

【發明說明書】

【中文發明名稱】

體幹細胞用於增加蛋白質精胺酸甲基轉移酶(PRMT)位準的用途

【英文發明名稱】

USE OF SOMATIC STEM CELLS FOR INCREASING PRMT LEVEL

【技術領域】

【0001】本發明係有關於體幹細胞用於增加蛋白質精胺酸甲基轉移酶(PRMT)位準的用途。

【先前技術】

【0002】蛋白質精胺酸甲基化作用(protein arginine methylation)為一常見的轉譯後修飾作用，其調節蛋白質(包括組蛋白)的功能。蛋白質精胺酸甲基轉移酶(protein arginine methyltransferases; PRMTs)基於所產生的甲基精胺酸類型進行分類。舉例而言，第I型PRMTs催化不對稱型二甲基精胺酸的形成，且第II型PRMTs催化對稱型二甲基精胺酸的形成。在人類中，已辨識出9種PRMTs。PRMT5是迄今所辨識出的主要第II型酵素。其與其輔因子MEP50一起介導R3處組蛋白H2A與H4及R8處組蛋白H3的甲基化作用。彼等組蛋白殘基的對稱型二甲基化作用通常產生基因轉錄時的抑制標記(repressive marks)。在幾個轉錄抑制因子複合物中，諸如SIN3A/HDAC、MBD2/NURD、及N-CoR/SMRT，發現存在PRMT5。PRMT5顯示通過募集DNMT3A而抑制球蛋白(globin)基

因表現，表示組蛋白精胺酸甲基化作用與DNA甲基化作用之間存在潛在的串擾(crosstalk)。該酵素在表觀遺傳調控中扮演重要角色，其在細胞中與老化過程相關。

【0003】 此外，已有研究PRMT5在造血幹細胞與先驅細胞(HSPC)中的功能。數據顯示，PRMT5在維持成體造血細胞中扮演基本角色。小鼠中PRMT5的缺失造成致命、非常嚴重的再生不良性貧血樣表型(aplastic anemia-like phenotype)。

【發明內容】

【0004】 在一態樣中，在本文所描述的是一種增加在一個體中之PRMT位準的方法。該方法包括辨識一有需求的個體；以及向該個體投予一含有複數個尺寸大於2微米且小於6微米之小型細胞的組成物；其中該等小型細胞包括複數個體幹細胞，該等體幹細胞係(i) 多潛能性(pluripotent)或多功能性(multipotent)；且係(ii) CD349(+)、CD9(+)、Oct4(+)、Nanog(+)、Lgr5(+)、CD66e(+)、CD133(+)**或**CD34(+)**或**。

【0005】 在一些實施例中，該辨識步驟包括檢測從該個體取得之生物樣本中的PRMT位準。在一些實施例中，所檢測出的位準係低於一對照組位準。該經辨識的個體可具有與PRMT功能異常相關之病症。舉例而言，該個體可具有與老化或貧血相關之病症。

【0006】 投予至該個體之組成物中的該等小型細胞可進一步包括血小板。舉例而言，75%至85%的小型細胞

可為血小板且20%至25%的小型細胞可為體幹細胞。在一些實施例中，組成物含有1千萬至5億個體幹細胞。

【0007】 在一些實施例中，該組成物係藉由一製程所製備，該製程包括：提供一混合物，其含有一取自於該個體或一供體個體的血液樣本及一種二價陽離子螯合劑；將該混合物儲存在介於2°C與12°C之間的溫度下3至72小時，藉此使該混合物分離成一上層及一下層，其中該上層包含該等小型細胞群(population)；以及收集該上層，藉此製備該組成物。可以每毫升血液樣本1.5至2.0 mg的該二價陽離子螯合劑與該血液樣品混合，以獲得該混合物。較佳地，該二價陽離子螯合劑為EDTA。

【0008】 任擇地，在取得該血液樣本以製備該組成物之前，在該個體或供體個體身上進行一用於增加幹細胞數目的動作(action)。該動作可為投予一有效量的褐藻糖膠(fucoidan)或顆粒性白血球群落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor)。

【0009】 製備組成物的製程進一步包括，在收集上層之後，添加一藥學上可接受之賦形劑至所收集的上層。或者，該製程可進一步包括，在收集上層之後，將上層離心以得一細胞沉澱物。沉澱物可進一步清洗並懸浮在一藥學上可接受之賦形劑中。藥學上可接受之賦形劑可為不含二價離子者。在一實施例中，藥學上可接受之賦形劑為食鹽水溶液。

