

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491557 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.05

(51) Int. Cl. A61K 31/519 (2006.01)  
A61K 31/5377 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.12.14

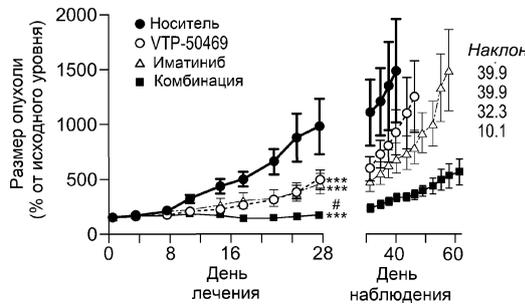
(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ЦЕЛЕВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНУЮ СТРОМАЛЬНУЮ ОПУХОЛЬ (GIST) ПУТЕМ РАЗРУШЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА MENIN-MLL

(31) 63/289,943  
(32) 2021.12.15  
(33) US  
(86) PCT/US2022/081587  
(87) WO 2023/114867 2023.06.22  
(88) 2023.07.27  
(71) Заявитель:  
ДАНА-ФАРБЕР КЭНСЕР  
ИНСТИТЮТ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Армстронг Скотт А., Хемминг  
Мэттью Л. (US)

(74) Представитель:  
Гизатуллина Е.М., Христофоров  
А.А., Угрюмов В.М., Тихонина О.В.,  
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Джермакян Р.В.  
(RU)

(57) Раскрыты способы лечения и ингибиторы желудочно-кишечной стромальной опухоли (GIST) у субъекта с активным агентом, который ингибирует менин или члена комплекса менин-MLL.



202491557  
A1

202491557  
A1

# **ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ЦЕЛЕВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНУЮ СТРОМАЛЬНУЮ ОПУХОЛЬ (GIST) ПУТЕМ РАЗРУШЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА MENIN-MLL**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Ссылки на родственные заявки**

[0001] Данная заявка в соответствии с §119(e) раздела 35 USC испрашивает приоритет предварительной заявки США №: 63/289943, поданной 15 декабря 2021 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### **Права государства на лицензию**

[0002] Это изобретение было создано при государственной поддержке в рамках грантов № K08 CA245235 и № UL 1TR002541, выданных Национальными институтами здравоохранения. Правительство имеет определенные права на это изобретение.

### **Перечень последовательностей**

[0003] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде в формате XML и включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанный файл XML, создан 14 декабря 2022 г., имеет имя 52095-752001WO\_SL.xml и размер 51 тыс п.о.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

[0004] Желудочно-кишечная стромальная опухоль (GIST) представляет собой саркому мягких тканей, которая может локализоваться в любом отделе пищеварительной системы, но чаще всего в желудке и тонкой кишке. GIST характеризуется рецидивирующими активирующими мутациями в протоонкогене тирозинкиназы KИТ или вокруг него, в рецепторе тирозинкиназы (*KИТ*) или в рецепторе тромбоцитарного фактора роста альфа (*PDGFRA*) (Corless et al., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 3:557–86 (2008), Hemming et al., Annals of Oncology. 3:557–9 (2018)).

[0005] Мутации в KИТ и/или PDGFRA или вокруг них имеют место более чем в 85% случаев GIST. Большинство первичных мутаций KИТ поддаются лечению ингибитором тирозинкиназы (ИТК), таким как иматиниб. Однако со временем возникают вторичные мутации киназы, создавая GIST, устойчивую к иматинибу. Сунитиниб, регорафениб и рипретиниб одобрены для лечения GIST, резистентной к иматинибу, на более поздних линиях лечения, хотя устойчивость к этим препаратам также развивается с течением времени time (Demetri et al., N. Engl. J. Med. 347(7):472–80 (2002), Blay et al.,

Lancet Oncol. 21(7):923–34 (2020)), Voss and Hager, Nat. Rev. Genet. 15(2):69-81 (2014), Chen and Dent, Nat. Rev. Genet. 15(2):93-106 (2014)).

[0006] Поэтому срочно необходима разработка способа лечения GIST с множественной лекарственной устойчивостью.

**Краткое раскрытие сущности настоящего изобретения**

[0007] Первый аспект настоящего изобретения относится к способу лечения желудочно-кишечной стромальной опухоли (GIST). Способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора менина. В некоторых вариантах осуществления способ также предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора тирозинкиназы (ИТК) и/или терапевтически эффективного количества ингибитора MOZ.

[0008] Другим аспектом настоящего изобретения является способ снижения активности KIT *in vitro* или *in vivo*. Этот способ предусматривает приведение в контакт клетки, имеющей активирующую мутацию в гене KIT или вокруг него, с ингибитором менина. В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества ИТК и/или терапевтически эффективного количества ингибитора MOZ.

[0009] Еще один аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему терапевтически эффективное количество ингибитора менина, фармацевтически приемлемый носитель, помещенный в подходящий контейнер, и печатные инструкции по применению ингибитора менина при лечении GIST у субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор также содержит терапевтически эффективное количество ИТК и печатные инструкции по применению ИТК при лечении GIST у субъекта, при этом ингибитор менина и ИТК содержатся в одной и той же лекарственной форме или в разных лекарственных формах, которые размещаются в одной или разных емкостях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор также содержит терапевтически эффективное количество ингибитора MOZ и напечатанные инструкции по применению ингибитора MOZ при лечении GIST у субъекта, при этом ингибитор менина и ингибитор MOZ содержатся в одной и той же лекарственной форме или в разных лекарственных формах, расположенных в одной или разных емкостях.

[0010] Как показано в рабочих примерах, авторы настоящего изобретения показали, что комплексы менин-MLL и MOZ, регулирующие хроматин, обогащаются генами, релевантными для GIST, регулируют их транскрипцию, а также транскрипцию эпигенома GIST. Ингибирование комплекса менин-MLL, отдельно или в сочетании с

ингибированием комплекса MOZ, уменьшало пролиферацию клеток GIST за счет нарушения взаимодействия с регуляторами транскрипции и хроматина, такими как DOT1L. Ингибирование менина и MOZ вызывало значительное снижение опухолевой нагрузки *in vivo*, причем еще больший эффект наблюдался при комбинированном ингибировании менина и KIT.

### **Краткое описание фигур**

[0011] Фиг. 1 А-1G представляют собой серию столбчатых и точечных диаграмм, которые иллюстрируют выявление эпигенетических зависимостей GIST с помощью скрининга зависимостей CRISPR в масштабе генома. Фиг. 1А и 1В представляют собой диаграммы рассеяния, показывающие  $\beta$ -показатели корреляции. На Фиг. 1А показана корреляция между библиотеками sgRNA (одиночная направляющая РНК) Н1 и Н2, каждая из которых нацелена на 18436 генов с 5 sgRNA на одну библиотеку. На Фиг. 1В показана корреляция между клеточными линиями GIST430 и GIST-T1. Фиг. 1С представляет собой диаграмму рассеяния, показывающую ранг при скрининге и оценку  $\beta$ -показателя, объединяющую библиотеки Н1 и Н2 и клеточные линии GIST. Фиг. 1D и 1E представляют собой гистограммы, показывающие относительные считывания для отдельных sgRNA, сравнивающие исходное секвенирование плазмидной библиотеки с конечным результатом скрининга. Фиг. 1D представляет собой гистограмму, показывающую sgRNA KIT, а Фиг. 1E представляет собой гистограмму, показывающую sgRNA MTOR. Фиг. 1F представляет собой точечный график, сравнивающий  $\beta$ -показатели незаменимых и несущественных генов. Фиг. 1G представляет собой гистограмму, показывающую 8 из 18 наиболее значительно обогащенных онтологических генов среди генов, уникально важных для GIST.

[0012] Фиг. 2А-2F представляют собой серию диаграмм рассеяния, линейных графиков и столбчатых диаграмм, которые иллюстрируют уникальную взаимозависимость MOZ и комплексов менин-MLL. Фиг. 2А представляет собой диаграмму рассеяния объединенных  $\beta$ -показателей для GIST-T1 и GIST430 и среднего показателя CERES всех клеточных линий в DerMap для ферментов, модифицирующих хроматин. Фиг. 2В представляет собой график Сирокса, показывающий перекрытие 50 основных коррелированных зависимостей DerMap для семи ферментов, модифицирующих хроматин, с расширенными зависимостями в GIST. Фиг. 2С и 2D представляют собой диаграммы рассеяния, на которых показаны ранжированные оценки чувствительности клеточных линий Project Drive для членов комплекса менин-MLL для KMT2A и ASH2L, при этом GIST-T1 выделены красным. Фиг. 2Е представляет собой линейный график, показывающий рост с течением времени, происходящий после трансдукции указанных sgRNA, нацеленных на членов комплекса менин-MLL в GIST-T1.

Фиг. 2F представляет собой гистограмму, показывающую количество клеток на 21-й день в анализе роста с течением времени, где сравниваются GIST-T1 и GIST48B.

[0013] Фиг. 3A-3I представляют собой серию тепловых карт, диаграмм Венна, диаграмм рассеяния и треков, которые показывают геномную локализацию комплексов MOZ и менин-MLL в GIST. Фиг. 3A представляет собой серию тепловых карт, демонстрирующих геномную локализацию в GIST-T1 для H3K27ac, H3K9ac, H3K4me3, BRPF1 и KAT6A, определенную с помощью анализа ChIP-seq, а также менин и MLL1n, определенные с помощью анализа CUT&Tag. Фиг. 3B-3D представляют собой диаграммы, показывающие перекрытие пиков, определенных при помощи MACS. Фиг. 3B представляет собой схему, изображающую BRPF1 и KAT6A. Фиг. 3C представляет собой диаграмму, изображающую менин и BRPF1. Фиг. 3D представляет собой диаграмму Венна, изображающую Менин и MLL1n. Фиг. 3E представляет собой точечную диаграмму, на которой показаны обогащенные геномные области связывания BRPF1, при этом транскрипционные факторы (TF) выделены красным цветом. Фиг. 3F представляет собой точечную диаграмму, на которой показаны обогащенные геномные области связывания менина, при этом TF выделены красным цветом. Фиг. 3G-3I представляют собой треки, показывающие области геномной занятости TF для HAND1, членов комплекса MOZ BRPF1 и KAT6A, членов комплекса менин-MLL, менин и MLL1n, а также гистоновых маркеров H3K4me3, H3K9ac и H3K27ac в различных генных локусах; на Фиг. 3G показаны локусы *FOXF1*, на Фиг. 3H показаны локусы *DUSP6* и на Фиг. 3I показаны локусы *USP1*.

[0014] Фиг. 4A-4F представляют собой серию линейных графиков и гистограмм, которые показывают, что ингибирование комплекса менин-MLL, с ингибированием комплекса MOZ или без него, приводит к остановке клеточного цикла. Фиг. 4A представляет собой линейный график, показывающий анализ роста с течением времени в GIST-T1 с указанными концентрациями ингибитора менина VTP-50469. Фиг. 4B представляет собой линейный график, показывающий анализ роста с течением времени в GIST-T1, обработанном VTP-50469, с WM-1119 или без него, где каждый ингибитор использовали в концентрации 0,1 мкМ. Фиг. 4C представляет собой гистограмму, показывающую количество клеток на 21-й день, нормализованное по ДМСО, после обработки GIST48B, GIST-T1 или независимой от энхансера KIT клеточной линии GIST-T1/KITΔe11 (где эндогенный *KIT* нокаутирован с помощью мутанта *KIT*, управляемого промотором CMV) с помощью VTP-50469, с WM-1119 или без него. На Фиг. 4D представлена гистограмма, показывающая рост активности во времени в GIST 430, с относительным количеством клеток на 42-й день после обработки VTP-50469 в

концентрации 0,5 мкМ, с VTP-50469 или без него; при этом комбинацию использовали с каждым лекарственным средством в концентрации 0,1 мкМ. На Фиг. 4Е представлена гистограмма, показывающая анализ клеточного цикла, где отражен процент клеток в G0/G1, S или G2/M по сравнению с ДМСО, с 72-часовым воздействием иматинибом или 8-дневным применением VTP-50469 в концентрации 0,5 мкМ, с VTP-50469 или без него; при этом комбинацию использовали с каждым лекарственным средством в концентрации 0,1 мкМ. На Фиг. 4F представлена столбчатая диаграмма, показывающую кратность изменения количества клеток, по сравнению с контролем ДМСО, при раннем апоптозе или позднем апоптозе и гибели клеток после 72-часовой обработки иматинибом в концентрации 0,5 мкМ или 8-дневным применением VTP-50469 в концентрации 0,5 мкМ или VTP-50469 с WM-1119, при этом каждое лекарственное средство использовали в концентрации 0,1 мкМ.

[0015] Фиг. 5А-5W представляют собой серию точечных и столбчатых диаграмм, показывающих транскрипционные эффекты ингибирования менина с ингибированием MOZ и без него. Фиг. 5А представляет собой точечную диаграмму, показывающую отношение экспрессии между обработкой ингибитором и ДМСО для всех экспрессируемых генов после 5 дней обработки ингибитором в клетках GIST-T1. Фиг. 5В представляет собой диаграмму-бабочку всех наборов генов Hallmark, показывающую значение величины  $q$  для NES и FDR при сравнении VTP-50469 (синий) на 5-й день с контролем ДМСО. Фиг. 5С представляет собой точечную диаграмму, показывающую наборы генов передачи сигналов Hallmark MTORC1 и EMT в сравнении ДМСО и VTP-50469. Фиг. 5D представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую относительную экспрессию, нормализованную к контролю по ДМСО, для всех экспрессируемых генов, основных генов, генов, уровень экспрессии которых снизился более чем в 2,5 раза при 6-часовой обработке иматинибом, и набора генов Hallmark EMT в клетках GIST-T1, обработанных в течение 5 дней с помощью иматиниба VTP-50469. Фиг. 5Е представляет собой гистограмму, показывающую относительную экспрессию, нормализованную к контролю по ДМСО, для всех экспрессируемых генов, сравнивающих гены с повышенным связыванием менина или гены без обогащения. Фиг. 5F представляет собой гистограмму, показывающую относительную экспрессию основных TF для GIST, связанных с Менином. Фиг. 5G и 5H представляют собой гистограммы, показывающие по данным qRT-PCR относительный уровень мРНК, отрицательного регулятора передачи сигналов KIT DUSP6, SE-ассоциированного NPR3 и незаменимого гена USP1 в клетках, обработанных в течение 5 дней VTP-50469 в концентрации 0,5 мкМ или VTP-50469 с WM-1119, при этом каждое лекарственное

средство использовали в концентрации 0,1 мкМ. Фиг. 5I представляет собой тепловую карту, показывающую неконтролируемую иерархическую кластеризацию данных секвенирования РНК, сравнивающую GIST-T1 с обработкой VTP-50469. Фиг. 5J представляет собой тепловую карту, показывающую неконтролируемую иерархическую кластеризацию данных секвенирования РНК, сравнивающую клетки GIST-T1/Cas9, трансдуцированные sgRNA. Фиг. 5K представляет собой тепловую карту, показывающую корреляцию Пирсона данных секвенирования РНК, нормализованных по контролю. Фиг. 5L-5N представляют собой графики корреляции изменений экспрессии генов в 5000 наиболее экспрессируемых транскриптов, сравнивающих обработку sgRNA или обработку комбинированными лекарственными средствами, нормализованными по контролю. Фиг. 5O представляет собой тепловую карту, показывающую нормализованные показатели обогащения (NES) для наборов генов при анализе GSEA. Фиг. 5P-5S представляют собой графики GSEA, показывающие изменения в генах, обогащенных менином/BRPF1, в генах, связанных с SE, и в генах, регулируемых HAND1. Фиг. 5T представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую экспрессию генов, активируемую HAND1, нормализованную к контролю. Фиг. 5U-5W представляют собой точечные графики, показывающие экспрессию избранных генов, связанных с линией GIST, регуляцией TF или HAND1, в зависимости от условий обработки лекарствами и sgRNA.

[0016] Фиг. 6A-6Q представляют собой серию фотографических изображений, точечных диаграмм, столбчатых диаграмм, тепловых карт, точечных графиков и дорожек, которые иллюстрируют изменение белковых взаимодействий после ингибирования менина. Фиг. 6A представляет собой ретроспективный блот родительских клеток GIST-T1 или клеток после делеции и сохранения sgRNA с оптимизированной по кодам конструкцией MEAF6, слитой с BirA\* (R118G). Фиг. 6B представляет собой диаграмму рассеяния PSM и интенсивности сигнала  $\log_2$  проксимальных белков, идентифицированных с помощью MEAF6 BioID. Фиг. 6C представляет собой гистограмму, показывающую обогащение терминами GO проксимальных белков MEAF6. Фиг. 6D представляет собой диаграмму рассеяния  $\log_2$  отношения интенсивности сигнала VTP-50469/ДМСО для белков, обогащенных MEAF6, после 2-дневной предварительной обработки ингибиторами, с дополнительной 24-часовой обработкой во время мечения биотином. Фиг. 6E представляет собой тепловую карту, показывающую неконтролируемую иерархическую кластеризацию нормализованной по ДМСО интенсивности сигнала 67 генов, значительно изменяющихся по меньшей мере в одном состоянии в ответ на воздействие VTP-50469 или на комбинированную обработку с

использованием VTP-50469 и WM-1119. Фиг. 6F-6G представляют собой точечные графики интенсивности сигнала, нормализованного по ДМСО, для белковых интеракторов, обогащенных VTP-50469 или VTP-50469 в сочетании с WM-1119. Фиг. 6H представляет собой набор тепловых карт, где показан нормализованный сигнал DOT1L на пиках, определяемых MACS, в клетках GIST-T1, обработанных ДМСО или VTP-50469. Фиг. 6I и 6J представляют собой столбчатые диаграммы, показывающие нормализованный пиковый сигнал DOT1L (Фиг. 6I) или MEAF6 (Фиг. 6J) на пиках, определенных MACS. Фиг. 6K представляет собой график треков, показывающий области геномной занятости нормализованного DOT1L при указанных обработках для H3K79me2, MEAF6 и H3K27ac в локусе *HAND1*. На Фиг. 6L показано количество клеток на 21 день, нормализованное по ДМСО, после обработки GIST-T1 или GIST48B указанными концентрациями EPZ-5676. Фиг. 6M представляет собой тепловую карту, показывающую корреляцию Пирсона нормализованных по контролю данных секвенирования РНК из клеток, обработанных в течение 5 дней указанными ингибиторами. На Фиг. 6N показана корреляцию Пирсона для изменений экспрессии генов в экспрессируемых транскриптах (n = 5000) при сравнении нормализованной по контролю обработки лекарственными средствами EPZ-5676 и VTP-50469. На Фиг. 6O представлены графики анализа GSEA, показывающие изменения в генах, регулируемых *HAND1*, возникающие в результате обработки EPZ-5676. Фиг. 6P и 6Q представляют собой точечные графики, показывающие экспрессию избранных генов, связанных с линией GIST и TF (n = 4 на каждое условие).

[0017] Фиг. 7A-7F представляют собой линейные графики и серию микрофотографий, которые иллюстрируют эффекты ингибирования менина на GIST *in vivo*. Фиг. 7A представляет собой линейный график, показывающий ксенотрансплантаты клеточной линии GIST-T1, обработанные в течение 28 дней иматинибом, VTP-50469, комбинацией иматиниба и VTP-50469 или носителем (контроль). Фиг. 7B представляет собой линейный график, показывающий результаты обработки PG27 PDX в течение 18 дней иматинибом, VTP-50469, комбинацией иматиниба и VTP-50469 или носителем (контроль). На Фиг. 7C представлена серия микрофотографий, показывающих срезы ткани опухолей PG27, собранные в конце периода обработки, зафиксированные, разделенные на срезы и окрашенные H&E. Фиг. 7D представляет собой линейный график, показывающий ксенотрансплантаты клеточной линии GIST-T1, которые обрабатывали в течение 28 дней. Фиг. 7E представляет собой тепловую карту, показывающую данные секвенирования РНК, выполненного на ксенотрансплантатах клеточной линии GIST-T1, обработанных в течение 5 или 10 дней. Фиг. 7F представляет собой точечный график, показывающий экспрессию выбранных генов (выраженную из расчета тысяч оснований транскрипта на

миллион картированных чтений (FPKM)) связанных с линией GIST, регуляцией иматиниба или пролиферацией клеток.

[0018] Фиг. 8А-8N представляют собой серию столбчатых, линейных и точечных графиков и диаграмм, иллюстрирующих уникальные зависимости GIST. Фиг. 8А представляет собой гистограмму, показывающую 18 наиболее значительно обогащенных онтологических генов среди генов, уникально важных для GIST. Фиг. 8В представляет собой линейный график, показывающий ранг при скрининге и оценки  $\beta$ -показателей, выделяющий членов комплекса менин-MLL. Фиг. 8С представляет собой линейный график ранга на экране и  $\beta$ -оценки, выделяющий члены комплекса INO80. Фиг. 8D представляет собой линейный график, показывающий ранг при скрининге и оценки  $\beta$ -показателей, выделяющий членов комплекса гистонацетилтрансферазы NuA4. Фиг. 8Е-8G представляют собой диаграммы рассеяния ранжированных показателей чувствительности клеточных линий Project Drive для избранных членов комплексов INO80 и NuA4. Фиг. 8H представляет собой линейный график, показывающий ранг при скрининге и оценки  $\beta$ -показателей, выделяющий члены комплекса FACT. Фиг. 8I-8J представляют собой диаграммы рассеяния ранжированных показателей чувствительности клеточных линий Project Drive для членов комплекса FACT. Фиг. 8K представляет собой линейный график, показывающий ранг при скрининге и оценки  $\beta$ -показателей, выделяющий члены комплекса PAF1. Фиг. 8L-8M представляют собой диаграммы рассеяния ранжированных показателей чувствительности клеточных линий Project Drive для избранных членов комплекса PAF1. Фиг. 8N представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую относительные значения считываний для восьми лучших sgRNA, нацеленных на указанные гены в GIST-T1 или GIST430, нормализованные к исходному уровню плазмидной библиотеки (n=2 для каждой sgRNA).

[0019] Фиг. 9А-9Е представляют собой серию линейных графиков и точечных диаграмм, которые иллюстрируют зависимость комплекса PRC2 в GIST. Фиг. 9А представляет собой линейный график, показывающий ранг при скрининге и оценки  $\beta$ -показателей, где выделены основные члены комплекса PRC2. На Фиг. 9В-9С представлены ранжированные показатели чувствительности клеточных линий Project Drive для избранных членов комплекса PRC2. Фиг. 9D представляет собой график, показывающий ранг при скрининге и оценки зависимости CERES для членов комплекса EZH2 в клеточных линиях в DerMap (n = 726), где пунктирная линия при -1 указывает на значительную зависимость. На Фиг. 9Е показаны основные корреляции генной зависимости с EZH2 в DerMap. Помечены созависимые ферменты, модифицирующие хроматин, и члены комплекса.

[0020] Фиг. 10А-10Н представляют собой серию диаграмм и дорожек, иллюстрирующих локализацию комплекса менин-MLL в GIST. Фиг. 10А представляет собой диаграмму, показывающую перекрытие в обогащенных областях между менином и BRPF1, с указанием избранных GIST-ассоциированных генов. На Фиг. 10В-10Н представлены дорожки, показывающие области геномной занятости TF для HAND1, членов комплекса менин-MLL менин-MLL1n и меток гистонов для H3K4me3, H3K9ac и H3K27ac; на Фиг. 10В показаны локусы OSR1, на Фиг. 10С показаны локусы *KDR*, на Фиг. 10F показаны локусы *MEIS1*, на Фиг. 10G показаны локусы *HAND1* и на Фиг. 10Н показаны локусы *NPR3*.

[0021] Фиг. 11 представляет собой гистограмму, которая показывает нормализованное по ДМСО количество клеток после первого пассажа медленно растущих клеточных линий GIST GIST430 и GIST882, ингибированных VTP-50469 или VTP-50469, в сочетании с WM-1119.

[0022] Фиг. 12А-12С представляют собой серию точечных и столбчатых диаграмм, которые иллюстрируют транскрипционные эффекты ингибирования менина. Фиг. 12А представляет собой точечную диаграмму, показывающую отношение экспрессии между обработкой ингибитором и ДМСО для 500 наиболее важных генов после 5 дней обработки ингибитором. Фиг. 12В представляет собой гистограмму, показывающую относительную экспрессию негативных регуляторов передачи сигналов KIT SPRY2, SPRY4 и DUSP6 после 1-или 5-дневной обработки VTP-50469. Фиг. 12С представляет собой гистограмму, показывающую относительную экспрессию KIT после 1-или 5-дневной обработки VTP-50469.

[0023] Фиг. 13А-13J представляют собой серию тепловых карт, диаграмм рассеяния и дорожек, которые иллюстрируют результаты анализа ChIP-seq для DOT1L, H3K79me2 и MEAF6, а также эффекты действия VTP-50469. На Фиг. 13А представлены тепловые карты, показывающие нормализованный сигнал MEAF6 на пиках, определяемых анализом MACS, в клетках GIST-T1, обработанных ДМСО или VTP-50469. Фиг. 13В-13С представляют собой точечные диаграммы, показывающие обогащенные геномные области связывания DOT1L и H3K79me2. Фиг. 13D представляет собой серию тепловых карт, показывающих геномную локализацию в GIST-T1 для DOT1L, H3K79me2 и MEAF6, полученную с помощью анализа ChIP-seq. Фиг. 13Е представляет собой набор дорожек, который показывает области геномной занятости нормализованного DOT1L при указанных обработках для H3K79me2 и H3K27ac в локусе *GPR20*. Фиг. 13F представляет собой точечный график, показывающий 70 основных корреляций геномной зависимости DOT1L в DepMap с указанием членов комплекса менин-MLL, MOZ и PRC2. Фиг. 13G

представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую нормализованный по ДМСО сигнал для DOT1L в областях с повышенным ( $n = 1343$ ) или типичным ( $n = 45256$ ) сигналом для DOT1L. Фиг. 13H представляют собой фотографии вестерн-блоттинга, показывающие сигнал DOT1L после 5 дней обработки указанными ингибиторами. Фиг. 13I представляет собой точечный график, показывающий уровни экспрессии DOT1L, полученные с помощью секвенирования РНК после 5 дней обработки указанными лекарственными средствами. Фиг. 13J представляет собой гистограмму, показывающую количество клеток GIST-T1 на 21-й день в анализе роста с течением времени, сравнивающим sgRNA, нацеленные на два экзона DOT1L или Luc, или RPS19 в качестве контроля.

[0024] Фиг. 14A-14F представляют собой линейные графики и серию микрофотографий, которые показывают эффекты ингибирования менина *in vivo*. Фиг. 14A представляет собой линейный график, показывающий массу тела мышей, которым трансплантировали клеточную линию GIST-T1 и которые получали в течение 28 дней иматиниб, VTP-50469, комбинацию иматиниба и VTP-50469, а также носитель (контроль). Фиг. 14B представляет собой линейный график, показывающий массу тела мышей, которым привили PG27 PDX и которые в течение 18 дней получали иматиниб, VTP-50469, комбинацию иматиниба и VTP-50469, а также носитель (контроль). На Фиг. 14C представлена серия микрофотографий, показывающих срезы ткани опухолей PG27, собранные в конце периода лечения, фиксированные ткани, разделенные на срезы и оцененные на наличие Ki-67 (верхний ряд) и расщепленной каспазы-3 (нижний ряд); масштабная шкала = 25 мкм. Фиг. 14D представляет собой линейный график, показывающий размер опухоли после того, как мышам были привиты клеточные линии GIST-T1 и они были обработаны sgRNA. Фиг. 14E представляет собой линейный график, показывающий массу тела мышей, которым привита клеточная линия GIST-T1 и которым в течение 28 дней вводили VTP-50469, WM-1119, комбинацию VTP-50469 и WM-1119 или носитель (контроль). Фиг. 14F представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую нормализованную по контролю экспрессию всех экспрессируемых генов ( $n=7434$ ) или тех, экспрессия которых усиливается с помощью HAND1 ( $n=438$ ) в каждой группе, получавшей лечение.

[0025] Фиг. 15A-15C представляет собой набор линейных и столбчатых графиков, показывающий ингибирование KAT6A, менина и BRPF1 в клеточных линиях GIST. Фиг. 15A представляет собой линейный график, показывающий рост с течением времени клеток GIST-T1 или GIST48B после обработки с использованием 50 нМ иматиниба. Фиг. 15B представляет собой гистограмму, которая показывает нормализованное по ДМСО

количество клеток после первого пассажа медленно растущих клеточных линий GIST GIST430 (день 6), GIST882 (день 12) и GIST48 (день 12) по сравнению с GIST-T1 (день 4). Фиг. 15С представляет собой линейный график, показывающий рост с течением времени клеток GIST-T1 или GIST48В после обработки селективными ингибиторами BRPF1 GSK6853 или PFI-4.

[0026] Фиг. 16А-16Н представляет собой набор столбчатых диаграмм и тепловых карт, показывающих нарушающие транскрипционные эффекты для MOZ и менина. Фиг. 16А представляет собой тепловую карту экспрессии 10 GIST-ассоциированных TF, нормализованной по контролю, в ответ на обработку лекарственным средством или sgRNA. Фиг. 16В представляет собой столбчатую диаграмму, которая показывает нормализованную по ДМСО экспрессию 18 GIST-ассоциированных TF при назначенном медикаментозном лечении (n=4 на каждое условие). Фиг. 16С-16F представляет собой набор гистограмм, которые показывают относительный уровень мРНК отрицательного регулятора передачи сигналов KIT DUSP6 и HAND1-ассоциированного и SE-ассоциированного гена NPR3 в клеточных линиях GIST. Фиг. 16G представляет собой тепловую карту, на которой показаны результаты NES анализа GSEA для наборов генов, связанных с трансляцией Reactome, при каждом условии обработки препаратом или sgRNA. Фиг. 16Н представляет собой столбчатую диаграмму, которая показывает нормализованную по контролю экспрессию всех генов, связанных с трансляцией (n=48), для sgRNA и каждого условия обработки лекарственным средством.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

#### **Определения**

[0027] Если специально не указано и не следует очевидным образом из контекста, термин «приблизительно» понимается как находящийся в пределах нормальных значений, принятых в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. «Приблизительно» можно понимать как в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от заявленного значения показателя. Если иное не следует очевидным образом из контекста, то все числовые значения, представленные здесь, охарактеризованы термином «приблизительно».

[0028] Под «агентом» подразумевают любое низкомолекулярное соединение, антитело, молекулу нуклеиновой кислоты или полипептид или их фрагменты. Если специально не указано и не очевидно из контекста, термин «или» понимается как включающий. Если не указано иное или очевидно из контекста, термины, представленные

в единственном числе в данном документе, понимаются как в единственном, так и во множественном числе.

[0029] Любые композиции или способы, представленные в настоящем документе, можно комбинировать с одной или несколькими любыми другими композициями и с одним или несколькими любыми другими способами, представленными в настоящем документе.

[0030] Термин «содержащий», который является синонимом слов «включающий», «предусматривающий» или «характеризующийся», является включающим или открытым и не исключает дополнительных, неуказанных элементов или стадий способа. Напротив, указание «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в формуле изобретения. Выражение «состоящий по существу из» ограничивает объем формулы изобретения указанными материалами или стадиями, «и теми, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики» заявленного изобретения.

[0031] Другие особенности и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из представленного ниже описания предпочтительных вариантов осуществления изобретения, а также из формулы изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют смысловое значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, некоторые конкретные способы и материалы описаны ниже.

### Способы применения

[0032] Некоторые аспекты настоящего изобретения направлены на лечение GIST у субъекта. Способ предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества или терапевтически эффективного количества ингибитора менина.

[0033] GIST представляет собой саркому мягких тканей, которая часто характеризуется рецидивирующими активирующими мутациями в гене тирозинкиназы *KIT* и/или в гене *PDGFRA* или вокруг него. Выражение «внутри или вокруг», используемое в настоящем документе, относится к мутации внутри кодирующей области гена или к мутации в 5'-или 3'-проксимальной области гена, которая способствует функции гена (например, регуляторной области, которая влияет на транскрипцию гена). В GIST отсутствует амплификация онкогенов, и она характеризуется устоявшейся сетью

транскрипционных факторов. В рабочих примерах показаны уникальные ферменты, модифицирующие хроматин, которые необходимы для организации эпигенома GIST; например, *KMT2A/MLL1* показана здесь как ранее неизвестная зависимость GIST, и в более широком смысле установлено, что он обеспечивает аналогичную регуляцию для некоторых подтипов рака. *KMT2A/MLL1* является членом комплекса менин-MLL и отвечает за метилирование H3K4 и активацию транскрипции (Ruthenburg et al., *Molecular Cell* 25:15-30 (2007), Krivtsov et al., *Nat. Rev. Cancer* 7:823).-33 (2007)). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта диагностирована GIST, имеющая мутацию в гене *KIT* или вокруг него. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мутация представляет собой активирующую мутацию. Активирующие мутации приводят к тому, что мутировавший белок остается в нарушенном состоянии по сравнению с немутантным белком. Активирующие мутации в киназных доменах чаще всего приводят к лиганд-независимой активации киназного домена и, следовательно, к целевому фосфорилированию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта имеется метастатическая GIST.

[0034] Термин «субъект» (или «пациент»), используемый здесь, включает всех представителей животного мира, склонных (или предрасположенных) к GIST или страдающих от нее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является человек. Следовательно, субъект, «имеющий GIST» или «нуждающийся» в лечении согласно настоящему изобретению, в широком смысле охватывает субъектов, у которых был поставлен положительный диагноз в отношении GIST, включая субъектов, имеющих активное заболевание, которые ранее могли пройти один или несколько курсов терапии, и субъекты, которые в настоящее время не получают лечения (например, в стадии ремиссии), но которые все еще могут подвергаться риску рецидива, и субъекты, у которых не был поставлен положительный диагноз в отношении GIST, но которые предрасположены к раку или аутоиммунным заболеваниям (например, на основании предыдущей истории болезни и/или семейной медицинской истории, или те, кто иным образом имеет один или несколько факторов риска, на основании которых медицинский работник может обоснованно подозревать, что субъект предрасположен к GIST).

[0035] Термины «лечить» и «лечение», используемые в настоящем документе, относятся к любому типу вмешательства, процесса, выполняемого или обеспечивающего введение эффективного количества или терапевтически эффективных количеств ингибитора менина, ИТК и/или ингибитора MOZ субъекту, нуждающемуся в этом, с терапевтической целью (для достижения «терапевтического эффекта») для реверсии,

облегчения, улучшения, ингибирования, уменьшения, замедления, остановки, стабилизации или предотвращения возникновения, прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптомов, осложнений или состояния субъекта или биохимических признаков, связанных с GIST.

[0036] Активные агенты, используемые при осуществлении настоящего изобретения, представляют собой ингибиторы менина. Как раскрыто в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно использовать один или несколько дополнительных активных агентов, включая ингибиторы тирозинкиназы (ИТК) и ингибиторы MOZ (моноцитарный лейкозный цинковый палец; также известный как лизин-(К)-ацетилтрансфераза 6A (КАТ6A), которая представляет собой гистон-ацетилтрансферазу (НАТ)).

[0037] Термин «ингибитор» используется здесь в самом широком смысле и включает любой агент, такой как низкомолекулярное соединение, нуклеиновая кислота (например, рибозим, антисмысловая нуклеиновая кислота, киРНК), антитело или его функциональный фрагмент, пептид, пептидомиметик или аптамер, который действует нарушая, прямо или косвенно, и уменьшает или даже устраняет функцию целевой мишени.

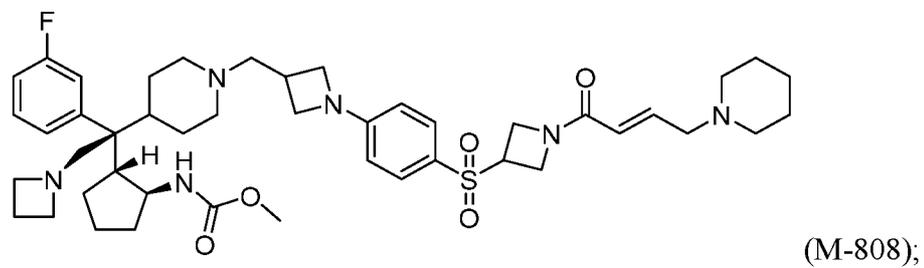
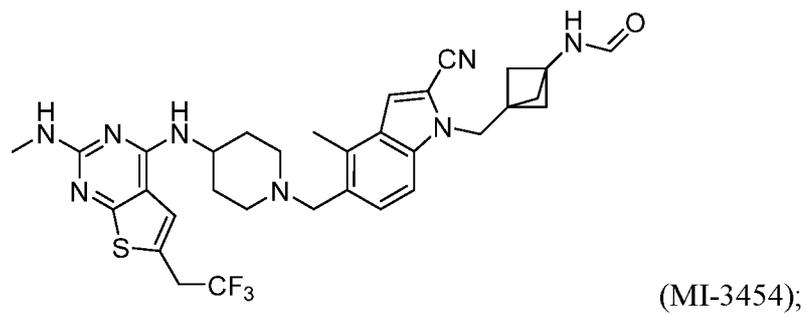
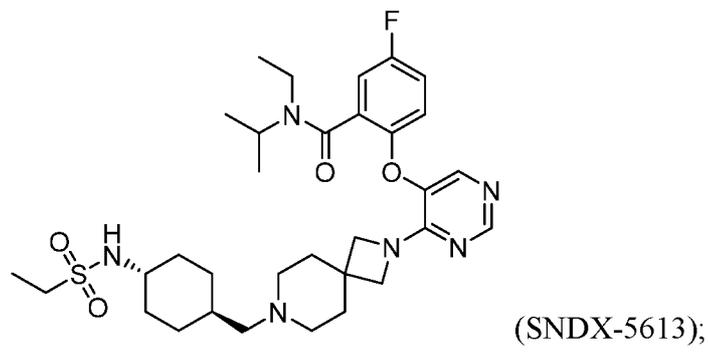
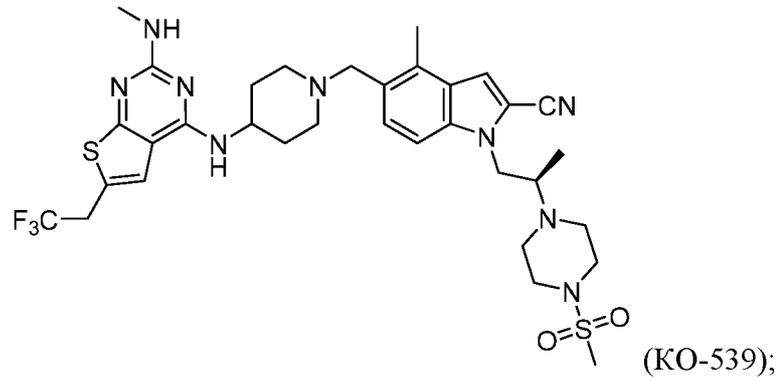
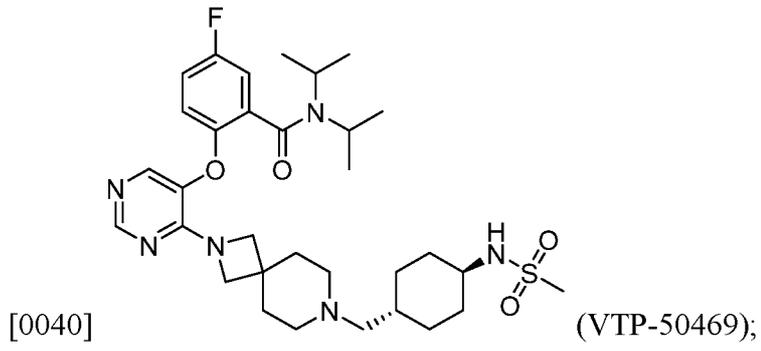
#### Ингибиторы менина

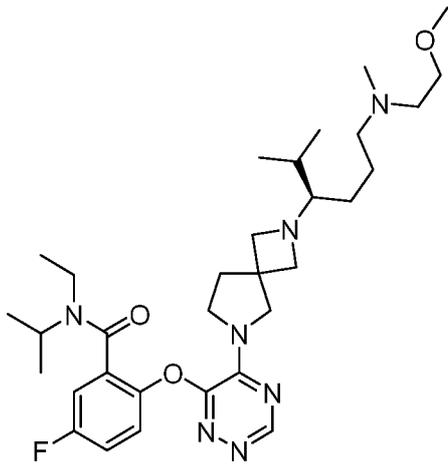
[0038] Термины «ингибитор менина», «ингибиторы менина» и «ингибиторы комплекса менин-MLL» используются здесь взаимозаменяемо и могут пониматься в самом широком смысле. Ингибитор менина включает один агент или комбинацию любых агентов, таких как низкомолекулярное соединение, нуклеиновая кислота (например, киРНК) или антитело, пептид, пептидомиметик или аптамер, который действует, нарушая, прямо или косвенно, и уменьшает или даже устраняет функцию или экспрессию белка менина, гена множественной эндокринной неоплазии 1 (*MEN1*) или комплекса менин-MLL. Нарушение функции белка может включать прямую блокировку активности, блокировку белок-белкового взаимодействия и т.п. Менин, белковый продукт гена *MEN1* (синдром множественной эндокринной неоплазии типа 1), взаимодействует с белками семейства лейкомий смешанного происхождения (MLL) в комплексе гистон-метилтрансферазы, включая MLL1 (также известный как лизин-(К)-специфическая метилтрансфераза 2A (KMT2A)), Ash2, Rbbp5 и WDR5. В результате хромосомных перестроек гена MLL, белок продуцируемый геном *MLL*, сливается с одним из более чем 60 различных белков-партнеров, что приводит к усилению экспрессии генов *HOXA9* и *MEIS1*, которые имеют решающее значение для лейкемогенеза. В отличие от AML (острая

миелобластная лейкемия) или ALL (острая лимфобластная лейкемия), слитые белки MLL не встречаются при GIST.

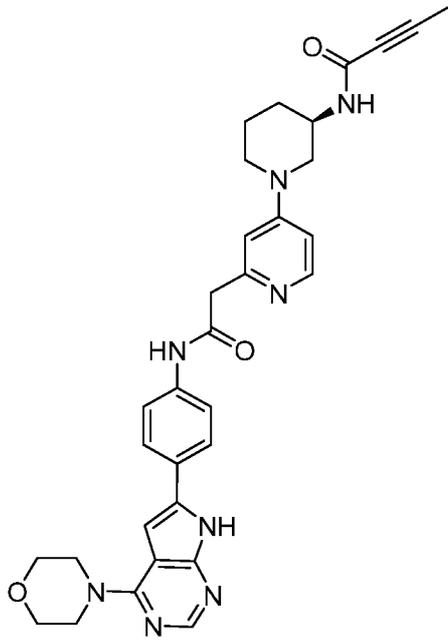
[0039] Типичные низкомолекулярные ингибиторы менина включают VTP-50469 (5-фтор-N,N-диизопропил-2-((4-(7-(((1r,4r)-4-(метилсульфонамидо)циклогексил)метил)-2,7-диазаспиро[3.5]нонан-2-ил)пиримидин-5-ил)окси)бензамид), КО-539 ((R)-4-метил-5-((4-((2-(метиламино)-6-)-(2,2,2-трифторэтил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)амино)пиперидин-1-ил)метил)-1-(2-(4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил))пропил)-1H-индол-2-карбонитрил, также используемый в NCT04067336), JNJ-75276617 ((R)-N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(2-(6-((2-метоксиэтил)(метил)амино)-2-метилгексан-3-ил)-2,6-диазаспиро[3.4]октан-6-ил)-1,2,4-триазин-6-ил)окси) бензамид, также используется в NCT04811560), SNDX-5613 (N-этил-2-((4-(7-(((1r,4r)-4-(этилсульфонамидо)циклогексил)метил)-2,7-диазаспиро[3.5]нонан-2-ил)пиримидин-5-ил)окси)-5-фтор-N-изопропилбензамид, также используемый в NCT04065399), DS-1594 ((1R,2S,4R)-4-((4-(5,6-диметоксипиридазин-3-ил)бензил)амино)-2-(метил(6-(2,2,2-трифторэтил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)амино)циклопентан-1-ол, также используемый в NCT04752163), BMF-219 ((R)-N-(1-(2-(2-((4-(4-морфолино-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-ил)фенил)амино)-2-оксоэтил)пиридин-4-ил)пиперидин-3-ил)бут-2-инамид), DSP-5336 (N-этил-5-фтор-N-изопропил-2-((5-(7-(((1S,3S,4R)-5-метилен-2-азабицикло[2.2.2]октан-3-карбонил)-2,7-диазаспиро[3.5]нонан-2-ил)-1, 2,4-триазин-6-ил)окси)бензамид, также используемый в NCT04988555), антитело A300-105A (коммерчески доступное от Vmethyl Laboratories), MI-3453 (N-(3-((2-циано-4-метил-5-((4-((2-(метиламино)-6-(2,2,2-трифторэтил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)амино)пиперидин-1-ил)метил)-1H-индол-1-ил)метил)бицикло[1.1.1]пентан-1-ил)формаид, M-808 (метил((1S,2R)-2-((S)-2-(азетидин-1-ил)-1-(3-фторфенил)-1-(1-((1-(4-((1-(E)-4-(пиперидин-1-ил)бут-2-еноил)азетидин-3-ил)сульфонил)фенил)азетидин-3-ил)метил)пиперидин-4-ил)этил)циклопентил)карбамат), MI-0202 (4-(4-(5,5-диметил-4,5-дигидротиазол-2-ил)пиперазин-1-ил)-6-(2,2,2-трифторэтил)тиено[2,3-d]пиримидин), MI-503 (1-((1H-пиразол-4-ил))метил)-4-метил-5-((4-((6-(2,2,2-трифторэтил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)амино)пиперидин-1-ил)метил)-1H-индол-2-карбонитрил), MI-463 (4-метил-5-((4-((6-(2,2,2-трифторэтил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)амино)пиперидин-1-ил)метил)-1H-индол-2-карбонитрил), MI-136 (5-((4-((6-(2,2,2-трифторэтил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)амино)пиперидин-1-ил)метил)-1H-индол-2-карбонитрил) и ML-227 (4-(3-(4-(циклопентил(гидрокси))(фенил)метил)пиперидин-1-ил)пропокси)бензонитрил).

Структуры этих низкомолекулярных ингибиторов приведены ниже:

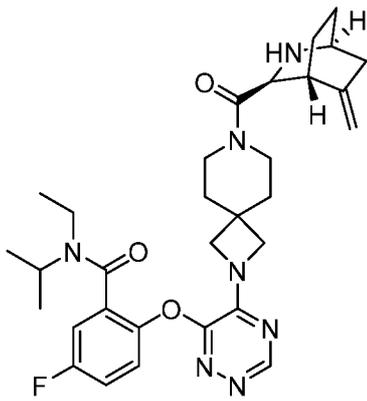




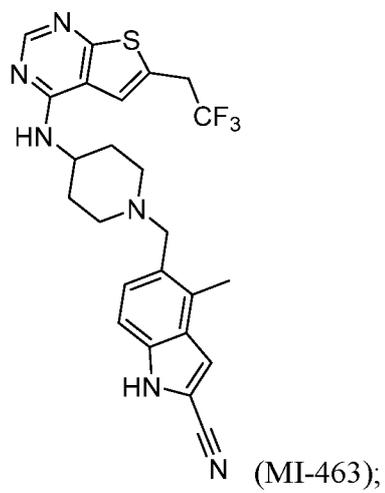
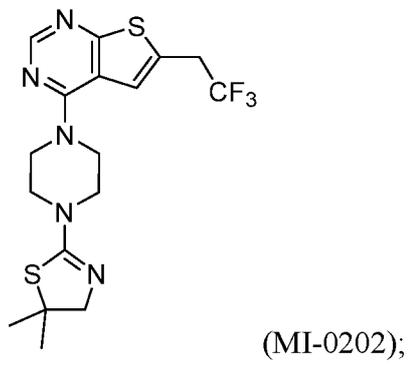
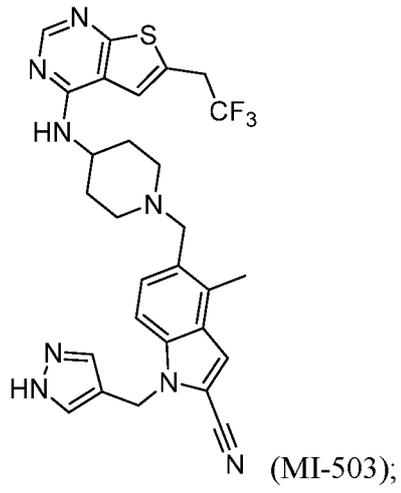
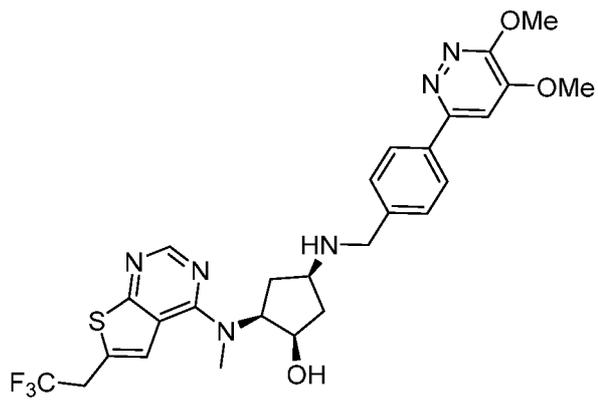
(JNJ-75276617);

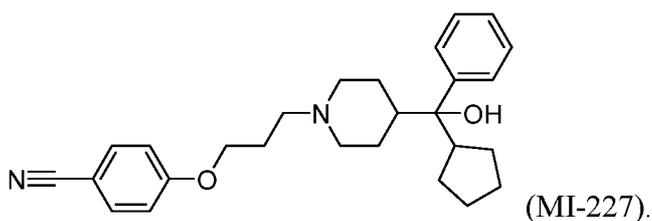
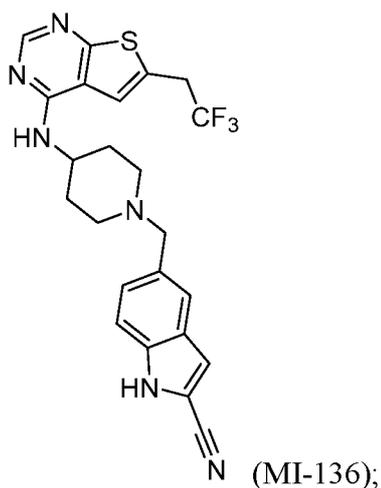


(BMF-219);



(DSP-5336);





[0041] Другие ингибиторы менина, которые могут быть полезны при осуществлении настоящего изобретения, известны в данной области техники. См., например, публикации международных заявок WO 2017/112768, WO 2017/214367, WO 2018/053267, WO 2020/069027 A1, WO 2021/207335 A1, публикации заявок на выдачу патента США US 2021/0115018 A1, US 2019/0307750, US 2016/0339035 (соединения формулы (I)), и Borkin et al., *Cancer Cell* 27(4): 589-602 (2015).

