



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2021.01.12

(21) Номер заявки  
201692497

(22) Дата подачи заявки  
2015.06.19

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01)  
*G01N 33/574* (2006.01)

## (54) БИОМАРКЕРЫ ОТВЕТА НА ИНГИБИТОРЫ EZH2

(31) 62/014,594

(32) 2014.06.19

(33) US

(43) 2017.06.30

(86) PCT/US2015/036677

(87) WO 2015/196064 2015.12.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

МЕМОРИАЛ СЛОАН-КЕТТЕРИНГ  
КЭНСЕР СЕНТЕР (US)

(72) Изобретатель:

Левайн Росс, Лейфэйв Линдсей,  
Абдель-Вахаб Омар (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2012144220  
US-A1-20140011696

KEMP, CD et al. Polycomb Repressor Complex-2 Is A Novel Target For Mesothelioma Therapy. Clin Cancer Res. 01 January 2012, Vol. 18, No. 1; pages 77-90; abstract; page 79, second column, second paragraph; page 84, second column, second paragraph to page 84, third paragraphs; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0962.

CHEN, X et al. MicroRNA-124a Is Epigenetically Regulated And Acts As A Tumor Suppressor By Controlling Multiple Targets In Uveal Melanoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 01 March 2013, Vol. 54, No. 3; pages 2248-2256; abstract; page 2253, figure 5; second column, third paragraph to page 2254, first column, first paragraph; DOI: 10.1167/iovs.12-10977.

SHEN, Y et al. Expression And Significance Of Histone H3K27 Demethylases In Renal Cell Carcinoma. BMC Cancer. 12 October 2012, Vol. 12, No. 470; page 3, second column, fourth paragraph; DOI: 10.1186/1471-2407-12-470.

BACHMANN, IM et al. Ezh2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate And Aggressive Tumor Subgroups In Cutaneous Melanoma And Cancers Of The Endometrium, Prostate, And Breast. J Clin Oncol. 10 January 2006, Vol. 24, No. 2; abstract; page 269, first column, third paragraph to second column, third paragraph; pages 268-273; DOI:10.1200/JCO.2005.01.5180.

WO-A2-2013049770

WO-A1-199925373

BATTAGLIA, A. The Importance Of Multidisciplinary Approach In Early Detection Of BAP1 Tumor Predisposition Syndrome: Clinical Management And Risk Assessment. Clin Med Insights Oncol. 28 April 2014, Vol. 8; pages 37-47; DOI: 10.4137/CMO.S15239.

(57) Описываемый в настоящем документе объект изобретения относится к применению одного или более биомаркеров для оценки вероятности того, что ингибитор EZH2 проявит противоопухолевое действие у индивидуума. Он основан, по меньшей мере частично, на открытии, что потеря BAP1 приводит к возрастанию уровня экспрессии и активности EZH2. В конкретном неограничивающем варианте осуществления способ включает получение у индивидуума образца злокачественной опухоли и определение в образце уровня экспрессии биомаркера BAP1, где, если биомаркер BAP1 отсутствует или экспрессируется в злокачественной опухоли на более низком уровне по сравнению с эталонным контрольным уровнем, проводят введение терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2 для получения противоопухолевого действия.

### **Перекрестная ссылка на родственную заявку**

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США с серийным номером 62/014594, зарегистрированной 19 июня 2014 года, содержание которой полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки.

### **Информация о грантах**

Настоящее изобретение сделано с поддержкой правительства США в виде гранта № F31CA180642-01, выданного национальным институтом здравоохранения США. Правительство США обладает определенными правами на это изобретение.

### **Введение**

Настоящее изобретение относится к биомаркерам, которые можно использовать для оценки вероятности проявления ингибитором EZH2 противоопухолевого действия у индивидуума. По существу, эти биомаркеры можно использовать в способах лечения пациентов со злокачественными опухолями.

### **Уровень техники, предшествующий изобретению**

Ассоциированный с BRCA1 белок 1 (BAP1) представляет собой карбоксиконцевую гидролазу убиквитина, которая вовлечена в удаление убиквитина из белков. BAP1, связывается с белком чувствительности к раку молочной железы типа 1 (BRCA1) через домен RING цинковых пальцев BRCA1 и может действовать в качестве опухолевого супрессора. BAP1 вовлечен в регуляцию транскрипции, регуляцию клеточного цикла и роста, ответ на повреждение ДНК и динамики хроматина. Исследования по секвенированию генома показали, что мутации BAP1 в зародышевой линии могут быть ассоциированы с синдромом предрасположенности к опухолям (TPDS), который включает повышенный риск злокачественных опухолей, включая злокачественную мезотелиому, увеальную меланому и кожную меланому. Дополнительные исследования выявили мутации BAP1 в зародышевой линии, ассоциированные с другими злокачественными опухолями, включая аденокарциному легких и почечноклеточную карциному. Для некоторых пациентов с мутациями BAP1 прогноз является в значительной степени плохим с отсутствием установленного эффективного лечения, так как многие пациенты со злокачественной мезотелиомой умирают вследствие их заболевания. Мутации BAP1 у пациентов с почечноклеточной карциномой определяют неблагоприятный прогноз, а мутации BAP1 у пациентов с увеальной меланомой определяют группу высокого риска и метастазирование.

Энхансер гомолога zeste 2 (EZH2) является представителем семейства группы поликомб (PcG), представители которого вовлечены в регуляцию транскрипционного состояния генов посредством метилирования гистоновых белков. Разработаны лекарственные средства, которые специфически направлены к EZH2, и действие таких лекарственных средств у пациентов с рядом опухолей являлось активной областью исследований. В настоящее время ингибиторы EZH2 проходят клиническое тестирование у пациентов, страдающих лимфомой с активирующими EZH2 мутациями. Таким образом, в данной области существует необходимость в средствах лечения пациентов с мутациями BAP1 и биомаркерах, которые пригодны для определения того, когда для лечения злокачественной опухоли следует применять ингибитор EZH2.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится к использованию одного или более биомаркеров для оценки вероятности того, что ингибитор EZH2 проявит противоопухолевое действие у индивидуума. Оно, по меньшей мере частично, основано на открытии, что потеря активности BAP1 приводит к повышению уровня экспрессии и активности EZH2.

Таким образом, в неограничивающих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам и наборам для анализа для определения присутствия в образце, полученном у пациента, одного или более биомаркеров, например биомаркеров BAP1, и к способам использования таких определений для выбора схемы лечения пациента со злокачественной опухолью, и к способам лечения пациентов со злокачественными опухолями.

Настоящее изобретение относится к способу определения возможности проявления ингибитором EZH2 противоопухолевого действия при злокачественной опухоли. В неограничивающем варианте осуществления способ включает определение экспрессии биомаркера BAP1 в одной или более клетках злокачественной опухоли, где, если биомаркер BAP1 в злокачественной опухоли отсутствует или экспрессирован на низких уровнях по сравнению с эталонным контрольным уровнем, для обеспечения противоопухолевого действия вводят терапевтически эффективное количество ингибитора EZH2. В определенных неограничивающих вариантах осуществления экспрессию биомаркера BAP1 можно определять посредством иммунофлуоресценции, вестерн-блоттинга, гибридизации *in situ* или полимеразной цепной реакции. В определенных вариантах осуществления способ может дополнительно включать определение в образце уровня экспрессии EZH2, SUZ12 и/или L3MBTL2.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения индивидуума со злокачественной опухолью. В определенных неограничивающих вариантах осуществления способ включает получение у индивидуума образца злокачественной опухоли и определение в образце уровня экспрессии биомаркера BAP1 и/или уровня экспрессии EZH2 и/или SUZ12, где, если биомаркер BAP1 отсутствует или экспрессирован на более низком уровне, чем эталонный контрольный уровень BAP1, и/или если экс-

прессия EZH2 и/или SUZ12 увеличена по сравнению с эталонными контрольными уровнями EZH2 и/или SUZ12, начинают лечение индивидуума терапевтически эффективным количеством ингибитора EZH2.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу определения вероятности проявления противоопухолевого действия ингибитором EZH2 в злокачественной опухоли. В неограничивающем варианте осуществления способ включает получение у индивидуума образца злокачественной опухоли и определение в образце уровня экспрессии биомаркера VAP1, где, если биомаркер VAP1 в злокачественной опухоли отсутствует или экспрессируется на более низком уровне по сравнению с эталонным контрольным уровнем, ингибитор EZH2 с большей вероятностью окажет противоопухолевое действие на злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления биомаркер VAP1 представляет собой биомаркер в виде белка VAP1. В определенных вариантах осуществления биомаркер VAP1 представляет собой биомаркер в виде нуклеиновой кислоты VAP1.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу прогноза чувствительности злокачественной опухоли пациента к ингибитору EZH2. В неограничивающем варианте осуществления способ включает получение у пациента образца злокачественной опухоли и определение уровня экспрессии биомаркера белка VAP1 в клетках, составляющих образец, где, если биомаркер VAP1 отсутствует или обладает сниженным уровнем экспрессии по сравнению с эталонным контрольным уровнем, делают прогноз, что злокачественная опухоль чувствительна к ингибитору EZH2.

В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль может представлять собой злокачественную мезотелиому, увеальную меланому, почечноклеточную карциному, кожную меланому, рак легких, рак молочной железы, рак яичника, не являющийся меланомой рак кожи, менингиому, холангиокарциному, лейомиосаркому, нейроэндокринные опухоли, рак поджелудочной железы, параганглиому, злокачественные фиброзную гистиоцитому, меланоцитарные атипичные интрадермальные опухоли с мутантным VAP1 (MBAIT), острый миелолейкоз, миелодиспластические синдромы или рак мочевого пузыря.

Настоящее изобретение относится к набору определения вероятности проявления ингибитором EZH2 противоопухолевого действия при злокачественной опухоли. В неограничивающем варианте осуществления набор содержит средства определения биомаркера VAP1. В определенных вариантах осуществления средства детекции биомаркера VAP1 включают один или более комплектов праймеров, зондов, панелей/микропанелей, специфичные к биомаркерам антитела и/или гранулы. В определенных вариантах осуществления средства детекции биомаркера VAP1 включают одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов для детекции биомаркера VAP1. В определенных вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или более праймеров, зондов, панели/микропанели, специфичные к биомаркерам антитела и/или гранулы для детекции экспрессии EZH2 и/или SUZ12.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - повышенная экспрессия гистона H3K27me3 при снижении VAP1 *in vitro*.

Фиг. 2 - EZH2 сверхэкспрессирован в клетках мезотелиомы с мутантным VAP1.

Фиг. 3 - повышение/снижение экспрессии VAP1 приводило к измененной экспрессии субъединицы PRC2.

Фиг. 4 - ингибирование EZH2 уменьшало объем опухоли у ксенотрансплантатов мезотелиомы.

Фиг. 5a-1 - характеристика условной делеции VAP1 в гемопоэтических клетках.

(a) Средняя экспрессия генов VAP1, ASXL1, ASXL2 и ASXL3 при AML (острый миелолейкоз) по TCGA и (b) у пациентов с мезотелиомой, выражаемая в виде математического среднего со стандартной ошибкой количества нормализованных прочтений. (c) Экспрессия VAP1 при кПЦР-ПВ в очищенных популяциях гемопоэтических клеток мышей C57/B6H. LT-HSC, долгосрочные гемопоэтические стволовые клетки (HSC), (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>); ST-HSC, краткосрочные HSC (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>); MPP, плюрипотентный предшественник, (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>); LSK, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>; MP, миелоидные предшественники (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>), GMP, гранулоцитарно-макрофагальные предшественники (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>Fcy<sup>+</sup>); CMP, общие миелоидные предшественники (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>Fcy<sup>lo</sup>); MEP; макрофагально-эритроидные предшественники (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>Fcy<sup>-</sup>), MONO; моноциты (Mac1<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup>), PMN; (полиморфноядерный нейтрофил, Mac1<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>), Т-клетки, CD3<sup>+</sup> и В-клетки, B220<sup>+</sup>. (d) Схема направленного воздействия на VAP1 в эмбриональных стволовых клетках мышей, полученная из консорциума EUCOMM. После получения химер мышей скрещивали с трансгенными мышами FLPE для вырезания кассеты с преждевременным стоп-сигналом. Затем мышей скрещивали с трансгенными по Mx1-Cre мышами. Системы генотипирования, подтверждающие генотип и вырезание через 4 недели после обработки поли-И-поли-С (pIpC). (e) Подсчет лейкоцитов периферической крови у контрольных мышей и мышей с КО VAP1 после обработки (pIpC) с индукцией вырезания и (f) подсчет миелоидных клеток (Mac1<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>) посредством проточной цитометрии. (g) Гематокрит в процентах в периферической крови и (h) подсчет предшественников эритроцитов (CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup>) посредством проточной цитометрии в костном мозге контрольных мышей и мышей с КО VAP1 после индуцированного pIpC вырезания. (i) Относительные частоты популяций миелоидных предшественников в костном мозге контрольных мышей и мышей с КО VAP1 (Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>). Окна для

клеток получали на живых линейно-негативных популяциях. (j) Относительный количественный анализ популяций предшественников миелоидных клеток костного мозга (GMP, CMP, MEP) у контрольных мышей и мышей с КО VAP1. (k) Диаграммы проточной цитометрии для контрольных животных и животных с анализируемым костным мозгом из примера для демонстрации размножения предшественников и GMP. (l) Подсчет проходящих цикл клеток-предшественников (краситель Ki67/DAPI) посредством проточной цитометрии; для всех экспериментов  $n=5$  для мышей CON (контрольных) и  $n=8$  для мышей с КО VAP1.

Фиг. 6а-л. Делеция VAP1 приводит к активации отличного по сравнению с потерей *Asxl1* метаболического пути и к увеличению H3K27me3. (a) Изображения селезенки через три недели после условной делеции VAP1 и подтверждение делеции VAP1 в костном мозге контрольных мышей (однопометные мыши VAP1f/f, CON) и мышей с нокаутом VAP1 (мыши VAP1f/f с Mx1-Cre, КО VAP1) посредством вестерн-блоттинга. (b) Диаграммы Венна со сравнением экспрессии генов миелоидных предшественников у мышей с КО VAP1 и *Asxl1*,  $p<0,05$ ; сравнения включают перекрытие генов и гены, изменяющиеся в одном направлении. (c) Количественная кПЦР с детекцией в реальном времени (кПЦР-РВ) кластера *HoxA* в отсортированных гранулоцитарно-макрофагальные предшественниках (GMP; Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>Fcy<sup>+</sup>) у мышей с КО VAP1 и у контрольных мышей ( $n=3$ ). (d) Масс-спектрометрический анализ очищенных гистонов из обогащенных c-Kit<sup>+</sup> клеток костного мозга мышей с КО VAP1 и контрольных мышей, нормализованных по общему количеству гистона H3. (e) Вестерн-блоттинг H3K27me3 и общего количества H3 для очищенных гистонов из костного мозга мышей с КО VAP1 и контрольных мышей. (f) Количество широких доменов H3K27me3, которые определяют в образцах CON и КО VAP1. Диаграмма Венна, демонстрирующая уникальный и перекрывающийся широкий домен. (g) Диаграмма размаха, демонстрирующая нормализованные прочтения H3K27me3 в обогащенных c-Kit клетках костного мозга ( $n=2$ ). (h) Построение плотности широких доменов как функции от расстояния от домена H3K27me3, который определен в образцах CON и КО VAP1. (i) GSEA, демонстрирующий корреляции экспрессии генов с ингибированными генами. (j) Локальная диаграмма ChIP-seq H3K27me3 в локусе *HOXA*. (k) Определение пиков в ChIP-Seq H3K27me3 в отсортированных клетках GMP, представлено в виде вулканической диаграммы, представленной отношением (КО/CON) в зависимости от значения  $p$ . (l) Значимость профилей экспрессии указанных генов для генов, связанных с H3K27me3, и RNA-Seq. Статистику рассчитывали с использованием  $t$ -критерия Стьюдента; \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,005$ ; приведены значения  $\pm$ SEM.

Фиг. 7а-с. Потери VAP1 и *Asxl1* приводят к противоположно направленным изменениям экспрессии генов. (a) Данные RNA-Seq дифференциально экспрессируемых генов гранулоцитарно-макрофагальных предшественников контрольных мышей в сравнении с мышами с КО VAP1 (GMPs; Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>Fcy<sup>+</sup>); клетки, анализируемые с использованием DESeq2 (порог значения  $p<0,05$ ). На тепловой карте приведены гены с повышенной (красный) и сниженной (синий) экспрессией. (b) Количество позитивно и негативно обогащенных наборов генов после анализа GSEA КО VAP1 и КО *Asxl1* с  $FDR<0,25$  (сверху). Диаграмма Венна, на которой приведены наборы генов, разнонаправленно обогащенных в миелоидных предшественниках при КО VAP1 и КО *Asxl1* по данным RNA-Seq (снизу). (c) GSEA разнонаправленно обогащенных и статистически значимых наборов генов кластера *HoxA* в клетках-предшественниках с КО VAP1 и КО *Asxl1*. Значения  $p$  и значения FDR указаны.

Фиг. 8а-с. Делеция VAP1 увеличивает активность PRC2. (a) ELISA H3K27me3, нормализованного на общее количество H3, для гистонов, очищенных из клеток костного мозга мышей КО VAP1 и контрольных мышей. (b) Процент широких доменов H3K27me3, выявляемых в отношении участка старта транскрипции гена (промотор, экзон, интрон, расположенная ниже последовательность ( $\pm 2$  т.п.н.), дистальная последовательность (2-5 т.п.н.) и межгенная последовательность ( $>50$  т.п.н.)). (c) Опубликованное RNA-Seq отсортированных популяций костного мозга (Lara-Astiaso et al., 2014) анализировали и сравнивали с генами, которые дифференциально ингибированы и маркированы H3K27me3 после потери VAP1, анализировали с использованием GSEA. Гены, которые ингибированы и маркированы H3K27me3 только коррелировали с популяциями предшественников гемопоэза, полагая, что они могут являться подходящими популяциями-мишенями. Эти данные объясняют размножение предшественников, наблюдаемое в модели на мышах с КО VAP1.

Фиг. 9а-с. Изменения VAP1 *in vitro* приводят к изменениям H3K27me3. (a) Вестерн-блоттинг клеток SET2, трансдуцированных двумя независимыми кшПНК VAP1, выявляющими уровни H3K27me3 в очищенных гистонах и нокдаун VAP1 из экстракта цельных клеток. (b) Анализ метилцеллюлозы с использованием клеток костного мозга контролей и КО VAP1. Конструкции кДНК VAP1 обратно вводили в контрольные клетки и клетки с делецией VAP1. Проводили анализы ELISA гистонов на H3K27me3. Количественная кПЦР для оценки экспрессии конструкции VAP1. (c) Обратное введение VAP1 и мутанта деубиквитиназы VAP1 S91A в клетки мышей с недостаточностью VAP1. Проводили вестерн-блоттинг гистонов на H3K27me3 и общий H3. Количественная кПЦР для демонстрации уровней экспрессии конструкций.

Фиг. 10а-d. Характеристика мышей с составным КО VAP1/Ezh2. (a) Патология костного мозга для различных генотипов VAP1/Ezh2. (b) Окрашивание на эритроидные клетки при проточной цитометрии

для указанных генотипов (CD71, Ter119) и количественный анализ. (I-IV) являются указателями стадий эритроидной дифференцировки, где I являются наиболее незрелыми, а IV являются наиболее зрелыми. Количественное определение этих фенотипов справа от типичных диаграмм проточной цитометрии. (c) Размеры селезенки для указанных генотипов через 4 недели после рIpC. (d) Количества лейкоцитов для указанных генотипов через 4 недели после рIpC.

Фиг. 11а-к. Пролиферация, индуцируемая делецией VAP1, снижается при потере Ezh2. (a) Вестерн-блоттинг уровней H3K27me3 в гистонах, очищенных из костного мозга мышей с KO VAP1, KO Ezh2, KO VAP1/Ezh2 и контрольных мышей. (b) Характерные изображения селезенки и (c) подсчет массы селезенки для указанных генотипов мышей, 3 недели после рIpC. (d) Количества периферических лейкоцитов и (e) гематокрит в процентах, как количественно определяют посредством Hemavet. (f) Подсчет посредством проточной цитометрии миелоидных предшественников (Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Sea1) и (g) зрелых миелоидных клеток (Mac1<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>). (h) Анализы клеточного цикла у миелоидных предшественников с использованием Ki67 и красителя DAPI (n=3/группа). (i) Вестерн-блоттинг на уровне H3K27me3 у мышей (n=5/группа), обработанных EPZ011989 дважды в сутки при 500 мг/кг в течение 16 суток. (j) Массы селезенки и (k) количества лейкоцитов после обработки. Если не указано иначе, n=5/CON, n=5/KO Ezh2, n=8/KO VAP1 и n=11/KO VAP1/Ezh2, статистику рассчитывали с использованием t-критерия Стьюдента; \*p<0,05, \*\*p<0,005; приведены значения ±SEM.

Фиг. 12а-с. Анализы гистонов у животных с KO VAP1. (a) Транскрипцию EZH2, как оценивали посредством кПЦР в клетках контроля и KO VAP1. Клетки подвергали транедукции пустым вектором или конструкцией со сверхэкспрессией VAP1. (b) Масс-спектрометрия гистонов для обогащенных c-Kit клеток костного мозга у контрольных животных и животных с KO VAP1, n=2. (c) эксперименты ChIP-кПЦР с H4K20me1 в клетках 293T со сверхэкспрессией меченых FLAG VAP1, ASXL1 и Vmi1.

Фиг. 13а-л. Удаление VAP1 приводит к возрастанию экспрессии компонентов PRC2, увеличенному уровню H4K20me1 и деубиквитинированию L3MBTL2. (a) Коиммунопреципитация эндогенных EZH2 и VAP1 в клетках SET2 с последующим анализом вестерн-блоттинга (проводимого в присутствии бензоназы для ингибирования взаимодействий, зависимых от ДНК). (b) Экспрессия VAP1, Ezh2 и Suz12 по кПЦР-РВ для отсортированных гранулоцитарно-макрофагальных предшественников (GMP; Lin<sup>-</sup>Kit<sup>+</sup>Scal<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Fcy<sup>+</sup>). (c) Анализ вестерн-блоттинга VAP1 и Ezh2 в клетках костного мозга мышей с KO VAP1 и контрольных мышей. (d) Количественный анализ H4K20me1 после масс-спектрометрических экспериментов с гистонами. (e) Жизнеспособность клеток по оценкам посредством анализа жизнеспособности CellTiter Glo и (f) анализов аннексина V для экспериментов по сверхэкспрессии SETD8 в линиях клеток с VAP1 дикого типа (MSTO-211H, Meso10) и мутантных линий клеток H226 с делецией; каталитическая мутация H2452). (g) Количественная кПЦР SETD8 и EZH2 в мутантных по VAP1 клетках со сверхэкспрессией SETD8. (h) Анализ вестерн-блоттинга SETD8 и EZH2 в линии клеток с VAP1 дикого типа. (i) Анализ CellTiter Glo в клетках, обработанных DMSO или 5, 10, 20 мкМ BVT594. (j) Экспрессия L3MBTL2 и VAP1 в линиях клеток VAP1 дикого типа (Met5a, JMN) и мутантных линиях клеток мезотелиомы (H226, H2452, H28). (k) Клетки 293T, сверхэкспрессирующие меченый Muc-His убиквитин и кДНК L3MBTL2 и варьирующие уровни VAP1 (0,5 мкг, 2,5 мкг, 1 мкг). Эксперименты по коиммунопреципитации проводили с использованием Ni-гранул и ряда отмывок в жестких условиях. (l) Модель, отражающая регуляцию VAP1, приводящую к действию на хроматин и экспрессию генов. Статистику рассчитывали с использованием t-критерия Стьюдента; \*p<0,05, \*\*p<0,005; приведены значения ±SEM.

