



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0112333
(43) 공개일자 2024년07월18일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/341 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/341 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7021295
(22) 출원일자(국제) 2022년11월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/080563
(87) 국제공개번호 WO 2023/102377
국제공개일자 2023년06월08일
(30) 우선권주장
63/284,527 2021년11월30일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 매사추세츠 02215 보스턴 브록클린 애비뉴 450</p> <p>(72) 발명자
문시, 니힐 씨.
미국 02494 매사추세츠 니덤 부스 스트리트 77
모델리, 유지니오
미국 02215 매사추세츠 보스턴 브록클린 애비뉴 150
그라즈노프, 세르게이
미국 02215 매사추세츠 보스턴 브록클린 애비뉴 450 다나-파버 캔서 인스티튜트, 인크. 내</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|--|---|

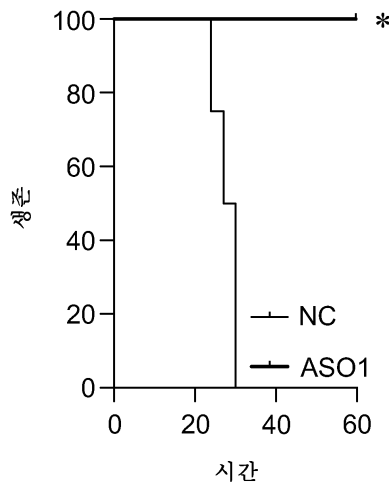
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 암에서 치료제로서의 MIR17HG 프리-RNA의 안티센스 억제제

(57) 요약

MIR17HG 프리-RNA가 역할을 하는 질환을 치료하거나 또는 개선시키기 위한 MIR-17-92a-1 클러스터 숙주 유전자 (MIR17HG) 프리-RNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 억제제가 개시된다.

대표도 - 도2f



(52) CPC특허분류

A61K 31/7088 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 2310/321 (2013.01)

C12N 2310/322 (2013.01)

C12N 2310/3231 (2013.01)

C12N 2310/3515 (2013.01)

C12N 2310/3525 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

생리학적 조건 하에 MIR-17-92a-1 클러스터 숙주 유전자 (MIR17HG) 프리-RNA에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)로서, 여기서 ASO는 15 내지 약 30개의 뉴클레오티드 길이이고 프리-RNA는 서열식별번호: 1의 핵산 서열을 갖는 것인 ASO.

청구항 2

제1항에 있어서, 프리-RNA의 5' 말단 영역에서 결합하는 ASO.

청구항 3

제1항에 있어서, 프리-RNA의 인트론 영역에서 결합하는 ASO.

청구항 4

제1항에 있어서, lnc-17-92^{TV1}의 일부를 코딩하는 프리-RNA의 엑스트론 영역에서 결합하는 ASO.

청구항 5

제1항에 있어서, AGTGGCGGAAGGCGCAGGT (서열식별번호: 2), GTGGCGGAAGGCGCAGGTC (서열식별번호: 3), CCTCGCCGAGGGCGCGAAG (서열식별번호: 4), GAGGGCGGAAGTGGCGGA (서열식별번호: 5), TACTTGCTTGGCTT (서열식별번호: 6), CACCGTCCAAATCTAT (서열식별번호: 7), AGCACTCAACATCAGC (서열식별번호: 8), CACCGTCCAAATCTAT (서열식별번호: 9), GTATGACTGGAATAGG (서열식별번호: 10), TACAGTGGAAATCGGC (서열식별번호: 11), GCGAGCAAACACGAAA (서열식별번호: 12), ACTTGATTGGATGAG (서열식별번호: 13) 중 임의의 1개의 핵산 서열을 포함하는 ASO.

청구항 6

제1항에 있어서, 15 내지 23개의 뉴클레오티드 길이인 ASO.

청구항 7

제1항에 있어서, 18 내지 23개의 뉴클레오티드 길이인 ASO.

청구항 8

제1항에 있어서, 그의 뉴클레오티드가 화학적으로 변형되는 것인 ASO.

청구항 9

제8항에 있어서, 뉴클레오티드가 포스포로티오에이트 (PS) 뉴클레오시드간 연결, 메톡시프로필포스포네이트 (MOP) 뉴클레오시드간 연결, 2'-O-메틸 (Me) 기, 2'-O-메톡시에틸리보스 (MOE) 기, 구속성 에틸 (S-cEt) 기, 잠금 핵산 (LNA), 또는 2'플루오로 (2'F) 기에 의해 변형되는 것인 ASO.

청구항 10

제1항에 있어서, 지질에 접합되는 ASO.

청구항 11

제10항에 있어서, 지질이 팔미트산, 토크페롤, 또는 콜레스테롤인 ASO.

청구항 12

제11항에 있어서, 18개의 뉴클레오티드 길이이고 토코페롤에 접합되는 ASO.

청구항 13

제1항에 있어서, ASO가 단일 가닥 DNA인 ASO.

청구항 14

제13항에 있어서, 단일 가닥 DNA가 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드에 의해 3' 말단 상에서 플랭킹되는 것인 ASO.

청구항 15

제14항에 있어서, 단일 가닥 DNA가 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드에 의해 5' 말단 상에서 플랭킹되는 것인 ASO.

청구항 16

제15항에 있어서, 단일 가닥 DNA가 5개의 변형된 뉴클레오티드에 의해 5' 말단 상에서 플랭킹되는 것인 ASO.

청구항 17

제16항에 있어서, 단일 가닥 DNA가 5개의 변형된 뉴클레오티드에 의해 3' 말단 상에서 플랭킹되고 단일 가닥 DNA가 8개의 뉴클레오티드 길이인 ASO.

청구항 18

제15항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 1개 이상의 2'-O-메톡시에틸리보스 (MOE) 기를 포함하는 것인 ASO.

청구항 19

제18항에 있어서, 단일 가닥 DNA가 15개의 뉴클레오티드 길이인 ASO.

청구항 20

제19항에 있어서, 토코페롤에 접합되는 ASO.

청구항 21

제1항에 있어서, ASO가 단일 가닥 RNA인 ASO.

청구항 22

치료 유효량의 제1항의 ASO 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 23

하기를 포함하는, MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환을 갖는 대상체를 치료하는 방법: 치료를 필요로 하는 대상체에게 제22항의 제약 조성물을 투여하는 것.

청구항 24

제23항에 있어서, 질환이 다발성 골수종, 림프종, 또는 결장직장암인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 질환이 다발성 골수종인 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 대상체에게 치료 유효량의 아세틸-CoA 카르복실라제- α (ACC1) 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, ACC1 억제제가 5-테트라데실-옥시-2-푸로산 (TOFA)인 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, ACC1 억제제가 제약 조성물의 투여에 후속하여 투여되는 것인 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, ACC1 억제제가 제약 조성물의 투여와 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 30

제23항에 있어서, 대상체에게 치료 유효량의 보르테조밍, 멜팔란, 카르필조밍, 텍사메타손, 1종 이상의 프로테아솜 억제제, 1종 이상의 면역조정 이미드 약물 (IMiD), 또는 이들의 2종 이상의 조합으로부터 선택된 추가적인 활성제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 추가적인 활성제가 제약 조성물의 투여에 후속하여 투여되는 것인 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 추가적인 활성제가 제약 조성물의 투여와 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 33

제23항에 있어서, 질환이 간 질환인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 질환이 비알콜성 지방간염 (NASH)인 방법.

청구항 35

제23항에 있어서, 질환이 MYC의 이상 발현 및 기능을 특징으로 하는 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 대상체에게 치료 유효량의 MYC 원종양유전자, bHLH 전사 인자 (MYC) 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, MYC 억제제가 시스플라틴, 잼시타빈, 액시티닙, 나드로파린, 벤즈아미딘, 또는 이들의 2종 이상의 조합인 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, MYC 억제제가 제약 조성물의 투여에 후속하여 투여되는 것인 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, MYC 억제제가 제약 조성물의 투여와 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 40

치료 유효량의 제22항의 제약 조성물, 및 MIR17HG 프리-RNA가 역할을 하는 질환의 치료에 제약 조성물을 사용하는 것에 대한 인쇄된 설명서를 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2021년 11월 30일에 출원된 미국 가출원 번호: 63/284,527에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다.
- [0003] 서열 목록
- [0004] 본 출원은 XML 포맷으로 전자 제출되었고 그 전문이 본원에 참조로서 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2022년 11월 28일에 생성된 상기 XML 사본은 52095_753001WO_SL.xml로 명명되고 71 KB 바이트 크기이다.

배경 기술

- [0005] 인간 게놈에서, 긴 비-코딩 RNA (lncRNA)를 보유하는 유전자 로커스는 단백질-코딩 유전자보다 수가 더 많고 동일한 종양원성 발병 사례에 영향을 받기 쉽다 (Hon *et al.*, *Nature* 543:199-204 (2017); Wang *et al.*, *Cancer Cell* 33:706-720 (2018)). 이들 RNA 분자는 200개의 뉴클레오티드 (nt)보다 큰 길이 및 단백질-코딩 가능성의 결여를 갖는 것으로 정의되고, 그러므로 다양한 기능적 개체를 나타낸다 (Ulitsky *et al.*, *Cell* 154:26-46 (2013)). lncRNA는 보통 단백질-코딩 유전자에 대한 이들의 위치에 기반하여 4개의 별개의 하위그룹: 엑손, 인트론, 중첩, 유전자간, 센스 및 안티센스 lncRNA로 분류되고; 대안적으로, 이들은 시스- 및 트랜스-작용 lncRNA로 기능적으로 분류될 수 있다 (Ulitsky *et al.*, *Cell* 154:26-46 (2013)). 트랜스-작용 lncRNA는 이들의 다양한 작용 메커니즘, 예컨대 성숙 마이크로RNA (miRNA)의 생물발생을 위한 전구체 분자로서의 (Lu *et al.*, *Nat. Med.* 23:1331-1341 (2017)) 또는 단백질 기능 및/또는 안정성을 조절하기 위한 단백질 및 핵산과의 이들의 직접적인 상호작용을 통한 (Tseng *et al.*, *Nature* 512:82-6 (2014)) 이들의 역할로 인해 특별히 관심이 있다. lncRNA의 이상 발현 및 기능은 종양 세포에 의한 악성 표현형의 점진적인 증가에 연루되어 있다 (Gutschner and Diederichs, *RNA. Biol.* 9:703-19 (2012)).

발명의 내용

- [0006] 본 개시내용의 제1 측면은 생리학적 조건 하에 MIR-17-92a-1 클러스터 숙주 유전자 (MIR17HG) 프리-RNA에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)로서, 여기서 ASO는 15 내지 약 30개의 뉴클레오티드 길이이고 MIR-17-92a-1 클러스터 숙주 유전자 (MIR17HG) 프리-RNA는 서열식별번호(SEQ ID NO): 1의 핵산 서열을 갖는 것인 ASO에 대한 것이다.
- [0007] 본 개시내용의 또 다른 측면은 치료 유효량의 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 제약상 허용되는 담체를 함유하는 제약 조성물이다.
- [0008] 본 개시내용의 또 다른 측면은 MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환을 치료하는 방법이다. 방법은 대상체에게 제약 조성물을 투여하는 것을 수반한다.
- [0009] 본 개시내용의 또 다른 측면은 치료 유효량의 MIR17HG 프리-RNA에 결합하는 ASO, 및 대상체에서 MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환의 치료에 제1 활성제를 사용하는 것에 대한 인쇄된 설명서를 함유하는 키트이다.
- [0010] 본원에 기재된 실시예는 MIR17HG 프리-RNA에 결합하는 ASO가 마이크로RNA 및 드로샤(DROSHA) 독립적인 방식으로, 독성 없이 생체내 감소된 다발성 골수종 종양 성장을 초래한다는 것을 입증한다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1a - 1d는 다발성 흑색종 (MM)에서의 주요 의존성으로서 MIR17HG를 확인한 전장-게놈 CRISPRi 생존을 스크린을 예시하는 도식 및 도트 및 라인 플롯 세트이다. 도 1a는 생존을 스크린을 도식적으로 예시한다. 도 1b는 2차 스크린에서의 lncRNA 의존성의 RRA-기반 순위 분석을 제시하는 라인 플롯 세트이다. 도 1c는 MM 세포주의 CCK-8 증식 검정을 제시하는 라인 플롯 세트이다. 도 1d는 MIR17HG 프리-RNA를 표적화하는 ASO 또는 비-표적화 ASO (NC)로 형질감염된 MM 세포주의 CCK-8 증식 검정을 제시하는 라인 플롯 세트이다.
- 도 2a - 2g는 또한 본원에서 지질형성의 조절인자 (RROL)로 지칭된, lncRNA lnc-17-92^{TV1}이 어떻게 마이크로RNA-독립적인 방식으로 의존성을 매개하는지를 제시하는 도식, 라인, 막대, 및 생존 플롯 세트이다. 도 2a는 lncRNA (RROL) 및 miRNA (miR-17-92) 유래 전사체 둘 다를 포함하는, MIR17HG 로커스의 개요를 도식적으로 예

시한다. 도 2b는 MM 환자의 3개의 대형 코호트에서의 높은 RROL 발현 (상위 사분위수)의 예후 유의성 (PFS 및 OS)을 제시하는 라인 플롯 세트이다. 도 2c는 pri-mir-17-92 (pri-miR) 또는 GFP 대조군으로 형질도입된 AMO1 및 H929 세포에서의 CCK-8 증식 검정을 예시하는 막대 플롯 세트이다. 도 2d는 ASO1에 노출된 드로샤 WT 또는 KO AMO1 및 H929 세포의 CCK-8 증식 검정을 예시하는 막대 플롯 및 이미지 세트이다. 도 2e는 NOD SCID 마우스의 매트릭셀-기반 AMO1^{DR-KO} 이종이식편에서의 RROL 고갈의 효과를 예시하는 라인 플롯이다. 도 2f는 중앙 주사된 마우스의 생존 분석을 예시하는 생존 플롯이다. 도 2g는 WT 또는 돌연변이된 (-/-) 다이서(Dicer)를 발현하는 HCT-116 및 DLD-1 결장직장암 세포주에서의 CCK-8 증식 검정을 제시하는 막대 플롯 세트이다.

도 3a - 3g는 유전자 발현을 조절하기 위한 염색질과의 RROL의 상호작용을 제시하는 다이어그램, 이미지, 막대, 및 도트 플롯 세트이다. 도 3a는 MM 세포주, 드로샤 WT (AMO1, H929) 또는 KO (AMO1^{DR-KO})에서의 RROL 고갈 후 전사체학 분석을 제시하고 통상적으로 하향조절된 유전자를 제시하는 다이어그램이다 (adj p<0.05; lfc<-1). 도 3b는 24h 동안 ASO1에 노출된 3명의 MM 환자로부터의 CD138+ 세포에서의 RROL 표적의 qRT-PCR 분석을 예시하는 막대 플롯이다. 도 3c는 각각의 RROL 표적에 대한 함께 및 단독으로 CD138+ MM 환자 세포에서의 RROL 표적 (mRNA)과 RROL 사이의 상관관계를 제시하는 도트 플롯 및 상관관계 플롯 세트이다. 도 3d는 ASO1을 사용하는 RROL 녹다운 후 ACC1, ANO6, CCDC91, EPT1, EXT1, FER, 및 KIAA1109 프로모터 활성의 감소된 활성을 제시하는 GLuc/ SEAP 이중 리포터 검정을 예시하는 막대 플롯이다. 도 3e는 RROL 표적에 대한 siRNA로의 형질감염 후 5개의 MM 세포주에서의 CCK-8 증식 검정을 예시하는 라인 플롯 세트이다. 도 3f는 LacZ 안티센스 프로브 (음성 대조군)를 사용하여 정제된 염색질과 비교하여, 2개의 RROL 안티센스 프로브 세트 (ps1 및 ps2)를 사용하여 정제된 염색질에서의 ACC1 프로모터의 효과적인 증폭을 제시하는 ChIRP-qPCR 분석을 예시하는 막대 플롯이다. 도 3g는 (좌측) 대표적인 AMO1 세포에서의 ACC1 프리-mRNA (녹색) 및 RROL (자주색)의 이중 RNA-FISH 분석에 의해 획득된 스냅샷; (우측) 최근접 RROL 스팟 또는 최근접 무작위 스팟까지의 ACC1 프리-RNA 스팟의 거리 (nm)를 제시하는 박스 플롯을 예시하는 이미지 및 도트 플롯 세트이다.

도 4a - 4g는 ACC1 프로모터에서의 MYC 점유의 RROL의 축진을 예시하는 막대 및 이미지 세트이다. 도 4a는 H929 및 AMO1 세포에서의 ASO1에 대한 짐노틱 노출의 3일 후 전사 변화의 상류 조절인자 분석을 제시하는 막대 플롯이다. 도 4b는 ASO1 또는 NC (비히클)에 24h 동안 노출된 AMO1, H929 및 U266^{MYC+}의 ACC1 프로모터에서의 MYC 점유의 ChIP-qPCR 분석을 예시하는 막대 플롯 및 이미지 세트이다. 도 4c는 MYC를 녹다운하기 위해 독시사이클린 또는 DMSO에 2일 동안 노출되고 추가적인 2일 동안, RROL을 고갈시키기 위해 ASO1 또는 비히클 (NC)에 노출된 P493-6 세포에서의 ACC1 mRNA의 qRT-PCR 분석을 예시하는 막대 플롯 및 이미지이다. 도 4d는 ACC1 프리-RNA (적색), MYC 단백질 (녹색) 및 RROL (자주색)의 Co-IF/FISH 분석을 예시하는 이미지 세트이다. 도 4e는 항-MYC 항체 (α-MYC) 또는 IgG 대조군을 사용하여 침전된 RIP 물질에서의 RROL (이소형 2를 검출함)의 qRT-PCR 분석을 예시한다. 도 4f는 대조군 RNA 또는 RROL 전사체 -1 및 -2로 침전된 RPPD 물질에서의 MYC의 웨스턴 블롯 분석을 예시한다. 도 4g는 혼성체 단백질 2로서 MYC 및, 혼성체 RNA로서, 음성 대조군 RNA (-) 또는 RROL 전사체 -1 및 -2를 사용하는 RNA Y3H를 예시한다.

도 5a - 5i는 RROL이 MYC-WDR82 전사 복합체의 조립을 매개하며, 이는 ACC1의 전사 및 후성적 활성화를 야기한다는 것을 예시하는 도식, 이미지, 및 막대 플롯 세트이다. 도 5a는 도식적으로 RROL 고갈의 존재 또는 부재 하에 MYC-단백질 상호작용 네트워크를 탐구하는 통합된 BioID 및 Co-IP/MS 검정을 제시한다. 도 5b는 RROL-1 및 RROL-2 또는 대조군 RNA로 침전된 RPPD 물질에서의 WDR82의 웨스턴 블롯 분석을 예시하는 이미지이다. 도 5c는 혼성체 단백질 2로서 WDR82 및, 혼성체 RNA로서, 음성 대조군 RNA (-) 또는 RROL 전사체 -1 및 -2를 사용하는 RNA Y3H를 예시하는 이미지이다. 도 5d는 WDR82의 침묵 후 AMO1의 ACC1 프로모터에서의 H3K4me3 점유의 ChIP-qPCR 분석을 예시하는 막대 플롯 및 이미지이다. 도 5e는 WDR82의 침묵 후 AMO1의 ACC1 프로모터에서의 MYC 점유의 ChIP-qPCR 분석을 예시하는 막대 플롯 및 이미지이다. 도 5f는 AMO1에서의 WDR82를 표적화하는 siRNA (siWDR82-1 또는 -2)의 형질감염 후 ACC1 mRNA의 qRT-PCR 분석을 예시하는 막대 플롯 및 이미지이다. 도 5g는 짐노틱 ASO1에 24h 동안 노출된 AMO1의 ACC1 프로모터에서의 WDR82-GFP 점유의 ChIP-qPCR 분석을 예시하는 막대 플롯 및 이미지이다. 도 5h는 짐노틱 ASO1에 24h 동안 노출된 AMO1 및 H929의 ACC1 프로모터에서의 H3K4me3 점유의 ChIP-qPCR 분석을 예시하는 막대 플롯 및 이미지이다. 도 5i는 ACC1 프로모터 부위에서의 H3K4me3 수준을 제시하는 웨스턴 블롯의 이미지 세트이다.

도 6a - 6e는 RROL/MYC-ACC1 축이 신생 지질형성을 조절한다는 것을 제시하는 막대 플롯, 유동 세포측정 플롯, 및 도식 세트이다. 도 6a는 MM 세포주 또는 CD138+ MM 환자 세포에서의 RROL, MYC, 또는 ACC1 고갈 / 억제 후 지질로의 ¹⁴C-글루코스의 혼입을 예시한다. 도 6b는 MM 세포에서의 RROL 억제 후 액체 크로마토그래피 - 질량

분광분석법 (LC-MS) 기반 지질 프로파일링을 제시하는 막대 플롯 세트이다. 도 6c는 MM 세포에서의 RROL 고갈의 항-증식 효과에 대한 팔미테이트의 효과를 제시하는 막대 플롯이다. 도 6d는 MM 세포에서의 RROL 고갈의 증식-유발 효과에 대한 팔미테이트의 효과를 제시하는 유동 세포측정 플롯 세트이다. 도 6e는 MM 세포 성장에 영향을 미치는 바와 같은 RROL 경로를 도식적으로 예시한다.

도 7a - 7j는 인간 MM의 동물 모델에서 강력한 항-종양 활성을 시험관내 및 생체내 발휘하는 RROL의 치료 억제제를 도시하는 도트, 막대, 및 생존 플롯 및 이미지 세트이다. 도 7a는 RROL 치료 ASO를 개발하기 위한 다단계 스크린을 도식적으로 예시한다. 도 7b는 11개의 MM 세포주의 패널에서의 CCK-8 증식 검정을 예시하는 막대 플롯 세트이다. 도 7c는 NOD SCID 마우스에서의 AMO1 세포의 피하 생체내 종양 성장을 예시하는 도트 플롯이다. 도 7d - 도 7e는 AMO1 이종이식편에서의 RROL (도 7d) 및 RROL 표적 (도 7e)의 qRT-PCR 분석을 예시하는 막대 플롯이다. 도 7f는 종양에서의 트리팔미틴의 조절을 제시하는 지질 프로파일링 분석을 예시하는 막대 플롯이다. 도 7g는 NSG 마우스에서의 MOLP8-luc+의 생체내 종양 성장의 BLI-기반 측정을 예시하는 도트 플롯 및 이미지이다. 도 7h는 도 7e에서의 실험으로부터의 생존 플롯이며, 흑색 화살표는 치료를 나타낸다. 도 7i는 NSG 마우스 (PDX-NSG)에서의 MM 환자 세포의 생체내 종양 성장의 인간 k 경쇄 ELISA-기반 측정을 제시하는 라인 플롯이다. 도 7j는 G2-15b*-TO (G) 또는 SB9-19-TO (SB) 또는 대조군으로서의 비히칼 (NC)로 치료된 동물로부터 회수된 종양에서의 BCL2L1의 qRT-PCR 분석을 제시하는 막대 플롯이다.

도 8a - 8c는 스크린 데이터 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용한 및 없이 MIR17HG 녹다운을 예시하는 막대 플롯 세트이다. 도 8a는 스크리닝 데이터의 분석을 제시하는 막대 플롯이며, 업셋 플롯은 MM 세포에서의 세포-유형 고유 및 공유된 lncRNA 의존성의 확인을 제시한다. 도 8b는 조건부 프로모터의 조절 하에 dCas9-KRAB 융합 단백질 및 항-MIR17HG gRNA를 발현하도록 조작된 AMO1에서 수득된 MIR17HG의 녹다운을 제시하는 막대 플롯이다. 도 8c는 2개의 캡-meR로 형질감염된 AMO1에서 수득된 MIR17HG의 녹다운을 예시하는 막대 플롯이다.

도 9a - 9l은 RROL 발현 및 miR-17-92 마이크로RNA와의 상관관계를 예시하는 박스 및 막대 플롯 세트이다. 도 9a는 새로 진단된 (ND) vs 재발된 (R) MM 환자에서의 RROL 발현을 제시하는 박스 플롯이다. 도 9b는 GSE66293 으로부터의 ND vs R MM 환자에서의 RROL 발현을 제시하는 박스 플롯이다. 도 9c는 RNA-seq 및 miRNA 프로파일링에 의해 분석된 140명의 MM 환자로부터의 CD138+ 세포에서의 RROL과 miR-17-92 사이의 상호관계를 제시하는 스피어만의 상관관계이다. 도 9d는 AMO1 및 H929 세포에서의 miR-17-92 마이크로RNA의 qRT-PCR 분석을 예시하는 막대 플롯 세트이다. 도 9e는 드로샤에 대한 AMO1 및 H929 WT 또는 KO에서의 miR-17-92 마이크로RNA의 qRT-PCR 분석을 예시하는 막대 플롯 세트이다. 도 9f는 AMO1^{DR-KO} 및 H929^{DR-KO}에서의, 3개의 상이한 ASO, 또는 스크램블 대조군 (NC)을 사용하는 MIR17HG의 녹다운을 예시하는 막대 플롯 세트이다. 도 9g는 4개의 MM 샘플에서의 RROL에 대한 RNA-seq 커버리지 플롯 및 접합 분석이다. 도 9h는 AMO1에서의 RROL 전사체 변이체 1 및 2의 qRT-PCR 분석을 제시하는 막대 플롯이다. 프라이머는 도 9g에 표시된 영역을 증폭시킨다. 도 9i는 MMRF/CoMMpass 데이터세트 (n=720) 및 60개의 MM 세포주에서의 RROL 발현 (TPM)의 RNA-seq 분석을 제시하는 박스 플롯이다. 도 9j는 NOD SCID 마우스의 매트릭셀-기반 AMO1DR-KO 이종이식편에서의 RROL 고갈의 효과를 제시하는 라인 플롯이다. 도 9k는 MIR17HG 프리-RNA의 5'단부를 표적화하는 ASO (5'-ASO) 또는 스크램블 대조군 (NC)으로 형질감염된 HCC-116 세포에서의 CCK-8 증식 검정을 제시하는 막대 플롯이다. 도 9l은 pri-mir-17-92, lnc-17-92TV1, 및 lnc-17-92TV2의 이소성 발현을 제시하는 막대 플롯이고, 하기를 제시하는 qRT-PCR에 의해 확인되었다: i) pri-mir-17-92의 이소성 발현 후 miR-17의 상향조절, ii) 그의 이소성 발현 후 lnc-17-92TV1의 상향조절, 및 iii) 그의 이소성 발현 후 lnc-17-92TV2의 상향조절.

도 10a - 10i는 시험관내 RROL 및 miR-17-92 miRNA 발현 및 국제화를 예시하는 이미지, 히트맵, 및 막대 플롯 세트이다. 도 10a는 AMO1 및 H929에서의 RROL의 세포-하 qRT-PCR 분석을 제시하는 막대 플롯이다. 도 10b는 AMO1에서의 RROL의 세포하 국제화의 RNA-FISH 분석을 제시하는 이미지 세트이다. 도 10c는 ASO1 또는 ASO-1-NC에 침노된 AMO1에서의 RROL 및 miR-17-92 miRNA의 qRT-PCR 분석을 제시하는 히트맵이다. 도 10d는 24h 동안 ASO1에 침노된 Daudi 및 Raji 세포에서의 RROL 전사 표적의 qRT-PCR 분석을 제시하는 막대 플롯이다. 도 10e는 뮤린 *mir17hg* 초기 RNA를 표적화하는 3개의 상이한 ASO로 형질감염된 5TGM1 뮤린 MM 세포에서의 뮤린 *rrol*, *acc1* 및 *fer*의 qRT-PCR 분석을 제시하는 막대 플롯이다. 도 10f - 도 10g는 폴링된 miR-17-92 miRNA 억제제 (도 10f) 또는 모방체 (도 10g)로 형질감염된 AMO1에서의 miR-17-92 miRNA (흑색 막대) 및 RROL 전사 표적 (백색 막대)의 qRT-PCR 분석을 제시하는 막대 플롯이다. 도 10h - 도 10i는 2개의 RROL 안티센스 프로브 세트 (ps1 및 ps2)를 사용하거나 또는 LacZ 안티센스 프로브 (음성 대조군)를 사용하여 정제된 염색질에서의 GAPDH 엑손2의 양성 반응 (증폭)의 % (도 10h) 또는 CT 값 (도 10i)을 제시하는 ChIRP-qPCR 분석을

제시하는 막대 플롯이다.

도 11a - 11g는 RROL이 ACC1 프로모터에서의 MYC 점유를 촉진한다는 것을 제시하는 사진 및 막대 플롯 세트이다. 도 11a는 U266 세포 WT 또는 FLAG 또는 MYC-FLAG의 발현을 보유하는 벡터로 감염된 것에서의 MYC의 웨스턴 블롯이다. 도 11b는 RROL의 이소형의 도식 예시이다. 도 11c는 항-MYC 항체 (α -MYC) 또는 IgG 대조군으로의 면역침전 후 RROL 이소형 -2 및 -2의 qRT-PCR이다. 도 11d는 MM 세포주 AMO1 및 H929에서의 MYC 억제제 10058-F4로의 치료 후 ACC1 mRNA의 qRT-PCR 분석을 제시하는 막대 플롯이다. 도 11e는 MM 세포주 AMO1 및 H929에서의 MYC 억제제 10058-F4로의 치료 후 지질로의 C^{14} -글루코스의 혼입을 제시하는 막대 플롯이다. 도 11f는 ACC1을 표적화하는 siRNA 또는 스크램블 siRNA (NC)로의 형질감염 후 U266^{MYC-} 및 U266^{MYC+}에서의 CCK-8 증식 검정을 제시하는 막대 플롯이다. 세포 생존율은 형질감염 후 48h에 측정되었고 이는 NC 형질감염된 세포의 %로서 표시된다. 도 11g는 대조군 RNA 또는 lnc-17-92TV1의 말단절단된 버전으로 침전된 RPPD 물질에서의 MYC의 웨스턴 블롯 분석의 사진이고; 5% 입력이 참조로서 사용된다.

도 12a - 12d는 RROL 녹다운 후 MYC 및 GFP 발현 또는 WDR82-GFP 융합 단백질 발현을 제시하는 이미지 세트이다. 도 12a는 FBA-MYC 융합 단백질을 유도하기 위한 독시사이클린이 있거나 또는 없고 RROL을 녹다운하기 위해 NC 또는 ASO1로 형질감염된 FBA-MYC 세포에서의 MYC의 웨스턴 블롯 분석을 제시하는 이미지이다. 도 12b는 AMO1 세포 WT 또는 GFP 또는 WDR82-GFP의 발현을 보유하는 벡터로 감염된 것에서의 GFP의 웨스턴 블롯 분석을 제시하는 이미지이다. 도 12c는 대조군 RNA 또는 lnc-17-92TV1의 말단절단된 버전으로 침전된 RPPD 물질에서의 WDR82의 웨스턴 블롯 분석을 제시하는 이미지이다. 도 12d는 H929에서의 siRNA 풀 (n=4)로의 WDR82의 침묵 후 (48h 시점) WDR82, H3, H3H3K4me1, H3H3K4me2, 및 H3H3K4me3의 웨스턴 블롯 분석을 제시하는 이미지 및 막대 플롯 세트이다. 라민 A/C가 단백질 로딩 대조군 (핵 용해물)으로서 사용되었고, ii.는 밀도측정 분석의 정량화이다.

도 13a - 13c는 글루코스 업데이트의 효과 및 RROL에 결합하는 ASO에의 노출 후 RROL 표적의 발현을 제시하는 막대 플롯 및 사진 세트이다. 도 13a는 miR-17-92 항-miR로의 AMO1의 형질감염 후 지질로의 C^{14} -글루코스의 혼입을 제시하는 막대 플롯이다. 도 13b는 36h 동안 ASO1에 노출된 AMO1 및 H929에서의 miR-17-92의 정규 표적 BCL2L1 (BIM) 및 PTEN의 GEP 분석을 제시하는 막대 플롯이다. 도 13c는 36h 동안 ASO1에 노출된 AMO1에서의 miR-17-92의 정규 표적 BIM의 웨스턴 블롯 분석의 사진이다.

도 14a-14c는 RROL을 표적화하는 치료 ASO를 개발하기 위한 다단계 스크린을 도시하는 막대 플롯 세트이다. 도 14a는 "G" 또는 "SB" 입체형태의 16개의 서열 (>20-mer)인, RROL 상의 ASO-접근가능한 스트레치를 확인하는 단계 1의 결과를 제시하는 막대 플롯이다. 도 14b는 단계 1로부터 선택된 G2 및 SB9 설계를 최적화하는 단계 2의 결과를 제시하는 막대 플롯이다. 도 14c는 팔미트산 (P), 콜레스테롤 (C), 또는 토크페롤 (T)과 접합된 단계 2 분자가 시험된 단계 3의 결과를 제시하는 막대 플롯이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 정의
- [0013] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본원의 주제가 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 반대로 명시되지 않는 한, 하기 용어는 본 개시내용의 이해를 용이하게 하기 위해 표시된 의미를 갖는다.
- [0014] 본 설명 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수형을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "조성물"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 조성물의 혼합물을 포함하고, "억제제"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 억제제의 혼합물을 포함하는 등이다.
- [0015] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "약"은 관련 기술분야의 일반적인 허용 오차의 범위 내, 예를 들어 평균의 2 표준편차 내인 것으로 이해된다. "약"은 명시된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 내인 것으로 이해될 수 있다.
- [0016] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대략"은 달리 명시되지 않거나 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한 명시된 참조 값의 어느 하나의 방향으로 (초과 또는 미만) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다 (이러한 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외함). 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 본원에 제공된 모든

수치 값은 용어 "약"에 의해 수식된다.

[0017] "포함하는", "함유하는", 또는 "특징으로 하는"과 동의어인, 전환 용어 "포함하는"은 포괄적이거나 또는 개방형 이고 추가적인, 언급되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 대조적으로, 전환 어구 "이루어진"은 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분을 배제한다. 전환 어구 "본질적으로 이루어진"은 청구범위의 범주를 명시된 물질 또는 단계 및 청구된 개시내용의 "기본 및 신규 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것"으로 제한한다.

[0018] 안티센스 올리고뉴클레오티드

[0019] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 생리학적 조건 하에 MiR-17-92a-1 클러스터 숙주 유전자 (MIR17HG) 프리-RNA에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)를 제공한다.

[0020] MIR17HG 유전자는 2개의 lncRNA, lnc-17-92^{TV1} 및 lnc-17-92^{TV2}, 및 6개의 miRNA, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, 및 miR-92a를 함유한다. lnc-17-92^{TV1} (또한 지질형성의 RNA 조절인자 (RROL), lnc-17-92^{TV1}, 및 MIR17HG^{miR-17-92}로 공지됨) 전사체의 핵산 서열은 NCBI 수탁 번호 NR_027350, 버전 NR_027350.1에 제공된다. lnc-17-92^{TV1}은 본원에서 종양원성 유전자 번역을 구동시키기 위한 전사 인자 복합체를 매개하는 염색질 스캐폴드를 제공하는 것으로 제시된다. lnc-17-92^{TV2} 전사체의 핵산 서열은 NCBI 수탁 번호 NR_027349, 버전 NR_027349.1에 제공된다.

