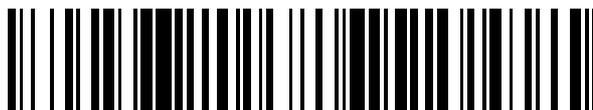


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 380**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07D 473/34 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2011 E 11824247 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2614369**

54 Título: **Método para determinar la aptitud de inhibidores de EZH2 humano en tratamiento**

30 Prioridad:

10.09.2010 US 381684 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.05.2016

73 Titular/es:

**EPIZYME, INC. (100.0%)
400 Technology Square, 4th Floor
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**COPELAND, ROBERT ALLEN;
RICHON, VICTORIA MARIE;
SCOTT, MARGARET DAVIS;
SNEERINGER, CHRISTOPHER JOHN;
KUNTZ, KEVIN WAYNE;
KNUTSON, SARAH KATHLEEN y
POLLOCK, ROY MACFARLANE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 570 380 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la aptitud de inhibidores de EZH2 humano en tratamiento

5 Campo de la invención

Esta invención se relaciona con la inhibición de formas tipo natural y determinadas formas mutantes de metiltransferasa histona humana EZH2, la subunidad catalítica del complejo PRC2 que cataliza la mono a trimetilación de lisina 27 sobre histona H3 (H3-K27), métodos para tratar cánceres que incluyen linfoma folicular y linfoma de células B grandes difusas (DLBCL) y métodos para determinar la sensibilidad a un inhibidor EZH2 en un sujeto.

Antecedentes

15 En el ADN de células eucarióticas se empaqueta con histonas para formar cromatina. Aproximadamente 150 pares de base de ADN se envuelven dos veces alrededor de un octámero de histonas (dos de cada una de las histonas 2A, 2B, 3 y 4) para formar una nucleosoma, la unidad básica de cromatina. Los cambios en la estructura ordenada de cromatina pueden conducir a alteraciones en la transcripción de genes asociados. Este proceso es altamente controlado debido a que los cambios en los patrones de expresión de gen pueden afectar profundamente los procesos celulares fundamentales, tal como diferenciación, proliferación y apoptosis. El control de los cambios en la estructura de cromatina (y por lo tanto de la transcripción) está mediado por modificaciones covalentes a histonas, más notablemente de sus colas de terminal N. Estas modificaciones se denominan frecuentemente como epigenéticas debido a que pueden conducir a cambios heredables en la expresión del gen, pero no afectan la secuencia del ADN propiamente dicho. Las modificaciones covalentes (por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación) de las cadenas laterales de aminoácidos están mediadas enzimáticamente.

25 La adición selectiva de los grupos metilo a sitios de aminoácidos específicos en histonas se controla por la acción de una única familia de enzimas conocidas como metiltransferasas histona (HMT). El nivel de expresión de un gen particular está influenciado por la presencia o ausencia de uno o más grupos metilo en un sitio de histona relevante. El efecto específico de un grupo metilo en un sitio particular de histona persiste hasta que el grupo metilo se retira mediante una desmetilasa histona, o hasta que la histona modificada se reemplaza a través de la rotación de nucleosoma. En una forma similar, otras clases de enzimas pueden decorar el ADN y las histonas con otras especies químicas, y todavía otras enzimas pueden retirar estas especies para proporcionar el control de la expresión de gen.

35 La colección orquestada de síntesis bioquímica entre la regulación transcripcional se debe controlar cercanamente con el propósito de que la diferenciación y el crecimiento celular procedan óptimamente. Los estados de enfermedad resultan cuando estos controles se interrumpen mediante la expresión aberrante y/o actividad de las enzimas responsables para ADN y modificación de histona. En cánceres humanos, por ejemplo, existe un cuerpo creciente de evidencia que sugiere que la actividad de enzima epigenética desregulada contribuye a la proliferación celular no controlada asociada con cáncer así como también otros fenotipos relevantes de cáncer tales como migración celular mejorada e invasión. Además del cáncer, existe creciente evidencia de una función de enzimas epigenéticas en una serie de otras enfermedades humanas, que incluyen enfermedades metabólicas (tales como diabetes), enfermedades inflamatorias (tales como enfermedad de Crohn), enfermedades neurodegenerativas (tales como enfermedad de Alzheimer), y enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, modular selectivamente la acción aberrante de enzimas epigenéticas mantiene gran promesa en el tratamiento para el tratamiento de un rango de enfermedades.

45 Metiltransferasa Histona EZH2

50 Se sabe que las proteínas del grupo Polycomb (PcG) y grupo trithorax (trxG) hacen parte del sistema de memoria celular. Francis et al. (2001) Nat Rev Mol Cell Biol 2:409-21; Simon et al. (2002) Curr Opin Genet Dev 12:210-8. Ambos grupos de proteínas están implicadas en el mantenimiento de los patrones espaciales de la expresión de gen de la casilla homeótica (Hox), que se establecen tempranamente en el desarrollo embrionario mediante genes de segmentación expresados transitoriamente. En general, las proteínas PcG son represores transcripcionales que mantienen la "desactivación", y las proteínas trxG son activadores transcripcionales que mantienen la "activación". Debido a que los miembros de las proteínas PcG y trxG contienen actividad intrínseca de metiltransferasa histona (HMTasa), las proteínas PcG y trxG pueden participar en la memoria celular a través de la metilación de las histonas núcleo. Beisel et al. (2002) Nature 419:857-62; Cao et al. (2002) Science 298:1039-43; Czermin et al. (2002) Cell 111:185-96; Kuzmichev et al. (2002) Genes Dev 16:2893-905; Milne et al. (2002) Mol Cell 10:1107-17; Muller et al. (2002) Cell 111:197-208; Nakamura et al. (2002) Mol Cell 10:1119-28.

60 Los estudios genéticos y bioquímicos han proporcionado evidencia que la función de las proteínas *Drosophila* PcG en por lo menos dos complejos de proteína distintos, el complejo 1 represivo Polycomb (PRC1) y el complejo ESC-E(Z) (también conocido como el complejo 2 represivo Polycomb (PRC2)), aunque las composiciones de los complejos pueden ser dinámicas. Otte et al. (2003) Curr Opin Genet Dev 13:448-54. Studies in *Drosophila* (Czermin et al. (*supra*); Muller et al. (*supra*)) y células de mamífero (Cao et al. (*supra*); Kuzmichev et al. (*supra*)) han demostrado que los complejos ESC-E(Z)/EED-EZH2 (es decir, PRC2) tienen actividad intrínseca de metiltransferasa histona. Aunque las composiciones de los complejos aislados mediante diferentes grupos son ligeramente diferentes, que contienen

generalmente EED, EZH2, SUZ12, y RbAp48 u homólogos de *Drosophila* de los mismos. Sin embargo, un complejo reconstituido que comprende solo EED, EZH2, y SUZ12 retiene la actividad de metiltransferasa histona para lisina 27 de histona H3. La Patente Estadounidense 7, 563, 589.

5 De las diversas proteínas que constituyen los complejos PRC2, EZH2 (Mejorador del Homólogo 2 Zeste) es la subunidad catalítica. El sitio catalítico de EZH2 a su vez está presente en un dominio SET, un motivo de secuencia altamente conservado (denominado después como Su(var)3-9, Mejorador de Zeste, Trithorax) que se encuentra en diversas proteínas asociadas con cromatina, que incluyen miembros del grupo Trithorax y el grupo Polycomb. El dominio SET es característico de todas las metiltransferasas histona lisina conocidas excepto la metiltransferasa H3-K79 DOT1.

10 Además de la inactivación del gen Hox, se ha mostrado que la metilación H3-K27 de histona mediada por PRC2 participa en la inactivación de X. Plath et al. (2003) Science 300:131-5; Silva et al. (2003) Dev Cell 4:481-95. El reclutamiento del complejo PRC2 A Xi y la trimetilación posterior en histona H3-K27 ocurre durante la etapa de iniciación de la inactivación de X y es dependiente del ARN Xist. Adicionalmente, el EZH2 y su actividad de metiltransferasa histona H3-K27 asociada se encuentra que marca diferencialmente las células de epiblasto pluripotentes y el trofotodermo diferenciado. Erhardt et al. (2003) Development 130: 4235-48).

15 Consistente con una función de EZH2 para mantener los patrones de modificación epigenéticos de células de epiblasto pluripotentes, la eliminación mediada con Cre de EZH2 resulta en pérdida de metilación de histona H3-K27 en las células. Erhardt et al. (*supra*). Adicionalmente, los estudios en estirpes celulares de cáncer de próstata y mama y los tejidos han revelado una fuerte correlación entre los niveles de EZH2 y SUZ12 y la invasividad de estos cánceres (Bracken et al. (2003) EMBO J 22: 5323-35; Kirmizis et al. (2003) Mol Cancer Ther 2:113-21; Kleer et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:11606-11; Varambally et al. (2002) Nature 419:624-9), que indica que la disfunción del complejo PRC2 puede contribuir a cáncer.

20 Recientemente, se reportan las mutaciones somáticas de tirosina 641 (Y641F, Y641N, Y641S y Y641 H) de EZH2 que están asociadas con linfoma folicular (FL) y el subtipo similar a células B del centro germinal (GCB) de linfoma de células B grandes difusas (DLBCL). Morin et al. (2010) Nat Genet 42:181-5. En todos los casos, se encuentra que la ocurrencia del gen mutante EZH2 es heterocigoto, y la expresión de los alelos mutantes y tipo natural se detecta en las muestras mutantes perfiladas por el secuenciamiento de transcriptoma. También se demuestra que todas las formas mutantes de EZH2 se pueden incorporar en el complejo PRC2 de múltiples proteínas, pero que los complejos resultantes carecen de la capacidad de catalizar la metilación del residuo H3-K27 equivalente de un sustrato peptídico. Por lo tanto, se concluye que los cambios asociados con la enfermedad a Tyr641 de EZH2 resultan en pérdida de la función con respecto a la metilación de H3-K27 catalizada por EZH2.

25 Morin, R.D. et al (2010) Nature Genetics, vol 42, no. 2 pp 181-185 describe las mutaciones que resultan en el reemplazo de una única tirosina en el dominio SET de la proteína EZH2 (Tyr641) que ocurre en algunos casos del subtipo GCB de linfoma de células B grandes difusas y linfoma folicular. Se indica que las proteínas EZH2 con Tyr641 mutante han reducido la actividad enzimática.

30 Miranda, T. B. et al (2009) Mol Cancer Ther 8(6) reporta que DZNep es un inhibidor global de metilación la de histona que reactiva los genes desarrollados no inactivados por metilación de ADN.

35 El documento US 2009/0012031 se relaciona con moléculas pequeñas y ácidos nucleicos que dirigen la expresión de EZH2 en cáncer de próstata.

40 El documento WO 2009/124137 se relaciona con métodos para suprimir la expresión transcripcional de uno o más genes al metilar las proteínas de histona cromatina de uno o más genes. Específicamente, una metiltransferasa de lisina histona del dominio SET vírico (proteína similar a vSET o vSET) metila la lisina 27 de una proteína de histona 3 de gen (H3-K27) suprimiendo por lo tanto la transcripción del gen.

45 El documento WO 2011/140324 se relaciona con una serie de compuestos con base en indol propuestos para tratar cáncer.

50 Richon, V.M. et al (2010) Blood, vol 116 no. 21 p 312 se relaciona con mutaciones asociadas con linfoma de EZH2 que resulta en un cambio de función.

55 Wigle, T.J. (2011) FEB5 Letters, 585 pp 3011-3014 describe mutaciones en el dominio SET de EZH2 que cambia la especificidad del sustrato de EZH2 para diversos estados de metilación de lisina 27 en histona H3.

60 Sneeringer, C.J. (2010) PNAS, vol 107, no. 49, pp 20980-20985 describe las actividades coordinadas del mutante EZH2 más tipo natural que dirige la hipermetilación asociada con el tumor de lisina 27 en histona H3 (H3K27) en linfomas de células B humanas.

65

Yap, D.B. (2011) Blood, vol 117, no. 8 pp 2451-2459 describe que las mutaciones somáticas en EZH2 Y641 actúan predominantemente a través de un mecanismo para alterar selectivamente la actividad catalítica PRC2 para aumentar la trimetilación H3K27.

5 Resumen de la invención

Un aspecto de la presente invención se relaciona con la modulación de la actividad de la metiltransferasa histona EZH2 mutante y tipo natural, la subunidad catalítica del complejo PRC2 que cataliza la mono a trimetilación de lisina 27 en histona H3 (H3-K27). Por ejemplo, la presente invención se relaciona con la inhibición de la actividad de determinadas formas mutantes de EZH2. Las formas mutantes de EZH2 incluyen una sustitución de otro residuo de aminoácido para tirosina 641 (Y641, también Tyr641) de EZH2 tipo natural.

En particular la presente invención proporciona un método para determinar si un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer seleccionado de linfoma y melanoma es un candidato para tratamiento con un inhibidor de EZH2, que comprende; detectar un mutante Y641 de un polipéptido EZH2, si está presente, en una muestra obtenida del sujeto; en donde la presencia del mutante Y641 indica que el sujeto es un candidato para tratamiento con un inhibidor de EZH2.

Otro aspecto de la presente divulgación se relaciona con la determinación de la sensibilidad de un paciente a un inhibidor EZH2 de acuerdo con el nivel de H3-K27me2 dimetilado, o preferiblemente de acuerdo con los niveles de H3-K27me2 dimetilado y H3-K27me3 trimetilado. Por ejemplo, células con un nivel bajo o indetectable de H3-K27me2 dimetilado o células con baja relación de H3-K27me2/me3 son mucho más sensibles al efecto antiproliferativo de un inhibidor EZH2 que las células con la mayor relación H3-K27me2/me3 típica.

Un aspecto de la invención es un método para inhibir en un sujeto la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilado. El método comprende la etapa de administrar a un sujeto que expresa un mutante Y641 de EZH2 una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2, inhibir por lo tanto la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilado en el sujeto.

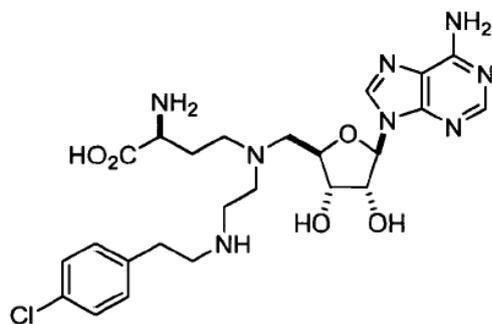
En estos y otros aspectos de la invención, en una realización el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2.

En estos y otros aspectos de la invención, en una realización el inhibidor inhibe selectivamente la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2.

En estos y otros aspectos de la invención, en una realización el mutante Y641 de EZH2 se selecciona del grupo que consiste de Y641F, Y641H, Y641N, y Y641S.

En estos y otros aspectos de la invención, en una realización el inhibidor de EZH2 es S-adenosil-L-homocisteína o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En estos y otros aspectos de la invención, en una realización el inhibidor de EZH2 es el Compuesto 75



(75)

45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto de la invención es un método de inhibir en un sujeto la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilado. El método comprende las etapas de realizar un ensayo para detectar un mutante Y641 de EZH2 en una muestra de un sujeto; y administrar a un sujeto que expresa un mutante Y641 de EZH2 una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2, inhibir por lo tanto la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilado en el sujeto.

En estos y otros aspectos de la invención, en una realización, realizar el ensayo para detectar el mutante Y641 de EZH2 incluye resecuenciamiento del genoma completo o resecuenciamiento de la región objetivo que detecta un ácido nucleico que codifica el mutante Y641 de EZH2.

5 En estos y otros aspectos de la invención, en una realización, realizar el ensayo para detectar el mutante Y641 de EZH2 incluye poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a una característica del polipéptido o fragmento del mismo del mutante Y641 de EZH2.

10 En estos y otros aspectos de la invención, en una realización, realizar el ensayo para detectar el mutante Y641 de EZH2 incluye poner en contacto la muestra bajo condiciones altamente exigentes con una sonda de ácido nucleico que hibrida a un ácido nucleico que codifica una característica del polipéptido o fragmento del mismo del mutante Y641 de EZH2.

15 Un aspecto de la invención es un método de inhibir la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilado. El método comprende la etapa de poner en contacto un mutante Y641 de EZH2 con un sustrato histona que comprende H3-K27 y una cantidad efectiva de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2, inhibiendo por lo tanto la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilado.

20 Un aspecto de la invención es un método para identificar un sujeto como un candidato para tratamiento con un inhibidor de EZH2. El método comprende las etapas de realizar un ensayo para detectar un mutante Y641 de EZH2 en una muestra de un sujeto; e identificar un sujeto que expresa un mutante Y641 de EZH2 como un candidato para tratamiento con un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2.

25 Un aspecto de esta divulgación es un método identificar un inhibidor de un mutante Y641 de EZH2. El método comprende la etapas de combinar un mutante Y641 aislado de EZH2 con un sustrato histona, un donante del grupo metilo, y un compuesto de prueba, en donde el sustrato de histona comprende una forma de H3-K27 seleccionado del grupo que consiste de H3-K27 no metilado, H3-K27 monometilado, H3-K27 dimetilado, y cualquier combinación de los mismos; y realizar un ensayo para detectar metilación de H3-K27 en el sustrato de histona, identificando por lo tanto el compuesto de prueba como un inhibidor del mutante Y641 de EZH2 cuando la metilación de H3-K27 en la presencia del compuesto de prueba es menor que la metilación de H3-K27 en la ausencia del compuesto de prueba.

30 En una realización, realizar el ensayo para detectar metilación de H3-K27 en el sustrato de histona comprende medir la incorporación de los grupos metilo etiquetados.

35 En una realización, los grupos metilo etiquetados son los grupos metilo isotópicamente etiquetados.

En una realización, realizar el ensayo para detectar metilación de H3-K27 en el sustrato de histona comprende poner en contacto el sustrato de histona con un anticuerpo que se une específicamente a H3-K27 trimetilado.

40 Un aspecto de esta divulgación es un método de identificar un inhibidor de un mutante Y641 de EZH2. El método comprende la etapas de combinar un mutante Y641 aislado de EZH2 con un sustrato histona, un donante del grupo metilo, y un compuesto de prueba, en donde el sustrato de histona comprende una forma de H3-K27 seleccionado del grupo que consiste de H3-K27 no metilado, H3-K27 monometilado, H3-K27 dimetilado, y cualquier combinación de los mismos; y realizar un ensayo para detectar la formación de H3-K27 trimetilado en el sustrato de histona, identificando por lo tanto el compuesto de prueba como un inhibidor del mutante Y641 de EZH2 cuando la formación de H3-K27 trimetilado en la presencia del compuesto de prueba es menor que la formación de H3-K27 trimetilado en la ausencia del compuesto de prueba.

45 En una realización, realizar el ensayo para detectar la formación de H3-K27 trimetilado en el sustrato de histona comprende medir la incorporación de los grupos metilo etiquetados.

50 En una realización, los grupos metilo etiquetados son los grupos isotópicamente metilo etiquetados.

55 En una realización, realizar el ensayo para detectar la formación de H3-K27 trimetilado en el sustrato de histona comprende poner en contacto el sustrato de histona con un anticuerpo que se une específicamente a H3-K27 trimetilado.

60 Un aspecto de esta divulgación es un método de identificar un inhibidor selectivo de un mutante Y641 de EZH2. El método comprende la etapas de combinar un mutante Y641 aislado de EZH2 con un sustrato histona, un donante del grupo metilo, y un compuesto de prueba, en donde el sustrato de histona comprende una forma de H3-K27 seleccionado del grupo que consiste de H3-K27 monometilado, H3-K27 dimetilado, y una combinación de H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado, formando por lo tanto una mezcla de prueba; combinar un EZH2 tipo natural aislado con un sustrato histona, un donante del grupo metilo, y un compuesto de prueba, en donde el sustrato de histona comprende una forma de H3-K27 seleccionado del grupo que consiste de H3-K27 monometilado, H3-K27 dimetilado, y una combinación de H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado, formando por lo tanto una mezcla de control; realizar un ensayo para detectar la trimetilación del sustrato de histona en cada uno de la mezcla de prueba y la mezcla de control; calcular la relación de (a) la trimetilación con el mutante Y641 de EZH2 y el compuesto de prueba (M+) a (b) la

trimetilación con el mutante Y641 de EZH2 sin el compuesto de prueba (M-); calcular la relación de (c) la trimetilación con EZH2 tipo natural y el compuesto de prueba (WT+) a (d) la trimetilación con EZH2 tipo natural sin el compuesto de prueba (WT-); comparar la relación (a)/(b) con la relación (c)/(d); e identificar el compuesto de prueba como un inhibidor selectivo del mutante Y641 de EZH2 cuando la relación (a)/(b) es menor que la relación (c)/(d).

5

Un aspecto de la invención es un método para tratar cáncer. El método comprende la etapa de administrar a un sujeto que tiene un cáncer que expresa un mutante Y641 de EZH2 una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2, tratando por lo tanto el cáncer.

10

En estos y otros aspectos de la invención, en una realización el cáncer se selecciona del grupo que consiste de linfoma folicular y linfoma de células B grandes difusas (DLBCL) del subtipo similar a células B de centro germinal (GCB).

15

Un aspecto de la invención es un método para tratar cáncer. El método comprende la etapa de administrar a un sujeto que tiene un cáncer que expresa un mutante Y641 de EZH2 una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe selectivamente la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2, tratando por lo tanto el cáncer.

20

Un aspecto de la invención es un método para tratar cáncer. El método comprende la etapas de realizar un ensayo para detectar un mutante Y641 de EZH2 en una muestra que comprende células de un sujeto que tiene a cáncer; y administrar a un sujeto que expresa un mutante Y641 de EZH2 una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2, tratando por lo tanto el cáncer.

25

Otro aspecto de esta divulgación es un método para determinar la sensibilidad a un inhibidor EZH2 en un sujeto. En una realización el método incluye aislar una muestra de tejido del sujeto; detectar un nivel de dimetilación (me2) de H3-K27 en la muestra de tejido; comparar el nivel de dimetilación (me2) a un nivel de control de dimetilación (me2); e identificar el sujeto es sensible a dicho inhibidor EZH2 cuando el nivel de dimetilación (me2) está ausente o menor que el nivel de control de dimetilación (me2). En una realización, el método incluye adicionalmente detectar un nivel de trimetilación (me3) de H3-K27 en la muestra de tejido; comparar el nivel de trimetilación (me3) para controlar el nivel de trimetilación (me3) y el nivel de dimetilación (me2) a un nivel de control de dimetilación (me2); e identificar dicho sujeto es sensible al inhibidor EZH2 cuando el nivel de trimetilación (me3) es igual que o mayor que el nivel de control de trimetilación (me3) y el nivel de dimetilación (me2) está ausente o menor que el nivel de control de dimetilación (me2). En otra realización, el método incluye adicionalmente obtener una relación del nivel de dimetilación (me2) al nivel de trimetilación (me3) de H3-K27 en la muestra de tejido; obtener una relación de control del nivel de control de dimetilación (me2) al nivel de control de trimetilación (me3); comparar la relación a la relación de control; e identificar si el sujeto es sensible a dicho inhibidor EZH2 cuando dicha relación es menor que dicha relación de control. En una realización preferida, el sujeto tiene cáncer. En una realización, el cáncer es un linfoma folicular. Alternativamente, el cáncer es linfoma de células B grandes difusas (DLBCL). En otra realización preferida, el sujeto expresa un mutante Y641 EZH2. En una realización preferida, el mutante Y641 es Y641F, Y641H, Y641N o Y641S.

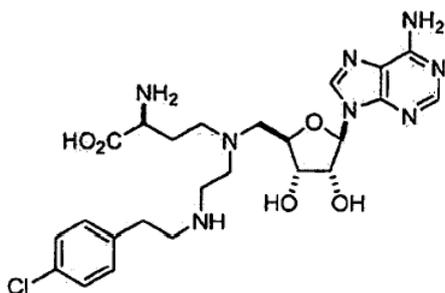
30

40

Un aspecto de la invención es un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene un cáncer. El método incluye la determinación de sensibilidad del sujeto a un inhibidor EZH2 mediante el nivel de H3-K27 dimetilado o preferiblemente mediante los niveles de H3-K27 dimetilado y H3-K27 trimetilado; y proporcionar el inhibidor EZH2 al sujeto cuando el sujeto es sensible al inhibidor EZH2. En una realización, el cáncer es un linfoma folicular. Alternativamente, el cáncer es un linfoma de células B grandes difusas (DLBCL). En otra realización preferida, el sujeto expresa un mutante Y641 EZH2. En una realización preferida, el mutante Y641 es Y641F, Y641H, Y641N o Y641S.

45

Un aspecto de esta divulgación es el Compuesto 75

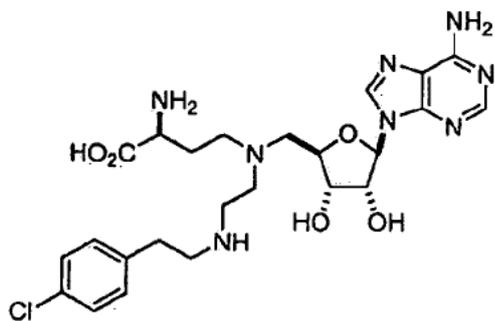


(75)

50

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

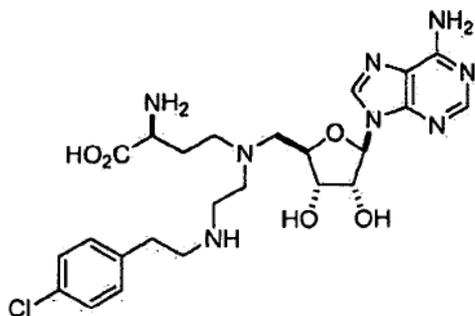
Un aspecto de esta divulgación es una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 75



(75)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

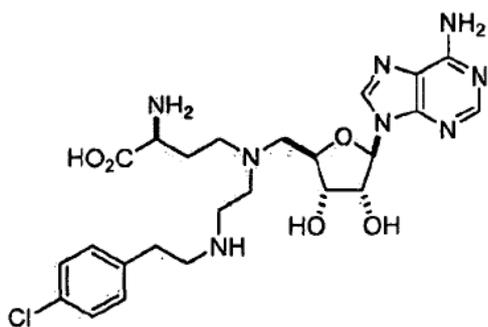
5 Un aspecto de esta divulgación es el uso del Compuesto 75



(75)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en el tratamiento de linfoma folicular.

10 Un aspecto de esta divulgación es el uso del Compuesto 75



(75)

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en el tratamiento de linfoma de células B grandes difusas (DLBCL).

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto común en la técnica al que pertenece esta invención. En la especificación, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

20 En el caso de conflicto, controlará la presente especificación, que incluyen definiciones.

Breve descripción de las figuras

25 La Figura 1 es dos gráficas que establecen que los mutantes asociados con linfoma de células B de EZH2 son metiltransferasas histona activas. La actividad de complejos metiltransferasa PRC2 *in vitro* que contiene los diversos mutantes Y641 y del tipo natural de EZH2 se mide como (A) reacciones de transferencia metilo utilizando un péptido (H321-44) como sustrato, y (B) reacciones de transferencia metilo utilizando nucleosomas aviares como sustrato.

