween) 20, 0.005% 우피 젤라틴(BSG), pH 7.6) 중의 PRC2에 첨가하였다. 표시된 시간 간격 동안 반응이 진행되도록 한 후, 과량의 냉 SAM(600 μ M 최종 농도)의 첨가에 의해 켄칭하였다. 켄칭된 반응 혼합물을 스트랩타비딘으로 코팅된 플래쉬플레이트(퍼킨 엘머, 카탈로그 번호 제SMP410호)로 옮긴 후, 1시간 동안 결합시킨 후, 탑카운트(TopCount) NXT HTS 섬멸 및 발광 계수기(퍼킨 엘머)에서 검출하였다. 각 시점은 6개의 개별 반응들의 평균을 나타냈다. 다른 기질의 포화 조건 하에서, 펩티드 또는 SAM의 농도를 변동시킨 것을 제외하고는 동일한 반응 조건 하에서 정지 상태 동역학 매개변수를 구하였다. 속도를 변동되는 기질 농도의 함

수로서 플로팅하였고, 데이터를 비변형 버전의 미카엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 방정식 또는 비변형 버전의 S자형 동역학 방정식에 피팅하여, K 및 k_{cat} 의 값을 구하였다. 피팅된 매개변수의 표준오차를 표 1에 열거하고 이를 도 2 패널 B 및 C에 도시된 오차 막대를 제작하는 데 사용하였다. k_{cat}/K (표 1)와 연관된 오차를 오차 전파를 위한 표준 방법에 따라 계산하였고; k_{cat}/K 의 분수 오차를 하기와 같이 구하였다:

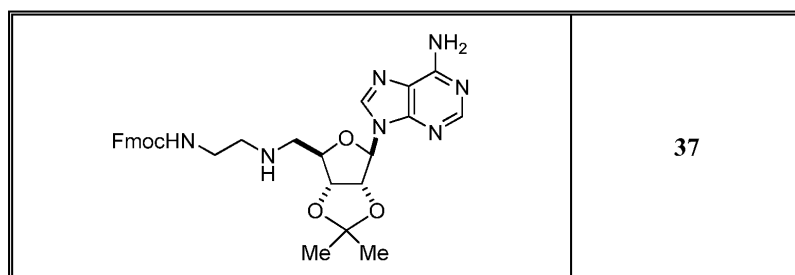
$$\mu \frac{k_{cat}}{K} = \sqrt{\left(\frac{\mu k_{cat}}{k_{cat}}\right)^2 + \left(\frac{\mu K}{K}\right)^2} \quad (1)$$

(식 중, μk_{cat} 는 k_{cat} 의 표준 오차이고, μK 는 K 의 표준 오차임).

올리고뉴클레오타이드를 이용한 필터플레이트 검정. 전술된 바와 같이 닭 적혈구 올리고뉴클레오타이드를 정제하였다. 문헌[Fang et al. (2004) *Methods Enzymol* 377:213-26]. 뉴클레오타이드를 SAM 및 삼중수소화 SAM의 혼합물과 조합하여, 검정 완충액(20 mM BICINE, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.002% 트윈 20, 0.005% BSG, pH 7.6) 내의 PRC2에 첨가하였다. 상기와 같이 반응을 수행하고 퀀칭하였다. 퀀칭된 반응 혼합물을 유리 섬유 필터플레이트(밀리포어, 카탈로그 번호 제MSFBN6B호)로 옮겨, 10% 삼염화아세트산으로 3회 세정하고, 건조시켰다. 마이크로싯 제로(Microscint Zero)(30 μ l)를 첨가하고, 탑카운트 섬멸 및 발광 계수기에서 삼중수소 도입을 검출하였다. 다른 기질의 포화 조건 하에서, 뉴클레오타이드 또는 SAM의 농도를 변동시킨 것을 제외하고는 동일한 반응 조건 하에서 정지 상태 매개변수를 구하였다. 속도를 변동되는 기질 농도의 함수로서 플로팅하였고, 데이터를 비변형 버전의 미카엘리스-멘텐 방정식에 피팅하여, 상술된 바와 같이 K_m 및 k_{cat} 의 값을 유도하였다.

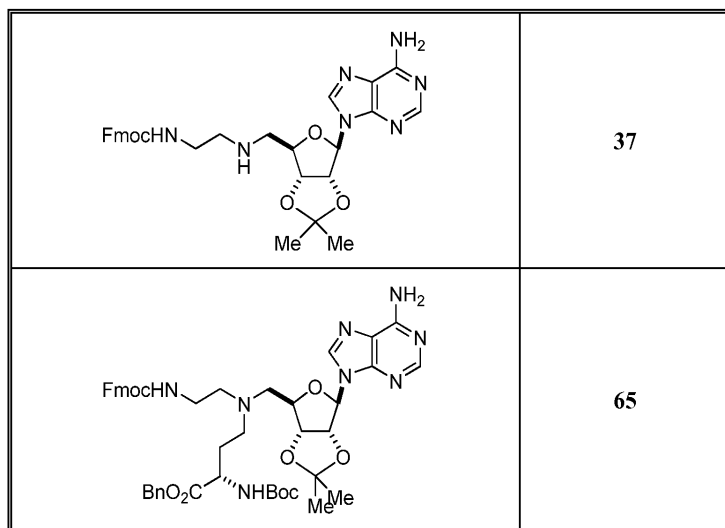
실시예 8 - 화합물 75의 제조

A. 화합물 37의 제조



DCE(250 mL) 중의 9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(아미노메틸)-2,2-디메틸테트라하이드로플루오로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)-9H-푸린-6-아민(문헌[Townsend, A. P. et al. (2009) *Org. Let.* 11:2976-2979])(3.05 g, 9.96 mmol)의 용액에 (9H-플루오렌-9-일)메틸(2-옥소에틸)카르바메이트(2.8 g, 9.96 mmol) 및 $\text{NaB(OAc)}_3\text{H}$ (2.96 g, 13.95 mmol)를 첨가하였고, 그 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. pH 8 내지 9가 되도록 K_2CO_3 용액을 첨가하였다. DCM을 첨가하였고, 유기층을 Na_2SO_4 로 건조시키고 농축시키며, SGC(DCM: MeOH = 30:1)에 의해 정제하여, 37(2.9 g, 수율: 50.9%)을 수득하였다.

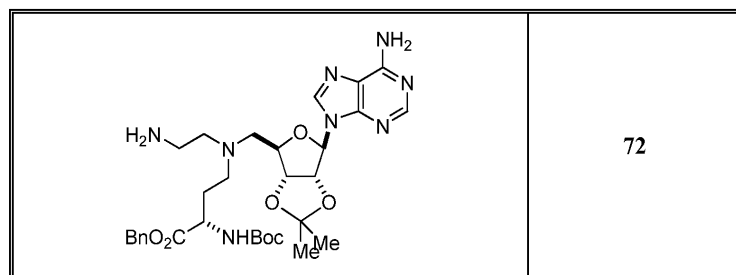
[0265] B. 화합물 65의 제조



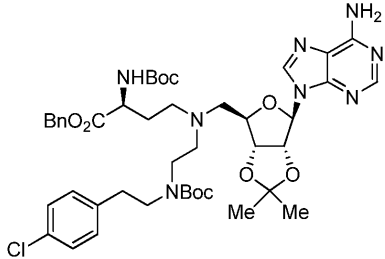
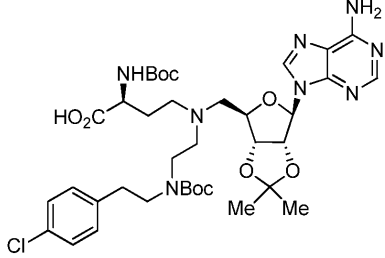
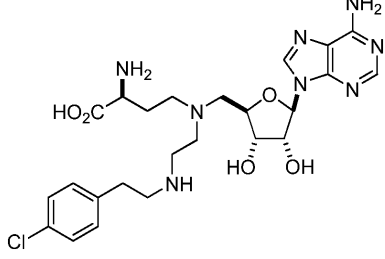
[0266]

[0267] DCE(250 mL) 중의 **37**(2.9 g, 5.08 mmol)의 용액에 (S)-벤질 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-4-옥소부타노에이트(1.56 g, 5.08 mmol) 및 NaB(OAc)₃H(1.51 g, 7.11 mmol)를 첨가하였고, 그 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. pH가 8 내지 9가 되도록 K₂CO₃ 용액을 첨가하였다. DCM을 첨가하였고, 유기층을 Na₂SO₄로 건조시키고, 농축시키며, SGC(DCM:MeOH = 100:1)에 의해 정제하여, **65**(2.8 g, 수율: 63.9%)을 수득하였다.

[0268] C. 화합물 75의 제조



[0269]

	73
	74
	75

[0270]

[0271]

단계 1. DCM(10 mL) 중의 **65B**(2.2 g, 2.55 mmol)의 용액에 Et₂NH(1.1 g, 15.3 mmol)을 첨가하였고, 그 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축하여, 조질의 **72**(2.2 g)을 수득하였다.

[0272]

단계 2. MeOH(4 mL) 중의 **72**(167 mg, 0.26 mmol)의 교반 용액에 2-(4-클로로페닐)아세트알데히드(40 mg, 0.26 mmol)를 첨가하여, 20분 동안 실온에서 교반하였다. 이어서, Na(OAc)₃BH(83 mg, 0.39 mmol) 및 HOAc(0.4 mL)를 첨가하고, 하룻밤 동안 교반하였다. 이어서, NaHCO₃(수성)를 첨가하여, DCM(25 mL×3)로 추출하며, 염수로 세정하고, Na₂SO₄로 건조시켜, 농축하였다. 조질의 생성물을 분취 TLC(DCM/MeOH = 10:1)에 의해 정제하여, **73**(30 mg, 수율: 14%)을 백색 분말로서 수득하였다. LC/MS(m/z): 779.7 [M+1]⁺.

[0273]

단계 3. MeOH(2 mL) 중의 **73**(30 mg, 0.038 mmol) 및 10% Pd/C(15 mg)의 혼합물을 하룻밤 동안 H₂ 하에서 실온에서 교반하였다. 그 혼합물을 여과하였고, 여과액을 농축하여 조질의 생성물을 수득하였다. 조질의 생성물을 분취 TLC(DCM/MeOH = 8:1)에 의해 정제하여, **74**(20 mg, 수율: 69%)를 백색 분말로서 제공하였다. LC/MS(m/z): 689.7 [M+1]⁺.

[0274]

단계 4. 90% TFA(1 mL) 중의 **74**(20 mg, 0.028 mmol)의 용액을 1시간 동안 실온에서 교반하였고, 고체로서 농축시켜 TFA를 제거함으로써, 화합물 **75**(TFA 염)를 정제하지 않고 무색 오일로서 수득하였다. LC/MS(m/z): 549.7 [M+1]⁺.

