

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7392954号
(P7392954)

(45)発行日 令和5年12月6日(2023.12.6)

(24)登録日 令和5年11月28日(2023.11.28)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K 31/7105

Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

Z N A

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00

1 1 1

A 6 1 K 31/337(2006.01)

A 6 1 K 31/337

請求項の数 9 (全81頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-536930(P2020-536930)

(86)(22)出願日 平成30年9月18日(2018.9.18)

(65)公表番号 特表2020-534354(P2020-534354
A)

(43)公表日 令和2年11月26日(2020.11.26)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/051489

(87)国際公開番号 WO2019/055977

(87)国際公開日 平成31年3月21日(2019.3.21)

審査請求日 令和3年9月17日(2021.9.17)

(31)優先権主張番号 62/560,140

(32)優先日 平成29年9月18日(2017.9.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 523091224

シーゼット・バイオハブ・エスエフ・リ
ミテッド・ライアビリティ・カンパニー
C Z Biohub SF, LLC
アメリカ合衆国 9 4 1 5 8 カリフォルニ
ア州サンフランシスコ、イリノイ・スト
リート 4 9 9

(73)特許権者 503115205

ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
ザ レランド スタンフォード ジュニア
ユニバーシティ
アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8
カリフォルニア州 スタンフォード メイ
ン クワッド ビルディング 1 7 0 サー
ド フロア ビー・オー・ボックス 2 0
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トリプルネガティブ乳癌の治療方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トリプルネガティブ乳癌(TNBC)の治療における使用のための、サイクリン依存性キナーゼ19(CDK19)の発現または活性の阻害剤を含む医薬組成物であって、阻害剤は、CDK19標的shRNA、CDK19標的siRNA、または、CDK19遺伝子にハイブリダイズし、かつCRISPR/Casシステムで使用されるガイドRNAである、医薬組成物。

【請求項 2】

該癌が、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}上皮細胞を含む腫瘍であることを特徴とする、TNBCの治療における使用のための請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

阻害剤が、CDK19の発現または活性を阻害するが、CDK8の発現または活性を有意に阻害しない、TNBCの治療における使用のための請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

阻害剤が、CDK19の5'UTRに相補的または実質的に相補的であるがCDK8の5'UTRには相補的または実質的に相補的でない配列を含む、CDK19標的shRNAまたはsiRNAである、TNBCの治療における使用のための請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

阻害剤が、CDK19の3'UTRに相補的または実質的に相補的であるがCDK8の3'UTRには相補的または実質的に相補的でない配列を含む、CDK19標的shRNAまたはsiRNAである、TNBCの治療における使用のための請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

20

【請求項 6】

阻害剤が、CDK19のコード領域に相補的または実質的に相補的であるがCDK8のコード領域には相補的または実質的に相補的でない、CDK19標的shRNAまたはsiRNAである、TNBCの治療における使用のための請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

阻害剤が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、および配列番号11よりなる群から選択される配列を含むCDK19標的shRNAまたはsiRNAである、TNBCの治療における使用のための請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

阻害剤が、抗癌放射線療法またはアントラサイクリン、タキサン、代謝拮抗物質、プラチナ剤、ピノレルピン、もしくはエリブリンを含む抗癌化学療法剤と組み合わせて投与される、TNBCの治療における使用のための請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

阻害剤の投与が、悪液質の減少、生存時間の増加、腫瘍進行までの時間の延長、腫瘍量の減少、全身腫瘍組織量の減少、腫瘍転移までの時間の延長、腫瘍再発までの時間の延長の少なくとも一つという結果となる、TNBCの治療における使用のための請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、2017年9月18日に提出された米国仮特許出願第62/560,140に対する優先権の利益を主張し、これは、すべての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。

【0002】

この明細書に記載されている研究は、NIH/NCI 5R01 CA100225、国防総省の助成金W81XWH-11-1-0287、国防総省/乳癌研究プログラム(BCRP)イノベーター賞W81XWH-13-1-0281およびNIH S10 Share Instrument Grant (1S10RR02933801)によってサポートされた。

【0003】

本発明は、生物医学、例えば腫瘍学の分野に関する。

【背景技術】

【0004】

トリプルネガティブ乳癌(TNBC)は、若い女性に過度に影響を及ぼし、予後不良に関連する炎症性乳癌サブタイプである。Bauerら、"Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry" Cancer 109, 1721-1728, doi:10.1002/cncr.22618 (2007)を参照。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

すべての乳癌患者の20%が罹患しているにもかかわらず、現在これらの患者を対象とした臨床的に承認された標的療法は存在しない。当技術分野では、TNBCを治療する効果的な方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、サイクリン依存性キナーゼ19(CDK19)の発現または活性を阻害する薬剤を患者に投与することにより、患者のTNBCを治療する方法に関する。

【0007】

一つの側面において、サイクリン依存性キナーゼ19 (CDK19) の発現または活性を阻害し、悪液質の減少、生存時間の増加、腫瘍進行までの時間の延長、腫瘍量の減少、全身腫瘍組織量の減少および/または腫瘍転移までの時間、腫瘍再発までの時間、腫瘍応答、完全応答、部分的応答、安定した疾患、進行性の疾患、または無増悪生存の延長の少なくとも一つを達成する薬剤の治療有効量を投与することによる、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) と診断された患者を治療する方法を特徴とする。

【0008】

別の側面では、本発明は、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) と診断された患者を治療する方法であって、該癌が、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}上皮細胞を含む腫瘍であることを特徴とする方法の特徴とする。この方法は、サイクリン依存性キナーゼ19 (CDK19) の発現または活性を阻害する薬剤の治療有効量を投与することを含み、その際、該治療により腫瘍内のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞の数が減少し、腫瘍の単位容積あたりのEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}の数が減少し、または腫瘍内の正常な (EpCAM^{Hi}/CD10⁻) 上皮細胞に対するEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}上皮細胞の比率が低下する。

10

【0009】

さらに別の側面において、本発明は、CDK19の発現または活性を阻害する薬剤の治療有効量を投与することによる、患者におけるTNBCの転移を減少させる方法の特徴とする。

【0010】

本明細書に記載される本発明のすべての側面のいくつかの実施形態では、患者は、(a) CDK19の発現または活性を阻害する薬剤と (b) 放射線療法および/または化学療法とを含む併用療法で治療される。

20

【0011】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、治療を開始する前または後に、患者からの組織試料中のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞を検出することを含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で患者に投与される薬剤は、CDK8の発現または活性を有意に阻害しない。いくつかの実施形態では、該薬剤は、CDK19の発現または活性を、それがCDK8の発現または活性を阻害するよりも大きく阻害する。

【0013】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、該薬剤は核酸である。いくつかの実施形態では、該薬剤はタンパク質である。いくつかの実施形態では、該薬剤はCRISPR/Cas9システムである。

30

【0014】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、該薬剤は、CDK19標的shRNAである。

【0015】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、該薬剤は、CDK19標的siRNAである。

【0016】

本明細書に記載する方法のいくつかの実施形態では、該薬剤は、CDK19の3'UTRに相補的または実質的に相補的であるがCDK8の3'UTRには相補的でない、CDK19標的shRNAまたはsiRNAである。

40

【0017】

本明細書に記載する方法のいくつかの実施形態では、該薬剤は、CDK19のコード領域に相補的または実質的に相補的であるがCDK8のコード領域には相補的でない、CDK19標的shRNAまたはsiRNAである。

【0018】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、該薬剤は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、または配列番号11から選択されるCDK19標的shRNAまたはsiRNAで

50

ある。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、該薬剤は、乳房上皮細胞の細胞質中のCDK19に結合する。

【 0 0 2 0 】

別の側面において、本発明はまた、CDK19標的薬剤に対するTNBCを有する対象の起こり得る治療応答性を予測する方法を特徴とする。この方法は、(a)対象から得られた腫瘍試料中のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞を定量し、(b)(a)のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞の量をCDK19標的療法に応答する腫瘍に特徴的な参照値と比較し、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞の量が参照値に等しいかそれ以上である場合に患者をCDK19標的薬剤で処置することを含む。いくつかの実施形態では、CDK19標的薬剤は、CDK19の発現または活性の阻害剤である。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図1】図1Aは、RNAiドロップアウト生存率(RNAi dropout viability)スクリーニングの概略図である。TNBC PDX(PDX-T1)で2つの別個のスクリーニングを行った。1つの実験の細胞は、インピトロでオルガノイドコロニーとして増殖させ、もう1つの実験では、NSGマウス中のPDXとしてインピボで増殖させた。図1B~1Dは、対照shRNAまたはCDK19標的shRNA(shCDK19-1、shCDK19-2)による形質導入の4日後に評価された、CDK19ノックダウンがTNBC細胞(図1B:MDA-MB231細胞;図1C:MDA-MB468細胞;および図1D:HS578T細胞)の生存率を有意に低下させることを示すグラフである。図1Eは、CDK19ノックダウンがPDX-T1においてオルガノイドコロニーの形成を有意に減少させたことを示すグラフである。図1Fは、CDK19ノックダウンが非形質転換ヒト乳房上皮細胞(HMEC)の生存率を低下させないことを示すグラフである。図1G~1Jは、CDK19ノックダウンがNSGマウスで増殖させたPDX腫瘍(図1G:PDX-T1;図1H:PDX-T2;図1I:PDX-T3;および図1J:PDX-T4)の増殖を有意に阻害することを示すグラフである。図1Kおよび図1Lは、CDK19ノックダウンが、形質導入された(RFP陽性)TNBC細胞(図1K:PDX-T1および図1L:PDX-T4)がマウスで肺への転移を防止したことを示す棒グラフである。図1Mは、CDK19 shRNAで形質導入されたPDX腫瘍(2行目と3行目の画像)では、RFP(最後の列の画像)がほとんど見えないことを示している。これらの腫瘍は主に、形質導入されていないGFP陽性腫瘍細胞で構成されている(中央の列の画像)。PDX腫瘍細胞は最初に緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識され(中央の列)、その後CDK19 shRNAまたは対照shRNAのいずれかに感染した細胞は、赤色蛍光タンパク質(RFP)でさらに標識された(右の列)。図1Nは、PDX-T1転移を伴うマウス肺の代表的な画像を示す。対照shRNA(上段)、shCDK19-1(中段)またはshCDK19-2(下段)でPDXが導入されたマウスの肺を示す。通常は肺に転移するPDX-T1では、CDK19ノックダウンにより、これらの細胞による肺転移の検出が排除された。明視野画像(左の列)は全体的な肺の形態を示し、FITC画像(中央の列)はGFPで標識された転移性腫瘍細胞を識別し、その後CDK19 shRNAまたは対照shRNAのいずれかに感染した転移性腫瘍細胞はさらに赤い蛍光タンパク質(RFP)で標識した(右の列)。

20

30

【 0 0 2 2 】

【図2】図2Aは、細胞表面マーカーとしてEpCAMとCD49f(左)またはEpCAMとCD10(右)を使用したTNBC(PDX-T1)の代表的なフローサイトメトリー分析のデータを示す。図2Bは、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}およびEPCAM^{low/med}/CD10^{low/+}細胞集団のオルガノイドコロニー形成能力を比較するグラフである。図2Cは、6つのグループのPDX腫瘍細胞について形成された腫瘍の数および実施された注射の数を示す表である。腫瘍が形成された集団および注射は太字で示されている。PDX腫瘍細胞を、EpCAMおよびCD10の発現に基づいてフローサイトメトリーにより単離した(図2A、右のように)。図2D~2Gは、PDX-T1、PDX-T2、およびPDX-T8においてEPCAM^{low/med}/CD10^{low/+}細胞と比較して、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞のCDK19発現が高いことを示す棒グラフである。

40

50

【 0 0 2 3 】

【図 3】図 3 A は、CDK19 ノックダウン、CDK8 ノックダウンによって、または CDK19 と CDK8 の両方（オーバーラップ領域）によってアップレギュレーションされた（上方の図）およびダウンレギュレーションされた（下方の図）遺伝子の数を示すベン図を含む。図 3 B は、GSEA によって決定された、CDK19 ノックダウン、CDK8 ノックダウン、または CDK19 と CDK8 の両方の ノックダウン（オーバーラップ領域）によってアップレギュレーションされた（上方の図）またはダウンレギュレーションされた（下方の図）遺伝子全体で富んでいる特徴（Hallmark）遺伝子セットのベン図である。図 3 C および 3 D は、CDK19KD-H3K27AcUP および CDK19KD-H3K27AcDOWN 領域にわたる CHIP-Seq シグナルが、対照と比較して CDK19 ノックダウン試料において有意に異なることを示すグラフである。図 3 E および 3 F は、平均された CDK19 ノックダウン vs 対照発現データを使用した、CDK19KD-EnhancerUP および CDK19KD-EnhancerDOWN 遺伝子の遺伝子セットエンリッチメント解析（GSEA）を示すグラフである。図 3 G は、CDK19KD-EnhancerUP の「コア」遺伝子（上部および中央のバー）および CDK19KD-EnhancerDOWN の「コア」遺伝子（下部のバー）の Metascape 分析で富んでいると識別された特徴的な遺伝子セットを示すグラフである。各特徴遺伝子セットのエンリッチメントに寄与する個々の遺伝子は、各バーの右側に示してある。

10

【 0 0 2 4 】

【図 4】図 4 A および図 4 B は、inducCDK19KD-PDX-T1 細胞において、ドキシサイクリンの添加による CDK19 shRNA の誘導が、対照と比較してドキシサイクリン処置群においてオルガノイドコロニーの数を有意に減少させたことを示すグラフである。ドキシサイクリン処理開始後の 0 日目（図 4 A）および 16 日目（図 4 B）のオルガノイドコロニーの数を示す。図 4 C および 4 D は、事前に確立された腫瘍における CDK19 shRNA の誘導が腫瘍増殖を損なったことを示すグラフである。ドキシサイクリン摂食 NSG マウスおよび対照 NSG マウスにおける事前に確立された腫瘍の増殖を、inducCDK19KD-PDX-T1（図 4 C）および inducCDK19KD-PDX-T3（図 4 D）について示す。図 4 E は、CDK19 ノックダウンが PDX-T1 腫瘍を有する NSG マウスの生存を延長することを示すグラフである。図 4 F は、CDK19 および CDK8 の経口で生物学的に利用可能な選択的阻害剤である CCT251921 の化学構造を示す。図 4 G は、毎日の強制経口投与による CCT251921 によるマウスの処置が、事前に確立された PDX-T1 異種移植腫瘍の増殖を有意に損なったことを示すグラフである。

20

30

【 0 0 2 5 】

【図 5】図 5 A および図 5 B は、インビボ増殖実験試料における shRNA 数 vs ベースライン試料における shRNA 数（図 5 A）およびインビトロ増殖実験試料における shRNA 数 vs ベースライン試料における shRNA 数（図 5 B）を示すグラフである。図 5 C は、インビトロスクリーニングおよびインビボスクリーニングからのヒットの最初のリストを 46 個の候補遺伝子に絞り込むために使用される基準の概略図である。図 5 D は、5 C に示される基準でフィルタリングした後のインビトロスクリーニングおよびインビボスクリーニングから決定された 46 の候補遺伝子のリストである。CDK19 は囲んである。

【 0 0 2 6 】

【図 6】図 6 A は、TNBC サブタイプを有する患者からの TCGA 乳癌試料が、他のサブタイプと比較して、CDK19 コピー数増幅または CDK19 mRNA アップレギュレーションが富んでいることを示す棒グラフである。図 6 B は、サイトケラチン 8（CK8）抗体（左から 1 番目の画像）、CDK19 抗体（2 番目の画像）、および DAPI（3 番目の画像）で染色した PDX-T1 の共焦点免疫蛍光画像を含む。前記 3 つすべての画像から構成される合成画像を右端に表示する（画像は 3 つの独立した実験の代表である）。

40

【 0 0 2 7 】

【図 7】図 7 A および図 7 B は、CDK19 標的 shRNA が、TNBC 細胞株において CDK19 を効果的にサイレンシングすることを示す棒グラフである。対照 shRNA、shCDK19-1、および shCDK19-2 で形質導入された細胞の RT-qPCR によって決定された MDA-MB231（図

50

7 A) またはMDA-MB468 (図 7 B) におけるCDK19の発現。図 7 C は、CDK19標的shRNAが、TNBC PDXにおいてCDK19を効果的にサイレンシングすることを示す棒グラフである。対照shRNA、shCDK19-1、およびshCDK19-2で形質導入された細胞のRT-qPCRによって決定されたPDX-T1におけるCDK19の発現。図 7 D は、組織試料の画像およびPDX-T4転移を有するマウス肺の代表的な画像を含む。対照shRNA (上段)、shCDK19-1 (中段)、またはshCDK19-2 (下段) でPDXが導入されたマウスの肺を示す。明視野画像 (左の列) は全体的な肺の形態を示し、FITC画像 (中央の列) はGFPで標識された転移性腫瘍細胞を識別し、Texas-Red画像 (右の列) はRFPで標識されたshRNA形質導入転移細胞を識別する。

【0028】

【図8】図 8 A は、EpCAMおよびCD49fを使用したTNBC (PDX-T1) のフローサイトメトリー分析およびEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low} (1)、EPCAM^{low/med}/CD10^{low/+} (3) およびEpCAM⁻/CD10⁻ (2) サブ母集団のオーバーラップを示すグラフである。図 8 B は、ドキシサイクリンによるCDK19 shRNAの誘導がinducCDK19KD-PDX-T1細胞においてCDK19を効果的にサイレンシングすることを示す棒グラフである。RT-qPCRで測定された、対照inducCDK19KD-PDX-T1細胞 (黒いバー) およびドキシサイクリン処理したinducCDK19KD-PDX-T1細胞 (灰色のバー) におけるCDK19の発現。図 8 C は、限界希釈アッセイにおいて、CDK19ノックダウンが異種移植腫瘍の増殖を効果的に防止することを示す。図 8 D は、図 8 C からのデータのELDA (Huら、Journal of Immunol. Methods 347:70-78, 2009) 分析を示すグラフであり、ドキシサイクリン群 (Group + Dox) および対照群 (Group NoDox) の腫瘍開始頻度を決定する。ELDAソフトウェアによって決定されたP値。

【0029】

【図9】図 9 は、CDK19とCDK8との間の84%の配列相同性を示すアミノ酸配列アライメントを示す。アミノ酸位置は配列の上に示してある。アライメントは、MegAlign (DN AStar) でClustal W法を使用して行う。

【0030】

【図10】図 10 は、CDK19ノックダウンまたはCDK8ノックダウンのいずれかによってアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされた遺伝子の、GSEAによって富んでいることが見出された特徴遺伝子セットを示す表である。

【0031】

【図11】図 11 は、同定されたすべてのH3K27Acピーク領域にわたるゲノム全体のH3K27Ac CHIP-Seqシグナルが、CDK19ノックダウン、CDK8ノックダウン、および対照試料間で有意差がないことを示すグラフである。CDK19ノックダウン (1)、CDK8ノックダウン (2)、および対照 (3) 試料でのすべてのH3K27Acピーク領域にわたる正規化H3K27Ac CHIP-Seqシグナルの集約プロット (nsはP = 0.05、すべての試料n=3、実験は3回行った)。

【0032】

【図12】図 12 A および図 12 B は、CDK19KD-EnhancerUP「コア」遺伝子 (図 12 A) およびCDK19KD-EnhancerDOWN「コア」遺伝子 (図 12 B) の発現のヒートマップを示す。CDK19ノックダウンおよび対照試料の各生物学的複製における各遺伝子の正規化された発現を示す。

【0033】

【図13】図 13 A ~ 図 13 D は、CDK19ノックダウンがH3K27Acシグナルの変化および対応する遺伝子発現の変化をもたらす代表的な遺伝子を示すグラフである。選択したCDK19KD-EnhancerUP「コア」 (図 13 A および図 13 B) およびCDK19KD-EnhancerDOWN「コア」遺伝子 (図 13 C および図 13 D) の遺伝子座におけるH3K27Acシグナルを表す代表的な遺伝子トラック (gene tracks)。図 13 E は、対照およびCDK19ノックダウン試料における3つの生物学的複製のそれぞれにわたるELF3、ETV7、CHI3L2、およびCRTAMの正規化された遺伝子発現のヒートマップである。

10

20

30

40

50

【0034】

【図14】図14Aおよび図14Bは、inducCDK19KD-PDX-T1（平均±標準偏差、n=5、実験は2回行った）（図14A）およびinducCDK19KD-PDX-T3（平均±標準偏差、n=5、実験は1回行った）（図14B）の腫瘍実験において、マウスの総体重が、標準的な齧歯類の餌を与えられたマウス（対照群）と比較して、ドキシサイクリンの齧歯類の餌を与えられたマウス（ドキシサイクリン群）で有意差がなかったことを示すグラフである。図14Cは、マウスの総体重が、ビヒクルと比較して、CCT251921で経口強制投与を受けたマウスで有意差がなかったことを示すグラフである（平均±標準偏差、n=5、実験は1回行った）。

【0035】

【図15】図15は、実験で使用された患者由来の異種移植腫瘍の病理学的特徴および患者情報を示す表である。

【0036】

【図16】図16A～図16Dは、CDK8およびCDK19の3'UTRの核酸アラインメントを示す。下線および太字のテキストは、重複する領域を示す。

【0037】

【図17】図17は、CDK8およびCDK19の5'UTRの核酸アラインメントを示す。下線および太字のテキストは、重複する領域を示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

1. はじめに-CDK19はトリプルネガティブ乳癌（TNBC）の増殖に必要である

本発明者らは、TNBC細胞株または乳癌患者由来の異種移植片におけるCDK19の発現または活性をマウスにおいて低下させると、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）腫瘍の増殖と転移が阻害されることを見出した。以下の§4（実施例）を参照。本発明者らはまた、CDK19の生物学的機能はそのパラログCDK8の生物学的機能とは異なること、およびTNBC腫瘍に対するCDK19を介した効果はCDK8活性とは無関係であることも示した。これらのデータは、TNBCが、CDK19を阻害するがCDK8を阻害しない薬剤、またはCDK8と比較してCDK19を優先的に阻害する薬剤によって治療できることを示している。CDK19の阻害がTNBCの増殖と転移の抑制に必要なかつ十分であるという発見は、一つには、治療標的としてのCDK19の潜在的な利点のために重要である。CDK8、CDK9、およびBRD4などの他のユビキタスな転写補因子と比較して、CDK19の組織分布はより限定的であり、CDK19阻害剤の毒性の低下とより広い治療ウィンドウを示唆している。

【0039】

CDK19ノックダウンが腫瘍増殖阻害効果を有することを示すことに加えて、CDK19発現は、腫瘍形成性の低い細胞、例えばEPCAM^{low/med}/CD10^{low/+}発現を有する細胞と比較して腫瘍形成開始細胞、例えばEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}発現を有する腫瘍形成性細胞において富んでいることも示された（実施例4を参照）。さらなる研究はまた、CDK19ノックダウンが腫瘍開始頻度を有意に減少させることを示した（図8D）。この発見は、他の薬剤と比較して、CDK19を標的とすることが、腫瘍形成性の高い（例えば、腫瘍開始）細胞に対してより顕著で有意な効果をもたらすことを示している。これらの発見はまた、CDK19標的療法に応答する可能性が高い特定のTNBC患者を同定するためのセラノスティック法の開発を可能とする。

【0040】

2. 定義

2.1: トリプルネガティブ乳癌（TNBC）

トリプルネガティブ乳癌（TNBC）は、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、およびヒト上皮成長因子受容体2（Her2）の発現の欠如を特徴とする乳癌サブタイプである。受容体の発現は、免疫組織化学染色または他の方法で測定できる。TNBCは通常、除外診断される。これらの受容体を標的とする広く使用されている乳癌治療は、TNBCに対して効果的ではなく、TNBC治療を特に困難にしている。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

2 . 2 : サイクリン依存性キナーゼ19 (CDK19)

サイクリン依存性キナーゼ19 (CDK19) は、Broudeら、Curr. Cancer Drug Targets 15:739, 2015およびSatoら、Molecular Cell 14:685-691, 2004に記載されている。CDK19は、細胞周期の進行よりもRNAポリメラーゼII (RNAPII) 転写の調節 (Galbraithら、Transcription 1: 4-12, 2010) に一層関連すると報告されているCDKファミリーのサブセットに属する。UniProtエントリNP_055891.1; GenbankエントリAY028424 & AL603914を参照。CDK19のmRNA配列も本明細書に開示されている (例えば、配列番号12~15)。

【 0 0 4 2 】

2 . 3 : サイクリン依存性キナーゼ8 (CDK8)

CDK8は、CDK19と84%のアミノ酸配列相同性を持つCDK19のパラログである。図9を参照。CDK8はBroudeら、Curr. Cancer Drug Targets 15:739, 2015およびSatoら、Molecular Cell 14:685-691, 2004に記載されている。UniProtエントリCAA59754.1; GenbankエントリX85753およびAL590108を参照。CDK8のmRNA配列も本明細書に開示されている (例えば、配列番号16~18)。

【 0 0 4 3 】

2 . 4 : 薬剤

本明細書で使用する場合、「薬剤」という用語は、CDK19の発現または活性を低下または阻害することができる生体分子 (例えば、核酸、タンパク質、ペプチド、抗体) または (例えば、分子量が1000未満、通常500未満の) 小さな有機分子をいう。

【 0 0 4 4 】

2 . 5 : 阻害剤

本明細書で使用する場合、CDK19の文脈で使用される「阻害剤」という用語は、CDK19の発現または活性を低下させる化合物、組成物またはシステムをいう。薬剤はまた、CDK19の発現または活性をCDK8のものよりも選択的に阻害し得る。

【 0 0 4 5 】

2 . 6 : ノックダウン

本明細書で使用する場合、「ノックダウン」という用語は、CDK19遺伝子の発現レベルの低下を指す。CDK19遺伝子発現レベルをノックダウンするには、該遺伝子に対応するmRNA転写産物の量を減らし、CDK19タンパク質の発現レベルを低下させる。CDK19遺伝子発現レベルをノックダウンすることは、CDK19タンパク質の量を減らすことによっても達成できる。ノックダウン剤は阻害剤の例である。

【 0 0 4 6 】

2 . 7 : ノックアウト

本明細書で使用する場合、「ノックアウト」という用語は、CDK19遺伝子の機能を妨害する仕方で細胞内のCDK19遺伝子のすべてまたは一部を欠損させることをいう。例えば、ノックアウトは、CDK19配列を変更することで実現できる。当業者は、CDK19遺伝子またはその一部をノックアウトするために、様々な遺伝的アプローチ、例えばCRISPR/Casシステムをどのように使用するかを容易に理解するであろう。ノックアウト剤は阻害剤の例である。

【 0 0 4 7 】

2 . 8 : 参照レベルと比較した減少

本明細書で使用する場合、「減少 (decrease)」、「減少した (reduced)」、「減少 (reduction)」、および「減少する (decreasing)」という用語はすべて、参照レベルと比較して少なくとも10%の減少、例えば少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%または100%までおよび100% (すなわち、参照試料と比較して存在しないレベル) の減少、または参照レベルと比較して10~100%の間の減少をいう

10

20

30

40

50

。

【 0 0 4 8 】

2 . 9 : 核酸

本明細書で使用する場合、「ポリヌクレオチド」、「核酸」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドまたはそれらの類似体のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含むか、または当該技術で既知の方法により修飾されて、ポリヌクレオチドをヌクレアーゼに対して耐性にする、標的細胞または組織へのポリヌクレオチドの送達を改善する、安定性を改善する、分解を減らす、組織分布を改善する、または他の有利な特性を与えることができる。例えば、DNAまたはRNAポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド骨格（例えば、ホスホロチオエート修飾）、糖（例えば、ロックされた糖）、または核酸塩基上の1つ以上の修飾を含み得る。ヌクレオチド構造への修飾は、存在する場合、オリゴヌクレオチドの組み立ての前または後に与えることができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。オリゴヌクレオチドはさらに、標識成分、標的化成分、または他の成分との結合などによって、重合後にさらに修飾することができる。ポリヌクレオチドは、二本鎖または一本鎖分子であり得る。さらに、オリゴヌクレオチド送達を改善するために、DNAまたはRNAオリゴヌクレオチドは、脂質分子（例えば、脂質ナノ粒子）にパッケージ化され得るか、または細胞透過性ペプチドに結合され得る。

10

20

【 0 0 4 9 】

2 . 1 0 : 治療

本明細書で使用する場合、「治療」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的および/または生理学的効果を得ることを指す。効果は、疾患またはその症状を完全にまたは部分的に防止することに関して予防的であり得、および/または疾患および/または疾患に起因する有害作用の部分的または完全な治癒に関して治療的であり得る。本明細書で使用する「治療」は、疾患の抑制をもたらす、すなわちその進行を阻止する治療；および疾患を和らげる、すなわち疾患を後退させることを含む。例えば、癌の場合、治療への応答には、悪液質の減少、生存時間の増加、腫瘍進行までの時間の延長、腫瘍量の減少、全身腫瘍組織量の減少および/または腫瘍転移までの時間、腫瘍再発までの時間、腫瘍応答、完全応答、部分的応答、安定した疾患、進行性の疾患、無増悪生存の延長、全生存期間が含まれ、それぞれ新薬の承認のために国立癌研究所および米国食品医薬品局によって設定された基準によって測定され、および/またはEisenhauer, EAら、“New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)” European journal of cancer 45.2 (2009):228-247に記載されている。

30

【 0 0 5 0 】

2 . 1 1 : 投与

本明細書で使用する場合、「投与する」または「投与」という用語は、TNBCと診断された対象にCDK19の発現または活性を阻害する薬剤を導入または送達する任意の経路を含む。投与は、薬剤の送達に適した任意の経路によって実施することができる。したがって、送達経路は、例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下送達を含むことができる。いくつかの実施形態では、薬剤は、例えば腫瘍中への注射によって、腫瘍に直接投与される。

40

【 0 0 5 1 】

2 . 1 2 : 治療有効量

本明細書で使用する場合、「治療有効量」という用語は、対象または患者に所望の生物学的効果を誘発するか、または本明細書に記載のTNBCを有する患者を治療するのに有効な量、例えば医薬用量を指す。「治療有効量」という用語は、疾患、障害、または状態、例えばTNBCをある程度治療し、治療される疾患の1つまたはそれ以上の症状を軽減する、投与される活性剤の量、および/または治療される対象が有するまたは発症するリスクが

50

ある疾患の1つまたはそれ以上の症状をある程度防止する量をいう。例えば、所定のパラメーター（例えば、腫瘍容積、腫瘍直径、転移など）について、治療有効量は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%、または少なくとも1倍、2倍、または3倍の治療効果の増加または減少を示すであろう。治療有効量は、通常、数日、数週間、または数ヶ月の期間にわたって延在する可能性がある治療過程にわたって送達される。薬剤の治療有効量は、単独で、または他の治療剤と組み合わせて摂取され得る。場合によっては、CDK19阻害剤の治療有効量は、TNBC患者の部分的な応答を達成するのに十分な量（例えば、病変の測定可能な直径が20%以上減少、時には30%以上減少）である。

【0052】

2.13: 患者または対象

本明細書で使用される「患者」または「対象」は、ヒトまたは非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、例えば非ヒト霊長類のいずれかを含むことが意図されている。最も好ましくは、対象または患者はヒトである。

【0053】

2.14: アンチセンス鎖

「アンチセンス鎖」は、標的配列（例えば、5'UTR、オープンリーディングフレーム（ORF）のエクソン、または3'UTRを含むヒトCDK8またはCDK19 mRNA）に相補的または実質的に相補的である領域を含む二本鎖RNAi剤（siRNAまたはshRNA）の鎖を指す。

「相補的」または「実質的に相補的」な領域は標的配列に完全に相補的である必要はなく、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列%同一性または%類似性であってよい。

【0054】

2.15: センス鎖

本明細書で使用される「センス鎖」は、アンチセンス鎖の領域に相補的または実質的に相補的である領域を含むRNAi剤（siRNAまたはshRNA）の鎖を指す。

【0055】

3. 治療方法

1つのアプローチにおいて、本発明は、サイクリン依存性キナーゼ19（CDK19）の発現または活性を阻害する薬剤の治療有効量を投与することを含む、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）と診断された患者を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、治療により、治療開始から6ヶ月以内に腫瘍容積が少なくとも10%減少する。

【0056】

1つのアプローチにおいて、本発明は、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）と診断された患者を治療する方法を提供し、ここで該癌はEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}上皮細胞を含む腫瘍であることを特徴とし、該方法は、サイクリン依存性キナーゼ19（CDK19）の発現または活性を阻害する薬剤の治療有効量を投与することを含み、当該治療により、腫瘍において正常な細胞に対してEpCAMの発現レベルが中レベルから高レベルでありCD10の発現レベルが低い細胞の比が低下する。いくつかの実施形態では、該方法は、治療を開始する前または後に、患者からの組織試料中のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}上皮細胞を検出する工程を含む。

【0057】

腫瘍の表現型を決定するため、または治療の予後を評価するために、TNBCと診断された患者から生検が行われてよい。生検は針生検でもよいし、乳房に供給される血管および/またはリンパ節、たとえば内胸動脈、側胸動脈、胸肩峰動脈、腋窩リンパ節から採取される液体生検でもよい。

【0058】

以下の§4で説明するように、CD10およびEpCAMバイオマーカーは、TNBCの腫瘍開始細胞（TIC）の3つの異なる亜集団、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}、EPCAM^{low/med}/CD10^{low/+}、およびEpCAM⁻/CD10を識別する。TNBC患者における癌細胞の表現型は、当

10

20

30

40

50

技術分野で既知の方法を使用して決定することができる。1つのアプローチにおいて、組織を患者から得、細胞表現型を、免疫組織化学、質量分析、蛍光活性化細胞分類 (FACS) または他の方法を使用して決定する。細胞表現型は、健康または癌性組織に特徴的な標準値と比較して割り当てることができる。1つのアプローチでは、正常な乳房上皮細胞に対するEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}の比を治療開始前に決定して、CDK19標的療法に対する患者の応答しやすさを評価する。1つのアプローチでは、正常細胞に対するEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞の比率の変化、または組織の容積あたりのEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞の量の変化を治療の開始後に検出する。

【0059】

1つのアプローチにおいて、本発明は、患者におけるTNBCの転移を低減するための方法を提供し、この方法は、CDK19の発現または活性を阻害する薬剤の治療有効量を投与することを含む。

10

【0060】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、炎症性TNBCまたは化学療法抵抗性であるTNBCを治療するために使用され得る。他の実施形態において、本発明の方法は、TNBCの転移を減速または防止するために使用され得る。さらなる実施形態では、CDK19遺伝子またはその対応するタンパク質を標的とする本明細書に記載の方法は、P53シグナル伝達、KRASシグナル伝達、アンドロゲン応答、NOTCHシグナル伝達、TGFベータシグナル伝達、およびIL6-JAK-STAT3シグナル伝達などのCDK19によって調節される臨床的に関連するTNBC経路をさらに調節し得 (図3B)、それらを癌治療に対してより治療的に感受性にする。

20

【0061】

3.1: 治療剤 (阻害剤)

3.1.1: ポリヌクレオチド

実施例で示されるように、CDK19遺伝子はTNBCの増殖に不可欠である。本明細書に記載されるような対象におけるTNBCを治療する方法は、CDK19遺伝子の発現を減少または阻害するために対象にポリヌクレオチド (例えば、オリゴヌクレオチド) を投与することにより達成され得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば、DNAオリゴヌクレオチドまたはRNAオリゴヌクレオチドであり得る。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、CRISPR/Casシステムで使用されてよい。CDK19遺伝子の発現を阻害または減少させるオリゴヌクレオチドは、対象においてCDK19遺伝子 (例えば、TNBC細胞におけるCDK19遺伝子) をノックアウトまたはノックダウンすることができる。

30

【0062】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、shRNAまたはmiRNAであり得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、CDK19遺伝子のmRNA転写物のRNAアーゼH依存性切断を媒介し得る。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、CRISPR/Casシステムで使用してもよい。

【0063】

いくつかの実施形態では、CDK19遺伝子のmRNA転写物は、切断および分解の標的となり得る。mRNA転写物の異なる部分を標的として、CDK19遺伝子の発現を減少または阻害することができる。いくつかの実施形態では、DNAオリゴヌクレオチドを使用して、mRNA転写物を標的とし、mRNA転写物とDNA:RNA二本鎖を形成することができる。次に二本鎖が認識され、mRNAが細胞内の特定のタンパク質によって切断される。他の実施形態では、RNAオリゴヌクレオチドを使用して、CDK19遺伝子のmRNA転写物を標的とすることができる。

40

【0064】

3.1.1.1: shRNA

ショートヘアピンRNAまたはスモールヘアピンRNA (shRNA) は、ヘアピンターンを備えた人工的なRNA分子であり、細胞内で生成された低分子干渉RNA (siRNA) を介して標的遺伝子の発現を抑制することができる。例えば、Fireら、Nature 391:806-811, 199

50

8; Elbashirら、Nature 411:494-498, 2001; Chakrabortyら、Mol Ther Nucleic Acids 8:132-143, 2017; Bouardら、Br. J. Pharmacol. 157:153-165, 2009を参照。細胞におけるshRNAの発現は、典型的にはプラスミドの送達によって、またはウイルスベクターまたは細菌ベクターを介して達成される。適切な細菌ベクターには、アデノ随伴ウイルス (AAV)、アデノウイルス、およびレンチウイルスが含まれるが、これらに限定されない。ベクターが宿主ゲノムに組み込まれると、プロモーターの選択に応じて、shRNAがポリメラーゼIIまたはポリメラーゼIIIによって核で転写される。その結果生じるプレshRNAは、核から転出され、ついでダイサーによってプロセッシングされ、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) にロードされる。センス鎖はRISCによって分解され、アンチセンス鎖はRISCを相補的な配列を持つmRNAに誘導する。次に、RISC中のAgo2と呼ばれるタンパク質がmRNAを切断するか、場合によっては、mRNAの翻訳を抑制し、その結果、その破壊およびmRNAによってコードされるタンパク質の最終的な減少に導く。したがって、shRNAは標的遺伝子のサイレンシングにつながる。shRNAは、分解および代謝回転の速度が比較的遅いという点で、siRNAの有利なメディエーターである。

