



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118234497 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 21

(21) 申请号 202280073517.6

(22) 申请日 2022.12.14

(30) 优先权数据

63/289,943 2021.12.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/081587 2022.12.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/114867 EN 2023.06.22

(71) 申请人 丹娜-法伯癌症研究所

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·A·阿姆斯特朗 M·L·赫名

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

专利代理师 王建秀 刘小立

(51) Int.Cl.

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

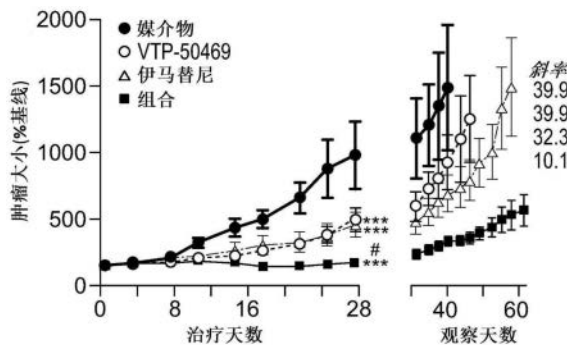
权利要求书2页 说明书42页
序列表(电子公布) 附图76页

(54) 发明名称

通过破坏MENIN-MLL表观遗传复合体靶向治疗胃肠道间质瘤(GIST)

(57) 摘要

公开了用于受试者胃肠道间质瘤(GIST)的治疗方法和抑制剂,其具有抑制Menin或Menin-MLL复合体成员的活性剂。



1. 一种治疗受试者的胃肠道间质瘤(GIST)的方法,其包括:
向受试者施用治疗有效量的Menin抑制剂。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述Menin抑制剂是JNJ-75276617、K0-539、SNDX-5613、DS-1594或DSP-5336、MI-3454、M-808、BMF-219、A300-105A、VTP-50469、短干扰RNA(siRNA)或其两种或更多种的组合。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述Menin抑制剂是SNDX-5613。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述Menin抑制剂是VTP-50469。
5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述Menin抑制剂是M-808。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述Menin抑制剂经口服、肌内、皮下或静脉内施用。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,还包括向受试者施用治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂(TKI)的步骤。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述TKI是伊马替尼、舒尼替尼、瑞格非尼、瑞派替尼、尼洛替尼、帕唑帕尼、卡博替尼、阿伐替尼或其两种或更多种的组合。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述TKI是伊马替尼。
10. 根据权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述TKI在施用所述Menin抑制剂之后施用。
11. 根据权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述TKI基本上在施用所述Menin抑制剂的同时施用。
12. 根据权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述TKI在施用所述Menin抑制剂之前施用。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其还包括向受试者施用治疗有效量的MOZ抑制剂的步骤。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述MOZ抑制剂是WM-1119、WM-8014、PF-9363、siRNA或其两种或更多种的组合。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述MOZ抑制剂是WM-1119。
16. 根据权利要求13-15中任一项所述的方法,其中所述MOZ抑制剂经口服、肌内、皮下或静脉内施用。
17. 根据权利要求13-16中任一项所述的方法,其中所述MOZ抑制剂在施用所述Menin抑制剂之后施用。
18. 根据权利要求13-16中任一项所述的方法,其中所述MOZ抑制剂在施用所述Menin抑制剂的同时施用。
19. 根据权利要求13-16中任一项所述的方法,其中所述MOZ抑制剂在施用所述Menin抑制剂之前施用。
20. 根据权利要求17所述的方法,其中所述MOZ抑制剂在施用TKI之后施用。
21. 根据权利要求18所述的方法,其中所述MOZ抑制剂基本上在施用TKI的同时施用。
22. 根据权利要求19中任一项所述的方法,其中所述MOZ抑制剂在施用TKI之前施用。
23. 根据权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述受试者被诊断为在受体酪氨酸激酶(KIT)基因内或其周围具有激活突变。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述GIST是转移性的。
25. 一种在体外或体内降低KIT活性的方法,其包括:
使在KIT基因内或其周围具有激活突变的细胞与Menin抑制剂接触。
26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述Menin抑制剂是MI-3454、M-808、JNJ-75276617、KO-539、SNDX-5613、DS-1594或DSP-5336、BMF-219、A300-105A、VTP-50469或其两种或更多种的组合。
27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述Menin抑制剂是SNDX-5613。
28. 根据权利要求26所述的方法,其中所述Menin抑制剂是VTP-5613。
29. 根据权利要求25-28中任一项所述的方法,还包括使所述细胞与TKI接触的步骤。
30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述TKI是伊马替尼、舒尼替尼、瑞格非尼、瑞派替尼、尼洛替尼、帕唑帕尼、卡博替尼、阿伐替尼或其两种或更多种的组合。
31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述TKI是伊马替尼。
32. 根据权利要求25-31中任一项所述的方法,其还包括使所述细胞与治疗有效量的MOZ抑制剂接触的步骤。
33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述MOZ抑制剂是WM-1119。
34. 一种试剂盒,其包含置于合适容器中的治疗有效量的Menin抑制剂、药学上可接受的载体和使用Menin抑制剂治疗受试者的GIST的印刷说明书。
35. 根据权利要求34所述的试剂盒,其中所述Menin抑制剂是SNDX-5613。
36. 根据权利要求34或35所述的试剂盒,其还包含治疗有效量的TKI和使用TKI治疗受试者的GIST的印刷说明书,其中所述Menin抑制剂和所述TKI包含在置于相同或不同容器中的相同剂型或不同剂型中。
37. 根据权利要求36所述的试剂盒,其中所述TKI是伊马替尼。
38. 根据权利要求34-37中任一项所述的试剂盒,其还包含治疗有效量的MOZ抑制剂和使用MOZ抑制剂治疗受试者的GIST的印刷说明书,其中所述Menin抑制剂和所述MOZ抑制剂包含在置于相同或不同容器中的相同剂型或不同剂型中。

通过破坏MENIN-MLL表观遗传复合体靶向治疗胃肠道间质瘤 (GIST)

[0001] 相关申请

[0002] 本申请依据《美国法典》第35编第119(e)条要求2021年12月15日提交的美国临时申请序号63/289,943的优先权,其被通过引用整体并入本文。

[0003] 政府许可权利

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的项目号为K08 CA245235和UL 1TR002541的政府资助下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

[0005] 序列列表

[0006] 本申请包含已以XML格式电子提交的序列列表,并通过引用以其整体并入本文。所述XML副本,创建于2022年12月14日,命名为52095-752001WO_SL.xml,且大小为51KB字节。

[0007] 本公开的背景

[0008] 胃肠道间质瘤(GIST)是一种软组织肉瘤,可发生于消化系统的任何部位,最常见于胃和小肠。GIST的特征是酪氨酸激酶KIT原癌基因、受体酪氨酸激酶(KIT)或血小板衍生生长因子受体 α (PDGFRA)内或周围的反复出现的激活突变(Corless et al., Annu.Rev.Pathol.Mech.Dis.3:557-86(2008), Hemming et al., Annals of Oncology.3:557-9(2018))。

[0009] KIT和/或PDGFRA内或周围的突变占GIST病例的85%以上。大多数KIT原发性突变对酪氨酸激酶抑制剂(TKI)伊马替尼治疗有反应。然而,继发性激酶突变会随着时间出现,产生耐伊马替尼的GIST。舒尼替尼、瑞格非尼和瑞派替尼已被批准用于耐伊马替尼GIST治疗的后线治疗,但这些药物的耐药性也随时间发生(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))。

[0010] 因此,迫切需要一种针对多重耐药的GIST的治疗方法。

[0011] 本公开概述

[0012] 本公开的第一个方面涉及治疗胃肠道间质瘤(GIST)的方法。该方法需要向受试者施用治疗有效量的Menin抑制剂。在一些实施方案中,该方法还需要向受试者施用治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂(TKI)和/或治疗有效量的MOZ抑制剂。

[0013] 本公开的另一个方面是在体外或体内降低KIT活性的方法。该方法需要使Menin抑制剂接触KIT基因内或周围具有激活突变的细胞。在一些实施方案中,该方法需要向受试者施用治疗有效量的TKI和/或治疗有效量的MOZ抑制剂。

[0014] 本发明的又一方面涉及试剂盒,其包含置于合适容器中的治疗有效量的Menin抑制剂、药学上可接受的载体和使用Menin抑制剂治疗受试者GIST的印刷说明书。在一些实施方案中,该试剂盒还包含治疗有效量的TKI和使用TKI治疗受试者GIST的印刷说明书,其中Menin抑制剂和TKI包含在置于相同或不同容器中的相同剂型或不同剂型中。在一些实施方案中,该试剂盒还包含治疗有效量的MOZ抑制剂和使用MOZ抑制剂治疗受试者GIST的印刷说

说明书,其中Menin抑制剂和MOZ抑制剂包含在置于相同或不同容器中的相同剂型或不同剂型中。

[0015] 如本文工作实例所示,本发明人已经证明Menin-MLL和MOZ染色质调控复合物富集于GIST相关基因处,调节其转录和GIST表观基因组的转录。单独或与MOZ复合体抑制一起抑制Menin-MLL复合体,通过破坏与转录调节因子和染色质调节因子(如DOT1L)的相互作用来降低GIST细胞增殖。Menin和MOZ抑制导致体内肿瘤负荷显著降低,使用Menin和KIT联合抑制观察到更大的效果。

[0016] 附图简要说明

[0017] 图1A-图1G是一系列散点图、条形图和点图,其说明了通过基因组规模的CRISPR依赖性筛选来鉴定GIST表观遗传依赖性。图1A和图1B是显示相关性 β -分数的散点图。图1A显示了H1和H2 sgRNA文库之间的相关性,每个文库靶向18,436个基因,每个文库有5个sgRNA。图1B显示了GIST430细胞系与GIST-T1细胞系之间的相关性。图1C是散点图,其显示了合并H1文库和H2文库以及GIST细胞系的筛选和 β -评分排序。图1D和图1E是条形图,其通过与基线质粒文库测序比较显示了筛选最终结果的单个sgRNA的相对读数。图1D是显示KIT sgRNA的条形图,图1E是显示MTOR sgRNA的条形图。图1F是比较泛必需基因(pan-essential gene)和非必需基因的 β -分数的点图。图1G是条形图,其显示了GIST中独特必需的基因中前18个显著富集的基因本体术语中的8个。

[0018] 图2A-图2F是一系列散点图、Circos图、线图和条形图,其说明了MOZ和Menin-MLL复合体的独特共同依赖性。图2A是GIST-T1和GIST430中的染色质修饰酶的合并 β -分数和DepMap中所有细胞系的染色质修饰酶的平均CERES分数的散点图。图2B是Circos图,其显示了在GIST中具有富集依赖性的七种染色质修饰酶的前50个DepMap相关依赖性的重叠。图2C和图2D是散点图,其显示了来自Project Drive细胞系的Menin-MLL复合体成员KMT2A和ASH2L的排序敏感性分数,其中GIST-T1以红色突出显示。图2E是线图,其显示了所示靶向Menin-MLL复合体成员的sgRNA在转导到GIST-T1中后的随时间生长测定。图2F是条形图,其显示了比较GIST-T1和GIST48B的随时间生长测定第21天的细胞计数。

[0019] 图3A-图3I是一系列热图、韦恩图、散点图和轨迹,其显示了MOZ和Menin-MLL复合体在GIST中的基因组定位。图3A是一系列热图,其通过ChIP-seq展示了H3K27ac、H3K9ac、H3K4me3、BRPF1和KAT6A在GIST-T1中的基因组定位以及通过CUT&Tag展示了Menin和MLL1n在GIST-T1中的基因组定位。图3B-图3D是显示MACS定义的峰的重叠的图表。图3B是描述BRPF1和KAT6A的图表。图3C是描述Menin和BRPF1的图表。图3D是描述Menin和MLL1n的韦恩图。图3E是散点图,其显示了BRPF1结合的富集基因组区域,TF以红色表示。图3F是散点图,其显示了Menin结合的富集基因组区域,TF以红色表示。图3G-图3I是显示TF HAND1、MOZ复合体成员BRPF1和KAT6A、Menin-MLL复合体成员Menin和MLL1n以及组蛋白标记物H3K4me3、H3K9ac和H3K27ac在不同基因座的基因组占位区域的轨迹;其中图3G显示FOXF1基因座,图3H显示DUSP6基因座和图3I显示USP1基因座。

[0020] 图4A-图4F是一系列的线图和条形图,其证明在具有和不具有MOZ复合体抑制的情况下,Menin-MLL复合体抑制导致细胞周期停滞。图4A是线图,其显示了在所示浓度的Menin抑制剂VTP-50469,GIST-T1随时间生长的测定。图4B是线图,其显示了在具有和不具有WM-1119的情况下,用VTP-50469处理的GIST-T1随时间生长的测定,每种抑制剂使用0.1 μ M。图

4C是条形图,其显示了在具有或不具有WM-1119的情况下,用VTP-50469处理GIST48B、GIST-T1或KIT增强子非依赖性细胞系GIST-T1/KIT^{Δe11} (敲除内源性KIT,用CMV启动子驱动的突变KIT挽救)后,针对DMSO归一化的第21天细胞计数。图4D是条形图,其显示了GIST430随时间生长的测定,在有或无VTP-50469的情况下,使用0.5 μ M VTP-50469处理第42天的相对细胞计数;各药物以0.1 μ M组合使用。图4E是条形图,其显示了细胞周期分析,显示了比较DMSO与72小时伊马替尼或8天0.5 μ M VTP-50469(有或无VTP-50469)的G0/G1、S或G2/M期的细胞百分比;各药物以0.1 μ M组合使用。图4F是条形图,其显示了在用0.5 μ M的伊马替尼处理72小时或0.5 μ M的VTP-50469处理或VTP-50469和WM-1119处理8天后与DMSO对照的细胞相比在早期凋亡或晚期凋亡和细胞死亡方面的倍数变化,每种药物0.1 μ M。

[0021] 图5A-图5W是一系列散点图和条形图,其显示了有和无MOZ抑制情况下的Menin抑制的转录效应。图5A是散点图,其显示了抑制剂处理GIST-T1细胞5天后,所有表达基因在抑制剂和DMSO处理之间的表达比率。图5B是所有Hallmark基因集的蝴蝶图,其指示第5天的VTP-50469(蓝色)与DMSO对照相比的NES和FDR q 值。图5C是散点图,其显示了比较DMSO和VTP-50469的Hallmark MTORC1信号和EMT基因集。图5D是条形图,其显示了在用VTP-50469处理5天的GIST-T1细胞中,所有表达基因、必需基因、通过6小时伊马替尼处理下调 >2.5 倍的基因和Hallmark EMT基因集的相对表达,针对DMSO对照归一化。图5E是条形图,其显示了与富集Menin结合的基因和缺乏富集的基因相比,所有表达基因的相对表达量,针对DMSO对照归一化。图5F是条形图,其显示了Menin结合的核心GIST TF的相对表达。图5G和5H是条形图,其显示了在用0.5 μ M的VTP-50469或VTP-50469和WM-1119处理5天的细胞中KIT信号负调节因子DUSP6、SE相关的NPR3和必需基因USP1通过qRT-PCR检测的相对mRNA水平,每种药物0.1 μ M。图5I是热图,其显示了比较了VTP-50469处理的GIST-T1的RNA-seq数据的无监督层次聚类。图5J是热图,其显示了比较用sgRNA转导的GIST-T1/Cas9细胞的RNA-seq数据的无监督层次聚类。图5K是热图,其显示了针对对照归一化RNA-seq数据的Pearson相关性。图5L-图5N是比较针对对照归一化的sgRNA处理或组合药物处理的前5000个被表达的转录产物的基因表达变化的相关图。图5O是热图,其显示了来自GSEA基因集的归一化富集分数(NES)。图5P-图5S是GSEA图,其显示了Menin/BRPF1富集基因、SE相关基因和HAND1调节基因的变化。图5T是箱形图,其显示了由被HAND1上调的基因的对照归一化表达。图5U-图5W是点图,其显示了与GIST谱系、TF或HAND1调节相关的选定基因在药物和sgRNA处理条件下的表达。

[0022] 图6A-图6Q是一系列摄影图像、散点图、条形图、热图、点图和轨迹图,其说明了Menin抑制后蛋白质相互作用的变化。图6A是亲代GIST-T1细胞或用融合至BirA* (R118G)的密码子优化的MEAF6构建体进行sgRNA缺失和拯救后的细胞的蛋白质印迹。图6B是由MEAF6 BioID鉴定的近端蛋白的PSM和 \log_2 信号强度的散点图。图6C是条形图,其显示了MEAF6近端蛋白的GO术语富集。图6D是在生物素标记期间用抑制剂预处理2天并额外处理24小时后,富含MEAF6的蛋白质的VTP-50469/DMSO信号强度的 \log_2 比率的散点图。图6E是热图,其显示了响应于VTP-50469或VTP-50469与WM-1119的联合治疗,在至少一种情况下显著变化的67个基因的DMSO归一化信号强度的无监督层次聚类。图6F-图6G是富集了VTP-50469或VTP-50469与WM-1119的组的相互作用蛋白质的DMSO归一化信号强度的点图。图6H是一组热图,其显示在经DMSO或VTP-50469处理的GIST-T1细胞中,在MACS定义的峰处DOT1L的加标

(spike-in) 归一化信号。图6I和图6J是箱形图,其显示了在MACS定义的峰处的加标归一化DOT1L(图6I)或MEAF6(图6J)信号。图6K是轨迹图,其显示了所示处理的加标归一化DOT1L、H3K79me2、MEAF6和H3K27ac在HAND1基因座的基因组占位区域。图6L显示了用所示浓度的EPZ-5676处理GIST-T1或GIST48B后,针对DMSO归一化的第21天细胞计数。图6M是热图,其显示了用所示抑制剂处理5天的细胞的对照归一化RNA-seq数据的Pearson相关性。图6N是被表达的转录产物的基因表达变化的Pearson相关性($n=5,000$),其比较了对照归一化的EPZ-5676和VTP-50469药物治疗。图6O是GSEA图,其显示了EPZ-5676处理引起的HAND1调节基因的变化。图6P和图6Q是点图,其显示了与GIST谱系和TF相关的选定基因的表达(每个条件 $n=4$)。

[0023] 图7A-图7F是线图和一系列显微照片,其说明了Menin抑制对GIST的体内影响。图7A是线图,其显示了用伊马替尼、VTP-50469、伊马替尼和VTP-50469的组合或媒介物对照处理28天的GIST-T1细胞系异种移植物。图7B是线图,其显示了用伊马替尼、VTP-50469、伊马替尼和VTP-50469的组合或媒介物对照处理18天的PG27 PDX。图7C是一系列显微照片,其显示了在治疗期结束时收获的、固定的、切片的并用H&E染色的PG27肿瘤的组织切片。图7D是线图,其显示了处理28天的GIST-T1细胞系异种移植物。图7E是热图,其显示了在处理5天或10天的GIST-T1细胞系异种移植物上进行的RNA-seq的数据。图7F是点图,其显示了与GIST谱系、伊马替尼调节或细胞增殖相关的选定基因的表达(以FPKM计)。

[0024] 图8A-图8N是一系列条形图、线图和散点图,其说明了独特的GIST依赖性。图8A是条形图,其显示了GIST独特必需的基因中前18个显著富集的基因本体术语。图8B是突出显示Menin-MLL复合体成员的筛选和 β -分数排序的线图。图8C是突出显示IN080复合体成员的筛选和 β -分数排序的线图。图8D是突出显示NuA4组蛋白乙酰转移酶复合体成员的筛选和 β -分数排序的线图。图8E-图8G是来自Project Drive细胞系的IN080和NuA4复合体的选定成员的排序敏感性分数的散点图。图8H是突出显示FACT复合体成员的筛选和 β -分数排序的线图。图8I-图8J是来自Project Drive细胞系的FACT复合体成员的排序敏感性分数的散点图。图8K是突出显示PAF1复合体成员的筛选和 β -分数排序的线图。图8L-图8M是来自Project Drive细胞系的PAF1复合体的选定成员的排序敏感性分数的散点图。图8N是条形图,其显示了靶向GIST-T1或GIST430中的所示基因的前8个sgRNA的相对读数,针对基线质粒文库($n=2/\text{sgRNA}$)归一化。

[0025] 图9A-图9E是一系列线图和散点图,其说明了GIST中PCR2复合体的依赖性。图9A是线图,其显示了突出核心PRC2复合体成员的筛选和 β -分数的排序图。图9B-图9C是来自Project Drive细胞系的PRC2复合体的选定成员的排序敏感性分数。图9D是跨DepMap细胞系($n=726$)的EZH2复合体成员的排序和CERES依赖性分数的图,-1处的虚线表示显著的依赖性。图9E显示了DepMap中EZH2的前面几个基因依赖性相关性。标记了共依赖染色质修饰酶和复合体成员。

[0026] 图10A-图10H是一系列图表和轨迹,其说明了Menin-MLL复合体在GIST中的定位。图10A是图表,其显示了Menin和BRPF1之间富集区域的重叠,指示了选定的GIST相关基因。图10B-图10H是显示TF HAND1、Menin-MLL复合体成员Menin和MLL1n以及组蛋白标志物H3K4me3、H3K9ac和H3K27ac的基因组占位区域的轨迹;图10B显示OSR1基因座,图10C显示PDGFRA基因座,图10D显示KIT基因座,图10E显示KDR基因座,图10F显示MEIS1基因座,图10G

显示HAND1基因座,且图10H显示NPR3基因座。

[0027] 图11是条形图,其显示了用VTP-50469或VTP-50469与WM-1119组合抑制的缓慢生长的GIST细胞系GIST430和GIST882第一次传代后针对DMSO归一化的细胞计数。

[0028] 图12A-图12C是一系列散点图和条形图,其说明了Menin抑制的转录效应。图12A是散点图,其显示了在抑制剂处理5天后,前500个必需基因在抑制剂和DMSO处理之间的表达比率。图12B是条形图,其显示了用VTP-50469处理1天或5天后KIT信号传导负调节因子SPRY2、SPRY4和DUSP6的相对表达。图12C是条形图,其显示了用VTP-50469处理1天或5天后KIT的相对表达。

[0029] 图13A-图13J是一系列热图、散点图和轨迹,其说明了DOT1L、H3K79me2和MEAF6的ChIP-seq结果以及VTP-50469的作用。图13A是热图,其显示在用DMSO或VTP-50469处理的GIST-T1细胞中,在MACS定义的峰处MEAF6的加标归一化信号。图13B-图13C是散点图,其显示了DOT1L和H3K79me2结合的富集基因组区域。图13D是一系列热图,其通过ChIP-seq展示了DOT1L、H3K79me2和MEAF6在GIST-T1中的基因组定位。图13E是一组轨迹,其显示了经历所示处理的加标归一化DOT1L、H3K79me2和H3K27ac在GPR20基因座的基因组占位区域。图13F是点图,其显示了DepMap中DOT1L的前70个基因依赖性相关性,指示了Menin-MLL、MOZ和PRC2复合体的成员。图13G是箱形图,其显示了DOT1L信号富集区域($n=1,343$)或典型($n=45,256$)信号区域的区域中DOT1L的DMSO归一化信号。图13H是蛋白质印迹的照片,其显示用所示抑制剂处理5天后的DOT1L信号。图13I是点图,其显示了用所示药物处理5天后通过RNA-seq检测的DOT1L表达水平。图13J是条形图,其显示了在随时间生长的测定中第21天的GIST-T1细胞计数,比较了靶向两个DOT1L外显子的sgRNAs或作为对照的Luc或RPS19。

[0030] 图14A-图14F是线图和一系列显微照片,其显示了Menin抑制在体内的作用。图14A是线图,其显示了用GIST-T1细胞系移植并用伊马替尼、VTP-50469、伊马替尼和VTP-50469的组合以及媒介物对照处理28天的小鼠的重量。图14B是线图,其显示了用PG27 PDX移植并用伊马替尼、VTP-50469、伊马替尼和VTP-50469的组合以及媒介物对照处理18天的小鼠的重量。图14C是一系列显微照片,其显示了在治疗期结束时收获的PG27肿瘤的组织切片,并对固定组织进行切片和Ki-67(上排)和裂解的胱天蛋白酶-3(下排)评估;比例尺=25 μ m。图14D是线图,其显示了用GIST-T1细胞系移植小鼠并用sgRNA处理后的肿瘤大小。图14E是线图,其显示了用GIST-T1细胞系移植并用VTP-50469、WM-1119、VTP-50469和WM-1119的组合以及媒介物对照处理28天的小鼠的重量。图14F是箱形图,其显示了每个处理组中所有表达基因($n=7,434$)或其表达被HAND1上调的基因($n=438$)的对照归一化表达。

[0031] 图15A-图15C是一组线图和条形图,其显示了GIST细胞系中KAT6A、Menin和BRPF1的抑制。图15A是线图,其显示了GIST-T1或GIST48B用50nM伊马替尼处理后随时间生长的测定。图15B是条形图,其显示了与GIST-T1(第4天)相比,缓慢生长的GIST细胞系GIST430(第6天)、GIST882(第12天)和GIST48(第12天)第一次传代后的DMSO归一化的细胞计数。图15C是线图,其显示了GIST-T1或GIST48B细胞经选择性BRPF1抑制剂GSK6853或PFI-4处理的随时间生长测定。

[0032] 图16A-图16H是一组条形图、箱形图和热图,其显示了MOZ和Menin破坏的转录效应。图16A是响应于药物或sgRNA处理的10个GIST相关TF的对照归一化表达的热图。图16B是箱形图,其显示了18个GIST相关TF在所示药物治疗时的DMSO归一化表达(每种情况 $n=4$)。

图16C-图16F是一组条形图,其显示了GIST细胞系中KIT信号传导负调控因子DUSP6以及HAND1和SE相关基因NPR3的相对mRNA水平。图16G是热图,其显示了GSEA数据,指示了每种药物或sgRNA处理条件下Reactome翻译相关基因集的NES。图16H是箱形图,其显示了每种sgRNA和药物处理条件下所有翻译相关基因(n=48)的对照归一化表达。

[0033] 本公开的详细描述

[0034] 定义

[0035] 除非特别说明或上下文明显,如本文所用,否则术语“约”被理解为在该领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。“约”能理解为在所示值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%以内。除非上下文另有明确规定,否则本文提供的所有数值均由术语“约”修饰。

[0036] “剂”是指任何小化合物、抗体、核酸分子或多肽或其片段。除非特别说明或从上下文明显的,如本文所用,术语“或”被理解为包括在内。除非特别说明或从上下文明显,否则如本文所用,术语“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“所述/该(the)”被理解为单数或复数。

[0037] 本文提供的任何组合物或方法可以与本文提供的任一其他组合物和方法中的一种或更多种组合。

[0038] 过渡术语“comprising(包含)”,与“including(包括)”、“containing(含有)”或“以……为特征”同义,是包含性的或开放式的,并且不排除其他未引用的要素或方法步骤。相比之下,过渡短语“由……组成”排除了权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。过渡短语“主要由……组成”将权利要求的范围限制为本公开的指定材料或步骤“以及实质上不影响基本和新颖特征的材料或步骤”。

[0039] 本公开的其他特征和优点将从以下对其优选实施方案的描述以及权利要求中变得明显。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管类似于或等同于本文所述的方法和材料可用于本公开的实践或测试中,但以下描述了合适的方法和材料。

[0040] 使用方法

[0041] 在一些方面,本公开涉及治疗受试者的GIST。该方法需要向有此需要的受试者施用有效量或治疗有效量的Menin抑制剂。

[0042] GIST是一种软组织肉瘤,通常以酪氨酸激酶KIT基因和/或PDGFRA基因内或周围反复出现的激活突变为特征。如本文所用,短语“在…内或周围”是指基因编码区内的突变或有助于基因功能的基因5'或3'近端区内的突变(例如,影响基因转录的调节区)。GIST既缺乏癌基因扩增,又依赖于已建立的转录因子网络。独特的染色质修饰酶在工作实例中显示为在协调GIST表观基因组中必不可少;例如,本文将KMT2A/MLL1确立为之前未知的GIST依赖性,且更广泛地说,发现在选定的癌症亚型中显示类似的调节作用。KMT2A/MLL1是Menin-MLL复合体的成员,且负责H3K4甲基化和转录激活(Ruthenburg et al.,Molecular Cell 25:15-30(2007),Krivtsov et al.,Nat.Rev.Cancer 7:823-33(2007))。在一些实施方案中,受试者被诊断为在KIT基因内或周围具有突变的GIST。在一些实施方案中,突变是激活突变。与未突变蛋白相比,激活突变使突变蛋白保持在失调状态。激酶结构域中的激活突变通常导致激酶结构域的配体非依赖性激活,且因此靶向磷酸化。在一些实施方案中,受试者有转移性GIST。

[0043] 如本文所用,术语“受试者”(或“患者”)包括易患或患有GIST的动物界所有成员。在一些实施方案中,受试者是人类。因此,根据本公开的“患有GIST”或“需要”治疗的受试者广泛地包括已诊断为阳性的受试者,包括之前可能接受过一轮或更多轮治疗的患有活动性疾病的受试者,以及目前未接受治疗(例如,病情缓解)但仍有复发风险的受试者,以及未诊断为阴性但易患癌症或自身免疫性疾病的受试者(例如,由于既往病史和/或家族病史,或以其他方式存在一种或更多种风险因素,使得医学专业人员可能合理怀疑受试者易患GIST)。

[0044] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指对需要其的受试者进行任何类型的干预、方法或施用有效量或治疗有效量的Menin抑制剂、TKI和/或MOZ抑制剂,其治疗目的(“治疗效果”)是逆转、缓解、改善、抑制、减少、减缓、停止、稳定或预防GIST相关症状、并发症或病症或生化指标的发作、进展、发展、严重程度或复发。

[0045] 在本公开的实践中使用的活性剂是Menin抑制剂。如本文所公开的,在一些实施方案中,可以采用一种或更多种附加活性剂,包括酪氨酸激酶抑制剂(TKI)和MOZ抑制剂(单核细胞白血病锌指;也称为赖氨酸(K)乙酰转移酶6A(KAT6A),其为组蛋白乙酰转移酶(HAT))。

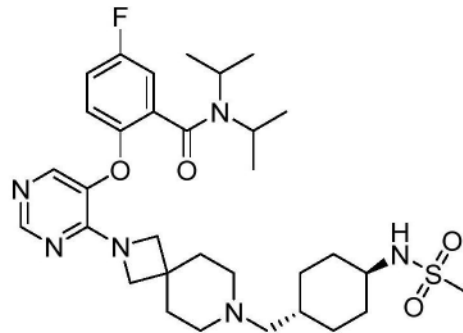
[0046] 术语“抑制剂”在其最广泛的意义上使用,并包括任何剂,如小分子、核酸(例如,核酶、反义核酸、siRNA)、抗体或其功能片段、肽、拟肽或适体,其作用是直接或间接破坏且减少或甚至消除靶标的功能。

[0047] Menin抑制剂

[0048] 术语“Menin抑制剂(Menin inhibitor)”、“Menin抑制剂(Menin inhibitors)”和“Menin-MLL复合体抑制剂”在本文中可互换使用,并可按其最广义理解。Menin抑制剂包括一种或任何剂的组合,如小分子、核酸(例如,siRNA)或抗体、肽、拟肽或适体,其作用是直接或间接破坏且减少或甚至消除Menin蛋白、多发性内分泌腺瘤病1型(MEN1)基因或Menin-MLL复合体的功能或表达。蛋白质破坏可包括直接活性阻断、蛋白质-蛋白质相互作用阻断等。Menin是MEN1(多发性内分泌肿瘤综合征1型)基因的蛋白产物,与组蛋白甲基转移酶复合体中的混合谱系白血病(MLL)家族蛋白(包括MLL1(也称为赖氨酸(K)特异性甲基转移酶2A(KMT2A))、Ash2、Rbbp5和WDR5)相互作用。由于MLL基因的染色体重排,MLL与60多种不同蛋白质伴侣中的一种融合,导致对白血病发生至关重要的HOXA9和MEIS1基因的表达上调。与AML或ALL不同,MLL融合蛋白在GIST中不存在。

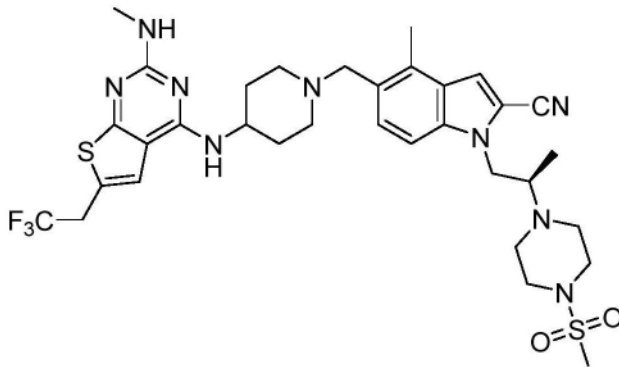
[0049] 代表性的小分子Menin抑制剂包括VTP-50469(5-氟-N,N-二异丙基-2-((4-(7-(((1r,4r)-4-(甲磺酰胺基)环己基)甲基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-基)嘧啶-5-基)氧基)苯甲酰胺)、K0-539((R)-4-甲基-5-((4-((2-(甲氨基)-6-(2,2,2-三氟乙基)噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)哌啶-1-基)甲基)-1-(2-(4-(甲磺酰胺基)哌嗪-1-基)丙基)-1H-吡啶-2-甲腈,也以NCT04067336使用)、JNJ-75276617((R)-N-乙基-5-氟-N-异丙基-2-((5-(2-(6-((2-甲氧基乙基)(甲基)氨基)-2-甲基己烷-3-基)-2,6-二氮杂螺[3.4]辛烷-6-基)-1,2,4-三嗪-6-基)氧基)苯甲酰胺,也以NCT04811560使用)、SNDX-5613(N-乙基-2-((4-(7-(((1r,4r)-4-(乙磺酰胺基)环己基)甲基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-基)嘧啶-5-基)氧基)-5-氟-N-异丙基苯甲酰胺,也以NCT04065399使用)、DS-1594((1R,2S,4R)-4-((4-(5,6-二甲氧基哒嗪-3-基)苄基)氨基)-2-(甲基(6-(2,2,2-三氟乙基)噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)环戊烷-1-醇,也以NCT04752163使用)、BMF-219((R)-N-(1-(2-(2-((4-(4-吗啉

基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基)苯基)氨基)-2-氧代乙基)吡啶-4-基)哌啶-3-基)丁-2-炔酰胺)、DSP-5336(N-乙基-5-氟-N-异丙基-2-((5-(7-((1S,3S,4R)-5-亚甲基-2-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-羰基)-2,7-二氮杂螺[3.5]壬烷-2-基)-1,2,4-三嗪-6-基)氧基)苯甲酰胺,也以NCT04988555使用)、抗体A300-105A(购自Bethyl Laboratories)、MI-3453(N-(3-((2-氰基-4-甲基-5-((4-((2-(甲氨基)-6-(2,2,2-三氟乙基)噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)哌啶-1-基)甲基)-1H-吡啶-1-基)甲基)双环[1.1.1]戊烷-1-基)甲酰胺、M-808(甲基((1S,2R)-2-((S)-2-(氮杂环丁烷-1-基)-1-(3-氟苯基)-1-(1-((1-(4-((1-(E)-4-(哌啶-1-基)丁-2-烯酰基)氮杂环丁烷-3-基)磺酰基)苯基)氮杂环丁烷-3-基)甲基)哌啶-4-基)乙基)环戊基)氨基甲酸酯、MI-0202(4-(4-(5,5-二甲基-4,5-二氢噻唑-2-基)哌啶-1-基)-6-(2,2,2-三氟乙基)噻吩并[2,3-d]嘧啶)、MI-503(1-((1H-吡啶-4-基)甲基)-4-甲基-5-((4-((6-(2,2,2-三氟乙基)噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)哌啶-1-基)甲基)-1H-吡啶-2-甲腈)、MI-463(4-甲基-5-((4-((6-(2,2,2-三氟乙基)噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)哌啶-1-基)甲基)-1H-吡啶-2-甲腈)、MI-136(5-((4-((6-(2,2,2-三氟乙基)噻吩并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)哌啶-1-基)甲基)-1H-吡啶-2-甲腈)和ML-227(4-(3-(4-(环戊基(羟基)(苯基)甲基)哌啶-1-基)丙氧基)苄腈)。这些小分子抑制剂的结构如下:

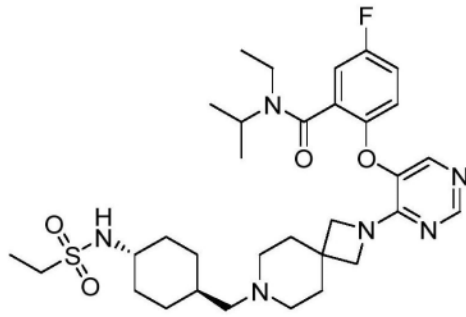


(VTP-50469) ;

[0050]

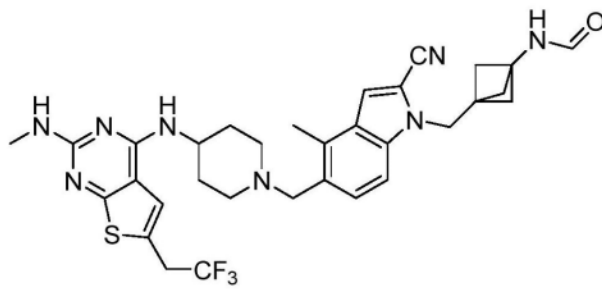


(KO-539) ;



(SNDX-5613)

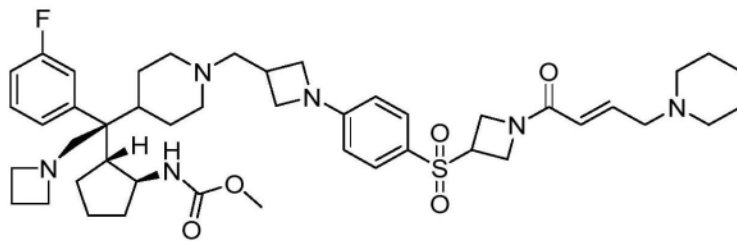
;



(MI-3454)

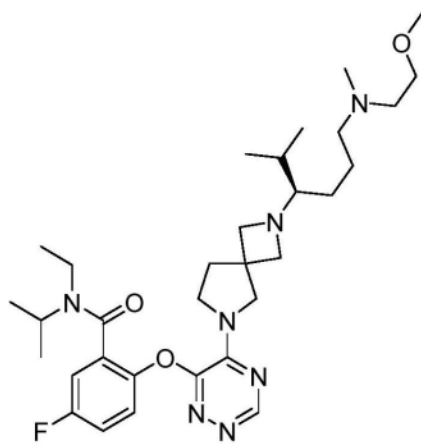
;

[0051]

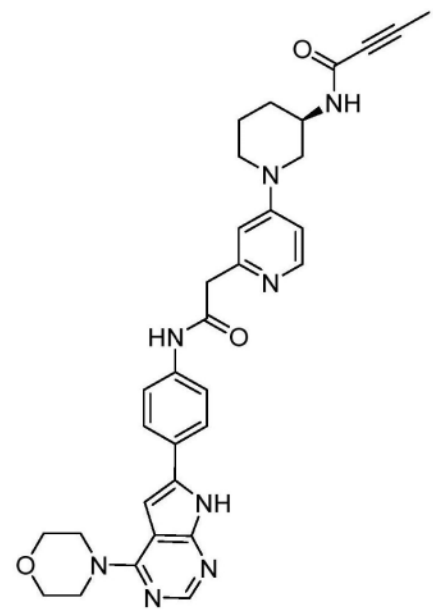


(M-808)

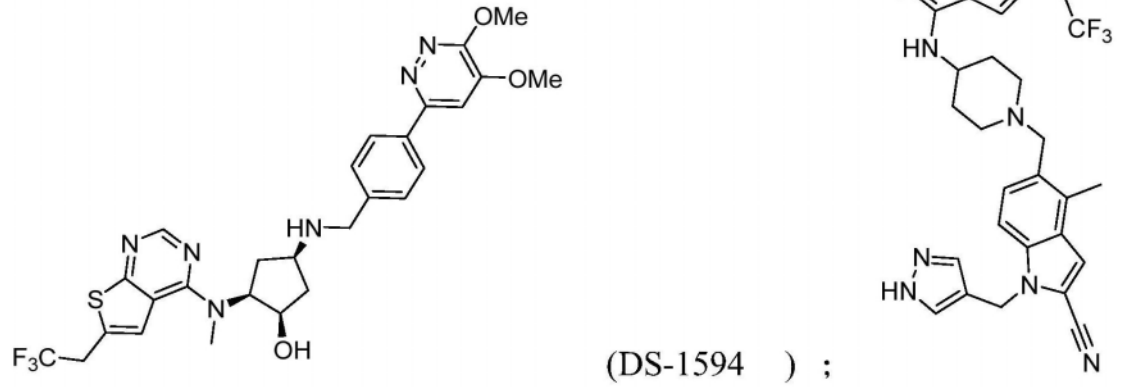
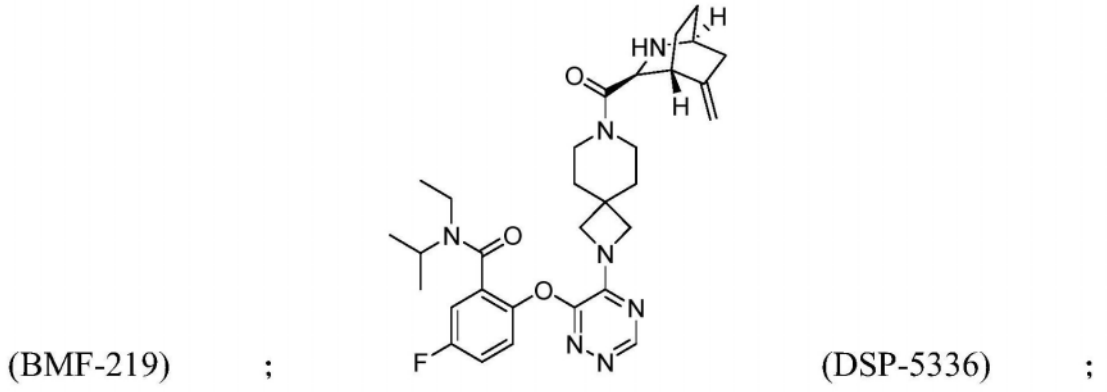
;



