



(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 I866964 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 12 月 21 日

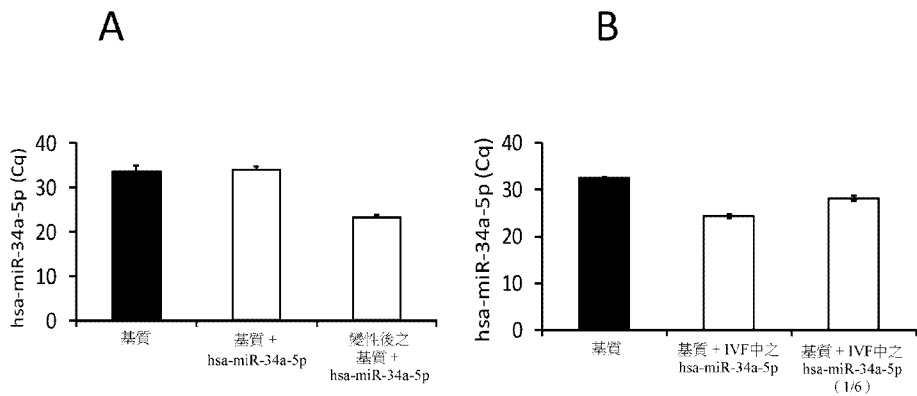
(21)申請案號：109113038 (22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 17 日
(51)Int. Cl. : C12Q1/6806 (2018.01) C12Q1/6876 (2018.01)
(30)優先權：2019/04/16 歐洲專利局 19 305496.2
(71)申請人：法商 G E N F I T 公司 (法國) GENFIT (FR)
法國
(72)發明人：馬傑 祖赫 MAJD, ZOUHER (FR)
(74)代理人：張仲謙
(56)參考文獻：
WO 2013148151A1
審查人員：張維纓
申請專利範圍項數：15 項 圖式數：7 共 43 頁

(54)名稱
穩定微 RNA 的組成物及方法
(57)摘要

本發明係關於微 RNA(miRNA)分子之穩定化。本文所述之組成物及方法可有利地用於提供內部對照及標準的微 RNA 以包含於套組中，該等套組可用於生物體液中 miRNA 之正規化的相對或絕對定量。

The present invention relates to the stabilization of micro-RNA molecules. The compositions and methods described herein can advantageously be used for the provision of internal control and standard microRNAs for inclusion into kits, useful for the normalized, relative or absolute quantification of a microRNA in a biological fluid.

指定代表圖：



第 1 圖



I866964

【發明摘要】

【中文發明名稱】 穩定微RNA的組成物及方法

【英文發明名稱】 COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE

STABILIZATION OF MICRO-RNA

【中文】

本發明係關於微 RNA (miRNA) 分子之穩定化。本文所述之組成物及方法可有利地用於提供內部對照及標準的微 RNA 以包含於套組中，該等套組可用於生物體液中 miRNA 之正規化的相對或絕對定量。

【英文】

The present invention relates to the stabilization of micro-RNA molecules. The compositions and methods described herein can advantageously be used for the provision of internal control and standard microRNAs for inclusion into kits, useful for the normalized, relative or absolute quantification of a microRNA in a biological fluid.

【指定代表圖】 第1圖

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【特徵化學式】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 穩定微RNA的組成物及方法

【英文發明名稱】 COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE

STABILIZATION OF MICRO-RNA

【技術領域】

【0001】 本發明係關於微RNA (miRNA) 分子之穩定化。本文所述之組成物及方法可有利地用於提供標準的微RNA以包含於套組中，該等套組可用於生物體液中miRNA之相對或絕對定量。

【先前技術】

【0002】 循環miRNA提供許多特徵，使其成為一類有吸引力的生物標誌物。其為穩定的，其序列具有進化保守性，miRNA表現通常為組織或病理學特異性的，且由於其可藉由即時PCR進行偵測，因此分析可具有高度靈敏性及特異性。然而，亦存在仍需解決的與循環miRNA之偵測相關聯的挑戰。其中一個挑戰與血液中總RNA含量低有關，使得經分離之RNA的濃度及品質難以量測。因此，至關重要的是：i)具有所關注之miRNA之經校準及精確的陽性對照，及ii)基於起始物質及miRNA提取量的差異，精確地將所偵測之miRNA值正規化。已有藉由尋找「管家」循環RNA進行正規化的嘗試。一些報道使用U6或其他miRNA（例如miR-16）作為管家RNA。然而，此等RNA之含量經常在病理條件下改變。另有報道一種加標正規化(spiked-in normalization)方法，其中在純化過程中添加3種合成的秀麗隱桿線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) miRNA（與人類miRNA沒有同

源性)並用於資料正規化。然而，儘管miRNA在生物體液中相對穩定，與蛋白質及脂質相關聯且封裝於大囊泡中，但合成miRNA容易被RNA酶水解且因此難以處理或使用。此為一個主要問題，因為加標方法應使用已知濃度的miRNA標準物，是對生物體液之miRNA含量進行絕對或相對定量的要求。

【發明內容】

【0003】 本發明提供解決此問題之組成物及方法。

【0004】 本發明人在本文中表明，當與脂質載體複合時，合成miRNA可有利地引入套組中，該等套組可用於疾病之診斷、預後或監測。

【0005】 因此，本發明之第一態樣係關於一種診斷套組，其包含一或多個包含合成miRNA及脂質載體之容器，其中該合成miRNA處於設定濃度。

【0006】 本發明之一個特定態樣係關於一種診斷套組，其包含一或多個包含合成miRNA、脂質載體及基質（例如合成血清、去除核酸之血漿、血液來源的樣品）的容器，其中該合成miRNA處於設定濃度。

【0007】 在一個特定實施例中，套組包含多於一個容器。

【0008】 在第一變形例中，每個容器可包含相同的合成miRNA，該合成miRNA在每個不同的容器中處於不同的設定濃度。舉例而言，套組可包含第一容器及至少一個第二容器，第一容器包含設定濃度的合成miRNA，第二容器包含與第一容器相同的合成miRNA，其中第二容器中合成miRNA之濃度與其在第一容器中之濃度不同。套組可包含另一個包含相同的合成miRNA之第三容器，其中第三容器中合成miRNA之濃度與其在第一容器中之濃度及其在第二容器中

之濃度不同。套組可包含一或多個另外的容器，其含有不同濃度之相同的合成miRNA。

【0009】 在第二變形例中，套組包含：

- 一或多個包含第一合成miRNA之容器；及
- 一或多個包含與第一合成miRNA不同之第二合成miRNA的容器。

【0010】 舉例而言，套組可包含：

- 第一組含有第一合成miRNA之容器，其中該第一合成miRNA在第一組容器之每個容器中的濃度不同；及
- 第二組含有第二合成miRNA之容器，其中該第二合成miRNA在第二組容器之每個容器中的濃度不同。

【0011】 套組可進一步包含至少另一個容器或至少另一組容器，其包含另外的合成miRNA（例如第三或多於第三的合成miRNA）。另外的合成miRNA可與第一合成miRNA、第二合成miRNA及套組中包括的任何其他低階miRNA不同。舉例而言，在第三合成miRNA之情況下，該第三合成miRNA與第一合成miRNA及第二合成miRNA不同。在包含另一組容器之實施例中，另外的合成miRNA（例如第三合成miRNA）在另外（例如第三）組容器之每個容器中可具有不同的濃度。

【0012】 本發明之套組中所包括之合成miRNA可為任何可用於品質控制或用於內部控制、診斷、預後或監測價值之合成miRNA。舉例而言，套組中所包括之合成miRNA可具有一種miRNA之序列，該miRNA在生物體液中之含量、存在與否與疾病或疾病階段相關，或與疾病或疾病階段潛在相關，或與潛在疾病或潛在疾病階段相關。診斷中可包含評定至少一種miRNA之含量、存在或不

存在的說明性疾病包括但不限於非酒精性脂肪肝病（NAFLD）、NASH、癌症、纖維化、病毒感染、神經系統病症、心血管病症及糖尿病。

【0013】 在一個特定實施例中，此合成miRNA為含量、存在與否與NAFLD、NASH或纖維化相關聯，尤其與具有纖維化之NASH相關聯的一種miRNA。

【0014】 在一個特定實施例中，一或多個容器中之至少一個包含合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）、hsa-miR-452（更尤其hsa-miR-452-5p）或合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）。

【0015】 在另一個特定實施例中，一或多個容器中之至少一個包含合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）。在又一個實施例中，套組包含一組容器，其各自包含不同濃度的合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）。在一個特定變形例中，該套組包含一個、至少兩個或至少三個容器，其各自包含不同濃度的合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）。在另一個特定變形例中，該套組包含一個、兩個或三個容器，其各自包含不同濃度的合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）。另一個變形例係關於包含一個容器之套組，該容器包含設定濃度的合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）。另一個變形例係關於包含兩個容器之套組，該兩個容器包含設定濃度的合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p），其中第一容器中合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）之濃度與第二容器中合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）之濃度不同。在又一個變形例中，套組包含三個容器，其包含設定濃度的合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p），其中第一容器中合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）之濃度與第二容器中合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）之濃度不同，且

其中第三容器中合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）之濃度與第一容器及第二容器中合成hsa-miR-34a（更尤其hsa-miR-34a-5p）之濃度不同。

【0016】 在另一個特定實施例中，一或多個容器中之至少一個包含合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）。在另一個實施例中，套組包含一組容器，其各自包含不同濃度的合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）。在一個特定變形例中，該套組包含一個、至少兩個或至少三個容器，其各自包含不同濃度的合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）。在另一個特定變形例中，該套組包含一個、兩個或三個容器，其各自包含不同濃度的合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）。另一個變形例係關於包含一個容器之套組，該容器包含設定濃度的合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）。另一個變形例係關於包含兩個容器之套組，該兩個容器包含設定濃度的合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p），其中第一容器中合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）之濃度與第二容器中合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）之濃度不同。在另一個變形例中，套組包含三個容器，其包含設定濃度的合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p），其中第一容器中合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）之濃度與第二容器中合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）之濃度不同，且其中第三容器中合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）之濃度與第一容器及第二容器中合成hsa-miR-193（更尤其hsa-miR-193b-3p）之濃度不同。

