(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118339292 A
(43)申请公布日 2024.07.12

(21)申请号 202280079655.5
(22)申请日 2022.11.29
(30)优先权数据
63/284,527 2021.11.30 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/080563 2022.11.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/102377 EN 2023.06.08
(71)申请人 丹娜-法伯癌症研究院
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 N·C·蒙希 E·莫雷利
S·格里亚兹诺夫
(74)专利代理机构 北京市路盛律师事务所 11326
专利代理师 冯云 李宓
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

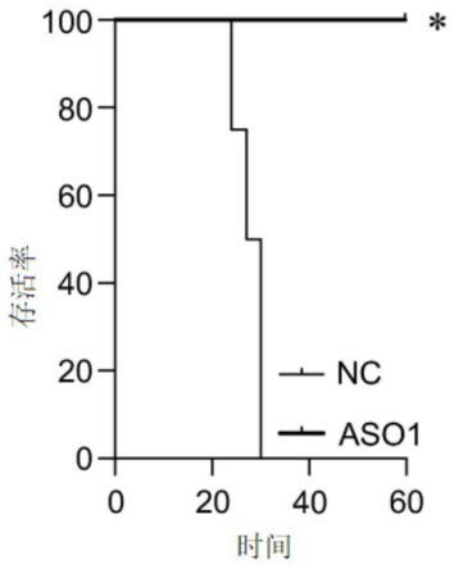
权利要求书2页 说明书45页
序列表（电子公布） 附图52页

(54)发明名称

作为癌症治疗剂的MIR17HG前体RNA的反义抑制剂

(57)摘要

本文公开了用于治疗或改善MIR17HG前体RNA在其中发挥作用的疾病的MIR-17-92a-1簇宿主基因(MIR17HG)前体RNA的反义寡核苷酸抑制剂。



CN 118339292 A

1.一种在生理条件下结合MIR-17-92a-1簇宿主基因(MIR17HG)前体RNA的反义寡核苷酸(ASO),其中所述ASO的长度为15个至约30个核苷酸,并且所述前体RNA具有SEQ ID NO:1的核酸序列。

2.根据权利要求1所述的ASO,其在所述前体RNA的5'末端区域结合。

3.根据权利要求1所述的ASO,其在所述前体RNA的内含子区域结合。

4.根据权利要求1所述的ASO,其在编码lnc-17-92^{TV1}的一部分的前体RNA的外显子区域结合。

5.根据权利要求1所述的ASO,其包含以下任何一个核酸序列AGTGGCGCGAAGGCGCAGGT(SEQ ID NO:2)、GTGGCGCGAAGGCGCAGGTC(SEQ ID NO:3)、CCTCGCCCGAGGGCGCGAAG(SEQ ID NO:4)、GAGGGCGCGAAGTGGCGCGA(SEQ ID NO:5)、TACTTGCTTGGCTT(SEQ ID NO:6)、CACCGTCCAAATCTAT(SEQ ID NO:7)、AGCACTCAACATCAGC(SEQ ID NO:8)、CACCGTCCAAATCTAT(SEQ ID NO:9)、GTATGACTGGAATAGG(SEQ ID NO:10)、TACAGTGGAAATCGGC(SEQ ID NO:11)、GCGAGCAAACACGAAA(SEQ ID NO:12)、ACTTGGATTGGATGAG(SEQ ID NO:13)。

6.根据权利要求1所述的ASO,其长度为15个至23个核苷酸。

7.根据权利要求1所述的ASO,其长度为18个至23个核苷酸。

8.根据权利要求1所述的ASO,其中其核苷酸经化学修饰。

9.根据权利要求8所述的ASO,其中所述核苷酸由硫代磷酸酯(PS)核苷间连接、甲氧基丙基膦酸酯(MOP)核苷间连接、2'-O-甲基(Me)基团、2'-O-甲氧基乙基核糖(MOE)基团、受限乙基(S-cEt)基团、锁核酸(LNA)或2'氟(2'F)基团修饰。

10.根据权利要求1所述的ASO,其与脂质接合。

11.根据权利要求10所述的ASO,其中所述脂质是棕榈酸、生育酚或胆固醇。

12.根据权利要求11所述的ASO,其长度为18个核苷酸并且与生育酚接合。

13.根据权利要求1所述的ASO,其中所述ASO是单链DNA。

14.根据权利要求13所述的ASO,其中所述单链DNA在3'末端有一个或多个修饰的核苷酸侧翼。

15.根据权利要求14所述的ASO,其中所述单链DNA在5'末端有一个或多个修饰的核苷酸侧翼。

16.根据权利要求15所述的ASO,其中所述单链DNA在5'末端有5个修饰的核苷酸侧翼。

17.根据权利要求16所述的ASO,其中所述单链DNA在3'末端有5个修饰的核苷酸侧翼,并且其中所述单链DNA的长度为8个核苷酸。

18.根据权利要求15所述的ASO,其中所述修饰的核苷酸包含一个或多个2'-O-甲氧基乙基核糖(MOE)基团。

19.根据权利要求18所述的ASO,其中所述单链DNA的长度为15个核苷酸。

20.根据权利要求19所述的ASO,其与生育酚接合。

21.根据权利要求1所述的ASO,其中所述ASO是单链RNA。

22.一种药物组合物,其包含治疗有效量的权利要求1所述的ASO和药学上可接受的载体。

23.一种治疗MIR17HG前体RNA的异常表达和功能在其中发挥作用的疾病的方法,其包括:

向有需要的受试者施用权利要求22所述的药物组合物。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述疾病是多发性骨髓瘤、淋巴瘤或结肠直肠癌。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述疾病是多发性骨髓瘤。

26.根据权利要求23所述的方法,其还包括向所述受试者施用治疗有效量的乙酰辅酶A羧化酶-α(ACC1)抑制剂。

27.根据权利要求26所述的方法,其中所述ACC1抑制剂是5-十四烷氧基-2-糠酸(TOFA)。

28.根据权利要求26所述的方法,其中在施用所述药物组合物之后施用所述ACC1抑制剂。

29.根据权利要求26所述的方法,其中与所述药物组合物同时施用所述ACC1抑制剂。

30.根据权利要求23所述的方法,其还包括向所述受试者施用治疗有效量的附加活性剂,所述附加活性剂选自硼替佐米、美法仑、卡非佐米、地塞米松、一种或多种蛋白酶体抑制剂、一种或多种免疫调节酰亚胺药物(IMiD)或其中两种或更多种的组合。

31.根据权利要求30所述的方法,其中在施用所述药物组合物之后施用所述附加活性剂。

32.根据权利要求30所述的方法,其中与所述药物组合物同时施用所述附加活性剂。

33.根据权利要求23所述的方法,其中所述疾病是肝病。

34.根据权利要求33所述的方法,其中所述疾病是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

35.根据权利要求23所述的方法,其中所述疾病的特征是MYC的异常表达和功能。

36.根据权利要求35所述的方法,其还包括向所述受试者施用治疗有效量的MYC原癌基因、bHLH转录因子(MYC)抑制剂。

37.根据权利要求36所述的方法,其中所述MYC抑制剂是顺铂、吉西他滨、阿西替尼、那屈肝素、苯甲脒或其中两种或更多种的组合。

38.根据权利要求36所述的方法,其中在施用所述药物组合物之后施用所述MYC抑制剂。

39.根据权利要求36所述的方法,其中与所述药物组合物同时施用所述MYC抑制剂。

40.一种试剂盒,其包含治疗有效量的权利要求22所述的药物组合物,以及用于使用所述药物组合物治疗MIR17HG前体RNA在其中发挥作用的疾病的印刷说明书。

作为癌症治疗剂的MIR17HG前体RNA的反义抑制剂

相关申请

[0001] 本申请根据《美国法典》第35卷第119(e)节要求2021年11月30日提交的第63/284,527号美国临时申请的优先权权益,该申请通过引用整体并入本文。

序列表

[0002] 本申请包含以XML格式通过电子方式提交的序列表,其通过引用整体并入本文。所述XML副本创建于2022年11月28日,名称为52095_753001WO_SL.xml,大小为71KB字节。

背景技术

[0003] 在人类基因组中,携带长链非编码RNA(lncRNA)的基因座数量多于蛋白质编码基因,并且易受相同致癌致病事件的影响(Hon等人,《自然》543:199-204(2017年);Wang等人,《癌细胞》33:706-720(2018年)(Hon et al.,Nature 543:199-204(2017);Wang et al.,Cancer Cell33:706-720(2018)).)。这些RNA分子被定义为长度大于200个核苷酸(nt)且缺乏蛋白质编码潜力,因此代表了多种多样的功能实体(Ulitsky等人,《细胞》154:26-46(2013年)(Ulitsky et al.,Cell 154:26-46(2013)))。lncRNA通常根据其相对于蛋白质编码基因的位置分为四个独立的亚组:外显子lncRNA、内含子lncRNA、重叠lncRNA、基因间lncRNA、正义lncRNA和反义lncRNA;可替代地,它们可以在功能上分为顺式作用lncRNA和反式作用lncRNA。Ulitsky等人,《细胞》154:26-46(2013年)。反式作用lncRNA因其多种多样的作用机制而特别令人感兴趣,例如其作为成熟microRNA(miRNA)生物发生的前体分子的作用(Lu等人,《自然-医学》23:1331-1341(2017年)(Lu et al.,Nat.Med.23:1331-1341(2017)))或通过其与蛋白质和核酸的直接相互作用来调节蛋白质功能和/或稳定性(Tseng等人,《自然》512:82-6(2014年)(Tseng et al.,Nature 512:82-6(2014)))。lncRNA的异常表达和功能与肿瘤细胞恶性表型的逐渐增加有关(Gutschner和Diederichs,《RNA生物学》9:703-19(2012年)(Gutschner and Diederichs,RNA.Biol.9:703-19(2012)))。

发明内容

[0004] 本公开的第一方面涉及一种在生理条件下结合MIR-17-92a-1簇宿主基因(MIR17HG)前体RNA的反义寡核苷酸(ASO),其中ASO的长度为15个至约30个核苷酸,并且MIR-17-92a-1簇宿主基因(MIR17HG)前体RNA具有SEQ ID NO:1的核酸序列。

[0005] 本公开的另一个方面是包含治疗有效量的反义寡核苷酸和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0006] 本公开的又一个方面是一种治疗其中MIR17HG前体RNA的异常表达和功能发挥作用的疾病的方法。方法需要向受试者施用药物组合物。

[0007] 本公开的又一个方面是一种试剂盒,其包含治疗有效量的结合MIR17HG前体RNA的ASO,以及用于使用第一活性剂治疗受试者的其中MIR17HG前体RNA的异常表达和功能发挥作用的疾病的印刷说明书。

[0008] 本文所述的工作实例表明,结合MIR17HG前体RNA的ASO以不依赖microRNA和

DROSHA的方式在体内无毒性地减少多发性骨髓瘤肿瘤生长。

附图说明

[0009] 图1A-1D是一组示意图和点线图,其示出了全基因组CRISPRi活力筛选,该筛选确定MIR17HG为多发性黑色素瘤(MM)中的主要依赖性。图1A示意性地示出了活力筛选。图1B是一组示出二次筛选中lncRNA依赖性的基于RRA的排序分析的线图。图1C是一组示出MM细胞系的CCK-8增殖测定的线图。图1D是一组线图,示出了用靶向MIR17HG前体RNA的ASO或非靶向ASO(NC)转染的MM细胞系的CCK-8增殖测定。

[0010] 图2A-2G是一组示意图、线图、柱状图和生存图,示出了lncRNA lnc-17-92^{TV1}(在本文中也称为脂肪生成调控因子(RROL))如何以不依赖microRNA的方式介导依赖性。图2A示意性地示出了MIR17HG基因座的概况,包括lncRNA(RROL)和miRNA(miR-17-92)衍生的转录本。图2B是一组线图,示出了3个大型MM患者队列中高RROL表达(上四分位数)的预后显著性(PFS和OS)。图2C是一组柱状图,示出了用pri-mir-17-92(pri-miR)或GFP对照转导的AMO1和H929细胞中的CCK-8增殖测定。图2D是一组柱状图和图像,示出了暴露于ASO1的DROSHA WT或KO AMO1和H929细胞的CCK-8增殖测定。图2E是示出RROL耗竭在NOD SCID小鼠中基于基质胶的AMO1^{DR-KO}异种移植物中的效果的线图。图2F是示出肿瘤注射小鼠的生存分析的生存图。图2G是一组柱状图,示出了表达WT或突变(-/-)Dicer的HCT-116和DLD-1结肠直肠癌细胞系中的CCK-8增殖测定。

[0011] 图3A-3G是一组图表、图像、柱状图和点图,示出了RROL与染色质的相互作用以调节基因表达。图3A是示出在MM细胞系(DROSHA WT(AMO1,H929)或KO(AMO1^{DR-KO}))中RROL耗竭后的转录组分析并示出通常下调的基因(adj p＜0.05;lfc＜-1)的图表。图3B是柱状图,其示出了暴露于ASO1 24小时的3名MM患者的CD138+细胞中RROL靶点的qRT-PCR分析。图3C是点图和一组相关图,示出了CD138 MM患者细胞中所有RROL靶点(mRNA)与RROL之间的相关性以及每个RROL靶点单独与RROL之间的相关性。图3D是示出GLuc/SEAP双报告基因测定的柱状图,该GLuc/SEAP双报告基因测定显示在使用ASO1敲低RROL后ACC1、ANO6、CCDC91、EPT1、EXT1、FER和KIAA1109启动子活性降低。图3E是一组线图,示出了在用针对RROL靶点的siRNA转染后的5种MM细胞系中的CCK-8增殖测定。图3F是示出ChIRP-qPCR分析的柱状图,该分析显示与使用LacZ反义探针纯化的染色质(阴性对照)相比,使用2个RROL反义探针组(ps1和ps2)纯化的染色质中ACC1启动子的有效扩增。图3G是一组图像和点图,示出了(左)通过对代表性AMO1细胞中的ACC1前mRNA(绿色)和RROL(紫色)进行双重RNA-FISH分析获得的快照;(右)箱线图显示了ACC1前体RNA点到最近的RROL点或到最近的随机点的距离(nm)。

[0012] 图4A-4G是一组示出RROL在ACC1启动子处对MYC占有率的促进的柱状图和图像。图4A是柱状图,示出了H929和AMO1细胞中裸暴露于ASO1 3天后转录变化的上游调控因子分析。图4B是一组柱状图和图像,示出了暴露于ASO1或NC(载体)24小时的AMO1、H929和266^{MYC+}中ACC1启动子处MYC占有率的ChIP-qPCR分析。图4C是柱状图和图像,示出了暴露于多西环素或DMSO 2天以敲低MYC并再暴露于ASO1或载体(NC)2天以耗竭RROL的P493-6细胞中ACC1 mRNA的qRT-PCR分析。图4D是示出ACC1前体RNA(红色)、MYC蛋白(绿色)和RROL(紫色)的Co-IF/FISH分析的一组图像。图4E示出了使用抗MYC抗体(α-MYC)或IgG对照对沉淀的RIP材料中RROL(检测同种型2)的qRT-PCR分析。图4F示出了对用对照RNA或RROL转录本-1和转录本-

2沉淀的RPPD材料中MYC的蛋白质印迹分析。图4G示出了使用MYC作为杂交蛋白2并使用阴性对照RNA(-)或RROL转录本-1和转录本-2作为杂交RNA的RNA Y3H。

[0013] 图5A-5I是一组示意图、图像和柱状图,示出了RROL介导MYC-WDR82转录复合体的组装,从而导致ACC1的转录和表观遗传激活。图5A示意性地示出了综合BioID和Co-IP/MS测定以探索在存在或不存在RROL耗竭的情况下的MYC-蛋白质相互作用网络。图5B是示出用RROL-1和RROL-2或对照RNA沉淀的RPPD材料中WDR82的蛋白质印迹分析的图像。图5C是示出使用WDR82作为杂交蛋白2并使用阴性对照RNA(-)或RROL转录本-1和转录本-2作为杂交RNA的RNA Y3H的图像。图5D是柱状图和图像,示出了WDR82沉默后AMO1中ACC1启动子处H3K4me3占有率的ChIP-qPCR分析。图5E是柱状图和图像,示出了WDR82沉默后AMO1中ACC1启动子处MYC占有率的ChIP-qPCR分析。图5F是柱状图和图像,示出了在AMO1中转染靶向WDR82(siWDR82-1或siWDR82-2)的siRNA后ACC1 mRNA的qRT-PCR分析。图5G是柱状图和图像,示出了暴露于裸ASO1 24小时的AMO1中ACC1启动子处WDR82-GFP占有率的ChIP-qPCR分析。图5H是柱状图和图像,示出了暴露于裸ASO1 24小时的AMO1和H929中ACC1启动子处H3K4me3占有率的ChIP-qPCR分析。图5I是一组示出ACC1启动子位点处的H3K4me3水平的蛋白质印迹图像。

[0014] 图6A-6E是一组柱状图、流式细胞术图表和示意图,示出了RROL/MYC-ACC1轴调控从头脂肪生成。图6A示出了在MM细胞系或CD138+MM患者细胞中RROL、MYC或ACC1耗竭/抑制之后^{14}C葡萄糖掺入脂质的情况。图6B是一组柱状图,示出了MM细胞中RROL抑制后基于液相色谱法-质谱法(LC-MS)的脂质分析。图6C是示出棕榈酸盐对MM细胞中RROL耗竭的抗增殖作用的影响的柱状图。图6D是一组流式细胞术图表,示出了棕榈酸盐对MM细胞中RROL耗竭的促增殖作用的影响。图6E示意性地示出了影响MM细胞生长的RROL途径。

[0015] 图7A-7J是一组点图、柱状图和生存图以及图像,描绘了在人MM的动物模型中在体外和体内发挥强大的抗肿瘤活性的RROL治疗性抑制剂。图7A示意性地示出了开发RROL治疗性ASO的多步骤筛选。图7B是示出一组11种MM细胞系中的CCK-8增殖测定的一组条形图。图7C是示出NOD SCID小鼠中AMO1细胞的皮下体内肿瘤生长的点图。图7D-图7E是示出AMO1异种移植物中RROL(图7D)和RROL靶点(图7E)的qRT-PCR分析的柱状图。图7F是示出显示三棕榈酸甘油酯在肿瘤中的调节的脂质谱分析的柱状图。图7G是示出NSG小鼠中MOLP8-luc+的体内肿瘤生长的基于BLI的测量的点图和图像。图7H是来自图7E中实验的生存图,黑色箭头表示治疗。图7I是示出NSG小鼠(PDX-NSG)中MM患者细胞的体内肿瘤生长的基于人κ轻链ELISA的测量的线图。图7J是示出从用G2-15b*-TO(G)或SB9-19-TO(SB)或载体(NC)作为对照处理的动物中取回的肿瘤中BCL2L11的qRT-PCR分析的柱状图。

[0016] 图8A-8C是一组柱状图,示出了筛选数据以及使用和不使用反义寡核苷酸的MIR17HG敲低。图8A是示出筛选数据分析的柱状图,其中upset图示出了MM细胞中细胞类型独特和共享lncRNA依赖性的鉴定。图8B是柱状图,示出了在条件启动子的调控下被工程化以表达dCas9-KRAB融合蛋白和抗MIR17HG gRNA的AMO1中获得的MIR17HG的敲低。图8C是示出在用两个gapmeR转染的AMO1中获得的MIR17HG的敲低的柱状图。

[0017] 图9A-9L是示出RROL表达以及与miR-17-92microRNA的相关性的一组箱线图和柱状图。图9A是示出新诊断(ND)与复发(R)MM患者中的RROL表达的箱线图。图9B是示出来自GSE66293的ND与R MM患者中RROL表达的箱线图。图9C是斯皮尔曼相关性(Spearman'

scorrelation),示出了通过RNA-seq和miRNA谱分析的140名MM患者的CD138+细胞中RROL与miR-17-92之间的相互关联。图9D是示出AMO1和H929细胞中miR-17-92microRNA的qRT-PCR分析的一组柱状图。图9E是一组柱状图,示出了DROSHA的WT或KO的AMO1和H929细胞中miR-17-92microRNA的qRT-PCR分析。图9F是一组柱状图,示出了在$MO1^{DR-KO}$和$H929^{DR-KO}$中使用3种不同的ASO或加扰对照(NC)的MIR17HG的敲低。图9G是4个MM样本中RROL的RNA-seq覆盖图和连接分析。图9H是示出AMO1中RROL转录变异体1和2的qRT-PCR分析的柱状图。引物扩增图9G中所示的区域。图9I是示出MMRF/CoMMpass数据集(n=720)和60种MM细胞系中RROL表达(TPM)的RNA-seq分析的箱线图。图9J是示出NOD SCID小鼠中基于基质胶的AMO1DR-KO异种移植物中RROL耗竭的影响的线图。图9K是示出用靶向MIR17HG前体RNA的5'端(5'-ASO)的ASO或扰乱对照(NC)转染的HCC-116细胞中的CCK-8增殖测定的柱状图。图9L是柱状图,示出了pri-mir-17-92、lnc-17-92TV1和lnc-17-92TV2的异位表达,通过qRT-PCR证实,显示:i)pri-mir-17-92异位表达后miR-17上调,ii)lnc-17-92TV1异位表达后上调,以及iii)lnc-17-92TV2异位表达后上调。

[0018] 图10A-10I是一组图像、热图和柱状图,示出了RROL和miR-17-92miRNA在体外的表达和定位。图10A是示出AMO1和H929中RROL的亚细胞qRT-PCR分析的柱状图。图10B是示出AMO1中RROL亚细胞定位的RNA-FISH分析的一组图像。图10C是示出裸(gymnotically)暴露于ASO1或ASO-1-NC的AMO1中RROL和miR-17-92miRNA的qRT-PCR分析的热图。图10D是示出裸暴露于ASO1 24小时的Daudi和Raji细胞中RROL转录靶点的qRT-PCR分析的柱状图。图10E是示出用靶向小鼠mir17hg新生RNA的3种不同ASO转染的5TGM1小鼠MM细胞中小鼠rrol、acc1和fer的qRT-PCR分析的柱状图。图10F-10G是示出用合并的miR-17-92miRNA抑制剂(图10F)或模拟物(图10G)转染的AMO1中miR-17-92miRNA(黑条)和RROL转录靶点(白条)的qRT-PCR分析的柱状图。图10H-图10I是示出ChIRP-qPCR分析的柱状图,其显示了使用2个RROL反义探针组(ps1和ps2)或使用LacZ反义探针(阴性对照)纯化的染色质中GAPDH外显子2的阳性反应(扩增)的%(图10H)或CT值(图10I)。

[0019] 图11A-11G是一组照片和柱状图,示出了RROL提高MYC在ACC1启动子处的占有率。图11A是野生型U266细胞或用携带FLAG或MYC-FLAG表达的载体感染的U266细胞中MYC的蛋白质印迹。图11B是RROL同种型的示意图。图11C是用抗MYC抗体(α-MYC)或IgG对照免疫沉淀后的RROL同种型-1和同种型-2的qRT-PCR。图11D是示出在MM细胞系AMO1和H929中用MYC抑制剂10058-F4处理后ACC1 mRNA的qRT-PCR分析的柱状图。图11E是示出在MM细胞系AMO1和H929中用MYC抑制剂10058-F4处理后C^{14}葡萄糖掺入脂质的情况的柱状图。图11F是示出用靶向ACC1的siRNA或扰乱siRNA(NC)转染后$U266^{MYC-}$和$U266^{MYC+}$中的CCK-8增殖测定的柱状图。转染后48小时测量细胞活力,并以NC转染细胞的%表示。图11G是用对照RNA或截短版本的lnc-17-92TV1沉淀的RPPD材料中MYC的蛋白质印迹分析的照片;5%的输入用作参考。

[0020] 图12A-12D是一组示出RROL敲低或WDR82-GFP融合蛋白表达后MYC和GFP表达的图像。图12A是示出在具有或不具有多西环素以诱导FBA-MYC融合蛋白并用NC或ASO1转染以敲低RROL的FBA-MYC细胞中MYC的蛋白质印迹分析的图像。图12B是示出在野生型AMO1细胞或用携带GFP或WDR82-GFP表达的载体感染的AMO1细胞中GFP的蛋白质印迹分析的图像。图12C是示出用对照RNA或截短版本的lnc-17-92TV1沉淀的RPPD材料中WDR82的蛋白质印迹分析的图像。图12D是一组图像和柱状图,示出了在H929中用siRNA库(n=4)沉默WDR82之后(48

小时时间点)WDR82、H3、H3H3K4me1、H3H3H3K4me2和H3H3K4me3的蛋白质印迹分析。核纤层蛋白A/C被用作蛋白质上样对照(核裂解物),ii.是密度测定分析的量化。

[0021] 图13A-13C是一组柱状图和照片,示出了暴露于结合RROL的ASO后葡萄糖更新和RROL靶点表达的影响。图13A是示出在用miR-17-92anti-miR转染AMO1后C14-葡萄糖掺入脂质的情况的柱状图。图13B是示出暴露于ASO1 36小时的AMO1和H929中miR-17-92的典型靶点BCL2L11(BIM)和PTEN的GEP分析的柱状图。图13C是暴露于ASO1 36小时的AMO1中miR-17-92的典型靶点BIM的蛋白质印迹分析的照片。

[0022] 图14A-14C是一组描绘开发靶向RROL的治疗性ASO的多步骤筛选的柱状图。图14A是示出步骤1结果的柱状图,该步骤识别RROL上ASO可访问的序列段,16个序列(>20-mer)为“G”或“SB”构型。图14B是示出步骤2结果的柱状图,该步骤优化从步骤1中选择的G2和SB9设计。图14C是示出步骤3结果的柱状图,其中测试了与棕榈酸(P)、胆固醇(C)或生育酚(T)接合(conjugated)的步骤2分子。

具体实施方式

定义

[0023] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本文主题所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。如在说明书和所附权利要求中使用的,除非有相反的规定,否则下列术语具有为便于理解本公开而指示的含义。

[0024] 如在说明书和所附权利要求中使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物,除非上下文另有明确指示。因此,例如,提及“一种组合物”包括两种或更多种此类组合物的混合物,提及“一种抑制剂”包括两种或更多种此类抑制剂的混合物等等。

[0025] 除非另有说明,否则术语“约(about)”被理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。“约”可以被理解为在所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%以内。

[0026] 本文所用的术语“大约(approximately)”是指在所述参考值的任一方向(大于或小于)上落入25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小的值的范围,除非另有说明或从上下文中明显可见(除非该数字超过可能值的100%)。除非上下文另有明确规定,否则本文提供的所有数值均用术语“约”修饰。

[0027] 过渡术语(transitional term)“包含(comprising)”与“包括(including)”、“含有(contains)”或“特征在于(characterized by)”同义,是包含性的或开放式的,并不排除附加的未列举的元素或方法步骤。相比之下,过渡短语“由……组成(consisting of)”排除了权利要求中未说明的任何元素、步骤或成分。过渡短语“基本上由……组成(consisting essentially of)”将权利要求的范围限制为说明的材料或步骤以及“不会对所要求保护的公开的基本和新颖特征产生实质性影响的材料或步骤”。

反义寡核苷酸

[0028] 在一个方面,本公开提供了在生理条件下结合MiR-17-92a-1簇宿主基因(MIR17HG)前体RNA的反义寡核苷酸(ASO)。

[0029] MIR17HG基因包含两种lncRNA,即lnc-17-92^{TV1}和lnc-17-92^{TV2},以及六种miRNA,即miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20a和miR-92a。lnc-17-92^{TV1}(也称为脂肪生成的RNA调控因子(RROL),lnc-17-92^{TV1}和MIR17HG$^{miR-17-92}$)转录本的核酸序列的NCBI登录号为NR_027350,版本为NR_027350.1。本文所示,Lnc-17-92^{TV1}提供介导转录因子复合物以驱动致癌基因翻译的染色质支架。Lnc-17-92^{TV1}转录本的核酸序列的NCBI登录号为NR_027349,版本为NR_027349.1。

[0030] MIR17HG前体RNA的核酸序列的Ensembl登录号为ENSG00000215417,如下所示(SEQ ID NO:1):

```
   1 gaagctctcc tcgcggggcg ggccggccgg ccgcaccccc ggcctggggc ctccggtcgt
  61 agtaaagcgc aggcgggcgg ggaggcggga gcaggagccc gcggccggcc agccgaagat
 121 ggtggcggct actcctcctg gtgagtctgc ccgcccctcc ggcgacggag ggaaacctgt
 181 tgtgtgcggc ccgggtctgg cgggcggggc ggagcggccc ggggcggact ggcccggggc
 241 agcgtggcgg cggcggcgtg gccggggcgg gtctcggccg ttggccgccc cggcgtgtgg
 301 cagccgcatc tggctgcccc ctcgctcgcc cgcgggccgg cggagggggg cagggccggg
 361 gcgggagggt gggagggggc ggcgtgcgcg tggcggccgc gcccgggacc cgcgcagacc
 421 ctgcctgggc cgacccgaag gcgggtgggc ggacggcgaa cacaatggcc cctcggggag
 481 aggacgtgcg aggcccgtgc cttctccggg gcccggggcg cgcgcggggc gtggggtctc
 541 tgggtaggaa agtttctccc gagggcgaga gttaaagcgc ctccagaaca aagcggcggc
 601 ggcggcggca catggggcag gccgcgggcc gggagggggc gcgcccacga ggtacctgcg
 661 cgccagcggg cggcgtggcg tgggcgggag cccgcggttc cccaaacttt gtacgcgcga
 721 gggtgggcgg aggggcgccg agatcggcgc ggcctgggcg ccacccccgc tccgcgtggg
 781 ctttgttagc ccgcgtgggc agcctcgggg cggggcccgc aacttccccg ccgtggccct
 841 cggaggaggc cgcagtcggc ctcagccgcg gcgtggagcc gcctgcgccc ggccgcttgc
 901 tgggagtgtg gcgcgggagg gccagcccgg ctcggcggga gcggcgtccc cgccgccatg
 961 ttcctgcggg gcgggctgca cgggggtgag ggcgggggac atggcggcga ctgcgcgccg
1021 ccgccgattg ttcccggctt aggcctcggg ccgcgtgcga cgggcaccgc ggccgcggag
1081 cccccgcccc tctgggccgg gctcgggggg gctgggggac acaaaggagg ggcggcgcgc
1141 ccgcgtcccc gccgcactcg ggcctcggcg ccgccggtcg ccgcgcggct gccgccggga
1201 aacgggttgg gggggttgcc gcgtccggcg gggcctgact ctgacccgcc gccccctggc
1261 ggctacgcgg agaatcgcag ggccgcgctc ccccttgtgc gacatgtgct gccggcccgg
1321 gctccatgag cgtggcgggc actttgcagt ctcgggtgtt cctgcccggt cttctgttcc
1381 taaactgcag caaagggaaa aggaactgaa aaaggcaggc tcgtcgttgc aatatcacca
1441 aaagagaaaa ttaacggcat gccatcagga ccacagcagt tggagaaaca actctttatc
1501 ccggcttgca gccacgaggt cttgattggg ggaggggtgg tgaagaatag tctgtgggct
1561 gctttttttt tttcctttta ctggagctgt acagtggagt cggtgattgc tgctgatcat
1621 aatcaagtat tttaggagct tatttagaca tgtatctgat agctaaggat ttttcaactt
1681 tattctctta cgtatttttc aactgtaaat tattgggctt ttaaatcctg ctagtattgc
1741 tcgactctta ctctcacaaa tggatggaat taattgctgt taggaggttg gaaaatagca
1801 aatatagatt tggacggtgg tagtaatttt gagcaaataa tgttttatct ttttttttcct
1861 tatttttccc tattccagtc atacacgtgg acctaactgc accagtagct tttctgagaa
1921 tacttgctga aaaggaagtt ttctggaatg ggtaagtgta ttctgatttt cttgaacttt
1981 tcttaaaaac aaatttttct tgctattaaa gttgaataaa taggattggt ttcttagaga
2041 gtaaaagtag gtgtttcttt ctttagacaa tgtacctttt ctgaaaaact aactcattaa
2101 gtacggattt gctaatttta aggtagtaaa attacagtgt aaatattcct gtacattttt
2161 ggaaactggc ttatgcagtt tacgaaatat aattttagac cctcttttaa gttgggtgat
2221 aaagtagata taacctgaga tgatagattt aaacaggata tttacgttct gctacaattg
2281 actgataaca cttgaagtgt agtctgaaca gtaattttgt taatcatttc aacaagtatt
2341 tgctaagtgg aagccagaag aggaggaaaa tgttttgcca cgtggatgtg aagatttcct
```