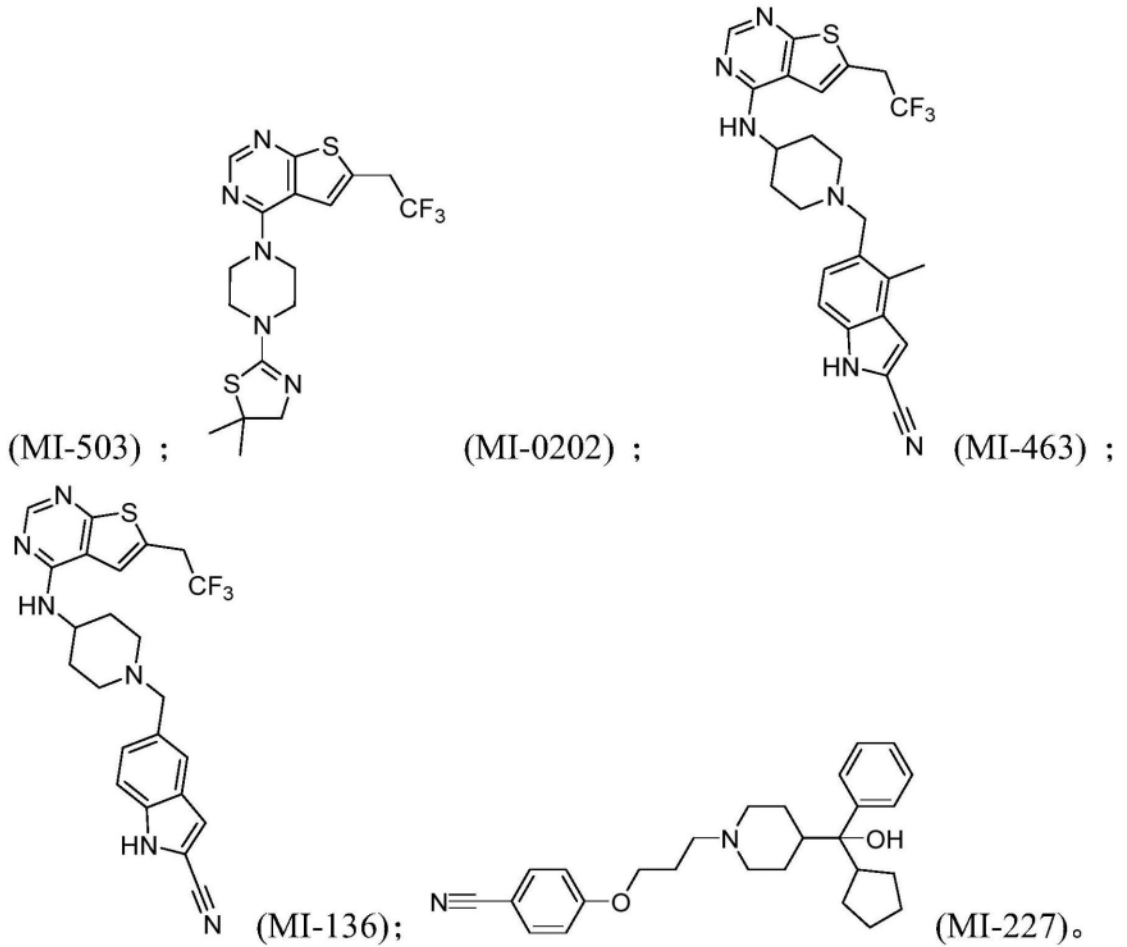
(JNJ-75276617);



[0052]



[0053]



[0054] 在本公开的实践中可能有用的其他Menin抑制剂是本领域已知的。参见,例如,WO 2017/112768、WO 2017/214367、WO 2018/053267、WO 2020/069027A1、WO 2021/207335A1、U.S.2021/0115018A1、U.S.2019/0307750、U.S.20160339035 (其中式(I)的化合物)以及 Borkin et al.,Cancer Cell 27(4):589-602(2015)。

[0055] 在本公开的实践中可能有用的其他Menin抑制剂包括MI-2-2 (其抑制Menin与MLL之间的相互作用(Grembecka et al.,Nat.Chem.Biol.8:277-284(2012);Shi et al.,Blood 120:4461-4469(2102)) 和N,N'-双(4-氨基苯基)-N,N'-二甲基乙二胺(也称为ISC-30,且其抑制MLL酶和menin的相互作用),以及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)。

[0056] 在一些实施方案中,Menin抑制剂是干扰RNA,例如短干扰RNA(siRNA),用作活性剂来降低MEN1的水平或另一Menin-MLL复合体成员的水平。RNA干扰(RNAi)是将双链RNA(dsRNA)引入多种生物和细胞类型中导致互补mRNA降解的现象。Soutschek et al.,432:173-178(2004)描述了对siRNA的化学修饰,其有助于静脉内全身递送。优化siRNA需要考虑总G/C含量、末端C/T含量、溶解温度(Tm)和3'突出端的核苷酸含量。参见,例如,Schwartz et al.,Cell 115:199-208(2003)和Khvorova et al.,Cell 115:209-216(2003)。因此,本公开还包括使用RNAi技术降低MEN1、MOZ或其他靶蛋白水平的方法。表1列出了与Menin-MLL复合体成员结合的代表性siRNA的核酸序列。

[0057] 表1:结合Menin-MLL复合体的siRNA的核酸序列

寡核苷酸	序列(5'-->3')
sgKMT2A_A_For	CACCGAGGGTCTTAATGATCCGCG(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)

[0059] Menin抑制剂可作为单药治疗或以联合治疗的方式(例如,与TKI和/或MOZ抑制剂联合)施用于患者。单药治疗和联合治疗均可作为“一线(front/first-line)”,即,作为既往未接受过抗GIST癌治疗方案(无论是单独使用还是与其他治疗联合使用)的患者的初始治疗;或“二线”,作为既往接受过抗癌治疗方案的患者的治疗,无论是单独使用还是与其他治疗联合使用;或作为“三线”、“四线”等治疗,无论是单独使用还是与其他治疗联合使用。也可以对既往治疗不成功或部分成功但对特定治疗不耐受的患者进行治疗。治疗也可以作为辅助治疗给予,即,在目前未检出疾病或在手术切除肿瘤后的患者中预防GIST复发。因此,在一些实施方案中,可以将抑制剂施用于接受过另一种治疗(如化疗、放射免疫治疗、手术治疗、免疫治疗、放射治疗、靶向治疗,或其任意组合)的患者。

[0060] 酪氨酸激酶抑制剂(TKI)和/或MOZ抑制剂的联合治疗

[0061] 在一些实施方案中,通过Menin抑制剂治疗与有效量或治疗有效量的TKI和/或MOZ

抑制剂联合或同时治疗受试者。阻断KIT或MOZ可以提供增强Menin抑制剂治疗效果的附加手段。

[0062] 在联合治疗的上下文中使用的术语“组合”和“同时”是指活性剂通过相同或分开的剂型,以及通过相同或不同的施用方式,或依次地,例如作为同一治疗方案的一部分,或通过相继的治疗方案,共同施用,其包括基本上同时施用。因此,如果顺序给药,在开始施用第二种抑制剂时,在某些情况下,第一种抑制剂在治疗部位的有效浓度下仍然是可检测的。可以确定顺序和时间间隔,以便它们可以共同作用(例如,协同作用)以提供比以其他方式施用更大的益处。例如,可以同时或在不同的时间点以任何顺序依次施用治疗剂;然而,如果不同时施用,它们可以在足够接近的时间内施用,以提供所需的治疗效果,所述治疗效果以是协同的方式。因此,这些术语不限于在完全相同的时间施用活性剂。

[0063] 酪氨酸激酶抑制剂

[0064] TKI包括任何一种剂或剂的组合,如小分子、核酸(例如,siRNA)或抗体、肽、拟肽或适体,其作用是直接或间接破坏且减少或甚至消除KIT蛋白或KIT的功能或表达。在一些实施方案中,TKI是伊马替尼、舒尼替尼、瑞格非尼、阿伐替尼、瑞派替尼或尼洛替尼。TKI可以是抗体,例如,抗KIT抗体是单克隆抗D4和抗D5。参见Shi et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 113(33):E4784-93(2016)。在一些实施方案中,KIT抑制剂是抗体片段,例如,二价抗体片段2D1-Fc和3G1-Fc。参见Gall et al.,Mol.Cancer.Ther.14(11):2595-605(2015)。可以使用两种或更多种TKI抑制剂的组合。

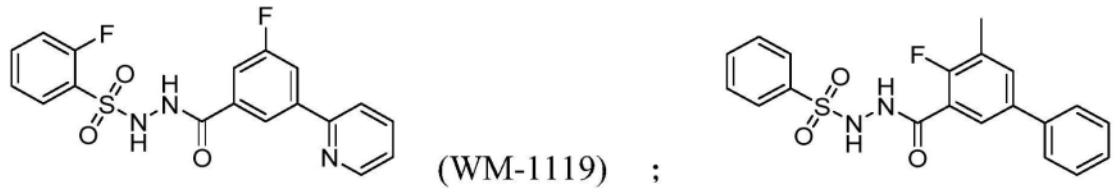
[0065] 在一些实施方案中,TKI在施用Menin抑制剂之后施用。在一些实施方案中,TKI与Menin抑制剂的施用基本同时施用(即,同时地)。在一些实施方案中,TKI在施用Menin抑制剂之前施用。

[0066] MOZ抑制剂

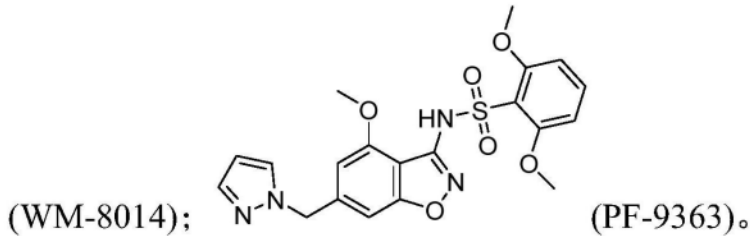
[0067] 在一些实施方案中,附加的活性剂可以是有效量的MOZ抑制剂。在一些实施方案中,附加的活性剂可以是治疗有效量的MOZ抑制剂。MOZ抑制剂包括一种或任何剂的组合,如小分子、核酸(例如,siRNA)或抗体、肽、拟肽或适体,其作用是直接或间接破坏且减少或甚至消除MOZ蛋白或MOZ基因的功能或表达。在一些实施方案中,MOZ抑制剂在施用Menin抑制剂之后施用。在一些实施方案中,MOZ抑制剂与Menin抑制剂施用基本上同时施用。在一些实施方案中,Menin抑制剂与TKI和MOZ抑制剂联合使用。在一些实施方案中,TKI在施用MOZ抑制剂之后施用。在一些实施方案中,TKI与MOZ抑制剂施用基本上同时施用。

[0068] 在本公开的实践中可能有用的MOZ抑制剂的代表性实例包括WM-1119(2-氟-N'-(3-氟-5-(吡啶-2-基)苯甲酰基)苯磺酰肼)、WM-8014(N'-(4-氟-5-甲基-[1,1'-联苯]-3-羰基)苯磺酰肼)、PF-9363(N'-(4-氟-5-甲基-[1,1'-联苯]-3-羰基)苯磺酰肼)和抗体21620002(购自Novus Biologicals)。

[0069] 这些代表性小分子MOZ抑制剂的结构如下:



[0070]



[0071] 在一些实施方案中,MOZ抑制剂是干扰RNA(例如,siRNA),其用作活性剂来降低MOZ的水平或另一MOZ复合体成员的水平。表2列出了与MOZ复合体成员结合的代表性siRNA的核酸序列。

[0072] 表2:结合MOZ复合体的siRNA的核酸序列

寡核苷酸	序列 (5'-->3')
sgBRPF1_A_For	CACCGGCTTAGTCGCCCCGCAAGTTG (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_Re	AAACGCAGTTACGATTGGCTATCAC (SEQ ID NO: 14)
v	
sgKAT6A_B_For	CACCGTCACTCGAACCGTTAGTTCA (SEQ ID NO: 15)
sgKAT6A_B_Re	AAACTGAACTAACGGTTCGAGTGAC (SEQ ID NO: 16)
v	
sgMEAF6_A_For	CACCGCATGGCGATGCACAACAAGG (SEQ ID NO: 17)
sgMEAF6_A_Re	AAACCCTTGTTGTGCATCGCCATGC (SEQ ID NO: 18)
v	
sgMEAF6_B_For	CACCGGCGGCTCTTCAGTAAATCCT (SEQ ID NO: 19)
sgMEAF6_B_Re	AAACAGGATTTACTGAAGAGCCGCC (SEQ ID NO: 20 16)
v	

[0073]

[0074] 在一些实施方案中,MOZ抑制剂在施用Menin抑制剂之后施用。在一些实施方案中,MOZ抑制剂基本上与Menin抑制剂施用同时施用(即,同时地)。在一些实施方案中,在施用Menin抑制剂之前施用MOZ抑制剂。

[0075] 就需要施用TKI及MOZ抑制剂(除Menin抑制剂外)的实施方案而言,在施用TKI之前、基本上同时或之后施用MOZ抑制剂。

[0076] 在一些实施方案中,在施用TKI和Menin抑制剂之后施用MOZ抑制剂。在一些实施方案中,MOZ抑制剂基本上与TKI和Menin抑制剂施用同时施用(即,同时地)。在一些实施方案

中,在施用MOZ抑制剂和TKI之后施用Menin抑制剂。

[0077] 组合物和制剂

[0078] 本文所述的活性剂可以按照已知技术配制成药物组合物。本公开的药物组合物包括单独或与有效量的TKI和MOZ抑制剂组合的有效量的Menin抑制剂。在一些实施方案中,本公开的药物组合物包括单独或与有效量或治疗有效量的TKI和MOZ抑制剂组合的有效量或治疗有效量的Menin抑制剂。活性剂可以是药学上可接受的盐或其异构体(例如,立体异构体)的形式。术语“抑制剂”和“活性剂”包括盐和立体异构体。如本文所使用,“药学上可接受的盐”意指任何无毒盐,其在施用给接受者时能够直接或间接提供本公开的化合物或化合物前药。药学上可接受的盐可用酸形成,酸的代表性实例包括盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸和琥珀酸。

[0079] 本文公开的活性剂及其药学上可接受的盐和立体异构体可根据常规制药实践,例如常规混合、溶解、制粒、制糖衣丸、粉碎、乳化、胶囊化、包封和压制工艺,单独或与两种或更多种组合一起配制成给定类型的组合物(参见,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York)。制剂的类型取决于施用方式,其可以包括肠内(例如,口服、含服、舌下和直肠)、肠胃外(例如,皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌内(i.m.)和胸骨内注射,或输注技术、眼内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、经皮的、皮内的、阴道内、腹膜内、经粘膜、经鼻、气管内滴注、支气管滴注和吸入)和局部(例如,经皮的)。一般来说,最合适的施用途径将取决于多种因素,包括,例如,剂的性质(例如,其在胃肠道环境中的稳定性)和/或受试者的状况(例如,受试者是否能够耐受口服施用)。例如,胃肠外(例如,静脉内)施用也可能是有利的,因为例如在单剂量治疗和/或急性病症的情况下,抑制剂可以相对快速地被施用。

[0080] 在一些实施方案中,活性剂被配制成用于口服或静脉内施用(例如,全身静脉内注射)。

[0081] 因此,活性剂可以配制成固体组合物(例如,粉剂、片剂、分散颗粒、胶囊、扁囊剂和栓剂)、液体组合物(例如,溶解该抑制剂的溶液、分散该抑制剂的固体颗粒的悬浮液、乳剂和含有脂质体、胶束或纳米颗粒的溶液、糖浆和酏剂);半固体组合物(例如,凝胶、混悬剂和霜剂)和气体(例如,气溶胶组合物的推进剂)。还可将抑制剂配制用于速释、中速释放(intermediate release)或缓释。

[0082] 口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒。在这类固体剂型中,活性抑制剂与载体如枸橼酸钠或磷酸氢二钙以及其他的载体或赋形剂混合,例如a) 填充剂或增量剂如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸,b) 粘合剂例如,如甲基纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶,c) 保湿剂如甘油,d) 崩解剂如交联聚合物(如交联聚乙烯吡咯烷酮(交联维酮)、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲纤维素钠)、淀粉羟乙酸钠、琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠,e) 溶液阻滞剂如石蜡,f) 吸收促进剂如季铵化合物,g) 润湿剂例如,如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,h) 吸收剂如高岭土和膨润土,和i) 润滑剂如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物。在胶囊剂、片剂和丸

剂的情况下,剂型还可以包括缓冲剂。类似类型的固体组合物也可以使用如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等赋形剂作为的填充和硬填充明胶胶囊的填充物。片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒的固体剂型可以用包衣和壳例如肠溶衣和其他包衣等来制备,并且还可以含有遮光剂。

[0083] 在一些实施方案中,本公开的抑制剂可以配制在硬胶囊或软胶囊中,如明胶胶囊。可以使用的代表性赋形剂包括预胶化淀粉、硬脂酸镁、甘露醇、硬脂酰富马酸钠、无水乳糖、微晶纤维素和交联羧甲基纤维素钠。明胶壳可包括明胶、二氧化钛、氧化铁和着色剂。

[0084] 用于口服施用的液体剂型包括溶液、混悬剂、乳剂、微乳剂、糖浆和酞剂。除抑制剂外,液体剂型可含有本领域常用的水性或非水性载体(取决于抑制剂的溶解度),例如,如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨醇酐脂肪酸酯及其混合物。口服组合物还可以包括赋形剂,其代表性实例包括润湿剂、助悬剂、着色剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0085] 可注射制剂可包括无菌水溶液或含油混悬剂。它们可以根据标准技术使用合适的分散剂或湿润剂和助悬剂来配制。无菌可注射制剂也是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、混悬剂或乳剂,如1,3-丁二醇溶液。可以使用的可接受的媒介物和溶剂是水、林格氏溶液(美国药典)和等渗氯化钠溶液。此外,通常使用无菌的固定油作为溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何温和的固定油,其包括合成的单甘油酯或双甘油酯。此外,脂肪酸(如油酸)用于制备注射剂。可将注射制剂灭菌,例如,通过细菌截留过滤器过滤,或通过以无菌固体组合物形式掺入灭菌剂,所述灭菌剂可在使用前溶解或分散于无菌水或其他无菌注射介质中。可通过减慢化合物的吸收来延长其作用,其可通过使用具有较差水溶性的液体悬浮液或结晶或无定形材料来实现。延长来自肠胃外施用制剂的抑制剂的吸收也可以通过将抑制剂悬浮在油性媒介物中来实现。

[0086] 剂量

[0087] 如本文所用,术语“有效量”和“治疗有效量”是指本文公开的活性剂(例如,Menin抑制剂、TKI或MOZ抑制剂)或其药学上可接受的盐或异构体在GIST患者中有效产生所需反应的量。因此,术语“有效量”和“治疗有效量”包括活性剂当施用时,诱导GIST的积极改变,或足以抑制GIST的发展或进展,或在一定程度上减轻GIST的一种或更多种症状,或仅仅杀死或抑制GIST的生长,或以其他方式阻断或降低病变细胞中Menin-MLL复合体的活性的量。活性剂的有效量可能因多种因素而异,其中可能包括GIST的严重程度和阶段、施用方式、受试者的年龄、体重和总体健康状况以及医学领域公知的类似因素。参见,例如,Goodman and Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th Edition, A. Gilman, J. Hardman and L. Limbird, eds., McGraw-Hill Press, 155-173, 2001。最终,主治医师或兽医将决定适当的量和给药方案。

[0088] 在本公开的实践中有用的活性剂可以在很宽的剂量范围内有效。在一些实施方案中,给定活性剂的每日总剂量(例如,对于成年人)的范围可以是约0.001mg至约1600mg、0.01mg至约1600mg、0.01mg至约500mg、约0.01mg至约100mg、约0.5mg至约100mg、每天约1mg至约100mg-400mg、每天约1mg至约50mg、和每天约5mg至约40mg,且在其他实施方案中每天约10mg至约30mg。根据每天施用活性剂的次数,可以配制含有所需剂量的单个剂量。作为实

例,可以用约1mg至约200mg的活性剂(例如,1mg、2mg、2.5mg、3mg、4mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg、50mg、100mg、150mg和200mg)来配制胶囊。在一些实施方案中,根据每天施用活性剂的次数,可以配制含有所需剂量的单个剂量。

[0089] 在一些实施方案中,Menin抑制剂的合适日剂量范围可以是1ng/kg至约200mg/kg、约1 μ g/kg至约100mg/kg或约1mg/kg至约50mg/kg体重。本领域公开了Menin抑制剂的其他剂量。参见,例如,国际申请公开号WO 2017/112768、WO 2017/214367、WO 2018/053267、WO 2020/069027A1、WO 2021/207355 A1以及美国专利申请公开2021/0115018A1和2019/0307750。

[0090] 在一些实施方案中,TKI伊马替尼的日剂量约为100mg/天。在一些实施方案中,KIT抑制剂以约300mg/天、约340mg/天、约400mg/天、约600mg/天或约800mg/天的日剂量施用。

[0091] 在一些实施方案中,TKI舒尼替尼的日剂量约为50mg,例如,每天口服一次,持续4周,然后2周无治疗,通常为含有12.5mg、25mg或50mg舒尼替尼的硬明胶胶囊的形式。

[0092] 在一些实施方案中,TKI瑞格非尼的日剂量约为160mg(例如,口服,持续21天,然后停药一周,通常为40mg薄膜包衣片的形式)。

[0093] 在一些实施方案中,TKI阿伐替尼的日剂量约为300mg(例如,每天口服一次,通常为含有25mg、50mg、100mg、200mg或300mg的薄膜包衣胶囊的形式)。

[0094] 在一些实施方案中,TKI瑞派替尼的日剂量约为150mg(例如,每天口服一次,通常为50mg片剂的形式)。

[0095] 在一些实施方案中,TKI尼洛替尼的日剂量约为300mg至400mg(例如,150mg和200mg硬胶囊,通常每天两次,间隔约12小时空腹服用)。

[0096] 在一些实施方案中,MOZ抑制剂的日剂量范围为每公斤受试者体重约0.5 μ g至约50mg。在一些实施方案中,MOZ抑制剂的剂量范围可以为每公斤受试者体重约1 μ g至约10mg,而在一些实施方案中,每公斤受试者体重约3 μ g至约1mg。

[0097] 该方法可能需要以单剂量或多剂量(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、10、15、20或更多剂量)向患者施用Menin抑制剂和任选的一种或更多种其他活性剂或其药物组合物。例如,施用频率的范围可以从每天一次到大约每八周一次。在一些实施方案中,施用频率的范围为约每天一次,持续1周、2周、3周、4周、5周或6周,而在其他实施方案中,需要28天的周期,其包括每天施用,持续3周(21天),随后是7天的停药期,或施用持续4周,随后是14天的停药期。在其他实施方案中,活性剂可以在两天半的疗程内每天给药两次(BID)(总共5剂)或在两天的疗程内每天给药一次(QD)(总共2剂)。在其他实施方案中,活性剂在五天的疗程内每天给药一次(QD)。

[0098] 附加联合疗法

[0099] 本方法可能需要施用至少一种其他活性抗癌剂。代表性抗癌剂在美国专利9,101,622(其第5.2节)中公开。

[0100] 然而,其他疗法包括免疫疗法、化疗和放疗。

[0101] 免疫疗法,包括免疫检查点抑制剂,可用于治疗确诊的癌症。免疫检查点分子包括例如PD1、CTLA4、KIR、TIGIT、TIM-3、LAG-3、BTLA、VISTA、CD47和NKG2A。临床上可用的免疫检查点抑制剂实例包括德瓦鲁单抗(Imfinzi[®])、阿特珠单抗(Tecentriq[®])和阿维鲁单抗

(Bavencio[®])。临床上可用的PD1抑制剂实例包括纳武单抗(Opdivo[®])、派姆单抗(Keytruda[®])和西米普利单抗(Libtayo[®])。

[0102] 联合化疗包括,例如,白蛋白结合型紫杉醇(Abraxane[®])、六甲蜜胺、多西他赛、Herceptin[®]、甲氨蝶呤、Novantrone[®]、Zoladex[®]、顺铂(CDDP)、卡铂、甲基苄肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普瑞巴林、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、Taxol[®]、吉西他滨、Navelbine[®]、法尼基蛋白转移酶抑制剂、反式铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春碱和甲氨蝶呤,或上述任何类似物或衍生物变体及其组合。

[0103] 联合放疗包括通常所说的 γ 射线、X射线和/或将放射性同位素定向输送到肿瘤细胞,这会对DNA、DNA的复制和修复以及染色体的组装和维持造成广泛的损伤。放射性同位素的剂量范围变化很大,且取决于同位素的半衰期、发出的辐射强度和类型以及肿瘤细胞的吸收,并且将由主治医师确定。

[0104] 放射治疗可包括外部或内部放疗。体外放疗涉及受试者体外的放射源,并将辐射发送到体内的癌症区域。内部放疗使用密封在针头、种子、线路或导管中的放射性物质,直接放置在癌症内或附近。

[0105] 试剂盒

[0106] 药物组合物可以组装成用于治疗GIST的试剂盒或药物系统。试剂盒或药物系统可以包括一种或更多种含有Menin抑制剂和药学上可接受的载体的剂量配方(dosage formulation),其被置于合适的容器中,例如,管、小瓶、安瓿瓶、瓶子、注射器或袋子。在一些实施方案中,试剂盒或药物系统还可以包括一种或更多种剂量配方的TKI。在一些实施方案中,试剂盒或药物系统还可以包括一种或更多种剂量配方的MOZ抑制剂。在一些实施方案中,试剂盒或药物系统还可以包括一种或更多种剂量配方的TKI抑制剂和一种或更多种剂量配方的MOZ抑制剂。附加活性物质可以单独配制或一起配制,并且可以放置在相同或单独的容器中。本公开的试剂盒或药物系统还可以包括用于使用其中包含的附加活性物质的印刷说明书。

[0107] 在一些实施方案中,试剂盒包括相同剂型的Menin抑制剂和TKI。在其他实施方案中,Menin抑制剂和TKI包含在不同的剂型中。

[0108] 本公开的这些和其他方面将在考虑以下工作实施例时得到进一步理解,这些实施例旨在说明本公开的某些实施方案,但不旨在限制通过权利要求定义的范围。

实施例

[0109] 实施例1:材料和方法

[0110] 细胞培养和病毒生产。所有细胞系在常规监测中呈支原体感染检测阴性(MilliporeSigma货号MP0025-1KT)。人胚肾(HEK)293FT(Thermo Fisher Scientific货号R70007,RRID:CVCL_6911)和GIST细胞系GIST-T1(Cosmo Bio货号PMC-GIST01-COS,RRID:CVCL_4976;KIT突变为外显子11 Δ 560-578中)、GIST430(RRID:CVCL_7040;KIT突变为外显子11 Δ 560-576中)、GIST48B(RRID:CVCL_M441;不依赖KIT)和GIST882(RRID:CVCL_7044;KIT突变为外显子13K642E)在含有10%FBS、2mm L-谷氨酰胺、100mg/ml青霉素和100mg/ml

链霉素的杜氏改良Eagle培养基中培养。如前所述,产生了不依赖KIT增强子的KIT拯救细胞系(Hemming et al., *Cancer Research* 79:994-1009 (2019))。2014年至2016年间,从Jonathan Fletcher的实验室获得了非商业细胞系。对KIT外显子进行测序,以确认GIST细胞系的预期密码子突变和细胞身份,并且在大约3个月内将细胞从原始或衍生的原液中解冻并用于所述实验。使用X-tremeGene (Roche, 货号6365809001) 进行转染。如前所述进行慢病毒生产(Hemming et al., *PLoS Biol.* 6:e2571-15 (2008))。简而言之,将293FT细胞与pMD2.G (Addgene#12259)、psPAX2 (Addgene#12260) 和慢病毒表达质粒共转染。在大约72h收集病毒上清液,并通过以1000g离心5min去除碎片。用病毒上清液和8 μ g/mL的聚凝胺通过以680g旋转接种60min转导细胞。药物按所示浓度使用且包括伊马替尼 (LC Laboratories 货号I-5508)、WM-1119 (Selleck Chemicals 货号S8776)、VTP-50469 (Syndax pharmaceuticals 赠送)、他泽司他 (Selleck Chemicals 货号S7128) 和EPZ-5676 (Selleck Chemicals 货号S7062)。对于随时间生长的测定,在96孔板中的每个孔分配 15×10^3 个细胞,用病毒转导或用药物处理,并且在Guava easyCyte流式细胞仪 (Luminex Corporation) 上每周进行大约两次细胞计数,将细胞计数针对对照条件归一化。

[0111] 基因组规模的CRISPR筛选。用185,634个sgRNA靶向18,436个基因的Liu人类CRISPR基因敲除文库 (Addgene#1000000132; Fei et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Natl. Acad. Sci. USA* 116:25186-95 (2019)), 分为两个合并文库, H1和H2, 每个文库中每个基因包含大约5个sgRNA。每个病毒粒子均含有sgRNA、Cas9和源自lentiCRISPRv2的嘌呤霉素耐药基因。用每个文库一式两份转导细胞系GIST-T1和GIST430 (总数 $n=8$)。对于每个文库转导,以0.3的靶MOI转导 44.64×10^6 个细胞,估计文库覆盖率为134x。应用嘌呤霉素72h进行选择。细胞在融合状态下传代,以保持文库覆盖率 $>134x$ 约30天。实验结束时,对每个文库从 30×10^6 个细胞中提取基因组DNA。U6和EF-1 α 之间的sgRNA区域以32个独立的100 μ L反应从来自每个实验重复的200 μ g基因组DNA中扩增。将产物合并,且进行第二次PCR反应以并入Illumina衔接子和6bp条形码。进行第三次PCR反应以富集全长扩增子 (引物详见表1至表3)。通过琼脂糖凝胶电泳和QIAquick凝胶提取试剂盒 (Qiagen 货号28704) 提取对最终扩增子文库进行纯化。在NovaSeq 6000 (Illumina) 上进行下一代测序。采用MAGeCK软件 (0.5.8版) 对筛选数据进行分析 (Wang et al., *Nat. Protoc.* 14(3):756-780 (2019))。使用“count”命令生成所有文库 ($n=8$) 的读取计数,以初始质粒文库 ($n=2$) 作为基线对照。对样本之间的总计数进行归一化,以尽量减少测序深度的影响。使用最大似然估计命令生成每次筛选的 β -分数,并将数据针对H1和H2文库中包含的AAVS1 sgRNA对照归一化。利用Metascape进行基因本体富集分析 (Zhou et al., *Nat. Commun.* 10(1):1523 (2019))。

[0112] 表3:代表性引物的核酸序列

[0113]

寡核苷酸	序列 (5'-->3')	应用
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	TCGCACCCACACTCATTTCG (SEQ ID NO: 31)	qPCR
USP1_Rev	GGGCTACCTCTTGAAAGTCCA (SEQ ID NO: 32)	qPCR
CRISPR_1st_For	AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGA AAGTATTTTCG (SEQ ID NO: 33)	CRISPR 筛选第 1 轮引物
CRISPR_1st_R	TCTACTATTCTTTCCCTGCACTGTGACTGTG GCGATGTGCGCTCTG (SEQ ID NO: 34)	CRISPR 筛选第 1 轮引物

CRISPR_2nd_Fo r_01	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACT CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCAA GGTCAtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 35)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Fo r_02	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACT CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTatGC ATAACTtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 36)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Fo r_03	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACT CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgatCT CTGATTtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 37)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Fo r_04	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACT CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTcgatT ACGTACGtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 38)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Fo r_05	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACT CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTtcatT ACGCGTTtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 39)	CRISPR 筛选第2 轮引物
CRISPR_2nd_Fo r_06	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACT CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTatcgat CTCAGTGAtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 40)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Fo r_07	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACT CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTgatcga tTCTGATATtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 41)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Fo r_08	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACT CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTcgatcg atCATATGCTtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 42)	CRISPR 筛选第2 轮引物
CRISPR_2nd_Fo r_09	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACT CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTacgatc	CRISPR 筛选第 2 轮引物

[0114]

[0115]

	gatCGTAATTAtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 43)	
CRISPR_2nd_Fo r_10	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTiACG TACTCtcttgtggaaggacgaaacaccg (SEQ ID NO: 44)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Re v_01	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGGT CAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTacgatcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCA CTGT (SEQ ID NO: 45)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Re v_02	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCATAA CTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTcgatcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCAC TGT (SEQ ID NO: 46)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Re v_03	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCTGA TTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTgatcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACT GT (SEQ ID NO: 47)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Re v_04	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACGTA CGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTategatTCTACTATTCTTTCCCTGCACT GT (SEQ ID NO: 48)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Re v_05	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACGCG TTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTtcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTG T (SEQ ID NO: 49)	CRISPR 筛选第 ¹ 2 轮引物
CRISPR_2nd_Re v_06	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCAGT GAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTcgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTG T (SEQ ID NO: 50)	CRISPR 筛选第 2 轮引物
CRISPR_2nd_Re v_07	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGAT ATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTgatTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 51)	CRISPR 筛选第 2 轮引物

CRISPR_2nd_Re v_08	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATATG CTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTatTCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 52)	CRISPR 筛选第2 轮引物	
CRISPR_2nd_Re v_09	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTAAT TAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTtTCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT (SEQ ID NO: 53)	CRISPR 筛选第2 轮引物	
[0116]	CRISPR_2nd_Re v_10	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGTAC TCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCC GATCTacgatgatTCTACTATTCTTTCCCCTGCA CTGT (SEQ ID NO: 54)	CRISPR 筛选第 2轮引物
CRISPR_3rd_For	AATGATACGGCGACCACCGAGATC (SEQ ID NO: 55)	CRISPR 筛选第3 轮引物	
CRISPR_3rd_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT (SEQ ID NO: 56)	CRISPR 筛选第3 轮引物	

[0117] 克隆和CRISPR。通过病毒转导产生稳定表达人类密码子优化的化脓性链球菌Cas9 (Addgene#73310)的细胞系。使用CHOPCHOP (Labun et al., Nucleic Acids Research 44: W272-6 (2016)) (chopchop.cbu.uib.no) 设计CRISPR单导向RNA (sgRNA), 将其克隆到用GFP修饰的Lenti sgRNA EFS-GFP (LRG, Addgene#65656) 中, 用通过2A肽连接至嘌呤霉素耐药基因的copGFP取代GFP, 且详见表1-表3。通过密码子优化合成BioID表达载体以改变sgRNA结合序列 (Twist Bioscience)。利用CRISPR (Avana) 公开的20Q3至20Q4版本, 通过depmap.org (Barretina et al., Nature 483: 603-7 (2012)) 访问依赖性地图 (DepMap) 门户数据。

[0118] 细胞周期和细胞凋亡。在药物处理72h (伊马替尼) 或8天 (VTP-50469, WM-1119) 后进行细胞周期分析。将细胞进行胰酶消化, 在PBS中洗涤, 并在70%乙醇中固定。25 μ g/mL的碘化丙啶 (Life Technologies货号P1304MP) 和0.2mg/mL的RNAse A (Thermo Fischer Scientific货号EN0531) 用于染色核DNA。在Guava easyCyte流式细胞仪 (Luminex Corporation) 上进行分析, 并使用Guava InCyte软件评估单细胞的核含量。根据制造商的建议, 使用Guava Nexin试剂 (Luminex Corporation货号4500-0450) 在药物处理72h后测量凋亡和细胞死亡。非凋亡细胞对膜联蛋白V和7-AAD染色阴性, 早期凋亡细胞对膜联蛋白V染色阳性但对7-AAD染色阴性, 且晚期凋亡和死亡细胞对膜联蛋白V和7-AAD染色均阳性。在Guava easyCyte流式细胞仪上测定染色, 并使用Guava InCyte软件分析数据。

[0119] 定量RT-PCR。对细胞进行胰酶消化并在PBS中洗涤以使用RNeasy Mini Kit (Qiagen货号74106) 提取RNA。使用SuperScript IV VILO cDNA合成试剂盒 (Invitrogen货号11766050) 制作cDNA文库。在QuantStudio 6Flex实时荧光定量PCR系统 (Thermo Fischer Scientific) 上使用Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies货号4367659) 进行RT-PCR。以GAPDH表达为参考, 采用 $\Delta\Delta$ Ct方法计算相对mRNA水平。引物列在表1至表3中。

[0120] RNA-seq。使用RNeasy Plus试剂盒(Qiagen货号74136)分离总RNA,并使用Nanodrop(Thermo Fisher Scientific)测量浓度,且通过TapeStation4200(Agilent)测量质量。使用NEBNext Ultra IIDNA文库制备试剂盒(New England Biolabs货号E7645S)进行文库制备。在NovaSeq 6000(Illumina)上进行双端150bp测序。使用STAR(Dobin et al., Bioinformatics 29:15-21(2012))将RNA-seq数据与hg19比对,使用Cufflinks(Trapnell et al., Nat. Biotechnol. 28:511-5(2010))进行表达定量,以生成以每千个碱基的转录每百万映射读取的片段(FPKM)为单位的基因表达值。使用分子签名数据库中的Hallmark基因列表进行基因集富集分析(GSEA, RRID:SCR_003199)(Subramanian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15545-50(2005))。

[0121] ChIP-seq和Cut&Tag。对于ChIP-seq,将大约 20×10^6 个细胞在1%甲醛中孵育10min。固定后,多余的甲醛用0.125M的甘氨酸淬灭5min。样品用PBS洗涤,且完整的细胞核混悬在SDS缓冲液(0.5% SDS, 50mM Tris, 100mM NaCl, 5mM EDTA和蛋白酶抑制剂混合物(Roche货号11873580001))中,且在E220聚焦超声仪(Covaris, Inc.)中进行超声处理。将超声处理的样品20,000g离心进行澄清,并将上清液稀释至 $<0.1\%$ SDS,然后与预先结合抗体(H3K9ac, Active Motif货号39137, RRID:AB_2561017; H3K4me3, Abcam货号ab8580, RRID:AB_306649; BRPF1, Thermo Fisher Scientific货号PA5-27783, RRID:AB_2545259; KAT6A, Cell Signaling Technology货号78462; HA, Cell Signaling Technology货号3724, RRID:AB_1549585; DOT1L, Cell Signaling Technology货号77087, RRID:AB_2799889; H3K79me2, Cell Signaling Technology货号5427, RRID:AB_10693787)的Dynabeads蛋白A(Life Technologies货号1002d)一起孵育过夜。将磁珠重悬于洗脱缓冲液(200mM NaCl, 100mM NaHCO₃, 1% SDS)中并在65℃下孵育以反向交联12h至15h后,用缓冲液A(150mM NaCl, 5mM EDTA, 5%蔗糖, 1% Triton X-100, 0.2% SDS, 20mM Tris)、缓冲液B(5mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1%脱氧胆酸盐, 20mM Tris)、缓冲液C(250mM LiCl, 1mM EDTA, 0.5% NP40, 0.5%脱氧胆酸盐, 10mM Tris)和TE连续洗涤样品。根据制造商的建议,使用AMPureXP磁珠(Beckman Coulter货号A63881)纯化DNA,并通过Qubit dsDNA HS测定试剂盒(Life Technologies货号Q32854)和TapeStation 4200(Agilent)评估质量。使用ThruPLEX DNA-seq试剂盒(Takara Bio货号R400675)制备测序文库,并在NextSeq 500或550系统(Illumina)上测序。通过使加标抗体(Active Motif货号61686)与Dynabeads的目的IP抗体一起预结合来进行ChIP-seq加标归一化。按照制造商的建议,将等量的黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)染色质(Active Motif货号53083)添加到制备的GIST细胞染色质中。将所得测序样本与果蝇基因组进行比对,使用果蝇总读段计数对样本中的智人读段计数进行归一化。

[0122] 如前所述(Kaya-Okur et al., Nat. Commun. 10(1):1930(2019))使用蛋白A和Tn5转座酶融合蛋白(Addgene#124601)进行Cut&TAG。简而言之,将100,000个GIST-T1细胞在洗涤缓冲液(20mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM亚精胺, 蛋白酶抑制剂混合物)中洗涤,并在室温与刀豆球蛋白A珠(Bangs Laboratories货号BP531)结合15min。将结合的细胞重悬于50 μ L Dig洗涤缓冲液(20mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM亚精胺, 蛋白酶抑制剂混合物, 2mM EDTA, 0.05%洋地黄皂苷)中,并与1:100稀释的抗体在4℃下孵育过夜(Menin, Bethyl货号A300-105A, RRID:AB_2143306; MLL1n, Bethyl货号A300-086A, RRID:AB_

242510)。使用磁铁收集磁珠,并将细胞重悬于具有1:100稀释的二抗的100 μ L Dig洗涤缓冲液中,并在室温孵育30min。将细胞在含有1:250pA-Tn5转座酶的Dig-Med缓冲液(0.05%洋地黄皂苷,20mM HEPES,pH 7.5,300mM NaCl,0.5mM亚精胺,蛋白酶抑制剂混合物)中洗涤3次,并在室温下孵育1h。将细胞在Dig-Med缓冲液中洗涤3次,并重悬于300 μ L标记缓冲液(10mM MgCl₂于Dig-Med缓冲液中)中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1h。通过添加10 μ L 0.5M EDTA,3 μ L 10% SDS和2.5 μ L的20mg/mL蛋白酶K(Invitrogen货号25530049)终止标记,并将样品在50 $^{\circ}$ C孵育1h。标记的DNA通过苯酚:氯仿:异戊醇萃取法纯化,并使水层经过乙醇沉淀,并将DNA重悬于30 μ L TE中。对于每个样品,将21 μ L DNA与通用i5和独特条形码化的i7引物混合,并使用NEBNext高保真2xPCR预混液(New England Biolabs货号M0541S)在热循环仪中使用以下条件进行扩增:98 $^{\circ}$ C持续30sec;14个循环的98 $^{\circ}$ C持续10sec、63 $^{\circ}$ C持续10sec;72 $^{\circ}$ C持续2min。根据制造商的建议,使用AMPureXP磁珠纯化DNA,并使用Qubit dsDNA HS测定试剂盒和TapeStation 4200评估质量。样品在NextSeq 550系统(Illumina)上测序。

[0123] 使用Bowtie2(Langmead et al.,*Genome Biol.*10:R25.1-R25.10(2009))将所有测序数据与人类参考基因组组合体hg19进行比对。使用Bamliquidator(1.0版)读取密度计算器计算标准化读取密度。将对齐的读段延长200bp,并计算每个碱基对的读取密度。在每个区域,读取密度针对百万次映射读取的总数标准化,以生成以每个碱基每百万映射读取的读数(rpm/bp)为单位的读取密度。通过基于模型的ChIP-seq分析(MACS,1.4.2版,Feng et al.,*Nature Protocols* 7:1728-40(2012))进行峰发现,并使用ROSE2(Lovén et al.,*Cell* 153:320-34(2013))识别信号富集区域。使用bamplot(github.com/linlabbcm)生成单个ChIP-seq轨迹显示。使用ChAsE(Younesy et al.,*Bioinformatics* 32:3324-6(2016))生成ChIP-seq数据的热图可视化。

[0124] 免疫印迹。将细胞在含有蛋白酶抑制剂混合物(Roche货号11873580001)的RIPA缓冲液中裂解,并以14,000g离心10min以去除基因组DNA和碎片。使用基于二喹啉甲酸的测定法(Pierce Biotechnology货号23225)测定蛋白质浓度。蛋白质样品采用以下抗体进行SDS-PAGE和蛋白质印迹:HA(1:1,000,Cell Signaling Technology货号2367,RRID:AB_10691311)、MEAF6(1:500,Proteintech货号26465-1-AP,RRID:AB_2880524)、肌动蛋白(1:1,000,Cell Signaling Technology货号4967,RRID:AB_330288)、Menin(1:10,000,Bethyl货号A300-105A,RRID:AB_2143306)或链霉亲和素-HRP(1:40,000,Abcam货号ab7403)。用抗小鼠或抗兔二抗探测蛋白质印迹,并使用Odyssey CLx红外成像系统(LI-COR Biosciences)或通过化学发光的链霉亲和素-HRP(MilliporeSigma货号wbk1s 0500)进行检测。所示的免疫印迹代表了至少三个独立实验。