【0065】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、shRNAを使用して対象のTNBCを治療することを含む。この方法は、対象に治療有効量のベクターを投与することを含み、該ベクターは、CDK19遺伝子のmRNA転写物の一部にハイブリダイズすることができるshRNAをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ベクターはまた、例えば、プロモーター（例えば、組織特異的プロモーター）、エンハンサー、および転写ターミネーターを含む、当該分野で公知の適切な発現制御エレメントを含み得る。ベクターがTNBC細胞に送達されると、shRNAが細胞のゲノムに組み込まれ、ダイサーおよびRISCによるダウンストリームプロセッシングを受けて（本明細書でさらに詳細に説明）、最終的にCDK19遺伝子のmRNA転写産物にハイブリダイズし、mRNAの切断および分解につながる。いくつかの実施形態では、shRNAは、GCGAGAATTGAAGTACTCTAA（配列番号1）の配列またはACCAGCAAATATCTCTAGTAAT（配列番号2）の配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有する核酸配列を含み得る。特定の実施形態では、shRNAは、CDK19遺伝子のmRNA転写物のN末端のアミノ酸を標的とし得る。他の実施形態では、shRNAは、CDK19遺伝子のmRNA転写物の内部領域のアミノ酸を標的とすることができる。

【0066】

実施例、例えば、図1G～図1Jに示されるように、CDK19遺伝子を標的とする両shRNA（GCGAGAATTGAAGTACCTTAA（配列番号1）およびACCAGCAAATATCCTAGTAAT（配列番号2））は、該遺伝子をノックダウンすることができ、3つのすべてのTNBC PDXからの腫瘍においてRFP陽性細胞のパーセンテージを大幅に低下させた。さらに、CDK19ノックダウンはまた、化学療法抵抗性の炎症性乳癌を有する患者の脳転移から得られる悪性のPDXの増殖を阻害したが（図1J）、この化学療法抵抗性の炎症性乳癌は悪性であり、治療が困難であり、予後が極めて悪いことが知られていた。腫瘍成長の阻害に加えて、shRNAはまた、マウスにおけるこれらの腫瘍の肺転移も阻害した（図1L）。

【0067】

いくつかの実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、GCGAGAATTGAAGTACCTTAA（配列番号1）に対して少なくとも85%の配列同一性（例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性）を有し得る。他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、ACCAGCAAATATCCTAGTAAT（配列番号2）に対して少なくとも85%の配列同一性（例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性）を有し得る。他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、GCTTGTAGAGAGAGATTGTACTT（配列番号3）に対して少なくとも85%の配列同一性（例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性）を有し得る。他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、GAGGACTGATAGTTCTTCTTT（配列番号4）に対して少なくとも85%の配列同一性（例えば、8

7%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性)を有し得る。他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、GATATTAGAAAGATGCCAGAA(配列番号5)に対して少なくとも85%の配列同一性(例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性)を有し得る。他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、GCCAACAGTAGCCTCATAAAG(配列番号6)に対して少なくとも85%の配列同一性(例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性)を有し得る。他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、CGTTCGTATTTATCTAGTTTC(配列番号7)に対して少なくとも85%の配列同一性(例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性)を有し得る。他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、GCATGACTTGTGGCATTAT(配列番号8)に対して少なくとも85%の配列同一性(例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性)を有し得る。他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、GCTTG TAGAGAGAGATTGCACTT(配列番号9)に対して少なくとも85%の配列同一性(例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性)を有し得る。他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、AGGACTGATAGCTCTTCTTTA(配列番号10)に対して少なくとも85%の配列同一性(例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性)を有し得る。さらに他の実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするshRNAは、GTATGGCTGCTGTTTGATTAT(配列番号11)に対して少なくとも85%の配列同一性(例えば、87%、89%、91%、93%、95%、97%、または99%の配列同一性)を有し得る。当業者は、CDK19遺伝子の異なる部分(例えば、5'UTR領域または3'UTR領域)を標的とし、遺伝子の発現の所望の低減を達成するshRNAを設計する知識および能力を有する。例えば、shRNAを設計するために利用可能なツールには、例えば、Project Insilico、Genomics and Bioinformatics Group、LMP、CCR、NIHが含まれる。いくつかの実施形態では、shRNAは、CDK19遺伝子をノックアウトするように設計され得る。

【0068】

CDK8およびCDK19 shRNA:

shRNAの有効性に影響を与える可能性のある多数の構造要素がある。所望の標的遺伝子の特定のRNAiノックダウンのために、その複数の構造要素を考慮してshRNAを設計することができる。一般に、shRNAは約80ヌクレオチドの長さであり、shRNAのヘアピン構造を作るために(5'から3'へ)次の構造要素で構成されるように設計されている:(1)センス鎖(たとえば、上部ステム);(2)続いてヘアピンループ;(3)標的mRNAに完全にまたはほぼ完全に相補的であり、標的mRNAに対してアンチセンスであるアンチセンス鎖(例えば、下部ステムまたはガイド鎖);(4-5)ガイド鎖の最初の位置での「U」または「UH」、およびガイド鎖のテール領域での「UUC」または「CUUC」などの2つの切断モチーフ;および(6)ガイド鎖の最初のヌクレオチド「U」モチーフとヘアピンループの間、およびセンス鎖の最後のヌクレオチドとヘアピンループの間の、長さが約2ヌクレオチドの任意のスペーサヌクレオチド。ステムを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖は、長さが約19~29ヌクレオチドの範囲からなるように設計することができ、これがステムを形成する。ループ構造は、長さが約2~15ヌクレオチドの範囲からなるように、そして好ましくはいかなる内部二次構造も含まないように設計され得る。ヘアピンループを作製するために使用することができる配列のいくつかの例には、配列(TTCAAGAGA)を含む9ヌクレオチドループ、および配列(TCAAGAG)を含む7ヌクレオチドループが含まれるが、これらに限定されない。その他の設計戦略は、Ros XB-D、Gu S、miRNAベースのshRNAの最適設計に関するガイドライン.Methods(San Diego, Calif) 2016;103:157-166(これは、すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)の関連する開示に記載されている。Sigma-AldrichやThermo-Fisher Scientificから入手できるBroad InstituteのRNAi Consortiumソフトウェアなどのいくつかの設計プログラムも利用できる。

【0069】

多くのmRNAが同様の配列を共有できるため、標的配列の特異性も考慮する必要がある。遺伝子特異的なノックダウンを可能にするために、ゲノム内の他の遺伝子との配列相同性が低い標的配列の選択には注意が必要である。遺伝子に複数の形態がある場合、遺伝子発現の完全なノックダウンを達成するには、shRNAは標的mRNAのすべてのアイソフォーム間で共有される配列を標的にする必要がある。

【0070】

CDK19およびCDK8 mRNA配列のアラインメントは、同一ではないか低いパーセントの同一性または類似性のヌクレオチド配列領域を識別でき、該領域はCDK19 mRNAを標的とするがCDK8を標的としないという選択性を有するshRNAの設計に使用できる。例えば、図16および図17の3'UTRおよび5'UTRのアラインメントを参照。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、CDK8 mRNA転写物ではなくCDK19 mRNA転写物を標的とするshRNAを設計することができる。1つのアプローチでは、National Center for Biotechnology Information (NCBI, Pubmed.govにある)からのヒトCDK19およびCDK8のmRNA配列およびアライメントを行う(例えば、LALIGNなどのペアワイズアライメントプログラムを使用)。長さが約19~29の連続したヌクレオチドの領域(例えば、19-20、19-21、19-22、19-23、19-24、19-25、19-26、19-27、19-28、または19-29)を、低い配列同一性(例えば、75%未満の同一性、時には70%未満の同一性、時には60%未満の同一性)に基づいて選択する。いくつかの実施形態では、19~29ntの領域は非常に低い(例えば、40%未満、30%未満または20%未満)配列同一性を有する。連続した配列は、タンパク質コード領域、5'-UTR、3'-UTRにあってよく、または2つの領域にまたがることことができる。

20

【0072】

一実施形態では、CDK19の標的特異的なノックダウンは、CDK19の3'UTR領域(配列番号42)に相補的であり、CDK8の3'UTR(配列番号44)との相同性が低いか全くないガイド鎖を有するshRNAを設計することによって達成できる。ガイド鎖は、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29ヌクレオチド長であり得る。CDK19 shRNAの設計に使用できるいくつかの例示的な配列領域には、CTCCAGCTCCCGTTGGGCCAGGCCAGCCC(配列番号20)、AGCCCAGAGCACAGGCTCCAGCAATATGT(配列番号21)、CTGCATTGAAAAGAACCAAAAAAATGCAA(配列番号22)、ACTATGATGCCATTTCTATCTAAACTCA(配列番号23)、TACACATGGGAGGAAAACCTTATATACTG(配列番号24)、AGCATTGTGCAGGACTGATAGCTCTTCTT(配列番号25)、TATTGACTTAAAGAAGATTCTTGTGAAGT(配列番号26)、TTCCCCTATCTCAGCACCCCTTCCCTGCA(配列番号27)、TGTGTTCCATTGTGACTTCTCTGATAAAG(配列番号28)、CGTCTGATCTAATCCCAGCAC TTCTGTAA(配列番号29)、またはCCTTCAGCATTTCTTTGAAGGATTCTATC(配列番号30)が含まれるが、これらに限られない。この開示によって導かれる当業者は、3'UTRにおける他の低い相同性配列領域もまた使用され得ることを理解する。例えば、図16A~D、(1-1186)および(2418-4570)からの低相同性配列領域を参照。一実施形態では、shRNAは、CDK19の上流、CDK19の下流、またはCDK19のエクソンを標的とするように設計することができる。いくつかの場合に、CDK19 shRNAの発現により、CDK19の少なくとも約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のノックダウンとなる。別の実施形態では、CDK19 shRNAの発現は、CDK8と比較してCDK19を優先的にノックダウンすることができる。

30

40

【0073】

CDK19を優先的に標的とするshRNAを作成するため、CDK19の独自の領域、他のCDK(例えば、CDK8)またはゲノム内の他のmRNAと有意な相同性を持たない領域を特定する。この配列を使用して、この標的に対してアンチセンスであり、19~29ヌクレオチド長を含むガイド鎖を作製する。発現カセットを作成するため、カセットの最初にpolyAまたはpolyAプロモーターなどの適切なプロモーターを追加し、その後に相補的センス鎖(例えば、標的ガイド鎖に相補的)を追加し、その後に約2~15ヌクレオチド長のループ構

50

造を追加する。さらに、2つのAgo切断モチーフ、「U」または「UH」をガイド鎖の最初の位置に含め、「UUC」または「CUUC」をループ構造の終わりの1-2スパーサーヌクレオチドに沿ってガイド鎖のテール領域に含める必要がある。例えば、米国出願番号US2008/0293142およびRos XB-D、Gu S、miRNAベースのshRNAの最適設計に関するガイドライン.Methods (San Diego, Calif) 2016;103:157-166 (すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照。

【0074】

別の実施形態では、CDK8の標的特異的ノックダウンは、CDK8の5'UTR (配列番号43) に相補的であり、CDK19の5'UTR (配列番号41) との相同性が低いか全くないガイド鎖を有するshRNAを使用することにより達成できる。ガイド鎖は、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29ヌクレオチド長であり得る。CDK8 shRNAの設計に使用できるいくつかの例示的な配列には、TGGGCCGCCCGCCGCTCCCGCCGCAGCAG (配列番号31)、GAGCAGAACGCGCGGCCGAGAGAGCGGC (配列番号32)、GGAGGCGCGCCCAGGGAGCCCGCGGGGA (配列番号33)、CAAGGGCAGAGACACCGCTCCCCACCC (配列番号34)、AGCCCTCGTCCCTCGGCTCTCCTTCGCCG (配列番号35)、GGGATCCTCCCCGTTCTCCACCCCCGG (配列番号36)、CCGGCCTCTGCCCGCCGTCCCTTGAT (配列番号37)、GTCCCTGGCGCTTTTCGCGGGGCCTCCTCC (配列番号38)、TGCTCTTGCCGCATCAGTCGGGCTGGTGC (配列番号39)、またはTGCGGCCGGCGGGCGTAGAGCGGGCGGGT (配列番号40)が含まれるが、これらに限られない。当業者は、5'UTRにおける他の低い相同性配列領域もまた使用され得ることを理解するであろう。例えば、図17、(1-33)および(223-504)からの低相同性配列領域を参照。別の実施形態では、shRNAは、CDK8の上流、CDK8の下流、またはCDK8のエクソンを標的とするように設計することができる。いくつかの場合に、CDK8 shRNAの発現により、CDK8の少なくとも約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のノックダウンとなる。

【0075】

CDK8を優先的に標的とするshRNAを作成するため、CDK8の独自の領域、他のCDK (たとえば、CDK19) またはゲノム内の他のmRNAと有意な相同性を持たない領域を特定する。この配列を使用して、この標的に対してアンチセンスであり、19~29ヌクレオチド長を含むガイド鎖を作製する。発現カセットを作成するため、カセットの最初にpolIIIまたはpolIIIプロモーターなどの適切なプロモーターを追加し、その後に相補的センス鎖 (例えば、標的ガイド鎖に相補的) を追加し、その後に約2~15ヌクレオチド長のループ構造を追加する。さらに、2つのAgo切断モチーフ、「U」または「UH」をガイド鎖の最初の位置に含め、「UUC」または「CUUC」をループ構造の終わりの1-2スパーサーヌクレオチドに沿ってガイド鎖のテール領域に含める必要がある。例えば、米国出願番号US2008/0293142およびRos XB-D、Gu S、miRNAベースのshRNAの最適設計に関するガイドライン.Methods (San Diego, Calif) 2016;103:157-166 (すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照。

【0076】

shRNAまたはsiRNAの特異性またはノックダウンレベルは、mRNAレベルについてはリアルタイムPCR分析を用いて、またはタンパク質レベルについてはELISAアッセイを用いて確認できる。ノックダウンを評価するために、実験対照を並行して実行する。使用できる実験対照のいくつかの例には、モック感染またはモックトランスフェクションされた試料、空のベクター、スクランブルされた標的またはシード領域をコードするshRNA、ハウスキーピング遺伝子GAPDHまたはアクチンなどの完全に別の遺伝子を標的とするshRNA、またはGFP陽性対照などが含まれるが、これらに限られない。

【0077】

siRNAまたはshRNA (例えば、RNAi剤) がCDK8よりもCDK19を優先的に標的とすることがどうかを決定するため、細胞株または他の発現系でGFPなどのマーカーにタグ付けされたshRNAまたはsiRNAをトランスフェクションまたは形質導入し、GFP陽性細胞 (例えば

10

20

30

40

50

、形質転換細胞)を選択し、RNAi剤によるトランスフェクションまたは形質導入なしの細胞系におけるCDK19発現と比較したCDK19ノックダウンのレベルを決定することができる。いくつかの実施形態では、RNAの発現を測定する。他の実施形態では、タンパク質の発現を測定する。一例では、mRNAは、当該技術分野で既知の任意のPCRベースのアッセイ(例えば、RT-PCRまたはqRT-PCRなど)によって測定され得る。一例では、タンパク質レベルは、イムノアッセイ(例えば、ELISAアッセイまたは当該技術分野で知られている任意の抗体ベースの方法)によって測定することができる。

【0078】

いくつかの実施形態では、標的化CDK19 shRNAまたはsiRNAは、トランスフェクションまたは形質導入なしのシステムと比較して、約30%未満のCDK19発現および約70%を超えるCDK8をもたらす。他のいくつかの実施形態では、標的化CDK19 shRNAまたはsiRNAは、約50%未満のCDK19発現および約95%を超えるCDK8をもたらす。いくつかの実施形態では、標的化CDK19 shRNAまたはsiRNAは、約5%のCDK19発現および約80%を超えるCDK8をもたらす。いくつかの実施形態では、標的化CDK19 shRNAまたはsiRNAは、約1%未満のCDK19発現および約60%を超えるCDK8をもたらす。いくつかの実施形態では、標的化CDK19 shRNAまたはsiRNAは、約0.5%未満のCDK19発現および約90%を超えるCDK8をもたらす。いくつかの実施形態では、標的化CDK19 shRNAまたはsiRNAは、約0%のCDK19発現および約100%のCDK8をもたらす。いくつかの実施形態では、RNAの発現を測定する。他の実施形態では、タンパク質の発現を測定する。

【0079】

CDK8およびCDK19 siRNA:

本開示はまた、トリプルネガティブ乳癌の患者においてCDK8およびCDK19の発現を阻害するためのsiRNAベースの治療法を提供する。二本鎖RNAi治療薬は、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含む。siRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖は、約14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチド長であり得る。siRNAベースの治療薬のアンチセンス鎖は、CDK8またはCDK19をコードするmRNAの一部に相補的な領域を含む。治療用siRNAを作製するためのさらなる方法は、米国特許第9399775号に見出すことができ、これは、すべての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。

【0080】

場合によっては、CDK19 siRNAの発現により、少なくとも約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のCDK19がノックダウンされる。別の実施形態では、CDK19 siRNAの発現は、CDK8と比較して優先的にCDK19をノックダウンする。場合によっては、CDK8 siRNAの発現により、少なくとも約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のCDK8がノックダウンされる。

【0081】

好ましい実施形態では、CDK19 siRNAは、少なくとも約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%のCDK19のノックダウンおよび少なくとも約10%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、または30%のCDK8のノックダウンをもたらす。

【0082】

shRNAおよびsiRNA送達:

一過性かまたは安定した発現のいずれが望ましいかに応じて、適切な送達ベクターを選択することができる。本開示で使用され得る送達ベクターの例は、ウイルスベクター、プラスミド、エキソソーム、リボソーム、細菌ベクター、またはナノ粒子である。本開示はまた、当該技術分野で公知の任意の手段による送達を提供する。

【0083】

トリプルネガティブ乳癌細胞への標的化送達のため、当業者は、送達ベクターが特定の

細胞型または組織型を標的とするように遺伝子改変され得ることを理解するであろう。標的化送達ベクターまたはプラスミドを作成するため、トリプルネガティブ乳癌で発現されまたは関連する独自の分子（例えば、受容体、タンパク質、糖タンパク質、またはそれらの組み合わせ）を特定し、ついでこれらマーカーを、好ましくは送達ベクターまたはプラスミドの外側（例えば、細胞質ゾルに面する）に保持または発現する送達ベクターまたはプラスミドを作成する。さらに、必要な治療期間に応じて、Sliva K, Schnierle BS. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology Journal*. 2010に記載されているように、ウイルス送達ベクターを遺伝子改変して、継続的に複製、複製欠陥、または条件付きで複製することができる。

【0084】

一実施形態では、CDK8またはCDK19のshRNAまたはsiRNAは、アデノウイルスベクターによって送達することができる。アデノウイルスは、ヌクレオカプシドと線状dsDNAゲノムを持つエンベロープのないウイルスである。アデノウイルスは哺乳動物細胞の核内で複製することができるが、宿主のゲノムに効率的に組み込まれないため、挿入変異誘発のリスクは最小限に抑えられるが長期治療には不十分である。

【0085】

別の実施形態では、CDK8またはCDK19のshRNAまたはsiRNAは、アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）によって送達することができる。AAVは最小のウイルスの1つで、Dependovirus属に属する。AAVは小さな一本鎖DNAゲノムを持ち、約8個の個別のshRNAを収容できる。AAVは侵入のリターゲティング（entry retargeting）を可能にし、特定の細胞または組織型へのshRNAの送達を可能にする。さらなる実施形態では、本開示は、トリプルネガティブ乳癌細胞または組織型への送達のために標的化した改変AAVを提供する。

【0086】

別の実施形態では、CDK8またはCDK19のshRNAまたはsiRNAは、レトロウイルスベクターによって送達することができる。レトロウイルスは、Retroviridae科に属し、二本鎖DNA中間体を介して複製する一本鎖RNAウイルスである。それらは宿主のゲノム中に組み込まれることができ、それによりshRNAの長期発現を可能にする。Envタンパク質は、レトロウイルスを標的細胞に標的化する上で中心的な役割を果たす。さらなる実施形態において、本開示は、トリプルネガティブ乳癌細胞または組織型への送達のための改変されたenv遺伝子またはそのタンパク質産物を有するレトロウイルスベクターを提供する。さらなる実施形態では、本開示は、プロテアーゼ活性化Envタンパク質を有するレトロウイルスベクターを使用した、siRNAのCDK8またはCDK19 shRNAの送達を提供する。

【0087】

別の実施形態では、CDK8またはCDK19のshRNAまたはsiRNAは、レンチウイルスベクターによって送達することができる。レンチウイルスは、大量のDNAを収容できるLentivirinae属のレトロウイルスのサブクラスである。いくつかの応用では、「SIN」ベクターとして知られる「自己不活性化」されるように設計されたレンチウイルスベクターを使用することが好ましい。さらなる実施形態において、本開示は、トリプルネガティブ乳癌細胞または組織型への送達のための改変されたenv遺伝子またはそのタンパク質産物を有するレンチウイルスベクターによるCDK8またはCDK19 shRNAの送達を提供する。

【0088】

別の実施形態では、shRNAまたはsiRNAは、ナノ粒子によって送達することができる。本開示で 사용할 ことができるナノ粒子の例には、エキソソーム、リボソーム、有機ナノ粒子、または無機ナノ粒子が含まれるが、これらに限られない。ナノ粒子の他の非限定的な例には、例えば、Hong, Cheol Am,およびYoon Sung Nam. "Functional Nanostructures for Effective Delivery of Small Interfering RNA Therapeutics." *Theranostics* 4.12 (2014): 1211-1232. PMC. Web. 13 Sept. 2018（あらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる）で提供されるものが含まれるが、これに限られない。いくつかの実施形態では、shRNAまたはsiRNAの送達は、トリプルネガティブ乳癌

10

20

30

40

50

細胞に存在するかまたは特異的である受容体、タンパク質、糖タンパク質またはそれらの組み合わせによって媒介される。

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態では、siRNA CDK19治療薬は、溶液で投与される。siRNAは非緩衝液で投与することができる。一実施形態では、siRNAは水中で投与される。他の実施形態では、siRNAは、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、プロラミン緩衝液、炭酸緩衝液、またはリン酸緩衝液またはそれらの任意の組み合わせなどの緩衝液と共に投与される。いくつかの実施形態では、緩衝液はリン酸緩衝生理食塩水である。

【 0 0 9 0 】

3 . 1 . 1 . 2 : RNase H-媒介mRNA分解/アンチセンス

RNase H依存アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) は、標的mRNAの相補配列に結合し、RNase Hを介した標的RNAの切断とリボソームの立体障害との両者による翻訳の阻害との両方によって遺伝子発現を低下させる一本鎖の化学修飾オリゴヌクレオチドである。

【 0 0 9 1 】

RNase Hは、RNA:DNA二本鎖においてRNAの切断を触媒するエンドヌクレアーゼ酵素である。この酵素の最もよく研究されている内因性機能は、細胞分裂中のDNA複製の準備に使用される岡崎フラグメント (小さなRNA) の除去である。いくつかの実施形態では、分解のためにCDK19遺伝子のmRNA転写物を標的化するために、該mRNAの一部にハイブリダイズすることができる核酸 (例えば、DNAオリゴヌクレオチド) を対象に投与する。細胞 (例えば、TNBC細胞) の内部に入ると、DNAオリゴヌクレオチドはその標的mRNA転写産物と塩基対を形成する。RNase Hは、得られた二本鎖に結合し、mRNA転写産物を1箇所または複数の箇所で切断する。DNAオリゴヌクレオチドは、他のmRNA転写産物にさらに結合して、RNase H分解の標的とする。したがって、CDK19遺伝子の発現は、TNBCのある対象では大幅に減少する。

【 0 0 9 2 】

CDK19遺伝子のmRNA転写産物にハイブリダイズできるDNAオリゴヌクレオチドは、例えば、10~30ヌクレオチド (例えば、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、または30ヌクレオチド) を含み得る。いくつかの実施形態では、DNAオリゴヌクレオチドは、それが結合するmRNA転写物の一部に対して100%の相補性を有し得る。他の実施形態では、DNAオリゴヌクレオチドは、それが結合するmRNA転写物の一部に対して100%未満の相補性 (例えば、95%、90%、85%、80%、75%、または70%の相補性) を有し得るが、それでもなお安定なRNA:DNA二本鎖を形成してRNase HがmRNA転写産物を切断することができる。DNAオリゴヌクレオチドは、CDK19遺伝子のmRNA転写産物の5'UTRまたは3'UTRに結合する。

【 0 0 9 3 】

さらに、CDK19遺伝子のmRNA転写産物にハイブリダイズできるDNAオリゴヌクレオチドは、5'末端と3'末端に修飾ヌクレオチドを含んでいてよい。末端の修飾ヌクレオチドは、DNAオリゴヌクレオチドの内部をヌクレアーゼ分解から保護し、標的mRNA転写産物に対する結合親和性を高めるように機能する。いくつかの実施形態では、末端の修飾ヌクレオチドは、修飾核酸塩基 (例えば、5-メチルシトシン) および/または修飾糖 (例えば、ロックされた糖) を含み得る。いくつかの実施形態では、DNAオリゴヌクレオチドの5'および3'各末端の3~5ヌクレオチドが修飾され得る。

【 0 0 9 4 】

3 . 1 . 1 . 3 : miRNA

マイクロRNA (miRNA) は、RNAサイレンシングおよび遺伝子発現の転写後調節で機能する小さな非コードRNA分子である。miRNAは、mRNA転写産物内の相補的な配列と塩基対を形成する。その結果、mRNA転写産物は、mRNA鎖の切断、ポリ (A) テールの短縮によるmRNAの不安定化、およびリボソームによるmRNA転写産物のタンパク質への翻訳効率の低下などの1つまたはそれ以上の機構によってサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、miRNAは、それ自体が折り返されて短いヘアピンを形成するRNA転写産

10

20

30

40

50

物の領域に由来することを除いて（これは、pri-miRNAとも呼ばれる）、shRNA経路のsiRNAに似ている。pri-miRNAとして転写されると、ヘアピンはDroshaと呼ばれる酵素によって核内の一次転写産物から開裂される。ついで、ヘアピンまたはpre-miRNAは、核からサイトゾルに輸送される。サイトゾルでは、ヘアピンのループがDicerと呼ばれる酵素によって切断される。結果として得られる産物は、3'末端にオーバーハングを持つ二本鎖RNAとなり、RISCに組み込まれる。RISCに入ると、2番目の鎖は破棄され、現在RISCにあるmiRNAは成熟したmiRNAであり、相補的な配列を持つmRNAに結合する。

【0095】

miRNAとshRNA経路からのsiRNAとの違いは、miRNAとの塩基対形成がシード配列とも呼ばれるmiRNAの5'末端から行われることである。シード配列が短いため、各miRNAはより多くのmRNA転写産物を標的にすることができる。いくつかの実施形態では、CDK19遺伝子を標的とするmiRNAを本明細書に記載される方法で使用してよい。

【0096】

3.1.2: CRISPR/CASシステム

いくつかの実施形態では、CDK19遺伝子のノックアウトまたはノックダウンは、CRISPR/Casシステムなどの遺伝子編集システムを使用して実行される。SandersおよびJoung, Nature Biotechnol 32:347-355, 2014, Huangら, J Cell Physiol 10:1-17, 2017 およびMitsunobuら, Trends Biotechnol 17:30132-30134, 2017を参照。CRISPR/Casシステムは、Casタンパク質と、Casタンパク質をCDK19配列内の標的モチーフに誘導し、ハイブリダイズできる少なくとも1つまたは2つのリボ核酸を含む。次にCasタンパク質は標的モチーフを切断し、二本鎖切断または一本鎖切断をもたらす。細胞内の標的ポリヌクレオチド配列を変更できるいかなるCRISPR/Casシステムも本明細書で説明する方法で使用できる。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casシステムは、CRISPR I型システムである。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casシステムは、CRISPR II型システムである。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casシステムは、CRISPR V型システムである。

【0097】

本明細書に記載の方法で使用されるCasタンパク質は、天然に存在するCasタンパク質またはその機能的誘導体であり得る。「機能的誘導体」は、それらに対応する天然配列ポリペプチドと共通の生物学的活性を有するという条件で、天然配列の断片ならびに天然配列ポリペプチドの誘導体およびその断片を含むが、これらに限定されない。本明細書で企図される生物活性は、機能的誘導体がDNA基質（例えば、CDK19遺伝子）を断片に加水分解する能力である。「誘導体」という用語は、ポリペプチドのアミノ酸配列変異体、共有結合修飾、およびそれらの融合の両方を包含する。Casタンパク質の適切な誘導体またはその断片には、Casタンパク質の変異体、融合、または共有結合修飾が含まれるが、これらに限定されない。

【0098】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で使用されるCasタンパク質は、Cas9またはその機能的誘導体である。いくつかの実施形態では、Cas9タンパク質はストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）に由来する。Cas9は、crRNAに非相補的な標的DNAを切断するRuvC様ドメインと、crRNAに相補的な標的DNAを切断するHNHヌクレアーゼドメインの2つのエンドヌクレアーゼドメインを含む。Cas9の二本鎖エンドヌクレアーゼ活性はまた、プロトスペーサー関連モチーフ（PAM）として知られる短い保存された配列（例えば、2～5ヌクレオチド）が、標的配列中の標的モチーフの3'末端の直後に続くことを必要とする。

【0099】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質はTNBC細胞にポリペプチドの形態で導入される。特定の実施形態では、Casタンパク質は、細胞透過性ポリペプチドにコンジュゲートされ得る。細胞透過性ペプチドの非限定的な例には、例えば、Millettiら, Drug Discov. Today 17: 850-860, 2012（その関連する開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において提供されるものが含まれるが、これに限られない。他の実施形態で

は、TNBC細胞は、Casタンパク質を産生するように遺伝子操作され得る。

【0100】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質がガイドRNAによって向けられるCDK19遺伝子中の標的モチーフは、15～25ヌクレオチド長（例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長）であってよい。いくつかの実施形態では、標的モチーフは少なくとも20ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、CDK19遺伝子中の標的モチーフは、Casタンパク質によって認識される、プロトスペーサー関連モチーフ（PAM）として知られる短い保存された配列の直前にある。いくつかの実施形態では、PAMモチーフはNGGモチーフである。いくつかの実施形態では、CDK19遺伝子中の標的モチーフは最初のエクソン内にある。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casシステムのオフターゲット効果を最小化するように標的モチーフを選択することができる。当業者は、様々な技術を使用してオフターゲット効果を最小化するために適切なターゲットモチーフを選択できることを理解するであろう（例えば、パイオインフォマティクス分析）。

10

【0101】

Casタンパク質をCDK19遺伝子中の標的モチーフに誘導してハイブリダイズできるリボ核酸は、シングルガイドRNA（「sgRNA」）と呼ばれる。当業者に理解されるように、sgRNAは、使用される特定のCRISPR/Casシステム、および標的ポリヌクレオチドの配列に応じて選択することができる。いくつかの実施形態では、1つまたは2つのリボ核酸はまた、標的ポリヌクレオチド配列以外の核酸配列とのハイブリダイゼーションを最小化するように選択され得る。いくつかの実施形態では、1つまたは2つのリボ核酸は、Casタンパク質によって認識されるデオキシリボ核酸モチーフにすぐ隣接する標的モチーフにハイブリダイズするように設計される。ガイドRNAはまた、利用可能なソフトウェア、例えば、CRISPR Design Tool（マサチューセッツ工科大学）を使用して設計することもできる。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のsgRNAを、当技術分野で知られている方法に従って、TNBC細胞にトランスフェクションすることができる。

20

【0102】

治療目的での抗体の使用は、癌を治療するために使用されてきた。受動免疫療法には、癌治療におけるモノクローナル抗体（mAb）の使用が含まれる（例えば、Devita, Hellman, And Rosenberg's Cancer: Principles & Practice Of Oncology, 第8版(2008), DeVita, V.ら編、Lippincott Williams & Wilkins, フィラデルフィア、ペンシルベニア州、pp. 537-547, 2979-2990を参照）。これらの抗体は、腫瘍細胞の増殖または生存の直接阻害、および身体の免疫系の自然な細胞殺傷活性を動員する能力の両方によって、固有の治療的生物学の活性を持つことができる。抗体は、単独で、または放射線または化学療法剤と組み合わせて投与することができる。乳癌の治療が承認されたトラスツズマブはそのような治療法の一例である。あるいは、抗体が薬物に連結され、腫瘍に特異的に結合することによりその薬物を腫瘍に向けることができる抗体薬物複合体を作製するために抗体を使用することができる。トラスツズマブエムタンシン（Ado-Trastuzumab emtansine (T-DM1)）は、乳癌の治療に使用される承認された抗体薬物複合体の例である（Dengら、Curr. Med. Chem., Vol. 24(23), 2505-2527 (2017)を参照）。別のタイプの免疫療法は、特定の癌（例えば、TNBC細胞）に存在する抗原、または抗原の発現を指示するDNA構築物による能動免疫療法またはワクチン接種であり、これにより、対象において免疫応答を誘発させ、対象に自分の癌に対する抗体を能動的に産生するように誘導する。

30

40

【0103】

抗体は、疾患に関与する細胞表面タンパク質の標的化に非常に効果的である。それらの大きなサイズ、複雑な構造、およびジスルフィド結合への構造的依存が細胞内適用を妨げると一般に考えられているが、in situで発現した（例えば、MierschおよびSidhu, F1000Res doi: 10.12688/f1000research.8915.1, 2016参照）および機能的な細胞内活性を維持することが示されている外因的に供給された全抗体の両方が文献に存在する（Bioccaら、Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian ce

50

lls. EMBO J. (1990); 9(1): 101-8およびSteinbergerら、Functional deletion of the CCR5 receptor by intracellular immunization produces cells that are refractory to CCR5-dependent HIV-1 infection and cell fusion. Proc Natl Acad Sci U S A. (2000); 97(2): 805-10参照)。細胞内適用のために抗原結合フラグメント (Fab) や一本鎖可変フラグメント (scFv) などの一層小さく複雑でない結合タンパク質を使用する試みは、細胞質タンパク質に結合して機能を調節する能力において同様に成功を収めている (例えば、Marascoら、Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. (1993); 90(16): 7889-93参照)。

【0104】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、任意のクラスの全免疫グロブリン (すなわち、無傷の抗体) を包含するが、これらに限定されない。天然の抗体は通常、2つの同一の軽 (L) 鎖と2つの同一の重 (H) 鎖で構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。通常、各軽鎖は1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合されるが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重鎖と軽鎖には、規則的に間隔をあけた鎖内ジスルフィド架橋もある。各重鎖の一端には可変ドメイン (V(H)) があり、その後いくつかの定常ドメインが続く。各軽鎖には、一端に可変ドメイン (V(L)) があり、他端に定常ドメインがある; 軽鎖の定常ドメインは重鎖の最初の定常ドメインと整列し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間の界面を形成すると考えられている。脊椎動物種の抗体の軽鎖は、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ () とラムダ () と呼ばれる2つの明確に区別できるタイプの1つに割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つの主要なクラスがあり: IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM、これらのいくつかはさらにサブクラス (アイソタイプ)、例えばIgG-1、IgG-2、IgG-3、およびIgG-4; IgA-1およびIgA-2に分類できる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、ミューと呼ばれる。

【0105】

本明細書で使用される場合、用語「エピトープ」は、提供された抗体との特異的相互作用が可能な任意の決定基を含むことを意味する。エピトープ決定基は通常、アミノ酸や糖側鎖などの化学的に活性な分子の表面基で構成され、通常、特定の3次元構造特性と特定の電荷特性を持っている。抗体が認識するエピトープの同定は以下のように行う。まず、モノクローナル抗体が認識する標的分子の様々な部分構造を用意する。部分構造は、分子の部分ペプチドを調製することによって調製される。そのようなペプチドは、例えば、既知のオリゴペプチド合成技術によって、または所望の部分ポリペプチドをコードするDNAを適切な発現プラスミドに組み込むことによって調製される。発現プラスミドは、大腸菌などの適切な宿主に送達され、ペプチドを産生する。例えば、標的分子のC末端またはN末端から機能する、適切に長さが短縮された一連のポリペプチドは、確立された遺伝子工学技術によって調製することができる。どのフラグメントが抗体と反応するかを確立することにより、エピトープ領域が同定される。エピトープは、確立されたオリゴペプチド合成技術を使用して、さまざまなより小さなペプチドまたはペプチドの変異体を合成することにより、より厳密に同定される。より小さいペプチドは、例えば、特定のペプチドが標的分子への抗体の結合を妨害するかどうかを決定するための競合阻害アッセイで使用される。もしそうなら、該ペプチドは抗体が結合するエピトープである。SPOTs Kit (Genosys Biotechnologies, Inc., The Woodlands, TX) などの市販のキットと、マルチピン合成法に基づく一連のマルチピンペプチド合成キット (Chiron Corporation, Emeryville, CA) を使用して、非常にさまざまなオリゴペプチドを得ることができる。

【0106】

抗体またはそのフラグメントという用語は、二重または複数の抗原またはエピトープ特

10

20

30

40

50

異性を有するキメラ抗体およびハイブリッド抗体、およびハイブリッドフラグメントを含む、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab などのフラグメントをも包含する。したがって、その特定の抗原に結合する能力を保持する抗体のフラグメントが提供される。例えば、CDK19結合活性を保持する抗体のフラグメントは、抗体またはそのフラグメントという用語の意味に含まれる。そのような抗体およびフラグメントは、当技術分野で公知の技術によって作製でき、抗体を産生し、特異性および活性について抗体をスクリーニングする一般的な方法に従って、特異性および活性についてスクリーニングできる（HarlowおよびLane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, ニューヨーク(1988)を参照）。

抗体またはそのフラグメントの意味には、例えば米国特許第4,704,692号（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）に記載されている抗体フラグメントと抗原結合タンパク質（一本鎖抗体）の複合体も含まれる。

【0107】

一実施形態では、任意の正常な（非癌性）組織では存在しないかまたは低レベルでのみ存在する、乳癌、特にTNBC細胞に存在する抗原に対して特異性を有する治療抗体（または抗体フラグメント）を、当技術分野で公知の方法を使用して調製できる。したがって、治療抗体はTNBC細胞に対して生物活性を有し、免疫系の反応を動員して疾患を治療することができる。治療抗体は、治療薬として単独で、または現在の治療法（化学療法、放射線、白金ベースの治療など）と組み合わせて投与することができ、または薬物などの毒性物質に結合した免疫複合体の調製に使用できる。

【0108】

当該分野で公知の方法によって作製された、CDK19に対するモノクローナル抗体（例えば、抗CDK19抗体）は、診断または治療の目的で、乳房組織における癌性細胞の有無を同定するために使用され得る。抗CDK19抗体はまた、固形腫瘍からの放出後に血液中を循環している癌性細胞の有無またはそのレベルを同定するために使用され得る。そのような循環抗原は、無傷のCDK19抗原、または本明細書で教示される方法に従って検出される能力を保持するそのフラグメントを含み得る。そのような検出は、例えば、当技術分野で一般に使用されている標準的な方法を使用したFACS分析によって行うことができる。