[0275]

실시예 9 - SAH에 의한 EZH2 야생형 및 Y641 돌연변이체의 억제

[0276]

S-아데노실-L-호모시스테인(SAH)을 10 점에 대해 DMSO 중에 3배로 일련 희석하였고, 1 μl을 384 웰 마이크로티터 플레이트에 플레이팅하였다. 양성 대조(100% 억제 표준)는 100 μM 최종 농도의 SAH였고, 음성 대조(0% 억제 표준)는 1 μl의 DMSO를 포함하였다. 이어서, pH 7.6의 검정 완충액(20 mM BICINE, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.002% 트윈(Tween) 20, 0.005% BSG) 중 8 nM의 EZH2 야생형 및 돌연변이체가 웰 당 40 μl가 되도록 하여, SAH를 30분 동안 인큐베이션하였다. pH 7.6의 검정 완충액 중에 150 nM의 S-아데노실메티오닌-C1(SAM), 100 nM의 삼중수소화 SAM, 및 150 nM의 비오틴닐화된 올리고뉴클레오타이드를 함유하는, 웰 당 10 μl의 기질 믹스를 첨가하였다. 퀀칭된 효소 반응을 스트렙타비딘으로 코팅된 플래쉬플레이트(퍼킨 엘머, 카탈로그 번호 제SMP410호)로 옮

기고, 1시간 동안 결합시키며, 탑카운트 NXT HTS(퍼킨 엘머)에서 검출하였다.

[0277] 결과가 도 7에 나와 있다. IC50 값이 표 2에 나와 있다.

표 2

[0278] SAH에 의한 WT EZH2 및 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제

	WT	Y641H	Y641S	Y641N	Y641F
IC50, μ M	0.467	0.263	0.283	0.380	4.80

[0279] 실시예 10 - 화합물 75에 의한 EZH2 야생형 및 Y641 돌연변이체의 억제

[0280] 화합물 75을 10 점에 대해 DMSO 중에 3배로 일련 희석하였고, 1 μ l을 384 웰 마이크로티터 플레이트에 플레이팅 하였다. 양성 대조(100% 억제 표준)는 100 μ M 최종 농도의 SAH였고, 음성 대조(0% 억제 표준)는 1 μ l의 DMSO를 포함하였다. 이어서, pH 7.6의 검정 완충액(20 mM BICINE, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.002% 트윈 20, 0.005% BSG) 중 8 nM의 EZH2 야생형 및 돌연변이체가 웰 당 40 μ l가 되도록 하여, 화합물 75를 30분 동안 인큐베이션하였다. pH 7.6의 검정 완충액 중에 150 nM의 S-아데노실메티오닌-C1(SAM), 100 nM의 삼중수소화 SAM, 및 150 nM의 비오틴화된 올리고뉴클레오타이드를 함유하는, 웰 당 10 μ l의 기질 믹스를 첨가하였다. 퀀팅된 효소 반응을 스트렙타비딘으로 코팅된 플래쉬플레이트(퍼킨 엘머, 카탈로그 번호 제SMP410호)로 옮기고, 1시간 동안 결합하도록 두며, 탑카운트 NXT HTS(퍼킨 엘머)에서 검출하였다.

[0281] 결과가 도 8에 나와 있다. IC50 값이 표 3에 나와 있다.

표 3

[0282] 화합물 75에 의한 WT EZH2 및 EZH2의 Y641 돌연변이체의 억제

	WT	Y641S	Y641N	Y641F	Y641H
IC50, μ M	8.95	2.50	4.10	7.18	7.56

[0283] 실시예 11 - H3-K27me2/me3 비는 EZH2 억제제에 대한 감도를 예측한다

[0284] EZH2(Y641) 돌연변이에 대해 이형성인 종양 세포주는 H3-K27me3의 증가된 수준을 나타내어, H3-K27의 메틸화 상태는 종양발생에 있어 중요한 것으로 사료된다. EZH2에 대해 WT이거나 EZH2(Y641) 돌연변이에 대해 이형성인, 세포주의 패널 내 모노메틸화(H3-K27me1), 디메틸화(H3-K27me2), 또는 트리메틸화된(H3-K27me3) 형태의 H3-K27의 수준을 평가하였다. 사용된 세포주들은 표 4에 열거되어 있다. 다수의 세포주는 B-세포 림프종 세포주이나, 2개의 흑색종 세포주도 또한 포함되었다. IGR1은 EZH2 내에 Y641N 돌연변이를 포함하는 것으로 최근 밝혀진 흑색종 세포주이고, A375 세포는 WT EZH2 흑색종 대조 세포주로서 포함되었다. 도 9A 및 B는 H3-K27me1, H3-K27me2, 또는 H3-K27me3을 인식하는 항체로 프로빙된 상기 세포주 패널로부터 단리된 히스톤의 웨스턴 블롯 분석의 결과를 보여준다. 일반적으로, 전반적 H3-K27me3 수준은 WT EZH2만을 발현하는 세포주에서보다 Y641 돌연변이체 함유 세포주에서 더 높다. 2가지 예외는 파라지(Farage) 및 파이프(Pfeiffer) 세포이고, 이 세포 내 H3-K27me3 수준은 WT 세포주에서의 그 수준과 유사하였다. 더욱 놀랍게도, 야생형 세포주 대비, EZH2 Y641 돌연변이체 세포주 내 H3-K27me2의 수준이 현저하게 더 낮다. Y641 돌연변이체 세포주로부터 추출된 히스톤의 웨스턴 블롯에서 H3-K27me2 신호가 거의 관찰되지 않았거나 전혀 관찰되지 않은 반면, WT 세포주에서 동일한 항체로 관찰된 신호는 H3-K27me3에 대해 특이적인 항체에서 관찰된 것보다 더욱 강하였다. 전반적으로, WT 세포주에서, HK27me2 항체에서의 웨스턴 블롯 신호는 H3-K27me3 항체로 관찰된 신호보다 더 높았던 반면, Y641 돌연변이체 세포주에 대해서는 그 반대가 성립된다. 따라서, Y641 세포주에서의 H3-K27me3/me2 신호의 비는 WT 세포주에서 관찰된 비보다 더 높다. 이에 대한 한 예외는 파이프 세포주로서, 이는 Y641 EZH2 돌연변이를 함유하지 않으나, 높은 H3-K27me3 신호를 가지고 H3-K27me2 신호는 거의 가지지 않거나 전혀 가지지 않는다. 그러므로, 파이프 세포주는 Y641 돌연변이체 세포주와 유사한 H3-K27me3/me2 비를 갖는다.

[0285] H3-K27 메틸화 상태는 또한 항체 시약에 의존하지 않는 비의존적 방법인 질량분석법(MS)에 의해서도 조사될 수 있다. MS 분석은, H3-K27me3 수준이 다른 WT 세포주들에서보다 Y641 돌연변이체 및 파이프 세포주에서 더 높은 반면, H3-K27me2 수준에 대해서는 그 반대가 성립함을 입증하였다. Y641 돌연변이체 및 파이프 세포주에서, H3-K27me3 수준은 H3-K27me2 수준보다 더 높은 반면, 다른 기타 WT 세포주에 대해서는 그 반대가 성립하였다. 이

결과는 도 9A 및 B에서 웨스턴 블롯 분석에 의해 관찰되는 것과 일치한다.

[0286] H3-K27 메틸화 상태의 차이는 또한 H3-K27me2 또는 H3-K27me3에 대한 항체를 이용하여 면역세포화학에 의해 검출되었다. 이 면역조직화학 검정은 포르말린에 고정하고, 파라핀에 포매한 환자 종양 조직 샘플에서 Y641 돌연변이체 EZH2와 연관된 이상 H3-K27me2/3 비를 검출하기 위해 사용된다. 5개의 WT 및 5개의 Y641 돌연변이체 림프종 세포주 펠렛의 패일을 고정하여, 파라핀 블록에 포매하고, 항-H3-K27me2 또는 H3-K27me3 항체로 염색하였다. 모든 세포들이 핵 히스톤 H3을 함유하게 되므로, 히스톤 H3에 대한 항체를 양성 대조로 포함시켰다. 도 10은, 모든 세포주들이 H3-K27me3 및 H3 염색 모두에 대해 세포들 중 100%에 있어 양성이었다. 이들 조건 하에서, WT 및 Y641 돌연변이체 세포주 간에는 H3-K27me3 염색 강도의 명료한 차이가 관찰되지 않았다. 이는 다른 검출 방법에 비해 제한된 역학 범위의 발색 면역세포화학 염색을 반영할 수 있다. 그러나, 도 11에 나타난 바와 같이, 세포주는 H3-K27me2에 대해 양성 또는 음성으로 염색된 것들로 명료하게 격리될 수 있었다. 파이프 세포를 제외한 모든 WT 세포주들은 H3-K27me2에 대해 양성으로 염색된 반면, 모든 Y641 돌연변이체 세포주 및 파이프 세포는 H3-K27me2 항체에 대해 염색을 나타내지 않았다. 이 결과들은 웨스턴 분석 및 MS 분석에 의해 얻은 결과와 일치한다.

[0287] 이론에 의해 국한되려 않으나, EZH2(Y641) 돌연변이의 기능 부가와 연관된 증가된 H3-K27me3 수준은 EZH2 돌연변이를 가지는 세포가 소분자 EZH2 억제제에 대해 더욱 민감하도록 만들 수 있다. EZH2 Y641 돌연변이의 부재 하에 파이프 세포에서 관찰된 증가된 H3-K27me3 수준 및/또는 감소된 H3-K27me2 수준이 또한 EZH2 억제제에 대한 감도와 상관되는지의 여부를 평가하기 위해, IC50이 각기 85 nM 및 16 nM인 생화학적 검정에서 EZH2의 강한 억제를 나타내는 2개의 화합물을 시험하였다. 그 중 어느 한 화합물을 이용한 WSU-DLCL2 세포의 처리는 전반적 H3-K27me3 수준의 억제를 초래하였고, 이로써 세포에 들어가서 세포내 EZH2 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하는 능력을 확인하였다(도 12).

[0288] 각 화합물에 대한 WT 및 Y641 돌연변이체 세포주의 패일의 감도를 증식 검정으로 평가하였다. EZH2 억제제의 항증식성 활성이 분명해지는 데에는 수일이 걸리기 때문에, 화합물을 11일 증식 검정으로 평가하였다. 도 13은 WT(OCI-LY19), 또는 시험 화합물로 처리한 Y641 돌연변이체(WSU-DLCL2) 세포주에 대한 대표적 성장 곡선을 도시한다. 양 화합물 모두는 WSU-DLCL2 세포에 대해 항증식성 활성을 나타냈고, OCI-LY19 세포에 대해서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 억제제 A는 억제제 B보다 WSU-DLCL2 증식의 더욱 강한 억제제였고, 이는 생화학적 검정에서 억제제 A가 더욱 강한 EZH2의 억제제인 것과 일치한다. 억제제 B를 이용하여 WT 및 Y641 돌연변이체 림프종 세포주의 패일에서 증식 검정을 수행하였고, 11일 IC90 값을 유도하였다. 도 14A는 EZH2 Y641 상태에 의해 군 분류된 림프종 세포주의 IC90 값을 도시한다. 전반적으로, RL 및 SUDHL4 세포가 다른 돌연변이체 세포주보다 유의적으로 덜 민감하나, Y641 돌연변이체 세포주는 WT 세포주에 비해 EZH2 억제제에 대한 증가된 감도를 나타냈다. 파이프 세포는 WT이므로 예외이나 낮은 몰 범위 또는 서브나노몰 범위의 IC90을 가지는 양 화합물의 항증식성 효과에 대해 매우 민감하다. 파이프 세포는 높은 H3-K27me3 및 낮은 H3-K27me2 수준을 나타내고, 높은 H3-K27me3 수준 및 낮은 H3-K27me2에 따라 상기와 같이 군 분류하는 세포주는 도 14B에서 억제제 B에 대해 도시된 바와 같이 EZH2 억제제 감도를 보다 잘 식별하도록 한다. 따라서, 높은 H3-K27me3 수준 및 낮은 H3-K27me2 수준은 돌연변이 상태를 아는 것과 무관하게, EZH2 억제제에 대한 감도를 예측하기 위해 사용될 수 있다. 파이프 세포에서 관찰되는 이상 메틸화 비는 EZH2 활성에 대한 의존성을 부여하는 분리된 기작에 의해 일어난다.

