



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201932123 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：107142677

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 29 日

(51)Int. Cl. : A61K31/713 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2017/11/29 日本

2017-229046

(71)申請人：國立大學法人東京醫科齒科大學(日本) NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY (JP)

日本

(72)發明人：稻澤讓治 INAZAWA, JOHJI (JP)；玄泰行 GEN, YASUYUKI (KR)；村松智輝
MURAMATSU, TOMOKI (JP)；外內江梨奈 TONOUCI, ERINA (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：10 共 73 頁

(54)名稱

包含微小 RNA 及其衍生物作為活性成分之藥物組成物

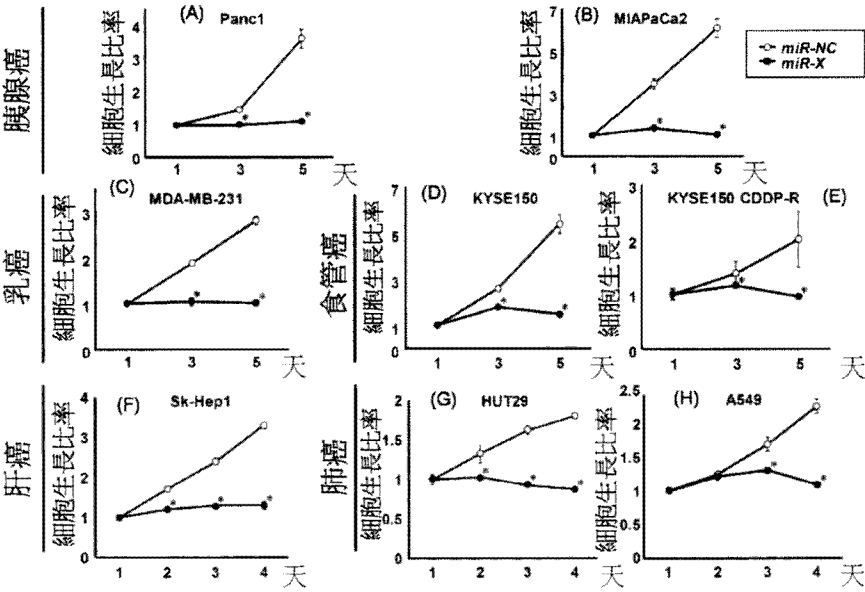
PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING MICRORNA AND DERIVATIVES THEREOF
AS AN ACTIVE INGREDIENT

(57)摘要

本發明提供一種藥物組成物，其基於以癌與 BRD4 的關係為出發點的新概念，用於醫治腫瘤。本發明的藥物組成物包含具有序列編號 1、序列編號 2、序列編號 4 或序列編號 5 所表示的鹼基序列的多核苷酸，用於醫治腫瘤。

The present invention provides a pharmaceutical composition which is based on a novel concept starting from the relationship between cancer and BRD4, for use in a treatment of tumor. The pharmaceutical composition comprises a polynucleotide having a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5, and is used for treatment of tumor.

指定代表圖：



【第1-5圖】

【發明說明書】

【中文發明名稱】 包含微小RNA及其衍生物作為活性成分之藥物組成物

【英文發明名稱】 PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING
MICRORNA AND DERIVATIVES THEREOF AS AN
ACTIVE INGREDIENT

【技術領域】

【0001】 本發明涉及一種包含微小RNA及其衍生物作為活性成分的藥物組成物。

【先前技術】

【0002】 癌症係日本人的第一大死因，根據2012年日本國立癌症中心的統計，關於一生中患癌之概率，日本男性高達63%，女性高達47%。另外，根據2015年日本厚生勞動省的統計，關於癌症在死亡原因中所占比例，日本男性為32%、女性為24%，全部人口的約三分之一死於癌症。癌症引起的死亡還在繼續增加，據預測，2030年全世界每年將有1140萬人死於癌症。

【0003】 藉由在2003年完成的人類基因組計畫，加速了在基因水平、蛋白質分子水平上理解癌症並試圖將其應用於癌症的診斷、治療，結果，圍繞癌症進行的診斷及治療的進步驚人。尤其是在治療方面，作為與現有的抗癌劑不同的機制，以癌細胞中活化的基因或蛋白質為靶的所謂分子靶向治療藥也正在得到發展、開發。藉由在診斷時鑒定癌中活化的分子，從而對這種分子靶向治療藥進行臨床應用。

【發明內容】

[發明要解決的問題]

【0004】在有關癌的上述情況下，本發明者們著眼於癌與BRD4 (bromodomain-containing protein 4，溴結構域蛋白4)的關係，課題在於提供一種用於醫治腫瘤的藥物組成物，其基於以上述關係為出發點的新概念。

[解決問題的手段]

【0005】用來解決所述問題的具體手段如以下所述，本發明包含以下形態。第一形態為一種藥物組成物，其用於醫治腫瘤，且包含具有序列編號1、序列編號2、序列編號4或序列編號5所表示的鹼基序列的多核苷酸。第二形態為一種藥物組成物，其用來醫治表現選自由BRD4、CDK2(cyclin dependent kinase 2，周期蛋白依賴性激酶2)、BRD3、EGFR(epidermal growth factor receptor，表皮生長因子受體)、及CDK6所組成之群中的至少1種的腫瘤，且包含選自由miR-3140、miR-766及它們的衍生物所組成之群中的至少1種。第三形態為一種腫瘤之醫治方法，其包括向對象投予所述藥物組成物。

[發明效果]

【0006】根據本發明，可提供一種藥物組成物，其基於以癌與BRD4的關係為出發點的新概念，用於醫治腫瘤。

【圖式簡單說明】

【0007】

[圖1-1]係表示抑制細胞增殖的微小RNA的篩選工序之圖。

[圖1-2]係表示胰腺癌細胞株Panc1的圖1-1的篩選結果之圖。

[圖1-3]係用威恩(Venn)圖表示圖1-2的篩選結果之圖。

[圖1-4]係表示對2種胰腺癌細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA時該癌細胞株的狀態之顯微鏡照片。

[圖1-5]係表示對各種癌細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA時的細胞增殖曲線之圖。

[圖1-6]係接著圖1-5表示對各種癌細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA時的細胞增殖曲線之圖。

[圖2-1]係分別以卞氏圖表表示將活性成分之一的第一雙股miRNA導入至癌細胞株後進行表現陣列分析的結果、及預測到的該活性成分作用於3'UTR區的候選靶基因子之圖。

[圖2-2]係表示用西方印跡法研究導入了活性成分之一的第一雙股miRNA的2種胰腺癌細胞株中CDK2基因與CDK6基因的表現抑制所得的結果之圖。

[圖2-3]係表示使用將CDK2基因與EGFR基因的3'UTR區引入至螢光素酶載體中而成的構建物，對活性成分之一的第一雙股miRNA進行螢光素酶報告基因分析所得的結果之圖。

[圖2-4]係表示對於2種胰腺癌細胞株使用siRNA敲減CDK2基因時對細胞增殖的影響之圖。

[圖2-5]係表示對於胰腺癌細胞株、及EGFR成為驅動基因(driver)促進癌的增殖的肺癌細胞株使用siRNA敲減EGFR基因時對細胞增殖的影響之圖。

[圖2-6]係表示在對EGFR成為驅動基因促進癌的增殖的肺癌細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA時對細胞增殖的影響之圖。

[圖3-1]係分別以卞氏圖表表示根據在將活性成分之一的第一雙股miRNA導入至癌細胞株後進行表現陣列分析所得的結果預測的、該活性成分作用於編碼區的候選靶基因子之圖。

[圖3-2]係表示用西方印跡法顯示對2種胰腺癌細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA時對BRD2基因、BRD3基因、BRD4基因等表現的影響所得的結果之圖。

[圖3-3]係表示對於胰腺癌細胞株使用siRNA敲減BRD2基因、BRD3基因、BRD4基因時對細胞增殖的影響之圖。

[圖3-4]係表示在對胰腺癌細胞導入BRD4基因表現載體來使BRD4過度表現時對細胞增殖的影響之圖。

[圖3-5]係表示BRD4基因的編碼區中與活性成分之一的第一雙股miRNA的嚮導序列同源的區域的鹼基序列、製作的變異序列、及由導入該活性成分所獲得的螢光素酶報告基因分析的結果之圖。

[圖3-6]係表示BRD3基因的編碼區中與活性成分之一的第一雙股miRNA的嚮導序列同源的區域的鹼基序列、製作的變異序列、及由導入該活性成分所獲得的螢光素酶報告基因分析的結果之圖。

[圖3-7]係表示BRD3基因的3'UTR區中與活性成分之一的第一雙股miRNA的嚮導序列同源的區域的鹼基序列、及由導入該活性成分所獲得的螢光素酶報告基因分析的結果之圖。

[圖3-8]係表示用西方印跡法顯示導入活性成分之一的第一雙股miRNA對胰腺癌細胞中BRD4表現的影響所得的結果之圖。

[圖3-9]係表示用西方印跡法顯示導入活性成分之一的第一雙股miRNA對胰腺癌細胞中BRD3表現的影響所得的結果之圖。

[圖4-1]表示BRD4-NUT融合基因的mRNA與活性成分之一的第一雙股miRNA的嚮導序列之關係。

[圖4-2]係用細胞增殖與西方印跡法顯示對NUT中線癌的細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA所得的結果之圖。

[圖4-3]係用細胞增殖與西方印跡法顯示BET(bromodomain and extra-terminal, 溴結構域和額外末端結構域)抑制劑對NUT中線癌的細胞株的效果之圖。

[圖4-4]係表示NUT中線癌的細胞株與其BET抑制劑耐性株的用量反應曲線及IC50之圖。

[圖4-5]係表示用細胞增殖與西方印跡法顯示對NUT中線癌的BET抑制劑耐性細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA所得的結果之圖。

[圖5-1]係表示使用小鼠進行的體內(in vivo)試驗中活性成分之一的第一雙股miRNA的投予時間表之圖。

[圖5-2]係表示從皮下注射胰腺癌細胞株起23天後小鼠的皮下腫瘤的外觀之照片圖。

[圖5-3]係從圖5-2的小鼠摘除的腫瘤之照片圖。

[圖5-4]係表示根據摘除的腫瘤的體積研究上述體內試驗中活性成分之一的第一雙股miRNA的投予效果所得的結果之圖。

[圖5-5]係表示對上述體內試驗中摘除的腫瘤進行hsa-miR-3140的表現分析所得的結果之圖。

[圖5-6]係用摘除腫瘤的免疫染色顯示上述體內試驗中摘除的腫瘤中伴隨hsa-miR-3140的表現增加而引起的BRD4基因、BRD3基因、EGFR基因、CDK2基因的表現降低之照片圖。