[0042] Дополнительные ингибиторы менина, которые могут быть полезны при осуществлении настоящего изобретения, включают MI-2-2, который ингибирует взаимодействие между менином и MLL (Grembecka et al., *Nat. Chem. Biol.* 8:277-284 (2012); Shi et al., *Blood* 120:4461-4469 (2102)), и N,N'-бис(4-аминофенил)-N,N'-диметилендиамин, также известный как ISC-30, который ингибирует взаимодействие фермента MLL и менина, (Krivtsov et al., *Cancer Cell.* 36(6):660–673 (2019), Klossowski et al., *J. Clin. Invest.* 130:981–97 (2020), Xu et al., *J. Med. Chem.* 63:4997–5010 (2020).

[0043] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор менина представляет собой интерферирующую РНК, например, короткую интерферирующую РНК (киРНК), используемую в качестве активного агента для снижения уровня MEN1 или уровня другого члена комплекса менин-MLL. РНК-интерференция (РНКи)-явление, при котором введение двухцепочечной РНК (дцРНК) в различные организмы и типы клеток вызывает деградацию комплементарной мРНК. В публикации Soutschek et al., 432:173-178 (2004) описана химическая модификация киРНК, которая способствует внутривенной системной доставке. Оптимизация киРНК включает

оценку общего содержания G/C, содержания C/T на концах, температуры плавления ( $T_m$ ) и содержания нуклеотидов на 3'-конце. См., например, Schwartz et al., Cell 115:199-208 (2003) и Khvorova et al., Cell 115:209-216 (2003). Таким образом, настоящее изобретение также охватывает способы снижения уровней *MEN1*, *MOZ* или другого целевого белка с использованием технологии РНКи. Последовательности нуклеиновых кислот типичных кРНК, которые связываются с членом комплекса менин-MLL, представлены в Таблице 1.

**Таблица 1:** Последовательности нуклеиновых кислот кРНК, связывающих комплекс менин-MLL

Олигонуклеотид	Последовательность (5'-->3')
sgKMT2A_A_For	CACCGAGGGGTCTTAATGATCCGCG (SEQ ID NO: 1)
sgKMT2A_A_Rev	AAACCGCGGATCATTAAGACCCCTC (SEQ ID NO: 2)
sgKMT2A_B_For	CACCGGATCCTTCTACTTGCATGGG (SEQ ID NO: 3)
sgKMT2A_B_Rev	AAACCCCATGCAAGTAGAAGGATCC (SEQ ID NO: 4)
sgMEN1_A_For	CACCGACGTCGTCGATGGAGCGCAG (SEQ ID NO: 5)
sgMEN1_A_Rev	AAACCTGCGCTCCATCGACGACGTC (SEQ ID NO: 6)
sgMEN1_B_For	CACCGAGAGGGCGGCGATGATAGAC (SEQ ID NO: 7)
sgMEN1_B_Rev	AAACGTCTATCATCGCCGCCCTCTC (SEQ ID NO: 8)

[0044] Ингибитор менина можно вводить пациенту в виде монотерапии или в виде комбинированной терапии (например, в сочетании с ИТК и/или ингибитором *MOZ*). Как монотерапия, так и комбинированная терапия могут быть «первой линией» лечения, т.е. для начального лечения у пациентов, которые ранее не проходили схемы лечения против *GIST*, либо отдельно, либо в сочетании с другими методами лечения; или «второй линией» лечения против *GIST*, т.е. для лечения пациентов, которые ранее прошли курс лечения против *GIST* отдельно или в сочетании с другими методами лечения; или в качестве лечения «третьей линии» лечения, «четвертой линии» лечения и т.п., отдельно или в сочетании с другими методами лечения. Терапию также можно назначать пациентам, которые ранее проходили лечение, которое было безуспешным или частично успешным, или у пациентов возникла непереносимость конкретного лечения. Терапия также может назначаться в качестве вспомогательного лечения, т.е. для предотвращения повторного возникновения *GIST* у пациентов, у которых в настоящее время не обнаруживается заболевание, или после хирургического удаления опухоли. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор(ы) можно вводить пациенту, который получал ранее другую терапию, такую как

химиотерапия, радиоиммунотерапия, хирургическая терапия, иммунотерапия, лучевая терапия, таргетная терапия или любая их комбинация.

Комбинированная терапия с ингибиторами тирозинкиназы (ИТК) и/или ингибиторами MOZ

[0045] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъекта лечат посредством терапии ингибитором менина в сочетании или одновременно с эффективным количеством или терапевтически эффективным количеством ИТК и/или ингибитора MOZ. Блокирование KIT или MOZ может стать дополнительным средством усиления терапевтического эффекта ингибитора менина.

[0046] Термины «в комбинации» и «одновременно», используемые в контексте комбинированной терапии, означают, что активные агенты вводятся совместно, что предусматривает, по существу, одновременное введение, посредством одних или отдельных лекарственных форм и одними или разными способами введения, или активные агенты вводятся последовательно, например, как часть одной схемы лечения, или посредством последовательных схем лечения. Таким образом, при последовательном введении в начале введения второго ингибитора первый ингибитор в некоторых случаях все еще можно обнаружить в эффективных концентрациях в месте лечения. Последовательность и временной интервал могут быть определены так, чтобы они могли действовать вместе (например, синергически), обеспечивая больший эффект, чем если бы их вводили иначе. Например, терапевтические средства можно вводить одновременно или последовательно в любом порядке в разные моменты времени; однако, если их не вводить одновременно, их можно вводить достаточно близко по времени, чтобы обеспечить желаемый терапевтический эффект, который может иметь синергический характер. Таким образом, условия введения не ограничиваются одновременным введением активных агентов.

Ингибиторы тирозинкиназы

[0047] Ингибиторы тирозинкиназы (ИТК) включают любой один агент или комбинацию агентов, таких как низкомолекулярное соединение, нуклеиновая кислота (например, кРНК) или антитело, пептид, пептидомиметик или аптамер, который действует нарушая, прямо или косвенно, и уменьшает или даже устраняет функцию или экспрессию белка KIT или *KIT*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ИТК представляет собой иматиниб, сунитиниб, регорафениб, авапритиниб, рипретиниб или нилотиниб. ИТК может представлять собой антитело, например,

моноклональные антитела анти-KIT анти-D4 и анти-D5. См. Shi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113(33):E4784-93 (2016). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор KIT представляет собой фрагмент антитела, например, фрагменты двухвалентных антител 2D1-Fc и 3G1-Fc. См. Gall et al., Mol. Cancer Ther. 14(11):2595-605 (2015). Могут использоваться комбинации двух или более ингибиторов ИТК.

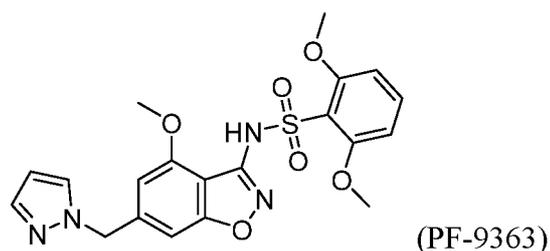
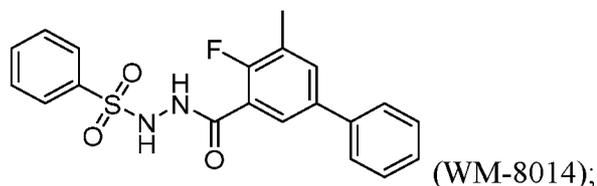
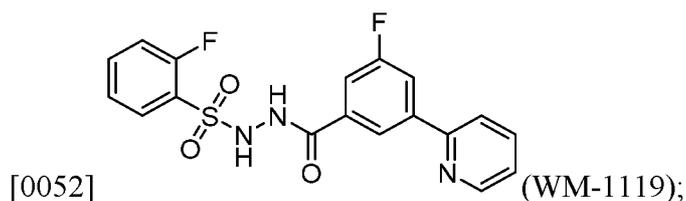
[0048] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ИТК вводят после введения ингибитора менина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ИТК вводят по существу одновременно с введением ингибитора менина (т.е. одновременно). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ИТК вводят до введения ингибитора менина.

### Ингибиторы MOZ

[0049] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительный активный агент может представлять собой эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительный активный агент может представлять собой ингибитор MOZ в терапевтически эффективном количестве. Ингибитор MOZ включает один агент или комбинацию любых агентов, таких как низкомолекулярное соединение, нуклеиновая кислота (например, кРНК) или антитело, пептид, пептидомиметик или аптамер, которые действуют нарушая, прямо или косвенно, и уменьшают или даже устраняют функцию или экспрессию белка MOZ или гена MOZ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор MOZ вводят после введения ингибитора менина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор MOZ вводят по существу одновременно с введением ингибитора менина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор менина комбинируют как с ИТК, так и с ингибитором MOZ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ИТК вводят после введения ингибитора MOZ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ИТК вводят по существу одновременно с введением ингибитора MOZ.

[0050] Репрезентативные примеры ингибиторов MOZ, которые могут быть полезны в практике настоящего изобретения, включают WM-1119 (2-фтор-N'-(3-фтор-5-(пиридин-2-ил)бензоил)бензолсульфоногидразид), WM-8014 (N'-(4-фтор-5-метил-[1,1'-бифенил]-3-карбонил)бензолсульфоногидразид), PF-9363 (N'-(4-фтор-5-метил-[1,1'-бифенил]-3-карбонил)бензолсульфоногидразид) и антитело 21620002 (коммерчески доступное от Novus Biologicals).

[0051] Структуры этих типичных низкомолекулярных ингибиторов MOZ приведены ниже:



[0053] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор MOZ представляет собой интерферирующую РНК (например, киРНК), используемую в качестве активного агента для снижения уровня *MOZ* или уровня другого члена комплекса MOZ. Последовательности нуклеиновых кислот репрезентативных киРНК, которые связываются с членом комплекса MOZ, представлены в Таблице 2.

**Таблица 2:** Последовательности нуклеиновых кислот киРНК, связывающих комплекс MOZ

Олигонуклеотид	Последовательность (5'-->3')
sgBRPF1_A_For	CACCGGCTTAGTCGCCCGCAAGTTG (SEQ ID NO: 9)
sgBRPF1_A_Rev	AAACCAACTTGCGGGCGACTAAGCC (SEQ ID NO: 10)
sgBRPF1_B_For	CACCGAGGCGACCCTAATGCGCTAG (SEQ ID NO: 11)
sgBRPF1_B_Rev	AAACCTAGCGCATTAGGGTCGCCTC (SEQ ID NO: 12)
sgKAT6A_A_For	CACCGTGATAGCCAATCGTAACTGC (SEQ ID NO: 13)
sgKAT6A_A_Rev	AAACGCAGTTACGATTGGCTATCAC (SEQ ID NO: 14)
sgKAT6A_B_For	CACCGTCACTCGAACCGTTAGTTCA (SEQ ID NO: 15)
sgKAT6A_B_Rev	AAACTGAACTAACGGTTCGAGTGAC (SEQ ID NO: 16)
sgMEAF6_A_For	CACCGCATGGCGATGCACAACAAGG (SEQ ID NO: 17)
sgMEAF6_A_Rev	AAACCCTTGTGTGCATCGCCATGC (SEQ ID NO: 18)
sgMEAF6_B_For	CACCGGCGGCTCTTCAGTAAATCCT (SEQ ID NO: 19)

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор MOZ вводят после введения ингибитора менина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор MOZ вводят по существу одновременно с введением ингибитора менина (т.е. одновременно). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор MOZ вводят до введения ингибитора менина.

[0055] Что касается вариантов осуществления настоящего изобретения, которые предполагают введение ИТК и ингибитора MOZ (в дополнение к ингибитору менина), то ингибитор MOZ можно вводить до введения ИТК, по существу одновременно или после введения ИТК.

[0056] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор MOZ вводят после введения ИТК и ингибитора менина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор MOZ вводят по существу одновременно с введением ИТК и ингибитора менина (т.е. одновременно). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор менина вводят после введения ингибитора MOZ и ИТК.

#### Композиции и препараты

[0057] Активные агенты, описанные здесь, могут быть включены в состав фармацевтических композиций в соответствии с известными технологиями. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат эффективное количество ингибитора менина, отдельно или в комбинации с эффективными количествами ИТК и ингибиторов MOZ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат эффективное количество или терапевтически эффективное количество ингибитора менина, отдельно или в комбинации с эффективными количествами или терапевтически эффективными количествами ИТК и ингибиторов MOZ. Активный агент или агенты могут находиться в форме фармацевтически приемлемой соли или его изомера (например, стереоизомеров). Соли и стереоизомеры охватываются терминами «ингибитор(ы)» и «активный агент(ы)». В настоящем документе «фармацевтически приемлемая соль» означает любую нетоксичную соль, которая при введении реципиенту способна обеспечить получение субъектом, прямо или косвенно, соединения или пролекарства соединения по настоящему изобретению. Фармацевтически приемлемые

соли могут быть образованы кислотами, иллюстративные примеры которых включают соляную, серную, уксусную, молочную, винную, яблочную и янтарную кислоты.

[0058] Активные агенты, раскрытые в настоящем документе, и их фармацевтически приемлемые соли и стереоизомеры могут быть использованы по отдельности или вместе, в комбинациях двух или более агентов, при изготовлении композиции конкретного типа в соответствии с традиционной фармацевтической практикой, такой как обычное смешивание, растворение, гранулирование, приготовление драже, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, включения в матрицу и прессования (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York). Тип препарата зависит от предполагаемого способа введения, который может включать энтеральное введение (например, пероральное, буккальное, сублингвальное и ректальное), парентеральное введение (например, подкожное (п/к), внутривенное (в/в), внутримышечное (в/м) и внутригрудное введение, или инфузионные методы, внутриглазное введение, внутриартериальное введение, интрамедуллярное введение, интратекальное введение, внутрижелудочковое введение, чрескожное введение, межкожное введение, интравагинальное введение, внутрибрюшинное введение, введение через слизистые, назальное введение, интратрахеальную инстилляцию, бронхиальную инстилляцию и ингаляцию) и местное введение (например, чрескожное). В общем, наиболее подходящий путь введения будет зависеть от множества факторов, включая, например, природу агента (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или состояние субъекта (например, способен ли субъект переносить пероральное введение). Например, парентеральное (например, внутривенное) введение также может быть выгодным, поскольку ингибитор можно вводить относительно быстро, например, в случае лечения одной дозой и/или в случае острого состояния.

[0059] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активные агенты приготовлены в форме для перорального или внутривенного введения (например, для системной внутривенной инъекции).

[0060] Соответственно, активные агенты могут быть приготовлены в виде твердых композиций (например, порошков, таблеток, диспергируемых гранул, капсул, облаток и суппозиторияев), жидких композиций (например, растворов, в которых растворен ингибитор, суспензий, в которых содержатся твердые частицы ингибитора), дисперсий, эмульсий и растворов, содержащих липосомы, мицеллы или наночастицы, сиропов и эликсиров), полутвердых композиций (например, гелей, суспензий и кремов) и аэрозолей

(с использованием, например, пропеллентов для аэрозольных композиций). Ингибиторы также могут быть приготовлены в виде форм быстрого, промежуточного или пролонгированного высвобождения.

[0061] Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активный ингибитор смешивают с носителем, таким как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и дополнительным носителем или эксципиентом, таким как а) наполнители или экстендеры, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота; b) связующие вещества, такие как, например, метилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и акация, c) увлажнители, такие как глицерин, d) дезинтегрирующие агенты, такие как сшитые полимеры (например, сшитый поливинилпирролидон (кросповидон), сшитая натрийкарбоксиметилцеллюлоза (кроскармеллоза натрия), крахмалгликолят натрия, агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия, e) агенты, замедляющие растворение, такие как парафин, f) ускорители абсорбции, такие как соединения четвертичного аммония, g) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина, h) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина, и i) лубриканты, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. В случае, когда лекарственная форма представлена в виде капсул, таблеток и пилюль, она может также включать буферные агенты. Твердые композиции аналогичного типа также можно использовать для заполнения мягких и твердых желатиновых капсул с использованием таких наполнителей, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярных полиэтиленгликолей и т.п. Твердые лекарственные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, и эти покрытия могут дополнительно содержать агент, придающий непрозрачность.

[0062] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибиторы по изобретению могут быть помещены в твердую или мягкую капсулу, такую как желатиновая капсула. Типичные наполнители, которые можно использовать в этом случае, включают предварительно желатинизированный крахмал, стеарат магния, маннит, стеарилфумарат натрия, безводную лактозу, микрокристаллическую целлюлозу и

кроскармеллозу натрия. Желатиновые оболочки могут включать желатин, диоксид титана, оксиды железа и красители.

[0063] Жидкие лекарственные формы для перорального применения включают растворы, суспензии, эмульсии, микроэмульсии, сиропы и эликсиры. Помимо ингибитора, жидкие лекарственные формы могут содержать водный или неводный носитель (в зависимости от растворимости ингибитора), который обычно используется в данной области техники, такой как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси. Композиции для перорального применения также могут включать эксципиент, иллюстративные примеры которого включают смачивающие агенты, суспендирующие агенты, красители, подсластители, флаворанты и ароматизирующие агенты.

[0064] Препараты для инъекций могут включать стерильные водные растворы или масляные суспензии. Их можно приготовить в соответствии со стандартными методиками с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор, суспензию или эмульсию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Приемлемыми носителями и растворителями, которые можно использовать в данном случае, являются вода, раствор Рингера, другие растворители по USP и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды традиционно используются стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при приготовлении инъекционных препаратов используются жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Препараты для инъекций можно стерилизовать, например, путем фильтрации через фильтр, задерживающий бактерии, или путем включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые перед применением можно растворить или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной среде для инъекций. Эффект действия соединения можно продлить за счет замедления его абсорбции, что можно достичь путем использования жидкой суспензии или кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. Пролонгированная абсорбция ингибитора из препарата,

вводимого парентерально, также может быть достигнута путем суспендирования ингибитора в масляном носителе.

### Дозировка

[0065] Используемые здесь термины «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» относятся к количеству активного агента, раскрытого в настоящем документе (например, ингибитора менина, ИТК или ингибитора MOZ) или его фармацевтически приемлемой соли или изомера. Таким образом, термины «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» охватывают количества активных агентов, которые при введении вызывают положительную модификацию GIST или достаточны для ингибирования развития или прогрессирования GIST, или облегчают в некоторой степени один или несколько симптомов GIST, или просто устраняют или ингибируют рост GIST, или иным образом блокируют или снижают активность комплекса менин-MLL в патологических клетках. Эффективное количество активного агента может варьироваться в зависимости от нескольких факторов, среди которых могут быть тяжесть и стадия GIST, способ введения, возраст, масса тела и общее состояние здоровья субъекта, а также другие факторы, хорошо известные в области медицины. См., например, Goodman and Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th Edition, A. Gilman, J. Hardman and L. Limbird, ed., McGraw-Hill Press, 155-173, 2001. В конечном итоге лечащий врач или ветеринар самостоятельно определяет подходящее количество и режим дозировки активных агентов.

[0066] Активные агенты, полезные при осуществлении настоящего изобретения, могут быть эффективны в широком диапазоне доз. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения общая суточная доза активного агента (например, для взрослых людей) может находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 1600 мг, от 0,01 до приблизительно 1600 мг, от 0,01 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 100 мг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мг, от 1 до приблизительно 100-400 мг в день, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг в день и от приблизительно 5 до приблизительно 40 мг в день, и в других вариантах осуществления настоящего изобретения от приблизительно 10 мг до приблизительно 30 мг в день. Индивидуальные дозировки могут быть представлены таким образом, чтобы они содержали желаемую дозу в зависимости от количества приемов активного агента в день. Например, капсулы могут быть приготовлены с содержанием активного агента от приблизительно 1 до приблизительно 200 мг (например, 1, 2, 2,5, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, и 200 мг). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

индивидуальные дозы могут быть представлены таким образом, чтобы они содержали желаемую дозу в зависимости от количества приемов активного агента в день.

[0067] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подходящие суточные дозы ингибитора менина могут находиться в диапазоне от 1 нг/кг до приблизительно 200 мг/кг, от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг или от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг массы тела. Другие дозировки ингибиторов менина известны в данной области техники. См., например, публикации международных заявок WO 2017/112768, WO 2017/214367, WO 2018/053267, WO 2020/069027 A1, WO 2021/207335 A1 и публикации заявок на патент США 2021/0115018 A1 и 2019/0307 750.

[0068] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения суточная доза ИТК, такого как иматиниб, составляет приблизительно 100 мг/день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор КИТ вводят в суточной дозе, составляющей приблизительно 300 мг/день, приблизительно 340 мг/день, приблизительно 400 мг/день, приблизительно 600 мг/день или приблизительно 800 мг/день.

[0069] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения суточная доза ИТК, такого как сунитиниб, составляет приблизительно 50 мг. Например, его перорально вводят один раз в день в течение 4 недель с последующими 2 неделями перерыва в лечении, обычно в форме твердых желатиновых капсул, содержащих 12,5, 25 или 50 мг сунитиниба.

[0070] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения суточная доза ИТК, такого как регорафениб, составляет приблизительно 160 мг. Например, его перорально вводят в течение 21 дня с последующим перерывом лечения в течение одной недели, обычно в форме таблеток с пленочным покрытием, содержащих 40 мг регорафениба.

[0071] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения суточная доза ИТК, такого как авапритиниб, составляет приблизительно 300 мг. Например, его перорально вводят один раз в день, обычно в форме капсул с пленочным покрытием, содержащих 25, 50, 100, 200 или 300 мг авапритиниба.

[0072] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения суточная доза ИТК, такого как рипретиниб, составляет приблизительно 150 мг. Например, его перорально вводят один раз в день, обычно в форме таблеток содержащих 50 мг рипретиниба.

[0073] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения суточная доза ИТК, такого как нилотиниб, составляет приблизительно 300-400 мг. Например,

твердые капсулы, содержащие 150 и 200 мг нилотиниба, обычно принимают два раза в день натощак приблизительно с 12-часовыми интервалами.

[0074] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения суточная доза ингибитора MOZ может находиться в диапазоне от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 50 мг на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доза ингибитора MOZ может находиться в диапазоне от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мг на килограмм массы тела субъекта, а в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения от приблизительно 3 мкг до приблизительно 1 мг на килограмм массы тела субъекта.

[0075] Способы настоящего изобретения могут предусматривать введение ингибитора менина и, необязательно, одного или нескольких дополнительных активных агентов или их фармацевтических композиций пациенту в однократной дозе или в нескольких дозах (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 или более доз). Например, частота введения может варьироваться от одного раза в день до приблизительно одного раза в восемь недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частота введения варьируется приблизительно от одного раза в день в течение 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель, а в других вариантах осуществления предусмотрен 28-дневный цикл, который включает ежедневное введение в течение 3 недель (21 день с последующим 7-дневным перерывом лечения или прием в течение 4 недель с последующим 14-дневным перерывом лечения. В других вариантах осуществления настоящего изобретения активный агент(ы) можно вводить дважды в день ((BID) две дозы в день) в течение двух с половиной дней (всего 5 доз) или один раз в день ((QD) одна доза в день) в течение двух дней. (всего 2 дозы). В других вариантах осуществления настоящего изобретения активный агент(ы) можно вводить один раз в день (QD) в течение пяти дней.

#### Дополнительная комбинированная терапия

[0076] Способы настоящего изобретения могут предусматривать введение по меньшей мере еще одного активного противоракового агента. Типичные противораковые агенты раскрыты в патенте США № 9101622 (см. раздел 5.2).

[0077] Другие методы лечения включают иммунотерапию, химиотерапию и лучевую терапию.

[0078] Иммунотерапия, которая включает ингибиторы иммунных контрольных точек, может использоваться для лечения диагностированного рака. Молекулы иммунных контрольных точек включают, например, PD1, CTLA4, KIR, TIGIT, TIM-3, LAG-3, BTLA, VISTA, CD47 и NKG2A. Клинически доступные примеры ингибиторов иммунных

контрольных точек включают дурвалумаб (имфинзи®), атезолизумаб (тецентрик®) и авелумаб (бавенсио®). Клинически доступные примеры ингибиторов PD1 включают ниволумаб (опдиво®), пембролизумаб (кейтруда®) и цемиплимаб (либтайо®).

[0079] Комбинированные химиотерапевтические препараты включают, например, абраксан®, альтретамин, доцетаксел, гецептин®, метотрексат, новантрон®, золадекс®, цисплатин (CDDP), карбоплатин, прокарбазин, мехлоретамин, циклофосфамид, камптотецин, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, нитромочевину, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, блеомицин, поликомицин, митомицин, этопозид (VP16), тамоксифен, ралоксифен, агенты, связывающие рецепторы эстрогена, таксол®, гемцитабин, навельбин®, ингибиторы фарнезилпротеиновой трансферазы, трансплатин, 5-фторурацил, винкристин, винбластин и метотрексат или любой их аналог или производный вариант, а также их комбинации.

[0080] Комбинированная лучевая терапия предусматривает использование так называемых гамма-лучей, рентгеновских лучей и/или направленную доставку радиоизотопов к опухолевым клеткам, которые вызывают широкий спектр повреждений ДНК, нарушений репликации и репарации ДНК, а также сборки и поддержание хромосом. Диапазоны доз радиоизотопов широко варьируются и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения, а также поглощения неопластическими клетками и поэтому дозы определяются лечащим врачом.

[0081] Лучевая терапия может предусматривать внешнюю или внутреннюю лучевую терапию. Внешняя лучевая терапия предполагает использование источника радиации вне тела субъекта и направление излучения на область рака внутри тела. Внутренняя лучевая терапия предусматривает использование радиоактивного вещества, запечатанного в иглы, источники, шнуры или катетеры, которые помещаются непосредственно в раковую опухоль или рядом с ней.

### Наборы

[0082] Фармацевтические композиции могут быть собраны в набор или фармацевтическую систему для применения при лечении GIST. Наборы или фармацевтические системы могут включать один или несколько лекарственных препаратов, содержащих ингибитор менина и фармацевтически приемлемый носитель, помещенные в подходящий контейнер, например, пробирку, флакон, ампулу, бутылку, шприц или пакет. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор или фармацевтическая система также может включать одну или несколько лекарственных форм ИТК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор или

фармацевтическая система также может включать одну или несколько лекарственных форм ингибитора MOZ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор или фармацевтическая система также может включать одну или несколько лекарственных форм ингибитора ИТК и одну или несколько лекарственных форм ингибитора MOZ. Дополнительные активные вещества могут быть представлены отдельно или могут быть представлены вместе в одной лекарственной форме, и они могут быть помещены в один или отдельные контейнеры. Наборы или фармацевтические системы по настоящему изобретению также могут включать печатные инструкции по применению содержащегося в них дополнительного активного вещества (веществ).

[0083] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор включает ингибитор менина и ИТК в одной лекарственной форме. В других вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор менина и ИТК содержатся в разных лекарственных формах.

[0084] Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут дополнительно пояснены при рассмотрении следующих рабочих примеров, которые предназначены для иллюстрации частных вариантов осуществления изобретения, при этом они не предназначены для ограничения объема изобретения, определенного формулой изобретения.

## **ПРИМЕРЫ**

### Пример 1: Материалы и методы

[0085] Культура клеток и продуцирование вирусов. Все клеточные линии показали отрицательный результат в отношении микоплазменную инфекцию, при контроле с использованием набора MilliporeSigma Cat# MP0025-1КТ. Клеточную линию эмбриональной почки человека (НЕК) 293FT (Thermo Fisher Scientific Cat# R70007, RRID: CVCL\_6911) и клеточные линии GIST GIST-T1 (Cosmo Bio Cat# PMC-GIST01-COS, RRID: CVCL\_4976; мутация КИТ в экзоне 11  $\Delta$ 560-578), GIST430 (RRID: CVCL\_7040; мутация КИТ в экзоне 11  $\Delta$ 560-576), GIST48B (RRID: CVCL\_M441; КИТ-независимый) и GIST882 (RRID: CVCL\_7044; мутация КИТ в экзоне 13 K642E) культивировали в модифицированной по Дульбекко среде Игла, содержащей 10% FBS (фетальной телячьей сыворотки), 2 мМ L-глутамин, 100 мг/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина. Линии спасательных клеток *KIT*, независимые от энхансера *KIT*, были получены, как описано ранее (Hemming et al., Cancer Research 79:994–1009 (2019)). Некоммерческие клеточные линии получены из лаборатории Джонатана Флетчера в период с 2014 по 2016 год. Экзоны КИТ секвенировали для подтверждения ожидаемых кодирующих мутаций и

клеточной идентичности клеточных линий GIST, и клетки размораживали из исходных или производных запасов и использовали для описанных ниже экспериментов, выполненных в течение приблизительно 3 месяцев. Трансфекции осуществляли с помощью набора X-tremeGene (Roche, Cat# 6365809001). Продуцирование лентивирусов осуществляли, как описано ранее (Hemming et al., PLoS Biol. 6:e2571-15 (2008)). Вкратце, клетки 293FT котрансфицировали pMD2.G (Addgen #12259), psPAX2 (Addgen #12260) и лентивирусной экспрессирующей плазмидой. Вирусный супернатант собирали приблизительно через 72 часа, а дебрис удаляли центрифугированием при 1000 g в течение 5 минут. Клетки трансдуцировали вирусным супернатантом и полибренном в концентрации 8 мкг/мл путем спинокуляции при 680 g в течение 60 минут. Лекарственные препараты применялись в указанных концентрациях, и они включали иматиниб (LC Laboratories Cat# I-5508), WM-1119 (Selleck Chemicals Cat# S8776), VTP-50469 (подарок Syndax Pharmaceuticals), таземетостат (Selleck Chemicals Cat# S7128), и EPZ-5676 (Selleck Chemicals, Cat# S7062). Для анализа роста во времени  $15 \times 10^3$  клеток распределяли в лунки 96-луночного планшета, трансдуцировали вирусом или обрабатывали лекарственным средством, и проводили подсчет клеток приблизительно два раза в неделю на проточном цитометре Guava easyCyte (Luminex Corporation) с нормализацией количества клеток до контрольного состояния.

[0086] Геномный CRISPR скрининг. Нокаутную библиотеку Liu Human CRISPR (Addgene #1000000132; Fei et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116:25186-95 (2019)) нацеленную на 18436 генов с 185634 sgRNA, разделяли на две объединенные библиотеки, H1 и H2, содержащие приблизительно 5 sgRNA на ген в каждой библиотеке. Каждый вирион содержал sgRNA, Cas9 и ген устойчивости к пурамицину, полученный из lentiCRISPRv2. Клеточные линии GIST-T1 и GIST430 трансдуцировали каждой библиотекой в двух повторностях (всего  $n = 8$ ). Для каждой трансдукции библиотеки трансдуцировали  $44,64 \times 10^6$  клеток при целевом уровне МОI равном 0,3 с предполагаемым охватом библиотеки 134x. Для отбора клеток через 72 часа наносили пурамицин. Клетки пассировали при слиянии для поддержания покрытия библиотеки >134x в течение приблизительно 30 дней. По окончании эксперимента геномную ДНК экстрагировали из  $30 \times 10^6$  клеток на библиотеку. Область sgRNA между U6 и EF-1 $\alpha$  амплифицировали с 200 мкг геномной ДНК из каждого экспериментального повтора в 32 отдельных реакциях по 100 мкл. Продукт объединяли и проводили вторую ПЦР-реакцию для включения адаптеров Illumina и кода длиной в 6 пар оснований. Третью реакцию ПЦР проводили для обогащения полноразмерными ампликонами (праймеры подробно описаны в Таблицах 1 - 3). Конечные библиотеки ампликонов очищали электрофорезом в

агарозном геле и экстрагировали с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Cat# 28704). Секвенирование следующего поколения проводили на NovaSeq 6000 (Illumina). Для анализа данных скрининга использовали программное обеспечение MAGeCK (версия 0.5.8) (Wang et al., Nat. Protoc. 14(3):756-780 (2019)). Команду «count» использовали для генерации количества чтений всех библиотек (n = 8), при этом исходную плазмидную библиотеку (n = 2) использовали в качестве базового контроля. Общее количество нормализовали между образцами, чтобы минимизировать влияние глубины секвенирования. Для генерации  $\beta$ -показателей использовали команду оценки максимального правдоподобия для каждого скрининга в отношении данных, нормализованных для контроля sgRNA для AAVS1, содержащихся в библиотеках Н1 и Н2. Команду «metascape» использовали для анализа обогащения онтологических генов (Zhou et al., Nat. Commun. 10(1):1523 (2019)).

**Таблица 3:** Последовательности нуклеиновых кислот для репрезентативных праймеров

Олигонуклеотид	Последовательность (5'-->3')	Применение (назначение)
sgDOT1L_e1_For	CACCGACGTAGACCGGCAGCGGCCA (SEQ ID NO: 21)	sgRNA
sgDOT1L_e1_Rev	AAACTGGCCGCTGCCGGTCTACGTC (SEQ ID NO: 22)	sgRNA
sgDOT1L_e8_For	CACCGCGAATCGCCAACACGAGGTA (SEQ ID NO: 23)	sgRNA
sgDOT1L_e8_Rev	AAACTACCTCGTGTTGGCGATTTCGC (SEQ ID NO: 24)	sgRNA
GAPDH_For	TGCACCACCAACTGCTTAGC (SEQ ID NO: 25)	qPCR
GAPDH_Rev	GGCATGGACTGTGGTCATGAG (SEQ ID NO: 26)	qPCR
NPR3_For	AGGGTTTGCACACGTCCATC (SEQ ID NO: 27)	qPCR
NPR3_Rev	GTCACTGCTCGCACACATGA (SEQ ID NO: 28)	qPCR
DUSP6_For	CTCTACGACGAGAGCAGCAG (SEQ ID NO: 29)	qPCR

DUSP6_Rev	AGACACCACAGTTCTTGCCC (SEQ ID NO: 30)	qPCR
USP1_For	TCGCACCCACACTCATTCG (SEQ ID NO: 31)	qPCR
USP1_Rev	GGGCTACCTCTTGAAAGTCCA (SEQ ID NO: 32)	qPCR
CRISPR_1st_For	AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACT TGAAAGTATTTTCG (SEQ ID NO: 33)	Праймер для 1-го скринирования CRISPR
CRISPR_1st_R	TCTACTATTCTTTCCCTGCACTGTGAC TGTGGGCGATGTGCGCTCTG (SEQ ID NO: 34)	Праймер для 1-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_For_01	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTtCAAGGTCAtcttggaaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 35)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_For_02	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTatGCATAACTtcttggaaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 36)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_For_03	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTgatCTCTGATTtcttggaaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 37)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_For_04	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTcgatTACGTACGtcttggaaaggacgaaacacc g (SEQ ID NO: 38)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_For_05	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTtcatTACGCGTTtcttggaaaggacgaaacac cg (SEQ ID NO: 39)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR

CRISPR_2nd_For_06	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTatcgatCTCAGTGAtcttggaaaggacgaaaca ccg (SEQ ID NO: 40)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_For_07	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTgatcgatTCTGATATtcttggaaaggacgaaac accg (SEQ ID NO: 41)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_For_08	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTcgatcgatCATATGCTtcttggaaaggacgaa caccg (SEQ ID NO: 42)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_For_09	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTacgatcgatCGTAATTAAtcttggaaaggacgaa acaccg (SEQ ID NO: 43)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_For_10	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTtACGTACTCtcttggaaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 44)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_Rev_01	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAA GGTCAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTacgatcgatTCTACTATTCT TCCCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 45)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_Rev_02	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCA TAACTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTcgatcgatTCTACTATTCTT TCCCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 46)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR

CRISPR_2nd_Rev_03	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTC TGATTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTgatgatTCTACTATTCTT TCCCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 47)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_Rev_04	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAC GTACGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTatcgatTCTACTATTCTTT CCCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 48)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_Rev_05	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAC GCGTTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTtcgatTCTACTATTCTTTC CCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 49)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_Rev_06	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTC AGTGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTcgatTCTACTATTCTTTC CCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 50)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_Rev_07	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCT GATATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTgatTCTACTATTCTTCC CCTGCACTGT (SEQ ID NO: 51)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_Rev_08	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAT ATGCTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTatTCTACTATTCTTTCCC CTGCACTGT (SEQ ID NO: 52)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_2nd_Rev_09	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGT AATTAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTtTCTACTATTCTTTCCC CTGCACTGT (SEQ ID NO: 53)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR

CRISPR_2nd_Rev_10	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACG TACTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTacgatcgatTCTACTATTCT TTCCCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 54)	Праймер для 2-го скринирования CRISPR
CRISPR_3rd_For	AATGATACGGCGACCACCGAGATC (SEQ ID NO: 55)	Праймер для 3-го скринирования CRISPR
CRISPR_3rd_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT (SEQ ID NO: 56)	Праймер для 3-го скринирования CRISPR

[0087] Клонирование и CRISPR. Клеточные линии, стабильно экспрессирующие стрептококк, с оптимизированными кодонами человека *Streptococcus pyogenes* Cas9 (Addgene #73310), получали путем вирусной трансдукции. Одноцепочечные РНК CRISPR (sgRNA) получали с использованием технологии ЧОПЧОП (Labun et al., *Nucleic Acids Research* 44:W272-6 (2016)) (chopchop.cbu.uib.no), клонированных в Lenti-sgRNA-EFS-GFP (LRG, Addgene #65656), модифицированных заменой GFP на сорGFP, связанные с геном устойчивости к пуромицину, с помощью пептида 2A, как подробно описано в Таблицах 1 - 3. Векторы экспрессии BioID синтезировали с оптимизацией кодонов для изменения последовательностей связывания sgRNA (Twist Bioscience). Доступ к данным портала Dependency Map (DepMap) осуществляли через depmap.org (Barretina et al., *Nature* 483:603-7 (2012)), используя общедоступные выпуски CRISPR (Avana) 20Q3-20Q4.

[0088] Клеточный цикл и апоптоз. Анализ клеточного цикла проводили после обработки препаратом в течение 72 часов (иматиниб) или 8 дней (VTP-50469, WM-1119). Клетки трипсинизировали, промывали PBS и фиксировали в 70% этаноле. Для окрашивания ядерной ДНК использовали йодид пропидия в концентрации 25 мкг/мл (Life Technologies Cat# P1304MP) и РНКазу А в концентрации 0,2 мг/мл (Thermo Fischer Scientific Cat# EN0531). Анализ проводили на проточном цитометре Guava easyCyte (Luminex Corporation), и содержание ядер в отдельных клетках оценивали с использованием программного обеспечения Guava InCyte. Апоптоз и гибель клеток измеряли после 72 часов обработки препаратом с использованием реагента гуава-нексин (Luminex Corporation Cat# 4500-0450) в соответствии с рекомендациями производителя. Неапоптотические клетки окрашивались отрицательно на аннексин V и 7-AAD, ранние апоптотические клетки окрашивались положительно на аннексин V, но отрицательные на

7-AAD и поздние апоптотические и мертвые клетки окрашивались положительно как на аннексин V, так и на 7-AAD. Окрашивание анализировали на проточном цитометре Guava easyCyte, а данные анализировали с использованием программного обеспечения Guava InCyte.

[0089] Количественная RT-PCR (количественная ПЦР с обратной транскрипцией; qRT-PCR). Клетки трипсинизировали и промывали PBS для экстракции РНК с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen Cat# 74106). Библиотеки кДНК получали с использованием набора для синтеза кДНК SuperScript IV VILO (Invitrogen Cat# 11766050). RT-PCR проводили с использованием Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies Cat# 4367659) на системе для проведения ПЦР в реальном времени QuantStudio 6 Flex (Thermo Fischer Scientific). Относительные уровни мРНК рассчитывали методом  $\Delta\Delta C_t$ , используя в качестве эталона экспрессию GAPDH. Праймеры показаны в Таблицах 1 - 3.

[0090] RNA-seq (секвенирование РНК). Тотальную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus Kit (Qiagen Cat# 74136), концентрацию измеряли с помощью Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), а качество - с помощью TapeStation 4200 (Agilent). Подготовку библиотеки осуществляли с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra II (New England Biolabs, Cat# E7645S). Секвенирование парных концов длиной 150 п.о. проводили на NovaSeq 6000 (Illumina). Данные секвенирования РНК были приведены в соответствие с hg19 с использованием STAR (Dobin et al., *Bioinformatics* 29:15-21 (2012)) с количественной оценкой экспрессии с использованием Cufflinks (Trapnell et al., *Nat. Biotechnol.* 28:511-5 (2010)) для генерации значений экспрессии генов в фрагментах из расчета тысяч оснований транскрипта на миллион картированных чтений (FPKM). Анализ обогащения набора генов (GSEA, RRID:SCR\_003199) (Subramanian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15545-50 (2005)) проводили с использованием перечня генов Hallmark из базы данных молекулярных сигнатур Molecular Signatures Database.

[0091] Анализы ChIP-seq и Cut&Tag. Для ChIP-seq приблизительно 20x10<sup>6</sup> клеток инкубировали в 1% формальдегиде в течение 10 минут. После фиксации избыток формальдегида гасили глицином при концентрации 0,125 М в течение 5 мин. Образцы промывали PBS, а интактные ядра суспендировали в буфере SDS (0,5% SDS, 50 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА с коктейлем ингибиторов протеаз (Roche Cat# 11873580001)) и обрабатывали ультразвуком в аппарате для фокусированного воздействия ультразвука E220 (Covaris), Inc.). Обработанные ультразвуком образцы центрифугировали при 20 000 g для осветления, супернатант разбавляли до <0,1% SDS, а затем в течение ночи инкубировали с белком А на гранулах Dynabeads (Life Technologies Cat# 10002D),

предварительно связанным с антителом (H3K9ac, Active Motif Cat# 39137, RRID:AB\_2561017; H3K4me3, Abcam Cat# ab8580, RRID:AB\_306649; BRPF1, Thermo Fisher Scientific Cat# PA5-27783, RRID:AB\_2545259; KAT6A, Cell Signaling Technology Cat# 78462; HA, Cell Signaling Technology Cat# 3724, RRID:AB\_1549585; DOT1L, Cell Signaling Technology Cat# 77087, RRID:AB\_2799889; H3K79me2, Cell Signaling Technology Cat# 5427, RRID:AB\_10693787). Образцы последовательно промывали буфером А (150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 5% сахарозы, 1% тритона X-100, 0,2% SDS, 20 mM трис), буфером В (5 mM ЭДТА, 1% тритона X-100, 0,1% дезоксихолата, 20 mM Трис), буфер С (250 mM LiCl, 1 mM ЭДТА, 0,5% NP40, 0,5% дезоксихолата, 10 mM Трис) и ТЕ после ресуспендирования гранул в элюирующем буфере (200 mM NaCl, 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS), и инкубировали в течение 12-15 часов при 65°C для обращения сшивок. ДНК очищали с использованием гранул AMPureXP (Beckman Coulter, Cat# A63881) в соответствии с рекомендациями производителя, и качество очистки оценивали с помощью набора для анализа Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Cat# Q32854) и TapeStation 4200 (Agilent). Библиотеки секвенирования готовили с использованием набора ThruPLEX DNA-seq Kit (Takara Bio Cat# R400675) и секвенировали на системе NextSeq 500 или 550 (Illumina). Нормализацию вставки ChIP-seq осуществляли с помощью антитела для вставки, с предварительным связыванием (Active Motif Cat# 61686) вместе с интересующим IP-антителом с гранулами Dynabeads. Равные количества хроматина *Drosophila melanogaster* (Active Motif Cat# 53083) добавляли к подготовленному хроматину из клеток GIST в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные секвенированные образцы были сопоставлены с геномом дрозофилы, при этом общее количество чтений от дрозофилы использовалось для нормализации количества чтений в образцах от *Homo sapiens*.

[0092] Анализ Cut&TAG проводили, как описано ранее (Кауа-Окур et al., Nat. Commun. 10(1):1930 (2019)) с использованием слитого белка А и транспозазы Tn5 (Addgene #124601). Вкратце, 100000 клеток GIST-T1 промывали промывочным буфером (20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM спермидина, смесь ингибиторов протеаз) и связывали с гранулами конканавалина А (Bangs Laboratories, Cat# BP531) в течение 15 минут при комнатной температуре. Связанные клетки ресуспендировали в 50 мкл промывочного буфера Dig (20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM спермидина, смесь ингибиторов протеаз, 2 mM ЭДТА, 0,05% дигитонина) и инкубировали с антителами, разведенными в соотношении 1:100, в течение ночи при 4°C (менин, Bethyl Cat# A300-105A, RRID:AB\_2143306; MLL1n, Bethyl Cat# A300-086A, RRID:AB\_242510). Для сбора гранул использовали магнит, клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера Dig-

Wash с вторичным антителом, разведенным в соотношении 1:100, и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Клетки трижды промывали в буфере Dig-Wash и ресуспендировали в буфере Dig-Med (0,05% дигитонина, 20 mM HEPES, pH 7,5, 300 mM NaCl, 0,5 mM спермидина, смесь ингибиторов протеаз), содержащем 1:250 транспозазы рА-Tn5 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Клетки трижды промывали буфером Dig-Med и ресуспендировали в 300 мкл буфера для тагментации (10 mM MgCl<sub>2</sub> в буфере Dig-Med) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Тагментацию останавливали добавлением 10 мкл 0,5 M ЭДТА, 3 мкл 10% SDS и 2,5 мкл 20 мг/мл протеиназы К (Invitrogen Cat# 25530049) и образцы инкубировали при 50°C в течение 1 часа. Меченую ДНК очищали экстракцией с метью фенол:хлорформ:изоамиловый спирт, водный слой подвергали осаждению этанолом, и ДНК ресуспендировали в 30 мкл TE. Для каждого образца 21 мкл ДНК смешивали с универсальным праймером i5 и уникальным праймером i7 с кодом, и амплифицировали с использованием NEBNext High Fidelity 2x PCR Master Mix (New England Biolabs Cat# M0541S) в термоциклере при следующих условиях: 98°C в течение 30 секунд; 14 циклов при 98°C в течение 10 секунд, 63°C в течение 10 секунд; 72°C в течение 2 минут. ДНК очищали с помощью гранул AMPureXP в соответствии с рекомендациями производителя, а качество очистки оценивали с помощью набора Qubit dsDNA HS Assay Kit и TapeStation 4200. Образцы секвенировали на системе NextSeq 550 (Illumina).

[0093] Все данные секвенирования выравнивали со сборкой эталонного генома человека hg19 с использованием программы Bowtie2 (Langmead et al., *Genome Biol.* 10:R25.1-R25.10 (2009)). Нормализованную плотность считывания рассчитывали с помощью калькулятора плотности считывания Bamliquidator (версия 1.0). Выровненные прочтения удлиняли на 200 п.о. и рассчитывали плотность чтения на пару оснований. В каждой области плотность чтений нормализовали на основе общего количества миллионов сопоставленных чтений, получая плотность считывания в единицах чтений на миллион сопоставленных чтений (rpm) на пар оснований (п.о.) (rpm/bp). Обнаружение пиков осуществляли с помощью анализа на основе модели для анализа ChIP-seq (MACS, версия 1.4.2, Feng et al., *Nature Protocols* 7:1728-40 (2012)) и ROSE2 (Lovén et al., *Cell* 153:320.-34 (2013)) использовался для выявления областей обогащения сигнала. Отдельные дисплеи треков ChIP-seq получали с использованием bamplot ([github.com/linlabbcm](https://github.com/linlabbcm)). Визуализации тепловых карт данных анализа ChIP-seq получали с использованием ChAsE (Younesy et al., *Bioinformatics* 32:3324-6 (2016)).

[0094] Иммуноблоттинг. Клетки лизировали в буфере RIPA, содержащем смесь ингибиторов протеаз (Roche Cat# 11873580001), и центрифугировали при 14000 g в

течение 10 минут для удаления геномной ДНК и дебриса. Концентрации белка определяли с использованием анализа на основе бицинхониновой кислоты (Pierce Biotechnology Cat# 23225). Образцы белка подвергали SDS-PAGE и вестерн-блоттингу со следующими антителами к: HA (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat# 2367, RRID:AB\_10691311), MEAF6 (1:500, Proteintech, Cat# 26465-1-AP, RRID:AB\_2880524), актину (1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 4967, RRID:AB\_330288), менину (1:10000, Bethyl, Cat# A300-105A, RRID:AB\_2143306) или стрептавидин-HRP (1:40000, Abcam, Cat# ab7403). Вестерн-блоттинги анализировали с помощью вторичных антител против мыши или против кролика, и детектировали с использованием системы инфракрасной визуализации Odyssey CLx (LI-COR Biosciences) или с использованием стрептавидин-HRP методом хемилюминесценции (MilliporeSigma Cat# WBKLS0500). Представленные иммуноблоты отражают результаты как минимум для трех независимых экспериментов.