Фиг. 14а-б. Анализ связывания VAP1, ASXL1, HCF-1 и OGT.

(a) Анализ кластеризации k-средних для ChIP-Seq VAP1, ASXL1, HCF-1 и OGT. (b) Анализ мотивов de novo Номер в связанных с VAP1 кластерах.

Фиг. 15а-и. L3MBTL2 и VAP1 совместно регулируют EZH2. (a) Экспрессия VAP1 и L3mbtl2 в клетках костного мозга контроля и с KO VAP1. (b) Экспрессия L3mbtl2 посредством кПЦР в GMP. (c) Вестерн-блоттинг клеток H226 и H2452, обработанных 25 мкМ MG132. Нерастворимые фракции экстрагировали с использованием содержащего 2% SDS буфера для лизиса. (d) Экспрессия EZH2 в линиях клеток, сверхэкспрессирующих L3MBTL2. (e) Анализ активности промотора EZH2 с конструкцией, содержащей 1,9 п.н. промотора EZH2 и контрольный вектор Renilla, транзиторно трансфицированный в клетки 293T с пустым вектором, а экспрессирующим VAP1 или L3MBTL2 вектором. В каждом из этих условий активность люциферазы светляка нормализовали по активности Renilla. (f) Для нокдауна белка L3MBTL2 в клетках SET2 использовали две независимых шпильки. Анализы вестерн-блоттинга проводили для L3MBTL2, EZH2 и актлина, включая короткое и длительное экспонирование. (g) ChIP L3MBTL2 с последующей кПЦР по локусам EZH2, SUZ12, E2F6 (положительный контроль), PHF20 (положительный контроль) и MORC3 (отрицательный контроль) в клетках 293T. (h) ChIP с антителами к FLAG с последующей кПЦР по локусу EZH2 в клетках 293T, сверхэкспрессирующих FLAG-L3MBTL2 или FLAG-VAP1. JAM2 представляет собой положительный контроль. По сравнению с клетками 293T без сверхэкспрессии FLAG. (i) Вестерн-блоттинг L3MBTL2 и VAP1 с последующими соответствующими IP в клетках 293T. Агарозный гель с ДНК включен для демонстрации расщепления ДНК.

Фиг. 16а-г. Линии клеток мезотелиома и модели на ксенотрансплантатах с мутантным VAP1 чувст-

вительны к ингибированию EZH2. (a) Экспрессия транскриптов EZH2 у пациентов с мезотелиомой по TCGA по сравнению соответствующими нормальными донорами. (b) Анализ аннексина V в линиях клеток с VAP1 дикого типа и линиях клеток с мутантным VAP1, экспрессирующим пустой вектор или шпильку, направленные к EZH2. (c) Эксперименты по количественному определению аннексина V в линиях клеток мезотелиомы. (d) Размер опухоли линий клеток Meso10 и H226, экспрессирующих шпильку EZH2, имплантируемых мышам NOD-SCID, n=6/группу. (e) Анализ жизнеспособности 2D CellTiter Glo через 2 недели обработки EPZ011989 с концентрацией 1,25 мкМ. (f) Анализ жизнеспособности 3D CellTiter Glo через 3 недели обработки EPZ011989 с концентрацией 1,25 мкМ. (g) Образование опухоли определенного размера из клеток с мутантным VAP1 (H226 и H2452) или (h) клеток дикого типа (MSTO и Meso10), имплантированных мышам NOD-SCID и обрабатываемых носителем или 500 мг/кг EPZ011989 дважды в сутки. Опухоли измеряли 3 раза в неделю, n=6/группа. Ингибирование мишени оценивали посредством вестерн-блоттинга гистонов для извлеченных опухолей (представлено на соответствующих фигурах). Патология легких с клетками H2452 с обработкой носителем и EPZ011989. Стрелки указывают основной объем метастазирующей опухоли. Статистику рассчитывали с использованием t-критерия Стьюдента; \*p<0,05, \*\*p<0,005; приведены значения  $\pm$ SEM.

Фиг. 17. Экспрессия компонентов PRC2 в отсортированных популяциях и во всем костном мозге возрастала.

Фиг. 18. H3K27me3 локально и глобально увеличен у мышей с KO VAP1. Метилирование гистонов у животных с KO VAP1 оценивали, проводя кислотную экстракцию с последующим вестерн-блоттингом костного мозга контроля и KO VAP1. Секвенирование после иммунопреципитации хроматина (ChIP-Seq) также проводили на обогащенном cKit костном мозге. Перекрытие данных ChIP-Seq и секвенирования РНК показало, что гены, ингибируемые у мышей с KO VAP1 были в большей степени маркированы H3K27me3. У мышей с KO VAP1 наблюдали увеличение уровня H3K27me3 в генах-мишенях EZH2, таких как locus NOXA.

Фиг. 19. Повышение уровня H3K27me2/3 в клетках с KO VAP1 происходило при расходе H3K27me0/1.

Фиг. 20a-d. Линии клеток с мутантным VAP1 являются более чувствительными к ингибированию EZH2. (a) Линия клеток Meso10, сверхэкспрессирующая EZH2, в возрастающем объеме пролиферирующая после инъекции в бок мышей NOD-SCID. (b) EZH2 сверхэкспрессирован в линиях клеток MSTO-211H и Meso10. Линии клеток при сверхэкспрессии EZH2 становились в большей степени чувствительными к EPZ011989. (c) Клетки с мутантным VAP1 при обработке ингибитором EZH2 GSK126 становились менее инвазивными. (d) Экспрессия E-кадгерина в линии клеток H226 после обработки GSK126 возрастала.

Фиг. 21a-c. Линии клеток мезотелиомы и модели на ксенотрансплантатах с мутантным VAP1 более чувствительны к ингибированию EZH2. (a) Объем опухоли ксенотрансплантатов H2452, обработанных GSK126 с концентрацией 150 мг/кг или носителем (n=10 мыши рег группа). 5 мышей из каждой группы для оценки удаления H3K27me3 через 16 суток обработки подвергали эвтаназии. Оставшихся мышей обрабатывали в течение оставшегося срока эксперимента. (b) ELISA гистонов и анализ вестерн-блоттинга уровней H3K27me3 в опухолях обрабатываемых in vivo мышей через 16 суток обработки. (c) Окрашивание H&E, окрашивание Ki67 и окрашивание TUNEL опухолей, выделяемых у обработанных носителем и обработанных GSK126 мышей, увеличение 10x.

#### Подробное описание

Для ясности и не с целью ограничения подробное описание изобретения разделено на следующие подразделы:

- (i) биомаркеры VAP1;
- (ii) ингибиторы EZH2;
- (iii) злокачественные опухоли-мишени;
- (iv) детекция биомаркеров;
- (v) способы применения и
- (vi) наборы.

#### Биомаркеры VAP1

Как используют в настоящем документе, термин "биомаркер" включает нуклеиновые кислоты и белки, которые относятся к уровню активности у индивидуума ассоциированного с BRCA1 белка 1, обозначаемого в настоящем документе как VAP1.

"Пациент" или "индивидуум", как взаимозаменяемо используют в настоящем документе, относится к человеку или к не являющемуся человеком индивидууму. Неограничивающие примеры не являющихся человеком индивидуумов включают не являющихся человеком приматов, собак, кошек, мышей, крыс, морских свинок, кроликов, свиней, домашнюю птицу, лошадей, коров, коз, овец, китообразных и т.д.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления описываемый биомаркер VAP1 может представлять собой нуклеиновую кислоту. Например, но не в качестве ограничения, биомаркер может представлять собой дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или рибонуклеиновую кислоту (РНК),

например, иРНК.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления биомаркер нуклеиновая кислота VAP1 может представлять собой нуклеиновую кислоту VAP1 человека с последовательностью, указанной под номерами доступа базы данных NCBI NG\_031859.1 или NM\_004656, или нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу белка VAP1 с аминокислотной последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_004647.

В конкретном неограничивающем варианте осуществления биомаркер нуклеиновая кислота VAP1 может представлять собой нуклеиновую кислоту VAP1 мыши с последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NM\_027088, или нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу белка VAP1 с аминокислотной последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_081364.1.

В конкретном неограничивающем варианте осуществления биомаркер нуклеиновая кислота VAP1 может представлять собой нуклеиновую кислоту VAP1 крысы с последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NM\_001107292.1, или нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу белка VAP1 с аминокислотной последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_001100762.1.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления биомаркер VAP1 может представлять собой белок.

В конкретном неограничивающем варианте осуществления биомаркер белок VAP1 может представлять собой белок VAP1 человека с аминокислотной последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_004647.

В конкретном неограничивающем варианте осуществления биомаркер белок VAP1 может представлять собой белок VAP1 мыши с аминокислотной последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_081364.1.

В конкретном неограничивающем варианте осуществления биомаркер белок VAP1 может представлять собой белок VAP1 крысы с аминокислотной последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_001100762.1.

В определенных вариантах осуществления уровень биомаркера VAP1 сравнивают с эталонным контрольным уровнем. "Эталонный контрольный уровень" или "эталонный контрольный уровень экспрессии" VAP1, как взаимозаменяемо используют в настоящем документе, можно установить, например, с использованием эталонного контрольного образца. Неограничивающие примеры эталонных контрольных образцов включают нормальные и/или здоровые клетки с активностью VAP1 дикого типа. В определенных вариантах осуществления эталонный контрольный уровень VAP1 можно установить, например, с использованием нормальных клеток, например доброкачественных клеток, находящихся у пациента рядом с опухолью.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления изобретения уровень биомаркера VAP1 можно оценивать, оценивая функцию VAP1, где уровень экспрессии VAP1 прямо пропорционален уровню функции VAP1. В одном из неограничивающих примеров функцией VAP1 может являться ингибирование экспрессии EZH2 (например, экспрессии белка или экспрессии нуклеиновой кислоты EZH2). Например, и не в качестве ограничения, уровень биомаркера VAP1 можно определять, определяя уровень экспрессии EZH2 в злокачественных клетках индивидуума по сравнению с эталонным контрольным уровнем EZH2. В определенных вариантах осуществления эталонный контрольный уровень EZH2 можно определять с использованием нормальных и/или здоровых клеток с активностью дикого типа и/или нормальной активностью EZH2 и/или нормальной активностью VAP1. В определенных неограничивающих вариантах осуществления EZH2 может представлять собой нуклеиновую кислоту EZH2 человека с последовательностью, указанной под номерами доступа базы данных NCBI NG\_032043.1; NM\_004456.4; NM\_001203249.1; NM\_152998.2; NM\_001203247.1 и/или NM\_001203248.1, или нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу белка EZH2 с аминокислотной последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_001190176.1; NP\_001190177.1; NP\_001190178.1; NP\_004447.2 и/или NP\_694543.1. В конкретном неограничивающем варианте осуществления EZH2 может представлять собой белок EZH2 человека с аминокислотной последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_001190176.1; NP\_001190177.1; NP\_001190178.1; NP\_004447.2 и/или NP\_694543.1.

В одном из неограничивающих примеров функция VAP1 может представлять собой регуляцию экспрессии SUZ12 (например, экспрессии белка или экспрессии нуклеиновой кислоты SUZ12). В определенных неограничивающих вариантах осуществления уровень биомаркера VAP1 можно определять, определяя уровень экспрессии SUZ12 в злокачественных клетках индивидуума по сравнению с эталонным контрольным уровнем SUZ12. В определенных вариантах осуществления эталонный контрольный уровень SUZ12 можно определять с использованием нормальных и/или здоровых клеток с активностью дикого типа, и/или нормальной активностью SUZ12, и/или нормальной активностью VAP1. В определенных неограничивающих вариантах осуществления SUZ12 может представлять собой нуклеиновую кислоту SUZ12 человека с последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NM\_015355.2, или нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу белка SUZ12 с аминокислотной после-

довательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_056170.2. В конкретном неограничивающем варианте осуществления SUZ12 может представлять собой белок SUZ12 человека с аминокислотной последовательностью, указанной под номером доступа базы данных NCBI NP\_056170.2.

Когда в настоящем указаны сравнения с эталонными контрольными уровнями экспрессии, биомаркер оценивают относительно эталонного контрольного уровня экспрессии в пределах того же вида. Например, уровень экспрессии и/или присутствие биомаркера VAP1 человека сравнивают с эталонным контрольным уровнем VAP1 человека.

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления отсутствие и/или сниженная экспрессия биомаркера VAP1 означает детекцию менее чем приблизительно 90%, менее чем приблизительно 80%, менее чем приблизительно 70%, менее чем приблизительно 60%, менее чем приблизительно 50%, менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 30% экспрессии относительно эталонного контрольного уровня.

#### Ингибиторы EZH2

Неограничивающие примеры ингибиторов EZH2 включают соединения, молекулы, химические вещества, полипептиды, белки, которые ингибируют и/или снижают экспрессию и/или активность EZH2. Дополнительные неограничивающие примеры ингибиторов EZH2 включают низкомолекулярные ингибиторы, конкурирующие с S-аденозилметионином. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления ингибитор EZH2 получают из тетраметилпиперидинильных соединений. Дополнительные неограничивающие примеры включают UNC1999, 3-деазанепланоцин А (DZNep), E11, EPZ-5676, EPZ-6438, GSK343, EPZ005687, EPZ011989 и GSK126.

Дополнительные неограничивающие примеры ингибиторов EZH2 описаны в Garapaty-Rao et al., *Chemistry and Biology*, 20: pp. 1-11 (2013), в патентных заявках PCT №№ WO 2013/138361, WO 2013/049770 и WO 2003/070887 и в патентных заявках США №№ US 2014/0275081, US 2012/0071418, US 2014/0128393 и US 2011/0251216, содержания которых, таким образом, полностью включены в качестве ссылки.

Дополнительные неограничивающие примеры ингибиторов EZH2 включают рибозимы, антисмысловые олигонуклеотиды, молекулы кшРНК и молекулы миРНК, которые специфически ингибируют экспрессию или активность EZH2. Один из неограничивающих примеров ингибиторов EZH2 включает антисмысловую последовательность, последовательность кшРНК или миРНК нуклеиновой кислоты, гомологичную по меньшей мере части последовательности нуклеиновой кислоты EZH2, где гомология части относительно последовательности EZH2 составляет по меньшей мере приблизительно 75, или по меньшей мере приблизительно 80, или по меньшей мере приблизительно 85, или по меньшей мере приблизительно 90, или по меньшей мере приблизительно 95, или по меньшей мере приблизительно 98%, где процент гомологии можно определять, например, посредством программного обеспечения BLAST или FASTA. В определенных неограничивающих вариантах осуществления комплементарная часть может состоять по меньшей мере из 10 нуклеотидов, или по меньшей мере из 15 нуклеотидов, или по меньшей мере из 20 нуклеотидов, или по меньшей мере из 25 нуклеотидов, или по меньшей мере из 30 нуклеотидов, а длина антисмысловой нуклеиновой кислоты, молекул кшРНК или миРНК может составлять до 15, или до 20, или до 25, или до 30, или до 35, или до 40, или до 45, или до 50, или до 75, или до 100 нуклеотидов. Антисмысловые молекулы, молекулы кшРНК или миРНК могут содержать ДНК или нестандартные или неприродные остатки, в качестве неограничивающих примеров, тиофосфатные остатки.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления ингибитор EZH2 можно использовать отдельно или в комбинации с одним или более средствами против злокачественных опухолей. Средство против злокачественных опухолей может представлять собой любую молекулу, химическое соединение или композицию, которые обладают противоопухолевым действием. Средства против злокачественных опухолей в качестве неограничивающих примеров включают химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства, цитокины, антиангиогенные средства, индуцирующие апоптоз средства или противоопухолевые иммунотоксины, такие как антитела. "В комбинации с" означает, что ингибитор EZH2 и одно или более средств против злокачественных опухолей вводят индивидууму в качестве части схемы или плана лечения. Эти термины не требуют того, чтобы ингибитор EZH2 и одно или более средств против злокачественных опухолей были физически скомбинированы до введения, а также того, чтобы их вводили в течение одного и того же временного интервала.

#### Злокачественные опухоли-мишени

Неограничивающие примеры злокачественных опухолей, которые могут представлять собой объекты для описываемого в настоящем описании объекта изобретения, включают злокачественные мезотелиомы, увеальные меланомы, почечноклеточную карциному, кожные меланомы, рак легких, рак молочной железы, рак яичника, не являющийся меланомой рак кожи, менингиому, холангиокарциному, лейомиосаркому, нейроэндокринные опухоли, рак поджелудочной железы, параганглиому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, миелодиспластические синдромы, острый миелолейкоз, меланоцитарные атипичные интрадермальные опухоли с мутантным VAP1 (MVAIT) и рак мочевого пузыря.

### Детекция биомаркеров

Способы качественных и количественных детекции и/или определения уровня экспрессии биомаркера нуклеиновой кислоты VAP1, нуклеиновой кислоты EZH2, нуклеиновой кислоты LZMBTL2 или нуклеиновой кислоты SUZ12 в качестве неограничивающих примеров включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР), включая общепринятые кПЦР и цифровую ПЦР, гибридизацию *in situ* (в качестве неограничивающих примеров флуоресцентную гибридизацию *in situ* ("FISH")), электрофорез в геле, секвенирование и анализ последовательности, анализ микропанелей и другие способы, известные в данной области.

В определенных вариантах осуществления способ детекции может представлять собой ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ), количественную ПЦР, флуоресцентную ПЦР, RT-MSP (специфичная к метилированию полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени), детекцию ДНК PicoGreen™ (молекулярные зонды, Eugene, OR), радиоиммунологический анализ или прямое радиоактивное мечение ДНК. Например, но не в качестве ограничения, биомаркер нуклеиновую кислоту можно подвергать обратной транскрипции в кДНК с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР); или для обоих этапов можно использовать один фермент, как описано в патенте США № 5322770, или биомаркер можно подвергать обратной транскрипции в кДНК с последующей ассиметричной лигазной цепной реакцией с пропусками (RT-AGLCR), как описано в R.L. Marshall, et al., PCR Methods and Applications 4: 80-84 (1994). Неограничивающие примеры праймеров для применения в описываемых способах представлены в табл. 1.

В определенных вариантах осуществления для оценки уровней биомаркерной иРНК используют количественную полимеразную цепную реакцию с детекцией в реальном времени (кПЦР-РВ). Уровни биомаркерной и контрольной иРНК можно количественно определять в тканях или клетках злокачественной опухоли и близлежащих доброкачественных тканях. В определенных вариантах осуществления в биологическом образце можно количественно определять уровни одного или более биомаркеров.

В неограничивающем варианте осуществления способ детекции по настоящему изобретению можно проводить без применения амплификации, например без получения какой-либо копии или удвоения последовательности-мишени, без привлечения какой-либо полимеразы или без необходимости в какой-либо термической циклической обработки. В определенных вариантах осуществления детекцию по настоящему изобретению можно проводить с использованием принципов, приведенных в способе QuantiGene™, описанном в заявке США с серийным № 11/471025, зарегистрированной 19 июня 2006 года и включенной в настоящий документ в качестве ссылки.

В определенных вариантах осуществления можно использовать визуализацию гибридизации *in situ*, где радиоактивно меченый зонд антисмысловой РНК гибридизуют с тонким срезом биологического образца, например образца биопсии, отмывают, подвергают расщеплению РНКазой и экспонируют на чувствительную эмульсию для радиоавтографии. Образцы можно окрашивать гематоксилином для демонстрации гистологического состава образца, и проявленную эмульсию можно наблюдать в виде изображения в темном поле с подходящим световым фильтром. Также можно использовать нерадиоактивные метки, такие как диоксигенин.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления оценку экспрессии биомаркера нуклеиновой кислоты можно проводить посредством флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). FISH представляет собой способ, которым можно напрямую идентифицировать конкретную область ДНК или РНК в клетке и, таким образом, обеспечить визуальное определение экспрессии биомаркера в образцах тканей. Способ FISH обладает преимуществами более объективной системы регистрации и присутствия встроенного внутреннего контроля, состоящего из сигналов биомаркерных генов, присутствующих во всех неопухолевых клетках одного и того же образца. FISH представляет собой прямой способ *in situ*, который может быть относительно быстрым и чувствительным и который также можно автоматизировать. Когда уровень экспрессии биомаркера трудно определить одним FISH, со способом FISH можно комбинировать иммуногистохимию.

В определенных вариантах осуществления экспрессию биомаркера нуклеиновой кислоты можно детектировать на матрице, чипе или микропанели ДНК. Олигонуклеотиды, соответствующие биомаркеру(ам) иммобилизуют на чипе, который затем гибридизуют с мечеными нуклеиновыми кислотами биологического образца, например образца опухоли, полученного у индивидуума. С использованием образца, содержащего транскрипты биомаркеров, получают положительный сигнал гибридизации. Способы получения матриц ДНК и их использования хорошо известны в данной области, (см., например, патенты США №№ 66186796; 6379897; 6664377; 6451536; 548257; патентные заявки США №№ 20030157485 и Schena et al., 1995 Science 20:467-470; Gerhold et al., 1999 Trends in Biochem. Sci. 24, 168-173; и Lennon et al., 2000 Drug discovery Today 5: 59-65, которые полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки). Также можно проводить серийный анализ экспрессии генов (SAGE) (см., например, патентную заявку США № 20030215858).

В определенных вариантах осуществления для мониторинга биомаркера нуклеиновой кислоты, например иРНК, уровней экспрессии VAP1 иРНК можно выделять из тестируемого биологического образца, подвергать обратной транскрипции и можно получать флуоресцентно-меченые зонды кДНК. Затем

меченые зонды кДНК можно наносить на микропанели, способные к гибридизации с биомаркером, обеспечивая гибридизацию зонда с микропанелью, и сканировать стекла для измерения интенсивности флуоресценции. Эта интенсивность коррелирует с интенсивностью гибридизации и уровнями экспрессии биомаркера.

Типы зондов для детекции биомаркеров нуклеиновых кислот включают кДНК, рибонуклеиновые зонды, синтетические олигонуклеотиды и геномные зонды. Как правило, тип используемого зонда продиктован конкретной ситуацией, например рибонуклеиновые зонды используют для гибридизации *in situ*, а кДНК для нозерн-блоттинга. В определенных неограничивающих вариантах осуществления зонд направлен к нуклеотидным областям, уникальным для конкретной биомаркерной РНК. Зонды могут быть настолько короткими, как необходимо для дифференциального распознавания конкретных биомаркерных транскриптов иРНК, и может быть настолько коротким, как, например, 15 оснований. Также можно использовать зонды по меньшей мере из 17 оснований, 18 оснований и 20 оснований. В определенных вариантах осуществления праймеры и зонды специфически гибридизуются в жестких условиях с фрагментом нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, соответствующей геномишному. Как используют в настоящем документе, термин "жесткие условия" означает гибридизацию, которая происходит, только если последовательности идентичны по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 97%.

Форма мечения зондов может являться любой подходящей формой, такой как использование радиоактивных изотопов, например  $^{32}\text{P}$  и  $^{35}\text{S}$ , или флуорофоров. Мечение радиоактивными изотопами можно осуществлять при химическом или биологическом синтезе зонда, используя подходящие меченые основания.