Símbolos: tipo natural (●), Y641F (○), Y641H (□), Y641N (■), y Y641S (▲). El CPM es el recuento por minuto, con referencia a conteo de centelleo como resultado de radicación ^3H .

5 La Figura 2 es cuatro gráficas que establecen que complejos de PRC2 que contienen EZH2 mutante catalizan preferencialmente di y trimetilación de histona H3-K27. (A) Actividad de metiltransferasa de complejos mutantes y tipo natural (WT, por sus siglas en inglés) en péptido no metilado (barras abiertas), péptido monometilado (barras sombreadas), y péptido dimetilado (barras cerradas). (B) Afinidad para sustratos de péptido como se juzga por $K_{1/2}$ es similar a través de los estados de metilación de péptido para complejos de PRC2 que contienen tipo natural (○), Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■), y Y641S (▲) EZH2. Observe que la variación en los valores $K_{1/2}$ a través de todos los sustratos y todas las formas de enzima es menor que 3.5 veces. Para cualquier estado particular de metilación de sustrato la variación en el valor $K_{1/2}$ es menor que 2 veces. (C) El número de giro de enzima (k_{cat}) varía con el estado del sustrato de metilación en formas opuestas para WT y los mutantes Y641 de EZH2. El k_{cat} se reduce con el aumento de los estados de metilación K27 para tipo natural (○), pero aumenta para mutantes Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■), y Y641S (▲) de EZH2. (D) La eficiencia catalítica ($k_{\text{cat}}/K_{1/2}$) se reduce con el aumento de los estados de metilación K27 para tipo natural (○), pero aumenta para los mutantes Y641F (●), Y641H (□), Y641N (■), y Y641S (▲) de EZH2. En los paneles B-D, las líneas se dibujan para conectar los puntos de datos que no pretenden implicar ninguna relación matemática; más bien, pretenden servir únicamente como ayudas visuales.

20 La Figura 3A es un trío de gráficas que describen niveles relativos predichos de H3-K27me3 (panel superior), H3-K27me2 (panel intermedio), y H3-K27me1 (panel inferior) para células que contienen diferentes mutantes EZH2. Se realizan simulaciones utilizando una ecuación de velocidad de estado constante de enzima acoplada y los parámetros cinéticos en estado constante en la Tabla 1. Todos los valores son relativos células que contienen EZH2 de WT homocigoto y asume concentraciones de saturación del SAM intracelular, con relación a K_m y concentraciones de nucleosoma intracelular similar a K_m .

25 La Figura 3B es una serie de análisis Western blot de patrones relativos del estado de metilación H3-K27 para estirpes celulares de linfoma homocigotos para EZH2 WT, o heterocigotos para la mutación EZH2 Y641 indicada. Los paneles desde superior hasta inferior describen los resultados de sondeo con anticuerpos específicos para los siguientes: EZH2 total; H3-K27me3; H3-K27me2; H3-K27me1; y histona H3 total como control de carga.

30 La Figura 4 describe mecanismos propuestos seleccionados que conducen a niveles aberrantemente altos de trimetilación en histona H3-K27 en cáncer. Estos incluyen: a) mutación de Y641 en EZH2 que resulta en un cambio en la preferencia del sustrato de la mono- y di- histona metilada a la no metilada para H3-K27; b) sobreexpresión de EZH2; c) mutaciones en *UTX* que inactivan la función de la enzima, provocando una reducción de desmetilación de H3-K27me3; y d) sobreexpresión de la subunidad PHF19/PCL3 del complejo PRC2 que conduce a aumento en el reclutamiento del complejo PRC2 a genes específicos y un aumento en la trimetilación de histona H3-K27. En todos los cuatro modelos la alteración conduce a la alteración a la trimetilación H3-K27 de histona aberrante en las regiones promotoras próximas de genes lo que resulta en represión transcripcional de genes clave en cáncer.

40 La Figura 5 describe un gel SDS-PAGE que muestra que los niveles de expresión de cada uno de los cinco complejos de PRC2 componentes son similares con el EZH2 tipo natural y mutante.

45 La Figura 6 es un par de tablas que muestran que los complejos de PRC2 mutantes y tipo natural (WT) exhiben preferencia fuerte del sustrato para péptidos que contienen H3-K27. Cada enzima se prueba contra un panel que superpone péptidos 15-mer que cubren todos los H3 y H4. La actividad se mide como velocidad (CPM por minuto), y el valor reportado representa la media de dos determinaciones independientes para cada reacción. Para todos los complejos el péptido más favorecido es H3:16-30. El complejo WT tiene más de 6 veces más actividad contra este péptido que cualquiera de los complejos mutantes.

50 La Figura 7 es una gráfica que describe la potencia inhibidora de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) contra los mutantes EZH2 WT y Y641 de EZH2. El eje X muestra la concentración log de SAH; el eje Y muestra el porcentaje de inhibición.

55 La Figura 8 es una gráfica que describe la potencia inhibidora del Compuesto 75 contra los mutantes EZH2 WT y Y641 de EZH2. El eje X muestra la concentración log de Compuesto 75; el eje Y muestra el porcentaje de la inhibición.

60 La Figura 9 describe un análisis Western Blot de niveles relativos de H3-K27me1, me2 y me3 en un panel de estirpe celular, que incluye múltiples estirpes DLBCL que expresa el mutante EZH2 WT o Y641. a) Se extraen histonas de las estirpes celulares mostradas, fraccionadas por SDS-PAGE en 4-20 % de gel, transferido a membranas de nitrocelulosa, y se sondea con anticuerpos de Histona H3, H3-K27me1, me2, o me3. Los niveles EZH2 se determinan al preparar lisados celulares completos de las estirpes celulares mezcladas, tratando como anteriormente y se sondea con un anticuerpo para EZH2; b) Se extraen histonas de las estirpes celulares mostradas y se tratan como anteriormente, excepto que no se determinan los niveles EZH2.

La Figura 10 describe un análisis inmunocitoquímico de niveles H3 y H3-K27me3 en un panel de estirpes celulares de linfoma mutante WT y Y641. Los gránulos celulares de las estirpes celulares indicadas se fijan y se incorporan en parafina. Se preparan portaobjetos y se evalúan los niveles de H3 y H3-K27me3 mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos para histona H3, o H3-K27me3.

La Figura 11 describe un análisis de inmunocitoquímica de H3 y los niveles de H3-K27me2 en un panel de estirpes celulares de linfoma mutante WT y Y641. Los gránulos celulares de las estirpes celulares indicadas se fijan y se incorporan en parafina. Se preparan portaobjetos y se evalúan los niveles de H3 y H3-K27me2 mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos para histona H3, o H3-K27me2.

La Figura 12 es una gráfica que describe la inhibición de los niveles globales de H3-K27me3 mediante tratamiento de inhibidor EZH2 en células WSU-DLCL2 mutantes Y641. Las células WSU-DLCL2 se tratan durante 4 días con las concentraciones indicadas del inhibidor EZH2 A o B. Luego del tratamiento del compuesto, se extraen las histonas, se fraccionan mediante SDS-PAGE en 4-20 % de gel, se transfieren a membranas de nitrocelulosa, y se sondan con anticuerpos a Histona H3, o H3-K27me3.

La Figura 13 es una gráfica que muestra que los inhibidores EZH2 pueden bloquear la proliferación de células mutantes Y641 WSU-DLCL2, pero tiene poco efecto en células OCI-LY19 no mutantes Y641. Las células se incuban en la presencia del aumento de concentraciones de inhibidor EZH2 A o B durante once días. Se incluyen células tratadas con vehículo (DMSO) como controles. Se determina la viabilidad y el número de células utilizando el ensayo Guava Viacount en un instrumento Guava EasyCyte Plus. Las células se dividen y el medio y el compuesto se reponen cada 3-4 días.

La Figura 14 es una gráfica que muestra la presencia de una mutación EZH2 (Y641) y/o los niveles altos de H3-K27me3 y niveles bajos de H3- K27me2 predicen la sensibilidad a los inhibidores EZH2. Las estirpes celulares se mantienen en la presencia de aumento de las concentraciones de un inhibidor EZH2 hasta 25 mM. Se utilizan conteos de células viables para derivar valores IC₉₀ después de 11 días de tratamiento. Los resultados se grafican con estirpes celulares segregadas de acuerdo con estado de mutación EZH2 (A), o se segrega de acuerdo con los niveles de H3-K27me2 y H3-K27me3 (B). En ambas gráficas, la línea muestra los valores IC₉₀ promedio del grupo de estirpe celular indicado.

Descripción detallada

La estructura de cromatina es importante en la regulación de genes y la herencia epigenética. Las modificaciones post-traduccionales de histonas están implicadas en el establecimiento y mantenimiento de la estructura de cromatina de mayor orden; por ejemplo, las colas de determinadas histonas núcleo se modifican mediante acetilación, metilación, fosforilación, ribosilación y/o ubiquitinación.

El EZH2 es una metiltransferasa histona que es la subunidad catalítica del complejo PRC2 que cataliza la mono- a trimetilación de lisina 27 en histona H3 (H3-K27). La trimetilación de histona H3-K27 es un mecanismo para suprimir la transcripción de genes específicos que son próximos al sitio de la modificación de histona. Se sabe que esta trimetilación es un marcador de cáncer con expresión alterada en cáncer, tal como cáncer de próstata (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2003/0175736; incorporado aquí mediante referencia en su totalidad). El EZH2 pertenece a la familia de la proteína del grupo Polycomb (PcG). Las proteínas del grupo Polycomb ayudan a mantener la identidad celular mediante represión transcripcional de genes objetivo. Jacobs et al. (1999) *Semin Cell Dev Biol* 10(2):227-35; Jacobs et al. (2002) *Biochim Biophys Acta* 1602(2):151-61. Las microdisposiciones de ADN que identifican EZH2 como se regula por aumento en cáncer de próstata metastásico resistente a hormona. Dhanasekaran et al. (2001) *Nature* 412(6849):822-6; Varambally et al. (2002) *Nature* 419(6907):624-9. El EZH2 se regula por aumento en tumores de mama agresivos y es un mediador de un fenotipo proinvasivo. Kleer et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100(20):11606-11. La sobreexpresión de EZH2 en estirpes celulares epiteliales mamarias humanas inmortalizadas promueve la invasión celular y crecimiento independiente de anclaje. Kleer et al. (*supra*). La invasión celular mediada por EZH2 requiere un dominio intacto SET y actividad de desacetilasa histona. Los estudios previos evidencian un enlace funcional entre la expresión EZH2 desregulada, represión transcripcional, y transformación neoplásica. Varambally et al. (*supra*); Kleer et al (*supra*).

Un aspecto de la presente invención se relaciona con inhibir la actividad de EZH2, que incluye determinadas formas mutantes de EZH2. En una realización la presente invención se relaciona con inhibir selectivamente la actividad de determinadas formas mutantes de EZH2.

Se ha reportado que las mutaciones puntuales del gen EZH2 en un único residuo de aminoácido (Tyr641, aquí denominado como Y641) de EZH2 se enlazan a los subgrupos de linfoma de células B humanas. Morin et al. (2010) *Nat Genet* 42(2):181-5. En particular, Morin et al. reporta que las mutaciones de tirosina 641 somáticas (Y641F, Y641H, Y641N, y Y641S) de EZH2 se asocian con linfoma folicular (FL) y el subtipo similar a células B de centro germinal (GCB) de linfoma de células B grandes difusas (DLBCL). Siempre se asocia que el alelo mutante se asocia con un alelo tipo natural (heterocigoto) en células enfermas, y se reporta que las mutaciones hacen ablación de la actividad enzimática del complejo PRC2 para metilar un sustrato de péptido no modificado.

ggcggcgcttgattgggctgggggggccaataaaagcgatggcgattgggctgccgct
 ttggcgctcgggtccggtcgcgctccgacacccggtgggactcagaaggcagtgaggcccg
 gggcgggcgggcgggcgcgcgggggcgacgcgcggggaacaacgcgagtcggcgcgcggg
 acgaagaataatcatgggcccagactgggaagaaatctgagaaggaccagtttgttggcg
 gaagcgtgtaaaatcagagtacatgcgactgagacagctcaagaggttcagacgagctga
 tgaagtaaagagtatgtttagttccaatcgtcagaaaattttggaaagaacggaaatctt
 aaaccaagaatggaaacagcgaaggatacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc
 attgcgcggggactagggagtgttcgggtgaccagtgacttggattttccaacacaagtc
 cccattaaagactctgaatgcagttgcttcagtaccataatgtattcttgggtctccct
 acagcagaattttatgggtggaagatgaaactgttttacataacattccttatatgggaga
 tgaagttttagatcaggatgggtactttcattgaagaactaataaaaaattatgatgggaa
 agtacacggggatagagaatgtgggtttataaatgatgaaattttgtggagttggtgaa
 tgccttgggtcaatataatgatgatgacgatgatgatggagacgatcctgaaagaaag
 agaagaaaagcagaaagatctggaggatcaccgagatgataaagaaagccgccacctcg
 gaaatttccttctgataaaaattttgaagccatttctcctcaatgtttccagataaggcac
 agcagaagaactaaaggaaaaatataaagaactcaccgaacagcagctcccaggcgcact
 tcctcctgaatgtaccccccaacatagatggaccaaagtctaaatctgttcagagagagca
 aagcttacactcctttcatacgttttctgtaggcagatgttttaaatatgactgcttct
 acatcgtaagtgaattattcttttcatgcaacacccaacacttataagcggagaagaacac
 agaaacagctctagacaacaaaccttgtggaccacagtggtaccagcatttggaggggagc
 aaaggagtttgcctgctgctctcaccgctgagcggataaagaccccacaaaacgctccagg
 aggccgcagaagaggacggcttcccaataacagtagcaggcccagcacccccaccattaa
 tgtctggaatcaaaggatacagacagtgatagggaaagcagggactgaaacggggggaga
 gaacaatgataaagaagaagaagaagaagaagaatgaaacttcgagctcctctgaagcaaa
 ttctcgggtgcaaacaccaataaagatgaagccaaatattgaacctcctgagaatgtgga
 gtggagttgctgaagcctcaatgttttagagctcctcattggcacttactatgacaattt
 ctgtgccattgctaggttaattgggaccaaacatgtagacaggtgtatgagtttagagt
 caaagaatctagcatcatagctccagctcccgtgaggatgtggatactcctccaaggaa
 aaagaagaggaaacaccggttgtgggctgcacactgcagaaagatacagctgaaaaagga

Secuencia de mRNA de EZH2 humano, variante de transcripto 1 (No. de Acceso GenBank NM 004456) (SEQ ID NO: 2)

cggctcctctaaccatgtttacaactatcaaccctgtgatcatccacggcagccttgtga
 cagttcgtgcccttgtgtgatagcaciaaatttttgtgaaaagtgttgtcaatgtagttc
 agagtgtcaaaaccgcttccgggatgcccgtgcaaagcacagtgcaacaccaagcagtg
 cccgtgctacctggctgtccgagagtgtgacctgacctctgtcttacttgtggagccgc
 tgaccattgggacagtaaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagattcagcggggctccaa
 aaagcatctattgctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaatcc
 tgtgcagaaaaatgaattcatctcagaataactgtggagagattatttctcaagatgaagc
 tgacagaagaggaaagtgtatgataaatacatgtgcagcttctgttcaacttgaacaa
 tgattttgtgggtggatgcaaccgcaagggttaacaaaatcgttttgcaaatcattcgggt
 aatccaaactgctatgcaaaaagtattgatgggttaacgggtgatcacaggataggtat
 tgccaagagagccatccagactggcgaagagctgtttttgattacagatacagccaggc
 tgatgccctgaagtatgtcggcatcgaaagagaaatggaaatcccttgacatctgctacc
 tcctccccctcctctgaaacagctgccttagcttcaggaaacctcgagtactgtgggcaa
 tttagaaaaagaacatgcagtttgaatttctgaatttgcaaagtactgtaagaataattt
 atagtaatgagtttaaaaaatcaactttttattgccttctcaccagctgcaaaagtgtttg
 taccagtgaatttttgcaataatgcagtatgggtacatttttcaactttgaaataaagaata
 cttgaacttgccttgttgaatc

Aminoácido completo de EZH2, isoforma a (No. de Acceso GenBank NP_004447) (SEQ ID NO: 3)

ES 2 570 380 T3

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVGHDRECGFINDEI FVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREEKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNI DGNPAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHRKC
NYSFHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKT PPKRPGGRRR
GRLPNSSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETGGENNDKEEEEKKDETS SSSEANSRCQ
TPIKMKPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESS
IIAPAPAEDVDTPPRKKKRKHLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCP
CVIAQNFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWD
SKNVSCKNCSIQRGSKKHL LAPS DVAGWGIFIKDPVQKNEFI SEYCGEI ISQDEADRRG
KVYDKYMCSFLFNLNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRA
IQTGEELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

Secuencia de mRNA de EZH2 humano, variante de transcripto 2 (No. de Acceso GenBank NM 152998)
(SEQ ID NO: 4)

ggcgcgcttgattgggctggggggccaaataaaagcgatggcgattgggctgccgct
 ttggcgctcgggtccgggtcgcgctccgacacccgggtgggactcagaaggcagtgagccccg
 gggcgggcgggcgggcgcgcgggggcgacgcgcggggaacaacgcgagtcggcgcgcggg
 acgaagaataatcatgggcccagactgggaagaatctgagaaggaccagtttgttggcg
 gaagcgtgtaaaatcagagtacatgagactgagacagctcaagagggttcagacgagctga
 tgaagtaaagagtatgttttagttccaatcgtcagaaaattttgaaagaacggaatctt
 aaaccaagaatggaaacagcgaaggatcacagcctgtgcacatcctgacttctgtgagctc
 attgcgcgggactagggagggtggaagatgaaactgttttacataacattccttatatggg
 agatgaagttagatcaggatggtactttcattgaagaactaataaaaaattatgatgg
 gaaagtacacggggatagagaatgtgggtttataaatgatgaaatttttgtggagtggg
 gaatgcccttggcfaatataatgatgatgacgatgatgatggagacgatcctgaaga
 aagagaagaaaagcagaaagatctggaggatcaccgagatgataaagaaagccgccacc
 tcggaatcttcttgataaaattttgaaagccatttccctcaatgtttccagataaggg
 cacagcagaagaactaaaggaaaaatataaagaactcaccgaacagcagctcccaggcgc
 acttctcctgaatgtacccccacatagatggaccaaagtctaaatctgttcagagaga
 gcaaagcttacactcctttcatagcctttctgttagggcgatgttttaaatatgactgctt
 cctacatcctttcatgcaacacccaacacttataagcgggaagaacacagaaacagctct
 agacaacaaaccttgtggaccacagtggtaccagcatttgaggaggcaaaggagtgtgc
 tgcctctcaccgctgagcggataaagacccccacaaaacgtccaggaggccgcagaag
 aggacggcttcccaataacagtagcaggccagcaccaccattaatgtgctggaatc
 aaaggatacagacagtgatagggaaagcaggactgaaacggggggagagaacaatgataa
 agaagaagaagagaagaaagatgaaactcagagctcctctgaagcaaattctcgggtgca
 aacaccaataaagatgaagccaaatattgaacctcctgagaatgtggagtggagtggg
 tgaagcctcaatgttttagagtctcattggcacttactatgacaatctctgtgccattgc
 taggttaattgggaccaaacaatgtagacagggtgatgagtttagagtcaaagaatctag
 catcatagctccagctcccgcgtgaggatgtggatactcctccaaggaaaaagaaggaa
 acaccggttgtgggctgcacactgcagaaagatacagctgaaaaaggacggctcctctaa
 ccatgtttacaactatcaacctgtgatcatccacggcagccttgtgacagttcgtgccc
 ttgtgtgatagcaciaaaatttttgtgaaaagttttgtcaatgtagttcagagtgtcaaaa
 ccgctttccgggatgccgctgcaaagcagctgcaacaccaagcagtgcccgtgctacct
 ggtgtccgagagtgtagccctgacctctgtcttacttgtggagccgctgaccattggga
 cagtaaaaatgtgtcctgcaagaactgcagattcagcggggctccaaaagcatctatt
 gctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgcagaaaaa
 tgaattcatctcagaatactgtggagagattatttctcaagatgaagctgacagaagagg
 gaaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaactgaacaatgattttgtggg
 ggatgcaaccgcgaagggttaacgggtgatcacaggataggatatttttgccaagagagc
 catccagactggcgaagagctgtttttgattacagatacagccaggctgatgccctgaa
 gtatgtcggcatcgaaagagaaaatggaaatcccttgacatctgctacctcctccccctc
 ctctgaaacagctgecttagcttcaggaacctcgagtaactgtgggcaatttagaaaaaga
 acatgcagtttgaaattctgaatttgcaaagtaactgtaagaataatttatagtaatgagt
 ttaaaaatcaactttttattgccttctcaccagctgcaaagtgtttgtaccagtgatt
 tttgcaataatgcagtatggtacatttttcaactttgaataaagaatacttgaactgtc
 cttgttgaatc

Aminoácido completo de EZH2, isoforma b (No. de Acceso GenBank NP_694543) (SEQ ID NO: 5)

MGQTGKKSEKGPVCWRKRKVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKIL
 ERTEILNQEWKQRRIQPVHILTSVSSLRGTTREVEDETVLHNI PYMGDEVL
 DQDGTFFIEELIKNYDGGKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQYNDDDDDDD
 GDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPRFPSDKIFEAISSMFPDKGTAAE
 LKEKYKELTEQQLPGALPPECTPNI DGNPAKSVQREQSLHSFHTLFCRRC
 FKYDCFLHPPHATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALT
 AERIKTPPKRPGRRRGRLPNNSSRPSTPTINVLESKDTSDREAGTETG
 GENNDKEEEEKKDETSSSEANSRCQTP IKMKPNIEPPENVEWSGAEASM
 FRVLIGTYDYNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESSI IAPAPAEDVDTPP
 RKKKRKHLRWAHAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSPCVIA
 QNFCEKFCQCSSECQNRFPGRCKAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCG
 AADHWDSKNVSKNCISIQRGSKKHLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFIS
 EYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNNDVFVVDATRKGNKIRFANH
 SVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDYRYSQADALKYVGI
 EREMEIP

Como se mencionó anteriormente, se considera que el sitio catalítico de EZH2 reside en un dominio conservado de la proteína conocida como el dominio SET. La secuencia de aminoácidos del dominio SET de EZH2 se proporciona por la siguiente secuencia parcial que abarca los residuos de aminoácidos 613-726 de No. de Acceso Swiss-Prot Q15910 (SEQ ID NO: 1):

HLLLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEYCGEIIISQDEADRRGKVYDKYMCSFLFNLNNDVFV
 VDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGEELFFDY

(SEQ ID NO:6).

El residuo de tirosina (Y) mostrado se bosqueja en la SEQ ID NO: 6 es Tyr641 (Y641) en No. de Acceso Swiss-Prot Q15910 (SEQ ID NO: 1).

El dominio SET del No. de Acceso GenBank NP_004447 (SEQ ID NO: 3) abarca residuos de aminoácidos 618-731 y es idéntico a la SEQ ID NO: 6. El residuo tirosina que corresponde a Y641 en No. de Acceso Swiss-Prot Q15910 mostrado se destaca en la SEQ ID NO: 6 es Tyr646 (Y646) en No. de Acceso GenBank NP_004447 (SEQ ID NO: 3).

El dominio SET de No. de Acceso GenBank NP_694543 (SEQ ID NO: 5) abarca residuo de aminoácidos 574-687 y es idéntico a SEQ ID NO: 6. El residuo tirosina que corresponde a Y641 en No. de Acceso Swiss-Prot Q15910 mostrado se destaca en SEQ ID NO: 6 es Tyr602 (Y602) en No. de Acceso GenBank NP_694543 (SEQ ID NO: 5).

La secuencia de nucleótidos que codifica el dominio SET de No. de Acceso GenBank NP_004447

catctattgctggcaccatctgacgtggcaggctgggggatttttatcaaagatcctgtgca
 gaaaaatgaattcatctcagaatactgtggagagattatctcaagatgaagctgacagaa
 gagggaaagtgtatgataaatacatgtgcagctttctgttcaacttgaacaatgattttgtg
 gtggatgcaaccgcaaggtaacaaaattcgttttgcaaatcattcggtaaatccaaactg
 ctatgcaaaaagttagtgatggttaacgggtgatcacaggataggtatttttgccaagagagcca
 tccagactggcgaagagctgttttttgattac

(SEQ ID NO: 7),

está en donde el codón que codifica Y641 se muestra subrayado.

Para los propósitos de esta solicitud, se entiende que el residuo de aminoácido Y641 de EZH2 humano se refiere al residuo tirosina que es o corresponde a Y641 en No. de Acceso Swiss-Prot Q15910.

Secuencia de aminoácido completa del mutante Y641 EZH2 (SEQ ID NO: 8)

MGQTGKKSEKGPVCRKRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLOQNF
 MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQPLGALPPECTPNIDGPNASVQREQLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPH
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRGRRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEEKDETSSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYDNEFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPA
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCQAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
 CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEXCGEIIISQDEADRRGKVYDK
 YMCSEFLNLFNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

En donde x puede ser cualquier residuo de aminoácido diferente a tirosina (Y)

También para propósito de esta solicitud, se entiende que un mutante Y641 de EZH2 humano, y, equivalentemente, un mutante Y641 de EZH2, se refiere a un EZH2 humano en el que el residuo de aminoácido que corresponde a Y641 de EZH2 tipo natural humano se sustituye por un residuo de aminoácido diferente a tirosina.

5

En una realización la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 tipo natural humano solo mediante sustitución de un único residuo de aminoácido que corresponde a Y641 EZH2 de tipo natural humano mediante un residuo de aminoácido diferente a tirosina.

10

En una realización la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos EZH2 humano tipo natural solo mediante sustitución de fenilalanina (F) por el único residuo de aminoácido que corresponde a Y641 de EZH2 tipo natural humano. El mutante Y641 de EZH2 de acuerdo con esta realización se denomina aquí como un mutante Y641F o, equivalentemente, Y641F.

