

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年8月3日(03.08.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/131208 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/7088 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/003059
- (22) 国際出願日: 2017年1月27日(27.01.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-014379 2016年1月28日(28.01.2016) JP
特願 2016-124328 2016年6月23日(23.06.2016) JP
- (71) 出願人: 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)
[JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 宮野 敦子(MIYANO Atsuko); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 須藤裕子(SUDO Hiroko); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 高山 愛子(TAKAYAMA Aiko); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 荒井 大河(ARAI Taiga); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING AND/OR PREVENTING CANCER

(54) 発明の名称: 癌の治療及び/又は予防用医薬組成物

(57) Abstract: Provided is a new pharmaceutical composition for treating and/or preventing cancer, the active ingredient of said pharmaceutical composition being a polynucleotide derived from various cancer-related miRNA. Further provided are a combination drug combining said pharmaceutical composition with a separate antitumor drug, and a method for carrying out treatment or prevention on a subject who has cancer using said pharmaceutical composition or combination drug. The present invention pertains to a pharmaceutical composition for treating and/or preventing cancer, said pharmaceutical composition containing, as an active ingredient, a polynucleotide containing a base sequence represented by SEQ ID NO: 1, or a base sequence represented by SEQ ID NO: 1 in which one base has been substituted (if at least a portion of the polynucleotide is DNA, uracil in the region corresponding to the DNA in the base sequence is replaced by thymine).

(57) 要約: 本発明は、癌と関連する様々なmiRNAを由来とするポリヌクレオチドを有効成分とする新たな癌の治療及び/又は予防用医薬組成物、この医薬組成物と別の抗腫瘍剤との組み合わせ医薬品、並びに、これらの医薬組成物又は組み合わせ医薬品を用いて癌をもつ被検体を治療又は予防する方法を提供する。本発明は、配列番号1で表される塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列を含むポリヌクレオチドを有効成分として含む、癌の治療及び/又は予防用医薬組成物(但し前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部がDNAである場合、前記塩基配列中のDNAに相当する領域のウラシルはチミンに読み替える)に関する。



WO 2017/131208 A1

明 細 書

発明の名称： 癌の治療及び／又は予防用医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明はマイクロRNA由来のポリヌクレオチドを有効成分とする、癌の治療及び／又は予防用医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] マイクロRNA (miRNA) は16～28塩基のタンパク質非翻訳RNAであり、miRBase release 21 (<http://www.mirbase.org/>) によるとヒトには現在2590種類存在することが知られている。近年、miRNAは生体内でさまざまな遺伝子の発現抑制を行う分子として注目されている。ゲノム上には各miRNA遺伝子の領域が存在し、RNAポリメラーゼIIによりヘアピン構造のRNA前駆体として転写され、核内でDrosha、細胞質内でDicerと呼ばれる2種類のRNaseIII切断活性を有するdsRNA切断酵素により切断され、成熟miRNAが形成される。この成熟miRNAはRISCと称するタンパク質複合体に取り込まれ、相補的配列をもつ複数のターゲット遺伝子のmRNAと相互作用し、遺伝子の発現を抑制することが知られている（非特許文献1）。

[0003] ある種のmiRNAは、癌を含めたヒト疾患との関連が示唆されており、特に癌では、例えばhsa-miR-8073、hsa-miR-6893-5p、hsa-miR-575など多くのmiRNAが血液中の膵臓癌特異的マーカーとなることが知られている（非特許文献1、特許文献1）。

[0004] また、癌細胞の増殖に関与するmiRNAだけでなく、癌細胞を抑制する方向に働くmiRNAの存在が報告されており、miRNAの発現パターンを利用した癌の治療法が示唆されている。具体例として、hsa-Let-7aなど153個のmiRNAを含む活性化血清を投与してmiRNAを上方調節することにより癌などの疾患を治療する方法（特許文献2）、hsa

—Let-7aなど多くのmiRNAを含む体液を用いて肺癌を治療する方法（特許文献3）、体内の循環エクソソームに含まれるmiR-1321など多くのmiRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与して血液癌を治療する方法（特許文献4）が知られている。

[0005] また、hsa-miR-30a、hsa-miR-221-5p、hsa-miR-146aなど乳癌細胞に発現するmiRNAが正常血管の新生を抑制する作用を有することから、これらmiRNAの腫瘍治療剤としての利用可能性について報告がある（特許文献5）。しかしながら、特許文献5で実験的に確認できているのはあくまで正常血管の新生を抑制する作用であり、当該作用の確認のみをもって実際に腫瘍治療剤としての利用が可能であるかどうかを判断することはできず、特許文献5ではこれらmiRNAを実際に腫瘍治療剤として利用できることについては記載されていないのに等しい。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開WO2015/182781
特許文献2：国際公開WO2011/029903
特許文献3：国際公開WO2014/072468
特許文献4：国際公開WO2014/071205
特許文献5：国際公開WO2012/121178

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Kojima, M PLoS One, 10 (2) (2015)
) “MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary-tract cancers.”

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、癌と関連する様々なmiRNAから、様々な癌種に共通して治療及び／又は予防効果を奏するmiRNAを同定し、該miRNAを由来とするポリヌクレオチドを有効成分とする新たな癌の治療及び／又は予防用医薬組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討の結果、癌患者の体液もしくは組織中で発現が上昇又は減少しているmiRNAより癌細胞の増殖を抑制する新規のポリヌクレオチドを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下の(1)～(14)を含む。

(1) 5'側の塩基配列として以下の(a)又は(b)の塩基配列を含むポリヌクレオチドを有効成分として含む、癌の治療及び／又は予防用医薬組成物：

(a) 配列番号1で表される塩基配列

(b) 配列番号1で表される塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列。

(2) 前記(b)の塩基配列が、配列番号1で表される塩基配列の5'末端側から4～6番目のいずれか1個の塩基が置換した塩基配列である、(1)に記載の医薬組成物。

(3) 前記ポリヌクレオチドが、5'側の塩基配列として配列番号1～4のいずれかで表される塩基配列を含むポリヌクレオチドである、(1)又は(2)に記載の医薬組成物。

(4) 前記ポリヌクレオチドの塩基配列長が8～60塩基である、(1)～(3)のいずれかに記載の医薬組成物。

(5) 前記ポリヌクレオチドが、配列番号1で表される塩基配列の3'末端側に以下の(c)又は(d)の塩基配列を含む、(1)～(4)のいずれかに記載の医薬組成物：

(c) 配列番号5～11のいずれかで表される塩基配列

(d) 配列番号5～11のいずれかで表される塩基配列において、1～5個

の塩基が欠失、置換、挿入及び／又は付加された塩基配列。

(6) 前記ポリヌクレオチドが配列番号12～22のいずれかで表される塩基配列を含む、(1)～(5)のいずれかに記載の医薬組成物。

(7) 前記ポリヌクレオチドが一本鎖又は二本鎖である、(1)～(6)のいずれかに記載の医薬組成物。

(8) 前記ポリヌクレオチドがRNAである、(1)～(7)のいずれかに記載の医薬組成物。

(9) 癌が固形癌である、(1)～(8)のいずれかに記載の医薬組成物。

(10) 癌が、乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、肝癌、線維肉腫、肥満細胞腫及びメラノーマからなる群から選択される、(9)に記載の医薬組成物。

(11) 前記ポリヌクレオチドが、DNAの形態でベクターに発現可能に挿入されている、(1)～(10)のいずれかに記載の医薬組成物。

(12) 前記ポリヌクレオチドが、非カチオン性ポリマー担体、リポソーム担体、樹脂状担体、ナノ材料担体、マイクロ粒子担体、生体構造担体、ミセル担体、高分子微粒子及び磁気微粒子からなる群から選択される担体中に内包されている、又は、該担体に結合されている、(1)～(11)のいずれかに記載の医薬組成物。

(13) (1)～(12)のいずれかに記載の医薬組成物、並びに抗腫瘍剤を有効成分として含む、癌の治療及び／又は予防のための組み合わせ医薬品。

(14) (1)～(12)のいずれかに記載の医薬組成物、又は(13)に記載の組み合わせ医薬品を、癌に罹患した、又は癌に罹患したことのある被検体に投与することを含む、前記被検体において癌を治療又は予防する方法。

[0011] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2016-014379及び2016-124328号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明の癌の治療及び／又は予防用医薬組成物は、癌細胞の増殖を効果的に抑制することから、癌の治療や予防に有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]この図は、配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるh s a - m i R - 2 2 1 - 5 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるh s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるh s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA導入後の膵癌細胞株P a n c - 1の細胞生存数の、ネガティブコントロールオリゴの合成RNA導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（細胞生存比率%）を示す。。

[図2]この図は、配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるh s a - m i R - 2 2 1 - 5 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるh s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるh s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA導入後の乳癌細胞株M C F - 7の細胞生存数の、ネガティブコントロールオリゴの合成RNA導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（細胞生存比率%）を示す。

[図3]この図は、配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるh s a - m i R - 2 2 1 - 5 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるh s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるh s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA導入後の肺癌細胞株A 5 4 9の細胞生存数の、ネガティブコントロールオリゴ導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（細胞生存比率%）を示す。

[図4]この図は、配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩

基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるh s a - m i R - 2 2 1 - 5 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるh s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるh s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号20で表されるh s a - m i R - 4 6 4 5 - 5 pと同じ塩基配列を有する合成RNA導入後の胃癌細胞株NC 1 - N 8 7の細胞生存数の、ネガティブコントロールオリゴ導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（細胞生存比率%）を示す。

[図5]この図は、配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるh s a - m i R - 2 2 1 - 5 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるh s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるh s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA導入後の肝癌細胞株H e p G 2の細胞生存数の、ネガティブコントロールオリゴ導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（細胞生存比率%）を示す。

[図6]この図は、配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるh s a - m i R - 2 2 1 - 5 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるh s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるh s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA、及び配列番号20で表されるh s a - m i R - 4 6 4 5 - 5 pと同じ塩基配列を有する合成RNA導入後の大腸癌細胞株H C T 1 1 6の細胞生存数の、ネガティブコントロールオリゴ導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（細胞生存比率%）を示す。

[図7]この図は、配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号15で表されるh s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列

番号16で表される塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号17で表される塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号18で表される塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号19で表される塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号21で表される塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号22で表される塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号23で表されるh s a - m i R - 4 4 5 4と同じ塩基配列を有する合成RNA（比較例）導入後の大腸癌細胞株HCT116の細胞生存数の、ネガティブコントロールオリゴの合成RNA導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（それぞれ、細胞生存比率11%、19%、26%、50%、23%、16%、50%、5%及び103%）を示す。

[図8]この図は、配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号13で表されるh s a - m i R - 2 2 1 - 5 pと同じ塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号14で表されるh s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号15で表されるh s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 pと同じ塩基配列を有する合成RNA（本発明）、配列番号24で表されるh s a - m i R - 5 7 5と同じ塩基配列を有する合成RNA（比較例）及び配列番号25で表されるh s a - m i R - 1 3 2 1と同じ塩基配列を有する合成RNA（比較例）導入後の大腸癌細胞株HCT116の細胞生存数の、ネガティブコントロールオリゴ導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（それぞれ、細胞生存比率11%、15%、13%、19%、96%、93%）を示す。

[図9]この図は、配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩基配列を有する合成RNA（3 n M）を導入後の乳癌細胞株MCF-7の細胞生存数の、ネガティブコントロールオリゴの合成RNA導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（細胞生存比率72%）（A）、及び配列番号12で表されるh s a - m i R - 8 0 7 3と同じ塩基配列を有する合成RNA（3 n M）を導入後の正常細胞である乳腺上皮細胞株184B5の細胞生

存数の、ネガティブコントロールオリゴの合成RNA導入後の細胞生存数（100%）に対する割合（細胞生存比率102%）（B）を示す。

[図10]この図は、配列番号12で表されるhsa-miR-8073と同じ塩基配列を有する合成RNA及びネガティブコントロールオリゴの合成RNAを担癌マウスに投与後13日間の腫瘍体積の変化（B）と13日目の腫瘍体積比率（A）を示す。

発明を実施するための形態

[0014] <有効成分となるポリヌクレオチド>

本発明の癌の治療及び／又は予防用医薬組成物は、ACCUGGCA（配列番号1）又はACCUGGCAにおいて1個の塩基が置換された塩基配列（例えば、ACCUGCCA、ACCUUGCA、及びACCAGGCA；それぞれ配列番号2、3及び4）で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドを有効成分とすることを特徴とする。以下、本発明において有効成分となるポリヌクレオチドについて説明する。