[圖6]係表示研究由導入作為活性成分的4種第一雙股miRNA(包括鹼基序列修飾型)產生的腫瘤抑制效果所得的結果之圖。

[圖7]係匯總表示利用作為活性成分的第一雙股miRNA抑制腫瘤增殖的機制之圖。

[圖8-1]係表示用西方印跡法研究作為活性成分的第二雙股miRNA(hsa-miR-766-5p)的癌抑制效果所得的結果之圖。

[圖8-2]係在編碼區與3'UTR區顯示BRD4基因與作為活性成分的第二雙股miRNA(hsa-miR-766-5p)的同源區之圖。

[圖8-3]係表示對BRD4基因的第1與第2編碼區中的與作為活性成分的第二雙股miRNA(hsa-miR-766-5p)的同源區進行螢光素酶報告基因分析所得的結果之圖。

[圖8-4]係表示對BRD4基因的第3編碼區中的與作為活性成分的第二雙股miRNA(hsa-miR-766-5p)的同源區進行螢光素酶報告基因分析所得的結果之圖。

[圖8-5]係表示對BRD4基因的第4編碼區中的與作為活性成分的第二雙股miRNA(hsa-miR-766-5p)的同源區進行螢光素酶報告基因分析所得的結果之圖。

[圖8-6]係表示對BRD4基因的第5編碼區中的與作為活性成分的第二雙股miRNA(hsa-miR-766-5p)的同源區進行螢光素酶報告基因分析所得的結果之圖。

[圖8-7]係表示對BRD4基因的3'UTR區中的與作為活性成分的第二雙股miRNA(hsa-miR-766-5p)的同源區進行螢光素酶報告基因分析所得的結果之圖。

[圖9-1]係表示對MYCN基因擴增的神經母細胞瘤細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA時對細胞增殖的影響之圖。

[圖9-2]係表示對MYCN基因未擴增的神經母細胞瘤細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA時對細胞增殖的影響之圖。

[圖9-3]係表示用西方印跡法顯示導入活性成分之一的第一雙股miRNA對神經母細胞瘤細胞中BRD4及MYCN表現的影響所得的結果之圖。

[圖9-4]係表示導入活性成分之一的第一雙股miRNA對神經母細胞瘤細胞中MYCN表現的影響之圖。

[圖10]係表示對膠質母細胞瘤細胞株導入活性成分之一的第一雙股miRNA時對細胞增殖的影響之圖。

【實施方式】

【0008】 在本說明書中，關於組成物中的各成分的含量，當組成物中存在多種相當於各成分的物质時，只要沒有特別說明，則意指存在於組成物中的該多種物質的合計量。另外，微小RNA(miRNA)中除了由核糖核苷酸構成的多核苷酸(寡核苷酸)以外，還包含由核糖核苷酸與經修飾的核苷酸構成的多核苷酸(寡核苷酸)。進而，微小RNA可以是單股，也可以是雙股。進而，微小RNA的變體包括變更了鹼基序列的衍生物、含有經修飾的核苷酸的衍生物、含有經修飾的核苷酸且變更了鹼基序列的衍生物等。以下對本發明的實施方式進行詳細說明。但是，以下所示的實施方式係為了將本發明的技術思想具體化而例示出藥物組成物等，而本發明並不限定於以下所示的藥物組成物等。

【0009】 BRD4係在結構上具有2個與經乙醯化修飾的賴胺酸結合的溴結構域、且C末端側具有與p-TEFb(positive transcription elongation factor b，正性轉

錄延長因子b)結合的區域的蛋白質(例如，參照Jang, M. K., ET AL., MOL. CELL, vol 19, 2005, 第523-534頁.)。發現組蛋白的乙醯化修飾與轉錄活性呈正相關，p-TEFb藉由將抑制進行轉錄的RNA聚合酶II的蛋白質去活化而使轉錄活化。BRD4具有如下作用：藉由結合於經乙醯化修飾的組蛋白的賴胺酸上，從而於該處動員p-TEFb而促進轉錄。根據報告，在血液腫瘤、胰腺癌、乳癌等幾種癌症種類中，BRD4表現的異常活化有助於癌細胞增殖，抑制BRD4表現可能在癌症治療方面有效(例如，參照Filippakopoulos, P., ET AL., NATURE, vol 468, 2010, 第1067-1073頁；Delmore, J. E., ET AL., CELL, 2011, vol 146, 2011, 第904-917頁；Dawson, M. A., ET AL., NATURE, 2011, vol 478, 第529-533頁；Chapuy, B., ET AL., CANCER CELL, 2013, vol 24, 第777-790頁；Shu S, ET AL., NATURE, 2016, vol 529, 第413-417頁；Sahai V ET AL., MOL CANCER THER, 2014, vol 13, 第1907-1917頁.)。因此，目前正在開發抑制BRD4的BET抑制劑。多數BET抑制劑具有BRD4的溴結構域與乙醯化賴胺酸結合的區域的抑制作用(例如，參照Wang CY ET AL., TRENDS BIOCHEM SCI, 2015, vol 40, 第468-479頁.)。

【0010】本發明者們著眼於微小RNA(miRNA)對該BRD4的作用。miRNA係藉由結合於靶轉錄產物(mRNA)的編碼(CDS)區或3'-非轉譯區(3'UTR)來妨礙其轉譯或穩定化，由此調整基因表現的內源性小分子非編碼RNA(例如，參照Bartel DP, CELL, 2004, vol 116, 第281-297頁；Ambros V, NATURE 2004, vol 431, 第350-355頁.)。有一些miRNA可以抑制性地調節腫瘤基因，腫瘤抑制型的miRNA的去活化與致癌路徑的活化相關(例如，參照Zhang BH ET AL., DEV BIOL, 2007, vol 302, 第1-12頁.)。重要的是，1個mRNA可被多個miRNA作為靶，另一方面，1個miRNA可將多個mRNA作為靶(例如，參照Lewis BP ET AL., CELL, 2005, vol

120, 第15-20頁.)。即，認為投予可將有助於多條致癌路徑的多個基因作為靶的miRNA在癌症治療方面有效。

【0011】 結果發現，hsa-miR-3140與hsa-miR-766-5p具有癌抑制效果，特別是對可見表現BRD4的癌與可見表現BRD4-NUT融合基因的基因產物的癌確認到優異的抑制效果，並且發現，hsa-miR-3140對可見表現與BRD4基因相關的選自由CDK2、CDK6、BRD3、及EGFR所組成之群中的至少1種的癌也確認到優異的抑制效果。

【0012】 本發明的第一形態的藥物組成物包含具有序列編號1、序列編號2、序列編號4或序列編號5所表示的鹼基序列的至少1種多核苷酸作為活性成分，用於醫治腫瘤。另外，第二形態的藥物組成物包含選自由miR-3140、miR-766及它們的衍生物所組成之群中的至少1種，用於醫治腫瘤。這裡所謂醫治腫瘤只要為對腫瘤實施的一些醫治即可，例如可列舉腫瘤的治療、改善、發展的抑制(惡化的防止)、預防、由腫瘤引起的症狀的緩解等。

【0013】 [表1]

AGCUUUUGGGAAUUCAGGUA	序列編號1
AGGAGGAAUUGGUGCUGGUCUU	序列編號2
UACCUGAAUUhCCAAAAGCUUU	序列編號4
ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC	序列編號5

【0014】 藥物組成物用於醫治腫瘤，例如提供對廣泛的癌症種類、耐藥性癌、頑固性癌具有治療效果的藥物組成物。藥物組成物特別是對可見表現BRD4的癌、進而對可見表現BRD4-NUT融合基因的基因產物的頑固性癌——NUT中線癌確認到醫治效果。進而，實施形態之一的含包含“以hsa-miR-3140(成熟

miRNA)為基礎的雙股多核苷酸(也可以是RNA)”作為活性成分的藥物組成物除了上述以外，對表現選自由CDK2、CDK6、BRD3、及EGFR所組成之群中的至少1種的腫瘤也確認到醫治效果。

【0015】藥物組成物所含的多核苷酸可以於5'末端或3'末端進而具有1個以上的任意的核苷酸。當於5'末端或3'末端具有任意核苷酸時，其殘基數例如為10個殘基以下，較佳的是5個殘基以下，更較佳的是2個殘基以下。另外，多核苷酸也可以具有序列編號1所表示的鹼基序列，且於3'末端具有2個任意的核苷酸。多核苷酸的股長例如為20個殘基以上且35個殘基以下，較佳的是20個殘基以上且30個殘基以下。

【0016】藥物組成物可以以單股的形式含有多核苷酸，也可以以雙股的形式含有多核苷酸。當以雙股的形式含有多核苷酸時，至少局部形成雙股即可，可以於雙股的至少一末端具有單股部分，也可以於雙股部分具有至少1對錯配鹼基對。當於雙股的末端具有單股部分時，較佳的是至少於3'側具有單股部分。另外，單股部分的股長例如為2個殘基以上且20個殘基以下，較佳的是2個殘基以上且12個殘基以下或2個殘基以上且5個殘基以下。另一方面，當於雙股部分具有錯配鹼基對時，錯配鹼基對可以連續配置，也可以不連續配置，另外，錯配鹼基對的總數例如為10個鹼基對以下，較佳的是6個鹼基對以下或4個鹼基對以下，而且例如為1個鹼基對以上、2個鹼基對以上、或3個鹼基對以上。

【0017】藥物組成物所含的多核苷酸可以是選自由miR-3140、miR-766及它們的衍生物所組成之群中的至少1種。miR-3140可以是hsa-miR-3140，miR-766可以是hsa-miR-766-5p。另外，衍生物包括該等天然型微小RNA的至少一部分核

苷酸經修飾所得到的微小RNA、天然型微小RNA的鹼基序列中置換、缺失或附加了1個或2個鹼基所得到的微小RNA。

【0018】 雙股的多核苷酸可以是下述(1)的雙股多核苷酸(以下也稱為第一雙股多核苷酸)、及下述(2)的雙股多核苷酸(以下也稱為第二雙股多核苷酸)的至少一種。進而，第一雙股多核苷酸可以是第一雙股RNA，第二雙股多核苷酸可以是第二雙股RNA。

【0019】 (1)第一雙股多核苷酸係由鹼基序列
“AGCUUUUGGGAAUUCAGGUAk₁k₂”[G表示鳥嘌呤，A表示腺嘌呤，C表示胞嘧啶，T表示胸腺嘧啶，並且U表示尿嘧啶，k₁與k₂分別獨立為任意的核苷酸，可以是G、T或U：序列編號3]的單股多核苷酸、及鹼基序列
“UACCUGAAUUhCCAAAAGCUUU”[h為任意的核苷酸，可以是A、U或C：序列編號4]的單股多核苷酸所構成的大致互補的雙股多核苷酸。當構成大致互補的雙股多核苷酸時，也可以採用髮夾結構的形態。

【0020】 [表2]