[0289] 이 결과는, 환자 종양에서의 EZH2 Y641 돌연변이를 동정하고/하거나 환자에 있어 웨스턴 블롯, MS 또는 IHC와 같은 기법을 이용함으로써 H3-K27me3 대비 H3-K27me2의 낮은 수준을 검출하는 것은 어느 환자가 EZH2 억제제 처리에 대해 반응하는 지를 동정하기 위해 사용될 수 있다.

표 4

[0290] 본 연구에 사용된 세포주

암	EZH2 상태	세포주
---	---------	-----

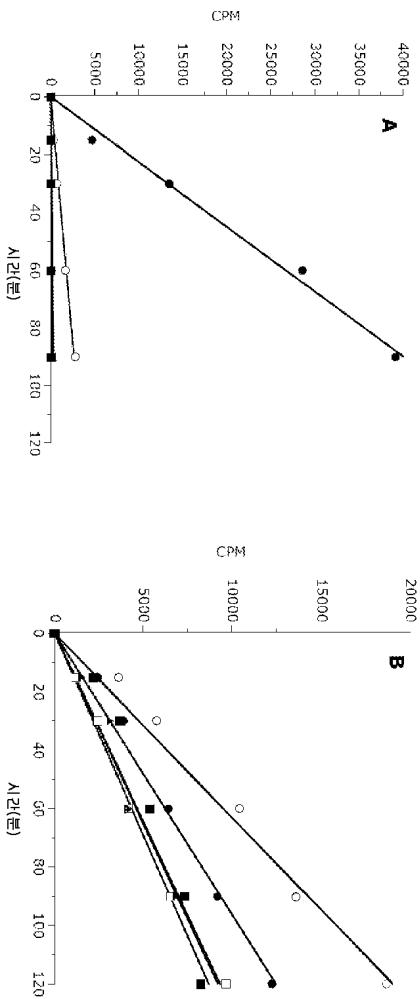
림프종: DLBCL(미만성 거대 B 세포 림프종) 및 기타 B 세포	야생형	OCI-LY19
		HT
		MC116
		BC-1
		BC-3
		파이프
		틀레도
		DOHH-2
		파라지
		SR
		NU-DHL-1
		NU-DUL-1
	Y641 돌연변이	SU-DHL-10 (Y641F)
		DB (Y641N)
		카르파스 422 (Y641N)
		SU-DHL-6 (Y641N)
		WSU-DLCL-2 (Y641F)
		RL (Y641N)
		SU-DHL-4 (Y641S)
흑색종	야생형	A375
	Y641 돌연변이	IGR-1 (Y641N)

[0291] **균등양태**

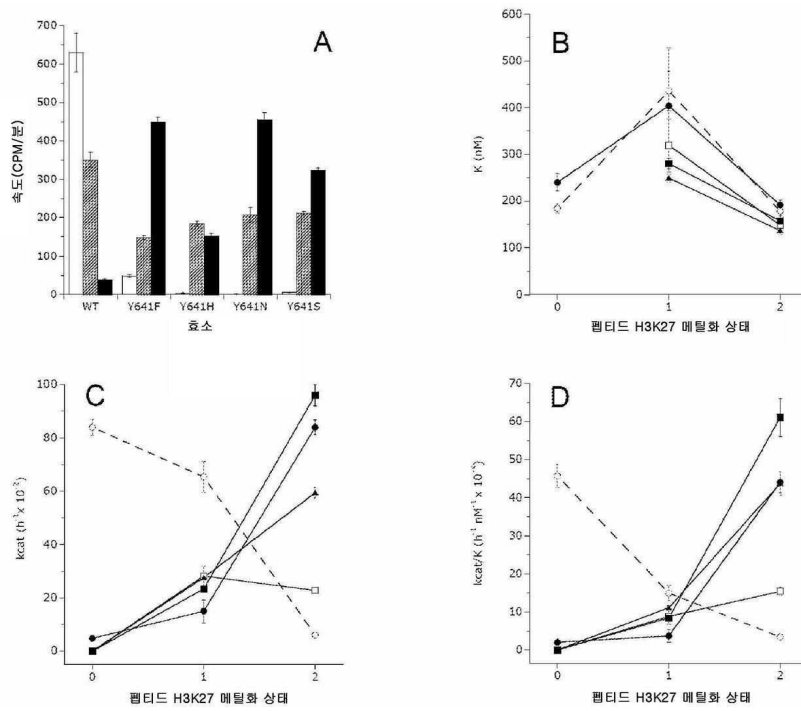
[0292] 본원에 본 발명의 몇 가지 실시양태들이 기재되고 예시되었으나, 당업자는 기능을 수행하고/하거나 본원에 기재된 하나 이상의 이점 및/또는 결과를 얻기 위한 다른 각종 수단 및/또는 구조를 용이하게 구상할 것이며, 그러한 변동 및/또는 변형은 각기 본 발명의 범주 내에 속하는 것으로 간주된다. 더욱 일반적으로, 당업계의 숙련가는 본원에 기재된 모든 매개변수, 차원, 물질 및 구성은 예시적인 것으로 의미하고, 실측 매개변수, 차원, 물질 및/또는 구성은 본 발명의 교시가 이용되는 특정 용도 또는 용도들에 의존할 것임을 용이하게 인식할 것이다. 당업계의 숙련가는 통상적 수준 이하의 실험을 이용하여 본원에 기재된 본 발명의 특정 실시양태에 대한 많은 균등양태를 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러므로, 상기 실시양태들은 단지 예로서 제시된 것이며, 첨부된 특허청구범위 및 이에 대한 균등양태의 범주 내에서 본 발명이 구체적으로 기재되고 청구된 것과는 다른 방식으로 수행될 수도 있음을 이해하도록 한다. 본 발명은 본원에 기재된 각 개별적 특성, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 2종 이상의 그러한 특성, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법의 임의의 조합은, 그러한 특성, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법이 상호 모순된다면, 본 발명의 범주 내에 포함된다.