2401 ctaaaaggta cacatggact aaattgcctt taaatgttcc aaaattagtt ctcatttatt
2461 tgcagtctca ttttgttttg ttttttttct ctatgtgtca atccatttgg gagaggccag
2521 ccattggaag agccaccact tccagtgcta gttggatggt tggttatgat tgccttctgt
2581 aaagaattct taaggcataa atacgtgtct aaatggacct catatctttg agataattaa
2641 actaattttt tcttccccat tagggattat gctgaatttg tatggtttat agttgttaga
2701 gtttgaggtg ttaattctaa ttatctattt caaatttagc aggaaaaaag agaacatcac
2761 cttgtaaaac tgaagattgt gaccagtcag aataatgtca aagtgcttac agtgcaggta
2821 gtgatatgtg catctactgc agtgaaggca cttgtagcat tatggtgaca gctgcctcgg
2881 gaagccaagt tgggctttaa agtgcagggc ctgctgatgt tgagtgcttt ttgttctaag
2941 gtgcatctag tgcagatagt gaagtagatt agcatctact gccctaagtg ctccttctgg
3001 cataagaagt tatgtattca tccaataatt caagccaagc aagtatatag gtgttttaat
3061 agtttttgtt tgcagtcctc tgttagtttt gcatagttgc actacaagaa gaatgtagtt
3121 gtgcaaatct atgcaaaact gatggtggcc tgctatttcc ttcaaatgaa tgatttttac
3181 taattttgtg tacttttatt gtgtcgatgt agaatctgcc tggtctatct gatgtgacag
3241 cttctgtagc actaaagtgc ttatagtgca ggtagtgttt agttatctac tgcattatga
3301 gcacttaaag tactgctagc tgtagaactc cagcttcggc ctgtcgccca atcaaactgt
3361 cctgttactg aacactgttc tatggttagt tttgcaggtt tgcatccagc tgtgtgatat
3421 tctgctgtgc aaatccatgc aaaactgact gtggtagtga aaagtctgta gaaaagtaag
3481 ggaaactcaa acccctttct acacaggttg ggatcggttg caatgctgtg tttctgtatg
3541 gtattgcact tgtcccggcc tgttgagttt ggtggggatt gtgaccagaa gattttgaaa
3601 attaaatatt actgaagatt tcgacttcca ctgttaaatg tacaagatac atgaaatatt
3661 aaagaaaatg tgtaactttt tgtgtaaata catcttgtct tgttttcatt caaaaacatt
3721 tcacttttgg ggttgcgtgt cagatttggc agtataaatt ctggctatat tttttgttgt
3781 tagatttatt tggctgttaa gtattgcgat atgactaaac atactgtata cctgatgatc
3841 atctgtaaag ttagagtata tctttttgct ttctttggag ttagtgttat tccaggatat
3901 tttacttaat ctaaaagtta atttatgttg ctcatatatt actcaagtat ttaaatttag
3961 agagaatgcc gctctgttta aagcaatgtg taaagatgag tttttttaag catggaattt
4021 agggttgggg tacaatttgt ttctattaag caagtaccag tttaccaata catgagtaac
4081 tgaagtgtaa ctgttaaatg cttgtatact agtttttctt tctgattgtc agtgatttat
4141 aagctataaa tgaccaaggt cctcagactg cttttagcat ctgcaactta aaaaaatggg
4201 agttagaaaa agaacaaatg ctaaatagag taacagttaa atgtatgtgt acactcttcc
4261 caaatgccaa gagtgcagcg gtggggtgag attcagatat tcatttattt ctaagtctgt
4321 agttaacatt tatgttccct actccctacg taagccagac tttggcaaca gtgatagttg
4381 attccaggct tatttgactt aaagtcactg aagtggaaac taagaagtgg cagttagtgt
4441 tttacccagc atttctgcct tctctctttt cttcatgtgt ttttgtctct agcctatgtg
4501 tatttgtgta gaataatgtg ggatacctga ataatagatt taaaaggacc aagtggtaaa
4561 attgggccca agctgaagta caggcaaact tgatgtttga aagataagtt ttgagaaatg
4621 tcattgtatt ttggagtaaa agaggctatc ttagtaataa gaaataaact tccataacac
4681 taggttagac cacccaataa atctagaaat cagcttttaa aaatattgtc tgaagtctaa
4741 caaaagtttt cacctctaat gtgttcttta agaaatttaa ggaacttagc cttggattcc
4801 tgaatagaaa ggtaagaatt ctatcattct ggagttgatg aaaacataaa ttttcaggat
4861 gtgaaatgaa cagtgattta taaaatggaa atcaaattgt acattagcag agttcttaag
4921 ctttttgaat tgaaggagac ctaataattg tgtctttttg gttatttagt gacaaacgtg
4981 gctttcaaac tatgcttaaa aagttccggc tggacacggt ggctcacacc tataatccta
5041 gcacttgggg aggctgaggc agacggatta cctgaggtca ggagttcgag accaacctgg

```
5101 ccgacatggt gaaacgctgt ctctactaaa aatataaaaa attagccggg tgcagtggcg
5161 tgcacctgta atcccagcta ctctggaggc tgaggcagga gaatcacctg aacctgggag
5221 gtggaggttt cagtgagctg agatcctgcc actgcactcc agcctgggcg caagaccaag
5281 acttaaacgc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagtt tcataataca gcatggtctg
5341 gtagtttgca aaatggtgtg cttttgggga gatacactag caatttttt aaaaactgga
5401 acagtgtgat aggaagcctg ctggatgatt tcttaaatat tctaaaatgt aagtcaaata
5461 tgttttaata acaaagactt aaatggcttt tctccctaga gactgaaact agtattcatt
5521 gtgttcagaa cttaattggg cttgaactga gatttaaatc taataaacaa gttaataaat
5581 gtgtatgttt tgttgtgggt ttggtagtga tctgtggttc tatagggttt aataggaatt
5641 gcttttgatt tgtttctggc tttagaatgt gaggcaaatt ttacattctt ggttctatta
5701 agattttctt aggcatgcta acatgccaac aaaaagccat gtaagtattg tataaaaaga
5761 ttcacattgt taatttagcc attttgaaat tcagatgagt gagcaagttg ataatggcct
5821 catctctgac ctgagaaaaa acaactttga cccttgttct taaaatgctt taaccttgaa
5881 gttgcttgag acttaagagg tcatgttgct ttaggtttaa taaatagcct taactatttg
5941 gaggggaaaa aatgggtcaa ctttttttt ttttttggc gtttgcatgt acaactttct
6001 atttttagcc tatatttgga aagaaagcac ttaacatttt aggaattctt tttaaagctg
6061 cttgcaaagt gttggtgatt ttactgaaaa cttttgagat cttcatttta caggcagacc
6121 tgtctaacta caagccagac ttgggttttc tcctgtagtt tgaagacaca ctgactcctg
6181 acaaaatgca gcctgcaact tcctggagaa caactcagtg tcacattaaa gtttattatg
6241 tatttaatga tacactgttt aattgacagt tttgcatagt ttgtctaact ttagagaatt
6301 aagagcctct caactgagca gtaaaggtaa ggagagctca atctgcacag agccagtttt
6361 tagtgtttga tggaaataag atcatcatgc ccacttgaga cttcagatta ttctttagct
6421 tagtggttgt atgagttaca tcttattaaa gtcgaaatta atgtagtttt ctgccttgat
6481 aacatttcat atgtggtatt agttttaaag ggtcattagg aaaatgcaca tattccatga
6541 attttaagac ccatagaaaa gttgaagaat gcttaatttt cttatccagt aatgtaaaca
6601 cagagacaga acattgagat gtgcctagtt ctgtatttac agtttggtct ggctgtttga
6661 gttctagcgc atttaatgtt aataaataaa atactgcatt ttaaagctgt taagaaattg
6721 tccagaacga gaatattgaa ataaaaactt caaggttatt
```

[0031] 本文所用的术语“反义寡核苷酸”(缩写为ASO)是指能够结合靶RNA分子的非天然存在的核苷酸聚合物(寡聚物)。

[0032] 除非明确说明或从上下文显而易见,否则术语“核苷酸”包括具有核糖(即,形成核糖核酸RNA的核糖核苷酸)或2’-脱氧核糖(即,形成脱氧核糖核酸DNA的脱氧核糖核苷酸)和磷酸盐的核苷。核苷酸是核酸聚合物或多核苷酸的单体单元。DNA中的四种核碱基是鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。RNA中的四种核碱基是鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。在本上下文中,应当理解的是,ASO对于它们可能被引入的细胞而言是外源性的。

[0033] ASO可以由核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸或其组合组成。ASO通过至少部分互补区进行杂交来调节目标RNA。ASO调节机制包括转录停滞、RNA合成中断(例如,在包括加帽、剪接和/或从细胞核到细胞质的运输的各个阶段)、核糖体附着、核糖核酸酶(RNase)H募集、mRNA降解(例如,gapmer ASO)、翻译停滞(例如,ASO与目标RNA结合阻断翻译),或者通过ASO杂交对目标RNA进行空间阻断。

[0034] 术语“gapmer”和“gapmeR”在本文中用于指在间隙或主要区域两侧具有RNA样翼片段的短DNA ASO结构。这些线性DNA分子被设计成与靶点杂交,以通过诱导RNase H切割来降

解RNA。由于修饰的RNA样侧翼区以及对核酸酶降解ASO的抗性,gapmer与目标RNA的结合具有更高的亲和力。gapmer间隙包含至少一种与一个或两个翼中的修饰不同的修饰。此类修饰包括核碱基修饰、单体连接修饰和糖修饰。

[0035] 在一些实施方式中,ASO与MIR17HG前体RNA的5'末端区域结合。当在MIR17HG前体RNA的背景下使用时,术语"末端区域"是指5'末端核苷酸的前20%。在一些实施方式中,ASO在MIR17HG前体RNA的5'末端核苷酸的前10%、前15%或前20%内结合。在一些实施方式中,ASO在MIR17HG前体RNA的3'末端区域内结合。

[0036] 在一些实施方式中,ASO靶向接近MIR17HG前体RNA的5'末端的内含子区域。本文所用的术语"内含子区域"是指在转录过程中从前体RNA中除去的RNA分子的区域。在一些实施方式中,ASO靶向MIR17HG前体RNA的miRNA初级转录本(pri-miRNA)从其中剪接的区域(例如,pri-mir-17-92)。pre-miRNA是较长的序列,成熟miRNA来源于此。

[0037] 本文公开的ASO在生理条件下与MIR17HG前体RNA结合。本文所用的术语"生理条件"是指哺乳动物体内条件下通常遇到的条件,例如在体温(约37℃)、在生理pH值(在约7.3至约7.5的范围内)下的等渗溶液(约0.9%生理盐水)。

[0038] ASO有效互补性的最低百分比可以根据标准程序确定。通常,ASO与MIR17HG前体RNA具有约85%至约100%的互补性。在一些实施方式中,ASO与其靶向的MIR17HG前体RNA序列具有100%互补性。在一些实施方式中,ASO与MIR17HG前体RNA具有至少99%的互补性、至少98%的互补性、至少97%的互补性、至少96%的互补性、至少95%的互补性、至少90%的互补性、至少85%的互补性。

[0039] ASO的长度范围为15个至30个核苷酸。在一些实施方式中,ASO的长度为30个或更少的核苷酸。在一些实施方式中,ASO的长度为25个或更少的核苷酸。在一些实施方式中,ASO的长度为24个或更少的核苷酸。在一些实施方式中,ASO的长度为23个或更少的核苷酸。在一些实施方式中,ASO的长度为20个或更少的核苷酸。在一些实施方式中,ASO的长度为18个或更少的核苷酸。在一些实施方式中,ASO的长度为15个核苷酸至24个核苷酸。在一些实施方式中,ASO的长度为18个核苷酸至23个核苷酸。在一些实施方式中,ASO的长度为18个核苷酸(在本文中被称为18-聚体(18-mer))。在一些实施方式中,ASO是20-聚体(20-mer)。在一些实施方式中,ASO是21-mer。在一些实施方式中,ASO是22-mer。在一些实施方式中,ASO是23-mer。本文中提及ASO时使用的术语"mer"是指核苷酸的长度。例如,术语"16-mer"和"16mer"是指一段16个核苷酸。

[0040] 在一些实施方式中,ASO是用于与CRISPR cas9基因编辑系统一起使用的单链RNA、单向导RNA(sgRNA)。代表性抗MIR17HG前体RNA sgRNA的核酸序列如下所示:

[0041] MIR17HG前体RNA sgRNA#1:AGTGGCGCGAAGGCGCAGGT(SEQ ID NO:2);

[0042] MIR17HG前体RNA sgRNA#2:GTGGCGCGAAGGCGCAGGTC(SEQ ID NO:3);

[0043] MIR17HG前体RNA sgRNA#3:CCTCGCCCGAGGGCGCGAAG(SEQ ID NO:4);和

[0044] MIR17HG前体RNA sgRNA#4:GAGGGCGCGAAGTGGCGCGA(SEQ ID NO:5)。

[0045] 在一些实施方式中,ASO是单链DNA(ssDNA)分子。代表性ssDNA抗MIR17HG前体RNA ASO的核酸序列如表1所示。

表1:代表性抗MIR17HG前体RNA ASO的核酸序列

名称	序列
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
鼠 aso1（SEQ ID NO: 11）	TACAGTGGAAATCGGC
鼠 aso2（SEQ ID NO: 12）	GCGAGCAAACACGAAA
鼠 aso3（SEQ ID NO: 13）	ACTTGGATTGGATGAG
ASO-非靶向对照（ASO-NC）（SEQ ID NO: 14）	GCTCCCTTCAATCCAA

[0046] 可以通过在ASO的核碱基、核苷酸或核苷间连接上添加化学部分(moiety)或化学修饰来进一步修饰ASO。ASO修饰增强体内稳定性、提高特异性并减少毒副作用。代表性修饰包括用2'-O-甲氧基乙基核糖(2′-O-methoxyethylribose,MOE)基团修饰核苷酸。

[0047] MIR17HG前体RNA结合ASO可以以G构型制备,其中ASO包含用2'-MOE修饰的5'末端核苷酸、未修饰的DNA("DNA间隙")和用2'-MOE修饰的3'末端核苷酸。可替代地,MIR17HG前体RNA结合ASO可以以SB构型制备,其中ASO中的所有核苷酸均用2'MOE修饰。代表性ASO的核酸序列如表2所示。

[0048] Gapmer ASO包含末端到DNA间隙的修饰的核苷酸。在一些实施方式中,DNA间隙长度为5、6、7、8、9、10、11、12或15个核苷酸。在一些实施方式中,ASO是5-8-5gapmer,其中DNA间隙的5'侧翼是5mer的2'-MOE化学修饰的核苷酸,并且3'侧翼是5mer的2'-MOE化学修饰的核苷酸。

表2:代表性MIR17HG前体RNA结合ASO的核酸序列。

名称	序列
ASO 1（SEQ ID NO: 15）	CCCGGCCGCCTCCCCCCGTCCC
ASO 2，选择为 G 分子（G2）（20mer）（SEQ ID NO: 16）	CCCTCCCACCCTCCCCCGCC
ASO 3（SEQ ID NO: 17）	CCCCCCCGACCCCCTGTGTTT
ASO 4（SEQ ID NO: 18）	TCCTCCAACCTTTTATCGTTT
ASO 5（SEQ ID NO: 19）	TCGTCCTTTTTTCTCTTGT
ASO 6（SEQ ID NO: 20）	CTCCCCTTTTTTACCCAGTT
ASO 7（SEQ ID NO: 21）	CCCTCTCCGGTCGGTAACCTT
ASO 8（SEQ ID NO: 22）	TCGTCCTTTTTTCTCTTGTAGT
ASO 9，选择为 SB 分子（SB9）（22mer）（SEQ ID NO: 23）	CCACCCCTAACACTGGTCTTCT
ASO 10（SEQ ID NO: 24）	CCCCTCCGCCCTCGTCCTC
ASO 11（SEQ ID NO: 25）	TCTCTCATTTTCATCCAC
ASO 12（SEQ ID NO: 26）	AGAGTAAAACAAAACAAAA
ASO 13（SEQ ID NO: 27）	ACAAAATAGAAAAAAAAGGA
ASO 14（SEQ ID NO: 28）	ATAAAAAGGGATAAGGTCAG
ASO 15（SEQ ID NO: 29）	TCGTCCTTTTTTCTCTTGTA
ASO 16（SEQ ID NO: 30）	CCCTATGGACTTATTATCT

[0049] 可以对表2中代表性的ASO进行修饰，例如可以选择ASO 2作为G构型ASO进行进一步修饰，可以选择ASO 9作为SB构型ASO进行进一步修饰。这些ASO可以被进一步修饰，如表3所示。在一个实施方式中，如表3所示，G2微调15可以被选择为G构型ASO（G2-15），如表4所示，SB微调19可以被选择为SB构型ASO（SB2-19）。

表3：基于G2分子的代表性ASO修饰的核酸序列

名称	序列
20mers	
G2 微调 1（SEQ ID NO: 31)	gCCCTCCCACCCTCCCCCGC
G2 微调 2（SEQ ID NO: 32)	cgCCCTCCCACCCTCCCCCG
G2 微调 3（SEQ ID NO: 33)	ccgCCCTCCCACCCTCCCCC
G2 微调 4（SEQ ID NO: 34)	cccgCCCTCCCACCCTCCCC
G2 微调 5（SEQ ID NO: 35)	CCTCCCACCCTCCCCCGCCg
G2 微调 6（SEQ ID NO: 36)	CTCCCACCCTCCCCCGCCgc
G2 微调 7（SEQ ID NO: 37)	TCCCACCCTCCCCCGCCgca
G2 微调 8（SEQ ID NO: 38)	CCCACCCTCCCCCGCCgcac
18mers	
G2 微调 9（SEQ ID NO: 39)	CCCTCCCACCCTCCCCCG
G2 微调 10（SEQ ID NO: 40)	CCTCCCACCCTCCCCCGC
G2 微调 11（SEQ ID NO: 41)	CTCCCACCCTCCCCCGCC
G2 微调 12（SEQ ID NO: 42)	gCCCTCCCACCCTCCCCC
G2 微调 13（SEQ ID NO: 43)	cgCCCTCCCACCCTCCCC
G2 微调 14（SEQ ID NO: 44)	TCCCACCCTCCCCCGCCg
G2 微调 15，选择为 G 分子（G2-15）（SEQ ID NO: 45)	CCCACCCTCCCCCGCCgc

表4:基于SB9分子的代表性ASO修饰的核酸序列

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

[0050] 在一些实施方式中,ASO可以被进一步修饰。在一些实施方式中,修饰包括将附加部分(例如,脂质)与一种或多种ASO核苷酸接合。此外,ASO还可以包括一种或多种核碱基、核苷酸或核苷间连接的一种或多种化学修饰。

ASO接合(Conjugation)和修饰

[0051] 附加部分(例如,脂质部分)可以与ASO内的任何一个或多个核苷酸接合,以提高递送效率、特异性细胞或组织靶向性、细胞摄取和/或延长循环时间。在一些实施方式中,ASO内的一个或多个核苷酸与亲脂性部分接合。在一些实施方式中,化学部分与ASO的5’或3’末

端(即,gapmer中DNA间隙的5’和/或3’)上的一个或多个核苷酸接合。在一些实施方式中,ASO的每个核苷酸均与化学部分接合(即,完全2’MOE构型)。在一些实施方式中,第一个5’末端核苷酸与化学部分接合。在一些实施方式中,最后一个3’末端核苷酸与化学部分接合。代表性亲脂性部分包括棕榈酸、甾醇(例如,生育酚、胆固醇)、碳水化合物(例如,N-乙酰半乳糖胺;GalNAc)、油烯基残基、视黄醇基残基、胆固醇基残基、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、双氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶基氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、肉豆蔻酸、O3-(油酰)石胆酸、O3-(油酰)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基和吩噁嗪。

[0052] 代表性生育酚包括α-生育酚、β-生育酚、γ-生育酚、δ-生育酚。生育酚的类似物包括α-生育三烯酚、β-生育三烯酚、γ-生育三烯酚和δ-生育三烯酚的各种不饱和类似物。

[0053] 在一些实施方式中,ASO内的一个或多个核苷酸与脂质(例如棕榈酸、生育酚或胆固醇)接合。脂质可以通过PS(*)或PO()连接与ASO的5’或3’端相连。在一些实施方式中,ASO内的一个或多个核苷酸与脂质接合。在两个或更多个核苷酸被如此修饰的实施方式中,脂质可以是相同或不同的。例如,在三个核苷酸与脂质接合的实施方式中,每种脂质均可以是不同的,例如棕榈酸、生育酚和胆固醇。适于与核酸接合的附加的亲脂性部分是本领域已知的。参见例如美国专利8,106,022、8,404,862、10,077,443、10,358,643、10,441,653、11,116,843和11,260,134以及美国专利申请公开2014/0045919、2016/0289677、2021/0163934和2022/0175817。

[0054] 在一些实施方式中,ASO包含对一个或多个核碱基、糖部分、核苷间连接(即,骨架)或其组合的化学修饰。

[0055] 核碱基修饰包括任何在结构上可与核碱基区分但在功能上可与核碱基互换的修饰或取代,包括5-取代嘧啶、6-氮杂嘧啶、烷基或炔基取代嘧啶、烷基取代嘌呤以及N-2、N-6和O-6取代嘌呤。代表性修饰核碱基包括假尿苷、2’-硫尿苷(s2u)、N6’-甲基腺苷、5’甲基胞苷、N-乙基哌啶7’-EAA三唑修饰腺嘌呤、N-乙基哌啶6’-三唑修饰腺嘌呤、6’-苯基吡咯胞嘧啶、2’,4’-二氟甲苯酰核糖核苷、2-氨基丙基腺嘌呤、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-N-甲基鸟嘌呤、6-N-甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、2-硫代胞嘧啶、5-丙炔基($C\equiv C—CH_3$)尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-核糖尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基、8-氮杂和其他8-取代嘌呤、5-卤代,特别是5-溴、5-三氟甲基、5-卤代尿嘧啶和5-卤代胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤、3-脱氮腺嘌呤、6-N-苯甲酰腺嘌呤、2-N-异丁酰鸟嘌呤、4-N-苯甲酰胞嘧啶、4-N-苯甲酰尿嘧啶、5-甲基4-N-苯甲酰胞嘧啶、5-甲基4-N-苯甲酰尿嘧啶、三环嘧啶、通用碱基、疏水性碱基、混杂碱基、尺寸扩大碱基和氟化碱基。代表性三环嘧啶包括1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮、1,3-二氮杂吩噻嗪-2-酮和9-(2-氨基乙氧基)-1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮(G-夹钳)。修饰的核碱基还可以包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环取代的核碱基,例如7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟苷、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。

[0056] 附加的核碱基修饰是本领域已知的。参见例如美国专利3,687,808、5,130,302、5,811,534、5,830,653和6,005,096、美国专利申请公开20030158403和2003/0175906以及Kroschwitz等人,编辑,《聚合物科学与工程学简明百科全书》,第1版,John Wiley&Sons,

1990年(Kroschwitz et al.,eds.,The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,1sted.,John Wiley&Sons,1990)。

[0057] 糖部分修饰包括双环、三环和非双环糖部分或糖替代物,包括呋喃糖部分(例如,2-脱氧呋喃糖部分修饰)。代表性修饰呋喃糖部分包括非环状修饰,例如在2'、4'和5'位置。在一些实施方式中,非环状修饰是支链的。糖部分2'位置的代表性修饰包括2'-脱氧-2'-氟(2'-F)、2'-阿拉伯糖-氟(2'-Ara-F)、2'-O-苄基、2'-O-甲基-4-吡啶(2'-O-CH_2Py(4))、2'-O-甲基(2'-OCH_3)(2'-OMe或Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-O(CH_2)$_2$$OCH_3$)(2-O-MOE或MOE)、卤素、烯丙基、氨基、叠氮基、解锁核酸(UNA)、乙二醇核酸(GNA)、SH、CN、OCN、CF_3、OCF_3、O—C_1-C_{10}烷氧基,O—C_1-C_{10}取代烷氧基、O—C_1-C_{10}烷基、O—C_1-C_{10}取代烷基、S-烷基、N(R_m)-烷基、O-烯基、S-烯基、N(R_m)-烯基、O-炔基、S-炔基、N(R_m)-炔基、O-亚烷基-O-烷基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基、O-芳烷基、O(CH_2)$_2$$SCH_3$、O($CH_2$)$_2$ON($R_m$)($R_n$)和$OCH_2$C(=O)—N($R_m$)($R_n$),其中每个$R_m$和$R_n$独立地为H、氨基保护基或$C_1$-$C_{10}$烷基(未修饰或经修饰)。

[0058] 在一些实施方式中,糖部分修饰包含2'位置的氟修饰(2'-氟或2'-F)。2'-F修饰具有较高的RNA结合亲和力和对核酸酶降解的抗性。含2'-F的糖部分修饰的制备方法是本领域已知的。参见例如美国专利5,459,255和6,262,241、美国专利申请公开20060036087和20110269814,以及Ludwig,《生物化学与生物物理学报》16(3-4):131-3(1981年)以及Ludwig和Eckstein《有机化学期刊》54:631-635(1989年)(Ludwig,acta Biochim.Biophys.Acad.Sci.Hung.16(3-4):131-3(1981)and Ludwig and Eckstein J.Org.Chem.54:631-635(1989))。

[0059] 双环糖部分修饰包括形成第二环的桥接糖修饰。在一些实施方式中,第二环包含呋喃糖环上4'和2'位置之间的桥。在一些实施方式中,糖部分是核糖。代表性4'至2'桥接糖部分修饰包括(S)-cEt-BNA、三环DNA(tcDNA)、PMO、4'-CH_2-2'、4'-(CH_2)$_2$-2'、4'-(CH_2)$_3$-2'、4'-CH_2—O-2'(也被称为锁核酸或"LNA")、4'-CH_2—S-2'、4'-(CH_2)$_2$—O-2'(也被称为乙烯桥连核酸或"ENA")、4'-CH(CH_3)—O-2'(以S构型时也被称为"受限乙基"或"cEt")、4'-CH_2—O—CH_2-2'、4'-CH_2—N(R)-2'、4'-CH(CH_2OCH_3)—O-2'("受限MOE"或"cMOE")、4'-C(CH_3)(CH_3)—O-2'、4'-CH_2—N(OCH_3)-2、4'-CH_2—O—N(CH_3)-2'、4'-CH_2—C(H)(CH_3)-2'、4'-CH_2—C(=CH_2)-2'、4'-C(RARb)—N(R)—O-2'、4'-C(R_aR_b)—O—N(R)-2'、4'-CH_2—O—N(R)-2'和4'-CH_2—N(R)—O-2',其中每个R、R_a和R_b独立地为H、保护基或C_1-C_{12}烷基(未修饰或经修饰)。附加的糖部分修饰及其类似物是本领域已知的。参见例如美国专利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和10,119,136、美国专利申请公开20100190837和Zhou等人,《有机化学期刊》74(1):118-34(2009年)(Zhou et al.,J.Org.Chem.74(1):118-34(2009))。

[0060] 核苷间连接(即,骨架)修饰包括任何改变的3'至5'磷酸二酯键,包括烷基膦酸酯(例如,甲氧基丙基膦酸酯(MOP))和硫代磷酸酯(例如,硫代磷酸酯(PS))。包含具有手性中心的多个修饰核苷间连接的ASO可以是立体纯的(仅包含一个立体异构体)、立体无规的(立体异构体没有规律性),或者具有立体异构体的模式。代表性核苷间连接修饰包括磷酸二酯键(P=O)(未修饰,天然存在)、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯和硫代磷酸酯(PS)(P=S)(包括Pr异构体和Sp异构体)以及二硫代磷酸酯(PS2)(HS-P=S)、5'-(E)-乙烯基膦酸酯(5'-(E)-VP)、5'-甲基膦酸酯(5'-MP)、(S)-5'-C-甲基磷酸酯,以及5'-硫代磷酸酯(5'-

PS)。非含磷的核苷间连接包括亚甲基甲基亚氨基(—CH_2—N(CH_3)—O—CH_2)、硫代二酯、硫代氨基甲酸酯(—O—C(=O)(NH)—S—)、硅氧烷(—O—SiH_2—O—)、肽核酸(PNA)和N,N'-二甲基肼(—CH_2—N(CH_3)—N(CH_3)—)。中性电荷核苷间连接包括磷酸三酯、甲基膦酸酯(MP)、MMI(3'-CH_2—N(CH_3)—O-5')、酰胺-3(3'-CH_2—C(=O)—N(H)-5')、酰胺-4(3'-CH_2—N(H)—C(=O)-5')、甲醛缩醛(3'-O—CH_2—O-5')、甲氧基丙基和硫代甲醛(3'-S—CH_2—O-5')。含磷和非含磷的核苷间连接的制备方法是本领域已知的。参见例如美国专利申请公开20220049248和Hu等人,《信号转导和靶向治疗》5(1):101-25(2020年)(Hu et al.,Signal Transduct.Target.Ther.5(1):101-25(2020))。

[0061] 2'-脱氧呋喃糖基糖部分修饰涉及在2'-位置添加具有两个氢的五元碳呋喃糖环糖部分,并且可以在2'位置以外的位置上未修饰或进一步修饰。2'-O-甲氧基乙基糖部分修饰涉及用2'-O(CH_2)$_2$—OCH_3)取代核糖基环的2'-OH基团。

药物组合物

[0062] 本公开的药物组合物包括治疗有效量的ASO和药学上可接受的载体。本文所用的术语"治疗有效量的ASO"是指提供所需治疗效果的足量ASO。

[0063] 对于特定患者而言,ASO的有效量取决于一个或多个因素,这些因素可以包括受试者的年龄、体重、癌症的类型、位置和严重程度以及总体健康状况。最终,主治医师将决定适当的剂量和给药方案。通常,ASO将以一系列剂量给予,通常是每周单剂量,持续数周。在一些实施方式中,ASO的有效量为每剂量约0.03mg至约3kg。在一些实施方式中,ASO的有效量为每剂量约0.3mg至约300mg。在一些实施方式中,ASO的有效剂量为每剂量约30mg。在一些实施方式中,ASO的有效量为每剂量约10mg/kg受试者体重至约50mg/kg受试者体重。在一些实施方式中,ASO每周施用一次,持续约30周至约60周。在一些实施方式中,ASO每周施用一次,持续约40周。在一些实施方式中,ASO每周施用一次、每周施用两次或每隔一个工作日施用一次(例如,每周3天),持续约4周。

[0064] 组合物可以以无菌液体制剂的形式提供,例如,等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘稠组合物,其可以被缓冲至选定的pH值。液体的药学上可接受的载体包括水性载体或非水性载体。短语"药学上可接受的载体"是领域公认的,包括药学上可接受的材料、组合物或媒介物,其适用于向哺乳动物施用本公开的ASO。载体包括液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料,参与将目标药剂从一个器官或身体的一部分携带或运输到另一个器官或身体的一部分。每种载体均必须是"可接受的",即与制剂中的其他成分相容且不会对患者造成伤害。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;西黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液(Ringer's solution);乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及药物制剂中使用的其他无毒相容物质。

[0065] 液体载体的代表性实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水及其合适的混合物。组合物通常是等渗的,即它们具有与血液相同的渗透压。氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠、碳酸钠、磷酸二氢钠一水合物、无水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠七水合物、等渗电解质溶液(例

如,Plasma-Lyte®)可用于实现所需的等渗性。可以使用盐酸和/或氢氧化钠调节组合物的pH。在一些实施方式中,pH可以在约7.5至约8.5的范围内。根据载体和ASO,可以添加其他赋形剂,例如,润湿剂、分散剂或乳化剂、胶凝剂和增粘剂、防腐剂以及本领域已知的类似物。

[0066] 在一些实施方式中,组合物包含药学上可接受的载体。载体可以是基于脂质的,例如,脂肪酸、脂质纳米颗粒(LNP)、脂质体、脂质囊泡或脂质体复合物。在一些实施方式中,ASO在脂肪酸载体中乳化。代表性脂肪酸包括二十碳五烯酸乙酯(EPA-E)、十八碳四烯酸乙酯(ODTA-E)、十九碳五烯酸乙酯(NDPA-E)、花生四烯酸乙酯(AA-E)、二十碳四烯酸乙酯(ETA-E)、二十一碳五烯酸乙酯(HPA-E)。

[0067] 在一些实施方式中,载体是LNP。LNP包括两个或更多个由水性隔室分隔的同心双层。脂质双层可以被官能化和/或彼此交联。脂质双层可以包括一种或多种配体、蛋白质或通道。

[0068] 脂质载体(例如LNP)可以包括一种或多种阳离子/可离子化脂质、一种或多种聚合物接合脂质、一种或多种结构脂质、和/或一种或多种磷脂。“阳离子脂质”是指带正电荷的脂质或能够保持正电荷的脂质。阳离子脂质包括一个或多个带正电荷的胺基,具体取决于pH。“聚合物接合脂质”是指具有接合的聚合物部分的脂质。聚合物结合脂质包括聚乙二醇化的脂质,其是与聚乙二醇结合的脂质。“结构脂质”是指在生理pH下不带净电荷的非阳离子脂质。示例性结构脂质包括胆固醇、粪固醇、谷固醇、麦角固醇、菜油固醇等。“磷脂”是指具有两个脂肪酸和一个磷酸根离子的甘油三酯的脂质。LNP中的磷脂将脂质组装成一个或多个脂质双层。LNP、其制备方法、配方和递送公开于例如美国专利申请公开2004/0142025、2007/0042031和2020/0237679以及美国专利9,364,435、9,518,272、10,022,435和11,191,849。

[0069] 脂质体复合物、脂质体和脂质纳米颗粒可以包括脂质分子的组合,例如,阳离子脂质、中性脂质、阴离子脂质、多肽-脂质接合物和其他稳定成分。代表性稳定成分包括抗氧化剂、表面活性剂和盐。脂质体复合物、脂质体和脂质纳米颗粒的组成和制备方法是本领域已知的。参见例如美国专利8,058,069、8,969,353、9,682,139、10,238,754、美国专利申请公开2005/0064026和2018/0291086,和Lasic,《生物技术趋势》16(7):307-21(1998年),Lasic等人,《欧洲生物化学学会联合会快报》312(2-3):255-8(1992年),以及Drummond等人,《药理学评论》51(4):691-743(1999年)(Lasic,Trends Biotechnol.16(7):307-21(1998),Lasic et al.,FEBS Lett.312(2-3):255-8(1992),and Drummond et al.,Pharmacol.Rev.51(4):691-743(1999))。

药物试剂盒

[0070] 在一个方面中,本公开涉及包含一个或多个ASO的药物试剂盒或系统。试剂盒或系统包括例如盒、箱、管或类似物的包装,其中严密封闭有一个或多个容器,例如小瓶、管子、安瓿瓶或瓶,其包含ASO或其药物组合物。试剂盒或系统还可以包括使用ASO及其药物组合物的印刷说明书。

[0071] 在一些实施方式中,试剂盒包含治疗有效量的抗MIR17HG前体RNA ASO,以及用于在治疗受试者的MIR17HG前体RNA引起的疾病中使用的印刷说明书。在一些实施方式中,试剂盒还包含MYC原癌基因、bHLH转录因子(MYC)抑制剂以及关于MYC抑制剂使用的印刷说明

书,其中MIR17HG前体RNA ASO和MYC抑制剂或以相同剂型或不同剂型置于相同或不同的容器中。

使用方法

[0072] 在一个方面,本公开涉及治疗患有MIR17HG前体RNA的异常表达和功能在其中发挥作用的疾病的受试者。方法需要向有需要的受试者施用包含治疗有效量的ASO的药物组合物。

[0073] 术语“MIR17HG前体RNA的异常表达和功能在其中发挥作用的疾病”在本文中用于指可以通过MIR17HG前体RNA转录本的治疗靶向而改善的疾病。

[0074] 本文所用的术语“治疗”是指获得有益或期望结果(包括临床结果)的方法。此类结果可以包括以下中的一种或多种:缓和或改善MIR17HG前体RNA在其中发挥作用的疾病的一种或多种症状、减轻疾病程度、稳定疾病状态、延迟或减缓疾病、改善或减轻疾病以及缓解疾病(无论是部分缓解还是完全缓解),无论是可检测的还是不可检测的。