[0021] MIR17HG 프리-RNA의 핵산 서열은 Ensembl 수탁 번호 ENSG00000215417에 제공되고, 하기 제시된다 (서열식별번호: 1):

```

1 gaagctctcc tcgcgggggc ggccggcccg ccgcaccccc ggcctggggc ctccggctcg
61 agtaaacgcg aggcggggcg ggaggcgagg gcaggagccc gcggccggcc agccgaagat
121 ggtggcggct actcctcctg gtgagtctgc ccgcccctcc ggcgacggag ggaaacctgt
181 tgtgtgcggc ccgggtcttg cggcgggggc ggagcggccc gggcgggact ggccccgggc
241 agcgtggggc cgcgggcggt gccggggggc gtctcggccc ttggccgccc cggcgtgtgg
301 cagcccgcatc tggctgcccc ctgcctcgcc cgcgggcccg cggagggggg caggggccgg
361 gcgggagggg gggagggggc gccgtgcggc tggcgggccc gcccgggacc cgcgcagacc
421 ctgcctgggc cgacctgaag gcgggtgggc ggcggggcaa cacaatggcc cctcggggag
481 agaacgtgcg agggccgtgc cttctccggg gcccgggggc cgcgcggggc gtgggggtctc
541 tgggtaggaa agtttctccc gagggcgaga gttaaagcgc ctccagaaca aagcggcgcg
601 ggcgggcgca catggggcag gcccgggccc gggagggggc gcgcccacga ggtacctgcg
661 gcgcagcggg cgcgctggcg tggcggggag ccccggggtc cccaaacttt gtacgcgca
721 ggggtggggc agggggcgcc agatcggcgc ggcctggggc ccacccccgc tccgctgtgg
781 ctttggtagc ccgcgtgggc agcctcgggg cggggcccgc aacttccccg cctggccct
841 cggaggaagg cgcagtcggc ctacggcgcg gcgtggagcc gctcgcggcc ggcgcttgc
901 tgggagtgtg gcgcgggagg gccagcccgg ctccggcgga gcggcgtccc cgcggccatg
961 ttccctggcg cggggctgca cgggggtgag ggcggggggc atggcgggca ctgcccggcg
1021 ccgcccggat ttcccggctt agccctcggg ccgctgagca cgggcaaccg gcccgcgagg
1081 cccccgcccc tctggcgccg gctcgggggg gctggggggc acaaaggagg ggcgcgcgcg
1141 ccgctgcccc gccgcactcg ggcctcggcg ccgcccggcg ccgcccggct gcccgcgga
1201 aacgggttgg gggggttggc gcgtccggcg gggcctgact ctgaccccgc gcccccctgg
1261 ggctacggcg agaatcgag ggcccgcgct ccccttctgc gacatgtgct gccggcccgg
1321 gctccatgag cgtggcgggc actttgcagt ctccgggtgt cctgcccggg cttctgttcc
1381 taaactgcag caaagggaaa aggaactgaa aaagggcagg tcgtcgttgc aatatcacca
1441 aaagagaaaa ttaacggcat gccatcagga ccacagcagt tggagaaaaa actctttatc
1501 ccggcttcca gccacagagg cttgattggg ggaggggtgg tgaagaatag tctgtgggct
1561 gctttttttt tttcctttta ctggagctgt acagtgagtt cgtgattgct tctgatcatc
1621 aatcaagtat tttaggagct tatttagaca tgtatctgat agctaaggat tttcaactt
1681 tatttctcta cgtatttttc aactgtaaat tattgggctt taaatcctg ctagtattgc
1741 tcgactctta ctctcacaata tggatggaat taattgctgt taggaggttg gaaaatagca
1801 aatatagatt tggacgggtg tagtaatttt gagcaataa tgttttatct ttttttctct
1861 tatttttccc tattccagtc atacacgtgg acctaactgc accagtagct tttctgagaa
1921 tacttgctga aaagggaagt ttctggaatg ggtaagtgta ttctgatttt cttgaacttt
1981 tcttaaaaac aaatttttct tgctattaaa gttgaaataa taggattggt ttcttagaga
2041 gtaaaagtag gtgtttcttt ctttagacaa tgtacctttt ctgaaaaact aactcattaa
2101 gtacggattt gctaatttta agtgatgaaa attacagtgt aaatattcct gtacattttt
2161 ggaactggc ttatgcagtt tacgaaatat aattttagac cctcttttaa gttgggtgat
2221 aaagtagata taacctgaga tgatagattt aaacaggata tttacgttct gtcacaattg
2281 actgataaca cttgaagtgt agtctgaaca gtaattttgt taatcatttc aacaagtatt
2341 tgctaagtgg aagccagaag aggaggaaaa tgttttgcca cgtggatgtg aagatttctc
2401 ctaaaaggta cacatggact aaattgcctt taaatgttcc aaaatagtt ctcaattatt
2461 tgcagtctca tttgtttttg ttttttttct ctatgtgcca atccatttgg gagaggccag
2521 ccattggaag agccaccact tccagtgcta gttggatggt tggttatgat tgccttctgt
2581 aaagaattct taaggcataa atacgtgtct aaatggacct catatctttg agataattaa
2641 actaaatttt tcttccccat tagggattat gctgaatttg tatggtttat agttgttaga
2701 gtttgagggt taaattctaa ttatctattt caaatttagc agggaaaaag agaacatcac
2761 cttgtaaaac tgaagattgt gaccagtcag aataatgtca aagtgtctac agtgcaggta
2821 gtgatattgt catctactgc agtgaaggca cttgtagcat tatggtgaca gctgcctcgg
2881 gaagccaagt tggcctttaa agtgcagggc ctgctgatgt tgagtgtctt ttgttctaa
2941 gtgcatctag tgcagatagt gaagttagat agcatctact gccctaagtg ctcctctcgg
3001 cataagaagt tatgtattca tccaataatt caagccaagc aagtatatag gtgttttaat
3061 agttttttgt tgcagtcctc tgttagtttt gcatagtttg actacaagaa gaatgtagtt
3121 gtgcaaatct atgcaaaact gatggtggcc tgcattttcc tcaaatgaa tgatttttac
3181 taattttgtg taattttatt gtgtcagatg agaactgtcc tggctctatc gatgtgacag
3241 cttctgtagc actaaagtgc ttatagtgca ggtagtgttt agttatctac tgcattatga
3301 gcacttaaaq tactgctagc tgtagaactc cagcttcggc ctgtcggcca atcaaacctg
    
```

[0022]

```

3361 cctgttactg aacactgttc tatggttagt tttgcaggtt tgcattccagc tgtgtgatat
3421 tctgtctgtc aaatccatgc aaaactgact gtggtagtga aaagtctgta gaaaagtaag
3481 ggaaactcaa accccttctt acacaggttg ggatcggttg caatgctgtg tttctgtatg
3541 gtattgcact tgtcccggcc tgttgagttt ggtggggatt gtgaccagaa gattttgaaa
3601 attaaatatt actgaagatt tgcacttcca ctgttaaattg tacaagatag atgaaatatt
3661 aaagaaaatg tgaacttttt tgtgtaataa catcttctgt tgttttctat caaaaacatt
3721 tcaacttttg ggttgcgtgt cagatttggtc agtataaatt ctggctatat tttttgttgt
3781 tagatttatt tggctgttaa gtattgcatg atgactaaac atactgtata cctgatgac
3841 atctgtaaa ttagagtata tctttttgct tcttttgag ttagtgttat tccaggatat
3901 tttacttaat ctaaaagtta atttatgttg ctcatatatt actcaagtat ttaaatttag
3961 agagaatgcc gctctgttta aagcaatgtg taaagatgag tttttttaag catggaattt
4021 aggggtgggg tacaaattgt ttctattaag caagtaccag ttaccaata catgagtaac
4081 tgaagtgtaa ctgttaaatg cttgtatact agtttttctt tctgattgtc agtgatttat
4141 aagctataaa tgaccaaggt cctcagactg ctttttagcat ctgcaactta aaaaaatggg
4201 agttagaaaa agaacaaatg ctaaatagag taacagttaa atgtatgtgt acactcttcc
4261 caaatgccc gagtgcagcg gtgggtgag attcagatat tcatttattt ctaagtctgt
4321 agttaacatt tatgttccct actccctacg taagccagac ttggcaaca gtgatagttg
4381 attccaggct tatttgactt aaagtcaact aagtggaaac taagaagtgg cagttagtgt
4441 tttaccocagc atttctgctt tctctctttt ctctatgtgt ttttctctc agcctatgtg
4501 tatttgtgta gaataatgtg ggatacctga ataatagatt taaaaggacc aagtggtaaa
4561 attgggcccc agctgaagta caggcaaac tgatgtttga aagataagtt ttgagaaatg
4621 tcattgtatt ttggagtaaa agaggctatc tttagtaataa gaaataaact tccataaac
4681 taggttagac caccacaata atctagaaat cagcttttaa aaatattgtc tgaagtctaa
4741 caaaagttt cacctctaat gtgttcttta agaaatttaa ggaacttagc cttggattcc
4801 tgaatagaaa gtaagaatt ctatcattct ggagttgatg aaaaacataa ttttcaggat
4861 gtgaaatgaa cagtgattta taaaatggaa atcaaatgtt acattagcag agttcttaag
4921 ctttttgaat tgaagggagc ctaataattg tgtctttttg gttatttagt gacaacagtg
4981 gctttcaaac tatgcttaaa aagtccggc tggacacggg ggctcacacc tataatccta
5041 gcaactgggg aggtcgaggg agacggatta cctgaggtca ggagtctgag acaaacctgg
5101 ccgacatggt gaaacgctgt ctctactaaa aatataaaaa attagccggg tgcagtggcg
5161 tgcacctgta atcccagcta ctctggaggg tgaggcagga gaatcacctg aacctgggag
5221 gtggaggttt cagtgcagctg agatcctgccc actgcactcc agcctggggc caagaccaag
5281 acttaaacgc aaaaaaaaaa aaaaaaaagt tcataataca gcatggctctg
5341 gtagtgtgca aaatggtgtg cttttgggga gatacacatg caattttttt aaaaactgga
5401 acagtgtgat aggaagcctg ctggatgatt tcttaaatat tctaaatgt aagtcaaaa
5461 tgttttaata acaagactt aaatggcctt tctccctaga gactgaaact agtattcatt
5521 gtgttcagaa cttaattggg cttgaaactg gatttaaatc taataacaa gtaataaatt
5581 gtgtatgttt tgttgggtt ttggtagtga tctgtggttc tatagggttt aataggatt
5641 gcttttgatt tgtttctggc tttagaatgt gaggcaaat ttacattctt ggttctatta
5701 agattttctt aggcattgca acatgccaac aaaagccat gtaagtattg tataaaaaaga
5761 ttcaacttgt taatttagcc attttgaat tcagatgatg gagcaagttg ataatggcct
5821 catctctgac ctgagaaaaa acaactttga cccttgttct taaaatgctt taacctgaa
5881 gttgcttgag acttaagagg tcatgttctt ttagggttaa taaatagcct taactatttg
5941 gaggggaaaa ataggggtcaa cttttttttt tttttttggc gtttgcattg acaactttct
6001 attttttagcc tatatttggg aagaaagcac ttaacatttt aggaattctt tttaaagctg
6061 ctgcaaaagt gttggtgatt ttactgaaaa cttttgagat cttcatttta caggcagacc
6121 tgtctaacta caagccagac ttgggttttc tctgtagtt tgaagacaca ctgactctg
6181 aaaaaatgca gcctgcaact tctgggagaa caactcagtg tcacattaaa gtttattatg
6241 tatttaatga tacactgttt aattgacagt tttgcatagt ttgtctaact tttagaatt
6301 aagagcctct caactgagca gtaaaagtaa ggagagctca atctgcaag agccagttt
6361 tagtgtttga tggaaataag atcatcatgc ccaacttgaga cttcagatta tcttttagct
6421 tagtggttgt atgagttaca tcttattaaa gtcgaaatta atgtagtttt ctgctttagt
6481 aacatttcat atgtggtatt agttttaaag ggtcattagg aaaaatgcaca tattccatg
6541 atttaagac ccaatgaaaa gttgaaagaat gcttaatttt cttatccagt aatgtaaaa
6601 cagagacaga acattgagat gtcgctagtt ctgtatttac agtttggctt ggcgttttga
6661 gttctagcgc atttaatggt aataaataaa atactgcatt ttaaagctgt taagaaattg
6721 tccgaacga gaattattgaa ataaaaactt caaggttatt

```

[0023]

[0024]

본원에 사용된 바와 같은 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드" (ASO로 축약됨)는 표적 RNA 분자에 결합할 수 있는 뉴클레오티드의 비-천연 발생 중합체 (올리고머)를 지칭한다.

[0025]

용어 "뉴클레오티드"는, 구체적으로 명시되거나 또는 문맥으로부터 명확하지 않는 한, 리보스 당 (즉, 리보핵산, RNA를 형성하는 리보뉴클레오티드) 또는 2'-데옥시리보스 당 (즉, 데옥시리보핵산, DNA를 형성하는 데옥시리보뉴클레오티드) 및 포스페이트를 갖는 뉴클레오시드를 포함한다. 뉴클레오티드는 핵산 중합체 또는 폴리뉴클레오티드의 단량체성 단위로서 역할을 한다. DNA에서의 4개의 핵염기는 구아닌 (G), 아데닌 (A), 시토신 (C) 및 티민 (T)이다. RNA에서의 4개의 핵염기는 구아닌 (G), 아데닌 (A), 시토신 (C) 및 우라실 (U)이다. 본 맥락에서, ASO가 이들이 도입될 수 있는 세포에 대해 외인성임이 이해된다.

[0026]

ASO는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 변형된 리보뉴클레오티드, 변형된 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 이들의 조합으로 구성될 수 있다. ASO는 적어도 부분적인 상보성 영역(들)을 통한 혼성화에 의해 표적 RNA를 조정한다. ASO 조정 메커니즘은 전사 정지, (예를 들어, 캡핑, 스플라이싱, 및/또는 핵에서 세포질로의 수송을 포함하는 다양한 단계에서의) RNA 합성 파괴, 리보솜 부착, 리보뉴클레아제 (RNase) H 모집, mRNA의 분해 (예를 들어, 깎머 ASO), 번역 정지 (예를 들어, 표적 RNA에 결합하여 번역을 차단하는 ASO), 또는 ASO 혼성화에 의한 표적 RNA의 입체구조적 차단을 포함한다.

[0027]

용어 "깎머" 및 "깎-meR"은 본원에서 깎, 또는 주요 영역의 양측 상에 RNA-유사 링 분절을 갖는 짧은 DNA ASO 구조를 지칭하는데 사용된다. 이들 선형 DNA 분자는 표적에 혼성화하여 RNase H 절단의 유도를 통해 RNA를 분해하도록 설계된다. 표적 RNA에 대한 깎머의 결합은 변형된 RNA-유사 플랭킹 영역으로 인해 보다 높은 친화도, 뿐만 아니라 뉴클레아제에 의한 ASO 분해에 대한 저항성을 갖는다. 깎머 깎은 하나의 링 또는 양쪽 링에서의

변형의 것과 상이한 적어도 1개의 변형을 함유한다. 이러한 변형은 핵염기, 단량체성 연결, 및 당 변형을 포함한다.

- [0028] 일부 실시양태에서, ASO는 MIR17HG 프리-RNA의 5' 말단 영역에 결합한다. MIR17HG 프리-RNA의 문맥에서 사용될 때, 용어 "말단 영역"은 5' 말단 뉴클레오타이드의 첫 20%를 지칭한다. 일부 실시양태에서, ASO는 MIR17HG 프리-RNA의 5' 말단 뉴클레오타이드의 첫 10%, 첫 15%, 또는 첫 20% 내에서 결합한다. 일부 실시양태에서, ASO는 MIR17HG 프리-RNA의 3' 말단 영역 내에서 결합한다.
- [0029] 일부 실시양태에서, ASO는 MIR17HG 프리-RNA의 5' 말단 단부에 근접한 인트론 영역을 표적화한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인트론 영역"은 전사의 과정에서 프리-RNA로부터 제거되는 RNA 분자의 영역을 지칭한다. 일부 실시양태에서, ASO는 그로부터 miRNA 1차 전사체 (pri-miRNA)가 스플라이싱되는 MIR17HG 프리-RNA의 영역 (예를 들어, pri-mir-17-92)을 표적화한다. 프리-miRNA는 그로부터 성숙 miRNA가 유래되는 보다 긴 서열이다.
- [0030] 본원에 개시된 ASO는 생리학적 조건 하에 MIR17HG 프리-RNA에 결합한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "생리학적 조건"은 일반적으로 포유류 생체내 조건에서 마주치는 조건, 예를 들어, 체온 (약 37 °C), 생리학적 pH (약 7.3 내지 약 7.5의 범위 내)에서의 등장액 (약 0.9 % 생리 식염수)을 지칭한다.
- [0031] 효과적인 ASO의 최소 퍼센트 상보성은 표준 절차에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, ASO는 MIR17HG 프리-RNA와 약 85% 내지 약 100% 상보성을 갖는다. 일부 실시양태에서, ASO는 그가 표적화하는 MIR17HG 프리-RNA 서열과 100% 상보성을 갖는다. 일부 실시양태에서, ASO는 MIR17HG 프리-RNA와 적어도 99% 상보성, 적어도 98% 상보성, 적어도 97% 상보성, 적어도 96% 상보성, 적어도 95% 상보성, 마지막으로 90% 상보성, 적어도 85% 상보성이다.
- [0032] ASO는 15 내지 30개의 뉴클레오타이드 범위의 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, ASO는 30개 이하의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, ASO는 25개 이하의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, ASO는 24개 이하의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, ASO는 23개 이하의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, ASO는 20개 이하의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, ASO는 18개 이하의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, ASO는 15개의 뉴클레오타이드 내지 24개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, ASO는 18개의 뉴클레오타이드 내지 23개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, ASO는 18개의 뉴클레오타이드 길이이다 (이는 본원에서 18-mer로 지칭됨). 일부 실시양태에서, ASO는 20-mer이다. 일부 실시양태에서, ASO는 21-mer이다. 일부 실시양태에서, ASO는 22-mer이다. 일부 실시양태에서, ASO는 23-mer이다. ASO와 관련하여 본원에 사용될 때 용어 "mer"는 뉴클레오타이드의 길이를 지칭한다. 예를 들어, 용어 "16-mer" 및 "16mer"는 16개의 뉴클레오타이드의 스트레치를 지칭한다.
- [0033] 일부 실시양태에서, ASO는 단일 가닥 RNA, CRISPR cas9 유전자 편집 시스템으로의 사용을 위한 단일 가이드 RNA (sgRNA)이다. 대표적인 항-MIR17HG 프리-RNA sgRNA의 핵산 서열은 하기 제시된다:
- [0034] MIR17HG 프리-RNA sgRNA #1: AGTGGCGGAAGGCGCAGGT (서열식별번호: 2);
- [0035] MIR17HG 프리-RNA sgRNA #2: GTGGCGGAAGGCGCAGGTC (서열식별번호: 3);
- [0036] MIR17HG 프리-RNA sgRNA #3: CCTCGCCCGAGGGCGCGAAG (서열식별번호: 4); 및
- [0037] MIR17HG 프리-RNA sgRNA #4: GAGGCGCGAAGTGGCGCGA (서열식별번호: 5).
- [0038] 일부 실시양태에서, ASO는 단일 가닥 DNA (ssDNA) 분자이다. 대표적인 ssDNA 항-MIR17HG 프리-RNA ASO의 핵산 서열은 표 1에 제시된다.

[0039] 표 1: 대표적인 항-MIR17HG 프리-RNA ASO의 핵산 서열

명칭	서열
ASO1 (SEQ ID NO: 6)	TACTTGCTTGGCTT
ASO2 (SEQ ID NO: 7)	CACCGTCCAAATCTAT
ASO3 (SEQ ID NO: 8)	AGCACTCAACATCAGC
5'-ASO1 (SEQ ID NO: 9)	CACCGTCCAAATCTAT
5'-ASO2 (SEQ ID NO: 10)	GTATGACTGGAATAGG
뮤린 aso1 (SEQ ID NO: 11)	TACAGTGGAATCGGC
뮤린 aso2 (SEQ ID NO: 12)	GCGAGCAAACACGAAA
뮤린 aso3 (SEQ ID NO: 13)	ACTTGGATTGGATGAG
ASO-비 표적화 대조군 (ASO-NC) (SEQ ID NO: 14)	GCTCCCTTCAATCCAA

[0040]

[0041]

ASO는 추가로 그의 핵염기, 뉴클레오타이드, 또는 뉴클레오타이드간 연결에 대한 화학적 모이어티의 부가 또는 화학적 변형으로, 변형될 수 있다. ASO 변형은 생체내 안정성을 증진시키고, 특이성을 개선시키고, 독성 부작용을 감소시킨다. 대표적인 변형은 2'-O-메톡시에틸리보스 (MOE) 기로의 뉴클레오타이드의 변형을 포함한다.

[0042]

MIR17HG 프리-RNA-결합 ASO는 ASO가 2'-MOE로 변형된 5' 말단 뉴클레오타이드, 비변형된 DNA ("DNA 겹"), 및 2'-MOE로 변형된 3' 말단 뉴클레오타이드를 함유하는, G 입체형태로 제조될 수 있다. 대안적으로, MIR17HG 프리-RNA-결합 ASO는 ASO에서의 뉴클레오타이드 모두가 2'MOE로 변형되는, SB 입체형태로 제조될 수 있다. 대표적인 ASO의 핵산 서열은 표 2에 제시된다.

[0043]

겹머 ASO는 DNA 겹에 대한 변형된 뉴클레오타이드 말단을 함유한다. 일부 실시양태에서 DNA 겹은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, ASO는 DNA 겹이 2'-MOE 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드의 5mer에 의해 5' 플랭킹될 뿐만 아니라 2'-MOE 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드의 5mer에 의해 3' 플랭킹되는, 5-8-5 겹머이다.

[0044]

표 2: 대표적인 MIR17HG 프리-RNA-결합 ASO의 핵산 서열.

명칭	서열
ASO 1 (SEQ ID NO: 15)	CCCGGCCGCTCCCCCGTCCC
G 분자로서 선택된, ASO 2 (G2) (20mer) (SEQ ID NO: 16)	CCCTCCCACCTCCCCCGCC
ASO 3 (SEQ ID NO: 17)	CCCCCGGACCCCTGTGTTT
ASO 4 (SEQ ID NO: 18)	TCCTCCAACCTTTTATCGTTT
ASO 5 (SEQ ID NO: 19)	TCGTCCTTTTTTCTCTGT
ASO 6 (SEQ ID NO: 20)	CTCCCTTTTTTACCCAGTT
ASO 7 (SEQ ID NO: 21)	CCCTCTCCGGTCGGTAACCTT
ASO 8 (SEQ ID NO: 22)	TCGTCCTTTTTTCTCTGTAGT
SB 분자로서 선택된, ASO 9 (SB9) (22mer) (SEQ ID NO: 23)	CCACCCCTAACACTGGTCTTCT
ASO 10 (SEQ ID NO: 24)	CCCTCCGCCCTCGTCCTC
ASO 11 (SEQ ID NO: 25)	TCTCTCATTTTCATCCAC
ASO 12 (SEQ ID NO: 26)	AGAGTAAAACAAAACAAAA
ASO 13 (SEQ ID NO: 27)	ACAAAATAGAAAAAAAAAGGA
ASO 14 (SEQ ID NO: 28)	ATAAAAAGGGATAAGGTCAG
ASO 15 (SEQ ID NO: 29)	TCGTCCTTTTTTCTCTTGTA
ASO 16 (SEQ ID NO: 30)	CCCTATGGACTTATTATCT

[0045]

[0046]

표 2에서의 대표적인 ASO는 변형될 수 있고, 예를 들어, ASO 2는 추가 변형을 위한 G 입체형태 ASO로서 선택될 수 있고, ASO 9는 추가 변형을 위한 SB 입체형태 ASO로서 선택될 수 있다. 이들 ASO는 표 3에 예시된 바와 같이, 추가로 변형될 수 있다. 하나의 실시양태에서, G2 미세 조정 15는 표 3에 제시된 바와 같이 G 입체형태

ASO (G2-15)로서 선택될 수 있고, SB 미세 조정 19는 표 4에 제시된 바와 같이, SB 입체형태 ASO (SB2-19)로서 선택될 수 있다.

[0047] 표 3: G2 분자에 기반하는 대표적인 ASO 변형의 핵산 서열

명칭	서열
20mer	
G2 미세 조정 1 (SEQ ID NO: 31)	gCCCTCCCACCCTCCCCCGC
G2 미세 조정 2 (SEQ ID NO: 32)	cgCCCTCCCACCCTCCCCCG
G2 미세 조정 3 (SEQ ID NO: 1)	ccgCCCTCCCACCCTCCCCC
G2 미세 조정 4 (SEQ ID NO: 34)	cccgCCCTCCCACCCTCCCC
G2 미세 조정 5 (SEQ ID NO: 35)	CCTCCCACCCTCCCCCGCCg
G2 미세 조정 6 (SEQ ID NO: 36)	CTCCCACCCTCCCCCGCCgc
G2 미세 조정 7 (SEQ ID NO: 37)	TCCCACCCTCCCCCGCCgca
G2 미세 조정 8 (SEQ ID NO: 38)	CCCACCCTCCCCCGCCgcac
18mer	
G2 미세 조정 9 (SEQ ID NO: 39)	CCCTCCCACCCTCCCCCG
G2 미세 조정 10 (SEQ ID NO: 40)	CCTCCCACCCTCCCCCGC
G2 미세 조정 11 (SEQ ID NO: 41)	CTCCCACCCTCCCCCGCC
G2 미세 조정 12 (SEQ ID NO: 42)	gCCCTCCCACCCTCCCCC
G2 미세 조정 13 (SEQ ID NO: 43)	cgCCCTCCCACCCTCCCC
G2 미세 조정 14 (SEQ ID NO: 44)	TCCCACCCTCCCCCGCCg
G 분자로서 선택된, G2 미세 조정 15 (G2-15) (SEQ ID NO: 45)	CCCACCCTCCCCCGCCgc

[0048]

[0049] 표 4: SB9 분자에 기반하는 대표적인 ASO 변형의 핵산 서열

명칭	서열
22mer	
SB9 미세 조정 1 (SEQ ID NO: 46)	aCCACCCCTAACACTGGTCTTC
SB9 미세 조정 2 (SEQ ID NO: 47)	aaCCACCCCTAACACTGGTCTT
SB9 미세 조정 3 (SEQ ID NO: 48)	aaaCCACCCCTAACACTGGTCT
SB9 미세 조정 4 (SEQ ID NO: 49)	caaaCCACCCCTAACACTGGTC
SB9 미세 조정 5 (SEQ ID NO: 50)	CACCCCTAACACTGGTCTTCa
SB9 미세 조정 6 (SEQ ID NO: 51)	ACCCCTAACACTGGTCTTCaa
SB9 미세 조정 7 (SEQ ID NO: 52)	CCCTAACACTGGTCTTCaaa
SB9 미세 조정 8 (SEQ ID NO: 53)	CCTAACACTGGTCTTCaaaa
20mer	
SB9 미세 조정 9 (SEQ ID NO: 54)	CCACCCCTAACACTGGTCTT
SB9 미세 조정 10 (SEQ ID NO: 55)	CACCCCTAACACTGGTCTTC
SB9 미세 조정 11 (SEQ ID NO: 56)	ACCCCTAACACTGGTCTTCT
SB9 미세 조정 12 (SEQ ID NO: 57)	aCCACCCCTAACACTGGTCT
SB9 미세 조정 13 (SEQ ID NO: 58)	aaCCACCCCTAACACTGGTC
SB9 미세 조정 14 (SEQ ID NO: 59)	CCCCTAACACTGGTCTTCa
SB9 미세 조정 15 (SEQ ID NO: 60)	CCCTAACACTGGTCTTCaa
18mer	
SB9 미세 조정 16 (SEQ ID NO: 61)	ACCCCTAACACTGGTCTT
SB9 미세 조정 17 (SEQ ID NO: 62)	CACCCCTAACACTGGTCT
SB9 미세 조정 18 (SEQ ID NO: 63)	CCACCCCTAACACTGGTC
SB 분자로서 선택된, SB9 미세 조정 19 (SB9-19) (SEQ ID NO: 64)	CCCCTAACACTGGTCTTC
SB9 미세 조정 20 (SEQ ID NO: 65)	CCCTAACACTGGTCTTCT

[0050]

[0051]

일부 실시양태에서, ASO는 추가로 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형은 1개 이상의 ASO 뉴클레오티드의 추가적인 모이어티 (예를 들어, 지질)의 접합을 포함한다. 더욱이, ASO는 또한 1개 이상의 핵염기, 뉴클레오티드, 또는 뉴클레오티드간 연결의 1개 이상의 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[0052]

ASO 접합 및 변형

[0053]

추가적인 모이어티 (예를 들어, 지질 모이어티)가 전달 효율, 특정 세포 또는 조직 표적화, 세포 흡수, 및/또는 연장된 순환 시간을 증가시키기 위해 ASO 내 임의의 1개 이상의 뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, ASO 내 1개 이상의 뉴클레오티드가 친유성 모이어티에 접합된다. 일부 실시양태에서, 화학적 모이어티가 ASO의 5' 또는 3' 말단 단부 (즉, 캡머에서 DNA 캡의 5' 및/또는 3') 상 뉴클레오티드 중 1개 이상에 접합된다. 일부 실시양태에서, ASO의 모든 뉴클레오티드가 화학적 모이어티에 접합된다 (즉, 완전 2'MOE 입체형태). 일부 실시양태에서, 첫 번째 5' 말단 뉴클레오티드가 화학적 모이어티에 접합된다. 일부 실시양태에서, 마지막 3' 말단 뉴클레오티드가 화학적 모이어티에 접합된다. 대표적인 친유성 모이어티는 팔미트산, 스테롤 (예를 들어, 토크페롤, 콜레스테롤), 탄수화물 (예를 들어, N-아세틸갈락토사민; GalNAc), 올레일 잔기, 레티닐 잔기, 콜레스테릴 잔기, 콜산, 아다만탄 아세트산, 1-피렌 부티르산, 디히드로테스토스테론, 1,3-비스-0(헥사데실)글리세롤, 케라닐옥시헥실 기, 헥사데실글리세롤, 보르네올, 멘톨, 1,3-프로판디올, 헵타데실 기, 미리스탄, 03-(올레오일)리토콜산, 03-(올레오일)콜렌산, 디메톡시트리틸, 및 페녹사진을 포함한다.

[0054]

대표적인 토크페롤은 α-토크페롤, β-토크페롤, γ-토크페롤, 및 δ-토크페롤을 포함한다. 토크페롤의 유사체는 α-토크트리엔올, β-토크트리엔올, γ-토크트리엔올, 및 δ-토크트리엔올의 다양한 불포화 유사체를 포함한다.

[0055]

일부 실시양태에서, ASO 내 1개 이상의 뉴클레오티드는 지질, 예컨대 팔미트산, 토크페롤, 또는 콜레스테롤과 접합된다. 지질은 PS (*) 또는 PO () 연결로 ASO의 5' 또는 3' 단부에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, ASO 내 1개 이상의 뉴클레오티드는 지질과 접합된다. 2개 이상의 뉴클레오티드가 그렇게 변형되는 실시양태에

서, 지질은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 예를 들어, 3개의 뉴클레오타이드가 지질에 접합되는 실시양태에서, 지질 각각은 상이할, 예를 들어, 팔미트산, 토크페롤, 및 콜레스테롤일 수 있다. 핵산에의 접합에 적합한 추가적인 친유성 모이어티는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 8,106,022, 8,404,862, 10,077,443, 10,358,643, 10,441,653, 11,116,843, 및 11,260,134 및 미국 특허 출원 공개 2014/0045919, 2016/0289677, 2021/0163934, 및 2022/0175817을 참조한다.

[0056] 일부 실시양태에서, ASO는 1개 이상의 핵염기, 당 모이어티, 뉴클레오시드간 연결 (즉, 백본), 또는 이들의 조합에 대한 화학적 변형을 포함한다.

[0057] 핵염기 변형은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘, 알킬 또는 알킬닐 치환된 피리미딘, 알킬 치환된 퓨린, 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 포함하는, 핵염기와 구조적으로 구별가능하지만, 기능적으로 상호교환적인 임의의 변형 또는 치환을 포함한다. 대표적인 변형된 핵염기는 슈도우리딘, 2'-티오우리딘 (s2u), N⁶'-메틸아데노신, 5'메틸시티딘, N-에틸피페르딘 7'-EAA 트리아졸 변형된 아데닌, N-에틸피페르딘 6'-트리아졸 변형된 아데닌, 6'-페닐피롤로-시토신, 2',4'-디플루오로톨루일 리보뉴클레오시드, 2-아미노프로필아데닌, 5-히드록시메틸 시토신, 5-메틸시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 6-N-메틸구아닌, 6-N-메틸아데닌, 2-프로필아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 2-티오시토신, 5-프로피닐 (C=C-CH₃) 우라실, 5-프로피닐시토신, 6-아조우라실, 6-아조시토신, 6-아조티민, 5-리보실우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실, 8-아자 및 다른 8-치환된 퓨린, 5-할로, 특히, 5-브로모, 5-트리플루오로메틸, 5-할로우라실, 및 5-할로시토신, 7-메틸구아닌, 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노아데닌, 7-테아자구아닌, 7-테아자아데닌, 3-테아자구아닌, 3-테아자아데닌, 6-N-벤조일아데닌, 2-N-이소부틸릴구아닌, 4-N-벤조일시토신, 4-N-벤조일우라실, 5-메틸 4-N-벤조일시토신, 5-메틸 4-N-벤조일우라실, 트리시클릭 피리미딘, 보편적인 염기, 소수성 염기, 무차별 염기, 크기-확장된 염기, 및 플루오린화 염기를 포함한다. 대표적인 트리시클릭 피리미딘은 1,3-디아자페녹사진-2-온, 1,3-디아자페노티아진-2-온, 및 9-(2-아미노에톡시)-1,3-디아자페녹사진-2-온 (G-clamp)을 포함한다. 변형된 핵염기는 또한 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로사이클로 대체되는 것, 예를 들어, 7-테아자-아데닌, 7-테아자구아노신, 2-아미노피리딘, 및 2-피리돈을 포함할 수 있다.

[0058] 추가적인 핵염기 변형은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 3,687,808 5,130,302, 5,811,534, 5,830,653, 및 6,005,096, 미국 특허 출원 공개 20030158403 및 2003/0175906, 및 문헌 [Kroschwitz *et al.*, eds., *The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 1st ed., John Wiley & Sons, 1990]을 참조한다.

[0059] 당 모이어티 변형은 비시클릭, 트리시클릭, 및 비-비시클릭 당 모이어티 또는 푸라노실 당 모이어티 (예를 들어, 2-데옥시푸라노실 당 모이어티 변형)를 포함하는, 당 대응물을 포함한다. 대표적인 변형된 푸라노실 당 모이어티는 예를 들어, 2', 4', 및 5' 위치에서의 비-시클릭 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-시클릭 변형은 분지형이다. 당 모이어티 2' 위치에 대한 대표적인 변형은 2'-데옥시-2'-플루오로 (2'-F), 2'-아라비노-플루오로 (2'-Ara-F), 2'-O-벤질, 2'-O-메틸-4-피리딘 (2'-O-CH₂Py(4)), 2'-O-메틸 (2'-OCH₃) (2'-OMe 또는 Me), 2'-O-메톡시에틸 (2'-O(CH₂)₂OCH₃) (2'-O-MOE 또는 MOE), 할로, 알릴, 아미노, 아지도, 비잠금 핵산 (UNA), 글리콜 핵산 (GNA), SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O-C₁-C₁₀ 알콕시, O-C₁-C₁₀ 치환된 알콕시, O-C₁-C₁₀ 알킬, O-C₁-C₁₀ 치환된 알킬, S-알킬, N(R_m)-알킬, O-알케닐, S-알케닐, N(R_m)-알케닐, O-알키닐, S-알키닐, N(R_m)-알키닐, O-알킬레닐-O-알킬, 알키닐, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴, O-아르알킬, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n), 및 OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n)을 포함하며, 여기서 각각의 R_m 및 R_n은, 독립적으로, H, 아미노 보호기, 또는 C₁-C₁₀ 알킬 (비변형되거나 또는 변형을 가짐)이다.

[0060] 일부 실시양태에서, 당 모이어티 변형은 2' 위치에서의 플루오린 변형 (2'-플루오로 또는 2'-F)을 포함한다. 2'-F 변형은 높은 RNA 결합 친화도 및 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 제공한다. 2'-F 함유 당 모이어티 변형의 제조 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,459,255 및 6,262,241, 미국 특허 출원 공개 20060036087 및 20110269814, 및 문헌 [Ludwig, *acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 16(3-4):131-3 (1981)] 및 [Ludwig and Eckstein *J. Org. Chem.* 54:631-635 (1989)]을 참조한다.

[0061] 비시클릭 당 모이어티 변형은 제2 고리를 형성하는 가교 당 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 고리는 푸라노스 고리 상의 4'과 2' 위치 사이의 다리를 포함한다. 일부 실시양태에서, 당 모이어티는 리보스이다. 대표적인 4'에서 2' 가교 당 모이어티 변형은 (S)-cEt-BNA, 트리시클로-DNA (tcDNA), PMO, 4'-CH₂-2', 4'-

(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2' (또한 잠금 핵산 또는 "LNA"로 공지됨), 4'-CH₂-S-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' (또한 에틸렌-가교된 핵산 또는 "ENA"로 공지됨), 4'-CH(CH₃)-O-2' (또한 S 입체형태에 있을 때 "구속성 에틸" 또는 "cEt"로 공지됨), 4'-CH₂-O-CH₂-2', 4'-CH₂-N(R)-2', 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' ("구속성 MOE" 또는 "cMOE"), 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2', 4'-CH₂-N(OCH₃)-2, 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2', 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2', 4'-CH₂-C(=CH₂)-2', 4'-C(R_aR_b)-N(R)-O-2', 4'-C(R_aR_b)-O-N(R)-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2', 및 4'-CH₂-N(R)-O-2'을 포함하며, 여기서 각각의 R, R_a, 및 R_b는, 독립적으로, H, 보호기, 또는 C₁-C₁₂ 알킬 (비변형되거나 또는 변형을 가짐)이다. 추가적인 당 모이어티 변형 및 그의 유사체는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,859,221, 6,005,087, 6,531,584, 7,399,845, 7,569,686, 7,741,457, 8,022,193, 8,278,283, 8,278,425, 8,278,426, 9,102,938, 및 10,119,136, 미국 특허 출원 공개 20100190837, 및 문헌 [Zhou *et al.*, *J. Org. Chem.* 74(1):118-34 (2009)]을 참조한다.

[0062] 뉴클레오시드간 연결 (즉, 백분) 변형은 알킬포스포네이트 (예를 들어, 메톡시프로필포스포네이트 (MOP)) 및 포스포로티오에이트 (예를 들어, 포스포로티오에이트 (PS))를 포함하는, 임의의 변경된 3'에서 5' 포스포디에스테르 연결을 포함한다. 키랄 중심과 함께 다중 변형된 뉴클레오시드간 연결을 포함하는 ASO는 입체적 순수하거나 (오직 1종의 입체이성질체를 함유함), 입체적 무작위이거나 (입체이성질체에 규칙성이 없음), 또는 입체이성질체에서의 패턴을 가질 수 있다. 대표적인 뉴클레오시드간 연결 변형은 포스포디에스테르 결합 (P=O) (비변형됨, 천연 발생), 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 및 포스포로티오에이트 (PS) (P=S) (Pr 이성질체 및 Sp 이성질체를 포함함), 및 포스포로티오에이트 (PS2) (HS-P=S), 5'-(E)-비닐포스포네이트 (5'-(E)-VP), 5'-M메틸 포스포네이트 (5'-MP), 포스페이트를 갖는 (S)-5'-C-메틸, 및 5'-포스포로티오에이트 (5'-PS)를 포함한다. 비-인 함유 뉴클레오시드간 연결은, 메틸렌메틸이미노 (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂), 티오디에스테르, 티오노카르바메이트 (-O-C(=O)(NH)-S-), 실록산 (-O-SiH₂-O-), 펩티드 핵산 (PNA), 및 N,N'-디메틸히드라진 (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-)을 포함한다. 중성 전하 뉴클레오시드간 연결은, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트 (MP), MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), 아미드-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'), 아미드-4 (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'), 포름아세탈 (3'-O-CH₂-O-5'), 메톡시프로필, 및 티오포름아세탈 (3'-S-CH₂-O-5')을 포함한다. 인-함유 및 비-인-함유 뉴클레오시드간 연결의 제조 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 20220049248 및 문헌 [Hu *et al.*, *Signal Transduct. Target. Ther.* 5(1):101-25 (2020)]을 참조한다.

[0063] 2'-데옥시푸라노실 당 모이어티 변형은 2'-위치에서 2개의 수소를 갖는 5-원 탄소 푸라노실 고리 당 모이어티의 부가를 수반하고 비변형되거나 또는 추가로 2'-위치 이외의 위치에서 변형될 수 있다. 2'-O-메톡시에틸 당 모이어티 변형은 2'-O(CH₂)₂OCH₃)으로의 리보실 고리의 2'-OH 기의 치환을 수반한다.

[0064] 제약 조성물

[0065] 본 개시내용의 제약 조성물은 치료 유효량의 ASO 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료 유효량의 ASO"는 목적하는 치료 효과를 제공하기에 충분한 양의 ASO를 지칭한다.

[0066] 제공된 환자를 위한 ASO의 유효량은 연령, 체중, 암의 유형, 위치, 및 중증도 및 대상체의 전반적인 건강을 포함할 수 있는 1개 이상의 인자에 따라 달라진다. 궁극적으로, 담당의는 적절한 용량 및 투여 요법을 결정할 것이다. 전형적으로, ASO는 일련의 용량, 전형적으로 다수의 주 동안 1주에 단일 용량으로 제공될 것이다. 일부 실시양태에서, ASO의 유효량은 용량당 약 0.03 mg 내지 약 3 kg이다. 일부 실시양태에서, ASO의 유효량은 용량당 약 0.3 mg 내지 약 300 mg이다. 일부 실시양태에서, ASO의 유효 용량은 용량당 약 30 mg이다. 일부 실시양태에서, ASO의 유효량은 용량당 약 10 mg/kg 대상체 체중 내지 약 50 mg/kg 대상체 체중이다. 일부 실시양태에서, ASO는 약 30주 내지 약 60주 동안 1주 1회 투여된다. 일부 실시양태에서, ASO는 약 40주 동안 1주 1회 투여된다. 일부 실시양태에서, ASO는 약 4주 동안 1주 1회, 1주 2회, 또는 평일 격일마다 (예를 들어, 1주 3일) 투여된다.

[0067] 조성물은 멸균 액체 제제, 예를 들어, 등장 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액, 또는 점성 조성물로서 제공될 수 있으며, 이는 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체, 제약상 허용되는 담체는 수성 또는 비-수성 담체 둘 다를 포함한다. 어구 "제약상 허용되는 담체"는 관련 기술분야에 인식되어 있고 본 개시내용의 ASO를 포유동물에게 투여하는데 적합한, 제약상 허용되는 물질, 조성물, 또는 비히클을 포함한다. 담체는 대상 작용제를 하나의

기관, 또는 신체의 일부로부터, 또 다른 기관, 또는 신체의 일부로 운반하거나 또는 수송하는데 수반된, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매, 또는 캡슐화 물질을 포함한다. 각각의 담체는 제제의 다른 성분과 상용성이고 환자에게 해롭지 않다는 의미에서 "허용되어야" 한다. 제약상 허용되는 담체로서 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예는 하기를 포함한다: 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스, 및 그의 유도체, 예컨대 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 활석; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; 오일, 예컨대 땅콩 오일, 면실 오일, 홍화 오일, 참기름, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 아가; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 발열원-무함유 물; 등장 염수; 링거액; 에틸 알콜; 포스페이트 완충제 용액; 및 제약 제제에 이용된 다른 비-독성 상용성 물질.

[0068] 액체 담체의 대표적인 예는 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 및 이들의 적합한 혼합물을 포함한다. 조성물은 전형적으로 등장성이며, 즉, 이들은 혈액과 동일한 삼투압을 갖는다. 염화나트륨, 염화칼륨, 탄산수소나트륨, 탄산나트륨, 제1 인산나트륨 1수화물, 제2 무수 인산나트륨, 제1 인산칼륨, 제2 인산나트륨 7수화물, 및 등장성 전해질 용액 (예를 들어, 플라즈마-라이트(Plasma-Lyte)®)이 목적하는 등장성을 달성하는데 사용될 수 있다. 염산, 및/또는 수산화나트륨이 조성물의 pH를 조정하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, pH는 약 7.5 내지 약 8.5의 범위일 수 있다. 담체 및 ASO에 따라, 다른 부형제, 예를 들어, 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 습윤제, 분산제, 또는 유화제, 겔화제 및 점도 증진제, 보존제 등이 첨가될 수 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 조성물은 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 담체는 지질-기반, 예를 들어, 지방산, 지질 나노입자 (LNP), 리포솜, 지질 소포, 또는 리포플렉스일 수 있다. 일부 실시양태에서, ASO는 지방산 담체 중에 유화된다. 대표적인 지방산은 에틸 에이코사펜타에노에이트 (EPA-E), 에틸 옥타데카테트라에노에이트 (ODTA-E), 에틸 노나데카펜타에노에이트 (NDPA-E), 에틸 아라키도네이트 (AA-E), 에틸 에이코사테트라에노에이트 (ETA-E), 및 에틸 헤나이코사펜타에노에이트 (HPA-E)를 포함한다.

