

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-543952
(P2024-543952A)

(43)公表日 令和6年11月26日(2024.11.26)

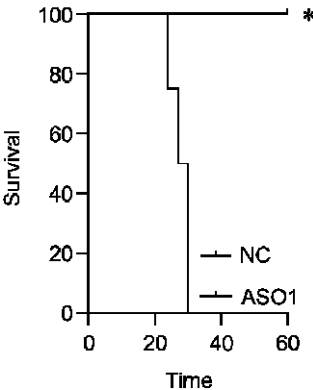
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		4 C 0 8 6
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 2 0 6
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全74頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-532316(P2024-532316)	(71)出願人	399052796	デyna ファーバー キャンサー インス ティテュート, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 2 1 5, ボストン, ブルックライン ア ベニュー 4 5 0	
(86)(22)出願日	令和4年11月29日(2022.11.29)				
(85)翻訳文提出日	令和6年7月10日(2024.7.10)				
(86)国際出願番号	PCT/US2022/080563				
(87)国際公開番号	WO2023/102377				
(87)国際公開日	令和5年6月8日(2023.6.8)	(74)代理人	100092783	弁理士 小林 浩	
(31)優先権主張番号	63/284,527	(74)代理人	100120134		
(32)優先日	令和3年11月30日(2021.11.30)	(74)代理人	100103182		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100153693	弁理士 日野 真美	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(72)発明者	ムンシ, ニキル シー.		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 がんにおける治療剤としてのMIR17HGプレRNAのアンチセンス阻害剤

(57)【要約】

MIR-17-92a-1クラスター宿主遺伝子(MIR17HG)プレRNAが役割を果たす疾患を治療するまたは改善するための、MIR17HGプレRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤が開示される。

FIG. 2F



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生理学的条件下で M I R - 1 7 - 9 2 a - 1 クラスター宿主遺伝子 (M I R 1 7 H G) プレ R N A に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) であって、前記 A S O は長さが 1 5 ~ 約 3 0 ヌクレオチドであり、前記プレ R N A は配列番号 1 の核酸配列を有する、A S O。

【請求項 2】

前記プレ R N A の 5 ' 末端領域において結合する、請求項 1 に記載の A S O。

【請求項 3】

前記プレ R N A のイントロン領域において結合する、請求項 1 に記載の A S O。

10

【請求項 4】

l n c - 1 7 - 9 2 ^{T V 1} の一部分をコードする、前記プレ R N A のエクソン領域において結合する、請求項 1 に記載の A S O。

【請求項 5】

A G T G G C G C G A A G G C G C A G G T (配列番号 2)、G T G G C G C G A A G G C G C A G G T C (配列番号 3)、C C T C G C C C G A G G G C G C G A A G (配列番号 4)、G A G G G C G C G A A G T G G C G C G A (配列番号 5)、T A C T T G C T T G G C T T (配列番号 6)、C A C C G T C C A A A T C T A T (配列番号 7)、A G C A C T C A A C A T C A G C (配列番号 8)、C A C C G T C C A A A T C T A T (配列番号 9)、G T A T G A C T G G A A T A G G (配列番号 1 0)、T A C A G T G G A A A T C G G C (配列番号 1 1)、G C G A G C A A A C A C G A A A (配列番号 1 2)、A C T T G G A T T G G A T G A G (配列番号 1 3) のうちの任意の 1 種の核酸配列を含む、請求項 1 に記載の A S O。

20

【請求項 6】

長さが 1 5 ~ 2 3 ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の A S O。

【請求項 7】

長さが 1 8 ~ 2 3 ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の A S O。

【請求項 8】

そのヌクレオチドは化学修飾されている、請求項 1 に記載の A S O。

【請求項 9】

前記ヌクレオチドは、ホスホロチオエート (phosphorothioate) (P S) ヌクレオシド間連結、メトキシプロピルホスホネート (methoxypropylphosphonate) (M O P) ヌクレオシド間連結、2 ' - O - メチル (M e) 基、2 ' - O - メトキシエチルリボース (M O E) 基、拘束エチル (S - c E t) 基、ロックド核酸 (L N A)、または 2 ' フルオロ (2 ' F) 基によって修飾されている、請求項 8 に記載の A S O。

30

【請求項 1 0】

脂質にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の A S O。

【請求項 1 1】

前記脂質は、パルミチン酸、トコフェロール、またはコレステロールである、請求項 1 0 に記載の A S O。

40

【請求項 1 2】

長さが 1 8 ヌクレオチドであり、トコフェロールにコンジュゲートされている、請求項 1 1 に記載の A S O。

【請求項 1 3】

一本鎖 D N A である、請求項 1 に記載の A S O。

【請求項 1 4】

前記一本鎖 D N A は、1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドが 3 ' 末端において隣接している、請求項 1 3 に記載の A S O。

【請求項 1 5】

前記一本鎖 D N A は、1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドが 5 ' 末端において隣接して

50

いる、請求項 14 に記載の A S O。

【請求項 16】

前記一本鎖 DNA は、5 つの修飾ヌクレオチドが 5' 末端において隣接している、請求項 15 に記載の A S O。

【請求項 17】

前記一本鎖 DNA は、5 つの修飾ヌクレオチドが 3' 末端において隣接しており、前記一本鎖 DNA は長さが 8 ヌクレオチドである、請求項 16 に記載の A S O。

【請求項 18】

前記修飾ヌクレオチドは、1 つまたは複数の 2'-O-メトキシエチルリボース (MOE) 基を含む、請求項 15 に記載の A S O。

【請求項 19】

前記一本鎖 DNA は長さが 15 ヌクレオチドである、請求項 18 に記載の A S O。

【請求項 20】

トコフェロールにコンジュゲートされている、請求項 19 に記載の A S O。

【請求項 21】

一本鎖 RNA である、請求項 1 に記載の A S O。

【請求項 22】

治療有効量の請求項 1 に記載の A S O および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 23】

MIR17HG プレ RNA の異常な発現および機能が役割を果たす疾患を治療する方法であって、請求項 22 に記載の医薬組成物をそれを必要とする対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 24】

前記疾患は、多発性骨髄腫、リンパ腫、または結腸直腸がんである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記疾患は多発性骨髄腫である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

治療有効量のアセチル-CoA カルボキシラーゼ- α (ACC1) 阻害剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記 ACC1 阻害剤は、5-テトラデシル-オキシ-2-フロ酸 (TOFA) である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 ACC1 阻害剤は、前記医薬組成物の投与の後に投与される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 ACC1 阻害剤は、前記医薬組成物の投与と同時に投与される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

ボルテゾミブ、メルファラン、カルフィルゾミブ、デキサメタゾン、1 種もしくは複数のプロテアソーム阻害剤、1 種もしくは複数の免疫調節性イミド薬 (IMiD)、またはそのうちの 2 種以上の組合せから選択される付加的な活性剤の治療有効量を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 31】

前記付加的な活性剤は、前記医薬組成物の投与の後に投与される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記付加的な活性剤は、前記医薬組成物の投与と同時に投与される、請求項 30 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 33】

前記疾患は肝臓疾患である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 34】

前記疾患は非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記疾患は、MYC の異常な発現および機能によって特徴付けられる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 36】

治療有効量の MYC がん原遺伝子、bHLH 転写因子（MYC）阻害剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 MYC 阻害剤は、シスプラチン、ゲムシタビン、アキシチニブ、ナドロパリン、ベンズアミジン、またはそのうちの 2 種以上の組合せである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記 MYC 阻害剤は、前記医薬組成物の投与の後に投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記 MYC 阻害剤は、前記医薬組成物の投与と同時に投与される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

治療有効量の請求項 22 に記載の医薬組成物、および MIR17HG プレ RNA が役割を果たす疾患の治療において前記医薬組成物を使用するための印刷された使用説明書を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第 119 条（e）の下で、2021 年 11 月 30 日に出願された米国仮特許出願第 63 / 284, 527 号に対する優先権の利益を主張するものであり、それは、参照によりその全体として本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表

本出願は、XML 形式で電子的に提出されており、参照によりその全体として本明細書によって組み入れられる配列表を含有する。2022 年 11 月 28 日に作成された前記 XML 複製物は、52095__753001WO__SL.xml と名付けられ、サイズが 71 KB バイトである。

【背景技術】

【0003】

ヒトゲノムにおいて、長いノンコーディング RNA（lncRNA）を持つ遺伝子座は、タンパク質コード遺伝子の数を上回り、同じ発がん性病原事象の影響を受けやすい（Hon et al., Nature 543:199-204 (2017); Wang et al., Cancer Cell 33:706-720 (2018))。これらの RNA 分子は、200 ヌクレオチド（nt）を上回る長さおよびタンパク質をコードする潜在能の欠如を有すると定義され、それゆえ多種多様な機能的実体となる（Ulitsky et al., Cell 154:26-46 (2013))。lncRNA は、タンパク質コード遺伝子に対するそれらの位置に基づき、4 つの別個の下位群：エクソン性、イントロン性、重複性、遺伝子間、センスおよびアンチセンス lncRNA にしばしば分類され；代替的に、それらは、シスおよびトランス作用性 lncRNA に機能的に分類され得る。Ulitsky et al., Cell 154:26-46 (2013)。トランス作用性 lncRNA は、成熟マイクロ RNA（miRNA）の生合成のための前駆体分子としてのそれらの役割

10

20

30

40

50

(Lu et al., Nat. Med. 23:1331-1341 (2017))、またはタンパク質機能および／もしくは安定性を調節するタンパク質および核酸とのそれらの直接的相互作用 (Tseng et al., Nature 512:82-6 (2014)) によるもの等、それらの多様な作用のメカニズムが故に、特別な関心対象である。lncRNAの異常な発現および機能は、腫瘍細胞による悪性表現型の漸進的増大に関わっている (Gutschner and Diederichs, RNA. Biol. 9:703-19 (2012))。

【発明の概要】

【0004】

本開示の第1の態様は、生理学的条件下でMIR-17-92a-1クラスター宿主遺伝子 (MIR17HG) プレRNAに結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) であって、ASOは長さが15～約30ヌクレオチドであり、MIR-17-92a-1クラスター宿主遺伝子 (MIR17HG) プレRNAは配列番号1の核酸配列を有する、ASOを対象とする。

10

【0005】

本開示の別の態様は、治療有効量のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。

【0006】

本開示のさらに別の態様は、MIR17HGプレRNAの異常な発現および機能が役割を果たす疾患を治療する方法である。方法は、医薬組成物を対象に投与するステップを伴う (entailing)。

20

【0007】

本開示のさらに別の態様は、MIR17HGプレRNAに結合する治療有効量のASO、ならびにMIR17HGプレRNAの異常な発現および機能が対象において役割を果たす疾患の治療において第1の活性剤を使用するための印刷された使用説明書を含むキットである。

【0008】

本明細書に記載される現実の実施例は、MIR17HGプレRNAに結合するASOが、マイクロRNAおよびドロシャ (DROSHA) 非依存的様式で、毒性なくインビボにおいて多発性骨髄腫腫瘍成長の減少をもたらすことを実証する。

【図面の簡単な説明】

30

【0009】

【図1-1】多発性骨髄腫 (multiple melanoma) (MM) における主要な依存関係としてMIR17HGを特定したゲノムワイドCRISPRi生存率スクリーニングを例示する図式ならびに点および折れ線プロットのセットである。図1Aは、生存率スクリーニングを図式的に例示する。図1Bは、二次スクリーニングにおけるlncRNA依存関係についてのRRAベースのランク付け解析を示した折れ線プロットのセットである。図1Cは、MM細胞株についてのCCK-8増殖アッセイを示した折れ線プロットのセットである。図1Dは、MIR17HGプレRNAを標的にするASOまたは非標的化ASO (NC) をトランスフェクトされたMM細胞株についてのCCK-8増殖アッセイを示した折れ線プロットのセットである。

40

【図1-2】 (上記の通り。)

【図1-3】 (上記の通り。)

【図1-4】 (上記の通り。)

【図2-1】本明細書において脂質生成の調節因子 (RROL) とも称されるlncRNA lnc-17-92^{TV1}が、マイクロRNA非依存的様式でどのように依存関係を媒介するかを示す、図式、折れ線、棒、および生存プロットのセットである。図2Aは、lncRNA (RROL) およびmiRNA (mir-17-92) 由来転写産物の両方を含めた、MIR17HG遺伝子座の概観を図式的に例示する。図2Bは、MM患者の3つの大きなコホートにおける高いRROL発現 (上位4分の1) の予後的意義 (PFSおよびOS) を示す折れ線プロットのセットである。図2Cは、pri-mir-17-9

50

2 (pri-miR) または GFP 対照を形質導入された AMO1 および H929 細胞における CCK-8 増殖アッセイを例示する棒プロットのセットである。図 2D は、ASO1 に曝露されたドロージャ WT または KO AMO1 および H929 細胞についての CCK-8 増殖アッセイを例示する棒プロットおよび画像のセットである。図 2E は、NODSCID マウスにおけるマトリゲルベースの AMO1^{DR-KO} 異種移植における RROL 枯渇の効果を例示する折れ線プロットである。図 2F は、腫瘍を注射されたマウスの生存解析を例示する生存プロットである。図 2G は、WT または変異した (—/—) ダイサー (Dicer) のいずれかを発現する HCT-116 および DLD-1 結腸直腸がん細胞株における CCK-8 増殖アッセイを示す棒プロットのセットである。

【図 2-2】 (上記の通り。)

10

【図 2-3】 (上記の通り。)

【図 2-4】 (上記の通り。)

【図 2-5】 (上記の通り。)

【図 3-1】 遺伝子発現を調節するためのクロマチンとの RROL の相互作用を示す図表、画像、棒、および点プロットのセットである。図 3A は、ドロージャ WT (AMO1、H929) または KO (AMO1^{DR-KO}) のいずれかである MM 細胞株における RROL 枯渇後のトランスクリプトーム解析を示し、よく下方調節された遺伝子 (調整済み $p < 0.05$; $lfc < -1$) を示す図表である。図 3B は、ASO1 に 24 時間曝露された、3 人の MM 患者由来の CD138+ 細胞における RROL 標的についての qRT-PCR 解析を例示する棒プロットである。図 3C は、各 RROL 標的に対して、一緒でのおよび単独での、CD138+ MM 患者細胞における RROL 標的 (mRNA) と RROL との間の相関を示した点プロット、および相関プロットのセットである。図 3D は、ASO1 を使用した RROL ノックダウン後の、ACC1、ANO6、CCDC91、EPT1、EXT1、FER、および KIAA1109 プロモーター活性の活性低下を示した Gluc/SEAP デュアルレポーターアッセイを例示する棒プロットである。図 3E は、RROL 標的に対する siRNA を用いたトランスフェクション後の、5 種の MM 細胞株における CCK-8 増殖アッセイを例示する折れ線プロットのセットである。図 3F は、LacZ アンチセンスプローブを使用して精製されたクロマチン (陰性対照) と比較して、2 種の RROL アンチセンスプローブセット (ps1 および ps2) を使用して精製されたクロマチンにおける ACC1 プロモーターの有効な増幅を示した ChIRP-qPCR 解析を例示する棒プロットである。図 3G は、(左) 代表的な AMO1 細胞における ACC1 プレ mRNA (緑色) および RROL (紫色) についてのデュアル RNA-FISH 解析によって獲得されたスナップショット; (右) 最も近い RROL スポットまでのまたは最も近い無作為スポットまでの、ACC1 プレ RNA スポットの距離 (nm) を示したボックスプロット、を例示する画像のセットおよび点プロットである。

20

30

【図 3-2】 (上記の通り。)

【図 3-3】 (上記の通り。)

【図 3-4】 (上記の通り。)

【図 3-5】 (上記の通り。)

【図 4-1】 ACC1 プロモーターにおける MYC 占有の RROL の促進を例示する棒および画像のセットである。図 4A は、H929 および AMO1 細胞における ASO1 への 3 日間のジムノティック (gymnotic) 曝露後の転写変化についての上流調節因子解析を示す棒プロットである。図 4B は、ASO1 または NC (ビヒクル) に 24 時間曝露された AMO1、H929、および U266^{MYC+} における、ACC1 プロモーターにおける MYC 占有率についての ChIRP-qPCR 解析を例示する棒プロットおよび画像のセットである。図 4C は、MYC をノックダウンするためにドキシサイクリンまたは DMSO のいずれかに 2 日間曝露され、RROL を枯渇させるために ASO1 またはビヒクル (NC) のいずれかにさらに 2 日間曝露された P493-6 細胞における ACC1 mRNA についての qRT-PCR 解析を例示する棒プロットおよび画像である。図 4D は、ACC1 プレ RNA (赤色)、MYC タンパク質 (緑色)、および RROL (紫色) につい

40

50

てのC o - I F / F I S H解析を例示する画像のセットである。図4 Eは、抗MYC抗体（ α -MYC）またはIgG対照を使用して沈降したRIP材料におけるRROLについてのqRT-PCR解析（アイソフォーム2を検出する）を例示する。図4 Fは、対照RNAまたはRROL転写産物-1および-2とともに沈降したRPPD材料におけるMYCについてのウェスタンブロット解析を例示する。図4 Gは、ハイブリッドタンパク質2としてのMYC、およびハイブリッドRNAとしての陰性対照RNA（-）またはRROL転写産物-1および-2のいずれかを使用したRNA Y3Hを例示する。

【図4-2】（上記の通り。）

【図4-3】（上記の通り。）

【図5-1】RROLが、MYC-WDR82転写複合体の会合を媒介し、ACC1の転写およびエピジェネティック活性化につながることを例示する図式、画像、および棒プロットのセットである。図5 Aは、RROL枯渇の存在または非存在下における、MYC-タンパク質相互作用ネットワークを調べるための統合BioIDおよびC o - I P / M Sアッセイを図式的に示す。図5 Bは、RROL-1およびRROL-2とともにまたは対照RNAとともに沈降したRPPD材料におけるWDR82についてのウェスタンブロット解析を例示する画像である。図5 Cは、ハイブリッドタンパク質2としてのWDR82、およびハイブリッドRNAとしての陰性対照RNA（-）またはRROL転写産物-1および-2のいずれかを使用したRNA Y3Hを例示する画像である。図5 Dは、WDR82のサイレンシング後のAMO1におけるACC1プロモーターにおけるH3K4me3占有率についてのChIP-qPCR解析を例示する棒プロットおよび画像である。図5 Eは、WDR82のサイレンシング後のAMO1におけるACC1プロモーターにおけるMYC占有率についてのChIP-qPCR解析を例示する棒プロットおよび画像である。図5 Fは、AMO1におけるWDR82を標的にするsiRNA（siWDR82-1または-2）のトランスフェクション後の、ACC1 mRNAについてのqRT-PCR解析を例示する棒プロットおよび画像である。図5 Gは、ジミノティックASO1に24時間曝露されたAMO1におけるACC1プロモーターにおけるWDR82-GFP占有率についてのChIP-qPCR解析を例示する棒プロットおよび画像である。図5 Hは、ジミノティックASO1に24時間曝露されたAMO1およびH929におけるACC1プロモーターにおけるH3K4me3占有率についてのChIP-qPCR解析を例示する棒プロットおよび画像である。図5 Iは、ACC1プロモーター部位におけるH3K4me3レベルを示すウェスタンブロットの画像のセットである。

【図5-2】（上記の通り。）

【図5-3】（上記の通り。）

【図5-4】（上記の通り。）

【図5-5】（上記の通り。）

【図6-1】RROL/MYC-ACC1軸がデノボ脂質生成を調節することを示す棒プロット、フローサイトメトリープロット、および図式のセットである。図6 Aは、MM細胞株またはCD138+ MM患者細胞におけるRROL、MYC、またはACC1枯渇/阻害のいずれかの後の、脂質への¹⁴C-グルコースの組み入れを例示する。図6 Bは、MM細胞におけるRROL阻害後の液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）ベースの脂質プロファイリングを示す棒プロットのセットである。図6 Cは、MM細胞におけるRROL枯渇の抗増殖効果に対するパルミチン酸の効果を示す棒プロットである。図6 Dは、MM細胞におけるRROL枯渇の抗増殖効果に対するパルミチン酸の効果を示すフローサイトメトリープロットのセットである。図6 Eは、RROL経路を、それがMM細胞成長に影響を及ぼすとして図式的に例示する。

【図6-2】（上記の通り。）

【図6-3】（上記の通り。）

【図6-4】（上記の通り。）

【図6-5】（上記の通り。）

【図7-1】ヒトMMの動物モデルにおいてインビトロおよびインビボで強い抗腫瘍活性

を発揮する、RROLの治療用阻害剤を描写する点、棒、および生存プロット、ならびに画像のセットである。図7Aは、RROL治療用ASOを開発するための多ステップスクリーニングを図式的に例示する。図7Bは、11種のMM細胞株のパネルにおけるCCK-8増殖アッセイを例示する棒プロットのセットである。図7Cは、NOD SCIDマウスにおけるAMO1細胞の皮下インビボ腫瘍成長を例示する点プロットである。図7D～図7Eは、AMO1異種移植におけるRROL（図7D）およびRROL標的（図7E）についてのqRT-PCR解析を例示する棒プロットである。図7Fは、腫瘍におけるトリパルミチンのモジュレーションを示した脂質プロファイリング解析を例示する棒プロットである。図7Gは、NSGマウスにおけるMOLP8-luc+のインビボ腫瘍成長についてのBLIベースの測定を例示する点プロットおよび画像である。図7Hは、図7Eにおける実験からの生存プロットであり、黒色の矢印は処理を示す。図7Iは、NSGマウス（PDX-NSG）におけるMM患者細胞のインビボ腫瘍成長についてのヒトκ軽鎖ELISAベースの測定を示す折れ線プロットである。図7Jは、G2-15b*-TO（G）もしくはSB9-19-TO（SB）または対照としてのビヒクル（NC）で処理された動物から取り出された腫瘍におけるBCL2L11についてのqRT-PCR解析を示す棒プロットである。

10

【図7-2】（上記の通り。）

【図7-3】（上記の通り。）

【図7-4】（上記の通り。）

【図7-5】（上記の通り。）

20

【図8】アンチセンスオリゴヌクレオチドの有無での、スクリーニングデータおよびMIR17HGノックダウンを例示する棒プロットのセットである。図8Aは、スクリーニングデータの解析を示す棒プロットであり、アップセットプロットは、MM細胞における細胞タイプ固有のおよび共有されるlncRNA依存関係の特定を示す。図8Bは、条件付きプロモーターの調節下で、dCas9-KRAB融合タンパク質および抗MIR17HG gRNAを発現するように操作されたAMO1において獲得されたMIR17HGのノックダウンを示す棒プロットである。図8Cは、2種のgapmeRをトランスフェクトされたAMO1において獲得されたMIR17HGのノックダウンを例示する棒プロットである。

【図9-1】RROL発現、およびmiR-17-92マイクロRNAとの相関を例示するボックスおよび棒プロットのセットである。図9Aは、新たに診断された（ND）対再発した（R）MM患者におけるRROL発現を示すボックスプロットである。図9Bは、GSE66293からのND対R MM患者におけるRROL発現を示すボックスプロットである。図9Cは、RNA-seqおよびmiRNAプロファイリングによって解析された140人のMM患者由来のCD138+細胞におけるRROLとmiR-17-92との間の相互関係を示すスピアマン相関である。図9Dは、AMO1およびH929細胞におけるmiR-17-92マイクロRNAについてのqRT-PCR解析を例示する棒プロットのセットである。図9Eは、ドロージャに対してWTまたはKOのいずれかのAMO1およびH929におけるmiR-17-92マイクロRNAについてのqRT-PCR解析を例示する棒プロットのセットである。図9Fは、AMO1^{DR-KO}およびH929^{DR-KO}における3種の異なるASO、またはスクランブル対照（NC）を使用したMIR17HGのノックダウンを例示する棒プロットのセットである。図9Gは、4種のMMサンプルにおけるRROLに関するRNA-seq網羅率プロットおよびジャンクション解析である。図9Hは、AMO1におけるRROL転写産物バリエーション1および2についてのqRT-PCR解析を示す棒プロットである。プライマーは、図9Gに示される領域を増幅する。図9Iは、MMRF/CoMMpassデータセット（n=720）および60種のMM細胞株におけるRROL発現（TPM）についてのRNA-seq解析を示すボックスプロットである。図9Jは、NOD SCIDマウスにおけるマトリゲルベースのAMO1^{DR-KO}異種移植におけるRROL枯渇の効果を示す折れ線プロットである。図9Kは、MIR17HGプレRNAまたはスクランブル対照（NC）の5

30

40

50

’末端を標的にするASO(5’-ASO)をトランスフェクトされたHCC-116細胞におけるCKK-8増殖アッセイを示す棒プロットである。図9Lは、pri-mir-17-92、lnc-17-92TV1、およびlnc-17-92TV2の異所性発現が、i) pri-mir-17-92の異所性発現後のmiR-17の上方調節、ii) その異所性発現後のlnc-17-92TV1の上方調節、およびiii) その異所性発現後のlnc-17-92TV2の上方調節を示すqRT-PCRによって確認されたことを示す棒プロットである。

【図9-2】(上記の通り。)

【図9-3】(上記の通り。)

【図9-4】(上記の通り。)

【図9-5】(上記の通り。)

【図9-6】(上記の通り。)

【図9-7】(上記の通り。)

【図9-8】(上記の通り。)

【図9-9】(上記の通り。)

【図10-1】インビトロにおけるRROLおよびmiR-17-92 miRNA発現および局在を例示する画像、ヒートマップ、および棒プロットのセットである。図10Aは、AMO1およびH929におけるRROLについての細胞内qRT-PCR解析を示す棒プロットである。図10Bは、AMO1におけるRROLの細胞内局在についてのRNA-FISH解析を示す画像のセットである。図10Cは、ASO1またはASO-1-NCにジムノティックに曝露されたAMO1におけるRROLおよびmiR-17-92 miRNAについてのqRT-PCR解析を示すヒートマップである。図10Dは、ASO1に24時間ジムノティックに曝露されたDaudiおよびRaji細胞におけるRROL転写標的についてのqRT-PCR解析を示す棒プロットである。図10Eは、ネズミ科mir17hg発生期RNAを標的にする3種の異なるASOをトランスフェクトされた5TGM1ネズミ科MM細胞におけるネズミ科rrol、acc1、およびferについてのqRT-PCR解析を示す棒プロットである。図10F~図10Gは、プールされたmiR-17-92 miRNA阻害剤(図10F)または模倣体(図10G)をトランスフェクトされたAMO1における、miR-17-92 miRNA(黒色の棒)およびRROL転写標的(白色の棒)についてのqRT-PCR解析を示す棒プロットである。図10H~図10Iは、2種のRROLアンチセンスプローブセット(p s1およびp s2)を使用してまたはLacZアンチセンスプローブ(陰性対照)を使用して精製されたクロマチンにおけるGAPDHエクソン2の陽性反応(増幅)の%(図10H)またはCT値(図10I)を示したChIRP-qPCR解析を示す棒プロットである。

【図10-2】(上記の通り。)

【図10-3】(上記の通り。)

【図10-4】(上記の通り。)

【図11-1】RROLが、ACC1プロモーターにおけるMYC占有を促進することを示す写真のセットおよび棒プロットである。図11Aは、WT、またはFLAGもしくはMYC-FLAGの発現を有するベクターに感染したU266細胞におけるMYCについてのウェスタンブロットである。図11Bは、RROLのアイソフォームの略図である。図11Cは、抗MYC抗体(α -MYC)またはIgG対照を用いた免疫沈降後のRROLアイソフォーム-2についてのqRT-PCRである。図11Dは、MM細胞株AMO1およびH929におけるMYC阻害剤10058-F4を用いた処理後のACC1 mRNAについてのqRT-PCR解析を示す棒プロットである。図11Eは、MM細胞株AMO1およびH929におけるMYC阻害剤10058-F4を用いた処理後の、脂質への C^{14} -グルコースの組み入れを示す棒プロットである。図11Fは、ACC1を標的にするsiRNAまたはスクランブルsiRNA(NC)を用いたトランスフェクション後のU266^{MYC-}およびU266^{MYC+}におけるCKK-8増殖アッセイを示す棒

10

20

30

40

50

プロットである。細胞生存率をトランスフェクションの48時間後に測定し、それは、NCをトランスフェクトされた細胞についての%として表される。図11Gは、対照RNAまたはlnc-17-92TV1の短縮バージョンとともに沈降したRPPD材料におけるMYCについてのウェスタンプロット解析の写真である；5%インプットが参照として使用される。

【図11-2】（上記の通り。）

【図11-3】（上記の通り。）

【図12-1】RROLノックダウンまたはWDR82-GFP融合タンパク質発現後のMYCおよびGFP発現を示す画像のセットである。図12Aは、FBA-MYC融合タンパク質を誘導するドキシサイクリンの有無での、およびRROLをノックダウンするためにNCまたはASO1のいずれかをトランスフェクトしたFBA-MYC細胞におけるMYCについてのウェスタンプロット解析を例示する画像である。図12Bは、WT、またはGFPもしくはWDR82-GFPの発現を有するベクターに感染したAMO1細胞におけるGFPについてのウェスタンプロット解析を例示する画像である。図12Cは、対照RNAまたはlnc-17-92TV1の短縮バージョンとともに沈降したRPPD材料におけるWDR82についてのウェスタンプロット解析を示す画像である。図12Dは、H929におけるsiRNAプール（n=4）を用いたWDR82のサイレンシング後の（48時間の時点）、WDR82、H3、H3H3K4me1、H3H3K4me2、およびH3H3K4me3についてのウェスタンプロット解析を示す画像のセットおよび棒プロットである。ラミンA/Cをタンパク質ローディング対照として使用し（核溶解物）、iiは密度測定解析の定量である。

【図12-2】（上記の通り。）

【図13】RROLに結合するASOへの曝露後の、グルコース取り込み（update）およびRROL標的の発現の効果を棒プロットおよび写真のセットである。図13Aは、miR-17-92抗miRを用いたAMO1のトランスフェクション後の、脂質へのC14-グルコースの組み入れを示す棒プロットである。図13Bは、ASO1に36時間曝露されたAMO1およびH929におけるmiR-17-92の標準的標的BCL2L11（BIM）およびPTENについてのGEP解析を示す棒プロットである。図13Cは、ASO1に36時間曝露されたAMO1におけるmiR-17-92の標準的標的BIMについてのウェスタンプロット解析の写真である。

【図14-1】RROLを標的にする治療用ASOを開発するための多ステップスクリーニングを描写する棒プロットのセットである。図14Aは、RROL上のASO接近可能な伸長、「G」または「SB」のいずれかの立体配置にある16種の配列（>20-mer）を特定するステップ1の結果を示す棒プロットである。図14Bは、ステップ1から選択されたG2およびSB9設計を最適化するステップ2の結果を示す棒プロットである。図14Cは、パルミチン酸（P）、コレステロール（C）、またはトコフェロール（T）とコンジュゲートしたステップ2分子を試験したステップ3の結果を示す棒プロットである。

【図14-2】（上記の通り。）

【発明を実施するための形態】

【0010】

定義

別様に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術的および科学的用語は、本明細書における主題が属する技術分野における当業者によって共通して理解されるのと同じ意味を有する。本明細書および添付の特許請求の範囲において使用するとき、それとは反対に指定されない限り、以下の用語は、本開示の理解を促すために示される意味を有する。

【0011】

本説明および添付の特許請求の範囲において使用するとき、「a」、「an」、および「the」という単数形態は、文脈が別様に明白に指示しない限り、複数形の指示対象

を含む。ゆえに、例えば、「組成物 (a composition)」への言及は、2 種以上のそのような組成物の混合物を含み、「阻害剤 (an inhibitor)」への言及は、2 種以上のそのような阻害剤の混合物を含む、等。