도면

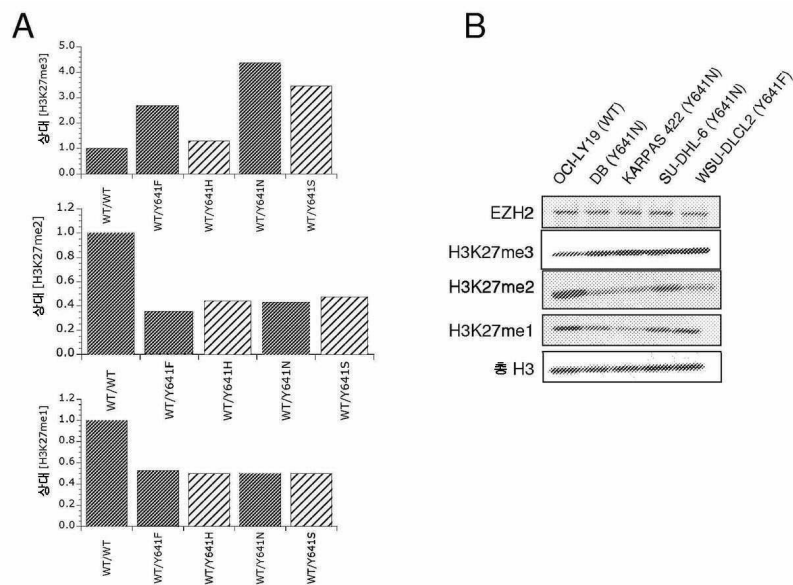
도면1



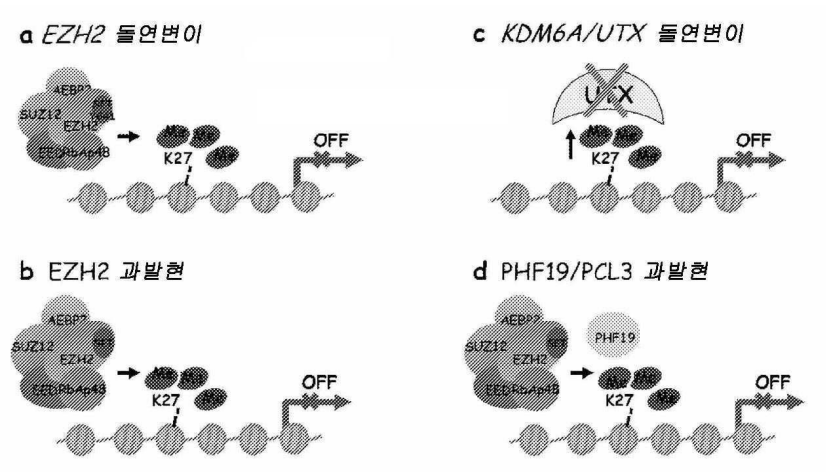
도면2



도면3



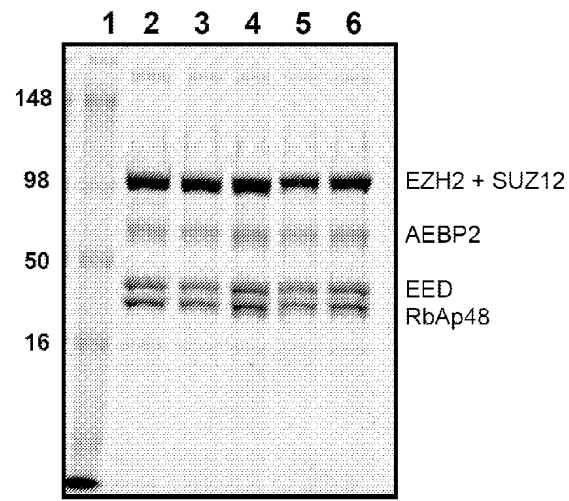
도면4



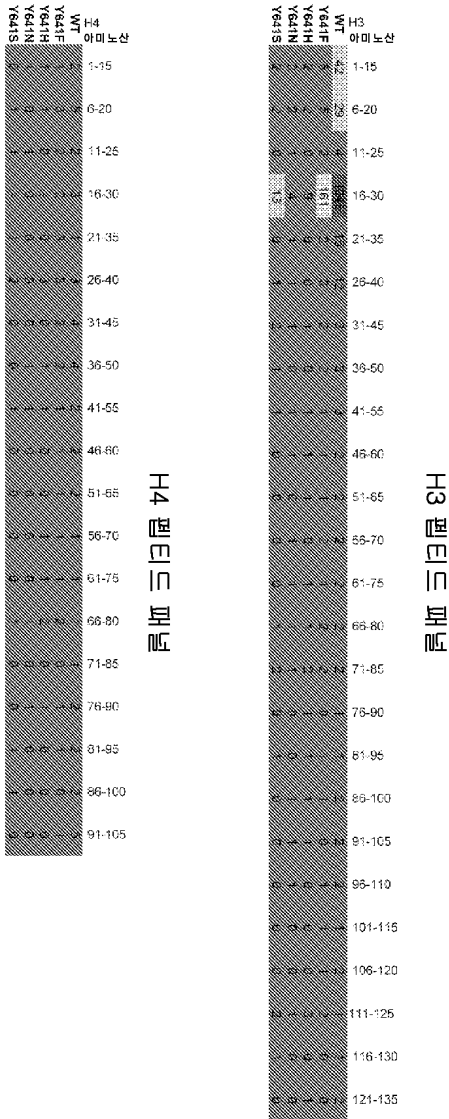
도면5

설명

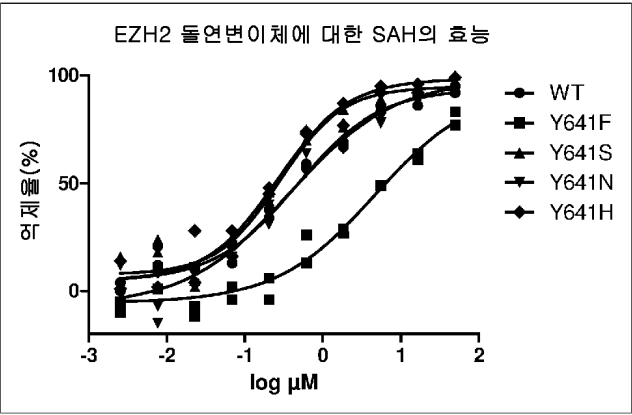
- 1 = 마커
- 2 = EZH2: WT
- 3 = EZH2: Y641F
- 4 = EZH2: Y641H
- 5 = EZH2: Y641N
- 6 = EZH2: Y641S