[0070] 일부 실시양태에서, 담체는 LNP이다. 특정 실시양태에서, LNP는 수성 구획에 의해 분리된 2개 이상의 동심 이중층을 포함한다. 지질 이중층은 기능화되고/거나 서로 가교될 수 있다. 지질 이중층은 1개 이상의 리간드, 단백질, 또는 채널을 포함할 수 있다.

[0071] 지질 담체, 예를 들어, LNP는 1종 이상의 양이온성/이온화가능한 지질, 1종 이상의 중합체 접합된 지질, 1종 이상의 구조적 지질, 및/또는 1종 이상의 인지질을 포함할 수 있다. "양이온성 지질"은 양으로 하전된 지질 또는 양성 전하를 보유할 수 있는 지질을 지칭한다. 양이온성 지질은 pH에 따라, 양성 전하를 지니는 1개 이상의 아민 기(들)를 포함한다. "중합체 접합된 지질"은 접합된 중합체 부분을 갖는 지질을 지칭한다. 중합체 접합된 지질은 폐길화 지질을 포함하며, 이는 폴리에틸렌 글리콜에 접합된 지질이다. "구조 지질"은 생리학적 pH에서 알짜 전하를 갖지 않는 비-양이온성 지질을 지칭한다. 예시적인 구조적 지질은 콜레스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤, 캄페스테롤 등을 포함한다. "인지질"은 2개의 지방산 및 1개의 포스페이트 이온을 갖는 글리세롤의 트리에스테르를 갖는 지질을 지칭한다. LNP에서의 인지질은 1개 이상의 지질 이중층으로 지질을 조립한다. LNP, 이들의 제조 방법, 제제, 및 전달은, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2004/0142025, 2007/0042031, 및 2020/0237679 및 미국 특허 9,364,435, 9,518,272, 10,022,435, 및 11,191,849에 개시되어 있다.

[0072] 리포플렉스, 리포솜, 및 지질 나노입자는 지질 분자, 예를 들어, 양이온성 지질, 중성 지질, 음이온성 지질, 폴리펩티드-지질 접합체, 및 다른 안정화 성분의 조합을 포함할 수 있다. 대표적인 안정화 성분은 항산화제, 계면활성제, 및 염을 포함한다. 리포플렉스, 리포솜, 및 지질 나노입자의 조성물 및 제조 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 8,058,069, 8,969,353, 9,682,139, 10,238,754, 미국 특허 출원 공개 2005/0064026 및 2018/0291086, 및 문헌 [Lasic, Trends Biotechnol. 16(7):307-21 (1998)], [Lasic et al., FEBS Lett. 312(2-3):255-8 (1992)], 및 [Drummond et al., Pharmacol. Rev. 51(4):691-743 (1999)]을 참조한다.

[0073] 제약 키트

[0074] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 1개 이상의 ASO를 함유하는 제약 키트 또는 시스템에 대한 것이다. 키트 또는 시스템은 1개 이상의 용기, 예컨대 바이알, 튜브, 앰플, 또는 병이 그에 철저히 갇혀있는, 패키지 예컨대 박스, 카톤, 튜브 등을 포함하며, 이는 ASO 또는 그의 제약 조성물을 함유한다. 키트 또는 시스템은 또한 ASO 및 그의 제약 조성물을 사용하는 것에 대한 인쇄된 설명서를 포함할 수 있다.

- [0075] 일부 실시양태에서, 키트는 치료 유효량의 항-MIR17HG 프리-RNA ASO, 및 대상체에서 MIR17HG 프리-RNA-기여 질환의 치료에 이를 사용하는 것에 대한 인쇄된 설명서를 함유한다. 일부 실시양태에서, 키트는 또한 MYC 원종양 유전자, bHLH 전사 인자 (MYC) 억제제 및 MYC 억제제의 사용에 대한 인쇄된 설명서를 함유하며, 여기서 MIR17HG 프리-RNA ASO 및 MYC 억제제는 동일한 또는 상이한 용기에 배치되는 동일한 투여 형태 또는 상이한 투여 형태이다.
- [0076] 사용 방법
- [0077] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환을 갖는 대상체를 치료하는 것에 대한 것이다. 방법은 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 ASO를 함유하는 제약 조성물을 투여하는 것을 수반한다.
- [0078] 용어 "MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환"은 본원에서 MIR17HG 프리-RNA 전사체의 치료 표적화에 의해 개선될 수 있는 질환을 지칭하는데 사용된다.
- [0079] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료"는 임상 결과를 포함하는, 유익하거나 또는 목적하는 결과를 수득하기 위한 접근법을 지칭한다. 이러한 결과는 검출가능하든 또는 검출가능하지 않든, MIR17HG 프리-RNA가 역할을 하는 질환의 하나 이상의 증상의 완화 또는 개선, 질환의 정도의 감소, 질환의 상태의 안정화, 질환의 지연 또는 둔화, 질환의 개선 또는 경감, 및 질환의 차도 (부분적이든 또는 전체적이든) 중 1개 이상을 포함할 수 있다.
- [0080] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대상체" (또는 "환자")는 MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환을 앓기 쉽거나 또는 앓고 있는 동물계의 모든 구성원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 그러므로, "MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환을 갖는", "신생물을 갖는", 또는 본 개시내용에 따른 치료를 "필요로 하는" 대상체는 광범위하게 양성으로 진단된 대상체를 포괄하며, 이는 이전에 요법의 1회 이상의 라운드로 치료되었을 수 있는 활성 질환을 갖는 대상체, 및 현재 치료되고 있지 않으나 (예를 들어, 차도 중인) 여전히 재발의 위험에 있을 수 있는 대상체, 및 양성으로 진단되지 않았으나 MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환에 걸리기 쉬운 (예를 들어, 이전 병력 및/또는 가족 병력에 기반하여, 또는 달리 의료 전문가가 합리적으로 대상체가 MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환에 걸리기 쉬웠다는 것을 의심할 수 있도록 1개 이상의 위험 인자를 제시하는) 대상체를 포함한다.
- [0081] MIR17HG 프리-RNA가 역할을 하는 질환은, 예를 들어, 신생물 (암), 및 비-암 질환 예컨대 간 질환을 포함한다.
- [0082] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "신생물"은 과도한 증식 또는 감소된 아포토시스를 특징으로 하는 질환이 의미된다. 본 개시내용이 사용될 수 있는 예시적인 신생물은 췌장암, 백혈병 (예를 들어, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수모구성 백혈병, 급성 전골수구성 백혈병, 급성 골수단구성 백혈병, 급성 단구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성 적혈구 증가증, 림프종 (호지킨병, 비-호지킨병), 다발성 골수종, 발텐스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 및 고형 종양 예컨대 육종 및 암종 (예를 들어, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 종피종, 유방 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장 세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모막암종, 정상피종, 배아 암종, 빌름 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 다형성 교모세포종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 신경초종, 뇌수막종, 흑색종, 신경모세포종, 및 망막모세포종)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0083] 일부 실시양태에서, MIR17HG 프리-RNA의 이상 발현 및 기능이 역할을 하는 질환은 다발성 골수종, 림프종, 또는 결장직장암이다. 대표적인 림프종은 만성 림프구성 백혈병, 피부 b-세포 림프종, 피부 t-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 및 발텐스트롬 마크로글로불린혈증을 포함한다. 대표적인 결장직장암은 위장관 선암종, 직장 선암종, 및 결장 선암종을 포함한다. 다발성 골수종 (MM)은 혈액암의 약 10%를 차지하는 형질 세포의 유전자 복합 악성종양이고 최근 진보에도 불구하고, MM은 여전히 크게 불치병이다 (Gulla and Anderson, *Haematologica* 105:2358-2367 (2020)).
- [0084] 일부 실시양태에서, MIR17HG 프리-RNA가 역할을 하는 질환은 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 비알콜성 지방간염 (NASH), 간 섬유증, 바이러스 간염, 또는 알콜성 간 질환 (ALD)이다. 이들 질환에서, 간 세포 기능을 조절하는 고도로 다면발현성 전사 인자인 MYC가 이상조절된 것으로 확인되어 있다. MYC의 과다발현은 세포 증식, 성장,

물질대사, DNA 복제, 세포 주기 진행, 세포 부착 및 분화를 포함하는 다양한 역할을 변경시킨다. 과다발현된 MYC는 문헌 [Zheng *et al.*, *Genes (Basel)* 8:123-20 (2017)]에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 보통 간 섬유증을 갖는 환자에서 관찰된다.

[0085] 일부 실시양태에서, 질환은 MIR17HG 프리-RNA의 전사체가 추가로 MYC 원종양유전자, bHLH 전사 인자 (MYC) 또는 MYC-결합 파트너와 상호작용하는 것이거나 또는 이상조절된 MYC 또는 이상조절된 MYC-결합 파트너를 특징으로 한다. MYC가 역할을 하는 대표적인 질환은 다발성 골수종, B-세포 림프종 (예를 들어, 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 여포성 림프종, 및 버킷 림프종), 삼중 음성 유방암, 췌장암, 간암, 및 위암을 포함한다.

[0086] 조합 요법

[0087] 본 개시내용의 요법은 적어도 1종의 다른 활성제와 조합되어 질환 및 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 이 맥락에서 용어 "조합되어"는 작용제가 공동-투여되는 것을 의미하며, 이는 동일한 또는 별개의 투여 형태에 의한, 또는 순차적으로, 예를 들어, 동일한 치료 요법의 일부로서 또는 연속적인 치료 요법에 의한, 실질적으로 동시 투여를 포함한다. 따라서, 순차적으로 제공된 경우에, 제2 요법의 투여의 시작 시, 2개의 요법 중 첫 번째는, 일부 경우에, 여전히 치료 부위에서 유효 농도로 검출가능하다. 순서 및 시간 간격은 이들이 함께 (예를 들어, 이들이 달리 투여된 경우보다 증가된 이익을 제공하기 위해 상승작용적으로) 작용할 수 있도록 결정될 수 있다. 예를 들어, 치료제는 동시에 또는 상이한 시점에서 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있으나; 동시에 투여되지 않는 경우에, 이들은 목적하는 치료 효과를 제공하기 위해 충분히 가까운 시간에 투여될 수 있으며, 이는 상승작용적 방식일 수 있다. 따라서, 기간은 정확히 동시에 활성제의 투여로 제한되지 않는다.

[0088] 추가적인 치료제의 투여량은 공지된 또는 권장된 용량과 동일하거나 또는 이보다 훨씬 더 낮을 수 있다. 문헌 [Hardman *et al.*, eds., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001]; [Physician's Desk Reference 60th ed., 2006]을 참조한다. 본 발명의 요법과 조합되어 사용될 수 있는 항암제는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 9,101,622 (그의 섹션 5.2)를 참조한다. "항암제"는, 예를 들어, 암 세포를 사멸시키거나, 암 세포에서 아포토시스를 유도하거나, 암 세포의 성장 속도를 감소시키거나, 전이의 발생률 또는 수를 감소시키거나, 종양 크기를 감소시키거나, 종양 성장을 억제하거나, 종양 또는 암 세포로의 혈액 공급을 감소시키거나, 암 세포 또는 종양에 대한 면역 반응을 촉진하거나, 암의 진행을 예방하거나 또는 억제하거나, 또는 암을 갖는 대상체의 수명을 증가시킴으로써 대상체에서 암에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다. 보다 일반적으로, 이들 추가적인 활성제는 질환에 걸린 또는 암 세포를 사멸시키거나 또는 이의 증식을 억제하는데 효과적인 조합된 양으로 제공될 것이다. 이 공정은 세포를 수용자 세포 및 작용제(들) 또는 다중 인자(들)와 동시에 접촉시키는 것을 수반할 수 있다. 이는 동시에, 세포를 단일 조성물 또는 작용제 둘 다를 포함하는 약리학적 제제와 접촉시킴으로써, 또는 세포를 2개의 별개의 조성물 또는 제제와 접촉시킴으로써 달성될 수 있으며, 여기서, 1종의 조성물은 ASO를 포함하고 다른 것은 제2 작용제(들)를 포함한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법 증제, 표적화된 요법, 아포토시스-유발 요법, 또는 세포 주기 조절 요법과 함께 사용된다.

[0090] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 요법은 수분 내지 수주 범위의 간격으로 추가적인 작용제 (예를 들어, 항암) 치료에 선행하거나 또는 이어질 수 있다. 추가적인 작용제 및 본 개시내용의 요법이 대상체에게 개별적으로 적용되는 실시양태에서, 작용제 및 본 발명의 요법이 여전히 대상체의 질환에 유리하게 조합된 효과를 발휘할 수 있도록, 일반적으로 상당한 기간이 각각의 전달 시간 사이에 만료되지 않았다는 것을 보장할 것이다. 이러한 경우에, 대상체에게 양식 둘 다를 서로에 대해 약 12-24 h 이내에 및, 보다 바람직하게는, 서로에 대해 약 6-12 h 이내에 투여할 수 있다는 것이 고려된다. 일부 경우에, 치료 기간을 유의하게 연장하는 것이 바람직할 수 있으나, 여기서 각각의 투여 사이에 수일 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7일) 내지 수주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주)가 경과한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 요법 및 추가적인 작용제는 동일한 환자 방문 내에 투여될 수 있고; 다른 실시양태에서, 2종의 작용제는 상이한 환자 방문 동안 투여된다.

[0091] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 요법 및 추가적인 작용제는 주기적으로 투여된다. 순환 요법은 추가적인 치료제 중 하나 또는 둘 다에 대한 저항성의 발생을 감소시키고/거나, 추가적인 치료제 중 하나 또는 둘 다의 부작용을 피하거나 또는 감소시키고/거나, 요법의 효능을 개선시키기 위해, 일정 기간 동안 1종의 치료제의 투여에 이어, 일정 기간 동안 제2 치료제의 투여 및 이 순차적인 투여, 즉, 주기를 반복하는 것을 수반한다. 하나의 예에서, 순환 요법은 일정 기간 동안 제1 추가적인 치료제의 투여에 이어, 일정 기간 동안 제2 추가적인 치료제의 투여에 이어, 임의로, 일정 기간 동안 제3 추가적인 치료제의 투여 등, 및 이 순차적인 투여, 즉, 주기

를 반복하는 것을 수반한다. 치료 주기가 필요에 따라 반복될 것임이 예상된다. 또한 다양한 표준 요법, 뿐만 아니라 외과적 중재가 본 개시내용의 세포와 조합되어 적용될 수 있다는 것이 고려된다.

[0092] 추가적인 치료제의 대표적인 유형은 하기 기재된다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 MYC 억제제이다. 대표적인 MYC 억제제는 시스플라틴, 켄시타빈, 엑시티닙, 나드로파린, 및 벤즈아미딘을 포함한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 아세틸-CoA 카르복실라제- α (ACC1) 억제제이다. 일부 실시양태에서, ACC1 억제제는 5-테트라데실-옥시-2-푸로산 (TOFA)이다.

[0094] 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 면역조정 이미드 약물 (IMiD)이다. 대표적인 IMiD는 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드, 및 이베르도마이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 프로테아솜 억제제이다. 대표적인 프로테아솜 억제제는 보르테조밐, 카르필조밐 (키프롤리스(Kyprolis)®), 텔란조밐, 익사조밐, 마리조밐, 및 오프로조밐을 포함한다.

[0095] 본원에 기재된 본 발명의 요법과의 조합에 적합할 수 있는 다발성 골수종 치료제는 벨란타맙 마포도틴-blmf (블렌레프(Blenrep)®), 보르테조밐 (벨케이드(Velcade)®), 카르필조밐 (키프롤리스®), 카무스틴 (BiCNU®), 실타캅타젠 오토류셀 (카빅티(Carvykti)®), 시클로포스파미드, 다라투무맙 (다잘렉스(Darzallex)®), 다라투무맙 및 히알루로니다제-fihj (다잘렉스 파스프로(Darzallex Faspro)®), 독소루비신 히드로클로라이드 리포솜 (독실(Doxil)®), 엘로투주맙 (엠펙시티(Empliciti)®), 이테캅타진 비클류셀 (아베크마(Abecma)®), 이사톡시맙-irfc (사클리사(Sarclisa)®), 익사조밐 시트레이트 (닌라로(Ninlaro)®), 레날리도마이드 (레블리미드(Revlimid)), 멜팔란 및 멜팔란 히드로클로라이드 (알케란(Alkeran)® 정제, 주사용 알케란®, 에보멜라(Evomela)®), 파미드로네이트 이나트륨 (아레디아(Aredia)®), 플레릭사포 (모조빌(Mozobil)®), 포말리도마이드 (포말리스트(Pomalyst)®), 셀리넥서 (엑스포비오(Xpovio)®), 탈리도마이드 (탈로미드(Thalomid)®), 줄레드론산 (조메타(Zometa)®), 및 보르테조밐 (PS-341), 독소루비신 히드로클로라이드 (아드리아마이신(Adriamycin)®), 및 텍사메타손의 PAD 조합을 포함한다.

[0096] 면역요법

[0097] 면역 체크포인트 억제제를 포함하는, 면역요법은 진단된 암을 치료하는데 이용될 수 있다. 면역 체크포인트 분자는, 예를 들어, PD1, CTLA4, KIR, TIGIT, TIM-3, LAG-3, BTLA, VISTA, CD47, 및 NKG2A를 포함한다. 면역 체크포인트 억제제의 임상적으로 이용가능한 예는 더발루맙 (임핀지(Imfinzi)®), 아테졸리주맙 (티센트릭(Tecentriq)®), 및 아벨루맙 (바벤시오(Bavencio)®)을 포함한다. PD1 억제제의 임상적으로 이용가능한 예는 니볼루맙 (옵디보(Opdivo)®), 켈브룰리주맙 (키트루다(Keytruda)®), 및 세미플리맙 (리브타요(Libtayo)®)을 포함한다.

[0098] 화학요법

[0099] 항암 요법은 또한 화학 및 방사선-기반 치료 둘 다와의 다양한 조합 요법을 포함한다. 조합 화학요법은, 예를 들어, 아브락산(Abraxane)®, 알트레타딘, 도세탁셀, 허셉틴(Herceptin)®, 메토티렉세이트, 노반트론(Novantrone)®, 졸라덱스(Zoladex)®, 시스플라틴 (CDDP), 카르보플라틴, 프로카르바진, 메클로레타민, 시클로포스파미드, 캄프토테신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 부술판, 니트로소우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드 (VP16), 타목시펜, 랄록시펜, 에스트로겐 수용체 결합제, 탁솔(Taxol)®, 켄시타빈, 나벨빈(Navelbine)®, 파르네실-단백질 트랜스퍼라제 억제제, 트랜스플래티늄, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 메토티렉세이트, 또는 상기의 임의의 유사체 또는 유도체 변이체 및 또한 이들의 조합을 포함한다.

[0100] 방사선요법

[0101] 항암 요법은 또한 방사선-기반, DNA-손상 치료를 포함한다. 조합 방사선요법은 통상적으로 DNA, DNA의 복제 및 복구, 및 염색체의 조립 및 유지에 대한 광범위한 손상을 초래하는 감마-선, X-선, 및/또는 종양 세포로의 방사성동위원소의 지정 전달로 공지되어 있는 것을 포함한다. 방사성동위원소에 대한 투여량 범위는 크게 달라지고, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도 및 유형, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 의존하고 담당 의에 의해 결정될 것이다.

[0102] 방사선요법은 외부 또는 내부 방사선 요법을 포함할 수 있다. 외부 방사선 요법은 대상체의 신체 외부의 방사선 공급원 및 신체 내 암의 영역을 향해 방사선을 보내는 것을 수반한다. 내부 방사선 요법은 암으로 바로 또는 그 근처에 배치되는 바늘, 시드, 와이어, 또는 카테터에 밀봉된 방사성 물질을 사용한다.

- [0103] 본 개시내용의 이들 및 다른 측면이 추가로 하기 실시예의 고려 시 인식될 것이며, 이는 본 개시내용의 특정 실시양태를 예시하는 것으로 의도되나 청구범위에 의해 정의된 바와 같은, 그의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0104] **실시예**
- [0105] 실시예 1: 물질 및 방법
- [0106] 세포주: 세포주 (CL)를 37°C, 5% CO₂에서 성장시켰다. a) MM-CL: AMO1, NCI-H929, SK-MM-1, U266, JLN3 및 KMS-12-BM을 DSMZ (독일 브라운슈바이크)로부터 구입하였다. MM.1S, MM.1R 및 RPMI-8226을 ATCC (미국 버지니아주 매너서스)로부터 구입하였다. ABZB CL은 AMO1 보르테오미프-저항성이고 ACFZ C1은 AMO1 카르필조미프-저항성이다 (Morelli *et al.*, Blood 132:1050-1063 (2018)). LR7 CL은 U266 멜팔란-저항성이다 (Morelli *et al.*, Blood 132:1050-1063 (2018)). 이들 세포를 10% 소 태아 혈청 (론자 그룹 엘티디.(Lonza Group Ltd.), 스위스 바젤) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (깁코(Gibco)® 라이프 테크놀로지스(Life Technologies))으로 보충된 RPMI-1640 배지 (깁코®, 라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼즈배드) 중에 배양하였다. b) B-세포 림프종 세포주 (BCLOCL): Maver-1, Jeko-1 (맨틀 세포 림프종), Sultan, P3HR1, Daudi 및 Raji (버킷 림프종) (ATCC로부터 구입됨)를 10% 소 태아 혈청 (론자 그룹 엘티디.) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (깁코®, 라이프 테크놀로지스)으로 보충된 RPMI-1640 배지 (깁코® 라이프 테크놀로지스) 중에 배양하였다. c) 비-악성 세포주: HK-2 (인간 신장 세포, 피질/근위 세포)를 ATCC로부터 구입하였고 K-SFM (각질세포 혈청 무함유 배지) (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 미국 매사추세츠주 윌섬) 중에 배양하였다. ATCC 가이드라인에 따라 보충됨; THLE-2 (인간 간 세포)를 ATCC로부터 구입하였고 ATCC 가이드라인에 따라 보충된 BEGM (기관지 상피 세포 성장 배지) (론자 그룹 엘티디.) 중에 배양하였다; d) 렌티-X(Lenti-X)TM 293T (인간 배아 신장, 다카라(Takara)로부터 구입됨 (카탈로그 번호 632180)) 및 Flp-In T-REx 세포를 10% 소 태아 혈청 (론자 그룹 엘티디.) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (깁코®, 라이프 테크놀로지스)으로 보충된 DMEM (둘베코 변형된 이글 배지) (깁코®, 라이프 테크놀로지스) 중에 배양하였다. e) P493-6을 10% 소 태아 혈청 (론자 그룹 엘티디.) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (깁코®, 라이프 테크놀로지스)으로 보충된 RPMI-1640 배지 (깁코® 라이프 테크놀로지스) 중에 배양하였다. f) 5TGM1 무린 MM 세포를 10% 소 태아 혈청 (론자 그룹 엘티디.) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (깁코®, 라이프 테크놀로지스)으로 보충된 IMDM (이스코브 변형된 둘베코 배지) (깁코®, 라이프 테크놀로지스) 중에 배양하였다. g) 결장직장암 세포주 HCT116 및 DLD-1, 모 및 다이서 돌연변이체를 호라이즌 디스커버리(Horizon Discovery)로부터 구입하였고 10% 소 태아 혈청 (론자 그룹 엘티디.) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (깁코®, 라이프 테크놀로지스)으로 보충된 ATCC-제제화된 McCoy의 5a 변형된 배지 (카탈로그 번호 30-2007) 중에 배양하였다. 세포를 마이코플라스마 오염을 배제하기 위해 주기적으로 시험하였다. 세포는 STR (짧은 탠덤 반복부) 인증되었다.
- [0107] 1차 환자 세포: 다나-파버 캔서 인스티튜트(Dana-Farber Cancer Institute) 생명윤리위원회에 의해 승인된 사전 동의에 따라, CD138+ 세포를 피콜-하이파크(Ficoll-Hypaque) (론자 그룹, 스위스 바젤) 밀도 구배 침강분리에 의해 MM 환자의 BM 흡인으로부터 단리한 후; 항-CD138 자기 활성화된 세포 분리 마이크로비드 (밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotech), 독일 글라트바흐)를 사용하여 항체-매개된 양성 선택하였다. 면역선택된 세포의 순도를 표준 절차에 의해 피코에리트린-접합된 CD138 모노클로날 항체를 사용하는 유동-세포측정 분석에 의해 평가하였다. 장기간 배양 (6일) 동안, CD138+ 세포를, 이전에 기재된 바와 같이 (Morelli *et al.*, Blood 132:1050-1063 (2018)), 제조업체의 설명서에 따라, 팔콘(Falcon) 세포 배양 삽입물 (코닝(Corning), 미국 뉴욕주 뉴욕)에 의해 HS-5 세포로부터 물리적으로 분리되어 배양하였다.
- [0108] 말초 혈액 단핵구 세포: 다나-파버 캔서 인스티튜트 생명윤리위원회에 의해 승인된 사전 동의에 따라, CD138+ 세포를 피콜-하이파이크 (론자 그룹, 스위스 바젤) 밀도 구배 침강분리에 의해 MM 환자의 BM 흡인으로부터 단리한 후; 항-CD138 자기 활성화된 세포 분리 마이크로비드 (밀테니 바이오테크, 독일 글라트바흐)를 사용하여 항체-매개된 양성 선택하였다. 면역선택된 세포의 순도를 표준 절차에 의해 피코에리트린-접합된 CD138 모노클로날 항체를 사용하는 유동-세포측정 분석에 의해 평가하였다. 장기간 배양 (6일) 동안, CD138+ 세포를, 이전에 기재된 바와 같이 (Morelli *et al.*, Blood 132:1050-1063 (2018)), 제조업체의 설명서에 따라, 팔콘 세포 배양 삽입물 (코닝, 미국 뉴욕주 뉴욕)에 의해 HS-5 세포로부터 물리적으로 분리되어 배양하였다.
- [0109] MM 환자의 RNA-seq, 마이크로어레이-기반 유전자 발현 분석 및 마이크로RNA 프로파일링. RNA-seq: 1차 데이터 세트로서, IFM/DFCI 20019 임상 시험 (NCT01191060)으로부터의 360명의 MM 환자로부터의 CD138+ MM 세포로부터의 이전에 공개된 RNAseq 데이터가 사용되었다 (Samur *et al.*, Leukemia 32:2626-2635 (2018)). 이 데이터세

트가 새로 진단된 MM 환자에서의 lncRNA의 발현을 평가하는데 사용되었다. 비-가닥 쌍형성된-단부 RNA 시퀀싱을 Salmon으로의 유사-맵핑을 사용하여 정량화하였다. GRCh38 전사체에 대한 참조 전사체를 Gencode v24로부터 다운로드하였다. QC 후 유전자에 대한 대조군 TPM 값을 tximport를 사용하여 이소형 수준 TPM으로부터 생성하였다. 모든 도면은 R 및 ggpubr로 생성되었다. IFM 코호트 상의 RNAseq 데이터에 대한 신생 조립을 TopHat를 사용하여 수행하였다. Gencode v24 GTF 파일이 참조로서 사용되었고 TopHat에 의해 주석달린 새로운 이소형이 출력 파일로부터 확인되었다. DFCI/IFM 연구의 연속으로부터의 새로 진단 (ND) 및 재발 (R) 샘플이 ND-MM 및 R-MM을 비교하는데 사용되었다. 오직 진단 샘플과 유사하게 이들 샘플을 쌍형성된 단부 시퀀싱으로 시퀀싱하였고 발현을 상기 설명된 동일한 파이프라인을 사용하여 정량화하였다. 2차 데이터셋으로서, TPM 수준 필터링된 MMRF CoMMpass 데이터를 MMRF 리서치 포털로부터 다운로드하였다. 오직 진단 시 CD138+ 선택된 BM 샘플로부터 수집된 샘플만이 분석에 사용되었다.

- [0110] 마이크로레이-기반 유전자 발현 분석: RROL 발현 수준을 공중 이용가능한 데이터셋 (GSE66293) (Lionetti *et al.*, *Oncotarget* 6:24205-17 (2015))에서 평가하였으며 이는 진칩(GeneChip) 인간 유전자 1.0 ST 어레이 (아피메트릭스(Affymetrix), 미국 캘리포니아주 산타 클라라)에 의해 프로파일링된 129개의 새로 진단된 및 12개의 재발된 MM 케이스를 포함한다 (Todoerti *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 19:3247-58 (2013)). 정규화된 및 재-주석달린 발현 수준이 브레인어레이 라이브러리 버전 20.0.0으로부터의 칩 정의 파일을 사용하여 (Dai *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 33:e175-9 (2005)), 기재된 바와 같이 수득되었다 (Todoerti *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 19:3247-58 (2013)). 2개의 그룹 사이의 차등 발현을 R 환경에서의 연속성 수정을 사용한 윌콕슨 순위 합계 검정 (버전 4.0.4)에 의해 평가하였다.
- [0111] miRNA 프로파일링: IFM 코호트에 대한 miRNA 발현 데이터를 아피메트릭스 진칩® miRNA 어레이 4.0 플랫폼을 사용하여 생성하였다. 바이오컨덕터(Bioconductor)로부터의 Affy 및 oligo 패키지가 miRNA 발현 데이터를 정규화하는데 사용되었다.
- [0112] 상관관계 분석: 스피어만 상관관계가 lncRNA, mRNA 및 miRNA 사이의 상관관계를 평가하는데 사용되었다.
- [0113] 생존 분석: 생존 분석을 R에서의 생존 패키지를 사용하여 수행하였고, log 순위 검정이 그룹을 비교하는데 사용되었다.
- [0114] dCas9-KRAB 세포주의 생성. dCas9-KRAB 융합 단백질을 발현하는 세포주를 문헌 [Morelli *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 2348:189-204 (2021)]에 이전에 기재된 바와 같이 생성하였다. 간단하게, 세포를 dCas9-BFP-KRAB 트랜스젠을 발현하는 렌티바이러스 (애드진(Addgene), 플라스미드 #46911)로 감염시켰고 높은 BFP를 안정하게 발현하는 클론에 대해 분류하였다. 감염을 낮은 MOI (<0.4)로 수행하였다. dCas9-KRAB 융합 단백질을 발현하는 MM 세포주에서의 전사 억제의 검증을 ENO1 (gRNA_ENO1: CCGGCGAGATCTCCGTGCTC (서열식별번호: 66) 또는 비-표적화 음성 대조군 (gRNA_NC: GATGTGGTCATTCGTCATGA (서열식별번호: 67)에 대한 sgRNA를 발현하는 렌티바이러스를 감염시킴으로써 평가하였다. sgRNA를 pU6-sgRNA EF1알파-puro-T2A-BFP (플라스미드 #60955)로 클로닝하였다. 이 절차는 바이스만(Weissman) 랩에 의해 확립되고 온라인 weissmanlab.ucsf.edu/CRISPR/CRISPR.html 이용가능한 프로토콜을 따랐다. ENO1의 하향조절을 역전사 (RT) 및 정량적 실시간 증폭 (qRT-PCR)에 대해 하기 기재된 절차에 따른 qRT-PCR 분석에 의해 평가하였다.
- [0115] CRISPRi 생존율 스크린. 라이브러리 설계: lncRNA TSS를 표적화하는 gRNA가 브로드 인스티튜트(Broad Institute) 웹 포털 (이제 CRISPick: portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public으로 불림)을 사용하여 설계되어 사용되었다. 1차 스크린을 위해, 표적 lncRNA는 IFM/DFCI 코호트에서의 중앙값 TPM>0.5에 기반하여 선택되었다. 2차 스크린을 위해, 표적 lncRNA는 1차 스크린 결과 (즉, 유의하게 고갈된 또는 풍부화된 gRNA에 의해 표적화됨, FDR<0.25)에 기반하여 선택되었고; 플러스 추가적인 lncRNA가 RNA-seq 데이터의 신생 조립을 통해 확인되었고 수동으로 선택된 lncRNA는 IFM/DFCI 임상 연구에 등록된 MM 환자의 임상 결과에 대한 이들의 영향에 기반하여 선택되었다.
- [0116] gRNA 풀 라이브러리 생산: 7,500개의 gRNA로 이루어진 1차 CRISPRi 라이브러리 또는 3,750개의 gRNA로 이루어진 2차 CRISPRi 라이브러리를 제조업체의 프로토콜에 따라 리포펙타민 2000 형질감염 시약 (썬도 피셔 사이언티픽)을 사용하여 패키징 플라스미드 (psPAX2, 애드진 #12260; pMD2.G, 애드진 #12259)와 함께 HEK293T 세포로 공동-형질감염시켰다. 라이브러리 DNA (4 µg), psPAX2 DNA (4 µg) 및 VSV-G DNA (2 µg)를 혼합하고 T75 플라스크 (x10)에서 HEK293T 세포로 형질감염시켰다. 형질감염 후 6시간에, 배지를 제거하고 10ml의 바이러스 생산 배지 (10%의 FBS로 보충된 DMEM 배지)로 대체하였다. 형질감염 후 48시간에, 렌티바이러스 배지를 수거하고, 렌티-X™ 농축기 (다카라, 카탈로그 번호 631232)를 사용하여 농축시키고 -80°C에서 저장하였다.

- [0117] 바이러스 역가 결정: 1×10^6 개의 세포 (각각의 세포주)를 6-웰 플레이트의 웰당 플레이팅하였다. 세포를 $8 \mu\text{g/ml}$ 의 폴리브렌의 존재 하에 밤새 상이한 양의 렌티바이러스로 감염시켰다. 렌티바이러스 입자의 역가를 셀렉타(Collecta), 섹션 5.3 및 5.4로부터의 프로토콜에 따라 유동-세포측정에 의해 수행하였다.
- [0118] 1차 스크리닝: dCAS-KRAB 융합 단백질을 발현하는 4×10^7 개의 MM 세포를, 스피너를 사용하여, 0.1 내지 0.3 범위의 MOI로 라이브러리 렌티바이러스 입자로 감염시켰다. 감염을 삼중으로 수행하였다. 바이러스-함유 배지를 스피너접종의 1h 후 제거하였고, 세포를 PBS로 2x 세척하고 완전 배지 중에 배양하였다. 4일 후, 세포를 추가적인 3일 동안 퓨로마이신으로 선택하였다. 제7일에, 세포 파편을 피콜-하이페이크 (론자 그룹, 스위스 바젤) 밀도 구배 침강분리에 의해 제거하였다. 세포를 추가적인 2주 동안 배양하여 라이브러리의 1000x 표지를 보장하였다. 게놈 DNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 혈액 & 세포 배양 DNA 맥시/미디 키트 (퀴아젠(Qiagen) #13362, 13343)를 사용하여 분리하였다. 셀렉타 (캘리포니아주 마운틴 뷰)는 gRNA 표지의 일루미나(Illumina) 시퀀싱을 위한 gRNA 카세트의 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 및 일루미나 시퀀싱을 위한 프로토콜은 온라인 이용 가능하다.
- [0119] 스크리닝 데이터 분석: 후보 유전자 발견을 위해, 정규화된 gRNA 계수 표가 실험적인 및 대조군 (플라스미드 라이브러리) 조건을 비교함으로써 MaGeCK (전장-게놈 CRISPR-Cas9 녹아웃의 모델-기반 분석)에 로딩되었다. 상위 유전자를 모든 gRNA에 대한 평균 \log_2 배수 변화 (LFC) 및 위발견율 (FDR)에 기반하여 결정하였다.
- [0120] MIR17HG의 시험관내 검증: MIR17HG를 표적화하는 상위 점수 ($n=4$, MIR17HG sgRNA#1-4, 서열식별번호: 2-5) sgRNA를 pRSGT16-u6Tet-sg-CMV-TetRep-2A-TagRFP-2A-Puro (셀렉타, 카탈로그 #SVCRU6T16-L) 벡터로 클로닝하였고 시퀀싱에 의해 확인하였다. gRNA 구축물을 제조업체의 프로토콜에 따라 리포펙타민 2000 형질감염 시약 (써모 피셔 사이언티픽)을 사용하여 패키징 플라스미드 (psPAX2, 애드진 #12260; pMD2.G, 애드진 #12259)와 함께 HEK293T 세포로 공동-형질감염시켰다. 바이러스를 48시간 이후 수거하고, 농축시키고, -80°C 에서 저장하였다. dCas9-KRAB 융합 단백질을 안정하게 발현하는 MM 세포주를 개별 sgRNA의 발현을 구동시키는 렌티바이러스로 감염시켰다. 감염된 세포를 퓨로마이신을 사용하여 선택하였다. sgRNA의 발현을 독시사이클린 ($0.5 \mu\text{g/ml}$, 격일)에 의해 획득하였다.
- [0121] 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 합성 miRNA 모방체 및 억제제, siRNA. 긴 비-코딩 LNA 캡-meR, 서열식별번호: 2-14를 맞춤-설계하고 엑시콘(Exiqon) (덴마크 베드베크)으로부터 구입하였다.
- [0122] miR-17a, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 및 miR-92a1에 대한 합성 모방체 및 억제제를 앰비온(Ambion) (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 미국 캘리포니아주)으로부터 구입하였다. 사일런서 선택된 siRNA를 앰비온 (어플라이드 바이오시스템즈, 미국 캘리포니아주)으로부터 구입하였다. t-ASO의 설계는 표 2 - 표 4에 기재된다.
- [0123] 짐노시스. 짐노틱 실험을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Taiana *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 2348:157-166 (2021)). 간단하게: 세포를 실험의 마지막 날에 융합에 도달하는 플레이팅 밀도로 시딩하였다. 플레이팅에서의 세포 수는 96-웰 플레이트에서 0.5 내지 2.5×10^3 개, 12-웰 플레이트에서 2.5 내지 10×10^4 개, 6-웰 플레이트에서 1 내지 3×10^5 개 범위였다. ChIP 및 Co-IP 실험의 경우, 플레이팅에서의 세포 수는 T75 플라스크 (10mL 마지막 부피)에서 1×10^6 개였다.
- [0124] 세포의 일시적인 형질감염. 부착성 세포주로부터의 세포를 제조업체 설명서에 따라 리포펙타민 2000에 의해 25nM의 LNA 캡-meR (엑시콘)로 형질감염시켰다. 현탁 세포주 (즉, 비-부착성)로부터의 세포를 네온(Neon) 형질감염 시스템 (인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주)에 의해 형질감염시켰다 (전기천공), (1150, 30ms에서의 2 펄스). LNA 캡-meR, miRNA 억제제/모방체 및 siRNA가 25nM에서 사용되었다. FAM 염료-표지된 항-miR-음성 대조군에 비해 유동 세포측정 분석에 의해 평가된 형질감염 효율은 85% 내지 90%에 도달하였다.
- [0125] 렌티바이러스 플라스미드를 사용하는 안정한 발현. miR-17-92 클러스터를 안정하게 과다-발현하는 세포를 생성하기 위해, AMO1을 PMIRH17-92PA-1 렌티-벡터 (시스템 바이오사이언시스(System Biosciences), 미국 캘리포니아주 팔로 알토)로 형질도입시켰다. c-MYC를 안정하게 발현하는 세포를 생성하기 위해, U266을 인간 v-myc 골수구종증 바이러스 종양유전자 상동체 (조류) (MYC), Myc-DDK-태그된 (RC201611L3) (오리진 테크놀로지스(Origene Technologies), 메릴랜드주 메릴랜드 록빌)의 렌티 ORF 클론으로 형질도입시켰다. WDR82를 안정하게 발현하는 세포를 생성하기 위해, AMO1을 인간 WD 반복부 도메인 82 (WDR82), mGFP 태그된 (RC216325L4) (오리

진 테크놀로지스, 메릴랜드주 메릴랜드 록빌)의 렌터 ORF 클론으로 형질도입시켰다. Cas9를 안정하게 발현하는 세포를 생성하기 위해, AMO1 및 H929를 pLX_311-Cas9 (애드진 #96924)로 형질도입시켰다. 트랜스진을 발현하는 세포를 3 내지 5일 동안 항생제-선택에 의해 선택하였다.

