

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-501843

(P2015-501843A)

(43) 公表日 平成27年1月19日 (2015. 1. 19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7105 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 45/06 (2006. 01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 P 35/04 (2006. 01)	A 6 1 P 35/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-547416 (P2014-547416)	(71) 出願人	514137997
(86) (22) 出願日	平成24年12月13日 (2012. 12. 13)		オハイオ・ステイト・イノベーション・フ
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月5日 (2014. 8. 5)		ァウンデーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/069484		アメリカ合衆国オハイオ州4 3 2 0 1, コ
(87) 国際公開番号	W02013/090556		ロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1
(87) 国際公開日	平成25年6月20日 (2013. 6. 20)		5 2 4
(31) 優先権主張番号	61/569, 862	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成23年12月13日 (2011. 12. 13)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	61/644, 980		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成24年5月9日 (2012. 5. 9)	(74) 代理人	100101373
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 m i R - 2 1 および m i R - 2 9 a、エキソソーム阻害、およびがん転移に関する方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍が分泌する m i R - 2 1 および m i R - 2 9 a は免疫細胞中で T o l l 様受容体ファミリーの受容体であるマウス T L R 7 およびヒト T L R 8 にリガンドとして結合して T L R に媒介される転移促進性炎症反応を誘発することにより機能することができ、それは腫瘍の増殖および転移をもたらすという発見に関連する材料および方法を提供する。従って、T L R の傍分泌アゴニストとして作用することにより、分泌された m i R N A は腫瘍微小環境の重要な制御因子である。この m i R N A の作用の機序は、腫瘍-免疫系コミュニケーションにおいて、腫瘍の増殖および拡散において、ならびにがん処置において重要である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 個のがん細胞において $miR-21$ および／または $miR-29a$ のレベルを減少させることならびに転移を阻害することを含む、少なくとも 1 個のがん細胞の転移を阻害するための方法。

【請求項 2】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を遺伝子療法、小分子療法、または生物学的療法からなる群から選択される手段により減少させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ をアンチセンス $miR-21$ および／またはアンチセンス $miR-29a$ の投与により減少させる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を少なくとも 1 種類のエキソソーム阻害剤の投与により減少させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ をロックド核酸 $anti-miR-21$ 阻害剤および／またはロックド核酸 $anti-miR-29a$ 阻害剤の投与により減少させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも 1 個の TLR を発現しているがん細胞において $miR-21$ および／または $miR-29a$ のレベルを減少させることならびに TLR に媒介される転移促進反応を阻害することを含む、少なくとも 1 個のがん細胞の TLR に媒介される転移促進反応を阻害するための方法。

20

【請求項 7】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を遺伝子療法、小分子療法、または生物学的療法からなる群から選択される手段により減少させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ をアンチセンス $miR-21$ および／またはアンチセンス $miR-29a$ の投与により減少させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を少なくとも 1 種類のエキソソーム阻害剤の投与により減少させる、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 10】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ をロックド核酸 $anti-miR-21$ 阻害剤および／またはロックド核酸 $anti-miR-29a$ 阻害剤の投与により減少させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

発現される前記 TLR が TLR 7 または TLR 8 である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

少なくとも 1 個のがん細胞において $miR-21$ および／または $miR-29a$ のレベルを減少させることならびに腫瘍増殖を阻害することを含む、少なくとも 1 個のがん細胞の腫瘍増殖を阻害するための方法。

40

【請求項 13】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を遺伝子療法、小分子療法、または生物学的療法からなる群から選択される手段により減少させる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ をアンチセンス $miR-21$ および／またはアンチセンス $miR-29a$ の投与により減少させる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を少なくとも 1 種類のエキソソーム阻害剤の

50

投与により減少させる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

m i R-21 および／または m i R-29 a をロックド核酸 a n t i-m i R-21 阻害剤および／またはロックド核酸 a n t i-m i R-29 a 阻害剤の投与により減少させる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

m i R-21 および m i R-29 a を発現している少なくとも 1 個のがん細胞において m i R-21 および／または m i R-29 a のレベルを減少させること、ならびに m i R-21 および m i R-29 a の t o l l 様受容体の活性化作用を阻害することを含む、少なくとも 1 個の m i R-21 および m i R-29 a を発現しているがん細胞において m i R-21 および m i R-29 a の t o l l 様受容体の活性化作用を阻害するための方法。

10

【請求項 18】

m i R-21 および／または m i R-29 a を遺伝子療法、小分子療法、または生物学的療法からなる群から選択される手段により減少させる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

m i R-21 および／または m i R-29 a をアンチセンス m i R-21 および／またはアンチセンス m i R-29 a の投与により減少させる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

m i R-21 および／または m i R-29 a を少なくとも 1 種類のエキソソーム阻害剤の投与により減少させる、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 21】

m i R-21 および／または m i R-29 a をロックド核酸 a n t i-m i R-21 阻害剤および／またはロックド核酸 a n t i-m i R-29 a 阻害剤の投与により減少させる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも 1 個のがん細胞において m i R-21 および／または m i R-29 a のレベルを減少させることを含む、少なくとも 1 個のがん細胞において転移を阻害するための方法。

【請求項 23】

m i R-21 および／または m i R-29 a を遺伝子療法、小分子療法、または生物学的療法からなる群から選択される手段により減少させる、請求項 22 に記載の方法。

30

【請求項 24】

m i R-21 および／または m i R-29 a をアンチセンス m i R-21 および／またはアンチセンス m i R-29 a の投与により減少させる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

m i R-21 および／または m i R-29 a を少なくとも 1 種類のエキソソーム阻害剤の投与により減少させる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

m i R-21 および／または m i R-29 a をロックド核酸 a n t i-m i R-21 阻害剤および／またはロックド核酸 a n t i-m i R-29 a 阻害剤の投与により減少させる、請求項 22 に記載の方法。

40

【請求項 27】

少なくとも 1 種類の医薬的に許容できるキャリアーまたは賦形剤中に少なくとも 1 種類のロックド核酸 a n t i-21 阻害剤および少なくとも 1 種類のロックド核酸 a n t i-29 a 阻害剤を含む物質の組成物。

【請求項 28】

さらに追加の化学療法化合物を含む、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

組成物をがんを有する対象に投与することを含む、がんを有する対象においてがん転移を改善するための方法。

50

【請求項 30】

請求項 27 に記載の組成物をがんを有する対象に投与することを含む、がんを有する対象において全生存時間を増大させるための方法。

【請求項 31】

請求項 27 に記載の組成物をがんを有する対象に投与することを含む、がんを有する対象において腫瘍の多数性を減少させるための方法。

【請求項 32】

少なくとも 1 個のがん細胞において $miR-21$ および／または $miR-29a$ のレベルを減少させることを含む、少なくとも 1 個のがん細胞の炎症マーカーの発現を阻害するための方法。

10

【請求項 33】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を遺伝子療法、小分子療法、または生物学的療法からなる群から選択される手段により減少させる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ をアンチセンス $miR-21$ および／またはアンチセンス $miR-29a$ の投与により減少させる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を少なくとも 1 種類のエキソソーム阻害剤の投与により減少させる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 36】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ をロックド核酸 $anti-miR-21$ 阻害剤および／またはロックド核酸 $anti-miR-29a$ 阻害剤の投与により減少させる、請求項 32 に記載の方法。

20

【請求項 37】

少なくとも 1 個の肺がん細胞において $miR-21$ および／または $miR-29a$ のレベルを減少させることを含む、少なくとも 1 個のがん細胞の肺腫瘍の多数性を阻害するための方法。

【請求項 38】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を遺伝子療法、小分子療法、または生物学的療法からなる群から選択される手段により減少させる、請求項 37 に記載の方法。

30

【請求項 39】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ をアンチセンス $miR-21$ および／またはアンチセンス $miR-29a$ の投与により減少させる、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ を少なくとも 1 種類のエキソソーム阻害剤の投与により減少させる、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

$miR-21$ および／または $miR-29a$ をロックド核酸 $anti-miR-21$ 阻害剤および／またはロックド核酸 $anti-miR-29a$ 阻害剤の投与により減少させる、請求項 37 に記載の方法。

40

【請求項 42】

対象におけるがん転移の危険性を診断する方法であって、以下の工程：

a. 対照と比較した相対的な $miR-21$ および $miR-29a$ の発現を同定し、そして

b. 前記対象が対照と比較して増大した $miR-21$ および $miR-29a$ の発現を有する場合、前記対象において増大したがん転移の危険性があると診断し、または

c. 前記対象が対照と比較して増大した $miR-21$ および $miR-29a$ の発現を有しない場合、前記対象において増大したがん転移の危険性がないと診断する；

を含む、前記方法。

【請求項 43】

50

さらに診断に基づいた処置計画を設計することを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

さらに診断に基づいた処置を施すことを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

さらに肺がん転移が診断された場合に少なくとも 1 種類のアンチセンス *miR-21* および／またはアンチセンス *miR-29a* を投与することを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

さらに診断に基づいて予後を決定することを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】

さらに以下の工程：

a. 対象から得られた試験試料から *miR-21* RNA および *miR-29a* RNA を逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供し；

b. 前記標的オリゴデオキシヌクレオチドを *miR-21* 特異的および *miR-29a* 特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて前記試験試料に関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し；そして

c. 工程 (b) のプロファイルを対照と比較する；

を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 8】

工程 c) が試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルに対して比較することを含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

工程 c) が試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを試料と関係するデータベース、統計、または *miR* レベルの表に対して比較することを含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

少なくとも 1 種類の追加の *miR* がマイクロアレイ中に含まれる、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

対象における炎症反応の危険性を診断する方法であって、以下の工程：

a. 対照と比較した相対的な *miR-21* および *miR-29a* の発現を同定し、そして

b. 前記対象が対照と比較して増大した *miR-21* および *miR-29a* の発現を有する場合、前記対象において増大した炎症反応の危険性があると診断し、または

c. 前記対象が対照と比較して増大した *miR-21* および *miR-29a* の発現を有しない場合、前記対象において増大した炎症反応の危険性がないと診断する；

を含む、前記方法。

【請求項 5 2】

前記炎症反応が転移促進性炎症反応である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

さらに診断に基づいた処置計画を設計することを含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

さらに診断に基づいた処置を施すことを含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

さらにがん転移が診断された場合に少なくとも 1 種類のアンチセンス *miR-21* および／またはアンチセンス *miR-29a* を投与することを含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 6】

さらに診断に基づいて予後を決定することを含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 7】

10

20

30

40

50

以下の工程：

前記対象から得られた試験試料からm i R-21 RNAおよびm i R-29a RNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供し；

前記標的オリゴデオキシヌクレオチドをm i R-21特異的およびm i R-29a特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて前記試験試料に関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し；そして

前記ハイブリダイズ工程のプロファイルを対照と比較する；を含む、請求項51に記載の方法。

【請求項58】

前記比較工程が以下の工程：前記試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルに対して比較する；を含む、請求項57に記載の方法。

10

【請求項59】

前記比較工程が以下の工程：前記試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを試料と関係するデータベース、統計、またはm i Rレベルの表に対して比較する；を含む、請求項57に記載の方法。

【請求項60】

少なくとも1種類の追加のm i Rが前記マイクロアレイ中に含まれる、請求項57に記載の方法。

【請求項61】

前記がんがルイス肺癌；扁平上皮癌；非小細胞肺癌；小細胞肺癌からなる群から選択される肺がんである、上記の請求項のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項62】

前記がんが肺胞性基底上皮腺癌；肺腺癌；結腸腺癌；子宮頸部腺癌、前立腺腺癌；乳腺癌；食道腺癌、膵臓腺癌；および胃腺癌からなる群から選択される腺癌である、上記の請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】

ant i-m i R-29aをそれを必要とする対象に投与することを含む、化学療法抵抗性のがんを処置する方法。

【請求項64】

対象においてがんを処置する方法であって、以下の工程：（a）対象からエキソソームを含有する体液試料を得て、（b）前記体液試料からエキソソームを分離し、（c）（b）の前記エキソソーム中の1種類又はそれより多くのバイオマーカーを検出し、ここで前記1種類又はそれより多くのバイオマーカーはm i R-29aおよびm i R-21を含み、そして（c）エキソソーム中で高レベルのm i R-29aおよびm i R-21が検出された場合、前記対象をアンチセンスm i R-29a／m i R-21で処置する；を含む、前記方法。

30

【請求項65】

対象におけるがんの診断またはがんの進行もしくは退縮の監視を補助するための方法であって、以下の工程：（a）それを必要とする対象からエキソソームを含有する体液試料を得て、（b）前記体液試料からエキソソームを分離し、（c）（b）の前記エキソソーム中の1種類又はそれより多くのバイオマーカーを検出し、ここで前記1種類又はそれより多くのバイオマーカーはm i R-29aおよびm i R-21を含み、かつここでエキソソーム中の前記バイオマーカーの検出は前記対象中のがんに関係しており、それにより前記がんの診断、または前記がんの進行もしくは退縮の監視を助ける；を含む、前記方法。

40

【請求項66】

バイオマーカーの1種類又はそれより多くを生物学的経路中で前記バイオマーカーの上流もしくは下流で見出される分子、または前記分子の測定可能な断片で置き換えることができる、請求項65に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

発明者：Muller Fabbri, Carlo M Croce

関連出願への相互参照

[0001] この出願は2011年5月9日に出願された米国仮出願第61/644,980号の、および2011年12月13日に出願された米国仮出願第61/569,862号の利益を主張し、その開示を全ての目的に関して参照により本明細書に援用する。

【0002】

連邦政府により資金提供を受けた研究に関する記載

[0002] この発明は、国立衛生研究所により与えられたR01 CA135030およびR01 CA124541の下での米国政府の経済的支援によりなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列リストへの参照

[0003] この出願は、MPEP § 1730 II, B, 2(a)(A)において認可され、示されているように、USPTO EFS-WEBサーバーを介して電子出願されており、この電子出願には電子的に提出された配列(SEQ ID)リストが含まれる。この配列リストの全内容を、全ての目的に関して、参照により本明細書に援用する。その配列リストは、2012年12月11日に作成された以下：604__53483__SEQ__LIST__2012-066.txtのような電子出願された.txtファイル上で同定され、大きさは3,171バイトである。

【背景技術】

【0004】

[0004] マイクロRNAは遺伝子発現を制御する19~24ヌクレオチド長の低分子非コードRNA(ncRNA)であり、ほとんどのタイプのがんにおいて異常に発現している。miRNAはがん患者の血中でも検出されており、循環性バイオマーカーの役目を果たすことができる。エキソソーム内の分泌されたmiRNAは細胞から細胞へと移動することができ、受け取った細胞中でそれらの標的メッセンジャーRNAへの標準的な(canonical)結合により遺伝子発現を制御することができる。

【0005】

[0005] マイクロRNA(miRNA)は遺伝子発現を制御し、タンパク質と直接相互作用する。Toll様受容体ファミリー(すなわちマウスTLR7、およびヒトTLR8)のメンバーは樹状細胞およびBリンパ球上でウイルスの一本鎖RNA(ssRNA)配列を認識して結合することができ、それは細胞の活性化およびサイトカイン産生をもたらす。TLRはそれを通して哺乳類の自然免疫系が侵入している病原体の存在を認識する受容体のファミリーである。マウスのTLR7およびヒトのTLR8は両方とも20ヌクレオチド(nt)長の一本鎖RNA(ssRNA)に結合してそれにより活性化され、それはこれらの2つの受容体に関する生理的リガンドであり、細胞内のエンドソーム中に位置している。

【0006】

[0006] 様々なタイプの細胞がエキソソーム(微小胞としても知られている)、マイクロパーティクル、エクソソーム(exosomes)、またはアルゴソーム(argosome)を産生し、細胞の周囲に放出する(shed)ことが知られている。エキソソームは歴史的に明らかな機能を有しない細胞の破片とみなされていた。しかし、増えつつある実験データがエキソソームは数多くの生物学的活性を有することを示唆してきた。例えば、血小板由来の微小胞は選択された細胞を膜表面タンパク質により刺激することが示された(例えば、Thromb. Haemost. (1999), 82:794、またはJ. Biol. Chem. (1999), 274:7545)。他の例では、血小板微小胞中の生理活性脂質の特定の標的細胞への特異的作用が報告された(例えば、J. Biol. Chem. (2001), 276:19672;またはCardiovasc. Res. (2001), 49(5):88)。さらに他の例では、血小板微小胞は可動化された(mobilized

）C D 3 4 + 内皮細胞の接着を特定の表面構成要素のその可動化された細胞への移動により増大させた(例えば、Blood (2001), 89:3143)。より最近、微小胞はRNAを含み、それはエキソソームが由来する細胞のRNAの内容を少なくとも部分的に反映することも示されてきた。

【0007】

[0007] この節において開示された背景技術が法的に先行技術を構成するという自認は存在しない。

【0008】

[0008] 本発明は、miRNAおよびがんが含まれるバイオテクノロジーおよび医学に関する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Thromb. Haemost. (1999), 82:794

【非特許文献2】J. Biol. Chem. (1999), 274:7545

【非特許文献3】J. Biol. Chem. (2001), 276: 19672

【非特許文献4】Cardiovasc. Res. (2001), 49(5):88

【非特許文献5】Blood (2001), 89:3143

【発明の概要】

【0010】

[0009] 第1の広い観点において、miRNAはがん細胞により周囲の腫瘍微小環境においてエキソソーム（微小胞としても知られている）内で分泌される。エキソソームに含有されるmiRNA、すなわちmiR-21およびmiR-29aは、がん細胞の周囲の免疫細胞により飲み込まれ、次いでその免疫細胞中に存在するToll様受容体8（TLR8）に結合することができる。結果として、TLR8が活性化され、その免疫細胞はインターロイキン-6（IL-6）および腫瘍壊死因子アルファ（TNF-α）を放出し、それは腫瘍増殖および転移能を増大させる。腫瘍が分泌したmiR-21およびmiR-29aは免疫細胞中のTLRの受容体にリガンドとして結合してTLRに媒介される転移促進性（prometastatic）炎症反応を誘発することにより機能することができ、それは腫瘍増殖および転移をもたらす。従って、TLRの傍分泌アゴニストとして作用することにより、分泌されたmiRNAは腫瘍微小環境の重要な制御因子である。このmiRNAの作用の機序は腫瘍-免疫系コミュニケーションに関わっていることが示されており、腫瘍の増殖および拡散において重要であり、従ってがん処置において重要である。

【0011】

[0010] 本発明の態様は、少なくとも1個のがん細胞においてmiR-21および／またはmiR-29aのレベルを減少させることならびに転移を阻害することを含む、少なくとも1個のがん細胞の転移を阻害するための方法を提供する。

【0012】

[0011] miR-21および／またはmiR-29aを遺伝子療法、小分子療法、または生物学的療法からなる群から選択される手段により減少させるそのような方法も提供する。

【0013】

[0012] miR-21および／またはmiR-29aを少なくとも1種類のエキソソーム阻害剤の投与により減少させるそのような方法も提供する。

【0014】

[0013] miR-21および／またはmiR-29aをアンチセンスmiR-21および／またはアンチセンスmiR-29aの投与により減少させるそのような方法も提供する。

【0015】

[0014] *miR-21* および／または *miR-29a* をロックド (locked) 核酸 *anti-miR-21* 阻害剤および／またはロックド核酸 *anti-miR-29a* 阻害剤の投与により減少させるそのような方法も提供する。

【0016】

[0015] 本発明の態様は、少なくとも1個のTLRを発現しているがん細胞において *miR-21* および／または *miR-29a* のレベルを減少させることならびにTLRに媒介される転移促進反応を阻害することを含む、少なくとも1個のがん細胞のTLRに媒介される転移促進反応を阻害するための方法を提供する。

【0017】

[0016] 発現されるTLRがTLR7またはTLR8であるそのような方法も提供する。

10

【0018】

[0017] 本発明の態様は、少なくとも1個のがん細胞において *miR-21* および／または *miR-29a* のレベルを減少させることならびに腫瘍増殖を阻害することを含む、少なくとも1個のがん細胞の腫瘍増殖を阻害するための方法を提供する。

【0019】

[0018] 本発明の態様は、*miR-21* および *miR-29a* を発現している少なくとも1個のがん細胞において *miR-21* および／または *miR-29a* のレベルを減少させること、ならびに *miR-21* および *miR-29a* の toll 様受容体の活性化作用 (agonism) を阻害することを含む、少なくとも1個の *miR-21* および *miR-29a* を発現しているがん細胞において *miR-21* および *miR-29a* の toll 様受容体の活性化作用を阻害するための方法を提供する。

20

【0020】

[0019] 本発明の態様は、少なくとも1個のがん細胞に近接した少なくとも1個の非がん性細胞において *miR-21* および／または *miR-29a* のレベルを減少させることを含む、少なくとも1個のがん細胞の転移を阻害するための方法を提供する。

【0021】

[0020] 本発明の態様は、少なくとも1種類の医薬的に許容できるキャリアーまたは賦形剤中に少なくとも1種類のロックド核酸 *anti-21* 阻害剤および少なくとも1種類のロックド核酸 *anti-29a* 阻害剤を含む物質の組成物を提供する。

30

【0022】

[0021] さらに追加の化学療法化合物を含むそのような組成物も提供する。

【0023】

[0022] 本明細書における組成物をがんを有する対象に投与することを含む、がんを有する対象においてがん転移を改善するための方法も提供する。

【0024】

[0023] 本発明の態様は、本明細書における組成物をがんを有する対象に投与することを含む、がんを有する対象において全生存時間を増大させるための方法を提供する。

【0025】

[0024] 本明細書における組成物をがんを有する対象に投与することを含む、がんを有する対象において腫瘍の多数性 (tumor multiplicities) を減少させるための方法も提供する。

40

【0026】

[0025] 本発明の態様は、以下の工程を含む、対象におけるがん転移の危険性を診断する方法を提供する：a.) 対照と比較した相対的な *miR-21* および *miR-29a* の発現量を同定し、そしてb.) その対象が対照と比較して増大した *miR-21* および *miR-29a* の発現を有する場合、その対象においてがん転移の高い危険性があると診断し、またはc.) その対象が対照と比較して増大した *miR-21* および *miR-29a* の発現を有しない場合、その対象においてがん転移の高い危険性がないと診断する。

【0027】

50

[0026] さらにその診断に基づいた処置計画を設計することを含むそのような方法も提供する。

【0028】

[0027] さらにその診断に基づいた処置を施すことを含むそのような方法も提供する。

【0029】

[0028] さらに少なくとも1種類のエキソソーム阻害剤を投与することを含むそのような方法も提供する。

【0030】

[0029] さらにがん転移が診断された場合に少なくとも1種類のアンチセンスmiR-21および／またはアンチセンスmiR-29aを投与することを含むそのような方法も提供する。

【0031】

[0030] さらにその診断に基づいて予後を決定することを含むそのような方法も提供する。

【0032】

[0031] 以下の工程を含むそのような方法も提供する：a.) その対象から得られた試験試料からmiR-21 RNAおよびmiR-29a RNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供し；b.) その標的オリゴデオキシヌクレオチドをmiR-21特異的およびmiR-29a特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせてその試験試料に関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し；そしてc.) 工程(b.) のプロファイルを対照と比較する。

【0033】

[0032] 工程(c.) がその試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルに対して比較することを含むそのような方法も提供する。

【0034】

[0033] 工程(c.) がその試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを試料と関係するデータベース、統計、またはmiRレベルの表に対して比較することを含むそのような方法も提供する。

【0035】

[0034] 少なくとも1種類の追加のmiRがそのマイクロアレイ中に含まれるそのような方法も提供する。

【0036】

[0035] 本発明の態様は、以下の工程を含む、対象において転移促進性炎症反応の危険性を診断する方法を提供する：a.) 対照と比較した相対的なmiR-21およびmiR-29aの発現を同定し、そしてb.) その対象が対照と比較して増大したmiR-21およびmiR-29aの発現を有する場合、その対象において転移促進性炎症反応の高い危険性があると診断し、またはc.) その対象が対照と比較して増大したmiR-21およびmiR-29aの発現を有しない場合、その対象において転移促進性炎症反応の高い危険性がないと診断する。

【0037】

[0036] さらにがん転移が診断された場合に少なくとも1種類のアンチセンスmiR-21および／またはアンチセンスmiR-29aを投与することを含むそのような方法も提供する。

【0038】

[0037] そのがんがルイス肺癌；扁平上皮癌；非小細胞肺癌；小細胞肺癌からなる群から選択される肺がんであるそのような方法も提供する。

【0039】

[0038] そのがんが肺胞性基底上皮腺癌；肺腺癌；結腸腺癌；子宮頸部腺癌、前立腺腺癌；乳腺癌；食道腺癌、膵臓腺癌；および胃腺癌からなる群から選択される腺癌であるそ

10

20

30

40

50

のような方法も提供する。

【0040】

[0039] この発明の態様の様々な目的および利点は、添付の図面を考慮して読んだ際に、以下の詳細な記述から当業者に明らかになるであろう。

【0041】

[0040] 本特許または出願ファイルは、カラーで作成された1個以上の図面および／または1個以上の写真を含有し得る。カラーの図面（単数または複数）および／または写真（単数または複数）を有するこの特許または特許出願公開のコピーは、要請して必要な料金を払えば米国特許商標庁により提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】[0041] 図1 肺がん細胞株およびHEK-293細胞に由来するエキソソーム中のmiRNAのレベル。（図1A）A-549の精製されたエキソソームから得られたNanoString miRNAプロファイルを表す散布図。赤線は50コードカウントの閾値を示す。（図1B）定量的リアルタイムPCRによるHEK-293の精製された小胞と比較したA-549およびSK-MESの精製されたエキソソームにおけるNanoStringの結果の検証。その実験は6連で実施され；結果は平均±SDとして示されている。* * $P < 0.0001$ 。

【図2-1】[0042] 図2 miR-21およびmiR-29aはエンドソーム中でマウスTLR7およびヒトTLR8と相互作用する。（図2A）cell trackerを用いて（青）、およびLysoTrackerエンドソームマーカー（赤）を用いて染色し、HEK-293が分泌したCD9-GFPエキソソーム（緑）と共培養したRAW 264.7細胞の共焦点画像。共局在は黄色で示される（重ね合わせた画像）。（図2B）エンドソームLysoTracker（青）、GFPタグを付けたTLR8（TLR8-GFP）（緑）、およびCy5-コンジュゲート成熟miRNA（miRNA-Cy5）（赤）を用いて同時形質移入したHEK-293細胞の共焦点画像。共局在は黄色で示される（重ね合わせた画像）。

【図2-2】（図2C）定量的リアルタイムPCRにより検出されたTLR8-HEK-293細胞におけるTLR8に関する免疫共沈物（それぞれIPTLR8/miR-16、IPTLR8/miR-21、およびIPTLR8/miR-29a）中のmiR-16、miR-21、およびmiR-29aのレベル。結果は平均±SDとして示されている。* * $P < 0.001$ 。（図2D）TLR8-GFP-HEK-293細胞に由来する免疫共沈物に対して実施されたTLR8-GFP複合体に関する抗GFP抗体を用いた免疫ブロット。