Y641F (SEQ ID NO: 9)

MGQTGKKSEKGPVCRKRKRVKSEYMRLRQLKRFRRRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
 KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLOQNF
 MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGTFFIEELIKNYDGKVGHDRECGFINDEIFVELVNALGQ
 YNDDDDDDDDGDDPEEREKQKDLLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
 KEKYKELTEQQPLGALPPECTPNIDGPNASVQREQLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPPH
 ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGRRRGRRLPN
 NSSRPSTPTINVLESKDTDSREAGTETGGENNDKEEEEKDETSSSSEANSRCQTPIKM
 KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYDNEFCAIARLIGTKTCRQVYEFVKESSIIAPA
 PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
 NFCEKFCQCSSECQNRFPGCRCQAQCNTKQCPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
 CKNCSIQRGSKKHLALLAPSDVAGWGIFIKDPVQKNEFISEFCGEIISQDEADRRGKVYDK
 YMCSEFLNLFNDFVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
 ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP

15

En una realización la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 tipo natural humano solo mediante sustitución de histidina (H) para el único residuo de aminoácido que corresponde a Y641 de EZH2 tipo natural humano. El mutante Y641 de EZH2 de acuerdo con esta realización se denomina aquí como un mutante Y641H o, equivalentemente, Y641H.

20

Y641H (SEQ ID NO: 10)

```

MGQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNI DGNPAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTDS DREAGTETGGENNDKEEEEEKDETS SSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECNRFPGCRCKAQCN TKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHL L LAPS DVAGWGI FIKDPVQKNEFISEHCGEII SQDEADRRGKVYDK
YMC SFLFNLNND FVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP
    
```

5 En una realización la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 tipo natural humano solo mediante sustitución de asparagina (N) para el único residuo de aminoácido que corresponde a Y641 de EZH2 tipo natural humano. El mutante Y641 de EZH2 de acuerdo con esta realización se denomina aquí como un mutante Y641N o, equivalentemente, Y641N.

Y641N (SEQ ID NO: 11)

```

MGQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNI DGNPAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTDS DREAGTETGGENNDKEEEEEKDETS SSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECNRFPGCRCKAQCN TKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHL L LAPS DVAGWGI FIKDPVQKNEFISENCGEII SQDEADRRGKVYDK
YMC SFLFNLNND FVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP
    
```

10 En una realización la secuencia de aminoácidos de un mutante Y641 de EZH2 difiere de la secuencia de aminoácidos de EZH2 tipo natural humano solo por sustitución de serina (S) por el único residuo de aminoácido que corresponde a Y641 de EZH2 tipo natural humano. El mutante Y641 de EZH2 de acuerdo con esta realización se denomina aquí como un mutante Y641S o, equivalentemente, Y641S.

Y641 S (SEQ ID NO: 12)

```

MGQTGKKSEKGPVCRKRVKSEYMRLRQLKRFRADEVKSMFSSNRQKILERTEILNQEW
KQRRIQPVHILTSVSSLRGTRECSVTSDLDFPTQVIPLKTLNAVASVPIMYSWSPLQQNF
MVEDETVLHNI PYMGDEVLDQDGT FIEELIKNYDGKVHGDRECGFINDEIFVELVNALGQ
YNDDDDDDGDDPEEREKQKDLEDHRDDKESRPPRKFPSDKIFEAISSMFPDKGTAEEL
KEYKELTEQQLPGALPPECTPNI DGNPAKSVQREQSLHSFHTLFCRRCFKYDCFLHPFH
ATPNTYKRKNTETALDNKPCGPQCYQHLEGAKEFAAALTAERIKTPPKRPGGRRRGRLPN
NSSRPSTPTINVLESKDTDS DREAGTETGGENNDKEEEEEKDETS SSSSEANSRCQTPIKM
KPNIEPPENVEWSGAEASMFVRLIGTYYDNFCAIARLIGTKTCRQVYEFVRKESSIIAPA
PAEDVDTPPRKKRKHRLWAAHCRKIQLKKGSSNHVYNYQPCDHPRQPCDSSCPCVIAQ
NFCEKFCQCSSECNRFPGCRCKAQCN TKQPCYLAVRECDPDLCLTCGAADHWDSKNVS
CKNCSIQRGSKKHL L LAPS DVAGWGI FIKDPVQKNEFISESCGEII SQDEADRRGKVYDK
YMC SFLFNLNND FVVDATRKGNKIRFANHSVNPNCYAKVMMVNGDHRIGIFAKRAIQTGE
ELFFDYRYSQADALKYVGIEREMEIP
    
```

15 La tolerancia para múltiples mutaciones Y641 en EZH2 sugiere que una liberación de aglomeración estérica puede permitir mayor acceso para alineación apropiada de la dimetil lisina mayor como el sustrato para la reacción de di- a -tri metilación. El análisis cristalográfico de las proteínas metiltransferasas SET7/9 y G9a revela que los hidroxilos de cadena lateral de los residuos de tirosina de sitio activo están implicados en interacciones de unión a H directamente

con la amina de la lisina que acepta metilo, o indirectamente a través una molécula de agua que interviene. Aunque el sitio activo mayor e del mutante Y641 es favorable para di y trimetilación, la pérdida del receptor de unión a hidrógeno hidroxilo tirosina puede resultar en una orientación desfavorables del sitio activo para transferencia de metilo inicial a la amina lisina.

5

Las implicaciones de los actuales presentes para enfermedad humana se hacen claras mediante los datos resumidos en la Tabla 1 (véase adelante). Se esperaría que las células heterocigotas para EZH2 exhiban un fenotipo maligno debido a la formación eficiente de H3-K27me1 mediante la enzima WT y la transición posterior, eficiente de esta especie progenitora para H3- K27me2, y, especialmente, H3-K27me3, mediante las formas de enzima mutantes.

10

Se ha reportado que la formación H3-K27me1 no es exclusivamente dependiente en catálisis WT-EZH2. Los estudios de modificación de EZH2 y de otra subunidad PRC2, EED, han demostrado H3-K27me1 la formación se puede catalizar mediante complejos de PRC2 que contiene EZH2 o la proteína relacionada EZH1 como la subunidad catalítica. Shen, X. et al. (2008) Mol Cell 32:491-502. Por lo tanto, el acoplamiento catalítico entre las especies mutantes EZH2 y complejos de PRC2 que contiene WT-EZH2 o WT-EZH1 sería suficiente para aumentar la formación H3-K27me2/3, y produciendo de esta forma el fenotipo maligno auxiliar. Los datos por lo tanto sugieren que el fenotipo maligno de linfoma folicular (FL) y linfoma de células B grandes difusas (DLBCL) del subtipo de células B de centro germinal (GCB), asociados con la expresión de formas mutantes de EZH2, es el resultado de una ganancia general de la función con respecto a la formación de la forma trimetilado de H3-K27. Esta interpretación de los datos también ayuda a reconciliar la existencia de sobreexpresión asociada con cáncer de proteínas asociadas con EZH2 o PRC2 (por ejemplo, PHF19/PCL3) y también genotipos de pérdida de función para la desmetilasa *UTX* histona H3-K27. La pérdida de actividad *UTX* sería enzimáticamente equivalente a una ganancia de función para EZH2, en cualquier situación que resulta en niveles de estado constante mayor de tri-metilado H3-K27 en células de cáncer (Figura 4).

20

Los estados de mono-, di-, y tri- metilación de histona H3-K27 se asocian con diferentes funciones en el control transcripcional. La monometilación histona H3-K27 está asociada con la transcripción de genes activos que están preparados para transcripción. Cui et al. (2009) Cell Stem Cell 4:80-93; Barski (2007) Cell 129: 823-37. En contraste, la trimetilación de histona H3-K27 está asociada con genes transcripcionalmente represados o genes que están preparados para transcripción cuando la trimetilación de histona H3-K4 está en *cis*. Cui et al. (*supra*); Kirmizis et al. (2007) Genes Dev 18:1592-1605; Bernstein et al. (2006) Cell 125:315-26. Tomados juntos, las alteraciones en la actividad del complejo PRC2 se reporta en cáncer, que incluye la mutación Y641 de EZH2, se predice que resultan en un aumento en el estado trimetilado de histona H3-K27 y de esta forma resulta en represión transcripcional.

25

Otro descubrimiento de la presente invención es que las células que expresan Y641 EZH2 mutante, en general, son más sensibles a inhibidores EZH2 de molécula pequeña que las células que expresan EZH2 WT. Específicamente, las células que expresan Y641 EZH2 mutante muestran crecimiento reducido, división o proliferación, o incluso experimenta apoptosis o necrosis después del tratamiento de los inhibidores EZH2. En contraste, las células que expresan EZH2 WT no son sensibles al efecto anti-proliferativo de los inhibidores EZH2 (Figuras 13 y 14). Otro descubrimiento sorprendente de la presente invención es que es posible para las células que expresan EZH2 WT visualizar un estado similar de metilación de histona H3-K27 como células que expresan Y641 EZH2, y que este estado de metilación también se puede correlacionar con sensibilidad a un inhibidor EZH2 independientemente del estado de mutación EZH2. En general, los niveles globales H3-K27me3 son similares o mayores en el mutante Y641 que contiene estirpes celulares que en estirpes celulares que expresan EZH2 WT; sin embargo los niveles de H3-K27me2 son dramáticamente menores en estirpes celulares mutantes EZH2 Y641 y determinadas estirpes celulares tipo natural, tal como la estirpe celular Pfeiffer que en otras estirpes celulares tipo natural (Figuras 9, 10 y 11). De esta forma la relación de la señal H3-K27me2/me3 en estirpes mutantes Y641 y la estirpe celular Pfeiffer es mucho menor que aquella observada en otras estirpes WT. Los datos presentes demuestran adicionalmente que las estirpes celulares con una señal menor de H3-K27me2 y similar o mayor señal H3-K27me3 con relación al EZH2 WT típico que expresa estirpes celulares que son más sensibles a los inhibidores EZH2 de molécula pequeña. Específicamente, las células con una señal baja de H3-K27me2 y una detección normal o alta de señal H3K27me3 se dividen o incluso mueren después de tratamiento con los inhibidores EZH2 (Figuras 9, 10, 11, 13, y 14). En contraste, las células con una relación mayor de señal H3-K27me2/me3 no son sensibles al efecto anti-proliferativo de los inhibidores EZH2 (Figuras 9, 10, 11, 13, y 14). La invención actual proporciona resultados previamente desconocidos e inesperados que identifican las mutaciones EZH2 Y641 en tumores de paciente y/o detectan los niveles bajos de H3-K27me2 y niveles normales o altos de H3-K27me3 con relación a un control, a través del uso de técnicas tales como western blot, MS o IHC en un paciente que se pueden utilizar para identificar que el paciente responderá a un tratamiento de inhibidor EZH2.

35

Se ha sugerido que EZH2 y otras metiltransferasas de proteína son objetivos atractivos para el descubrimiento de fármacos. Copeland et al. (2009) Nat Rev Drug Discov 8:724-32; Copeland et al. (2010) Curr Opin Chem Biol 14(4): 505-10; Pollock et al. (2010) Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 6(1): 71-9. Los datos actuales también sugieren una estrategia experimental para el desarrollo de fármacos específicos de linfoma FL y GCB. Cuando las diferencias en el reconocimiento del sustrato entre los mutantes asociados con la enfermedad y WT se derivan de interacciones de estado de transición, inhibidores de molécula pequeña que imitan selectivamente el estado de transición del mutante EZH2 sobre aquel de la enzima WT debe probar que es efectivo en el bloqueo de metilación H3- K27 en células que tienen mutación. Se esperaría que los inhibidores de este tipo exhiban un índice terapéutico grande, cuando la toxicidad mediada por objetivo sería mínima para cualesquiera células que tienen solo la enzima WT. La imitación del estado de

60

Se ha sugerido que EZH2 y otras metiltransferasas de proteína son objetivos atractivos para el descubrimiento de fármacos. Copeland et al. (2009) Nat Rev Drug Discov 8:724-32; Copeland et al. (2010) Curr Opin Chem Biol 14(4): 505-10; Pollock et al. (2010) Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 6(1): 71-9. Los datos actuales también sugieren una estrategia experimental para el desarrollo de fármacos específicos de linfoma FL y GCB. Cuando las diferencias en el reconocimiento del sustrato entre los mutantes asociados con la enfermedad y WT se derivan de interacciones de estado de transición, inhibidores de molécula pequeña que imitan selectivamente el estado de transición del mutante EZH2 sobre aquel de la enzima WT debe probar que es efectivo en el bloqueo de metilación H3- K27 en células que tienen mutación. Se esperaría que los inhibidores de este tipo exhiban un índice terapéutico grande, cuando la toxicidad mediada por objetivo sería mínima para cualesquiera células que tienen solo la enzima WT. La imitación del estado de

65

transición ha probado ser una estrategia efectiva para el diseño del fármaco en muchas áreas de enfermedad. Véase, por ejemplo, Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. 2nd ed, (Wiley, 2000).

5 Los resultados puntuales actuales para una dependencia sorprendente previamente no reconocida, en el acoplamiento enzimático entre enzimas que realizan mono-metilación H3-K27 y determinadas formas mutantes de EZH2 para patogenicidad en linfoma folicular y linfoma de células B grandes difusas. Aunque no pretende estar limitado por ninguna teoría, se considera que los datos constituyen el primer ejemplo de una enfermedad humana que es dependiente en dicho acoplamiento de actividad catalítica entre enzimas normales (WT) y mutantes asociadas con la enfermedad (Y641).

10 Un aspecto de la invención es un método para inhibir en un sujeto la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilado. La inhibición puede involucrar inhibir en un sujeto la conversión de H3-K27 no metilado a H3-K27 monometilado, la conversión de H3-K27 monometilado a H3-K27 dimetilado, la conversión de H3-K27 dimetilado a H3-K27 trimetilado, o cualquier combinación de los mismos, que incluyen, por ejemplo, la conversión de H3-K27 monometilado a H3-K27 dimetilado y la conversión de H3-K27 dimetilado a H3-K27 trimetilado. Como se utiliza aquí, H3-K27 no metilado se refiere a histona H3 sin un grupo metilo covalentemente unido al grupo amino de lisina 27. Como se utiliza aquí, H3-K27 monometilado se refiere a histona H3 con un único grupo metilo covalentemente unido al grupo amino de lisina 27. H3-K27 monometilado también se denomina aquí como H3-K27me1. Como se utiliza aquí, H3-K27 dimetilado se refiere a histona H3 con dos grupos metilo covalentemente unidos al grupo amino de lisina 27. H3-K27 dimetilado también se denomina aquí como H3-K27me2. Como se utiliza aquí, H3-K27 trimetilado se refiere a histona H3 con tres grupos metilo covalentemente unidos al grupo amino de lisina 27. H3-K27 trimetilado también se denomina aquí como H3-K27me3.

25 La histona H3 es una proteína de 136 aminoácidos de largo, la secuencia que se conoce. Véase, por ejemplo, No. de Acceso GenBank CAB02546, cuyos contenidos se incorporan aquí mediante referencia. Como se describe adicionalmente aquí, además de histona H3 de longitud completa, fragmentos de péptido de histona H3 que comprende el residuo de lisina que corresponde a K27 de histona H3 de longitud completa se puede utilizar como sustrato para EZH2 (y de forma similar para las formas mutantes de EZH2) para evaluar la conversión de H3-K27m1 a H3-K27m2 y la conversión de H3-K27m2 a H3-K27m3. En una realización, dicho fragmento de péptido corresponde al residuo de aminoácidos 21-44 de histona H3. Dicho fragmento de péptido tiene la secuencia de aminoácidos LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO: 13).

35 El método involucra administrar a un sujeto que expresa un mutante Y641 de EZH2 una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2, inhibir por lo tanto la conversión de H3-K27 a H3-K27 trimetilado en el sujeto. En una realización un sujeto que expresa un mutante Y641 de EZH2 se refiere a un sujeto que tiene una cantidad detectable de un polipéptido EZH2 mutante Y641. En una realización un sujeto que expresa un mutante Y641 de EZH2 se refiere a un sujeto que tiene una cantidad detectable de un ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante Y641.

40 Se puede detectar el polipéptido EZH2 mutante Y641 utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, un mutante polipéptido Y641 EZH2 se puede detectar utilizando un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido EZH2 mutante Y641 o a un fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante Y641. Un fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante Y641 puede incluir, por ejemplo, un dominio SET como se proporciona en la SEQ ID NO: 6, excepto para sustitución de Y641 mediante un residuo de aminoácido diferente a tirosina. En otra realización, un fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante Y641 puede incluir, por ejemplo, un fragmento de 10-113 aminoácidos del dominio SET como se proporciona en la SEQ ID NO: 6, excepto para sustitución de Y641 mediante un residuo de aminoácido diferente a tirosina, dado que el fragmento incluye el residuo de aminoácido que corresponde a Y641. Se espera que el epítipo de dicho anticuerpo incluya el residuo de aminoácido que corresponde a Y641 de EZH2 tipo natural. Se considera que un anticuerpo se une específicamente al polipéptido EZH2 mutante Y641 o a un fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante Y641 si se une a aquel polipéptido EZH2 mutante o fragmento de péptido del mismo pero no al polipéptido EZH2 tipo natural correspondiente o fragmento de péptido del mismo. En una realización, se considera que dicho anticuerpo se une específicamente al polipéptido EZH2 mutante Y641 o a un fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante Y641 si se une al polipéptido EZH2 mutante o fragmento de péptido del mismo con una afinidad que es por lo menos ca. 100 veces mayor que para el polipéptido EZH2 tipo natural correspondiente o fragmento de péptido del mismo. En una realización, se considera que dicho anticuerpo se une específicamente al polipéptido EZH2 mutante Y641 o a un fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante Y641 si se une a aquel polipéptido EZH2 mutante o fragmento de péptido del mismo con una afinidad que es por lo menos ca. 1000 veces mayor que para el polipéptido EZH2 tipo natural correspondiente o fragmento de péptido del mismo. El anticuerpo se puede utilizar, por ejemplo, en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o ensayo Western.

65 En una realización el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal se puede preparar de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Köhler and Milstein (1975) *Nature* 256 (5517):495-7.

Como otro ejemplo, se puede detectar un polipéptido EZH2 mutante Y641 utilizando espectrometría de masa (MS), por ejemplo, ionización de electrospray con desorción/ionización de láser asistido por matriz o tiempo de vuelo (ESI-TOF) acoplado con tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Dichos métodos se conocen bien en la técnica. El análisis involucrará la identificación de uno o más fragmentos de péptido que comprenden la mutación de interés, por ejemplo, un péptido de 12 a 24 aminoácidos de largo que comprende una secuencia que abarca el aminoácido que corresponde a Y641 en EZH2 tipo natural.

Se puede utilizar un ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante Y641 o a fragmento de péptido que es característico del polipéptido EZH2 mutante Y641 utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, se puede detectar un ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante Y641 utilizando resecuenciamiento del genoma completo o resecuenciamiento de la región objetivo (el último también conocido como resecuenciamiento objetivo) utilizando fuentes de ADN adecuadamente seleccionadas y cebadores de reacción de la cadena de polimerasa (PCR) de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bentley (2006) *Curr Opin Genet Dev.* 16:545-52, y Li et al. (2009) *Genome Res* 19:1124-32. El método normalmente y generalmente conlleva a la etapas de purificación de ADN genómico, amplificación PCR para amplificar la región de interés, secuenciamiento de ciclo, limpieza de reacción de secuenciamiento, electroforesis capilar, y análisis de datos. Los cebadores PCR de alta calidad que cubren la región de interés se diseñan utilizando herramientas de diseño de cebador *in silico*. El secuenciamiento del ciclo es un método simple en el que rondas sucesivas de desnaturalización, hibridación, y extensión en un ciclizador térmico resulta en amplificación lineal de productos de extensión. Los productos se terminan normalmente con una etiqueta fluorescente que identifica la base de nucleótido terminal base como G, A, T, o C. Los terminadores de tinte no incorporado y sales que pueden competir para inyección electroforética capilar se retiran mediante lavado. Durante electroforesis capilar, los productos de la reacción de secuenciamiento de ciclo migran a través de capilares cargados con el polímero. Los fragmentos de ADN cargados negativamente se separan por tamaño cuando se mueven a través de las capilaridades hacia el electrodo positivo. Después de electroforesis, el software de recolección de datos crea un archivo de muestra de los datos brutos. Utilizando aplicaciones de software hacia el usuario, se realiza análisis adicional de los datos para traducir las imágenes de datos de color recolectadas en las bases de nucleótidos correspondientes. Alternativamente o adicionalmente, el método puede incluir el uso de secuenciamiento y/o captura de ADN genómico objetivo con base en microdisposición. Están comercialmente disponibles los kits, reactivos, y métodos para seleccionar cebadores de PCR apropiados y realizar resecuenciamiento, por ejemplo, de Applied Biosystems, Agilent, y NimbleGen (Roche Diagnostics GmbH). Se han utilizado métodos tales como los utilizados para detectar *JAK2* y *gen de leucemia mieloproliferativa (MPL)* mutaciones y para diagnosticar policitemia vera, trombocitemia esencial, y mielofibrosis idiopática. Para uso en la invención actual, se pueden seleccionar cebadores PCR con el propósito de amplificar, por ejemplo, por lo menos una porción relevante de la SEQ ID NO: 7 (anterior).

Alternativamente o adicionalmente, se puede detectar un ácido nucleico que codifica un polipéptido EZH2 mutante Y641 utilizando un Southern blot de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En una realización se detecta una secuencia de ADN que codifica un polipéptido EZH2 mutante Y641 utilizando hibridación de ácido nucleico realizada bajo condiciones altamente exigentes. Se selecciona una sonda de ácido nucleico de tal manera que su secuencia es complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos objetivo que incluye un codón para el aminoácido mutante que corresponde a Y641 de EZH2 tipo natural.

Se combina una sonda específica de secuencia con una muestra se prueba bajo condiciones altamente exigentes. El término "condiciones altamente exigentes" como se utiliza aquí se refiere a parámetros con el cual la técnica está familiarizado. Se puede encontrar los parámetros de hibridación de ácido nucleico en referencias que compilan dichos métodos, por ejemplo, J. Sambrook, et al., eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segundo Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, o F. M. Ausubel, et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York. Más específicamente, condiciones altamente exigentes, como se utiliza aquí, se refiere a, por ejemplo, hibridación a 65° C en regulador de hibridación (3.5 3 SSC, 0.02 % de Ficoll, 0.02 % de povidona, 0.02 % de albúmina de suero bovino (BSA), NaH₂PO₄ 2.5 mM (pH 7), 0.5 % de SDS, EDTA 2 mM). El SSC es cloruro de sodio 0.15 M /citrate de sodio 0.015 M, pH 7; SDS es dodecil sulfato de sodio; y EDTA es ácido etilendiaminatetracético. Después de hibridación, se lava la membrana en la que el ADN se transfiere, por ejemplo, en 2 X SSC a temperatura ambiente y luego a 0.1-0.5 X SSC/0.1 X SDS a temperaturas de hasta 68° C.

Existen otras condiciones, reactivos, y así sucesivamente se pueden utilizar, que resulta en un grado similar de exigencia. El experto estará familiarizado con dichas condiciones, y de esta forma no se dan aquí. Sin embargo, se entenderá que el experto será capaz de manipularlas condiciones en una forma para permitir la identificación clara de ácidos nucleicos asociados con EZH2 de la invención, que incluyen, en particular, ácidos nucleicos que codifican los mutantes Y641 de EZH2 (por ejemplo, al utilizar condiciones de baja exigencia). El experto también está familiarizado con la metodología para detectar células y colecciones para la expresión de dichas moléculas, que luego se aíslan rutinariamente, seguido por aislamiento de la molécula de ácido nucleico pertinente y secuenciamiento.

Al sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de EZH2. Como se utiliza aquí, un inhibidor de EZH2, de manera general, se refiere a una molécula pequeña, es decir, una molécula de peso molecular menor de aproximadamente 1.5 kilodaltons (kDa), que es capaz de interferir con la actividad enzimática metiltransferasa histona de EZH2.

En una realización el inhibidor de EZH2 inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2 tipo natural. En una realización el inhibidor de EZH2 inhibe la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2. En una realización el inhibidor de EZH2 inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2 tipo natural y la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2. En una realización el inhibidor de EZH2 inhibe selectivamente la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2.

Como se describe aquí, determinados mutantes Y641 de EZH2 son catalizadores relativamente pobres para la conversión de H3-K27 no metilado a H3-K27me1 y catalizadores aun inesperadamente efectivas para la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. Por el contrario, el EZH2 tipo natural es un catalizador relativamente efectivo para la conversión de H3-K27 no metilado a H3-K27me1 y catalizador aun inesperadamente inefectivo para la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. Esto es importante debido a que los estados mono-, di- y trimetilados de H3-K27 exhiben diferentes funciones en control transcripcional. Por ejemplo, el H3-K27me1 está asociado con la transcripción activa de genes que se preparan para transcripción, aunque el H3-K27me3 está asociado con genes represados transcripcionalmente o genes que están preparados para transcripción cuando la trimetilación H3-K4 está en *cis*. De esta forma, la inhibición selectiva de la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2 efectúa la inhibición selectiva de producción de la forma trimetilada de H3-K27, por lo que favorece la transcripción asociada con H3-K27me1 y desfavorece la represión de transcripción asociada con H3-K27me3.

Un inhibidor de EZH2 "inhibe selectivamente" la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2 cuando inhibe la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2 más efectivamente que la que inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2 tipo natural. Por ejemplo, en una realización el inhibidor selectivo tiene un IC50 para el mutante Y641 de EZH2 que es por lo menos 40 por ciento menor que el IC50 para el EZH2 tipo natural. En una realización el inhibidor selectivo tiene un IC50 para el mutante Y641 de EZH2 que es por lo menos 50 por ciento menor que el IC50 para el EZH2 tipo natural. En una realización el inhibidor selectivo tiene un IC50 para el mutante Y641 de EZH2 que es por lo menos 60 por ciento menor que el IC50 para el EZH2 tipo natural. En una realización el inhibidor selectivo tiene un IC50 para el mutante Y641 de EZH2 que es por lo menos 70 por ciento menor que el IC50 para el EZH2 tipo natural. En una realización el inhibidor selectivo tiene un IC50 para el mutante Y641 de EZH2 que es por lo menos 80 por ciento menor que el IC50 para EZH2 tipo natural. En una realización el inhibidor selectivo tiene un IC50 para el mutante Y641 de EZH2 que es por lo menos 90 por ciento menor que el IC50 para EZH2 tipo natural.

En una realización, el inhibidor selectivo de un mutante Y641 de EZH2 no ejerce esencialmente efecto inhibidor en EZH2 tipo natural.

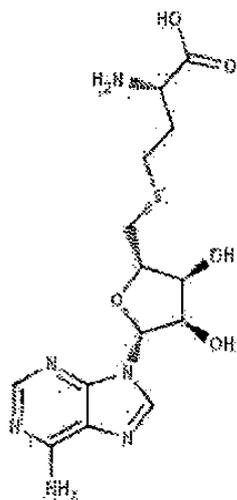
El inhibidor inhibe la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. En una realización se dice que el inhibidor inhibe la trimetilación de H3-K27. Debido a que la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 precede la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3, un inhibidor de la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 también inhibe naturalmente la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3, es decir, inhibe la trimetilación de H3-K27. También es posible inhibir la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3 sin la inhibición de la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2. La inhibición de este tipo también resultaría en la inhibición de la trimetilación de H3-K27, aunque sin la inhibición de dimetilación de H3-K27.

