



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108136011 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680057570.1

(22)申请日 2016.07.28

(30)优先权数据

62/200,244 2015.08.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/044409 2016.07.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/023671 EN 2017.02.09

(71)申请人 星座制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 S·戈施 J·M·洛拉

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 侯宝光

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/4439(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

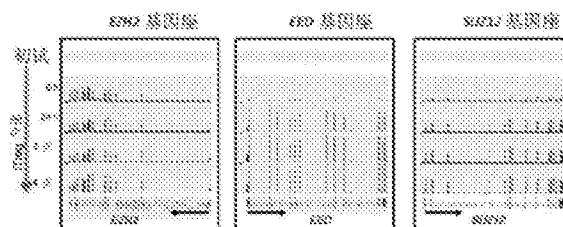
权利要求书3页 说明书13页 附图10页

(54)发明名称

EZH2抑制剂和调节性T细胞功能的调制

(57)摘要

本文提供了用于治疗特征为高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的癌症的方法,该方法包括给予治疗有效量的zeste增强子同源物2(EZH2)抑制剂。还提供了使用EZH2抑制剂和为免疫调节剂的第二试剂进行的组合疗法。



1. 一种治疗受试者的方法,该受试者患有特征为高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的癌症,该方法包括向该受试者给予治疗有效量的zeste增强子同源物2 (EZH2) 抑制剂。

2. 如权利要求1所述的方法,其中在治疗之前,确定该癌症包含高频率的一种或多种抑制性免疫细胞。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其包括在治疗之前对受试者的癌症进行活组织检查并确定该癌症是否包含高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的步骤。

4. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括确定该癌症中一种或多种抑制性免疫细胞的频率;并且如果该受试者的癌症包含高频率的一种或多种抑制性免疫细胞,则向该受试者给予治疗有效量的EZH2抑制剂。

5. 一种评估EZH2抑制剂治疗患者癌症的功效的方法,该方法包括从该患者获得样品并确定该癌症的一种或多种抑制性免疫细胞的频率,其中如果该一种或多种抑制性免疫细胞的频率高,则该EZH2抑制剂可能是有效的。

6. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括确定该癌症的一种或多种抑制性免疫细胞的频率,并且如果该受试者的癌症的一种或多种抑制性免疫细胞的频率不高,则向该受试者给予治疗有效量的除给予EZH2抑制剂以外的癌症疗法;并且如果该受试者的癌症的一种或多种抑制性免疫细胞的频率高,则施用治疗有效量的EZH2抑制剂。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,该方法进一步包括给予治疗有效量的免疫调节剂。

8. 如权利要求7所述的方法,其中该EZH2抑制剂与该免疫调节剂同时给予。

9. 如权利要求7或8所述的方法,其中该免疫调节剂选自免疫检查点阻断抑制剂、基于细胞的疗法、疫苗接种策略、防止免疫应答的代谢性抑制的试剂和基于细胞因子的疗法。

10. 如权利要求7至9中任一项所述的方法,其中该免疫调节剂是免疫检查点阻断抑制剂。

11. 如权利要求7至10中任一项所述的方法,其中该免疫调节剂是选自如下的免疫检查点阻断抑制剂:抗-CTLA4、易普利姆玛、纳武单抗、派姆单抗、佩蒂单抗、BMS 936559、阿特朱单抗、阿维鲁单抗、抗-CD47、PD-1抗体、抗-PDL1、莱姆博丽珠单抗、AMP-224和MEDI-4736。

12. 如权利要求7至11中任一项所述的方法,其中该免疫调节剂是选自如下的免疫检查点阻断抑制剂:抗-CTLA4、易普利姆玛、纳武单抗、派姆单抗、佩蒂单抗、BMS 936559、阿特朱单抗、抗-CD47、PD-1抗体、抗-PDL1、莱姆博丽珠单抗、AMP-224和MEDI-4736。

13. 如权利要求7至12中任一项所述的方法,其中该免疫调节剂是αPD-1抗体。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中该癌症的特征为高频率的调节性T细胞、高频率的M2肿瘤相关巨噬细胞、或高频率的调节性T细胞和高频率的M2肿瘤相关巨噬细胞两者。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的方法,其中该癌症的特征为高频率的调节性T细胞,该调节性T细胞由取自该癌症的组织样品中每个高倍显微镜视野的1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6或6.5个肿瘤内Treg的中值截断值所定义;高频率的M2肿瘤相关巨噬细胞,该M2肿瘤相关巨噬细胞由取自该癌症的组织样品中每个高倍显微镜视野的1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6或6.5个肿瘤内M2肿瘤相关巨噬细胞的中值截断值所定义;或高频率的调节性T细胞和高频率的M2肿瘤相关巨噬细胞两者,该调节性T细胞由取自该癌症的组织样

品中每个高倍显微镜视野的1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6或6.5个肿瘤内Treg的中值截断值所定义并且该M2肿瘤相关巨噬细胞由取自该癌症的组织样品中每个高倍显微镜视野的约1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6或6.5个肿瘤内M2肿瘤相关巨噬细胞的中值截断值所定义。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的方法, 其中该癌症选自乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、T细胞淋巴瘤、葡萄膜黑素瘤、胃癌、结肠直肠肿瘤、卵巢癌、肝细胞癌、黑素瘤、和胶质瘤。

17. 如权利要求1至15中任一项所述的方法, 其中该癌症选自多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、成人急性髓细胞性白血病 (AML)、鳞状细胞肺癌、多形性成胶质细胞瘤和弥漫型巨细胞瘤。

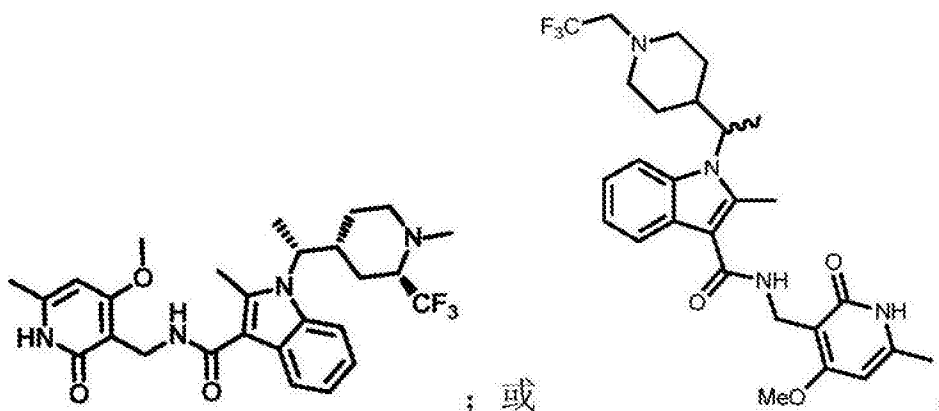
18. 如权利要求1至15和17中任一项所述的方法, 其中该癌症是霍奇金淋巴瘤。

19. 一种治疗患有癌症的受试者的方法, 该方法包括给予治疗有效量的EZH2抑制剂; 确定给予该EZH2抑制剂后是否发生T细胞增生的Treg介导的抑制的减少、是否发生M2肿瘤相关巨噬细胞的抑制或是否发生自然杀伤细胞 (NK) 细胞的频率的增加, 或其组合; 并且如果存在T细胞增生的Treg介导的抑制的减少、肿瘤相关巨噬细胞的抑制、或自然杀伤细胞 (NK) 细胞的频率的增加, 或其组合, 则继续给予治疗有效量的EZH2抑制剂。

20. 一种治疗患有癌症的受试者的方法, 该方法包括给予治疗有效量的EZH2抑制剂; 确定给予该EZH2抑制剂后是否发生T细胞增生的Treg介导的抑制的减少、是否发生M2肿瘤相关巨噬细胞的抑制或是否发生自然杀伤细胞 (NK) 细胞的频率的增加, 或其组合; 并且如果没有发生Treg介导的T细胞增生抑制的减少、没有发生肿瘤相关巨噬细胞的抑制且没有发生自然杀伤细胞 (NK) 细胞的频率的增加, 则向该受试者给予治疗有效量的除给予EZH2抑制剂以外的癌症疗法; 并且如果存在T细胞增生的Treg介导的抑制的减少、M2肿瘤相关巨噬细胞的抑制、或自然杀伤细胞 (NK) 细胞的频率的增加, 或其组合, 则继续给予治疗有效量的EZH2抑制剂。

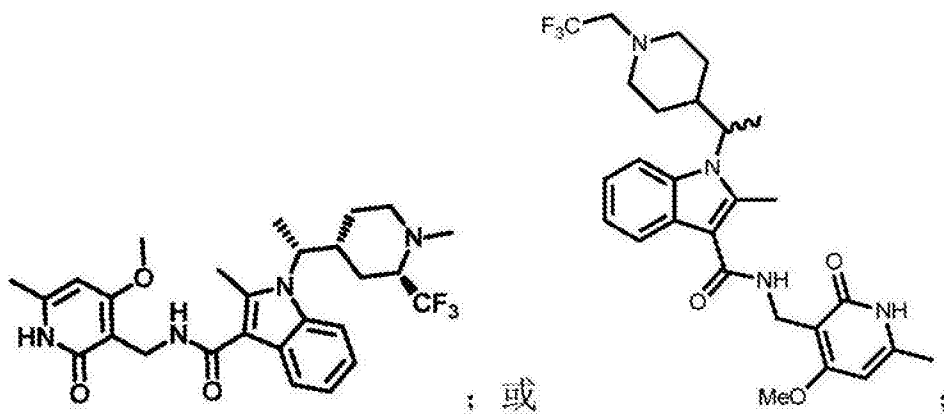
21. 如权利要求1至20中任一项所述的方法, 其中该EZH2抑制剂选自EPZ-6438、3-deazaneplanocin (脱氮腺苷环戊基类似物) A (DZNep)、EPZ005687、EPZ011989、EI1、GSK126、GSK343、UNC1999、EPZ-6438。

22. 如权利要求1至20中任一项所述的方法, 其中该EZH2抑制剂是



或其药学上可接受的盐。

23. 一种经包装的组合物, 其包含有效量的具有下式的EZH2抑制剂



或其药学上可接受的盐；和药学上可接受的载体或稀释剂，其中该组合物与说明书一起包装以治疗患有特征为高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的癌症的受试者。

24. 如权利要求23所述的经包装的组合物，其进一步包含有效量的免疫调节剂。

EZH2抑制剂和调节性T细胞功能的调制

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2015年8月3日提交的美国临时申请号62/200,244的优先权,所述临时申请的内容以其整体并入本文。

背景技术

[0003] Zeste增强子同源物2 (EZH2) 的大量的小分子抑制剂正处于临床开发中,用于治疗各种类型的癌症。尽管在开发新的EZH2抑制剂作为抗癌疗法方面取得了进步,但是这些抑制剂对哪些患者群体特别有效仍然是未知的。本文披露了特别适合于用EZH2抑制剂进行治疗的患者群体。

发明内容

[0004] 现在已经发现抑制EZH2减少调节性T细胞 (Treg) 的增生、增加细胞毒性T细胞 (CD8)、产生有利的CD8/Treg比率、增加自然杀伤(NK) 细胞和自然杀伤T (NKT) 细胞、和减少M2肿瘤相关巨噬细胞 (TAM)。基于这些发现,患有特征为高频率的Treg或高频率的M2相关的巨噬细胞的癌症的受试者,或者需要针对癌症的免疫应答的受试者,代表使用EZH2抑制剂的抗癌治疗有效的可行患者群体。