AGCUUUUGGGAAUUCAGGUArk ₁ k ₂	序列編號3
UACCUGAAUUhCCAAAAGCUUU	序列編號4

【0021】 第一雙股多核苷酸以 hsa-miR-3140(成熟miRNA)為基礎。該 hsa-miR-3140(天然型)的嚮導股係具有“k₁k₂”為“GU”的鹼基序列的單股RNA，隨從股係具有“h”為“A”的鹼基序列的單股RNA。該等單股RNA相互大致互補地結合而例如構成下式的雙股RNA。於下式中，鹼基間的粗實線表示鹼基間的氫鍵，表示該部分的鹼基對互補。所謂“大致互補”係指像下式那樣包含雙股多核苷酸的一部分為單股的部分、及/或鹼基對的一部分未以氫鍵結合的部分(錯配)，並且

'

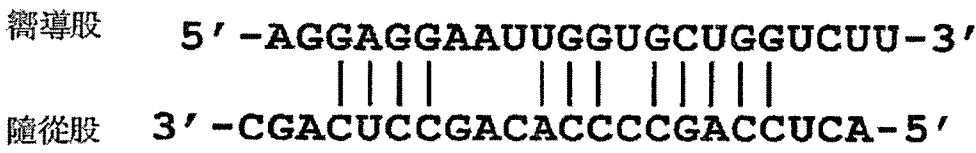
【0028】 該等雙股多核苷酸例如可從GeneDesign股份有限公司獲得，可包含至少1種經修飾的核苷酸。

【0029】 (2)第二雙股多核苷酸係由鹼基序列“AGGAGGAAUUGGUGCUGGUCUU”(序列編號2)的單股多核苷酸、及鹼基序列“ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC”(序列編號5)的單股多核苷酸構成的大致互補的雙股多核苷酸。序列編號2為hsa-miR-766-5p(成熟miRNA)的鹼基序列，序列編號5為hsa-miR-766-3p(成熟miRNA)的鹼基序列，具有下述大致互補性結構。於天然型的成熟miRNA中，具有序列編號2的鹼基序列的RNA定位為嚮導股，具有序列編號5的鹼基序列的RNA定位為隨從股。

【0030】 [表3]

AGGAGGAAUUGGUGCUGGUCUU	序列編號2
ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC	序列編號5

【0031】 [化6]



【0032】 構成多核苷酸的核苷酸只要含有至少1個核糖核苷酸即可，也可以代替核糖核苷酸含有相應的去氧核糖核苷酸、及經修飾的核苷酸的至少1種。經修飾的核苷酸包括磷酸部分經修飾的核苷酸、糖部分經修飾的核苷酸、鹼基部分經修飾的核苷酸等。經修飾的核苷酸可以是磷酸部分、糖部分及鹼基部分的任一個經修飾的核苷酸，也可以是組合2種以上的修飾而成的核苷酸。關於經修飾的核苷酸，例如可參照日本專利特開平10-304889號公報、國際公開第

2005/021570號、日本專利特開平10-195098號公報、日本專利特表2002-521310號公報、國際公開第2007/143315號、國際公開第2008/043753號、國際公開第2008/029619號、國際公開第2008/049085號等。

【0033】作為磷酸部分的修飾，已知有將氧原子取代為硫原子的“硫代磷酸酯修飾”(S化)等。

【0034】作為糖部分的修飾，已知有非交聯化型修飾與交聯型修飾。作為非交聯型修飾，可列舉2'位的氟(F)化、O-甲基化、MOE化等2'位羟基的修飾、利用咪啉基核酸化進行的修飾等。另外，作為交聯化型修飾，可列舉LNA(2',4'-BNA)化、ENA化等。

【0035】藥物組成物所含的多核苷酸可以是上述多核苷酸的鹼基序列中置換或缺失了1個或2個鹼基而成的多核苷酸，也可以是在上述多核苷酸的任意位置附加了1個或2個鹼基而成的多核苷酸。

【0036】本實施方式的多核苷酸可使用公知的多核苷酸的合成法等來合成。作為多核苷酸的合成法，可列舉亞磷醯胺法及其改良法、H-磷酸酯法及其改良法、酶合成法(體外(in vitro)轉錄法)等。另外，也可以應用市售品的該核酸、委託製造的該核酸。

【0037】藥物組成物中除了多核苷酸以外，可進而含有其他抗腫瘤性化合物作為活性成分。作為其他抗腫瘤性化合物，例如可列舉：代謝拮抗劑、分子靶向藥、烷化劑、植物鹼劑、抗癌性抗生素、鉑製劑、激素劑、生物學應答調節劑、免疫檢查點抑制劑等。

【0038】藥物組成物可與上述作為活性成分的核酸(多核苷酸)一起含有適當的藥物製劑載體而製備成製劑組成物的形態。作為該製劑載體，可根據使用

形態選擇載體，可使用填充劑、增量劑、結合劑、潤濕劑、崩散劑、表面活性劑等賦形劑、稀釋劑等。另外，也可以藉由對上述作為活性成分的核酸添加合適的載體而製成使用時能夠成為液狀的乾燥劑。

【0039】藥物組成物也可以以內包、或結合於藥學上可接受的載體的狀態含有作為活性成分的多核苷酸。例如可運用高分子微胞、由含環糊精的聚合物構成的奈米粒子、穩定核酸脂質粒子、多功能包膜型奈米結構體等藥物遞送系統來進一步提高藥物組成物的效果。

【0040】藥物組成物的形態只要為可有效地含有上述作為活性成分的核酸的形態，則沒有特別限定，可以是片劑、粉末劑、顆粒劑、丸劑等固體劑、軟膏劑、貼膏劑。另外，也適宜製成液劑、懸浮劑、乳劑等注射劑形態。在現狀下，藥物組成物對局部的投予有效。適合該投予形式的劑型通常為注射劑、軟膏劑、或貼膏劑的形態。使用注射劑對局部的投予可以用如下等形態進行：藉由靜脈內、皮下、皮內、肌內注射等從體外注射而對腫瘤直接注入活性成分，以及使用內窺鏡對體內(消化道內、子宮內、膀胱內等)的腫瘤直接注入活性成分。使用軟膏劑或貼膏劑對局部的投予可以用直接使活性成分浸潤皮膚癌等形態進行。

【0041】上述作為活性成分的核酸對人體的投予量為每個成人每天例如0.01 μg 以上且100 mg以下左右。該投予可以是每天1次、或2次以上且5次以下，進而也可以連日進行或每隔數天進行。

【0042】藥品組成物例如用作癌治療劑。藥物組成物可以藉由符合其形態的合適的投予路徑，以向靜脈內、肌內、皮下、皮內、皮膚上、消化道內、子宮內、膀胱內、血管內、腹腔內等進行投予的形態投予。藥品組成物中的上述

作為活性成分的核酸的含量可根據該組成物的投予方法、投予形態、使用目的、患者的症狀等適當選擇，並不一定，通常理想的是製備成含有0.1質量%以上且95質量%以下左右活性成分的核酸的組成物形態，以上述活性成分的投予量與投予頻度進行投予。

【0043】 作為藥物組成物的醫治對象的腫瘤沒有特別限定。例如至少表現BRD4的腫瘤、表現BRD4-NUT融合基因的基因產物的腫瘤成為適宜的醫治對象。BRD4-NUT融合基因係因主要在上部消化道呼吸道中產生的頑固性癌NUT中線癌(midline carcinoma)中的15號染色體與19號染色體易位而被確認到的融合基因。

【0044】 進而，表現選自由CDK2、CDK6、BRD3、及EGFR所組成之群中的至少1種的腫瘤也成為適宜的醫治對象。例如當藥物組成物包含第一雙股多核苷酸作為活性成分時是適宜的。

【0045】 關於 CDK2 與 CDK6，CDK 係“周期蛋白依賴性激酶(cyclin-dependent kinase)”的簡稱，CDK2與周期蛋白E形成CDK2-周期蛋白E複合體，使細胞週期從G1期向S期轉變。若於該複合體上結合CDK抑制劑p21，則細胞週期不向S期轉變(G1/S期檢查點)。已知這係防止DNA受到了傷害的細胞癌化的重要功能(例如，參照O'Connor P.M, Cancer Surv., 1997, vol 29, 第82-151頁.)，癌細胞中CDK2的過度表現認為對癌具有促進作用。CDK6也是具有控制細胞週期從G1期向S期轉變的作用的基因，癌細胞中CDK6基因的過度表現認為對癌具有增殖促進作用，開發出以CDK6為靶的低分子化合物，對各種癌進行了臨床試驗。該CDK2或CDK6過度表現的癌係包含第一雙股多核苷酸、或第一雙股RNA的形態的藥物組成物的適宜醫治對象。

【0046】 BRD3與上述BRD4同樣地，係具有如下功能的蛋白質結構域“溴結構域”之一，即，識別組蛋白的乙醯化賴胺酸，使調節蛋白聚集來控制染色質結構或基因表現。已知其係具有溴結構域重複序列及特異性末端序列的BET(溴結構域和額外末端結構域)家族蛋白之一，編碼其的基因成為抗癌劑BET抑制劑的靶之一。BRD3過度表現的癌係包含第一雙股多核苷酸、或第一雙股RNA的形態的藥物組成物的適宜醫治對象。

【0047】 EGFR係“上皮生長因子受體(Epidermal Growth Factor Receptor)”的簡稱，係識別控制細胞的增殖或生長的上皮生長因子(EGF)，進行信號傳遞的受體。在許多癌中確認到EGFR的過度表現(例如，參照Normanno N ET AL., Journal of Cellular Physiology, 2003, vol.194, No.1, 第13-19頁.)，癌中的EGFR的過度表現係預後不良因子(例如，參照Selvaggi G ET AL., Annals of Oncology, 2004, vol.15, No.1, 2004, 第28-32頁；Hirsch FR, ET AL., Journal of Clinical Oncology, 2003, vol.21, No.20, 第3798-3807頁.)。尤其已知肺癌會被EGFR強烈地促進，成為包含第一雙股多核苷酸、或第一雙股RNA的形態的藥物組成物的適宜醫治對象。該形態的藥物組成物對獲得了針對EGFR抑制劑的抵抗性的肺癌也有效。

【0048】 進而，期望“與癌共存”的情況也可以成為藥物組成物的應用對象。即，認為藥物組成物也適於期望藉由抑制癌中BRD4的表現以及BRD3、EGFR、CDK2、CDK6的表現來防止癌的惡化或發展以延續壽命情況。

【0049】 上述基因表現的定量可依照常規方法進行。例如作為BRD4基因、CDK2基因、CDK6基因、BRD3基因、EGFR基因等的表現的定量方法，可列舉北方印跡法、西方印跡法、原位(in situ)雜交法(ISH法)、定量RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction，逆轉錄聚合酶鏈式反應)法(包括即時PCR

法)、RNase保護分析法、體外(in vitro)轉錄法、表現陣列分析法、免疫組織化學染色法等或該等方法的變法。另外，NUT中線癌的診斷通常是基於使用側翼(flanking)NUT探針的分離(split apart)FISH(fluorescence in situ hybridization，螢光原位雜交)法、RT-PCR法、西方印跡法、免疫組織化學染色法等進行診斷。

