



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201629227 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 16 日

(21) 申請案號：104104456

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 02 月 10 日

(51) Int. Cl. :

*C12N15/70 (2006.01)**A61K48/00 (2006.01)**A61K31/5375(2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(71) 申請人：林希龍 (中華民國) LIN, SHI LUNG (TW)

美國

吳堂熙 (中華民國) WU, DAVID TS (TW)

美國

(72) 發明人：林希龍 LIN, SHI LUNG (TW)；吳堂熙 WU, DAVID TS (TW)

(74) 代理人：李貞儀

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：36 項 圖式數：17 共 145 頁

(54) 名稱

新穎治療用抗癌藥的製造與使用

PRODUCTION AND UTILIZATION OF A NOVEL ANTI-CANCER DRUG IN THERAPY

(57) 摘要

本發明一般而言係關於一種使用微型核糖核酸(microRNA、miRNA)及/或其小髮夾型核糖核酸(shRNA)同源物/類似物/衍生物，發展新穎的抗腫瘤及/或抗癌藥物、疫苗與治療的設計及方法。具體而言，本發明係關於使用原核細胞生產之 microRNA 前驅物(pro-miRNA)組成物。該組成物被傳送至人類細胞、經處理為成熟的 miRNA 效應子，並對於能為 mir-302 標的的基因引發特定靜默效應，接著產生有益腫瘤抑制及癌症治療的結果。原核細胞在自然情況下不表現或處理真核 miRNA 前驅物(pre-miRNA)。本發明亦教示一種使用原核轉錄系統表現 pre-miRNAs，特別是 mir-302 前驅物的可誘導式方法。由於 mir-302 對於人類是一種腫瘤抑制子，此新穎發現促進了新抗癌藥物、疫苗及/或針對各種人類腫瘤與癌症之治療在設計及方法上的發展。

This invention generally relates to a design and method for developing novel anti-tumor and/or anti-cancer drugs, vaccines and therapies, using microRNA and/or its shRNA homologues/mimics/derivatives. More specifically, the present invention relates to a use of a prokaryote-produced miRNA precursor (pro-miRNA) composition capable of being delivered into human cells and processed by the cells into mature miRNA effectors to elicit specific silencing effects on mir-302-targeted genes, subsequently leading to a beneficial result of tumor suppression and cancer therapy. The prokaryotic cells do not naturally express or process eukaryotic miRNA precursors (pre-miRNA); meanwhile, the present invention also teaches an inducible method for expressing pre-miRNAs, particularly mir-302 precursors by using the prokaryotic transcription system. Since mir-302 is a known tumor suppressor in human, this novel finding advances the design and method for developing new anti-cancer drugs, vaccines and/or therapies directed against multiple kinds of human tumors and cancers.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

新穎治療用抗癌藥的製造與使用/

Production and Utilization of a Novel Anti-Cancer Drug in Therapy

【0001】 發明人：林希龍和吳堂熙

【0002】 要求的優先權

本發明要求以2012年12月28日提交的申請序號為61/746,786以及2013年2月7日提交的申請序號為61/761,890，標題為“普適性抗癌藥物及疫苗的開發”的美國臨時申請案為其優先權。本發明還要求以2010年6月2日提交的申請序號為12/792,413，標題為“普適性抗癌藥物及疫苗的開發”的美國申請案為其優先權。本發明還要求以2012年8月10日提交的申請序號為13/572,263，標題為“用於在原核細胞內使用真核第二型聚合酶啟動子驅動之轉錄作用的可誘導之基因表現組成物及其應用”的美國申請案為其優先權。本申請是以下申請案的部分繼續申請案(continuation-in-part)：2010年6月2日提交的標題為“普適性抗癌藥物及疫苗的開發”的美國專利申請12/792,413；2012年8月10日提交的標題為“用於在原核細胞內使用真核第二型聚合酶啟動子驅動之轉錄作用的可誘導之基因表現組成物及其應用”的美國專利申請13/572,263。這些申請以其全部內容引入本文作為參考。

【技術領域】

【0003】 本發明一般而言係關於新穎DNA/RNA治療藥及/或疫苗在癌症治療上的產品設計與相關使用。更明確言之，本發明係關於使用一新穎核酸組成物的設計與方法，其中該核酸組成物在傳遞至人類細胞後，經處理為小型核糖核酸(small RNA)基因靜默效應子，以在mir-302標的之細胞週期調節者及/或致癌基因引發特定基因的靜默效應，進而對腫瘤/癌細胞之生長、侵犯及轉移產生腫瘤抑制及/或癌症預防的效果。小型核糖核酸基因

靜默效應子較佳包含腫瘤抑制子微型核糖核酸(tumor suppressor microRNA, TS-miRNA), 像是mir-302a、mir-302b、mir-302c、mir-302d、mir-302e、mir-302f與其前驅物(前驅微型核糖核酸, pre-miRNAs)以及其人
造重設及/或經修飾的小髮夾型核糖核酸/小干擾核糖核酸(shRNA/siRNA)等
同源物/衍生物, 以及其組合。感興趣的該等人類細胞包括離體(ex vivo)及/
或活體內(in vivo)之正常體細胞或腫瘤/癌細胞。