[0015] 配列番号1で表される塩基配列は、ヒトのmiRNAであるhsa-miR-8073（miRBase Accession No. MIMAT0031000）の5'末端側の部分配列、あるいはヒトのmiRNAであるhsa-miR-221-5p（miRBase Accession No. MIMAT0004568）の5'末端側の部分配列として同定された塩基配列である。また、配列番号2、3及び4で表される塩基配列は、それぞれヒトのmiRNAであるhsa-miR-4722-3p（miRBase Accession No. MIMAT0019837）の5'末端側の部分配列、hsa-miR-6841-3p（miRBase Accession No. MIMAT0027585）の5'末端側の部分配列、及びhsa-miR-4645-5p（miRBase Accession No. MIMAT0019705）の5'末端側の部分配列として同定された塩基配列である。

[0016] これらmiRNAのうち、hsa-miR-8073は膵臓癌の特異的マ

ーカーとなるmiRNAの一部であることが知られている (Kojima M PLoS One, 10 (2) (2015) “MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary-tract cancers.”)。また、hsa-miR-221-5pは乳癌細胞で発現し、正常血管の新生の抑制に働くmiRNAの一部であることが知られているが (WO2012/121178)、膵癌やそれ以外の癌細胞の増殖を抑制すること、これらmiRNAの部分配列である配列番号1~4で表される塩基配列のポリヌクレオチドが癌細胞の増殖抑制に重要な役割を果たしていることについては本発明者が新規に見出した知見である。そして配列番号2~4で表される塩基配列は、配列番号1で表される塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列に相当する。

[0017] 従って、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1で表される塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列を含んでいれば特に制限はない。配列番号1で表される塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列の好ましい例は、配列番号1で表される塩基配列の5'末端側から4~6番目のいずれか1個の塩基が置換した塩基配列、例えば配列番号2~4で表される塩基配列である。すなわち、配列番号1で表される塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列 (例えば配列番号2~4) からなるポリヌクレオチドそのものであっても、あるいは、配列番号1で表される塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列 (例えば配列番号2~4) の5'末端側及び/又は3'側に別の塩基配列が付加されていてもよい。本発明のポリペプチドは、好ましくは、配列番号1で表される塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列 (例えば配列番号2~4) の3'末端側に別の塩基配列が付加されているポリヌクレオチドである。また、ポリヌクレオチドの塩基配列長は、好ましくは8~60塩基であり、より好ましくは16~28塩基である。

[0018] 配列番号 1 で表される塩基配列又は配列番号 1 で表される塩基配列において 1 個の塩基が置換した塩基配列（例えば配列番号 2～4）の 3' 末端側に付加される塩基配列としては、好ましくは以下の（a）又は（b）を部分配列として含む塩基配列であり、より好ましくは以下の（a）又は（b）を 5' 末端側に含む塩基配列であり、さらに好ましくは以下の（a）又は（b）からなる塩基配列である：

（a）配列番号 5～11 のいずれかで表される塩基配列、

（b）配列番号 5～11 のいずれかで表される塩基配列において、1～5 個、好ましくは 1～4 個、より好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 1～2 個、特に好ましくは 1 個の塩基が欠失、置換、挿入及び／又は付加された塩基配列。

[0019] 好ましい一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 1～4 のいずれかで表される塩基配列とその 3' 末端又は 5' 末端に付加された上記（a）又は（b）の塩基配列とからなるものであってもよい。

[0020] なお本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部が DNA である場合、配列番号 1～11 のいずれかで表される塩基配列中の DNA に相当する領域のウラシルはチミンに読み替えるものとする。

[0021] 配列番号 1～4 のいずれかで表される塩基配列の 3' 末端側に別の塩基配列が付加されているポリヌクレオチドの好ましい具体例としては、配列番号 12～20 のいずれかで表される塩基配列（但しそのポリヌクレオチドの少なくとも一部が DNA である場合、配列番号 12～20 で表される塩基配列中の DNA に相当する領域のウラシルはチミンに読み替える）を含むポリヌクレオチドが挙げられる。そのようなポリヌクレオチドの特に好ましい例は、配列番号 12～20 で表される塩基配列（但しそのポリヌクレオチドの少なくとも一部が DNA である場合、当該塩基配列中の DNA に相当する領域のウラシルはチミンに読み替える）からなるポリヌクレオチドである。なお、これら 9 種のポリヌクレオチドのうち、配列番号 12～15 又は 18 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドに関しては、既にヒトで同定されて

いるmiRNAとして知られている。これらmiRNAの名称とmiRBase Accession No. (登録番号) は表1に記載の通りである。

[0022] [表1]

配列番号	遺伝子名	miRBase登録番号
12	h s a - m i R - 8 0 7 3	M I M A T 0 0 3 1 0 0 0
13	h s a - m i R - 2 2 1 - 5 p	M I M A T 0 0 0 4 5 6 8
14	h s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 p	M I M A T 0 0 1 9 8 3 7
15	h s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 p	M I M A T 0 0 2 7 5 8 5
20	h s a - m i R - 4 6 4 5 - 5 p	M I M A T 0 0 1 9 7 0 5
23	h s a - m i R - 4 4 5 4	M I M A T 0 0 1 8 9 7 6
24	h s a - m i R - 5 7 5	M I M A T 0 0 0 3 2 4 0
25	h s a - m i R - 1 3 2 1	M I M A T 0 0 0 5 9 5 2

[0023] 配列番号12で表される塩基配列を有するmiRNAであるh s a - m i R - 8 0 7 3は、5'末端(1番目)から8番目が配列番号1で表される塩基配列、9番目以降が配列番号5で表される塩基配列で構成される。これは、前述の通り、膵臓癌の特異的マーカーであると知られているが、これまでにそのmiRNAの遺伝子又はその転写産物の配列を用いた化合物が腫瘍細胞を抑制するという報告はない。

[0024] 配列番号13で表される塩基配列を有するmiRNAであるh s a - m i R - 2 2 1 - 5 pは、5'末端(1番目)から8番目の塩基配列が配列番号1で表される塩基配列、9番目以降が配列番号6で表される塩基配列で構成される。このmiRNAは、前述の通り、乳癌細胞で発現し正常血管の形成阻害に働くと知られているが、これまでにそのmiRNAの遺伝子又はその転写産物の配列を用いた化合物が腫瘍細胞を抑制するという報告はない。

[0025] 配列番号14で表される塩基配列を有するmiRNAであるh s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 pは、5'末端(1番目)から8番目の塩基配列が配列番号2で表される塩基配列、9番目以降が配列番号7で表される塩基配列で構成される。このmiRNAは、Persson Hら、2011年、Can

cer Res. , 71号、p78-86に記載される方法によって同定されたものであるが、これまでにそのmiRNAの遺伝子又はその転写産物の配列を用いた化合物が腫瘍細胞を抑制するという報告はない。

[0026] 配列番号15で表される塩基配列を有するmiRNAであるhsa-miR-6841-3pは、5'末端(1番目)から8番目の塩基配列が配列番号3で表される塩基配列、9番目以降が配列番号8で表される塩基配列で構成される。このmiRNAは、Ladewig Eら、2012年、Genome Res. 22号、p1634-1645に記載される方法によって同定されたものであるが、これまでにそのmiRNAの遺伝子又はその転写産物の配列を用いた化合物が腫瘍細胞を抑制するという報告はない。

[0027] 配列番号20で表される塩基配列を有するmiRNAであるhsa-miR-4645-5pは、5'末端(1番目)から8番目の塩基配列が配列番号4で表される塩基配列、9番目以降が配列番号10で表される塩基配列で構成される。このmiRNAは、Persson Hら、2011年、Cancer Res. , 71号、p78-86に記載される方法によって同定されたものであるが、これまでにそのmiRNAの遺伝子又はその転写産物の配列を用いた化合物が腫瘍細胞を抑制するという報告はない。

[0028] 一方、配列番号16で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号1で表される塩基配列の3'末端側に、前記hsa-miR-4722-3p(配列番号14)の5'末端側から数えて9番目以降の塩基配列(配列番号7)をフュージョン(融合)させた人工ポリヌクレオチドである。同様に、配列番号17で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号1で表される塩基配列の3'末端側に、癌マーカーとして公知ではあるが腫瘍細胞を抑制することの報告はない配列番号23で表される塩基配列を有するmiRNAであるhsa-miR-4454(Kojima M PLoS One. 10(2)(2015) "MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary-tract cancers")の5'末端

側から数えて9番目以降の塩基配列（配列番号9）をフュージョン（融合）させた人工ポリヌクレオチドである。同様に、配列番号18で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号3で表される塩基配列の3'末端側に、前記h s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 p（配列番号14）の5'末端側から数えて9番目以降の塩基配列（配列番号7）をフュージョン（融合）させた人工ポリヌクレオチドである。同様に、配列番号19で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号3で表される塩基配列の3'末端側に、前記h s a - m i R - 4 4 5 4（配列番号23）の5'末端側から数えて9番目以降の塩基配列（配列番号9）をフュージョン（融合）させた人工ポリヌクレオチドである。同様に、配列番号21で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号4で表される塩基配列の3'末端側に、配列番号11、すなわち配列番号10で表される塩基配列の3'末端側にCUCで表される塩基配列をフュージョン（融合）させた人工ポリヌクレオチドである。同様に、配列番号22で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号4で表される塩基配列の3'末端側に、配列番号12で表される塩基配列を有するm i R N Aであるh s a - m i R - 8 0 7 3の5'末端側から数えて9番目以降の塩基配列（配列番号5）をフュージョン（融合）させた人工ポリヌクレオチドである。

[0029] 本発明のポリヌクレオチドは、癌の治療及び／又は予防の効果を発揮する限りにおいてはいかなる構造をとってもよく、例えば、一本鎖、二本鎖、又は三本以上の多重構造をとってもよいが、好ましくは一本鎖又は二本鎖構造であり、より好ましくは一本鎖構造である。

[0030] 本発明のポリヌクレオチドは、癌の治療及び／又は予防の効果を発揮する限りにおいては、RNA、DNA、又はRNA／DNA（キメラ）であってもよいが（なお、本発明のポリヌクレオチドについて、配列表に記載の配列番号に該当する塩基配列の全部又は一部がDNAに相当する場合、配列表に記載のその塩基配列中のDNAに相当する領域のU（ウラシル）はT（チミン）に読み替えるものとする。）、好ましくはRNAである。RNAの形

態としては、前述のmiRNAの他、mRNA、rRNA、非コードRNA (non-coding RNA)、siRNA、shRNA、snRNA、snoRNA、snRNA、nkRNA (登録商標)、PnkRNA (商標)等の形態が挙げられるが、好ましくはmiRNAである。なお、miRNAには天然由来のmiRNAの他、いわゆるミミックと呼ばれる合成miRNAも包含される。

[0031] 本発明で使用可能なポリヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド類似体を含むことができる。ヌクレオチド類似体は、例えば、RNA分子の5'末端、3'末端及び／又は分子内部に配置することができる。特に、修飾ヌクレオチド類似体を組み込むことにより、ポリヌクレオチドをより安定化させることができる。

[0032] 好ましいヌクレオチド類似体の例は、糖又は骨格鎖修飾リボヌクレオチドであり、さらに好ましくは核酸塩基が修飾されたりボヌクレオチド、すなわち、天然に存在しない核酸塩基を含むリボヌクレオチドである。天然に存在しない核酸塩基としては、例えば、5位で修飾されたウリジン、又はシチジン、例えば、5-メチルウリジン、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-メチル-2-チオウリジン、あるいは5-ブロモウリジン、6-アゾウリジン、8位で修飾されたアデノシン及びグアノシン、例えば、8-ブロモグアノシン、デアザヌクレオチド、7-デアザーアデノシン；O-及びN-アルキル化ヌクレオチド、N6-メチルアデノシン、ユニバーサル塩基などが挙げられる。

[0033] 好ましい糖修飾リボヌクレオチドとしては、例えば、H、OR、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、CNからなる群より選択される基で糖部分の2'-OH基が置換されたりボヌクレオチドであってもよいし、あるいは2'-O、4'-Cメチレン架橋やエチレン架橋を含有(例えば、LNAやENAなど)するリボヌクレオチドであってもよい。ここで、Rは、C1~C6アルキル、アルケニル又はアルキニルであり、ハロは、F、Cl、Br又はIである。また糖修飾リボヌクレオチドにおける修飾された糖部分は

、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4' - チオリボース及び他の糖、ヘテロ環又は炭素環であってもよい。

[0034] 好ましい骨格鎖修飾リボヌクレオチドとしては、例えば、隣接するリボヌクレオチドと結合するホスホエステル基を、例えば、ホスホチオエート基の修飾基やボラノホスフェート、3' - (又は5') デオキシ-3' - (又は5') アミノホスホルアミデート、水素ホスホネート、ボラノリン酸エステル、ホルホルアミデート、アルキル又はアリールホスホネート及びホスホトリエステルで置換したものであってよい。前述した修飾を組み合わせてもよい。