[0005] 例如,发现了用EZH2抑制剂进行的治疗降低了人类调节性T细胞的体外抑制能力(参见图4)。在体内,发现了EZH2抑制减少调节性T细胞 (Treg) 的增生、增加细胞毒性T细胞 (CD8)、产生有利的CD8/Treg比率、增加自然杀伤(NK) 细胞和自然杀伤T细胞 (NKT)、并减少M2肿瘤相关巨噬细胞 (TAM)。参见例如图6-8。另外,虽然发现CT26癌细胞对体外EZH2抑制不敏感(图9),但用EZH2抑制剂治疗小鼠(即体内)减少CT26癌细胞的生长。参见例如图10和图14。

[0006] Treg在肿瘤中是丰富的并且是癌症进展中的主要组分,因为它们通过抑制抗癌免疫应答并且甚至非免疫介导的机制而在促癌中具有关键作用。参见,例如Farashi-bonab等人,MOJ Immunol [分子免疫学] 2014, 1 (4) :00024。肿瘤微环境中Treg诱导因子的调制以及Treg的耗尽或阻断已被证明是诱导抗癌免疫和改善免疫疗法的功效的有价值的方法,特别是在检测到肿瘤中Tregs水平增加并且与不良疾病结果相关的情况下。参见,例如,Nizar等人,British Journal of Cancer [英国癌症杂志] (2009) 100,1697-1703。即使是耗尽肿瘤中Treg的单一操作也已被证明是有效的癌症单一疗法,并且是可以很好地与其他癌症疗法相结合的方法。参见,例如Smyth等人,Immunology and Cell Biology [免疫学和细胞生物学] (2014) 92,473-474。

[0007] 由于EZH2抑制剂在本文中显示为有效减少调节性T细胞 (Treg, 参见例如图6) 的增生并且鉴于Treg抑制和抗癌免疫疗法之间的已知联系,在一方面,本文提供了用于治疗患有具有高频率Treg的癌症的受试者的方法,该方法包括给予有效量的EZH2抑制剂。此类方法进一步包括给予治疗有效量的为免疫调节剂的第二试剂。

[0008] 细胞毒性T细胞(也称为CD8+T细胞或杀伤T细胞)是杀死癌细胞的T淋巴细胞、被感

染的细胞或者以其他方式受损或感染的细胞。参见,例如,Maher等人,British Journal of Cancer[英国癌症杂志](2004) 91,817-821。基于此数据,并且因为EZH2抑制剂在本文中显示为增加细胞毒性T细胞(参见图6),在另一方面,本文提供了增加患有癌症的受试者中细胞毒性T细胞频率的方法,该方法包括向该受试者给予有效量的EZH2抑制剂。此类方法进一步包括给予治疗有效量的为免疫调节剂的第二试剂。

[0009] 已知NK细胞通过例如直接诱导肿瘤细胞的死亡而在肿瘤免疫监视中起作用。参见,例如,Zamai等人,J Immunol[免疫学杂志]2007;178:4011-4016。NKT细胞与NK细胞共享性质,并且可以共表达半恒定型T细胞受体和NK细胞标记物。参见例如,Godfrey, Nat.Rev.Immunol.[自然免疫学综述]4(3):231-7。基于癌症治疗中NK细胞和NKT细胞之间的联系,因为EZH2抑制剂在本文中显示为增加NK和NKT细胞(参见例如图7),在另一方面,本文提供了增加患有癌症的受试者中NK细胞或NKT细胞或者两者的频率的方法,该方法包括向该受试者给予有效量的EZH2抑制剂。此类方法可以进一步包括给予治疗有效量的免疫调节剂。

[0010] 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)分为两种主要的表型,M1和M2。M1TAM抑制癌症进展,而M2TAM促进肿瘤生长。参见例如,Zhang等人,Journal of Ovarian Research[卵巢研究杂志]2014,7:19和Heusinkveld,Journal of Translational Medicine[转化医学杂志]2011,9:216。基于此数据,因为EZH2抑制剂在本文中显示为减少M2肿瘤相关巨噬细胞(参见例如图8),在另一方面,本文提供了治疗患有特征为高频率的M2TAM的癌症的受试者的方法,该方法包括向该受试者给予治疗有效量的EZH2抑制剂。此类方法进一步包括给予治疗有效量的为免疫调节剂的第二试剂。

[0011] 本文还提供了包含EZH2抑制剂和为免疫调节剂的第二试剂的药物组合物。已经发现,在减少调节性T细胞(Treg)的增生、增加细胞毒性T细胞(CD8)、产生有利的CD8/Treg比率、增加自然杀伤(NK)细胞和自然杀伤T(NKT)细胞、和减少M2肿瘤相关巨噬细胞(TAM)方面,这种组合产生协同效应。参见例如图11-13。在体内给予时也看见了协同作用,其中发现该组合减少癌细胞。参见例如,图10和图14。

附图说明

[0012] 图1展示了在人类Treg分化过程中上调的PRC2核心组分。

[0013] 图2展示了EZH2与Treg细胞中的阻遏基因座结合,并且抑制导致H3K27三甲基化的丧失。

[0014] 图3A展示了EZH2抑制对FOXP3表达没有影响,图3B展示了经处理的FOXP3⁺T细胞中H3K27me3水平的降低,并且图3C展示了某些细胞因子水平的表达呈剂量依赖性增加。

[0015] 图4展示了EZH2催化活性是Treg细胞抑制能力所必需的。

[0016] 图5展示了在人类iTreg中的EZH2敲低削弱抑制功能。

[0017] 图6展示了用EZH2抑制剂治疗后调节性T细胞(Treg)增生的减少和细胞毒性CD8T细胞增生的增加。

[0018] 图7展示了用EZH2抑制剂治疗后NK细胞的增加。

[0019] 图8展示了用EZH2抑制剂治疗后抑制性M2TAM的减少。

[0020] 图9展示了关于用顺铂和EZH2抑制剂治疗后CT26细胞敏感性的体外实验。

[0021] 图10展示了用EZH2抑制剂治疗后和用EZH2抑制剂和为免疫调节剂的第二试剂治疗后CT26肿瘤体积的体内减少。

[0022] 图11展示了用EZH2抑制剂和为免疫调节剂的第二试剂治疗后调节性T细胞 (Treg) 增生的减少和细胞毒性CD8T细胞增生的增加。

[0023] 图12展示了用EZH2抑制剂和为免疫调节剂的第二试剂治疗后NK和NKT细胞的增加。

[0024] 图13展示了用EZH2抑制剂和为免疫调节剂的第二试剂治疗后抑制性M2TAM的减少。

[0025] 图14A展示了CT26癌细胞对体外EZH2抑制不敏感,而图14B展示了用EZH2抑制剂治疗后和用EZH2抑制剂和为免疫调节剂的第二试剂治疗后CT26肿瘤体积的体内减少。

具体实施方式

[0026] 已经发现EZH2抑制剂的给予通过本文所述标记物中的一种或多种引起免疫应答。基于这一发现,本披露一方面涉及使用EZH2抑制剂用于治疗特定癌症受试者群体的方法。这种癌症受试者群体包含特征为具有高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的癌症。

[0027] 在一方面,本披露提供了治疗受试者的方法,该受试者患有特征为高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的癌症,该方法包括向该受试者给予治疗有效量的EZH2抑制剂。

[0028] 在一方面,在用治疗有效量的EZH2抑制剂治疗前,确定该癌症包含高频率的一种或多种抑制性免疫细胞。这种确定可以通过常规的诊断方法进行。这些方法包括但不限于活组织检查、内窥镜检查、诊断成像(X射线、CAT扫描、MRI和超声波)和血液检查。在一方面,在治疗之前对受试者的癌症进行活组织检查并在用治疗有效量的EZH2抑制剂治疗之前进行确定该癌症是否包含高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的步骤。

[0029] 在另一方面,本文提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括确定该癌症中一种或多种抑制性免疫细胞的频率;并且如果该受试者的癌症包含高频率的一种或多种抑制性免疫细胞,则向该受试者给予治疗有效量的EZH2抑制剂。

[0030] 在另一方面,本文提供了评估EZH2抑制剂治疗患者癌症的功效的方法,该方法包括从该患者获得样品并确定该癌症的一种或多种抑制性免疫细胞的频率,其中如果该一种或多种抑制性免疫细胞的频率高,则该EZH2抑制剂可能是有效的。

[0031] 在另一方面,本文提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括确定该癌症的一种或多种抑制性免疫细胞的频率,并且如果该受试者的癌症的一种或多种抑制性免疫细胞的频率不高,则向该受试者给予治疗有效量的除给予EZH2抑制剂以外的癌症疗法;并且如果该受试者的癌症的一种或多种抑制性免疫细胞的频率高,则施用治疗有效量的EZH2抑制剂。

[0032] 在另一方面,本文所述的这些方法可以进一步包括给予治疗有效量的免疫调节剂。应该理解的是,除非另有说明,否则本文所述的给予包括在给予本文所述的免疫调节剂之前、同时或之后给予所述EZH2抑制剂。因此,为了治疗目的,同时给予不是必需的。然而,在一方面,该EZH2抑制剂与该免疫调节剂同时给予。

[0033] 如本文所定义的,“免疫调节剂”是指负责诱导或增强患者对癌症的免疫应答的试剂,使得该患者的免疫系统能够减缓该进展,延迟、减少该患者的癌症或减小癌症的传播。

这类试剂包括例如免疫检查点阻断抑制剂、基于细胞的治疗、疫苗接种策略、防止免疫应答的代谢性抑制的试剂和基于细胞因子的治疗。在一方面,本发明的这些方法的免疫调节剂是免疫检查点阻断抑制剂。在一方面,本文所述的免疫调节剂是选自如下的免疫检查点阻断抑制剂:抗-CTLA4、易普利姆玛(ipilimumab)、纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、佩蒂单抗(pidilizumab)、BMS 936559、阿特朱单抗(atezolizumab)、抗-CD47、PD-1抗体、抗-PDL1、莱姆博丽珠单抗(lambrolizumab)、AMP-224和MEDI-4736。在一方面,本文所述的免疫调节剂是选自如下的免疫检查点阻断抑制剂:抗-CTLA4、易普利姆玛、纳武单抗、派姆单抗、佩蒂单抗、BMS 936559、阿特朱单抗、抗-CD47、PD-1抗体、抗-PDL1、阿维鲁单抗(avelumab)、莱姆博丽珠单抗、AMP-224和MEDI-4736。在另一个替代方案中,本文所述的免疫调节剂是 α PD-1抗体。

[0034] 如本文所定义的,“抑制性免疫细胞”是指淋巴谱系的那些(例如T淋巴细胞、B淋巴细胞和自然杀伤细胞)和骨髓谱系的那些(例如单核细胞、巨噬细胞、朗格汉斯细胞、树突细胞、巨核细胞和粒细胞(嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞)),其可以抑制包含在患者的抗癌防御中的其他免疫细胞的活性或增生。在一方面,如本文所述的方法中所述的一种或多种抑制性免疫细胞选自调节性T细胞(Treg)、细胞毒性T细胞(CD8)、自然杀伤(NK)细胞和自然杀伤T细胞(NKT)和M2肿瘤相关巨噬细胞(TAM),及其组合。在另一方面,如本文所述的方法中所述的一种或多种抑制性免疫细胞是调节性T细胞或M2肿瘤相关巨噬细胞,或其组合。