【図2-3】（図2E）マウスの腫瘍に対して実施されたmiR-29a（青）に関するLNA-ISH。（図2F）（上）マウスの腫瘍中のCD9（赤）およびmiR-29a（青）のISH。同時発現は黄色で示される（重ね合わせた画像）。（下の左）より低い倍率での重ね合わせた画像は、腫瘍の境界面におけるCD9およびmiR-29aの同時発現を示している。（下の右）対応する赤／緑／青の画像（miR-29aは青で、CD9は褐色で染色されている）。

【図3-1】[0043] 図3 miR-21、-29a、および-147はTLRの活性化を誘導する。（図3Aおよび図3B）WT（ $n=4$ ）およびTLR7^{-/-}（ $n=4$ ）マウスから単離し、図中のmiRNAのDotap配合物を用いて処理した腹腔マクロファージに対して実施したTNF- α （図3A）およびIL-6（図3B）に関するELISA。

【図3-2】（図3C）図中のmiRNAで処理したWTおよびTLR7^{-/-}マウスの脾臓細胞におけるCD69のフローサイトメトリー分析。

【図3-3】（図3D）Cにおいて図中の結果のグラフ表現。ポリ（I:C）をTLR3に媒介されるCD69の活性化に関する陽性対照として用いた。（図3E）Dotapのみで、または図中のmiRNAのDotap配合物で処理したTLR7-およびTLR8

10

20

30

40

50

—H E K—2 9 3細胞中のN F— κ B活性。T L R 7およびT L R 8に媒介されるN F— κ Bの活性化に関する陽性対照としてそれぞれG a r d i q u i m o dおよびs s R N A 4 0を用いた。(図3 F) T L R 8のドミナントネガティブ形態(T L R 8 D N)をコードするプラスミドまたはその空ベクター対応物(C M V)を用いて形質移入し、D o t a pのみで、または図中の成熟m i R N AのD o t a p配合物で処理したT L R 8—H E K—2 9 3細胞中のN F— κ Bの活性。

【図3—4】(図3 Gおよび図3 H)、2人の健康な提供者の血液から単離し、D o t a pのみで、または図中の成熟m i R N AのD o t a p配合物で処理したヒトP B M Cに対して実施したT N F— α (図3 G)およびI L—6 (図3 H)に関するE L I S A。s s R N A 4 0配列をT L R 8に媒介されるサイトカイン分泌に関する陽性対照として用いた。A～Hにおける結果は平均 $\pm$ S Dとして示されている。 $* P < 0.05$; $** P < 0.01$ 。

【図3—5】(図3 Iおよび図3 J)成熟m i R—2 7 bおよび—5 7 4—5 pのD o t a p配合物で24時間処理したヒトP B M Cに対して実施したT N F— α およびI L—6に関するE L I S A。D o t a pのみとの、およびm i R—1 6とのインキュベートを陰性対照として用いた。その実験は3連で実施された。結果は平均 $\pm$ S Dとして示されている。 $* P < 0.01$; $** P < 0.0001$ 。

【図4—1】[0044] 図4 m i R N Aに誘導されるT L R 7の活性化はマウスにおいて肺の多数性の形成を増大させる。(図4 Aおよび図4 B) W T (n=3)およびT L R 7— $\backslash$ — (n=3)マウスから単離し、R P M I (培地; 陰性対照)またはL L C細胞から精製したエキソソームと共に48時間インキュベートした腹腔マクロファージの条件培地に対して実施したT N F α (図4 A)およびI L—6 (図4 B)に関するE L I S A。図4 A～E、G、およびHにおける結果は、平均 $\pm$ S Dとして示されている。 $* P < 0.05$; $** P < 0.01$; $*** P \leq 0.005$ 。

【図4—2】(図4 Cおよび図4 D)図4 Aおよび図4 Bにおけるように処理したW TおよびT L R 7— $\backslash$ —マウスから単離した脾臓細胞におけるC D 6 9のフローサイトメトリ分析。図4 A～E、G、およびHにおける結果は、平均 $\pm$ S Dとして示されている。 $* P < 0.05$; $** P < 0.01$; $*** P \leq 0.005$ 。

【図4—3】(図4 E) L L C細胞の尾への注射後のW T (n=7)およびT L R 7— $\backslash$ — (n=7)マウスに関するカプラン・マイヤー曲線。(図4 F) W TおよびT L R 7— $\backslash$ —マウス群において肺において検出された異なる腫瘍多数性の代表的な画像。図4 A～E、G、およびHにおける結果は、平均 $\pm$ S Dとして示されている。 $* P < 0.05$; $** P < 0.01$; $*** P \leq 0.005$ 。

【図4—4】(図4 G) W TおよびT L R 7— $\backslash$ —マウス群における、L L C細胞の尾への注射後の腫瘍多数性。(図4 H) L N Aアンチスクランブル(s c r a m b l e d) (対照; n=6)、L N A a n t i—m i R—1 6 (n=6)、またはL N A a n t i—m i R—2 1/2 9 a (n=6)を用いて形質移入したL L C細胞を注射したB 6マウスにおける腫瘍多数性。図4 A～E、G、およびHにおける結果は、平均 $\pm$ S Dとして示されている。 $* P < 0.05$; $** P < 0.01$; $*** P \leq 0.005$ 。

【図4—5】(図4 I)形質移入したL L C細胞を注射したマウスにおける肺の代表的な画像を示す。

【図5】[0045] 図5 ヒトマクロファージにおけるm i R—2 9 aおよびI L—6の同時発現。ヒト肺がん試料に対して実施されたm i R—2 9 a (蛍光青として示されている、上の左のパネル)およびI L—6 (蛍光赤、上の右のパネル)に関するL N A—I S H (N u a n c eで変換した(N u a n c e c o n v e r t e d)画像)。重ね合わせた画像(下の左のパネル)はm i R—2 9 aおよびI L—6両方を同時発現しているマクロファージを蛍光黄色で示す。下の右のパネルは対応するR G B画像である:その重ね合わせた画像との比較は、腫瘍境界面におけるm i R—2 9 aを発現しているマクロファージのみがI L—6も同時発現していることを確認している(矢印参照)。逆に、m i R—2 9 aを発現していないマクロファージはI L—6も発現していない。

10

20

30

40

50

【図6-1】[0046] 図6 NF- κ BはmiR-21および29a依存性の（そしてTLRに媒介される）TNF- α の分泌に必要である。（図6A）miR-16、21および29aのDotap配合物と共にインキュベートした、または（陽性対照として）LPSで処理したRAW 264.7細胞におけるホスホp65に関する免疫プロット。ビンキュリンは標準として使用しており、タンパク質の添加が等量であることを示している。

（図6B）I κ B α のドミナントネガティブ形態（B細胞内カップ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子の阻害剤、アルファ、“I κ B α DN”として示す）、I κ κ 2のドミナントネガティブ形態（B細胞内カップ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーの阻害剤、キナーゼベータ、“I κ κ 2DN”として示す）をコードするプラスミドまたは対照としての対応する空ベクター（“EV”として示す）を用いて形質移入したRAW 264.7細胞の条件培地上で実施したTNF- α に関するELISAアッセイ。そのアッセイは、図中のmiRNAのDotap配合物で細胞を処理した48時間後に実施した。その実験は3連で実施され、データは平均±s.d.として示されている；*P<0.05。

【図6-2】（図6C）miR-21およびmiR-29aの配列中の構造的特徴の研究。TLR8-HEK-293細胞を図中の成熟miRNA（cfr.図14（図6B））のDotap配合物と共に24時間インキュベートし、QUANTIBLUEアッセイを実施した。Dotap単独を陰性対照として、ssRNA40をNF- κ B活性化に関する陽性対照として用いた。その実験は5連で実施され、平均±s.d.として示されている；**P<0.0001。

【図7-1】[0047] 図7 miRNA含有エキソソームを用いて実施された機能研究。（A）LLCおよびA-549細胞の上清中のエキソソームから抽出されたRNA中のmiR-16、21、27b、および29aに関する定量的リアルタイムPCR。その実験は3連で実施され、平均±s.d.として示されている；**P<0.0001。

【図7-2】（図7B、7C）WT（n=3）B6マウスから単離し、エキソソームを含有するLLC上清（条件培地）と共に、または超遠心分離によるエキソソームの除去後のLLC上清（超遠心分離した培地）と共にインキュベートした腹腔マクロファージの条件培地で実施したTNF- α （図7B）およびIL-6（図7C）に関するELISAアッセイ。

【図7-3】（図7D）WT（n=3）B6マウスから単離し、図7Bおよび図7Cにおけるように処理した脾臓細胞に対して実施したフローサイトメトリーにより検出されたCD69の活性化。データは平均±s.d.として示されている；**P<0.005。（E）LLCが放出したエキソソームで処理したTLR8-HEK-293細胞におけるNF- κ B活性化。TLR8-HEK-293細胞は前処理されず（“エキソソーム”群）、またはバフィロマイシンAで前処理された（“エキソソーム+Bafilomycin”群）。陽性対照として、TLR8-HEK-293細胞をTLR8活性化剤ssRNA40を含有する人工エキソソームで処理した（“ssRNA40”群）。その実験は9回実施され、平均±s.d.として示されている。*P<0.0005（“エキソソーム”対“エキソソーム+Bafilomycin”）。

【図7-4】（図7F）LLC細胞に、LNAアンチスクランブル（対照）、またはmiR-16に関するLNA anti-miRNA（LNA anti-miR-16）ならびにmiR-21および29aの両方に関するLNA anti-miRNA（LNA anti-miR-21/29a）を用いて形質移入した。48時間後に細胞を集め、LLC細胞およびそれらの上清から精製したエキソソームの両方からRNAを抽出した。3種類全てのmiRNAのレベルを、LLC細胞において（左のパネル、“LLC細胞”と表記）およびそれらの上清から精製したエキソソームにおいて（右のパネル、“LLCエキソソーム”と表記）の両方で定量的リアルタイムPCRにより検出した。その実験は3連で実施され、平均±s.d.として示されている；**P<0.001。（図7G）野生型LLC細胞を注射し、続いてジメチルスルホキシド（DMSO）を注射したB6マウス（n=5、群“LLC wt ctrl”）、野生型LLC細胞を注射し、続いてmiR

10

20

30

40

50

NAおよびエキソソーム放出阻害剤GW4869を注射したB6マウス ($n=5$ 、群“LLC wt-GW4869”)、または野生型LLC細胞を注射し、続いてGW4869の注射および2回のLLC由来エキソソームの尾静脈内レスキュー注射を行ったB6マウス ($n=5$ 、群“LLC wt-GW4869レスキュー”)における肺の多数性。データは平均±s.d.として示されている。 $*P<0.05$; $**P<0.005$ 。

【図8】[0048] 図8 miR-29aを発現するがん細胞のみが肺腫瘍多数性を形成することができる。LNA anti miR-21/29aを用いて形質移入したLLC細胞を注射したマウスにより発現された肺の多数性における、miR-29aに関する(左のパネル)、およびanti miR-29aに関する(右のパネル)インサイチュハイブリダイゼーション。青はプロブ染色であり、桃色は対比染色である。この画像はLNA anti miR-21/29aを注射したマウスからの全ての試験された多数性における所見の代表的なものである。

【図9-1】[0049] 図9 miR-16、21および29aのサイレンシングのLLC細胞の生物学への作用。(図9A) LNAアンチスクランブル(対照)、LNA anti miR-16またはLNA anti miR-21および29aの組み合わせ(LNA anti miR-21/29a)を用いた形質移入の24時間、48時間および72時間後に決定されたLLC細胞の増殖曲線。

【図9-2】(図9B) 図に記載の時点でのLLC形質移入細胞に対するMTSアッセイ。LLCの生存度をそのプレートを490nmにおいて読み取ることにより得られたOD値として表す。(図9C) 形質移入の48時間後に集め、細胞蛍光測定(cytofluorimetry)により実施したLLC細胞の細胞周期アッセイ。

【図9-3】(図9D) 形質移入されたLLCに対して実施された侵入性アッセイ。それぞれの処置に関する細胞侵入の百分率を対照(LNAアンチスクランブル)より正規化した。(図9E) 細胞を10%FBSを添加した培地の入ったトランスウェル中で6時間、または無血清培地の入ったトランスウェル中で24時間インキュベートすることにより評価した、形質移入されたLLC細胞の移動アッセイ。

【図9-4】(図9F) LNAアンチスクランブル(対照)、LNA anti miR-16(LNA anti miR-16)、またはLNA anti miR-21およびmiR-29a(LNA anti miR-21/29a)を用いて形質移入したLLC細胞を皮下注射した異種移植ヌードマウス ($n=9$) における腫瘍増殖。データは対照に関して正規化されている。その実験は別途明記しない限り3連で実施され、平均±s.d.として示されている; $**P<0.005$ 。

【図10】[0050] 図10 miRNAはがん細胞によりエキソソーム中に分泌され、周囲の免疫細胞のエンドソーム中の(マウスにおいて)TLR7または(ヒトにおいて)TLR8に到達して結合することができる。結果として、TLRが活性化され、その免疫細胞はサイトカイン類、例えばTNF- α およびIL-6を放出し、それはがんの増殖および播種を促進する。

【図11】[0051] 図11 CD9、CD63およびmiR-29aの分布。(図11A) A-549およびSK-MESの上清からの精製された画分は2種類の周知のエキソソームのマーカーであるCD9およびCD63タンパク質に富むことを示す、CD9およびCD63に関する免疫プロット。(図11B) miR-29aに関するインサイチュハイブリダイゼーションに関して処理されたマウスの腫瘍試料に対して実施された統計分析。がん細胞は、Nuanceシステムにより測定した際にそれらの青いシグナルが背景染色よりも少なくとも5倍大きい場合にmiR-29aに関して陽性であると考えられた。miR-29陽性がん細胞を試験した異なるスライドに関して多数の200倍視野において計数し、次いで平均±s.d.をInstatソフトウェアを用いることにより決定した。 $**P<0.005$ 。

【図12】[0052] 図12 ヒトの肺がんにおいてCD9は主に腫瘍境界面において生成される。(図12A) ヒト肺がん試料に対して実施されたエキソソームマーカーCD9に関するISH。矢印は腫瘍境界面におけるCD9に非常に富む細胞(赤で染色されている

10

20

30

40

50

）を示す。青で示されているのはヘマトキシリン対比染色である。（図12B）パネルAにおいて見られるようなヒト肺がん試料における腫瘍境界面のより高い倍率。CD9は主に、マクロファージに典型的な楕円形の／折り畳まれた核および豊富な（ample）細胞質の特徴を示す細胞中に位置している。

【図13-1】[0053] 図13 腫瘍境界面において、miR-29aはマクロファージマーカーであるF-11と、TLR7受容体と同時発現されているが、がん関連上皮マーカーであるサイトケラチンとは同時発現されていない。（図13A）miR-29aおよびマクロファージマーカーであるF-11は腫瘍境界面のレベルにおいてのみ同時発現されているが隣接する正常な肺においては同時発現されていないことを示す、マウスの腫瘍に対して実施されたLNA-ISH。Nuanceで変換された画像は、miR-29aを蛍光青として、F-11を蛍光緑として示しており、一方で蛍光黄色はそれらの同時発現を示している。（図13B）マウスの腫瘍をmiR-29a LNA-ISHおよびがん関連上皮マーカーであるサイトケラチンAE1／3に関して染色した。miR-29aに関して陽性の細胞（蛍光青）は腫瘍中でのみサイトケラチンと共局在しており（蛍光黄色）、腫瘍境界面ではサイトケラチンと共局在しておらず、そこにはmiR-29a陽性かつサイトケラチン陰性の細胞が存在する。

【図13-2】（図13C）マウスの腫瘍におけるmiR-29aおよびTLR7のLNA-ISH。Nuanceで変換された画像は、miR-29aを蛍光青として、TLR7を蛍光緑として示している。それらの同時発現は蛍光黄色シグナルにより示されている。

【図14】[0054] 図14 miRNA配列分析。（図14A）成熟miR-147（SEQ ID NO：3）および574-5p（SEQ ID NO：2）の配列とRNA33（SEQ ID NO：1）の配列の間の類似性を示すBLAST分析。RNA33はGUに富むオリゴヌクレオチドに対応し、それはヒトおよびマウスの免疫細胞においてそれぞれヒトTLR8およびマウスTLR7を介してサイトカイン類の分泌を誘導することが示されている。正確にマッチする塩基は赤で強調されている。（図14B）点変異の研究に関して考慮されたmiRNA配列（それぞれSEQ ID NO 4～12、登場順）のリスト。miR-21配列をG18およびU20において変異導入し（赤で示す）、一方でmiR-29aをU20およびU21において変異導入した：これらの塩基をmiR-16配列中の同じ位置を占める塩基で置換した。2個の考えられる点変異の組み合わせを有する配列も生成した。

【発明を実施するための形態】

【0043】

[0055] この開示全体を通して、様々な刊行物、特許および公開された特許明細書を、引用を同定することにより参照する。これらの刊行物、特許および公開された特許明細書の開示を、この発明が属する技術の現状をより完全に記述するために本開示の中に参照により援用する。

【0044】

[0056] 腫瘍が分泌するmiR-21およびmiR-29aは免疫細胞中でToll様受容体ファミリーの受容体であるマウスTLR7およびヒトTLR8にリガンドとして結合してTLRに媒介される転移促進性炎症反応を誘発することにより機能することもでき、それは最終的に腫瘍増殖および転移をもたらす得ることを本明細書において記述および出願する。従って、TLRの傍分泌アゴニストとして作用することにより、分泌されたmiRNAは腫瘍微小環境の重要な制御因子である。このmiRNAの作用の機序は腫瘍-免疫系コミュニケーションに関わっていることが示されており、腫瘍の増殖および拡散において重要であり、従ってがん処置のための新規の標的である。

【0045】

[0057] 腫瘍細胞により分泌されるエクソソーム（微小胞としても知られている）中のmiR-21および29aは、免疫細胞中でTLR8（およびTLR7）に結合してこれらの受容体を活性化することができ、それはTLRに媒介されるNF- κ Bの活性化およ

び転移促進性炎症性サイトカイン類の分泌をもたらすことが本明細書において示される。細胞外マトリックスプロテオグリカンであるベルシカンの腫瘍による分泌は骨髓細胞においてTLR2：TRL6複合体を活性化することにより炎症促進性反応を誘導することが以前に示されている。本明細書において、腫瘍が分泌するmiRNAは、免疫細胞においてTLR8応答を活性化することにより、腫瘍促進性（pro-tumoral）炎症プロセスにも関与することが示されている。結果として、腫瘍細胞はこの傍分泌ループが完全である場合、より多く転移する傾向がある。本発明者らのデータはmiRNA、エキソソーム中のmiRNA、およびエキソソームがTLR受容体ファミリーのアゴニストであることを証明し、腫瘍微小環境および関連する相互作用へのそれらの作用を示している。さらに、がん細胞によるエキソソーム分泌に影響を及ぼす薬物はその細胞の転移能を有意に低減し、この作用は腫瘍を有するマウスにその処理された細胞により分泌されたエキソソームを注射することによりレスキューされ得る。

10

【0046】

[0058] 本明細書において互換的に用いられる際、“miR遺伝子産物”、“マイクロRNA”、“miR”、または“miRNA”は、miR遺伝子からのプロセシングされていない、またはプロセシングされたRNA転写産物を指す。miR遺伝子産物はタンパク質に翻訳されないため、用語“miR遺伝子産物”にはタンパク質は含まれない。そのプロセシングされていないmiR遺伝子転写産物は“miR前駆体”とも呼ばれ、典型的には約70～100ヌクレオチド長のRNA転写産物を含む。そのmiR前駆体はRNAse（例えばDicer、Argonaut、RNAseIII（例えばE. coli RNAseIII））による消化によりプロセシングされて活性な19～25ヌクレオチドのRNA分子になり得る。この活性な19～25ヌクレオチドのRNA分子は“プロセシングされた”miR遺伝子転写産物または“成熟”miRNAとも呼ばれる。

20

【0047】

[0059] その活性な19～25ヌクレオチドのRNA分子は、miR前駆体から、天然のプロセシング経路を通して（例えば完全な細胞または細胞溶解物を用いて）、または合成的プロセシング経路により（例えば単離されたプロセシング酵素、例えば単離されたDicer、Argonaut、またはRNAseIIIを用いて）得ることができる。その活性な19～25ヌクレオチドのRNA分子はmiR前駆体からプロセシングされなければならないわけではなく、生物学的合成または化学合成により直接生成することもできることは理解されている。マイクロRNAが本明細書において名前により言及される場合、別途示さない限り、その名前はその前駆体および成熟形態両方に対応する。

30

【0048】

[0060] 本発明の主題の1観点において、複数の別個のRNA分子が含まれるエキソソームを生きた対象から得る、哺乳類の生物学的試料を分析するための方法を記述する。次いで、1種類又はそれより多くの別個のRNA分子に基づく結果をもたらすために、そのエキソソームを濃縮し（enriched）、識別する。そのRNA分析には単一のRNAの、少なくとも2種類の別個のRNAの、またはRNAプロファイル全体の分析が含まれ得る。次いでその結果をその対象の状態の診断（例えばがんまたは前がん期が含まれるがんの臨床病期）または予後／診断と関連付ける。

40

【0049】

[0061] 本明細書で用いられる際、“対象”はがんを有する、または有することが疑われるあらゆる哺乳類であることができる。好ましい態様において、その対象はがんを有する、または有することが疑われるヒトである。

【0050】

[0062] 少なくとも1種類のmiR遺伝子産物のレベルをその対象から得た生物学的試料の細胞において測定することができる。例えば、組織試料をがんを有することが疑われる対象から従来の生検技法により採取することができる。別の態様において、血液試料を対象から採取することができ、標準的な技法によるDNA抽出物のために白血球を分離することができる。その血液または組織試料は、好ましくは放射線療法、化学療法、または

50

他の療法処置の開始前に対象から得られる。対応する対照組織もしくは血液試料、または対照参照試料は、その対象の冒されていない組織から、正常なヒトの個体もしくは正常な個体の集団から、またはその対象の試料中の細胞の大部分に対応する培養細胞から得ることができる。次いでその対照の組織または血液試料を、その対象の試料からの細胞中の所与のm i R遺伝子から生成されたm i R遺伝子産物のレベルをその対照試料の細胞からの対応するm i R遺伝子産物のレベルに対して比較することができるように、その対象からの試料と一緒に処理する。あるいは、参照試料をその試験試料とは別に（例えば異なる時点において）得て処理することができ、その試験試料からの細胞中の所与のm i R遺伝子から生成されたm i R遺伝子産物のレベルをその参照試料からの対応するm i R遺伝子産物のレベルと比較することができる。

10

【0051】

[0063] 対照および正常な試料中の相対的なm i R遺伝子発現は、1種類又はそれより多くのRNA発現標準に関して決定することができる。その標準は、例えばゼロm i R遺伝子発現レベル、標準的な細胞株におけるそのm i R遺伝子の発現レベル、その対象の冒されていない組織におけるそのm i R遺伝子の発現レベル、または以前に正常なヒトの対照の集団に関して得られたm i R遺伝子発現の平均レベルを含み得る。例えば、その対照は多くの患者の試料からの腫瘍試料中の平均m i R発現レベル、または転移が疑われる対象からの原発腫瘍試料のm i R発現、または同じタイプの原発がんを有する別の対象からの原発腫瘍試料を有するデータベースであってよい。従って“対照”は腫瘍の細胞型、例えば原発性対転移性、または正常対がん性の間の比較を反映し得る。その対照は既知の疾患状態であってよい。その対照比較は、別の時点、例えば：前の健康な組織試料、診断前の試料、診断後の試料、処置前の試料、寛解の間の試料、および／または異なるがんの病期における試料に関してなされてよい。

20

【0052】

[0064] 試料中のm i R遺伝子産物のレベルは、生物学的試料中のRNA発現レベルを検出するのに適したあらゆる技法を用いて測定することができる。生物学的試料（例えば細胞、組織）中のRNA発現レベルを決定するための適切な技法（例えばノーザンブロット分析、RT-PCR、インサイチュハイブリダイゼーション）は、当業者には周知である。特定の態様において、少なくとも1種類のm i R遺伝子産物のレベルはノーザンブロット分析を用いて検出される。例えば、細胞の総RNAを細胞から核酸抽出緩衝液の存在下でのホモジナイゼーション、続いて遠心分離により精製することができる。核酸が沈殿し、DNAをDNアーゼによる処理および沈殿により除去する。次いでそのRNA分子を標準的な技法に従うアガロースゲル上でのゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロースフィルターに転写する。次いでそのRNAを加熱によりそのフィルター上に固定する。特定のRNAの検出および定量化は、問題のRNAに相補的な適切に標識されたDNAまたはRNAプローブを用いて成し遂げられる。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al.（編者）、第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第7章を参照、その全開示を参照により援用する。

30

【0053】

[0065] 所与のm i R遺伝子産物のノーザンブロットハイブリダイゼーションのための適切なプローブ（例えばDNAプローブ、RNAプローブ）は本明細書において提供される核酸配列から生成することができ、それには対象のm i R遺伝子産物に対する少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の相補性を有するプローブ、ならびに対象のm i R遺伝子産物に対する完全な相補性を有するプローブが含まれるが、それらに限定されない。標識されたDNAおよびRNAプローブの調製のための方法ならびにその標的ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションに関する条件は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al.（編者）、第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第10章および第11章において記述されており、その開示を参照により本明細書に援用する。

40

【0054】

50

[0066] 例えば、その核酸プローブは、例えば放射性核種、例えば ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 、または ^{35}S ；重金属；標識されたりリガンドに特異的な結合対のメンバーとして機能することができるリガンド（例えばビオチン、アビジン、または抗体）；蛍光分子；化学発光分子；酵素等を用いて標識することができる。

【0055】

[0067] プローブは、Rigby et al. (1977), J. Mol. Biol. 113:237-251のニックトランスレーション法またはFienberg et al. (1983), Anal. Biochem. 132:6-13のランダムプライミング法のどちらかにより高い特異的活性まで標識することができ、その全開示を参照により本明細書に援用する。後者は、一本鎖DNAから、またはRNA鋳型から高い特異的活性の ^{32}P 標識されたプローブを合成するための一般的に好まれる方法である。例えば、ニックトランスレーション法に従って既存のヌクレオチドを高度に放射性のヌクレオチドを用いて置き換えることにより、 10^8 cpm/マイクログラムを十分に超える特異的活性を有する ^{32}P 標識された核酸プローブを調製することが可能である。

【0056】

[0068] 次いでハイブリダイズさせたフィルターを写真フィルムに曝露することにより、ハイブリダイゼーションのオートラジオグラフィによる検出を実施することができる。ハイブリダイズさせたフィルターに曝露した写真フィルムのデンシトメトリー走査は、miR遺伝子転写産物のレベルの正確な測定を提供する。別のアプローチを用いて、miR遺伝子転写産物のレベルをコンピューター化された画像化システム、例えばAmersham Biosciences（ニュージャージー州ピスカタウェイ）から入手可能なMolecular Dynamics 400-B 2D Phosphor imagerにより定量化することができる。

【0057】

[0069] DNAまたはRNAプローブの放射性核種標識が現実的でない場合、ランダムプライマー法を用いて類似体、例えばdTTP類似体5-（N-（N-ビオチニル-イプシロン-アミノカプロイル）-3-アミノアシル）デオキシウリジン三リン酸をプローブ分子中に組み込むことができる。そのビオチン化されたプローブオリゴヌクレオチドは、蛍光色素または呈色反応を生ずる酵素に連結されたビオチン結合タンパク質、例えばアビジン、ストレプトアビジンおよび抗体（例えば抗ビオチン抗体）との反応により検出することができる。