- [0126] CRISPR/CAS9 유전자 녹아웃. 드로샤 KO 세포를 생성하기 위해, Cas9를 안정하게 발현하는 AMO1 및 H929를 드로샤를 표적화하는 transEDIT CRISPR 단일 gRNA 렌터바이러스 발현 벡터 (CMV 프로모터, ZsGreen, TEVH-1203933) (트랜스오믹 테크놀로지스 인크.(transOMIC technologies Inc.), 미국 앨라배마주 헌츠빌)로 형질도입시켰다. ZsGreen+ 세포를 감염 후 5일에 분류하고 (BD FACSAria III; BD 바이오사이언시스(BD Biosciences), 미국 캘리포니아주 산 호세 쿼드라이브) 배양하였다.
- [0127] 세포 생존율 측정. 세포 생존율을 제조업체의 설명서에 따라, 세포 계수 키트-8 (CCK-8) 측정 (도진도 몰레클러 테크놀로지스(Dojindo Molecular Technologies)) 및 7-아미노액티노마이신 (7-AAD) 유동 세포측정 측정 (BD 바이오사이언시스)에 의해 평가하였다. 유동 세포측정 분석을 FACS CANTO II (BD 바이오사이언시스) 또는 아툰 (Attune) NxT 유동 세포측정기 (써모 피셔 사이언티픽)에 의해 수행하였다.
- [0128] 아포토시스의 검출. 아포토시스를 아넥신 V/7-AAD 유동 세포측정 측정 (BD 바이오사이언시스) 및 전자 현미경에 의해 조사하였다. 유동 세포측정 분석을 FACS CANTO II (BD 바이오사이언시스) 또는 아툰 NxT 유동 세포측정기 (써모 피셔 사이언티픽)에 의해 수행하였다.
- [0129] 역전사 (RT) 및 정량적 실시간 증폭 (qRT-PCR). RNA 추출, 역전사 (RT) 및 정량적 실시간 증폭 (qRT-PCR)을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Morelli *et al.*, *Blood* 132:1050-1063 (2018)). 간단하게, 총 RNA를 제조업체의 설명서에 따라, 세포로부터 트리졸(Trizol)[®] 시약 (써모 피셔 사이언티픽)으로 추출하였다. 핵 및 시토졸 세포하 RNA 정제를 제조업체의 설명서에 따라, RNA 세포하 분리 키트 (카탈로그 번호 25501) (액티브 모티프(Active Motif), 캘리포니아주 칼즈배드)를 사용하여 수행하였다. 총 RNA의 온전성을 나노드롭 (셀바이오 (Celbio) 나노드롭 분광광도계 nd-1000)에 의해 확인하였다. RROL (MIR17HG) 및 mRNA 투여량 연구를 위해, 올리고-dT-프라이밍된 cDNA를 대용량 cDNA 역전사 키트 (써모 피셔 사이언티픽)를 통해 획득하고 이어서 정량화하는데 주형으로서 사용하였다:
- [0130] a) 인간 RROL (Hs03295901), ACACA 또는 ACC1 (Hs01046047_m1), ANO6 (Hs03805835_m1), EXT1 (Hs00609156_m1), FER (Hs00245497_m1), MALAT1 (Hs00273907_s1) 및 PVT1 (Hs00413039_m1). 정규화를 인간 GAPDH (Hs03929097_g1) 또는 ACTB (Hs03023943_g1) 또는 18S (Hs03003631_g1)로 수행하였다.
- [0131] b) 무린 rrol (Mm01230322_s1), acaca (Mm01304258_m1) 및 fer (Mm00484303_m1).
- [0132] 단일-튜브 TaqMan miRNA 측정 (써모 피셔 사이언티픽)이 ViiA7 RT 관독기 (써모 피셔 사이언티픽)의 사용에 의해, 제조업체의 설명서에 따라, miR-17 (002308), miR-18a (002422), miR-19a (000395), miR-20a (000580), miR-19b (000396) 및 miR-92a-1 (000431)을 검출하고 정량화하는데 사용되었다. 성숙 miRNA 발현을 RNU44 (써모 피셔 사이언티픽, 측정 Id: Hs03929097_g1)에 대해 정규화하였다. RROL 이소형을 또한 하기 프라이머를 사용하는 SYBR 그린 qRT-PCR에 의해 검출하였다: RROL-1 (Fw, 5'-CCTGCACTTCCTGGAGAAC (서열식별번호: 68); Rev, 5'-GTCTCAAGTGGGCATGATGA (서열식별번호: 69)), RROL-2 (Fw, 5'-GACCCCTCTTTAAGTTGGGTG (서열식별번호: 70); Rev, 5'-TGGCAAAACATTTTCCTCCT (서열식별번호: 71)). 비교 실시간 폴리머라제 연쇄-반응 (RT-PCR)을 주형-없는 대조군을 포함하여, 삼중으로 수행하였다. 상대 발현을 비교 교차 역치 (Ct) 방법을 사용하여 계산하였다.
- [0133] 웨스턴 블롯 분석. 단백질 추출 및 웨스턴 블롯 분석을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간단하게, 세포를 할트(Halt) 프로테아제 억제제 1회용 각테일 (100X, 써모 사이언티픽)로 보충된 1x RIPA 완충제 (셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology)) 중에 용해시켰다. 전세포 용해물 (레인당 ~20 µg)을 4-12% 노백스(Novex) 비스-트리스 SDS-아크릴아미드 겔 (인비트로젠)을 사용하여 분리하고, 니트로셀룰로스 막 (바이오-래드(Bio-Rad)) 상으로 전기-이동시켰다. 핵 단백질의 추출을 제조업체의 설명서에 따라, NE-PER[™] 핵 및 세포질 추출 시약 (써모 피셔, #78833)을 사용하여 수행하였다. 전기영동 후 니트로셀룰로스 막을 차단하고 밤새 1차 항체로 4°C에서 프로빙하였고, 이어서 막을 PBS-트윈 중에 3회 세척하고 이어서 2시간 동안 실온에서 홀스래디 시 퍼옥시다제와 접합된 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 화학발광을 웨스턴 블롯팅 루미놀 시약 (sc-2048, 미국 텍사스주 델러스 산타 크루즈)을 사용하여 검출하였다.
- [0134] 1차 항체: 항-MYC [D84C1] (#5605), 항-WDR82 [D2I3B] (#99715), 항-H3K4me3 [C42D8] (#9751) 및 항-라민 A/C (#2032) 항체를 셀 시그널링 바이오테크놀로지 (매사추세츠주 덴버스)로부터 구입하였다. 항-드로샤 항체

[EPR12794] (ab183732)를 압캠(Abcam) (영국 캠브릿지)으로부터 구입하였다. 항-MYC [9E10] (sc-40), GAPDH (sc-25778) 및 β -액틴 (ab96682) 항체를 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology) (미국 텍사스주 델러스)로부터 구입하였다. 모노클로날 항-FLAG® M2 항체 (F3165)를 밀리포어 시그마(Millipore Sigma) (매사추세츠주 베드포드)로부터 구입하였다. 2차 항체: 항-토끼 IgG, HRP-연결된 항체 (#7074) 및 항-마우스 IgG, HRP-연결된 항체 (#7076)를 셀 시그널링 바이오테크놀로지 (매사추세츠주 덴버스)로부터 구입하였다.

[0135] RNA FISH. RNA-FISH 실험을 확립된 프로토콜에 따라 수행하였다 (Raj *et al.*, Nat. Methods 5:877-9 (2008); Shaffer *et al.*, PLoS One 8:e75120-9 (2013)). 세포를 폴리-L-리신으로 코팅된 커버슬립 상에 플레이팅하고 적어도 1시간 동안 부착하도록 허용되었다. 배지를 이어서 제거하였고, 세포를 1X PBS로 1회 세척하고, 이어서 고정시키고 4°C에서 10분 동안 차가운 95% 메탄올/5% 아세트산 중에 투과하였다. 고정액을 제거한 후, 세포를 5분 동안 실온에서 세척 완충제 A (20% 스텔라리스(Stellaris) RNA FISH 세척 완충제 A, 바이오서치 테크놀로지스, 인크.(Biosearch Technologies, Inc.), SMF-WA1-60; 10% 탈이온 포름아미드, EMD 밀리포어, S4117; RNase-무함유 물, 라이프 테크놀로지스, AM9932 중)로 세척하였다. 세포를 이어서 37°C에서 습한 챔버에서 암실에서 밤새 혼성화 완충제 (90% 스텔라리스 RNA FISH 혼성화 완충제, 바이오서치 테크놀로지스, SMF-HB1-10; 10% 탈이온 포름아미드) 중 125 nM의 작업 농도에서 RNA FISH 프로브 (스텔라리스)와 함께 인큐베이션하였다. 다음 날, 세포를 각각 30분 동안 37°C에서 암실에서 세척 완충제 A로 3회 세척하였다. 세포를 이어서 15분 동안 세척 완충제 A 플러스 1:1000 획스트(Hoescht) 33342 (인비트로젠, 스톡 10 mg/mL)로 37°C에서 인큐베이션한 후, 5분 동안 실온에서 세척 완충제 B (바이오서치 테크놀로지스, SMF-WB1-20)로 세척하였다. 커버슬립을 벡타실드 (Vectashield) (VWR 101098-042)를 갖는 슬라이드 상에 장착시켰고, 커버슬립을 투명한 네일 폴리시로 밀봉하였다. Z-stack 이미지를 유침 63X 대물렌즈 및 2-3X 줌을 갖는 에어리스크랜(Airyscan)을 사용한 LSM 880 상에서 획득하였고 (W.M. Keck Microscopy Facility, MIT), 에어리스크랜 프로세싱을 "자동" 강도 특색을 사용하여 수행하였다. 대표적인 이미지를 ImageJ를 사용하여 생성하였다.

[0136] RNA FISH와의 공동-면역형광 (Co-IF/FISH). Co-IF/FISH 실험을 하기 변형과 함께 이중 RNA-FISH 실험과 유사한 방식으로 수행하였다. 세포를 커버슬립에 부착시킨 후, 세포를 10분 동안 실온에서 RNase-무함유 PBS 중 4% PFA (VWR, BT140770)로 고정시켰다. 세포를 3X 5분 동안 PBS로 세척한 후, 세포를 4°C에서 10분 동안 차가운 95% 메탄올/5% 아세트산으로 투과하였다. 세포를 이어서 PBS 중 4% IgG-무함유 소 혈청 알부민 (VWR, 102643-516)으로 30분 동안 차단하였고 1차 항체 혼합물 (PBS 중 1:500 토끼 항-c-MYC D84C12)을 이어서 세포에 첨가하고 밤새 습한 챔버에서 실온에서 인큐베이션하였다. 다음 날, 세포를 5분 동안 실온에서 PBS로 3X 세척하였고, 2차 항체 혼합물 (PBS 중 1:500 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 염소 항-토끼 IgG, 씨모피서 A11008)을 첨가하고 1시간 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션하였다. 세포를 5분 동안 PBS로 3X 세척하였고, RNA FISH 전에, 항체 염색과 함께 세포를 10분 동안 실온에서 PBS 중 4% PFA로 재-고정시킨 후, PBS로 3X 세척하였다. 항체 염색 및 고정 후, RNA FISH 프로토콜을 세척 완충제 A로의 세척으로 시작하여, 상기 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0137] RROL 고갈 후 마이크로레이-기반 유전자 발현 프로파일링. ASO1로의 치료 후 유전자 발현 변화의 마이크로레이-기반 분석을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Morelli *et al.*, Blood 132:1050-1063 (2018)).

[0138] RROL 고갈 후 AMO1^{DR-KO}의 RNA-seq 분석. 총 RNA를 상기 기재된 바와 같이 추출하고 NovaSeq RNAseq 분석에 이어 VIPER NGS 분석 파이프라인에 제출하였다 (Cornwell *et al.*, BMC Bioinformatics 19:135-14 (2018)). 차등 발현된 유전자 (DEG)의 목록을 RROL에 의해 조정된 생물학적 경로를 밝히기 위해 GSEA 또는 IPA 소프트웨어에 적용하였다.

[0139] 루시페라제 리포터 검정. 인간 ACC1 (NM_198834), ANO6 (NM_001025356), CCDC91 (NM_018318), EPT1 (NM_033505), EXT1 (NM_000127), FER (NM_001308028) 및 ZYG11A (NM_001004339)를 위한 프로모터 리포터 클론을 GLuc-ON™ 프로모터 리포터 벡터 (진코피아(GeneCopoeia), 메릴랜드주 록빌)로 클로닝하였다. 루시페라제 리포터 검정을 제조업체의 설명서에 따라 수행하였다.

[0140] ChIRP. RROL 및 LacZ 안티센스 DNA 프로브를 singlemoleculfish.com에서의 온라인 프로브 디자이너를 사용하여 설계하였다. 올리고뉴클레오타이드를 18-탄소 스페이서 아암을 갖는 3' 단부에서 비오틴화시켰다. AMO1 세포를 수집하고 제조업체의 설명서 및 확립된 프로토콜에 따라, EZ- Magna ChIRP RNA 인터랙툼 키트 (밀리포어 시그마, 매사추세츠주 베드포드)를 사용하여 ChIRP에 적용하였다 (Chu *et al.*, J. Vis. Exp. 61:3912-6 (2012)).

- [0141] 신생 지질형성 검정. 세포를 6-웰 플레이트에서 웰당 5×10^5 개의 세포로 시딩하고 치료 (AS01 / 10058-F4 / IPTG 또는 각각의 대조군)의 존재 하에 3일 동안 인큐베이션하였다. 치료의 종료 전 24 (24)시간에, 1 μ Ci의 14 C-표지된 글루코스 (ARC-0122D)를 각각의 웰에 첨가하였다. 세포를 수거하고, 차가운 PBS로 세척하고 유리 튜브에 수집하였다. 정제된 지질 추출물은 클로로포름-메탄을 기반 추출에 의해 수득된다 (Bligh and Dyer, Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-7 (1959)). 세포 지질에서의 글루코스 혼입을 신틸레이션 계수를 통해 광자 방출에 의해 정량화하고 총 단백질 함량에 대해 정규화하였다.
- [0142] 지질 프로파일링. 지질을 MM 세포로부터 추출하고, 건조시키고, 분석까지 아르곤 하에 저장하였다. 지질 중을 벨기에 KU 루벤에서 리포메트릭스에 의해 혼성체 삼중 사중극자/선형 이온 트랩 질량 분광계 (6500+ QTRAP 시스템; AB 사이엑스(AB SCIEX))와 커플링된 넥세라(Nexera) X2 UHPLC 시스템 (시마즈(Shimadzu)) 상에서 액체 크로마토그래피 전기분무 이온화 탠덤 질량 분광분석법 (LC-ESI/MS/MS)에 의해 분석하였다.
- [0143] 지질 추출: 지질 추출을 1 N HCl:CH₃OH 1:8 (v/v), 900 μ l CHCl₃ 및 200 μ g/ml의 항산화제 2,6-디-tert-부틸-4-메틸페놀 (BHT; 시그마 알드리치(Sigma Aldrich))로 수행하였다. 중수소 표지된 지질 스플래시(SPLASH)[®] 리피도믹스(LIPIDOMIX)[®] 질량 스펙 표준 (#330707, 아반티 폴라 리피즈(Avanti Polar Lipids))의 혼합물을 추출물 혼합물로 섞었다. 유기 분획을 실온에서 사반트 스피드백(Savant Speedvac) spd111v (써모 피서 사이언티픽)를 사용하여 증발시켰고 남은 지질 펠릿을 -20°C 하에 아르곤 하에 저장하였다.
- [0144] 질량 분광분석법. 질량 분광분석법 분석 직전에, 지질 펠릿을 100% 에탄올 중에서 재구성하였다. 지질 중을 혼성체 삼중 사중극자/선형 이온 트랩 질량 분광계 (6500+ QTRAP 시스템; AB 사이엑스)와 커플링된 넥세라 X2 UHPLC 시스템 (시마즈) 상에서 액체 크로마토그래피 전기분무 이온화 탠덤 질량 분광분석법 (LC-ESI/MS/MS)에 의해 분석하였다. 크로마토그래피 분리를 하기 구배로 이동상 A [물-아세트니트릴 5:95 (v/v) 중 1 mM 아세트산암모늄] 및 이동상 B [물-아세트니트릴 50:50 (v/v) 중 1 mM 아세트산암모늄]를 사용하여 35°C에서 유지된 엑스브리지(XBridge) 아마이드 칼럼 (150 mm x 4.6 mm, 3.5 μ m; 워터스(Waters)) 상에서 수행하였다: 13분부터 1.5 mL/분으로 증가된 0.7 mL/분의 유량으로 (0-6분: 0% B > 6% B; 6-10분: 6% B > 25% B; 10-11분: 25% B > 98% B; 11-13분: 98% B > 100% B; 13-19분: 100% B; 19-24분: 0% B). 스펙고미엘린, 세라미드, 디히드로세라미드, 헥소실세라미드 및 락토실세라미드를 양성 이온 모드에서 각각 184.1, 264.4, 266.4, 264.4 및 264.4의 전구체 스캔으로 측정하였다. 트리아실글리세리드 및 디아실글리세리드를 양성 이온 모드에서 지방 아실 모이어티 중 1개에 대한 중성 손실 스캔으로 측정하였다. 포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨 및 포스파티딜세린을 음성 이온 모드에서 지방 아실 단편 이온으로 측정하였다. 지질 정량화를 예정된 다중 반응 모니터링 (MRM)에 의해 수행하였으며, 전이는 상기 기재된 바와 같이 중성 손실 또는 전형적인 산물 이온에 기반한다. 기구 파라미터는 하기와 같았다: 커튼 기체 = 35 psi; 충돌 기체 = 8 a.u. (중간); 이온분무 전압 = 5500 V 및 -4,500 V; 온도 = 550°C; 이온 공급원 기체 1 = 50 psi; 이온 공급원 기체 2 = 60 psi; 디클러스터링 전위 = 60 V 및 -80 V; 입구 전위 = 10 V 및 -10 V; 충돌 세포 탈출 전위 = 15 V 및 -15 V. 하기 지방 아실 모이어티: 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 16:2, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:0, 22:1, 22:2, 22:4, 22:5 및 22:6이 지질체학 분석을 위해 고려되었고 하기를 고려한 TG: 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:3, 20:4, 20:5, 22:2, 22:3, 22:4, 22:5, 22:6은 제외한다.
- [0145] 데이터 분석. 피크 통합을 MultiQuant[™] 소프트웨어 버전 3.0.3으로 수행하였다. 지질 중 신호를 동위원소 기여에 대해 보정하고 (Python Molmass 2019.1.1로 계산됨) 내부 표준 신호에 기반하여 정량화하였고 지질체학 표준 계획 (LSI)의 가이드라인 (LSI에 의해 정의된 바와 같은 수준 2 유형 정량화)을 고수한다.
- [0146] ChIP-qPCR. ChIP-qPCR을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Fulciniti *et al.*, Cell Rep. 25:3693-3705 (2018)). 간단하게, 1×10^7 개의 세포 (AM01, H929 및 U266^{MYC+}, 상응하는 치료를 가짐)를 10분 동안 37°C에서 1% 포르말데히드와 가교시켰다. 가교된 염색질을 이어서 추출하고, 용해 완충제로 희석하고, 초음파처리에 의해 전단하였다. 염색질을 특정 항체로의 면역침전을 위해 동일한 샘플로 분할하였다. 면역침전물을 원심분리에 의해 펠릿화하고 단백질-DNA 가교를 역전시키기 위해 68°C에서 인큐베이션하였다. DNA를 퀴아퀵(Qiaquick) PCR 정제 키트 (퀴아젠)에 의해 용리액으로부터 추출하였다. 사용된 항체는 하기와 같았다: 내인성 MYC (셀 시그널링 테크놀로지, #13987), MYC-DDK (산타 크루즈 바이오테크놀로지, 9E10-x), GFP (압캠, #ab290), H3K4me3 (#ab8580), 정상 토끼 IgG (셀 시그널링 테크놀로지, #2729), 정상 마우스 IgG (산타 크루즈 바이오테크놀로지, sc-2025). 동일한 세포로부터의 입력 DNA의 병렬 샘플이 대조군으로서 사용되었다. ChIP 및 입력 DNA를 SYBR

그런 실시간 PCR 분석 (어플라이드 바이오시스템즈)을 사용하여 분석하였다. ChIP-qPCR을 위한 프라이머: ACC1 Fw: TTCTCTCTTGCAGAGTGAGGTGTGG (서열식별번호: 72) 및 ACC1 Rv: TACAAAGGCACGGAGAGCAAGT (서열식별번호: 73).

- [0147] RNA-단백질 풀-다운. RROL 전사체를 pBlueScript 벡터로 클로닝하였고 서열을 확인하였다. 시험관내 전사 및 비오티닐화를 제조업체의 설명서에 따라, 앰플리스크라이브(AmpliScribe)TM T7-플래시(Flash)TM 비오티-RNA 전사 키트 (루시젠(Lucigen), 카탈로그 번호 #ASB71110)를 사용하여 수행하였다. (1×10^7 개의 AMO1 세포로부터의) 세포 핵 용해물을 피어스(Pierce)TM 자기 RNA-단백질 풀-다운 키트 (썬모 피셔 사이언티픽, 카탈로그 번호 #20164)를 사용하여, 제조업체의 설명서에 따라, RNA 풀-다운 인큐베이션을 위해 비오티닐화 RNA 및 스트렙타비딘 비드와 함께 인큐베이션하였다. RNA-연관 단백질을 용리시키고 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다.
- [0148] RNA 효모 3 혼성체. 사카로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주 YLW3을 표준 프로토콜을 사용하여, RNA 플라스미드로 형질전환시켰다. 이들을 우라실이 고갈된 SC 플레이트 (SC-U) 상에 점을 찍음으로써 생존율에 대해 시험하였다. 단백질 플라스미드를 효모 균주 Y8800으로 형질전환시키고 트립토판이 고갈된 SC-플레이트 (SC-W)에서 성장시켰다. 검사된 RNA 플라스미드를 함유하는 효모 균주 YLW3을 단백질 플라스미드를 함유하는 Y8800 효모 균주와 메이팅하였다. 메이팅을 YPD 배지에서 제조업체의 프로토콜에 따라 수행하였다. 플라스미드 둘 다를 보유하는 이배체를 트립토판 및 우라실이 고갈된 SC 배지 (SD-WU)에서 선택하였고, 이량체화를 또한 히스티딘이 고갈된, (SC-WUH) 배지에서 성장에 의해 시험하였다. 다음 날 SC-WUH 배지에서의 이배체를 선택의 엄격성을 증가시키기 위해, 상이한 수준의 3AT, HIS3 유전자 산물의 경쟁적 억제제를 함유하는 고체 아가 플레이트로 이동시켰다. 오직 유의한 상호작용을 갖는 이배체만이 생존에 충분한 히스티딘을 생산할 수 있어야 한다. 1-3일 후 상이한 조건에서의 상이한 콜로니의 성장을 가장 강한 상호작용을 갖는 이배체를 찾아내기 위해 검사하였다.
- [0149] RIP-qPCR. RNA 면역침전 (RIP) 실험을 제조업체의 설명서에 따라, Magna RIP RNA-결합 단백질 면역침전 키트 (밀리포어 시그마, 카탈로그 번호 17-701)를 사용하여 수행하였다. RIP에 사용된 항-MYC 항체 [Y69]를 압캡 (ab32072)으로부터 구입하였다. 정상 토끼 IgG를 셀 시그널링 테크놀로지 (카탈로그 번호 #2729)로부터 구입하였다. RROL을 검출하는데 사용된 프라이머는 상기 열거된다.
- [0150] 공동-면역침전 (Co-IP). 단백질 용해물을 1×10^7 개의 세포 (AMO1, H929 및 U266^{MYC+}, 상응하는 치료를 가짐)로부터 수득하였다. 공동면역침전을 제조업체의 설명서에 따라, 피어스TM 공동-면역침전 키트 (썬모 피셔 사이언티픽, 카탈로그 번호 26149)를 사용하여 수행하였다. 사용된 IP 항체는 하기와 같았다: 항-MYC 항체 [Y69]를 압캡 (ab32072)으로부터 구입하였고, 항-FLAG[®] M2 항체를 밀리포어 시그마 (F3165)로부터 구입하였고, 정상 토끼 IgG를 셀 시그널링 테크놀로지 (2729)로부터 구입하였다.
- [0151] 근접-의존적 비오티닌 확인 (BioID). BioID를 문헌 [Kalkat *et al.*, Mol. Cell 72:836-848 (2018)]에 의해 기재된 바와 같이 수행하였다. 간단하게, FBA-MYC 세포를 ASO1 (50nM, 상기 기재된 바와 같이 리포펙타민 2000을 사용함)로의 형질감염 및 24시간 동안 1 mg/mL 독시사이클린 (밀리포어 시그마), 1 μ M MG132 (밀리포어 시그마) 및 50 mM 비오티닌 (바이오 베이직(Bio Basic))으로의 치료 전에 T75 플라스크로 60% 융합으로 성장시켰다. 독시사이클린에 노출된, FBA-MYC 세포를 사용한 실험은 16개의 생물학적 복제 (8개는 RROL 고갈이 있고 8개는 RROL 고갈이 없음)를 포함하였다. 분석에 사용된 음성 대조군은 독시사이클린에 노출되지 않은 FBA-MYC 세포의 6개의 생물학적 복제를 포함하였다. 세포를 스크래핑에 의해 수거하고 급속-냉동 전에 50mL의 PBS로 3회 세척하였다. 세포 펠렛을 250U의 벤조나스 (밀리포어)를 갖는, 1 mL의 변형된 RIPA 완충제 (1% NP-40, 50 mM 트리스-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, 1:100 프로테아제 억제제 콕테일 (썬모 피셔 사이언티픽), 0.5% 소듐 데옥시콜레이트) 중에 용해시켰다. 용해물을 1 h 동안 4°C에서 회전시키고, 3x30 s 초음파처리하고, 이어서 27000 g에서 30분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 비오티닐화 단백질을 2 h 동안 4°C에서 회전과 함께 30 mg의 세척된 스트렙타비딘-세파로스 비드 (GE)를 사용한 친화도 정제에 의해 단리하였다. 비드를 이어서 트립틱 소화 전에 7x1 mL 50 mM 탄산수소암모늄 (pH 8.0)으로 세척하였다.
- [0152] 질량 분광분석법. Co-IP 및 BioID 샘플의 질량 분광분석법 분석을 확립된 프로토콜에 따라, 태플린(Taplin) 질량 분광분석법 시설 (하버드 메디컬 스쿨(Harvard Medical School), 매사추세츠주 보스턴)에서 수행하였다.
- [0153] 동물 연구. 6-주령 암컷 면역결핍 NOD.CB17-Prkdcscid/NCr1 (NOD/SCID) 마우스 (찰스 리버(Charles River)) 또는 NSG 마우스 (잭슨 래보라토리(Jackson Laboratory))를 다나-파버 캔서 인스티튜트 (DFCI)의 본 발명자들의 동물 시설에 수용하였다. 모든 실험을 DFCI의 동물 윤리 위원회에 의한 승인 후 수행하고 기관 가이드라인을

사용하여 수행하였다.

- [0154] AMO1^{DR-KO} 이종이식편 모델: AMO1^{DR-KO}를 SCID NOD 마우스로의 피하 주사 전 2일 동안 ASO1 (2.5μM) 또는 ASO-NC (2.5μM)에 짐노틱 노출시켰다. 주사 일에 (제0일), 세포 생존율을 아넥신 V / 7-AAD 유동 세포측정 검정에 의해 평가하였으며, 이는 이 시점에 ASO-1의 검출가능한 아포토시스-유발 활성이 없다는 것을 확인한다 (제시되지 않음). 종양 세포 주사를 위해, 세포를 ASO1 (5μM) 또는 ASO-NC (5μM)로 보충된 PBS1X 중에 재현탁시켰고; 이어서 2.5μM의 마지막 올리고 농도에 도달하는 동등한 부피의 매트릭겔 (코닝, #354230)과 혼합하였다. 5x10⁶개의 세포를 마우스당 (그룹당 5마리의 마우스) 피하로 주사하였다. 종양 크기를 전자 캘리퍼에 의해 측정하였다.
- [0155] AMO1 이종이식편 모델: 5x10⁶개의 AMO1 세포를 NOD SCID 마우스에서 피하로 주사하였다. 종양이 촉진가능해지면 (~50mm), 마우스를 G2-15b*-T0 또는 SB9-19-T0 또는 대조군으로서 비히클 (-)을 받도록 무작위화하였다 (3개의 그룹, 5마리의 마우스/그룹). 치료를 2주당 격일로, 10mg/kg으로의 I.P. 주사를 통해 투여하였다. 종양 크기를 전자 캘리퍼에 의해 측정하였다. RR0L 및 ACC1의 qRT-PCR 분석에 사용된 독립적인 실험에서, 마우스를 종양이 ~200mm의 부피에 도달한 후 치료를 받도록 등록하고 제1일-제3일-제5일에 치료하였다. 종양을 이어서 제6일에 수집하였다.
- [0156] MOLP8-luc+ 이종이식편 모델: 1x10⁶개의 MOLP8-luc+ 세포를 28마리의 NSG 마우스에서 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 3마리의 마우스 (X에 의해 표시됨)는 이어서 실패한 주사로 배제되었다. 다음 날, 11마리의 마우스를 대조군 그룹에, 8마리의 마우스를 G2-19b*-T0로의 치료에 및 6마리의 마우스를 SB9-19-T0로의 치료에 지정하였다. 치료를 2주당 격일로, 10mg/kg으로의 I.P. 주사를 통해 투여하였다. 치료 주기의 종료 시 (제15일), BLI를 종양 성장의 적응증으로서 측정하였다.
- [0157] 종양 성장 억제 (%TGI)를 하기 식에 의해, 이전에 기재된 바와 같이 (Buck *et al.*, Cancer Res. 68:8322-32 (2008)), 결정하였다 : %TGI = (1- [Tt/T0 / Ct/C0] 1-[C0/Ct]) X 100 여기서 Tt = 시간 t에 치료된 종양값 종양 부피이고, T0 = 시간 0에 치료된 종양값 종양 부피, Ct = 시간 t에서의 대조군의 종양값 종양 부피 및 C0 = 시간 0에서의 대조군의 종양값 종양 부피.
- [0158] 통계적 분석. 모든 시험관내 실험을 적어도 3회 반복하고 삼중으로 수행하였고; 대표적인 실험은 도면에 제시되었다. 차이의 통계적 유의성을 (달리 명시되지 않는 한) 스튜던트 t 검정을 사용하여 결정하였으며, 최소 수준의 유의성은 p<0.05로 명시되었다. 카플란-마이어 생존 곡선을 log-순위 검정에 의해 비교하였다. 통계적 분석을 GraphPad 소프트웨어를 사용하여 결정하였다. 그래프를 (달리 명시되지 않는 한) GraphPad 소프트웨어를 사용하여 획득하였다.
- [0159] 실시예 2: 전장-게놈 CRISPRi 생존율 스크린은 MM에서의 주요 의존성으로서 MIR17HG를 확인한다.
- [0160] 360명의 새로 진단된 MM 환자로부터의 RNA-seq 데이터가 분석되었고 913개의 lncRNA 전사체가 도 1a I로 표시된 좌측 패널에 예시된 바와 같이, 1차 MM 세포에서, 및 70개의 MM 세포주의 패널에서 발현된 것으로 확인되었다. MM 세포 성장에서의 이들 lncRNA의 역할을 체계적으로 심문하기 위해, 3개의 MM 세포주 (H929, KMS-11 및 KMS-12-BM)를 dCAS9-KRAB 융합 단백질을 발현하도록 조작하고 913개의 전사 시작 부위 (TSS) 각각에 대한 7개의 sgRNA 및 576개의 음성 대조군 sgRNA로 이루어진 풀링된 라이브러리로 형질도입시켰다 (도 1a II로 표시된 중간 패널 참조). sgRNA의 상대 표시를 3주 후 덩 시퀀싱에 의해 평가하고 전장-게놈 CRISPR-Cas9 녹아웃 (MAGECK) 강력한 순위 집계 (RRA) 알고리즘의 모델-기반 분석을 사용하여 분석하였다 (Li *et al.*, Genome Biol. 15:554-12 (2014)). 가장 풍부화된 또는 고갈된 sgRNA를 도 1a, III로 표시된 우측 패널에 예시된 바와 같이, 224개의 lncRNA TSS, 공지된 단백질 코딩 종양유전자의 TSS (MYC, IRF4) (Chesi *et al.*, Cancer Cell 13:167-80 (2008); Shaffer *et al.*, Nature 454:226-31 (2008)) 또는 양성 대조군으로서의 종양 억제인자 (TP53) (Jovanovic *et al.*, Front. Oncol. 8:665-7 (2019)), 및 음성 대조군으로서의 2245개의 비-표적화 sgRNA를 표적화하는 풀링된 라이브러리를 사용하여 2차 스크린에서 추가로 시험하였다. 2차 스크린에서 4개의 MM 세포주 (H929, KMS11, KMS12BM 및 AMO1)가 유의하게 고갈된 또는 풍부화된 sgRNA를 검출하고 순위를 매기는데 사용되었다. 예상된 바와 같이, IRF4 및 MYC를 표적화하는 sgRNA는 3개 (MYC) 또는 모든 (IRF4) 세포주에서 유의하게 고갈되었지만, TP53을 표적화하는 sgRNA는 TP53 야생형 세포주 둘 다 (AMO1 및 H929)에서 유의하게 풍부화되었다 (Tessoulin *et al.*, J. Hematol. Oncol. 11:137 (2018)). 도 1b는 양성 대조군으로서 사용된 단백질 코딩 유전자 IRF4 및 MYC와 함께, 상위 lncRNA 의존성 MIR17HG를 강조한다. 도 1c는 KRAB-dCAS9 융합 단백질을 안

정하게 발현하고 항-MIR17HG sgRNA를 조건부 발현하는 렌티벡터로 형질도입된 MM 세포주 AMO1, H929, KMS11 및 KMS12BM의 CCK-8 증식 검정을 예시한다. CCK-8 검정을 독시사이클린 (0.5 $\mu\text{g/mL}$)에의 노출 후 표시된 시점에 수행하였다. 세포 증식을 빈 sgRNA 벡터로 감염되고 일부 조건 하에 독시사이클린에 노출된 모 세포와 비교하여 계산하였다. 고갈된 sgRNA에 초점을 맞추어, 세포 유형 특이적이거나 (54%) 또는 2개 이상의 세포주에 의해 공유된 (46%) MM 세포에서의 lncRNA 의존성이 확인되었다 (도 8a 참조). sgRNA 고갈의 순위화된 분석은 스크린에서의 주요 lncRNA 의존성으로서 MIR17HG를 확인하였으며, RRA 점수는 시험된 모든 세포주에서 MYC 또는 IRF4를 표적화함으로써 획득된 것 이상이다 (도 8b). 이 데이터를 추가로 입증하기 위해, dCAS9-KRAB 융합 단백질을 발현하는 MM 세포주를 테트라사이클린-유도성 프로모터의 조절 하에 MIR17HG를 표적화하는 상위 4개의 sgRNA로 형질도입시키고 도 1c 및 도 8b에 예시된 바와 같이, 독시사이클린에의 계속된 노출 후 비-표적화 sgRNA로 감염된 세포와 비교하여 감소된 세포 성장을 관측하였다. MIR17HG 발현을 독시사이클린으로의 gRNA의 유도 후 5일에 qRT-PCR에 의해 조사하였다. 결과는 ACTB로의 정규화 및 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 계산 후 평균 RNA 발현 수준으로서 도 8b에 제시된다.

[0161] 게다가, RNase H-매개된 분해를 위해 MIR17HG 초기 RNA (프리-RNA)를 표적화하는 2개의 상이한 잠금 핵산 (LNA) 캡-meR ASO (Lai *et al.*, Mol. Cell 77:1032-1043 (2020); Lee and Mendell, 2020)가 종래의 항-MM 작용제에 대한 이들 저항성 (보르테조미프에 대한 AMO1-ABZB 저항성; 카르필조미프에 대한 AMO1-ACFZ 저항성; 텍사메타손에 대한 MM.1R 저항성)을 포함하는 11개의 MM 세포주를 형질감염시키는데 사용되었고; 도 1d 및 도 8c에 예시된 바와 같이, 유전자 및 분자 배경과 독립적인 MM 세포 생존율에 대한 유의한 영향을 확인하였다. ASO가 25nM의 농도로 사용되었다. 세포 생존율을 전기천공 후 2 및 4일에 측정하였고, 이는 NC-ASO로 형질감염된 세포와 비교하여 생존율의 %로서 표시된다. 3개의 독립적인 실험 중 1개로부터의 데이터는 도 1d 및 도 1e에 제시된다. 데이터는 도 1d 및 도 1e에서 평균 \pm s.d.를 제시한다. 스튜던트 *t* 검정에 의한 $*p < 0.05$. 도 8c는 형질감염 후 24h에 qRT-PCR에 의한 MIR17HG 발현을 제시한다. 제시된 결과는 ACTB로의 정규화 및 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 계산 후 평균 RNA 발현 수준의 것이다. 3개의 독립적인 실험 중 하나 (1개)가 제시된다.

[0162] 이들 데이터는 MM 세포에서의 lncRNA에 대한 광범위한 의존성을 확립한다. MIR17HG의 분자 및 기능적 역할은 MM 설정에서 추가로 탐구된다.

[0163] 실시예 3: MIR17HG^{RROL} (RROL)은 마이크로RNA-독립적인 방식으로 의존성을 매개한다.

[0164] 마이크로RNA 클러스터 miR-17-92 (MIR17HG^{miR-17-92}; miR-17/-18a/-19a/-20a/-19b/-92a1)를 위한 전구체를 제공하는 것 이외에, MIR17HG는 또한 도 2a에 예시된 바와 같이, 아직 부족하게 특징화된 lncRNA 전사체 lnc-17-92^{TV1} (또한 MIR17HG^{RROL}로 공지됨)을 생산한다 (He *et al.*, Nature 435:828-33 (2005); Ota *et al.*, Cancer Res. 64:3087-95 (2004)). RROL 발현이 진단 및/또는 재발 시 분석된 IFM/DFCI 임상 시험 (NCT01191060)에 등록된 MM 환자로부터의 2개의 독립적인 데이터세트에서 질환 진행 동안 보다 높았다는 것 (도 9a - 도 9b 참조); 및 RROL의 보다 높은 발현이 새로 진단된 MM 환자의 3개의 대형 코호트에서의 보다 짧은 무사례 (EFS) 및 전체 (OS) 생존과 연관되었다는 것 (도 2b)이 관측되었다. RROL의 발현은 140명의 환자로부터의 CD138+ MM 세포에서의 miR-17-92s와 상관관계가 유의하게 있지 않았으며 (평균 스피어만 $r = 0.16$), 이는 RROL 및 miR-17-92가 독립적인 조절 제어를 받고 별개의 분자 경로로 기능할 수 있다는 것을 시사한다 (도 9c).