Способы детекции и/или определения уровня белкового биомаркера, например, биомаркера белка VAP1, белка EZH2, белка LZMBTL2 или белка SUZ12, хорошо известны специалистам в данной области и в качестве неограничивающих примеров включают масс-спектрометрические способы, основанные на 1-D или 2-D геле системы анализа, хроматографию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), иммуноферментный анализ (EIA), вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию и иммуногистохимию. В этих способах для детекции белка используют антитела или эквиваленты антител или используют биофизические способы. Также можно применять матрицы антител или белковые чипы, см., например, патентные заявки США №№ 2003/0013208; 2002/0155493, 2003/0017515 и патенты США №№ 6329209 и 6365418, полностью включенные в настоящий документ в качестве ссылки.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления способ детекции для определения экспрессии белкового биомаркера включает этапы: приведения биологического образца, например образца ткани, в контакт с антителом или его вариантом (например, фрагментом), которые селективно связываются с биомаркером, и детекции связывания антитела или его варианта с образцом. Дополнительно способ может включать приведение образца в контакт со вторым антителом, например меченым антителом. Дополнительно способ может включать один или более этапов отмывки, например для удаления одного или более реагентов.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления для детекции и количественного определения уровня экспрессии белкового биомаркера можно использовать вестерн-блоттинг. Клетки можно гомогенизировать в буфере для лизиса с получением лизата, а затем подвергать SDS-PAGE и блоттингу на мембрану, такую как нитроцеллюлозный фильтр. Затем в контакт с мембраной можно приводить антитела (немеченные) и оценивать посредством вторичного иммунологического реагента, такого как меченый белок А или антитело к иммуноглобулину (подходящие метки включают  $^{125}\text{I}$ , пероксидазу хрена и щелочную фосфатазу). Также можно использовать хроматографическую детекцию. В определенных вариантах осуществления иммунодетекцию можно проводить с использованием антитела к биомаркеру с использованием системы усиленной хемилюминесценции (например, из PerkinElmer Life Sciences, Boston, Mass.). Затем мембрану можно разделять на полосы и подвергать повторному блоттингу с использованием контрольного антитела, специфичного к контрольному белку, например актину.

Для детекции экспрессии и/или присутствия биомаркера, например в образце биопсии, можно использовать иммуногистохимию. Подходящее антитело можно приводить в контакт, например, с тонким слоем клеток с последующей отмывкой для удаления несвязанного антитела, а затем приводить в контакт со вторичным, меченым, антителом. Мечение может представлять собой мечение флуоресцентными маркерами, ферментами, такими как пероксидаза, мечение авидином или мечение радиоактивными изотопами. Анализ можно оценивать визуально с использованием микроскопии, и результаты можно определять количественно, также для определения результатов иммуноокрашивания биомаркера можно использовать машинные способы или автоматизированные системы.

В данной области доступны различные автоматизированные системы обработки, сканирования и анализа образцов, пригодные для использования иммуногистохимии. Такие системы могут включать автоматическое окрашивание (см., например, the Benchmark system, Ventana Medical Systems, Inc.) и сканирование с использованием микроскопа, компьютеризированный анализ изображений, сравнение серийных срезов (с контролем на вариацию образцов по ориентации и размерам), формирование цифрового отчета и архивирование и отслеживание образцов (таких как предметные стекла, на которые помеща-

ют тканевые срезы). Коммерчески доступны системы визуализации клеток, в которых скомбинированы общепринятые оптические микроскопы с цифровыми системами обработки изображения для проведения количественного анализа в клетках и тканях, включая иммуноокрашенные образцы. См., например, систему CAS-200 (Becton, Dickinson & Co.).

С целями визуализации, например для детекции присутствия биомаркера в клетках индивидуума, также можно использовать меченые антитела к биомаркерам. Подходящие метки включают радиоактивные изотопы, йод ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), углерод ( $^{14}\text{C}$ ), серу ( $^{35}\text{S}$ ), тритий ( $^3\text{H}$ ), индий ( $^{112}\text{In}$ ) и технеций ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Иммуоферментные взаимодействия можно визуализировать с использованием различных ферментов, таких как пероксидаза, щелочная фосфатаза, или различных хромогенов, таких как DAB, АЕС или Fast Red. Меченые антитела или фрагмент антитела преимущественно накапливаются в положении клеток, содержащих биомаркер. Затем меченые антитела или его вариант, например фрагмент антитела, можно детектировать известными способами.

Антитела включают любое антитело, природное или синтетическое, полноразмерное или его фрагмент, моноклональное или поликлональное, которое достаточно сильно и специфически связывается с детектируемым биомаркером.  $K_d$  антитела может составлять максимум приблизительно  $10^{-6}$  М,  $10^{-7}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М,  $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$  М и  $10^{-12}$  М. Фраза "специфически связывается" относится к связыванию, например, антитела с эпитопом или антигеном или антигенной детерминантой таким образом, что из связывания может вытеснять или за него может конкурировать второй препарат идентичного или сходного эпитопа, антигена или идентичной или сходной антигенной детерминанты.

Антитела и их производные, которые можно использовать, включают поликлональные или моноклональные антитела, синтетические и сконструированные антитела, химерные, принадлежащие человеку, гуманизированные, приматизированные (с привитыми CDR), винированные или одноцепочечные антитела, продуцируемые фагами антитела (например, из библиотек фагового дисплея), а также функциональные связывающие фрагменты антител. Например, можно использовать фрагменты антител, способные к связыванию с биомаркером, или их части, включая в качестве неограничивающих примеров фрагменты Fv, Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>. Такие фрагменты можно получать посредством ферментативного расщепления или рекомбинантными способами. Неограничивающие примеры коммерчески доступных антител к VAP1 включают SC-8132, SC-48386, SC-13576, SC-28236, SC-8133 и SC-28383 из Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Ab167250 из Abcam (Cambridge, England) и HPA028814 из Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Неограничивающие примеры коммерчески доступных антител к EZH2 включают каталожные номера 39933, 39875 и 39901 из Active Motif (Carlsbad, CA), 07-689 из Millipore (Billerica, MA) и PA1-46476 и PA5-24594 из Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Неограничивающий пример коммерчески доступного антитела к SUZ12 включает Ab12073 из Abcam. Неограничивающий пример коммерчески доступного антитела к LZMBTL2 включает 39569 из Active Motif.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления используют специфически связывающиеся с полипептидом средства, отличные от антител, такие как пептиды. Специфически связывающиеся пептиды можно идентифицировать любыми средствами, известными в данной области, например пептидными библиотеками фагового дисплея. Как правило, можно использовать средство, способное к детекции полипептидного биомаркера так, что происходит детекция и/или количественное определение биомаркера. Как определено в настоящем документе, "средство" относится к веществу, обеспечивающему идентификацию или детекцию биомаркера в биологическом образце (например, идентифицирует или детектирует иРНК биомаркера, ДНК биомаркера, белок биомаркера).

Кроме того, биомаркер можно детектировать с использованием масс-спектрометрии, такой как MALDI/TOF (время-пролетная), SELDI/TOF, жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (LC-MS), газовая хроматография-масс-спектрометрия (GC-MS), высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-MS), капиллярный электрофорез-масс-спектрометрия, спектрометрия ядерного магнитного резонанса или тандемная масс-спектрометрия (например, MS/MS, MS/MS/MS, ESI-MS/MS и т.д.). см., например, патентные заявки США №№ 2003/0199001, 2003/0134304, 2003/0077616, которые полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Способы масс-спектрометрии хорошо известны в данной области и их использовали для количественного определения и/или идентификации биомолекул, таких как белки (см., например, Li et al. (2000) *Tibtech* 18:151-160; Rowley et al. (2000) *Methods* 20: 383-397; и Kuster and Mann (1998) *Curr. Opin. Structural Biol.* 8: 393-400). Кроме того, разработаны масс-спектрометрические способы, которые обеспечивают, по меньшей мере, частичное секвенирование выделенных белков de novo. Chait et al., *Science* 262:89-92 (1993); Keough et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:7131-6 (1999); рассмотрено в Bergman, *EXS* 88:133-44 (2000).

Как правило, детекция присутствия биомаркера или другого вещества включает детекцию интенсивности сигнала. В свою очередь это может отражать количество и характер полипептида, связанного с субстратом. Например, в определенных вариантах осуществления можно сравнивать силу сигнала пиковых значений из спектров первого образца и второго образца (например, визуально или посредством компьютерного анализа) с определением относительных количеств конкретного биомаркера. Для помощи в анализе масс-спектров можно использовать такие программы как Biomarker Wizard program (Ci-

phergen Biosystems, Inc., Fremont, Calif.).

Дополнительные способы определения экспрессии биомаркеров нуклеиновых кислоты и/или белков в образцах описаны, например, в патенте США № 6271002; патенте США № 6218122; патенте США № 6218114 и патенте США № 6004755; и в Wang et al., J. Clin. Oncol., 22(9): 1564-1671 (2004) и Schena et al., Science, 270:467-470 (1995); которые все полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки.

#### Способы применения

В определенных неограничивающих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам определения вероятности проявления ингибитором EZH2 противоопухолевого действия в злокачественной опухоли, включающим определение присутствия, отсутствия и/или уровня экспрессии биомаркера VAP1, например биомаркера нуклеиновой кислоты и/или белка VAP1. Способы определения присутствия, отсутствия и/или уровней экспрессии биомаркера VAP1 указаны в разделе "Детекция биомаркеров" выше. Злокачественные опухоли, подходящие для лечения, описаны выше в разделе "Злокачественные опухоли-мишени". Ингибиторы EZH2 описаны выше в разделе "Ингибиторы EZH2".

В определенных вариантах осуществления в настоящем описании предоставлен способ обеспечения противоопухолевого действия в злокачественной опухоли, включающий определение содержания в клетках злокачественной опухоли биомаркера VAP1, где, если биомаркер VAP1 в злокачественной опухоли отсутствует и/или экспрессирован на низких уровнях по сравнению с эталонным контрольным уровнем, проводят введение терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2 для обеспечения противоопухолевого действия. Альтернативно, если выявлено, что биомаркер VAP1 экспрессирован на том же или более высоких уровнях относительно эталонного контрольного уровня, проводят альтернативную терапию средством, которое не является ингибитором EZH2.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое может осуществлять одно или более из противоопухолевого действия, продления длительности жизни и/или увеличения периода до рецидива.

"Противоопухолевое действие" относится к одному или более из уменьшения массы агрегированных злокачественных клеток, уменьшения скорости роста злокачественных клеток, снижения пролиферации злокачественных клеток, уменьшения массы опухоли, уменьшения объема опухоли, снижения пролиферации клеток опухоли, уменьшения скорости роста опухоли и/или снижение метастазирования опухоли. В определенных вариантах осуществления противоопухолевое действие может относиться к полному ответу, частичному ответу, стабильному заболеванию (без прогрессирования или рецидивов), ответу с поздним рецидивом или выживанию пациента с диагностированной злокачественной опухолью без прогрессирования.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения противоопухолевого действия в злокачественной опухоли, включающему определение уровня экспрессии биомаркера VAP1 в одной или более клетках злокачественной опухоли, где, если биомаркер белок VAP1 в клетках отсутствует и/или экспрессирован на низких уровнях по сравнению с эталонным контрольным уровнем, проводят введение терапевтически эффективного количества ингибитора EZH2 для получения противоопухолевого действия. В определенных вариантах осуществления эталонный контроль представляет собой уровень VAP1 в нормальных клетках, например доброкачественных клетках, находящихся рядом со злокачественной опухолью.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления для обеспечения сравнения уровень VAP1 в образце злокачественной опухоли и/или эталонном контрольном образце можно нормализовать относительно нуклеиновой кислоты и/или белка, присутствующих в обоих образцах, например стандартных белка или нуклеиновой кислоты, таких как ген и/или белок домашнего хозяйства. Например, и не в качестве ограничения, стандартные белок или нуклеиновая кислота могут представлять собой актин или тубулин.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу прогноза чувствительности злокачественной опухоли пациента к ингибитору EZH2, где способ включает получение у пациента образца злокачественной опухоли и определение уровня экспрессии биомаркера белка VAP1 в клетках, составляющих образец, где, если биомаркер белок VAP1 отсутствует или экспрессирован в меньшей степени по сравнению с эталонным контрольным уровнем, делают прогноз, что злокачественная опухоль чувствительна к ингибитору EZH2. В определенных вариантах осуществления, если сделан прогноз, что злокачественная опухоль пациента чувствительна к ингибитору EZH2, пациента затем можно лечить ингибитором EZH2. В определенных вариантах осуществления, если сделан прогноз, что злокачественная опухоль пациента нечувствительна к ингибитору EZH2, пациента можно лечить средством, которое не является ингибитором EZH2.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума со злокачественной опухолью. Например, и не в качестве ограничения, способ включает получение у индивидуума образца злокачественной опухоли и определение в образце уровня экспрессии биомаркера VAP1, где, если биомаркер VAP1 отсутствует или экспрессирован на более низком уровне, чем эталонный контрольный уровень VAP1, начинают лечение индивидуума терапевтически эффективным количеством ингибитора EZH2. Альтернативно, если выявлено, что биомаркер

ВAP1 экспрессирован на том же или более высоком уровне относительно эталонного контрольного уровня, индивидуума можно лечить средством, которое не является ингибитором EZH2.

В определенных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут дополнительно включать детекцию в образце уровня экспрессии EZH2, L3MBTL2 и/или SUZ12. Например, но не в качестве ограничения, можно детектировать уровни экспрессии иРНК и/или белка EZH2, L3MBTL2 и/или SUZ12. В определенных вариантах осуществления способ лечения индивидуума со злокачественной опухолью включает получение у индивидуума образца злокачественной опухоли и определение в образце уровня экспрессии биомаркера ВАР1 и уровня экспрессии EZH2, L3MBTL2 и/или SUZ12, где, если биомаркер ВАР1 отсутствует или экспрессирован на более низком уровне, чем эталонный контрольный уровень ВАР1, а экспрессия EZH2 и/или SUZ12 увеличена по сравнению с эталонными контрольными уровнями EZH2 и/или SUZ12 (и/или снижена экспрессия L3MBTL2 по сравнению с эталонным контрольным уровнем L3MBTL2), начинают лечение индивидуума терапевтически эффективным количеством ингибитора EZH2. В определенных вариантах осуществления образец можно получать до и после лечения ингибитором EZH2 и можно сравнивать уровни экспрессии EZH2 в образцах.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления образцы в качестве неограничивающих примеров включает клетки в культуре, супернатанты клеток, лизаты клеток, сыворотку, плазму крови, биологическую жидкость (например, кровь, плазму, сыворотку, стул, мочу, лимфу, асцит, смыв протоков, аспират из сосков, слюну, бронхоальвеолярный лаваж, слезы и цереброспинальную жидкость) и образцы тканей. Источник образца может представлять собой плотную ткань (например, из только полученного, замороженного и/или законсервированного органа или образца опухоли, образец ткани, биопсию или аспират), кровь или любые составляющие крови, биологические жидкости (такие как, например, моча, лимфа, цереброспинальная жидкость, амниотическая жидкость, перитонеальная жидкость или межклеточная жидкость) или клетки индивидуума, включая циркулирующие опухолевые клетки. В определенных неограничивающих вариантах осуществления образец получают из опухоли. В определенных вариантах осуществления образец может представлять собой "клинический образец", который представляет собой образец, получаемый у пациента.

#### Наборы

В определенных неограничивающих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к набору для определения вероятности проявления ингибитором EZH2 противоопухолевого действия в злокачественной опухоли, где набор включает средства детекции биомаркера ВАР1, как указано в предыдущих разделах. Указанный набор может дополнительно содержать инструкции или документацию, где описано применение набора для определения вероятности проявления ингибитором EZH2 противоопухолевого действия в злокачественной опухоли и/или приведена ссылка на веб-сайт или публикации, описывающие его.

Типы наборов в качестве неограничивающих примеров включают упакованные специфичный к биомаркеру зонд и наборы праймеров (например, наборы зондов/праймеров TaqMan), панели/микропанели, специфичные к биомаркерам антитела, специфичные к биомаркеру гранулы, которые дополнительно содержат один или более зонды, праймеры или другие реагенты для детекции одного или более биомаркеров по настоящему изобретению.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к набору для определения вероятности проявления ингибитором EZH2 противоопухолевого действия в злокачественной опухоли, содержащему средства для детекции присутствия биомаркера нуклеиновой кислоты ВАР1.

В конкретном неограничивающем варианте осуществления набор может содержать пару олигонуклеотидных праймеров, подходящих для полимеразной цепной реакции (ПЦР) или секвенирования нуклеиновой кислоты, для детекции идентифицируемого биомаркера(ов) нуклеиновой кислоты. Пара праймеров может содержать нуклеотидные последовательности, комплементарные биомаркеру, указанному выше, и обладать достаточной длиной для селективной гибридизации с указанным биомаркером. Альтернативно комплементарные нуклеотиды могут селективно гибридизоваться с конкретной областью в достаточно тесной близости с 5'- и/или 3'-конца от положения биомаркера для проведения ПЦР и/или секвенирования. В набор можно включать несколько специфичных к биомаркеру праймеров для одновременной детекции более одного биомаркера. Также набор может содержать одну или более полимераз, обратную транскриптазу и нуклеотидные основания, где нуклеотидные основания могут быть дополнительно детектируемо мечеными.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления длина праймера может составлять по меньшей мере приблизительно 10 нуклеотидов, или по меньшей мере приблизительно 15 нуклеотидов, или по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов, и/или приблизительно до 200 нуклеотидов, или приблизительно до 150 нуклеотидов, или приблизительно до 100 нуклеотидов, или приблизительно до 75 нуклеотидов, или приблизительно до 50 нуклеотидов. Неограничивающие примеры праймеров приведены в табл. 1. Например, но не в качестве ограничения, праймер по настоящему изобретению может содержать одну или более последовательностей, описываемых в табл. 1.

В дополнительном неограничивающем варианте осуществления олигонуклеотидные праймеры

можно иммобилизовать на твердой поверхности, субстрате или подложке, например на микропанели нуклеиновых кислот, где положение каждого олигонуклеотидного праймера, связанного с твердой поверхностью или подложкой, известно и поддается идентификации. Олигонуклеотиды можно фиксировать на субстрате, таком как стекло, пластик, бумага, нейлон или другой тип мембраны, фильтра, чипа, гранулы или любая другая подходящая твердая подложка. Полинуклеотиды можно синтезировать непосредственно на субстрате или синтезировать отдельно от субстрата, а затем фиксировать на субстрате. Панели получают известными способами.

В конкретном неограничивающем варианте осуществления набор может содержать по меньшей мере один зонд из нуклеиновой кислоты, подходящий для гибридизации *in situ* или флуоресцентной гибридизации *in situ*, для детекции подлежащих идентификации биомаркера(ов). Как правило, такие наборы содержат один или более олигонуклеотидных зондов, которые специфичны для различных биомаркеров. В одном наборе необязательно могут содержаться средства для тестирования нескольких биомаркеров.

В определенных вариантах осуществления наборы могут содержать контейнеры (включая микролитровые планшеты, пригодные для использования в автоматизированных реализациях способа), каждый с одним или более из различных реагентов (как правило, в концентрированной форме), используемых в способах, включая, например, предварительно изготовленные микропанели, буферы, соответствующие нуклеотидтрифосфаты (например, dATP, dCTP, dGTP и dTTP, или rATP, rCTP, rGTP и UTP), обратную транскриптазу, ДНК-полимеразу, РНК-полимеразу и один или более зондов и праймеров по настоящему изобретению (например, поли(Т) подходящей длины или случайные праймеры, связанные с промотором, взаимодействующим с РНК-полимеразой).

В неограничивающих вариантах осуществления настоящее изобретение относится к набору для определения вероятности проявления ингибитором EZH2 противоопухолевого действия в злокачественной опухоли, содержащему средства для детекции уровней биомаркера белка VAP1.

В неограничивающих вариантах осуществления набор может содержать по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для иммунодетекции подлежащего идентификации биомаркера(ов). Антитела, поликлональные и моноклональные, специфичные к биомаркеру, можно получать общепринятыми способами иммунизации, как в основном известно специалистам в данной области. Реагенты для иммунодетекции набора могут включать детектируемые метки, которые ассоциированы или связаны с данным антителом или самим антигеном. Такие детектируемые метки включают, например, хемилюминесцентные или флуоресцентные молекулы (родамин, флуоресцеин, зеленый флуоресцентный белок, люциферазу, Cy3, Cy5 или ROX), радиоактивные метки ( $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$  или  $^{131}\text{I}$ ) или ферменты (щелочную фосфатазу, пероксидазу хрена).

В дополнительном неограничивающем варианте осуществления одно или более специфичных к биомаркерам антител можно предоставлять связанными с твердой подложкой, такой как матрикс для колонки, панель или лунка планшета для микротитрования. Альтернативно подложку можно предоставлять как отдельный элемент набора.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления, где в средствах для измерения набора используют панель, набор биомаркеров, указанных выше, может составлять по меньшей мере 10, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50, или по меньшей мере 60, или по меньшей мере 70, или по меньшей мере 80% от видов биомаркеров, представленных на микропанели.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может содержать один или более зондов, праймеров, антител или других детектирующих реагентов для детекции уровня экспрессии EZH2 в образце. Например, набор может содержать антитело или его фрагмент для детекции уровня экспрессии белка EZH2 в биологическом образце.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может содержать один или более зондов, праймеров, антител или других детектирующих реагентов для детекции уровня экспрессии SUZ12 в образце. Например, набор может содержать антитело или его фрагмент для детекции уровня экспрессии белка SUZ12 в биологическом образце.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может содержать один или более зондов, праймеров, антител или других детектирующих реагентов для детекции уровня экспрессии L3MBTL2 в образце. Например, набор может содержать антитело или его фрагмент для детекции уровня экспрессии белка L3MBTL2 в биологическом образце.

Набор может дополнительно содержать средства для обеспечения сравнения уровня биомаркера в образце злокачественной опухоли и уровня биомаркера в эталонном контрольном образце. Например, но не в качестве ограничения, набор по настоящему изобретению может содержать один или более зондов, праймеров, антител или других детектирующих реагентов для детекции стандартных белка или иРНК, которые можно использовать для нормализации уровней экспрессии одного или более биомаркеров образцов для обеспечения сравнения. Неограничивающие примеры стандартных белков, например белков домашнего хозяйства, включают альфа- или бета-тубулин, актин, кофилин, винкулин и GADPH.

В определенных неограничивающих вариантах осуществления набор может дополнительно содержать инструкции по применению набора для детекции исследуемого биомаркера. Например, инструкции

могут описывать, что отсутствие и/или сниженная экспрессия биомаркера VAP1, указанного в настоящем документе, в образце злокачественной опухоли, получаемом у пациента, по сравнению с эталонным контрольным уровнем, является показателем увеличенной вероятности проявления противоопухолевого действия ингибитора EZH2 в злокачественной опухоли.

В определенных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может дополнительно содержать один или более ингибиторов EZH2. Неограничивающие примеры ингибиторов EZH2 описаны в разделе "Ингибиторы EZH2".

Приводимые далее примеры предложены для более полной иллюстрации изобретения, но их не следует рассматривать как ограничивающие его объем.

Пример 1. Потеря VAP1 приводит к увеличенной экспрессии EZH2 и его активности *in vitro*.

В этом примере проводили исследование *in vitro* механизма, по которому потеря активности VAP1 приводит к состоянию болезни.

Результаты.