[0035] 本文还提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括给予治疗有效量的EZH2抑制剂;确定给予该EZH2抑制剂后是否发生T细胞增生的Treg介导的抑制的减少、是否发生M2肿瘤相关巨噬细胞的抑制或是否发生自然杀伤细胞(NK)细胞的频率的增加,或其组合;并且如果存在T细胞增生的Treg介导的抑制的减少、肿瘤相关巨噬细胞的抑制、或自然杀伤细胞(NK)细胞的频率的增加,或其组合,则继续给予治疗有效量的EZH2抑制剂。否则,则用与EZH2不同的抗癌疗法治疗该受试者。

[0036] 进一步提供了治疗受试者癌症的方法,该方法包括取该癌症样品并确定是否存在高频率的一种或多种高频率的调节性T细胞或高频率的M2肿瘤相关巨噬细胞并用EZH2抑制剂治疗该受试者。如果该受试者不具有高频率的一种或多种高频率的调节性T细胞或高频率的M2肿瘤相关巨噬细胞,则可以用除EZH2抑制剂之外的抗癌疗法治疗该受试者。

[0037] 因此,本文还提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括给予治疗有效量的EZH2抑制剂;确定给予该EZH2抑制剂后是否发生T细胞增生的Treg介导的抑制的减少、是否发生M2肿瘤相关巨噬细胞的抑制或是否发生自然杀伤细胞(NK)细胞的频率的增加,或其组合;并且如果没有发生Treg介导的T细胞增生抑制的减少、没有发生肿瘤相关巨噬细胞的抑制且没有发生自然杀伤细胞(NK)细胞的频率的增加,则向该受试者给予治疗有效量的除给予EZH2抑制剂以外的癌症疗法;并且如果存在T细胞增生的Treg介导的抑制的减少、M2肿瘤相关巨噬细胞的抑制、或自然杀伤细胞(NK)细胞的频率的增加,或其组合,则继续给予治疗有效量的EZH2抑制剂。

[0038] 如本文所使用的,“高频率”是指在取自癌症的组织样品中每个高倍显微镜视野(放大400倍)的1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6或6.5个肿瘤内Treg或M2肿瘤相关巨噬细胞的中值截断值。在一方面,该中值截断值是在取自癌症的组织样品中每个高倍显微镜视

野(放大400倍)的1.5、2、2.5或3个肿瘤内Treg或M2肿瘤相关巨噬细胞。在另一方面,该中值截断值是在取自癌症的组织样品中每个高倍显微镜视野(放大400倍)的2个肿瘤内Treg或M2肿瘤相关巨噬细胞。用于确定每个高倍显微镜视野(放大400倍)的肿瘤内Treg或M2肿瘤相关巨噬细胞的方法是本领域已知的并且可以在例如Gao等人,(2007) J.Clin Onc[临床肿瘤学杂志]25(18):2586-2593中发现。

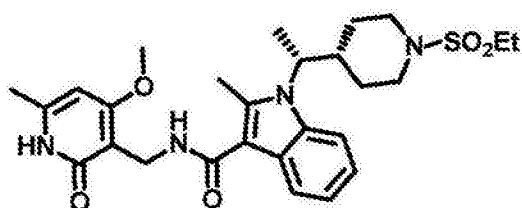
[0039] 除上述之外,高频率的M2肿瘤相关巨噬细胞也指针对每个肿瘤样品约20,000个总细胞的20、25、30、35、40、45、50、55或60个M2巨噬细胞的密度。在另一方面,平均密度是针对每个肿瘤样品约20,000个总细胞的20、25或30个M2巨噬细胞。用于确定肿瘤样品中M2巨噬细胞的密度/总细胞的方法是本领域已知的,并且包括,例如在石蜡包埋的癌症样本的免疫染色的15 μ m切片上进行基于激光捕获显微切割(LCM)的流式细胞术。参见,例如,Zhang等人,Journal of Ovarian Research[卵巢研究杂志]2014,7:19。

[0040] 如本文所使用的,本文所定义的细胞毒性免疫细胞中的一种或多种的“频率增加”,例如,自然杀伤细胞的频率增加,是指与治疗前相比,治疗后增加患者细胞毒性免疫细胞中的一种或多种的活性、增生或发育。

[0041] 如本文所使用的,本文所定义的抑制性免疫细胞中的一种或多种的“减少”,例如T细胞增生的Treg介导的抑制的减少,是指与治疗前相比,治疗后抑制性免疫细胞的活性、增生或发育的降低。

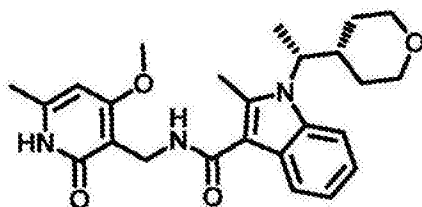
[0042] 如本文所使用的,对本文所定义的抑制性免疫细胞中的一种或多种的“抑制”,例如对T细胞增生的抑制,是指降低本文所定义的抑制性免疫细胞的活性、增生或发育。

[0043] 本文所述的EZH2抑制剂包括例如能够抑制EZH2甲基转移酶活性的小分子或生物制剂。抑制可以在体外、体内或从其组合进行测量。在一方面,本文所述方法中的EZH2抑制剂选自EPZ-6438、EPZ005687、EPZ011989、EI1、GSK126、GSK343、UNC1999以及描述于WO 2013/075083、WO 2013/075084、WO 2013/078320、WO 2013/120104、WO 2014/124418、WO 2014/151142、和WO 2015/023915中的那些。在一个可替代的方面,本文所述方法中的EZH2抑制剂选自

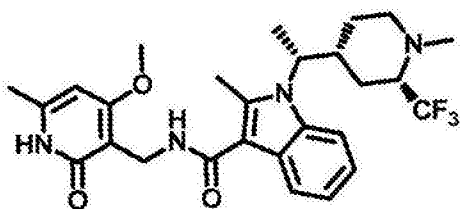


(抑制剂 1);

[0044]

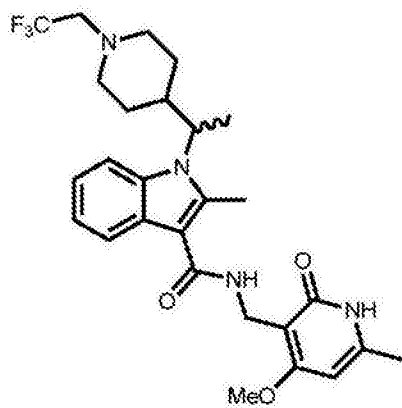


(抑制剂 2);



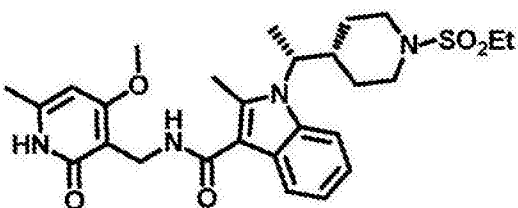
(抑制剂 3); 和

[0045]



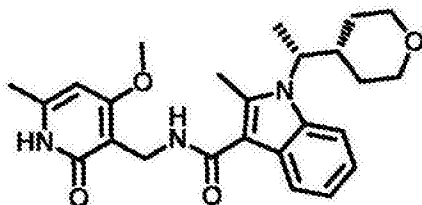
(抑制剂 4);

[0046] 或其药学上可接受的盐。在另一个可替代的方面,本文所述方法中的EZH2抑制剂是



(抑制剂 1); 或

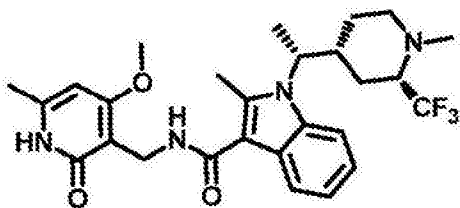
[0047]



(抑制剂 2);

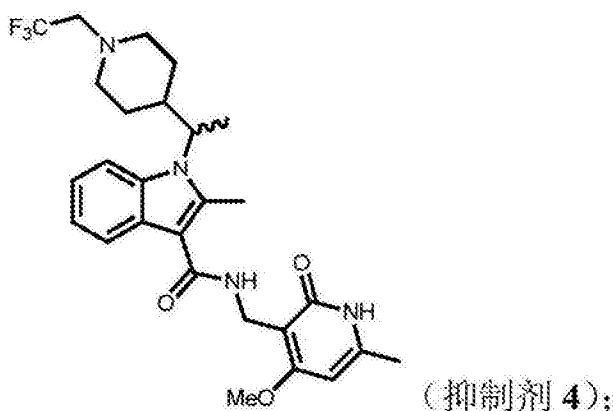
[0048] 或其药学上可接受的盐。在另一个可替代的方面,本文所述方法中的EZH2抑制剂是

[0049]



(抑制剂 3); 或

[0050]



[0051] 或其药学上可接受的盐。

[0052] 本文还提供了治疗对其有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者给予治疗有效量的如本文所述的EZH2抑制剂和治疗有效量的如本文所定义的为免疫调节剂的第二试剂。

[0053] 如本文所定义的EZH2抑制剂和免疫调节剂的量一起致使它们引起协同作用以在生物样品或患者中减少调节性T细胞(Treg)的增生、增加细胞毒性T细胞(CD8)、产生有利的CD8/Treg比率、增加自然杀伤(NK)细胞和自然杀伤T(NKT)细胞、减少M2肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、抑制EZH2和/或治疗如本文所述的一种或多种癌症。

[0054] 还包括包含如本文所述的EZH2抑制剂和免疫调节剂的药物组合物。

[0055] 如本文所使用的术语“治疗(treatment、treat和treating)”是指逆转、缓解、或抑制如本文所述的癌症或者其一种或多种症状的进展。癌症的示例性类型包括例如肾上腺癌、腺泡细胞癌、听神经瘤、肢端雀斑样黑色素瘤、肢端汗腺瘤、急性嗜酸细胞性白血病、急性红细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性成巨核细胞性白血病、急性单核细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、腺癌、腺样囊性癌、腺瘤、牙源性腺样瘤、腺鳞癌、脂肪组织肿瘤、肾上腺皮质癌、成人T-细胞白血病/淋巴瘤、侵袭性NK-细胞白血病、AIDS-相关淋巴瘤、肺泡横纹肌肉瘤、肺泡软组织肉瘤、成釉细胞纤维瘤、间变性大细胞淋巴瘤、甲状腺未分化癌、血管免疫母细胞性T-细胞淋巴瘤、血管平滑肌脂肪瘤、血管肉瘤、星形细胞瘤、非典型畸胎样横纹肌样瘤、B-细胞慢性淋巴细胞白血病、B-细胞幼淋巴细胞白血病、B-细胞淋巴瘤、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、母细胞瘤、骨癌、布伦纳瘤、棕色瘤、伯基特氏淋巴瘤、乳腺癌、脑癌、上皮癌(carcinoma)、原位癌、癌肉瘤、软骨瘤、牙骨质瘤、骨髓肉瘤、软骨瘤、脊索瘤、绒毛膜癌、脉络丛乳头状瘤、肾透明-细胞肉瘤、颅咽管瘤、皮肤T-细胞淋巴瘤、宫颈癌、结肠直肠癌、德戈斯病、促结缔组织增生性小圆细胞瘤、弥漫性大B-细胞淋巴瘤、胚胎发育不良性神经上皮瘤、无性细胞瘤、胚胎瘤、内分泌腺肿瘤、内胚窦瘤、肠病-相关T-细胞淋巴瘤、食道癌、胎中胎、纤维瘤、纤维肉瘤、滤泡性淋巴瘤、滤泡状甲状腺癌、神经节细胞瘤、胃肠癌、生殖细胞瘤、妊娠绒毛膜癌、巨细胞成纤维细胞瘤、骨巨细胞瘤、胶质肿瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、大脑胶质瘤病、胰高血糖素瘤、性腺胚细胞瘤、粒层细胞瘤、两性胚胎细胞瘤、胆囊癌、胃癌、毛细细胞白血病、成血管细胞瘤、头颈癌、血管外皮细胞瘤、恶性血液肿瘤、肝母细胞瘤、肝脾T-细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非-霍奇金淋巴瘤、浸润性小叶癌、肠癌、肾癌、喉癌、恶性雀斑样痣、致死性中线癌、白血病、莱迪希细胞瘤、脂肪肉瘤、肺癌、淋巴管瘤、淋巴管肉瘤、淋巴上皮瘤、淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋

巴细胞白血病、肝癌、小细胞肺癌、非-小细胞肺癌、MALT淋巴瘤、恶性纤维组织细胞瘤、恶性外周神经鞘瘤、恶性蝶螈瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区B-细胞淋巴瘤、肥大细胞白血病、纵隔生殖细胞瘤、乳腺髓样癌、甲状腺髓样癌、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、转移性尿路上皮癌、苗勒管混合瘤、粘液性肿瘤、多发性骨髓瘤、肌肉组织肿瘤、蕈样霉菌病、粘液样脂肪肉瘤、粘液瘤、粘液肉瘤、鼻咽癌、神经鞘瘤、神经母细胞瘤、神经纤维瘤、神经瘤、结节性黑素瘤、眼癌、少突星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、大嗜酸粒细胞瘤、视神经鞘膜瘤、脑膜瘤、视神经肿瘤、口腔癌、骨肉瘤、卵巢癌、肺沟癌、乳头状甲状腺癌、副神经节瘤、松果体母细胞瘤、松果体细胞瘤、垂体细胞瘤、垂体腺瘤、垂体瘤、浆细胞瘤、多胚瘤、前体T-淋巴母细胞性淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、原发性腹膜癌、前列腺癌、胰腺癌、咽癌、腹膜假粘液瘤、肾细胞癌、肾髓样癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌瘤、横纹肌肉瘤、李希特氏转化(Richter's transformation)、直肠癌、肉瘤、施万细胞瘤(Schwannomatosis)、精原细胞瘤、睾丸支持细胞瘤、性索-性腺间质肿瘤、印戒细胞癌、皮肤癌、小蓝圆细胞瘤、小细胞癌、软组织肉瘤、生长抑素瘤、煤烟疣、脊髓肿瘤、脾边缘区淋巴瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤、塞扎里氏病、小肠癌、鳞状细胞癌、胃癌、T-细胞淋巴瘤、睾丸癌、卵泡膜细胞瘤、甲状腺癌、移行细胞癌、喉癌、脐尿管癌、泌尿生殖系统癌、尿路上皮癌、葡萄膜黑素瘤、子宫癌、疣状癌、视路胶质瘤、外阴癌、阴道癌、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、沃辛氏瘤和威尔姆氏瘤。

[0056] 在一方面,通过本文所述的方法或组合治疗的癌症选自乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、T细胞淋巴瘤、葡萄膜黑素瘤、胃癌、结肠直肠肿瘤、卵巢癌、肝细胞癌、黑素瘤、和胶质瘤。在另一方面,该癌症选自多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、成人急性髓细胞性白血病(AML)、急性B成淋巴细胞白血病(B-ALL)和T谱系急性成淋巴细胞白血病(T-ALL)。在另一方面,该癌症选自多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、成人急性髓细胞性白血病(AML)、鳞状细胞肺癌、多形性成胶质细胞瘤和弥漫型巨细胞瘤。在另一方面,治疗的癌症是非霍奇金氏淋巴瘤。

[0057] 还包括本文所述的EZH2抑制剂在制备用于治疗一种或多种本文所述的癌症(例如特征为高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的那些癌症)的药物中的用途。本文还包括包含如本文所述的EZH2抑制剂和免疫调节剂的药物组合物,任选地与药学上可接受的载体一起,在制备用于治疗一种或多种本文所述的癌症(例如特征为高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的那些癌症)的药物中的用途。还包括用于治疗患有癌症(例如特征为高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的那些癌症)的受试者的EZH2抑制剂。进一步包括包含如本文所述的EZH2抑制剂和免疫调节剂的药物组合物,任选地与药学上可接受的载体一起,用于治疗一种或多种本文所述的癌症(例如特征为高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的那些癌症)。

[0058] 进一步提供了经包装的组合物,该组合物包含有效量的本文所述的EZH2抑制剂或其药学上可接受的盐;和药学上可接受的载体或稀释剂,其中该组合物与说明书一起包装以治疗患有特征为高频率的一种或多种抑制性免疫细胞的癌症的受试者。在一方面,该经包装的组合物进一步包含有效量的本文所述的免疫调节剂。

[0059] 术语“药学上可接受的载体、佐剂、或媒介物”是指不会不利地影响与其一起配制的化合物的药理学活性并且也是用于人类使用安全的无毒的载体、佐剂、或媒介物。可以在

本披露的组合物中使用的药学上可接受的载体、佐剂或媒介物包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、硬脂酸镁、卵磷脂、血清蛋白如人血清蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、部分饱和的植物脂肪酸的甘油酯混合物、水、盐或者电解质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质(例如微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖一水合物、十二烷基硫酸钠和交联羧甲基纤维素钠)、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡类、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇以及羊毛脂。

[0060] 本文中的组合物和给予方法可以是口服、胃肠外地、经吸入喷雾、局部地、经直肠、经鼻、经颊、经阴道或经由植入式储药器进行。如本文使用的术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌内、关节-内、滑膜-内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内以及颅内的注射或输注技术。

[0061] 其他形式的给予如W0 2013/075083、W0 2013/075084、W0 2013/078320、W0 2013/120104、W0 2014/124418、W0 2014/151142、和W0 2015/023915中所述,这些专利的内容通过引用以其全文结合在此。

[0062] 实例

[0063] 尽管已经描述了本发明的许多实施例,但清楚的是,可以改变我们的基本实例以便提供利用本披露的化合物和方法的其他实施例。因此,应当理解,本披露的范围将由所附权利要求而不是由已经通过示例表示的具体实施例来限定。

[0064] 贯穿本申请引用的所有文献(包括参考文献、授权的专利、公布的专利申请和共同未决的专利申请)的内容通过引用以其全文特此结合。除非另外限定,本文所用的所有的技术和科学术语符合本领域普通技术人员公知的含义。

[0065] 根据以下文献中所述的程序来制备抑制剂1:Bradley, W.D. 等人(2014), EZH2Inhibitor Efficacy in Non-Hodgkin's Lymphoma Does Not Require Suppression of H3K27Monomethylation[非霍奇金淋巴瘤中的EZH2抑制剂功效不需要H3K27单甲基化的抑制], Chemistry&Biology[化学与生物学]21,1463-1475。

[0066] 根据W0 2013/120104中所述的程序制备抑制剂4。

[0067] 材料与方法

[0068] Treg分化和RNA-seq。Leukopak样品采购自生物专业公司(Biological Specialty Corporation, 美国宾夕法尼亚州科尔马)并通过Ficoll (GE生物科学公司(GE Biosciences))密度梯度离心分离外周血单核细胞(PBMC)。使用美天旎公司(Miltenyi)初试人类T细胞分离试剂盒(130-094-131, 美天旎生物科技公司(Miltenyi Biotech))从PBMC分离初试CD4+CD45RA+T细胞至纯度>98%。使用人类T-活化剂(Human T-Activator) CD3/CD28Dynabeads® (11132D, 英杰公司(Invitrogen))、10ng/mL的人类TGFβ和10U/mL的人类IL-2(分别为100-B和202-IL; R&D生物系统公司(R&D Biosystems))将分离的细胞在iTreg极化条件下以10⁶个细胞/mL培养。使用Qiagen RNeasy Plus微型试剂盒在活化后6h、24h、3d和4d从iTreg培养物中分离RNA,并在洋脊生物科学公司(Ocean Ridge Biosciences)进行测序,使用TopHat v1.4.1和参数p 2--library-type fr-unstranded将来自RNA-seq的FL. 读数映射到人类基因组的hg19版本上。Hg19bowtie基因组指数下载自ftp://ftp.ccb.jhu.edu/pub/data/bowtie_indexes/。在进一步处理之前去除重复的读数对。针对参考转录物组Homo_sapiens.GRCh37.73.chr.gtf运行Cufflinks,该转录物组获得自

`ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-73/gtf/homo_sapiens/Homo_sapiens.GRCh37.73.gtf.gz`, 参数为`--no-effective-length-correction`和`--library-type fr-unstranded`。将失败的表达评估尝试设置为NA, 并在其余分析中将其忽略。

[0069] 在iTreg极化条件(如上所述)下用5 μ M抑制剂1或DMSO处理ChIP。初试人类CD4⁺T细胞持续4天。在具有1%甲醛的细胞培养基中将 4×10^7 个细胞交联10分钟。使用终浓度为125mM的甘氨酸使甲醛交联淬灭10分钟。将这些细胞粒化并用PBS加蛋白酶抑制剂进行洗涤。将细胞沉淀在液氮中快速冷冻并储存在-80℃直到进行下一步。添加冷的1ml的裂解缓冲液(1%SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.1, 蛋白酶抑制剂), 在冰上解冻细胞沉淀并在冰上孵育10分钟。然后使用微尖探头超声波仪(必能信公司(Branson))在总共15分钟(循环:10秒钟开启, 30秒钟关闭)的设定3.5上在冰上超声处理样品。使样品澄清并收集上清液。在向溶解产物中添加抗体之前, 添加另外的ChIP稀释缓冲液(1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, pH 8.1, 167mM NaCl)以将SDS浓度降低至0.1%。对于免疫沉淀反应, 将4 μ g的抗EZH2抗体(07-689, 密理博公司(Millipore))添加到来自 2×10^7 个细胞的染色质中, 并在4℃下孵育过夜。对于组蛋白修饰ChIP, 将4 μ g的抗H3K27me3抗体(9733, Cell Signaling公司)与来自 1.25×10^5 个果蝇S2细胞的经超声处理的染色质一起添加到来自 10×10^6 个细胞的染色质中, 并且将2 μ l抗H2Av抗体(39715, Active Motif公司)用于标准化对照并在4℃下孵育过夜。通过每个样品添加50 μ l蛋白G磁性小珠(英杰公司)来捕获抗体-染色质复合物。将小珠-染色质混合物在4℃下旋转孵育1小时。具有结合的抗体-蛋白质-DNA的珠子用RIPA洗涤缓冲液(0.1%SDS, 0.1%DOC, 1%Triton X 100, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 8.1), 150mM NaCl)洗涤三次, 用RIPA 500洗涤缓冲液(0.1%SDS, 0.1%DOC, 1%Triton X 100, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 8.1), 500mM NaCl)洗涤三次, 用LiCl洗涤缓冲液(0.5%DOC, 10mM Tris-HCl (pH 8.1), 250mM LiCl, 0.5%Triton X-100)洗涤三次和用TE(10mM Tris-HCl (pH 8.5), 1mM EDTA)洗涤两次。伴随间歇搅拌, 用洗脱缓冲液(10mM Tris-HCl (pH 8), 10mM EDTA, 0.1%SDS, 5mM DTT)在65℃下将DNA-蛋白质复合物洗脱1小时。将洗脱的染色质在65℃进行交联逆转4小时。将未交联的DNA用0.25mg/ml RNA酶A在37℃下处理30分钟, 接着在55℃下经蛋白酶K消化(0.25mg/ml)1小时。通过PCR纯化柱(凯杰公司(Qiagen) MinElute)纯化DNA, 并用缓冲液EB(10mM Tris-HCl, pH 8)洗脱。