[0035] <有効成分であるポリヌクレオチドと共に用いる担体>

本発明の癌の治療及び／又は予防用医薬組成物は、本発明のポリヌクレオチドに加えて薬学的に許容しうる担体を含んでもよい。薬学的に許容しうる担体は、標的細胞又は組織への本発明のポリヌクレオチドの輸送を容易にする物質であって、生物体を刺激せず、また、本発明のポリヌクレオチドの活性及び特性を阻害しないものが好ましく、また、それ自体が組成物を投与された個体に有害な抗体の生産を誘導することがないことが好ましい。担体のサイズについて、正常な血管壁を透過しないが、癌組織内の新生血管壁を透過することができるサイズが好ましい。担体が略球状体であるとした場合、好ましくは、担体の直径は例えば約1 nm以上100 nm未満のナノサイズであってよい。

[0036] 担体は、本発明のポリヌクレオチドを内包していてもよく、本発明のポリヌクレオチドと可動的に結合していてもよい。「可動的に結合している」とは、担体と1又は2以上の剤との間の電子的相互作用を指す。かかる相互作用は、限定されずに、共有結合、極性共有結合、イオン結合、静電結合、配位共有結合、芳香族結合、水素結合、双極子又はファンデルワールス相互作用を含む任意の化学結合の形をとってもよい。

[0037] 本発明のポリヌクレオチドと担体の結合部分としては、好ましくは5' 末端側又は3' 末端側であり、より好ましくは5' 末端側である。

- [0038] 担体の具体例としては、非カチオン性ポリマー担体、リポソーム担体、樹枝状（デンドリマー）担体、ナノ材料（ナノマテリアル）担体、マイクロ粒子担体、生体構造（バイオストラクチャル）担体、ミセル担体、高分子微粒子及び磁気微粒子が挙げられる。
- [0039] 非カチオン性ポリマー担体は、1又は2以上の剤を内包し得る、及び／又はその剤と可動的に結合し得る、例えば、アニオン性（すなわち、負に荷電した）ポリマー又は電子的に中性の綿状あるいは分枝したポリマーをさす。形態はマイクロ粒子であってもナノ粒子であってもよく、水溶性あるいは水不溶性であってもよく、生分解性あるいは非生分解性であってもよい。好適な非カチオン性ポリマー担体は当業者に知られている。非カチオン性ポリマー担体は、例えば、ポリ-L-グルタミン酸（PGA）、ポリ-（ γ -L-グルタミルグルタミン）（PGGA）、ポリ-（ γ -L-アスパルチルグルタミン）（PGAA）、ポリ-（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）を含んでもよく、少なくとも2種のポリマーの混合物を含んでもよい。
- [0040] リポソーム担体は、水性媒体中で、1又は2以上の剤を内包し得る、及び／又はその剤と可動的に結合し得る実質的に閉鎖された構造を形成する、極性の親水性基に付着した脂質を含む、脂質二重層構造を表し、単一の脂質二重層（すなわちユニラメラ）を含んでもよく、あるいは、2層又は3層以上の同心の脂質二重層（すなわちマルチラメラ）を含んでもよい。リポソーム担体は、略球状又は略楕円状の形状であってもよい。好適なりポソーム担体は当業者に知られており、種々の特性、例えば脂質二重層の剛性、脂質二重層の電子電荷及び／又は剤の一方もしくは両方とリポソーム担体との適合性などに基づいて選択することができる。リポソーム担体は、例えば、天然リン脂質、例えば卵ホスファチジルコリン、卵ホスファチジルエタノールアミン、大豆ホスファチジルコリン、レシチン及びスフィンゴミエリン、合成ホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミ

ン、N-1-2、3-ジオレイルオキシプロピル-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロライド、2, 3-ジオレキシオロキシー-N-2スペルミンカルボキシアミドエチルN, N-ジメチル-1-プロパンアンモニウムトリフルオロアセトアミド、ホスファチジルセリン及びこれらの誘導体、PEG化リン脂質などである。

[0041] 樹枝状担体は、1種又は2種以上の剤を内包し得る、及び／又はその剤と可動的に結合し得る、デンドリマー、デンドロン又はこれらの誘導体を指す。デンドリマーは、コアを有し、かつ、コアから広がる分枝構造の複数のシェルを有する巨大分子を指す。デンドロンは、焦点から広がる分枝を有するタイプのデンドリマーである。樹枝状担体は商業的に入手可能であるか、又は当業者に既知の方法によって合成することができる。樹枝状担体の少なくとも一部分は疎水性であってもよく、親水性であってもよい。樹枝状担体はカチオン性であってもよく、電子的に中性であってもアニオン性であってもよい。樹枝状担体は、コア分子を含んでもよく、例えば、エチレンジアミン、1, 4-ジアミノブタン、1, 6-ジアミノヘキサン及び1, 12-ジアミノデカンなどのアルキルジアミン、アンモニアなどのアミン、シスタミン、ポリエチレンジアミン（PEI）などのアルキルイミン、又はシクロトリホスファゼン及びチオホスホリルなどの塩素化リン分子を含んでもよい。また、樹枝状担体は、ポリプロピレンジアミン（PPDI）などのアルキルイミン、ポリアミドアミン（PAMAM）などの第三級アミン、ポリリジンなどのポリアミノ酸、及び／又はフェノキシメチル（メチルヒドラゾノ）（PMMH）を含んでもよい。

[0042] ナノ材料担体は、約1nm～約100nmの範囲の最長寸法を有し、1又は2以上の剤を内包し得る、及び／又はその剤と可動的に結合し得る材料を指す。好適なナノ材料担体は、当業者に知られており、例えば、ナノ粒子、ナノパウダー、ナノクラスター、ナノ結晶、ナノスフェア、ナノファイバー、ナノチューブ、ナノクラスター、ナノ結晶、ナノスフェア、ナノファイバー、ナノチューブ、ナノゲル及び／又はナノロッドを含んでもよい。また、

ナノ材料担体を構成する物質としては、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）、ポリアルキルシアノアクリレート（PACA）、ポリイプシロン-カプロラクトン（PCL）及びポリ乳酸（PLA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ-N-ビニルカプロラクタムアクリル酸ナトリウム、ポリ-N-イロプロピルアクリルアミド及びポリ酢酸ビニルなどが例示される。また、一部の態様においてナノ材料担体はフラーレンであってもよく、フラーレンは球状フラーレン（例えばC60）、カーボンナノチューブ、フラーレン誘導体を含んでもよい。

[0043] ミクロ粒子担体は、約100nm～約1000 μ mの範囲の最長寸法を有する粒子を指す。ミクロ粒子は、あらゆる形状及びあらゆる形態を有してもよい。ミクロ粒子担体を構成する物質としては、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）、ポリアルキルシアノアクリレート（PACA）、ポリイプシロン-カプロラクトン（PCL）及びポリ乳酸（PLA）、PLGA及びポリエチレングリコール（PEG）などが例示される。

[0044] 生体構造担体は、生体構造担体の多数の単位がアミノ酸及び／又はサッカリドであり、かつ、1又は2以上の剤を内包し得る、及び／又はその剤に可動的に結合しているポリマー又は化合物を指す。好適な生体構造担体は当業者に知られており、糖、単糖、オリゴ糖、多糖、環状多糖、非環状多糖、線状多糖、分枝多糖、アミノ酸、タンパク質及びペプチド、並びにこれらの半合成誘導体の任意のものを含んでもよく、例えば、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、及び γ -シクロデキストリン、メチル β -シクロデキストリン、ジメチル- β -シクロデキストリン、カルボキシメチル- β -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン、スルホブチルエーテル- β -シクロデキストリン、トリ-O-メチル- β -シクロデキストリン、及びグルコシル- β -シクロデキストリン、 β 1、3Dグルカン、 β 1、6グルカン、C反応性タンパク質、コンアルブミン、ラクトアルブミン、オボアルブミン、パルブアルブミン、血清アルブミン及びテクネチウムTC99m凝集アルブミン、ヒト血清アルブミン（HSA）及

びウシ血清アルブミン（BSA）組換えヒト血清アルブミン（rHSA）、グルコース（デキストロース）、フルクトース、ガラクトース、キシロース、リボース、スクロース、セルロース、シクロデキストリン及びデンプンなどの任意のものを含んでいてもよい。

[0045] ミセル担体は、脂質、任意の脂溶性（すなわち、親油性）分子、油、ワックス、ステロール、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質等がミセル構造をとったものである。ポリエチレングリコール（PEG）などのポリアルキレングリコール、ポリアスパラギン酸及びポリグルタミン酸（PGA）などのポリアミノ酸、ポリ（ γ -L-グルタミルグルタミン）（PGGA）、ポリフェニレンオキシド（PPO）、ポリ（ ϵ -カプロラクトン）（PCL）、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）（PLGA）及びジブロックコポリマーなどの任意のものを含んでもよい。

[0046] また、担体は、コンジュゲートであってもよく、核酸のセンス領域とアンチセンス領域とを連結する、ヌクレオチドリンカー、非ヌクレオチドリンカー、又はヌクレオチド/非ヌクレオチド複合リンカー、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン又は細胞取り込みを誘導することができる細胞レセプターに対するリガンドなどを含んでもよい。また、ヌクレオチドリンカーは、長さが2ヌクレオチド以上のリンカーであってもよく、核酸アプタマーであってもよい。

[0047] 本発明のポリヌクレオチドを含む癌の治療及び/又は予防用医薬組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤、医薬担体及び希釈剤から選択される少なくとも1つをさらに含んでいてもよい。本発明のポリヌクレオチドは、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤、潤滑剤及び/又はそれらの混合物を付加的に添加して、注射用剤形などの非経口用剤型、直腸内投与、鼻腔内投与、局所投与、皮下投与、経膈投与又は他の非経口投与に適した形態、又は、丸薬、カプセル、顆粒又は錠剤などの経口用剤型に、又は吸入若しくは注入による投与に適した形態を含む任意の剤形で製剤化することができる。

[0048] 本発明のポリヌクレオチドを液状製剤として使用する場合、担体は滅菌及

び生体に適したものが好ましく、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤などの他の通常の添加剤を添加してもよい。添加剤は、以下に限定されないが、好ましくは、大きく、ゆっくりと代謝される巨大分子、例えばタンパク質、多糖、ポリ乳糖、ポリグリコール酸、ポリマー状アミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体、ハイドロジェル及び不活性ウイルス粒子、コラーゲン類である。また、本発明のポリヌクレオチドを含む液状製剤は、水、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、アルブミン注射溶液、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール及びエタノールのような液体を含んでいてもよく、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝化物質等の補助物質も含んでいてもよい。

[0049] 本発明において、投与とは、いずれかの適切な方法で患者に本発明のポリヌクレオチド又はそれを有効成分として含む癌の治療及び／又は予防用医薬組成物を導入することを意味し、本発明のポリヌクレオチドのウイルス性又は非ウイルス性技術による運搬、あるいは本発明のポリヌクレオチドを発現する細胞の移植を含む。

[0050] 投与経路は、目的組織に到達することができる限り、経口又は非経口の多様な経路を介して投与できる。例えば、口腔内、直腸内、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、経皮、鼻腔内、吸入、眼球内又は皮内経路によって投与できる。

[0051] 投与量は、投与の目的、投与方法、腫瘍の種類、大きさ、投与対象者（被験体）の状況（性別、年齢、体重など）によって異なる。典型的には、投薬量はより低いレベルで投与され、所望の効果が達成されるまで増量する。本発明のポリヌクレオチドの好適な投与量は、例えば、体重1キログラムにつき1 pmol から100 nmol の範囲にあってもよく、体重1キログラムにつき0.001から0.25 mg の範囲、体重1 kg につき0.01から20 μ g の範囲、体重1 kg につき0.10から5 μ g の範囲にあってもよいが、これらに限定されない。かかる投与量は1～10回、より好ましくは5～10回投与することが望ましい。