【0010】 在一些實施例中，該方法進一步包含，在該投予

步驟之後，檢測在該投予步驟之後從該個體取得之生物樣本中的PRMT位準。

【0011】 在另一態樣中，本文描述一種用於增加在一個體中之PRMT位準的組成物。組成物含有複數個尺寸大於2微米且小於6微米的小型細胞，其中該等小型細胞包括複數個體幹細胞，該等體幹細胞係(i)多潛能性或多功能性；且係(ii) CD349(+)、CD9(+)、Oct4(+)、Nanog(+)、Lgr5(+)、CD66e(+)、CD133(+)或CD34(+)。

【0012】 在附圖及下列描述中闡述了一或多個實施例的細節。依據說明書與附圖，以及申請專利範圍，實施例的其他特徵、目的、及優點將顯而易見。

【實施方式】

【0013】 意外地發現，含有特定小型體幹細胞(諸如Lgr5(+)或CD349(+)細胞)的組成物可增加PRMT的位準。據此，本文所描述的是用於增加在一個體中之PRMT位準及用於治療與PRMT缺陷相關之病症的方法與組成物。

體幹細胞

【0014】 有多種類型的體幹細胞，包括全能性幹細胞(totipotent stem cells)、多潛能性幹細胞(pluripotent stem cells)、多功能性幹細胞(multipotent stem cells)及前驅幹細胞(progenitor stem cells)(亦稱作單能性幹細胞(unipotent stem cells))。類卵裂球幹細胞(blastomere-like stem cells；BLSCs)為全能性或多潛能性體幹細胞。極小類胚胎幹細胞(very small embryonic-like stem cells；

VSELs)為多潛能性體幹細胞。SB細胞為多潛能性或多功能性體幹細胞。間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells ; MSCs)與造血幹細胞(hematopoietic stem cell ; HSC)為多功能性體幹細胞。

【0015】 本文中使用的細胞(諸如幹細胞)之尺寸(Z)可指：(1)細胞生物學領域或幹細胞領域中細胞之尺寸或代表長度的常規定義，(2)細胞之直徑，尤其是當細胞實質上為球形時，(3)細胞長軸之長度，尤其是當細胞實質上為橢圓形時，(4)當細胞形狀有一近似正方形形狀時之細胞寬度，(5)當細胞形狀有一近似矩形形狀時之細胞長度或者(6)細胞之最大橫截面或橫向尺寸。利用光學顯微鏡或電子顯微鏡(諸如掃描式電子顯微鏡(SEM))獲得的細胞影像或利用流式細胞儀獲得的細胞數據(諸如二維點、輪廓或密度圖)，可確定或測定尺寸(Z)、直徑、長度、寬度或最大橫截面或橫向尺寸。掃描式電子顯微鏡(SEM)。從光學顯微鏡或電子顯微鏡獲得的細胞影像可為細胞的二維(2D)橫截面或三維(3D)結構。作為一示例，可利用測定光學顯微鏡或電子顯微鏡(諸如SEM)獲得的2D橫截面影像的細胞最大橫截面或橫向維度(transverse dimension)，取得細胞尺寸(Z)。

【0016】 「小型細胞」(諸如小型體幹細胞)乙詞係指具有尺寸小於6微米(諸如介於2.0與6.0微米之間)的細胞。「大型細胞」乙詞係指具有尺寸大於6微米的細胞。

【0017】 CD349(+) SB細胞為多潛能性或多功能性體幹細胞。CD349(+) SB細胞亦可為CD9(+)、Oct4(+)、及Nanog(+)，以及CD133(-)、CD90(-)、CD34(-)、及Sox2(-)。CD349(+) SB細胞各具有一等於或小於4、5或6微米的尺寸，諸如介於0.1與6.0微米

之間、介於0.5與6.0微米之間、介於1.0與6.0微米之間、介於2.0與6.0微米之間、介於0.1與5.0微米之間、介於0.5與5.0微米之間、介於1.0與5.0微米之間、介於0.1與4.0微米之間、介於0.5與4.0微米之間或介於1.0與4.0微米之間。較佳地，該尺寸係大於2微米且小於6微米。

【0018】 Lgr5(+) SB細胞亦為多潛能性或多功能性體幹細胞。其亦可為Oct4(+)與Nanog(+), 以及CD133(-)、CD66e(-)、CD4(-)、CD8(-)、CD9(-)、CD10(-)、CD11(-)、CD16(-)、CD17(-)、CD18(-)、CD19(-)、CD20(-)、CD21(-)、CD31(-)、CD42(-)、CD63(-)、CD34(-)、Lin(-)、CD38(-)、CD90(-)、CD45(-)、CD349(-)、及Sox2(-)。Lgr5(+) SB細胞之尺寸可以係等於或小於4、5或6微米，諸如介於0.1與6.0微米之間、介於0.5與6.0微米之間、介於1.0與6.0微米之間、介於2.0與6.0微米之間、介於0.1與5.0微米之間、介於0.5與5.0微米之間、介於1.0與5.0微米之間、介於0.1與4.0微米之間、介於0.5與4.0微米之間或介於1.0與4.0微米之間。較佳地，Lgr5(+) SB細胞之尺寸係大於2微米且小於6微米。