【先前技術】

【0004】 幹細胞宛若寶盒, 內含多種有效成分, 可用於誘發幹細胞生長/再生以及受損/老化組織的修復及/或更生, 以及用於處置退化性疾病與防止腫瘤/癌症形成。因此, 可理解的是吾人可將這些幹細胞作為新藥鑑定與製造的一種工具。獲得的新藥因此用於發展藥學上及/或治療上的應用, 例如生物藥利用、診斷裝置及/或裝備、幹細胞生成、幹細胞研究及/或治療、組織/器官修復及/或更生、傷口癒合處理、腫瘤抑制、癌症治療及/或預防、疾病處置、藥物製造, 及其組合。

【0005】 微型核糖核酸 mir-302 是在人類胚胎幹細胞 (human embryonic stem, hES cell) 及誘發型多能性幹細胞 (induced pluripotent stem, iPS cell) 中發現到的最主要的微型核糖核酸 (microRNA, miRNA), 然而其功能大多尚不清楚。先前的研究已指出 mir-302 的異位 (extopic) 過量表現, 即高於人類幹細胞 (hES cells) 內水平的表現, 能將人類正常細胞與癌細胞重新編程為正常的似 hES 的多能性幹細胞, 其具有緩慢的細胞週期速率 (20 至 24 小時/週期) 以及似休眠細胞之細胞形態 (Lin 等人, 2008 與 2011; US 12/792,413, EP2198025)。相對靜止是這些由 mir-302 引發生成的多能性幹細胞 (mirPS) 的一個清楚的特徵; 然而, 人類幹細胞 (hES) 及先前報導以三/四個因子 (即 *Oct4-Sox2-Klf4-c-Myc* 或 *Oct4-Sox2-Nanog-Lin28*) 誘發所得的 iPS 細胞皆呈現高度的增生能力 (12~15 小時/週期) 以及不可擋的腫瘤發生傾向 (Takahashi

等人，2006；Yu等人，2007；Wernig等人，2007)。儘管存在於mirPS細胞之抗增生特性背後的機制仍不甚清楚，吾人發現兩個mir-302標的的G1檢控點調節者(G1-checkpoint regulators) 可能參與其中，他們是：週期素依賴性激酶2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK2)及週期素D (cyclin D)， (Lin等人，2010；US 12/792,413)。真核細胞細胞週期的進行是經由週期素依賴性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs)的活化來驅動的；週期素依賴性激酶與正調節次單元(positive regulatory subunits)：週期素，以及負調節者(negative regulators)：週期素依賴性激酶抑制子(CDK inhibitors, CKI, 像是 p14/p19Arf、p15Ink4b、p16Ink4a、p18Ink4c、p21Cip1/Waf1與p27Kip1) 形成功能性複合體。在哺乳動物細胞中，不同的週期素－週期素依賴性激酶複合體(cyclin－CDK complexes) 參與調節細胞週期中不同時期的轉換，像是參與G1期行進的cyclin-D－CDK4/6、G1－S期轉換的cyclin-E－CDK2、S期行進的 cyclin-A－CDK2，以及參與進入M期的 cyclinA/B－CDC2 (cyclin-A/B－CDK1)。因此，可理解的是mir-302之抗增生功能可能是CDK2及cyclin D在G1－S期轉換期間受到共同抑制的結果。

【0006】 然而，在有關人類mir-302的類似物：小鼠mir-291/294/295家族的研究中，顯示其與人類細胞內之mir-302的角色全然不同的功能。在小鼠胚胎幹細胞(mES)中，mir-291/294/295的異位表現透過直接靜默p21Cip1 (又名CDKN1A) 以及絲胺酸/蘇胺酸蛋白質激酶Lats2 (Wang等人，2008)，促進快速的細胞增生，並導致所轉染細胞的高度的腫瘤發生。已知缺乏p21Cip1/Waf1基因的轉殖小鼠在缺乏G1檢控點的控制下係展現正常的發展(Deng等人，1995)。然而，由於Lats2在有絲分裂開始時具有徵召 λ -微管蛋白(γ -tubulin) 及參與紡錘體形成等功能，因此其角色仍待釐清。此外，小鼠胚胎中Lats2的缺乏已被發現會導致嚴重的有絲分裂缺陷且具致命性，此亦指出Lats2的靜默會阻礙而非促進細胞分裂 (Yabuta等人，2007)。綜合來說，p21Cip1的靜默似是mir-291/294/295引介誘導之腫瘤發生背後的主要

機制。然而，吾人篩選人類*p21Cip1*基因之mir-302標的位的結果係全為陰性。同樣陰性的結果亦在兩個最為知名的線上微型核糖核酸-標的預測程式「TARGETSCAN」(<http://www.targetscan.org/>)及「PICTAR-VERT」(<http://pictar.mdc-berlin.de/>)中展現。因此，即使mir-302及mir-291/294/295為同源類似物，它們在調控細胞的腫瘤發生上的功能係實質相反。此係指出同源微型核糖核酸可能不具有相同的功能！。以上發現亦說明了，目前以小干擾核糖核酸等擬物(mimics)取代天然微型核糖核酸的研究可能無法獲致同天然微型核糖核酸的結果。