[0052] <ポリヌクレオチドによる癌の抑制>

本発明のポリヌクレオチドは細胞に導入された形態で提供してもよい。「細胞に導入させる」とは、形質感染 (transfection) 又は形質導入 (transduction) によって外来のポリヌクレオチドを細胞に流入させることを意味する。形質感染は、例えば、リン酸カルシウム-DNA共沈法、DEAE-デキストラン-媒介形質感染法、ポリブレン媒介形質感染法、エレクトロポレーション法、微細注射法、リポソーム融合法、リポフェクタミントランスフェクション、及び原形質体融合法などを意味し、また、形質導入は、感染 (infection) を手段としてウイルス又はウイルスベクター粒子 (例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、センダイウイルス、レトロウイルス (レンチウイルスなど) などのベクター) を用いて、あるいはプラスミドベクターを用いて、他の細胞内に遺伝子を伝達させることを意味する。ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを発現可能とするために必要な要素 (例えばプロモーターなど) を含むことができるし、公知の手法で作製可能である (例えば、Sambrook and Russell, Molecular Cloning A Laboratory Manual (4th Ed., 2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press、特開2016-153403号公報、特開2016-025853号公報など)。このような方法によって本発明のポリヌクレオチドを導入された細胞は、本発明のポリヌクレオチドを高い水準で発現することができるため、このような細胞を癌組織に移植することにより癌の増殖を抑制させる細胞治療剤として利用することができる。

[0053] <癌の種類>

本発明において用語「腫瘍」及び「癌」は、悪性新生物を意味し、互換的に使用される。対象となる癌としては特に制限はないが、固形癌であることが好ましい。対象となる癌の具体例として膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、消化管、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、前立

腺、皮膚、胃、精巣、舌、血液、又は子宮の又はそれに由来する癌及び癌細胞を含む。好ましくは、乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮頸癌、子宮体癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、肝癌、線維肉腫、肥満細胞腫及びメラノーマが挙げられる。なお、これらの特定の癌には、例えば、乳腺癌、複合型乳腺癌、乳腺悪性混合腫瘍、乳管内乳頭状腺癌、肺腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌、神経上皮組織性腫瘍である神経膠腫、脳質上衣腫、神経細胞性腫瘍、胎児型神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、神経線維腫、髄膜腫、慢性型リンパ球性白血病、リンパ腫、消化管型リンパ腫、消化器型リンパ腫、小～中細胞型リンパ腫、盲腸癌、上行結腸癌、下行結腸癌、横行結腸癌、S状結腸癌、直腸癌、卵巣上皮癌、胚細胞腫瘍、間質細胞腫瘍、膵管癌、浸潤性膵管癌、膵臓癌の腺癌、腺房細胞癌、腺扁平上皮癌、巨細胞腫、膵管内乳頭粘液性腫瘍、粘液性嚢胞腺癌、膵芽腫、漿液性嚢胞腺癌、固体乳頭状癌、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、インスリノーマ、多発性内分泌腺腫症、非機能性島細胞腫、ソマトスタチノーマ、VIP産生腫瘍が包含されるが、これらに限定されない。

[0054] また、本発明において対象となる好ましい被験体は、哺乳動物であり、例えばヒトなどの霊長類、牛、豚、羊、馬などの家畜類、犬猫などのペット動物、動物園で飼育される哺乳動物を含み、好ましくはヒトである。

[0055] 本発明では、癌の治療及び／又は予防のために、本発明のポリヌクレオチド、又は本発明の癌の治療及び／又は予防用医薬組成物を被験体に投与することができる。

[0056] <抗腫瘍剤の種類>

本発明において、本発明のポリヌクレオチドを有効成分とする癌の治療及び／又は予防用医薬組成物と、（典型的には公知の）他の抗腫瘍剤又は他の抗腫瘍剤を含む医薬組成物とを組み合わせた医薬品（「組み合わせ医薬品」という）被験体に併用投与することができ、それにより好ましくは抗腫瘍効果を増大させることができる。本発明の癌の治療及び／又は予防用医薬組成物と他の抗腫瘍剤（又は他の抗腫瘍剤を含む医薬組成物）は、同時に、又は

、別々に被験体に投与されうる。別々に投与する場合には、いずれの投与が先であっても又は後であってもよく、それらの投与間隔、投与量、投与経路及び投与回数は専門医によって適宜選択されうる。同時に投与するための別の医薬剤型には、例えば、本発明の癌の治療及び／又は予防用医薬組成物と抗腫瘍剤を、薬学的に許容される担体（又は媒体）中で混合し製剤化して得られる医薬組成物（「混合医薬品」ともいう）も包含されるものとする。

[0057] 抗腫瘍剤の例としては、文献等で公知の下記の抗腫瘍剤が挙げられる。

[0058] チオテパやシクロスファミドのようなアルキル化剤として、ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンのような（すなわち、「などの」）アルキルスルホネート；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、及びウレドーパのようなアジリジン；アルトレタアミン、トリエチレンアミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド及びトリメチロールアミン等のエチレンイミン；ブラタシン及びブラタシノンのようなアセトゲニン；カンプトテシン；ブリオスタチン；カリスタチン；クリプトフィシン1、クリプトフィシン8；ドラスタチン；ドウオカルマイシン；エロイスロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クオルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチンのようなナイトロジェンマスタード；イホスファミド、メクロルエタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、テモゾロミド、ノベンピシン；フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ベンダムスチン、カルムスチン、クロロゾトシン、ストレプトゾシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニンヌスチンのようなニトロスウレア類が挙げられる。

[0059] 抗癌性抗生物質として、カリケアマイシン、ダイネマイシン、クロドロネート、エスペラマイシン、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロ

イシン、アドリアマイシン（ドキシソルピシン）、ブレオマイシン、アクリルピシン、アムルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン、マイトマイシンC、マイコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンが挙げられる。

[0060] 代謝拮抗物質として例えば、デノプテリン、プテロプテリン、メソトレキサート、トリメトレキサート、ペメトレキサドのような葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン、クラドリビン、クロファラビンのようなプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジン、トリフルリジン、カペシタビン、5-FU、ゲムシタビン、S-1、テガフルのようなピリミジン類似体；ヒドロキシカルバミド、ネララビンが挙げられる。

[0061] ホルモン製剤として例えば、アナストロゾール、ビカルタミド、デガレリクス、エストラムスチン、エキセメスタン、フルタミド、フルベストラント、ゴセレリン、レトロゾール、リュープリン、メドロキシプロゲステロン、メピチオスタン、オクトレオチド、タモキシフェン、トレミフェンがあり、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン、エンザルタミドのようなアンドロゲン製剤；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎性製剤；フロリン酸、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ビスアントレン、エダトラキセート、デフォファミン、デメコルシン、ジアジクオン、エルフォルミチン、酢酸エリプチニウム、エポチロン、エトグルシド、レンチナン、ロニダミン、メイタンシン、アンサミトシン、アビラテロン、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダンモール、ニトラエリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2-エ

チルヒドラジド、プロカルバジン、ラゾキサン、リゾキシム、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テニユアゾン酸、トリアジコン、ロリジンA、アンガイジン、ウレタン、ビンデシン、ダカーバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピポプロマン、ガシトシン、アラビノシド、BCG、クレスチン、ピシバニールなどが挙げられる。

[0062] 植物由来などその他の抗癌剤として、例えばドセタキセル、エトポシド、テニポシド、イリノテカン、ノギテカン、パクリタキセル、カバジタキセル、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、カルボプラチン、シスプラチン、ダカルバジン、エリブリン、L-アスパラキナーゼ、ミリプラチン、ミトキサントロン、ネダプラチン、オキサリプラチン、ペントスタチン、プロカルバジン、三酸化ヒ素、ソブゾキサン、タミバロテン、マイトキサントロン、ノバントロン、エダトレキセート、イバンドロナー、トポイソメラーゼインヒビター、ジフルオロメチロールニチン (DMFO)、レチノイン酸などが挙げられる。

[0063] 分子標的薬として、例えば、アファチニブ、アキシチニブ、アレクチニブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、クリゾチニブ、エルロチニブ、エベロリムス、ゲフィチニブ、ラパチニブ、ラムシルマブ、パニツムマブ、パゾパニブ、ペルツズマブ、ニボルマブ、レゴラフェニブ、レンバチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、テミシロリムス、トラスツズマブ並びにそれらの薬学的に許容可能な塩又は誘導体が挙げられる。

[0064] さらに、抗腫瘍剤は、文献等で公知の、 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{175}Lu 、 ^{176}Lu などの放射性同位体であってもよい。なお、放射性同位体は、腫瘍の治療や診断のために有効なものが望ましく、このような放射性同位体も、本発明における癌の治療及び／又は予防用医薬組成物に含まれてもよい。

<治療及び予防法>

さらにまた本発明は、本発明の癌の治療及び／又は予防用医薬組成物、あるいは本発明の癌の治療及び／又は予防用医薬組成物と前記の他の抗腫瘍剤

(又はその抗腫瘍剤を含む医薬組成物) とを含む組み合わせ医薬品を、癌に罹患した (又は癌に罹患したことのある) 被験体に投与することを含む、被験体において癌を治療及び／又は予防する方法も提供する。

[0065] 本明細書における「癌の治療」及び「抗腫瘍効果」なる用語は、本発明のポリヌクレオチド又は本発明の癌の治療及び／若しくは予防用医薬組成物で処置しない陰性対照と比較した癌細胞及び腫瘍に対する効果を指し、癌細胞の増殖の完全な阻止や、腫瘍の退縮又は消失だけでなく、本発明のポリヌクレオチド又は本発明の癌の治療及び／若しくは予防用医薬組成物で処置しない陰性対照と比較して癌細胞の増加を遅らせる (癌細胞の増加量をより少なくする) こと及び腫瘍成長を遅らせることも含む。

[0066] 本明細書における「予防」なる用語は、外科手術、化学療法、放射線療法、免疫療法などの癌療法における癌処置後の再発のリスクを低減するための癌再発の予防を含む。

[0067] 上記の医薬組成物、組み合わせ医薬品、有効成分であるポリヌクレオチド、用量、用法、製剤形態、対象となる癌の種類などについては、上で説明した内容をこの節でも同様に適用する。

実施例

[0068] 本発明を以下の実施例によってさらに具体的に説明する。しかし、本発明の範囲は、この実施例によって制限されないものとする。

[0069] [実施例 1] 合成 RNA の膵癌細胞への有効性

配列番号 12 で表される h s a - m i R - 8 0 7 3 と同じ塩基配列を有する (からなる ; 配列に関して本明細書中で同じ) 合成 RNA、配列番号 13 で表される h s a - m i R - 2 2 1 - 5 p と同じ塩基配列を有する合成 RNA、配列番号 14 で表される h s a - m i R - 4 7 2 2 - 3 p と同じ塩基配列を有する合成 RNA 及び配列番号 15 で表される h s a - m i R - 6 8 4 1 - 3 p と同じ塩基配列を有する合成 RNA のそれぞれの、膵癌細胞への有効性を評価した。

[0070] 膵癌細胞として P a n c - 1 細胞株 (A T C C ^(R) C R L - 1 4 6 9 TM) を

10% FBSを含んだDMEM培地（ナカライテスク社）に播いて、37℃、5% CO₂条件下で培養を行った。96ウェルプレートに1ウェルあたり各6×10³個の膵癌細胞Panc-1株を播いて、それぞれ30nMの濃度で添加した配列番号12、配列番号13、配列番号14若しくは配列番号15で表される塩基配列を有するRNA合成品（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimics）又はネガティブコントロールオリゴ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control）を、リポフェクタミンRNAiMAX（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて膵癌細胞に遺伝子導入した。24時間後に培養液を交換し、細胞数を5日間測定した。細胞数の測定は、Celltiter-glo（プロメガ社）試薬を用いてATP活性を測定することにより行い、得られた測定値を生存細胞数の指標とした。結果を図1に示す。評価試験はn=3で行い、図1のグラフにはネガティブコントロールと比較した膵癌細胞の生存比率（%）を平均±標準偏差で示す。

[0071] その結果、配列番号12～15で表される塩基配列を有するRNA合成品を遺伝子導入したPanc-1細胞株では、ネガティブコントロールオリゴを導入したPanc-1細胞株に比べて細胞生存比率はそれぞれ39%、56%、77%及び66%であった。

[0072] [実施例2] 合成RNAの乳癌細胞への有効性

配列番号12で表されるhsa-miR-8073と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるhsa-miR-221-5pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるhsa-miR-4722-3pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるhsa-miR-6841-3pと同じ塩基配列を有する合成RNAのそれぞれの、乳癌細胞への有効性を評価した。