【0050】作為醫治對象的腫瘤中的BRD4、BRD3、EGFR、CDK2、CDK6等的表現可以是過度表現。能夠以如下方式確定給定基因有無過度表現。基於各基因的正常的表現量來綜合性地或按腫瘤個別地設定合適的臨界值。將上述基因表現的定量法應用於醫治對象的腫瘤，求出該腫瘤中給定基因的表現定量值，並對該值比對上述臨界值，由此可確定給定基因有無過度表現。可以將確認到像這樣的給定基因的過度表現的癌指定為藥物組成物的合適的應用對象。

【0051】表現出上述基因性特徵的腫瘤為藥物組成物的適宜醫治對象。作為醫治對象的腫瘤就外在形式來說，除了上述NUT中線癌以外，可例示食道癌、肺癌、口腔癌、胃癌、大腸癌、子宮癌、皮膚癌、腦腫瘤、神經母細胞瘤、膠質母細胞瘤、乳癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、肝癌、腎癌等實體癌、及包括造血器官腫瘤、血液癌等在內的血液腫瘤等。當然醫治對象並不限定於該等癌的外形，適宜基於上述基因性特徵選擇醫治對象。另外，就作為活性成分的核酸可確實地到達腫瘤的方面來說，可進行局部投予、即可使藥物組成物直接與腫瘤接觸的腫瘤適宜作為醫治對象。

【0052】作為基於基因性特徵而成為醫治對象的疾病，例如作為與BRD4基因及BRD3基因相關的疾病，可列舉：急性骨髓性白血病(AML)、混合譜系白血病(MLL)、伯基特(Burkitt)氏淋巴瘤、作為兒童期最常見腦腫瘤的髓母細胞瘤、MYCN擴增神經母細胞瘤、去勢抵抗性前列腺癌、轉移性去勢抵抗性前列腺癌

(CRPC)、尤文(Ewing)氏肉瘤、結直腸癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、多發性骨髓瘤、實體腫瘤(例如，胰腺癌及前列腺癌)、乳癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、骨髓異常增生綜合徵(MDS)、髓樣增生異常/骨髓增殖性腫瘤、無法分類的葉狀纖維腫瘤、NUT中線癌(NMC)、彌漫大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、三陰乳腺癌(TNBC)、胰腺導管腺癌、多形性神經膠質母細胞瘤、2型真性糖尿病、冠狀動脈疾病、心血管疾病(例如，參照Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 1849；Cold Spring Harb Perspect Med. 2017; 7:a026674)等。

【0053】作為與CDK2基因及CDK6基因相關的疾病，可列舉：晚期結直腸癌、原發性/復發性結直腸癌、結腸癌、胰腺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、子宮內膜癌、頭頸部鱗狀細胞癌、多發性骨髓瘤、乳癌、結直腸癌、卵巢癌、子宮漿液性癌、慢性淋巴母細胞白血病、各種惡性淋巴瘤、食道鱗狀細胞癌、肝細胞癌、良性/惡性甲狀腺腫瘤、子宮內膜腺癌、軟組織肉瘤、胃癌、食道癌、急性淋巴母細胞白血病、霍奇金氏淋巴瘤、早期NSCLC、惡性胸膜間皮瘤、黑色素瘤、視網膜母細胞瘤、骨肉瘤、胃癌、巴雷特(Barrett)食道癌、前列腺癌、復發/非復發性前列腺癌、胰臟/消化道神經內分泌腫瘤、膀胱癌、卵巢癌、兒童急性淋巴母細胞白血病、成人急性淋巴母細胞白血病、彌漫大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、原發性結直腸癌、神經膠質母細胞瘤、子宮頸癌、神經膠質母細胞瘤/未分化星形細胞瘤、脂肪肉瘤、橫紋肌肉瘤、原發性胰腺癌、神經膠質瘤、髓母細胞瘤、T細胞淋巴瘤/白血病、PNET(primitive neuroectodermal tumor，原始神經外胚層腫瘤)/神經母細胞瘤、肺癌、胸腺癌、淋巴瘤、腎癌、肝癌、皮膚癌、神經母細胞瘤、尿路上皮癌、頭頸部癌(例如，參照Pharmacological Research

2016, 107, 249-275; European Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 142, 424-458.)等。

【0054】作為與EGFR基因相關的疾病，可列舉：肺癌、乳癌、胃癌、結腸癌、前列腺癌、腎癌、卵巢癌、頭頸部癌(例如，參照Journal of Cellular Physiology, 2002, 194, 13-19.)等。

【0055】腫瘤的醫治方法

腫瘤的醫治方法係包括向對象投予有效量的所述藥物組成物的醫治腫瘤的方法。作為醫治對象的腫瘤如上文所述，例如為表現選自由BRD4、CDK2、BRD3、EGFR、及CDK6所組成之群中的至少1種的腫瘤。另外，藥物組成物的詳情及投予方法如上文所述。醫治的對象例如為哺乳動物，哺乳動物包括人。另外，醫治的對象也可以是非人動物。

【0056】本發明中作為其他形態，還包括：一種所述多核苷酸之用途，其用於製造醫治腫瘤的藥物組成物；一種所述多核苷酸的用途，其用於醫治腫瘤；一種所述多核苷酸，其用於醫治腫瘤。

[實施例]

【0057】以下，利用實施例更具體地說明本發明，但本發明並不限定於該等實施例。

【0058】1.材料與方法

在揭示實施例的結果前，對其所使用的材料與試驗方法進行說明。

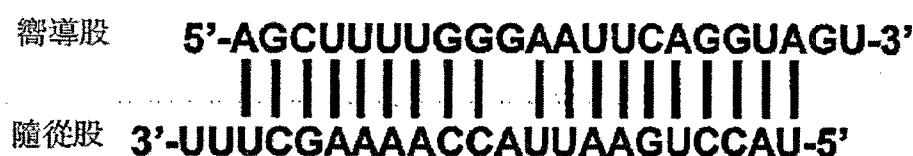
【0059】(1)微小RNA(藥物組成物的活性成分的有用性的驗證用途)

(a)第一雙股RNA(hsa-miR-3140(成熟miRNA))

(a)-1：雙股RNA

作為“hsa-miR-3140(成熟miRNA)”，從Ambion公司(Ambion, Inc.，美國)獲得該微小RNA的合成品(Ambion公司的商品名：MC17496)。該微小RNA係具有下述鹼基序列的雙股RNA。以下，在該實施例中，只要沒有特別說明，則將該雙股RNA記載為“miR-X”。

【0060】 [化7]



【0061】 (a)-2：變體

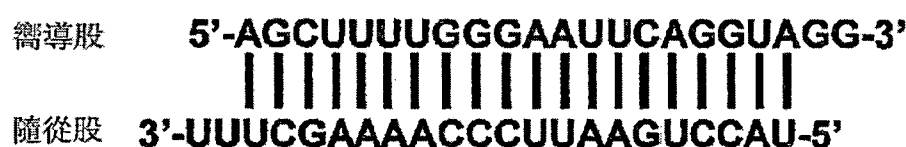
委託GeneDesign股份有限公司合成hsa-miR-3140(成熟miRNA)的雙股RNA的變體。該變體為下述4種，分別包含經修飾的核苷酸。

【0062】 [化8]



【0063】 以下，在本實施例中，只要沒有特別說明，則將該變體記載為“基因設計-1”。

【0064】 [化9]



【0065】 以下，在本實施例中，只要沒有特別說明，則將該變體記載為“基因設計-2”。

【0066】 [化10]



【0067】 以下，在本實施例中，只要沒有特別說明，則將該變體記載為“基因設計-3”。

【0068】 [化11]



【0069】 以下，在本實施例中，只要沒有特別說明，則將該變體記載為“基因設計-4”。

【0070】 (b)第二雙股RNA(miR-766)

從Ambion公司(Ambion, Inc., 美國)獲得以hsa-miR-766-5p(成熟miRNA)作為嚮導股的雙股miRNA的合成品(Ambion公司的商品名：MC23847)。已知該雙股miRNA中，由hsa-miR-766-5p(成熟miRNA)與hsa-miR-766-3p(成熟miRNA)構成的天然型的大致互補股取下述結構。以下，在本實施例中，只要沒有特別說明，則將該雙股RNA記載為“miR-766-5p”。

【0071】 [化12]



【0072】 (c)對照miRNA與siRNA

對照的miRNA使用對照miRNA(陰性對照#1；miR-NC)(Ambion公司)。

【0073】針對 BRD2(siGENOME SMARTpool : M-004935-02-0005) 、 BRD3(siGENOME SMARTpool : M-004936-01-0005) 、 BRD4(siGENOME SMARTpool : M-004937-02-0005) 、 EGFR(siGENOME SMARTpool : M-003114-03-0005) 、 CDK2(siGENOME SMARTpool : M-003236-04-0005) 的 siRNA分別從Dharmacon公司獲得。

【0074】 (2)癌細胞株

胰腺癌細胞株(Panc1、MIAPaCa2細胞、CFPAC1細胞、SW1990細胞)、乳癌細胞株(MDA-MB-231細胞、SK-BR3細胞、T-47D細胞、CRL1500細胞、YMB-1-E細胞)、肺癌細胞株(NCI-H1650細胞、NCI-H1975細胞、A549細胞、HUT29細胞、11-18細胞)、肝癌細胞株(Sk-Hep1細胞、Hep3B細胞、HepG2細胞、Huh7細胞、PLC/PRF/5細胞)係從美國典型培養物保藏中心(美國)購買的。NUT中線癌細胞株(Ty-82細胞)係從JCRB(Japanese Collection of Research Bioresources, 日本研究生物資源集存庫)細胞庫購買的。食道癌細胞株(KYSE150細胞)由嶋田裕博士(富山大學)提供, KYSE150順鉑耐性株使用以前建立的株(Fujiwara N ET AL., CANCER RES, 2015, vol 75, 第3890-3901頁)。

【0075】 Panc1、MIAPaCa2、KYSE150、KYSE150順鉑耐性株、CFPAC1、SW1990、HepG2、Huh7、PLC/PRF/5、SK-BR3、T-47D、CRL1500、YMB-1-E細胞係在杜氏改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)中添加10%胎牛血清, 在5%CO₂、37°C下培養; A549、HUT29、NCI-H1975、Ty-82、NCI-H1650、11-18細胞係在RPMI1640培養基中添加10%胎牛血清, 在5%CO₂、37°C下培養; Sk-Hep1、Hep3B細胞係在威廉姆斯(Williams)E培養基中添加10%

胎牛血清，在5%CO₂、37°C下培養，MDA-MB-231細胞係在L15培養基中添加10%胎牛血清，在5%CO₂、37°C下培養。

【0076】大腸癌細胞株HCT116+/+細胞及HCT116-/-細胞由Vogelstein研究室提供，在杜氏改良伊格爾培養基中添加10%胎牛血清，在5%CO₂、37°C下培養。