【0007】 編碼mir-302的基因序列位在人類第四染色體的4q25基因座，其係一個常與長壽有關的保守區域。進一步而言，mir-302是由La核糖核蛋白域家族成員7(*La ribonucleoprotein domain family member 7 (LARP7)*)基因的內含子區域編碼，且藉由內含子微型核糖核酸的生合成途徑表現(Barroso-delJesus, 2008; Ying與Lin, 2004; 圖13)。天然mir-302含有四個家族同源正義成員(mir-302b、c、a與d)以及三個可區別的反義成員(mir-302b*、c*與a*)；他們一起隨另一miRNA，即mir-367，經轉錄為一多順反子的核糖核酸群集(polycistronic RNA cluster)(Suh等人, 2004)。在吾人先前的發明US 12/792,413中，發明人觀察到mir-302能刺激其它miRNA如mir-92、mir-93、mir-367、mir-371、mir-372、mir-373、mir-374、以及整個mir-520家族成員的表現。使用網站“Sanger miRBase::Sequences”(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)的線上程式“TARGETSCAN”與“PICTAR-VERT”分析，進一步顯示mir-302與這些刺激表現的miRNA共同享有超過400個標的基因。此說明了該些刺激表現的miRNA與mir-302可能具有相似的角色。這些共享的標的基因包含但不限於RAB/RAS相關致癌基因的成員、ECT相關致癌基因、多形性腺瘤基因、E2F轉錄因子、cyclin D binding Myb-like轉錄因子、HMG框轉錄因子、Sp3轉錄因子、似轉錄因子CP2 (CP2-like)蛋白、NFkB活化蛋白基因、週期素依賴激

酶、MAPK/JNK相關激酶、SNF相關激酶、肌球蛋白輕鏈激酶、TNF- α – 誘導蛋白基因、DAZ相關蛋白基因、LIM相關同源箱基因、DEAD/H箱蛋白基因、forkhead箱蛋白基因、BMP調節子、Rho/Rac鳥糞嘌呤核苷酸交換因子、IGF受體(IGFR)、內皮素受體、左右決定因子(Lefty)、週期素、p53誘導核蛋白基因、似RB 1、RB結合蛋白基因、Max結合蛋白基因、c-MIR免疫識別細胞調節子、似Bcl細胞凋亡促進子、鈣黏附蛋白、整合蛋白 $\beta 4/\beta 8$ 、抑制素、錨蛋白、SENP1、NUFIP2、FGF9/19、SMAD2、CXCR4、EIF2C、PCAF、MECP2、組蛋白乙醯基移轉酵素MYST3、核RNP H3，以及許多核受體及因子。這些標的基因大部分高度參與胚胎發生與癌症/腫瘤發生。總而言之，miR-302能進一步促進其同源miRNAs如miR-92、miR-93、miR-367、miR-371、miR-372、miR-373、miR-374及miR-520而提升及/或維持其功能。

【0008】 MiRNA是細胞質中的基因抑制子(inhibitor)，其通常的功能為與特定標的位由於高度互補性(complementarity)而結合，抑制其標的基因的轉錄分子(mRNAs)的轉譯；其中並且形成RNA-誘導靜默複合體(RISC)而阻礙或降解mRNAs。因此，miRNA與標的基因結合的嚴謹度決定了該miRNA的真正功能。對此，吾人先前的研究(Lin等人，2010；US 12/792,413)對於mir-302調解的腫瘤抑制背後的機制提出了重要的解釋。在人類細胞中，mir-302標的多個細胞週期調節者包含CDK2、*cyclins D1/D2*、以及*BMI-1*基因而進行靜默；但有趣的是，不包含*p21Cip1*。如前所述，CDK2與cyclin D的共同靜默在細胞週期中阻擋G1期至S期的轉移，且導致一個較慢的細胞增生率。此外，*BMI-1*的靜默促使兩主要的腫瘤抑制子p16Ink4a與p14ARF的表現的提升，其進而減弱細胞增生且抑制腫瘤生成。由於在人類細胞中，p16Ink4a/p14ARF的表現提升而p21Cip1可能不受影響，mir-302抗腫瘤發生的功能除了來自cyclin-E – CDK2及cyclin-D – CDK4/6路徑的共抑制以外，可能再透過p16Ink4a – Rb及/或p14/19ARF – p53兩途徑而具有該功能。

【0009】 依據前述mir-302抗腫瘤發生的特徵，吾人可使用mir-302作

為治療人類腫瘤與癌症的藥物。然而，該嘗試可能遇到四個主要問題：(1) 作為基因靜默效應子，mir-302必須以其前驅物形式發揮功能；目前仍沒有任何有效的核糖核酸合成技術，可生成似髮夾且73~75核苷酸長度的RNA。為確保其序列的精確度，合成的RNA的最大長度大約為45~55核苷酸，然其係不足以形成mir-302前驅物(pre-mir-302)。(2) 吾人需要濃度高於hES細胞內mir-302水平的mir-302表現，藉以引發其抗腫瘤/癌症效應(Lin等人，2010)。然而，目前尚無方法得產生如此多量的pre-mir-302以供應藥物生產。自hES或iPS細胞分離pre-mir-302係昂貴的，其中細菌勝任細胞無法生產具有高度二級結構的pre-mir-302。(3) 合成的siRNA等擬物(mimics)從未於動物試驗中取得成功。由於siRNA等擬物短的生命週期(3~5天)及其高毒性，siRNA無法用於在活體(in vivo)條件下取代天然的mir-302。此外，曾有報導指出，siRNA等擬物的使用導致細胞內microRNA途徑的過飽和，並引致毒性(Grimm等人，2006)。(4) mir-302完整的功能有賴其前驅物中的mir-302正義及其mir-302*反義股(例如mir-302a*, mir-302b* and mir-302c*)。因此，就開發以mir-302調解的抗腫瘤/癌症療法及其相關藥物而言，生產及/或分離pre-mir-302的可負擔且有效的方法為要件。