En una realización el inhibidor inhibe la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 y la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. Dicho inhibidor puede inhibir directamente la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 solo. Alternativamente, dicho inhibidor puede inhibir directamente la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 y la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3.

El inhibidor inhibe la actividad de metilasa histona. La inhibición de la actividad de metilasa histona se puede detectar utilizando cualquier método adecuado. La inhibición se puede medir, por ejemplo, ya sea en términos del índice de actividad de metilasa histona o como producto de actividad de metilasa histona. Los métodos adecuados para estas lecturas se incluyen en los Ejemplos adelante.

La inhibición es una inhibición medible comparada con un control negativo adecuado. En una realización, la inhibición es por lo menos 10 por ciento de la inhibición comparado con un control negativo adecuado. Es decir, el índice de actividad enzimática o la cantidad de producto con el inhibidor es menor que o igual a 90 por ciento del índice correspondiente o cantidad hecha sin el inhibidor. En diversas otras realizaciones, la inhibición es por lo menos 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, o 95 por ciento de la inhibición comparado con un control negativo adecuado. En una realización, la inhibición es por lo menos 99 por ciento de la inhibición comparado con un control negativo adecuado. Es decir, el índice de actividad enzimática o la cantidad de producto con el inhibidor es menor que o igual a 1 por ciento del índice correspondiente o cantidad hecha sin el inhibidor.

En una realización, el inhibidor es S-adenosil-L-homocisteína (SAH). SAH tiene la fórmula estructural

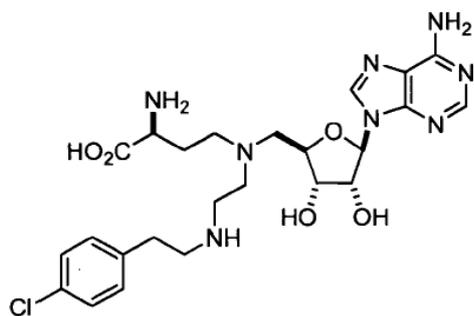


(SAH)

y está comercialmente disponible de una serie de proveedores, que incluyen, por ejemplo, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Se ha descrito SAH como un inhibidor de transmetilación mediante metiltransferasas dependientes de S-

5

En una realización, el inhibidor es el Compuesto 75



(75)

10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En determinadas realizaciones la invención comprende la etapa de realizar un ensayo para detectar un mutante Y641 de EZH2 en una muestra de un sujeto. Ensayos de este tipo se describieron anteriormente. Como se utiliza aquí, una "muestra de un sujeto" se refiere a cualquier muestra adecuada que contiene células o componentes de células obtenidas o derivadas de un sujeto. En una realización la muestra incluye células que se sospecha expresan el mutante Y641 de EZH2, por ejemplo, células neoplásicas. En una realización la muestra es una muestra de sangre. En una realización la muestra es una muestra de biopsia obtenida a partir de, por ejemplo, un tejido linfático (por ejemplo, ganglio linfático) o médula ósea. En una realización la muestra es una muestra de biopsia obtenida de un tejido diferente a o además de un tejido linfático (por ejemplo, ganglio linfático) o médula ósea. Por ejemplo, en una realización la muestra es una biopsia de un cáncer, por ejemplo, un tumor compuesto de células neoplásicas. Las células en la muestra se pueden aislar de otros componentes de la muestra. Por ejemplo, se pueden aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como un recubrimiento leucocitario de una muestra de sangre que se ha centrifugado de acuerdo con métodos familiares para aquellos expertos en la técnica.

15

20

25

Cuando el resultado del ensayo en una muestra de un sujeto indica que está presente un mutante Y641 de EZH2 en la muestra, se dice que el sujeto expresa el mutante Y641 de EZH2. De hecho, en una realización, cuando el resultado del ensayo en una muestra de un sujeto indica que un mutante Y641 de EZH2 está presente en la muestra, el sujeto se identifica como un candidato para tratamiento con un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe selectivamente la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2.

30

Cuando el resultado del ensayo en una muestra de cáncer indica que un mutante Y641 de EZH2 está presente en el cáncer, se dice que el cáncer expresa el mutante Y641 de EZH2.

De forma similar, cuando el resultado del ensayo en una muestra que comprende células neoplásicas de un sujeto que tiene un cáncer indica que un mutante Y641 de EZH2 está presente en la muestra, se dice que el sujeto expresa el mutante Y641 de EZH2.

5 La presente invención también proporciona una correlación sorprendente, previamente no reconocida de la sensibilidad de un paciente a un inhibidor EZH2 con el nivel H3-K27me2 o preferiblemente con los niveles de H3-K27me y H3-K27me3. Por ejemplo, las células con niveles de H3-K27me2 y me3 altos o normales con relación a un control son mucho más sensibles a un efecto anti-proliferativo de un inhibidor EZH2 que las células con niveles normales de H3-K27 me2 y me3.

10 Un aspecto de la invención es un método para determinar la sensibilidad a un inhibidor EZH2 en un sujeto. En una realización el método incluye aislar una muestra de tejido del sujeto; detectar un nivel de dimetilación (me2) de H3-K27 en la muestra de tejido; comparar el nivel de dimetilación (me2) a un nivel de control de dimetilación (me2); e identificar el sujeto es sensible a dicho inhibidor EZH2 cuando el nivel de dimetilación (me2) está ausente o menor que el nivel de control de dimetilación (me2). En una realización, el método incluye adicionalmente detectar un nivel de trimetilación (me3) de H3-K27 en la muestra de tejido; comparar el nivel de trimetilación (me3) con un nivel de control de trimetilación (me3) y el nivel de dimetilación (me2) a un nivel de control de dimetilación (me2); e identificar que dicho sujeto es sensible al inhibidor EZH2 cuando el nivel de trimetilación (me3) es igual que o mayor que el nivel de control de trimetilación (me3) y el nivel de dimetilación (me2) está ausente o menor que el nivel de control de dimetilación (me2). En otra realización, el método incluye adicionalmente obtener una relación del nivel de dimetilación (me2) al nivel de trimetilación (me3) de H3-K27 en la muestra de tejido; obtener una relación de control del nivel de dimetilación (me2) al nivel de control de trimetilación (me3); comparar la relación a la relación de control; e identificar que el sujeto es sensible a dicho inhibidor EZH2 cuando dicha relación es menor que dicha relación de control. En una realización preferida, el sujeto has cáncer. En una realización, el cáncer es un linfoma folicular. Alternativamente, el cáncer es un linfoma de células B grandes difusas (DLBCL). En otra realización preferida, el sujeto expresa un mutante Y641 EZH2. En una realización preferida, el mutante Y641 es Y641F, Y641H, Y641N o Y641S.

30 La detección de H3-K27 dimetilado o H3-K27 trimetilado se puede llevar a cabo utilizando cualquier método adecuado en la técnica. En una realización, el nivel de metilación se detecta utilizando anticuerpos específicos para H3-K27 dimetilado o H3-K27 trimetilado. Por ejemplo, el tejido aislado es formalina fija y se incorporan en bloques de parafina para conservación a largo plazo. Los bloques se pueden utilizar para preparar portaobjetos para tinción inmunohistoquímica o tinción fluorescente con anticuerpos contra H3-K27. Alternativamente, se pueden preparar lisados de célula completa o extractos de histona de la muestra de tejido aislada y se utiliza posteriormente para tinción inmunohistoquímica, análisis western o tinción fluorescente. En otra realización el nivel de metilación se detecta utilizando un polipéptido o un aptámero específico para H3-K27 dimetilado o H3-K27 trimetilado. En otra realización, el nivel de metilación se detecta utilizando espectrometría de masa (MS).

40 Un H3-K27 dimetilado de control o un H3-K27 trimetilado de control se puede establecer a partir de una muestra de control, por ejemplo, un tejido de no tumor adyacente aislado del sujeto o un tejido saludable de un sujeto saludable. Alternativamente, el nivel de control metilación de H3-K27me2 o H3-K27me3 se puede establecer mediante un patólogo con métodos conocidos en la técnica.

Métodos de detección

45 Un aspecto de la invención es un método para identificar un compuesto de prueba como un inhibidor de un mutante Y641 de EZH2. En una realización el método incluye combinar un mutante Y641 aislado de EZH2 con un sustrato histona, un donante del grupo metilo (tal como S-adenosil metionina (SAM)), y un compuesto de prueba, en donde el sustrato de histona comprende una forma de H3-K27 seleccionado del grupo que consiste de H3-K27 no metilado, H3-K27 monometilado, H3-K27 dimetilado, y cualquier combinación de los mismos; y realizar un ensayo para detectar metilación de H3-K27 en el sustrato de histona, identificando por lo tanto el compuesto de prueba como un inhibidor del mutante Y641 de EZH2 cuando metilación de H3-K27 en la presencia del compuesto de prueba es menor que metilación de H3-K27 en la ausencia del compuesto de prueba. El ensayo para detectar metilación de H3-K27 se puede seleccionar para medir el índice de metilación, el grado de metilación, o el índice y grado de metilación.

55 El mutante Y641 de EZH2 se aísla como un complejo PRC2 o equivalente funcional del mismo. Como se utiliza aquí, el término "aislado" significa que se separa sustancialmente de otros componentes con los cuáles se puede encontrar el complejo como ocurre en la naturaleza. Se puede aislar un compuesto sin ser necesariamente purificado. En una realización el mutante de EZH2 se aísla como un complejo de un mutante Y641 de EZH2 junto con EED y SUZ12. En otra realización el mutante de EZH2 se aísla como un complejo de un mutante Y641 de EZH2 junto con EED, SUZ12, y RbAp48. Bajo condiciones apropiadas, un complejo PRC2 o equivalente funcional del mismo exhibe la actividad de metiltransferasa histona para H3-K27. En una realización el complejo está compuesto de polipéptidos del componente expresado recombinantemente, por ejemplo, EZH2, EED, SUZ12, con o sin RbAp48.

65 El mutante Y641 aislado de EZH2 se combina con un sustrato histona. Un sustrato histona incluye cualquier fuente adecuada de polipéptidos histona o fragmentos de los mismos que pueden servir como sustrato para EZH2. En una realización el sustrato de histona incluye histonas aisladas de un sujeto. Las histonas se pueden aislar de células de un

5 sujeto utilizando cualquier método adecuado; dichos métodos se conocen bien por los expertos en la técnica y no necesitan estar especificados adicionalmente aquí. Véase, por ejemplo, Fang et al. (2004) *Methods Enzymol* 377:213-26. De acuerdo con los Ejemplos adelante, en una realización el sustrato de histona se proporciona como nucleosomas. De acuerdo con los ejemplo adelante, en una realización se proporciona el sustrato de histona como nucleosomas de eritrocito aviar (pollo).

10 el sustrato de histona así proporcionado puede incluir una mezcla de estados de modificación de histona, que incluyen diversos estados de metilación H3-K27 como se juzga por Western blotting con anticuerpos específicos de estado de metilación H3-K27. En una realización el sustrato de histona se puede proporcionar como histona H3 de longitud completa purificada. Dicha histona H3 de longitud completa purificada se puede proporcionar como una preparación homogénea con respecto a los estados de metilación H3-K27, o como una mezcla de diversos estados de metilación H3-K27. Se pueden preparar preparaciones homogéneas de histona H3 aisladas con respecto a los estados de metilación H3-K27 en parte mediante el pasaje sobre una columna de inmunoafinidad cargada con anticuerpos específicos del estado de metilación H3-K27 adecuados o mediante inmunoprecipitación utilizando gránulos magnéticos con anticuerpos específicos de metilación H3-K27 adecuados. Alternativamente o adicionalmente, el estado de metilación de H3-K27 se puede caracterizar como parte de realizar el ensayo. Por ejemplo, el sustrato histona de material de partida se puede caracterizar porque contiene 50 por ciento de H3-K27 no metilado, 40 por ciento de H3-K27 monometilado, 10 por ciento de H3-K27 dimetilado, y 0 por ciento de H3-K27 trimetilado.

20 En una realización el sustrato de histona incluye una colección de péptidos o un péptido adecuado que comprende una o más secuencias de aminoácidos relacionadas con histona H3, que incluyen, en particular, una secuencia que abarca H3-K27. Por ejemplo, en una realización, el sustrato de histona es un fragmento de péptido que corresponde al residuo de aminoácidos 21-44 de histona H3. Dicho fragmento de péptido tiene la secuencia de aminoácidos LATKAARKSAPATGGVKKPHRYRP (SEQ ID NO: 13). La colección de péptidos o péptido se puede preparar mediante síntesis de péptido de acuerdo con técnicas bien conocidas en el arte y opcionalmente modificar con el propósito de incorporar cualquier grado deseado de metilación de lisina que corresponde a H3-K27. Como describe en los Ejemplos adelante, dichos péptidos también se pueden modificar para incorporar una etiqueta, tal como biotina, útil en la realización de ensayos en la dirección 3'. En una realización la etiqueta se adjunta al terminal amino (N) de los péptidos. En una realización la etiqueta se adjunta al terminal carboxi (C) de los péptidos.

30 Los anticuerpos específicos de metilación H3-K27 están disponibles de una variedad de fuentes comerciales, que incluyen, por ejemplo, Tecnología de Señalización Celular (Danvers, MA) y Motivo Activo (Carlsbad, CA).

35 El mutante Y641 aislado de EZH2 se combina con un compuesto de prueba. Como se utiliza aquí, un "compuesto de prueba" se refiere a una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 1.5 kDa. En una realización un compuesto de prueba es un compuesto conocido. En una realización un compuesto de prueba es un compuesto novedoso. En una realización, se puede proporcionar un compuesto de prueba como parte de una colección de dichos compuestos, en donde la colección incluye, por ejemplo, decenas, centenas, miles, o incluso más compuestos. Se puede detectar ventajosamente una colección de compuestos en un ensayo de detección de alto rendimiento, por ejemplo, utilizando disposiciones de los compuestos de prueba y manipulación robótica de acuerdo con técnicas generales bien conocidas en el arte.

45 En determinadas realizaciones un compuesto de prueba es un compuesto que es un derivado de SAH o un derivado de Compuesto 75.

50 La detección de metilación de H3-K27 se puede llevar a cabo utilizando cualquier método adecuado. En una realización, la fuente de grupos donantes metilo incluye grupos metilo que se etiquetan con una etiqueta detectable. La etiqueta detectable en una realización es una etiqueta isotópica, por ejemplo, tritio. Otros tipos de etiquetas pueden incluir, por ejemplo, etiquetas fluorescentes.

55 La detección de la formación de H3-K27 trimetilado se puede llevar a cabo utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, la detección de la formación de H3-K27 trimetilado se puede llevar a cabo utilizando un ensayo para detectar la incorporación de los grupos metilo etiquetados, tal como se describió anteriormente, opcionalmente combinado con un método cromatográfico u otro para separar los productos etiquetados por tamaño, por ejemplo, electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE), electroforesis capilar (CE), o cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Alternativamente o adicionalmente, la detección de la formación de H3-K27 trimetilado se puede llevar a cabo utilizando anticuerpos que son específicos para H3-K27 trimetilado.

60 La detección de la conversión de H3-K27 monometilado a H3-K27 dimetilado se puede llevar a cabo utilizando cualquier método adecuado. En una realización la conversión se mide utilizando anticuerpos específicos para H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado. Por ejemplo, las cantidades de partida o concentraciones de H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado se pueden determinar utilizando anticuerpos específicos apropiados para H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado. Luego de la combinación de la enzima, el sustrato, donante de grupo metilo, y compuesto de prueba, cantidades resultantes o concentraciones de H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado luego se pueden determinar utilizando anticuerpos específicos apropiados para H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado. Las cantidades de inicio y resultantes o concentraciones de H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado luego se pueden

5 comparar. Alternativamente o adicionalmente, las cantidades de inicio y resultantes o concentraciones de H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado luego se pueden comparar con cantidades correspondientes de concentraciones de un control negativo. Una reacción de control negativo, en la que no se incluye el agente de prueba en el ensayo, se puede hacer correr en paralelo o como un control histórico. Los resultados de dicha reacción de control se pueden sustraer opcionalmente de resultados correspondientes de la reacción experimental antes de o en conjunto con la elaboración de la comparación mencionada anteriormente.

10 Debido a que la forma dimetilada de H3-K27 se puede metilar adicionalmente en el mismo ensayo, no puede aparecer una reducción en la cantidad o concentración del H3-K27 monometilado que corresponda directamente a un aumento en el H3-K27 dimetilado. En este caso, se puede presumir, sin embargo, que una reducción en la cantidad o concentración de H3-K27 monometilado es, por sí mismo, reflectivo de la conversión de H3-K27 monometilado a H3-K27 dimetilado.

15 La detección de la conversión de H3-K27 dimetilado a H3-K27 trimetilado se puede llevar a cabo utilizando cualquier método adecuado. En una realización la conversión se mide utilizando anticuerpos específicos para H3-K27 dimetilado y H3-K27 trimetilado. Por ejemplo, las cantidades o concentraciones de partida de H3-K27 dimetilado y H3-K27 trimetilado se puede determinar utilizando anticuerpos específicos apropiados para H3-K27 dimetilado y H3-K27 trimetilado. Luego la combinación de enzima, sustrato, y compuesto de prueba, que resulta cantidades o concentraciones de H3-K27 dimetilado y H3-K27 trimetilado luego se puede determinar utilizando anticuerpos específicos apropiados para H3-K27 dimetilado y H3-K27 trimetilado. Al inicio y resulta en cantidades o concentraciones de H3-K27 dimetilado y H3-K27 trimetilado luego se puede comparar. Alternativamente o adicionalmente, las cantidades de inicio y resultantes de H3-K27 dimetilado y H3-K27 trimetilado luego se puede comparar con cantidades correspondientes de concentraciones de un control negativo. Una reacción de control negativo, en el que no incluye el agente de prueba en el ensayo, se puede hacer correr en paralelo o como un control histórico. Los resultados de dicha reacción de control se pueden sustraer opcionalmente de resultados correspondientes de la reacción experimental antes de o en conjunto con hacer la comparación mencionada anteriormente.

20 Un agente de prueba se identifica como un inhibidor del mutante Y641 de EZH2 cuando la metilación de H3-K27 con el compuesto de prueba es menor que la metilación de H3-K27 sin el compuesto de prueba. En una realización, un agente de prueba se identifica como un inhibidor del mutante Y641 de EZH2 cuando la formación de H3-K27 trimetilado en la presencia del compuesto de prueba es menor que la formación de H3-K27 trimetilado en la ausencia del compuesto de prueba.

25 Un aspecto de la invención es un método para identificar un inhibidor selectivo de un mutante Y641 de EZH2. En una realización el método incluye combinar un mutante Y641 aislado de EZH2 con un sustrato histona, un donante del grupo metilo (por ejemplo, SAM), y un compuesto de prueba, en donde el sustrato de histona comprende una forma de H3-K27 seleccionado del grupo que consiste de H3-K27 monometilado, H3-K27 dimetilado, y una combinación de H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado, formando por lo tanto una mezcla de prueba; combinar un EZH2 tipo natural aislado con un sustrato histona, un donante del grupo metilo (por ejemplo, SAM), y un compuesto de prueba, en donde el sustrato de histona comprende una forma de H3-K27 seleccionada del grupo que consiste de H3-K27 monometilado, H3-K27 dimetilado, y una combinación de H3-K27 monometilado y H3-K27 dimetilado, formando por lo tanto una mezcla de control; realizar un ensayo para detectar la trimetilación del sustrato de histona en cada uno de la mezcla de prueba y la mezcla de control; calcular la relación de (a) la trimetilación con el mutante Y641 de EZH2 y el compuesto de prueba (M+) a (b) la trimetilación con el mutante Y641 de EZH2 sin el compuesto de prueba (M-); calcular la relación de (c) la trimetilación con EZH2 tipo natural y el compuesto de prueba (WT+) a (d) la trimetilación con EZH2 tipo natural sin el compuesto de prueba (WT-); comparar la relación (a)/(b) con la relación (c)/(d); y identificar el compuesto de prueba como a inhibidor selectivo del mutante Y641 de EZH2 cuando la relación (a)/(b) es menor que la relación (c)/(d). En una realización el método incluye adicionalmente tomar en cuenta un control negativo sin el compuesto de prueba para cualquiera o ambos de la mezcla de prueba y la mezcla de control.

50 Composiciones farmacéuticas

Uno o más antagonistas EZH2 se pueden administrar solos a un paciente humano o en composiciones farmacéuticas cuando se mezclan con portadores o excipientes adecuados en dosis para tratar o aliviar una enfermedad o afección como se describe aquí. Las mezclas de estos antagonistas EZH2 también se pueden administrar al paciente como una mezcla simple o en composiciones farmacéuticas formuladas adecuadas. Por ejemplo, un aspecto de la invención se relaciona con composición farmacéutica que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de un antagonista EZH2, o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, enantiómero o estereoisómero del mismo; y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

60 Las técnicas para formulación y administración de antagonistas EZH2 se pueden encontrar en las referencias bien conocidas para un experto común en la técnica, tal como Remington's "The Science and Practice de Pharmacy", 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins 2005.

65 Las rutas de administración adecuadas, por ejemplo, pueden incluir administración oral, rectal, o intestinal; suministro parenteral, que incluye inyecciones intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, o intramedular, así como

también suministro intratecal, intraventricular directo, o inyecciones intraoculares; suministro tópico, que incluyen gotas oculares y suministro transdérmico; e intranasal y otro suministro por transmucosa.

5 Alternativamente, se puede administrar un antagonista EZH2 en una forma local a diferencia de una forma sistémica, por ejemplo, por medio de inyección del antagonista EZH2 directamente en un sitio edematoso, frecuentemente en un depósito o formulación de liberación sostenida.

En una realización, se administra un antagonista EZH2 mediante inyección directa en un tumor o ganglio linfático.

10 Adicionalmente, se puede administrar un antagonista EZH2 en un sistema de suministro de fármaco objetivo, por ejemplo, en un recubrimiento de liposoma con anticuerpo específico de célula de cáncer.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar, por ejemplo, mediante procesos de mezcla convencional, disolución, granulación, elaboración de grajeas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

20 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención de esta forma se pueden formular en una forma convencional utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los antagonistas EZH2 activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación apropiada es dependiente de la ruta de administración seleccionada.

25 Para inyección, los agentes de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o regulador de solución salina fisiológica. Para administración transmucosal, se utilizan penetrantes en la formulación apropiada para la barrera que se va a permear. Dichos penetrantes se conocen de manera general en la técnica.

30 Para administración oral, los antagonistas EZH2 se pueden formular fácilmente al combinar los antagonistas EZH2 activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos portadores permiten que los antagonistas EZH2 de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grajeas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para ingesta oral por un paciente que se va a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener al combinar el antagonista activo EZH2 con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grajea. Los excipientes adecuados incluyen rellenos tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o povidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, tales como povidona entrecruzada, agar, o ácido algínico o una sal de los mismos tales como alginato de sodio.

40 Se proporcionan núcleos de grajea con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden utilizar soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, povidona, gel carbopol, polietilenglicol, y/o óxido de titanio, soluciones de laca, y los solventes orgánicos adecuados o mezclas de solvente. Se pueden agregar pigmentos y tintes a los comprimidos o recubrimientos de grajea para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis activas del antagonista EZH2.

45 Se pueden utilizar oralmente preparaciones farmacéuticas que incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como también cápsulas selladas, blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tal como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los antagonistas EZH2 activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Adicionalmente, se pueden agregar estabilizantes.

50 Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas en forma convencional.

55 Para administración mediante inhalación, los antagonistas EZH2 para uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en la forma de una presentación de rociado en aerosol de empaques presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de aerosol presurizado se puede determinar la unidad de dosificación al proporcionar una válvula para suministrar una cantidad mediana. Las cápsulas y cartuchos de por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla de polvo del antagonista EZH2 y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

60 Los antagonistas EZH2 se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma de dosificación

unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante agregado. Las composiciones pueden tomar dichas formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos o aceitosos, y pueden contener agentes de formulación tal como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

5 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los antagonistas EZH2 activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los antagonistas EZH2 activos se pueden preparar como suspensiones de inyección de aceite apropiadas. Los vehículos o solventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tal como aceite de sésamo, o ésteres de ácido graso sintético, tal como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetil celulosa sorbitol de sodio, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los antagonistas EZH2 para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

10 Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en la forma de polvo para reconstitución antes de uso con vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógeno estéril.

15 Los antagonistas EZH2 también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contiene bases supositorias convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

20 Además de las formulaciones descritas previamente, los antagonistas EZH2 también se pueden formular como una preparación de depósito. Se pueden administrar dichas formulaciones de acción larga mediante implante (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente o mediante inyección intramuscular). De esta forma, por ejemplo, los antagonistas EZH2 se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o como derivados escasamente solubles (por ejemplo, como una sal escasamente soluble).

25 Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de suministro para antagonistas EZH2 farmacéuticos adecuados. Las liposomas y emulsiones son ejemplos de portadores o vehículos de suministro para fármacos hidrófobos. También se pueden emplear determinados solventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido. Adicionalmente, los antagonistas EZH2 se pueden suministrar utilizando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación sostenida y se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida, dependiendo de su naturaleza química, pueden liberar los antagonistas EZH2 durante unas pocas semanas hasta casi 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de la proteína.

30 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender portadores o excipientes de fase de gel o sólido adecuados. Ejemplos de dichos portadores o excipientes incluyen pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros, tales como polietilenglicoles.

Métodos de tratamiento

35 Se proporcionan aquí métodos para tratar o evitar afecciones y enfermedades cuyo curso puede estar influenciado por la modulación del estado de metilación de histonas u otras proteínas, en donde dicho estado de metilación está mediado por lo menos en parte por la actividad de EZH2. La modulación del estado de metilación de histonas a su vez puede influenciar el nivel de expresión de genes objetivos activados por metilación, y/o genes objetivo suprimidos por metilación.

40 Por ejemplo, un aspecto de la invención se relaciona con un método para tratar cáncer. El método comprende la etapa de administrar a un sujeto que tiene un cáncer que expresa un mutante Y641 de EZH2 una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2, tratando por lo tanto el cáncer. En una realización el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2. En una realización el inhibidor inhibe selectivamente la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2. En una realización el cáncer es un linfoma folicular. En una realización el cáncer es un linfoma de células B grandes difusas (DLBCL).

45 Un aspecto de la invención se relaciona con un método para tratar cáncer. El método comprende la etapas de realizar un ensayo para detectar un mutante Y641 de EZH2 en una muestra que comprende células neoplásicas de un sujeto que tiene un cáncer; y administrar a un sujeto que expresa un mutante Y641 de EZH2 una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de EZH2, en donde el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona de EZH2, tratando por lo tanto el cáncer. En una realización el inhibidor inhibe la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2. En una realización el inhibidor inhibe selectivamente la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2. En una realización el cáncer es un linfoma folicular. En una realización el cáncer es un linfoma de células B grandes difusas (DLBCL).