[0075] 本文所用的术语“受试者”(或“患者”)包括易患或患有MIR17HG前体RNA的异常表达和功能在其中发挥作用的疾病的动物界所有成员。在一些实施方式中,受试者是人类。因此,根据本公开,“患有MIR17HG前体RNA的异常表达和功能在其中发挥作用的疾病”、“患有肿瘤”或“需要”治疗的受试者广泛涵盖已被确诊的受试者,包括先前可能已经接受过一轮或多轮治疗的患有活性疾病的受试者,以及目前未接受治疗的受试者(例如处于缓解期)但可能仍有复发风险的受试者,以及尚未确诊但有患MIR17HG前体RNA的异常表达和功能在其中发挥作用的疾病的倾向的受试者(例如基于既往病史和/或家族病史,或具有一种或多种风险因素的患者,使得医疗专业人员可能合理怀疑该受试者有患MIR17HG前体RNA的异常表达和功能在其中发挥作用的疾病的倾向)。

[0076] MIR17HG前体RNA在其中发挥作用的疾病包括例如肿瘤(癌症)以及肝病等非癌性疾病。

[0077] 本文所用的术语“肿瘤”是指以过度增殖或细胞凋亡减少为特征的疾病。可以使用的本公开的说明性肿瘤包括但不限于胰腺癌、白血病(例如,急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病、急性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性粒单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金病(Hodgkin’s disease)、非霍奇金病(non-Hodgkin’s disease))、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom’s macroglobulinemia)、重链病和实体肿瘤,例如肉瘤和癌(例如,纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肉瘤(Ewing’s tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、威尔姆氏瘤(Wilm’s tumor)、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤,室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0078] 在一些实施方式中,MIR17HG前体RNA的异常表达和功能在其中发挥作用的疾病是

多发性骨髓瘤、淋巴瘤或结肠直肠癌。代表性淋巴瘤包括慢性淋巴细胞白血病、皮肤B细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)。代表性结肠直肠癌包括胃肠道腺癌、直肠腺癌、结肠腺癌。多发性骨髓瘤(MM)是一种遗传复杂的浆细胞恶性肿瘤,约占血液系统癌症的10%,尽管近来取得了进展,但MM在很大程度上仍无法治愈(Gulla和Anderson,《血液学》105:2358-2367(2020年)(Gulla and Anderson,Haematologica 105:2358-2367(2020)))。

[0079] 在一些实施方式中,MIR17HG前体RNA在其中发挥作用的疾病是非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝纤维化、病毒性肝炎或酒精性肝病(ALD)。在这些疾病中,MYC(一种调节肝细胞功能的高度多效性的转录因子)已被鉴定为失调。MYC的过表达改变了多种作用,包括细胞增殖、生长、代谢、DNA复制、细胞周期进程、细胞粘附和分化。MYC过表达常见于肝纤维化患者,如Zheng等人,《基因》(巴塞尔)8:123-20(2017年)(Zheng et al.,Genes(Basel)8:123-20(2017).)中更详细地描述的。

[0080] 在一些实施方式中,疾病是其中MIR17HG前体RNA的转录本进一步与MYC原癌基因、bHLH转录因子(MYC)或MYC结合伴侣相互作用的疾病,或者以MYC失调或MYC结合伴侣失调为特征的疾病。MYC在其中发挥作用的代表性疾病包括多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤(例如,弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤和伯基特淋巴瘤(burkitt lymphoma))、三阴性乳腺癌、胰腺癌、肝癌和胃癌。

联合治疗

[0081] 本公开的疗法可以与至少一种其他活性剂联合使用来治疗疾病和病症。本文中的术语"联合"是指联合施用药剂,其包括以相同或单独的剂型基本上同时施用,或按顺序施用,例如作为同一治疗方案的一部分或通过连续的治疗方案。因此,如果按顺序施用,则在开始施用第二种疗法时,在某些情况下,仍可在治疗部位以有效浓度检测到两种疗法中的第一种疗法。可以确定顺序和时间间隔,使得它们可以一起作用(例如,协同作用以提供比以其他方式施用更多的益处)。例如,可以同时或在不同时间点以任何顺序依次施用治疗剂;但是,如果不是同时施用,则可以在时间上足够接近地施用,从而提供所需的治疗效果,其可以是协同作用的方式。因此,这些术语并不限于在完全相同的时间施用活性剂。

[0082] 附加治疗剂的剂量可以与已知或推荐的剂量相同,甚至更低。参见Hardman等人,Goodman和Gilman主编的《治疗学的药理学基础》,第10版,McGraw-Hill,纽约,2001年;《医生桌上参考书》第60版,2006年(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)。可以与本发明的疗法联合使用的抗癌剂是本领域已知的。参见例如美国专利9,101,622(其第5.2部分)。"抗癌"剂能够对受试者的癌症产生负面影响,例如通过杀死癌细胞、诱导癌细胞凋亡、降低癌细胞的生长速度、减少转移的发生率或数量、减小肿瘤大小、抑制肿瘤生长、减少肿瘤或癌细胞的血液供给、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫应答、预防或抑制癌症的进展或者延长癌症受试者的寿命。更一般地,这些附加的活性剂将以有效杀死或者抑制患病或癌细胞增殖的组合量提供。这一过程可能涉及将癌细胞与受体细胞和药剂或多种因子同时接触。这可以通过将细胞与包含两种药剂的单一组合物或药理制剂接触来实现,或者通过将细胞与两种不同的组合物或制剂

同时接触来实现,其中一种组合物包括ASO,另一种组合物包括第二药剂。

[0083] 在一些实施方式中,本公开的疗法与化学疗法、放射疗法、免疫治疗干预、靶向疗法、促凋亡疗法或细胞周期调节疗法结合使用。

[0084] 在一些实施方式中,本公开的疗法可以在附加药剂(例如,抗癌剂)治疗之前或之后以从几分钟到几周的间隔进行。在将本公开的附加药剂和疗法分别应用于受试者的实施方式中,通常会确保在每次递送的时间之间不会间隔很长一段时间,使得药剂和本发明的疗法仍然能够对受试者的疾病发挥有利的联合作用。在这种情况下,可以考虑在相隔约12-24小时内、更优选地在相隔约6-12小时内向受试者施用这两种形式。然而,在某些情况下,可能需要大幅延长治疗时间,在相应的施用之间间隔数天(2天、3天、4天、5天、6天或7天)至数周(1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周)。在一些实施方式中,本公开的疗法和附加药剂可以在同一患者就诊期间施用;在其他实施方式中,两种药剂在不同的患者就诊期间施用。

[0085] 在一些实施方式中,本公开的疗法和附加药剂是周期性施用的。循环疗法涉及在一段时间内施用一种治疗剂,然后在一段时间内施用第二种治疗剂,并重复这种顺序施用,即循环,以减缓对一种或两种附加治疗剂产生耐药性,避免或减少一种或两种附加治疗剂的副作用,和/或提高治疗的效力。在一个实例中,循环疗法涉及在一段时间内施用第一种附加治疗剂,然后在一段时间内施用第二种附加治疗剂,可选地,然后在一段时间内施用第三种附加治疗剂,依此类推,并重复这种顺序施用,即循环。预计必要时将重复治疗周期。还考虑可以将各种标准疗法和外科手术干预与本公开的细胞联合应用。

[0086] 以下描述了代表性的附加治疗剂类型。在一些实施方式中,附加治疗剂是MYC抑制剂。代表性MYC抑制剂包括顺铂、吉西他滨(gemcitabine)、阿西替尼(axitinib)、那屈肝素和苯甲脒。

[0087] 在一些实施方式中,附加治疗剂是乙酰辅酶A羧化酶-α(acetyl-CoA carboxylase-α,ACC1)抑制剂。在一些实施方式中,AAC1抑制剂是5-十四烷氧基-2-糠酸(5-tetradecyl-oxy-2-furoic acid,TOFA)。

[0088] 在一些实施方式中,附加治疗剂是免疫调节酰亚胺药物(IMiD)。代表性IMiD包括沙利度胺(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)、泊马度胺(pomalidomide)和伊贝度胺(iberdomide)。在一些实施方式中,附加治疗剂是蛋白酶体抑制剂。代表性蛋白酶体抑制剂包括硼替佐米(bortezomib)、卡非佐米(carfilzomib)(Kyprolis®)、德兰佐米(delanzomib)、伊沙佐米(ixazomib)、马里佐米(marizomib)和奥普佐米(oprozomib)。

[0089] 可能适合与本文所述的本发明疗法联合的多发性骨髓瘤治疗剂包括贝兰妥单抗莫福汀(belantamab mafodotin-blmf)(Blenrep®)、硼替佐米(bortezomib)(Velcade®)、卡非佐米(carfilzomib)(Kyprolis®)、卡莫司汀(carmustine)(BiCNU®)、西达基奥仑赛(ciltacabtagene autoleucel)(Carvykti®)、环磷酰胺、达雷妥尤单抗(daratumumab)(Darzalex®)、达雷妥尤单抗(daratumumab)和透明质酸酶(Darzalex Faspro®)、盐酸多柔比星脂质体(Doxil®)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)(Empliciti®)、艾基维仑赛(idecabtagene vicleucel)(Abecma®)、伊沙妥昔单抗

(isatuximab-irfc)(Sarclisa®)、柠檬酸伊沙佐米(ixazomib citrate)(Ninlaro®)、来那度胺(lenalidomide)(Revlimid)、美法仑(melphalan)和盐酸美法仑(Alkeran®片剂、注射用Alkeran®、Evomela®)、帕米膦酸二钠(Aredia®)、普乐沙福(plerixafor)(Mozobil®)、泊马度胺(pomalidomide)(Pomalyst®)、塞利尼索(Selinexor)(Xpovio®)、沙利度胺(thalidomide)(Thalomid®)、唑来膦酸(Zometa®)以及硼替佐米(bortezomib)(PS-341)、盐酸阿霉素(Adriamycin®)和地塞米松(dexamethasone)的PAD组合。

免疫疗法

[0090] 可以采用免疫疗法(包括免疫检查点抑制剂)治疗已经确诊的癌症。免疫检查点分子包括例如PD1、CTLA4、KIR、TIGIT、TIM-3、LAG-3、BTLA、VISTA、CD47和NKG2A。临床上可用的免疫检查点抑制剂的实例包括度伐利尤单抗(durvalumab)(Imfinzi®)、阿替利珠单抗(atezolizumab)(Tecentriq®)和阿维鲁单抗(avelumab)(Bavencio®)。临床上可用的PD1抑制剂的实例包括纳武单抗(nivolumab)(Opdivo®)、帕博利珠单抗(pembrolizumab)(Keytruda®)和西米普利单抗(cemiplimab)(Libtayo®)。

化学疗法

[0091] 抗癌疗法还包括多种化学疗法和放射疗法的联合疗法。联合化疗包括例如Abraxane®、六甲蜜胺、多西他赛(docetaxel)、Herceptin®、甲氨蝶呤、Novantrone®、Zoladex®、顺铂(CDDP)、卡铂、甲基苄肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑(melphalan)、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝脲、放线菌素D、柔红霉素、阿霉素、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicomycin)、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)(VP16)、他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、雌激素受体结合剂、Taxol®、吉西他滨(gemcitabien)、Navelbine®、法尼基蛋白转移酶抑制剂、反式铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱和甲氨蝶呤,或前述的任何类似物或衍生变体及其组合。

放射疗法

[0092] 抗癌疗法还包括基于辐射的DNA损伤治疗。联合放射疗法包括通常所知的伽马射线、X射线和/或将放射性同位素定向递送至肿瘤细胞,这对DNA、DNA的复制和修复以及染色体的组装和维持造成广泛的损伤。放射性同位素的剂量范围差异很大,取决于同位素的半衰期、所发射的辐射强度和类型以及肿瘤细胞的吸收情况,并将由主治医师确定。

[0093] 放射疗法可以包括外部放射治疗或内部放射治疗。外部放射治疗涉及将放射源置于受试者体外,并向体内的癌症区域发射辐射。内部放射治疗使用密封在直接放置在癌症内部或附近的针头、种子、导线或导管中的放射性物质。

[0094] 考虑以下工作实施例将进一步理解本公开的这些和其他方面,这些工作实施例意在说明本公开的某些实施方式,但并非意在限制其由权利要求限定的范围。

实施例

实施例1:材料和方法

[0095] 细胞系:细胞系(CL)在37℃、5% CO_2下生长。a)MM-CL:AMO1、NCI-H929、SK-MM-1、

U266、JJN3和KMS-12-BM均购自DSMZ(德国布伦瑞克市)。MM.1S、MM.1R和RPMI-8226均购自ATCC(美国弗吉尼亚州马纳萨斯市)。ABZB CL对AMO1硼替佐米耐药,ACFZ Cl对AMO1卡非佐米耐药(Morelli等人,《血液》132:1050-1063(2018年)(Morelli et al.,Blood 132:1050-1063(2018)))。LR7 CL对U266美法仑耐药(Morelli等人,《血液》132:1050-1063(2018年))。这些细胞在补充有10%胎牛血清(Lonza Group Ltd.,瑞士巴塞尔市)和1%青霉素/链霉素(Gibco®,Life Technologies)的RPMI-1640培养基(Gibco®Life Technologies,美国加利福尼亚州卡尔斯巴德)中培养。b)B细胞淋巴瘤细胞系(BCLOCL):Maver-1、Jeko-1(套细胞淋巴瘤)、Sultan、P3HR1、Daudi和Raji(伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma))(购自ATCC)在补充有10%胎牛血清(Lonza Group Ltd.)和1%青霉素/链霉素(Gibco®,Life Technologies)的RPMI-1640培养基(Gibco®Life Technologies)中培养。c)非恶性细胞系:HK-2(人肾细胞,皮质/近端小管)购自ATCC,并在根据ATCC指南进行补充的K-SFM(角质形成细胞无血清培养基)(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific),美国马萨诸塞州沃尔瑟姆市)中培养;THLE-2(人肝细胞)购自ATCC,并在根据ATCC指南进行补充的BEGM(支气管上皮细胞生长培养基)(Lonza Group Ltd.)中培养;d)Lenti-X™293T(人胚肾,购自Takara(目录号632180))和Flp-In T-REx细胞在补充有10%胎牛血清(Lonza Group Ltd.)和1%青霉素/链霉素(Gibco®,Life Technologies)的DMEM(杜氏改良Eagle培养基)(Gibco®,Life Technologies)中培养。e)P493-6在补充有10%胎牛血清(Lonza Group Ltd.)和1%青霉素/链霉素(Gibco®,Life Technologies)的RPMI-1640培养基(Gibco®,Life Technologies)中培养。f)5TGM1鼠MM细胞在补充有10%胎牛血清(Lonza Group Ltd.)和1%青霉素/链霉素(Gibco®,Life Technologies)的IMDM(Iscove改良的杜氏培养基)(Gibco®,Life Technologies)中培养。g)结肠直肠癌细胞系HCT116和DLD-1(亲本和DICER突变体)购自Horizon Discovery,并在补充有10%胎牛血清(Lonza Group Ltd.)和1%青霉素/链霉素(Gibco®,Life Technologies)的ATCC配制的McCoy's 5a改良培养基(目录号30-2007)中培养。定期检测细胞以排除支原体污染。对细胞进行STR(短串联重复序列)鉴定。

[0096] 原代患者细胞:在获得丹娜—法伯癌症研究所机构审查委员会(Dana-Farber Cancer Institute Institutional Review Board)批准的知情同意后,通过菲科勒-海帕奇(Ficoll-Hypaque)(Lonza Group,瑞士巴塞尔市)密度梯度沉降法从MM患者的BM抽吸物中分离出CD138+细胞;然后使用抗CD138磁性活化细胞分离微珠(美天旎(Miltenyi Biotech),德国格拉德巴赫市)进行抗体介导的阳性选择。采用标准程序,使用藻红蛋白接合的CD138单克隆抗体通过流式细胞术分析来评估免疫选择细胞的纯度。对于长期培养(6天),根据制造商的说明,使用Falcon细胞培养插入物(康宁(Corning),美国纽约州纽约市)将CD138+细胞与HS-5细胞物理分离培养,如先前所述(Morelli等人,《血液》132:1050-1063(2018年)(Morelli et al.,Blood 132:1050-1063(2018)))。

[0097] 外周血单核细胞:在获得丹娜—法伯癌症研究所机构审查委员会(Dana-Farber Cancer Institute Institutional Review Board)批准的知情同意后,通过Ficoll-Hypaque(Lonza Group,瑞士巴塞尔市)密度梯度沉降法从MM患者的BM抽吸物中分离出CD138+细胞;然后使用抗CD138磁性活化细胞分离微珠(Miltenyi Biotech,德国格拉德巴

赫市)进行抗体介导的阳性选择。采用标准程序,使用藻红蛋白接合的CD138单克隆抗体通过流式细胞术分析来评估免疫选择细胞的纯度。对于长期培养(6天),根据制造商的说明,使用Falcon细胞培养插入物(Corning,美国纽约州纽约市)将CD138+细胞与HS-5细胞物理分离培养,如先前所述(Morelli等人,《血液》132:1050-1063(2018年)(Morelli et al., Blood 132:1050-1063(2018)))。

[0098] RNA-seq,MM患者的基于微阵列的基因表达分析和microRNA谱分析。RNA-seq:作为主数据集,使用先前发布的来自IFM/DFCI 20019临床试验(NCT01191060)的360名MM患者的CD138+MM细胞的RNAseq数据(Samur等人,《白血病》32:2626-2635(2018年)(Samur et al., Leukemia 32:2626-2635(2018)))。该数据集用于评估新诊断的MM患者中lncRNA的表达。使用Salmon的准映射对非链双端RNA测序进行量化。GRCh38转录本的参考转录本从Gencode v24下载。在QC用tximport控制从同种型水平TPM生成的基因的TPM值之后。所有图均使用R和ggpubr创建。使用TopHat对IFM队列的RNAseq数据进行从头组装。使用Gencode v24 GTF文件作为参考,并从输出文件中识别出由TopHat注释的新同种型。使用来自继续进行的DFCI/IFM研究的新诊断(ND)和复发(R)样本来比较ND-MM和R-MM。与仅诊断样本类似,这些样本通过双端测序进行测序,并使用上文说明的相同流程对表达进行量化。作为次要数据集,从MMRF研究门户网站下载TPM级别过滤的MMRF CoMMpass数据。仅使用诊断时从CD138+选定的BM样本中收集的样本进行分析。

[0099] 基于微阵列的基因表达分析:在公开数据集(GSE66293)(Lionetti等人,《肿瘤靶点》6:24205-17(2015年)(Lionetti et al.,Oncotarget6:24205-17(2015)))中评估RROL表达水平,该公开数据集包括通过GeneChip人类基因1.0ST阵列(Affymetrix,美国加利福尼亚州圣克拉拉市)进行分析的129例新诊断和12例复发MM病例(Todoerti等人,《临床癌症研究》19:3247-58(2013年)(Todoerti et al.,Clin.Cancer.Res.19:3247-58(2013)))。使用来自BrainArray库版本20.0.0的芯片定义文件(Dai等人,《核酸研究》33:e175-9(2005年)(Dai et al.,Nucleic Acids Res.33:e175-9(2005))),如所述(Todoerti等人,《临床癌症研究》19:3247-58(2013年)(Todoerti et al.,Clin.Cancer.Res.19:3247-58(2013)))获得归一化和重新注释的表达水平。通过威尔科克森秩和检验(Wilcoxon rank sum test)并在R环境(版本4.0.4)中进行连续性校正来评估两组之间的差异表达。

[0100] miRNA谱分析:使用AffymetrixGeneChip®miRNA Array 4.0平台生成IFM队列的miRNA表达数据。使用Bioconductor的Affy和oligo包来归一化miRNA表达数据。

[0101] 相关性分析:使用斯皮尔曼相关(Spearman correlation)来评估lncRNA、mRNA和miRNA之间的相关性。

[0102] 生存分析:使用R中的生存包进行生存分析,并使用对数秩检验进行组间比较。

[0103] dCAS9-KRAB细胞系的生成。表达dCas9-KRAB融合蛋白的细胞系根据Morelli等人,《分子生物学方法》2348:189-204(2021年)(Morelli et al.,Methods Mol.Biol.2348:189-204(2021))先前所述而生成。简言之,用表达dCas9-BFP-KRAB转基因的慢病毒(Addgene,质粒#46911)感染细胞,并分选稳定表达高BFP的克隆。感染是在低MOI(<0.4)下进行的。通过感染表达ENO1的sgRNA(gRNA_ENO1:CCGGCGAGATCTCCGTGCTC(SEQ ID NO:66)的慢病毒或非靶向阴性对照(gRNA_NC:GATGTGGTCATTCGTCATGA(SEQ ID NO:67)来评估表达dCas9-KRAB融合蛋白的MM细胞系中转录抑制的验证。sgRNA被克隆到pU6-sgRNA EF1Alpha-

pure-T2A-BFP(质粒#60955)中。该程序遵循Weissman实验室制定的协议,并可在线获取weissmanlab.ucsf.edu/CRISPR/CRISPR.html。根据下述逆转录(RT)和定量实时扩增(qRT-PCR)程序,通过qRT-PCR分析评估ENO1的下调。

[0104] CRISPRi活力筛选。文库设计:使用布洛德研究所(Broad Institute)门户网站(现称为CRISPick:portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public)设计靶向lncRNA TSS的gRNA。对于初步筛选,根据IFM/DFCI队列中的TPM中值>0.5选择目标lncRNA。对于二次筛选,根据初次筛选结果选择目标lncRNA(即,通过显著耗竭或富集的gRNA靶向,FDR<0.25);加上通过RNA-seq数据的从头组装鉴定的其他lncRNA以及基于其对纳入IFM/DFCI临床研究的MM患者的临床结果的影响而手动选择的lncRNA。

[0105] gRNA池文库构建:根据制造商的方案,使用Lipofectamine2000转染试剂(Thermo Fisher Scientific),将由7,500个gRNA组成的初级CRISPRi文库或由3,750个gRNA组成的次级CRISPRi文库与包装质粒(psPAX2,Addgene#12260;pMD2.G,Addgene#12259)共转染到HEK293T细胞中。将文库DNA(4μg)、psPAX2 DNA(4μg)和VSV-G DNA(2μg)混合并转染到T75烧瓶(x10)中的HEK293T细胞中。转染6小时后,除去培养基并替换为10ml病毒生产培养基(补充有10%FBS的DMEM培养基)。转染48小时后,收获慢病毒培养基,使用Lenti-X™浓缩试剂(Takara,目录号631232)浓缩,并储存在-80℃下。

[0106] 病毒滴度测定:将$1x10^6$个细胞(每种细胞系)接种到6孔板的每个孔中。在8μg/ml聚凝胺的存在下,用不同量的慢病毒感染细胞过夜。根据Cellecta第5.3和5.4节的方案,通过流式细胞进行慢病毒颗粒的滴度测定。

[0107] 初步筛选:使用Spinooculation,用MOI为0.1至0.3的文库慢病毒颗粒感染表达dCAS-KRAB融合蛋白的$4x10^7$个MM细胞。感染以一式三份进行。Spinoculation 1小时后除去含病毒的培养基,用PBS清洗细胞2次,然后在完全培养基中培养。4天后,用嘌呤霉素筛选细胞3天。在第7天,通过Ficoll-Hypaque(Lonza Group,瑞士巴塞尔市)密度梯度沉降法去除细胞碎片。将细胞再培养2周,确保文库的代表性达到1000倍。根据制造商的方案,使用血液和细胞培养物DNA Maxi/Midi试剂盒(Qiagen#13362133343)分离基因组DNA。Cellecta(加利福尼亚州山景城)对gRNA盒进行PCR扩增,用于gRNA代表性的Illumina测序。PCR和Illumina测序的方案可在线获取。

[0108] 筛选数据分析:为了发现候选基因,通过比较实验和对照(质粒文库)条件,将归一化的gRNA计数表加载到MaGeCK(基于模型的全基因组CRISPR-Cas9敲除分析)中。根据所有gRNA的平均log2倍数变化(LFC)和伪发现率(FDR)确定顶级基因。

[0109] MIR17HG的体外验证:将靶向MIR17HG的得分最高(n=4,MIR17HG sgRNA#1-4,SEQ ID NO:2-5)的sgRNA克隆到pRSGT16-u6Tet-sg-CMV-TetRep-2A-TagRFP-2A-Puro(Cellecta,cat.#SVCRU6T16-L)载体中,并通过测序确认。根据制造商的方案,使用Lipofectamine 2000转染试剂(Thermo Fisher Scientific)将gRNA构建体与包装质粒(psPAX2,Addgene#12260;pMD2.G,Addgene#12259)共转染到HEK293T细胞中。48小时后收获病毒,浓缩并储存在-80℃下。用驱动单个sgRNA表达的慢病毒感染稳定表达dCas9-KRAB融合蛋白的MM细胞系。使用嘌呤霉素选择感染的细胞。通过多西环素(0.5μg/mL,每隔一天)获得sgRNA的表达。

[0110] 反义寡核苷酸、合成miRNA模拟物和抑制剂、siRNA、长非编码LNA gapmerR,SEQ ID

NO:2-14均是定制设计的,购自Exiqon(丹麦韦兹拜克市)。

miR-17a、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b-1和miR-92a1的合成模拟物和抑制剂均购自Ambion(应用生物系统公司(Applied Biosystems),美国加利福尼亚州)。Silencer选定的siRNA购自Ambion(Applied Biosystems,美国加利福尼亚州)。t-ASO的设计如表2至表4所示。

[0111] 剥裸(Gymnosis)。裸实验如前所述进行(Taiana等人,《分子生物学方法》2348:157-166(2021年)(Taiana et al.,Methods Mol.Biol.2348:157-166(2021)))。简言之:以平板密度接种细胞以在实验的最后一天达到汇合。接种时细胞数量范围为96孔板中0.5至2.5x 10^3、12孔板中2.5至10x 10^4、6孔板中1至3x 10^5。对于ChIP和Co-IP实验,在T75烧瓶中(最终体积为10mL),接种时的细胞数量为1x 10^6。

[0112] 细胞的瞬时转染。根据制造商的说明,使用25nM LNA gapmeRs(Exiqon)通过Lipofectamine 2000转染来自粘附细胞系的细胞。通过Neon转染系统(Invitrogen,美国加利福尼亚州)转染(电穿孔)来自悬浮细胞系(即非粘附细胞系)的细胞(1150下2脉冲,30ms)。使用25nM的LNA gapmeR、miRNA抑制剂/模拟物和siRNA。相对于FAM染料标记的抗miR阴性对照,通过流式细胞分析评估的转染效率达到85%至90%。

[0113] 使用慢病毒质粒的稳定表达。为了生成稳定过表达miR-17-92簇的细胞,用PMIRH17-92PA-1慢病毒载体(System Biosciences,美国加利福尼亚州帕洛阿尔托市)转导AMO1。为了生成稳定表达c-MYC的细胞,用MYC-DDK标记(RC201611L3)的人v-MYC骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(鸟)(MYC)的Lenti ORF克隆(Origene Technologies,马里兰州罗克维尔)转导U266。为了生成稳定表达WDR82的细胞,用mGFP标记(RC216325L4)的人WD重复结构域82(WDR82)的Lenti ORF克隆(Origene Technologies,马里兰州罗克维尔)转导AMO1。为了生成稳定表达Cas9的细胞,用pLX_311-Cas9(Addgene#96924)转导AMO1和H929。通过抗生素选择3至5天来选择表达转基因的细胞。

[0114] CRISPR/CAS9基因敲除。为了生成DROSHA KO细胞,用靶向DROSHA的transEDIT CRISPR单gRNA慢病毒表达载体(CMV启动子,ZsGreen,TEVH-1203933)(transOMIC technologies Inc.,美国阿拉巴马州亨茨维尔市)转导稳定表达Cas9的AMO1和H929。在感染5天后对ZsGreen+细胞进行分选(BD FACSARIA III;BD Biosciences,美国加利福尼亚州圣何塞市Qume Drive)并培养。

[0115] 细胞活力测定。根据制造商的说明,通过细胞计数试剂盒8(CCK-8)测定(Dojindo Molecular Technologies)和7-氨基放线菌素(7-AAD)流式细胞术测定(BD biosciences)评估细胞活力。流式细胞术分析由FACS CANTO II(BD biosciences)或由Attune NxT流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific)进行。

[0116] 细胞凋亡检测。通过Annexin V/7-AAD流式细胞术测定(BD biosciences)和电子显微镜研究细胞凋亡。流式细胞术分析由FACS CANTO II(BD biosciences)或由Attune NxT流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific)进行。

[0117] 逆转录(RT)和定量实时扩增(qRT-PCR)。RNA提取、逆转录(RT)和定量实时扩增(qRT-PCR)如前所述进行(Morelli等人,《血液》132:1050-1063(2018年)(Morelli et al.,Blood 132:1050-1063(2018)))。简言之,根据制造商的说明,用TRIzol®试剂(Thermo Fisher Scientific)从细胞中提取总RNA。根据制造商的说明,使用RNA亚细胞分离试剂盒

(目录号25501)(Active Motif,加利福尼亚州卡尔斯巴德市)进行细胞核和细胞质亚细胞RNA纯化。通过nanodrop(Celbio Nanodrop分光光度计nd-1000)验证总RNA的完整性。对于RROL(MIR17HG)和mRNA剂量研究,通过高容量cDNA逆转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific)获得oligo-dT引发的cDNA,然后用作模板来量化:

[0118] a)人RROL(Hs03295901)、ACACA或ACC1(Hs01046047_m1)、ANO6(Hs03805835_m1)、EXT1(Hs00609156_m1)、FER(Hs00245497_m1)、MALAT1(Hs00273907_s1)和PVT1(Hs00413039_m1)。使用人GAPDH(Hs03929097_g1)或ACTB(Hs03023943_g1)或18S(Hs03003631_g1)进行归一化。

[0119] b)鼠rrol(Mm01230322_s1)、acaca(Mm01304258_m1)和fer(Mm00484303_m1)。

[0120] 根据制造商的说明,使用ViiA7 RT读取器(Thermo Fisher Scientific),使用单管TaqMan miRNA测定(Thermo Fisher Scientific)检测和量化miR-17(002308)、miR-18a(002422)、miR-19a(000395)、miR-20a(000580)、miR-19b(000396)和miR-92a-1(000431)。成熟miRNA表达在RNU44上归一化(Thermo Fisher Scientific,测定Id:Hs03929097_g1)。还使用以下引物通过SYBR Green qRT-PCR检测RROL同种型:RROL-1(Fw,5'-CCTGCAACTTCCTGGAGAAC(SEQ ID NO:68);Rev,5'-GTCTCAAGTGGGCATGATGA(SEQ ID NO:69)),RROL-2(Fw,5'-GACCCTCTTTTAAGTTGGGTG(SEQ ID NO:70;Rev,5'-TGGCAAAACATTTTCCTCCT(SEQ ID NO:71))。比较实时聚合酶链式反应(RT-PCR)一式三份进行,包括无模板对照。使用比较交叉阈值(Ct)法计算相对表达。

[0121] 蛋白质印迹分析。蛋白质提取和蛋白质印迹分析如前所述进行。简言之,在补充有Halt蛋白酶抑制剂一次性混合物(100X,Thermo Scientific)的1x RIPA缓冲液(Cell Signaling Technology)中裂解细胞。使用4%-12%的Novex Bis-Tris SDS丙烯酰胺凝胶(Invitrogen)分离全细胞裂解物(每泳道约20μg),在硝化纤维素膜(Bio-Rad)上电转移。根据制造商的说明,使用NE-PER™细胞核和细胞质提取试剂(Thermo Fisher,#78833)提取核蛋白。电泳后,将硝化纤维素膜封闭并在4℃下用一级抗体探测过夜,然后将膜在PBS-Tween中洗涤3次,然后用与辣根过氧化物酶接合的二级抗体在室温下孵育2小时。使用蛋白质印迹Luminol试剂(sc-2048,圣克鲁兹(Santa Cruz),美国德克萨斯州达拉斯市)检测化学发光。

[0122] 一级抗体:抗MYC[D84C1](#5605)、抗WDR82[D2I3B](#99715)、抗H3K4me3[C42D8](#9751)和抗Lamin A/C(#2032)抗体均购自Cell Signaling Biotechnology(马萨诸塞州丹弗斯市)。抗Drosha抗体[EPR12794](ab183732)购自Abcam(英国剑桥)。抗MYC[9E10](sc-40)、GAPDH(sc-25778)和β-肌动蛋白(ab96682)抗体均购自Santa Cruz Biotechnology(美国德克萨斯州达拉斯市)。单克隆ANTI-FLAG® M2抗体(F3165)购自密理博西格玛(Millipore Sigma)(马萨诸塞州贝德福德市)。二级抗体:抗兔IgG,HRP连接抗体(#7074)和抗鼠IgG,HRP连接抗体(#7076)购自Cell Signaling Biotechnology(马萨诸塞州丹弗斯市)。

[0123] RNA FISH。RNA-FISH实验根据既定方案进行(Raj等人,《自然-方法》5:877-9(2008年);Shaffer等人,《公共科学图书馆:综合》8:e75120-9(2013年)(Raj et al.,Nat.Methods 5:877-9(2008);Shaffer et al.,PLoS One 8:e75120-9(2013)))。将细胞接种到包被有聚-L-赖氨酸的盖玻片上,并使其附着至少1小时。然后除去培养基,用1X PBS洗

涤细胞一次,然后在4℃下在冰冷的95%甲醇/5%乙酸中固定和透化10分钟。除去固定剂后,用洗涤缓冲液A(20% Stellaris RNA FISH洗涤缓冲液A,Biosearch Technologies,Inc.,SMF-WA1-60;10%去离子甲酰胺,EMD Millipore,S4117;在无RNAse的水中,Life Technologies,AM9932)在室温下洗涤细胞5分钟。然后将细胞与工作浓度为125nM的RNA FISH探针(Stellaris)在杂交缓冲液(90% Stellaris RNA FISH杂交缓冲液,Biosearch Technologies,SMF-HB1-10;10%去离子甲酰胺)中在37℃的加湿室里在黑暗中孵育过夜。第二天,在黑暗中在37℃下用洗涤缓冲液A洗涤细胞3次,每次30分钟。然后在37℃下用洗涤缓冲液A加1:1000Hoescht 33342(Invitrogen,原液10mg/mL)孵育细胞15分钟,随后在室温下用洗涤缓冲液B(Biosearch Technologies,SMF-WB1-20)洗涤5分钟。用Vectashield(VWR 101098-042)将盖玻片安装在载玻片上,并用透明指甲油密封盖玻片。Z堆栈图像是在具有Airyscan的LSM 880上获取的,其具有63X油浸物镜和2-3X变焦(W.M.Keck Microscopy Facility,MIT)中,并使用“自动”强度特征执行Airyscan处理。使用ImageJ生成代表性图像。