Клетки SET2 трансдуцировали кшРНК, направленной к VAP1 со снижением экспрессии VAP1 *in vitro*. Снижение экспрессии VAP1, как подтверждается вестерн-блоттингом, приводило к возрастанию триметилирования гистона 3 по K27 (H3K27me3) (фиг. 1). Фиг. 9а: в клетках BaF3 была снижена экспрессия белка VAP1 с подтверждением потери VAP1 посредством вестерн-блоттинг, и проводили масс-спектрометрию гистонов. Нокдаун VAP1 в клетках BaF3 выявил повышение H3K27me3 (фиг. 1).

Показано, что VAP1 сильно мутирован в солидных опухолях (Carbone et al., 2012), таких как злокачественная мезотелиома и увеальная меланома. В клетках мезотелиомы, которые несут мутации в VAP1, например мутацию гомозиготной делеции H28, гомозиготную миссенс-мутацию H2452 и мутацию делеции H226, наблюдали повышение уровня экспрессии EZH2 по сравнению с клетками с активностью VAP1 дикого типа (фиг. 2). Кроме того, сверхэкспрессия VAP1 в клетках 293T *in vitro*, приводила к снижению EZH2 и экспрессии SUZ12, тогда как потеря экспрессии VAP1 приводила к повышению уровня экспрессии SUZ12 (фиг. 3).

Обсуждение.

Как описано выше, потеря экспрессии белка VAP1 вызывала повышение уровня H3K27me3, репрессивного маркера хроматина, устанавливаемого EZH2, и повышение экспрессии EZH2 и SUZ12 в системах линий злокачественных клеток *in vitro*. Ингибиторы EZH2 в настоящее время проходят клиническое тестирование у пациентов с лимфомами с активирующими EZH2 мутациями. Таким образом, статус мутаций VAP1 может помочь в идентификации пациентов, которые могут реагировать на лечение ингибиторами EZH2, что может быть эффективным для продления срока жизни у пациентов с мутантным VAP1.

Пример 2. Потеря VAR1 приводит к повышенной экспрессии EZH2 и его активности in vivo.

Способы и материалы

Таблица 1. Праймеры

Ген	Праймеры для генотипирования (мышь)
<i>Var1</i> up	ACTGCAGCAATGTGGATCTG (SEQ ID NO:1)
<i>Var1</i> down	GAAAAGGTCTGACCCAGATCA (SEQ ID NO:2)
<i>Var1</i> flox F	GCGCAACGCAATTAATGATA (SEQ ID NO:3)
<i>Var1</i> flox R	CAGTGTCCAGAATGGCTCAA (SEQ ID NO:4)
Ген	Праймеры для мутагенеза (человек)
<i>VAR1</i> C91A смысловой	CCACCAGCTGATACCCAACTCTGCTGCAACTCATGC (SEQ ID NO:5)
<i>VAR1</i> C91A антисмысловой	GCATGAGTTGCAGCAGAGTTGGGTATCAGCTGGTGG (SEQ ID NO:6)
Ген	Праймеры для кПЦР у мыши
<i>Ezh2</i> F	AGCACAAGTCATCCCCTTAAAG (SEQ ID NO:7)
<i>Ezh2</i> R	ЛЛТТСТГТТГТЛЛГГГCGACC (SEQ ID NO:8)
<i>Suz12</i> F	GGCTGACCACGAGCTTTTC (SEQ ID NO:9)
<i>Suz12</i> R	TGGTGGCATAAGATTTCGAGTTC (SEQ ID NO:10)
<i>Var1</i> F	GTTGGTGGATGACACGTCTG (SEQ ID NO:11)
<i>Var1</i> R	CTCAGGACTGAAGCCTTTGG (SEQ ID NO:12)
Актин В F	GATCTGGCACCACACCTTCT (SEQ ID NO:13)
Актин В R	CCATCACAATGCCTGTGGTA (SEQ ID NO:14)
<i>НохА5</i> F	GCTCAGCCCCAGATCTACC (SEQ ID NO:15)
<i>НохА5</i> R	GGCATGAGСТАТТTCGATCC (SEQ ID NO:16)
<i>НохА6</i> F	CCCTGTTTACCCCTGGATG (SEQ ID NO:17)
<i>НохА6</i> R	ACCGACCGGAAGTACACAAG (SEQ ID NO:18)
<i>НохА8</i> F	CTTCTCCAGTTCAGCGTCT (SEQ ID NO:19)
<i>НохА8</i> R	AGGTAGCGGTTGAAATGGAA (SEQ ID NO:20)
<i>НохА9</i> F	ATGCTTGTGGTTCTCCTCCA (SEQ ID NO:21)
<i>НохА9</i> R	GTTCCAGCGTCTGGTGTTTT (SEQ ID NO:22)
Ген	Праймеры для кПЦР у человека
<i>E-CAD</i> F	GACCGGTGCAATCTTCAA (SEQ ID NO:23)
<i>E-CAD</i> R	TTGACGCCGAGAGCTACAC (SEQ ID NO:24)
<i>HPRT</i> F	CATTATGCCGAGGATTTGG (SEQ ID NO:25)

<i>HPRT</i> R	GCAAGTCTTTTCAGTCTCTGT (SEQ ID NO:26)
<i>BAP1</i> F	CGATCCATTTGAACAGGAAGA (SEQ ID NO:27)
<i>BAP1</i> R	CTCGTGGAAGATTTTCGGTGT (SEQ ID NO:28)
<b>Ген</b>	<b>Праймеры для кПЦР ChIP (человек)</b>
<i>EZH2-1</i> F	AGCTGACTCAAGCTGCTTGT (SEQ ID NO:29)
<i>EZH2-1</i> R	CAGGAAACCTGAGATTTTCA (SEQ ID NO:30)
<i>EZH2-2</i> F	CTCAGGACAG TTCTGTTTGG (SEQ ID NO:31)
<i>EZH2-2</i> R	TCTGACTTAGTTGGAGAACT (SEQ ID NO:32)
<i>SUZ12-1</i> R	TGAATACAGATGCAGTTATAAGAGAGA (SEQ ID NO:33)
<i>MORC3</i> F	CATCTTCCCAAGCTCCCAAT (SEQ ID NO:34)
<i>MORC3</i> R	GAGCGAGCTACAAAGCCAGGA (SEQ ID NO:35)
<i>E2F6</i> F	CCTGTTCCCTTCCCTCTGGAA (SEQ ID NO:36)
<i>E2F6</i> R	CGACGCAGACGGAAAAGAG (SEQ ID NO:37)
<i>PHF20</i> F	TGAGTGGGGACTTCGTGTTC (SEQ ID NO:38)
<i>PHF20</i> R	GACCAACCGACAGAAGGACT (SEQ ID NO:39)
<i>JAM2</i> F	TCCACCCCTAGGCTGAAAAG (SEQ ID NO:40)
<i>JAM2</i> R	GATCGGCTTTGTGTCTGGTC (SEQ ID NO:41)

Животные: всех животных содержали в центре Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Все процедуры с животными проводили в соответствии с руководствами по уходу и использованию лабораторных животных, и они были одобрены комитетом по уходу и использованию животных института Memorial Sloan Kettering Cancer Center.

Получение мышей с недостаточностью *BAP1* и с недостаточностью *BAP1/Ezh2*: эмбриональные стволовые клетки с возможностью направленного воздействия на экзоны 6-12 *BAP1* получали из European Conditional Mouse Consortium. Выше по последовательности была вставлена фланкированная *Frt* кассета с преждевременным стоп-сигналом, содержащая кассету *lacZ* и неомицина. Клоны ES клеток размножали и инъецировали в первичные бластоцисты. Полученных мышей скрещивали с зародышевой линией, удаляющей *Flp* (The Jackson Laboratory), для вырезания фланкированной *Frt* кассеты. Затем этих мышей скрещивали с трансгенными мышами с индуцируемым *IFN-α Mx1-cre* (The Jackson Laboratory) для оценки действия индуцируемой потери *BAP1* в системе гемопоэза. Однопометных мышей *BAP1 fl/fl*, *BAP1 fl/+* и *BAP1+/+* генотипировали посредством ПЦР с праймерами *BAP1-up* (actgcagcaatgtggatctg (SEQ ID NO:1)), *BAP1-down* (gaaaaggctctgaccscagatca (SEQ ID NO:2)) с использованием следующих параметров: 95°C в течение 10 мин, с последующими 40 циклами 94°C в течение 10 с, 65°C в течение 40 с и 72°C в течение 1 мин, а затем 72°C в течение 5 мин. Аллель WT детектировали при 300 п.н., тогда как фланкированный аллель *LoxP* детектировали при 500 п.н. продукта ПЦР. Вырезание после индукции *IFN-α* подтверждали посредством ПЦР с праймерами для детекции полос фланкированных *LoxP* и полос с вырезанными последовательностями: *BAP1-F* (actgcagcaatgtggatctg (SEQ ID NO:1)), *BAP1-F2* (gcgcaacgcaattaatgata (SEQ ID NO:3)) и *BAP1-R* (cagtgtccagaatggctcaa (SEQ ID NO:4)), с использованием таких же параметров ПЦР, как указано выше. Мышей с *Mx1-Cre-BAP1 f/f* скрещивали с мышами с *Ezh2 f/f* 12. Мышам *Mx-cre BAP1f/f* с возможностью условной делеции и контрольным мышам *BAP1f/f* проводили четыре интраперитонеальные инъекции поли I:поли C по 200 мкл раствора 1 мг/мл. Через два недели после вырезания собирали периферическую кровь посредством ретроорбитального кровотоечения с использованием гепаринизированных гематокритных капилляров (Thermo Fisher Scientific). Подтверждали вырезание, и количественные показатели периферической крови получали с использованием *Neova* по стандартным инструкциям производителя. Фиксированные в формалине, погруженные в парафин тканевые срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E). Делецию *BAP1* подтверждали посредством ПЦР вырезания из генома и анализа вестерн-блоттинга. Хвосты посылали в сервис генотипирования *Transnetix* (Cordova, TN) для генотипирования на основе кПЦР фланкированных *LoxP* и вырезанных аллелей *Ezh2*. Вырезание подтверждали посредством вестерн-блоттинга.

Ксенотрансплантаты и введение EPZ011989 *In vivo*: группам мышей *NOD-SCID* в возрасте 10 недель подкожно в бок инъецировали 6-10×10<sup>6</sup> клеток линий мезотелиомы (*MSTO-211H*, *Meso10*, *H226* и *H2452*) в смеси 1:1 матригеля и среды. Когда опухоли достигали размера приблизительно 60-80 мм<sup>3</sup>, начинали обработку носителем (0,5% *NaCMC*+0,1% *Tween-80* в воде) или EPZ011989. В течение экспери-

мента EPZ011989 или носитель вводили перорально дважды в сутки в концентрации 500 мг/кг. Объемы опухолей оценивали в трех измерениях с использованием циркуля. После обработки выделяли опухоли или ткань легких и использовали для вестерн-блоттинга для оценки ингибирования мишени. Разрабатывали предустановленные критерии для исключения мышей из экспериментов с ксенотрансплантатами, если после имплантации опухоли не формировались (на 75% меньше, чем среднее у животных с имплантацией из той же самой группы). Животные не исключали из испытаний лекарственного средства. Для всех исследований лекарственного средства на ксенотрансплантатах размер опухоли контролировали в течение 10 суток и после этого мышей случайно распределяли по размеру опухоли. Генетические испытания EPZ011989 при KO VAP1 проводили с рандомизацией с использованием анализа СВС через 3 недели после поли I:поли С и подтверждали, что средние количества WBC были эквивалентны в обработанном носителем и средством группах. Пять животных в группе обрабатывали перорально носителем (описано выше) или 500 мг/кг EPZ011989 дважды в сутки в течение 16 суток. В этих экспериментах испытания не были слепыми.

Гистологические анализы: мышей умерщвляли и подвергали аутопсии, а затем выделенные образцы тканей фиксировали в течение 24 ч в 4% параформальдегиде, дегидратировали и заливали парафином. Парафиновые блоки нарезали по 4 мкм и окрашивали H&E, Ki67, на E-кадгерин или TUNEL. Изображения получали с использованием микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss).

Культура клеток: клетки 293T культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS) и заменимыми аминокислотами. Линии клеток лейкоза человека (SET2) и линии клеток мезотелиомы человека (JMN, Met5a, MSTO-211H, H2373, H226, H2452) культивировали в среде RPMI-1640, дополненной 10% FBS. MSTO-211H получали из ATCC, тогда как остальные линии мезотелиомы представляли собой щедрый подарок Prasad Adusumilli.

Выделение РНК, амплификация SMARTer, секвенирование и анализ транскриптома в Proton: клетки костного мозга сортировали в устройстве FACS на GMP (Lin<sup>-</sup>cKit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>Fcy<sup>+</sup>) с использованием FACS Aria. Выделяли тотальную РНК из 200-500К клеток с использованием реагентов для выделения РНК TRIzol (кат. № 15596-026, Life Technologies). До амплификации подтверждали качество РНК посредством анализа 20-50 пг каждого образца с использованием набора RNA 6000 pico и bioAnalyzer (Agilent). Затем 10 нг тотальной РНК высокого качества (RIN>8) амплифицировали с использованием набора для секвенирования малых количеств РНК SMARTER® Universal Low Input RNA Kit for Sequencing (Clontech Laboratory, кат. № 634940) по инструкциям, предоставляемым производителем. Из амплифицированного материала получали библиотеку полного транскриптома по протоколу для набора Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Life Technologies) с 16 циклами ПЦП. На образцы наносили штрих-код и получали содержащую матрицу частицы ION pi™ ION SPHERE™ (ISP) с использованием системы ion One Touch II и набора ION PI™ Template OT2 200kit v2 (Life Technologies). Обогащенные частицы подвергали секвенированию в системе секвенирования Proton с использованием химического состава для 200 п.н. версии 2. Получали в среднем от 70 до 80 млн прочтений на образец и 76 до 82% прочтений картировали на основании иРНК. BAM с "сырым" выходом обратно конвертировали в FASTQ с использованием PICARD Sam2Fastq. Затем прочтения сначала картировали на геном мыши с использованием gnaStar. Используемым геномом был MM9 с соединениями из ENSEMBL (Mus\_musculus.NCBIM37.67) и с выступом прочтений 49. Затем любые некартированные прочтения картировали на MM9 с использованием BWA MEM (версии 0.7.5a). Затем два картированных BAM объединяли, сортировали и рассчитывали количества на уровне генов с использованием htseq-count (параметры -s у -m intersection-strict) и с теми же моделями генов (Mus\_musculus.NCBIM37.67). "Сырые" данные загрузили в базу данных GEO со следующим номером доступа: GSE61360.

Выделение гистонов, ELISA гистонов, вестерн-блоттинг гистонов и LC/MS гистонов: гистоны выделяли стандартными способами выделения или в течение ночи с использованием набора Active Motif Histone Extraction Minikit (40026). ELISA гистонов проводили с использованием набора для Elisa триметил-K27 (Active Motif, 53106), нормализуя по стандартной кривой H3K27me3 и общему белку H3. Вестерн-блоттинг гистонов проводили с 3-5 мкг гистонов. Для LC/MS гистонов лизировали 12 млн контрольных клеток и клеток с KO VAP1, выделяли ядра, гистоны выделяли с использованием 0,4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и химически дериватизировали с использованием пропионового ангидрида, как описано ранее 26. Затем гистоны расщепляли трипсином и разделяли посредством жидкостной хроматографии (вн. диам. 75 мкм, длина 15 см, упаковка средой MagicC18aq, д.ф. 3 мкм) с выводом на масс-спектрометр TSQ Quantum Ultra. Данные анализировали с использованием Skyline 27 и проводили относительный количественный анализ по площадям пиков.

Получение и иммунопреципитация хроматина, получение и секвенирование библиотеки ChIP и анализ данных ChIP-Seq: клетки костного мозга обогащали клетками c-Kit<sup>+</sup> с использованием набора для обогащения гемопоэтических клеток мыши EasySep Mouse Hematopoietic cell Enrichment Kit (Stem Cell Technologies, 19756). 5×10<sup>6</sup> клеток фиксировали в 1% растворе формальдегида без метанола, а затем ресуспендировали в буфере для лизиса с SDS. Лизаты обрабатывали ультразвуком в фокусируемом ультразвуковом устройстве E220 (Covaris) до желаемого распределения размера фрагментов 100-500 пар осно-

ваний. Реакции IP проводили с использованием антител к триметил-Н3K27 (Cell Signaling, 9733), антител к монометил-Н4K20 (Abcam, 9051) и IgG (Santa Cruz, 2027), каждую приблизительно на 400000 клетках, как описано ранее (Krivtsov et al., 2008). Анализы ChIP обрабатывали в системе SX-8G IP-STAR Compact Automated System (Diagenode) с использованием протокола Direct ChIP, как описано в другом документе (O'Geen et al., 2011). Затем у элюированных фрагментов хроматина убрали шивки и очищали фрагменты ДНК с использованием гранул Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter).

Из обогащенной ChIP и вводимой ДНК получали библиотеки со штрих-кодом с использованием набора готовой смеси NEBNext ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set для Illumina (New England Biolabs) и адаптеров TruSeq (Illumina) по инструкциям производителя в устройстве SX-8G IP-STAR Compact Automated System (Diagenode). Для амплификации библиотек использовали высокоточную ДНК-полимеразу Phusion (New England Biolabs) и праймеры для ПЦР TruSeq (Illumina), после чего библиотеки очищали с удалением димеров адаптеров с использованием гранул AMPure XP и мультиплексировали на HiSeq 2000 (Illumina).

Прочтения корректировали по качеству и обрезали адаптере с использованием "trim\_galore" с последующим выравниванием по сборке мыши mm9 посредством bowtie2 с использованием параметров по умолчанию. Перед последующим анализом выровненные прочтения с одним и тем же начальным положением и ориентацией сжимали в одно прочтение. Получали профили плотности посредством продления каждого прочтения до среднего размера фрагмента библиотеки, а затем подсчитывали плотность с использованием комплекта BEDTools. Обогащенные области выявляли с использованием MACS 1.4 с параметрами по умолчанию и индексировали по сравнению с соответствующими входными библиотеками. Все трэки геномного браузера и таблицы плотности прочтений нормализовали на глубину секвенирования. Для сравнения образцов ChIP-seq в условиях контроля и КО тестировали сигналы в трех повторениях на состояние с использованием U-критерия Манна-Уитни или t-критерия. Кластерный анализ проводили на нормализованных количественных данных в Matlab с использованием пакета кластерного анализа kmeans. Анализ мотивов проводили в Homer с использованием параметров по умолчанию программы findMotifsGenome.

Вестерн-блоттинг и иммунопреципитация: клетки для экспериментов вестерн-блоттинга и иммунопреципитации лизировали в следующем буфере: 150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,4), 5 mM ЭДТА, 1% Triton, протеазы arrest (EMD) и ингибиторов фосфатазы (Calbiochem). Для проведения иммунопреципитации в присутствии бензоназы клетки лизировали в буфере BC-300: 20 mM Tris (pH 7,4), 10% глицерин, 300 mM KCl, 0,1% NP-40. Очищенный лизат обрабатывали MgCl<sub>2</sub> до 2,5 mM и добавляли бензоназу в концентрации 1250 Ед/мл. Лизат инкубировали в течение 1 ч с центрифугированием и реакцию терминировали, добавляя 5 mM ЭДТА. Расщепление ДНК подтверждали, запуская лизат до постановки эксперимента по иммунопреципитации на геле с бромистым этидием. Используемые антитела включали антитела к: BAP1 (C-4; Santa Cruz sc-28383), EZH2 (Active Motif, 39933, Active Motif, 39901 или Millipore, 07-689), SUZ12 (Abcam, Ab12073), ASXL1 (N-13; Santa Cruz sc-85283), L3MBTL2 (Active Motif, 39569), Мус-Tag (Cell Signaling, 2276), тубулину (Sigma, T9026), H3K27me3 (Abcam, 6002 или Millipore, 07-449), H3 (Abcam, Ab1791) и H4K20me1 (Abcam, Ab9051).

Анализы и антитела для проточной цитометрии: окрашивание поверхностных маркеров живых клеток костного мозга и селезенки проводили посредством начального лизирования клеток буфером для лизиса с хлоридом аммония-бикарбонатом калия и отмывкой клеток фосфатно-солевым буфером (PBS). Клетки окрашивали антителами в PBS в течение 20 мин на льду. Для окрашивания гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников клетки окрашивали смесью для линий, включающей CD4 (RM4-5), CD3 (17A2), B220 (RA3-6B2), NK1.1 (PK136), Gr-1 (RB6-8C5), Cd11b (M1/70) и Ter119, обеспечивая исключение из анализа зрелых линий. Клетки также окрашивали антителами к c-Kit (2B8), Sca-1 (D7), FcγRII/III (2.4G2) и CD34 (RAM34). Для оценки состава зрелых мононуклеарных клеток использовали Mac1, Gr-1, B220 и CD4/CD3. Анализ клеточного цикла проводили посредством окрашивания клеток смесью для гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, описанной выше. Клетки фиксировали с использованием набора FIX and PERM (Invitrogen, кат. № GAS-003). Клетки после фиксации окрашивали Ki67, а затем окрашивали DAPI с последующим анализом на LSR Fortessa.

Плазмиды: полноразмерный клон кДНК FLAG-L3MBTL2 человека получали из Addgene (плазида 28232). Меченная Мус-His конструкция убиквитина представляла собой щедрый подарок Xuejun Jiang. Полноразмерный клон кДНК HA-FLAG BAP1 человека получали из Addgene (плазида 22539). Меченная 3X FLAG конструкция BAP1 представляла собой щедрый подарок Marc Ladanyi. Конструкции мутантной деубиквитиназы (C91A, C91S) получали с использованием наборов для сайт-специфического мутагенеза Agilent и подтверждали посредством секвенирования полноразмерной ДНК.

Короткошпилечную РНК получали из консорциума RNAi Consortium (TRC) в векторе pLKO.1-пуromицин. Последовательности для коротких шпилек представляли собой следующее: BAP1 человека (ID TRC Oligo: TRCN0000078702 и TRCN0000078698), BAP1 мыши (TRCN0000030719 и TRCN0000030720), L3MBTL2 человека (TRCN0000021724 и TRCN0000021726) и контрольный вектор pLKO.1-пуromицин, кодирующий кшРНК для люциферазы (shLUC).

Анализы убиквитина: клетки HEK293T высевали в 10-см чашку и через 24 ч транецировали 4 мкг

экспрессирующей конструкции Мус-His-Ubi и контролем, 1 мкг сверхэкспрессирующих конструкций L3MBTL2 и/или 1-10 мкг VAP1-GFP. Через 48 ч после трансфекции клетки лизировали в буфере для лизиса на основе гуанидина HCl: 6 М гуанидин, 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ Tris, pH 8,0 и 10 мМ BME. Белки His-Ubi очищали посредством инкубации в 20 мкл Ni-NTA-агарозы (Qiagen) в течение 4 ч при комнатной температуре. Гранулы отмывали последовательно по 1 мл 4 отмывочными буферами: буфер А - 6 М гуанидин, 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ Tris, pH 8,0, 10 мМ BME и 0,2% Triton-X; буфер В - 8 М мочевины, 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ Tris, pH 8,0, 10 мМ BME и 0,2% Triton-X; буфер С - 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ Tris, pH 6,3, 10 мМ BME и 0,2% Triton-X; буфер D - 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ Tris, pH 6,3, 10 мМ BME и 0,1% Triton-X. Все буферы дополняли 15 мМ имидазолом. Меченные His белки очищали от гранул посредством кипячения с буфером Лэммли с 2× SDS, дополненным имидазолом. Затем белки анализировали посредством вестерн-блоттинга.