【0019】 類卵裂球幹細胞(BLSCs)為CD66e(+)全能性或多潛能性體幹細胞。其等可各具有一等於或小於4、5或6微米的尺寸，諸如介於0.1與6.0微米之間、介於0.5與6.0微米之間、介於1.0與6.0微米之間、介於2.0與6.0微米之間、介於0.1與5.0微米之間、介於0.5與5.0微米之間、介於1.0與5.0微米之間、介於0.1與4.0微米之間、介於0.5與4.0微米之間或介於1.0與4.0微米之間。舉例而言，BLSC可具有大於2微米且小於6微米的尺寸。

【0020】 極小類胚胎幹細胞(VSELs)為多潛能性體幹細胞

胞，其可為CD133(+)或CD34(+)。VSEL亦可為CD45(-)與Lin(-)。舉例而言，VSEL可為CD133(+)、CD45(-)與Lin(-)或CD34(+)、CD45(-)與Lin(-)。VSEL之尺寸可等於或小於4、5或6微米，諸如介於0.1與6.0微米之間、介於0.5與6.0微米之間、介於1.0與6.0微米之間、介於2.0與6.0微米之間、介於0.1與5.0微米之間、介於0.5與5.0微米之間、介於1.0與5.0微米之間、介於0.1與4.0微米之間、介於0.5與4.0微米之間或介於1.0與4.0微米之間。VSEL之尺寸可以係大於2微米且小於6微米。

【0021】 間葉系幹細胞(MSCs)為多功能性體幹細胞。MSC可表現一或多個細胞表面標記CD13、CD29、CD44、CD73、CD90及CD105。MSCs構成一極異質性群體。一些類型的MSCs之尺寸可以係等於或小於4、5或6微米，諸如介於0.1與6.0微米之間、介於0.5與6.0微米之間、介於1.0與6.0微米之間、介於0.1與5.0微米之間、介於0.5與5.0微米之間、介於1.0與5.0微米之間、介於0.1與4.0微米之間、介於0.5與4.0微米之間或介於1.0與4.0微米之間。其他類型的MSCs之尺寸可以係大於6、7或10微米。

【0022】 造血幹細胞(HSCs)為多功能性體幹細胞。其等可為CD34(+)、cKit(-)、CD38(-)、Lin(-)細胞或CD150(+)、CD244(-)及CD48(-)細胞。HSCs之尺寸可以係等於或小於4、5或6微米，諸如介於0.1與6.0微米之間、介於0.5與6.0微米之間、介於1.0與6.0微米之間、介於0.1與5.0微米之間、介於0.5與5.0微米之間、介於1.0與5.0微米之間、介於0.1與4.0微米之間、介於0.5與4.0微米之間或介於1.0與4.0微米之間。

增加幹細胞的動作

【0023】本文中使用的動作(X)為一可在活體內(例如在一人類個體或非人類個體內)有效增加一或多種幹細胞之數目的動作。動作(X)可包括：

1. 服用藥物，諸如合成之藥物或天然衍生之化合物；
2. 服用草藥或中草藥，諸如冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis*)、人蔘 (*ginseng*)、枸杞 (*Lycium Chinese Mill*)、靈芝 (*Ganoderma lucidum*)、台灣香菇 (*Taiwanofungus camphoratus*)、及/或巴西蘑菇 (*Brazil mushroom*)；
3. 服用營養素或膳食補充劑，諸如營養丸劑或粉末，包括下列材料或元素：維生素(維生素A、B、B複合物、B₁₂、D、D₃、E等)、大量及/或微量礦物質(諸如鈣、鈉、鉀、氟、溴、鉻、碘、矽、硒、鉍、鋰、鈷、鈉、及/或鎳)、多醣、高分子量含海藻糖醣蛋白、海藻(包括綠藻、藍綠藻、褐藻等)、海藻糖、褐藻糖膠(褐藻的主要組分)、寡褐藻糖膠、藻類、含褐藻糖膠之褐藻(例諸如，日本沖繩生產與製造的褐藻)、日本褐藻 (*Japanese Mozuku*)、綠藻、藍綠藻(或藍藻)、褐藻(包括褐藻、海帶、裙帶菜、馬尾藻、羽衣甘藍等)、植物性化合物(諸如異黃酮或植物雌激素)、茄紅素、表沒食子兒茶素沒食子酸酯 (*epigallocatechin gallate*；EGCG)、綠茶精華、葡萄糖營養素(諸如木糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯殼聚醣胺或N-乙醯神

