



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I480043 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：101115482 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 01 日

(51)Int. Cl. : A61K31/7105 (2006.01) A61K31/352 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：蔡英美 TSAI, EING MEI (TW)；謝宗樺 HSIEH, TSUNG HUA (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

JP 2006507841A1 WO 03/074654A2

WO 2008030239A1

Shu Zhang1 et al., "The aryl hydrocarbon receptor as a target for estrogen receptor-negative breast cancer chemotherapy", *Endocrine-Related Cancer* (2009) 16 835-844.

Hyun Mi Kim et al., "CG0006, a novel histone deacetylase inhibitor, induces breast cancer cell death via histone-acetylation and chaperone-disrupting pathways independent of ER status", *Breast Cancer Res Treat* (2011) 130:365-375.

Bruna Barneda-Zahonero et al., "Histone deacetylases and cancer", *MOLECULAR ONCOLOGY* 6 (2012) 579-589.

ALOK CHHABRA et al., "Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis", *ONCOLOGY REPORTS* 18: 953-958, 2007.

Suping Zhang et al., "ROR1 Is Expressed in Human Breast Cancer and Associated with Enhanced Tumor-Cell Growth", *PLOS ONE* Volume: 7
Published: MAR 5 2012 Page:1-12

Yan Jiang1 et al., "A novel mechanism of cell growth regulation by Cell Cycle and Apoptosis Regulatory Protein (CARP)-1", *Journal of Molecular Signaling* 2010, 5:7 Page:1-12.

Sher Singh et al., "Phthalates: Toxicogenomics and inferred human diseases", *Genomics* 97 (2011) 148-157.

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：13 共 39 頁

(54)名稱

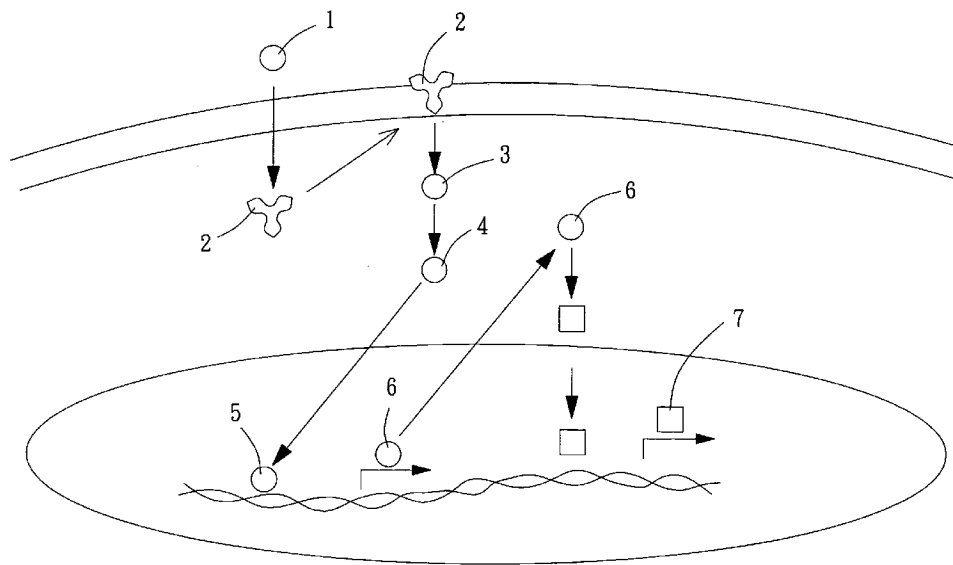
用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物

A MEDICATION FOR PHTHALATES-INDUCED ESTROGEN RECEPTOR-NEGATIVE BREAST CANCER

(57)摘要

本發明係關於一種用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物包含由芳香煙受體抑制劑、芳香煙受體拮抗劑、組蛋白去乙酰化酶6抑制劑、組蛋白去乙酰化酶6拮抗劑、cAMP反應元件結合蛋白抑制劑及蛋白磷酸化激酶抑制劑所組成的群組，係可以改善雌激素受體陰性型乳癌，特別係由塑化劑所引發的乳癌。

The present invention relates to a medication for phthalates-induced estrogen receptor-negative breast cancer comprising composition that is selected from a group of inhibitors of aryl hydrocarbon receptor (AhR), antagonists of AhR, inhibitors of histone deacetylase 6 (HDAC6), antagonists of HDAC6, inhibitors of cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1) and inhibitors of protein kinase A (PKA). The anti-breast-cancer drug of the present invention is sufficient to improving estrogen receptor-negative breast cancers, especially for estrogen receptor-negative breast cancers caused by chemical phthalates.



- 1 . . . 塑化劑
- 2 . . . 芳香煙受體
- 3 . . . 環化磷酸腺苷
- 4 . . . 蛋白磷酸化激酶 A
- 5 . . . cAMP 反應元件結合蛋白
- 6 . . . 組蛋白去乙酰化酶 6
- 7 . . . cMyc 基因

第 1 圖

公告本

發明專利說明書

修正
108年3月19日修正替換本
補充

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101115482

A61K 31/105, 31/352; A61P 35/60.

※申請日：101.5.1

※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物 / A Medication for Phthalates-Induced Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物包含由芳香烴受體抑制劑、芳香烴受體拮抗劑、組蛋白去乙酰化酶 6 抑制劑、組蛋白去乙酰化酶 6 拮抗劑、cAMP 反應元件結合蛋白抑制劑及蛋白磷酸化激酶抑制劑所組成的群組，係可以改善雌激素受體陰性型乳癌，特別係由塑化劑所引發的乳癌。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to a medication for phthalates-induced estrogen receptor-negative breast cancer comprising composition that is selected from a group of inhibitors of aryl hydrocarbon receptor (AhR), antagonists of AhR, inhibitors of histone deacetylase 6 (HDAC6), antagonists of HDAC6, inhibitors of cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1)

and inhibitors of protein kinase A (PKA). The anti-breast-cancer drug of the present invention is sufficient to improving estrogen receptor-negative breast cancers, especially for estrogen receptor-negative breast cancers caused by chemical phthalates.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

- | | | | | |
|---|---------------|---|-----------|---------|
| 1 | 塑化劑 | 2 | 芳香烴受體 | |
| 3 | 環化磷酸腺苷 | 4 | 蛋白磷酸化激酶 A | |
| 5 | cAMP 反應元件結合蛋白 | | | |
| 6 | 組蛋白去乙酰化酶 | 6 | 7 | cMyc 基因 |

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種醫藥組成物，特別是用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌之醫藥組成物。

【先前技術】

乳癌是女性最常見的惡性腫瘤之一，包含雌激素受體陽性型乳癌(estrogen receptor-positive breast cancer)與雌激素受體陰性型乳癌(estrogen receptor-negative breast cancer)，前者癌細胞保留全部或部分的雌激素受體，一旦雌激素(estrogen)與雌激素受體結合，即活化癌細胞內一連串的訊息傳遞路徑，使癌細胞快速地增生或轉移，因此，雌激素受體陽性型乳癌的發生、生長與轉移皆受雌激素的控制與調節；後者癌細胞的雌激素受體係完全喪失或僅保留少數，其生長完全不受雌激素的控制與調節，故預後狀況較差。

乳癌的發病率在已開發國家一向高於開發中國家，其發病原因尚且不明，然習用技術已知乳癌的發生與基因、性別、年齡、雌激素的分泌及環境皆有相關，近年來更有研究指稱長期暴露於塑化劑可提升女性罹患乳癌的風險。

乳癌的習用治療方法包含手術切除、放射線治療、化學治療及荷爾蒙治療，前兩者係屬局部控制，而後兩者則屬全身性的療法，多係依照患者病情或腫瘤分期而選擇單獨或合併使用前述四種治療方法。其中，荷爾蒙治療為

術後常見的輔助性治療，主要係阻斷雌激素與癌細胞的接觸與反應，從而抑制癌細胞生長及繁殖，可減少癌細胞轉移，以避免復發，為治療雌激素受體陽性型乳癌的第一線療法。

然而，前述之習用治療方法對於雌激素受體陰性型乳癌的治療卻成效不彰，特別係由塑化劑引發的乳癌。直至目前，塑化劑致乳癌的致癌機轉仍未臻明朗，因此，在治療上困難重重，往往造成預後不良、易復發及高致死率等問題，因而有必要針對雌激素受體陰性型乳癌，特別係由塑化劑引發的乳癌，提供新興的治療手段，以改善乳癌的治療成效。

【發明內容】

本發明之主要目的係提供一種用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，係可以用以改善雌激素受體陰性型乳癌，特別係由塑化劑所引發的乳癌。

本發明之又一目的係提供一種用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，係可以避免雌激素受體陰性型乳癌之轉移與復發。

為達到前述發明目的，本發明所運用之技術手段包含有：

一種用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，係包含由芳香烴受體抑制劑、芳香烴受體拮抗劑、組蛋白去乙酰化酶 6 抑制劑、組蛋白去乙酰化酶 6 拮抗劑、cAMP 反應元件結合蛋白抑制劑及蛋白磷酸化