【0077】 (3)抗體與BET抑制劑

作為西方印跡法用的抗體，使用抗BRD4抗體(cell signaling公司)、抗BRD3抗體(Bethyl laboratories公司)、抗BRD2抗體(cell signaling公司)、抗MYC抗體(cell signaling公司)、抗NUT抗體(cell signaling公司)、抗CCND2抗體(cell signaling公司)、抗EGFR抗體(Santa Cruz Biotechnology公司)、抗CDK2抗體(Santa Cruz Biotechnology公司)、抗CDK6抗體(cell signaling公司)、抗Vinculin抗體(Sigma公司)、抗β肌動蛋白抗體(Sigma公司)。免疫組織染色用的抗體使用抗BRD4抗體(Atlas antibodies公司)、抗BRD3抗體(Bethyl laboratories公司)、抗CDK2抗體(Bethyl laboratories公司)、抗EGFR抗體(Santa Cruz Biotechnology公司)。BET抑制劑使用JQ1(ApExBIO公司)。

【0078】 (4)統計分析

子群間的差係利用學生t檢驗(Student t-test)及配對t檢驗(Paired t-test)(在下述體內試驗中小鼠腫瘤重量的分析中使用)進行分析。當計算出的P值未達0.05時，判斷存在統計學上的顯著差異。

【0079】 2.實施例的記述

[實施例群A]

實施例群A(實施例A1-A5)表示對miR-X及其變體進行作為藥物組成物的活性成分的研究所獲得的結果。

【0080】 <實施例A1> 抑制細胞增殖的miRNA的篩選

圖1-1表示抑制細胞增殖的miRNA的篩選工序。

【0081】 使用Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen公司)，依照隨附的工序說明書向來源於Panc1的細胞#1、#2(3000個/孔或5000個/孔)中導入10 nmol/L的1090種前驅物miR庫[Pre-miR-miRNA Precursor Library-Human V15(Ambion公司)]或對照miRNA，3天後利用結晶紫(CV)染色分析來評估細胞存活數。利用PBS(Phosphate Buffered Saline，磷酸鹽緩衝液)清洗細胞，利用含0.2%CV的10%甲醛PBS固定5分鐘。將過量的CV溶液去除，完全經空氣乾燥後，藉由添加2%SDS(Sodium dodecyl sulfate，十二烷基硫酸鈉)溶液，將培養盤振盪1小時而使染色細胞溶解。光學密度(OD)吸光度係使用微板讀取儀(ARVOMx；PerkinElmer公司)以560 nm測量，算出各孔的吸光度百分率。為了確定存活細胞的百分率，將對照孔中導入了對照miRNA的細胞的OD吸光度值任意地設定為100%。

【0082】 圖1-2表示上述Panc1#1(3000個/孔)與Panc1#2(5000個/孔)中的篩選結果。示出導入1090種前驅物miRNA時與對照miRNA相比時細胞存活的比。左邊表示Panc1#1細胞的結果(A)，右邊表示Panc1#2細胞的結果(B)。示出將轉染對照miRNA時的存活細胞數設為1時的相對存活細胞數。另外，作為增殖抑制效果的基準，設為與對照的比未達0.6。

【0083】 在將細胞增殖抑制的臨界值設為未達0.6時，對Panc1#1、Panc1#2均確認到增殖抑制的有12種miRNA。圖1-3用卞氏圖表表示該結果。顯示出有29種對Panc1#1確認到細胞增殖抑制效果，有65種對Panc1#2確認到增殖抑制效果，兩者共通的有12種。

【0084】 其中，在miRBase的資料庫分析中其存在可能性高(注釋可信度(Annotation confidence)：高)的miRNA為4種。該4種中，作為未見報告為腫瘤抑制miRNA的miRNA，確定為hsa-miR-3140。

【0085】 其次，分別使用Lipofectamine RNAiMAX，依照隨附的工序說明書將10 nmol/L的miR-X(對照為對照miRNA(陰性對照#1(Ambion公司)：miR-NC)導入至靶癌細胞株中。

【0086】 靶癌細胞株為胰腺癌細胞株[Panc1、MIAPaCa2、CFPAC1細胞、SW1990細胞]、乳癌細胞株[MDA-MB-231細胞(三陰乳癌細胞株：已知三陰乳癌係雌激素受體、黃體酮受體、HER2均未在腫瘤細胞中表現的乳癌，係著眼於該等受體等的激素療法或分子靶向藥不見有效性且預後差的癌症)、SK-BR3細胞、T-47D細胞、CRL1500細胞、YMB-1-E細胞]、肺癌細胞株[NCI-H1650細胞、NCI-H1975細胞、A549細胞(非小細胞性肺癌細胞株)、HUT29細胞(非小細胞性肺癌細胞株)、11-18細胞]、肝癌細胞株[Sk-Hep1細胞、Hep3B細胞、HepG2細胞、Huh7細胞、PLC/PRF/5細胞]、及食道癌細胞株[KYSE150及其順鉑(CDDP)耐性株KYSE150 CDDP-R]。

【0087】 圖1-4係上述導入72小時後上述2種胰腺癌細胞株(Panc1(A、B)、MIAPaCa2(C、D))的顯微鏡照片。顯示出在各胰腺癌細胞株中，miR-X導入群(B、D)中確認到大量死細胞，存活細胞少於對照(A、C)。

【0088】 圖1-5表示胰腺癌細胞株(Panc1(A)、MIAPaCa2(B))、三陰乳癌細胞株(MDA-MB-231(C))、食道癌細胞株(KYSE150(D)及其順鉑(CDDP)耐性株KYSE150 CDDP-R(E))、肝癌細胞株(Sk-Hep1(F))、非小細胞性肺癌細胞株

(HUT29(G)、A549細胞(H))中投予miR-NC或miR-X時的細胞增殖曲線。在任一細胞株中，藉由投予miR-X，均確認到了顯著的增殖抑制效果。

【0089】進而，在圖1-5所圖示的癌細胞株以外的靶癌細胞株、即胰腺癌細胞株[CFPAC1細胞(A)、SW1990細胞(B)]、乳癌細胞株[SK-BR3細胞(E)、T-47D細胞(F)、CRL1500細胞(G)、YMB-1-E細胞(H)]、肺癌細胞株[NCI-H1650細胞(C)、11-18細胞(D)]、肝癌細胞株[Hep3B細胞(I)、HepG2細胞(J)、Huh7細胞(K)、PLC/PRF/5細胞(L)]中，藉由投予miR-X，也確認到了顯著的增殖抑制效果(圖1-6)。

【0090】根據以上的結果顯示，miR-X對包括頑固性癌症在內的各種癌症種類顯著地表現出增殖抑制效果。

【0091】＜實施例A2＞作為miR-X的功能性靶的EGFR基因、CDK家族基因的鑒定

對上述導入了miR-NC或miR-X的Panc1細胞、MIAPaCa2細胞、MDA-MB-231細胞進行基因表現陣列分析。該基因表現陣列分析係使用Agilent 4x44K基因表現陣列(Agilent Technologies公司)，依照其操作指南進行的。對各miR導入癌細胞分別進行2次基因表現陣列分析，使用GeneSpring軟體(Agilent Technologies公司)分析資料。

【0092】圖2-1係用卞氏圖表表示上述基因表現陣列分析的結果、及根據Target Scan資料庫預測的miR-X作用於3'UTR區的候選靶基因子。與miR-NC導入群相比超過2倍地抑制了表現的基因中，該3種癌細胞株共通的基因存在228個。該228個共通基因中，在Target Scan資料庫中作為miR-X的3'UTR區的候選靶基因而列舉的基因存在99個。

【0093】 根據該等結果，作為miR-X的候選靶，著眼於與細胞增殖相關的基因EGFR基因、CDK2基因、CDK6基因。圖2-2係表示對按照實施例A1中所記載的要領導入了miR-X的胰腺癌細胞株Panc1細胞(A)與MIAPaCa2細胞(B)進行西方印跡法所得的結果的照片圖。西方印跡法係利用總細胞的溶解物進行SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳)，將蛋白質轉印到PVDF(polyvinylidene fluoride，聚偏二氟乙烯)膜(GE Healthcare公司)，使用含有0.05%Tween20與5%脫脂乳的TBS(Tris-buffered saline，三羥甲基胺基甲烷緩衝生理鹽水)在室溫下封閉1小時後，使該膜與抗體在4℃下一起反應一晚。第二抗體的稀釋倍率為抗EGFR抗體(1/200)、抗CDK2抗體(1/200)、抗CDK6抗體(1/1000)、抗 β -肌動蛋白抗體(1/5000)。將該膜清洗後，在室溫下在HRP結合抗小鼠或抗兔IgG抗體(均為1/5000)中暴露1小時。使用SuperSignal West Femto Substrate(Thermo Fisher Scientific公司)將結合的抗體視覺化。結果，確認到藉由向該等胰腺癌細胞導入miR-X，抑制了CDK2基因、CDK6基因、及EGFR基因的表現。

【0094】 圖2-3表示使用將CDK2基因(A)、EGFR基因(B)的3'UTR區引入至螢光素酶載體中而成的構建物，對miR-X利用螢光素酶報告基因分析進行驗證所得的結果。與miR-X的嚮導股的鹼基序列同源的區域在EGFR基因、CDK2基因中均各存在一個，該分析所使用的螢光素酶報告基因質粒係藉由在pmiRGlo雙螢光素酶miRNA靶表現載體(pmiRGlo Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector)(Promega公司)的螢光素酶基因的下游插入包含該同源區的CDK2基因或EGFR基因的3'UTR區、或在該區域引入了變異的序列而製作的。全部部位特異性變異都是使用KOD突變試劑盒(KOD mutagenesis kit)(TOYOBO公司)製作。使

用Lipofectamine2000(Invitrogen公司)，按照隨附的工序說明書將螢光素酶報告基因質粒導入至Panc1細胞或MIAPaCa2細胞中，第二天導入miR-X或對照miRNA。2天後使用雙螢光素酶報告基因檢測系統(Dual-Luciferase Reporter Assay System)(Promega公司)測定螢火蟲螢光素酶活性與海腎螢光素酶活性，相對螢光素酶活性係藉由利用相應內部標準對照的海腎螢光素酶活性進行修正來將螢火蟲螢光素酶活性標準化而算出。

【0095】藉由導入CDK2基因、EGFR基因及miR-X，確認到與野生型的3'UTR區對應的螢光素酶活性的降低，在與miR-X的嚮導股的鹼基序列匹配的區域引入了變異的載體中螢光素酶活性恢復。根據該等結果可知，miR-X藉由作用於CDK2基因與EGFR基因的3'UTR區而直接抑制了CDK2基因與EGFR基因的表現。