【0010】 總而言之，需要一種製造、分離以及使用mir-302及其前驅物，以及其相關同源物/衍生物的有效與安全的方法。

【發明內容】

【0011】 本發明是使用微型核糖核酸前驅物(microRNA precursors, pre-miRNAs)作為癌症治療的治療藥物及/或疫苗的設計與方法。具體而言，本發明係有關於使用一重組核酸組成物的設計與方法，其中該重組核酸組合物在被傳送至人類細胞後，能經處理成為小型核糖核酸基因靜默效應子(small RNA-based gene silencing effector)，且誘發針對mir-302標的的細胞週期調節者及/或致癌基因的特定基因靜默效應，導致腫瘤抑制及/或癌症預症

防等效應，藉此而可用於抑制腫瘤/癌細胞生長、增生、侵犯及轉移。這些小型核糖核酸基因靜默效應子較佳包含腫瘤抑制子微型核糖核酸 (TS-miRNA)，例如mir-302a、mir-302b、mir-302c、mir-302d、mir-302e、mir-302f 以及其前驅物(pre-miRNAs)，以及其人造重設的似小髮夾型核糖核酸 (shRNA)同源物/衍生物及其組合。小髮夾型核糖核酸同源物/衍生物的設計包含在shRNA以及與其同源的小干擾核糖核酸(small interfering RNA， siRNA)結構中，個別單員或多員群集(cluster)內核酸組成物的失配 (mismatched)與完全配對(perfectly matched)。其皆可促進標的專一性並減少傳送與治療所需的mir-302數量(拷貝數，copy number)。所述人類細胞包含體外、離體及/或活體內的正常及/或腫瘤/癌細胞。

【0012】 天然微型核糖核酸(miRNA)的大小大約為18~27個核苷酸 (nucleotides， nt)長，並且，依微型核糖核酸(miRNA)與其標的之間的互補情況，能夠直接降解其所標的的傳訊核糖核酸(messenger RNA， mRNA)或抑制其標的傳訊核糖核酸(mRNA)的轉譯。Mir-302家族(mir-302s)是一群高度同源、並且保存 (conserved)於許多哺乳動物身上的微型核糖核酸 (miRNAs)。Mir-302家族(mir-302s)包含四個主要家族成員，他們一起經轉錄成一非編碼核糖核酸群集(non-coding RNA cluster)，其由五端至三端依序包含mir-302b、mir-302c、mir-302a、mir-302d、以及mir-367 (Suh 等人，2004)。近來，科學家發現了在原先家族群集之外的第五個與第六個mir-302成員：mir-302e與mir-302f。雖然mir-367與mir-302s在自然狀況下共同被表現，但他們的功能相當不同。在本發明中，基於抗腫瘤發生的功能，吾人傾向僅表現mir-302s。在一些實施例中，吾人可進一步使用人工重設之髮夾環 (hairpin loops)，像是 5'-GCTAAGCCAG GC-3' (SEQ.ID.NO.1) 與 5'-GCCTGGCTTA GC-3' (SEQ.ID.NO.2) 取代原本 mir-302 前驅物 (pre-mir-302)的髮夾環，以便於細胞內的傳送與表現。正常來說，mir-302 僅在小鼠以外的人類胚胎幹(hES)細胞及誘發型多能性幹(iPS)細胞 內大量

表現；然而，在其它已分化體細胞內並非如此(Tang等人，2007；Suh等人，2004)。由於mir-302s是一群同源的小型抑制RNAs，其能夠靜默與其高度互補的標的基因，因此mir-302s可能與防止hES及iPS細胞中致癌基因活化的迷途(errant)及早發(premature)有關；因此，其亦可用於抗腫瘤/癌症藥物的開發。事實上，在桑椹期(morula stage，32~64細胞期)之前的hES細胞通常表現相對慢的細胞週期速率，類似於mir-302誘發的多能性幹(mirPS)細胞(Lin等人，2010)。此係指出mir-302調控正常幹細胞以及預防腫瘤/癌細胞形成的雙重角色。