[0095] Масс-спектрометрия и анализ BioID. Получали клеточные линии GIST-T1, которые стабильно экспрессировали контрольные или экспериментальные мутантные слитые белки, меченные биотинлигазой (BirA\* R118G). Меченный биотином (24 часа) цельноклеточный лизат подвергали снижению аффинности в течение ночи при 4°C с использованием стрептавидин-сефарозных гранул (GE Healthcare Cat# 17-5113-01). Гранулы трижды промывали 2% SDS в 50 mM Трис, дважды в буфере BioID (50 mM Трис, 500 mM NaCl, 0,4% SDS), шесть раз в 50 mM Трис и ресуспендировали в 100 мкл бикарбоната аммония. Образцы подвергали триптическому расщеплению, а гранулы и соли удаляли на стадии очистки в обращенной фазе. Экстракты сушили в проточном вакууме, а затем восстанавливали в 5-10 мкл смеси 2,5% ацетонитрила и 0,1% муравьиной кислоты. Наномасштабную капиллярную колонку для ВЭЖХ с обращенной фазой получали путем упаковки сферических шариков кремнезема C18 диаметром 2,6 мкм в капилляр из плавленого кварца (внутренний диаметр 100 мкм и длина ~30 см) с наконечником, полученным пламенной вытяжкой. После уравнивания колонки каждый образец загружали через автоматический пробоотборник Famos (LC Packings). Формировали градиент и пептиды элюировали возрастающими концентрациями смеси 97,5% ацетонитрила и 0,1% муравьиной кислоты. По мере элюирования пептидов их подвергали ионизации электрораспылением, а затем вводили в масс-спектрометр с ионной ловушкой LTQ Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific). Пептиды детектировали, выделяли и фрагментировали для получения tandemного масс-спектра конкретных ионов-фрагментов для каждого пептида. Пептидные последовательности (и, следовательно, идентичность белков) определяли путем сопоставления баз данных белков с полученным паттерном фрагментации с помощью программы Sequest (Thermo Fisher Scientific). Все

базы данных включают обращенную версию всех последовательностей, и данные были отфильтрованы с уровнем ложного обнаружения пептидов от одного до двух процентов. Количественное определение интенсивности сигнала без метки использовали в повторных образцах для количественного сравнения. Тепловые карты логарифмического 2-кратного изменения сигнала по сравнению с ДМСО получали с использованием программы Morpheus ([software.broadinstitute.org/morpheus/](http://software.broadinstitute.org/morpheus/)).

[0096] Модели ксенотрансплантатов. Ксенотрансплантат получен от пациента PG27, перенесшего хирургическое вмешательство по клиническим показаниям, и после его письменного информированного о согласии на протокол исследования, одобренный IRB Института рака Дана-Фарбер. Криоконсервированную опухоль или клеточную линию GIST-T1, смешанную в соотношении 1:1 с матригелем, имплантировали подкожно 6-недельным самкам голых мышей (NU/NU; Charles River Laboratories). GIST-T1 дал отрицательный результат на микоплазму и патогены грызунов (Charles River Laboratories). Для оценки *in vivo* роста CRISPR/Cas9-модифицированной клеточной линии, клетки GIST-T1/Cas9 обрабатывали указанными sgRNA и отбирали *in vitro* пуромицином в течение 14 дней перед двусторонней фланговой имплантацией. Для исследований по лечению лекарственными средствами мышей с единичными трансплантатами включали в группы лечения, когда опухоли достигали размера приблизительно 100-200 мм<sup>3</sup>, измеренного штангенциркулем и определенного по уравнению объема опухоли: объем = длинный диаметр<sup>2</sup> x короткий диаметр x 0,5. Мышей случайным образом распределяли группы лечения, и им вводили иматиниб (50 мг/кг через зонд ежедневно, 5 дней в неделю), WM-1119 (50 мг/кг через зонд 3 раза в день, 7 дней в неделю), VTP-50469 (0,1% в рационе) или проводили комбинированное лечение. Иматиниб назначали в дозе ниже максимально переносимой, чтобы облегчить тестирование комбинированного лечения. Для предварительного определения размера выборки статистические методы не использовали, и ни одно животное не погибло во время лечения исследуемыми препаратами. Две мыши с ксенотрансплантатами клеточной линии GIST-T1 в контрольных группах были исключены из анализа, поскольку первоначально измеренный подкожный имплантат не рос. Одна мышь с необычной опухолью в группе VTP-50469 (Фиг. 7D) была исключена из исследования из-за раннего прекращения лечения из-за быстрого роста опухоли. Опухоли иссекали и фиксировали в 10% формалине для дополнительных исследований, включая окрашивание H&E и иммуногистохимию рассеченных опухолей. Из фиксированных опухолей вырезали срезы толщиной 4 мкм и их окрашивали Ki-67 (1:400, Cat#9027, Cell Signaling Technology) и расщепленной каспазой-3 (1:250, Cat#9579, Cell Signaling Technology). Реакции проводили с использованием

наборов субстратов DAB (Cell Signaling Technology, Cat# 8059) или NovaRed (Vector Laboratories, Cat# SK-4800) в соответствии с рекомендациями производителя. Все процедуры проводили в соответствии с протоколами, одобренными Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Института рака Дана-Фарбер.

[0097] Статистический анализ. Центральные значения, интервалы погрешностей, пороговые значения величин  $P$ , количество повторов и используемые статистические методы указаны в соответствующих надписях на фигурах. Для столбчатых диаграмм прямоугольник простирается от 25-го до 75-го перцентиля, при этом центральная линия указывает медиану, а интервалы относятся к 10-му и 90-му перцентилю. Размеры выборок заранее не были определены.

[0098] Доступность данных и материалов. Новые данные по секвенированию доступны по номеру публикации исследования GEO GSE172154. Дополнительные наборы данных по анализам RNA-seq, ATAC-seq и ChIP-seq, полученные в этом исследовании, включены в публикации исследований GSE95864 (Hemming et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115(25): E5746-E5755 (2018)), GSE113207 и GSE113217 (Hemming et al., Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)).

#### Пример 2: Полногеномный скрининг выявляет эпигенетические зависимости GIST

[0099] Глобальный пространственный профиль транскрипции и энхансеров GIST был охарактеризован с использованием РНК-секвенирования, иммунопреципитации хроматина с секвенированием (анализ ChIP-seq) и анализа доступного для транспозазы хроматина с использованием секвенирования (анализ ATAC-seq). Эти исследования сосредоточены на TF, имеющих отношение к биологии GIST, включая основные TF, такие как ETV1, FOXF1, NIC1 и OSR1, присутствующие в образцах GIST, а также дополнительные TF BARX1 и HAND1, экспрессируемые в паттернах, специфичных для болезненного состояния (Hemming et al., Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)). Однако то, как эти TF интегрируются с другими эпигенетическими регуляторами для установления программы экспрессии генов, ассоциированных с GIST, было неизвестно. В этой связи был проведен полногеномный скрининг отсева на основе CRISPR/Cas9 в двух мутантных по KIT клеточных линиях GIST, таких как GIST-T1 и GIST430, чтобы установить, какие гены важны для биологии GIST. Для этого применяли подход с разделенной библиотекой с использованием парных библиотек sgRNA полного генома человека (обозначенных H1 и H2), при этом использовали приблизительно по 5 sgRNA на один ген в каждой библиотеке, нацеленной на 18436 генов; всего в скрининге присутствовало 185634 sgRNA. Наблюдали значительную корреляцию в показателях зависимости ( $\beta$ ) между

библиотеками H1 и H2, как показано на Фиг. 1A, а также между двумя клеточными линиями GIST, как показано на Фиг. 1B (на клеточную линию,  $n = 4$  для библиотек). Затем наборы данных объединяли для последующего анализа для повышения статистической мощности ( $n = 4$  для библиотек). Корреляция Пирсона, со значением  $P$  и  $r^2$ , показана на Фиг. 1A и 1B. Гены стратифицировали как «незаменимые», поскольку ранее было установлено, что они универсально необходимы для жизнеспособности клеток (Blomen et al., Science 350:1092-6 (2015), Wang et al., Science 350:1096-101 (2015)), «основные» для GIST с  $FDR < 0,05$  на скрине, но которые отсутствуют в списке незаменимых, или «несущественные», см. Фиг. 1C, где незаменимые гены (Blomen et al., Science 350:1092-6 (2015)) обозначены синим цветом, гены, значительно истощенные в GIST, но не являющиеся незаменимыми, показаны красным, а несущественные гены, у которых отсутствует значительное истощение, выделены серым цветом. Отдельные гены, связанные с GIST, помечены.

[00100] Как и ожидалось, ген *KIT* оказался среди самых сильных обнаруженных зависимостей для GIST, причем данные на уровне sgRNA показали почти полное выпадение большинства (9/10) sgRNA во время скрининга, что проиллюстрировано на Фиг. 1D ( $n=2$  на библиотеку). Другие канонические нижестоящие сигнальные медиаторы пути KIT, такие как mTOR, показали значительное выпадение их при скрининге, но в меньшей степени по сравнению с KIT, см. Фиг. 1E ( $n=4$ ). Подмножество «незаменимых генов GIST» из всех незаменимых ( $n = 1702$ ) и не относящихся к незаменимым генам ( $n = 16757$ ) сосредоточено на биологических процессах, в которых могут иметь место специфическое обогащение при GIST, показано на Фиг. 1F. Условия на Фиг. 1D, 1E и 1F сравнивали с помощью t-теста (по сравнению с несущественными генами или с исходной sgRNA; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ). Эти уникальные зависимости в GIST оценивали с помощью анализа обогащения онтологических генов, который показал, что 8 из 18 основных условий связаны с эпигенетическими регуляторными механизмами, включая хроматин и хромосомную организацию, см. Фиг. 1G и 8A. В совокупности, данные этих объективных скринингов зависимостей характеризуют GIST для поддержания своей онкогенной программы как значительно зависимую от эпигенетических механизмов (Tabone et al., Biochim. Biophys. Acta. 1741(1-2):165-72 (2005)).

[00101] Чтобы лучше определить, какие регуляторные комплексы хроматина могут быть наиболее актуальными и уникальными для биологии GIST,  $\beta$ -показатели сравнивали для всех ферментов, модифицирующих хроматин в клеточных линиях GIST, с аналогичными показателями зависимости CERES, усредненными по всем клеточным линиям в проекте DepMap (Barretina et al., Nature 483:603-7 (2012)). Только 7 из 77

оцененных ферментов, модифицирующих хроматин, были уникальными и важными для GIST, с  $\beta$ -показателем  $<-0,7$  и показателем CERES  $>-0,25$  (Фиг. 2А и Фиг. 8N), при этом пороговые значения оценки зависимости были выбраны для выбора регуляторов хроматина, которые, вероятно, являются уникальными зависимостями и маркировкой для коэффициента корреляции Пирсона. Обогащенные ферменты включали членов семейств лизин-ацетилтрансферазы (KAT), MYST, лизиндеметилазы (KDM) и лизинметилтрансферазы (KMT). Пунктирные линии делят график на квадранты, причем верхний квадрант содержит 7 генов, которые были зависимыми в GIST, но не являлись общими зависимыми для клеточных линий в DerMap. Чтобы установить, какие модифицирующие ферменты могут действовать совместно для поддержания эпигенома, данные о взаимозависимости на уровне генов были проанализированы в DerMap. Сравнительный анализ 50 основных взаимозависимостей каждого фермента, модифицирующего хроматин, показал наибольшее взаимодействие на уровне генов и условий онтологии между KMT2A, EZH2 и KAT6A, как показано на Фиг. 2B, что позволяет предположить их генетическую взаимозависимость. На Фиг. 2B красные линии соединяют гены, находящиеся в нескольких перечнях взаимозависимости. Синие линии соединяют гены, попадающие в одни и те же условия онтологии. KMT2A, каталитический член комплекса менин-MLL, также имел несколько признанных членов комплекса со значительными показателями зависимости, включая MEN1/менин и ASH2L, как проиллюстрировано на Фиг. 8B. Поскольку ни одна попытка скрининга зависимостей CRISPR в DerMap не позволила профилировать GIST, доступные сравнительные результаты скрининга проекта DRIVE (McDonald et al., Cell 170:577-592 (2017)), который включал GIST-T1 среди почти 400 клеточных линий, профилированных с помощью иРНК, были использованы из сторонних источников. Среди всех профилированных клеточных линий KMT2A и ASH2L находились в верхних 5% по самой высокой чувствительности к GIST-T1, как показано на Фиг. 2C-2F, что дополнительно указывает на существенную и взаимозависимую природу комплексов MOZ и менин-MLL в GIST, определенную с помощью независимого и сравнительного скрининга. Обнаружено, что несколько других регуляторных комплексов хроматина имеют несколько членов со значительными зависимостями при скрининге, и они также показали обогащение GIST-T1 в клеточных линиях Project Drive, включая члены комплекса INO80, комплекса гистон-ацетилтрансферазы NuA4, комплекса FACT и комплекса PAF1, как показано на Фиг. 8C-8M. На Фиг. 8I-8J показана ранжированная оценка чувствительности клеточных линий Project Drive ( $n = 387$ ) для членов комплекса FACT, при этом GIST-T1 выделен красным. На Фиг. 8L-8M показана ранжированная оценка чувствительности для клеточных линий

Project Drive (n = 387) для избранных членов комплекса PAF1, при этом GIST-T1 выделен красным. EZH2, SUZ12 и EED, основные члены комплекса PRC2 (Laugesen et al., Cold Spring Harb. Perspect. Med. 6(9):a026575 (2016)), оказались зависимостями на скрине, а GIST-T1 имел среди самых высоких показателей чувствительности для EZH2 и EED в клетках Project Drive, как показано на Фиг. 9А-9С. На Фиг. 9В-9С показаны ранжированные оценки чувствительности клеточных линий Project Drive (n = 387) для избранных членов комплекса PRC2, при этом GIST-T1 выделен красным. Хотя немногие клеточные линии в DerMap имели значительную зависимость от основных членов комплекса PRC2, наиболее коррелированные взаимозависимости EZH2, включая DOT1L, EP300 и MEN1, показали перекрытие с взаимозависимостями комплекса MOZ и менин-MLL, как проиллюстрировано на Фиг. 9Е, что указывает на комплементарную функцию транскрипционно-репрессивного комплекса PRC2.

[00102] Для подтверждения зависимости членов комплекса менин-MLL, проведен анализ роста во времени с использованием уникальных sgRNA, нацеленных на членов комплекса Menin-MLL, *KMT2A* и *MEN1*. Для каждого гена и с двумя независимыми sgRNA на ген, обработка sgRNA значительно снижала пролиферацию клеток, как показано на Фиг. 2Е, при этом sgRNA, нацеленные на *Luc* и *RPS19*, показаны соответственно в светлых прямоугольниках и кружках (n =3 на sgRNA). GIST48В использовали для сравнения относительной токсичности этих sgRNA с контрольной клеточной линией. GIST48В показал такую же скорость роста, что и GIST-T1, но в результате селекции *in vitro* он потерял экспрессию *KIT* и связанную с GIST эпигенетическую и транскрипционную программу (Hemming et al., Proc. Natl. Sci. USA 115(25):E5746-E5755 (2018), Hemming et al., Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)). В то время как все sgRNA, нацеленные на комплексы менин-MLL, значительно снижали пролиферацию клеток GIST-T1, GIST48В показал незначительные изменения или вообще не показал никаких изменений в отношении пролиферации клеток, как показано на Фиг. 2F, где n=6 на ген из двух sgRNA. Данные анализировали с помощью двустороннего дисперсионного анализа с использованием теста множественных сравнений Тьюки по сравнению с GIST48В в тех же условиях обработки; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*\*:  $P < 0,01$ . В совокупности эти данные показывают зависимость GIST и отдельных клеточных линий в DerMap от комплекса менин-MLL в поддержании эпигенома GIST.

[00103] Для определения того, где в геноме GIST комплекс менин-MLL связывает и ацетирует гистоны, проводили анализ ChIP-seq для меток гистонов H3K4me3, BRPF1 и KATA6. Геномные области связывания менин и MLL1 идентифицировали с использованием аналогичного метода анализа CUT&Tag (Kaya-Okur et al., Nat. Commun.

10(1):1930 (2019)). Установлено, что члены комплекса менин-MLL локализованы в последовательностях начала транскрипции (TSS) активных генов, что определяется их совместной занятостью с H3K27ac и H3K9ac (см. Фиг. 3А верхний ряд). Напротив, наблюдали очень небольшое присутствие этих членов хроматинового комплекса в энхансерах, определяемых H3K27ac (см. Фиг. 3А средний ряд). Пики АТАС, которые включают доступные сайты ДНК как на TSS, так и на энхансерах, демонстрируют промежуточный уровень связывания комплекса менин-MLL (см. Фиг. 3А нижний ряд). На Фиг. 3А шкала считывания представлена в масштабе  $\pm 10$  тыс п.о. для TSS, суперэнхансеров, определенных H3K27ac, или для определенных пиков АТАС, которые показаны.

[00104] Затем анализировали геномные области, которые показали сильное обогащение менином в наборах данных анализов ChIP-seq и CUT&Tag, и сделали вывод, что эти факторы являются репрезентативными для комплекса менин-MLL. Хотя этот белок связывается с тысячами сайтов по всему геному, непропорциональное обогащение наблюдали в 3-5% этих геномных областей, многие из которых имеют явное отношение к GIST, как показано на Фиг. 3Е и 10А. Процент всех обогащенных областей, связанных с генами TF, и находящихся в верхнем квантиле, показан на Фиг. 3Е и Фиг. 3F. Сайты транскрипционных факторов (TF), особенно те, которые входят в группу основных и дополнительных TF GIST (Hemming et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115(25):E5746-E5755 (2018), Hemming et al., Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)) включены в эти обогащенные области, как и отрицательные регуляторы передачи сигналов KIT из семейств DUSP и ростков, а также гены, используемые в качестве биомаркеров для GIST (например, GPR20, CD34 (Corless et al, J. Clin. 22(18):3813-25 (2004)). Треки, полученные в анализах ChIP-seq и CUT&Tag, показали связывание членов комплекса менин-MLL в TSS и теле этих обогащенных генов, аналогично H3K4me3, таких как основные TF генов *DUSP6* и незаменимого гена *USP1*, как проиллюстрировано на Фиг. 3F-3H и 10B; напротив, H3K27ac и H3K9ac обогащены как энхансерными областями, так и телами генов, а вспомогательный TF GIST из *HAND1* связывается исключительно с энхансерами. Члены комплекса менин-MLL не были заметно обогащены локусом *KIT*, хотя были доказательства того, что эти регуляторы связываются с TSS и областью ниже тела гена (см. Фиг. 10C). Замечено, что максимальное связывание членов комплекса менин-MLL имеет место внутри и непосредственно после TSS других областей обогащения, при этом обнаруживаемый сигнал заметен в некоторых энхансерах этих высокорегулируемых генов, см. Фиг. 10D-10H. Эти данные показывают, что комплекс менин-MLL глобально

присутствует в активных генах, с обогащением в подмножестве генов, имеющих отношение к программе транскрипции GIST.

Пример 3: Ингибирование менина нарушает пролиферацию клеток GIST без апоптоза

[00105] На основании генетических данных и геномной колокализации комплекса менин-MLL высказано предположение, что низкомолекулярные ингибиторы, нацеленные на GIST-связанные комплексы, будут жизнеспособным терапевтическим подходом. Чтобы изучить функциональные последствия нарушения комплекса менин-MLL, клетки GIST-T1 обрабатывали ингибитором менина VTP-50469 (Krivtsov et al., *Cancer Cell* 36:660–673 (2019)), отдельно или в сочетании с селективным в отношении KAT6A ингибитором WM-1119 (Baell et al., *Nature* 560(7717):253-257 (2018)). В субмикромольных концентрациях VTP-50469 уменьшал пролиферацию клеток GIST с течением времени, что установлено в анализе роста, как показано на Фиг. 4А-4В, причем наибольший эффект наблюдался при сочетании двух лекарственных средств (Фиг. 4В). Демонстрируя селективную токсичность этих ингибиторов в KIT-зависимых клеточных линиях GIST, KIT-независимая клеточная линия GIST48В показала умеренные изменения или отсутствие изменений в пролиферации после 21-дневной обработки этим лекарственным средством (Фиг. 4С), что согласуется с генетическими данными экспериментов CRISPR (Фиг. 2I). В предыдущих исследованиях энхансера *KIT* использовали sgRNA, направленную на TSS *KIT*, для устранения эндогенной экспрессии *KIT* и одновременного спасения жизнеспособности клеток путем экспрессии управляемой вирусным промотором конструкции *KIT*, несущей ту же активирующую мутацию (Hemming et al., *Cancer Res.* 79(5):994-1009 (2019)). Эта KIT-зависимая линия спасательных клеток была аналогичным образом чувствительна к VTP-50469, используемым отдельно или в комбинации с WM-1119, как проиллюстрировано на Фиг. 4С, что указывает на то, что регуляция эндогенного локуса *KIT* не является основным механизмом токсичности этих соединений. Статистические сравнения со ссылкой на GIST48В при идентичной обработке показаны на Фиг. 4С. Чтобы подтвердить пролиферативные эффекты этих ингибиторов в дополнительных клеточных линиях GIST, более медленно растущие мутантные по *KIT* клеточные линии GIST430 (Hemming et al., *Cancer Res.* 79(5):994-1009 (2019)) и GIST882 обрабатывали VTP-50469 отдельно или в комбинации с WM-1119, наблюдая при этом аналогичные антипролиферативные эффекты, возникающие в результате обработки лекарственным средством, как проиллюстрировано на Фиг. 4D и 11А. Данные на Фиг. 11 анализировали с помощью

однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта; по сравнению с контролем ДМСО; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*:  $P < 0,05$ .

[00106] Для оценки клеточных фенотипических последствий обработки VTP-50469 были предварительно проведены анализы клеточного цикла и апоптоза с использованием VTP-50469 и ИТК иматиниба в качестве агента сравнения. Хотя иматиниб резко и эффективно вызывал остановку клеточного цикла G0/G1 в течение 72 часов, восемь дней обработки VTP-50469 приводили к умеренному увеличению фракции клеток G0/G1, как проиллюстрировано на Фиг. 4Е; комбинация VTP-50469 с WM-1119 приводила к более выраженному нарушению клеточного цикла после 8-дневной обработки (Фиг. 4Е). В то время как 72-часовая обработка иматинибом приводила к значительному увеличению ранней и поздней фазы апоптоза и гибели клеток, 8-дневная обработка VTP-50469 отдельно или в сочетании с WM-1119 не приводила к значительному увеличению апоптоза или гибели клеток по сравнению с контролем (ДМСО) как показано на Фиг. 4F, где  $n = 3-5$  на каждое условие. Данные анализировали с помощью двустороннего или одностороннего дисперсионного анализа, при необходимости, с апостериорным тестом Тьюки по сравнению с ДМСО или указанными условиями; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*\*:  $P < 0,01$ . В совокупности эти данные показывают, что комплекс менин-MLL является мишенью при GIST и представляет собой уникальную уязвимость при GIST, а в соответствии с его распределением по геному в TSS активных генов он играет важную роль в регуляции генов, причем большую, чем просто экспрессия генов *KIT*. Нарушение этого комплекса само по себе или в сочетании с разрушением комплекса MOZ вызывает изменения клеточного цикла, но не запрограммированную клеточную гибель.

#### Пример 4: Ингибирование комплекса менин-MLL вызывает глобальные изменения в экспрессии генов

[00107] На основании оценки заселенности комплексов менин-MLL по всему геному с избранными областями обогащения, выполнили исследование по избирательным изменениям в экспрессии генов, возникающих в результате действия VTP-50469, WM-1119 и комбинированной обработки VTP-50469 и WM-1119, для дальнейшего подробного описания фенотипа ингибирования роста, возникающего в результате целевого разрушения генов (Фиг. 5А, с показанной корреляцией Пирсона). Предварительно проводили секвенирование РНК на клетках GIST-T1, обработанных VTP-50469 или WM-1119 в течение 1 и 5 дней, по сравнению с обработкой ДМСО в качестве контроля. Обработка VTP-50469 и WM-1119 умеренно изменяла экспрессию многочисленных генов

( $n = 5095$  для  $FPKM > 10$ ), со значительной корреляцией изменений экспрессии генов между этими ингибиторами, при этом группы обработки VTP-50469 и комбинации показали наибольшее отклонение от контроля (Фиг. 5А и Фиг. 5I). Фиг. 5I иллюстрирует неконтролируемую иерархическую кластеризацию данных секвенирования РНК, сравнивающую 5-дневную обработку GIST-T1 с использованием VTP-50469 в концентрации 0,5 мкмоль/л, WM-1119 в концентрации 1 мкмоль/л или комбинации каждого препарата в концентрации 0,1 мкмоль/л ( $n = 4$  на условие), для всех экспрессируемых генов ( $> 10$  фрагментов на тысячу оснований транскрипта на миллион картированных чтений (FPKM)),  $n = 7106$ ).

[00108] Также оценивали изменения экспрессии генов после генетического разрушения комплексов MOZ и менин-MLL с использованием sgRNA, каждый из которых нацелен на два члена комплекса. Используя эту генетическую систему, sgRNA, нацеленные на MEN1, привели к глобальным изменениям в экспрессии генов, при этом нарушение других членов комплекса MOZ и менин-MLL1 показало менее существенные изменения (Фиг. 5J), что иллюстрирует неконтролируемую иерархическую кластеризацию данных RNA-seq при сравнении клеток GIST-T1/Cas9, трансдуцированных sgRNA, нацеленных на KAT6A, BRPF1, KMT2A, MEN1 или люциферазу, в качестве контроля ( $n = 3$  на каждое условие) и собранных на 5-й день.

[00109] Чтобы интегрировать и сравнить изменения транскрипции, возникающие в результате фармакологических или генетических нарушений, оценивали корреляцию изменений экспрессии генов от контроля по всему транскриптому. Для сравнения также оценивали транскрипционные изменения, возникающие в результате sgRNA-опосредованного разрушения GIST TF HAND1 и ETV1. sgRNA, нацеленные на членов комплекса MOZ KAT6A и BRPF1, показали самую высокую степень корреляции, и более того, они индуцировали аналогичные глобальные транскрипционные изменения, как и нарушение HAND1, ETV1 или KMT2A (Фиг. 5K - Фиг. 5S). Фармакологическое ингибирование комплексов MOZ и/или менин-MLL имело сравнительно слабую, но положительную корреляцию с sgRNA, нацеленными на TF GIST, членов комплекса MOZ и KMT2A, тогда как генетическое нарушение MEN1 показало наименьшую корреляцию с другими состояниями (Фиг. 5K и Фиг. 5H). На Фиг. 5K показана корреляция Пирсона для нормализованных по контролю данных секвенирования РНК из Фиг. 5I и Фиг. 5J с включением нормализованных по контролю данных секвенирования РНК из клеток GIST-T1/Cas9, трансдуцированных sgRNA, нацеленных на HAND1 и ETV1. Эти данные демонстрируют несопоставимые глобальные транскрипционные последствия,

возникающие из-за генетических или химических нарушений этих эпигенетических регуляторов.

[00110] С помощью анализа обогащения набора генов (GSEA) оценивали экспрессию генов, обогащенных комплексами MOZ и менин-MLL, генов, связанных с суперэнхансером H3K27ac (SE), и генов, регулируемых TF HAND1 и ETV1. Среди этих списков генов, связанных с GIST, гены, регулируемые TF, подверглись наиболее заметному воздействию: воздействие лекарственными агентами или sgRNA вызывало снижение экспрессии генов, активируемых HAND1, и повышенную экспрессию генов, которые обычно подавляются функцией HAND1 или ETV1 (Фиг. 5O), где показаны нормализованные показатели обогащения (NES) из наборов генов GSEA, включая гены, демонстрирующие обогащение менином и BRPF1 (n = 385), гены, связанные с GIST-T1 SE, определяемые H3K27ac (n = 366), гены с повышенной регуляцией (n = 421) или с пониженной регуляцией. (n = 165) с помощью HAND1, и гены, которые активируются (n = 438) или подавляются (n = 31) с помощью ETV1.

[00111] Наборы генов со значимыми FDR отображены с использованием цветовой шкалы, а те, которые несут незначительные FDR, обозначены серым цветом. Генетическое или фармакологическое нарушение MOZ оказало наибольшее влияние на гены, связанные с менином или BRPF1 (Фиг. 5H), тогда как только нацеливание на HAND1 или применение комбинации WM-1119 и VTP-50469 снижало экспрессию генов, связанных с SE (Фиг. 5Q). Однако общим для всех условий было нарушение экспрессии генов, связанных с HAND1, с нарушением уровней экспрессии MOZ и комплекса менин-MLL, вызванный использованием либо ингибиторов, либо sgRNA, фенокопирующих прямой нокаут HAND1 (Фиг. 5R-Фиг. 5T).

[00112] На экспрессию гена KIT наиболее заметно влияло фармакологическое или генетическое нарушение менина, тогда как наблюдали общую потерю DUSP6, отрицательного регулятора передачи сигналов KIT, и биомаркера GIST CD34 (Фиг. 5U). Экспрессия нескольких основных TF GIST была изменена генетическим или фармакологическим разрушением комплекса MOZ или менин-MLL (особенно FOXF1, HAND2 и PITX1), при этом WM-1119 вызывал наибольшее глобальное снижение экспрессии TF (Фиг. 5V, Фиг. 16A - Фиг. 16B). Несколько других генов, в высокой степени регулируемых экспрессией HAND1, включая NPR3, ITGA4 и RASL11A, показали аналогичную потерю экспрессии с разрушением комплексов MOZ и менин-MLL (Фиг. 5W). Сравнительное снижение экспрессии генов DUSP6 и NPR3 наблюдали в KIT-зависимых линиях клеток GIST, таких как GIST430, GIST882 и GIST48, с помощью qRT-PCR (Фиг. 16C - Фиг. 16F).

[00113] Среди всех наборов генов, связанных с трансляцией Reactome, процессы, связанные с трансляцией белков, были наиболее часто изменяющимися наборами генов в условиях лечения, при этом большинство данных в отношении лекарственных агентов и sgRNA показывали снижение экспрессии генов (Фиг. 16G-Фиг. 16H). В совокупности эти результаты показывают, что как генетические, так и фармакологические средства разрушения MOZ и комплекса менин-MLL приводят к избирательному изменению транскрипционных программ, связанных с TF GIST, и с наиболее значимым HAND1. Кроме того, двойное ингибирование менина и MOZ низкомолекулярными соединениями вызывает дополнительные эффекты на глобальную экспрессию генов и снижает экспрессию генов GIST, связанных с SE.

[00114] Для изучения изменений путей, связанных с медикаментозным лечением использовали анализ GSEA (Subramanian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15545-50 (2005)). Обработка с использованием VTP-50469 привела к аналогичным изменениям в наборах генов Hallmark со значительной активацией наборов генов, связанных с миогенезом и эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT); медикаментозное лечение также приводило к снижению экспрессии наборов генов, связанных с клеточным циклом и передачей митогенных сигналов, как проиллюстрировано на Фиг. 5B и 5C, где показаны наборы генов передачи сигналов MTORC1, контрольной точки G2M, миогенеза и EMT для каждого условия. Хотя при медикаментозном лечении наблюдались минимальные изменения в глобальной средней экспрессии генов, наборы генов, связанные с GIST, показали более значительные изменения. Гены, идентифицированные как важные для GIST (см. Фиг. 1C и 12A), и гены, активность которых снижается после 6 часов лечения иматинибом (Hemming et al., Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)) показали соответствующее снижение экспрессии, возникающее от действия VTP-50469, при этом сигнатура в Hallmark EMT показывает повышение регуляции в качестве сравнения, как проиллюстрировано на Фиг. 5D (все экспрессируемые гены:  $n = 5093$ , основные гены:  $n = 1507$ , гены, уровень экспрессии которых снижен более чем в 2,5 раза за 6 часов обработки иматинибом:  $n = 544$ , и гены Hallmark EMT:  $n = 63$ ). Данные анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта по сравнению с ДМСО; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*:  $P < 0,05$ . На Фиг. 12A показано соотношение экспрессии между обработкой ингибитором и ДМСО для 500 наиболее важных генов после 5 дней обработки ингибитором, а также показана корреляция Пирсона. Гены с непропорционально более высокой нагрузкой менина ( $n = 294$ ) показали большее снижение экспрессии генов после обработки ингибитором как через 1, так и через 5 дней (по сравнению с генами, не имеющими обогащения:  $n = 4799$ ),

что проиллюстрировано на Фиг. 5Е. Среди членов семейства DUSP и членов семейства исходных генов с высокой экспрессией в GIST, экспрессия DUSP6 была наиболее значительно снижена, в то время как экспрессия KIT показала только тенденцию к снижению экспрессии, при обработке VTP-50469 в течении 5 дней, как проиллюстрировано на Фиг. 12В-12С. Эти снижения подтверждены с использованием qRT-PCR в избранных транскриптах DUSP6, NPR3 и USP1 в GIST-T1 и GIST430, возникающих при обработке VTP-50469 отдельно или в комбинации с WM-1119, как проиллюстрировано на Фиг. 5G-5H, при этом комбинированная обработка, в частности, не показало сильного аддитивного эффекта на экспрессию генов этих мишеней. На Фиг. 5G-5H и 12В-12С приведены результаты для  $n = 3-4$  на группу. Данные анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта по сравнению с ДМСО; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*:  $P < 0,05$ . Вместе с исследованиями хроматина эти данные подчеркивают селективные изменения в экспрессии генов, связанные с фармакологическим ингибированием менина, отдельно или в сочетании с ингибированием MOZ, выявляя изменения в генах, связанных с клеточным циклом, жизнеспособностью, трофической передачей сигналов KIT и потенциально изменяющими состояние при дифференцировке путем активации мезенхимальных программ развития.

Пример 5: Нарушение взаимодействия хроматина и регуляторных белков транскрипции с ингибированием менина

[00115] Поскольку комплексы MOZ и менин-MLL функционируют координировано в высокорегулируемых областях генома вместе с другими регуляторами хроматина, то влияние на локальные белковые взаимодействия оценивали в присутствии или отсутствии VTP-50469 отдельно или в комбинации с WM-1119. Систему BioID (Lambert et al., J. Proteomics 118:81-94 (2015)) использовали для присоединения биотинлигазы BirA\* к N-концу члена комплекса MOZ MEAF6, что позволило ковалентно метить белки, локализованные в пределах 10 нм с фрагментом биотина. Чтобы обеспечить соответствующее включение, MEAF6, меченный BirA\*, в комплекс MOZ использовали CRISPR/Cas9 и sgRNA, нацеленную на MEAF6, для разрушения эндогенного MEAF6, что в противном случае было бы летальным, если бы он не было функционально заменен на стабильно экспрессируемую конструкцию MEAF6-BirA (Фиг. 2Е). Стабильная экспрессия MEAF6-BirA с N-концевой меткой в GIST-T1 приводила к высоким уровням продукции белка, при этом при вестерн-блоттинге наблюдались продукты деградации N-конца, включая MEAF6 и HA, что указывает на эндогенное спасение полноразмерной

конструкции или актина, как контроля нагрузки (Фиг. 6А). Конструкцию, где BirA\* слита с ДНК-связывающим доменом *IKZF1*, который сохранял сигнал ядерной локализации, использовали в качестве ядерного фонового контроля BioID. После мечения клеток биотином в течение 24 часов проводили анализ со стрептавидином с последующей масс-спектрометрией, идентифицируя 243 белка, меченных MEAF6-BirA и обогащенных выше контроля (Фиг. 6В, Таблица 4). На Фиг. 6В, показано, что белки, обогащенные MEAF6, обозначенные синим цветом, демонстрируют более чем двукратное увеличение интенсивности по сравнению с фоновым контролем (n = 243). Некоторые интеракторы помечены. Меченые интеракторы включают регуляторные белки хроматина, такие как KMT2A/MLL1, KMT2B/MLL2, JADE3 и RUVBL1, в дополнение к членам комплекса MOZ, белкам, связанным с энхансером, таким как BRD4, и основному GIST TF NIC1. Упорядочение этих MOZ-проксимальных белков по онтологии генов привело к обогащению клеточных процессов, включая репарацию ДНК, процессинг мРНК и регуляцию комплекса хроматина (Фиг. 6С). Эти данные демонстрируют интегрированную клеточную функцию этих регуляторных белков транскрипции и их сложные взаимодействия между факторами сплайсинга, энхансерами и комплексами хроматина.

Таблица 4

Ссылка	Название гена	Ссылка	Название гена	Ссылка	Название гена
sp Q9HAF1 EAF6_HUMAN	MEAF6	sp Q9UKV3 ACIN1_HUMAN	ACIN1	sp Q96Q89 KI20B_HUMAN	KIF20B
sp P46013 KI67_HUMAN	MKI67	sp Q6UN15 FIP1_HUMAN	FIP1L1	sp O95251 KAT7_HUMAN	KAT7
sp P12270 TPR_HUMAN	TPR	sp Q9NW82 WDR70_HUMAN	WDR70	sp P61289 PSME3_HUMAN	PSME3
sp P06748 NPM_HUMAN	NPM1	sp Q9UQR0 SCML2_HUMAN	SCML2	sp Q9NPF5 DMAP1_HUMAN	DMAP1
sp P19338 NUCL_HUMAN	NCL	sp Q9ULD4 BRPF3_HUMAN	BRPF3	sp P52272 HNRPM_HUMAN	HNRNPM
sp O75182 SIN3B_HUMAN	SIN3B	sp P53999 TCP4_HUMAN	SUB1	sp Q9H8H0 NOL11_HUMAN	NOL11
sp Q9H307 PININ_HUMAN	PNN	sp O00541 PESC_HUMAN	PES1	sp P18615 NELFE_HUMAN	NELFE

sp Q9Y265 RUVB1_HUMAN	RUVBL1	sp Q8WXI9 P66B_HUMAN	GATA D2B	sp Q93009 UBP7_HUMAN	USP7
sp P42167 LAP2B_HUMAN	TMPO	sp P09661 RU2A_HUMAN	SNRPA1	sp Q96JM3 CHAP1_HUMAN	CHAMP1
sp Q7L014 DDX46_HUMAN	DDX46	sp Q9H583 HEAT1_HUMAN	HEATR1	sp Q9P2D1 CHD7_HUMAN	CHD7
sp Q13435 SF3B2_HUMAN	SF3B2	sp Q969G3 SMCE1_HUMAN	SMARCE1	sp P26358 DNMT1_HUMAN	DNMT1
sp Q13206 DDX10_HUMAN	DDX10	sp Q86YP4 P66A_HUMAN	GATA D2A	sp Q7Z6E9 RBBP6_HUMAN	RBBP6
sp Q8IY81 SPB1_HUMAN	FTSJ3	sp Q9H2F5 EPC1_HUMAN	EPC1	sp P55081 MFAP1_HUMAN	MFAP1
sp Q14526 HIC1_HUMAN	HIC1	sp Q5T3I0 GPTC4_HUMAN	GPAT CH4	sp Q9UPT8 ZC3H4_HUMAN	ZC3H4
sp Q15233 NONO_HUMAN	NONO	sp P13984 T2FB_HUMAN	GTF2F2	sp Q92576 PHF3_HUMAN	PHF3
sp Q14839 CHD4_HUMAN	CHD4	sp P18583 SON_HUMAN	SON	sp Q9UHB7 AFF4_HUMAN	AFF4
sp Q13428 TCOF1_HUMAN	TCOF1	sp P15822 ZEP1_HUMAN	HIVEP1	sp Q8WTT2 NOC3L_HUMAN	NOC3L
sp P38432 COIL_HUMAN	COIL	sp Q9Y2W2 WBP1_HUMAN	WBP11	sp Q9Y4C8 RBM19_HUMAN	RBM19
sp Q9UMN6 KMT2B_HUMAN	KMT2B	sp Q15459 SF3A1_HUMAN	SF3A1	sp P49750 YLPM1_HUMAN	YLPM1
sp Q9UHR5 S30BP_HUMAN	SAP30BP	sp Q76FK4 NOL8_HUMAN	NOL8	sp Q8WWY3 PRP31_HUMAN	PRPF31
sp P49321 NASP_HUMAN	NASP	sp O95696 BRD1_HUMAN	BRD1	sp O75909 CCNK_HUMAN	CCNK
sp Q9ULW0 TPX2_HUMAN	TPX2	sp Q8NI36 WDR36_HUMAN	WDR36	sp Q96T58 MINT_HUMAN	SPEN
sp Q15652 JHD2C_HUMAN	JMJD1C	sp O60216 RAD21_HUMAN	RAD21	sp Q96PZ0 PUS7_HUMAN	PUS7
sp Q03164 KMT2A_HUMAN	KMT2A	sp O75663 TIPRL_HUMAN	TIPRL	sp Q2VIQ3 KIF4B_HUMAN	KIF4B

sp P61978 HNRPK_HUMAN	HNRNP K	sp O60563 CCNT1_HUMAN	CCNT 1	sp Q6IE81 JADE1_HUMAN	JADE1
sp Q9BTC0 DIDO1_HUMAN	DIDO1	sp P07737 PROF1_HUMAN	PFN1	sp Q6PJT7 ZC3HE_HUMAN	ZC3H1 4
sp Q8IX01 SUGP2_HUMAN	SUGP2	sp Q16630 CPSF6_HUMAN	CPSF6	sp Q8NI27 THOC2_HUMAN	THOC 2
sp O43290 SNUT1_HUMAN	SART1	sp P49959 MRE11_HUMAN	MRE1 1	sp Q9Y2U8 MAN1_HUMAN	LEMD 3
sp Q9H6Z4 RANB3_HUMAN	RANBP 3	sp Q9UHX1 PUF60_HUMAN	PUF60	sp P21675 TAF1_HUMAN	TAF1
sp P09874 PARP1_HUMAN	PARP1	sp Q15637 SF01_HUMAN	SF1	sp Q9H267 VP33B_HUMAN	VPS33 B
sp Q92613 JADE3_HUMAN	JADE3	sp Q99459 CDC5L_HUMAN	CDC5 L	sp O75643 U520_HUMAN	SNRN P200
sp Q15020 SART3_HUMAN	SART3	sp Q13573 SNW1_HUMAN	SNW1	sp P22626 ROA2_HUMAN	HNRN PA2B1
sp Q96L91 EP400_HUMAN	EP400	sp Q9UK61 TASOR_HUMAN	FAM2 08A	sp O60934 NBN_HUMAN	NBN
sp Q13823 NOG2_HUMAN	GNL2	sp Q96KR1 ZFR_HUMAN	ZFR	sp Q8N7H5 PAF1_HUMAN	PAF1
sp Q7Z5K2 WAPL_HUMAN	WAPL	sp Q5T8P6 RBM26_HUMAN	RBM2 6	sp O75376 NCOR1_HUMAN	NCOR 1
sp P46108 CRK_HUMAN	CRK	sp O43719 HTSF1_HUMAN	HTAT SF1	sp Q13123 RED_HUMAN	IK
sp P78347 GTF2I_HUMAN	GTF2I	sp O95239 KIF4A_HUMAN	KIF4A	sp Q14739 LBR_HUMAN	LBR
sp Q8TDI0 CHD5_HUMAN	CHD5	sp Q14692 BMS1_HUMAN	BMS1	sp Q03188 CENPC_HUMAN	CENP C
sp Q9Y2W1 TR150_HUMAN	THRAP 3	sp O43143 DHX15_HUMAN	DHX1 5	sp Q9P013 CWC15_HUMAN	CWC1 5
sp Q12873 CHD3_HUMAN	CHD3	sp Q92541 RTF1_HUMAN	RTF1	sp Q13330 MTA1_HUMAN	MTA1
sp O75533 SF3B1_HUMAN	SF3B1	sp Q14966 ZNF638_HUMAN	ZNF63 8	sp P53814 SMTN_HUMAN	SMTN

sp P55201 BRPF1_HUMAN	BRPF1	sp O14776 TCRG1_HUMAN	TCERG1	sp P52597 HNRPF_HUMAN	HNRNPF
sp P53680 AP2S1_HUMAN	AP2S1	sp Q14241 ELOA1_HUMAN	ELOA	sp Q9BWU0 NADAP_HUMAN	SLC4A1AP
sp O60885 BRD4_HUMAN	BRD4	sp P29590 PML_HUMAN	PML	sp Q7Z5J4 RAI1_HUMAN	RAI1
sp P42166 LAP2A_HUMAN	TMPO	sp Q9BRR8 GPTC1_HUMAN	GPATCH1	sp Q6NZY4 ZCHC8_HUMAN	ZCCHC8
sp Q5VUA4 ZN318_HUMAN	ZNF318	sp P23246 SFPQ_HUMAN	SFPQ	sp Q3L8U1 CHD9_HUMAN	CHD9
sp Q52LR7 EPC2_HUMAN	EPC2	sp Q9H1E3 NUCKS_HUMAN	NUCKS1	sp Q92917 GPKOW_HUMAN	GPKOW
sp O00763 ACACB_HUMAN	ACACB	sp Q96T23 RSF1_HUMAN	RSF1	sp P28340 DPOD1_HUMAN	POLD1
sp O15042 SR140_HUMAN	U2SURP	sp Q5QJE6 TDIF2_HUMAN	DNTTIP2	sp Q69YH5 CDCA2_HUMAN	CDCA2
sp Q9ULM3 YETS2_HUMAN	YEATS2	sp Q5UIP0 RIF1_HUMAN	RIF1	sp Q8N163 CCAR2_HUMAN	CCAR2
sp Q13263 TIF1B_HUMAN	TRIM28	sp Q14814 MEF2D_HUMAN	MEF2D	sp P43243 MATR3_HUMAN	MATR3
sp Q86VM9 ZCH18_HUMAN	ZC3H18	sp Q14865 ARI5B_HUMAN	ARID5B	sp Q86YC2 PALB2_HUMAN	PALB2
sp Q1ED39 KNOP1_HUMAN	KNOP1	sp Q92794 KAT6A_HUMAN	KAT6A	sp O00566 MPP10_HUMAN	MPHOSPH10
sp P51003 PAPOA_HUMAN	PAPOLA	sp Q9H4I2 ZHX3_HUMAN	ZHX3	sp Q96QC0 PP1RA_HUMAN	PPP1R10
sp Q8WYP5 ELYS_HUMAN	AHCTF1	sp Q92945 FUBP2_HUMAN	KHSRIP	sp Q9Y4E5 ZN451_HUMAN	ZNF451
sp Q9H5V9 CX056_HUMAN	CXorf56	sp Q02241 KIF23_HUMAN	KIF23	sp Q8NFC6 BD1L1_HUMAN	BOD1L1
sp Q9H0A0 NAT10_HUMAN	NAT10	sp O00567 NOP56_HUMAN	NOP56	sp O95391 SLU7_HUMAN	SLU7
sp P55265 DSRAD_HUMAN	ADAR	sp Q7Z4V5 HDGR2_HUMAN	HDGFL2	sp O15381 NVL_HUMAN	NVL

sp P98175 RBM10_HUMAN	RBM10	sp Q96PV6 LENG8_HUMAN	LENG8	sp A3KN83 SBNO1_HUMAN	SBNO1
sp Q08211 DHX9_HUMAN	DHX9	sp Q9HCS7 SYF1_HUMAN	XAB2	sp Q9NQC1 JADE2_HUMAN	JADE2
sp Q9NYF8 BCLF1_HUMAN	BCLAF1	sp Q12789 TF3C1_HUMAN	GTF3C1	sp O94913 PCF11_HUMAN	PCF11
sp Q9HCK8 CHD8_HUMAN	CHD8	sp Q9BVJ6 UT14A_HUMAN	UTP14A	sp Q9UBC2 EP15R_HUMAN	EPS15L1
sp Q86XP3 DDX42_HUMAN	DDX42	sp Q12888 TP53B_HUMAN	TP53BP1	sp P33991 MCM4_HUMAN	MCM4
sp Q9BQG0 MBB1A_HUMAN	MYBBP1A	sp Q9UBB9 TFP11_HUMAN	TFIP11	sp P46109 CRKL_HUMAN	CRKL
sp Q8IWZ8 SUGP1_HUMAN	SUGP1	sp Q9Y2X3 NOP58_HUMAN	NOP58	sp Q8TEK3 DOT1L_HUMAN	DOT1L
sp Q9H501 ESF1_HUMAN	ESF1	sp Q15061 WDR43_HUMAN	WDR43	sp Q6PL18 ATAD2_HUMAN	ATAD2
sp Q6IN85 PPP4R3A_HUMAN	PPP4R3A	sp P35637 FUS_HUMAN	FUS	sp Q96JK2 DCAF5_HUMAN	DCAF5
sp O75152 ZC11A_HUMAN	ZC3H11A	sp Q96RE7 NACC1_HUMAN	NACC1	sp Q13129 RLF_HUMAN	RLF
sp Q03701 CEBPZ_HUMAN	CEBPZ	sp O75717 WDHD1_HUMAN	WDHD1	sp Q2NL82 TSR1_HUMAN	TSR1
sp P46100 ATRX_HUMAN	ATRX	sp Q15648 MED1_HUMAN	MED1	sp Q14684 RRP1B_HUMAN	RRP1B
sp P17480 UBF1_HUMAN	UBTF	sp Q9NQZ2 SAS10_HUMAN	UTP3	sp O75150 BRE1B_HUMAN	RNF40
sp Q9NR30 DDX21_HUMAN	DDX21	sp Q9NXR8 ING3_HUMAN	ING3	sp P28715 ERCC5_HUMAN	ERCC5
sp Q9P2N5 RBM27_HUMAN	RBM27	sp O00193 SMAP_HUMAN	SMAP	sp Q9BSC4 NOL10_HUMAN	NOL10
sp P17844 DDX5_HUMAN	DDX5	sp Q8WUQ7 CATIN_HUMAN	CACTIN	sp Q14687 GSE1_HUMAN	GSE1
sp Q96KK5 H2A1_H_HUMAN	HIST1H2AH	sp Q5JTH9 RRP12_HUMAN	RRP12	sp Q03111 ENL_HUMAN	MLLT1

sp Q01780 EXOS X_HUMAN	EXOSC 10	sp Q8IWX8 CHER P_HUMAN	CHER P	sp Q92620 PRP16_ HUMAN	DHX38
sp Q96EV2 RBM3 3_HUMAN	RBM33	sp Q15059 BRD3_ HUMAN	BRD3	sp P51587 BRCA2_ HUMAN	BRCA 2
sp Q7LBC6 KDM 3B_HUMAN	KDM3 B	sp O00148 DX39A _HUMAN	DDX3 9A	sp P05455 LA_HU MAN	SSB
sp Q96ST3 SIN3A _HUMAN	SIN3A	sp P49790 NU153_ HUMAN	NUP1 53	sp Q6P2Q9 PRP8_ HUMAN	PRPF8
sp O43395 PRPF3 _HUMAN	PRPF3	sp P46087 NOP2_ HUMAN	NOP2	sp P26599 PTBP1_ HUMAN	PTBP1
sp Q5VT52 RPRD 2_HUMAN	RPRD2	sp Q14690 RRP5_ HUMAN	PDCD 11	sp P12956 XRCC6_ HUMAN	XRCC 6

[00116] Для оценки изменений в проксимальной протеоме в MEAF6 вследствие ингибирования менина (отдельно или в сочетании с ингибированием MOZ) клетки MEAF6-BirA, экспрессирующие GIST-T1, предварительно обрабатывали в течение 3 дней VTP-50469 отдельно или в сочетании с WM-1119 перед мечением биотином и последующим количественным определением без метки с использованием масс-спектрометрии. Хотя большинство проксимальных белков в MEAF6 остались прежними, подмножество белков показало значительные изменения в количестве при обработке лекарственным средством, со значительной корреляцией в изменениях, наблюдаемых с VTP-50469 и WM-1119 (Фиг. 6D). Взаимодействия членов семейства MLL, таких как KMT2A/MLL1, KMT2B/MLL2, и ДНК- и РНК-связывающего антиапоптоического белка GRATCH4 (Lambert et al., J. Proteomics 118:81-94 (2015)) снижались при обработке только VTP-50469, а при комбинированной обработке с VTP-50469 и WM-1119 дополнительного эффекта не было (Фиг. 6F). Близость избранных регуляторов хроматина, факторов сплайсинга и регуляторных белков полимеразы изменялась аналогичным образом при обработке с помощью VTP-50469 отдельно или в комбинации с WM-1119, особенно DOT1L, уровень которого значительно снижался при всех условиях обработки (Фиг. 6G).