[0165] RROL의 miRNA-독립적인 기능을 지지하여, 먼저, 2개의 MM 세포주에서의 pri-mir-17-92의 이소성 발현의 존재 또는 부재 하에 항-MIR17HG ASO의 무손상 항-증식 활성이 관측되었다 (도 2c 및 도 9d). AMO1 및 H929 세포를 pri-mir-17-92 (pri-miR)를 보유하는 렌티벡터 또는 대조군으로서 GFP를 보유하는 렌티바이러스 벡터로 안정하게 형질도입시켰고; MIR17HG 프리-RNA의 5'단부를 표적화하는 2개의 상이한 ASO (5'-ASO) 또는 스크램블 대조군 (NC)으로 형질감염시켰다. 세포 증식에 대한 효과를 형질감염 후 48h에 평가하였다. 도 9d는 pri-mir-17-92 (렌티-pri-mir)를 함유하는 렌티바이러스 벡터 또는 GFP를 함유하는 렌티바이러스 벡터로 감염된 세포를 제시한다. 제시된 결과는 RNU44로의 정규화 및 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 계산 후 평균 miRNA 발현 수준이다. 단독으로 RROL을 고갈시키기 위해, ASO를 5'-단부에서 MIR17HG를 표적화하도록 설계하였으며 (5'-ASO), 서열은 이소성 pri-mir-17-92에 포함되지 않는다. 두 번째로, 2개의 드로샤 녹아웃 (DR-KO) MM 세포주 (AMO1^{DR-KO} 및 H929^{DR-KO})를 확립하였으며, 이는 miR-17-92s를 생산할 수 없다 (도 9e). 제시된 결과는 RNU44로의 정규화 및 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 계산 후 평균 miRNA 발현 수준이다 (Bartel *et al.*, Cell 116:281-97 (2004)). MIR17HG 프리-RNA의 ASO-매개된 표적화는 이들 세포에서 단독으로 RROL에 영향을 미친다. RROL 고갈 후 DR-WT 및 DR-KO 세포 시스템 둘 다에서의 강한 항-증식 활성이 관측되었으며, 6일 동안 ASO1 (AMO1의 경우 1 μM 및 H929의 경우 2.5 μM)로의 짐노틱 치료 후 평

가되고 WT 및 KO 세포에서의 드로샤 발현의 웨스턴 블롯 분석에 의해 (도 2d) 또는 3개의 상이한 ASO (-1/-2/-3)로의 형질감염 후 (도 9f) 검출된 바와 같이, DR-KO 세포에서의 유의한 구제는 없다. 빈쿨린이 단백질 로딩 대조군으로서 사용되었다. 살아있는 세포의 백분율을 NC와 비교하고 CCK-8 검정에 의해 형질감염 후 48h에 분석하였다. RROL 발현을 qRT-PCR에 의해 형질감염 후 48h에 분석하였다. 3개의 독립적인 실험 중 1개가 제시된다. *는 스튜던트 t 검정 계산 후 $p < 0.05$ 를 나타낸다. MM 세포에서, RNA-seq (도 2g) 및 qRT-PCR (도 2h) 둘 다는 RROL TV1의 우선적인 발현을 나타냈으며, 이는 추가로 조사된 이소형이고 이후 RROL로 지칭된다 (또한 lnc-17-92로 공지됨). RNA-seq를 사용하여, MM 환자의 추가적인 대형 코호트 (MMRF/CoMMpass, n=720)로부터의 CD138+ 세포 및 MM 세포주 (n=60)에서의 그의 발현 (도 9i)이 확인되었다.

[0166] 중요하게도, ASO1에의 노출은 RROL 고갈과 함께 (ASO-1) 또는 없이 (NC) AMO1^{DR-KO}의 종양 성장 (도 2e) 및 연장된 동물 생존 (도 2f)에 의해 검출된 바와 같이, NOD SCID 마우스 내로 종양을 확립하는 AMO1^{DR-KO}의 능력을 폐지하였다. MIR17HG³⁴에 의해 구동되는, 형질감염이 용이한 결장직장암 세포주 HCT-116이 lnc-17-92^{TV1}의 이소성 발현이 2.5 µg 보유 이소성 pri-mir-17-92, lnc-17-92TV1, lnc-17-92^{TV2}, 또는 GFP (빈)로 형질감염된, 이소성 lnc-17-92TV2 또는 pri-mir-17-92 (도 9k 및 도 9l)보다 더 효과적으로 MIR17HG 프리-RNA를 표적화하는 ASO의 항-증식 활성을 유의하게 구제하였다는 것을 발견하는데 사용되었다. 세포 증식에 대한 효과를 5'-ASO로의 형질감염 후 2일 및 플라스미드로의 형질감염 후 3일에 평가하였다. NC 및 빈 벡터로 형질감염된 세포가 참조로서 사용되었다. 세포 증식에 대한 효과를 형질감염 후 48h에 평가하였다. pri-mir-17-92, lnc-17-92TV1, 및 lnc-17-92TV2의 이소성 발현을 하기를 제시하는 qRT-PCR에 의해 확인하였다: i) pri-mir-17-92의 이소성 발현 후 miR-17의 상향조절; ii) 그의 이소성 발현 후 lnc-17-92TV1의 상향조절; iii) 그의 이소성 발현 후 lnc-17-92TV2의 상향조절. 결장직장암 세포주 HCT-116 및 DLD-1에서의 항-MIR17HG ASO의 항-증식 활성이 또한 도 2g에 예시된 바와 같이, 하이포모르픽 표현형을 부여하는 돌연변이체 다이서를 보유하는 (-/-) 또는 없는 (wt) 이들 세포주에도 불구하고 관측되었다 (Cummins *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3687-92 (2006)). 세포를 스크램블 대조군 (NC) 또는 2개의 상이한 ASO (-1 및 -2)로 형질감염시켜 RROL 고갈을 수득하였다. NC와 비교하여, 살아있는 세포 %를 형질감염 후 48h에 분석하였다. *는 $p < 0.05$ 를 나타내고, ns는 스튜던트 t 검정 후 $p > 0.05$ 를 나타낸다. 이들 결과는 RROL이 miR-17-92와 관계 없는 MIR17HG 압 의존성의 주요 매개체임을 나타낸다.

[0167] 실시예 4: RROL은 염색질과 상호작용하여 유전자 발현을 조절한다.

[0168] lncRNA의 기능적 역할은 이들의 세포학 국제화에 의존한다 (Ulitsky *et al.*, Cell 154:26-46 (2013)). 양성 대조군으로서 MALAT1 및 GAPDH mRNA를 사용한, 핵 및 시토졸 구획의 qRT-PCR 분석은 RROL의 핵 풍부화를 나타냈다 (도 10a). MALAT1 및 GAPDH가 각각 핵- 및 시토졸- 풍부화된 RNA에 대한 내부 대조군으로서 사용되었다. 결과는 2-ΔCt 계산 후 핵 vs 시토졸 분획의 평균 배수 풍부화이다. 이 발견은 도 10b에 예시된 바와 같이, RNA FISH에 의해 확인되었다. 이에 기반하여, 다음에 MM에서 RROL에 의해 조절된 전사 네트워크가 탐구되었다. 이를 위해, ASO-기반 기능 손실 (LOF) 연구를 수행한 후 DR-WT (AMO1 및 H929) 및 DR-KO (AMO1^{DR-KO}) MM 세포주들 다에서 통합된 유전자 발현 분석하였다. 드로샤 WT 세포에서의 miR-17-92의 조절을 피하기 위한 짐노틱 ASO1에의 초기 노출 (도 10c) 또는 ASO2로의 형질감염 (도 9k) 후 수행된, 차등 발현된 유전자 (DEG)의 동역학적 분석을 통해 시험된 모든 세포주에서의 RROL 고갈 후 신속히 하향조절된 유전자 세트를 확인하였다. 도 10c에 제시된 히트맵은 각각 GAPDH 또는 RNU44로의 정규화 및 ΔΔCt 계산 후 평균 RROL 또는 miRNA 발현 수준을 제시한다. RROL을 또한 드로샤 WT 세포에서의 RROL의 정규 표적의 조절을 피하기 위한 짐노틱 ASO1에의 초기 노출을 사용하여 DR-WT (AMO1 및 H929) 및 DR-KO (AMO1DR-KO) MM 세포주에서 고갈시켰다 (도 13b 및 도 13c).

[0169] 이들 발견은 ASO1로 생체의 치료된 3명의 MM 환자로부터의 CD138+ 세포에서 입증되었다 (도 3b). 도 3b에 제시된 결과는 GAPDH로의 정규화 및 ΔΔCt 계산 후 평균 mRNA 발현 수준이다. NC (비히클)에 노출된 세포에서의 RNA 수준이 내부 참조로서 설정되었다. RROL 고갈 발견은 또한 림프종 세포주 Raji 및 Daudi (도 10d) 및 인간 또는 뮤린 RROL이 고갈된 뮤린 MM 세포주 5TGM1 (도 10e)을 포함하는, 다른 세포 모델에서 입증되었다. 도 10d에 제시된 결과는 GAPDH로의 정규화 및 ΔΔCt 계산 후 평균 mRNA 발현 수준이다. 도 10e에 제시된 결과는 뮤린 *gapdh*로의 정규화 및 ΔΔCt 계산 후 평균 mRNA 발현 수준이다. 반대로, 이들 유전자의 발현은 합성 모방체 또는 억제체에 의한 miR-17-92의 개별 구성원의 조절에 의해 영향을 받지 않았다 (도 10f - 도 10g). 제시된 결과는 각각 RNU44 또는 GAPDH로의 정규화 및 ΔΔCt 계산 후 평균 miRNA 또는 mRNA 발현 수준이다. 게다가, 2개의 대형 RNA-seq MM 환자 데이터세트 (IFM/DFCI 및 MMRF/CoMMpass) 중 적어도 1개에서의 RROL과 그의 표적

유전자 사이의 유의한 양의 상관관계 (스피어만 $r > 0.3$; $p < 0.001$)가 도 3c에 예시된 바와 같이, 관측되었고; 이는 이들 조절 축의 임상 관련성을 지지한다. 도 3c는 2개의 대형 RNA-seq 코호트 (DFCI/IFM, $n=360$; MMRF/CoMMpass, $n=720$)로부터의 CD138+ MM 환자 세포에서의 RROL 표적 (mRNA)과 RROL 사이의 상관관계 분석을 예시한다. DFCI/IFM (x 축) 및 MMRF/CoMMpass (y 축) 데이터셋에서 획득된 스피어만 r 이 보고되었다. 적색 점선은 $r=0.3$ 을 나타낸다.

[0170] RROL 고갈의 존재 또는 부재 하에 293T^{DR-KO} 세포에서 수행된, 루시페라제 리포터 검정은 AN06을 제외하고, 이들 유전자에 걸친 RROL의 조절 제어가 프로모터 수준에서 발생한다는 것을 입증한다 (도 3d). 리포터 벡터를 ASO1 또는 대조군 ASO와 함께 293T 세포로 공동-형질감염시켰다. 세포를 루시페라제 활성 검정을 위해 형질감염 후 48h에 수거하였다. 결과는 대조군과 비교하여 ASO1 형질감염된 세포에서의 정규화된 Gluc 활성의 %로서 제시된다. 5개의 MM 세포주에서의 RNAi-기반 LOF 스크린은 MM 세포 증식 및 생존에 대한 가장 유의한 영향을 갖는 RROL 표적 유전자로서 ACC1 (아세틸-CoA 카르복실라제 알파)을 확인하였다 (도 3e). 이들 결과는 MM 병리생물학에서의 RROL-ACC1 축의 역할을 추가로 탐구할 근거를 제공하였다. 도 3e에 제시된 바와 같이, 각각의 표적에 대한 2개의 siRNA, 플러스 대조군으로서 스크램블 siRNA (NC)가 사용되었다. 세포 생존율을 표시된 시점에 측정하였다. 이는 NC 형질감염된 세포의 %로서 표시된다. 일관되게, 상위 표적 ACC1의 프로모터 영역에서의 RROL 상호작용은 RNA 침전에 의한 염색질 단리 (ChIRP) 검정에 이어 qRT-PCR 분석에 의해 확인되었다 (도 3f 및 도 10h - 도 10i). 게다가, ACC1 유전자 로커스에서의 RROL의 빈번한 근위 국제화는 RROL 및 ACC1 프리-mRNA의 단일 분자 이중 RNA FISH 분석에 의해 입증되었다 (분석된 ~50%의 ACC1 프리-RNA 스팟 ($n=60$)에서의 최 근접 RROL 스팟까지 <300nm (도 3g).

[0171] 통틀어, 이론에 얽매이지 않으면서, 이들 데이터는 전사 조절 기능을 갖는 염색질-상호작용 lncRNA로서 RROL을 나타낸다.

[0172] 실시예 5: RROL은 ACC1 프로모터에서의 MYC 점유를 촉진한다.

[0173] 시험된 세포주 둘 다에서의 RROL 고갈 시 MYC 관련 네트워크의 강한 억제가 RROL-관련 유전자 발현 변화의 상류 조절 분석을 통해 관측되었다 (도 4a). 이 분석에 기반하여, MYC 및 RROL이 협력하여 MM 세포에서의 ACC1 발현을 촉진하는 지 여부가 평가되었다. MM 세포에서의 RROL 고갈은 실제로 ACC1 프로모터에서의 MYC 점유를 폐기하였지만, 그의 발현은 영향을 받지 않았다 (도 4b 및 도 11a). ACC1 프로모터에서의 MYC 점유를 입력 염색질의 %로서 계산하였다. 쌍형성된 샘플로부터의 MYC의 웨스턴 블롯 분석은 하기 각각의 히스토그램 플롯에 제시된다. GAPDH 또는 α -튜불린이 단백질 로딩 대조군으로서 사용되었다. 조건부 MYC Tet-오프 세포주 P493-6에서의 ACC1의 발현은 (Schuhmacher *et al.*, *Curr. Biol.* 9:1255-8 (1999)) 오직 높은 MYC 수준의 존재 하에 감소되었다 (도 4c). NC에 노출된 세포에서의 ACC1 발현 수준이 내부 참조로서 설정되었다. 게다가, RROL 및 ACC1 프리-RNA의 RNA FISH 분석을 MYC 단백질의 면역형광 분석 (FISH/IF)과 커플링함으로써, ACC1 유전자 로커스에서의 RROL 및 MYC의 공동-국제화가 도 4d에 예시된 바와 같이, 관찰되었다. RROL을 2개의 상이한 프로브 (RROL-ps1 및 RROL-ps2)를 사용하여 검출하였고, 대표적인 이미지는 도 4d에 각각의 RROL 프로브와 함께 제시된다.

[0174] RROL-MYC 복합체의 존재를 평가하기 위해, RNA 면역침전 (RIP) 검정을 MYC 항체로 수행하였으며, 이는 도 4e 및 도 11b - 도 11c에 예시된 바와 같이, MYC-결합된 RNA에서의 RROL 이소형 2 (RROL-2)의 특이적 풍부화를 제시하였다. LncRNA PVT1이 MYC 상호작용인자로서 공지된 역할에 대한 양성 대조군으로서 사용되었다 (도 4e). RNA-단백질 폴-다운 (RPPD) 실험은 RROL-2와의 복합체를 형성하는 MYC를 확인하였다 (도 4f 및 도 11d). 더욱이, RNA 효모-3-혼성체 (Y3H) 검정은 생체내 세포 모델에서의 RROL-MYC 상호작용을 확인하기 위해 조정되었다 (Hook *et al.*, *RNA* 11:227-33 (2005)). 이 검정에서, 직접적인 RROL-MYC 상호작용은 효모 콜로니 성장을 허용하는 리포터 유전자를 활성화시키고; 도 4g에 제시된 바와 같이, 본 발명자들은 혼성체 RNA로서의 RROL-2의 존재 하에 효모 콜로니 성장을 검출하였다.

[0175] 이들 데이터는 RROL이 전사 인자 MYC와의 RNA-단백질 복합체를 형성하여 ACC1 프로모터에서의 그의 염색질 점유 및 전사 활성을 촉진한다는 것을 입증하는 것으로 보인다.

[0176] 실시예 6: RROL은 MYC-WDR82 전사 복합체의 조립을 매개하며, 이는 ACC1의 전사 및 후성적 활성화를 야기한다.

[0177] MIR17HG의 표적화는 주로 MM을 포함하는, c-MYC 양성 (MYC+) 종양 세포를 사멸시킨다. 흥미롭게도, MYC는 종양 세포에서의 ACC1 (또한 ACACA로 공지됨) 발현 및 신생 지질형성을 재활성화시키는 것으로 공지되어 있으며, MYC+ 종양 세포는 이 물질대사 경로에 중독되어 가며, 이는 본원에서 MM 세포에서 입증된다 (도 11d - 도 11f).

도 11d는 MM 세포주 AMO1 및 H929에서의 MYC 억제제 10058-F4로의 치료 후 ACC1 mRNA를 제시한다. 원시 Ct 값을 GAPDH mRNA에 대해 정규화하고 비교 교차 역치 방법을 사용하여 계산된 $\Delta\Delta Ct$ 값으로서 표현하였다. DMSO (NC)로 치료된 세포에서의 ACC1 발현 수준이 내부 참조로서 설정되었다. 그러므로, MYC와 MIR17HG 사이의 기능적 상호작용이 조사되었다.

- [0178] MYC 활성은 전사 및 후성적 공동-조절인자와의 상호작용을 통해 조정되는 것으로 제시되어 있다 (Gouw *et al.*, *Cell Metab.* 30:556-572 (2019)). RROL이 이들 단백질-단백질 상호작용에 영향을 미치는 지 여부를 결정하기 위해, 근접-의존적 비오틴 확인 (BioID) 분석의 결과를 RROL 고갈의 존재 및 부재 하에, 공동-면역침전 검정에 이어 3개의 MM 세포주 (AMO1, H929 및 U266^{MYC+})에서의 질량-분광분석법 분석 (Co-IP/MS)과 통합하였다. 이 통합된 분석은 매우 높은-신뢰도 RROL-의존적 MYC 상호작용인자로서 WDR82를 강조하였고 (도 5a 및 도 12a, 및 표 5 - 표 8); RROL과 WDR82 사이의 직접적인 RNA-단백질 상호작용을 RPPD (도 5b) 및 RNA Y3H (도 5c) 검정 둘다에 의해 추가로 확인하였다. 도 5c에서의 흑색 화살표는 효모 콜로니 성장을 나타낸다. lnc-17-92TV1의 말 단절단된 버전을 사용하는 분석은 3'-단부 영역을 추가로 나타냈으며, 이는 MM 세포에서의 MYC와의 상호작용에 특히 관련이 있는 바와 같은, miR-17-92를 포함하지 않는다 (도 11g).
- [0179] 생체내 모든 172개의 MYC 상호작용인자는 표 5에 열거된다. BioID 검정으로부터 확인된 모든 18개의 RROL-의존적 생체내 MYC 상호작용인자는 표 6에 열거된다.
- [0180] MM 세포에서의 모든 176개의 MYC 상호작용인자 (2개 초과인 세포주에서 확인된 바와 같음)는 표 7에 열거된다. MM 세포에서의 모든 8개의 RROL-의존적 MYC 상호작용인자 (2개 초과인 세포주에서 확인된 바와 같음)는 표 8에 열거된다.

[0181] 표 5: 생체내 MYC 상호작용인자 (n=172)

유전자	P 값	유전자	P 값	유전자	P 값
AARS2	0.000	TOR1AIP1	0.012	ASB6	0.028
EDC4	0.000	HCFC1	0.012	SNW1	0.029
KDM3B	0.000	AP3B1	0.012	CDK12	0.03
DMAP1	0.000	RPRD1B	0.012	WDR6	0.031
IPO4	0.000	CPSF4	0.012	CANX	0.031
RUVBL2	0.000	ARF5	0.013	ANKFY1	0.032
NCOR1	0.000	CHD1	0.014	TOX4	0.032
WDR82	0.001	FAM96B	0.014	GIPC1	0.033
SAE1	0.001	U2SURP	0.014	SMAD5	0.033
ATP1A1	0.001	GEMIN5	0.014	CDCA2	0.033
FIP1L1	0.001	TAF5L	0.015	PSME3	0.034
TUBB2B	0.002	TPR	0.015	SALL2	0.034
PDCD6	0.002	ERLIN2	0.015	ATP2B4	0.035
GTF2E2	0.002	STAT3	0.016	MAGED2	0.035
RPL14	0.002	ARID3B	0.016	USP10	0.035
SAP30BP	0.003	SAR1B	0.016	CHD8	0.035
SRPRB	0.003	MAD2L1	0.017	ALAS1	0.035
SAFB	0.003	NCOR2	0.017	API5	0.035
RSU1	0.003	PBRM1	0.017	R0214	0.035
DHFR	0.003	DIDO1	0.017	EMD	0.036
SMUG1	0.004	IRF2BP2	0.017	CBLL1	0.036
TUBB4A	0.004	RACGAP1	0.017	BIN3	0.036
RUVBL1	0.005	ACTL6A	0.017	MAP4	0.036
MAP7D1	0.005	EEF1A2	0.018	SETDB1	0.036
LSM2	0.005	CIZ1	0.018	HBA1	0.036
SF1	0.005	EIF2B2	0.018	IPO9	0.037
DKFZp686L22104	0.006	Z0318	0.018	SEC22B	0.037
NOB1	0.006	CBWD1	0.019	OSBP	0.037

[0182]

PRRC2B	0.006	ITPA	0.019	MDC1	0.037
ECD	0.006	CSNK2A2	0.019	CEP85	0.038
RPRD2	0.006	TUBB	0.02	SAR1A	0.038
ATXN10	0.006	IQGAP2	0.02	TAF6	0.038
TOR1AIP1	0.006	TRNT1	0.02	PPM1G	0.038
TAF6L	0.007	NELFA	0.022	ZBTB33	0.039
TK1	0.007	GAPVD1	0.022	HSPA14	0.039
PTRH2	0.007	EIF2S2	0.022	RIF1	0.039
SCML2	0.007	RTKN	0.023	SRP72	0.039
TUBA1C	0.007	LRRC47	0.023	SNRNP40	0.04
PSMD11	0.008	XPO5	0.023	HIST1H1C	0.041
TRIM4	0.008	PSMB6	0.023	LIMA1	0.041
SF3A1	0.008	TUBB4B	0.024	AP3M1	0.041
EP400	0.008	CTPS2	0.024	TTL12	0.042
NUBP2	0.008	EIF5	0.024	EMC4	0.043
GIGYF2	0.008	JUN	0.024	CHORDC1	0.044
ARID1A	0.008	MGA	0.025	IPO8	0.044
DVL2	0.009	COG8	0.025	GATAD2A	0.045
GTF2F2	0.01	HAT1	0.026	ZC3H14	0.045
TTC37	0.01	RPL37A	0.026	AP2B1	0.047
STAU1	0.01	RING1	0.026	C6orf120	0.047
PIGU	0.01	NUFIP2	0.027	FANCI	0.047
CLPTM1	0.011	DYNC1LI1	0.027	POLR2B	0.047
EIF4E	0.011	TCAF1	0.027	KTI12	0.047
TRRAP	0.011	WDR5	0.028	GON4L	0.048
XRCC6	0.011	HAUS8	0.028	EIF3H	0.048
SCAF4	0.011	USP33	0.028	NUP62	0.049
CRTC3	0.011	GPATCH8	0.028	VBP1	0.049
ITPK1	0.012	PCGF6	0.028	RPL30	0.049
I02	0.012				

[0183]

[0184]

표 6: BioID 검정으로부터의 RROL-의존적 생체내 MYC 상호작용 (n=18)

유전자	P 값	유전자	P 값	유전자	P 값
AARS2	0.000	GIGYF2	0.003	CRTC3	0.006
KDM3B	0.000	AP3B1	0.004	EEF1A2	0.007
PTRH2	0.001	DMAP1	0.005	SAE1	0.007
SNW1	0.001	WDR82	0.006	RUVBL2	0.007
PRRC2B	0.001	EIF4E	0.006	FAM96B	0.008
EDC4	0.002	RPRD2	0.006	ARID3B	0.009

[0185]

[0186] 표 7: MM 세포에서의 MYC 상호작용인자 (>2개의 세포주; n=176)

명칭	종수	요소
AMO1 H929 U266 ^{MYC+}	7	MAX, CDSN, NELFCD, WDR82, CAPNS1, RPL34, RNASEH2A
AMO1 H929	137	RPS17, NCBP2-AS2, HSPB1, PMPCA, AIFM1, MRPL4, NAXE, COX6C, LONP1, PTC3, FAHD1, PRDX6, TUBAL3, GRPEL1, PDIA3, MRPL19, PCMT1, SRI, MYO1C, RPLP1, GMPPA, SF3B6, GDI1, ARHGFE2, EFTUD2, COX7A2, ACTR1A, ISOC2, CBR4, HSPA8, GET4, DHX15, ARPC3, RPS8, OSGEP, RSU1, SSR3, PPP3CC, IFI16, OXCT1, LSM3, MOGS, SNRPE, NDUFA13, FAU, PAFAH1B3, QPCTL, SELENOF, HIST1H2BB, PCNA, 43710, EIF2B2, NAP1L4, ATP6V1A, PSIP1, MYC, RFC4, GNB2, RPS24, VCP, PSMA5, ACTN2, PSMC1, STMN1, Ighg1, GAR1, NDUFB3, CNOT9, PARP1, FMNL1, BAG6, PSMA2, PSMA4, BRI3BP, WDR61, PPIH, TLL12, LSP1, NSF, NAMPT, BLMH, PRSS2, RPS10, IGKC, COPE, UQCC2, EIF4A1, RPL15, MRPL39, DDX3Y, HSPA14, PABPC4, ARFIP1, DKFZp686J1372, HNRNPAB, AIMP1, SYNCRIP, MRPS23, SNRPGP15, MTAP, MSI2, TMEM109, PAFAH1B2, SORD, MCM4, RPL9, PDHX, GNG7, RPA3, ISOC1, SEC11A, CAT, CANX, SRM, NDUFA9, ARF3, NUDT5, PSMB3, HDGF, SDF2L1, MPRIP, TRMT10C, PSME3, NDUFS3, EC11, PAM16, USP39, RPL38, RPL14, IDH3B, EIF3G, HNRNPA1L2, CCT6A, FKBP2, NDUFA5, NCLN, DNAJC19
AMO1 U266 ^{MYC+}	9	LAMTOR3, ARPC2, FAM207A, ASL, SDC1, BAG2, FLOT1, MIF, MAGED2
H929 U266 MYC+	23	MRPS35, THRAP3, YARS2, PPIL1, C19orf25, FAM98B, ALDH1L2, SEC13, PSMC4, FLNB, DKC1, AUH, TPM4, GMPPB, ACTR1B, RAD50, PSMD4, HLA-B, HNRNPA3, CDKN2C, POLR2E, DDX41, TOP1

[0187]

[0188] 표 8: MM 세포에서의 RROR-의존적 MYC 상호작용인자 (>2개의 세포주; n=8)

명칭	종수	요소
AMO1 H929 U266 ^{MYC+}	1	WDR82
AMO1 H929	5	RNASEH2A, COX6C, ARFIP1, IDH3B, RPA3
H929 U266 ^{MYC+}	2	C19orf25, RAD50

[0189]

[0190]

WDR82는 활성 로커스의 전사 시작 부위에서 히스톤 H3 'Lys-4' 트리메틸화 (H3K4me3)를 촉매하는 SET1 메틸트랜스퍼라제 복합체의 조절 성분이며 (Lee and Skalnik, Mol. Cell. Biol. 28:609-18 (2008)), 염색질에 대한 MYC 결합 및 전사촉진에 대해 필요 조건이다 (Amente *et al.*, Am. J. Cancer Res. 1:413-418 (2011)). 일관되게, WDR82의 고갈은 H3K4me3의 전반적인 감소 (도 5d 및 도 12d) 및 ACC1 프로모터에서의 MYC의 감소된 점유 (도 5e)를 초래하였으며, 이는 MM 세포에서의 감소된 ACC1 발현 (도 5f)을 초래한다. 도 5d는 WDR82 및 H3K4me3의 웨스턴 블롯 분석 (입력 염색질의 %로서 표시됨)을 제시한다. 라민 A/C가 단백질 로딩 대조군 (핵 용해물)으로서 사용되었다. 도 5e는 WDR82 및 쌍형성된 샘플로부터의 MYC의 웨스턴 블롯 분석 (입력 염색질의 %로서 표시됨)을 제시한다. α-튜불린이 단백질 로딩 대조군으로서 사용되었다. 도 5f에서의 데이터는 GAPDH mRNA에 대해 정규화되고 비교 교차 역치 방법을 사용하여 계산된 ΔΔCt 값으로서 표현된 원시 Ct 값으로 제시된다. NC로 형질감염된 세포에서의 ACC1 발현 수준이 내부 참조로서 설정되었다.

[0191]

도 5g는 쌍형성된 샘플로부터의 WDR82-GFP의 웨스턴 블롯 분석으로서 집노틱 AS01에 24h 동안 노출된 AMO1의 ACC1 프로모터에서의 WDR82-GFP 점유의 ChIP-qPCR 분석을 예시한다 (입력 염색질의 %로서 표시됨). α-튜불린

이 단백질 로딩 대조군으로서 사용되었다. 더욱이, 이소성 WDR82-GFP 융합 단백질을 발현하는 MM 세포를 사용하여 (도 12b), RROL 발현이 H3K4 메틸화 상태에 전반적으로 영향을 미치지 않으면서 (도 5i), ACC1 프로모터에서의 WDR82 점유에 필수적임 (도 5h)이 입증되었다. 도 5h는 쌍형성된 샘플로부터의 H3K4me3의 웨스턴 블롯 분석에 제시된 바와 같은 짐노틱 ASO1에 24h 동안 노출된 AMO1 및 H929의 ACC1 프로모터에서의 H3K4me3 점유의 ChIP-qPCR 분석을 예시한다 (입력 염색질의 %로서 표시됨). 라민 A/C가 단백질 로딩 대조군 (핵 용해물)으로서 사용되었다. *p < 0.05, 스튜던트 t 검정. 추가적으로, RROL 고갈은 총 H3K4me3에 대한 검출가능한 영향 없이 (도 5i), ACC1 프로모터 부위에서의 감소된 수준의 H3K4me3을 초래하였다.

[0192] 염색질 스캐폴드로서의 RROL의 역할을 제시하는 것은 ACC1의 발현을 제어하는, MYC-WDR82 다중단백질 전사 복합체의 조립을 매개한다.

[0193] 실시예 7: RROL/MYC-ACC1 축은 신생 지질형성을 조절한다.

[0194] ACC1은 신생 지질형성 (DNL) 동안 속도 제한 단계이고 (Beloribi-Djefafilia *et al.*, *Oncogenesis* 5:e189-10 (2016)), 암 세포에서 이상 활성화된 물질대사 경로인 (Roehrig and Schulze., *Nat. Rev. Cancer* 16:732-749 (2016)), 말로닐-CoA로의 아세틸-CoA의 카르복실화를 촉매한다. 여기서, MYC 또는 ACC1 억제와 유사하게 RROL 고갈은 MM 세포주 및 CD138+ MM 환자 세포 둘 다에서 지질 풀로의 C¹⁴-방사성표지된 글루코스의 혼입을 유의하게 감소시켰고 - 감소된 DNL을 나타낸다 (Zadra *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116:631-640 (2019)) (도 6a). RROL을 ASO1을 사용하여 고갈시켰고, MYC를 소분자 10058-F4를 사용하여 억제하였고, ACC1을 IPTG-유도성 shRNA를 사용하여 고갈시켰다. 결과는 음성 대조군 (각각 NC ASO, DMSO, 및 비유도됨)의 백분율로서 표현된다. 이 억제는 miR-17-92s의 합성 억제제로의 MM 세포의 형질감염 후 관측되지 않았으며 (도 13a), 이는 miR-17-92 항-miR (각각 25nM)로의 AMO1의 형질감염 후 48h에, 지질로의 C¹⁴-글루코스의 혼입을 예시한다. 결과는 비유도된 세포의 백분율로서 표현된다. NS는 스튜던트 t 검정 후 p > 0.05를 나타낸다. MM 세포에서의 RROL 억제 후 액체 크로마토그래피 - 질량 분광분석법 (LC-MS) 기반 지질 프로파일링은 DNL을 통해 생산된 여러 포화 (SFA) 및 단일불포화 (MUFA) 인지질 종의 고갈 (도 6b)을 확인하였다. ASO1로의 AMO1 및 H929의 치료 후, 포화 (SFA) 또는 단일불포화 (MUFA) 아실 쇠로의, 주요 막 인지질 부류 [포스파티딜글리세롤 (PG), 포스파티딜에탄올아민 (PE), 포스파티딜세린 (PS), 포스파티딜콜린 (PC) 및 포스파티딜이노시톨 (PI)]의 조정을 제시하는 지질 프로파일링 분석은 도 6b에 제시된다 (Rysman *et al.*, *Cancer Res.* 70:8117-26 (2010); Zaidi *et al.*, *Prog. Lipid Res.* 52:585-9 (2013)). 게다가, ACC1 활성화의 주요 하류 산물, 팔미테이트 (PA)의 부가는 MM 세포에서의 RROL 고갈의 항-증식 (도 6c, CCK-8 증식 검정) 및 아포토시스-유발 (도 6d) 효과를 유의하게 구제하였으며, 이는 MM에서의 RROL의 종양 촉진 활성화에서의 DNL의 역할을 확인하고 도 6e의 제안된 모델에 예시된 바와 같이, 지질형성의 RNA 조절인자의 명칭을 정당화시킨다. 도 6d는 BSA (대조군) 또는 BSA-PA (20 μM)로 보충된, 표시된 농도로 ASO1에 6일 동안 노출된 AMO1에서의 아넥신 V / 7-AAD 유동 세포측정 검정을 제시한다.

[0195] 실시예 8: RROL의 치료 억제제는 인간 MM의 동물 모델에서 강력한 항-종양 활성을 시험관내 및 생체내 발휘한다.

[0196] 80개 초과인 완전 포스포리티오에이트 (PS), 2'-O-메톡시에틸 (2'-MOE)-변형된, 지질-접합된 ASO를 RROL의 치료 가능성을 탐구하고 억제제를 개발하기 위해 스크리닝하였다. 이들 ASO를 RROL (꺾-meR)의 RNase H-매개된 분해를 유발하거나 또는 RNase H-독립적인 메커니즘을 통해 기능을 발휘하는 (입체구조적 차단제) 이들의 가능성에 대해 스크리닝하였다 (Puttaraju *et al.*, *Nat. Med.* 27:526-535 (2021)) (도 7a 및 도 14a - 도 14c). 이 절차는 주요 화합물로서 18-mer 토코페롤 (T)-접합된 꺾-meR G2-15b-T ("G") 및 18-mer 토코페롤 (T)-접합된 입체구조적 차단제 SB9-19-T ("SB")를 확인하였으며, 둘 다 MM 세포주의 대형 패널 뿐만 아니라 CD138+ 1차 MM 세포에서 강한 항-증식 활성 (세포 성장 억제, CGI > 50%)을 생산하고; 비-악성 세포주 (THLE-2, HK-2, HS-5 및 293T) 및 3명의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 아긴다 (CGI < 50%) (도 7b). 도 7b는 MM 세포주 AMO1, ABZB, ACFZ, H929, MM.1S, MM1.R, U266, LR7, R8226, KMS-11, KMS-12-BM, 및 2명의 MM 환자 (MM-Pt)로부터의 CD138+ 세포, 4개의 비-악성 세포주 (THLE-2, HK-2, HS-5 및 293T), 및 3명의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 제시한다. 세포 생존율을 G2-15b*-TO (G) 또는 SB9-19-TO (SB) 또는 대조군으로서의 비히클 (-)로의 형질감염 후 48h (또는 MM-pt의 경우 24h)에 측정하였다. 세포 증식은 비히클로 형질감염된 세포와 비교하여 계산된다.

[0197] RROL을 표적화하는 치료 ASO를 개발하기 위한 다단계 스크린의 시험 결과는 도 14a - 도 14c에 제시된다. 단계 1의 결과는 도 14a에 제시되며, 이는 총 32개의 ASO에 대해 "G" 또는 "SB" 입체형태의 16개의 서열 (>20-mer)인, RROL 상의 ASO-접근가능한 스트레치가 시험되었다는 것을 확인하였고; KD 활성화에 기반하여 AMO1 세포에서 qRT-PCR에 의해 평가하였고, 서열 G2 (21-mer) 및 SB9 (22-mer)를 추가 조사를 위해 선택하였다. 단

계 2의 결과는 G2 및 SB9 설계를 최적화한, 도 14b에 제시되며, 이들 서열을 미세-조정하여 G2의 경우 20-mer (n=8) 및 18-mer (n=5) 유도체 ASO, 및 SB9의 경우 22-mer (7), 20-mer (n=8) 및 18-mer (n=5) 유도체 ASO를 획득하였고; KD 활성화에 기반하여 AMO1 세포에서 qRT-PCR에 의해 평가하였다. 18-mer 유도체 서열 G2-15 및 SB9-19를 추가 조사를 위해 선택하였다. 단계 3의 결과는 도 14c에 제시되며, 이는 팔미트산 (P) 또는 콜레스테롤 (C) 또는 토코페롤 (T)과 접합된 2개의 선택된 단계 2 분자의 시험을 제시한다. KD 활성화에 기반하여 AMO1 세포에서 qRT-PCR에 의해 평가하였다. TO-접합된 분자를 주요 화합물로서 선택하였다. G2-15-T ASO를 10-mer "코어" DNA 겹을 8-mer "코어" DNA 겹 (G2-15b-T)으로 대체함으로써 추가로 최적화하였다.

[0198] 면역손상된 NOD SCID 마우스에서의 피하 AMO1 이종이식편 모델이 화합물 둘 다의 생체내 항-종양 활성을 평가하는데 사용되었다. 여기서, 종양 성장의 유의한 감소가 도 7c에 예시된 바와 같이, G2-15b*-TO (G; n=5; 종양 성장 억제, TGI=76%) 또는 SB9-19-TO (SB; n=5; TGI=69%) 또는 비히클 (NK; n=5)로의 치료 주기 후 21일에 관측되었다. 이 치료 후 마우스로부터 회수된 종양의 분석은 RROL의 감소된 발현 (도 7d) 및 그의 표적 (도 7e), 표적 BIM (*BCL2L1*로 공지됨) (도 7j), 뿐만 아니라 감소된 수준의 트리팔미틴 (도 7f), DNL 산물 팔미테이트에 대한 대용물 (Falchook *et al.*, *EClinicalMedicine* 34:100797-11 (2021))을 확인하였으며; 이는 종양 세포에 의한 생체내 G2-15b-T 및 SB9-19-T의 효율적인 흡수를 입증한다. 게다가, 과잉 독성은 마우스에서 관측되지 않았다. 도 7d 및 도 7e에서의 데이터는 G2-15b*-TO (G; n=1) 또는 SB9-19-TO (SB; n=1) 또는 대조군으로서의 비히클 (NC; n=1)로 치료된 동물로부터 회수된 샘플을 제시한다. 원시 Ct 값을 ACTB mRNA에 대해 정규화하고 비교 교차 역치 방법을 사용하여 계산된 $\Delta\Delta Ct$ 값으로서 표현하였다. NC에서의 발현 수준이 내부 참조로서 설정되었다.

[0199] G2-15b-T 및 SB9-19-T의 유의한 항-MM 활성을 미만성 골수종의 공격적인 모델에서 확인하였으며, 여기서 MOLP8-luc+ MM 세포의 종양 성장은 생물발광 영상 (BLI) 측정에 의해 평가된다. 이 모델에서, 종양 성장은 G2-15b*-TO (G; n=8; TGI=84%) 또는 SB9-19-TO (SB; n=6; TGI=52%) 또는 비히클 (NC; n=11)로의 치료 주기 후 유의하게 길항작용되었다. G2-15b*-TO로의 치료는 8마리의 마우스 중 2마리 (25%)에서 종양 클리어런스를 초래하였다 (도 7g). 도 7g의 좌측에, 산점도는 생물발광 강도의 분석을 제시한다. 흑색 막대는 중앙값을 나타낸다. 생물발광을 치료 주기의 종료 시 (제15일) 측정하였다. 도 7g의 우측에, 이미지 취득이 제시된다. 종양 세포의 실패한 I.V. 주사로 인해 연구로부터 제거된 마우스는 흑색 직사각형에 의해 커버된다. 중요하게도, 억제제 둘 다는 동물 생존을 유의하게 연장하였다 (도 7h).

[0200] 마지막으로, 진행기 환자로부터 수득된 CD138+ MM 세포의 꼬리-정맥 주사에 의한 임상적으로 관련이 있는 PDX-NSG 마우스 모델 (PDX-NSG)이 사용되었다. 이 모델에서 종양 성장을 대용물로서 인간 κ 경쇄를 사용하는 혈청 샘플에서 모니터링하였다. 놀랍게도, G2-15b-T (G; n=2)로의 치료 주기 후 종양 성장의 퇴행이 관측되었고 (도 7i), 효과는 보르테오미 (BZT; n=2, 양성 대조군)과 비교할 만하였고 비히클 대조군은 NC로 표시된다 (n=3). 흑색 화살표는 치료를 나타낸다.

[0201] 상기 실시예 8은 lncRNA RROL이 MM에서 주요 의존성임을 입증한다. RROL 숙주 유전자, MIR17HG는 보통 드라이버 역할로 인간 암에서 증폭되고/거나 과다발현된다. 작동 이론에 얽매이지 않으면서, RROL은 염색질 점유 및 전사 인자 및 후성적 조정인자, 예컨대 MYC 및 WDR82와의 상호작용을 통한 유전자 발현의 조절인자이다.