【0013】 所有的mir-302成員在五端最前方的17個共有一完全相同的核苷酸序列，其中包含種子基序(seed motif) 5'-UAAGUGCUUC CAUGUUU-3' (SEQ.ID.NO.3)；並且在其同樣擁有的23個核苷酸的成熟微型核糖核酸(miRNA)中具有高於85%的序列同源性(homology)。根據線上演算程式「TARGETSCAN」(<http://www.targetscan.org/>)及「PICTAR-VERT」(<http://pictar.mdc-berlin.de/>)目前的預測結果，這些成員同時標的幾乎相同的細胞基因，其中包含超過607個人類基因。此外，mir-302與在功能上也許有某程度相似的mir-92、mir-93、mir-200c、mir-367、mir-371、mir-372、mir-373、mir-374及mir-520家族成員亦共有許多標的基因。大部分的標的基因是為與早期胚胎發育當中特定細胞系分化(lineage-specific cell differentiation)之起始及/或建立有關的發育訊號(developmental signals)及轉錄因子(Lin等人，2008)。另外，許多標的基因也已知為致癌基因(oncogenes)。由於許多這些標的的發育訊號及分化相關的轉錄因子為致癌基因，因此mir-302並具有抑制腫瘤的功能而預防正常hES細胞朝腫瘤/癌細胞形成的方向進行生長。

【0014】 在一較佳實施例中，本發明為一非載體(non-vector-based)的pre-mir-302製造與遞送的方法，用以治療人類腫瘤/癌症。如前所述，pre-mir-302大小約為73至75核苷酸且由於45至55核苷酸長度的限制，吾人無法以現有RNA合成技術合成。因此，吾人需要採用新的方法，生成且擴增

pre-mir-302的量，以供應藥物生產。因此，本發明使用以原核生產miRNA前驅物(產物即pro-miRNA) 的技術並製備pre-mir-302的擬物；該技術係優先權US 13/572,263之發明的衍伸。Pro-miRNA是一新的髮夾樣pre-miRNA擬物，其係由原核勝任細胞如大腸桿菌DH5 α 細胞株製造。如本發明所屬技術領域熟習技藝者已知的，原核與真核的轉錄機轉非常不同且彼此不相容，因此吾人需要修改原核轉錄系統以轉錄真核基因與pre-miRNAs。本申請優先權案US 13/572,263的發明已教示藉由某些化學誘導，原核細胞能採用真核pol-2與似pol-2 (即CMV)啓動子，來轉錄大量似pre-mir-302的髮夾樣RNAs (產物即pro-mir-302)。此一轉錄誘導物不僅使原核轉錄系統相容於真核基因表現，也能安定原核細胞內真核基因轉錄分子的二級結構。Pro-miRNA技術的好處在於：第一，由於細菌勝任細胞快速且簡單的生長天性，特定pre-miRNA或一群(需要的)pre-miRNA的生產係符合成本效益原則；其次，可期望數公克至公斤水準的工業規模量產；第三，由於毋需培養融合腫瘤或哺乳動物細胞，操作上較為簡易且不昂貴；第四，化學試劑誘導之似pol-2啓動子之轉錄，可確保高的序列精確度；最後，由於原核細胞內缺乏Dicer及其他miRNA的表現，因此獲得高純度的pre-miRNA產物。獲得之pro-miRNA可自細菌提取物及/或溶解產物輕易分離(實施例20)與進一步純化(實施例21)，該提取物及溶解產物可用於開發許多藥學上及治療上的應用。

【0015】 吾人已製造大量似pre-mir-302的pro-miRNA、pro-mir-302(實施例18~21)並將之用於提升傷口癒合(實施例22)。為用於治療，分離的pro-mir-302係以一預先準備、含有可可油、棉子油、橄欖油、丙酮酸鈉及白蠟油的軟膏製備。軟膏內pro-mir-302的濃度係10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其中係解剖刀切割皮膚，產生開放性傷口。含有或不含有pro-mir-302的軟膏係分別直接施用於傷口，且覆蓋整個受傷區域。再者，進一步以液體繃帶密合該區域。如圖14所示，兩週內結果顯示以pro-mir-302處理的受傷區域的癒合速率顯著提

高；其中超過兩倍快於其他所有控制組。再者，以pro-mir-302治癒的區域顯示正常毛髮再生且沒有疤痕(如黑色箭頭所指處)；相較之下，其他處理留下些許疤痕且無毛髮生長。顯然地，此結果指出pro-mir-302具有刺激正常的組織修復與再生的功能。

【0016】 吾人亦將上述pro-mir-302純化並製備為液態藥劑，實施注射並活體內測試肝癌/惡性肝腫瘤的治療(實施例23)。如圖15所示，在三次注射之後，含pro-mir-302的藥劑成功縮小體內所植肝癌細胞/惡性肝腫瘤近90%的體積；亦即相較於未處理組別，平均腫瘤尺寸縮減為未處理組別的10%。再者，以H&E染色進行組織學試驗的結果進一步顯示此針對癌症/惡性腫瘤治療所得結果不只因為mir-302的抗腫瘤發生的性質(Lin等人，2010)，也因為先前未曾觀察到的新發現的重新編程的功能。舉例來說，如圖16所示，其清楚顯示mir-302能將體內高度惡性的人類肝癌植體重新編程為較良性的狀態，且近似於正常肝組織！經過治療的癌細胞植體甚至可形成正常肝臟構造如典型的肝小葉、中央靜脈(CV)以及肝門三合體(PT)。因此，mir-302不僅能抑制腫瘤/癌的生長，且在體內環境幫助修復及/或再生正常組織，達到有益癌症治療的效果。