[00117] Чтобы определить, как ингибирование менина изменяет ассоциацию хроматина DOT1L, нормализованного по ChIP-seq, в клетки GIST-T1 вводили VTP-50469 отдельно или в комбинации, и это значительно уменьшало ассоциацию DOT1L с хроматином во всех сайтах связывания DOT1L, с уменьшением среднего сигнала от DOT1L по всему геному, как проиллюстрировано на Фиг. 6G-6I и Фиг. 13G - Фиг. 13I. На Фиг. 6G представлены тепловые карты, демонстрирующие нормализованный сигнал от

DOT1L на пиках, определенных анализом MACS ( $n = 67,769$ ) в клетках GIST-T1, обработанных ДМСО или VTP-50469 в течение 3 дней. Показаны масштабированные плотности чтения  $\pm 1,25$  тыс. п.о. от центра пика. На Фиг. 6I-6J представлены результаты  $n = 67769$  для сигнала DOT1L и  $n = 22581$  для сигнала MEAF6. \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*:  $P < 0,05$ .

[00118] Как и другие члены комплекса менин-MLL, DOT1L, H3K79me2, гистоновая метка, депонированная DOT1L, и MEAF6, все они показали обогащение по всему геному в TSS и в теле гена для активных генов, с обогащением в локусах, соответствующих биологии GIST, и снижением сигнала DOT1L при обработке VTP-50469, как показано на Фиг. 6K и 13B - 13E. На Фиг. 13D показаны тепловые карты, демонстрирующие геномную локализацию в GIST-T1 DOT1L и H3K79me2, полученные с помощью анализа ChIP-seq. Показаны масштабированные плотности чтения  $\pm 10$  тыс. п.о. от TSS, суперэнхансеров, определенных H3K27ac, или пиков, определенных в анализе ATAC. На Фиг. 13E показаны треки отражающие области геномной занятости нормализованного DOT1L при указанных обработках для H3K79me2 и H3K27ac в локусе *GPR20*. DOT1L TE против SE: SE = 1343, TE = 45256. Т-критерий Уэлча:  $P < 0,001$ , но абсолютная разница  $\sim 1\%$ . Для дальнейшего изучения того, может ли потеря функции DOT1L представлять собой механизм клеточной токсичности после ингибирования менина, клетки GIST-T1 или GIST48B (в качестве контроля) обрабатывали в анализе роста во времени при различных дозах селективного ингибитора DOT1L EPZ-5676 (Daigle et al., Cancer Cell 20:53-65 (2011)). При всех протестированных дозах клетки GIST-T1 показали значительно сниженную клеточную пролиферацию по сравнению с контролем (ДМСО или GIST48B; по 5 на условие), что указывает на селективную токсичность ингибирования DOT1L, аналогичную ингибированию менина, как проиллюстрировано на Фиг. 6L.

[00119] sgRNA, нацеленные на DOT1L, приводили к значительному снижению пролиферации клеток GIST-T1, хотя и более умеренному, чем наблюдаемое при использовании sgRNA, нацеленных на комплексы менин-MLL и MOZ, что согласуется с результатами скрининга CRISPR в масштабе генома (Фиг. 2A и Фиг. 13I). Чтобы лучше охарактеризовать транскрипционные последствия ингибирования DOT1L при GIST, клетки GIST-T1 обрабатывали EPZ-5676 в течение 5 дней с последующим секвенированием РНК. В глобальном масштабе транскрипционные изменения, связанные с лечением EPZ-5676, высоко коррелировали с изменениями, возникающими в результате ингибирования менина с помощью VTP-50469 (Фиг. 6M - Фиг. 6N), ранее наблюдавшегося при MLL-переаранжированной лейкемии. Подобно ингибированию

менин-MLL и MOZ, ингибирование DOT1L приводило к значительным нарушениям в программах транскрипции, регулируемых HAND1 (Фиг. 6O), с изменениями в экспрессии TF KIT, CD34, NPR3 и GIST (Фиг. 6P - Фиг. 6Q). В совокупности эти данные показывают сложность проксимальных белковых взаимодействий между этими эпигенетическими комплексами, изменения в ассоциациях белков и хроматина нескольких регуляторов транскрипции с ингибированием MOZ или менина, а также то, что функция DOT1L является зависимой при KIT-зависимой GIST с потерей ассоциации хроматина DOT1L, служащей последующим следствием ингибирования MOZ или менина. Результаты вышеуказанных экспериментов по росту во времени анализировали с помощью двустороннего дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки по сравнению с GIST48B; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*:  $P < 0,05$ . В совокупности эти данные демонстрируют сложность проксимальных белковых взаимодействий между этими эпигенетическими комплексами, изменения в ассоциациях белков и хроматина для нескольких регуляторов транскрипции с ингибированием менина, а также то, что функция DOT1L является зависимой при KIT-зависимой GIST с потерей ассоциации DOT1L, служащей последующим следствием ингибирования менина.

Пример 6: Терапевтические эффекты ингибирования менина *in vivo* отдельно или в сочетании с ИТК.

[00120] Чтобы оценить влияние генетической потери KAT6A, менина или DOT1L на рост опухоли *in vivo*, клетки, экспрессирующие sgRNA, направленную против каждого из KAT6A (sgKAT6A), менина (sgMEN1) или DOT1L (sgDOT1L) или люциферазы в качестве контроля (sgLuc), получали клетки GIST-T1, коэкспрессирующие Cas9. После имплантации мышам равного количества модифицированных клеток, мышей контролировали на предмет образования и роста опухоли. Хотя все имплантаты генерировали опухоли, но те, которые были получены из клеток, обработанных sgKAT6A или sgMEN1, имели значительно сниженный рост по сравнению с контролем sgLuc, тогда как экспрессия sgDOT1L приводила к незначительной тенденции к снижению роста (Фиг. 14D). Хотя ограничение роста было более скромным, чем в аналогичных экспериментах *in vitro* (Фиг. 2H и Фиг. 13I), использование sgKAT6A и sgMEN1 требовало отбора и размножения в течение 2 недель *in vitro*, чтобы произвести достаточное количество клеток для имплантации, отбирая клетки с менее вредными генными изменениями.

[00121] Ингибиторы менина широкого спектра прошли раннюю фазу клинических испытаний для лечения лейкемии, включая национальные клинические испытания (NCT) NCT04067336 (исследование соединения KO539), NCT04811560 (исследование

соединения JNJ-75276617) и NCT04065399 (исследование соединения SNDX-5613). КО539 также известен как Unii-4mod1F4enc и зифтомениб.

[00122] Чтобы оценить эффекты ингибирования менина отдельно или в сочетании с WM-1119 или иматинибом *in vivo*, мышам прививали клетки GIST-T1 и лечили иматинибом (n = 5), VTP-50469 (постоянно вводили в пищу; n = 4), WM-1119 (в дозе 3 раза в день 7 дней в неделю n=6), комбинацией VTP-50469 и WM-1119 (n=6), комбинацией иматиниба и VTP-50469 (n = 5) или вводили носитель (n = 5). В конце 28-дневного периода лечения группы монотерапии продемонстрировали значительное снижение роста опухоли по сравнению с группой, получавшей носитель, тогда как группы комбинированной терапии продемонстрировали полное прекращение роста опухоли. Мониторинг восстановления опухоли продолжали без дальнейшего медикаментозного лечения, и хотя опухоли в группах монотерапии иматинибом и VTP-50469 восстановили рост опухоли, аналогичную росту опухоли в группе носителя; комбинация иматиниба и VTP-50469 продемонстрировала снижение наклона кривой восстановления опухоли в 3-4 раза, как проиллюстрировано на Фиг. 7А. Объем опухоли относительно исходного уровня подробно описан в Таблице 5 для группы, получавшей носитель в качестве контроля, в Таблице 6 для группы, получавшей VTP-50469, в Таблице 7 для группы, получавшей WM-1119, и в Таблице 8 для группы, получавшей комбинацию VTP-50469 и WM-1119. В ходе продолжающегося наблюдения за выздоровлением, установили, что опухоли без дальнейшего медикаментозного лечения во всех случаях показали сопоставимые скорости роста опухоли, аналогичные контролю (носитель). Комбинированная терапия VTP-50469 и WM-1119 показала такой же рост опухоли, что и в случае терапии иматинибом и VTP-50469, что проиллюстрировано на Фиг. 7D. Мыши переносили лечение WM-1119, VTP-50469, иматинибом и их комбинацией без признаков явной токсичности или потери веса (Фиг. 14E - Фиг. 14F).

**Таблица 5:** Объем контрольной опухоли у животных, получавших носитель, относительно исходного уровня

День лечения	Животное				
	1	2	3	4	5
<b>1</b>	100	100	100	100	100
<b>5</b>	167	184	239	171	243
<b>8</b>	177	325	426	193	335
<b>12</b>	213	389	502	225	379
<b>14</b>	259	405	546	253	510

<b>19</b>	265	430	683	255	664
<b>22</b>	317	438	713	487	689
<b>27</b>	368	455	948	593	759
<b>29</b>	384	522	967	578	876

**Таблица 6:** Объем опухоли у животных, получавших VTP-50469, относительно исходного уровня

<b>День лечения</b>	<b>Животное</b>					<b>6</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	
<b>1</b>	100	100	100	100	100	100
<b>5</b>	191	172	102	182	68	160
<b>8</b>	201	188	107	178	67	284
<b>12</b>	221	290	90	176	59	486
<b>14</b>	265	356	136	276	73	519
<b>19</b>	383	399	188	379	43	832
<b>22</b>	353	440	128	480	71	1108
<b>27</b>	622	466	119	735	80	1469
<b>29</b>	773	461	153	962	92	*

\*мышь умерщвлена досрочно из-за быстрого роста опухоли.

**Таблица 7:** Объем опухоли у животных, получавших WM-1119, относительно исходного уровня

<b>День лечения</b>	<b>Животное</b>					<b>6</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	
<b>1</b>	100	100	100	100	100	100
<b>5</b>	175	211	114	133	87	152
<b>8</b>	480	322	157	173	131	206
<b>12</b>	518	368	287	160	145	260
<b>14</b>	527	429	327	181	163	328
<b>19</b>	876	501	511	180	268	277
<b>22</b>	878	409	489	150	205	361
<b>27</b>	856	525	558	202	232	317
<b>29</b>	874	532	648	199	221	353

**Таблица 8:** Объем опухоли у животных, получавших комбинацию VTP-50469 и WM-1119, относительно исходного уровня

День лечения	Животное					6
	1	2	3	4	5	
<b>1</b>	100	100	100	100	100	100
<b>5</b>	100	128	79	242	159	103
<b>8</b>	119	138	90	288	138	115
<b>12</b>	98	111	66	384	104	92
<b>14</b>	71	104	64	316	114	121
<b>19</b>	79	123	45	445	45	98
<b>22</b>	61	155	53	493	49	112
<b>27</b>	32	159	43	518	46	101
<b>29</b>	67	198	46	613	57	98

[00123] Для оценки изменений в программе транскрипции GIST, возникающих в результате ингибирования менина и/или KIT *in vivo* проводили секвенирование РНК на ксенотрансплантатах GIST-T1 после 5 и 10 дней лечения иматинибом и/или VTP-50469. Хотя все условия лечения приводили к глобальным изменениям транскрипции по сравнению с контролем (носитель), более значимые изменения наблюдали после лечения VTP-50469 и комбинацией иматиниба и VTP-50469 в обеих временных точках, при этом профиль экспрессии генов при лечении иматинибом более тесно коррелировал с опухолями, обработанными носителем (Фиг. 7E). На Фиг. 7E показана корреляция Пирсона усредненных по группе фрагментов всех экспрессируемых генов из расчета тысяч оснований транскрипта на миллион картированных прочтений (FPKM) (FPKM >10, n = 7434). Иматиниб, VTP-50469 и комбинированное лечение приводили к снижению экспрессии генов, регулируемых HAND1 (Фиг. 14G). Хотя GIST-ассоциированные транскрипты, включая KIT, CD34 и NPR3, преимущественно снижались при лечении VTP-50469, другие транскрипты, зависимые от передачи сигналов KIT, включая TMEM100 и SPRY2, преимущественно снижались при лечении иматинибом. Маркер клеточной пролиферации PCNA, снижался только при использовании комбинации иматиниба и VTP-50469 как через 5, так и через 10 дней (Фиг. 7F), что соответствует большему эффекту комбинированного лечения в отношении роста опухоли.

[00124] Оценивали влияние лечения иматинибом и VTP-50469 на PG27, модель GIST, полученную от мыши с мутантным ксенотрансплантатом *KIT* (PDX) (Hemming et al., Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)). В то время как введение иматиниба в дозе ниже

максимально переносимой дозы оказывало значительный, но умеренный эффект ингибирования роста по сравнению с ксенотрансплантатом клеточной линии GIST-T1, но лечение только VTP-50469 ( $n = 5$ ) или в комбинации с иматинибом ( $n = 5$ ) приводило к значительное снижение роста опухоли, как проиллюстрировано на Фиг. 7B. Данные анализировали с помощью двустороннего дисперсионного анализа по сравнению с носителем; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; по сравнению с иматинибом; #:  $P < 0,01$ . В то время как мыши, получавшие VTP-50469 в корме ( $n = 5$ ), не показали потери веса в эксперименте с ксенотрансплантатом GIST-T1, мыши PG27, обработанные другой партией VTP-50469 в той же концентрации, продемонстрировали умеренную потерю веса (см. Фиг. 14A-14B; анализ данных с помощью двустороннего дисперсионного анализа, по сравнению с носителем \*:  $P < 0,05$ ). В конце периода лечения опухоли PG27 собирали, фиксировали и разрезали для оценки гистологии опухоли. В то время как опухоли, обработанные носителем и иматинибом, имели мономорфные листы опухолевых клеток, ксенотрансплантаты, обработанные VTP-50469 или комбинацией лекарств, имели области некроза опухоли, как показано на Фиг. 7C. Репрезентативные изображения на Фиг. 7C показаны группы лечения при 4-кратном увеличении (верхние панели, масштабная линейка = 250 мкм) и при 40-кратном увеличении (нижние панели, масштабная линейка = 25 мкм). Несмотря на ограничение роста опухоли при лечении VTP-50469, жизнеспособные участки опухоли показали одинаковые уровни Ki-67 и расщепленной каспазы-3 в разных условиях (см. Фиг. 14C, где опухоли PG27 собирали в конце периода лечения и фиксировали, ткани разрезали и оценивали на наличие Ki-67 (верхний ряд) и расщепленной каспазы-3 (нижний ряд)). В то время как мыши, получавшие VTP-50469 в корме, не показали потери веса в экспериментах с ксенотрансплантатом GIST-T1, мыши с привитым PG27, получавшие VTP-50469 в той же концентрации, показали умеренную потерю веса (Фиг. 14B), возможно, связанную с системными эффектами наблюдаемого некроза опухоли. Несмотря на ограничение роста опухоли при лечении VTP-50469, жизнеспособные участки опухоли показали одинаковые уровни Ki-67 и расщепленной каспазы-3 в разных условиях (Фиг. 14B). Эти данные подтверждают терапевтическую активность VTP-50469, применяемого отдельно или в сочетании с иматинибом, заключающуюся в том, что ингибирование менина снижает рост ксенотрансплантата GIST, вызывает некроз опухоли, а в сочетании с иматинибом обеспечивает стойкие противоопухолевые реакции после прекращения лечения.

[00125] Эти варианты осуществления настоящего изобретения показывают, что организация и ремоделирование хроматина важны для клеточного роста, их идентичности и функций. Посттрансляционные модификации гистонов служат связующим звеном

эпигенетической регуляции, которая контролирует связывание TF и регуляторов хроматина, в конечном итоге управляя экспрессией генов и структурой хромосом. Модификации хроматина являются динамическими и обратимыми, и они требуют активного поддержания типом клеток и специфическими ферментами, модифицирующими хроматин. Рак использует такое состояние хроматина из своих клеток-предшественников для поддержания злокачественного фенотипа посредством поддержания среды, благоприятствующей активации онкогенов, или путем изменений в регуляторах хроматина с усилением функции, таких как слияния генов *MLL* (Krivtsov et al., Nat. Rev. Cancer 7:823–33 (2007)). Настоящее изобретение показывает, что специфические регуляторы хроматина необходимы для поддержания эпигенома GIST, при этом комплекс менин-MLL связывается с активно экспрессируемыми генами по всему геному, регулируя программы экспрессии генов, связанных с GIST, координируя белок-белковые взаимодействия между многочисленными регуляторами экспрессию генов и, в конечном итоге, они обеспечивают регулирование клеточной пролиферации и роста опухоли.

[00126] Менин, кодируемый геном *MEN1*, классически описывается как супрессор опухоли, при этом мутации в *MEN1* способствуют образованию эндокринных опухолей. Однако в других тканях менину приписывают множество функций, обусловленных способностью белка положительно или отрицательно регулировать экспрессию генов, связываться с различными комплексами хроматина, интегрировать входные сигналы от вышестоящих сигнальных путей и модулировать репликацию и репарацию ДНК (Matkar et al., Trends Biochem. Sci. 38(8):394-402 (2013)). Менин лучше всего изучен как онкоген, зависимый в контексте *MLL*-реаранжированной лейкемии, где он связывается со слитым белком MLL, и вместе с рекрутированием DOT1L выполняет программу экспрессии лейкемогенного гена (Krivtsov et al., Cancer Cell 36:660–673 (2019), Yokoyama et al., Cell 123:207–18 (2005), Dafflon et al., Leukemia 31:1269–77 (2017)). При GIST члены комплекса менин-MLL необходимы для глобальной регуляции хроматина, и, в конечном итоге, для пролиферации опухолевых клеток. По сравнению с сотнями других типов клеток, представленных в Project Drive и DepMap, GIST характеризуется исключительной чувствительностью к целенаправленному разрушению членов комплекса менин-MLL. В соответствии с консервативностью TF, а также пространственных профилей транскрипции и хроматина в KIT-зависимой GIST (Hemming et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115:E5746–55 (2018), Dafflon et al., Leukemia 31:1269–77 (2017)), чувствительность к генетическому или фармакологическому разрушению комплекса менин-MLL была потеряна в KIT-независимой клеточной линии GIST. Эти данные

подтверждают, что, в отличие от онкогенного захвата, наблюдаемого при *MLL*-реаранжированных лейкозах, *GIST* зависит от нативной функции комплекса менин-*MLL* и связанных с ними зависимостей для поддержания профиля хроматина, который обеспечивает основу для программы экспрессии злокачественных генов.

[00127] Множество данных свидетельствуют о совместном действии комплексов менин-*MLL*, *MOZ* и других комплексов в регуляции транскрипции. Сведения, представленные здесь, показывают и подтверждают, что по всему геному имеет место совместная локализация членов комплекса менин-*MLL* и *MOZ* в TSS активно экспрессируемых генов. Аналогичные изменения имеют место при экспрессии генов, и они возникают в результате ингибирования любого комплекса, при этом проксимальные белковые взаимодействия между этими двумя комплексами, координируют регуляцию *DOT1L* и других белков, связанных с транскрипцией, и это влияние на клеточный цикл и клеточную пролиферацию более выражено при ингибировании комплекса менин-*MLL* в сочетании с ингибированием комплекса *MOZ*. В соответствии с результатами, раскрытыми в настоящем документе, взаимодействия между комплексами *MOZ* и *MLL*, способствующие экспрессии генов, были ранее описаны в локусе *HOXA* в гематопоэтических клетках-предшественниках (Paggetti et al., *Oncogene* 29:5019-31 (2010)). Используя данные *ChIP*, описание настоящего изобретения подчеркивает ранее недооцененную и дополняющую друг друга генетическую взаимозависимость этих регуляторных комплексов хроматина в некоторых линиях раковых клеток. Зависимость от комплекса *PRC2* также наблюдалась при *GIST*, при этом аналогичная взаимозависимость наблюдалась по данным *ChIP*, что указывает на контрастирующую, но дополняющую роль *PRC2* в подавлении хроматина, уравнивающем активирующие функции комплекса менин-*MLL*.

[00128] Представленные выше данные также подтверждают, что комплексы менин-*MLL* и *PRC2* совместно функционируют по всему геному, контролируя состояние хроматина и выход транскрипции. Хотя описание настоящего изобретения подчеркивает превосходную активность одновременного ингибирования комплексов менин-*MLL* и *MOZ* с помощью *VTP-50469*, применяемого отдельно или в сочетании с *WM-1119* в анализах клеточного цикла и клеточной пролиферации, экспрессии избранных *GIST*-ассоциированных генов и нарушении белок-белковых взаимодействий будет во многом схожим между монотерапией и комбинированным лечением. Хотя механизм комбинаторной токсичности требует дальнейшего изучения, эти результаты позволяют предположить, что разрушение одного комплекса может максимально дерегулировать как

определенные целевые локусы, и что, вероятно, существуют неперекрывающиеся функции комплексов менин-MLL и MOZ.

[00129] В связи ассоциацией комплекса менин-MLL с TSS активных генов по всему геному, нарушение комплекса менин-MLL привело к значительным изменениям в транскрипции, которые были как умеренными, так и обогащенными специфическими путями. Гены, несущие наибольшее обогащение этих хроматиновых комплексов, значительно снижали экспрессию генов при ингибировании менина. Это открытие также подтверждает непропорциональное снижение транскрипции генов, важных для GIST, а также генов, активность которых снижается при лечении иматинибом, что указывает на основополагающую роль, которую комплекс менин-MLL играет в поддержке транскрипции после передачи сигналов KIT. Транскрипционные изменения, возникающие в результате ингибирования менина, установленные при использовании анализа GSEA, были в значительной степени связаны с наборами генов, ответственными за снижение клеточного цикла и митогенной передачи сигналов, а также за активацию программ развития и EMT. В предыдущих исследованиях наблюдали усиление сигнатуры EMT при менее агрессивных формах GIST или после разрушения онкогенного TF HAND1 (Hemming et al., *Clin. Cancer Res.* 27:1706-19 (2021)), что указывает на конвергенцию путей транскрипции, связанную либо с разрушением TF, либо с фармакологическим ингибированием регулятора хроматина. В соответствии с тем, что нарушение комплекса менин-MLL вызывает умеренные изменения в экспрессии генов, влияние на пролиферацию и клеточный цикл наблюдали только после нескольких дней лечения препаратом, в отличие от остротоксических эффектов, наблюдаемых при использовании иматиниба.

[00130] Последующие последствия ингибирования менина включают нарушение проксимальных взаимодействий между множественными регуляторами транскрипции, раскрытыми здесь, включая потерю DOT1L из хроматина. DOT1L метилирует H3K79, чтобы поддерживать активное состояние транскрипции, и он был исследован при лейкемии, где его рекрутирование слитым белком MLL важно для лейкогенеза (Okada et al., *Cell.* 121:167-78 (2005)). Было обнаружено, что в солидных опухолях DOT1L взаимодействует с онкогенными факторами транскрипции (Wong et al., *Cancer Research* 77:2522-33 (2017), Vatapalli et al., *Nat. Commun.* 11(1):4153 (2020)), хотя ингибиторы DOT1L до сих пор не оценивались в клинических испытаниях при солидных опухолях. Учитывая предыдущие исследования, демонстрирующие зависимость TF при GIST, и текущую работу, показывающую уязвимость клеток GIST как к генетическим, так и к фармакологическим нарушениям DOT1L, следует признать, что DOT1L может

функционировать как нижестоящий интегратор активности TF и комплекса менин-MLL при установлении транскрипционно активного состояния некоторых видов генов, ассоциированных с раком.

[00131] В совокупности все представленные и известные данные доказывают важную функцию комплекса менин-MLL при GIST, который служит неотъемлемым компонентом регуляции хроматина и программы экспрессии онкогенных генов.

[00132] Ранее были разработаны многие ингибиторы менина, которые нарушают связь между менином и MLL. MLL (Krivtsov et al., *Cancer Cell*. 36(6):660–673 (2019), Klossowski et al., *J. Clin. Invest.* 130:981–97 (2020), Xu et al., *J. Med. Chem.* 63:4997–5010 (2020)), и в настоящее время они проходят клинические исследования в отношении лейкемии. Для оценки эффекта ингибирования менина *in vivo* на моделях ксенотрансплантатов GIST в описании настоящего изобретения представлены сведения о лечении на модели клеточной линии и ксенотрансплантатов, полученных от пациента, с помощью ИТК, ингибирования менина или комбинированного лечения, которое продемонстрировало активность ингибирования менина в качестве монотерапии и даже более высокую активность при сочетании ИТК и ингибиторов менина. После периода лечения опухоли в обеих группах монотерапии восстановили свой рост, в то время как опухоли, обработанные комбинированной терапией ингибированием менина и ИТК, сохраняли пролонгированные эффекты подавления опухоли, наблюдаемые через несколько недель после отмены лечения. Приведенное выше описание в отношении PDX-модели GIST подтвердило мощную противоопухолевую активность ингибирования менина, при этом гистология показала области некроза, перемежающиеся жизнеспособной опухолью. Эти результаты подтверждают клинический эффект действия ингибиторов менина для пациентов с GIST, применяемых либо отдельно, либо, в идеале, в сочетании с ИТК.

[00133] Поскольку ИТК являются единственной активной терапевтической стратегией при GIST, которая обладает естественной устойчивостью к цитотоксической химиотерапии (Maki et al., *Oncologies* 20(7):823–30 (2015)), нацеливание на менин и другие важные компоненты эпигенома GIST может быть терапевтически выгодно. Консервативный профиль транскрипции и энхансеров, наблюдаемый в опухолях и клеточных линиях GIST, вместе с экспрессией онкогенного гена *KIT*, регулируемой специфичными для заболевания TF и элементами-энхансерами, предполагают зависимость этого заболевания от эпигенетических механизмов регуляции заболевания. Как описано здесь, действующие совместно регуляторы хроматина, ответственные за поддержание эпигенома GIST, как и их разрушение во множественных разрозненных

узлах с помощью низкомолекулярных ингибиторов (например, VTP-50469, EPZ-5676) предполагают многообещающую и селективную противораковую активность; при этом представители каждого из этих классов ингибиторов прошли клинические испытания (например, NCT04606446, NCT02141828). По сравнению с лейкомиями, несущими онкогенные изменения в регуляторах хроматина, GIST может быть исключением среди солидных опухолей по своей зависимости от этих путей и восприимчивости к их нарушению.

[00134] Все патентные и непатентные публикации ориентированы на уровень квалификации специалистов в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все эти публикации (включая любые их конкретные части, на которые имеются ссылки) включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была конкретно и индивидуально указана как включенная в текст описания.

[00135] Хотя раскрытия, представленные в настоящем документе, представлены со ссылкой на конкретные варианты осуществления изобретения, следует понимать, что эти варианты осуществления изобретения являются лишь иллюстрацией принципов и осуществлений настоящего изобретения. Поэтому следует понимать, что в иллюстративные варианты осуществления могут быть внесены многочисленные модификации, и что могут быть разработаны другие технические решения, не отступая от сущности и объема настоящего изобретения, определенного прилагаемой формулой изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения желудочно-кишечной стромальной опухоли (GIST) у субъекта, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора менина.

2. Способ по п.1, где ингибитор менина представляет собой JNJ-75276617, KO-539, SNDX-5613, DS-1594 или DSP-5336, MI-3454, M-808, BMF-219, A300-105A, VTP-50469, короткую интерферирующую РНК (киРНК) или комбинацию двух или более из них.

3. Способ по п.2, где ингибитор менина представляет собой SNDX-5613.

4. Способ по п.2, где ингибитор менина представляет собой VTP-50469.

5. Способ по п.2, где ингибитор менина представляет собой M-808.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где ингибитор менина вводят перорально, внутримышечно, подкожно или внутривенно.

7. Способ по любому из пп. 1-6, дополнительно предусматривающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора тирозинкиназы (ИТК).

8. Способ по п.7, где ИТК представляет собой иматиниб, сунитиниб, регорафениб, рипретиниб, нилотиниб, пазопаниб, кабозантиниб, авапритиниб или комбинацию двух или более из них.

9. Способ по п.8, где ИТК представляет собой иматиниб.

10. Способ по любому из пп. 7-9, где ИТК вводят после введения ингибитора менина.

11. Способ по любому из пп. 7-9, где ИТК вводят по существу одновременно с введением ингибитора менина.

12. Способ по любому из пп. 7-9, где ИТК вводят до введения ингибитора менина.

13. Способ по любому из пп.1-12, дополнительно предусматривающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора MOZ.

14. Способ по п.13, где ингибитор MOZ представляет собой WM-1119, WM-8014, PF-9363, киРНК или комбинацию двух или более из них.

15. Способ по п.14, где ингибитор MOZ представляет собой WM-1119.

16. Способ по любому из пп. 13-15, где ингибитор MOZ вводят перорально, внутримышечно, подкожно или внутривенно.

17. Способ по любому из пп. 13-16, где ингибитор MOZ вводят после введения ингибитора менина.

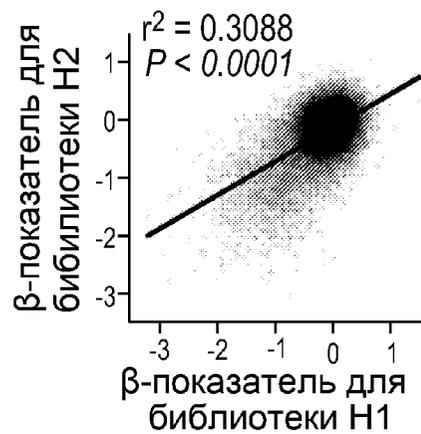
18. Способ по любому из пп. 13-16, где ингибитор MOZ вводят одновременно с введением ингибитора менина.

19. Способ по любому из пп. 13-16, где ингибитор MOZ вводят до введения ингибитора менина.
20. Способ по п.17, где ингибитор MOZ вводят после введения ИТК.
21. Способ по п.18, где ингибитор MOZ вводят по существу одновременно с введением ИТК.
22. Способ по любому из п.19, где ингибитор MOZ вводят до введения ИТК.
23. Способ по любому из пп. 1-22, где у субъекта диагностирована активирующая мутация в гене рецепторной тирозинкиназы (*KIT*) или вокруг него.
24. Способ по любому из пп. 1-23, где GIST является метастатическим.
25. Способ снижения активности КИТ *in vitro* или *in vivo*, предусматривающий приведение клетки, имеющей активирующую мутацию в гене *KIT* или вокруг него, в контакт с ингибитором менина.
26. Способ по п.25, где ингибитор менина представляет собой MI-3454, M-808, JNJ-75276617, KO-539, SNDX-5613, DS-1594 или DSP-5336, BMF-219, A300-105A, VTP-50469 или комбинацию двух или более из них.
27. Способ по п.26, где ингибитор менина представляет собой SNDX-5613.
28. Способ по п.26, где ингибитор менина представляет собой VTP-5613.
29. Способ по любому из пп. 25-28, дополнительно предусматривающий стадию приведения клетки в контакт с ИТК.
30. Способ по п.29, где ИТК представляет собой иматиниб, сунитиниб, регорафениб, рипретиниб, нилотиниб, пазопаниб, кабозантиниб, авапритиниб или комбинацию двух или более из них.
31. Способ по п.30, где ИТК представляет собой иматиниб.
32. Способ по любому из пп. 25-31, дополнительно предусматривающий стадию приведения в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством ингибитора MOZ.
33. Способ по п.32, где ингибитор MOZ представляет собой WM-1119.
34. Набор, содержащий терапевтически эффективное количество ингибитора менина и фармацевтически приемлемый носитель, помещенные в подходящий контейнер, и напечатанные инструкции по применению ингибитора менина при лечении GIST у субъекта.
35. Набор по п.34, где ингибитор менина представляет собой SNDX-5613.
36. Набор по п. 34 или 35, дополнительно содержащий терапевтически эффективное количество ИТК и напечатанные инструкции по использованию ИТК при лечении GIST у субъекта, при этом ингибитор менина и ИТК содержатся в одной и той же

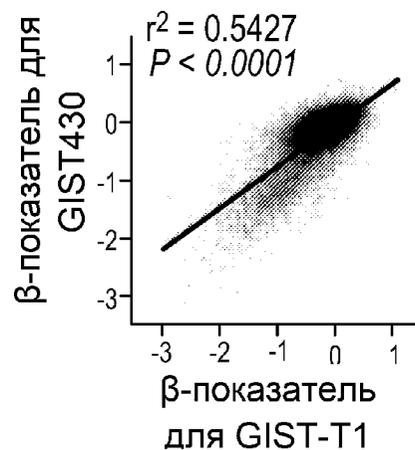
лекарственной форме или в разных лекарственных формах, находящихся в одном или разных контейнерах.

37. Набор по п.36, где ИТК представляет собой иматиниб.

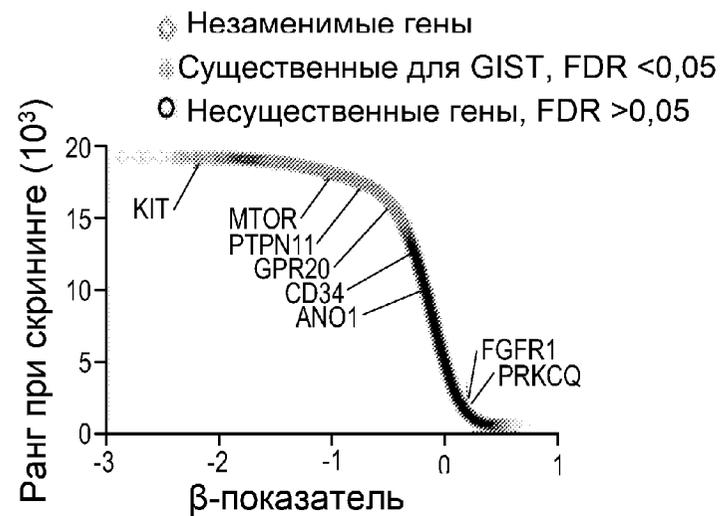
38. Набор по любому из пп. 34-37, дополнительно содержащий терапевтически эффективное количество ингибитора MOZ и напечатанные инструкции по применению ингибитора MOZ при лечении GIST у субъекта, где ингибитор менина и ингибитор MOZ содержатся в одной и той же лекарственной форме или в разных лекарственных формах, находящихся в одном или разных контейнерах.