激酶抑制劑所組成的群組。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該芳香烴受體抑制劑係選自由芳香烴受體之干擾 RNA 及 3', 4'-二甲氧基黃酮所組成的群組。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該組蛋白去乙醯化酶 6 抑制劑係組蛋白去乙醯化酶 6 之干擾 RNA。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該 cAMP 反應元件結合蛋白抑制劑係 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該芳香烴受體之干擾 RNA 包含如 SEQ ID NO: 1 及 2 所示的序列。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該組蛋白去乙醯化酶 6 之干擾 RNA 包含如 SEQ ID NO: 3 及 4 所示的序列。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該組蛋白去乙醯化酶 6 之干擾 RNA 包含如 SEQ ID NO: 5 及 6 所示的序列。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA 包含如 SEQ ID NO: 7 及 8 所示的序列。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型

乳癌的醫藥組成物，其中該用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物更包含醫藥上可接受之載劑。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該載劑係一核酸轉殖試劑。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該芳香烴受體之干擾 RNA 的使用劑量為 1~10 ng/ μ l。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該 3', 4'-二甲氧基黃酮的使用劑量為 1~5 μ M。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該組蛋白去乙酰化酶 6 之干擾 RNA 的使用劑量為 1~10 ng/ μ l。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA 的使用劑量則為 1~10 ng/ μ l。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物為口服劑或注射劑。

【實施方式】

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵和優點能更明確被了解，下文將特舉本發明較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下。

本發明係提供一種用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，包含芳香烴受體抑制劑、芳香烴受體拮抗劑、組蛋白去乙酰化酶 6 抑制劑、組蛋白去乙酰化酶 6 拮抗劑、cAMP 反應元件結合蛋白抑制劑、蛋白磷酸化激酶抑制劑或由前述成分所組成的群組；該用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物可以抑制癌細胞生長、減少癌細胞轉移、改善雌激素受體陰性型乳癌的預後狀況。

請參照第 1 圖所示，為本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物的作用機轉，係參考自本案申請人近期發表的期刊(Hsieh T-H., et al., (2012) Phthalates induce proliferation and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer through the AhR/HDAC6/cMyc signaling pathway. *The FASEB Journal*. 26, 778-787)，環境中的塑化劑(phthalate)¹，如鄰苯二甲酸酯(n-butyl benzyl phthalate; BBP)及鄰苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate; DBP)，可由皮膚或經消化道進入人體，活化芳香烴受體(aryl hydrocarbon receptor; AhR)²，提升該芳香烴受體的細胞膜轉移作用，開啟下游非基因的傳遞路徑，依序活化環化磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate; cAMP)³、蛋白磷酸化激酶 A(protein kinase A; PKA)⁴ 及 cAMP 反應元件結合蛋白(cAMP responsive element binding protein 1; CREB1)⁵，最後該 cAMP 反應元件結合蛋白 5 結合於組蛋白去乙酰化酶 6 的

啟動子(histone deacetylase 6; HDAC6)6，使組蛋白去乙醯化酶 6 大量表現，進而誘發 cMyc 基因 7 的表現，促成癌細胞增生與轉移，前述癌細胞形成之路徑，與雌激素的分泌反應無關。此外，戴奧辛(未繪示)也同樣會活化該芳香烴受體 2，啟動下游環化磷酸腺苷 3/蛋白磷酸化激酶 A4/cAMP 反應元件結合蛋白 5 的訊號傳遞路徑，誘發 cMyc 基因 7 的表現，促成癌細胞增生與轉移。

而本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物即係單獨或合併利用芳香烴受體抑制劑、芳香烴受體拮抗劑、組蛋白去乙醯化酶 6 抑制劑、組蛋白去乙醯化酶 6 拮抗劑、cAMP 反應元件結合蛋白抑制劑及蛋白磷酸化激酶抑制劑等成分，阻斷由塑化劑或戴奧辛啟動的訊號傳遞路徑(AhR-cAMP/PKA/CREB1-HDAC6-cMyc)，從而抑制癌細胞增生、轉移，以有效治療雌激素受體陰性型乳癌，或者改善該雌激素受體陰性型乳癌的預後狀況。其中，該芳香烴受體抑制劑可以係芳香烴受體之干擾 RNA、3', 4'-二甲氧基黃酮(3', 4'-dimethoxyflavone; 3', 4'-DMF)或其組合物，該芳香烴受體之干擾 RNA 係呈 siRNA 形式，且正股 siRNA 係具有如 SEQ ID NO: 1 所示序列，反股 siRNA 係具有 SEQ ID NO: 2 所示序列；該組蛋白去乙醯化酶 6 抑制劑係組蛋白去乙醯化酶 6 之干擾 RNA(HDAC siRNA)，係包含如 SEQ ID NO: 3 及 4，或 5 及 6 所示的核酸序列，該組蛋白去乙醯化酶 6 之干擾 RNA 同樣可呈小段干擾 RNA(siRNA)、小髮夾型核糖核

酸 RNA(shRNA)或微小 RNA(miRNA)的形式；該 cAMP 反應元件結合蛋白抑制劑係 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA，包含如 SEQ ID NO：7 及 8 所示的核酸序列，係可以呈小段干擾 RNA(siRNA)、小髮夾型核糖核酸 RNA(shRNA)或微小 RNA(miRNA)之形式；該蛋白磷酸化激酶抑制劑則係蛋白磷酸化激酶抑制劑 H89。

前述之干擾 RNA(包含芳香烴受體之干擾 RNA、組蛋白去乙酰化酶 6 之干擾 RNA 及 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA)係由該技術領域慣用之方法進行合成，包含利用合適的表現系統以重組 RNA 之方式合成或以化學方法合成。該表現系統可為熟知該技術領域者所慣用之真核系統，如酵母菌；原核系統，如大腸桿菌(*E. coli*)；或病毒系統，如巨細胞病毒(CMV)載體。然而，該前述之干擾 RNA 也可以另以標準化的化學方法直接合成。

此外，本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物較佳是製成口服劑或注射劑等劑型，如錠劑、丸劑、注射劑等，以便於施用於一個體，如小鼠或人類。其中，該芳香烴受體之干擾 RNA 的使用劑量為 1~10 ng/ μ l，較佳為 5 ng/ μ l；該 3', 4'-二甲氧基黃酮的使用劑量為 1~5 μ M，較佳為 1 μ M；該組蛋白去乙酰化酶 6 之干擾 RNA 的使用劑量為 1~10 ng/ μ l，較佳為 5 ng/ μ l；該 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA 的使用劑量則為 1~10 ng/ μ l，較佳為 5 ng/ μ l。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型

乳癌的醫藥組成物較佳是更包含一醫藥上可接受之載劑或賦型劑，該載劑可以係藥理學上與前述芳香烴受體抑制劑、芳香烴受體拮抗劑、組蛋白去乙酰化酶 6 抑制劑、組蛋白去乙酰化酶 6 拮抗劑、cAMP 反應元件結合蛋白抑制劑、以及蛋白磷酸化激酶抑制劑性質相容的鹽類試劑或水溶液，較佳是為一核酸轉殖試劑，如 LT1 轉殖試劑，以提升本發明之芳香烴受體之干擾 RNA、組蛋白去乙酰化酶 6 之干擾 RNA 及 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA 送至個體細胞之效率，以有效阻斷由塑化劑或戴奧辛啟動的訊號傳遞路徑(AhR-cAMP/PKA/CREB1-HDAC6-cMyc)，抑制癌細胞增生，使該用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物可發揮較佳的療效。該賦型劑則可選用為溶劑、注射劑或澱粉糊等，以將使本發明之抗乳癌藥劑進一步製成便於注射或口服之劑型。

本發明已經由實驗證實，確實可阻斷塑化劑或戴奧辛引發癌細胞增生的訊號傳遞路徑，達到治療雌激素受體陰性型乳癌，特別是由塑化劑所引發的雌激素受體陰性型乳癌的功效。以下為本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物的功效驗證。

置備數株乳癌細胞株，包含 MCF-7、T-47D、ZR-75-1、MDA-MB-231、MDA-MB-435 及 SK-BR-3(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)，利用一培養基，於 37°C、含 5%二氧化碳之環境分別培養前述數株乳癌細胞株，其中，該培養基包含 DMEM/F12(Life

Technologies, Grand Island, NY, USA)、10%胎牛血清蛋白 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 及 1% 抗生素 penicilla/streptomycin(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。另外，購置鄰苯二甲酸酯、鄰苯二甲酸二丁酯、3', 4'-二甲氧基黃酮及蛋白磷酸化激酶抑制劑 H89(Calbiochem, San Diego, CA, USA)，並分別配置成 1 微莫耳濃度(μM)備用。

請參照第 2 圖，係前述數株乳癌細胞株之芳香烴受體 mRNA 的表現量，本試驗是利用一商用 RNA 分離套組-Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)取得各乳癌細胞株之 RNA 檢體，以一反轉錄系統(Reverse Transcription System, Promega, Madison, WI, USA)合成各 RNA 檢體的 cDNA，再利用定量聚合酶連鎖反應分析芳香烴受體 mRNA 的表現量，其中，本試驗係利用 ABI-7500(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)進行該定量聚合酶連鎖反應，並且所採用的引子對(AhR 引子對)係包含由 SEQ ID NO:9 及 10 所示的序列。

由第 2 圖結果可知，雌激素受體陰性型乳癌之細胞株中(包含 MDA-MB-231、MDA-MB-435 及 SK-BR-3)，芳香烴受體的表現量明顯較雌激素受體陽性型乳癌之細胞株為高，顯示該芳香烴受體的表現與雌激素受體陰性型乳癌的發生確有相關。