【0017】 在其他較佳實施例中，本發明亦提供載體表現mir-302，並治療腫瘤/癌症。如優先權案US 12/792,413的揭露，發明人已設計並發展出一可誘導的*pTet-On-tTS-miR302s*表現載體(圖1A)，再配合病毒感染、電穿孔法或微脂體/多聚體(polysomal)轉染以將mir-302傳送到正常及/或人類癌細胞中。重新設計的mir-302構造包含四個小非編碼核糖核酸成員(small non-coding RNA members)：同在一個群集中的mir-302a、mir-302b、mir-302c、與mir-302d (mir-302s；圖1B)。在去氧羥四環素(Doxycycline, Dox)的刺激之下，此mir-302s構造受到一由四環黴素反應元件(tetracycline-responsive element, TRE)控制的cytomegaloviral (CMV) 啟動子的驅動而被表現。在感染/轉染之後，mir-302的表現依自然的微型核糖核酸

(miRNA)生合成途徑進行。其中mir-302s構造與一報告基因，像是紅移螢光蛋白基因(red-shifted fluorescent protein, *RGFP*)，共同被轉錄，然後進一步由剪接複合體(spliceosomal components)及/或細胞質內的RNA內切酶(RNaseIII)岱塞爾(Dicers) (圖2A) (Lin等人, 2003)處理成個別的mir-302成員。此策略的結果是，在微型核糖核酸微陣列分析中(實施例3)，所有正義(sense) mir-302成員在去氧脛四環素的刺激後有效地在被轉染的細胞中表現(圖1C)。將mir-302表現載體轉導至人類細胞的步驟概述於圖2B。

【0018】 發明人仿效自然的內含子微型核糖核酸(intronic miRNA)生合成路徑(圖2A)，設計了一內含子微型核糖核酸表現系統，即*SpRNAi-RGFP*，以轉錄重組*RGFP*基因。*SpRNAi-RGFP*包含一人造/人工的剪切勝任內含子(splicing competent intron, *SpRNAi*)，其能夠產生內含子微型核糖核酸(intronic miRNA)及/或似小髮夾型核糖核酸(shRNA-like)基因靜默效應子(Lin等人, 2003; Lin等人, (2006) *Methods Mol Biol.* 342: 295-312)。*SpRNAi*與*RGFP*共同被第二型RNA聚合酶(Pol-II RNA polymerase)轉錄而包含在*SpRNAi-RGFP*基因的傳訊核糖核酸前驅物/前驅傳訊核糖核酸(pre-mRNA)中，並*RGFP*且被RNA剪接複合體(RNA splicing components)剪出。接著，被剪出的*SpRNAi*進一步被處理為成熟的基因靜默效應子，像是天然的微型核糖核酸(native miRNA)以及人造小髮夾型核糖核酸(shRNAs)，以引發對於標的基因的特定的核糖核酸干擾效應(RNA interference, RNAi)。同時，在內含子剪出(intron splicing)之後，*SpRNAi-RGFP*基因轉錄分子(transcript)的外顯子(exons)被連接在一起而形成成熟的傳訊核糖核酸(mRNA)，其接著被轉譯成*RGFP*報告蛋白質，作為鑑別miRNA/shRNA表現之用。在定量上，一倍濃度的*RGFP*相當於四倍濃度的mir-302表現。此外，亦可選擇性地以一些功能性蛋白之外顯子取代*RGFP*來提供附加的基因功能，例如體細胞重新編程(somatic cell reprogramming, SCR)中的hES基因標記。鑑於目前在脊椎動物中，有超過1000個、功能尚未

釐清的天然微型核糖核酸種類已被發現，且更多新的微型核糖核酸亦陸續被識別，因此吾人的內含子微型核糖核酸表現系統能作為一測試所述微型核糖核酸在體外及體內的功能的一有利工具。

【0019】 *SpRNAi*內含子包含數個一致性核苷酸組成分，包括一五端剪接位(5'-splice site)、一分支點基序(Branch-Point, BrP)、一多嘧啶段(poly-pyrimidine tract)、以及一三端剪接位(3'-splice site)。另外，並有被插入在五端剪接位及分支點基序之間的一髮夾形微型核糖核酸(miRNA)或小髮夾型核糖核酸(shRNA)前驅物。此內含子部分在RNA剪接及處理過程當中通常形成一套索(lariat)構造。再者，*SpRNAi*三端包含一多樣的轉譯終止密碼子區域(translational stop codon region (T codon))，以增加內含子RNA剪接(intronic RNA splicing)與處理的準確度。當T codon在細胞質內的傳訊核糖核酸(mRNA)上表現，該T codon會通知細胞內無意義調節之衰敗(nonsense-mediated decay, NMD)系統的活化，降解任何累積在細胞中、非結構化的核糖核酸以防止細胞毒性的產生。然而，高度結構化的小髮夾型核糖核酸(shRNA)及微型核糖核酸前驅物(pre-miRNA)將被保留，並接著經岱塞爾(Dicer)切割而分別形成成熟小干擾核糖核酸(siRNA)及微型核糖核酸(miRNA)。為了表現內含子miRNA/shRNA，吾人人工地將*SpRNAi*併入到*RGFP*基因的*DraII*限制位點中(Lin等人，2006與2008)，如此形成了重組*SpRNAi-RGFP*基因。以*DraII*限制酶切割*RGFP*可在每一端產生具有內凹三個核苷酸的AG-GN核苷酸斷口，其在*SpRNAi*插入後，將分別形成五端與三端剪接位。內含子插入中斷了*RGFP*蛋白質的完整性，但由於其能藉由內含子剪切而恢復完整性，吾人因此能透過在被轉染細胞中出現的紅色的紅移螢光蛋白(RGFP)來測定成熟miRNA/shRNA的表現。*RGFP*基因亦包含多個外顯子剪接增強子(exonic splicing enhancers, ESEs)以增加RNA剪接的準確度及效率。