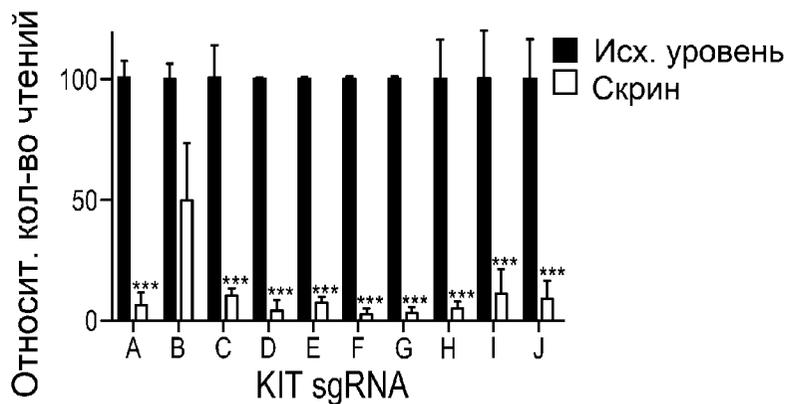
Фиг. 1А



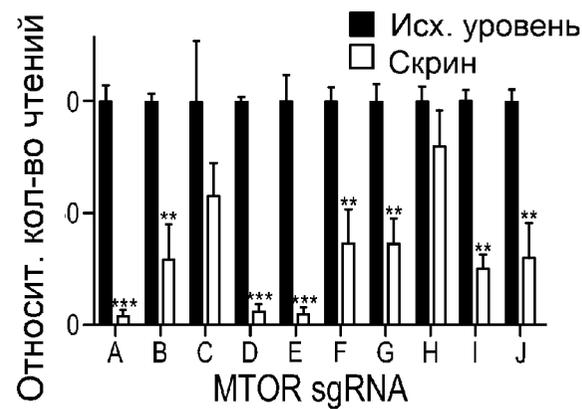
Фиг. 1В



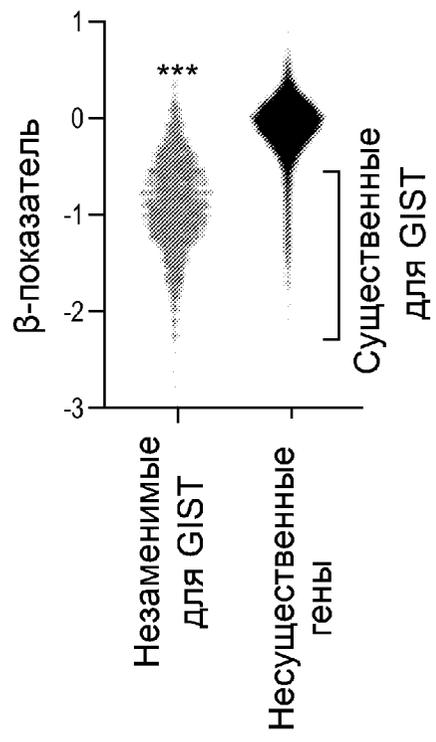
Фиг. 1С



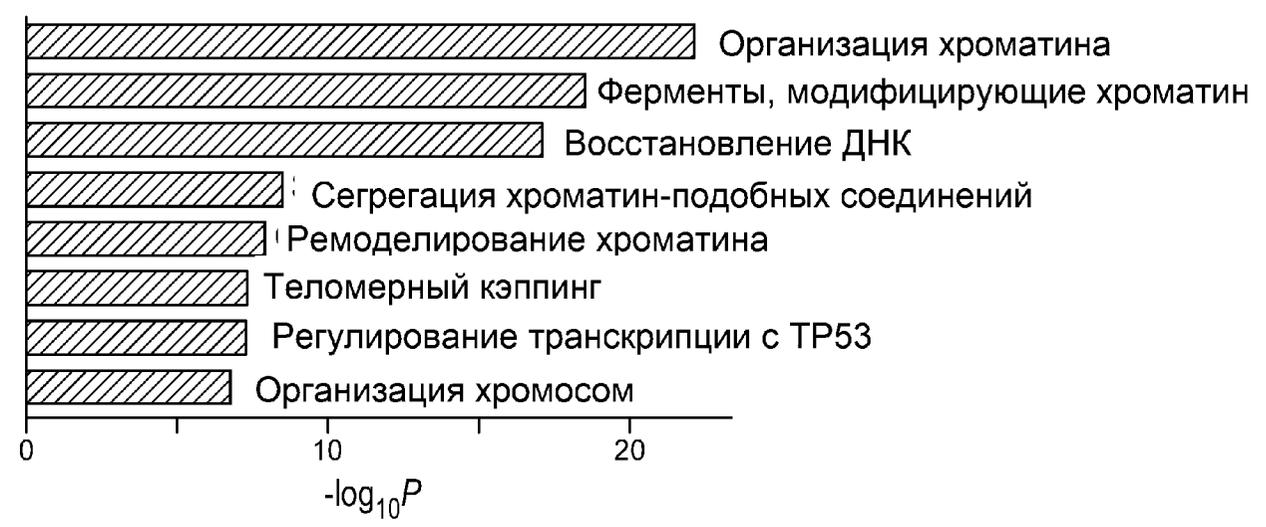
Фиг. 1D



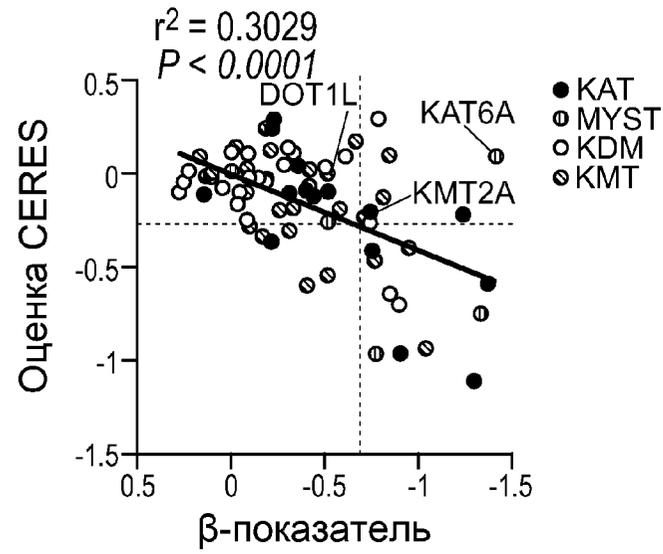
Фиг. 1Е



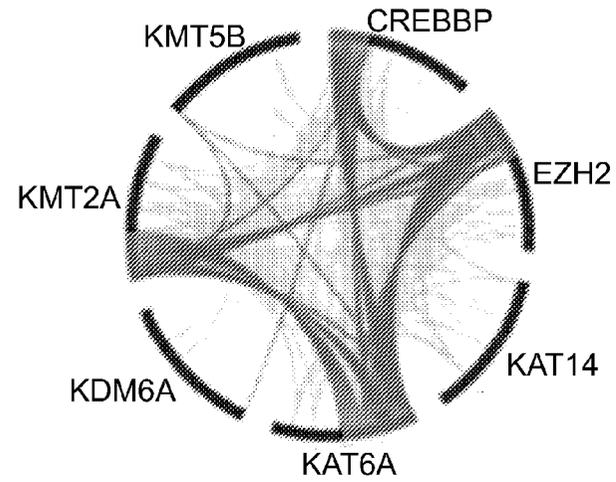
Фиг. 1F



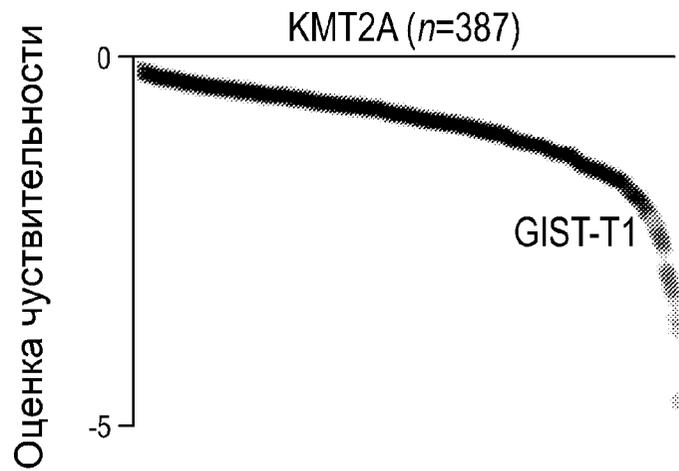
Фиг. 1G



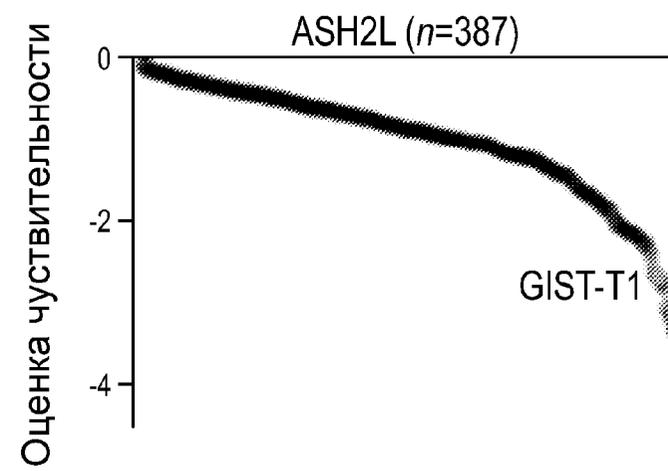
Фиг. 2А



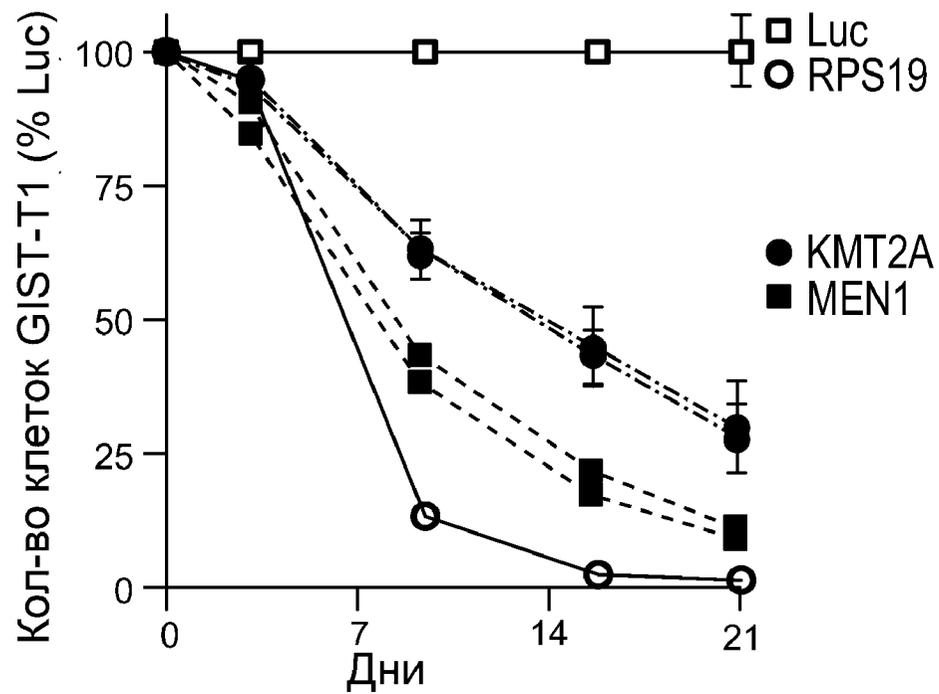
Фиг. 2В



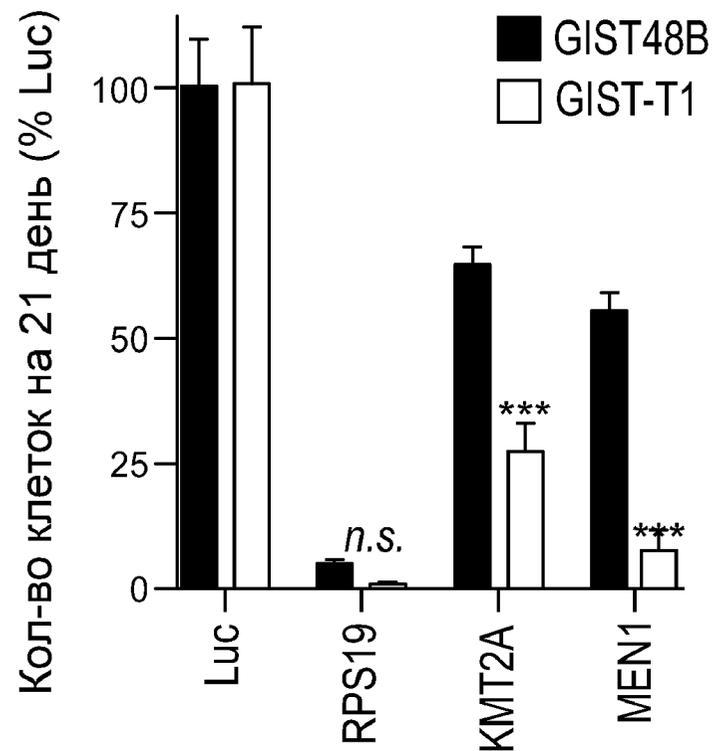
Фиг. 2С



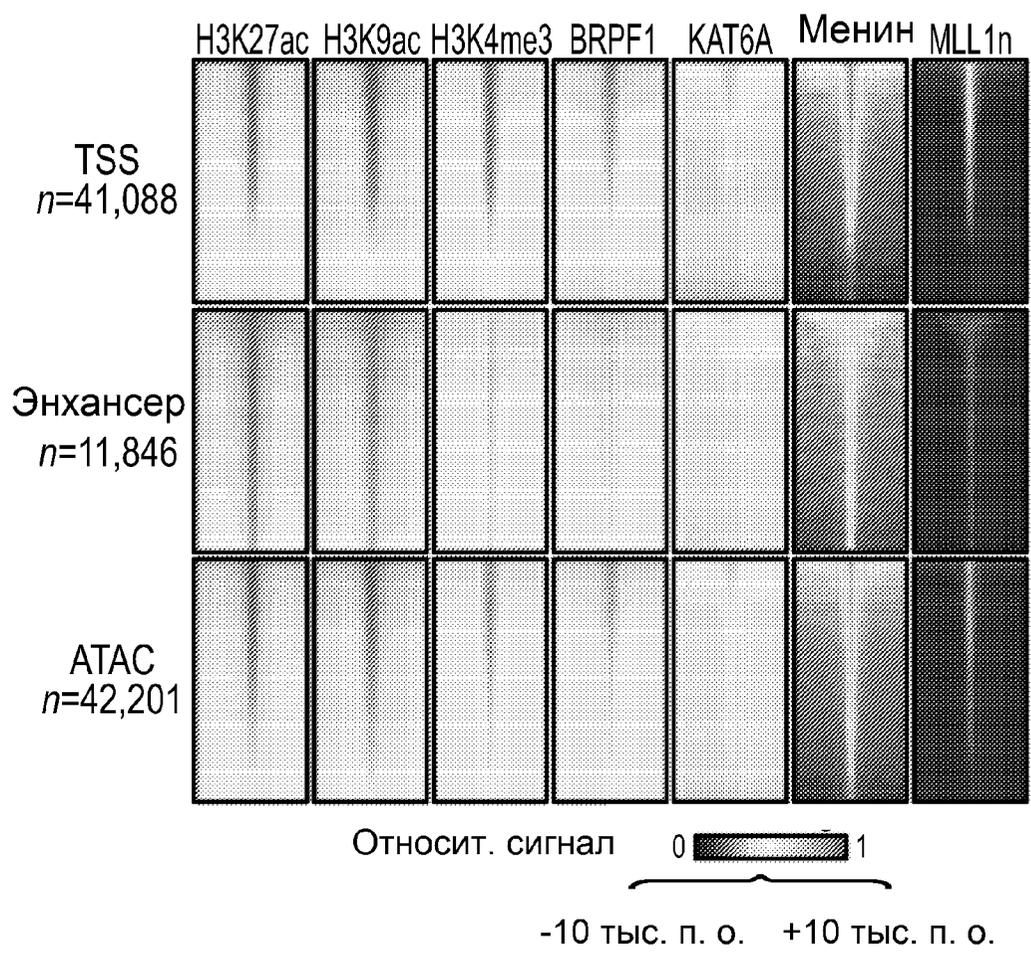
Фиг. 2D



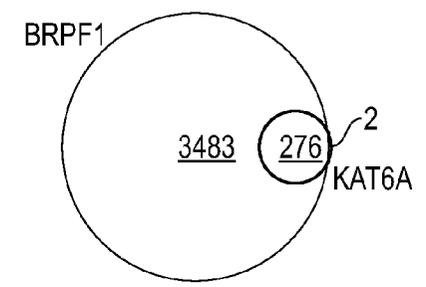
Фиг. 2Е



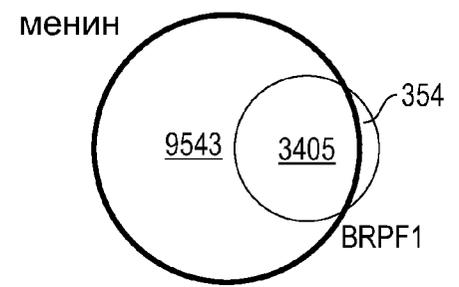
Фиг. 2F



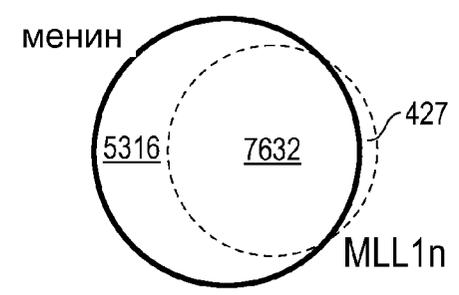
Фиг. 3А



Фиг. 3В

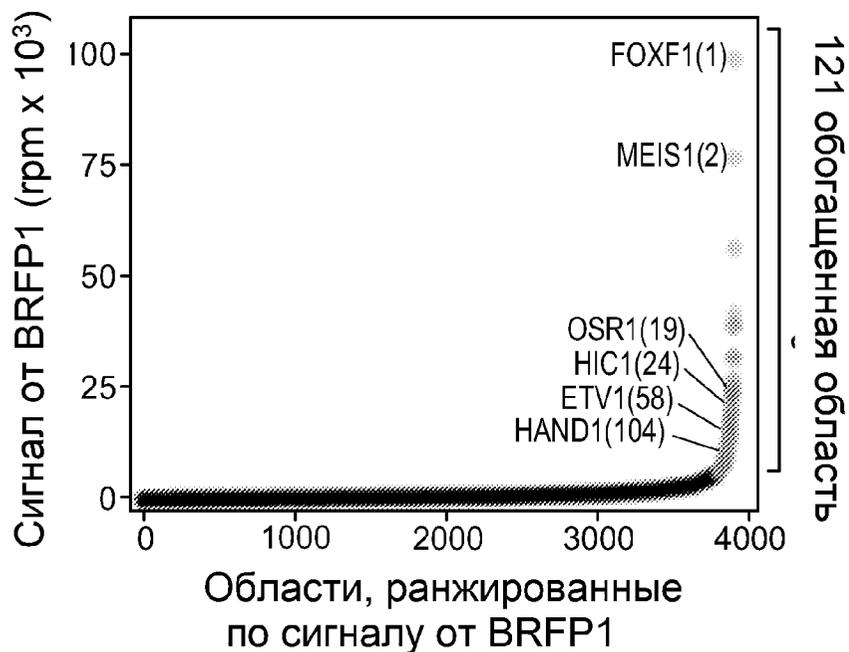


Фиг. 3С



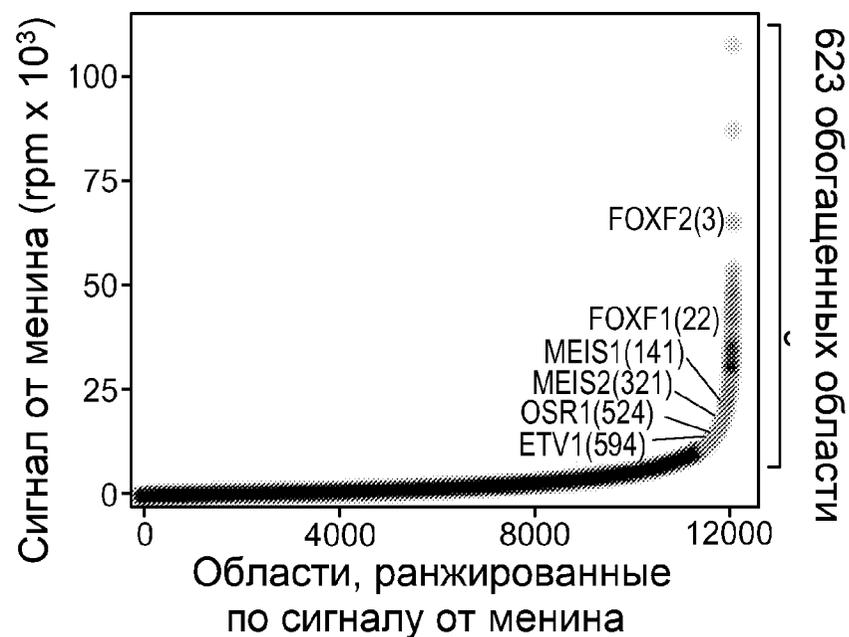
Фиг. 3D

Фактор транскрипции (23%)  
 TF в верхнем квантиле = 48%

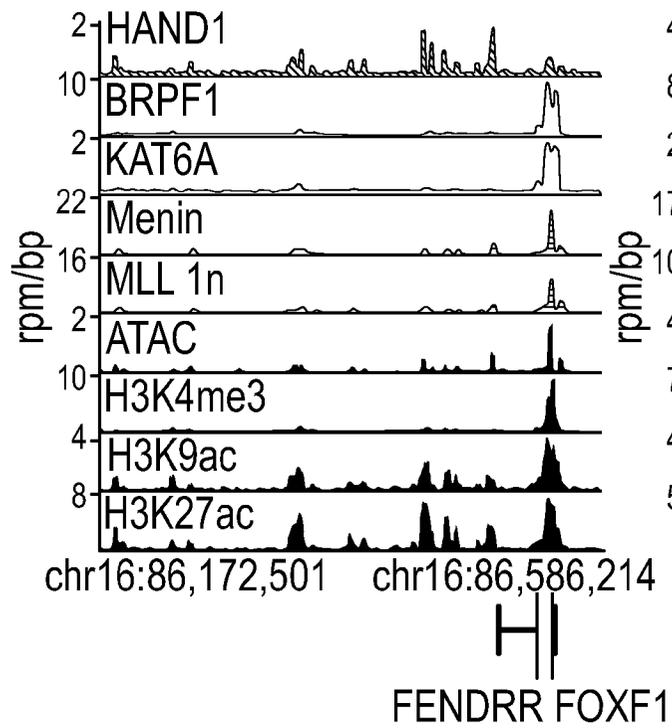


Фиг. 3Е

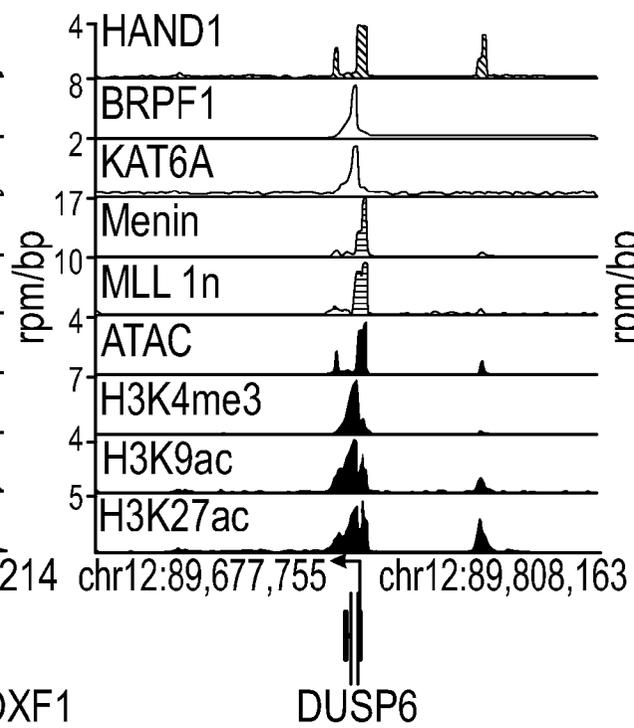
Фактор транскрипции (10%)  
 TF в верхнем квантиле = 11%



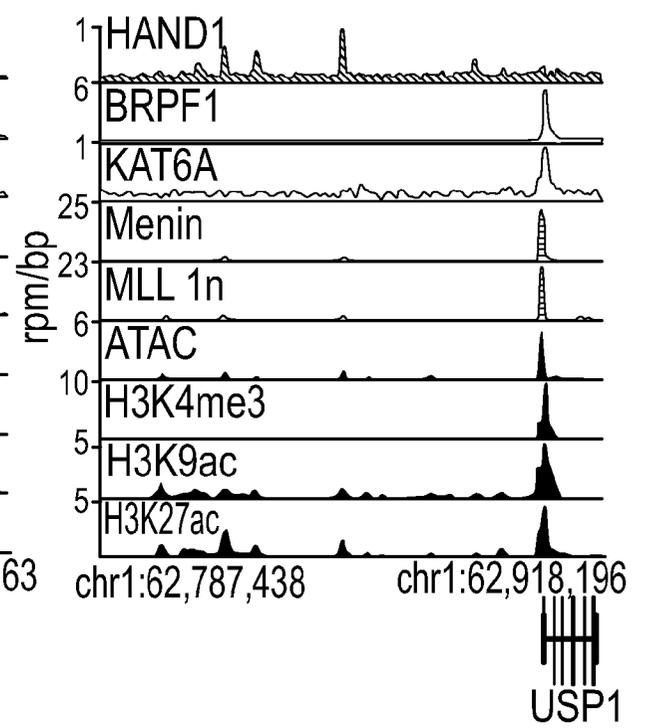
Фиг. 3F



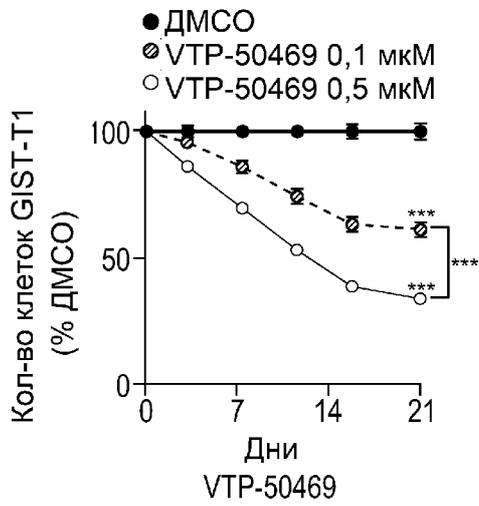
Фиг. 3Г



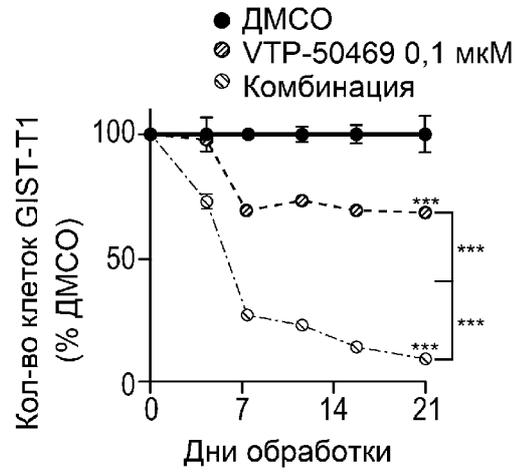
Фиг. 3Н



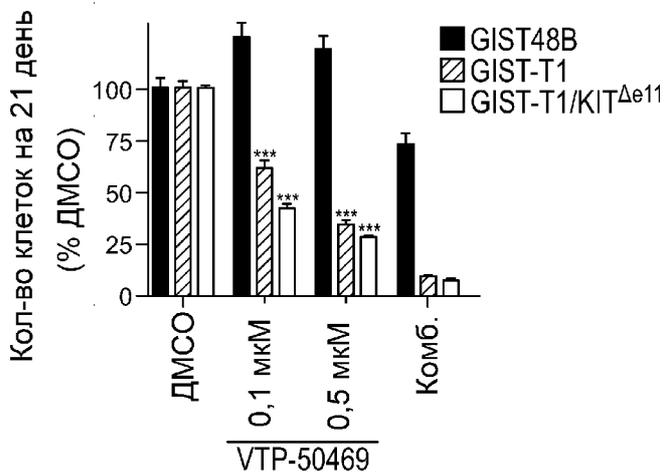
Фиг. 3І



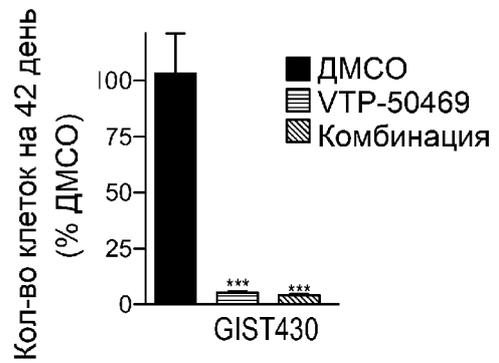
Фиг 4А



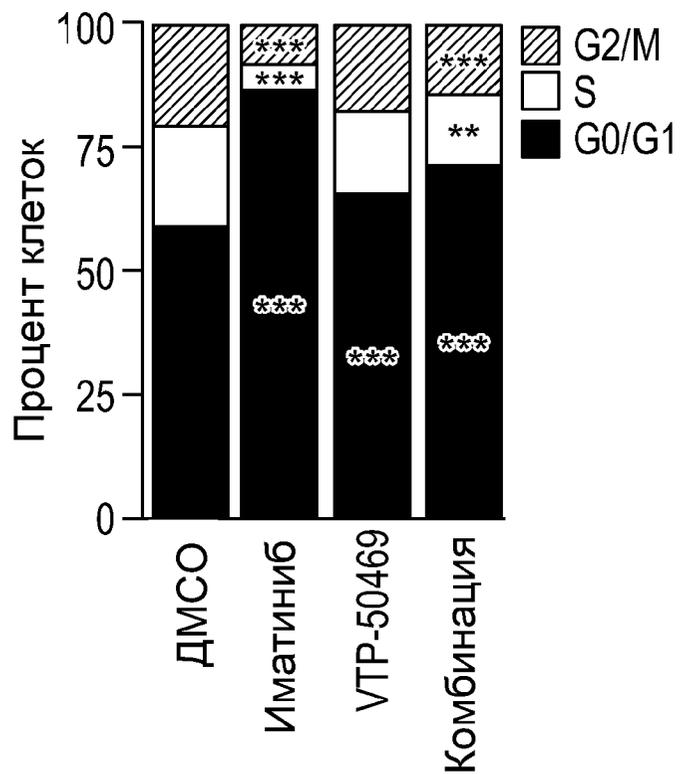
Фиг. 4В



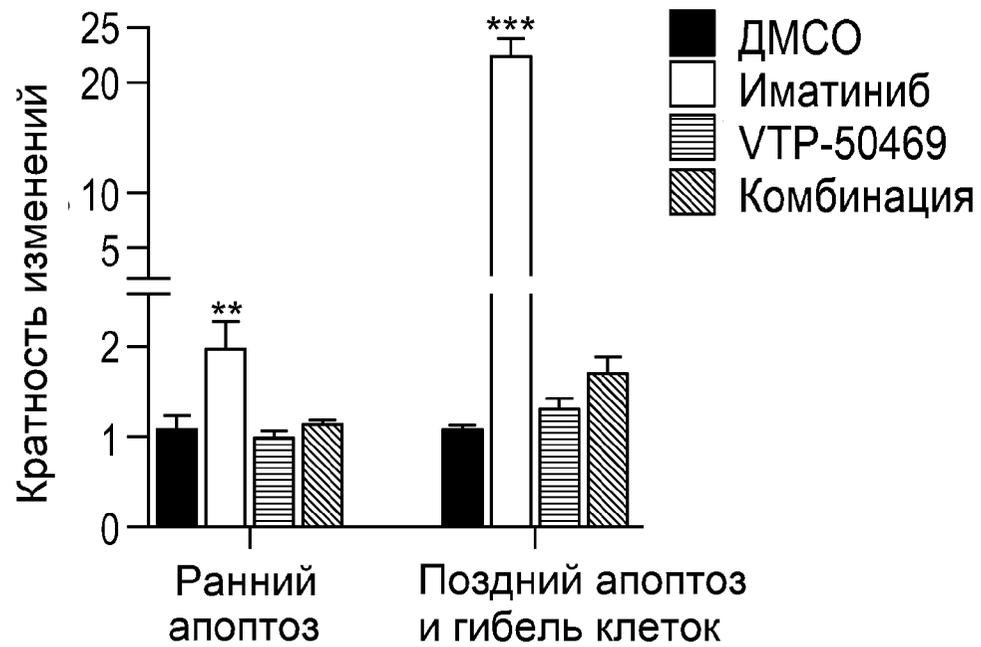
Фиг. 4С



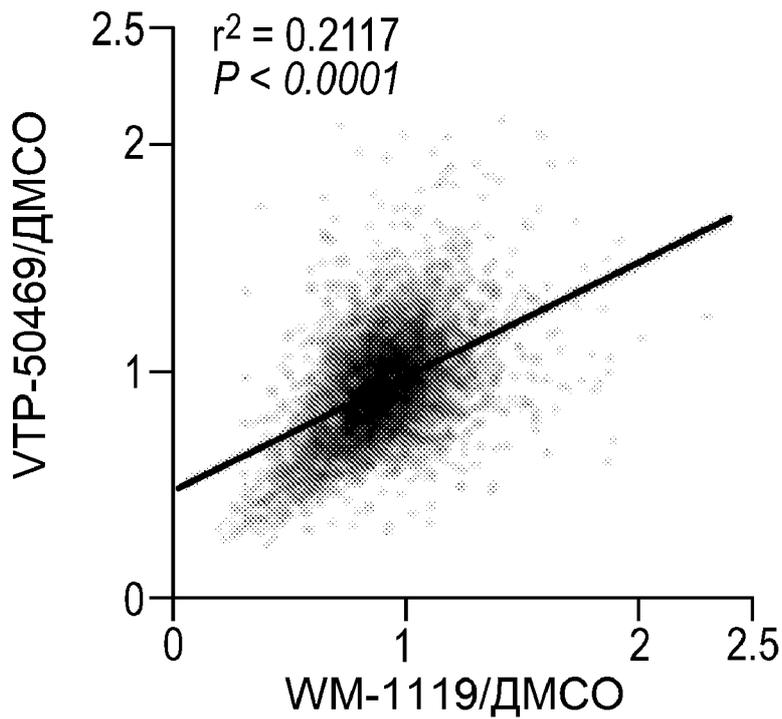
Фиг. 4Д



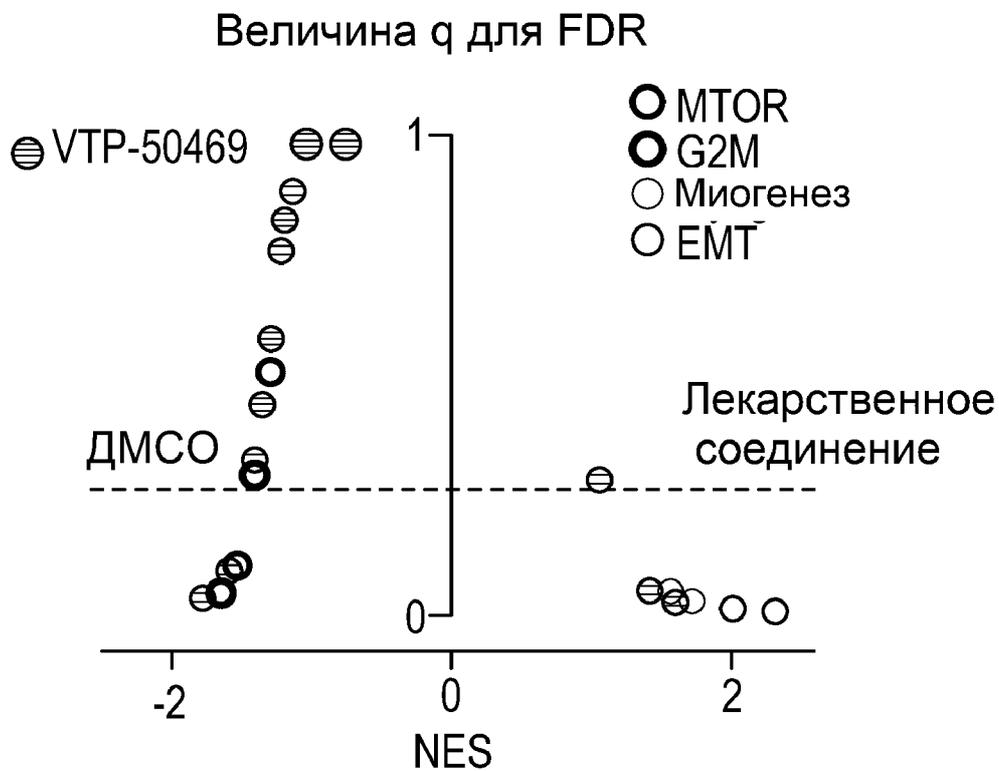
Фиг. 4Е



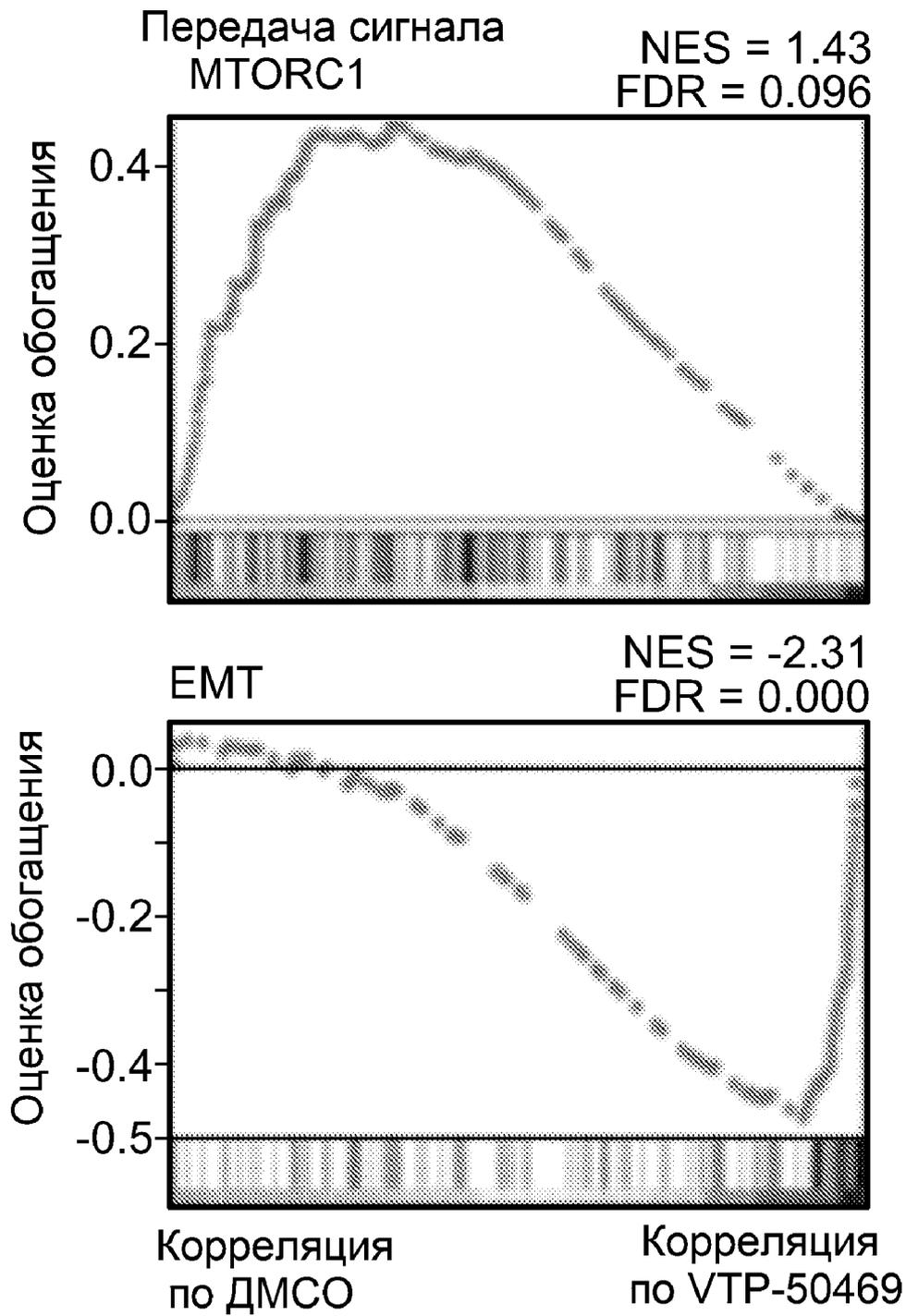
Фиг. 4F



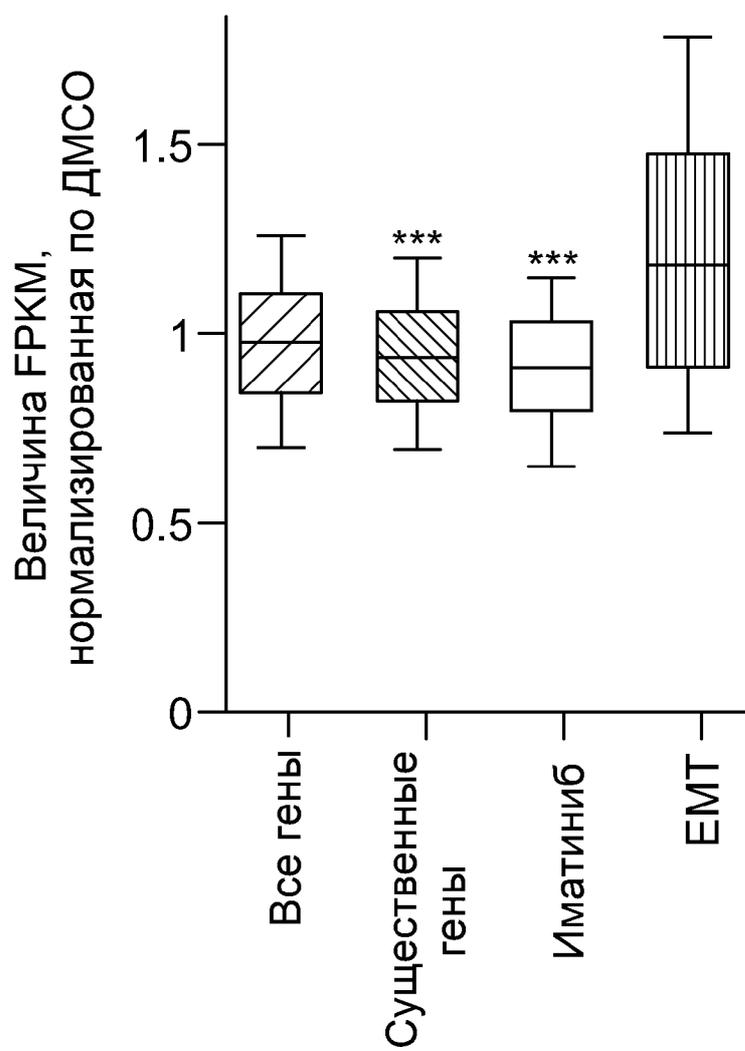
Фиг. 5А



Фиг. 5В

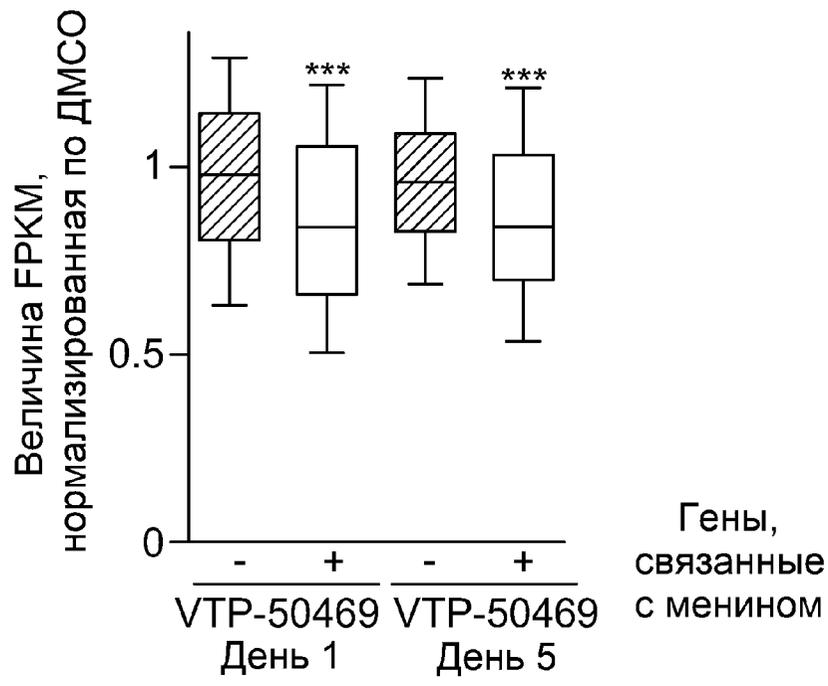


Фиг. 5С

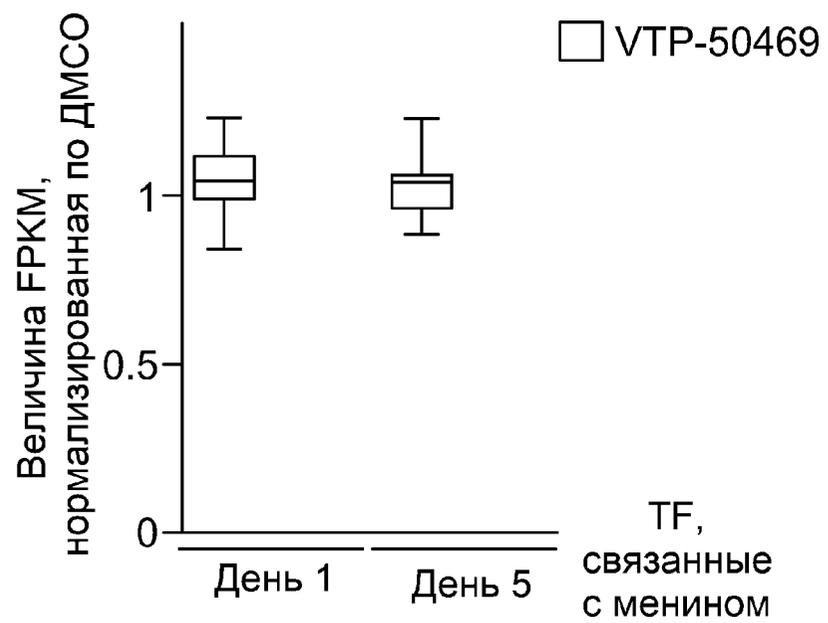


VTP-50469

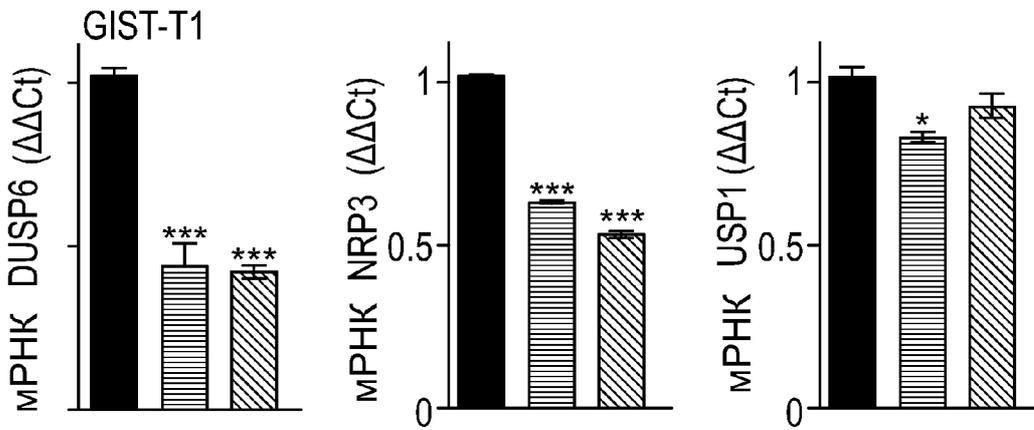
Фиг. 5D



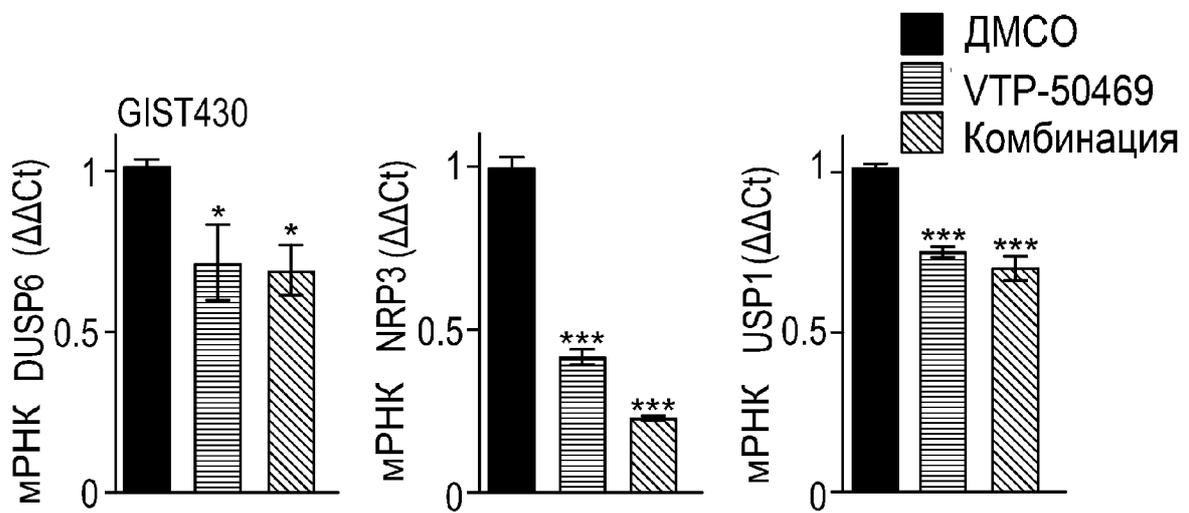
Фиг. 5Е



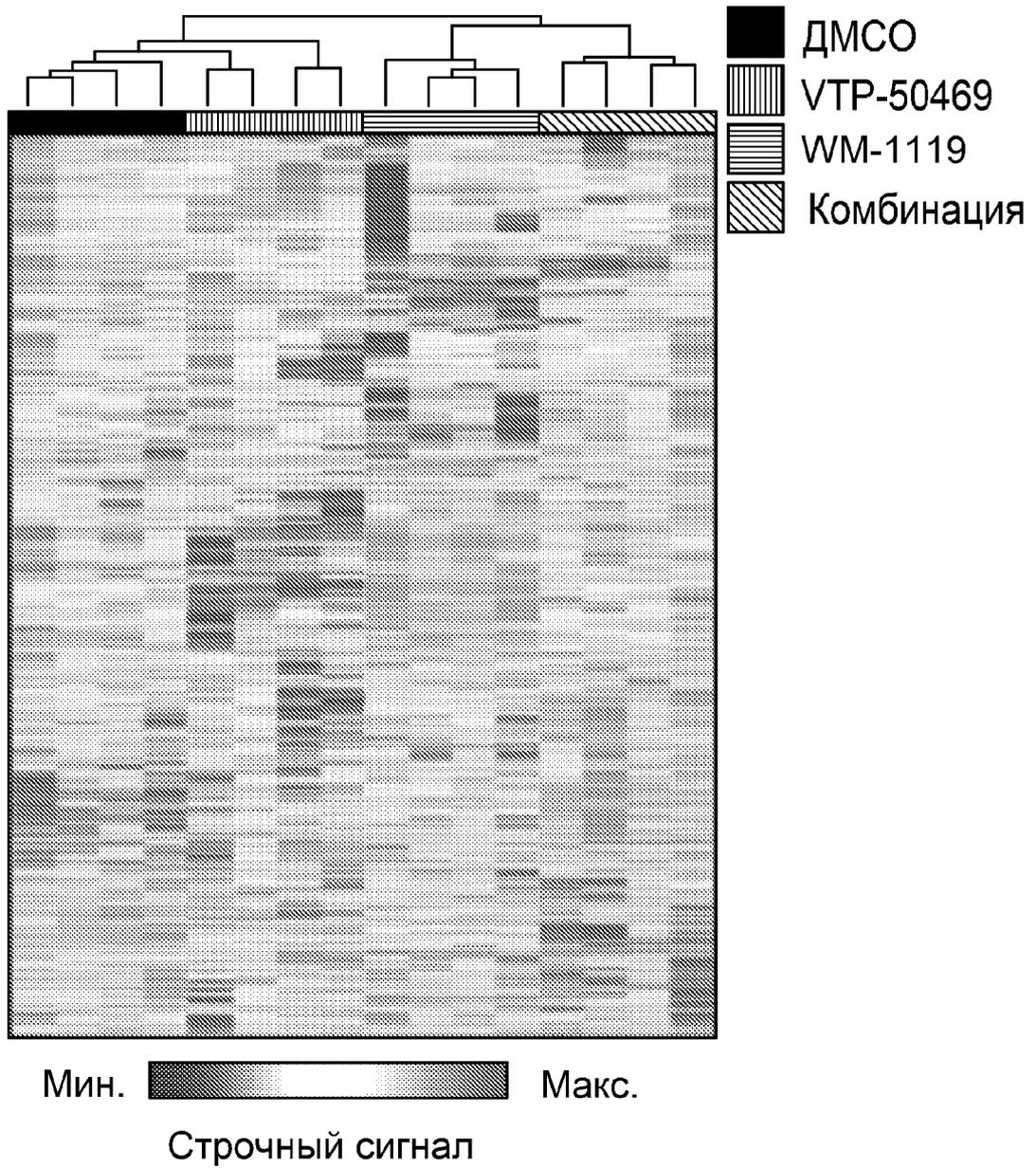
Фиг. 5F



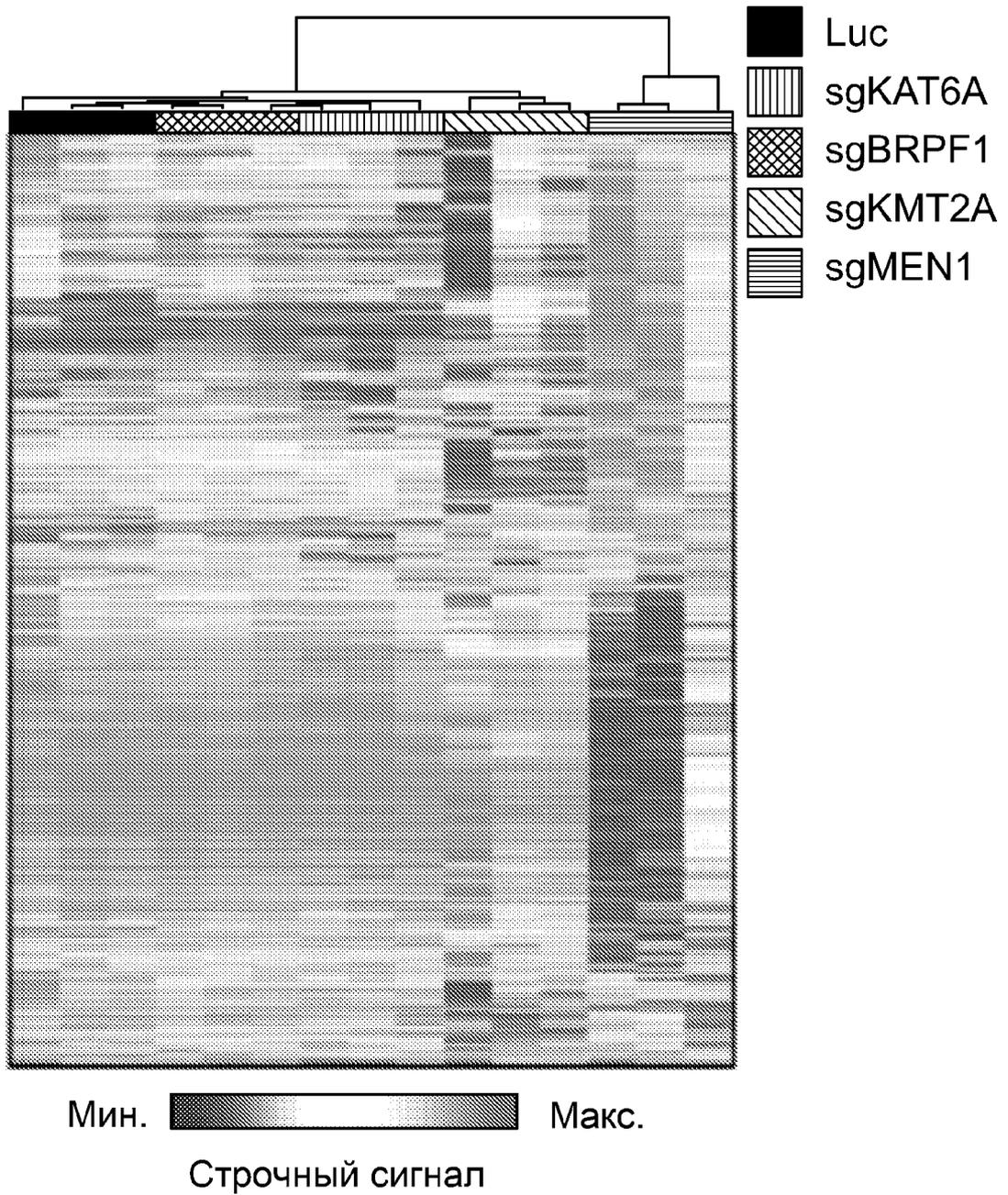
Фиг. 5G



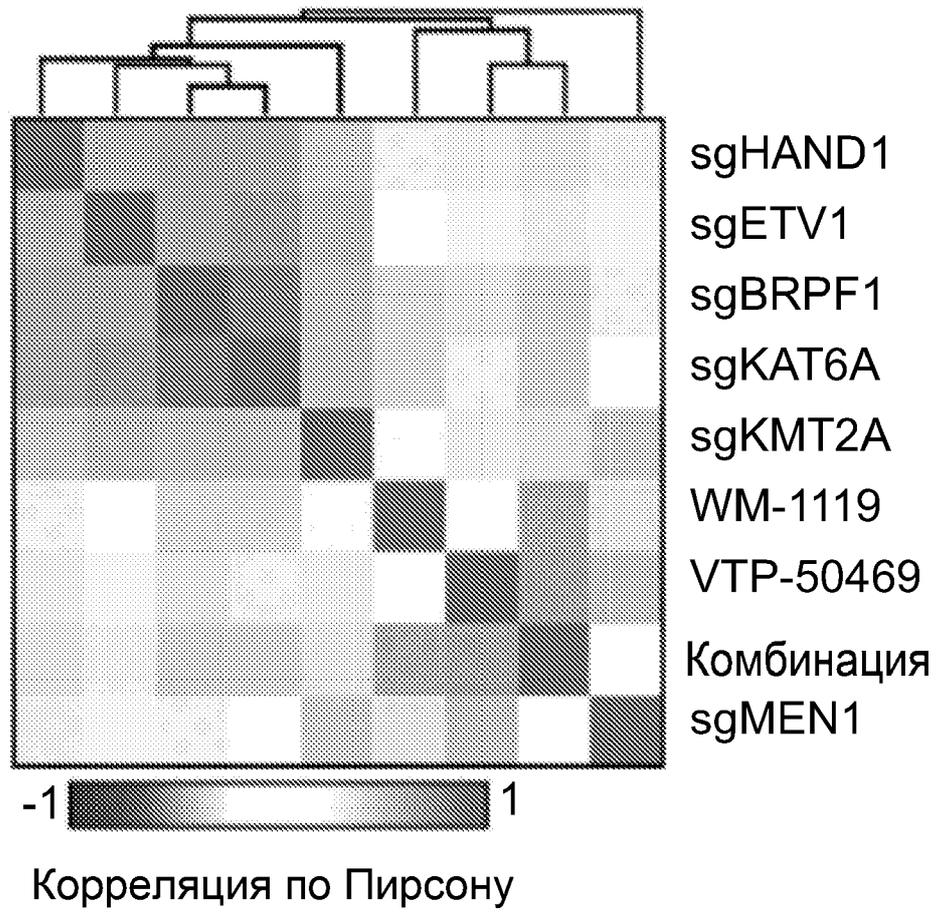
Фиг. 5H



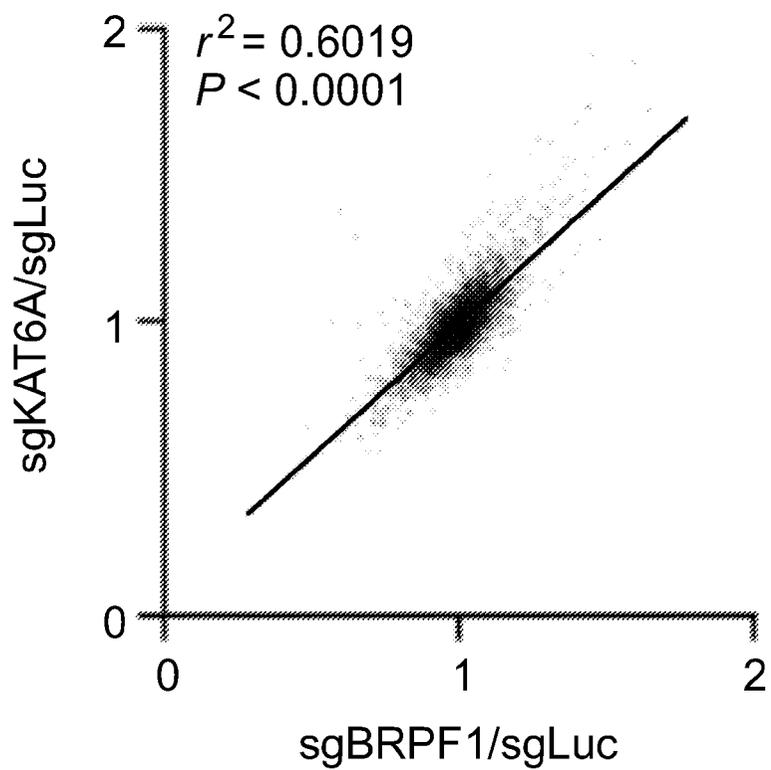
Фиг. 5I



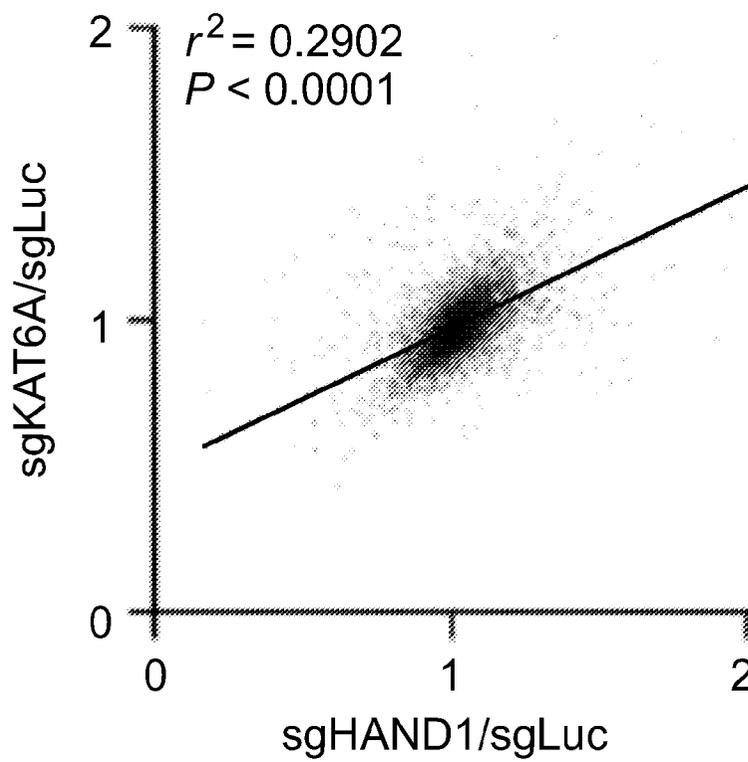
Фиг. 5J



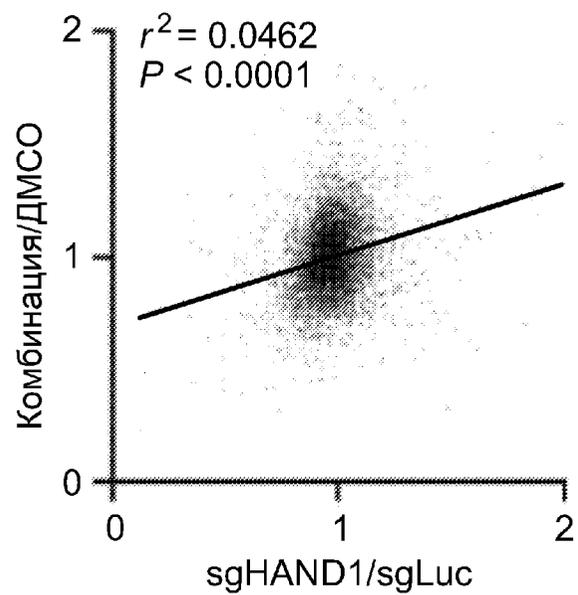
Фиг. 5К



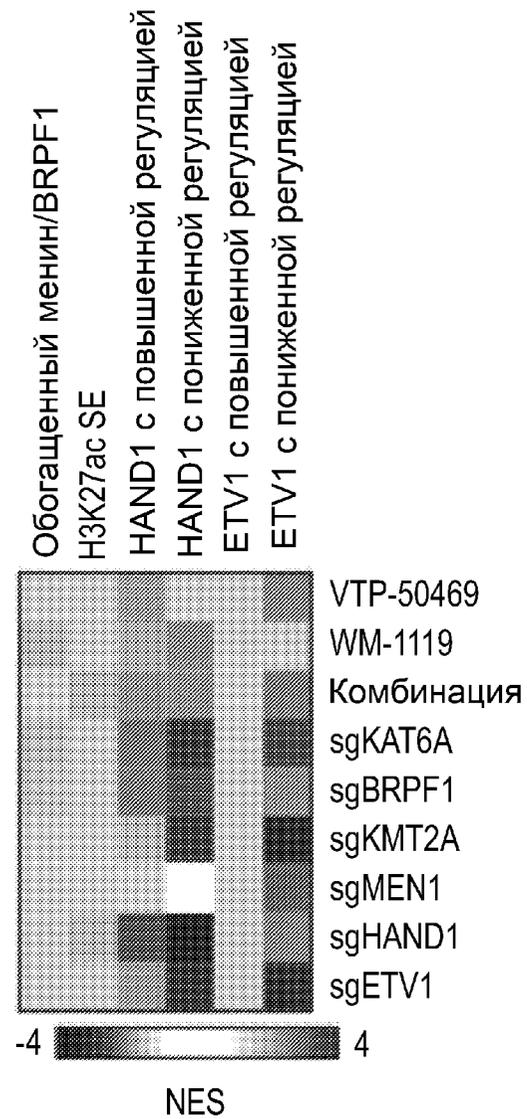
Фиг. 5L



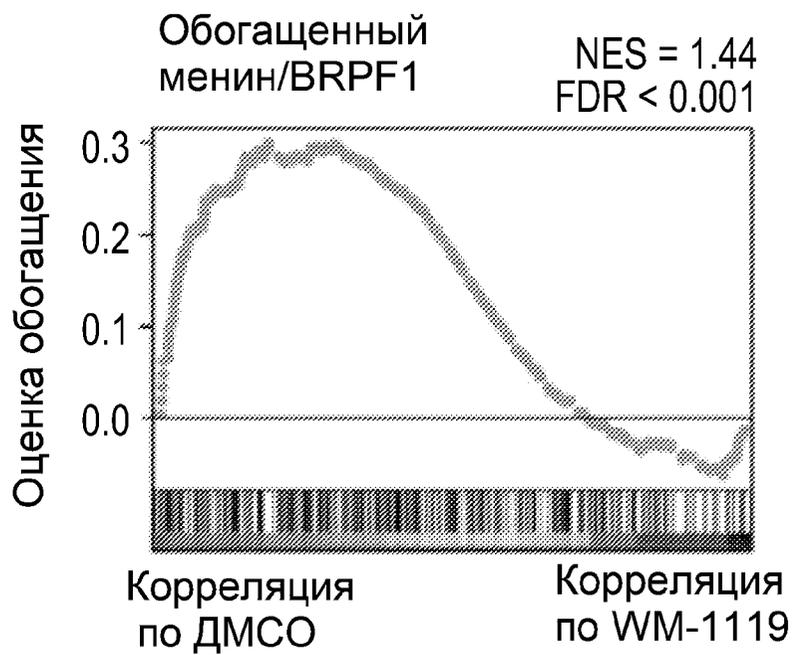
Фиг. 5M



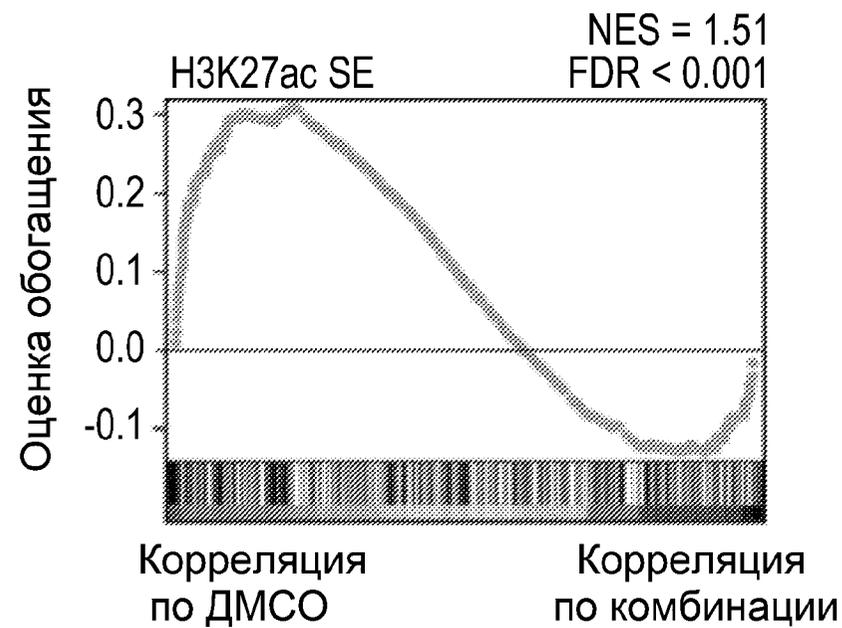
Фиг. 5N



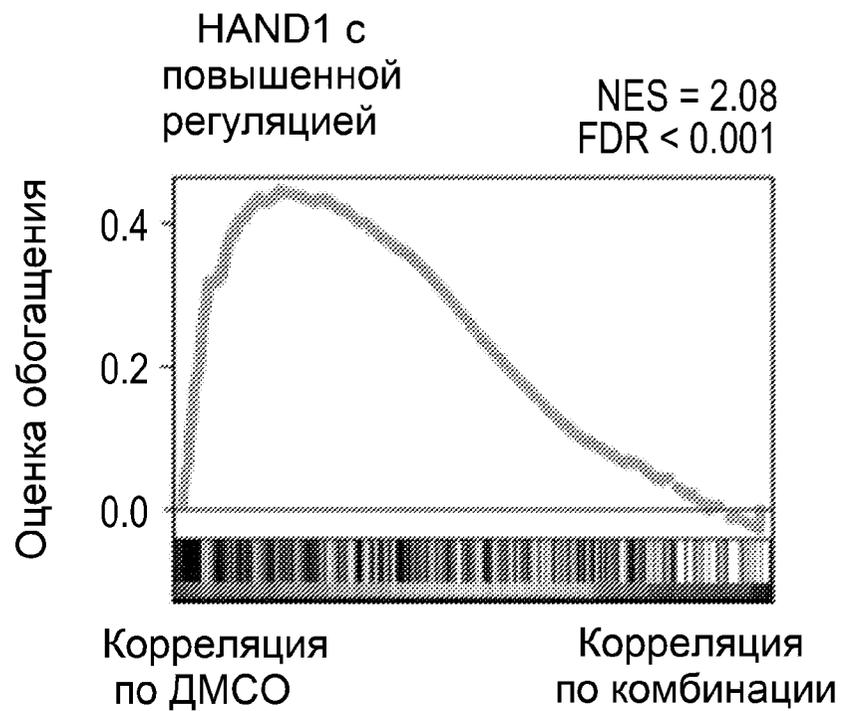
Фиг. 5O



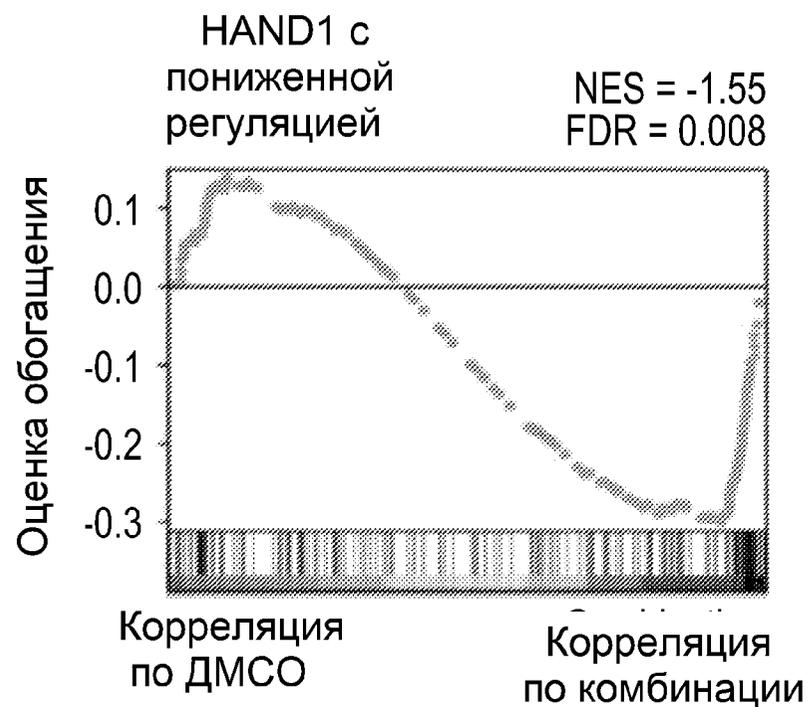
Фиг. 5P



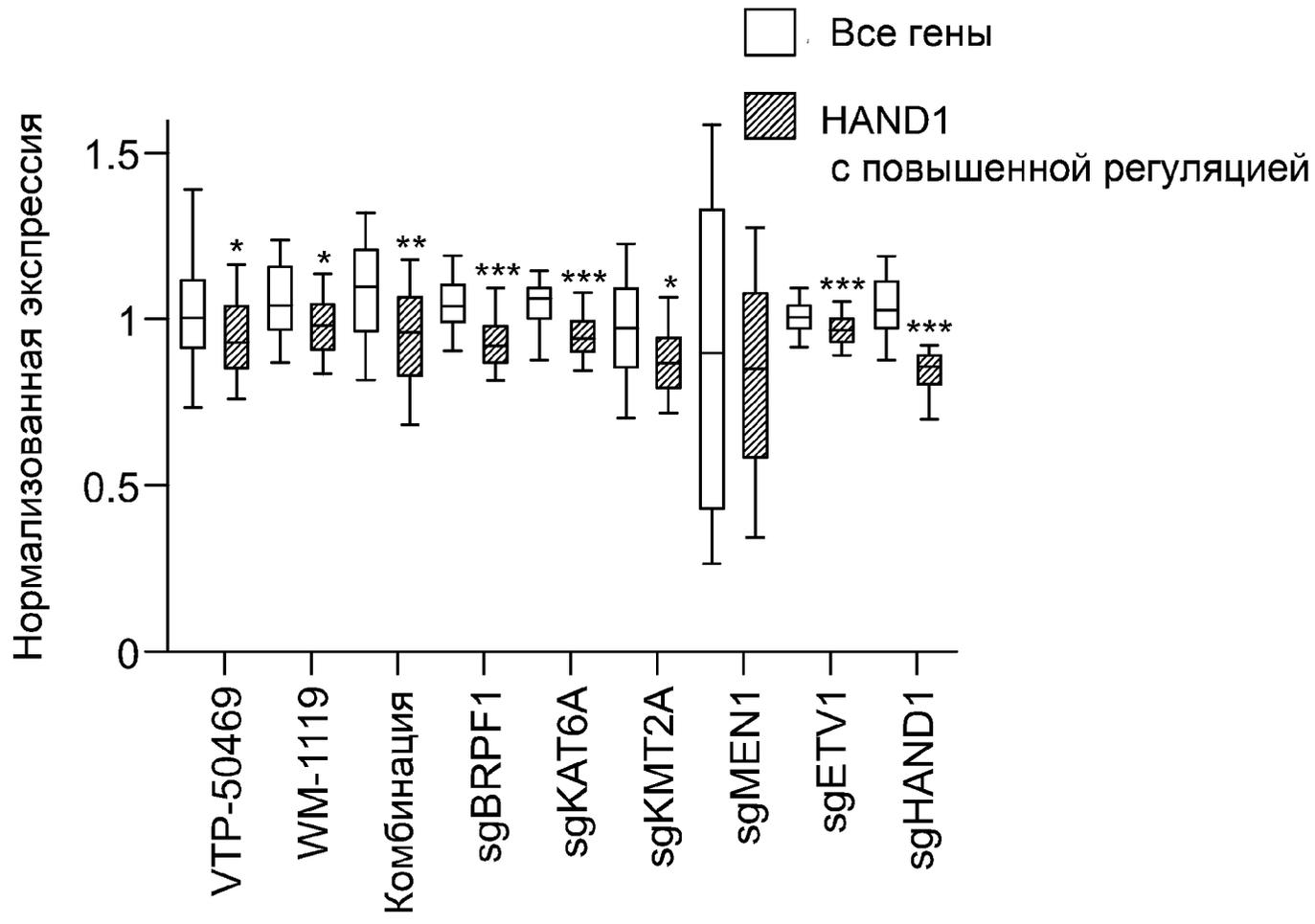
Фиг. 5Q



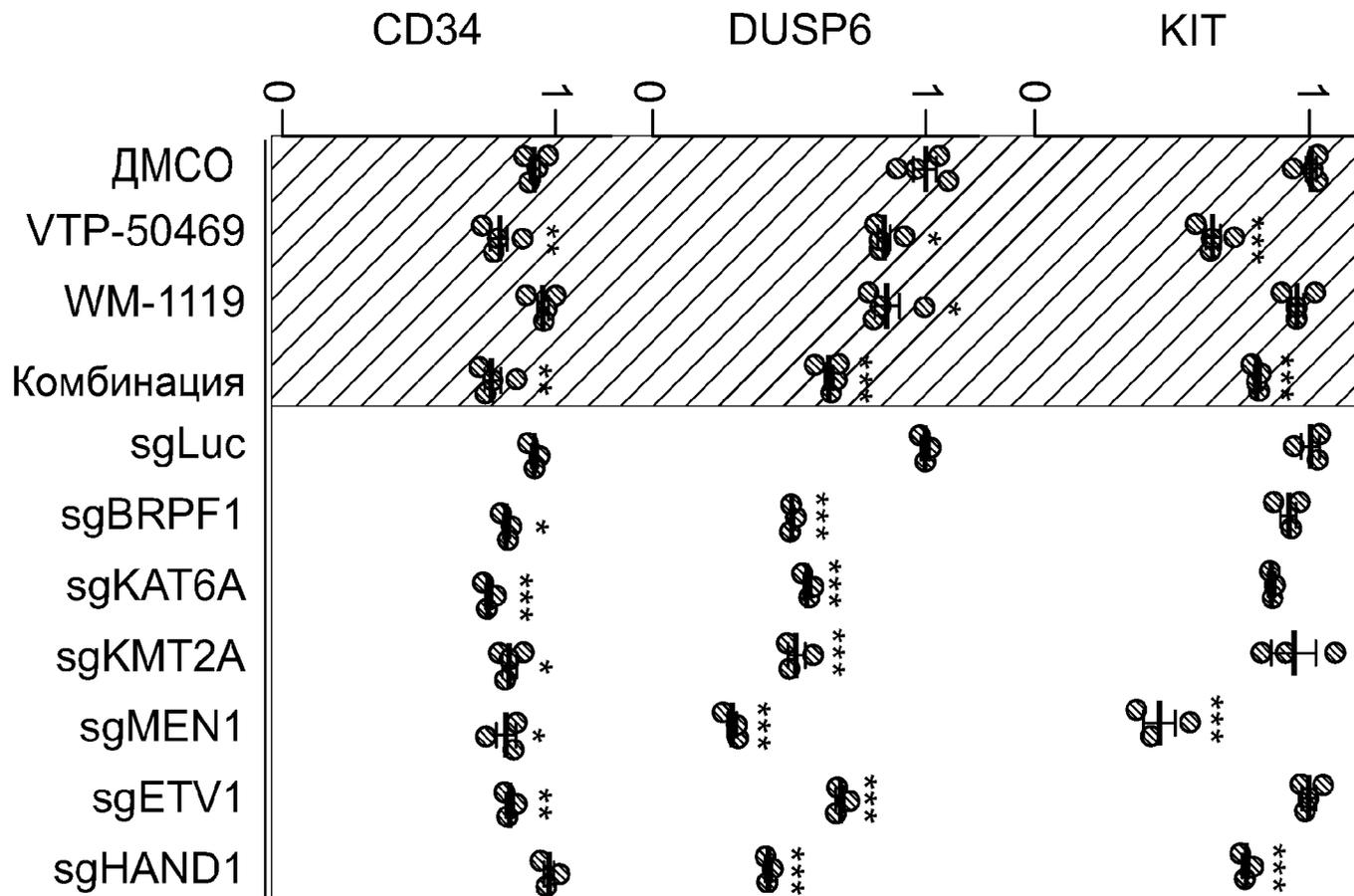
Фиг. 5R



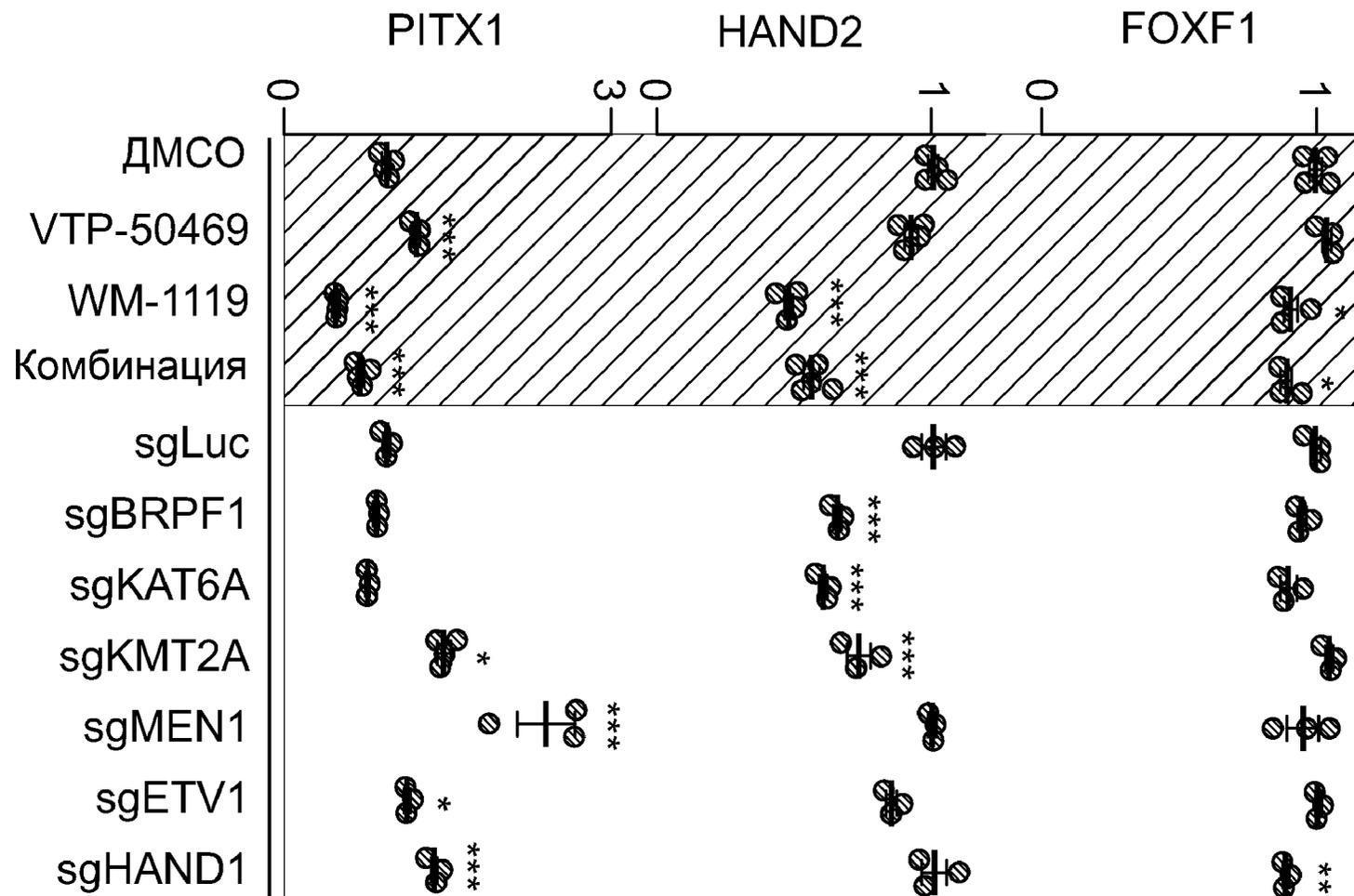
Фиг. 5S



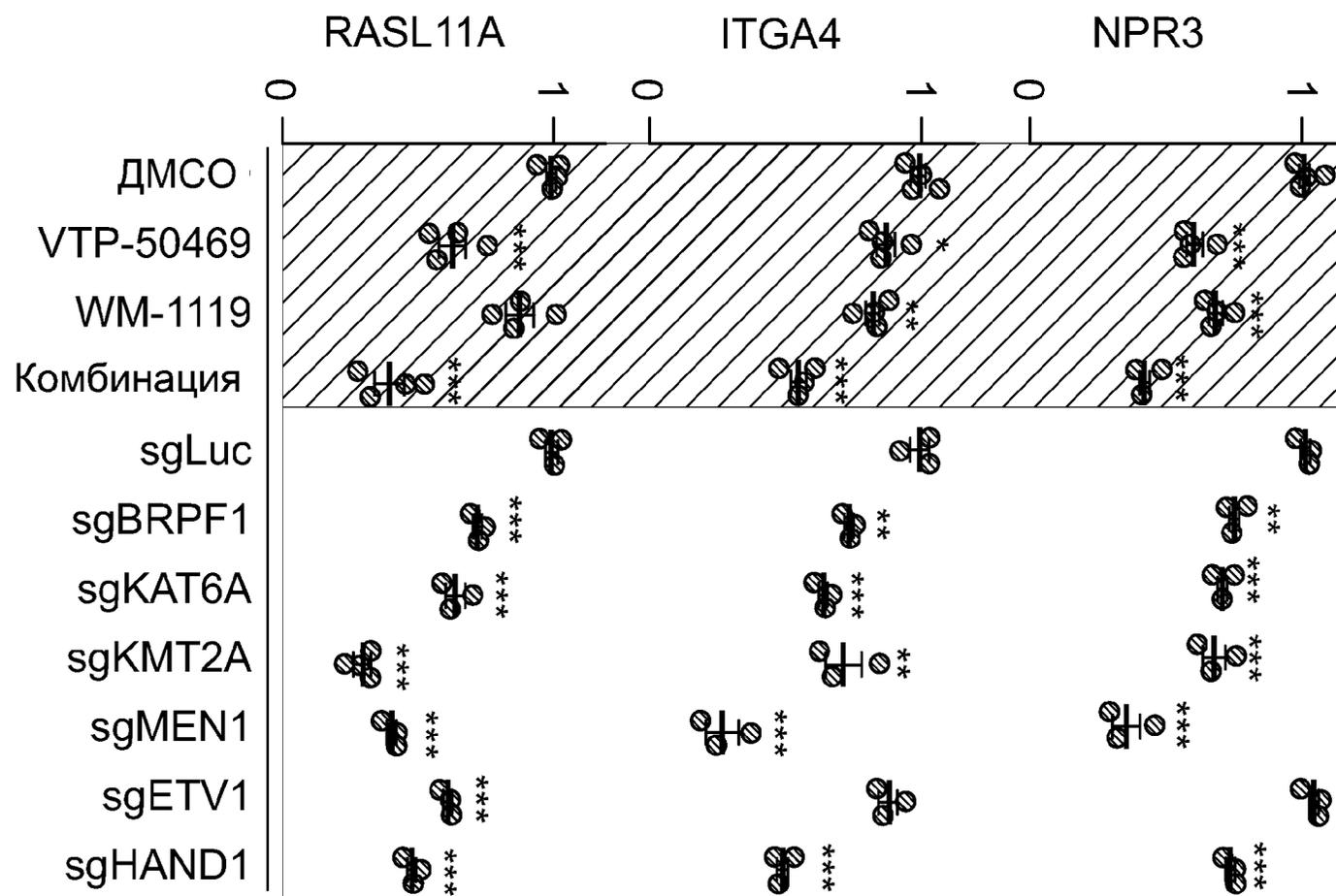
Фиг. 5Т



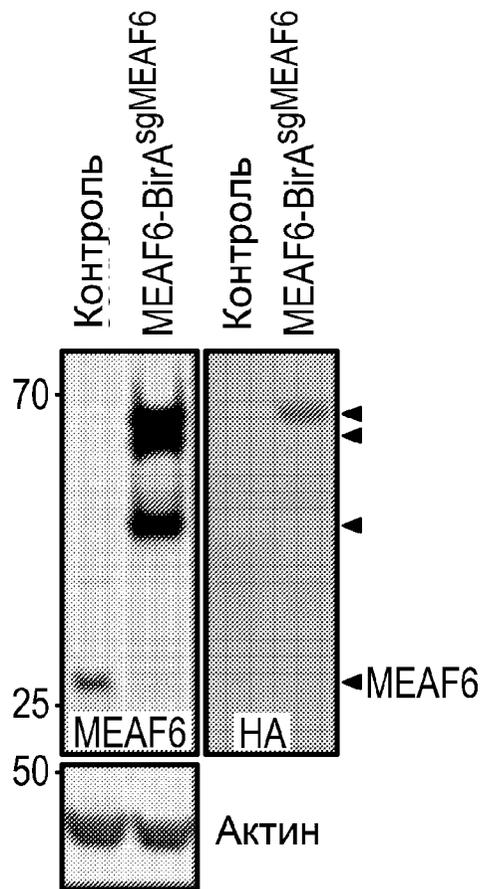
Фиг. 5U



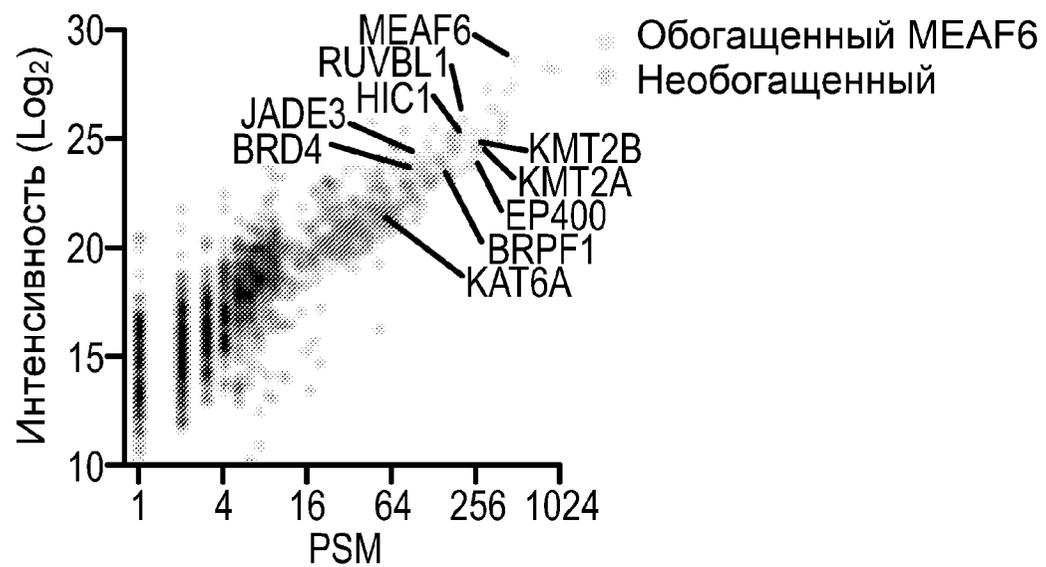
Фиг. 5V



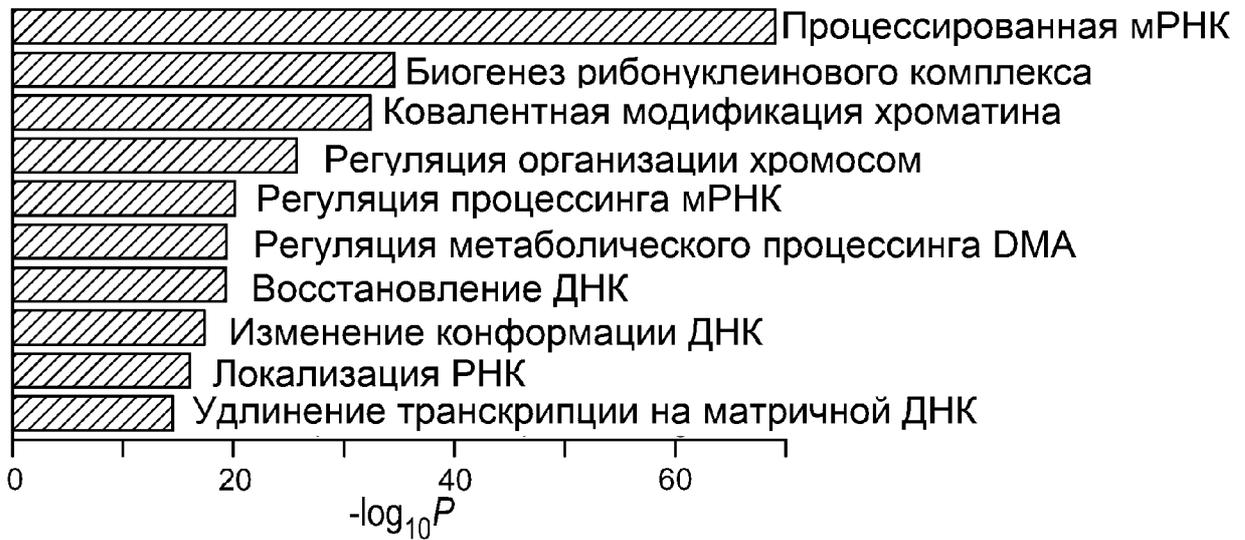
Фиг. 5W



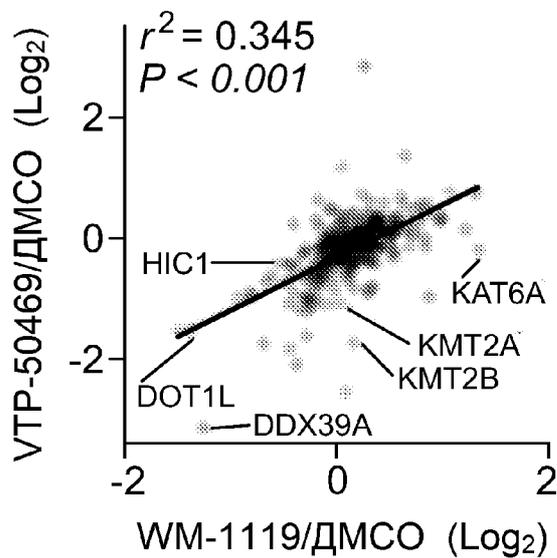
Фиг. 6А



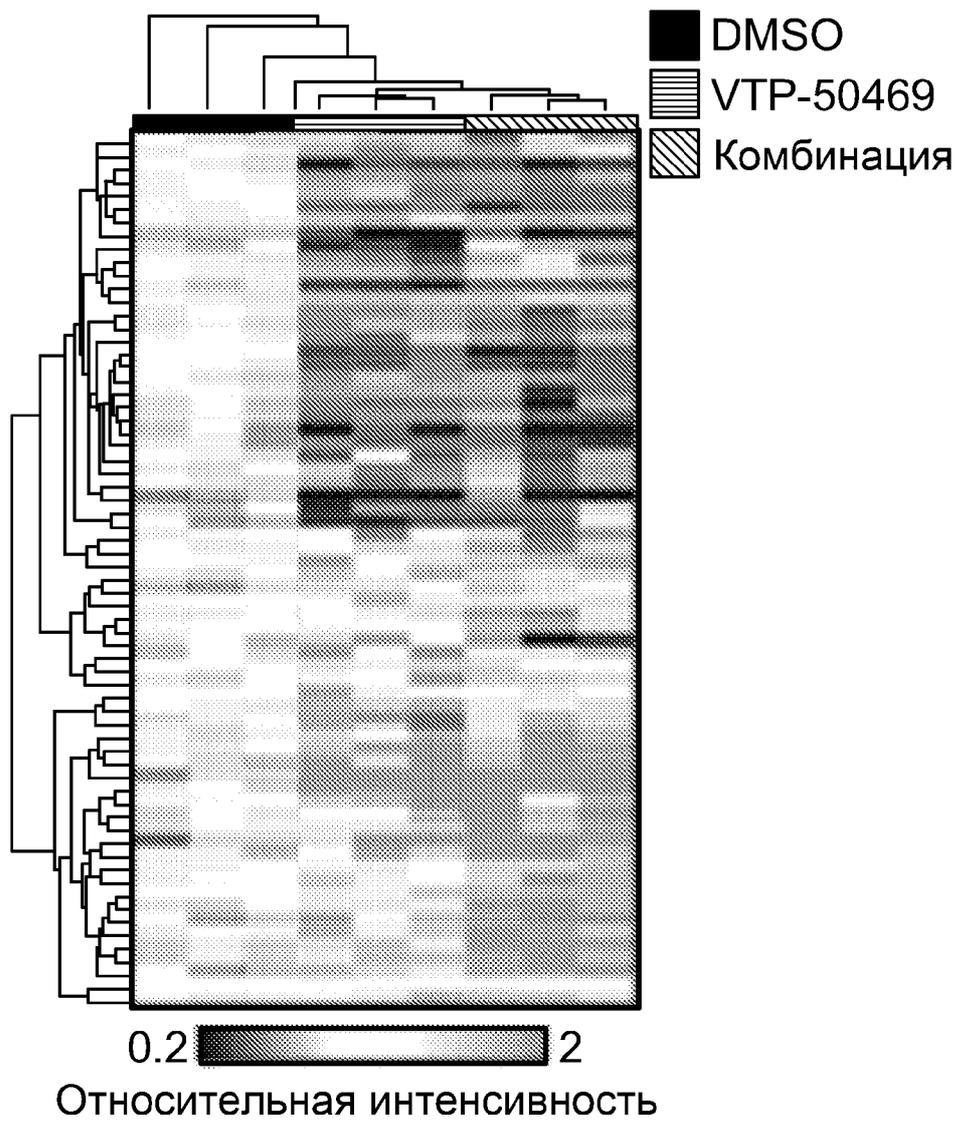
Фиг. 6В



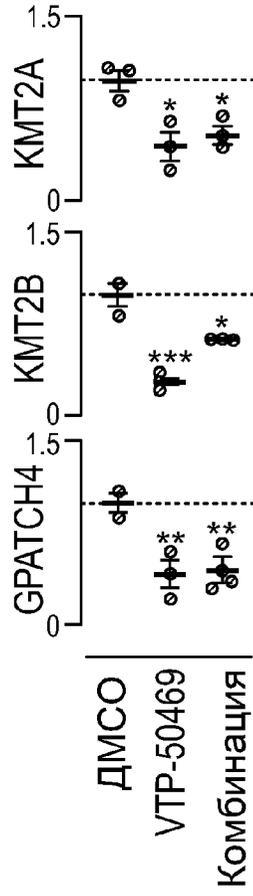
Фиг. 6С



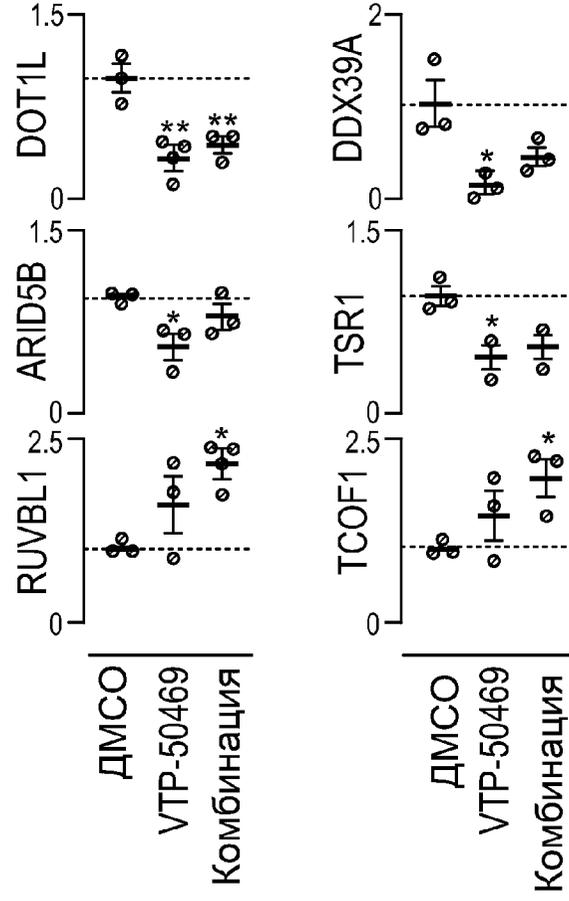
Фиг. 6D



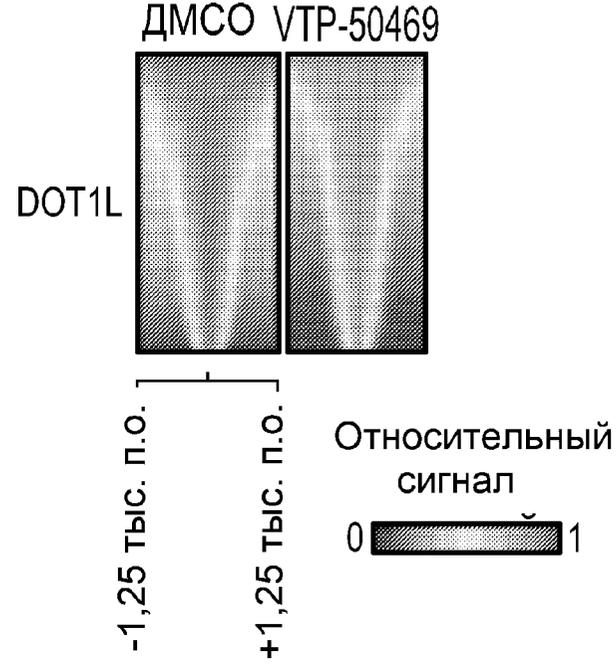
Фиг. 6Е



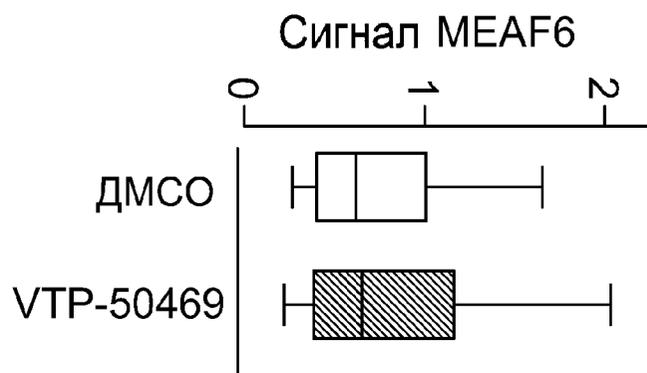
Фиг. 6F



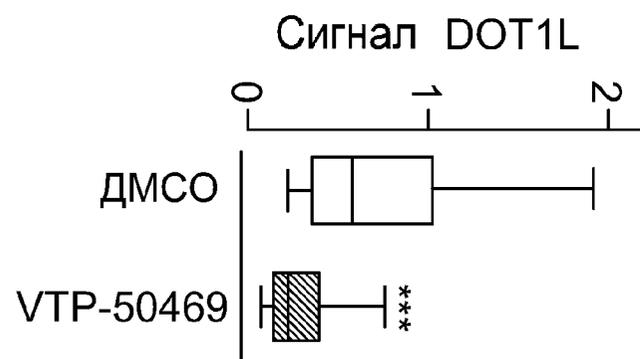
Фиг. 6G



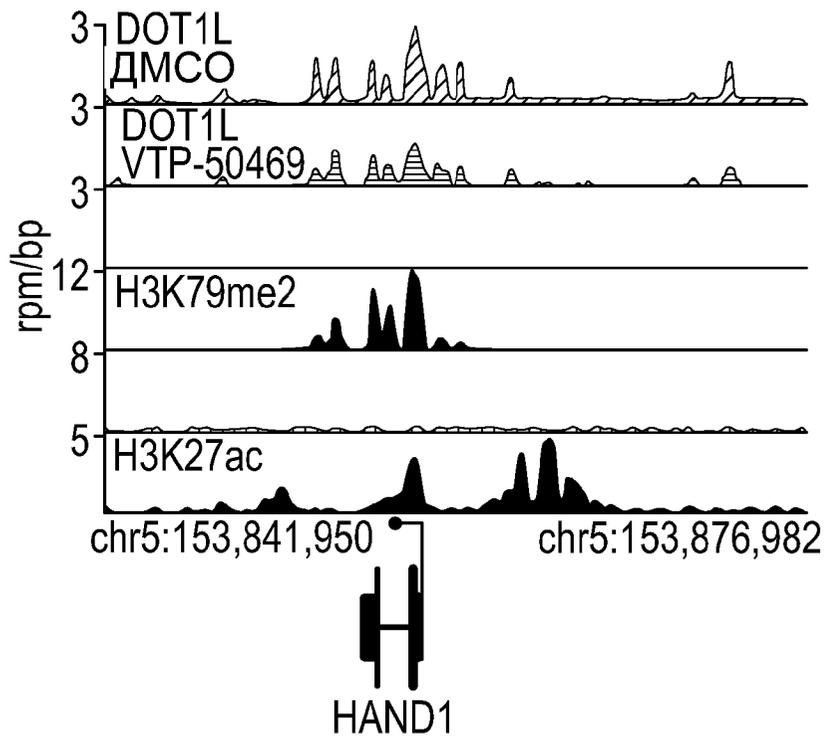