請參照第 3 圖所示，係該乳癌細胞株 MDA-MB-231 分別與鄰苯二甲酸酯、鄰苯二甲酸二丁酯、3', 4'-二甲氧

基黃酮、芳香烴受體之干擾 RNA 或其組合共培養後，其細胞內環化磷酸腺苷的表現量。其中，該乳癌細胞株 MDA-MB-231 係隨機分配至 9 組，並依照第 1 表所列之處理方式，分別培養各組之乳癌細胞株 MDA-MB-231，本試驗係先將乳癌細胞株 MDA-MB-231 與 3', 4'-二甲氧基黃酮或芳香烴受體之干擾 RNA 預先培養 1 小時後，再與塑化劑(鄰苯二甲酸酯或鄰苯二甲酸二丁酯)共同培養 2 小時。前述 9 組乳癌細胞株的蛋白質檢體係於培養後，先以 100 毫莫耳濃度鹽酸溶液溶裂細胞，再進一步利用一商用環化磷酸腺苷測量套組 (cAMP-EIA kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) 定量各組細胞中的環化磷酸腺苷。

第 1 表: 9 組乳癌細胞株 MDA-MB-231 之處理方式

組別	處理			
	BBP	DBP	3', 4'-DMF	AhR siRNA
I	-	-	-	-
II	1 μ M	-	-	-
III	-	1 μ M	-	-
IV	-	-	1 μ M	-
V	1 μ M	-	1 μ M	-
VI	-	1 μ M	1 μ M	-
VII	-	-	-	5ng/ μ l
VIII	1 μ M	-	-	5ng/ μ l
IX	-	1 μ M	-	5ng/ μ l

由該第 3 圖結果，塑化劑可活化乳癌細胞中的芳香烴受體，啟動環化磷酸腺苷/蛋白磷酸化激酶 A/cAMP 反應元件結合蛋白的訊號傳遞路徑，進而引發癌細胞增生，然而，3', 4'-二甲氧基黃酮及芳香烴受體之干擾 RNA 可阻斷由塑化劑誘發產生的環化磷酸腺苷。

請參照第 4 圖，係該乳癌細胞株 MDA-MB-231 分別經鄰苯二甲酸酯、鄰苯二甲酸二丁酯誘發後，乳癌細胞內磷酸化 cAMP 反應元件結合蛋白(Ser133 phosphorylation CREB1; CREB1-P)與總 cAMP 反應元件結合蛋白的表現量。其中，6 組乳癌細胞株 MDA-MB-231 係先與 1 微莫耳濃度(1 μ M)之 3', 4'-二甲氧基黃酮或蛋白磷酸化激酶抑制劑 H89 預先培養一小時，再與塑化劑(鄰苯二甲酸酯或鄰苯二甲酸二丁酯)共同培養 2 小時，最後利用免疫印跡法(immunoblotting)分析各組乳癌細胞內磷酸化 cAMP 反應元件結合蛋白的表現情形。

本試驗之免疫印跡法係以冰磷酸緩衝液分別清洗各組的乳癌細胞株，再利用一商用蛋白質抽取溶劑(M-PER mammalian protein extraction reagent, Thermo Scientific, Franklin, MA, USA)進行均質處理，以獲得各組乳癌細胞株的蛋白質檢體。將各蛋白質檢體分別點在聚二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membrane; Millipore, Bedford, MA, USA)上，依序與抗磷酸化 cAMP 反應元件結合蛋白抗體、抗 cAMP 反應元件結合蛋白抗體與抗 β 機動蛋白抗體(Sigma)反應。

由該第 4 圖結果，因塑化劑而引發環化磷酸腺苷的過表現，會進一步導致蛋白激酶 A 的活化，使轉錄因子-cAMP 反應元件結合蛋白第 133 位置的絲胺酸發生磷酸化，然而，前述由塑化劑引發的現象卻可被 3', 4'-二甲氧基黃酮及蛋白磷酸化激酶抑制劑 H89 所阻斷。

請參照第 5 圖所示，係該乳癌細胞株 MDA-MB-231 分別經鄰苯二甲酸酯、鄰苯二甲酸二丁酯誘發後，乳癌細胞內組蛋白去乙酰化酶 6 的啟動子與 cAMP 反應元件結合蛋白的結合關係。同前一試驗，其中 6 組乳癌細胞株 MDA-MB-231 係先與 1 微莫耳濃度(1 μ M)之 3', 4'-二甲氧基黃酮或蛋白磷酸化激酶抑制劑 H89 預先培養一小時，再與塑化劑(鄰苯二甲酸酯或鄰苯二甲酸二丁酯)共同培養 2 小時，接著利用免疫沉澱分析法(immunoprecipitation analyse)沉澱乳癌細胞中的 cAMP 反應元件結合蛋白，最後再以染色體免疫沉澱分析法(chromatin immunoprecipitation assay)，分離該 cAMP 反應元件結合蛋白上的核酸，並以聚合酶連鎖反應進行分析。

其中，各組的乳癌細胞株同樣係先利用該商用蛋白質抽取溶劑進行均質處理，取得各組乳癌細胞株的蛋白質檢體，再依序與蛋白質 G 磁珠(protein G beads, Roco, Indianapolis, IN)於 4°C 培養兩小時、與抗免疫球蛋白 G 抗體(anti-IgG, Santa Cruz)、抗 cAMP 反應元件結合蛋白抗體及抗 LEF1/TCF4 抗體(epitomics)分別反應，其中，該抗免疫球蛋白 G 抗體係作為負對照，而抗 LEF1/TCF4 抗體則

係內部對照。另一方面，本試驗的染色體免疫沉澱分析法則係直接利用一商用染色體免疫沉澱分析套組(ChIP assay kit, Upstae Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)進行分析，而聚合酶連鎖反應所選用的引子對(HDAC6 啟動子引子對)係包含如 SEQ ID NO: 11 及 12 所示序列。

而該第 5 圖結果顯示，塑化劑可誘導 cAMP 反應元件結合蛋白的磷酸化，並使磷酸化的 AMP 反應元件結合蛋白結合於組蛋白去乙酰化酶 6 的啟動子，開啟組蛋白去乙酰化酶 6 的表現；然而，此現象同樣可被 3', 4'-二甲氧基黃酮及蛋白磷酸化激酶抑制劑 H89 所阻斷。

第 6 圖係該乳癌細胞株 MDA-MB-231 分別經鄰苯二甲酸酯、鄰苯二甲酸二丁酯誘發後，細胞內組蛋白去乙酰化酶 6 的表現量。而其中數組係先與 1 微莫耳濃度(1 μ M)之 3', 4'-二甲氧基黃酮或蛋白磷酸化激酶抑制劑 H89 預先培養一小時，或者經轉殖入芳香煙受體之干擾 RNA(5ng/ μ l)或 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA(5ng/ μ l)，再與 1 微莫耳濃度(1 μ M)塑化劑(鄰苯二甲酸酯或鄰苯二甲酸二丁酯)共同培養 24 小時，最後再利用定量聚合酶連鎖反應定量各組中組蛋白去乙酰化酶 6 的表現量。

按第 6 圖結果，塑化劑可誘使乳癌細胞中，組蛋白去乙酰化酶 6 的過表現；然而，此現象可分別被 3', 4'-二甲氧基黃酮、蛋白磷酸化激酶抑制劑 H89、芳香煙受體之干擾 RNA 或 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA 所阻

斷。

前述數試驗可證實塑化劑，如鄰苯二甲酸酯及鄰苯二甲酸二丁酯可活化芳香烴受體，開啟環化磷酸腺苷-蛋白磷酸化激酶 A-cAMP 反應元件結合蛋白的訊號傳遞路徑(cAMP/PKA/CREB1)，使組蛋白去乙醯化酶 6 大量表現，造成乳癌細胞增生與惡化；然而，利用芳香烴受體抑制劑(如芳香烴受體之干擾 RNA、3', 4'-二甲氧基黃酮)、組蛋白去乙醯化酶 6 抑制劑(如組蛋白去乙醯化酶 6 之干擾 RNA)、cAMP 反應元件結合蛋白抑制劑(如 cAMP 反應元件結合蛋白之干擾 RNA)及蛋白磷酸化激酶抑制劑(如蛋白磷酸化激酶抑制劑 H89)則可抑制由塑化劑所引發的訊號傳遞路徑(cAMP/PKA/CREB1)，避免乳癌細胞過度增生。

請參照第 7 圖，係乳癌細胞株 MDA-MB-231 及 SK-BR-3 分別經鄰苯二甲酸酯、鄰苯二甲酸二丁酯誘發後，二株乳癌細胞株中組蛋白去乙醯化酶 6 的表現量。其中一組乳癌細胞株 MDA-MB-231 及 SK-BR-3，係先與 1 微莫耳濃度(1 μ M)之 3', 4'-二甲氧基黃酮預先培養一小時，再與塑化劑(鄰苯二甲酸酯或鄰苯二甲酸二丁酯)共同培養 2 小時，本試驗同樣係利用定量聚合酶連鎖反應分析各組乳癌細胞株中，組蛋白去乙醯化酶 6 的表現量。