經胺酸)、魚油、中國香椿(*toona sinensis*)、及/或從植物、葉子、水果、蔬菜、魚類、海藻或藻類中提取的營養成分；

4. 實施素食膳食；
5. 服用或食用健康食品或有機食品；
6. 服用替代(非傳統)藥物；
7. 接受替代療法或治療，諸如葛森療法(Gerson therapy)或布魯士癌症治療(Breuss cancer cure)；
8. 接受針灸治療(acupuncture)；
9. 接受按摩，諸如足部按摩；
10. 運動，諸如散步、慢跑、跳舞、體操、瑜伽、有氧運動、及/或太極拳(中國影子運動)；
11. 睡眠(目的在於測定睡眠品質)；
12. 冥想；
13. 實施由個人、健康專業人員或醫生所設計的健康改善計劃或疾病治療計劃；
14. 服用一定的營養素以改善體內特定器官的健康，例諸如，服用茄紅素以改善前列腺的健康；
15. 採取復健計劃以治癒傷口或治癒手術引起的傷口或治癒疾病；
16. 服用藥液(或稱作藥酒、含藥液或含藥酒)，諸如將一中藥或多個中藥浸泡在酒中一段時間製成，諸如將人蔘浸入高酒精濃度的米酒中一個月所製成的人蔘酒；

17. 服用一或多個政府部門或機構許可的藥物，諸如美國食品藥物管理局(U.S. FDA)，用於治療特定疾病(諸如特定癌症、皮膚病、腎病、及/或其他疾病)；
18. 服用或接受政府部門許可的治療或療法，以治癒特定疾病(諸如癌症、皮膚病或腎病)；
19. 進行宗教活動，諸如祈求和平或敬拜上帝；
20. 直接或間接暴露在陽光或光線下(早晨介於日出前10分鐘與日出後50分鐘之間(含有大量紅外(IR)線)；或中午左右，例如，介於11:30 AM與12:30 PM之間(含有大量紫外線(UV))；或在下午，例如，介於日落前50分鐘與日落後10分鐘之間(含有大量紅外(IR)光)；
21. 暴露於燈光或發光二極體(LED)光線，其可包括完整光譜之可見光、IR光、紅光、綠光、藍光或UV光或一者以上之上述光線的組合；
22. 鍛煉或接受用於改進身體自我修復的程序、療法、方法、裝置、及/或系統，例如，在受傷或手術後進行的方法或療法(諸如高壓氧療法)，以改進自我修復；
23. 飲用咖啡，諸如黑咖啡；
24. 飲用茶，諸如綠茶、紅茶或茉莉花茶；
25. 飲用紅酒；
26. 服用褪黑激素(melatonin)；

27. 聆聽音樂，諸如莫扎特或貝多芬的交響曲；
28. 注射含有褐藻糖膠或寡褐藻糖膠的物質(諸如營養素或補充劑)；
29. 服用激素補充劑或接受激素注射；
30. 注射顆粒性白血球群落刺激因子(G-CSF或GCSF)，其為醣蛋白；
31. 接受GCSF注射療程；以及
32. 攝取營養素、營養品、營養液、營養飲料、營養溶液或營養食品，其含有：(1)多種胺基酸(諸如精胺酸、組胺酸、離胺酸、天冬胺酸、穀胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺酸、穀胺醯胺酸、半胱胺酸、纈胺酸、脯胺酸、甘胺酸、硒代半胱胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、酪胺酸或色胺酸)，(2)平衡的胺基酸或(3)人體的9種必需胺基酸(亦即，組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、蘇胺酸、色胺酸、及纈胺酸)。舉例而言：(a)從紅豆、綠豆、黑豆發酵所產生或提取的產物；(b)從水果或水果組合(諸如甜菜、蘋果、番石榴、獼猴桃、葡萄、菠蘿、紅火龍果(火龍果)、青木瓜、番茄、及/或酪梨等)發酵產生的液體、溶液或飲料；(c)藥液(或稱作藥酒、含藥液或含藥酒)，諸如將一中藥或多個中藥浸泡在酒中一段時間製成，諸如將人蔘浸入高酒精濃度的米酒中一個月所製成的人蔘酒。

含幹細胞之組成物

【0024】可利用下述示例性方法製備含幹細胞之組成物(諸如含幹細胞之溶液)。

【0025】對個體執行的動作(X)可為上述動作(X)之一。個體，舉例而言，為人類(諸如兒童、青少年、成人或老人)或非人類動物。非人類動物之範例包括靈長類動物(諸如猴子或猩猩)、狗、嚙齒動物(諸如小鼠或天竺鼠)、貓、馬、乳牛、黃牛、羊、豬、雞、鴨、鵝、鳥、及大象。