Фиг. 6H



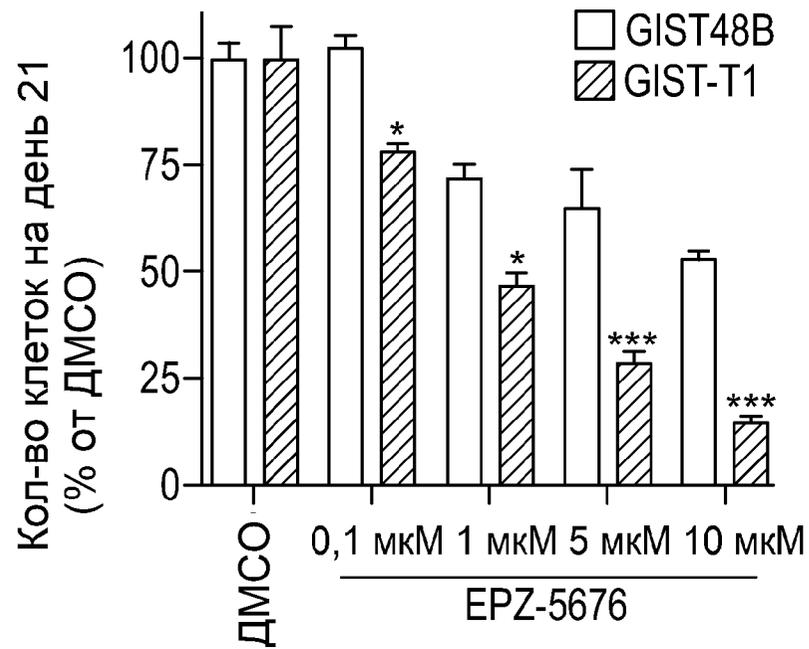
Фиг. 6I



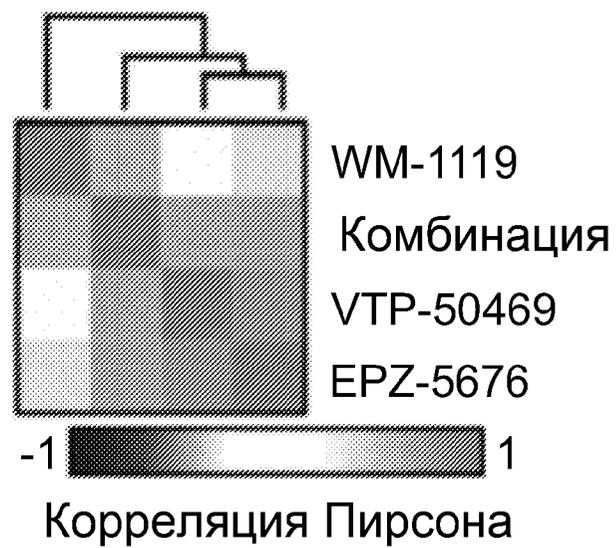
Фиг. 6J



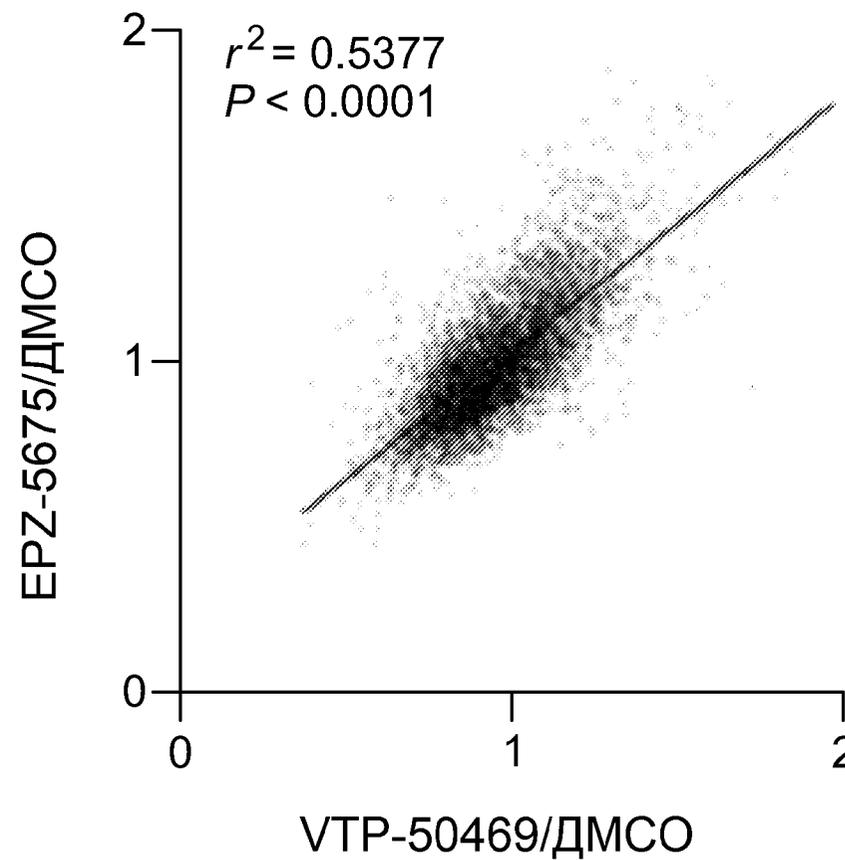
Фиг. 6К



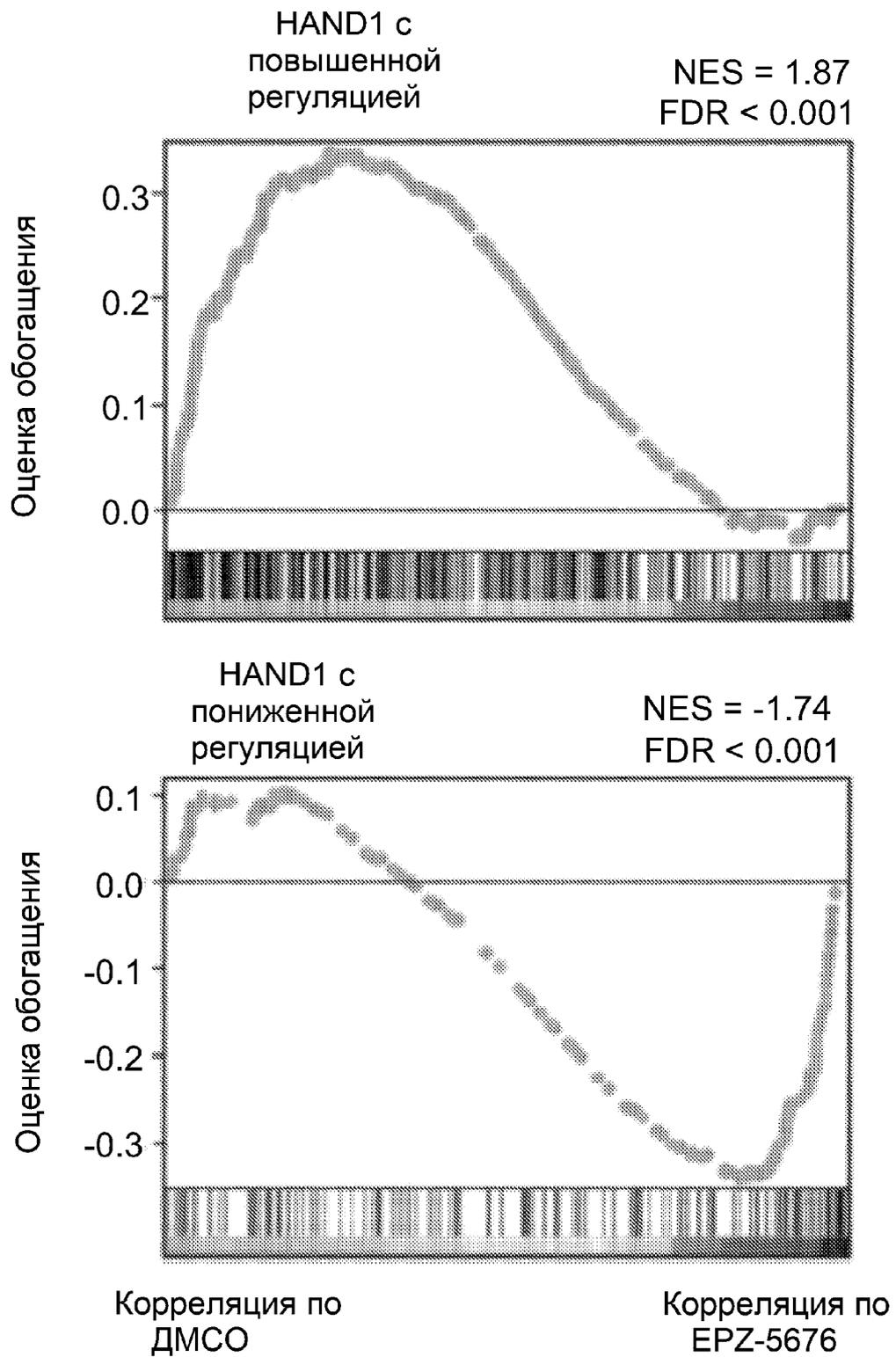
Фиг. 6L



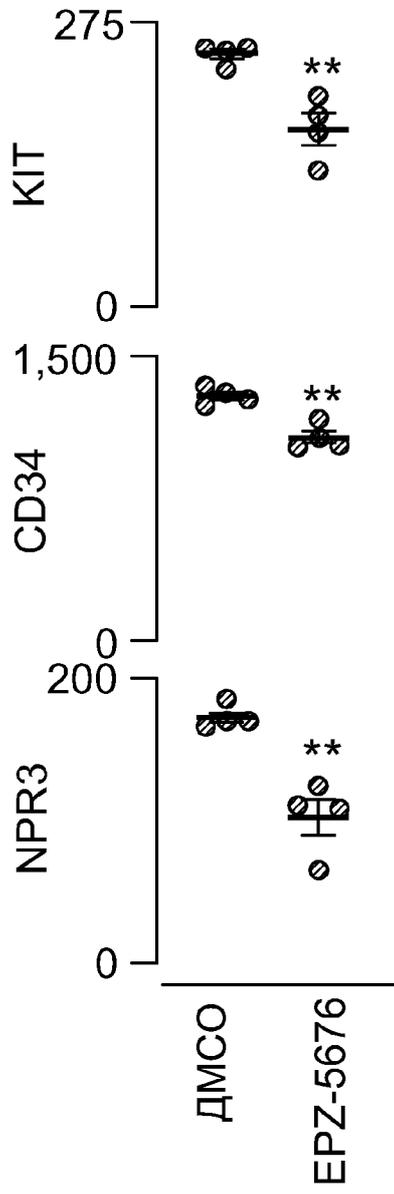
Фиг. 6М



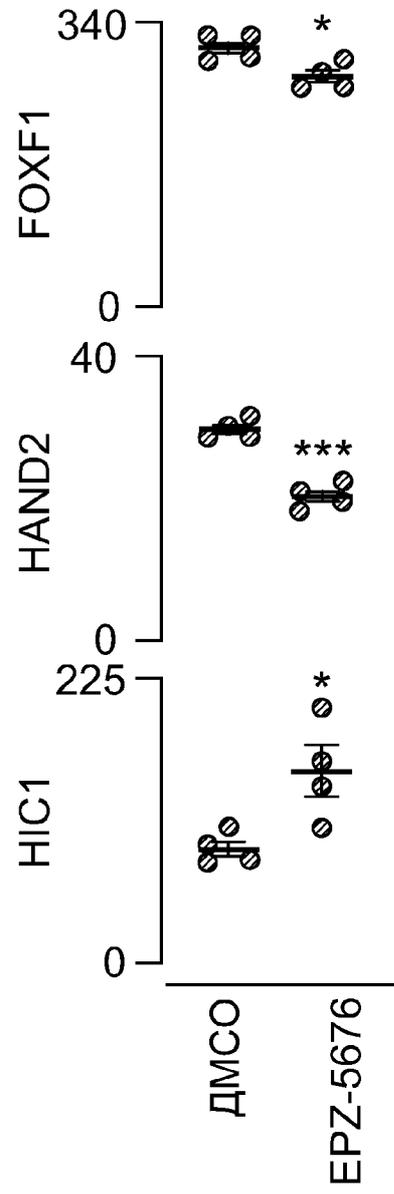
Фиг. 6N



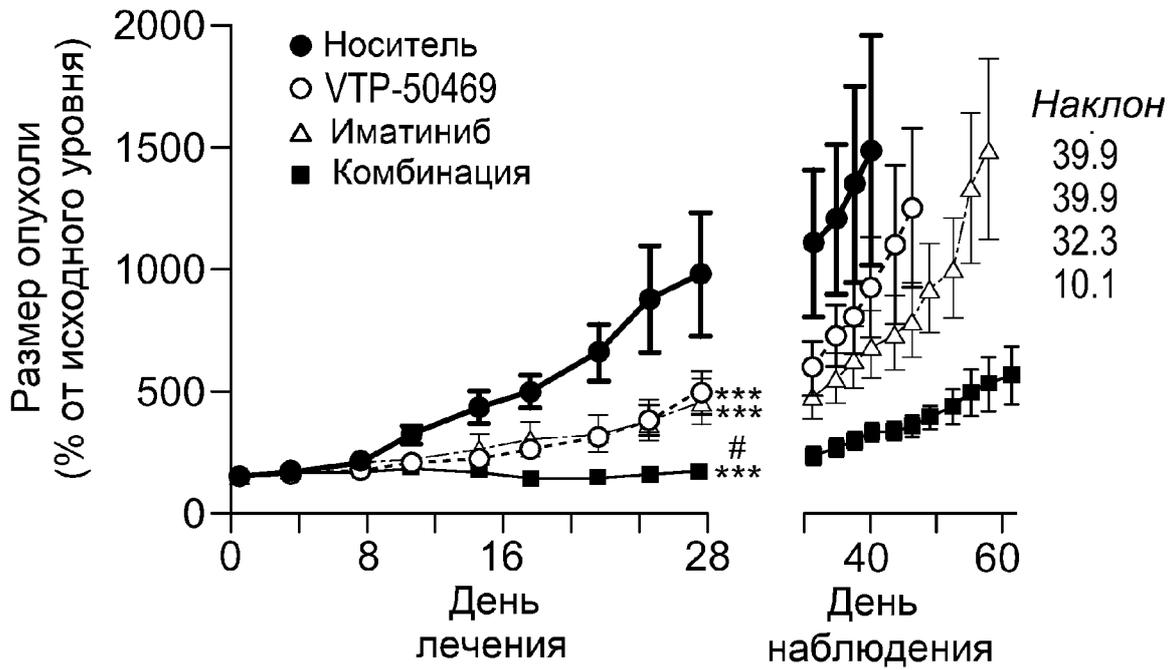
Фиг. 60



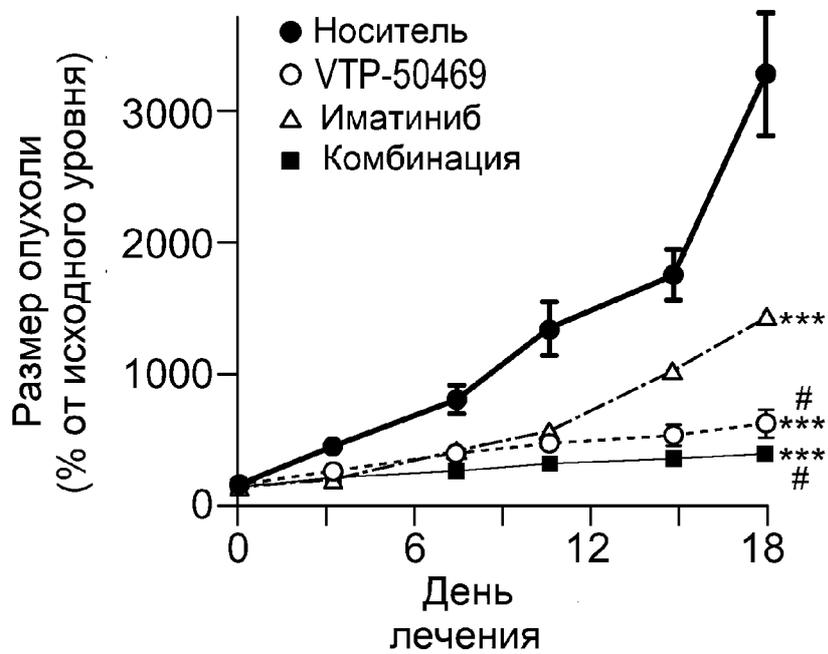
Фиг. 6P



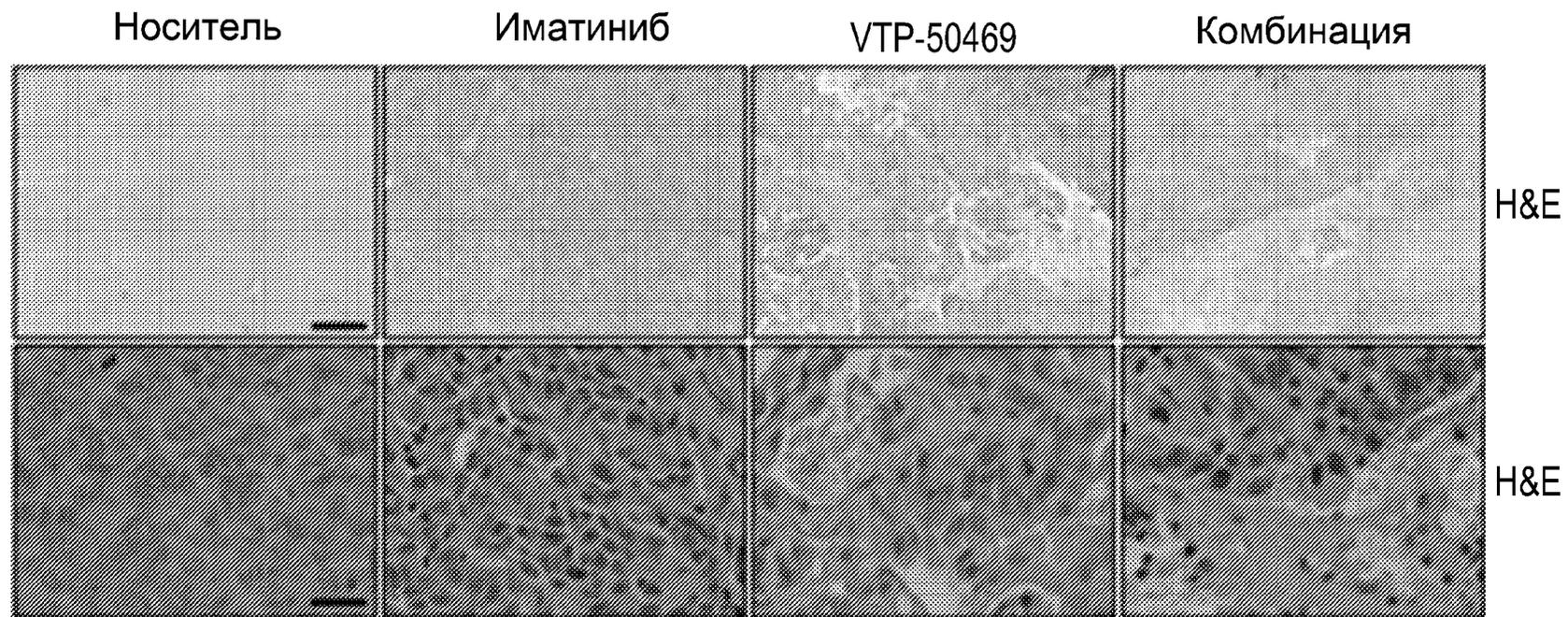
Фиг. 6Q



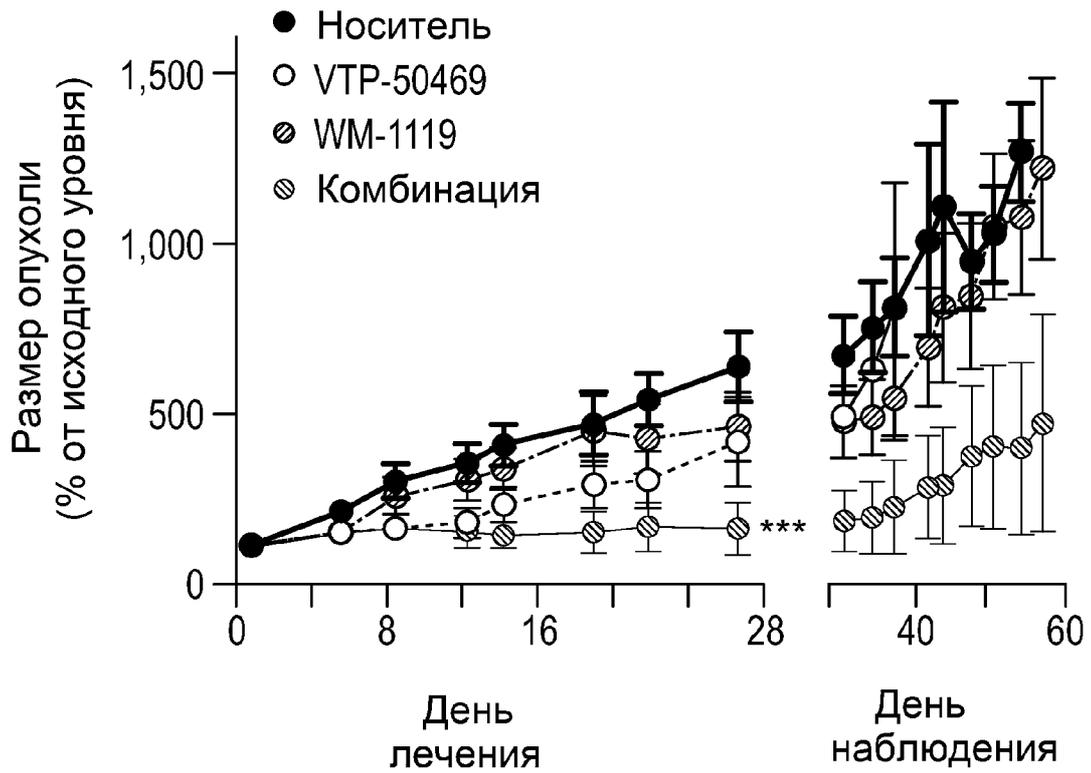
Фиг. 7А



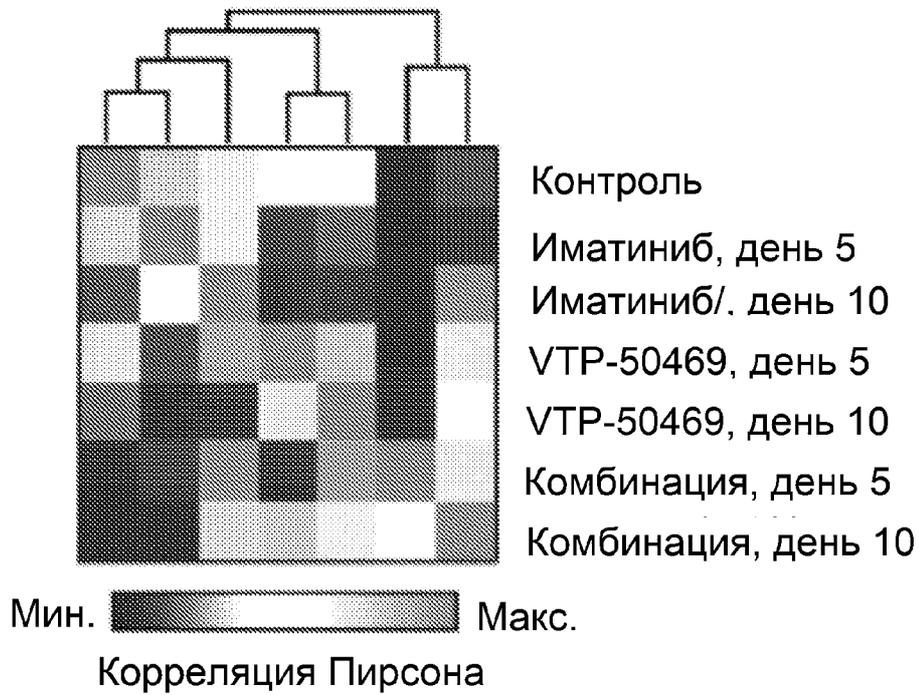
Фиг. 7В



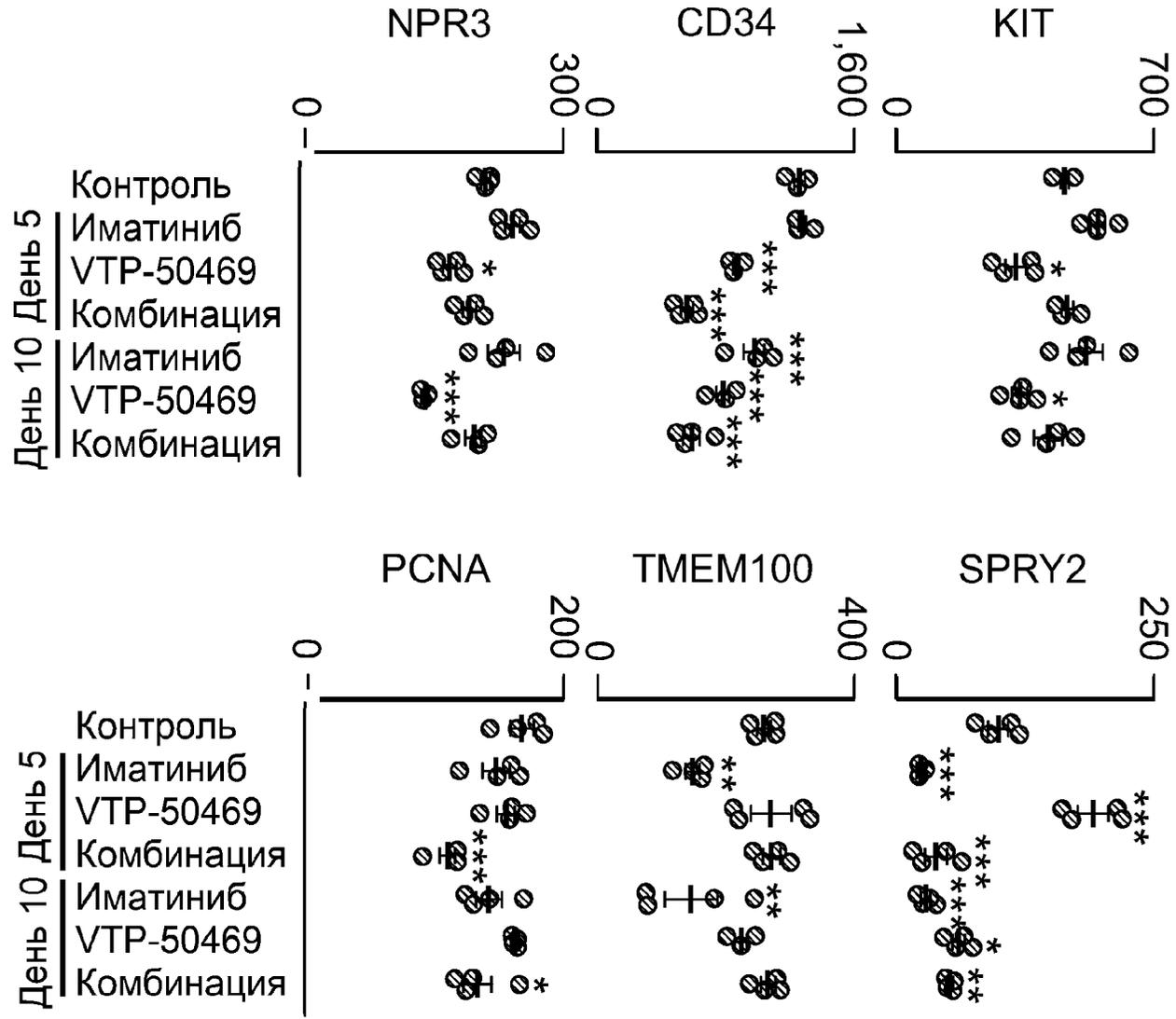
Фиг. 7С



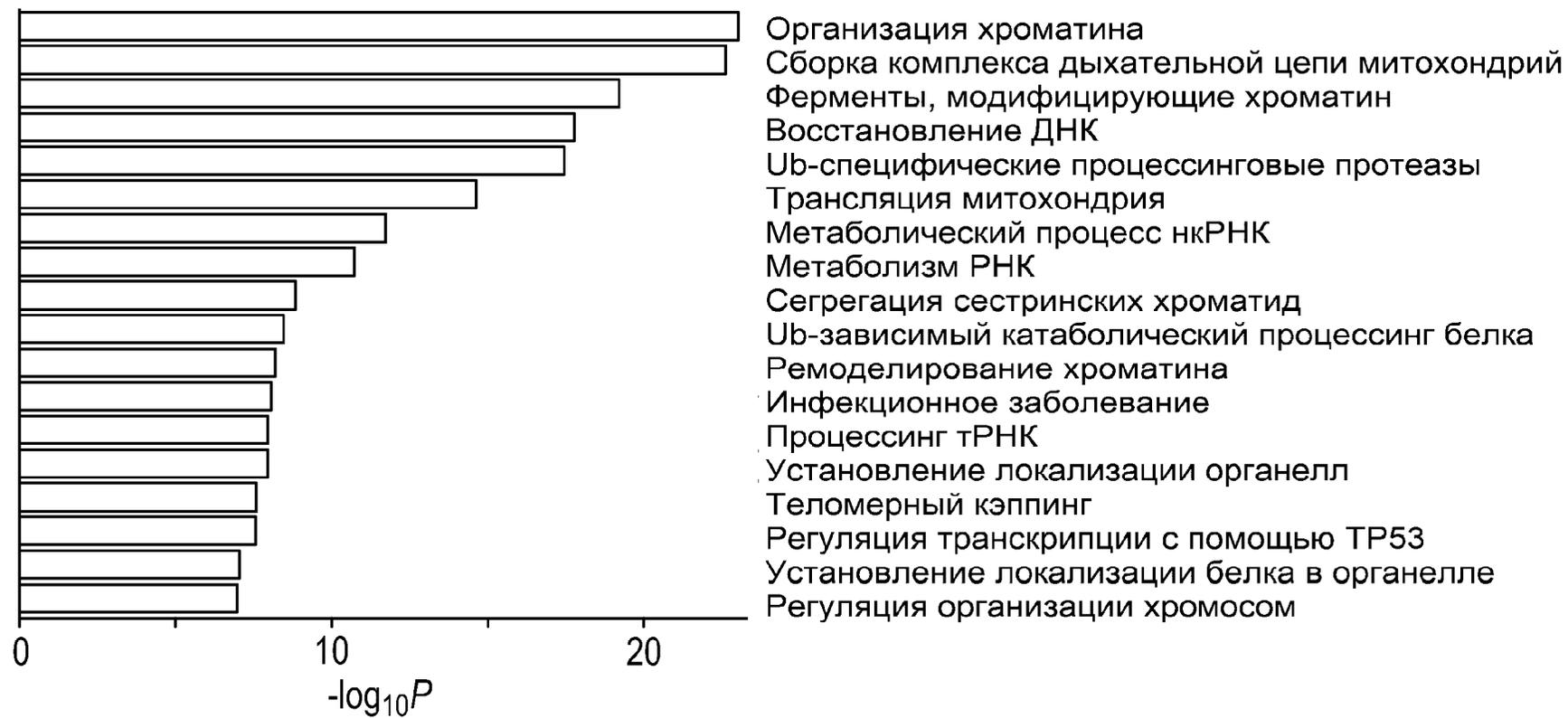
Фиг. 7D



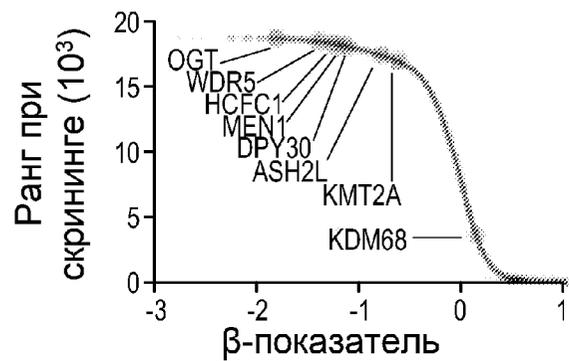
Фиг. 7E



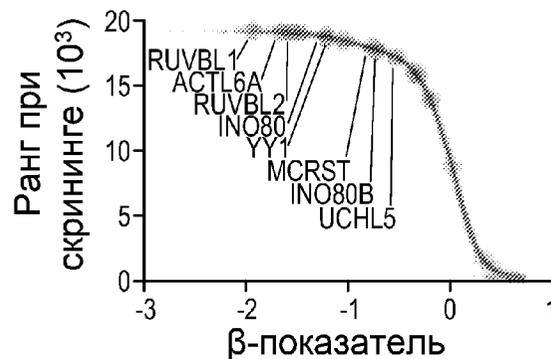
Фиг. 7F



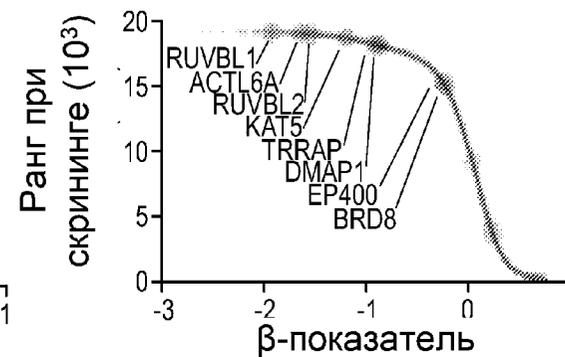
Фиг. 8А



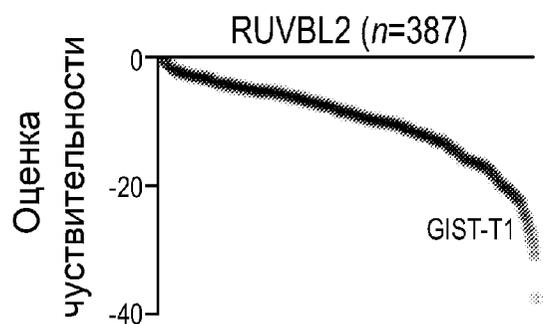
Фиг. 8В



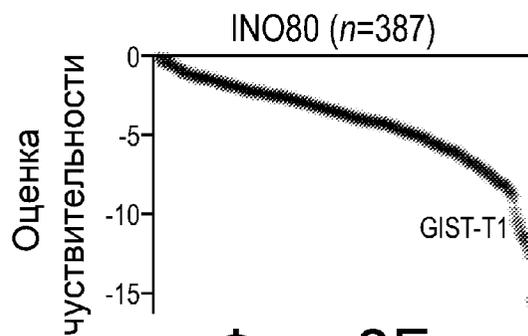
Фиг. 8С



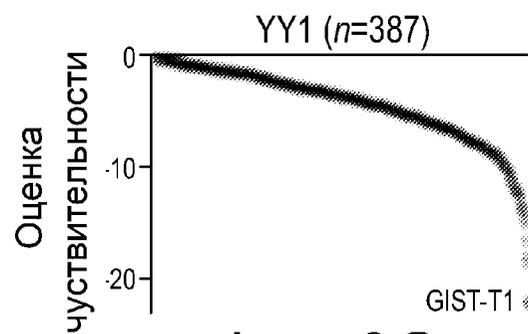
Фиг. 8D



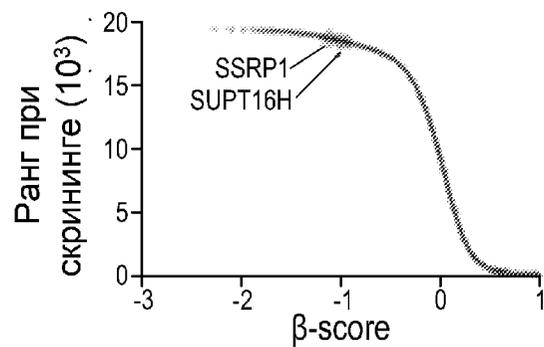
Фиг. 8Е



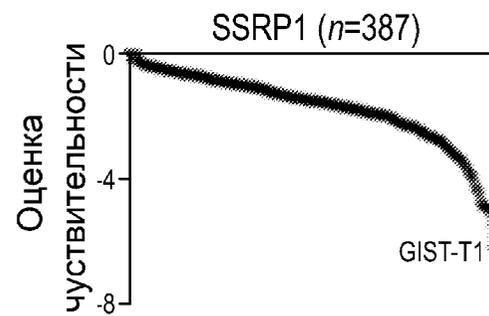
Фиг. 8F



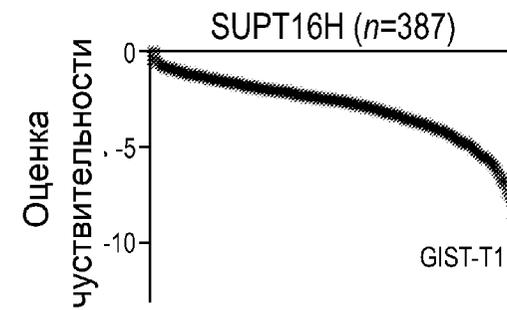
Фиг. 8G



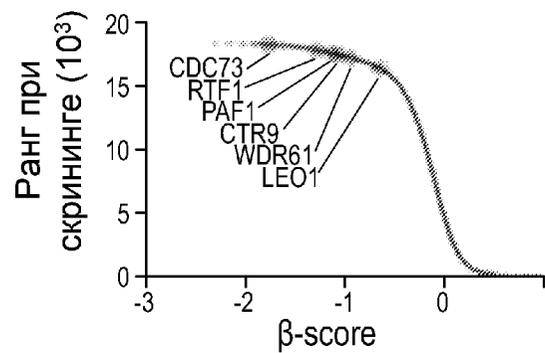
Фиг. 8H



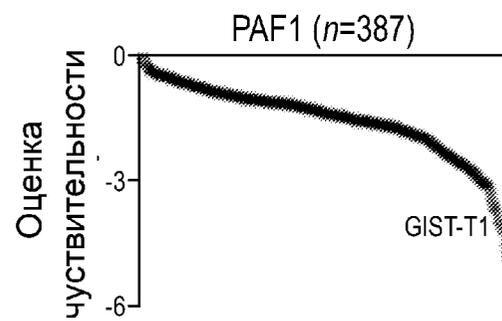
Фиг. 8I



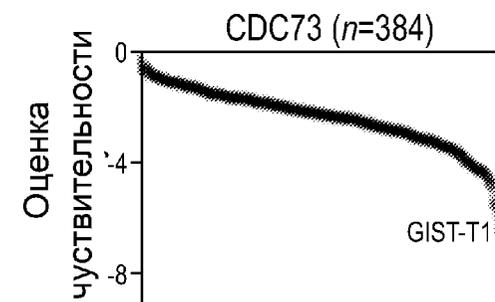
Фиг. 8J



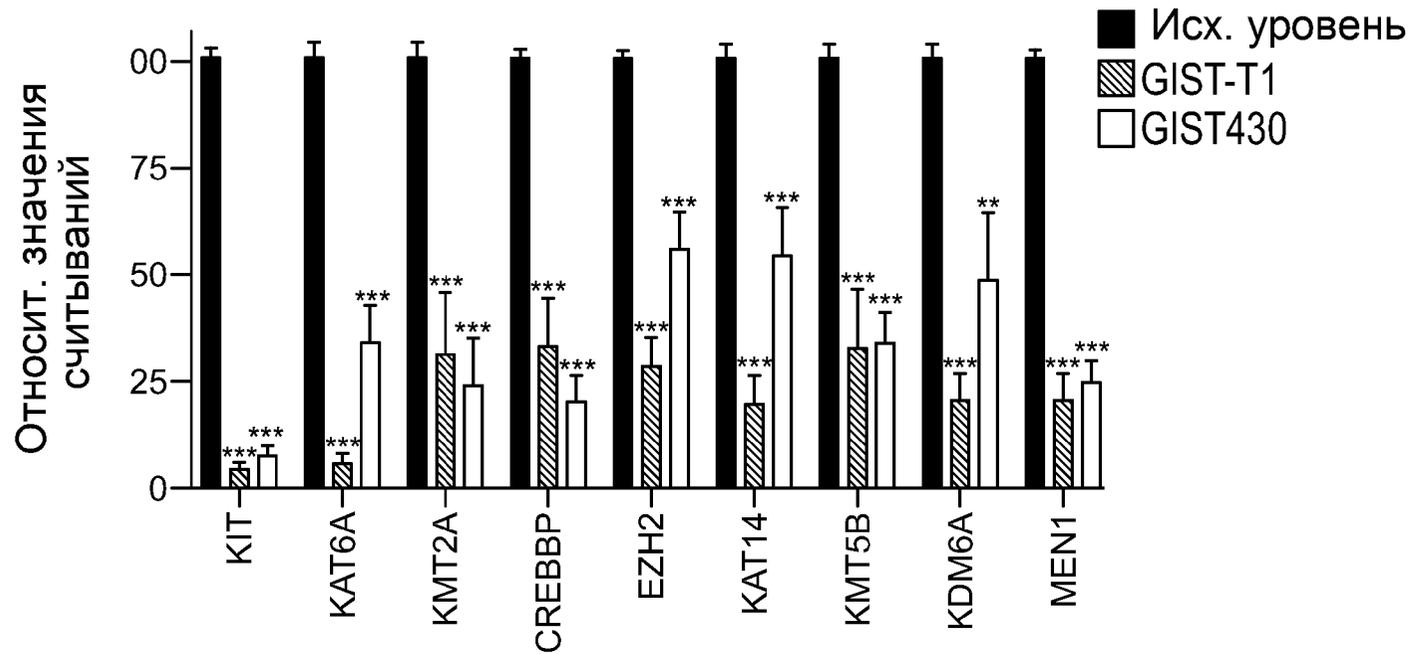
Фиг. 8K



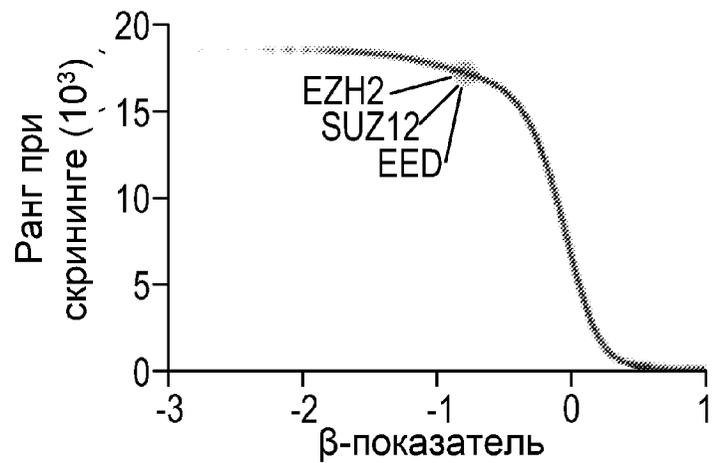
Фиг. 8L



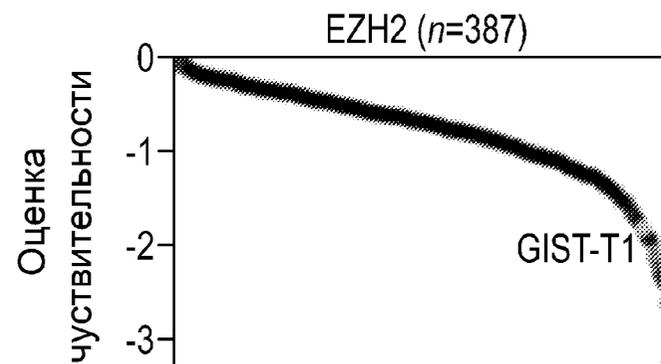
Фиг. 8M



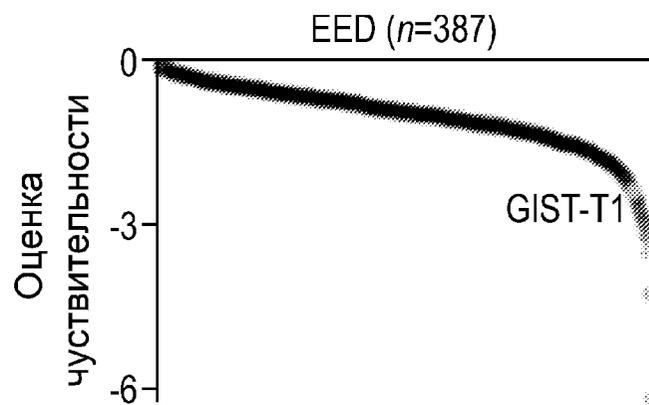
Фиг. 8N



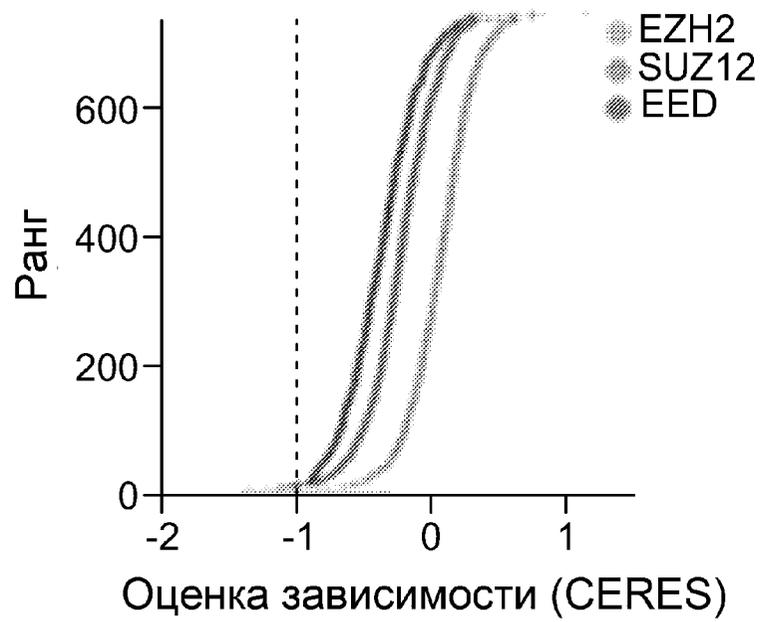
Фиг. 9А



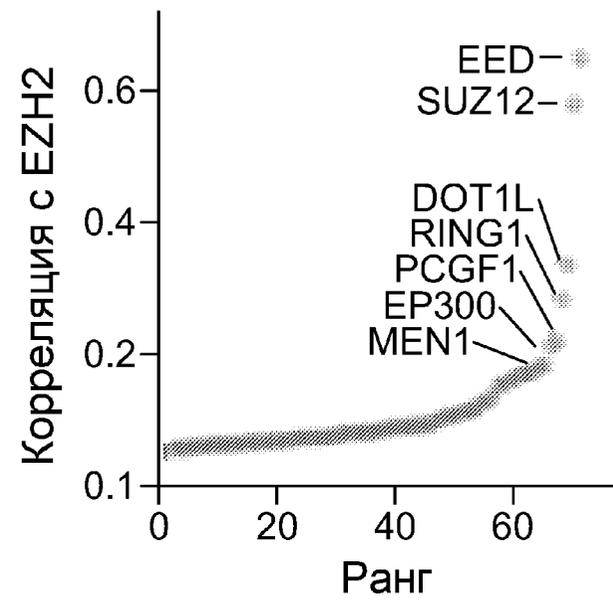
Фиг. 9В



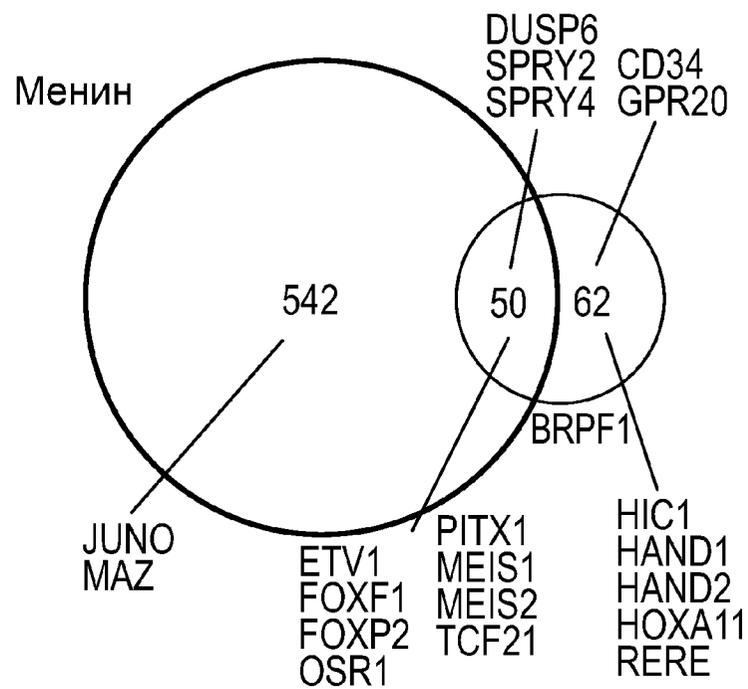
Фиг. 9С



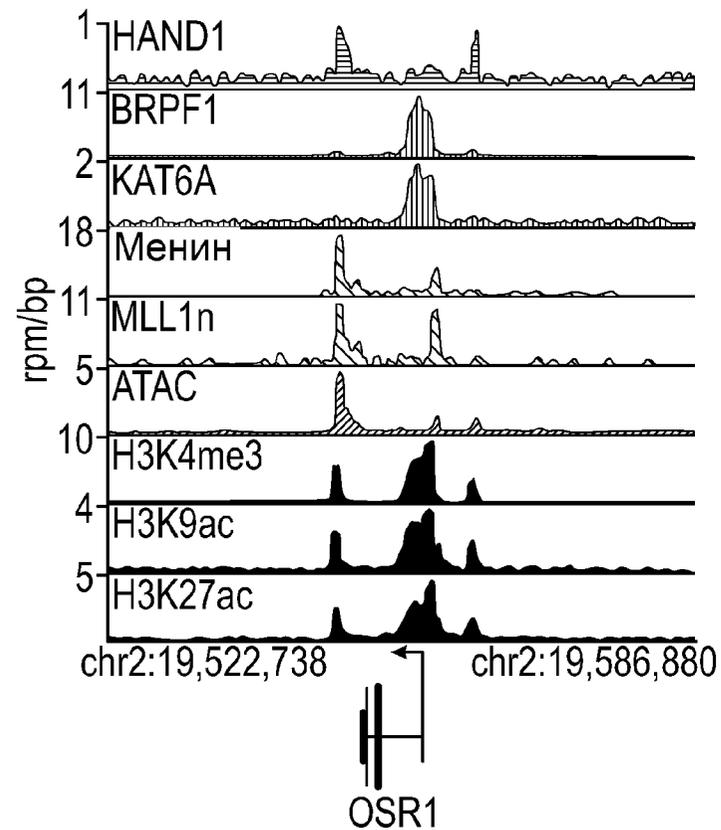
Фиг. 9D



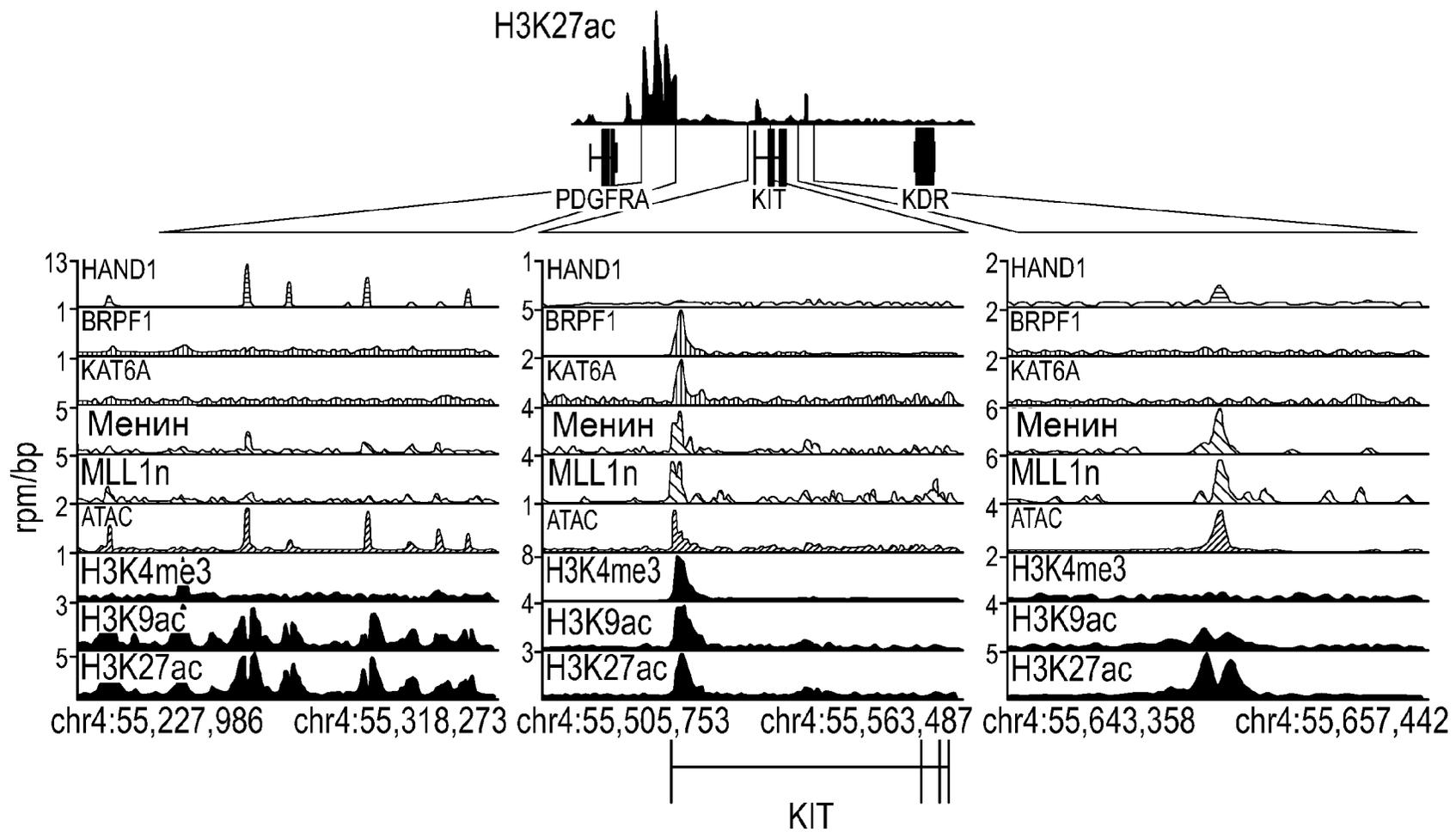
Фиг. 9E



Фиг. 10А



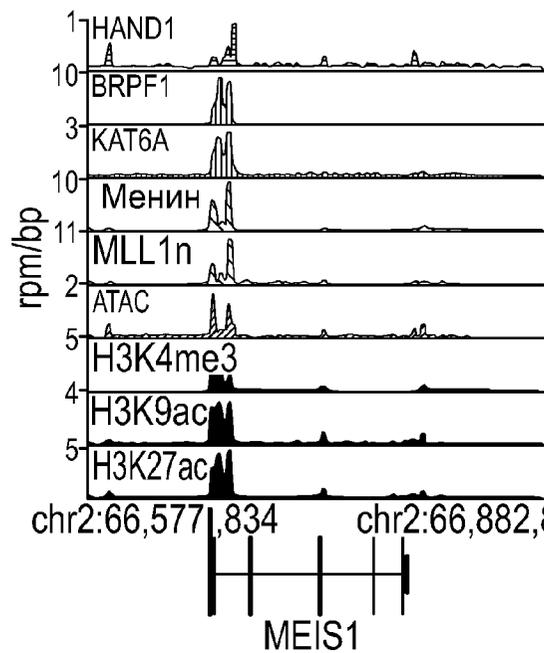
Фиг. 10В



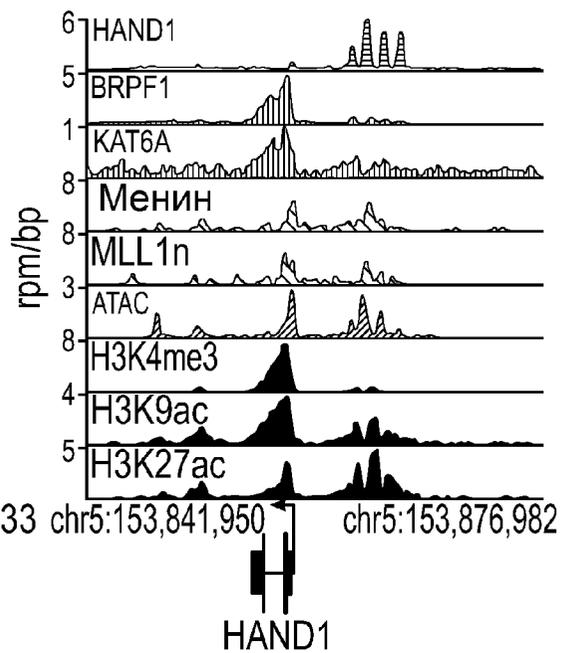
Фиг. 10С

Фиг. 10D

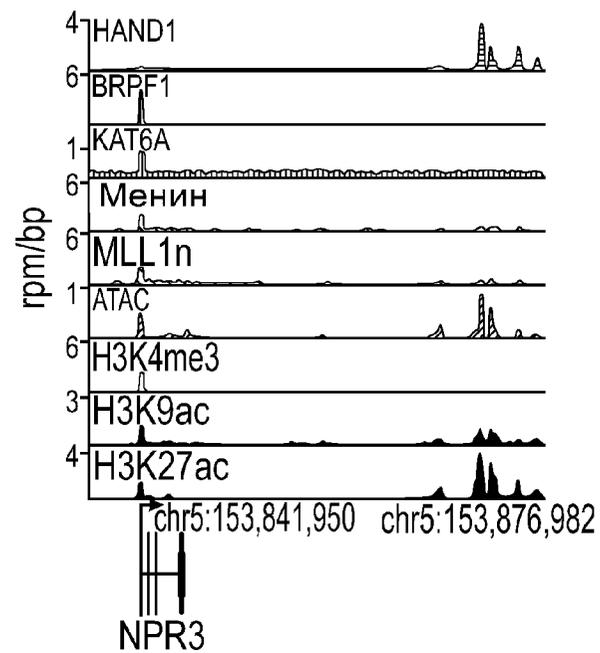
Фиг. 10Е



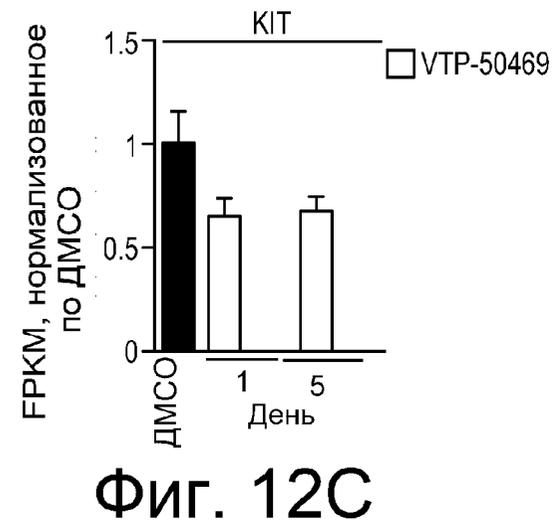
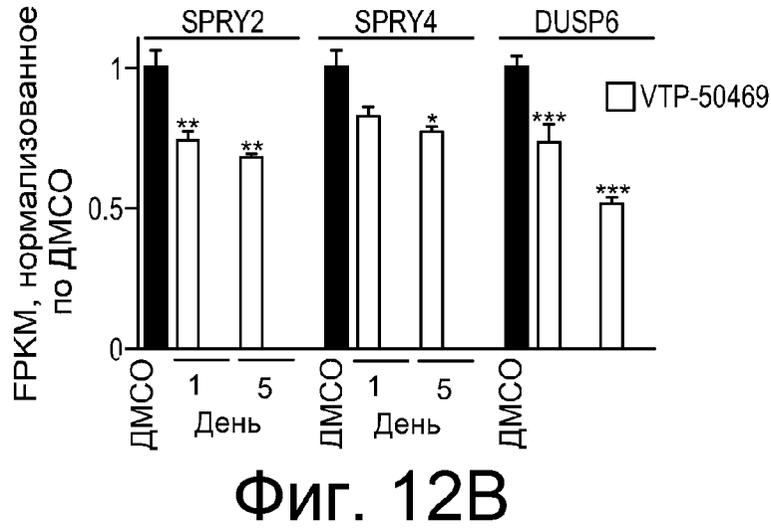
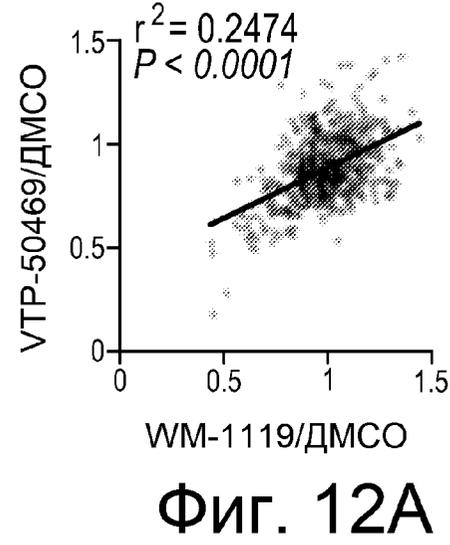
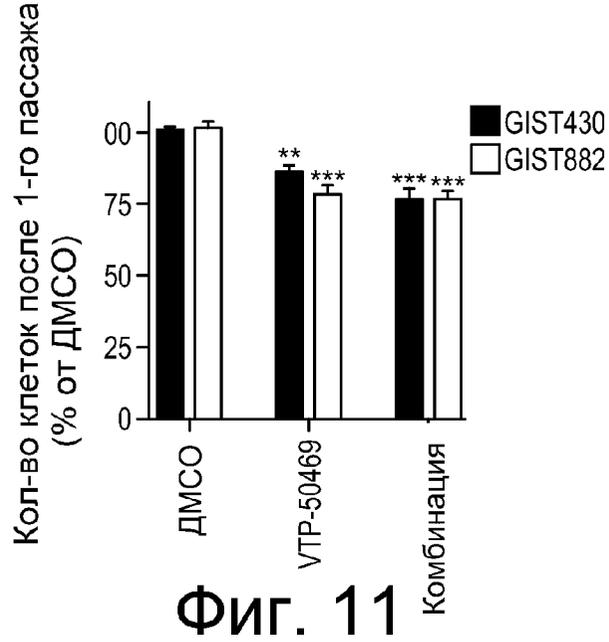
Фиг. 10F