[0124] 用RNA FISH(Co-IF/FISH)共免疫荧光。Co-IF/FISH实验以与双RNA-FISH实验类似的方式进行,但进行了以下修改。将细胞粘附到盖玻片后,在室温下用4% PFA(VWR,BT140770)在无RNase的PBS中固定细胞10分钟。用PBS洗涤细胞3次5分钟,然后在4℃下用冰冷的95%甲醇/5%乙酸透化细胞10分钟。然后用4%无IgG牛血清白蛋白(VW,102643-516)在PBS中封闭细胞30分钟,然后将一级抗体混合物(PBS中1:500兔抗c-MYC D84C12)添加到细胞中,并在室温下在加湿室中孵育过夜。第二天,在室温下用PBS洗涤细胞3次5分钟,然后添加二级抗体混合物(PBS中1:500Alexa Fluor 488山羊抗兔IgG、ThermoFisher A11008)并在室温下在黑暗中孵育1小时。用PBS洗涤细胞3次5分钟,并且在进行RNA FISH之前,将具有抗体染色的细胞在室温下用4% PFA在PBS中重新固定10分钟,然后用PBS洗涤3次。在抗体染色和固定后,如上所述进行RNA FISH方案,从用洗涤缓冲液A洗涤开始。

[0125] RROL耗竭后基于微阵列的基因表达谱分析。如前所述(Morelli等人,《血液》132:1050-1063(2018年)(Morelli et al.,Blood 132:1050-1063(2018)))对用ASO1处理后的基因表达变化进行基于微阵列的分析。

[0126] RROL耗竭后AMO1DR-KO的RNA-seq分析。如上所述提取总RNA,并进行NovaSeq RNAseq分析,然后进行VIPER NGS分析流程(Cornwell等人,《BMC生物信息学》19:135-14(2018年)(Cornwell et al.,BMC Bioinformatics 19:135-14(2018)))。将差异表达基因(DEG)列表应用于GSEA或IPA软件,以揭示RROL调节的生物途径。

[0127] 荧光素酶报告基因测定。将人ACC1(NM_198834)、ANO6(NM_001025356)、CCDC91(NM_018318)、EPT1(NM_033505)、EXT1(NM_000127)、FER(NM_001308028)和ZYG11A(NM_001004339)的启动子报告基因克隆克隆到GLuc-ON™启动子报告基因载体(GeneCopoeia,马里兰州罗克维尔市)中。荧光素酶报告基因测定根据制造商的说明进行。

[0128] ChIRP。RROL和LacZ反义DNA探针是使用singlemoleculefish.com上的在线探针设计器设计的。寡核苷酸在3’端用18碳间隔臂生物素化。根据制造商的说明和既定方案(Chu等人,《可视化实验期刊》61:3912-6(2012年)(Chu et al.,J.Vis.Exp.61:3912-6(2012))),收集AMO1细胞并使用EZ-Magna ChIRP RNA Interactome试剂盒(Millipore Sigma,马萨诸塞州贝德福德市)进行ChIRP。

[0129] 从头脂肪生成测定。将细胞以每孔5x10^{5}个细胞接种在6孔板中,并在存在处理(ASO1/10058-F4/IPTG或各自的对照)的情况下孵育3天。在处理结束前二十四(24)小时,向每个孔中添加1μCi的^{14}C标记的葡萄糖(ARC-0122D)。收获细胞,用冷PBS洗涤并收集在玻璃管中。通过氯仿-甲醇提取法获得纯化的脂质提取物(Bligh和Dyer,《加拿大生物化学与生理学杂志》37:911-7(1959)(Bligh and Dyer,Can.J.Biochem.Physiol.37:911-7(1959)))。通过闪烁计数的光子发射对细胞脂质中的葡萄糖掺入进行量化,并将其归一化为总蛋白质含量。

[0130] 脂质谱分析。从MM细胞中提取脂质,干燥,并在氩气下储存直至分析。通过液相色谱-电喷雾电离串联质谱法(LC-ESI/MS/MS)在Nexera X2 UHPLC系统(Shimadzu)上分析脂质类,该系统与在比利时鲁汶大学的Lipometrix的混合三重四极杆/线性离子阱质谱仪(6500+QTRAP系统;AB SCIEX)相连。

[0131] 脂质提取:用1N HCl:CH3OH 1:8(v/v)、900μl $CHCl_3$以及200μg/ml抗氧化剂2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT;Sigma Aldrich)进行脂质提取。将氘标记脂质SPLASH® LIPIDOMIX®质谱标准品(#330707,Avanti Polar Lipids)的混合物掺入提取物混合物中。使用Savant Speedvac spd111v(Thermo Fisher Scientific)在室温下蒸发有机部分,并将剩余的脂质颗粒储存在-20℃的氩气下。

[0132] 质谱法。在质谱分析之前,将脂质颗粒在100%乙醇中重构。通过液相色谱-电喷雾电离串联质谱法(LC-ESI/MS/MS)在与混合三重四极杆/线性离子阱质谱仪(6500+QTRAP系统;AB SCIEX)相连的Nexera X2UHPLC系统(Shimadzu)上分析脂质种类。使用流动相A[1mM乙酸铵在水-乙腈5:95(v/v)中]和流动相B[1mM乙酸铵在水-乙腈50:50(v/v)中]在温度保持在35℃的XBridge酰胺柱(150mm×4.6mm,3.5μm;Waters)上进行色谱分离,梯度如下:(0-6min:0% B>6% B;6-10min:6%B>25% B;10-11min:25% B>98% B;11-13min:98% B>100% B;13-19min:100% B;19-24min:0% B),流速为0.7mL/min,从13分钟开始增加到1.5mL/min。在正离子模式下测量鞘磷脂、神经酰胺、二氢神经酰胺、己糖神经酰胺和乳糖神经酰胺,母离子扫描分别为184.1、264.4、266.4、264.4和264.4。在正离子模式下测量三酰甘油酯和二酰甘油酯,并对其中一个脂肪酰基部分进行中性丢失扫描。通过脂肪酰基碎片离子在负离子模式下测量磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸。脂质定量通过预定的多反应监测(MRM)进行,跃迁基于如上所述的中性丢失或典型产物离子。仪器参数如下:帘气=35psi;碰撞气体=8a.u.(中等);离子喷雾电压=5500V和-4,500V;温度=550℃;离子源气体1=50psi;离子源气体2=60psi;去簇电压=60V和80V;入口电压=10V和-10V;碰撞室出口电压=15V和15V。脂质组学分析考虑了以下脂肪酰基部分: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和22:6,但考虑以下的TG除外: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、22:6。

[0133] 数据分析。用MultiQuantTM软件(版本3.0.3)进行峰积分。对脂质类信号进行同位素贡献校正(用Python Molmass 2019.1.1计算),并根据内部标准信号进行量化,并遵守脂质组学标准倡议(LSI)的指南(LSI定义的2级类型量化)。

[0134] ChIP-qPCR。如前所述进行ChIP-qPCR(Fulciniti等人,《细胞报导》25:3693-3705

(2018年)(Fulciniti et al.,Cell Rep.25:3693-3705(2018)))。简言之,将1x10^{7}个细胞(AMO1、H929和U266^{MYC+},经过相应的处理)与1%甲醛在37℃下交联10分钟。然后提取交联的染色质,用裂解缓冲液稀释,并通过超声处理剪切。将染色质分成相等的样本,用特异性抗体进行免疫沉淀。通过离心将免疫沉淀物沉淀并在68℃下孵育以逆转蛋白质-DNA交联。使用Qiaquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN)从洗脱液中提取DNA。所用抗体如下:内源性MYC(Cell Signaling Technology,#13987)、MYC-DDK(Santa Cruz Biotechnology,9E10-x)、GFP(Abcam,#ab290)、H3K4me3(#ab8580)、正常兔IgG(Cell Signaling Technology,#2729)、正常小鼠IgG(Santa Cruz Biotechnology,sc-2025)。来自相同细胞的输入DNA的平行样本被用作对照。使用SYBR Green实时PCR分析(Applied Biosystems)来分析ChIP和输入DNA。ChIP-qPCR的引物:ACC1Fw:TTTCTCTCTTGCAGAGTGAGGTGTGG(SEQ ID NO:72)和ACC1 Rv:TACAAAGGCACGGAGAGAGCAAGT(SEQ ID NO:73)。

[0135] RNA-蛋白质下拉。RROL转录本被克隆到pBlueScript载体中并进行序列验证。根据制造商的说明,使用AmpliScribe^{TM}T7-Flash^{TM}生物素-RNA转录试剂盒(Lucigen,目录号#ASB71110)进行体外转录和生物素化。根据制造商的说明,使用Pierce^{TM}磁性RNA-蛋白质下拉试剂盒(Thermo Fisher Scientific,目录号#20164),将细胞核裂解物(来自1x10^{7}个AMO1细胞)与生物素化的RNA和链亲和素微珠孵育,用于RNA下拉孵育。对RNA相关蛋白进行洗脱,并通过蛋白质印迹法进行分析。

[0136] RNA酵母三杂交。使用标准方案,用RNA质粒转化酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)菌株YLW3。通过在耗竭尿嘧啶(SC-U)的SC板上进行点样来测试它们的活力。将蛋白质质粒转化到酵母菌株Y8800中,并在耗竭色氨酸的SC板(SC-W)中生长。将含有受检RNA质粒的酵母菌株YLW3与含有蛋白质质粒的酵母菌株Y8800交配。根据制造商的方案在YPD培养基中进行交配。在耗竭色氨酸和尿嘧啶(SD-WU)的SC培养基中选择携带两种质粒的二倍体,并通过在耗竭组氨酸的(SC-WUH)培养基中生长来测试二聚化。第二天,将SC-WUH培养基中的二倍体转移到含有不同水平的3AT(HIS3基因产物的竞争性抑制剂)的固体琼脂平板,以提高选择的严格性。仅有具有显著相互作用的二倍体才能产生足够的组氨酸以供生存。1-3天后,检查不同菌落在不同条件下的生长情况,以找出相互作用最强的二倍体。

[0137] RIP-qPCR。根据制造商的说明,使用Magna RIP RNA结合蛋白免疫沉淀试剂盒(Millipore Sigma,目录号17-701)进行RNA免疫沉淀(RIP)实验。用于RIP的抗MYC抗体[Y69]购自Abcam(ab32072)。正常兔IgG购自Cell Signaling Technology(目录号#2729)。用于检测RROL的引物如上所列。

[0138] 免疫共沉淀(Co-IP)。蛋白质裂解物获自1x10^{7}个细胞(AMO1、H929和U266^{MYC+},经过相应的处理)。根据制造商的说明,使用Pierce^{TM}免疫共沉淀试剂盒(Thermo Fisher Scientific,目录号26149)进行免疫共沉淀。所用IP抗体如下:抗MYC抗体[Y69]购自Abcam(ab32072)、抗FLAG® M2抗体购自Millipore Sigma(F3165)、正常兔IgG购自Cell Signaling Technology(2729)。

[0139] 邻近依赖性生物素识别(BioID)。根据Kalkat等人,《分子细胞》72:836-848(2018年)(Kalkat et al.,Mol.Cell 72:836-848(2018))描述的方式进行BioID。简言之,FBA-MYC细胞在T75烧瓶中生长至60%汇合,然后用ASO1(50nM,如上所述使用Lipofectamine 2000)转染并用1mg/mL多西环素(Millipore Sigma)、1μM MG132(Millipore Sigma)和50mM

生物素(Bio-Basic)处理24小时。暴露于多西环素的FBA-MYC细胞的实验包括16个生物学重复(8个RROL耗竭,8个RROL未耗竭)。用于分析的阴性对照包括未暴露于多西环素的FBA-MYC细胞的6个生物学重复。通过刮擦收获细胞,并在快速冷冻之前用50mL PBS洗涤三次。将细胞沉淀物裂解于1mL改性RIPA缓冲液(1% NP-40、50mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、0.1% SDS、1:100蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Fisher Scientific)、0.5%脱氧胆酸钠)中,其中含有250U的核酸酶(Millipore)。将裂解物在4℃下旋转1小时,超声处理3x30秒,然后在4℃下以27000g离心30分钟。通过用30mg洗涤的链霉亲和素-琼脂糖微珠(GE)在4℃下旋转2小时的亲和纯化来分离生物素化的蛋白质。然后在胰蛋白酶消化之前,用7x1 mL 50mM碳酸氢铵(pH8.0)洗涤微珠。

[0140] 质谱法。根据既定方案,在Taplin质谱分析设施(哈佛医学院,马萨诸塞州波士顿市)上进行Co-IP和BioID样品的质谱分析。

[0141] 动物研究。6周龄雌性免疫缺陷NOD.CB17-Prkdcscid/NCrCrl(NOD/SCID)小鼠(Charles River)或NSG小鼠(杰克逊实验室(Jackson Laboratory))被饲养在丹娜—法伯癌症研究所(Dana-Farber Cancer Institute,DFCI)的动物设施中。所有实验均在DFCI动物伦理委员会批准之后进行,并按照机构指南进行。

[0142] $AMO1^{DR-KO}$异种移植物模型:AMO^{DR-KO}在皮下注射到SCID NOD小鼠体内之前,裸(gymnotically)暴露于ASO1(2.5uM)或ASO-NC(2.5uM)2天。注射当天(第0天),通过Annexin V/7-AAD流式细胞术测定来评估细胞活力,确认在该时间点没有可检测到的ASO-1促凋亡活性(未示出)。对于肿瘤细胞注射,将细胞重悬于补充有ASO1(5uM)或ASO-NC(5uM)的PBS1X中;然后与等体积的Matrigel(Corning,#354230)混合,达到2.5uM的最终寡核苷酸浓度。每只小鼠(每组5只小鼠)皮下注射5x106个细胞。用电子卡尺测量肿瘤大小。

[0143] AMO1异种移植物模型:将$5x10^6$个AMO1细胞皮下注射到NOD SCID小鼠体内。当肿瘤变得可触知(约50mm)时,小鼠随机接受G2-15b*-TO或SB9-19-TO或载体(-)作为对照(3组,每组5只小鼠)。经由腹膜内注射施用治疗,每2周隔一天施用,剂量为10mg/kg。用电子卡尺测量肿瘤大小。在用于RROL和ACC1的qRT-PCR分析的独立实验中,小鼠在肿瘤体积达到约200mm后接收治疗,并在第1-3-5天接收治疗。然后在第六天收集肿瘤。

[0144] MOLP8-luc+异种移植物模型:将$1x10^6$个MOLP8-luc细胞经由尾静脉注射到28只NSG小鼠体内。3只小鼠(标记为X)因注射失败而被排除。第二天,11只小鼠被分配到对照组,8只小鼠接受G2-19b*-TO治疗,6只小鼠接受SB9-19-TO治疗。经由腹膜内注射施用治疗,每2周隔一天施用,剂量为10mg/kg。在治疗周期结束时(第15天),测量BLI作为肿瘤生长的指示。

[0145] 如前所述(Buck等人,《癌症研究》68:832-32(2008年)),通过以下公式测定肿瘤生长抑制(%TGI):%TGI=(1-[Tt/T0/Ct/C0]1-[C0/Ct])X 100,其中Tt=时间t时治疗的中位肿瘤体积,T0=时间0时治疗的中位肿瘤体积,Ct=时间t时对照的中位肿瘤体积,C0=时间0时对照的中位肿瘤体积。

[0146] 统计分析。所有体外实验重复至少三次并且一式三份进行;图中示出了代表性实验。使用学生t检验(除非另有说明)确定差异的统计学显著性,最低显著性水平规定为$p<0.05$。通过对数秩检验比较Kaplan-Meier生存曲线。使用GraphPad软件进行统计分析。使用GraphPad软件(除非另有说明)获得图表。

实施例2:全基因组CRISPRi活力筛选将MIR17HG鉴定为MM中的主要依赖性。

[0147] 分析来自360名新诊断的MM患者的RNA-seq数据,并鉴定913个lncRNA转录本在原代MM细胞中表达,如图1A标记为I的左侧面板所示,以及在70种MM细胞系的小组中表达。为了系统地探究这些lncRNA在MM细胞生长中的作用,对3种MM细胞系(H929、KMS-11和KMS-12-BM)进行工程化改造,使其表达dCAS9-KRAB融合蛋白,并用由针对913个转录起始位点(TSS)中的每一个的7个sgRNA和576个阴性对照sgRNA组成的汇集文库进行转导(参见图1A标记为II的中间面板)。3周后通过深度测序评估sgRNA的相对代表性,并使用基于模型的全基因组CRISPR-Cas9敲除分析(MAGeCK)鲁棒秩聚合(RRA)算法(Li等人,《基因组生物学》15:554-12(2014年)(Li et al.,Genome Biol.15:554-12(2014)))进行分析。使用靶向224个lncRNA TSS、已知蛋白质编码癌基因(MYC,IRF4)(Chesi等人,《癌症细胞》13:167-80(2008年)(Chesi et al.,Cancer Cell 13:167-80(2008));Shaffer等人,《自然》454:226-31(2008年)(Shaffer et al.,Nature 454:226-31(2008))或肿瘤抑制剂(TP53)(Jovanovic等人,《肿瘤学前沿》8:665-7(2019)(Jovanović et al.,Front.Oncol.8:665-7(2019)))的TSS作为阳性对照以及2245种非靶向sgRNA作为阴性对照的汇集文库,在二次筛选中进一步测试最富集或耗竭的sgRNA,如图1A标记为III的右侧面板所示。在二次筛选中,4种MM细胞系(H929、KMS11、KMS12BM和AMO1)用于检测和排序显著耗竭或富集的sgRNA。正如所预期的,靶向IRF4和MYC的sgRNA在三种(MYC)或所有(IRF4)细胞系中显著耗竭,而靶向TP53的sgRNA在两种TP53野生型细胞系(AMO1和H929)中显著富集(Tessoulin等人,《血液学与肿瘤学杂志》11:137(2018年)(Tessoulin et al.,J.Hematol.Oncol.11:137(2018)))。图1B突出显示了最高lncRNA依赖性MIR17HG,以及用作阳性对照的蛋白质编码基因IRF4和MYC。图1C示出了稳定表达KRAB-dCAS9融合蛋白并用慢病毒载体转导以条件性表达抗MIR17HG sgRNA的MM细胞系AMO1、H929、KMS11和KMS12BM的CCK-8增殖测定。在暴露于多西环素(0.5μg/mL)后的指示时间点进行CCK-8测定。与用空sgRNA载体感染并在某些条件下暴露于多西环素的亲本细胞相比,计算细胞增殖。重点关注耗竭的sgRNA、鉴定了MM细胞中的lncRNA依赖性,其为细胞类型特异性的(54%)或是两种或更多种细胞系共有的(46%)(参见图8A)。sgRNA耗竭的排序分析鉴定MIR17HG为筛选中主要的lncRNA依赖性,在所有测试的细胞系中,RRA得分等于或高于通过靶向MYC或IRF4获得的得分(图8B)。为了进一步验证该数据,表达dCAS9-KRAB融合蛋白的MM细胞系在四环素诱导型启动子的调控下用靶向MIR17HG的前四种sgRNA转导,并观察到在持续暴露于多西环素后,与用非靶向sgRNA感染的细胞相比,细胞生长减少,如图1C和图8B所示。在用多西环素诱导gRNA后5天,通过qRT-PCR研究MIR17HG的表达。图8B中所示的结果为用ACTB归一化和ΔΔCt计算后的平均RNA表达水平。

[0148] 此外,用于RNase H介导的降解的靶向MIR17HG新生RNA(前体RNA)的2种不同锁核酸(LNA)gapmeR ASO(Lai等人,《分子细胞》77:1032-1043(2020年);Lee和Mendel,2020年(Lai et al.,Mol.Cell77:1032-1043(2020);Lee and Mendell,2020))被用于转染11种MM细胞系,包括对常规抗MM药剂具有耐药性的细胞系(对硼替佐米(bortezomib)具有抗性的AMO1-ABZB;对卡非佐米(carfilzomib)具有抗性的AMO1-ACFZ;对地塞米松(dexamethasone)具有抗性的MM.1R);并且被证实独立于遗传和分子背景对MM细胞活力的显著影响,如图1D和图8C所示。ASO的使用浓度为25nM。电穿孔后2天和4天测量细胞活力,其以与用NC-ASO转染的细胞相比的活力%表示。图1D和图1E示出了来自3个独立实验中的1个

的数据。在图1D和图1E中,数据呈现平均值±s.d。*学生t检验的p<0.05。图8C示出转染后24小时通过qRT-PCR的MIR17HG表达。所示结果是用ACTB归一化和ΔΔCt计算后的平均RNA表达水平。示出了三个独立实验中的一(1)个。

[0149] 这些数据证实了MM细胞中对lncRNA的广泛依赖性。在MM环境中进一步探索MIR17HG的分子和功能作用。

实施例3:$MIR17HG^{RROL}$(RROL)以不依赖microRNA的方式介导依赖性。

[0150] 除了为microRNA簇miR-17-92($MIR17HG^{miR-17-92}$;miR-17/-18a/-19a/-20a/-19b/-92a1)提供前体之外,MIR17HG还产生表征较差的lncRNA转录本$lnc-17-92^{TV1}$(也称为$MIR17HG^{RROL}$)(He等人,《自然》435:828-33(2005年);Ota等人,《癌症研究》64:3087-95(2004年)(He et al.,Nature 435:828-33(2005);Ota et al.,Cancer Res.64:3087-95(2004))),如图2A所示。在诊断和/或复发时分析的IFM/DFCI临床试验(NCT01191060)中纳入的MM患者的2个独立数据集中,观察到RROL表达在疾病进展期间更高(参见图9A-图9B);并且RROL的较高表达与3个大型新诊断的MM患者队列中较短的无事件生存期(EFS)和总生存期(OS)相关(图2B)。在来自140名患者的CD138+MM细胞中,RROL的表达与miR-17-92没有显著相关性(平均Spearman r=0.16),这表明RROL和miR-1792受到独立的调节控制,并且可以在不同的分子途径中发挥作用(图9C)。

[0151] 支持RROL的miRNA独立功能,首先,在两种MM细胞系中观察到在存在或不存在pri-mir-17-92异位表达的情况下抗MIR17HG ASO的完整抗增殖活性(图2C和图9D)。AMO1和H929细胞用携带pri-mir17-92(pri-miR)的慢载体或携带GFP的慢病毒载体作为对照稳定转导;并用靶向MIR17HG前体RNA的5'端(5'-ASO)的2种不同ASO或扰乱对照(NC)转染。转染后48小时评估对细胞增殖的影响。图9D示出用含有pri-mir-17-92(Lenti-pri-mir)的慢病毒载体或含有GFP的慢病毒载体感染的细胞。所示结果是用RNU44和ΔΔCt计算归一化后的平均miRNA表达水平。为了单独耗竭RROL,ASO被设计为靶向MIR17HG的5'端(5'-ASO),这是异位pri-mir-17-92中不包含的序列。第二,创建了两种DROSHA敲除(DR-KO)MM细胞系($AMO1^{DR-KO}$和$H929^{DR-KO}$),它们无法产生miR-17-92s(图9E)。所示结果是用RNU44归一化和ΔΔCt计算后的平均miRNA表达水平(Bartel等人,《细胞》116:281-97(2004年)(Bartel et al.,Cell 116:281-97(2004)))。ASO介导的MIR17HG前体RNA的靶向仅影响这些细胞中的RROL。用ASO1(AMO1为1μM,H929为2.5μM)裸处理6天后评估,并通过WT和KO细胞中DROSHA表达的蛋白质印迹分析检测(图2D)或用3种不同的ASO(-1/-2/-3)转染后(图9F),在RROL耗竭后,在DR-WT和DR-KO细胞系统中均观察到强烈的抗增殖活性,而在DR-KO细胞中没有显著的挽救。纽蛋白被用作蛋白质上样对照。将活细胞的百分比与NC进行比较,并在转染后48小时通过CCK-8测定进行分析。转染48小时后通过qRT-PCR分析RROL表达。示出了三个独立实验中的一个。*表示学生t检验计算后p<0.05。在MM细胞中,RNA-seq(图2G)和qRT-PCR(图2H)均表明RROL TV1的优先表达,其是进一步研究的同种型,以下称为RROL(也称为lnc-17-92)。使用RNA-seq,证实了其在来自附加的大型MM患者队列的CD138+细胞(MMRF/CoMMpass,n=720)和MM细胞系(n=60)中的表达(图9I)。

[0152] 重要的是,暴露于ASO1消除了$AMO1^{DR-KO}$在NOD SCID小鼠体内建立肿瘤的能力,如通过具有(ASO-1)或不具有(NC)RROL耗竭的$AMO1^{DR-KO}$的肿瘤生长(图2E)和延长的动物生存期(图2F)所检测到的。由$MIR17HG^{34}$驱动的易转染结肠直肠癌癌细胞系HCT-116用于发现lnc-

17-92^{TV1}的异位表达比用2.5μg携带异位pri-mir-17-92、lnc-17-92-TV1、lnc-1792^{TV2}或GFP(空)转染的异位lnc-17-92TV2或pri-mir17-92更有效地显著挽救了靶向MIR17HG前体RNA的ASO的抗增殖活性(图9K和图9L)。在用5'-ASO转染后2天和用质粒转染后3天评估对细胞增殖的影响。用NC和空载体转染的细胞被用作参考。转染后48小时评估对细胞增殖的影响。通过qRT-PCR证实了pri-mir-17-92、lnc-17-92TV1和lnc-17-92TV2的异位表达,显示:i)pri-mir17-92异位表达后mir-17的上调;ii)lnc-17-92TV1异位表达后的上调;iii)lnc-17-92TV2异位表达后的上调。在结肠直肠癌癌细胞系HCT-116和DLD-1中也观察到抗MIR17HG ASO的抗增殖活性,尽管这些细胞系携带(-/-)或不携带(wt)赋予次形态表型的突变Dicer(Cummins等人,《美国国家科学院院刊》103:3687-92(2006年)(Cummins et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:3687-92(2006))),如图2G所示。用扰乱对照(NC)或2种不同的ASO(-1和-2)转染细胞以获得RROL耗竭。转染后48小时分析与NC相比的活细胞%。*表示p<0.05,ns表示学生t检验后p>0.05。这些结果表明,RROL是MIR17HG癌症依赖性的主要介质,与miR-17-92无关。

实施例4:RROL与染色质相互作用以调控基因表达。

[0153] lncRNA的功能作用取决于其亚细胞定位(Ulitsky等人,《细胞》154:26-46(2013年)(Ulitsky et al.,Cell 154:26-46(2013)))。以MALAT1和GAPDH mRNA作为阳性对照的细胞核和胞质区室的qRT-PCR分析表明RROL的细胞核富集(图10A)。MALAT1和GAPDH分别用作细胞核富集RNA和细胞质富集RNA的内部对照。结果是2-ΔCt计算后细胞核部分与细胞质部分的平均富集倍数。通过RNA FISH证实了这一发现,如图10B所示。在此基础上,接下来探索RROL在MM中调控的转录网络。为此,进行了基于ASO的功能丧失(LOF)研究,然后在DR-WT(AMO1和H929)和DR-KO(AMO1^{DR-KO})MM细胞系中进行了综合基因表达分析。通过在早期暴露于裸ASO1以避免DROSHA WT细胞中miR-17-92的调节(图10C)或用ASO2转染(图9K)后进行的差异表达基因(DEG)的动力学分析,在所有测试的细胞系中鉴定了RROL耗竭后快速下调的一组基因。图10C中所示的热图示出了分别用GAPDH或RNU44归一化和ΔΔCt计算后的平均RROL或miRNA表达水平。RROL也在DR-WT(AMO1和H929)和DR-KO(AMO1DR-KO)MM细胞系中被耗竭,该细胞系使用早期暴露于裸ASO1以避免DROSHA WT细胞中RROL的典型靶点的调节(图13B和图13C)。

[0154] 这些结果在来自用ASO1离体治疗的3名MM患者的CD138+细胞中得到验证(图3B)。图3B中所示的结果是用GAPDH归一化和ΔΔCt计算后的平均mRNA表达水平。将暴露于NC(载体)的细胞中的RNA水平设定为内部参考。RROL耗竭结果也在其他细胞模型中得到验证,包括淋巴瘤细胞系Raji和Daudi(图10D)以及耗竭人或鼠RROL的鼠MM细胞系5TGM1(图10E)。图10D中所示的结果是用GAPDH归一化和ΔΔCt计算后的平均mRNA表达水平。图10E中所示的结果是用鼠gapdh归一化和ΔΔCt计算后的平均mRNA表达水平。相反,这些基因的表达不受合成模拟物或抑制剂对miR-17-92个体成员的调节的影响(图10F-图10G)。所示结果是分别用RNU44或GAPDH归一化和ΔΔCt计算后的平均miRNA或mRNA表达水平。此外,如图3C所示,在2个大型RNA-seq MM患者数据集(IFM/DFCI和MMRF/CoMMpass)中的至少1个中,观察到RROL与其靶基因之间的显著正相关(Spearman r>0.3;p<0.001);支持这些调控轴的临床相关性。图3C示出了来自2个大型RNA-seq队列(DFCI/IFM,n=360;MMRF/CoMMpass,n=720)的CD138+MM患者细胞中RROL靶点(mRNA)和RROL之间的相关性分析。据报道,在DFCI/IFM(x

轴)和MMRF/CoMMpass(y轴)数据集中获得Spearman r。红色虚线表示r＝0.3。

[0155] 在存在或不存在RROL耗竭的293T^{DR-KO}细胞中进行的荧光素酶报告基因测定表明,RROL对除ANO6外的这些基因的调节控制发生在启动子水平(图3D)。将报告基因载体与ASO1或对照ASO共转染到293T细胞中。转染48小时后收获细胞进行荧光素酶活性测定。结果显示为与对照相比ASO1转染细胞中归一化的Gluc活性的%。在5种MM细胞系中基于RNAi的LOF筛选鉴定ACC1(乙酰辅酶A羧化酶α)为对MM细胞增殖和存活具有最显著影响的RROL靶基因(图3E)。这些结果为进一步探索RROL-ACC1轴在MM病理生物学中的作用提供了理论依据。如图3E所示,每个靶点使用2个siRNA,加上作为对照的加扰siRNA(NC)。在指示的时间点测量细胞活力。其表示为NC转染细胞的%。一致地,通过RNA沉淀的染色质分离(ChIRP)测定,然后进行qRT-PCR分析,证实了在顶部靶点ACC1的启动子区的RROL相互作用(图3F和图10H-图10I)。此外,RROL和ACC1前体mRNA的单分子双RNA FISH分析证明了RROL在ACC1基因座的频繁近端定位(在分析的约50%的ACC1前体RNA点中,距最近的RROL点＜300nm(n＝60))(图3G)。

[0156] 总之,在不受理论约束的情况下,这些数据表明RROL是具有转录调控功能的染色质相互作用的lncRNA。

实施例5:RROL提高MYC在ACC1启动子处的占有率。

[0157] 通过RROL相关基因表达变化的上游调控分析,在两种测试的细胞系中观察到RROL耗竭后MYC相关网络的强烈抑制(图4A)。基于该分析,评估了MYC和RROL是否协同促进MM细胞中ACC1的表达。MM细胞中的RROL耗竭确实消除了ACC1启动子处的MYC占有率,而其表达不受影响(图4B和图11A)。ACC1启动子处的MYC占有率被计算为输入染色质的%。每个直方图下方显示配对样本的MYC的蛋白质印迹分析。GAPDH或α-微管蛋白用作蛋白质上样对照。ACC1在条件性MYC-Tet-Off细胞系P493-6(Schuhmacher等人,《当代生物学》9:1255-8(1999年)(Schuhmacher et al.,Curr.Biol.9:1255-8(1999)))中的表达仅在存在高MYC水平的情况下降低(图4C)。将暴露于NC的细胞中的ACC1表达水平设定为内部参考。此外,通过将RROL和ACC1前体RNA的RNA-FISH分析与MYC蛋白的免疫荧光分析(FISH/IF)相结合,可以看到RROL和MYC在ACC1基因座处的共定位,如图4D所示。使用2种不同的探针(RROL-ps1和RROL-ps2)检测RROL,并且在图4D中示出了每种RROL探针的代表性图像。

[0158] 为了评估RROL-MYC复合物的存在,用MYC抗体进行了RNA免疫沉淀(RIP)测试,结果显示RROL同种型2(RROL-2)在MYC结合的RNA中的特异性富集,如图4E和图11B-11C所示。LncRNA PVT1被用作已知MYC相互作用物作用的阳性对照(图4E)。RNA-蛋白质下拉(RPPD)实验证实MYC与RROL-2形成复合物(图4F和图11D)。此外,RNA酵母三杂交(Y3H)测定适于在体内细胞模型中证实RROL-MYC相互作用(Hook等人,《RNA》11:227-33(2005年))。在该测定中,直接的RROL-MYC相互作用激活报告基因,使得酵母菌落生长;并且,如图4G所示,检测到在RROL-2作为杂交RNA存在的情况下酵母菌落的生长。

[0159] 这些数据看来证明RROL与转录因子MYC形成RNA-蛋白质复合物,以提高其在ACC1启动子处的染色质占有率和转录活性。

实施例6:RROL介导MYC-WDR82转录复合物的组装,导致ACC1的转录和表观遗传激活。

[0160] MIR17HG的靶向作用主要杀死c-MYC阳性(MYC+)肿瘤细胞,包括MM中的细胞。有趣

的是,已知MYC可重新激活肿瘤细胞中的ACC1(也称为ACACA)表达和从头脂肪生成,其中MYC+肿瘤细胞会对这种代谢途径成瘾,这在本文的MM细胞中得到了验证(图11D-图11F)。图11D示出了在MM细胞系AMO1和H929中用MYC抑制剂10058-F4处理后的ACC1 mRNA。将原始Ct值归一化为GAPDH mRNA,并表示为使用比较交叉阈值法计算的ΔΔCt值。将用DMSO(NC)处理的细胞中的ACC1表达水平设定为内部参考。因此,研究了MYC和MIR17HG之间的功能相互作用。