【0012】

別様に記述されない限り、「約」という用語は、当技術分野における通常の容認の域内、例えば平均の2標準偏差以内と理解される。「約」は、記述された値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%以内と理解され得る。

【0013】

本明細書において使用される「およそ」という用語は、別様に記述されないまたは文脈から別様に明確でない限り、記述された参照値のいずれかの方向（より大きいまたはより小さい）に25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満以内に入る値の域を指す（そのような数が、考え得る値の100%を超えるであろう場合を除く）。文脈から別様に明白でない限り、本明細書において提供されるすべての数値は、「約」という用語によって修飾される。

【0014】

「含む (including)」、「含有する」、または「によって特徴付けられる」と同義である、「含む (comprising)」という移行用語は、内包的でありまたは制約がなく、付加的な挙げられていない要素または方法ステップを除外しない。対照的に、「からなる」という移行句は、請求項において指定されないいかなる要素、ステップ、または成分も除外する。「から本質的になる」という移行句は、指定された材料またはステップ、「および主張される開示の基本的でかつ新規の特徴に大きな影響を及ぼさないもの」に、請求項の範囲を限定する。

【0015】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

1つの態様において、本開示は、生理学的条件下でMIR-17-92a-1クラスター宿主遺伝子 (MIR17HG) プレRNAに結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を提供する。

【0016】

MIR17HG遺伝子は、2種のlncRNAであるlnc-17-92TV¹およびlnc-17-92TV²、ならびに6種のmiRNAであるmiR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20a、およびmiR-92aを含む。lnc-17-92TV¹（脂質生成のRNA調節因子 (RROL)、lnc-17-92TV¹、およびMIR17HGmiR-17-92としても公知）転写産物の核酸配列は、NCBIアクセッション番号NR_027350、バージョンNR_027350.1に提供される。lnc-17-92TV¹は、発がん性遺伝子翻訳を推進する転写因子複合体を媒介するクロマチン足場を提供すると本明細書において示される。lnc-17-92TV²転写産物の核酸配列は、NCBIアクセッション番号NR_027349、バージョンNR_027349.1に提供される。

【0017】

MIR17HGプレRNAの核酸配列は、Ensemblアクセッション番号ENSG00000215417に提供され、下に明記される（配列番号1）：

【0018】

10

20

30

40

50

【化 1 - 1】

```

1  gaagctctcc  tcgcggggcg  ggccggcccg  ccgcaccccc  ggccctggggc  ctccggtcgt
61  agtaaagcgc  aggcggggcg  ggaggcggga  gcaggagccc  gccggccggc  agccgaagat
121  ggtggcggt  actcctcctg  gtgagttctg  ccgccccctc  ggcgacggag  ggaaacctgt
181  tgtgtgcggc  ccgggtcttg  cggggcgggg  ggagcggccc  ggggcggact  ggcccggggc
241  agcgtggcgg  cggcggcggt  gcggggcgcg  gtctcggccg  ttggccgccc  cggcgtgtgg
301  cagccgcate  tggctgcccc  ctccgtccgc  ccggggccgg  cggagggggg  cagggccggg
361  gcgggagggg  gggagggggg  ggcgtgcgcg  tggcggccgc  gcccgggacc  ccgcagacc
421  ctgcctgggc  ccacccgaag  gcgggtgggc  ggaaggcgaa  cacaatggcc  cctcggggag
481  aggacgtgcg  aggcctgtgc  cttctccggg  gcccgggcg  ccgcggggc  gtcgggtctc
541  tgggtaggaa  agtttctccc  gagggcgaga  gttaaagcgc  ctccagaaca  aagcggcggc
601  ggcgcgcgca  catggggcag  gccgcgggcc  gggagggggg  gcccccacga  ggtacctgcg
661  ccgcagcggg  cggcgtggcg  tggggcgggg  cccgcgggtc  cccaaaactt  gtacgcgcga
721  ggggtggcgg  aggggcggcg  agatcggcgc  ggccctggcg  ccaccccgc  tccgcgtggg
781  ctttgttagc  ccgcgtgggc  agcctcgggg  cggggcccg  aacttcccc  ccgtggccct
841  cggaggaggc  ccagtcggc  ctccgcggcg  gcgtggagcc  gctgcgccc  ggccgcttgc
901  tgggagtggt  gcgcgggagg  gccagcccg  ctccgcggga  gccgcgtccc  ccgcgcctg
961  ttccctgcgg  gcgggctgca  cgggggtgag  ggccggggac  atggcgggga  ctgcgcggcg
1021  ccgcgcgatt  ttcccgctt  aggcctcggg  ccgcgtgcga  ccggcacccg  ggccgcggag
1081  ccccgccccc  tctgggcgg  gctcgggggg  gctgggggac  acaaaggagg  ggccgcgcgc
1141  ccgcgtcccc  gccgcactcg  ggccctcggg  ccgcgggtcg  ccgcggcgct  gccgcgggga
1201  aacgggttgg  gggggttgc  ggcctcggcg  gggcctgaat  ctgaaccgc  gccccctggc
1261  ggctacggcg  agaatcgag  ggccgcgtc  ccccttgtgc  gacatgtgt  gccggcccg
1321  gctccatgag  cgtggcgggc  actttgcagt  ctgggtgtt  cctgcccgg  cttctgttcc
1381  taaactgcag  caaaggga  aggaactgaa  aaaggcaggc  tcgtcgttgc  aatatccca
1441  aaagagaaaa  ttaacggcat  gccatcagga  ccacagcagt  tggagaaaca  actctttatc
1501  ccggcttgca  gccacgagg  cttgattggg  ggagggtgg  tgaagaatag  tctgtgggct
1561  gctttttttt  tttcttttta  ctggagctgt  acagtggagt  cggtgattgc  tgcgatcat
1621  aatcaagtat  tttaggagct  ttttagaca  tgtatctgat  agctaaggat  ttttcaactt
1681  tattctctta  cgtatttttc  aactgtaaat  tattgggctt  ttaaactcct  ctagtattgc
1741  tcgactotta  ctctcacaaa  tggatggaat  taattgctgt  taggaggttg  gaaaatagca
1801  aatatagatt  tggacgggtg  tagtaatttt  gagcaataaa  tgttttatct  ttttttcc
1861  tatttttccc  tattccagtc  atacacgtgg  acctaacctg  accagtagct  tttctgagaa
1921  tacttgctga  aaaggaagt  ttctggaatg  ggttaagtgt  ttctgatttt  cttgaacttt
1981  tottaaaaa  aaattttct  tgcattataa  gttgaataaa  taggattggg  ttottagaga
2041  gtaaaagtag  gtgtttcttt  ctttagacaa  tgtacctttt  ctgaaaaact  aactcattaa

```

10

20

30

40

50

【0 0 1 9】

【化 1 - 2】

```

2101 gtacggatttt gctaattttta aggtagtaaa attacagtggt aaatatteect gtacatttttt
2161 ggaaactggc ttatgcagtt tacgaatat aatttttagac cctcttttaa gttgggtgat
2221 aaagtagata taacctgaga tgatagattt aacacaggata tttacgttct gctacaattg
2281 actgataaca cttgaagtgt agtctgaaca gtaattttgt taatcatttc aacaagtatt
2341 tgctaagtgg aagccagaag aggaggaaaa tgttttgcca cgtggatgtg aagatttcct
2401 ctaaaaggta cacatggact aaattgocct taaaatgttc aaaattagtt ctcattttatt
2461 tgcagctcca ttttgttttg tttttttct ctatgtgtca atccatttgg gagaggccag
2521 ccattggaag agccaccaact tccagtgtca gttggatggg tggttatgat tgcctctctg
2581 aaagaattct taaggcataa atacgtgtct aaatggacct catabctttg agataattaa
2641 actaattttt tcttccccc tagggattat gctgaatttg tatggtttat agttgttaga
2701 gttttaggtg ttaattctaa ttatctattt caaatttagc aggaaaaaag agaactcac
2761 cttgtaaaae tgaagattgt gaccagtcag aataatgtca aagtgtttac agtcaggta
2821 gtgatattgt catctactgc agtgaaggca cttgttagcat tatgttgaca gctgcctcgg
2881 gaagccaagt tgggctttta agtgcagggc ctgctgatgt tgagtgcctt ttgttctaag
2941 tgcagctcca tgcagtagatt agcatctact gccctaagtg ctcctctcgg
3001 cataagaagt tatgtattca tccaataatt caagccaagc aagtatatag gtgttttaat
3061 agtttttgtt tgcagctcctc tgttagtttt gcatagttgc actacaagaa gaatgtagtt
3121 tggcaaatct atgcaaaact gatggtgccc tgcattttcc ttcaaatgaa tgatttttac
3181 taattttgtg taattttatt gtgtcgtatg agaactcgc ttgtctatct gatgtgacag
3241 cttctgtagc actaaagtgc ttatagtcca ggtagtgttt agttatctac tgcattatga
3301 gcacttaaaag tactgtcagc tgtagaacte cagcttcggc ctgtcggcca atcaaaactgt
3361 cctgttactg aacactgttc tatggttagt ttgcagggt tgcctccagc tegtgtgat
3421 tctgtctgtc aactcctgc aaaaactgact gtggtagtga aaagtctgta gaaaagttaag
3481 ggaaactcaa acccctttct acacagggtt ggatcgggtt caatgctgtg tttctgtatg
3541 gtattgcact tgtcccgccc tgttgagttt ggtggggatt gtgaccagaa gattttgaaa
3601 attaaatatt actgaagatt tgcacttcca ctgttaaatg tacaagatac atgaaatatt
3661 aaagaaaaatg tttaactttt tgtgtaaaata catctgtctc tgttttcatt caaaaacatt
3721 tcacttttgg gggtgcgtgt cagattttggc agtataaatt ctggctatat tttttgttgt
3781 tagatttatt tggctgttaa gtattgcgat atgactaaac ataactgtata cctgatgac
3841 atctgtaaa gttagagtata tctttttgct ttctttggag ttagtgttat tccaggatat
3901 ttacttttat ctaaaagttt abttatgttt ctcatatatt actcaagtat ttaaatttag
3961 agagaatgcc gctctgttta aagcaatgtg taaagatgag tttttttaag catggaattt
4021 aggggtgggg tacaatttgt ttctattaa gcaagaccag tttaccaata catgagtaac
4081 tgaagtgtaa ctgttaaatg cttgtatact agtttttctt tctgattgtc agtgatttat
4141 aagctataaa tgaccaaggt cctcagactg ctttttagcat ctgcaactta aaaaatggg
4201 agttgttagc ctaaaatagag taacagttaa atgtatgtgt acactcttcc acactcttcc
4261 caaatgcca gagtgcagcg gtgggtgag attcagatat tcatattttt ctaagtctgt
4321 agtttaacatt tatgttccct actccctacg taagccagac tttggcaaca gtgatagttg
4381 attccaggct tatttgactg aaagtcaact aagtggaaac taagaagtgg cagttagtgt
4441 tttccaccgc atttctgccc tctctctttt cttcatgtgt ttttgcctct agcctatgtg
4501 tttttgtgta gaataatgtg ggatacctga ataatagatt taaaaggacc aagtggtaaa
4561 attgggcccc agctgaagta caggcaaaact tgatgtttga aagataagtt ttgagaaatg
4621 tcattgtatt ttggagtaaa agaggctatc ttagtaataa gaaataaact tccataaac
4681 taggttagac caaccaataa atctagaaat cagcttttaa aaatattgtc tgaagtctaa
4741 caaaagtttt cacctctaatt gtgttcttta agaaatttaa ggaacttagc cttggattcc
4801 tgaatagaaa ggtaagaatt ctatcattct ggagttgatg aaaacataaa ttttcaggat
4861 gtgaatgaa cagtgattta taaaatggaa atcaaatgtt acattagcag agttcttaag
4921 ctttttgaat tgaaggagac ctaataattg tgtctttttg gttatttagt gacaaaactg
4981 gctttcaaac tatgtctaaa aagttccggc tggacacggg ggctcacacc tataatccta
5041 gcacttgggg aggtctgaggc agacggatta cctgagggtc ggagttcag agctagcggg
5101 cggacatggt gaaaocgtgt ctctactaaa aatataaaaa attagccggg tgcagtggcg
5161 tgcacctgta atcccagcta ctctggaggc tgaggcagga gaatcacctg aacctgggag
5221 gtggagggtt cagtgcagct agatcctgcc actgcactcc agcctggggc caagaccaag
5281 acttaaaagc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagtt tcataataca gcatgggtctg
5341 gtagtgtgca aaatggtgtg cttttgggga gatacactag caattttttt aaaaactgga
5401 acagtgtgat aggaagcctg ctggatgatt tcttaaatat tctaaaatgt aagtcaataa
5461 tgttttaata acaaagactt aaatggcttt tctccctaga gactgaaact agtattcatt
5521 gtgttcagaa cttaattggg cttgaaactg gatttaaatc taataaacia gtttaataat
5581 gtgtatgttt tgttgggggt ttggtagtga tctgtgggtc tatagggttt aatagggaatt
5641 gcttttgatt tttttctggc tttagaatgt gaggcaaat ttacattctt ggtctatta
5701 agattttctt aggcattgcta acatgccaac aaaaagccat gtaagtattg tataaaaaa

```

10

20

30

40

【0 0 2 0】

50

【化 1 - 3】

```

5761 ttcacattgt taatttagcc attttgaaat tcagatgagt gagcaagttg ataatggcct
5821 catctctgac ctgagaaaaa acaactttga cccttggtct taaaatgctt taaccttgaa
5881 gttgcttgag acttaagagg tcatgttgct ttaggtttaa taaatagcct taactatttg
5941 gaggggaaaa aatgggtcaa cttttttttt tttttttggt gtttgcatgt acaactttct
6001 attttttagcc tatatttgga aagaaagcac ttaacatttt aggaattott tttaaagctg
6061 cttgcaaagt gttgggtgatt ttactgaaaa ctttttgagat cttcatttta caggcagacc
6121 tgtctaacta caagccagac ttgggttttc tctgtagtt tgaagacaca ctgactcctg
6181 acaaaaatgca gcttgcaact tcttgagaa caactcagtg tcacattaaa gtttattatg
6241 tatttaattga tacactgttt aattgacagt tttgcatagt ttgtetaact tttagaattt
6301 aagagcctct caactgagca gtaaaaggtaa ggagagctca atctgcacag agccagtttt
6361 tagtggttga tggaaataag atcatcatgc ccacttgaga cttcagatta ttcttttagct
6421 tagtggttga atgagttaca tottattaaa gtgaaatta atgtagtttt ctgccttgat
6481 aacatttcat atgtggtatt agtttttaaag ggtcattagg aaaatgcaca tattccatga
6541 attttaagac ccatagaaaa gttgaagaat gcttaatttt cttatccagt aatgtaaaaca
6601 cagagacaga acattgagat gtgcctagtt ctgtatttac agtttggtct ggctgtttga
6661 gttctagcgc attttaattgt aataaataaa atactgcatt ttaaagctgt taagaaattg
6721 tccagaacga gaattattgaa ataaaaactt caaggttatt

```

10

【0021】

本明細書において使用される「アンチセンスオリゴヌクレオチド」（ASOと略される）という用語は、標的RNA分子に結合し得る、天然に存在しないヌクレオチドのポリマー（オリゴマー）を指す。

20

【0022】

「ヌクレオチド」という用語は、具体的に記述されない（sated）または文脈から明確でない限り、リボース糖（すなわち、リボ核酸、RNAを形成するリボヌクレオチド）または2'-デオキシリボース糖（すなわち、デオキシリボ核酸、DNAを形成するデオキシリボヌクレオチド）を有するヌクレオシド、およびリン酸を含む。ヌクレオチドは、核酸ポリマーまたはポリヌクレオチドのモノマー単位として働く。DNAにおける4種の核酸塩基は、グアニン（G）、アデニン（A）、シトシン（C）、およびチミン（T）である。RNAにおける4種の核酸塩基は、グアニン（G）、アデニン（A）、シトシン（C）、およびウラシル（U）である。本文脈において、ASOは、それらが導入され得る細胞に対して外在性であると理解される。

30

【0023】

ASOは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、またはその組合せから作製され得る。ASOは、少なくとも部分的な相補的領域を通じたハイブリダイゼーションによって標的RNAをモジュレートする。ASOモジュレーションメカニズムは、転写停止、RNA合成妨害（例えば、キヤッピング、スプライシング、および／または核から細胞質への輸送を含めた様々な段階における）、リボソーム付着、リボヌクレアーゼ（RNAse）H動員、mRNAの分解（例えば、ギャップマー型ASO）、翻訳停止（例えば、翻訳を遮断する標的RNAに結合するASO）、またはASOハイブリダイゼーションによる標的RNAの立体遮断を含む。

40

【0024】

「ギャップマー」および「gapmer」という用語は、ギャップの両側または主たる領域にRNA様ウィングセグメントを有する短いDNA ASO構造を指すために本明細書において使用される。これらの線形DNA分子は、RNAse H切断の誘導によりRNAを分解するために、標的にハイブリダイズするように設計される。標的RNAへのギャップマーの結合は、修飾RNA様隣接領域に起因したより高いアフィニティー、ならびにヌクレアーゼによるASO分解に対する抵抗性を有する。ギャップマーのギャップは、一方または両方のウィングにおける修飾のものとは異なる少なくとも1種の修飾を含有する。そのような修飾は、核酸塩基、モノマー連結、および糖修飾を含む。

【0025】

50

一部の実施形態において、ASOは、MIR17HGプレRNAの5'末端領域に結合する。「末端領域」という用語は、MIR17HGプレRNAの文脈において使用される場合、5'末端ヌクレオチドの最初の20%を指す。一部の実施形態において、ASOは、MIR17HGプレRNAの5'末端ヌクレオチドの最初の10%、最初の15%、または最初の20%以内に結合する。一部の実施形態において、ASOは、MIR17HGプレRNAの3'末端領域内に結合する。

【0026】

一部の実施形態において、ASOは、MIR17HGプレRNAの5'末端に最も近いイントロン領域を標的にする。本明細書において使用される「イントロン領域」という用語は、転写の経過においてプレRNAから除去されるRNA分子の領域を指す。一部の実施形態において、ASOは、miRNA一次転写産物（pri-miRNA）がスプライスされるMIR17HGプレRNAの領域を標的にする（例えば、pri-mir-17-92）。プレmiRNAは、成熟miRNAが由来するより長い配列である。

10

【0027】

本明細書に開示されるASOは、生理学的条件下でMIR17HGプレRNAに結合する。本明細書において使用される「生理学的条件」という用語は、哺乳類インビボ条件において通常遭遇する条件、例えば生理学的pH（約7.3～約7.5の域内）における体温（約37℃）での等張溶液（約0.9%生理食塩水）を指す。

【0028】

有効であるASOの相補性最小パーセントは、標準的手順に従って判定され得る。一般的に、ASOは、MIR17HGプレRNAと約85%～約100%の相補性を有する。一部の実施形態において、ASOは、それが標的にするMIR17HGプレRNA配列と100%の相補性を有する。一部の実施形態において、ASOは、MIR17HGプレRNAと少なくとも99%の相補性、少なくとも98%の相補性、少なくとも97%の相補性、少なくとも96%の相補性、少なくとも95%の相補性、少なくとも（at last）90%の相補性、少なくとも85%の相補性である。

20

【0029】

ASOは、15～30ヌクレオチドに及ぶ長さを有する。一部の実施形態において、ASOは、長さが30ヌクレオチド以下である。一部の実施形態において、ASOは、長さが25ヌクレオチド以下である。一部の実施形態において、ASOは、長さが24ヌクレオチド以下である。一部の実施形態において、ASOは、長さが23ヌクレオチド以下である。一部の実施形態において、ASOは、長さが20ヌクレオチド以下である。一部の実施形態において、ASOは、長さが18ヌクレオチド以下である。一部の実施形態において、ASOは、長さが15ヌクレオチド～24ヌクレオチドである。一部の実施形態において、ASOは、長さが18ヌクレオチド～23ヌクレオチドである。一部の実施形態において、ASOは、長さが18ヌクレオチドである（本明細書において18-merと称される）。一部の実施形態において、ASOは20-merである。一部の実施形態において、ASOは21-merである。一部の実施形態において、ASOは22-merである。一部の実施形態において、ASOは23-merである。「mer」という用語は、ASOとの関連で本明細書において使用される場合、ヌクレオチドの長さを指す。例えば、「16-mer」および「16mer」という用語は、16ヌクレオチドの伸長を指す。

30

40

【0030】

一部の実施形態において、ASOは、CRISPR Cas9遺伝子編集システムとの使用のための単鎖RNA（sgRNA）である一本鎖RNAである。代表的な抗MIR17HGプレRNA sgRNAの核酸配列が下に明記される：

【0031】

MIR17HGプレRNA sgRNA #1：AGTGGCGCGAAGGCGCAGGT（配列番号2）；

MIR17HG プレRNA sgRNA #2：GTGGCGCGAAGGCGCAG

50

G G T C（配列番号 3）；
M I R 1 7 H G プレ R N A s g R N A # 3 : C C T C G C C C G A G G G C G C
G A A G（配列番号 4）；および
M I R 1 7 H G プレ R N A s g R N A # 4 : G A G G G C G C G A A G T G G C
G C G A（配列番号 5）
【 0 0 3 2 】

一部の実施形態において、A S Oは、一本鎖 D N A（s s D N A）分子である。代表的な s s D N A 抗 M I R 1 7 H G プレ R N A A S Oの核酸配列が、表 1 に明記される。

【 0 0 3 3 】

【表 1】

10

表 1: 代表的な抗 MIR17HG プレ RNA ASO の核酸配列

名前	配列
ASO1(配列番号 6)	TACTTGCTTGGCTT
ASO2(配列番号 7)	CACCGTCCAAATCTAT
ASO3(配列番号 8)	AGCACTCAACATCAGC
5'-ASO1(配列番号 9)	CACCGTCCAAATCTAT
5'-ASO2(配列番号 10)	GTATGACTGGAATAGG
ネズミ科 aso1(配列番号 11)	TACAGTGGAAATCGGC
ネズミ科 aso2(配列番号 12)	GCGAGCAAACACGAAA
ネズミ科 aso3(配列番号 13)	ACTTGGATTGGATGAG
ASO 非標的化対照(ASO-NC) (配列番号 14)	GCTCCCTTCAATCCAA

20

【 0 0 3 4 】

A S Oは、化学的部分の付加、またはその核酸塩基、ヌクレオチド、もしくはヌクレオシド間連結への化学修飾を用いてさらに修飾され得る。A S O修飾は、インビボにおける安定性を増強し、特異性を向上させ、有毒な副作用を低下させる。代表的な修飾は、2'-O-メトキシエチルリボース（M O E）基でのヌクレオチドの修飾を含む。

30

【 0 0 3 5 】

M I R 1 7 H G プレ R N A 結合 A S Oは、A S Oが、2'-M O Eで修飾された5'末端ヌクレオチド、非修飾 D N A（「D N Aギャップ」）、および2'-M O Eで修飾された3'末端ヌクレオチドを含有する、G立体配置で調製され得る。代替的に、M I R 1 7 H G プレ R N A 結合 A S Oは、A S Oにおけるヌクレオチドのすべてが2'M O Eで修飾される、S B立体配置で調製され得る。代表的な A S Oの核酸配列が、表 2 に明記される。

【 0 0 3 6 】

40

ギャップマー A S Oは、D N Aギャップの末端に修飾ヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、D N Aギャップは、長さが5、6、7、8、9、10、11、12、または15ヌクレオチドである。一部の実施形態において、A S Oは、D N Aギャップが、5merの2'-M O E化学修飾ヌクレオチドが5'側に隣接し、ならびに5merの2'-M O E化学修飾ヌクレオチドが3'側に隣接している、5-8-5ギャップマーである。

【 0 0 3 7 】

50

【表 2】

表 2: 代表的な MIR17HG プレ RNA 結合 ASO の核酸配列

名前	配列
ASO1(配列番号 15)	CCCGGCCGCCTCCCCCGTCCC
G 分子(G2)として選択される ASO2(20mer)(配列番号 16)	CCCTCCCACCCTCCCCGCC
ASO3(配列番号 17)	CCCCCCGACCCCTGTGTTT
ASO4(配列番号 18)	TCCTCCAACCTTTTATCGTTT
ASO5(配列番号 19)	TCGTCCTTTTTTCTCTTGT
ASO6(配列番号 20)	CTCCCCTTTTTTACCCAGTT
ASO7(配列番号 21)	CCCTCTCCGGTCGGTAACCTT
ASO8(配列番号 22)	TCGTCCTTTTTTCTCTTGTAGT
SB 分子(SB9)として選択される ASO9(22mer)(配列番号 23)	CCACCCCTAACACTGGTCTTCT
ASO10(配列番号 24)	CCCCTCCGCCCTCGTCCTC
ASO11(配列番号 25)	TCTCTCATTTTCATCCAC
ASO12(配列番号 26)	AGAGTAAAACAAAACAAAA
ASO13(配列番号 27)	ACAAAATAGAAAAAAAAGGA
ASO14(配列番号 28)	ATAAAAAGGGATAAGGTCAG
ASO15(配列番号 29)	TCGTCCTTTTTTCTCTTGTA
ASO16(配列番号 30)	CCCTATGGACTTATTATCT

10

20

30

【0038】

表 2 における代表的な ASO は修飾され得、例えば ASO2 は、さらなる修飾のための G 立体配置 ASO として選択され得、ASO9 は、さらなる修飾のための SB 立体配置 ASO として選択され得る。これらの ASO は、表 3 に例示されるようにさらに修飾され得る。1 つの実施形態において、G2 微調整 15 は、表 3 に明記される G 立体配置 ASO (G2-15) として選択され得、SB 微調整 19 は、表 4 に明記される SB 立体配置 ASO (SB2-19) として選択され得る。

【0039】

40

50

【表 3】

表 3: G2 分子に基づく代表的な ASO 修飾の核酸配列

名前	配列
20mers	
G2 微調整 1(配列番号 31)	gCCCTCCCACCCTCCCCCGC
G2 微調整 2(配列番号 32)	cgCCCTCCCACCCTCCCCCG
G2 微調整 3(配列番号 33)	cggCCCTCCCACCCTCCCCC
G2 微調整 4(配列番号 34)	cccgCCCTCCCACCCTCCCC
G2 微調整 5(配列番号 35)	CCTCCCACCCTCCCCCGCCg
G2 微調整 6(配列番号 36)	CTCCCACCCTCCCCCGCCgc
G2 微調整 7(配列番号 37)	TCCCACCCTCCCCCGCCgca
G2 微調整 8(配列番号 38)	CCCACCCTCCCCCGCCgcac
18mers	
G2 微調整 9(配列番号 39)	CCCTCCCACCCTCCCCCG
G2 微調整 10(配列番号 40)	CCTCCCACCCTCCCCCGC
G2 微調整 11(配列番号 41)	CTCCCACCCTCCCCCGCC
G2 微調整 12(配列番号 42)	gCCCTCCCACCCTCCCCC
G2 微調整 13(配列番号 43)	cgCCCTCCCACCCTCCCC
G2 微調整 14(配列番号 44)	TCCCACCCTCCCCCGCCg
G 分子(G2-15)として選択される G2 微調整 15(配列番号 45)	CCCACCCTCCCCCGCCgc

【 0 0 4 0 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4: SB9 分子に基づく代表的な ASO 修飾の核酸配列

名前	配列
22mers	
SB9 微調整 1(配列番号 46)	aCCACCCCTAACACTGGTCTTC
SB9 微調整 2(配列番号 47)	aaCCACCCCTAACACTGGTCTT
SB9 微調整 3(配列番号 48)	aaaCCACCCCTAACACTGGTCT
SB9 微調整 4(配列番号 49)	caaaCCACCCCTAACACTGGTC
SB9 微調整 5(配列番号 50)	CACCCCTAACACTGGTCTTCa
SB9 微調整 6(配列番号 51)	ACCCCTAACACTGGTCTTCaa
SB9 微調整 7(配列番号 52)	CCCTAACACTGGTCTTCaaa
SB9 微調整 8(配列番号 53)	CCTAACACTGGTCTTCaaaa
20mers	
SB9 微調整 9(配列番号 54)	CCACCCCTAACACTGGTCTT
SB9 微調整 10(配列番号 55)	CACCCCTAACACTGGTCTTC
SB9 微調整 11(配列番号 56)	ACCCCTAACACTGGTCTTCT
SB9 微調整 12(配列番号 57)	aCCACCCCTAACACTGGTCT
SB9 微調整 13(配列番号 58)	aaCCACCCCTAACACTGGTC
SB9 微調整 14(配列番号 59)	CCCCTAACACTGGTCTTCa
SB9 微調整 15(配列番号 60)	CCCTAACACTGGTCTTCaa
18mer	
SB9 微調整 16(配列番号 61)	ACCCCTAACACTGGTCTT
SB9 微調整 17(配列番号 62)	CACCCCTAACACTGGTCT
SB9 微調整 18(配列番号 63)	CCACCCCTAACACTGGTC
SB 分子(SB9-19)として選択される SB9 微調整 19(配列番号 64)	CCCCTAACACTGGTCTTC
SB9 微調整 20(配列番号 65)	CCCTAACACTGGTCTTCT

【0041】

一部の実施形態において、ASOはさらに修飾され得る。一部の実施形態において、修飾は、1つまたは複数のASOヌクレオチドへの付加的な部分（例えば、脂質）のコンジュゲーションを含む。さらに、ASOは、1つまたは複数の核酸塩基、ヌクレオチド、またはヌクレオシド間連結の1種または複数の化学修飾も含み得る。

【0042】

ASOコンジュゲーションおよび修飾

付加的な部分（例えば、脂質部分）を、ASO内の任意の1つまたは複数のヌクレオチドにコンジュゲートして、送達効率、特異的細胞もしくは組織標的化、細胞取り込み、および／または長期の循環時間を増加させ得る。一部の実施形態において、ASO内の1つまたは複数のヌクレオチドは、親油性部分にコンジュゲートされる。一部の実施形態において、化学的部分が、ASOの5'または3'末端（すなわち、ギャップマーにおけるDN

Aギャップの5'および／または3'いずれか)におけるヌクレオチドの1つまたは複数にコンジュゲートされる。一部の実施形態において、ASOのあらゆるヌクレオチドが化学的部分にコンジュゲートされる(すなわち、完全2'MOE立体配置)。一部の実施形態において、最初の5'末端ヌクレオチドが化学的部分にコンジュゲートされる。一部の実施形態において、最後の3'末端ヌクレオチドが化学的部分にコンジュゲートされる。代表的な親油性部分は、パルミチン酸、ステロール(例えば、トコフェロール、コレステロール)、糖質(例えば、N-アセチルガラクトサミン; GalNAc)、オレイル残基、レチニル残基、コレステリル残基、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、ミリスチン酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コレン酸(cholenic acid)、ジメトキシトリチル、およびフェノキサジンを含む。

10

【0043】

代表的なトコフェロールは、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、および δ -トコフェロールを含む。トコフェロールの類似体は、 α -トコトリエノール、 β -トコトリエノール、 γ -トコトリエノール、および δ -トコトリエノールの様々な不飽和類似体を含む。