【0096】圖2-4表示使siRNA作用於胰腺癌細胞株Panc1細胞(A、B)與MIAPaCa2細胞(C、D)來敲減CDK2基因時對細胞增殖的效果。藉由siRNA對CDK2基因的作用來與導入對照siRNA(si-NC)時進行比較。藉由依照實施例A2所記載的要領進行西方印跡法，顯示出CDK2基因的表現受到抑制(A、B)。另外，在MIAPaCa2細胞中，伴隨CDK2基因的敲減，細胞增殖受到抑制(D)。由此確認CDK2基因的表現實際上有助於該等胰腺癌細胞株的增殖。另外，與使本實施方式的藥物組成物的活性成分發揮作用的情況相比，細胞增殖的抑制程度很小，因此藥物組成物的有效性變得明確。

【0097】圖2-5表示使siRNA作用於胰腺癌細胞株Panc1細胞(A、B)與EGFR成為驅動基因而促進癌的增殖的肺癌細胞株NCI-H1975細胞(C、D)來敲減EGFR基因時對細胞增殖的效果。藉由siRNA對EGFR基因的作用來與導入對照

siRNA(si-NC)時進行比較。藉由進行西方印跡法，顯示出EGFR基因的表現受到抑制(A、B)。另外，在該等細胞中，伴隨EGFR基因的敲減，細胞增殖受到抑制(C、D)。由此確認EGFR基因的表現實際上有助於該等癌細胞株的增殖。另外，與使本實施方式的藥物組成物的活性成分發揮作用的情況相比，細胞增殖的抑制程度很小，因此藥物組成物的有效性變得明確。

【0098】圖2-6表示對肺癌細胞株NCI-H1975細胞導入miR-X時對細胞增殖的效果。如上所述，已知NCI-H1975細胞係EGFR成為驅動基因而促進癌的增殖的肺癌細胞，對EGFR抑制劑具有抵抗性的變異。對於這種EGFR抑制劑抵抗性的肺癌細胞，若導入miR-X，則藉由西方印跡法也顯示出EGFR的表現減少，進而CDK2的表現也降低(A)，進而明確細胞增殖也顯著地受到抑制(B)。

【0099】該等結果表明，miR-X藉由與CDK2基因及EGFR基因的3'UTR區直接結合，來抑制該等基因表現，進而有助於顯著抑制細胞增殖。

【0100】<實施例A3>作為miR-X的功能性靶的BRD4基因與BRD3基因的鑒定

按照實施例A1所記載的要領將miR-NC或miR-X導入至胰腺癌細胞株Panc1細胞與MIAPaCa2細胞、及三陰乳癌細胞株MDA-MB-231細胞中，對它們進行上述的表現陣列分析。圖3-1以卞氏圖表表示根據對該等導入了miR的細胞進行表現陣列的結果及StarMirDB資料庫所預測的、miR-X的編碼區(CDS)的候選靶基因子。

【0101】與miR-NC導入群相比表現被抑制為未達1/2的基因中，上述3種癌細胞株共通的基因存在228個，其中，StarMirDB資料庫中作為miR-X的CDS的候選靶基因所列舉的基因存在103個。

【0102】 根據該等結果，作為miR-X的候選靶，著眼於與細胞增殖相關的BRD4基因。

【0103】 按照上述要領，藉由進行以 β -肌動蛋白的表現作為陽性對照的西方印跡法來研究導入了miR-X的胰腺癌細胞株Panc1細胞與MIAPaCa2細胞中的BRD2、BRD3、BRD4、周期蛋白D2、MYC、磷酸化STAT3(p-STAT3(Tyr705))、STAT3蛋白的表現。將結果示於圖3-2的照片圖。如圖3-2所示，在Panc1細胞(A)與MIAPaCa2細胞(B)中，顯著地確認到因導入miR-X而抑制BRD4表現，進而確認到抑制BET家族的BRD2、BRD3蛋白表現。還確認到BRD4下游的靶MYC、p-STAT3、CCND2(周期蛋白D2)的表現降低。

【0104】 圖3-3將對胰腺癌細胞株Panc1使用siRNA分別敲減BRD2基因、BRD3基因、BRD4基因時對基因表現與細胞增殖的效果和使用了對照siRNA(si-NC)的情況進行比較並顯示出來。根據西方印跡法，表明該等基因的表現受到抑制(A)，細胞增殖也受到抑制(B)。

【0105】 圖3-4表示將BRD4表現載體導入至Panc1細胞中使BRD4基因過度表現時對細胞增殖的影響。BRD4表現載體係從Kazusa DNA研究所購買BRD4的cDNA，將其引入至從Promega公司購買的pFN28A Halotag CMV-neo Flexi載體中而製作的。藉由對BRD4基因標注標籤Halotag，可將外源性(exo)導入的BRD4與內源性(endo)表現的BRD4加以區分。由西方印跡法的照片圖表明，藉由導入BRD4表現載體，與對照的導入了空載體(Empty vector)的細胞相比，確認到外源性導入的BRD4的表現，進而BRD4下游的靶MYC的表現也上升了(A)。於是可知，藉由導入BRD4基因引起BRD4過度表現，促進了細胞增殖(B)。

【0106】 根據該等結果表明，miR-X抑制包括BRD4基因在內的BET家族基因表現，從而抑制癌細胞的增殖。

【0107】 其次，為了研究miR-X是否直接控制BRD4基因及BRD3基因，大致按照實施例A2所記載的要領，使用將BRD4基因與BRD3基因的CDS區引入至螢光素酶載體中而成的構建物，對miR-X利用螢光素酶報告基因分析進行驗證。與miR-X的嚮導股的鹼基序列同源的區域在BRD4基因的CDS中靠近地存在2處，在BRD3基因的CDS中存在1處。將包含該區域的野生型的CDS區、或在該區域引入了變異的序列引入至螢光素酶報告基因載體並導入至胰腺癌細胞株MIAPaCa2細胞中後，導入miR-X。圖3-5(A)、圖3-6(A)分別表示BRD4基因與BRD3基因的CDS序列中原本與miR-X的嚮導股的鹼基序列同源的區域的基因序列及上述導入了變異的序列。圖3-5(B)表示變異體的變異狀態。如圖3-5(C)、圖3-6(B)所示，藉由導入BRD4基因、BRD3基因及miR-X，野生型的CDS中確認到螢光素酶活性的降低，在與miR-X的嚮導股的鹼基序列同源的區域引入了變異的載體中螢光素酶活性恢復。

【0108】 另外，如圖3-7所示，對存在於BRD3基因的3'UTR區中的與miR-X的嚮導股的鹼基序列同源的區域(A)雖然進行了與上述相同的螢光素酶報告基因分析，但未確認到因導入miR-X引起螢光素酶活性降低(B)，表明miR-X不以BRD3基因的3'UTR區為靶。

【0109】 進而，使用BRD4基因與BRD3基因的表現載體、及以不改變胺基酸序列的方式對該等基因的CDS中與miR-X的嚮導股的鹼基序列同源的區域導入變異而成的構建物來驗證miR-X是否實際上藉由BRD3基因與BRD4基因的CDS來控制基因表現。圖3-8、圖3-9分別用西方印跡法的照片圖表示BRD4基因、

BRD3基因的表現藉由各自的CDS受到miR-X抑制。該等圖顯示，對胰腺癌細胞株MIAPaCa2細胞導入BRD4基因或BRD3基因的表現載體以及它們的基因變異載體後，若導入miR-X，則導入了野生型的BRD4基因或BRD3基因的細胞中，其表現受到miR-X抑制，另一方面，當導入了變異型的BRD4基因或BRD3基因時，miR-X對該等基因的表現抑制被解除。

【0110】根據該等結果，明確miR-X藉由與BRD4基因及BRD3基因的CDS區直接結合，從而抑制該等基因的表現。

【0111】〈實施例A4〉作為miR-X的功能性靶的BRD4-NUT融合基因的鑒定

已知雖然罕見但惡性度極高的NUT中線癌的主病因係因15號染色體與19號染色體的易位形成的BRD4-NUT融合基因。圖4-1表示BRD4-NUT融合基因的mRNA與miR-X的關係。miR-X如上所述以BRD4基因的CDS為靶，因此預測該BRD4-NUT融合基因也是靶。

【0112】圖4-2中用細胞增殖曲線(A)與西方印跡法的照片圖(B)表示對NUT中線癌的細胞株Ty-82細胞導入miR-X的結果。顯示出Ty-82雖然表現BRD4-NUT融合基因，但藉由導入miR-X，BRD4-NUT融合基因的基因產物的表現受到抑制，其下游的MYC也受到抑制，結果細胞增殖被顯著地抑制。

【0113】另外，臨床試驗中認為BET抑制劑對NUT中線癌有效，圖4-3表示BET抑制劑JQ1對Ty-82的效果。在JQ1濃度500 nM下，BRD4-NUT融合基因的下游的MYC受到抑制(B)，細胞增殖被明顯地抑制(A)。

【0114】其次，為了驗證miR-X是否能夠克服BET抑制劑的抵抗性，使用Ty-82細胞建立了JQ1耐性株。即，對於Ty-82細胞，利用以低濃度添加了JQ1的

培養液進行培養，利用不含JQ1的培養液使倖存的細胞增殖後，利用JQ1的濃度較上次增加的培養液對其進行培養，再次利用不含JQ1的培養液使倖存的細胞增殖後，利用JQ1的濃度較上次增加的培養液對其進行培養。將該逐漸增加JQ1的濃度來培養確保倖存的細胞的步驟重複1個月以上，確保最終即使在JQ1的濃度為2.5 μM 的培養液中也能夠存活的細胞，將其作為建立的JQ1耐性株使用。

【0115】圖4-4表示使用xCELLigence系統測得的Ty-82細胞(A)與新建立的Ty-82JQ1耐性株(B)的JQ1的用量反應曲線及IC50。顯示出Ty-82JQ1耐性細胞與Ty-82細胞相比IC50高3倍左右，為JQ1抵抗性。

【0116】圖4-5中用細胞增殖曲線(A)與西方印跡法的照片圖(B)表示對該Ty-82JQ1耐性細胞導入miR-X的結果。表明藉由導入miR-X，即使在Ty-82JQ1耐性細胞中，BRD4-NUT融合基因的表現與下游的MYC基因的表現也被顯著地抑制，細胞增殖也被顯著地抑制。

【0117】根據該等結果表明，miR-X藉由抑制BRD4-NUT融合基因的表現，能夠抑制NUT中線癌的增殖，進而也能夠克服BET抑制劑JQ1抵抗性。

【0118】〈實施例A5〉藉由投予miR-X獲得的體內的腫瘤細胞的增殖抑制效果

從Oriental Bioservice公司購買7周齡的Balb/c裸小鼠，在無菌狀態下飼養。對小鼠的背側側腹皮下注射100 μl 含有 5×10^6 個胰腺癌細胞株MIAPaCa2細胞的PBS。圖5-1係該皮下注射之後的體內試驗的時間表。向腫瘤與皮膚之間の間隙投予共計5次1 nmol的miR-X或對照miRNA與200 μl 的AteroGene(KOKEN公司)的混合物(從注射MIAPaCa2細胞起7、11、15、18、21天後)。細胞投予23天後將小