[0202] 데이터는 또한 RROL-MYC-WDR82 복합체가 속도-제한 효소 ACC1을 통해 DNL 경로를 활성화시킴으로써 종양 세포 물질대사에 영향을 미친다는 것을 제시한다. 이 동화작용 경로는 주로 정상 성인에서 간 및 지방 조직에 제한되나 아직 완전히 기재되지 않은 메커니즘을 통해 암 세포에서 재활성화된다 (Beloribi-Djefafia *et al.*, *Oncogenesis* 5:e189-10 (2016); Roehrig and Schulze., *Nat Rev Cancer* 16:732-749 (2016)). MYC는 ACC1 및 다른 유전자를 통해 DNL을 활성화시킴으로써 종양 세포 물질대사의 재프로그래밍에 연루되어 있다 (Stine *et al.*, *Cancer Discov* 5:1024-39 (2015)). 결과적으로, DNL은 ACC1의 약리학적 억제에 영향을 받기 쉬운, MYC-구동된 암의 발병 및 진행을 위한 필수적인 경로로서 부상하였다 (Gouw *et al.*, *Cell Metab* 30:556-572 (2019)). 종양형성에서의 ACC1 및 DNL의 역할은 MM에서 특히 관련이 있는 것으로 보이며, 여기서 종양 세포는 모노클로날 이뮤노글로불린의 끊임없는 생산과 커플링된 악성 세포 성장에 의해 제기된 높은 바이오에너지 및 생물합성 요구를 만족시키기 위해 이들의 물질대사 경로를 조정할 필요가 있다 (El Arfani *et al.*, *Int J Mol Sci* 19:1200-19 (2018); Masarwi *et al.*, *JBMR Plus* 3:e10173-10 (2019)).

[0203] 생체내 실시예는 상이한 작용 메커니즘 (즉, RNase H-의존적 또는 -독립적)을 통해 RROL을 표적화하는 본 발명의 ASO 중 2개를 이용하였다. RNA 의약에서의 최근 진보로 (Crooke *et al.*, *Cell Metab* 27:714-739 (2018); Damase *et al.*, *Front Bioeng Biotechnol* 9:628137-24 (2021); Sullenger and Nair., *Science* 352:1417-20

(2016)) 질환-드라이버 유전자를 치료 길항작용하는 ASO의 사용은 점점 더 가능해지고 있으며 (Dhuri *et al.*, J Clin Med 9:2004-24 (2020); Puttaraju *et al.*, Nat Med 27:526-535 (2021)), 이는 MM 요법을 포함한다 (Mondala *et al.*, Cell Stem Cell 28:623-636 (2021); Morelli *et al.*, Blood 132:1050-1063 (2018); (Mondala *et al.*, 2021; Morelli *et al.*, 2018).

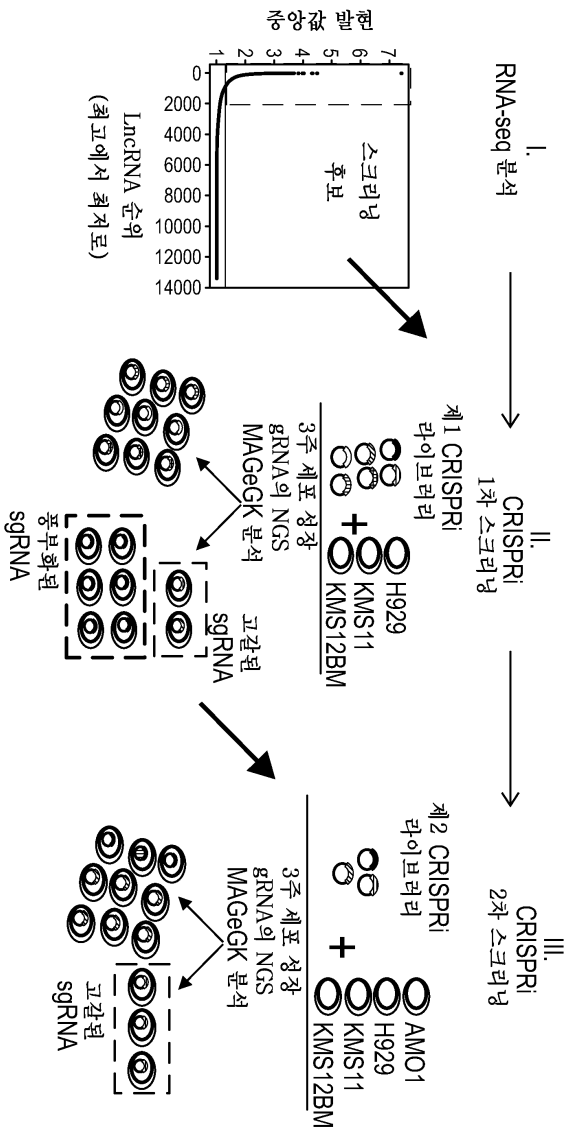
[0204] 결론적으로, 이 실시예는 MYC-WDR82 단백질 복합체 형성 및 그의 염색질 결합을 용이하게 하여, 지질 물질대사 및 궁극적으로 종양 세포 성장에 영향을 미치는 lncRNA로서의 RROL을 확립한다.

[0205] 모든 특허 공개 및 비-특허 공개는 본 개시내용이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자의 수준을 나타낸다. 이들 모든 공개 (언급되는 그의 임의의 특정 부분을 포함함)는 각각의 개별 공개가 구체적으로 및 개별적으로 참조로서 포함되는 것으로 표시된 바와 동일한 정도로 본원에 참조로서 포함된다.

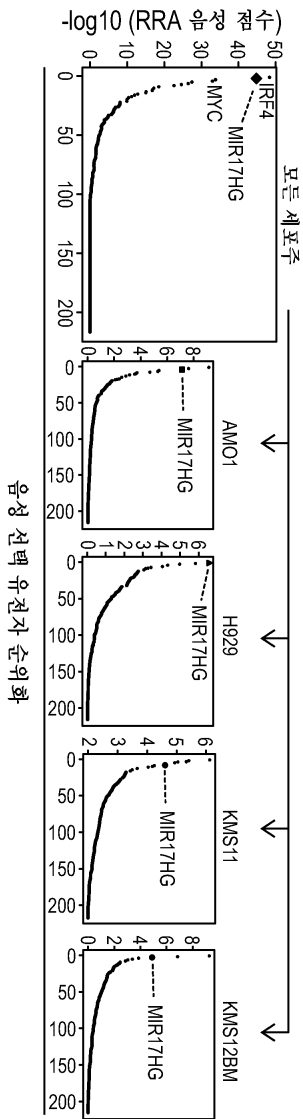
[0206] 비록 본 개시내용이 본원에서 특정한 실시양태와 관련하여 기재되어 있지만, 이들 실시양태는 단지 본 개시내용의 원리 및 적용을 예시하는 것임이 이해되어야 한다. 그러므로 수많은 변형이 예시적인 실시양태에 대해 이루어질 수 있고 다른 배열이 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 개시내용의 사상 및 범주를 벗어나지 않으면서 고안될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

도면

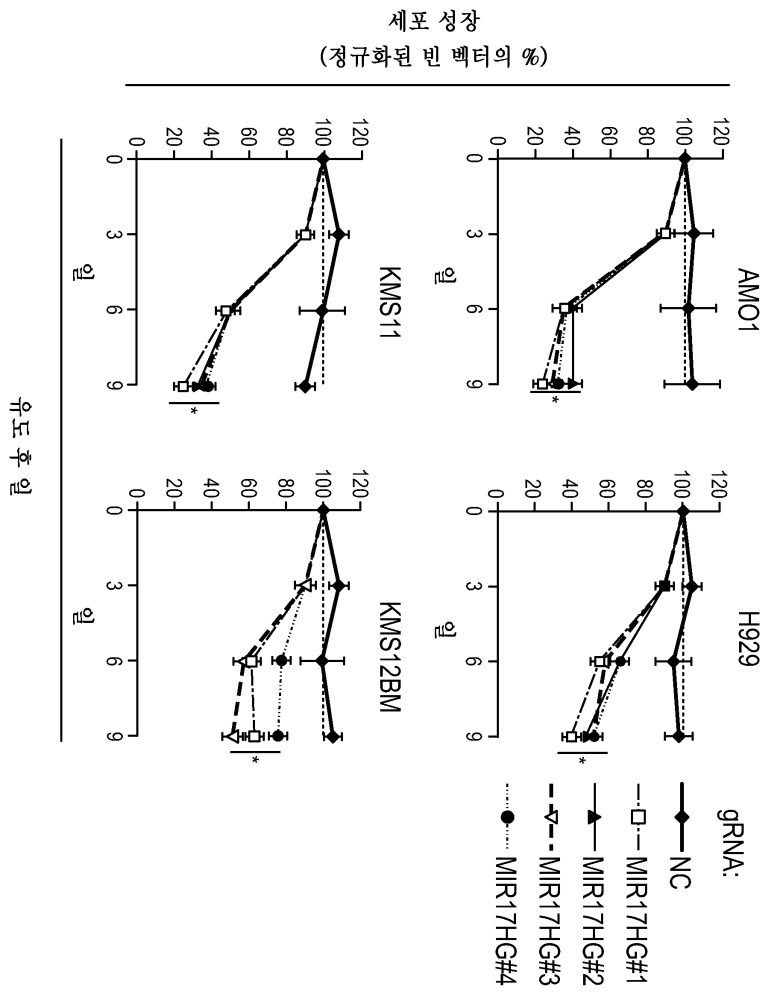
도면1a



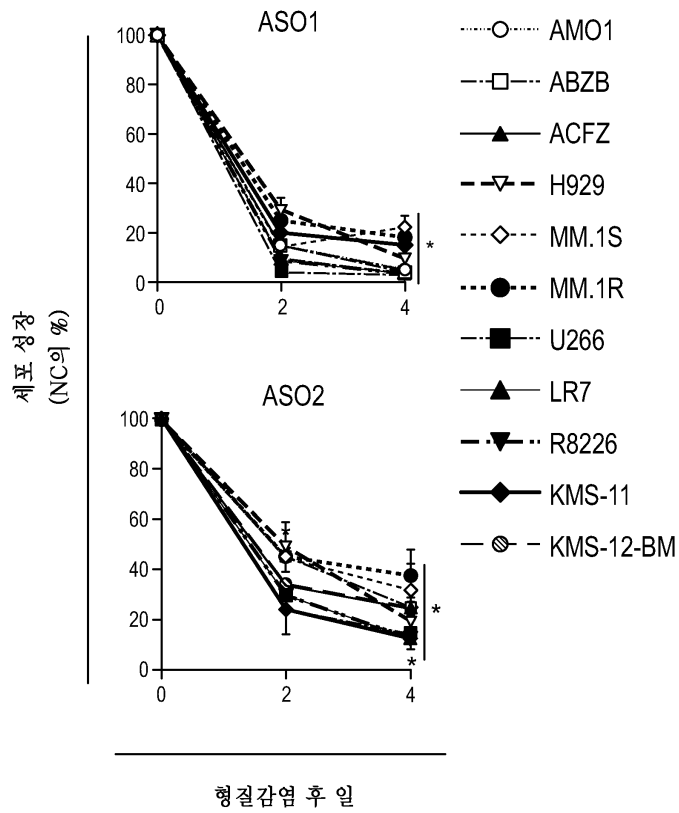
도면1b



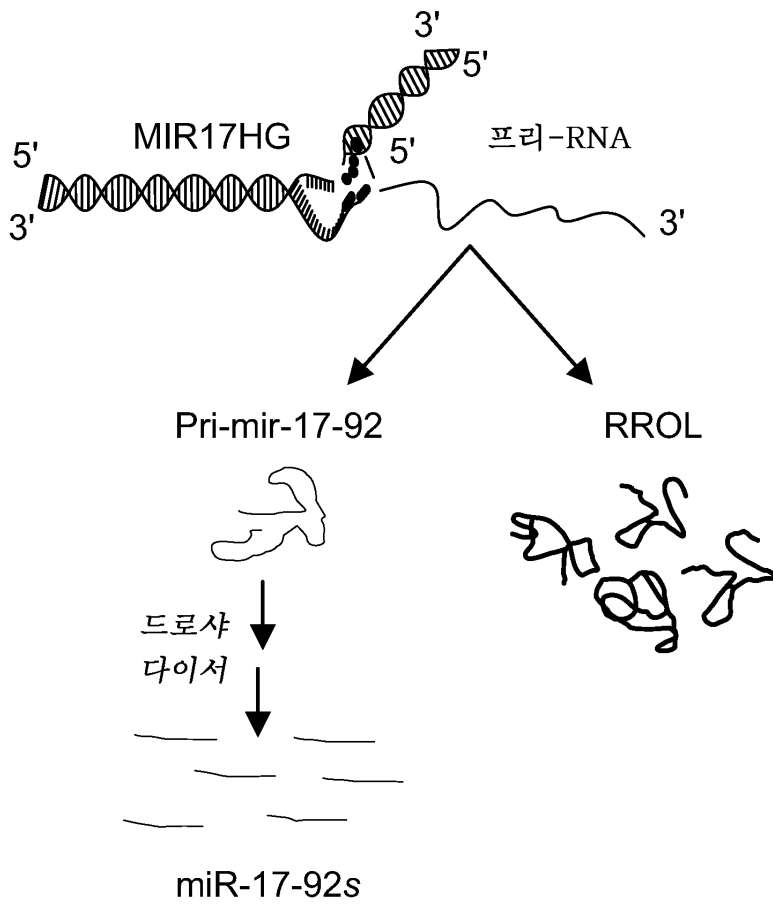
도면1c



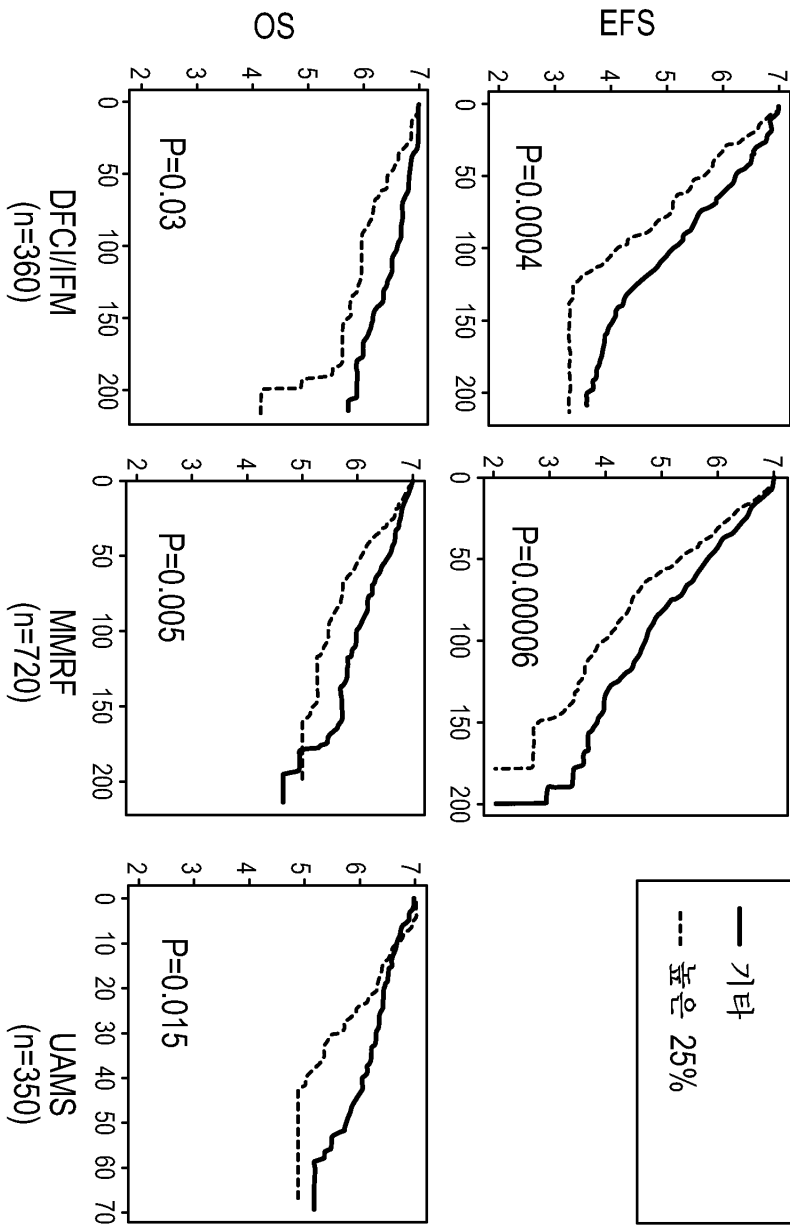
도면1d



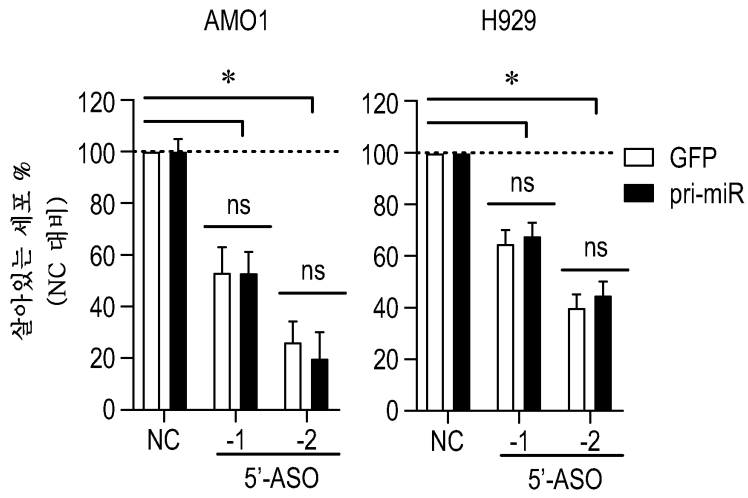
도면2a



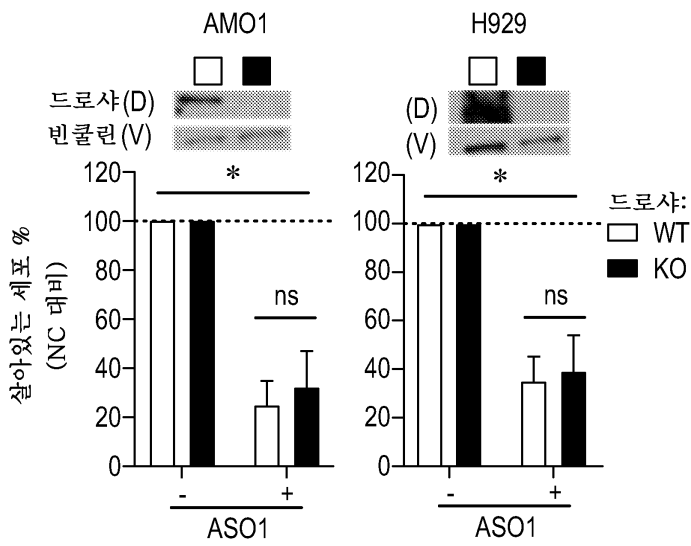
도면2b



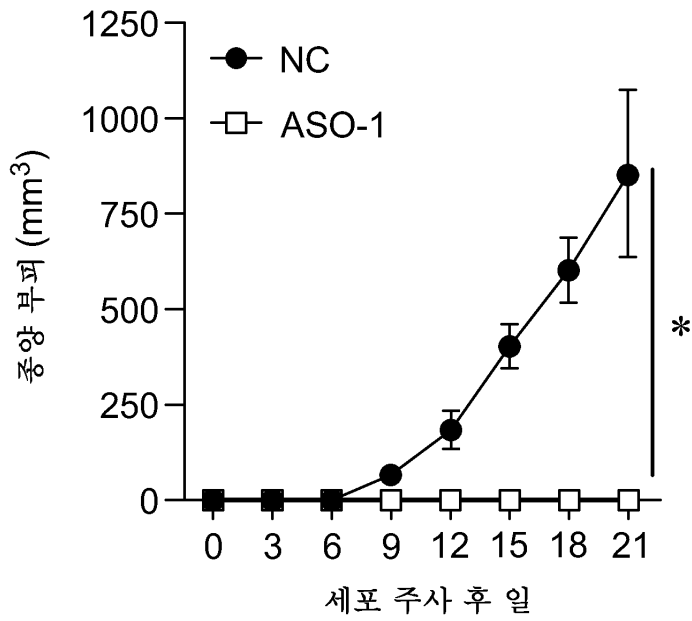
도면2c



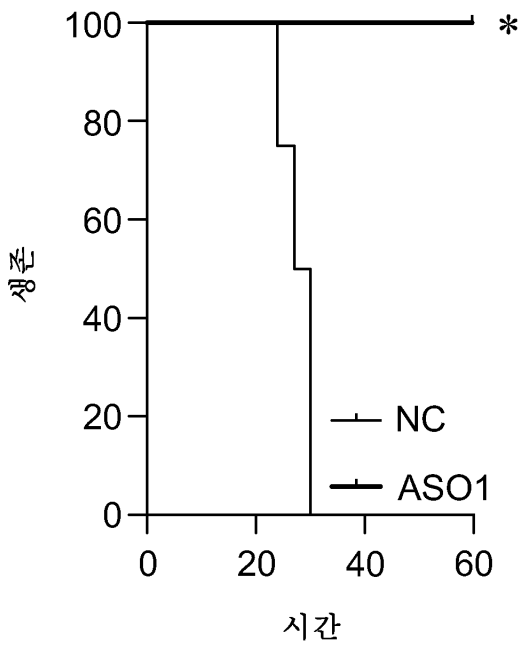
도면2d



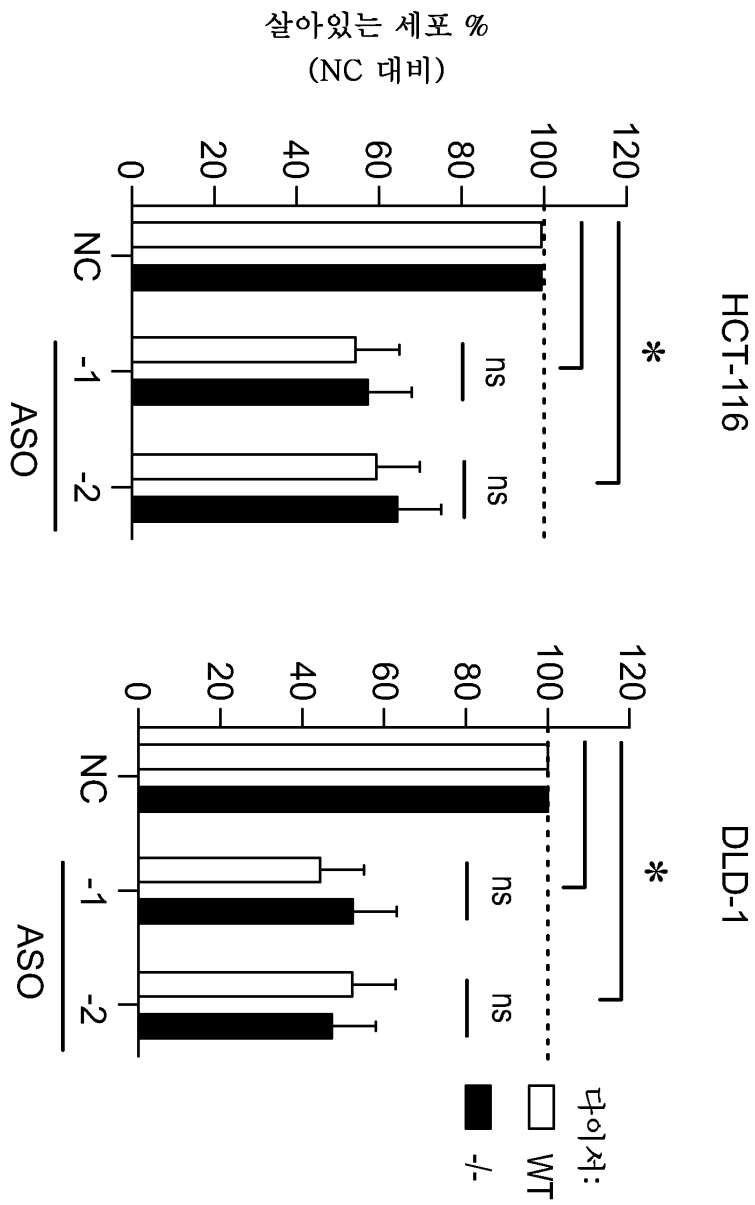
도면2e



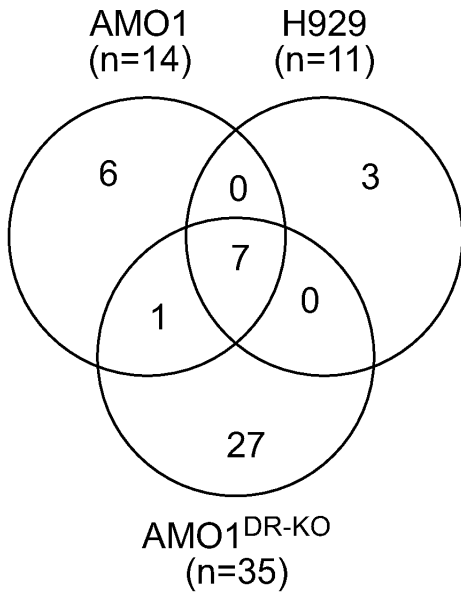
도면2f



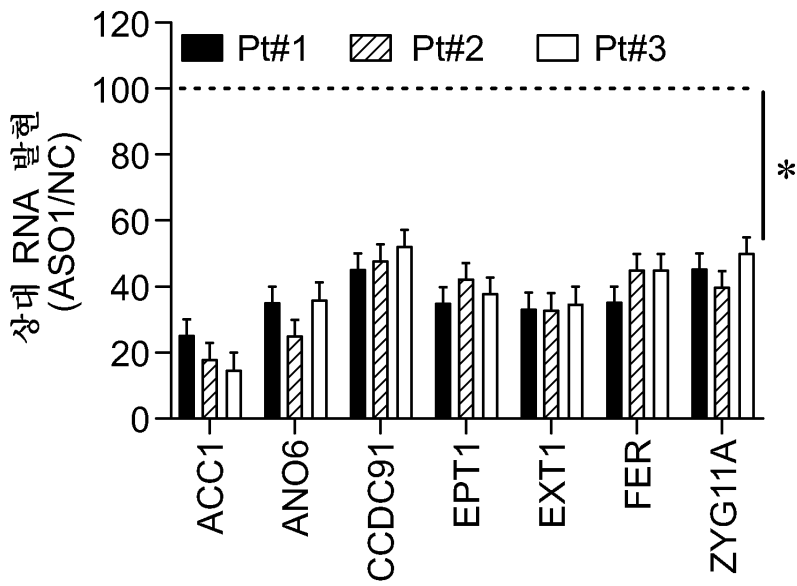
도면2g



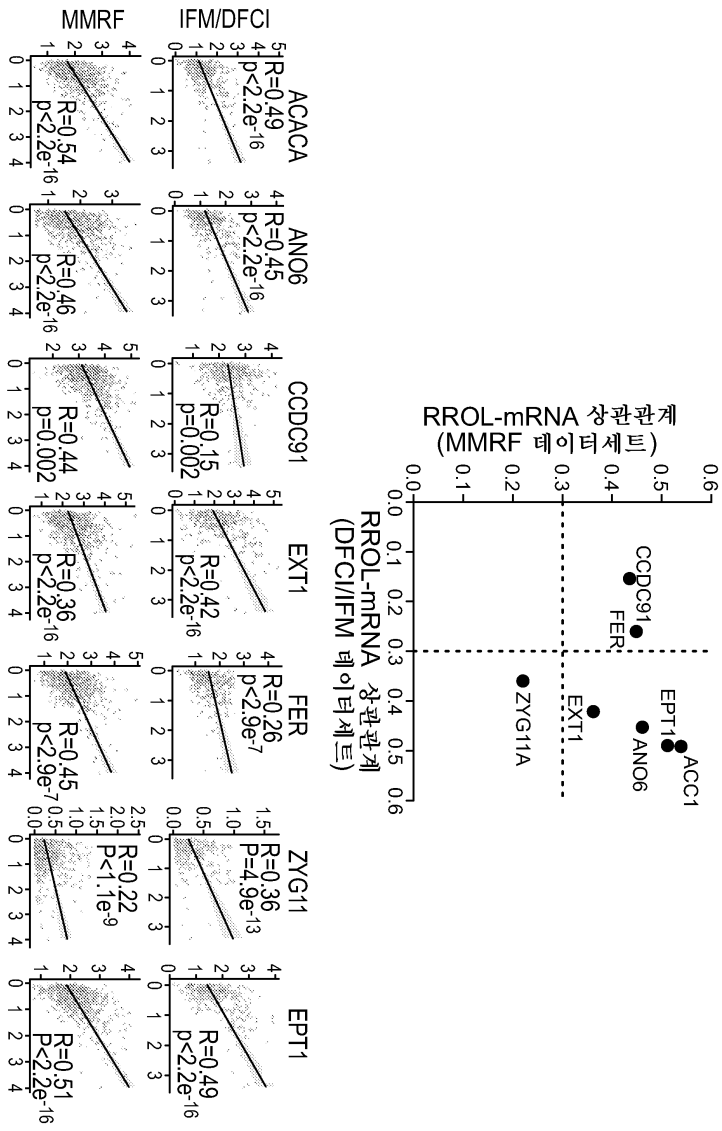
도면3a



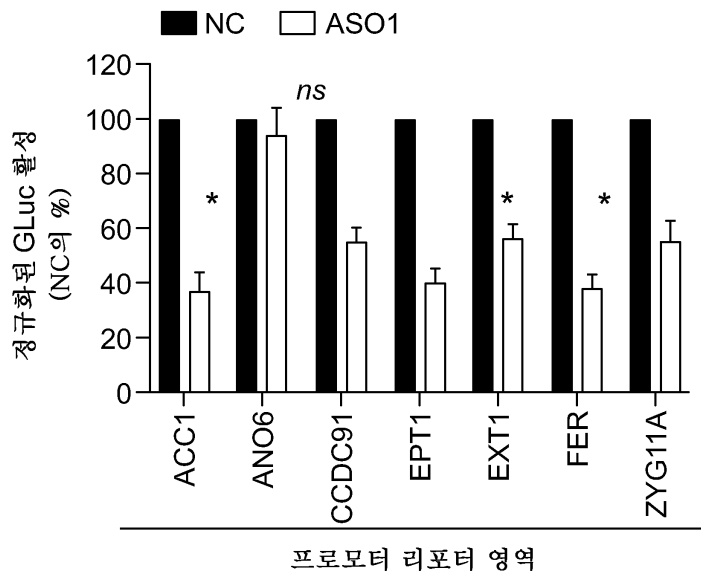
도면3b



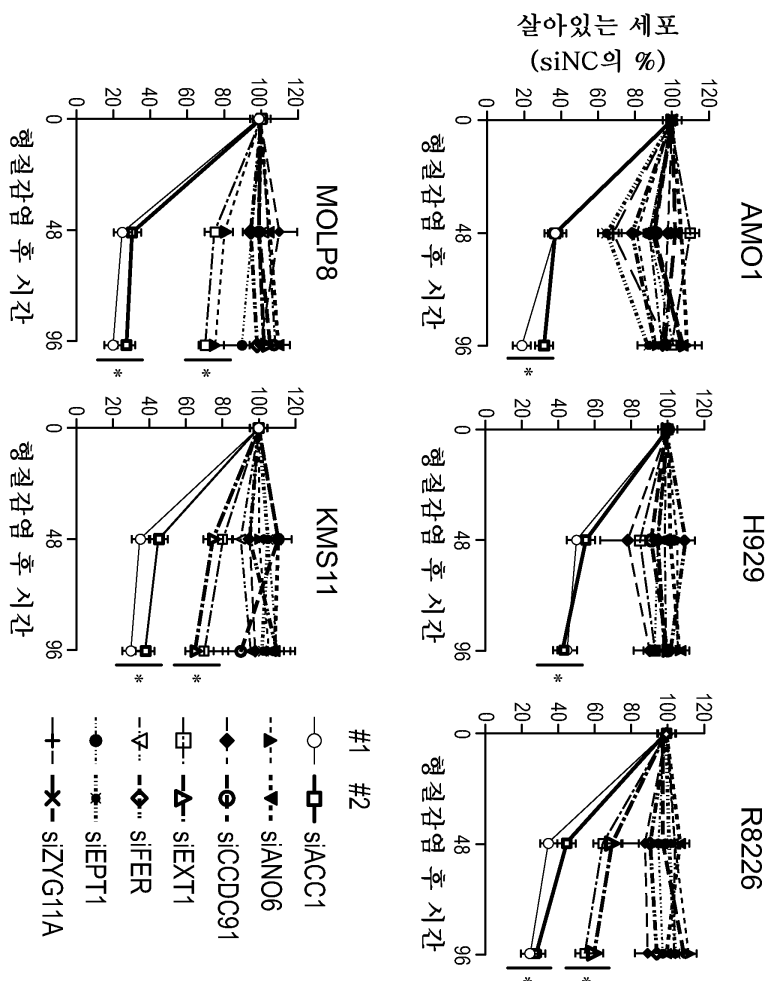
도면3c



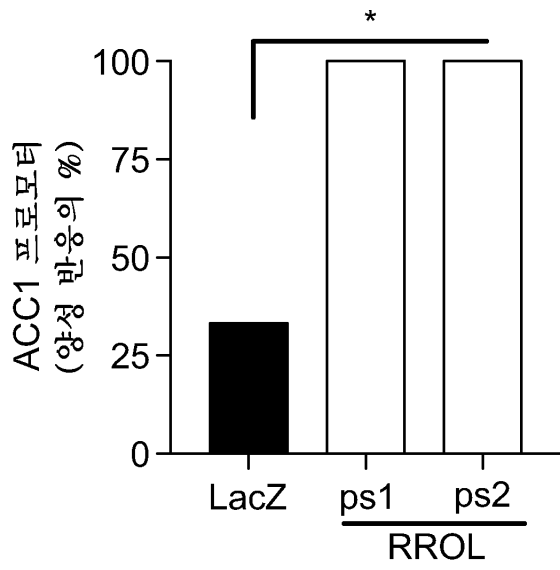
도면3d



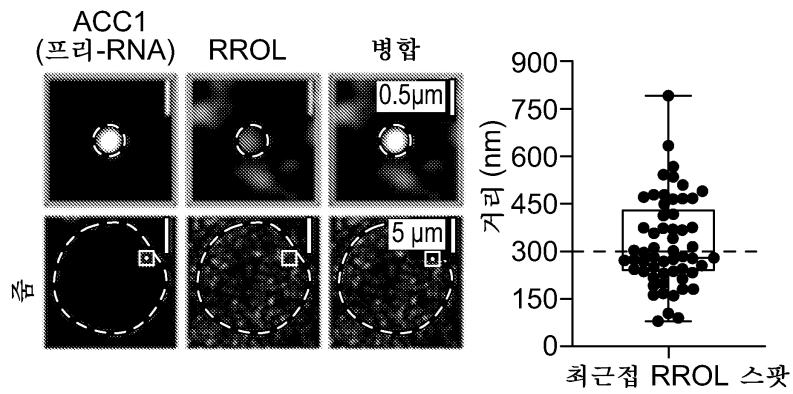
도면3e



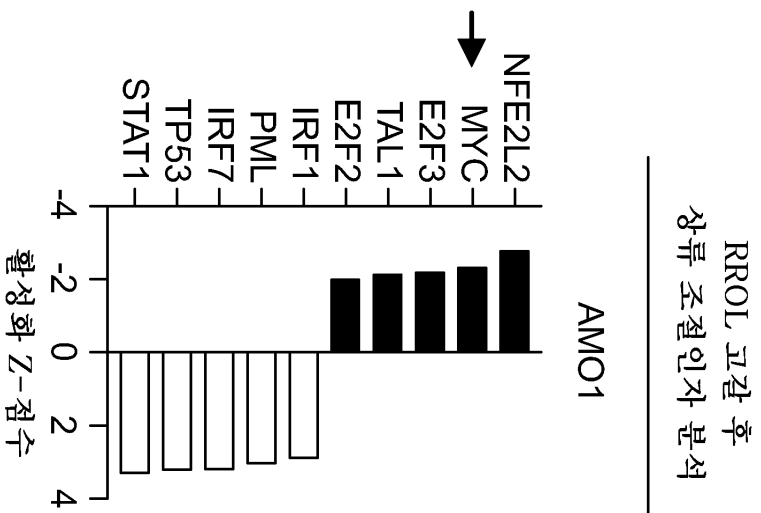
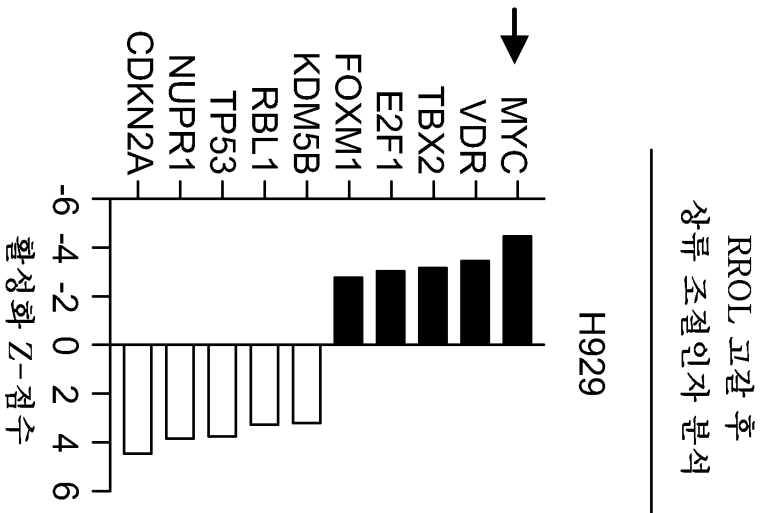
도면3f