【0044】

一部の実施形態において、ASO内の1つまたは複数のヌクレオチドは、パルミチン酸、トコフェロール、またはコレステロール等の脂質とコンジュゲートされる。脂質は、PS(*)またはPO()連結を用いてASOの5'または3'末端に接続され得る。一部の実施形態において、ASO内の1つまたは複数のヌクレオチドは脂質とコンジュゲートされる。2つ以上のヌクレオチドがそのように修飾される実施形態において、脂質は同じであっても異なってもよい。例えば、3つのヌクレオチドが脂質にコンジュゲートされる実施形態において、脂質のそれぞれは異なってよく、例えばパルミチン酸、トコフェロール、およびコレステロールであり得る。核酸へのコンジュゲーションに適切な付加的な親油性部分は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第8,106,022号明細書、第8,404,862号明細書、第10,077,443号明細書、第10,358,643号明細書、第10,441,653号明細書、第11,116,843号明細書、および第11,260,134号明細書、ならびに米国特許出願公開第2014/0045919号明細書、第2016/0289677号明細書、第2021/0163934号明細書、および第2022/0175817号明細書を参照されたい。

20

30

【0045】

一部の実施形態において、ASOは、1つまたは複数の核酸塩基、糖部分、ヌクレオシド間連結(すなわち、骨格)、またはその組合せへの化学修飾を含む。

【0046】

核酸塩基修飾は、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、アルキルまたはアルキニル置換ピリミジン、アルキル置換プリン、ならびにN-2、N-6、およびO-6置換プリンを含めた核酸塩基と、構造的に区別できるが機能的に互換可能である任意の修飾または置換を含む。代表的な修飾核酸塩基は、シュドウリジン、2'-チオウリジン(s2u)、N6'-メチルアデノシン、5'-メチルシチジン、N-エチルピペリジン(ethylpiperdine)7'-EAAトリアゾール修飾アデニン、N-エチルピペリジン6'-トリアゾール修飾アデニン、6'-フェニルピロロシトシン、2',4'-ジフルオロトルイルリボヌクレオシド、2-アミノプロピルアデニン、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-メチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-N-メチルグアニン、6-N-メチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、5-プロピニル(C=C-CH₃)ウラシル、5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、5-リボシルウラシル(シュドウウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8

40

50

ーチオアルキル、8-ヒドロキシル、8-アザおよび他の8-置換プリン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、5-ハロウラシル、および5-ハロシトシン、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン、3-デアザアデニン、6-N-ベンゾイルアデニン、2-N-イソブチリルグアニン、4-N-ベンゾイルシトシン、4-N-ベンゾイルウラシル、5-メチル4-N-ベンゾイルシトシン、5-メチル4-N-ベンゾイルウラシル、三環式ピリミジン、ユニバーサル塩基、疎水性塩基、種々雑多な (promiscuous) 塩基、サイズ拡張塩基、ならびにフッ素化塩基を含む。代表的な三環式ピリミジンは、1, 3-ジアザフェノキサジン-2-オン、1, 3-ジアザフェノチアジン-2-オン、および9-(2-アミノエトキシ)-1, 3-ジアザフェノキサジン-2-オン (G-クランプ) を含む。修飾核酸塩基は、プリンまたはピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられているもの、例えば7-デアザーアデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン、および2-ピリドンも含み得る。

10

【0047】

付加的な核酸塩基修飾が、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第3, 687, 808号明細書、第5, 130, 302号明細書、第5, 811, 534号明細書、第5, 830, 653号明細書、および第6, 005, 096号明細書、米国特許出願公開第20030158403号明細書および第2003/0175906号明細書、ならびにKroschwitz et al., eds., *The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 1st ed., John Wiley & Sons, 1990を参照されたい。

20

【0048】

糖部分修飾は、フラノシル糖部分 (例えば、2-デオキシフラノシル糖部分修飾) を含めた、二環式、三環式、および非二環式糖部分または糖代用物を含む。代表的な修飾フラノシル糖部分は、例えば2'、4'、および5'位における非環式修飾を含む。一部の実施形態において、非環式修飾は分岐状である。糖部分2'位への代表的な修飾は、2'-デオキシ-2'-フルオロ (2'-F)、2'-アラビノ-フルオロ (2'-Ara-F)、2'-O-ベンジル、2'-O-メチル-4-ピリジン (2'-O-CH₂Py (4))、2'-O-メチル (2'-OCH₃) (2'-OMeまたはMe)、2'-O-メトキシエチル (2'-O(CH₂)₂OCH₃) (2'-OMEまたはMOE)、ハロ、アリル、アミノ、アジド、アンロックド核酸 (UNA)、グリコール核酸 (GNA)、SH、CN、OCN、CF₃、OCF₃、O-C₁-C₁₀アルコキシ、O-C₁-C₁₀置換アルコキシ、O-C₁-C₁₀アルキル、O-C₁-C₁₀置換アルキル、S-アルキル、N(R_m)-アルキル、O-アルケニル、S-アルケニル、N(R_m)-アルケニル、O-アルキニル、S-アルキニル、N(R_m)-アルキニル、O-アルキレニル-O-アルキル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、O-アラルキル、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n)、およびOCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n)、式中、各R_mおよびR_nは、独立してH、アミノ保護基、またはC₁-C₁₀アルキル (alkyl) (非修飾または修飾あり) である、を含む。

30

【0049】

一部の実施形態において、糖部分修飾は、2'位におけるフッ素修飾 (2'-フルオロまたは2'-F) を含む。2'-F修飾は、高いRNA結合アフィニティー、およびヌクレアーゼ分解に対する抵抗性を提供する。2'-F含有糖部分修飾の調製法は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5, 459, 255号明細書および第6, 262, 241号明細書、米国特許出願公開第20060036087号明細書および第20110269814号明細書、ならびにLudwig, *acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 16(3-4):131-3 (1981)およびLudwig and Eckstein *J. Org. Chem.* 54: 631-635 (1989)を参照されたい。

40

【0050】

二環式糖部分修飾は、第2の環を形成する架橋性糖修飾を含む。一部の実施形態において、第2の環は、フラノース環における4'と2'位との間の架橋を含む。一部の実施形態

50

において、糖部分はリボースである。代表的な4'から2'への架橋性糖部分修飾は、(S)-cEt-BNA、トリシクロ-DNA (tcDNA)、PMO、4'-CH₂-2'、4'-(CH₂)₂-2'、4'-(CH₂)₃-2'、4'-CH₂-O-2' (ロックド核酸または「LNA」としても公知)、4'-CH₂-S-2'、4'-(CH₂)₂-O-2' (エチレン架橋核酸または「ENA」としても公知)、4'-CH(CH₂)-O-2' (S立体配置における場合、「拘束エチル」または「cEt」としても公知)、4'-CH₂-O-CH₂-2'、4'-CH₂-N(R)-2'、4'-CH(CH₂OHCH₃)-O-2' (「拘束MOE」または「cMOE」)、4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'、4'-CH₂-N(OCH₃)-2'、4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'、4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'、4'-CH₂-C(=CH₂)-2'、4'-C(RR_b)-N(R)-O-2'、4'-C(RR_b)-O-N(R)-2'、4'-CH₂-O-N(R)-2'、および4'-CH₂-N(R)-O-2'、式中、各R、R_a、およびR_bは、独立してH、保護基、またはC₁-C₁₂アルキル(非修飾または修飾あり)である、を含む。付加的な糖部分修飾およびその類似体が、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,859,221号明細書、第6,005,087号明細書、第6,531,584号明細書、第7,399,845号明細書、第7,569,686号明細書、第7,741,457号明細書、第8,022,193号明細書、第8,278,283号明細書、第8,278,425号明細書、第8,278,426号明細書、第9,102,938号明細書、および第10,119,136号明細書、米国特許出願公開第20100190837号明細書、ならびにZhou et al., J. Org. Chem. 74(1):118-34 (2009)を参照されたい。

10

20

【0051】

ヌクレオシド間連結(すなわち、骨格)修飾は、アルキルホスホネート(alkylphosphonate)(例えば、メトキシプロピルホスホネート(methoxypropylphosphonate)(MOP))およびホスホロチオエート(phosphorothioate)(例えば、ホスホロチオエート(phosphorothioate)(PS))を含めた、任意の変更された3'から5'へのホスホジエステル連結を含む。キラル中心を有する複数の修飾ヌクレオシド間連結を含むASOは、立体純粋(stereopure)(1種の立体異性体のみを含有する)、立体ランダム(stereorandom)(立体異性体における規則性なし)であり得る、または立体異性体におけるパターンを有し得る。代表的なヌクレオシド間連結修飾は、ホスホジエステル(phosphodiester)結合(P=O)(非修飾、天然に存在する)、ホスホトリエステル、メチルホスホネート(methylphosphonate)、ホスホロアミダート(phosphoramidate)、およびホスホロチオエート(phosphorothioate)(PS)(P=S)(Pr異性体およびSp異性体を含む)、およびホスホロジチオエート(phosphorodithioate)(PS₂)(HS-P=S)、5'-(E)-ビニルホスホネート(vinylphosphonate)(5'-(E)-VP)、5'-Mメチルホスホネート(Mmethylphosphonate)(5'-MP)、ホスホネート(phosphate)を有する(S)-5'-C-メチル、ならびに5'-ホスホロチオエート(phosphorothioate)(5'-PS)を含む。リンを含有しないヌクレオシド間連結は、メチレンメチルイミノ(-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂)、チオジエステル、チオノカルバメート(thionocarbamate)(-O-C(=O)(NH)-S-)、シロキサン(-O-SiH₂-O-)、ペプチド核酸(PNA)、およびN,N'-ジメチルヒドラジン(-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-)を含む。中性電荷ヌクレオシド間連結は、ホスホトリエステル、メチルホスホネート(methylphosphonate)(MP)、MMI(3'-CH₂-N(CH₃)-O-5')、アミド-3(3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5')、アミド-4(3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5')、ホルムアセタール(3'-O-CH₂-O-5')、メトキシプロピル、およびチオホルムアセタール(3'-S-CH₂-O-5')を含む。リンを含有するおよびリンを含有しないヌクレオシド間連結の調製法は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許出願公開第20220049248号明細書およびHu et al., Signal Transduct. Target. Ther. 5(1):101-25 (2020)を参照されたい。

30

40

50

【0052】

2'-デオキシフラノシル糖部分修飾は、2'位に2つの水素を有する5員炭素フラノシル環糖部分の付加を伴い、2'位以外の位置で修飾されなくてもさらに修飾されてもよい。2'-O-メトキシエチル糖部分修飾は、2'-O(C₂H₅)₂-OCH₃でのリボシル環の2'-OH基の置換を伴う。

【0053】

医薬組成物

本開示の医薬組成物は、治療有効量のASOおよび薬学的に許容される担体を含む。本明細書において使用される「治療有効量のASO」という用語は、所望の治療効果を提供するための十分量のASOを指す。

【0054】

所与の患者に対するASOの有効量は、年齢、体重、がんのタイプ、位置、および重症度、ならびに対象の全般的健康状態を含み得る1つまたは複数の要因に応じて変動する。最終的には、主治医が、適当な用量および投薬量レジメンを決定するであろう。典型的に、ASOは、一連の投薬、典型的には数週間の週単回投薬で与えられるであろう。一部の実施形態において、ASOの有効量は、投薬あたり約0.03mg〜約3kgである。一部の実施形態において、ASOの有効量は、投薬あたり約0.3mg〜約300mgである。一部の実施形態において、ASOの有効用量は、投薬あたり約30mgである。一部の実施形態において、ASOの有効量は、投薬あたり約10mg/kg対象体重〜約50mg/kg対象体重である。一部の実施形態において、ASOは、約30週間〜約60週間、週1回投与される。一部の実施形態において、ASOは、約40週間、週1回投与される。一部の実施形態において、ASOは、約4週間、週1回、週2回、または隔週平日（例えば、週3日）投与される。

【0055】

組成物は、無菌液体調製物、例えば等張水溶液、懸濁液、乳濁液、分散体、または粘性組成物として提供され得、それは選択pHまで緩衝化され得る。液体の薬学的に許容される担体は、同様に水性または非水性担体を含む。「薬学的に許容される担体」という語句は、当技術分野において認識されており、哺乳類に本開示のASOを投与するのに適切な薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクルを含む。担体は、身体の1種の臓器または部分から身体別の臓器または部分に対象作用物質を運ぶまたは輸送することに関与する、液体もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、またはカプセル化材料を含む。各担体は、製剤の他の成分と適合性でありかつ患者にとって有害でないという意味で「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体として働き得る材料の一部の例は、ラクトース、グルコース、およびスクロース等の糖；トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン等のデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロース等のセルロースおよびその誘導体；トラガント粉末；モルト；ゼラチン；タルク；ココアバターおよび座薬ワックス等の賦形剤；落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、および大豆油等の油；プロピレングリコール等のグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール等のポリオール；オレイン酸エチルおよび라우リン酸エチル等のエステル；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム等の緩衝化剤；アルギン酸；発熱物質不含水；等張食塩水；リンゲル溶液；エチルアルコール；リン酸塩緩衝溶液；ならびに医薬製剤において採用される他の非毒性適合物質を含む。

【0056】

液体担体の代表的な例は、水、食塩水、リン酸塩緩衝食塩水、およびその適切な混合物を含む。組成物は典型的に等張性であり、すなわちそれらは、血液と同じ浸透圧を有する。塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム一水和物、無水リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素ナトリウム七水和物、および等張電解質溶液（例えば、Plasma-Lyte（登録商標））を使用して、所望の等張性を達成し得る。塩酸および／または水酸化ナトリウムを

10

20

30

40

50

使用して、組成物のpHを調整し得る。一部の実施形態において、pHは、約7.5～約8.5の域内にあり得る。担体およびASOに応じて、他の賦形剤、例えば当技術分野において公知の湿潤剤、分散剤、または乳化剤、ゲル化剤、および粘性増強剤、防腐剤等が添加され得る。

【0057】

一部の実施形態において、組成物は、薬学的に許容される担体を含む。担体は、液体ベース、例えば脂肪酸、脂質ナノ粒子(LNP)、リポソーム、脂質小胞、またはリポプレックスであり得る。一部の実施形態において、ASOは、脂肪酸担体に乳化される。代表的な脂肪酸は、エイコサペンタエン酸エチル(EPA-E)、オクタデカテトラエン酸エチル(ODTA-E)、ノナデカペンタエン酸エチル(NDPA-E)、アラキドン酸エチル(AA-E)、エイコサテトラエン酸エチル(ETA-E)、およびヘンエイコサペンタエン酸エチル(HPA-E)を含む。

10

【0058】

一部の実施形態において、担体はLNPである。ある特定の実施形態において、LNPは、水性コンパートメントによって分離された2つ以上の同心二重層を含む。脂質二重層は、官能化され得かつ／または互いに架橋され得る。脂質二重層は、1種または複数のリガンド、タンパク質、またはチャネルを含み得る。

【0059】

脂質担体、例えばLNPは、1種もしくは複数のカチオン性／イオン性脂質、1種もしくは複数のポリマーコンジュゲート脂質、1種もしくは複数の構造脂質、および／または1種もしくは複数のリン脂質を含み得る。「カチオン性脂質」とは、正に荷電した脂質または正電荷を保ち得る脂質を指す。カチオン性脂質は、pHに応じて、正電荷を持つ1つまたは複数のアミン基を含む。「ポリマーコンジュゲート脂質」とは、コンジュゲートされたポリマー部分を有する脂質を指す。ポリマーコンジュゲート脂質は、ポリエチレングリコールにコンジュゲートされた脂質であるpeg化脂質を含む。「構造脂質」とは、生理学的pHで正味電荷を有しない非カチオン性脂質を指す。例示的な構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンベステロール等を含む。「リン脂質」とは、2つの脂肪酸および1つのリン酸イオンとのグリセロールのトリエステルを有する脂質を指す。LNPにおけるリン脂質は、脂質を1つまたは複数の脂質二重層に集める。LNP、それらの調製の方法、製剤化、および送達は、例えば米国特許出願公開第2004/0142025号明細書、第2007/0042031号明細書、および第2020/0237679号明細書、ならびに米国特許第9,364,435号明細書、第9,518,272号明細書、第10,022,435号明細書、および第11,191,849号明細書に開示される。

20

30

【0060】

リポプレックス、リポソーム、および脂質ナノ粒子は、脂質分子、例えばカチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質、ポリペプチド-脂質コンジュゲート、および他の安定化構成要素の組合せを含み得る。代表的な安定化構成要素は、抗酸化物質、界面活性剤、および塩を含む。リポプレックス、リポソーム、および脂質ナノ粒子の組成および調製法は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第8,058,069号明細書、第8,969,353号明細書、第9,682,139号明細書、第10,238,754号明細書、米国特許出願公開第2005/0064026号明細書および第2018/0291086号明細書、ならびにLasic, Trends Biotechnol. 16(7):307-21 (1998)、Lasic et al., FEBS Lett. 312(2-3):255-8 (1992)、およびDrummond et al., Pharmacol. Rev. 51(4):691-743 (1999)を参照されたい。

40

【0061】

医薬キット

1つの態様において、本開示は、1種または複数のASOを含有する医薬キットまたはシステムを対象とする。キットまたはシステムは、ASOまたはその医薬組成物を含有するバイアル、チューブ、アンプル、またはボトル等の1つまたは複数の容器をその中に厳

50

重に閉じ込めて有する箱、カートン、チューブ等のパッケージを含む。キットまたはシステムは、A S Oおよびその医薬組成物を使用するための印刷された使用説明書も含み得る。

【0062】

一部の実施形態において、キットは、治療有効量の抗MIR17HGプレRNA A S O、および対象におけるMIR17HGプレRNAに起因する疾患の治療においてそれを使用するための印刷された使用説明書を含有する。一部の実施形態において、キットは、MYCがん原遺伝子、bHLH転写因子(MYC)阻害剤、およびMYC阻害剤の使用に関する印刷された使用説明書も含み、同じ剤形または異なる剤形にあるMIR17HGプレRNA A S OおよびMYC阻害剤は、同じまたは異なる容器に入れる。

10

【0063】

使用の方法

1つの態様において、本開示は、MIR17HGプレRNAの異常な発現および機能が役割を果たす疾患を有する対象を治療することを対象とする。方法は、治療有効量のA S Oを含有する医薬組成物をそれを必要とする対象に投与するステップを伴う。

【0064】

「MIR17HGプレRNAの異常な発現および機能が役割を果たす疾患」という用語は、MIR17HGプレRNA転写産物の治療的標的化によって向上し得る疾患を指す。

【0065】

本明細書において使用される「治療」という用語は、臨床結果を含めた有益なまたは所望の結果を獲得するための手法を指す。そのような結果は、検出可能か検出不能かにかかわらず、MIR17HGプレRNAが役割を果たす疾患の1つまたは複数の症状の軽減または改善、疾患の程度の縮小、疾患の状態の安定化、疾患の遅延または減速、疾患の改善または緩和、および疾患の寛解（部分的か全体的かにかかわらず）のうちの1つまたは複数を含み得る。

20

【0066】

本明細書において使用される「対象」（または「患者」）という用語は、MIR17HGプレRNAの異常な発現および機能が役割を果たす疾患になりやすいまたは罹患している動物界のすべてのメンバーを含む。一部の実施形態において、対象はヒトである。それゆえ、「MIR17HGプレRNAの異常な発現および機能が役割を果たす疾患を有する」、「新生物を有する」、または本開示に従った治療「を必要とする」対象は、1回または複数のラウンドの療法で以前に治療されたことがあってもよい活動性疾患を有する対象を含めた陽性と診断されている対象、ならびに現在は治療されていない（例えば、寛解期にある）が、再発のリスクが依然としてあり得る対象、ならびに陽性と診断されていないが、MIR17HGプレRNAの異常な発現および機能が役割を果たす疾患にかかりやすい対象（例えば、既往医療歴および／もしくは家族医療歴が理由で、または医療専門家が、対象は、MIR17HGプレRNAの異常な発現および機能が役割を果たす疾患にかかったことを合理的に疑い得るような1つもしくは複数のリスク因子を別様に提示する者）を広く包含する。

30

【0067】

MIR17HGプレRNAが役割を果たす疾患は、例えば新生物（がん）、および肝臓疾患等の非がん性疾患を含む。

40

【0068】

本明細書において使用される「新生物」という用語は、過度の増殖またはアポトーシスの低下によって特徴付けられる疾患を意味する。本開示が使用され得る例示的な新生物は、膵臓がん、白血病（例えば、急性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病）、真性多血症、リンパ腫（ホジキン病、非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、ならびに肉腫および癌腫（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂

50

肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、子宮がん、精巣がん、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、多形性膠芽細胞腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫（oligodendroglioma）、神経鞘腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫）等の固形腫瘍を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0069】

一部の実施形態において、MIR17HGプレRNAの異常な発現および機能が役割を果たす疾患は、多発性骨髄腫、リンパ腫、または結腸直腸がんである。代表的なリンパ腫は、慢性リンパ球性白血病、皮膚b細胞リンパ腫、皮膚t細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症を含む。代表的な結腸直腸がんは、胃腸管腺癌、直腸腺癌、および結腸腺癌を含む。多発性骨髄腫（MM）は、血液がんの約10%を占める、形質細胞の遺伝学的に複雑な悪性腫瘍であり、近年の進歩にもかかわらず、MMは大部分が治療不能のままである（Gulla and Anderson, Haematologica 105:2358-2367 (2020)）。

【0070】

一部の実施形態において、MIR17HGプレRNAが役割を果たす疾患は、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、肝線維症、ウイルス性肝炎、またはアルコール性肝臓疾患（ALD）である。これらの疾患において、肝細胞機能を調節する高度に多面的な転写因子であるMYCは、調節不全であると特定されている。MYCの過剰発現は、細胞増殖、成長、代謝、DNA複製、細胞周期進行、細胞接着、および分化を含めた多種多様な役割を変更する。過剰発現したMYCは、Zheng et al., Genes (Basel) 8:123-20 (2017)により詳細に記載されるように、肝線維症を有する患者においてしばしば見られる。

【0071】

一部の実施形態において、疾患は、MIR17HGプレRNAの転写産物が、MYCがん原遺伝子、bHLH転写因子（MYC）、もしくはMYC結合パートナーとさらに相互作用するものである、または調節不全のMYCもしくは調節不全のMYC結合パートナーによって特徴付けられる。MYCが役割を果たす代表的な疾患は、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫（例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、濾胞性リンパ腫、およびバーキットリンパ腫）、トリプルネガティブ乳がん、膵臓がん、肝臓がん、および胃がんを含む。

【0072】

併用療法

本開示の療法は、疾患および障害を治療することにおいて、少なくとも1種の他の活性剤との組合せで使用され得る。この文脈における「組合せで」という用語は、作用物質が共投与されることを意味し、それは、同じもしくは別個の剤形による実質的に同時に起こる投与、または、例えば同じ治療レジメンの一部としてもしくは連続的治療レジメンによって逐次的に、を含む。ゆえに、逐次的に与えられる場合、第2の療法の投与の始まりに、2回の療法の1回目は、ある場合には、治療の部位において有効濃度で依然として検出可能である。配列および時間間隔は、それらが一緒に（例えば、それらが別様に投与された場合よりも増加した有益性を提供するように相乗的に）作用し得るように判定され得る。例えば、治療薬は、同時にまたは異なる時点において任意の順序で逐次的に投与され得るが；しかしながら、同時に投与されない場合、それらは、所望の治療効果を提供するように時間的に十分に近接して投与され得、それは相乗的な形式であり得る。ゆえに、該用語は、正確に同時での活性剤の投与に限定されるわけではない。

【0073】

付加的な治療薬の投薬量は、公知のまたは推奨される用量と同じであってもよくまたはさらに低くてもよい。Hardman et al., eds., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001 ; Physician's Desk Reference 60th ed., 2006を参照されたい。本発明の療法との組合せで使用され得る抗がん剤は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第9,101,622号明細書（その第5.2節）を参照されたい。「抗がん」剤は、例えば、がん細胞を殺滅する、がん細胞においてアポトーシスを誘導する、がん細胞の成長速度を低下させる、転移の発生率もしくは数を低下させる、腫瘍サイズを低下させる、腫瘍成長を阻害する、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給を低下させる、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答を促進する、がんの進行を阻止するもしくは阻害する、またはがんを有する患者の寿命を延ばすことによって、対象におけるがんへの影響を及ぼし得る。より一般的には、これらの付加的な活性剤は、罹患したまたはがん性の細胞を殺滅するまたはその増殖を阻害するのに有効な組合せの量で提供されるであろう。この過程は、細胞とレシピエント細胞および作用物質または複数の因子とを同時に接触させるステップを伴い得る。これは、細胞と、両作用物質を含む単一の組成物もしくは薬理学的製剤とを接触させることによって、または細胞と、一方の組成物がASOを含み、他方が第2の作用物質を含む2種の個別の組成物もしくは製剤とを同時に接触させることによって達成され得る。

10

【0074】

一部の実施形態において、本開示の療法は、化学療法的、放射線療法的、免疫療法的介入、標的療法、アポトーシス誘発性療法、または細胞周期調節療法と併せて使用される。

20

【0075】

一部の実施形態において、本開示の療法は、数分間から数週間に及ぶ間隔分、付加的な作用物質（例えば、抗がん）治療に先行しても後続してもよい。付加的な作用物質および本開示の療法が対象に別個に適用される実施形態において、作用物質および本発明の療法が、対象の疾患に対して有利な組合せ効果を依然として発揮し得るであろうように、各送達の時間の間で相当な期間が経過しなかったことが一般的に保証されるであろう。そのような場合、互いの約12～24時間以内に、より好ましくは互いの約6～12時間以内に、両モダリティーを対象に投与し得ることが企図される。ある状況では、治療の期間を有意に延長することが望ましくあり得るが、しかしながら、それぞれの投与の間で、数日間（2、3、4、5、6、または7）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、または8）が経過する。一部の実施形態において、本開示の療法および付加的な作用物質は、同じ患者来院のうちに投与され得；他の実施形態において、2種の作用物質は、異なる患者来院の間に投与される。

30

【0076】

一部の実施形態において、本開示の療法および付加的な作用物質は、サイクル的に投与される。サイクル療法は、付加的な治療薬の一方もしくは両方に対する抵抗性の発生を低下させるために、付加的な治療薬の一方もしくは両方の副作用を回避するもしくは低下させるために、および／または療法の効力を向上させるために、ある期間の一方の治療薬の投与、それに続くある期間の第2の治療薬の投与、およびこの逐次的投与を繰り返すこと、すなわちサイクルを伴う。一例では、サイクル療法は、ある期間の第1の付加的な治療薬の投与、それに続くある期間の第2の付加的な治療薬の投与、任意選択でそれに続くある期間の第3の付加的な治療薬の投与等、およびこの逐次的投与を繰り返すこと、すなわちサイクルを伴う。治療サイクルは、必要に応じて繰り返されるであろうことが予想される。様々な標準的療法ならびに外科的介入が、本開示の細胞との組合せで適用され得ることも企図される。

40

【0077】

付加的な治療薬の代表的なタイプが下に記載される。一部の実施形態において、付加的な治療薬は、MYC阻害剤である。代表的なMYC阻害剤は、シスプラチン、ゲムシタビン、アキシチニブ、ナドロパリン、およびベンズアミジンを含む。

50

【0078】

一部の実施形態において、付加的な治療薬は、アセチル-CoAカルボキシラーゼ- α (ACC1) 阻害剤である。一部の実施形態において、ACC1阻害剤は、5-テトラデシル-オキシ-2-フコ酸 (TOFA) である。

【0079】

一部の実施形態において、付加的な治療薬は、免疫調節性イミド薬 (IMiD) である。代表的なIMiDは、サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミド、およびイベルドミドを含む。一部の実施形態において、付加的な治療薬は、プロテアソーム阻害剤である。代表的なプロテアソーム阻害剤は、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ (Kymprolis (登録商標))、デランゾミブ、イキサゾミブ、マリゾミブ、およびオプロゾミブを含む。

10

【0080】

本明細書に記載される本発明の療法との組合せに適切であり得る多発性骨髄腫治療薬は、ベランタマブマホドチン-blmf (Blenrep (登録商標))、ボルテゾミブ (Velcade (登録商標))、カルフィルゾミブ (Kymprolis (登録商標))、カルムスチン (BiCNU (登録商標))、シルタカブタゲンオートルユーセル (Carvykti (登録商標))、シクロホスファミド、ダラツムマブ (Darzalex (登録商標))、ダラツムマブおよびヒアルロニダーゼ-fihj (Darzalex Faspro (登録商標))、ドキシソルビシン塩酸塩リポソーム (Doxil (登録商標))、エロツズマブ (Emplliciti (登録商標))、イデカブタゲンビクルユーセル (Abecma (登録商標))、イサツキシマブ-irfc (Sarclisa (登録商標))、イキサゾミブクエン酸エステル (Ninlaro (登録商標))、レナリドミド (レブラミド)、メルファランおよびメルファラン塩酸塩 (Alkeran (登録商標) 錠剤、注射用Alkeran (登録商標))、Evomela (登録商標))、パミドロン酸二ナトリウム (Aredia (登録商標))、プレリキサホル (Mozobil (登録商標))、ポマリドミド (Pomalyst (登録商標))、セリネクソル (Xpovio (登録商標))、サリドマイド (Thalomid (登録商標))、ゾレドロン酸 (Zometa (登録商標))、ならびにボルテゾミブのPAD組合せ (PS-341)、ドキシソルビシン塩酸塩 (Adriamycin (登録商標))、ならびにデキサメタゾンを含む。

20

30

【0081】

免疫療法

免疫チェックポイント阻害剤を含めた免疫療法を採用して、診断されたがんを治療し得る。免疫チェックポイント分子は、例えばPD1、CTLA4、KIR、TIGIT、TIM-3、LAG-3、BTLA、VISTA、CD47、およびNKG2Aを含む。免疫チェックポイント阻害剤の臨床的に使用可能な例は、デュルバルマブ (Imfinzi (登録商標))、アテゾリズマブ (Tecentriq (登録商標))、およびアベルマブ (Bavencio (登録商標))を含む。PD1阻害剤の臨床的に使用可能な例は、ニボルマブ (Opdivo (登録商標))、ペムブロリズマブ (Keytruda (登録商標))、およびセンプリマブ (Libtayo (登録商標))を含む。

40

【0082】

化学療法

抗がん療法は、化学物質および放射線ベースの治療の両方との多様な併用療法も含む。併用化学療法は、例えばAbraxane (登録商標)、アルトレタミン、ドセタキセル、Herceptin (登録商標)、メトトレキサート、Novantrone (登録商標)、Zoladex (登録商標)、シスプラチン (CDDP)、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア (nitrosurea)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン (plicomycin)、マイトマイシン、エトポシド (VP16)、タモキシフェン、ラロキシ

50

フェン、エストロゲン受容体結合剤、Taxol（登録商標）、ゲムシタビン（gemcitabine）、Navelbine（登録商標）、ファルネシルータンパク質トランスフェラーゼ（transferase）阻害剤、トランスプラチナ（transplatinum）、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、およびメトトレキサート、または前述のものの任意の類似体もしくは誘導体バリエーション、ならびにまたその組合せを含む。

【0083】

放射線療法

抗がん療法は、放射線ベースのDNAに損傷を与える治療も含む。併用放射線療法は、DNAに、DNAの複製および修復に、ならびに染色体の会合および維持に広範な損傷を引き起こす、ガンマ線、X線、および／または腫瘍細胞への放射性同位体の指向性送達として一般に知られているものを含む。放射性同位体の投薬量域は、幅広く変動し、同位体の半減期、放たれた放射線の強度およびタイプ、ならびに新生細胞による取り込みに依存し、主治医によって判定されるであろう。