[0161] MYC活性已被证明通过与转录和表观遗传共调控因子的相互作用进行调节(Gouw等人,《细胞代谢》30:556-572(2019年)(Gouw etal.,Cell Metab.30:556-572(2019)))。为了确定RROL是否影响这些蛋白质-蛋白质相互作用,在存在和不存在RROL耗竭的情况下,将邻近依赖性生物素鉴定(BioID)分析的结果与3种MM细胞系(AMO1、H929和$U266^{MYC+}$)的免疫共沉淀测定相结合,然后进行质谱分析(co-IP/MS)。该综合分析强调WDR82是置信度极高的RROL依赖性MYC相互作用物(图5A和图12A,以及表5-表8);RROL和WDR82之间的直接RNA-蛋白质相互作用通过RPPD(图5B)和RNA Y3H(图5C)测定进一步得到证实。图5C中的黑色箭头表示酵母菌落生长。使用截短版本的lnc-17-92TV1进行的分析进一步表明,不包括miR-17-92的3'端区域与MM细胞中与MYC的相互作用特别相关(图11G)。

[0162] 表5列出了体内全部172种MYC相互作用物。表6列出了从BioID测定中鉴定的全部18种RROL依赖性体内MYC相互作用物。表7列出了MM细胞中的全部176种MYC相互作用物(如在多于2种细胞系中鉴定的)。表8列出了MM细胞中的全部8种RROL依赖性MYC相互作用物(如在多于2种细胞系中鉴定的)。

表5:体内MYC相互作用物(n=172)

基因	P 值	基因	P 值	基因	P 值
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
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	TTLL12	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				

表6:来自BioID测定的RROL依赖性体内MYC相互作用(n＝18)

基因	P 值	基因	P 值	基因	P 值
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

表7:MM细胞中的MYC相互作用物(>2种细胞系;n=176)

名称	总数	要素
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、PTCD3、FAHD1、PRDX6、TUBAL3、GRPEL1、PDIA3、MRPL19、PCMT1、SRI、MYO1C、RPLP1、GMPPA、SF3B6、GDI1、ARHGEF2、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、TTLL12、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、ECI1、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

表8:MM细胞中的RROL依赖性MYC相互作用物(>2种细胞系;n=8)

名称	总数	要素
AMO1 H929 U266^{MYC+}	1	WDR82
AMO1 H929	5	RNASEH2A、COX6C、ARFIP1、IDH3B、RPA3
H929 U266^{MYC+}	2	C19orf25、RAD50

[0163] WDR82是SET1甲基转移酶复合物的调节成分,催化活性基因座转录起始位点的组蛋白H3'Lys-4'三甲基化(H3K4me3)(Lee和Skalnik,《分子与细胞生物学》28:609-18(2008年)(Lee and Skalnik,Mol.Cell.Biol.28:609-18(2008))),这是MYC与染色质结合和反式激活的必要条件(Amente等人,《美国癌症研究杂志》1:413-418(2011年)(Amente et al.,Am.J.Cancer Res.1:413-418(2011))。同样,WDR82的耗竭导致H3K4me3的全面减少(图5D和

图12D)和ACC1启动子处MYC占有率的减少(图5E),导致MM细胞中ACC1的表达减少(图5G)。图5D示出了WDR82和H3K4me3的蛋白质印迹分析(以输入染色质的%表示)。核纤层蛋白A/C被用作蛋白质上样对照(核裂解物)。图5E示出了来自配对样本的WDR82和MYC的蛋白质印迹分析(以输入染色质的%表示)。α-微管蛋白被用作蛋白质上样对照。图5F中的数据显示为原始Ct值,其被归一化为GAPDH mRNA并表示为使用比较交叉阈值法计算的ΔΔCt值。将用NC转染的细胞中的ACC1表达水平设定为内部参考。

[0164] 图5G示出了在暴露于裸ASO1 24小时的AMO1中WDR82-GFP在ACC1启动子处的占有率的ChIP-qPCR分析,作为来自配对样本的WDR82-GFP的蛋白质印迹分析(以输入染色质的%表示)。α-微管蛋白被用作蛋白质上样对照。此外,使用表达异位WDR82-GFP融合蛋白的MM细胞(图12B),证明RROL表达对于WDR82在ACC1启动子处的占有率至关重要(图5H),而不会全面影响H3K4甲基化状态(图5I)。图5H示出了暴露于裸ASO1 24小时的AMO1和H929中H3K4me3在ACC1启动子处的占有率的ChIP-qPCR分析,作为来自配对样本的H3K4me3的蛋白质印迹分析(以输入染色质的%表示)。核纤层蛋白A/C被用作蛋白质上样对照(核裂解物)。*$p<0.05$,学生t检验。此外,RROL耗竭导致ACC1启动子位点处的H3K4me3水平降低,但对总H3K4me3没有可检测到的影响(图5I)。

[0165] 显示RROL作为染色质支架介导MYC-WDR82多蛋白转录复合物的组装的作用,以控制ACC1的表达。

实施例7:RROL/MYC-ACC1轴调节从头脂肪生成。

[0166] ACC1催化乙酰辅酶A羧化为丙二酰辅酶A,这是从头脂肪生成(DNL)过程中的限速步骤(Beloribi-Djefaflia等人,《瘤形成》5:e189-10(2016年)(Beloribi-Djefaflia et al.,Oncogenesis 5:e189-10(2016))),一种在癌细胞中异常激活的代谢途径(Röhrig和Schulze.,《自然综述:癌症》16:732-749(2016年)(Röhrig and Schulze.,Nat.Rev.Cancer 16:732-749(2016)))。此处,RROL耗竭,类似于MYC或ACC1抑制,在MM细胞系和CD138+MM患者细胞中显著减少了C^{14}放射性标记的葡萄糖向脂质库的掺入,这表明DNL减少(Zadra等人,《美国国家科学院院刊》116:631-640(2019年)(Zadra et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 116:631-640(2019)))(图6A)。使用ASO1耗竭RROL,使用小分子10058-F4抑制MYC,并使用IPTG诱导的shRNA耗竭ACC1。结果以阴性对照(分别为NC ASO、DMSO和未诱导)的百分比表示。在用miR-17-92的合成抑制剂转染MM细胞后未观察到这种抑制作用(图13A),其说明了在用miR-17-92抗miR(各25nM)转染AMO1后48小时C^{14}葡萄糖掺入脂质。结果以未诱导细胞的百分比表示。NS表示学生t检验后$p>0.05$。MM细胞中RROL抑制后基于液相色谱法-质谱法(LC-MS)的脂质分析证实了经由DNL产生的几种饱和(SFA)和单不饱和(MUFA)磷脂类的耗竭(图6B)。图6B示出了显示在用ASO1处理AMO1和H929之后,具有饱和(SFA)或单不饱和(MUFA)酰基链的主要膜磷脂类[磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰基丝氨酸(PS)、磷脂酰基胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)]的调节的脂质谱分析。(Rysman等人,《癌症研究》70:8117-26(2010年);Zaidi等人,《脂类研究进展》52:585-9(2013年)(Rysman et al.,Cancer Res.70:8117-26(2010);Zaidi et al.,Prog.Lipid Res.52:585-9(2013)))。此外,添加ACC1活性的主要下游产物棕榈酸盐(PA)显著挽救了MM细胞中RROL耗竭的抗增殖作用(图6C,CCK-8增殖测定)和促凋亡作用(图6D),证实了DNL在MM中RROL的促肿瘤活性中的作用,

并证明了RNA脂质生成调控因子这一名称的合理性,如图6E的拟建模型所示。图6D示出了在补充BSA(对照)或BSA-PA(20μM)的情况下,暴露于指示浓度的ASO1 6天的AMO1中的膜联蛋白V/7-AAD流式细胞术测定。

实施例8:RROL的治疗性抑制剂在人MM的动物模型中在体外和体内发挥强大的抗肿瘤活性。

[0167] 筛选了多于80种完全硫代磷酸化(PS)的、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)修饰的、脂质共轭的ASO,以探索RROL的治疗潜力并开发抑制剂。对这些ASO进行筛选,以确定它们是否有可能引发RNase H介导的RROL降解(gapmeRs)或经由RNase H非依赖性机制(空间阻滞剂)发挥功能(Puttaraju等人,《自然-医学》27:526-535(2021年)(Puttaraju etal., Nat.Med.27:526-535(2021)))(图7A和图14A-图14C)。该程序鉴定18-mer生育酚(T)共轭的gapmeR G2-15b-T("G")和18-mer生育酚共轭的空间阻断剂SB9-19-T("SB")为先导化合物,两者均在大型MM细胞系组和CD138+原代MM细胞中产生强大的抗增殖活性(细胞生长抑制,CGI>50%);同时保护(CGI<50%)非恶性细胞系(THLE-2、HK-2、HS-5和293T)和来自3名健康供体的PBMC(图7B)。图7B示出了来自2名MM患者(MM-Pt)的MM细胞系AMO1、ABZB、ACFZ、H929、MM.1S、MM1.R、U266、LR7、R8226、KMS-11、KMS-12-BM和CD138+细胞,4种非恶性细胞系(THLE-2、HK-2、HS-5和293T),以及来自3名健康供体的PMBC。用G2-15b*-TO(G)或SB9-19-TO(SB)或载体(-)作为对照转染后48小时(或MM-pt为24小时)测量细胞活力。与用载体转染的细胞相比,计算细胞增殖。

[0168] 开发靶向RROL的治疗性ASO的多步骤筛选的测试结果如图14A-图14C所示。步骤1的结果如图14A所示,鉴定了RROL上ASO访问的片段,测试了共32种ASO的16个"G"或"SB"构型的序列(>20-mer);根据由qRT-PCR评估的AMO1细胞中的KD活性,选择了序列G2(21-mer)和SB9(22-mer)进行进一步研究。步骤2的结果如图14B所示,其优化了G2和SB9的设计,对这些序列进行微调以获得用于G2的20-mer(n=8)和18-mer(n=5)衍生物ASO,以及用于SB9的22-mer(7)、20-mer(n=8)和18mer(n=5)衍生物ASO;基于由qRT-PCR评估的AMO1细胞中的KD活性。选择18-mer衍生序列G2-15和SB9-19进行进一步研究。步骤3的结果如图14C所示,其示出了对与棕榈酸(P)或胆固醇(C)或生育酚(T)共轭的两种选定的步骤2分子的测试。由qRT-PCR评估的AMO1细胞中的KD活性。选择TO共轭分子作为先导化合物。通过用8-mer"核心"DNA间隙(G2-15b-T)取代10-mer"核心"DNA间隙而进一步优化G2-15-T ASO。

[0169] 使用免疫功能低下的NOD SCID小鼠的皮下AMO1异种移植物模型来评估两种化合物的体内抗肿瘤活性。此处,在用G2-15b*-TO(G;n=5;肿瘤生长抑制,TGI=76%)或SB9-19-TO(SB;n=5%;TGI=69%)或载体(NK;n=5)的治疗周期后21天观察到肿瘤生长的显著减少,如图7C所示。对在该治疗后从小鼠体内取回的肿瘤的分析证实了RROL(图7D)及其靶点(图7E)、靶点BIM(又名BCL2L11)(图7J)的表达减少,以及作为DNL产物棕榈酸的替代物的三棕榈酸甘油酯(图7F)的水平降低(Falcook等人,《eClinicalMedicine》34:100797-11(2021年));证明了体内肿瘤细胞对G2-15b-T和SB9-19-T的有效摄取。此外,在小鼠中未观察到明显的毒性。图7D和图7E中的数据显示从用G2-15b*-TO(G;n=1)或SB9-19-TO(SB;n=2)或载体(NC;n=3)作为对照处理的动物中取回的样本。将原始Ct值归一化为ACTB mRNA,并表示为使用比较交叉阈值法计算的ΔΔCt值。NC中的表达水平被设定为内部参考。

[0170] 和SB9-19-T的显著抗MM活性在弥漫性骨髓瘤的侵袭性模型中得到证实,其中通过

生物发光成像(BLI)测量来评估MOLP8-luc+MM细胞的肿瘤生长。在该模型中,用G2-15b*-TO(G;n＝8;TGI＝84%)或SB9-19-TO(SB;n＝6;TGI＝52%)或载体(NC;n＝11)的治疗周期后,肿瘤生长被显著抑制。用G2-15b*-TO使得导致8只小鼠中有2只(25%)的肿瘤被清除(图7G)。在图7G的左侧,是示出生物发光强度的分析的散点图。黑条表示中值。在治疗周期结束时(第15天)测量生物发光。在图7G的右侧,示出了图像采集。因静脉注射肿瘤细胞失败而移出研究的小鼠被黑色矩形覆盖。重要的是,两种抑制剂均显著延长了动物的存活期(图7H)。

[0171] 最后,使用通过尾静脉注射从晚期患者(PDX-NSG)获得的CD138+MM细胞的临床相关的PDX-NSG小鼠模型。在该模型中,使用人κ轻链作为替代物来监测血清样本中的肿瘤生长。值得注意的是,在用G2-15b-T(G;n＝2)的治疗周期后观察到肿瘤生长的消退(图7I),并且效果与硼替佐米(bortezomib(BZT;n＝2中,阳性对照)相当,并且载体对照表示为NC(n＝3)。黑色箭头表示治疗。

[0172] 上述工作实施例8证明了lncRNA RROL是MM中的主要依赖性。RROL宿主基因MIR17HG通常在人类癌症中被扩增和/或过表达,具有驱动作用。在不受操作理论约束的情况下,RROL是通过染色质占有率以及与转录因子和表观遗传调节因子(例如MYC和WDR82)相互作用的基因表达的调控因子。

[0173] 数据还显示,RROL-MYC-WDR82复合物通过经由限速酶ACC1激活DNL途径来影响肿瘤细胞代谢。这种合成代谢途径主要限于正常成年人的肝脏和脂肪组织,但在癌细胞中通过尚未完全描述的机制被重新激活(Beloribi-Djefaflia等人,《瘤形成》5:e189-10(2016年);Röhrig 和Schulze.,《自然综述:癌症》16:732-749(2016年)(Beloribi-Djefaflia et al.,Oncogenesis 5:e189-10(2016);Röhrig and Schulze.,Nat Rev Cancer16:732-749(2016)))。MYC通过经由ACCI和其他基因激活DNL来参与肿瘤细胞代谢的重新编程(Stine等人,《癌症探索》5:1024-39(2015年)(Stine et al.,Cancer Discov 5:1024-39(2015)))。反过来,DNL已经成为MYC驱动的癌症发生和进展的重要途径,这些癌症易受ACC1的药理学抑制(Gouw等人,《细胞代谢》30:556-572(2019年)(Gouw et al.,Cell Metab 30:556-572(2019)))。ACC1和DNL在肿瘤发生中的作用似乎与MM特别相关,其中肿瘤细胞需要调整其代谢途径,以满足恶性细胞生长和单克隆免疫球蛋白不断产生所带来的高生物能量和生物合成需求(El Arfani等人,《国际分子科学杂志》19:1200-19(2018年);Masarwi等人,《JBMR Plus》3:e10173-10(2019年)(El Arfani et al.,Int J Mol Sci 19:1200-19(2018);Masarwi et al.,JBMR Plus 3:e10173-10(2019)))。

[0174] 该体内工作实施例利用了两种本发明的ASO,它们通过不同的作用机制(即RNase H依赖性或非依赖性)靶向RROL。随着RNA医学的最新进展(Crooke等人,《细胞代谢》27:714-739(2018年);Damase等人,《生物工程与生物技术前沿》9:628137-24(2021年);Sullenger和Nair.,《科学》352:1417-20(2016年)(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))),使用ASO治疗性拮抗疾病驱动基因的可能性越来越大(Dhuri等人,《临床医学杂志》9:2004-24(2020年);Puttaraju等人,《自然-医学》27:526-535(2021年)(Dhuri et al.,J Clin Med 9:2004-24(2020);Puttaraju et al.,Nat Med 27:526-535(2021))),包括在MM治疗中(Mondala等人,《细胞干细胞》28:623-636(2021年);

Morelli等人,《血液》132:1050-1063(2018年);(Mondala等人,2021年;Morelli等人,2018年(Mondala et al.,Cell Stem Cell 28:623-636(2021);Morelli et al.,Blood132:1050-1063(2018);(Mondala et al.,2021;Morelli et al.,2018))。

[0175] 总之,本工作实例证实了RROL为一种lncRNA,其促进MYC-WDR82蛋白复合物形成及其染色质结合,从而影响脂质代谢并最终影响肿瘤细胞生长。

[0176] 所有专利出版物和非专利出版物均表明了本公开所属领域的技术人员的技术水平。所有这些出版物(包括其被引用的任何特定部分)均通过引用并入本文,其程度如同每份单个出版物被具体地且单独地指示为通过引用并入。

[0177] 尽管已经参考特定实施方式描述了本公开,但是应当理解,这些实施方式仅说明了本公开的原理和应用。因此,应当理解,在不脱离由所附权利要求限定的本公开的精神和范围的情况下,可以对说明性实施方式进行许多修改,并且可以设计其他布置。

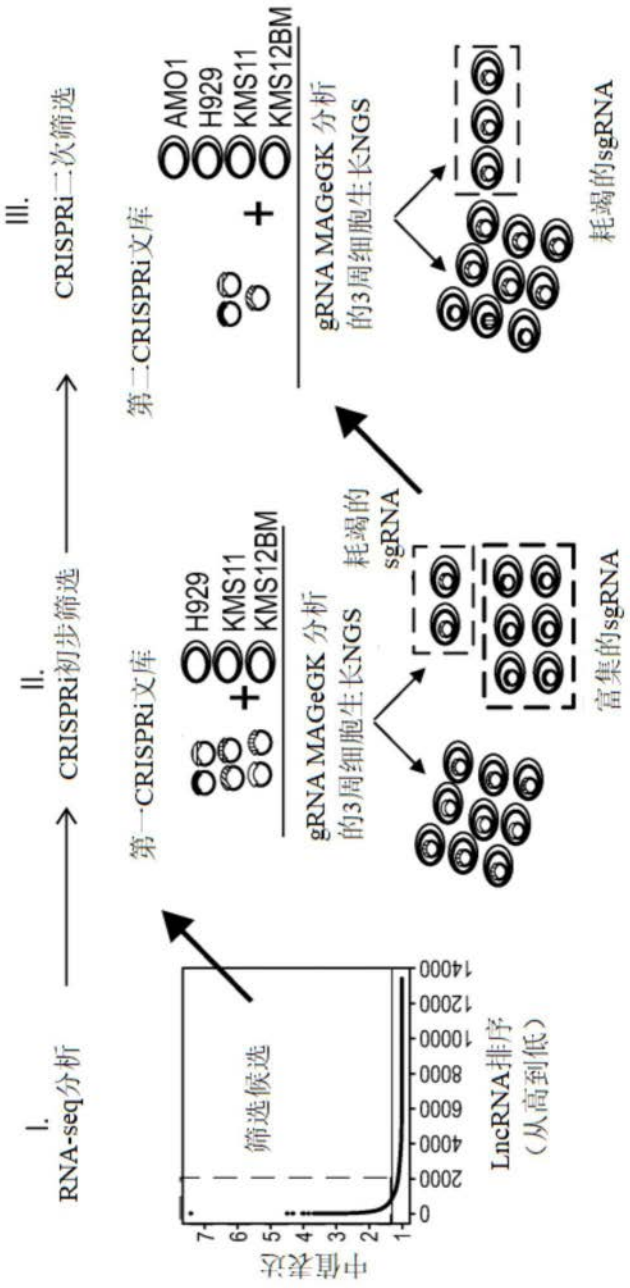

I.
RNA-seq分析
II.
CRISPRi初步筛选
III.
CRISPRi二次筛选
第一CRISPRi文库
第二CRISPRi文库
H929
KMS11
KMS12BM
AMO1
H929
KMS11
KMS12BM
gRNA MAGeGK 分析
的3周细胞生长NGS
耗竭的
sgRNA
gRNA MAGeGK 分析
的3周细胞生长NGS
耗竭的sgRNA
富集的sgRNA
筛选候选
中值表达
LncRNA排序
（从高到低）

图1A

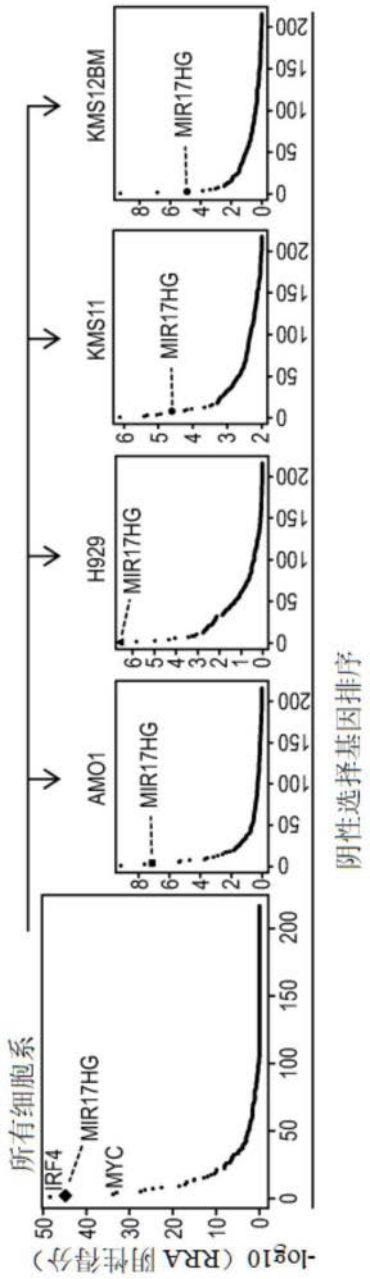

所有细胞系
IRF4
MIR17HG
MYC
AMO1
H929
KMS11
KMS12BM
-log10 (RRA 阴性得分)
阴性选择基因排序

图1B

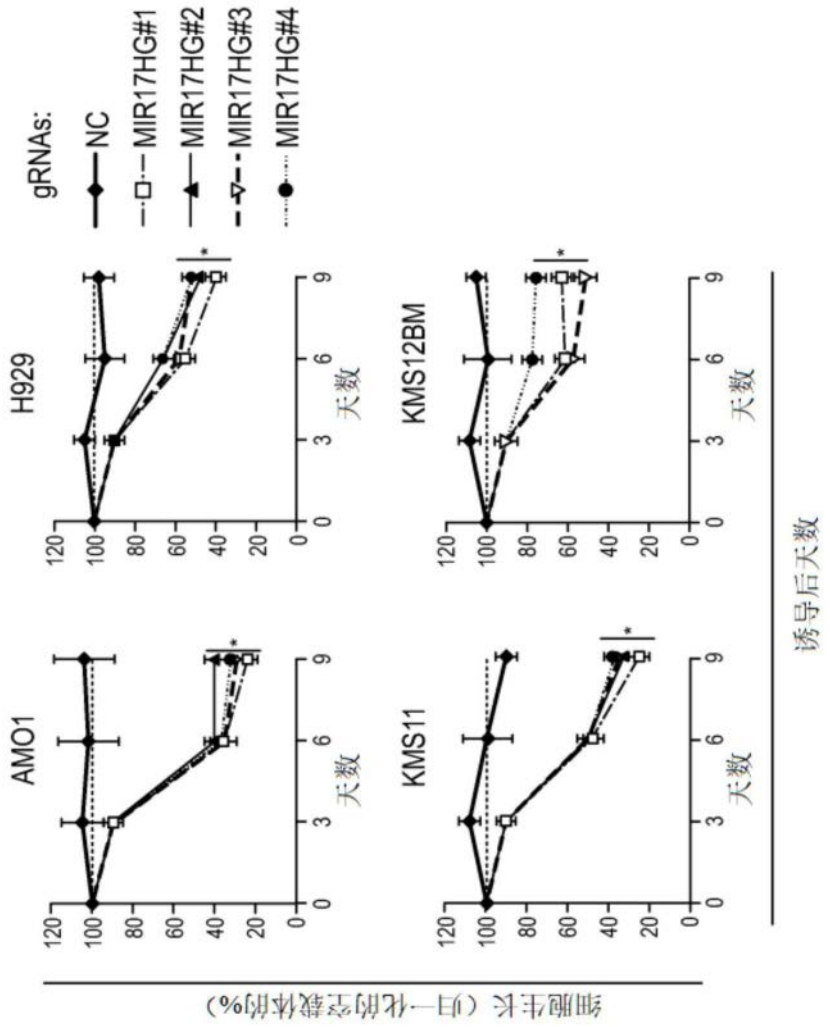

gRNAs:
NC
MIR17HG#1
MIR17HG#2
MIR17HG#3
MIR17HG#4
H929
KMS12BM
AMO1
KMS11
细胞生长（归一化的空载体的%）
天数
诱导后天数

图1C

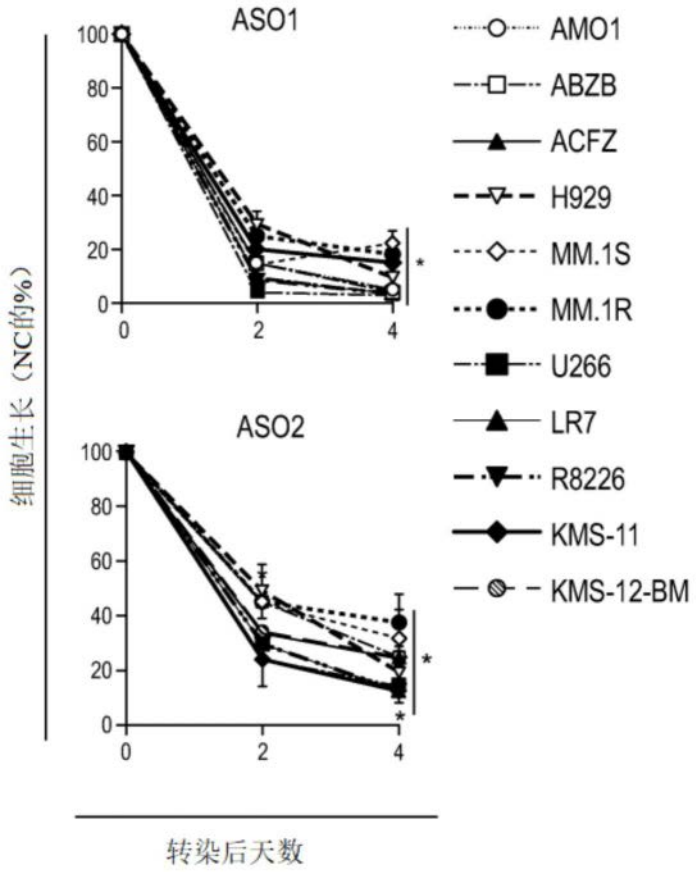

ASO1
ASO2
细胞生长（NC的%）
转染后天数
AMO1
ABZB
ACFZ
H929
MM.1S
MM.1R
U266
LR7
R8226
KMS-11
KMS-12-BM

图1D

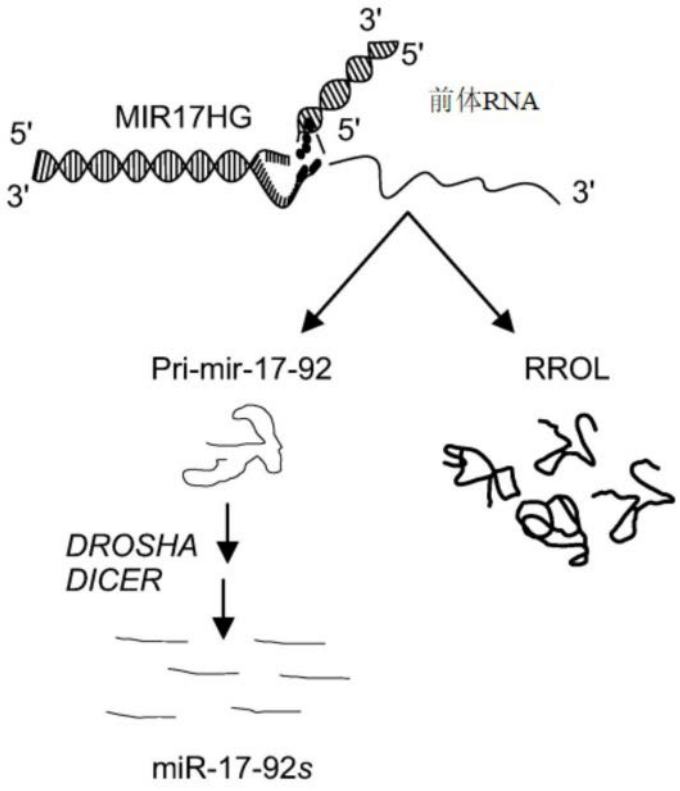

3'
5'
前体RNA
MIR17HG
5'
5'
3'
3'
Pri-mir-17-92
RROL
DROSHA
DICER
miR-17-92s

图2A

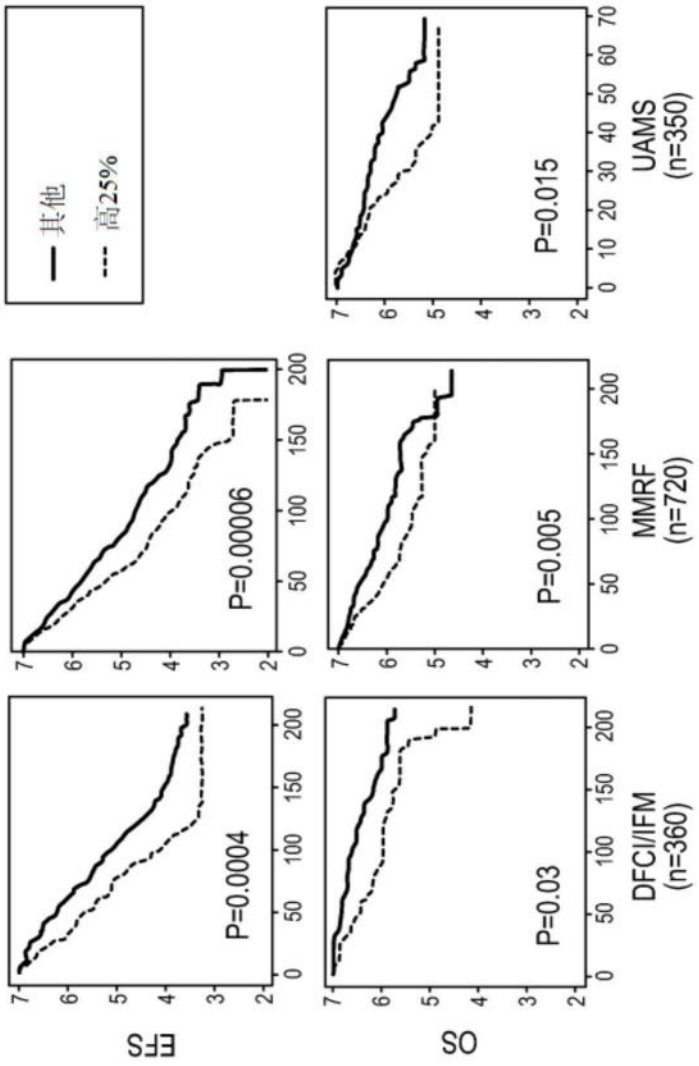

其他
高25%
EFS
OS
P=0.0004
P=0.00006
P=0.03
P=0.005
P=0.015
DFCI/IFM (n=360)
MMRF (n=720)
UAMS (n=350)

图2B

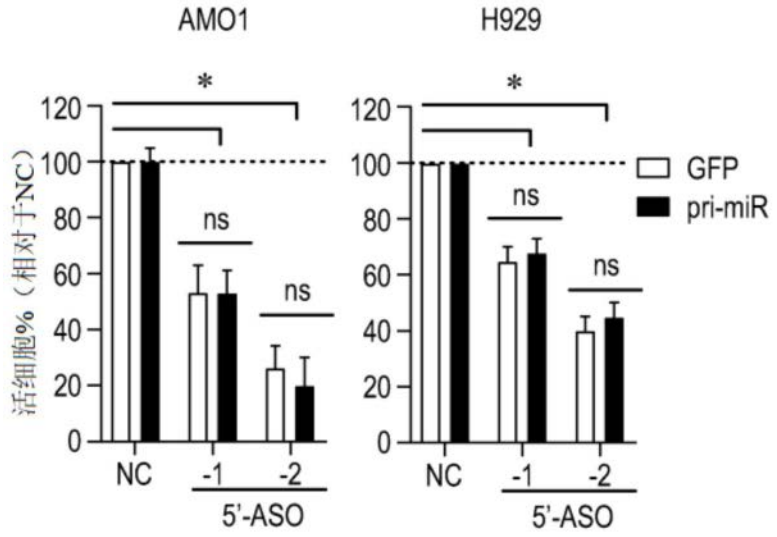

AMO1
H929
活细胞%（相对于NC）
120
100
80
60
40
20
0
*
ns
ns
GFP
pri-miR
NC
-1
-2
5'-ASO

图2C

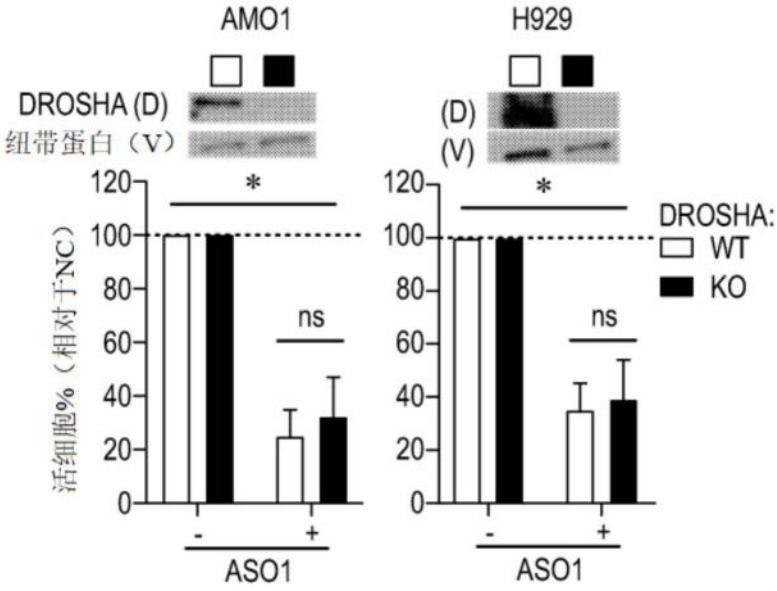

AMO1
H929
DROSHA (D)
纽带蛋白（V）
(D)
(V)
活细胞%（相对于NC）
120
100
80
60
40
20
0
*
ns
DROSHA:
WT
KO
-
+
ASO1