【0017】 在一個特定實施例中，一或多個容器中之至少一個包含合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）。在另一個實施例中，套組包含一組容器，其各自包含不同濃度的合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）。在一個特定變

形例中，該套組包含一個、至少兩個或至少三個容器，其各自包含不同濃度的合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）。在另一個特定變形例中，該套組包含一個、兩個或三個容器，其各自包含不同濃度的合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）。另一個變形例係關於包含一個容器之套組，該容器包含設定濃度的合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）。另一個變形例係關於包含兩個容器之套組，該兩個容器包含設定濃度的合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p），其中第一容器中合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）之濃度與第二容器中合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）之濃度不同。在又一個變形例中，套組包含三個容器，其包含設定濃度的合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p），其中第一容器中合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）之濃度與第二容器中合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）之濃度不同，且其中第三容器中合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）之濃度與第一容器及第二容器中合成cel-miR-39（更尤其cel-miR-39-3p）之濃度不同。

【0018】在另一個特定實施例中，一或多個容器中之至少一個包含合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）。在又一個實施例中，套組包含一組容器，其各自包含不同濃度的合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）。在一個特定變形例中，該套組包含一個、至少兩個或至少三個容器，其各自包含不同濃度的合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）。在另一個特定變形例中，該套組包含一個、兩個或三個容器，其各自包含不同濃度的合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）。另一個變形例係關於包含一個容器之套組，該容器包含設定濃度的合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）。另一個變形例係關於包含兩個容器之套組，該兩個容器包含設定濃度的合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p），

其中第一容器中合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）之濃度與第二容器中合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）之濃度不同。在又一個變形例中，套組包含三個容器，其包含設定濃度的合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p），其中第一容器中合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）之濃度與第二容器中合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）之濃度不同，且其中第三容器中合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）之濃度與第一容器及第二容器中合成cel-miR-40（更尤其cel-miR-40-3p）之濃度不同。

【0019】 在另一個特定實施例中，一或多個容器中之至少一個分別包含合成的ath-miR-159a、cel-lin-4、cel-miR-2、cel-miR-238、cel-miR-54或cel-miR-55，更尤其ath-miR-1549a、cel-lin4-5p、cel-miR2-3p、cel-miR-238-3p、cel-miR-54-3p或cel-miR-55-3p。

【0020】 本發明之套組的容器包含miRNA及脂質載體之複合物。用於實踐本發明之說明性脂質載體可包含但不限於陽離子脂質、非陽離子脂質（諸如中性或陰離子脂質）及結合脂質，諸如與胺基酸結合之脂質、與肽結合之脂質或與PEG結合之脂質。在另一個實施例中，用於實踐本發明之脂質載體包含非陽離子脂質（諸如中性或陰離子脂質）及結合脂質，諸如與胺基酸結合之脂質、與肽結合之脂質或與PEG結合之脂質。在一個特定實施例中，脂質載體包含至少一種陽離子脂質。在另一個特定實施例中，將至少一種陽離子脂質與至少一種中性脂質及/或至少一種結合脂質混合。在另一個特定實施例中，陽離子脂質可與PEG混合，諸如分子量為500-7500之C12-C20，尤其C14-C18 PEG。

【0021】 在一個特定實施例中，用於實踐本發明之脂質載體係選自與PEG結合之脂質。在另一個特定實施例中，脂質載體為與PEG結合之甘油磷脂。在又

一個實施例中，脂質載體為與PEG結合之單甘油磷酸乙醇胺或與PEG結合之二醯基甘油磷酸乙醇胺或其鹽。在另一個實施例中，脂質載體為與PEG結合之二醯基甘油磷酸乙醇胺或其鹽。在另一個特定實施例中，脂質載體為與PEG結合之二(C₁₄-C₁₈)醯基甘油磷酸乙醇胺或其鹽，諸如與PEG結合之二C₁₆醯基甘油磷酸乙醇胺或其鹽。在本段中揭示之每個實施例中，PEG部分可為分子量為500至7500，尤其750至5000，諸如1000至4000之PEG。在特定實施例中，本段中所述之脂質載體的PEG部分可具有1000、2000、3000或4000，尤其2000。在另一個特定實施例中，脂質載體為1,2-二棕櫚醯基-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000] (C16 PEG2000 PE) 或其鹽，諸如其銨鹽。

【0022】 在一個特定實施例中，陽離子脂質為單價或多價陽離子脂質。在單價陽離子脂質中，可列舉但不限於DOTMA、DOTAP、DMRIE及DDAB。說明性多價陽離子脂質包括但不限於DOSPA、DOSPER、DOGS、TMTPS、TMTOS、TMTLS、TMTMS及TMDOS。在中性脂質中，可列舉但不限於DOPE、DPhPE及膽固醇。

【0023】 舉例而言，說明性脂質載體包括但不限於WO9405624、WO9427435、WO9502698、WO9517373、WO9640961、US8058068、WO9840502、US20060229246、US20030069173、WO200027795、WO200234879、WO2006102163、WO201268176、WO201611203及US20190060482中所揭示之脂質載體。

【0024】 在一個特定實施例中，脂質載體係選自：

2,3-二油烯基氧基-1-(N,N-二甲基胺基)丙烷；

2H-異吡啶-2-乙銨, N-[2,3-雙(9-十八烯氧基)丙基]-1,3-二氫-N,N-二甲基-1,3-二側氧基-, 溴化物；

1-丙銨. N-(2-胺基)乙基-N,N-二甲基-2,3-雙(9-十八烯氧基)-溴化物；

3-氧雜-5,9,15-三氮雜十七烷-17-銨, N-[2,3-雙(9-十八烯氧基)丙基]-9-[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]-13-[(1,1-二甲基乙氧基)羰基] [3-[(1,1-二甲基乙氧基)-羰基]胺基丙基]胺基-N,N,2,2-四甲基-4,14-二側氧基-, 溴化物；

1-丙銨. N-[2-[[2,5-雙[(3-胺基丙基)胺基]-1-側氧基-戊基]胺基]乙基]-n,n-二甲基-2,3-雙(9-十八烯氧基)-, 四(三氟乙酸)鹽

1-丙銨, N-[2-(2-溴)乙基]-N,N-二甲基-2,3-雙(9-十八烯氧基)-, 溴化物；

1-丙銨, N-{2-[[3-[[4-[(3-胺基丙基)胺基]丁基]胺基]丙基]胺基]乙基}-n,n-二甲基-2,3-雙(9-十八烯氧基)-, 溴化物；及

1-丙銨, N-[2-[(3-胺基丙基)胺基]乙基]-N,N-二甲基-2,3-雙(9-十八烯氧基)-, 溴化物。

【0025】 在一個特定實施例中，脂質載體係選自：

與DOPE混合或未混合的N,N,N',N'-四棕櫚醯基精胺；

與DOPE混合或未混合的N,N,N',N'-四棕櫚基精胺；

與DOPE混合或未混合的N,N,N',N'-四甲基四棕櫚基精胺四銨碘化物；

N,N,N',N'-六甲基四棕櫚基精胺四銨碘化物；

DOTMA:DOPE（尤其1:1（w/w））及

DOSPA:DOPE（尤其1.5:1（w/w））；

在一個特定實施例中，脂質載體為N,N,N',N'-四甲基四棕櫚基精胺四銨碘化物，更尤其N,N,N',N'-四甲基四棕櫚基精胺四銨碘化物及DOPE之1:1混合物；

【0026】 在一個特定實施例中，基於脂質之載體包含2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙銨三氟乙酸鹽。在另一個實施例中，2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙銨三氟乙酸鹽與諸如二油醯基磷脂醯乙醇胺之中性脂質混合。

【0027】 在另一個特定實施例中，基於脂質之載體包含：

N¹,N⁴-二油醯基-二胺基丁烷；

N¹,N⁴-二油烯基-二胺基丁烷；

N¹,N⁴-二油烯基- N¹,N⁴-二-[2-羥基-3-(N-鄰苯二甲醯胺基) 丙基]-二胺基-丁烷；

N¹,N⁴-二油烯基- N¹,N⁴-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)]- 二胺基丁烷 (DHDOS)；

N¹,N⁴-二肉豆蔻基- N¹,N⁴-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基丁烷；

N¹,N⁴-二棕櫚基- N¹,N⁴-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基 丁烷；

N¹,N⁴-二棕櫚醯基- N¹,N⁴-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基丁烷；

N¹,N⁴-二硬脂醯基- N¹,N⁴-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基丁烷；

N¹,N⁴-二月桂基- N¹,N⁴-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基丁烷；

N¹,N²-二肉豆蔻基- N¹,N²-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基乙烷；

N¹,N²-二棕櫚基- N¹,N²-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基乙烷；

N¹,N²-二棕櫚醯基- N¹,N²-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基乙烷；

N¹,N²-二硬脂醯基- N¹,N²-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基乙烷；

N¹,N²-二月桂基- N¹,N²-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基乙烷；

N¹,N²-二油烯基- N¹,N²-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-二胺基乙烷；

N¹,N⁹-二肉豆蔻基- N¹,N⁹-二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-聚醚胺；

N^1, N^9 -二棕櫚基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-聚醚胺；

N^1, N^9 -二棕櫚醯基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-聚醚胺；

N^1, N^9 -二硬脂醯基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-聚醚胺；

N^1, N^9 -二月桂基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-聚醚胺；

N^1, N^9 -二油烯基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-胺基丙基)-聚醚胺；

N^1, N^4 -二油烯基- N^1, N^4 -二-[2-羥基-3-(N-甲脒)胺基丙基]-二胺基丁烷；

N^1, N^4 -二油烯基- N^1, N^4 -二-{2-羥基-3-[N-(NI, NII, NIII, NIV-丁氧基羰基-精胺
甲醯胺基)]胺基丙基}二胺基丁烷；