10

【0084】

放射線療法は、外部または内部放射線療法を含み得る。外部放射線療法は、対象の身体の外側にある放射線源、および身体内のがんのエリアに放射線を送ることを伴う。内部放射線療法は、がんの中または付近に直接入れられる針、シード、針金、またはカテーテルに密封された放射性物質を使用する。

【0085】

本開示のこれらのおよび他の態様は、本開示のある特定の実施形態を例示することを意図されるが、特許請求の範囲によって規定されるその範囲を限定することを意図されるわけではない以下の現実の実施例を考慮して、さらに解されるであろう。

20

【実施例】

【0086】

[実施例1]

材料および方法

細胞株：細胞株（CL）を37℃、5%CO₂で成長させた。a) MM-CL：AMO1、NCI-H929、SK-MM-1、U266、JJN3、およびKMS-12-BMを、DSMZ（Braunschweig、Germany）から購入した。MM.1S、MM.1R、およびRPMI-8226を、ATCC（Manassas、VA、USA）から購入した。ABZB CLはAMO1ボルテゾミブ抵抗性であり、ACFZ CLはAMO1カルフィルゾミブ抵抗性である（Morelli et al., Blood 132:1050-1063 (2018)）。LR7 CLはU266メルファラン抵抗性である（Morelli et al., Blood 132:1050-1063 (2018)）。これらの細胞を、10%胎仔ウシ血清（Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland）および1%ペニシリン／ストレプトマイシン（Gibco（登録商標）、Life Technologies）を補給されたRPMI-1640培地（Gibco（登録商標）Life Technologies、Carlsbad、CA、USA）中で培養した。b) B細胞リンパ腫細胞株（BCL0CL）：Maver-1、Jeko-1（マントル細胞リンパ腫）、Sultana、P3HR1、DaudiおよびRaji（バーキットリンパ腫）（ATCCから購入）を、10%胎仔ウシ血清（Lonza Group Ltd.）および1%ペニシリン／ストレプトマイシン（Gibco（登録商標）、Life Technologies）を補給されたRPMI-1640培地（Gibco（登録商標）Life Technologies）中で培養した。c) 非悪性細胞株：HK-2（ヒト腎臓細胞、皮質／近位尿細管）をATCCから購入し、ATCCガイドラインに従って補給されたK-SFM（ケラチノサイト血清不含培地）（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA）中で培養した；THLE-2（ヒト肝臓細胞）をATCCから購入し、ATCCガイドラインに従って補給されたBEGM（気管支上皮細胞成長培地）（Lonza Group Ltd.）中で培養した；d) Lentix（商標）293T（ヒト胎児腎臓、タカラバイオ株式会社から購入（カタログ

30

40

50

番号632180))およびFlp-In T-Rex細胞を、10%胎仔ウシ血清(Lonza Group Ltd.)および1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco(登録商標)、Life Technologies)を補給されたDMEM(ダルベッコ改変イーグル培地)(Gibco(登録商標)、Life Technologies)中で培養した。e)P493-6を、10%胎仔ウシ血清(Lonza Group Ltd.)および1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco(登録商標)、Life Technologies)を補給されたRPMI-1640培地(Gibco(登録商標)Life Technologies)中で培養した。f)5TGM1ネズミ科MM細胞を、10%胎仔ウシ血清(Lonza Group Ltd.)および1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco(登録商標)、Life Technologies)を補給されたIMDM(イスコフ改変ダルベッコ培地)(Gibco(登録商標)、Life Technologies)中で培養した。g)結腸直腸がん細胞株HCT116およびDLD-1、親、ならびにダイサー変異体を、Horizon Discoveryから購入し、10%胎仔ウシ血清(Lonza Group Ltd.)および1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco(登録商標)、Life Technologies)を補給されたATCC調合マッコイ5a培地改変(McCoy's 5a Medium Modified)(カタログ番号30-2007)中で培養した。細胞を定期的に試験して、マイコプラズマ汚染を排除した。細胞は、STR(ショートタンデムリピート)について確認された。

10

20

【0087】

初代患者細胞：インフォームドコンセントがダナ・ファーマーがん研究所(Dana-Farber Cancer Institute)治験審査委員会によって承認された後、CD138+細胞を、フィコール・ハイパーク(Ficoll-Hypaque)(Lonza Group, Basel, Switzerland)密度勾配沈降によって、MM患者のBM吸引物から単離し；その後、抗CD138磁気活性化細胞分離マイクロビーズ(Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany)を使用した抗体媒介性陽性選択が続いた。免疫選択された細胞の純度を、標準的手順によって、フィコエリスリンコンジュゲートCD138モノクローナル抗体を使用したフローサイトメトリー解析によって査定した。長期培養(6日間)に関しては、以前に記載されるように(Morelli et al., Blood 132:1050-1063 (2018))、メーカーの使用説明書に従って、CD138+細胞を、Falconセルカルチャーインサート(Corning, New York, NY, USA)を用いてHS-5細胞から物理的に分離して培養した。

30

【0088】

末梢血単核細胞：インフォームドコンセントがダナ・ファーマーがん研究所治験審査委員会によって承認された後、CD138+細胞を、フィコール・ハイパーク(Lonza Group, Basel, Switzerland)密度勾配沈降によって、MM患者のBM吸引物から単離し；その後、抗CD138磁気活性化細胞分離マイクロビーズ(Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany)を使用した抗体媒介性陽性選択が続いた。免疫選択された細胞の純度を、標準的手順によって、フィコエリスリンコンジュゲートCD138モノクローナル抗体を使用したフローサイトメトリー解析によって査定した。長期培養(6日間)に関しては、以前に記載されるように(Morelli et al., Blood 132:1050-1063 (2018))、メーカーの使用説明書に従って、CD138+細胞を、Falconセルカルチャーインサート(Corning, New York, NY, USA)を用いてHS-5細胞から物理的に分離して培養した。

40

【0089】

MM患者のRNA-seq、マイクロアレイベースの遺伝子発現解析、およびマイクロRNAプロファイリング。RNA-seq：一次データセットとして、IFM/DFCI 20019臨床試験(NCT01191060)からの360人のMM患者由来のCD138+ MM細胞からの以前に公開されたRNA-seqデータを使用した(Samur et al., Leukemia 32:2626-2635 (2018))。このデータセットを使用して、新たに診

50

断されたMM患者における lncRNA の発現を査定した。鎖を区別しない (Unstranded) ペアエンドRNAシーケンシングを、Salmonを用いた擬似的マッピングを使用して定量した。GRCh38転写産物に対する参照転写産物を、Gencode v24からダウンロードした。QC制御の後、遺伝子に対するTPM値を、tximportを用いてアイソフォームレベルTPMから生成した。すべての図を、Rおよびggpubrを用いて作成した。IFMコホートに関するRNAseqデータに対するデノボアセンブリを、TopHatを使用して行った。Gencode v24 GTFファイルを参照として使用し、TopHatによってアノテーションされた新たなアイソフォームを、出力ファイルから特定した。DFCI/IFM調査の継続からの新たに診断された (ND) および再発 (R) サンプルを使用して、ND-MMおよびR-MMを比較した。診断のみサンプルと同様に、これらのサンプルを、ペアエンド (paired end) シーケンシングを用いてシーケンシングし、発現を、上で説明された同じパイプラインを使用して定量した。二次データセットとして、TPMレベルでフィルタリングされたMMRF CoMMpassデータを、MMRF研究ポータルからダウンロードした。診断時にCD138+選択BMサンプルから回収されたサンプルのみを解析に使用した。

10

【0090】

マイクロアレイベースの遺伝子発現解析：RROL発現レベルを、GeneChip Human Gene 1.0 STアレイ (Affymetrix、Santa Clara、CA、USA) (Todoerti et al., Clin. Cancer. Res. 19:3247-58 (2013)) によってプロファイリングされた129件の新たに診断されたおよび12件の再発したMM症例を含めて、公的に使用可能なデータセット (GSE66293) (Lionetti et al., Oncotarget 6:24205-17 (2015)) において評価した。正規化されかつ再アノテーションされた発現レベルを、Brain Arrayライブラリーバージョン20.0.0からのChip Definition File (Dai et al., Nucleic Acids Res. 33:e175-9 (2005)) を使用して、記載されるように (Todoerti et al., Clin. Cancer. Res. 19:3247-58 (2013)) 獲得した。2群間の示差的発現を、R環境 (バージョン4.0.4) における連続修正を有するウィルコクソンの順位和検定 (rank sum test) によって査定した。

20

【0091】

miRNAプロファイリング：IFMコホートに関するmiRNA発現データを、Affymetrix GeneChip (登録商標) miRNA Array 4.0プラットフォームを使用して生成した。AffyおよびBioconductor製のオリゴパッケージを使用して、miRNA発現データを正規化した。

30

【0092】

相関解析：スピアマン相関を使用して、lncRNA、mRNA、およびmiRNAの間の相関を評価した。

【0093】

生存解析：Rにおけるsurvivalパッケージを使用して、生存解析を実施し、ログランク検定を使用して群を比較した。

【0094】

dCAS9-KRAB細胞株の作出。dCas9-KRAB融合タンパク質を発現する細胞株を、以前に記載されたMorelli et al., Methods Mol. Biol. 2348:189-204 (2021)のように作出した。簡潔には、細胞に、dCas9-BFP-KRAB導入遺伝子を発現するレンチウイルス (Addgene、プラスミド#46911) を感染させ、高いBFPを安定に発現するクローンについて選別した。感染を低いMOI (<0.4) で実施した。dCas9-KRAB融合タンパク質を発現するMM細胞株における転写抑制の検証を、ENO1に対するsgRNA (sgRNA_ENO1: CCGGCGAGATCTCCGTGCTC (配列番号66) または非標的化陰性対照 (sgRNA_NC: GATGTGGTTCATTTCGTTCATGA (配列番号67) を発現するレンチウイルスを感染させることによって査定した。sgRNAを、pU6-sgRNA EF1Alpha

40

50

－puro－T2A－BFP（プラスミド#60955）にクローニングした。この手順は、Weissman研究室によって確立され、weissmanlab.ucsf.edu/CRISPR/CRISPR.htmlでオンラインにて入手可能なプロトコールに従った。ENO1の下方調節を、逆転写（RT）および定量的リアルタイム増幅（qRT－PCR）に関して下で記載される手順に従って、qRT－PCR解析によって査定した。

【0095】

CRISPRi生存率スクリーニング。ライブラリー設計：lncRNA TSSを標的にするgRNAを、Broad Instituteウェブポータル（今はCRISPickと呼ばれる：portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public）を使用して設計した。一次スクリーニングに関しては、標的lncRNAを、IFM／DFCIコホートにおいて中央値TPM>0.5に基づいて選択した。二次スクリーニングに関しては、標的lncRNAを、一次スクリーニング結果に基づいて選択した（すなわち、有意に枯渇したまたは富化したgRNAによって標的にされる、FDR<0.25）；それに加えて、付加的なlncRNAを、RNA－seqデータのデノボアセンブリにより特定し、IFM／DFCI臨床調査に登録されたMM患者の臨床転帰に対するそれらの影響に基づいて選択されたlncRNAを手動で選択した。

【0096】

gRNAプールライブラリー産生：7,500種のgRNAからなる一次CRISPRiライブラリー、または3,750種のgRNAからなる二次CRISPRiライブラリーを、メーカーのプロトコールに従って、Lipofectamine 2000トランスフェクション試薬（Thermo Fisher Scientific）を使用して、パッケージングプラスミド（psPAX2、Addgene #12260；pMD2.G、Addgene #12259）とともにHEK293T細胞に共トランスフェクトした。ライブラリーDNA（4μg）、psPAX2 DNA（4μg）、およびVSV－G DNA（2μg）を混合し、T75フラスコ（×10）においてHEK293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの6時間後、培地を除去し、10mlのウイルス産生培地（10%のFBSを補給されたDMEM培地）で置き換えた。トランスフェクションの48時間後、レンチウイルス培地を収集し、Lenti－X（商標）濃縮試薬（タカラバイオ株式会社、カタログ番号631232）を使用して濃縮し、－80℃で保管した。

【0097】

ウイルス力価判定： 1×10^6 個細胞（各細胞株）を6ウェルプレートのウェルあたりに播種した。細胞に、8μg/mlのポリブレンの存在下で、種々の量のレンチウイルスを一晩感染させた。レンチウイルス粒子の力価滴定を、Celllectaからのプロトコール、第5.3および5.4節に従って、フローサイトメトリーによって実施した。

【0098】

一次スクリーニング：dCAS－KRAB融合タンパク質を発現する 4×10^7 個のMM細胞に、スピノキュレーションを使用して、0.1～0.3に及ぶMOIでライブラリーレンチウイルス粒子を感染させた。感染を三連で実施した。スピノキュレーションの1時間後にウイルス含有培地を除去し、細胞をPBSで2×洗浄し、完全培地中で培養した。4日後、細胞を、さらに3日間ピューロマイシンを用いて選択した。7日目に、細胞残屑を、フィコール・ハイパーク（Lonza Group、Basel、Switzerland）密度勾配沈降によって除去した。細胞をさらに2週間培養し、ライブラリーの1000×存在率（representation）を確保した。ゲノムDNAを、メーカーのプロトコールに従って、Blood&Cell Culture DNA Maxi／Midikit（Qiagen #13362、13343）を使用して単離した。Celllecta（Mountain View、CA）が、gRNA存在率のIlluminaシーケンシングのためのgRNAカセットのPCR増幅を実施した。PCRおよびIlluminaシーケンシングに関するプロトコールは、オンラインで入手可能である。

【0099】

スクリーニングデータ解析：候補遺伝子発見に関しては、実験および対照（プラスミドライブラリー）条件を比較することによって、正規化された gRNA カウント表を、MaGeCK（ゲノムワイド CRISPR-Cas9 ノックアウトのモデルベースの解析）にロードした。すべての gRNA に対する平均 $\log_2$ 変化倍率（LFC）および偽発見率（FDR）に基づいて、上位遺伝子を判定した。

【0100】

MIR17HG のインビトロ検証：MIR17HG を標的にする上位スコア（ $n=4$ 、MIR17HG sgRNA #1~4、配列番号 2~5）の sgRNA を、pRSGT16-u6Tet-sg-CMV-TetRep-2A-TagRFP-2A-Puro（Cellecta、カタログ #SVCRU6T16-L）ベクターにクローニングし、シーケンシングによって確認した。gRNA 構築物を、メーカーのプロトコルに従って、Lipofectamine 2000 トランスフェクション試薬（Thermo Fisher Scientific）を使用して、パッケージングプラスミド（psPAX2、Addgene #12260；pMD2.G、Addgene #12259）とともに HEK293T 細胞に共トランスフェクトした。ウイルスを 48 時間後に収集し、濃縮し、 -80°C で保管した。dCas9-KRAB 融合タンパク質を安定に発現する MM 細胞株に、個々の sgRNA の発現を推進するレンチウイルスを感染させた。感染した細胞を、ピューロマイシンを使用して選択した。sgRNA の発現を、ドキシサイクリン（ $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、隔日）によって獲得した。

10

【0101】

アンチセンスオリゴヌクレオチド、合成 miRNA 模倣体および阻害剤、siRNA。長いノンコーディング LNA gapmer R、配列番号 2~14 をカスタム設計し、Exiqon（Vedbaek、Denmark）から購入した。miR-17a、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b-1、および miR-92a1 に対する合成模倣体および阻害剤を、Ambion（Applied Biosystems、CA、US）から購入した。サイレンサーセレクト siRNA を、Ambion（Applied Biosystems、CA、US）から購入した。t-ASO の設計は、表 2~表 4 に記載される。

20

【0102】

ジムノシス（Gymnosis）。ジムノティック（Gymnotic）実験を、以前に記載されるように（Taiana et al., Methods Mol. Biol. 2348:157-166 (2021)）実施した。簡潔には：細胞を、実験の最終日にコンフルエンスに達する播種密度で播いた。播種時の細胞数は、96 ウェルプレートにおいて $0.5\sim 2.5\times 10^3$ 個、12 ウェルプレートにおいて $2.5\sim 10\times 10^4$ 個、6 ウェルプレートにおいて $1\sim 3\times 10^5$ 個に及んだ。ChIP および Co-IP 実験に関しては、播種時の細胞数は、T75 フラスコ（10 mL 最終容積）において 1×10^6 個であった。

30

【0103】

細胞の一過性トランスフェクション。接着細胞株由来の細胞に、メーカーの使用説明書に従って Lipofectamine 2000 によって、25 nM の LNA gapmer R（Exiqon）をトランスフェクトした。浮遊細胞株（すなわち、非接着性）由来の細胞に、Neon トランスフェクションシステム（Invitrogen、CA、US）によってトランスフェクトした（エレクトロポレーション）（1150、30 ms で 2 パルス）。LNA gapmer R、miRNA 阻害剤／模倣体、および siRNA を 25 nM で使用した。FAM 色素標識抗 miR 陰性対照と比べた、フローサイトメトリー解析によって評価されたトランスフェクション効率は 85%~90% に達した。

40

【0104】

レンチウイルスプラスミドを使用した安定発現。miR-17-92 クラスターを安定に過剰発現する細胞を作出するために、AMO1 に PMIRH17-92 PA-1 レンチベクター（System Biosciences、Palo Alto、CA、USA）を形質導入した。c-MYC を安定に発現する細胞を作出するために、U266 に、M

50

y c-D D K タグ付けされたヒト v-m y c 骨髄球腫症ウイルスがん遺伝子ホモログ（鳥類）（MYC）のレンチORFクローン（RC201611L3）（Origene Technologies、Rockville、Maryland、MD）を形質導入した。WDR82を安定に発現する細胞を作出するために、AMO1に、mGFPタグ付けされたヒトWDRリピードメイン82（WDR82）のレンチORFクローン（RC216325L4）（Origene Technologies、Rockville、Maryland、MD）を形質導入した。Cas9を安定に発現する細胞を作出するために、AMO1およびH929に、pLX_311-Cas9（Addgene #96924）を形質導入した。導入遺伝子を発現する細胞を、3～5日間の抗生物質選択によって選択した。

10

【0105】

CRISPR/CAS9遺伝子ノックアウト。ドロージャKO細胞を作出するために、Cas9を安定に発現するAMO1およびH929に、ドロージャを標的にするtransEDIT CRISPR単鎖gRNAレンチウイルス発現ベクター（CMVプロモーター、ZsGreen、TEVH-1203933）（transOMIC technologies Inc.、Huntsville、AL、USA）を形質導入した。感染の5日後に、ZsGreen+細胞を選別し（BD FACSAria III；BD Biosciences、Qume Drive San Jose、CA、USA）、培養した。

20

【0106】

細胞生存率アッセイ。細胞生存率を、メーカーの使用説明書に従って、Cell Counting Kit-8（CCK-8）アッセイ（Dojindo Molecular Technologies）および7-Aminoactinomycin（7-AAD）フローサイトメトリーアッセイ（BD biosciences）によって評価した。フローサイトメトリー解析を、FACS CANTO II（BD biosciences）によってまたはAttune NxTフローサイトメーター（Thermo Fisher Scientific）によって実施した。

【0107】

アポトーシスの検出。アポトーシスを、アネキシンV／7-AADフローサイトメトリーアッセイ（BD biosciences）によっておよび電子顕微鏡法によって検討した。フローサイトメトリー解析を、FACS CANTO II（BD biosciences）によってまたはAttune NxTフローサイトメーター（Thermo Fisher Scientific）によって実施した。

30

【0108】

逆転写（RT）および定量的リアルタイム増幅（qRT-PCR）。RNA抽出、逆転写（RT）、および定量的リアルタイム増幅（qRT-PCR）を、以前に記載されるように（Morelli et al., Blood 132:1050-1063 (2018)）実施した。簡潔には、総RNAを、メーカーの使用説明書に従って、TRIzol（登録商標）試薬（Thermo Fisher Scientific）を用いて細胞から抽出した。核および細胞質細胞内RNA精製を、メーカーの使用説明書に従って、RNA細胞内単離キット（カタログ番号 25501）（Active Motif、Carlsbad、CA）を使用して実施した。総RNAの完全性を、nanodrop（Celbio Nanodrop Spectrophotometer nd-1000）によって検証した。RROL（MIR17HG）およびmRNA投薬量調査に関しては、オリゴdTプライマーによるcDNAを、High-Capacity cDNA逆転写キット（Thermo Fisher Scientific）により獲得し、次いで鋳型として使用して、以下のものを定量した：

40

【0109】

a）ヒトRROL（Hs03295901）、ACACAまたはACC1（Hs01046047_m1）、ANO6（Hs03805835_m1）、EXT1（Hs006

50

09156__m1)、FER(Hs00245497__m1)、MALAT1(Hs00273907__s1)、およびPVT1(Hs00413039__m1)。ヒトGAPDH(Hs03929097__g1)またはACTB(Hs03023943__g1)または18S(Hs03003631__g1)を用いて、正規化を実施した。

【0110】

b) ネズミ科 rrol (Mm01230322__s1)、acaca (Mm01304258__m1)、および fer (Mm00484303__m1)。

【0111】

Via7 RTリーダー (Thermo Fisher Scientific) の使用によって、メーカーの使用説明書に従って、Single-tube TaqMan miRNA アッセイ (Thermo Fisher Scientific) を使用して、miR-17 (002308)、miR-18a (002422)、miR-19a (000395)、miR-20a (000580)、miR-19b (000396)、および miR-92a-1 (000431) を検出しかつ定量した。成熟 miRNA 発現を、RNU44 (Thermo Fisher Scientific、アッセイ Id: Hs03929097__g1) に対して正規化した。RROL アイソフォームも、以下のプライマー: RROL-1 (Fw、5'-CCTGCAACTTCCTGGAGAAC (配列番号 68); Rev、5'-GTCTCAAGTGGGCATGATGA (配列番号 69))、RROL-2 (Fw、5'-GACCCCTCTTTTAAGTTGGGTG (配列番号 70; Rev、5'-TGGCAAACATTTTTCCTCCT (配列番号 71)) を使用して、SYBR Green qRT-PCR によって検出した。鋳型なし対照を含めた、比較リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を三連で実施した。相対的発現を、比較閾値超過 (comparative cross threshold) (Ct) 法を使用して算出した。

【0112】

ウェスタンブロット解析。タンパク質抽出およびウェスタンブロット解析を、以前に記載されるように実施した。簡潔には、細胞を、 Halt プロテアーゼ阻害剤単回使用カクテル (100×、Thermo Scientific) を補給された 1×RIPA 緩衝液 (Cell Signaling Technology) 中で溶解した。全細胞溶解物 (レーンあたり約 20 μg) を、4~12% Novex Bis-Tris SDS-アクリルアミドゲル (Invitrogen) を使用して分離し、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad) に電気泳動転写した。核タンパク質の抽出を、メーカーの使用説明書に従って、NE-PER (商標) 核および細胞質抽出試薬 (Thermo Fisher、#78833) を使用して実施した。電気泳動の後、ニトロセルロース膜をブロッキングし、一次抗体で 4℃ にて一晚ブローブし、次いで膜を PBS-Tween 中で 3 回洗浄し、次いでホースラディッシュペルオキシダーゼをコンジュゲートされた二次抗体とともに室温で 2 時間インキュベートした。化学発光を、ウェスタンブロットティングルミノール試薬 (sc-2048、Santa Cruz、Dallas、TX、USA) を使用して検出した。

【0113】

一次抗体: 抗 MYC [D84C1] (#5605)、抗 WDR82 [D2I3B] (#99715)、抗 H3K4me3 [C42D8] (#9751)、および抗 ラミン A/C (#2032) 抗体を、Cell Signaling Biotechnology (Danvers、MA) から購入した。抗 ドローシャ 抗体 [EPR12794] (ab183732) を Abcam (Cambridge、UK) から購入した。抗 MYC [9E10] (sc-40)、GAPDH (sc-25778)、および β-アクチン (ab96682) 抗体を、Santa Cruz Biotechnology (Dallas、TX、USA) から購入した。モノクローナル抗 FLAG (登録商標) M2 抗体 (F3165) を、Millipore Sigma (Bedford、MA) から購入した。二次抗体: 抗ウサギ IgG、HRP 連結抗体 (#7074) および抗マウス IgG、HR

P 連結抗体（#7076）を、Cell Signaling Biotechnology（Danvers、MA）から購入した。

【0114】

RNA FISH。RNA-FISH 実験を、確立されたプロトコール（Raj et al., Nat. Methods 5:877-9 (2008); Shaffer et al., PLoS One 8:e75120-9 (2013)）に従って行った。細胞を、ポリ-L-リジンコートされたカバースリップ上に播種し、少なくとも1時間付着させた。次いで培地を除去し、細胞を1×PBSで1回洗浄し、次いで固定し、氷冷95%メタノール/5%酢酸中で4℃にて10分間透過処理した。固定剤を除去した後、細胞を、洗浄緩衝液A（20% Stellaris RNA FISH 洗浄緩衝液A、Biosearch Technologies, Inc., SMF-WA1-60; 10% 脱イオンホルムアミド、EMD Millipore, S4117; RNase 不含水における、Life Technologies, AM9932）で室温にて5分間洗浄した。次いで細胞を、ハイブリダイゼーション緩衝液（90% Stellaris RNA FISH ハイブリダイゼーション緩衝液、Biosearch Technologies, SMF-HB1-10; 10% 脱イオンホルムアミド）中125 nMの作業濃度のRNA FISHプローブ（Stellaris）とともに、暗所で加湿チャンバー中にて37℃で一晩インキュベートした。翌日、細胞を、洗浄緩衝液Aを用いて暗所で37℃にてそれぞれ30分間3回洗浄した。次いで細胞を、洗浄緩衝液A+1:1000 Hoechst 33342（Invitrogen、ストック10 mg/mL）とともに37℃で15分間インキュベートし、その後に洗浄緩衝液B（Biosearch Technologies, SMF-WB1-20）を用いて室温で5分間の洗浄が続いた。カバースリップをVectashield（VWR 101098-042）を用いてスライド上に封入し、カバースリップを透明のマニキュア液で密封した。油浸63×対物レンズおよび2~3×ズームを用いて、Airyscanを有するLSM 880にて、Z軸画像を取得し（W. M. Keck Microscopy Facility, MIT）、Airyscan処理を、「オート」強度特質を使用して実施した。代表的な画像を、ImageJを使用して生成した。

10

20

【0115】

RNA FISHとの共免疫蛍光（Co-IF/FISH）。Co-IF/FISH 実験を、以下の修正を加えて、デュアルRNA-FISH実験と同様の形式で行った。細胞をカバースリップに接着させた後、細胞を、RNase 不含PBS中4% PFA（VWR、BT140770）を用いて室温で10分間固定した。細胞をPBSで5分間3×洗浄した後、細胞を、氷冷95%メタノール/5%酢酸を用いて4℃で10分間透過処理した。次いで細胞を、PBS中4% IgG 不含ウシ血清アルブミン（VWR、102643-516）で30分間ブロッキングし、次いで一次抗体混合物（PBS中1:500 ウサギ抗c-MYC D84C12）を細胞に添加し、加湿チャンバー中にて室温で一晩インキュベートした。翌日、細胞をPBSで室温にて5分間3×洗浄し、二次抗体混合物（PBS中1:500 Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギIgG、ThermoFisher A11008）を添加し、暗所にて室温で1時間インキュベートした。細胞をPBSで5分間3×洗浄し、RNA FISHの前に、抗体染色を有する細胞を、PBS中4% PFAを用いて室温で10分間再固定し、その後にPBSを用いた3×洗浄が続いた。抗体染色および固定の後、RNA FISHプロトコールを、洗浄緩衝液Aを用いた洗浄から始まる、上で記載されるように行った。

30

40

【0116】

RROL 枯渇後のマイクロアレイベースの遺伝子発現プロファイリング。ASO1を用いた処理後の遺伝子発現変化についてのマイクロアレイベースの解析を、以前に記載されるように（Morelli et al., Blood 132:1050-1063 (2018)）実施した。

【0117】

RROL 枯渇後のAMO1^{DR-KO}のRNA-seq解析。総RNAを上で記載されるように抽出し、NovaSeq RNA-seq解析に提出し、その後にVIPER N

50

G S 解析パイプライン (Cornwell et al., BMC Bioinformatics 19:135-14 (2018)) が続いた。示差的に発現した遺伝子 (D E G) のリストを G S E A または I P A ソフトウェアに適用して、R R O L によってモジュレートされる生物学的経路を明らかにした。

【0118】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ。ヒト A C C 1 (N M _ 1 9 8 8 3 4)、A N O 6 (N M _ 0 0 1 0 2 5 3 5 6)、C C D C 9 1 (N M _ 0 1 8 3 1 8)、E P T 1 (N M _ 0 3 3 5 0 5)、E X T 1 (N M _ 0 0 0 1 2 7)、F E R (N M _ 0 0 1 3 0 8 0 2 8)、および Z Y G 1 1 A (N M _ 0 0 1 0 0 4 3 3 9) に対するプロモーターレポータークロンを、G L u c - O N (商標) プロモーターレポーターベクター (G e n e C o p p o e i a、R o c k v i l l e、M D) にクローニングした。ルシフェラーゼレポーターアッセイを、メーカーの使用説明書に従って実施した。

10

【0119】

C h I R P。R R O L および L a c Z アンチセンス DNA プローブを、singlemoleculefish.com においてオンラインプローブデザイナーを使用して設計した。オリゴヌクレオチドを、18-炭素スパーサーアームを有する 3' 末端においてビオチン化した。A M O 1 細胞を回収し、メーカーの使用説明書および確立されたプロトコル (C h u et al., J. Vis. Exp. 61:3912-6 (2012)) に従って、E Z - M a g n a C h I R P R N A インタラクトームキット (M i l l i p o r e S i g m a、B e d f o r d、M A) を使用した C h I R P に供した。

20

【0120】

デノボ脂質生成アッセイ。細胞を 6 ウェルプレートにおいてウェルあたり 5×10^5 個細胞で播き、処理 (A S O 1 / 1 0 0 5 8 - F 4 / I P T G またはそれぞれの対照) の存在下で 3 日間インキュベートした。処理の終了の 24 時間前に、 $1 \mu C i$ の ^{14}C 標識グルコース (A R C - 0 1 2 2 D) を各ウェルに添加した。細胞を収集し、冷却 P B S で洗浄し、ガラス管に回収した。精製された脂質抽出物を、クロロホルム-メタノールベースの抽出によって獲得する (B l i g h and D y e r, Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-7 (1959))。細胞脂質へのグルコース組み入れを、シンチレーション計数による光子放出によって定量化し、総タンパク質含有量に対して正規化した。

【0121】

脂質プロファイリング。脂質を M M 細胞から抽出し、乾燥させ、解析までアルゴン下で保管した。ベルギー、K U ルーヴェンにおける L i p o m e t r i x によるハイブリッドトリプル四極子/線形イオントラップ質量分析計 (6500+ Q T R A P システム; A B S C I E X) と連動した N e x e r a X 2 U H P L C システム (島津製作所) での液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (L C - E S I / M S / M S) によって、脂質種を解析した。

30

【0122】

脂質抽出: 1 N H C l : C H ₃ O H 1 : 8 (v/v)、900 μ l C H C l ₃、および 200 μ g / m l の抗酸化物質 2, 6 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - メチルフェノール (B H T ; S i g m a A l d r i c h) を用いて、脂質抽出を実施した。デューテリウム標識脂質の混合物 S P L A S H (登録商標) L I P I D O M I X (登録商標) M a s s S p e c 標準物質 (#330707、A v a n t i P o l a r L i p i d s) を、抽出物ミックスにスパイクした。有機画分を、S a v a n t S p e e d v a c s p d 1 1 1 v (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を使用して室温で蒸発させ、残りの脂質ペレットをアルゴン下にて - 20 °C で保管した。