图2D

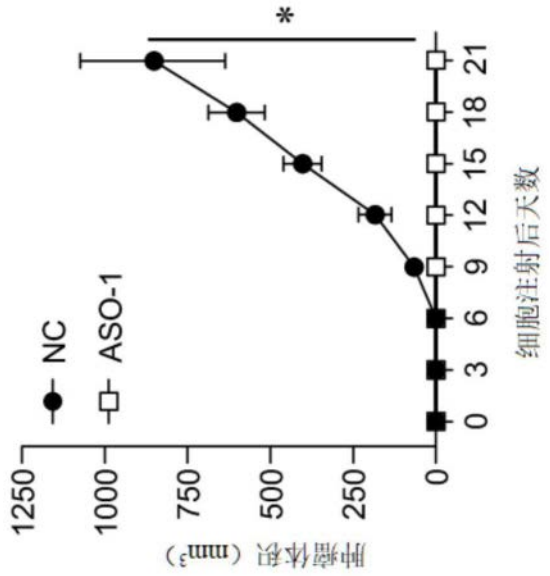

*
NC
ASO-1
1250
1000
750
500
250
0
肿瘤体积（mm³）
0
3
6
9
12
15
18
21
细胞注射后天数

图2E

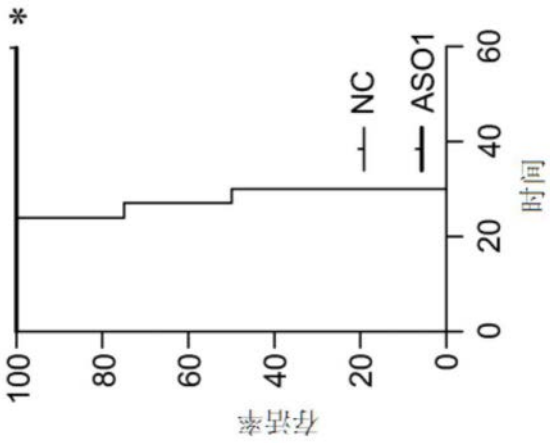

*
NC
ASO1
100
80
60
40
20
0
存活率
0
20
40
60
时间

图2F

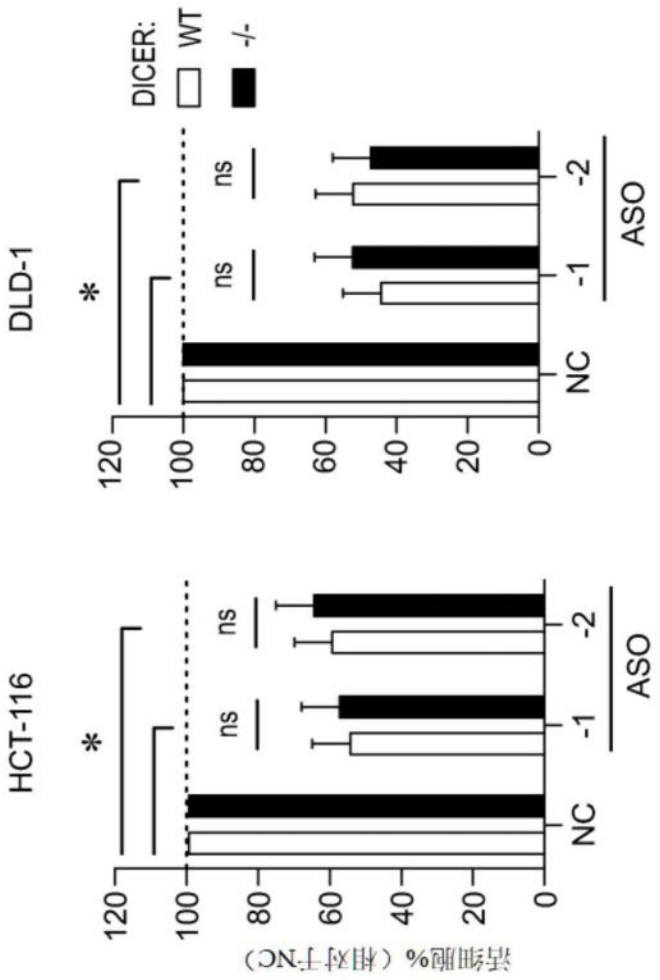

DICER: WT -/-
DLD-1
HCT-116
*
ns
NC
-1
-2
ASO
120
100
80
60
40
20
0
活细胞%（相对于NC）

图2G

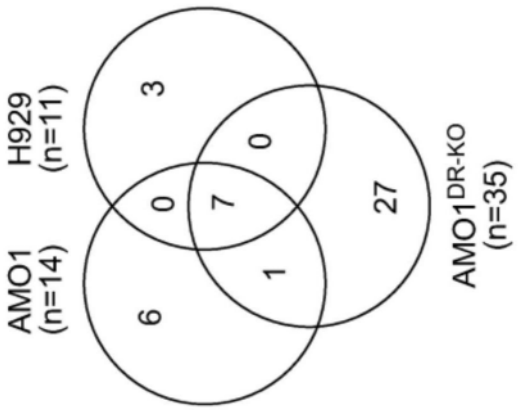

H929 (n=11)
AMO1 (n=14)
AMO1DR-KO (n=35)
3
0
0
7
27
6
1

图3A

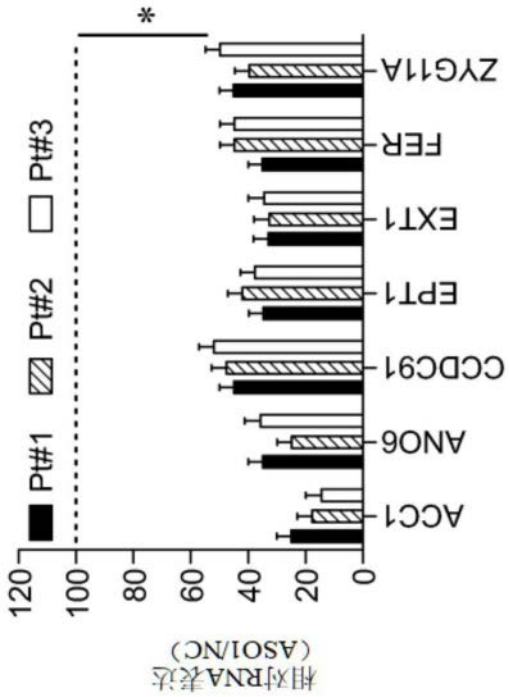

*
Pt#1
Pt#2
Pt#3
ACC1
ANO6
CCDC91
EPT1
EXT1
FER
ZYG11A
0
20
40
60
80
100
120
相对RNA表达
(ASO1/NC)

图3B

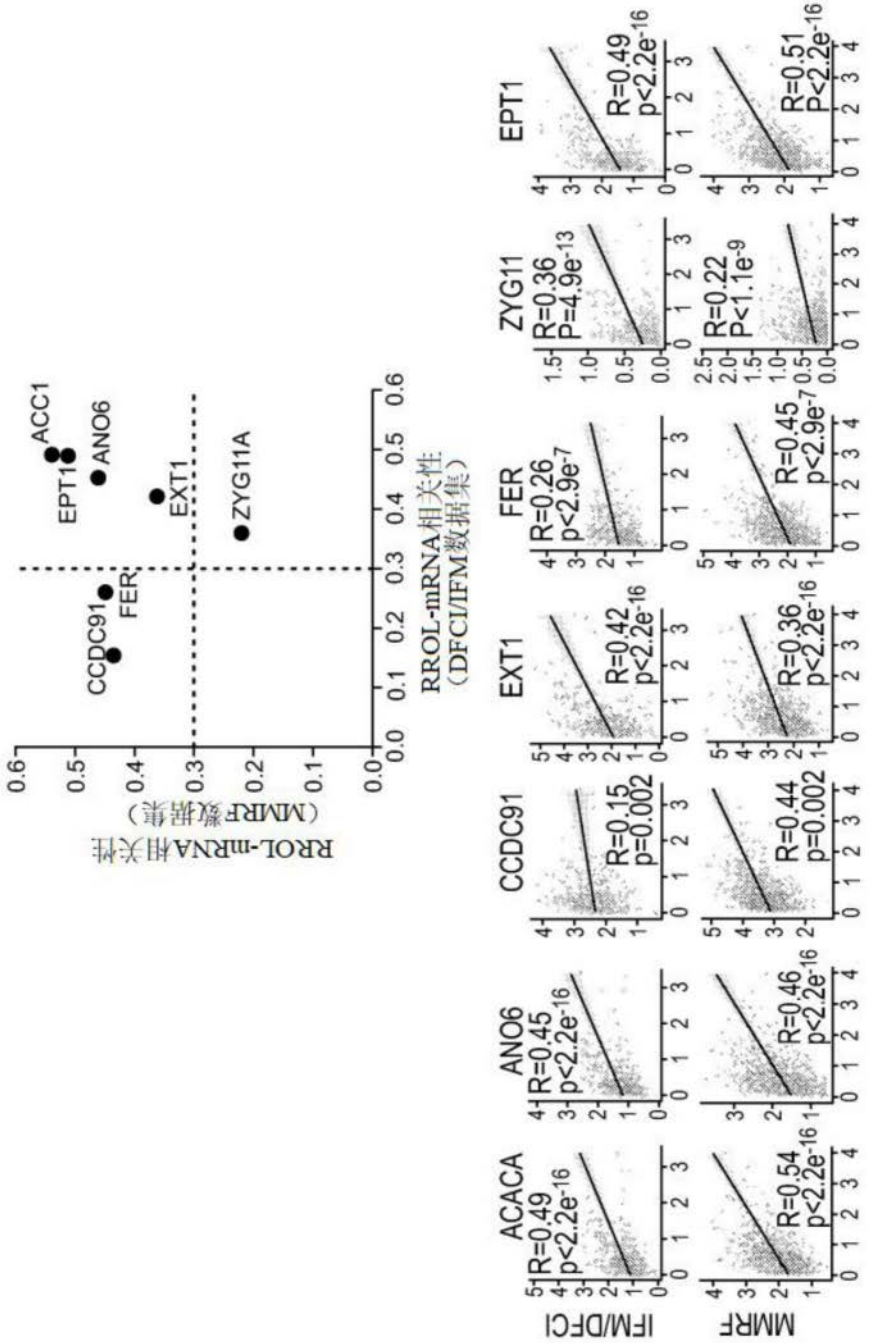

ACC1
EPT1
ANO6
EXT1
ZYG11A
CCDC91
FER
RROL-mRNA相关性
（MMRF数据集）
RROL-mRNA相关性
（DFCI/IFM数据集）
IFM/DFCI
MMRF
ACACA
ANO6
CCDC91
EXT1
FER
ZYG11
EPT1
R=0.49 p<2.2e-16
R=0.45 p<2.2e-16
R=0.15 p=0.002
R=0.42 p<2.2e-16
R=0.26 p<2.9e-7
R=0.36 P=4.9e-13
R=0.49 p<2.2e-16
R=0.54 p<2.2e-16
R=0.46 p<2.2e-16
R=0.44 p=0.002
R=0.36 p<2.2e-16
R=0.45 p<2.9e-7
R=0.22 P<1.1e-9
R=0.51 P<2.2e-16

图3C

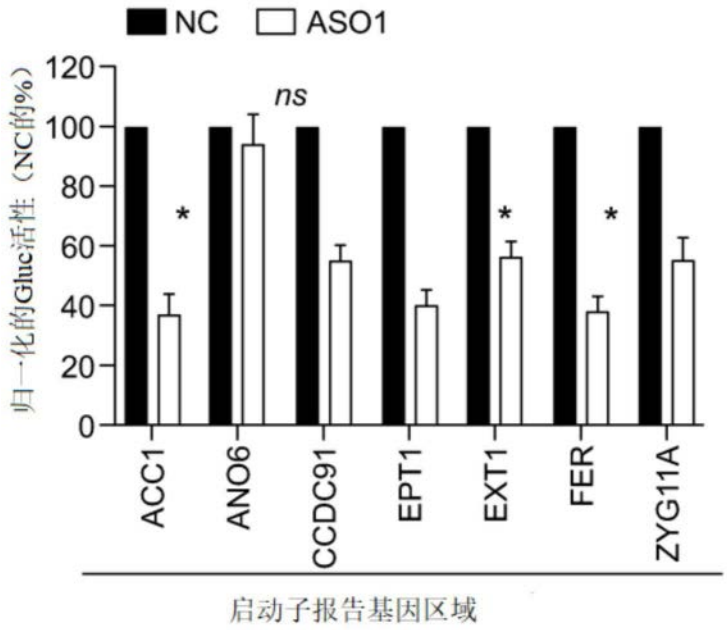

NC
ASO1
归一化的Gluc活性（NC的%）
120
100
80
60
40
20
0
ns
*
*
*
ACC1
ANO6
CCDC91
EPT1
EXT1
FER
ZYG11A
启动子报告基因区域

图3D

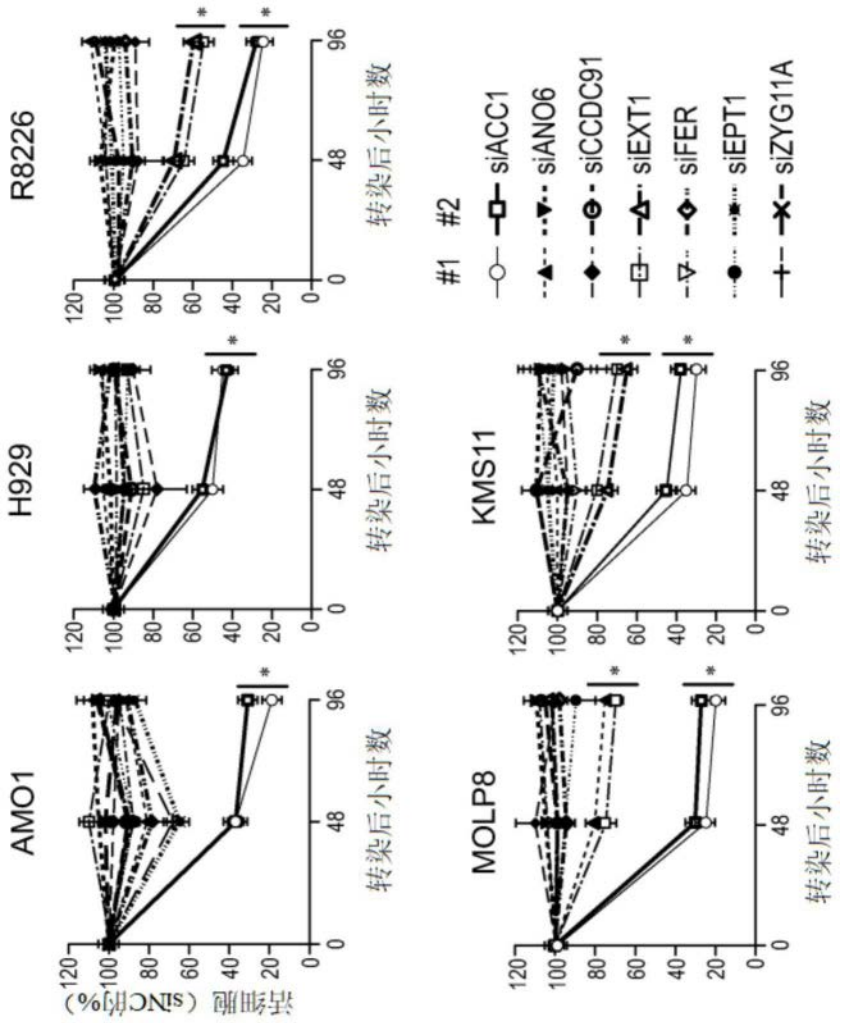

R8226
H929
AMO1
KMS11
MOLP8
转染后小时数
活细胞（siNC的%）
#1 #2
siACC1
siANO6
siCCDC91
siEXT1
siFER
siEPT1
siZYG11A

图3E

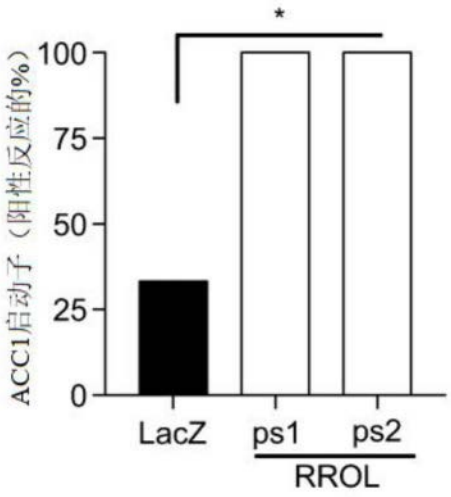

ACC1启动子（阳性反应的%）
LacZ
ps1
ps2
RROL

图3F

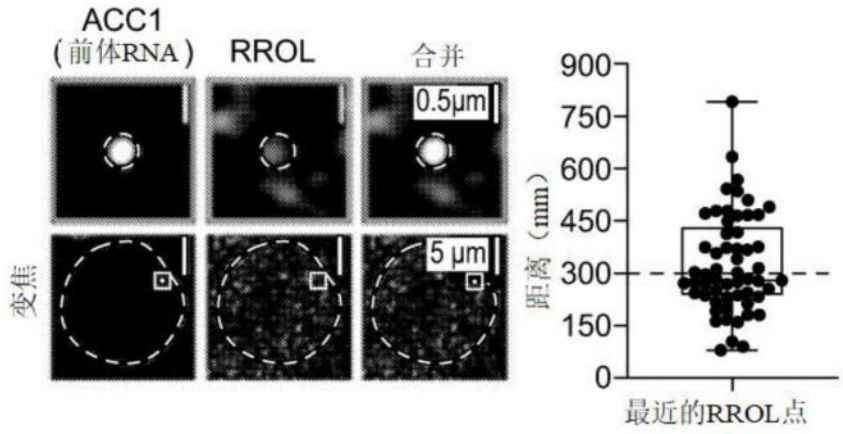

ACC1
(前体RNA)
RROL
合并
0.5μm
5 μm
变焦
900
750
600
450
300
150
0
距离（nm）
最近的RROL点

图3G

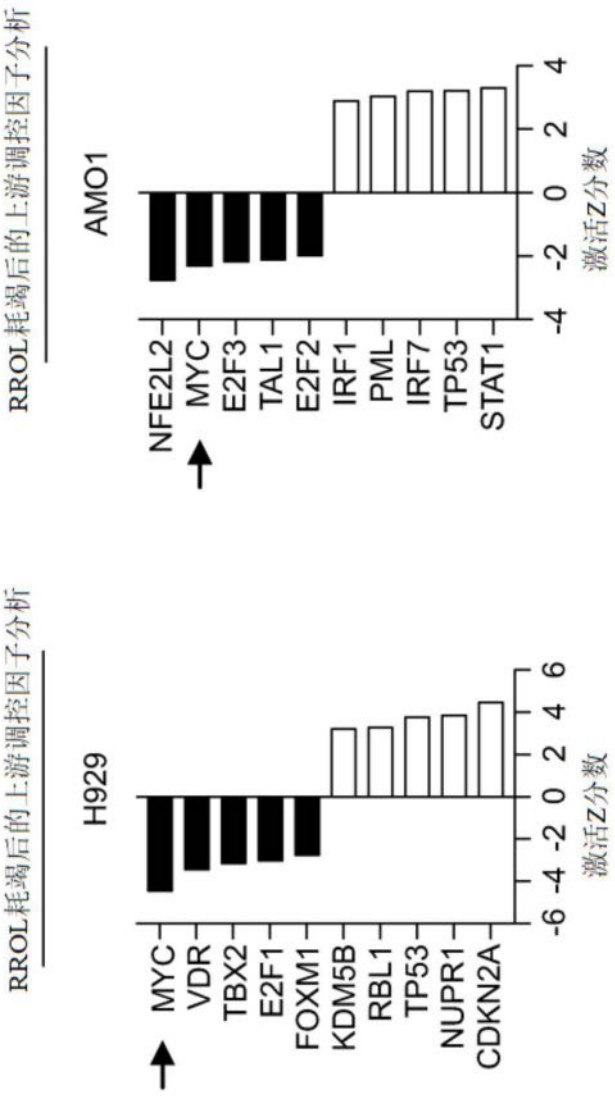

RROL耗竭后的上游调控因子分析
AMO1
NFE2L2
MYC
E2F3
TAL1
E2F2
IRF1
PML
IRF7
TP53
STAT1
-4
-2
0
2
4
激活Z分数
RROL耗竭后的上游调控因子分析
H929
MYC
VDR
TBX2
E2F1
FOXM1
KDM5B
RBL1
TP53
NUPR1
CDKN2A
-6
-4
-2
0
2
4
6
激活Z分数

图4A

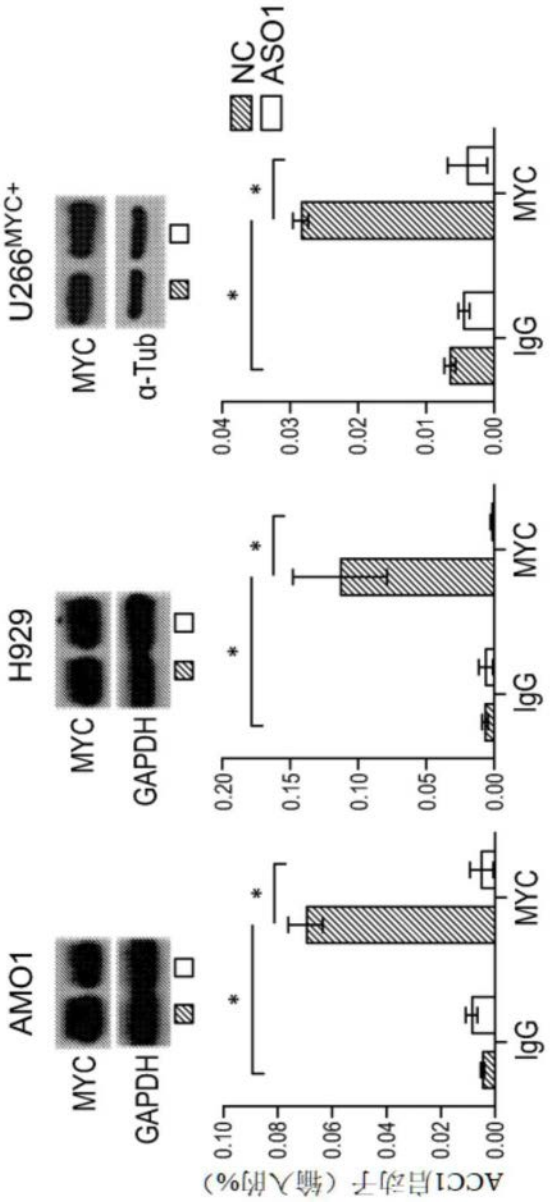

U266MYC+
MYC
α-Tub
NC
ASO1
H929
MYC
GAPDH
AMO1
MYC
GAPDH
IgG
MYC
ACC1启动子（输入的%）
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00

图4B

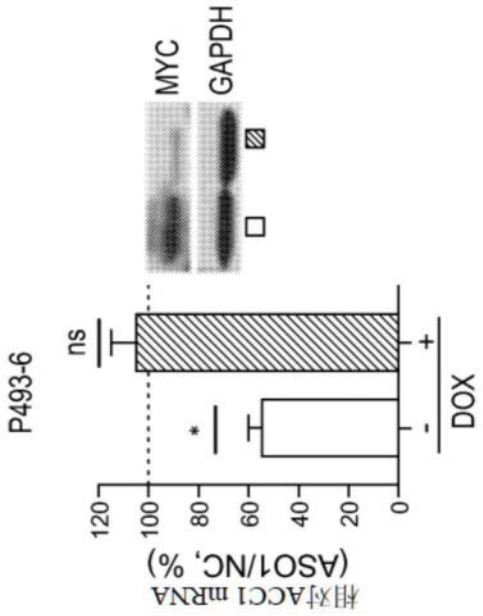

MYC
GAPDH
P493-6
ns
*
DOX
+
-
120
100
80
60
40
20
0
相对ACC1 mRNA
(ASO1/NC, %)

图4C

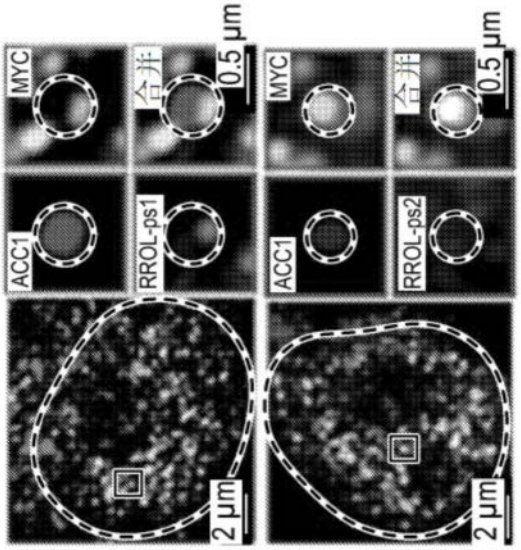

MYC
合并
0.5 μm
ACC1
RROL-ps1
2 μm
MYC
合并
0.5 μm
ACC1
RROL-ps2
2 μm

图4D

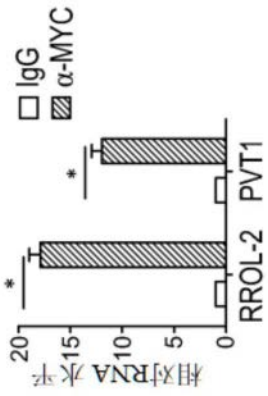

IgG
α-MYC
相对RNA 水平
20
15
10
5
0
*
*
RROL-2
PVT1

图4E

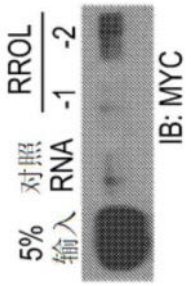

RROL
-2
-1
对照
RNA
5%
输入
IB: MYC

图4F

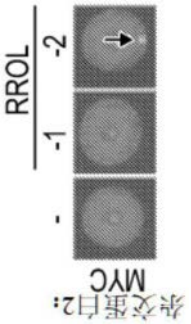

RROL
-2
-1
-
杂交蛋白2:
MYC

图4G

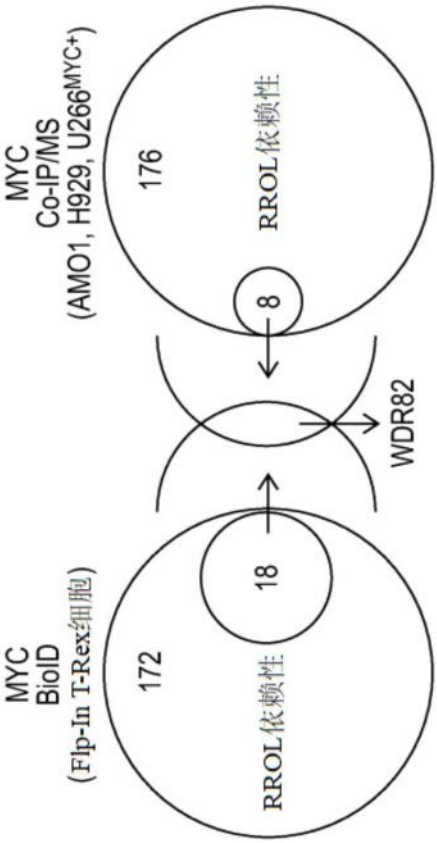

MYC
Co-IP/MS
(AMO1, H929, U266MYC+)
176
RROL依赖性
8
WDR82
MYC
BioID
(Flp-In T-Rex细胞)
172
18
RROL依赖性

图5A

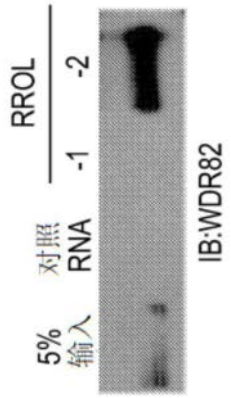

RROL
-2
-1
对照
RNA
5%
输入
IB:WDR82

图5B

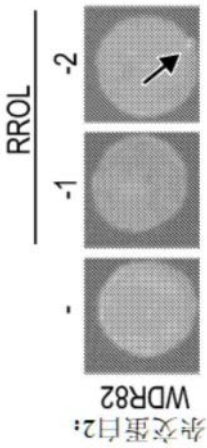

杂交蛋白2:
WDR82
-
-1
-2
RROL

图5C

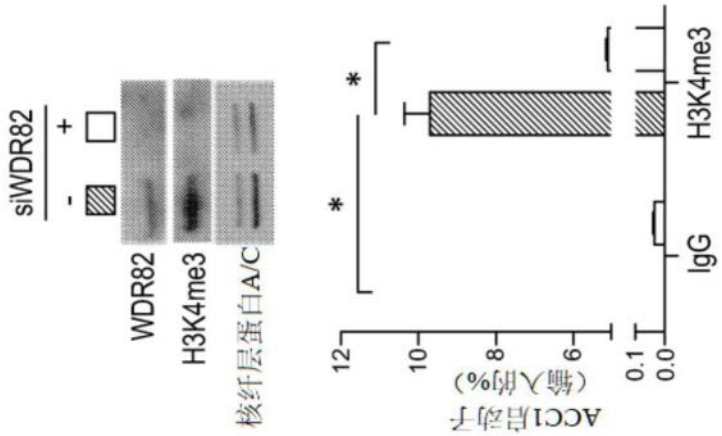

siWDR82
-
+
WDR82
H3K4me3
核纤层蛋白A/C
ACC1启动子
(输入的%)
12
10
8
6
0.1
0.0
IgG
H3K4me3
*
*
*

图5D

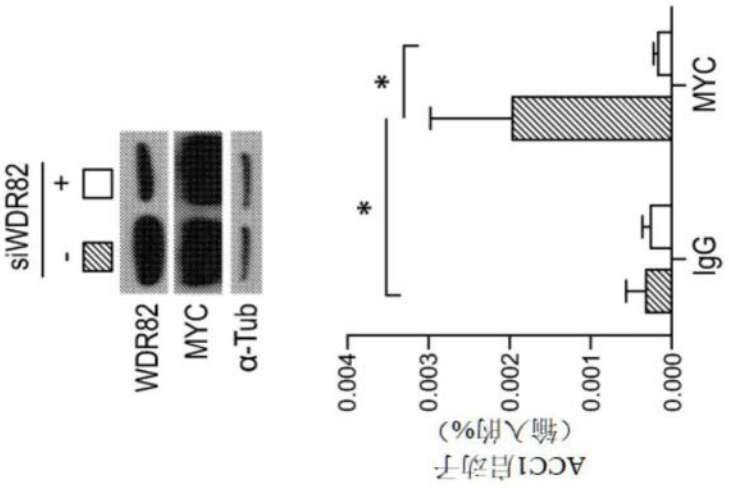

siWDR82
-
+
WDR82
MYC
α-Tub
ACC1启动子
(输入的%)
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
IgG
MYC
*
*
*

图5E

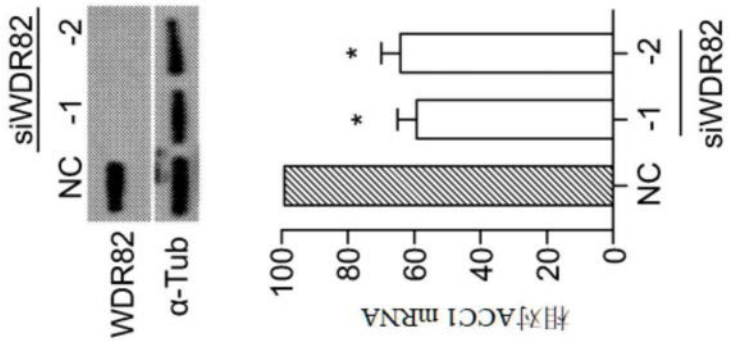

siWDR82
NC -1 -2
WDR82
α-Tub
相对ACC1 mRNA
100
80
60
40
20
0
NC -1 -2
siWDR82
*
*

图5F

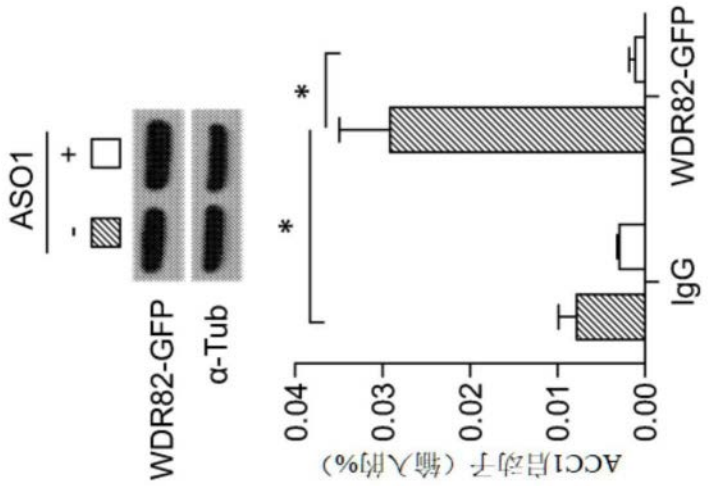

ASO1
- +
WDR82-GFP
α-Tub
ACC1启动子（输入的%）
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
IgG
WDR82-GFP
*
*

图5G

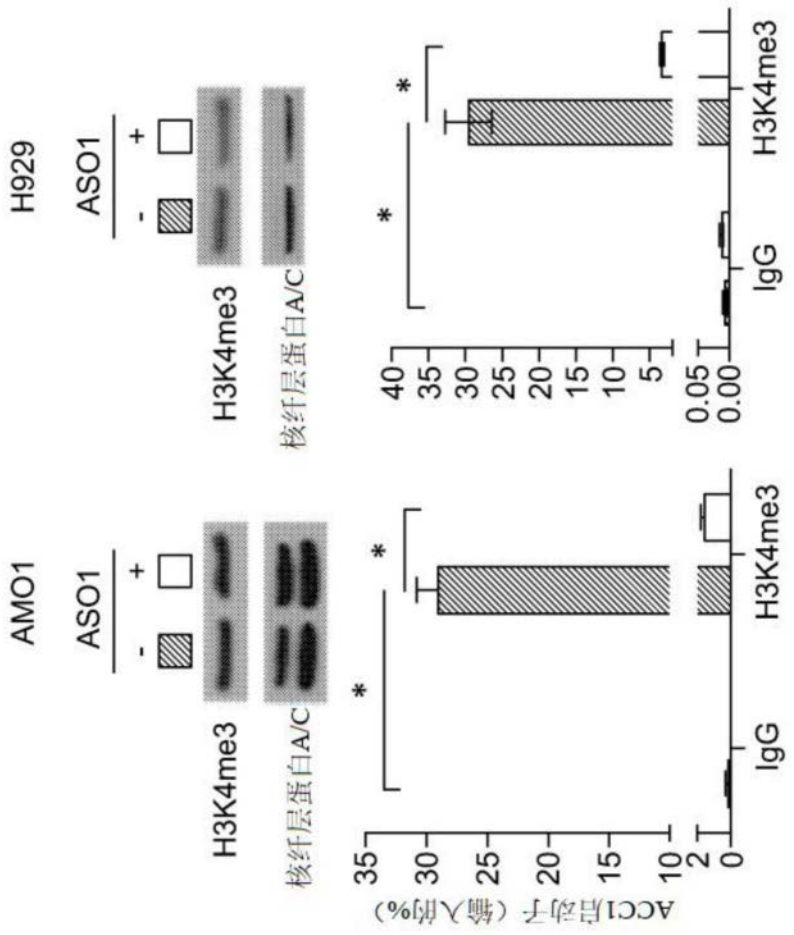

H929
ASO1
- +
H3K4me3
核纤层蛋白A/C
AMO1
ASO1
- +
H3K4me3
核纤层蛋白A/C
ACC1启动子（输入的%）
IgG
H3K4me3
IgG
H3K4me3
*
*
*
*

图5H

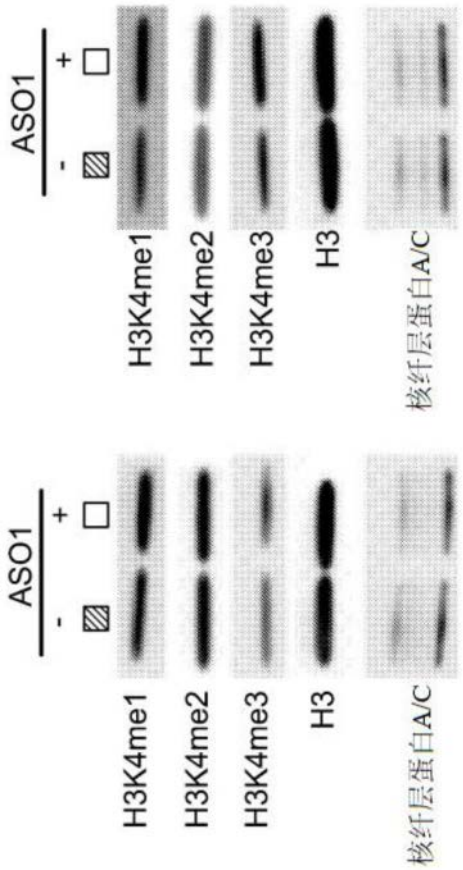

ASO1
-
+
H3K4me1
H3K4me2
H3K4me3
H3
核纤层蛋白A/C
ASO1
-
+
H3K4me1
H3K4me2
H3K4me3
H3
核纤层蛋白A/C

图5I

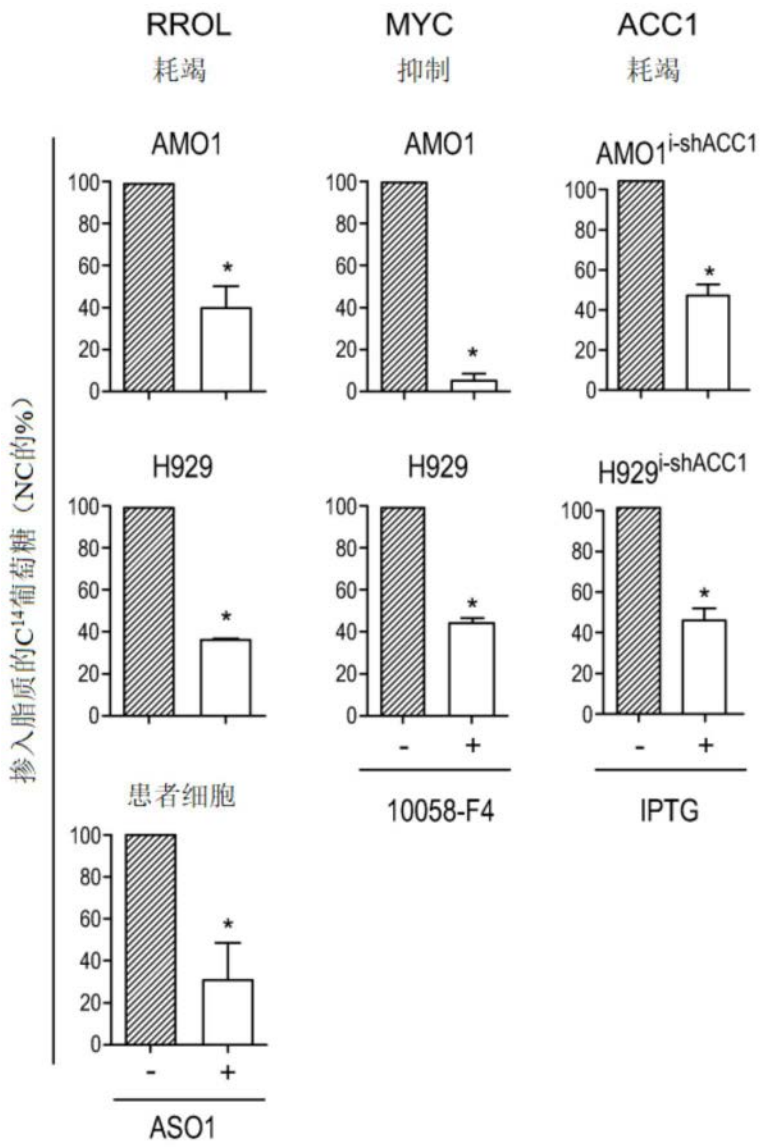

RROL
耗竭
MYC
抑制
ACC1
耗竭
AMO1
AMO1
AMO1i-shACC1
H929
H929
H929i-shACC1
患者细胞
掺入脂质的C14葡萄糖（NC的%）
10058-F4
IPTG
ASO1

图6A

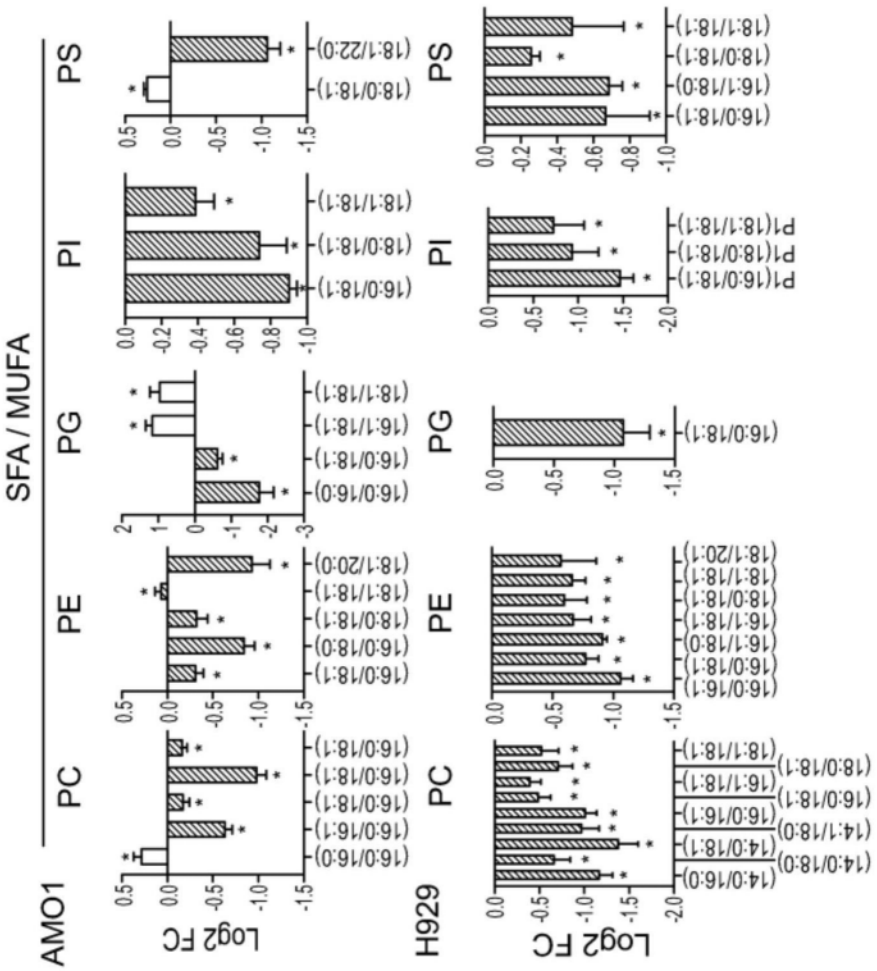

SFA / MUFA
PS
PI
PG
PE
PC
AMO1
H929
Log2 FC

图6B

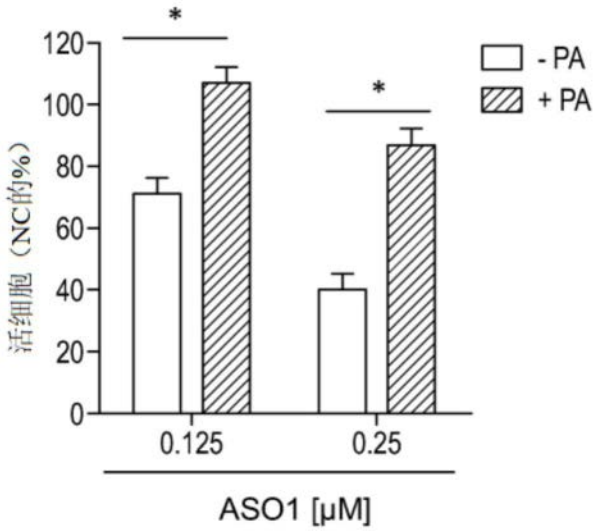

- PA
+ PA
活细胞（NC的%）
ASO1 [μM]
0.125
0.25

图6C

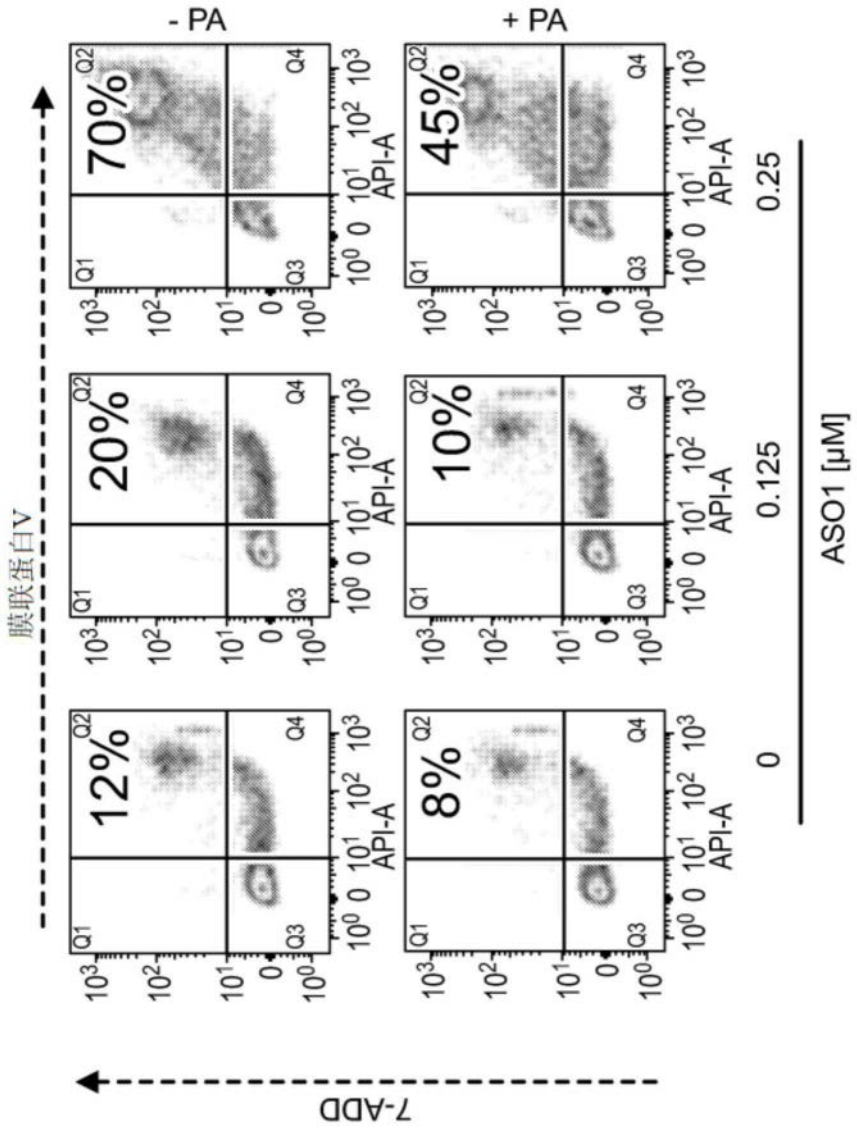

- PA
+ PA
膜联蛋白V
7-ADD
API-A
ASO1 [μM]
0
0.125
0.25
70%
45%
20%
10%
12%
8%
Q1
Q2
Q3
Q4

图6D



图6E

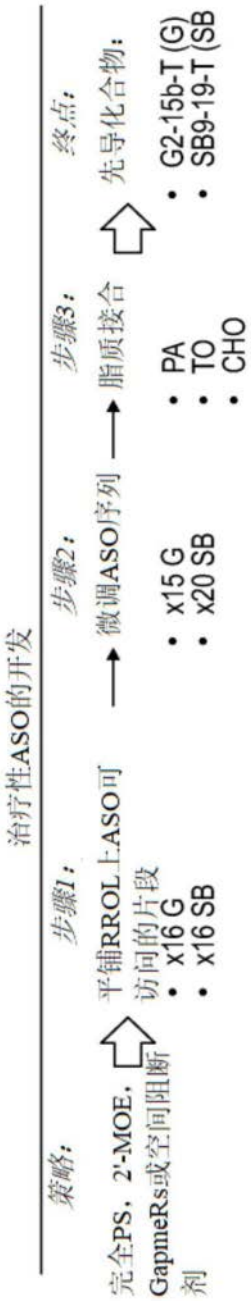

治疗性ASO的开发
策略：
完全PS，2'-MOE，GapmeRs或空间阻断剂
步骤1：
平铺RROL上ASO可访问的片段
• x16 G
• x16 SB
步骤2：
微调ASO序列
• x15 G
• x20 SB
步骤3：
脂质接合
• PA
• TO
• CHO
终点：
先导化合物：
• G2-15b-T (G)
• SB9-19-T (SB

图7A

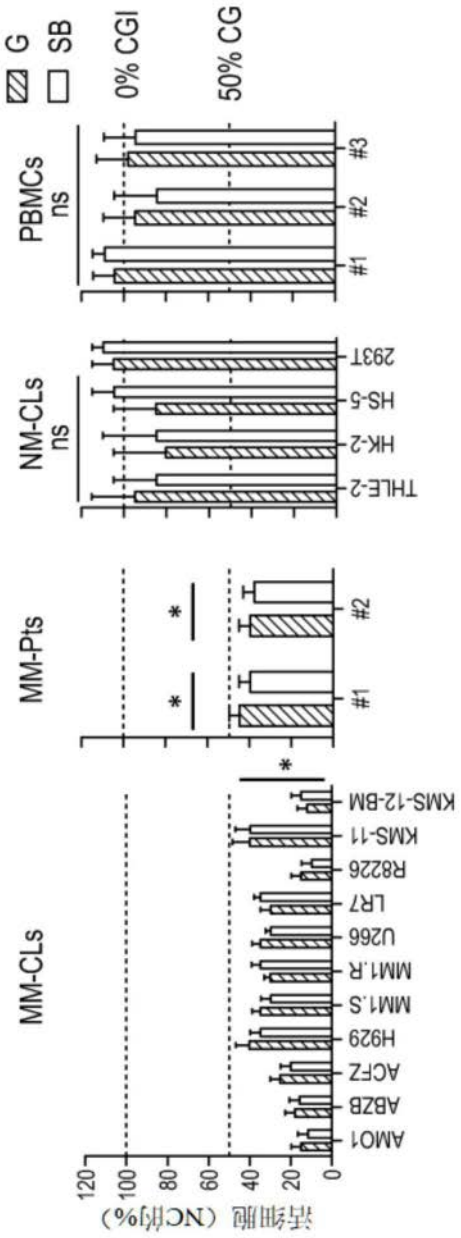

G
SB
0% CGI
50% CG
PBMCs
ns
#1
#2
#3
NM-CLs
ns
THLE-2
HK-2
HS-5
293T
MM-Pts
#1
#2
MM-CLs
AMO1
ABZB
ACFZ
H929
MM1.S
MM1.R
U266
LR7
R8226
KMS-11
KMS-12-BM
120
100
80
60
40
20
0
活细胞（NC的%）

图7B

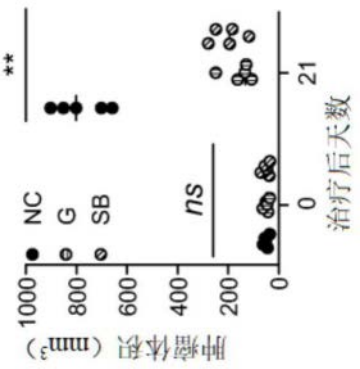

肿瘤体积（mm³）
1000
800
600
400
200
0
NC
G
SB
ns
**
0
21
治疗后天数

图7C

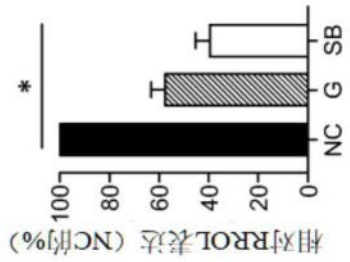

相对RROL表达（NC的%）
100
80
60
40
20
0
NC
G
SB
*

图7D

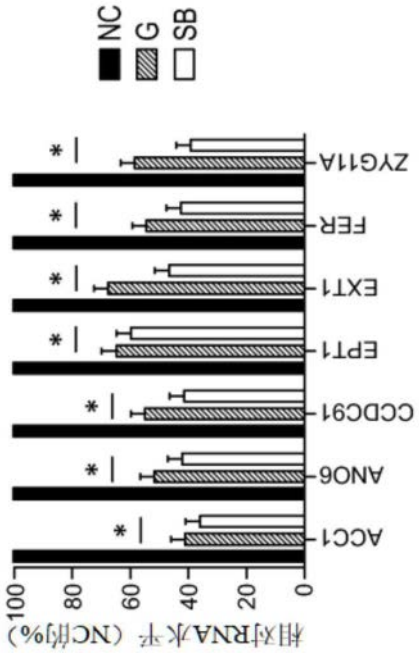

NC
G
SB
相对RNA水平（NC的%）
100
80
60
40
20
0
ACC1
ANO6
CCDC91
EPT1
EXT1
FER
ZYG11A
*

图7E

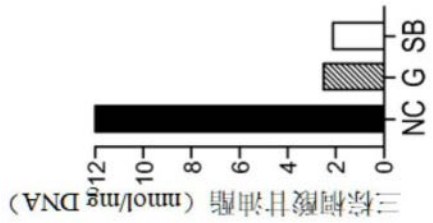

三棕榈酸甘油酯（nmol/mg DNA）
0
2
4
6
8
10
12
NC G SB

图7F

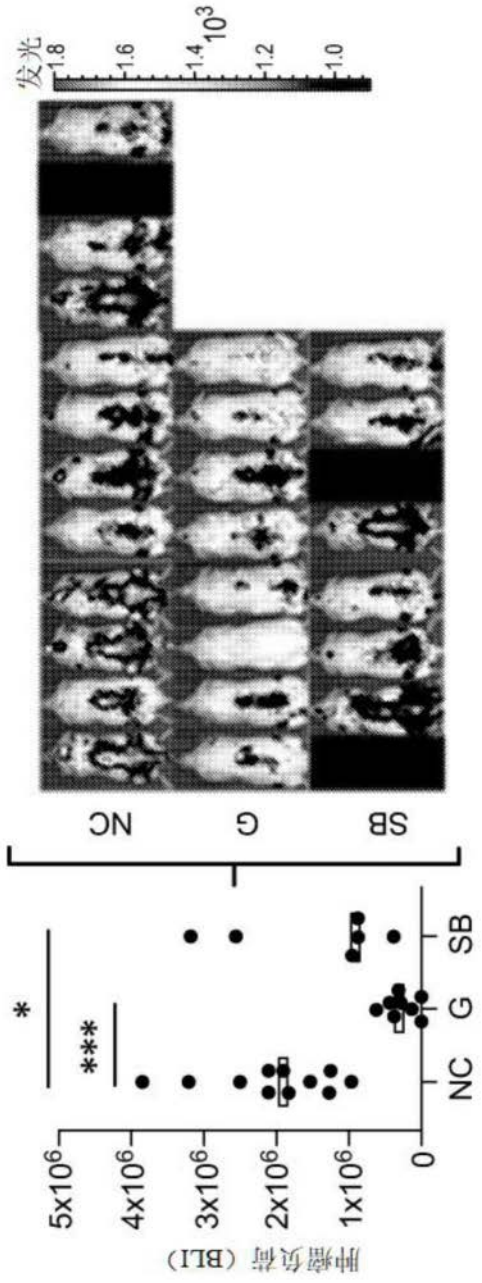

发光
1.8
1.6
1.4
10^3
1.2
1.0
NC
G
SB
肿瘤负荷（BLI）
0
1x10^6
2x10^6
3x10^6
4x10^6
5x10^6
NC G SB
***
*

图7G

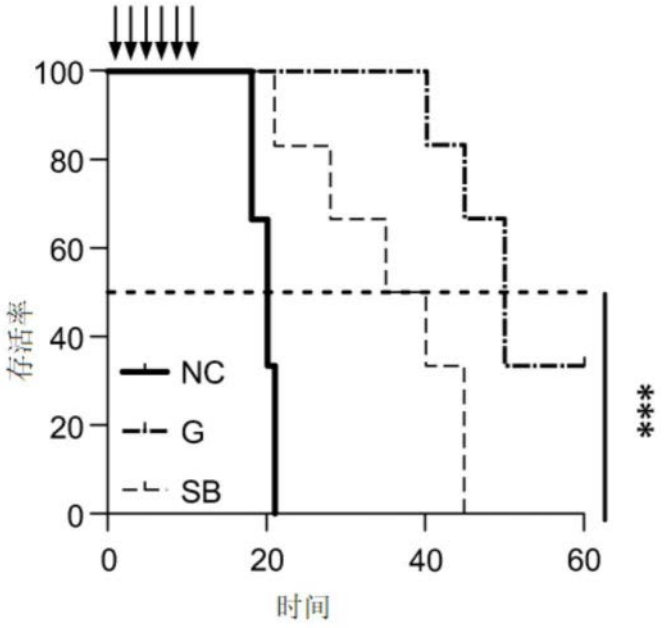

100
80
60
40
20
0
存活率
NC
G
SB
***
0
20
40
60
时间

图7H

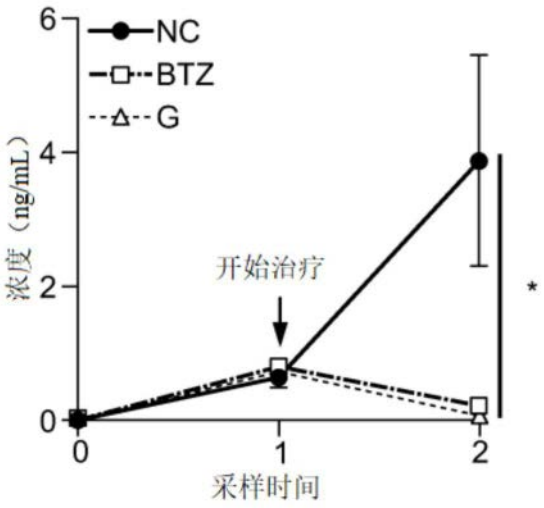

6
4
2
0
浓度（ng/mL）
NC
BTZ
G
开始治疗
*
0
1
2
采样时间

图7I

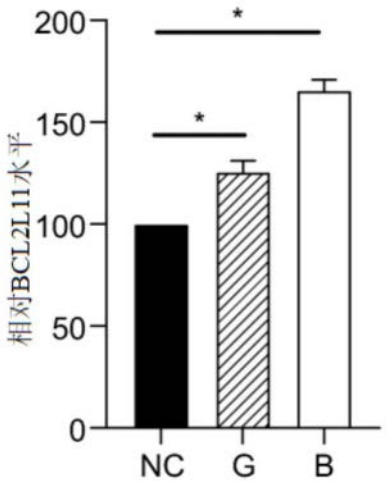

相对BCL2L11水平
200
150
100
50
0
*
*
NC
G
B

图7J

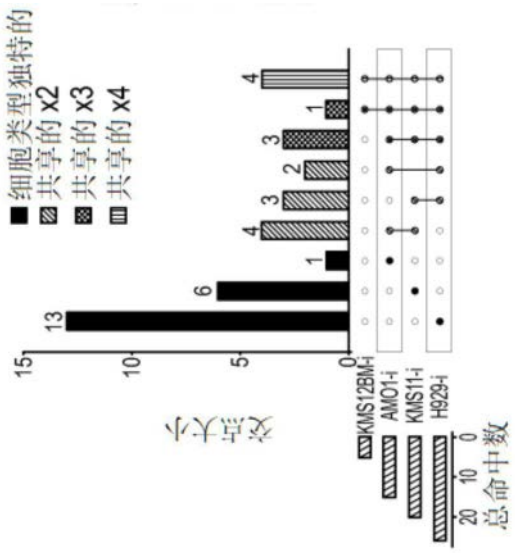

细胞类型独特的
共享的 x2
共享的 x3
共享的 x4
交点大小
15
10
5
0
13
6
1
4
3
2
KMS12BM-i
AMO1-i
KMS11-i
H929-i
20
10
0
总命中数

图8A

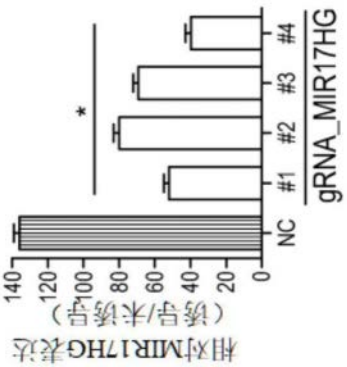

相对MIR17HG表达
（该导/未该导）
140
120
100
80
60
40
20
0
NC
#1
#2
#3
#4
gRNA_MIR17HG
*

图8B

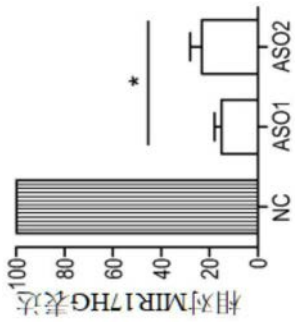

相对MIR17HG表达
100
80
60
40
20
0
NC
ASO1
ASO2
*

图8C

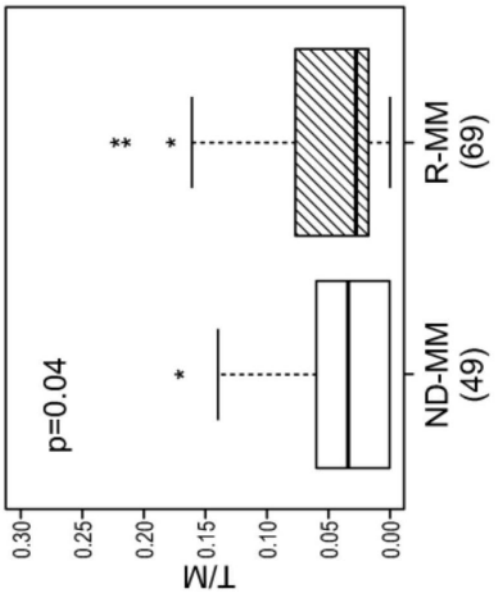

T/M
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
p=0.04
*
**
*
ND-MM
(49)
R-MM
(69)

图9A

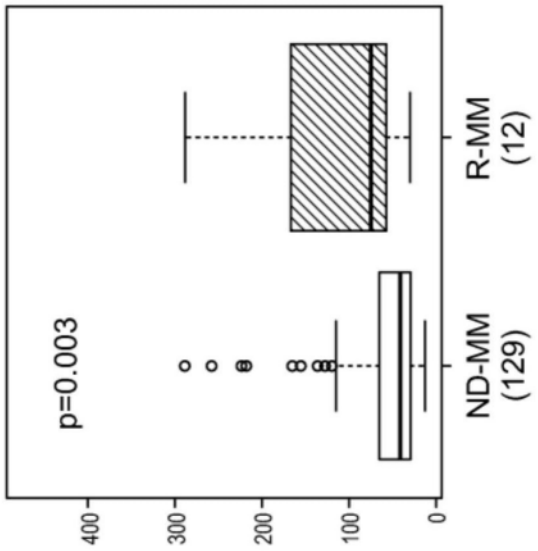

p=0.003
ND-MM
(129)
R-MM
(12)
400
300
200
100
0

图9B

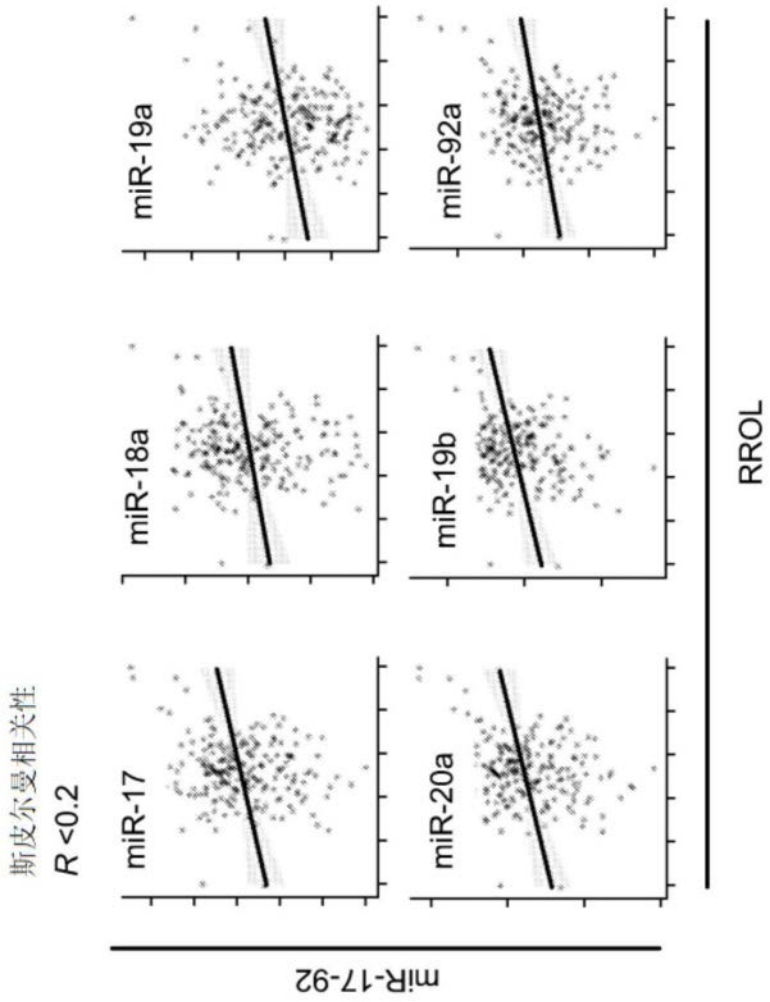

斯皮尔曼相关性
R <0.2
miR-17
miR-18a
miR-19a
miR-20a
miR-19b
miR-92a
miR-17-92
RROL

图9C

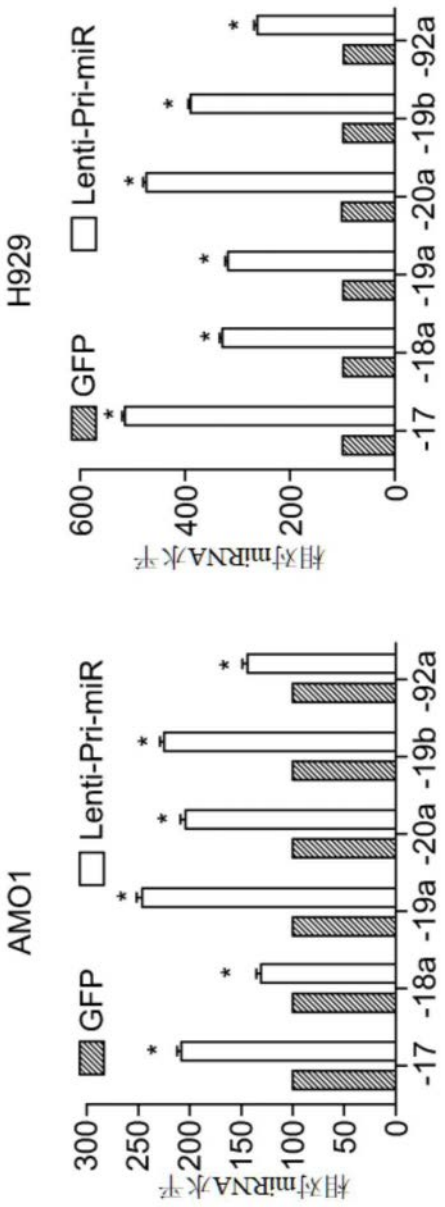

H929
GFP
Lenti-Pri-miR
相对miRNA水平
600
400
200
0
-17
-18a
-19a
-20a
-19b
-92a
AMO1
GFP
Lenti-Pri-miR
相对miRNA水平
300
250
200
150
100
50
0
-17
-18a
-19a
-20a
-19b
-92a