【0058】

[0070] ノーザンおよび他のRNAハイブリダイゼーション技法に加えて、RNA転写産物のレベルを決定することはインサイチュハイブリダイゼーションの技法を用いて成し遂げることができる。この技法はノーザンブロッティング技法よりも少ない細胞しか必要とせず、細胞全体を顕微鏡カバーガラス上に置き、その細胞の核酸内容物を放射性または他の方法で標識された核酸（例えばcDNAまたはRNA）プローブを含有する溶液で調べることを含む。この技法は、対象からの組織生検試料を分析するのに特に適している。インサイチュハイブリダイゼーション技法の実施は米国特許第5,427,916号においてより詳細に記述されており、その全開示を参照により本明細書に援用する。所与のmiR遺伝子産物のインサイチュハイブリダイゼーションのための適切なプローブは、本明細書において提供されている核酸配列から生成することができ、それには、上記で記述されたような対象のmiR遺伝子産物に対する少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の相補性を有するプローブ、ならびに対象のmiR遺伝子産物に対する完全な相補性を有するプローブが含まれるが、それらに限定されない。

【0059】

[0071] 細胞中のmiR遺伝子転写産物の相対的な数は、miR遺伝子転写産物の逆転写、続いてポリメラーゼ連鎖反応による逆転写された転写産物の増幅（RT-PCR）により決定することもできる。miR遺伝子転写産物のレベルは、内部標準、例えば同じ試料中に存在する“ハウスキーピング”遺伝子からのmRNAのレベルと比較して定量化す

ることができる。内部標準としての使用のための適切な“ハウスキーピング”遺伝子には、例えばミオシンまたはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（G3PDH）が含まれる。定量的および半定量的RT-PCRならびにその変形を実施するための方法は、当業者には周知である。

【0060】

[0072] 一部の場合において、試料中の複数の異なるmiR遺伝子産物の発現レベルを同時に決定することが望ましい可能性がある。他の場合では、がんに関連している全ての既知のmiR遺伝子の転写産物の発現レベルを決定することが望ましい可能性がある。数百のmiR遺伝子または遺伝子産物のがん特異的発現レベルを評価することは時間がかかり、大量の総RNA（例えばそれぞれのノーザンブロットに関して少なくとも20μg）および放射性同位体を必要とするオートラジオグラフィーの技法を必要とする。

10

【0061】

[0073] これらの限界を克服するため、miR遺伝子のセットに特異的であるオリゴヌクレオチド（例えばオリゴデオキシヌクレオチド）プローブのセットを含有するマイクロチップ形式（すなわちマイクロアレイ）のオリゴライブラリーを構築することができる。そのようなマイクロアレイを用いることで、生物学的試料中の多数のマイクロRNAの発現レベルを、RNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを生成し、それらをそのマイクロアレイ上のオリゴヌクレオチドを調べるためにハイブリダイズさせてハイブリダイゼーションプロファイルまたは発現プロファイルを生成することにより決定することができる。次いでその試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料のハイブリダイゼーションプロファイルと比較して、どのマイクロRNAががん転移および/または再発細胞において変化した発現レベルを有するかを決定することができる。本明細書で用いられる際、“プローブオリゴヌクレオチド”または“プローブデオキシオリゴヌクレオチド”は、標的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを指す。“標的オリゴヌクレオチド”または“標的デオキシオリゴヌクレオチド”は、（例えばハイブリダイゼーションにより）検出されるべき分子を指す。“miR特異的プローブオリゴヌクレオチド”または“miRに特異的なプローブオリゴヌクレオチド”は、特異的なmiR遺伝子産物に、または特異的なmiR遺伝子産物の逆転写産物にハイブリダイズするように選択された配列を有するプローブオリゴヌクレオチドを意味する。

20

30

【0062】

[0074] 特定の試料の“発現プロファイル”または“ハイブリダイゼーションプロファイル”は、本質的にその試料の状態のフィンガープリントであり；2つの状態が類似して発現されたあらゆる特定の遺伝子を有し得るが、いくつかの遺伝子の評価はその細胞の状態に特有である遺伝子発現プロファイルの生成を同時に可能にする。すなわち、正常な組織をがん細胞から識別することができ、がん細胞の複数のタイプ内で異なる予後の状態（例えば良好な、または乏しい長期生存の見込み）を決定することができる。異なる状態にある細胞の発現プロファイルを比較することにより、これらの状態のそれぞれにおいてどの遺伝子が重要であるかに関する情報（遺伝子の上方および下方制御両方が含まれる）が得られる。がん細胞または正常細胞において差次的に発現している配列、ならびに結果として異なる予後転帰をもたらす差次的発現の同定は、いくつかの方法でのこの情報の使用を可能にする。例えば、特定の処置計画を（例えば化学療法薬が特定の患者において長期予後を向上させるように作用するかどうかを決定するために）評価することができる。同様に、患者の試料を既知の発現プロファイルと比較することにより、診断を行う、または確証することができる。さらに、これらの遺伝子発現プロファイル（または個々の遺伝子）は、miRもしくは疾患発現プロファイルを抑制する、または乏しい予後のプロファイルをよりよい予後のプロファイルに変換する薬物候補のスクリーニングを可能にする。

40

【0063】

[0075] マイクロアレイは、既知のmiRNA配列から生成された遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブから調製することができる。そのアレイは、それぞれのmiRNA

50

に関する2種類の異なるオリゴヌクレオチドプローブ（一方は活性な成熟した配列を含有し、他方はそのmiRNAの前駆体に特異的である）を含有することができる。そのアレイは、対照、例えばヒトのオルソログと数塩基のみ異なる1種類以上のマウスの配列も含有してよく、それはハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの条件に関する対照の役目を果たすことができる。両方の種からのtRNAおよび他のRNA（例えばrRNA、mRNA）をマイクロチップ上にプリントし、特定のハイブリダイゼーションに関する内部の（比較的安定な）陽性対照を提供することもできる。非特異的ハイブリダイゼーションに関する1種類以上の適切な対照がそのマイクロチップ上に含まれていてもよい。この目的に関して、配列はあらゆる既知のmiRNAと一切相同性がないことに基づいて選択される。

10

【0064】

[0076] そのマイクロアレイは当技術で既知の技法を用いて製作することができる。例えば、適切な長さ、例えば40ヌクレオチドのプローブオリゴヌクレオチドをC6位において5'-アミン改変し、商業的に入手可能なマイクロアレイシステム、例えばGene Machine OmniGrid（商標）100マイクロアレイヤーおよびAmersham CodeLink（商標）活性化スライドを用いてプリントする。その標的RNAに対応する標識されたcDNAオリゴマーを、その標的RNAを標識されたプライマーを用いて逆転写することにより調製する。最初の鎖の合成の後、そのRNA/DNAハイブリッドを変性させてRNA鋳型を分解する。こうして調製された標識された標的cDNAを、次いでそのマイクロアレイチップにハイブリダイズする条件（例えば25℃において6×SSPE/30%ホルムアミド中で18時間）下でハイブリダイズさせ、続いて0.75×TNTで37℃において40分間洗浄する。その固定されたプローブDNAが試料中の相補的な標的cDNAを認識するアレイ上の位置において、ハイブリダイゼーションが起こる。その標識された標的cDNAは結合が起こるアレイ上の正確な位置を示し、自動的な検出および定量化を可能にする。その出力は、患者試料中の特異的なcDNA配列の相対的存在量、従って対応する相補的miRの相対的存在量を示すハイブリダイゼーション事象のリストからなる。一態様によれば、その標識されたcDNAオリゴマーはビオチン標識されたプライマーから調製されたビオチン標識されたcDNAである。次いでそのマイクロアレイを、例えばストレプトアビジン-Alexa647コンジュゲートを用いるビオチン含有転写産物の直接検出により処理し、一般に用いられる走査法を利用して走査する。そのアレイ上のそれぞれのスポットの画像強度は、その患者試料中の対応するmiRの存在量に比例している。

20

30

【0065】

[0077] そのアレイの使用は、miRNA発現の検出に関するいくつかの利点を有する。第1に、数百種類の遺伝子の全体的な発現を同じ試料中で1つの時点において同定することができる。第2に、オリゴヌクレオチドプローブの注意深い設計により、成熟した分子および前駆体分子の両方の発現を同定することができる。第3に、ノーザンブロット分析と比較して、そのチップは少量のRNAしか必要とせず、2.5μgの総RNAを用いて再現性のある結果を提供する。その比較的限られた数のmiRNA（種あたり数百）は、それぞれに関して異なるオリゴヌクレオチドプローブを有する、いくつかの種に関する共通のマイクロアレイの構築を可能にする。そのような道具は、様々な条件下でのそれぞれの既知のmiRに関する種を越えた発現の分析を可能にするであろう。

40

【0066】

[0078] 特定のmiRの定量的発現レベルアッセイのための使用に加えて、miRNomeの実質的な部分、好ましくはmiRNome全体に対応するmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含有するマイクロチップを用いて、miR発現パターンの分析のためにmiR遺伝子発現プロファイリングを実施することができる。異なるmiRシグネチャーを、確立された疾患マーカーと、または直接疾患状態と関連付けることができる。

【0067】

[0079] 本明細書に記述される発現プロファイリング法に従って、がんのプロファイル

50

(たとえば転移または再発)を有することが疑われる対象からの試料からの総RNAを定量的に逆転写して、その試料中のRNAに相補的な標識された標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供する。次いでその標的オリゴデオキシヌクレオチドをmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせてその試料に関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供する。その結果は、その試料中のmiRNAの発現パターンを表すその試料に関するハイブリダイゼーションプロファイルである。そのハイブリダイゼーションプロファイルは、その試料からの標的オリゴデオキシヌクレオチドのそのマイクロアレイ中のmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドへの結合からのシグナルを含む。そのプロファイルは、結合の存在または非存在(シグナル対ゼロシグナル)として記録することができる。より好ましくは、その記録されたプロファイルには、それぞれのハイブリダイゼーションからのシグナルの強度が含まれる。そのプロファイルを正常な、例えば非がん性の対照試料から生成されたハイブリダイゼーションプロファイルに対して比較する。そのシグナルは、その対象におけるがんのプロファイルの存在またはそれを発現する傾向を示している。

10

【0068】

[0080] miRNA遺伝子発現を測定するための他の技法も当技術分野における技術の範囲内であり、それにはRNAの転写および分解の速度を測定するための様々な技法が含まれる。

【0069】

[0081] 本発明の態様は予後を決定する方法も提供する。悪い予後の例には低い生存率および急速な疾患進行が含まれるが、それらに限定されない。

20

【0070】

[0082] 特定の態様において、その少なくとも1種類のmiRNA遺伝子産物のレベルは、その対象から得られた試験試料からのRNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供し、その標的オリゴデオキシヌクレオチドをmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせてその試験試料に関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し、そしてその試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料から生成されたハイブリダイゼーションプロファイルに対して比較することにより測定される。

【0071】

[0083] 従って、本発明の態様は対象においてがんを処置する方法を含む。その方法は、有効量の少なくとも1種類の単離されたアンチセンスmiRNA遺伝子産物または単離されたその変異体もしくは生物学的に活性な断片を、その対象における転移、再発またはがん細胞の増殖が阻害されるように投与することを含む。その対象に投与される単離されたアンチセンスmiRNA遺伝子産物は内因性の野生型miRNA遺伝子産物と同一の配列(identical)に相補的であることができ、またはそれはその変異体もしくは生物学的に活性な断片に相補的であることができる。

30

【0072】

[0084] 本明細書で定義される際、miRNA遺伝子産物の“変異体”は、対応する野生型miRNA遺伝子産物に対して100%未満の同一性を有し、その対応する野生型miRNA遺伝子産物の1種類以上の生物学的活性を有するmiRNAを指す。そのような生物学的活性の例には、転移または再発と関係する細胞プロセス(例えば細胞分化、細胞増殖、細胞死)の阻害が含まれるが、それらに限定されない。これらの変異体には、種変異体(species variants)およびmiRNA遺伝子中の1個以上の変異(例えば置換、欠失、挿入)の結果である変異体が含まれる。特定の態様において、その変異体は対応する野生型miRNA遺伝子産物に対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一である。

40

【0073】

[0085] 本明細書で定義される際、miRNA遺伝子産物の“生物学的に活性な断片”は、対応する野生型miRNA遺伝子産物の1種類以上の生物学的活性を有するmiRNA遺伝子産物

50

のRNA断片を指す。上記で記述したように、そのような生物学的活性の例には、がんの転移または再発と関係する細胞プロセスの阻害が含まれるが、それらに限定されない。特定の態様において、その生物学的に活性な断片は少なくとも約5、7、10、12、15、または17ヌクレオチド長である。特定の態様において、単離されたmiR遺伝子産物は1種類以上の追加の抗がん処置との組み合わせで対象に投与することができる。適切な抗がん処置には、化学療法、放射線療法およびその組み合わせ（例えば化学放射線療法）が含まれるが、それらに限定されない。

【0074】

【0086】 用語“処置する”、“処置すること”および“処置”は、本明細書で用いられる際、疾患または病気、例えば肺がんの転移および／または再発と関係する症状を改善することを指し、それにはその疾患症状の開始を予防する、もしくは遅らせる、および／またはその疾患もしくは病気の症状の重症度もしくは頻度を減らすことが含まれる。用語“対象”および“個体”は、本明細書において、動物、例えば、霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウスまたは他のウシの、ヒツジの、ウマの、イヌの、ネコの、齧歯類の、もしくはマウスの種が含まれるがそれらに限定されない哺乳類を含むように定義されている。好ましい態様において、その動物はヒトである。

【0075】

【0087】 時々アクセス不能 (inaccessible) RNAと呼ばれるロックド核酸 (LNA) は、改変されたRNAヌクレオチド／オリゴヌクレオチドである。LNAヌクレオチドのリボース部分は、2' 酸素および4' 炭素を結合させる余分な架橋で修飾されている。その架橋はそのリボースを3' -エンド型の立体配座で“ロックする”。LNAヌクレオチドは所望であればオリゴヌクレオチド中でDNAまたはRNA残基と混合することができる。そのようなオリゴマーは化学的に合成され、商業的に入手可能である。

【0076】

【0088】 本明細書で用いられる際、単離されたmiR遺伝子産物の“有効量”は、がんの転移および／または再発を患う対象中のがん細胞の増殖を阻害するために十分な量である。当業者は、所与の対象に投与すべきmiR遺伝子産物の有効量を、その対象の大きさおよび体重；疾患浸透 (disease penetration) の程度；その対象の年齢、健康状態および性別；投与の経路；ならびにその投与が局所性か全身性かのよう

【0077】

【0089】 例えば、単離されたmiR遺伝子産物の有効量は、処置されるべき腫瘍塊のおおよその重量に基づくことができる。その腫瘍塊のおおよその重量は、その塊のおおよその体積を計算することにより決定することができ、ここで1立方センチメートルの体積はおおよそ1グラムに相当する。腫瘍塊の重量に基づく単離されたmiR遺伝子産物の有効量は、約10～500マイクログラム／腫瘍塊1グラムの範囲であることができる。特定の態様において、その腫瘍塊は、少なくとも約10マイクログラム／腫瘍塊1グラム、少なくとも約60マイクログラム／腫瘍塊1グラム、または少なくとも約100マイクログラム／腫瘍塊1グラムであることができる。

【0078】

【0090】 単離されたmiR遺伝子産物の有効量は、処置されるべき対象のおおよその、または推定される体重に基づくこともできる。好ましくは、そのような有効量は、本明細書で記述されるように、非経口で、または経腸的に投与される。例えば、対象に投与される単離されたmiR遺伝子産物の有効量は、約5から3000マイクログラム／kg体重まで、約700から1000マイクログラム／kg体重までの範囲、または約1000マイクログラム／kg体重より多い量であることができる。

【0079】

【0091】 当業者は、単離されたmiR遺伝子産物の所与の対象への投与のための適切な投与計画もすぐに決定することができる。例えば、miR遺伝子産物は対象に一度に（例

えば単回注射または沈着 (d e p o s i t i o n) として) 投与することができる。あるいは、m i R 遺伝子産物は対象に約 3 日間から約 28 日間まで、より詳細には約 7 日間から約 10 日間までの期間の間、1 日 1 回または 2 回投与することができる。特定の投与計画において、m i R 遺伝子産物は 1 日 1 回 7 日間投与される。投与計画が多数回投与を含む場合、その対象に投与される m i R 遺伝子産物の有効量は、その投与計画全体にわたって投与される遺伝子産物の総量を含むことができる。

【0080】

[0092] 本明細書で用いられる際、“単離された” m i R 遺伝子産物は、合成された、またはヒトの介入により天然の状態から変化した、もしくは取り出された m i R 遺伝子産物である。例えば、合成 m i R 遺伝子産物、またはその天然の状態と一緒に存在する物質から部分的に、もしくは完全に分離された m i R 遺伝子産物は、“単離されている”と考えられる。単離された m i R 遺伝子産物は実質的に精製された形態で存在することができる、またはその中にその m i R 遺伝子産物が送達された細胞中に存在することができる。従って、細胞に意図的に送達された、またはその中で発現された m i R 遺伝子産物は、“単離された” m i R 遺伝子産物と考えられる。細胞内部で m i R 前駆体分子から生成された m i R 遺伝子産物も、“単離された”分子であると考えられる。本発明の態様によれば、本明細書で記述される単離された m i R 遺伝子産物は、対象（例えばヒト）におけるがんの転移および／または再発を処置するための医薬品の製造のために用いることができる。本明細書で用いられる際、m i R 遺伝子産物には同定された m i R の a n t i - m i R またはアンチセンスの部分的または完全な相補物が広く含まれてよい。

【0081】

[0093] 単離された m i R 遺伝子産物は、いくつかの標準的な技法を用いて得ることができる。例えば、その m i R 遺伝子産物は当技術で既知の方法を用いて化学合成することができ、または組み替えで生成することができる。一態様において、m i R 遺伝子産物は適切に保護されたりボスクレオシドホスホラミダイトおよび一般に用いられる DNA/RNA 合成装置を用いて化学合成される。合成 RNA 分子または合成試薬の商業的な供給業者には、例えば P r o l i g o (ドイツ、ハンブルク)、D h a r m a c o n R e s e a r c h (米国コロラド州ラファイエット)、P i e r c e C h e m i c a l (P e r b i o S c i e n c e の一部、米国イリノイ州ロックフォード)、G l e n R e s e a r c h (米国バージニア州スターリング)、C h e m G e n e s (米国マサチューセッツ州アッシュランド) および C r u a c h e m (英国グラスゴー) が含まれる。

【0082】

[0094] あるいは、その m i R 遺伝子産物はあらゆる適切なプロモーターを用いて組み替え環状または線状 DNA プラスミドから発現させることができる。RNA をプラスミドから発現させるための適切なプロモーターには、例えば U 6 もしくは H 1 RNA p o l I I I プロモーター配列、またはサイトメガロウイルスプロモーターが含まれる。他の適切なプロモーターの選択は、当技術の範囲内である。本発明の態様の組み換えプラスミドは、がん細胞におけるその m i R 遺伝子産物の発現のための誘導可能または制御可能なプロモーターを含むこともできる。

【0083】

[0095] 組み換えプラスミドから発現された m i R 遺伝子産物を、標準的な技法により培養細胞発現系から単離することができる。組み換えプラスミドから発現された m i R 遺伝子産物をがん細胞に送達することもでき、がん細胞中で直接発現させることもできる。m i R 遺伝子産物をがん細胞に送達するための組み換えプラスミドの使用は、下記でより詳細に論じられる。

【0084】

[0096] その m i R 遺伝子産物は別の組み換えプラスミドから発現させることができ、またはそれらは同じ組み換えプラスミドから発現させることができる。一態様において、その m i R 遺伝子産物は単一のプラスミドから RNA 前駆体分子として発現され、その前駆体分子ががん細胞内に現存するプロセッシング系が含まれるがそれらに限定されない適切

なプロセッシング系によりプロセッシングされて機能するmiR遺伝子産物になる。他の適切なプロセッシング系には、例えばインビトロドロソフィラ (*Drosophila*) 細胞溶解物系 (例えばTuschlらへの米国公開特許出願第2002/0086356号において記述されているような系、その全開示を参照により本明細書に援用する) および大腸菌RNase III系 (例えばYangらへの米国公開特許出願第2004/0014113号において記述されているような系、その全開示を参照により本明細書に援用する) が含まれる。

【0085】

[0097] miR遺伝子産物を発現させるのに適したプラスミドの選択、核酸配列をそのプラスミド中に挿入してその遺伝子産物を発現させるための方法、およびその組み換えプラスミドを対象の細胞に送達する方法は、当技術分野における技術の範囲内である。例えば、Zeng et al. (2002), Molecular Cell 9:1327-1333; Tuschl (2002), Nat. Biotechnol, 20:446-448; Brummelkamp et al. (2002), Science 296:550-553; Miyagishi et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:497-500; Paddison et al. (2002), Genes Dev. 16:948-958; Lee et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:500-505; およびPaul et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:505-508を参照、その全開示を参照により本明細書に援用する。

【0086】

[0098] 一態様において、miR遺伝子産物を発現するプラスミドは、CMV中初期 (intermediate-early) プロモーターの制御下のmiR前駆体RNAをコードする配列を含む。本明細書で用いられる際、プロモーターの“制御下”は、miR遺伝子産物をコードする核酸配列がそのプロモーターの3'に、そのプロモーターがそのmiR遺伝子産物をコードする配列の転写を開始することができるように位置していることを意味する。

【0087】

[0099] そのmiR遺伝子産物は、組み換えウイルスベクターから発現させることもできる。そのmiR遺伝子産物は、2個の別個の組み換えウイルスベクターから、または同じウイルスベクターから発現させることができることが意図されている。その組み換えウイルスベクターから発現されたRNAは、標準的な技法により培養細胞発現系から単離することもでき、またはがん細胞中で直接発現させることもできる。miR遺伝子産物をがん細胞に送達するための組み換えウイルスベクターの使用は、下記でより詳細に論じられる。

【0088】

[00100] 本発明の態様の組み換えウイルスベクターは、そのmiR遺伝子産物をコードする配列およびそのRNA配列を発現するためのあらゆる適切なプロモーターを含む。適切なプロモーターには、U6もしくはH1 RNA pol IIIプロモーター配列、またはサイトメガロウイルスプロモーターが含まれるが、それらに限定されない。他の適切なプロモーターの選択は、当技術分野における技術の範囲内である。本発明の態様の組み換えウイルスベクターは、そのmiR遺伝子産物のがん細胞中での発現のための誘導可能または制御可能なプロモーターを含むこともできる。

【0089】

[00101] miR遺伝子産物に関するコード配列を受け入れることができるあらゆるウイルスベクターを用いることができる; 例えば、アデノウイルス (AV); アデノ関連ウイルス (AAV); レトロウイルス (例えば、レンチウイルス類 (LV)、ラブドウイルス類、マウス白血病ウイルス); ヘルペスウイルス等に由来するベクター。そのウイルスベクターの指向性を、他のウイルスからのエンベロープタンパク質もしくは他の表面抗原を用いてそのベクターを偽型化することにより、または異なるウイルスカプシドタンパク質を代わりに用いることにより、適宜改変することができる。

【0090】

[00102] 例えば、本発明の態様のレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、狂犬病ウイルス、エボラウイルス、モコラウイルス等からの表面タンパク質

10

20

30

40

50

を用いて偽型化することができる。本発明の態様のAAVベクターは、異なるカプシドタンパク質血清型を発現するようにそのベクターを操作することにより、異なる細胞を標的とするようにすることができる。例えば、血清型2ゲノム上の血清型2カプシドを発現するAAVベクターは、AAV2/2と呼ばれる。AAV2/2ベクター中のこの血清型2カプシド遺伝子を血清型5カプシド遺伝子により置き換えてAAV2/5ベクターを生成することができる。異なるカプシドタンパク質血清型を発現するAAVベクターを構築するための技法は、当技術分野における技術の範囲内であり；例えばRabinowitz, J.E., et al. (2002), J. Virol. 76:791-801を参照、その全開示を参照により本明細書に援用する。

【0091】

10

[00103] 本発明の態様における使用に適した組み換えウイルスベクターの選択、RNAを発現するための核酸配列をそのベクター中に挿入するための方法、そのウイルスベクターを対象の細胞に送達する方法、および発現したRNA産物の回収は、当技術分野における技術の範囲内である。例えばDornburg (1995), Gene Therap. 2:301-310; Eglitis (1988), Biotechniques 6:608-614; Miller (1990), Hum. Gene Therap. 1:5-14;およびAnderson (1998), Nature 392:25-30を参照、その全開示を参照により本明細書に援用する。

【0092】

[00104] 特に適切なウイルスベクターは、AVおよびAAV由来のウイルスベクターである。miR遺伝子産物を発現させるための適切なAVベクター、その組み換えAVベクターを構築するための方法、およびそのベクターを標的細胞中に送達するための方法はXia et al. (2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010において記述されており、その全開示を参照により本明細書に援用する。miR遺伝子産物を発現させるための適切なAAVベクター、その組み換えAAVベクターを構築するための方法、およびそのベクターを標的細胞中に送達するための方法はSamulski et al. (1987), J. Virol. 61:3096-3101; Fisher et al. (1996), J. Virol., 70:520-532; Samulski et al. (1989), J. Virol. 63:3822-3826; 米国特許第5, 252, 479号; 米国特許第5, 139, 941号; 国際特許出願第WO94/13788号; および国際特許出願第WO93/24641号において記述されており、その全開示を参照により本明細書に援用する。一態様において、そのmiR遺伝子産物はCMV中初期プロモーターを含む単一の組み換えAAVベクターから発現される。

20

30

【0093】

[00105] 特定の態様において、組み換えAAVウイルスベクターは、ヒトU6 RNAプロモーターの制御下でポリT終結配列と作動可能に連結されたmiR前駆体RNAをコードする核酸配列を含む。本明細書で用いられる際、“ポリT終結配列と作動可能に連結された”は、そのセンスまたはアンチセンス鎖をコードする核酸配列がポリT終結シグナルに5'方向においてすぐに隣接していることを意味する。そのmiR配列のそのベクターからの転写の間、そのポリT終結シグナルは転写を終結するように作用する。

【0094】

[00106] 対象の体の中のがん細胞の数は、直接測定により、または原発性もしくは転移性腫瘍塊の大きさからの推定により決定することができる。例えば、対象中のがん細胞の数は、免疫組織化学的方法、フローサイトメトリー、またはがん細胞の特徴的な表面マーカーを検出するように設計された他の技法により測定することができる。

40

【0095】

[00107] miR遺伝子産物は、あらゆる適切な経腸または非経口投与経路により対象に投与することもできる。本方法に関する適切な経腸投与経路には、例えば経口、直腸、または鼻内送達が含まれる。適切な非経口投与経路には、例えば血管内投与（例えば静脈内ボラス注射、静脈内注入、動脈内ボラス注射、動脈内注入および血管系中へのカテーテル点滴注入）；組織周囲および組織内への注射（例えば腫瘍周囲および腫瘍内への注射、網膜内注射、または網膜下注射）；皮下注入が含まれる、皮下注射又は沈着（例えば