Анализ формирования колоний In vitro: клетки сортировали на клетки Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Scal<sup>+</sup> с использованием FACSARIA. 100 клеток в двух повторениях высевали в метилцеллюлозу (MethoCult GF M3434, Stem Cell Technologies). Через 14 суток после высевания подсчитывали колонии и колонии собирали посредством отмывки PBS. Затем клетки лизировали для выделения РНК и гистонов.

Транзиторная трансфекция: клетки 293Т трансфицировали указанными конструкциями с использованием реагента для трансфекции генов X-treme (Roche). Белок и/или гистоны выделяли через 48-72 ч после трансфекции.

Анализ инвазии: клетки мезотелиомы (MSTO-211H, H2373, H226 и H2452) высевали в колбы T75 (100000 клеток). Через 12 ч высеянные клетки обрабатывали GSK126 (0-2 мкМ) (Chemitek), а затем оставляли для пролиферации на 7 суток. Затем 250000 обработанных клеток помещали на верх инвазионной камеры Matrigel (BD Biosciences, каталожный номер 354480) в средах, не содержащих сыворотки, а нижняя камера содержала среды с сывороткой. Через 22 ч клетки на нижней стороне мембраны окрашивали кристаллическим фиолетовым и подсчитывали с использованием Image J.

Анализ люциферазы: клетки 293Т в дополнение к конструкциям с EV, VAP1 и L3MBTL2 транзитивно трансфицировали репортерной конструкцией с промотором EZH2 pGL3 (щедрый подарок Naomi Goldfinger) и контрольной конструкцией Switchgear Renilla. Клетки оценивали на люциферазную активность с использованием системы анализа DualLuciferase Reporter Assay System (Promega). Клетки высевали в 24-луночные планшеты и совместно трансфицировали 200 нг конструкции pGL3-EZH2-люцифераза, 200 нг контрольной конструкции люциферазы Renilla и 500 нг экспериментальных конструкций. После трансфекции клетки инкубировали 48 ч, лизировали в течение 15 мин при комнатной температуре и оценивали люциферазную активность на люцинометре. Показатели люцифераза светляка нормализовали на контроль трансфекции Renilla.

Статистические анализы: для анализа статистической значимости, не учитывая того, что описано в тексте, использовали t-критерий Стьюдента с коррекцией Уэлша. Для статистических расчетов использовали программное обеспечение GraphPad Prism. Ошибку рассчитывали с использованием SEM, \*p<0,05, \*\*p<0,005.

#### Результаты.

Геномные исследования идентифицировали соматические мутации в опухолевых супрессорах ASXL1 и VAP1 при различных злокачественных новообразованиях. Гомолог Asx дрозофилы ASXL1 и гомолог Calypso VAP1 формируют комплекс, который удаляет H2AK119Ub (Scheuermann et al., 2010). Однако не показано, что комплекс VAP1-ASXL1 играет роль в трансформации мутанта VAP1. Инактивирующие мутации в ASXL1 являются наиболее частыми в миелоидных злокачественных новообразованиях (Abdel-Wahab et al., 2011; Bejar et al., 2011; Gelsi-Boyer et al., 2009), тогда как повторяющиеся мутации VAP1 часто наблюдают при мезотелиоме (Bott et al., 2011), почечноклеточной карциноме (Pena-Llopis et al., 2012) и метастатической увеальной меланоме (Harbour et al., 2010), что позволяет полагать, что VAP1 и ASXL1 играют существенные роли в опухолевой супрессии. Эти профили мутаций нельзя объяснить дифференциальной тканеспецифической экспрессией VAP1 и ASXL1 (фиг. 5a-c). Этот пример определяет механизмы, посредством которых потеря VAP1 приводит к трансформации, независимо от ASXL1, и определяет терапевтические уязвимости в мутантных по VAP1 злокачественных клетках.

Недавние исследования продемонстрировали, что соматическая потеря VAP1 может способствовать гемопоэтической трансформации (Deu et al., 2012). Проведены исследования влияния условной делеции VAP1 на экспрессию генов и состояние хроматина в гемопоэтических клетках (фиг. 5a, b). Условную делецию VAP1 получали с использованием схемы, представленной на фиг. 5d. Использовали MX-Cre, рекомбиназу, которая обуславливает делецию VAP1 в гемопоэтических тканях после индукции у взрослого животного. Потеря VAP1 приводила к полностью пенетрантному миелопролиферативному заболеванию со спленомегалией (фиг. 6a), лейкоцитозом (фиг. 5e, f), анемией (фиг. 5g, h) и размножением гранулоцитарно-макрофагальных предшественников (GMP) (фиг. 5i-k). Например, у мышей с нокаутом (KO) VAP1 наблюдали, что размер, например масса и длина селезенки, превышают размер у мышей с VAP1 дикого типа (фиг. 6a, 10c и 11c). Также наблюдали усиление пролиферации и происхождения клеточного цикла у миелоидных предшественников с дефицитом VAP1 (фиг. 5L). Анализ последовательно РНК выявил, что у большинства дифференциально экспрессируемых генов в GMP с дефицитом

ВАР1 была снижена экспрессия ( $p\text{-корр} < 0,001$ ) (фиг. 7а). Хотя наблюдали значимое перекрытие наборов дифференциально экспрессируемых генов в предшественниках с КО ВАР1 и *Asxl1*, во многих случаях наблюдали парадоксальное обратное действие на экспрессию генов (фиг. 6В). Анализ представленности групп генов (GSEA) идентифицировал наборы генов с обратным воздействием, представленные в предшественниках с КО ВАР1 и *Asxl1* (Abdel-Wahab et al., 2013) (фиг. 7b). Сайленсинг ASXL1 приводит к повышению экспрессии генов кластера *NoxA* в соответствии с уменьшенной активностью PRC2 (Abdel-Wahab et al., 2012). В отличие от этого, в клетках с дефицитом ВАР1 наблюдали сниженную экспрессию представителей генов *NoxA* (фиг. 6с) и сниженную экспрессию групп генов *NoxA* (фиг. 7с). Эти данные демонстрируют, что потеря *Asxl1* и ВАР1 оказывает противоположное действие на регуляцию генов.

ASXL1 напрямую взаимодействует с комплексом PRC2 и удаление ASXL1 уменьшает количество общего и сайт-специфического H3K27me3 (Abdel-Wahab et al., 2012). Принимая во внимание различное действие потери *Asxl1* и ВАР1 на экспрессию генов, исследовали влияние делеции ВАР1 на H3K27me3. При масс-спектрометрии (фиг. 6d), вестерн-блоттинге (фиг. 6е) и ELISA (фиг. 8а) гистонов наблюдали увеличение уровней H3K27me3 в клетках с КО ВАР1. Секвенирование после иммунопреципитации хроматина (ChIP-Seq) с H3K27me3 выявило общее увеличение у мышей с КО ВАР1 (фиг. 6f) с увеличением количества широких доменов H3K27me3 (Beguelin et al., 2013) (фиг. 6g) и увеличением "распространенности" широких доменов H3K27me3 в соседние локусы (фиг. 6h). Это увеличение количества и распространения H3K27me3 хорошо видно в локусе *NoxA* клеток с КО ВАР1 (фиг. 6i). Участки, маркированные H3K27me3, в клетках с КО ВАР1 преимущественно находятся в промоторных областях генов (фиг. 8b), и гены с захваченными H3K27me3 промоторами были обогащены по усиленной репрессии ( $FDR < 0,001$ ) (фиг. 6j). Подобные результаты наблюдали в очищенных GMP (фиг. 6k). Гены с нарушенной регуляцией посредством ассоциированного с КО ВАР1 H3K27me3 и репрессии генов участвовали в зависимой от EZH2 регуляции, коммитировании/дифференцировке и пролиферации линий клеток (фиг. 6l, фиг. 8с). Сайленсинг ВАР1 увеличивал уровни H3K27me3 (фиг. 9а), а резэкспрессия ВАР1 в клетках с дефицитом ВАР1 снижала уровни H3K27me3 (фиг. 9b). В отличие от этого, аллель ВАР1 с дефицитом деубиквитиназы не снижал уровень H3K27me3 (фиг. 9с), демонстрируя, что изменения уровня H3K27me3 происходят вследствие каталитической активности ВАР1.

Затем оценивали роль опосредуемого PRC2 H3K27me3 на зависимую от ВАР1 трансформацию, исследуя влияние потери *Ezh2* (Su et al., 2003) на трансформацию *in vivo*. Делеция *Ezh2* снижала уровни H3K27me3 у мышей с дефицитом ВАР1/*Ezh2* по сравнению с мышами с нокаутом ВАР1 (фиг. 11а). Делеция *Ezh2* устраняла миелоидные злокачественные новообразования, индуцируемые потерей ВАР1 (фиг. 10а), с ослабленными спленоомегалией (фиг. 11b, c), лейкоцитозом (фиг. 11d) и анемией (фиг. 11е). Совместная потеря ВАР1/*Ezh2* уменьшала размножение миелоидных предшественников (фиг. 11f), уменьшала размножение миелоидных клеток  $\text{Mac1}^+\text{Gr1}^+$  (фиг. 11g) и восстанавливала эритроидную дифференцировку ( $\text{CD71}^+\text{Ter119}^+$ ) (фиг. 10b). Наблюдали сниженную пролиферацию предшественников с дефицитом ВАР1/*Ezh2* (фиг. 11h). Гаплонедостаточность *Ezh2* снижала, но не устраняла, миелопролиферацию при дефиците ВАР1 (фиг. 10с, d) в соответствии с зависимой от дозы необходимостью *Ezh2*. В соответствии с генетическими данными обработка мышей с КО ВАР1 низкомолекулярным ингибитором EPZ011989 (Campbell et al., 2015) уменьшала уровни H3K27me3, спленоомегалию и количество лейкоцитов (фиг. 11i-k). Эти данные демонстрируют, что для миелоидной трансформации с дефицитом ВАР1 необходимы PRC2 и специфическая активность EZH2.

Затем исследовали механизм, посредством которого делеция ВАР1 повышала уровни H3K27me3. В отличие от описанных взаимодействий между ASXL1 и ВАР1 и между ASXL1 и PRC2, взаимодействие между ВАР1 и EZH2 посредством совместной IP не идентифицировано (фиг. 13а). Наблюдали повышение иРНК и экспрессии белка *Ezh2* и *Suz12* (фиг. 13b, c) в соответствии с ролью ВАР1 в регуляции экспрессии PRC2. Кроме того, анализ отсортированных клеток  $\text{Lin}^-\text{Sca}^+\text{Kit}^+$  (популяция, содержащая гемопоэтические стволовые клетки) из всего костного мозга мышей с КО ВАР1 продемонстрировал значимое повышение экспрессии РНК *Suz12* и *Ezh2* по сравнению с мышами с ВАР1 дикого типа (фиг. 17). Кроме того, вестерн-блоттинг всего костного мозга выявил повышение экспрессии белка EZH2 и SUZ12 в клетках с КО ВАР1 по сравнению с контрольными клетками (фиг. 17). Резэкспрессия ВАР1 в клетках костного мозга с КО ВАР1 снижала экспрессию иРНК *Ezh2* до нормальных уровней (фиг. 12а). Предполагается, что потеря ВАР1 может непосредственно изменять другие маркеры гистонов, которые затем могут изменять состояние хроматина по ключевым локусам-мишеням, включая EZH2. Масс-спектрометрия гистонов выявила заметное снижение уровней H4K20me1 в клетках с КО ВАР1 (фиг. 13d) по сравнению с другими определяемыми маркерами гистонов (фиг. 12b). Экспрессия ВАР1, но не ASXL1 или BMI1, повышала уровни H4K20me1 в локусе EZH2 (фиг. 12с). Таким образом, предполагается, что потеря маркера H4K20me1 может играть важную роль в зависимой от ВАР1 экспрессии генов. Единственной известной метилтрансферазой, формирующей H4K20me1, является SETD8 (Nishioka et al., 2002). Экспрессия SETD8 в клетках мезотелиомы с мутантным ВАР1 (H226, H2452) увеличивала апоптоз и снижала пролиферацию, тогда как клетки дикого типа (MSTO-211H и Meso10) оставались нетронутыми (фиг. 13е, f). Сверхэкспрессия SETD8 в клетках мезотелиомы снижала экспрессию иРНК и белка EZH2 (фиг. 13g, h). Линии клеток с ВАР1 дикого типа были более чувствительны к ингибитору SETD8 (Blum et al., 2014)

(BVT594), чем линии клеток с мутантным VAP1 (фиг. 13i).

Предположено, что VAP1 деубиквитинизирует модулятор хроматина, которые регулирует H4K20me1. Анализ данных ChIP-Seq (Abdel-Wahab et al., 2013; Dey et al., 2012) идентифицировал кластер генов с захватом VAP1, но не связыванием с Asxl1 (кластер 1) и были обогащены мотивом E-бокс (фиг. 14a, b). Предыдущие исследования продемонстрировали, что атипичные белки группы поликомб L3MBTL1 и L3MBTL2 связывают мотивы E-бокс, и могут связывать и поддерживать уровень H4K20me1 (Guo et al., 2009; Qin et al., 2012; Trojer et al., 2011; Trojer et al., 2007). Мыши с дефицитом L3mbtl1 не обладают выраженным фенотипом (Qin et al., 2010), тогда как у мышей с дефицитом L3mbtl2 наблюдают эмбриональную летальность сходную по времени с потерей VAP1 (Dey et al., 2012; Qin et al., 2012). Таким образом, исследовали, приводит ли потеря VAP1 к изменениям экспрессии L3mbtl2. Была снижена экспрессия белка, но не РНК, L3MBTL2 в гемопоэтических клетках с KO Vap1 (фиг. 15A,B) и в клетках мезотелиомы с мутантным VAP1 по сравнению с клетками мезотелиомы с VAP1 дикого типа (фиг. 13j). Было снижено убиквитинирование L3MBTL2 в клетках, экспрессирующих VAP1 (фиг. 13k), а обработка ингибитором протеасом увеличивала стабильность L3MBTL2 в клетках с мутантным VAP1 (фиг. 15c). Экспрессия L3MBTL2 снижает уровни белка EZH2 с коэкспрессией VAP1 и без нее (фиг. 15d) и экспрессия VAP1 или сверхэкспрессия L3MBTL2 снижали активность промотора EZH2 (фиг. 15e). В отличие от этого, сайленсинг L3MBTL2 повышал экспрессию EZH2 (фиг. 15f). В клетках, экспрессирующих L3MBTL2 и VAP1, наблюдали обогащение L3MBTL2 и VAP1 в локусе EZH2 (фиг. 15g, h). Не будучи связанными с конкретной теорией, эти данные позволяют предполагать, что VAP1 и L3MBTL2 взаимодействуют (фиг. 15i) и совместно оккупируют локус EZH2. Потеря VAP1 приводит к снижению стабильности L3MBTL2 и повышению выхода транскрипции EZH2 (фиг. 13l).

Анализ данных TCGA выявил, что экспрессия иРНК EZH2 при мезотелиоме увеличена (фиг. 16a). Затем оценивали, может ли ингибирование EZH2 препятствовать выживанию линий клеток мезотелиомы с мутантным VAP1. Сайленсинг EZH2 индуцировал апоптоз в линиях клеток с мутантным VAP1, тогда как линии клеток дикого типа продолжали пролиферировать (фиг. 16b, c). Сайленсинг EZH2 устранял формирование опухоли *in vivo* у линий клеток с мутантным VAP1, но не линий клеток дикого типа (фиг. 16d). Сверхэкспрессия EZH2 в линиях клеток с VAP1 дикого типа увеличивала пролиферацию (фиг. 20a) и чувствительность к ингибированию EZH2 (фиг. 20b). Линии клеток с мутантным VAP1 были более чувствительны к ингибированию EZH2 (EPZ011989) *in vitro* в 2d (фиг. 16e) и 3d культурах (фиг. 16f). Затем оценивали влияние ингибирования EZH2 *in vivo*. Ингибирование EZH2 значимо снижало размер опухоли с мутантным VAP1 по сравнению с обработанными носителем мышами (фиг. 16g), тогда как опухоли дикого типа были менее чувствительными/нечувствительными к ингибированию EZH2 (фиг. 16h), несмотря на сходное действие на H3K27me3. Ингибирование EZH2 устраняло метастазирование в легкие у линий клеток мезотелиомы с метастатическим потенциалом с мутантным VAP1 (фиг. 16g) в соответствии с ролью VAP1/EZH2 в метастазировании (Harbour et al., 2010). Ингибирование EZH2 снижало инвазию и повышала экспрессию E-кадгерина *in vitro* (фиг. 20c-d). Затем оценивали влияние ингибирования EZH2 с использованием ингибитора VAP1 GSK126. Клетки мезотелиомы с мутантным VAP1 инъецировали в бок мышам NOD-SCID, а затем, после формирования опухоли, начинали обработку носителем или 150 мг/кг GSK126. Ингибирование EZH2 значимо снижало размер опухоли по сравнению с обработанными носителем мыши (фиг. 21a и фиг. 4). Обработка GSK126 значимо снижала H3K27me3 в клетках с мутантным VAP1 *in vivo* (фиг. 21b). Патологический анализ выявил, что ингибирование EZH2 было ассоциировано со сниженным окрашиванием Ki67 и повышенным окрашиванием TUNEL (фиг. 21c). Эти данные означают, что EZH2 представляет потенциальную терапевтическую мишень в мутантных по VAP1 злокачественных клетках.

Идентификация онкогенных мутаций EZH2 (Morin et al., 2010; Morin et al., 2011; Pasqualucci et al., 2011) привела к разработке специфичных для мутантов эпигенетических лечебных средств. Однако большинство мутаций в эпигенетических регуляторах приводят к потере функции так, что они не представляют собой легкие непосредственные терапевтические мишени. Ингибиторы EZH2 недавно начали тестировать в клинических испытаниях (McCabe et al., 2012), и описываемые данные позволяют предполагать, что потеря VAP1 приводит к специфичной для мутаций зависимости PRC2, которую необходимо дополнительно исследовать в доклинических и клинических исследованиях. Эти данные перекликаются с недавними исследованиями, позволяющими предполагать наличие у ингибирования PRC2 роли в мутантных по SWI/SNF рабдоидных опухолях (Alimova et al., 2013; Knutson et al., 2013), и анализы продемонстрировали, что мутации VAP1 являются взаимоисключающими с мутациями SWI/SNF (Wilson et al., 2010). Эти данные позволяют предполагать, что подробные исследования мутаций в эпигенетических регуляторах можно использовать для информирования разработчиков лечебных средств, которые обращают специфичное для мутантов действие на эпигенетическое состояние в различных случаях злокачественных опухолей.

#### Обсуждение

VAP1 и ASXL1 взаимодействуют с формированием деубиквитиназного комплекса поликомб, который может устранять моноубиквитин лизина 119 гистона H2A (H2AK119Ub). Однако VAP1 и ASXL1 в различных типах злокачественных опухолей являются мутантными в соответствии с независимыми ро-

лями в регуляции эпигенетического состояния и в злокачественной трансформации. В этом примере продемонстрировано, что потеря VAP1 приводит к повышенному уровню триметилированного лизина 27 гистона H3 (H3K27me3), повышенной экспрессии EZH2 и повышенной репрессии мишеней репрессивного комплекса поликомб 2 (PRC2). Эти результаты отличаются от снижения уровня H3K27me3, наблюдаемого при потере Asx11. Условная делеция VAP1 и Ezh2 *in vivo* устраняет размножение миелоидных предшественников, индуцируемое потерей одного VAP1. Потеря VAP1 приводит к заметному снижению монометилирования H4K20 (H4K20me1). В соответствии с ролью H4K20me1 в регуляции транскрипции EZH2, экспрессия SETD8, метилтрансферазы H4K20me1, снижает экспрессию EZH2 и устраняет пролиферацию клеток с мутантным VAP1. Кроме того, клетки мезотелиомы, в которых отсутствует VAP1, чувствительны к фармакологическому ингибированию EZH2, позволяя предполагать новый подход к терапии злокачественных новообразований с мутантным VAP1.

#### Ссылки.

Abdel-Wahab, O., Adli, M., LaFave, L.M., Gao, J., Hricik, T., Shih, A.H., Pandey, S., Patel, J.P., Chung, Y.R., Koche, R., et al. (2012). ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* 22, 180-193.

Abdel-Wahab, O., Gao, J., Adli, M., Dey, A., Trimarchi, T., Chung, Y.R., Kuscu, C., Hricik, T., Ndiaye-Lobry, D., Lafave, L.M., et al. (2013). Deletion of Asx11 results in myelodysplasia and severe developmental defects *in vivo*. *J Exp Med* 210, 2641-2659.

Abdel-Wahab, O., Pardananani, A., Patel, J., Wadleigh, M., Lasho, T., Heguy, A., Beran, M., Gilliland, D.G., Levine, R.L., and Tefferi, A. (2011). Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 25, 1200-1202.

Alimova, I., Birks, D.K., Harris, P.S., Knipstein, J.A., Venkataraman, S., Marquez, V.E., Foreman, N.K., and Vibhakar, R. (2013). Inhibition of EZH2 suppresses self-renewal and induces radiation sensitivity in atypical rhabdoid teratoid tumor cells. *Neuro Oncol* 15, 149-160.

Beguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K.L., Rosen, M., Shen, H., Yang, S.N., Wang, L., Ezponda, T., et al. (2013). EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell* 23, 677-692.

Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., et al. (2011). Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine* 364, 2496-2506.

Blum, G., Ibanez, G., Rao, X., Shum, D., Radu, C., Djaballah, H., Rice, J.C., and Luo, M. (2014). Small-molecule inhibitors of SETD8 with cellular activity. *ACS Chem Biol* 9, 2471-2478.

Bott, M., Brevet, M., Taylor, B.S., Shimizu, S., Ito, T., Wang, L., Creaney, J., Lake, R.A., Zakowski, M.F., Reva, B., et al. (2011). The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly

inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nature genetics* 43, 668-672.

Campbell, J.E., Kuntz, K.W., Knutson, S.K., Warholic, N.M., Keilhack, H., Wigle, T.J., Raimondi, A., Klaus, C.R., Rioux, N., Yokoi, A., et al. (2015). EPZ011989, A Potent, Orally-Available EZH2 Inhibitor with Robust in Vivo Activity. *ACS Med Chem Lett* 6, 491-495.

Dey, A., Seshasayee, D., Noubade, R., French, D.M., Liu, J., Chaurushiya, M.S., Kirkpatrick, D.S., Pham, V.C., Lill, J.R., Bakalarski, C.E., et al. (2012). Loss of the tumor suppressor BAP1 causes myeloid transformation. *Science* 337, 1541-1546.

Garcia, B.A., Mollah, S., Ueberheide, B.M., Busby, S.A., Muratore, T.L., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (2007). Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2, 933-938.

Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adelaide, J., Bonansea, J., Cervera, N., Carbuccia, N., Lagarde, A., Prebet, T., Nezri, M., Sainty, D., et al. (2009). Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British journal of haematology* 145, 788-800.

Guo, Y., Nady, N., Qi, C., Allali-Hassani, A., Zhu, H., Pan, P., Adams-Cioaba, M.A., Amaya, M.F., Dong, A., Vedadi, M., et al. (2009). Methylation-state-specific recognition of histones by the MBT repeat protein L3MBTL2. *Nucleic Acids Res* 37, 2204-2210.

Harbour, J.W., Onken, M.D., Roberson, E.D., Duan, S., Cao, L., Worley, L.A., Council, M.L., Matatall, K.A., Helms, C., and Bowcock, A.M. (2010). Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 330, 1410-1413.