N^1, N^4 -二油烯基- N^1, N^4 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-二胺基丁
烷；

N^1, N^4 -二肉豆蔻基- N^1, N^4 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)胺基丙基]-二 胺
基 丁烷；

N^1, N^4 -二棕櫚基- N^1, N^4 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-二胺基
丁烷；

N^1, N^4 -二棕櫚醯基- N^1, N^4 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)胺基丙基]-二胺基
丁烷；

N^1, N^4 -二硬脂醯基- N^1, N^4 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-二胺
基丁烷；

N^1, N^4 -二月桂基- N^1, N^4 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]二胺基丁
烷；

N^1, N^9 -二肉豆蔻基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)胺基丙基]-聚醚
胺；

N^1, N^9 -二棕櫚基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-聚醚胺；

N^1, N^9 -二棕櫚醯基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-聚醚胺；

N^1, N^9 -二硬脂醯基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-聚醚胺；

N^1, N^9 -二月桂基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-聚醚胺；

N^1, N^9 -二油烯基- N^1, N^9 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-聚醚胺；

N^1, N^2 -二肉豆蔻基- N^1, N^2 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-二胺基乙烷；

N^1, N^2 -二棕櫚基- N^1, N^2 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-二胺基乙烷；

N^1, N^2 -二棕櫚醯基- N^1, N^2 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-二胺基乙烷；

N^1, N^2 -二硬脂醯基- N^1, N^2 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-二胺基乙烷；

N^1, N^2 -二月桂基- N^1, N^2 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-二胺基乙烷；

N^1, N^2 -二油烯基- N^1, N^2 -二-[2-羥基-3-(N-精胺甲醯胺基)-胺基丙基]-二胺基乙烷。

【0028】 在另一個實施例中，基於脂質之載體包含：

N, N', N'', N''' 四甲基四棕櫚基精胺（TMTPS-碘化物或TMTPS-氯化物）；

與DOPE混合（（例如1:1.5（M/M））之N,N',N'',N'''四甲基四棕櫚基精胺（TMTPS-碘化物）；

與DOPE混合（（例如1:1.5（M/M））之脂質體N,N',N'',N'''四甲基四棕櫚基精胺（TMTPS-碘化物）。

【0029】 在另一個實施例中，基於脂質之載體包含含胺脂質，諸如：

2-[3-甲胺基丙基-(2-側氧基-2-十四烷氧基乙基)胺基]乙酸十四烷基酯；

2-[2-[2-[2-[雙 [2-(十二烷基胺基)-2-側氧基-乙基] 胺基] 乙基-[2-(十二烷基胺基)-2-側氧基-乙基] 胺基] 乙基胺基] 乙基-[2-(十二烷基胺基)-2-側氧基-乙基] 胺基]-N-十二烷基-乙醯胺；

2-[2-[2-[2-[雙[2-(十二烷基胺基)-2-側氧基乙基]胺基] 乙基胺基] 乙基胺基] 乙基-[2-(十二烷基胺基)-2-側氧基乙基]胺基]-N-十二烷基-乙醯胺；

4,4'-(3-(甲基(4-側氧基-4-(十五烷氧基)丁基)胺基)丙基氮二基)二丁酸二(十五烷基)酯；及

4-(甲基(3-(4-側氧基-4-(十五烷氧基) 丁基胺基)丙基)胺基)丁酸十五烷基酯。

【0030】 在另一個特定實施例中，脂質載體包含WO2012068176之化合物1至87中之至少一個。在另一個特定實施例中，脂質載體包含選自由以下組成之群的至少一種脂質：

WO2012068176之化合物1；

WO2012068176之化合物2；

WO2012068176之化合物3；

WO2012068176之化合物4；

WO2012068176之化合物5；
WO2012068176之化合物6；
WO2012068176之化合物7；
WO2012068176之化合物8；
WO2012068176之化合物9；
WO2012068176之化合物10；
WO2012068176之化合物11；
WO2012068176之化合物12；
WO2012068176之化合物13；
WO2012068176之化合物14；
WO2012068176之化合物15；
WO2012068176之化合物16；
WO2012068176之化合物17；
WO2012068176之化合物18；
WO2012068176之化合物19；
WO2012068176之化合物20；
WO2012068176之化合物21；
WO2012068176之化合物22；
WO2012068176之化合物23；
WO2012068176之化合物24；
WO2012068176之化合物25；
WO2012068176之化合物26；

WO2012068176之化合物27；
WO2012068176之化合物28；
WO2012068176之化合物29；
WO2012068176之化合物30；
WO2012068176之化合物31；
WO2012068176之化合物32；
WO2012068176之化合物33；
WO2012068176之化合物34；
WO2012068176之化合物35；
WO2012068176之化合物36；
WO2012068176之化合物37；
WO2012068176之化合物38；
WO2012068176之化合物39；
WO2012068176之化合物40；
WO2012068176之化合物41；
WO2012068176之化合物42；
WO2012068176之化合物43；
WO2012068176之化合物44；
WO2012068176之化合物45；
WO2012068176之化合物46；
WO2012068176之化合物47；
WO2012068176之化合物48；

WO2012068176之化合物49；
WO2012068176之化合物50；
WO2012068176之化合物51；
WO2012068176之化合物52；
WO2012068176之化合物53；
WO2012068176之化合物54；
WO2012068176之化合物55；
WO2012068176之化合物56；
WO2012068176之化合物57；
WO2012068176之化合物58；
WO2012068176之化合物59；
WO2012068176之化合物60；
WO2012068176之化合物61；
WO2012068176之化合物62；
WO2012068176之化合物63；
WO2012068176之化合物64；
WO2012068176之化合物65；
WO2012068176之化合物66；
WO2012068176之化合物67；
WO2012068176之化合物68；
WO2012068176之化合物69；
WO2012068176之化合物70；

WO2012068176之化合物71；
WO2012068176之化合物72；
WO2012068176之化合物73；
WO2012068176之化合物74；
WO2012068176之化合物75；
WO2012068176之化合物76；
WO2012068176之化合物77；
WO2012068176之化合物78；
WO2012068176之化合物79；
WO2012068176之化合物80；
WO2012068176之化合物81；
WO2012068176之化合物82；
WO2012068176之化合物83；
WO2012068176之化合物84；
WO2012068176之化合物85；
WO2012068176之化合物86；
WO2012068176之化合物87；及
其鹽。

【0031】 在另一個特定實施例中，脂質載體可為如WO2012068176之表1、
2及3中所揭示之脂質調配物，該等表再現如下：

WO2012068176 之表 1

WO2012068176 之化合物	PEG 脂質	輔助脂質	緩衝液	乙醇(%)	濃度 (mg/ml)
----------------------	--------	------	-----	-------	---------------

49	C16 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
7	C16 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
69	C14 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
70	C14 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
51	C14 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
52	C14 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
54	C14 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
56	C16 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
57	C16 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
73	C16 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
76	C16 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625
77	C16 PEG2000 PE	膽固醇	50mM 乙酸鈉	25	15.625

WO2012068176 之表 2：

WO2012068176 之 化合物	PEG 脂質	輔助脂質	緩衝液	乙醇 (%)	濃度 (mg/ml)
IVF2.0	C16 PEG2000 PE	膽固醇	139.5mM 乙酸鈉	25	15.625
57 NO (CB00396)	C16 PEG2000 PE	膽固醇	139.5mM 乙酸鈉	25	15.625
57 OPT (CB00396)	C14 PEG2000 PE	膽固醇	139.5mM 乙酸鈉	25	15.625
72 OPT (CB00401)	C14 PEG2000 PE	膽固醇	139.5mM 乙酸鈉	25	15.625
84 NO (CB00416)	C14 PEG2000 PE	膽固醇	139.5mM 乙酸鈉	25	15.625
84 OPT (CB00416)	C14 PEG2000 PE	膽固醇	139.5mM 乙酸鈉	25	15.625

WO2012068176 之化合物	輔助脂質	乙醇(%)
83	無	100
67	膽固醇	100

【0032】 在另一個特定實施例中，脂質載體為DHDMS、HDMS、DOPE及膽固醇之混合物。在另一個實施例中，脂質載體為如WO2016011203之表1中所揭示之脂質調配物：

WO2016011203 之表 1：

調配物	DHDMS	HDMS	DOPE	膽固醇
1	0.1	0.1	0.4	0.4
2	0.1	0.25	0.25	0.4
3	0.1	0.25	0.4	0.25
4	0.1	0.4	0.1	0.4
5	0.1	0.4	0.25	0.25

6	0.1	0.4	0.4	0.1
7	0.1	0.3	0.3	0.3
8	0.2	0.4	0.2	0.2
9	0.2	0.2	0.2	0.4
10	0.2	0.2	0.4	0.2
11	0.25	0.4	0.1	0.25
12	0.25	0.4	0.25	0.1
13	0.25	0.1	0.25	0.4
14	0.25	0.1	0.4	0.25
15	0.25	0.25	0.1	0.4
16	0.25	0.25	0.4	0.1
17	0.3	0.1	0.3	0.3
18	0.3	0.3	0.1	0.3
19	0.3	0.3	0.3	0.1
20	0.4	0.4	0.1	0.1
21	0.4	0.2	0.2	0.2
22	0.4	0.25	0.1	0.25
23	0.4	0.25	0.25	0.1
24	0.4	0.1	0.1	0.4
25	0.4	0.1	0.25	0.25
26	0.4	0.1	0.4	0.1

【0033】 在另一個特定實施例中，脂質載體包含如US20190060482中所揭示之脂質奈米粒子調配物，其包含分子量為750、2000或5000，鏈長為14或18之PEG、DHDMS、HDMS、DOPE及膽固醇。更具體地，調配物為US20190060482之表2的調配物中之一個：