鼠安樂死，摘除腫瘤。對全部小鼠進行的實驗工序受東京醫科齒科大學的動物實驗委員會批准。

【0119】 圖5-2表示從注射MIAPaCa2細胞起23天後的代表性的小鼠的皮下腫瘤的外觀。

【0120】 圖5-3表示摘除的腫瘤的照片(A)。對各小鼠稱量摘除的腫瘤的重量，結果miR-X的投予群的腫瘤的重量顯著地輕於對照miRNA的投予群(B)。

【0121】 藉由投予miR-X，腫瘤的體積與投予對照miRNA(miR-NC)相比顯著地減少(圖5-4)。腫瘤的體積按照(長徑) $\times$ (短徑)² $\times$ 0.5進行計算。

【0122】 圖5-5表示摘除的腫瘤中的miR-3140的表現分析。miR-3140的表現水平表示由定量RT-PCR算出的結果。

【0123】 在該定量RT-PCR中，使用TRIpure試劑(Bioline公司)，按照標準方法從腫瘤組織分離總RNA，用對miR-3140特異性的引物擴增由該總RNA製備的單股RNA。對miR-3140進行的即時RT-PCR係使用ABI Prism 7500快速即時PCR系統(ABI Prism 7500 Fast Real-time PCR system)(Applied Biosystems公司)、Taqman Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems公司)、Taqman Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems公司)、Taqman microRNA Assays(Applied Biosystems公司)，依照它們的操作指南進行的。miR-3140的表現水平藉由將RNU6B的表現量作為總RNA的初始量的標準化對照加以修正而進行了標準化。

【0124】 藉由用該定量RT-PCR進行研究，結果可確認腫瘤細胞中的miR-3140的表現在miR-X投予群中顯著地增加。

【0125】 圖5-6中用摘除腫瘤的免疫染色表示伴隨上述miR-3140的表現增加而引起的BRD4基因、BRD3基因、EGFR基因、及CDK2基因的表現降低。

【0126】在免疫染色中，腫瘤樣品利用含10%甲醛的PBS固定，進行石蠟包埋，薄切成4 μm 厚的切片，藉由親和素-生物素-過氧化酶法進行BRD4、BRD3、EGFR、CDK2的免疫組織化學染色。被石蠟包埋的腫瘤切片利用二甲苯脫石蠟後，利用乙醇進行再水合。藉由在10 mM的檸檬酸緩衝液(pH值為6.0)中煮沸來激活抗原，對於該切片，為了將內源性過氧化酶去活化，利用含0.3%過氧化氫的甲醇進行處理。其後該切片在抗BRD4抗體(1/500稀釋)、抗BRD3抗體(1/500稀釋)、抗EGFR抗體(1/200稀釋)或抗CDK2抗體(1/500稀釋)中在4°C下反應一晚。結合了的抗體使用二胺基聯苯胺(VECTASTAIN-EluteABCkit，Vector Laboratories公司)作為色抗原進行視覺化，其後利用蘇木精將該切片進行對比染色。

【0127】該等結果表明，藉由投予miR-X，在體內的腫瘤組織中，BRD4基因、BRD3基因、EGFR基因及CDK2基因的表現受到抑制，腫瘤增殖受到抑制。即，期待包含miR-3140的藥物組成物對由表現選自由BRD4、BRD3、EGFR、CDK2、及CDK6所組成之群中的至少1種所引起的各種腫瘤具有效果。

【0128】<實施例A6>變體對癌細胞的抑制效果的研究

圖6係表示在與miR-X的比較中研究由導入作為藥物組成物的活性成分的一部分的4種第一雙股miRNA(包括鹼基序列修飾型)所獲得的腫瘤抑制效果所得的結果的圖。即，按照實施例A1所記載的要領，對胰腺癌細胞株MIAPaCa2細胞導入miR-NC(圖中為NC)、miR-X(圖中為miRVana)、基因設計-1、基因設計-2、基因設計-3、及基因設計-4，對於該等導入細胞，顯示西方印跡法的照片圖(A)，且隨時間經過追蹤癌細胞的增殖，顯示基於此的細胞增殖曲線(B)。

【0129】根據該結果表明，對上述4種變體也確認到與hsa-miR-3140同等的癌抑制效果。

【0130】 <實施例A群的總結>

圖7係由上述實施例A群的結果推導出的miR-X抑制腫瘤增殖的機制的總結圖。

【0131】 根據上述實施例A群的結果發現，miR-X藉由直接以BRD4基因的轉錄產物mRNA的編碼區為靶來抑制BRD4基因的蛋白質水平的表現，在各種癌中發揮抗癌效果。進而，也明確了其直接以BRD4-NUT融合基因的轉錄產物mRNA為靶、以及以EGFR基因與CDK2基因的轉錄產物mRNA的3'UTR區為靶。另外，也明確了其抑制CDK6基因的表現。

【0132】 在癌的治療中，藥劑抵抗性常常成為問題。對肺癌在臨床應用上實際使用EGFR抑制劑，有效性也得到了確認，但另一方面，對EGFR抑制劑的抵抗性成為問題。該方面如上述實施例A群所示，可知藉由導入miR-X，即使對EGFR抑制劑抵抗性的肺癌細胞，也能夠藉由使EGFR本身減少來抑制該肺癌細胞的增殖，顯示出miR-X能夠克服EGFR抵抗性肺癌的藥劑抵抗性。

【0133】 另外，NUT中線癌係罕見的惡性度極高的預後不良的癌，也已知其主病因係BRD4-NUT融合基因，此前還沒有治療方法，正以臨床研究級別使用BET抑制劑(例如，參照Stathis A ET AL., CANCER DIS, 2016, vol 6, 第492-500頁)。該方面如上述實施例A群所示，發現藉由使miR-X直接抑制BRD4-NUT融合基因，從而對NUT中線癌細胞也發揮出高抗癌效果。進而發現，甚至對於BET抑制劑抵抗性的NUT中線癌細胞也能夠抑制增殖。這表明miR-X對頑固性的NUT中線癌極為有效。

【0134】進而，在miR-X經部分修飾所得的雙股RNA(基因設計-1、基因設計-2、基因設計-3、及基因設計-4)中也確認到與miR-X同等的癌抑制效果，明確：藉由利用結構性方法修飾微小RNA，也能夠使活性成分多樣化。

【0135】根據以前的研究也表明，1個miRNA藉由與各基因的編碼區或3'UTR區直接結合，能夠抑制多個靶的表現，這表明1個miRNA以與癌的活化相關的多條路徑為靶。例如，已知hsa-miR-34a經由CCND1基因、CDK6基因、MYC基因、c-MET基因、NOTCH基因等多個靶來抑制腫瘤增殖(例如，參照Sun F ET AL., FEBS LETT, 2008, vol 582, 第1564-1568頁；Li Y ET AL., CANCER RES, 2009, vol 69, 第7569-7576頁.)。在上述實施例A群中確認到如下效果：miR-X及其變體藉由以BRD4基因、BRD3基因、EGFR基因、CDK2基因、及CDK6基因為靶來抑制在裸小鼠的皮下形成的由胰腺癌細胞株MIAPaCa2細胞導致的腫瘤增大。

【0136】如上所述，本實施方式提供一種藥物組成物，其尤其是對BRD4基因、BRD3基因、EGFR基因、CDK2基因、或CDK6基因活化所導致的腫瘤、進而對表現BRD4-NUT融合基因的腫瘤確認到有效性。

【0137】[實施例B] miR-766-5p的癌抑制效果的研究

對於大腸癌細胞株HCT116+/+(p53基因為野生型的細胞株)、HCT116-/(缺失野生型的p53基因的細胞株)、食道癌細胞株KYSE150、及胰腺癌細胞株MIAPaCa2，使用Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen公司)，依照隨附的工序說明書將10 nmol/L的miR-766-5p導入至靶癌細胞株中，對於導入後72小時後的各導入細胞，按照實施例A2所記載的要領，對BRD4及MYC進行西方印跡法。將其結果示於圖8-1。

【0138】如圖8-1所示，明確藉由導入miR-766-5p，上述癌細胞的BRD4基因及其下游的MYC基因的表現受到抑制。

【0139】其次，使用將BRD4基因的CDS區與3'UTR區引入至螢光素酶載體中而成的構建物，對miR-766-5p利用螢光素酶報告基因分析進行驗證。與miR-766-5p的鹼基序列同源的區域在CDS區存在5處(R1-5)，在3'UTR區存在1處(R6)(圖8-2)。

【0140】該分析所使用的螢光素酶報告基因質粒係藉由在pmiRGlo雙螢光素酶miRNA靶表現載體(pmiRGlo Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector)(Promega公司)的螢光素酶基因的下游插入包含該同源區的BRD4基因的CDS區或3'UTR區而製作的。使用Lipofectamine2000(Invitrogen公司)，按照隨附的工序說明書將螢光素酶報告基因質粒導入至大腸癌細胞株HCT116/-細胞中，第二天導入miR-766-5p或對照miRNA(miR-NC)。2天後使用雙螢光素酶報告基因檢測系統(Dual-Luciferase Reporter Assay System)(Promega公司)測定螢火蟲螢光素酶活性與海腎螢光素酶活性，相對螢光素酶活性係藉由利用相應內部標準對照的海腎螢光素酶活性進行修正，將螢火蟲螢光素酶活性標準化而算出。

【0141】圖8-3表示以BRD4基因的CDS區的同源部分的R1與R2為靶時上述螢光素酶報告基因分析的結果(C)。另外，圖8-3(A)及(B)表示靶序列的位置關係。據此認為miR-766-5p以BRD4的CDS區的R1與R2為靶。

【0142】圖8-4表示以BRD4基因的CDS區的同源部分的R3為靶時上述螢光素酶報告基因分析的結果(C)。另外，圖8-4(A)及(B)表示靶序列的位置關係。據此認為miR-766-5p以BRD4的CDS區的R3為靶。

【0143】圖8-5表示以BRD4基因的CDS區的同源部分的R4為靶時上述螢光素酶報告基因分析的結果(C)。另外，圖8-5(A)及(B)表示靶序列的位置關係。據此認為miR-766-5p不以BRD4的CDS區的R4為靶。

【0144】圖8-6表示以BRD4基因的CDS區的同源部分的R5為靶時上述螢光素酶報告基因分析的結果(C)。另外，圖8-6(A)及(B)表示靶序列的位置關係。據此認為miR-766-5p以BRD4的CDS區的R5為靶。

【0145】圖8-7表示以BRD4基因的3'UTR區的同源部分的R6為靶時上述螢光素酶報告基因分析的結果(C)。另外，圖8-7(A)及(B)表示靶序列的位置關係。由此表明miR-766-5p不以BRD4基因的3'UTR區為靶。