50

浸透圧ポンプによる) ; 例えばカテーテルまたは他の留置装置 (例えば、網膜ペレットまたは坐薬または多孔性、非多孔性、もしくはゲル状材料を含むインプラント) による、対象組織への直接適用 ; ならびに吸入が含まれる。特に適切な投与経路は、注射、注入および腫瘍中への直接注射である。

【0096】

[00108] 本方法において、miR遺伝子産物を、ネイキッドRNAとして、送達試薬との組み合わせで、またはそのmiR遺伝子産物もしくはmiR遺伝子産物発現阻害化合物を発現する配列を含む核酸 (例えば組換えプラスミドまたはウイルスベクター) としてのいずれかで対象に投与することができる。適切な送達試薬には、例えばMirus Transi-TKO親油性試薬 ; LIPOFECTIN ; lipofectamine ; cellfectin ; ポリカチオン類 (例えばポリリジン) およびリボソームが含まれる。

10

【0097】

[00109] miR遺伝子産物を発現する配列を含む組換えプラスミドおよびウイルスベクター、ならびにそのようなプラスミドおよびベクターをがん細胞に送達するための技法は本明細書において論じられており、および/または当技術で周知である。

【0098】

[00110] 特定の態様において、miR遺伝子産物 (またはそれらをコードする配列を含む核酸) を対象に送達するためにリボソームが用いられる。リボソームはその遺伝子産物または核酸の血中半減期を増大させることもできる。本発明の態様における使用に関する適切なリボソームは標準的なベシクル形成性脂質から形成させることができ、それには一般に中性または負に荷電したリン脂質およびコレステロールのようなステロールが含まれる。脂質の選択は一般に、所望のリボソームの大きさおよび血流中でのリボソームの半減期のような要因の考慮により導かれる。リボソームを調製するための様々な方法、例えばSzoka et al. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 ; ならびに米国特許第4, 235, 871号、第4, 501, 728号、第4, 837, 028号、および第5, 019, 369号において記述されているような方法が既知であり、その全開示を参照により本明細書に援用する。

20

【0099】

[00111] 本方法における使用のためのリボソームは、そのリボソームをがん細胞に標的化するリガンド分子を含むことができる。がん細胞に広く存在する受容体に結合するリガンド、例えば腫瘍細胞抗原に結合するモノクローナル抗体が好ましい。

30

【0100】

[00112] 本方法における使用のためのリボソームを、単核性マクロファージ系 (“MMS”) および網内系 (“RES”) による排除を回避するように改変することもできる。そのような改変されたリボソームは、表面上に、またはそのリボソーム構造中に組み込まれたオブソニン作用阻害部分を有する。特に好ましい態様において、リボソームはオブソニン作用阻害部分およびリガンドの両方を含み得る。

【0101】

[00113] リボソームの調製における使用のためのオブソニン作用阻害部分は、典型的にはリボソーム膜に結合した大型の親水性ポリマーである。本明細書で用いられる際、オブソニン作用阻害部分は、それが例えば脂溶性アンカーの膜自体中へのインターカレーションにより、または膜脂質の活性基に直接結合することによりその膜に化学的または物理的に付着している場合、リボソーム膜に “結合している”。これらのオブソニン作用阻害性の親水性ポリマーは、MMSおよびRESによるリボソームの取込みを著しく減少させる防御表面層を形成し ; これは例えば米国特許第4, 920, 016号において記述されており、その全開示を参照により本明細書に援用する。

40

【0102】

[00114] リボソームを改変するのに適したオブソニン作用阻害部分は、好ましくは約500から約40, 000ダルトンまで、より好ましくは約2, 000から約20, 000

50

0ダルトンまでの数平均分子量を有する水溶性ポリマーである。そのようなポリマーには、ポリエチレングリコール（PEG）もしくはポリプロピレングリコール（PPG）またはそれらの誘導体；例えばメトキシPEGまたはメトキシPPG、およびPEGステアレートまたはPPGステアレート；合成ポリマー、例えばポリアクリルアミドまたはポリN-ビニルピロリドン；線状、分枝状またはデンドリマー状のポリアミドアミン類；ポリアクリル酸類；カルボキシル基またはアミノ基が化学的に連結されたポリアルコール類、例えばポリビニルアルコールおよびポリキシリトール、ならびにガングリオシド類、例えばガングリオシドGM1が含まれる。PEG、メトキシPEG、もしくはメトキシPPG、またはそれらの誘導体のコポリマーも適切である。加えて、そのオプソニン作用阻害性ポリマーは、PEGおよびポリアミノ酸、多糖類、ポリアミドアミン、ポリエチレンアミン、またはポリヌクレオチドのいずれかのブロックコポリマーであることができる。そのオプソニン作用阻害性ポリマーは、アミノ酸またはカルボン酸を含有する天然多糖類であることもでき、それは例えばガラクトツロン酸、グルクロン酸、マンヌロン酸、ヒアルロン酸、ペクチン酸、ノイラミン酸、アルギン酸、カラゲナン；アミノ化された多糖類もしくはオリゴ糖（線状または分枝状）；またはカルボキシル化された多糖類もしくはオリゴ糖類、例えばカルボン酸の誘導体と反応して結果としてもたらされたカルボキシル基の連結を有する多糖類もしくはオリゴ糖類である。好ましくは、そのオプソニン作用阻害部分はPEG、PPG、またはそれらの誘導体である。PEGまたはPEG誘導体により改変されたりリボソームは時々“PEG化リボソーム”と呼ばれる。

10

【0103】

20

[00115] そのオプソニン作用阻害部分は、数多くの周知の技法のいずれか1つによりリボソーム膜に結合させることができる。例えば、PEGのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルをホスファチジル-エタノールアミン脂溶性アンカーに結合させ、次いで膜に結合させることができる。同様に、デキストランポリマーを、 $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ および溶媒混合物、例えば30：12の比率でのテトラヒドロフランおよび水を60℃で用いる還元的アミノ化により、ステアシルアミン脂溶性アンカーを用いて誘導体化することができる。

【0104】

[00116] オプソニン作用阻害部分により改変されたりリボソームは未改変のリボソームよりもはるかに長く循環中に留まる。この理由のため、そのようなリボソームは時々“ステルス（stealth）”リボソームと呼ばれる。ステルスリボソームは多孔性または“漏出性”微小血管系により養われる（fed）組織中に蓄積することが知られている。従って、そのような微小血管系の障害を特徴とする組織、例えば固形腫瘍（例えば肺がんの転移および／または再発）は、これらのリボソームを効率的に蓄積するであろう；Gabin, et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18:6949-53を参照。加えて、RESによる取込みの低減は、リボソームの肝臓および脾臓における著しい蓄積を予防することにより、ステルスリボソームの毒性を低下させる。従って、オプソニン作用阻害部分により改変されたりリボソームは、miR遺伝子産物（またはそれらをコードする配列を含む核酸）を腫瘍細胞に送達するのに特に適している。

30

【0105】

40

[00117] そのmiR遺伝子産物は、それらを対象に投与する前に、当技術で既知の技法に従って医薬組成物（時々“医薬品”と呼ばれる）として配合することができる。従って、本発明の態様はがんの転移および／または再発を処置するための医薬組成物を含む。一態様において、その医薬組成物は、少なくとも1種類の単離されたmiR遺伝子産物、または単離されたその変異体もしくは生物学的に活性な断片、および医薬的に許容できるキャリアーを含む。

【0106】

[00118]

【実施例】

【0107】

50

【00119】 がん細胞に由来するエクソソーム中で放出された特定のm i R N Aの同定

【00120】 どのm i R N Aが、腫瘍が分泌したエクソソーム中に存在するのかを同定するため、エクソソームをA-549およびSK-MES肺がん細胞株の上清から単離した。第1に、その精製された上清のエクソソーム画分を2つの既知のエクソソームマーカーであるCD9およびCD63における濃縮に関して評価した(図11A)。NanoString分析を実施することにより、9種類のm i R N A (m i R-16、-21、-27b、-29a、-133a、-193a-3p、-544、-563、および-1283)が両方の細胞株由来のエクソソーム中に50コードカウントより高い発現レベルで存在することが観察された(図1A)。

【0108】

10

【00121】 表1：A-549およびSK-MES肺がん細胞株により分泌されたエクソソーム中に含有され、そのコードカウントが50より上であるm i R N Aに関するNanoStringコードカウント。

【0109】

【表1】

	A-549	SK-MES
	コードカウント	コードカウント
miR-133a	528.2	766.3
miR-193a-3p	65.8	107.8
miR-29a	50.3	63.0
miR-21	92.2	173.3
miR-27b	540.3	992.5
miR-16	96.8	145.8
miR-544	70.5	151.0
miR-1283	57.0	110.3
miR-563	74.7	130.8

20

30

【0110】

【00122】 これらのデータを検証するため、我々はA-549およびSK-MESからの同じエクソソーム由来のRNAならびにHEK-293細胞の上清から精製されたエクソソーム由来のRNAを用いて9種類のm i R N A全て(それに加えて陰性対照としてm i R-15a)に関して定量的リアルタイムPCRを実施した。我々は、m i R-15aの発現はその3種類の細胞株のいずれのエクソソームにおいても検出不能であることおよびm i R-16の発現はその3種類の細胞株の間で有意に異なっていないことを確認した(図1B)。しかし、m i R-21、-27b、および-29aの発現は、A-549およびSK-MES細胞由来のエクソソームにおいて、HEK-293細胞からのエクソソームにおけるよりも有意に高く($P < 0.001$)、これは分泌されたm i R N Aのがん特異的パターンを示唆している(図1B)。m i R-133a、-193a-3p、-544、-563、および-1283に関するNanoStringの発現データは定量的リアルタイムPCRにより確認されなかった。

40

【0111】

【00123】 がんから放出されたエクソソーム中のm i R N AはTLRに到達して結合することができる。

【0112】

【00124】 マウスTLR7およびヒトTLR8は両方とも細胞内エンドソーム中に位置

50

しているため、最初の研究は細胞から放出されたエクソソームが“受け取る”細胞中のTLRを含有するエンドソームに到達することができるかどうかに関して行われた。従って、GFPとコンジュゲートしたCD9エクソソームマーカーをコードするプラスミドを用いて予め形質移入したHEK-293細胞をバイタルブルー(vital blue) cell trackerで染色したRAW 264.7マウスマクロファージと共培養し、ここでTLRを含有するエンドソームは赤色のLysoTrackerでも標識された。RAWマクロファージはHEK-293細胞により放出されたCD9-GFPエクソソームを取り込み、これらのエクソソームはRAW細胞中でエンドソームと共局在していることが観察された(図2A)。次に、我々は細胞外のmiR-16、-21、および-29aが細胞内エンドソーム内のTLR8に到達し得るかを調べた。この目的のため、対象のmiRNAのDotapリボソーム配合物を用いた(それらが封入されるエクソソームを真似る)。TLR8を発現しないHEK-293細胞に、GFPタグを付けたTLR8タンパク質を発現するプラスミドを用いて形質移入した。48時間後、細胞をCy5コンジュゲート成熟miR-16、-21、または-29aを含有するDotapリボソーム配合物で処理し、次いで青色のLysoTrackerをその培地に添加して細胞のエンドソームを標識した。miRNA、TLR8、およびエンドソームの共局在が3種類のmiRNA全てに関して検出され(図2B)、これは外因性のmiRNAが細胞のエンドソーム中のTLR8に到達し得ることを示している。これらのmiRNAがTLR8に結合するかどうかを決定するため、我々は、GFP-TLR8を発現し、Dotap-miR-16、Dotap-miR-21、Dotap-miR-29a、またはDotapのみで処理したHEK-293細胞においてTLR8に関する免疫共沈アッセイを実施し、定量的リアルタイムPCRによりmiRNAレベルを決定した。miR-16はGFP-TLR8免疫共沈物においてほとんど検出できなかったが、miR-21およびmiR-29aの発現は高度に濃縮された(50倍より大きい)(図2C)。また、GFP-TLR8を発現しているHEK-293細胞を、Dotapのみで、または5'ビオチン化miR-16、-21、または-29aのDotap配合物で処理した。陽性対象として、細胞を5'ビオチン化ssRNA40(以前にTLR8を活性化することが示された20塩基長のssRNA)で処理した。miRNAおよびssRNA40の免疫共沈後、TLR8がssRNA40、miR-21、および-29aで処理した細胞において検出された(図2D)が、Dotapのみで、またはDotap-miR-16で処理した細胞では検出されなかった。この相互作用がインビボでも起こるかどうかを調べるため、我々はB6マウスに尾中への注射後に肺に局在する傾向があるルイス肺癌(LLC)細胞を注射し、注射の15日後に肺腫瘍を分析した。ISHにより、我々はmiR-29aはがん細胞により産生され、隣接する正常な肺組織中の細胞によっては産生されないことを示した(図2Eおよび図11B)。これらの発見はヒト原発肺がんの試料においても確認され、ここでエクソソームマーカーCD9の濃縮もマクロファージ中で腫瘍-正常組織境界面において観察された(図12)。また、ロックド核酸インサイチュハイブリダイゼーション(LNA-ISH)により、miR-29aおよびエクソソームはマウスおよびヒトの肺がんの試料中で腫瘍-正常組織境界面において共局在している(図2F)が腫瘍から1mmの距離の正常な組織では共局在していないことが観察された。また、我々は、腫瘍の中心部においてmiR-29aががん関連上皮マーカーであるサイトケラチンと共局在している(がん細胞はmiR-29aの主な産生者であることを確認している)が、腫瘍の周辺部ではmiR-29aはマクロファージマーカーであるF-11と共局在しているがサイトケラチンとは共局在していないことを示し、これはmiR-29aは腫瘍の境界面においてマクロファージ中に存在していることを示唆している(図13Aおよび13B)。我々は、miR-29aは腫瘍の境界面においてマクロファージのTLR7と共局在していることも示した(図13C)。全体として、これらのデータは、がん細胞はmiR-29aをエクソソーム中で分泌することおよびこのmiRNAは腫瘍-正常組織境界面においてマクロファージ中でTLR7およびTLR8と共局在することを示している。

[00125] がんから放出されたエクソソーム中のm i R N AはT L Rを機能的に活性化
する。

【0114】

[00126] m i R N A-T L R相互作用が機能性であるかどうかを決定するための実験
を実施し、対象のm i R N Aがその産生がT L Rの活性化により増大するサイトカイン類
、例えばT N F- α およびI L-6の分泌を誘導するかどうかを評価した。我々はW Tお
よびT L R 7-/-のB 6マウスから腹腔マクロファージを単離した。細胞をD o t a p
のみで、またはm i R-16、-21、-29a、および-147のD o t a p配合物で
処理し、T N F- α およびI L-6に関するE L I S Aを実施した。機能性アッセイでは
m i R-147および-574-5pも含まれ、これはそれらがR N A 33の配列と類似
してT L R 8およびT L R 7の活性化を通してサイトカイン産生を誘導する成熟したウイ
ルス由来の配列を有するためである（図14A）。D o t a pのみおよびD o t a p-m
i R-16はサイトカイン分泌を誘導しなかったが、m i R-21、-29a、および-
147はT N F- α およびI L-6の産生をW Tにおいて増大させたがT L R 7-/-マ
ウスでは増大させなかった（図3AおよびB）。我々はまた、W TおよびT L R 7-/-
マウスからの脾臓細胞を同じm i R N Aを用いて処理し、炎症および増殖において役割を
有する細胞の早期活性化マーカーでありT L R 3によっても活性化されるC D 69の発現
を評価した。T L R 3の既知のアゴニストであるポリイノシン酸：ポリシチジル酸 [ポリ
(I : C)] が陽性対照の役目を果たした。細胞蛍光測定 (C y t o f l u o r i m e t
r y) は、m i R-21、-29a、および-147はW Tからの脾臓細胞においてC D
69の活性化を誘導するがT L R 7-/-マウスからの脾臓細胞では誘導せず、m i R-
16またはD o t a pのみはいずれにおいても誘導しないことを示し（図3CおよびD）
、これはこれらのm i R N AがT L R 7に媒介される脾臓細胞の活性化を誘導すること
を示している。

【0115】

[00127] m i R N Aに誘導されるT L Rの活性化がヒト細胞においても起こるかどう
かを調べるため、N F- κ BレポーターアッセイをH E K-293細胞において実施した
。いくつかのサイトカイン遺伝子の発現を調節している転写因子であるN F- κ Bは、唯
一のs s R N A結合型のヒトのT L RであるT L R 7およびT L R 8が含まれるいくつか
のT L Rにより活性化される。従って、我々はヒトT L R 7またはT L R 8を発現するH
E K-293細胞（以下それぞれT L R 7-およびT L R 8-H E K-293細胞）をD
o t a pのみで、またはm i R-16、-21、-29a、もしくは-147のD o t a
p配合物で処理し、N F- κ Bレポーターアッセイを実施した。陽性対照として、それぞ
れT L R 7およびT L R 8の特異的アゴニストであるG a r d i q u i m o dおよびs s
R N A 40を用いた。N F- κ BはT L R 8-H E K-293細胞においてのみm i R-
16を除く試験したm i R N Aのそれぞれにより活性化された（図3E）。これらの結果
は、m i R N Aに誘導されるN F- κ Bの活性化がヒト細胞ではT L R 8により媒介され
、T L R 7によつては媒介されないことを示唆している。この結論を確認するため、T L
R 8-H E K-293細胞にT L R 8のドミナントネガティブ形態 (T L R 8 D N) をコ
ードするプラスミドを用いて形質移入し、これらの細胞を対象のm i R N Aで処理した。
T L R 8 D N細胞において、m i R-21およびm i R-29aによるN F- κ Bの活性
化が消失した（図3F）。また、2人の健康な提供者からのT L R 7およびT L R 8を発
現するヒトの末梢血単核細胞 (P B M C) を、D o t a pのみまたはm i R-16、-2
1、-27b、-29a、-147、-574-5p、もしくはs s R N A 40のD o t
a p配合物と共にインキュベートし、T N F- α およびI L-6に関してE L I S Aを実
施した。D o t a pのみで、およびD o t a p-m i R-16で処理したP B M Cを除い
て、その他のm i R N Aおよびs s R N A 40のそれぞれがT N F- α およびI L-6の
産生を誘導した（図3G~3J）。また、ヒトの原発肺腫瘍において、我々は腫瘍境界面
におけるマクロファージ中でm i R-29aおよびI L-6の同時発現を観察した（図5
）。興味深いことに、腫瘍境界面ではm i R-29a陽性のマクロファージのみがI L-

6陽性でもあった(図5)。

【0116】

[00128] ホスホ-p65がmiR-21および-29aにより誘導され(miR-16によっては誘導されない)、IKBαまたはIKK2のドミナントネガティブプラスミドを用いた形質移入がRAW 264.7細胞におけるTNF-αの分泌を低減したため、NF-κB経路の活性化がmiR-21および-29aに誘導されるTNF-αおよびIL-6の分泌に必要であることも観察された(図6Aおよび6B)。全体として、そのデータは、肺がん細胞によりエクソソーム中に分泌されたmiRNAは腫瘍境界面においてマクロファージ中のTLR8に結合してTLR8に媒介されるNF-κBの活性化ならびにNF-κBに媒介される炎症促進性サイトカイン類TNF-αおよびIL-6の分泌を誘導することができることを示している。

10

【0117】

[00129] miR-21および-29aの配列中のどの構造的特徴がTLR8を活性化する能力を与えるのかを調べた。miR-16とは異なり、miR-21および-29aの両方がヌクレオチド領域18~21においてGUモチーフ(miR-21に関してGUU GおよびmiR-29aに関してGGUU)を示すことが観察され、GUモチーフはTLRを活性化するRNA33において顕著である(図14A)。従って、実験はmiR-21配列中の塩基番号18、20、および18+20ならびにmiR-29a配列中の塩基番号20、21、および20+21をそれぞれの特定の位置に関するmiR-16の対応する塩基で置換することによりGUモチーフを破壊した(図14B)。塩基番号20はmiR-21および-29aの両方に関してTLRに媒介されるNF-κBの活性化の調節において非常に重要であり、一方でmiR-21の塩基番号18におけるG→U変異はTLR8-HEK-293細胞においてmiR-21によるTLR8の活性化を有意に増大させることが観察された(図16C)。全体として、miRNAの成熟配列中のヌクレオチドの特定の性質および位置がTLRの活性化に関わっていることが判明した。

20

【0118】

[00130] がんから放出されるエクソソーム中のmiRNAは、周囲の免疫細胞中のTLRに結合して活性化することにより腫瘍の増殖および拡散に影響を及ぼす。

【0119】

[00131] LLC細胞は肺転移の標準的なモデルではないが、炎症と関連する肺がんの周知のモデルである。宿主の骨髄細胞により誘導されるTNF-αの分泌はLLC細胞を注射されたマウスの肺における多数性の形成に重要であることが実証されている。従って、肺がんが分泌したmiRNAにより刺激された免疫細胞により誘導されるサイトカイン分泌はLLCの肺の多数性の形成に関わっている可能性があることが推測された。

30

【0120】

[00132] エクソソームをLLCおよびA-549細胞の上清から精製し、定量的リアルタイムPCRによりmiR-16、-21、-27b、および-29aに関して評価した。LLC細胞は最高レベルのmiR-16、-21、および-29aを放出しており(図7A)、これはこれらの細胞が優れたモデルであることを確証している。LLC由来のエクソソーム(または対照として空の培地)をWTまたはTLR7-/-マウスから単離した腹腔マクロファージと共培養し、エクソソームの存在下で、およびTLR7-/-マウスに対してWTマウスにおいて有意に増大したTNF-αおよびIL-6の分泌が観察された(図4Aおよび4B)。また、LLC由来のエクソソーム(または対照として空の培地)をWTまたはTLR7-/-マウスから単離した脾臓細胞と共培養し、エクソソームの存在下で、およびTLR7-/-マウスに対してWTマウスにおいて有意に高いCD69の活性化が観察された(図4Cおよび4D)。最後に、LLC上清の超遠心分離を実施し、条件培地または超遠心分離した(そしておそらくエクソソームが欠損した)培地をWTマウスの腹腔マクロファージおよび脾臓細胞と共培養し、エクソソームの除去はマクロファージによるTNF-αおよびIL-6の分泌ならびにWTマウスの脾臓細胞によるCD69の活性化を有意に低減することを確認した(図7B~7D)。

40

50

【0121】

[00133] 興味深いことに、いくつかのTNF- α およびIL-6の分泌ならびにCD69の活性化がエクソソームの存在下でTLR7-/-マウスにおいても観察され、これはこれらの小胞がサイトカイン分泌およびCD69の活性化を活性化することができる他のシグナルも運んでいることを示している。また、LLC由来のエクソソーム（または陽性対照としてssRNA40）をWTのTLR8-HEK-293細胞と、またはバフィロマイシンA（エンドソームの機能を乱す抗生物質）で前処理したTLR8-HEK-293細胞と共培養し、バフィロマイシンAの存在下で有意に低減したNF- κ Bの活性化（ $P < 0.0005$ ）が観察された（図7E）。次に、LLC細胞をWTおよびTLR7-/-マウスの尾の中に注射し、その動物の全生存時間および検死後の肺の多数性の数を評価した。 Kaplan-Meier曲線は、LLCを注射したWTマウスのTLR7-/-マウスに対して有意に短い全生存時間を示している（ $P < 0.001$ ）（図4E）。また、肺腫瘍の多数性はLLCを注射したWTマウスにおいてLLCを注射したTLR7-/-マウスにおけるよりも有意に高かった（多数性の平均数はそれぞれ13.8対3.8； $P < 0.05$ ）（図4Fおよび4G）。これらのデータは肺がんの多数性の発現におけるTLR7の活性化の重要性を確認している。

10

【0122】

[00134] 最後に、TLR7の活性化における肺がんエクソソームから放出されたmiRNAの役割を評価するため、LLC細胞においてmiR-16の発現を、またはmiR-21および-29aの発現を合わせてロックド核酸（LNA）anti-miRNA阻害剤によりサイレンシングした。anti-miRNAの形質移入後、サイレンシングされたmiRNAのレベルがこれらの細胞由来のエクソソーム中で低減した（図7F）。形質移入した細胞をB6マウスの尾静脈中に注射し、肺の多数性を計数した。それらのエクソソーム中でmiR-21/29aを発現していないLLC細胞を注射されたマウスは、より少ない肺の多数性を形成した（図4Hおよび4I）。miRNAおよびエクソソーム分泌の阻害剤であるGW4869で処置したWTマウスはLLC細胞を注射した際に有意により少ない数の肺の多数性をもたらすことも観察された。この作用は、LLC由来のエクソソームをGW4869で処置したマウス中に静脈内注射した場合に少なくとも部分的にレスキューすることができた（図7G）。我々はさらに、アンチスクランブルLLCまたはanti-miR-21/29a LLCを注射したマウスにおいてどのmiRNAががん細胞および隣接する正常な肺組織において発現されているかを調べた。アンチスクランブルLLCを注射したマウスにより発現された肺腫瘍中のがん細胞は、アンチスクランブルオリゴヌクレオチドに関して陽性であった。

20

30

【0123】

[00135] 興味深いことに、anti-miR-21/29a LLC細胞を注射したマウスにおいて、肺に局在する全てのがん細胞がmiR-29a発現に関して陽性であり、anti-miR-29aオリゴヌクレオチド発現に関して陰性であった（図8）。これらの発見は、miR-29aがLNA anti-miR-21/29aの形質移入によりうまくサイレンシングされなかったLLC細胞のみが肺に局在することができたことを示している。

40

【0124】

[00136] 観察された違いがそれらのエクソソーム放出と無関係なmiRNAサイレンシングの作用により引き起こされた可能性を排除するため、miR-16またはmiR-21/29aサイレンシングのLLC生物学への作用を調べた。miR-16またはmiR-21/29aがサイレンシングされた際、LLCの増殖曲線、細胞生存度、細胞周期、LLCの侵入性、もしくはLLCの移動能力において、またはインビボ異種移植マウスモデルにおける腫瘍増殖において、違いは観察されなかった（図9）。結果は、腫瘍細胞がエクソソーム中に分泌したmiR-21および-29aは免疫細胞中でTLR8（およびTLR7）に結合してこれらの受容体を活性化し、TLRに媒介されるNF- κ Bの活性化および転移促進性炎症性サイトカイン類の分泌をもたらす得ることを示している。腫

50

瘍による細胞外マトリックスプロテオグリカンであるベルシカンの分泌は骨髄細胞においてTLR2:TLR6複合体を活性化することにより炎症促進性反応を誘導することが以前に示されている。本明細書において、腫瘍が分泌するmiRNAは免疫細胞におけるTLR8応答を活性化することにより腫瘍促進性炎症プロセスにおいて重要な役割を果たしていることがここで示されている。結果として、腫瘍細胞はこの傍分泌ループが完全である場合、より大きな肺の多数性をもたらす傾向がある。LLC細胞は肺がん転移の標準的なモデルではないが、そのデータはmiRNAの特定の受容体ファミリーのアゴニストとしての作用機序を同定し、この機序が腫瘍微小環境相互作用に関わっていることを確認している。