【0026】舉例而言，個體可攝入幹細胞活化作用劑，諸如含褐藻糖膠之化合物。含褐藻糖膠之化合物可為褐藻補充劑。褐藻補充劑之丸劑含有80%的日本褐藻粉末、15%的結晶纖維素、3%的蔗糖脂肪酸酯類、及2%的二氧化矽微粒或細粒(含二氧化矽)。日本褐藻粉末可從日本沖繩週圍與附近海域生長之日本褐藻(一種海藻)中提取。然後，將日本褐藻粉末與結晶纖維素、蔗糖脂肪酸酯類、及二氧化矽微粒或細粒(含二氧化矽)混合，以形成褐藻補充劑之丸劑，其含有0.1克的褐藻糖膠。個體可攝入20或更多顆丸劑(諸如至少30顆丸劑)的褐藻補充劑或2克或更多(諸如至少3克)的褐藻糖膠。在另一個範例中，個體可注射顆粒性白血球群落刺激因子(GCSF)，亦即，活化作用劑或者可進行GCSF注射療程。

【0027】在進行動作(X)之後，個體等待一段時間(諸如一段預定時間)，諸如介於15分鐘與60分鐘之間、介於20分鐘與100分鐘之間、介於30分鐘與4小時之間、介於60

分鐘與90分鐘之間、介於0.5小時與3小時之間、介於1小時與6小時之間、介於1小時與12小時之間、介於12小時與36小時之間或介於36小時與50小時之間。進行動作(X)與等待一段時間，使得一或多個特定類型的體幹細胞，諸如SB細胞(亦即，CD349(+)與Lgr5(+) SB細胞)，從諸如個體的骨髓活化作用至個體週邊血液。因此，個體週邊血液變得富集該一或多個特定類型的體幹細胞。一或多個特定類型的體幹細胞，舉例而言，可為或可包括一或多個上述的體幹細胞。舉例而言，該一或多個特定類型的體幹細胞可為或可包括尺寸小於6微米的體幹細胞，且更佳地，尺寸大於2微米，諸如CD349(+)體幹細胞及/或Lgr5(+)體幹細胞。

【0028】 進行動作(X)與等待一段時間為任意步驟。換言之，欲製造含幹細胞之組成物，可從個體取得血液樣本，而無須在個體身上首先進行任何動作(X)。

【0029】 在上述等待步驟之後(若進行動作(X)與等待步驟)，立即從個體週邊血液取得血液樣本，並將其置於含有二價陽離子螯合劑之一或多個容器中(諸如一個袋子、一或多個注射器或一或多個試管)。在容器中，將血液樣本與二價陽離子螯合劑混合，以形成混合物。二價陽離子螯合劑，諸如抗凝血劑，可為乙烯二胺四乙酸(EDTA)，諸如K2 EDTA抗凝血劑或K3 EDTA抗凝血劑，其具有重量，諸如大於70 mg，諸如介於90與900 mg之間、介於120與450 mg之間或介於150與400 mg之間。或者，二價陽離子螯合劑可為檸檬

檬酸鹽，其具有重量，諸如大於70 mg，諸如介於90與900 mg 之間、介於120與450 mg之間或介於150與400 mg之間。血液樣本含有複數個細胞，包括尺寸小於6微米的小型細胞與尺寸大於6微米的大型細胞。小型細胞，舉例而言，含有尺寸小於6微米的血小板與小型體幹細胞。舉例而言，小型體幹細胞含有一或多個特定類型的體幹細胞(亦即，諸如SB細胞)、BLSCs (亦即，CD66e(+)體幹細胞)、及VSELs (諸如CD133(+)體幹細胞與CD34(+)體幹細胞)。大型細胞，舉例而言，含有尺寸大於6微米的大型體幹細胞與譜系細胞(lineage cells)諸如紅血球細胞與白血球細胞。血液樣本可具有體積大於或等於 45毫升，諸如介於60與500毫升之間、介於80與250毫升之間或介於100與200毫升之間。在一個範例中，血液樣本可在容器中與每毫升血液樣本大於1.5 mg(諸如介於1.6與2.0 mg之間)的二價陽離子螯合劑(諸如K2 EDTA、K3 EDTA或檸檬酸鹽)混合，以形成混合物。

【0030】 接著，處理混合物以形成含幹細胞之溶液。該製程可包括將幹細胞活化與純化/分離的步驟。本文中使用的「純化」或「分離」等詞意指實質上從大型細胞(諸如細胞尺寸大於6微米)中分離出小型細胞(諸如細胞尺寸大於2微米且小於6微米)。

【0031】 混合物可儲存在溫度介於2°C與12°C之間，更佳地，介於2°C與7°C之間或為4°C，的適當設施中(諸如冰箱或其他保持冷凍的設備)一段預定的時間。該段時間可為介於3小時與72小時之間，且更佳地，介於3小時與6小時之間、介於6小時與72小時之間、介於6小時與48小時之間、介於16小時與72小時