而第 7 圖結果顯示，兩組乳癌細胞株中的組蛋白去乙醯化酶 6，皆會受塑化劑的誘發而過度表現，再次證實雌激素受體陰性型乳癌與塑化劑之間的關連性。

下段試驗係進一步驗證本發明之用以治療塑化劑引

發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物的功效。

第 8 圖所示係經鄰苯二甲酸酯、鄰苯二甲酸二丁酯誘發後之乳癌細胞，其組蛋白去乙醯化酶 6 的表現明顯因塑化劑的影響而提升，該組蛋白去乙醯化酶 6 可催化 α -微管蛋白(α -tubulin)的脫乙醯作用，促進乳癌細胞的增生與浸潤。

第 9 圖則顯示，本發明之組蛋白去乙醯化酶 6 之干擾 RNA，可專一性地抑制乳癌細胞中該組蛋白去乙醯化酶 6 的表現。其中控制組干擾 RNA(control siRNA)係作為此試驗的負對照，係包含如 SEQ ID NO: 13 及 14 所示的核酸序列。

第 10 至 13 圖分別係經塑化劑誘導之乳癌細胞株，其乳癌細胞的活動能力(如第 10 圖)、分化能力(如第 11 圖)及細胞浸潤能力(如第 12 及 13 圖)。其中，部份組別之乳癌細胞株係先轉殖入本發明之組蛋白去乙醯化酶 6 之干擾 RNA(包含 HDAC6 siRNA-1 與 HDAC6 siRNA-2，轉入劑量皆為 5ng/ μ l)或控制組干擾 RNA(5ng/ μ l)，再與 1 微莫耳濃度(1 μ M)塑化劑(鄰苯二甲酸酯或鄰苯二甲酸二丁酯)共同培養，之後再利用細胞增生比色法(XTT assay)分別各組乳癌細胞的活動、分化及細胞浸潤能力。

由第 10 至 13 圖結果，乳癌細胞的活動、分化及細胞浸潤能力皆受塑化劑的誘發而明顯提升；然而，藉由組蛋白去乙醯化酶 6 之干擾 RNA 的轉殖，則可抑制組蛋白去乙醯化酶 6 的表現及其下游的訊號傳遞反應，進而抑制

乳癌細胞的活動、分化及細胞浸潤能力。

由以上各試驗均可證實，本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物在投藥至一個體後，可有效阻斷由塑化劑或戴奧辛啟動的訊號傳遞路徑(AhR-cAMP/PKA/CREB1-HDAC6-cMyc)，抑制組蛋白去乙酰化酶 6 的表現，進而達到控制癌細胞增生、轉移及浸潤的功效，以改善雌激素受體陰性型乳癌的預後狀況，特別係由塑化劑所引發的雌激素受體陰性型乳癌。

本發明之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，包含芳香烴受體抑制劑、芳香烴受體拮抗劑、組蛋白去乙酰化酶 6 抑制劑、組蛋白去乙酰化酶 6 拮抗劑、cAMP 反應元件結合蛋白抑制劑、蛋白磷酸化激酶抑制劑或由前述成分所組成的群組，可阻斷塑化劑或戴奧辛所引發的訊息傳遞路徑，避免雌激素受體陰性型乳癌的增生與惡化，為本發明之功效。

雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者在不脫離本發明之精神和範圍之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖：塑化劑引發雌激素受體陰性型乳癌之訊息傳遞路徑。

第 2 圖：乳癌細胞株之芳香烴受體 mRNA 表現量示意圖。

第 3 圖：乳癌細胞株之環化磷酸腺苷表現量示意圖。

第 4 圖：乳癌細胞株之磷酸化 cAMP 反應元件結合蛋白表現量示意圖。

第 5 圖：乳癌細胞株之組蛋白去乙酰化酶 6 的啟動子與 cAMP 反應元件結合蛋白的結合關係示意圖。

第 6 圖：乳癌細胞株之組蛋白去乙酰化酶 6 表現量示意圖。

第 7 圖：乳癌細胞株之組蛋白去乙酰化酶 6 表現量示意圖。

第 8 圖：乳癌細胞株之組蛋白去乙酰化酶 6 表現量示意圖。

第 9 圖：乳癌細胞株之組蛋白去乙酰化酶 6 表現量示意圖。

第 10 圖：乳癌細胞株之活動能力示意圖。

第 11 圖：乳癌細胞株之分化能力示意圖。

第 12 圖：乳癌細胞株之細胞浸潤能力示意圖。

第 13 圖：乳癌細胞株之細胞浸潤能力示意圖。

【主要元件符號說明】

- | | | | |
|---|---------------|---|-----------|
| 1 | 塑化劑 | 2 | 芳香烴受體 |
| 3 | 環化磷酸腺苷 | 4 | 蛋白磷酸化激酶 A |
| 5 | cAMP 反應元件結合蛋白 | | |

6 組蛋白去乙酰化酶 6 7 cMyc 基因

序列表

<110> 高雄醫學大學

<120> 用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物

<130> PK12537

<160> 14

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> AhR siRNA sense

<400> 1

cuacagauc uuuggucu

19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> AhR siRNA antisense

<400> 2

aagaccaaag caucuguag

19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> HDAC6 siRNA-1 sense

<400> 3

gcauuauccu uauccuaga

19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> HDAC6 siRNA-1 antisense

<400> 4

ucuaggauaa ggauaaugc

19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> HDAC6 siRNA-2 sense

<400> 5

cacugaucag gccauauuu

19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> HDAC6 siRNA-2 antisense

<400> 6

aaauauggcc ugaucagug

19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> CREB1 siRNA sense

<400> 7

cugaaagcaa cuacagaau

19

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> CREB1 siRNA antisense

<400> 8

auucuguagu ugcuuucag

19

<211> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> AhR forward primer

<400> 9

tactctgccg cccaaactgg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> AhR reverse primer