【0109】

いくつかの実施形態では、CDK19を標的とする方法は、それを必要とする対象に、乳癌の治療、特にTNBCの治療のためにCDK19に免疫応答性である治療有効量の抗体（例えば抗CDK19抗体）を投与することを含み得る。一実施形態では、CDK19に対して免疫応答性を有する抗体は、細胞表面分子とは対照的に、キナーゼなどの細胞内シグナル伝達分子を標的とし、それによって抗体の特異性は、CDK8上には存在しないCDK19上に存在するエピトープを中和することによって提供される。別の実施形態では、抗CDK19抗体は、PI3K/mTOR/AKT経路またはERK5を標的とすることができる（OcanaおよびPandiella, *Oncotarget*, 8(13), 22218-22234 (2017)を参照）。一実施形態では、抗CDK19抗体は、複数の細胞内シグナル伝達分子、例えば、PI3K/mTORおよびJAK/STAT経路を標的とすることができる。さらに別の実施形態では、抗CDK19抗体は、CDK8上には存在せずCDK19上に存在する中和エピトープに結合する操作されたタンパク質を含み得る。

【0110】

一実施形態では、CDK19を標的とする方法は、それを必要とする対象に、TNBCの治療のための腫瘍抗原（TA）特異的モノクローナル抗体の治療有効量を投与することを含み得る。一実施形態では、TA特異的mAbは、TNBCに関連する細胞内抗原に向けることができる（例えば、Wangら、*Molecular Oncology*, Vol. 9(10), (2015) 1982-1993およびJust, *FEBS letters*, 2:21 (2014), 350-355を参照）。

【0111】

一実施形態では、乳癌を有する対象を治療する方法が提供され、該方法は、対象に、CDK19標的化薬剤を含む組成物の薬学的有効量を投与する工程を含む。CDK19標的化薬剤は、CDK19標的化抗体、CDK19標的化ペプチド、CDK19標的化小分子、CDK19標的化RN

10

20

30

40

50

A分子、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの例では、CDK19標的化薬剤は治療剤に結合され得る。場合によっては、該方法は、第2の形態の癌療法（例えば、化学療法または放射線療法）を対象に投与することをさらに含む。一実施形態では、乳癌はTNBCである。別の局面において、乳癌細胞においてCDK19遺伝子の発現を阻害する方法が提供され、該方法は、CDK19遺伝子を発現する乳癌細胞を合成CDK19標的化RNA分子と接触させる工程を含む。

【0112】

別の実施形態では、以下の工程を含む、癌を有する対象のCDK19標的薬剤に対する応答性を評価する方法が提供される：（a）対象からの腫瘍試料でCDK19の量を測定する；（b）対象が高レベルのCDK19発現を有するとして特徴付けられる癌を有するかどうかを決定する；ついで（c）対象の癌が高レベルのCDK19発現を有するとして特徴付けられる場合、対象がCDK19標的薬剤に応答する可能性が高いか、または対象の癌が低レベルのCDK19発現を有するとして特徴付けられる場合、対象がCDK19標的薬剤に応答する可能性が低いことを示す。

【0113】

一側面では、癌を有する対象を治療する方法が提供され、該方法は、CDK19標的薬剤を含む薬学的有効量の組成物を患者に投与することを含む。CDK19標的薬剤は、CDK19タンパク質またはCDK19 mRNAに特異的に結合する薬剤である。CDK19標的薬剤には、CDK19タンパク質またはCDK19 mRNAに特異的に結合する抗体またはそのフラグメント、ペプチド、小分子、およびポリヌクレオチド（RNA分子など）が含まれる。組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含み得る。場合によっては、CDK19タンパク質に結合するCDK19標的薬剤は、CDK19活性を直接阻害する。他の例では、CDK19 mRNAに結合するCDK19標的薬剤は、CDK19発現を阻害し、それによりCDK19活性を阻害する。

【0114】

一例では、CDK19標的薬剤は、CDK19標的抗体を含む。CDK19標的抗体は、モノクローナル抗体であってよい。いくつかの例では、CDK19標的抗体はヒト化抗体であってよい。別の例では、CDK19標的薬剤は、CDK19標的ペプチドであってよい。さらに別の例では、CDK19標的薬剤は、CDK19標的小分子であってよい。CDK19標的ペプチドおよび小分子は、以下でさらに考察されるように、様々な仕方で由来してよい。場合によっては、ペプチドは、CDK19標的抗体の配列に由来する。

【0115】

場合によっては、本明細書に記載の方法で対象を治療することは以下の少なくとも一つを阻害する：対象における腫瘍の形成、腫瘍細胞の増殖（proliferation）、腫瘍細胞の増殖（growth）、または腫瘍細胞の転移。別の実施形態では、本明細書に記載の方法で対象を治療すると、腫瘍サイズが減少し、場合によっては、対象の1つまたはそれ以上の腫瘍が排除される。

【0116】

3.1.4：小分子阻害剤

1つのアプローチにおいて、TNBCを治療する方法は、CDK19活性の小分子阻害剤を使用して、CDK19タンパク質を標的化することを含む。CDK19の小分子阻害剤の例は、米国特許第9,321,737号、米国特許公開第US20170071942号、Mallingerら、J. Med. Chem. 59:1078, 2016、およびCzodrowskiら、J. Med. Chem. 59:9337, 2016に記載されている。いくつかの実施形態では、小分子阻害剤は、CDK19のATP結合部位に結合してその活性を阻害する。

【0117】

CDK19の小分子阻害剤は、CDK19のATP結合部位に共有結合または非共有結合してその活性を阻害する。他の実施形態では、小分子阻害剤は、ATP結合部位の外側でCDK19の他の部分に結合してよい。例えば、小分子阻害剤は、ATP結合部位の外側のアミノ酸（例えば、メチオニン、チロシン、またはセリン）と共有相互作用を形成して、CDK19活性を阻害することができる。ATP結合を占有してキナーゼ活性を阻害することに加えて、小分

子阻害剤はまた、CDK19に結合して、CDK19が機能するのを妨げるCDK19の構造変化を引き起こし得る。いくつかの実施形態では、小分子阻害剤は、CDK8よりも高い親和性でCDK19に結合することができる。図9に示すように、CDK19とCDK8とのアミノ酸の違いの大部分はC末端ドメインにある。いくつかの実施形態では、いかなる理論にも拘束されことなく、小分子阻害剤は、CDK8の対応するアミノ酸または部分とは異なる、CDK19のC末端ドメインのアミノ酸または部分に結合して、CDK8に対するCDK19の選択的阻害を達成することができる。

【0118】

いくつかの実施形態では、小分子阻害剤は、米国特許第9,321,737号に記載されている化合物以外のものである。いくつかの実施形態では、小分子阻害剤は、米国特許公開第US 20170071942号に記載されている化合物以外のものである。いくつかの実施形態では、小分子阻害剤は、Mallingerら、J. Med. Chem. 59:1078, 2016に記載されている化合物以外のものである。いくつかの実施形態では、小分子阻害剤は、Czodrowskiら、J. Med. Chem. 59:9337, 2016に記載されている化合物以外のものである。いくつかの実施形態では、小分子阻害剤は、コルチスタチンA (Cortistatin A)、ソラフェニブ (Sorafenib)、リニファニブ (Linifanib)、ボナチニブ (Ponatinib)、セネキシニンB (Senexin B)、CCT251545、およびCCT251921からなる群から選択される1つまたは複数の化合物以外のものである。

【0119】

3.1.5: CDK8の発現または活性を有意に阻害しないか、またはCDK8の発現または活性を阻害するよりもCDK19の発現または活性を一層阻害するCDK19阻害剤

CDK19の発現または活性を阻害するがCDK8の発現または活性を阻害しない薬剤、またはCDK8の発現または活性が阻害されるよりもCDK19の発現または活性を一層阻害する薬剤は、CDK19およびCDK8タンパク質およびそれらに対応する遺伝子およびmRNAの配列および構造の違いに基づいて設計することができる。例えば、CDK19およびCDK8 mRNA配列のアラインメントは、shRNAまたはCDK19 mRNAと関連するがCDK8配列とは関連しない他の核酸物質を設計するために使用できる非同一または低同一性ヌクレオチド配列を同定できる(図16および17を参照)。同様に、CDK19およびCDK8アミノ酸配列のアラインメントは、相違する領域を特定でき、CDK19タンパク質に特異的に結合する抗体または他の結合剤を生成できる。同様に、CDK19活性を特異的に阻害するかまたはCDK19活性をCDK8活性よりも一層阻害する小分子薬剤を(合理的な薬物設計またはスクリーニングによって)同定することができる。

【0120】

本明細書で使用される「CDK19活性を阻害するがCDK8の活性を有意に阻害しない」という用語は、最小のCDK19活性がインビボまたはインビトロで検出されるように、CDK19の活性に特異的に結合および阻害することができる薬剤を指す; 一方、該薬剤は、同じ条件下でCDK8活性の有意な低下を引き起こさない。例えば、CDK19の活性を阻害する薬剤は、CDK19に特異的に結合し、インビボまたはインビトロでCDK19活性を完全にまたは有意に阻害することができる。場合によっては、CDK19阻害剤は、CDK19遺伝子またはCDK19遺伝子産物に優先的に結合し、CDK19の発現または活性を完全に阻害する能力によって同定できる。CDK19の阻害は、薬剤への暴露時のCDK19活性が、対照の存在下または薬剤の不在下でのCDK19活性よりも少なくとも約70%少ない、例えば、少なくとも約75%、80%、90%、または95%少ないときに生じる。CDK8活性が薬剤への暴露時に、薬剤の不在下でのCDK8活性に比べて少なくとも約90%、例えば、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または100%である場合、CDK8活性の有意な減少は生じない。本明細書に記載されるように、薬剤は、小分子化学阻害剤などの小分子(すなわち、1000ダルトン以下の式量を有する分子)またはsiRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはタンパク質などの大分子を含み得る。

【0121】

CDK19および/またはCDK8活性に対する薬剤の効果を決定することは、限定されない

10

20

30

40

50

が、最大阻害濃度の半分 (IC_{50})、解離定数 (K_D)、および阻害定数 (K_I) を含む、当該分野で公知の1つ以上の方法を使用して測定され得る。例えば、 IC_{50} は、特定の生物学的または生化学的機能を阻害する上での物質の有効性の尺度である。この値は、特定の生物学的プロセス (または生物学的プロセスの成員) を半分に阻害するのに必要な物質の濃度を示す。 IC_{50} 値は通常、モル濃度として表される。食品医薬品局 (FDA) によると、 IC_{50} はインビトロで50%の阻害に必要な薬物の濃度を表す。一実施形態では、CDK19活性を阻害するがCDK8の活性を有意に阻害しない薬剤は、同じ条件下でCDK8活性に作用するのに必要な薬剤の濃度よりも少なくとも約2倍、5倍、10倍、50倍、75倍、または100倍低い IC_{50} を有する。別の実施形態では、CDK19活性を阻害する薬剤の IC_{50} は、CDK8の活性を阻害する薬剤の IC_{50} よりも少なくとも約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低い。

10

【0122】

別の実施形態では、CDK19およびCDK8活性に対する薬剤の効果は、各CDKに対する薬剤の平衡解離定数 (K_D) を計算することによって決定することができる。例えば、CDK19の活性を阻害するがCDK8の活性を有意に阻害しない薬剤は、同じ条件下でのCDK8に対する薬剤の K_D よりも少なくとも約2倍、5倍、10倍、50倍、または100倍低い K_D を有する。一実施形態では、(CDK19への) 薬剤の K_D は、(CDK8への) 薬剤の K_D よりも少なくとも約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低い。好ましい実施形態では、CDK19への薬剤の K_D はCDK8への薬剤の K_D と比較して低い。言い換えれば、(CDK8への) 薬剤の平衡解離定数は、(CDK19への) 薬剤の平衡解離定数よりも大きい。一実施形態では、薬剤は、マイクロモル (10^{-6}) からナノモル ($10^{-7} \sim 10^{-9}$) の範囲の K_D 値を有する抗体を含むことができる。別の実施形態では、薬剤は、ナノモル範囲 (10^{-9}) からピコモル (10^{-12}) の範囲の K_D を有する抗体を含むことができる。さらに別の実施形態では、薬剤は、CDK19に対してナノモル (nM) の平衡解離定数およびCDK8に対してマイクロモル (μM) の平衡解離定数を有することができる。米国特許公開第US20120071477号は、単一濃度 (2,000nM) の化合物がATPポケット結合を阻害するキナーゼ阻害アッセイを記載している。

20

【0123】

別の実施形態では、CDK19およびCDK8活性に対する薬剤の効果は、各CDKに対する薬剤の阻害定数 (K_I) を計算することによって決定することができる。 K_I は、阻害剤が如何に強力であるかの指標である；それは、最大阻害の半分を生み出すのに必要な濃度である。 K_I が低いほど、薬剤とCDK遺伝子との結合親和性が高くなる。例えば、CDK19の活性を阻害するがCDK8の活性を有意に阻害しない薬剤は、同じ条件下での (CDK8への) 薬剤の K_I よりも少なくとも約2倍、5倍、10倍、50倍、75倍、または100倍低い。一実施形態では、CDK19に対する薬剤の K_I はCDK8に対する薬剤の K_I よりも少なくとも約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低い。好ましい実施形態では、CDK19への薬剤の K_I はCDK8への薬剤の K_I と比較して低い。言い換えれば、CDK8への薬剤の阻害定数は、CDK19への薬剤の阻害定数よりも大きい。例えば、CDK19の活性を阻害する薬剤は、CDK19に結合し、インビボまたはインビトロでCDK19活性を有意に阻害することができる。場合によっては、CDK19阻害剤は、CDK19に優先的に結合し、CDK19の活性を完全に阻害する能力によって同定できる。CDK19の阻害は、薬剤にさらされたときのCDK19活性が、対照の存在下または薬剤の不在下でのCDK19活性よりも少なくとも約70%少ない、例えば、少なくとも約75%、80%、90%、または95%少ないときに生じる。CDK8活性が薬剤への曝露時に、薬剤の不在下でのCDK8活性に比べて少なくとも約90%、例えば、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または100%である場合、CDK8活性の有意な減少は生じない。

30

40

【0124】

本明細書で使用する「CDK8の活性を阻害するよりもCDK19の活性を一層阻害する薬剤」という用語は、同じ条件下でのCDK8の活性の阻害に対する薬剤の効果よりも有意に大きくCDK19の活性に結合して阻害することができる薬剤を指す。例えば、CDK8の活性を

50

阻害するよりも大きくCDK19の活性を阻害する薬剤は、CDK19活性が、本発明の薬剤への暴露時に、インビトロまたはインビボでの同じ条件下でのCDK8の活性よりも少なくとも約10%少なく、例えば、少なくとも約15%、20%、30%、40%、または50%少ないときに生じる。好ましい実施形態では、観察されたCDK19の活性が同じ条件下でのCDK8の活性よりも少なくとも10%低い場合に、薬剤はCDK8の活性を阻害するよりもCDK19の活性を一層阻害する。別の実施形態では、同じ条件下でCDK8活性と比較して少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍少ないCDK19活性が観察された場合に、薬剤はCDK8の活性を阻害するよりもCDK19の活性を一層阻害する。阻害の程度（すなわち、CDK19活性をCDK8活性と比較すること）は、本明細書の実施例セクションに記載されているアッセイ、例えば「対照のパーセント（POC）」または「正規化パーセント阻害（NPI）」を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の1つ以上の方法を使用して決定できる。POCおよびNPIは、データを正規化する方法であり、複数の薬剤（例えば、種々の抗体および小分子）を複数の標的（例えば、CDK19およびCDK8）と比較するときによく使用される。例えば、POCは、プレートに存在する1つまたはそれ以上の対照に対する薬剤の測定値を正規化することにより、プレート間の変動（例えば、ハイスループット薬物スクリーニングにおける）を補正する方法である。各薬剤の生の測定値は、プレート内対照の「平均」で割ることができる。NPIは、対照ベースの方法であり、薬剤の測定値と陽性対照の平均値との差を、陽性対照の測定値の平均と陰性対照の測定値の平均との差で割ったものである（Maloら、Nature Biotechnology, Vol. 24, 167-175 (2006)）。観察された阻害の程度を正規化することにより、検討中の各標的の活性の阻害にどの薬剤が効果的であるかに関して正確な結論を下すことができる。

10

20

【0125】

3.1.6：併用療法

1つのアプローチでは、患者は、CDK19の発現または活性を阻害する薬剤および（a）放射線療法および/または化学療法を含む併用療法で治療される。1つのアプローチでは、放射線または化学療法は腫瘍塊の大部分を排除し、CDK19阻害剤は生存可能な癌幹細胞（例えば、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}）細胞の数を減らす。1つのアプローチでは、化学療法は、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシンまたはエピルビシン）、タキサン（例えば、パクリタキセルまたはドセタキセル）、代謝拮抗物質（例えば、カペシタビンまたはゲムシタビン）、プラチナ剤（例えば、カルボプラチンまたはシスプラチン）、ピノレルピン、またはエリプリンの投与を含む。

30

【0126】

3.2：治療効果の評価または予測方法

CDK19阻害剤による一連の治療は、例えば腫瘍容積の減少、転移の減少、および表現型EpCAM^{med/high}およびCD10^{-/low}を有する腫瘍細胞の減少など、患者にとって有益な結果になる。

【0127】

腫瘍容積は、当技術分野で既知の方法を使用して測定することができる。例えば、Wapnirら、Breast Cancer Res Treat 41:15-19, 1996; Sapiら、PLoS One 10:e0142190, 2015を参照。CDK19阻害剤による単剤療法または他の薬剤または治療との併用の一連の治療後、腫瘍容積は少なくとも10%、任意で少なくとも20%、時には少なくとも50%減少する。いくつかの実施形態では、腫瘍容積の減少（例えば、腫瘍容積の少なくとも10%、20%、または30%の減少）は、治療を開始してから早くも1ヶ月以内に観察され得る。他の実施形態では、腫瘍容積の減少（例えば、腫瘍容積の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、または60%の減少）は、治療を開始してから2、3、4、5、または6か月間で観察され得る。他の実施形態では、本明細書に記載のTNBCを治療するための方法はまた、腫瘍のさらなる増殖を減速または阻害し得る。いくつかの実施形態では、患者は併用療法を受け、第2の薬剤による単剤療法のそれを超える治療効果が観察される。

40

【0128】

個体における転移の減少は、Makelaら、Sci Rep. 7:42109, 2017の記載に従って決

50

定することができ、標準的な方法に従って集団で観察することができる。

【0129】

いくつかの実施形態では、対象から得られたTNBC腫瘍組織におけるEpCAM^{med/high}およびCD10^{-/low}の発現プロファイルを有する癌細胞の存在または量を使用して、CDK19遺伝子またはその対応するタンパク質を標的とする治療に対する対象の治療応答性を予測または評価することができる。本明細書に記載および実証されるように、発現プロファイルEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}を有する細胞は、高い腫瘍開始能を有し、CDK19にも富んでいる。いくつかの実施形態では、高いパーセンテージのEpCAM^{med/high}およびCD10^{-/low}のTNBC細胞を有する対象は、特に応答性であり得る。

【0130】

1つのアプローチでは、TNBCを有する対象のCDK19標的剤に対する治療応答しやすさは、(a)対象から得られた腫瘍試料中のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞を定量し、(b)(a)のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞の量を、CDK19標的療法に応答する腫瘍に特徴的な参照値と比較し、ついでEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞が参照値に等しいか参照値を超える場合にCDK19発現または活性の阻害剤で患者を治療することによって決定される。参照値は、健常集団およびTNBC集団のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞を定量し、健常組織および腫瘍組織に特徴的な統計的に有意な範囲を計算することによって決定できる。別のアプローチでは、同じ対象からの腫瘍組織および健常な組織を試験することができ、健常組織と比較して腫瘍内のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞が高い対象を、CDK19標的療法に応答しやすいと同定できる。

【0131】

3.3：薬剤の送達

本明細書に記載の方法で使用される医薬組成物は、当業者に知られている方法により製剤化することができる、有効成分および1つまたはそれ以上の医薬的に許容される担体または賦形剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、治療上有効な量で、CDK19遺伝子の発現レベルを低下させるDNAまたはRNAオリゴヌクレオチドを含む。他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、治療有効量のDNAまたはRNAオリゴヌクレオチド、CDK19の活性を阻害する小分子を含む、本発明の医薬組成物を包含する。医薬組成物中の有効成分の治療有効量は、疾患の症状を予防、緩和、または改善するのに、または治療されている対象の生存を延長するのに十分である。治療有効量の決定は、当業者の能力の範囲内である。

【0132】

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物はデポ製剤として製剤化される。一般に、デポ製剤は通常、非デポ製剤よりも長く作用する。いくつかの実施形態では、そのような調製物は、埋め込み（例えば、皮下）によって、または筋肉内注射によって投与される。いくつかの実施形態では、デポ製剤は、適切なポリマーまたは疎水性材料（例えば、許容できる油中のエマルジョン）またはイオン交換樹脂を使用して、または難溶性誘導体として、例えば、難溶性塩として調製される。

【0133】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は送達システムを含み得る。送達システムの例には、エキソソーム、リポソーム、およびエマルジョンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性成分は、治療される細胞型、組織、または器官を特異的に標的とするエキソソームにロードまたはパッケージされ得る。エキソソームは、多胞体が原形質膜に融合した後に細胞外環境に放出される、エンドサイトーシス起源の小さな膜結合小胞である。エキソソームの産生は、B細胞、T細胞、樹状細胞を含む多くの免疫細胞で報告されている。治療用化合物をエキソソームにロードするために使用される技術は、当該技術分野で既知であり、例えば、米国特許公開第US20132013426号および第US20140348904号、ならびに国際特許公開WO2015002956（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、治療化合物は、エレクトロポレーションまたはトランスフェクション試薬（すなわち、カチオン性リポソーム）の使用

により、エキソソームにロードされ得る。いくつかの実施形態では、エキソソームを産生するようにエキソソーム産生細胞を操作することができ、それに治療化合物をロードすることができる。例えば、エキソソームは、エキソソームが宿主細胞によって産生されたときに、活性成分（すなわち、DNAまたはRNAオリゴヌクレオチド）がエキソソームに取り込まれるように、活性成分を発現する遺伝子構築物でエキソソーム産生宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションすることによりロードできる。エキソソームが選択された細胞型、組織、または器官を標的とすることができるよう、さまざまな標的化部分をエキソソームに導入することができる。標的化部分は、標的化された細胞型、組織、または器官に特異的な細胞表面受容体または他の細胞表面タンパク質またはペプチドに結合し得る。いくつかの実施形態では、エキソソームは標的化部分が表面上に発現されている。いくつかの実施形態では、エキソソームの表面上に発現される標的化部分は、エキソソーム膜貫通タンパク質に融合される。標的化部分をエキソソームに導入する技術は当技術分野で知られており、例えば、米国特許公開第US20130053426号および同第US20140348904号、および国際特許公開第WO2015002956号（参照により本明細書に組み入れられる）に記載されている。

10

【実施例】

【0134】

4. 実施例

4.1: 実施例1-材料および実験方法

化学試薬:

20

以下は、この研究で使用した化合物の化学名である。CCT152921は、4-[(2-フェニルエチル)アミノ]-6-キナゾリンカルボニトリル(NIH NCAT)である。この化合物をビヒクル(PBS+0.5% Methocel(w/v)+0.25% Tween 20(v/v))に3mg/mLの濃度に再懸濁し、マウスに30mg/kgを投与した。CCT251921またはビヒクルは、毎日強制経口投与した。

【0135】

shRNA発現レンチウイルスプラスミド:

センス標的配列、15-merルーブ配列(5'-GTTAATATTCATAGC-3': 配列番号19)、およびセンス配列の逆相補体を含む相補的ssDNAオリゴヌクレオチドのペアを合成した(Elim Biopharmaceuticals)。オリゴヌクレオチドを、50 μM アニリング緩衝液(10 mM Tris-HCl pH8.0、50mM NaCl、1mM EDTA)でアニリングした。その後、二本鎖DNAオリゴテンプレートと、構成的に活性なshRNAベクター構築物のためのBbsIで消化したpRSI12-U6-(sh)-HTS4-UbiC-TagRFP-2A-Puro shRNA発現ベクター(Cellecta)および誘導可能なshRNAベクター構築物のためのBbsIで消化したpRSITUR-U6Tet-(sh)-UbiC-TetRep-2A-TagRFPにクローニングした。この研究で使用したshRNAベクターのセンス鎖は、5'-GCG AGA ATT GAA GTA CCT TAA-3'(shCDK19-1(配列番号1))、5'-ACC AGC AAA TAT CCT AGT AAT-3'(shCDK19-2(配列番号2))、および5'-GCA GGG TAA TAA CCA CAT TAA-3'(shCDK8-2(配列番号3))であった。未修飾の上記のpRSI12-U6-(sh)-HTS4-UbiC-TagRFP-2A-Puro shRNA発現ベクターは「空の」対照shRNAとして使用した。pHIV-ZsGreen発現ベクター(Addgene)を使用してGF P陽性腫瘍細胞を作製した。RNAiスクリーニングに使用されるDECIPHER 27K Pooled shRNAレンチウイルスライブラリー-Human Module 1(Cellecta)には、同じpRSI12 shRNA発現ベクター内に5,043のヒト遺伝子を標的とする27,500の固有のshRNA構築物(遺伝子当たり約5または6の冗長shRNA)が含まれている。

30

40

【0136】

細胞株:

MDA-MB231、MDA-MB468、HS578T、および293T細胞をATCCから入手した。H MEC細胞はThermoFisher Scientificから入手した。これらの細胞は、マイコプラズマを含まないことが供給業者から認定されている。使用した細胞株はいずれも、ICLACが管理している一般的に誤認されている細胞株のデータベースにリストされていない。使用した

50

すべての細胞株は、供給業者からの元の細胞が解凍されてから10回未満継代した。MDA-MB231、MDA-MB468、293T、およびHS578T細胞はすべて、PSA (Life Technologies)、10%FBS (Hyclone)、Glutamax (ThermoFisher Scientific)、およびピルビン酸ナトリウム (Life Technologies) を補充したDMEM (Invitrogen) で増殖させた。HMEC細胞はHuMEC Ready Medium (ThermoFisher Scientific) で増殖させた。

【0137】

マウス：

Nod scidガンマ (NSG) マウス (NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2Rg^{tm1Wjl}/SzJ) をJackson Laboratoryから購入した。PDX実験に使用したマウスは、8~10週齢の成体雌マウスであった。この研究で使用されたすべてのマウスは、スタンフォード大学APLAC委員会によって承認されたプロトコルに従って、スタンフォード動物施設で維持された。マウスは無菌の滅菌条件下、社内で維持した。マウスにオートクレーブした食物と水を投与した。ドキシサイクリン誘導性構築物を利用するPDX実験のため、マウスに通常の齧歯類の餌の代わりに625mgのドキシサイクリンヒクレート/kg餌 (Envigo) を含む齧歯類の餌を与えた。

【0138】

PDX腫瘍およびその病理学的および臨床的特徴：

ヒトの試料については、スタンフォード大学の機関審査委員会およびシティー・オブ・ホープによるプロトコルの承認後に、インフォームドコンセントが得られた。この研究で使用されたすべてのPDX腫瘍の完全な説明については、図15を参照。

【0139】

PDX腫瘍細胞の単一細胞懸濁液：

異種移植片をかみそりの刃で機械的に約1mmに細断し、37℃で3~4時間、120 µg/mLのペニシリン、100 µg/mLのストレプトマイシン、0.25 µg/mLのアンプोटリシンB (PSA) (Life Technologies) を含むAdvanced DMEM/F12 (Invitrogen) 中、コラゲナーゼおよびヒアルロニダーゼ (Stem Cell Technologies) とともにインキュベートした。次に、細胞をACK溶解緩衝液 (Gibco) で処理して赤血球を溶解し、その後、予熱したディスパーゼ (Stem Cell Technologies) とDNaseI (Sigma) で5分間処理し、40 µmナイロンメッシュフィルターでろ過した。最後に、細胞をフローサイトメトリー緩衝液 (HBBS、2%FCS、PSA) で洗浄した。

【0140】

PDX腫瘍細胞のエンリッチメント：

PDX腫瘍が単一の細胞に解離した後、生細胞の数をトリパンブルー染色で決定し、血球計算盤で手動にてカウントした。細胞をフローサイトメトリー緩衝液で 10^6 生細胞/mLの濃度に再懸濁し、ビオチン抗ヒトCD326 (EpCAM) 抗体 (Biolegend) と1:50 (v/v) にて4℃で20分間インキュベートした。細胞をフローサイトメトリー緩衝液で洗浄し、80 µLに再懸濁し、20 µLの抗ビオチンマイクロビーズ (Miltenyi Biotec) と4℃で20分間インキュベートした。次に、細胞をフローサイトメトリー緩衝液で洗浄し、500 µLの緩衝液に再懸濁した。製造業者のプロトコルに従い、細胞を磁化したLSカラム (Miltenyi Biotec) に適用し、洗浄し、磁石から溶出させた。

【0141】

レンチウイルスの製造：

レンチウイルスは、パッケージングプラスミドミックス (Cellecra) を用いて製造し、293T細胞でLipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific) を使用し、製造業者の指示に従ってpRSI12shRNA発現プラスミドにサブクローニングした。上清を48時間後と72時間後に収集し、0.45 µmフィルターでろ過し、製造業者の指示に従ってレンチウイルス沈殿溶液 (Alstem LLC) で沈殿させた。ウイルスを元の量の1/100に再懸濁した。ウイルス力価は、濃縮ウイルスの連続希釈液に感染した293T細胞のフローサイトメトリー分析によって決定した。

【0142】

10

20

30

40

50

レンチウイルス感染：

インビトロ細胞株実験では、播種時に濃縮レンチウイルス上清（MOIが3になるように）を細胞と混合した。細胞は、蛍光顕微鏡下でRFPを視覚化することによりモニターした。すべてのフローサイトメトリー分析は、感染から少なくとも72時間後に行った。

【0143】

インビボPDX腫瘍増殖およびオルガノイドコロニー形成実験では、濃縮レンチウイルス上清（MOIが10になるように）を、4 μ g/mLのポリブレン（Sigma-Aldrich）を含むオルガノイド培地でPDX腫瘍細胞の単一細胞懸濁液と混合した。オルガノイド培地は以下から構成されている：Advanced DMEM/F12（Invitrogen）、10%FBS（Hyclone）、2.5%成長因子減少マトリゲル（BD）、10ng/mLのマウスEGF（R&D）、100ng/mLのNoggin（R&D）、250ng/mLのRSPO-1（R&D）、1XB27（Invitrogen）、1XN2（Invitrogen）、およびPSA（Life Technologies）。その後、細胞を1200xgで2時間、15で遠心分離することによりスピノキュレーションを行った。細胞をピペッティングによって再懸濁し、48ウエルの超低接着細胞培養プレート（Corning）に一晩放置した。

【0144】

オルガノイドコロニー形成アッセイでは、細胞を翌日マトリゲルに移した。インビボPDXアッセイでは、PDX腫瘍生着のセクションで説明したように、約75%の細胞をNSGマウスに注入した。残りの25%の細胞をマトリゲルに播種し、細胞がRFP陽性になるまで72時間オルガノイド培地で培養した。その時点で培地を除去し、デイスパーゼと交換し、マトリゲルが溶解するまで2～3時間インキュベートした。解離した細胞をフローサイトメトリー緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリーで分析して、マウスに注入された細胞の「ベースライン」RFPパーセンテージを決定した。

【0145】

オルガノイドコロニー形成アッセイ：

照射されたL1-Wnt3aフィーダー細胞（Dr. Roel Nusseからの気前の良い贈与品）を成長因子減少マトリゲル（BD Biosciences）と混合し、37で固化した。PDX腫瘍細胞の単一細胞懸濁液を、固化したマトリゲル/フィーダー細胞混合基質に移し、オルガノイド培地で増殖させた。細胞を、5%CO₂を含む37のインキュベーターで約2週間培養した。培地の50%を3～4日ごとに新しい培地と交換した。コロニーを蛍光顕微鏡下でカウントした。RFP陽性コロニー（形質導入細胞を表す）のみをカウントした。CDK19 shRNAの発現を誘導する実験では、ドキシサイクリンヒクレーートを100ng/mLの最終濃度で培地に添加した。

【0146】

細胞生存アッセイ：

化学物質で処理したまたはレンチウイルスに感染した細胞株について、製造業者の指示に従い、WST-1細胞増殖試薬（Roche）を各ウェルに1:10（v/v）の最終希釈で加えた。その後、細胞を37、5%CO₂でインキュベートした。試薬添加後1～4時間の間に、プレートをSpectraMax M3バイオアナライザー（Molecular Devices）で分析した。各ウェルの吸光度を450nm（シグナル波長）および650nm（参照波長）で測定した。したがって、各実験試料のシグナルは、吸光度_{experimental}（A_{450nm}-A_{650nm}）であった。培地の影響を補正するために、ブランクウェルの吸光度を測定することにより、吸光度_{background}（A_{450nm}-A_{650nm}）を得た。したがって、各試料のバックグラウンド補正シグナルA_{corrected}は吸光度_{experimental}-吸光度_{background}であった。ノックダウンのすべての補正值を対照試料の補正值に正規化し、「相対生存率」を得た。

【0147】

定量的PCR RNA発現分析：

細胞をTrizol（Life Technologies）で溶解し、製造業者の指示に従ってRNAを抽出した。次にRNAをDNaseIで処理して、混入しているゲノムDNAを除去した。製造業者の指示に従い、SuperScript III First Strand Synthesis Kit（Life Technologies）を使用してRNAをcDNAに逆転写した。製造業者の指示に従い、TaqMan Gene Expression Ma

10

20

30

40

50

ster Mix (Applied Biosystems) および次のTaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を使用した: ACTB, Hs00357333_g1; CDK19, Hs01039931_m1; CDK8, Hs00993274_m1。データは7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で収集され、データはSDS2.4ソフトウェア (Applied Biosystems) で分析された。各試料の遺伝子発現データは、ベータアクチンの発現に対して正規化した。

【0148】

PDX腫瘍細胞の生着および限界希釈アッセイ:

PDX細胞の単一細胞懸濁液を、通常のマトリゲル (BD Biosciences) とフローサイトメトリー緩衝液の50% (v/v) 混合物に再懸濁し、総量を50~100 μ Lにした。インスリン注射器を用い、細胞を4番目の腹部脂肪体でメスのNSGマウスの乳頭に皮下注射した。限界希釈アッセイのため、マウスに注入された特定の数の細胞をフローサイトメトリーにより、および第二に血球計算盤で手動にてカウントして決定した。

10

【0149】

PDX腫瘍の増殖および総体重:

PDX腫瘍は触診により検出された。腫瘍容積は、長さ (l) と幅 (w) を測定し、楕円体の計算式 $1/6 \times l \times w^2 \times \pi$ を使用して容積を計算することによって決定した。腫瘍の容積およびマウスの体重は週に2回測定した。

【0150】

マウスPDX腫瘍および肺の解剖:

マウスを安楽死させた後、異種移植腫瘍およびマウス肺を外科的に切除した。各腫瘍から3~4mmの切片を切り取り、画像化のため氷冷PBSに保存した。マウスの肺および腫瘍をM205FA蛍光実体顕微鏡 (Leica) で画像化し、画像はDFC310FXカメラ (Leica) で記録した。

20

【0151】

RFPパーセンテージを決定するフローサイトメトリー:

フローサイトメトリーは、100 μ mノズルで、フローサイトメトリーAria II (BD Biosciences) とDivaソフトウェア (BD Biosciences) を使用して行った。データ分析は、Flowjoソフトウェア (Flowjo) を用いて行った。すべての実験で、側方散乱プロファイルおよび前方散乱プロファイル (面積および幅) を用いて、残屑および細胞ダブレット (debris and cell doublets) を排除した。死んだ細胞は、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) 陽性細胞 (分子プローブ) を除外することにより排除した。PDX腫瘍細胞については、GFP陽性、次にRFP陽性にゲートした (gated)。RFPパーセンテージは、RFP陽性でもあるGFP陽性細胞のパーセンテージである。各試料について、腫瘍のRFP%をベースラインRFP%で除したものであるRFP画分を取得する (「レンチウイルス感染」のセクションを参照)。次に、各試料のRFP画分を、100%に設定されたshRNA対照試料のRFP画分に正規化して、「正規化された%RFP」を取得する。

30

【0152】

分析およびセルソーティングのためにEpCAM、CD10、およびCD49f細胞表面マーカーを使用するフローサイトメトリー:

分析およびセルソーティングのためのフローサイトメトリーは、以前の記載に従って行った。使用したヒト抗体には以下が含まれていた: EpCAM-Alexa Fluor 488 (クローン9C4、Biolegend); 1 μ g mL⁻¹、CD49f-APC (クローンGoH3、Biolegend); CD10-PeCy7/Apc-Cy7 (クローンH110a、Biolegend); 1 μ g mL⁻¹およびH-2Kdビオチン/パシフィックブルー (クローンSF1-1.1、Biolegend); 1 μ g mL⁻¹。

40

【0153】

RNAiドロップアウト生存スクリーニング:

NSGマウスで増殖したGFP陽性PDX-T1腫瘍を切開し、単一細胞に加工し、前述のようにEpCAMで濃縮した。この時点での細胞の分析は、それらが約98%-100%のGFP陽性であることを示した。

【0154】

50

インビトロRNAiドロップアウト生存スクリーニングのため、6千万個の解離したPDX-T1細胞に、ポリプレンの存在下でMOIが1のDECIPHER 27KプールshRNAレンチウイルスライブラリー-ヒトモジュール1 (Cellecta) を形質導入し、その後前述のように2時間スピノキュレーションした。翌日、細胞の半分を遠心分離し、インビトロベースライン参照試料として凍結した。少数の細胞をオルガノイドコロニー形成条件で別途プレーティングして、72時間後にレンチウイルス感染率を決定した (細胞は約80% RFP陽性であることがわかった)。残りの細胞を、250,000細胞/mLマトリゲルの照射されたL1-Wnt3aフィーダー細胞を含む12mLのマトリゲルで調製した12の150 mmディッシュにプレーティングした。3~4日ごとに新鮮な培地と交換しながら、細胞を19日間増殖させた。最終日に、マトリゲルを溶解し、細胞を回収するために、すべての培地をディスパーゼと交換した。すべてのプレートからの細胞をプールし、洗浄し、インビトロオルガノイド増殖実験試料として凍結した。