Knutson, S.K., Warholic, N.M., Wigle, T.J., Klaus, C.R., Allain, C.J., Raimondi, A., Porter Scott, M., Chesworth, R., Moyer, M.P., Copeland, R.A., et al. (2013). Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 7922-7927.

Krivtsov, A.V., Feng, Z., Lemieux, M.E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A.U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A.P., Silverman, L.B., et al. (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14, 355-368.

Lara-Astiaso, D., et al. *Immunogenetics*. Chromatin state dynamics during blood formation. *Science* 345, 943-949 (2014).

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15, 550.

MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., and MacCoss, M.J. (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26, 966-968.

McCabe, M.T., Ott, H.M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G.S., Liu, Y., Graves, A.P., Della Pietra, A., 3rd, Diaz, E., et al. (2012). EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492, 108-112.

Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature genetics* 42, 181-185.

Morin, R.D., Mendez-Lago, M., Mungall, A.J., Goya, R., Mungall, K.L., Corbett, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Chiu, R., Field, M., et al. (2011). Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476, 298-303.

Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., et al. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* 9, 1201-1213.

O'Geen, H., Echipare, L., and Farnham, P.J. (2011). Using ChIP-seq technology to generate high-resolution profiles of histone modifications. *Methods Mol Biol* 791, 265-286.

Pasqualucci, L., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., Wells, V.A., Grunn, A., Messina, M., Elliot, O., et al. (2011). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* 43, 830-837.

Pena-Lllois, S., Vega-Rubin-de-Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavia-Jimenez, A., Wang, S., Yamasaki, T., Zhrebker, L., Sivanand, S., Spence, P., et al. (2012). BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* 44, 751-759.

Phung, Y.T., Barbone, D., Broaddus, V.C., and Ho, M. (2011). Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy. *Journal of Cancer* 2, 507-514.

Qin, J., Van Buren, D., Huang, H.S., Zhong, L., Mostoslavsky, R., Akbarian, S., and Hock, H. (2010). Chromatin protein L3MBTL1 is dispensable for development and tumor suppression in mice. *J Biol Chem* 285, 27767-27775.

Qin, J., Whyte, W.A., Anderssen, E., Apostolou, E., Chen, H.H., Akbarian, S., Bronson, R.T., Hochedlinger, K., Ramaswamy, S., Young, R.A., et al. (2012). The polycomb group protein L3mbtl2 assembles an atypical PRC1-family complex that is essential in pluripotent stem cells and early development. *Cell Stem Cell* 11, 319-332.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Muller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 465, 243-247.

Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., et al. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, 337-342.

Su, I.H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T., and Tarakhovskiy, A. (2003). Ezh2

controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol* 4, 124-131.

Suraokar, M.B., Nunez, M.I., Diao, L., Chow, C.W., Kim, D., Behrens, C., Lin, H., Lee, S., Raso, G., Moran, C., et al. (2014). Expression profiling stratifies mesothelioma tumors and signifies deregulation of spindle checkpoint pathway and microtubule network with therapeutic implications. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO* 25, 1184-1192.

Trojer, P., Cao, A.R., Gao, Z., Li, Y., Zhang, J., Xu, X., Li, G., Losson, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et al. (2011). L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Mol Cell* 42, 438-450.

Trojer, P., Li, G., Sims, R.J., 3rd, Vaquero, A., Kalakonda, N., Boccuni, P., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nimer, S.D., et al. (2007). L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* 129, 915-928.

Wilson, B.G., Wang, X., Shen, X., McKenna, E.S., Lemieux, M.E., Cho, Y.J., Koellhoffer, E.C., Pomeroy, S.L., Orkin, S.H., and Roberts, C.W. (2010). Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18, 316-328.

В настоящем документе приведены различные ссылки, содержания которых, таким образом, полностью включены в качестве ссылки, в настоящем документе приведены различные номера доступа последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислот, и, таким образом, полные последовательности, указанные под этими номерами доступа, полностью включены в качестве ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий определение уровня экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа, в одной или более клетках злокачественной опухоли, где, если уровень экспрессии указанного биомаркера VAP1 дикого типа отсутствует или является более низким, чем эталонный контрольный уровень VAP1, тогда указанному индивидууму вводят терапевтически эффективное количество ингибитора EZH2 для лечения злокачественной опухоли,

где указанный эталонный контрольный уровень VAP1 представляет собой уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа в эталонном контрольном образце,

где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из злокачественной мезотелиомы, увеальной меланомы, почечноклеточной карциномы, кожной меланомы и рака легких, и

где ингибитор EZH2 представляет собой низкомолекулярный ингибитор, конкурирующий с S-аденозилметионином, выбранный из группы, состоящей из EPZ011989, GSK126, EPZ-6438, GSK343, EI1, EPZ005687 и UNC1999.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий определение уровней экспрессии EZH2 и/или SUZ12 в одной или более клетках злокачественной опухоли, где, если уровень экспрессии указанного биомаркера VAP1 дикого типа отсутствует или является более низким, чем эталонный контрольный уровень VAP1, и если уровень экспрессии EZH2 является более высоким, чем эталонный контрольный уровень EZH2, и/или уровень экспрессии SUZ12 является более высоким, чем эталонный контрольный уровень SUZ12, тогда указанному индивидууму вводят ингибитор EZH2.

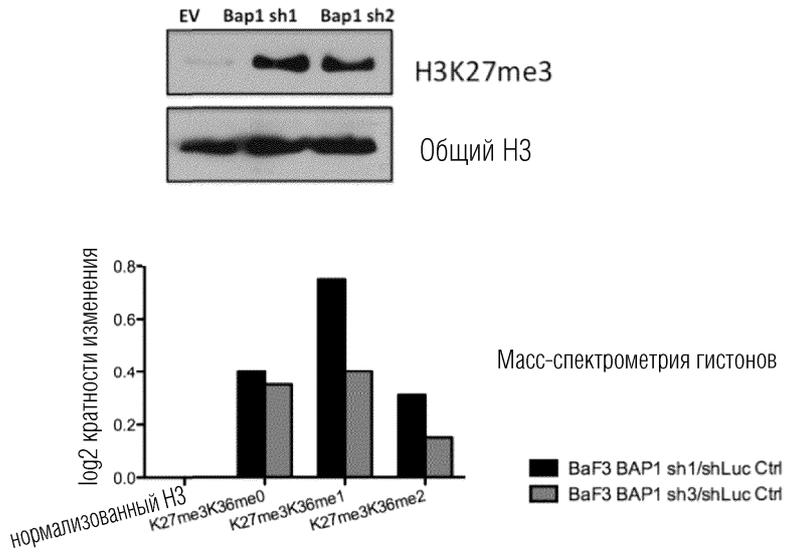
3. Способ по п.1, где уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа определяют посредством иммунофлуоресценции.

4. Способ по п.1, где уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа определяют посредством вестерн-блоттинга.

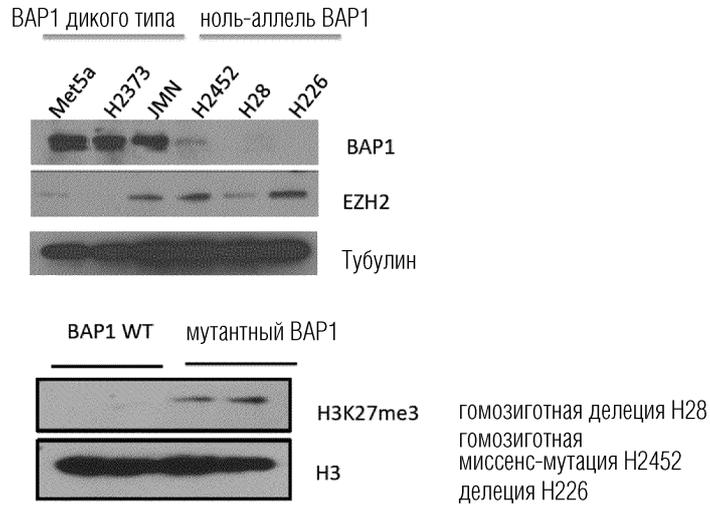
5. Способ по п.1, где уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа определяют посредством гибридизации *in situ*.

6. Способ по п.1, где уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа определяют посредством полимеразной цепной реакции.

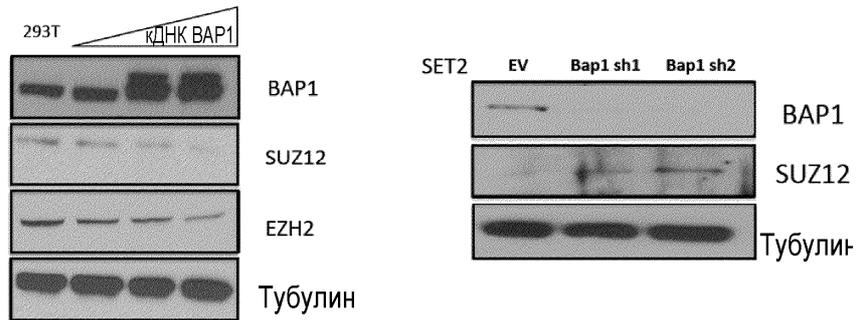
7. Способ по п.1, где уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа определяют с применением реагента, специфически связывающегося с биомаркером VAP1 дикого типа.
8. Способ по п.7, где реагент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
9. Способ по п.1, где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную мезотелиому.
10. Способ по п.1, где злокачественная опухоль представляет собой увеальную меланому.
11. Способ по п.1, где злокачественная опухоль представляет собой почечноклеточную карциному.
12. Способ по п.1, где ингибитор EZH2 представляет собой EPZ-6438.
13. Способ определения того, окажет ли, вероятно, ингибитор EZH2 действие против злокачественной опухоли на злокачественную опухоль у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий получение у указанного индивидуума образца злокачественной опухоли; определение уровня экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа в указанном образце, где, если уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа отсутствует или является более низким, чем эталонный контрольный уровень VAP1, вероятно, что указанный ингибитор EZH2 будет оказывать действие против злокачественной опухоли на указанную злокачественную опухоль, где указанный эталонный контрольный уровень VAP1 представляет собой уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа в эталонном контрольном образце, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из злокачественной мезотелиомы, увеальной меланомы, почечноклеточной карциномы, кожной меланомы и рака легких, и где ингибитор EZH2 представляет собой низкомолекулярный ингибитор, конкурирующий с S-аденозилметионином, выбранный из группы, состоящей из EPZ011989, GSK126, EPZ-6438, GSK343, EI1, EPZ005687 и UNC1999.
14. Способ по п.13, где биомаркер VAP1 дикого типа представляет собой биомаркер белок VAP1.
15. Способ по п.13, где биомаркер VAP1 дикого типа представляет собой биомаркер нуклеиновую кислоту VAP1.
16. Способ по п.13, где экспрессию биомаркера VAP1 определяют посредством иммунофлуоресценции.
17. Способ по п.13, где экспрессию биомаркера VAP1 определяют посредством вестерн-блоттинга.
18. Способ по п.1, где ингибитор EZH2 представляет собой EPZ-6438.
19. Применение набора для определения того, окажет ли вероятно ингибитор EZH2 действие против злокачественной опухоли на злокачественную опухоль у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный набор содержит средство для детекции биомаркера VAP1 дикого типа, где указанное средство включает определение уровня экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа в одной или более клетках злокачественной опухоли, полученных от указанного индивидуума, где, если уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа отсутствует или является более низким, чем эталонный контрольный уровень VAP1, тогда указанному индивидууму вводят терапевтически эффективное количество ингибитора EZH2 для оказания действия против злокачественной опухоли, где указанный эталонный контрольный уровень VAP1 представляет собой уровень экспрессии биомаркера VAP1 дикого типа в эталонном контрольном образце, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из злокачественной мезотелиомы, увеальной меланомы, почечноклеточной карциномы, кожной меланомы и рака легких, и где ингибитор EZH2 представляет собой низкомолекулярный ингибитор, конкурирующий с S-аденозилметионином, выбранный из группы, состоящей из EPZ011989, GSK126, EPZ-6438, GSK343, EI1, EPZ005687 и UNC1999.
20. Применение по п.19, где средство для детекции биомаркера VAP1 дикого типа включает один или более упакованных праймеров, зонд, панели/микрпанель, специфичное к биомаркеру антитело и/или гранулу.
21. Применение по п.19, где средство для детекции биомаркера VAP1 включает одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов для детекции биомаркера VAP1.
22. Применение по п.19, где набор дополнительно содержит один или более праймеров, зонд, панели/микрпанель, специфичное к биомаркеру антитело и/или гранулу для детекции экспрессии EZH2, экспрессии L3MBTL2 и/или экспрессии SUZ12.
23. Применение по п.19, где ингибитор EZH2 представляет собой EPZ-6438.



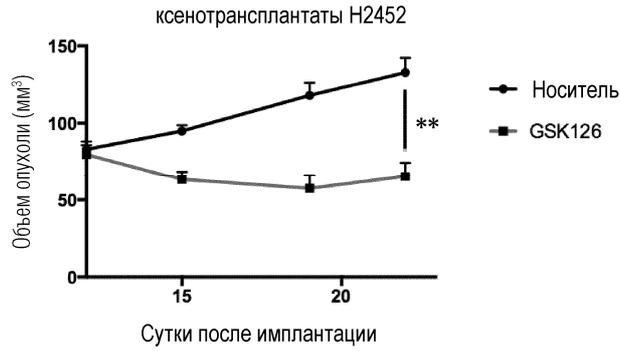
Фиг. 1



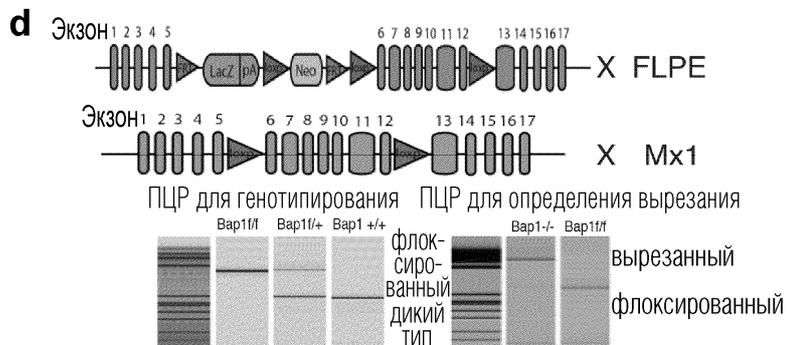
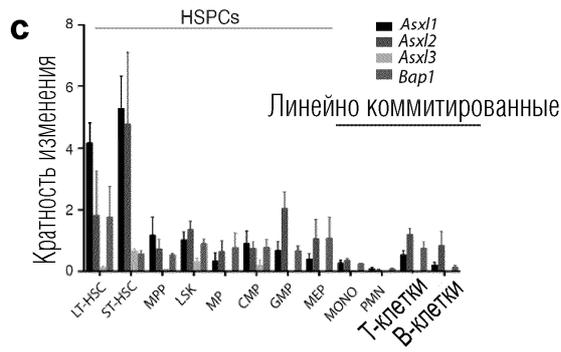
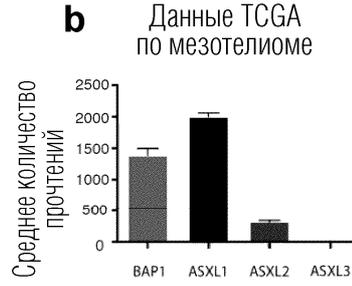
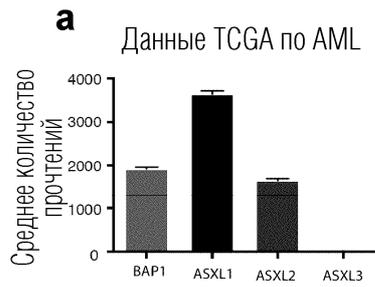
Фиг. 2