【0125】

10

[00137] miR-21および-29aのTLR7およびTLR8への結合は(CD69の活性化により示される)免疫細胞の活性化を誘導し、この作用はヒトのTLR7への結合によっては媒介されない。さらに、肺がんのインビボマウスモデル[ルイス肺癌(LLC)細胞を注射したマウス]において、TLR7への結合により、がん細胞が分泌したエクソソーム中のmiR-21および-29aは肺に優先的に転移し、この機序が損なわれているTLRノックアウトマウスと比較して全生存時間を低減することが示されている。がん細胞によるエクソソーム分泌に影響を及ぼす薬物はLLC細胞の転移能を有意に低減し、この作用は腫瘍を有するマウスにLLC細胞により分泌されたエクソソームを注射することによりレスキューされ得る。

【0126】

20

[00138] miRNAがリガンドとして作用してホルモン様の様式で受容体に結合して活性化することができるという本明細書における発見は、がんの範囲を越えるより広い含意を有する。例えば、これらの機序は自己免疫疾患および炎症性疾患に影響を及ぼす。これは、がん細胞が周囲の免疫細胞と相互干渉し、それらが腫瘍の増殖および拡散を増大させるサイトカイン類を放出するように誘導する機序を明らかにする。本研究は、がんの増殖および播種における腫瘍微小環境の重要性を実証し、抗がん処置の開発のための分子標的を提供する。

【0127】

[00139] 方法

[00140] 細胞培養、形質移入、および処置

30

[00141] 全ての細胞株は別途示さない限りアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから購入した。ヒトHEK-293細胞は標準的な条件を用いて維持し、10%(体積/体積)FBSを添加したDMEM(Gibco)中で増殖させた。ヒトHEKBlue-TLR7およびTLR8-293細胞(InvivoGen)(それぞれTLR7-HEK-293またはTLR8-HEK-293として示す)は10%(体積/体積)FBS、Normocin(50 µg/mL)、ブラストサイジン(10 µg/mL)、およびZeocin(100 µg/mL)(InvivoGen)を添加したDMEM中で培養した。

【0128】

40

[00142] ヒトA-549およびSK-MESならびにマウスLLC細胞は10%(体積/体積)FBSを添加したRPMI 1640中で維持した。RAW 264.7細胞は20%(体積/体積)FBSを添加したDMEM中で維持した。全ての細胞は、Lipofectamine LTXおよびPlus試薬(Invitrogen)を製造業者の説明書に従って用いて形質移入した。

【0129】

[00143] 全ての実験に関して、細胞を以前に記述されたようにDotapリポソーム性形質移入試薬(Roche)と複合体化した15 µgのHPLC精製された合成miRNA(Integrated DNA Technologies)で処理した。

【0130】

[00144] バフィロマイシンAを用いた実験に関して、TLR8-HEK-293細胞

50

を24ウェルプレート中にウェルあたり200,000細胞の密度で蒔いた。次の日に細胞を10nMバフィロマイシンA (Sigma)と共に30分間プレーインキュベートし、次いで10nMバフィロマイシンAの存在下または非存在下でLLC細胞から精製したエキソソームで24時間処理した。細胞上清を集めて回収し、QUANT-Blueアッセイを実施した。

【0131】

[00145] エキソソームの精製。

【0132】

[00146] 無血清条件培地を全ての言及された細胞株から細胞処理後の示した時点において集めた。次いで培地を14,000×gにおいて15分間で回収して細胞破壊片を排除した。エキソソームをエキソソーム沈殿溶液 (ExoQuick; System Bioscience) を製造業者の説明書に従って用いることにより沈殿させた。

【0133】

[00147] 免疫蛍光

[00148] HEK-293細胞を形質移入の24時間前に60mmプレート上に蒔き、50%コンフルエンスまで増殖させた。次いでそれらに1μgのGFP-TLR8をコードするプラスミド (Origene) を用いて形質移入した。48時間後、細胞を上記のようにCy-5蛍光体にコンジュゲートされた、図中の成熟miRNAオリゴで処理し、PBSで4回洗浄し、PBS中で1:25,000希釈したLysoTracker青色DND-22 (Invitrogen) と共に15分間保温した。

【0134】

[00149] 生理学的エキソソームを用いた免疫蛍光実験に関して、HEK-293細胞に1μgのGFP-CD9をコードするプラスミド (Origene) を用いて形質移入した。24時間後、細胞を剥がし、予め40mmのカバーガラス上に700,000細胞/mLの密度で蒔いて青色cell tracker (Invitrogen) で染色したRAW 264.7細胞と共培養した。30分間の培養後、HEK-293細胞を蒔いたままにして、その共培養物を最終的にPBS中で1:25,000希釈したLysoTracker赤色DND-99 (Invitrogen) で染色し、カバーガラスを共焦点顕微鏡で分析した。

【0135】

[00150] NanoString (登録商標) nCounter (登録商標) アッセイ。

【0136】

[00151] 300μlのSKMESおよびA-549の条件培地から精製した細胞およびエキソソームの両方を、RNA抽出のためにTrizol試薬 (Invitrogen) を用いて製造業者の説明書に従って6連で処理した。RNAの濃度および質をNanodropアッセイ (Nanodrop分光光度計2000) により概算し、100ngをnCounter (登録商標) のmiRNA試料調製反応のための入力として用いた。全ての試料調製は製造業者の説明書 (NanoString Technologies) に従って実施された。低分子RNA試料の調製には、特異的なDNAタグのそれぞれの成熟miRNAの3'末端へのライゲーションが含まれる。これらのタグは、そのmiRNAの融解温度を正規化する (normalize) ように、ならびにその試料中のそれぞれのmiRNA種に関する独特の同定を提供するように設計されている。そのタグ付けは、それぞれのmiRNAのライゲーションをその指定されたタグに方向付けるために逆相補架橋オリゴヌクレオチドを用いる多重ライゲーション反応で成し遂げられる。そのライゲーション反応の後、過剰なタグおよび架橋を除去し、結果として得られた物質をmiRNA: タグ特異的nCounter (登録商標) 捕捉およびバーコード化 (barcoded) レポータープローブのパネル (panel) とハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション反応は、製造業者の説明書に従って5μlの5倍希釈された試料調製反応を用いて実施された。全てのハイブリダイゼーション反応を64℃で最低18時間インキュ

べートした。ハイブリダイズしたプローブをnCounter（登録商標）Prep Station（NanoString Technologies）を製造業者の説明書に従って用いて精製して過剰な捕捉およびレポータープローブを除去し、転写産物特異的三元複合体をストレプトアビジンでコートされたカートリッジ上に固定した。データの収集をnCounter（登録商標）デジタル分析装置（NanoString Technologies）において製造業者の説明書に従って実施し、個々の蛍光バーコードを計数し、それぞれの試料中に存在する標的RNA分子を定量化した。それぞれのアッセイに関して、高密度走査（600視野角（fields of view））を実施した。その分析に関して、両方の細胞株において50以上のコードカウントの数（陰性対照の平均である25コードカウントより2倍多い）を有するmiRNAのみをさらに検討した。図1Aに関する閾値は、バックグラウンドノイズを排除し、同定されるmiRNAのレベルが実際のエキソソームの濃縮を表すことを確実にするように選択された。レーン中の全ての陰性対照プローブの計数の平均値＋標準偏差の倍数を、そのレーンに関するバックグラウンドとして定義することができるであろう。従って、そしてNanoString発現データ分析ガイドにおいても推奨されているように、我々は以下のように操作した：

10

[00152] 1. それぞれのレーンに関して、全ての陰性対照の計数の平均値を計算した。

【0137】

[00153] 2. それぞれのレーンに関して、全ての陰性対照の計数の標準偏差を計算した。

20

【0138】

[00154] 3. その標準偏差の倍数をその平均値に加えた。具体的には、その標準偏差に2を掛けた後その平均値に加えた。

【0139】

[00155] 4. そのバックグラウンドの閾値をそれにより決定した。

【0140】

[00156] その分析をそのエキソソーム中で実際に過剰発現しているmiRNAに限定するため、（4において計算されるような）バックグラウンドの閾値をさらに2倍することにより、さらにもっと厳しい閾値を用いた。この計算は51.04の閾値を与え、それを丸めて50にした。

30

【0141】

[00157] 定量的リアルタイムPCR。

【0142】

[00158] miRNAに関する定量的リアルタイムPCR分析を、TaqMan MicroRNAアッセイキット（Applied Biosystems）を製造業者の説明書に従って用いて3連で実施した。RNU44（ヒト試料）またはsnRNA234（マウス試料）を用いてその定量的リアルタイムPCRを正規化した。

【0143】

[00159] RNAをその細胞から抽出した。総RNA濃度を用いて、エキソソームから精製したmiRNAに対して実施した定量的リアルタイムPCRを正規化した。

40

【0144】

[00160] 免疫共沈実験。

【0145】

[00161] TLR8-HEK-293細胞を図中のmiRNAで処理し、37℃で20分間インキュベートした。次いでそれらを1.5mlの氷冷PBSで広範囲にわたって（extensively）洗浄し、集め、氷上で150μlのポリソーム溶解緩衝液と共に5分間インキュベートすることにより溶解を実施した。溶解物を最終的にドライアイス中で1時間凍結させ、次いで14,000gにおいて15分間で回収した。100μlのそれぞれの溶解物を50μlのA/Gタンパク質（Santa Cruz）に添加し、それは予め25μlのNT2緩衝液5%BSAと共に1時間、次いで100μlの抗TLR

50

8抗体と共に4℃で一夜、回転させて前プレーインキュベートした。溶解物をさらに、(製造業者のプロトコルに従ってNT2緩衝液で広範囲にわたって洗浄した)ビーズ(Mylt en i)と共に、1μlの1M DTTおよび34μlの0.5M EDTAを添加した850μlのNT2緩衝液の終体積中でインキュベートした。4℃で5時間回転させて免疫沈降した。ビーズをNT2緩衝液で4回洗浄し、100μlのNT2緩衝液およびプロテイナーゼK(Qiagen)と共に55℃で30分間インキュベートし、次いでRNAをTrizolで抽出し、以前に報告されたようにリアルタイム分析のために処理した。

【0146】

[00162] TLR8に関するmiRNA免疫沈降を以下のように実施した。TLR8-GFP-HEK-293細胞を5'-ビオチン化成熟miR-16、29またはRNA40(15μg/mLの終濃度)で37℃において20分間処理した。細胞を以前に記述されたように固定し、溶解させ、免疫共沈をストレプトアビジンコンジュゲート磁性ビーズ(Milteny i)を製造業者の説明書に従って用いることにより実施した。TLR8-GFPタンパク質を抗GFP抗体を用いて検出した。

【0147】

[00163] ウェスタンブロッティング。

【0148】

[00164] 細胞をPBS中で洗浄し、かき取って15mlチューブ中に集め、次いで1,500gにおいて10分間で回収した。そのペレットを、プロテアーゼ阻害剤(Roc he)を添加したNP-40細胞溶解緩衝液(Invitrogen)中で4℃において30分間再懸濁した。その懸濁液を最終的に14,000gにおいて10分間で回収し、可溶化されたタンパク質を含有する上清を集めた。タンパク質をBio-Radプロテインアッセイ(Bio-Rad)を製造業者の説明書に従って用いて定量化し、30μgのそれぞれの試料をCriterionトリス-HCl 4~20%プレキャストゲル(Bio-Rad)上にロードし、PVDF膜上に転写し、抗GFP(Novus Biologicals)および抗-TLR8(Santa Cruz)抗体を用いて調べた。アイソタイプの合うホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体(GE Healthcare)を用いて、続いて化学発光検出(Denville Scientific, Inc.)を行った。また、免疫プロットのために以下の抗体を用いた：抗CD9、および抗CD63(Santa Cruz)、および抗ホスホp65(Cell Signaling)。LNA-ISH タンパク質/マイクロRNAならびにタンパク質/タンパク質同時発現分析に関する我々のプロトコルは以前に公開されている。簡潔には、マイクロRNAに関するインサイチュハイブリダイゼーションは5'ジゴキシゲニンタグを付けたLNAプローブ(Exiqon)を用いて行った。インサイチュハイブリダイゼーションの後、我々はVentana Medical SystemsからのBenchmark LT自動化システムを製造業者の仕様書に従って用いてCD9(1:200、30分間の抗原賦活化)、TLR7(1:250、30分間の抗原賦活化)、およびIL-6抗体(1:300、30分間の抗原賦活化)に関する免疫組織化学的検査を行った。次いでそのデータをNuanceシステム(ケンブリッジ研究所)を用いて分析し、それは異なる発色体の発色シグナルを分け、これらを蛍光シグナルに変換し、次いでコンピューターを使った分析システムでそれらを混合する。

【0149】

[00165] 動物。

【0150】

[00166] WT B6マウス、B6 TLR7^{-/-}マウス、およびヌードマウスはJackson Laboratoriesから購入した。年齢および性別を合わせた(7週齢のオス)7匹のWT B6マウスおよび7匹のTLR7^{-/-} B6マウスに尾静脈中に1.8×10⁶個のLLC細胞を注射し、生存に関して追跡した。死亡した時に、または生存しているマウスを注射の36日後に殺した際に検死を実施し、肺腫瘍の多数性を

写真撮影し、計数した。

【0151】

[00167] anti-miRNAを用いて形質移入したLLC細胞を用いたインビボでの実験を、群あたり6匹の7週齢のオスのB6マウス（合計 $n=18$ ）で実施した。“LNAアンチスクランブル”は、対照として用いたLNAアンチスクランブルを用いて形質移入したLLC細胞を注射したマウスを指し；“LNA anti-miR-16”はLNA anti-miR-16を用いて形質移入したLLC細胞を注射したマウスを指し；“LNA anti-miR-21/29a”はLNA anti-miR-21およびLNA anti-miR-29aを用いて形質移入したLLC細胞を注射したマウスを指す。マウスに 1.8×10^6 個のLLC細胞を尾静脈中に注射し、15日後に殺した。検死を実施し、肺の多数性を写真撮影し、計数した。

10

【0152】

[00168] LLC細胞を用いたインビボレスキュー実験を15匹のオスの7週齢のB6マウスにおいて実施した。マウスに 1.8×10^6 個のLLC細胞を尾静脈中に300 μ Lの体積で注射した（ T_0 ）。4日後（ T_4 ）、エキソソーム分泌の阻害剤であり分泌されるエキソソーム中のmiRNAの含有量も低減することができるGW4869を用いた腹腔内注射（ $1.25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ 日}^{-1}$ ）を10匹のマウスに関して開始し、5匹のマウスに対照としてDMSO（GW4869の溶媒）を注射し、5日間毎日連続して行った。GW4869の1回目の注射の1週間後（ T_{11} ）、GW4869で処置したマウスの5匹の尾にWTのLLCの上清から精製したエキソソーム1 mLを注射した。同じマウスに3日後（ T_{14} ）にLLC由来のエキソソームの2回目の注射を与えた。全てのマウスを T_{18} において殺し、検死を実施し、肺の多数性を計数した。

20

【0153】

[00169] また、上記で言及したanti-miRNAを用いて形質移入したLLC細胞を9匹のヌードマウスの左側腹部中に皮下注射し（マウスあたり 8×10^6 細胞、条件あたり3匹のマウス）、その後の3週間の間腫瘍増殖を監視した。腫瘍の大きさを週1回デジタルキャリパーを用いて評価した。腫瘍の体積を、腫瘍の長さ（ l ）および幅（ w ）を測定して体積を計算する（ $V = lw^2 / 2$ ）ことにより決定した。

【0154】

[00170] この研究において用いられた全ての手順は、連邦政府のガイドラインおよびオハイオ州立大学動物実験委員会の施設の方針に従った。

30

【0155】

[00171] 初代ヒトおよびマウス細胞の分離。

【0156】

[00172] WTおよびTLR7 $^{-/-}$ の年齢および性別を合わせたマウスに由来する総脾細胞を、脾臓を回収して単一細胞懸濁液を調製することにより調製した。赤血球を赤血球溶解緩衝液（eBioscience）を用いた浸透圧溶解により排除した。総脾細胞を96ウェルプレートに蒔き（ウェルあたり200 μ Lの培地中に 1×10^6 個の細胞）、次いで合成miRNAで、または精製したエキソソームで18時間刺激した。細胞をフィコエリトリンコンジュゲート抗CD69（BioLegend）抗体で染色し、FACS Caliburフローサイトメーター（Becton Dickinson）を用いて分析した。

40

【0157】

[00173] 腹腔由来のマクロファージをWTおよびTLR7 $^{-/-}$ の年齢および性別を合わせたマウスから単離した。

【0158】

[00174] PBMCを健康な提供者のヘパリン処置された血液からFicoll-Paque（Pharmacia）遠心分離（ $500 \times g$ ）により製造業者の説明書に従って分離し、刺激のためにすぐに蒔いた。ヒトPBMCまたはマウス腹腔マクロファージ（300,000細胞）を合成miRNAで24時間刺激し；次いでTNF- α およびIL-

50

6に関するELISAをその条件培地に対してMulti-Analyte ELISA rrayキット (SABiosciences) を製造業者の説明書に従って用いて実施した。

【0159】

[00175] 増殖曲線、細胞生存度および細胞周期。

【0160】

[00176] 増殖曲線の決定のため、細胞を48ウェルプレート中に10,000細胞/mlの密度で蒔いた。24、48、および72時間後、細胞を集め、血球計算器 (Beckman Coulter) を用いて計数した。細胞生存度を3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTS)-Cell Titer 96 Aqueous One Solution細胞増殖アッセイ (Promega) を製造業者の説明書に従って用いて調べた。代謝的に活性な細胞を、20μlのMTSをそれぞれのウェルに添加することにより検出した。1時間のインキュベート後、そのプレートをMultilabel Counter (Bio-Rad Laboratories) において分析した。細胞周期分析を、メタノール中で固定した細胞のヨウ化プロピジウム染色 (PBS中50μg/ml)、続いてフローサイトメトリー分析 (FACScan Becton-Dickinson) により実施した。

【0161】

[00177] 細胞移動および侵入。

【0162】

[00178] 3D-細胞外マトリックスを通る細胞移動および侵入を、トランスウェル移動チャンバー (Corning) を用いることにより評価した。簡潔には、移動に関して、トランスウェルを室温において1時間PBS 1%BSAで飽和させた。LNAで形質移入した細胞をそのトランスウェルの上部チャンバー中に蒔き、37℃で6時間または24時間培養した。下部チャンバーを図に示す無血清培地または10%FBSを添加した血清で満たした。24または6時間後、フィルターを洗浄し、固定し、クマシーブリリアントブルー (Sigma-Aldrich Corp.) で染色した。フィルターの下部表面に侵入した細胞を顕微鏡下で計数した。侵入実験に関して、トランスウェルを4℃において一夜80μg/ml Matrigel (商標) (Becton Dickinson) でコートし、次いで室温において2時間PBS 1%BSAで飽和させた。次いでLNAで形質移入した細胞を上記で記述したように処理し、そのマトリックスに24時間まで侵入させた。

【0163】

[00179] NF-κB活性アッセイ

[00180] NF-κB活性をQUANTI-Blueアッセイ (InvivoGen) により評価した。HEK-Blue-TLR7およびTLR8 293細胞はそれぞれのTLRの刺激後のNF-κBの活性化の検証を可能にする。これらの細胞株は両方とも、TLR7および8遺伝子ならびに5個のNF-κBおよびAP-1結合部位に融合したIFN-α最小プロモーターの制御下の最適化された分泌型胚性アルカリホスファターゼレポーター遺伝子 (SEAP) のHEK-293細胞中への同時形質移入により得られた。TLR7または8リガンドによる刺激はNF-κBおよびAP-1を活性化し、それはSEAPの産生を誘導する。SEAPのレベルは、アルカリホスファターゼの存在下で紫/青に変わる検出媒体であるQUANTI-Blueにより容易に決定することができる。処理されたTLR7-HEK-293およびTLR8-HEK-293細胞に由来する上清を14,000gにおいて15分間で回収して破壊片を排除し;次いで20μlを96ウェルプレート中に移し、180μlのQUANTI-Blue溶液 (InvivoGen) に添加した。次いでそのプレートを37℃で1~3時間インキュベートし、SEAPのレベルをそのプレートを分光光度計 (SpectraMax, Molecular Devices) で620~655nmにおいて読み取ることにより決定した。

【0164】

[00181] データの統計分析。

【0165】

[00182] 統計データは別途明記しない限り平均±SDとして示されている。有意性は、スチューデントのt検定により、またはANOVA検定によりボンフェローニ補正を用いて計算した。 Kaplan・マイヤー生存曲線は、SPSS統計ソフトウェア（IBM）を用いてログランク（マンテル・コックス）法により計算した。

【0166】

[00183] LNA－ISH分析に関して、平均およびSDはInstatソフトウェアを用いることにより計算され、有意性はInstatによるスチューデントのt検定により決定された。

【0167】

[00184] 本発明は様々な態様に関連して記述されてきたが、当業者は、本発明の本質的な範囲から逸脱することなく様々な変更を行ってよく、その要素の代わりに均等物を用いてよいことを理解するべきである。加えて、特定の状況または材料を本発明の教示に適合させるために、その本質的な範囲から逸脱することなく多くの修正を行うことができる。従って、本発明は本明細書で開示されたこの発明を実施するために熟慮された特定の態様に限定されるのではなく、本発明には特許請求の範囲内に入る全ての態様が含まれるであろうことが意図されている。