[0073] 乳癌細胞としてMCF-7細胞株（ATCC^(R) HTB-22™）を、10% FBSを含んだRPMI培地（ナカライテスク社）に播いて37℃、5%

CO₂条件下で培養を行った。96ウェルプレートに1ウェルあたり6×10³個の乳癌細胞MCF-7株を播いて、それぞれ30nMの濃度で添加した配列番号12、配列番号13、配列番号14若しくは配列番号15で表される塩基配列を有するRNA合成品（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimics）又はネガティブコントロールオリゴ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control）をリポフェクタミンRNAiMAX（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて乳癌細胞に遺伝子導入した。24時間後に培養液を交換し、細胞数を5日間測定した。細胞数の測定は、Celltiter-glo（プロメガ社）試薬を用いてATP活性を測定することにより行い、得られた測定値を生存細胞数の指標とした。結果を図2に示す。評価試験はn=3で行い、図2のグラフにはネガティブコントロールと比較した乳癌細胞の生存比率（%）を平均±標準偏差で示す。その結果、配列番号12～15で表される塩基配列を有するRNA合成品を遺伝子導入した乳癌細胞では、ネガティブコントロールオリゴを導入した乳癌細胞に比べて細胞生存比率がそれぞれ68%、64%、81%及び49%であった。

[0074] [実施例3] 合成RNAの肺癌細胞への有効性

配列番号12で表されるhsa-miR-8073と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるhsa-miR-221-5pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるhsa-miR-4722-3pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるhsa-miR-6841-3pと同じ塩基配列を有する合成RNAのそれぞれの、肺癌細胞への有効性を評価した。

[0075] 肺癌細胞としてA549細胞株（ATCC^(R) CCL-185™）を、10%FBSを含んだRPMI培地（ナカライテスク社）に播いて37℃、5%CO₂条件下で培養を行った。96ウェルプレートに1ウェルあたり3×10³個の肺癌細胞A549株を播いて、それぞれ30nMの濃度で添加した配列

番号12、配列番号13、配列番号14若しくは配列番号15で表される塩基配列を有するRNA合成品（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimics）又はネガティブコントロールオリゴ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control）をリポフェクタミンRNAiMAX（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて肺癌細胞に遺伝子導入した。24時間後に培養液を交換し、細胞数を5日間測定した。細胞数の測定は、Celltiter-glo（プロメガ社）試薬を用いてATP活性を測定することにより行い、得られた測定値を生存細胞数の指標とした。結果を図3に示す。評価試験はn=3で行い、図3のグラフにはネガティブコントロールと比較した肺癌細胞の生存比率（%）を平均±標準偏差で示す。その結果、配列番号12～15で表される塩基配列を有するRNA合成品を遺伝子導入した肺癌細胞では、ネガティブコントロールオリゴを導入した肺癌細胞に比べて細胞生存比率がそれぞれ58%、59%、85%及び19%であった。

[0076] [実施例4] 合成RNAの胃癌細胞に対する有効性

配列番号12で表されるhsa-miR-8073と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるhsa-miR-221-5pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるhsa-miR-4722-3pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるhsa-miR-6841-3pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号20で表されるhsa-miR-4645-5pと同じ塩基配列を有する合成RNAのそれぞれの、胃癌細胞への有効性を評価した。

[0077] 胃癌細胞としてNC1-N87細胞株（ATCC^(R) CRL-5822™）を、10%FBSを含んだRPMI培地（ナカライテスク社）に播いて37℃、5%CO₂条件下で培養を行った。96ウェルプレートに1ウェルあたり6×10³個の胃癌細胞を播いて、それぞれ30nMの濃度で添加した配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15若しくは配列番号20

で表される塩基配列を有するRNA合成品（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimics）又はネガティブコントロールオリゴ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control）をリポフェクタミンRNAiMAX（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて胃癌細胞に遺伝子導入した。24時間後に培養液を交換し、細胞数を5日間測定した。細胞数の測定は、Celltiter-glo（プロメガ社）試薬を用いてATP活性を測定することにより行い、得られた測定値を生存細胞数の指標とした。結果を図4に示す。評価試験はn=3で行い、図4のグラフにはネガティブコントロールと比較した胃癌細胞の生存比率（%）を平均±標準偏差で示す。その結果、配列番号12～15及び20で表される塩基配列を有するRNA合成品を遺伝子導入した胃癌細胞では、ネガティブコントロールオリゴを導入した胃癌細胞に比べて細胞生存比率がそれぞれ83%、44%、59%、44%及び69%であった。

[0078] [実施例5] 合成RNAの肝癌細胞に対する有効性

配列番号12で表されるhsa-miR-8073と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるhsa-miR-221-5pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるhsa-miR-4722-3pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるhsa-miR-6841-3pと同じ塩基配列を有する合成RNAのそれぞれの、肝癌細胞への有効性を評価した。

[0079] 肝癌細胞としてHepG2細胞株（ATCC^(R) HB-8065™）を、10%FBSを含んだRPMI培地（ナカライテスク社）に播いて37℃、5%CO₂条件下で培養を行った。96ウェルプレートに1ウェルあたり6×10³個の肝癌細胞を播いて、それぞれ30nMの濃度で添加した配列番号12、配列番号13、配列番号14若しくは配列番号15で表される塩基配列を有するRNA合成品（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimics）又はネガティブコントロールオリ

ゴ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control）をリポフェクタミンRNAiMAX（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて肝癌細胞に遺伝子導入した。24時間後に培養液を交換し、細胞数を5日間測定した。細胞数の測定は、Celltiter-glo（プロメガ社）試薬を用いてATP活性を測定することにより行い、得られた測定値を生存細胞数の指標とした。結果を図5に示す。評価試験はn=3で行い、図5のグラフにはネガティブコントロールと比較した肝癌細胞の生存比率（%）を平均±標準偏差で示す。その結果、配列番号12～15で表される塩基配列を有するRNA合成品を遺伝子導入した肝癌細胞では、ネガティブコントロールオリゴを導入した肝癌細胞に比べて細胞生存比率がそれぞれ62%、20%、51%、及び31%であった。

[0080] [実施例6] 合成RNAの大腸癌細胞への有効性（1）

配列番号12で表されるhsa-miR-8073と同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号13で表されるhsa-miR-221-5pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号14で表されるhsa-miR-4722-3pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号15で表されるhsa-miR-6841-3pと同じ塩基配列を有する合成RNA、配列番号20で表されるhsa-miR-4645-5pと同じ塩基配列を有する合成RNAのそれぞれの、大腸癌細胞への有効性を評価した。

[0081] 大腸癌細胞としてHCT116細胞株（ATCC^(R) CCL-247™）を、10%FBSを含んだMcCoy's培地（ナカライテスク社）に播いて37℃、5%CO₂条件下で培養を行った。96ウェルプレートに1ウェルあたり6×10³個の大腸癌細胞HCT116株を播いて、それぞれ30nMの濃度で添加した配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15若しくは配列番号20で表される塩基配列を有するRNA合成品（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimics）又はネガティブコントロールオリゴ（サーモフィッシャーサイエ

ンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control) をリポフェクタミンRNAiMAX (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて大腸癌細胞に遺伝子導入した。24時間後に培養液を交換し、細胞数を5日間測定した。細胞数の測定は、Celltiter-glo (プロメガ社) 試薬を用いてATP活性を測定することにより行い、得られた測定値を生存細胞数の指標とした。結果を図6に示す。評価試験はn=3で行い、図6のグラフにはネガティブコントロールと比較した大腸癌細胞の生存比率(%)を平均±標準偏差で示す。その結果、配列番号12~15及び20で表される塩基配列を有するRNA合成産物を遺伝子導入した大腸癌細胞では、ネガティブコントロールオリゴを導入した大腸癌細胞に比べて細胞生存比率がそれぞれ11%、15%、13%、19%及び80%であった。

[0082] [実施例7] 合成RNAの大腸癌細胞への有効性(2)

配列番号16で表される塩基配列(配列番号1の3'末端側に、配列番号7すなわち配列番号14の5'末端側から9~22番目の塩基配列を付加した塩基配列)を有する合成RNA、配列番号17で表される塩基配列(配列番号1、すなわち配列番号12の5'末端側から1~8番目の塩基配列の3'末端側に、配列番号23で表されるhsa-miR-4454の5'末端側から9~20番目の塩基配列(配列番号9)を付加した塩基配列)を有する合成RNA、配列番号18で表される塩基配列(配列番号3の3'末端側に、配列番号7すなわち配列番号14の5'末端側から9~22番目の塩基配列を付加した塩基配列)を有する合成RNA、配列番号19で表される塩基配列(配列番号3、すなわち配列番号15の5'末端側から1~8番目の塩基配列の3'末端側に、配列番号23の5'末端側から9~20番目の塩基配列(配列番号9)を付加した塩基配列)を有する合成RNA、配列番号21で表される塩基配列(配列番号4の3'末端側に、配列番号20の5'末端側から9~19番目の塩基配列の3'末端側にCUCで表される塩基配列を付加した塩基配列(配列番号11)を付加した塩基配列)を有する合成

RNA、配列番号22で表される塩基配列（配列番号4、すなわち配列番号20の5'末端側から1~8番目の塩基配列の3'末端側に、配列番号12の5'末端側から9~22番目の塩基配列（配列番号5）を付加した塩基配列）を有する合成RNA、及び、癌マーカーとして公知である配列番号23で表されるhsa-miR-4454と同じ塩基配列を有する合成RNA（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimics）のそれぞれの、大腸癌への有効性を実施例6に記載の方法と同様にして評価した。

[0083] その結果、配列番号16、17、18、19、21及び22で表される塩基配列を有するRNA合成品をそれぞれ遺伝子導入した大腸癌細胞、及び配列番号12及び15で表される塩基配列を有するRNA合成品をそれぞれ遺伝子導入した大腸癌細胞（実施例6）では、細胞生存比率は50%以下であったのに対して、配列番号23で表される塩基配列を有するRNA合成品を遺伝子導入した大腸癌細胞の細胞生存比率は103%であり、ほとんど有効でなかった。結果を図7に示す。

[0084] 5'末端に配列番号1で表される塩基配列を含む配列番号12及び16、17、5'末端に配列番号3で表される塩基配列を含む配列番号15及び18、19で表される塩基配列からなる合成RNA、5'末端に配列番号4で表される塩基配列を含む配列番号21及び22は、いずれも大腸癌細胞の細胞生存比率を顕著に低下させた。配列番号17及び19と3'末端側の配列が共通である配列番号23で表される塩基配列を有する合成RNAは有効性を示さなかったことから、5'末端側の塩基配列（とりわけ、5'末端から1番目~8番目の塩基配列）が抗癌作用において重要であることが示された。

[0085] [比較例1] 合成RNAの大腸癌細胞への有効性

癌マーカーとして公知である配列番号24で表されるhsa-miR-575（miRBase Accession No. MIMAT0003240）と同じ塩基配列を有する合成RNA、及び血液癌に参与することが知

られている配列番号25で表されるhsa-miR-1321 (miRBase Accession No. MIMAT0005952)と同じ塩基配列を有する合成RNA (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimics)の大腸癌への有効性を実施例6に記載の方法と同様にして評価した。

[0086] その結果、配列番号12~15で表される塩基配列を有するRNA合成品を遺伝子導入した大腸癌細胞では細胞生存比率が20%以下であったのに対して、配列番号24又は25で表される塩基配列を有するRNA合成をそれぞれ遺伝子導入した大腸癌細胞の細胞生存比率は、それぞれ96%及び93%であった。結果を図8に示す。

[0087] [比較例2] 合成RNAの正常細胞に対する影響

配列番号12で表される塩基配列を有する合成RNA (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimics)の、正常細胞である乳腺上皮細胞に対する影響を評価した。

[0088] 乳腺上皮細胞として184B5株(ATCC^(R)CRL-8799™)を、BPE、ヒドロコルチゾン、hEGF、インスリンを含んだMEBM培地(ロンザ社)に播いて37℃、5%CO₂条件下で培養を行った。96ウェルプレートに1ウェルあたり6×10³個の細胞を播いて、3nMの濃度の配列番号12で表される塩基配列を有するRNA合成品又はネガティブコントロールオリゴ(サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control)をリポフェクタミンRNAiMAX(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用いて遺伝子導入した。24時間後に培養液を交換し、細胞数を5日間測定した。細胞数の測定は、Celltiter-glo(プロメガ社)試薬を用いてATP活性を測定することにより行い、得られた測定値を生存細胞数の指標とした。比較のため、乳腺上皮細胞184B5株の代わりに乳癌細胞株MCF-7を使用して、同様の実験を行った。

[0089] 結果を図9に示す。評価試験はn=3で行い、図9のグラフにはネガティ

ブコントロールと比較した細胞生存比率 (%) を平均±標準偏差で示す。その結果、配列番号 12 で表される塩基配列を有する RNA 合成品 (3 nM) を遺伝子導入した乳癌細胞株 MCF-7 では、細胞生存比率が 72% (図 9A) であったのに対して、乳腺上皮細胞の細胞生存比率は 102% であり、正常細胞に対する合成 RNA の影響は認められなかった (図 9B)。

[0090] [実施例 8] 合成 RNA の担癌マウスモデルに対する有効性

ヒト由来の癌細胞株を移植した担癌マウスを用いて、配列番号 12 で表される hsa-miR-8073 と同じ塩基配列を有する合成 RNA の抗腫瘍効果を検討した。

[0091] 6匹の Balb/cヌードマウス (日本チャールスリバー社) の背部皮下に、1匹あたり 5×10^6 個のヒト大腸癌細胞株 HCT116 (ATCC^(R) CCL-247TM) を移植し、腫瘍が直径 5 mm 程度の大きさになるまで成長させた。前記担癌マウス各 6 匹に配列番号 12 で表される塩基配列を有する合成 RNA (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVanaTM miRNA Mimics) 又はネガティブコントロールオリゴ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、mirVanaTM miRNA Mimic, Negative Control) (1匹あたり 2 nmol) と 0.5% アテロジーン Local Use (高研社) 50 μ l の混合溶液を、腫瘍周辺の皮下に投与した。その後、2日おきに計 3 回、各合成 RNA と 0.5% アテロジーン Local Use 混合溶液を同量ずつ各担癌マウスの腫瘍周辺の皮下に投与し、腫瘍の大きさを 2 日に 1 回計測した。なお、腫瘍の大きさは、 $0.5 \times (\text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径})$ の計算式を用いて体積を算出した。

[0092] その結果、最初の投与から 13 日後の配列番号 12 で表される塩基配列を有する合成 RNA を投与した検討群の腫瘍体積比率は、ネガティブコントロール群 (ネガティブコントロールオリゴを投与) の腫瘍体積を 100% としたとき 43% であった (図 10A)。また、合成 RNA を担癌マウスに投与後 13 日間の腫瘍体積の変化を図 10B に示した。

[0093] この結果から、配列番号 1 2 で表される塩基配列を有する合成 RNA は、癌細胞に対して、生体内で抗腫瘍効果を発揮することが示された。

産業上の利用可能性

[0094] 本発明の癌治療用医薬組成物は、癌の治療及び／又は予防のために有用である。

[0095] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

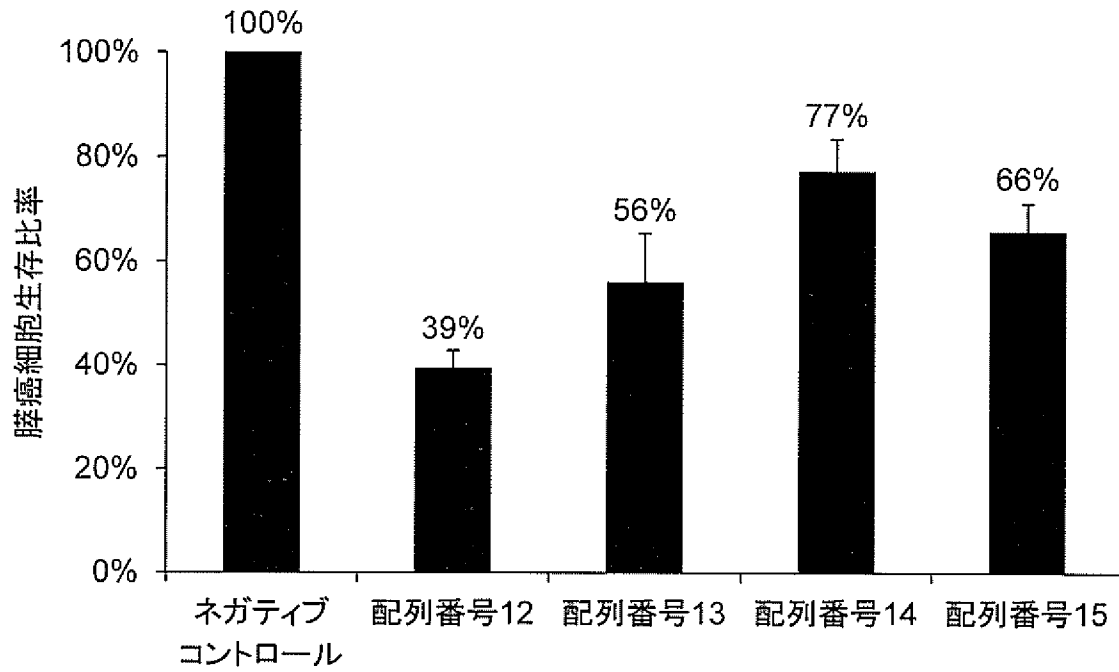
請求の範囲

- [請求項1] 5'側の塩基配列として以下の(a)又は(b)の塩基配列を含むポリヌクレオチドを有効成分として含む、癌の治療及び/又は予防用医薬組成物:
- (a) 配列番号1で表される塩基配列
 - (b) 配列番号1で表される塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列。
- [請求項2] 前記(b)の塩基配列が、配列番号1で表される塩基配列の5'末端側から4~6番目のいずれか1個の塩基が置換した塩基配列である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] 前記ポリヌクレオチドが、5'側の塩基配列として配列番号1~4のいずれかで表される塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項1又は2に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 前記ポリヌクレオチドの塩基配列長が8~60塩基である、請求項1~3のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項5] 前記ポリヌクレオチドが、配列番号1で表される塩基配列の3'末端側に以下の(c)又は(d)の塩基配列を含む、請求項1~4のいずれか1項に記載の医薬組成物:
- (c) 配列番号5~11のいずれかで表される塩基配列
 - (d) 配列番号5~11のいずれかで表される塩基配列において、1~5個の塩基が欠失、置換、挿入及び/又は付加された塩基配列。
- [請求項6] 前記ポリヌクレオチドが配列番号12~22のいずれかで表される塩基配列を含む、請求項1~5のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項7] 前記ポリヌクレオチドが一本鎖又は二本鎖である、請求項1~6のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項8] 前記ポリヌクレオチドがRNAである、請求項1~7のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項9] 癌が固形癌である、請求項1~8のいずれか1項に記載の医薬組成物。

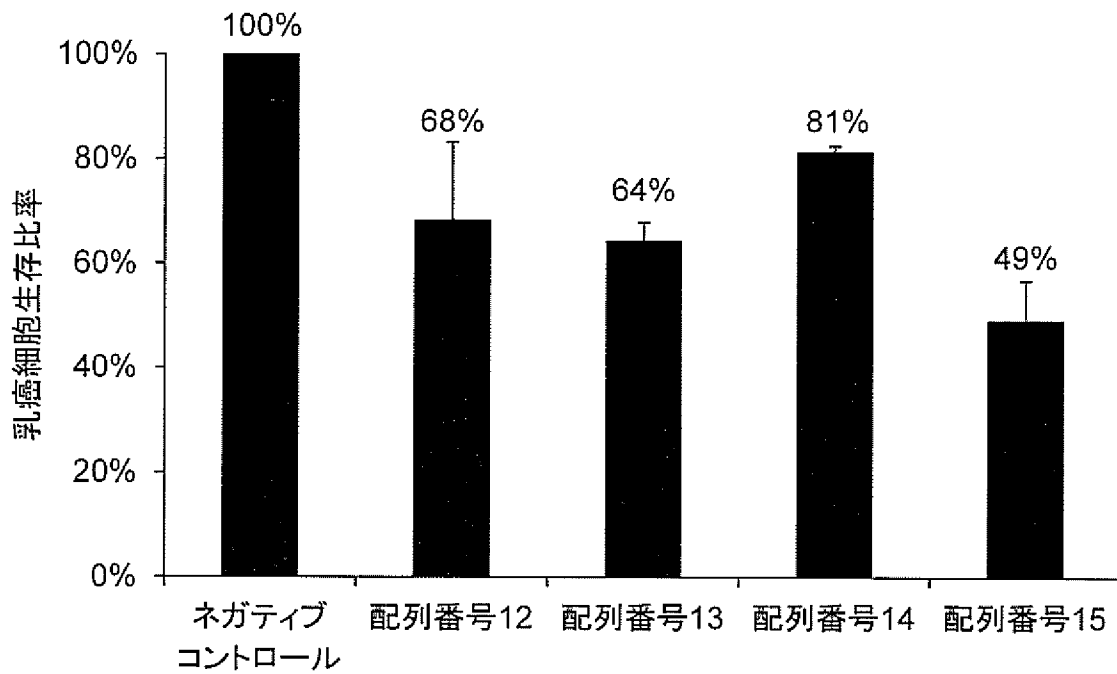
物。

- [請求項10] 癌が、乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、肝癌、線維肉腫、肥満細胞腫及びメラノーマからなる群から選択される、請求項9に記載の医薬組成物。
- [請求項11] 前記ポリヌクレオチドが、DNAの形態でベクターに発現可能に挿入されている、請求項1～10のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項12] 前記ポリヌクレオチドが、非カチオン性ポリマー担体、リポソーム担体、樹脂状担体、ナノ材料担体、マイクロ粒子担体、生体構造担体、ミセル担体、高分子微粒子及び磁気微粒子からなる群から選択される担体中に内包されている、又は、該担体に結合されている、請求項1～11のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項13] 請求項1～12のいずれか1項に記載の医薬組成物、並びに抗腫瘍剤を有効成分として含む、癌の治療及び／又は予防のための組み合わせ医薬品。
- [請求項14] 請求項1～12のいずれか1項に記載の医薬組成物、又は請求項13に記載の組み合わせ医薬品を、癌に罹患した、又は癌に罹患したことのある被検体に投与することを含む、前記被検体において癌を治療又は予防する方法。

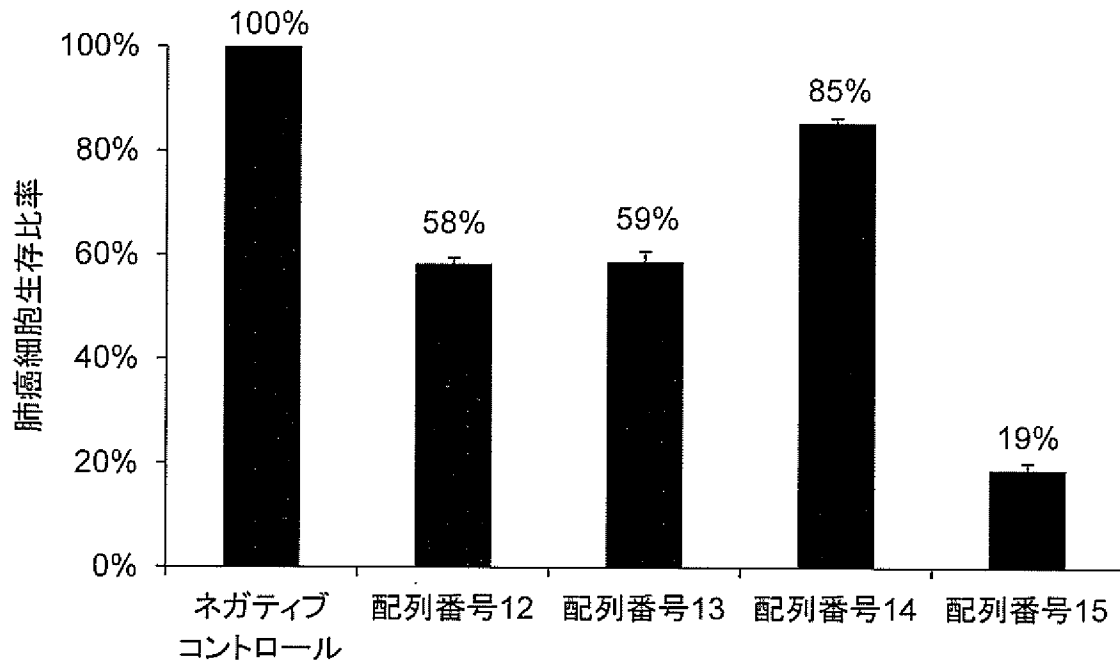
[図1]



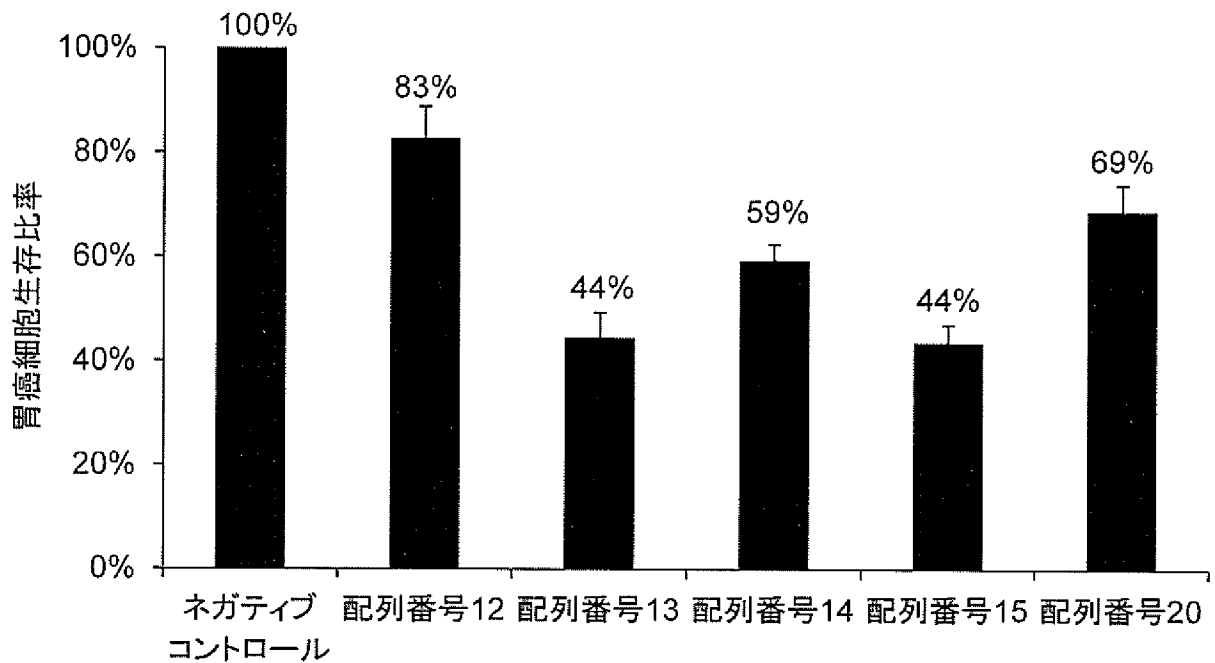
[図2]



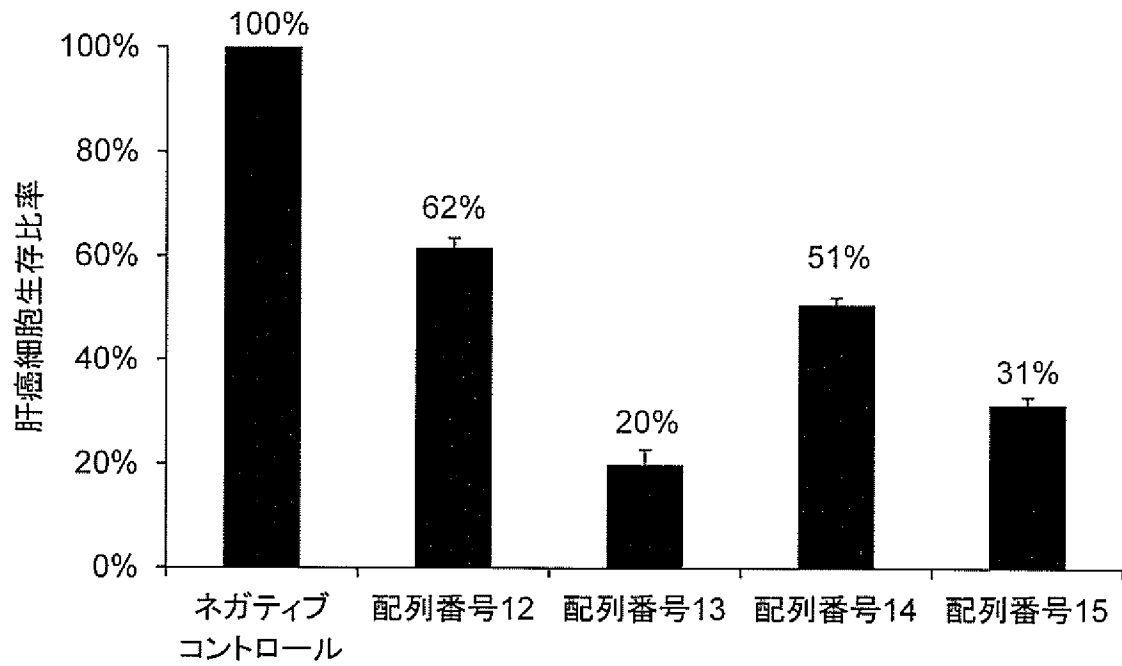
[図3]



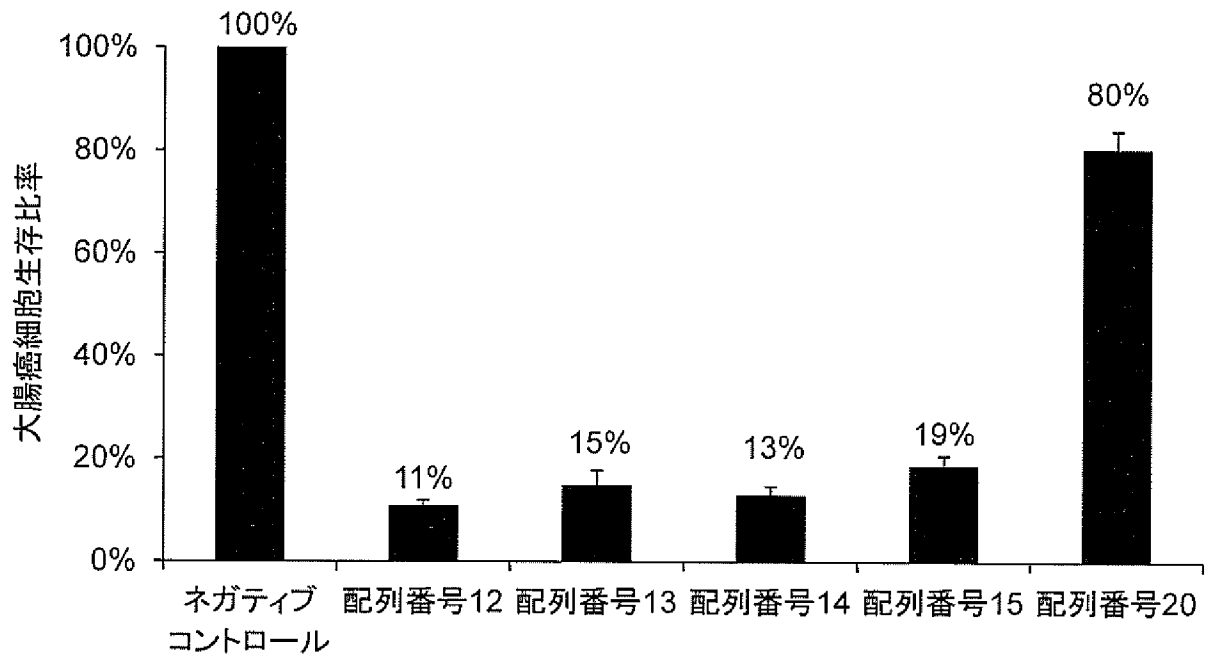
[図4]



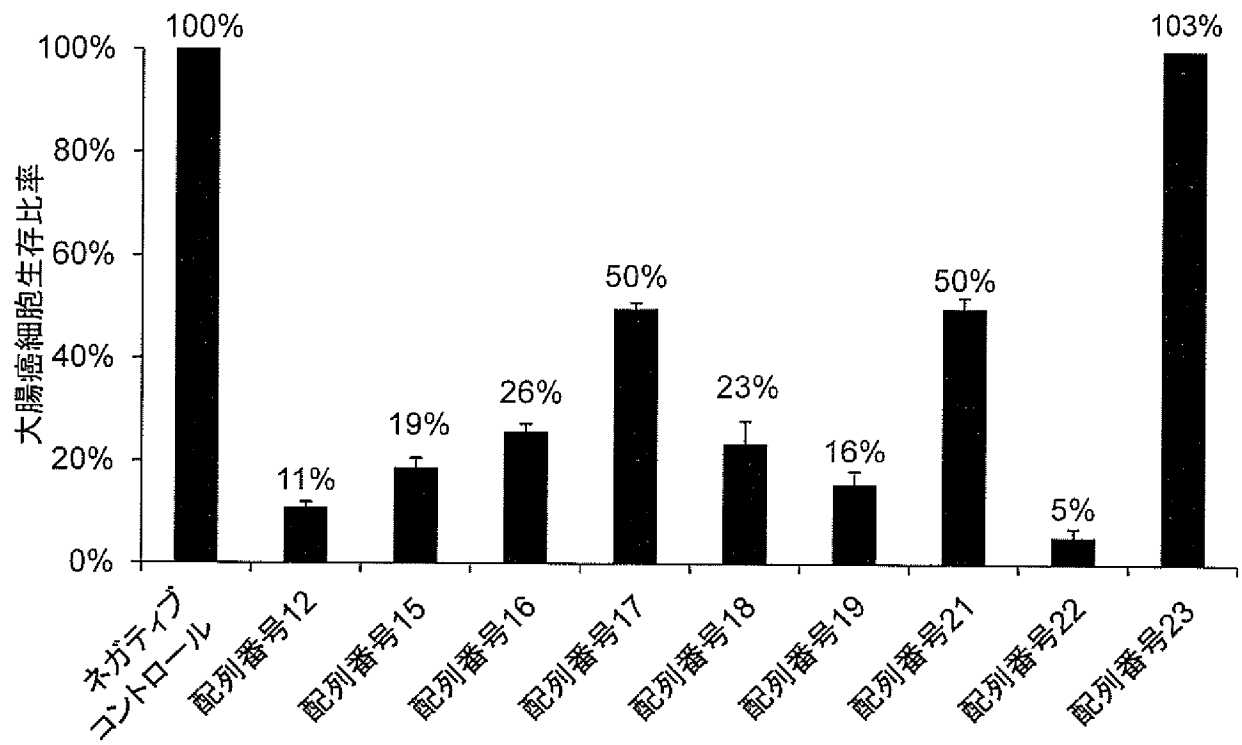
[図5]



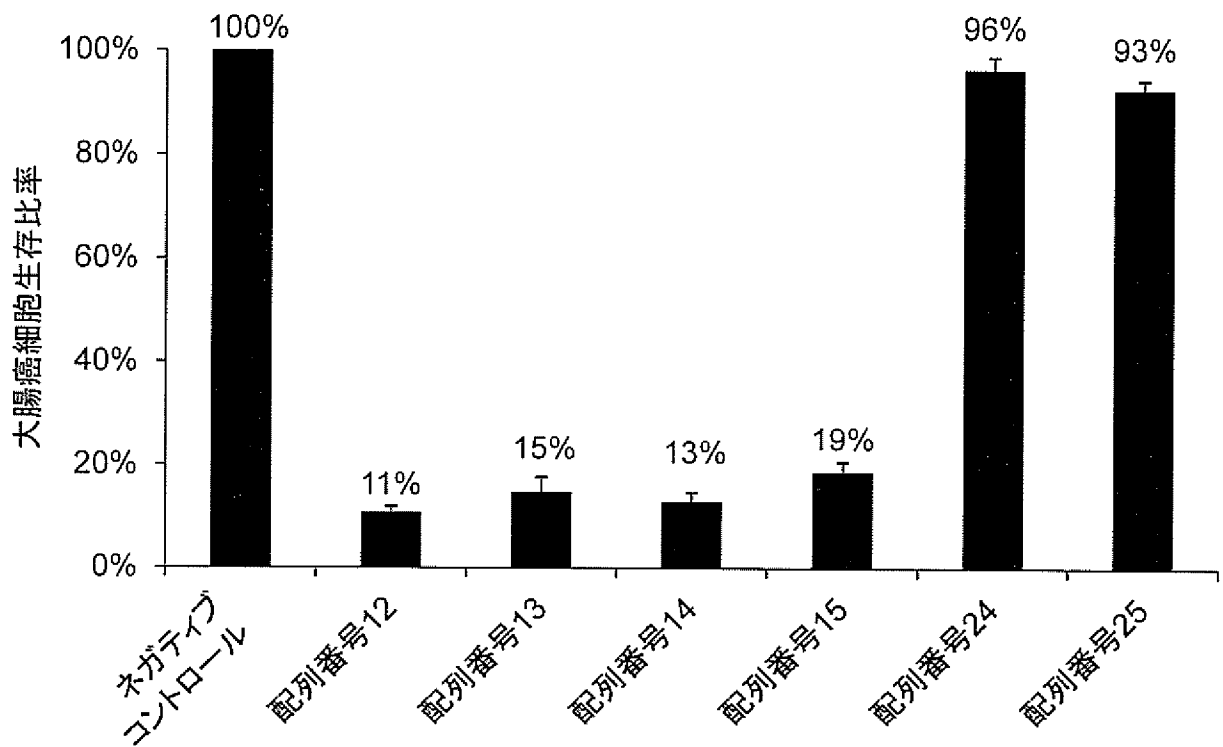
[図6]



[図7]

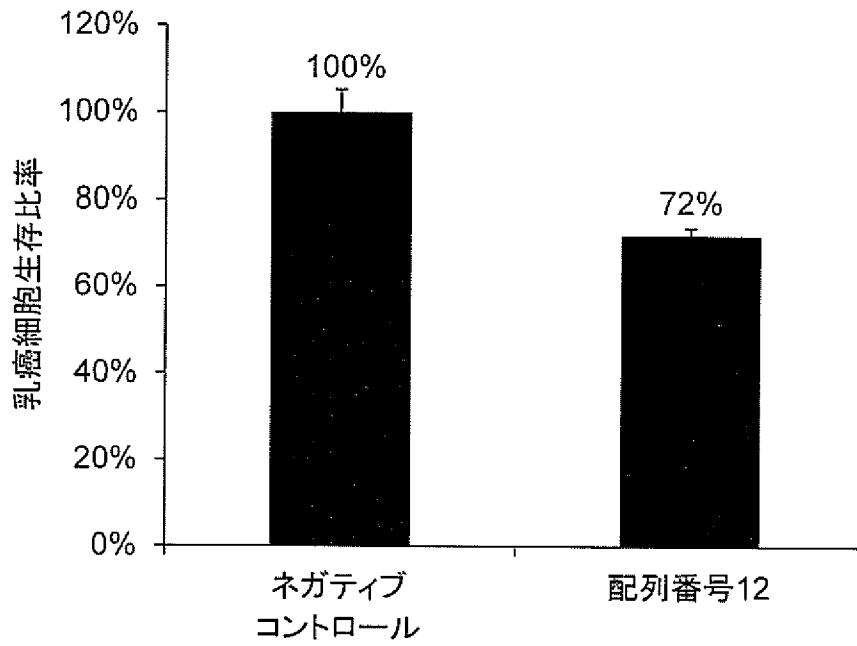


[図8]

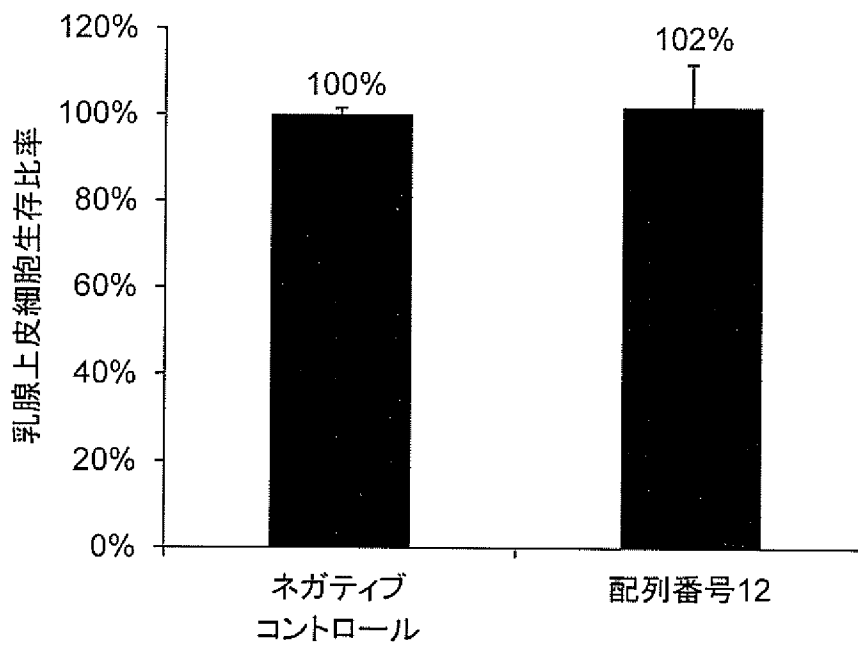


[図9]

A

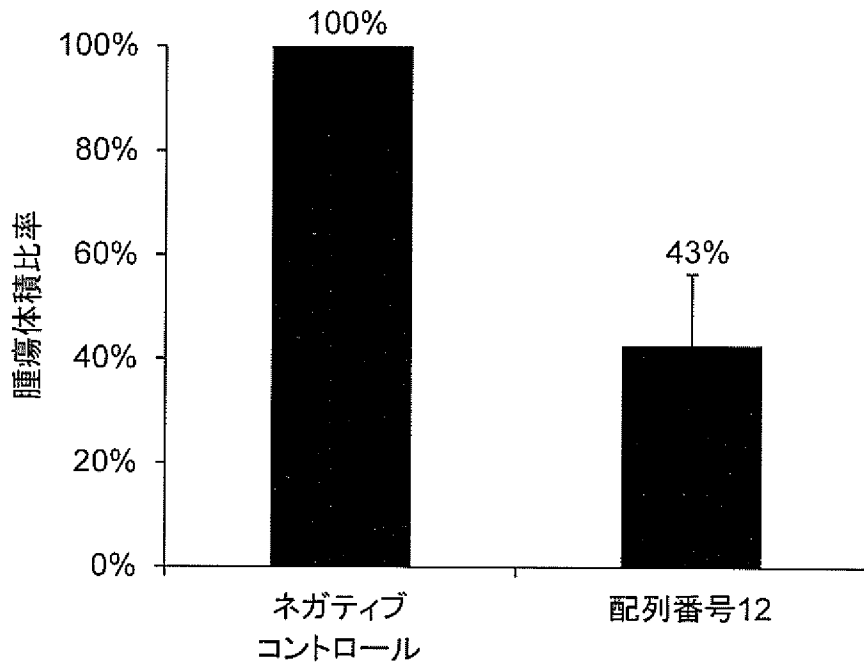


B

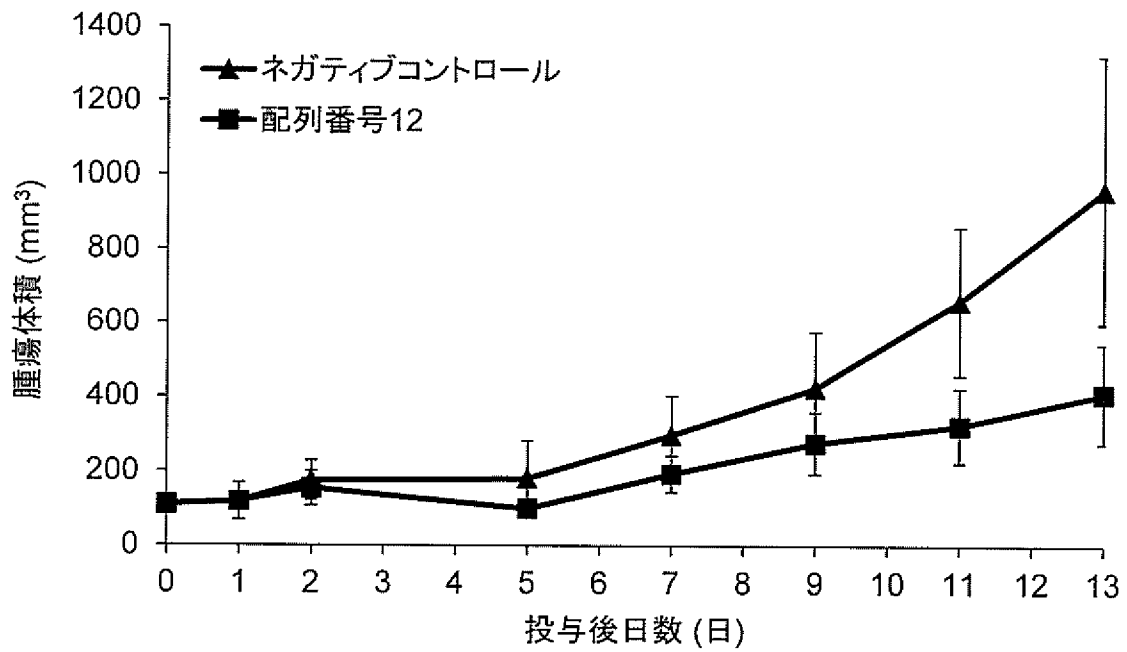


[図10]

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/003059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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)

A61K31/7088, A61K31/7105, A61K31/713, A61K48/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/121178 A1 (National Cancer Center), 13 September 2012 (13.09.2012), claim 1; paragraphs [0104] to [0107], [0117], [0119] (Family: none)	1-14
X	JP 2014-503553 A (Interna Technologies B.V.), 13 February 2014 (13.02.2014), claim 4; table 6-2; paragraphs [0253], [0259] to [0263] & US 2014/0005251 A1 page 43, table 5; claim 2; paragraphs [0272], [0277] to [0280] & WO 2012/096573 A1 & EP 2474617 A1	1-14

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

“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
22 March 2017 (22.03.17)

Date of mailing of the international search report
04 April 2017 (04.04.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/003059

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/182781 A1 (Toray Industries, Inc.), 03 December 2015 (03.12.2015), entire text (Family: none)	1-14
A	WO 2015/190591 A1 (Toray Industries, Inc.), 17 December 2015 (17.12.2015), entire text (Family: none)	1-14
A	WO 2015/190542 A1 (Toray Industries, Inc.), 17 December 2015 (17.12.2015), entire text & CN 106414774 A	1-14
A	WO 2015/194627 A1 (Toray Industries, Inc.), 23 December 2015 (23.12.2015), entire text (Family: none)	1-14

Object to be covered by this search:

The invention in claim 1 relates to a medicinal composition for treating and/or preventing cancer, said medicinal composition comprising, as an active ingredient, a polynucleotide which has, as the base sequence in the 5'-side, the base sequence consisting of 8 bases represented by SEQ ID NO:1 or a base sequence derived from the aforesaid base sequence by the substitution of one base. The polynucleotide as described above involves polynucleotides with various lengths and sequences which are merely in common to each other in the base sequence consisting of 8 bases in the 5'-side.

It is deemed that the pharmacological effects of such polynucleotides largely vary depending not only on the base sequence consisting of 8 bases in the 5'-side but also on other sequences in the polynucleotides. However, Examples in the description exclusively state the anticancer effects of polynucleotides having the base sequences represented by SEQ ID NOS: 12-22 alone.

Therefore, the description of the present application does not comply with the requirement prescribed under PCT Article 5, and further, claims of the present application lack the support within the meaning of PCT Article 6.

Such being the case, the present search was made on the basis of the parts disclosed in the description and supported thereby, i.e., the base sequences represented by SEQ ID NOS: 12-22 that are described in the description in practice.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K31/7088, A61K31/7105, A61K31/713, A61K48/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2012/121178 A1（独立行政法人国立がん研究センター） 2012.09.13, 請求項1、段落 [0104] - [0107]、[0117]、[0119]（ファミリーなし）	1-14
X	JP 2014-503553 A（インタールエヌエー テクノロジーズ ビー、 ヴィ。）2014.02.13, 請求項4、表6-2、段落 [0253]、[0259] - [0263]、 & US 2014/0005251 A1, p.43 TABLE 5, claim 2, [0272], [0277]-[0280] & WO 2012/096573 A1 & EP 2474617 A1	1-14

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

22.03.2017

国際調査報告の発送日

04.04.2017

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ISA/J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

井上 明子

4U

3230

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2015/182781 A1 (東レ株式会社) 2015. 12. 03, 全文 (ファミリーなし)	1 - 1 4
A	WO 2015/190591 A1 (東レ株式会社) 2015. 12. 17, 全文 (ファミリーなし)	1 - 1 4
A	WO 2015/190542 A1 (東レ株式会社) 2015. 12. 17, 全文 & CN 106414774 A	1 - 1 4
A	WO 2015/194627 A1 (東レ株式会社) 2015. 12. 23, 全文 (ファミリーなし)	1 - 1 4

<調査の対象について>

請求項1に係る発明は、5'側の塩基配列として、配列番号1で示される8の塩基配列あるいは当該塩基配列において1個の塩基が置換した塩基配列を含むポリヌクレオチドを有効成分とする、癌の治療及び/又は予防用の医薬組成物の発明であり、当該ポリヌクレオチドは、わずかに5'側の8の塩基配列のみが共通する、多種多様な長さや配列を有するポリヌクレオチドを包含するものである。

そして、当該ポリヌクレオチドの薬理作用は、5'側の8の塩基配列のみならず、ポリヌクレオチド中の他の配列によっても大きく異なるものと認められるところ、明細書においては、実施例として、配列番号12-22の塩基配列を有するポリヌクレオチドについての抗癌作用が記載されているに過ぎない。

したがって、本願明細書はPCT第5条に規定される要件を満たしておらず、また、本願請求項はPCT第6条の意味での裏付けを欠いている。

よって、本調査は、明細書に開示され、裏付けられている部分、すなわち明細書に具体的に記載された配列番号12-22の塩基配列に基づいて行った。