【0020】 詳細來說，*SpRNAi*內含子包含一五端剪接位(5'- splicing

site) , 其與 5'-GTAAGAGK-3' (SEQ.ID.NO.4) 或 GU(A/G)AGU (SEQ.ID.NO.35) 基序 (即 5'-GTAAGAGGAT-3' (SEQ.ID.NO.36) 、 5'-GTAAGAGT-3' (SEQ.ID.NO.37) 、 5'-GTAGAGT-3' (SEQ.ID.NO.38) 與 5'-GTAAGT-3' (SEQ.ID.NO.39))同源;該*SpRNAi*內含子三端為一三端剪接位 (3'- splicing site) , 其與 GWKSCYRCAG (SEQ.ID.NO.5) 或 CT(A/G)A(C/T)NG (SEQ.ID.NO.40) 基序 (即 5'-GATATCCTGC AG-3' (SEQ.ID.NO.41) , 5'-GGCTGCAG-3' (SEQ.ID.NO.42) 與 5'-CCACAG-3' (SEQ.ID.NO.43))同源。此外,一分支點基序(branch point sequence)位於五端及三端剪接位之間,其與5'-TACTWAY-3' (SEQ.ID.NO.6)基序,像是5'-TACTAAC-3' (SEQ.ID.NO.44)以及與5'-TACTTAT-3' (SEQ.ID.NO.45) 高度同源。分支點基序的腺嘌呤核苷酸(adenosine),「A」核苷酸,在幾乎所有的剪接體內含子 (spliceosomal introns) 中,能藉由細胞2'-5'寡腺苷酸合成酶((2'-5')-oligoadenylate synthetases)與剪接體(spliceosomes)形成一透過(2'-5')鍵結連接之套索內含子RNA (intron RNA)的一部份。再者,一多嘧啶段(poly-pyrimidine tract)位在接近分支點基序與三端剪接位之間,係為一高T (胸腺嘧啶核苷酸)或高C (胞嘧啶核苷酸)含量的序列,其與5'-(TY)m(C/-)(T)nS(C/-)-3' (SEQ.ID.NO.7) 或 5'-(TC)nNCTAG(G/-)-3' (SEQ.ID.NO.8) 基序同源。其中符號「m」及「n」表示多個重複,其 ≥ 1 ; m的數量最佳等於1~3且n的數量等於7~12。符號「-」係指在該序列中可被略過之核苷酸。另外,序列中亦包含一些鏈接核苷酸序列,其係用來連接所有合成的內含子成分。根據37 CFR 1.822中有關表示核苷酸及/或氨基酸序列資料之符號及格式的準則,符號W係指腺嘌呤(A)或胸腺嘧啶(T)/尿嘧啶(U),符號K係指鳥嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)/尿嘧啶(U),符號S係指胞嘧啶(C)或鳥嘌呤(G),符號Y係指胞嘧啶(C)或胸腺嘧啶(T)/尿嘧啶(U),符號R係指腺嘌呤(A)或鳥嘌呤(G),且符號N係指腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)/尿嘧啶(U)。

【0021】 在其他可能的實施例中，本發明是直接的(外顯子) mir-302 miRNA/shRNA表現系統，其能直接產生類mir-302基因靜默效應子而不需透過細胞內的RNA剪接及/或NMD機制。然而，此方式的缺點為類mir-302基因靜默效應子的表現不受到任何細胞內監視系統(surveillance system)，像是無意義調節之衰敗(NMD)的調控，因此可能造成自然微型核糖核酸生合成路徑的過度飽和而導致細胞毒性的產生(Grimm等人，2006)。此方法所使用的表現系統可以是線型或環型的核酸組成，其選自質體(plasmid)、病毒載體(viral vector)、慢病毒載體(lentiviral vector)、轉位子(transposon)、反轉位子(retrotransposon)、跳躍基因(jumping gene)、蛋白質編碼基因(protein-coding gene)、非編碼基因(non-coding gene)、人工重組轉殖基因(artificially recombinant transgene)，以及其組合。類mir-302基因靜默效應子，包含微型核糖核酸、小髮夾型核糖核酸、小干擾核糖核酸，及其前驅物 and 同源物/衍生物，受到組織特異性或非特異性的核糖核酸(RNA)啟動子的控制而表現。RNA啟動子係選自第二型RNA聚合酶(type-II RNA polymerase, Pol-II)、病毒聚合酶(viral polymerase)、第三型RNA聚合酶(type-III RNA polymerase, Pol-III)、第一型RNA聚合酶(type-I RNA polymerase, Pol-I)，及四環黴素反應元件控制的RNA聚合酶(*TRE*)啟動子。病毒啟動子為類第二型RNA啟動子，其係分離自但不限於巨細胞病毒(cytomegalovirus, *CMV*)、反轉錄病毒終端重複序列(retrovirus long-terminal region, *LTR*)、B型肝炎病毒(hepatitis B virus, *HBV*)、腺病毒(adenovirus, *AMV*)、以及腺相關病毒(adeno-associated virus, *AAV*)。舉例來說，慢病毒LTR啟動子在每細胞中能夠生產五十萬個前驅傳訊核糖核酸轉錄分子(pre-mRNA transcript)(拷貝)。此外，基因靜默效應子的轉錄速率亦可藉由在RNA聚合酶啟動子前方插入一藥敏感抑制子(drug-sensitive repressor, 即 *tTS*) 來控制。抑制子可以被化學藥物或選自G418、新黴素(neomycin)、四環黴素(tetracycline)、去氧羥四環素(doxycycline)、安比西林(ampicillin)、卡那黴素(kanamycin)、嘌呤黴素