Las enfermedades tales como cánceres y enfermedad neurológica se puede tratar mediante administración de moduladores de metilación de proteína (por ejemplo, histona), por ejemplo, moduladores de metiltransferasa histona, o actividad de enzima de desmetilasa histona. Se ha reportado que la metilación de histona está implicada en expresión aberrante de determinados genes en cánceres, y en inactivación de genes neuronales en células no neuronales. Se pueden utilizar los moduladores descritos aquí para tratar dichas enfermedades, es decir, para inhibir la metilación de histonas en células afectadas.

Con base por lo menos en el hecho que se ha encontrado que el aumento de metilación de histona está asociado con determinados cánceres, un método para tratar cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que inhibe la metilación o restaura la metilación a su nivel aproximado en células normales contraparte. En una realización un método para tratar cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que inhibe la conversión de no H3-K27 metilado para H3-K27 monometilado (H3-K27me1). En una realización un método para tratar cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que inhibe la conversión de H3-K27 monometilado (H3-K27me1) a H3-K27 dimetilado (H3-K27me2). En una realización un método para tratar cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que inhibe la conversión de H3-K27me2 a H3-K27 trimetilado (H3-K27me3). En una realización un método para tratar cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que inhibe la conversión de H3-K27me1 a H3-K27me2 y la conversión de H3-K27me2 a H3-K27me3. Es importante observar que el aumento específico de la enfermedad en metilación puede ocurrir en cromatina en locus genómico clave en la ausencia de un aumento global en niveles celulares de histona o metilación de proteína. Por ejemplo, es posible que ocurra la hipermetilación aberrante en genes relevantes de enfermedad clave contra un entorno de la histona global o hipometilación de proteína.

Se pueden utilizar moduladores de metilación para la modulación de proliferación celular, generalmente. Por ejemplo, en algunos casos se puede reducir la proliferación excesiva con agentes que reducen la metilación, aunque se puede estimular proliferación insuficiente con agentes que aumentan la metilación. De acuerdo con lo anterior, enfermedades que se pueden tratar incluyen enfermedades hiperproliferativas, tal como crecimiento celular benigno y crecimiento celular maligno (cáncer).

Ejemplos de cánceres que se pueden tratar incluyen linfomas, que incluyen linfoma folicular (FL) y linfoma de células B grandes difusas (DLBCL).

Otros cánceres incluyen Leucemia Linfoblástica Aguda; Leucemia Mieloide Aguda; Carcinoma Adrenocortical; Cánceres Relacionados con SIDA; Linfoma relacionado con SIDA; Cáncer Anal; Astrocitoma Cerebeloso Infantil; Astrocitoma, Cerebral Infantil; Carcinoma de Célula de Piel, véase Cáncer de Piel (diferente a melanoma); Cáncer del Conducto Biliar, Extrahepático; Cáncer de Vejiga; Cáncer Óseo, osteosarcoma/ Histiocitoma Fibroso Maligno; Glioma de Tallo Cerebral; Tumor Cerebral; Tumor Cerebral, Astrocitoma Cerebelar; Tumor Cerebral, Astrocitoma Cerebral / Glioma Maligno; Tumor Cerebral, Ependimoma; Tumor Cerebral, Meduloblastoma; Tumor Cerebral, Tumores Neuroectodérmicos Supratentoriales Primitivos; Tumor Cerebral, Ruta Visual y Glioma Hipotalámico; Cáncer de Mama; Adenomas Bronquiales /Carcinoides; Linfoma de Burkitt; Tumor Carcinoide; Tumor Carcinoide, Gastrointestinal; Carcinoma Primario Desconocido; Linfoma del Sistema Nervioso Central, Primario; Astrocitoma Cerebelar; Cáncer Cervical; Cánceres Infantiles; Leucemia Linfocítica Crónica; Leucemia Mielogénosa Crónica; Leucemia Mielogénosa Crónica, Tricoleucito; Trastornos Mieloproliferativos Crónicos; Cáncer de Colon; Cáncer Colorectal; Linfoma Cutáneo de Células T, véase Micosis Fungoides y V; Cáncer Endometrial; Cáncer Esofágico; Familia de Tumores de Ewing; Cáncer del Conducto Biliar Extrahepático; Cáncer Ocular, Melanoma Intraocular; Cáncer Ocular, Retinoblastoma; Cáncer de Vesícula Biliar; Cáncer Gástrico (Estómago); Tumor Carcinoide Gastrointestinal; Tumor de Célula Germinal, Extracranial; Tumor de Célula Germinal, Extragonadal; Tumor de Célula Germinal, Ovario; Tumor Trofoblástico Gestacional; Glioma; Glioma, Tallo Cerebral Infantil; Glioma, Astrocitoma Cerebral Infantil; Glioma, Ruta Visual Infantil y Hipotalámica; Leucemia Tricoleucito; Cáncer de Cabeza y Cuello; Cáncer Hepatocelular (Hígado), Adulto (Primario); Cáncer hepatocelular (Hígado), Infantil (Primario); Linfoma de Hodgkin; Linfoma de Hodgkin Durante Embarazo; Cáncer Hipofaríngeo; Glioma de la Ruta Hipotalámica y Visual; Melanoma Intraocular; Carcinoma de Célula Islote (Páncreas Endocrino); Sarcoma de Kaposi; Cáncer Renal (Célula Renal); Cáncer Renal; Cáncer de Laringe; Leucemia; Cáncer de Cavidad Oral y Labios; Cáncer Hepático, Adulto (Primario); Cáncer Hepático, Infantil (Primario); Cáncer Pulmonar, No Microcítico; Cáncer Pulmonar, Microcítico; Linfoma, Sistema Nervioso Central Primario; Macroglobulinemia, de Waldenstrom; Histiocitoma Maligno Fibroso Óseo /Osteosarcoma; Meduloblastoma; Melanoma; Carcinoma de Célula de Merkel; Mesotelioma; Mesotelioma, Maligno Adulto; Cáncer de Cuello Escamoso Metastásico Primario Oculito; Síndrome Múltiple de Neoplasia Endocrina; Mieloma Múltiple; Mieloma Múltiple/ Fungoides de Micosis de Neoplasma de Célula de Plasma; Síndromes Mielodisplásicos; Enfermedades Mielodisplásicas/Mieloproliferativas; Leucemia Mieloide, Agudo Adulto; Leucemia Mieloide, Agudo Infantil; Trastornos Mieloproliferativos, Crónicos; Cáncer del Sino Paranasal y Cavidad Nasal; Cáncer Nasofaríngeo; Neuroblastoma; Linfoma No Hodgkin; Linfoma No Hodgkin Durante Embarazo; Cáncer Oral; Cáncer de Cavidad Oral, Cáncer Orofaríngeo y de Labios; Osteosarcoma/ Histiocitoma Fibroso Maligno Óseo; Cáncer de Ovario; Cáncer Epitelial de Ovario; Tumor Potencial Maligno Bajo de Ovario; Cáncer Pancreático; Cáncer Pancreático, Célula Islote; Cáncer de Sino Paranasal y Cavidad Nasal; Cáncer Paratiroide; Cáncer de Pene; Feocromocitoma; Tumores Neuroectodérmicos Primitivos de Pineoblastoma y Supratentoriales; Tumor Pituitario; Neoplasma de Célula de Plasma/Mieloma Múltiple; Blastoma Pleuropulmonar; Cáncer de Mama y Embarazo; Cáncer de

Próstata; Cáncer Rectal; Retinoblastoma; Rhabdomyosarcoma; Cáncer de Glándula Salivar; Sarcoma, Familia de Tumores de Ewing; Sarcoma, Tejido Blando; Sarcoma, Uterino; V; Cáncer de Piel; Cáncer de Piel (diferente a Melanoma); Cáncer de Intestino Delgado; Sarcoma de Tejido Blando; Carcinoma de Célula Escamosa, véase Cáncer de Piel (diferente a Melanoma); Cáncer de Cuello Escamoso Primario Oculito, Metastásico; Cáncer de Estómago (Gástrico);
 5 Cáncer Testicular; Timoma; Timoma y Carcinoma Tímico; Cáncer de Tiroides; Cáncer de Célula Transicional de la Pelvis Renal y Uretra; Tumor Trofoblástico, Gestacional; Cáncer de Sitio Primario Desconocido, de; Cánceres Inusuales Infantiles; Cáncer Uretral; Cáncer Uterino, Endometrial; Sarcoma Uterino; Cáncer Vaginal; Glioma Hipotalámico y de Ruta Visual; Cáncer Vulvar; Macroglobulinemia de Waldenstrom; Tumor de Wilms; y Cánceres Femeninos.

10 Cualquier otra enfermedad en la que la metilación epigenética, que está mediada por EZH2, cumple una función que se puede tratar o evitar utilizando los compuestos y métodos descritos aquí.

15 Por ejemplo, las enfermedades neurológicas que se pueden tratar incluyen epilepsia, esquizofrenia, trastorno bipolar u otros trastornos psicológicos y/o psiquiátricos, neuropatías, atrofia muscular esquelética, y enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa. Las enfermedades neurodegenerativas de ejemplo incluyen: enfermedad de Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), y enfermedad de Parkinson. Otra clase de enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedades provocadas por lo menos en parte mediante agregación de poli-glutamina. Enfermedades de esta clase incluyen: Enfermedades de Huntington, Atrofia Muscular Espinal bulbar (SBMA o Enfermedad de Kennedy), Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA), Ataxia 1 Espinocerebelar (SCA1), Ataxia 2 Espinocerebelar (SCA2), Enfermedad de Machado-Joseph (MJD; SCA3), Ataxia 6 Espinocerebelar (SCA6), Ataxia 7 Espinocerebelar (SCA7), y Ataxia 12 Espinocerebelar (SCA12).

20 También se proporcionan aquí métodos para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene un cáncer. El método incluye la determinación de sensibilidad del sujeto a un inhibidor EZH2 mediante el nivel de H3-K27 dimetilado, preferiblemente mediante los niveles de H3-K27 dimetilado y H3-K27 trimetilado; y proporcionar el inhibidor EZH2 al sujeto cuando el sujeto es sensible al inhibidor EZH2. En una realización, el cáncer es un linfoma folicular. Alternativamente, el cáncer es un linfoma de células B grandes difusas (DLBCL). En otra realización preferida, el sujeto expresa un mutante Y641 EZH2. En una realización preferida, el mutante Y641 es Y641F, Y641H, Y641N o Y641 S.

30 Terapia de combinación

35 En un aspecto de la invención, un antagonista EZH2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede utilizar en combinación con otro agente terapéutico para tratar enfermedades tales como cáncer y/o trastornos neurológicos. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico que se reconoce en la técnica que es útil para tratar la enfermedad o afección que se va a tratar por el compuesto de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica (por ejemplo, un agente que afecta la viscosidad de la composición).

40 La terapia de combinación contemplada por la invención incluye, por ejemplo, la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y agentes adicionales en una formulación farmacéutica única así como también la administración de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y agentes adicionales en formulaciones farmacéuticas separadas. En otras palabras, la coadministración deberá significar la administración de por lo menos dos agentes a un sujeto con el propósito de proporcionar los efectos beneficiosos de la combinación de ambos agentes. Por ejemplo, los agentes se pueden administrar simultáneamente o
 45 secuencialmente durante un periodo.

50 Los agentes establecidos adelante son solo para propósitos de ilustración y no pretenden ser limitantes. Las combinaciones, que hacen parte de esta invención, pueden ser los compuestos de la presente invención y por lo menos un agente adicional seleccionado de las listas adelante. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función pretendida.

55 Por ejemplo, un aspecto de la invención se relaciona con el uso de un antagonista EZH2 en combinación con otro agente para el tratamiento de cáncer y/o un trastorno neurológico. En una realización, un agente adicional es un agente antineoplásico que es un compuesto que afecta las modificaciones de histona, tal como un inhibidor HDAC. En determinadas realizaciones, un agente antineoplásico adicional se selecciona del grupo que consiste de quimioterapéuticos (tal como 2CdA, 5-FU, 6-Mercaptopurina, 6-TG, Abraxane™, Accutane®, Actinomicina-D, Adriamycin®, Alimta®, todos los ácidos retinoicos trans, ametopterina, Ara-C, Azacitadina, BCNU, Blenoxane®, Camptosar®, CeeNU®, Clofarabina, Clolar™, Cytosan®, clorhidrato de daunorubicina, DaunoXome®, Dacogen®, DIC, Doxil®, Ellence®, Eloxatin®, Emcyt®, fosfato de etoposida, Fludara®, FUDR®, Gemzar®, Gleevec®, hexametilmelamina, Hycamtin®, Hydrea®, Idamycin®, Ifex®, ixabepilone, Ixempra®, L-asparaginasa, Leukeran®, Ara-C liposómico, L-PAM, Lisodren, Matulane®, mitracina, Mitomicina-C, Myleran®, Navelbine®, Neutrexin®, nilotinib, Nipent®, Mostaza de Nitrógeno, Novantrone®, Oncaspar®, Panretin®, Paraplatin®, Platino®, prolifeprospan 20 con implante de carmustina, Sandostatina®, Targretin®, Tassigna®, Taxotere®, Temodar®, TESPAs, Trisenox®, Valstar®, Velban®, Vidaza™, sulfato de vincristina, VM 26, Xeloda® y Zanosar®); biológicos (tales como Alfa Interferón, Bacillus Calmette-Guerin, Bexxar®, Campath®, Ergamisol®, Erlotinib, Herceptin®, Interleuquina-2, Iressa®, lenalidomida,

5 Mylotarg®, Ontak®, Pegasys®, Revlimid®, Rituxan®, Tarceva™, Thalomid®, Tykerb®, Velcade® y Zevalin™); corticosteroides, (tales como fosfato dexametasona de sodio, DeltaSone® y Delta-Corte®); terapias hormonales (tal como Arimidex®, Aromasin®, Casodex®, Cytadren®, Eligard®, Eulexin®, Evista®, Faslodex®, Femara®, Halotestin®, Megace®, Nilandron®, Nolvadex®, Plenaxis™ y Zoladex®); y radiofarmacéuticos (tales como Iodotope®, Metastron®, Fosfocol® y Samarium SM-153).

Dosificación

10 Como se utiliza aquí, una “cantidad terapéuticamente efectiva” o “dosis terapéuticamente efectiva” es una cantidad de un antagonista EZH2 o una combinación de dos o más de dichos compuestos, que inhiben, total o parcialmente, la evolución de la afección o alivia, por lo menos parcialmente, uno o más síntomas de la afección. Una cantidad terapéuticamente efectiva también puede ser cualquier cantidad que es profilácticamente efectiva. La cantidad que es terapéuticamente efectiva dependerá del tamaño y género del paciente, la afección que se va a tratar, la severidad de la afección y el resultado buscado. En una realización, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a aquella cantidad
15 de los antagonistas EZH2 que resulta en alivio de los síntomas en un paciente. Para un paciente dado, se puede determinar una cantidad terapéuticamente efectiva mediante los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

20 Se puede determinar la toxicidad y eficacia terapéutica de los antagonistas EZH2 mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la dosis máxima tolerada (MTD) y el ED₅₀ (dosis efectiva para 50 % de respuesta máxima). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y se pueden expresar como la relación entre MTD y ED₅₀. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación también se puede guiar al supervisar el efecto del antagonista EZH2 en marcadores farmacodinámicos de la inhibición de enzima (por ejemplo, histona metilación o la expresión de gen objetivo) en tejido enfermo o sustituto. Se pueden utilizar cultivo celular o experimentos en animales para
25 determinar la relación entre las dosis requeridas para cambios en los marcadores farmacodinámicos y dosis requeridas para eficacia terapéutica se puede determinar en cultivo celular o experimentos en animales o ensayos clínicos en etapa temprana. La dosificación de dichos antagonistas EZH2 se posiciona preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED₅₀ con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, la ruta de administración y dosificación puede ser seleccionada por el médico en vista de la afección del paciente. En el tratamiento de crisis, se puede requerir la administración de un método de infusión o de bolo agudo de MTD para obtener una respuesta rápida.

35 La cantidad de dosificación e intervalo se puede ajustar individualmente para proporcionar niveles de plasma de la unidad estructural activa que son suficientes para mantener la modulación de metiltransferasa de efectos, o concentración mínima efectiva (MEC) para el periodo requerido para lograr eficacia terapéutica. El MEC variará para cada antagonista EZH2 pero se puede estimar a partir de datos *in vitro* y experimentos en animales. Las dosificaciones necesarias para lograr el MEC dependerán de las características individuales y la ruta de administración. Sin embargo, se puede utilizar ensayos o bioensayos de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para determinar las concentraciones de plasma.
40

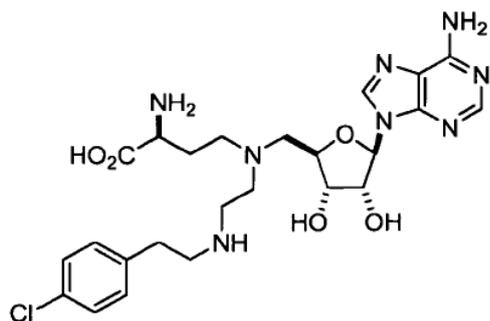
45 También se pueden determinar los intervalos de dosificación utilizando el valor MEC. En determinadas realizaciones, se pueden administrar antagonistas EZH2 utilizando un régimen que mantiene los niveles de plasma por encima de MEC para 10-90 % del tiempo, preferiblemente entre 30-90 % y más preferiblemente entre 50-90 % hasta que se logra el alivio deseado de los síntomas. En otras realizaciones, se mantendrán diferentes niveles de plasma MEC para diferentes cantidades de tiempo. En casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local efectiva del fármaco no se puede relacionar con la concentración de plasma.

50 Un experto en la técnica puede seleccionar de una variedad de regímenes de administración y la cantidad de antagonista EZH2 administrada, por supuesto, dependerá del sujeto que se va a tratar, en el peso del sujeto, la severidad de la afección, la forma de administración y el juicio del médico que prescribe.

Compuestos y composiciones farmacéuticas

55 Los aspectos de la invención se relacionan con compuestos que son útiles de acuerdo con los métodos de la invención. Estos compuestos se denominan aquí como “inhibidores de EZH2” y, equivalentemente, “antagonistas EZH2”. Los compuestos se pueden presentar como los compuestos *per se*, sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos, o como composiciones farmacéuticas.
60

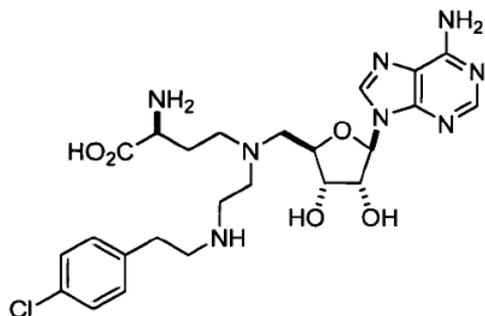
Dichos compuestos específicamente incluyen el Compuesto 75



(75)

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5 La invención incluye adicionalmente una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 75



(75)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

Un antagonista EZH2 y opcionalmente otros agentes terapéuticos se pueden administrar *per se* (solos) o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se utiliza en la medicina las sales debe ser farmacéuticamente aceptables, pero sales no farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

15

Los compuestos útiles de acuerdo con la invención se pueden proporcionar como sales con contraiones farmacéuticamente compatibles (es decir, sales farmacéuticamente aceptables). Una "sal farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal no tóxica que, luego de administración a un receptor, es capaz de proporcionar, ya sea directa o indirectamente, un compuesto o un profármaco de un compuesto útil de acuerdo con esta invención. Un "contraión farmacéuticamente aceptable" es una parte iónica de una sal que no es tóxica cuando se libera de la sal luego de administración a un sujeto. Se pueden formar sales farmacéuticamente compatibles con muchos ácidos, que incluyen pero no se limitan a ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, y succínico. Las sales tienden a ser más solubles en agua u otros solventes próticos que sus formas base libres correspondientes. La presente invención incluye el uso de dichas sales.

25

Las sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con ácidos minerales tales como ácido clorhídrico y ácido bromhídrico, y también aquellos formados con ácidos orgánicos tales como ácido maleico. Por ejemplo, los ácidos comúnmente empleados para formar sales farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como bisulfito de hidrógeno, ácido clorhídrico, bromhídrico, yohídrico, sulfúrico y fosfórico, así como también ácidos orgánicos tales como ácido paratoluenesulfónico, salicílico, tartárico, bitartárico, ascórbico, maleico, besílico, fumárico, glucónico, glucurónico, fórmico, glutámico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, láctico, oxálico, para-bromofenilsulfónico, carbónico, succínico, cítrico, benzoico y acético, y ácidos orgánicos e inorgánicos relacionados. Dichas sales farmacéuticamente aceptables de esta forma incluyen sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenfosfato, dihidrogenfosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formato, isobutirato, caprato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, methoxibenzoato, eftalato, terefatalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, β -hidroxibutirato, glicolato, maleato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato y similares.

40

Las bases adecuadas para formar sales farmacéuticamente aceptables con grupos funcionales ácidos incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos de metales alcalinos tales como sodio, potasio, y litio; hidróxidos de metal alcalinotérreo tal como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y zinc; amoniaco, y aminas orgánicas, tales como mono-, di- o trialquilaminas hidroxiladas o no sustituidas; dicitohexilamina; tributil amina; piridina; N-metilo, N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono-, bis-, o tris-(2-hidroxil- alquil aminas inferiores), tales como mono-, bis-, o tris-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxil-tert-butilamina, o tris-(hidroximetil)metilamina, N, N-di alquil-N-(hidroxil alquil)-aminas, tal como N, N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amina, o tri-(2-hidroxietil)amina; N-metil-D-glucamina; y aminoácidos tales como arginina, lisina, y similares.

Determinados compuestos útiles de acuerdo con la invención y sus sales pueden existir en más de una forma cristalina (es decir, polimorfo; la presente invención incluye el uso de cada una de las formas de cristal y mezclas de los mismos.

Determinados compuestos útiles de acuerdo con la invención pueden contener uno o más centros quirales, y existen en diferentes formas ópticamente activas. Cuando los compuestos útiles de acuerdo con la invención contienen un centro quiral, los compuestos existen en dos formas enantioméricas y la presente invención incluye el uso de enantiómeros y mezclas de enantiómeros, tales como mezclas racémicas de los mismos. Los enantiómeros se pueden resolver mediante los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica; por ejemplo, los enantiómeros se pueden resolver mediante la formación de sales diastereoméricas que se pueden separar, por ejemplo, mediante cristalización; la formación de complejos o derivados diastereoisoméricos que se pueden separar, por ejemplo, mediante cristalización, cromatografía de líquido o gas-líquido; reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico de enantiómero, por ejemplo, por medio de esterificación enzimática; o cromatografía líquida o de gas-líquido en un ambiente quiral, por ejemplo, en un soporte quiral (por ejemplo, sílice con un ligando quiral unido) o en la presencia de un solvente quiral. En donde el enantiómero deseado se convierte en otra entidad química mediante uno de los procedimientos de separación se describió anteriormente, se puede utilizar una etapa adicional para liberar un enantiómero purificado deseado. Alternativamente, se puede sintetizar enantiómeros específicos mediante síntesis asimétrica utilizando reactivos ópticamente activos, sustratos, catalizadores o solventes, o al convertir un enantiómero en el otro mediante transformación asimétrica.

Cuando un compuesto útil de acuerdo con la invención contiene más de un centro quiral, puede existir en formas diastereoméricas. Los compuestos diastereoméricos se pueden separar mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica (por ejemplo, cromatografía o cristalización) y se pueden separar los enantiómeros individuales como se describió anteriormente. La presente invención incluye el uso de diversos diastereoisómeros de compuestos útiles de acuerdo con la invención, y mezclas de los mismos. Los compuestos útiles de acuerdo con la invención pueden existir en diferentes formas tautoméricas o como diferentes isómeros geométricos, y la presente invención incluye el uso de cada tautómero y/o isómero geométrico de compuestos útiles de acuerdo con la invención, y mezclas de los mismos. Los compuestos útiles de acuerdo con la invención pueden existir en forma dipolar. La presente invención incluye el uso de cada forma dipolar de compuestos útiles de acuerdo con la invención, y mezclas de los mismos.

40 Kits

Si se desea, un antagonista EZH2 puede estar presentes en un kit (por ejemplo, un dispositivo dispensador o empaque) que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el antagonista EZH2. El empaque por ejemplo puede comprender lámina de metal o plástica, tal como un empaque alveolado. El empaque o dispositivo dispensador puede estar acompañado mediante instrucciones para administraciones. Las composiciones que comprenden un antagonista EZH2 de la invención formulado en un portador farmacéuticamente compatible también se pueden preparar, se pone en un recipiente apropiado, y etiquetar para tratamiento de una afección indicada. También se pueden proporcionar instrucciones para uso.

También se proporcionan aquí kits que comprenden una pluralidad de reactivos de detección de metilación que detectan el H3-K27 metilado. Por ejemplo, el kit incluye los reactivos de detección H3-K27 mono-metilado, H3-K27 di-metilado y H3-K27 tri-metilado. El reactivo de detección es por ejemplo anticuerpos o fragmentos de los mismos, polipéptidos o aptámeros. El kit puede contener en recipientes separados en un aptámero o un anticuerpo, formulaciones de control (positivo y/o negativo), y/o una etiqueta detectable tal como tintes de fluoresceína, proteína fluorescente verde, rodamina, cianuro, tintes Alexa, luciferasa, radioetiquetas, entre otros. Las instrucciones (por ejemplo, escritas, grabadas, VCR, CD-ROM, etc.) para realizar el ensayo se pueden incluir en el kit. El ensayo por ejemplo puede estar en la forma de un análisis Western Blot, Inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF) y espectrometría de masa (MS) como se conoce en la técnica.

60 Definiciones

Para conveniencia, se recolectan aquí determinados términos empleados en la especificación, ejemplos, y reivindicaciones adjuntas. Todas las definiciones, como se definen y utilizan aquí, definiciones de diccionario reemplazan, definiciones en los documentos incorporados mediante referencia, y/o significados ordinarios de los términos definidos.

65

Los artículos “un” y “uno” se utilizan aquí para referirse a uno a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. Por vía de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

La expresión “y/o”, como se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, cabe entender que significa “cualquiera o ambos” de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes en conjunto en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Múltiples elementos enumerados con “y/o” se debe construir en la misma forma, es decir, “uno o más” de los elementos así unidos. Otros elementos opcionalmente pueden estar presentes son diferentes a los elementos específicamente identificados por la cláusula “y/o”, si se relaciona o no se relaciona con aquellos elementos específicamente identificados. De esta forma, como un ejemplo no limitante, una referencia a “A y/o B”, cuando se utiliza en conjunto con lenguaje abierto tal como “que comprende” se puede referir, en una realización, a A solo (opcionalmente que incluyen elementos diferentes a B); en otra realización, a B solo (opcionalmente que incluyen elementos diferentes a A); en todavía otra realización, a A y B (opcionalmente que incluye otros elementos); etc.