<400> 10

gctctgcaac ctccgattcc

20

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> HDAC6 forward primer

<400> 11

ggccaatgga aaaga

15

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> HDAC6 reverse primer

<400> 10

aggagcgtgg gtatgtga

18

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> control siRNA-1 sense

<400> 13

gaucauacgu gcgaucaga

19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> control siRNA antisense

● <400> 14

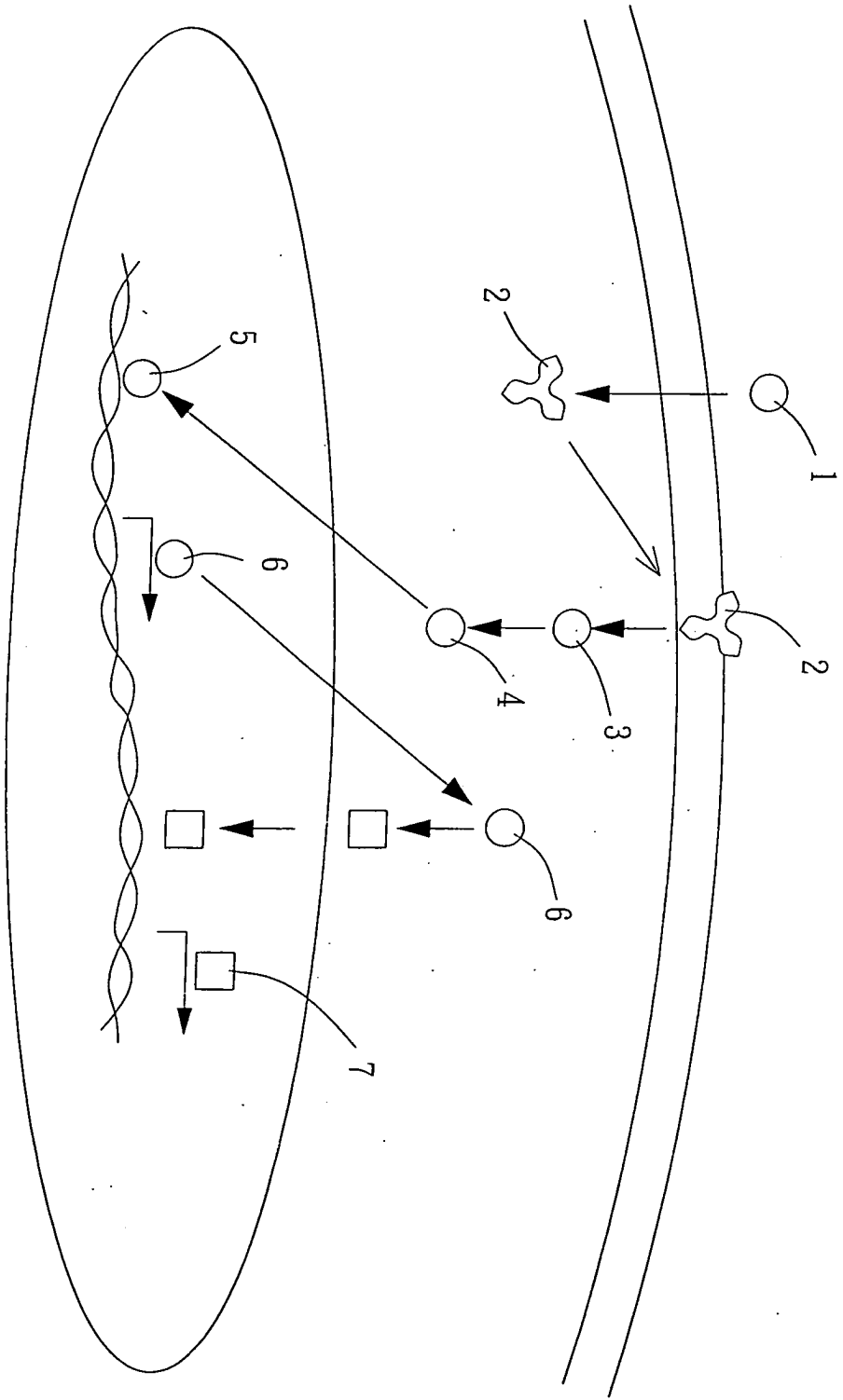
ucugaucgca cguaugauc

19

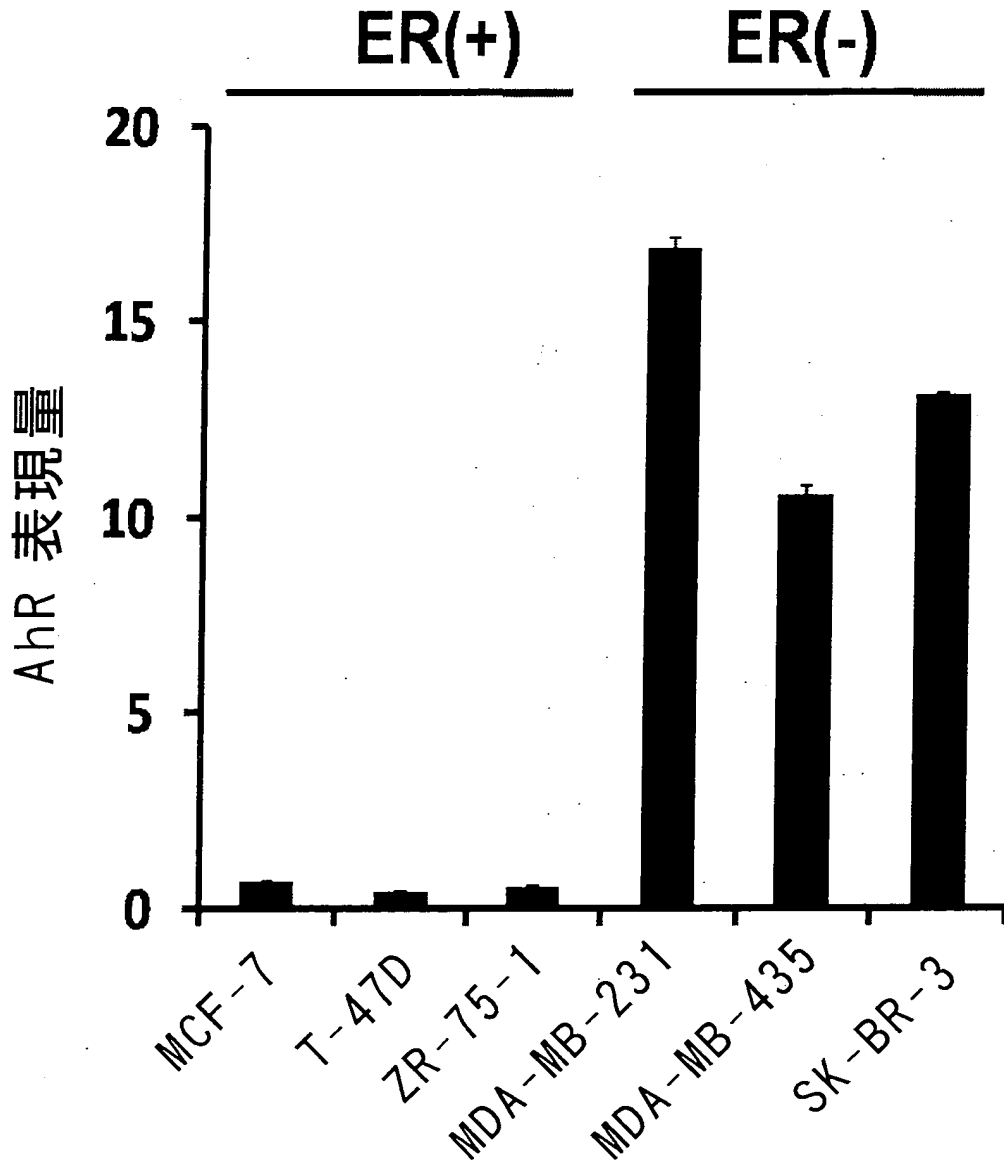
七、申請專利範圍：

- 1、一種用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，係包含：一芳香烴受體抑制劑，且該芳香烴受體抑制劑係選自由芳香烴受體之干擾 RNA 及 3', 4'-二甲氧基黃酮所組成的群組；
其中該芳香烴受體之干擾 RNA 係呈 siRNA 形式，且正股 siRNA 係具有如 SEQ ID NO：1 所示序列，反股 siRNA 係具有 SEQ ID NO：2 所示序列。
- 2、如申請專利範圍第 1 項所述之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中更包含醫藥上可接受之載劑。
- 3、如申請專利範圍第 2 項所述之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該載劑係一核酸轉殖試劑。
- 4、如申請專利範圍第 1 項所述之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該芳香烴受體之干擾 RNA 的使用劑量為 1~10 ng/ μ l。
- 5、如申請專利範圍第 1 項所述之用以治療塑化劑引發之雌激素受體陰性型乳癌的醫藥組成物，其中該 3', 4'-二甲氧基黃酮的使用劑量為 1~5 μ M。