【図 1】

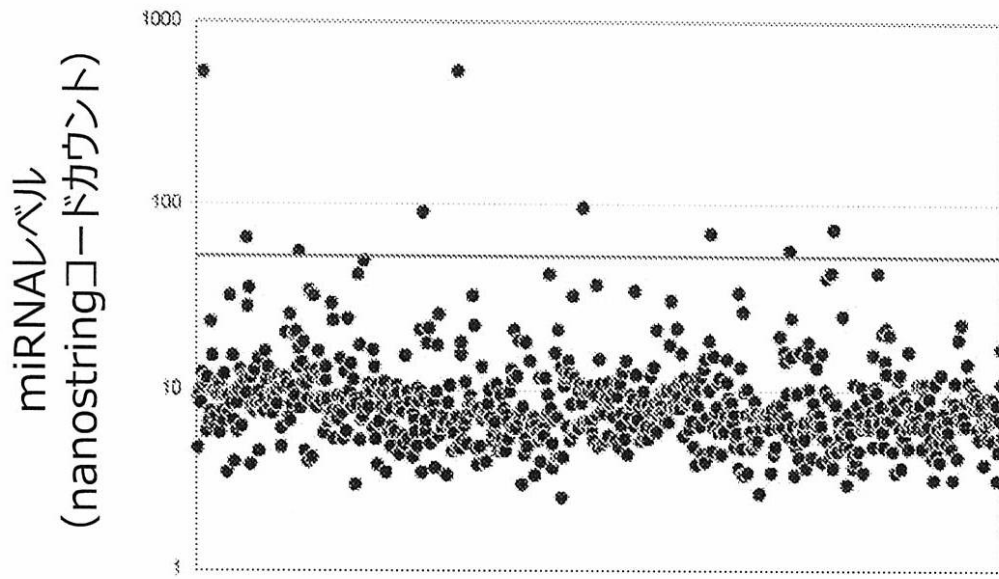


Fig. 1A

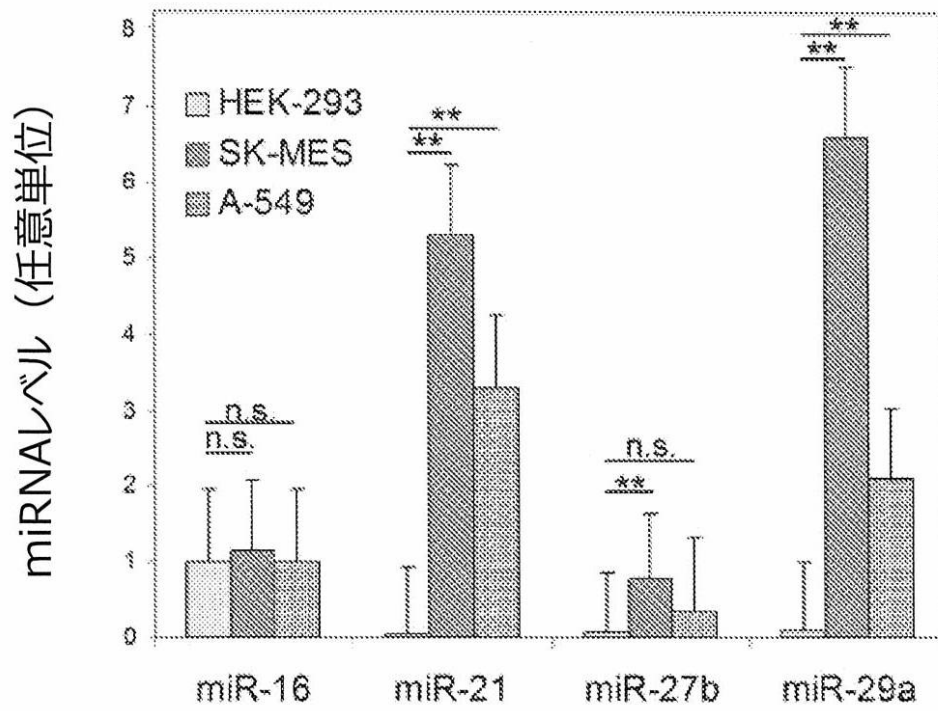


Fig. 1B

【図 2 - 1】

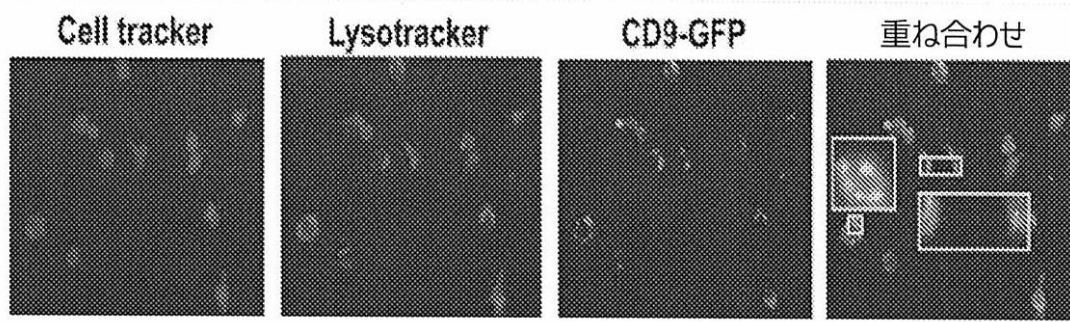


Fig. 2A

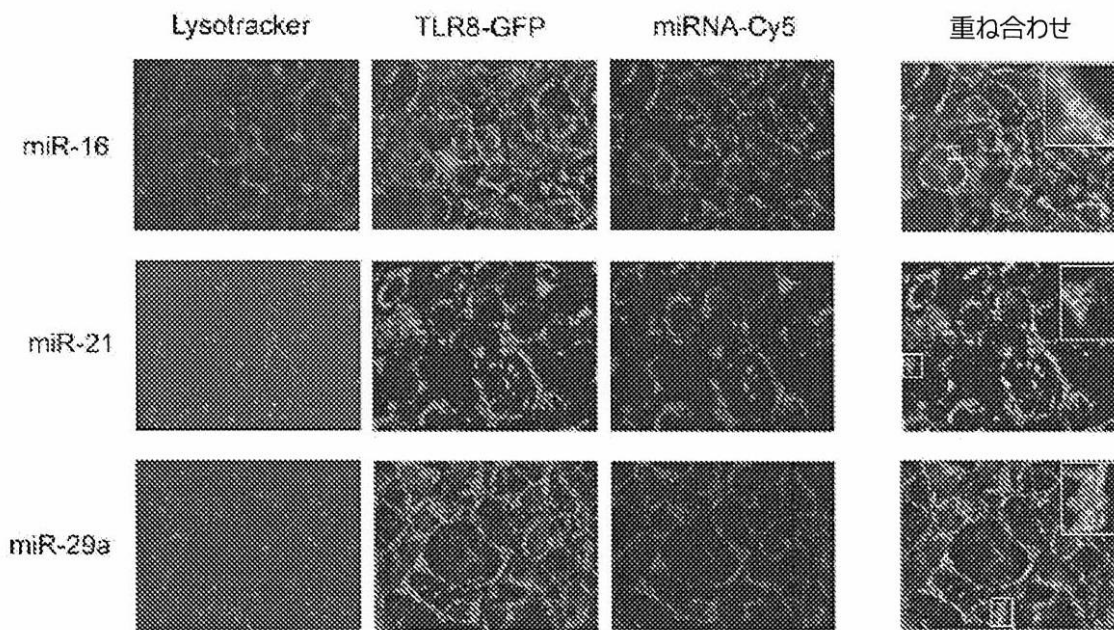


Fig. 2B

【図 2 - 2】

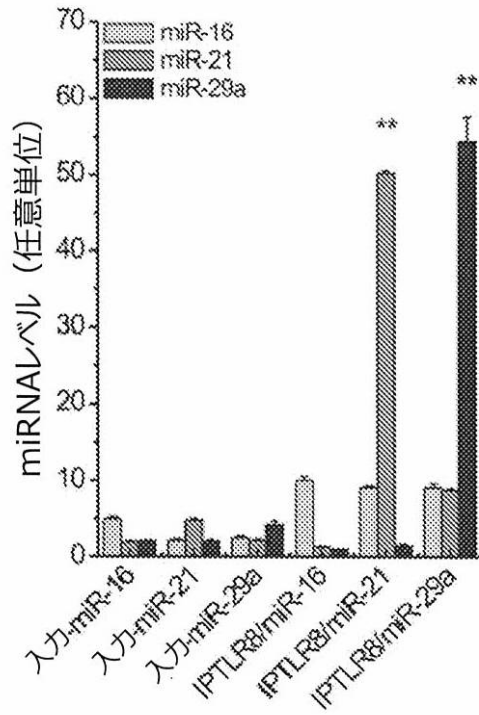


Fig. 2C

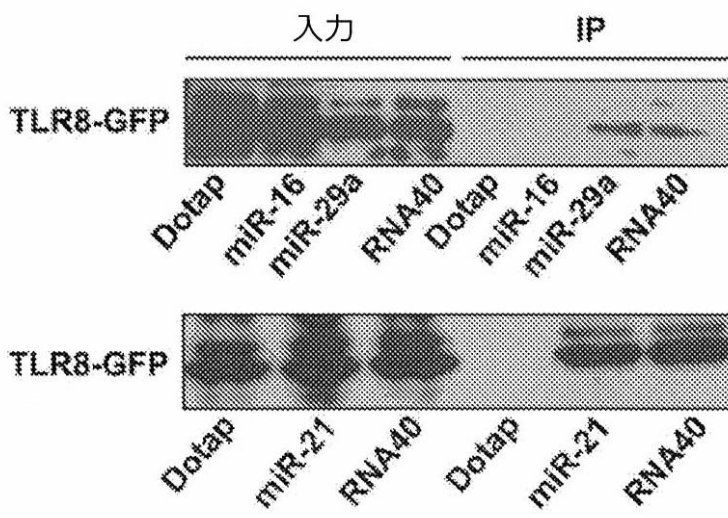


Fig. 2D

【図 2 - 3】

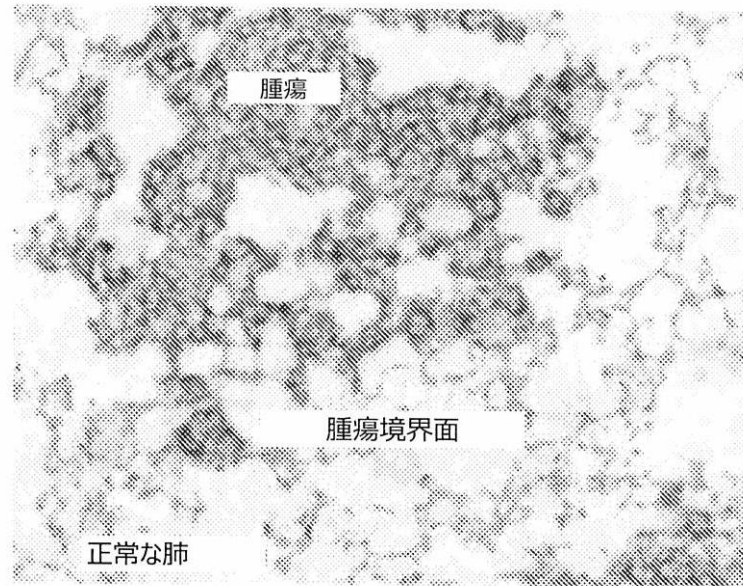
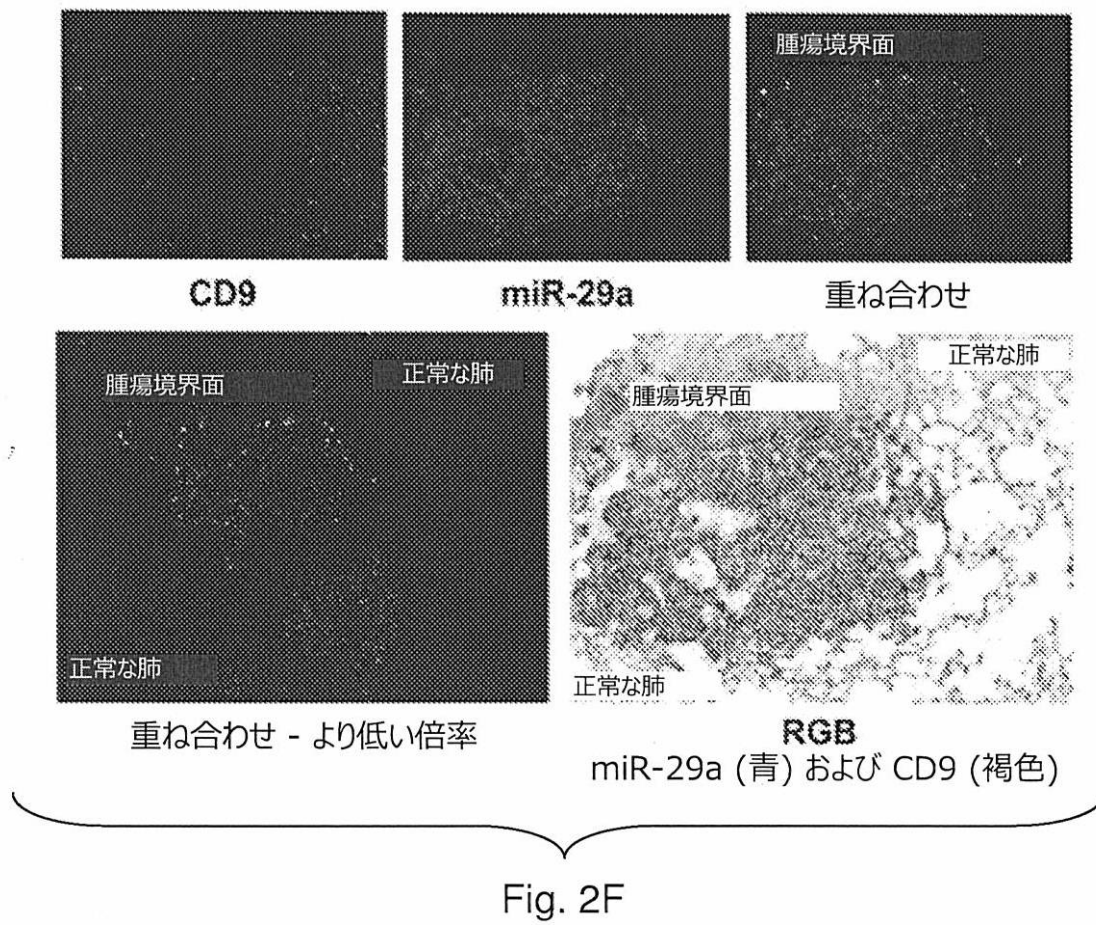