[0125] 质谱和BioID。生成稳定表达对照或实验突变生物素连接酶(BirA*R118G)-标记的融合蛋白的GIST-T1细胞系。使用链霉亲和素-琼脂糖珠(GE Healthcare货号17-5113-01)在4 $^{\circ}$ C下对24h生物素标记的全细胞裂解物进行过夜亲和力下拉。将磁珠在50mM Tris中的2%SDS中洗涤三次,在BioID缓冲液(50mM Tris,500mM NaCl,0.4% SDS)中洗涤两次,在50mM Tris中洗涤六次,并重悬于100 μ L碳酸氢铵中。对样品进行胰蛋白酶消化,并在反相净化步骤中去除磁珠和盐。提取物经快速真空干燥后,且之后用5 μ l至10 μ l的2.5%乙腈和0.1%甲酸复溶。通过将2.6 μ m C18球形二氧化硅珠填充到带有火焰制成的尖部的熔融石英毛细管(100 μ m内径 \times 约30cm长)中,创建了纳米级反相HPLC毛细管柱。平衡色谱柱后,通过

Famos自动进样器(LC Packings)装载每个样品。形成梯度,且用增加浓度的97.5%乙腈和0.1%甲酸洗脱肽。当肽洗脱时,对其进行电喷雾电离,且然后进入LTQ Orbitrap Velos Pro离子阱质谱仪(Thermo Fisher Scientific)。对肽进行检测、分离和片段化,以产生每个肽的特定片段离子的串联质谱。通过将蛋白质数据库与Sequest(Thermo Fisher Scientific)获得的片段化模式进行匹配来确定肽序列(并由此得到蛋白质身份)。所有数据库包括所有序列的反向版本,并将数据过滤至1%至2%的肽错误发现率。在重复样品中使用信号强度的无标记定量进行定量比较。使用Morpheus (software.broadinstitute.org/morpheus/)生成了相对于DMSO的 \log_2 倍信号变化的热图。

[0126] 异种移植模型。PG27患者来源的异种移植来自一名接受临床指示的手术并遵循丹娜-法伯癌症研究所IRB批准的研究方案的书面知情同意书的患者。将冻存的肿瘤或与基质胶1:1混合的GIST-T1细胞系皮下植入6周大的雌性裸鼠(NU/NU; Charles River Laboratories)中。GIST-T1的支原体和啮齿动物病原体检测呈阴性(Charles River Laboratories)。为了对CRISPR/Cas9修饰的细胞系生长进行体内评估,GIST-T1/Cas9细胞用指定的sgRNA处理,并在体外用嘌呤霉素选择14天,然后双侧腹植入。对于药物治疗研究,当肿瘤大小达到约 100mm^3 - 200mm^3 (通过卡尺测量并通过肿瘤体积方程确定:体积=长直径 \times 短直径 \times 0.5)时,将单独移植的小鼠入组治疗组。将小鼠随机分配到施用伊马替尼(每天50mg/kg灌胃,每周5天)、WM-1119(每天50mg/kg灌胃,每天3次,每周7天)、VTP-50469(食物中0.1%)或联合治疗的治疗组。伊马替尼以低于最大耐受剂量施用,以便于测试联合治疗。未采用统计学方法预先确定样本量,且药物治疗期间无动物死亡。将对照组中的两只GIST-T1细胞系异种移植小鼠排除在分析之外,因为最初测量的皮下植入物未能生长。将图7D中VTP-50469组中的一只由于肿瘤快速生长而提前终止的异常荷瘤小鼠排除。将肿瘤解剖并固定在10%的福尔马林中用于后续研究,包括H&E染色和切片肿瘤的免疫组化。从固定和包埋的肿瘤中切下 $4\mu\text{m}$ 切片,并用Ki-67(1:400, Cell Signaling Technology货号9027)和裂解的胱天蛋白酶-3(1:250, Cell Signaling Technology货号9579)染色。根据制造商的建议,使用DAB(Cell Signaling Technology货号8059)或NovaRed(Vector Laboratories货号SK-4800)底物试剂盒进行反应。所有程序均按照丹娜-法伯癌症研究所的实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)批准的方案进行。

[0127] 统计分析。将中心值、误差线、P值临界值、重复次数和统计检验在相应的图例中标识。对于箱形图,箱体从第25个百分位数延伸到第75个百分位数,中心线表示绘制到第10个和第90个百分位数的中位数和触须线。样本量不是预先确定的。

[0128] 数据和材料可用性。新的测序数据可通过GEO出版物参考ID GSE172154获得。本研究中分析的其他RNA-seq、ATAC-seq和ChIP-seq数据集包括GSE95864(Hemming et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.115(25):E5746-E5755(2018))、GSE113207和GSE113217(Hemming et al., Cancer Res.79(5):994-1009(2019))。

[0129] 实施例2:全基因组筛选鉴定GIST表观遗传依赖性。

[0130] 使用RNA-seq、染色质免疫共沉淀测序(ChIP-seq)和染色质转座酶可及性测序(ATAC-seq)测定来表征GIST的整体转录和增强子情况。这些研究集中在与GIST生物学相关

的TF上,包括跨GIST样本存在的核心TF,如ETV1、FOXF1、HIC1和OSR1,以及以疾病状态特异性模式表达的辅助TF, BARX1和HAND1 (Hemming et al., *Cancer Res.* 79 (5) :994-1009 (2019))。然而,这些TF如何与其他表观遗传学调节因子整合以建立GIST相关基因表达程序尚不清楚。在两种KIT突变GIST细胞系GIST-T1和GIST430中进行了基于全基因组CRISPR/Cas9的脱落筛选,以确定哪些基因在GIST生物学中是必需的。使用配对的人类全基因组sgRNA文库(表示为H1和H2)的分裂文库方法,每个文库中每个基因大约5个sgRNA,靶向18,436个基因,筛选中共有185,634个sgRNA。如图1A所示在H1和H2文库之间以及如图1B所示在两个GIST细胞系之间观察到依赖性(β)分数的显著相关性(每个细胞系, $n=4$ 个文库)。然后合并数据集进行后续分析,以提高统计功效(每个文库 $n=4$)。在图1A和图1B中进行Pearson相关性分析, P 值和 r^2 如图所示。将基因划分为“泛必需”(既往确定为对细胞活性普遍必需的(Blomen et al., *Science* 350:1092-6 (2015), Wang et al., *Science* 350:1096-101 (2015)))、“GIST必需基因”(筛选中 $FDR < 0.05$ 但未出现在泛必需基因列表中)或“非必需”(见图1C),其中泛必需基因(Blomen et al., *Science* 350:1092-6 (2015))用蓝色表示,在GIST中显著缺失但非泛必需基因用红色表示,且无显著缺失的非必需基因用灰色表示。标出了选定的GIST相关基因。

[0131] 正如预期的那样,KIT是检测到的最强依赖性之一,sgRNA水平数据显示在筛选过程中大多数(9/10)sgRNA几乎完全脱落,如图1D所示(每个文库 $n=2$)。KIT途径的其他典型下游信号调节因子,如mTOR,在筛选中显示明显脱落,但不如KIT脱落明显,见图1E($n=4$)。关注泛必需基因($n=1,702$)和非泛必需基因($n=16,757$)中的“GIST必需的”基因子集以鉴定可能在GIST中特异性富集的生物过程,如图1F所示。通过t检验比较图1D、图1E和图1F中的情况(与非必需基因或基线sgRNA相比;** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$)。通过基因本体富集分析评估了GIST中的这些独特依赖性,其显示前18个术语中有8个与表观遗传学调控机制有关,包括染色质和染色体组织,见图1G和图8A。综上所述,来自这些无偏倚依赖性筛选的数据将GIST表征为显著依赖表观遗传学机制来维持其致癌程序(Tabone et al., *Biochim.Biophys.Acta.* 1741 (1-2) :165-72 (2005))。

[0132] 为了更好地界定哪些染色质调控复合物可能与GIST生物学最相关和最独特,将GIST细胞系中所有染色质修饰酶的 β -分数与DepMap项目中所有细胞系平均的类似CERES依赖性分数进行了比较(Barretina et al., *Nature* 483:603-7 (2012))。在77种评估的染色质修饰酶中,只有7种对GIST是特有的和必需的, β -分数 < -0.7 且CERES分数 > -0.25 (图2A和图8N),选择依赖性分数临界值来选择可能是特有依赖性的染色质调节因子,并标记Person相关系数。富集的酶包括赖氨酸乙酰转移酶(KAT)、MYST、赖氨酸去甲基化酶(KDM)和赖氨酸甲基转移酶(KMT)家族的成员。虚线将图划分为多个象限,上象限包含7个在GIST中具有依赖性但在整个DepMap细胞系中不具有共同依赖性的基因。为了确定哪些修饰酶可能协同作用以维持表观基因组,在DepMap中分析了基因水平的共同依赖性数据。对每种染色质修饰酶的前50个共同依赖性的比较分析显示,KMT2A、EZH2和KAT6A在基因和本体术语水平上的相互作用最高,如图2B所示,表明它们的遗传共同依赖性。在图2B中,红线连接在多个共同依赖性列表上共享的基因。蓝线连接属于同一本体术语的基因。KMT2A(Menin-MLL复合体的催化成员)也具有多个具有显著依赖性分数的公认复合体成员,包括MEN1/Menin和ASH2L,如图8B所示。由于DepMap CRISPR依赖性筛选工作没有对GIST进行分析,因此利用了

Project DRIVE的现有比较筛选结果(McDonald et al., Cell 170:577-592(2017)),其在RNAi分析的近400个细胞系中包括GIST-T1。在所有分析的细胞系中,KMT2A和ASH2L与GIST-T1的敏感性最高,在前5%,如图2C-图2F所示,通过独立和比较性筛选方法进一步表明了GIST中MOZ和Menin-MLL复合体的必需和共同依赖性。在筛选中发现其他几种染色质调节复合体具有多个具有显著依赖性的成员,并且在Project Drive中也显示出GIST-T1的富集,包括INO80复合体、NuA4组蛋白乙酰转移酶复合体、FACT复合体和PAF1复合体的成员,如图8C-图8M所示。图8I-图8J显示了来自Project Drive细胞系(n=387)的FACT复合体成员的排序敏感性分数,其中GIST-T1以红色突出显示。图8L-图8M显示了来自Project Drive细胞系(n=387)的选定PAF1复合体成员的排序敏感性分数,其中GIST-T1以红色突出显示。PRC2复合体的核心成员EZH2、SUZ12和EED(Laugesen et al., Cold Spring Harb. Perspect. Med. 6(9):a026575(2016))是筛选的所有依赖性,并且GIST-T1在Project DRIVE中对EZH2和EED的敏感性分数最高,如图9A-图9C所示。图9B-图9C显示了来自Project Drive细胞系(n=387)的选定PRC2复合体成员的排序敏感性分数,其中GIST-T1以红色突出显示。尽管DepMap中很少细胞系对核心PRC2复合体成员具有显著的依赖性,但EZH2最相关的共同依赖性包括DOT1L、EP300和MEN1,显示出与MOZ和Menin-MLL复合体共同依赖性的重叠,如图9E所示,表明转录抑制性PRC2复合体的补充功能。

[0133] 为了验证对Menin-MLL复合体成员的依赖性,利用靶向Menin-MLL复合体成员KMT2A和MEN1的独特sgRNA进行了随时间生长的测定。对于每个基因,并且每个基因具有两个独立的sgRNA,sgRNA处理显著降低了细胞增殖,如图2E所示,靶向Luc和RPS19的sgRNA分别显示在空心框和圆圈中(每个sgRNA n=3)。GIST48B用于比较这些sgRNA对对照细胞系的相对毒性,GIST48B具有与GIST-T1相似的生长率,但GIST48B通过体外选择已经失去了KIT表达和GIST相关的表观遗传和转录程序(Hemming et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115(25):E5746-E5755(2018), Hemming et al., Cancer Res. 79(5):994-1009(2019))。虽然所有靶向Menin-MLL复合体的sgRNA显著降低GIST-T1细胞增殖,但GIST48B细胞增殖几乎没有变化,如图2F所示,其中n=6,每个基因两个sgRNA。通过双因素方差分析和Tukey多重比较检验分析数据,与相同处理条件下的GIST48B进行比较;***, P<0.001; **, P<0.01。综上所述,这些数据显示了在GIST中以及在DepMap中的选定细胞系中,Menin-MLL复合体在维持GIST表观基因组中的依赖性。

[0134] 对组蛋白标记物H3K4me3、BRPF1和KATA6进行ChIP-seq,以确定在GIST基因组中Menin-MLL复合体结合并乙酰化组蛋白的位置。使用类似的方法CUT&Tag鉴定Menin和MLL1结合的基因组区域(Kaya-Okur et al., Nat. Commun. 10(1):1930(2019))。发现Menin-MLL复合体成员定位在活性基因的转录起始序列(TSS),这是通过它们与H3K27ac和H3K9ac的共同占位来确定的,见图3A上排。相比之下,观察到这些染色质复合体成员在H3K27ac定义的增强子处的占位非常低,见图3A中排。包括TSS和增强子处的可及DNA位点的ATAC峰显示出Menin-MLL复合体结合的中等水平,见图3A下排。在图3A中,各排中显示了来自TSS、H3K27ac定义的超级增强子或ATAC定义的峰±10kb的缩放读取密度。

[0135] 接下来,分析了在ChIP-seq和CUT&Tag数据集中显示Menin强富集的基因组区域,推断这些因子代表Menin-MLL复合体。虽然这种蛋白质与全基因组的数千个位点结合,但在这些基因组区域的3%-5%中观察到不成比例的富集,其中许多与GIST有明显的相关性,如

图3E和图10A所示。与TF基因相关的所有富集区域和上四分位数区域的百分比见图3E和图3F。转录因子位点(TF),特别是核心和辅助GIST TF组中的转录因子位点(Hemming et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.115(25):E5746-E5755(2018),Hemming et al.,Cancer Res.79(5):994-1009(2019))被包括在这些富集区中,正如来自DUSP和sprouty家族的KIT信号负调节因子和用作GIST生物标志物的基因(例如,GPR20、CD34(Corless et al., J.Clin.Oncol.22(18):3813-25(2004)))。ChIP-seq和CUT&Tag轨迹显示类似于H3K4me3, Menin-MLL复合体成员在这些富集基因的TSS和基因主体处结合,如在核心TF成员DUSP6和必需基因USP1处,如图3F-图3H和图10B所示;相比之下,H3K27ac和H3K9ac富集于增强子区域和基因主体处,并且GIST辅助TF HAND1仅与增强子结合。Menin-MLL复合体成员明显不在KIT位点富集,尽管有证据表明这些调节因子与TSS和基因主体下游的一个区域结合,见图10C。观察到Menin-MLL复合体成员在其他富集区域的TSS内和紧邻TSS的下游的最大结合,在这些高度调节基因的一些增强子处有可检测到的信号,见图10D-图10H。这些数据表明, Menin-MLL复合体在活性基因处普遍存在,在与GIST转录程序相关的基因子集中富集。

[0136] 实施例3:Menin抑制破坏GIST细胞增殖而无凋亡

[0137] 基于Menin-MLL复合体的遗传学数据和基因组共定位,推断靶向GIST连接复合体的小分子抑制剂将是一种可行的治疗方法。为了探索Menin-MLL破坏的功能结果,用Menin抑制剂VTP-50469(Krivtsov et al.,Cancer Cell 36:660-673(2019))单独或与选择性KAT6A抑制剂WM-1119(Baell et al.,Nature 560(7717):253-257(2018))联合处理GIST-T1细胞。在亚微摩尔浓度下,VTP-50469在随时间生长的测定中降低了GIST细胞增殖,如图4A-图4B所示,两种药物的组合观察到更大的效果(图4B)。这些抑制剂在KIT依赖性GIST细胞系中显示出选择性毒性,KIT非依赖性GIST48B细胞系在21天的药物处理后显示适度增殖或无增殖变化(图4C),与来自CRISPR实验的遗传学数据一致(图2I)。先前对KIT增强子的研究使用靶向KIT TSS的sgRNA来消融内源性KIT表达,同时通过表达携带相同激活突变的病毒启动子驱动KIT构建体来挽救细胞活力(Hemming et al.,Cancer Res.79(5):994-1009(2019))。这种KIT依赖性KIT拯救细胞系对单独的或与WM-1119联合的VTP-50469均同样敏感,如图4C所示,表明对内源性KIT位点的调节不是这些化合物毒性的主要机制。参考GIST48B在相同处理下的统计比较如图4C所示。为了确认这些抑制剂在其他GIST细胞系中的增殖作用,使用VTP-50469单独或联合WM-1119处理生长较慢的KIT突变细胞系GIST430(Hemming et al.,Cancer Res.79(5):994-1009(2019))和GIST882,观察到药物治疗产生的类似抗增殖作用,如图4D和图11A中所示。图11中的数据采用单因素方差分析和Dunnett多重比较检验进行分析;与DMSO对照相比,***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$ 。

[0138] 为了评估VTP-50469处理的细胞表型结果,利用VTP-50469和作为对照的TKI伊马替尼进行了细胞周期和凋亡测定。虽然伊马替尼在72小时内急性和强有力地导致G0/G1细胞周期停滞,但用VTP-50469处理8天导致G0/G1细胞比例适度增加,如图4E所示;VTP-50469与WM-1119的组合导致处理8天后细胞周期的更明显破坏(图4E)。虽然72小时的伊马替尼处理产生了早期和晚期凋亡和细胞死亡的显著增加,但8天的VTP-50469单独或联合WM-1119处理与DMSO对照相比并没有显著增加凋亡或细胞死亡,如图4F所示,其中每个条件下 $n = 3-5$ 。数据通过双因素或单因素方差分析分析,在适当的情况下,使用Tukey事后检验,与DMSO或所示条件比较;***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$ 。综上所述,这些数据表明, Menin-MLL复合体是

可靶向的,并且在GIST中呈现出独特的脆弱性,并且保持分布在活性基因TSS处的基因组,表明它在基因调控中起着重要作用,而不仅仅是调控KIT基因表达。该复合体的单独破坏或与MOZ复合体的共同破坏导致细胞周期的改变,但不会导致程序性细胞死亡。

[0139] 实施例4:Menin-MLL抑制引起整体基因表达的变化

[0140] 观察Menin-MLL复合体的全基因组占位情况,具有选定的富集区域,接下来探测了VTP-50469、WM-1119以及VTP-50469和WM-1119联合处理引起的基因表达的选择性变化,以进一步详述由其靶向破坏引起的生长抑制表型(图5A,显示了Person相关性)。与作为对照的DMSO处理相比,对用VTP-50469或WM-1119处理1天和5天的GIST-T1细胞进行RNA-seq。VTP-50469和WM-1119处理适度改变了许多基因的表达(FPKM>10, n=5,095),这些抑制剂之间的基因表达变化显著相关,VTP-50469和联合组与对照的偏差最大(图5A和图5I)。图5I显示了RNA-seq数据的无监督层次聚类,比较了使用0.5 μ mol/L的VTP-50469、1 μ mol/L的WM-1119或0.1 μ mol/L的每种药物的组合(每个条件n=4)处理GIST-T1 5天的所有表达基因(每个千个碱基的转录每百万映射读取的片段>10, n=7,106)。

[0141] 还评估了使用靶向两个复合体成员的sgRNA对MOZ和Menin-MLL复合体进行遗传破坏后的基因表达变化。利用该遗传系统,靶向MEN1的sgRNA导致基因表达的整体变化,对其他MOZ和Menin-MLL复合体成员的破坏显示出不太明显的变化(图5J),图5J显示了RNA-seq数据的无监督层次聚类,其比较了被转染靶向KAT6A、BRPF1、KMT2A、MEN1的sgRNA或荧光素酶(作为对照)(每个条件下n=3)、在第5天收集的GIST-T1/Cas9细胞。

[0142] 为了整合和比较由药理或遗传破坏引起的转录变化,评估了整个转录组基因表达与对照相比的变化的相关性。为了比较,还评估了sgRNA介导的GIST TF, HAND1和ETV1的破坏引起的转录变化。靶向MOZ复合体成员KAT6A和BRPF1的sgRNA显示出最高程度的相关性,且此外诱导了类似的整体转录变化,HAND1、ETV1或KMT2A的破坏也是如此(图5K-图5S)。MOZ和/或Menin-MLL复合体的药理学抑制与靶向GISTTF、MOZ复合体成员和KMT2A的sgRNA具有相对较弱的正相关性,而MEN1的遗传破坏显示与其他条件的相关性最小(图5K和图5N)。图5K显示了来自图5I和图5J的对照归一化RNA-seq数据的Pearson相关性,包括来自用靶向HAND1和ETV1的sgRNA转导的GIST-T1/Cas9细胞的对照归一化RNA-seq数据。这些数据表明,这些表观遗传调节因子的遗传或化学破坏产生的不同整体转录结果。

[0143] 使用基因集富集分析(GSEA),评估了富集MOZ和Menin-MLL复合体的基因、H3K27ac定义的超级增强子(SE)相关基因以及由TF HAND1和ETV1调节的基因的表达。在这些GIST相关基因列表中,受TF调控的基因受到的影响最为明显,药物或sgRNA处理导致HAND1上调的基因表达减少,而通常由HAND1或ETV1功能下调的基因表达增加(图5O),图5O显示了GSEA基因集的归一化富集分数(NES),包括显示Menin和BRPF1富集的基因(n=385)、由H3K27ac定义的GIST-T1 SE相关基因(n=366)、HAND1上调(n=421)或下调(n=165)的基因以及ETV1上调(n=438)或下调(n=31)的基因。

[0144] 只有具有显著FDR的基因集才会使用色标显示,而那些携带不显著FDR的基因集则用灰色表示。遗传或药理学MOZ破坏对Menin或BRPF1结合的基因影响最大(图5H),而仅靶向HAND1或WM-1119和VTP-50469的组合降低了SE相关基因的表达(图5Q)。然而,所有情况共有的是使用抑制剂或sgRNA表型复制直接敲除HAND1, HAND1相关基因的表达被中断,见MOZ和Menin-MLL复合体破坏的表达值(图5R-图5T)。

[0145] KIT基因表达受Menin的药理或遗传破坏的影响最明显,而DUSP6(KIT信号传导的负调节因子)和GIST生物标志物CD34共同缺失(图5U)。MOZ或Menin-MLL复合体的遗传或药理学破坏改变了几种核心GIST TF的表达,最显著的是FOXF1、HAND2和PITX1,其中WM-1119对TF表达的整体降低作用最大(图5V、图16A-图16B)。其他几个受HAND1表达高度调控的基因,包括NPR3、ITGA4和RASL11A,随着MOZ和Menin-MLL复合体的破坏也表现出类似的表达缺失(图5W)。通过qRT-PCR,在KIT依赖性GIST细胞系GIST430、GIST882和GIST48中观察到DUSP6和NPR3基因表达水平的降低程度相当(图16C-图16F)。

[0146] 在所有Reactome基因集中,与蛋白质翻译相关的过程是治疗条件下最常发生改变的基因集,大多数药物和sgRNA数据集显示基因表达减少(图16G-图16H)。综上所述,这些结果表明,对MOZ和Menin-MLL复合体的遗传和药理学手段的破坏均导致与GIST TF相关的转录程序的选择性改变,且最显著的是HAND1。此外,用小分子双重抑制Menin和MOZ诱导了对整体基因表达的补充(complementary)作用,并降低了GIST-SE相关基因的表达。

[0147] GSEA(Subramanian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15545-50(2005))用于探索与药物治疗相关的通路改变。VTP-50469治疗导致Hallmark基因集发生类似变化,与肌发生和上皮间质转化(EMT)相关的基因集显著上调;药物治疗还导致与细胞周期和有丝分裂信号相关的基因集的表达减少,如图5B和5C所示,图中显示了每种情况的MTORC1信号、G2M检查点、肌生成和EMT基因集。虽然药物治疗对整体平均基因表达的改变很小,但GIST相关基因集显示出显著变化。鉴定的GIST必需基因(见图1C和图12A)和伊马替尼处理6小时后下调的基因(Hemming et al., Cancer Res. 79(5):994-1009(2019))显示在VTP-50469处理后表达相应降低,作为对照,Hallmark EMT标志物显示上调,如图5D所示(所有表达基因n=5,093,必需基因n=1,507,伊马替尼处理6小时后下调>2.5倍的基因n=544,和Hallmark EMT基因n=63)。采用单因素方差分析和Dunnett多重比较检验分析数据,与DMSO相比;***, P<0.001;**, P<0.01;*, P<0.05。图12A显示了抑制剂处理5天后,前500个必需基因在抑制剂和DMSO处理之间的表达比率,并显示了Pearson相关性。具有不成比例的较高Menin负荷的基因(n=294)在抑制剂处理1天和5天后显示出较大的基因表达减少(与缺乏富集的基因相比,n=4,799),如图5E所示。在GIST中高表达的DUSP和sprouty家族成员中,DUSP6最显著地减少,而KIT表达仅显示出在VTP-50469第5天时才减少表达的趋势,如图12B-图12C所示。使用qRT-PCR,在由VTP-50469单独或与WM-1119联合处理的GIST-T1和GIST430中证实了选定的转录本DUSP6、NPR3和USP1的降低,如图5G-图5H所示,联合治疗对这些靶点的基因表达没有显著的叠加效应。对于图5G-图5H和图12B-图12C,每组n=3-4,且采用单因素方差分析和Dunnett多重比较检验分析数据,与DMSO相比;***, P<0.001;**, P<0.01;*, P<0.05。结合染色质研究,这些数据强调了与药理学Menin抑制(单独或与MOZ抑制联合)相关的基因表达的通路选择性变化,确定了与细胞周期、活力、营养KIT信号传递相关的基因变化,并可能通过激活间充质发育程序改变分化状态。

[0148] 实施例5:采用Menin抑制破坏染色质和转录调节蛋白的相互作用

[0149] 由于MOZ和Menin-MLL复合体与其他染色质调节因子一起在高度调控的基因组区域以协调方式发挥作用,因此在存在或不单独VTP-50469或与WM-1119联合使用的情况下评估对局部蛋白质相互作用的影响。利用BioID系统(Lambert et al., J. Proteomics 118:81-94(2015))将生物素连接酶BirA*附加到MOZ复合体成员MEAF6的N-末端,其使生物

素部分能够共价标记定位在10nm内的蛋白质。如果将BirA*标记的MEAF6整合到MOZ复合体中,为了确保适当整合,使用了CRISPR/Cas9和靶向MEAF6的sgRNA来破坏内源性MEAF6,否则,如果不能被稳定表达的MEAF6 BirA构建体在功能上取代,这将是致命的(图2E)。N-末端标记的MEAF6 BirA在GIST-T1中的稳定表达导致高水平的蛋白质产生,在蛋白质印迹上观察到N-末端降解产物的证据,包括MEAF6和HA,指示内源性和全长拯救构建体,或肌动蛋白作为上样对照(图6A)。将BirA*与IKZF1的DNA结合结构域融合的构建体(保留其核定位信号)用作核背景BioID对照。用生物素标记细胞24小时后,进行链霉亲和素下拉,然后进行质谱分析,鉴定出MEAF6-BirA标记并富集上述对照的243个蛋白(图6B,表4)。在图6B中,MEAF6富集的蛋白,用蓝色表示,与背景对照(n=243)相比,显示出大于2倍的强度富集。标记选定的相互作用物。标记的相互作用物包括染色质调节蛋白,如KMT2A/MLL1、KMT2B/MLL2、JADE3和RUVBL1,以及MOZ复合体成员、增强子相关蛋白如BRD4,和核心GIST TF HIC1。通过基因本体对这些MOZ近端蛋白进行排序,细胞过程包括DNA修复、mRNA加工和染色质复合体调控存在富集(图6C)。这些数据证明了这些转录调节蛋白的集成细胞功能及其在剪接因子、增强子和染色质复合体之间的复杂相互作用。

[0150] 表4

[0151]

参考	基因符号	参考	基因符号	参考	基因符号
sp Q9HAF1 EAF6_HUMAN	MEAF6	sp Q9UKV3 ACIN1_HUMAN	ACIN1	sp Q96Q89 KI20B_HUMAN	KIF20B
sp P46013 K167_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

[0152]

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	GATA2 D2B	sp Q93009 UBP7_HUMAN	USP7
sp P42167 LAP2B_HUMAN	TMPO	sp P09661 RU2A_HUMAN	SNRPA A1	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	GATA2 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	GTF2F 2	sp Q92576 PHF3_HUMAN	PHF3
sp Q14839 CHD4_HUMAN	CHD4	sp P18583 SON_HUMAN	SON	sp Q9UHB7 AFF4_HUMAN	AFF4
sp Q13428 TCOF_HUMAN	TCOF1	sp P15822 ZEP1_HUMAN	HIVEP1	sp Q8WTT2 NOC3L_HUMAN	NOC3L
sp P38432 COIL_HUMAN	COIL	sp Q9Y2W2 WBP1_HUMAN	WBP1 1	sp Q9Y4C8 RBM19_HUMAN	RBM19
sp Q9UMN6 KMT2B_HUMAN	KMT2B	sp Q15459 SF3A1_HUMAN	SF3A1	sp P49750 YLPM1_HUMAN	YLPM1
sp Q9UHR5 S30BP_HUMAN	SAP30 BP	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

[0153]

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	HNRPK	sp O60563 CCNT1_HUMAN	CCNT1	sp Q6IE81 JADE1_HUMAN	JADE1
sp Q9BTC0 DIDO1_HUMAN	DIDO1	sp P07737 PROF1_HUMAN	PFN1	sp Q6PJT7 ZC3HE_HUMAN	ZC3H14
sp Q8IX01 SUGP2_HUMAN	SUGP2	sp Q16630 CPSF6_HUMAN	CPSF6	sp Q8NI27 THOC2_HUMAN	THOC2
sp O43290 SNUT1_HUMAN	SART1	sp P49959 MRE11_HUMAN	MRE11	sp Q9Y2U8 MAN1_HUMAN	LEMD3
sp Q9H6Z4 RANB3_HUMAN	RANBP3	sp Q9UHX1 PUF60_HUMAN	PUF60	sp P21675 TAF1_HUMAN	TAF1
sp P09874 PARP1_HUMAN	PARP1	sp Q15637 SF01_HUMAN	SF1	sp Q9H267 VP33B_HUMAN	VPS33B
sp Q92613 JADE3_HUMAN	JADE3	sp Q99459 CDC5L_HUMAN	CDC5L	sp O75643 U520_HUMAN	SNRNP200
sp Q15020 SART3_HUMAN	SART3	sp Q13573 SNW1_HUMAN	SNW1	sp P22626 ROA2_HUMAN	HNRNP A2B1
sp Q96L91 EP400_HUMAN	EP400	sp Q9UK61 TASOR_HUMAN	FAM208A	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	RBM26	sp O75376 NCOR1_HUMAN	NCOR1
sp P46108 CRK_HUMAN	CRK	sp O43719 HTSF1_HUMAN	HTATSF1	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	CENPC
sp Q9Y2W1 TR150_HUMAN	THRAP3	sp O43143 DHX15_HUMAN	DHX15	sp Q9P013 CWC15_HUMAN	CWC15

[0154]

sp Q12873 CHD3_HUMAN	CHD3	sp Q92541 RTF1_HUMAN	RTF1	sp Q13330 MTA1_HUMAN	MTA1
sp O75533 SF3B1_HUMAN	SF3B1	sp Q14966 ZN638_HUMAN	ZNF638	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 ARID5B_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 PPP1R0_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

[0155]

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 P4R3A_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 CAT1N_HUMAN	CACTIN	sp Q14687 GSE1_HUMAN	GSE1
sp Q96KK5 H2A1H_HUMAN	HIST1H2AH	sp Q5JTH9 RRP12_HUMAN	RRP12	sp Q03111 ENL_HUMAN	MLLT1

[0156]	sp Q01780 EXOSX_HUMAN	EXOSC10	sp Q8IWX8 CHERP_HUMAN	CHERP	sp Q92620 PRP16_HUMAN	DHX38
	sp Q96EV2 RBM33_HUMAN	RBM33	sp Q15059 BRD3_HUMAN	BRD3	sp P51587 BRCA2_HUMAN	BRCA2
	sp Q7LBC6 KDM3B_HUMAN	KDM3B	sp O00148 DX39A_HUMAN	DDX39A	sp P05455 LA_HUMAN	SSB
	sp Q96ST3 SIN3A_HUMAN	SIN3A	sp P49790 NUP153_HUMAN	NUP153	sp Q6P2Q9 PRP8_HUMAN	PRPF8
	sp O43395 PRPF3_HUMAN	PRPF3	sp P46087 NOP2_HUMAN	NOP2	sp P26599 PTBP1_HUMAN	PTBP1
	sp Q5VT52 RPRD2_HUMAN	RPRD2	sp Q14690 RRP5_HUMAN	PDCD11	sp P12956 XRCC6_HUMAN	XRCC6

[0157] 为了评估MEAF6近端蛋白质组因Menin抑制(单独或与MOZ抑制联合)而引起的变化,将表达MEAF6-BirA的GIST-T1细胞单独使用VTP-50469或与WM-1119联合预处理3天,然后用生物素标记并随后使用质谱法进行无标记定量。虽然大多数MEAF6近端蛋白保持不变,但一部分蛋白经药物治疗表现出显著的丰度变化,且与采用VTP-50469和WM-1119观察到的变化显著相关(图6D)。单独使用VTP-50469处理时,MLL家族成员KMT2A/MLL1、KMT2B/MLL2和DNA和RNA结合抗凋亡蛋白GPATCH4(Lambert et al., J. Proteomics 118:81-94(2015))的相互作用降低,而VTP-50469和WM-1119联合处理无附加影响(图6F)。VTP-50469单独或与WM-1119联合使用时,选定的染色质调节因子、剪接因子和聚合酶调控蛋白的接近性以类似的方式发生改变,最明显的是在所有处理条件下DOT1L显著降低(图6G)。

[0158] 为了确定Menin抑制如何改变DOT1L的染色质结合,对单独或联合使用VTP-50469处理的GIST-T1细胞进行加标归一化的ChIP-seq,所述处理显著减少了所有DOT1L结合位点的DOT1L与染色质的结合,伴全基因组平均DOT1L信号减少,如图6G-图6I和图13G-图13I。图6G是热图,显示在使用DMSO、VTP-50469处理3天的GIST-T1细胞在MACS定义的峰(n=67,769)处DOT1L的加标归一化信号。来自峰中心±1.25kb的缩放读取密度以行显示。图6I-图6J具有n为67,769的DOT1L信号和n为22,581的MEAF6信号。***, P<0.001; **, P<0.01; *, P<0.05。

[0159] 与其他Menin-MLL复合体成员一样,DOT1L、H3K79me2、DOT1L沉积的组蛋白标志物和MEAF6均在活性基因的TSS和基因主体处显示出全基因组富集,其富集在与GIST生物学相关的基因座,并且在用VTP-50469处理后DOT1L信号降低,如图6K和图13B-图13E所示。图13D显示了通过ChIP-seq证明DOT1L和H3K79me2在GIST-T1中的基因组定位的热图。各排中显示了来自TSS、H3K27ac定义的超级增强子或ATAC定义的峰±10kb的缩放读取密度。图13E包括轨迹图,其显示了在所示处理下加标归一化的DOT1L、H3K79me2和H3K27ac在GPR20位点的基因组占位区域。DOT1L TE比SE。SE=1343,TE=45256。Welch's T检验P<0.001,但绝对差值约1%。为了进一步探讨DOT1L功能的丧失是否能构成Menin抑制的细胞毒性下游的机制,以GIST-T1细胞或GIST48B作为对照,在随时间生长测定中使用不同剂量的选择性DOT1L抑制剂EPZ-5676(Daigle et al., Cancer Cell 20:53-65(2011))对其进行处理。在所有测试剂量下,与DMSO对照或GIST48B相比,GIST-T1显示显著降低的细胞增殖(每个条件下5个),表

明DOT1L抑制的选择性毒性类似于Menin抑制,如图6L所示。

[0160] DOT1L靶向性sgRNA导致GIST-T1细胞增殖显著减少,但比使用靶向Menin-MLL和MOZ复合体的sgRNA观察到的增殖降低幅度小,这与基因组规模CRISPR筛选的结果一致(图2A和图13I)。为了更好地表征DOT1L抑制在GIST中的转录结果,用EPZ-5676处理GIST-T1细胞5天,然后进行RNA-seq。整体上,与EPZ-5676处理相关的转录变化与VTP-50469抑制Menin引起的转录变化高度相关(图6M-图6N),这是以前在MLL重排白血病中观察到的现象。与Menin-MLL和MOZ抑制一样,DOT1L抑制导致HAND1调节的转录程序的显著破坏(图6O),伴KIT、CD34、NPR3和GIST TF的表达变化(图6P-图6Q)。总之,这些数据证明了这些表观遗传复合体之间邻近蛋白质相互作用的复杂性,多个转录调节因子的蛋白质和染色质结合因MOZ或Menin抑制而改变,且DOT1L功能是KIT依赖性GIST中的依赖性,DOT1L染色质结合的丧失是MOZ或Menin抑制的下游结果。以上,通过双因素方差分析和Tukey的事后检验对随时间生长的实验进行分析,并与GIST48B进行比较;***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$ 。总之,这些数据证明了这些表观遗传复合体之间邻近蛋白质相互作用的复杂性,多个转录调节因子的蛋白质和染色质结合因Menin抑制而改变,且DOT1L功能是KIT依赖性GIST中的依赖性,DOT1L染色质结合的丧失是Menin抑制的下游结果。

[0161] 实施例6:Menin抑制单独或与TKI联合的体内治疗效果。

[0162] 为了评估KAT6A、Menin或DOT1L的遗传缺失对体内肿瘤生长的影响,在共表达Cas9的GIST-T1细胞中制备了分别表达针对KAT6A (sgKAT6A)、Menin (sgMEN1) 或DOT1L的sgRNA或荧光素酶对照 (sgLuc) 的细胞。在植入等量的修饰细胞后,监测小鼠的肿瘤形成和生长。尽管所有植入物产生了肿瘤,但与sgLuc对照相比,来自sgKAT6A或sgMEN1处理的细胞的肿瘤生长显著降低,而sgDOT1L的表达导致的生长降低趋势不显著(图14D)。虽然生长限制比类似的体外实验更温和(图2H和图13I),但sgKAT6A和sgMEN1条件需要在体外选择和繁殖2周,以产生足够的细胞用于植入,可能选择有害基因改变较少的细胞。

[0163] 多种Menin抑制剂已进入用于治疗白血病的早期临床试验,包括美国国家临床试验(NCT) 编号NCT04067336(化合物K0539的研究)、NCT04811560(化合物JNJ-75276617的研究)和NCT04065399(化合物SNDX-5613的研究)。K0539也称为Unii-4mod1F4enc和ziftomenib。

[0164] 为了评估Menin抑制单独或与WM-1119或伊马替尼联合在体内的影响,将GIST-T1细胞移植入小鼠并用伊马替尼($n=5$)、VTP-50469(在食物中连续给药; $n=4$)、WM-1119(每天给药3次,每周7天, $n=6$)、VTP-50469和WM-1119的联合($n=6$)、伊马替尼和VTP-50469的联合($n=5$)或媒介物对照($n=5$)治疗。在28天的治疗期结束时,单药治疗组与媒介物相比,显示出相似的肿瘤生长显著减少,而联合组显示出肿瘤生长完全停止。在没有进一步药物治疗的情况下,继续肿瘤恢复监测,虽然伊马替尼和VTP-50469单药治疗组的肿瘤恢复了类似于媒介物组的肿瘤生长轨迹,但伊马替尼和VTP-50469联合使肿瘤恢复的斜率降低了3-4倍,如图7A所示。相对于基线的肿瘤体积详见表5(媒介物对照)、表6(VTP-50469)和表7(WM-1119)、表8(VTP-50469和WM-1119联合)。在持续监测肿瘤恢复而没有进一步药物治疗期间,所有条件显示出与媒介物对照相似的肿瘤生长率。VTP-50469和WM-1119的联合治疗与伊马替尼和VTP-50469治疗具有相似的肿瘤生长轨迹,如图7D所示。小鼠耐受WM-1119、VTP-50469、伊马替尼及其联合的治疗,没有明显毒性或体重减轻的迹象(图14E-图14F)。

[0165] 表5:媒介物对照相对于基线的肿瘤体积

治疗天数	动物				
	1	2	3	4	5
1	100	100	100	100	100
5	167	184	239	171	243
8	177	325	426	193	335
12	213	389	502	225	379
14	259	405	546	253	510
19	265	430	683	255	664
22	317	438	713	487	689
27	368	455	948	593	759
29	384	522	967	578	876

[0167] 表6:VTP-50469相对于基线的肿瘤体积

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

[0169] *由于肿瘤快速生长而提前终止的小鼠

[0170] 表7:WM-1119相对于基线的肿瘤体积

[0171]

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

[0172] 表8:VTP-50469和WM-1119组合相对于基线的肿瘤体积

[0173]

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

[0174] 在伊马替尼和/或VTP-50469治疗5天和10天后对GIST-T1异种移植植物进行RNA-seq,以评估Menin和/或KIT抑制引起的体内GIST转录程序的变化。虽然与媒介物对照相比,所有治疗条件导致了整体转录水平的变化,但在两个时间点,VTP-50469治疗以及伊马替尼与VTP-50469联合治疗后均观察到更大的变化,其中伊马替尼治疗的基因表达谱与媒介物治疗的肿瘤更密切相关(图7E)。图7E显示了所有表达基因的组平均每千个碱基的转录每百万映射读取的片段(FPKM)的Pearson相关性($FPKM > 10, n = 7,434$)。伊马替尼、VTP-50469和联合治疗均导致受HAND1调控的基因的表达降低(图14G)。尽管VTP-50469治疗优先降低了包括KIT、CD34和NPR3在内的GIST相关转录本,但伊马替尼治疗优先降低了包括TMEM100和SPRY2在内的其他KIT信号依赖转录本。与联合治疗对肿瘤生长的更大影响一致,PCNA,一种细胞增殖标志物,仅在联合使用伊马替尼和VTP-50469的第5天和第10的时间点才降低(图7F)。