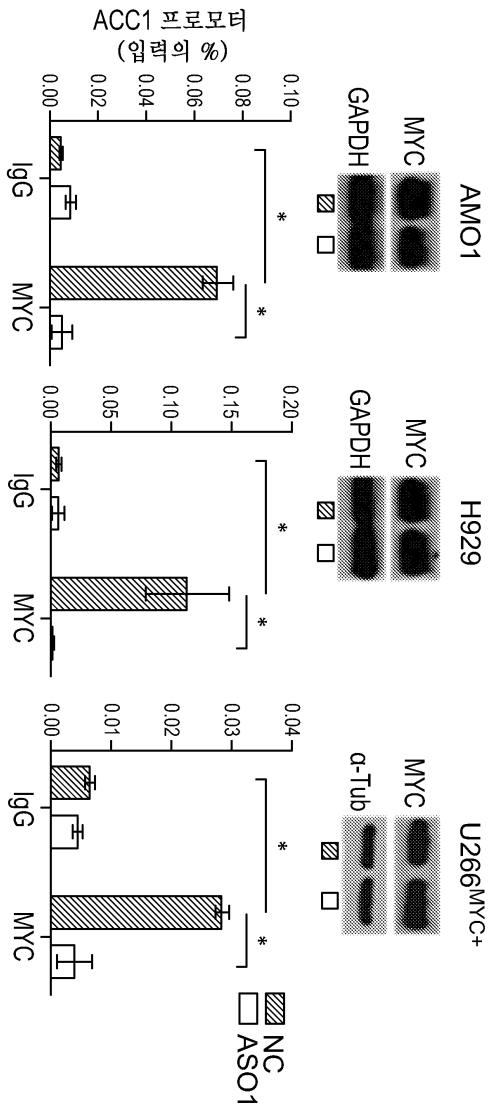
도면3g



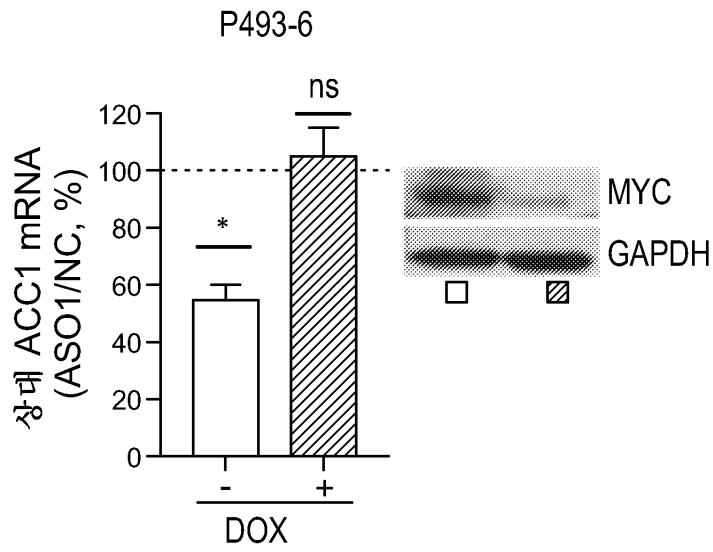
도면4a



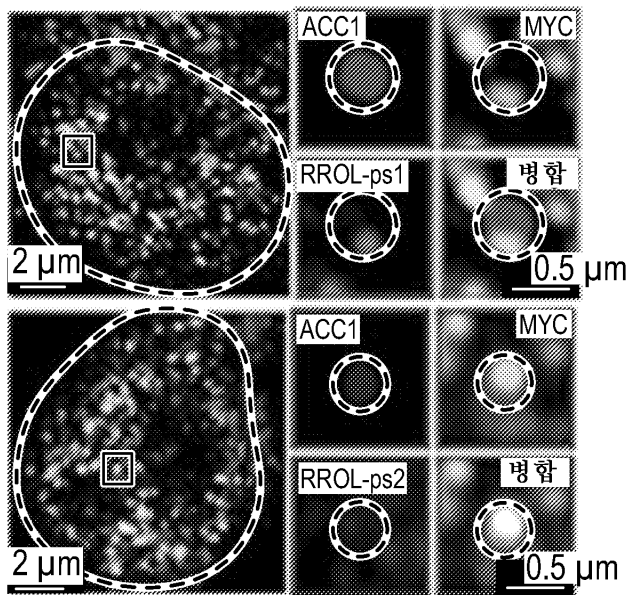
도면4b



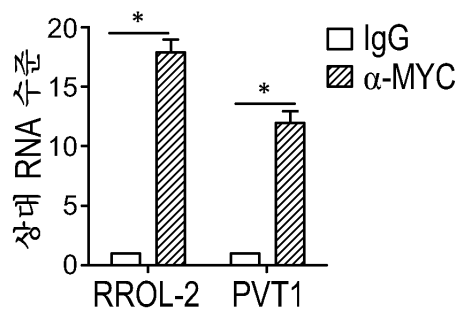
도면4c



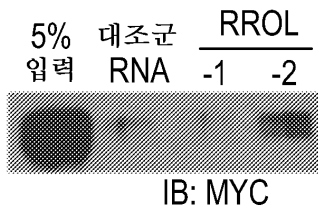
도면4d



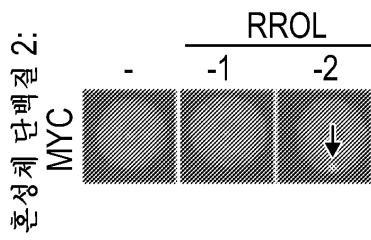
도면4e



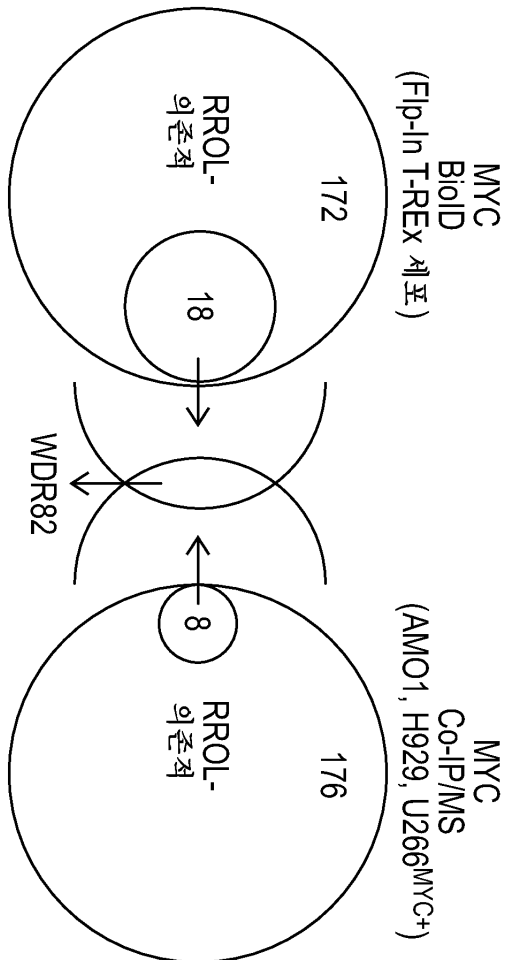
도면4f



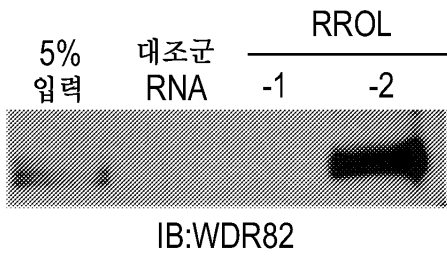
도면4g



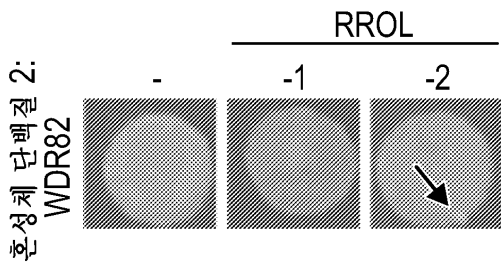
도면5a



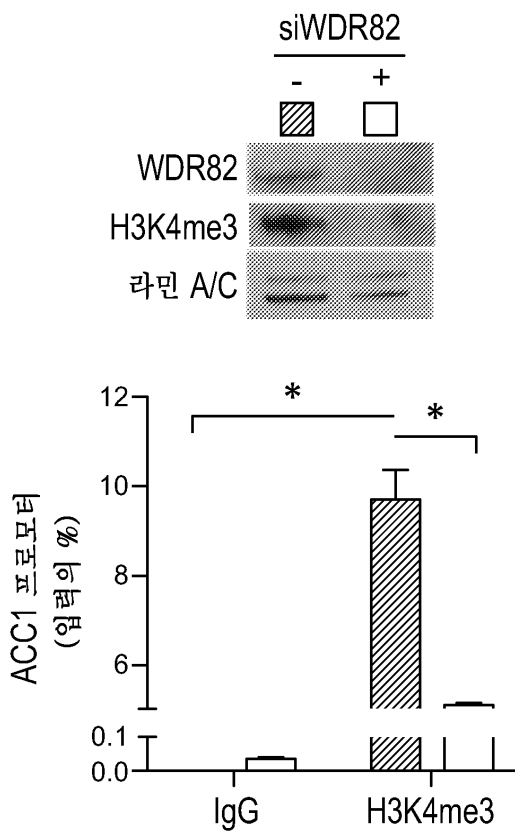
도면5b



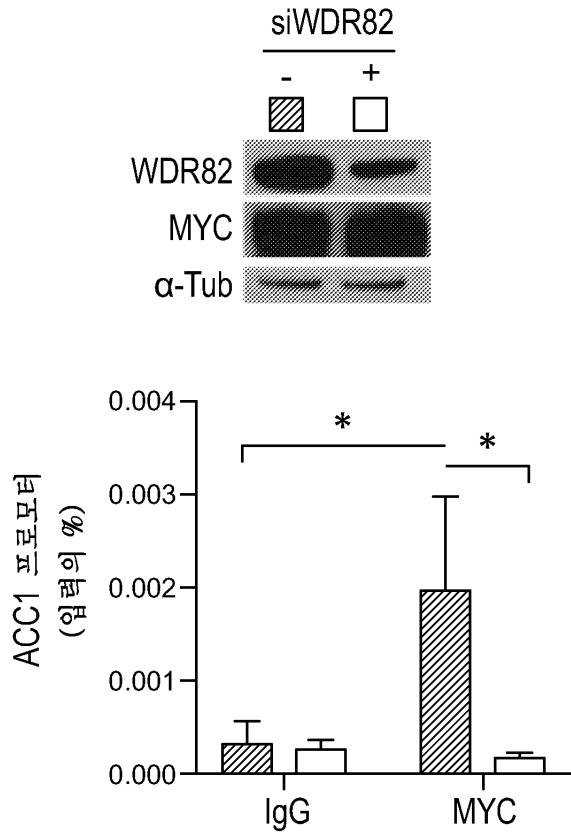
도면5c



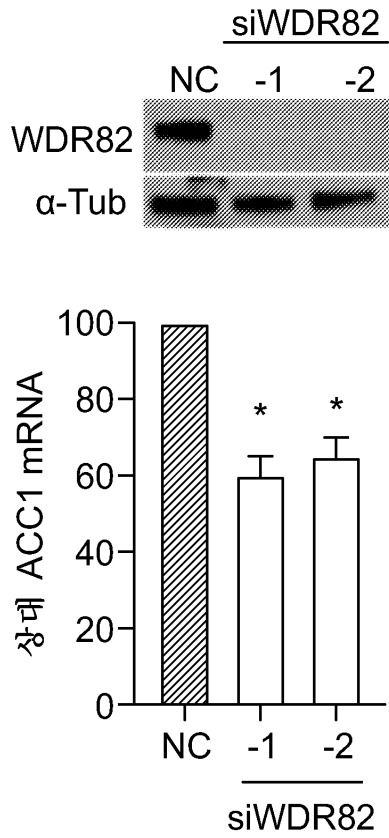
도면5d



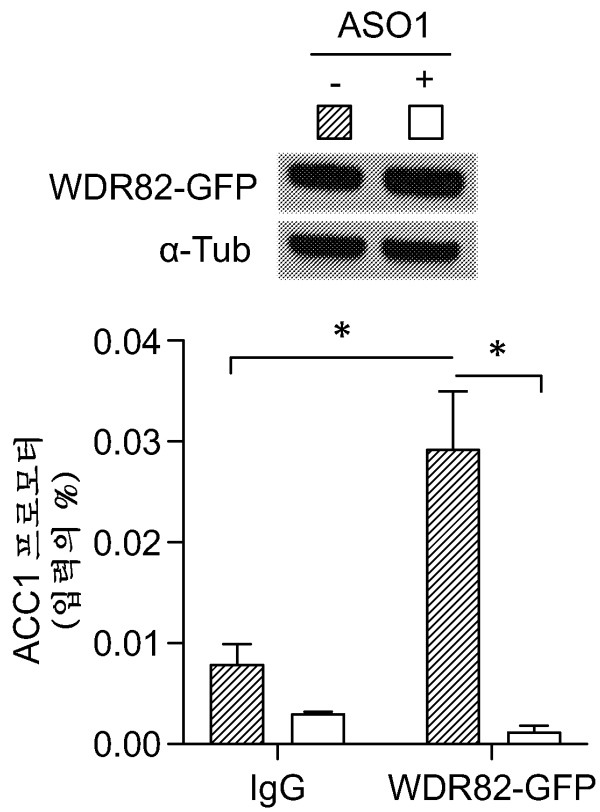
도면5e



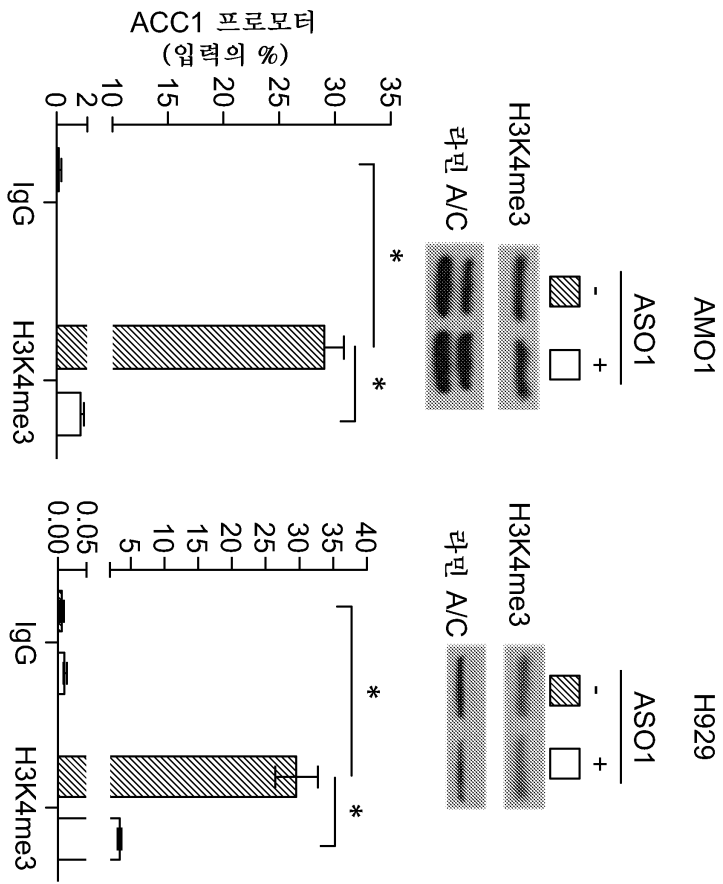
도면5f



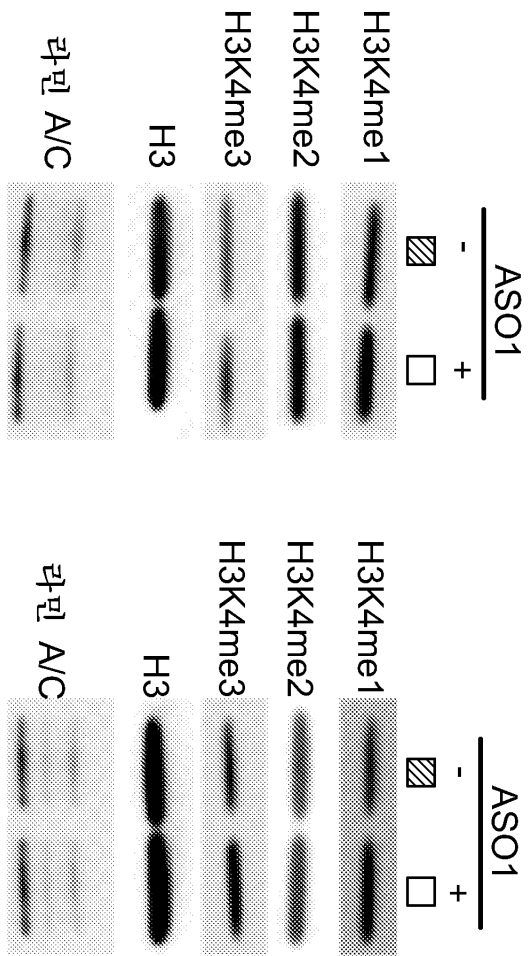
도면5g



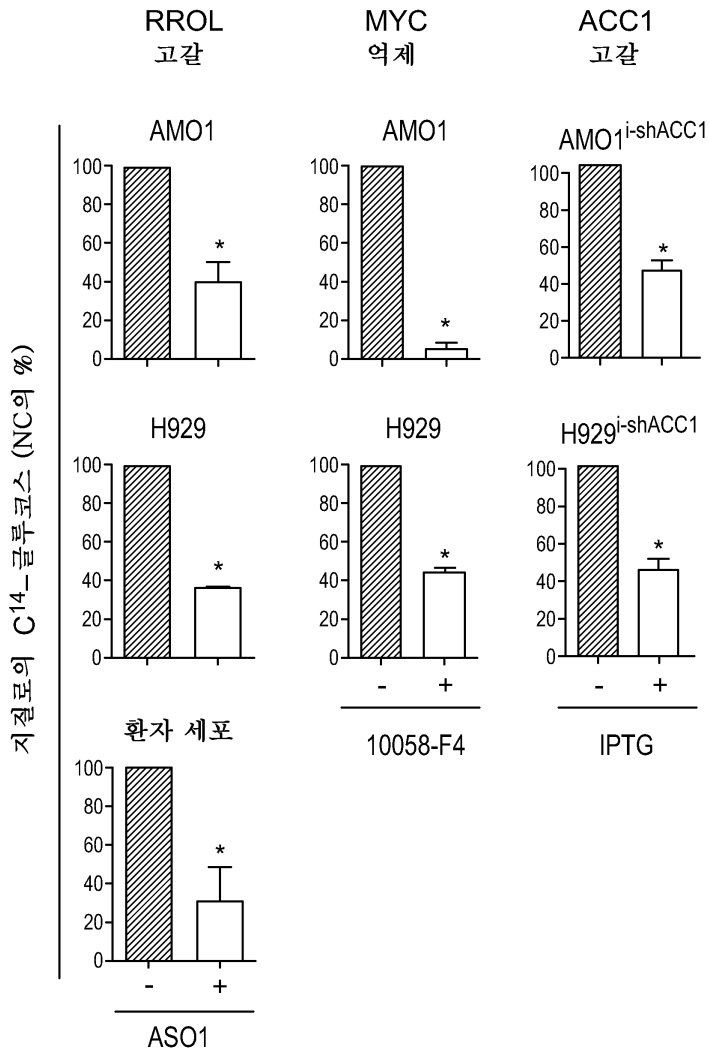
도면5h



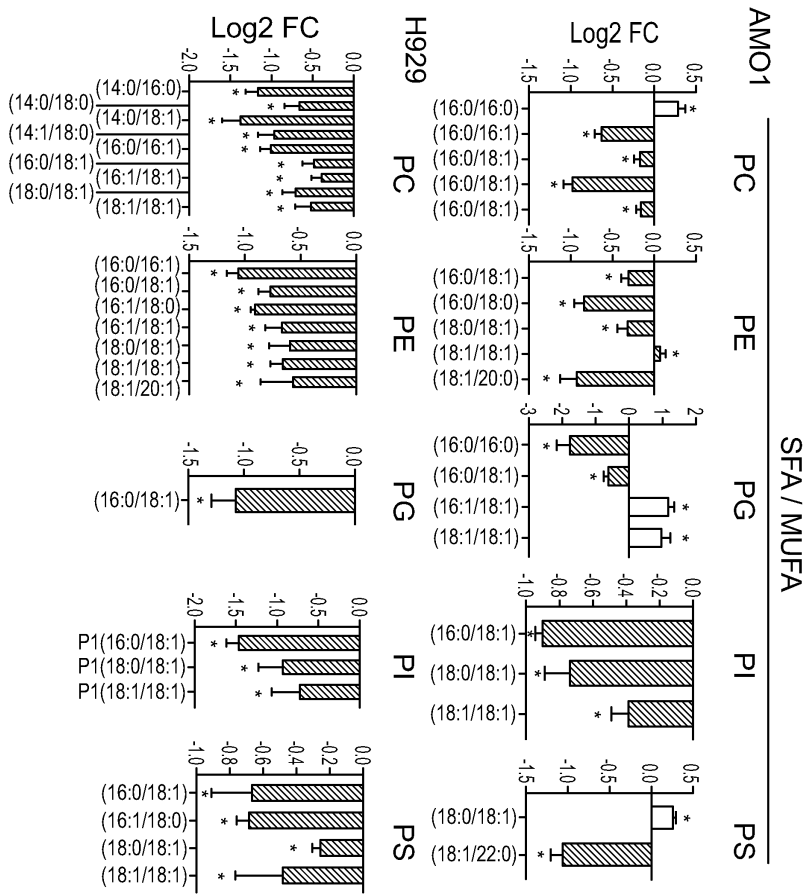
도면5i



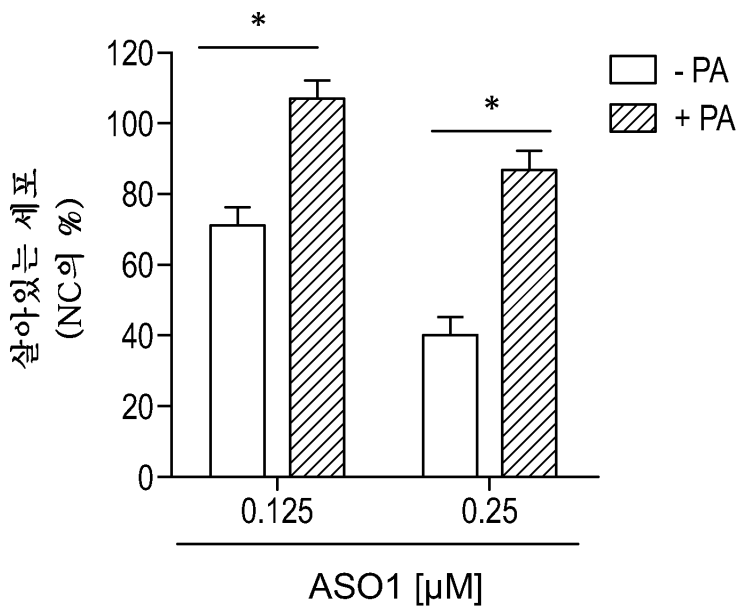
도면6a



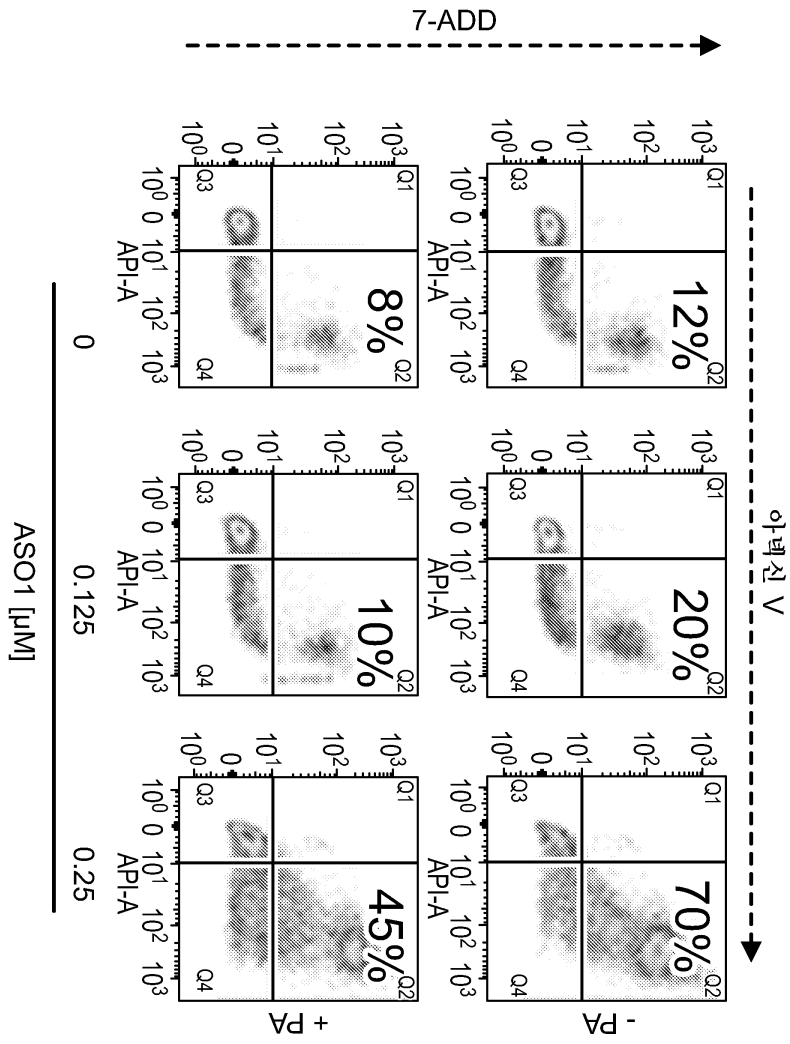
도면6b



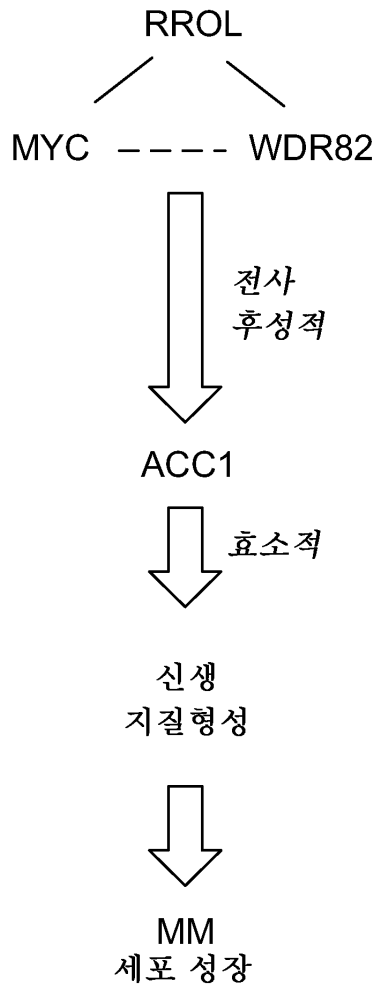
도면6c



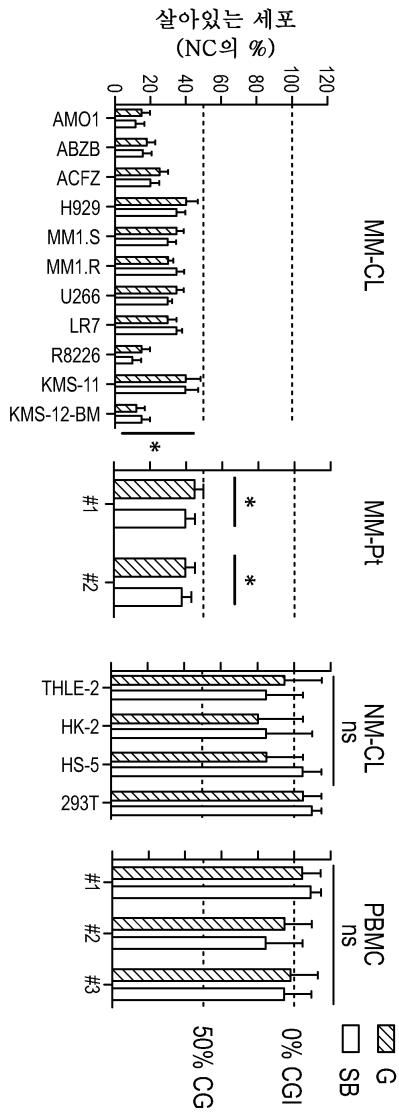
도면6d



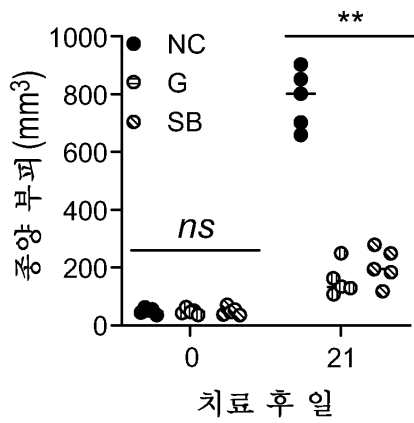
도면6e



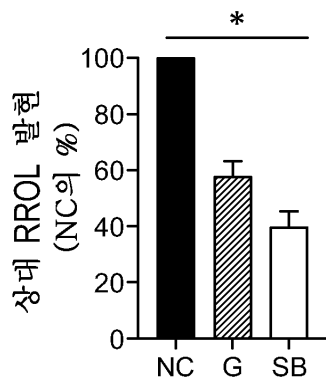
도면7b



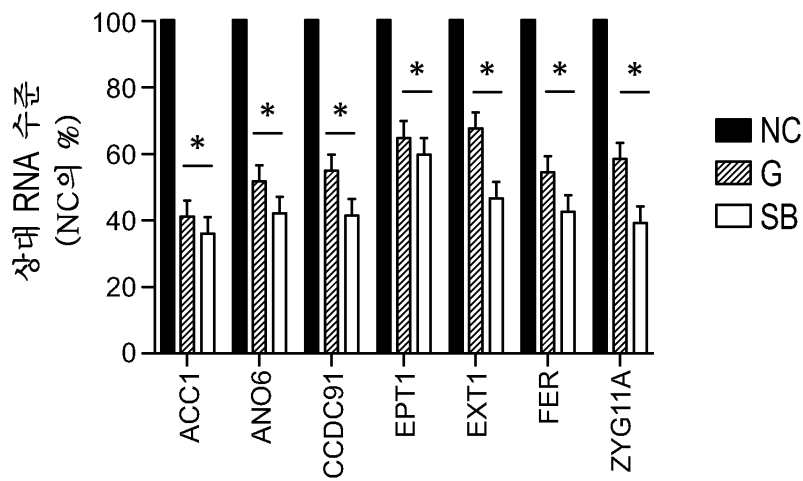
도면7c



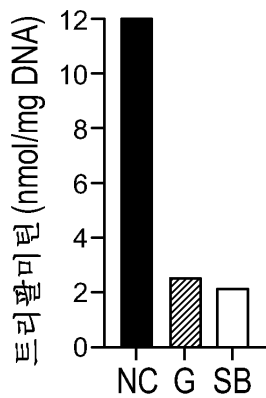
도면7d



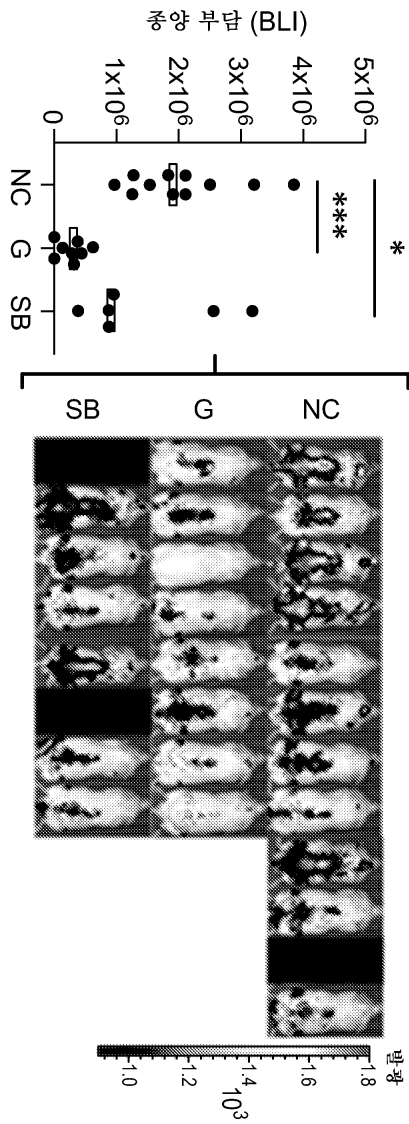
도면7e



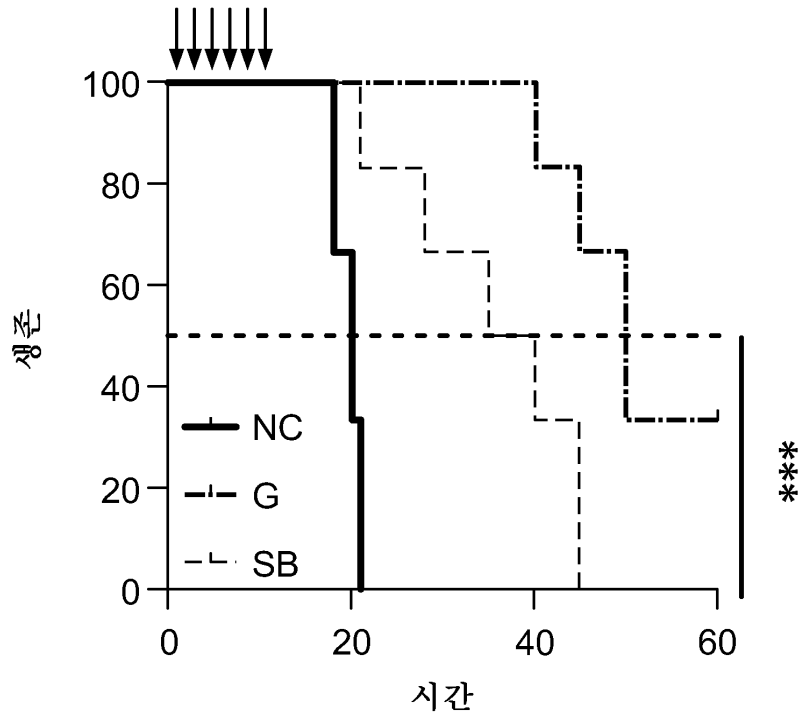
도면7f



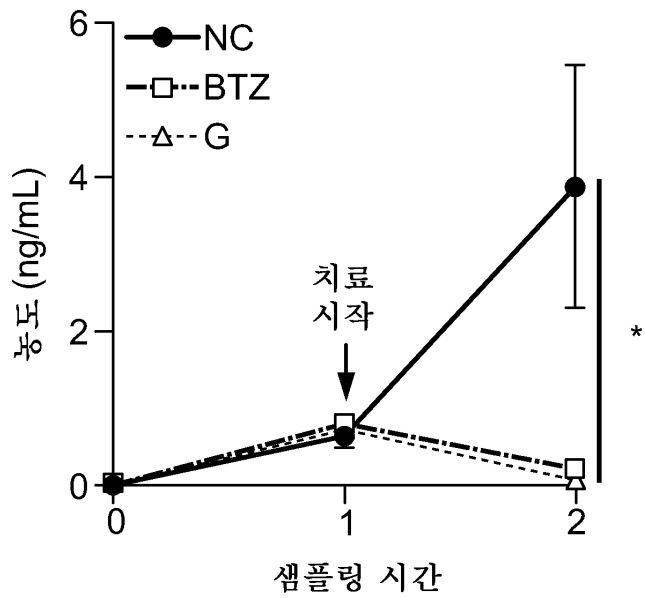
도면7g



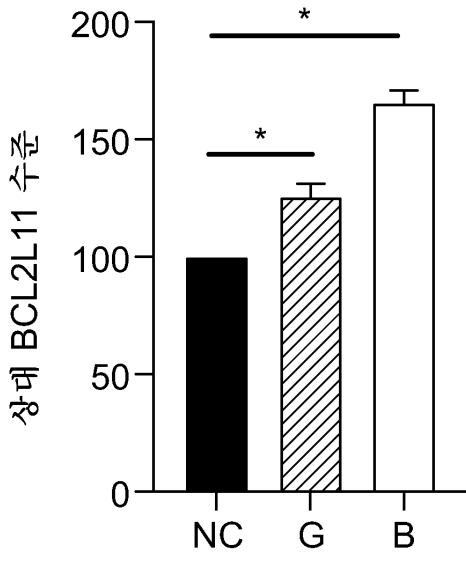
도면7h



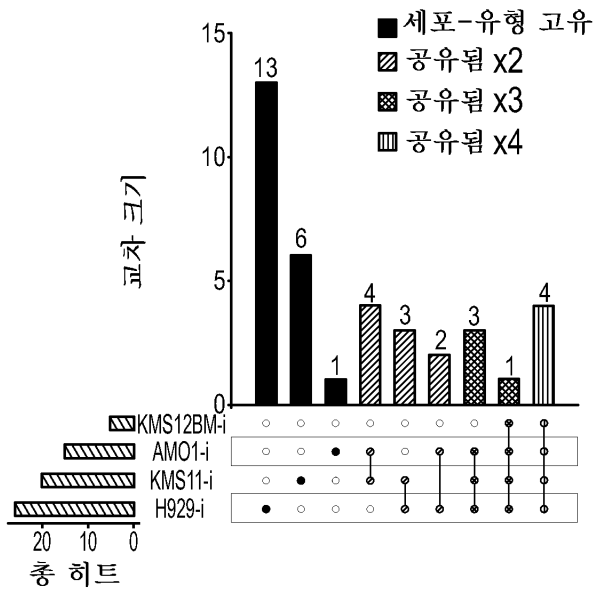
도면7i



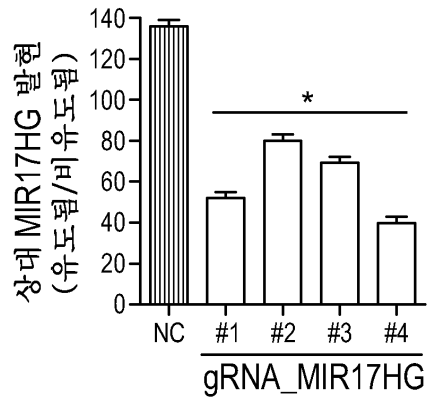
도면7j



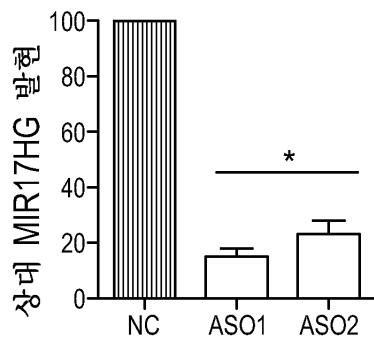
도면8a



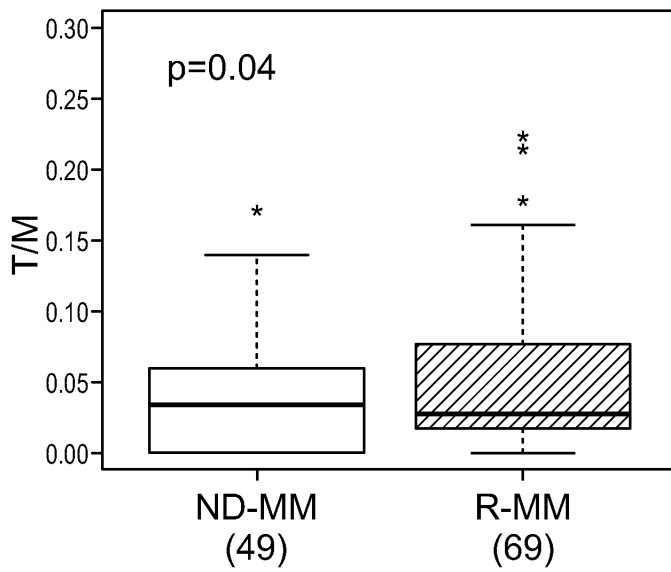
도면8b



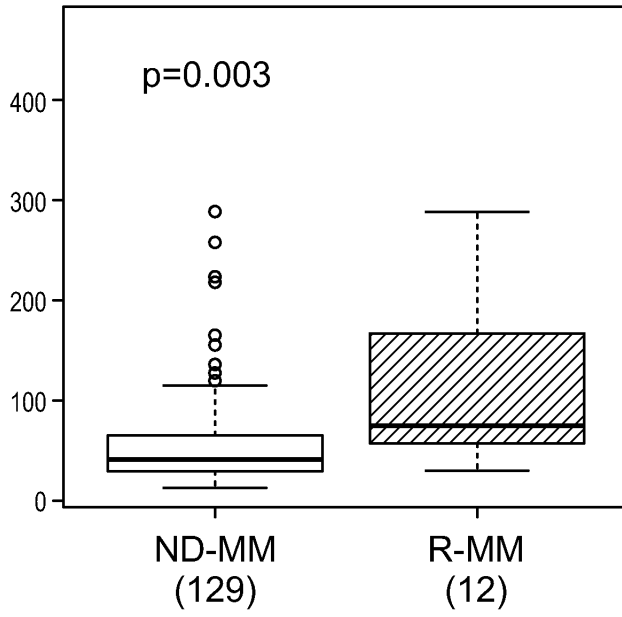
도면8c



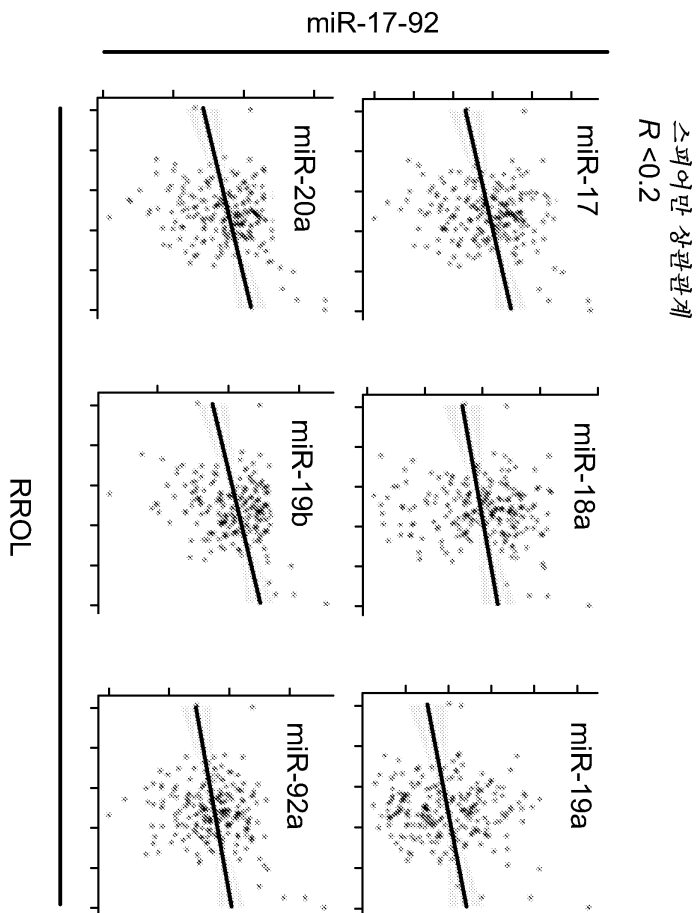
도면9a



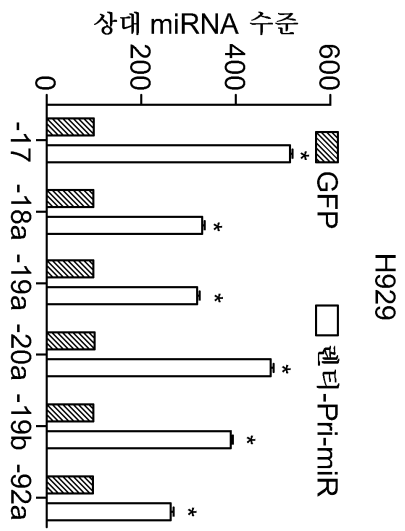
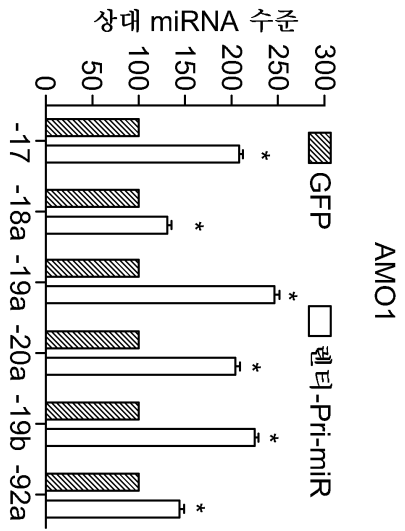
도면9b