調配物	PEG 鏈長	PEG 分 子量	DHDMS	HDMS	DOPE	膽固醇	PEG
Bruce #3.10	14	5000	0.24	0.38	0.32	0.05	0.01
Bruce #3.14	14	5000	0.32	0.39	0.26	0.01	0.02
Bruce #3.20	14	5000	0.18	0.38	0.32	0.10	0.02
Bruce #3.19	14	5000	0.23	0.45	0.20	0.10	0.02
Bruce #3.11	14	5000	0.18	0.51	0.20	0.10	0.01
Bruce #3.15	14	5000	0.27	0.38	0.32	0.01	0.02
Bruce #3.12	14	5000	0.25	0.38	0.26	0.10	0.01
Bruce #2.2	18	750	0.28	0.24	0.32	0.14	0.02
Bruce #3.16	14	5000	0.18	0.47	0.32	0.01	0.02
Bruce #4	14	2000	0.24	0.40	0.24	0.10	0.02
Bruce #3.18	14	5000	0.32	0.38	0.20	0.08	0.02
莫耳範圍			0.18-0.32	0.24-0.51	0.20-0.32	0.01-0.14	0.01-0.02

【0034】 在一個特定實施例中，脂質載體為基於脂質之轉染劑，諸如選自以下之基於脂質之轉染：

Invivofectamine[®]；

Invivofectamine[®] 2.0；

Invivofectamine[®] 3.0；

Lipofectamine（聚陽離子脂質 2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙銨三氟乙酸鹽（DOSPA）及 DOPE 之 3:1（w/w）混合物）；

Lipofectamine 2000；

Lipofectace（二甲基二(十八烷基)銨溴化物（DDAB）及二油醯基磷脂醯乙醇胺（DOPE）之1:2.5（w/w）混合物）；

DORI-醚；

DORI-醚/溶血脂；

Lipofectin（N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基銨氯化物（DOTMA）及二油醯基磷脂醯乙醇胺（DOPE）之1:1（w/w）混合物）；

DOTAP；

BioPORTER；

Cellfectin（陽離子脂質四甲基棕櫚基精胺（TMTPS）及DOPE之1:1.5 M/M脂質體調配物）；及

DMRIE-C（陽離子脂質N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2.3-雙(十四烷氧基)-1-丙銨溴化物（DMRIE）及膽固醇之1:1 M/M脂質體調配物）。

在一個特定實施例中，脂質載體為invivofectamine[®] 2.0或invivofectamine[®] 3.0，尤其invivofectamine[®] 3.0。

【0035】 本發明亦關於本發明之診斷套組的用途。

【0036】 在一個特定實施例中，本發明之診斷套組用於診斷疾病之方法中。特定言之，該套組用於為套組中所含之miRNA提供校正標準。

【0037】 在本發明之上下文中，表述「用於診斷之方法」表示用於疾病診斷、預後或監測之方法，且亦表示用於評估針對疾病之治療功效的方法。

【0038】 因此，本發明係關於本發明之診斷套組在疾病之診斷、預後或監測方法中的用途。本發明之套組可為用於診斷非酒精性脂肪變性肝炎（NASH）及用於將個體分類為NASH治療之潛在接受者的方法，如PCT申請案WO2017167934中所述。

【0039】 本發明進一步關於用於診斷疾病之方法，其包含測定個體之生物樣品中miRNA之含量，其中將該miRNA之含量與本發明套組之標準物或陽性對照中之相同miRNA的含量進行比較。

【0040】 在一個特定實施例中，本發明之用途及方法包含將自生物樣品測定之miRNA的含量與套組中用作標準物或陽性對照之合成miRNA的含量進行比較。

【0041】 在另一個實施例中，本發明之用途及方法包含將自生物樣品測定之miRNA的含量相對於套組中用作內部對照之合成miRNA的含量進行正規化。

【0042】 在另一個實施例中，本發明之用途及方法包含用套組中用作標準物或陽性對照之合成miRNA的提取產率對自生物樣品測定之miRNA的含量進行正規化。

【0043】 本發明之用途及方法可用於定量個體之生物體液樣品中的miRNA，諸如血液來源的樣品，例如全血、血清或血漿，尤其血清。

【0044】 在另一個實施例中，本發明之用途及方法包含將本發明套組中之設定量的合成miRNA摻入欲測定miRNA含量之生物樣品中。在一個特定實施例中，摻入的合成miRNA為非人類miRNA，亦即個體樣品中不存在之外源性miRNA。舉例而言，非人類的擬南芥合成或外源性miRNA可來源於秀麗隱桿線蟲（*cel*）或擬南芥（*ath*）。在一個特定實施例中，摻入的miRNA為cel-miR39（尤其cel-miR-39-3p）。在本發明之上下文中用作合成miRNA之其他非人類miRNA包括但不限於ath-miR-159a及cel-miR-40-3p。

【0045】 因此，本發明之套組可用於提供與生物體液樣品中待測試之miRNA同時量測的內部對照。可使用以下公式來計算樣品中miRNA之含量，該公式係針對hsa-miR-34a-5p作為樣品中待測試之miRNA，cel-miR-39-3p作為內部對照及摻入的合成miRNA的量測以說明目的而給出：

$$\text{hsa-miR-34a-5p含量} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

其中： $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{樣品}} - \Delta Cq_{\text{標準物}}$

$$\Delta Cq_{\text{樣品}} = Cq_{\text{樣品之hsa-miR-34a-5p}} - Cq_{\text{樣品中摻入之cel-miR-39-3p}}$$

$$\Delta Cq_{\text{標準物}} = Cq_{\text{陽性標準物之hsa-miR-34a-5p}} - Cq_{\text{陽性標準物中摻入之cel-miR-39-3p}}$$

【圖式簡單說明】

【0046】 第1圖：invivofectamine[®]保護摻入血清中之合成hsa-miR-34a-5p寡核糖核苷酸。

第2圖：miRNA/invivofectamine[®]複合物在4℃下長達4小時之穩定性。

第3圖：在4℃下Invivofectamine[®]保護摻入血清中之合成hsa-miR-34a-5p寡核糖核苷酸長達4週。

第4圖：在-20℃下反覆冷凍-融化循環後，合成miRNA在與invivofectamine[®]組合時在血清中之穩定性。

第5圖：在具有NASH患病患者之臨床群組（n=562名患者，NTBT = 271名患者及TBT = 291名患者）中，具有內部對照(A)或沒有內部對照(B)之hsa-miR-34a-5p的ROC曲線。

第6圖：Invivofectamine[®]（IVF）/hsa-miR-34-a-5p複合物條件準備。

第7圖：Lipofectamine/hsa-miR-34-a-5p複合物條件準備。

【實施方式】

【0047】 實例

【0048】 - Invivofectamine[®]/miR複合物製備

經高度純化之miRNA寡核糖核苷酸係由IDT（Integrated DNA Technologies Skokie, Illinois USA）定製合成。

【0049】 根據製造商的建議（出版號MAN0013651 Rev A.0.pdf），使用Invivofectamine[®] 3.0試劑(IVF3001-3005, ThermoFisher Scientific, USA)與miRNA形成複合物。miRNA/Invivofectamine[®]（IVF）複合物無需稀釋即可使用，或藉由添加1 mL PBS（pH 7.4）稀釋6倍。

【0050】 -標準物及內部對照製備

為了製備標準miRNA或內部對照，將5 μL製備物添加至1)標準製備物之生物學基礎基質（亦即來自健康供體之血清或血漿，或其他基礎基質）中或2)直接添加至生物樣品中作為內部對照。

【0051】 用合成的 miRNA 寡核糖核苷酸（亦即 hsa-miR-34a-5p、

cel-miR-39-3p、cel-miR-40-3p) 製備標準 miRNA、陽性對照及內部對照。

【0052】 -小RNA提取

將待測試之樣品在冰上解凍。輕輕渦旋生物樣品且以6,000xg離心15分鐘。

【0053】 根據製造商的建議

(KingFisher™_Flex_User_Manual_5400630.pdf, 部件號N07669), 在KingFisher™系統 (KingFisher™ Flex System, 目錄號5400630, ThermoFisher) 上使用MagMax mirVana™自動提取。按照使用者指南 (MagMAX mirVana™總RNA分離套組 (手動提取) 使用者指南-出版號MAN0011131 - Rev. B.0.pdf) 使用MagMax mirVana™總RNA分離套組 (A27828, ThermoFisher)。

【0054】 -反轉錄 (RT)

使用TaqMan®微RNA反轉錄套組, 目錄號4366597及Taqman®微RNA分析RT引子[60X], 目錄號4440888 (大型式(large format)), 按照使用者手冊方案進行反轉錄反應: TaqMan® Small RNA Assays Protocol (PN 4364031E).pdf, 部件號4364031 Rev E 01/2011 根據製造商的建議 (Bio-Rad T100 thermal cycler Cat nbr 186-1096.pdf) 在Bio-Rad T100熱循環儀中進行培育。將cDNA儲存於-20°C的低結合試管中, 待進一步使用。

【0055】 -定量PCR

根據製造商的說明書, 在PCR盤 (ThermoFisher96孔, 透明孔, 半裙邊, 目錄號AB-0900) 中使用Taqman miRNA RT-qPCR Assay 20X及無尿嘧啶-N-糖苷酶 (UNG) 之TaqMan Universal Master Mix II 2X (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) 定量成熟miRNA之表現。將固定體積之5 µL總RNA用作模板, 使用經IVD認證之CFX96™即時系統C1000, 根據製造商指南

(Bio-Rad CFX96 Touch_Instruction manual.pdf, 部件號110021337, Rev E US/EG)

進行qPCR分析。使用hsa-miR-34a-5p TaqMan分析。連續稀釋合成miRNA之RT產物，且對所有樣品（標準物及血清來源的RNA）進行PCR。Cq確定模式為回歸。