[0175] 接下来,评估伊马替尼和VTP-50469治疗对PG27的影响,PG27是GIST的KIT突变患者衍生异种移植(PDX)模型(Hemming et al., *Cancer Res.* 79(5):994-1009(2019))。与GIST-T1细胞系异种移植相比,低于最大耐受剂量的伊马替尼施用有显著但适中的生长抑制作用,单独VTP-50469(n=5)或与伊马替尼联合治疗(n=5)导致肿瘤生长显著降低,如图7B所示。数据采用双因素方差分析,与媒介物相比;***, $P < 0.001$;与伊马替尼相比;#, $P < 0.01$ 。而在GIST-T1异种移植实验中,用加在食物中的VTP-50469治疗的小鼠(n=5)没有显示体重下降,在相同浓度下使用不同批次的VTP-50469治疗的PG27小鼠显示出适度的体重下降(见图14A-图14B,通过双因素方差分析的数据,与媒介物相比;*, $P < 0.05$)。在治疗期结束时,收获PG27肿瘤、固定并切片以评估肿瘤组织学。媒介物和伊马替尼治疗的肿瘤具有单形性肿瘤细胞片,而用VTP-50469或药物联合治疗的异种移植则表现出肿瘤坏死区域,如图7C所示。图7C中的代表性图像显示来自4倍放大(上图,比例尺=250 μm)和40倍放大(下图,比例尺=25 μm)的治疗组。尽管用VTP-50469治疗限制了肿瘤生长,但肿瘤的存活区域在不同条件下显示出相似水平的Ki-67和裂解的胱天蛋白酶-3(见图14C,其中在治疗期结束时收获PG27肿瘤,并对固定组织进行切片和评估Ki-67(上排)和裂解的胱天蛋白酶-3(下排);比例尺=25 μm)。而在GIST-T1异种移植实验中,使用食物中VTP-50469治疗的小鼠没有显示体重下降,而使用相同浓度下VTP-50469治疗的PG27移植小鼠显示出适度的体重下降(图14B),这可能与观察到的肿瘤坏死的全身效应有关。尽管用VTP-50469治疗限制了肿瘤生长,但肿瘤的存活区域在不同条件下显示出相似水平的Ki-67和裂解的胱天蛋白酶-3(图14B)。这些数据证明了VTP-50469单独或与伊马替尼联合的治疗活性,Menin抑制减少GIST异种移植物的生长,产生肿瘤坏死,并且当与伊马替尼联合时,在停止治疗后产生持久的抗肿瘤反应。

[0176] 这些实施方案表明,染色质的组织和重塑对于细胞谱系、鉴别和功能至关重要。组蛋白的翻译后修饰作为表观遗传调控的纽带,其控制TF和染色质调节因子的结合,最终管理基因表达和染色体结构。染色质修饰是动态的和可逆的,它们需要细胞类型和状态特异性染色质修饰酶的主动维护。癌症利用或占位其前体细胞的染色质状态来维持恶性表型,通过维持允许癌基因激活的环境或通过维持染色质调节因子(如MLL基因融合)的获得性功能改变(Krivtsov et al., *Nat. Rev. Cancer* 7:823-33(2007))。在这里,本公开表明,特定的染色质调节因子对于维持GIST表观基因组至关重要,Menin-MLL复合体与全基因组活性表达基因结合,调节GIST相关基因表达程序,协调基因表达的多个调节因子之间的蛋白质-蛋白质相互作用,并最终调节细胞增殖和肿瘤生长。

[0177] Menin由MEN1基因编码,一般被描述为肿瘤抑制因子,MEN1的突变促进内分泌肿瘤的形成。然而,Menin蛋白在其他组织中具有多种功能,其源于该蛋白质正向或负向调节基因表达、与不同的染色质复合体结合、整合上游信号通路的输入以及调节DNA复制和修复(Matkar et al., *Trends Biochem. Sci.* 38(8):394-402(2013))。在MLL重排白血病的背景下,Menin作为一种致癌依赖性得到最好的研究,它与MLL融合蛋白结合,并与DOT1L的募集一起执行致白血病基因表达程序(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))。在GIST中,Menin-MLL复合体成员对整体染色质调控以及最终肿瘤细胞增殖至关重要。与Project DRIVE和DepMap中描述的数百种其他细胞类型相比,GIST对Menin-MLL复

合体成员的靶向破坏具有出色的灵敏度。与KIT依赖性GIST中TF以及转录和染色质图谱的保守性一致(Hemming et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115:E5746-55 (2018), Dafflon et al., Leukemia 31:1269-77 (2017)), 在KIT非依赖性GIST细胞系中, 其失去对Menin-MLL复合体的遗传或药理学破坏的敏感性。这些数据表明, 与在MLL重排白血病中观察到的致癌劫持不同, GIST依赖于Menin-MLL复合体的天然功能及与其相关联的依赖性来维持染色质图谱, 这为恶性基因表达程序提供了基础。

[0178] 多条证据表明, Menin-MLL、MOZ和其他复合体在转录调控中存在协作作用。在这里, 本公开显示了Menin-MLL和MOZ复合体成员在活性表达基因的TSS处的全基因组共定位, 抑制这两种复合体中的任一者引起基因表达、近端蛋白质相互作用、DOT1L和其他转录相关蛋白的协调调节类似变化, 并且抑制Menin-MLL复合体联合MOZ复合体抑制对细胞周期和细胞增殖的影响更为显著。与本文所公开的研究结果一致, MOZ和MLL复合体之间的相互作用促进基因表达先前已在造血祖细胞的HOXA基因座上描述过(Paggetti et al., Oncogene 29:5019-31 (2010))。利用DepMap数据, 本公开强调了这些染色质调节复合体在少数癌细胞系中的先前未被充分认识和补充性的遗传相关性。在GIST中也观察到对PRC2复合体的依赖性, 在DepMap数据中观察到类似的相关性, 这表明PRC2在染色质沉默中的鲜明但补充性的作用平衡了Menin-MLL复合体的激活功能。

[0179] 这些数据还表明, Menin-MLL和PRC2复合体在全基因组协同作用以控制染色质状态和转录输出。尽管本公开强调了VTP-50469单独使用或与WM-1119联合使用同时抑制Menin-MLL和MOZ复合体对细胞周期和细胞增殖测定的优越活性, 但选定GIST相关基因的表达和蛋白质-蛋白质相互作用的破坏在单一疗法和联合治疗之间基本相似。虽然组合毒性的机制需要进一步调查, 但这些结果表明, 一种复合体的破坏可能会最大限度地解除二者对特定靶位点的调控, 并且Menin-MLL和MOZ复合体可能存在非重叠功能。

[0180] 在保持与全基因组活性基因TSS缔合时, Menin-MLL复合体的破坏导致转录的广泛改变, 这些改变在特定途径中是适度的并且被富集。携带这些染色质复合体的最大富集的基因经Menin抑制基因表达显著降低。本公开还显示, GIST必需基因的转录以及受伊马替尼治疗而被下调的基因的转录不成比例地减少, 这表明Menin-MLL复合体在支持KIT信号的下游转录方面发挥着基础作用。使用GSEA, 由Menin抑制引起的转录变化与指示细胞周期和有丝分裂信号减少以及发育和EMT程序激活的基因集显著相关。先前的研究已经观察到, 在侵袭性较低的GIST中, 或在致癌性TF HAND1破坏后, EMT签名上调(Hemming et al., Clin. Cancer Res. 27:1706-19 (2021)), 表明转录通路与TF破坏或药物染色质调节因子抑制交汇。与Menin-MLL破坏导致基因表达适度变化一致, 在药物治疗几天后才能观察到对增殖和细胞周期的影响, 这与伊马替尼的急性毒性作用相反。

[0181] Menin抑制的下游后果包括破坏本文所公开的多个转录调节因子之间的邻近相互作用, 包括DOT1L自染色质中丢失。DOT1L将H3K79甲基化以支持活性转录状态, 并已在白血病中进行了研究, 其中MLL融合蛋白对DOT1L的募集对白血病发生至关重要(Okada et al., Cell. 121:167-78 (2005))。在实体瘤中, 已发现DOT1L与致癌转录因子协同作用(Wong et al., Cancer Research 77:2522-33 (2017), Vatapalli et al., Nat. Commun. 11(1):4153 (2020)), 但迄今尚未在实体瘤的临床试验中对DOT1L抑制剂进行评估。先前的研究证明了GIST的TF依赖性, 且目前的工作表明GIST细胞易受DOT1L遗传和药物破坏的影响, DOT1L可

能作为TF和Menin-MLL复合体活性的下游整合因子(integrator),在建立选定的癌症相关基因的转录活性状态中发挥作用。

[0182] 综上所述,这些数据证明了Menin-MLL复合体在GIST中的基本功能,它是染色质调控和致癌基因表达程序的组成部分。

[0183] 已经开发出多种破坏Menin和MLL之间联系的Menin抑制剂(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)),且目前正在进行白血病的临床研究。为了评估Menin抑制对GIST异种移植模型的体内影响,本公开描述了用TKI、Menin抑制或联合治疗对细胞系和患者来源的异种移植的治疗,其证明了抑制Menin作为单一疗法的活性,并且与TKI和Menin抑制联合的活性更强。治疗期过后,两个单药治疗组的肿瘤恢复其生长轨迹,而用Menin抑制和TKI联合治疗的肿瘤在停药数周后观察到持续延长的肿瘤抑制作用。在上述公开内容中,GIST的PDX模型显示了Menin抑制的有效抗肿瘤活性,组织学显示坏死区域散布在存活的肿瘤中。这些结果支持用于GIST患者的Menin抑制剂的临床开发,无论是单独使用还是在理想情况下与TKI联合使用。

[0184] 由于TKI是GIST的唯一有效治疗策略,其对细胞毒性化疗具有天然耐药性(Maki et al.,Oncologist 20(7):823-30(2015)),靶向Menin和GIST表观基因组的其他重要成分可能证明治疗优势。在GIST肿瘤和细胞系中观察到保守转录和增强子图谱,以及致癌KIT基因表达受疾病特异性TF和增强子元件的调控,预示着这种疾病对疾病调节的表观遗传机制的依赖性。如本文所述,负责维持GIST表观基因组的协作染色质调节因子,以及它们如何在多个不同节点上被小分子抑制剂(例如,VTP-50469、EPZ-5676)破坏显示出有前途的和选择性的抗癌活性;这些抑制剂类别中的每一个的成员已进入临床试验(例如,NCT04606446、NCT02141828)。与携带染色质调节因子致癌改变的白血病相比,GIST由于对这些途径的依赖性和对其破坏的易感性可能是实体瘤中的一个异类。

[0185] 所有专利出版物和非专利出版物表明了本公开所属领域技术人员的技术水平。所有这些出版物(包括所引用的任何特定部分)在此通过引用并入,其程度与每个单独的出版物被具体和单独指示为通过引用并入相同。

[0186] 虽然已经参照特定实施方案描述了本公开,但是应理解,这些实施方案仅仅是本公开的原理和应用的说明。因此,应当理解,在不脱离由所附权利要求限定的本公开的精神和范围情况下,可以对这些示例性实施方案进行多次修改,并且可以设计其他安排。

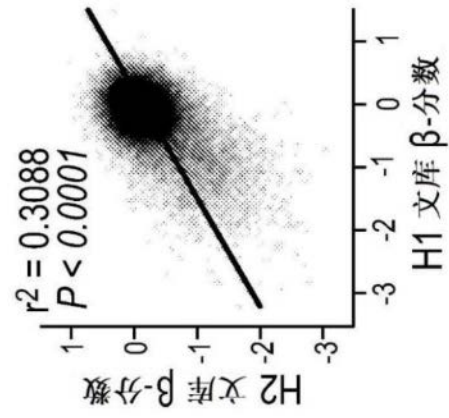


图1A

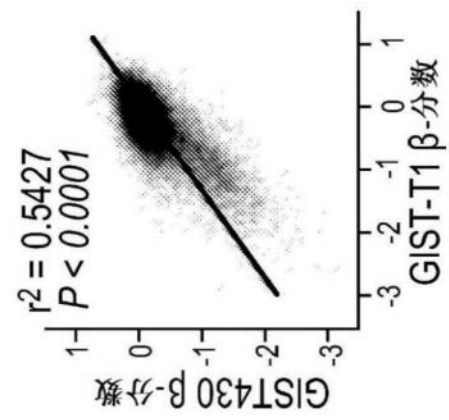


图1B

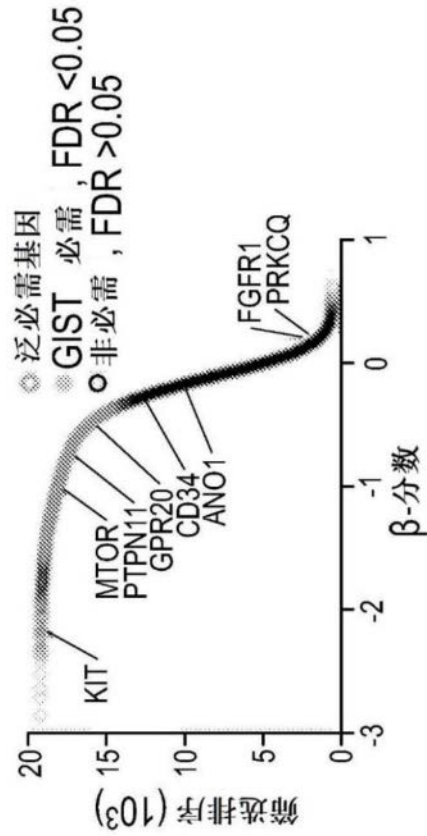


图1C

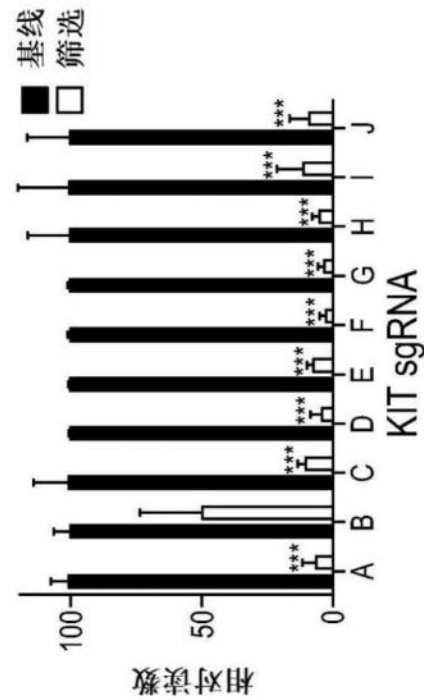


图1D

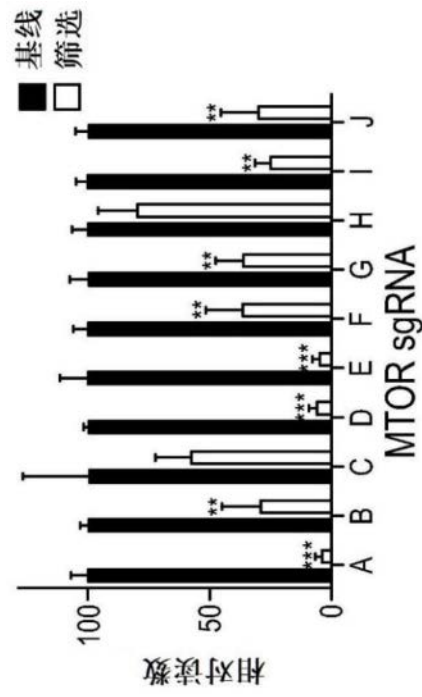


图1E

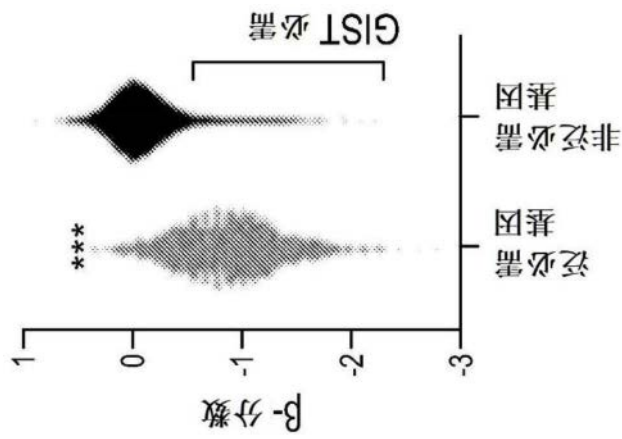


图1F

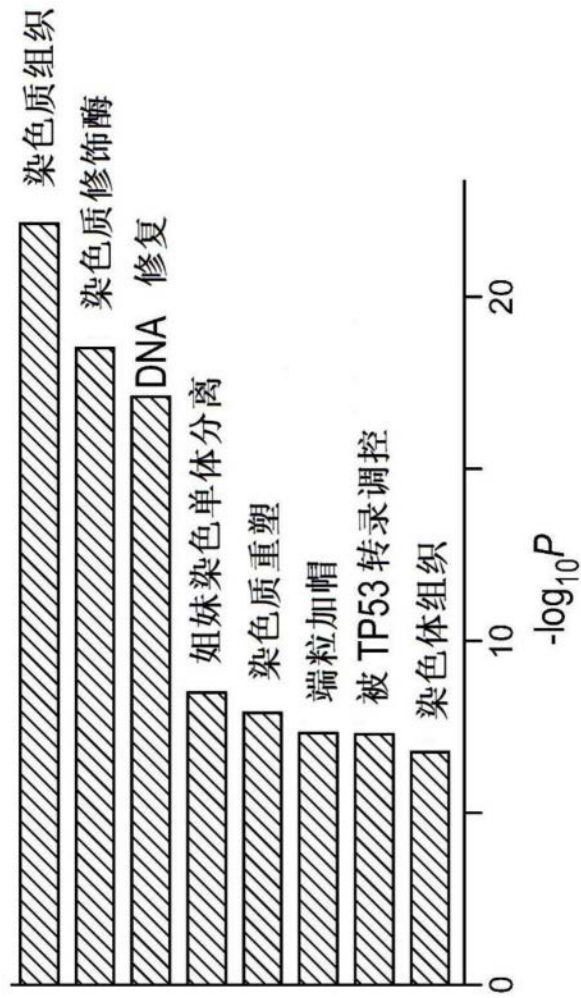


图1G

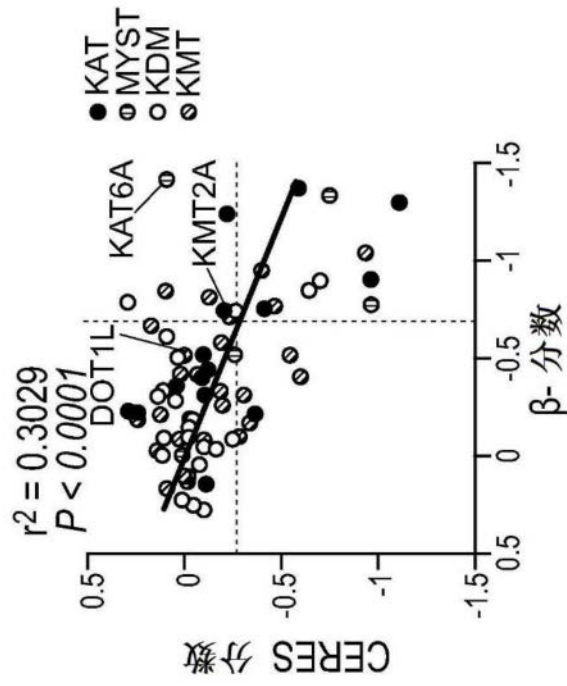


图2A

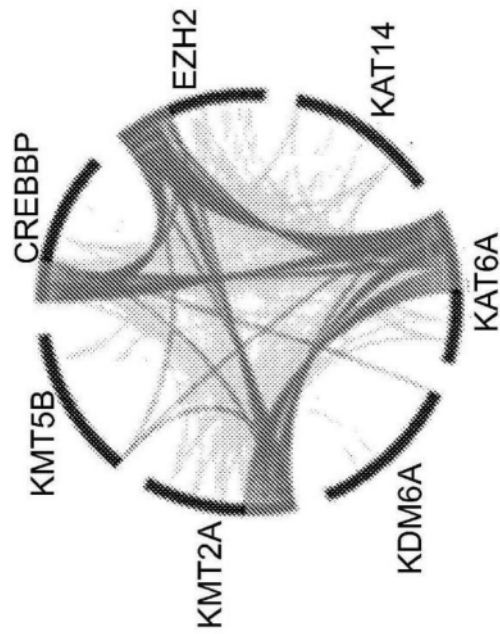


图2B

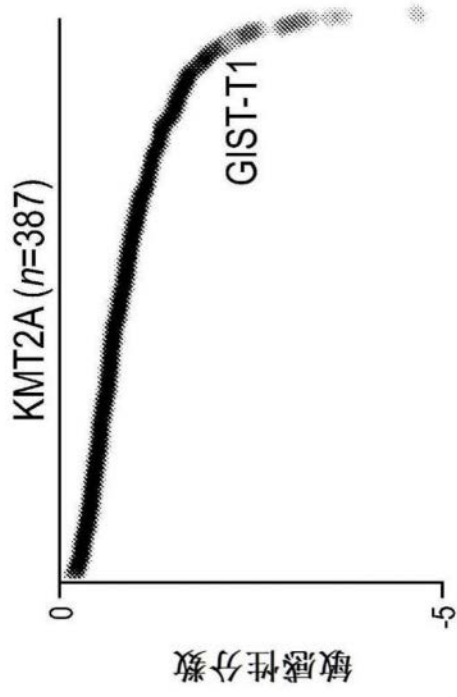


图2C

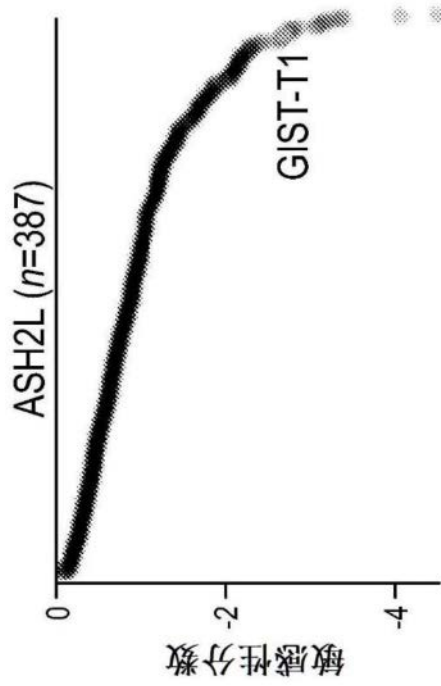


图2D

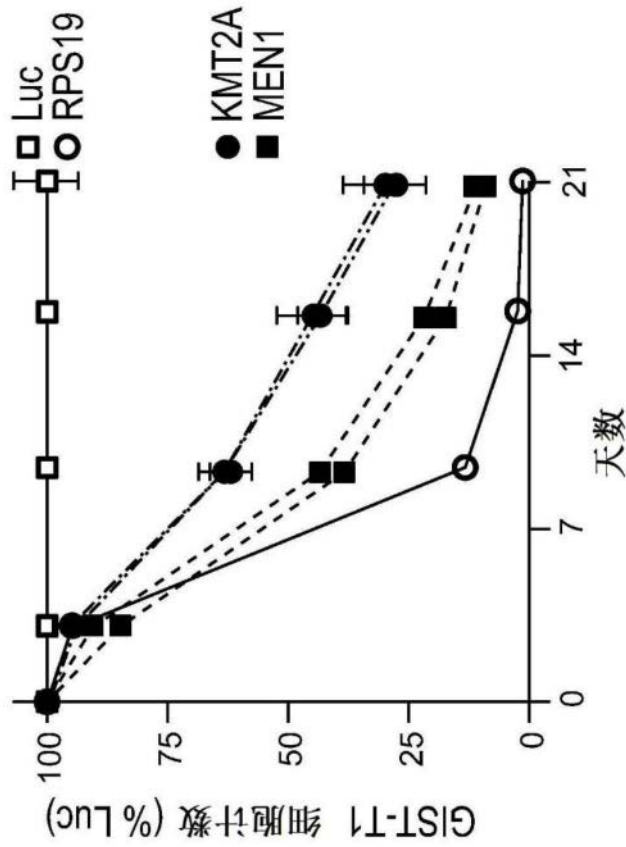


图2E

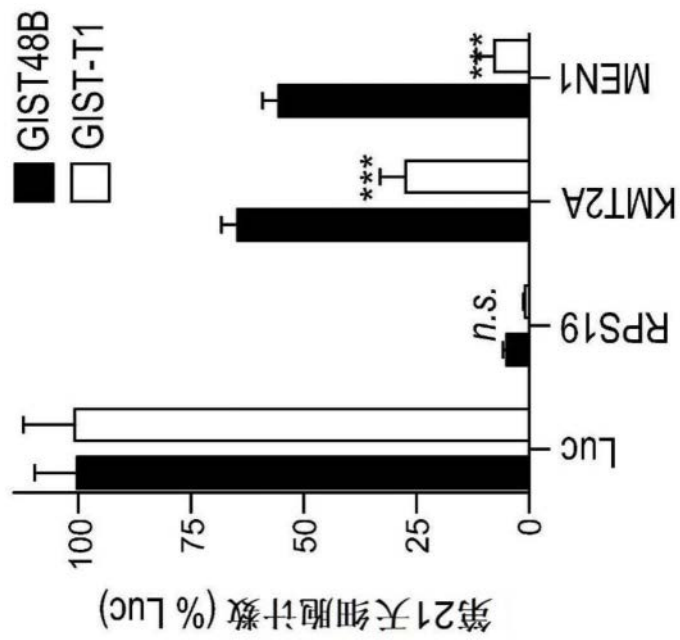


图2F

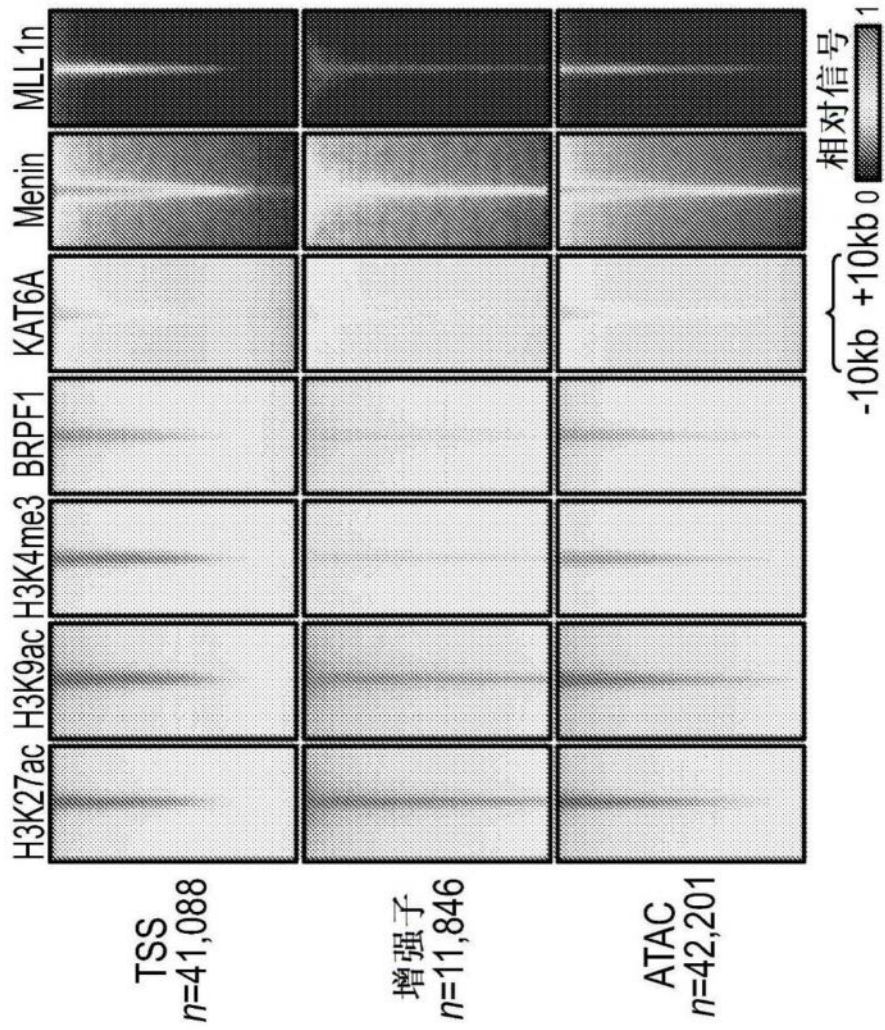


图3A

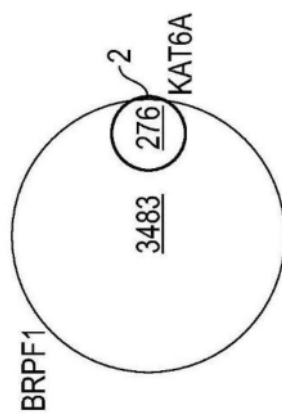


图3B

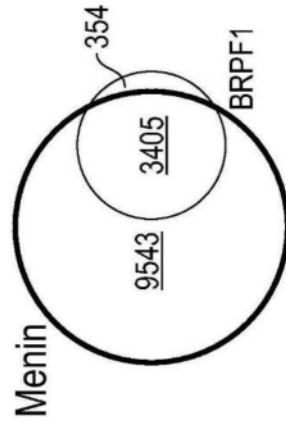


图3C

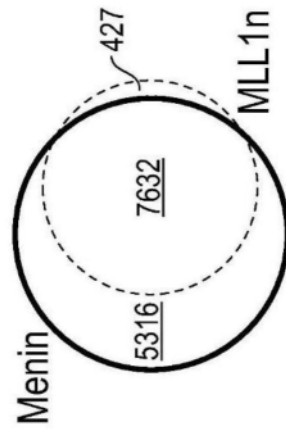


图3D

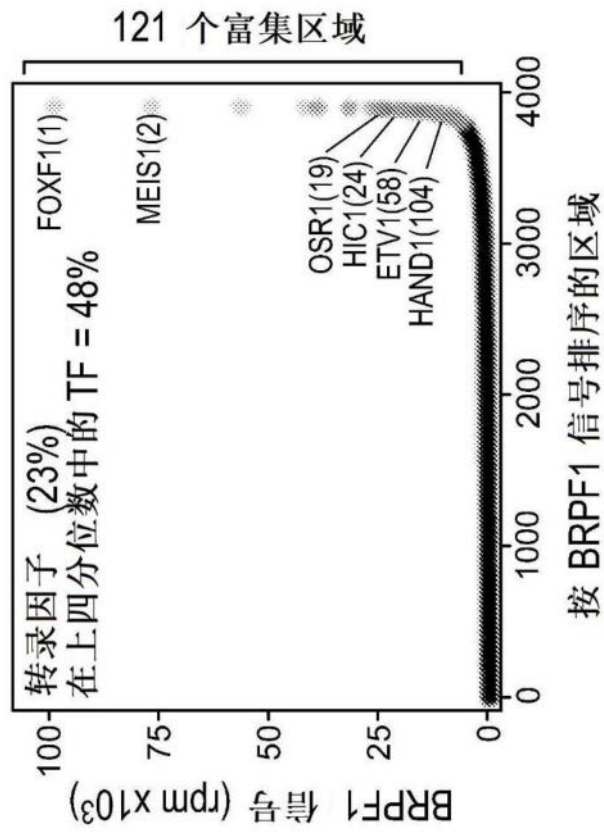


图3E

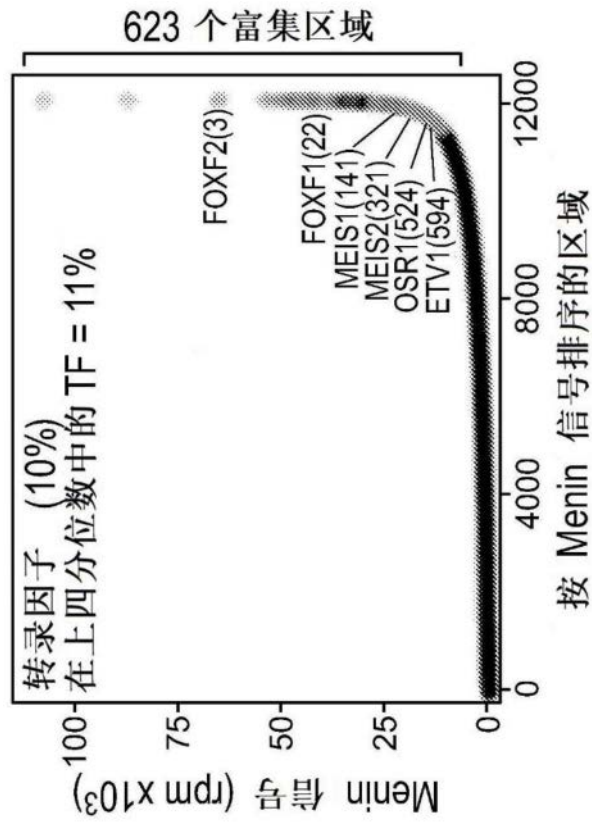


图3F

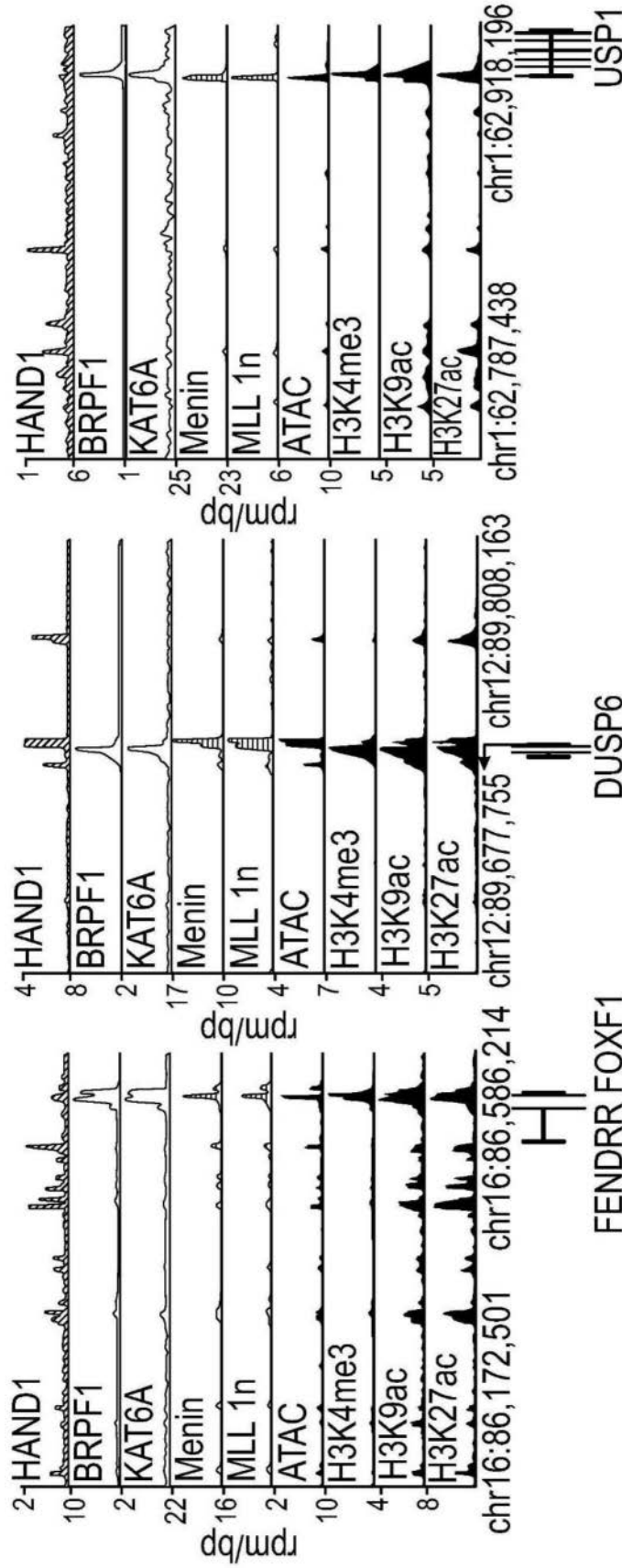


图3G

图3H

图3I

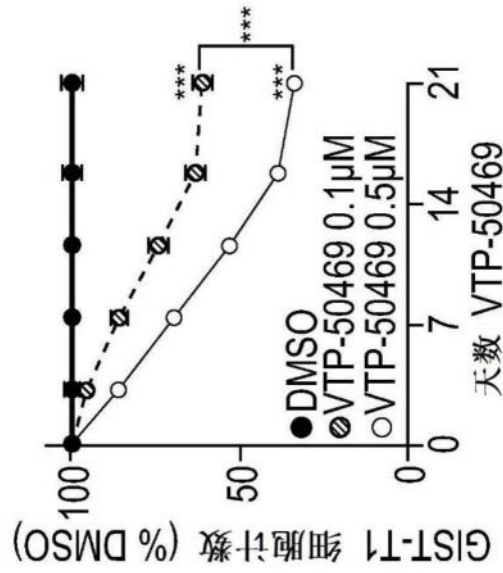


图4A

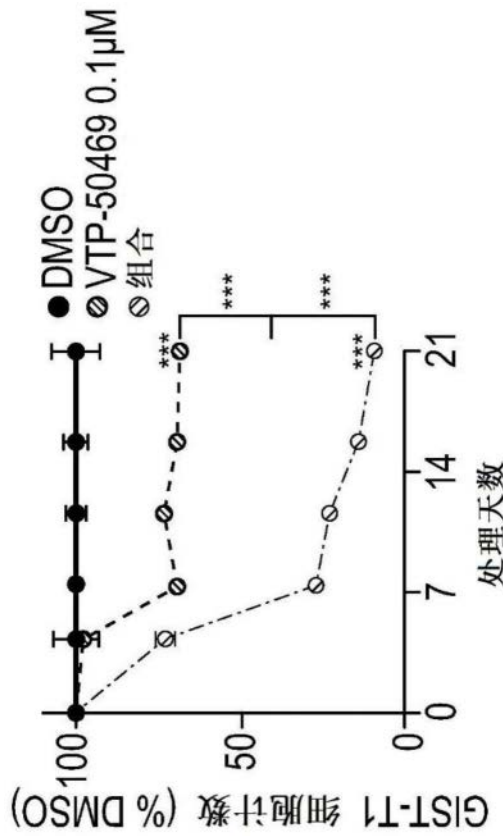


图4B

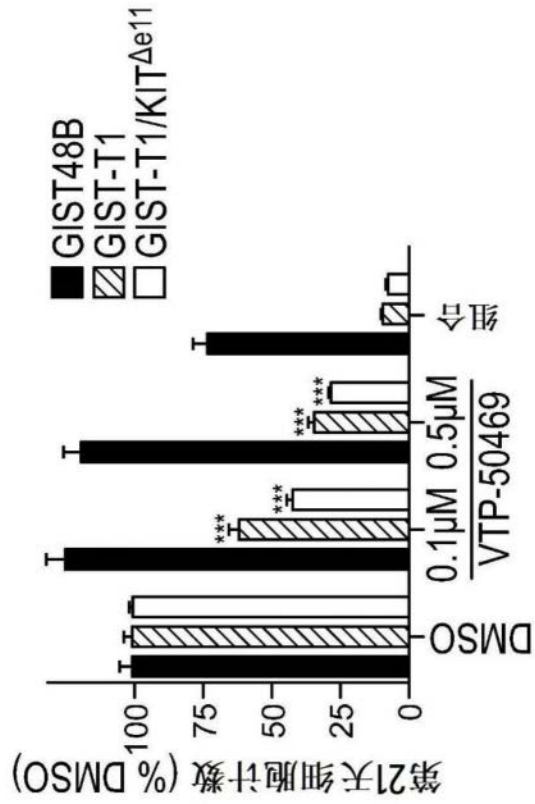


图4C

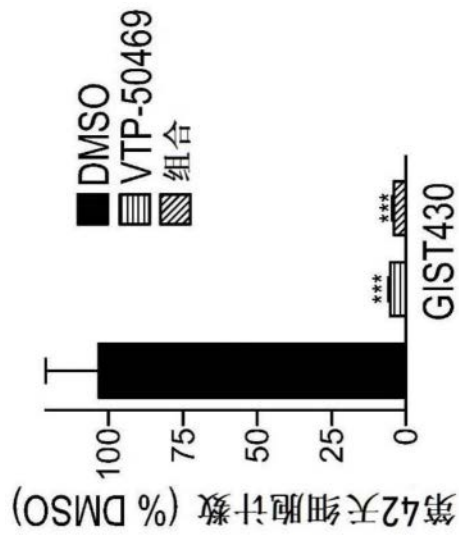


图4D

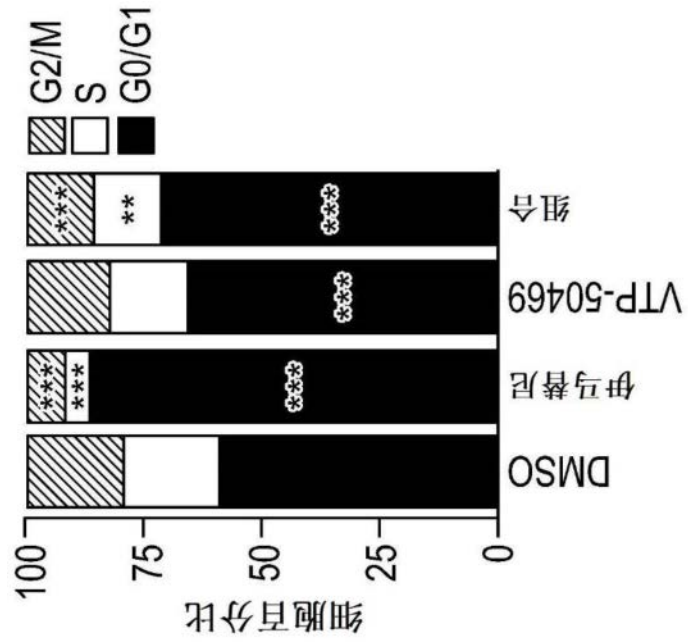


图4E

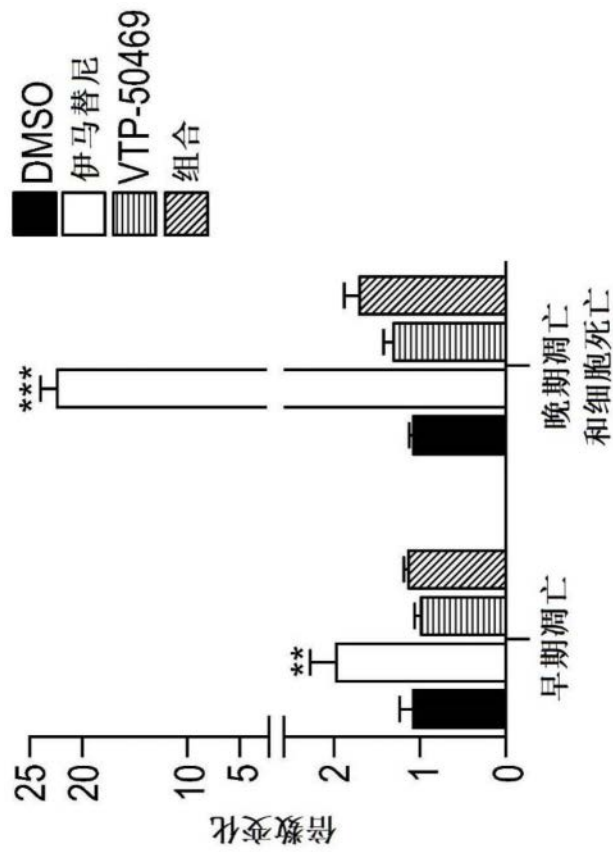


图4F

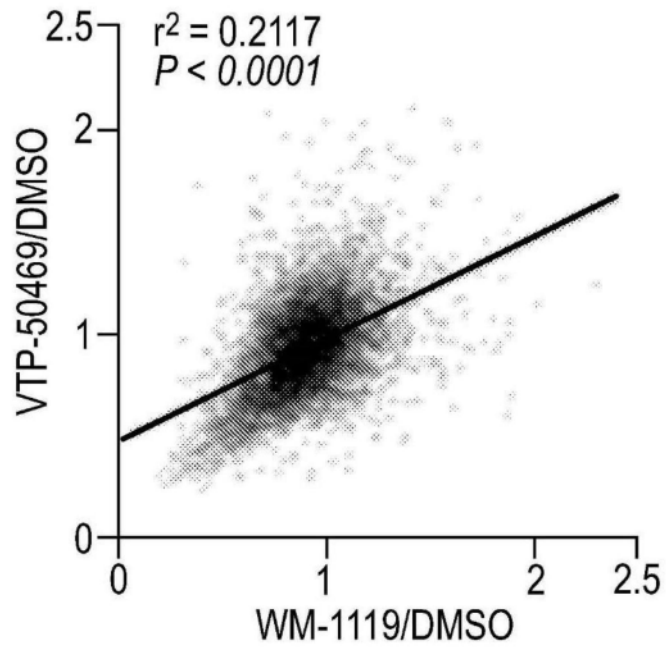


图5A

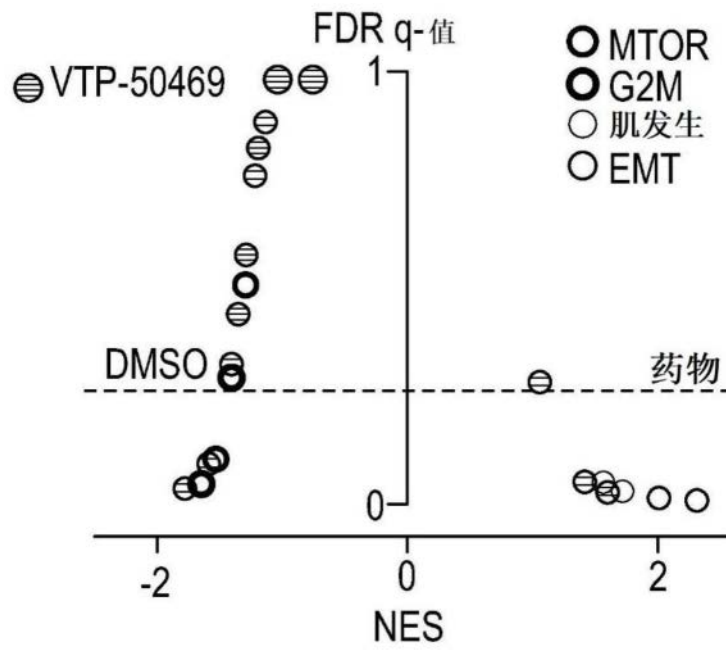


图5B

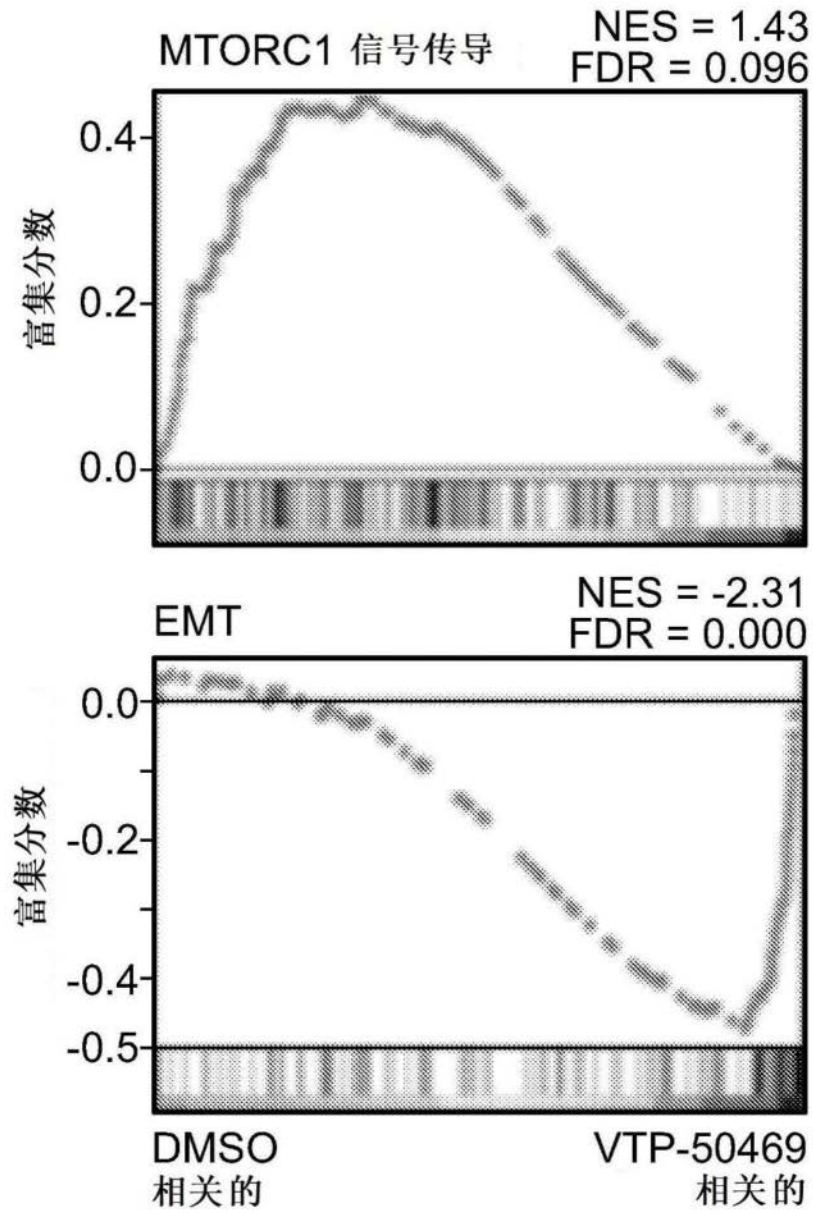


图5C

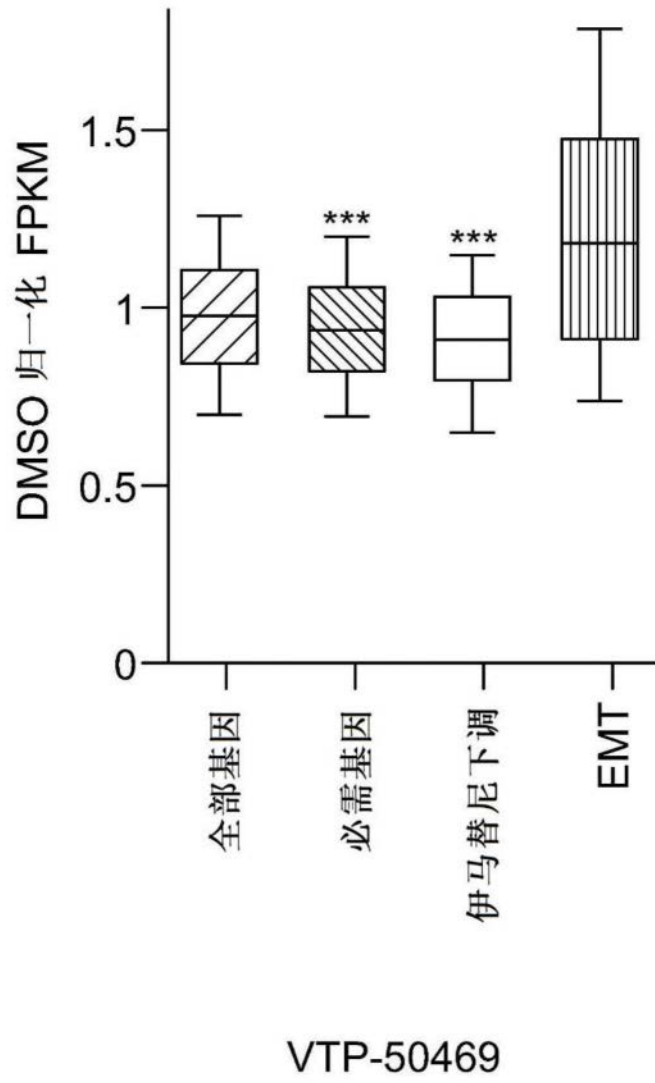


图5D

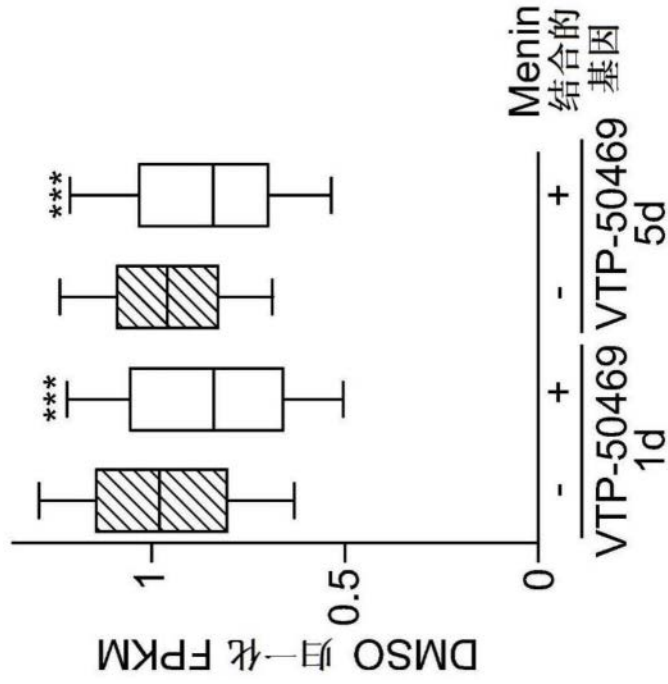


图5E

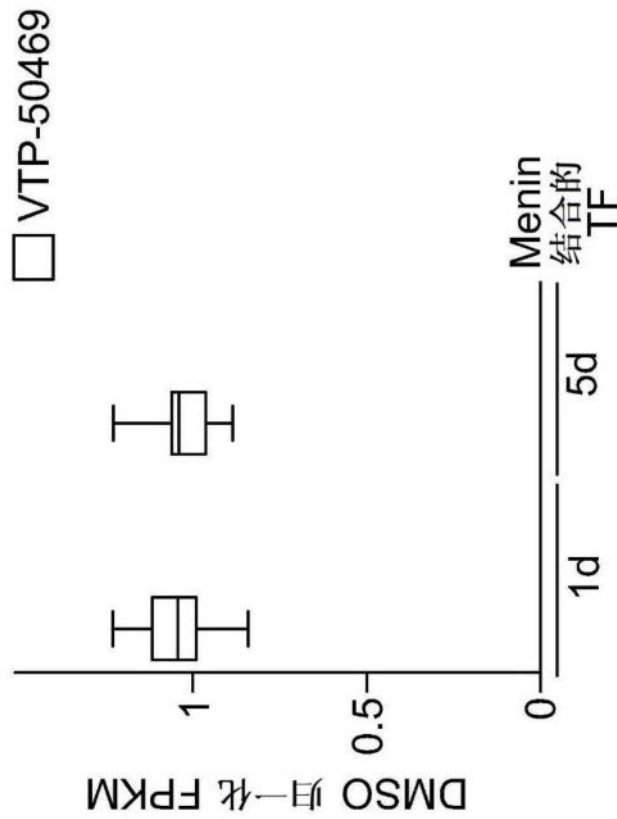


图5F

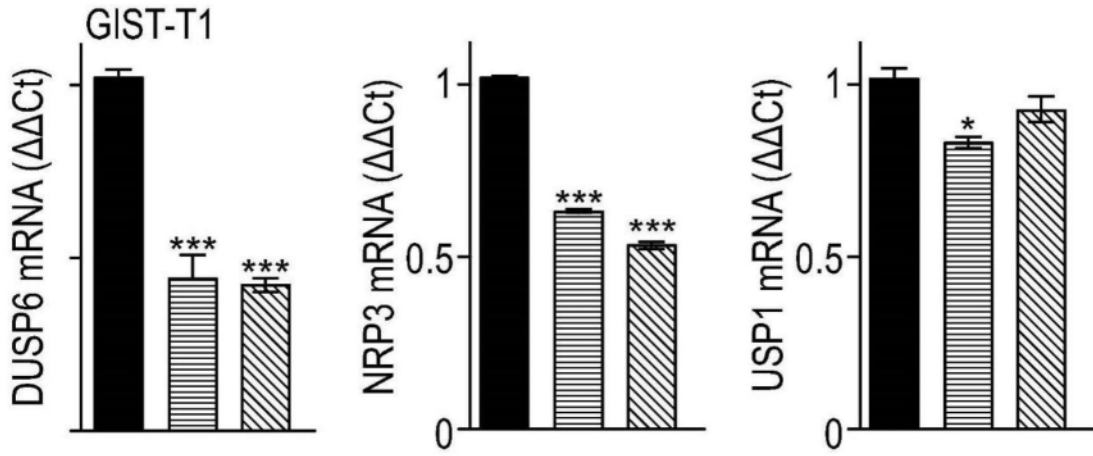


图5G

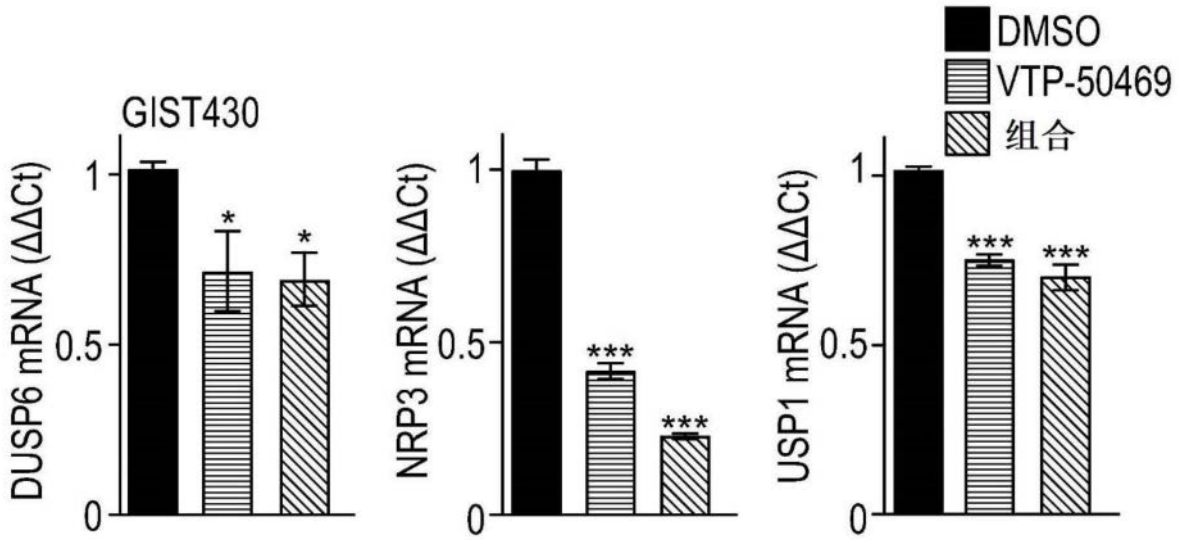


图5H

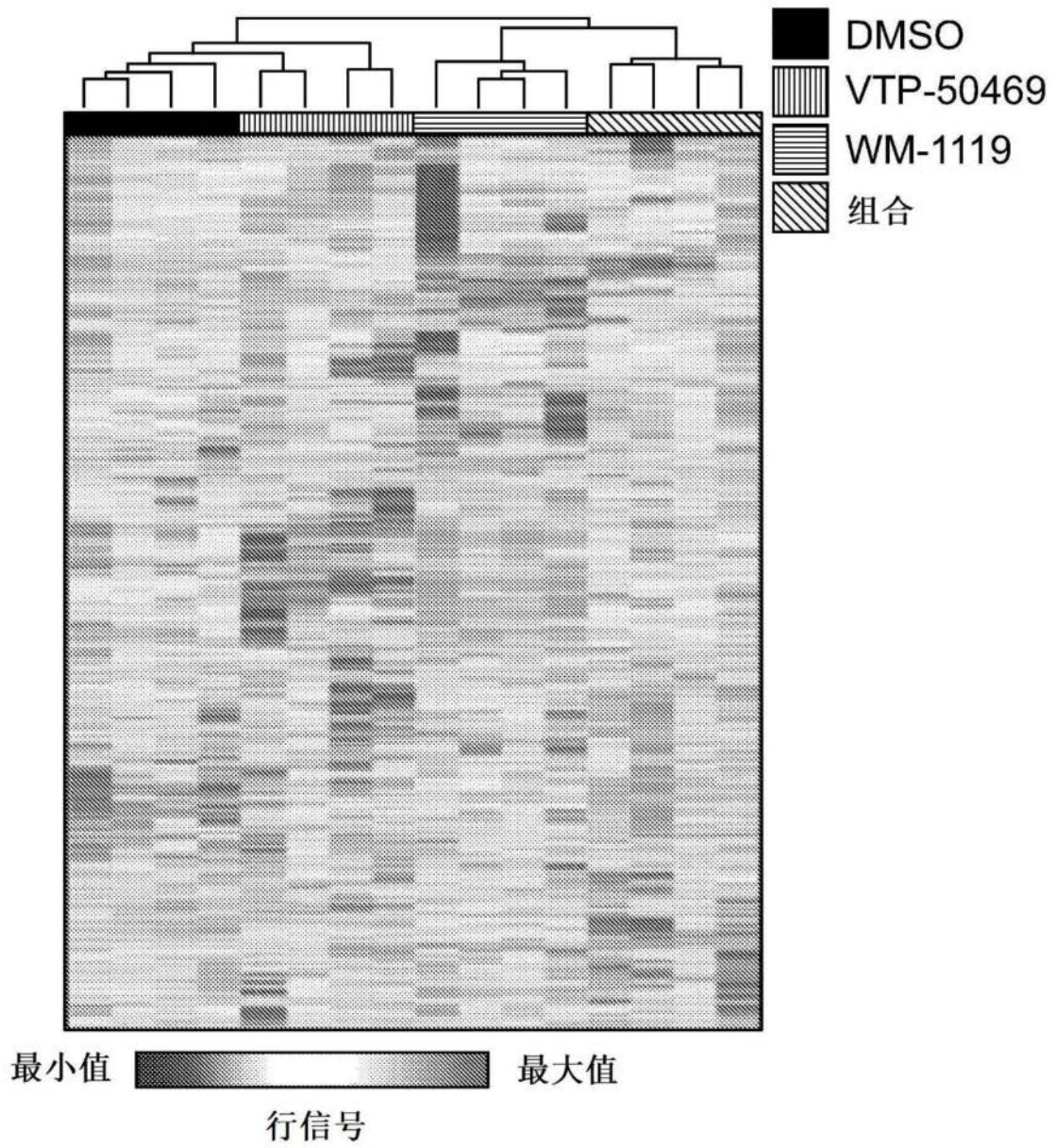


图5I

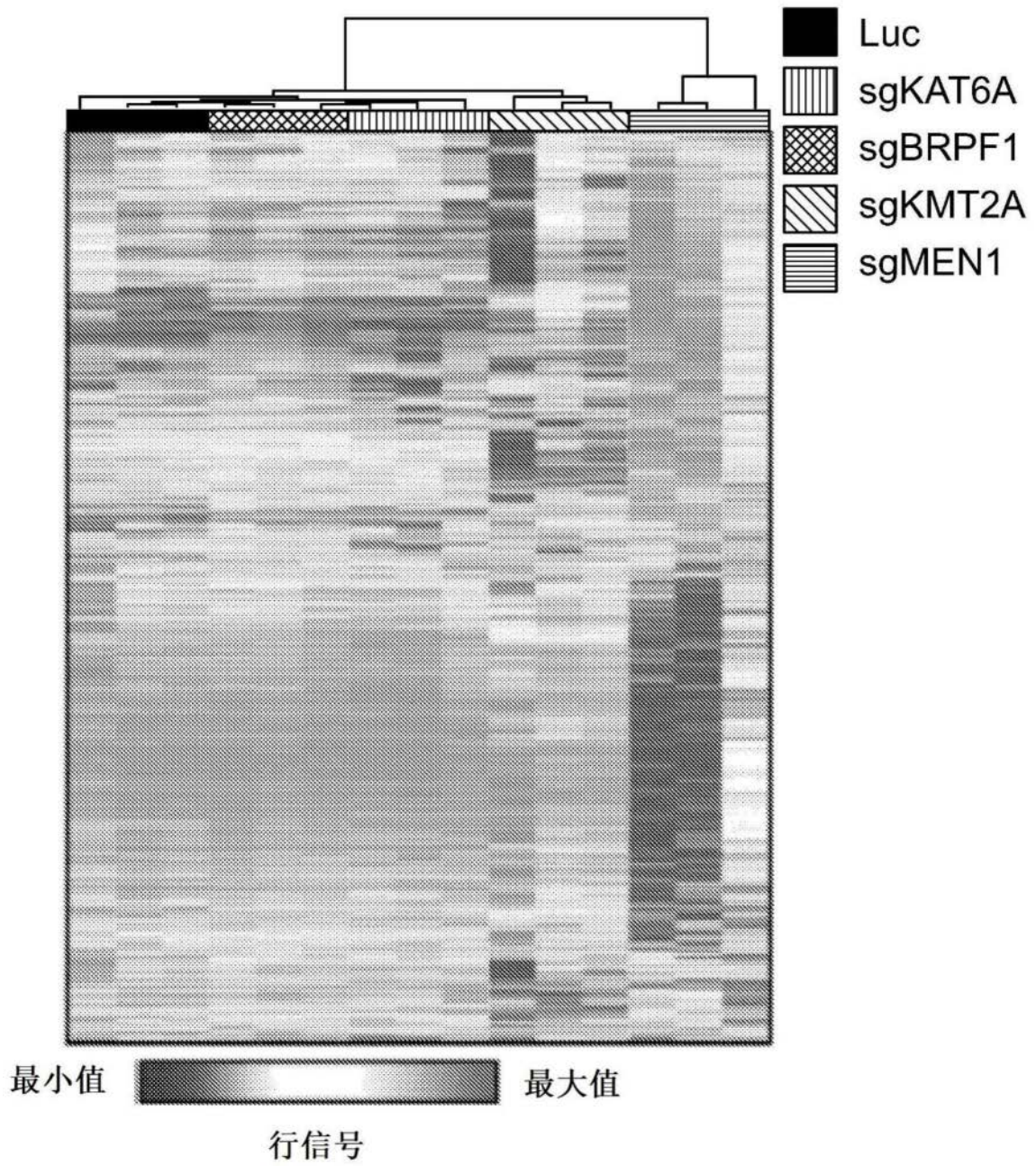


图5J

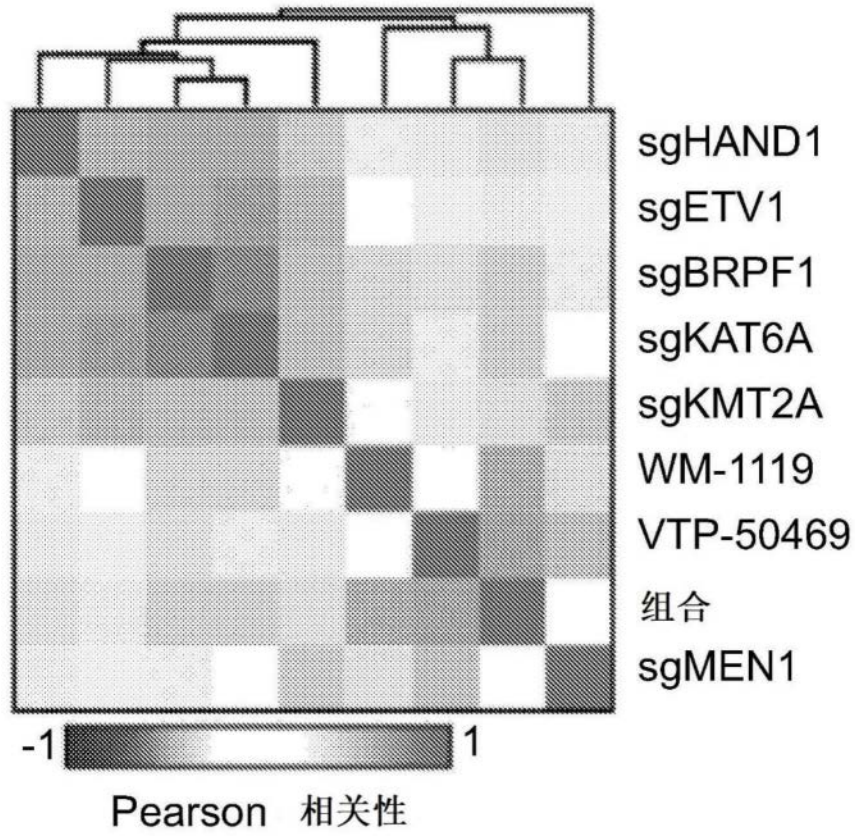


图5K

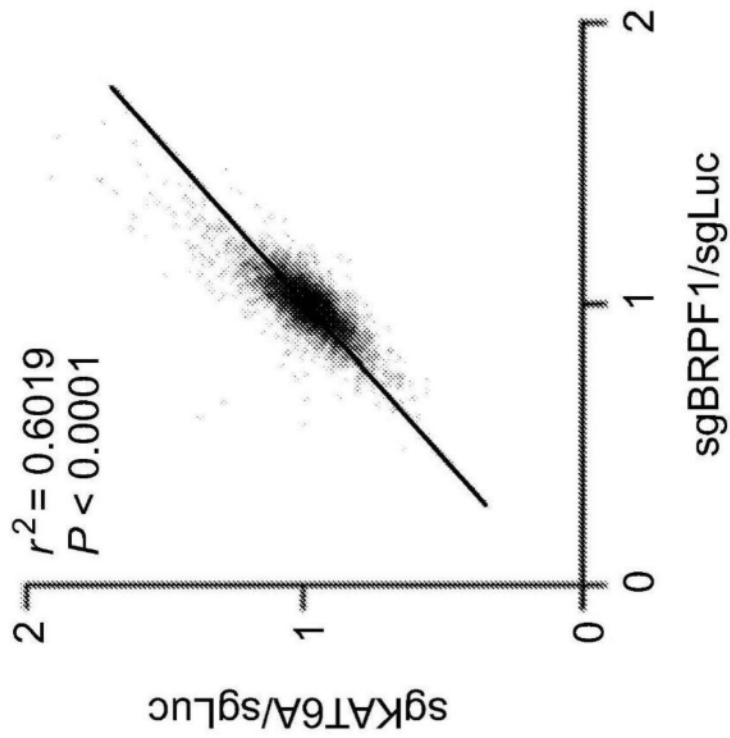


图5L

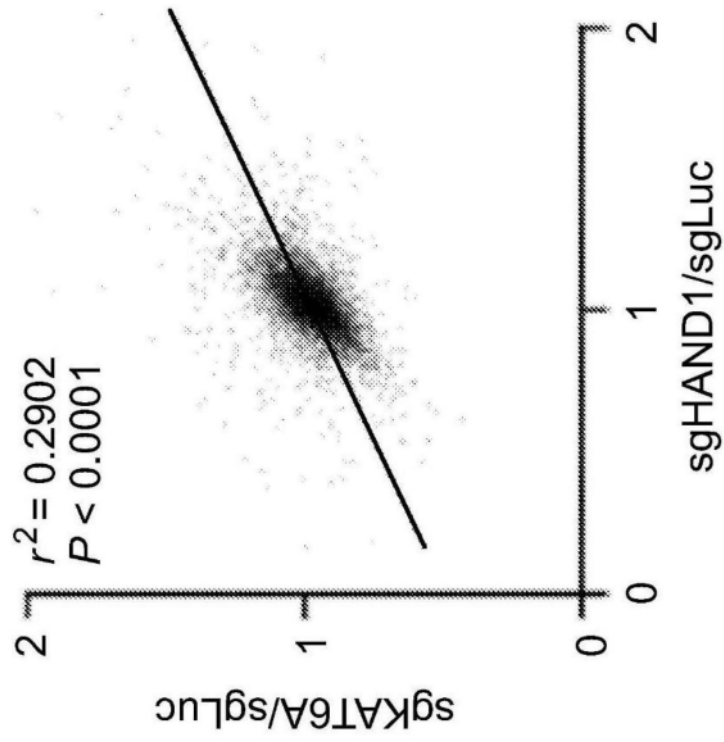


图5M

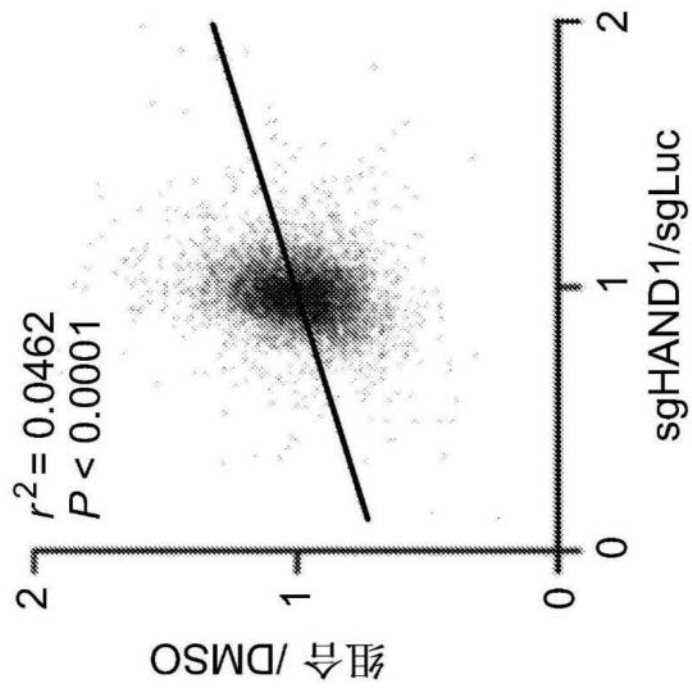


图5N

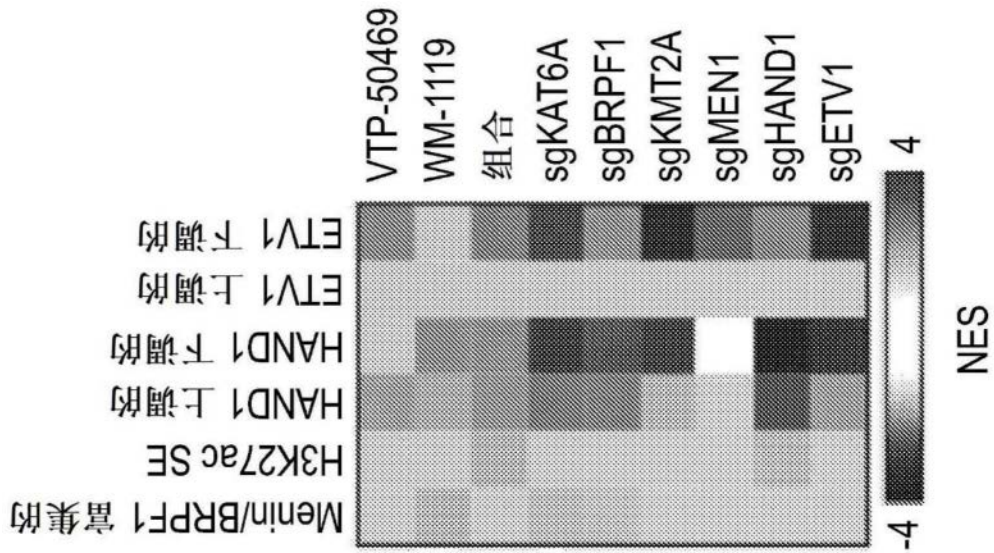


图50

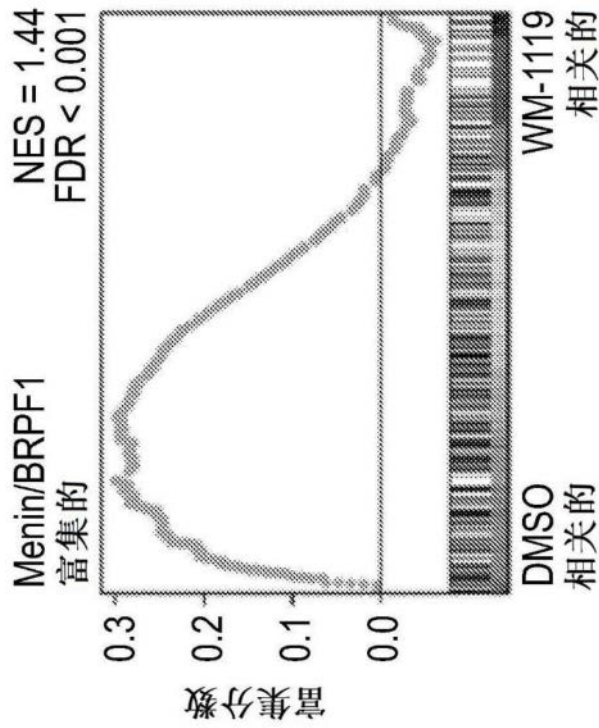


图5P

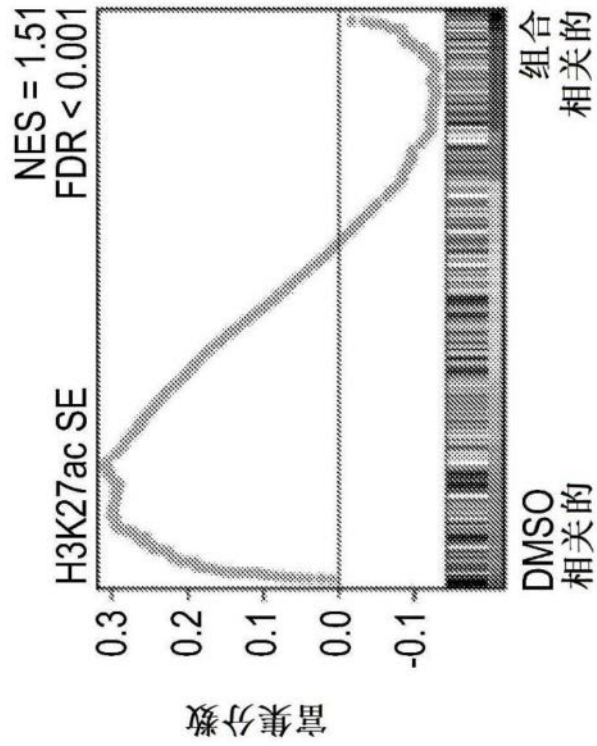


图5Q

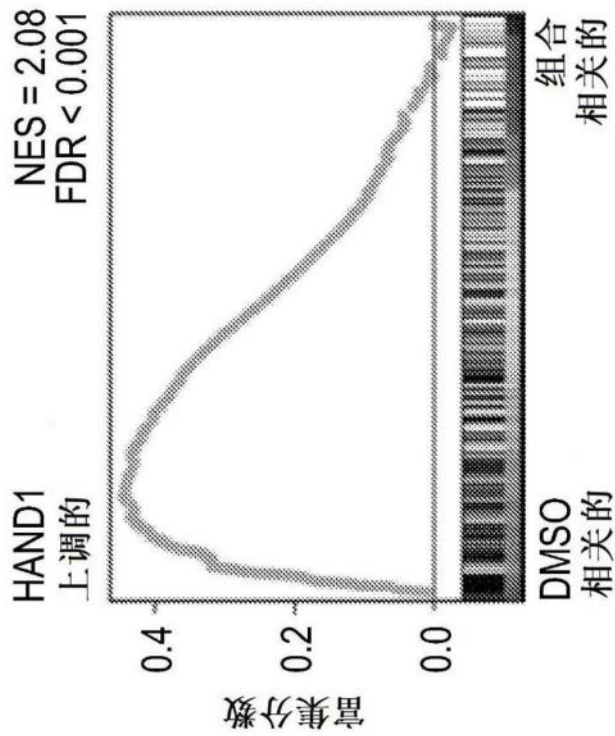


图5R

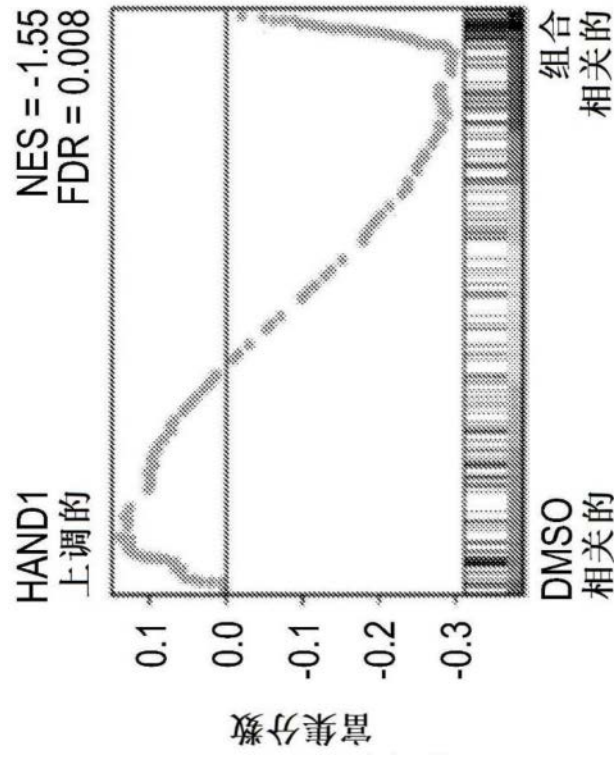


图5S

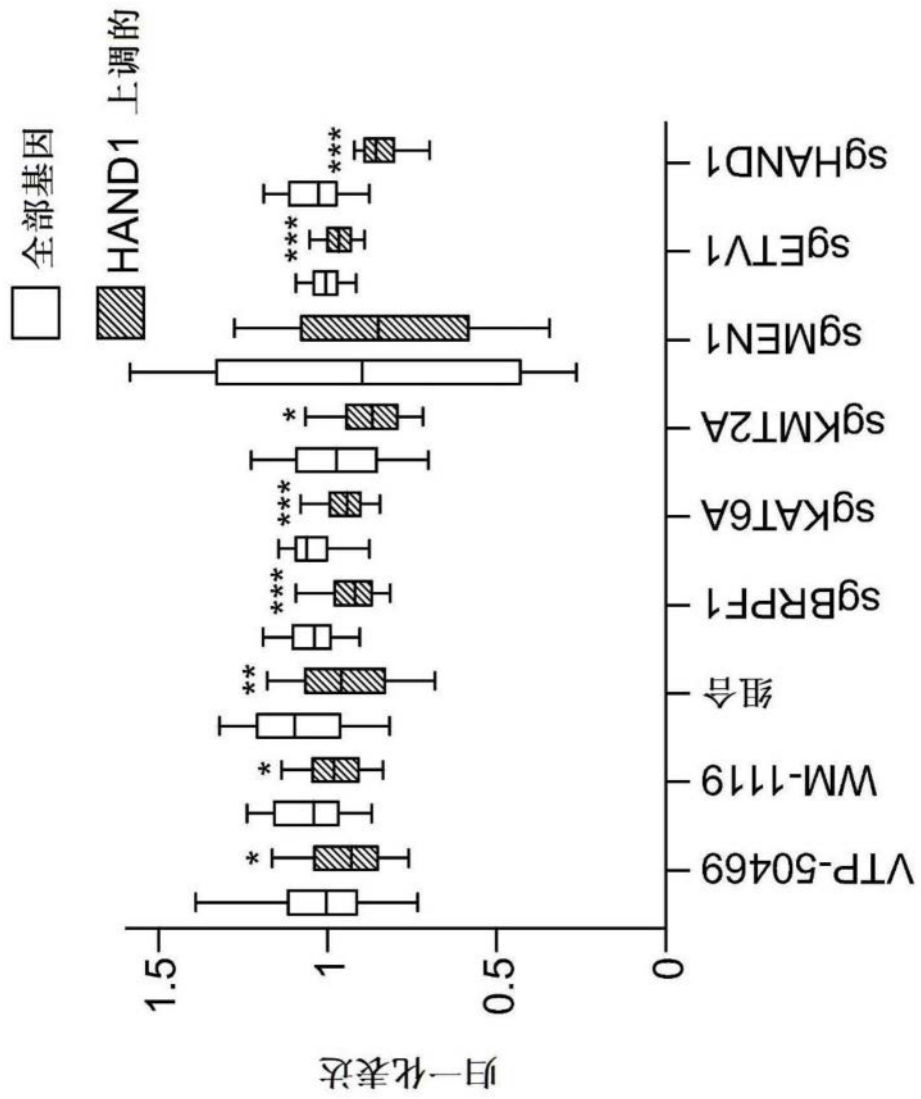


图5T

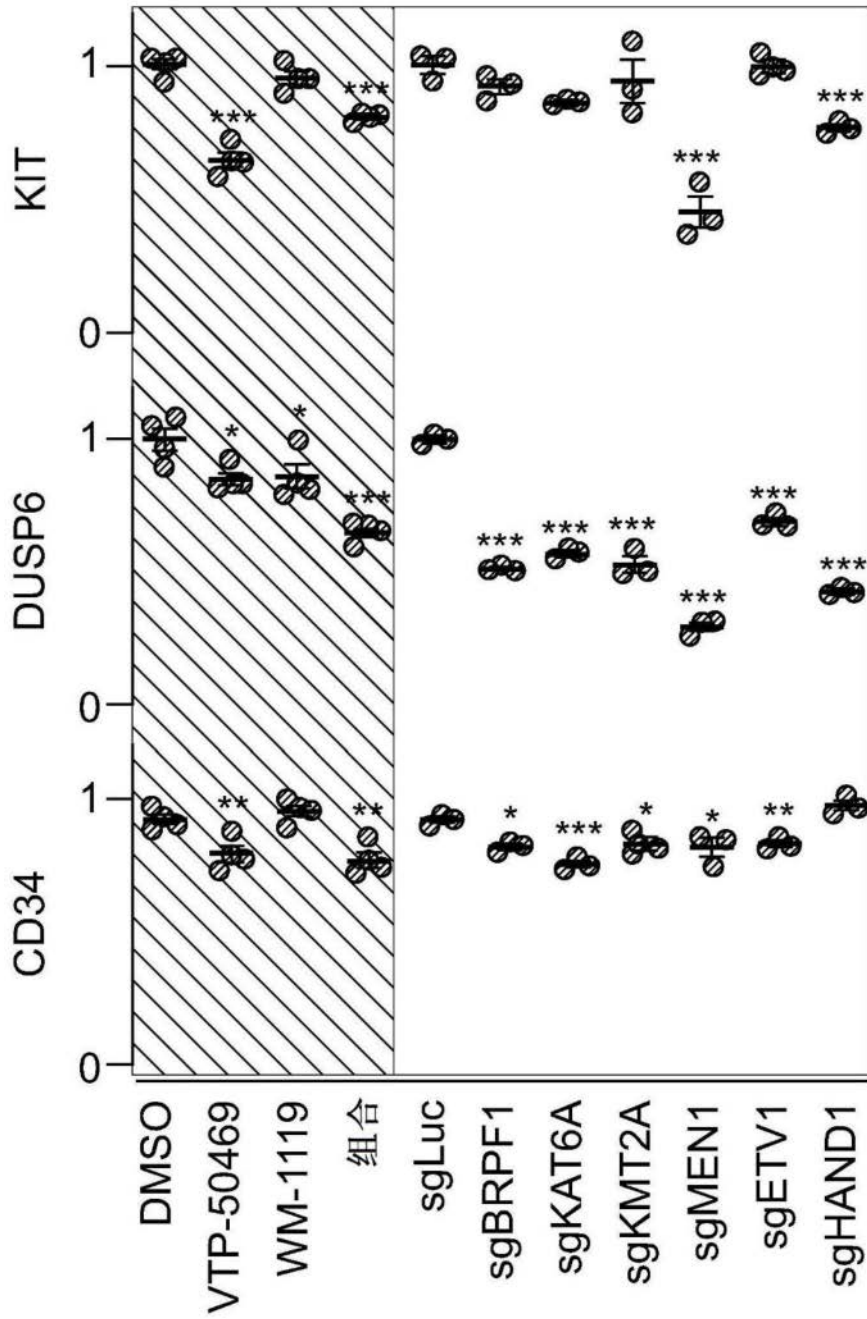


图5U

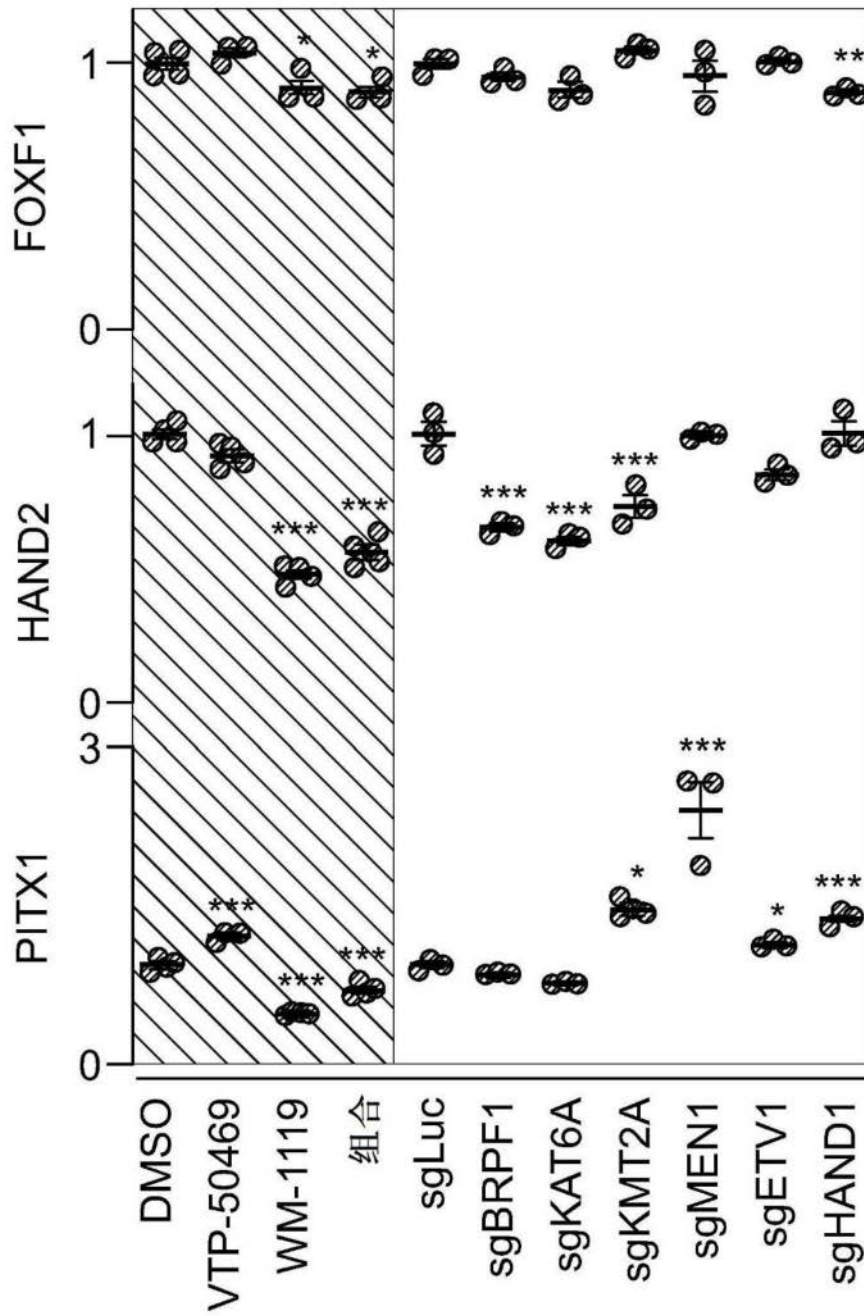


图5V

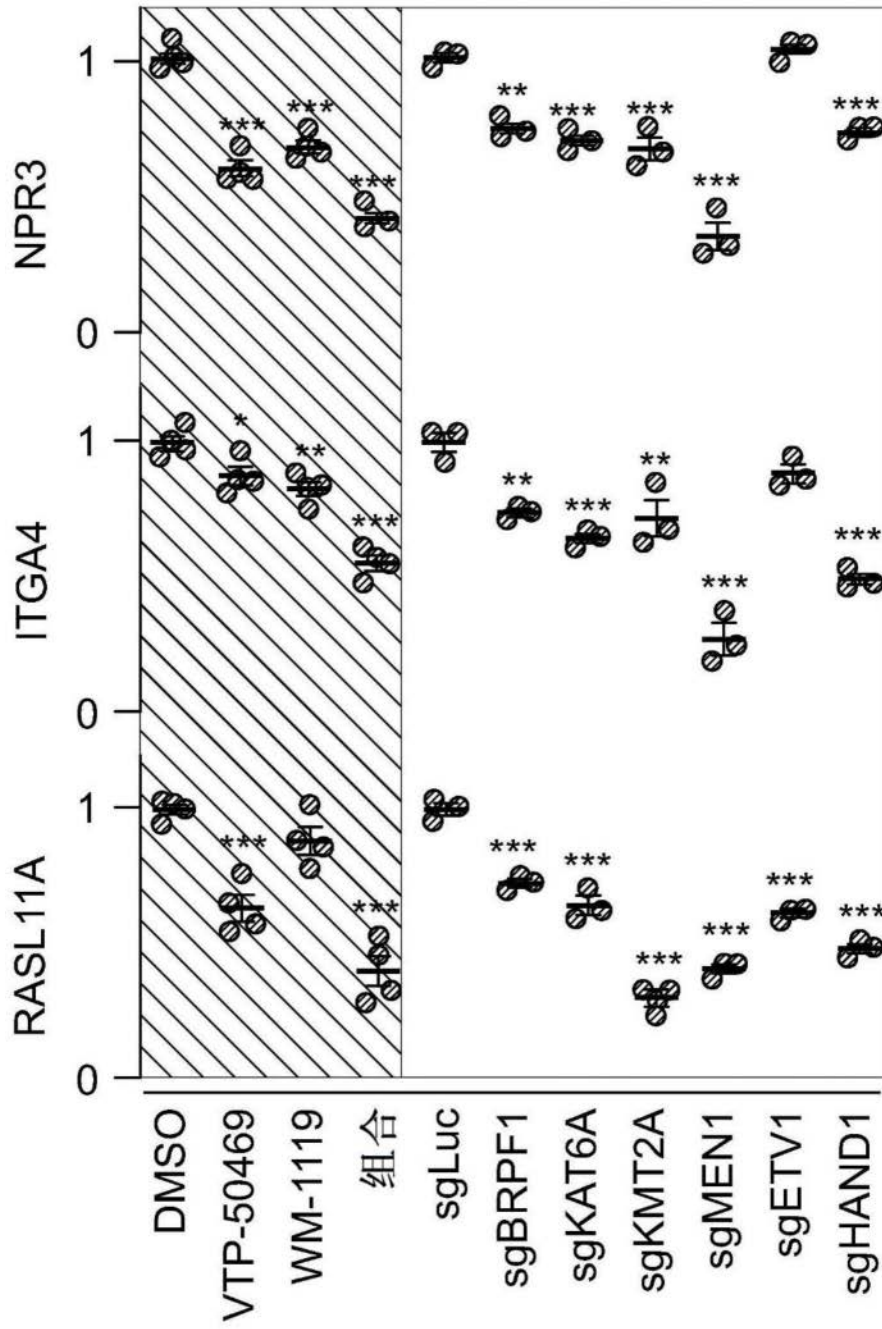


图5W

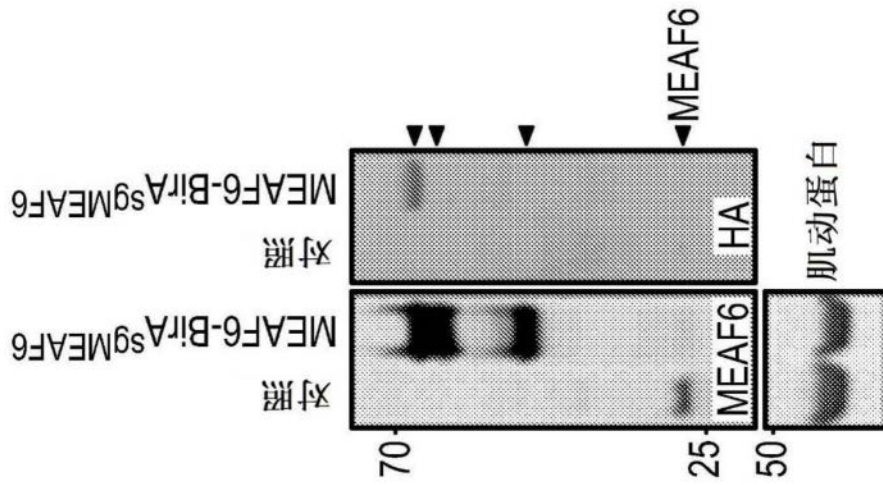


图6A

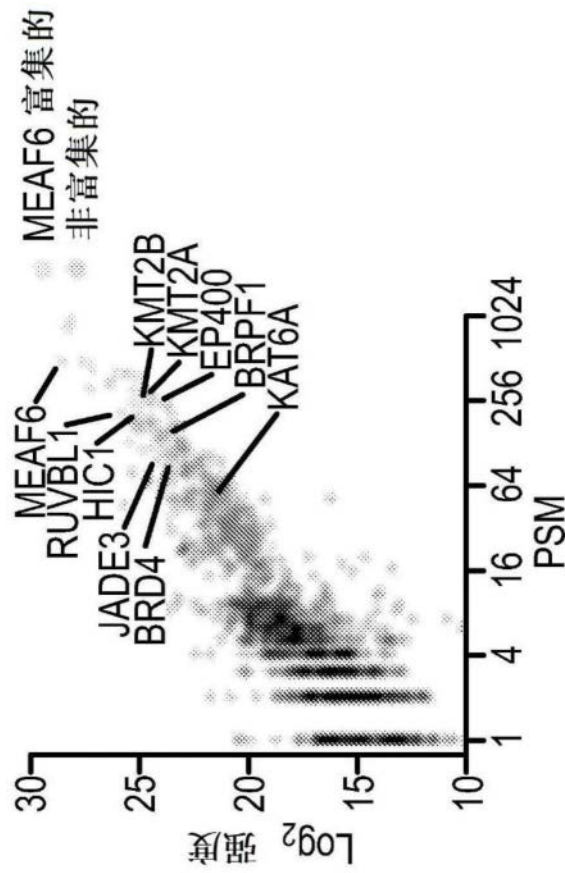


图6B

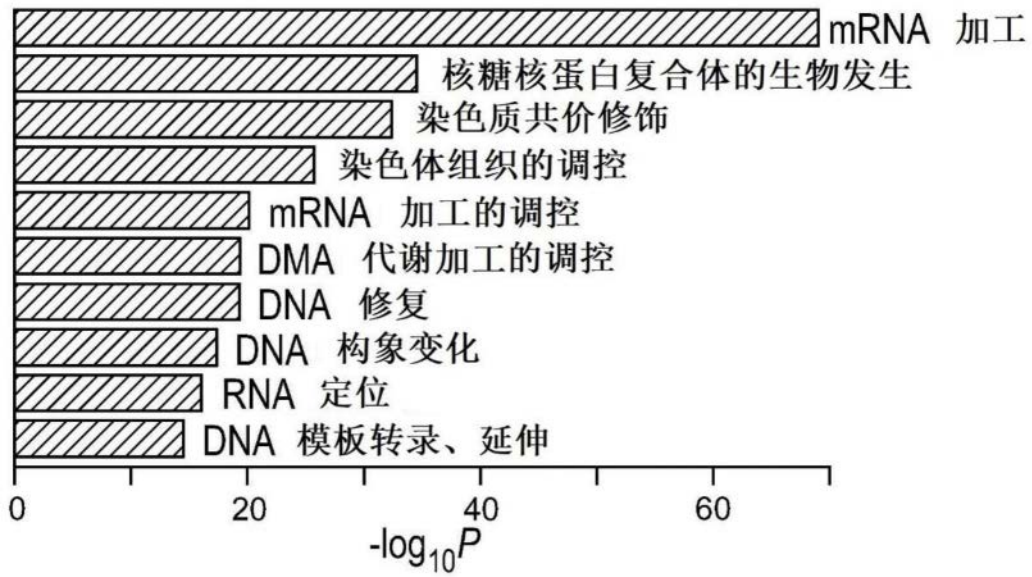


图6C

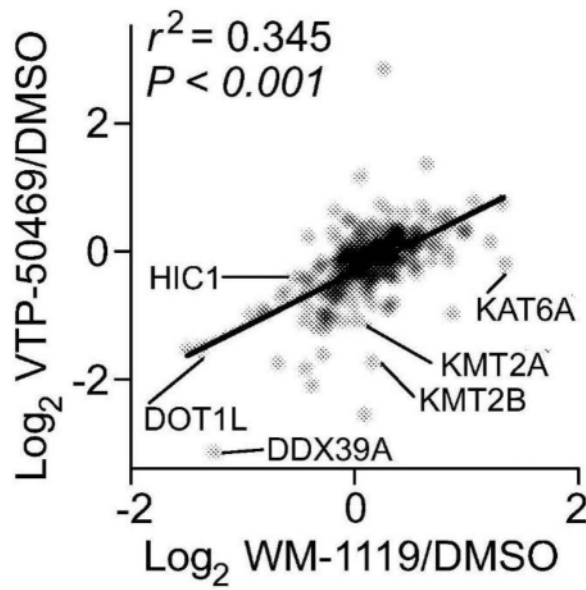


图6D

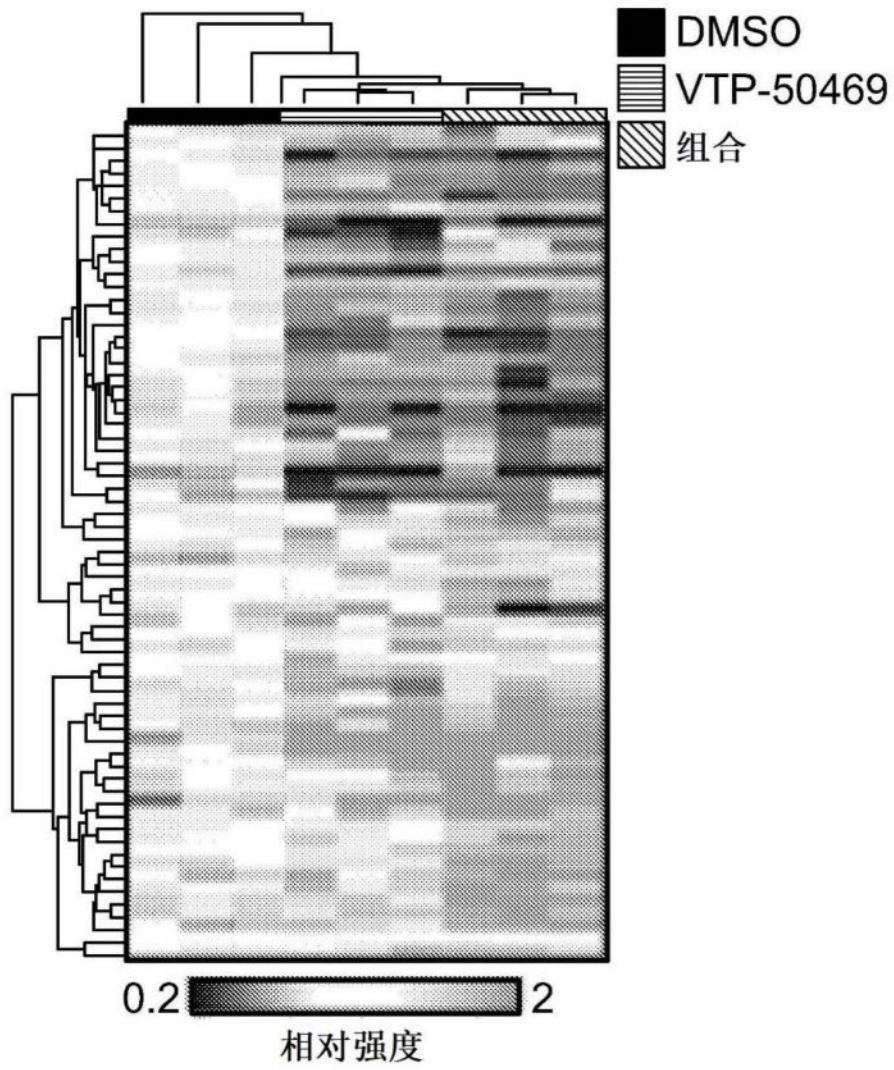


图6E

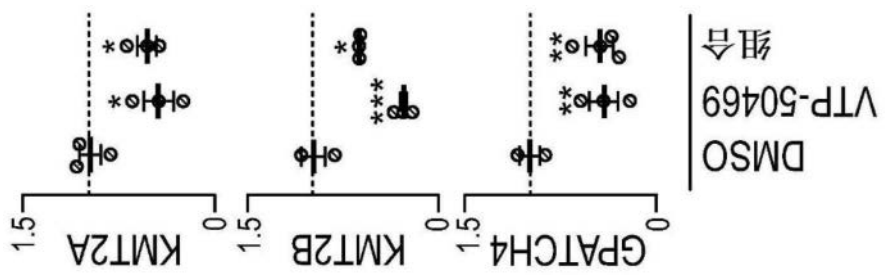


图6F

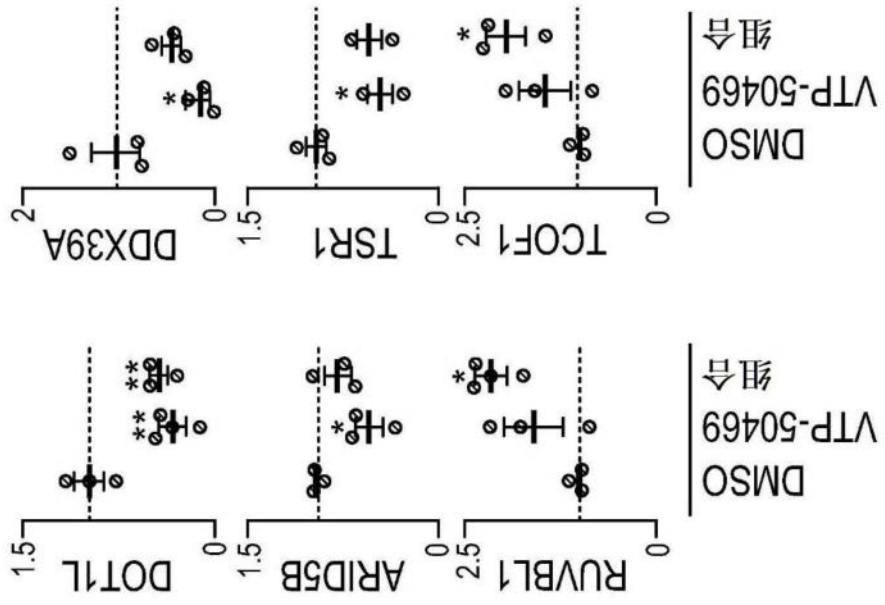


图6G

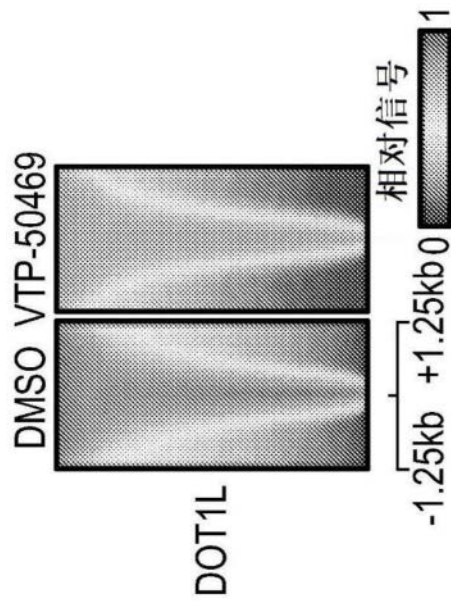


图6H

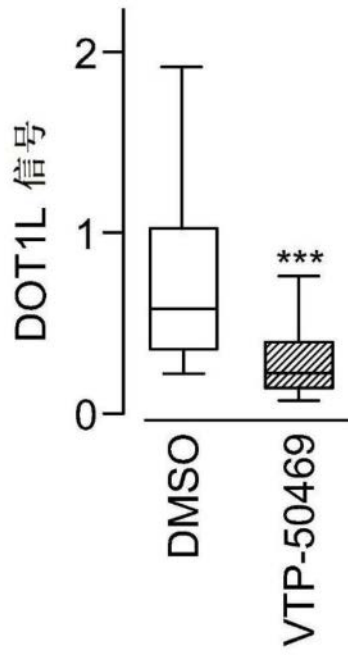


图6I

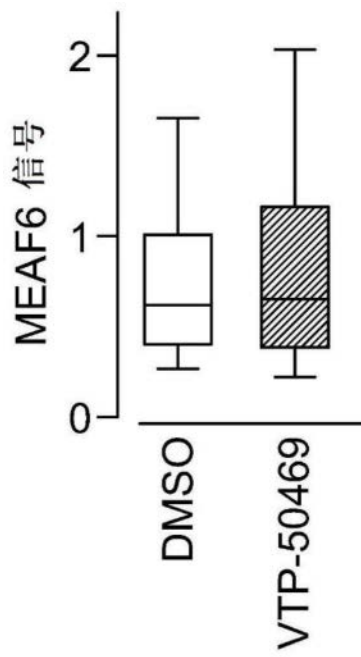


图6J

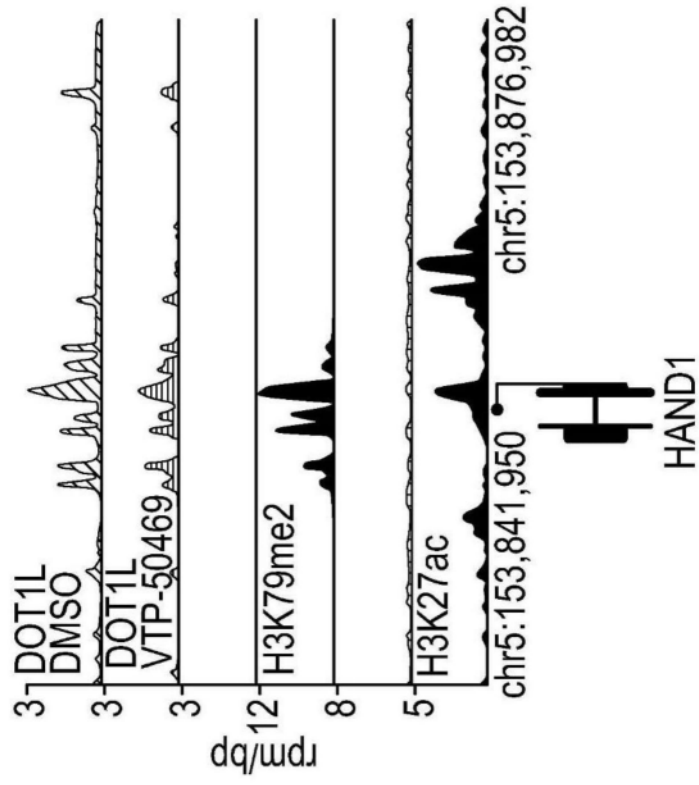


图6K

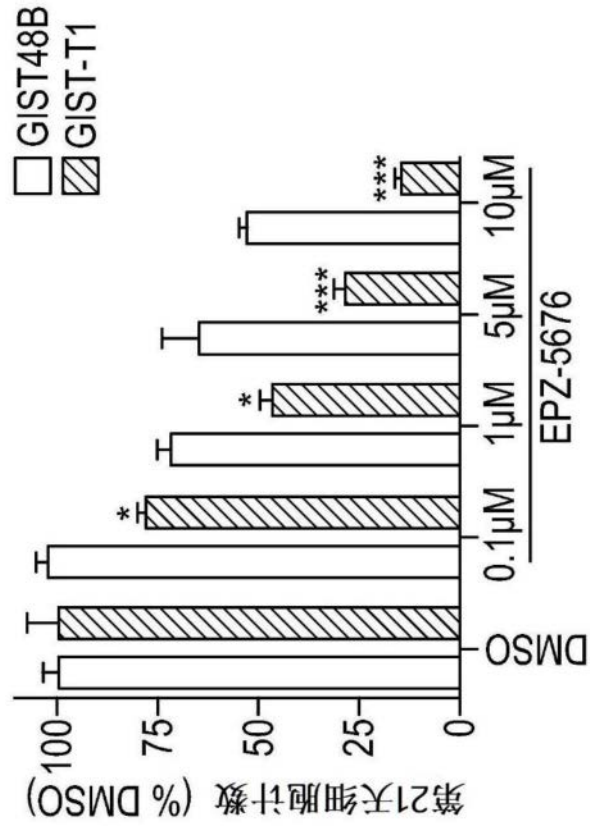


图6L

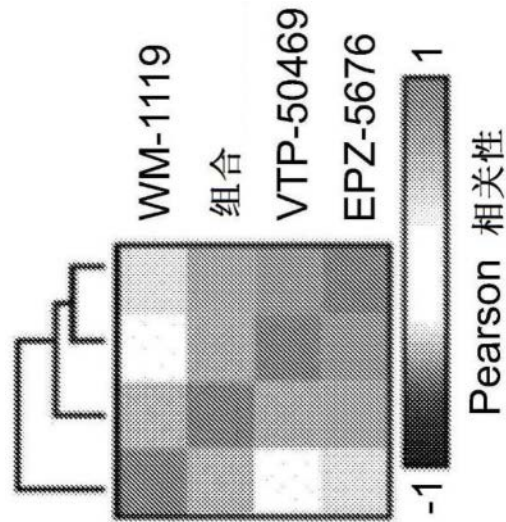


图6M

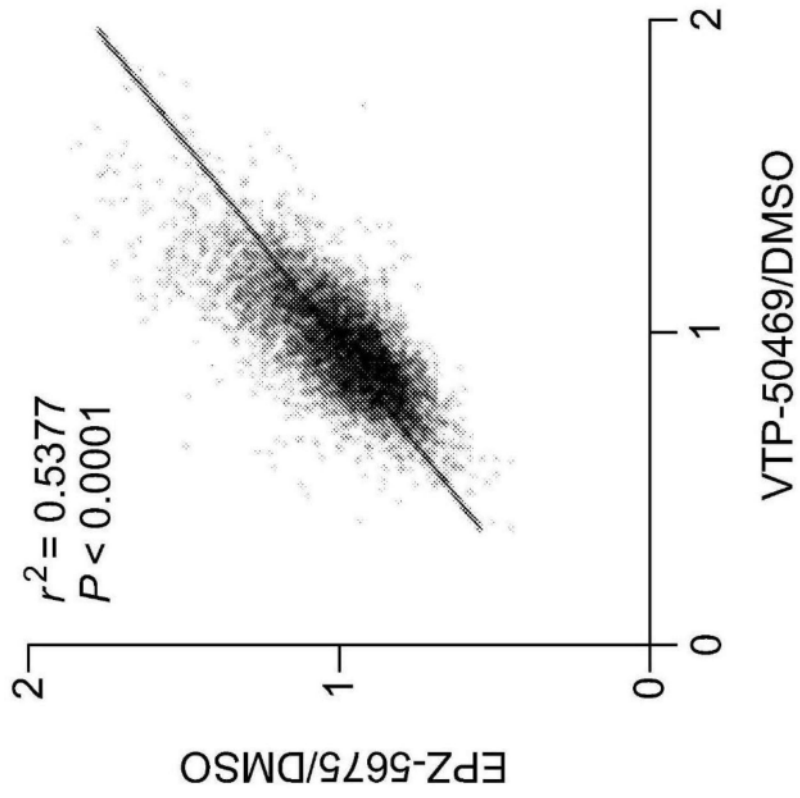


图6N

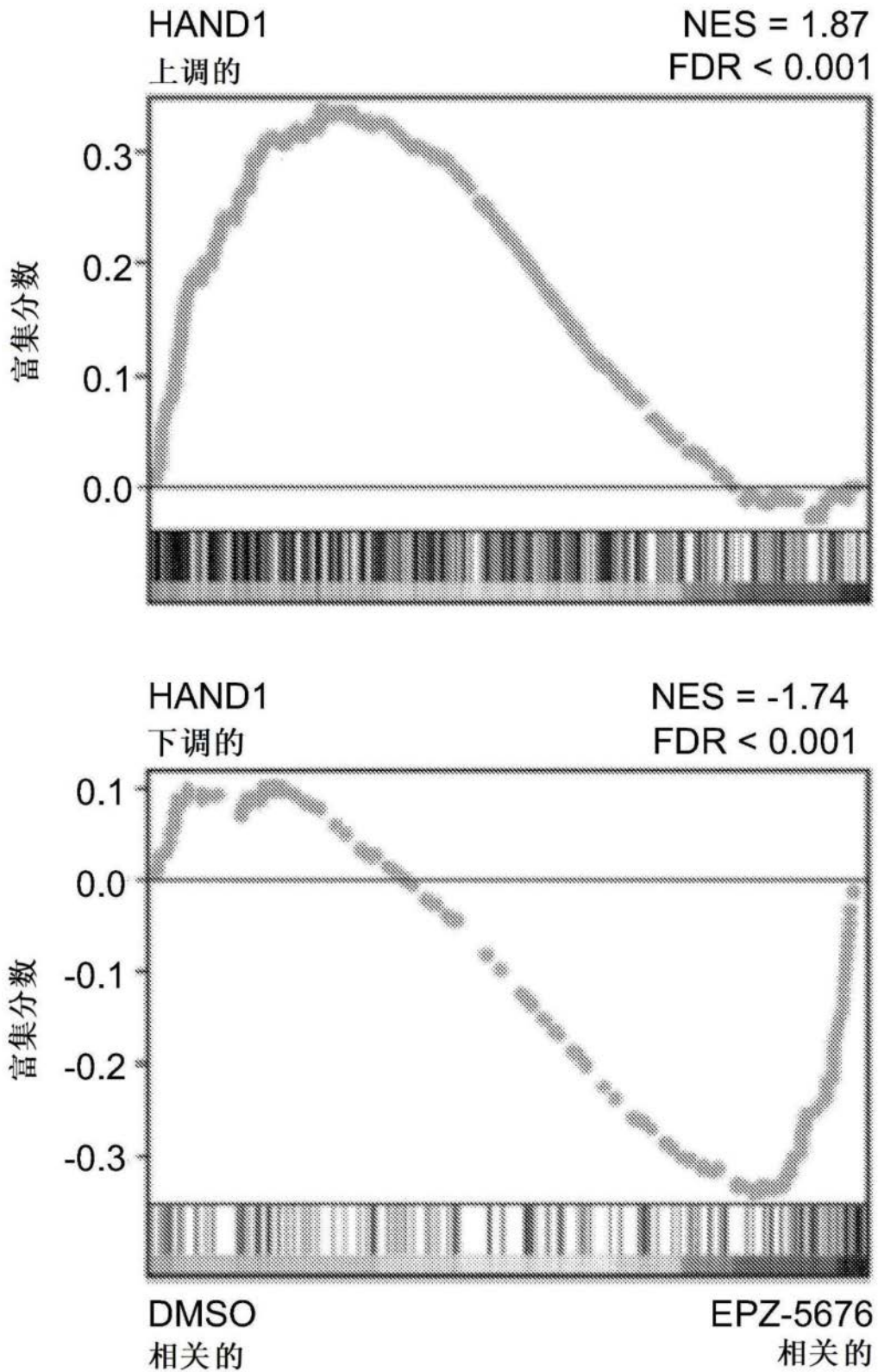


图60

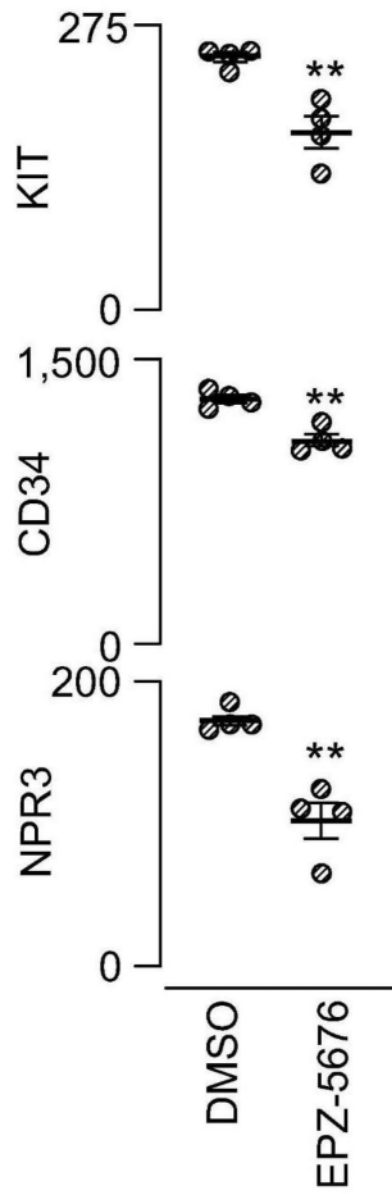


图6P

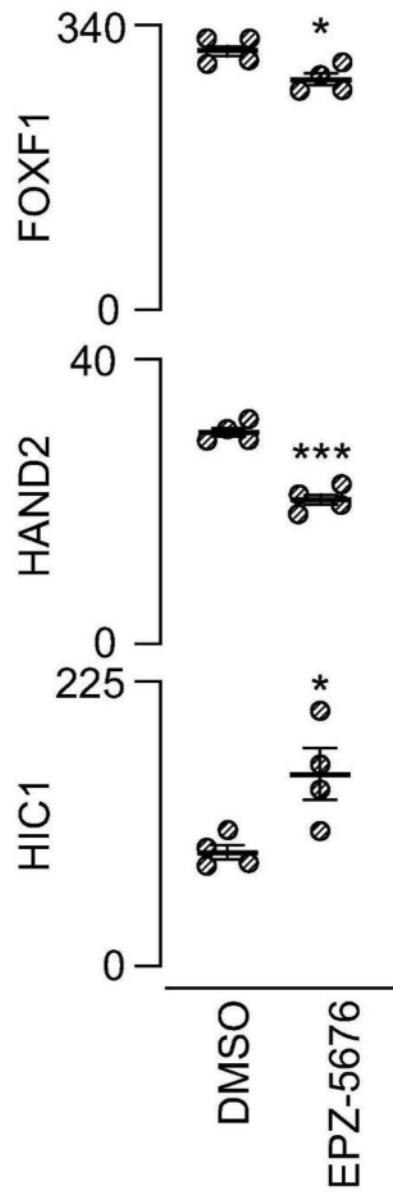


图6Q

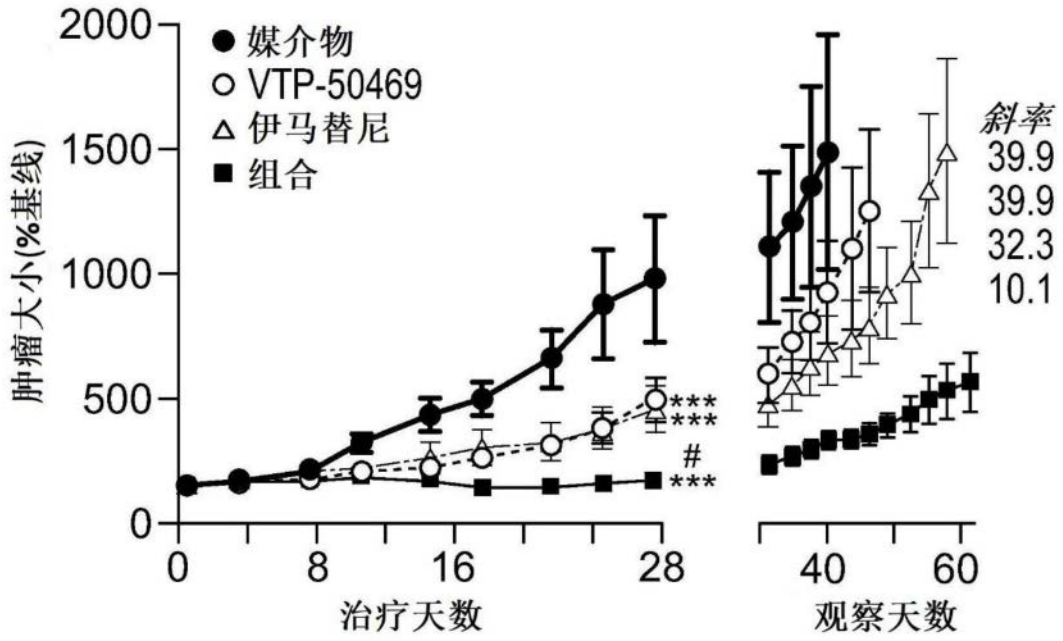


图7A

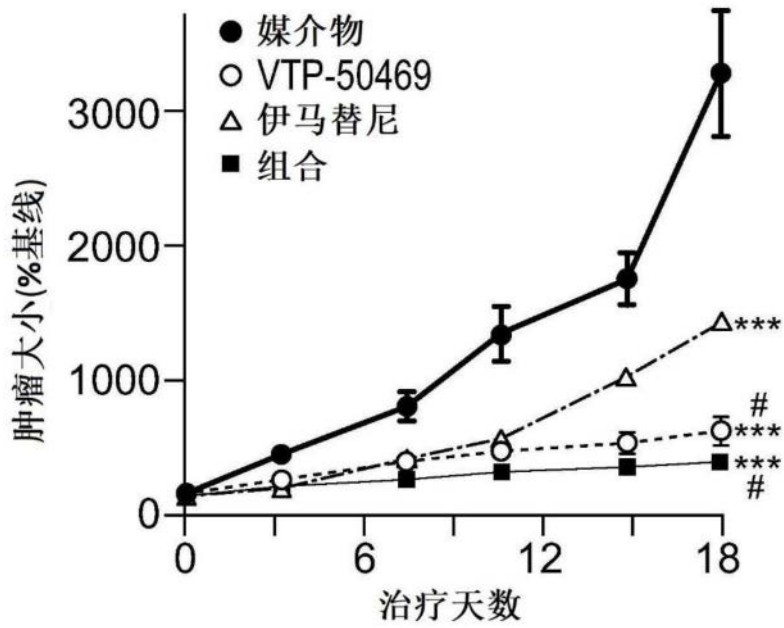


图7B

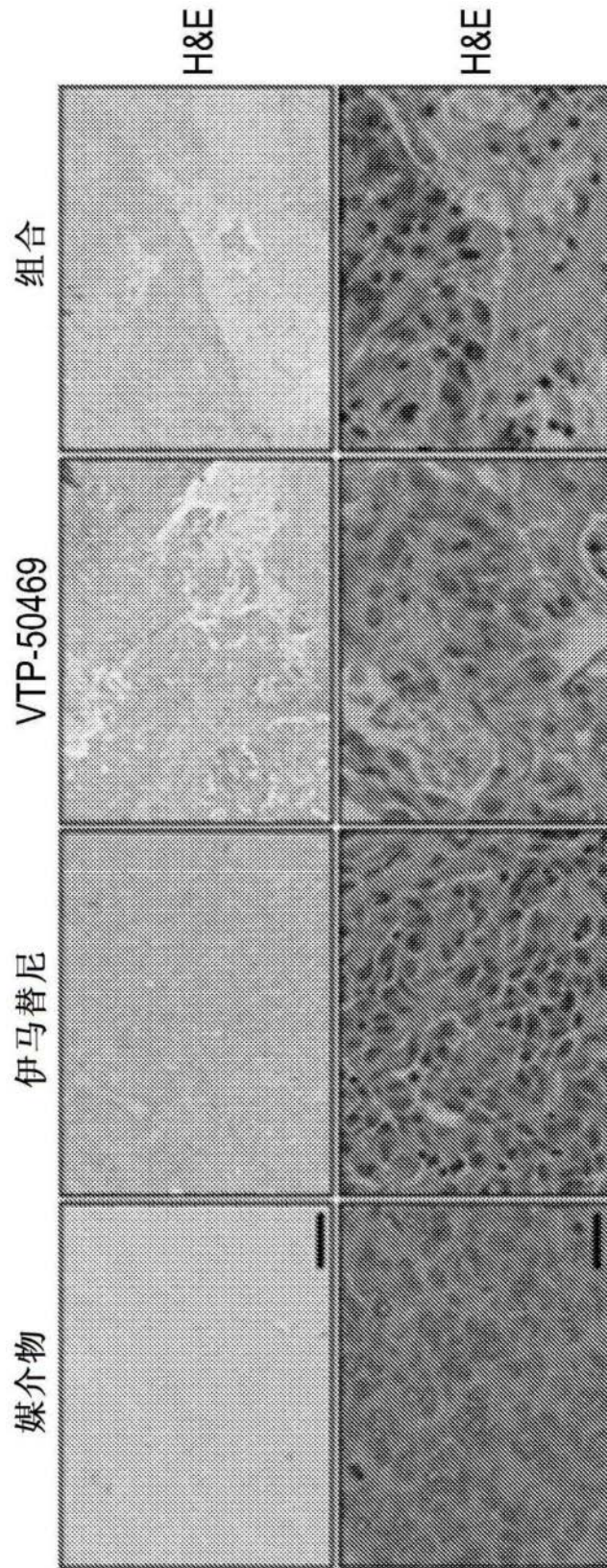


图7C

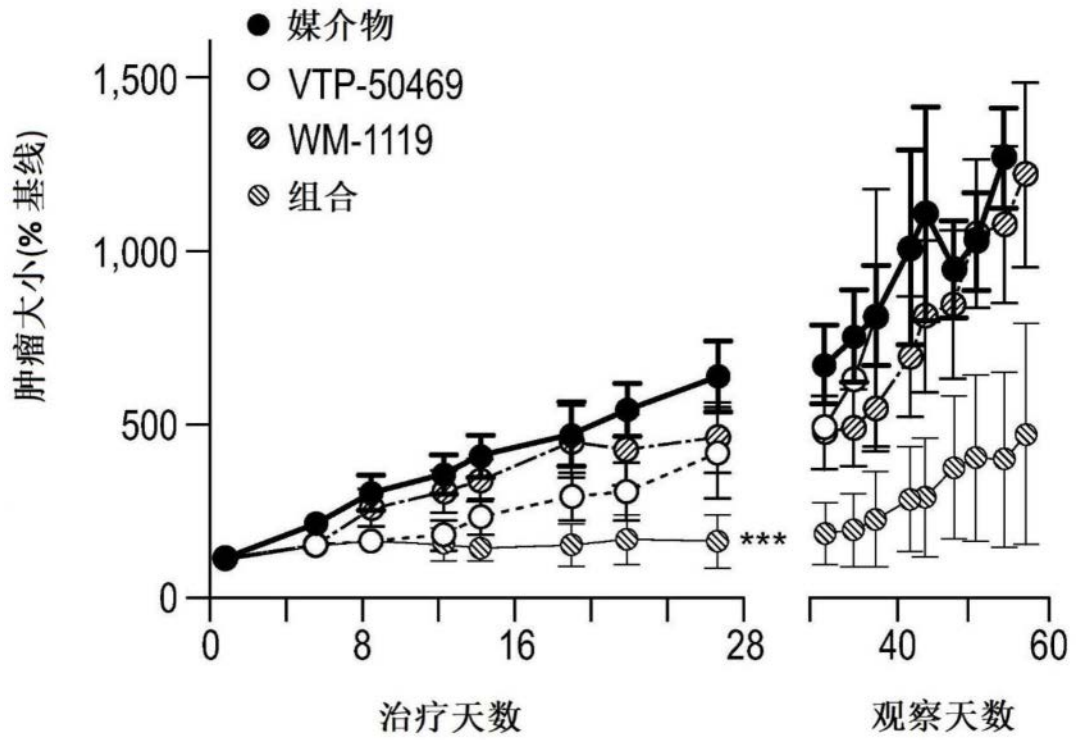


图7D

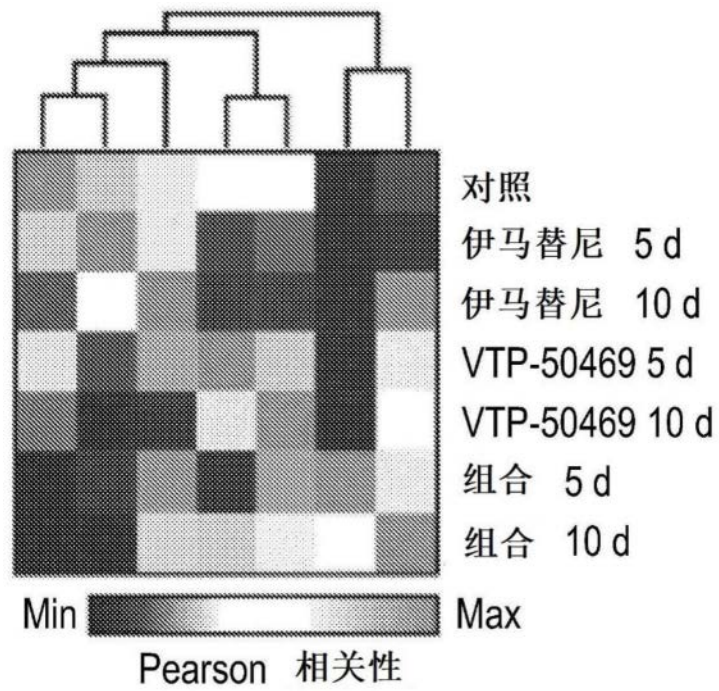


图7E

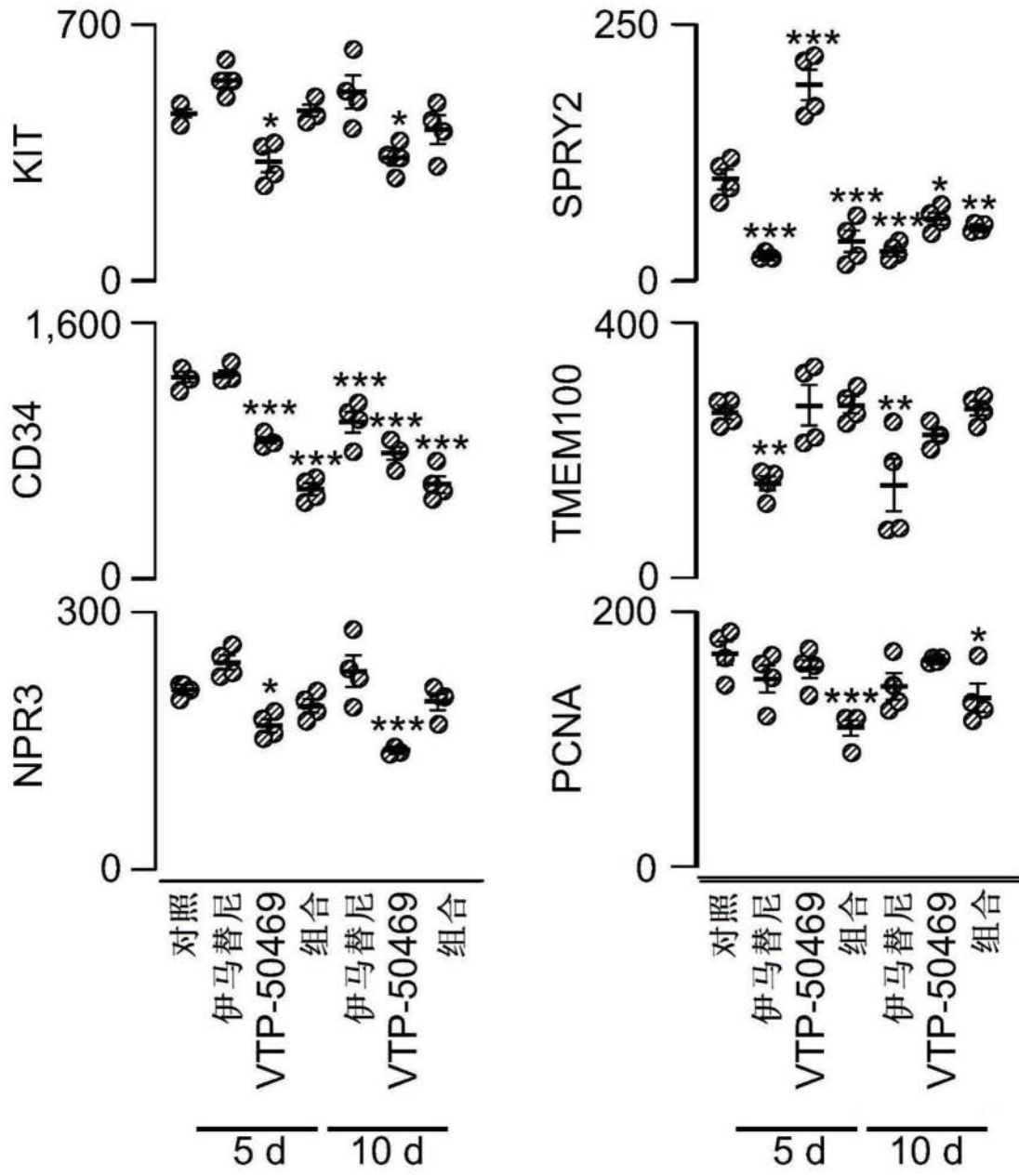


图7F

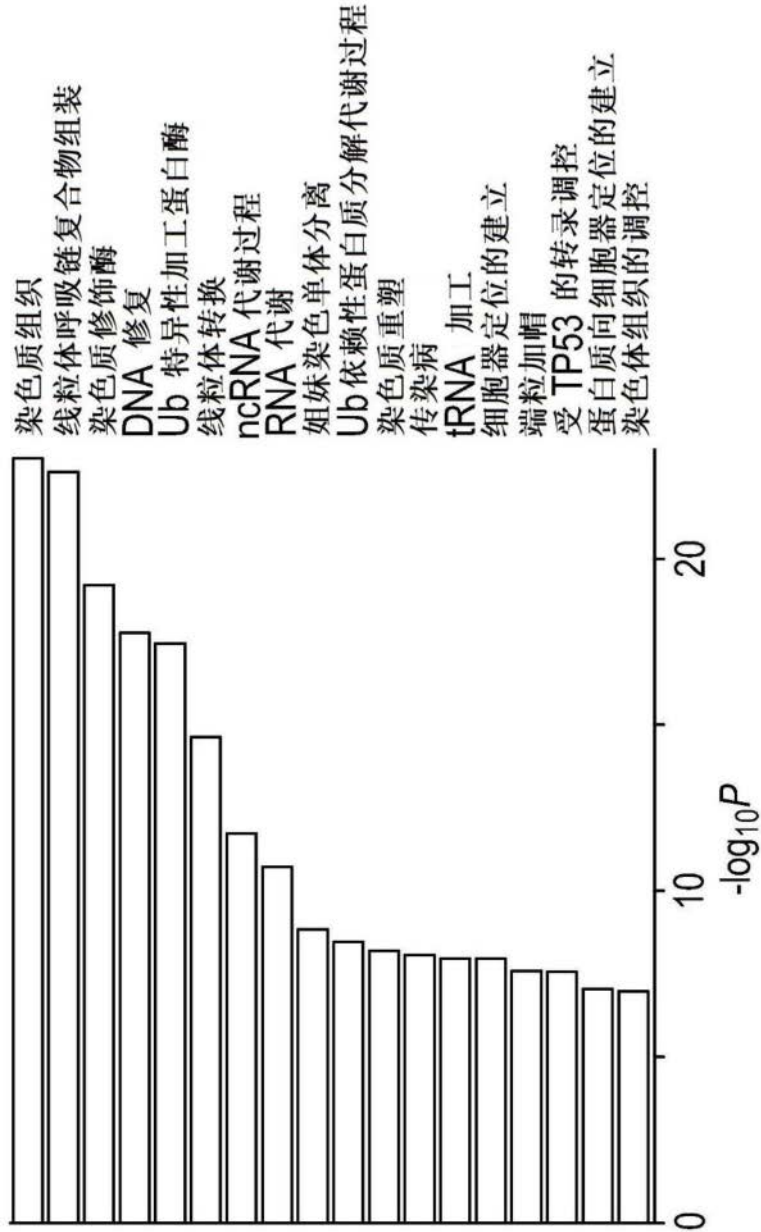


图8A

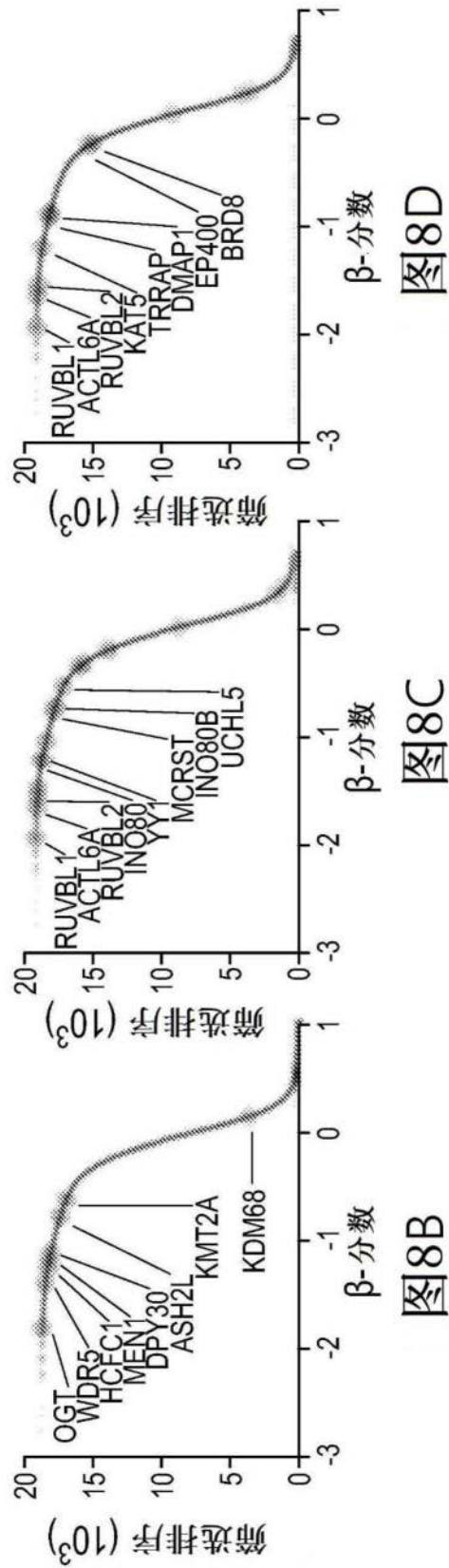


图8B

图8C

图8D

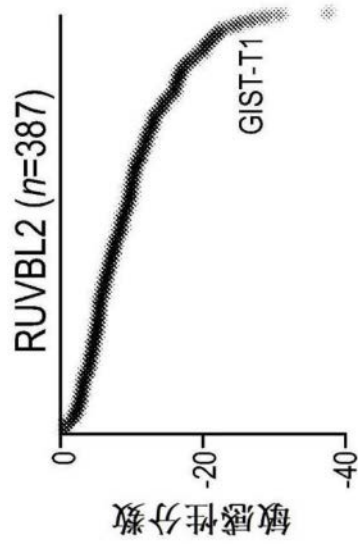


图8E

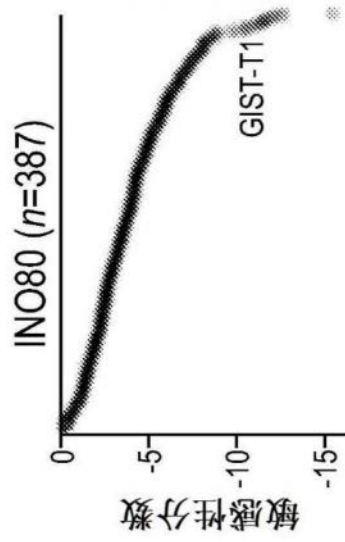


图8F

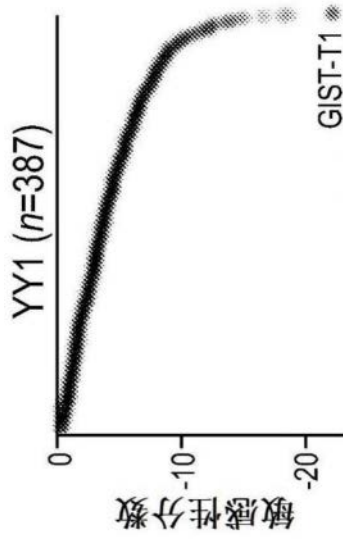


图8G

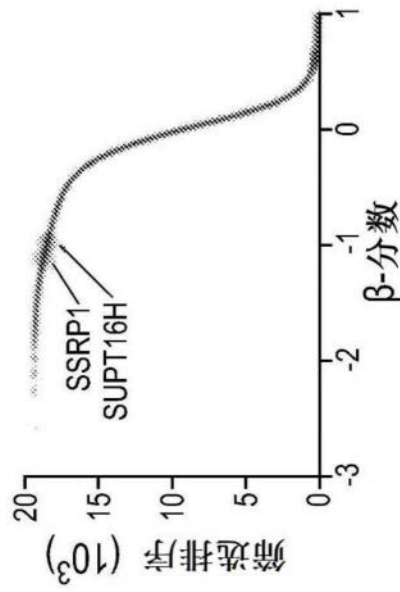


图8H

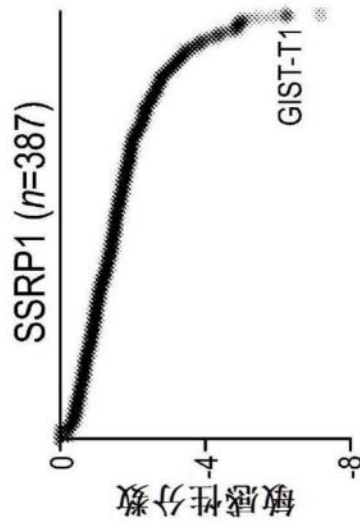


图8I

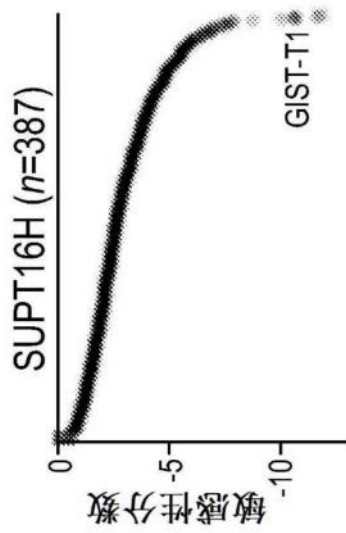


图8J

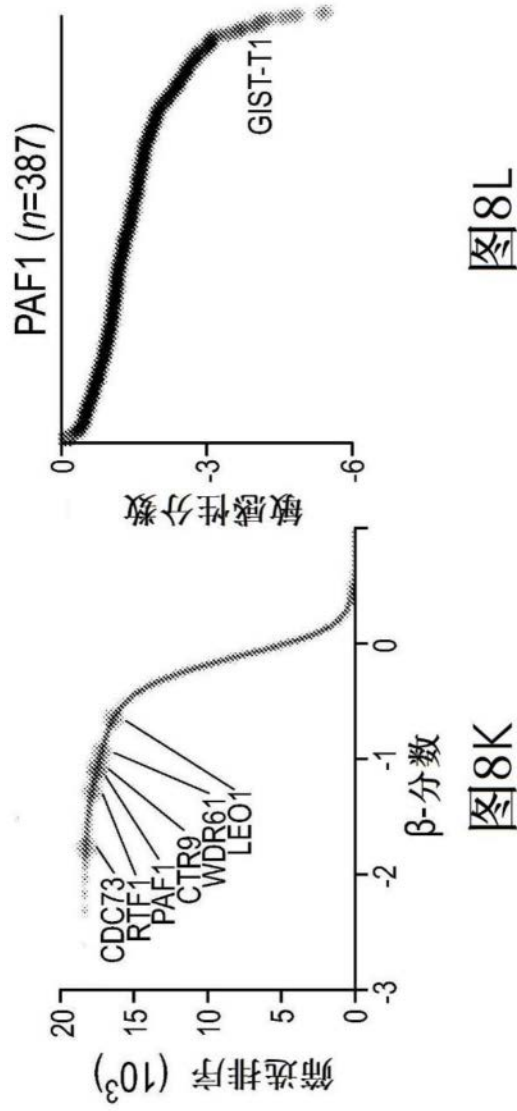


图8L

图8K

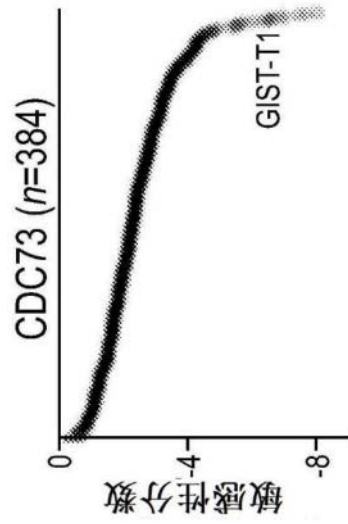


图8M

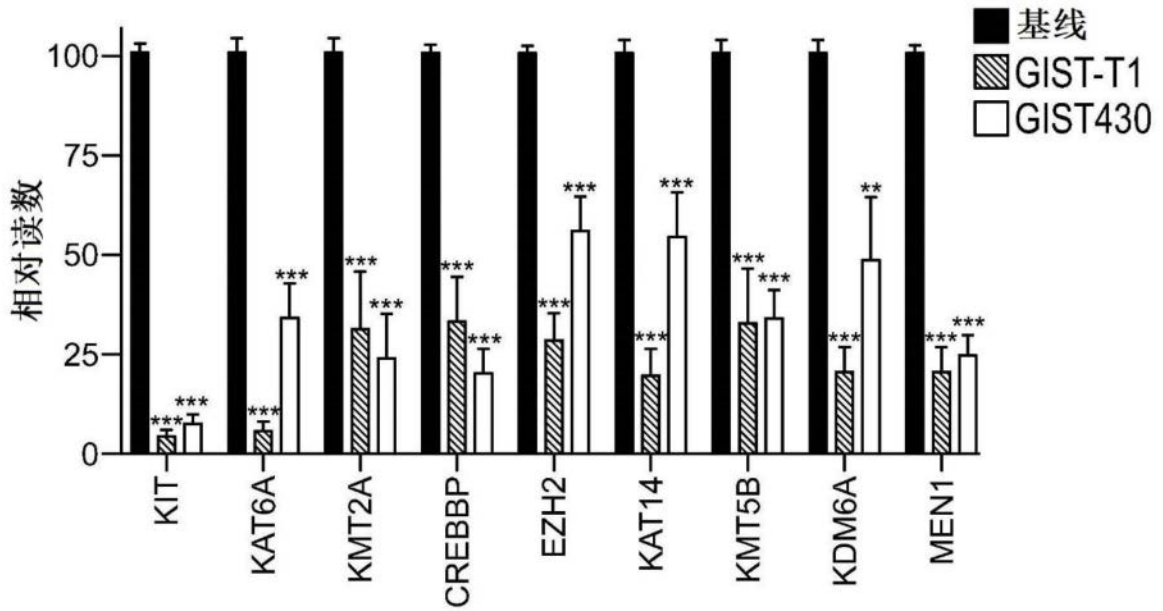


图8N

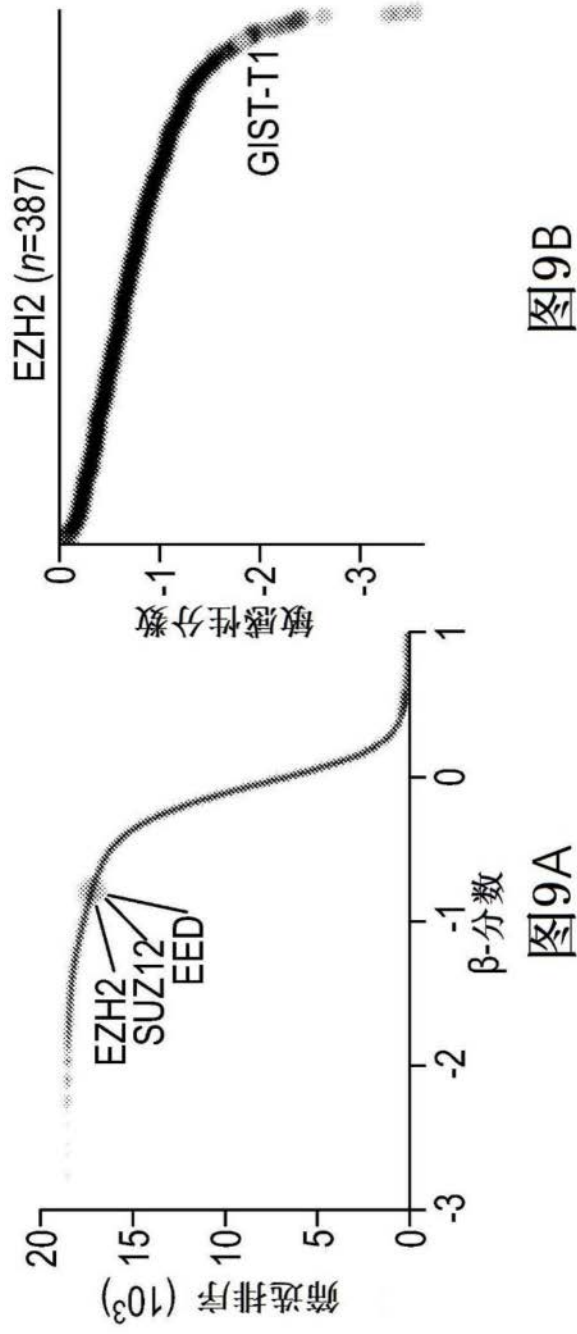


图9B

图9A

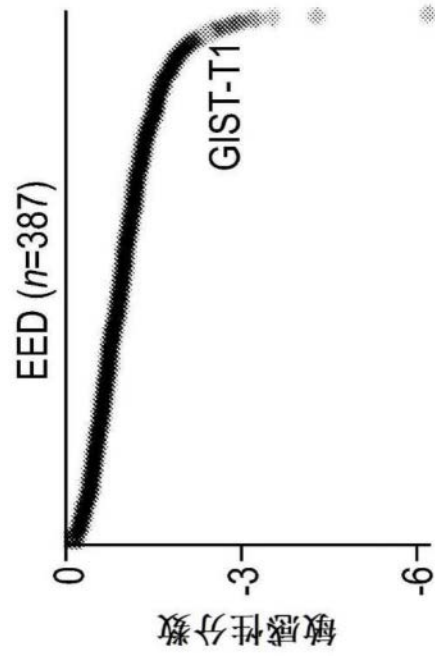


图9C

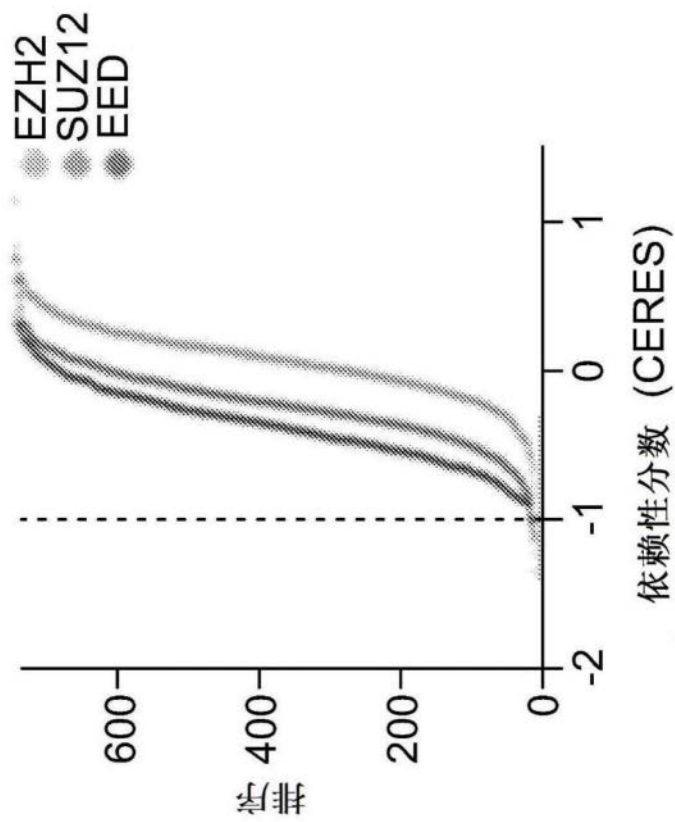


图9D

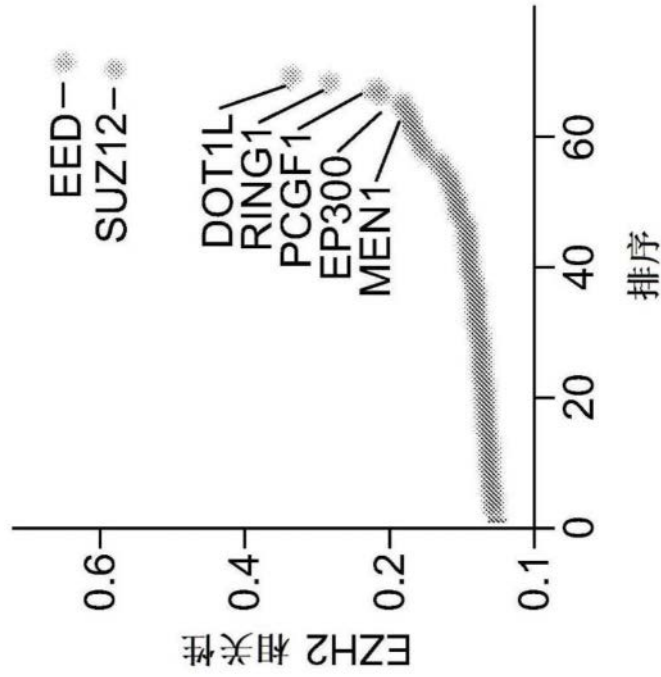


图9E

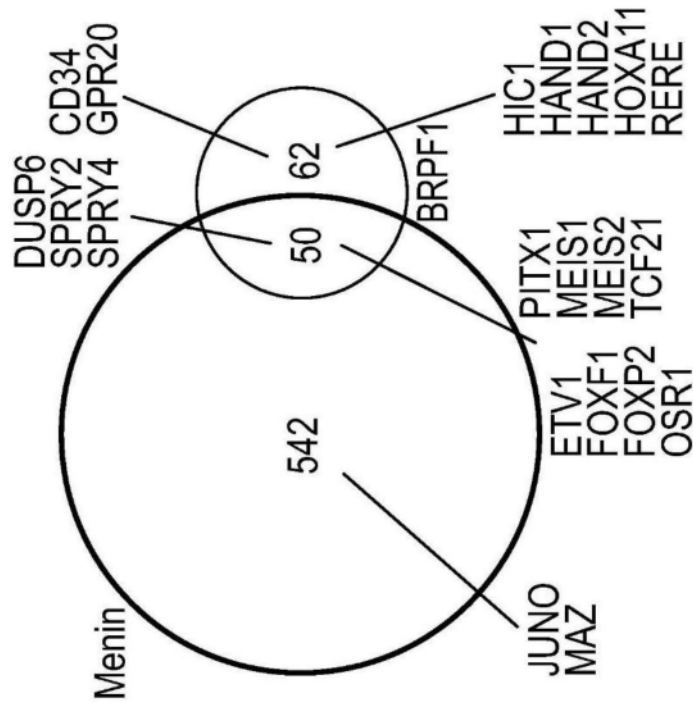


图10A

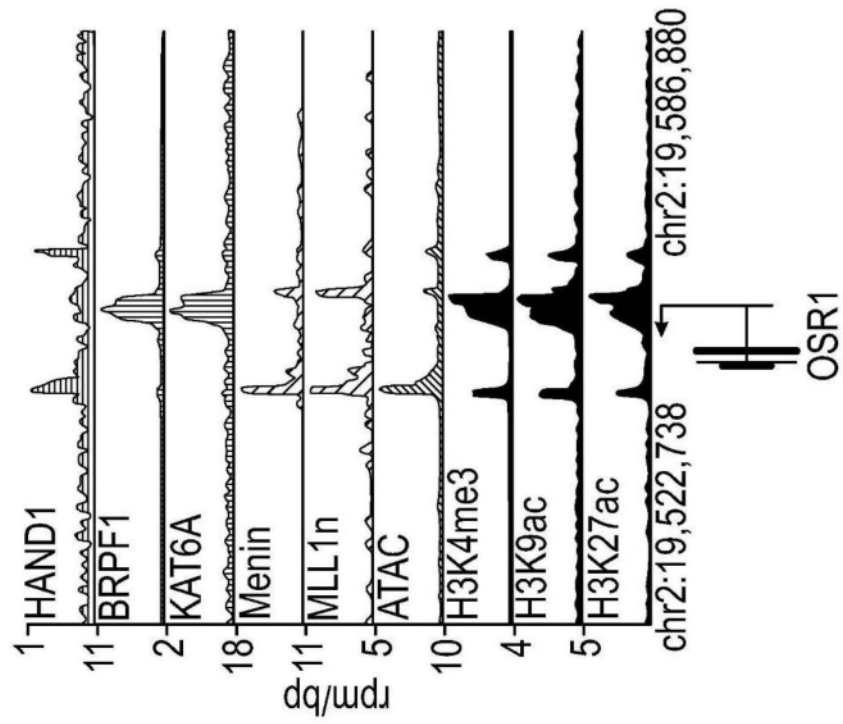


图10B

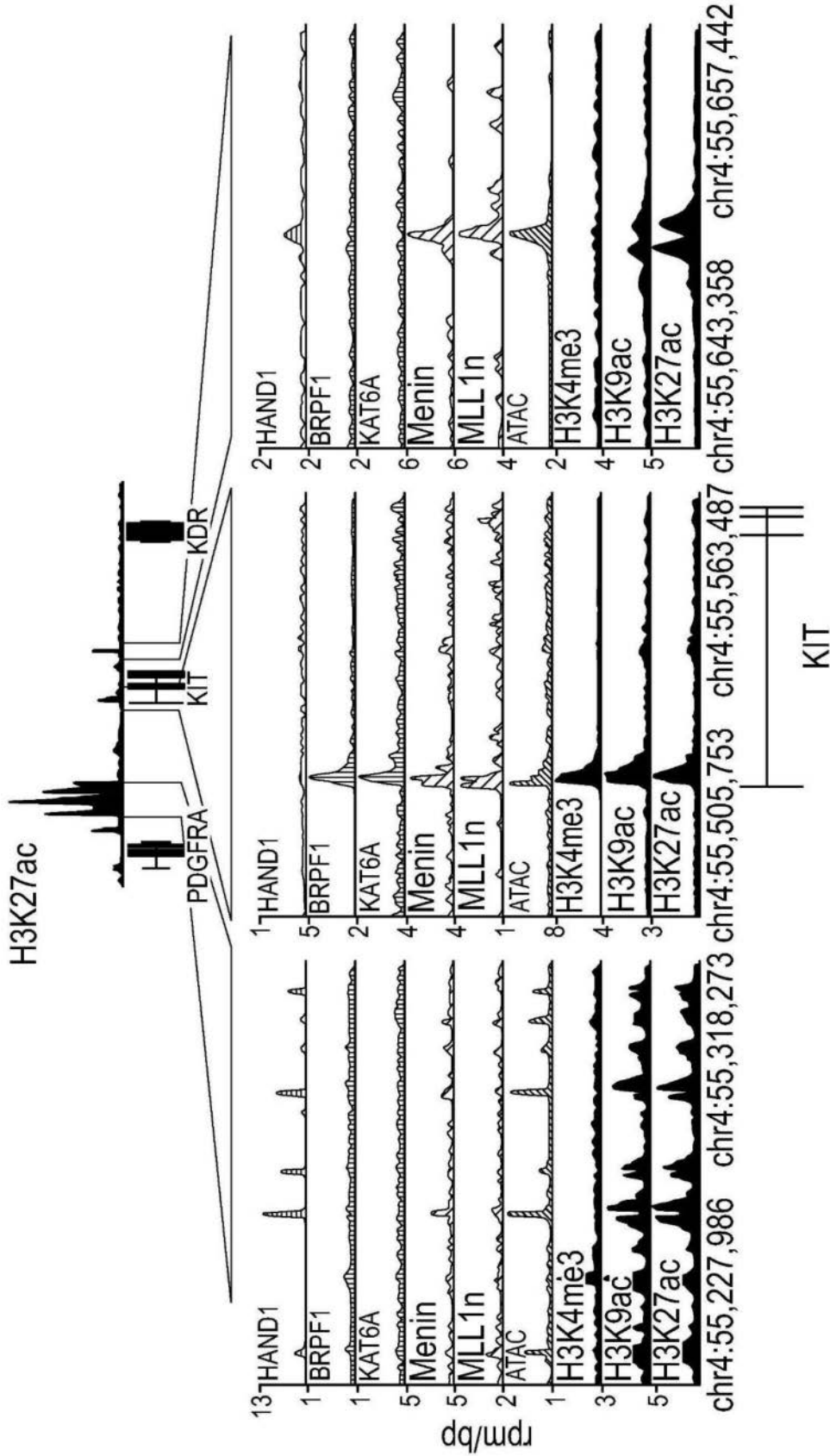


图10C

图10D

图10E

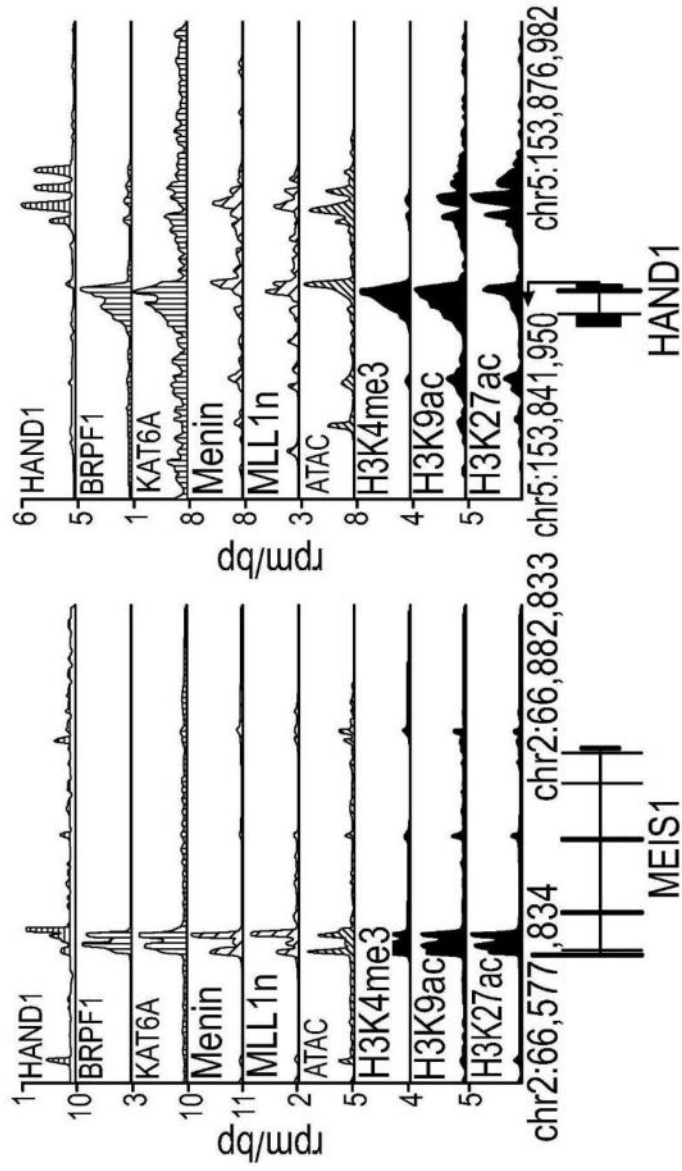


图10F

图10G