[0070] 使用免疫沉淀的、经纯化的DNA, 按照制造商的说明, 使用Ovation Ultralow DR Multiplex System(核时代公司(NuGEN))为每个样品产生独特的条形码文库。针对每个文库制备使用10ng的DNA。针对每个文库制备, 进行17个循环的PCR扩增。使用随试剂盒提供的不同条形码将三个样品复用在一起。在文库制备的最终珠纯化步骤之后, 将DNA在2%琼脂糖E-凝胶(英杰公司)上运行, 并提取200-350bp之间的DNA并通过凯杰公司MinElute柱进行纯化。在安捷伦公司(Agilent) 2100生物分析仪(安捷伦科技公司(Agilent Technologies))上评估DNA的质量, 并且然后在MIT(马萨诸塞州剑桥)的BioMicro中心的Illumina HiSeq上进行测序。

[0071] Luminex细胞因子测定。根据制造商的方案, 使用Luminex多重测定(HTH17MAG-14K-12, 密理博公司(Millipore))从第4天的细胞上清液定量细胞因子。

[0072] Treg抑制测定。在存在DMSO或5 μ M抑制剂1的情况下, 将人类iTreg体外(如上所述)分化4天。在第4天将细胞从Dynabead刺激中取出, 洗涤并计数。使用制造商的方案, 用CFSE

(羧基荧光素琥珀酰亚胺酯;C34554,生命技术公司(Life Technologies))标记初试T细胞。将初试T细胞和iTreg的共培养物设置为1:2、1:4和1:8的比率。将人类T活化剂CD3/CD28 Dynabeads®以1:8的珠与细胞的比率进行添加。

[0073] EZH2的慢病毒shRNA敲低。如上所述,在iTreg诱导条件下培养初试人类T细胞,并在激活后约16小时用含有对EZH2具有特异性的shRNA的慢病毒进行感染(将3个独立的发夹/蛋白质克隆到基于pLK0.1的慢病毒媒介物中;下表)。在8μg/mL sequabrene (S2667-1VL,西格玛公司(Sigma))存在下,将慢病毒上清液添加到T细胞中,接着在30℃以2100rpm旋转感染90'。24h后通过添加1μg/mL嘌呤霉素选择转导的细胞;通过测量GFP荧光来监测感染率。使用第7天的iTreg培养物设置抑制测定;将初试T细胞用细胞增生染料(Cell Proliferation dye)eFluor 450 (65-0842-90,亿生物科技公司)标记。

[0074]

shRNA	靶标序列
EZH2sh1	GCTGAAGCCTCAATGTTTAGA
EZH2sh2	CGATCCTGAAGAAAGAGAAGA
EZH2sh3	GACTCTGAATGCAGTTGCTTC

[0075] 肿瘤植入和给药。在体外扩展CT26小鼠结肠癌细胞(ATCC CRL-2638),并将1X 10⁵个细胞/小鼠用50%基质胶接种到6-8周龄雌性BABL/C小鼠(Taconic)的皮下侧翼区。一旦肿瘤可触及(>200mm³),将小鼠随机化,并在同一天开始给药。抑制剂1以200mg/kg皮下给予(BID),并且每3-4天以200μg/小鼠给予(IP)PD-1抗体(克隆:RMP1-14,BE0146,BioXCell)。每隔2-3天测量肿瘤并记录体重。

[0076] 肿瘤浸润细胞的分离和分析。将肿瘤切成小块,在37℃下用3mg/mL胶原酶A和100μg/mL DNA酶I消化30分钟,接着添加FBS。使用40μm过滤器过滤消化的肿瘤块,旋转沉降并用PBS洗涤。通过BD FACSCantoTMII流式细胞分析仪(BD生物科学公司)上的FACS使免疫细胞可视化 and 量化。

[0077] 小鼠抗体。CD16/CD32纯化的(Fc阻断剂(Fc block);14-0161-82,亿生物科技公司(eBioscience))、CD45eFluor®450 (48-0451-82,亿生物科技公司)、CD3e PerCP-花菁5.5 (45-0031-82,亿生物科技公司)、CD4APC (17-0041-82,亿生物科技公司)、CD8a PE-花菁7 (25-0081-82,亿生物科技公司)、CD45-FITC (11-0451-82,亿生物科技公司)、CD11b PE (12-0112-82,亿生物科技公司)、F4/80抗原PerCP花菁5.5 (45-4801-82,亿生物科技公司)、Ly-6C APC (17-5932-82,亿生物科技公司)、CD160PE (12-1601-82,亿生物科技公司)、CD335 (NKp46) PE-花菁7 (25-3351-82,亿生物科技公司)、NK1.1APC-eFluor®780 (47-5941-82,亿生物科技公司)、IFN γ APC (17-7311-82,亿生物科技公司)、TNFαPE (12-7321-82,亿生物科技公司)、CD3eAPC-eFluor®780 (47-0031-82,亿生物科技公司)、CD19APC-eFluor®780 (47-0193-82,亿生物科技公司)、Ki-67FITC (11-5698-82,亿生物科技公司)、CD4APC-eFluor®780 (47-0041-82,亿生物科技公司)、MHC-II (M/114.15.2)-AmCyam/V500 (562366,BD生物科学公司(BD Biosciences))、CD8αAmCyan/V500 (560778,BD生物科学公司)、CD206FITC (MRD5D3) (MCA2235FA,AbD赛洛特克(AbD Serotec))、Ly-6G PE/Cy7 (127617,博奇公司(Biolegend))。

[0078] 将PRC2核心组分在人类Treg分化中上调,并且其催化组分EZH2是这些细胞中染色

质结构的重要调节剂。

[0079] 为了探索EZH2在Treg生物学中的作用,我们通过探究EZH2以及PRC2核心组分EED和SUZ12在Treg分化过程中是否表达开始。为此目的,我们在6小时、24小时、3天和4天从初试人类T细胞和沿Treg谱系途径分化的T细胞(在TGF- β 1和IL-2存在下,通过T细胞受体激活的初试T细胞)进行RNA测序(RNA-seq)。初试T细胞中EZH2、EED和SUZ12的表达水平均低于检测值。然而,在分化成Treg的过程中,所有3种PRC2组分早在第6小时已被诱导,并且在所研究的分化期的其余时间(4天;图1)保持高度表达。这些观察结果与PRC2在人类Treg分化中起作用的概念是一致的。因为EZH2,PRC2的催化组分,驱动组蛋白H3中赖氨酸27的三甲基化(H3K27me₃),所以我们使用了有效的选择性EZH2小分子抑制剂,抑制剂1,来探究实际上EZH2是否不仅被表达,而且在人类Treg细胞中具有生物活性。事实上,深度测序(ChIP-seq)前的染色质免疫沉淀表明,EZH2与这些细胞中的某些阻遏基因座结合,并且EZH2的抑制导致H3K27三甲基化的丧失(图2)。

[0080] EZH2不是FOXP3表达所必需的。

[0081] 已知转录因子FOXP3是Treg细胞的基本调节子,并且因此了解EZH2在其表达中起什么作用是重要的。为此,我们在增加浓度的抑制剂1的存在下将初试人类T细胞分化成Treg,并通过流式细胞术(FACS)分析培养物。EZH2抑制对FOXP3表达没有影响,因为我们检测到在经抑制剂1处理的培养物与用DMSO对照处理的那些之间的FOXP3⁺细胞的频率方面没有差异(图3A)。这种在FOXP3表达方面缺乏效果不归因于该化合物的生化活性的缺乏,因为在相同细胞中H3K27me₃强烈降低(图3B)。此外,如通过向经编码的蛋白质(IFN γ 、IL-13和IL-10)的培养基中分泌所见,我们观察到在某些基因表达上呈剂量依赖性增加(图3C)。总之,这些观察结果表明,尽管EZH2对于FOXP3表达是不必要的,但它可能在人类Treg细胞的功能方面起重要作用。

[0082] EZH2在功能上是人类Treg细胞活性所必需的。

[0083] Treg细胞的基本生物学功能是抑制其他免疫细胞(包括T细胞)的增生。这些功能可以在所谓的抑制测定中进行体外探究,其中Treg细胞与初试T细胞(“应答细胞”,Tresp)共培养,其增生可以通过FACS染料CFSE或太平洋蓝(Pac-Blue)的逐步稀释进行跟踪。为了探索EZH2抑制的任何功能性结果,我们使用在抑制剂1或DMSO对照存在下已经分化的Treg细胞进行抑制测定。正如所料,增加DMSO处理的Treg细胞与Tresp细胞的比率导致Tresp增生的抑制增加。然而,在抑制剂1存在下分化的Treg细胞的抑制能力被削弱(图4),表明EZH2催化活性对于Treg细胞的全生物活性是必需的。重要的是,抑制剂1对单独的Tresp的增生没有影响(图4)。为了排除抑制剂1的脱靶效应的任何可能性,并为了采用正交测定确认EZH2对Treg活性的功能需求,在Treg细胞分化条件下通过人类T细胞中的3个独立的EZH2shRNA发夹的慢病毒转导来降低EZH2的表达。用靶向EZH2的shRNA而不是非靶向对照(NTC)转导的细胞显示EZH2mRNA水平显著降低和总体H3K27me₃水平降低,而对FOXP3蛋白表达的影响最小(图5)。在抑制测定中,所有3个发夹都降低了Treg细胞的抑制能力(图5)。总之,这些数据表明EZH2在功能上是人类Treg细胞的抑制能力所必需的,并且这个功能取决于其催化活性。