Como se utiliza aquí en la especificación y en las realizaciones, se debe entender que “o” tiene el mismo significado que “y/o” como se definió anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan elementos en una lista, “o” o “y/o” se deben interpretar que son inclusivos, es decir, la inclusión de por lo menos uno, pero que también incluyen más de uno, de una serie o lista de elementos, y, opcionalmente, elementos no enumerados adicionales. Solo los términos claramente indican lo contrario, tal como “solo uno de” o “exactamente uno de”, o, cuando se utiliza en las reivindicaciones, “que consiste de”, se referirá a la inclusión de exactamente un elemento de una serie o lista de elementos. En general, el término “o” como se utiliza aquí solo se debe interpretar como indicador de alternativas exclusivas (es decir, “uno o el otro pero no ambos”) cuando se precede por los términos de exclusividad, tal como “cualquiera”, “uno de”, “solo uno de”, o “exactamente uno de”. Que consiste esencialmente de”, cuando se utiliza en las reivindicaciones, deberá tener su significado ordinario como se utiliza en campo de la ley de patentes.

Como se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, la expresión “por lo menos uno”, en referencia a una lista de uno o más elementos, cabe entender que significa por lo menos un elemento seleccionado de uno cualquiera o más de los elementos en la lista de los elementos, pero que no incluye necesariamente por lo menos uno de cada uno y cada elemento específicamente enumerado dentro de una lista de elementos y no excluyen cualesquiera combinaciones de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que los elementos pueden estar opcionalmente presentes en forma diferente a los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a la que se refiere la lista “por lo menos uno”, si se relaciona o no se relaciona con aquellos elementos específicamente identificados. De esta forma, como un ejemplo no limitante, “por lo menos uno de A y B” (o, equivalentemente, “por lo menos uno de A o B”, o, equivalentemente “por lo menos uno de A y/o B”) se puede referir, en una realización, a por lo menos uno, que opcionalmente incluye más de uno, A, sin B presente (y que opcionalmente incluye elementos diferentes a B); en otra realización, a por lo menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y que incluye opcionalmente elementos diferentes a A); en todavía otra realización, a por lo menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, y por lo menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B (y que incluye opcionalmente otros elementos); etc.

También cabe entender, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquiera de los métodos reivindicados aquí que incluyen más de una etapa u obra, el orden de las etapas o actúa del método no se limita necesariamente al orden en el que se mencionan las etapas u obras del método.

En las reivindicaciones, así como también en la especificación anterior, se entiende que todas las fases transicionales tales como “que comprende”, “que incluye”, “que lleva”, “que tiene”, “que contiene”, “que implica”, “que mantiene”, “que contiene”, y similares son abiertas, es decir, significa que incluye pero no se limita a. Solo las expresiones transicionales “que consiste de” y “que consiste esencialmente” deberán ser expresiones transicionales cerradas o semicerradas, respectivamente, como se establece en el Manual de la Oficina de Patente de los Estados Unidos de los Procedimientos de Examen de Patente, Sección 2111.03.

Los términos “coadministración” y “coadministrar” se refiere a administración concurrente (administración de dos o más agentes terapéuticos al mismo tiempo) y administración variada con el tiempo (administración de uno o más agentes terapéuticos en un momento diferente a aquel de la administración de un agente o agentes terapéuticos adicionales), mientras que los agentes terapéuticos están presente en el paciente a algún grado al mismo tiempo.

El término “tratar” como se utiliza aquí se refiere a aliviar de por lo menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección. El término abarca la administración y/o aplicación de uno o más compuestos descritos aquí, a un sujeto, para el propósito de proporcionar el manejo de, o remedio para una afección. “Tratamiento” para los propósitos de esta descripción, puede, pero no tiene que, proporcionar una cura; a diferencia, “tratamiento” puede estar en la forma de administración de la afección. Cuando los compuestos descritos aquí se utilizan para tratar células de proliferación indeseada, que incluyen cánceres, “tratamiento” incluye destrucción parcial o total de las células de proliferación indeseable con efectos destructivos mínimos en células normales. Un mecanismo deseado de tratamiento de células que proliferan rápidamente indeseadas, que incluyen células neoplásicas, a nivel celular es apoptosis.

El término “evitar” como se utiliza aquí incluye evitar o retrasar el inicio de una evolución de enfermedad clínicamente evidente en conjunto o evitar o retrasar el inicio de un estado preclínicamente evidente de una enfermedad en individuos en riesgo. Esto incluye tratamiento profiláctico de aquellos que están en riesgo de desarrollar una enfermedad.

5 El término “sujeto” como se utiliza aquí para propósitos de tratamiento incluye cualquier sujeto humano que se ha diagnosticado con, tiene síntomas de, o está en riesgo de desarrollar un trastorno. Para los métodos de prevención el sujeto es cualquier sujeto humano. Para ilustración, para propósitos de prevención, un sujeto puede ser un sujeto humano que está en riesgo de o está genéticamente predispuesto a obtener un trastorno caracterizado por proliferación celular rápida, indeseada, tal como cáncer. El sujeto puede estar en riesgo debido a exposición a agentes carcinógenos, que está genéticamente predispuesto a trastornos caracterizados por proliferación celular rápida, indeseada, y así sucesivamente.

15 Excepto como se indica de otra forma, se pueden utilizar métodos estándar para la producción de polipéptidos recombinantes y sintéticos, proteínas de fusión, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, manipulación de secuencias de ácido nucleico, producción de células transformadas, y similares. Se conocen dichas técnicas para aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor, N.Y., 2001); F.M. Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York).

20 El término “polipéptido EZH2” abarca fragmentos funcionales de polipéptidos de longitud completa y equivalentes funcionales de cualquiera de los anteriores que tienen secuencias de aminoácidos sustancialmente similares o sustancialmente idénticos (por lo menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % 98 % o más identidad o similitud de la secuencia de aminoácidos), en donde el fragmento funcional o equivalente funcional retiene una o más de las propiedades funcionales del polipéptido natural.

25 “Funcional” significa que el polipéptido (o ácido nucleico) tiene la misma actividad o sustancialmente actividad similar con respecto a uno o más de las propiedades biológicas del polipéptido natural (o ácido nucleico), por ejemplo, por lo menos aproximadamente 50 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % o más de la actividad del polipéptido natural (o ácido nucleico).

30 El término “modula” (y equivalentes gramaticales) se refiere a un aumento o reducción en la actividad. En realizaciones particulares, el término “aumento” o “mejora” (y equivalentes gramaticales) significa una elevación mediante por lo menos aproximadamente 25 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más. En realizaciones particulares, los términos “reducción” o “reduce” (y equivalentes gramaticales) significa una reducción mediante por lo menos aproximadamente 25 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o más. En algunas realizaciones, la actividad indicada, sustancia u otro parámetro no es detectable. Específicamente se proporcionan antagonistas de EZH2.

40 El término “marcador farmacodinámico” se refiere a un marcador molecular de respuesta de fármaco que se puede medir en pacientes que reciben el fármaco. El marcador debe ser una medición directa de modulación del objetivo de fármaco y es capaz de mostrar cambios cuantitativos en respuesta a la dosis. Un marcador farmacodinámico potencial para los antagonistas EZH2 puede ser niveles de metilación de histona H3-K27 en tejido sustituto o enfermo.

45 Como se utiliza aquí, el término “sensibilidad” es intercambiable con los términos “que responde a”, “sensible”, y “sensibilidad”, y significa que un sujeto muestra respuesta terapéutica cuando se administra un inhibidor EZH, por ejemplo, células neoplásicas o tejidos de tumor el sujeto que experimenta apoptosis y/o necrosis, y/o exhibe crecimiento reducido, división, o proliferación..

50 El término “control” o “referencia” se refiere a niveles de metilación (por ejemplo, nivel de monometilación, nivel de dimetilación o nivel de trimetilación) detectados en un tejido no neoplásico adyacente aislado del sujeto, detectado en un tejido saludable de sujeto saludable, o establecido por un patólogo con métodos estándar en la técnica.

55 “Muestra” significa cualquier muestra biológica derivado del sujeto, incluye pero no se limita a, células, muestras de tejidos y fluidos corporales (que incluyen, pero no se limitan a, moco, sangre, plasma, suero, orina, saliva, y semen).

EJEMPLOS

60 La invención ahora se describe de manera general, se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente para propósitos de ilustración de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1 -- Complejo PRC2 de Cinco Componentes Recombinante

65 Se coexpresan EZH2 tipo natural (No. de Acceso GenBank NM_004456) o mutantes Tyr641 con tipo natural AEBP2 (No. de Acceso GenBank NM_153207), EED (No. de Acceso GenBank NM_003797), SUZ12 (No. de Acceso GenBank NM_015355) y células RbAp48 (No. de Acceso GenBank NM_005610) en *Spodoptera frugiperda* (Sf9) utilizando un

sistema de expresión baculovirus. Una etiqueta FLAG de terminal N en el EED se utiliza para purificar el complejo PRC2 activo de lisados celulares (BPS Bioscience, número de catálogo 51004). La pureza de las preparaciones finales de PRC2 se evalúa mediante SDS-PAGE con tinción con azul Coomassie.

5 Ejemplo 2 – Panel de Péptido H3, H4

Una colección que consiste de 44 péptidos de 15 aminoácidos cada una se sintetiza a partir de Productos Bioquímicos del Siglo 21 (Marlboro, MA). Este panel de péptido abarca todos los aminoácidos de histonas H3 y H4 humanas con 5 residuos superpuestos entre secuencias de péptido consecutivas. El terminal N de cada péptido se adjunta con biotina, y los terminales C se representan como la amida. Se confirman la pureza (> 95 %) e identidad mediante cromatografía líquida/análisis espectral de masa.

Para el estudio de dependencia del estado de metilación H3-K27 de actividad de enzima, se sintetizan péptidos que representan la secuencia de aminoácidos de H3 humano de los residuos 21-44 (H3:21-44) con lisina 27 representados como la amina de cadena lateral no modificada, mono-metilada, di-metilada o tri-metilada. Estos péptidos se compran de New England Peptide (Gardner, MA) con biotina unido al terminal C de cada péptido.

15 Ejemplo 3 - Evaluación del Estado de Metilación H3-K27 en Células

20 Las estirpes celulares OCI-LY19 (ACC 528), KARPAS-422 (ACC 32), y WSU-DLCL2 (ACC 575) se obtienen de DSMZ. Las estirpes celulares DB (CRL-2289) y SU-DHL2 (CRL-2959) se obtienen de ATCC. OCI-LY19, WSU-DLCL2, y las estirpes celulares DB se cultivan en RPMI-1640 con 10 % de FBS, y estirpes celulares KARPAS-422 y SU-DHL2 se cultivan en RPMI-1640 más 20 % de FBS. Las células se cultivan a una densidad de $1.5-2 \times 10^6$ células/mL y 1×10^7 células mediante centrifugación a $264 \times g$, se lavan PBS enfriado en hielo y se lisan mediante resuspensión en un volumen de gránulo 10X de regulador de lisis RIPA que contiene 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.25 % de DOC, 1 % de NP-40, y 1 mM EDTA (Millipore #20-188), más 0.1 % de SDS y comprimidos del inhibidor de proteasa (Roche # 1836153). Los lisados se someten a sonicación 2 rondas de 10 ráfagas de 1 segundo en configuración 3 con un Misonix XL-2000 para asegurar extracción de histona eficiente, y se aclara mediante centrifugación a $4^\circ C$ utilizando una centrífuga de mesa a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se determina la concentración de proteína mediante ensayo BCA (Pierce). Se fraccionan cuatro microgramos de cada lisado en 4-20 % de gel Tris-Glicina (Invitrogen), se transfiere a PVDF, y se sondea con los siguientes anticuerpos en regulador de bloqueo Odyssey: anti-EZH2 de ratón (CST 3147; dilución 1:2000), anti-H3-K27me3 de conejo (CST 9733; dilución 1:10000), anti-H3-K27me2 de conejo (CST 9755; dilución 1:5000), anti-H3-K27mel de conejo (Motivo Activo 39377; dilución 1:5000), y anti-Total H3 de ratón (CST 3638; dilución 1:20000). Luego de incubación Ab primaria, las membranas se sondean con IgG antiratón de asno IRDye 800CW (LiCOR #926-32212) o IgG de anticonejo de cabra Alexa Fluor 680 (Invitrogen #A-21076) Ab secundario y se forman imágenes utilizando el sistema LiCOR Odyssey.

35 Ejemplo 4 -- Enzimología

40 Como se observó anteriormente, se ha concluido previamente que los cambios asociados con la enfermedad a Tyr641 resulta en pérdida de la función con respecto a una metilación de H3-K27 catalizada por EZH2. Sin embargo, es difícil una reducción presuntiva en el índice de metilación de H3-K27 debido a heterocigosidad de enzima para racionalizar como la base de un fenotipo maligno, especialmente en claridad de datos previos que indican que la sobreexpresión de EZH2, mutaciones de pérdida de función en la desmetilasa *UTX* H3-K27 correspondiente, o sobreexpresión de los componentes del PRC2, tal como PHF19/PCL3, que implica aumento de la trimetilación H3-K27, todos resultan en fenotipos malignos en cánceres humanos específicos. Morin et al. (2010) Nat Genet 42:181-5; Martinez-Garcia et al. (2010) Nat Genet 42:100-1; Bracken et al. (2003) EMBO J 22:5323-35; Kleer et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:11606-11; Varambally et al. (2002) Nature 419:624-9; Simon et al. (2008) Mutat Res 647:21-9; van Haafden et al. (2009) Nat Genet 41:521-3; Wang et al. (2004) Gene 343:69-78; Cao et al. (2008) Mol Cell Biol 28:1862-72; y Sarma et al. (2008) Mol Cell Biol 28:2718-31). Por lo tanto, se explora la enzimología de estas mutaciones en mayor detalle.

Se preparan complejos de PRC2 recombinantes con las versiones WT y Tyr641 mutantes de EZH2 humano (véase Ejemplo 1 anterior; Cao et al. (2004) Mol Cell 15:57-67). Las concentraciones iguales (nominalmente 8 nM, con base en las determinaciones de proteína) de cada complejo se prueban inicialmente por la capacidad de catalizar la transferencia de 3H -metilo de S-adenosil metionina marcado (SAM) a un péptido no modificado que representa la secuencia de aminoácidos que rodea H3-K27 (H3:21-44) o a oligonucleosomas de eritrocito aviar natural. Como se reportó previamente (Morin et al. (2010) Nat Genet 42:181-5), se encuentra que la enzima WT exhibe actividad robusta para la transferencia de metilo a este sustrato peptídico no metilado sustrato, pero que ninguna de las enzimas mutantes exhiben actividad significativa de metiltransferasa (Figura 1A). En contraste a los datos previamente reportados y en la Figura 1A, se encuentra que todas las construcciones EZH2 mutantes son metiltransferasas activas contra el sustrato de nucleosoma aviar (Figura 1B). Las nucleosomas aisladas la fuente natural aviar representa una mezcla de estados de modificación de histona, que incluyen diversos estados de metilación H3-K27 según se juzga por Western blot con anticuerpos específicos a metilación H3-K27.

65 Existen diversas explicaciones potenciales para la actividad discordante de los complejos mutantes de PRC2 en sustratos de péptido y nucleosoma. Una posibilidad es que los sitios de reconocimiento de sustrato distales para el sitio

activo de enzima (es decir, exositos) son determinantes importantes de unión de sustrato y recambio; estos sitios enganchan los elementos de reconocimiento complementarios en la nucleosoma que no están disponibles en sustratos peptídicos pequeños. Sin embargo, cuando se prueba la histona H3 humana recombinante, expresada en *E. coli* como un sustrato para los complejos WT y mutantes de PRC2, el patrón resultante de actividad es idéntico a aquel visto para el sustrato de péptido; que es, la enzima WT demuestra actividad de metiltransferasa robusta contra el sustrato H3, el mutante Y641F muestra 7 % de la actividad del complejo WT, y todos los otros mutantes exhiben ≤ 1 % de actividad del complejo WT. Por lo tanto, el enganche de exosita parece una explicación improbable para los resultados corrientes. El nucleosoma presenta muchos residuos de lisina además de H3-K27 como sitios potenciales de metilación que no estarían presentes en el sustrato peptídico pequeño. De esta forma, otra posibilidad es que la mutación de Y641 altera la especificidad del sustrato de EZH2 para que resulte en metilación de residuos lisina diferente a H3-K27. Esta posibilidad es poco probable dado el excelente acuerdo entre la actividad mutante en péptido pequeño y los sustratos de proteína recombinante H3.

La discordancia evidente entre los presentes resultados y aquellos previamente reportados se resuelve cuando la actividad enzimática de los complejos WT y mutantes de PRC2 se prueban contra un panel de sustratos peptídicos que representan todas posibles residuos lisina (K) de histona H3 e histona H4 (véase Ejemplo 2 anterior). Todas las formas de las formas de enzima muestran actividad significativa solo contra péptidos que contienen el equivalente del residuo H3-K27. La actividad de los mutantes, sin embargo, se reduce en gran medida con relación a WT en el orden WT » Y641F > Y641S ~ Y641H > Y641N, de nuevo consistente con hallazgos reportados previos.

Ejemplo 5 -- Enzimología

Para entender adicionalmente la actividad enzimática de estos mutantes, y para reconciliar la discrepancia evidente entre la actividad contra sustratos peptídico y nucleosoma, se estudia la capacidad de las formas de enzima para catalizar metilación adicional de diversos estados de metilación H3-K27 en el contexto del péptido H3:21-44. Como se indicó anteriormente, se encuentra que todas las enzimas mutantes son catalizadores deficientes de metilación de péptido H3-K27 no modificado, con relación a la enzima WT. Notablemente, sin embargo, se encuentra que todas las enzimas mutantes son superiores a la enzima WT en catalizar la metilación adicional de los péptidos H3-K27 mono y especialmente dimetilados (Figura 2). De esta forma, los datos sugieren que la enzima WT es más eficiente en la catalización de la reacción de cero- a mono-metilación. Las enzimas mutantes son defectuosas en la catalización de esta etapa inicial, pero son más eficientes que la enzima WT en la catalización de etapas posteriores que conducen de mono-metil a di- y tri-metil H3-K27.

Los orígenes de las especificidades de sustrato diferenciales de WT y EZH2 mutante se exploran a través de cinéticas de enzima de estado constante. Como se resume en la Tabla 1, las mutaciones tienen efectos mínimos en estado fundamental de reconocimiento de sustrato, como se demuestra por los valores similares de K_m para nucleosoma y de $K_{1/2}$ para sustratos de péptido. En todos los casos las sustratos peptídicos exhiben comportamiento de unión sigmoideal; por lo tanto la concentración de péptido que resulta en velocidad máxima media se reporta aquí como $K_{1/2}$ en lugar de la constante Michaelis más común, K_m . Copeland (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide to Medicinal Chemists and Pharmacologists, Wiley. El SAM K_m de forma similar exhibe variación mínima entre las formas de enzima, que varía de 208 ± 50 a 304 ± 64 nM. En su lugar, las diferencias en el uso del sustrato parece tener su origen en reconocimiento de estado de transición, como se demuestra por las diferencias en valores k_{cat} entre enzimas para diversos sustratos (Tabla 1). Como resultado, la eficiencia catalítica, se cuantifica como la relación k_{cat}/K (en donde K es K_m o $K_{1/2}$, dependiendo de la identidad de sustrato; *vide supra*), varía entre las enzimas WT y mutante para diferentes estados de metilación H3-K27 (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de estado constante para reacciones de metilación catalizadas por PRC2 que contienen mutantes tipo natural o Y641 de EZH2.

Enzima	Estado de Metilación de Sustrato H3-K27	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 60.3	3.4 ± 0.3
	Nucleosoma	141 ± 31	42.6 ± 2.6	30.2 ± 6.9
Y641F	0	240 ± 19	4.8 60.3	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
	Nucleosoma	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
	Nucleosoma	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
	Nucleosoma	191 ± 34	23.4 ± 1.3	12.3 ± 2.3
Y641 S	0	-	-	-
	1	249 ± 8	27.6 ± 0.8	11.1 60.5
	2	136 ± 8	59.4 ± 2.0	43.7 ± 3.0
	Nucleosoma	137 ± 28	23.4 ± 1.4	17.1 ± 3.6

^a Actividad muy baja para medir.

Ejemplo 6 - Enzimología

5 Los parámetros cinéticos en estado constante enumerados en la Tabla 1 hacen posible calcular los valores esperados de diferentes estados de metilación H3-K27 para células heterocigotas para las diversas formas mutantes EZH2, con relación para las células homocigotas para la enzima WT. Para realizar estos estímulos, se hace una serie de presunciones de simplificación: (1) las cinéticas de enzima de estado constante son relevantes para la metilación H3-K27 catalizada por PRC2 en el contexto celular y que todas las mediciones se hacen en el mismo punto de tiempo en crecimiento celular; (2) la enzima mutante y WT se expresan en niveles iguales en células heterocigotas y que el nivel EZH2 total es igual en todas las células; (3) la concentración celular de SAM, con relación a su K_m se satura y no cambia entre las células; (4) la concentración celular de nucleosoma, es similar a su K_m y de esta forma no cambia entre las células; (5) que EZH1 cataliza la metilación de H3-K27 es insignificante y constante entre las células; y (6) cualquier actividad de desmetilasa H3-K27 también es constante entre las células.

15 Con estos supuestos en el lugar, las predicciones ilustradas en la Figura 3A se obtienen para niveles relativos de H3-K27me3 (panel superior), H3-K27me2 (panel intermedio) y H3-K27me1 (panel inferior). Un patrón claro emerge de estas simulaciones. El nivel de H3-K27me3 aumenta con relación a células WT para todas las células que albergan el mutante, varían a 30 % de aumento para el mutante Y641H a > 400 % para el mutante Y641N. Al mismo tiempo, los niveles de H3-K27me2 se reducen a < 50 % de WT para todos los mutantes, y los niveles de H3-K27me1 se reducen mediante aproximadamente la mitad de todos los mutantes, con relación a WT.

25 Los niveles relativos de los estados de metilación H3-K27 en líneas celulares de linfomas de células B que se sabe son homocigotas para EZH2 WT (OCI-LY19) o heterocigotas para EZH2 Y641N (DB, KARPAS 422, y SU-DHL-6) o EZH2 Y641F (WSU-DLCL2) luego se miden mediante Western blott (Figura 3B). El patrón de estados de metilación H3-K27 relativos vistos en la Figura 3b está en acuerdo excelente con los resultados de las simulaciones con base en parámetros cinéticos en estado constante in vitro, a pesar de los supuestos utilizados en las simulaciones y el uso de un sustituto de péptido no fisiológico como sustrato.

30 De esta forma, se observa que el aumento H3-K27me3 para todas las células que albergan el mutante Y641 con relación WT, se observa reducción H3-K27me2 para todas las células que albergan el mutante Y641 con relación a WT, y se observa reducción H3-K27me1 para por lo menos dos de las cuatro estirpes celulares mutantes. Los niveles casi comparables de H3-K27me1 en células WT y KARPAS 422 y SU-DHL-6 pueden reflejar diferentes niveles de expresión de WT y EZH2 mutante, diferentes contribuciones de EZH1, u otros factores no representados en las simulaciones. No obstante, la concordancia entre los patrones experimentales y predicho de estado de metilación H3-K27 es notable y soporta la vista del acoplamiento enzimático entre el mutante WT y EZH2 conduce a aumento de H3-K27me3, de esta forma que resulta en el fenotipo maligno de células que son heterocigotas para estos mutantes.

Ejemplo 7 – Ensayos *In Vitro* de Actividad de Metiltransferasa PRC2

40 Ensayo de placa *Flash con sustrato de péptido*. Para comparación inicial de los mutantes WT y Y641 de EZH2, péptido de histona H3:21-44 biotinilado que contiene K27 no metilado (Péptido New England), K27 monometilado (Millipore) o K27 dimetilado (Millipore) en una concentración de 800 nM se combina con una mezcla de S-adenosilmetionina-Cl (SAM) a 1,700 nM, y 300 nM SAM tritiatado (Perkin Elmer). Esta combinación de sustrato luego se agrega al PRC2 en

regulador de ensayo (20 mM de BICINE, 1 mM de DTT, 0.002 % de Tween 20, 0.005 % de gelatina de piel de bovino (BSG), pH 7.6). Las reacciones se dejan proceder durante el intervalo de tiempo indicado y luego se apagan mediante la adición de exceso de SAM frío (concentración final 600 μ M). Las mezclas de reacción apagadas se transfieren a una placa Flash recubierta con estreptavidina (Perkin Elmer, número de catálogo SMP410), permite unirse durante 1 hora, y luego se detecta en un contador de luminiscencia y centelleo TopCount NXT HTS (Perkin Elmer). Cada punto de tiempo representa el promedio de seis reacciones individuales. Se determinan los parámetros cinéticos de estado constante bajo condiciones de reacción idénticas excepto que varía la concentración del péptido o SAM, mientras está en condiciones de saturación del otro sustrato. La velocidad se grafica como una función de concentración de sustrato variado y los datos se ajustan a la versión no transformada de la ecuación Michaelis-Menten o la versión no transformada de una ecuación cinética sigmoide para calcular los valores de K y k_{cat} . Los errores estándar de los parámetros ajustados se enumeran en la Tabla 1 y se utilizan para construir las barras de error ilustradas en la Figura 2 paneles B y C. Los errores asociados con k_{cat}/K (Tabla 1) se calculan de acuerdo con métodos estándar de propagación de error; el error fraccional de k_{cat}/K se determina como:

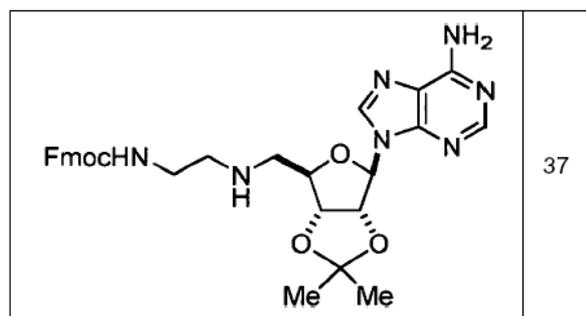
$$\mu \frac{k_{cat}}{K} = \sqrt{\left(\frac{\mu k_{cat}}{k_{cat}}\right)^2 + \left(\frac{\mu K}{K}\right)^2} \quad (1)$$

en donde μk_{cat} es el error estándar de k_{cat} y μK es el error estándar de K.