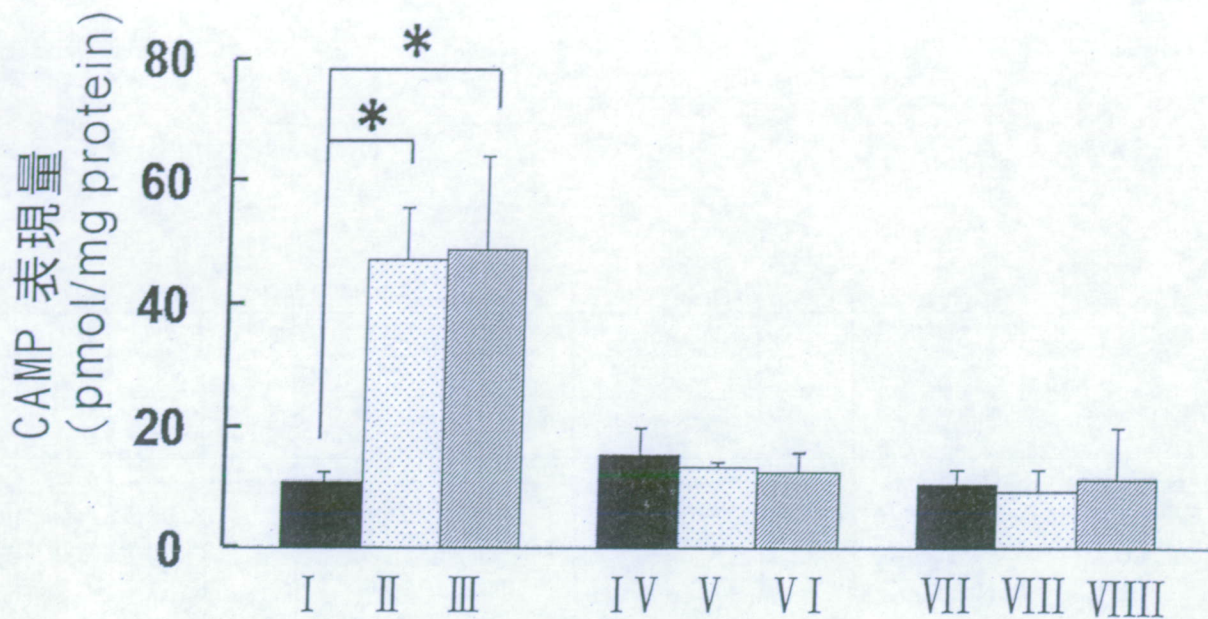
八、圖式：



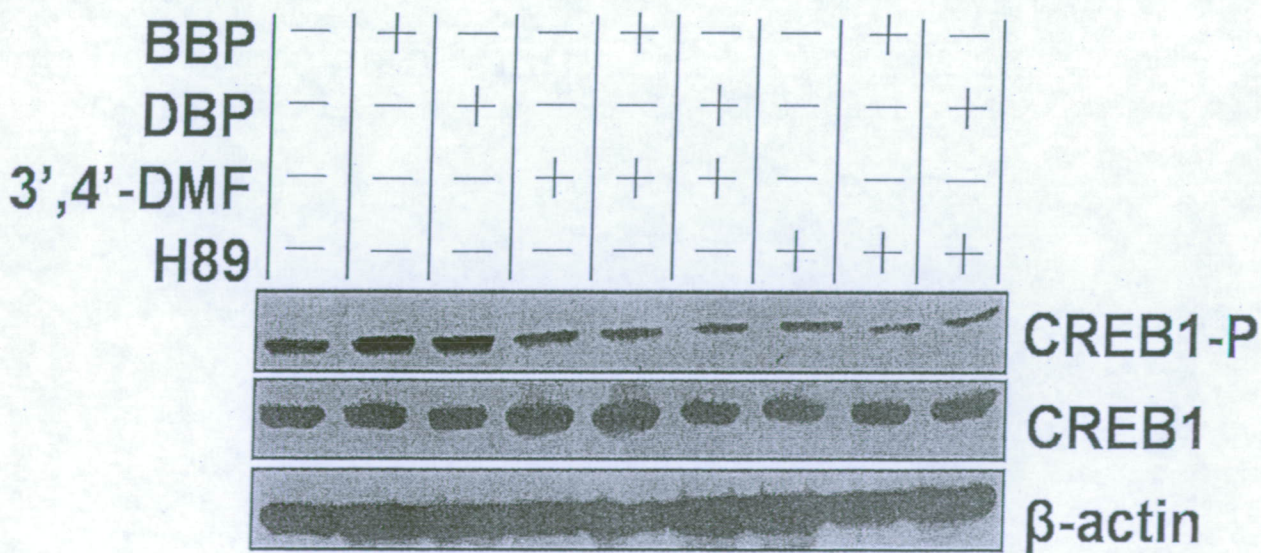
第 1 圖



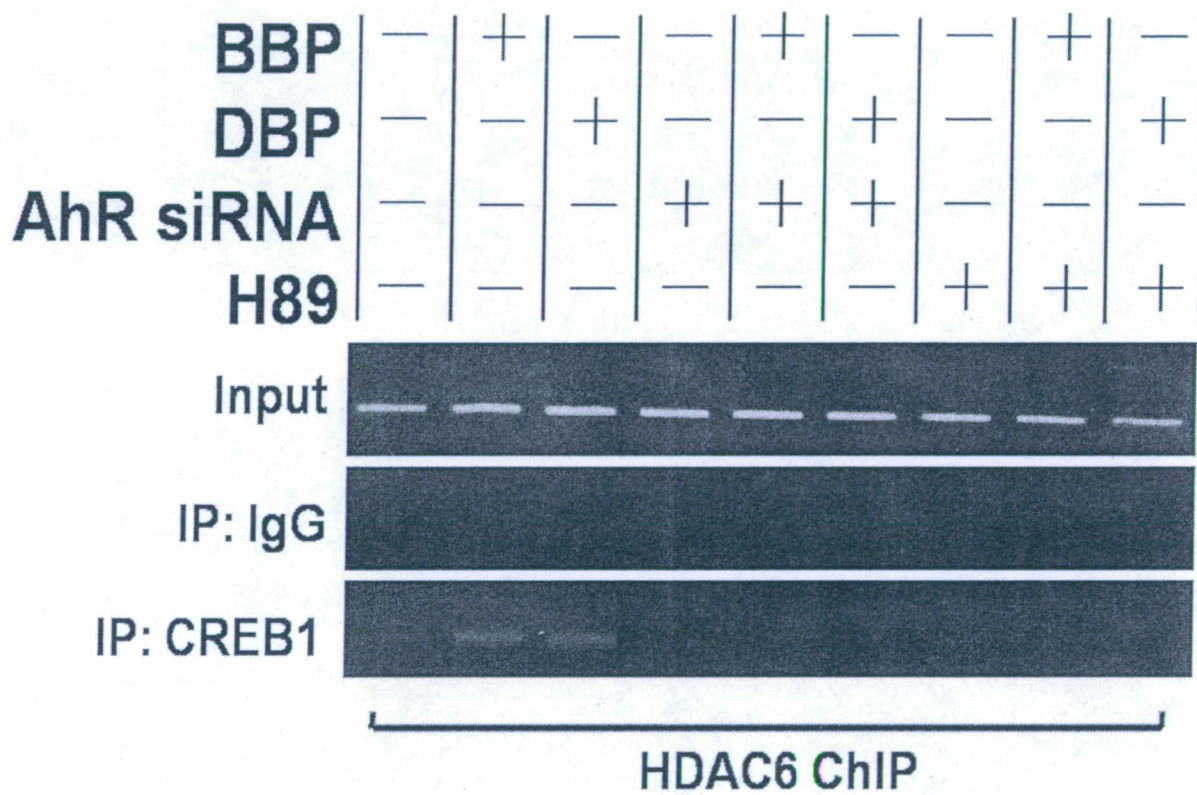
第 2 圖



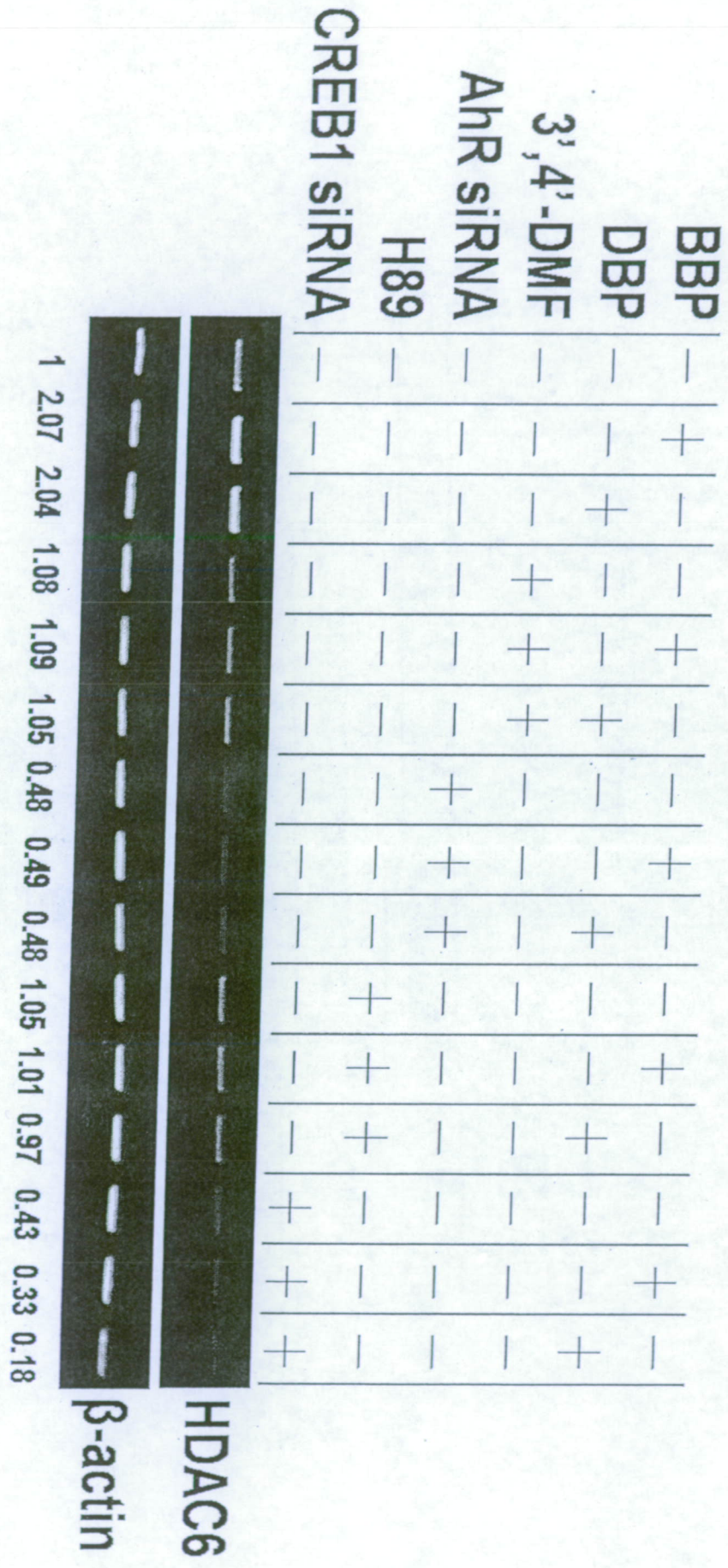