[0084] EZH2抑制导致CT26同种异体移植肿瘤模型中肿瘤生长抑制。

[0085] 我们首先评估了CT26癌细胞的治疗是否对EZH2抑制敏感。使用CT26癌细胞作为用

于测试免疫疗法方案的模型和在有关宿主免疫应答的研究中的方案是已知的。尽管在调节Treg、CD8细胞、NK和NKT细胞以及M2巨噬细胞方面取得了有利的结果(图6-8),但令人不安的是,给予抑制剂1时基本上没有发现CT26细胞敏感性(图9)。无论如何,基于我们发现EZH2对Treg细胞抑制能力的功能需求,并且因为已知抑制途径被体内肿瘤细胞共同选择以逃避免疫攻击,所以我们在体内功效研究中对抑制剂1进行了测试。我们用同基因CT26癌细胞(对EZH2抑制不敏感,抑制剂1)接种BALB/c小鼠,并且一旦肿瘤可触及,将动物随机分为4个治疗组:媒介物对照;抗PD1抗体(PD-1);抑制剂1;PD1+抑制剂1组合。PD1治疗组在21天治疗期后仅显示边缘效力。然而,用抑制剂1进行的治疗显著有效。组合组也是有效的,与所有其他组相比具有效力增加的趋势(图10)。

[0086] EZH2抑制改变体内肿瘤免疫应答。

[0087] 图示于图11中的所观察到的效力伴随有肿瘤中存在的免疫浸润物的变化。研究终止后(第22天)从小鼠分离肿瘤,进行消化并染色,用作免疫标记物,允许通过FACS定量免疫细胞群。相对于单独的PD1组;* $p \leq 0.05$,学生T检验,抑制剂1+ α PD1组显示增生性Treg的比例显著降低,并且增生性CD8T细胞显著增加。与在 α PD1组中观察到的降低的功效一致,我们在该组中发现增生性Treg细胞的增加和增生性细胞毒性CD8细胞的减少,尤其是当与组合组相比时(图11)。如果将用EZH2抑制剂处理的组一起分析并且针对未用EZH2抑制剂处理的组进行分析,该效果也是清楚的(图6)。

[0088] 已知CD8T细胞是小鼠和人类中抗肿瘤效力的主要效应物。我们还探索了超出我们的体外实验所预测的免疫细胞变化,并发现了几个意料之外的观察结果。首先,经抑制剂1处理的动物中自然杀伤(NK)和NKT细胞(也是抗肿瘤活性的主要驱动者)增加,而在 α PD1组中减少(图12)。如果将用EZH2抑制剂处理的组一起分析并且针对未用EZH2抑制剂处理的组进行分析,该效果也是清楚的(图7)。其次,M2肿瘤相关巨噬细胞(TAM),已知是免疫抑制性的,在抑制剂1处理的动物中减少,而在 α PD1处理的动物中增加(图13)。如果将用EZH2抑制剂处理的组一起分析并且针对未用EZH2抑制剂处理的组进行分析,该效果也可以观察到(图8)。图10中显示了用抑制剂1+ α PD1治疗的肿瘤体积减小。用抑制剂4也观察到类似的结果。在增加量的抑制剂4浓度的存在下评估CT26小鼠结肠癌细胞的生长。抑制剂4。如图14A所示,与在不存在抑制剂4的情况下生长的CT26细胞相比,抑制剂4没有引起显著的生存力缺陷。然而,当在用CT26细胞接种的具有免疫能力的Balb/c小鼠中评估抑制剂4作为单一试剂或与抗小鼠PD1抗体组合的效果时,与抗PD1组合的抑制剂4显示动物子集中肿瘤生长的完全消除(图14B)。在没有抗PD1的情况下,与经媒介物处理的对照动物相比,抑制剂4显示肿瘤生长的适度延迟。

[0089] 总之,这些新颖的数据表明EZH2抑制,作为单一试剂和与检查点抑制剂(如抗PD1抗体)组合时,是癌症免疫疗法中可行的方法。

[0090] 尽管我们已经描述了本发明的许多实施例,但清楚的是,可以改变我们的基本实施例以便提供利用本发明的化合物和方法的其他实施例。因此,应当理解,本发明的范围将由所附权利要求而不是由已经通过示例表示的具体实施例来限定。