【0056】成熟miRNA之序列及Taq Man分析ID報告於下表中：

miRNA ID	序列	miRbase 編號	分析 ID
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (SEQ ID NO: 1)	MIMAT0000010	000200
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU (SEQ ID NO:2)	MIMAT0000255	000426

【0057】結果

【0058】A. invivofectamine[®]與hsa-miR-34a-5p之複合作用保護合成miRNA免受降解。

第1圖：invivofectamine[®]保護摻入血清中之合成hsa-miR-34a-5p寡核糖核苷酸。

【0059】在Invivofectamine[®]不存在(A)或存在(B)下之hsa-miR-34a-5p表現量。黑框：健康供體之具有極低hsa-miR-34a含量的血清池，其用作生物學基礎基質，灰框：在變性之前或之後摻有合成hsa-miR-34a-5p而無invivofectamine[®] (IVF)的基礎基質。白框：摻有囊封於IVF中之合成hsa-miR-34a-5p的基礎基質。

【0060】在健康患者（基質）中偵測到極低含量（33.6 Cq）的hsa-miR-34a-5p。在添加變性緩衝液後，添加用作加標之合成hsa-miR-34a-5p引發誘導（23.3 Cq）。若在用變性緩衝液（基質 + hsa-miR-34a-5p）處理血清之前進行添加，則合成miRNA降解。有趣的是，當在變性緩衝液後添加加標miRNA

時，invivofectamine[®]與hsa-miR-34a-5p在1:6稀釋前之組合恢復所偵測之miRNA含量。複合物miRNA/invivofectamine[®]可與1/6稀釋之複合物一起使用（第1圖）。

【0061】 第2圖：miRNA/invivofectamine[®]複合物在4℃下長達4小時之穩定性。

【0062】 測試兩種miRNA/invivofectamine[®]複合物製備條件：溫度4℃（黑框）對比室溫（RT，白框）及複合物製備與其使用之間的時間（0、1及4小時）。
基質：健康供體（Etablissement Français du Sang: EFS）之具有極低hsa-miR-34a-5p含量的血清池。

【0063】 在室溫下，基質及具有加標hsa-miR-34a-5p之基質中的hsa-miR-34a-5p含量降低。含量在4℃下保持恆定。此結果表明，在miRNA/invivofectamine[®]複合物製備後，血液來源的樣品中之加標過程可能會在4℃下延遲（第2圖）。

【0064】 第3圖：在4℃下Invivofectamine[®]保護摻入血清中之合成hsa-miR-34a-5p寡核糖核苷酸長達4週。

【0065】 在4℃下，摻有hsa-miR-34a-5p/invivofectamine[®]複合物之血清中的hsa-miR-34a-5p含量穩定長達4週（第3圖）。

【0066】 第4圖：在-20℃下反覆冷凍-融化循環後，合成miRNA在與invivofectamine[®]組合時在血清中之穩定性。

【0067】 測試5個冷凍/融化循環。當合成miRNA與invivofectamine[®]組合時，Hsa-miR-34a-5p含量不受在-20℃下之反覆冷凍/融化循環影響。

【0068】 B. 使用miR/IVF複合物之hsa-miR-34a-5p分析的穩固性

分析內變異性		分析間變異性
實驗#1	實驗#2	實驗#1+2

	Cel-miR-39-3p		hsa-miR-34a-5p		Cel-miR-39-3p		hsa-miR-34a-5p		Cel-miR-39-3p		hsa-miR-34a-5p	
	4℃	-80℃	4℃	-80℃	4℃	-80℃	4℃	-80℃	4℃	-80℃	4℃	-80℃
平均值 (Cq)	28.30	28.13	31.40	31.25	28.34	28.07	31.38	31.17	28.32	28.10	31.39	31.21
SD (Cq)	0.12	0.08	0.28	0.26	0.19	0.12	0.42	0.24	0.15	0.10	0.35	0.25
CV (%)	0.41	0.28	0.89	0.84	0.66	0.41	1.33	0.78	0.54	0.36	1.11	0.81
平均值 (倍數)	1.01		1.12		1.02		1.17		1.02		1.15	
SD (倍數)	0.16		0.17		0.23		0.16		0.2		0.17	
CV (%)	16.01		15.47		22.37		13.92		19.31		14.41	

【0069】 表1：使用標準陽性對照（對於每一測試條件，n=12）及 cel-miR-39-3p/IVF複合物作為內部對照(摻入每個樣品)所量測之hsa-miR-34a-5p 的分析內及分析間變異性。將樣品在4℃下培育4小時或在-80℃下直接冷凍。資料使用以下公式表示為Cq之平均值 +/- SD或倍數hsa-miR-34a-p含量表達式：

$$\text{hsa-miR-34a-p含量} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

其中： $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{樣品}} - \Delta Cq_{\text{標準物}}$

$\Delta Cq_{\text{樣品}} = Cq_{\text{樣品之hsa-miR-34a-5p}} - Cq_{\text{樣品中摻入之cel-miR-39-3p}}$

$\Delta Cq_{\text{標準物}} = Cq_{\text{陽性標準物之hsa-miR-34a-5p}} - Cq_{\text{陽性標準物中摻入之cel-miR-39-3p}}$

【0070】 陽性標準物為來自NASH患者之合併血清，n=12。

【0071】 加標miRNA為非人類miRNA：cel-miR-39-3p，Cq=28。

Invivofectamine[®]以cel-miR-39-3p/IVF = 100/100之比率使用。

【0072】 在製備後，將複合物IVF/cel-miR-39在4℃下培育4小時或在-80℃下直接冷凍。

【0073】 條件之間的CV沒有顯著差異。hsa-miR-34a-5p之正規化定量在條件之間保持穩定且可再現。

【0074】 內部對照產生為穩固的。

	內部對照 = IVF 中之 Cel-miR-39-3p		
	hsa-miR-34a-5p (Cq)	Cel-miR-39-3p (Cq)	hsa-miR-34a-5p (倍數=2 ^{-ΔΔCq})
平均值	31.43	28.24	1.01

Sd	0.61	0.54	0.15
CV	1.93%	1.91%	14.60%

	內部對照= IVF 中之 Cel-miR-40-3p		
	hsa-miR-34a-5p (Cq)	Cel-miR-40-3p (Cq)	hsa-miR-34a-5p (倍數=2 ^{-ΔΔCq})
平均值	31.37	28.23	1.01
Sd	0.84	0.81	0.11
CV	2.69%	2.87%	10.90%

【0075】 表2：hsa-miR-34a-5p量測變異性之比較，使用標準陽性對照（對於每一測試條件，n=12）及cel-miR-39-3p/IVF或Cel-miR-40-3p/IVF作為內部對照（摻入每個樣品）。資料表示為Cq之平均值 +/- SD或倍數hsa-miR-34a-5p含量。

【0076】 C. hsa-miR-34a-5p分析之效能。

使用標準物及內部對照評估NASH患者之hsa-miR-34a-5p分析的效能。

【0077】 第5圖：在具有NASH患病患者之臨床群組（n=562名患者，NTBT = 271名患者及TBT = 291名患者）中，具有內部對照(A)或沒有內部對照(B)之hsa-miR-34a-5p的ROC曲線。分類為TBT之目標條件為NAS≥4 + F≥2。

【0078】 對使用相應肝臟活組織檢查之RESOLVE-IT研究的562名患者的血清進行處理，以驗證具有內部對照之分析。所有患者之血清樣品均用於使用與IVF複合之內部對照（Cel-miR-40-3p）評估hsa miR-34a-5p分析的效能，且隨後將該測試與不使用內部對照之hsa-miR-34a-5p分析進行比較。

【0079】 將患者分成2組：第1組：不待治療（NTBT）之患者，NAS評分<4及纖維化<2；及第2組：待治療之患者（TBT），NAS評分≥4及纖維化≥2。NAS評分為4至6且纖維化等級為1至3之患者在此臨床群組中更具代表性。具有目標條件（TBT：NAS≥4 + F≥2）之患者占群組總人群之51.8%。

條件	具有內部對照	沒有內部對照
面積	0,8108	0,7838

標準誤差	0,01813	0,01935
95%信賴區間	0,7753 至 0,8463	0,7458 至 0,8217
P 值	<0,0001	<0,0001
資料		
對照（NTBT2）	271	271
患者（TBT2）	291	291
缺失的對照	0	0
缺失的患者	0	0

【0080】 表3：診斷NAS≥4及F≥2之TBT患者的曲線下面積特徵。

【0081】 使用內部對照之hsa-miR-34a-5p分析的AUROC為0.81（95% CI 0.77-0.85），而未使用內部對照之hsa-miR-34a-5p分析的AUROC僅占0.78（95% CI 0.74-0.82），表明使用內部對照之hsa-miR-34a-5p分析表現得明顯好於沒有內部對照之分析（第5圖）。綜合而言，所有此等資料表明，當Cel-miR-40-3p/IVF複合物用於定量作為NASH疾病標誌物之hsa-miR-34a-5p時，hsa-miR-34a-5p分析更具特異性及靈敏性。

【0082】 比較Invivofectamine®/Lipofectamine

a- Invivofectamine®或Lipofectamine/miR複合物製備

經高度純化之miR模擬寡核糖核苷酸係由IDT（Integrated DNA Technologies Skokie, Illinois USA）定製合成。對於作為標準物或內部對照之活體外測試，藉由將50 μL含miR之無RNA酶的水（ref 733-2573, VWR）與50 μL複合緩衝液（Invivofectamine® 3.0試劑（IVF3001-3005, ThermoFisher Scientific）混合來製備100 μL miR模擬物溶液。舉例而言，使用12.5 fmol/ml之miR製備對照28Cq，使用2.5 fmol/ml之miR製備對照30Cq及使用0.5 fmol/ml之miR製備33Cq。隨後，將稀釋的miR立即添加至先前達到室溫之20 μL invivofectamine® 3.0或Lipofectamine（life Technologies Carlsbad, CA, USA）中。隨後使Invivofectamine®（或Lipofectamine）及稀釋的miR渦旋3秒，以確保miR-IVF 3.0（或

miR-Lipofectamine) 複合物形成。接著，將invivofectamine[®] (或Lipofectamine) -miR混合物在50°C下培育30分鐘，最後，藉由添加1 mL PBS (pH 7.4) 將複合物稀釋6倍，以使得對照28Cq、30Cq及33Cq之最終濃度分別為0,52 fmol/ml、104 amol/及20,8 amol/ml。將製備物以等分試樣在-20°C下冷凍保存。