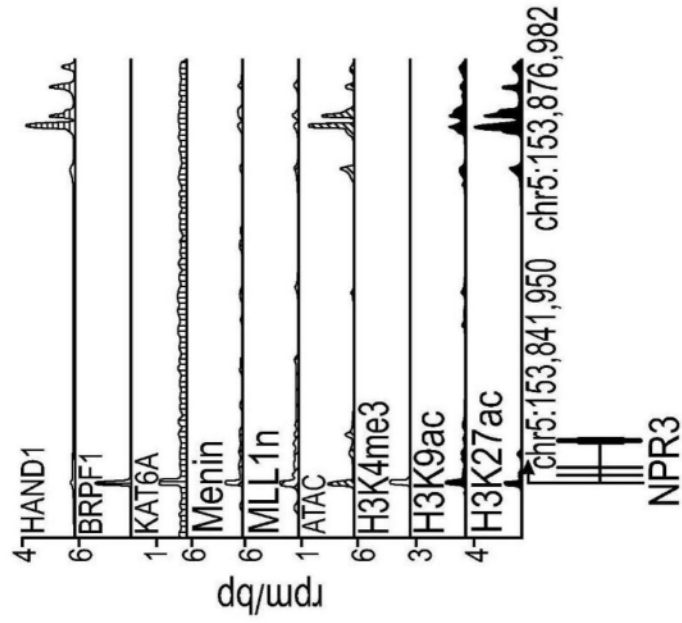


图10H

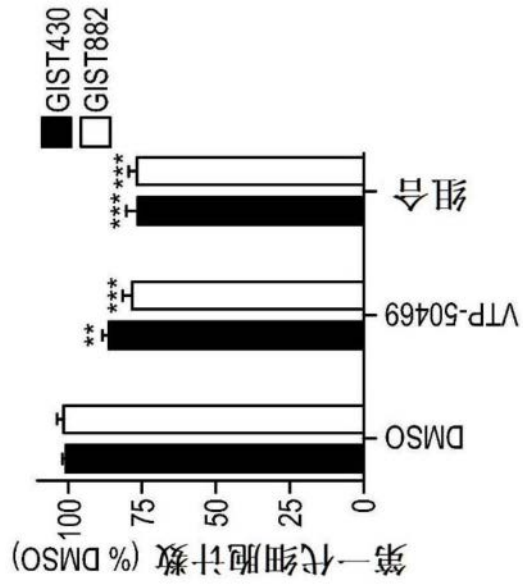


图11

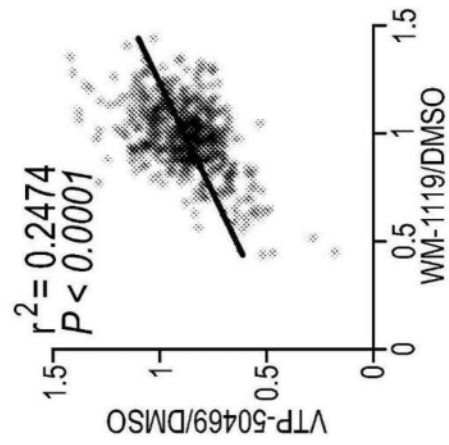


图12A

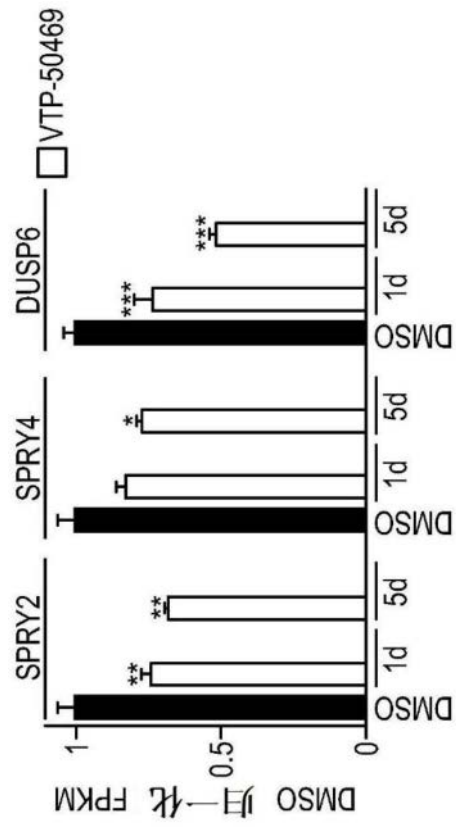


图12B

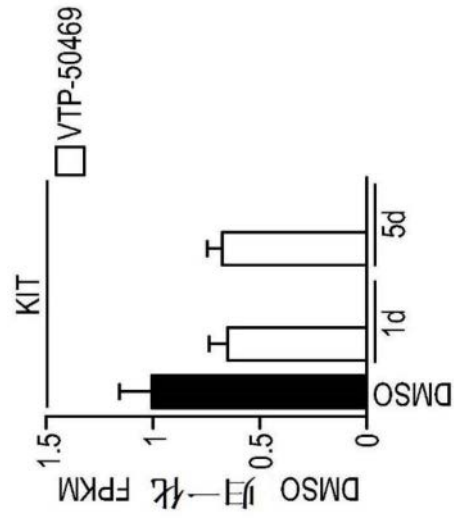


图12C

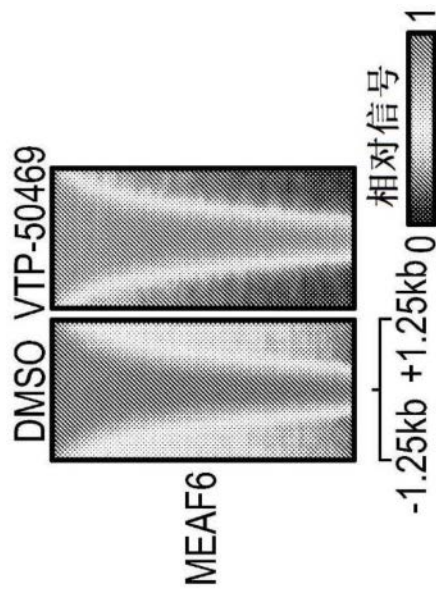


图13A

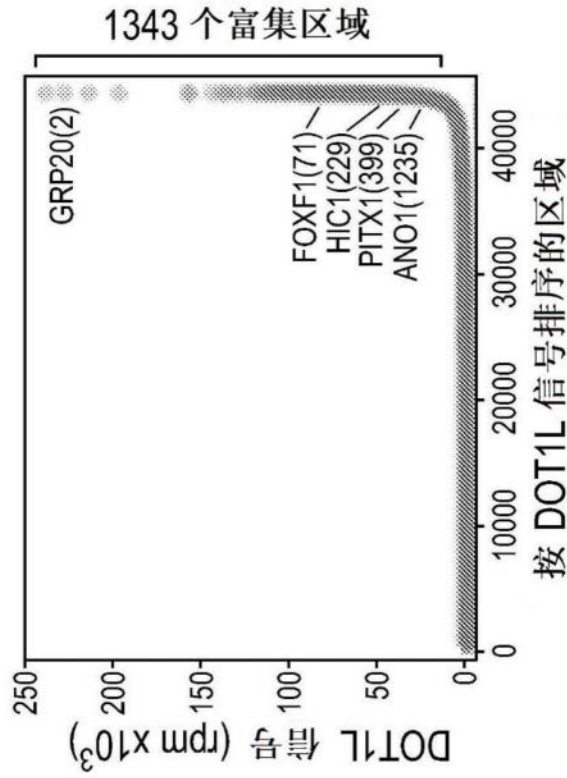


图13B

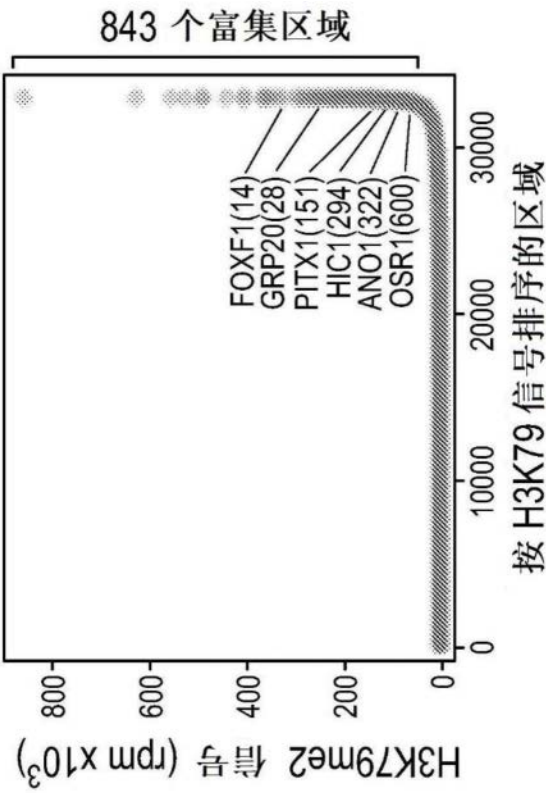


图13C

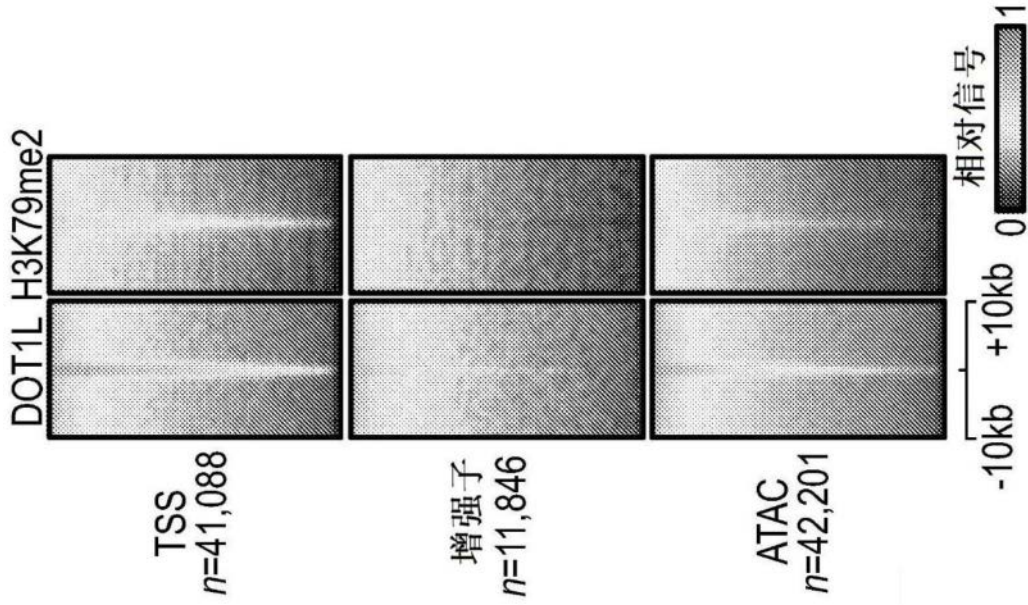


图13D

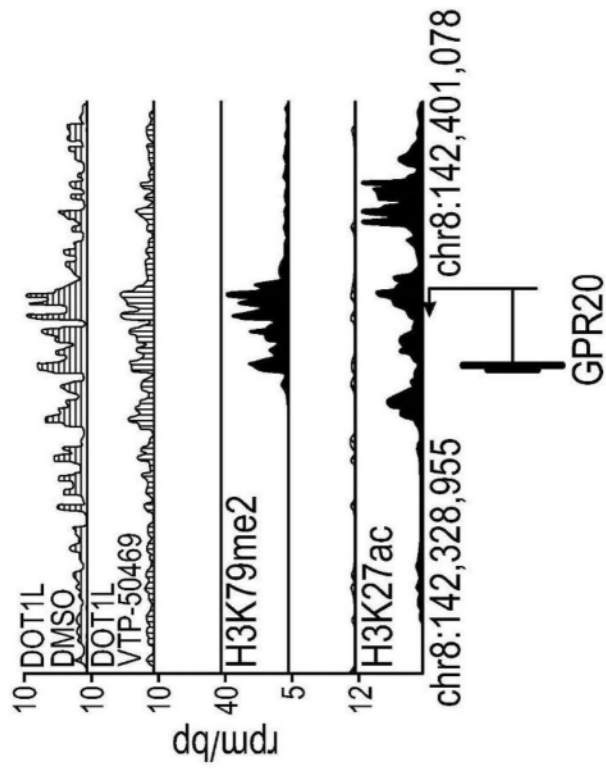


图13E

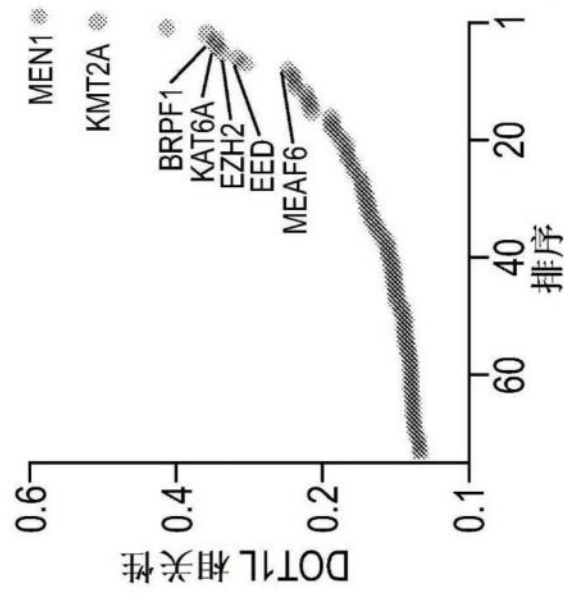


图13F

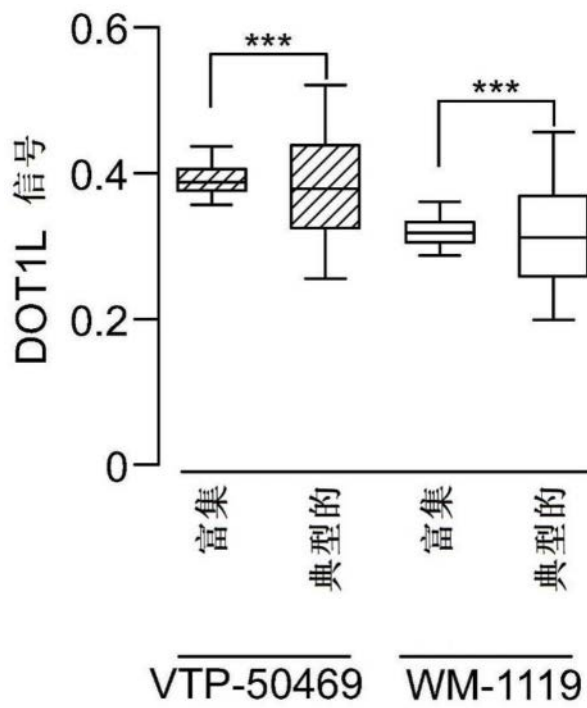


图13G

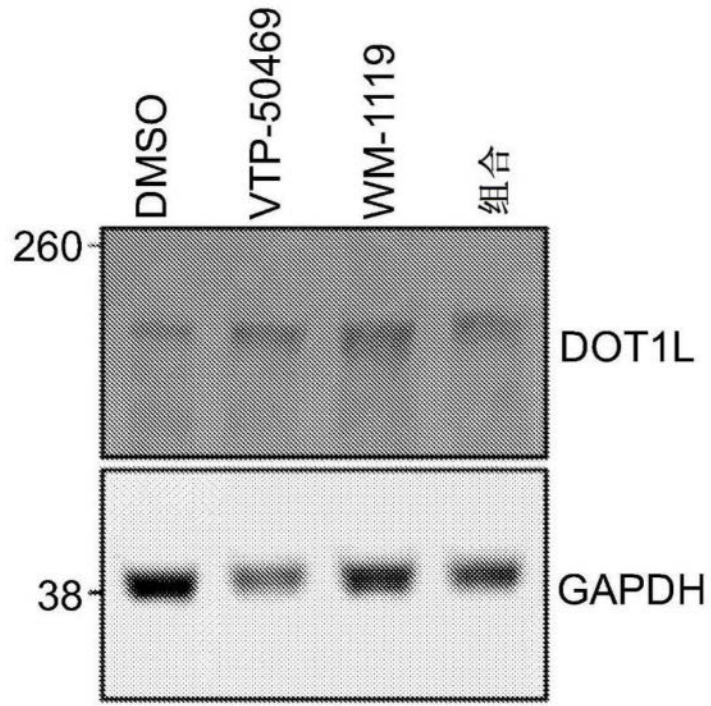


图13H

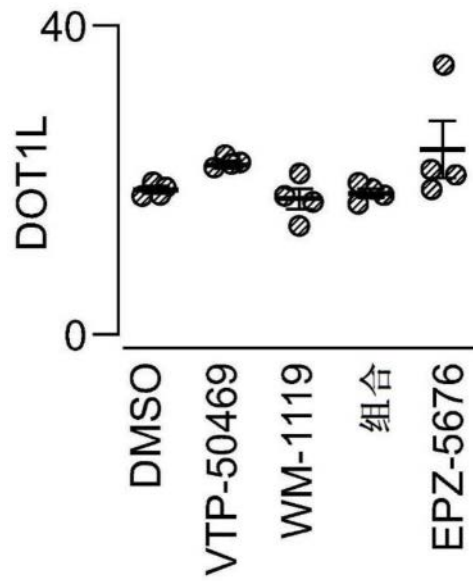


图13I

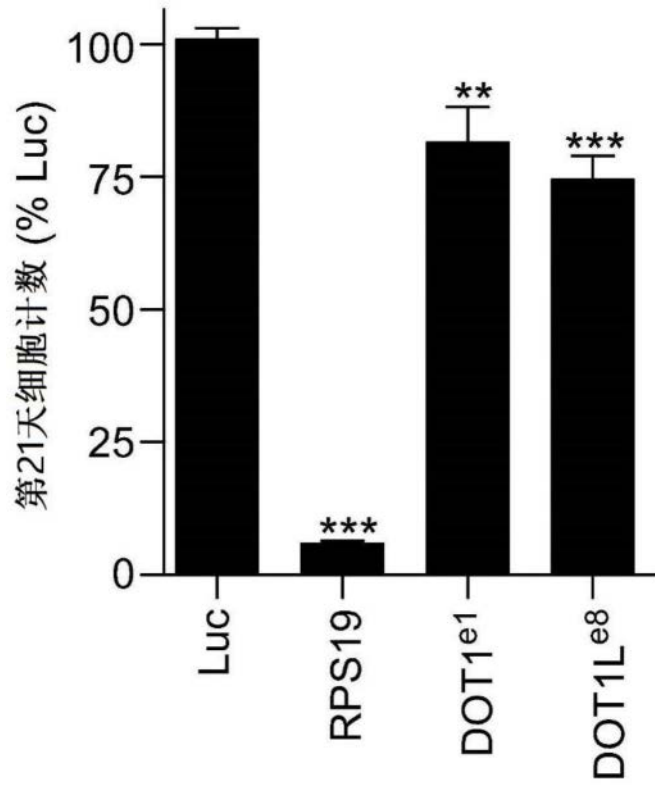


图13J

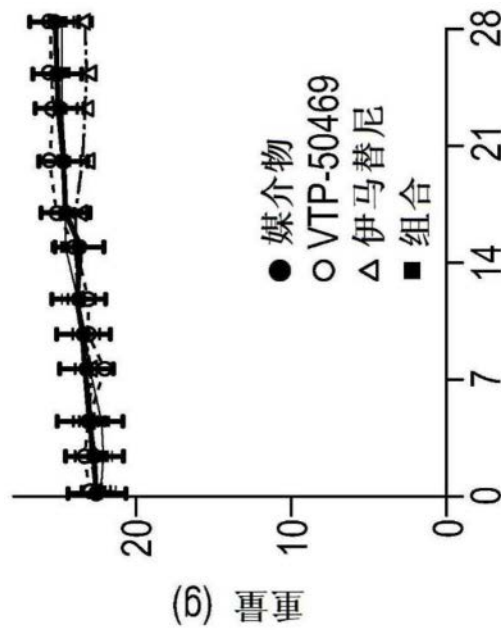


图14A

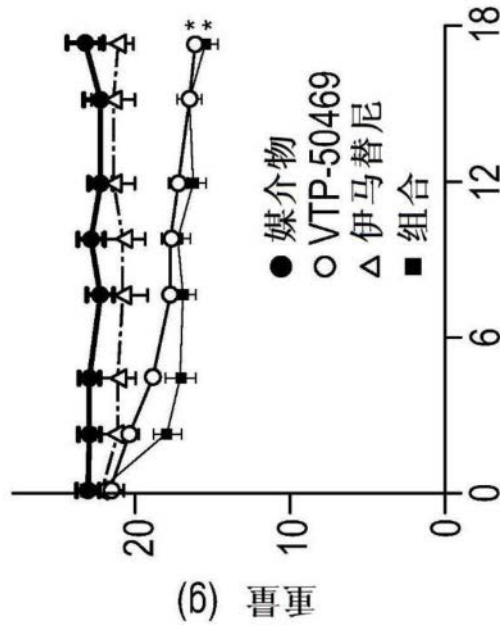


图14B

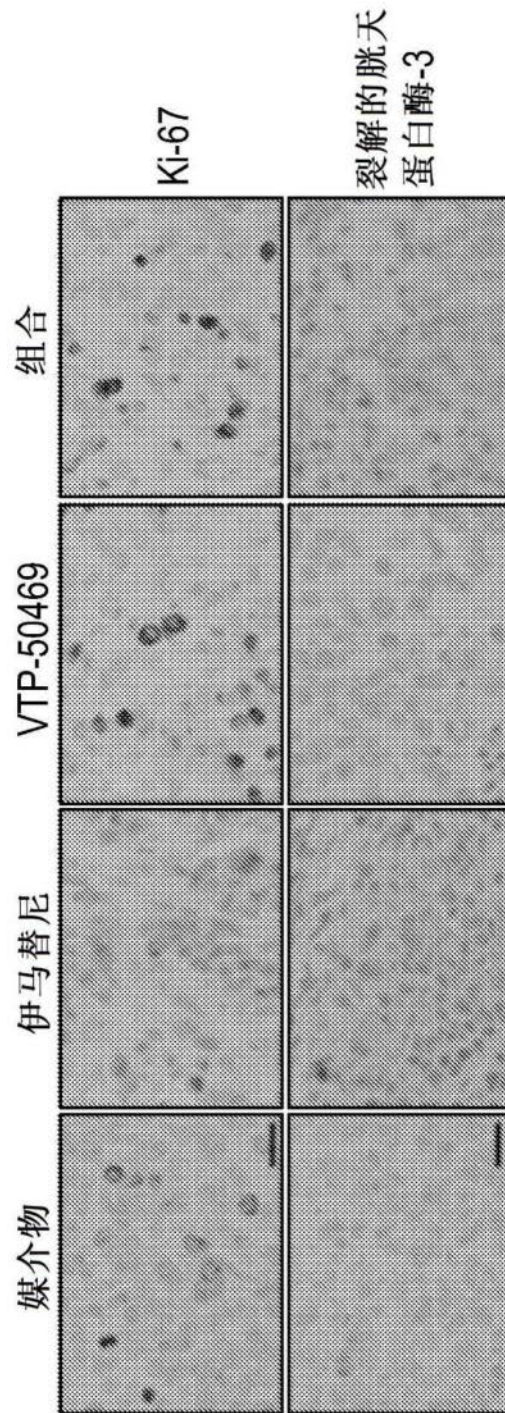


图14C

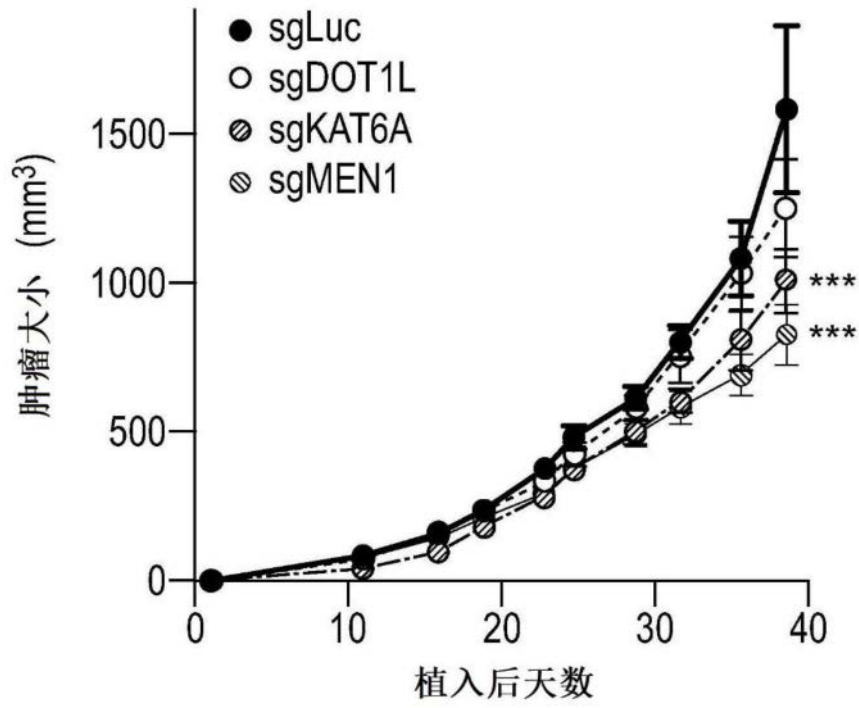


图14D

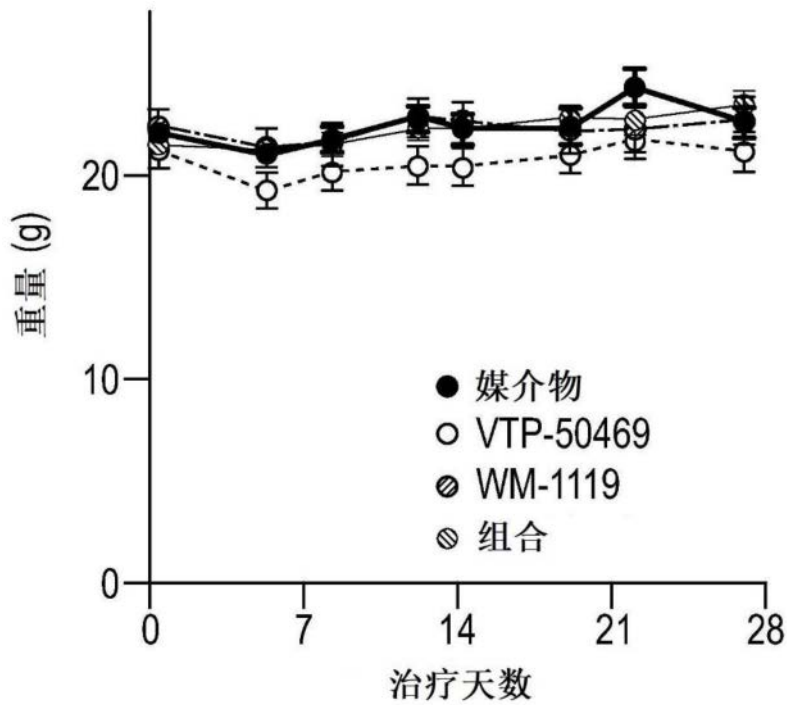


图14E

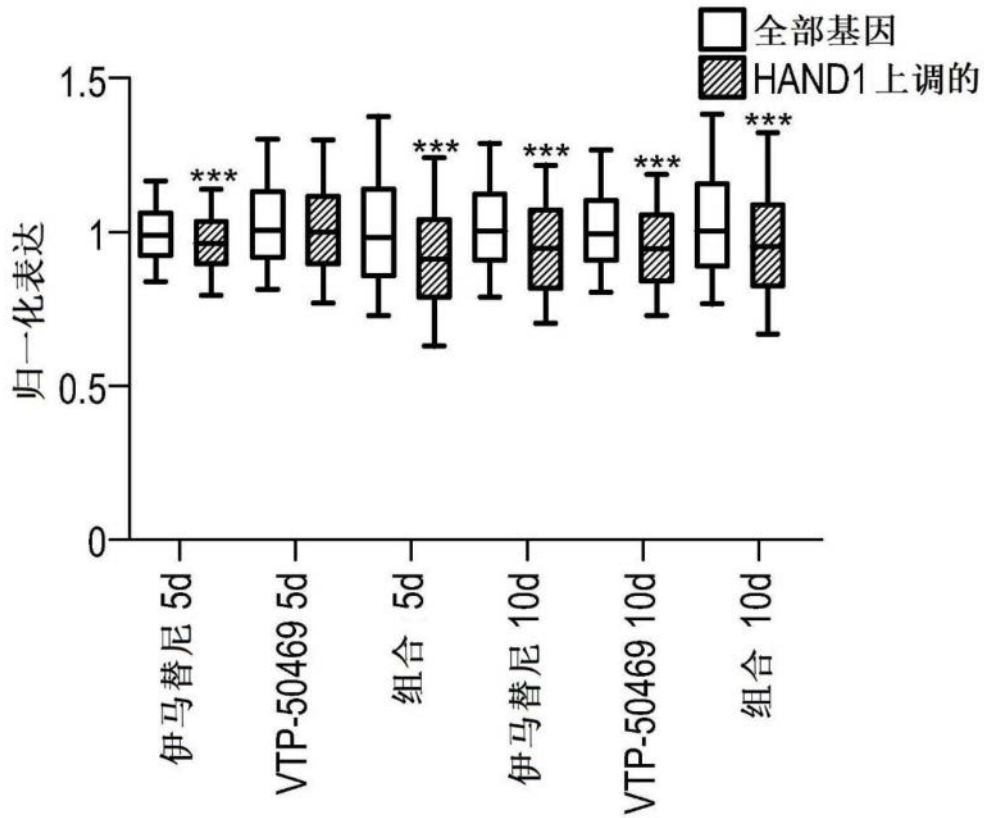


图14F

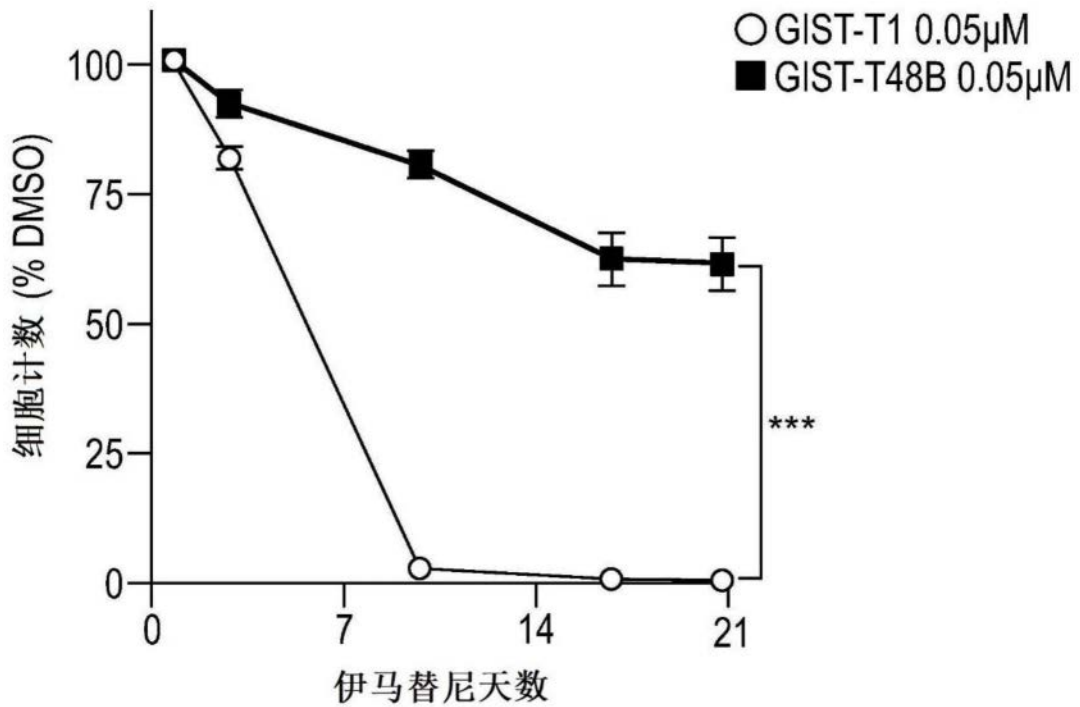


图15A

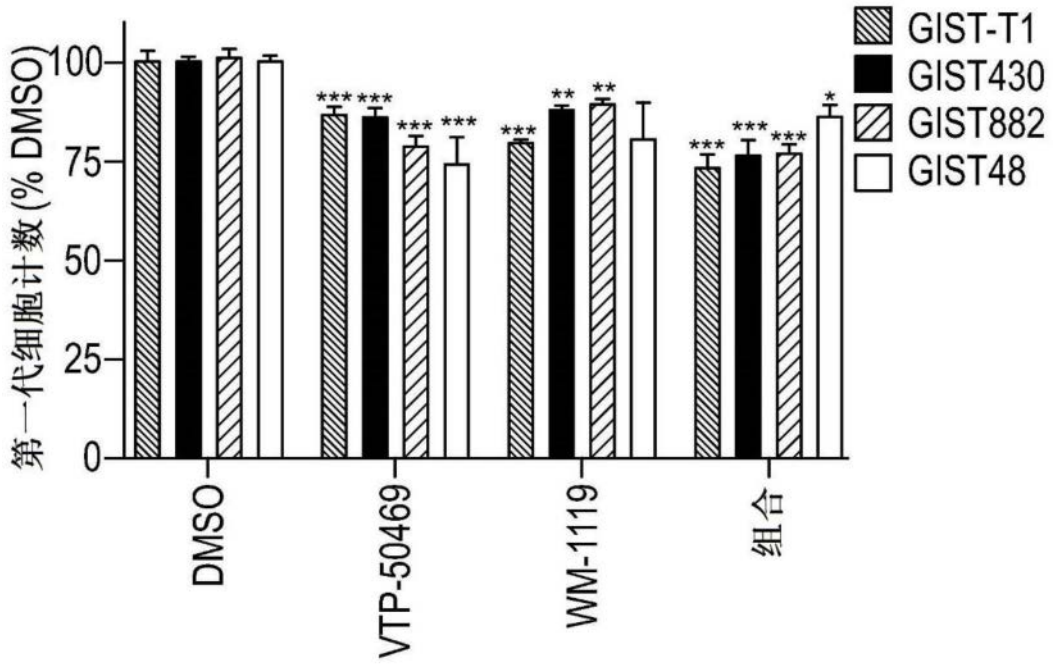


图15B

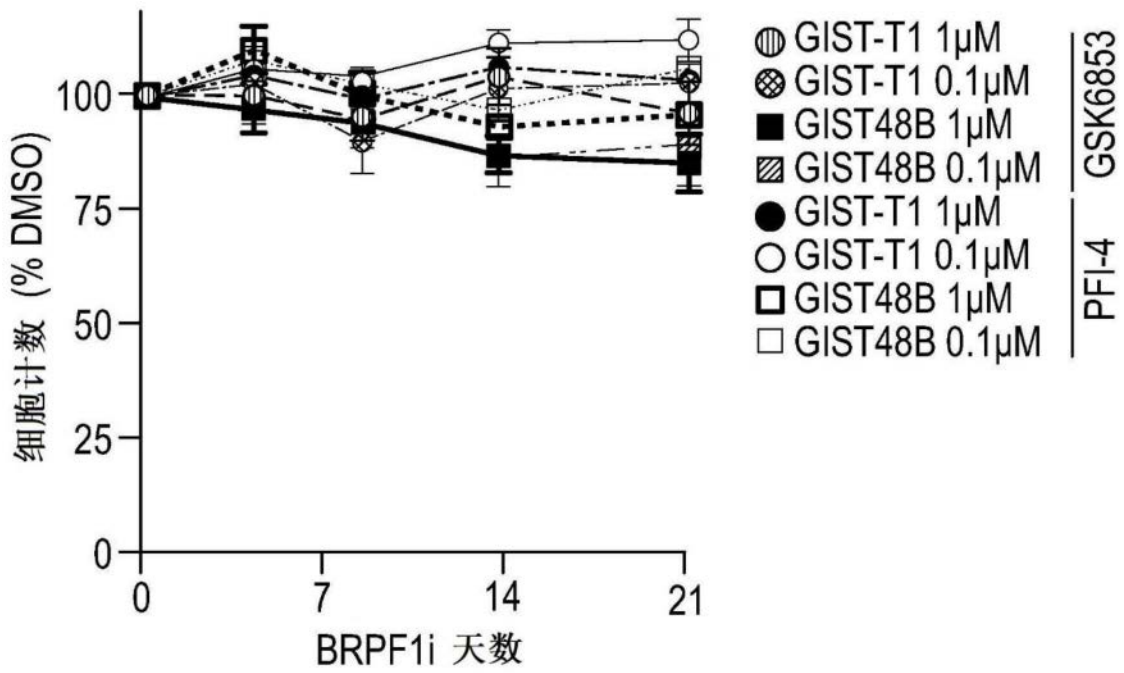


图15C

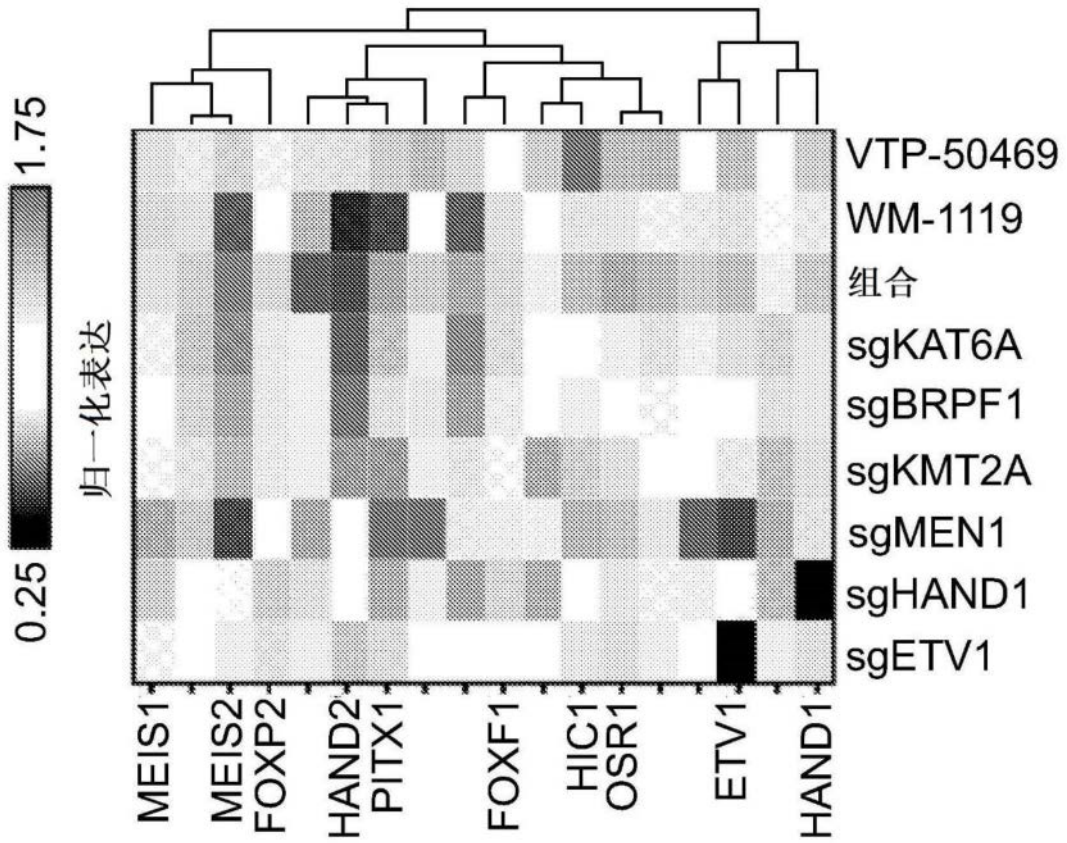


图16A

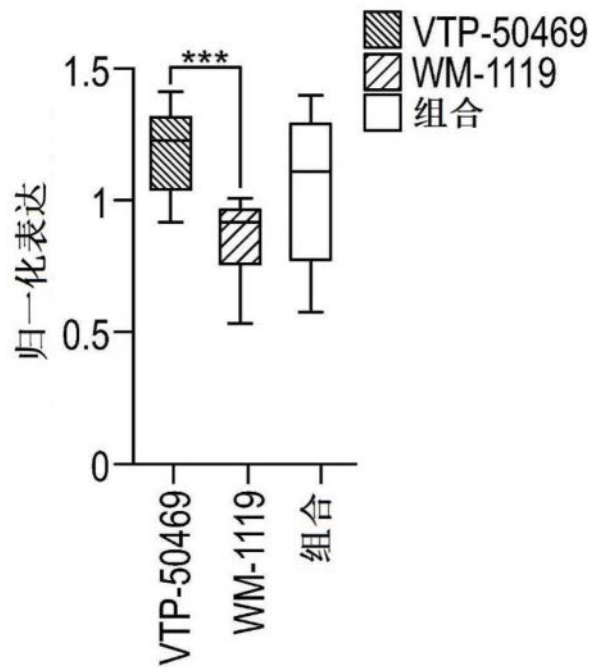


图16B

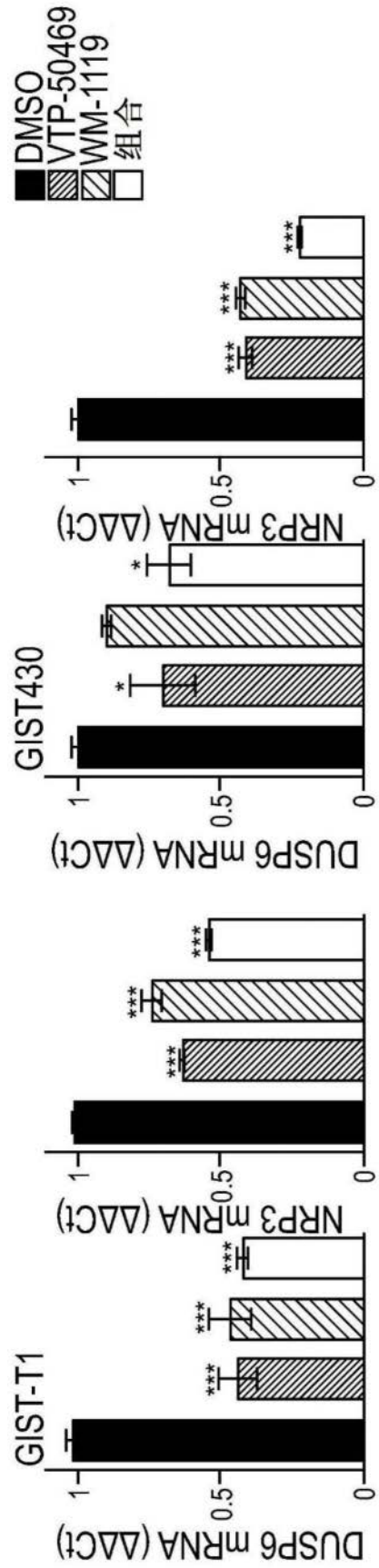


图16D

图16C

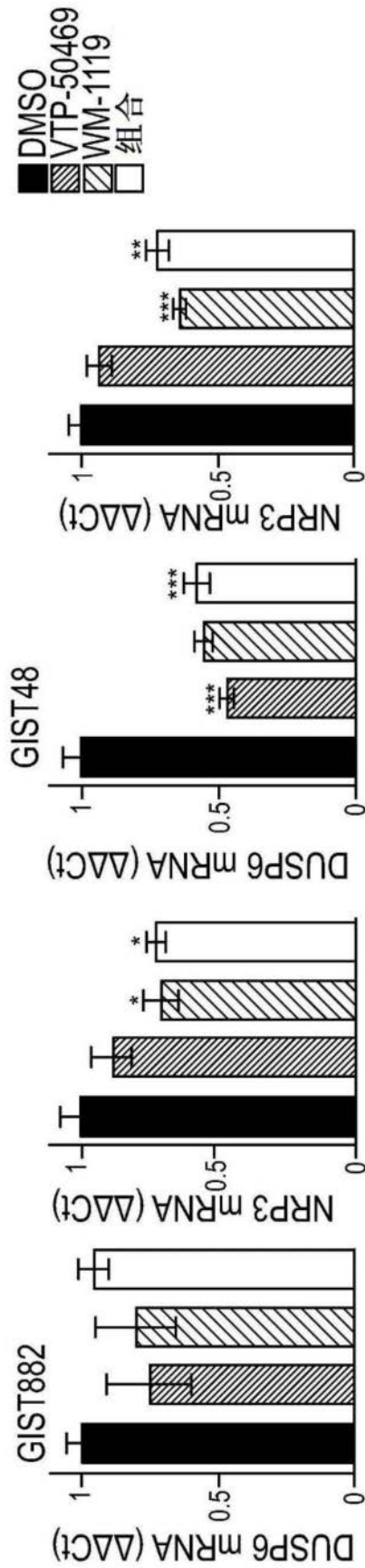


图16E

图16F

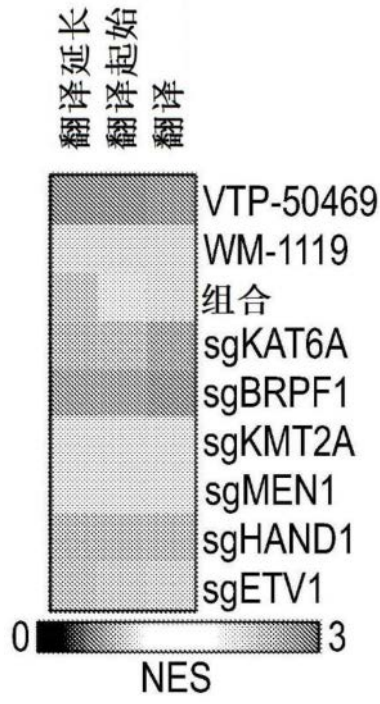


图16G

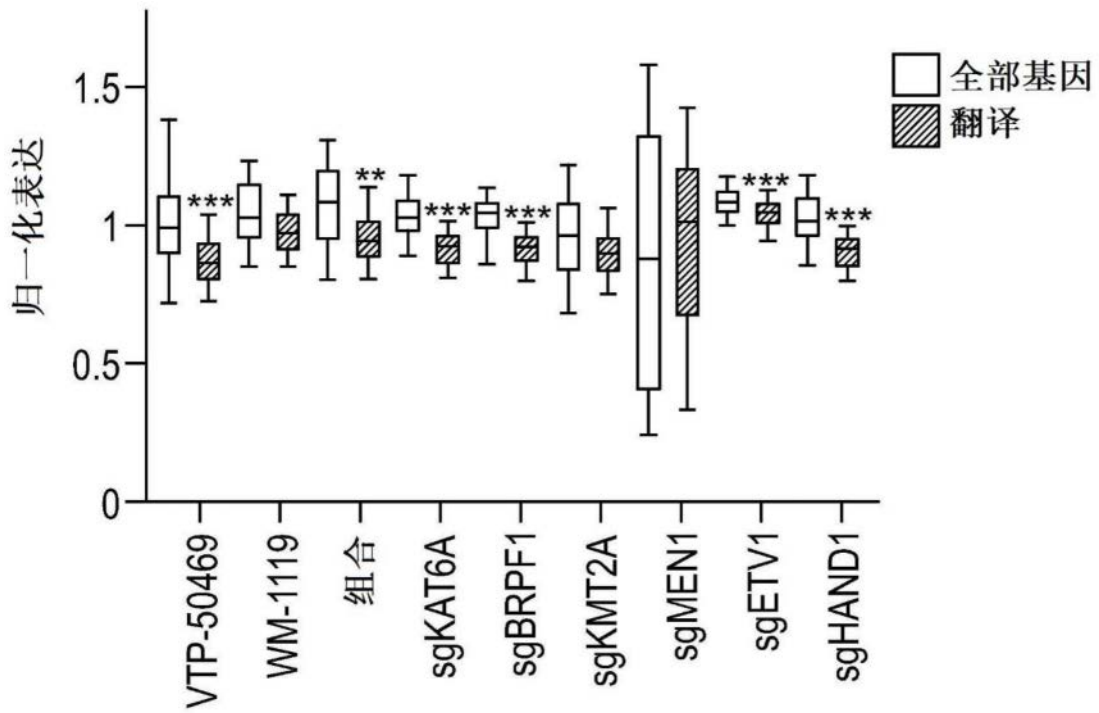


图16H