40

【0123】

質量分析。質量分析解析の直前に、脂質ペレットを 100 % エタノール中で復元した。ハイブリッドトリプル四極子/線形イオントラップ質量分析計 (6500+ Q T R A P システム; A B S C I E X) と連動した N e x e r a X 2 U H P L C システム (島津製作所) での液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (

50

LC-ESI/MS/MS)によって、脂質種を解析した。13分以降1.5mL/分まで増加する0.7mL/分の流速にて、以下の勾配：(0~6分間：0%B>6%B；6~10分間：6%B>25%B；10~11分間：25%B>98%B；11~13分間：98%B>100%B；13~19分間：100%B；19~24分間：0%B)で、移動相A[水-アセトニトリル5：95(v/v)中1mM酢酸アンモニウム]および移動相B[水-アセトニトリル50：50(v/v)中1mM酢酸アンモニウム]を使用して、35℃で維持されたXBridgeアミドカラム(150mm×4.6mm、3.5μm；Waters)でクロマトグラフ分離を実施した。スフィンゴミエリン、セラミド、ジヒドロセラミド、ヘキソシルセラミド、およびラクトシルセラミドを、それぞれ184.1、264.4、266.4、264.4、および264.4の前駆体スキャンを用いて陽イオンモードで測定した。トリアシルグリセリドおよびジアシルグリセリドを、脂肪酸アシル部分の1つに対するニュートラルロススキャンを用いて陽イオンモードで測定した。ホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、およびホスファチジルセリンを、脂肪酸アシルフラグメントイオンによって陰イオンモードで測定した。脂質定量を計画的多重反応モニタリング(MRM)によって実施し、遷移は、上で記載されるようにニュートラルロスまたは典型的プロダクトイオンに基づいた。機器パラメーターは以下のとおりであった：カーテングス=35psi；コリジョンガス=8a.u.(中間)；イオンスプレー電圧=5500Vおよび-4500V；温度=550℃；イオン源ガス1=50psi；イオン源ガス2=60psi；デクラスタリング電位=60Vおよび-80V；エントランス電位=10Vおよび-10V；コリジョンセル出口電位=15Vおよび-15V。リポドーム解析のために、以下の脂肪酸アシル部分を考慮に入れた：16：0、16：1、18：0、18：1、18：2、18：3、20：3、20：4、20：5、22：2、22：3、22：4、22：5、22：6と考えられるTGを除いて、14：0、14：1、16：0、16：1、16：2、18：0、18：1、18：2、18：3、20：0、20：1、20：2、20：3、20：4、20：5、22：0、22：1、22：2、22：4、22：5、および22：6。

10

20

30

40

50

[0124]

データ解析。ピーク積分を、MultiQuant™ソフトウェアバージョン3.0.3を用いて実施した。脂質種シグナルを同位体寄与に対して補正し(Python Molmass 2019.1.1を用いて算出)、内部標準シグナルに基づいて定量し、リポドミクス標準イニシアチブ(LSI)のガイドライン(LSIによって規定されるレベル2タイプ定量)を順守した。

[0125]

ChIP-qPCR。ChIP-qPCRを、以前に記載されるように(Fulciniti et al., Cell Rep. 25:3693-3705 (2018))実施した。簡潔には、 1×10^7 個の細胞(相当する処理を有する、AMO1、H929、およびU266^{MYC+})を、1%ホルムアルデヒドを用いて37℃で10分間架橋した。架橋されたクロマチンを次いで抽出し、溶解緩衝液で希釈し、超音波処理によって剪断した。特異的抗体を用いた免疫沈降のために、クロマチンを等しいサンプルに分割した。免疫沈降物を遠心分離によってペレットにし、68℃でインキュベートして、タンパク質-DNA架橋を解除した。Qiaquick PCR精製キット(QIAGEN)によって、溶出液(elute)からDNAを抽出した。使用された抗体は以下のとおりであった：内在性MYC(Cell Signaling Technology、#13987)、MYC-DDK(Santa Cruz Biotechnology、9E10-x)、GFP(Abcam、#ab290)、H3K4me3(#ab8580)、通常ウサギIgG(Cell Signaling Technology、#2729)、通常マウスIgG(Santa Cruz Biotechnology、sc-2025)。同じ細胞由来のインプットDNAの並行サンプルを、対照として使用した。ChIPおよびインプットDNAを、SYBR

GreenリアルタイムPCR解析 (Applied Biosystems) を使用して解析した。ChIP-qPCRに対するプライマー: ACC1 Fw: TTTCTCTCTTTGCAGAGTGAGGTGTGG (配列番号72) および ACC1 Rv: TACAAAGGCACGGAGAGAGCAAGT (配列番号73)。

【0126】

RNA-タンパク質プルダウン。RROL転写産物をpBlueScriptベクターにクローニングし、配列を検証した。インビトロ転写およびビオチン化 (biotinylation) を、メーカーの使用説明書に従って、Ampliscribe (商標) T7-Flash (商標) ビオチン-RNA転写キット (Lucigen、カタログ番号#ASB71110) を使用して実施した。細胞核溶解物 (1×10^7 個のAMO1細胞からの) を、メーカーの使用説明書に従って、Pierce (商標) 磁気RNA-タンパク質プルダウンキット (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号#20164) を使用して、RNAプルダウンインキュベーションのためにビオチン化RNAおよびストレプトアビジンビーズとともにインキュベートした。RNAと結び付いたタンパク質を溶出し、ウェスタンブロッティングによって解析した。

10

【0127】

RNA酵母3ハイブリッド。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 系統YLW3に、標準的プロトコルを使用してRNAプラスミドを形質転換した。それらを、ウラシルを枯渇したSCプレート (SC-U) にスポットティングすることによって、生存率について試験した。タンパク質プラスミドを酵母系統Y8800に形質転換し、トリプトファンを枯渇したSCプレート (SC-W) において成長させた。検査済みRNAプラスミドを含有する酵母系統YLW3を、タンパク質プラスミドを含有するY8800酵母系統と交配させた。交配を、YPD培地において、メーカーのプロトコルに従って実施した。両プラスミドを有する2倍体を、トリプトファンおよびウラシルを枯渇したSC培地 (SD-WU) において選択し、二量体化を、ヒスチジンも枯渇した (SC-WUH) 培地における成長によって試験した。翌日、SC-WUH培地における2倍体を、HIS3遺伝子産物の競合的阻害剤である3ATの種々のレベルを含有する固形寒天プレートに移して、選択のストリンジェンシーを増加させた。有意な相互作用を有する2倍体のみが、生存のための十分なヒスチジンを産生し得るはずである。1~3日後、種々の条件における種々のコロニーの成長を検査して、最も強力な相互作用を有する2倍体を探し出した。

20

30

【0128】

RIP-qPCR。RNA免疫沈降 (RIP) 実験を、メーカーの使用説明書に従って、Magna RIP RNA結合タンパク質免疫沈降キット (Millipore Sigma、カタログ番号17-701) を使用して実施した。RIPに使用された抗MYC抗体 [Y69] をAbcam (ab32072) から購入した。通常ウサギIgGをCell Signaling Technology (カタログ番号#2729) から購入した。RROLを検出するために使用されたプライマーは、上に列挙される。

【0129】

共免疫沈降 (Co-IP)。タンパク質溶解物を、 1×10^7 個の細胞 (相当する処理を有する、AMO1、H929、およびU266^{MYC+}) から獲得した。共免疫沈降を、メーカーの使用説明書に従って、Pierce (商標) 共免疫沈降キット (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号26149) を使用して実施した。使用されたIP抗体は以下のとおりであった: 抗MYC抗体 [Y69] をAbcam (ab32072) から購入し、抗FLAG (登録商標) M2抗体をMillipore Sigma (F3165) から購入し、通常ウサギIgGをCell Signaling Technology (2729) から購入した。

40

【0130】

近位依存性ビオチン特定 (BioID)。BioIDを、Kalkat et al., Mol. Cell 72:836-848 (2018) によって記載されるように実施した。簡潔には、ASO1を用いたトランスフェクション (50 nM、上に記載されるようにLipofectamine

50

2000を使用した)、ならびに1mg/mLドキシサイクリン(Millipore Sigma)、1μM MG132(Millipore Sigma)、および50mMピオチン(Bio Basic)を用いた24時間の処理の前に、FBA-MYC細胞をT75フラスコに60%コンフルエンスまで成長させた。ドキシサイクリンに曝露されたFBA-MYC細胞を用いた実験は、16個の生物学的複製物(RROL枯渇を有する8個、およびRROL枯渇を有しない8個)を含んだ。解析に使用された陰性対照は、ドキシサイクリンに曝露されていないFBA-MYC細胞の6個の生物学的複製物を含んだ。細胞を剥離によって収集し、瞬間凍結の前に50mLのPBSで3回洗浄した。細胞ペレットを、250Uのベンゾナーゼ(Millipore)を有する、1mLの改変RIPA緩衝液(1%NP-40、50mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、0.1%SDS、1:100プロテアソーム阻害剤カクテル(Thermo Fisher Scientific)、0.5%デオキシコール酸ナトリウム)中で溶解した。溶解物を4℃で1時間回転させ、3×30秒超音波処理し、次いで27000gにて4℃で30分間遠心分離した。ピオチン化タンパク質を、4℃で2時間の回転を用いた、30mgの洗浄されたストレプトアビジン-Sepharoseビーズ(GE)を用いたアフィニティー精製によって単離した。次いで、トリプシン消化の前に、ビーズを7×1mLの50mM炭酸水素アンモニウム(pH8.0)で洗浄した。

10

【0131】

質量分析。Co-IPおよびBioIDサンプルの質量分析解析を、確立されたプロトコルに従って、Taplin Mass Spectrometry Facility(Harvard Medical School、Boston、MA)において実施した。

20

【0132】

動物調査。6週齢の雌の免疫不全NOD.CB17-Prkdcscid/NCrCrL(NOD/SCID)マウス(Charles River)またはNSGマウス(Jackson Laboratory)を、ダナ・ファーマーがん研究所(DFCI)における本発明者らの動物施設で飼育した。すべての実験を、DFCIの動物倫理委員会による承認後に実施し、施設ガイドランを使用して実施した。

30

【0133】

AMO1^{DR-KO}異種移植モデル:SCID NODマウスへの皮下注射の前に、AMO1^{DR-KO}を、ASO1(2.5μM)またはASO-NC(2.5μM)に2日間ジムノティックに曝露した。注射の当日(0日目)、細胞生存率をアネキシンV/7-AADフローサイトメトリーアッセイによって査定し、この時点におけるASO-1の検出不能なアポトーシス誘発性活性を確認した(示さず)。腫瘍細胞注射に関しては、細胞を、ASO1(5μM)またはASO-NC(5μM)を補給されたPBS1×に再懸濁し;次いで、等価容積のマトリゲル(Corning、#354230)と混合し、2.5μMの最終オリゴ濃度に達した。マウスあたり5×10⁶個細胞を皮下注射した(群あたり5匹のマウス)。腫瘍サイズを電子キャリパーによって測定した。

40

【0134】

AMO1異種移植モデル:5×10⁶個のAMO1細胞を、NOD SCIDマウスに皮下注射した。腫瘍が触診可能(約50mm)になったとき、G2-15b*-TOもしくはSB9-19-TOまたは対照としてのビヒクル(-)を受けるように、マウスを無作為化した(3群、5匹のマウス/群)。処理を、I.P.注射により、2週間あたり隔日で、10mg/kgで投与した。腫瘍サイズを電子キャリパーによって測定した。RROLおよびACC1のqRT-PCR解析に使用された独立した実験では、マウスを、腫瘍が約200mmの容積に達した後に処理を受けるように登録し、1~3~5日目に処理した。次いで、腫瘍を6日目に回収した。

50

【0135】

MOLP8-luc+異種移植モデル:1×10⁶個のMOLP8-luc+細胞を、

50

28匹のNSGマウスに尾静脈を介して注射した。次いで、3匹のマウス(×によって印付けられた)を、注射の失敗のために除外した。その翌日、11匹のマウスを対照群に、8匹のマウスをG2-19b*-TOを用いた処理に、および6匹のマウスをSB9-19-TOを用いた処理に割り当てた。処理を、I.P.注射により、2週間あたり隔日で、10mg/kgで投与した。処理サイクルの終了時(15日目)に、腫瘍成長の指標としてBLIを測定した。

【0136】

腫瘍成長阻害(%TGI)を、以前に記載されるように(Buck et al., Cancer Res. 68:8322-32 (2008))、式: $\%TGI = (1 - [Tt / T0 / Ct / C0] 1 - [C0 / Ct]) \times 100$ 、式中、Tt=t時点で処理された腫瘍容積中央値、T0=0時点で処理された腫瘍容積中央値、Ct=t時点における対照の腫瘍容積中央値、およびC0=0時点における対照の腫瘍容積中央値、によって判定した。

10

【0137】

統計解析。すべてのインビトロ実験を少なくとも3回繰り返し、三連で実施し; 代表的な実験を図に示した。差の統計的有意性を、スチューデントt検定を使用して判定し(別様に指定されない限り)、有意性の最小レベルを $p < 0.05$ と指定した。カプラン・マイヤー生存曲線をログ・ランク検定によって比較した。GraphPadソフトウェアを使用して統計解析を判定した。GraphPadソフトウェアを使用してグラフを獲得した(別様に指定されない限り)。

20

【0138】

[実施例2]

ゲノムワイドCRISPRi生存率スクリーニングは、MMにおける主要な依存関係としてMIR17HGを特定する。

360人の新たに診断されたMM患者からのRNA-seqデータを解析し、913種のlncRNA転写産物を、Iと標識される図1A左のパネルに例示される初代MM細胞においておよび70種のMM細胞株のパネルにおいて、発現されると特定した。MM細胞成長におけるこれらlncRNAの役割を体系的に調べるために、3種のMM細胞株(H929、KMS-11、およびKMS-12-BM)を、dCAS9-KRAB融合タンパク質を発現するように操作し、913個の転写開始部位(TSS)のそれぞれに対する7種のsgRNAおよび576種の陰性対照sgRNAからなるプールされたライブラリーを形質導入した(IIと標識される図1A中央のパネルを参照されたい)。sgRNAの相対的存在率を、3週間後にディープシーケンシングによって査定し、ゲノムワイドCRISPR-Cas9ノックアウトのモデルベースの解析(MAGeCK)ロバストランク集約(RRA)アルゴリズム(Li et al., Genome Biol. 15:554-12 (2014))を使用して解析した。IIIと標識される図1A右のパネルに図解されるように、最も富化したまたは枯渇したsgRNAを、224個のlncRNA TSSを標的にするプールされたライブラリー、陽性対照としての公知のタンパク質コードがん遺伝子(MYC、IRF4)(Chesi et al., Cancer Cell 13:167-80 (2008); Shaffer et al., Nature 454:226-31 (2008))または腫瘍抑制剤(TP53)(Jovanovic et al., Front. Oncol. 8:665-7 (2019))、および陰性対照としての2245種の非標的化sgRNAのTSSを使用して、二次スクリーニングにおいてさらに試験した。二次スクリーニングにおいて、4種のMM細胞株(H929、KMS11、KMS12BM、およびAMO1)を使用して、有意に枯渇したまたは富化したsgRNAを検出しかつランク付けした。予想どおり、IRF4およびMYCを標的にするsgRNAは、3種(MYC)またはすべて(IRF4)の細胞株において有意に枯渇し、一方でTP53を標的にするsgRNAは、両TP53野生型細胞株(AMO1およびH929)において有意に富化した(Tessoulin et al., J. Hematol. Oncol. 11:137 (2018))。図1Bは、陽性対照として使用されたタンパク質コード遺伝子IRF4およびMYCとともに、上位lncRNA依存関係MIR17HGを強調する。図1Cは、KRAB-dCAS9融合タンパク質を安定に発現し、抗MIR17HG sgRNAを条件付きで発現するレンチ

30

40

50

ベクターを形質導入されたMM細胞株AMO1、H929、KMS11、およびKMS12BMについてのCCK-8増殖アッセイを例示する。ドキシサイクリン（0.5 μg/mL）への曝露後に表示される時点で、CCK-8アッセイを実施した。細胞増殖を、空のsgRNAベクターに感染しかついくつかの条件下でドキシサイクリンに曝露された親細胞と比較して算出した。枯渇したsgRNAに注目して、細胞タイプ特異的である（54%）または2種以上の細胞株によって共有される（46%）（図8Aを参照されたい）、MM細胞におけるlncRNA依存関係を特定した。sgRNA枯渇についてのランク付け解析は、試験されたすべての細胞株においてMYCまたはIRF4を標的にすることによって獲得されたものと等しいまたはより優れたRRAスコアを有して、スクリーニングにおける主要なlncRNA依存関係としてMIR17HGを特定した（図8B）。このデータをさらに検証するために、dCAS9-KRAB融合タンパク質を発現するMM細胞株に、テトラサイクリン誘導性プロモーターの調節下で、MIR17HGを標的にする上位4種のsgRNAを形質導入し、図1Cおよび図8Bに例示されるように、ドキシサイクリンへの継続的曝露後に非標的化sgRNAに感染した細胞と比較して、低下した細胞成長を観察した。MIR17HG発現を、ドキシサイクリンを用いたsgRNAの誘導の5日後にqRT-PCRによって検討した。図8Bに示される結果は、ACTBを用いた正規化およびΔΔCt算出後の平均RNA発現レベルである。

10

【0139】

さらに、RNase H媒介性分解に対するMIR17HG新生RNA（プレRNA）を標的にする2種の異なるロックド核酸（LNA）gapmeR ASO（Lai et al., Mol. Cell 77:1032-1043 (2020); Lee and Mendell, 2020)を使用して、従来の抗MM剤に抵抗性のもの（ボルテゾミブに抵抗性のAMO1-ABZB；カルフィルゾミブに抵抗性のAMO1-ACFZ；デキサメタゾンに抵抗性のMM.1R）を含めた11種のMM細胞株にトランスフェクトし；図1Dおよび図8Cに例示されるように、遺伝学的および分子的バックグラウンドとは無関係のMM細胞生存率に対する有意な影響を確認した。ASOを25 nMの濃度で使用した。細胞生存率をエレクトロポレーションの2および4日後に測定し、それは、NC-ASOをトランスフェクトされた細胞と比較した生存率の%として表される。3回の独立した実験うちの1回からのデータが、図1Dおよび図1Eに示される。データは、図1Dおよび図1Eにおいて平均±s.dを提示する。スチューデントt検定による* $p < 0.05$ 。図8Cは、トランスフェクションの24時間後のqRT-PCRによるMIR17HG発現を示す。示される結果は、ACTBを用いた正規化およびΔΔCt算出後の平均RNA発現レベルである。3回の独立した実験のうちの1回が示される。

20

30

【0140】

これらのデータは、MM細胞におけるlncRNAへの広い依存関係を立証する。MIR17HGの分子的小および機能的役割が、MM設定においてさらに探索される。

【0141】

[実施例3]

MIR17HG^{RROL}（RROL）は、マイクロRNA非依存的様式で依存関係を媒介する。

40

図2Aに図解されるように、マイクロRNAクラスターmiR-17-92（MIR17HG miR-17-92；miR-17/-18a/-19a/-20a/-19b/-92a1）に対する前駆体を提供する他に、MIR17HGは、今のところほとんど特徴付けされていないlncRNA転写産物lnc-17-92^{TV1}（MIR17HG^{RROL}としても公知）も産生する（He et al., Nature 435:828-33 (2005); Ota et al., Cancer Res. 64:3087-95 (2004)）。診断時および／または再発時に解析された、IFM/DFCI臨床試験（NCT01191060）に登録されたMM患者からの2つの独立したデータセットにおいて、RROL発現は疾患進行中により高いこと（図9A～図9Bを参照されたい）；ならびに、RROLのより高い発現は、新たに診断されたMM患者の3つの大きなコホートにおいてより短い無イベント生存期間（EFS）および

50

全生存期間（OS）と関連すること（図2B）が観察された。RROLの発現は、140人の患者由来のCD138+ MM細胞においてmiR-17-92と有意に相関せず（平均スピアマン $r=0.16$ ）、RROLおよびmiR-17-92が、独立した調節制御の対象となり、個別の分子経路において機能し得ることを示唆した（図9C）。

【0142】

RROLのmiRNA非依存的機能を支持して、第一に、2種のMM細胞株におけるpri-mir-17-92の異所性発現の存在または非存在下での、抗MIR17HGA SOの無傷の抗増殖活性が観察された（図2Cおよび図9D）。AMO1およびH929細胞に、pri-mir-17-92（pri-mir）を有するレンチベクターまたは対照としてのGFPを有するレンチウイルスベクターのいずれかを安定に形質導入し；MIR17HGPレRNAの5'末端を標的にする2種の異なるASO（5'-ASO）、またはスクランブル対照（NC）をトランスフェクトした。細胞増殖に対する効果を、トランスフェクションの48時間後に査定した。図9Dは、pri-mir-17-92を含有するレンチウイルスベクター（レンチ-pri-mir）、またはGFPを含有するレンチウイルスベクターに感染した細胞を示す。示される結果は、RNU44を用いた正規化および $\Delta\Delta Ct$ 算出後の平均miRNA発現レベルである。RROLを単独で枯渇させるために、ASOを、異所性pri-mir-17-92に含まれない配列である5'末端におけるMIR17HGを標的にするように設計した（5'-ASO）。第二に、miR-17-92を産生することができない2種のドロージャノックアウト（DR-KO）MM細胞株（AMO1^{DR-KO}およびH929^{DR-KO}）を確立した（図9E）。示される結果は、RNU44を用いた正規化および $\Delta\Delta Ct$ 算出後の平均miRNA発現レベルである（Bartel et al., Cell 116:281-97 (2004)）。MIR17HGPレRNAのASO媒介性標的化は、これらの細胞においてRROLだけに影響を及ぼす。6日間のASO1（AMO1に対して1 μ MおよびH929に対して2.5 μ M）を用いたジムノティック処理後に査定され、かつWTおよびKO細胞におけるドロージャノックアウトについてウェスタンブロット解析によって検出されるように（図2D）、または3種の異なるASO（-1/-2/-3）を用いたトランスフェクション後に（図9F）、DR-KO細胞における有意なレスキューなしで、RROL枯渇後に査定されるように、DR-WTおよびDR-KO細胞システムの両方における強力な抗増殖活性が観察された。ピンキュリンをタンパク質ローディング対照として使用した。生細胞のパーセンテージをNCと比較し、CCK-8アッセイによって、トランスフェクションの48時間後に解析した。RROL発現を、qRT-PCRによって、トランスフェクションの48時間後に解析した。3回の独立した実験のうちの1回が示される。*は、スチューデントt検定算出後の $p<0.05$ を示す。MM細胞において、RNA-seq（図2G）およびqRT-PCR（図2H）の両方とも、さらに検討されかつ以降でRROL（lnc-17-92としても公知）と称されるアイソフォームであるRROL TV1の優先的発現を示した。RNA-seqを使用して、MM患者の付加的な大きなコホート（MMRF/CoMMpass、 $n=720$ ）由来のCD138+細胞における、およびMM細胞株（ $n=60$ ）（図9I）におけるその発現を確認した。

【0143】

重要なことに、RROL枯渇の有（ASO-1）または無（NC）のAMO1^{DR-KO}の腫瘍成長（図2E）および長期の動物生存（図2F）によって検出されるように、ASO1への曝露は、NOD SCIDマウス内に腫瘍を確立するAMO1^{DR-KO}の能力を妨げた。MIR17HG³⁴によって推進される、トランスフェクトしやすい結腸直腸がん細胞株HCT-116を使用して、lnc-17-92^{TV1}の異所性発現が、異所性lnc-17-92^{TV2}またはpri-mir-17-92よりも有効に、MIR17HGPレRNAを標的にするASOの抗増殖活性を有意にレスキューすることを見出し（図9Kおよび図9L）、異所性pri-mir-17-92、lnc-17-92^{TV1}、lnc-17-92^{TV2}、またはGFP（空）を有する2.5 μ gをトランスフェクトした。細胞増殖に対する効果を、5'-ASOを用いたトランスフェクションの2

日後、およびプラスミドを用いたトランスフェクションの3日後に査定した。NCおよび空ベクターをトランスフェクトされた細胞を参照として使用した。細胞増殖に対する効果を、トランスフェクションの48時間後に査定した。pri-mir-17-92、lnc-17-92TV1、およびlnc-17-92TV2の異所性発現が、i) pri-mir-17-92の異所性発現後のmiR-17の上方調節；ii) その異所性発現後のlnc-17-92TV1の上方調節；iii) その異所性発現後のlnc-17-92TV2の上方調節を示すqRT-PCRによって確認された。図2Gに例示されるように、低形質表現型を付与する変異体ダイサーを有する(−/−)または有しない(wt)これらの細胞株にもかかわらず(Cummins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3687-92 (2006))、結腸直腸がん細胞株HCT-116およびDLD-1における抗MIR17HG ASOの抗増殖活性も観察された。細胞に、スクランブル対照(NC)または2種の異なるASO(−1および−2)のいずれかをトランスフェクトして、RROL枯渇を獲得した。NCと比較した生細胞%を、トランスフェクションの48時間後に解析した。*は、スチューデントt検定後の $p < 0.05$ を示し、nsは $p > 0.05$ を示す。これらの結果は、RROLが、miR-17-92とは関係なく、MIR17HGがん依存関係の主たる媒介因子であることを示す。

10

【0144】

[実施例4]

RROLはクロマチンと相互作用して遺伝子発現を調節する。

lncRNAの機能的役割は、それらの細胞内局在に依存する。Ulitsky et al., Cell 154:26-46 (2013)。MALAT1およびGAPDH mRNAを陽性対照として用いた、核および細胞質コンパートメントについてのqRT-PCR解析は、RROLの核富化を示した(図10A)。MALAT1およびGAPDHを、それぞれ核のおよび細胞質の富化したRNAに対する内部対照として使用した。結果は、 $2^{-\Delta Ct}$ 算出後の、核対細胞質画分の平均富化倍率である。この知見を、図10Bに例示されるように、RNA FISHによって確認した。これに基づき、次に、MMにおけるRROLによって調節される転写ネットワークを探索した。この目標に向けて、ASOベースの機能喪失(LOF)調査を実施し、その後にDR-WT (AMO1およびH929)およびDR-KO (AMO1^{DR-KO}) MM細胞株の両方における統合遺伝子発現解析が続いた。ドロージャWT細胞におけるmiR-17-92のモジュレーションを回避するジムノティックASO1への早期曝露(図10C)、またはASO2を用いたトランスフェクション(図9K)の後に実施された、示差的に発現した遺伝子(DEG)についての動態解析により、試験されたすべての細胞株におけるRROL枯渇後に急速に下方調節された遺伝子のセットを特定した。図10Cに示されるヒートマップは、それぞれGAPDHまたはRNU44を用いた正規化および $\Delta\Delta Ct$ 算出後の平均RROLまたはmiRNA発現レベルを示す。ジムノティックASO1への早期曝露を使用して、DR-WT (AMO1およびH929)およびDR-KO (AMO1^{DR-KO}) MM細胞株においてRROLを枯渇させて、ドロージャWT細胞におけるRROLの標準的標的のモジュレーションも回避した(図13Bおよび図13C)。

20

30

【0145】

これらの知見を、ASO1を用いてエキスピボで処理された3人のMM患者由来のCD138+細胞において検証した(図3B)。図3Bに示される結果は、GAPDHを用いた正規化および $\Delta\Delta Ct$ 算出後の平均mRNA発現レベルである。NC(ビヒクル)に曝露された細胞におけるRNAレベルを、内部参照として設定した。RROL枯渇知見を、リンパ腫細胞株RajiおよびDaudi(図10D)、ならびにヒトまたはネズミ科RROLを枯渇したネズミ科MM細胞株5TGM1(図10E)を含めた、他の細胞モデルにおいても検証した。図10Dに示される結果は、GAPDHを用いた正規化および $\Delta\Delta Ct$ 算出後の平均mRNA発現レベルである。図10Eに示される結果は、ネズミ科gapdhを用いた正規化および $\Delta\Delta Ct$ 算出後の平均mRNA発現レベルである。反対に、これらの遺伝子の発現は、合成模倣体または阻害剤によるmiR-17-92の個々のメ

40

50

ンバーのモジュレーションによる影響を受けなかった（図10F～図10G）。示される結果は、それぞれRNU44またはGAPDHを用いた正規化および $\Delta\Delta Ct$ 算出後の平均miRNAまたはmRNA発現レベルである。さらに、図3Cに例示されるように、2つの大きなRNA-seq MM患者データセット（IFM/DFCIおよびMMRF/CoMMpass）のうちの少なくとも1つにおけるRROLとその標的遺伝子との間の有意な正の相関（スピアマン $r > 0.3$ ； $p < 0.001$ ）が観察され；これらの調節軸の臨床的関連を支持した。図3Cは、2つの大きなRNA-seqコホート（DFCI/IFM、 $n = 360$ ；MMRF/CoMMpass、 $n = 720$ ）からのCD138+ MM患者細胞におけるRROL標的（mRNA）とRROLとの間の相関解析を例示する。DFCI/IFM（x軸）およびMMRF/CoMMpass（y軸）データセットにおいて、スピアマン r が獲得されたことが報告される。赤色の点線は $r = 0.3$ を示す。

10

【0146】

RROL枯渇の存在または非存在下で293TDR-KO細胞において実施されたルシフェラーゼレポーターアッセイは、プロモーターレベルで調節制御が起きるANO6を除いて、これらの遺伝子に対するRROLの調節制御を実証する（図3D）。レポーターベクターを、ASO1または対照ASOのいずれかとともに、293T細胞に共トランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に、細胞をルシフェラーゼ活性アッセイのために収集した。結果は、対照と比較した、ASO1をトランスフェクトされた細胞における正規化されたGluC活性の%として示される。5種のMM細胞株におけるRNAiベースのLOFスクリーニングは、MM細胞増殖および生存に対する最も有意な影響を有するRROL標的遺伝子としてACC1（アセチル-CoAカルボキシラーゼアルファ）を特定した（図3E）。これらの結果は、MM病理生物学におけるRROL-ACC1軸の役割をさらに探索する論理的根拠を提供した。図3Eに示されるように、2種のsiRNAを各標的に、それに加えてスクランブルsiRNA（NC）を対照として使用した。細胞生存率を、表示される時点で測定した。それは、NCをトランスフェクトされた細胞についての%として表される。一貫して、上位標的ACC1のプロモーター領域におけるRROL相互作用が、RNA沈降（ChIRP）アッセイによるクロマチン単離、それに続くqRT-PCR解析によって確認された（図3Fおよび図10H～図10I）。さらに、ACC1遺伝子座におけるRROLの高頻度の近位局在が、RROLおよびACC1プレmRNAの単分子デュアルRNA FISH解析によって実証された（解析されたACC1プレRNAスポットの約50%において、最も近いRROLスポットまで $< 300\text{ nm}$ ）（ $n = 60$ ）（図3G）。

20

30

【0147】

まとめると、理論によって拘束されることなく、これらのデータは、転写調節機能を有するクロマチン相互作用lncRNAとしてのRROLを示す。

【0148】

[実施例5]