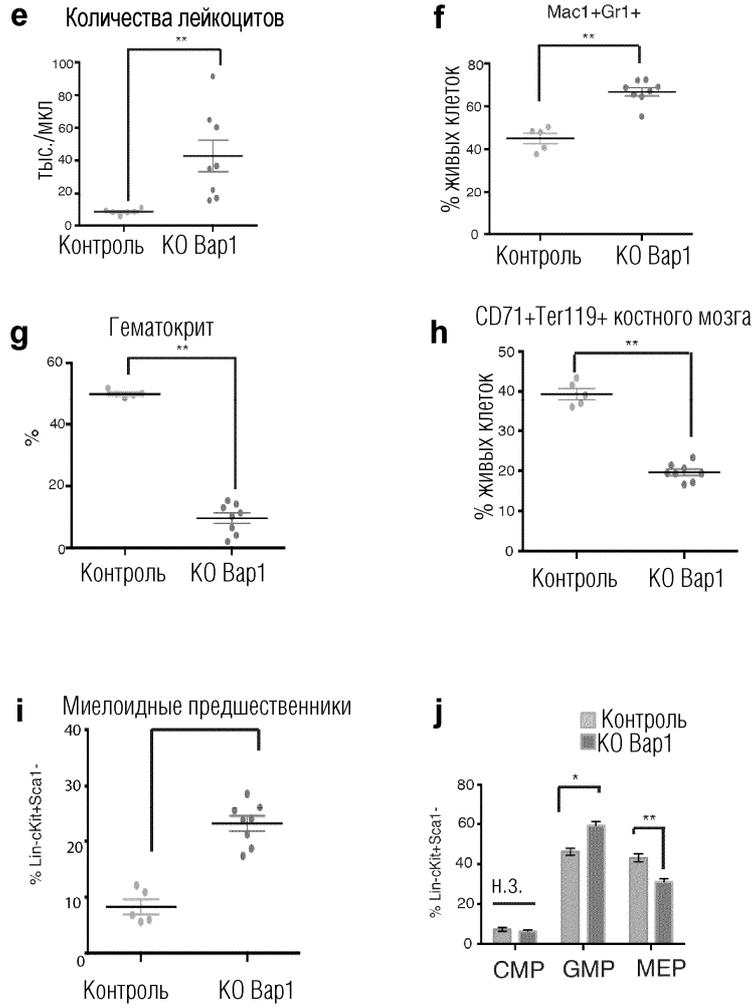
Фиг. 3



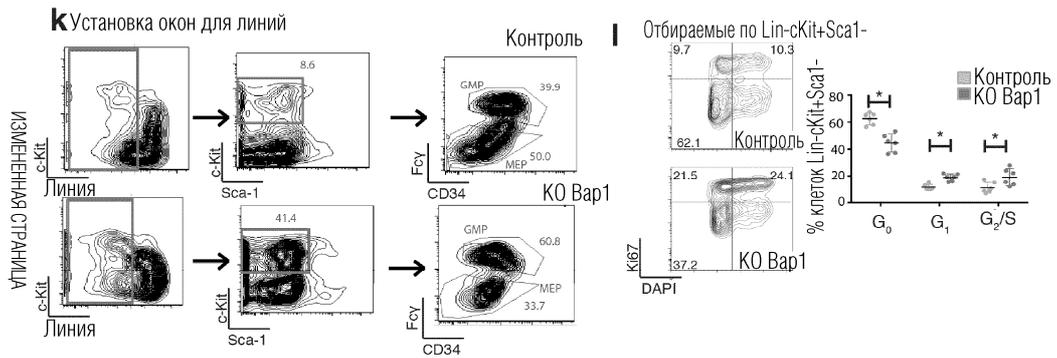
Фиг. 4



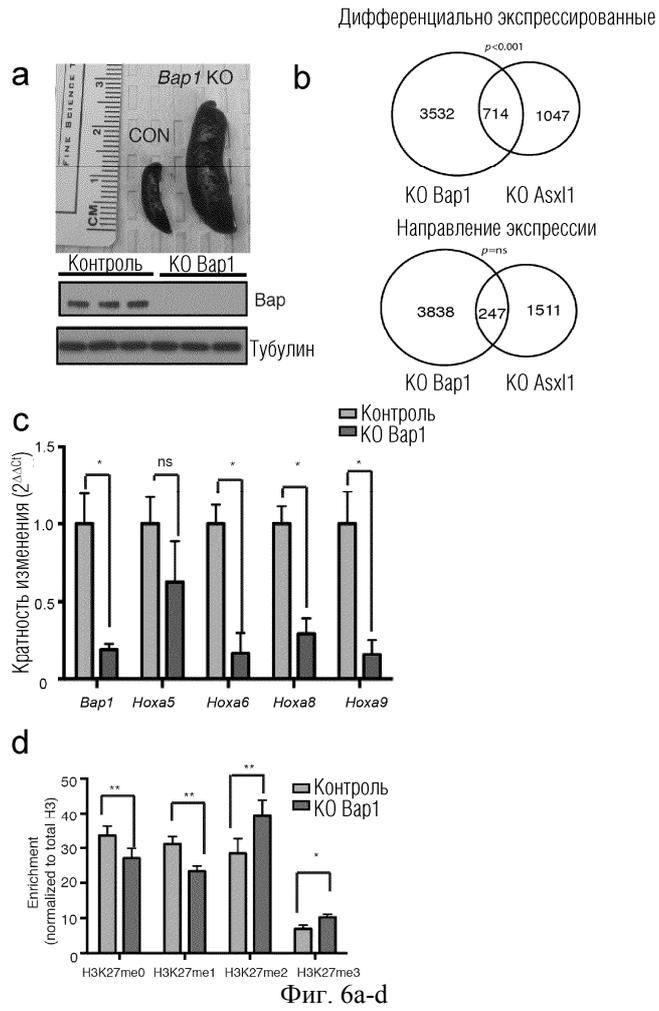
Фиг. 5a-d



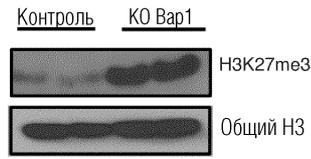
Фиг. 5е-ј



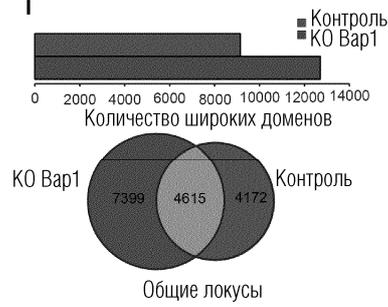
Фиг. 5к-л



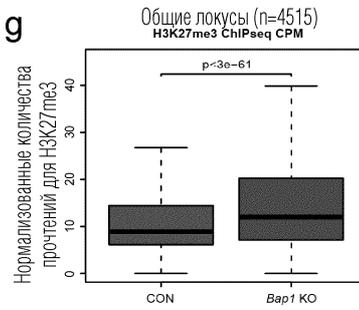
e



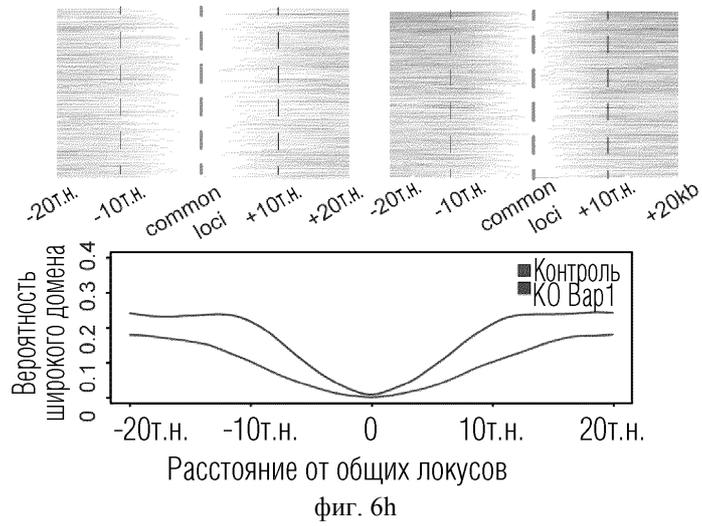
f



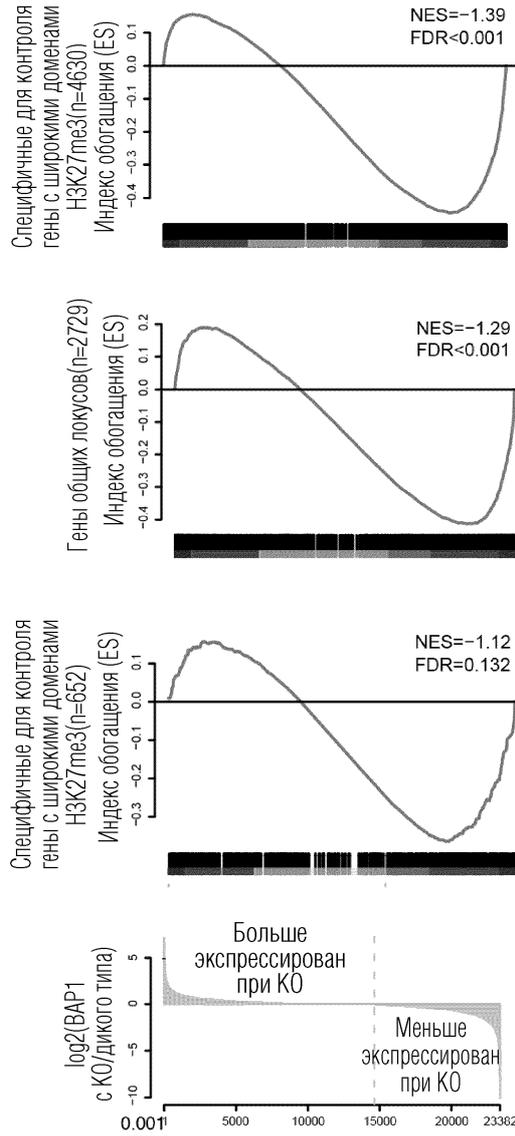
g



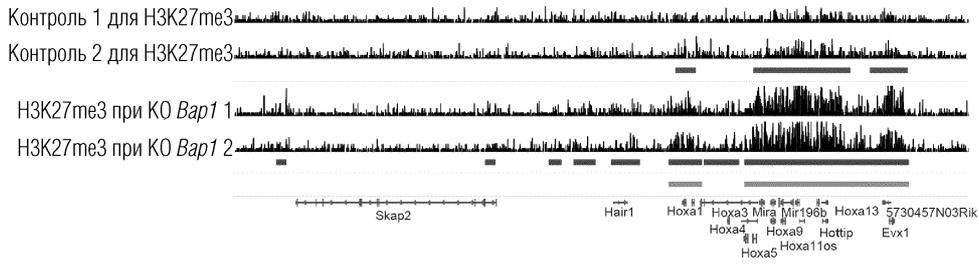
Фиг. 6e-g



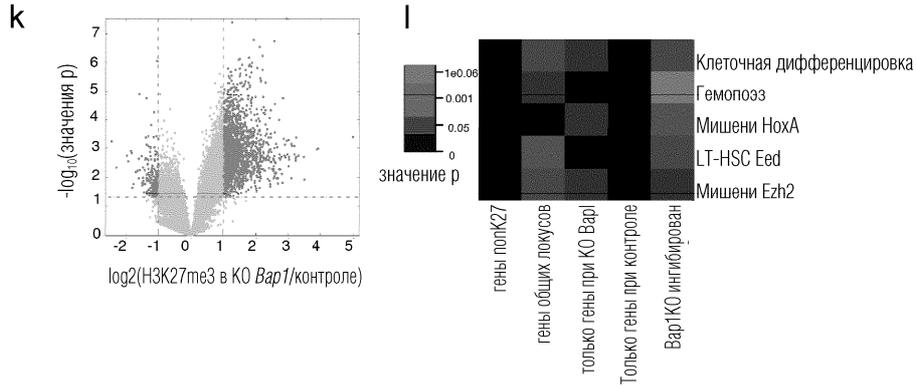
036889



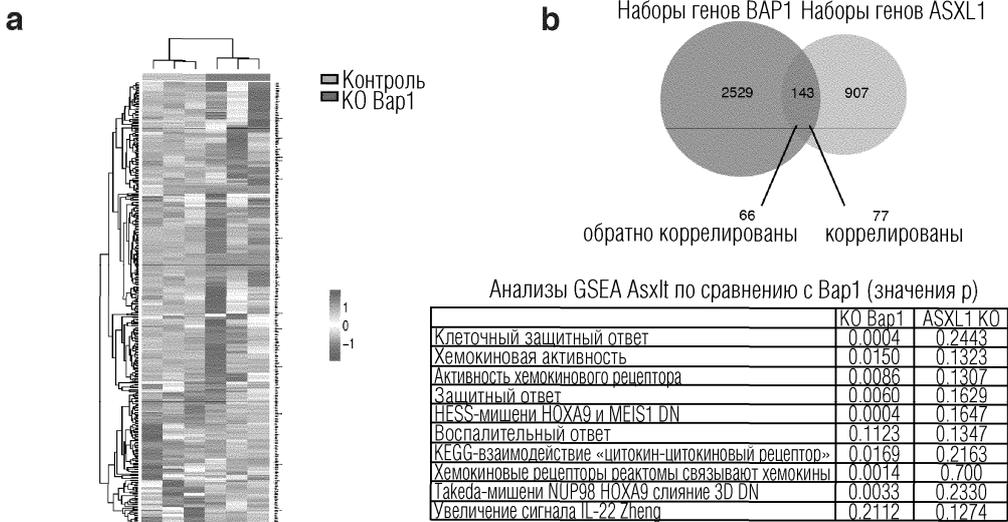
Фиг. бi



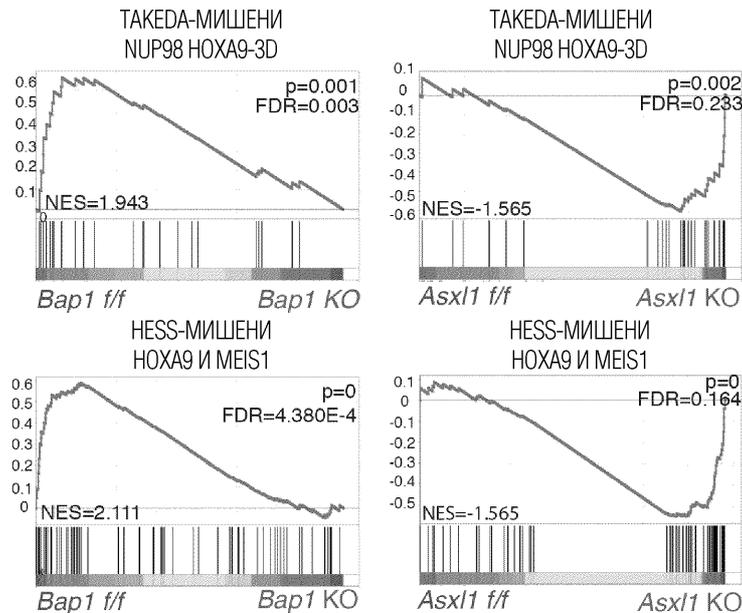
Фиг. бj



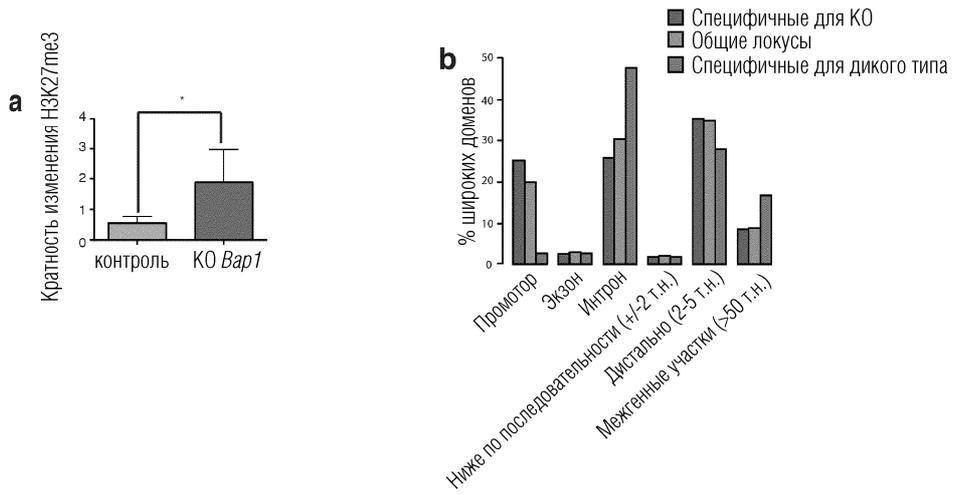
Фиг. 6к-l



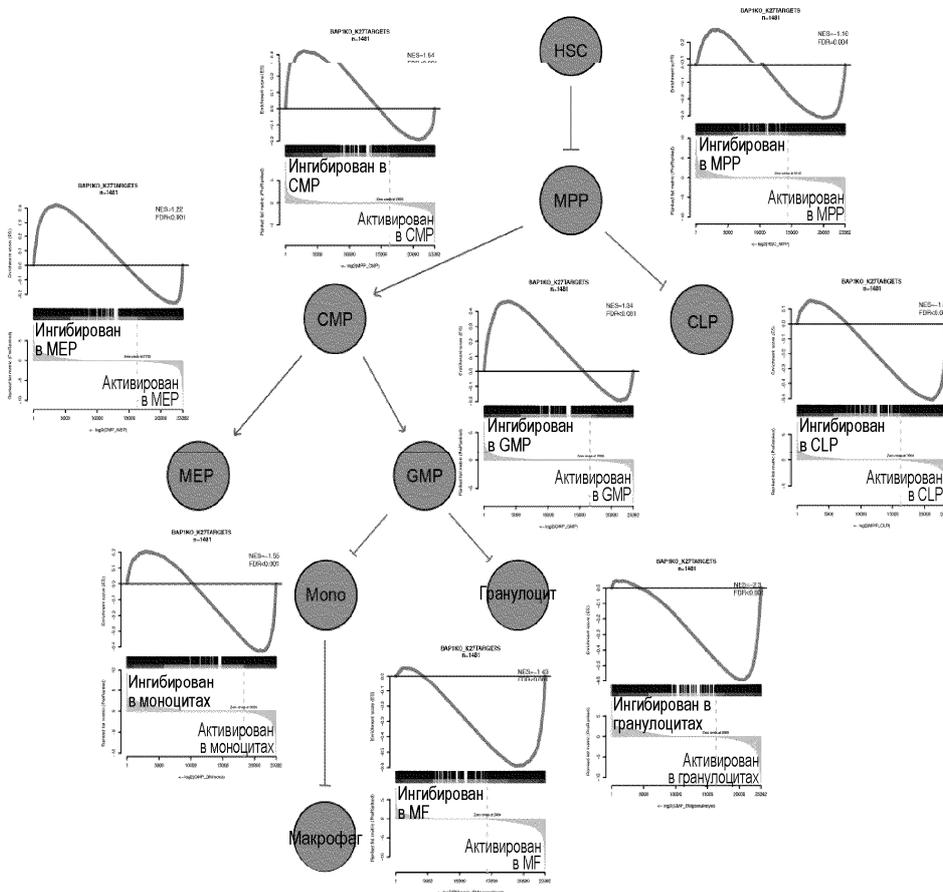
Фиг. 7а, б



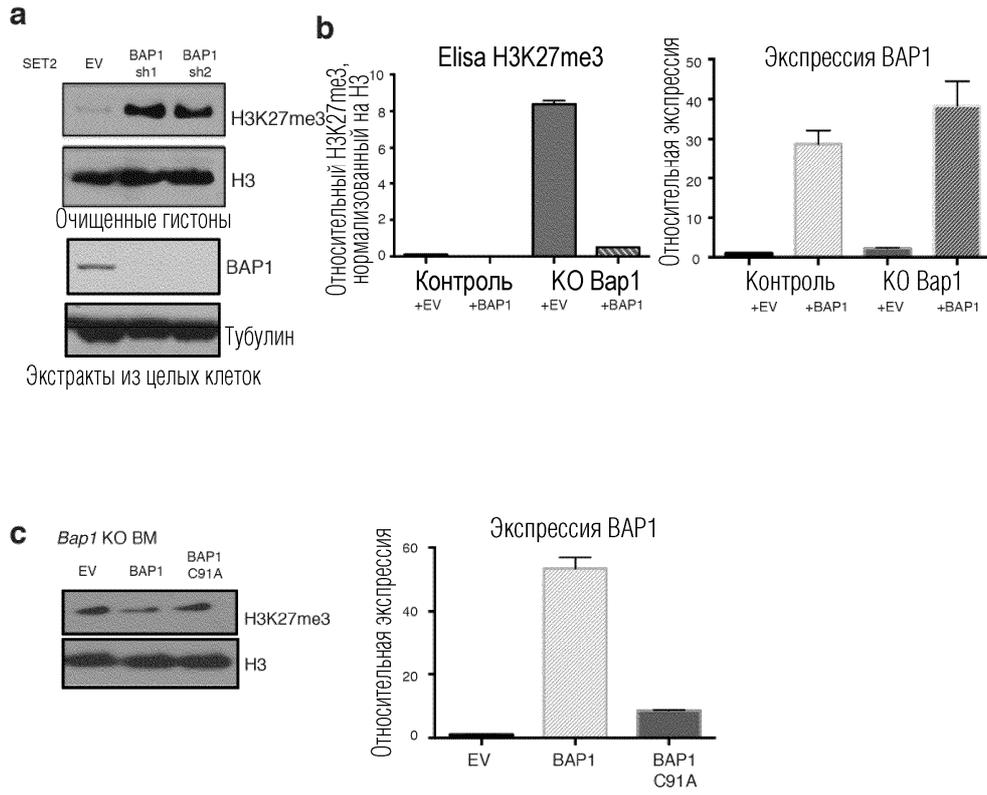
Фиг. 7с



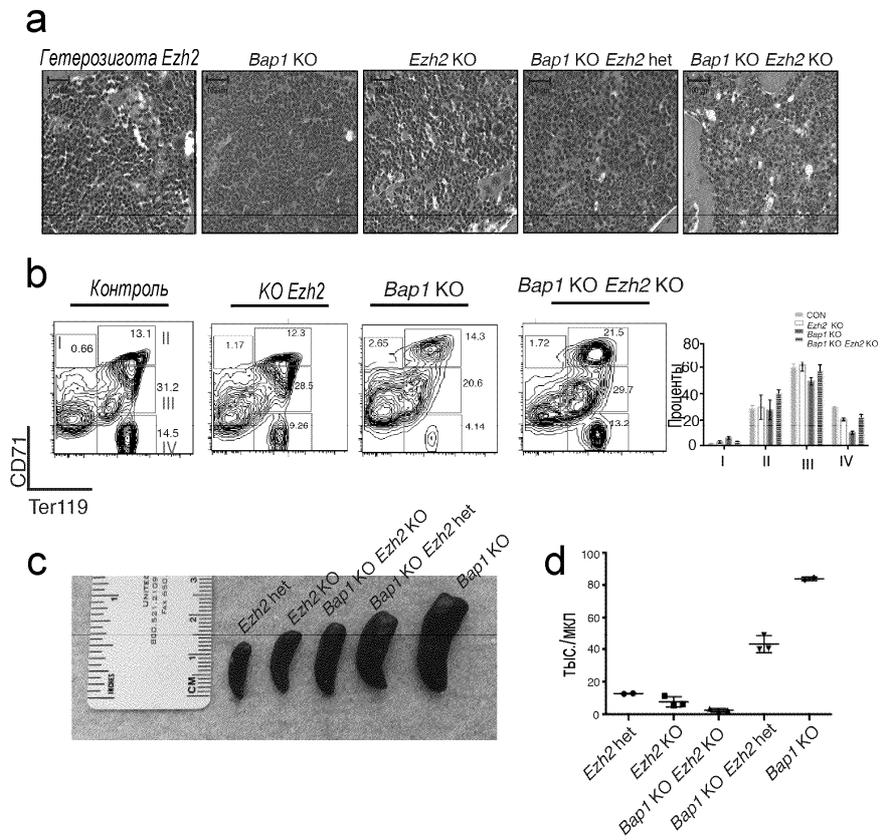
Фиг. 8а, б



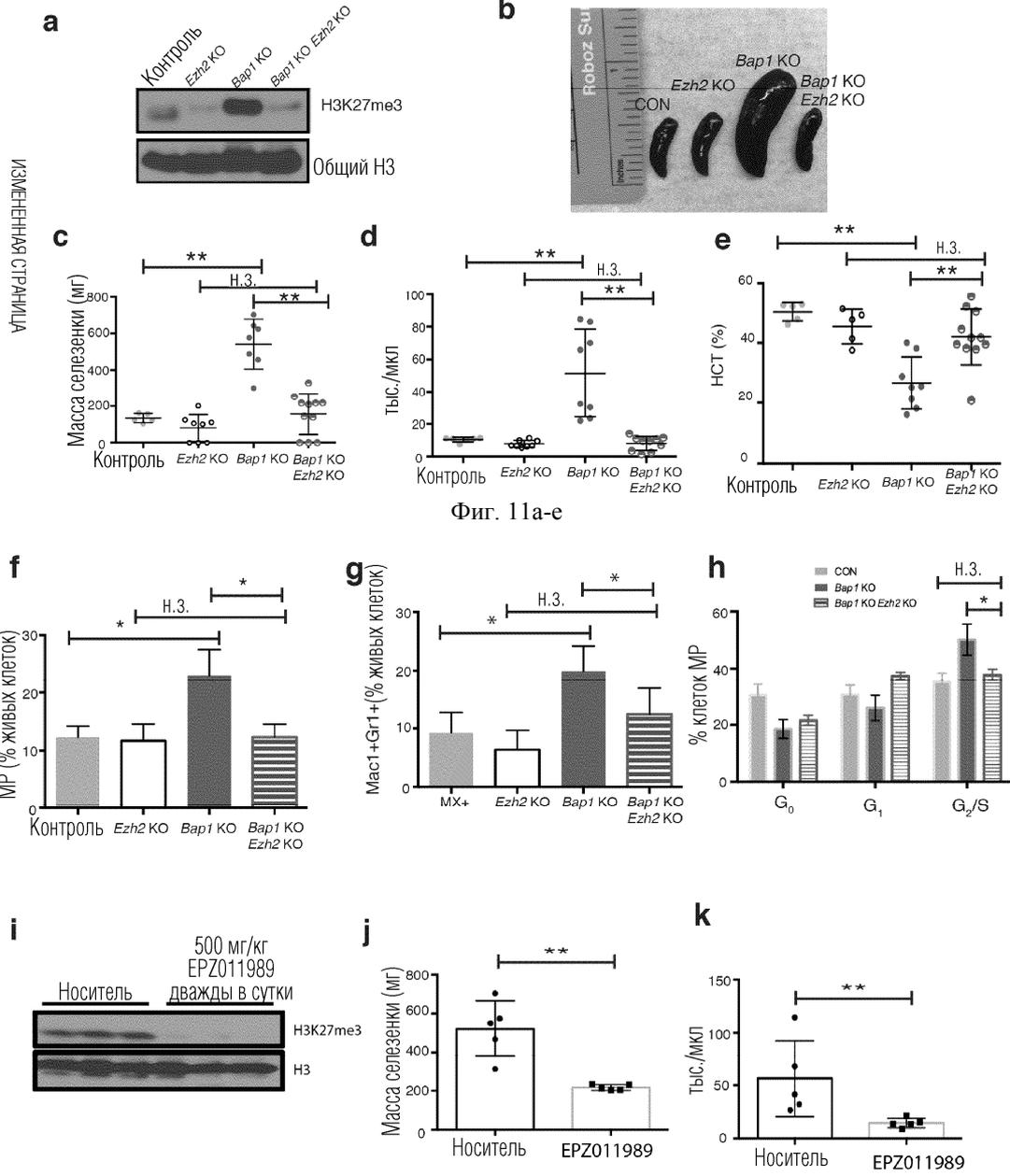