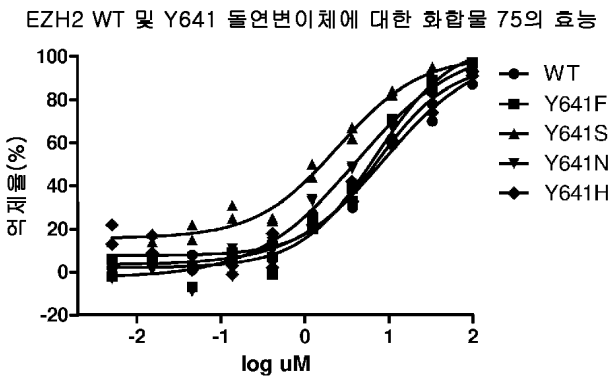
도면6



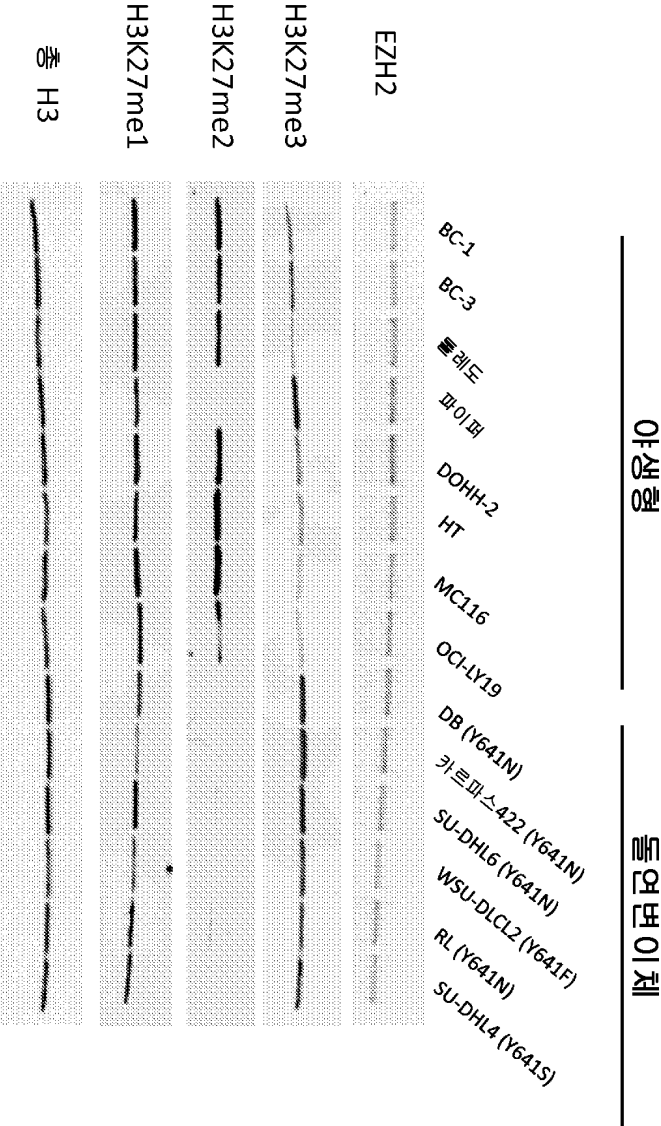
도면7



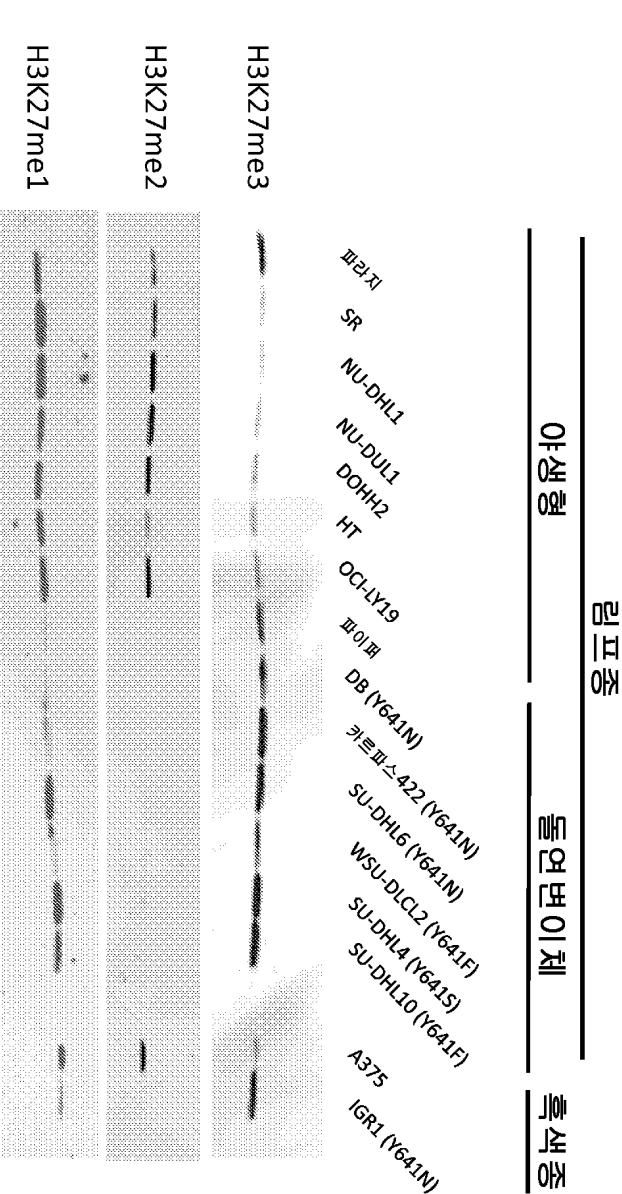
도면8



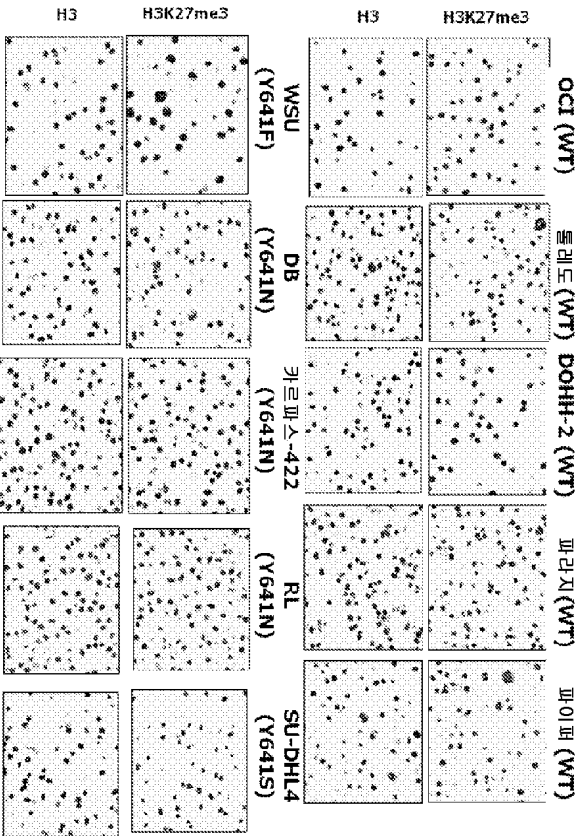
도면9a



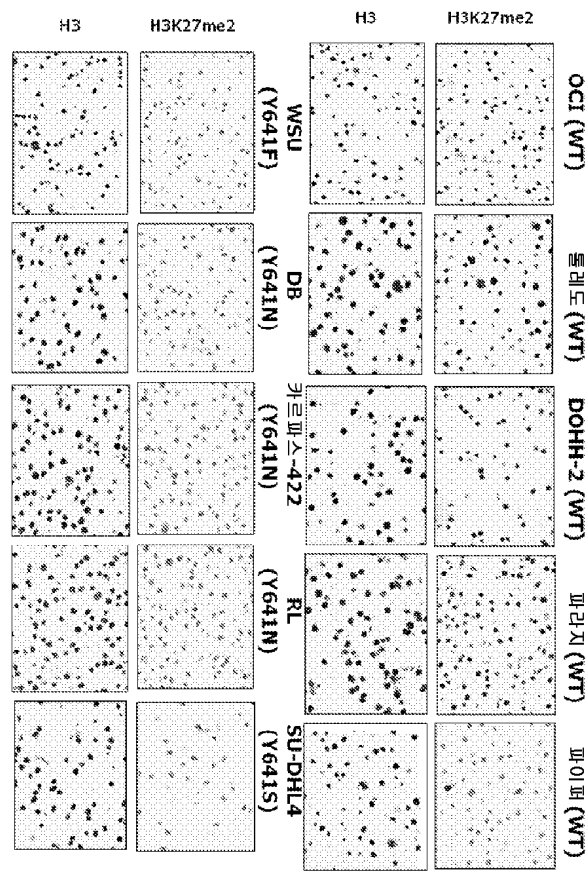
도면9b



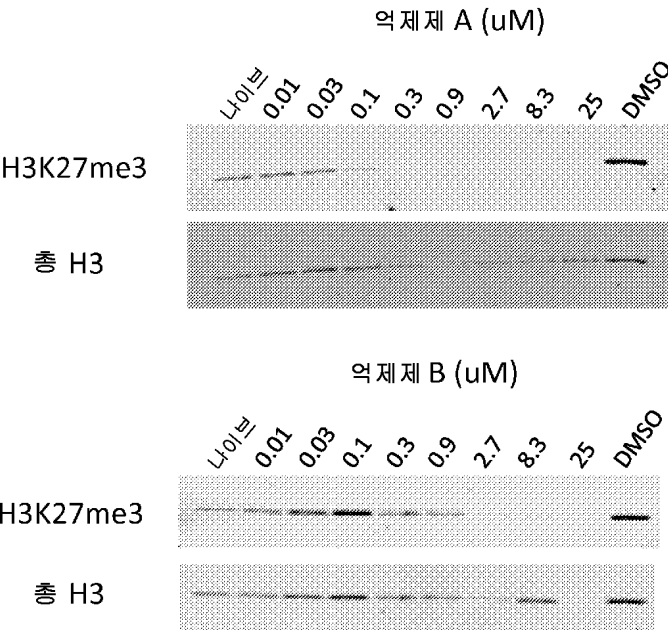
도면10



도면11

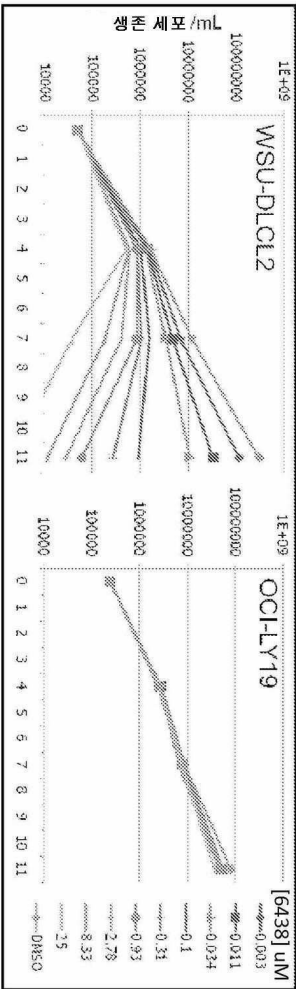


도면12

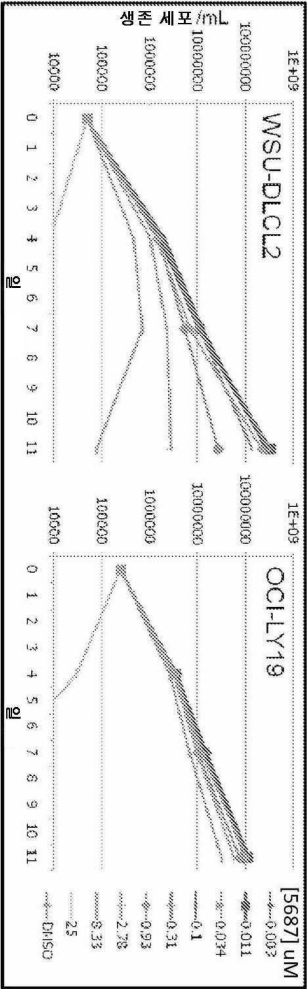


도면13

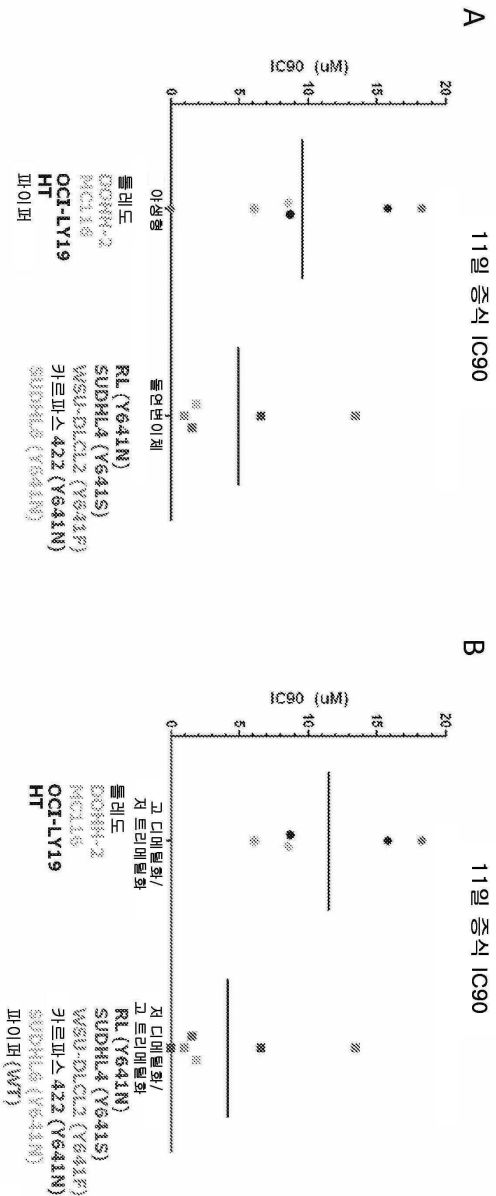
약제제 A



약제제 B



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Copeland, Robert Allen
Richon, Victoria M
Scott, Margaret Davis
Sneeringer, Christopher John
Kuntz, Kevin W
Knutson, Sarah K
Pollock, Roy M

<120> Inhibitors of Human EZH2, and Methods of Use Thereof

<130> 41478-506001US

<140> 13/230,703

<141> 2011-09-12

<150> 61/381,684

<151> 2010-09-10

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 746

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg

1 5 10 15

Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe

20 25 30

Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys

35 40 45

Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg

50 55 60

Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr

65 70 75 80

Arg Glu Cys Ser Val Thr Ser Asp Leu Asp Phe Pro Thr Gln Val Ile

85 90 95

Pro Leu Lys Thr Leu Asn Ala Val Ala Ser Val Pro Ile Met Tyr Ser

100 105 110

Trp Ser Pro Leu Gln Gln Asn Phe Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu

115 120 125

His Asn Ile Pro Tyr Met Gly Asp Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr

130 135 140

Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys Asn Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp

145 150 155 160

Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn Asp Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn
165 170 175

Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp
180 185 190

Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Gln Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp
195 200 205

Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro Arg Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe
210 215 220

Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe Pro Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu
225 230 235 240

Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu Thr Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu
245 250 255

Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn Ile Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val
260 265 270

Gln Arg Glu Gln Ser Leu His Ser Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg
275 280 285

Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe Leu His Pro Phe His Ala Thr Pro Asn
290 295 300

Thr Tyr Lys Arg Lys Asn Thr Glu Thr Ala Leu Asp Asn Lys Pro Cys
305 310 315 320

Gly Pro Gln Cys Tyr Gln His Leu Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Ala
325 330 335

Ala Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Thr Pro Pro Lys Arg Pro Gly Gly
340 345 350

Arg Arg Arg Gly Arg Leu Pro Asn Asn Ser Ser Arg Pro Ser Thr Pro
355 360 365

Thr Ile Asn Val Leu Glu Ser Lys Asp Thr Asp Ser Asp Arg Glu Ala
370 375 380

Gly Thr Glu Thr Gly Gly Glu Asn Asn Asp Lys Glu Glu Glu Glu Lys
385 390 395 400

Lys Asp Glu Thr Ser Ser Ser Ser Glu Ala Asn Ser Arg Cys Gln Thr

405	410	415
Pro Ile Lys Met Lys Pro Asn Ile Glu Pro Pro Glu Asn Val Glu Trp		
420	425	430
Ser Gly Ala Glu Ala Ser Met Phe Arg Val Leu Ile Gly Thr Tyr Tyr		
435	440	445
Asp Asn Phe Cys Ala Ile Ala Arg Leu Ile Gly Thr Lys Thr Cys Arg		
450	455	460
Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser Ile Ile Ala Pro Ala		
465	470	475
Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys Lys Lys Arg Lys His		
485	490	495
Arg Leu Trp Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln Leu Lys Lys Asp Gly		
500	505	510
Ser Ser Asn His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys Asp His Pro Arg Gln		
515	520	525
Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala Gln Asn Phe Cys Glu		
530	535	540
Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn Arg Phe Pro Gly Cys		
545	550	555
Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys Pro Cys Tyr Leu Ala		
565	570	575
Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr Cys Gly Ala Ala Asp		
580	585	590
His Trp Asp Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn Cys Ser Ile Gln Arg		
595	600	605
Gly Ser Lys Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp		
610	615	620
Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu		
625	630	635
Tyr Cys Gly Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys		
645	650	655

Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp
660 665 670
Phe Val Val Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn
675 680 685
His Ser Val Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly
690 695 700

Asp His Arg Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu
705 710 715 720
Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala Asp Ala Leu Lys Tyr
725 730 735
Val Gly Ile Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro
740 745

<210> 2

<211> 2723

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggcggcgctt gattgggctg ggggggccaa ataaaagcga tggcgattgg gctgccgcgt 60
ttggcgctcg gtccggtcgc gtccgacacc cgggtgggact cagaaggcag tggagccccg 120

gcggcgcgcg cggcggcgcg cgggggcgac gcgcgggaac aacgcgagtc ggcgcgcggg 180
acgaagaata atcatgggcc agactgggaa gaaatctgag aagggaccag ttgtttggcg 240
gaagcgtgta aaatcagagt acatcgact gagacagctc aagaggttca gacgagctga 300
tgaagtaaag agtatgttta gttccaatcg tcagaaaatt ttggaaagaa cggaaatctt 360
aaaccaagaa tggaacacgc gaaggataca gcctgtgcac atcctgactt ctgtgagctc 420
attgcgctgg actaggaggt gttcgggtgac cagtgacttg gattttccaa cacaagtcac 480
cccattaaag acitcgaatg cagttgcttc agtaccata atgtattctt ggtctcccct 540

acagcagaat tttatggtgg aagatgaaac tgttttacat aacattcctt atatgggaga 600
tgaagtttta gatcaggatg gtactttcat tgaagaacta ataaaaaatt atgatgggaa 660
agtacacggg gatagagaat gtgggtttat aaatgatgaa atttttgtgg agttggtgaa 720
tgcccttggt caatataatg atgatgacga tgatgatgat ggagacgac ctgaagaaag 780
agaagaaaag cagaaagatc tggaggatca ccgagatgat aaagaaagcc gccacactcg 840
gaaatttctt tctgataaaa tttttgaagc catttcctca atgtttccag ataagggcac 900