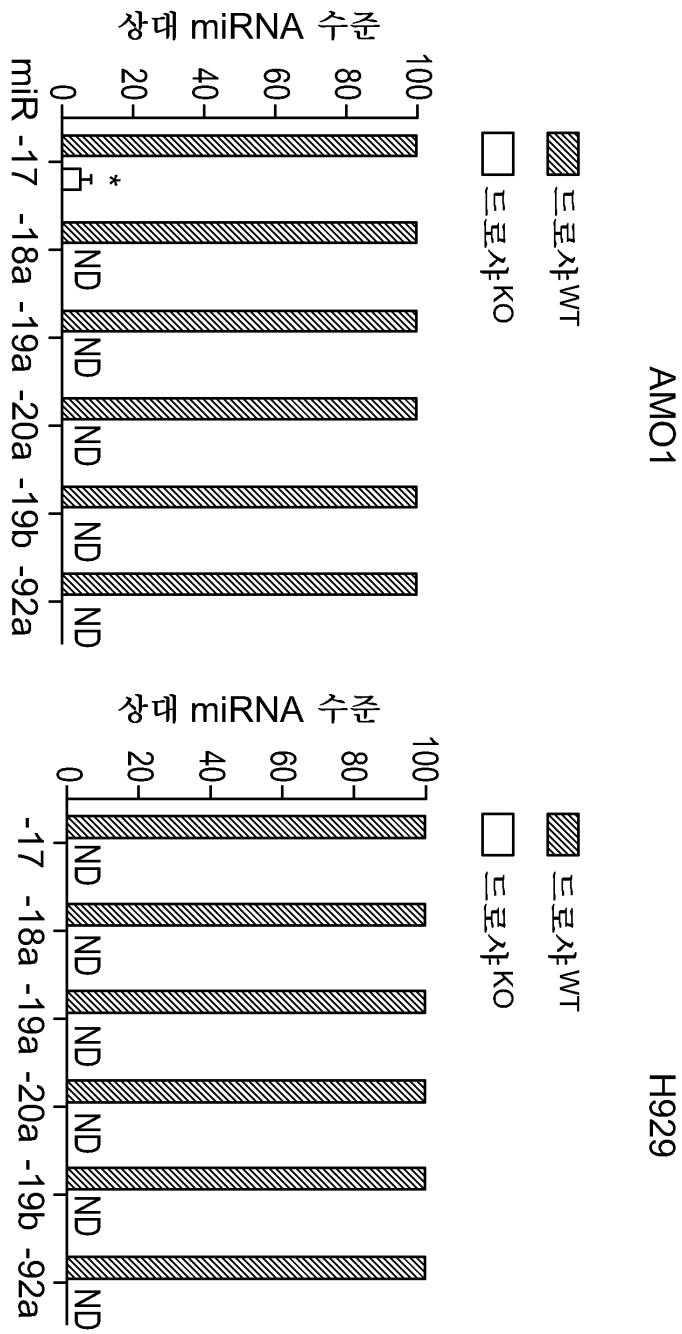
도면9c



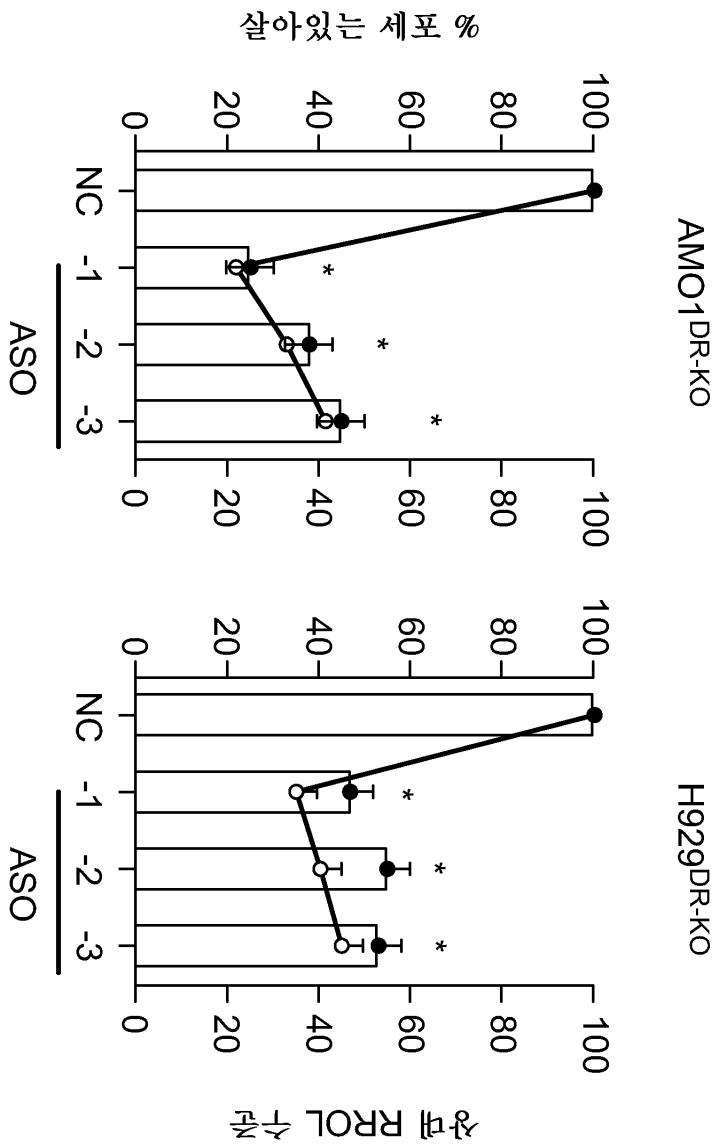
도면9d



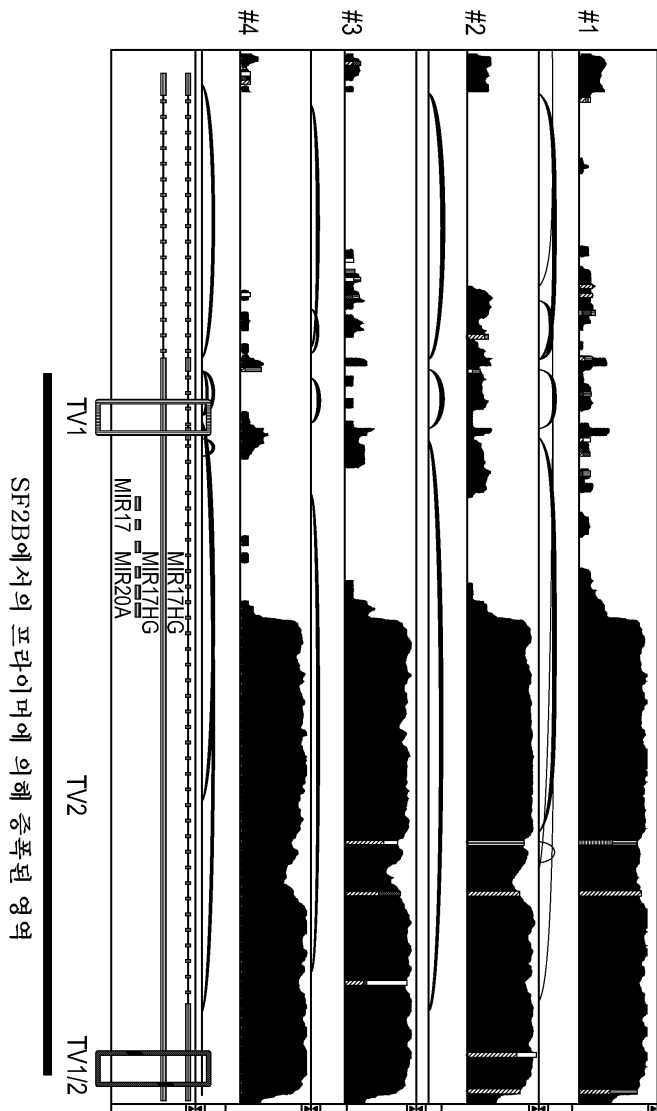
도면9e



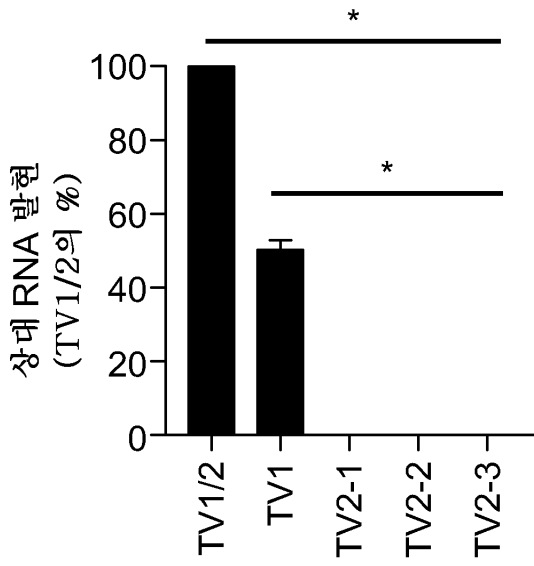
도면9f



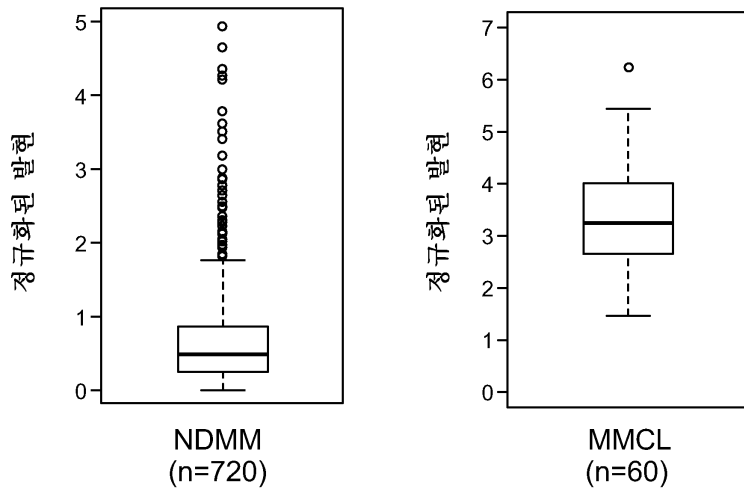
도면9g



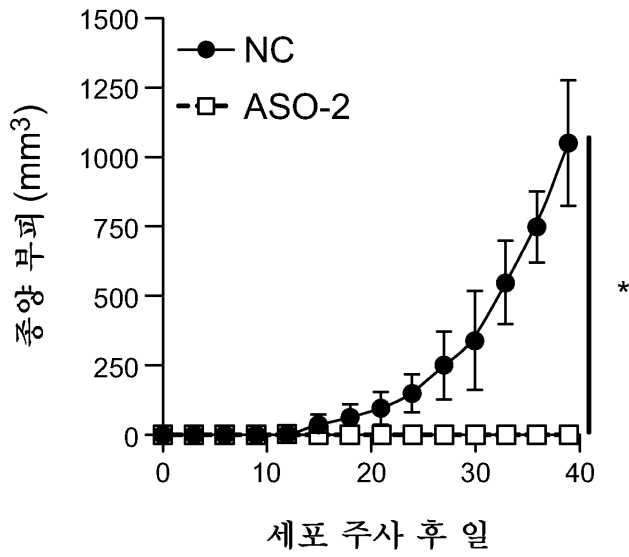
도면9h



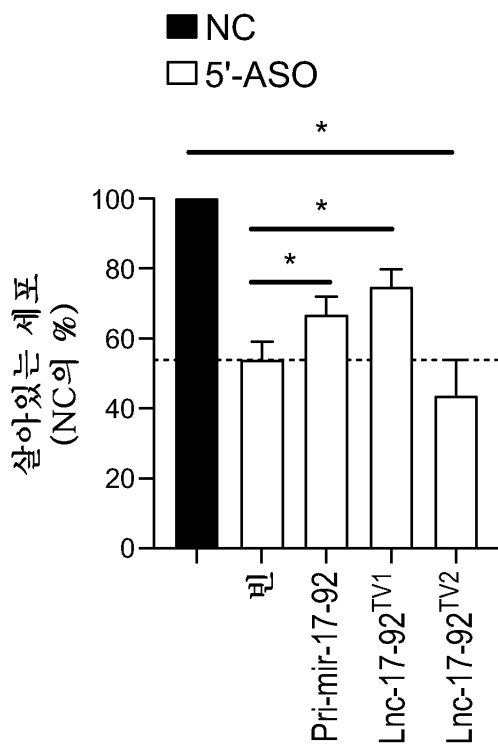
도면9i



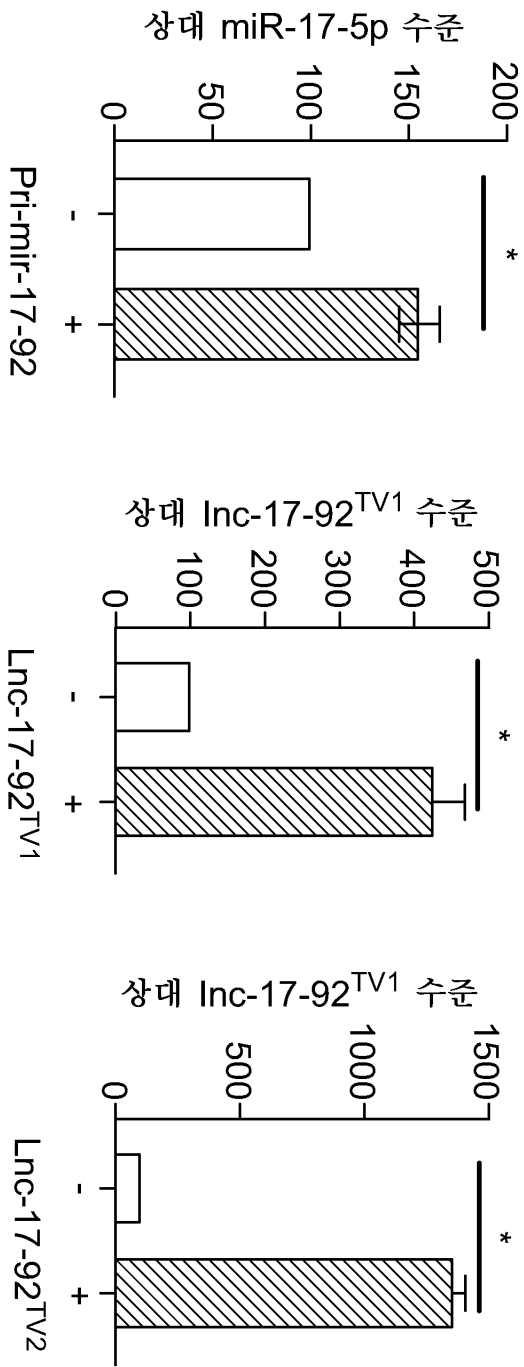
도면9j



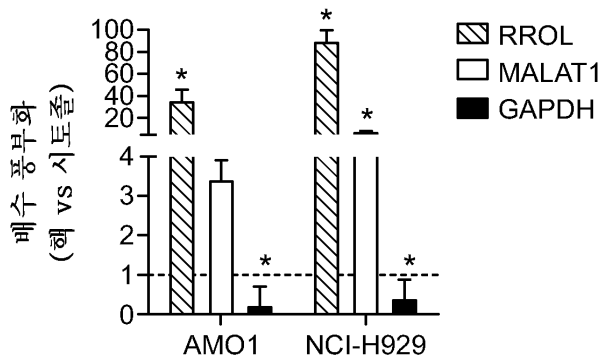
도면9k



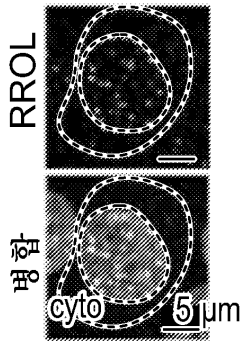
도면91



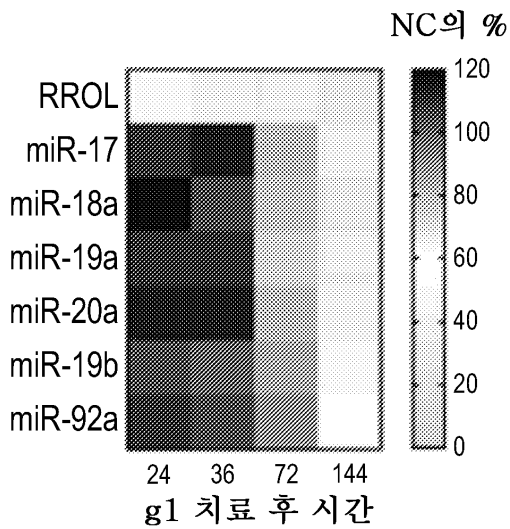
도면10a



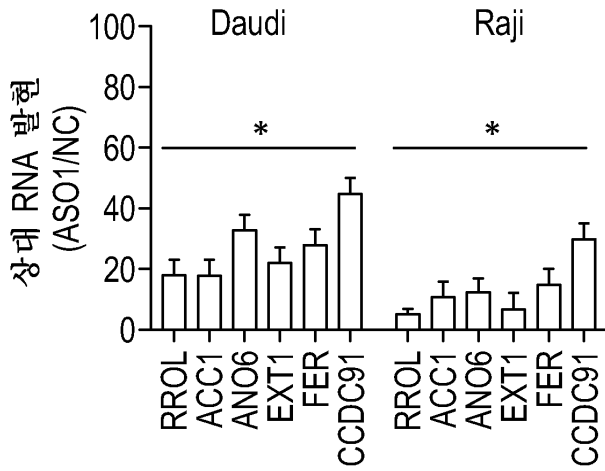
도면10b



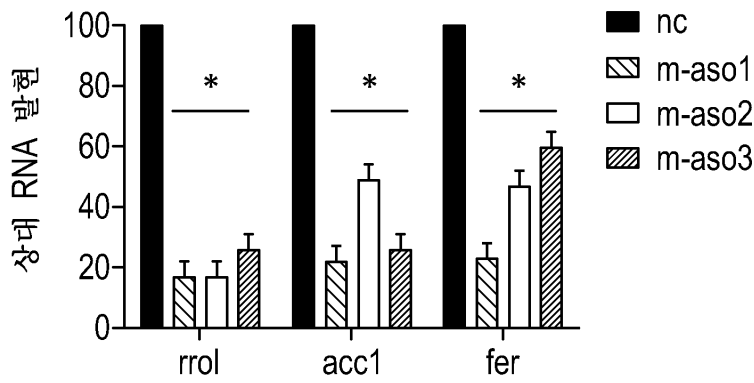
도면10c



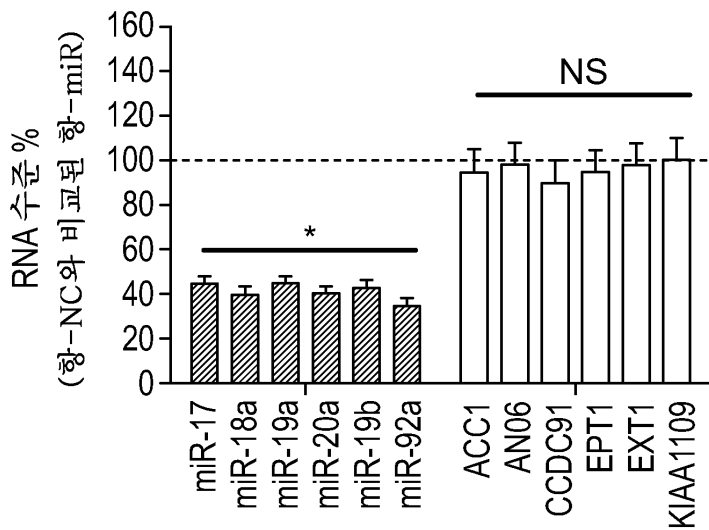
도면10d



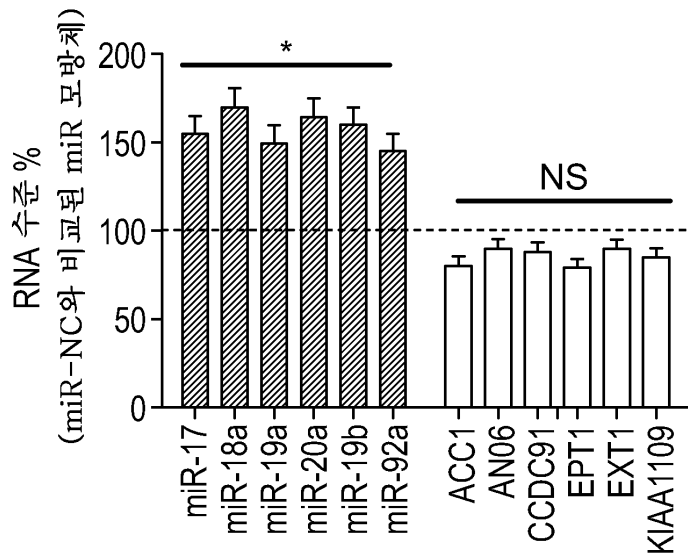
도면10e



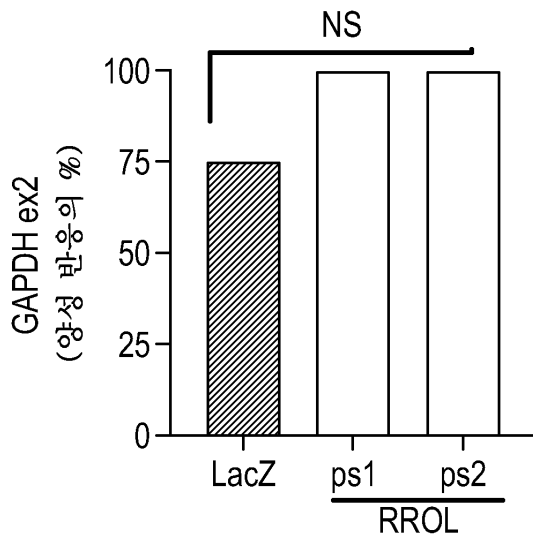
도면10f



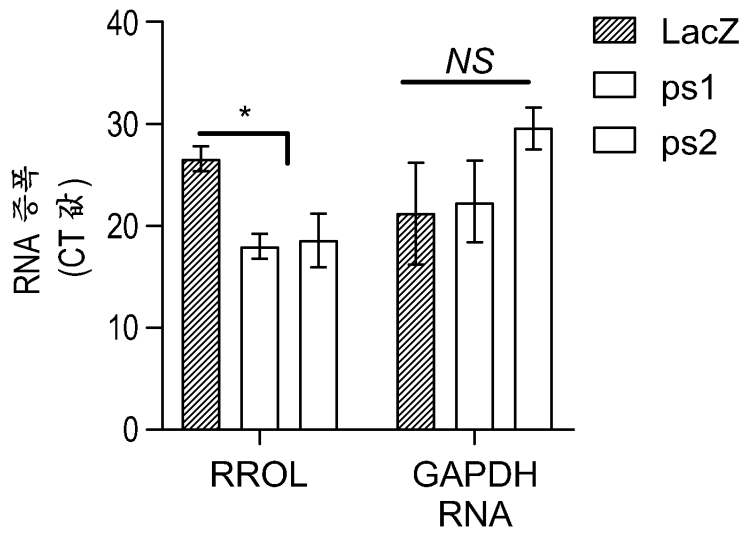
도면10g



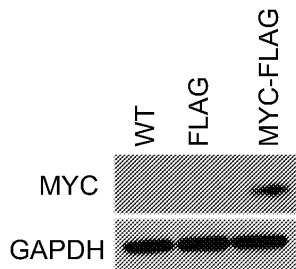
도면10h



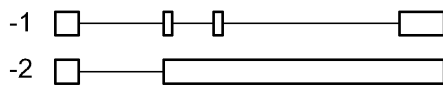
도면10i



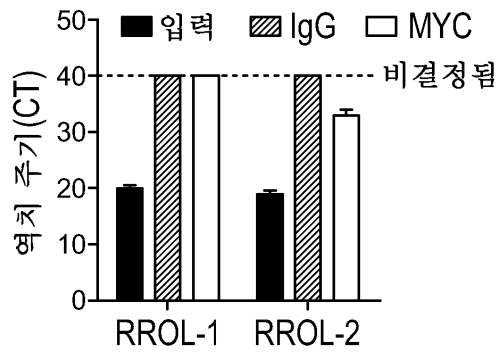
도면11a



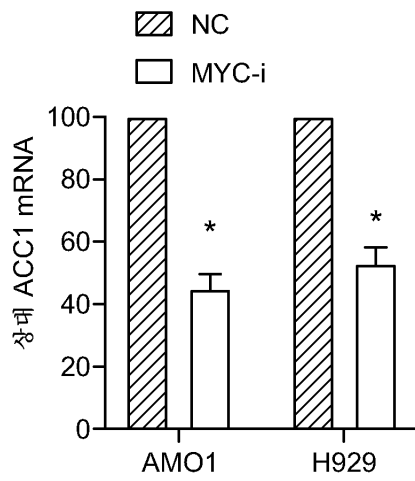
도면11b



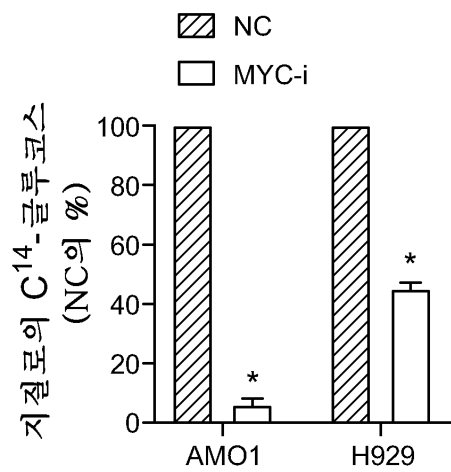
도면11c



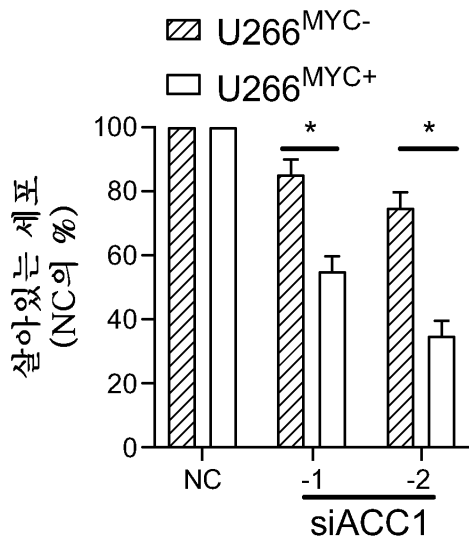
도면11d



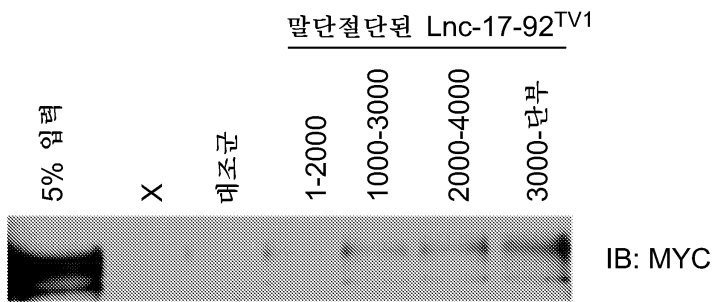
도면11e



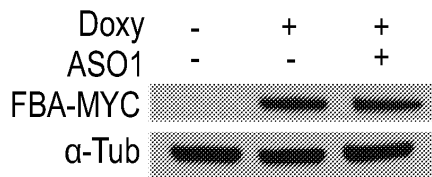
도면11f



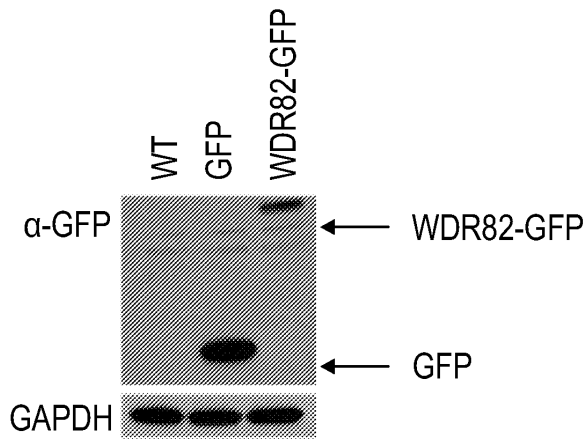
도면11g



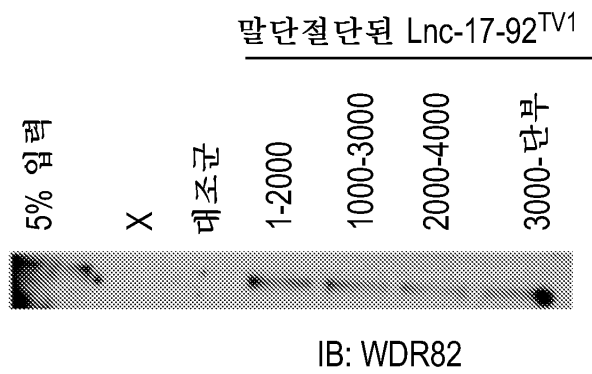
도면12a



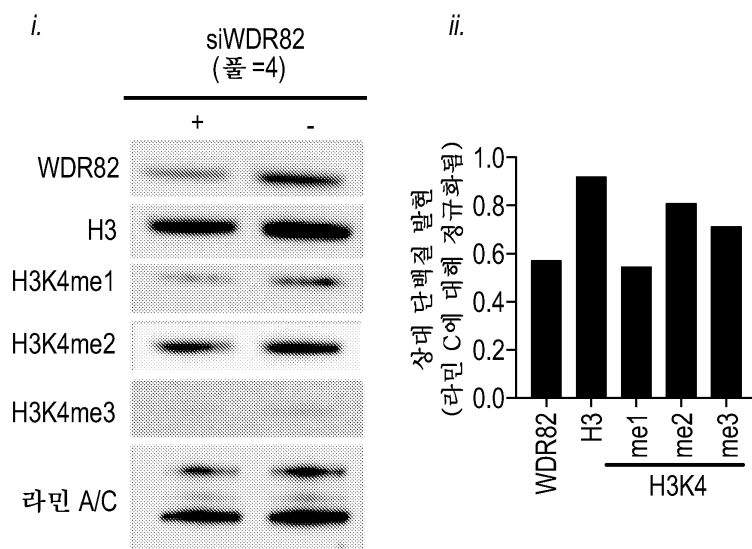
도면12b



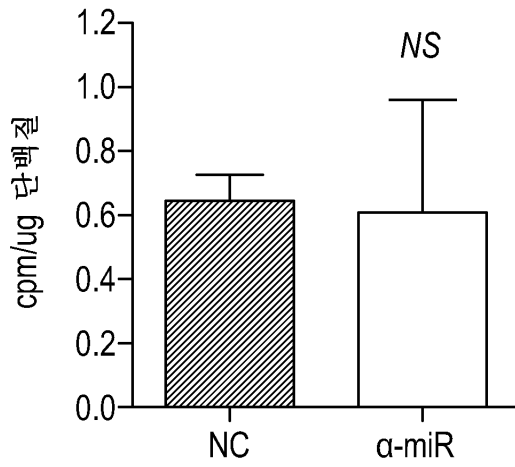
도면12c



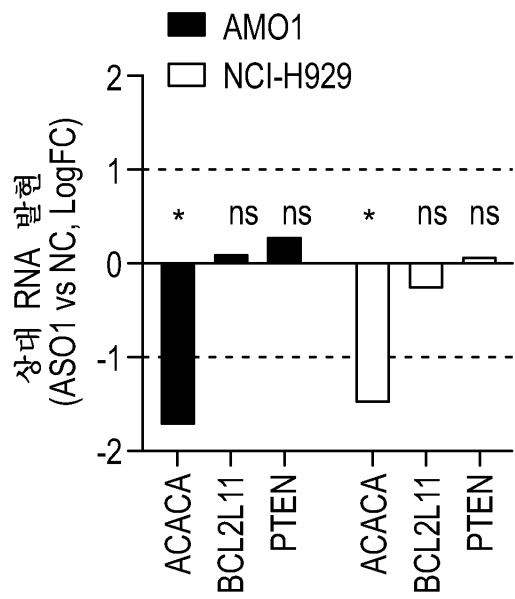
도면12d



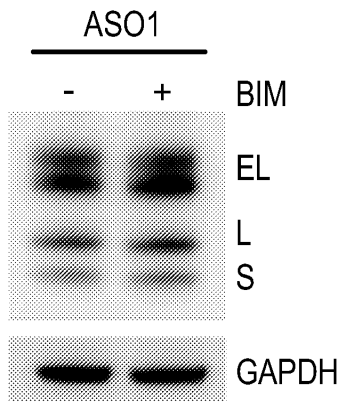
도면13a



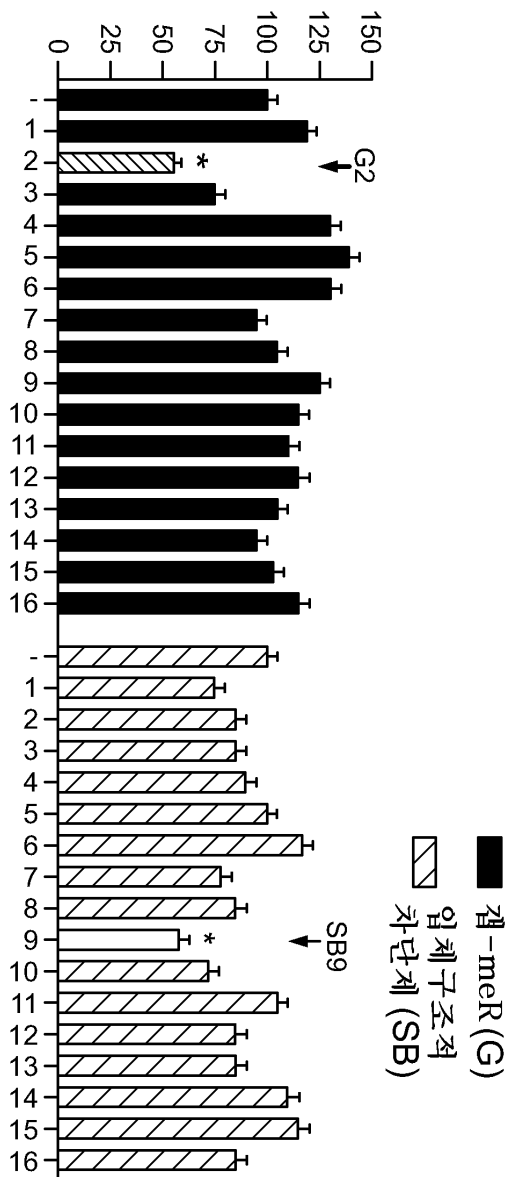
도면13b



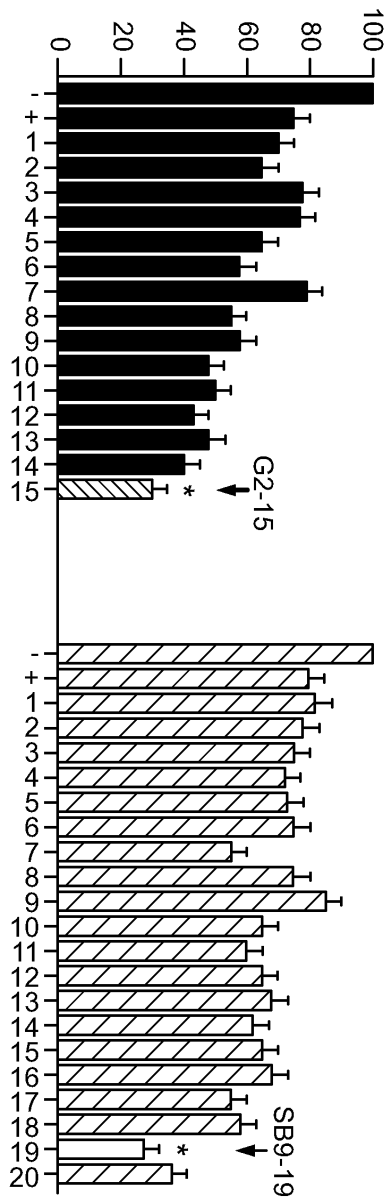
도면13c



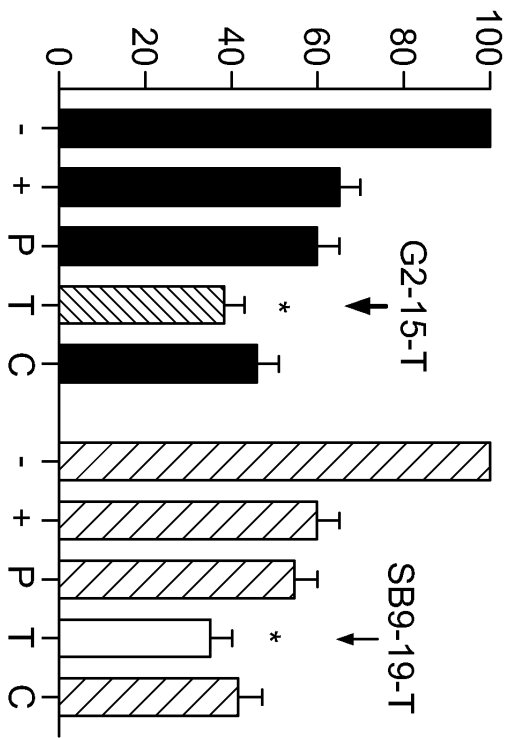
도면14a



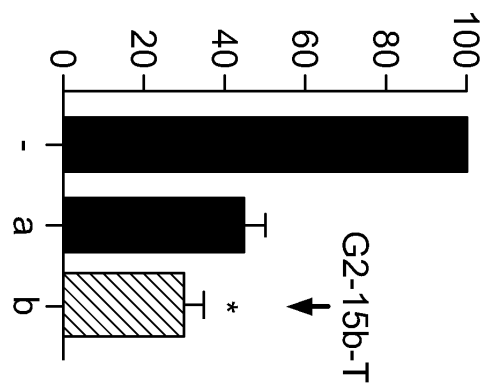
도면14b



도면14c



(iv)



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.