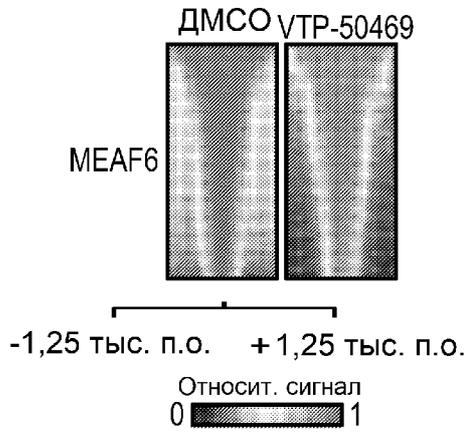


Фиг. 10G

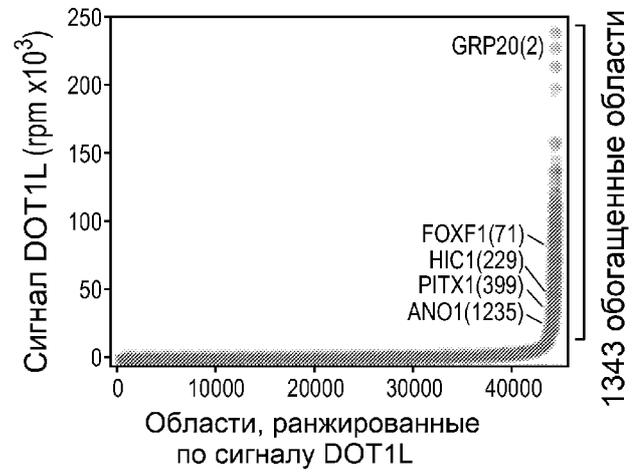


Фиг. 10H

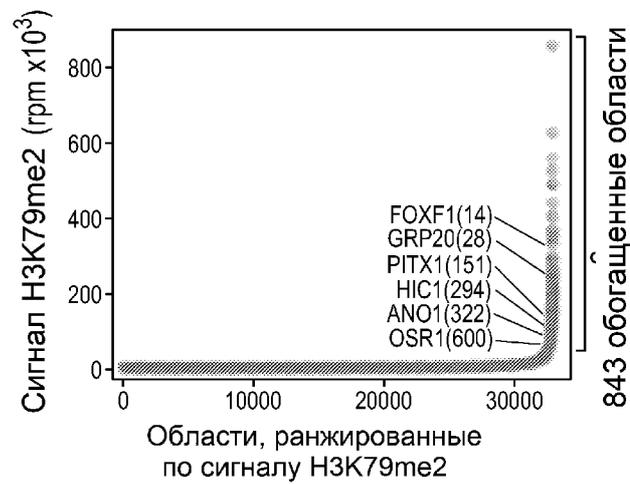




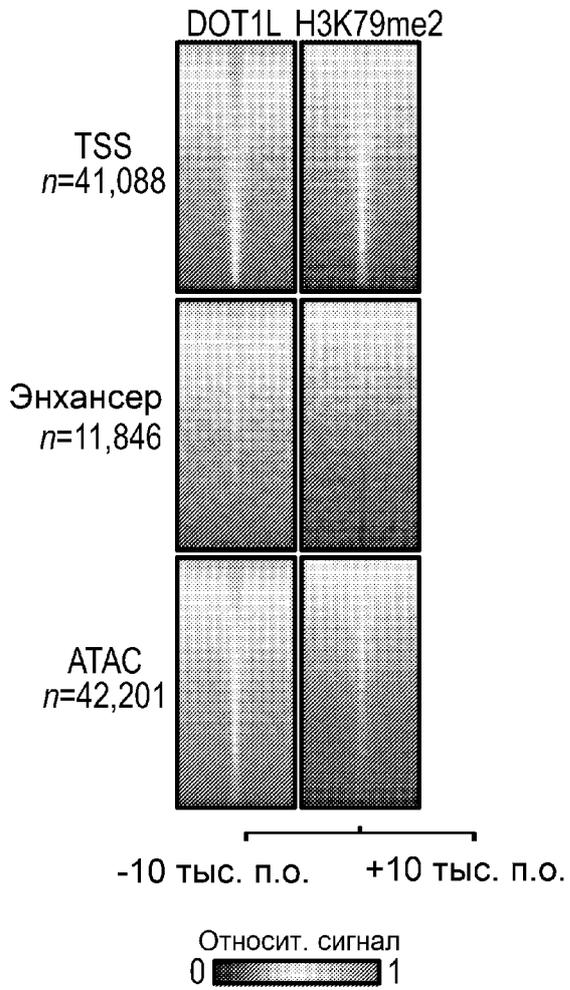
Фиг. 13А



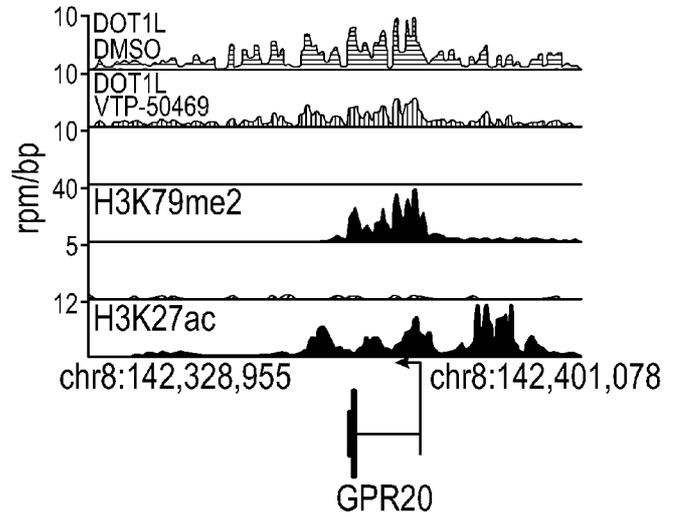
Фиг. 13В



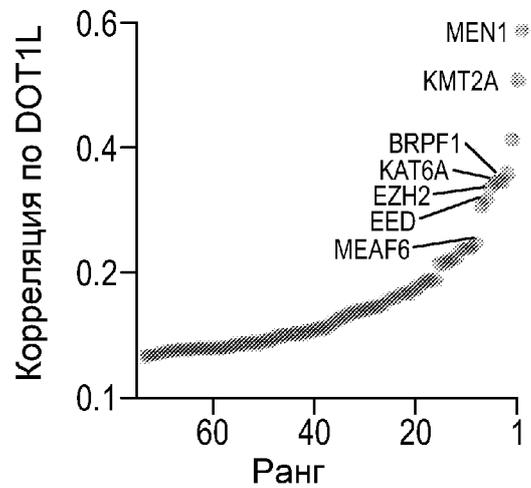
Фиг. 13С



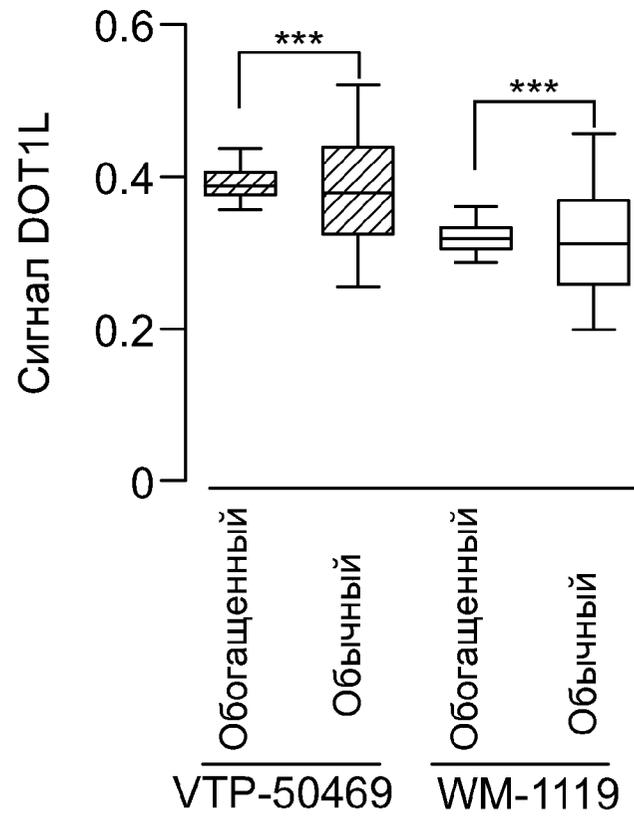
Фиг. 13 D



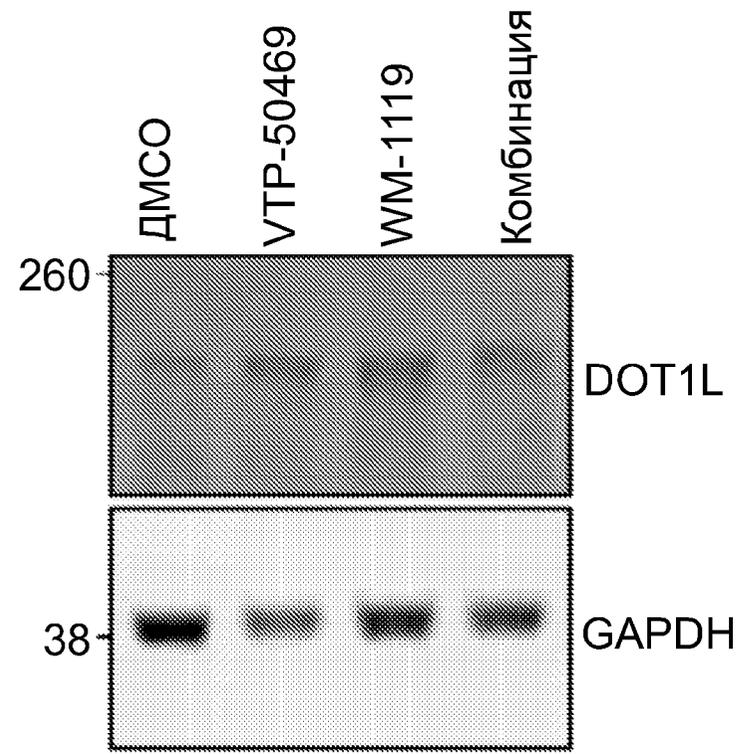
Фиг. 13 E



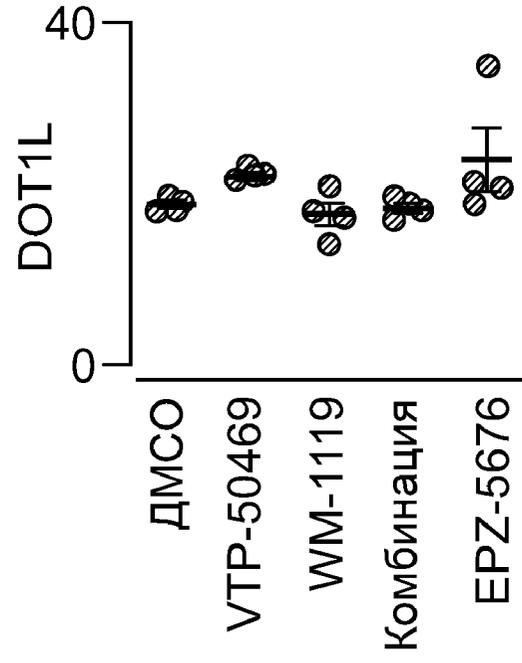
Фиг. 13 F



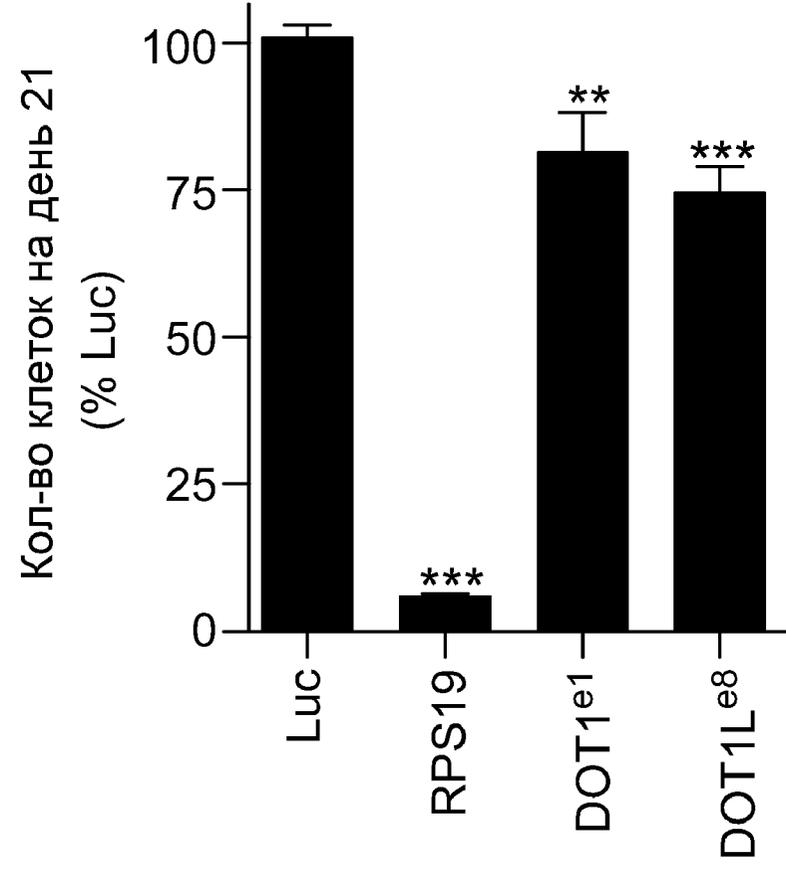
Фиг. 13G



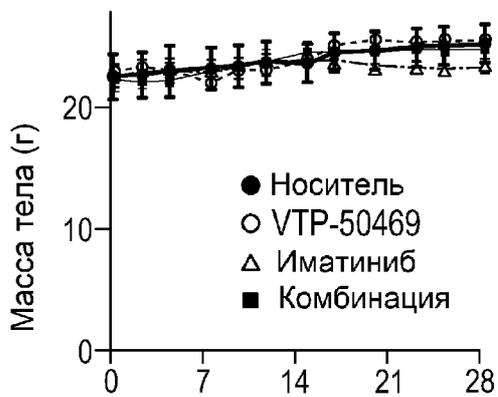
Фиг. 13H



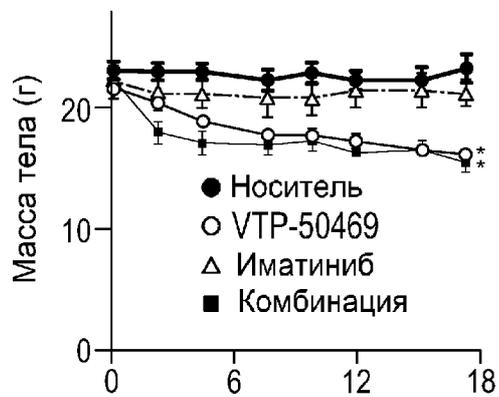
Фиг. 13I



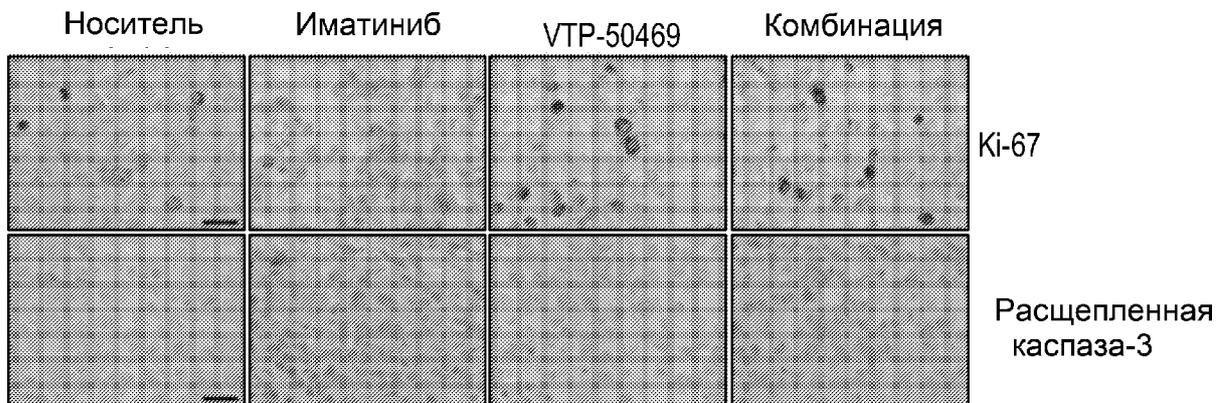
Фиг. 13J



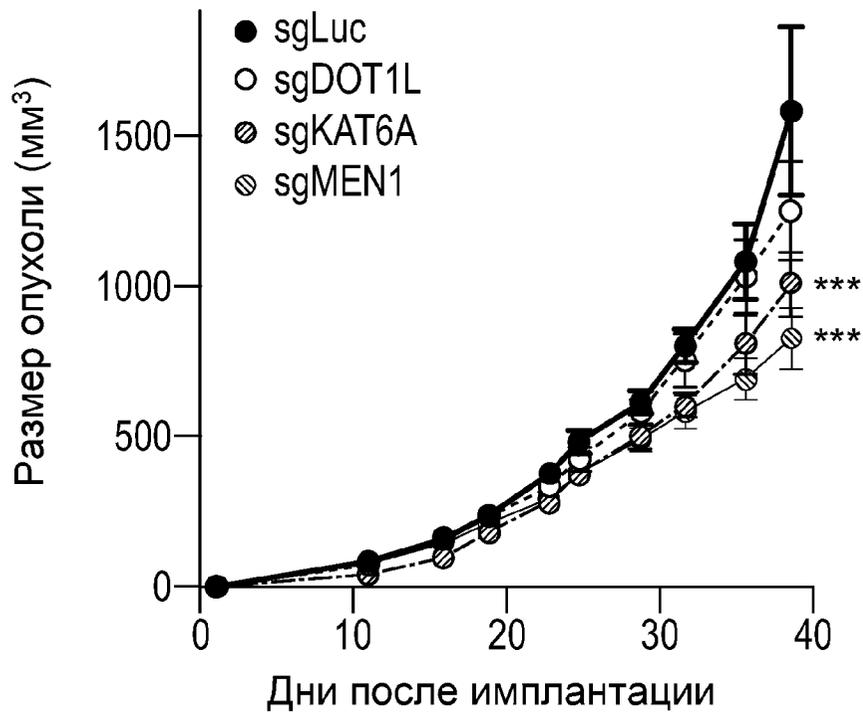
Фиг. 14А



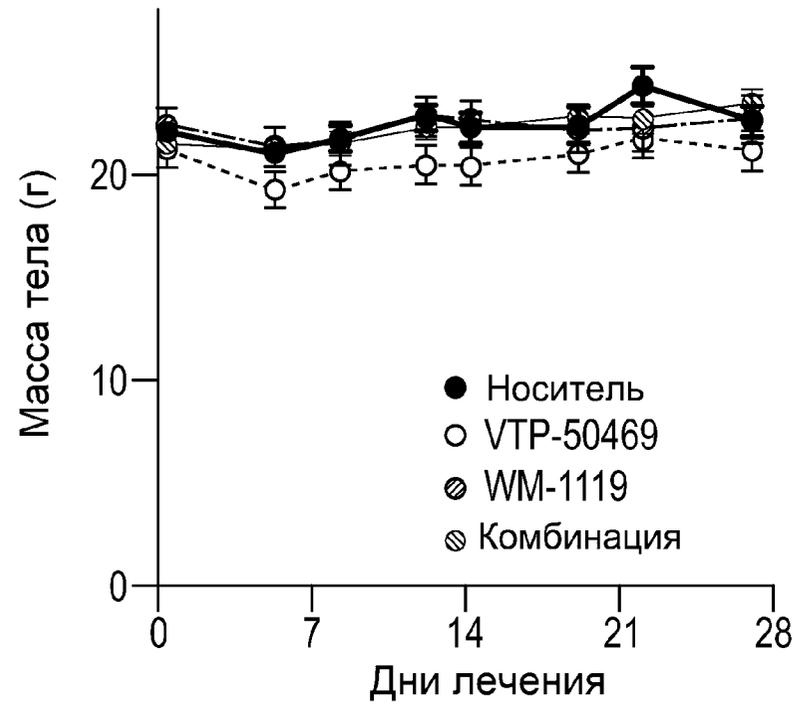
Фиг. 14В



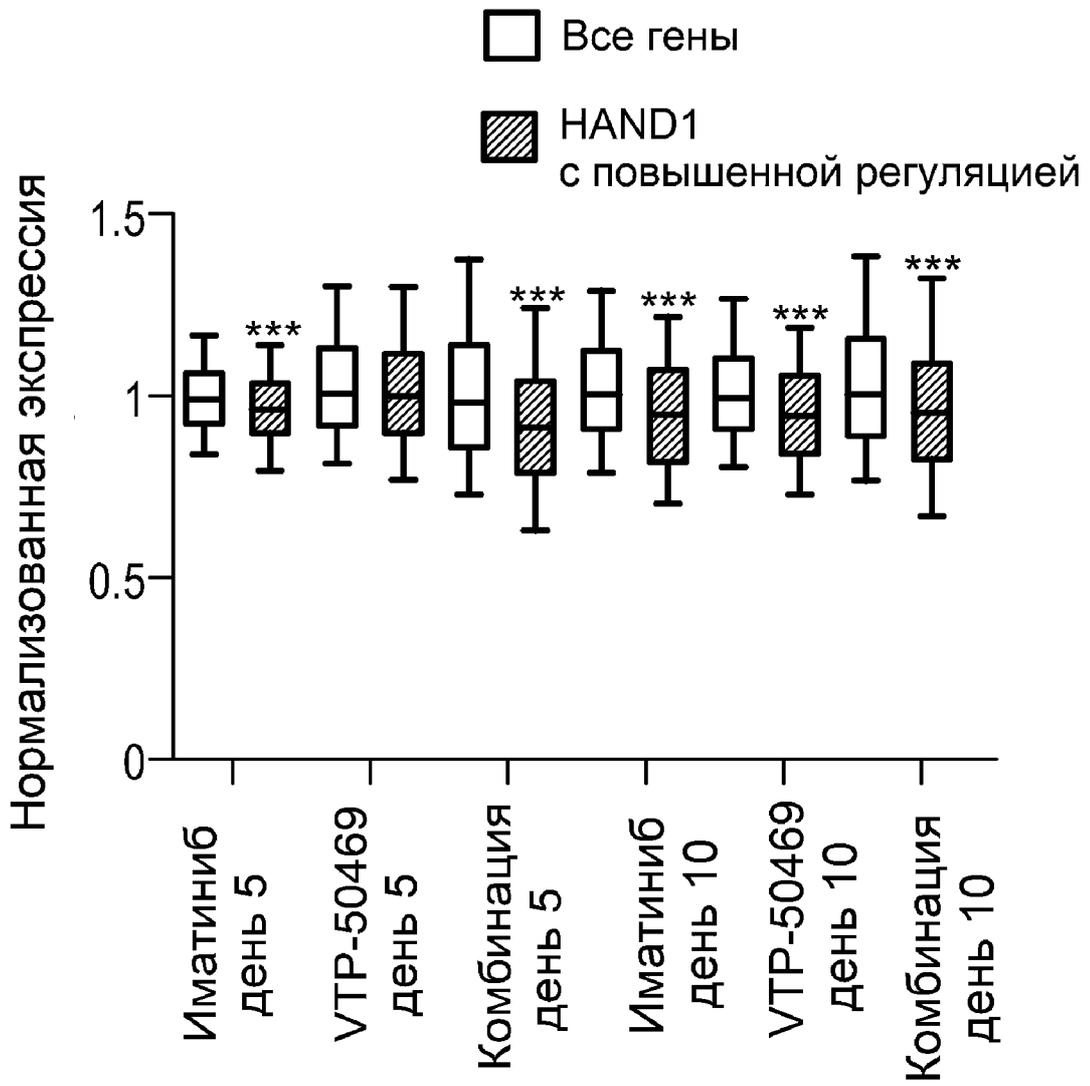
Фиг. 14С



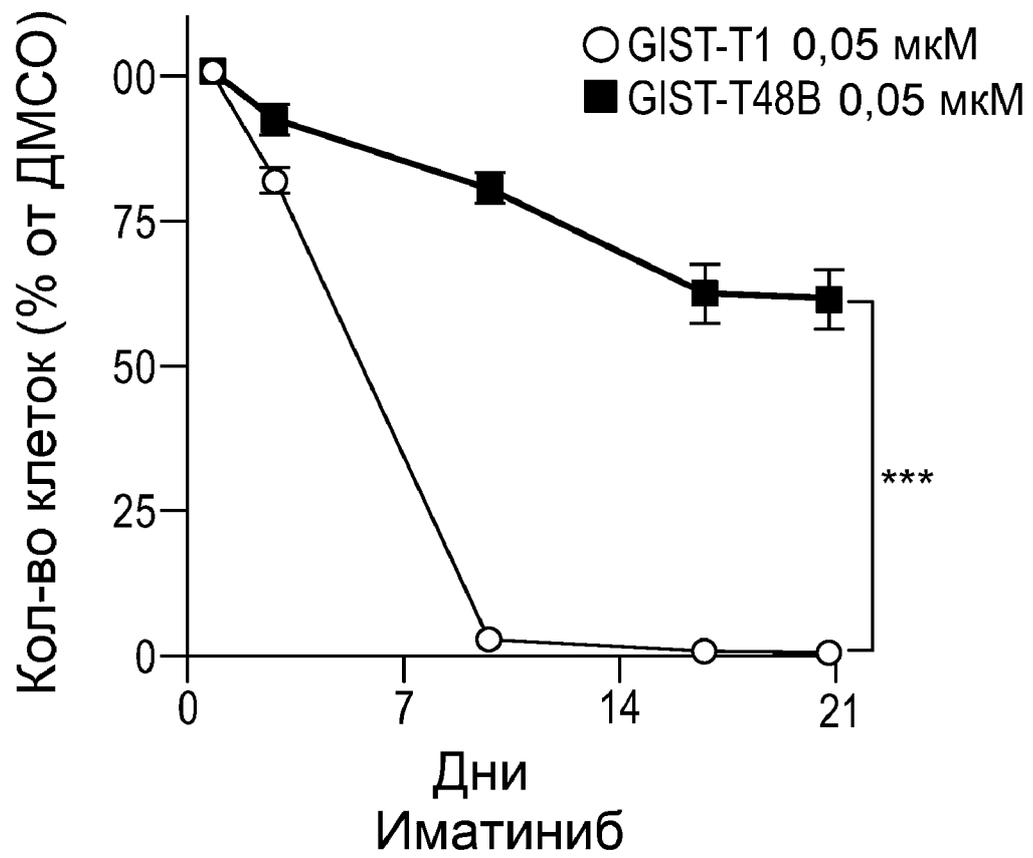
Фиг. 14D



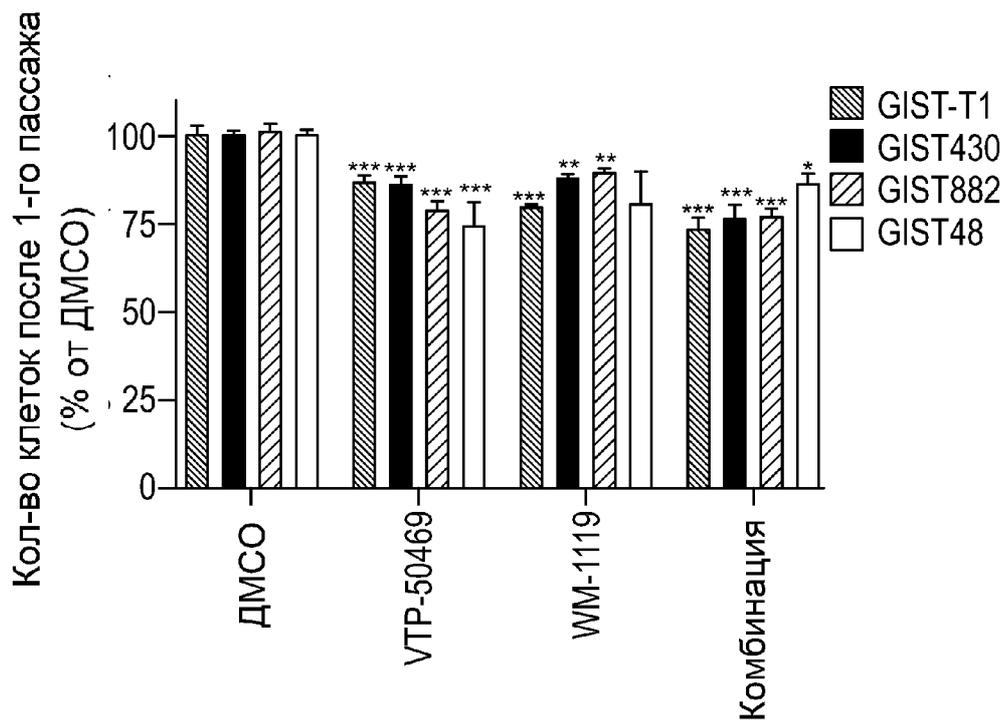
Фиг. 14E



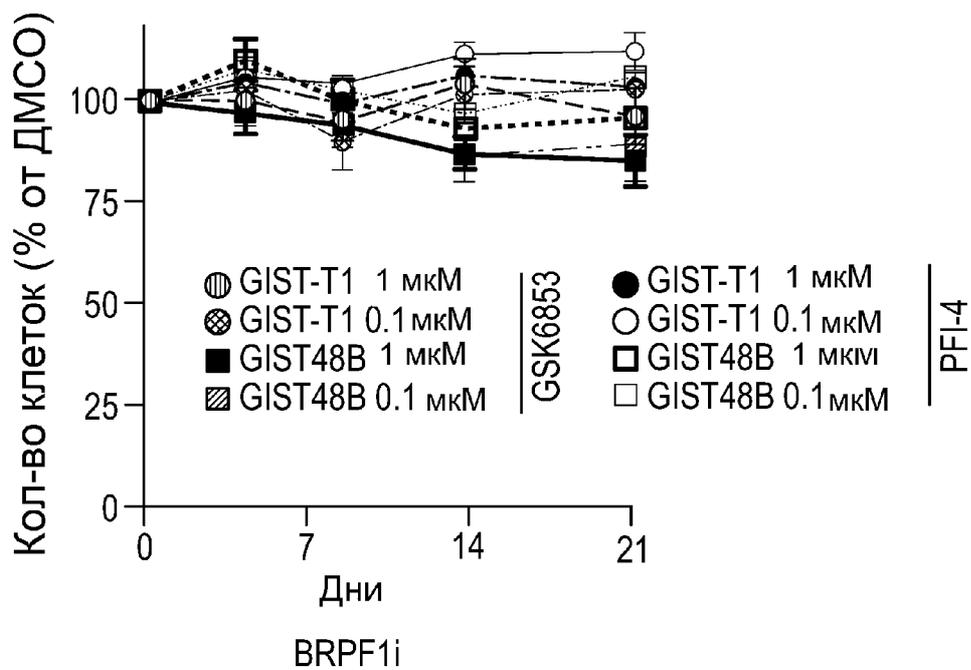
Фиг. 14F



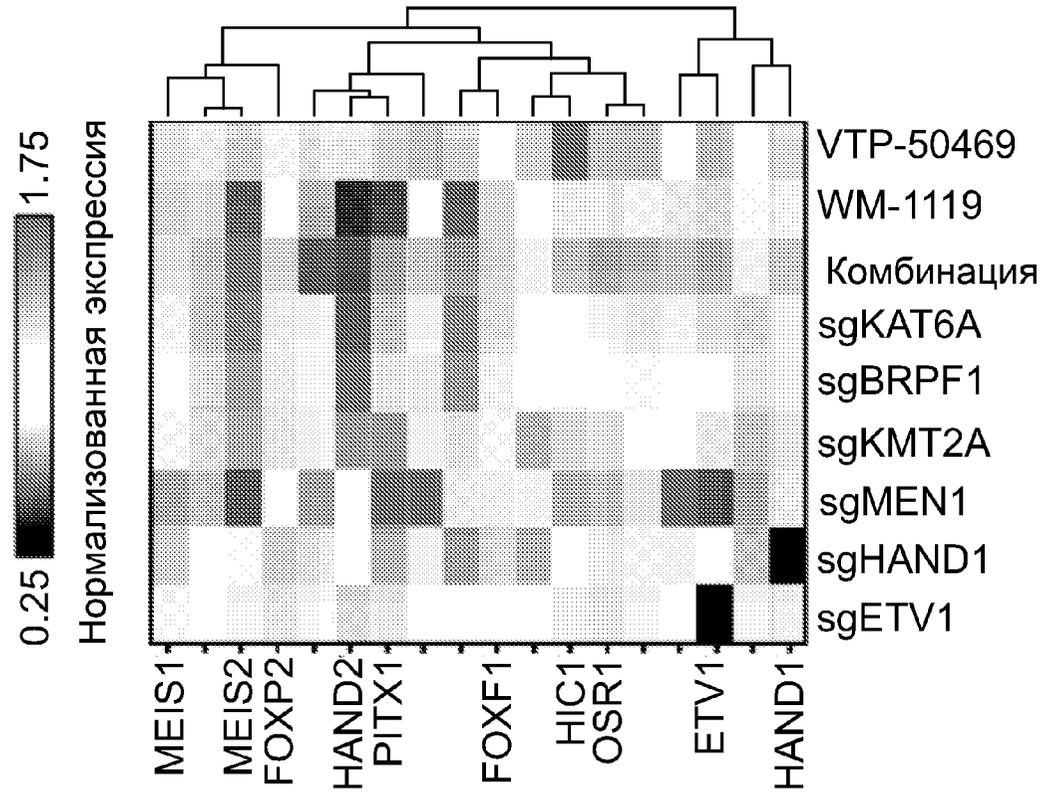
Фиг. 15А



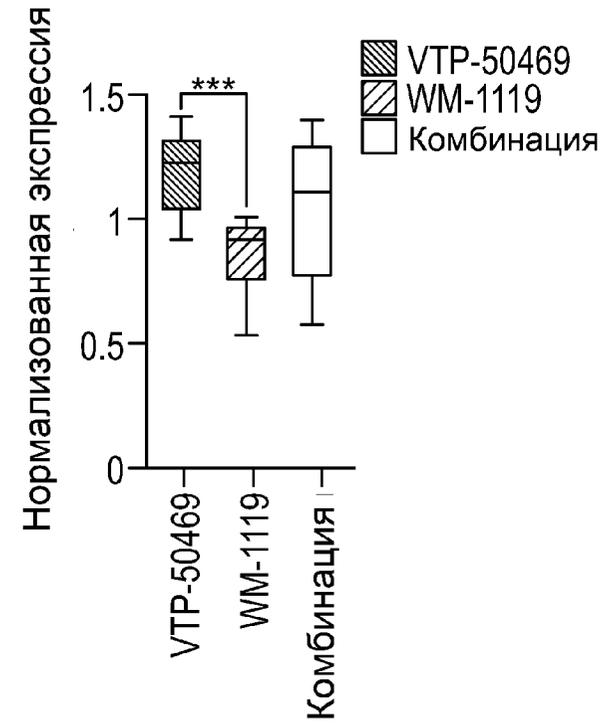
Фиг. 15В



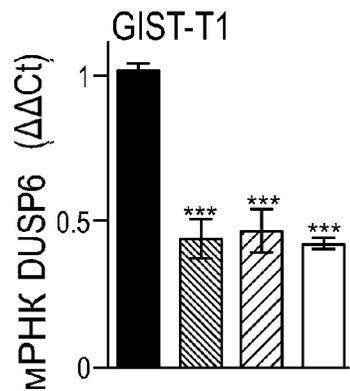
Фиг. 15С



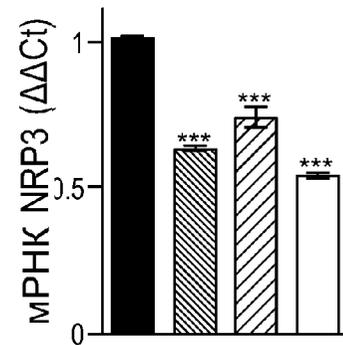
Фиг. 16А



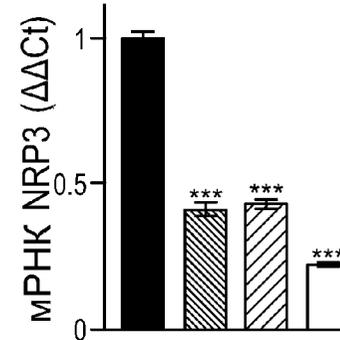
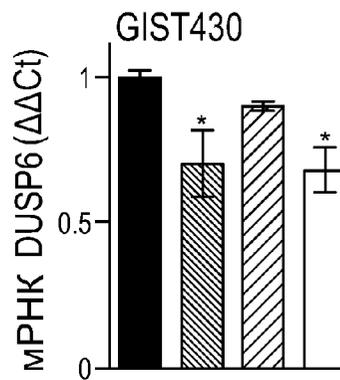
Фиг. 16В



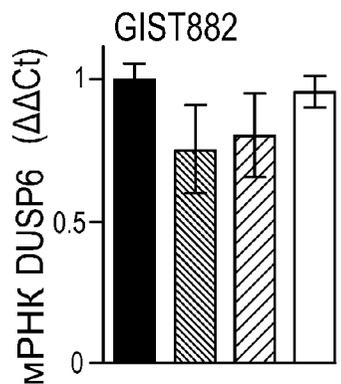
Фиг. 16С



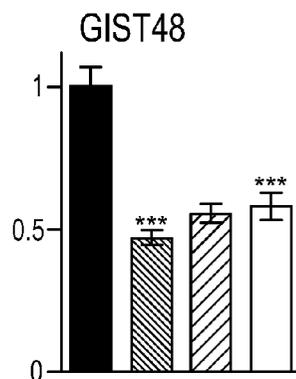
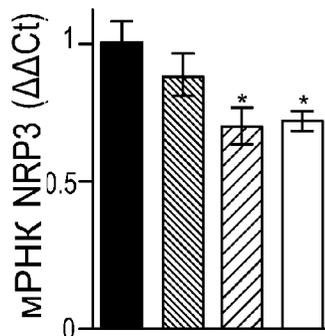
Фиг. 16D



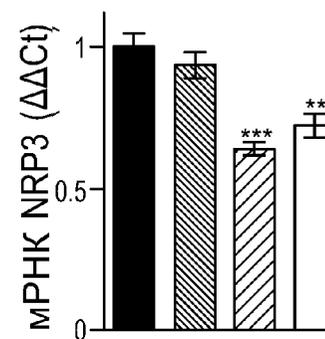
■ ДМСО  
 ▨ VTP-50469  
 ▩ WM-1119  
 □ Комбинация



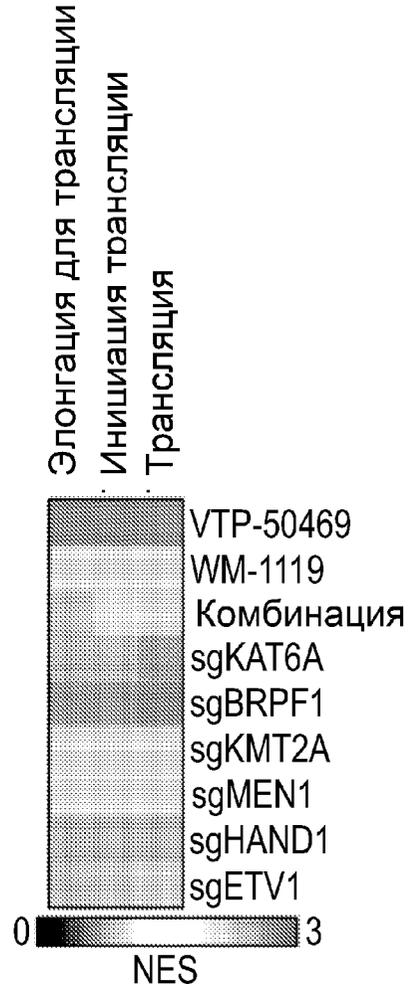
Фиг. 16Е



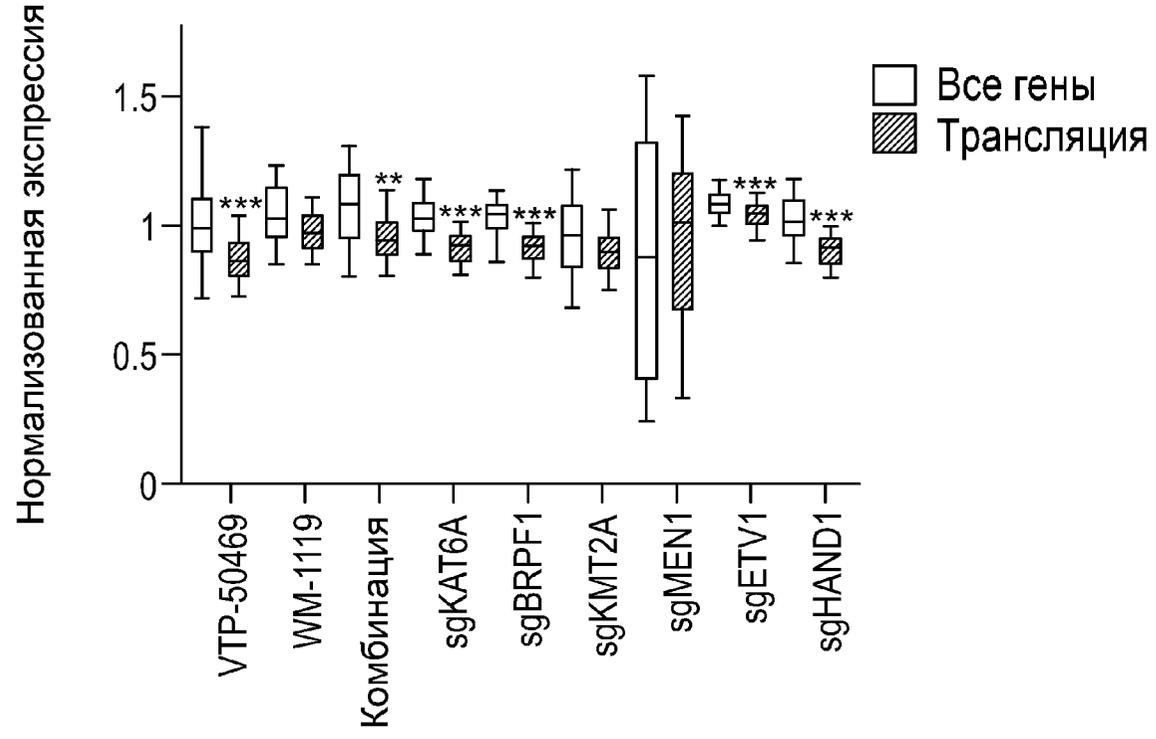
Фиг. 16F



■ ДМСО  
 ▨ VTP-50469  
 ▩ WM-1119  
 □ Комбинация



Фиг. 16G



Фиг. 16H