RROLはACC1プロモーターにおけるMYC占有を促進する。

試験された両細胞株におけるRROL枯渇時のMYC関連ネットワークの強力な阻害が、RROL関連遺伝子発現変化の上流調節解析により観察された（図4A）。この解析に基づき、MYCおよびRROLが協働してMM細胞におけるACC1発現を促進するかどうかを評価した。MM細胞におけるRROL枯渇は、実際に、ACC1プロモーターにおけるMYC占有を妨げ、一方でその発現は影響を受けなかった（図4Bおよび図11A）。ACC1プロモーターにおけるMYC占有率を、インプットクロマチンについての%として算出した。ペアのサンプルからのMYCについてのウェスタンブロット解析が、各ヒストグラムプロットの下に示される。GAPDHまたは α -チューブリンをタンパク質ローディング対照として使用した。条件付きMYC Tet-Off細胞株P493-6（Schuhmacher et al., Curr. Biol. 9:1255-8 (1999)）におけるACC1の発現は、高いMYCレベルの存在下でのみ低下した（図4C）。NCに曝露された細胞におけるACC1発現レベルを、内部参照として設定した。さらに、図4Dに例示されるように、

40

50

RROLおよびACC1ブレRNAについてのRNA FISH解析とMYCタンパク質についての免疫蛍光解析とを連動することによって(FISH/IF)、ACC1遺伝子座におけるRROLおよびMYCの共局在が見られた。2種の異なるプローブ(RROL-ps1およびRROL-ps2)を使用してRROLを検出し、代表的な画像が、図4Dにおいて各RROLプローブとともに示される。

【0149】

RROL-MYC複合体の存在を評価するために、RNA免疫沈降(RIP)アッセイをMYC抗体を用いて実施し、それは、図4Eおよび図11B~図11Cに例示されるように、MYC結合RNAにおけるRROLアイソフォーム2(RROL-2)の特異的富化を示した。LncRNA PVT1を、MYC相互作用物質としての公知の役割が理由で陽性対照として使用した(図4E)。RNA-タンパク質プルダウン(RPPD)実験は、RROL-2と複合体を形成するMYCを確認した(図4Fおよび図11D)。さらに、RNA酵母-3-ハイブリッド(Y3H)アッセイを、インビボ細胞モデルにおけるRROL-MYC相互作用を確認するように適応させた(Hook et al., RNA 11:227-33 (2005))。このアッセイにおいて、直接的RROL-MYC相互作用は、酵母コロニー成長を可能にするレポーター遺伝子を活性化し；図4Gに示されるように、本発明者らは、ハイブリッドRNAとしてのRROL-2の存在下で酵母コロニー成長を検出した。

10

【0150】

これらのデータは、RROLが転写因子MYCとRNA-タンパク質複合体を形成して、ACC1プロモーターにおけるそのクロマチン占有および転写活性を促進することを実証するように見える。

20

【0151】

[実施例6]

RROLは、MYC-WDR82転写複合体の会合を媒介し、ACC1の転写およびエピジェネティック活性化につながる。

MIR17HGの標的化は、MMにおいてを含めて、c-MYC陽性(MYC+)腫瘍細胞を主として殺滅する。興味深いことに、MYCは、腫瘍細胞においてACC1(ACACAとしても公知)発現およびデノボ脂質生成を再活性化し、MYC+腫瘍細胞はこの代謝経路に依存性になることが公知であり、これは本明細書においてMM細胞において検証される(図11D~図11F)。図11Dは、MM細胞株AMO1およびH929におけるMYC阻害剤10058-F4を用いた処理後のACC1 mRNAを示す。生Ct値をGAPDH mRNAに対して正規化し、比較閾値超過法を使用して算出された $\Delta\Delta Ct$ 値として表現した。DMSOで処理された細胞におけるACC1発現レベル(NC)を、内部参照として設定した。それゆえ、MYCとMIR17HGとの間の機能的相互関係を検討した。

30

【0152】

MYC活性は、転写およびエピジェネティック共調節因子との相互作用を通じてモジュレートされることが示されている(Gouw et al., Cell Metab. 30:556-572 (2019))。RROLがこれらのタンパク質-タンパク質相互作用に影響を及ぼすかどうかを判定するために、近位依存性バイオチン特定(BioID)解析の結果を、RROL枯渇の存在下および非存在下での、3種のMM細胞株(AMO1、H929、およびU266^{MYC+})における、質量分析解析が後に続く共免疫沈降アッセイ(Co-IP/MS)と統合した。この統合解析は、極めて信頼度の高いRROL依存性MYC相互作用物質としてWDR82を強調し(図5Aおよび図12A、ならびに表5~表8)；RROLとWDR82との間の直接的RNA-タンパク質相互作用は、RPPD(図5B)およびRNA Y3H(図5C)アッセイの両方によってさらに確認された。図5Cにおける黒色の矢印は、酵母コロニー成長を示す。Lnc-17-92TV1の短縮バージョンを使用した解析は、MM細胞におけるMYCとの相互作用に特に関連する、miR-17-92を含まない3'末端領域をさらに示した(図11G)。

40

50

インビボにおける 172 種すべての MYC 相互作用物質が、表 5 に列挙される。BioID アッセイから特定された 18 種すべての RROL 依存性インビボ MYC 相互作用物質が、表 6 に列挙される。

【0153】

MM細胞における 176 種すべての MYC 相互作用物質（2 種を上回る細胞株において特定される）が、表 7 に列挙される。MM細胞における 8 種すべての RROL 依存性 MYC 相互作用物質（2 種を上回る細胞株において特定される）が、表 8 に列挙される。

【0154】

【表 5－1】

表 5: インビボにおける MYC 相互作用物質(n=172)

遺伝子	P 値	遺伝子	P 値	遺伝子	P 値
AARS2	0.000	TOR1AIP1	0.012	ASB6	0.028
EDC4	0.000	HCFC1	0.012	SNW1	0.029
KDM3B	0.000	AP3B1	0.012	CDK12	0.03
DMAP1	0.000	RPRD1B	0.012	WDR6	0.031
IPO4	0.000	CPSF4	0.012	CANX	0.031
RUVBL2	0.000	ARF5	0.013	ANKFY1	0.032
NCOR1	0.000	CHD1	0.014	TOX4	0.032
WDR82	0.001	FAM96B	0.014	GIPC1	0.033
SAE1	0.001	U2SURP	0.014	SMAD5	0.033
ATP1A1	0.001	GEMIN5	0.014	CDCA2	0.033
FIP1L1	0.001	TAF5L	0.015	PSME3	0.034

【0155】

【表 5 - 2】

TUBB2B	0.002	TPR	0.015	SALL2	0.034
PDCD6	0.002	ERLIN2	0.015	ATP2B4	0.035
GTF2E2	0.002	STAT3	0.016	MAGED2	0.035
RPL14	0.002	ARID3B	0.016	USP10	0.035
SAP30BP	0.003	SAR1B	0.016	CHD8	0.035
SRPRB	0.003	MAD2L1	0.017	ALAS1	0.035
SAFB	0.003	NCOR2	0.017	API5	0.035
RSU1	0.003	PBRM1	0.017	R0214	0.035
DHFR	0.003	DIDO1	0.017	EMD	0.036
SMUG1	0.004	IRF2BP2	0.017	CBLL1	0.036
TUBB4A	0.004	RACGAP1	0.017	BIN3	0.036
RIUVBL1	0.005	ACTL6A	0.017	MAP4	0.036
MAP7D1	0.005	EEF1A2	0.018	SETDB1	0.036
LSM2	0.005	CIZ1	0.018	HBA1	0.036
SF1	0.005	EIF2B2	0.018	IPO9	0.037
DKFZp686L22104	0.006	Z0318	0.018	SEC22B	0.037
NOB1	0.006	CBWD1	0.019	OSBP	0.037
PRRC2B	0.006	ITPA	0.019	MDC1	0.037
ECD	0.006	CSNK2A2	0.019	CEP85	0.038
RPRD2	0.006	TUBB	0.02	SAR1A	0.038
ATXN10	0.006	IQGAP2	0.02	TAF6	0.038
TORIAIP1	0.006	TRNT1	0.02	PPM1G	0.038
TAF6L	0.007	NELFA	0.022	ZBTB33	0.039
TK1	0.007	GAPVD1	0.022	HSPA14	0.039
PTRH2	0.007	EIF2S2	0.022	RIF1	0.039
SCML2	0.007	RTKN	0.023	SRP72	0.039
TUBA1C	0.007	LRRC47	0.023	SNRNP40	0.04
PSMD11	0.008	XPO5	0.023	HIST1H1C	0.041
TRIM4	0.008	PSMB6	0.023	LIMA1	0.041
SF3A1	0.008	TUBB4B	0.024	AP3M1	0.041
EP400	0.008	CTPS2	0.024	TTLL12	0.042
NUBP2	0.008	EIF5	0.024	EMC4	0.043
GIGYF2	0.008	JUN	0.024	CHORDC1	0.044
ARID1A	0.008	MGA	0.025	IPO8	0.044
DVL2	0.009	COG8	0.025	GATAD2A	0.045

【 0 1 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

GTF2F2	0.01	HAT1	0.026	ZC3H14	0.045
TTC37	0.01	RPL37A	0.026	AP2B1	0.047
STAU1	0.01	RING1	0.026	C6orf120	0.047
PIGU	0.01	NUFIP2	0.027	FANCI	0.047
CLPTM1	0.011	DYNC1LI1	0.027	POLR2B	0.047
EIF4E	0.011	TCAF1	0.027	KTI12	0.047
TRRAP	0.011	WDR5	0.028	GON4L	0.048
XRCC6	0.011	HAUS8	0.028	EIF3H	0.048
SCAF4	0.011	USP33	0.028	NUP62	0.049
CRTC3	0.011	GPATCH8	0.028	VBP1	0.049
ITPK1	0.012	PCGF6	0.028	RPL30	0.049
I02	0.012				

10

【 0 1 5 7】

20

【表 6】

表 6: BioID アッセイからの RROL 依存性インビボ MYC 相互作用(n=18)

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

30

【 0 1 5 8】

40

50

【表 7】

表 7: MM 細胞における MYC 相互作用物質(>2 種の細胞株;n=176)

名前	合計	要素
AMO1 H929 U266 ^{MYC+}	7	MAX, CDSN, NELFCD, WDR82, CAPNS1, RPL34, RNASEH2A
AMO1 H929	137	RPS17, NCBP2-AS2, HSPB1, PMPCA, AIFM1, MRPL4, NAXE, COX6C, LONP1, PTC3, FAHD1, PRDX6, TUBAL3, GRPEL1, PDIA3, MRPL19, PCMT1, SRI, MYO1C, RPLP1, GMPPA, SF3B6, GDI1, ARHGEF2, EFTUD2, COX7A2, ACTR1A, ISOC2, CBR4, HSPA8, GET4, DHX15, ARPC3, RPS8, OSGEP, RSU1, SSR3, PPP3CC, IFI16, OXCT1, LSM3, MOGS, SNRPE, NDUFA13, FAU, PAFAH1B3, QPCTL, SELENOF, HIST1H2BB, PCNA, 43710, EIF2B2, NAP1L4, ATP6V1A, PSIP1, MYC, RFC4, GNB2, RPS24, VCP, PSMA5, ACTN2, PSMC1, STMN1, Ighg1, GAR1, NDUFB3, CNOT9, PARP1, FMNL1, BAG6, PSMA2, PSMA4, BRI3BP, WDR61, PPIH, TTLL12, LSP1, NSF, NAMPT, BLMH, PRSS2, RPS10, IGKC, COPE, UQCC2, EIF4A1, RPL15, MRPL39, DDX3Y, HSPA14, PABPC4, ARFIP1, DKFZp686J1372, HNRNPAB, AIMP1, SYNCRIP, MRPS23, SNRPGP15, MTAP, MSI2, TMEM109, PAFAH1B2, SORD, MCM4, RPL9, PDHX, GNG7, RPA3, ISOC1, SEC11A, CAT, CANX, SRM, NDUFA9, ARF3, NUDT5, PSMB3, HDGF, SDF2L1, MPRIP, TRMT10C, PSME3, NDUFS3, ECI1, PAM16, USP39, RPL38, RPL14, IDH3B, EIF3G, HNRNPA1L2, CCT6A, FKBP2, NDUFA5, NCLN, DNAJC19
AMO1 U266 ^{MYC+}	9	LAMTOR3, ARPC2, FAM207A, ASL, SDC1, BAG2, FLOT1, MIF, MAGED2
H929 U266 ^{MYC+}	23	MRPS35, THRAP3, YARS2, PPIL1, C19orf25, FAM98B, ALDH1L2, SEC13, PSMC4, FLNB, DKC1, AUH, TPM4, GMPPB, ACTR1B, RAD50, PSMD4, HLA-B, HNRNPA3, CDKN2C, POLR2E, DDX41, TOP1

【 0 1 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8: MM 細胞における RROL 依存性 MYC 相互作用物質(>2 種の細胞株;n=8)

名前	合計	要素
AMO1 H929 U266 ^{MYC+}	1	WDR82
AMO1 H929	5	RNASEH2A, COX6C, ARFIP1, IDH3B, RPA3
H929 U266 ^{MYC+}	2	C19orf25, RAD50

10

【0160】

WDR82 は、クロマチンへの MYC 結合およびトランス活性化の必須条件である Am
ente et al., Am. J. Cancer Res. 1:413-418 (2011)、活性遺伝子座の転写開始部
位におけるヒストン H3「Lys-4」トリメチル化 (H3K4me3) を触媒する SE
T1 メチルトランスフェラーゼ複合体の調節性構成要素である (Lee and Skalnik, M
ol. Cell. Biol. 28:609-18 (2008))。これと整合することにより、WDR82 の枯渇は
、H3K4me3 の包括的低下 (図 5D および図 12D) および ACC1 プロモーターに
おける MYC の占有率の低下 (図 5E) をもたらし、MM 細胞における ACC1 発現の減
少をもたらし (図 5F)。図 5D は、WDR82 および H3K4me3 についてのウェ
スタンブロット解析を示す (インプットクロマチンについての % として表される)。ラミ
ン A/C をタンパク質ローディング対照として使用した (核溶解物)。図 5E は、ペアの
サンプルからの WDR82 および MYC についてのウェスタンブロット解析を示す (イン
プットクロマチンについての % として表される)。α-チューブリンをタンパク質ロー
ディング対照として使用した。図 5F におけるデータは、GAPDH mRNA に対して正
規化されかつ比較閾値超過法を使用して算出された ΔΔCt 値として表現された生 Ct 値
として示される。NC をトランスフェクトされた細胞 (cell) における ACC1 発現レベ
ルを、内部参照として設定した。

20

【0161】

図 5G は、ペアのサンプルからの WDR82-GFP についてのウェスタンブロット解
析として、ジムノティック ASO1 に 24 時間曝露された AMO1 における、ACC1 プ
ロモーターにおける WDR82-GFP 占有率についての ChIP-qPCR 解析を例示
する (インプットクロマチンについての % として表される)。α-チューブリンをタン
パク質ローディング対照として使用した。さらに、異所性 WDR82-GFP 融合タン
パク質を発現する MM 細胞を使用して (図 12B)、RROL 発現は、H3K4 メチル化状態
に包括的に影響を与えることなく (図 5I)、ACC1 プロモーターにおける WDR82
占有に必須であることが実証された (図 5H)。図 5H は、ペアのサンプルからの H3K
4me3 についてのウェスタンブロット解析として示される、ジムノティック ASO1 に
24 時間曝露された AMO1 および H929 における、ACC1 プロモーターにおける H
3K4me3 占有率についての ChIP-qPCR 解析を例示する (インプットクロマチ
ンについての % として表される)。ラミン A/C をタンパク質ローディング対照として使
用した (核溶解物)。*p<0.05、スチューデント t 検定。付加的に、RROL 枯渇
は、全体的 H3K4me3 に対する検出可能な影響なく、ACC1 プロモーター部に
おける H3K4me3 のレベルの低下をもたらし (図 5I)。

30

40

【0162】

ACC1 の発現を制御する、MYC-WDR82 多タンパク質転写複合体の会合を媒介
するクロマチン足場としての RROL の役割を示す。

【0163】

[実施例 7]

RROL/MYC-ACC1 軸はデノボ脂質生成を調節する。

50

A C C 1 は、がん細胞において異常に活性化される代謝経路である (Rohrig and Schulze., Nat. Rev. Cancer 16:732-749 (2016)) デノボ脂質生成 (DNL) 中の律速ステップである、マロニル-CoA へのアセチル-CoA のカルボキシル化を触媒する (Beloribi-Djefalia et al., Oncogenesis 5:e189-10 (2016))。ここで、RROL 枯渇は、MYC または A C C 1 のいずれかの阻害と同様に、MM 細胞株および CD138+ MM 患者細胞の両方において、DNL の低下を指し示す (Zadra et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116:631-640 (2019))、脂質プールへの C¹⁴-放射性標識グルコースの組み入れを有意に低下させた (図 6 A)。ASO1 を使用して RROL を枯渇させ、小分子 10058-F4 を使用して MYC を阻害し、IPTG 誘導性 shRNA を使用して A C C 1 を枯渇させた。結果は、陰性対照 (それぞれ NC ASO、DM SO、および非誘導) についてのパーセンテージとして表現される。この阻害は、miR-17-92 の合成阻害剤を用いた MM 細胞のトランスフェクション後には観察されず (図 13 A)、それは、miR-17-92 抗 miR (それぞれ 25 nM) を用いた AMO1 のトランスフェクションの 48 時間後に脂質への C¹⁴-グルコースの組み入れを示す。結果は、非誘導細胞についてのパーセンテージとして表現される。NS は、スチューデント t 検定後の $p > 0.05$ を示す。MM 細胞における RROL 阻害後の、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) ベースの脂質プロファイリングは、DNL を介して産生されるいくつかの飽和 (SFA) および単不飽和 (MUFA) リン脂質種の枯渇を確認した (図 6 B)。ASO1 を用いた AMO1 および H929 の処理後の、飽和 (SFA) または単不飽和 (MUFA) アシル鎖を用いた、主な膜リン脂質クラス [ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルコリン (PC)、およびホスファチジルイノシトール (PI)] のモジュレーションを示す脂質プロファイリング解析が、図 6 B に示される。(Rysman et al., Cancer Res. 70:8117-26 (2010); Zaidi et al., Prog. Lipid Res. 52:585-9 (2013))。さらに、A C C 1 活性の主たる下流産物パルミチン酸 (PA) の付加は、MM 細胞における RROL 枯渇の抗増殖 (図 6 C、CCK-8 増殖アッセイ) およびアポトーシス誘発 (図 6 D) 効果を有意にレスキューし、図 6 E の提唱されるモデルにおいて例示されるように、MM において RROL の活性を促進するおよび脂質生成の RNA 調節因子の名前を正当化する、腫瘍における DNL の役割を裏付けた。図 6 D は、BSA (対照) または BSA-PA (20 μ M) のいずれかの補給を有する、表示される濃度の ASO1 に 6 日間曝露された AMO1 における アネキシン V / 7-AAD フローサイトメトリーアッセイを示す。

10

20

30

【0164】

[実施例 8]

RROL の治療用阻害剤は、インビトロおよびヒト MM の動物モデルにおけるインビボにおいて、強い抗腫瘍活性を発揮する。

RROL の治療潜在性を調べるためにおよび阻害剤を開発するために、80 種を上回る完全にホスホロチオエート化された (phosphorothioated) (PS)、2'-O-メトキシエチル (2'-MOE) 修飾された、脂質コンジュゲートされた ASO をスクリーニングした。これらの ASO を、RROL の RNase H 媒介性分解を誘発する (gapmeR) または RNase H 非依存的メカニズムを介して機能を発揮する (立体遮断薬) (Puttaraju et al., Nat. Med. 27:526-535 (2021)) それらの潜在性についてスクリーニングした (図 7 A および図 14 A ~ 図 14 C)。この手順は、18-mer トコフェロール (T) コンジュゲート gapmeR G2-15b-T (「G」) および 18-mer トコフェロール (T) コンジュゲート立体遮断薬 SB9-19-T (「SB」) をリーディング化合物として特定し、両方とも、MM 細胞株の大きなパネルならびに CD138+ 初代 MM 細胞において強力な抗増殖活性 (細胞成長阻害、CGI > 50%) をもたらし; 一方で、非悪性細胞株 (THLE-2、HK-2、HS-5、および 293T) および 3 人の健常ドナー由来の PBMC に対してはそのような抗増殖活性は示さなかった (CGI < 50%) (図 7 B)。図 7 B は、MM 細胞株 AMO1、ABZB、ACFZ

40

50

、H929、MM.1S、MM1.R、U266、LR7、R8226、KMS-11、KMS-12-BM、および2人のMM患者（MM-Pt）由来のCD138+細胞、4種の非悪性細胞株（THLE-2、HK-2、HS-5、および293T）、ならびに3人の健常ドナー由来のPMBCを示す。細胞生存率を、G2-15b*-TO（G）もしくはSB9-19-TO（SB）または対照としてのビヒクル（-）のいずれかを用いたトランスフェクションの48時間（または、MM-Ptに対しては24時間）後に測定した。ビヒクルをトランスフェクトされた細胞と比較して、細胞増殖を算出する。

【0165】

RROLを標的にする治療用ASOを開発するための多ステップスクリーニングの試験結果が、図14A～図14Cに示される。RROL上のASO接近可能な伸長を特定した、ステップ1の結果が図14Aに示され、合計32種のASOに対する「G」または「SB」立体配置にある16種の配列（>20-mer）を試験し；qRT-PCRによって査定されたAMO1細胞におけるKD活性に基づき、配列G2（21-mer）およびSB9（22-mer）を、さらなる検討に選択した。G2およびSB9設計を最適化した、ステップ2の結果が図14Bに示され、これらの配列を微調整して、G2に対する20-mer（n=8）および18-mer（n=5）誘導体ASO、ならびにSB9に対する22-mer（7）、20-mer（n=8）、および18-mer（n=5）誘導体ASOを獲得し；qRT-PCRによって査定されたAMO1細胞におけるKD活性に基づいた。18-mer誘導体配列G2-15およびSB9-19を、さらなる検討に選択した。ステップ3の結果が図14Cに示され、それは、パルミチン酸（P）またはコレステロール（C）またはトコフェロール（T）とコンジュゲートした2種の選択されたステップ2分子についての試験を示す。qRT-PCRによって査定されたAMO1細胞におけるKD活性に基づく。TOコンジュゲート分子をリーディング化合物として選択した。10-mer「コア」DNAギャップを8-mer「コア」DNAギャップで置き換えることによって、G2-15-T ASOをさらに最適化した（G2-15b-T）。

【0166】

免疫欠陥のあるNOD SCIDマウスにおける皮下AMO1異種移植モデルを使用して、両化合物のインビボ抗腫瘍活性を査定した。ここで、図7Cに例示されるように、G2-15b*-TO（G；n=5；腫瘍成長阻害、TGI=76%）もしくはSB9-19-TO（SB；n=5；TGI=69%）またはビヒクル（NK；n=5）のいずれかを用いた処理サイクルの21日後に、腫瘍成長の有意な低下が観察された。この処理後にマウスから取り出された腫瘍の解析は、RROL（図7D）およびその標的（図7E）、標的BIM（BCL2L11としても公知）（図7J）の発現の低下、ならびにDNL産物パルミチン酸の代用物であるトリパルミチン（Falchook et al., *EClinicalMedicine* 34:100797-11（2021））のレベルの低下（図7F）を確認し；インビボにおける腫瘍細胞によるG2-15b-TおよびSB9-19-Tの効率的な取り込みを実証した。さらに、マウスにおいて目立った毒性は観察されなかった。図7Dおよび図7Eにおけるデータは、G2-15b*-TO（G；n=1）もしくはSB9-19-TO（SB；n=1）または対照としてのビヒクル（NC；n=1）で処理された動物から取り出されたサンプルを示す。生Ct値をACTB mRNAに対して正規化し、比較閾値超過法を使用して算出された $\Delta\Delta Ct$ 値をとして表現した。NCにおける発現レベルを、内部参照として設定した。

【0167】

MOLP8-luc+ MM細胞の腫瘍成長を生物発光イメージング（BLI）測定によって査定する、びまん性骨髄腫の侵襲性モデルにおいて、G2-15b-TおよびSB9-19-Tの有意な抗MM活性が確認された。このモデルにおいて、腫瘍成長は、G2-15b*-TO（G；n=8；TGI=84%）もしくはSB9-19-TO（SB；n=6；TGI=52%）またはビヒクル（NC；n=11）のいずれかを用いた処理サイクルの後に有意にアンタゴナイズされた。G2-15b*-TOを用いた処理は、8匹のマウスのうちの2匹（25%）において腫瘍クリアランスをもたらした（図7G）。図

7 Gの左にある散布図は、生物発光強度の解析を示す。黒色のバーは中央値を示す。生物発光を、処理サイクルの終了時（15日目）に測定した。図7 Gの右には、画像取得が示される。腫瘍細胞のI.V.注射の失敗に起因して調査から外されたマウスは、黒色の長方形によって覆われている。重要なことに、両阻害剤は、動物生存を有意に引き延ばした（図7 H）。

【0168】

最後に、進行期患者から獲得されたCD138+ MM細胞の尾静脈注射による臨床的に関連するPDX-NSGマウスモデル（PDX-NSG）を使用した。このモデルでは、ヒトκ軽鎖を代用物として使用して、腫瘍成長を血清サンプルにおいてモニターした。顕著には、G2-15b-T（G；n=2）を用いた処理サイクル後の腫瘍成長の退縮が観察され（図7 I）、効果はボルテゾミブ（BZT；n=2、陽性対照）に匹敵し、ビヒクル対照はNCとして表される（n=3）。黒色の矢印は処理を示す。

【0169】

上の現実の実施例8は、lncRNA RROLがMMにおける主要な依存関係であることを実証する。RROL宿主遺伝子であるMIR17HGは、推進因子の役割を有して、ヒトがんにおいてしばしば増幅されかつ／または過剰発現される。作動の理論によって拘束されることを意図することなく、RROLは、クロマチン占有、ならびにMYCおよびWDR82等の転写因子およびエピジェネティックモジュレーターとの相互作用による、遺伝子発現の調節因子である。

【0170】

データは、RROL-MYC-WDR82複合体が、律速酵素ACC1を介してDNL経路を活性化することによって、腫瘍細胞代謝に影響を与えることも示す。この同化経路は、正常な成人において肝臓および脂肪組織に主として制限されるが、まだ十分には記載されていないメカニズムを介してがん細胞において再活性化される（Beloribi-Djefailia et al., *Oncogenesis* 5:e189-10 (2016)；Rohrig and Schulze., *Nat Rev Cancer* 16:732-749 (2016))。MYCは、ACC1および他の遺伝子を介してDNLを活性化することによって、腫瘍細胞代謝のリプログラミングに関わっている（Stine et al., *Cancer Discov* 5:1024-39 (2015))。次に、DNLは、ACC1の薬理的阻害の影響を受けやすいMYC推進性がんの発生および進行の必須の経路として浮上している（Gouw et al., *Cell Metab* 30:556-572 (2019))。腫瘍発生におけるACC1およびDNLの役割は、モノクローナル免疫グロブリンの絶え間ない産生と連動した悪性細胞成長によって課される高い生体エネルギーおよび生合成需要を満たすように、腫瘍細胞がそれらの代謝経路を適応させる必要があるMMにおいて特に関連があると思われる（El Arfani et al., *Int J Mol Sci* 19:1200-19 (2018)；Masarwi et al., *JBMR Plus* 3:e10173-10 (2019))。

【0171】

インビボの現実の実施例は、異なる作用のメカニズム（すなわち、RNase H依存性または非依存性）を介してRROLを標的にする本発明のASOの2種を利用した。RNA医薬の近年の進歩とともに（Crooke et al., *Cell Metab* 27:714-739 (2018)；Damase et al., *Front Bioeng Biotechnol* 9:628137-24 (2021)；Sullenger and Nair., *Science* 352:1417-20 (2016))、MM療法においてを含めて（Mondala et al., *Cell Stem Cell* 28:623-636 (2021)；Morelli et al., *Blood* 132:1050-1063 (2018)；（Mondala et al., 2021；Morelli et al., 2018）、疾患推進遺伝子を治療的にアンタゴナイズするためのASOの使用が、ますます可能になりつつある（Dhuri et al., *J Clin Med* 9:2004-24 (2020)；Puttaraju et al., *Nat Med* 27:526-535 (2021))。

【0172】

結論として、この現実の実施例は、脂質代謝および最終的には腫瘍細胞成長に影響を与える、MYC-WDR82タンパク質複合体形成およびそのクロマチン結合を促すlncRNAとしてのRROLを立証する。

【0173】

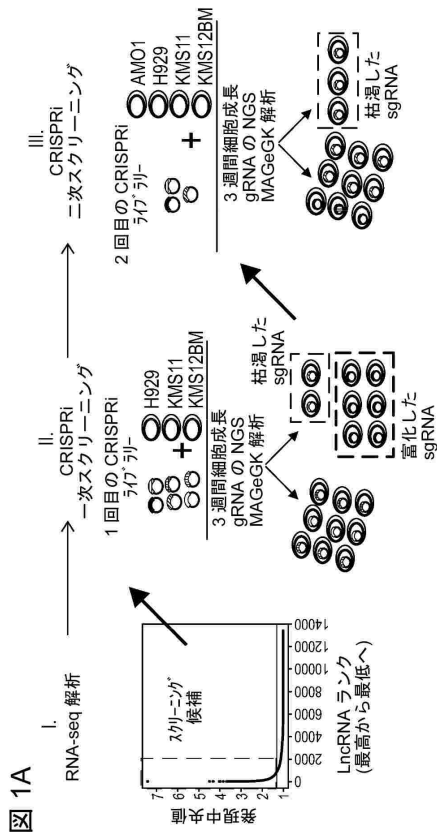
すべての特許公報および非特許公報は、本開示が関連する技術分野における当業者のレベルを指し示す。これらすべての刊行物（参照されるその任意の具体的部分を含む）は、あたかもそれぞれ個々の刊行物が、参照により組み入れられることを具体的にかつ個々に示されるのと同じ程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【0174】

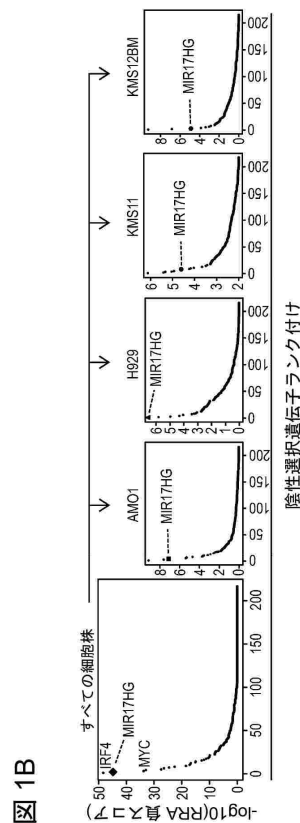
本明細書における本開示は、特定の実施形態を参照して記載されているものの、これらの実施形態は、本開示の原理および適用の単なる例示にすぎないことが理解されるべきである。それゆえ、添付の特許請求の範囲によって規定される本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、数多くの修正が例示的な実施形態に行われ得ること、および他の配置が考案され得ることが理解されるべきである。