agcagaagaa ctaaagga aatataaaga actcacgaa cagcagctcc caggcgcact 960

tcctcctgaa tgtaccccca acatagatgg accaaatgct aaatctgttc agagagagca 1020

aagcttacac tcctttcata cgcttttctg taggcgatgt tttaaatatg actgcttcct 1080

acatcgtaag tgcaattatt cttttcatgc aacaccaac acttataagc ggaagaacac 1140

agaaacagct ctagacaaca aaccttgtgg accacagtgt taccagcatt tggagggagc 1200

aaaggagttt gctgctgctc tcaccgctga gcggataaag accccaccaa aacgtccagg 1260

aggccgcaga agaggacggc ttccaataa cagtagcagg cccagcacc ccaccattaa 1320

tgtgctggaa tcaaaggata cagacagtga tagggaagca gggactgaaa cggggggaga 1380

gaacaatgat aaagaagaag aagagaagaa agatgaaact tcgagctcct ctgaagcaaa 1440

ttctcgggtg caaacaccaa taaagatgaa gccaaatatt gaacctcctg agaatgtgga 1500

gtggagtggg gctgaagcct caatgttttag agtctcatt ggcaacttact atgacaattt 1560

ctgtgccatt gctaggttaa ttgggaccaa aacatgtaga caggltgatg agtttagagt 1620

caaagaatct agcatcatag ctccagctcc cgctgaggat gtggatactc ctccaaggaa 1680

aaagaagagg aaacaccggt tgtgggctgc aactgcaga aagatacagc tgaaaaagga 1740

cggctcctct aacctgtttt acaactatca accctgtgat catccacggc agccttgtga 1800

cagttcgtgc ctttgttga tagcacaaaa tttttgtgaa aagttttgtc aatgtagtcc 1860

agagtgtcaa aaccgctttc cgggatgccg ctgcaaagca cagtgaaca ccaagcagtg 1920

cccgtgctac ctggctgtcc gagagtgtga ccctgacctc tgtcttactt gtggagccgc 1980

tgaccattgg gacagtaaaa atgtgtcctg caagaactgc agtatcagc ggggctccaa 2040

aaagcatcta ttgtcggcac catctgacgt ggagcagctgg gggattttta tcaaagatcc 2100

tgtgcagaaa aatgaattca tctcagaata ctgtggagag attatttctc aagatgaagc 2160

tgacagaaga gggaaagtgt atgataaata catgtgcagc tttctgttca acttgaacaa 2220

tgattttgtg gtggatgcaa cccgaaggg taacaaaatt cgttttgcaa atcattcggg 2280

aaatccaaac tgctatgcaa aagttatgat ggttaacggg gatcacagga taggtatatt 2340

tgccaagaga gccatccaga ctggcgaaga gctgtttttt gattacagat acagccaggc 2400

tgatgcctg aagtatgtcg gcatcgaaag agaaatggaa atcccttgac atctgctacc 2460

tcctcccc tcctctgaaa cagctgcctt agcttcagga acctcgagta ctgtgggcaa 2520

tttagaaaaa gaacatgcag ttgaaattc tgaatttgca aagtactgta agaataattt 2580

atagtaatga gtttaaaaat caacttttta ttgccttctc accagctgca aagtgttttg 2640

taccagtga tttttgcaat aatgcagtat ggtacat ttt tcaactttga ataaagaata 2700
 ctggaacttg tccttggtga atc 2723

<210> 3
 <211> 751
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe
 20 25 30
 Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys
 35 40 45
 Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg
 50 55 60
 Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr
 65 70 75 80
 Arg Glu Cys Ser Val Thr Ser Asp Leu Asp Phe Pro Thr Gln Val Ile
 85 90 95
 Pro Leu Lys Thr Leu Asn Ala Val Ala Ser Val Pro Ile Met Tyr Ser
 100 105 110
 Trp Ser Pro Leu Gln Gln Asn Phe Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu
 115 120 125
 His Asn Ile Pro Tyr Met Gly Asp Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr
 130 135 140
 Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys Asn Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp
 145 150 155 160
 Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn Asp Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn
 165 170 175
 Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp
 180 185 190
 Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Gln Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp

195 200 205
 Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro Arg Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe
 210 215 220
 Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe Pro Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu

 225 230 235 240
 Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu Thr Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu
 245 250 255
 Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn Ile Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val
 260 265 270
 Gln Arg Glu Gln Ser Leu His Ser Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg
 275 280 285
 Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe Leu His Arg Lys Cys Asn Tyr Ser Phe

 290 295 300
 His Ala Thr Pro Asn Thr Tyr Lys Arg Lys Asn Thr Glu Thr Ala Leu
 305 310 315 320
 Asp Asn Lys Pro Cys Gly Pro Gln Cys Tyr Gln His Leu Glu Gly Ala
 325 330 335
 Lys Glu Phe Ala Ala Ala Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Thr Pro Pro
 340 345 350
 Lys Arg Pro Gly Gly Arg Arg Arg Gly Arg Leu Pro Asn Asn Ser Ser

 355 360 365
 Arg Pro Ser Thr Pro Thr Ile Asn Val Leu Glu Ser Lys Asp Thr Asp
 370 375 380
 Ser Asp Arg Glu Ala Gly Thr Glu Thr Gly Gly Glu Asn Asn Asp Lys
 385 390 395 400
 Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asp Glu Thr Ser Ser Ser Ser Glu Ala Asn
 405 410 415
 Ser Arg Cys Gln Thr Pro Ile Lys Met Lys Pro Asn Ile Glu Pro Pro

 420 425 430
 Glu Asn Val Glu Trp Ser Gly Ala Glu Ala Ser Met Phe Arg Val Leu
 435 440 445

Ile Gly Thr Tyr Tyr Asp Asn Phe Cys Ala Ile Ala Arg Leu Ile Gly
450 455 460

Thr Lys Thr Cys Arg Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser
465 470 475 480

Ile Ile Ala Pro Ala Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys
485 490 495

Lys Lys Arg Lys His Arg Leu Trp Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln
500 505 510

Leu Lys Lys Asp Gly Ser Ser Asn His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys
515 520 525

Asp His Pro Arg Gln Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala
530 535 540

Gln Asn Phe Cys Glu Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn
545 550 555 560

Arg Phe Pro Gly Cys Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys
565 570 575

Pro Cys Tyr Leu Ala Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr
580 585 590

Cys Gly Ala Ala Asp His Trp Asp Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn
595 600 605

Cys Ser Ile Gln Arg Gly Ser Lys Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser
610 615 620

Asp Val Ala Gly Trp Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn
625 630 635 640

Glu Phe Ile Ser Glu Tyr Cys Gly Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala
645 650 655

Asp Arg Arg Gly Lys Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe
660 665 670

Asn Leu Asn Asn Asp Phe Val Val Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys
675 680 685

Ile Arg Phe Ala Asn His Ser Val Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val

690	695	700	
Met Met Val Asn Gly Asp His Arg Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala			
705	710	715	720
Ile Gln Thr Gly Glu Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala			
	725	730	735
Asp Ala Leu Lys Tyr Val Gly Ile Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro			
	740	745	750
<210> 4			
<211> 2591			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 4			
ggcggcgctt gattgggctg ggggggccaa ataaaagcga tggcgattgg gctgccgcgt	60		
ttggcgctcg gtccggtcgc gtccgacacc cgggtgggact cagaaggcag tggagccccg	120		
gcggcggcgg cgccggcgcg cgggggcgac gcgcgggaac aacgcgagtc ggcgcgcggg	180		
acgaagaata atcatgggcc agactgggaa gaaatctgag aagggaccag tttgttggcg	240		
gaagcgtgta aaatcagagt acatgcgact gagacagctc aagaggttca gacgagctga	300		
tgaagtaaag agtatgttta gttccaatcg tcagaaaatt ttggaaagaa cggaaatctt	360		
aaaccaagaa tggaacagc gaaggataca gcctgtgcac atcctgactt ctgtgagctc	420		
attgcgcggg actaggagg tggaagatga aactgtttta cataacattc cttatatggg	480		
agatgaagtt ttagatcagg atggtacttt cattgaagaa ctaataaaaa attatgatgg	540		
gaaagtacac ggggatagag aatgtgggtt tataaatgat gaaatTTTTg tggagttggt	600		
gaatgccctt ggicaatata atgatgatga cgatgatgat gatggagacg atcctgaaga	660		
aagagaagaa aagcagaaag atctggagga tcaccgagat gataaagaaa gccgcccacc	720		
tcggaaatTT cttctgata aaatTTTTga agccatttcc tcaatgttTc cagataaggg	780		
cacagcagaa gaactaaagg aaaaatataa agaactcacc gaacagcagc tcccaggcgc	840		
acttctctct gaatgtacc ccaacataga tggaccaaT gctaaatctg ttcagagaga	900		
gcaaagctta cactccttTc atacgctttt ctgtaggcga tgttttaaat atgactgctt	960		
cctacatcct tttcatgcaa cacccaacac ttataagcgg aagaacacag aaacagctct	1020		
agacaacaaa cttgtggac cacagtgtta ccagcatTTg gagggagcaa aggagtTTgc	1080		
tgctgtctc accgctgagc ggataaagac cccacaaaaa cgtccaggag gccgcagaag	1140		

aggacggctt cccaataaca gtagcaggcc cagcaccccc accattaatg tgctggaatc 1200
aaaggataca gacagtata ggaagcagg gactgaaacg gggggagaga acaatgataa 1260
agaagaagaa gagaagaaag atgaaacttc gagctcctct gaagcaaatt ctcggtgtca 1320
aacaccaata aagatgaagc caaatattga acctcctgag aatgtggagt ggagtggatgc 1380
tgaagcctca atgttttaga tcttcattgg cacttactat gacaatttct gtgccattgc 1440
taggttaatt gggacaaaa catgtagaca ggtgtatgag tttagagtca aagaatctag 1500
catcatagct ccagctcccg ctgaggatgt ggatactcct ccaaggaaaa agaagaggaa 1560

acaccggttg tgggctgcac actgcagaaa gatacagctg aaaaaggacg gctcctctaa 1620
ccatgtttac aactatcaac cctgtgatca tccacggcag ccttgtgaca gtgcgtgccc 1680
ttgtgtgata gcacaaaatt tttgtgaaa gttttgtcaa ttagattcag agtgtcaaaa 1740
ccgctttccg ggatgccgt gcaaagcaca gtgcaacacc aagcagtgcc cgtgctacct 1800
ggctgtccga gagtgtgacc ctgacctctg tcttacttgt ggagccgctg accattggga 1860
cagtaaaat gtgtcctgca agaactgcag tattcagcgg ggctccaaaa agcatctatt 1920
gtggcacca tctgacgtgg caggctgggg gatTTTTatc aaagatcctg tgcagaaaaa 1980

tgaattcatc tcagaatact gtggagagat tatttctcaa gatgaagctg acagaagagg 2040
gaaagtgtat gataaatata tgtgcagctt tctgttcaac ttgaacaatg attttgttgt 2100
ggatgcaacc cgcaagggtg acaaaattcg ttttgcaaat cattcggtaa atccaaactg 2160
ctatgcaaaa gttatgatgg ttaacgggtg tcacaggata ggtatTTTTg ccaagagagc 2220
catccagact ggcgaagagc tgttttttga ttacagatac agccaggctg atgccctgaa 2280
glatgtcggc atcgaaagag aaatggaaat ccttgacat ctgctacctc ctccccctc 2340
ctctgaaaca gctgccttag cttcaggaac ctgagtagt gtgggcaatt tagaaaaaga 2400

acatgcagtt tgaattctg aatttgcaaa gtactgtaag aataatttat agtaatgagt 2460
ttaaaaaatc actttttatt gccttctcac cagctgcaaa gtgttttgta ccagtgaatt 2520
tttgcaataa tgcagtatgg tacatttttc aactttgaat aaagaatact tgaacttgtc 2580
cttgttgaat c 2591