10

【0155】

インビボRNAiドロップアウト生存スクリーニングのため、3千万個の解離したPDX-T1細胞に、ポリプレンの存在下でMOIが1.25のDECIPHER 27KプールshRNAレンチウイルスライブラリー-ヒトモジュール1 (Cellecta) を形質導入し、その後前述のように2時間スピノキュレーションした。翌日、細胞の半分を遠心分離し、インビボベースライン参照試料として凍結した。少数の細胞をオルガノイドコロニー形成条件で別途プレーティングして、72時間後にレンチウイルス感染率を決定した (細胞は約70% RFP陽性であることがわかった)。残りの細胞を、通常マトリゲル (BD Biosciences) とフローサイトメトリー緩衝液の50% (v/v) 混合物に総量1.8mLで再懸濁した。これらの細胞を17匹のNSGマウスの左右の乳房脂肪体に均等に注入した。腫瘍の直径が約10mmに達したらマウスを安楽死させ、前述のように腫瘍を切開した。次に、これらの腫瘍を単一細胞に処理し、プールし、洗浄し、インビボ増殖実験試料として凍結した。

20

【0156】

2組の試料、インビトロベースライン参照試料とインビトロオルガノイド増殖実験試料、インビボベースライン参照試料とインビボ増殖実験試料を、ゲノムDNA抽出、バーコード増幅、ハイスループット配列決定およびデコンボリューションのためにCellecta, Inc. に提出した。各試料で2千万バーコードの読み取りが実行された。

【0157】

インビボおよびインビトロRNAiドロップアウト生存スクリーニングからの「ヒット」選択アルゴリズム：

30

概要について図5Cの模式図を参照。本発明者らは、アルゴリズムを適用して、検証のためにヒットをより扱いやすい数に絞り込んだ。1) 個々のshRNAについて、「ドロップアウト比」を決定した。これは、増殖実験試料のshRNAバーコード数をベースライン参照試料のshRNAバーコード数で除したものであった。各スクリーニングにおいて、これらを最低から最高にランク付けした。2) 本発明者らは、各実験で最も低いドロップアウト率の上位5%を調べ、2shRNAによりターゲットした遺伝子を同定した。3) 本発明者らは、2つの実験間で重複した遺伝子を同定するために、インビボスクリーニングのshRNA遺伝子標的 (208遺伝子) をインビトロスクリーニングのshRNA遺伝子標的 (150遺伝子) と相互参照した。これらの46個の重複する「ヒット」遺伝子を図5Aに示す。

40

【0158】

PDX腫瘍の免疫蛍光：

PDX腫瘍の切片をホルマリンで一晩固定し、70%エタノールに移した。次に試料をパラフィンに包埋し、組織学用に切片を作成した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノール勾配で再水和した。電子レンジで20分間加熱することにより、抗原検索をTris-EDTA緩衝液で行った。一次抗体であるポリクローナルウサギ抗CDK19抗体 (Sigma) とポリクローナルニワトリ抗CDK8抗体 (Novus Biologicals) を、試料に一晩適用する前に、TBS+1% BSAでそれぞれ1:50と1:100に希釈した。一晩のインキュベーション後、二次抗体であるCy3ロバ抗ウサギ抗体 (Jackson ImmunoResearch

50

h) およびAlexa488ヤギ抗ニワトリ抗体 (Life Technologies) をTBS+1%BSAで1:500に希釈し、試料と室温でインキュベートした。DAPI染色後、ProLong^RGold退色防止剤 (antifade) (Cell Signaling) で切片をマウントした。Zeiss LSM710共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) を使用して、免疫蛍光画像を撮影した。出版用の画像はFijiソフトウェアで処理した。

【0159】

マイクロアレイ実験:

EpCAM濃縮PDX-T1細胞をshCDK19-2、shCDK8-2または対照shRNAに感染させ、オルガノイド培養条件で72時間培養した。その後、細胞をディパーゼでマトリゲルから回収し、フローサイトメトリー緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリーでソーティングしてGFPとRFPの両方が陽性の細胞を得た。製造業者の指示に従ってRNeasy plus micro kit (Qiagen) によってこれらの細胞からRNAを抽出し、Agilent 2100バイオアナライザーで定量化した。各試料からの50ngの全RNAを使用した。インビトロ転写、断片化、標識、マイクロアレイへのハイブリダイゼーション、およびスキャニングは、スタンフォードタンパク質および核酸施設 (PAN施設) によって行った。試料はPrimeView Human Gene Expression Arrays (Affymetrix) でハイブリダイズした。遺伝子レベルの差別的発現分析は、Transcriptome Analysis Console (Affymetrix) で行った。ダウンレギュレーションされた遺伝子は \log_2 (試料/対照) -1.5 の遺伝子として、アップレギュレーションされた遺伝子は \log_2 (試料/対照) 1.5 の遺伝子として定義した。

【0160】

H3K27Acクロマチン免疫沈降:

ChIPアッセイは、例えば、Zarnegarら、Nucleic Acids Research, gkx648, July, 2017の記載に従って行った。ChIP当たり約250,000~500,000個のMDA-MB231細胞を使用した。ChIP当たり1 μ gの抗H3K27ac (Active Motif #39133) を使用した。

【0161】

ライブラリー構築:

ChIP濃縮DNAは、Qubit3.0およびdsDNA HSアッセイを使用して定量化した。転位ベースのNEXTERA XTを使用し (製造業者のプロトコルに従い、インデックス作成のために~14PCRサイクルを使用)、最大1ngのDNAをライブラリー構築に使用した。インデックス付きの試料をプールし、NextSeq500でのシーケンシングのために送り、読み取り深度が~6千万リードの75bpシングルエンドリードを取得した。

【0162】

配列分析:

生の配列読み取りをGalaxy (usegalaxy.org) にアップロードし、Bowtie2 (-very-fast-local) を使用してヒトゲノム (hg19) にアラインメントした。一意にマッピングされた読み取りのみをさらなる分析のために保持した。データを視覚化するため、アラインメントファイルを使用してDeepToolsでシグナルトラックを生成し (100bpの瓶に200bpの読み取り拡張子およびRPKM正規化)、BigWigファイルをBroadの統合ゲノムブラウザーにロードした。MACS2を使用して、各複製のピーク (-nomodel、p=0.01、-broad、cutoff0.1、duplicates=auto、extension200) を呼び出した。Bedtoolsを使用して、すべての複製で生じるピークのみを含むコンセンサスピークリストを生成した。本発明者らは、DiffBindを使用してコンセンサスピーク全体の差別的ピーク分析を行った。UCSCからのヒトRefSeq表の最も近い重複しない特徴をフェッチすることにより、DiffBind出力ピークリストに注釈が付けられた。さまざまなピークセットにわたるChIPシグナルの集約プロットのデータは、DeepToolsのcomputeMatrix (スケール領域: 1000; 50bp瓶) およびplotProfileを使用して生成された。次に、GraphPad Prismソフトウェアを使用してデータをプロットした。

【0163】

GSEA解析:

遺伝子セットエンリッチメント解析 (GSEA) は、javaGSEAデスクトップアプリケーション

10

20

30

40

50

ョン (GSEA 3.0) を使用して実行され、ランキングメトリックとしてのCDK19ノックダウン対対照のlog₂倍数変化値、およびエンリッチメントのために試験された遺伝子セットとしてのHallmarks、CDK19KD-EnhancerUpおよびCDK19KD-EnhancerDOWNを使用した。

【0164】

Metascape分析：

CDK19KD-EnhancerUPの「コア」遺伝子とCDK19KD-EnhancerDOWNの「コア」遺伝子を使用した特徴遺伝子セットのMetascapeカスタムエンリッチメント分析 (次のパラメーターを使用：入力種としてのH. Sapiens、0.01のp値カットオフ、および最小エンリッチメント1.5) をオンライン (www.metascape.org) で行った。

10

【0165】

統計解析：

結果を平均値 ± 標準偏差として示す。統計計算は、GraphPad Prismソフトウェア (GraphPad Software Inc) を使用して行った。分散は、F検定を使用して分析した。P値を決定するため、t検定を同分散集団で行い、ウェルチ補正付きのt検定を異なる分散のサンプルに適用した。動物実験では、サンプルサイズは事前に指定された効果サイズを検出するのに十分な検出力を確保するために事前に決定されず、分析から除外された動物はなく、実験は無作為化されておらず、研究者は実験中のグループ割り当てを知らされていないかった。

【0166】

20

4.2：実施例2-TNBCの増殖に不可欠な遺伝子の同定

TNBCの増殖に不可欠な遺伝子を同定するため、TNBC PDXであるPDX-T1の5000遺伝子をターゲットとする27,500shRNAライブラリーを使用して、2つのプールされたRNAiドロップアウト生存スクリーニングを行った (図15)。スクリーニングは、インビトロでのオルガノイド培養として、およびインビボでのnod scidガンマ (NSG) マウスにおけるPDXとしての2つの異なるフォーマットで行われた (図1A)。各実験試料およびベースライン参照試料における個々のshRNAの存在量は、shRNAバーコードのハイスループットシーケンスによって決定された。目標は、shRNAによるノックダウンがさまざまな実験条件でPDX腫瘍細胞の増殖を阻害する遺伝子を特定することであった。他の腫瘍におけるスクリーニングと一致して、インビボスクリーニングは、インビトロスクリーニング (図5B) と比較して、より有意なshRNAドロップアウト率を有した (図5A)。図5Aおよび5Bは、ベースライン試料におけるshRNA数に対するインビボ増殖実験試料 (図5A) およびインビトロ増殖実験試料 (図5B) におけるshRNA数を示すグラフである。ルシフェラーゼを標的とする対照shRNA (薄い灰色のドット) とCDK19を標的とするshRNA (濃い灰色のドット) を強調表示してある。他のshRNAはすべて黒いドットで示してある (各実験は1回行った)。最終的な候補リストは、2つ以上のshRNAによってターゲットにされ、インビトロとインビボの両方で同定された、各スクリーニングで最低5%のshRNA比を持つ遺伝子に限定した (図5C)。これにより、46個の候補遺伝子が同定された (図5D)。

30

【0167】

40

癌ゲノムアトラス (TCGA) からのデータが他の乳癌サブタイプからの試料と比較してTNBC患者の試料でCDK19コピー数の増幅とmRNAのアップレギュレーションがより一般的である (23%) ことを示したため、CDK19を選択した (例えば、Cancer Genome Atlas Research, N.ら、The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. Nat Genet 45:1113-1120, 2013;FIG.6Aを参照)。さらに、高いCDK19発現は乳癌患者の再発のない生存率の低さと相関することが報告されている (例えば、Broudeら、Current cancer drug targets 15, 739-749, 2015およびPorterら、Proc Natl Acad Sci USA 109:13799-13804, 2012を参照)。CDK19は、細胞周期の進行よりもRNAポリメラーゼII (RNAPII) 転写の調節に関連すると言われているCDKファミリーのサブセットに属している。CDK19とそのパラログであるCDK8は、他の3つのタンパク質：MED12、MED1

50

3、およびサイクリンCと結合することにより、どちらもCDKモジュール（CKM）を形成できる。PDX細胞におけるCDK19の存在と核局在は、免疫蛍光法によって確認された（図6B）。図6Aおよび6Bにおいて、パーセンテージは、トリプルネガティブ、HER2ポジティブ、エストロゲン受容体ポジティブ、およびすべての乳癌における、CDK19コピー数増幅またはCDK19 mRNAアップレギュレーションを伴う試料のパーセンテージを示す。分数は、各グループの陽性試料と合計試料の数を示す。データはcBioPortalから得た（例えば、Gaoら、Sci Signal 6, pl1, 2013を参照）。

【0168】

4.3：実施例3-CDK19ノックダウンの増殖阻害効果

CDK19ノックダウンの増殖阻害効果を検証するために、3つの一般的に使用されるTNBC細胞株：MDA-MB231、MDA-MB468、およびHS578Tを使用した。独立してCDK19を標的とする2つの異なるshRNA（shCDK19-1（配列番号1）およびshCDK19-2（配列番号2））を使用して、CDK19のノックダウンを確認した（図7Aおよび7B）。図7Aおよび7Bの両方の図について、CDK19ノックダウン細胞におけるCDK19の相対発現は、対照shRNAを形質導入した細胞におけるCDK19の平均発現に対して正規化される。各条件での遺伝子発現は、ハウスキーピング遺伝子としてのベータアクチンに正規化される（**P 0.01; ****P 0.0001、平均±標準偏差、（図7Aおよび7B）n=3（図7C）n=2、実験は2回行った）。CDK19のノックダウンはまた、3つのすべてのTNBC細胞株において増殖の低下を引き起こすことも示した（図1B～1D）。図1B～1Dは、CDK19ノックダウンがTNBC細胞の生存を大幅に減少させたことを示している（MDA-MB231細胞の生存率、****P 0.0001（図1B）、MDA-MB468細胞、***P 0.001; ****P 0.0001（図1C）、またはHS578T細胞、*P 0.05; ****P 0.0001（図1D）；対照shRNAまたはCDK19標的shRNA（shCDK19-1、shCDK19-2）での形質導入の4日後に評価）。図1B～1Dのすべての値は、対照shRNA試料に正規化された（平均±標準偏差、n=3、実験は2回行われ、P値は対応のないt検定によって決定された）。

【0169】

最初のドロップアウトスクリーニング（PDX-T1）で使用したのと同じTNBC PDXにおいて、CDK19ノックダウン（図7C）はまたオルガノイドコロニーの形成を阻害した（図1E）。図1Eにおいて、対照shRNAまたはCDK19標的shRNA（shCDK19-1、shCDK19-2）のいずれかによる形質導入の2週間後にコロニーをカウントした、***P 0.001（対応のないt検定）（平均±標準偏差、n=6、実験は2回行った）。非形質転換乳腺細胞におけるCDK19ノックダウンの効果を決定するため、ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）にCDK19を標的とするshRNAを感染させた。HMECでは、2つのCDK19ノックダウンのどちらも細胞の生存率に影響を与えなかった（図1F）。図1Fにおいて、HMEC細胞の生存率を、対照shRNAまたはCDK19を標的とするshRNA（shCDK19-1、shCDK19-2）による形質導入の4日後に評価した。すべての値は対照shRNA試料に正規化され、nsはP 0.05である（平均±標準偏差、n=6、実験は2回行い、対応のないt検定によってP値を決定した）。まとめると、本研究は、インビトロでCDK19ノックダウンにより複数のTNBC細胞株の増殖とPDXオルガノイドコロニーの形成が阻害されるが、非形質転換乳腺上皮細胞の増殖には悪影響がないことを示す。

【0170】

本発明者らは、NSGマウスで増殖させた3つの異なるTNBC PDXでCDK19をノックダウンすることにより、より生理学的に適切なインビボシステムに研究を拡張した。これらのPDX：PDX-T1、PDX-T2、およびPDX-T3は、化学療法を受けていない患者から得られた（図15）。これらの研究では、すべてのPDX腫瘍細胞を最初に緑色蛍光タンパク質（GFP）で標識し、その後CDK19 shRNAまたは対照shRNAのいずれかに感染した細胞を赤色蛍光タンパク質（RFP）でさらに標識した。RFP陽性でもあるGFP標識腫瘍細胞の割合を測定することで、shRNAがPDX腫瘍細胞に及ぼす影響を判断できた。試験した2つのCDK19 shRNAのそれぞれで、CDK19ノックダウンにより、3つすべてのTNBC PDXからの腫瘍のRFP陽性細胞のパーセンテージが大幅に減少した（図1G～1Iおよび図1M）。

腫瘍の増殖をモニターし、腫瘍が17mmを超えたときに腫瘍を分析した。PDX-T1におけるRFP陽性細胞の割合 $^{***}P = 0.001$; $^{****}P = 0.0001$ (図1 G)、PDX-T2における割合、 $^{****}P = 0.0001$ (図1 H)、PDX-T3における割合、 $^{**}P = 0.01$ (図1 I)、またはPDX-T4における割合、 $^{**}P = 0.01$ (図1 J)はフローサイトメトリーによって決定され、100%に設定された対照shRNA試料の平均RFPパーセンテージに正規化された。各データポイントは1匹のマウスを表す。図1 Hおよび1 Iについては、平均 \pm 標準偏差、 $n=9$ 、実験は3回行った。図1 Iおよび1 Jについては、平均 \pm 標準偏差、 $n=3$ 、実験は1回行った。すべてについて、P値は対応のないt検定によって決定した)。

【0171】

図1 Mは、対照shRNA (上段)、shCDK19-1 (中段)、またはshCDK19-2 (下段)で形質導入されたPDX-T1腫瘍の代表的な画像を示す。明視野画像 (左の列) は肉眼的腫瘍の形態を示し、FITC画像 (中央の列) はGFPで標識された腫瘍細胞を示し、Texas-Red画像 (右の列) はRFPで標識されたshRNA形質導入細胞を示す。

【0172】

これらの結果は、CDK19がインビボでの腫瘍増殖に重要であることを確認した。CDK19ノックダウンは、形質導入された (RFP陽性) TNBC細胞がマウスにおいて肺に転移するのを防いだ。PDX-T1 (図1 K) またはPDX-T4 (図1 L) 腫瘍異種移植片を有するマウスからのRFP陽性肺転移を有するマウスのパーセンテージを示す。RFP陽性の肺転移を有するマウスの数および各治療群のマウスの総数は、各状態の割合として示されている。PDX腫瘍細胞を、対照shRNAまたはCDK19を標的とするshRNA (shCDK19-1、shCDK19-2) のいずれかで形質導入した (図1 Kについては、 $n=9$ 、実験は3回行った; 図1 Iについては、 $n=3$ 、実験は1回行った)。さらに、通常は肺に転移するPDX-T1では、CDK19ノックダウンにより、これら細胞による肺転移の検出が排除された (図1 Kおよび図1 N)。図1 Nにおいて、明視野画像 (左の列) は全体的な肺の形態を示し、FITC画像 (中央の列) はGFPで標識された転移性腫瘍細胞を識別し、Texas-Red画像 (右の列) はRFPで標識されたshRNA形質導入転移細胞を示す。本発明者らはまた、化学療法抵抗性の炎症性乳癌患者の脳転移から得られる悪性のPDXであるPDX-T4に対するCDK19ノックダウンの効果も試験した。炎症性乳癌は悪性であり、治療が困難であり、予後が極めて悪いことが知られているため、CDK19ノックダウンがこれらのマウスにおいてPDXの増殖 (図1 J) と肺転移の両方を阻害したことは注目に値する (図1 Lおよび図7 D)。これらのデータは、インビボでCDK19ノックダウンが原発腫瘍の増殖に影響を与えただけでなく、腫瘍転移も阻害したことを示している。

【0173】

4.4: 実施例4-TNBC PDX内の腫瘍開始細胞 (TIC) の同定

CDK19ノックダウンが、発癌性を評価するために一般的に使用される2つの独立したアッセイ (インビボでのPDX増殖とインビトロでのオルガノイドコロニー形成) で増殖を阻害し、腫瘍の開始に重要な遺伝子がしばしば癌のサブセットで増幅または過剰発現されるとすると、腫瘍開始細胞 (TIC) はCDK19阻害に感受性があると仮定される。それゆえ、本発明者らは、TNBC PDX内のTICを同定しようとした。以前は、正常な乳房組織内および乳癌内の細胞亜集団を分離するのにEpCAMとCD49fが使用された。しかしながら、多くのTNBC PDXでは、EpCAMおよびCD49fはしばしば細胞を明確に別個の亜集団に分離することができない (図2 A、左)。したがって、本発明者らは、基底細胞マーカーであるCD10とEpCAMを併用して、乳癌PDXをFACSでソートした。本発明者らは、CD10およびEpCAMがPDX細胞を3つの異なる亜集団、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}、EPCAM^{low/med}/CD10^{low/+}、およびEpCAM⁻/CD10⁻に分離できることを発見した (図2 A、右)。図2 Aにおいて、EpCAMとCD49fを使用して見られる大きな分離できない細胞集団 (左) は、EpCAMとCD10を使用して3つの異なる亜集団になる (右): EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low} (ゲート (1))、EPCAM^{low/med}/CD10^{low/+} (ゲート (2)) およびEpCAM⁻/CD10⁻ (ゲート (3))。EpCAMおよびCD49fを使用したこれらの3つの亜集団の重複も示す (図8 A)。

10

20

30

40

50

【0174】

EpCAM/CD10で分離された3つの亜集団の腫瘍開始能力を試験するため、本発明者らは、インピトロでオルガノイドコロニー形成アッセイを行い、インピボで移植限界希釈アッセイ(LDA)を行った。オルガノイドコロニー形成アッセイでは、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞は、EpCAM^{low/med}/CD10^{low/+}細胞よりも有意に多くのオルガノイドコロニーを形成した(図2B)。図2Bにおいて、EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞は、EpCAM^{low/med}/CD10^{low/+}細胞よりも有意に多くのオルガノイドコロニーを形成した、*P 0.05(対応のないt検定)(平均±標準偏差、n=3、実験は2回行った)。NSGマウスで行われた移植アッセイでは、6つのすべてのPDXからのEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞の注入により、時にはわずか100細胞(PDX-T1およびPDX-T2)の移植で、一貫して腫瘍が形成された(図2C)。対照的に、EpCAM^{low/med}/CD10^{low/+}細胞の移植は、2つのPDX(PDX-T1およびPDX-T2)でのみ、および多数の細胞(すなわち2500細胞)を移植した場合にのみ、腫瘍を形成した(図2C)。さらに、あらゆるPDXからのEpCAM⁻/CD10⁻細胞の移植からは腫瘍は形成されなかった。したがって、TICは、本発明者らが調査したすべてのPDX乳房腫瘍のEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}亜集団で富んでいる。

10

【0175】

これらの異なる亜集団を同定したら、次に、本発明者らは、CDK19の発現が腫瘍形成性の低いEpCAM^{low/med}/CD10^{low/+}細胞と比較して腫瘍形成性の高いEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞で濃縮されるかどうかを調べた。調べた4つのPDXのうち3つにおいて、CDK19の発現は、腫瘍形成性の低いEpCAM^{low/med}/CD10^{low/+}細胞と比較して、腫瘍形成性の高いEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞で高かった(図2D~2G)。図2D~2Gのデータを生成するため、EpCAM^{low/med}/CD10^{low/+}細胞およびEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}細胞でのCDK19の相対発現をRT-qPCRで測定した。各条件での遺伝子発現は、ハウスキーピング遺伝子としてのベータアクチンに正規化されている。CDK19の相対発現は、EpCAM^{low/med}/CD10^{low/+}細胞におけるCDK19の平均発現に正規化される。*P 0.05(対応のないt検定)(PDX-T1:平均±標準偏差、n=2;PDX-T2:平均±標準偏差、n=6(EpCAM^{low/med}/CD10^{low/+})およびn=3(EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low});PDX-T3:平均±標準偏差、n=6(EpCAM^{low/med}/CD10^{low/+})およびn=3(EpCAM^{med/high}/CD10^{-/low});PDX-T8:平均±標準偏差、n=3。すべての実験は少なくとも2回行った)。したがって、CDK19は本発明者らが調べたすべてのPDX腫瘍で発現されたが、本発明者らが調べた4つの腫瘍のうち3つにおいて、より腫瘍形成性の高いEpCAM^{med/high}/CD10^{-/low}亜集団で高レベルで発現された。

20

30

【0176】

CDK19ノックダウンの設定における腫瘍開始頻度を決定するため、本発明者らは、ドキシサイクリン誘導性CDK19ノックダウン構築物で形質導入したPDX-T1細胞を使用してLDAを行い、CDK19発現を制御できるinducCDK19KD-PDX-T1細胞を生成した(図8B)。図8Bにおいて、ドキシサイクリン処理されたinducCDK19KD-PDX-T1細胞におけるCDK19の相対発現は、対照inducCDK19KD-PDX-T1細胞におけるCDK19の平均発現に対して正規化される。各条件での遺伝子発現は、ハウスキーピング遺伝子としてのベータアクチンに正規化される(*P 0.05、平均±標準偏差、n=2、実験は2回行った)。ドキシサイクリン(+Dox)の存在下でのinducCDK19KD-PDX-T1細胞のインピボ移植を、ドキシサイクリンなし(No Dox)のinducCDK19KD-PDX-T1細胞と比較することにより、本発明者らは、CDK19ノックダウンにより、調べたすべての細胞移植条件で腫瘍形成が排除されることを見出した(図8C)。inducCDK19KD-PDX-T1細胞をNSGマウスの乳房脂肪体に50、250、1250細胞で注入した。ドキシサイクリン群のマウスには、CDK19 shRNAを誘導するためのドキシサイクリン含有の齧歯類餌を与え、一方、対照群のマウスには通常の齧歯類餌を与えた。腫瘍は、腫瘍の触診により検出した。形成された腫瘍の数および実施された注射の数を各集団について示す。腫瘍が形成された集団および注射は、図8Cにおいて太字で示してある(n=5/群)。ELDAを使用して、本発明者らは、腫瘍開始頻度が対照(No Dox)群における342細胞に1つ(95%CI:828に1つから142に1つ

40

50

）からCDK19ノックダウン（+Dox）群における細胞に1つ（95%CI： に1つから2587に1つ）に有意に減少することを見出した（図8D）。CDK19ノックダウンによって引き起こされる腫瘍開始頻度の有意な減少と、TIC亜集団におけるCDK19のより高い発現との両方は、TIC阻害が、CDK19ノックダウンで観察される腫瘍増殖の障害の原因である可能性が高いことを示唆している。

【0177】

4.5：実施例5-CDK19によって制御される遺伝子および経路の同定

CDK19とそのよく説明されているパラログであるCDK8との間には84%のアミノ酸配列相同性がある（図9）。CDK8は、結腸癌、急性骨髄性白血病、および黒色腫などのさまざまな悪性腫瘍に役割を果たすことが示されている。CDK8の高発現は、結腸癌の予後不良と関連している（Firesteinら、Nature 455:547-551, 2008）。胚性幹細胞におけるCDK8ノックアウトは、多能性幹細胞の表現型におけるその本質的な役割により、胚発生を防止することが示された（Porterら、Proc Natl Acad Sci USA, 109:13799-13804, 2012）。CDK8の既知の癌関連の活性には、Wnt/ β -カテニン経路の正の調節、成長因子誘導転写、およびTGF β シグナル伝達が含まれる。状況に応じて、CDK8は転写を負または正に制御することも示されている。しかしながら、最近の証拠は、CDK19がCDK8とは異なって機能することが示唆されている。CDK19とCDK8とが他のCKM成員への結合に相互に排他的に関与することをインビトロ研究が示したのに対し、子宮頸癌および結腸癌の細胞株での遺伝子ノックダウン研究は、CDK19とCDK8とが異なる遺伝子を制御することを示した。本発明者らの目標は、TNBCにおいて、CDK19またはCDK8の標的ノックダウンから生じる包括的な遺伝子発現の変化を調べることであり、CDK19およびCDK8が異なる生物学的機能を持っているかどうかを調べることであった。

【0178】

TNBCにおいてCDK19の分子標的がCDK8とは異なるかどうかを理解するため、本発明者らは、MDA-MB231の各遺伝子をノックダウンし、対照に対する各遺伝子発現の変化を調べた。全体として、CDK19ノックダウンは3909遺伝子に影響を与え、CDK8ノックダウンは4233遺伝子に影響を与えた（図3A）。しかしながら、CDK19ノックダウン実験では、アップレギュレーションされた遺伝子の12%とダウンレギュレーションされた遺伝子の5%のみが、CDK8ノックダウンの影響も受けた。このことは、CDK19およびCDK8が異なる遺伝子を主に制御していることを示唆した（図3A）。

【0179】

CDK19およびCDK8ノックダウン遺伝子の遺伝子セットエンリッチメント解析（GSEA）により、最もアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされた遺伝子の中で濃縮された特徴遺伝子セットを同定することができた（図3Bおよび図10）。図10において、CDK19またはCDK8のノックダウンで独自に濃縮された特徴遺伝子セットは黒で示され、CDK19とCDK8の両方のノックダウンで濃縮されたものは「*」でマークされ、CDK19とCDK8のノックダウン間で反対方向に発現する遺伝子によって濃縮されたものは「**」でマークされている。正規化されたエンリッチメントスコアおよびFDRq値は、GSEAソフトウェアによって決定される。0.25のFDRカットオフを使用して、重要な特徴を選択した。これらの特徴遺伝子セットは、特定の生物学的状態または経路に特に関与する遺伝子で構成されている。有糸分裂（E2F標的、G2Mチェックポイント、有糸分裂紡錘体）、PI3K-AKT-MTORシグナル伝達、MYC経路（Myc標的v1）、解糖、アポトーシス、および酸化的リン酸化などの既知の乳癌関連の特徴に関連する遺伝子が、CDK19およびCDK8ノックダウンによって同じ方向に変化し（図3B、中央重複領域）、CDK19とCDK8との間の共制御関係を示す。さらに、早期のエストロゲン応答、上皮から間葉への移行（EMT）、コレステロールのホメオスタシス、MYC経路（Myc標的v2）、インターフェロン 応答、および脂肪酸代謝に関連する遺伝子は、CDK19によるノックダウンに反応して、CDK8と比べて反対方向に変化した（図3B、囲み）、これはCDK19とCDK8との間に逆制御関係が存在することを示唆している。CDK8ノックダウンと比較してCDK19ノックダウンにより反対方向に遺伝子発現によって濃縮された特徴遺伝子セットは、囲んで

ある。多くの特徴遺伝子セットは、CDK19ノックダウンのために独自に変化した遺伝子のみが濃縮されていた（図3B、左側の領域）。これらの遺伝子セットによって反映される特徴には、P53シグナル伝達、KRASシグナル伝達、アンドロゲン応答、NOTCHシグナル伝達、TGFベータシグナル伝達、およびIL6-JAK-STAT3シグナル伝達が含まれ、これらはTNBCの標的療法の潜在的な生物学的経路である。これらの生物学的経路はすべて、TNBCの標的療法の評価における臨床調査の活発な分野を表している。本発明者らの知見と一致して、コレステロールのホメオスタシス、P53シグナル伝達、有糸分裂、NF B経路など、本発明者らのCDK19ノックダウン実験で富んでいると見出された多くの経路は、以前に他の細胞型でもCDK19によって制御されることが示されている。

【0180】

10

要約すると、これらの分析は、CDK19とCDK8とが特定の経路を共制御する一方で、他の経路を逆制御する可能性があることを示した。さらに、CDK19は、CDK8と同様、生物学的経路を正または負に制御することができる。CDK19によって規制される臨床的に関連のあるTNBC経路が多数あることは、CDK19をターゲットにすると、同時に複数の経路を調節する機会を提供でき、それと同時にCDK19の有利な限定された組織分布のために潜在的な毒性を回避できることを示唆している。このアプローチは、TNBCで一般的に見られる単剤療法への抵抗を克服し、P53やMYCが関与するような「ドラッグできない（undruggable）」プロセスのターゲティングを可能にするであろう。

【0181】

4.6：実施例6-CDK19およびCDK8がエピジェネティックな変更に及ぼす影響

20

最近の研究では、ヒストン3リジン27アセチル化（H3K27Ac）でマークされる、エンハンサー（「スーパーエンハンサー」とも呼ばれる）の大きなクラスターで作用することにより重要な発癌性遺伝子の転写を調節する上で、CDK19とCDK8、およびその他の転写CDK（CDK7、CDK12/CDK13）の役割が強調されている。この遺伝子調節の正確なメカニズムは不明であるが、一部は、RNAPII-メディエーター相互作用を調節するメディエーターとのCKMの相互作用を介して、および一部は、RNAPIIのC末端ドメインのセリン残基をリン酸化することによって生じると考えられている。エンハンサーで機能する転写CDKの傾向を考慮して、本発明者らは、CDK19およびCDK8が、遺伝子発現を制御するメカニズムとしてエンハンサー部位でのエピジェネティックな修飾を調節できるかどうかを調べたいと考えた。他のシグナル伝達経路を介したエンハンサー修飾は同定されているが、この遺伝子制御のメカニズムはCDKについては未だ報告されていない。

30

【0182】

エピジェネティック制御におけるCDK19の役割を調べるため、H3K27Ac修飾に対するクロマチン免疫沈降およびシーケンシング（CHIP-Seq）を3つの異なる条件下でMDA-MB231細胞に対して行った：対照（空のベクター形質導入）、CDK19ノックダウン、およびCDK8ノックダウン。すべてのH3K27Ac修飾領域のゲノム全体の分析は、CDK19ノックダウンとCDK8ノックダウンの両方が、対照と比較して同様の全体的なH3K27Acレベルを持つことを示した（図11）。図11において、識別されたすべてのH3K27Acピーク領域にわたるH3K27Ac CHIP-Seqシグナルは1-Kbに正規化され、それらの領域の中央に集中している。隣接する2Kb領域のシグナルも示してある。相対的なシグナルの変化を比較するため、各領域の中心の周りにある各50ベースのウィンドウ1-Kbのシグナルを合計することにより、各生物学的複製の合計シグナルを決定した。各試料の合計CHIP-Seqシグナル間のP値は、対応のないt検定によって決定した。対照と比較したCDK19ノックダウンにおけるH3K27Acレベルの比較分析により、本発明者らは、H3K27Acシグナルが増加した3034のピーク領域（All-H3K27UP）とH3K27Acシグナルが減少した502のピーク領域（All-H3K27DOWN）を同定した。対照と比較してCDK8ノックダウンでも異なるピーク領域を除外することにより、本発明者らは、CDK19ノックダウンに固有の、H3K27Acシグナルが増加した2309のピーク領域（CDK19KD-H3K27UP）とH3K27Acシグナルが減少した432の領域（CDK19KD-H3K27DOWN）を同定した。CDK19に対するこれらの領域の特異性は、CDK19ノックダウン、CDK8ノックダウン、および対照におけるこれ

40

50

らの領域でのH3K27Acレベルを比較することによって調べた。対照と比較して、CDK19KD-H3K27UP領域全体のH3K27Acレベルのエンリッチメント（図3C）およびCDK19KD-H3K27DOWN領域全体のH3K27Acレベルの減少（図3D）は、CDK19ノックダウンでのみ有意であり、CDK8ノックダウンでは有意ではなかった。図3Cおよび3Dにおいて、***P 0.001；nsはP 0.05である（すべての試料n=3、実験は3回行った）。CDK19KD-H3K27AcUPまたはCDK19KD-H3K27AcDOWN領域のH3K27Ac CHIP-Seqシグナルは、1-Kbに正規化され、これらの領域の中央に集中している。隣接する2Kb領域のシグナルも示してある。相対的なシグナルの変化を比較するため、各領域の中心の周りにある各50ベースのウィンドウ1-Kbのシグナルを合計することにより、各生物学的複製の合計シグナルを決定した。各試料の合計CHIP-Seqシグナル間のP値は、対応のないt検定によって決定した。したがって、CDK19KD-H3K27UPおよびCDK19KD-H3K27DOWNは、H3K27AcシグナルがCDK8のノックダウンと比較してCDK19のノックダウンに対してより特異的で最も感受性のピーク領域を定める。

【0183】

本発明者らは、次に、CDK19ノックダウンの結果としてのH3K27Acレベルの増加または減少が遺伝子出力の変化に対応するかどうかを評価した。このため、以前に定義されたAll-H3K27UPおよびAll-H3K27DOWNピーク領域に、最も近い遺伝子への近接性によって注釈を付け、さらなる分析のため2つの遺伝子セット：CDK19KD-EnhancerUP（1593遺伝子）およびCDK19KD-EnhancerDOWN（341遺伝子）を確立した（表1および表2）。これらの遺伝子セットと本発明者らのCDK19ノックダウン遺伝子発現データのGSEAは、CDK19ノックダウンによって最もアップレギュレーションされた遺伝子は、CDK19KD-EnhancerUP遺伝子（NES1.68、FDR q値=0.000）（図3E）に富んでいるのに対し、CDK19ノックダウンによって最もダウンレギュレーションされた遺伝子は、CDK19KD-EnhancerDOWN遺伝子（NES-1.84、FDR q値=0.000）に富んでいる（図3F）ことを示した。したがって、CDK19ノックダウンの結果として、遺伝子の推定エンハンサー要素でのH3K27Acシグナルへの摂動は、遺伝子発現の変化とよく相関し、予想される方向にあった。

【0184】

表1：

10

20

30

40

50

CHIPSEQ CDK19-KD ENHANCERDOWN							
NDRG3	TTLL11	CYB561	KAZN	PPM1A	SLC25A32	GRAMD4	S100Z
SNRK	YWHAZ	FAM168A	KIAA1524	CDH4	PAQR5	KCNK12	NSMAF
RNF169	SLC35F3	HDAC8	KCNAB1	CDKAL1	ZFYVE9	AK7	DDX31
WDHD1	RNF144B	DGKB	FKTN	C6orf203	EPB41L2	RUNX2	CXCL8
PLXNA4	TOX2	XPO6	PGM2	TRIM60	PKP2	TWSG1	RGCC
AZU1	NORAD	ARFIP1	SSH2	ALKBH8	TMBIM4	IPO5	TTC39C
KITLG	C11orf87	SCN5A	ZCCHC24	FBXO11	RAI14	ABCA8	PRNP
OC90	STX8	LOC341056	MAGT1	FOS	LPA	OPHN1	FGF9
MPP4	IQCJ	RPL7L1	ZFAT	ABCA13	CSGALNACT2	KIAA0586	RNF114
TOX	G6PC2	BACH2	RGBM	C1QTNF3	MOK	MED27	WWC1
SPRED1	C11orf63	C12orf75	HRH1	NTNG1	GGCX	ADCK2	PDE7B
UBASH3B	ZNF281	LOC100506797	SLC04A1-AS1	WDR27	RBM5	AKR1B15	ENKUR
CACNA1A	WDR89	SLIT2	SHTN1	ALK	TLE1	FAM107B	ELOVL5
FZD8	CSTF2	XRRA1	ARSF	STX18	KIF3C	SLC25A12	HIVEP1
SATB2-AS1	SNX14	IDNK	OXCT1	ZNF133	TAPT1	STK38	STRA8
TMEM18	UTP18	VAPA	CCR1	SPPL3	MBP	ASAP3	SEMA4D
TBL1X	SMYD3	ITGB1BP1	CRTAM	MDM1	TRHR	FAF1	STK4
SMIM19	DNAJA3	PDE8B	TSNARE1	KCNV1	AVEN	FAM20B	CDH13
KIAA1109	KHDC1	DAP	HIPK3	OR10V1	VTI1A	FIP1L1	AKAP1
C20orf85	PPP4R1L	IL10	PIK3CB	ALG10B	ATAD1	ZBTB10	TNRC6A
COMMD2	MLEC	NCK2	FAM171A1	SGPL1	NFATC1	GRB10	NECAB1
AMOTL1	RHOH	HDAC9	PDE4B	RFX8	NR2F1-AS1	RNF34	TMSB10
KYNU	TMEM235	SLC26A8	SIK3	CHI3L2	PPP3CA	HESX1	CORIN
ARHGAP18	SYAP1	OLIG2	THG1L	MAST2	PPA2	BTBD9	GPR68
EPB41L1	OLFML2A	CFAP36	KLHL5	PRDM5	COMMD7	CEP112	SVIL
C1orf21	PUM2	ST3GAL6	MTCL1	RPAP2	ATG5	PLEKHM3	EDEM3
SAP18	PANX1	MAB21L2	PTPN20	DSCR9	SIPA1L1	SUMF1	CDK5RAP2
UBR5	GBF1	UBE3A	INHBC	EPS15L1	CD226	TCF7	TGFBR2
HTR7	BCAP29	PRLR	USP43	ATP6AP1L	RPS6KA5	EXOSC7	RAB10
KCNG1	CPD	KIAA1147	RPS3A	CCDC152	ATF7IP	CCDC88A	CASS4
ADM2	GTF2H5	FER1L6	DDR2	PARD3	PREP	RPL5	C1GALT1C1
GJD4	WWP2	SVIP	FZD4	BPGM	ARMC9	ERICH6B	MAP1B
TCP11	PLS3	NT5DC3	CBLN1	C5orf42	LIN7A	FIBP	TSEN2
CSNK2A1	UBE2V2	CMTM8	ARHGAP25	KAT7	BLCAP	IFI44	TMEM38B