Ensayo de placa de filtro *con oligonucleosoma*. Se purifican oligonucleosomas de eritrocito de pollo como se describió previamente. Fang et al. (2004) Methods Enzymol 377:213-26. Se combinan nucleosomas con una mezcla de SAM y tritio SAM, y se agregan a PRC2 en regulador de ensayo (20 mM de BICINE, 100 mM de KCl, 1 mM de DTT, 0.002 % de Tween 20, 0.005 % de BSG, pH 7.6). Las reacciones se hacen correr y se apagan como anteriormente. La mezcla de reacción apagada se transfiere a una placa de filtro de fibra de vidrio (Millipore, número de catálogo MSFB6B) y se lava tres veces con 10 % de ácido tricloroacético y se deja secar. Se agrega Microscint Zero (30 μ L) y se detecta la incorporación de tritio en un contador de luminiscencia y centelleo TopCount. Se determinan parámetros de estado constante bajo condiciones de reacción idénticas excepto que la concentración de nucleosoma o SAM varía mientras está en condiciones de saturación del otro sustrato. Se grafica la velocidad como una función de concentración de sustrato variada y se ajusta a la versión no transformada de la ecuación Michaelis-Menten para derivar los valores de K_m y k_{cat} como se describió anteriormente.

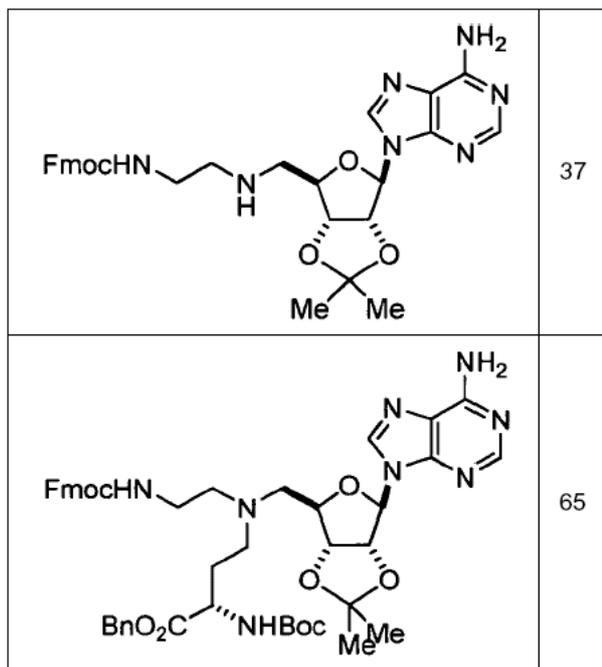
Ejemplo 8 - Preparación del Compuesto 75

A. Preparación del compuesto 37



A una solución de 9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(aminometil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3, 4- d][1,3]dioxol-4- il)-9Hpurin- 6- amina (Townsend, A. P. et al. (2009) Org. Let. 11:2976-2979) (3.05 g, 9.96 mmol) en DCE (250 mL) se agrega (9H-fluoren -9- il)metil (2- oxoetil)carbamato (2.8 g, 9.96 mmol) y $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$ (2.96 g, 13.95 mmol), la mezcla se agita durante 4 h a temperatura ambiente. Se agrega solución de K_2CO_3 a pH a 8-9. Se agrega DCM, la capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , se concentra y se purifica mediante SGC (DCM : MeOH = 30 : 1) para dar 37 (2.9 g, rendimiento: 50.9 %).

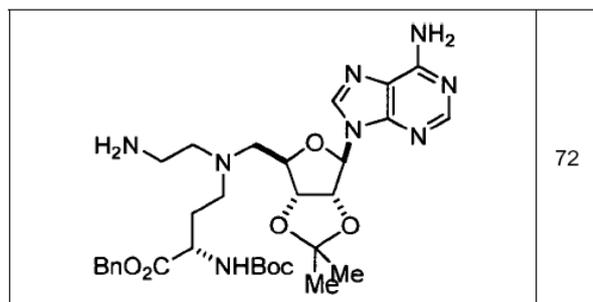
B. Preparación del compuesto 65



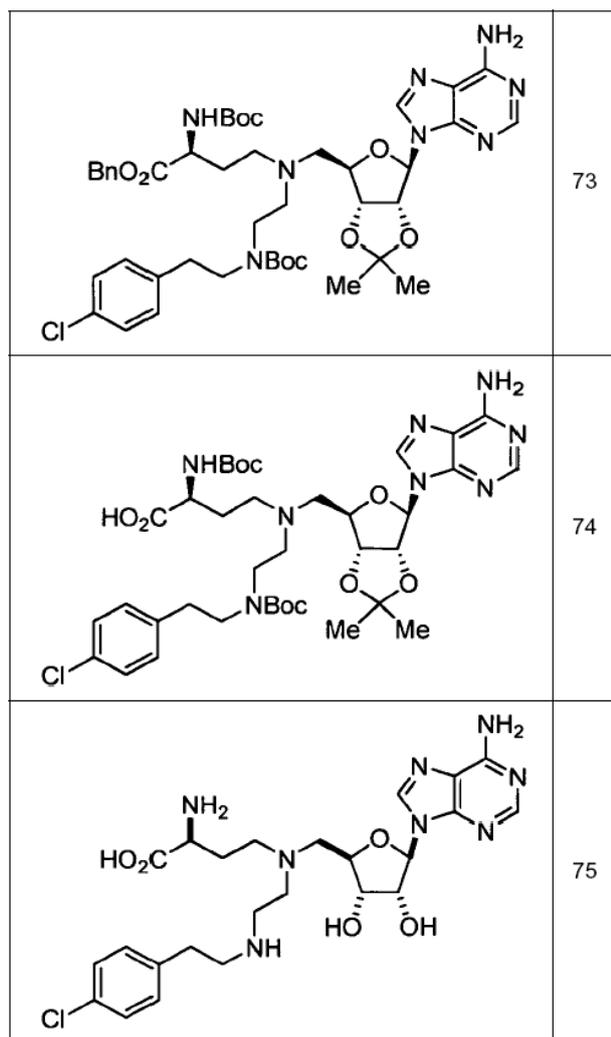
5

A una solución de 37 (2.9 g, 5.08 mmol) en DCE (250 mL), se agregan (S)-bencil 2-((tert-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoato (1.56 g, 5.08 mmol) y $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$ (1.51 g, 7.11 mmol), la mezcla se agita durante 4h a temperatura ambiente. Se agrega solución de K_2CO_3 a pH a 8-9. Se agrega DCM, la capa orgánica se seca con Na_2SO_4 , se concentra y se purifica con SGC (DCM: MeOH =100:1) para dar 65 (2.8 g, rendimiento: 63.9 %).

C. Preparación del compuesto 75



10



Etapa 1. A una solución de 65B (2.2 g, 2.55 mmol) en DCM (10 mL), se agregan Et₂NH (1.1 g, 15.3 mmol), la mezcla se agita durante 4 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentra para dar 72 crudo (2.2 g).

5

Etapa 2. A una solución agitada de 72 (167 mg, 0.26 mmol) en MeOH (4 mL), se agrega 2-(4-clorofenil) acetaldehído (40 mg, 0.26 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 20 min. Luego se agrega Na(OAc)₃BH (83 mg, 0.39 mmol) y HOAc (0.4 mL) y se agita durante la noche. Luego se agrega NaHCO₃ (ac.) y se extrae con DCM (25 mL x 3), se lava con solución salina, se seca con Na₂SO₄ y se concentra. El producto crudo se purifica mediante TLC preparativo (DCM / MeOH = 10: 1) para proporcionar 73 (30 mg, rendimiento: 14 %) como polvo blanco. LC/MS (m / z): 779.7 [M + 1]⁺.

10

Etapa 3. Una mezcla de 73 (30 mg, 0.038 mmol) y 10 % de Pd/C (15 mg) en MeOH (2 mL) se agita a temperatura ambiente bajo H₂ durante la noche. La mezcla se filtra y el filtrado se concentra para dar el producto crudo. El producto crudo se purifica mediante TLC preparativo (DCM / MeOH = 8: 1) para proporcionar 74 (20 mg, rendimiento: 69 %) como polvo blanco. LC/MS (m/z): 689.7 [M + 1]⁺.

15

Etapa 4. Una solución de 74 (20 mg, 0.028 mmol) en 90 % de TFA (1 mL) se agita a temperatura ambiente durante 1h, y se concentra como un sólido para retirar TFA para dar el compuesto 75 (sal TFA) como un aceite incoloro sin purificación. LC/MS (m/z): 549.7 [M + 1]⁺.

20

Ejemplo 9 - Inhibición de EZH2 Tipo Natural y Mutantes Y641 mediante SAH

Se diluye serialmente S-Adenosil-L-homocisteína (SAH) 3 veces en DMSO para 10 puntos y se pone en una placa 1 μL en una placa de microtítulo de 384 pozos. El control positivo (100 % de estándar de inhibición) es una concentración final 100 μM de SAH y control negativo (0 % de estándar de inhibición) que contiene 1 μL de DMSO. Luego se incubó SAH durante 30 minutos con 40 μL por pozo de EZH2 tipo natural y mutante a 8 nM en regulador de ensayo pH 7.6 (20 mM de BICINE, 100 mM de KCl, 1 mM de DTT, 0.002 % de Tween 20, 0.005 % de BSG). Se agrega una mezcla de

25

sustrato a 10 μ L por pozo que contiene S-adenosilmetionina-Cl (SAM) a 150 nM y tritiado SAM a 100 nM, y oligonucleosoma biotinilada a 150 nM en regulador de ensayo pH 7.6. Se transfiere la reacción de enzima apagada a una placa Flash recubierta con estreptavidina (Perkin Elmer, número de catálogo SMP410), que permite la unión durante una hora, y se detecta en un TopCount NXT HTS (Perkin Elmer).

Los resultados se muestran en la Figura 7. Los valores IC_{50} se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Inhibición de EZH2 WT y los mutantes Y641 de EZH2 mediante SAH.

	WT	Y641H	Y641S	Y641N	Y641F
IC_{50} , μ M	0.467	0.263	0.283	0.380	4.80

Ejemplo 10 - Inhibición de EZH2 Tipo Natural y Mutantes Y641 mediante el Compuesto 75

El Compuesto 75 se diluye serialmente 3 veces en DMSO para 10 puntos y se pone en una placa 1 μ L en una placa de microtítulo de 384 pozos. El control positivo (100 % de estándar de inhibición) es 100 μ M de concentración final de SAH y control negativo (0 % de estándar de inhibición) que contiene 1 μ L de DMSO. El Compuesto 75 luego se incuba durante 30 minutos con 40 μ L por pozo de EZH2 tipo natural y mutante a 8 nM en regulador de ensayo pH 7.6 (20 mM de BICINE, 100 mM de KCl, 1 mM de DTT, 0.002 % de Tween 20, 0.005 % de BSG). Se agrega una mezcla de sustrato a 10 μ L por pozo que contiene S- adenosilmetionina-Cl (SAM) a 150 nM y tritiado SAM a 100 nM, y oligonucleosoma biotinilada a 150 nM en regulador de ensayo pH 7.6. La reacción de enzima apagada se transfiere a una placa Flash recubierto con estreptavidina (Perkin Elmer, número de catálogo SMP410), permite la unión durante una hora, y se detecta en un TopCount NXT HTS (Perkin Elmer).

Los resultados se muestran en la Figura 8. Los valores IC_{50} se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Inhibición de EZH2 WT y mutantes Y641 de EZH2 mediante el Compuesto 75.

	WT	Y641 S	Y641N	Y641F	Y641H
IC_{50} , μ M	8.95	2.50	4.10	7.18	7.56

Ejemplo 11 – Relaciones H3-K27me2/me3 predicen sensibilidad a un inhibidor EZH2

Las estirpes celulares de tumor heterocigotas para la mutación EZH2 (Y641) exhiben aumento en los niveles de H3-K27me3, el estado de metilación de H3-K27 aunque sean importantes en tumorigenesis. Se evalúan los niveles de las formas mono (H3-K27me1), di (H3-K27me2), o trimetiladas (H3-K27me3) de H3-K27 en una estirpe celular de panel que son WT para EZH2, o mutaciones heterocigotas para EZH2 (Y641). Las estirpes celulares utilizadas se enumeran en la Tabla 4. La mayor parte de las estirpes son estirpes de linfoma de células B, sin embargo también se incluyen dos estirpes de melanoma. IGR1 es una estirpe de melanoma que se ha encontrado recientemente contiene una mutación Y641N en células EZH2, y A375 que se incluyen como una estirpe de control de melanoma EZH2 WT. Las Figuras 9A y B muestran los resultados de análogos western blot de histonas aisladas de este panel de estirpe celular sondeados con anticuerpos que reconocen H3- K27me1, H3-K27me2, o H3-K27me3. En general, los niveles globales de H3-K27me3 son mayores en el mutante Y641 que contiene estirpes celulares que en estirpes celulares que expresan EZH2 WT exclusivamente. Dos excepciones son células Farage y Pfeiffer, en donde los niveles H3-K27me3 son similares a aquellos en las estirpes WT. Más sorprendentes son los niveles dramáticamente menores de H3-K27me2 en estirpes celulares mutantes EZH2 Y641 con relación a estirpes celulares del tipo natural. Se observa poca o no se observa señal H3-K27me2 en western blot de histonas que se extrae de estirpes celulares Y641 mutantes, mientras que la señal observada con el mismo anticuerpo en estirpes celulares WT es más intensa que aquella observada con el anticuerpo específico para H3-K27me3. En general, en estirpes celulares WT la señal western blot con un anticuerpo HK27me2 es mayor que la señal observada con el anticuerpo H3-K27me3, mientras que la parte opuesta es verdadera en estirpes celulares mutantes Y641. De esta forma la relación de la señal H3-K27me3/me2 en estirpes Y641 es mayor que aquella observada en estirpes WT. Una excepción a esto es la estirpe celular Pfeiffer, que no contiene una mutación Y641 EZH2, pero tiene alta señal H3-K27me3, y poca señal o sin señal H3-K27me2. Las células Pfeiffer por lo tanto tienen una relación H3-K27me3/me2 similar a estirpes celulares mutantes Y641.

El estado de metilación H3-K27 también se puede examinar mediante espectrometría de masa (MS), un método independiente que no se basa en reactivos de anticuerpo. El análisis MS demuestra que los niveles de H3-K27me3 son mayores en estirpes Y641 mutantes y Pfeiffer que en otras estirpes WT, mientras que la parte opuesta es verdadero para los niveles de H3-K27me2. En el mutante Y641 y las estirpes Pfeiffer, los niveles H3-K27me3 son mayores que los niveles de H3-K27me2, aunque la parte opuesta es verdadera en las otras estirpes WT. Estos resultados son consistentes con aquellos observados mediante análisis western en la Figura 9A y B.

Las diferencias en el estado de metilación H3-K27 también se detectan mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos para H3-K27me2 o H3-K27me3. Este ensayo de inmunohistoquímico se utiliza para detectar relaciones aberrantes H3-K27me2/3 como se asocia con Y641 EZH2 mutante en parafina fijada a formalina que se incorporan en muestras de tejido de tumor del paciente. Un panel de cinco gránulos de estirpe celular de linfoma mutante WT y cinco Y641 se fijan y se incorporan en bloques de parafina y se tiñen con anticuerpos anti-H3- K27me2 o H3-K27me3. Un anticuerpo a histona H3 se incluye como un control positivo, debido a que todas las células deben contener histona H3 nuclear. La Figura 10 muestra que todas las estirpes celulares son positivas en 100 % de células para tinción H3-K27me3 y H3. Bajo estas condiciones, no se observa diferencia clara en intensidad de tinción H3-K27me3 entre estirpes celulares mutantes WT y Y641. Esto puede reflejar el rango dinámico limitado de tinción inmunocitoquímica cromogénico comparado con otros métodos de la detección. Sin embargo, como se muestra en la Figura 11, las estirpes celulares se pueden segregar claramente en aquellas tinciones positivas o negativas para H3-K27me2. Todas las estirpes celulares WT, con la excepción de células Pfeiffer, se tiñen positivas para H3-K27me2, mientras que todas las estirpes celulares Y641 mutantes y las células Pfeiffer no muestran tinción con el anticuerpo H3-K27me2. Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos mediante análisis western y MS.

Sin desear estar limitado por la teoría, el aumento en los niveles de H3-K27me3 asociado con la ganancia de la función de mutaciones EZH2 (Y641) puede hacer células que tienen mutaciones EZH2 más sensibles a inhibidores EZH2 de molécula pequeña. Para evaluar si el aumento H3-K27me3 y/o reducción de los niveles de H3-K27me2 observados en células Pfeiffer en la ausencia de una mutación EZH2 Y641 también se correlacionaría con sensibilidad a los inhibidores EZH2, se prueban dos compuestos que demuestran la inhibición potente de EZH2 en ensayos bioquímicos con los IC₅₀ de 85 y 16 nM respectivamente. El tratamiento de células WSU-DLCL2 con el compuesto conduce a la inhibición de los niveles globales de H3-K27me3, confirmando su capacidad de ingresar células e inhibir la actividad celular EZH2 de metiltransferasa (Figura 12).

La sensibilidad de un panel de estirpes celulares WT y Y641 mutantes a cada compuesto se evalúa en ensayos de proliferación. Debido a la anti- actividad proliferativa de inhibidores EZH2 toma varias días manifestar, los compuestos se evalúan en ensayos de proliferación de 11 días. La Figura 13 muestra curvas de crecimiento representativas para estirpes celulares WT (OCI-LY19), o Y641 mutante (WSU-DLCL2) tratadas con los compuestos de prueba. Ambos compuestos demuestran la actividad anti-proliferativa contra células WSU-DLCL2, pero poca actividad contra las células OCI-LY19. El inhibidor A es un inhibidor más potente de proliferación WSU-DLCL2 que el Inhibidor B y que es consistente con el Inhibidor A que es un inhibidor más potente de EZH2 en ensayos bioquímicos. Se realizan ensayos de proliferación en un panel de estirpes celulares de linfoma mutante WT y Y641, con Inhibidor B, y día 11 se derivan los valores IC₉₀. La Figura 14A muestra valores IC₉₀ de estirpes celulares de linfoma agrupadas por el estado EZH2 Y641. En general, las estirpes celulares Y641 mutantes demuestran aumento en la sensibilidad a los inhibidores EZH2 con relación a estirpes celulares WT, aunque las células RL y SUDHL4 son significativamente menos sensibles que otras estirpes mutantes. Las células Pfeiffer son una excepción, debido a WT, pero son altamente sensibles a los efectos antiproliferativos de ambos compuestos con IC₉₀ en el rango bajo o subnanomolares. Las células Pfeiffer demuestran niveles altos H3-K27me3 y niveles bajos de H3-K27me2, y agrupando de esta forma estirpes celulares de acuerdo con H3-K27me3 alto y H3-K27me2 bajo que da mejor discriminación de la sensibilidad del inhibidor EZH2 como se muestra para el Inhibidor B en la Figura 14B. De esta forma, se pueden utilizar niveles altos H3-K27me3 y niveles bajos de H3-K27me2 para predecir la sensibilidad a inhibidores EZH2, independiente del conocimiento del estado de mutación. La relación de metilación aberrante observada en células Pfeiffer ocurre mediante un mecanismo separado que confiere dependencia luego de actividad EZH2.

Estos resultados demuestra que la identificación de las mutaciones EZH2 Y641 en los tumores del paciente y/o detección de niveles bajos de H3-K27me2 con relación a H3-K27me3 a través del uso de técnicas tal como western blot, MS o IHC en un paciente se puede utilizar para identificar que el paciente responderá a tratamiento de inhibidor EZH2.

Tabla 4. Estirpes celulares utilizadas en este estudio.

Cáncer	Estado EZH2	Estirpe celular
Linfoma: DLBCL (Linfoma de células B de células grandes difusas) y otras células B	Tipo natural	OCI-LY19
		HT
		MC116
		BC-1
Linfoma		BC-3
		Pfeiffer
		Toledo
		DOHH-2

ES 2 570 380 T3

		Farage SR
		NU-DHL-1
		NU-DUL-1
	Mutación Y641	SU-DHL-10 (Y641F)
		DB(Y641N)
		KARPAS 422 (Y641N)
		SU-DHL-6 (Y641N)
		WSU-DLCL-2 (Y641F)
		RL (Y641N)
SU-DHL-4 (Y641S)		
Melanoma	Tipo natural	A375
	Mutación Y641	IGR-1 (Y641N)

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para determinar si un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer seleccionado de linfoma y melanoma es un candidato para tratamiento con un inhibidor de EZH2, que comprende;
- detectar un mutante Y641 de un polipéptido EZH2, si está presente, en una muestra obtenida del sujeto;
- en donde la presencia del mutante Y641 indica que el sujeto es un candidato para tratamiento con un inhibidor de EZH2.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mutante Y641 se selecciona del grupo que consiste de Y641F, Y641H, Y641N, y Y641S.
3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el cáncer es linfoma folicular o linfoma de células B grandes difusas (DLBCL).
- 15 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicha detección del mutante Y641 de EZH2 es por:
- 20 a. resecuenciamiento del genoma completo,
- b. resecuenciamiento de la región objetivo que detecta un ácido nucleico que codifica el mutante Y641 del polipéptido EZH2,
- 25 c. un anticuerpo que se une específicamente a una característica del polipéptido o fragmento del mismo del mutante Y641 del polipéptido EZH2; o
- d. una sonda de ácido nucleico que hibrida a un ácido nucleico que codifica una característica del polipéptido o fragmento del mismo del mutante Y641 del polipéptido EZH2.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en donde el resecuenciamiento de la región objetivo comprende amplificar por lo menos una porción del ácido nucleico con por lo menos un cebador PCR.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el inhibidor de EZH2
- 35 a. inhibe la trimetilación de H3-K27, o
- b. inhibe la actividad de metiltransferasa histona del mutante Y641 de EZH2, opcionalmente en donde la inhibición es inhibición selectiva.
- 40

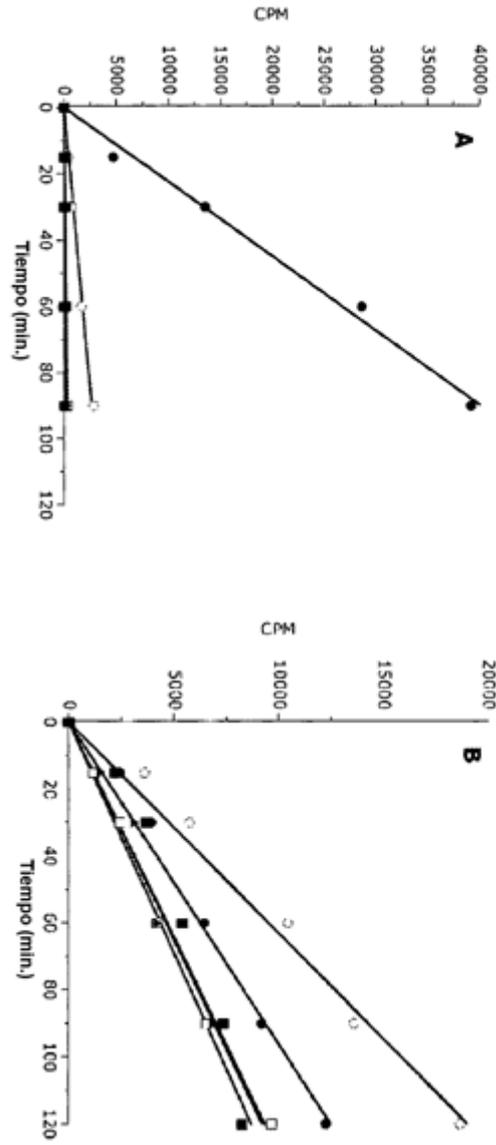


FIG. 1

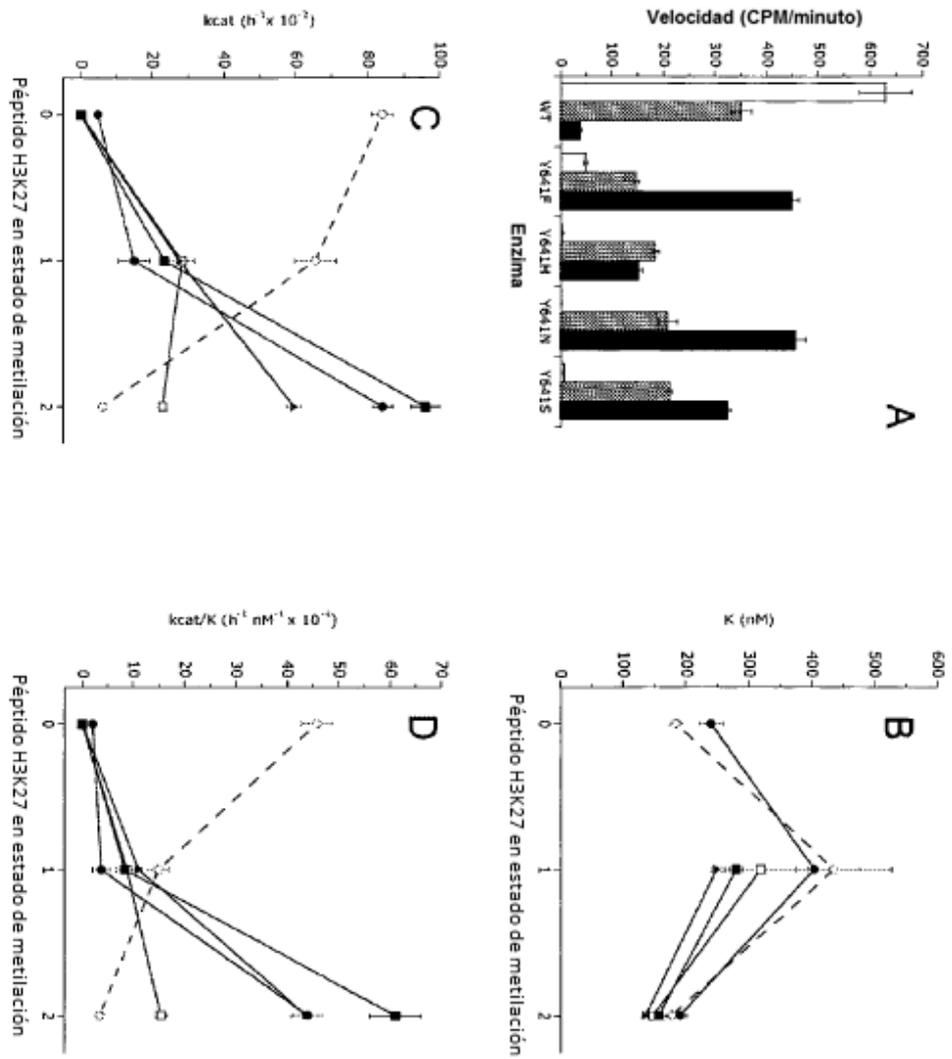


FIG. 2

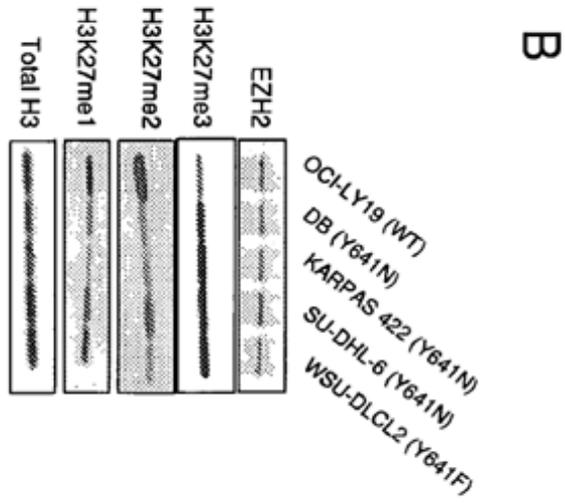
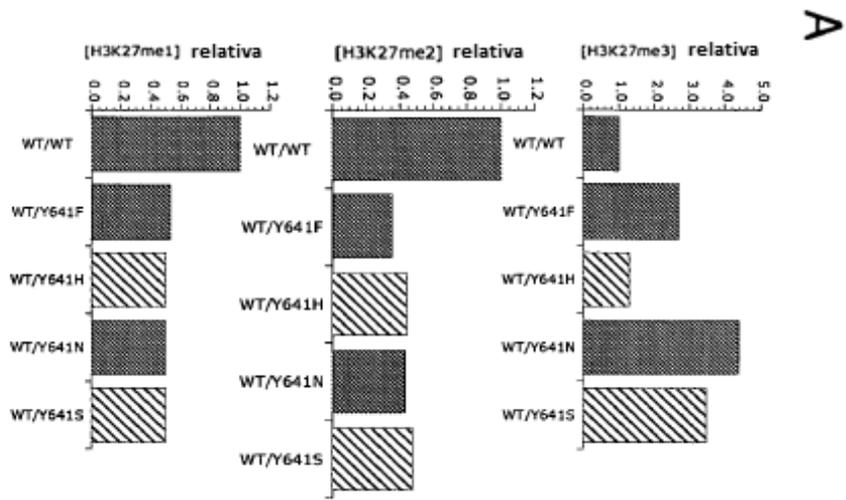