【図面】

【図1-1】



【図1-2】



10

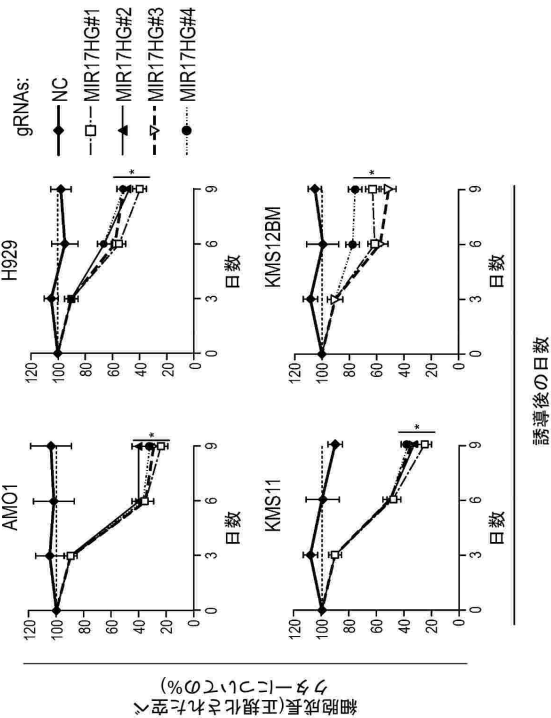
20

30

40

50

【図 1 - 3】



【図 1 - 4】

図 1D

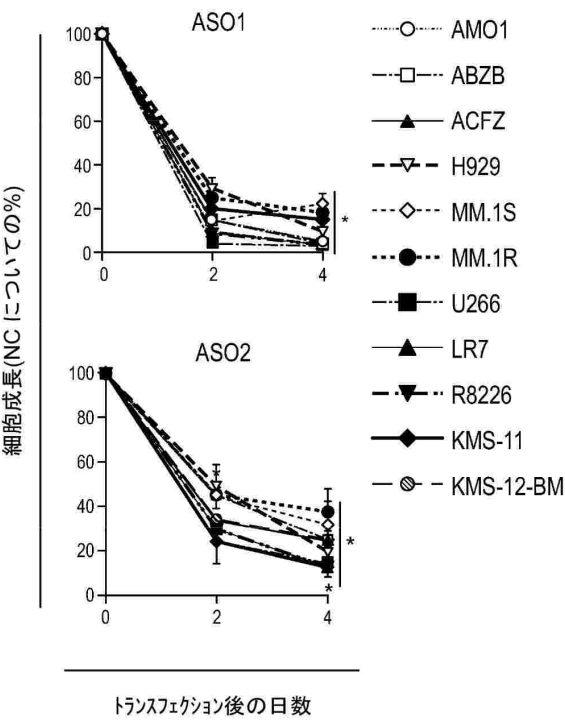
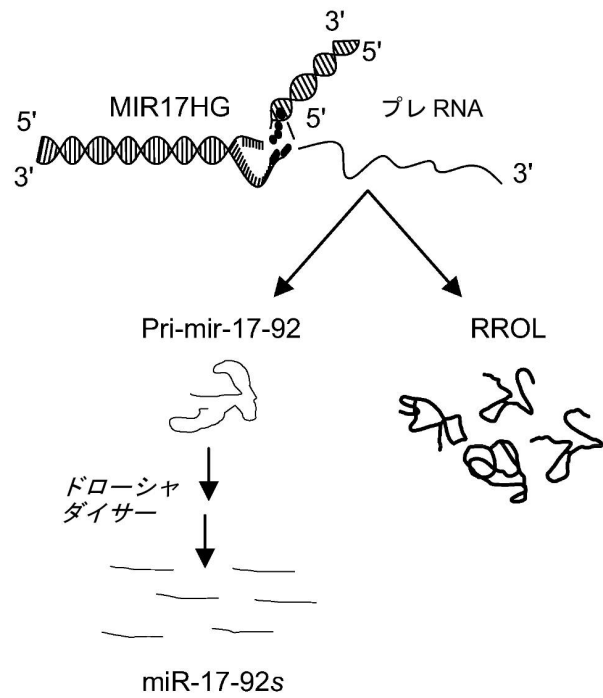


図 1C

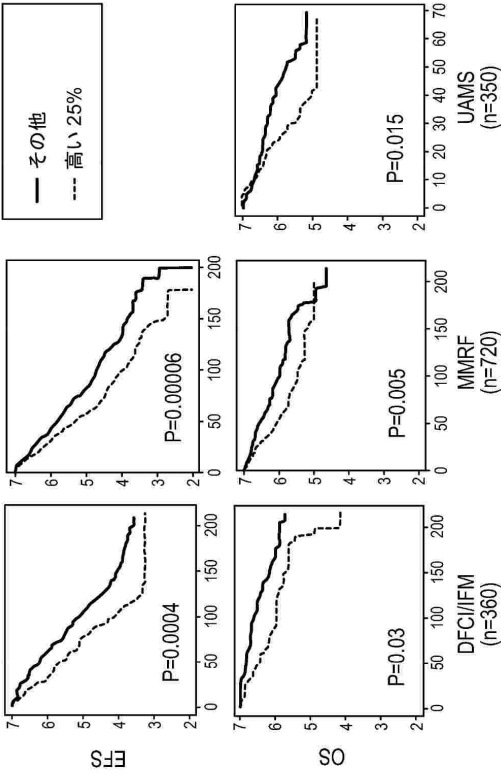
【図 2 - 1】

図 2A



【図 2 - 2】

図 2B



10

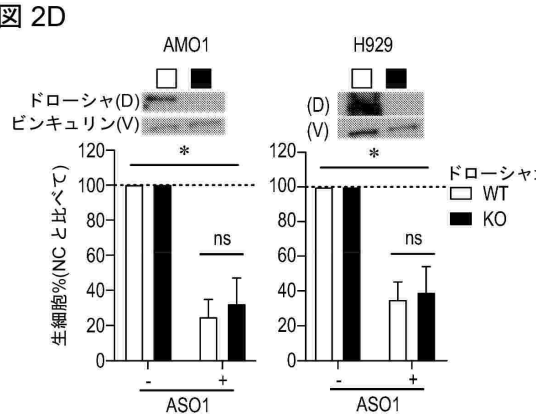
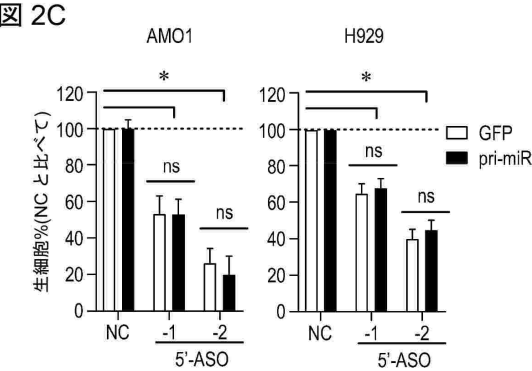
20

30

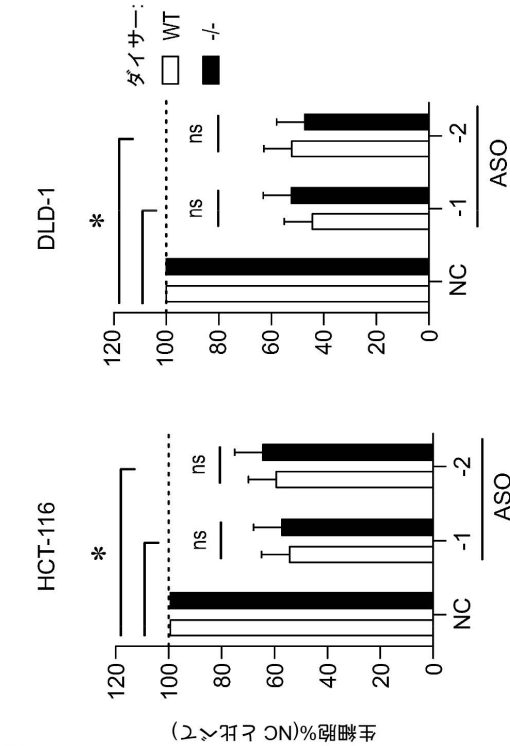
40

50

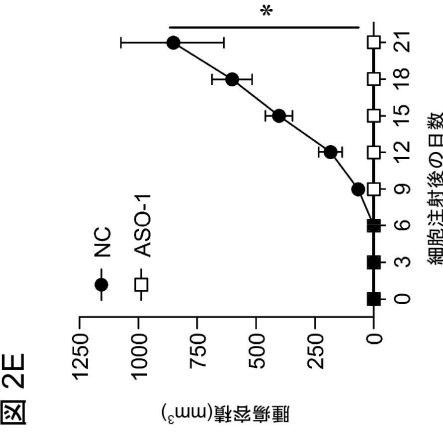
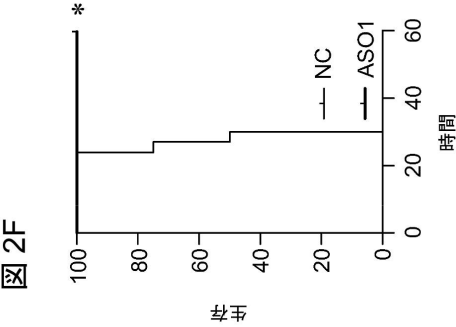
【図 2 - 3】



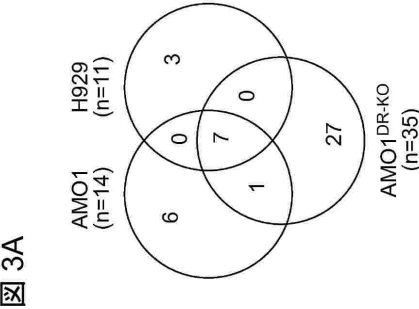
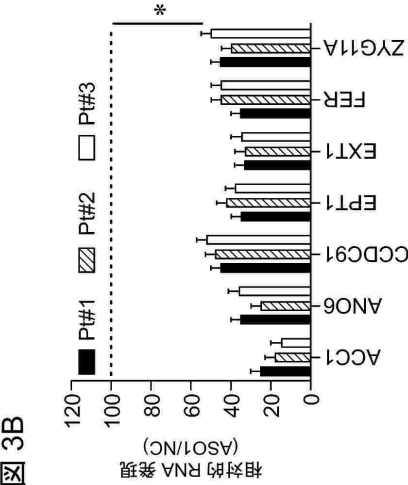
【図 2 - 5】



【図 2 - 4】



【図 3 - 1】



10

20

30

40

50

【図 3 - 2】

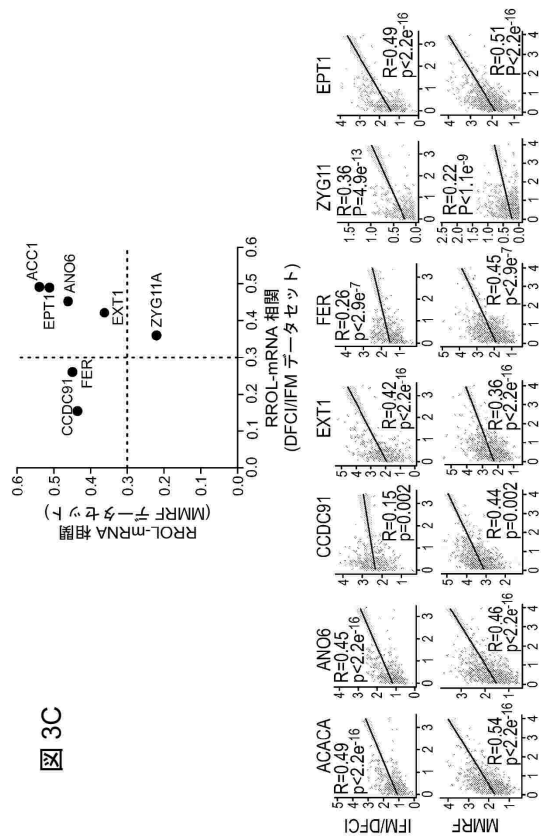


図 3C

【図 3 - 4】

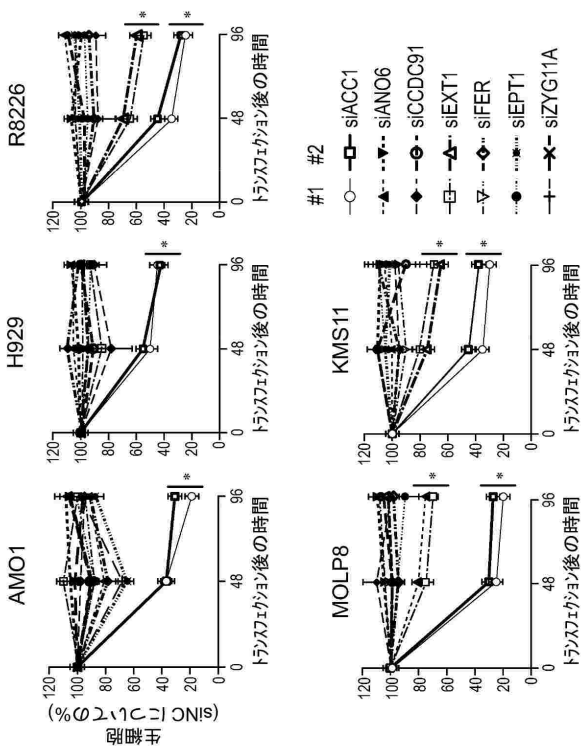
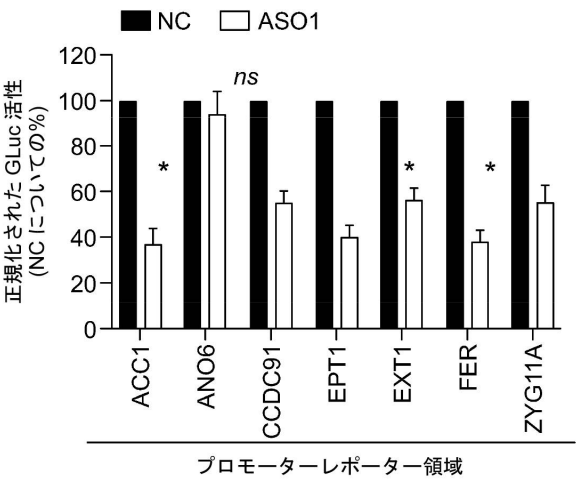


図 3E

【図 3 - 3】

図 3D



【図 3 - 5】

図 3F

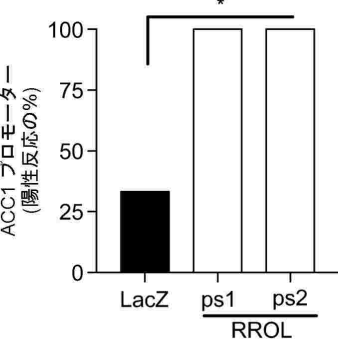
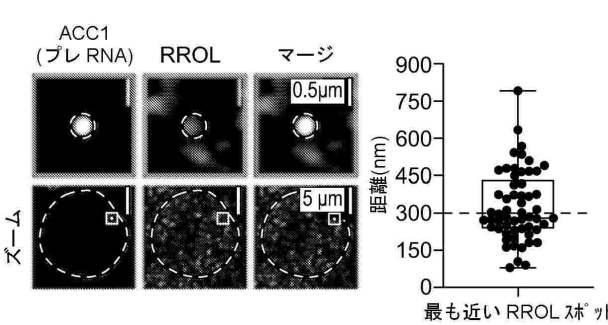


図 3G



10

20

30

40

50

【図 5 - 2】

図 5E

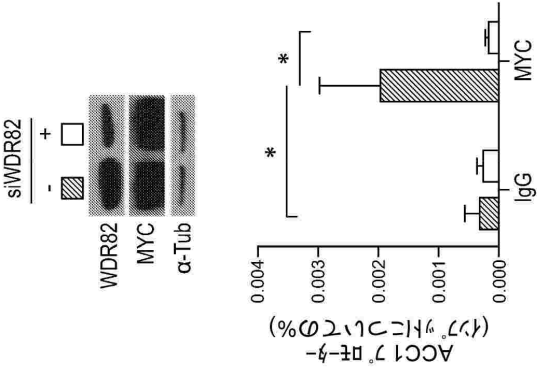
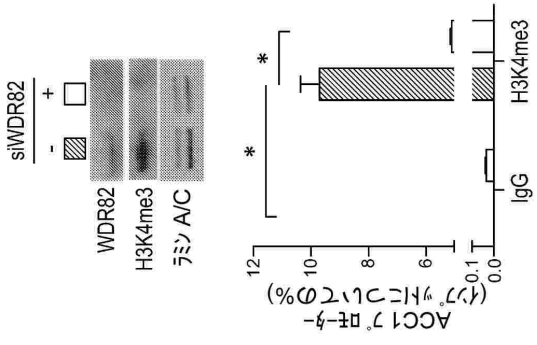
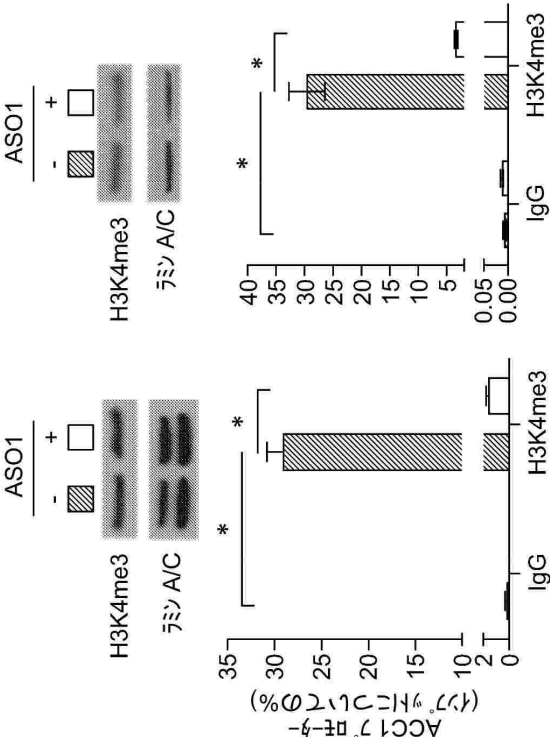


図 5D



【図 5 - 4】

図 5H



【図 5 - 3】

図 5G

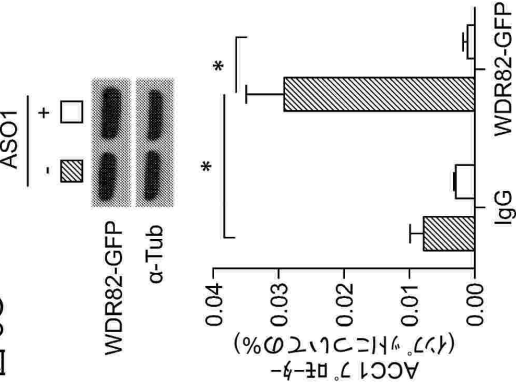
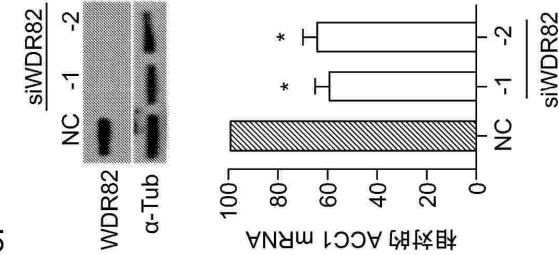
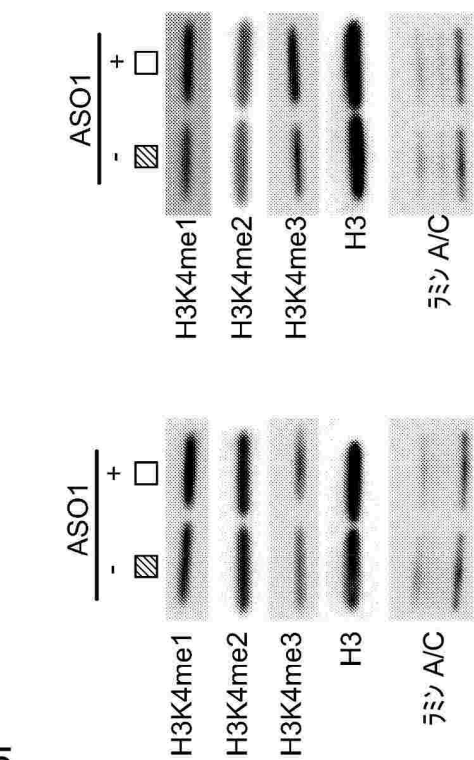


図 5F



【図 5 - 5】

図 5I



10

20

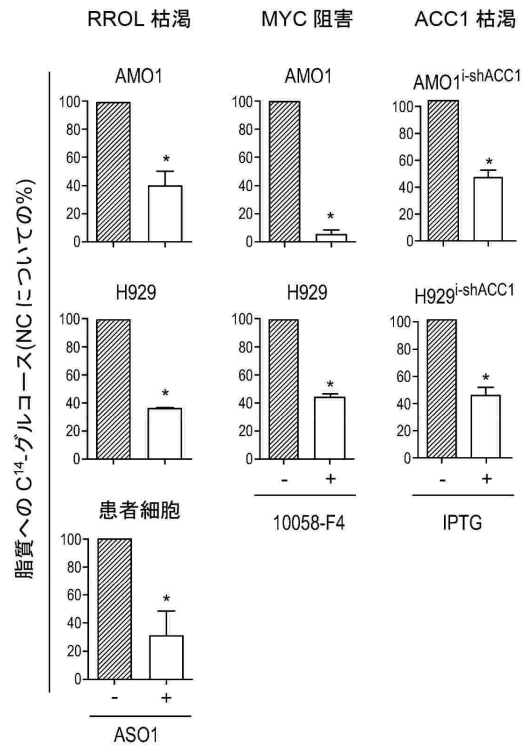
30

40

50

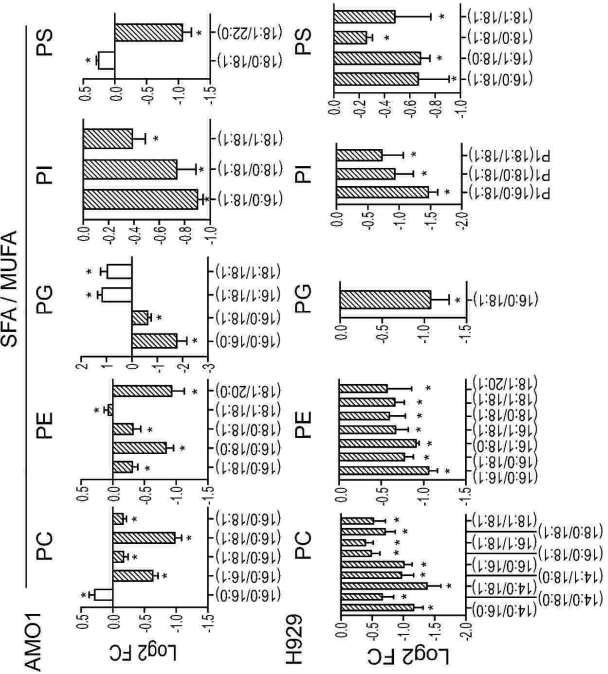
【図 6 - 1】

図 6A



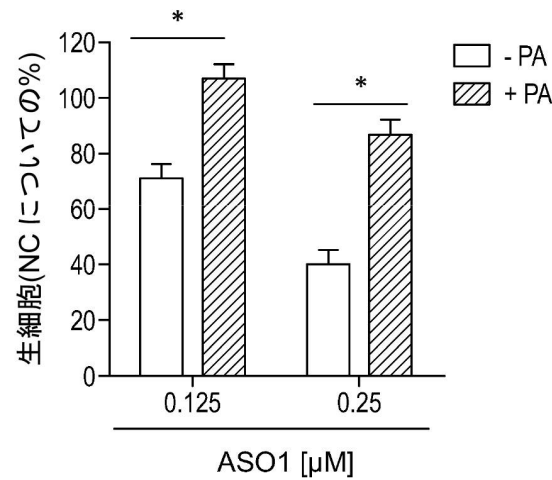
【図 6 - 2】

図 6B



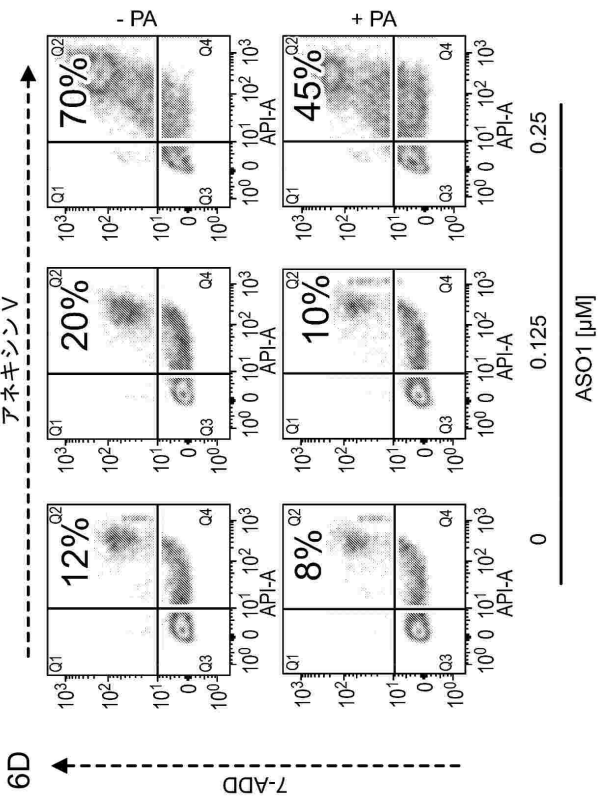
【図 6 - 3】

図 6C



【図 6 - 4】

図 6D



10

20

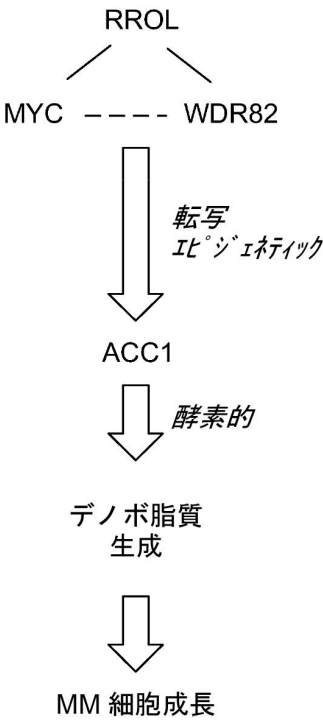
30

40

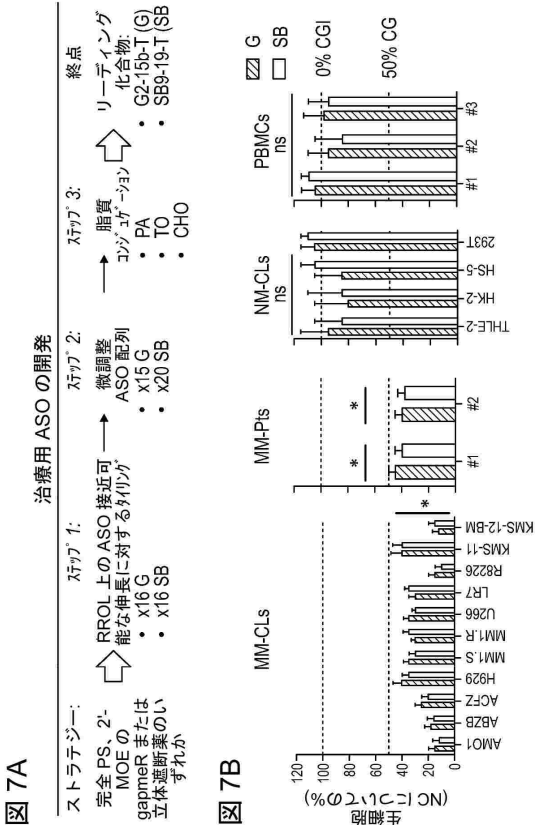
50

【図 6 - 5】

図 6E



【図 7 - 1】



【図 7 - 2】

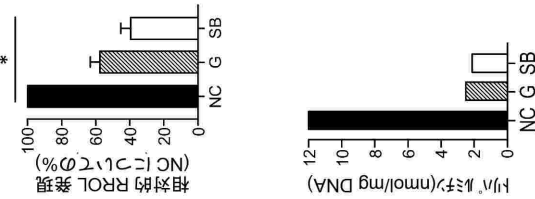


図 7D

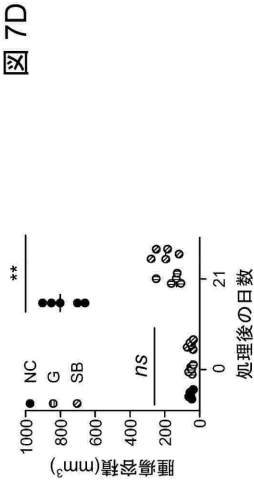
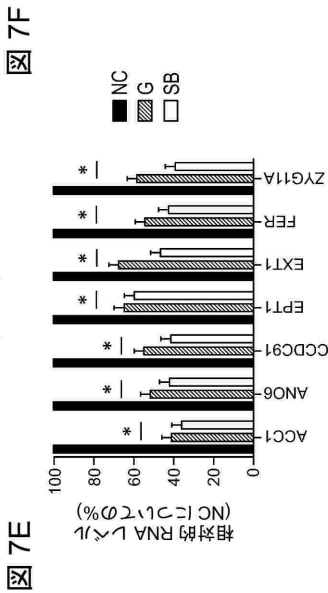
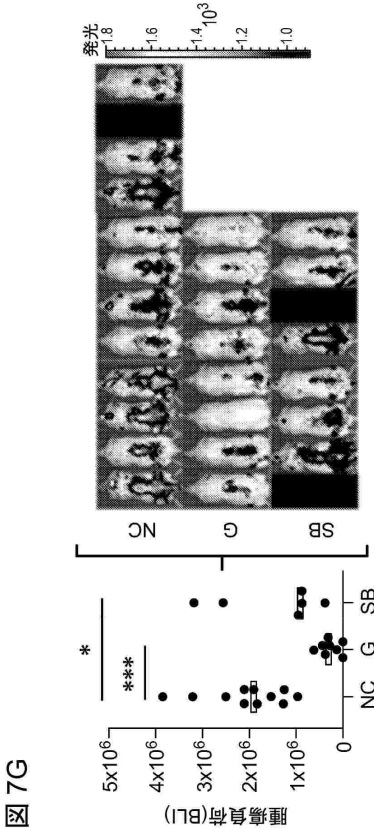


図 7F



【図 7 - 3】



10

20

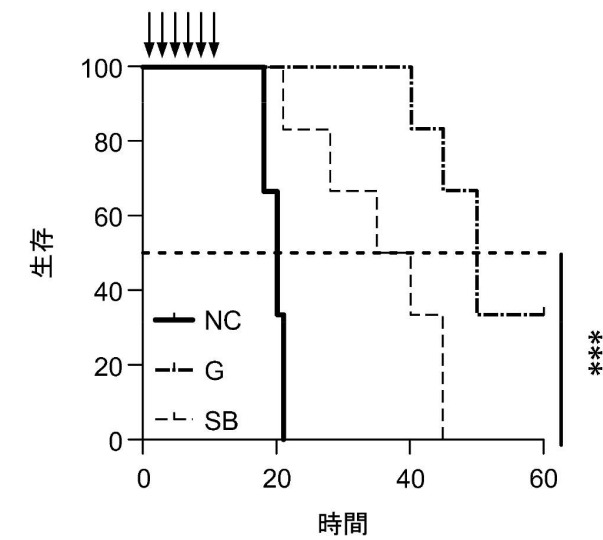
30

40

50

【図 7 - 4】

図 7H



【図 7 - 5】

図 7I

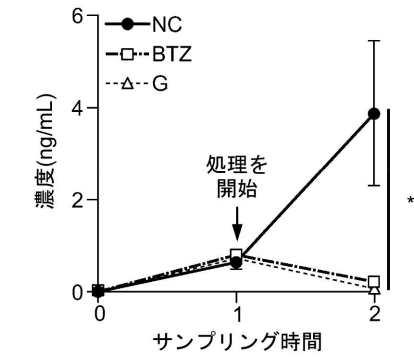
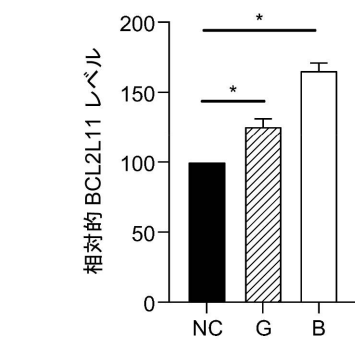