【0083】 為了製備標準miR或內部對照，將5 µL製備物添加至1)標準製備物之生物學基礎基質（亦即來自健康供體之血清或血漿，或市售基礎基質）中或2)直接添加至生物樣品中作為內部對照。

【0084】 比較Invivofectamine[®]/Lipofectamine複合物條件

測試數種Invivofectamine[®]/hsa-miR-34-a-5p或Lipofectamine

/hsa-miR-34-a-5p複合物製備條件：溫度；（4°C對比室溫）及複合物製備與其使用之間的時間（0、1及4小時）。基質為健康供體之具有極低hsa-miR-34a-5p含量的血清池。標準RNA為具有已知hsa-miR-34a-5p含量的RNA池。所有資料均表示為平均qPCR擴增循環（Cq） +/- SD，n=3。ND：未檢出。

【0085】 第6圖：Invivofectamine[®] (IVF)/hsa-miR-34-a-5p複合物條件準備。

【0086】 溫度；4°C（黑框），室溫（RT，白框）。亦測試複合物製備與其使用之間的時間（0、1及4小時）。

【0087】 NRT：無反轉錄酶對照，NTC：無模板對照，陰性對照：PCR空白。所有資料均表示為平均qPCR擴增循環（Cq） +/- SD，n=3。ND：未檢出。

【0088】 第7圖：Lipofectamine/hsa-miR-34-a-5p複合物條件準備。

【0089】 溫度；4°C（黑框），室溫（RT，灰框）。複合物製備與其使用之間的時間（0、1及4小時）。

【0090】 NRT：無反轉錄酶對照，NTC：無模板對照，陰性對照：PCR空白。所有資料均表示為平均qPCR擴增循環（Cq） +/- SD，n=3。ND：未檢出。

【0091】 結論：在所有條件（溫度及時間）下，用Lipofectamine均未觀察到對miR-34a-5p之保護。相反，使用Invivofectamine[®]保護複合物基質 + hsa-miR34a-5p。

【符號說明】

【0092】

無

【序列表】

<110> 法商GENFIT公司(GENFIT)

<120> 穩定微RNA的組成物及方法

<130> B2993PC00

<140> 109113038

<141> 2020-04-17

<150> EP19305496.2

<151> 2019-04-16

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 秀丽隱桿線蟲

<400> 1

ucaccgggug uaaaucagcu ug 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 2

uggcaguguc uuagcugguu gu 22

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種診斷套組，其包含多於一個包含合成微 RNA (miRNA) 及脂質載體之複合物的容器，其中該合成 miRNA 處於設定濃度，其中

該脂質載體包含與 PEG 結合之脂質；及

該套組包含：

- 一或多個包含第一合成 miRNA 之容器；及
- 一或多個包含與該第一合成 miRNA 不同之第二合成 miRNA 的容器。

【請求項2】 如請求項 1 所述之診斷套組，其中該套組包含：

- 第一組含有第一合成 miRNA 之容器，其中該第一合成 miRNA 在該第一組容器之每個容器中的濃度不同；及
- 第二組含有第二合成 miRNA 之容器，其中該第二合成 miRNA 在該第二組容器之每個容器中的濃度不同。

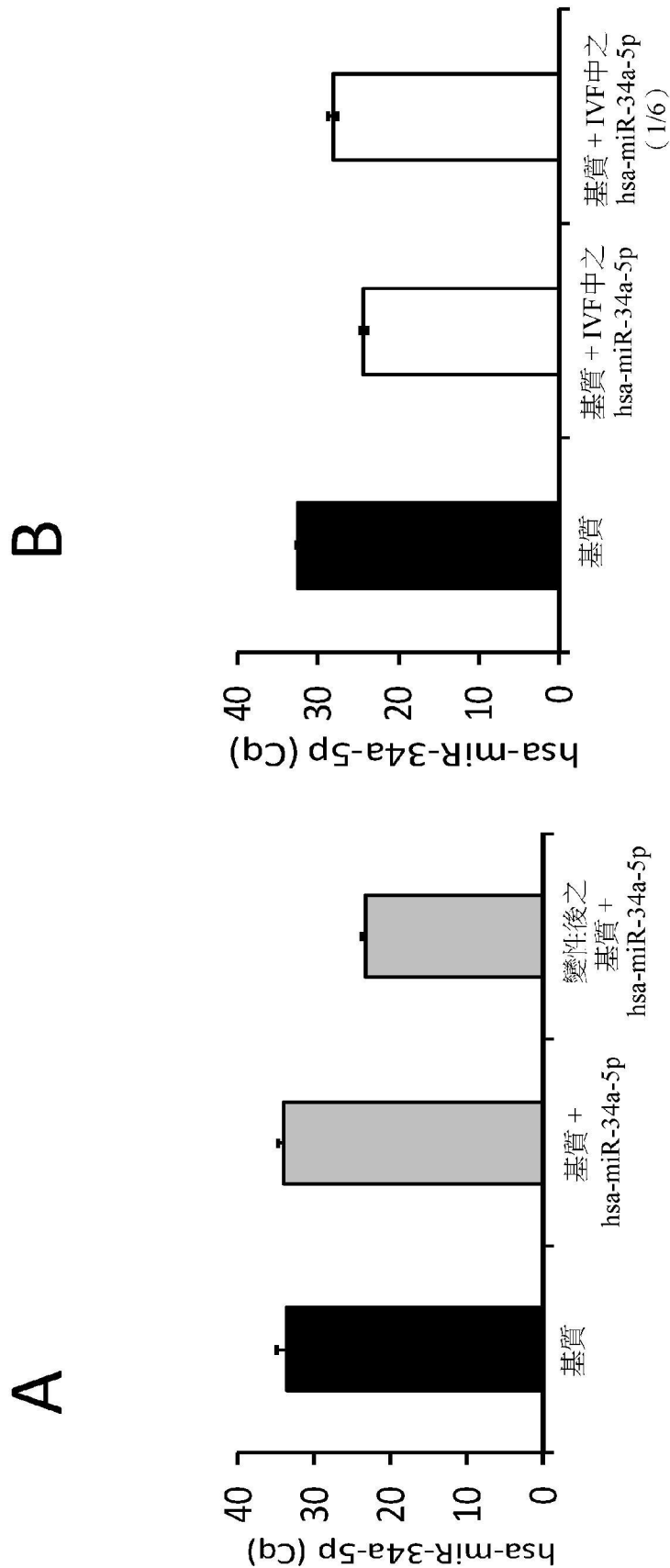
【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述之診斷套組，其中該多於一個的容器中之至少一個包含 hsa-miR-34a-5p、hsa-miR-193b-3p、hsa-miR-452-5p、cel-miR39-3p 或 cel-miR-40-3p。

【請求項4】 如請求項 1 或 2 所述之診斷套組，其中該脂質載體進一步包含中性脂質。

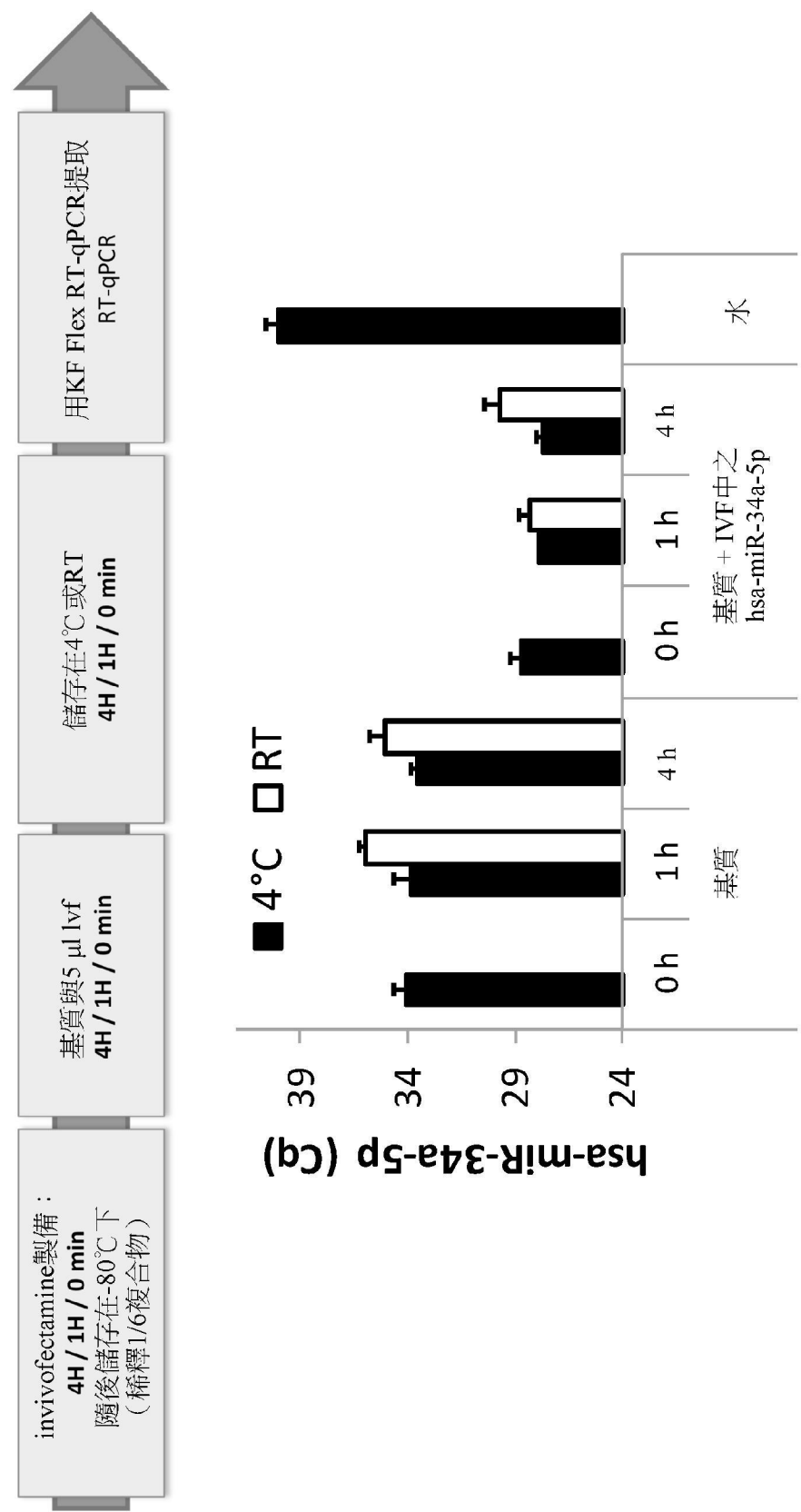
【請求項5】 如請求項 1 或 2 所述之診斷套組，其包含多於一個容器，該多於一個的容器中任一者包含合成微 RNA (miRNA)、脂質載體，及選自合成血清、去除核酸之血漿及血液來源的樣品組成之群的基質，其中該合成 miRNA 處於設定濃度。