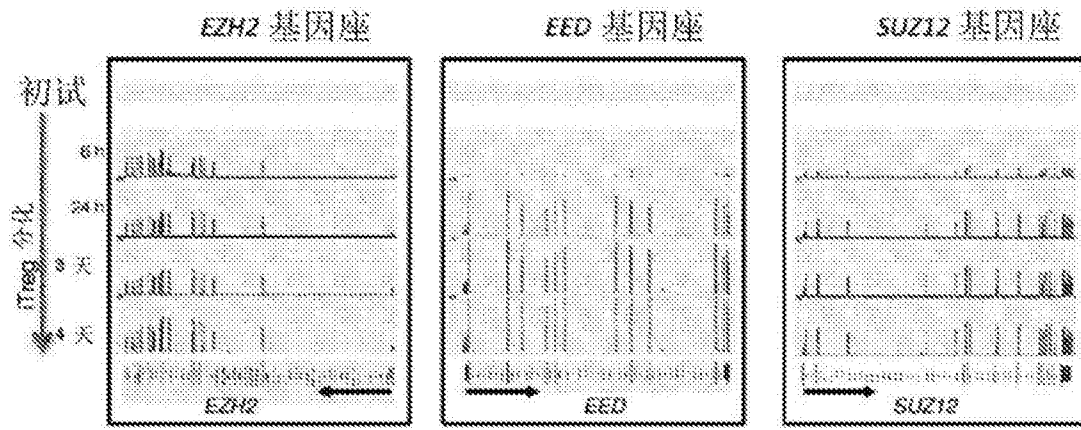


图1

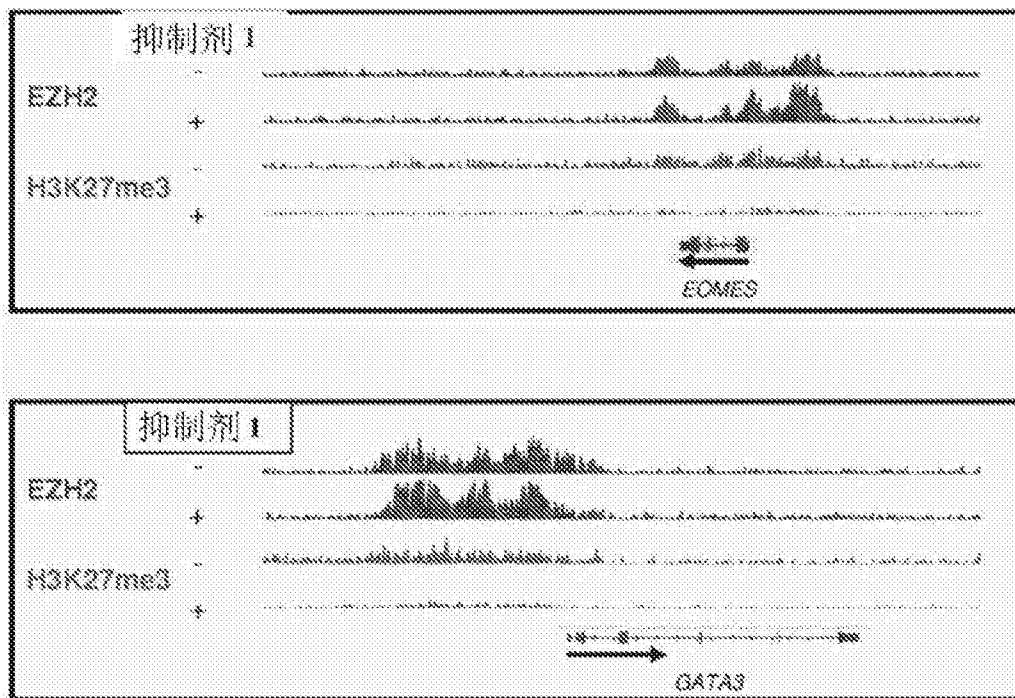


图2

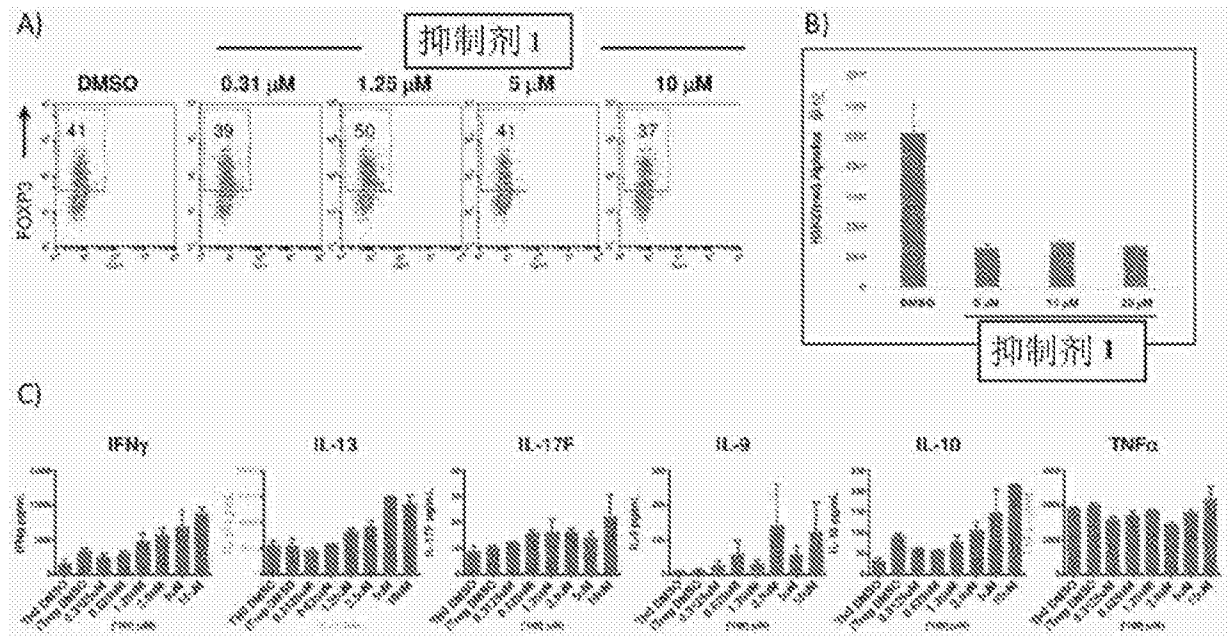


图3

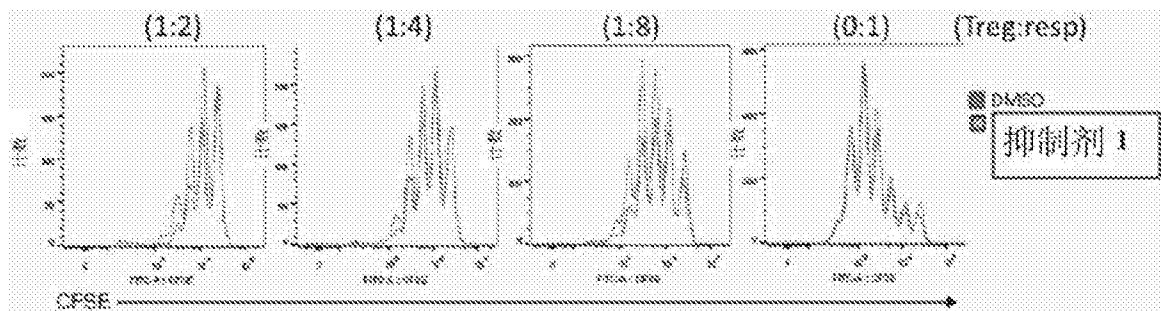


图4

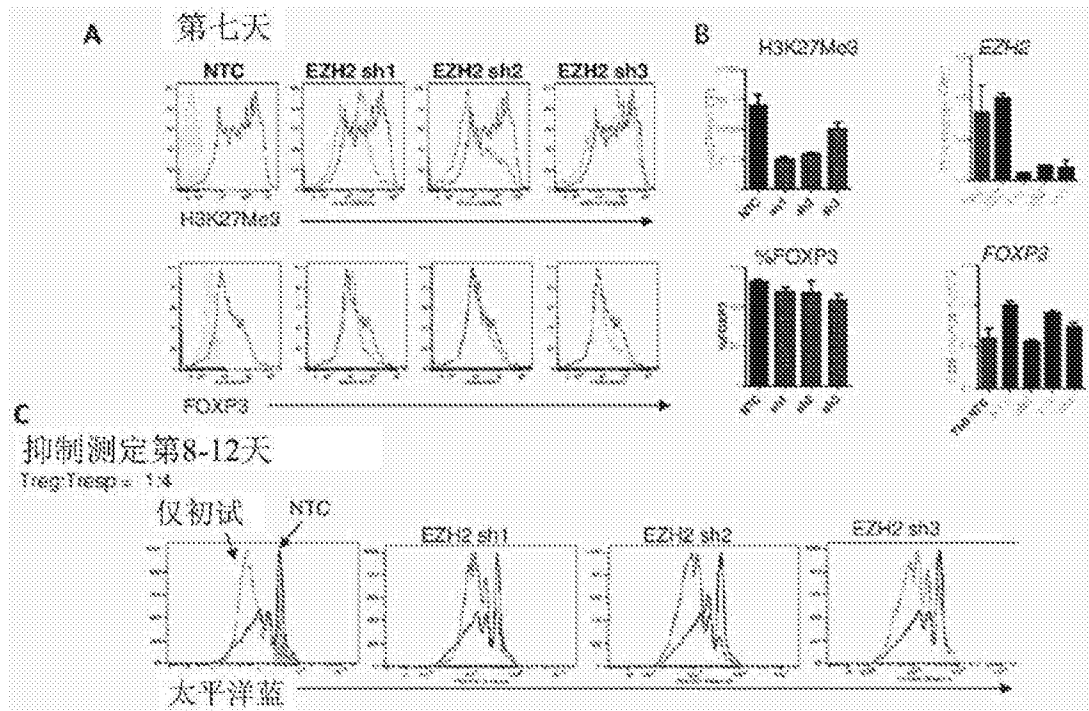


图5

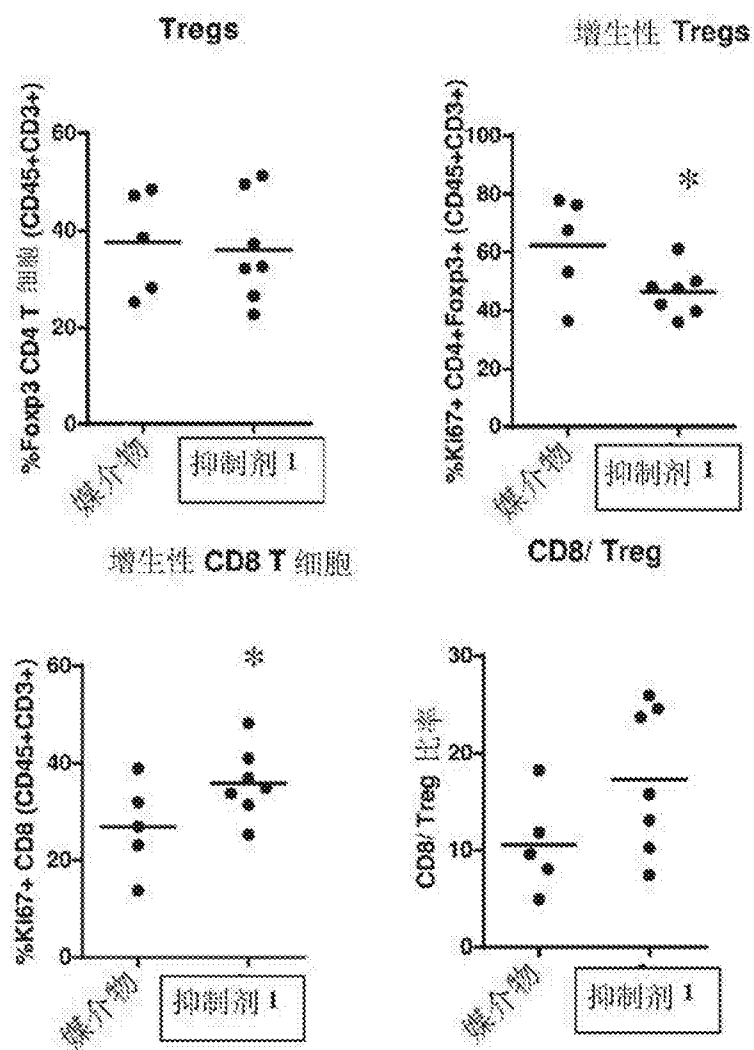


图6

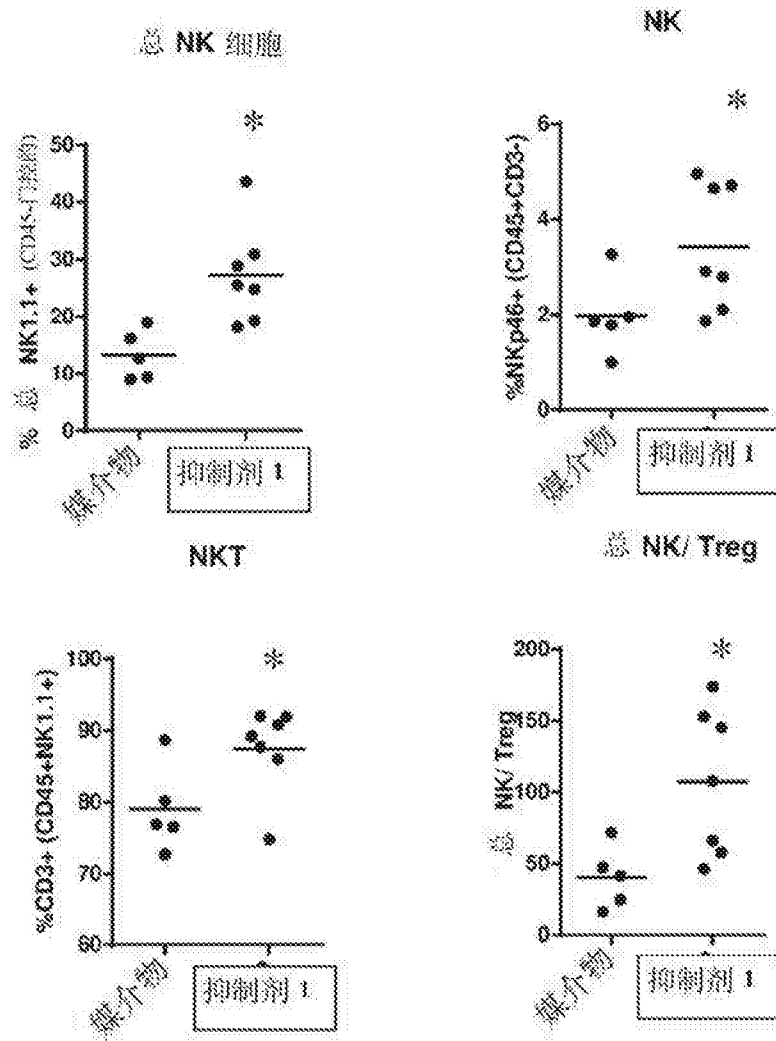


图7