FIG. 3

Figura 3

FIG. 4

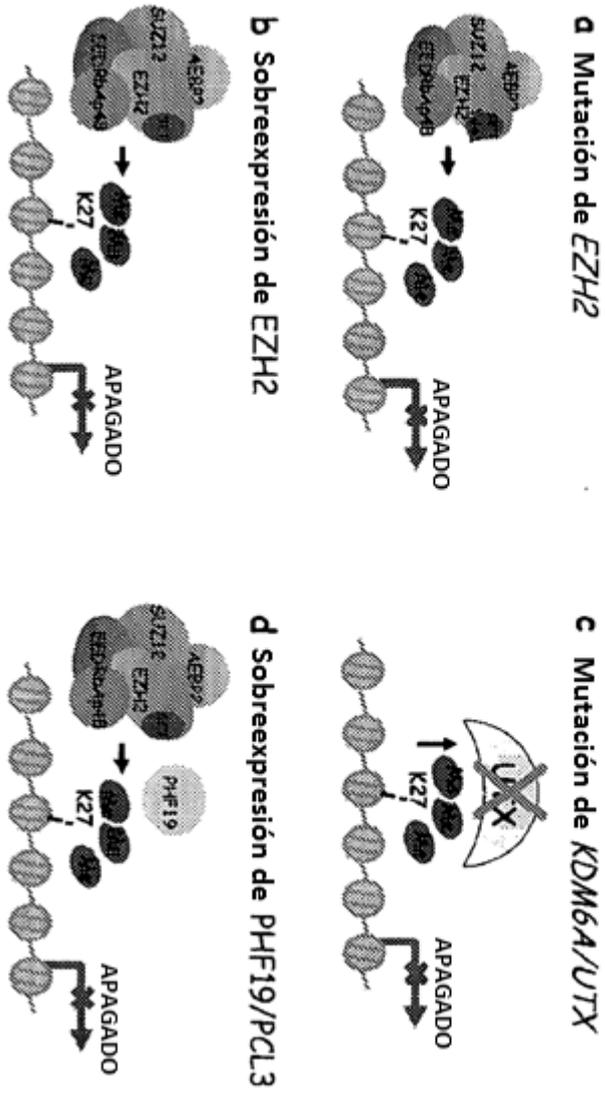
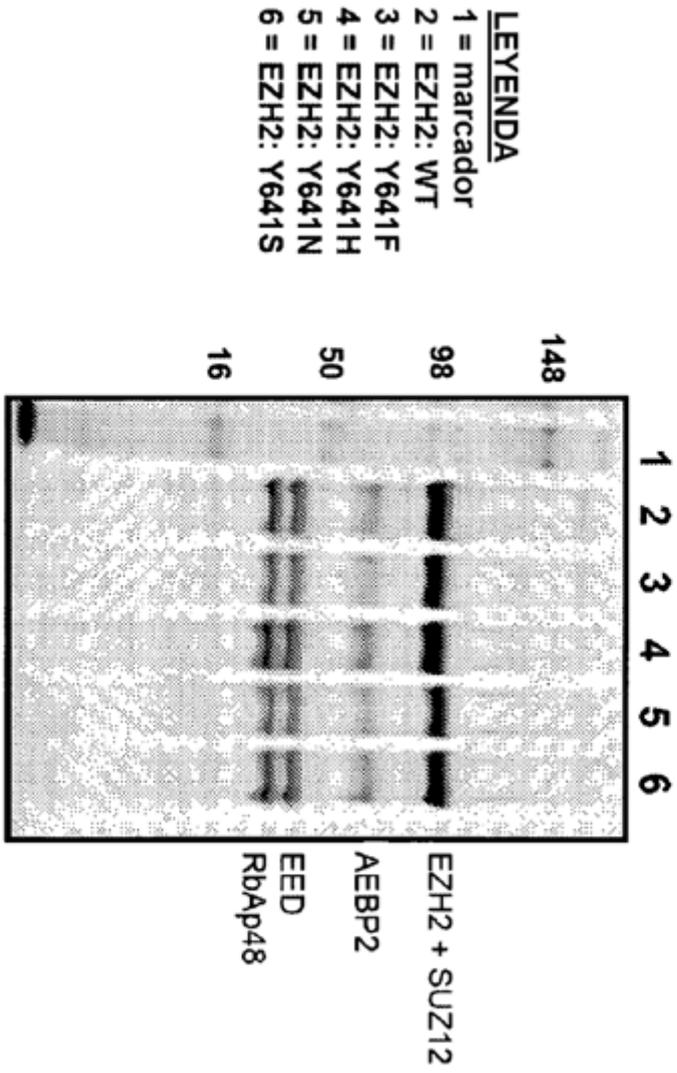


FIG. 5



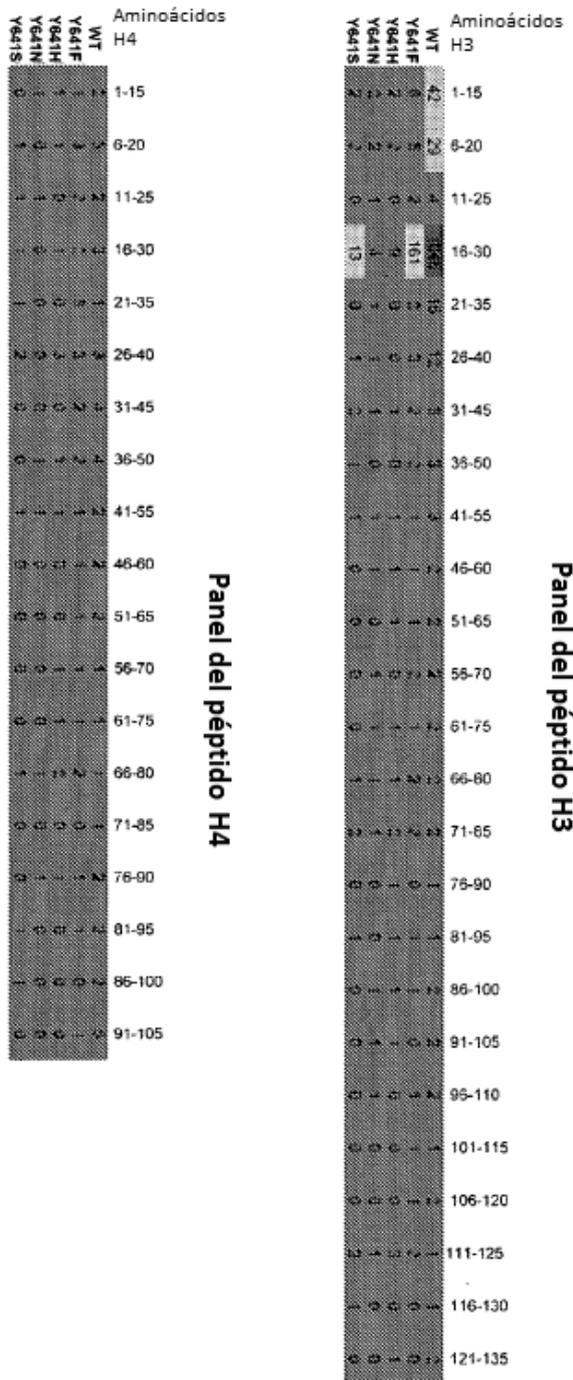


FIG. 6

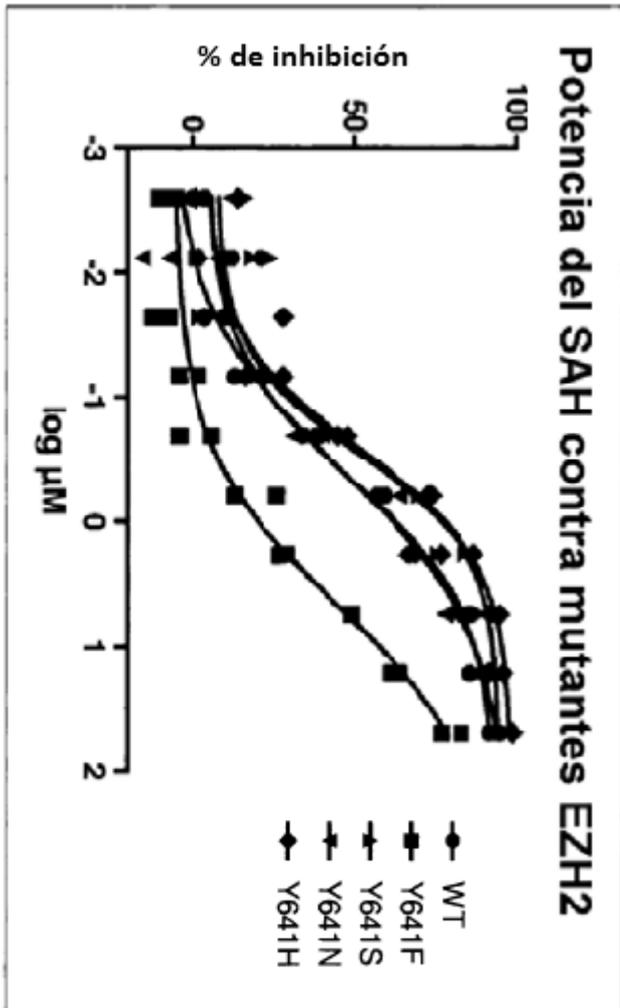


FIG. 7

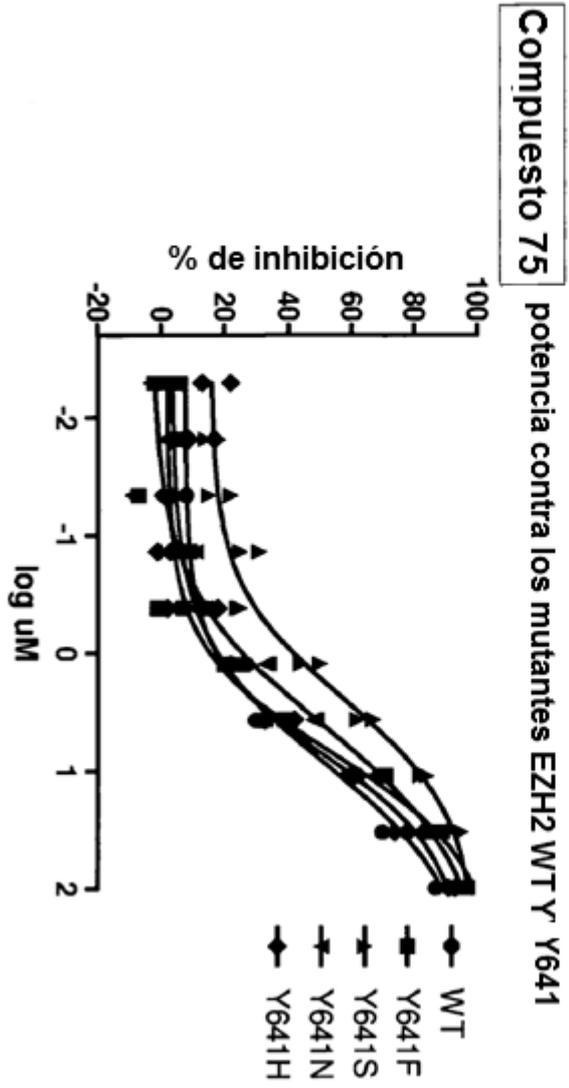


FIG. 8

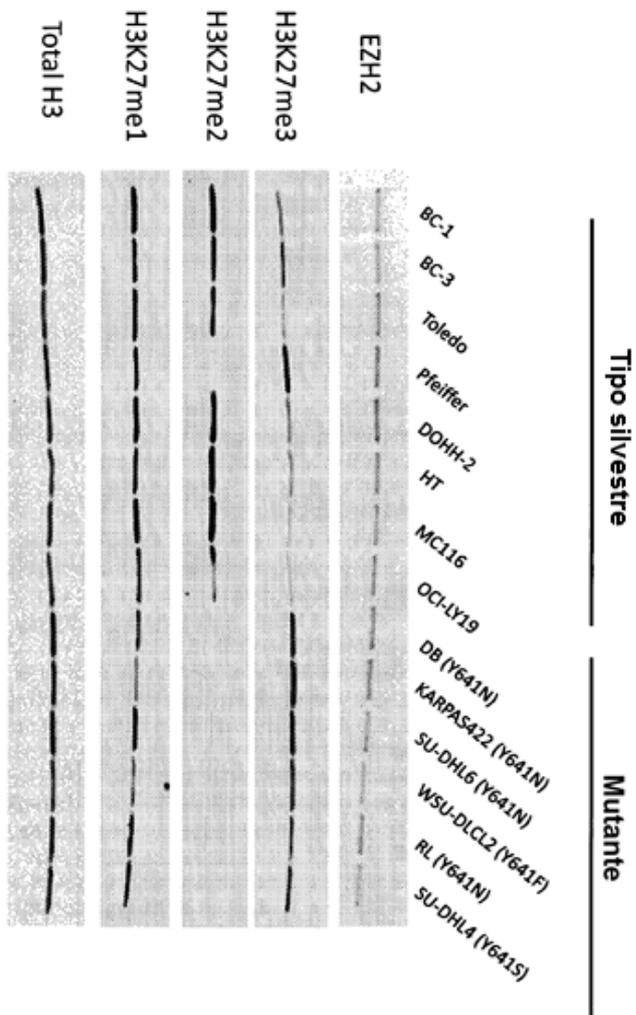
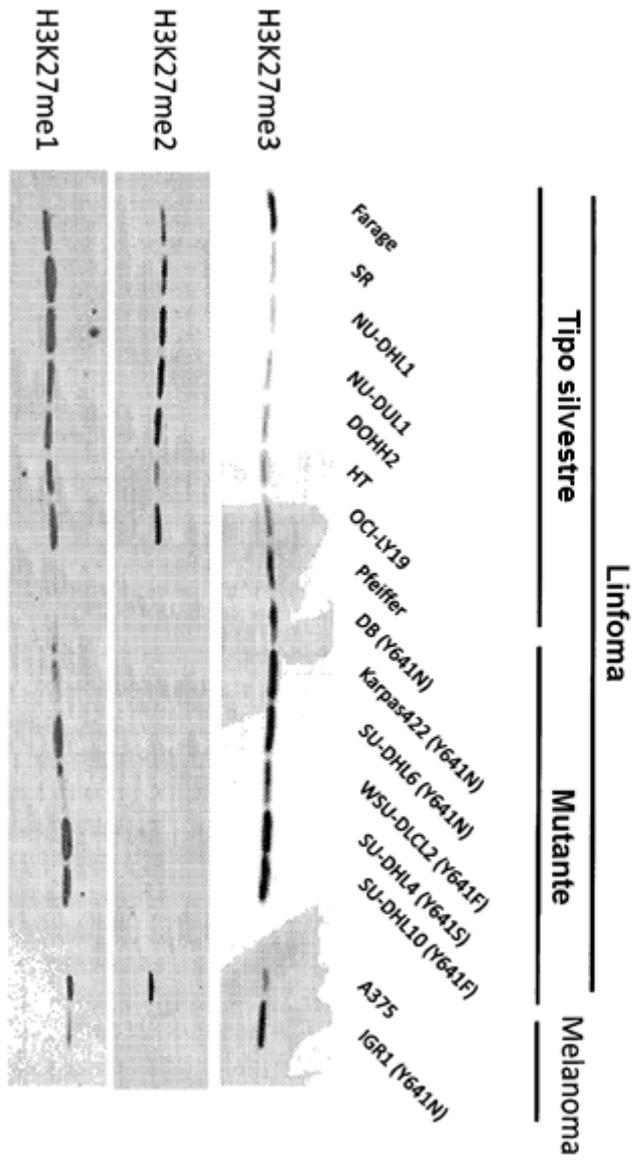


FIG. 9B



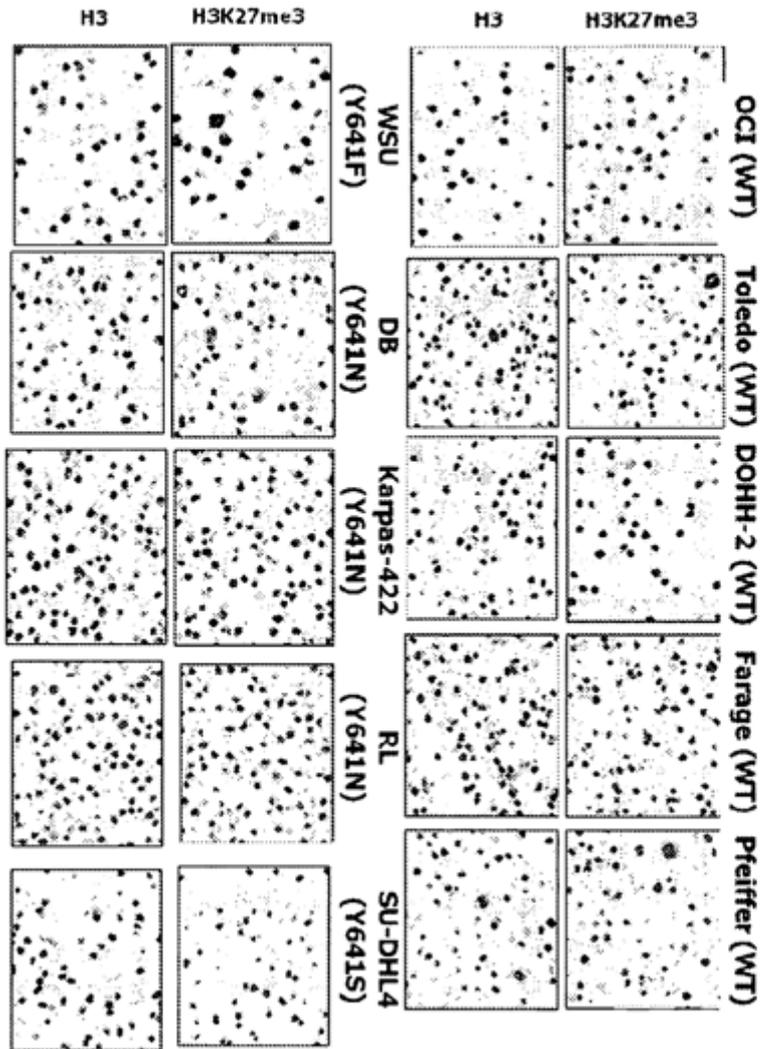


FIG. 10

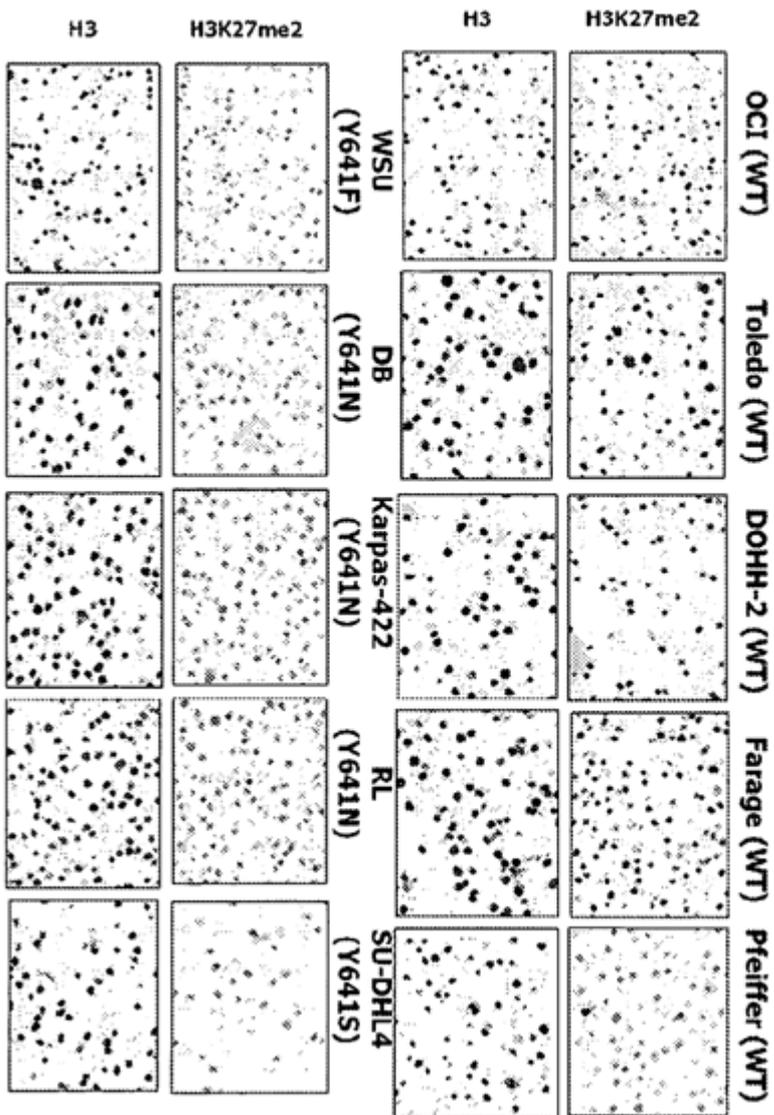


FIG. 11

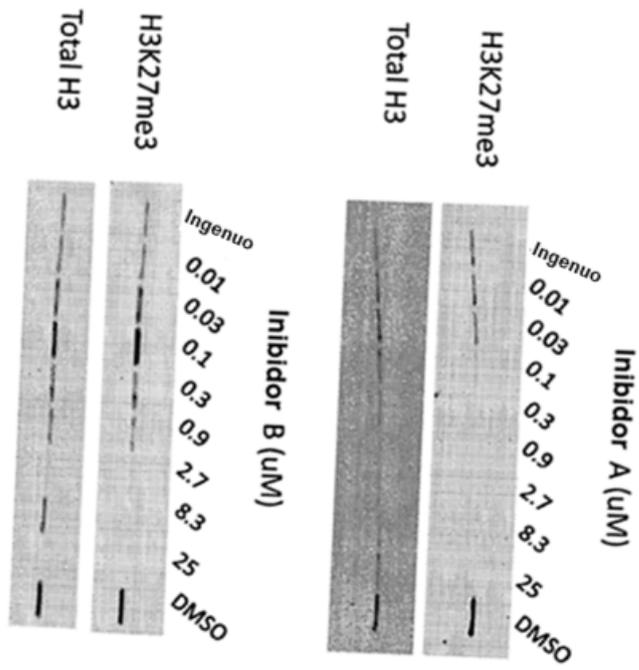
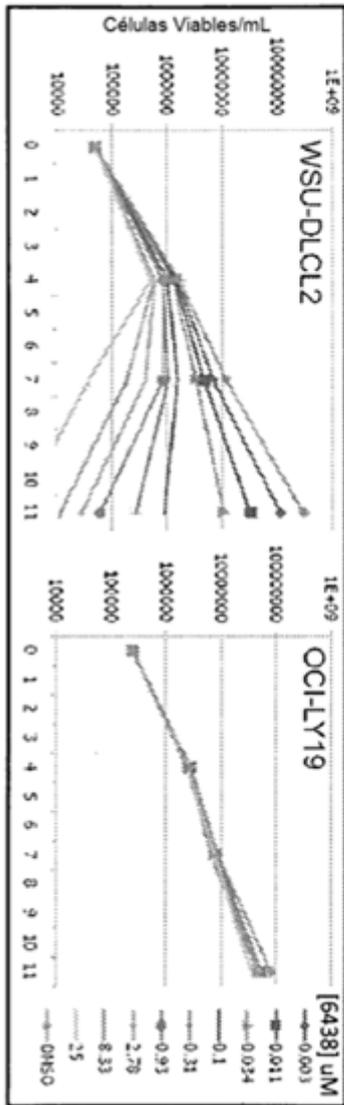


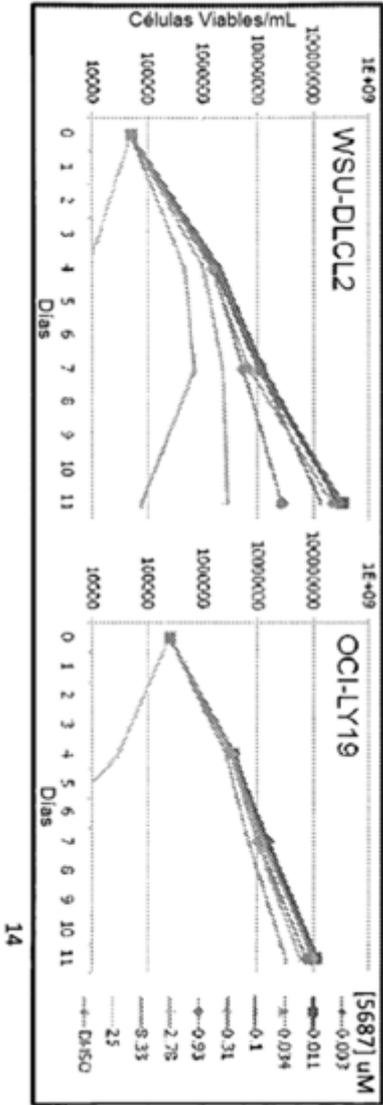
FIG. 12

FIG. 13

Inhibidor A



Inhibidor B



Tipo silvestre **FIG. 14**