図 7J



【図 8】

図 8C

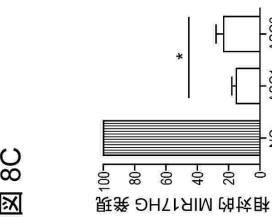


図 8B

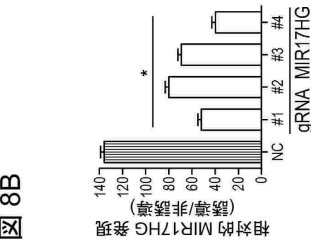
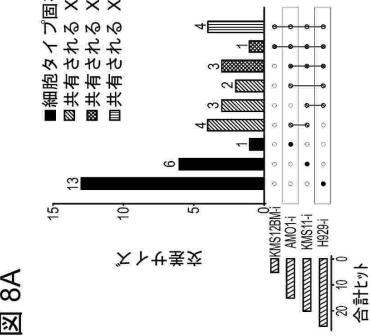


図 8A



【図 9 - 1】

図 9B

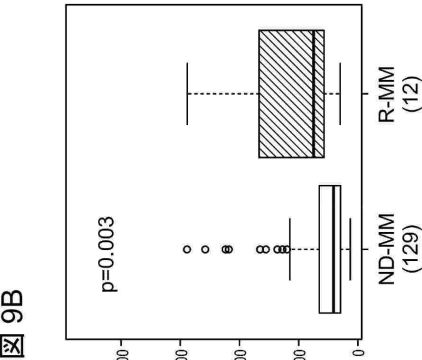
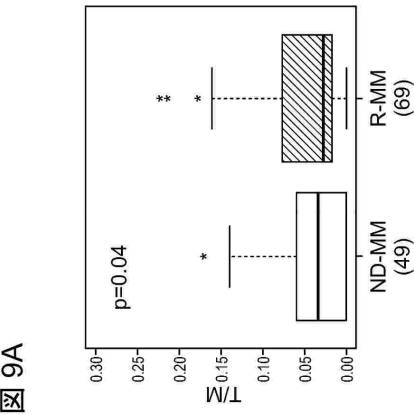


図 9A



10

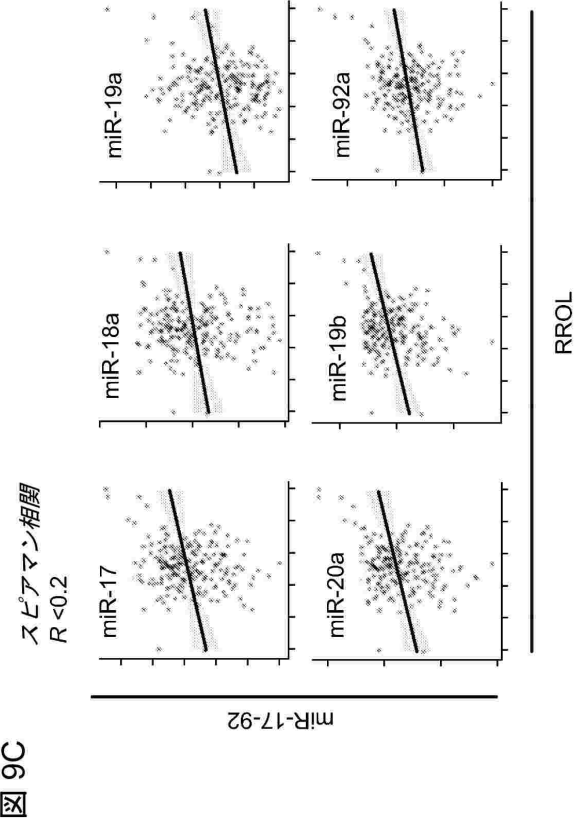
20

30

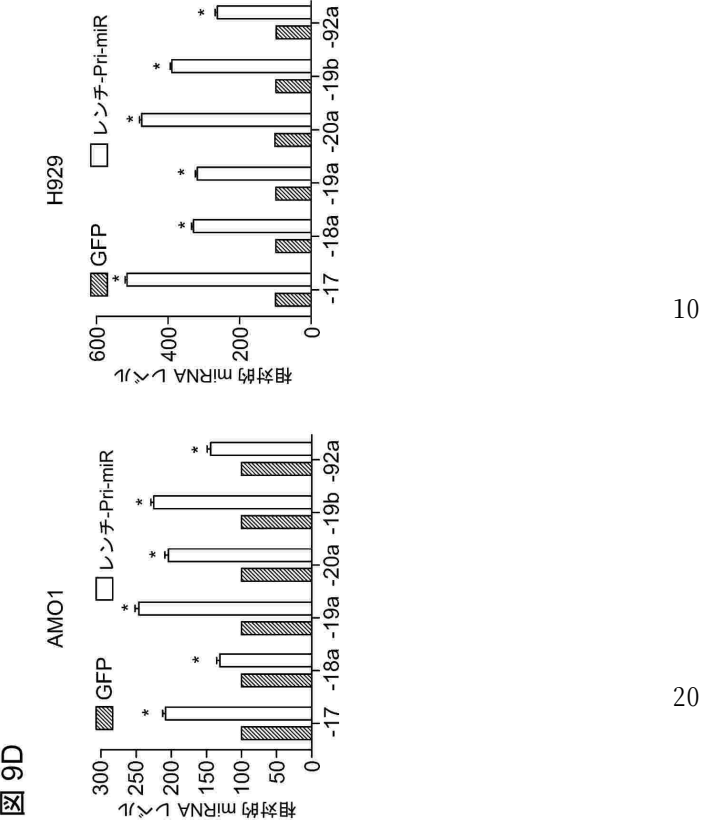
40

50

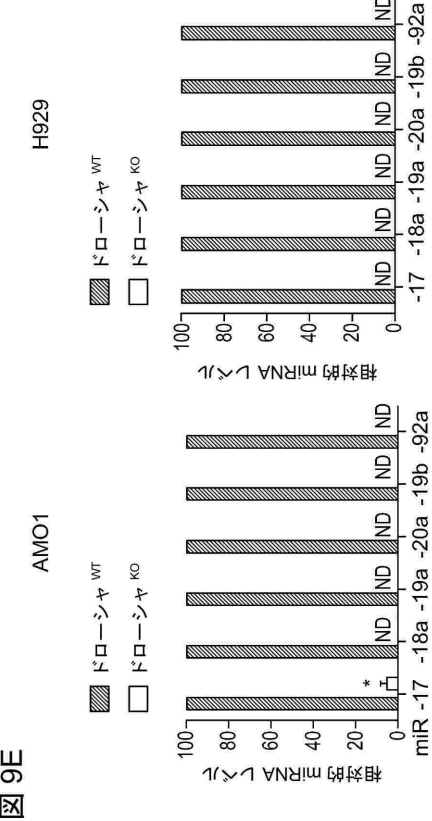
【図 9 - 2】



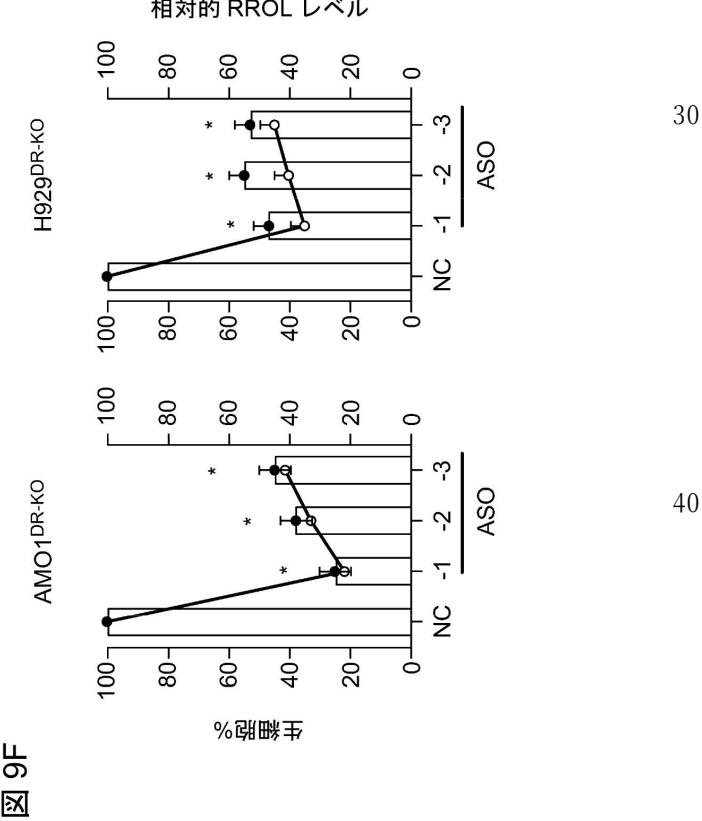
【図 9 - 3】



【図 9 - 4】



【図 9 - 5】



10

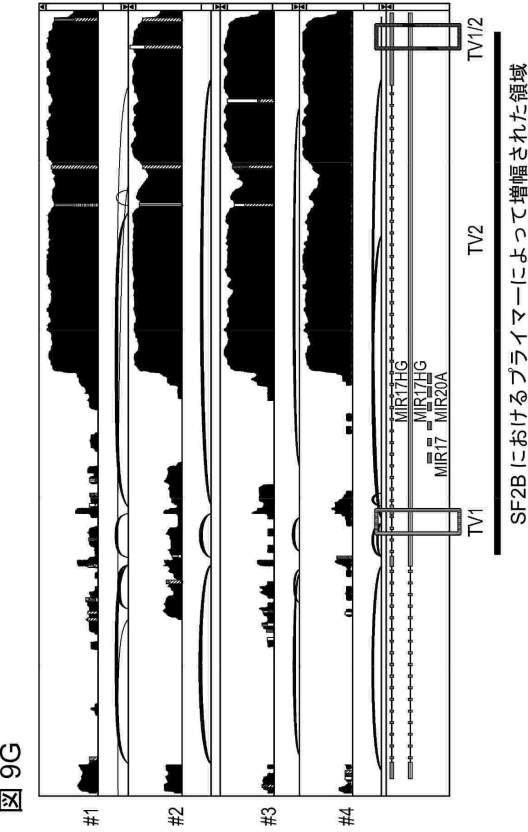
20

30

40

50

【図 9 - 6】



【図 9 - 7】

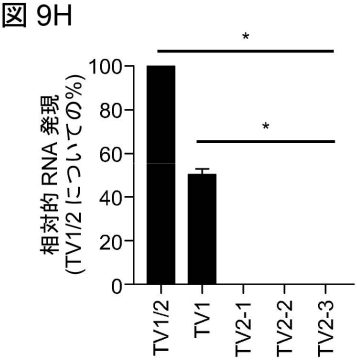
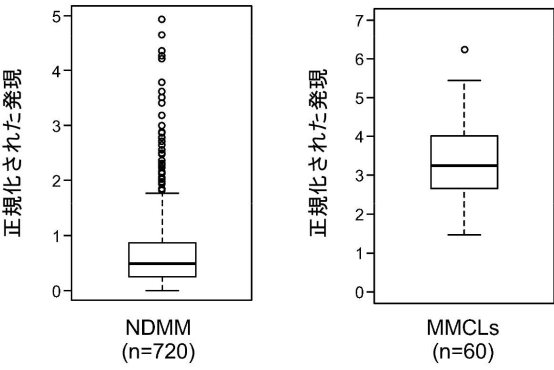


図 9I



【図 9 - 8】

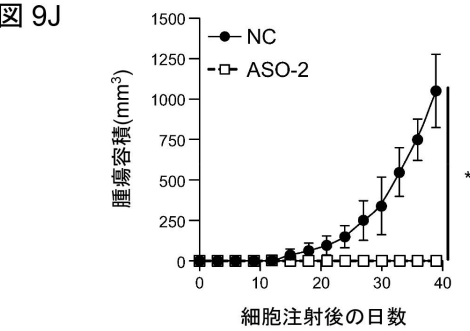
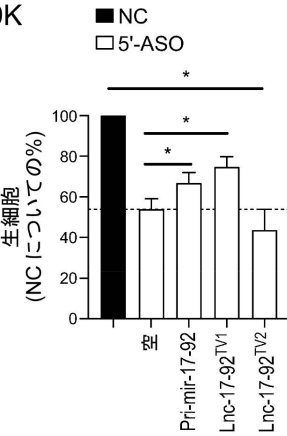
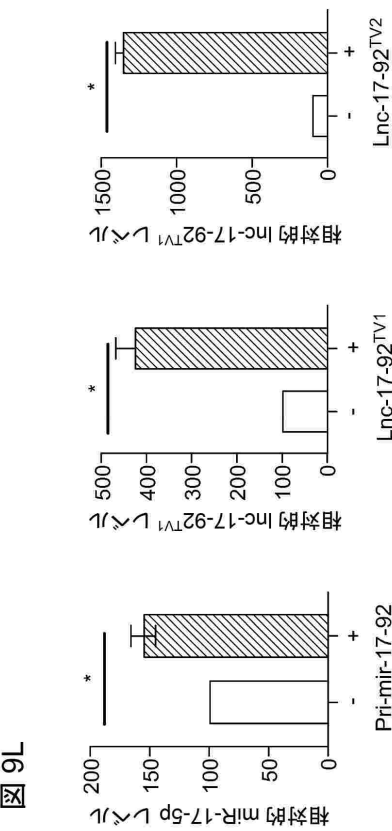


図 9K



【図 9 - 9】



10

20

30

40

50

【図 10-1】

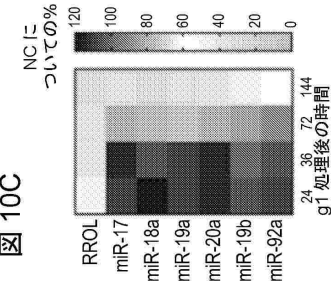


図 10B

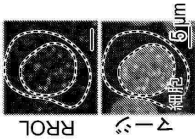
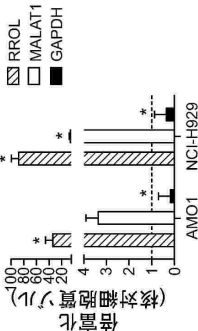


図 10A



【図 10-3】

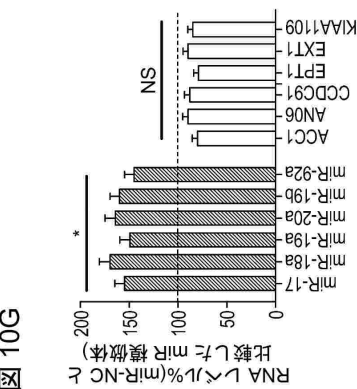
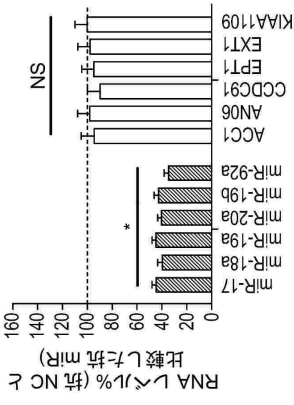


図 10F



【図 10-2】

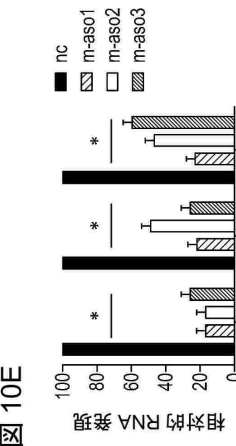


図 10E

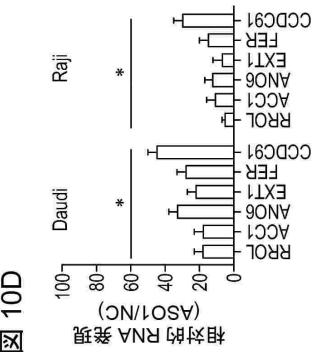


図 10D

【図 10-4】

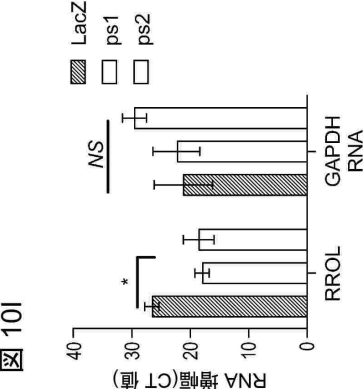


図 10I

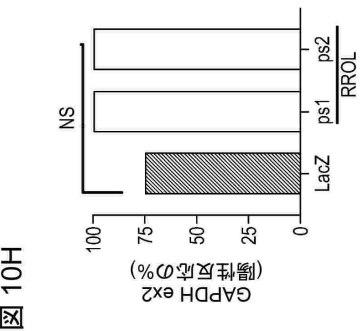


図 10H

10

20

30

40

50

【図 1 1 - 1】

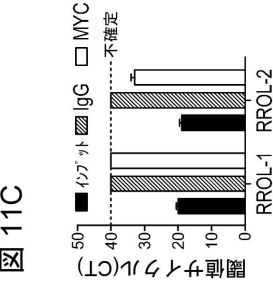


図 11B

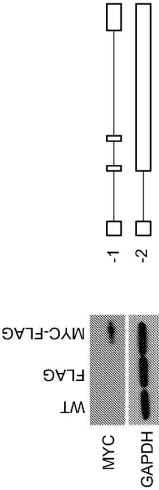
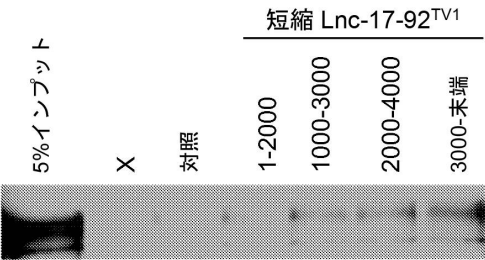


図 11A

【図 1 1 - 3】

図 11G



【図 1 1 - 2】

図 11D

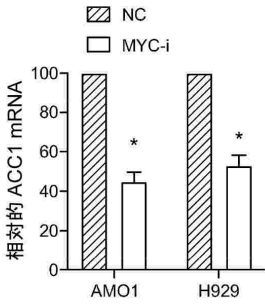


図 11E

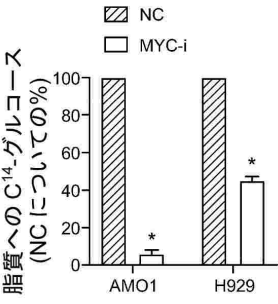
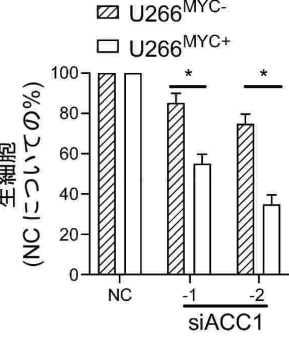


図 11F



【図 1 2 - 1】

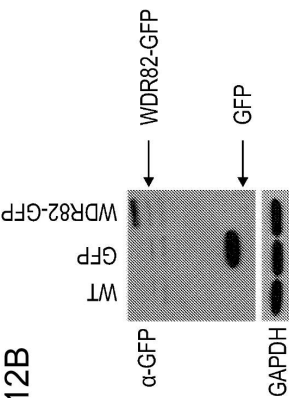


図 12B

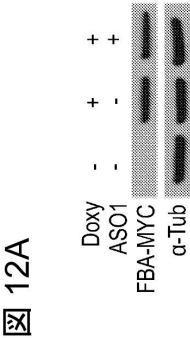


図 12A

10

20

30

40

50

【図 1 2 - 2】

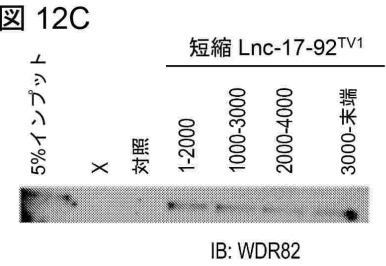
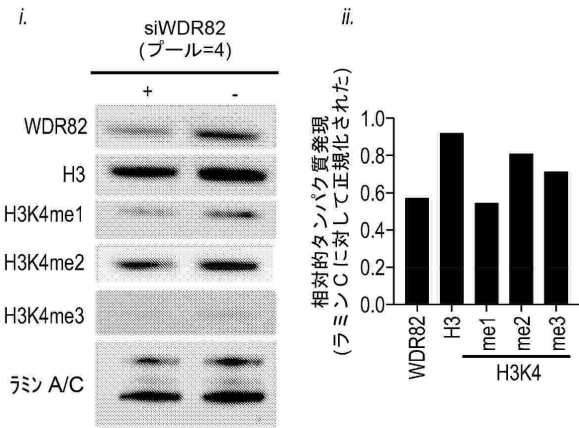
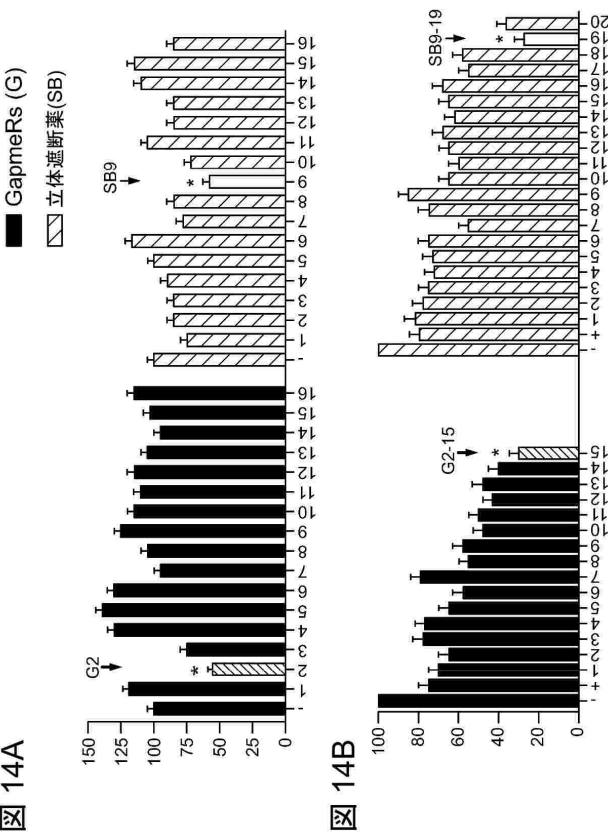


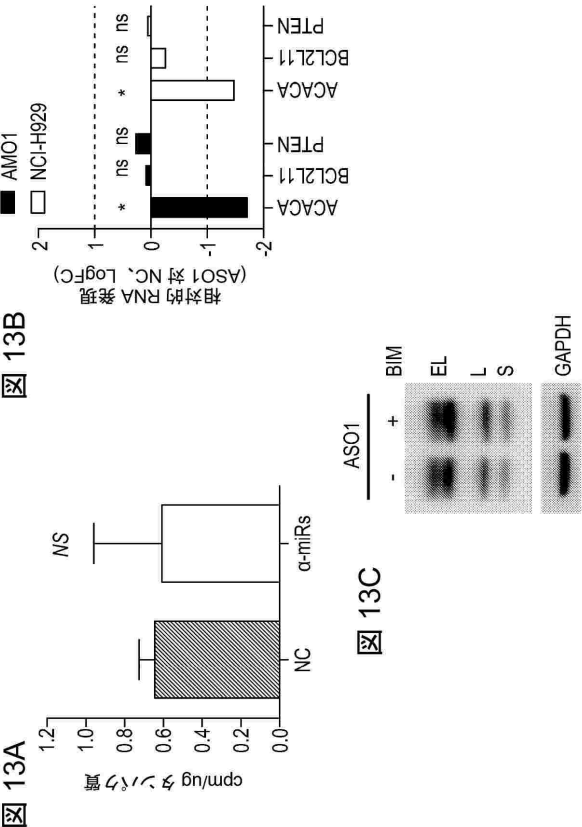
図 12D



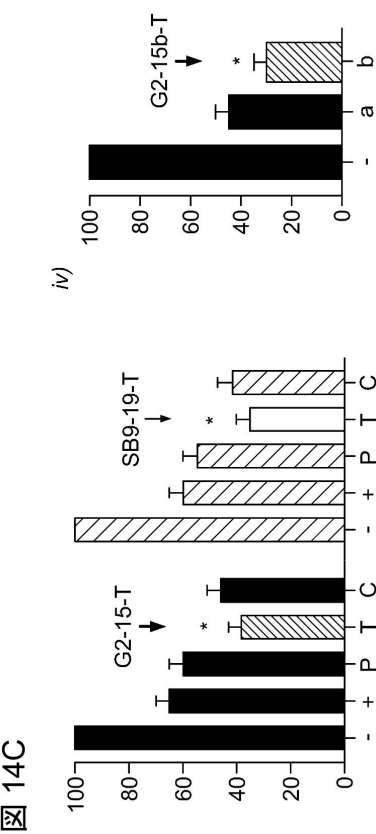
【図 1 4 - 1】



【図 1 3】



【図 1 4 - 2】



10

20

30

40

50

【配列表】

2024543952000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/80563

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N 15/113 (2023.01) IPC - ADD. A61K 48/00, A61P 35/00 (2023.01) INV. A61K 31/7088 CPC - ADD. C12N 2310/113, C12N 2310/141, C12Q 2600/178, A61P 35/02, C12N 15/63 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MORELLI et al., Therapeutic vulnerability of multiple myeloma to MIR17PTI, a first-in-class inhibitor of pri-miR-17-92. Blood, 06 September 2018, Vol. 132, No. 10, pages 1050-1063; abstract; Table 1; Figure 1; Figure 1 Legend	1-3, 6-11, 13-16, 18, 22 4-5
Y	US 10,533,177 B1 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 14 January 2020 (14.01.2020); abstract; col 2, ln 23-28, Table 3; claim 2, SEQ ID NO: 387	1-3, 6-11, 13-16, 18, 22
Y	US 2020/0239890 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 30 July 2020 (30.07.2020); abstract; para [0072], [0080], [0132], [0135], [0221]	10-11, 18, 22
A	WO 2007/013586 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK. et al.) 01 February 2007 (01.02.2007); abstract	5
A	US 2018/0051284 A1 (TASSONE et al.) 22 February 2018 (22.02.2018); abstract	4
X, P	MORELLI et al., A MIR17HG-derived long noncoding RNA provides an essential chromatin scaffold for protein interaction and myeloma growth. Blood, 26 January 2023, Vol. 141, No. 4, pages 391-405; entire document	1-11, 13-16, 18, 22
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March 2023		Date of mailing of the international search report MAY 15 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/80563

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/80563

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—See Supplemental Box —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-11, 13-16, 18 and 22, limited to SEQ ID NO: 2

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/80563

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+: Claims 1-22 and 40 directed to a composition comprising a 15 to 30 nucleotide antisense oligonucleotide (ASO) that binds MLR-17-92a-1 Cluster Host Gene (MIR17HG) pre-RNA (the pre-RNA consisting of SEQ ID NO: 1) under physiological conditions. The anti-MIR17HG ASO composition will be searched to the extent that the first named invention is a 20 nt single stranded ASO (claim 5) that comprises SEQ ID NO: 2 (AGTGGCGCGAAGGCGCAGGT).

This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-11, 13-16, 18 and 22 limited to said anti-MIR17HG ASO encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that anti-MIR17HG ASO encompasses SEQ ID NO: 2. Additional anti-MIR17HG ASOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected anti-MIR17HG ASOs. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a single stranded DNA ASO that comprises the SEQ ID NO: 6 (TACTTGCTTGGCTT, 15 nt)(claims 1-6, 8-11, 13-16, 18-20 and 22).

Group II: Claims 23-39, drawn to a method of treating a having a disease in which aberrant expression and function of MIR17HG pre-RNA plays a role, comprising: administering to a subject in need thereof a pharmaceutical composition an antisense oligonucleotide (ASO) that binds MLR-17-92a-1 Cluster Host Gene (MIR17HG) pre-RNA under physiological conditions, where the ASO is 15 to about 30 nucleotides in length and the pre-RNA has the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1.

The inventions listed as Groups I+, and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

No technical features are shared between the nucleotide sequences of the ASO's of Group I+ and, accordingly, Group I+ lacks unity a priori.

Additionally, even if the inventions listed as Group I+ were considered to share technical features, these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

Group I+ requires an isolated anti-MIR17HG ASO composition, not required by Group II.

Group II requires a method of treating a having a disease in which aberrant expression and function of MIR17HG pre-RNA plays a role, not required by Group I+.

Common Technical Features

The inventions of Groups I+ and II share the technical feature of a 15 to 30 nucleotide antisense oligonucleotide (ASO) that binds MLR-17-92a-1 Cluster Host Gene (MIR17HG) pre-RNA under physiological conditions.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by the publication entitled "Therapeutic vulnerability of multiple myeloma to MIR17PTI, a first-in-class inhibitor of pri-miR-17-92" by Morelli, E et al. (hereinafter "Morelli"). (Blood, 06 September 2018, Vol. 132, No. 10, pages 1050-1063).

Morelli discloses an antisense oligonucleotide (ASO) that binds MIR-17-92a-1 Cluster Host Gene (MIR17HG) pre-RNA under physiological conditions (abstract - "we developed novel LNA gapmeR antisense oligonucleotides (ASOs) to induce ribonuclease H-mediated degradation of MIR17HG primary transcripts and consequently prevent biogenesis of miR-17-92 miRNAs"; Figure 1; Figure 1 Legend - "Development of MIR17PTI...MIR17HG-PT...pri-miR-17-92...92a1"), where the ASO is 15 to about 30 nucleotides in length (Table 1 illustrates ASOs with a length of 14-16 nucleotides") and the pre-RNA has the nucleic acid sequence (pg 1058, col 2, para 2 - "It must be noted that MIR17PTI also induces the down-regulation of lncRNA MIR17HG-201/-202/-203, pre-miR-17-92 (pre-miR-17-18a/-19a/-20a/-19b/-92a), and miR-17-92 complementary strands (miR-17-3p/miR-18a-3p/miR-19a-5p/miR-20a-3p/miR-19b-5p/miR-92a-5p) that are potentially endowed with their own functions and can contribute to MIR17PTI anticancer activity").

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the inventions.

Groups I+ and II therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/341 (2006.01)	A 6 1 K 31/341	
A 6 1 K 31/69 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/69	
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	
A 6 1 K 38/07 (2006.01)	A 6 1 K 31/198	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/07	
A 6 1 K 31/4439(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 K 33/243 (2019.01)	A 6 1 K 31/4439	
A 6 1 K 31/7068(2006.01)	A 6 1 K 33/243	
	A 6 1 K 31/7068	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,
MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 9 4 , ニーダム, ブース ストリート 7 7

(72)発明者 モレリ, ユージニオ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 2 1 5 , ボストン, ブルックライン アベニュー 1 5 0

(72)発明者 グリャズノフ, セルゲイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 2 1 5 , ボストン, ブルックライン アベニュー 4 5
0 , デイナーファーバー キャンサー インスティテュート, インコーポレイテッド内

F ターム (参考)	4C084	AA02 AA19 BA01 BA08 BA16 BA23 DC02 NA05 NA14 ZA751 ZB261 ZC202 ZC751
	4C086	AA01 AA02 BA03 BC37 DA10 DA43 EA16 EA17 GA07 GA08 HA12 HA24 HA26 HA28 MA01 MA04 NA05 NA14 ZA75 ZB26 ZC20 ZC75
	4C206	AA01 AA02 FA53 KA01 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZC75