202146651

(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 202146651 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：110107244 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 03 月 02 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/113 (2010.01)* *A61K31/7088 (2006.01)*
A61P9/10 (2006.01)

(30)優先權：2020/03/02 日本 2020-034619

(71)申請人：日商田邊三菱製藥股份有限公司 (日本) MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION (JP)
日本
國立大學法人京都大學 (日本) KYOTO UNIVERSITY (JP)
日本
國立大學法人大阪大學 (日本) OSAKA UNIVERSITY (JP)
日本
國立研究開發法人醫藥基盤 健康 營養研究所 (日本) NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION (JP)
日本

(72)發明人：小寺淳 KOTERA, JUN (JP) ；尾野亘 ONO, KOH (JP) ；堀江貴裕 HORIE, TAKAHIRO (JP) ；山﨑智弘 YAMASAKI, TOMOHIRO (JP) ；小山智史 KOYAMA, SATOSHI (JP) ；小比賀聡 OBIKA, SATOSHI (JP) ；笠原勇矢 KASAHARA, YUYA (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：10 共 68 頁

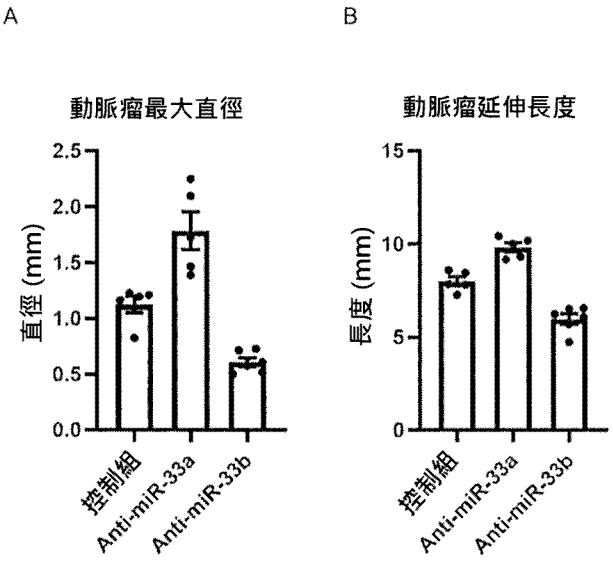
(54)名稱

ｍｉＲ－３３ｂ阻礙物質所致之動脈瘤的預防或治療

(57)摘要

一種動脈瘤的預防或治療劑，其係以 miR-33b 阻礙物質，宜為針對 miR-33b 的反義寡核苷酸作為有效成分。

指定代表圖：


A
動脈瘤最大直徑
直徑 (mm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
B
動脈瘤延伸長度
長度 (mm)
15
10
5
0
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

【圖 4】

202146651

【發明摘要】

【中文發明名稱】

ｍｉＲ－３３ｂ阻礙物質所致之動脈瘤的預防或治療

【中文】

一種動脈瘤的預防或治療劑，其係以miR-33b阻礙物質，宜為針對miR-33b的反義寡核苷酸作為有效成分。

【指定代表圖】第(４)圖。
【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

ｍｉＲ－３３ｂ阻礙物質所致之動脈瘤的預防或治療

【技術領域】

【0001】本發明關於一種動脈瘤的預防或治療劑，含有miR-33b阻礙物質作為有效成分。

【先前技術】

【0002】大動脈瘤的盛行率，因為高齡化與生活型態改變而正在增加。例如腹部大動脈瘤，在心血管死亡原因中排行第三，佔65歲以上男性總死亡數的1%至3%。雖然臨床上可利用電腦斷層掃描攝影來早期診斷，然而目前並不存在預防大動脈瘤惡化的藥劑。大動脈瘤是無症狀地發展，會有發生致死的破裂的可能性，所以開發出用來抑制大動脈瘤發展的藥物療法是一項未被滿足的緊急需求。目前發現，蛋白酶的活化所造成的細胞外基質分解的亢進、大血管平滑肌細胞的細胞凋亡及內皮功能障礙等，是動脈壁發炎的重要步驟，伴隨這些而來的發炎，會引起中膜破壞與大動脈壁脆弱化，被認為與大動脈瘤的形成及發展有關(非專利文獻1)。

【0003】目前為止的藥劑開發，焦點一直是放在阻礙被認為會引起大動脈壁脆弱的細胞外基質分解，然而大動脈瘤病因中的蛋白酶的一個主要組別的基質金屬蛋白酶，

其阻礙劑去氧羥四環素，對於動脈瘤的發展並未表現出明顯的臨床效果(非專利文獻1)。

【0004】miRNA(microRNA)被編碼在基因上，經過多階段的生成過程，最終為19～25個鹼長的微小單鏈RNA，藉由結合於作為標的的多個信使RNA(mRNA)的3'-非轉譯區域，抑制其轉譯或促進分解，負向地調控標的基因表現。目前在人體中已經有2000種以上的miRNA被鑑定出來，人體基因產物的60%以上會受到miRNA某種控制。另外，miRNA與各種生物體現象或病態的發病、進行有關，因此作為生物標記或新的治療標的正受到矚目。

【0005】miR-33(microRNA-33)被發現是以ATP結合盒轉運體A1(ABCA1)為標的，是調節膽固醇代謝，降低高密度脂蛋白質膽固醇(HDL-C)量的miRNA。有文獻報告在人體中存在miR-33a及miR-33b，相對於此，在小鼠之中僅存在miR-33(相當於人類的miR-33a)(非專利文獻2)。

【0006】關於動脈瘤與miR-33的關聯性，有文獻報告以剔除miR-33(相當於人類miR-33a)的小鼠建立動脈瘤模型來作評估，結果發現動脈瘤形成會受到抑制、或巨噬細胞的累積以及monocyte chemotactic protein-1的表現會受到抑制(非專利文獻3)。

另外還有文獻報告利用人腦動脈瘤患者的血液樣品中所網羅的基因表現解析數據，結果發現miR-33b的標的基因IRS2的表現量會上昇(非專利文獻4)。IRS2的表現會受miR-33b直接控制(抑制表現)(非專利文獻5)，所以此現象

是在說為了抑制人體動脈瘤形成，補充miR-33b是有效的，而並非阻礙miR-33b。

另外還有文獻報告在人腹部大動脈瘤的患者的腹部大動脈中，miR-33-5p的表現會上昇，或在來自人體單核球的巨噬細胞細胞株之中，藉由miR-33-5p的阻礙劑，MMP-2、MMP-9、TNF-α的基因表現會受到抑制，藉由促進膽固醇排出，使泡沫化巨噬細胞中的膽固醇減少(非專利文獻6)。此處，miR-33-5p的序列是記載了miR-33b的序列，然而在表現解析中miR-33a與miR-33b沒有被區別，另外，關於miR-33-5p的阻礙劑的標的分子是人類miR-33a還是miR-33b並沒有敘述。而且，在該文獻中，就連腹部大動脈瘤的治療效果也沒有揭示。

另外還有文獻報告，培養出分別表現人類miR-33a或人類miR-33b的小鼠，在表現miR-33b的小鼠之中，動脈硬化會較為惡化，此結果是說，因為高膽固醇飲食負荷，在肝臟細胞之中，miR-33b的表現會上昇，同時HDL膽固醇的產生會降低，所以認為miR-33b會與動脈硬化的惡化有關聯(非專利文獻2)。有文獻提出動脈瘤和巨噬細胞有關聯的報告(非專利文獻1)，然而也有文獻報告巨噬細胞的miR-33a與miR-33b的表現量變化沒有差異，也沒有功能的不同(非專利文獻2)。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

【0007】

[非專利文獻1] 日內會誌99., p237-244 (2010)

[非專利文獻2] J Am Heart Assoc., 8(13), e012609 (2019)

[非專利文獻3] Arterioscler Thromb Vasc Biol., 37(11), p2161-2170(2017)

[非專利文獻4] Med Sci Monit., 23, p4518-4525 (2017)

[非專利文獻5] Proc Natl Acad Sci USA, 108(22), 9232-7 (2011)

[非專利文獻6] Perfusion., doi：10. 1177/0267659119850685 (2019)

【發明內容】

[發明所欲解決的課題]

【0008】本發明目的為使用對於預防及治療動脈瘤有效的藥劑來預防及/或治療動脈瘤。更詳細而言，本發明目的為提供一種動脈瘤預防用及/或治療用藥劑，和針對所發生的動脈瘤的所有治療都有關，可阻止瘤的發生或擴大、或使瘤退縮來阻止破裂。

[用於解決課題的手段]

【0009】本發明人等為了解析miR-33a與miR-33b在大動脈瘤中的幫助，使用其阻礙劑來進行檢討，結果發現，miR-33b阻礙物質對於治療、預防或減輕動脈瘤是有用的，而完成本發明。

【0010】本揭示是關於以下的[1]～[25]項所記載的實施態樣，被加上了非限定的編號，而並不受這些實施態樣限定。

[1] 一種動脈瘤的預防或治療劑，其係以miR-33b阻礙物質作為有效成分。

[2] 如[1]之預防或治療劑，其中miR-33b阻礙物質為miR-33b量降低物質。

[3] 如[2]的預防或治療劑，其中miR-33b量降低物質為核酸。

[4] 如[3]之預防或治療劑，其中miR-33b量降低物質為針對miR-33b的反義寡核苷酸、siRNA或shRNA。

[5] 如[2]～[4]中任一項之預防或治療劑，其中前述miR-33b量降低物質的miR-33b量降低率高於miR-33a量降低率。

[6] 如[2]～[5]中任一項之預防或治療劑，其中miR-33b量降低物質為針對miR-33b的反義寡核苷酸。

[7] 如[6]之預防或治療劑，其中針對miR-33b的反義寡核苷酸

1)包含7～20個核苷酸殘基，

2)具有下述鹼基序列：與具有序列編號1的鹼基序列的miR-33b的等長部分90%以上互補的鹼基序列，並且由序列編號1所記載的miR-33b的鹼基序列的5'末端算起第9和第10個核酸鹼基不具有錯誤配對之鹼基序列；

(序列編號1)GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC。

[8] 如[7]之預防或治療劑，其中針對miR-33b的反義寡核苷酸具有包含下述序列編號5所記載的序列的核酸鹼基序列：

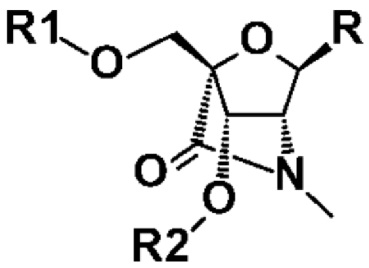
AACAGCAATGCA(序列編號5)，

(但是，C可為5-甲基胞嘧啶(M))。

[9] 如[8]之預防或治療劑，其中前述反義寡核苷酸為經修飾的寡核苷酸。

[10] 如[9]之預防或治療劑，其中前述構成經修飾的寡核苷酸的至少一個核苷包含經修飾的糖。

[11] 如[10]之預防或治療劑，其中前述經修飾的糖係選自AmNA的糖部分，



AmNA

[式中，R為核酸鹼基，R1、R2各自獨立表示可經取代之磷酸基]。

[12] 如[11]之預防或治療劑，其中前述經修飾的寡核苷酸為下式所表示的經修飾的寡核苷酸：

Aas Ads Mas Ads Gas Cds Aas Ads Tas Gds Mas Ad；

式中，

各核酸鹼基係以下述記號來表示：

A=腺嘌呤、T=胸腺嘧啶、G=鳥嘌呤、C=胞嘧啶、M=5-甲基胞嘧啶；

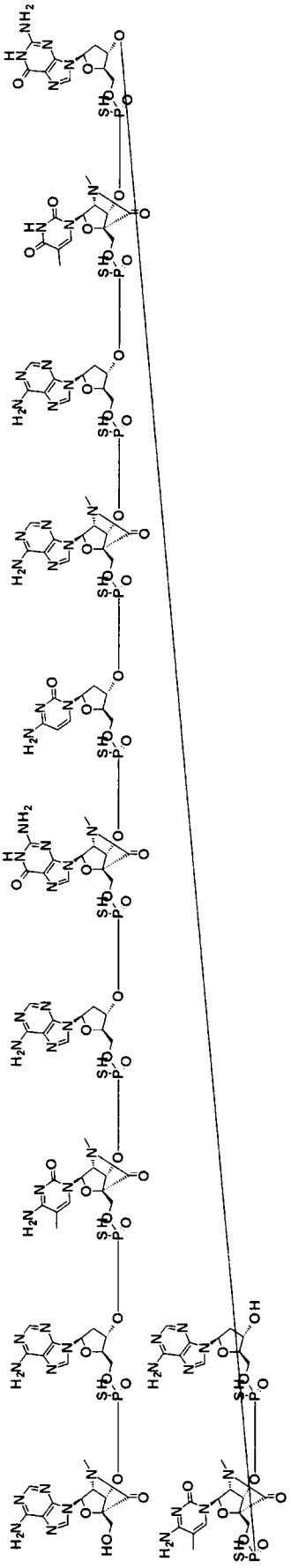
各糖部分係以下述記號來表示：

a=上述AmNA的糖部分、d=2'-去氧核糖；

各核苷間鍵結係以下述記號來表示：

s：硫代磷酸酯。

[13] 如[12]之預防或治療劑，其中前述經修飾的寡核苷酸為下式所表示的經修飾的寡核苷酸：



。

[14] 如[1]～[13]中任一項之預防或治療劑，其中動脈瘤為大動脈瘤或腦動脈瘤。

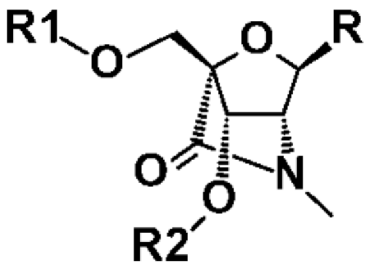
[15] 一種針對miR-33b的反義寡核苷酸，其係具有包含下述序列編號5所記載的序列的核酸鹼基序列：

AACAGCAATGCA(序列編號5)。

[16] 如[15]之反義寡核苷酸，其中反義寡核苷酸為經修飾的寡核苷酸。

[17] 如[16]之反義寡核苷酸，其中構成經修飾的寡核苷酸的至少一個核苷包含經修飾的糖。

[18] 如[17]之反義寡核苷酸，其中經修飾的糖係選自AmNA的糖部分，



AmNA

[式中，R為核酸鹼基，R1、R2各自獨立，表示可經取代之磷酸基]。

[19] 如[16]至[18]中任一項之反義寡核苷酸，其中構成經修飾的寡核苷酸的至少一個核苷包含經修飾的核酸鹼基。

[20] 如[19]之反義寡核苷酸，其中經修飾的核酸鹼基為5-甲基胞嘧啶。

[21] 如[16]～[20]中任一項之反義寡核苷酸，其中經修飾的寡核苷酸之經修飾的核苷間鍵結為硫代磷酸酯核苷間鍵結。

[22] 如[16]～[21]中任一項之反義寡核苷酸，其中經修飾的寡核苷酸係由下式表示的經修飾的寡核苷酸：

Aas Ads Mas Ads Gas Cds Aas Ads Tas Gds Mas Ad；

式中，

各核酸鹼基係以下述記號來表示：

A=腺嘌呤、T=胸腺嘧啶、G=鳥嘌呤、C=胞嘧啶、M=5-甲基胞嘧啶；

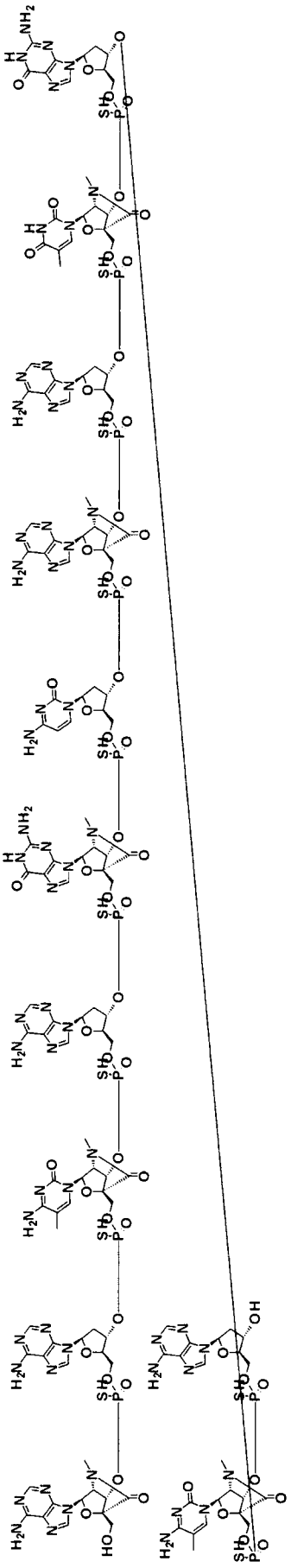
各糖部分係以下述記號來表示：

a=上述AmNA的糖部分、d=2'-去氧核糖；

各核苷間鍵結係以下述記號來表示：

s=硫代磷酸酯。

[23] 如[22]之反義寡核苷酸，其中經修飾的寡核苷酸係由下式表示：



。

[24] 一種醫藥組成物，其係包含如[15]～[23]中任一項之反義寡核苷酸或其醫藥上可容許的鹽、及藥學上可容許的擔體。

[25] 一種miR-33b阻礙物質在動脈瘤的預防或治療劑的製造中的使用。

[發明之效果]

【0011】miR-33b阻礙物質可作為動脈瘤的預防及/或治療藥，用來抑制動脈瘤的發生或擴大。

【圖式簡單說明】

【0012】

[圖1]為表示評估反義寡核苷酸對小鼠大動脈中的miR-33a(A)及miR-33b(B)表現量的效果之In vivo投予測試結果的圖形。

[圖2]為表示評估反義寡核苷酸對小鼠大動脈中的MCP-1蛋白質表現量(A)、磷酸化JNK1蛋白質表現量(B)及JNK1蛋白質表現量(C)的效果之In vivo投予測試結果的圖形。

[圖3]為表示評估反義寡核苷酸對小鼠大動脈中的MMP-9活性水平的效果之In vivo投予測試結果的圖形。

[圖4]為表示評估反義寡核苷酸對小鼠大動脈瘤模型1週的動脈瘤的直徑擴大(A)及延伸(B)的效果之In vivo投予測試結果的圖形。

[圖5]為表示評估反義寡核苷酸對小鼠大動脈瘤模型6週的動脈瘤的直徑擴大(A、C)及延伸(B、C)的效果之In vivo投予測試結果的圖形。

[圖6]為表示評估反義寡核苷酸對小鼠大動脈瘤模型中的AST(A)、ALT(B)、T-Bil(C)及CRE(D)量的效果之In vivo投予測試結果的圖形。

[圖7]為表示評估反義寡核苷酸對人體THP-1細胞的miR-33a(A)、miR-33b(B)及ABCA1 mRNA(C)表現量的效果之In vitro投予測試結果的圖形。

[圖8]為表示評估反義寡核苷酸對人體THP-1細胞中的SREBF1表現量的效果之In vitro投予測試結果的圖形。

[圖9]為表示評估反義寡核苷酸對人體THP-1細胞中的MMP-9mRNA表現量(A)、MCP-1mRNA表現量(B)及JNK1mRNA表現量(C)的效果之In vitro投予測試結果的圖形。

[圖10]為表示評估反義寡核苷酸對人體THP-1細胞中的原型MMP-9蛋白質的酵素活性水平(A)、切割型MMP-9蛋白質的酵素活性水平(B)、磷酸化JNK1蛋白質的表現量(C)、JNK1蛋白質的表現量(D)及磷酸化JNK1蛋白質相對於總JNK1蛋白質量的表現量(E)的效果之In vitro投予測試結果的圖形。

【實施方式】

【0013】

(定義)

「核酸」是指由核苷酸單元所構成的分子。核酸的例子有天然核酸(核糖核酸(RNA)、去氧核糖核酸(DNA))、非天然核酸，核酸的形態有單鏈核酸、雙鏈核酸，另外，功能性的核酸，可列舉低分子干擾核糖核酸(siRNA)、微核糖核酸(miRNA)等，然而不受此限定。核酸單一分子中可包含這些要素的組合。

【0014】「核酸鹼基」意指可與其他核酸的鹼形成配對的雜環部分。核酸鹼基，有「經修飾的核酸鹼基」與「未經修飾的核酸鹼基」。

【0015】「核苷」意指連結於糖上的核酸鹼基。在某種實施態樣中，核苷是連結於磷酸基。

【0016】「核苷酸」意指具有與核苷的糖部分產生共價鍵的磷酸基等的核苷。自然界中存在的核苷酸，糖部分為核糖或去氧核糖，藉由磷酸基與磷酸二酯鍵產生共價鍵而形成寡核苷酸、聚核苷酸。

【0017】「經修飾的核苷酸」，意指獨立具有經修飾的糖部分、經修飾的核苷間鍵結或經修飾的核酸鹼基的核苷酸。「經修飾的核苷」，意指獨立具有經修飾的糖部分或經修飾的核酸鹼基的核苷。

【0018】「未經修飾的核苷酸」意指自然界中存在，由核酸鹼基、糖部分及核苷間鍵結所形成的核苷酸。在某種實施態樣中，未經修飾的核苷酸為RNA核苷酸(亦即具有β-D-核糖核苷的核苷酸)或DNA核苷酸(亦即具有β-D-去

氧核糖核苷的核苷酸)，然而不受此限定。

【0019】「核苷間鍵結」是指核苷間的化學鍵。

【0020】「經修飾的核苷間鍵結」，是指自然界中存在的核苷間鍵結(亦即，磷酸二酯核苷間鍵結)發生取代或任意變化。已知有例如硫代磷酸酯核苷間鍵結，然而不受此限定。

【0021】「硫代磷酸酯核苷間鍵結」，意指藉由以硫原子取代一個非交聯氧原子使得磷酸二酯鍵被修飾的核苷間鍵結。硫代磷酸酯鍵是該經修飾的核苷間鍵結的一個例子。

【0022】「經修飾的核酸鹼基」是指除了腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶以外的任意核酸鹼基。已知有例如5-甲基胞嘧啶，然而不受此限定。「未經修飾的核酸鹼基」意指嘌呤鹼的腺嘌呤(A)及鳥嘌呤(G)，以及嘧啶鹼的胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。

【0023】「miRNA」意指利用Dicer酵素來切割pre-miR的切割產物，長度為18～25個核酸鹼基的內源性非編碼RNA。miRNA的例子，可藉由被稱為miRBase的miRNA資料庫來確認(http：//microrna.sanger.ac.uk/)。在某種實施態樣中，miRNA被簡記為「miR」或「microRNA」。

【0024】「pre-miR」意指由被稱為Drosha的雙鏈RNA特異性核糖核酸酶來切割pri-miR的切割產物，具有髮夾結構的非編碼RNA。

【0025】「主幹迴圈序列」意指具有髮夾結構，且包

含成熟型miRNA序列的RNA。在某實施態樣中，主幹迴圈序列為pre-miR。主幹迴圈序列的例子，可藉由被稱為miRBase的miRNA資料庫來確認(http：//www.mirbase.org/)。

【0026】「pri-miR」意指是雙鏈RNA特異性的核糖核酸酶Drosha的基質，且具有髮夾結構之非編碼RNA。

【0027】「miRNA前驅物」，意指來自基因DNA，且包含含一個或多個miRNA序列的非編碼structured RNA的轉錄物。例如在某種實施態樣中，miRNA前驅物為pre-RNA。在某種實施態樣中，miRNA前驅物為pri-miR。在某種實施態樣中，miRNA前驅物為主幹迴圈序列。

【0028】「miRNA的標的mRNA」，意指miRNA的直接標的mRNA。miRNA會與標的mRNA完全或大致完全互補，常常與種子序列(是指從miRNA的5'末端側算起第2至第8的這7個鹼的序列)互補地結合，造成標的mRNA的不安定化或轉譯阻礙。

【0029】「miRNA的標的蛋白質」意指藉由轉譯miRNA的標的mRNA而產生的蛋白質。

【0030】「miR-33b主幹迴圈序列」意指具有核酸鹼基序列

GCGGGCGGCCCCGCGGUGCAUUGCUGUUGCAUUGCACGUGUGUGAGGCGGGUGCAGUGCCUCGGCAGUGCAGCCCGGAGCCGGCCCCUGGCACCAC(序列編號4)的miRNA-33b的pre-miR。

【0031】「miR-33a」意指具有核酸鹼基序列GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA(序列編號2)的miRNA。(此外，在本說明書之中，鹼基序列是依照5'至3'的順序來記載)。

【0032】「miR-33b」意指具有核酸鹼基序列GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC(序列編號1)的miRNA。

【0033】「miR-33」意指具有核酸鹼基序列GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA(序列編號3)的miRNA。

【0034】在人體中存在miR-33a以及miR-33b。在小鼠中存在miR-33。人體的miR-33a與小鼠的miR-33為共通序列。所以，在小鼠之中，僅存在相當於人體的miR-33a的miRNA，不存在相當於人體的miR-33b的miR。

【0035】「miR-33b種子序列(亦稱為種子區域)」，是指miR-33b核酸鹼基序列之中的UGCAUUG。序列編號1或2中包含了兩個種子序列。

【0036】「miR-33a量」、「miR-33b量」、「miR-33量」分別意指在細胞內作為微核糖核酸發揮功能的miR-33a、miR-33b、miR-33的存在(量)，換言之意指表現量。

【0037】「反義寡核苷酸」可與標的核酸雜交的反義核酸(RNA或DNA)。在本發明中反義寡核苷酸，意指結合於miRNA，阻礙miRNA的活性或功能的分子。本發明中的反義寡核苷酸，除了天然核酸分子之外，還包括人工合成的核酸分子。

【0038】「siRNA(small interfering RNA)」是由15-30

個鹼對所形成的低分子雙鏈RNA。siRNA與被稱為RNA干擾的現象有關，藉由破壞標的核酸，序列特異地抑制核酸的表現。在本發明中，siRNA意指破壞miR-33a或miR-33b，作為抑制miR-33a或miR-33b表現的拮抗劑發揮功能的分子。本發明中的siRNA，除了自然界的核酸分子以外，還可包括人工核酸分子。

【0039】「shRNA(short hairpin RNA)」具有髮夾結構，受處理後會產生miRNA或siRNA(short interference RNA)。在某種實施形態中，shRNA在細胞內可由shRNA表現載體來轉錄。

【0040】「互補的」意指第一核酸與第二核酸的核酸鹼基之間形成配對的能力。具體而言，例如腺嘌呤會與胸腺嘧啶或尿嘧啶互補，胞嘧啶會與鳥嘌呤互補，5-甲基胞嘧啶會與鳥嘌呤互補，然而不受此限定。

【0041】「完全互補(亦稱為互補性)」或「100%互補(亦稱為互補性)」，意指第一核酸的核酸鹼基序列中所有的各核酸鹼基，會在第二核酸的第二核酸鹼基序列中有與之互補的核酸鹼基。在某種實施態樣中，第一核酸為經修飾的寡核苷酸，標的核酸為第二核酸。

【0042】「雜交」意指互補的核酸分子的黏合。

【0043】「錯誤配對」或「非互補的核酸鹼基」，是指第一核酸的核酸鹼基無法與第二核酸或標的核酸上對應的核酸鹼基形成配對的情形。

【0044】「預防」意指從數分鐘到無期限的期間，使

疾病、障礙或不好的健康狀態、或與該疾病、障礙或不好的健康狀態相關聯的症狀中的一種以上發病或發生遲延或防患於未然。預防還意指降低疾病、障礙或不好的健康狀態發生的危險性。

【0045】「治療」意指減輕或排除疾病、障礙或不好的健康狀態、或與該疾病、障礙或不好的健康狀態相關聯的症狀中的一種以上，或者將該疾病、障礙或不好的健康狀態本身的一個以上的原因部分解決或根絕。

【0046】以下針對本發明的實施形態詳細說明。此外，本發明不受以下的本實施形態限制，可在其要旨的範圍內以各種變形來實施。

【0047】

(miR-33b阻礙物質)

本發明為一種動脈瘤之治療或預防劑，其係包含miR-33b阻礙物質(以下會有稱為「本發明化合物」的情形)。miR-33b阻礙物質，以會阻礙miR-33b的表現或功能，結果抑制了與動脈瘤有關的細胞，例如單核球或巨噬細胞細胞(以下會有將其稱為「細胞」的情形)中的MMP-9的活性水平、MCP-1的表現量及/或磷酸化JNK1的表現量的物質為佳。

miR-33b阻礙物質，以會阻礙miR-33b的表現或功能，結果增加了miR-33b的標的mRNA、及/或miR-33b的標的蛋白質在細胞內的存在量的物質為佳。miR-33b的標的可列舉例如ATP結合盒轉運體A1(ABCA1)。亦即，ABCA1等的

miR-33b的標的分子，通常會因為miR-33b而遭受到表現阻礙，此時，藉由miR-33b阻礙物質可阻礙miR-33b，該標的分子在細胞內的存在量就會增加。

【0048】另外，miR-33b阻礙物質具體而言，可列舉例如降低細胞內作為miR-33b發揮功能的分子的含量的物質(以下會有將其稱為「miR-33b量降低物質」的情形)。miR-33b量的降低，意指降低具有在細胞內作用於miR-33b的標的mRNA，透過使mRNA不安定化或阻礙轉譯來降低在該細胞內標的mRNA及/或蛋白質量的功能的miR-33b量。

在本發明中，miR-33b的標的mRNA，只要是miR-33b會直接結合，並降低其表現量的標的mRNA，則任一者皆可，具體而言，可列舉例如ATP結合盒轉運體A1(ABCA1)、肉鹼棕櫚醯基轉移酶1(CPT1)等。這些標的mRNA可為任一種以上，或可為多種。

【0049】另外，miR-33b量降低物質，只要是至少降低細胞內的miR-33b量的物質即可，例如，亦可具有進一步降低該細胞內的miR-33a量的作用。但是，在此情況下，宜為降低細胞內的miR-33b量的作用比降低在細胞內的miR-33a的量的作用還強的物質，在測定後述THP-1細胞的miR-33b量的系統之中，適合使用miR-33b量降低率高於miR-33a量降低率的miR-33b量降低物質。miR-33b量降低率，可依照例如100*(miR-33b量降低物質未添加時的miR-33b的量-miR-33b量降低物質添加時的miR-33b量)/miR-

33b量降低物質未添加時的miR-33b量來計算。另外，miR-33a量降低率，可依照例如100*(miR-33b量降低物質未添加時的miR-33a量-miR-33b量降低物質添加時的miR-33a量)/miR-33b量降低物質未添加時的miR-33a量來計算。

miR-33b量降低率高於miR-33a量降低率的miR-33b量降低物質，具體而言，例如計算miR-33a量降低率/miR-33b量降低率時所得到之值，可列舉0.8以下、0.7以下、0.6以下、0.5以下、0.4以下、0.3以下、0.2以下或0.1以下，宜為0.6以下，較佳為0.3以下，更佳為0.1以下。

【0050】利用本發明之miR-33b量降低物質來降低細胞內的miR-33b量，是指例如藉由使miR-33b量降低物質與細胞接觸，與未接觸時或接觸陰性對照物質時相比，在細胞內的miR-33b量會降低。此處，該細胞內的miR-33b量的降低程度，只要讓細胞內的miR-33b量降低，結果增加了後述miR-33b的標的mRNA、及/或miR-33b的標的蛋白質在該細胞內的量；或讓細胞內的miR-33b量降低，結果miR-33b表現細胞的表現型為疾病關聯物質往改善疾病的方向被調控，則任一程度皆可，具體而言，例如使本發明之miR-33量降低物質與細胞接觸之後，在細胞內的miR-33b量，與未接觸時或接觸陰性對照物質時相比，以至少在50%以下的程度為佳，宜為30%以下，更佳為10%以下。

【0051】另一方面，利用miR-33b量降低物質增加miR-33b的標的mRNA表現量的程度，只要是讓該標的mRNA所編碼的蛋白質所調控的疾病關聯物質往改善疾病

的方向被調控，則任一程度皆可，可例示例如使miR-33b量降低物質與細胞接觸之後，與未接觸時或接觸陰性對照物質時相比，標的mRNA表現量上昇至少1.2倍以上，宜為1.5倍以上，更佳為2倍以上的程度。

miR-33b的標的mRNA所編碼的蛋白質所調控的疾病關聯物質往改善疾病的方向被調控，具體而言，是指例如抑制細胞的發炎狀態，例如MMP-9、MCP-1及/或JNK1的mRNA表現量或這些所編碼的蛋白質的表現量受到抑制、MMP-9活性受到抑制、及/或JNK1的磷酸化受到抑制。利用miR-33b量降低物質抑制MMP-9、MCP-1及/或JNK1的mRNA表現量或其所編碼的蛋白質的表現量的程度，可列舉使miR-33b量降低物質與細胞(巨噬細胞細胞等)接觸之後，與未接觸時或接觸陰性對照物質時相比，MMP-9、MCP-1及/或JNK1的mRNA表現量，或其所編碼的蛋白質的表現量為0.8倍以下、0.7倍以下、0.6倍以下、0.5倍以下、0.4倍以下、0.3倍以下、0.2倍以下或0.1倍以下，宜為0.6倍以下，較佳為0.3倍以下，更佳為0.1倍以下。另外，利用miR-33b量降低物質抑制MMP-9活性、及抑制JNK1的磷酸化的程度，可列舉使miR-33b量降低物質與細胞(巨噬細胞細胞等)接觸之後，與未接觸時或接觸陰性對照物質時相比，MMP-9活性及/或JNK1的磷酸化程度為0.8倍以下、0.7倍以下、0.6倍以下、0.5倍以下、0.4倍以下、0.3倍以下、0.2倍以下或0.1倍以下，宜為0.6倍以下，較佳為0.3倍以下，更佳為0.1倍以下。

【0052】另外，關於利用本發明化合物來增加標的mRNA所編碼的蛋白質表現量也是一樣，只要是讓標的蛋白質所調控的疾病關聯物質往改善疾病的方向被調控，則任一程度皆可，可例示使本發明化合物與細胞接觸之後，與未接觸時或接觸陰性對照物質時相比，標的蛋白質表現量上昇至少1.2倍以上，宜為1.5倍以上，更佳為2倍以上的程度。

【0053】miR-33b阻礙物質，可為阻礙miR-33b的功能的物質。利用本發明化合物來阻礙miR-33b的功能，是指增加miR-33b的標的mRNA、及/或標的蛋白質的表現量，或作用於miR-33b的標的核酸，結果抑制了miR-33b特異性的訊息傳遞途徑，而讓疾病關聯物質往改善疾病的方向被調控。疾病關聯物質往改善疾病的方向被調控，具體而言，是指例如抑制細胞的發炎狀態，例如MMP-9、MCP-1及/或JNK1的mRNA或蛋白質的表現量受到抑制、MMP-9活性受到抑制、及/或JNK1的磷酸化受到抑制。所以，本發明化合物可用來抑制MMP-9、MCP-1及/或JNK1的mRNA的表現量。另外，本發明化合物可用來抑制MMP-9、MCP-1及/或JNK1的蛋白質的表現量。

【0054】miR-33b量降低物質具體而言，可列舉例如針對miR-33b的反義寡核苷酸、siRNA、shRNA或表現這些RNA的載體，適合使用針對miR-33b的反義寡核苷酸(以下會有稱為「本發明之反義寡核苷酸」的情形)。另外，miR-33b阻礙物質還可使用阻礙miR-33b的功能的化合物。

【0055】本發明之反義寡核苷酸，是會降低細胞內的miR-33b量的反義寡核苷酸，而且1)包含7～20個殘基，2)與序列編號4所記載的miR-33b主幹迴圈序列，宜為序列編號1所記載的miR-33b(亦稱為hsa-miR-33b-5p)的核酸鹼基序列的等長部分90%以上互補。等長部分意指在特定鹼基序列之中，反義寡核苷酸的各核酸鹼基序列與miR-33b的核酸鹼基序列具有互補性的部分。亦即，本發明之反義寡核苷酸的核酸鹼基序列，雖然希望和miR-33b的核酸鹼基序列的等長部分完全互補，但也是可以具有一個或多個錯誤配對核酸鹼基，可使用具有85%以上，90%以上，宜為95%以上的互補性的反義寡核苷酸。這種具有錯誤配對的本發明化合物的核酸鹼基序列，只要可與miR-33b雜交，降低細胞內的miR-33b量，則任一者皆可，為了降低與miR-33a的結合，以序列編號1所記載的miR-33b的核酸鹼基序列的5'末端算起第9和第10個核酸鹼基不具有錯誤配對為佳。

【0056】上述錯誤配對核酸鹼基可簇化，或可被互補的核酸鹼基包夾，互補的核酸鹼基並沒有必要連續。miR-33b的本發明的反義寡核苷酸的互補性百分比，可使用例如該技術領域已知的BLAST程式(basic local alignment searchtools)及PowerBLAST程式(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410；Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649 656)常規地決定。相同性百分比、序列相同性或互補性，可例如藉由GAP程式(Wisconsin

Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)，並使用Smith and Waterman(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 489)的演算法，使用初始設定來決定。

【0057】序列編號1所記載的miR-33b的核酸鹼基序列，被包含在miR-33b主幹迴圈序列內，在本發明化合物標的的miR-33b核酸鹼基序列中也包含了miR-33b主幹迴圈序列全長。

【0058】本發明之反義寡核苷酸之核酸鹼基序列，可為序列編號4所記載的miR-33b主幹迴圈序列的鹼基序列的互補鏈，宜為序列編號1的miR-33b鹼基序列的互補鏈的等長部分，任一者皆可，序列長度可為任意，可列舉例如7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個殘基，理想的情況是，在序列編號1所記載的miR-33b的核酸鹼基序列之中，由5'末端算起第9～10包含互補的序列，序列長度以12～19個殘基為佳，12～16殘基為較佳。

具體而言，可列舉例如

AACAGCAATGCA(序列編號5)或

TGCAACAGCAATGCAC(序列編號6)等，

適合使用AACAGCAATGCA(序列編號5)。

某種實施態樣為序列編號5或6的序列中一部分或全部的胞嘧啶鹼為5-甲基胞嘧啶之反義寡核苷酸。一部分的胞嘧啶鹼為5-甲基胞嘧啶之經修飾的寡核苷酸，可列舉例如

序列編號8、10。

【0059】本發明之反義寡核苷酸可為經修飾的寡核苷酸。經修飾的寡核苷酸，可包含如上述5-甲基胞嘧啶般經修飾的鹼，或構成寡核苷酸的至少一個核苷可包含經修飾的糖。

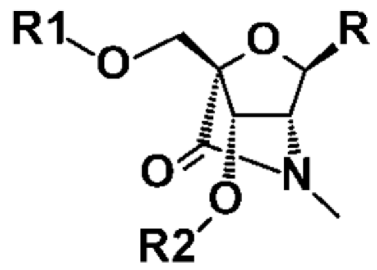
在本發明中，經修飾的糖是指糖部分被修飾，包含一個以上該經修飾的糖之經修飾的寡核苷酸，會具有增強核酸酶安定性、提高結合親和性等的有利特徵。經修飾的糖之中至少一者，以具有二環糖或取代糖部分為佳。

【0060】具有經修飾的糖的核苷的例子，可列舉包含5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH_3、2'-OCH_2CH_3、2'-OCH_2CH_2F及2'-$O(CH_2)_2OCH_3$取代基的核苷。2'位的取代基，可選自烯丙基、胺基、疊氮基、硫基、O-烯丙基、O-C_1～C_{10}烷基、OCF_3、OCH_2F、$O(CH_2)_2SCH_3$、$O(CH_2)_2$-O-$N(R_m)(R_n)$、O-CH_2-C(=O)-$N(R_m)(R_n)$及O-CH_2-C(=O)-$N(R_1)$-$(CH_2)_2$-$N(R_m)(R_n)$(式中，各R_1、R_m及R_n獨立地為H或經取代或未經取代之C_1～C_{10}烷基)。

【0061】具有二環糖的核苷的例子，可列舉含有4'與2'的核糖基環原子之間的橋接之核苷。在某種實施態樣中，本說明書所提供的寡核苷酸是橋接包含以下化學式的一個，而且包含具有一個或多個二環糖的核苷：4'-(CH_2)-O-2'(LNA)；4'-(CH_2)-S-2'；4'-$(CH_2)_2$-O-2'(ENA)；4'-$CH(CH_3)$-O-2'及4'-$CH(CH_2OCH_3)$-O-2'(及其類似物，請參考美國專利7,399,845號)；4'-$C(CH_3)(CH_3)$-O-2'(及其類似

物，請參考WO2009/006478號)；4'-CH_2-N(OCH_3)-2'(及其類似物，請參考WO2008/150729號)；4'-CH_2-O-N(CH_3)-2'(請參考US2004-0171570號)；4'-CH_2-N(R)-O-2'(式中，R為H、C1～C12烷基或保護基)(請參考美國專利7,427,672號)；4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2'(請參考Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134)；以及4'-CH_2-C(=CH_2)-2'(及其類似物，請參考WO2008/154401號)。

【0062】在某種實施態樣(AmNA)中，具有二環糖的核苷可列舉由以下的式子表示的核苷：



AmNA

[式中，R為核酸鹼基，R1、R2各自獨立，表示可經取代之磷酸基]。

經修飾的糖的調製方法可依照WO11/052436等，對業界人士來說為周知。

【0063】在某種實施態樣中，本發明之反義寡核苷酸具有至少一個核酸鹼基為胞嘧啶的核酸鹼基序列。在某種實施態樣中，至少一個胞嘧啶為經修飾的核酸鹼基之5-甲基胞嘧啶。在某種實施態樣中，全部的胞嘧啶皆為5-甲基胞嘧啶。

【0064】自然界中存在的RNA及DNA的核苷間鍵結為3'-5'磷酸二酯鍵。具有一個或多個經修飾的核苷間鍵結，亦即具有自然界中不存在的核苷間鍵結的寡核苷酸，因為例如增強細胞吸收、增強對標的核酸的親和性及提高在核酸酶的存在下的安定性等的特性為理由，比具有自然界中存在的核苷間鍵結的寡核苷酸還更合適的情形很多。

【0065】具有經修飾的核苷間鍵結的寡核苷酸，包含了保持磷原子的核苷間鍵結及不具有磷原子的核苷間鍵結。代表性的含磷的核苷間鍵結，可列舉磷酸二酯、磷酸三酯、甲基膦酸酯、亞磷醯胺及硫代磷酸酯的一種以上，然而不受此限定。含磷的及非含磷的鍵結的調製方法已周知。

【0066】在某種實施態樣中，本發明經修飾的寡核苷酸之核苷間鍵結全部為硫代磷酸酯核苷間鍵結。

【0067】本說明書中，在表示核苷酸的「Gas」等的記號之中，左側位置所表示的簡寫，意指核酸鹼基部分，中央位置所表示的簡寫，意指糖部分，而右側位置所表示的簡寫，意指核苷間鍵結的樣式。

【0068】在某種實施態樣中，反義寡核苷酸，係由下式所表示的經修飾的寡核苷酸：

Tas Gds Mas Ads Aas Cds Aas Gds Mas Ads Aas Tds Gas Cds Aas Cd;

式中，

各核酸鹼基係以下述記號來表示：

A=腺嘌呤、T=胸腺嘧啶、G=鳥嘌呤、C=胞嘧啶、M=5-甲基胞嘧啶；

各糖部分係以下述記號來表示：

a=AmNA的糖部分、d=2'-去氧核糖、

各核苷間鍵結係以下述記號來表示：

s=硫代磷酸酯。

【0069】在某種實施態樣中，反義寡核苷酸，係由下式所表示的經修飾的寡核苷酸：

Aas Ads Mas Ads Gas Cds Aas Ads Tas Gds Mas Ad；

式中，

各核酸鹼基係以下述記號來表示：

A=腺嘌呤、T=胸腺嘧啶、G=鳥嘌呤、C=胞嘧啶；

各糖部分係以下述記號來表示：

a=AmNA的糖部分、d=2'-去氧核糖、

各核苷間鍵結係以下述記號來表示：

s=硫代磷酸酯。

【0070】

(miR-33b阻礙物質的篩選方法)

本發明化合物的篩選方法，只要是可檢驗本發明化合物會降低miR-33b在細胞內的量或阻礙其功能的方法，則任何方法皆可，在本發明化合物中，適合使用miR-33b量降低率高於miR-33a量降低率的miR-33b量降低物質，因此適合使用可檢驗細胞內的miR-33b及miR-33a量降低的方

法。具體而言，可使用例如以下所揭示的in vitro及in vivo的檢驗方法。

【0071】本發明化合物的對於在細胞內的miR-33b量降低的in vitro檢驗，只要是miR-33b表現的細胞系，宜為miR-33b及miR-33a表現的細胞系(以下會有稱為「miR-33b表現細胞系」的情形)，則任一者皆可使用，可列舉例如THP-1細胞(人體巨噬細胞細胞，例如ATCC TIB-202)。另外，還可選擇導入了人類miR-33b，宜為miR-33b及miR-33a的細胞系。導入miR-33b或miR-33b及miR-33a所使用的細胞系，只要是來自動物且通常使用的細胞，則並無特別限制。這些細胞系可從商業上的供應業者來獲得，使用一般使用的市售試藥，依照供給業者的說明書來培養。在這些細胞系導入miR-33b或miR-33b及miR-33a的導入方法，一般而言，可列舉例如將miR-33b或miR-33b及miR-33a的表現用的載體轉染的方法等，並不受此限制。

【0072】使miR-33b表現細胞系接觸本發明化合物的方法也並無特別限制，一般而言，可列舉用來將核酸導入細胞內所使用的方法。具體而言，例如脂質體轉染法或電穿孔法、Gymnosis法等。

【0073】miR-33b或miR-33a的細胞內的量，可藉由該技術領域已知的各種方法來測定。具體而言，可列舉北方墨點法解析、競爭性聚合酶連鎖反應(PCR)，或即時定量PCR等。將miRNA分離時，可使用該技術領域周知的方法，例如依照製造業者推薦使用的實驗程序，使用TriPure

Isolation Reagent(Roche)、Maxwell RSC miRNA Tissue Kit試藥(Promega)等。以這樣的方式可解析miR-33b或miR-33b及miR-33a的表現量。

【0074】為了評估本發明化合物降低細胞內的miR-33b量或改變miR-33b表現細胞的表現型的能力，能夠以in vivo來進行測試。對於本發明化合物降低該細胞內miR-33b的量的檢驗，可列舉例如對於表現miR-33b，宜為miR-33b及miR-33a的動物投予本發明化合物，對該細胞之中上述miR-33b或miR-33b及miR-33a表現量進行解析的方法。另外，本發明化合物改變miR-33b表現細胞的表現型的能力的評估，可使用實驗用的疾病模型，例如動脈瘤的模型，例如氯化鈣塗佈模型來實施。

【0075】本發明化合物對降低miR-33b的量或阻礙miR-33b的機能的in vitro或in vivo檢驗，可藉由對於miR-33b表現細胞系或表現miR-33b，宜為miR-33b及miR-33a的動物投予本發明化合物，並測定MMP-9、MCP-1及/或JNK1的mRNA或蛋白質的表現量來進行。

【0076】

(本發明之反義寡核苷酸的製造方法)

本發明之反義寡核苷酸可藉由常法來合成，例如可藉由市售的核酸合成裝置輕易合成。另外，可被包含於反義寡核苷酸中、核苷的糖經過修飾的AmNA，可藉由WO11/052436所揭示的方法來合成。

【0077】本發明之siRNA及shRNA可為人工化學合成

。另外，siRNA及shRNA，可藉由例如使用T7RNA聚合酶及T7啟動子，由鑄模DNA在生物體外合成出反義及正義的RNA。

【0078】本發明之具有阻礙miR-33b的活性的化合物，可藉由例如Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 113(21)：5898-903(2016)、Mol. Pharm. 16(2)：914-920(2019)、J. Am. Chem. Soc. 139(9)：3446-3455(2017)等所揭示的方法來合成。

【0079】

(利用本發明化合物治療動脈瘤)

藉由本發明中的miR-33b阻礙物質可治療或預防動脈瘤。

動脈瘤其主要的病態是發炎介質亢進等所造成的慢性發炎與細胞外基質代謝異常。這些會互相關聯同時使病態擴大蔓延，而促使大動脈瘤發展。

發炎性介質已知有例如單核球趨化蛋白(Monocyte chemoattractant protein(MCP-1))、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor(TNF))、介白素-6(interleukin(IL)-6)、介白素-1(IL-1)等的發炎性細胞介素、或前列腺素或白三烯等的脂質介質、氣體介質的一氧化氮或各種氧化壓力(oxidative stress)。發炎介質被認為會誘導各種發炎細胞，浸潤的發炎細胞會分泌更多發炎介質，使發炎的病態過程擴大及蔓延。

另外，發炎介質會使細胞內訊息傳遞分子活化。細胞

內訊息傳遞分子，可列舉例如兩面神激酶(Janus kinase (JAK))、絲裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein (MAP) kinase)、核因子-κB(nuclear factor(NF)-κB)、轉錄訊息傳遞及活化子蛋白(signal transducer and activator of transcription(STAT))、轉化生長因子(transforming growth factor(TGF))、SMAD等。

訊息傳遞分子的活化會促進細胞外基質分解酵素的分泌。結果，大動脈壁主要構成成分的彈性蛋白或膠原蛋白等的分解會亢進，而引起大動脈壁的脆弱化。細胞外基質分解酵素可列舉例如基質金屬蛋白酶(MMP)-9或MMP-2。此外，訊息傳遞分子的活化，會抑制細胞外基質合成酵素的產生或引發誘導平滑肌細胞凋亡。

像這樣、細胞外基質代謝平衡傾向分解亢進，同時平滑肌細胞減少，血管壁會脆弱化，導致動脈瘤的形成及發展。這種發炎介質產生或訊息傳遞分子的活化，會發生在與動脈瘤有關的細胞，例如巨噬細胞，單核球，血管內皮細胞或平滑肌細胞，例如抑制巨噬細胞的活化，對於防止動脈瘤的形成及發展而言是重要的。

【0080】本發明人等檢討之後，結果發現，如後述實施例2所示般，本發明中的miR-33b阻礙物質會降低細胞內的miR-33b量，而抑制了動脈瘤的形成及發展。利用miR-33b阻礙物質來抑制動脈瘤的形成及發展的機制，例如，如後述實施例2所示般，可列舉抑制發炎性介質的MCP-1的表現、抑制細胞內訊息傳遞分子的JAK的活化及/或抑制

細胞外基質分解酵素的MMP-9的活性，然而存在有許多miR-33b的下游標的，並且在下游存在多個訊息傳遞途徑，所以並不受這些例子限制。另一方面，針對miR-33a的反義寡核苷酸，如後述實施例2所示般，會使miR-33b的表現上昇，而引起動脈瘤的形成及發展。

像這樣，在本發明中，首先解明了miR-33b在動脈瘤形成中所扮演的角色，並且發現藉由使用選擇性地阻礙miR-33b的阻礙物質，可預防或治療動脈瘤。

如以上般，miR-33b阻礙物質可抑制動脈瘤的發生或擴大，並可使動脈瘤退縮，因此可治療、預防或減輕動脈瘤。

【0081】miR-33b阻礙物質是藉由防止血管壁的脆弱化來阻止動脈瘤的發生，阻止動脈瘤繼續擴大，或使動脈瘤退縮或消失，透過這些方式，可阻止動脈瘤的破裂。

【0082】在本發明中，動脈瘤通常包括所有被稱為動脈瘤的病態。動脈瘤依照其發生部位、其原因、或其形狀而被分類成各種類型，依照發生部位來分類，可列舉例如包括胸部大動脈瘤或腹部大動脈瘤的大動脈瘤、腦動脈瘤、或腎動脈瘤等的內臟動脈瘤、或發生在末梢動脈的瘤等，在本發明中，宜為大動脈瘤、腦動脈瘤或腎動脈瘤，較佳為大動脈瘤或腦動脈瘤，特佳為大動脈瘤。依照血管壁構造，可分類成例如真性動脈瘤、解離性動脈瘤、假性動脈瘤等。依照原因來分類，可分類成例如動脈硬化性動脈瘤、發炎性動脈瘤、先天性動脈瘤、外傷性動脈瘤、或

由細菌性動脈瘤、真菌性動脈瘤、梅毒性動脈瘤所代表的感染性動脈瘤等。依照形狀來分類，可分類成例如囊狀動脈瘤與紡錘狀動脈瘤等。本發明並不受這些分類特別限定。

【0083】動脈瘤亦可為例如伴隨馬凡氏症候群、孔腦症、Loeys-Dietz症候群、常染色體優性腦動脈症、Ehlers-Danlos症候群、家族性大動脈瘤或剝離、遺傳性腦小血管病、川崎病、貝賽特氏症或高安動脈炎發生的動脈瘤，或可為伴隨這些疾病發生的胸部大動脈瘤、腹部大動脈瘤、腦動脈瘤、腎動脈瘤等，然而並不受其限定。

【0084】本發明中的miR-33b阻礙物質，會抑制例如巨噬細胞、單核球、血管內皮細胞、平滑肌細胞，與動脈瘤有關的細胞中的MMP-9、MCP-1及/或JNK1的mRNA或蛋白質的表現量，抑制MMP-9活性，及/或抑制JNK1的磷酸化。所以可使用於預防及治療這些因子之中的至少一種表現或活性上昇的血管障礙疾病。

【0085】如上述般，miR-33b阻礙物質可用來治療或預防動脈瘤，所以，本發明提供一種用來治療動脈瘤的miR-33b阻礙物質；用來治療動脈瘤的醫藥組成物；用來治療動脈瘤的miR-33b阻礙物質之使用；miR-33b阻礙物質在動脈瘤治療用醫藥的製造中之使用；用來製造動脈瘤治療用醫藥之miR-33b阻礙物質：動脈瘤的治療或預防方法，其包含將有效量的miR-33b阻礙物質投予至以其為必要的對象。

【0086】包含本發明化合物、或其醫藥上可容許的鹽、及藥學上可容許的擔體之本發明組成物，可作為醫藥組成物來使用。為了調製醫藥組成物，可將反義寡核苷酸與一種以上的醫藥上可容許的活性或非活性的物質混合。用來將醫藥組成物製劑化的組成物及方法，可依照包括投予途徑、疾病的程度或投予用量這幾項判斷基準來選擇。

例如非口服投予用的組成物可使用例如注射劑，注射劑包括靜脈注射劑、皮下注射劑、皮內注射劑、肌肉注射劑、點滴注射劑、關節內注射劑等的劑型。該注射劑可依據已周知的方法，藉由例如使上述反義寡核苷酸在通常注射劑所使用的無菌水性或油性液體中溶解、懸浮或乳化來調製。注射用的水性液體，可使用例如包含磷酸緩衝食鹽水、生理食鹽水、葡萄糖或其他輔助藥劑的等張液等，亦可併用適當的溶解助劑，例如醇(如乙醇)、多元醇(如丙二醇、聚乙二醇)、非離子界面活性劑[如聚山梨醇酯80、HCO-50(polyoxyethylene(50mol) adduct of hydrogenated castor oil)]等。另外，還可包含緩衝劑、pH調整劑、等張化劑、無痛劑、保存劑、安定化劑等。

【0087】口服投予用的組成物，可列舉固體或液體的劑型，具體而言，錠劑(包括糖衣錠、膜衣錠)、藥丸、顆粒劑、藥粉、膠囊劑(包括軟膠囊劑)、糖漿劑、乳劑、懸浮劑等。該組成物可藉由已周知的方法來製造，並含有在製劑領域中通常使用的擔體、稀釋劑或賦形劑。例如錠劑用的擔體、賦形劑，可使用乳糖、澱粉、蔗糖、硬脂酸鎂

等。

【0088】另外，本發明之醫藥組成物中還可包含核酸導入用試藥。該核酸導入用試藥，可使用核糖體、Lipofectin、Lipofectamine、DOGS(Transfectam)、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、聚凝胺、或聚乙烯亞胺(PEI)等的陽離子性脂質等。

【0089】另外，本發明之醫藥組成物中所含的反義寡核苷酸，適合使用在一個或多個地方與膽固醇、糖質、磷脂質、生物素、吩嗪、維生素、胜肽、葉酸鹽、菲啶、蒽醌、吖啶、螢光素、羅丹明、香豆素及色素等的綴合基發生綴合(conjugate)的反義寡核苷酸。上述綴合的反義寡核苷酸，可選擇增強其活性、增強以動脈瘤部位為標的的組織或細胞的吸收的反義寡核苷酸。上述綴合基以膽固醇或脂質為佳。

【0090】上述綴合基會直接鍵結於反義寡核苷酸，或者綴合基會藉由選自胺基、羥基、羧酸、硫醇、不飽和部分(例如雙或參鍵)、8-胺基-3,6-二氧雜辛酸(ADO)、琥珀醯亞胺基4-(N-馬來醯亞胺甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、6-胺基己酸(AHEX或AHA)、經取代的C1～C10烷基、經取代或未經取代的C2～C10烯基、及經取代或未經取代的C2～C10炔基的連結部分來鍵結於反義寡核苷酸。此處，取代基是選自胺基、烷氧基、羧基、苄基、苯基、硝基、硫醇、硫代烷氧基、鹵素、烷基、芳香基、烯基及炔基。

【0091】本發明之醫藥組成物可選擇副作用少者。副作用可列舉注射部位反應、肝功能檢查異常、腎功能異常、肝毒性、腎毒性、中樞神經系統異常、肌肉病變及倦怠感等。例如血液中的ALT、AST或γ-GTP量的上昇可表示肝毒性或肝功能異常。例如膽紅素的上昇可表示肝毒性或肝功能異常。另外，尿蛋白的上昇、血液中的肌酸酐、或BUN的上昇可表示腎毒性或腎功能異常。

【0092】本發明之醫藥組成物，藉由將其以適當的方法投予至對象個體，可治療、預防或減輕動脈瘤。亦即，本發明提供一種方法，藉由將有效量的miR-33b阻礙物質，宜為針對miR-33b的反義寡核苷酸、或包含其之醫藥組成物，以適當的方法投予至以其為必要的對象個體，來治療、預防或減輕動脈瘤。

【0093】本發明之醫藥組成物的投予形態，可為通常的靜脈內、動脈內等的全身投予，或可為局部注射或口服投予等的局部投予。本發明之醫藥組成物的投予量，可依照使用目的、疾病的嚴重度、患者的年齡、體重、性別等適當地變更，通常反義寡核苷酸量，可由0.1ng～100 mg/kg/天，宜為1ng～10mg/kg/天的範圍來選擇。

[實施例]

【0094】

非限定揭示以及因為參考的編入

本說明書所記載的某種化合物、組成物及方法，會依

照某種實施態樣而特異地記載，然而以下的實施例只不過是達成例示本說明書所記載的化合物的作用，沒有限定其之意圖。本申請所記載的各參考文獻，因為參考而全部被編入本說明書中。

【0095】

實施例1

反義寡核苷酸的合成及純化

AmNA amidite可由大阪合成有機化學研究所股份有限公司取得，含有AmNA的反義寡核苷酸是在Ajinomoto Bio-Pharma Services·GeneDesign股份有限公司合成純化。

將所合成出的反義寡核苷酸揭示於以下的表1。33b-2-AmNA及33b-1-AmNA表示針對miR-33b的寡核苷酸，33a-2-AmNA及33a-1-AmNA表示針對miR-33a的寡核苷酸，NEG-AmNA表示控制組反義寡核苷酸。反義寡核苷酸的表記中，各核苷酸是以3個字母來表示。但是，3'末端的核苷酸沒有核苷間鍵結，因此以兩個字母來表示。

1)第1個字母是以大寫字母來表示，代表下述核酸鹼基：

A=腺嘌呤、T=胸腺嘧啶、G=鳥嘌呤、C=胞嘧啶、M=5-甲基胞嘧啶、

2)第2個字母代表下述各糖部分：

a=AmNA的糖部分、d=2'-去氧核糖、

3)第3個字母代表下述核苷間鍵結：

s=硫代磷酸酯。

【0096】

【表1】

反義寡核苷酸的名稱	序列編號	序列	m/z
33a-2-AmNA(12)	7	AasAdsMasTdsAasCdsAasAdsTasGdsMasAd	4156.5
33b-2-AmNA(12)	8	AasAdsMasAdsGasCdsAasAdsTasGdsMasAd	4181.33
33a-1-AmNA(16)	9	TasGdsMasAdsAasCdsTasAdsMasAdsAasTdsGasCdsAasCd	5541.23
33b-1-AmNA(16)	10	TasGdsMasAdsAasCdsAasGdsMasAdsAasTdsGasCdsAasCd	5566.28
NEG-AmNA (12)	11	AasAdsMasAdsAasTdsAasCdsTasAdsMasGd	4156.15

【0097】

實施例2

使用miR-33b植入小鼠所建立的氯化鈣誘發大動脈瘤模型中的33a-2-AmNA(12)、33b-2-AmNA(12)藥理效果的測定

使用以C57BL/6作為背景的miR-33b植入小鼠。miR-33b植入小鼠是使用SCIENTIFIC REPORTS 4：5312 DOI：10.1038/srep05312所報告的小鼠。使用8週齡雄性的miR-33b植入小鼠來建立塗佈氯化鈣的腹部大動脈瘤模型(依照Atherosclerosis 2013；226：29-39.所報告的方法)。小鼠的麻醉方法是將三種麻醉藥的混合物(美托咪定(Medetomidine)0.3mg/kg、咪達唑侖(Midazolam)4.0mg/kg、布托啡諾(Butorphanol)1.0mg/kg)投予至腹腔內。腹部大動脈瘤模型，是將腎動脈下到總腸骨動脈分支部為止分離出來，對其外表面鋪上泡過0.5mol/L的氯化鈣紗布，20分鐘後將塗佈氯化鈣用的紗布除去，以泡過生理食鹽水的紗布將腹部大動脈周圍洗淨，然後將手術開刀的傷口縫合。在製作腹部大動脈瘤後的1週後或6週後，測定腹部大動脈瘤的最大直徑以及長軸方向延伸距離，進行解析。此時，使用通常的5倍量的上述三種麻醉藥混合物來安樂死，並由左心室將PBS以生理的壓力來灌流。測量腹部大動脈瘤

的最大直徑以及長軸方向延伸距離時，為了防止血管構造在體外發生虛脫，是在將大動脈由體內取出前使用量尺來測量，拍攝照片之後進行解析。

【0098】1週後進行解析的群組，反義寡核苷酸的投予(33a-2-AmNA(12)、33b-2-AmNA(12))，是在外科處置的前日、外科處置的翌日，外科處置的4天後，分別皮下注射10mg/kg的量。6週後進行解析的群組，是在外科處置的前日、外科處置的翌日、外科處置的1週後至6週後為止，每週1次分別皮下注射10mg/kg的量。在最終投予後，過7天後進行取樣，進行各種測定。

【0099】所有的小鼠都是在京都大學醫學部附屬動物實驗設施中飼養，該設施是維持在SPF(specific pathogen free)的狀態，此研究是得到京都大學醫學倫理委員會認可之後才進行。

【0100】進行反義寡核苷酸(NEG-AmNA(12)、33a-2-AmNA(12)、33b-2-AmNA(12))投予後的miR-33a及miR-33b的表現量測定(以下在圖中會有將NEG-AmNA(12)稱為「control」、33a-2-AmNA(12)稱為「Anti-miR-33a」、33b-2-AmNA(12)稱為「Anti-miR-33b」的情形)。miRNA測定時，RNA是使用TriPure Isolation Reagent(Roche)來分離純化，使用TaqMan MicroRNA assay protocols(Applied Biosystems)來測定。生成物是使用熱迴圈儀(ABI Prism 7900HT sequence detection sysrem)來解析，基因表現是使用U6 snRNA來標準化。

【0101】如圖1所示般，6週後進行解析的群組，在大動脈中，在33a-2-AmNA(12)投予組觀察到miR-33a量的強烈抑制，而另外，在33b-2-AmNA(12)投予組觀察到miR-33b量的強烈抑制。另一方面，在33a-2-AmNA(12)投予組觀察到miR-33b量的增加。miR-33a量降低率/miR-33b量降低率之值為0.23。

【0102】在使用miR-33b植入小鼠建立的氯化鈣誘發大動脈瘤模型之中，誘發1週後，依照以下的方法來測定33a-2-AmNA(12)33b-2-AmNA(12)投予後的MMP-9、MCP-1及JNK1蛋白質的表現量或磷酸化程度。對施加足量麻醉藥的小鼠由左室以生理的壓力使用PBS灌流，並採取標本。西方點墨法是使用標準的方法來進行。使用了以Complete mini protease inhibitor(Roche)、ALLN(25mg/mL)、0.5mM NaF、10mM Na3VO4以及100mmol/L Tris-HCl、75mmol/L NaCl、1%Triton X-100所製作出的lysis buffer。蛋白濃度是使用bicinchoninic acid protein assay kit(Bio-Rad)來測定，使用NuPAGE 4%～12%Bis-Tris(Invitrogen)膠體來進行電泳之後，轉印至Protran nitrocellulose transfer membrane(Whatman)。膜是使用1～5%的脫脂乳來進行封閉(Blocking)，一次抗體是使用Anti-phospho-SAPK/JNK(1:500，Cell Signaling 4668S)、anti-SAPK/JNK(1:500，Cell Signaling 9252S)、Anti-GAPDH(1:3000，Cell Signaling 2118S)，並在4℃下攪拌一晚。使用PBS-0.05% Tween 20(0.05%T-PBS)，洗淨之後，使用2次抗體(anti-

rabbit，anti-mouse IgG-linked；1:2000)，在4℃下攪拌1小時，使用PBS-0.05% Tween 20(0.05%T-PBS)，洗淨之後，添加ECL Western Blotting Detection Reagent(GE Healthcare)，並拍攝照片。

【0103】明膠酶譜法，與上述同樣地，是使用lysis buffer來萃取蛋白，將10μg的蛋白使用於測定。使用Gelatin-Zymography Kit(COSMO BIO)，依照附加文件來測定MMP-9的活性。

【0104】MCP-1蛋白質的表現量，是以製作出腹部大動脈瘤模型之後所採取到的血清50μL為樣品，使用enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)kit(R&D Systems)，依照附加文件來進行MCP-1濃度測定。

【0105】如圖2所示般，在33a-2-AmNA(12)投予組觀察到MCP-1及JNK1的蛋白質表現量的上昇以及JNK1的磷酸化程度的上昇。另一方面，在33b-2-AmNA(12)投予組觀察到MCP-1及JNK1的蛋白質表現量的減少以及JNK1的磷酸化程度的降低。

【0106】如圖3所示般，在33a-2-AmNA(12)投予組觀察到MMP-9活性的上昇，然而在33b-2-AmNA(12)投予組觀察到MMP-9活性的減少。

【0107】接下來，使用以miR-33b植入小鼠建立的氯化鈣誘發大動脈瘤模型來調查33a-2-AmNA(12)或33b-2-AmNA(12)對動脈瘤形成所造成的影響。結果，在1週後的解析結果中，如圖4所示般，在33b-2-AmNA(12)並未觀察

到在控制組(NEG-AmNA(12))觀察到的動脈直徑擴大及動脈長度的延伸。在6週後的解析結果中，如圖5所示般，在33b-2-AmNA(12)也並未觀察到在控制組(NEG-AmNA(12))觀察到的動脈直徑擴大及動脈長度的延伸。亦即觀察到動脈溜的形成挽制效果。另一方面，在33a-2-AmNA(12)觀察到與控制組相比動脈直徑更加擴大及動脈長度更加延伸，促進了動脈瘤的形成。

【0108】關於血清生化學解析，是由麻醉後的小鼠的下大靜脈採取血液，在4℃下將血清離心分離，並在-80℃下保存。生化學解析是使用日立7180自動分析裝置(長濱Life Science)來進行。結果如圖6所示般，在肝功能參數的AST、ALT、T-BiI、或腎機能參數的CRE之中，並未觀察到毒性嚴重的結果。

【0109】

實施例3

使用人體巨噬細胞THP-1細胞的33a-2-AmNA(12)、33b-2-AmNA(12)的藥理效果的測定

THP-1細胞是由American Type Cell Collection購得，使用加入10%FBS的RPMI 1640來培養，並使用100nM的PMA(Nacalai Tesque)使其分化成THP-1巨噬細胞。將AmNA轉染(transfection)至THP-1巨噬細胞時，是使用Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent(Thermo Fisher SCIENTIFIC)，依照附加文件來進行實驗。含有AmNA的反義寡(NEG-AmNA(12)、33a-2-AmNA(12)、33b-

2-AmNA(12))是以50nM來導入，在導入4天後回收細胞，如以下所述般進行RNA的萃取與各種RNA測定。

RNA萃取與即時PCR，是依照以下的程序來實施。RNA是使用Tri Pure Isolation Reagent(Roche)來分離純化，依照附加文件，使用Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche)合成出cDNA之後，使用SYBRTM Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)，將特異基因增幅40個循環。基因表現是使用β-actin或U6作為管家基因來標準化。所使用的引子的序列如以下所述。

SREBF1 Forward、AACAGTCCCACTGGTCGTAGAT(序列編號12)

SREBF1 Reverse、TGTTGCAGAAAGCGAATGTAGT(序列編號13)

ACTB Forward、AGGCACTCTTCCAGCCTTCC(序列編號14)

ACTB Reverse、GCACTGTGTTGGCGTACAGG(序列編號15)

MMP-9 Forward、TTGACAGCGACAAGAAGTGG(序列編號16)

MMP-9 Reverse、GCCATTCACGTCGTCCTTAT(序列編號17)

MCP-1 Forward、CCCCAGTCACCTGCTGTTAT(序列編號18)

MCP-1 Reverse、TGGAATCCTGAACCCACTTC(序列

編號19)

JNK1 Forward、TGCCTGACTCACACTCAAGG(序列編號20)

JNK1 Reverse、GGCTTCTCAGCAACTGAACC(序列編號21)

ABCA1 Forward、AACAGTTTGTGGCCCTTTTG(序列編號22)

ABCA1 Reverse、AGTTCCAGGCTGGGGTACTT(序列編號23)

【0110】如圖7所示般，分別在33a-2-AmNA(12)導入組觀察到miR-33a的表現量有強烈抑制，在33b-2-AmNA(12)導入組觀察到miR-33b的表現量有強烈抑制。另一方面，在33a-2-AmNA(12)導入組觀察到miR-33b的表現量的誘導。miR-33a量降低率/miR-33b量降低率之值為0.52。關於miR-33a及miR-33b標的基因的ABCA1的mRNA表現量，任一者的寡核苷酸皆呈現顯著增加，可確認分別抑制了miR-33a或b。

【0111】如圖8所示般，在33a-2-AmNA(12)導入組觀察到SREBF1mRNA表現量的誘導。miR-33b是存在於SREBP1基因的內含子，因此認為SREBF1基因的表現上昇，是33a-2-AmNA(12)導入組，亦即以miR-33a反義寡核苷酸處理時，miR-33b的表現被誘導出來的原因。

【0112】關於MMP-9mRNA、MCP-1mRNA及JNK1mRNA表現量的變動，在TNFα非刺激時(vehicle)或

TNFα刺激時，依照上述方法來測定mRNA表現量。結果如圖9所示般，在33b-2-AmNA(12)投予組中，任一者的mRNA量皆受到抑制，相對於此，在33a-2-AmNA(12)投予組中，任一者的mRNA量皆增加。

【0113】關於MMP-9蛋白質及磷酸化JNK蛋白質量的變動，依照上述方法，藉由西方墨點法及明膠酶譜法來測定。結果如圖10所示般，在33b-2-AmNA(12)投予組，MMP-9的活性及磷酸化JNK蛋白質的表現量會受到抑制，表現出巨噬細胞活化抑制作用，相對於此，在33a-2-AmNA(12)投予組，MMP-9的活性及磷酸化JNK蛋白質的表現量會增強，表現出巨噬細胞活化增強作用。

如以上般，關於小鼠動脈瘤模型中的33b-2-AmNA(12)的病態形成作用機制的一部分之巨噬細胞活化抑制作用，已知在人體的細胞中也會表現出同樣的作用，這代表miR-33b阻礙物質在人體動脈瘤的治療之中是有用的。

【0114】在本說明書中，只要沒有另外記載，單數形的使用也包括複數形。在本說明書中，只要沒有另外記載，「或」的使用意指「及/或」。此外，用語「包含(including)」以及其他形態，例如「包含(includes)」及「被包含(included)」的使用，並沒有限制性。此外，只要沒有特別記載，「要素」等的用語包括含一個單元的要素與含超過一個次單元的要素。

【0115】本說明書所使用的章節標題，只是為了構文

上的目的，不應該以限制所記載的主題來解釋。包括了專利、專利申請、新聞、書籍及論文，在本申請中被引用的所有文章或文章的部分，相關於本說明書所論述的文章的部分及其全體，會因為參考而明確被編入本說明書中，然而不受此限定。

【0116】只要沒有給予具體的定義，則本說明書所記載的相關於分析化學、有機合成化學以及醫藥化學而利用的命名法，及一些程序及技術，是在該技術領域為周知且一般被使用的。可將標準的技術使用於本說明書中所使用的化學合成及化學分析。在可容許的情況，本說明書揭示內容通篇提及的所有的專利、申請案、公開申請及其他出版物、透過國立生物技術資訊中心(NCBI)等的資料庫可取得的GenBank受託編號及相關的序列資訊以及其他數據，相關於本說明書所論述的文章的部分及其全體，會因為參考而收編進來。

另外，本說明書是與電子格式的序列表一起申請，該電子格式中所記載的序列表的資訊，因為參考，其全體被編入本說明書中。

【序列表】

<110> 日商田邊三菱製藥股份有限公司(Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation)
京都大學(Kyoto University)
大阪大學(Osaka University)
國立研究開發法人醫藥基盤健康營養研究所(National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)

<120> miR-33b 阻礙物質所致之動脈瘤的預防或治療

<130> P202227TW

<150> JP2020-034619
<151> 2020-03-02

<160> 23

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 20
<212> RNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1
gugcauugcu guugcauugc 20

<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> 人

<400> 2
gugcauugua guugcauugc a 21

<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> 人

<400> 3
gugcauugua guugcauugc a 21

<210> 4
<211> 96
<212> RNA
<213> 人

<400> 4
gcgggcggcc ccgcggugca uugcuguugc auugcacgug ugugaggcgg gugcagugcc 60
ucggcagugc agcccggagc cggccccugg caccac 96

<210> 5
<211> 12
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 反義寡核苷酸(Antisense oligonucleotide)

<400> 5
aacagcaatg ca 12

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 6
tgcaacagca atgcac 16

<210> 7
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (3)..(3)
<223> m5c

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (11)..(11)
<223> m5c

<400> 7
aactacaatg ca 12

<210> 8
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (3)..(3)
<223> m5c

<220>
<221> 經修飾的鹼基

<222> (11)..(11)
<223> m5c

<400> 8
aacagcaatg ca 12

<210> 9
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (3)..(3)
<223> m5c

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (9)..(9)
<223> m5c

<400> 9
tgcaactaca atgcac 16

<210> 10
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (3)..(3)
<223> m5c

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (9)..(9)
<223> m5c

<400> 10
tgcaacagca atgcac 16

<210> 11
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (3)..(3)
<223> m5c

<220>
<221> 經修飾的鹼基
<222> (11)..(11)
<223> m5c

<400> 11
aacaatacta cg 12

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 12
aacagtccca ctggtcgtag at 22

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 13
tgttgcagaa agcgaatgta gt 22

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 14
aggcactctt ccagccttcc 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 15
gcactgtgtt ggcgtacagg 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 16
ttgacagcga caagaagtgg 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 17
gccattcacg tcgtccttat 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 18
ccccagtcac ctgctgttat 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 19
tggaatcctg aacccacttc 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 20
tgcctgactc acactcaagg 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 21
ggcttctcag caactgaacc 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 22
aacagtttgt ggccctttg 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 23
agttccaggc tggggtactt 20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種動脈瘤的預防或治療劑，其係以miR-33b阻礙物質作為有效成分。

【請求項2】如請求項1之預防或治療劑，其中miR-33b阻礙物質為miR-33b量降低物質。

【請求項3】如請求項2之預防或治療劑，其中miR-33b量降低物質為核酸。

【請求項4】如請求項3之預防或治療劑，其中miR-33b量降低物質為針對miR-33b的反義寡核苷酸、siRNA或shRNA。

【請求項5】如請求項2～4中任一項之預防或治療劑，其中前述miR-33b量降低物質的miR-33b量降低率高於miR-33a量降低率。

【請求項6】如請求項2～5中任一項之預防或治療劑，其中miR-33b量降低物質為針對miR-33b的反義寡核苷酸。

【請求項7】如請求項6之預防或治療劑，其中針對miR-33b的反義寡核苷酸

1)包含7～20個核苷酸殘基，

2)具有下述鹼基序列：與具有序列編號1的鹼基序列的miR-33b的等長部分90%以上互補的鹼基序列，並且由序列編號1所記載的miR-33b的鹼基序列的5'末端算起第9和第10個核酸鹼基不具有錯誤配對之鹼基序列；

(序列編號1)GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC。

【請求項8】如請求項7之預防或治療劑，其中

針對miR-33b的反義寡核苷酸具有包含下述序列編號5所記載的序列的核酸鹼基序列：

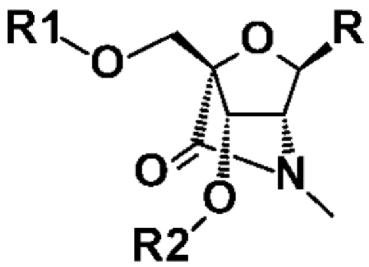
AACAGCAATGCA(序列編號5)，

(但是，C可為5-甲基胞嘧啶(M))。

【請求項9】如請求項8之預防或治療劑，其中前述反義寡核苷酸為經修飾的寡核苷酸。

【請求項10】如請求項9之預防或治療劑，其中前述構成經修飾的寡核苷酸的至少一個核苷包含經修飾的糖。

【請求項11】如請求項10之預防或治療劑，其中前述經修飾的糖係選自AmNA的糖部分，



AmNA

[式中，R為核酸鹼基，R1、R2各自獨立表示可經取代之磷酸基]。

【請求項12】如請求項11之預防或治療劑，其中前述經修飾的寡核苷酸係由下式表示的經修飾的寡核苷酸：

Aas Ads Mas Ads Gas Cds Aas Ads Tas Gds Mas Ad；

式中，

各核酸鹼基係以下述記號來表示：

A=腺嘌呤、T=胸腺嘧啶、G=鳥嘌呤、C=胞嘧啶、M=5-甲基胞嘧啶；

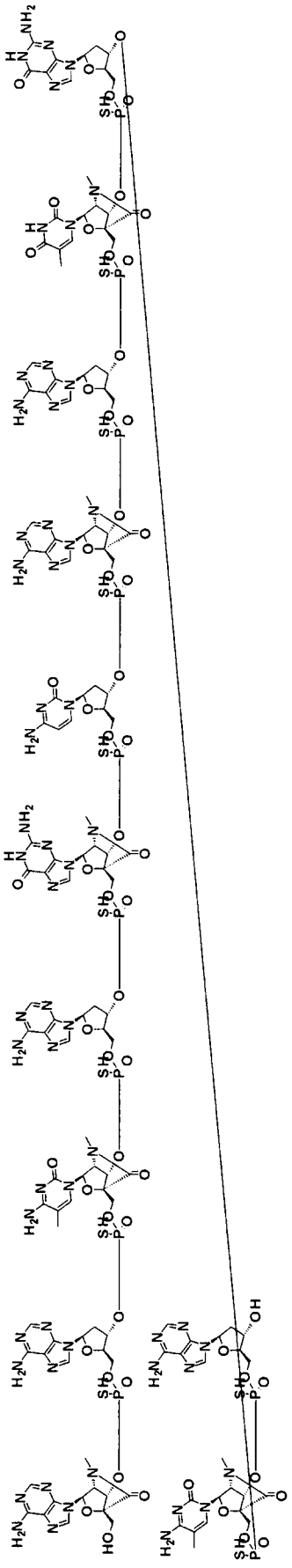
各糖部分係以下述記號來表示：

a=上述AmNA的糖部分、d=2'-去氧核糖；

各核苷間鍵結係以下述記號來表示：

s=硫代磷酸酯。

【請求項13】如請求項12之預防或治療劑，其中前述經修飾的寡核苷酸為下式所表示的經修飾的寡核苷酸：



。

【請求項14】如請求項1～13中任一項之預防或治療劑，其中動脈瘤為大動脈瘤或腦動脈瘤。

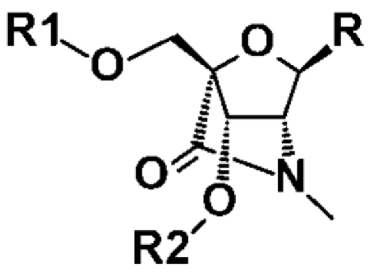
【請求項15】一種針對miR-33b的反義寡核苷酸，其係具有包含下述序列編號5所記載的序列的核酸鹼基序列：

AACAGCAATGCA(序列編號5)。

【請求項16】如請求項15之反義寡核苷酸，其中反義寡核苷酸為經修飾的寡核苷酸。

【請求項17】如請求項16之反義寡核苷酸，其中構成經修飾的寡核苷酸的至少一個核苷包含經修飾的糖。

【請求項18】如請求項17之反義寡核苷酸，其中經修飾的糖係選自AmNA的糖部分，



AmNA

[式中，R為核酸鹼基，R1、R2各自獨立表示可經取代之磷酸基]。

【請求項19】如請求項16～18中任一項之反義寡核苷酸，其中構成經修飾的寡核苷酸的至少一個核苷包含經修飾的核酸鹼基。

【請求項20】如請求項19之反義寡核苷酸，其中經修

飾的核酸鹼基為5-甲基胞嘧啶。

【請求項21】如請求項16～20中任一項之反義寡核苷酸，其中經修飾的寡核苷酸之經修飾的核苷間鍵結為硫代磷酸酯核苷間鍵結。

【請求項22】如請求項16～21中任一項之反義寡核苷酸，其中經修飾的寡核苷酸係由下式表示的經修飾的寡核苷酸：

Aas Ads Mas Ads Gas Cds Aas Ads Tas Gds Mas Ad；

式中，

各核酸鹼基係以下述記號來表示：

A=腺嘌呤、T=胸腺嘧啶、G=鳥嘌呤、C=胞嘧啶、M=5-甲基胞嘧啶；

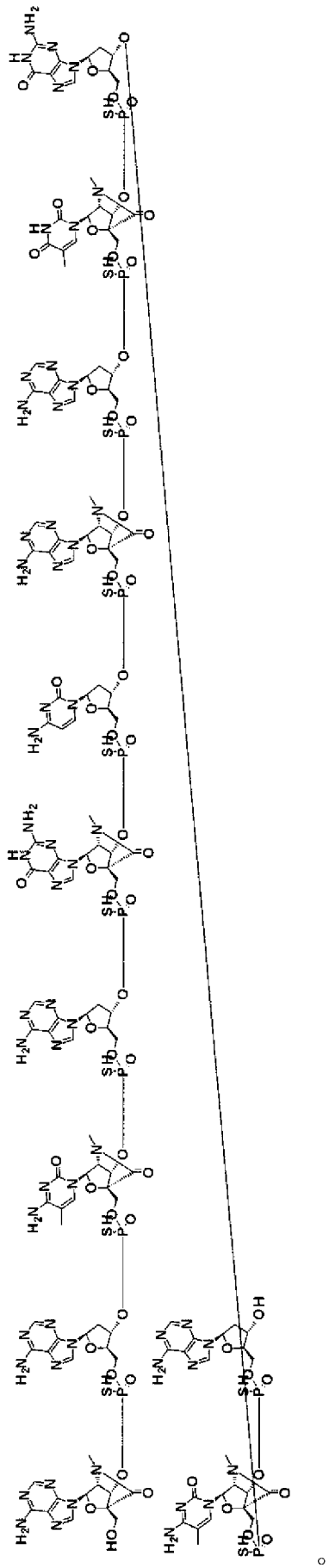
各糖部分係以下述記號來表示：

a=上述AmNA的糖部分、d=2'-去氧核糖；

各核苷間鍵結係以下述記號來表示：

s=硫代磷酸酯。

【請求項23】如請求項22之反義寡核苷酸，其中經修飾的寡核苷酸係由下式表示：

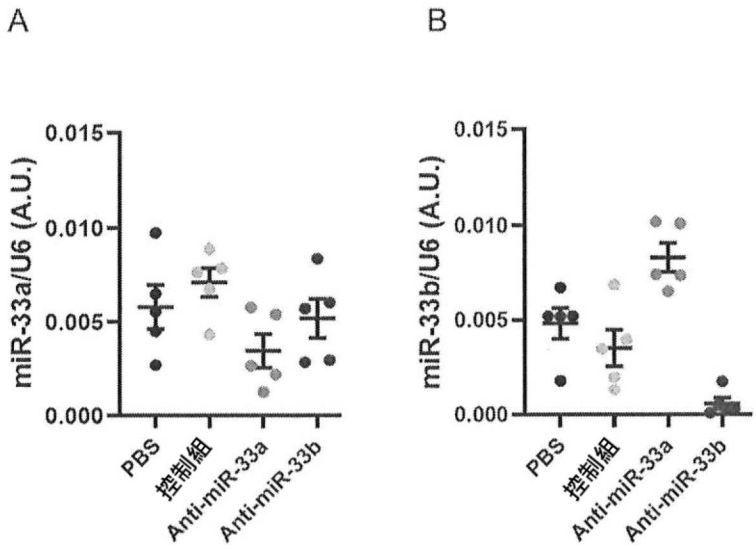


。

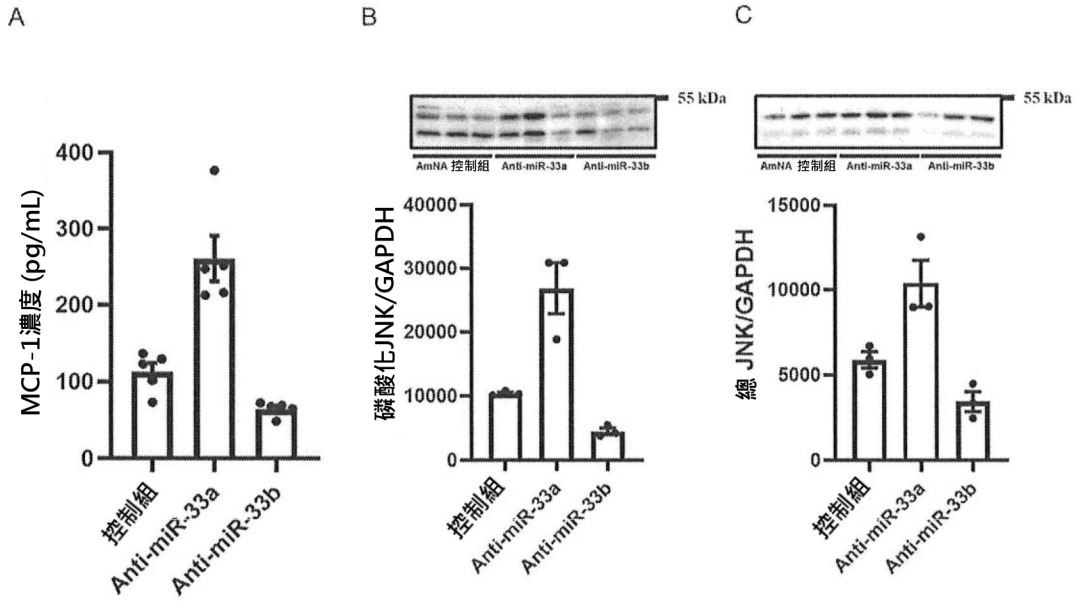
【請求項24】一種醫藥組成物，其係包含如請求項15～23中任一項之反義寡核苷酸或其醫藥上可容許的鹽、及藥學上可容許的擔體。