Фиг. 8с



Фиг. 9а-с

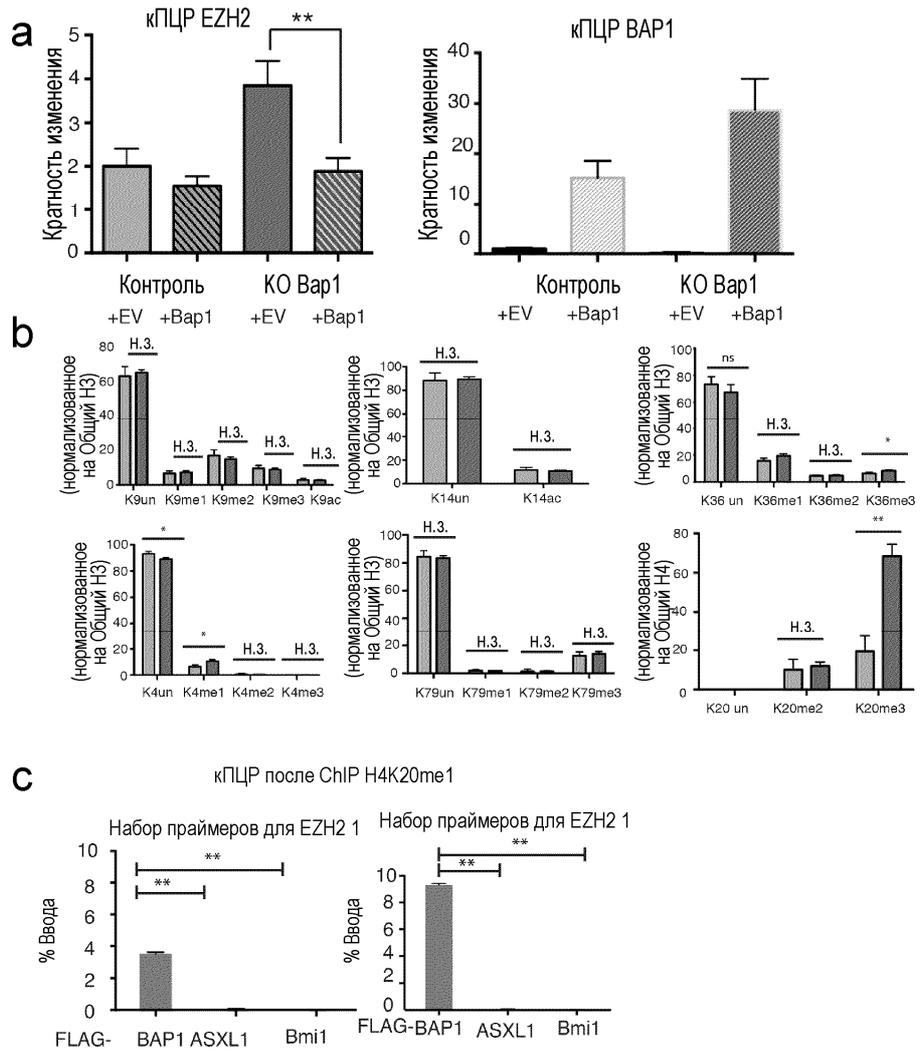


Фиг. 10а-d

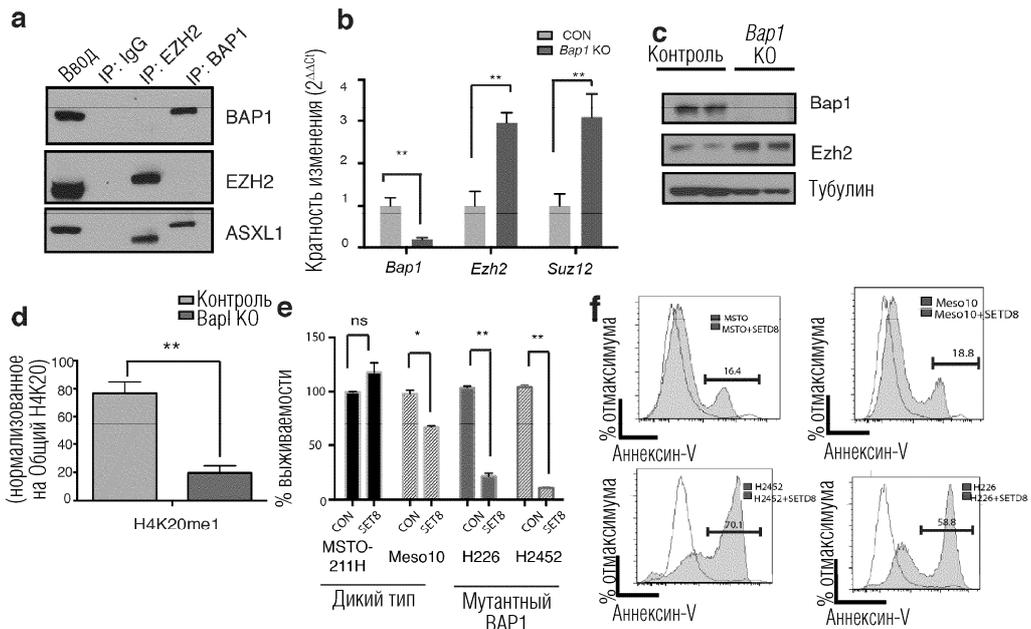


Фиг. 11а-е

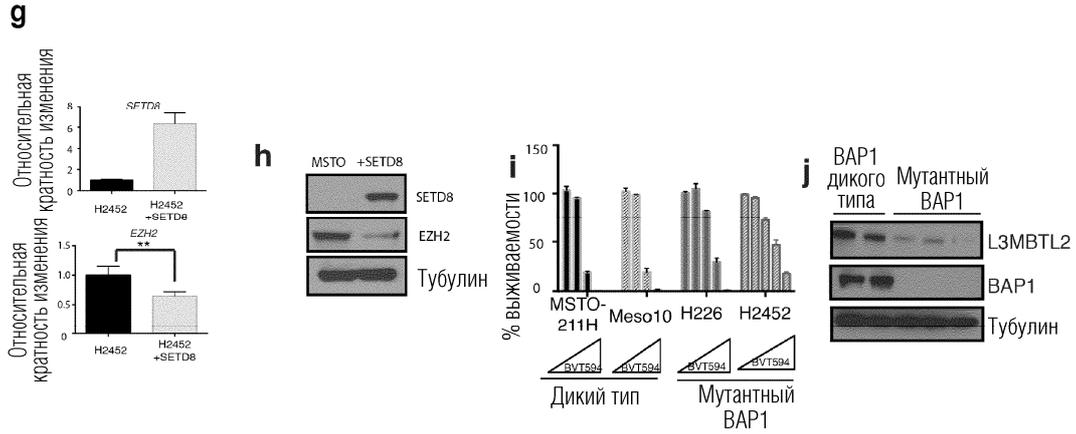
Фиг. 11f-к



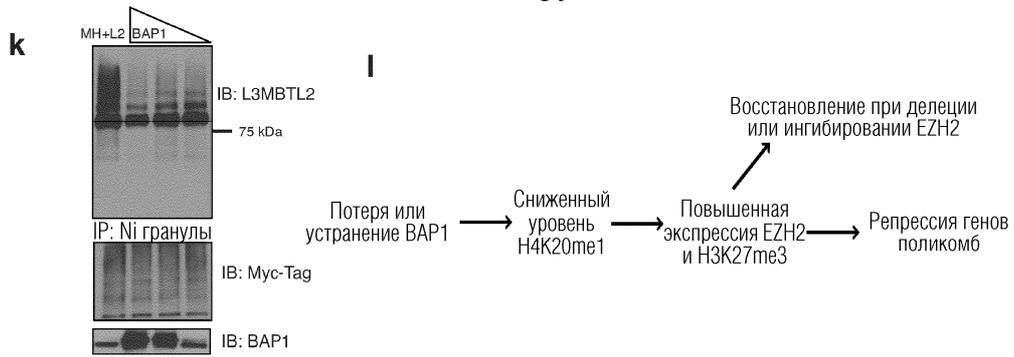
Фиг. 12a-с



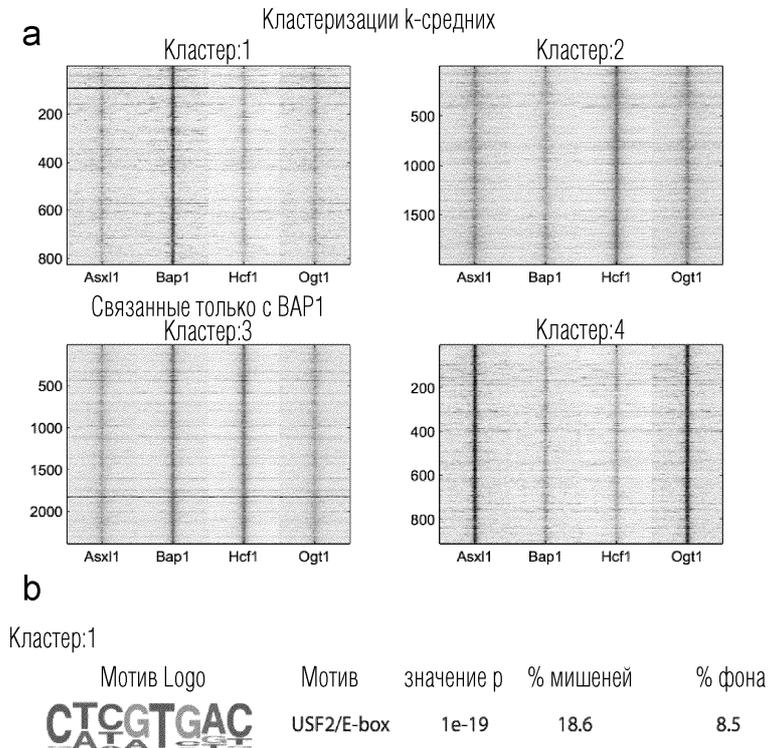
Фиг. 13a-f



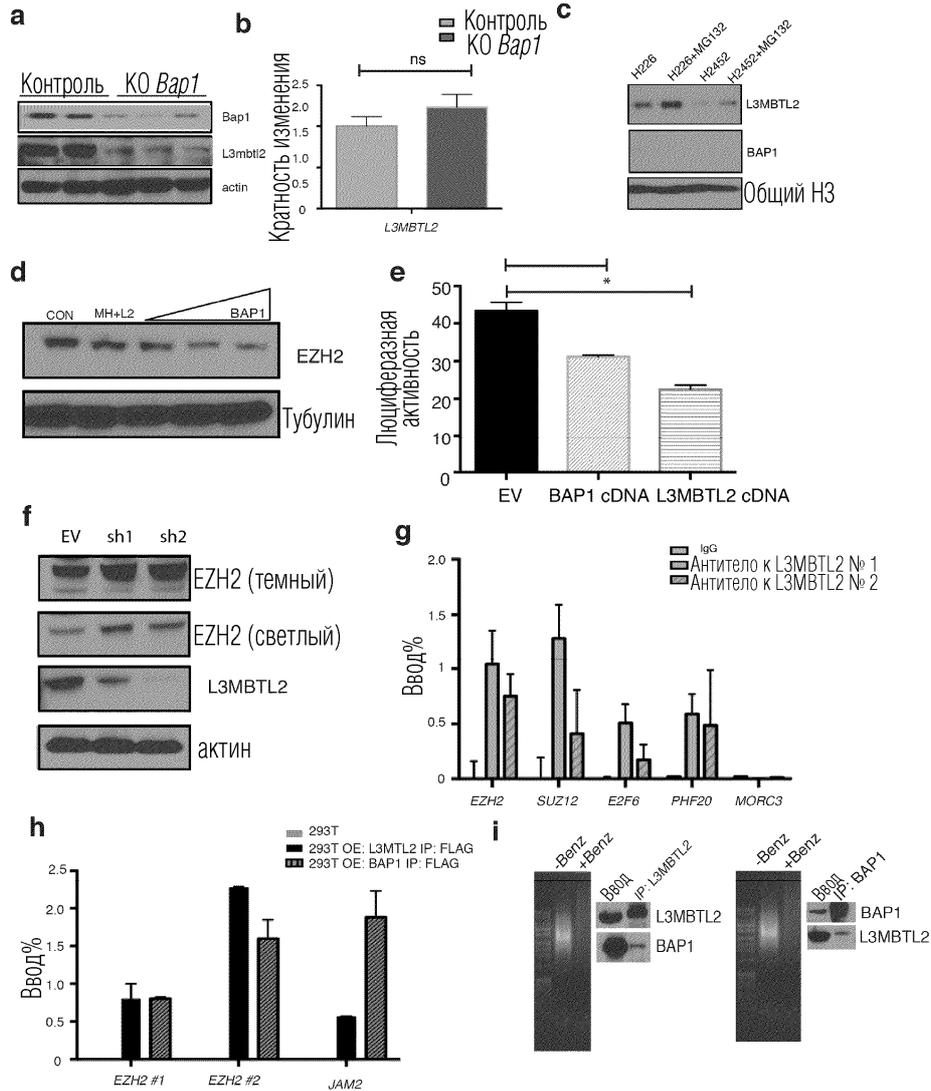
Фиг. 13g-j



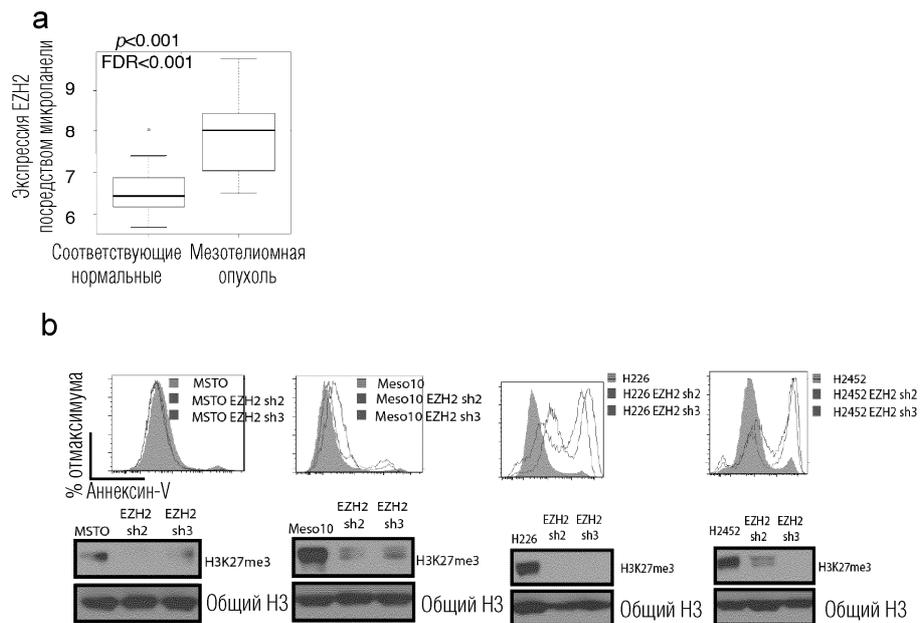
Фиг. 13k-l



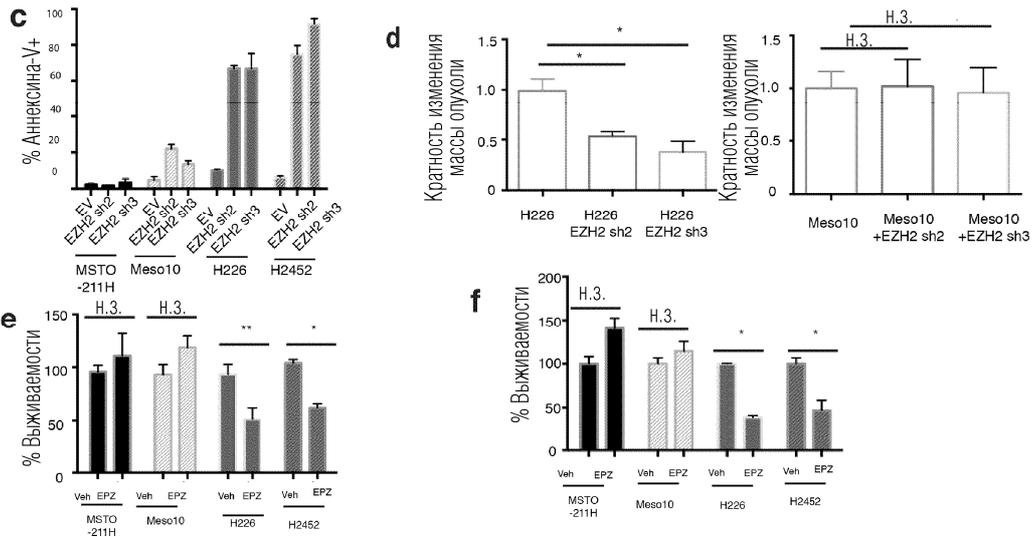
Фиг. 14a, b



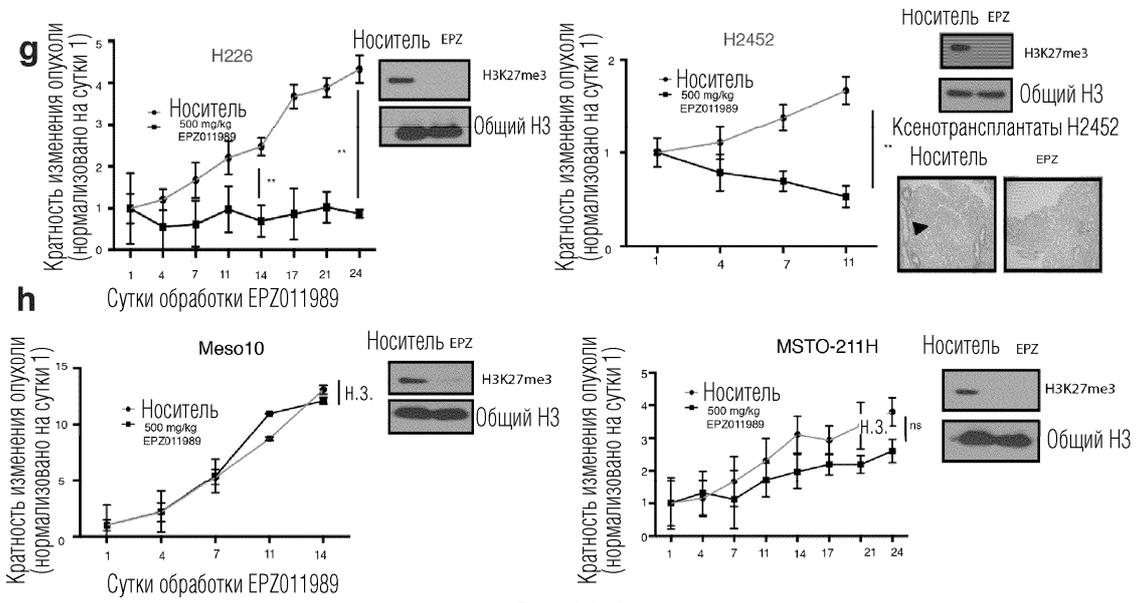
Фиг. 15а-і



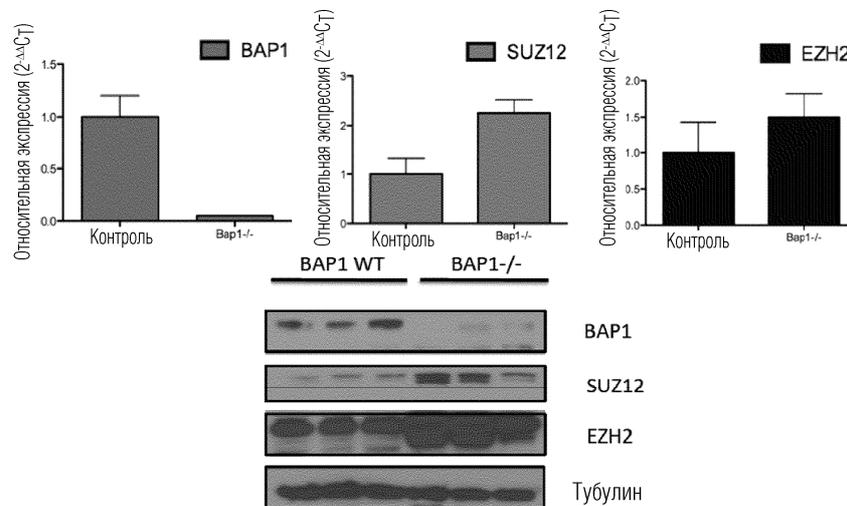
Фиг. 16а, b



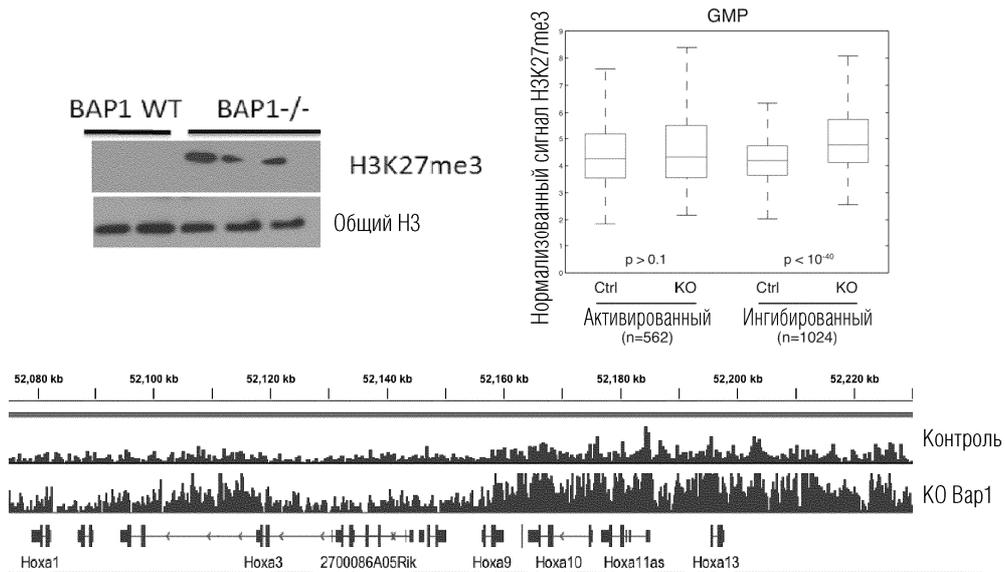
Фиг. 16с-f



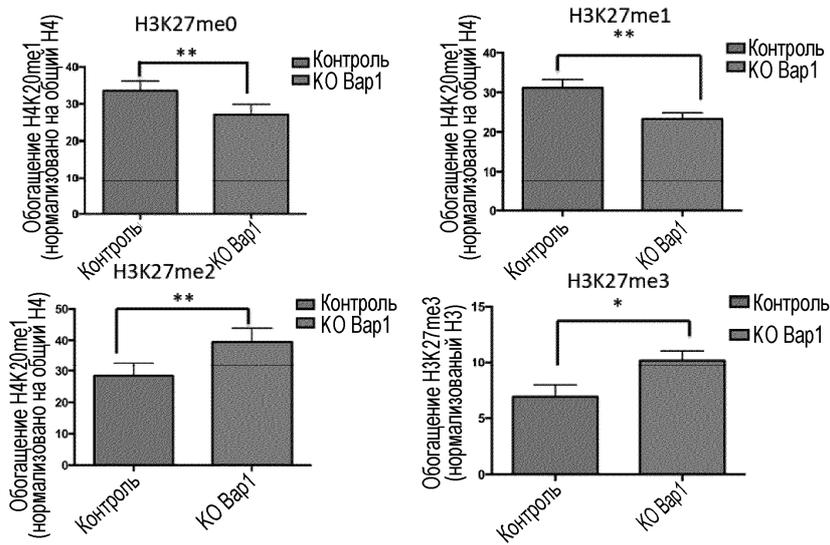
Фиг. 16g-h



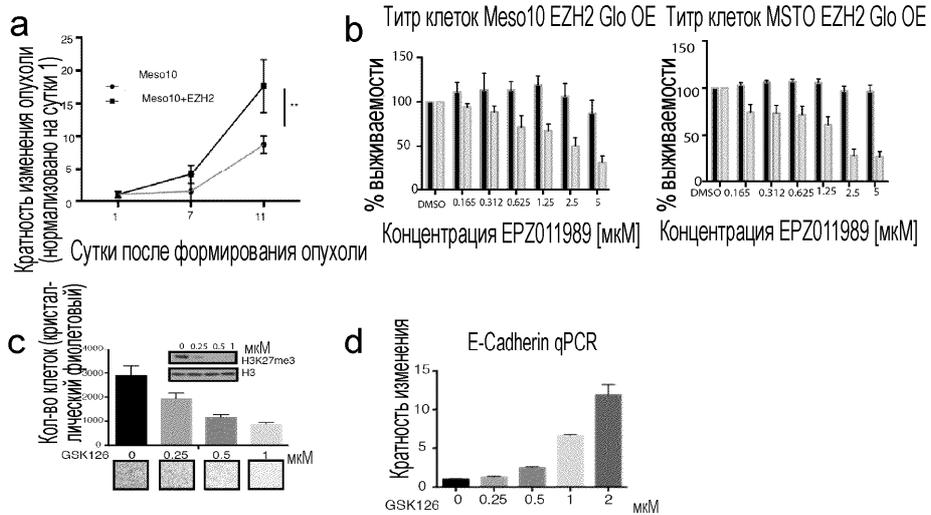
Фиг. 17



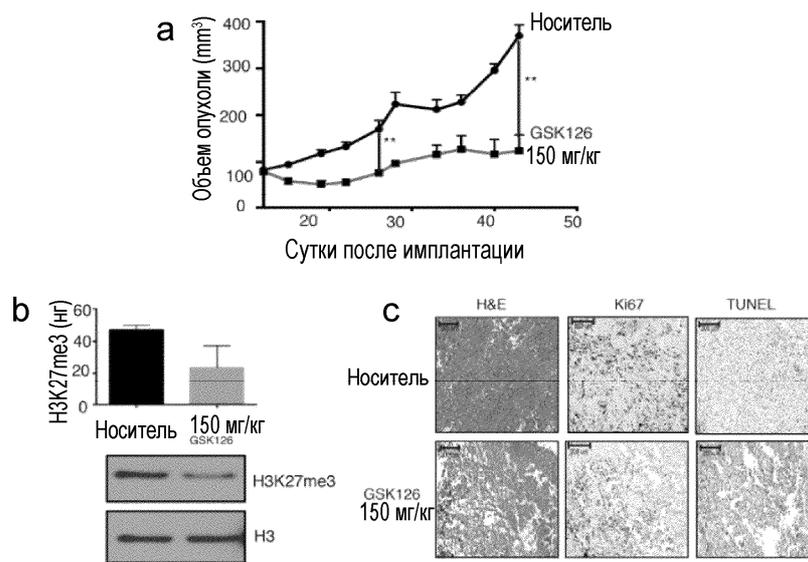
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20a-d



Фиг. 21а-с