Fig. 2E



【図 3 - 1】

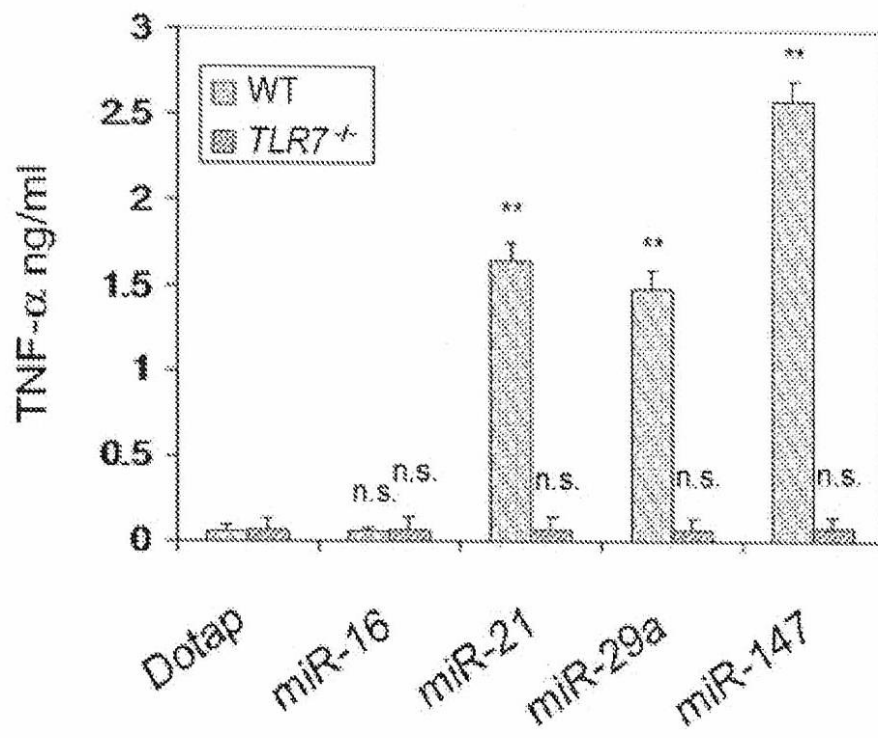


Fig. 3A

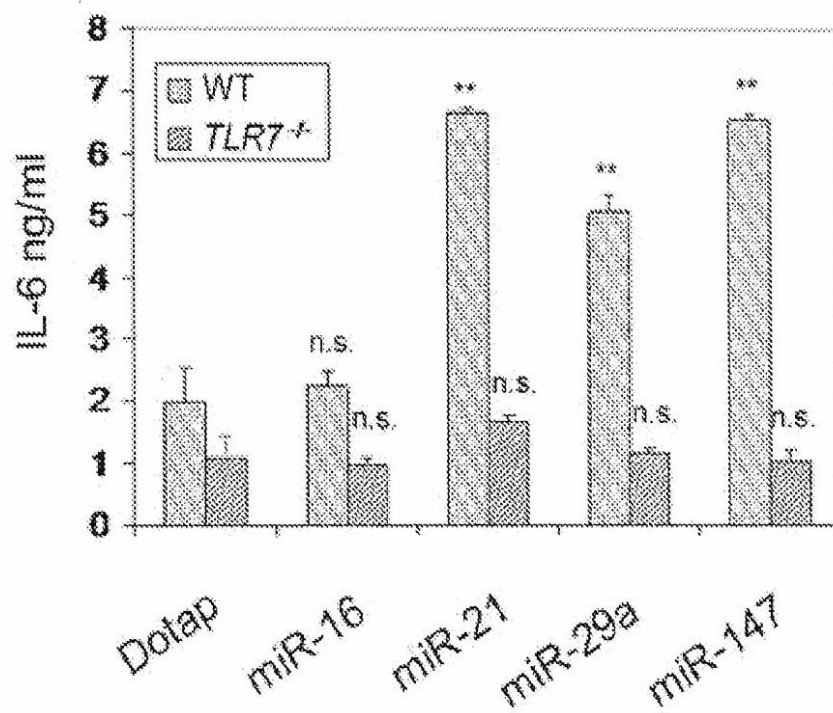


Fig. 3B

【図 3 - 2】

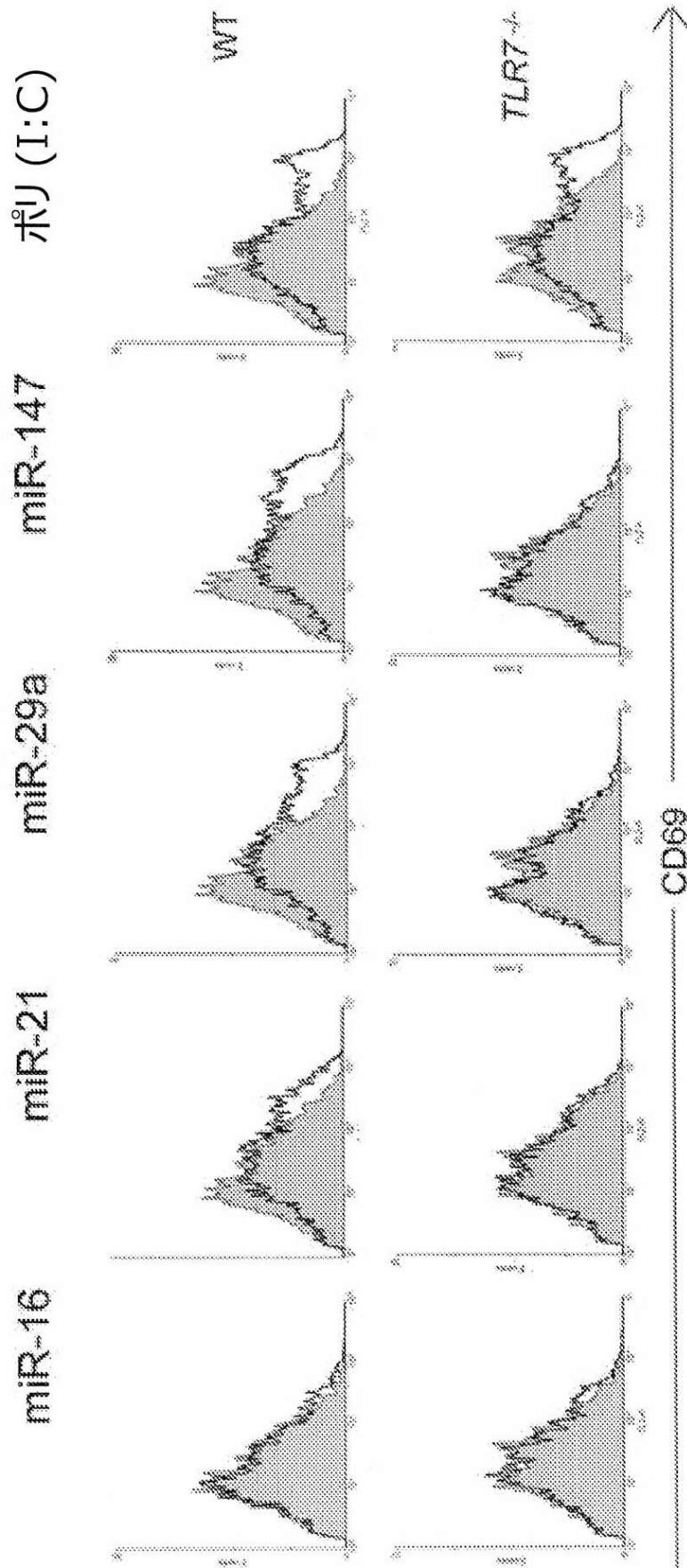


Fig. 3C

【図 3 - 3】

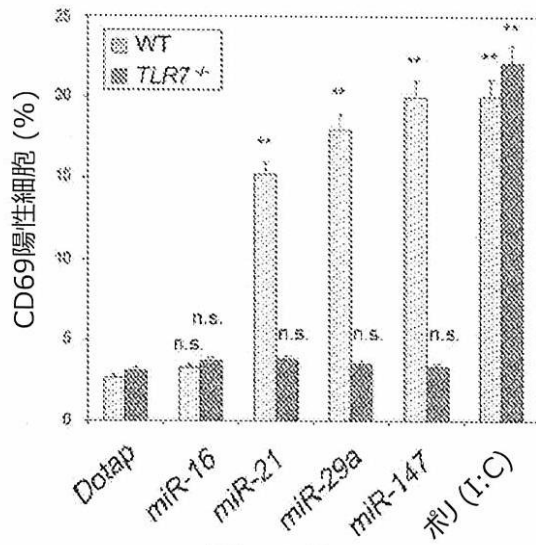


Fig. 3D

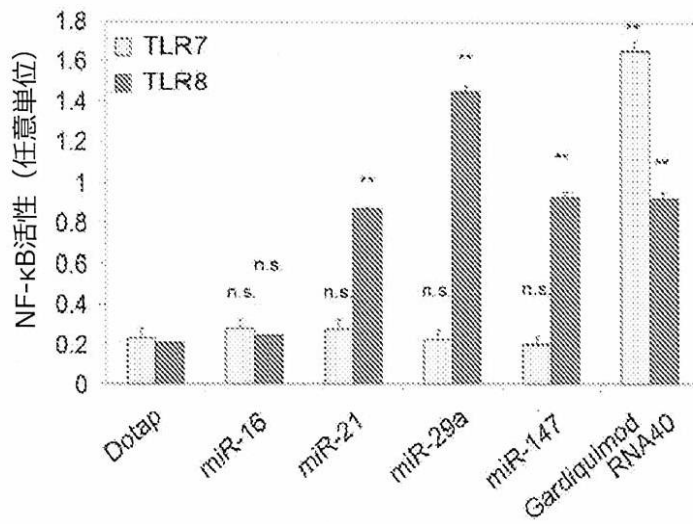


Fig. 3E

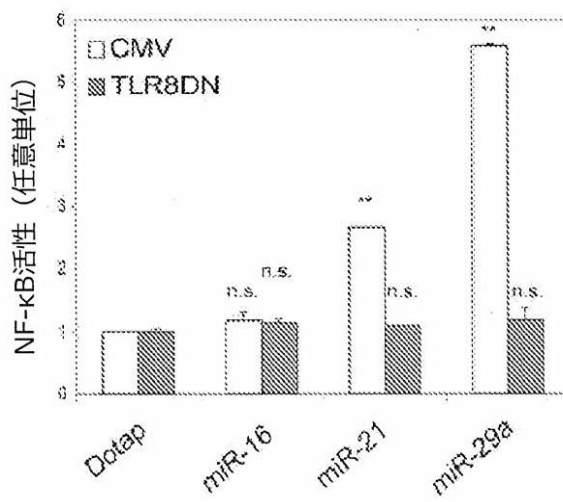


Fig. 3F

【図 3 - 4】

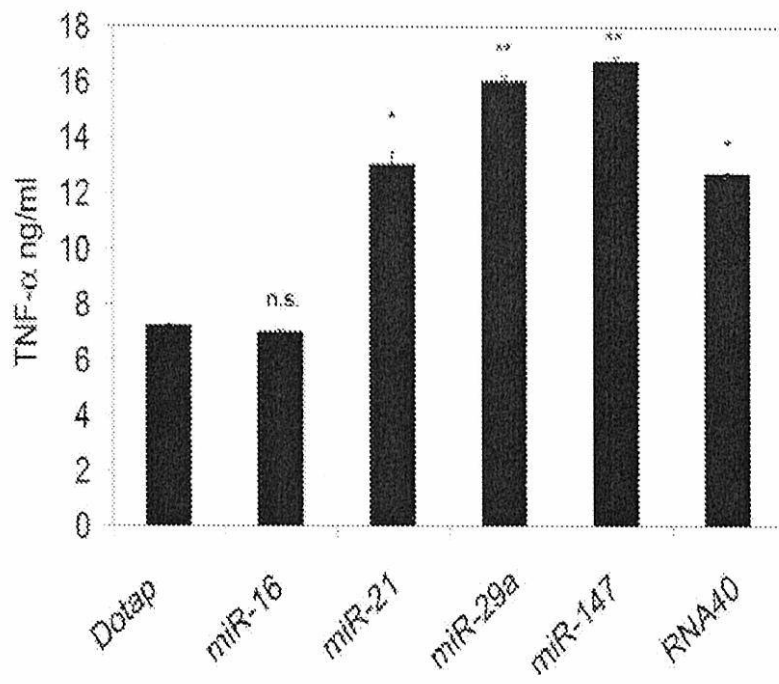


Fig. 3G

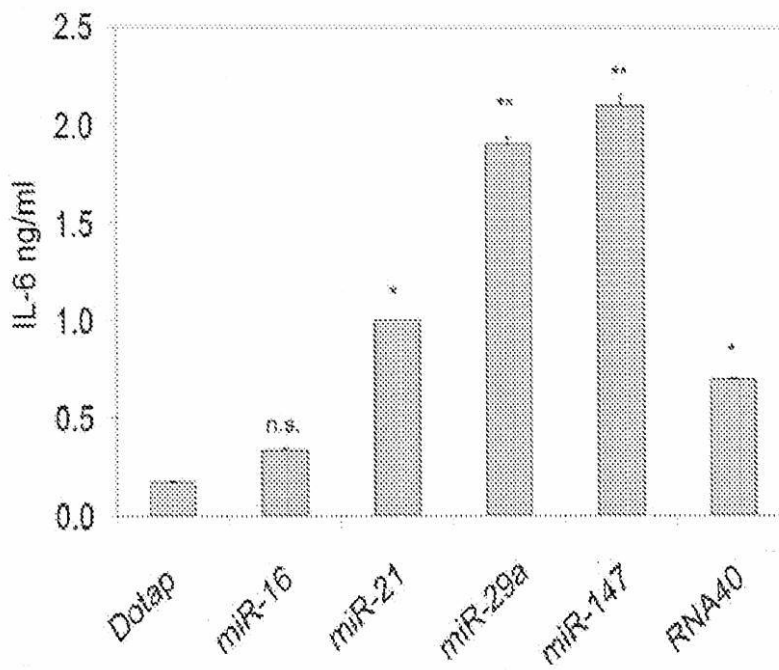


Fig. 3H

【図 3 - 5】

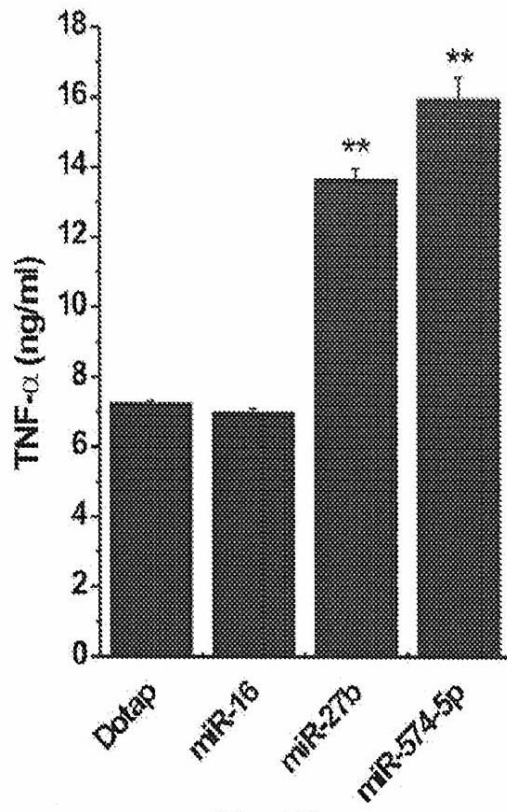


Fig. 3I

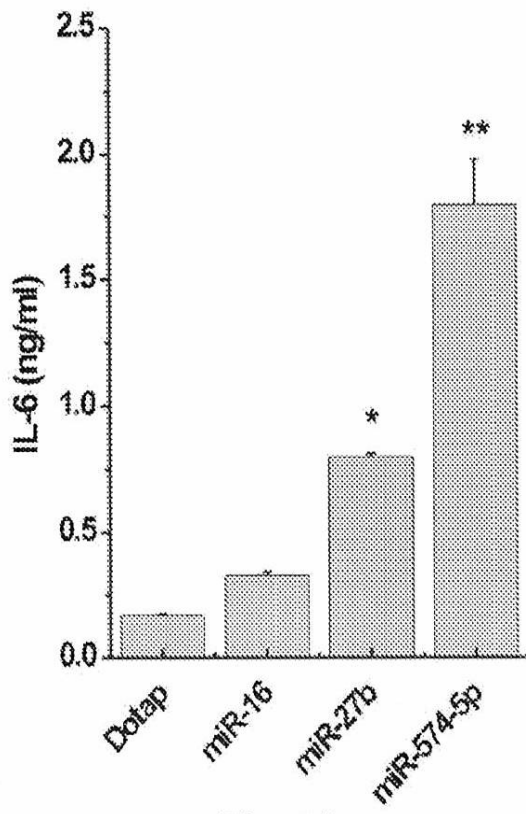


Fig. 3J

【図 4 - 1】

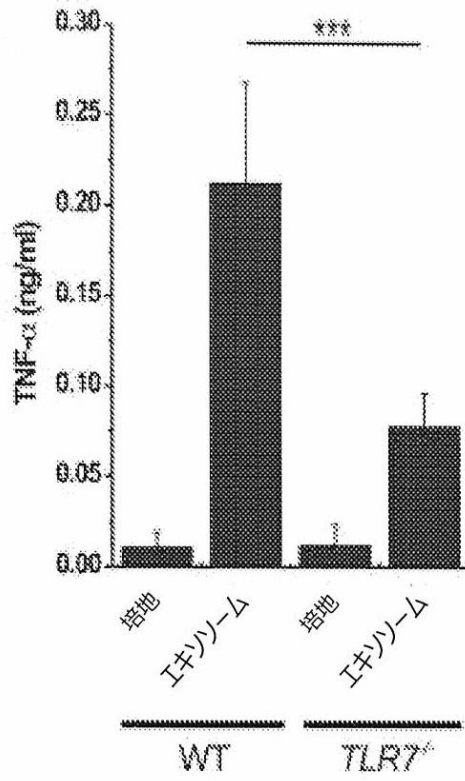


Fig. 4A

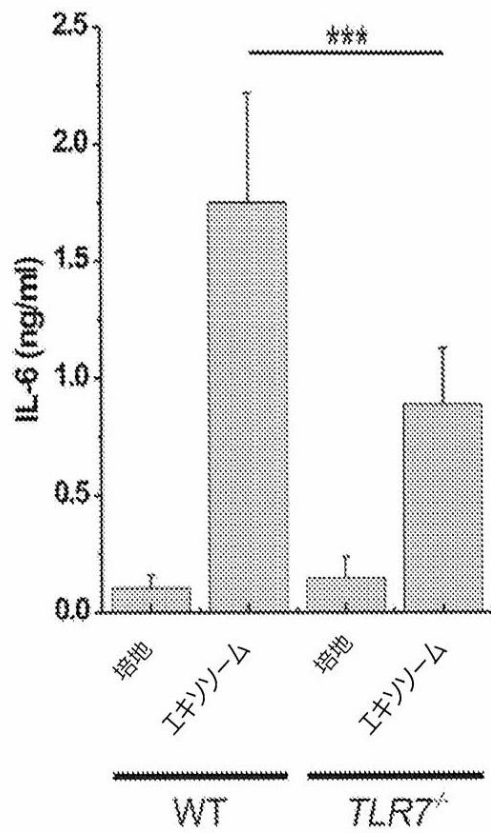


Fig. 4B

【図 4 - 2】

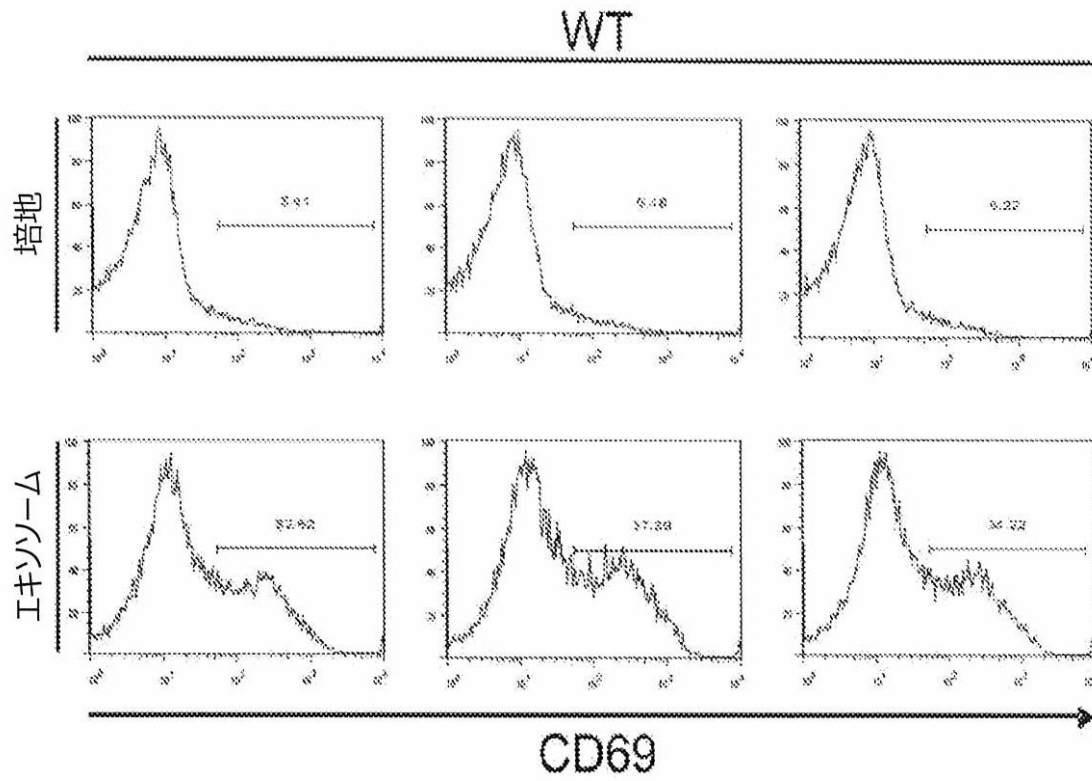


Fig. 4C

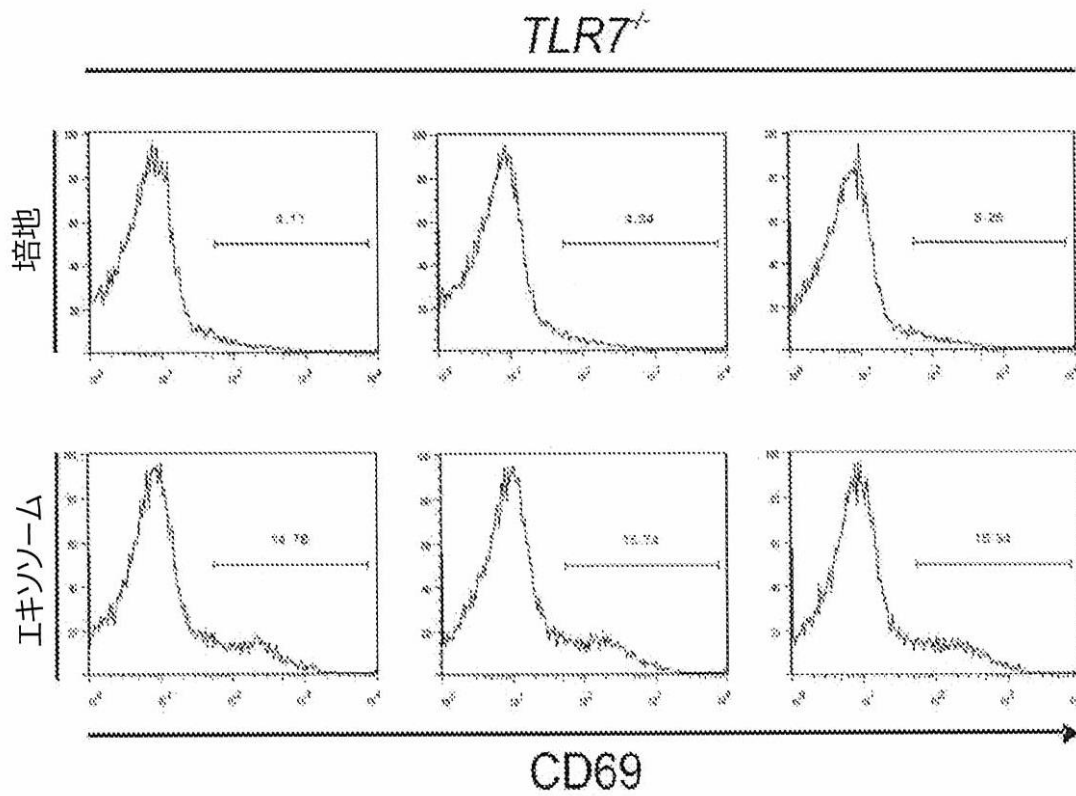


Fig. 4D

【図 4 - 3】

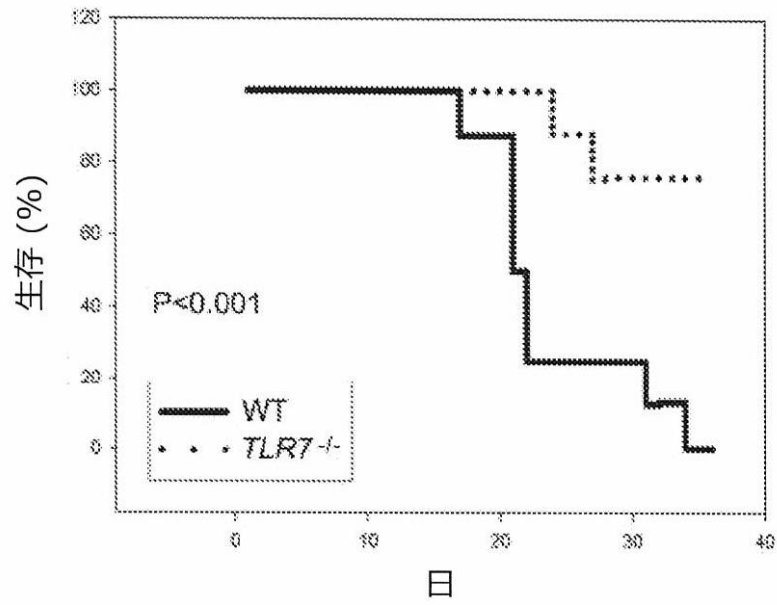


Fig. 4E

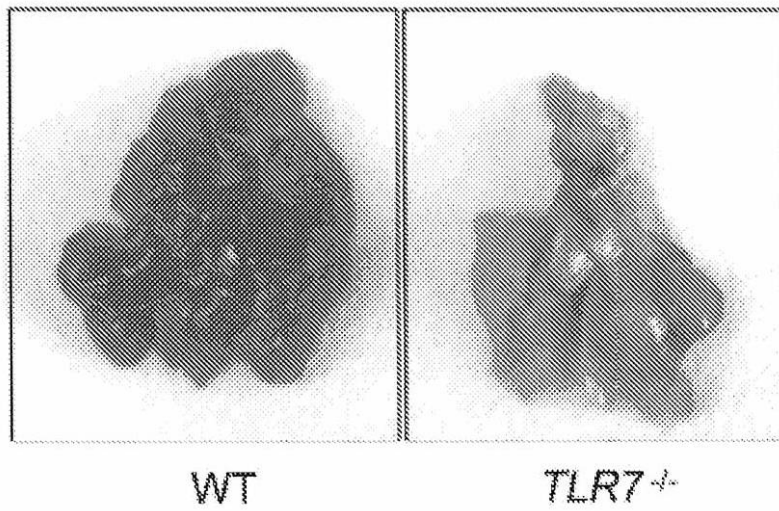


Fig. 4F

【図 4 - 4】

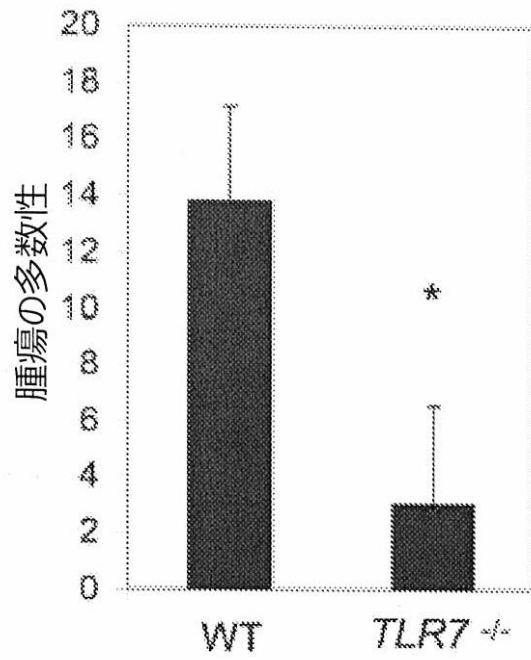


Fig. 4G

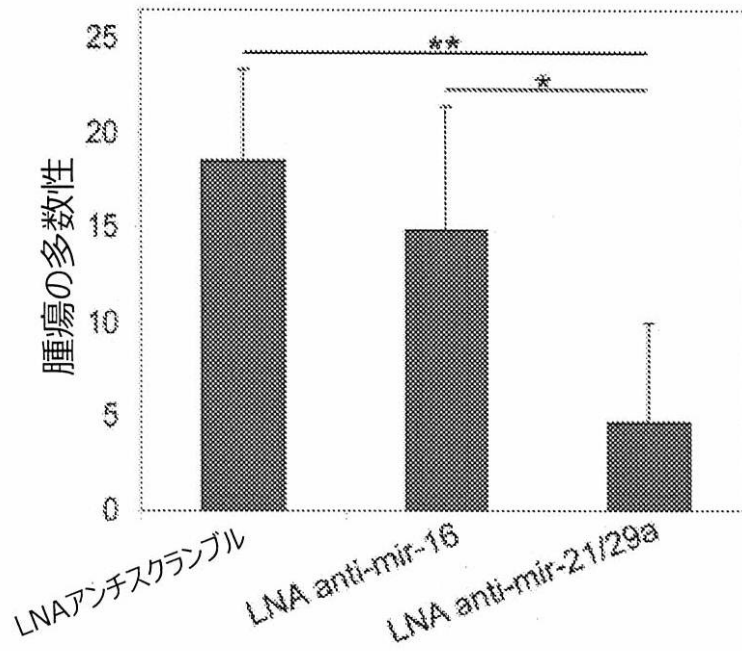


Fig. 4H

【図 4 - 5】

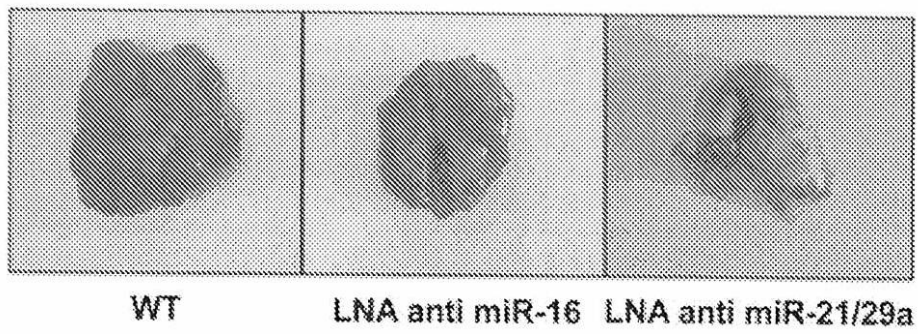


Fig. 4I

【図 5】

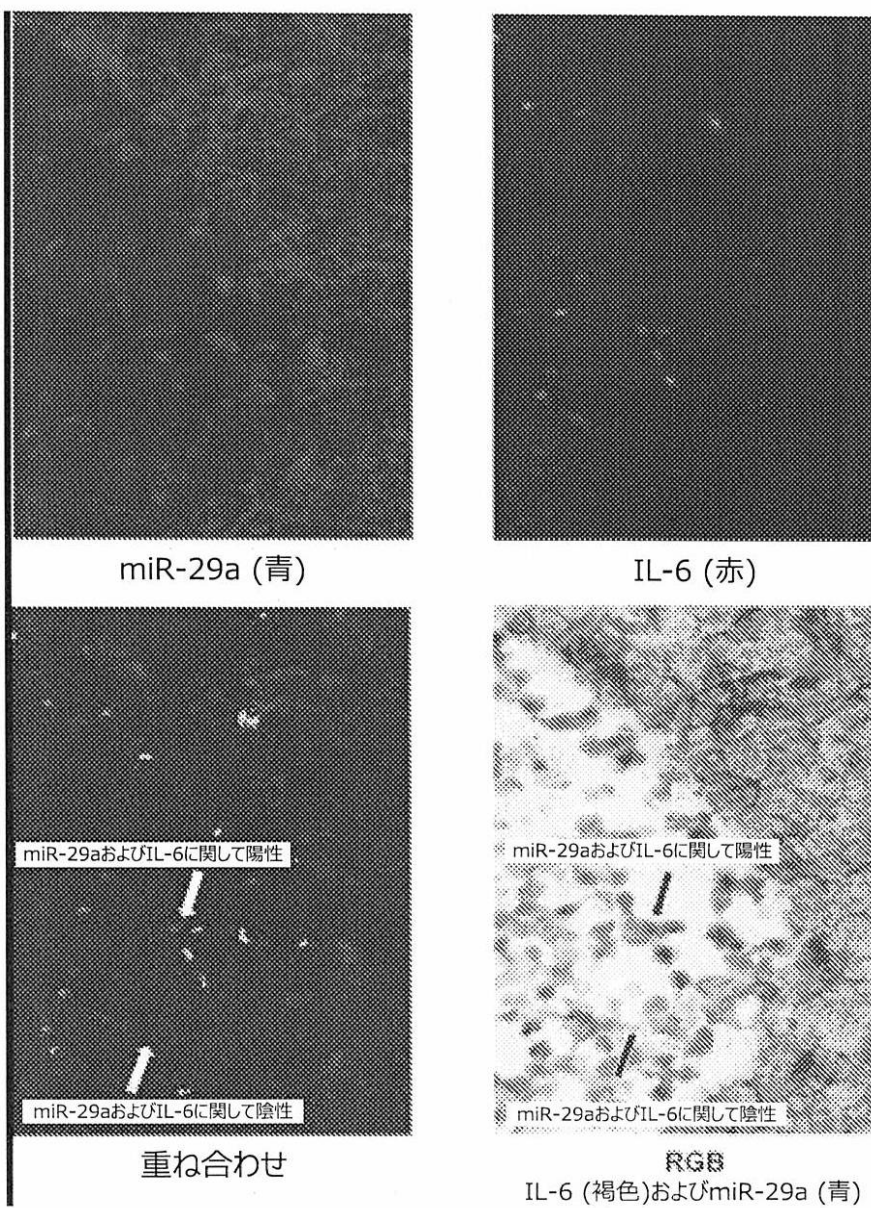


Fig. 5

【図 6 - 1】

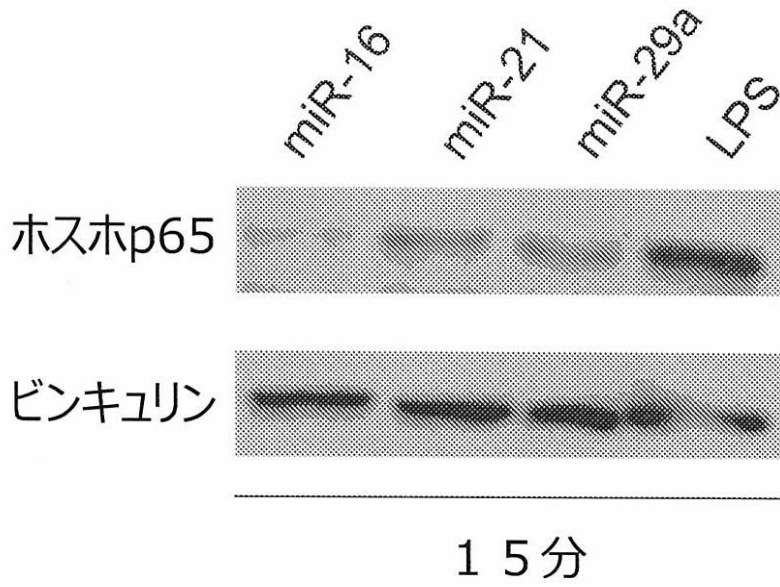


Fig. 6A

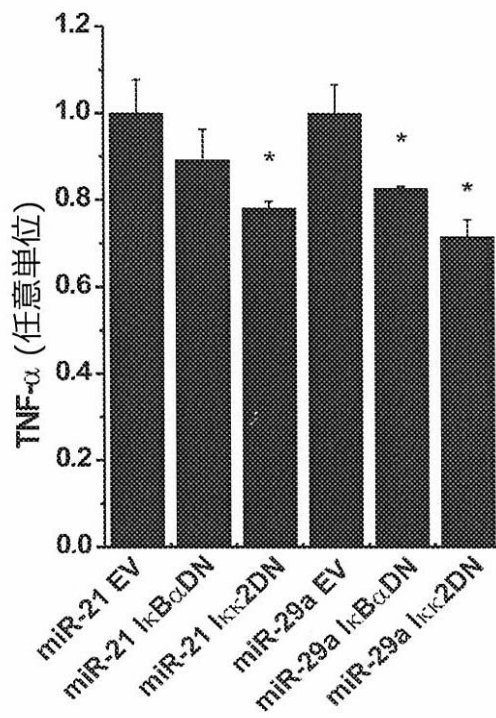


Fig. 6B

【図 6 - 2】

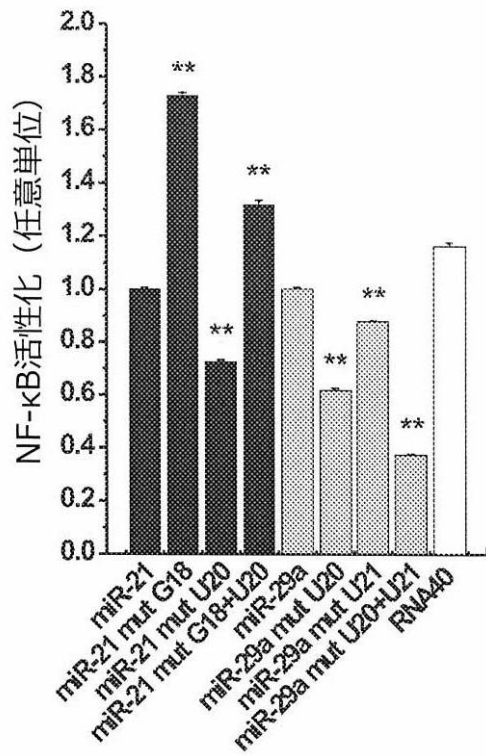


Fig. 6C

【図 7 - 1】

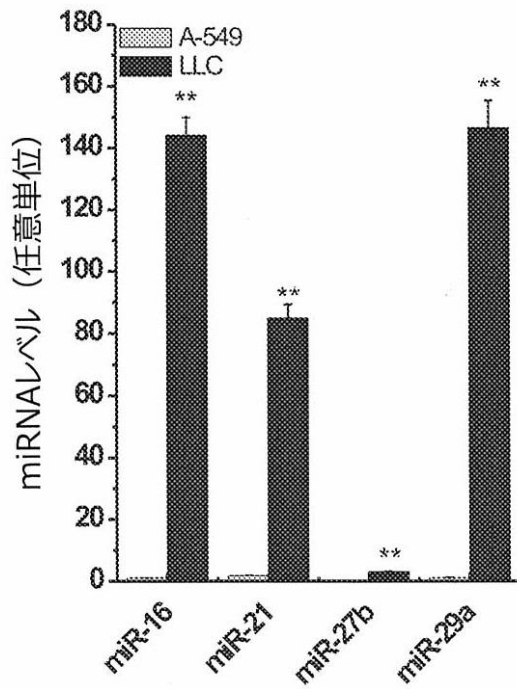


Fig. 7A

【図 7 - 2】

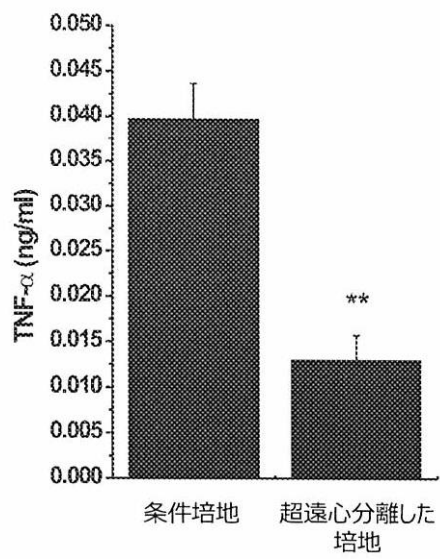


Fig. 7B

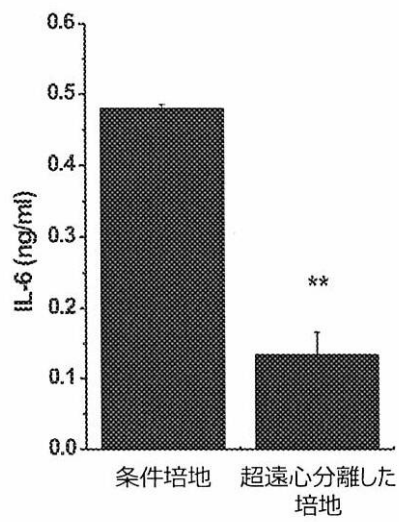


Fig. 7C

【図 7 - 3】

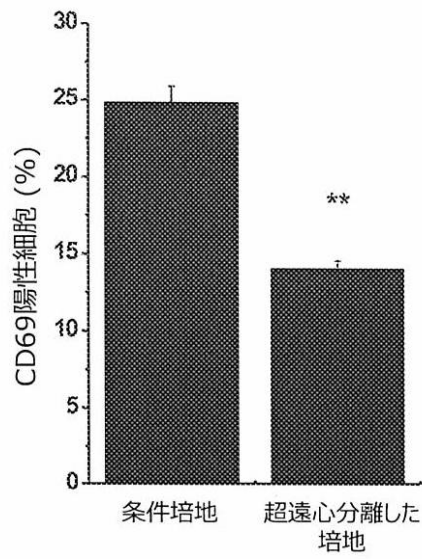


Fig. 7D

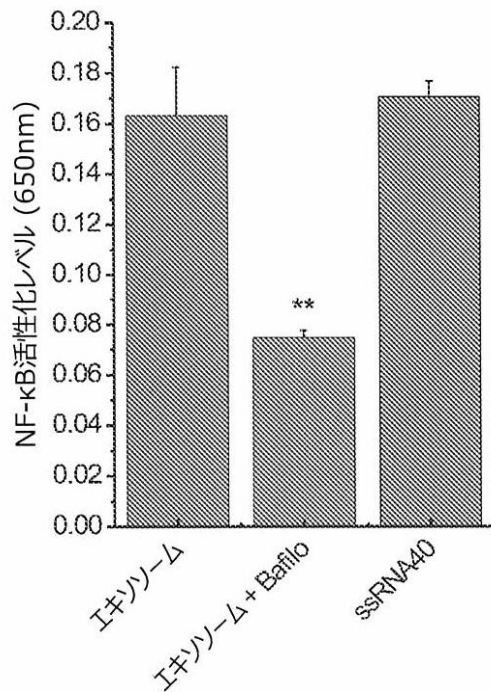


Fig. 7E

【図 7 - 4】

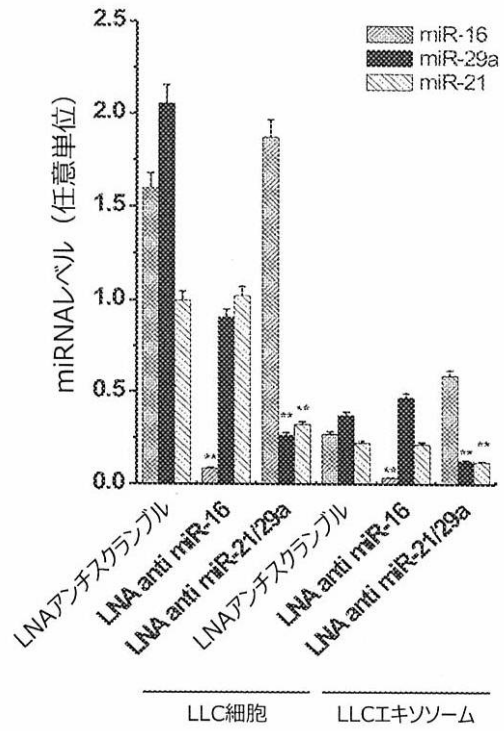


Fig. 7F

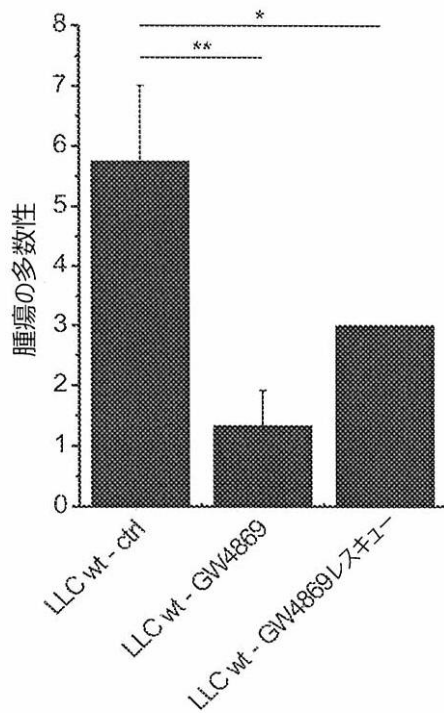


Fig. 7G

【図 8】

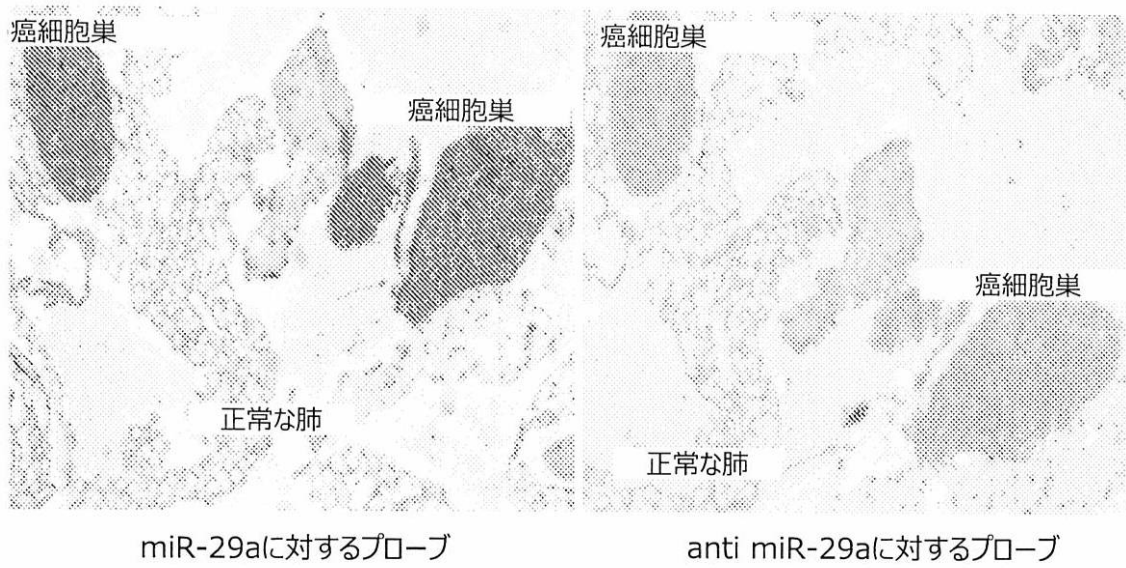


Fig. 8

【図 9 - 1】

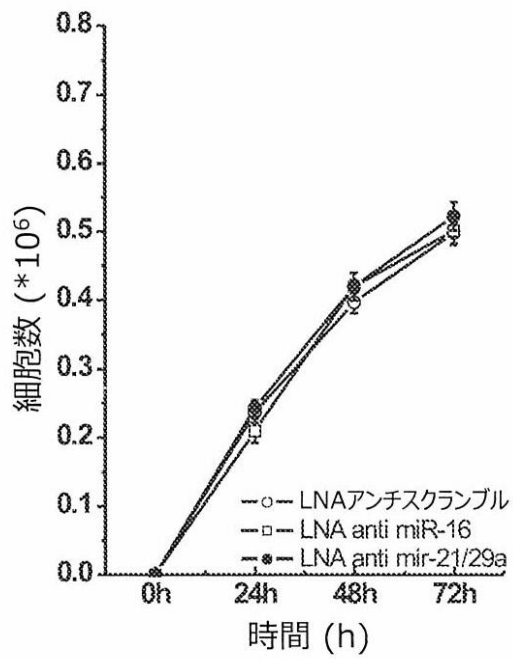


Fig. 9A

【図 9 - 2】

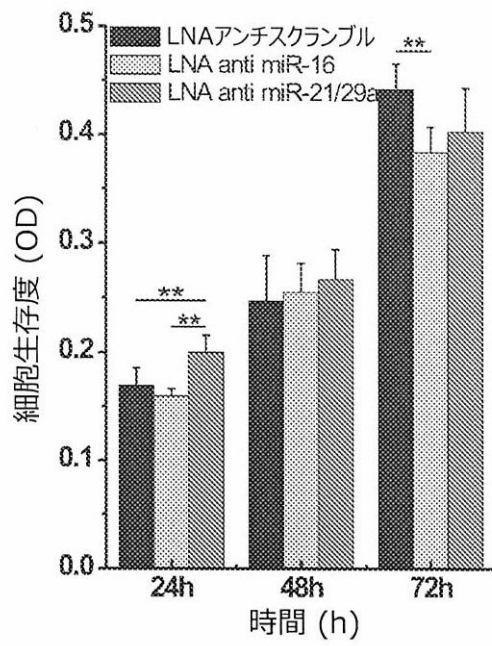


Fig. 9B

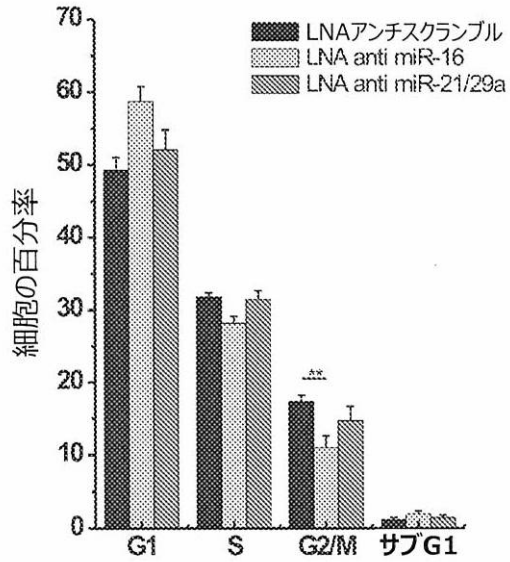


Fig. 9C

【図 9 - 3】

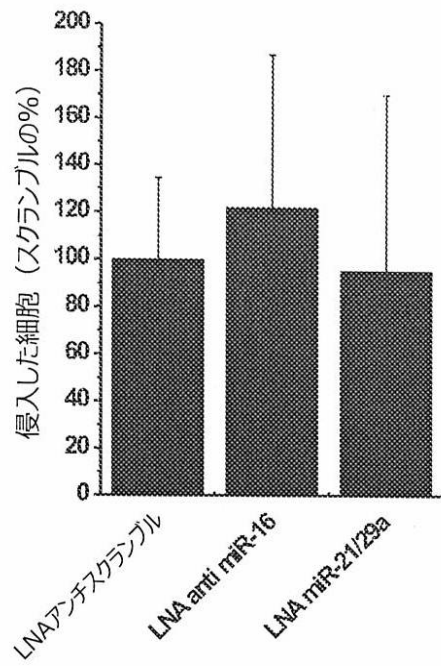


Fig. 9D

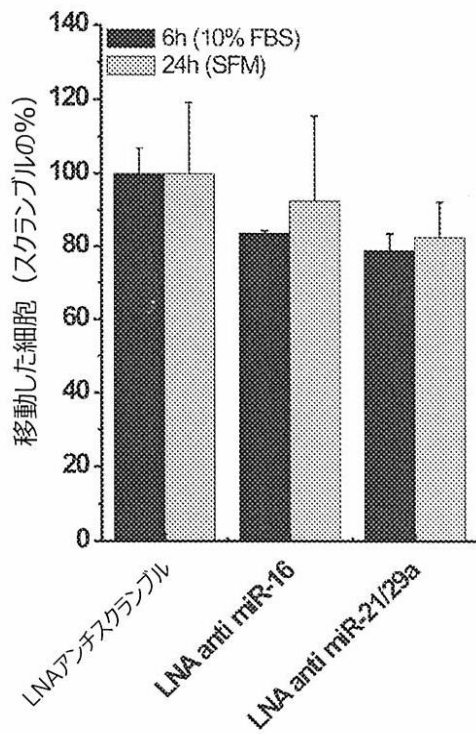


Fig. 9E

【図 9 - 4】

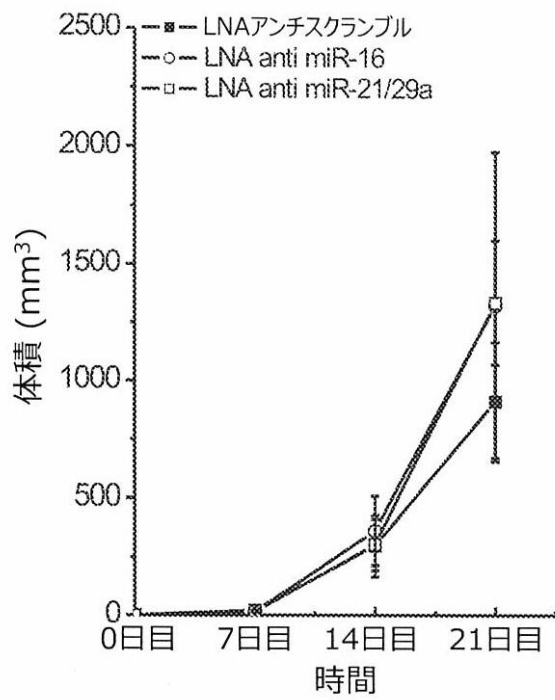


Fig. 9F

【図 10】

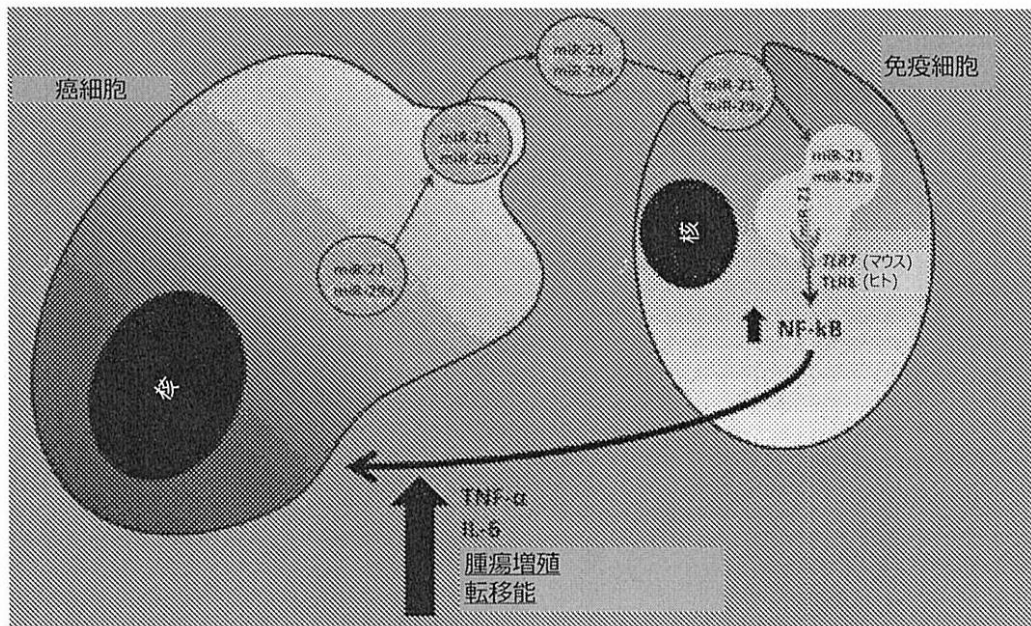


Fig. 10

【図 11】

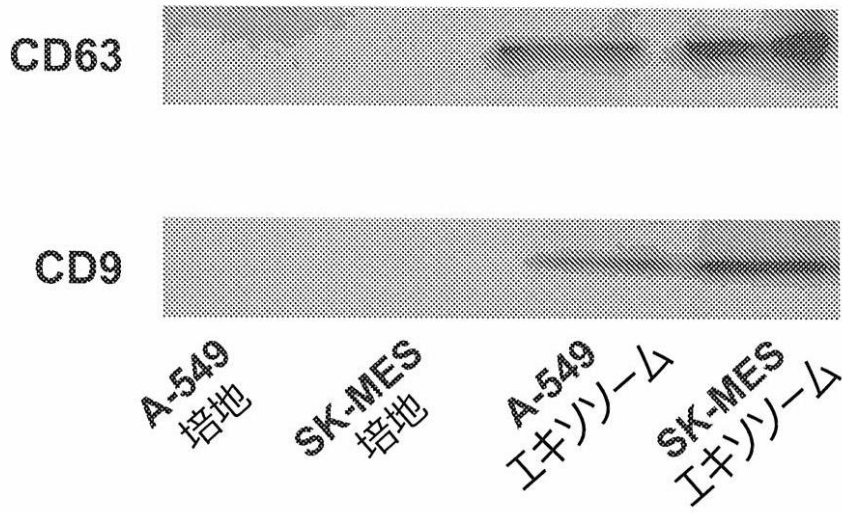


Fig. 11A

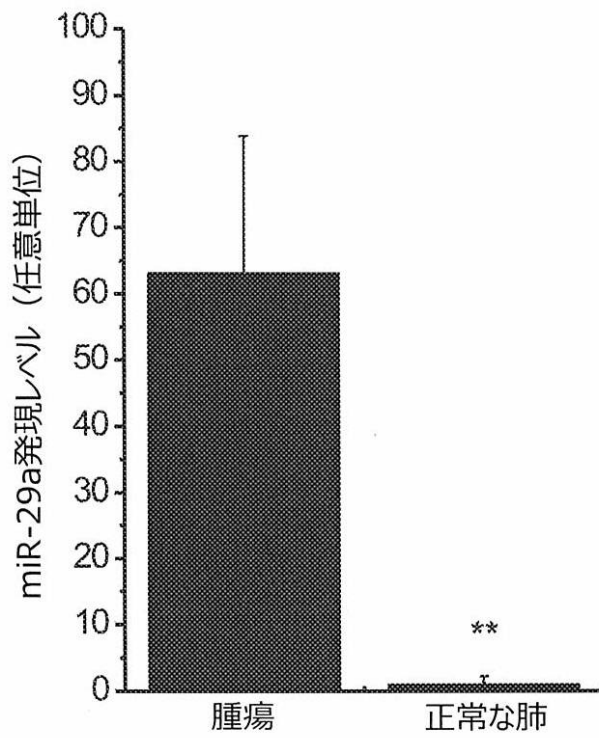
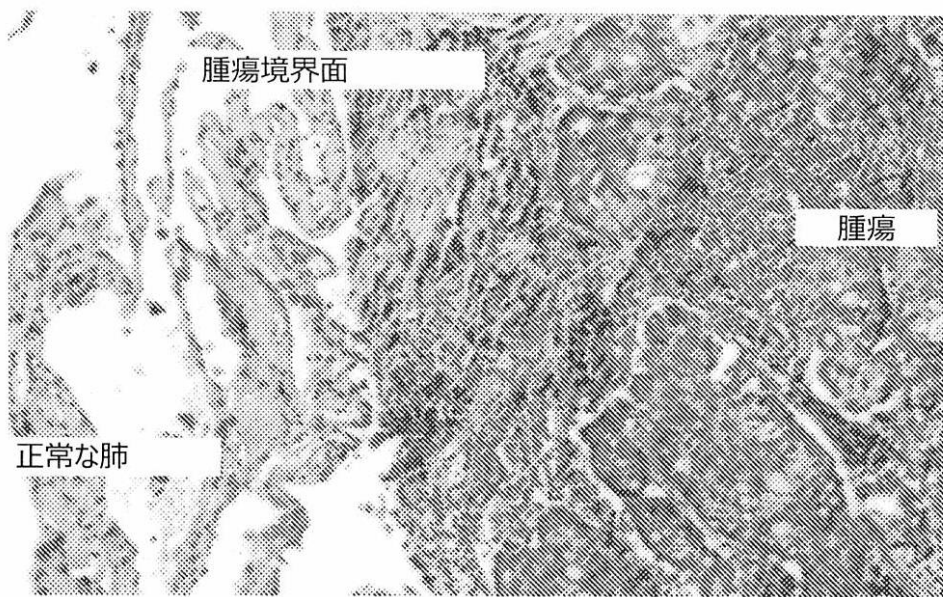


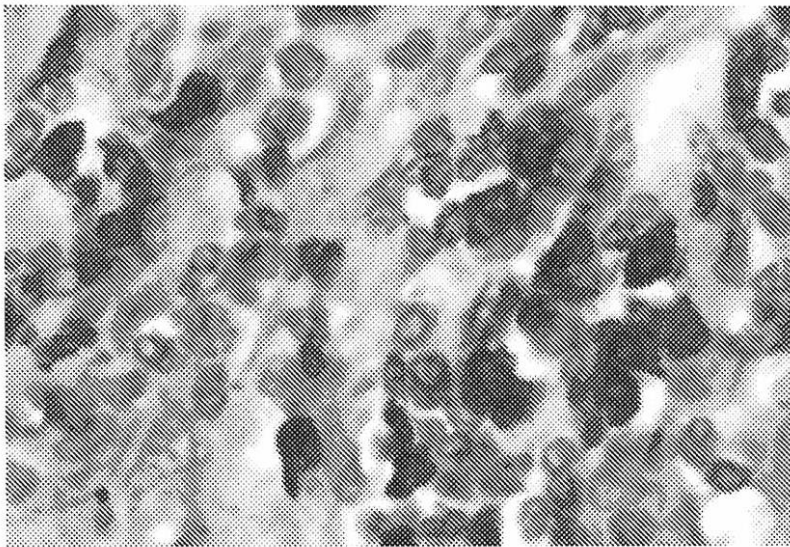
Fig. 11B

【図 1 2】



CD9 (赤)

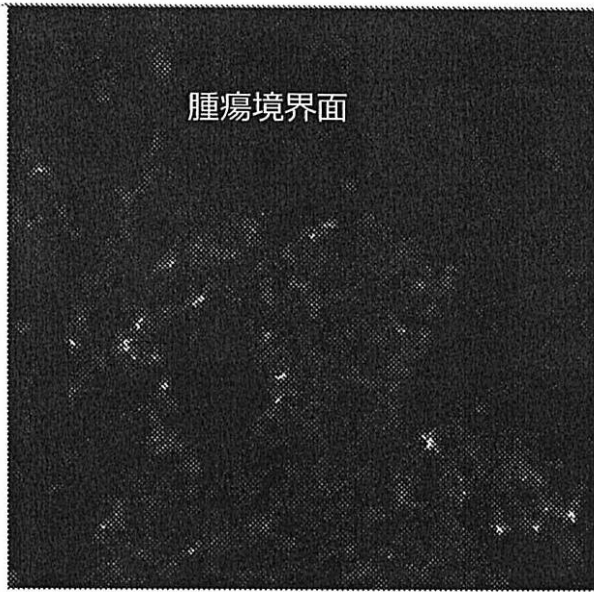
Fig. 12A



マクロファージ中のCD9(赤)の分布、
より高い倍率

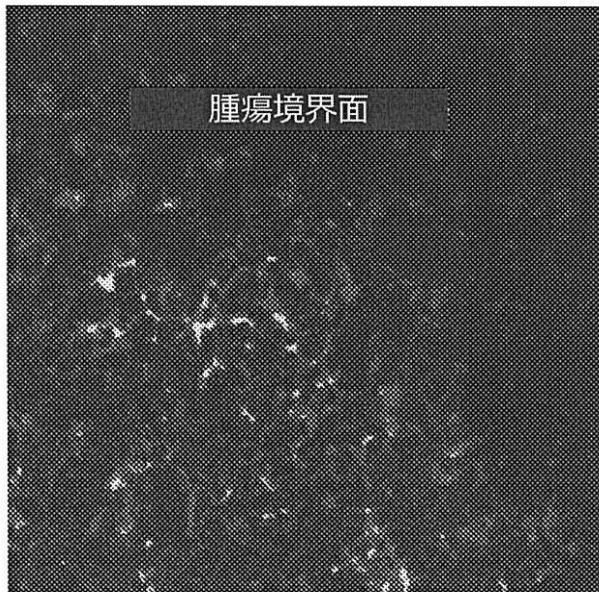
Fig. 12B

【図 13 - 1】



Naunceで変換された
miR-29a (青) および F-11 (緑)

Fig. 13A



Naunceで変換された
サイトケラチン(赤) および miR-29a (青)

Fig. 13B

【図 13 - 2】



Nauncceで変換された
TLR7 (緑) および miR-29a (青)

Fig. 13C

[illegible]

Fig. 14A

miRNAs	配列
miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-21 G18 改变	UAGCUUAUCAGACUGAUUUUGA
miR-21 U20 改变	UAGCUUAUCAGACUGAUGUGGA
miR-21 G18+U20 改变	UAGCUUAUCAGACUGAUUUUGGA
miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
miR-29a U20 改变	UAGCACCAUCUGAAAUCGGGUA
miR-29a U21 改变	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUCA
miR-29a U20+U21 改变	UAGCACCAUCUGAAAUCGGGCA

Fig. 14B

【配列表】

2015501843000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/69484

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 48/00, C07H 21/02, C12N 5/00 (2013.01)

USPC - 514/44R

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)

USPC: 514/44R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 536/23.1, 435/375 (keyword limited; terms below)

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

PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), PatBase, Google Patents/Scholar

Search Terms Used: MIR-21, miR-29a, locked nucleic acid, antisense, cancer, TLR, metastasis, inflammation, exosome

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2011/0251150 A2 (Bennett, et al.) 13 October 2011 (13.10.2011) para [0007], [0045], [0051], [0055]-[0057], [0178], [0217], [0314]-[0315], [0386]-[0387]	1-3, 5, 12-14, 16, 22-24, 26 ----- 4, 6-11, 15, 18-19, 21, 25, 28-31, 41
X — Y	US 2009/0176723 A1 (Brown, et al.) 09 July 2009 (09.07.2009) para [0006], [0100], [0155], [0286], claim 83	37-39, 61 ----- 40-41
X — Y	US 2010/0004320 A1 (Elmen, et al.) 07 January 2010 (07.01.2010) para [0021]-[0022], [0031]-[0032], [0109], [0294]	27 ----- 28-31
X — Y	US 2011/0021601 A1 (Park, et al.) 27 January 2011 (27.01.2011) para [0004]-[0005], [0015], [0020], [0023], [0035]-[0036]	32-34, 36 ----- 35
Y	Zhou, et al. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. Nucleic Acid Research 2010, 38:3222-3232; abstract, pg 3225, col 1, para 1, Table 1, Figs. 2-3, pg 3229, col 2, para 2	6-11
Y	US 2011/0275534 A1 (Cohn, et al.) 10 November 2011 (10.11.2011) para [0010], [0036], [0049], [0093], [0096], [0104]	17-21, 63

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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

11 April 2013 (11.04.2013)

Date of mailing of the international search report

29 APR 2013

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/69484

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ma, et al. MicroRNAs in NF- κ B signaling. J Mol Cell Biol April 2011, 3:159-166; pg 159, col 1, para 1, pg 162, col 1, para 3	17-21
Y	Resnick, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. Gynecologic Oncology 2009, 112:55-59; abstract, pg 55, col 1, para 1	63
Y	US 2010/0151480 A1 (Taylor, et al.) 17 June 2010 (17.06.2010) para [0011], [0017], [0054]	4, 9, 15, 20, 25, 35, 40
Y	US 2006/0116321 A1 (Robbins, et al.) 01 June 2006 (01.06.2006) para [0017], [0020], [0093]	4, 9, 15, 20, 25, 35, 40
Y	US 2010/0041734 A1 (Kandimalla, et al.) 18 February 2010 (18.02.2010) para [0007], [0022], [0035], [0050]	11
A	Asangani, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. Oncogene 2008, 27:2128-2136	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/69484

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 62
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I: claims 1-41, 61, 63, drawn to a method to inhibit metastasis of at least one cancer cell, comprising decreasing the levels of miR-21 and/or miR-29a in at least one cancer cell and inhibiting metastasis.

Group II: claims 42-61, 64-66, drawn to a method of diagnosing risk of cancer metastasis in a subject, comprising:

- a. identifying the relative miR-21 and miR-29a expression compared to control, and
- b. diagnosing increased risk of cancer metastasis in the subject if the subject has increased miR-21 and miR-29a expression compared to control, or
- c. diagnosing no increased risk of cancer metastasis in the subject if the subject does not have increased miR-21 and miR-29a expression compared to control.

- Please see extra sheet for Observations where unity of invention is lacking -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-41, 61, 63

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/69484

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

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

The inventions of Group I do not include the inventive concept of a method of diagnosing risk of cancer metastasis in a subject, as required by Group II.

The inventions of Groups I and II share the technical feature of decreasing the levels of miR-21 and/or miR-29a in at least one cancer cell and inhibiting metastasis. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by the article entitled 'MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer' by Asangani et al. (hereinafter 'Asangani') (Oncogene vol 27 pg 2128-2136, 2008). Asangani teaches a method to inhibit metastasis of at least one cancer cell, comprising decreasing the level of miR-21 in at least one cancer cell and inhibiting metastasis (abstract, Anti-miR-21-transfected RKO cells showed an increase of Pdc4-protein and reduced invasion. Moreover, these cells showed reduced intra-vasation and lung metastasis in a chicken?embryo?metastasis assay, pg 2131, col 2, para 2, Fig. 5b). As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

The inventions of Groups I and II further share the technical feature of miR-21 and/or miR29 in exosomes associated with cancer. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2010/0151480 A1 to Taylor et al. (hereinafter 'Taylor'). Taylor discloses a method for diagnosing a cancer in a subject comprising providing a biological sample from a subject; isolating cancer-derived exosomes comprising miR-21 from the biological sample; determining an amount of miR-21; and comparing the amount of miR-21 to control levels (para [0011] and [0017]). As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74)代理人 100128750
弁理士 廣瀬 しのぶ

(74)代理人 100198018
弁理士 石川 絵理

(72)発明者 クローセ, カーロ・エム
アメリカ合衆国オハイオ州43221, コロンバス, ケンブリッジ・ブルバード 2140

(72)発明者 ファップリ, ミュラー
アメリカ合衆国カリフォルニア州90039, ロサンゼルス, グリフィス・パーク・ブルバード
2018, アpartment 210

Fターム(参考) 4C084 AA13 AA17 AA20 NA05 NA14 ZB261 ZB262
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

专利名称(译)	miR-21和miR-29a的方法和组合物，外来体抑制和癌症转移		
公开(公告)号	JP2015501843A	公开(公告)日	2015-01-19
申请号	JP2014547416	申请日	2012-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	俄亥俄州立大学创新基金		
申请(专利权)人(译)	俄亥俄州立大学创新基金		
[标]发明人	クローセカーロエム ファブプリミユラー		
发明人	クローセ,カーロ・エム ファブプリ,ミユラー		
IPC分类号	A61K45/00 A61K48/00 A61K31/7105 A61K45/06 A61P35/04 A61P43/00 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A61K48/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C12N15/113 C12N2310/113 C12N2310/3231 C12N2320/31 A61K31/7115 A61K31/7125 A61K45/06 C12N2310/33 C12Q1/6886 C12Q2600/118 C12Q2600/158 C12Q2600/16		
FI分类号	A61K45/00 A61K48/00 A61K31/7105 A61K45/06 A61P35/04 A61P43/00.111 G01N33/53.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	61/569862 2011-12-13 US 61/644980 2012-05-09 US		
其他公开文献	JP2015501843A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供与以下发现相关的材料和方法：肿瘤分泌的miR-21和miR-29a可以通过作为配体结合Tolllike受体家族受体，鼠TLR7和人TLR8在免疫细胞中起作用，触发TLR介导的prometastatic炎症反应，导致肿瘤生长和转移。因此，通过充当TLR的旁分泌激动剂，分泌的miRNA是肿瘤微环境的关键调节剂。miRNA的这种作用机制在肿瘤免疫系统通讯，肿瘤生长和扩散以及癌症治疗中是重要的。

コードカウント コードカウント

miR-133a	528.2	766.3
miR-193a-3p	65.8	107.8
miR-29a	50.3	63.0
miR-21	92.2	173.3
miR-27b	540.3	992.5
miR-16	96.8	145.8
miR-544	70.5	151.0
miR-1283	57.0	110.3
miR-563	74.7	130.8