【0146】根據以上的結果表明，miR-766-5p至少以BRD4基因的CDS區的R1、R2、R3、及R5為靶來抑制BRD4的表現，對過度表現BRD4基因的癌具有抑制作用。

【0147】[實施例C1]對神經母細胞瘤細胞的MYCN抑制效果及增殖抑制效果

作為神經母細胞瘤細胞，使用MYCN基因擴增的細胞及MYCN基因未擴增的細胞，評估miR-3410對它們的細胞增殖抑制效果。作為MYCN基因擴增的細胞株，準備GOTO(從美國典型培養物保藏中心(ATCC)購買)、IMR-32(從ATCC購買)及RT-BMV-C6(由京都府立醫科大學小兒科學教室提供)，作為MYCN基因未擴增的細胞株，準備SK-N-AS及SH-SY5Y(均從ATCC購買)。以與實施例A1同樣的方式，分別使用Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen公司)，依照隨附的工序說明書，對靶癌細胞株導入10 nmol/L的miR-X(對照為對照miRNA(陰性對照#1(Ambion公司)：miR-NC)。另外，同時也對si-BRD4(20 nM；對照為siNC)、

JQ1(500 nM；對照為DMSO)、及OTX015(500 nM；對照為DMSO)評估細胞增殖抑制效果。將結果示於圖9-1、9-2。

【0148】圖9-1表示MYCN基因擴增的各細胞株的導入miR-NC或miR-X(圖9-1中標記為miR-3140)後的細胞增殖曲線(GOTO細胞株(A)、IMR-32細胞株(B)、RT-BMV-C6(C))、導入si-BRD4或siNC後的細胞增殖曲線(GOTO細胞株(D)、IMR-32細胞株(E)、RT-BMV-C6(F))、添加JQ1或DMSO後的細胞增殖曲線(GOTO細胞株(G)、IMR-32細胞株(H)、RT-BMV-C6(I))、及添加OTX015或DMSO後的細胞增殖曲線(GOTO細胞株(J)、IMR-32細胞株(K)、RT-BMV-C6(L))。在任一細胞株中，藉由投予miR-X，均確認到了顯著的增殖抑制效果。

【0149】圖9-2表示MYCN基因未擴增的各細胞株的導入miR-NC或miR-X(圖9-2中標記為miR-3140)後的細胞增殖曲線(SK-N-AS細胞株(A)、SH-SY5Y細胞株(B))、導入si-BRD4或siNC後的細胞增殖曲線(SK-N-AS細胞株(C)、SH-SY5Y細胞株(D))、添加JQ1或DMSO後的細胞增殖曲線(SK-N-AS細胞株(E)、SH-SY5Y細胞株(F))、及添加OTX015或DMSO後的細胞增殖曲線(SK-N-AS細胞株(G)、SH-SY5Y細胞株(H))。在任一細胞株中，藉由投予miR-X，均確認到了顯著的增殖抑制效果。

【0150】[實施例C2]

關於導入了miR-NC或miR-X的MYCN擴增的神經母細胞瘤細胞株中的BRD4及MYCN的表現、以及MYCN未擴增的神經母細胞瘤細胞株中的BRD4及MYC的表現，依照實施例A2，藉由西方印跡法進行評估。將結果示於圖9-3。圖9-3(A)表示MYCN擴增的神經母細胞瘤細胞株中的BRD4及MYCN的表現量，圖9-3(B)表示MYCN未擴增的神經母細胞瘤細胞株中的BRD4及MYCN的表現量。

【0151】 [實施例C3]

以GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 甘油醛-3-磷酸脫氫酶)基因的mRNA表現水平為基準, 藉由定量RT-PCR來評估導入了miR-NC或miR-X(圖9-4中標記為miR-3140)的神經母細胞瘤細胞株(IMR-32及RT-BMV-C6)中的MYCN基因的mRNA表現水平。將結果示於圖9-4。圖9-4(A)表示IMR-32細胞株中的MYCN的表現量, 圖9-4(B)表示RT-BMV-C6細胞株中的MYCN的表現量。

【0152】 在神經母細胞瘤中, MYCN的基因擴增為預後不良的生物標記。對於MYCN擴增的細胞及未擴增的細胞, 與針對BRD4的siRNA(si-BRD4)或BET抑制劑(JQ1及OTX015)相比, miR-3140均表現出良好的增殖抑制效果(圖9-1、圖9-2)。在MYCN擴增的細胞中, 導入miR-3140(10nM)確認到BRD4的抑制, 進而確認到MYCN的mRNA及蛋白質水平的表現降低。另一方面, 在MYCN未擴增的細胞中, 確認到MYC的表現降低(圖9-3、圖9-4)。

【0153】 [實施例D1]

在22種膠質母細胞瘤細胞株中, 對由miR-X產生的細胞增殖抑制效果進行評估。依照實施例A1, 以20 nM的濃度轉染(transfection)miR-X後, 在72小時後藉由結晶紫染色評估細胞增殖。

【0154】 作為膠質母細胞瘤細胞株, 準備A172、AM-36、Becker、GB-1、KALS-1、KINGS-1、KNS-42、KNS-60、KNS-81、KNS-89、KS-1、Marcus、NMC-G1、No.10、No11、SF126、T98G(以上均從JCRB細胞庫購買)、U-87MG(從ATCC購買)、U-251-MG(從JCRB細胞庫購買)、U373-MG(從ATCC購買)、YH-13(從JCRB細胞庫購買)及YKG-1(從JCRB細胞庫購買)。

【0155】如圖10(A)至(V)所示，在22種中，19種膠質母細胞瘤細胞藉由導入miR-X(圖10中標記為miR-3140)而將細胞增殖抑制為60%以下。

【0156】日本專利申請案2017-2290467號(申請日：2017年11月29日)的揭示內容係藉由參照將其整體併入至本說明書中。本說明書中所記載的全部文獻、專利申請案、及技術標準係以與具體且分別標明各文獻、專利申請案、及技術標準係藉由參照而併入時相同的程度藉由參照而併入至本說明書中。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 國立大學法人東京醫科齒科大學		
<120> 包含微小 RNA 及其衍生物作為活性成分之藥物組成物		
<130> 578549		
<160> 5		
<170> PatentIn version 3.5		
<210> 1		
<211> 20		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 1		
agcuuuuggg aaucaggua	20	
<210> 2		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		
aggaggaaau ggugcugguc uu	22	
<210> 3		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 3		
agcuuuuggg aaucaggua kk	22	
<210> 4		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 4		
uaccugaauu hccaaaagcu uu	22	
<210> 5		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 5		
acuccagccc cacagccuca gc	22	

【發明摘要】

【中文發明名稱】 包含微小RNA及其衍生物作為活性成分之藥物組成物

【英文發明名稱】 PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING
MICRORNA AND DERIVATIVES THEREOF AS AN
ACTIVE INGREDIENT

【中文】

本發明提供一種藥物組成物，其基於以癌與BRD4的關係為出發點的新概念，用於醫治腫瘤。本發明的藥物組成物包含具有序列編號1、序列編號2、序列編號4或序列編號5所表示的鹼基序列的多核苷酸，用於醫治腫瘤。

【英文】

The present invention provides a pharmaceutical composition which is based on a novel concept starting from the relationship between cancer and BRD4, for use in a treatment of tumor. The pharmaceutical composition comprises a polynucleotide having a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5, and is used for treatment of tumor.

【指定代表圖】 圖1-5

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種藥物組成物，其用於醫治腫瘤，且包含具有序列編號1、序列編號2、序列編號4、或序列編號5所表示的鹼基序列的多核苷酸。

【第2項】如申請專利範圍第1項所述之藥物組成物，其中，所述多核苷酸在5'末端或3'末端進而具有1個以上的任意的核苷酸。

【第3項】如申請專利範圍第1或2項所述之藥物組成物，其中，所述多核苷酸具有序列編號1所表示的鹼基序列，且於3'末端具有2個任意的核苷酸。

【第4項】如申請專利範圍第1至3項中任一項所述之藥物組成物，其以雙股的形式包含所述多核苷酸。

【第5項】如申請專利範圍第1至4項中任一項所述之藥物組成物，其中，所述多核苷酸為下述(1)的雙股多核苷酸、及下述(2)的雙股多核苷酸的至少一種：

(1)由鹼基序列為“AGCUUUUGGGAAUUCAGGUAK₁K₂”[K₁與K₂分別獨立為任意的核苷酸]的單股多核苷酸、及鹼基序列為“UACCUGAAUUhCCAAAAGCUUU”[h為任意的核苷酸]的單股多核苷酸構成的大致互補的雙股多核苷酸；

(2)由鹼基序列為“AGGAGGAAUUGGUGCUGGUCUU”的單股多核苷酸、及鹼基序列為“ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC”的單股多核苷酸構成的大致互補的雙股多核苷酸。

【第6項】如申請專利範圍第1至5項中任一項所述之藥物組成物，其中，所述多核苷酸包含至少1種經修飾的核苷酸。

【第7項】如申請專利範圍第1至6項中任一項所述之藥物組成物，其中，所述多核苷酸中置換、缺失或附加了1個或2個鹼基。

【第8項】 如申請專利範圍第1至7項中任一項所述之藥物組成物，其中，所述多核苷酸內包、或結合於藥學上可接受的載體。

【第9項】 如申請專利範圍第1至8項中任一項所述之藥物組成物，其中，作為醫治對象的腫瘤包含表現BRD4的腫瘤細胞。

【第10項】 如申請專利範圍第1至9項中任一項所述之藥物組成物，其中，作為醫治對象的腫瘤包含表現BRD4-NUT融合基因的基因產物的腫瘤細胞。

【第11項】 如申請專利範圍第1至10項中任一項所述之藥物組成物，其中，作為醫治對象的腫瘤包含表現選自由CDK2、BRD3、EGFR、及CDK6所組成之群中的至少1種的腫瘤細胞。

【第12項】 如申請專利範圍第1至11項中任一項所述之藥物組成物，其中，作為醫治對象的腫瘤為選自由食道癌、肺癌、口腔癌、胃癌、大腸癌、子宮癌、皮膚癌、血液腫瘤、腦腫瘤、神經母細胞瘤、膠質母細胞瘤、乳癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、食道癌、肝癌、腎癌及NUT中線癌所組成之群中的至少1種。

【第13項】 如申請專利範圍第1至12項中任一項所述之藥物組成物，其中，作為醫治對象的腫瘤係能夠向局部投予所述藥物組成物的腫瘤。

【第14項】 一種藥物組成物，其用來醫治表現選自由BRD4、CDK2、BRD3、EGFR、及CDK6所組成之群中的至少1種的腫瘤，且包含選自由hsa-miR-3140、hsa-miR-766、及它們的衍生物所組成之群中的至少1種。