图9D

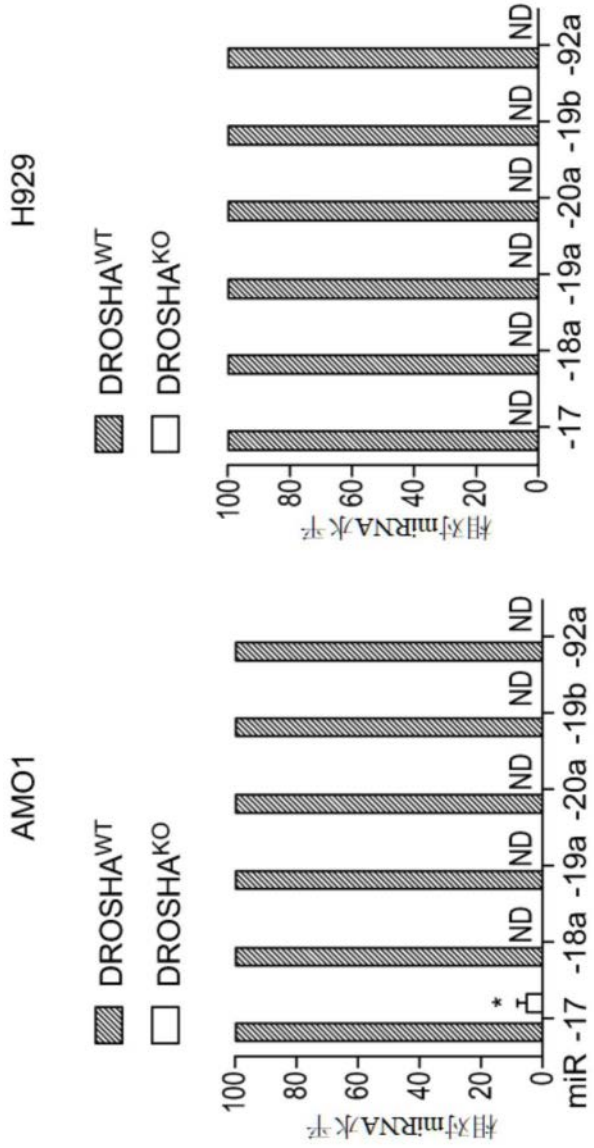

H929
AMO1
DROSHA^WT
DROSHA^KO
相对miRNA水平
100
80
60
40
20
0
*
ND
-17
-18a
-19a
-20a
-19b
-92a
miR

图9E

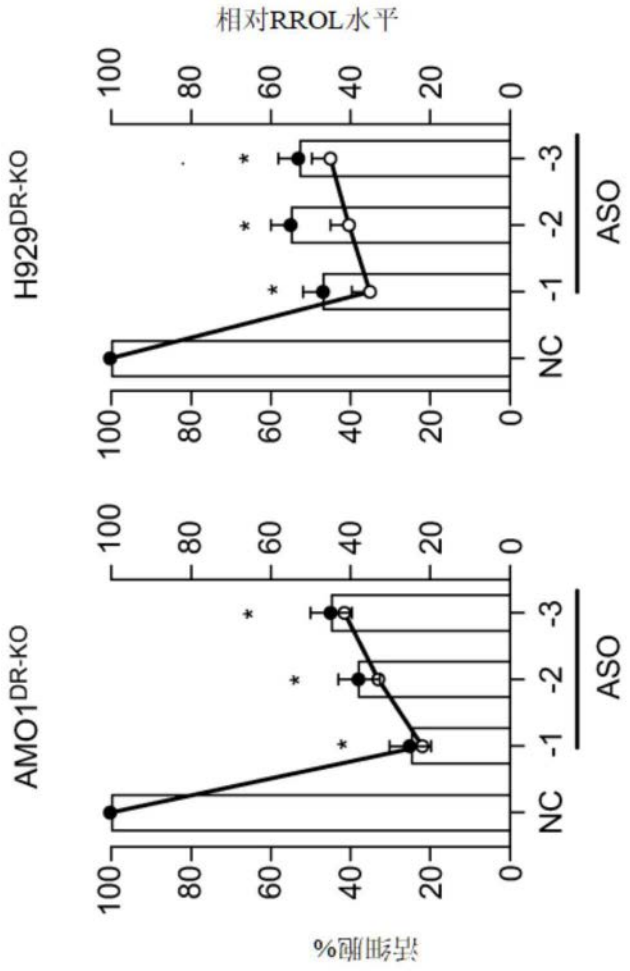


图9F

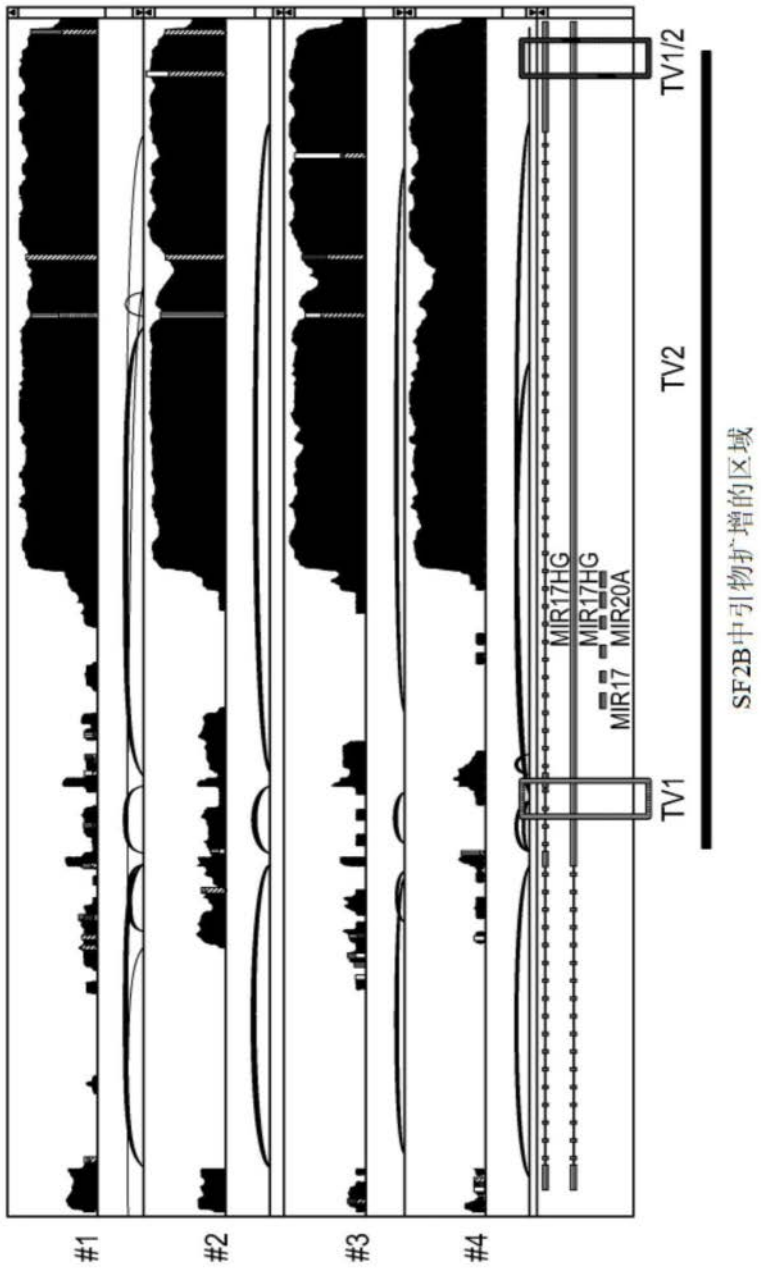

#1
#2
#3
#4
MIR17HG
MIR17HG
MIR17
MIR20A
TV1
TV2
TV1/2
SF2B中引物扩增的区域

图9G

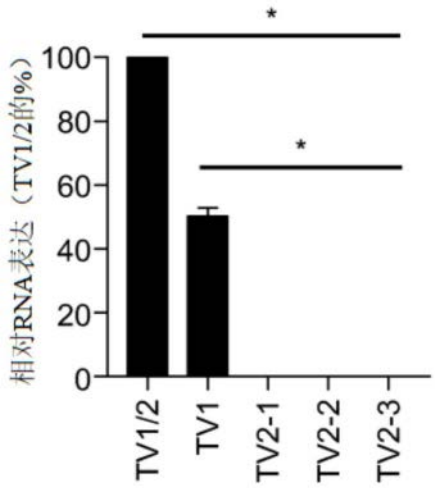

*
*
100
80
60
40
20
0
相对RNA表达（TV1/2的%）
TV1/2
TV1
TV2-1
TV2-2
TV2-3

图9H

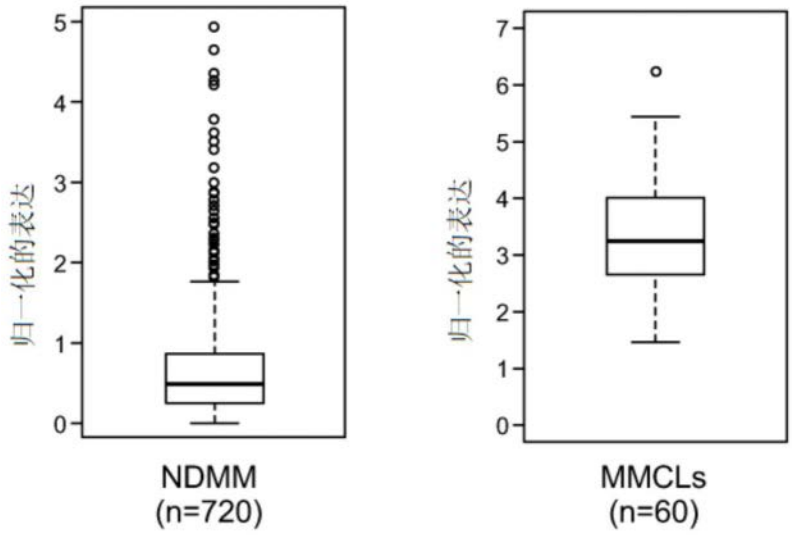

5
4
3
2
1
0
归一化的表达
NDMM
(n=720)
7
6
5
4
3
2
1
0
归一化的表达
MMCLs
(n=60)

图9I

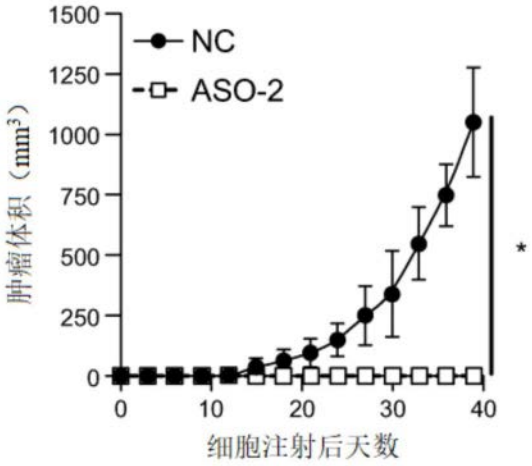

1500
1250
1000
750
500
250
0
NC
ASO-2
肿瘤体积（mm³）
0
10
20
30
40
细胞注射后天数
*

图9J

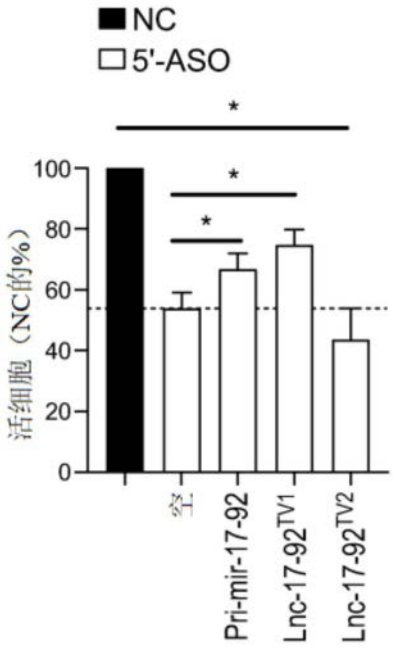

NC
5'-ASO
*
*
*
100
80
60
40
20
0
活细胞（NC的%）
空
Pri-mir-17-92
Lnc-17-92TV1
Lnc-17-92TV2

图9K

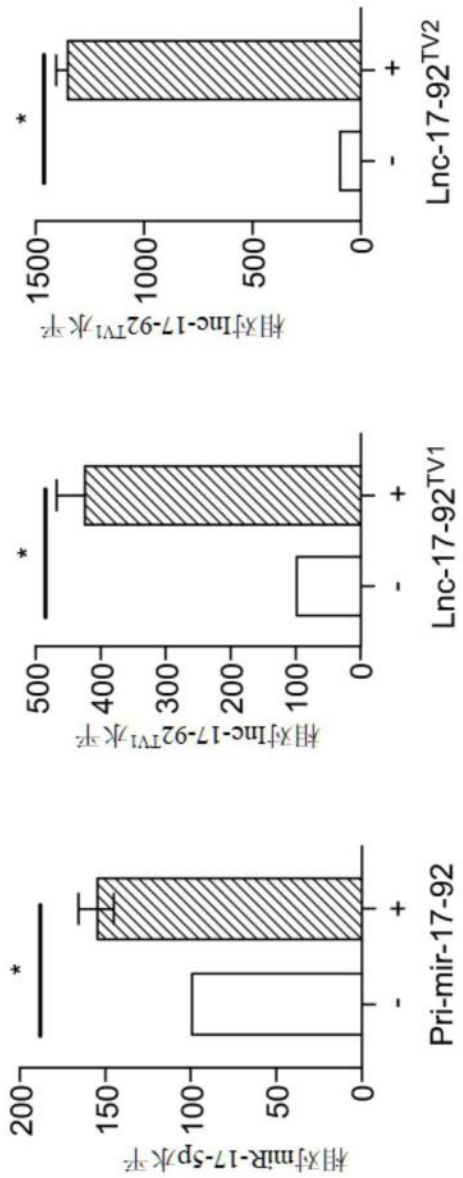

Pri-mir-17-92
Lnc-17-92TV1
Lnc-17-92TV2
-
+
*
0
50
100
150
200
0
100
200
300
400
500
0
500
1000
1500

图9L

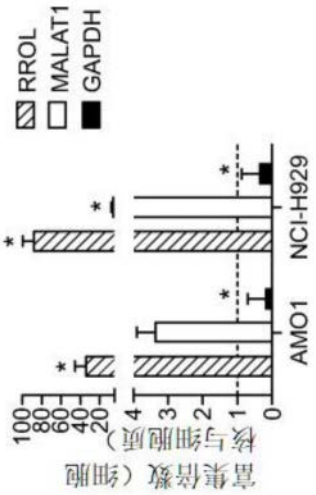


图10A

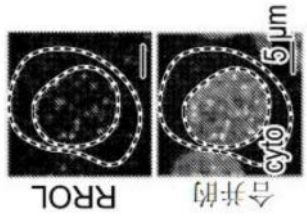


图10B

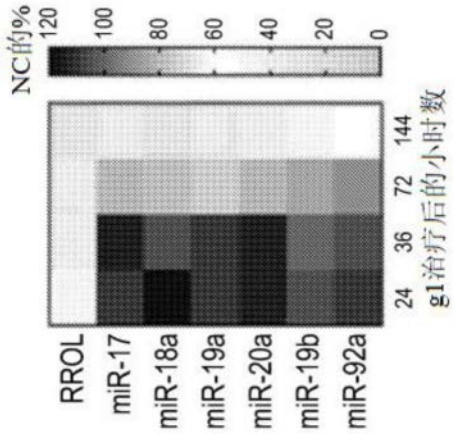


图10C

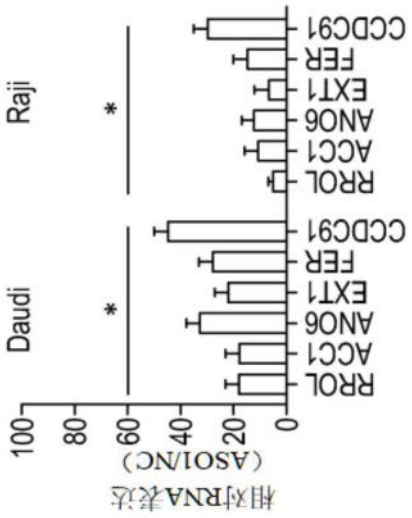

Raji
Daudi
*
*
RROL
ACC1
ANO6
EXT1
FER
CCDC91
0
20
40
60
80
100
相对RNA表达
(ASO1/NC)

图10D

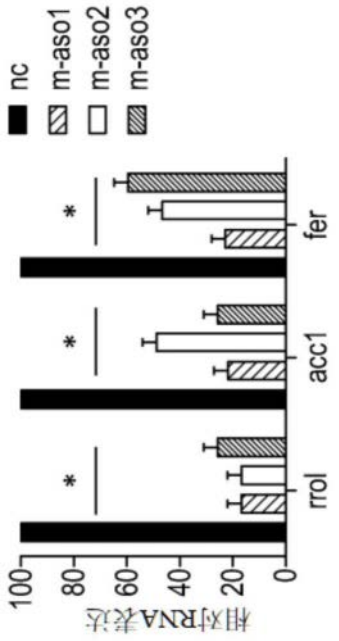

nc
m-aso1
m-aso2
m-aso3
rrol
acc1
fer
*
*
*
0
20
40
60
80
100
相对RNA表达

图10E

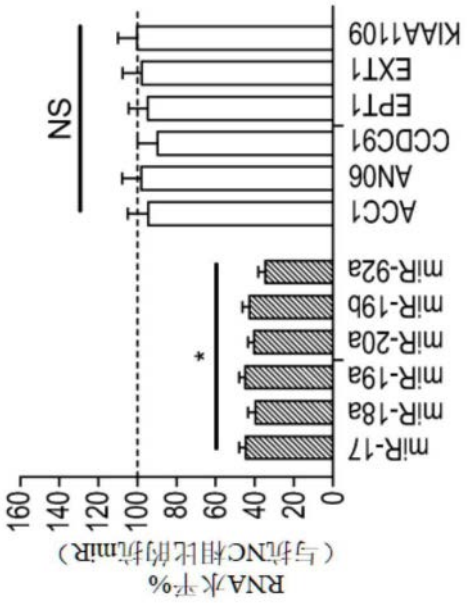

KIAA1109
EXT1
EPT1
CCDC91
AN06
ACC1
miR-92a
miR-19b
miR-20a
miR-19a
miR-18a
miR-17
NS
*
0
20
40
60
80
100
120
140
160
RNA水平%
（与抗NC相比的抗miR）

图10F

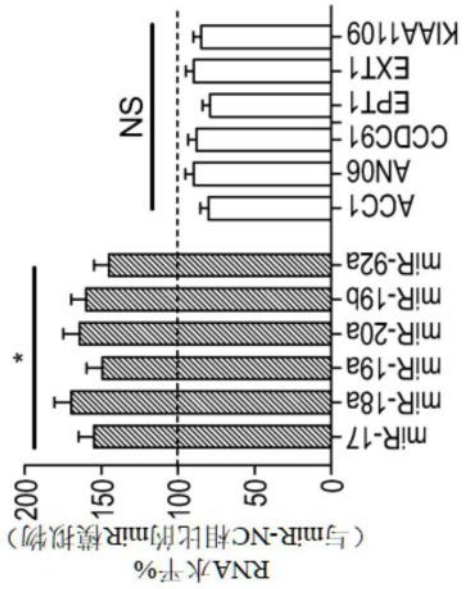

KIAA1109
EXT1
EPT1
CCDC91
AN06
ACC1
miR-92a
miR-19b
miR-20a
miR-19a
miR-18a
miR-17
NS
*
0
50
100
150
200
RNA水平%
（与miR-NC相比的miR模拟物）

图10G

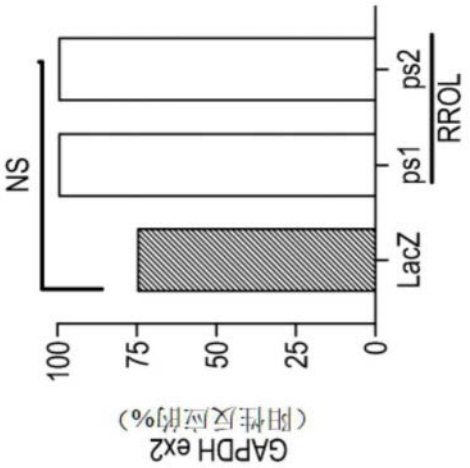


图10H

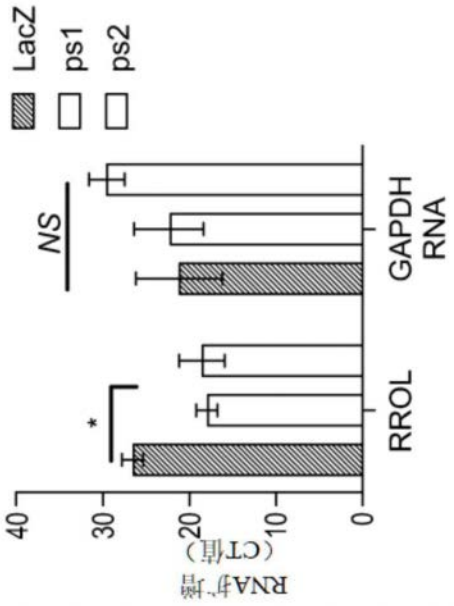


图10I

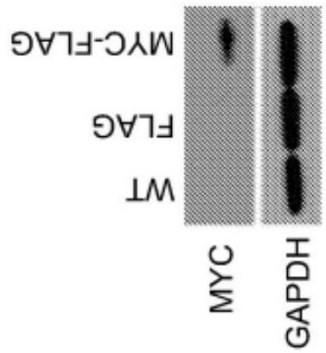


图11A

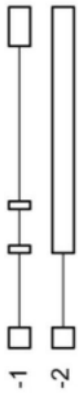

-1
-2

图11B

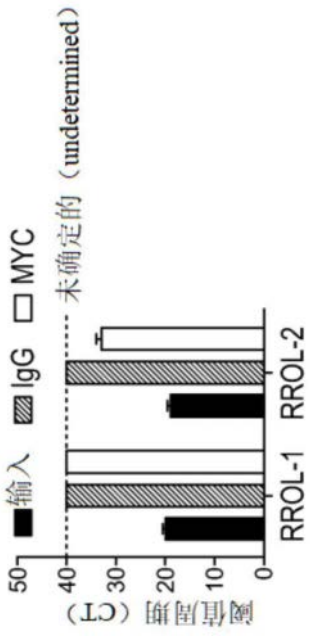

输入
IgG
MYC
未确定的（undetermined）
RROL-1
RROL-2
阈值周期（CT）
50
40
30
20
10
0

图11C

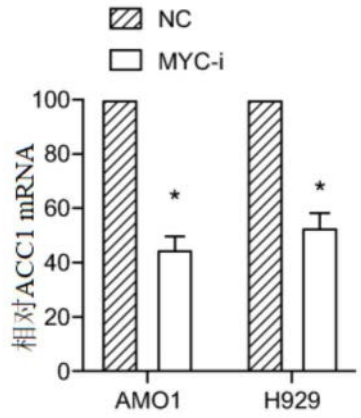


图11D

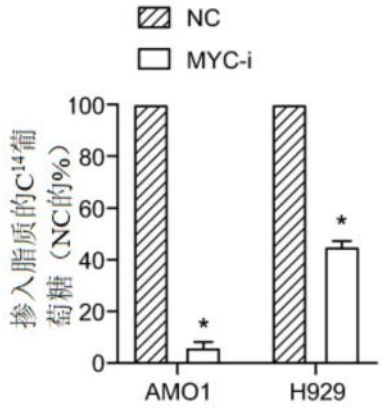


图11E

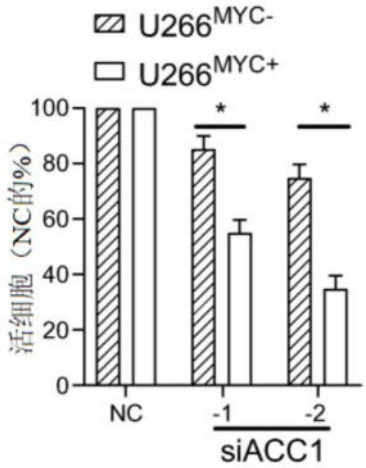


图11F

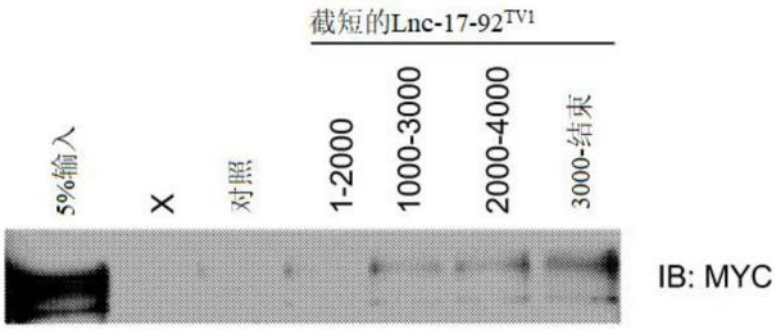


图11G

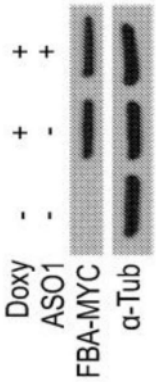


图12A

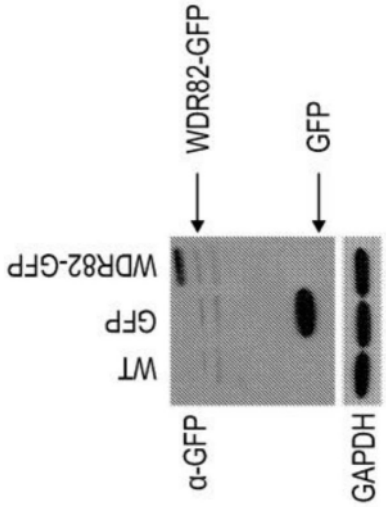


图12B

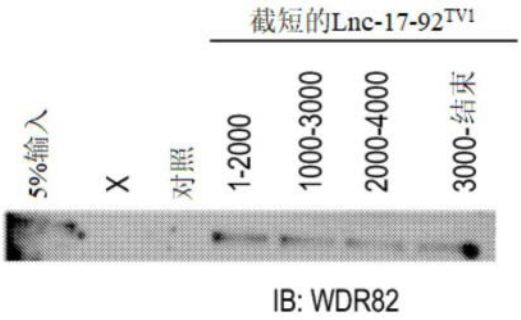


图12C

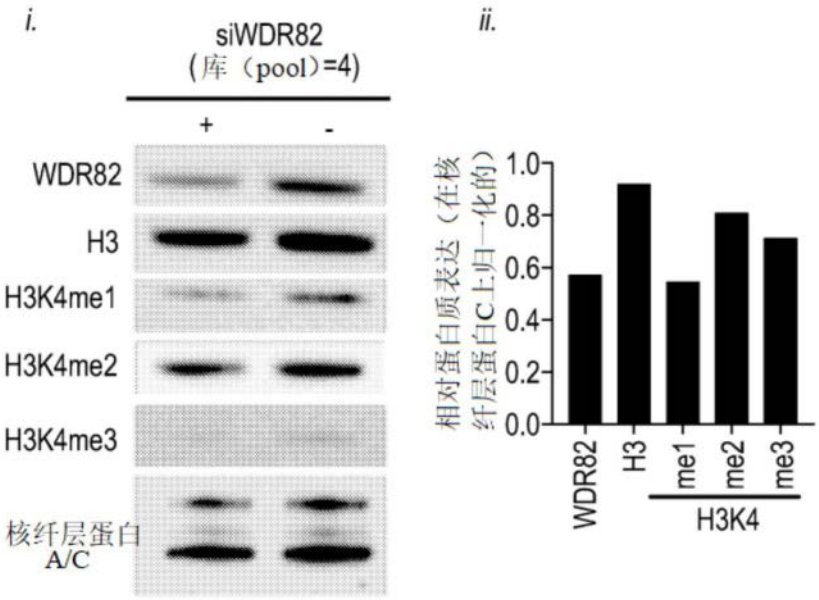


图12D

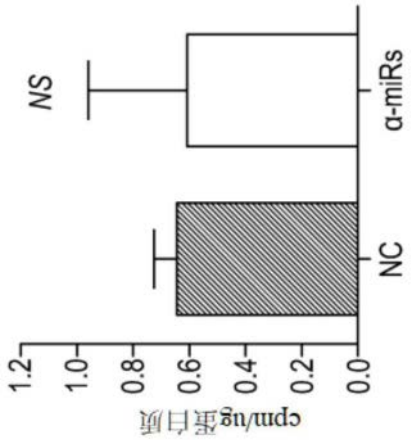


图13A

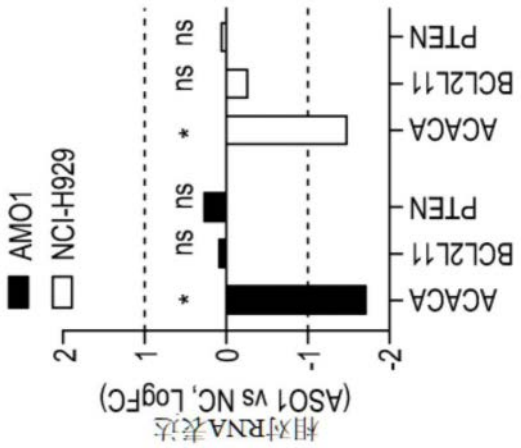

AMO1
NCI-H929
ns
ns
*
ns
ns
*
PTEN
BCL2L11
ACACA
PTEN
BCL2L11
ACACA
2
1
0
-1
-2
相对RNA表达
(ASO1 vs NC, LogFC)

图13B

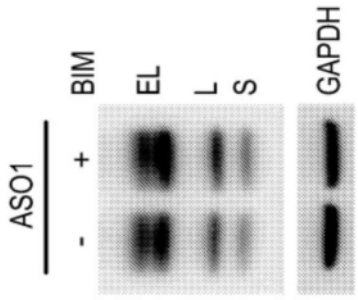

ASO1
+
-
BIM
EL
L
S
GAPDH

图13C

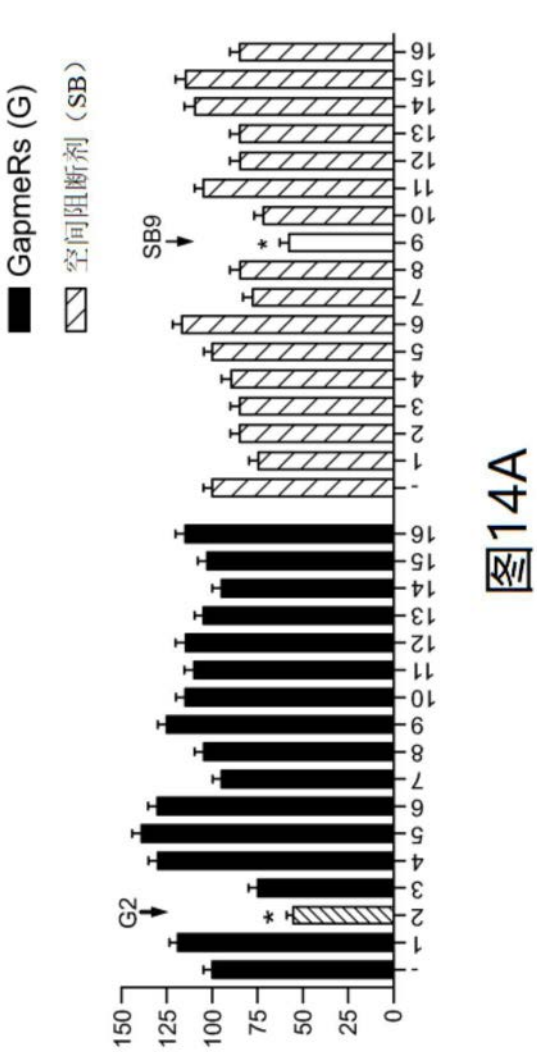

GapmeRs (G)
空间阻断剂（SB）
SB9
G2
150
125
100
75
50
25
0
-
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
*

图14A

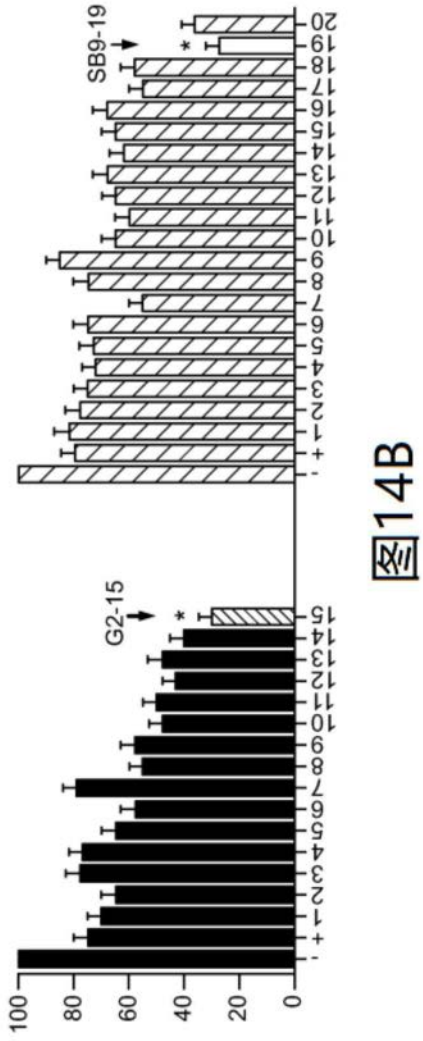

SB9-19
G2-15
100
80
60
40
20
0
-
+
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
*

图14B

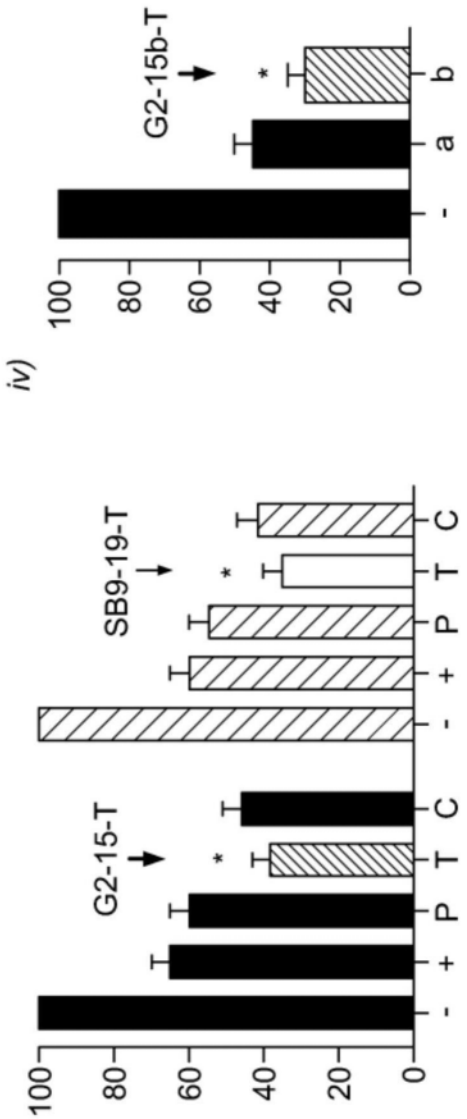


图14C