之間、介於16小時與48小時之間、介於36小時與60小時之間、介於48小時與72小時之間或約48小時。在混合物儲存一段預定時間之後，可利用二價陽離子螯合劑(諸如K₂ EDTA、K₃ EDTA或檸檬酸鹽)活化混合物中一或多個特定類型的體幹細胞(諸如SB細胞)，亦即，一或多個特定類型體幹細胞的細胞週期從G₀活化成G₁。該活化作用可與二價陽離子螯合劑抑制p53功能(假定藉由螯合Zn²⁺)的能力相關，從而使得一或多個特定類型的體幹細胞(諸如SB細胞)存活於細胞週期之G₀靜止期至G₁期。由於p53蛋白需要Zn²⁺以適當褶疊並形成功能性蛋白，利用二價陽離子螯合劑螯合Zn²⁺可為活化該一或多個特定類型體幹細胞(諸如SB細胞)的關鍵步驟。可能的是，二價陽離子螯合劑可螯合其他二價離子(諸如Ca²⁺)，從而活化該一或多個特定類型的體幹細胞，且迫使其分化與擴展。

【0032】 當混合物經儲存時，其由於重力而分層，包括上層與下層。上層或上清液，可具有體積介於20與250毫升之間、介於40與125毫升之間或介於50與100毫升之間。上層含有血小板、血清、及一或多個特定類型的小型體幹細胞(例如，亦稱作SB細胞)、BLSCs (亦即，CD66e(+))體幹細胞)、及VSELs (諸如CD133(+))體幹細胞與CD34(+))體幹細胞)。大多數含有譜系細胞的大型細胞與血液樣本中的大型體幹細胞，諸如血液樣本中大於95%、98%或99%的大型細胞，皆位於下層。上清液體積與血液樣本體積的比率，舉例而言，可在三分之一至二分之一的範圍內。

【0033】接著，實質上所有的上層可收集或轉移至液體容器中，諸如袋子、注射器或玻璃瓶，以產生含幹細胞之溶液或幹細胞混合物。上層，諸如含幹細胞之溶液，含有小型細胞，其包括血小板與小型體幹細胞。含幹細胞之溶液中的小型體幹細胞數目可為大於或等於一千萬個(諸如大於或等於三千萬個、大於或等於五千萬個、介於一千萬與五千萬個之間、介於二千五百萬與三億個之間或介於三千萬與五億個之間)。含幹細胞之溶液亦可含有二價陽離子螯合劑(諸如EDTA)及/或生長因子。

【0034】此外，含幹細胞之溶液幾乎不包括或實質上不包括大型細胞(諸如大型體幹細胞與譜系細胞)。舉例而言，大型細胞可構成含幹細胞之溶液中細胞總數的5%以下(諸如1%、0.5%或0.01%以下)。舉例而言，含幹細胞之溶液(諸如所收集的上層)中紅血球細胞的數目可為每毫升 10^5 或 10^4 個以下。較佳地，含幹細胞之溶液中紅血球細胞數目為每毫升 10^3 個以下。含幹細胞之溶液中白血球細胞數目可為每毫升 10^4 個以下(諸如 10^3 個以下)。較佳地，含幹細胞之溶液中白血球細胞數目為每毫升 10^2 個以下。

【0035】在含幹細胞之溶液中，所有細胞中有大於95%(諸如99%或99.99%)可為小型細胞。小型細胞可包括血小板、Lgr5(+)細胞、CD349(+)細胞、CD133(+)細胞、CD34(+)、及CD66e(+)細胞。血小板可構成含幹細胞之溶液中75%至85%的小型細胞。在所有的小型細胞中，有大於4%(諸如大於5%或介於4.5%與10%之間)可為Lgr5+體幹細胞。

CD349(+)體幹細胞可構成含幹細胞之溶液中所有小型細胞的4%以上(諸如5%以上或介於4.5%與10%之間)。在小型細胞中,有2%以下(諸如1%或0.5%以下)可為CD133(+)細胞與CD34(+)細胞的組合。在小型細胞中,有6%以下(諸如5%或4.5%以下)可為CD66e(+)細胞。

【0036】 利用流式細胞術或其他常規技術(諸如抗體為主的技術,如抗體鍵接珠粒),亦可從收集的上層中進一步分離或去除任何特定的小型細胞。

【0037】 所收集的上層可以原樣用作含幹細胞之溶液(諸如投予個體或儲存)或進一步加工。舉例而言,其可進一步純化(諸如過濾)或與一或多個其他組分混合。可將適用之無Ca²⁺細胞培養基或溶液(諸如大於400毫升,如介於500與900毫升之間)加入所收集的上層中,以製成含幹細胞之溶液。適用之無Ca²⁺細胞培養基或溶液,諸如含NaCl之溶液,可進一步無任何二價離子,包括Mg²⁺。含NaCl之溶液,舉例而言,可為正常食鹽水(諸如0.90% w/v之NaCl溶液,約300 mOsm/L或每公升9.0克)。