- 【請求項6】 一種如請求項 1 至 5 中任一項所述之診斷套組的用途，該診斷套組用於定量一個體體外之生物樣品中之 miRNA 的方法。
- 【請求項7】 如請求項 6 所述之用途，其中定量為相對或絕對定量。
- 【請求項8】 如請求項 6 所述之用途，其中定量為正規化之相對或絕對定量。
- 【請求項9】 如請求項 7 或 8 所述之用途，其中該套組用於建立該 miRNA 之標準濃度曲線。
- 【請求項10】 如請求項 6 或 8 所述之用途，其中該套組用於將該套組之容器中所包含之設定量的該合成 miRNA 摻入待測試之該生物樣品中。
- 【請求項11】 如請求項 6 至 8 中任一項所述之用途，其中該生物樣品為血液、血清、血漿、尿液、唾液或精子。
- 【請求項12】 如請求項 6 所述之用途，其中該個體為哺乳動物。
- 【請求項13】 如請求項 12 所述之用途，其中該個體為人類。
- 【請求項14】 如請求項 11 所述之用途，其中該生物樣品為血液、血清或血漿。
- 【請求項15】 如請求項 14 所述之用途，其中該生物樣品為血清。

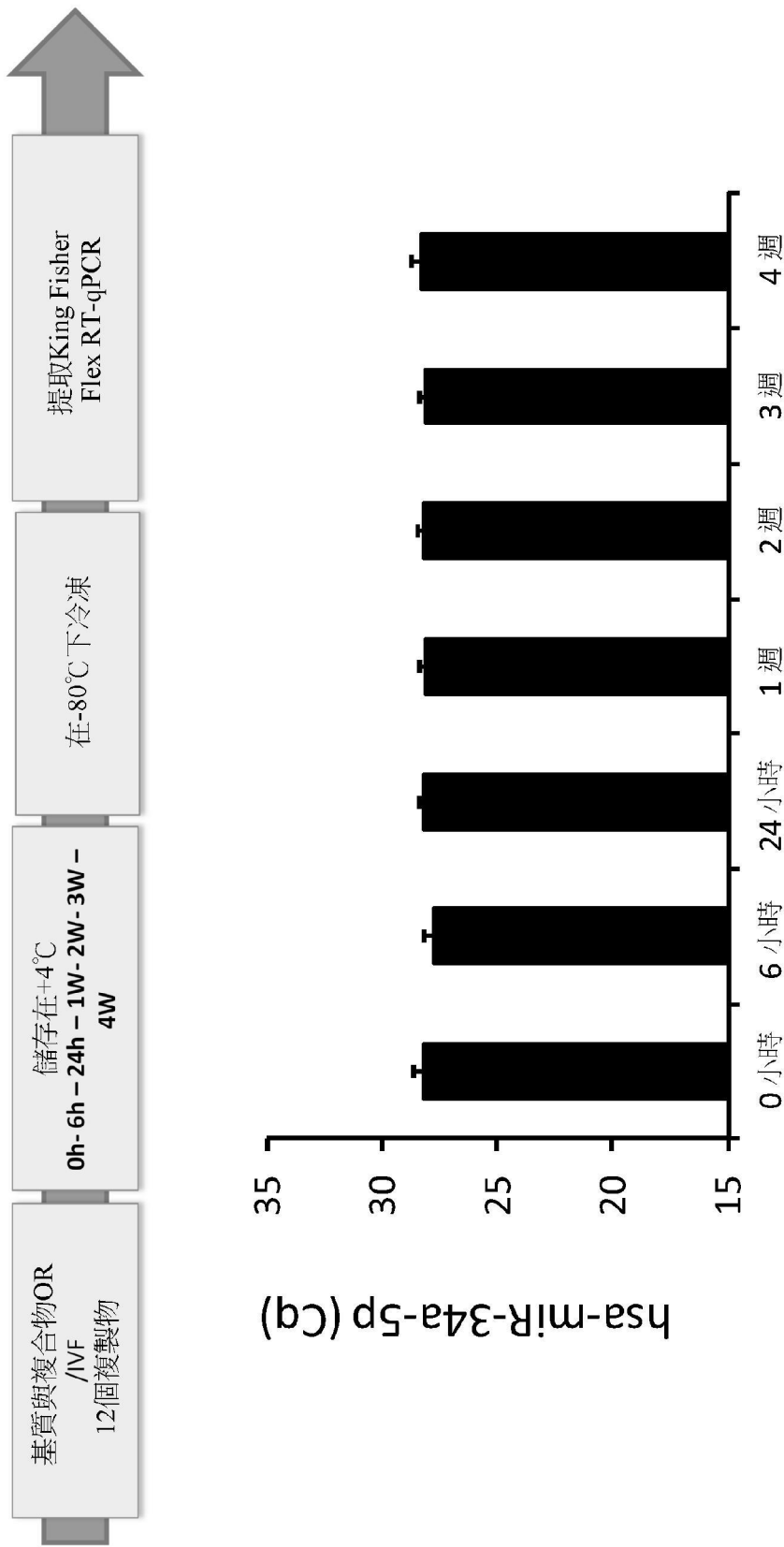
【發明圖式】



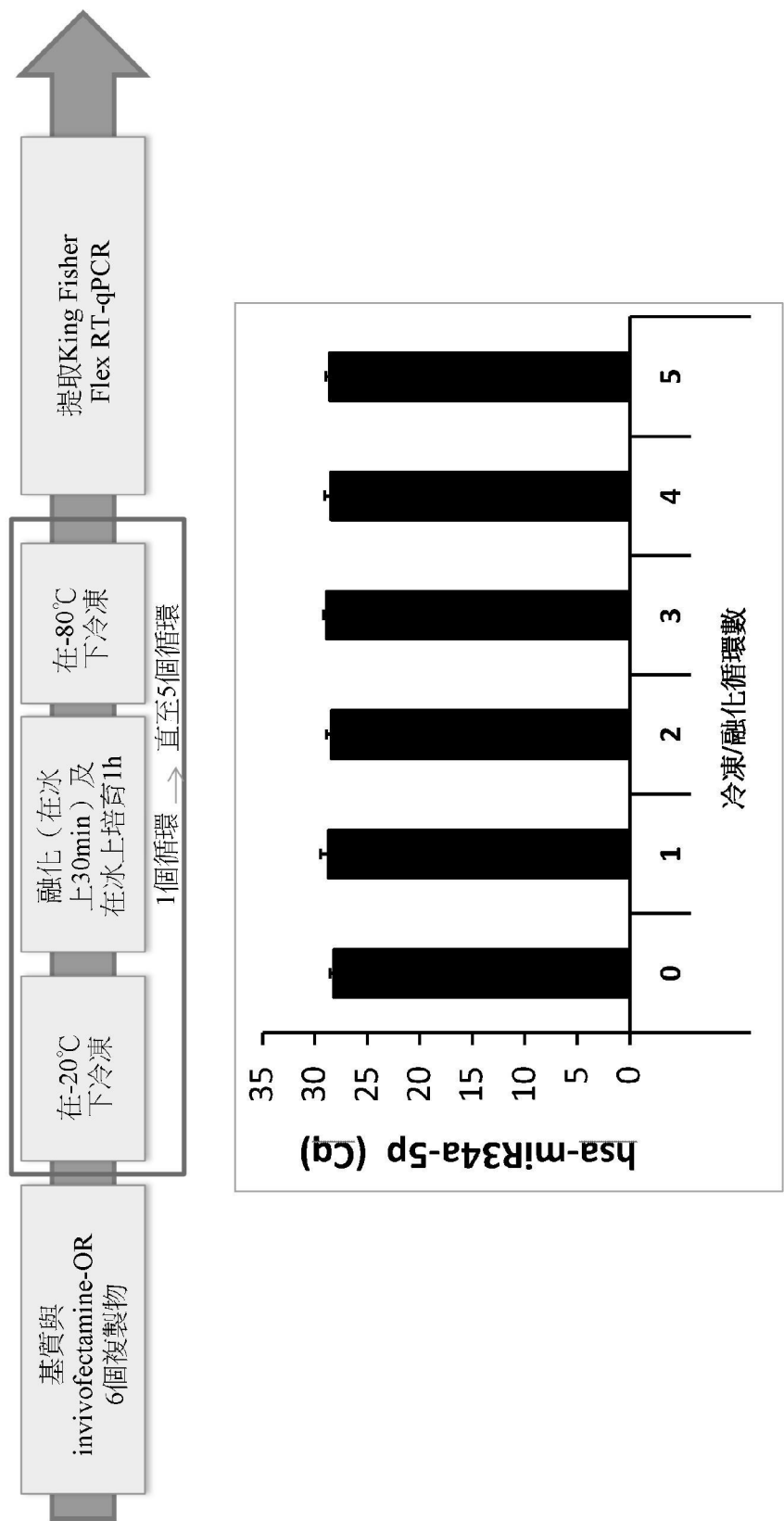
第 1 圖



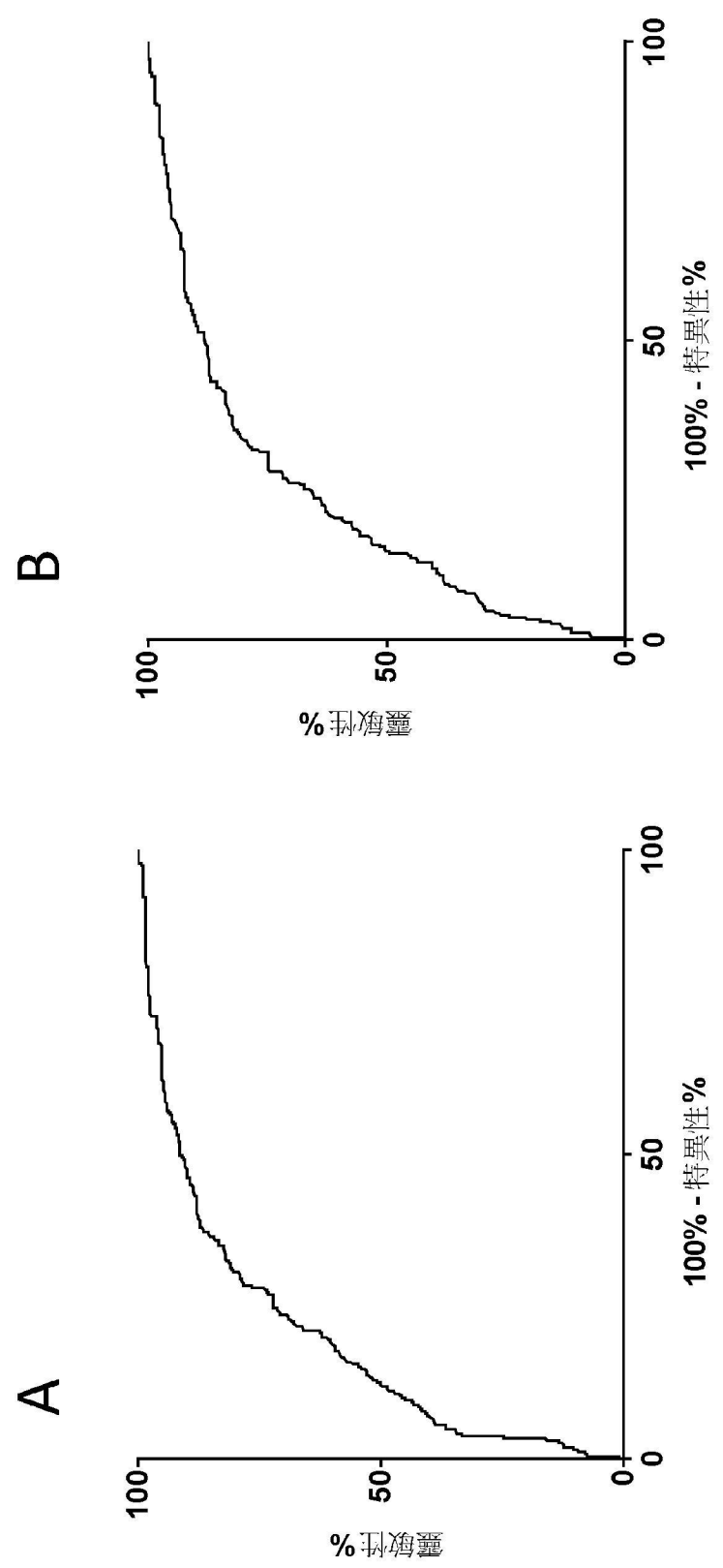
第 2 圖



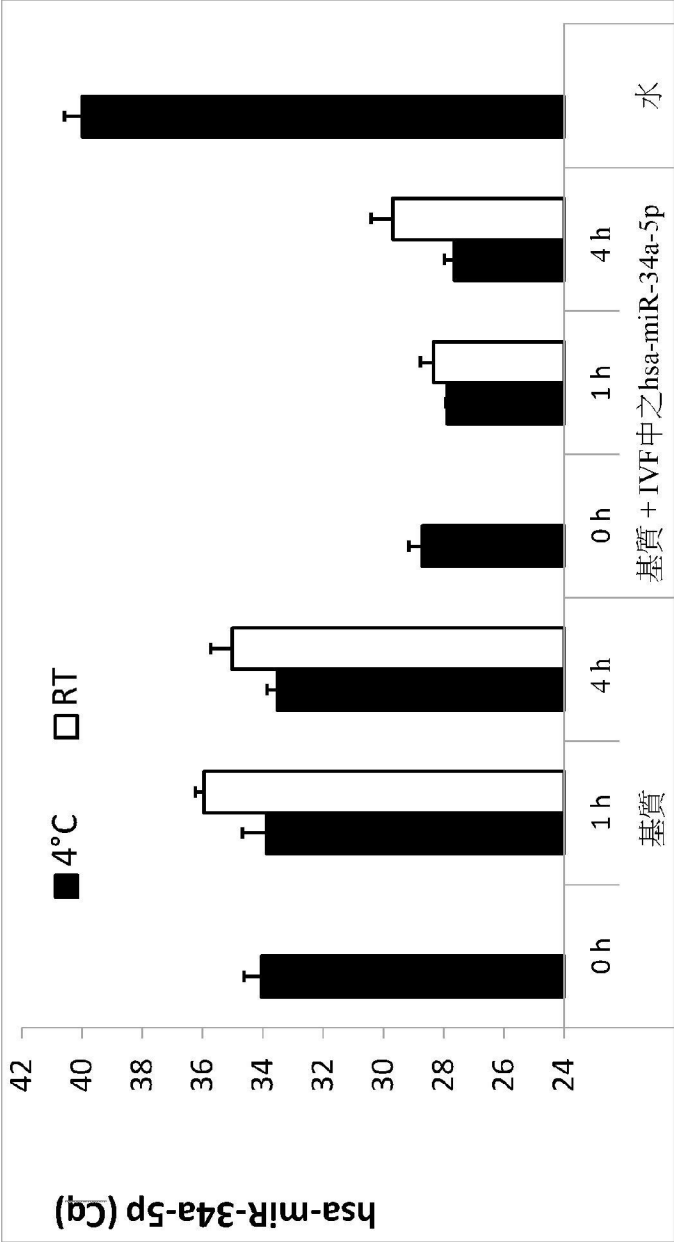
第 3 圖



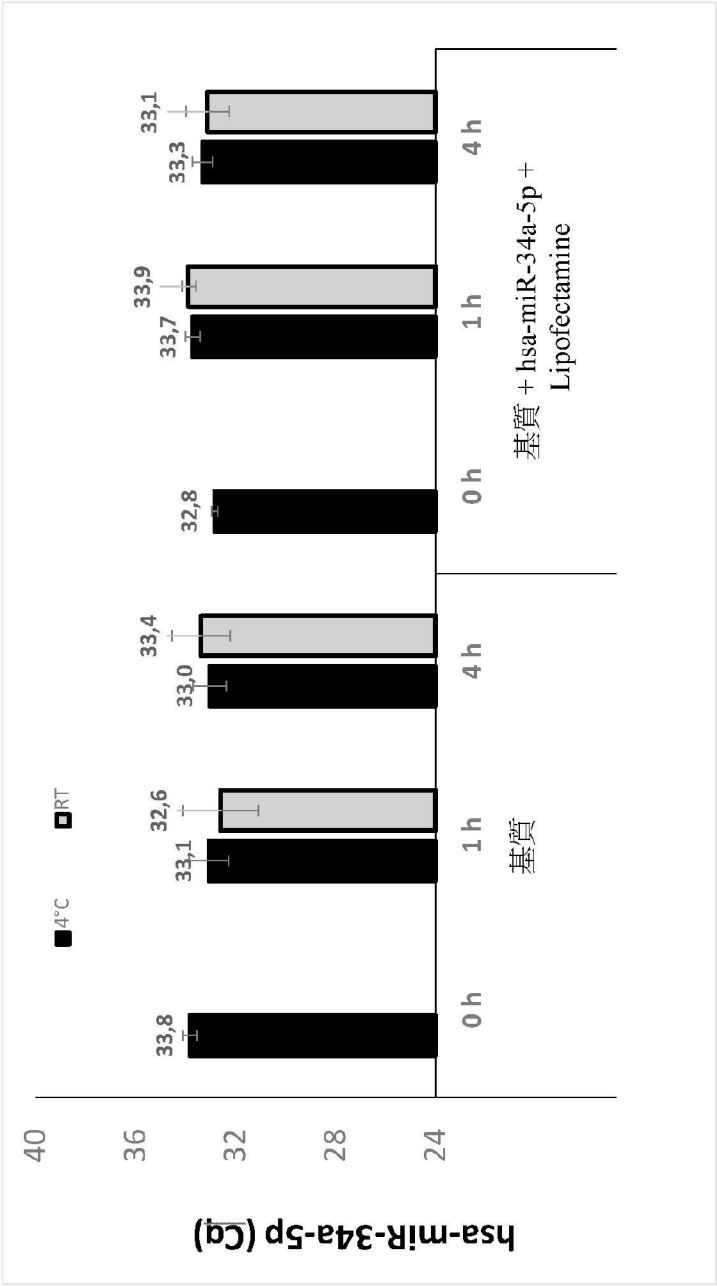
第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖



第 7 圖