第 3 圖



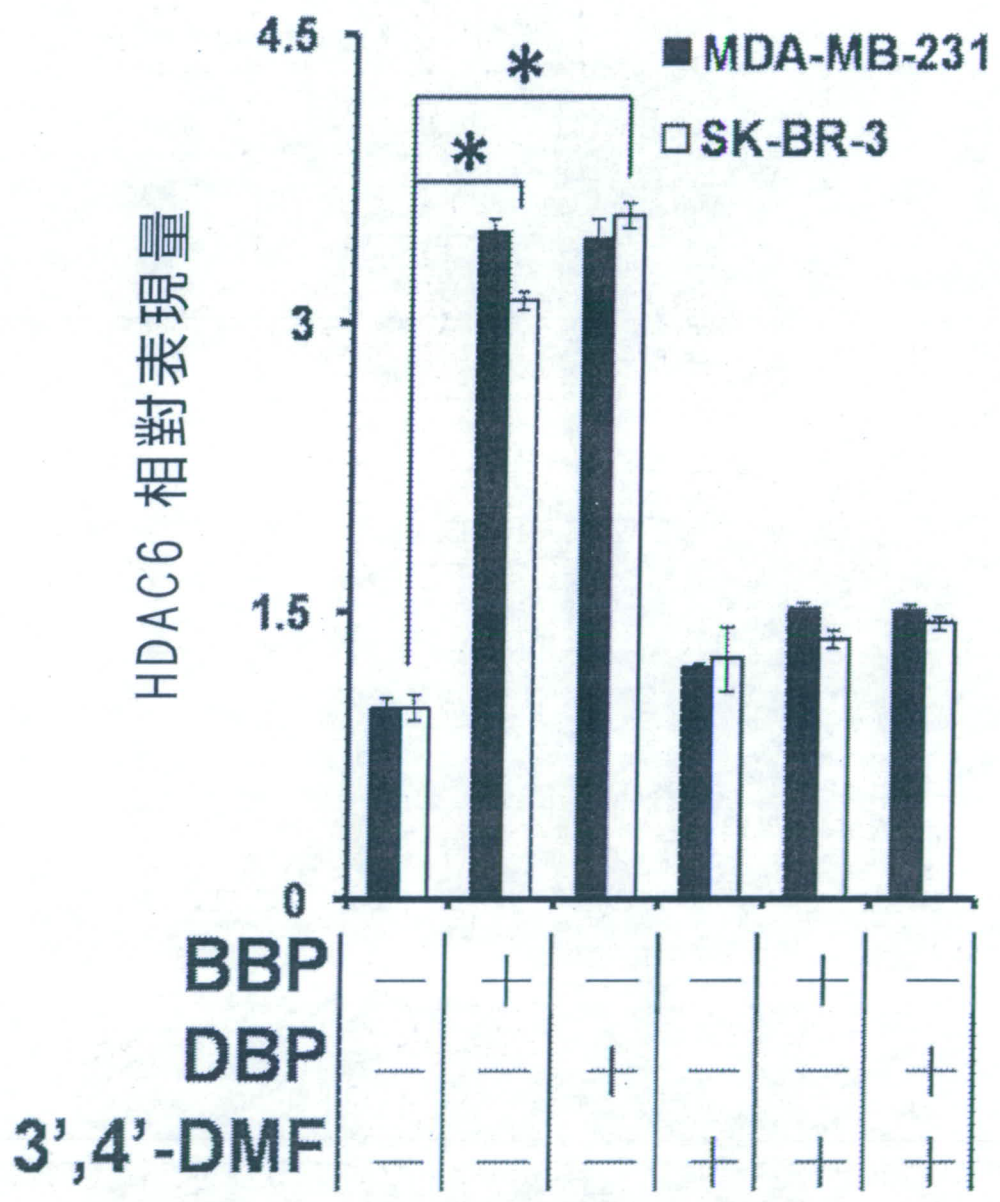
第 4 圖



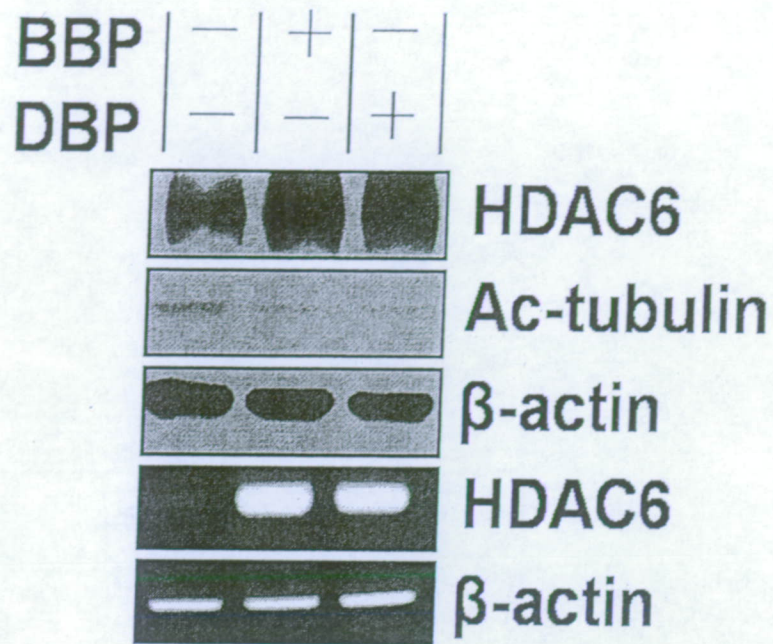
第 5 圖



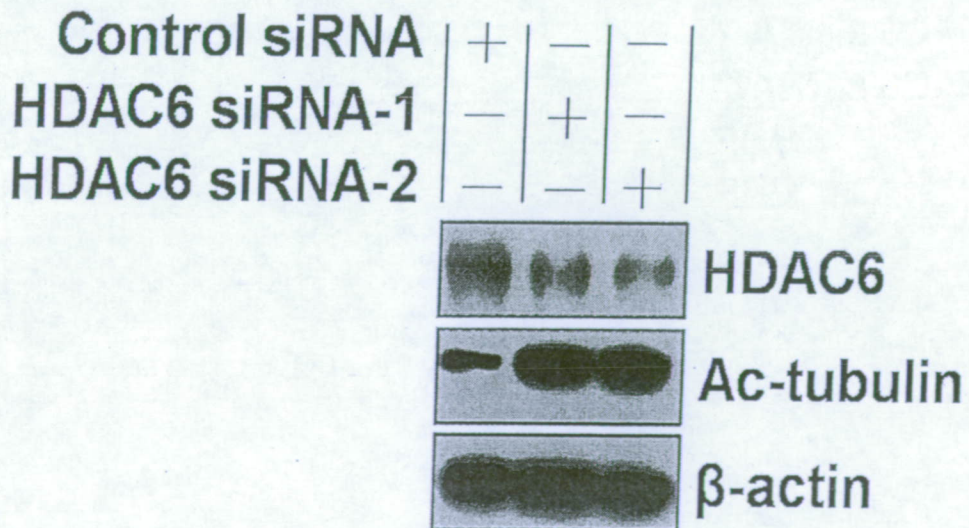
第 6 圖



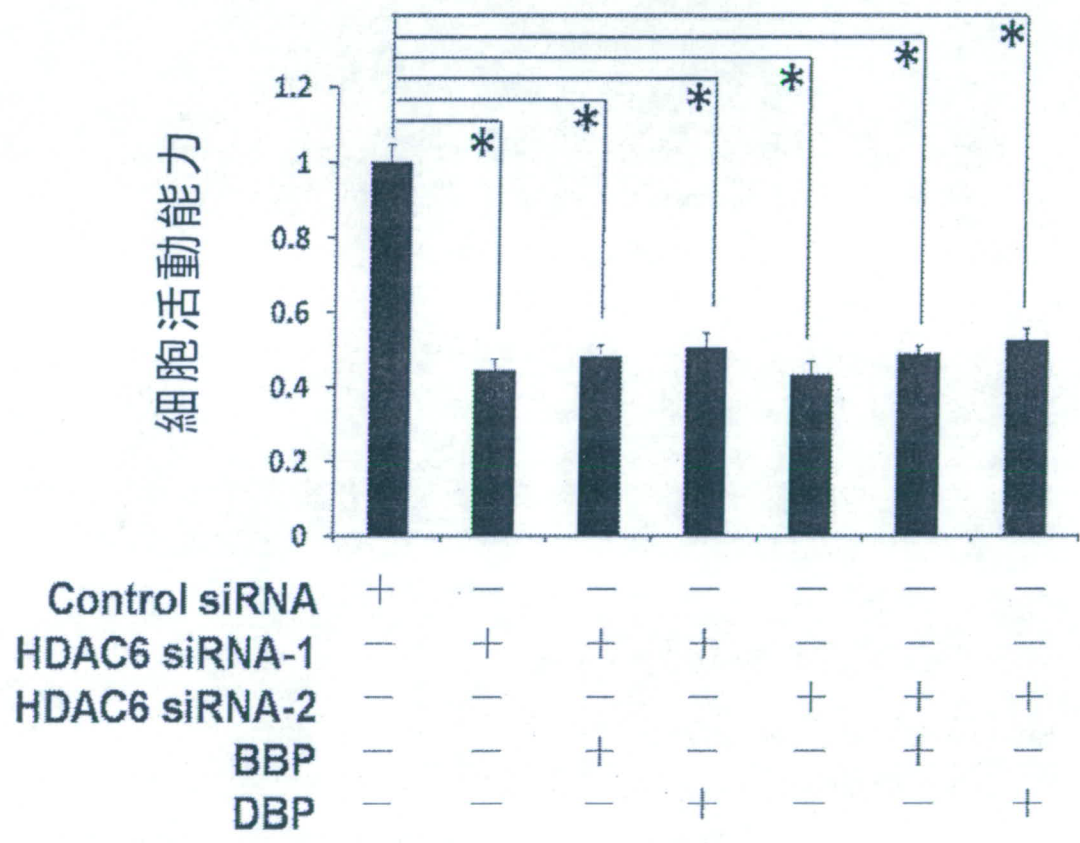