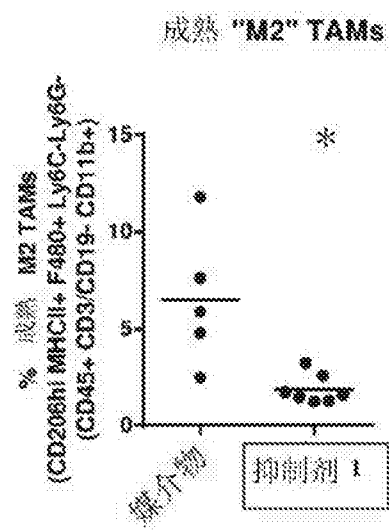


图8

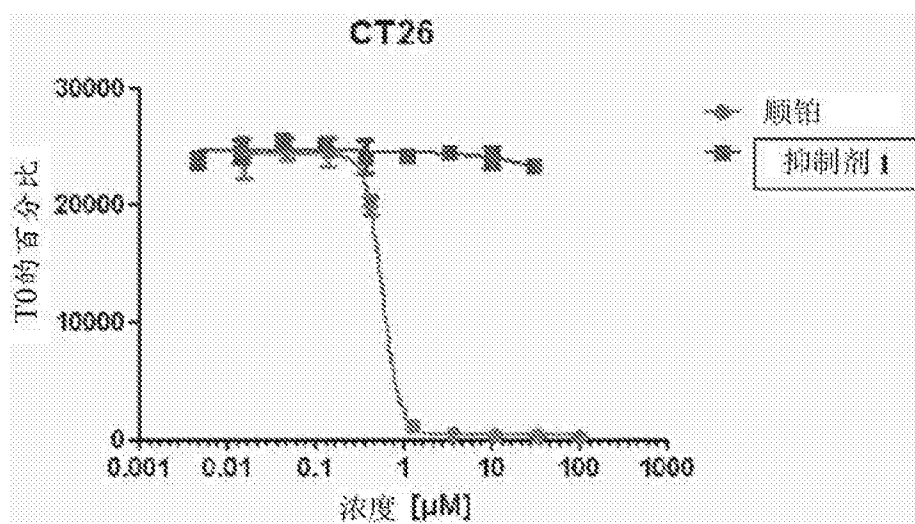


图9

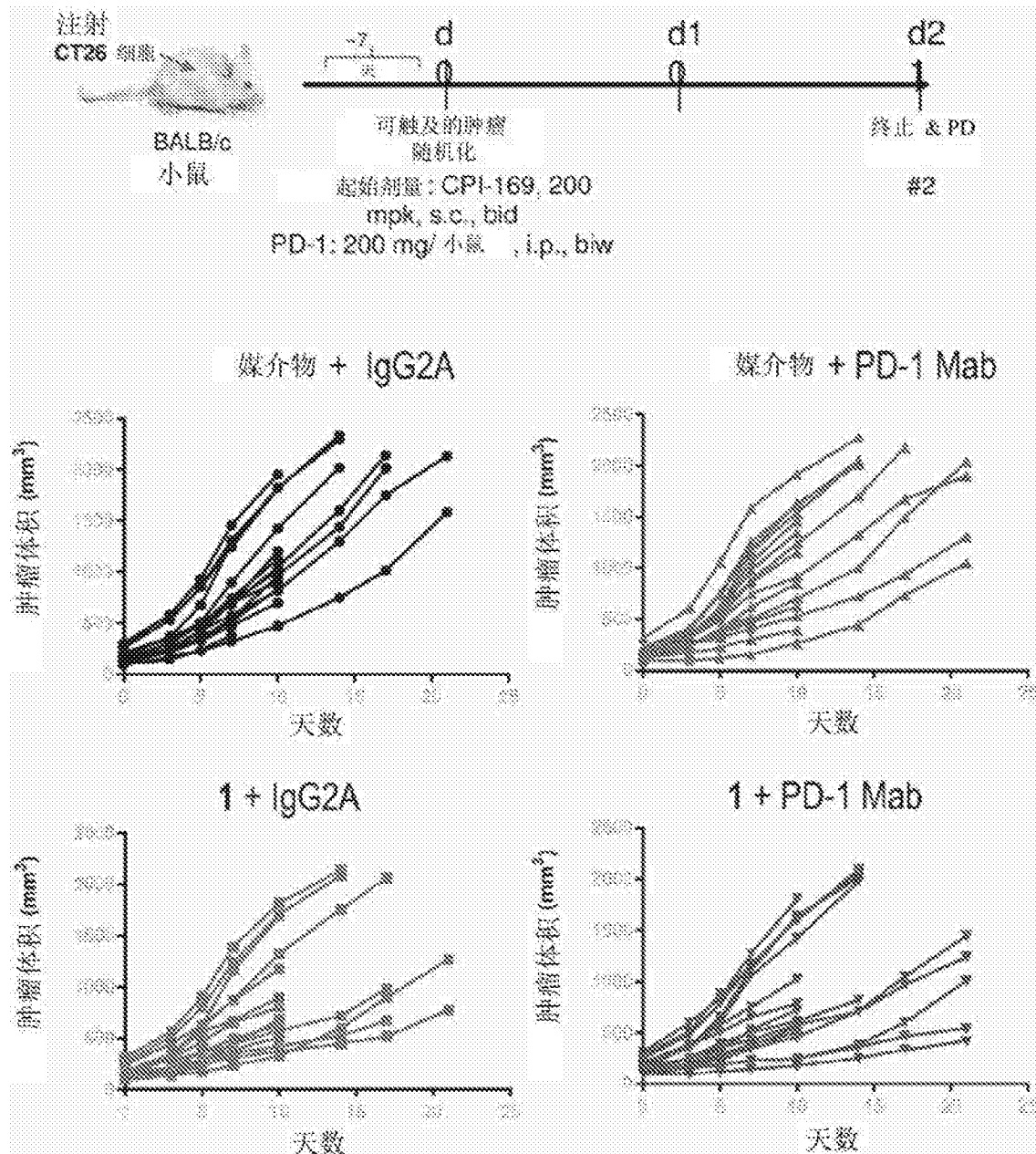


图10

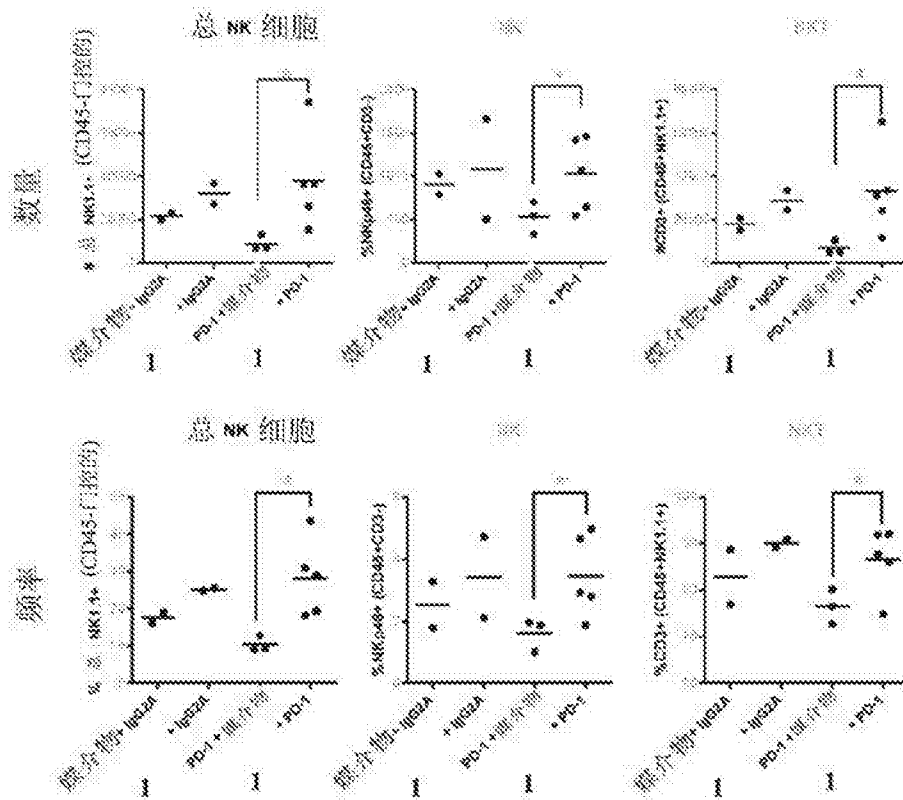


图12

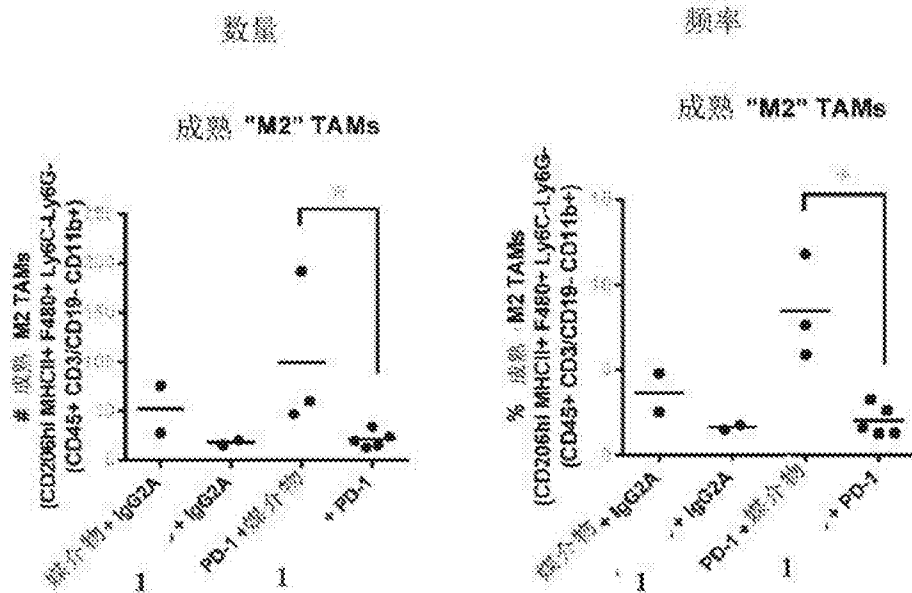


图13

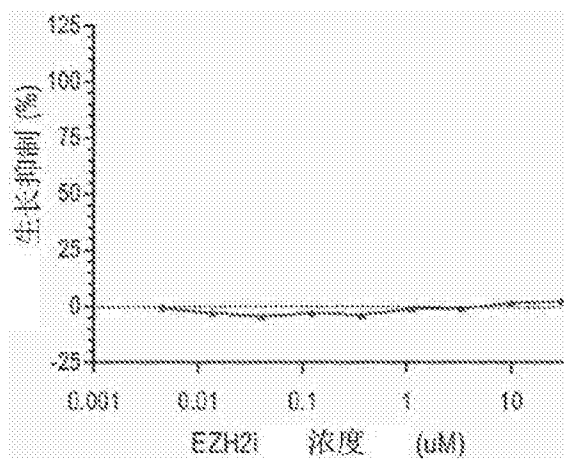


图14A

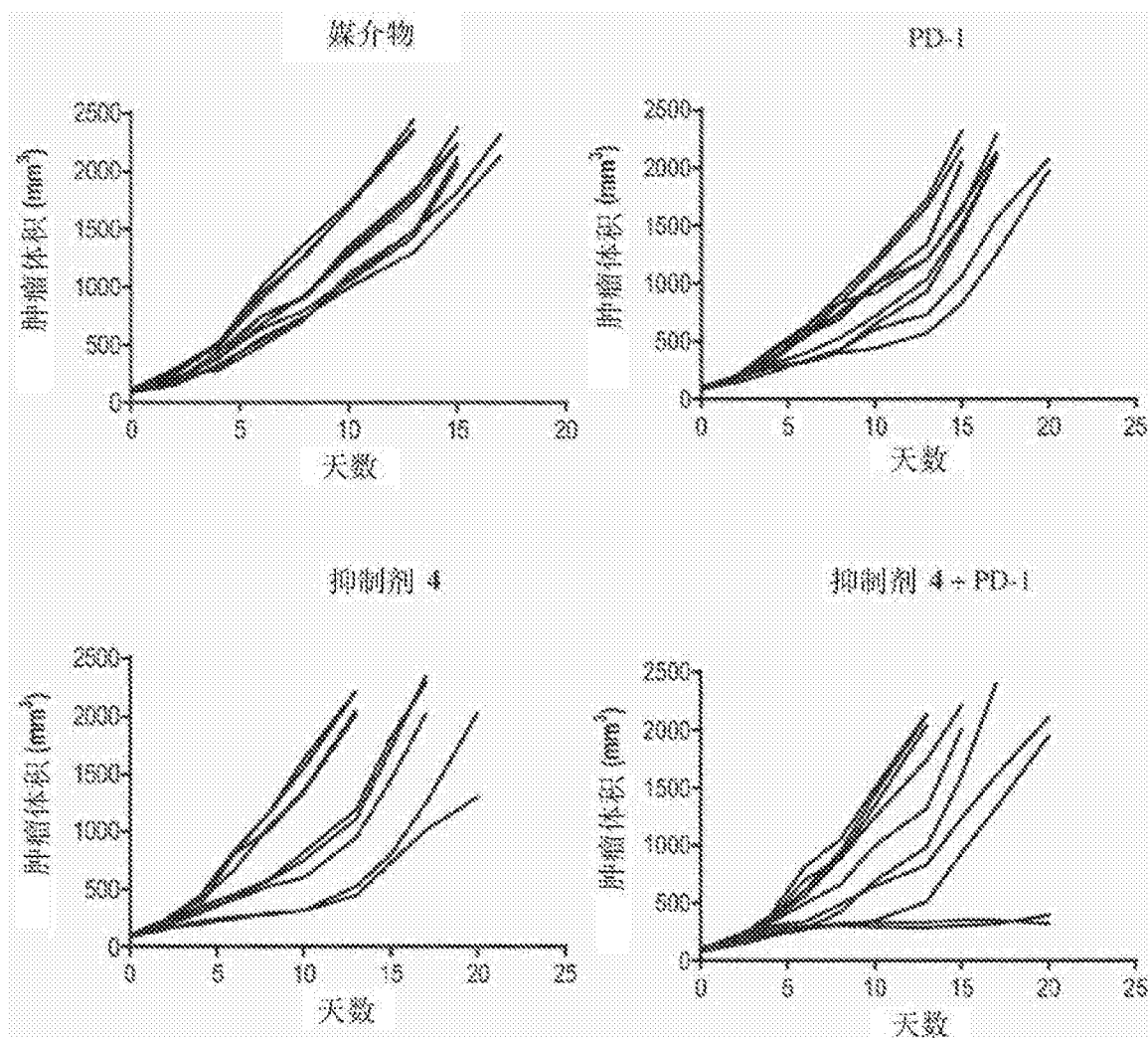


图14B