10

20

30

40

【 0 1 8 5 】

EDNRA	LOC285696	GOLIM4	NEK1	C3orf67	PRDM8	TBXAS1	SND1
ANAPC10	TSPAN9	ARC	ETV1	CTDSPL	NDRG1	WWTR1	WASF2
ADH7	NNT	SLC46A3	CTNND2	MBD2	HYPM	RNF217	CHST11
CLDN2	STAG2	INTS6	ZMIZ2	CHSY3	MRPS28	CBFA2T2	BTD
CEP290	RIN2	COX7A2L	TMEM30B	WASF3	APCDD1L	PARP12	FAM46C
TCF12	FKBP1A	ARFGAP2	PUDP	LDHD	ADGRL3	TMEM50A	TRDMT1
TSEN15	BAZ2A	TANC1	NANS	TAOK1	MAPK8	PPP4R3B	FAM196A
OAT	AGA	DNAH6	ARHGEF4	PSMC4	ANTXR2	BASP1	TPTE2P1
OR2AT4	MMAB	DENND2D	C7orf73	ST18			

10

【 0 1 8 6 】

表 2 :

CHIPSEQ CDK19-KD ENHANCERUP							
HLCS	EFCAB13	FBXL20	AGR2	ABCC11	MFSB7	RIC8B	KCNT2
IGF1	SLC12A8	AZIN1	LYSMD4	AVIL	ATP2B4	ASS1	MARCKSL1
CDYL	CRABP2	ERCC8	OSR2	CASQ2	ACTL7B	TNFRSF11A	NAV2
LHFPL2	TEX35	SLC22A16	LUM	PRKCZ	RDH16	ERICH2	STPG2
HGC6.3	PTPRE	GPCPD1	BEGAIN	BEST3	ABCG1	ZFPM2	SOWAHC
MYL4	TCF7L2	HAS2	IGSF22	BDKRB1	MYL12A	DNAJB11	LOC100506797
NNAT	SCAF8	LOC100268168	PPP1R36	CDC42EP5	EDN1	SP4	SOWAHC
NEURL1	TSC1	MIS18A	RALGPS1	SH3BP4	C15orf53	GJA4	FOPNL
RPIA	STOM	VEGFA	AHDC1	DBX1	PHACTR1	ALDH1A3	DACT1
SLC1A2	SRPX2	PLXNA2	TBC1D14	RAD23B	MAP1A	ECHDC3	GLI2
IQSEC1	ANKRD16	CHAT	MAGEF1	NOL6	SUB1	RFK	CHRENE
DENND3	NEK6	S1PR1	C12orf76	DIEXF	DHRS9	ERICH5	SCCPDH
TAF1B	XPR1	RYBP	ANP32C	MCHR1	DLX4	OSBPL11	ARHGAP12
FGD2	SNTG1	PTGER4	AGMO	PTRHD1	FANCA	AES	KRBA2
ZC3HC1	TRIM24	HMMB1	IRF2BP2	INPP5F	CACNG2	HHLA3	CFI
TTLL5	ACBD3	PLB1	EDIL3	IGFN1	TROAP	HAUS8	NOV
HPSE2	YARS	PROC	LEPROTL1	EFHD1	GALNT12	KANK4	JAK3
TMEM170B	DCLK1	PTPRN	SPATA16	CCDC97	ZNF787	TPRG1	DAPK3
KIF25	LMCD1	AADACL4	RFXAP	ALOX5AP	BIRC7	GBA3	C1R
TMPRSS5	TMEM100	ORIM1	ENO2	PTPN3	FAM196B	CLEC14A	TSPAN1
NPC1L1	TBL1X	PTPRR	LOC100130872	FAM136A	HSPH1	STK17B	GSTA3
ACKR3	OPTC	CREB5	PHTF2	SMIM20	SPRED2	SHE	AGAP1
CTAGE1	KIF16B	TRAF4	FAM57A	KIAA1211L	CORO6	SPNS2	MAOB
SOAT1	TRIB1	KCTD4	CELF2	TWIST2	C19orf38	TMEM40	THEM4
GSX2	ADAT2	USF2	NRP2	NSUN7	SEMA3E	ZNF462	SUGCT
BCAT1	CSNK1A1	RAD51AP2	FFAR4	NINJ1	SHH	SPIB	PSAT1
CLDN1	ERGIC1	SLC15A1	KISS1	C11orf49	NAT2	HECW1	EXOC6B
KLHL31	YAE1D1	PIM3	DGKZ	MEF2A	USB1	CAB39L	PCSK1N
MAST2	STON2	HIP1R	ELF3	C4orf26	ZNF429	DISC2	CENPB
MTCH1	PALLD	GLRA3	ZSWIM3	NMBR	C14orf37	GPR108	GSTP1

20

30

40

50

【 0 1 8 7 】

ATP1A2	RBM47	SORBS3	RAB14	RPS29	ACVR2A	C11orf94	DAW1
THADA	CKAP4	SF3B5	ANO6	BTBD16	XRCC2	OTOS	EMX1
EPS8L3	PTK2	ZNF318	RTN2	CAMK2D	MRPL4	VGLL3	LMNTD2
CAB39	PAPSS2	TRIML1	ZSCAN18	HCAR1	RPS3A	FAM81A	FIZ1
NEK2	EHF	NEDD4L	SYT2	LEPROT	MAP7D3	PRTFDC1	SEC14L5
HYI	SLC44A1	BAG1	GFI1	MFS4B	GCG	PPEF1	LAMB4
NANOS1	YWHAEP7	ATG9B	GCNT3	ATXN1	LIMD1	P2RY1	TMEM120B
SLC37A1	GRHL3	OTUD3	VWA2	IGFL1	P2RX7	TLR10	KIAA1324
MAPK8IP1	SLC2A8	RHOB	CAMSAP2	TMEM95	FAT1	TFAM	APIP
PPM1L	ETS2	KPNA7	HRK	ACOT11	RGS7	TMEM106B	CERS4
NXPH2	SLC30A6	RREB1	EML5	WFIKK2	PAK1	FJX1	HMGCR
RCAN1	GUCY1A2	LAMC3	RBFOX2	BMP6	DSG3	PITPNM3	ISL1
PACSIN2	TSN	BCOR	HES1	NIPBL	STAT4	CDH3	PSG2
SLC39A10	XIRP1	NAB1	DYNC2H1	TMEM51-AS1	ARRB2	CCL20	MINK1
MRPL15	LY86	PLEKHA1	METTL6	LRRRC8D	SPR	SCRT2	RALA
MAPK1IP1L	EGLN3	CRISPLD2	PAPLN	MOAP1	COL24A1	MYO5C	SLC28A3
MAP3K7CL	RB1CC1	SERPINB10	TPD52L1	PPARA	MZT1	ATP8B2	RASSF6
PIGU	ADTRP	CYP1B1	LRRFIP2	NLN	ZC3HAV1L	NECTIN1	CELA2A
SYT14	CDCA4	FBX03	ASCC3	SH2B2	C3orf58	ENOX2	PLEKHG4
DAAM1	TINAGL1	YIPF6	GPRI35	ZNF160	ANXA1	ERCC3	SLC39A11
CDKN3	CBX4	RALGDS	TUBA1A	PMAIP1	MN1	ADAMTS10	FGFR3
EPAS1	ZCCHC10	LRRRC4C	DUSP18	CXCR5	CRABP1	MAST3	ABLIM2
INO80C	TLR2	AKAP10	RASAL2	NR4A1	PNOC	SCN3A	NOCT
DDC	TACC2	IFNLR1	COL4A5	FOXQ1	DSG2	PPFIBP2	MAD2L1
FILIP1L	ASH2L	TJP3	NID2	DAOA-AS1	CAPZA2	RMND5A	SLC8A2
STC1	DDX47	RXFP3	COL6A3	PDE8A	RGS1	TMEM119	MXRA5
KCTD16	WDFY3	EMILIN2	PSAP	SETBP1	GPRC5C	MAST4	DNAH1
RPUSD4	KCNJ15	CCDC9	COX6B2	MEDAG	IL6R	NUAK1	ZP4
CD276	EVA1C	DPEP2	ABHD5	MRPS22	GLDN	RPH3AL	AQP7
LRRFIP1	GHSR	NME9	SALL4	F5	MCOLN3	GPATCH1	VSTM2L
PDLIM1	KIAA0753	STK39	TNFRSF11B	HSPBAP1	SLC9B2	PEX26	CNGB1
CDKAL1	SLC34A3	KERA	UBAP1	JADE1	IQCA1	FKBP6	SARM1
DLX1	P3H2	ITPR2	BTBD10	FBLN2	HES2	C1orf100	KRT10
NEDD9	GATA6	PLAC8	FAM198B	FBP2	BSN	SPINK2	PFKP

10

20

30

40

【 0 1 8 8 】

50

C11orf88	SIN3B	ORMDL3	TBX21	GPR173	KAZN	KIAA0040	HDAC11
FAM96A	DCHS2	UPF2	KCNMA1	PLA2G4E	ARL4C	HCN3	COL14A1
BEST1	ACSBG2	NPFFR1	TMEM178A	CDC123	NDUFA12	CDNF	RBM45
CBLB	PIM1	CTSO	DUSP6	LHFPL5	BCL2L10	DIXDC1	TCF12
TNFAIP8	PPM1H	SMARCD3	RAD54B	C4orf45	CREB3L2	NPVF	OR6B1
HMGCS1	SSR3	CXCL13	TTC8	MAPRE3	SLC2A6	SERPINB7	HTR3A
USP36	VIT	C17orf99	CYP27C1	NFKBIZ	AHCYL2	DHRS7C	KRT32
COL19A1	NOL10	MUC1	SYT17	GRHL1	DENND2C	CLCA1	WNT11
INTS10	CRELD2	LGR6	FHL1	ARRDC5	PARVB	CRK	NECAP2
KRTAP4-5	CLMP	NCF2	GGT7	INSR	PIK3C2B	C11orf65	CLUAP1
MBL2	ASPSR1	YBX3	SLC35F2	NEMP2	CLDN22	DAB2IP	MAMDC2
IL37	CDCA7	GAREM1	DCN	ATP12A	REPS2	FAM216B	CTTN
KLHDC9	CDKL2	AGRN	ATP9A	OXT	OLIG2	TSEN54	KIRREL2
HECTD1	ME3	INTU	PGRMC2	RFX2	DSPP	LSM8	TEX9
MYEOV	POLR1A	PKIG	NEBL	SOX4	HFM1	OSBPL5	TANK
CALHM3	TLE1	TRIM66	SACS	SLC10A7	MTM1	KLHL38	SHCBP1L
SRP19	TMC1	TOR2A	FNDC3B	XIAP	JARID2	ALG1L	NYX
BMP10	TRAF3IP2	WISP2	SCN1B	C15orf56	ARHGEF3	EPB41L4A	AFG3L2
MON1A	PSMA6	TRIP13	ACTR10	GJD3	EFCAB11	IRF4	SLC22A23
INPP4B	HNF1B	KIAA1522	ALPP	KRT37	MMP24	CMTR2	ARHGAP29
SSUH2	NUBPL	RRAD	CDH2	CREB1	ZNF621	APOBEC1	HIPK3
METAP1D	SPOCK2	PTPN1	INHBE	ACHE	UGP2	PITX2	RPS5
PTAFR	P2RX4	GJB4	PRKCSH	C12orf71	ZNF292	PKP1	MAOA
YPEL5	NKAIN1	KCNG1	EXD1	KRT39	STAU2	AFAP1L2	MIER3
ATG14	HRH1	CYB5B	QPCT	TRAK2	IL12B	AP4S1	ACSL1
LAMA3	GJA1	OR51B6	FOXS1	RPTOR	VAPA	ASIP	SPIN1
ZNF542P	THRB	COX11	RPS23	PIGC	CREBL2	PIN1	UNC13A
GPBP1	ATOH8	PPFIA2	DMKN	ZBTB43	INPP5K	STRA6	ABR
DEF6	DACH1	LILRB3	POLE4	CAPZA3	SNX13	MMP16	MOGAT2
NRCAM	NRARP	GATA2	TMEM65	FBN2	INTS7	INPP4A	TMEM38B
C10orf67	ATXN7L1	GPM6A	GSTZ1	GARNL3	USP38	AKTIP	NR2F1-AS1
KMT5B	LGALS9	ZFP36L2	CD200R1L	GPATCH2	DLL1	CNGA2	GAS7
RIPPLY3	FAM161A	C10orf113	TRPC4	RAB27B	CD109	TNS3	CDHR2
TNFRSF21	FAM50B	CAGE1	RNF220	ARFGEF3	RALB	INTS1	VWA3B
SLC30A1	ITCH	UPP2	LZTS3	YTHDF1	AKR1D1	TAS2R16	DPF3

10

20

30

40

【 0 1 8 9 】

50

IL15	LGMN	ST8SIA4	PROSER2	SHC3	PLEKHH1	GRIN2D	CCDC184
PLEKHG6	METTL25	CYP26B1	SHC4	GSG1L	BMPER	C3orf38	STEAP4
FA2H	TMEM88B	PPARGC1A	IGFBP3	HSD17B14	RNF112	CXCR4	TESC
AHR	CDK14	CD36	CLTC	TFCP2	PRRX2	FOXD2	ATP6V1H
GALNT15	FSCB	YTHDC2	C10orf35	ZNF92	COMMD10	RPTN	RGS11
C9orf135	IFT81	TTI1	AMTN	LPIN1	IRS2	SLTM	MYO1G
FGFBP1	LRRC25	RPS6KA3	BCR	EEPD1	RSPH1	LAMC1	KLF5
HRASLS2	FOXN3	ANO10	GTF2E2	TRIM9	PAPPA	RABEP2	PCL0
ATF3	PAFAH1B2	PRSS57	FAM3B	CYP24A1	CARTPT	NPEPPS	NTF3
TLR3	CABLES1	SLN	ANGPT1	TUFT1	CLCNKA	ANXA4	NCALD
LTBP1	CPPED1	DYNLT1	MREG	C4orf19	AIG1	THNSL2	RBM3
SMG6	OR2S2	AMER3	NAV3	RNF13	PPP1R2	SLC43A3	WIFI2
PANK1	TAMM41	ST6GALNAC4	TRIM54	NAT1	PTPRC	COX20	CCDC65
NRDE2	SPAG9	DCTN6	GABBR2	UPP1	ARHGEF18	C1orf226	TTC39C
TGFB3	EIF4A2	UNC5A	TPK1	LBH	PRKAR1A	SERBP1	TOPBP1
LARP4B	SERPINB1	C12orf74	GOSR2	OSCP1	PSTK	KNOP1	C1orf228
CD9	ACSL5	CT62	DENND5A	BATAP3	SLIT2	NFATC1	DNAJC6
ADAMTS6	ADAM29	FRMD3	RAB8B	OR10H1	RAB11FIP4	TMEM45B	FABP3
NNMT	WDFY1	CEP152	ARHGAP42	HIC1	SHQ1	TARBP2	SNX7
C10orf90	RAD51B	LRRC20	GNLY	TIMM22	SMARCA2	DUSP8	SOX8
NCOA6	CCNY	COX7A2	TRAF3IP1	SLC6A3	KBTBD12	ARHGAP39	MDF1C
PPM1B	SEMA3A	PLA2G2E	DNAH11	EGR4	DUSP27	TMPRSS7	NFE2
CACUL1	TMEM86B	TRABD2A	REEP3	NDUFB11	CCDC186	C7orf57	CC2D2A
LEKR1	ATP6V1G1	MPZL2	SLC4A1	MGAT4C	TMPRSS9	COL21A1	LBP
TMEM247	CCDC34	IGF2R	CLDN4	WNT7A	APBB1IP	CPA4	DTWD1
NSMCE4A	GDPD5	ANKRD33	PLEKHG3	CYP11A1	CDCA7L	NID1	MAF
NUP155	CAMK2B	ZEB2	ARID5A	FRMD4B	ATXN7	LSM3	FGGY
ABI3BP	PNPLA5	ATXN3L	ZNF396	SOCS2	MBTPS2	HS1BP3	C9orf3
MUC20	IL7R	FIGN	PPP2R2C	USP2	ENKUR	RALBP1	MRPS18A
CNIH3	ULK1	ADGRF1	FLJ23867	CRIP2	PTHLH	FAM187B	SH2D3C
SH3GL3	ODC1	LGALS1	PRRC1	GC	NEK10	MAMLD1	C4orf32
SH3TC1	LGI1	SLC6A20	CD180	PLCE1	THY1	CTSH	SLC04A1
SLC26A9	MPL	AACSP1	COL26A1	SSR2	CMAHP	ID4	ALCAM

10

20

30

【 0 1 9 0 】

40

50

TAGLN2	COBL	SCNN1G	TRAF7	MYOZ1	AKR1C3	CER1	AREG
ABCG2	DCK	CCDC174	PRKCE	CBLC	SYNM	BCAS2	BDKRB2
NABP1	TBC1D1	DHRS3	TES	USHBP1	UBQLN4	ETV7	CCR8
AGPAT2	MLXIPL	SLC13A1	ADAD1	NOSTRIN	QRFPR	RHOBTB1	SCFD2
PPP4R3A	E2F6	CDK4	PABPC1P2	COL5A3	RAB31	PPP1R14D	CASK
ADAMTS15	CRTAC1	HRC	KCNQ4	UBE3D	MIEN1	KIF18A	BPI
KIAA0895	SIM2	LITAF	RNF165	CCDC77	DI02	ABCA6	ZNF473
FHAD1	BRINP1	GRAMD1C	TAF1L	EMC7	TRIM29	AGXT2	CD300LF
PPP1R12B	GPR37L1	WAPL	AQP3	LZTFL1	YIPF5	ENOX1	ZC2HC1A
GIN1	FHDC1	PBOV1	DERA	FGD4	TYK2	ACP6	NLGN1
ULK4	BANK1	PER1	ITGA2	LLGL2	ALDH8A1	FBRSL1	TPPP3
TNNI2	TMEM167A	RGS4	PDGFB	ZDHC17	APOBEC2	THBD	HGF
BTN3A1	EXOC3-AS1	NAA20	VAV1	ZNF664	TRMO	TMEM139	PRR15
PHLPP1	GINS2	GMDS	PCDH1	PARD3B	MYH13	C1orf43	ARSB
TMEM217	SLC22A2	IL1RN	FMN1	KCNJ12	RASAL3	HTR1B	PCDH8
BRDT	NEK7	MCM10	NPSR1-AS1	ARID5B	SEMA3C	UBB	TACR2
VSX1	LOC100132215	MMD2	MEF2C	SPON1	FLVCR2	SNX25	GLOD5
STK38L	ZNF555	YKT6	NR5A1	DNAJC10	SYNP02L	APEH	ALDH3A1
DPYSL2	ETFB	GCM2	FGF19	GRN	GNAS	FCH01	DBN1
TCEANC	SOCS6	CEP128	RBM24	HEATR5A	ASAH1	CHMP6	RPS26
MRVI1	PLA2R1	CDC14B	SCARB1	SLC7A10	SLC13A2	WDR89	VPS45
INSIG2	GJA3	MCM5	TRPS1	CHMP4B	ZNF366	SRMS	CNTN6
MYO5B	AGTPBP1	TMC8	FAM173A	PITX3	TRAFD1	PNPLA8	CD28
YWHAQ	C9orf116	SLC16A3	VPS37D	ASB5	JSRP1	UGT8	WBP2NL
TSPAN2	EGFR	SRD5A3	CDC16	NDUFA10	SPOPL	NR5A2	ZC3H4
KLF4	C9orf153	GADD45A	C18orf12	EMX2	BMF	PPP2R5A	MKL2
TIMM17A	CMIP	METTL4	FEM1C	ST6GALNAC5	PIWIL3	SRL	CCBE1
CIT	ASB7	C15orf54	TMEM71	TGIF1	ARVCF	MEGF6	TPPP
TNFRSF19	RAB11FIP1	MRPS36	FTH1	ETS1	MAN1A1	PELO	OXER1
DYM	SLC23A3	MMP20	KCMF1	TRY2P	RPS6KA5	NPAS2	SLC25A19
CCDC112	SOX9	RGS9	NUTF2	OXSRI	MAGEB2	AVP	TMEM59
C9orf50	ABHD11-AS1	GPR132	PLCD1	NATD1	OTUD1	PLA2G4D	BHLHE41
AAED1	TMIE	NDUFB6	SPCS3	PRRG4	GCLC	CEACAM22P	LIN28A

10

20

30

40

【 0 1 9 1 】

50

KIF5C	PHLDB1	E2F8	EPHA5	CITED2	SLC5A1	TBC1D23	PLEKHG4B
BANF2	GLP2R	HSD17B2	PTPRK	SLC7A7	SLC9A7	SNX9	SND1-IT1
OLA1	PEBP1	TAPT1	LOC401052	CLIC5	CPEB4	KDM4C	SLC20A1
RAPGEF2	SGK1	TANGO6	SNCB	SEMA3D	FLRT2	NTRK2	LEPR
C9orf131	IFI6	LVRN	ZNF214	C14orf2	SSFA2	PABPC4L	TMEM244
C1QTNF1	TMC5	WDR18	BRMS1L	CTNNB1	PDE1A	SH3PXD2B	NTN4
LIMCH1	PSD3	SLC38A11	HTRA1	DIRAS1	EPHB6	HTRA3	PTGIR
YY1AP1	TFAP2A	GTPBP4	ARFGAP3	LDHAL6A	ZNF331	EPC1	SNRPC
CREG2	ZBTB7C	CDK20	KIAA0825	RXFP2	GPR182	CASZ1	ZBED2
ASAP2	INPP5A	UBE20	WNT7B	TNFRSF8	RANBP3L	SORBS1	GUSB
CFAP126	SNHG7	COL18A1	CACNA1A	FKBP8	TEKT3	RPEL1	GNAT2
FAM107B	LCA5	MAP1S	RHOD	ADSSL1	SLC8A1	PKP2	ABHD15
FAM86B3P	SNRNP35	SLC1A4	CLDN23	INHBB	FAM110B	TMEM207	HMCN1
ADAM12	PRF1	CD38	METRNL	OPCML	RAP1GAP2	IQUB	TP63
RECQL5	PIK3R1	KRT20	CYP1A1	DUSP14	FTHL17	EPYC	CCDC134
B4GALNT2	FOXE1	ADAMTSL1	SCIN	POPDC2	NXNL1	RFX7	VTCN1
CPA2	IL21	PPP2R2A	RAPGEF4	ARNT2	GSN	SIGLEC8	LRRC29
ZNF385B	NLRC5	FUZ	CCR3	VLDLR	MELTF	BDNF	ACSL3
ZNF488	FRAT2	BATF3	C11orf96	SULT4A1	ITGAV	ADGRL3	SKIL
SIRT4	MORN3	RIPK2	KLLN	MYO6	MTCL1	UBA7	JPH2
DYSF	TYROBP	CCDC83	RHOU	NFIL3	FKBP11	LRPAP1	CLDN10
ERP44	IPMK	LTBP4	BBS10	RNLS	SPAG17	YOD1	BPTF
FERMT2	SYT12	CCDC150	S1PR2	PRSS41	FAM120B	TPH2	CDKL3
SFXN4	NDRG4	FAM171A1	ANKRD10	SLC29A3	IRAK3	KCNA10	ZBTB16
MICAL3	C5orf51	NAA16	EDNRA	PRMT9	DCST1	PDC	VCL
RAD51C	OSER1	SFRP2	VSTM5	BCLAF1	CXCL16	BFSP1	SHISA2
LGALS3BP	SCG2	TYMP	NENF	TEX36	C17orf107	ST6GALNAC1	C5orf30
KCNJ6	AGTR2	SHANK2	GPR156	MICALL1	ZNF608	CCDC63	AQP9
MSX2	GPC1	GFPT1	GPRC5B	LACC1	NPFFR2	FBXO7	PARP11
TIGD2	ANKRD9	LRRN3	UBASH3A	CCDC68	TDRD7	ARHGAP24	SH3BGRL2
PNMA2	SLC1A3	ABCA13	CIPC	SPIRE2	H3F3C	EFHC2	VILL
CACNA1H	KCTD12	UBE4B	NYAP2	DUSP23	CCDC124	RHOBTB2	ERBB4
RAB35	ITPK1	PIK3R3	SPTSSA	MMP27	UBASH3B	PYM1	SPAG16
TOMM5	TLE6	MRPL21	JPH1	PKD1L2	TMEM94	LANCL3	IL2RG
FUNDC1							

10

20

30

40

【 0 1 9 2 】

前記GSEAにより、各エンリッチメントに最も貢献する最先端の「コア」遺伝子を同定することもできた（図12Aおよび12B）。これらの「コア」遺伝子では、CDK19ノックダウンによるH3K27Acエンハンサーシグナルの違い（図13A～13D）により、遺伝子発現において対応する大きな変化となる（図13E）。ELF3（図13A）およびETV7（図13B）遺伝子座での遺伝子トラックは、CDK19ノックダウン試料におけるH3K27Acシグナルのエンリッチメントを示し、一方、CHI3L2（図13C）およびCRTAM（図13D）遺伝子座での遺伝子トラックは、対照試料におけるH3K27Acシグナルのエンリッチメントを示す。上のトラックは対照試料を示し、下のトラックはCDK19ノックダウン試

50

料を示す。灰色のバーは、対照試料とCDK19ノックダウン試料の間で異なる (FDR 0.05) ことがDiffBindによって識別された領域を示す。次にMetascape分析を使用して、CDK19KD-EnhancerUPの「コア」遺伝子とCDK19KD-EnhancerDOWNの「コア」遺伝子内に富んでいる特徴遺伝子セットを評価した。CDK19KD-EnhancerUPの「コア」遺伝子内では、早期のエストロゲン応答 (p 値=8.72e-5) および上皮間葉細胞分化転換 (p 値=1.08e-3) が富んでいると識別された特徴であった (図3 G、暗い灰色のバー)。同様に、CDK19KD-EnhancerDOWNの「コア」遺伝子内では、アンドロゲン応答 (p 値=1.89e-3) が富んでいることがわかった (図3 G、薄い灰色のバー)。したがって、早期のエストロゲン応答、上皮間葉細胞分化転換、およびアンドロゲン応答の遺伝子セット内の遺伝子のサブセット (図3 G) は、H3K27Acエンハンサーシグナルに変化があり、遺伝子発現において対応する強い変化がある。これらの遺伝子は、各特徴遺伝子セット中の全遺伝子のごく一部 (5-10%) を構成するが、CDK19が遺伝子転写をエピジェネティックに調節できるこれらの生物学的プロセス内の主要な遺伝子を強調している。

【0193】

4.7: 実施例7-事前に確立されたオルガノイドの増殖に対するCDK19ノックダウンの影響

本発明者らは、CDK19ノックダウンが事前に確立されたオルガノイドのインビトロでの増殖と事前に確立されたPDX腫瘍にインビボで及ぼす影響を調べた。これは、患者の既存の腫瘍の治療をモデル化することを目的としていた。インビトロでは、(CDK19 shRNAを誘導するために) ドキシサイクリン処理群に加えると、対照 (ドキシサイクリンなし) と比較して、事前に確立されたオルガノイドの数が有意に減少した (図4 Aおよび4 B)。図4 Aおよび4 Bにおいて、ドキシサイクリン処理を開始した後の0日目 (図4 A) および16日目 (図4 B) でのオルガノイドコロニーの数を示す、****P 0.0001; nsはP

0.05 (平均±標準偏差、n=6、実験は2回行った、P値は対応のないt検定によって決定した)。インビボでは、事前に確立されたinducCDK19KD-PDX-T1またはinducCDK19KD-PDX-T3 (ドキシサイクリン誘導性CDK19ノックダウン構築物で形質導入されたPDX-T3細胞) 腫瘍を有するマウスにドキシサイクリンを給餌すると、これらの腫瘍の増殖に有意な影響を与えた (図4 Cおよび4 D)。図4 Cおよび4 Dにおいて、ドキシサイクリン給餌NSGマウスおよび対照NSGマウスにおける事前に確立された腫瘍の増殖を示す: inducCDK19KD-PDX-T1、****P 0.0001; ***P 0.001 (平均±標準偏差、n=5、実験は2回行った、P値は対応のないt検定によって決定した) (図4 C) およびinducCDK19KD-PDX-T3、****P 0.0001; ***P 0.001 (平均±標準偏差、n=5、実験は1回行った、P値は対応のないt検定によって決定した) (図4 D)。CDK19 shRNA誘導腫瘍は、対照腫瘍と比較した場合、inducCDK19KD-PDX-T1腫瘍では最終的に82%小さく、inducCDK19KD-PDX-T3腫瘍では38%小さかった (図4 Cおよび4 D)。inducCDK19KD-PDX-T1実験およびinducCDK19KD-PDX-T3実験の両方において、マウスの総体重は、処理群と対照群との間で有意差はなかった (図14 Aおよび14 B)。最後に、生存研究は、PDX-T1腫瘍が対照shRNAで形質導入されたマウスと比較してPDX-T1腫瘍がCDK19 shRNAで形質導入されたマウスにおいて全生存が有意に長かったことを示した (図4 E)。

図4 Eに示すのは、対照shRNA (黒線)、shCDK19-1 (実線灰色) またはshCDK19-2 (破線灰色) で形質導入されたPDX-T1異種移植片を移植されたマウスのカプランマイヤー生存曲線である。マウスを腫瘍の直径を毎週測定して追跡した。腫瘍の最長径が17mmを超えたときにマウスを殺した。shCDK19-2群の2匹のマウスはPDX腫瘍を発症せず、実験の終わりに殺した。これらのマウスは、shCDK19-2群の生存曲線を作成するとき打ち切られた、***P 0.001 (n=9、実験は3回行った、ログランク (Mantel-Cox) 検定を用いてP値を決定した)。要約すると、これらの実験は、事前に確立された腫瘍であっても、CDK19の特異的なノックダウンは腫瘍の増殖を有意に減少させること、およびCDK19ノックダウンはマウスの生存を延長できることを示した。

【0194】

4.8: 実施例8-事前に確立されたPDX腫瘍に対するCCT251921の影響

CDK19標的療法の使用を臨床的にモデル化するため、本発明者らは、CDK19および密接に関連するパラログCDK8の両方の経口で生物学的に利用可能な阻害剤であるCCT251921（図4F）で、事前に確立されたPDX腫瘍を有するマウスを処置した。PCT-T1腫瘍は、CCT251921またはビヒクルの毎日の経口投与（30mg/kg）を開始する前に、マウスで事前に確立された。CCT251921による処置は、14日目までに腫瘍増殖の有意な減少をもたらした（図4G）。CCT251921で処置されたマウスにおける腫瘍の最終的な容積は、ビヒクルで処置されたマウスの腫瘍よりも30%以上小さかった（図4G）。事前に確立されたPDX-T1異種移植腫瘍を有するNSGマウスを、CCT251921またはビヒクルの毎日の強制経口投与で処置した。マウスを週に2回、腫瘍容積を測定して追跡した、****P 0.0001；***P 0.0001（平均±標準偏差、n=5、実験は1回行った、P値は対応のないt検定で決定した）。CCT251921コホートおよびビヒクルコホートの両方のマウスは全体的な体重減少を被ったが、これは2群間で有意差はなく、おそらくそれらの摂食習慣に対する毎日の強制経口投与の影響によるものであった（図14C）。遺伝子のノックダウンと化学的阻害とで異なる生物学的結果が生じる可能性があることはよく知られている。本発明者らは、本実施例において、CDK19キナーゼ活性の化学的阻害が、ノックダウン研究で示されたCDK19の総損失の影響を再現できることを、事前に確立された腫瘍で示す。

【0195】

本発明者らのデータから、本発明者らは、CDK19が複数の癌関連経路を調節すること、およびCDK19がTICの潜在的な治療標的であることを結論付ける。したがって、CDK19阻害は、CDK8、CDK9、およびBRD4などの転写補因子を標的とする治療戦略と、TICおよびその自己複製経路、例えば、Hedgehog、Wnt/-カテニン、およびNotchなどを標的とする治療戦略との両方に有用である。しかしながら、一部の治療アプローチは、正常な細胞に対する毒性によって制限される場合がある。これは、正常な組織における転写補因子の遍在的な発現、および正常な幹細胞における自己複製経路の重要性に起因する。例えば、BRD4阻害は、マウスの複数の臓器における組織ホメオスタシスの破壊をもたらした。同様に、狭い治療指数の課題により、これまでのところ、Hedgehog、Notch、およびWnt経路阻害剤の臨床的成功は限られている。CDK19の生物学は、治療標的としての潜在的な利点を示している。CDK19は、そのパラログCDK8、CDK9、およびBRD4などの他の遍在する転写補因子と比較して、組織分布がより限定されており（例えば、Tsutsuiら、Genes to cells:devoted to molecular & cellular mechanisms 16:1208-1218, 2011参照）、CDK19阻害による毒性が限られる可能性があるが、CDK8、CDK9、およびBRD4のノックアウトは致命的である（例えば、Brownら、Mamm Genome 23:632-640, 2012;Westerling, Molecular and Cellular Biology 27:6177-6182, 2007; およびHouzelsteinら、Molecular and Cellular Biology 22, 3794-3802, 2002参照）。さらに、組織におけるCDK19の限られた発現は、治療ウィンドウを広げ、NOTCHなどの幹細胞経路の本来なら毒性の阻害を可能にするか、G2/Mチェックポイントなどの重要なプロセスを可能にする。CDK19の小分子阻害が障害されたPDX増殖を示す本発明者らの研究は、TNBCにおいてCDK19を治療的に標的とする可能性を確認している。

【0196】

5. 参考文献

1. Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A. & Caggiano, V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 109, 1721-1728, doi:10.1002/cncr.22618 (2007).
2. Tsutsui, T., Fukasawa, R., Tanaka, A., Hirose, Y. & Okhuma, Y. Identification of target genes for the CDK subunits of the Mediator complex. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 16, 1208-1218, doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01565.x (2011).
3. Brown, S. D. & Moore, M. W. The International Mouse Phenotyping Consortium

- ium: past and future perspectives on mouse phenotyping. *Mamm Genome* 23, 632-640, doi:10.1007/s00335-012-9427-x (2012).
4. Diehl, P., Tedesco, D. & Chenchik, A. Use of RNAi screens to uncover resistance mechanisms in cancer cells and identify synthetic lethal interactions. *Drug Discov Today Technol* 11, 11-18, doi:10.1016/j.ddtec.2013.12.002 (2014).
 5. Lee, C. Y. & Neuregulin autocrine signaling promotes self-renewal of breast tumor-initiating cells by triggering HER2/HER3 activation. *Cancer Res* 74, 341-352, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1055 (2014).
 6. Nolan-Stevaux, O. & Measurement of Cancer Cell Growth Heterogeneity through Lentiviral Barcoding Identifies Clonal Dominance as a Characteristic of Tumor Engraftment. *PloS one* 8, e67316, doi:10.1371/journal.pone.0067316 (2013). 10
 7. Cancer Genome Atlas Research, N. & The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 45, 1113-1120, doi:10.1038/ng.2764 (2013).
 8. Broude, E. V. & Expression of CDK8 and CDK8-interacting Genes as Potential Biomarkers in Breast Cancer. *Current cancer drug targets* 15, 739-749 (2015).
 9. Porter, D. C. & Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13799-13804, doi:10.1073/pnas.1206906109 (2012).
 10. Galbraith, M. D., Donner, A. J. & Espinosa, J. M. CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription* 1, 4-12, doi:10.4161/trns.1.1.12373 (2010). 20
 11. Robertson, F. M. & Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. *CA Cancer J Clin* 60, 351-375, doi:10.3322/caac.20082 (2010).
 12. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988, doi:10.1073/pnas.0530291100 (2003).
 13. Lim, E. & Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature medicine* 15, 907-913, doi:10.1038/nm.2000 (2009).
 14. Prat, A. & Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast cancer research and treatment* 142, 237-255, doi:10.1007/s10549-013-2743-3 (2013). 30
 15. Scheeren, F. A. & A cell-intrinsic role for TLR2-MYD88 in intestinal and breast epithelia and oncogenesis. *Nature cell biology* 16, 1238-1248, doi:10.1038/ncb3058 (2014).
 16. Bachelard-Cascales, E. & The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. *Stem cells* 28, 1081-1088, doi:10.1002/stem.435 (2010).
 17. Hu, Y. & Smyth, G. K. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of immunological methods* 347, 70-78, doi:10.1016/j.jim.2009.06.008 (2009). 40
 18. Sato, S. & A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Molecular cell* 14, 685-691, doi:10.1016/j.molcel.2004.05.006 (2004).
 19. Firestein, R. & CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* 455, 547-551, doi:10.1038/nature07179 (2008).
 20. Pelish, H. E. & Mediator kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML. *Nature* 526, 273-276, doi:10.1038/nature14904 (2015). 50

21. Kapoor, A. 5、 The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature* 468, 1105-1109, doi:10.1038/nature09590 (2010).
22. Galbraith, M. D. 5、 HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell* 153, 1327-1339, doi:10.1016/j.cell.2013.04.048 (2013).
23. Subramanian, A. 5、 Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-15550, doi:10.1073/pnas.0506580102 (2005).
24. Liberzon, A. 5、 The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell systems* 1, 417-425, doi:10.1016/j.cels.2015.12.004 (2015). 10
25. Kalimutho, M. 5、 Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease. *Trends in pharmacological sciences* 36, 822-846, doi:10.1016/j.tips.2015.08.009 (2015).
26. Chen, M. 5、 CDK8/19 Mediator kinases potentiate induction of transcription by NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi:10.1073/pnas.1710467114 (2017).
27. Audetat, K. A. 5、 A Kinase-Independent Role for Cyclin-Dependent Kinase 19 in p53 Response. *Molecular and cellular biology* 37, doi:10.1128/MCB.00626-16 (2017). 20
28. Melotte, V. 5、 The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications. *FASEB J* 24, 4153-4166, doi:10.1096/fj.09-151464 (2010).
29. Zarnegar, M. A., Reinitz, F., Newman, A.M., Clarke, M.F. Targeted chromatin ligation, a robust epigenetic profiling technique for small cell numbers. *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/gkx648 (2017).
30. Bae, D. H. 5、 The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers. *J Clin Pathol* 66, 911-917, doi:10.1136/jclinpath-2013-201692 (2013). 30
31. Brown, J. D. 5、 NF-kappaB directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis. *Molecular cell* 56, 219-231, doi:10.1016/j.molcel.2014.08.024 (2014).
32. Nabet, B. 5、 Deregulation of the Ras-Erk Signaling Axis Modulates the Enhancer Landscape. *Cell Rep* 12, 1300-1313, doi:10.1016/j.celrep.2015.06.078 (2015).
33. Tripathi, S. 5、 Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell host & microbe* 18, 723-735, doi:10.1016/j.chom.2015.11.002 (2015).
34. Mallinger, A. 5、 Discovery of Potent, Selective, and Orally Bioavailable Small-Molecule Modulators of the Mediator Complex-Associated Kinases CDK8 and CDK19. *Journal of medicinal chemistry* 59, 1078-1101, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01685 (2016). 40
35. Poss, Z. C. 5、 Identification of Mediator Kinase Substrates in Human Cells using Cortistatin A and Quantitative Phosphoproteomics. *Cell Rep* 15, 436-450, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.030 (2016).
36. Bolden, J. E. 5、 Inducible in vivo silencing of Brd4 identifies potential toxicities of sustained BET protein inhibition. *Cell Rep* 8, 1919-1929, doi:10.1016/j.celrep.2014.08.025 (2014).
37. Takebe, N. 5、 Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer st 50

em cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol* 12, 445-464, doi:10.1038/nrcli nonc.2015.61 (2015).

38. Westerling, T., Kuuluvainen, E. & Makela, T. P. Cdk8 is essential for prei mplantation mouse development. *Molecular and cellular biology* 27, 6177-61 82, doi:10.1128/MCB.01302-06 (2007).

39. Houzelstein, D.ら、Growth and early postimplantation defects in mice def icient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Molecular and cellular b iology* 22, 3794-3802 (2002).

40. Schindelin, J.ら、Fiji: an open-source platform for biological-image analy sis. *Nat Methods* 9, 676-682, doi:10.1038/nmeth.2019 (2012).

41. Gao, J.ら、Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical p rofiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6, pl1, doi:10.1126/scisignal.2004088 (2013).

【 0 1 9 7 】

前記発明は、明確化および理解の目的である程度詳細に記載したが、当業者は、この開示に精通すると、添付の特許請求の範囲における本発明の真の範囲から逸脱することなく、形式および詳細の様々な変更を加えることができることを理解するであろう。したがって、本発明は、上記の方法論または構成の正確な要素または詳細に限定されるものではない。プロセス自体に必要なまたは固有の範囲を除いて、図を含む本開示に記載される方法またはプロセスの工程または段階に対する特定の順序は、意図または暗示されない。多くの場合、プロセスの工程の順序は、記載されている方法の目的、効果、または取込みを変更することなく変えてよい。

【 0 1 9 8 】

本明細書に引用されるすべての刊行物および特許文献は、そのような各刊行物または文献が具体的かつ個別に参照により本明細書に組み込まれることが示されたかのように、参照により本明細書に組み込まれる。刊行物および特許文献（特許、公開された特許出願、および未公開の特許出願）の引用は、そのような文献が関連する先行技術であることの承認として意図されておらず、その内容または日付に関する承認を構成するものでもない。

【 0 1 9 9 】

CDK19転写変異体1 (NM_015076.4) (配列番号12) :

```

1  tgtggccgcc gaggagtccc ttgctgaagg cggaccgcgg agcggcgggc ggcggggcggc
61  gcgcgcgcgc gcgcgagagg cggctgttgg agaagtggag cggcggtcgc ggggggagga
121  ggaggaggga ctgagcggcg gcggcccccg cgtcccgtgc ctctatgggg gaagcagaca
181  atggattatg atttcaaggc gaagctggcg gcggagcggg agcgggtgga ggatttgttt
241  gagtacgaag ggtgcaaagt gggacgcggc acctacggtc acgtctacaa ggcgaggcgg
301  aaagatggaa aagatgaaaa ggaatatgca ttgaagcaaa ttgaaggcac aggaatatcc
361  atgtcggctt gtagagagat tgcacttttg cgagaattga agcaccctaa tgtgattgca
421  ttgcagaagg tgttcctttc tcacagtgcg aggaaggtat ggctgctgtt tgattatgca
481  gagcatgact tgtggcatat tattaagttt caccgtgcat caaaagcaaa taaaagccc
541  atgcagttgc caagatctat ggttaaattc ttactttacc agattcttga tggatatccat
601  tacctccatg caaattgggt gttcacaga gacttgaaac cagcaaatat cctagtaatg
661  ggagaaggtc ctgagagggg gagagtcaaa atagctgaca tgggttttgc cagattatcc
721  aattctcctc taaagccact agcagatttg gatccagtag ttgtgacatt ttggtatcgg
781  gctccagaac ttttgcttgg tgcaaggcat tatacaaagg ccattgatat atgggcaata
841  ggttgtatat ttgctgaatt gttgacttcg gaacctatit ttcactgtcg tcaggaagat
901  ataaaaacaa gcaatccctt tcatcatgat caactggatc ggatatttag tgtcatgggg
961  tttcctgcag ataaagactg ggaagatat agaaagatgc cagaatatcc cacacttcaa
1021 aaagacttta gaagaacaac gtatgccaac agtagcctca taaagtacat ggagaaacac
1081 aaggtcaagc ctgacagcaa agtgttcctc ttgcttcaga aactcctgac catggatcca
1141 accaagagaa ttacctcgga gcaagctctg caggatccct attttcagga ggacccttgg

```

1201 ccaacattag atgtatttgc cggctgccag attccatacc ccaaacgaga attccttaat
 1261 gaagatgatc ctgaagaaaa aggtgacaag aatcagcaac agcagcagaa ccagcatcag
 1321 cagcccacag cccctccaca gcaggcagca gcccctccac aggcgcccc accacagcag
 1381 aacagcaccc agaccaacgg gaccgcaggt ggggctgggg ccggggctgg gggcaccgga
 1441 gcagggttgc agcacagcca ggactccagc ctgaaccagg tgccctccaa caagaagcca
 1501 cggctagggc cttcaggcgc aaactcaggt ggacctgtga tgccctcgga ttatcagcac
 1561 tccagttctc gcctgaatta ccaaagcagc gttcagggat cctctcagtc ccagagcaca
 1621 cttggctact cttcctcgtc tcagcagagc tcacagtacc acccatctca ccaggcccac
 1681 cggctactgac cagctcccg tgggccaggc cagcccagcc cagagcacag gctccagcaa
 1741 tatgtctgca ttgaaaagaa ccaaaaaaat gcaaaactatg atgccattta aaactcatac 10
 1801 acatgggagg aaaaccttat atactgagca ttgtgcagga ctgatagctc ttctttattg
 1861 acttaaagaa gattcttgtg aagtttcccc agcaccctt ccttgcattgt gttccattgt
 1921 gacttctctg ataaagcgtc tgatctaate ccagcacttc tgtaaccttc agcatttctt
 1981 tgaaggattt cctgggtgcac ctttctcatg ctgtagcaat cactatgggt tatcttttca
 2041 aagctctttt aataggattt taatgtttta gaaacaggat tccagtgggt tatagtttta
 2101 tacttcatga actgatttag caacacaggt aaaaatgcac cttttaaagc actacgtttt
 2161 cacagacaat aactgttctg ctcatggaag tcttaaagc aaactgttac tgtcccaaag
 2221 tactttacta ttacgttctg atttatctag ttccaggga ggtctaataa aaagacaagc
 2281 ggtgggacag aggaaccta caacaaaaaa ctgcctagat ctttgcagtt atgtgcttta
 2341 tgccacgaag aactgaagta tgtggttaatt tttatagaat cattcatatg gaactgagtt 20
 2401 cccagcatca tcttattctg aatagcattc agtaattaag aattacaatt ttaaccttca
 2461 tgtagctaag tctaccttaa aaagggtttc aagagctttg tacagtctcg atggcccaca
 2521 ccaaaacgct gaagagagta acaactgcac taggatttct gtaaggagta attttgatca
 2581 aaagacgtgt tacttccctt tgaaggaaaa gtttttagtg tgtattgtac ataaagtcgg
 2641 cttctctaaa gaaccattgg ttcttccaca tctgggtctg cgtgagtaac ttcttgcatt
 2701 aatcaagggt actcaagtag aagcctgaaa attaatctgc ttttaaaata aagagcagtg
 2761 ttctccattc gtatttgtat tagatataga gtgactattt ttaaagcatg ttaaaaattt
 2821 aggttttatt catgtttaaa gtatgtatta tgtatgcata attttgctgt tgttactgaa
 2881 acttaattct atcaagaatc ttttcattg cactgaatga ttcttttgc ccctaggaga
 2941 aaacttaata attgtgccta aaaactatgg gcgtagatga taagactata ctagacaaag 30
 3001 tgaatatttg catttccatt atctatgaat tagtggtcga gttctttctt agctgcttta
 3061 aggagccctt cactcccag agtcaaaagg aaatgtaaaa acttagagct cccattgtaa
 3121 tgtaaggggc aagaaatttg tgttcttctg aatgctacta gcagcaccag cttgttttta
 3181 aatgttttct tgagctagaa gaaatagctg attattgtat atgcaaatta catgcatttt
 3241 taaaaactat tctttctgaa cttatctacc tggttatgat actgtgggtc catacacaag
 3301 taaaataaga ttagacagaa gccagtatac attttgcact attgatgtga tactgtagcc
 3361 agccaggacc ttactgatct cagcataata atgctcacta ataataagct ctgcatagtg
 3421 acactcatca agactgaaga tgaagcaggt tacgtgctcc attggaagga gtttctgata
 3481 gtctcctgct gttttacccc ttccattttt taaaataaga aattagcagc cctctgcata
 3541 atgtagctgc ctatatgcag ttttatcctg tgccctaaag cctcactgtc cagagctgtt 40
 3601 ggtcatcaga tgcttattgc accctacca tgtgcctggg gccctgctgg gtagagaaca
 3661 cagaggacag ggcatacttc ttgtccctaa ggagcttgtg atctgtgaca gtaagccctc
 3721 ctgggatgtc tgtgccatgt gattgactta caagtgaac tgtcttataa tatgaaggtc
 3781 ttttgttta cttctaaacc cacttgggtg gttactatcc ccaaactctg tctgtaaata
 3841 atattatgga agggtttcta tgtcagtcta ccttagagaa agccagtgt tcaatatcac
 3901 aaaaggcatt gacgtatctt tgaatgttc acagcagcct ttaacaaca actgggtggg
 3961 ccttgtaggc agaacatact ctctcaagtg gttgtaggaa attgcaagga aaatagaagg
 4021 tctgttcttg ctctcaagga ggttaccttt aataaaagaa gacaaaccca gatagatatg
 4081 taaacaaaa tactatgccc cttaatactt tataagcagc attgttaaat agttcttacg
 4141 cttatacatt cacagaacta ccctgttttc ctgtatata atgacttttg ctggcagaac 50

4201 tgaaatataa actgtaagg gatttcgtca gttgctccca gtatacaata tcctccagga
 4261 catagccaga aatctccatt ccacacatga ctgagttcct atccctgcac tggactggc
 4321 tcttttctcc tctttccttg cctcagggtt cgtgctaccc actgattccc tttaccctta
 4381 gtaataatit tgatcattt tctttccttt aaaggggaac aaagcctttt tttttttga
 4441 gacggagtgt tgctctgtca cccaagctgg agtgcagtgg cagcatcttg gctcactcca
 4501 acctccacct tccaggttca agtgattctc ctgcctcagc ctcccagta gctgggacta
 4561 cgggcacgca ccaccacgtc tggctaattt ttgtattttt agtagagatg gggtttcacc
 4621 ctattgggtca ggctgggtct gaattcctca cctcagggtca tccgctgtc tcggcctccc
 4681 gaagtgtctg gattataggt gtgagccacc gcaccaggt gggaacaaag cctttttaac
 4741 acacgtaagg gccctcaaac cgtgggacct ctaaggagac ctttgaagct ttttgagggc
 4801 aaactttacc tttgtgttcc ccaaatgatg gcatttctct ttgaaattta ttagatactg
 4861 ttatgtcccc caagggtaca ggaggggcat cctcagcct atgggaacac ccaaactagg
 4921 aggggttatt gacaggaagg aatgaatcca agtgaaggct ttctgtctt cgtgttacaa
 4981 accagtttca gagttagctt tctggggagg tgtgtgtttg tgaaggaat tcaagtgttg
 5041 caggacagat gagctcaagg taaggtagct ttggcagcag ggctgatact atgaggctga
 5101 aacaatcctt gtgatgaagt agatcatgca gtgacataca aagaccaagg attatgtata
 5161 tttttatata tctgtgggtt tgaacttta gtacttagaa tttggcctt ctgcactact
 5221 cttttgctct tacgaacata atggactctt aagaatggaa agggatgaca ttacctatg
 5281 tgtgctgcct cattcctggt gaagcaactg ctacttggtc tctatgcctc taaaatgatg
 5341 ctgttttctc tgctaaagg aaagaaaag aaaaaatag ttggaaaata agacatgcaa
 5401 cttgatgtgc ttttgagtaa atttatgcag cagaaactat acaatgaagg aagaattcta
 5461 tggaaattac aaatccaaaa ctctatgatg atgtcttctt agggagtaga gaaaggcagt
 5521 gaaatggcag ttagaccaac agaggcttga aggattcaag tacaagtaat attttgtata
 5581 aaacatagca gtttaggtcc ccataatcct caaaaatagt cacaaatata acaaagttca
 5641 ttgttttagg gtttttaaaa aacgtgtgt acctaaggcc atacttactc ttctatgcta
 5701 tcactgcaaa ggggtgatat gtatgtatta tataaaaaaa aaaaccctta atgcactgtt
 5761 atctcctaaa tatttagtaa attaatacta tttaattttt ttaaagattt gtctgttag
 5821 aactaaaag tattacacaa aatctggact gaagggtgct ttttaacaa caatttaag
 5881 tactttttat atatgttatg tagtatatcc ttctaaact gcctagtttg tatattccta
 5941 taattcctat ttgtgaagtg tacctgttct tgtctctttt ttcagtcatt ttctgcacgc
 6001 atcccccttt atatggttat agagatgact gtagcttttc gtgctccact gcgaggttg
 6061 tgctcagagc cgctgcaccc cagcagggcc tgctccatgg agtgcaggac gagctactgc
 6121 tttggagcga gggtttcctg cttttgagtt gacctgactt cttcttgaa atgactgtta
 6181 aaactaaaat aaattacatt gcatttattt tatattcttg gttgaaataa aatttaattg
 6241 actttg

10

20

30

40

50

【 0 2 0 0 】

CDK19転写変異体2 (NM_001300960.1) (配列番号13) :

1 tgtggccgcc gaggagtccc ttgctgaagg cggaccgcgg agcggcgggc ggcgggaggc
 61 gcgcgcgcgc gcgcgagagg cggctgttgg agaagtggag cggcggtcgc ggggggagga
 121 ggaggaggga ctgagcggcg gcggcccccg cgtcccgtgc ctctatgggg gaagcagaca
 181 atggattatg attcaaggc gaagctggcg gcggagcggg agcgggtgga ggatttgtt
 241 gactacgaag ggtgcaaagt gggacgcggc acctacggtc acgtctacaa ggcgaggcgg
 301 aaagatggaa aagatgaaaa ggaatatgca ttgaagcaaa ttgaaggcac aggaatatcc
 361 atgtcggctt gtagagagat tgcacttttg cgagaattga agcaccctaa tgtgattgca
 421 ttgcagaagg tgttcctttc tcacagtgc aggaagggtat ggctgctgtt tgattatgca
 481 gagcatgact tgtggcatat tattaagttt caccgtgcat caaaagcaaa taaaagccc
 541 atgcagtgtc caagatctat ggttaaatcc ttactttacc agattcttga tggatccat
 601 tacctccatg caaattgggt gcttcacaga gacttgaaac cagcaaatat ctagtaattg
 661 ggagaagggt ctgagagggg gagagtcaaa atagatatat gggcaatagg ttgtatatt
 721 gctgaattgt tgacttcgga acctattttt cactgtcgtc aggaagatat aaaaacaagc

781 aatccctttc atcatgatca actggatcgg atatttagtg tcatgggggtt tctgcagat
 841 aaagactggg aagatattag aaagatgcca gaatatccca cacttcaaaa agactttaga
 901 agaacaacgt atgccaacag tagcctcata aagtacatgg agaaacacaa ggtcaagcct
 961 gacagcaaag tgttctctt gcttcagaaa ctctgacca tggatccaac caagagaatt
 1021 acctcggagc aagctctgca ggatccctat ttccaggagg accctttgcc aacattagat
 1081 gtatttgccg gctgccagat tccatacccc aaacgagaat tccttaatga agatgatcct
 1141 gaagaaaaag gtgacaagaa tcagcaacag cagcagaacc agcatcagca gcccacagcc
 1201 cctccacagc aggcagcagc cctccacag gcgccccac cacagcagaa cagcaccag
 1261 accaacggga ccgcagggtg ggctggggcc ggggtcgggg gcaccggagc agggttgcag
 1321 cacagccagg actccagcct gaaccagggtg cctccaaaca agaagccacg gctagggcct 10
 1381 tcaggcgcaa actcagggtg acctgtgatg cctcggatt atcagcactc cagtctcgc
 1441 ctgaattacc aaagcagcgt tcagggatcc tctcagtccc agagcacact tggctactct
 1501 tctcgtctc agcagagctc acagtaccac ccatctcacc aggccaccg gtactgacca
 1561 gctcccgttg ggccaggcca gccagccca gagcacaggc tccagcaata tgtctgcatt
 1621 gaaaagaacc aaaaaaatgc aaactatgat gccatttaa actcatacac atgggaggaa
 1681 aaccttatat actgagcatt gtgcaggact gatagctctt cttattgac ttaaagaaga
 1741 ttcttgtgaa gttccccag cacccttcc ctgcatgtgt tccattgtga cttctctgat
 1801 aaagcgtctg atctaattcc agcacttctg taaccttcag catttcttg aaggatttcc
 1861 tgggtcacct ttctcatgct gtagcaatca ctatggttta tctttcaaa gctctttta
 1921 taggatttta atgttttaga aacaggattc cagtgggtga tagttttata cttcatgaac 20
 1981 tgatttagca acacaggtaa aaatgcacct tttaaagcac tacgtttca cagacaataa
 2041 ctgttctgct catggaagtc taaacagaa actgttactg tccaaagta cttactatt
 2101 acgttcgtat ttatctagtt tcagggaagg tctaataaaa agacaagcg tgggacagag
 2161 ggaacctaca accaaaaact gcctagatct ttgcagttat gtgctttatg ccacgaagaa
 2221 ctgaagtatg tggtaatttt tatagaatca ttcatatgga actgagttcc cagcatcatc
 2281 ttattctgaa tagcattcag taattaagaa ttacaatttt aaccttcag tagctaagtc
 2341 taccttaaaa agggtttcaa gagctttgta cagtctcgat ggcccacacc aaaacgctga
 2401 agagagtaac aactgcacta ggatttctgt aaggagtaat ttgatcaaa agacgtgtta
 2461 cttccctttg aaggaaaagt ttttagtgtg tattgtacat aaagtcggct tctctaaga
 2521 accattggtt tcttcacatc tgggtctgcg tgagtaactt tcttgcataa tcaaggttac 30
 2581 tcaagtagaa gcctgaaaat taatctgctt taaaataaa gagcagtgtt ctccattcgt
 2641 atttgtatta gatatagagt gactattttt aaagcatgtt aaaaatttag gttttattca
 2701 tgtttaaagt atgtattatg tatgcataat ttgctgttg ttactgaaac ttaattctat
 2761 caagaatctt ttcatgtgca ctgaatgatt tcttttgccc ctaggagaaa acttaataat
 2821 tgtgcctaaa aactatgggc ggatagtata agactatact agacaaagt aatatttgca
 2881 tttcattat ctatgaatta gtggctgagt tctttcttag ctgctttaag gagccccca
 2941 ctcccagag tcaaaaggaa atgtaaaaac ttagagctcc cattgtaatg taaggggcaa
 3001 gaaatttgtg ttctctgaa tgctactagc agcaccagcc ttgttttaa tgtttcttg
 3061 agctagaaga aatagctgat tattgtatat gcaaattaca tgcattttta aaaactattc
 3121 tttctgaact tatctacctg gttatgatac tgtgggtcca tacacaagta aaataagatt 40
 3181 agacagaagc cagtatacat ttgcactat tgatgtgata ctgtagccag ccaggacctt
 3241 actgatctca gcataataat gctcactaat aatgaagtct gcatagtgac actcatcaag
 3301 actgaagatg aagcaggtta cgtgctccat tggaggagt ttctgatagt ctctgctgt
 3361 ttaccctt ccatttttta aaataagaaa ttagcagccc tctgcataat gtagctgcct
 3421 atatgcagtt ttatcctgtg ccctaaagcc tactgtcca gagctgttg tcatcagatg
 3481 cttattgcac ctcaccatg tgctgtgtg cctgctgggt agagaacaca gaggacaggg
 3541 catacttctt gtccttaagg agcttgtgat ctgtgacagt aagccctctt gggatgtctg
 3601 tgccatgtga ttgacttaca agtgaaactg tcttataata tgaaggctt tttgtttact
 3661 tctaaacca cttgggtagt tactatcccc aaatctgttc tgtaataat attatggaag
 3721 ggtttctatg tcagtctacc ttagagaaag ccagtgttc aatatcacia aaggcattga 50

3781 cgtatctttg aaatgttcac agcagccttt taacaacaac tgggtgggtcc ttgtaggcag
 3841 aacatactct cctaagtggg ttagggaaat tgcaaggaaa atagaaggtc tgttcttgct
 3901 ctcaaggagg ttacctttta taaaagaaga caaaccacaga tagatatgta aaccaaata
 3961 ctatgcccct taatacttta taagcagcat tgttaaatag ttcttacgct tatacatcca
 4021 cagaactacc ctgttttctt tgtatataat gacttttgct ggcagaactg aaatataaac
 4081 tgtaagggga ttctgtcagt tgctccagat atacaatata ctccaggaca tagccagaaa
 4141 tctccattcc acacatgact gagttcctat ccctgcactg gtactggctc ttttctcctc
 4201 tttccttgcc tcagggttcg tgctacccac tgattccctt tacccttagt aataattttg
 4261 gatcattttc tttcctttta aggggaacaa agcctttttt tttttgaga cggagtgttg
 4321 ctctgtcacc caagctggag tgcagtggca cgatcttggc tcaactcaac ctccaccttc 10
 4381 caggttcaag tgattctcct gcctcagcct cccgagtagc tgggactacg ggcacgcacc
 4441 accacgtctg gctaattttt gtatttttag tagagatggg gtttcaccct attggtcagg
 4501 ctggtcttga attcctcacc tcaggtcata cgctgtctc ggctcccca agtgctggga
 4561 ttataggtgt gagccaccgc acccagtggg gaacaaagcc ttttaacac acgtaagggc
 4621 cctcaaaccg tgggacctct aaggagacct ttgaagcttt ttgagggcaa actttacctt
 4681 tgtgggtccc aaatgatggc atttctcttt gaaatttatt agatactgtt atgtcccca
 4741 agggtagagg aggggcatcc ctacgcctat gggaacaccc aaactaggag gggttattga
 4801 caggaaggaa tgaatccaag tgaaggcttt ctgctcttcg tgttacaac cagtttcaga
 4861 gttagctttc tggggagggtg tgtgtttgtg aaaggaattc aagtgttgca ggacagatga
 4921 gctcaaggta aggtagcttt ggcagcaggg ctgatactat gaggtgaaa caatccttgt 20
 4981 gatgaagtag atcatgcagt gacatacaaa gaccaaggat tatgtatatt ttatatctc
 5041 tgtggttttg aaactttagt acttagaatt ttggccttct gcactactct tttgctctta
 5101 cgaacataat ggactcttaa gaatggaaag ggatgacatt tacctatgtg tgctgcctca
 5161 ttcctgggtga agcaactgct acttggtctc tatgcctcta aaatgatgct gttttctctg
 5221 ctaaaggtaa aagaaaagaa aaaaatagtt ggaaaataag acatgcaact tgatgtgctt
 5281 ttgagtaaatt ttatgcagca gaaactatac aatgaaggaa gaattctatg gaaattacaa
 5341 atccaaaact ctatgatgat gtcttcctag ggagtagaga aaggcagtga aatggcagtt
 5401 agaccaacag aggcctgaag gattcaagta caagtaatat ttgtataaaa acatagcagt
 5461 ttaggtcccc ataactctca aaaatagtca caaatataac aaagttcatt gttttaggg
 5521 ttttaaaaaa cgtgtgttac ctaaggccat acttactctt ctatgctatc actgcaaagg 30
 5581 ggtgatatgt atgtattata taaaaaaaaa aacccttaac gcactgttat ctctaaata
 5641 tttagtaaatt taatactatt taattttttt aaagatttgt ctgtgtagac actaaaagta
 5701 ttacacaaaa tctggactga aggtgtcctt ttaacaaca atttaagta cttttatat
 5761 atgttatgta gtatatcctt tctaaactgc ctagtgtgta ttttctata attcctattt
 5821 gtgaagtgtg cctgttcttg tctctttttt cagtcatttt ctgcacgcat cccctttat
 5881 atggttatag agatgactgt agcttttcgt gctccactgc gaggtttgtg ctgagagccg
 5941 ctgcacccca gcgaggcctg ctccatggag tgcaggacga gctactgctt tggagcgagg
 6001 gtttctgct tttgagttga cctgacttcc ttcttgaaat gactgttaaa actaaaataa
 6061 attacattgc atttatttta tattcttggt tgaaataaaa ttaattgac ttg

【 0 2 0 1 】

40

CDK19 転写変異体3 (NM_001300963.1) (配列番号14) :

1 gaggggaggc cctggtagc aggcgcgcgt gctttgtggg ggcgaggctg tgggtggccc
 61 agattccagg agggcttcgt gtatggacct caagcgttgg aggtagcaga ctttcagca
 121 gaagaaaaga tgaaggaa tatgcattga agcaaatga aggcacagga atatccatgt
 181 cggctttag agagattgca cttttgcgag aattgaagca ccctaattgt attgcattgc
 241 agaagggtgt cttttctcac agtgacagga aggtatggct gctgtttgat tatgcagagc
 301 atgacttgtg gcatattatt aagtttcacc gtgcataaaa agcaataaaa aagcccatgc
 361 agttgccaag atctatgggt aaatccttac ttaccagat tcttgatgggt atccattacc
 421 tccatgcaaa ttgggtgctt cacagagact tgaaccagc aaatatccta gtaatgggag
 481 aaggctctga gagggggaga gtcaaaatag ctgacatggg ttttgccaga ttattcaatt 50

541 ctccctctaaa gccactagca gatttggatc cagtagttgt gacatttttg tatcgggctc
 601 cagaactttt gcttgggtgca aggcattata caaaggccat tgatatatgg gcaataggtt
 661 gtatatttgc tgaattgttg acttcggaac ctatttttca ctgtcgtcag gaagatataa
 721 aaacaagcaa tccctttcat catgatcaac tggatcggat atttagtgtc atgggggtttc
 781 ctgcagataa agactgggaa gatattagaa agatgccaga atatcccaca cttcaaaaaag
 841 actttagaag aacaacgtat gccaacagta gcctcataaa gtacatggag aaacacaagg
 901 tcaagcctga cagcaaagtg ttcctcttgc ttcagaaact cctgaccatg gatccaacca
 961 agagaattac ctgaggagcaa gctctgcagg atccctattt tcaggaggac cctttgccaa
 1021 cattagatgt atttgccggc tgccagattc cataccccaa acgagaattc cttaatgaag
 1081 atgatcctga agaaaaaggt gacaagaatc agcaacagca gcagaaccag catcagcagc 10
 1141 ccacagcccc tccacagcag gcagcagccc ctccacaggc gccccacca cagcagaaca
 1201 gcaccagac caacgggacc gcagggtggg ctggggccgg ggtcgggggc accggagcag
 1261 ggttgcagca cagccaggac tccagcctga accagggtgc tccaaacaag aagccacggc
 1321 tagggccttc aggcgcaaac tcagggtggac ctgtgatgcc ctgggattat cagcactcca
 1381 gttctgcct gaattaccaa agcagcgttc agggatcctc tcagtcccag agcacacttg
 1441 gctactcttc ctgctctcag cagagctcac agtaccaccc atctaccag gccaccgggt
 1501 actgaccagc tcccgttggg ccaggccagc ccagcccaga gcacaggctc cagcaatatg
 1561 tctgcattga aaagaaccaa aaaaatgcaa actatgatgc catttaaaac tcatcacat
 1621 gggaggaaaa ccttatatac tgagcattgt gcaggactga tagctcttct ttattgactt
 1681 aaagaagatt ctgtgaagt tccccagca ccccttcct gcattgttct cattgtgact 20
 1741 tctctgataa agcgtctgat ctaatcccag cacttctgta accttcagca tttctttgaa
 1801 ggatttcttg gtgcacctt ctcatgctgt agcaatcact atggtttctc tttcaaagc
 1861 tcttttaata ggattttaat gttttagaaa caggattcca gtgggtgtata gttttatact
 1921 tcatgaactg atttagcaac acaggtaaaa atgcacctt taaagcacta cgttttcaca
 1981 gacaataact gtctgtctca tggaaagtctt aaacagaaac tgttactgtc ccaaagtact
 2041 ttactattac gttcgtattt atctagtttc agggaaggtc taataaaaag acaagcggtg
 2101 ggacagaggg aacctacaac caaaaactgc ctatgcttt gcagttatgt gctttatgcc
 2161 acgaagaact gaagtatgtg gtaattttta tagaatcatt catatggaac tgagttccca
 2221 gcatcatctt attctgaata gcattcagta attaagaatt acaattttaa cttcatgta
 2281 gctaagtcta ctttaaaaag ggtttcaaga gctttgtaca gtctcgatgg cccacaccaa 30
 2341 aacgctgaag agagtaacaa ctgcactagg atttctgtaa ggagtaattt tgatcaaaag
 2401 acgtgttact tccctttgaa ggaaaagttt ttagtgtgta ttgtacataa agtcggcttc
 2461 tctaaagaac cattgggttc ttcacatctg ggtctgcgtg agtaactttc ttgcataatc
 2521 aaggttactc aagtagaagc ctgaaaatta atctgctttt aaaataaaga gcagtgttct
 2581 ccattcgtat ttgtattaga tatagagtga ctatttttaa agcatgttaa aaatttaggt
 2641 tttattcatg tttaaagtat gtattatgta tgcataattt tgctgttgtt actgaaactt
 2701 aattctatca agaattcttt tcattgcact gaatgatttc tttgcccct aggagaaaac
 2761 ttaataattg tgcctaaaaa ctatgggagg atagtataag actatactag acaaagtga
 2821 tatttgcatt tccattatct atgaattagt ggctgagttc tttcttagct gctttaagga
 2881 gcccctcact cccagagtc aaaaggaaat gtaaaaactt agagctccca ttgtaatgta 40
 2941 aggggcaaga aatttgtgtt cttctgaatg ctactagcag caccagcctt gttttaatg
 3001 tttcttgag ctagaagaaa tagctgatta ttgtatatgc aaattacatg catttttaa
 3061 aactattctt tctgaactta tctacctggt tatgatactg tgggtccata cacaagtaaa
 3121 ataagattag acagaagcca gtatacttt tgcactattg atgtgatact gtagccagcc
 3181 aggaccttac tgatctcagc ataataatgc tactaataa tgaagtctgc atagtacac
 3241 tcatcaagac tgaagatgaa gcaggttacg tgctccattg gaaggagttt ctgatagtct
 3301 cctgctgttt tacccttcc attttttaaa ataagaaatt agcagccctc tgcataatgt
 3361 agctgcctat atgcagtttt atcctgtgcc ctaaagcctc actgtccaga gctgttggtc
 3421 atcagatgct tattgcaccc tcaccatgtg cctgggtgcc tgctgggtag agaacacaga
 3481 ggacagggca tacttcttgt ccttaaggag cttgtgatct gtgacagtaa gccctcctgg 50

3541 gatgtctgtg ccatgtgatt gacttacaag tgaaactgtc ttataatatg aaggctcttt
 3601 tgtttacttc taaaccact tgggtagtta ctatcccaa atctgttctg taaataatat
 3661 tatggaaggg ttctatgtc agtctacctt agagaaagcc agtgattcaa tatcacaaaa
 3721 ggcattgacg tatctttgaa atgttcacag cagcctttta acaacaactg ggtggctctt
 3781 gtaggcagaa catactctcc taagtgggtg taggaaattg caaggaaaat agaaggctct
 3841 ttcttgctct caaggagggt acctttaata aaagaagaca aaccagata gatatgtaaa
 3901 ccaaaatact atgcccccta atactttata agcagcattg ttaaatagtt cttacgctta
 3961 tacattcaca gaactaccct gtttccctg tatataatga ctttgctgg cagaactgaa
 4021 atataaactg taaggggatt tctgtagttg ctcccagtat acaatatcct ccaggacata
 4081 gccagaaatc tccattccac acatgactga gttcctatcc ctgactggg actggctctt 10
 4141 ttctcctctt tcttgctc agggttcgtg ctaccactg attccttta ccttagtaa
 4201 taattttgga tcatcttctt tcttttaaag gggaacaaag ccttttttt tttgagacg
 4261 gagtgttgct ctgtcaccca agctggagtg cagtggcacg atcttggtc actccaacct
 4321 ccaccttcca ggttcaagtg atttctctgc ctacgcctcc cgagtagctg ggactacggg
 4381 cagcaccac cagctctggc taattttgt atttttagta gagatgggtt ttcacctat
 4441 tggtcaggct ggtcttgaat tctcacctc aggtcatccg cctgtctcgg cctcccgaag
 4501 tgctgggatt ataggtgtga gccaccgcac ccagtggga acaaagcctt ttaacacac
 4561 gtaagggccc tcaaaccgtg ggacctctaa ggagacctt gaagctttt gagggcaaac
 4621 ttacctttg tggccccaa atgatggcat ttctcttga aattattag atactgttat
 4681 gtccccaaag ggtacaggag gggcatcct cagcctatgg gaacaccaa actaggaggg 20
 4741 gttattgaca ggaaggaatg aatccaagtg aaggctttct gctctcgtg ttacaaacca
 4801 gtttcagagt tagctttctg gggaggtgtg tgtttgtga aggaattcaa gtgttcagg
 4861 acagatgagc tcaaggtaag gtagctttg cagcagggt gatactatga ggctgaaaca
 4921 atccttgtga tgaagtagat catgcagtga catacaaaga ccaaggatta tgtatattt
 4981 tatactctg tggttttgaa acttttagt ttagaattt ggcctctgc actactctt
 5041 tgctcttacg aacataatgg actcttaaga atggaaagg atgacattta cctatgtgtg
 5101 ctgcctcatt cctggtgaag caactgctac ttgttctta tgcctctaaa atgatgctgt
 5161 ttctctgct aaaggtaaaa gaaaagaaaa aaatagttgg aaaataagac atgcaactg
 5221 atgtgctttt gagtaattt atgcagcaga aactatacaa tgaaggaaga attctatgga
 5281 aattacaaat ccaaaactct atgatgatgt ctctctagg agtagagaaa ggcagtga 30
 5341 tggcagttag accaacagag gcttgaagga ttcaagtaca agtaatttt tgtataaac
 5401 atagcagttt aggtcccat aatcctcaa aatagtcaca aatatacaa agttcattgt
 5461 tttaggggtt taaaaaacg tgttgacct aaggccatac ttactcttct atgctatcac
 5521 tgcaaagggg tgatatgtat gtattatata aaaaaaaaa ccttaatgc actgttatct
 5581 cctaaatatt tagtaatta atactattta attttttaa agatttgtct gtgtagacac
 5641 taaaagtatt acacaaaatc tggactgaag gtgtccttt taacaacaat taaagtact
 5701 tttatatat gttatgtagt atatccttc taaactgcct agttgtata ttctataat
 5761 tctatttgt gaagtgtacc tgttctgtc tctttttca gtcatttct gcacgcaccc
 5821 ccctttatat ggttatagag atgactgtag ctttctgtc tccactgca ggtttgtct
 5881 cagagccgt gcacccagc gaggcctgct ccatggagt caggacgag tactgcttg 40
 5941 gagcgagggt ttctgctt tgagttgacc tgacttctt ctgaaatga ctgttaaac
 6001 taaaataaat tacattgcat ttatttata ttcttggtg aaataaaat taattgactt
 6061 tg

【 0 2 0 2 】

CDK19転写変異体4 (NM_001300964.1) (配列番号15) :

1 agaaaagaaa caagctgagg tacaactgtc ctaccagcc ctgcctccc gagtactgc
 61 agccaacct tcagcaagaa aagatgaaaa ggaatatgca ttgaagcaaa ttgaaggcac
 121 aggaatatcc atgtcggctt gtagagagat tgcactttg cgagaattga agcaccctaa
 181 tgtgattgca ttgcagaagg tgttcttctc tcacagtgc aggaaggat ggctgctgtt
 241 tgattatgca gagcatgact tgtggcatat tattaagttt caccgtgcat caaaagcaaa 50

301 taaaaagccc atgcagttgc caagatctat ggtaaatacc ttactttacc agattcttga
 361 tggatatccat tacctccatg caaatgggt gcttcacaga gacttgaaac cagcaaatat
 421 cctagtaatg ggagaaggtc ctgagagggg gagagtcaaa atagctgaca tgggttttgc
 481 cagattattc aattctctc taaagccact agcagatttg gatccagtag ttgtgacatt
 541 ttggtatcgg gctccagaac ttttgcttgg tgcaaggcat tatacaaagg ccattgatat
 601 atgggcaata ggttgatat ttgctgaatt gttgacttcg gaacctatit ttactgtcg
 661 tcaggaagat ataaaaacaa gcaatccctt tcatcatgat caactggatc ggatatttag
 721 tgtcatggg tttcctgcag ataaagactg ggaagatatt agaaagatgc cagaatatcc
 781 cacacttcaa aaagacttta gaagaacaac gtatgccaac agtagcctca taaagtacat
 841 ggagaaacac aaggtaagc ctgacagcaa agtgttctc ttgcttcaga aactcctgac 10
 901 catggatcca accaagagaa ttacctgga gcaagctctg caggatccct attttcagga
 961 ggaccctttg ccaacattag atgtatttgc cggctgccag attccatacc ccaaacgaga
 1021 attccttaat gaagatgatc ctgaagaaaa aggtgacaag aatcagcaac agcagcagaa
 1081 ccagcatcag cagcccacag cccctccaca gcaggcagca gcccctccac aggcgcccc
 1141 accacagcag aacagcacc agaccaacgg gaccgcagggt ggggctgggg cgggggtcgg
 1201 gggcacggga gcagggttgc agcacagcca ggactccagc ctgaaccagg tgcctccaaa
 1261 caagaagcca cggctagggc ctacagggc aaactcaggt ggacctgtga tgcctcggga
 1321 ttatcagcac tccagttctc gcctgaatta ccaaagcagc gtacaggat cctctcagtc
 1381 ccagagcaca ctgggtact ctctctctc tcagcagagc tcacagtacc acccatctca
 1441 ccaggccac cggctactgac cagctccgt tgggccaggc cagccagcc cagagcacag 20
 1501 gctccagcaa tatgtctgca ttgaaaagaa ccaaaaaaat gcaactatg atgccattta
 1561 aaactcatac acatgggagg aaaaccttat atactgagca ttgtgcagga ctgatagctc
 1621 ttctttattg acttaagaa gattcttgtg aagtttccc agcaccctt cctgcatgt
 1681 gttccattgt gacttctctg ataaagcgtc tgatctaata ccagcacttc tgtaaccttc
 1741 agcatttctt tgaaggattt cctgggtgcac ctttctcatg ctgtagcaat cactatgggt
 1801 tatcttttca aagctctttt aataggattt taatgtttta gaaacaggat tccagtgggtg
 1861 tatagtttta tacttcatga actgatttag caacacaggt aaaaatgcac cttttaagc
 1921 actacgtttt cacagacaat aactgttctg ctcatggaag tcttaaacag aaactgttac
 1981 tgtcccaaag tactttacta ttacgttctg atttatctag ttacaggga ggtctaataa
 2041 aaagacaagc ggtgggacag agggaacct caacaaaaaa ctgcctagat cttgcagtt 30
 2101 atgtgcttta tgcacgaag aactgaagta tgtggtaatt ttatagaat cattcatatg
 2161 gaactgagtt ccagcatca tcttattctg aatagcattc agtaattaag aattacaatt
 2221 ttaaccttca ttagctaaag tctaccttaa aaagggttc aagagcttg tacagtctcg
 2281 atggcccaca ccaaacgct gaagagagta acaactgcac taggatttct gtaaggagta
 2341 attttgatca aaagacgtgt tacttccct tgaaggaaaa gtttttagt tgtattgtac
 2401 ataaagtcgg ctctctaaa gaaccattgg ttcttcaca tctgggtctg cgtgagtaac
 2461 tttcttgcat aatcaagggt actcaagtag aagcctgaaa attaatctgc ttttaaaata
 2521 aagagcagtg ttctccattc gtatttgtat tagatataga gtgactattt taaagcatg
 2581 ttaaaaattt aggttttatt catgtttaaa gtatgtatta tgtatgcata atttgctgt
 2641 tgttactgaa acttaattct atcaagaatc ttttctattg cactgaatga tttcttttcg 40
 2701 ccctaggaga aaacttaata attgtgccta aaaactatgg gcgatagta taagactata
 2761 ctgacaaaag tgaatatttg catttccatt atctatgaat tagtggtga gttctttctt
 2821 agctgcttta aggagcccct cactccccag agtcaaaaagg aaatgtaaaa acttagagct
 2881 cccattgtaa tgaaggggc aagaaatttg tttcttctg aatgctacta gcagcaccag
 2941 ccttgtttta aatgttttct tgagctagaa gaaatagctg attattgtat atgcaaatta
 3001 catgcatttt taaaaactat tcttctgaa ctatctacc tggttatgat actgtgggtc
 3061 catacacaag taaaataaga ttagacagaa gccagtatac attttgcaat attgatgtga
 3121 tactgtagcc agccaggacc ttactgatct cagcataata atgctacta ataataagt
 3181 ctgcatagtg acactcatca agactgaaga tgaagcagggt tacgtgctcc attggaagga
 3241 gtttctgata gtctcctgct gttttacccc ttccattttt taaaataaga aattagcagc 50

3301 cctctgcata atgtagctgc ctatatgcag tttatcctg tgccctaaag cctcactgtc
 3361 cagagctgtt ggtcatcaga tgcttattgc accctcacca tgtgcctggg gccctgctgg
 3421 gtagagaaca cagaggacag ggcatacttc ttgtccttaa ggagcttgtg atctgtgaca
 3481 gtaagccctc ctgggatgtc tgtgccatgt gattgactta caagtgaac tgtcttataa
 3541 tatgaaggtc ttttgttta ctctaaacc cacttgggta gttactatcc ccaaactgtt
 3601 tctgtaaata atattatgga agggtttcta tgtcagtcta ccttagagaa agccagtgt
 3661 tcaatatcac aaaaggcatt gacgtatctt tgaaatgtt acagcagcct ttaacaaca
 3721 actgggtggg cctttaggc agaacatact ctctaagtgt gttgtaggaa attgcaagga
 3781 aaatagaagg tctgttcttg ctctcaagga ggttaccttt aataaaagaa gacaaacca
 3841 gatagatatg taaacaaaa tactatgccc cttaatactt tataagcagc attgttaa
 3901 agttcttacg ctatacatt cacagaacta cctgttttc cttgtatata atgactttg
 3961 ctggcagaac tgaaatataa actgtaaggg gatttcgtca gttgctcca gtatacaata
 4021 tctccagga catagccaga aatctccatt ccacacatga ctgagttcct atccctgcac
 4081 tgggtactggc tcttttctcc tcttcccttg cctcagggtt cgtgctaccc actgattccc
 4141 tttaccctta gtaataattt tggatcattt tcttccctt aaaggggaac aaagccttt
 4201 tttttttga gacggagtgt tgctctgtca cccaagctgg agtgcagtgg cacgatcttg
 4261 gctcactcca acctccacct tccaggttca agtgattctc ctgcctcagc ctcccgagta
 4321 gctgggacta cgggcacgca ccaccacgtc tggctaattt ttgtatttt agtagagatg
 4381 gggtttcacc ctattgggtc ggctgggtctt gaattcctca cctcagggtc tccgctgtc
 4441 tggcctccc gaagtgtgtg gattataggt gtgagccacc gcaccagtt gggaacaaag
 4501 cctttttaac acacgtaagg gccctcaaac cgtgggacct ctaaggagac cttgaagct
 4561 tttgagggc aaactttacc ttgtgtgtcc ccaaagtgtg gcatttctt ttgaaattta
 4621 ttagatactg ttatgtcccc caagggtaca ggaggggcat cctcagcct atgggaacac
 4681 ccaaactagg aggggttatt gacaggaagg aatgaatcca agtgaaggct ttctgtctt
 4741 cgtgttaca accagtttca gagttagctt tctggggagg tgtgtgttg tgaaaggaat
 4801 tcaagtgtg caggacagat gagtcaagg taaggtagct ttggcagcag ggctgatact
 4861 atgaggctga aacaatcctt gtgatgaagt agatcatgca gtgacataca aagaccaagg
 4921 attatgtata ttttatatc tctgtgggtt tgaaacttta gtacttagaa tttggcctt
 4981 ctgcactact ctttgtctt tacgaacata atggactctt aagaatggaa agggatgaca
 5041 tttacctatg tgtgctgcct cattcctggg gaagcaactg ctactgttc tctatgcctc
 5101 taaaatgatg ctgtttctc tgctaaagg aaaagaaaag aaaaaatag ttgaaaata
 5161 agacatgcaa cttgatgtg ttttgagtaa atttatgcag cagaaactat acaatgaagg
 5221 agaattcta tggaaattac aaatcaaaa ctctatgatg atgtcttct agggagtaga
 5281 gaaaggcagt gaaatggcag ttagaccaac agaggcttga aggattcaag tacaagtaat
 5341 atttgtata aaacatagca gtttaggtcc ccataatcct caaaaatagt cacaaatata
 5401 acaaagttca ttgttttagg gtttttaaaa aacgtgttgt acctaaggcc atacttactc
 5461 ttctatgcta tactgcaaa ggggtgatat gtatgtatta tataaaaaaa aaaaccctta
 5521 atgcactgtt atctcctaaa tatttagtaa attaatata ttaattttt ttaaagattt
 5581 gtctgtgtag acactaaaag tattacacaa aatctggact gaagggttcc ttttaacaa
 5641 caatttaaag tactttttat atatgttatg tagtatatcc ttctaaact gcctagtgtg
 5701 tatattccta taattcctat ttgtgaagtg tacctgttct tgtctcttt ttcagtcatt
 5761 ttctgcacgc atccccctt atatggttat agagatgact gtagcttttc gtgtccact
 5821 gcgaggtttg tgctcagagc cgctgcaccc cagcgaggcc tgctccatgg agtgcaggac
 5881 gagctactgc ttggagcga gggtttctg ctttgagtt gacctgactt cttcttgaa
 5941 atgactgtta aaactaaaat aaattacatt gcatttattt tatattcttg gttgaaataa
 6001 aatttaattg actttg

【 0 2 0 3 】

サイクリン依存性キナーゼ8 (CDK8)、転写変異体1 (NM_001260.2) (配列番号16)

):

1 gagtgcctc cctcctcctc tctttgagga ggtaccggct gttgtgcggc tctgcccttc

50

61 tgtttgagtg tatgggagag tgagtgagtg agtgagtgtg agcgtgtgtg tgagagcgtg
 121 aggcgtgagt gcgcgtgtga gaggacgaga gcccgcctgg ccgccccgcc gctccccccg
 181 cagcaggagc agaacgcgcg gccggagaga gcggcggagc cggcgcccag ggagcc
 cgcg
 241 gggacaaggg cagagacacc gctccccacc cccagccctc gtccctcggc tctccttcgc
 301 cgggggatcc tccccgttcc tccacccccg gccggcctct gccccgccgt cccccggat
 361 gtccctggcg ctttcgcggg gcctcctcct gctcttgccg catcagtcgg gctgggtgtg
 421 cggccggcgg gcgtagagcg ggccgggttc cgggggctgc ggctgccgt gcttccccgg
 481 tccccacccc tgccccccgg cccccgacc cagctctccg gcctcagagg ctgtgacaat
 541 ggactatgac tttaaagtga agctgagcag cgagcgggag cgggtcgagg acctgtttga 10
 601 atacgagggc tgcaaagttg gccgaggcac ttatggtcac gtctacaaag ccaagaggaa
 661 agatgggaag gatgataaag actatgcttt aaaacaaata gaaggaactg ggatctctat
 721 gtcggcatgt agagaaatag cattacttcg agagcttaag catccaaacg tcatttctct
 781 tcaaaagggt tttctgtctc atgctgatag gaagggtgtg cttctgtttg actatgctga
 841 acatgacctc tggcatataa tcaagtttca cagagcttct aaagcaaaca agaagccagt
 901 tcagttacct cggggaatgg tgaagtcact attatatcag atcctagatg gtattcacta
 961 cctgcatgct aactgggtgt tgcacagaga ttgaaacct gctaataatt tagttatggg
 1021 tgaaggctct gagcgaggaa gagtaaaaaat tgctgacatg ggctttgcc gattatttaa
 1081 ttcacctttg aagcctttag cagatttggg tccagtgggt gttacattct ggtaccgagc
 1141 ccctgaacta cttcttggag caaggcatta taccaaagct attgatattt gggctatagg 20
 1201 gtgtatattt gcagaactac taacgtcaga accaatattt cactgtcgac aagaggacat
 1261 caaaactagt aatccttacc accatgacca gctggacaga atattcaatg taatgggatt
 1321 tcctgcagat aaagattggg aagatataaa aaagatgcct gaacattcaa cattaatgaa
 1381 agatttcaga agaaatacgt ataccaactg cagccttacc aagtatatgg aaaaacataa
 1441 agttaacca gatagtaaag cattccactt gttcagaag ctgcttacca tggacccaat
 1501 aaagcgaatt acctcagaac aggctatgca ggaccctat ttcttagaag acccacttcc
 1561 tacatcagac gtttttgccg gttgtcaaat cccttacc caacgagaat ttttaacgga
 1621 agaagaacct gatgacaaaag gagacaaaaa gaaccagcag cagcagcagg gcaataacca
 1681 cactaatgga actggccacc cagggaatca agacagcagt cacacacagg gacccccgtt
 1741 gaagaaagtg agagttgttc ctctaccac tacctcaggt ggacttatca tgacctcaga 30
 1801 ctatcagcgt tccaatccac atgctgccta tcccaacct ggaccaagca catcacagcc
 1861 gcagagcagc atgggatact cagctacctc ccagcagcct ccacagtact cacatcagac
 1921 acatcggtac tgagctgcat cggaatcttg tccatgact gttgcgaatg ctgcagggt
 1981 gactgtgcag ctctctgcgg gaacctggta tgggcatga gaatgtactg tacaaccaca
 2041 tcttcaaaat gtccagtagc caagttccac cacttttacc agattggggg agtggcttcc
 2101 aagttgtacc tattttggag ttagacttga aaagaaagt ctagcacagt ttgtgtgtg
 2161 gatttgctac ttccatagtt tacttgacat ggttcagact gaccaatgca ttttttcag
 2221 tgacagtctg tagcagttga agctgtgaat gtgctagggg caagcatttg tctttgtatg
 2281 tggatgaattt tttcagtgtg acaacattat ctgaccaata gtacacacac agacacaaag
 2341 tttactgggt acttgaacaa tacagtatat gttaacgaaa taaccaagac tcgaaatgag 40
 2401 attattttgg tacacctttc ttttagtgt cttatcagtg ggctgattca ttttctacat
 2461 taatcagtggt tttctgacca agaataatgc ttggattttt ttgaaagtac aaaaagccac
 2521 atagtttttc cagaaagggt tcaaaactcc caaagattaa cttccaactt ataagttgt
 2581 tttattttc aatctatgac ttgactggta ttaaagctgc tatttgatag taattaaata
 2641 tgttgtcatt gatataaacc tgtttgggtc agcaacaaa ctaaatgat tgtcatagac
 2701 agtgttttat tttcctgtt ggtgttgctg attgtgagc atgctttaag atgaaaaaag
 2761 catgaatgat aacttcctta aaaagggtgc gcatccaatt caaatatttt cgtcctgatt
 2821 ttaaagctgg ttgggtgtagt gctattaaaa tttcgttcag ttaattttcc tttgaaaac
 2881 ttgttcgcac gttgtttagg gtgcccttac ttcagcaaag gagaaggagt aggagagcct
 2941 tagaattttt gaggaaaaaa aaacctataa catacaatgt actgtatcaa actattttac 50

3001 atgaatgaca caagtattct gaataaaaaa taattgaaca ttgttaaaaa caaggtgtta
 3061 tgtaataaat ttatitttca taaatcaaaa aaaaaaaaaa a

【 0 2 0 4 】

サイクリン依存性キナーゼ8 (CDK8)、転写変異体2 (NM_001318368.1) (配列番号
 17) :

1 gagtgccctc cctcctcctc tctttgagga ggtaccggct gttgtgcggc tctgcccttc
 61 tgtttgagtg tatgggagag tgagttagtg agtgagtgtg agcgtgtgtg tgagagcgtg
 121 aggcgtgagt gcgcgtgtga gaggacgaga gcccgcctgg ccgccccgcc gctcccgccg
 181 cagcaggagc agaacgcgcg gccggagaga gcggcggagc cggcgcccag ggagcc
 cgcg 10
 241 gggacaaggg cagagacacc gctccccacc cccagccctc gtccctcggc tctccttcgc
 301 cgggggatcc tccccgttcc tccacccccg gccggcctct gccccgccgt cccccggat
 361 gtccctggcg ctttcgctgg gctcctcctt gctcttgccg catcagtcgg gctgggtgtg
 421 cggccggcgg gcgtagagcg ggccgggttcc cgggggctgc ggctgccgt gcttccccgg
 481 tccccacccc tgccccccgg cccccgacc cagctctccg gctcagagg ctgtgacaat
 541 ggactatgac tttaaagtga agctgagcag cgagcgggag cgggtcagg accgtttga
 601 atacgagggc tgcaaagttg gccgaggcac ttatgggtac gtctacaaag ccaagaggaa
 661 agatgggaag gatgataaag actatgcttt aaaacaaata gaaggaactg ggatctctat
 721 gtcggcatgt agagaaatag cattacttcg agagcttaag catccaaacg tcatctctt
 781 tcaaaaggtg ttctgtctc atgctgatag gaagggtgtg ctctgtttg actatgctga 20
 841 acatgacctc tggcatataa tcaagtttca cagagcttct aaagcaaaca agaagccagt
 901 tcagttacct cggggaatgg tgaagtcact attatatcag atcctagatg gtattcacta
 961 cctgcatgct aactgggtgt tgcacagaga ttgaaacct gctaatttt tagttatggg
 1021 tgaaggtcct gagcgaggaa gagtaaaaaat tgctgacatg ggctttgccc gattatttaa
 1081 ttcacctttg aagcctttag cagatttggg tccagtgggt gttacattct ggtaccgagc
 1141 ccctgaacta cttcttgag caaggcatta taccaaagct attgatattt gggctatagg
 1201 gtgtatattt gcagaactac taacgtcaga accaatattt cactgtcgac aagaggacat
 1261 caaaactagt aatccttatt accatgacca gctggacaga atattcaatg taatgggatt
 1321 tcctgcagat aaagattggg aagatataaa aaagatgcct gaacattcaa cattaatgaa
 1381 agatttcaga agaaatacgt ataccaactg cagccttatt aagtatatgg aaaaacataa 30
 1441 agttaacca gatagtaaag cattccactt gcttcagaag ctgcttacca tggaccaat
 1501 aaagcgaatt acctcagaac aggctatgca ggaccctat ttcttagaag acccacttcc
 1561 tacatcagac gtttttgccg gttgtcaaat cccttaccga aaacgagaat ttttaacgga
 1621 agaagaacct gatgacaaag gagacaaaaa ccagcagcag cagcagggca ataaccacac
 1681 taatggaact ggccaccag ggaatcaaga cagcagtcac acacagggac ccccggtgaa
 1741 gaaagtgaga gttgttctc ctaccactac ctacggtgga ctatcatga cctcagacta
 1801 tcagcgttcc aatccacatg ctgcctatcc caacctgga ccaagcacat cacagccgca
 1861 gagcagcatg ggatactcag ctacctcca gcagcctcca cagtactcac atcagacaca
 1921 tcggtactga gctgcatcgg aatcttgtcc atgcactgtt gcgaatgctg cagggtgac
 1981 tgtgcagctc tctgcgggaa cctgggtatg gccatgagaa tgtactgtac aaccacatct 40
 2041 tcaaaatgtc cagtagccaa gttccaccac ttttcacaga ttggggtagt ggcttccaag
 2101 ttgtacctat ttggagttg gacttgaaaa gaaagtgtc gcacagtttg tgttggtgat
 2161 ttgctacttc catagtttac ttgacatggt tcagactgac caatgcattt tttcagtga
 2221 cagtctgtag cagtgaagc tgtgaatgtg ctaggggcaa gcatttgtct ttgtatgtg
 2281 tgaattttt cagtgaaca acattatctg accaatagta cacacacaga cacaagttt
 2341 aactggtact tgaaacatac agtatatgtt aacgaaataa ccaagactcg aaatgagatt
 2401 attttggtac accttcttt ttagtgtctt atcagtgggc tgattcattt tctacattaa
 2461 tcagtgtttt ctgaccaaga atattgcttg gattttttg aaagtacaaa aagccacata
 2521 gtttttccag aaaggtttca aaactcccaa agattaactt ccaacttata agtttgttt
 2581 tattttcaat ctatgacttg actggtatta aagctgctat ttgatagtaa ttaaataatgt 50

2641 tgtcattgat ataaacctgt ttggttcagc aaacaaacta aaatgattgt catagacagt
 2701 gttttatitt tctgttgggt gttgctgatt tgtgagcatg cttaagatg aaaaaagcat
 2761 gaatgataac ttccttaaaa aggtgcggca tccaattcaa atattttcgt cctgatttta
 2821 aagctggttg gtgtagtgtt attaaaattt cggttcagtta attttccttt tgaaaacttg
 2881 ttcgcacggt gtttaggggt cccttacttc agcaaaggag aaggagtagg agagccttag
 2941 aatttttgag gaaaaaaaaa cctataacat acaatgtact gtatcaaact attttacatg
 3001 aatgacacaa gtattctgaa taaaaaataa ttgaacattg taaaaacaa ggtgttatgt
 3061 aataaattta tttttcataa atcaaaaaaa aaaaaaaa

【 0 2 0 5 】

サイクリン依存性キナーゼ8 (CDK8)、転写変異体3 (NM_001346501.1) (配列番号 18) :

1 gagtgccttc cctcctcctc tctttgagga ggtaccggct gttgtgcggc tctgcccttc
 61 tgtttgagtg tatgggagag tgagtgagtg agtgagtgtg agcgtgtgtg tgagagcgtg
 121 aggcgtgagt gcgctgtgtg gaggacgaga gcccgccttg ccgccccgcc gctcccgcg
 181 cagcaggagc agaacgcgcg gccggagaga gcggcggagc cggcgcccag ggagcc
 cgcg

241 gggacaaggg cagagacacc gctccccacc ccagccctc gtccctcggc tctccttcgc
 301 cgggggatcc tccccgttc tccacccccg gccggcctct gccccgccgt cccccggat
 361 gtccctggcg ctttcgcggg gcctcctcct gctcttgccg catcagtcgg gctggtgctg
 421 cggccggcgg gcgtagagcg ggccgggttc cgggggctgc ggctgccgt gctccccgg
 481 tccccacccc tgccccccgg cccccgacc cagctctccg gcctcagagg ctgtgacaat
 541 ggactatgac tttaaagtga agctgagcag cgagcgggag cgggtcgagg acctgttga
 601 atacgagggc tgcaaagttg gccgaggcac ttatggtcac gtctacaaag ccaagaggaa
 661 agatgggaag gatgataaag actatgcttt aaaacaaata gaaggaactg ggatctctat
 721 gtcggcatgt agagaaatag cattacttcg agagcttaag catccaaacg tcatttctct
 781 tcaaaagggt tttctgtctc atgctgatag gaagggtgtg cttctgtttg actatgctga
 841 acatgacctc tggcatataa tcaagtttca cagagcttct aaagcaaaca agaagccagt
 901 tcagttacct cggggaatgg tgaagtcaat attatatcag atcctagatg gtatttacta
 961 cctgcatgct aactgggtgt tgcacagaga ttgtctgaca tgggctttgc ccgattattt
 1021 aattcacctt tgaagccttt agcagatttg gatccagtgg ttgttacatt ctggtaccga
 1081 gccctgaac tacttcttgg agcaaggcat tataccaaag ctattgatat ttgggctata
 1141 ggggtgtat ttgcagaact actaacgtca gaaccaatat ttactgtcg acaagaggac
 1201 atcaaaacta gtaatcctta tcacatgac cagctggaca gaatattcaa tgtaatggga
 1261 tttcctgcag ataaagattg ggaagatata aaaaagatgc ctgaacattc aacattaatg
 1321 aaagatttca gaagaaatac gtataccaac tgcagcctta tcaagtatat ggaaaaacat
 1381 aaagttaaac cagatagtaa agcattccac ttgcttcaga agctgcttac catggacca
 1441 ataaagcgaa ttacctcaga acaggctatg caggaccctt atttcttaga agaccactt
 1501 cctacatcag acgtttttgc cggttgtcaa atcccttacc caaaacgaga atttttaacg
 1561 gaagaagaac ctgatgacaa aggagacaaa aagaaccagc agcagcagca gggcaataac
 1621 cacactaatg gaactggcca ccaggggaat caagacagca gtcacacaca gggacccccg
 1681 ttgaagaaag tgagagttgt tctcctacc actacctcag gtggacttat catgacctca
 1741 gactatcagc gtccaatcc acatgctgcc tatcccaacc ctggaccaag cacatcacag
 1801 ccgagagca gcatgggata ctacgtacc tcccagcagc ctccacagta ctacatcag
 1861 acacatcggg actgagctgc atcggaatct tgtccatgca ctgttgcaa tgctgcaggg
 1921 ctgactgtgc agctctctgc gggaacctgg tatgggcat gagaatgtac tgtacaacca
 1981 catcttcaaa atgtccagta gccaaagtcc accactttc acagattggg gtagtggctt
 2041 ccaagttgta cctatttttg agttagactt gaaaagaaag tgctagcaca gtttgtgttg
 2101 tggatttgct acttccatag ttacttgac atgggtcaga ctgaccaatg cattttttc
 2161 agtgacagtc tgtagcagtt gaagctgtga atgtgctagg ggcaagcatt tgtctttgta
 2221 tgtggtgaat ttttcagtg taacaacatt atctgaccaa tagtacacac acagacacaa

10

20

30

40

50

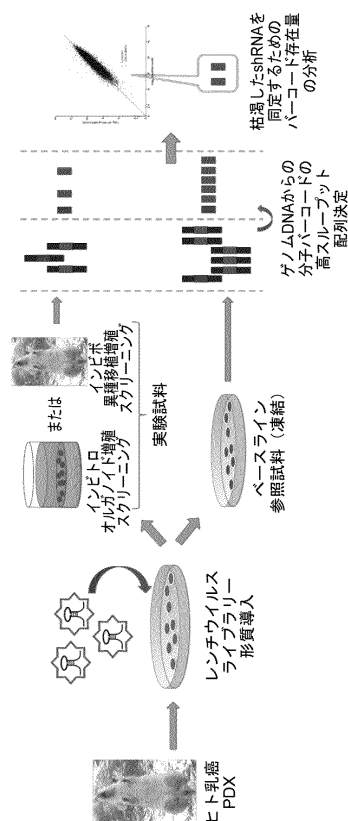
2281 agtttaactg gtacttgaaa catacagtat atgttaacga aataaccaag actcgaaatg
 2341 agattatfff ggtacacctt tctttttagt gtcttatcag tgggctgatt cattttctac
 2401 attaatacagt gttttctgac caagaatatt gcttggattt ttttgaaagt acaaaaagcc
 2461 acatagtfff tccagaaagg tttcaaaact cccaaagatt aacttccaac ttataagttt
 2521 gtttttattt tcaatctatg acttgactgg tattaaagct gctatttgat agtaattaa
 2581 tatgttgta ttgatataaa cctgtttggt tcagcaaaca aactaaaatg attgtcatag
 2641 acagtgtttt atttttcctg ttgggtgtgc tgatttgtga gcatgcttta agatgaaaaa
 2701 agcatgaatg ataacttcct taaaaagggt cgcatccaa ttcaaatatt ttcgtcctga
 2761 ttttaaagct gggtgggtga gtgctattaa aatttcgttc agttaatttt ctttttgaaa
 2821 acttgttcgc acgttgttta ggggtgccctt acttcagcaa aggagaagga gtaggagagc
 2881 cttagaattt ttgaggaaaa aaaaacctat aacatacaat gtactgtatc aaactatfff
 2941 acatgaatga cacaagtatt ctgaataaaa aataattgaa cattgttaaa aacaagggtg
 3001 tatgtataaa atttatfff cataaatcaa aaaaaaaaaa aaa

10

【図面】

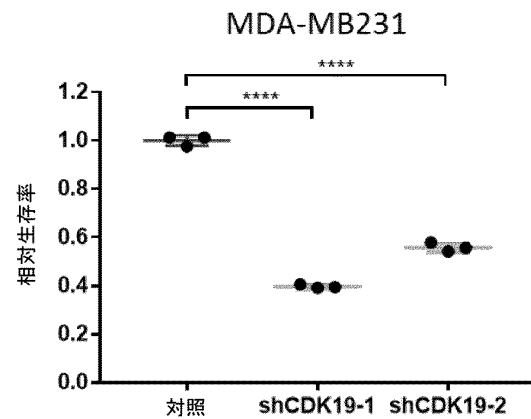
【図 1 - 1】

【図1A】



【図 1 - 2】

【図1B】



20

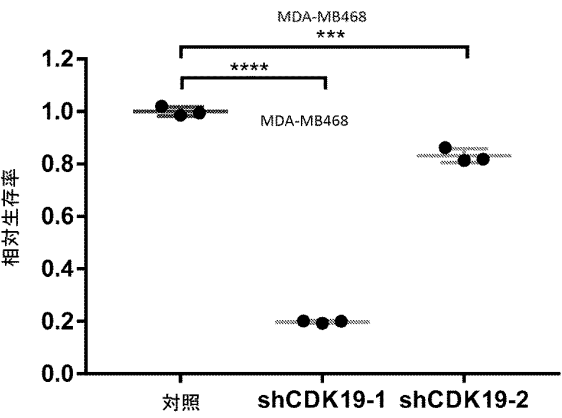
30

40

50

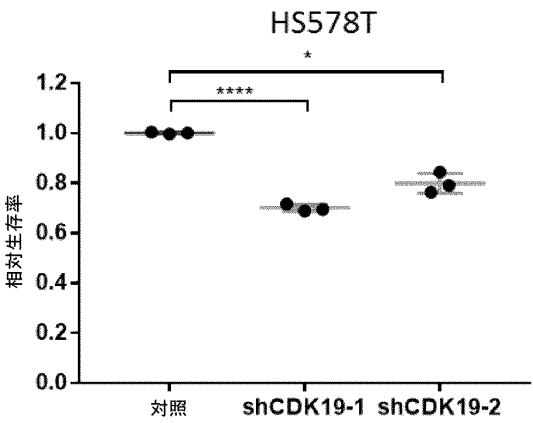
【 図 1 - 3 】

【図1C】



【 図 1 - 4 】

【図1D】

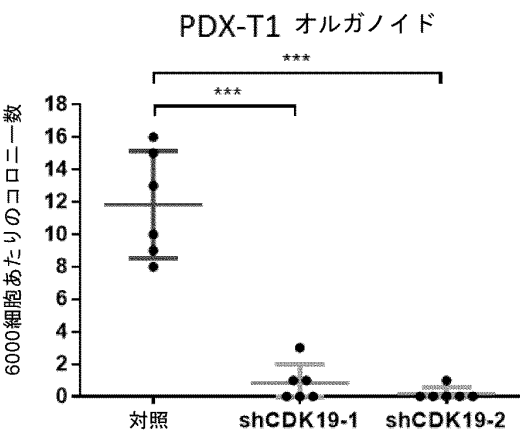


10

20

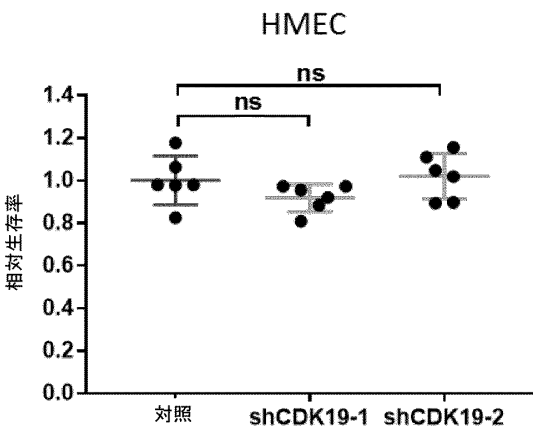
【 図 1 - 5 】

【図1E】



【 図 1 - 6 】

【図1F】



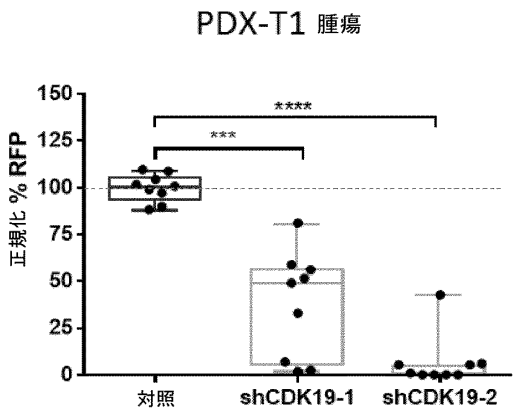
30

40

50

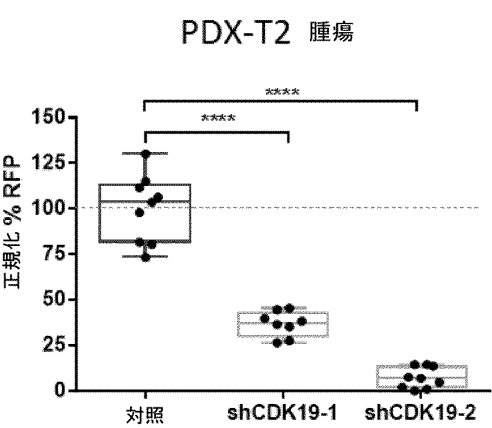
【図 1 - 7】

【図1G】



【図 1 - 8】

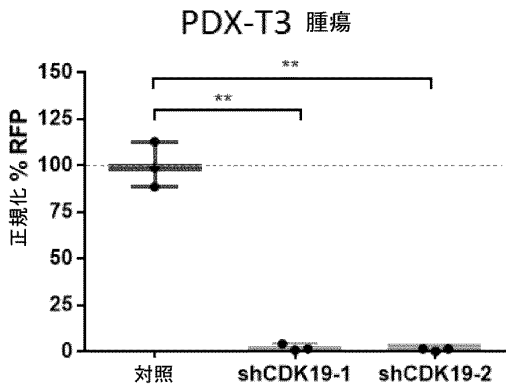
【図1H】



10

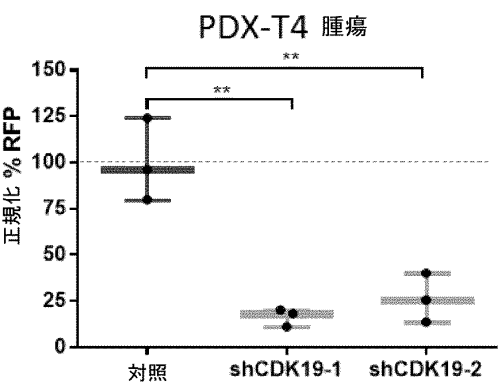
【図 1 - 9】

【図1I】



【図 1 - 10】

【図1J】



20

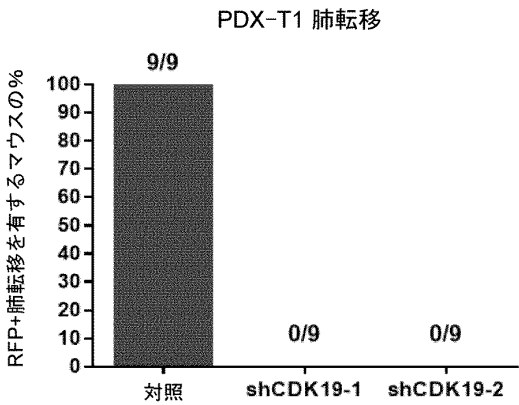
30

40

50

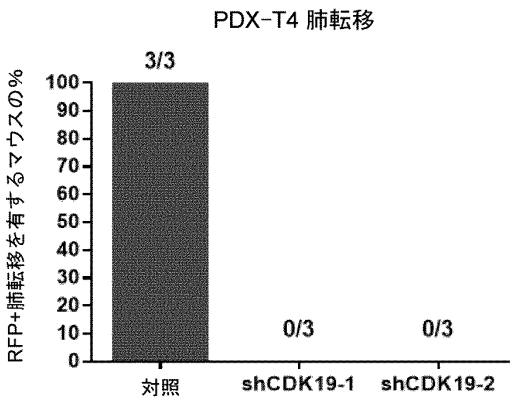
【図 1 - 1 1】

【図1K】



【図 1 - 1 2】

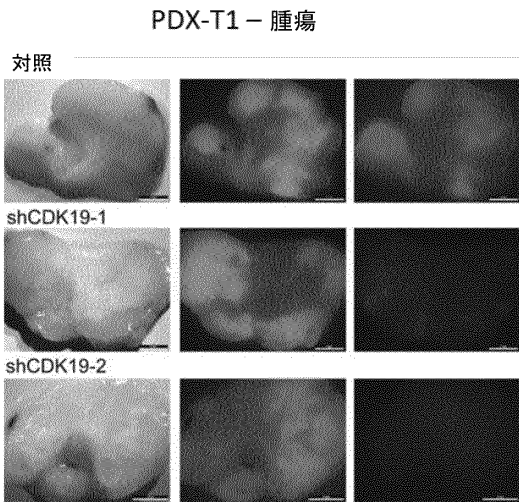
【図1L】



10

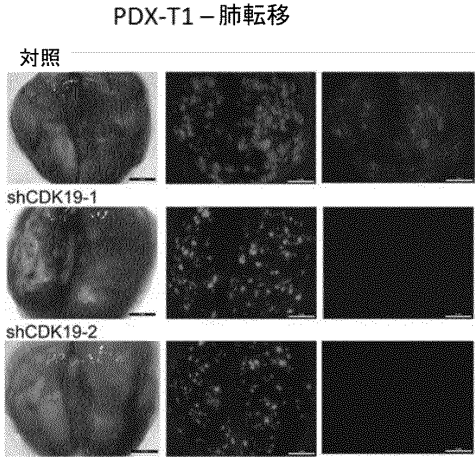
【図 1 - 1 3】

【図1M】



【図 1 - 1 4】

【図1N】



20

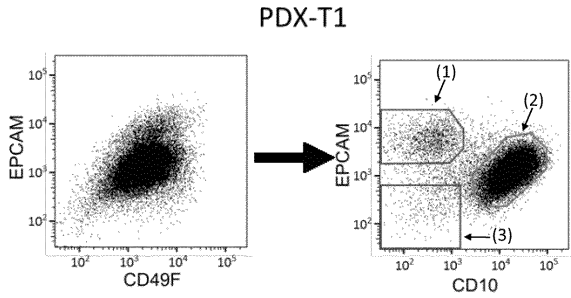
30

40

50

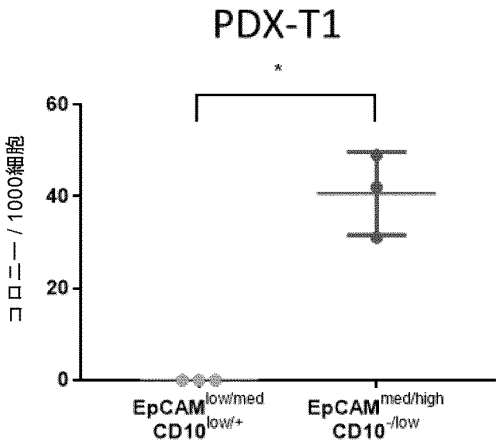
【図 2 - 1】

【図2A】



【図 2 - 2】

【図2B】



10

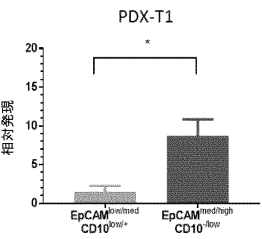
【図 2 - 3】

【図2C】

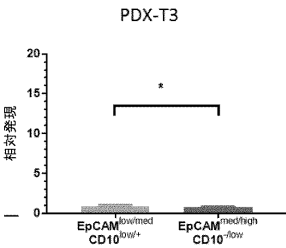
	PDX-T1				PDX-T2				PDX-T5				PDX-T4				PDX-T8				PDX-T7			
	100	500	2500		100	500	2500		100	500	2500		100	500	2500		100	500	2500		100	500	2500	
注射した細胞	1/2	4/4	4/4		2/8	8/8	10/12		0/4	0/4	0/4		4/4	4/4	4/4		3/8	4/8	4/8		3/4	3/4	3/4	
EpCAM^{med/high} CD10^{-low}	0/4	0/8	1/8		0/3	0/8	2/12		0/4	0/8	0/8		0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4	
EpCAM^{low/med} CD10^{low/+}	0/2	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4		0/4	0/4	0/4	
EpCAM⁻ CD10⁻																								

【図 2 - 4】

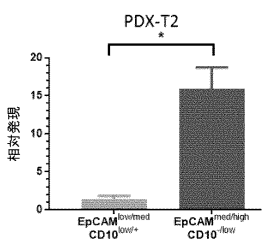
【図2D】



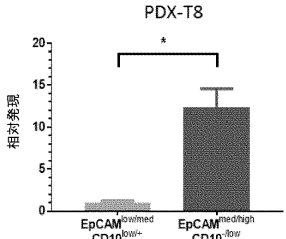
【図2F】



【図2E】



【図2G】



20

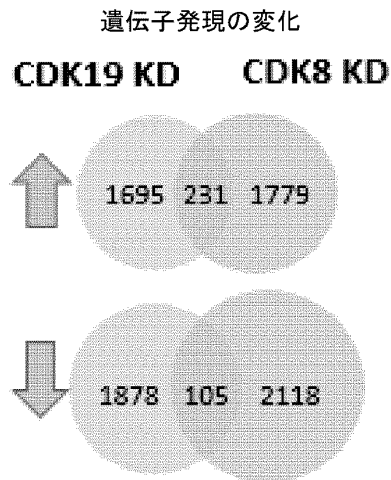
30

40

50

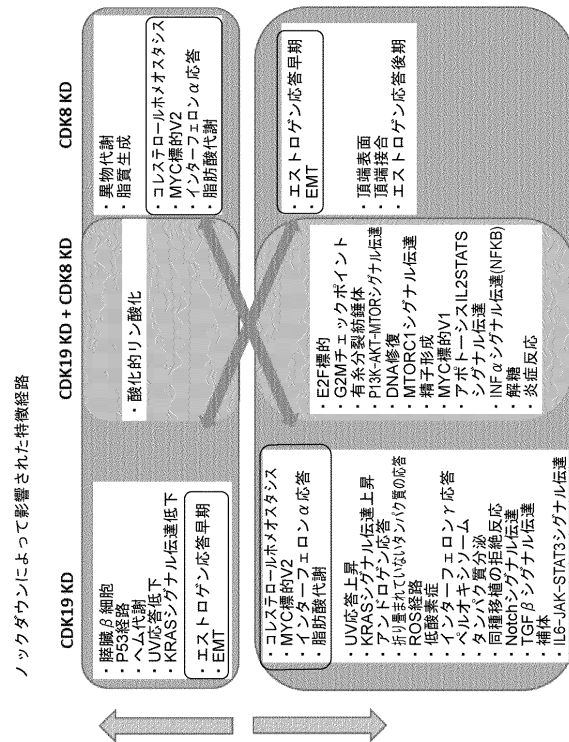
【図3-1】

【図3A】



【図3-2】

【図3B】

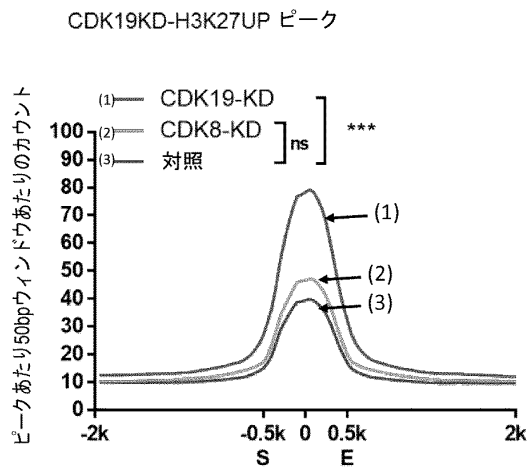


10

20

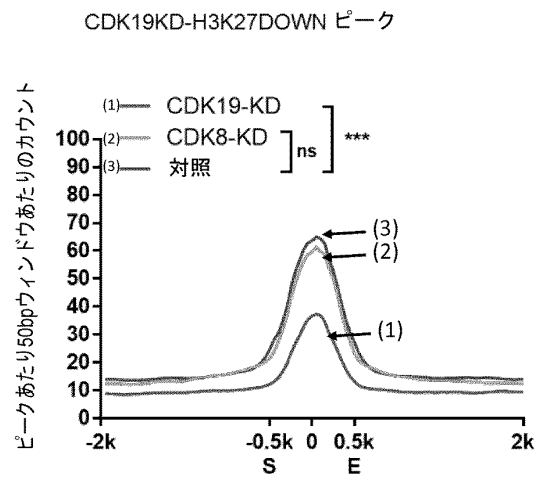
【図3-3】

【図3C】



【図3-4】

【図3D】



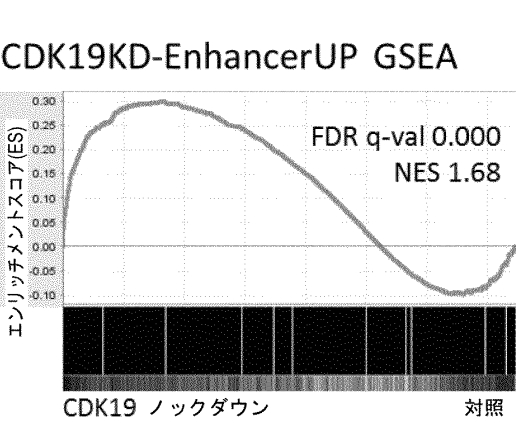
30

40

50

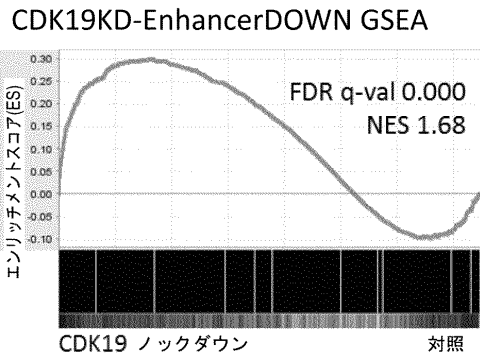
【 図 3 - 5 】

【 図3E】



【 図 3 - 6 】

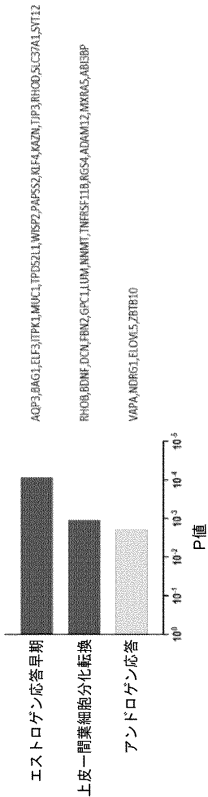
【 図3F】



10

【 図 3 - 7 】

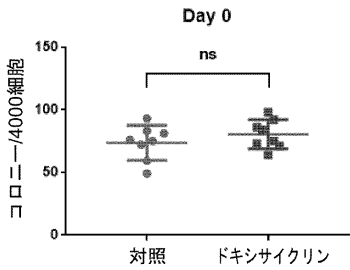
【 図3G】



【 図 4 - 1 】

【 図4A】

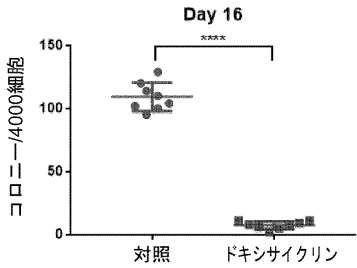
inducCDK19KD-PDX-T1 オルガノイド



20

30

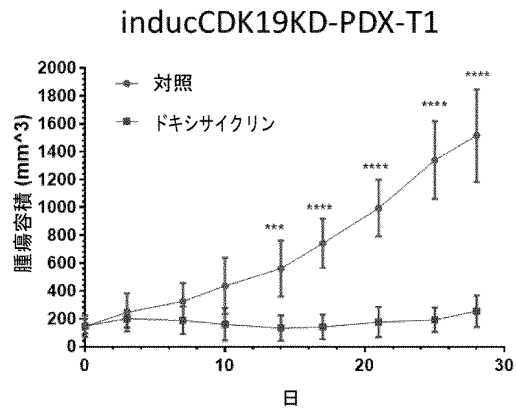
【 図4B】



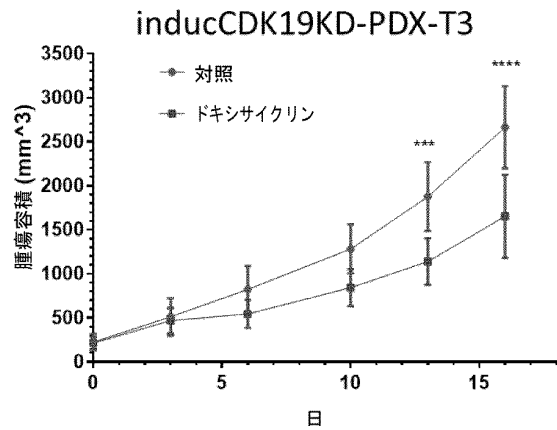
40

50

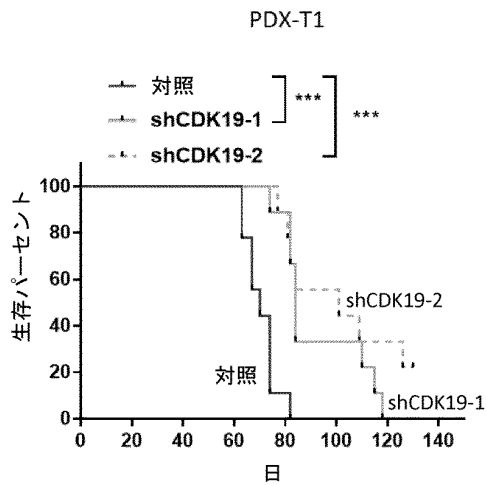
【図 4 - 2】
【図4C】



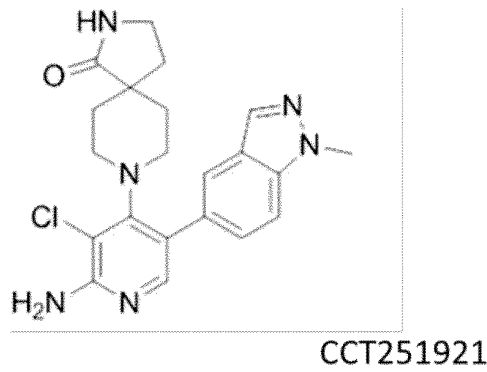
【図 4 - 3】
【図4D】



【図 4 - 4】
【図4E】



【図 4 - 5】
【図4F】



10

20

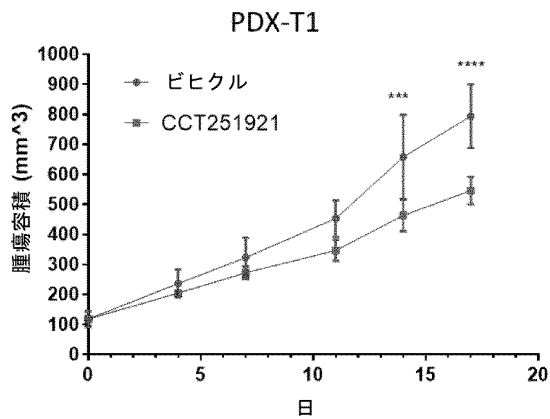
30

40

50

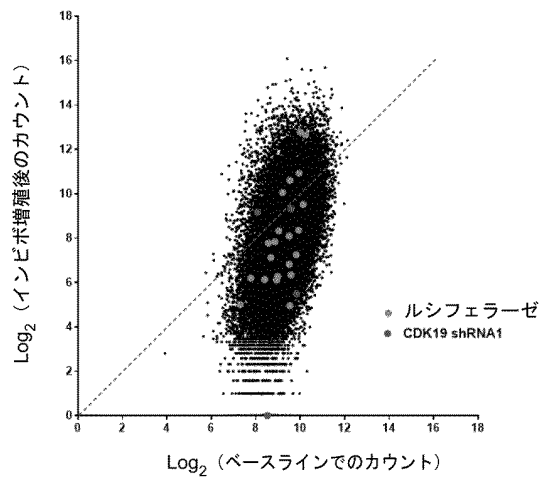
【図 4 - 6】

【図4G】



【図 5 - 1】

【図5A】

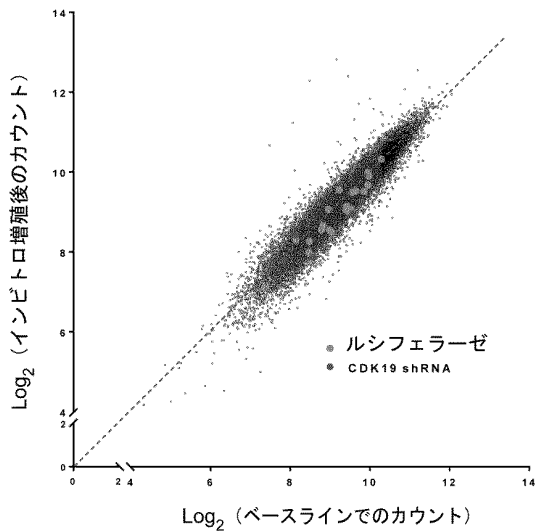


10

20

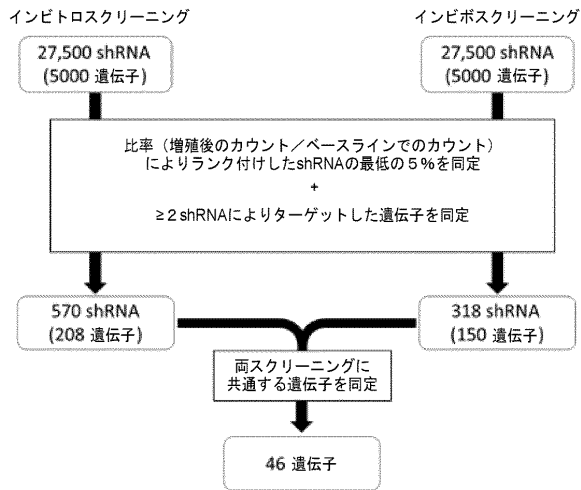
【図 5 - 2】

【図5B】



【図 5 - 3】

【図5C】



30

40

50

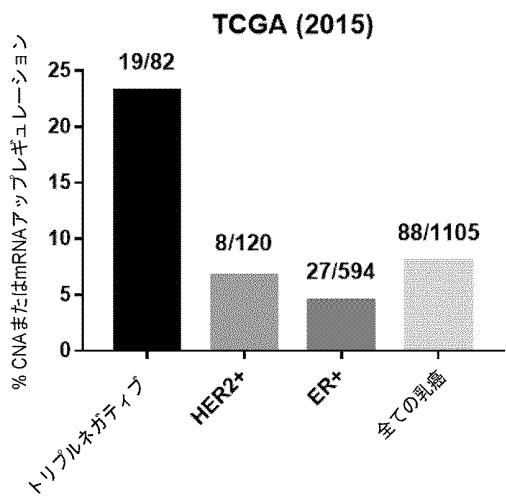
【 図 5 - 4 】

【図5D】

ARD1A/NAA10	EIF2S2	PSMA2	RPL13A
ASCC3L1	HGF	PSMA6	RPL14
C15ORF15	HNRNPC	PSMB3	RPL4
CDC2/CDK1	KARS	PSMB6	RPL6
CDC2L1/CDK11B	KLRK1	PSMC3	RRM1
CDC2L6/CDK19	KPNB1	PSMD1	RRM2
CSE1L	NEDD8	PSMD13	SEC22B
DTYMK	POLA	PSMD3	SH3GLB2
DUT	POLR2A	RBX1	TUBA1A
EEF2	POLR2F	RPA1	TUBA1C
EFTUD2	PSMA1	RPA2	WBSCR17
EIF1AX		RPA3	

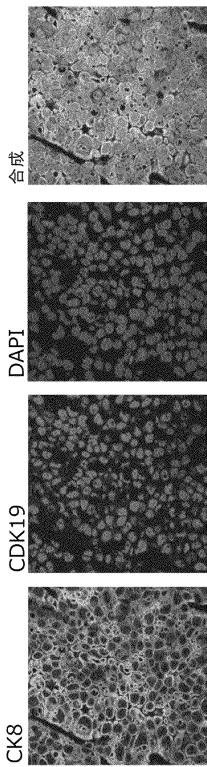
【 図 6 - 1 】

【図6A】



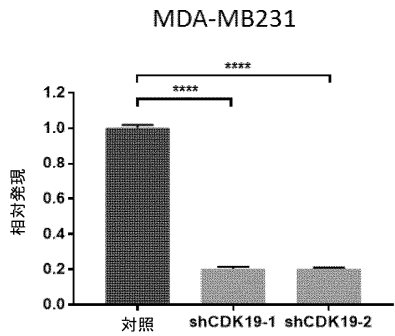
【 図 6 - 2 】

【図6B】

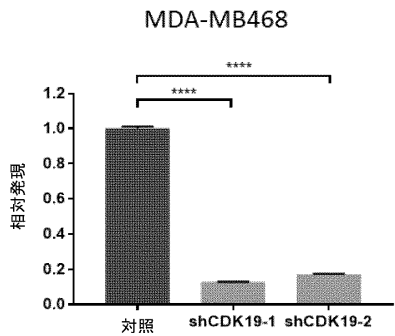


【 図 7 - 1 】

【図7A】



【図7B】



10

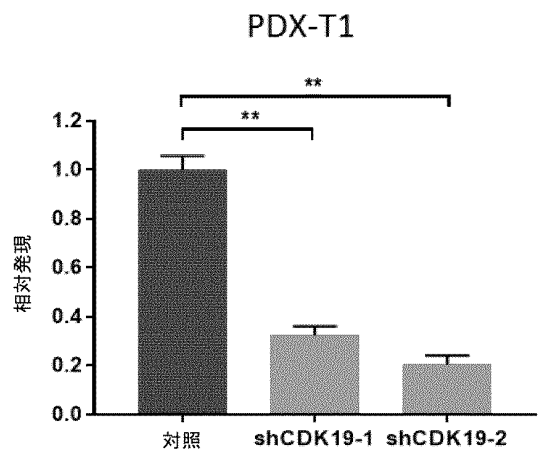
20

30

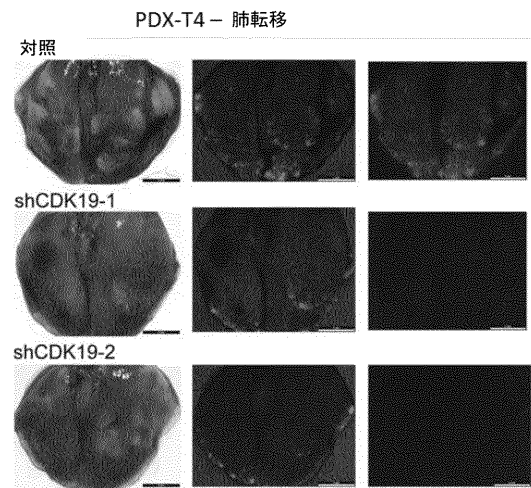
40

50

【 図 7 - 2 】
【図7C】

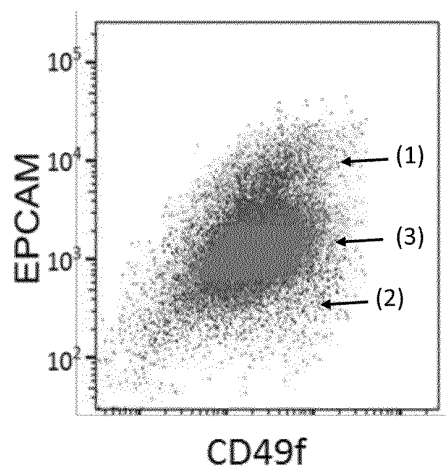


【 図 7 - 3 】
【図7D】

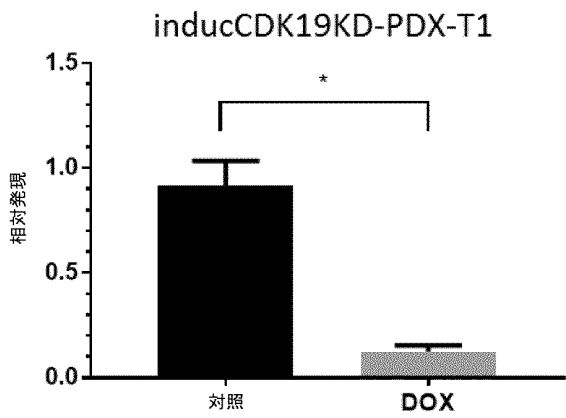


10

【 図 8 - 1 】
【図8A】



【 図 8 - 2 】
【図8B】



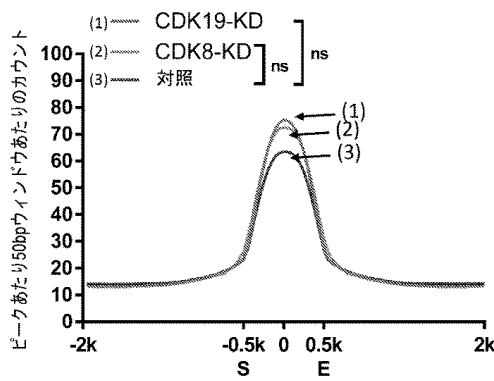
20

30

40

50

【 図 1 1 】



【 図 1 2 - 1 】

【図12A】

**CDK19KD-
EnhancerUP** 最先端の「コア」遺伝子

CDK19 KD	对照	遗传子	CDK19 KD	对照	遗传子
		CYP11A1			MAP3K271
		AS13BP			PTGSR24
		PAM150R			PGS4
		RG52			TPM3
		PMH1			HTP23
		PMH5A1			PTEP2
		CXCL16			SLF1A
		CTA7A			SLF1L
		FOXA			ALDH3A1
		PI111B11			PR31P22
		ITBP1			FBM1
		DPF27			BMF1
		CIDH1			USM11
		AGR3			PAH1
		SESP10B7			COLR
		PICH			C11orf62R
		TRIM5			PALA
		THBR			PAR11F12
		CTSH			HEPD5
		RHOBRTB1			D101
		ASAH1			STC5
		DYSF			DUSP14
		I7T33			SLC1A3
		S1PR1			TRIP11F11R
		ADH6F1R			JARID2
		ARF101			NEP2
		FABP3			SIPTF1
		FLNCR2			PTEP2
		LIM			TPH
		TPD5C11			ABR11P
		RHDH			MR1
		VGLL3			MR1B1
		SLC7A7			LIG1L
		ARC62			RYN1
		VILBP			BOL1M
		PPAD			BA3A1C
		DIAM1			BA255C
		K15P2			EE16
		SOLG			TRIP
		NCOLM3			IRS2
		INSE			EMF13
		IRAPOT			SPH1
		NTCL1			NO2H
		NOA1			NC2PH
		C12orf72			CDH3
		STOM			ALP2
		S1PE2			ADAD1
		IGALS1			TRIM54
		HSD17B1			HEP245
		ITCP			ARPC15
		AC1P1			MR
		LRP			TRIM613
		C9orf116			TRIM613
		THSM17			SVAV1
		SLC7A23			MLIC1
		SHISA2			C11orf56
		NECAN			GSH
		CBP55R			ERL11M2
		C2orf57			PLCF1
		PSG2			PRDM2C
		SPH1P			PRDM21
		IL13P1			CH25
					MR2P
					PRM1
					CD3E

10

20

【 図 1 2 - 2 】

【図12A】 (cont'd)

CDK19 KD	参照	遺伝子	CDK19 KD	参照	遺伝子
		NUM1			NUM1
		PAM151A1			PAM151B
		FOXP1			C6orf102
		DDN1L3			CAMSAP2
		CFAP4			CDONBP1
		HEI-5			BRCC1
		TFX1			SLC22A2
		PHF			MICAL1
		HDPL			MTPL1
		TCCMC10			TAF1B
		PTCH1			TSPAN7
		NATD1			PASPA
		TMCA			SL-DRG
		PRMT9			USP7
		TRPM10B			PRDM1
		TEXT3			FEHL1
		PTK1			COL4A5
		PTMLC			SIPTA
		OSR2			ZBTB143
		GDPA3			ADPS
		MTSSDR			TRAF7
		APORPC1			TRIM1V
		CIN2A3			TSL1
		MDIA			TRSL1
		FEVC			DGIF2
		FLRT2			MBF2
		HIS2A			POGZ2
		SLC16A10			NUF2
		ETAA0555			NAT1
		ZNF127			MDAA
		AGAP1			SLC11A8
		INDK1			RETAPAB-5
		GABX1			E2F7
		ELF4			PRDM4
		SPNSA3			NAB1A1
		C6orf131			USLBP3
		RAND1			PLACA
		SLAMF6			MBP1L
		SCN11			TBR1
		WIF1			FRAT7
		TRAP2			PARCEP2
		NOT1			HMLA1
		EIKAC2B			ELLY2
		MEP50A			TSNKA4
		ZNF555			DDX42
		CIN2B111			SPB
		EGFP			RAG1
		CIT2B			TRP3
		ZNF542P			CACMG2
		TRPM4			FAM50R
		KIF1A152			SLC6A11
		SLC10A1			SVIL1
		ADAM5			DNAC16
		PPARGC1A			PC10
		CLIC5			CAV1D1
		GATA2			GLDND1
		ITPR1			LEPM2
		TLE1			CYFIP4A1
		PDZK2			ALDH1A3
		IDA			ADVF6
		NANOS1			NUF3
		TRC11A			PRF1A
		SLC11A10A			NUF1B

【 図 1 2 - 3 】

【図12A】 (cont'd)

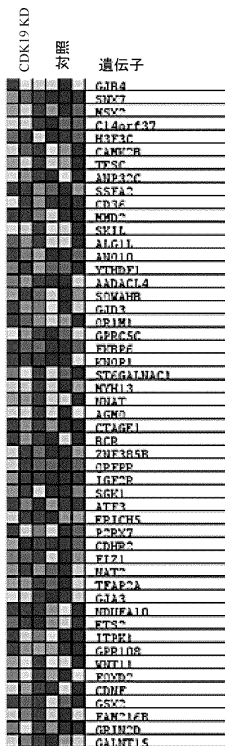
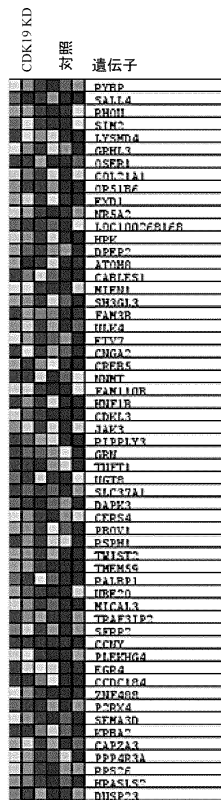
CDK19 KD	对照	遗传子	CDK19 KD	对照	遗传子
		AAFD1			STG6A1MAC5
		AMP136			SHR84
		ETA117111			TANG62
		IGAL58			TRY28
		ETA11324			GBH1
		CAMP20			ASH1
		TACH			CI20471
		DYH171			CPBP1
		GBF1			CSor13
		CDP67			ABPD53
		GPB122			ZRTH7
		ZRTH12			PTZH1
		FAM95A			TACB2
		SNU29			FMV1
		TRY3			HBAS2
		NLM			KIMK1
		ABHGAP36			CCDC106
		ISCA1			OLB101
		NCEH1			CI10467
		NHL			TC2HMC
		SLC13A2			BPFL1
		PTPRC			PHLD81
		ACSL5			USB32
		ZR22			PBP25A
		FEBF2			CTE2
		ATOH1			P2FE
		NEPPE5			TEAY2
		NDP11			MYT2
		DCH			ADAMTS10
		BMOR			CSor135
		SVT12			ABLH2
		TEX9			CI10412
		TOP2			PAN27
		NECFE			FSCR
		CMIP			PAR14
		MYN			EMCN2
		RSN17			KACR
		NME24			NEDE2
		RTY2			CMMP48
		FAM95B3P			TLR10
		LEPR			STIL
		ESN			CIFC12A
		ECM115			FAM81A
		CIP			NIFP3
		SNACD3			SUC27
		SCMLG1			TLR3
		BTV1			PGTRP1
		ABHD15			BEKAB1A
		FPH45			REPUR
		IMRE5			INTS10
		TGFR3			HCAR1
		TEH2			CACNA1H
		WDR7B			UGB2
		IGAP1			IL12B
		CI10474			ABPD10
		AT2EV1H			PAN23B
		EMC7			YWHAPP7

30

40

【図 1 2 - 4】

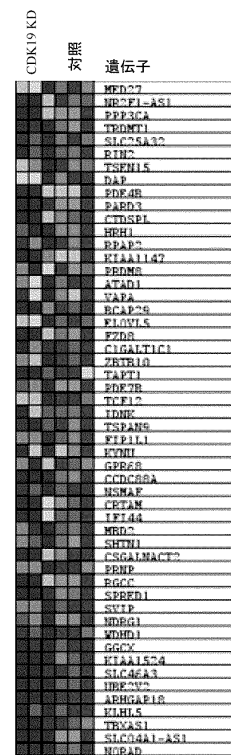
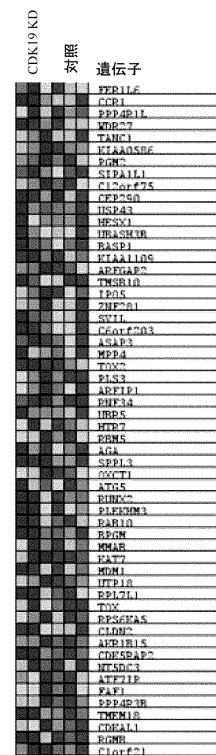
【図12A】 (cont'd)



【図 1 2 - 5】

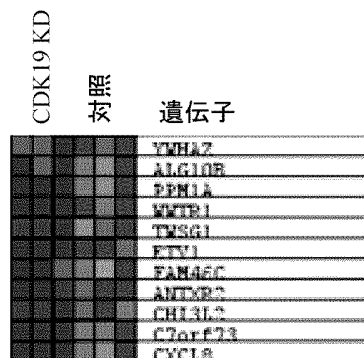
【図12B】

CDK19KD-
EnhancerDOWN 最先端の「コア」遺伝子



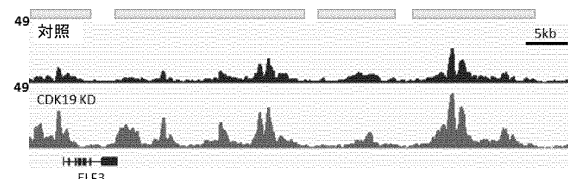
【図 1 2 - 6】

【図12B】 (cont'd)

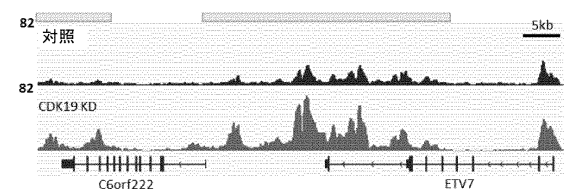


【図 1 3 - 1】

【図13A】



【図13B】



10

20

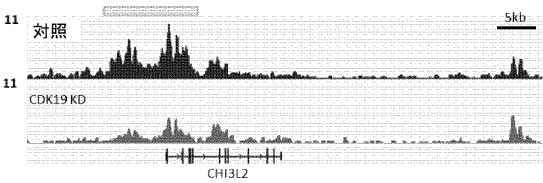
30

40

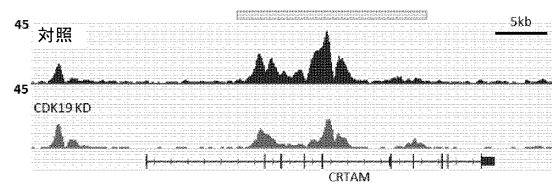
50

【図 1 3 - 2】

【図13C】

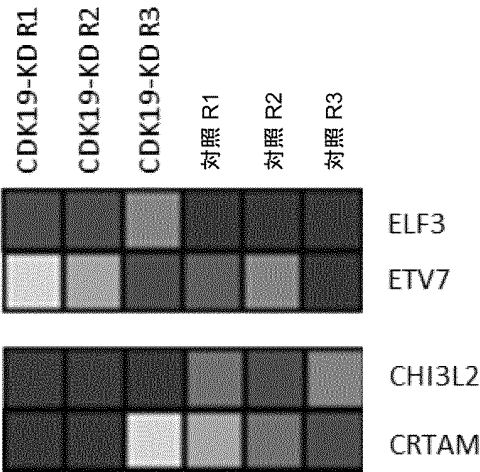


【図13D】



【図 1 3 - 3】

【図13E】

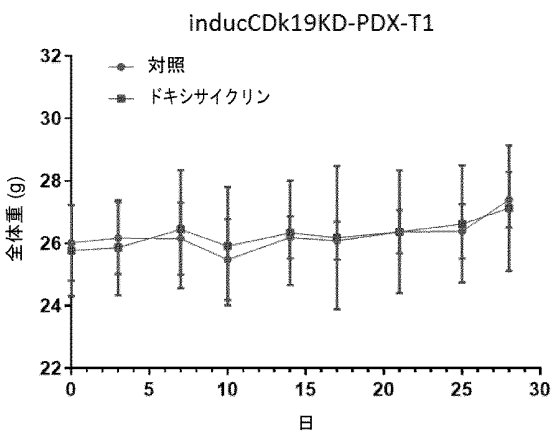


10

20

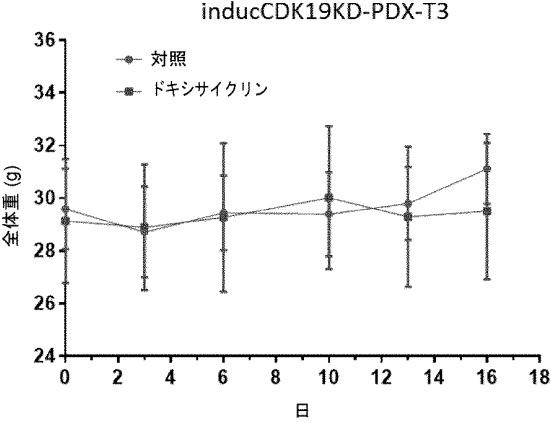
【図 1 4 - 1】

【図14A】



【図 1 4 - 2】

【図14B】



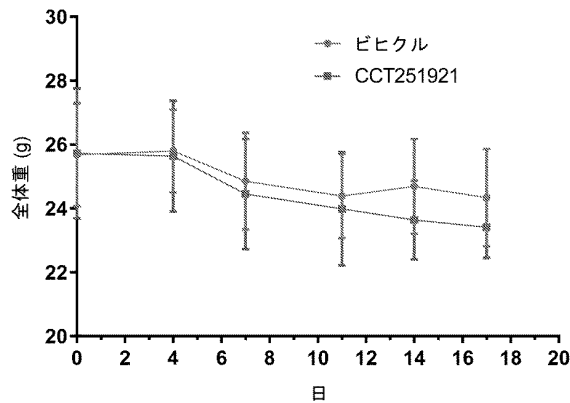
30

40

50

【 図 1 4 - 3 】

【図14C】



【 図 1 6 - 1 】

【図16A】

[illegible]

【 図 1 5 】

腫瘍	起源	ER/PR/HER2 状態	診断	治療の状況
PDX-T1 (C69)	乳癌 原発性	-/-/-	IDC	放射線
PDX-T2 (C70)	乳癌 原発性	-/-/-	IDC	治療せず
PDX-T3 (S58T)	乳癌 原発性	-/-/-	IDC	治療せず
PDX-T4 (C87)	脳 転移	-/-/-	炎症性乳癌	術前補助 化学療法
PDX-T5 (C51)	乳癌 原発性	-/-/+	炎症性乳癌	術前補助 化学療法
PDX-T6 (C64)	乳癌 原発性	-/-/-	IDC	術前補助 化学療法
PDX-T7 (C74)	乳癌 原発性	+/+/+	IDC	不明
PDX-T8 (S11T)	乳癌 原発性	+/+/-	IDC	術前補助 化学療法

10

20

【 図 1 6 - 2 】

【図16B】

[illegible]

30

40

【 図 1 6 - 3 】

【図16C】

[illegible]

【 図 1 7 】

[illegible]

【配列表】

0007392954000001.app

【 図 1 6 - 4 】

【図16D】

[illegible]

10

20

30

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 38/02 (2006.01)

A 6 1 K 38/02

A 6 1 K 31/704 (2006.01)

A 6 1 K 31/704

A 6 1 P 43/00 1 2 1

3 8 6 オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 マイケル・エフ・クラーク

アメリカ合衆国 9 4 1 5 8 カリフォルニア州サンフランシスコ、イリノイ・ストリート 4 9 9 番、
チャン・ザッカーバーグ・バイオハブ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ロバート・ダブリュー・シェ

アメリカ合衆国 9 4 1 5 8 カリフォルニア州サンフランシスコ、イリノイ・ストリート 4 9 9 番、
チャン・ザッカーバーグ・バイオハブ・インコーポレイテッド内

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 特表 2 0 1 5 - 5 0 6 3 7 6 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 8 / 1 3 9 6 6 0 (W O , A 1)

Cancer Res. , 2016年07月15日 , Vol. 76 (14_Supplement) , Abstract 4355

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K

A 6 1 P

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d