【0038】 含幹細胞之溶液可儲存在冷凍儲存溫度,諸如等於或小於-70°C或-80°C(如介於-75°C與-85°C之間),一段長的時間(諸如一週、一個月或一年以上)。當準備使用時,可快速解凍該冷凍的含幹細胞之溶液,且任擇地,與上述合適的無Ca²⁺培養基或溶液(諸如0.9% NaCl)混合。

治療方法

【0039】 由上述程序產生的含幹細胞之組成物可用於增加

個體的PRMT位準。該組成物亦可用於治療與PRMT位準下降相關之病症或可由PRMT促效劑治療之病症。

【0040】 「蛋白質精胺酸甲基轉移酶」或「PRMT」等詞意指催化精胺酸甲基化作用的酵素。哺乳類動物基因體編碼至少九個不同的PRMTs，亦即，PRMT1、PRMT2、PRMT3、PRMT4、PRMT5、PRMT6、PRMT7、PRMT8、及PRMT9。

【0041】 PRMT位準可指取自個體的任何生物樣本，諸如血液樣本、骨髓樣本、尿液樣本或實體組織樣本，中PRMT的蛋白質位準、mRNA位準、cDNA位準或功能性(諸如酵素性)位準。降低的PRMT位準是指該位準低於健康個體或個體無PRMT位準降低相關之病症的位準或位準範圍。對照組位準可為健康個體、個體無PRMT位準降低相關之病症或個體以含幹細胞之組成物治療之前的位準。測定蛋白質、mRNA、cDNA、及功能性位準的方法為本領域習知，諸如ELISA、西方墨點法、及即時PCR。

【0042】 在組成物投予個體之前與之後，可測定由個體所取得之樣本，諸如血液樣本、骨髓樣本、尿液樣本或實體組織樣本，中PRMT的位準，以監控治療功效。任擇地，可在投予之前及/或之後評估個體的疾病參數或症狀。

【0043】 可以含幹細胞之組成物治療之病症包括老化、貧血、其他血液細胞疾病、及T細胞相關之疾病。

【0044】 本文所述的含幹細胞之組成物可經由任何投予途徑投予有需求之個體，諸如靜脈、關節、結膜、顱內、腹膜、胸膜、肌肉、鞘內或皮下投予途徑。組成物可含有介於一千

萬與五億個之間的小型體幹細胞。可使用自體或同種異體之體幹細胞。組成物可諸如每1-14天、每2-4週、每1-6個月或每2-12個月、一段治療期(諸如1-36個月或2-10年)或在需要時投予個體。

【0045】「個體」意指人類或非人類動物。「治療」或「處理」意指投予化合物或組成物至患有疾病之個體，其目的在於治癒、緩和、緩解、補救、延緩疾病發作或改善疾病、疾病症狀、疾病繼發之疾病狀態或疾病素因(predisposition)。一「有效量」意指能在治療的個體身上產生醫學上所需結果之化合物或組成物的量。治療方法可單獨進行或與其他藥物或療法聯合進行。

【0046】以下具體的實施例僅用於說明，且不得以任何方式侷限本公開之其餘部分。無需進一步闡述，相信本發明所屬技術領域中具有通常知識者基於本文之內容可將本發明利用至其最充分的程度。

實施例

【0047】從91位個體之每一者中取得100至150 ml的週邊血液樣本。將含有血液樣本的EDTA塗佈管儲存在4°C下6至48小時，直到血液經由重力分離成兩個不同層。收集頂層，其含有SB細胞，並通過靜脈注射將其自體輸送回各個體。該等個體每隔三至六個月接受一次治療，總共四次治療。

【0048】在治療之前與之後從該等個體收集血液樣本。利用RT-PCR測定樣本中PRMT5的表現位準。在第1

次治療後24小時或1週內，67%的個體顯示出PRMT5表現顯著地增加(即至少1.3倍)。參見表1。此外，該等個體描述感覺更有活力且睡得更好。

表1.