【請求項25】一種miR-33b阻礙物質在動脈瘤的預防或治療劑的製造中的使用。

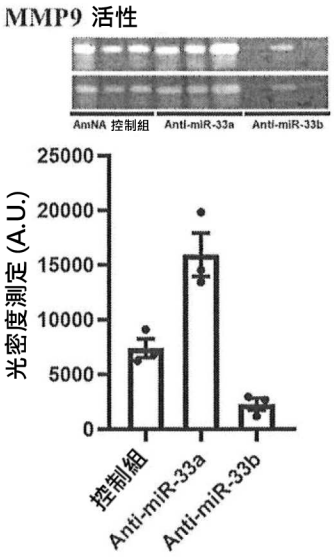
【發明圖式】


A
B
miR-33a/U6 (A.U.)
miR-33b/U6 (A.U.)
0.015
0.010
0.005
0.000
PBS
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

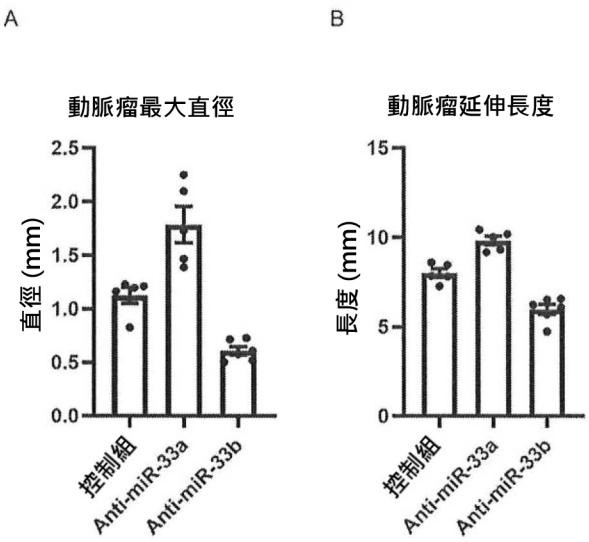
【圖 1】


A
B
C
MCP-1濃度 (pg/mL)
400
300
200
100
0
55 kDa
AmNA 控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
磷酸化JNK/GAPDH
40000
30000
20000
10000
總 JNK/GAPDH
15000
10000
5000
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

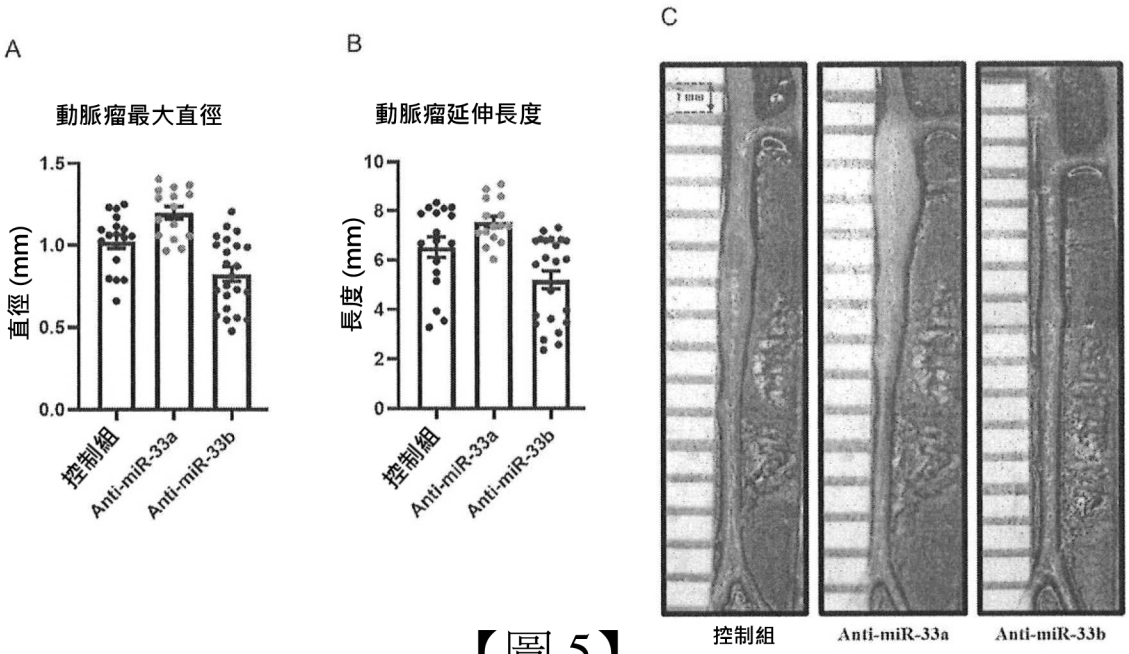
【圖 2】


MMP9 活性
AntNA 控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
光密度測定 (A.U.)
25000
20000
15000
10000
5000
0
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

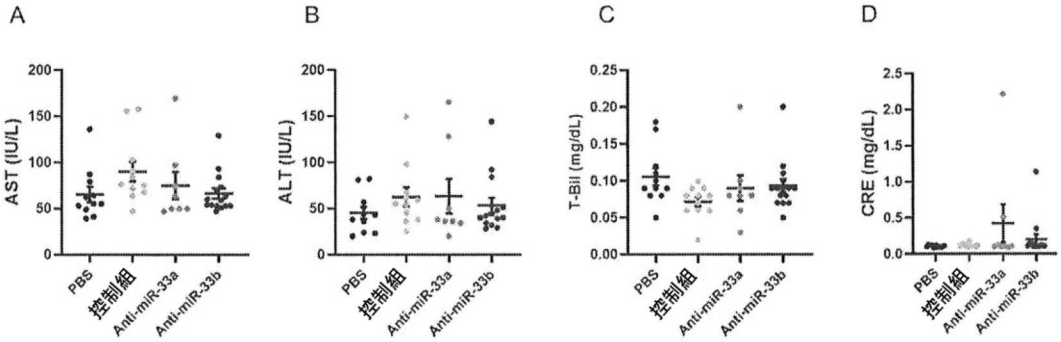
【圖 3】


A
B
動脈瘤最大直徑
直徑 (mm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
動脈瘤延伸長度
長度 (mm)
15
10
5
0
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

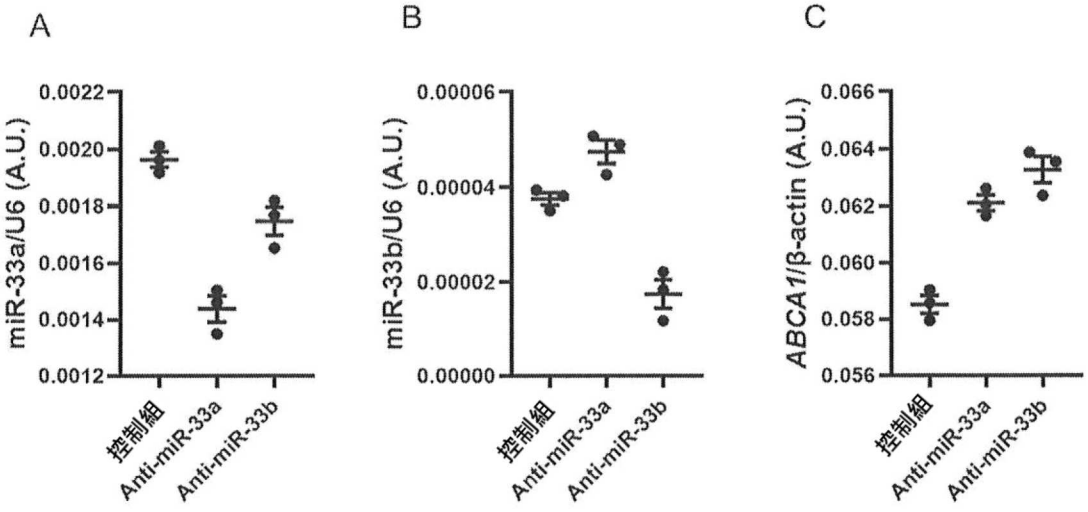
【圖 4】


A
動脈瘤最大直徑
直徑 (mm)
1.5
1.0
0.5
0.0
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
B
動脈瘤延伸長度
長度 (mm)
10
8
6
4
2
0
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
C
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

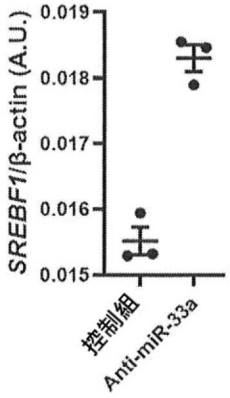
【圖 5】


A
AST (IU/L)
200
150
100
50
0
B
ALT (IU/L)
C
T-Bil (mg/dL)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
D
CRE (mg/dL)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PBS
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

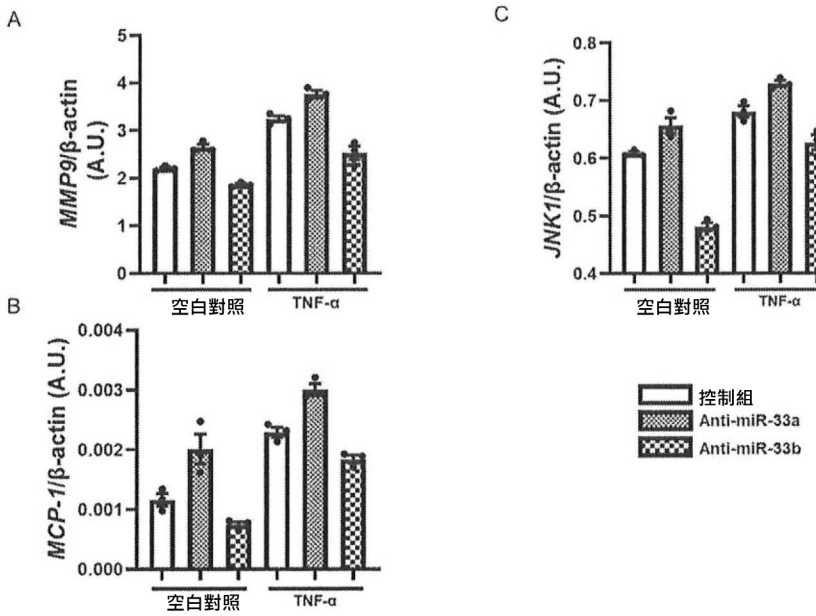
【圖 6】


A
miR-33a/U6 (A.U.)
0.0022
0.0020
0.0018
0.0016
0.0014
0.0012
B
miR-33b/U6 (A.U.)
0.00006
0.00004
0.00002
0.00000
C
ABCA1/β-actin (A.U.)
0.066
0.064
0.062
0.060
0.058
0.056
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

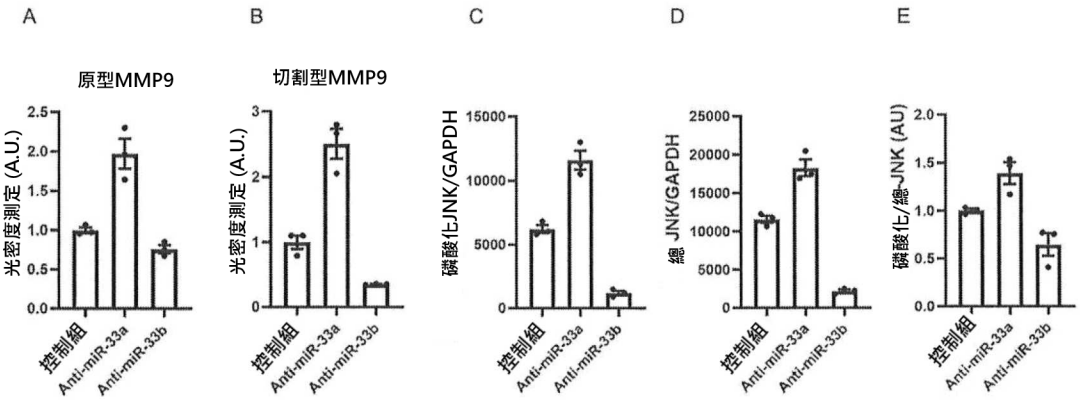
【圖 7】


SREBF1/β-actin (A.U.)
0.019
0.018
0.017
0.016
0.015
控制組
Anti-miR-33a

【圖 8】


A
MMP9/β-actin (A.U.)
空白對照
TNF-α
B
MCP-1/β-actin (A.U.)
空白對照
TNF-α
C
JNK1/β-actin (A.U.)
空白對照
TNF-α
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

【圖 9】


A
原型MMP9
光密度測定 (A.U.)
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
B
切割型MMP9
光密度測定 (A.U.)
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
C
磷酸化JNK/GAPDH
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
D
總 JNK/GAPDH
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
E
磷酸化/總-JNK (AU)
控制組
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

【圖 10】