<210> 5

<211> 707

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg

1 5 10 15

Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe

20 25 30

Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys

35 40 45

Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg

50 55 60

Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr

65 70 75 80

Arg Glu Val Glu Asp Glu Thr Val Leu His Asn Ile Pro Tyr Met Gly

85 90 95

Asp Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys

100 105 110

Asn Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn

115 120 125

Asp Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp

130 135 140

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys

145 150 155 160

Gln Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro

165 170 175

Arg Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe

180 185 190

Pro Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu

195 200 205

Thr Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn

210 215 220

Ile Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val Gln Arg Glu Gln Ser Leu His

225 230 235 240

Ser Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe

245 250 255

Leu His Pro Phe His Ala Thr Pro Asn Thr Tyr Lys Arg Lys Asn Thr

260 265 270
Glu Thr Ala Leu Asp Asn Lys Pro Cys Gly Pro Gln Cys Tyr Gln His

275 280 285
Leu Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Ala Ala Leu Thr Ala Glu Arg Ile

290 295 300
Lys Thr Pro Pro Lys Arg Pro Gly Gly Arg Arg Arg Gly Arg Leu Pro

305 310 315 320
Asn Asn Ser Ser Arg Pro Ser Thr Pro Thr Ile Asn Val Leu Glu Ser

325 330 335
Lys Asp Thr Asp Ser Asp Arg Glu Ala Gly Thr Glu Thr Gly Gly Glu

340 345 350
Asn Asn Asp Lys Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asp Glu Thr Ser Ser Ser

355 360 365
Ser Glu Ala Asn Ser Arg Cys Gln Thr Pro Ile Lys Met Lys Pro Asn

370 375 380
Ile Glu Pro Pro Glu Asn Val Glu Trp Ser Gly Ala Glu Ala Ser Met

385 390 395 400
Phe Arg Val Leu Ile Gly Thr Tyr Tyr Asp Asn Phe Cys Ala Ile Ala

405 410 415
Arg Leu Ile Gly Thr Lys Thr Cys Arg Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val

420 425 430
Lys Glu Ser Ser Ile Ile Ala Pro Ala Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr

435 440 445
Pro Pro Arg Lys Lys Lys Arg Lys His Arg Leu Trp Ala Ala His Cys

450 455 460
Arg Lys Ile Gln Leu Lys Lys Asp Gly Ser Ser Asn His Val Tyr Asn

465 470 475 480
Tyr Gln Pro Cys Asp His Pro Arg Gln Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro

485 490 495
Cys Val Ile Ala Gln Asn Phe Cys Glu Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser

500 505 510

Glu Cys Gln Asn Arg Phe Pro Gly Cys Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn

515 520 525

Thr Lys Gln Cys Pro Cys Tyr Leu Ala Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp

530 535 540

Leu Cys Leu Thr Cys Gly Ala Ala Asp His Trp Asp Ser Lys Asn Val

545 550 555 560

Ser Cys Lys Asn Cys Ser Ile Gln Arg Gly Ser Lys Lys His Leu Leu

565 570 575

Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro

580 585 590

Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu Tyr Cys Gly Glu Ile Ile Ser

595 600 605

Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys

610 615 620

Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp Phe Val Val Asp Ala Thr Arg

625 630 635 640

Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn His Ser Val Asn Pro Asn Cys

645 650 655

Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly Asp His Arg Ile Gly Ile Phe

660 665 670

Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg

675 680 685

Tyr Ser Gln Ala Asp Ala Leu Lys Tyr Val Gly Ile Glu Arg Glu Met

690 695 700

Glu Ile Pro

705

<210> 6

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

His Leu Leu Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp Gly Ile Phe Ile

1 5 10 15

Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu Tyr Cys Gly Glu

20 25 30

Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys Val Tyr Asp Lys

35 40 45

Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp Phe Val Val Asp

50 55 60

Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn His Ser Val Asn

65 70 75 80

Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly Asp His Arg Ile

85 90 95

Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu Glu Leu Phe Phe

100 105 110

Asp Tyr

<210> 7

<211> 342

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

catctattgc tggcaccatc tgacgtggca ggctggggga tttttatcaa agatcctgtg 60

cagaaaaatg aattcatctc agaatactgt ggagagatta tttctcaaga tgaagctgac 120

agaagaggga aagtgtatga taaatacatg tgcagctttc tgttcaactt gaacaatgat 180

tttgtggtgg atgcaaccgg caagggtaac aaaattcggt ttgcaaatca ttcggtaaat 240

ccaaactgct atgcaaaagt tatgatggtt aacggtgatc acaggatagg tatTTTTGCC 300

aagagagcca tccagactgg cgaagagctg ttttttgatt ac 342

<210> 8

<211> 746

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (641)..(641)

<223> Wherein X can be any amino acid residue other than tyrosine (Y)

<400> 8

Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg

1 5 10 15

Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe

20 25 30

Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys

35 40 45

Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg

50 55 60

Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr

65 70 75 80

Arg Glu Cys Ser Val Thr Ser Asp Leu Asp Phe Pro Thr Gln Val Ile

85 90 95

Pro Leu Lys Thr Leu Asn Ala Val Ala Ser Val Pro Ile Met Tyr Ser

100 105 110

Trp Ser Pro Leu Gln Gln Asn Phe Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu

115 120 125

His Asn Ile Pro Tyr Met Gly Asp Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr

130 135 140

Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys Asn Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp

145 150 155 160

Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn Asp Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn

165 170 175

Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp

180 185 190

Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Gln Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp

195 200 205

Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro Arg Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe

210 215 220

Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe Pro Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu

225 230 235 240
 Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu Thr Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu
 245 250 255
 Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn Ile Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val
 260 265 270

 Gln Arg Glu Gln Ser Leu His Ser Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg
 275 280 285
 Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe Leu His Pro Phe His Ala Thr Pro Asn
 290 295 300
 Thr Tyr Lys Arg Lys Asn Thr Glu Thr Ala Leu Asp Asn Lys Pro Cys
 305 310 315 320
 Gly Pro Gln Cys Tyr Gln His Leu Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Ala
 325 330 335

 Ala Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Thr Pro Pro Lys Arg Pro Gly Gly
 340 345 350
 Arg Arg Arg Gly Arg Leu Pro Asn Asn Ser Ser Arg Pro Ser Thr Pro
 355 360 365
 Thr Ile Asn Val Leu Glu Ser Lys Asp Thr Asp Ser Asp Arg Glu Ala
 370 375 380
 Gly Thr Glu Thr Gly Gly Glu Asn Asn Asp Lys Glu Glu Glu Glu Lys
 385 390 395 400

 Lys Asp Glu Thr Ser Ser Ser Ser Glu Ala Asn Ser Arg Cys Gln Thr
 405 410 415
 Pro Ile Lys Met Lys Pro Asn Ile Glu Pro Pro Glu Asn Val Glu Trp
 420 425 430
 Ser Gly Ala Glu Ala Ser Met Phe Arg Val Leu Ile Gly Thr Tyr Tyr
 435 440 445
 Asp Asn Phe Cys Ala Ile Ala Arg Leu Ile Gly Thr Lys Thr Cys Arg
 450 455 460

 Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser Ile Ile Ala Pro Ala
 465 470 475 480

Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys Lys Lys Arg Lys His
485 490 495

Arg Leu Trp Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln Leu Lys Lys Asp Gly
500 505 510

Ser Ser Asn His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys Asp His Pro Arg Gln
515 520 525

Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala Gln Asn Phe Cys Glu
530 535 540

Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn Arg Phe Pro Gly Cys
545 550 555 560

Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys Pro Cys Tyr Leu Ala
565 570 575

Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr Cys Gly Ala Ala Asp
580 585 590

His Trp Asp Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn Cys Ser Ile Gln Arg
595 600 605

Gly Ser Lys Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp
610 615 620

Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu
625 630 635 640

Xaa Cys Gly Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys
645 650 655

Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp
660 665 670

Phe Val Val Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn
675 680 685

His Ser Val Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly
690 695 700

Asp His Arg Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu
705 710 715 720

Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala Asp Ala Leu Lys Tyr

	725	730	735
Val Gly Ile Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro			
	740	745	
<210> 9			
<211> 746			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 9			
Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg			
1 5 10 15			
Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe			
20 25 30			
Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys			
35 40 45			
Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg			
50 55 60			
Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr			
65 70 75 80			
Arg Glu Cys Ser Val Thr Ser Asp Leu Asp Phe Pro Thr Gln Val Ile			
85 90 95			
Pro Leu Lys Thr Leu Asn Ala Val Ala Ser Val Pro Ile Met Tyr Ser			
100 105 110			
Trp Ser Pro Leu Gln Gln Asn Phe Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu			
115 120 125			
His Asn Ile Pro Tyr Met Gly Asp Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr			
130 135 140			
Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys Asn Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp			
145 150 155 160			
Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn Asp Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn			
165 170 175			
Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp			
180 185 190			

Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Gln Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp
195 200 205

Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro Arg Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe
210 215 220

Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe Pro Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu
225 230 235 240

Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu Thr Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu
245 250 255

Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn Ile Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val
260 265 270

Gln Arg Glu Gln Ser Leu His Ser Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg
275 280 285

Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe Leu His Pro Phe His Ala Thr Pro Asn
290 295 300

Thr Tyr Lys Arg Lys Asn Thr Glu Thr Ala Leu Asp Asn Lys Pro Cys
305 310 315 320

Gly Pro Gln Cys Tyr Gln His Leu Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Ala
325 330 335

Ala Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Thr Pro Pro Lys Arg Pro Gly Gly
340 345 350

Arg Arg Arg Gly Arg Leu Pro Asn Asn Ser Ser Arg Pro Ser Thr Pro
355 360 365

Thr Ile Asn Val Leu Glu Ser Lys Asp Thr Asp Ser Asp Arg Glu Ala
370 375 380

Gly Thr Glu Thr Gly Gly Glu Asn Asn Asp Lys Glu Glu Glu Glu Lys
385 390 395 400

Lys Asp Glu Thr Ser Ser Ser Ser Glu Ala Asn Ser Arg Cys Gln Thr
405 410 415

Pro Ile Lys Met Lys Pro Asn Ile Glu Pro Pro Glu Asn Val Glu Trp
420 425 430

Ser Gly Ala Glu Ala Ser Met Phe Arg Val Leu Ile Gly Thr Tyr Tyr

435 440 445
 Asp Asn Phe Cys Ala Ile Ala Arg Leu Ile Gly Thr Lys Thr Cys Arg
 450 455 460
 Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser Ile Ile Ala Pro Ala
 465 470 475 480

 Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys Lys Lys Arg Lys His
 485 490 495
 Arg Leu Trp Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln Leu Lys Lys Asp Gly
 500 505 510
 Ser Ser Asn His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys Asp His Pro Arg Gln
 515 520 525
 Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala Gln Asn Phe Cys Glu
 530 535 540

 Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn Arg Phe Pro Gly Cys
 545 550 555 560
 Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys Pro Cys Tyr Leu Ala
 565 570 575
 Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr Cys Gly Ala Ala Asp
 580 585 590
 His Trp Asp Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn Cys Ser Ile Gln Arg
 595 600 605

 Gly Ser Lys Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp
 610 615 620
 Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu
 625 630 635 640
 Phe Cys Gly Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys
 645 650 655
 Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp
 660 665 670

 Phe Val Val Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn
 675 680 685

His Ser Val Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly
 690 695 700
 Asp His Arg Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu
 705 710 715 720
 Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala Asp Ala Leu Lys Tyr
 725 730 735

 Val Gly Ile Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro
 740 745
 <210> 10
 <211> 746
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe
 20 25 30
 Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys
 35 40 45

 Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg
 50 55 60
 Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr
 65 70 75 80
 Arg Glu Cys Ser Val Thr Ser Asp Leu Asp Phe Pro Thr Gln Val Ile
 85 90 95
 Pro Leu Lys Thr Leu Asn Ala Val Ala Ser Val Pro Ile Met Tyr Ser
 100 105 110

 Trp Ser Pro Leu Gln Gln Asn Phe Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu
 115 120 125
 His Asn Ile Pro Tyr Met Gly Asp Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr
 130 135 140
 Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys Asn Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp

145 150 155 160
 Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn Asp Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn
 165 170 175

 Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp
 180 185 190
 Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Gln Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp
 195 200 205
 Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro Arg Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe
 210 215 220
 Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe Pro Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu
 225 230 235 240

 Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu Thr Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu
 245 250 255
 Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn Ile Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val
 260 265 270
 Gln Arg Glu Gln Ser Leu His Ser Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg
 275 280 285
 Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe Leu His Pro Phe His Ala Thr Pro Asn
 290 295 300

 Thr Tyr Lys Arg Lys Asn Thr Glu Thr Ala Leu Asp Asn Lys Pro Cys
 305 310 315 320
 Gly Pro Gln Cys Tyr Gln His Leu Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Ala
 325 330 335
 Ala Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Thr Pro Pro Lys Arg Pro Gly Gly
 340 345 350
 Arg Arg Arg Gly Arg Leu Pro Asn Asn Ser Ser Arg Pro Ser Thr Pro
 355 360 365

 Thr Ile Asn Val Leu Glu Ser Lys Asp Thr Asp Ser Asp Arg Glu Ala
 370 375 380
 Gly Thr Glu Thr Gly Gly Glu Asn Asn Asp Lys Glu Glu Glu Glu Lys
 385 390 395 400

Lys Asp Glu Thr Ser Ser Ser Ser Glu Ala Asn Ser Arg Cys Gln Thr
 405 410 415
 Pro Ile Lys Met Lys Pro Asn Ile Glu Pro Pro Glu Asn Val Glu Trp
 420 425 430

 Ser Gly Ala Glu Ala Ser Met Phe Arg Val Leu Ile Gly Thr Tyr Tyr
 435 440 445
 Asp Asn Phe Cys Ala Ile Ala Arg Leu Ile Gly Thr Lys Thr Cys Arg
 450 455 460
 Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser Ile Ile Ala Pro Ala
 465 470 475 480
 Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys Lys Lys Arg Lys His
 485 490 495

 Arg Leu Trp Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln Leu Lys Lys Asp Gly
 500 505 510
 Ser Ser Asn His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys Asp His Pro Arg Gln
 515 520 525
 Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala Gln Asn Phe Cys Glu
 530 535 540
 Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn Arg Phe Pro Gly Cys
 545 550 555 560

 Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys Pro Cys Tyr Leu Ala
 565 570 575
 Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr Cys Gly Ala Ala Asp
 580 585 590
 His Trp Asp Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn Cys Ser Ile Gln Arg
 595 600 605
 Gly Ser Lys Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp
 610 615 620

 Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu
 625 630 635 640
 His Cys Gly Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys

645 650 655
 Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp
 660 665 670
 Phe Val Val Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn
 675 680 685

 His Ser Val Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly
 690 695 700
 Asp His Arg Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu
 705 710 715 720
 Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala Asp Ala Leu Lys Tyr
 725 730 735
 Val Gly Ile Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro
 740 745

 <210> 11
 <211> 746
 <212>
 PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg
 1 5 10 15
 Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe
 20 25 30
 Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys
 35 40 45
 Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg
 50 55 60

 Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr
 65 70 75 80
 Arg Glu Cys Ser Val Thr Ser Asp Leu Asp Phe Pro Thr Gln Val Ile
 85 90 95
 Pro Leu Lys Thr Leu Asn Ala Val Ala Ser Val Pro Ile Met Tyr Ser
 100 105 110

Trp Ser Pro Leu Gln Gln Asn Phe Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu
115 120 125

His Asn Ile Pro Tyr Met Gly Asp Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr
130 135 140

Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys Asn Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp
145 150 155 160

Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn Asp Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn
165 170 175

Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp
180 185 190

Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Gln Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp
195 200 205

Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro Arg Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe
210 215 220

Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe Pro Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu
225 230 235 240

Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu Thr Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu
245 250 255

Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn Ile Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val
260 265 270

Gln Arg Glu Gln Ser Leu His Ser Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg
275 280 285

Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe Leu His Pro Phe His Ala Thr Pro Asn
290 295 300

Thr Tyr Lys Arg Lys Asn Thr Glu Thr Ala Leu Asp Asn Lys Pro Cys
305 310 315 320

Gly Pro Gln Cys Tyr Gln His Leu Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Ala
325 330 335

Ala Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Thr Pro Pro Lys Arg Pro Gly Gly
340 345 350

Arg Arg Arg Gly Arg Leu Pro Asn Asn Ser Ser Arg Pro Ser Thr Pro

355	360	365	
Thr Ile Asn Val Leu Glu Ser Lys Asp Thr Asp Ser Asp Arg Glu Ala			
370	375	380	
Gly Thr Glu Thr Gly Gly Glu Asn Asn Asp Lys Glu Glu Glu Glu Lys			
385	390	395	400
Lys Asp Glu Thr Ser Ser Ser Ser Glu Ala Asn Ser Arg Cys Gln Thr			
405	410	415	
Pro Ile Lys Met Lys Pro Asn Ile Glu Pro Pro Glu Asn Val Glu Trp			
420	425	430	
Ser Gly Ala Glu Ala Ser Met Phe Arg Val Leu Ile Gly Thr Tyr Tyr			
435	440	445	
Asp Asn Phe Cys Ala Ile Ala Arg Leu Ile Gly Thr Lys Thr Cys Arg			
450	455	460	
Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser Ile Ile Ala Pro Ala			
465	470	475	480
Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys Lys Lys Arg Lys His			
485	490	495	
Arg Leu Trp Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln Leu Lys Lys Asp Gly			
500	505	510	
Ser Ser Asn His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys Asp His Pro Arg Gln			
515	520	525	
Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala Gln Asn Phe Cys Glu			
530	535	540	
Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn Arg Phe Pro Gly Cys			
545	550	555	560
Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys Pro Cys Tyr Leu Ala			
565	570	575	
Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr Cys Gly Ala Ala Asp			
580	585	590	
His Trp Asp Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn Cys Ser Ile Gln Arg			
595	600	605	

Gly Ser Lys Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp
610 615 620

Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu
625 630 635 640

Asn Cys Gly Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys
645 650 655

Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp
660 665 670

Phe Val Val Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn
675 680 685

His Ser Val Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly
690 695 700

Asp His Arg Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu
705 710 715 720

Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala Asp Ala Leu Lys Tyr
725 730 735

Val Gly Ile Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro
740 745

<210> 12

<211> 746

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg
1 5 10 15

Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe
20 25 30

Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys
35 40 45

Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg
50 55 60

Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr

65	70	75	80
Arg Glu Cys Ser Val Thr Ser Asp Leu Asp Phe Pro Thr Gln Val Ile			
	85	90	95
Pro Leu Lys Thr Leu Asn Ala Val Ala Ser Val Pro Ile Met Tyr Ser			
	100	105	110
Trp Ser Pro Leu Gln Gln Asn Phe Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu			
	115	120	125
His Asn Ile Pro Tyr Met Gly Asp Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr			
130	135	140	
Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys Asn Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp			
145	150	155	160
Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn Asp Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn			
	165	170	175
Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp			
	180	185	190
Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Gln Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp			
195	200	205	
Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro Arg Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe			
210	215	220	
Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe Pro Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu			
225	230	235	240
Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu Thr Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu			
	245	250	255
Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn Ile Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val			
260	265	270	
Gln Arg Glu Gln Ser Leu His Ser Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg			
275	280	285	
Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe Leu His Pro Phe His Ala Thr Pro Asn			
290	295	300	
Thr Tyr Lys Arg Lys Asn Thr Glu Thr Ala Leu Asp Asn Lys Pro Cys			
305	310	315	320

Gly Pro Gln Cys Tyr Gln His Leu Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Ala
325 330 335

Ala Leu Thr Ala Glu Arg Ile Lys Thr Pro Pro Lys Arg Pro Gly Gly
340 345 350

Arg Arg Arg Gly Arg Leu Pro Asn Asn Ser Ser Arg Pro Ser Thr Pro
355 360 365

Thr Ile Asn Val Leu Glu Ser Lys Asp Thr Asp Ser Asp Arg Glu Ala
370 375 380

Gly Thr Glu Thr Gly Gly Glu Asn Asn Asp Lys Glu Glu Glu Glu Lys
385 390 395 400

Lys Asp Glu Thr Ser Ser Ser Ser Glu Ala Asn Ser Arg Cys Gln Thr
405 410 415

Pro Ile Lys Met Lys Pro Asn Ile Glu Pro Pro Glu Asn Val Glu Trp
420 425 430

Ser Gly Ala Glu Ala Ser Met Phe Arg Val Leu Ile Gly Thr Tyr Tyr
435 440 445

Asp Asn Phe Cys Ala Ile Ala Arg Leu Ile Gly Thr Lys Thr Cys Arg
450 455 460

Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser Ile Ile Ala Pro Ala
465 470 475 480

Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys Lys Lys Arg Lys His
485 490 495

Arg Leu Trp Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln Leu Lys Lys Asp Gly
500 505 510

Ser Ser Asn His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys Asp His Pro Arg Gln
515 520 525

Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala Gln Asn Phe Cys Glu
530 535 540

Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn Arg Phe Pro Gly Cys
545 550 555 560

Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys Pro Cys Tyr Leu Ala

565 570 575
Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr Cys Gly Ala Ala Asp
580 585 590

His Trp Asp Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn Cys Ser Ile Gln Arg
595 600 605

Gly Ser Lys Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp
610 615 620

Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu
625 630 635 640

Ser Cys Gly Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys
645 650 655

Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp
660 665 670

Phe Val Val Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn
675 680 685

His Ser Val Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly
690 695 700

Asp His Arg Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu
705 710 715 720

Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala Asp Ala Leu Lys Tyr
725 730 735

Val Gly Ile Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro
740 745

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr Gly Gly Val

1 5 10 15

Lys Lys Pro His Arg Tyr Arg Pro

20