	# 病患(總數)	# 病患(陽性)	% 病患
第 1 次治療	91	61	67%
第 2 次治療	12	4	33%
第 3 次治療	4	2	50%
第 4 次治療	2	2	100%

其他實施例

【0049】 在本說明書中所揭露之所有特徵可以係以任何組合被結合。在本說明書中所揭露之每個特徵可以被一相同的、等同的，或者相似目的之替代特徵所取代。因此，除非另有明確地表示，所揭露的每個特徵僅是一系列等同的或者相似的特徵的一範例。

【0050】 從以上的說明，本發明所屬技術領域中具有通常知識者可以輕易地確定所述具體實施例的主要特徵，並且在不脫離其精神及範圍的情況下，可以對該等具體實施例進行各種變化和修改，以使其適用於各種用途和條件。因此，其它具體實施例亦係在本申請專利範圍內。



201907926

【發明摘要】

【中文發明名稱】

體幹細胞用於增加蛋白質精胺酸甲基轉移酶(PRMT)位準的用途

【英文發明名稱】

USE OF SOMATIC STEM CELLS FOR INCREASING PRMT LEVEL

【中文】

一種增加在一個體中之蛋白質精胺酸甲基轉移酶(PRMT)位準的方法，其包含：辨識一有需求的個體；以及向該個體投予一含有複數個尺寸大於2微米且小於6微米之小型細胞的組成物；其中該等小型細胞包括複數個體幹細胞，該等體幹細胞係(i)多潛能性或多功能性；且係(ii) CD349(+)、CD9(+)、Oct4(+)、Nanog(+)、Lgr5(+)、CD66e(+)、CD133(+)或CD34(+)。

【英文】

A method of increasing a protein arginine methyltransferase (PRMT) level in a subject, comprising: identifying a subject in need thereof; and administering to the subject a composition that contains small cells that are greater than 2 micrometers and less than 6 micrometers in size; wherein the small cells include somatic stem cells that are (i) pluripotent or multipotent; and (ii) CD349(+), CD9(+), Oct4(+), Nanog(+), Lgr5(+), CD66e(+), CD133(+), or CD34(+).

【指定代表圖】 (無)

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種增加在一個體中之蛋白質精胺酸甲基轉移酶(PRMT)位準的方法，其包含：

辨識一有需求的個體；以及

向該個體投予一含有複數個尺寸大於2微米且小於6微米之小型細胞的組成物；

其中該等小型細胞包括複數個體幹細胞，該等體幹細胞係 (i) 多潛能性 (pluripotent) 或多功能性 (multipotent)，且係(ii) CD349(+)、CD9(+)、Oct4(+)、Nanog(+)、Lgr5(+)、CD66e(+)、CD133(+或CD34(+))。

【第2項】 如請求項1之方法，其中該辨識步驟包括檢測從該個體取得之一生物樣本中之PRMT位準。

【第3項】 如請求項2之方法，其中該PRMT為PRMT5。

【第4項】 如請求項1之方法，其中該個體具有一與PRMT功能異常相關之病症。

【第5項】 如請求項4之方法，其中該病症為老化或貧血。

【第6項】 如請求項1至5中任一項之方法，其中該小型細胞進一步包括血小板。

【第7項】 如請求項6之方法，其中該小型細胞的75%至85%為血小板，且該小型細胞的20%至25%為該等體幹細胞。

【第8項】 如請求項7之方法，其中該組成物含有1千萬至5億個該等體幹細胞。

【第9項】 如請求項8之方法，其中該組成物係藉由一製程所製備，該製程包括：

提供一混合物，其含有一從該個體或一供體個體所取得之血液樣本及一種二價陽離子螯合劑；

將該混合物儲存在介於2°C與12°C之間的溫度下3至72小時，藉此使該混合物分離成一上層及一下層，其中該上層包含該等小型細胞群(population)；以及

收集該上層，藉此製備該組成物。

【第10項】 如請求項9之方法，其中該二價陽離子螯合劑為EDTA。

【第11項】 如請求項10之方法，其中以每毫升血液樣本1.5至2.0 mg的二價陽離子螯合劑與該血液樣本混合，以獲得該混合物。

【第12項】 如請求項10之方法，其中在取得該血液樣本之前，在該個體或供體個體身上進行一用於增加幹細胞數目的動作。

【第13項】 如請求項12之方法，其中該動作為投予一有效量的褐藻糖膠(fucoidan)或顆粒性白血球群落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor)。

【第14項】 如請求項10之方法，其中該用於製備該組成物的製程進一步包括，在收集該上層之後，添加一藥學上可接受之賦形劑至該經收集的上層。

【第15項】 如請求項10之方法，其中該用於製備該組成物的製程進一步包括，在收集該上層之後，將該上層離

心以獲得一細胞沉澱物。

【第16項】如請求項15之方法，其中該用於製備該組成物的製程進一步包括清洗該沉澱物，並將該沉澱物懸浮在一藥學上可接受之賦形劑中。

【第17項】如請求項15或16之方法，其中該藥學上可接受之賦形劑中不含二價離子。

【第18項】如請求項17之方法，其中該藥學上可接受之賦形劑為一食鹽水溶液。

【第19項】如請求項1-18中任一項之方法，其中該組成物係經靜脈注射投予。

【第20項】如請求項1-19中任一項之方法，其進一步包含，在該投予步驟之後，檢測在該投予步驟之後從該個體取得之生物樣本中的PRMT位準。