第 7 圖



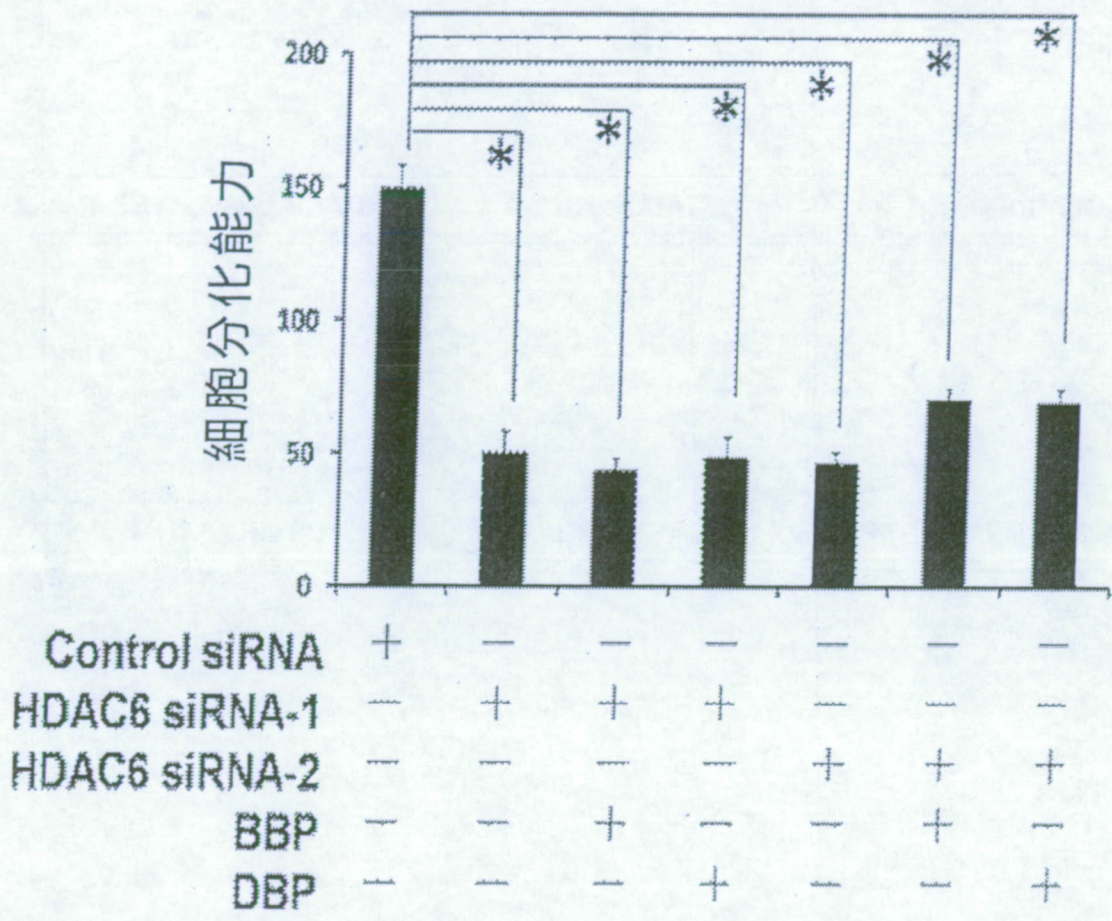
第 8 圖



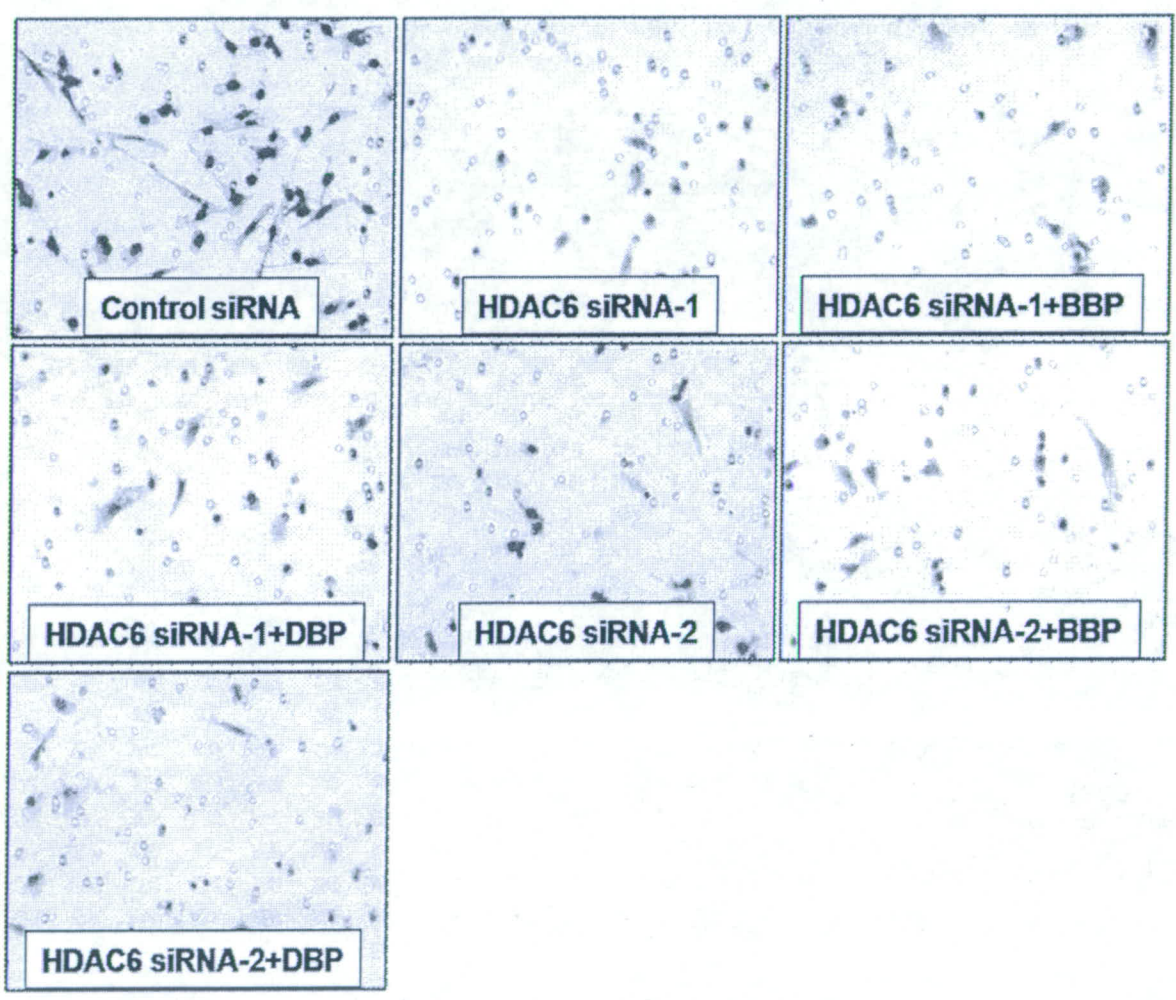
第 9 圖



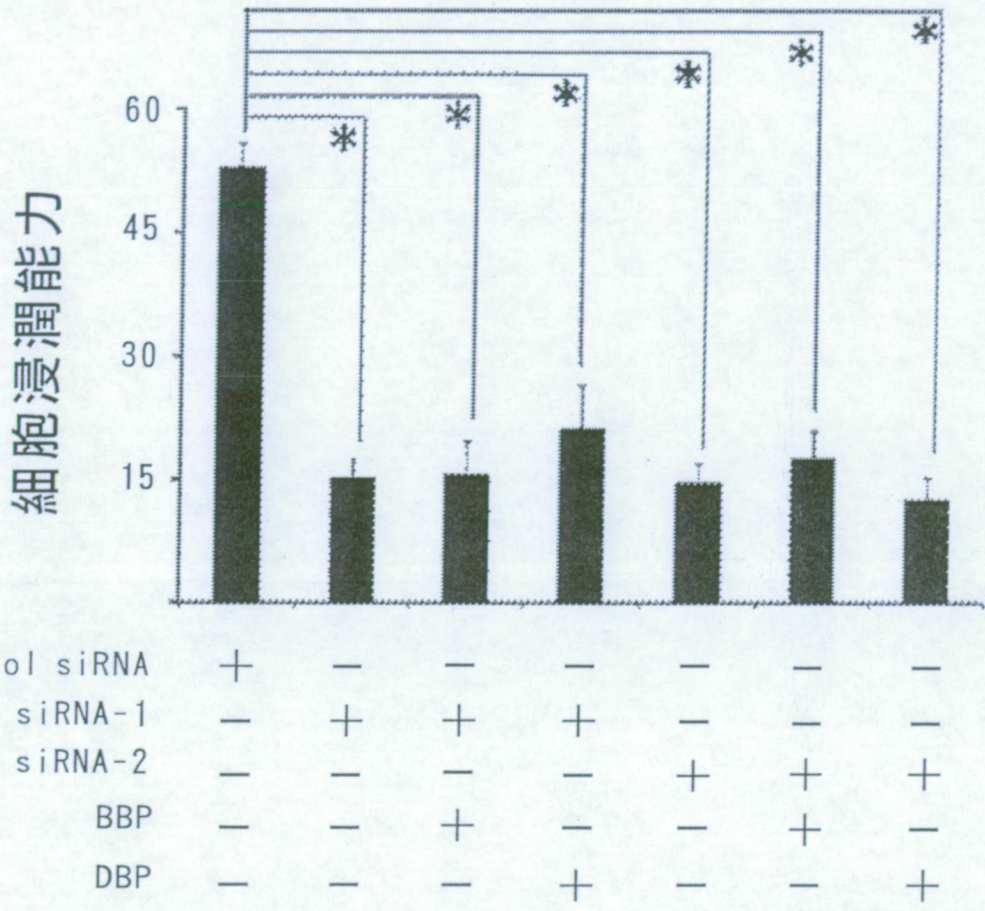
第 10 圖



第 11 圖



第 12 圖



第 13 圖