(puromycin)，及其衍生物等等的抗生素抑制。

【0022】 在一方面，亦可使用表現數個內含子基因靜默效應子的多個轉殖基因(transgenes)以及/或載體來達成對mir-302標的基因的基因靜默效應。此外，多個基因靜默效應子亦可從一個內含子插入子(intronic insert)產生。舉例來說，有報導指出，斑馬魚中一含有微型核糖核酸前驅物(pre-miRNA)的抗EGFP (anti-EGFP)內含子的異位表現(ectopic expression)能產生兩個不同大小的miRNA，即miR-EGFP(282/300)與miR-EGFP(280-302)，因此顯示出一個*SpRNAi*插入子能產生複數個基因靜默效應子(Lin等人 (2005) Gene 356 : 32-38)。在某些例子中，內含子基因靜默效應子能與一標的的基因轉錄分子(即，傳訊核糖核酸，mRNA)雜合，形成雙股小干擾核糖核酸(siRNAs)而引發次級核糖核酸干擾效應(RNAi)。由於這些基因靜默效應子由轉殖基因載體持續地被產生，因此可減輕對於RNA在體內快速降解的顧慮。此策略的好處在於透過載體轉殖基因轉染或者病毒感染提供可靠、長效的基因靜默效力。

【0023】 由於某些天然前驅微型核糖核酸(pre-miRNAs)的莖環(stem-loop)結構太大及/或太複雜而不適合用於微型核糖核酸表現系統/載體，因此發明人常使用人工重設甲硫胺酸的轉運核糖核酸環(tRNA_{met} loop，即 5'-(A/U)UCCAAGGGGG-3' (SEQ.ID.NO.46))取代天然前驅微型核糖核酸的環。tRNA_{met}環能有效使得人工重設的微型核糖核酸(miRNA)透過與天然微型核糖核酸相同的運送機制，藉著Ran-GTP與輸出蛋白5 (Exportin-5)，由細胞核輸出至細胞質(Lin 等人，2005)。本發明的優點在於使用一對人工改良的前驅微型核糖核酸環，包括5'-GCTAAGCCAG GC-3' (SEQ.ID.NO.1) 與5'-GCCTGGCTTA GC-3' (SEQ.ID.NO.2)，該等環能提供人工重設的微型核糖核酸(pre-miRNA)與天然前驅微型核糖核酸輸出相同的核輸出(nucleus export)效率，同時不干擾tRNA輸出。再者，此改良亦促進mir-302a-mir-302a* 雙股及mir-302c-mir-302c* 雙股的形成，因而增加

mir-302s總體的功能與穩定度。此新穎的前驅微型核糖核酸環之設計是結合 tRNAmet 環與 mir-302b/mir-302a 短莖環並修飾而完成，其中 mir-302b/mir-302a之短莖環在人類ES細胞中高度表現但在其他已分化組織的細胞內則否。如此，在mir-302構造中使用該重組/人造/人工髮夾環不會干擾人體中自然的miRNA路徑，因而減低細胞毒性且增加安全性。

【0024】 Mir-302前驅微型核糖核酸的家族群集是經由雜合與鏈接/連結合成的mir-302同源物而形成，該群集由五端至三端包含四個部分：mir-302a、mir-302b、mir-302c，及mir-302d的前驅微型核糖核酸(pre-miRNAs，圖1B)。所有人工重設的mir-302 miRNA/shRNA分子在其五端最前面具有相同的17個核苷酸[例：5'-UAAGUGCUUC CAUGUUU-3' (SEQ.ID.NO.3)]。Mir-302之前驅微型核糖核酸群集使用的合成寡核苷酸如下所列：包含 mir-302a- 正義，5'-GTCACGCGTT CCCACCACTT AAACGTGGAT GTACTTGCTT TGAAACTAAA GAAGTAAGTG CTTCCATGTT TTGGTGATGG ATAGATCTCT C-3' (SEQ.ID.NO.9)；mir-302a- 反義，5'-GAGAGATCTA TCCATCACCA AAACATGGAA GCACTTACTT CTTTAGTTTC AAAGCAAGTA CATCCACGTT TAAGTGGTGG GAACGCGTGA C-3' (SEQ.ID.NO.10)；mir-302b-正義，5'-ATAGATCTCT CGCTCCCTTC AACTTTAACA TGGAAGTGCT TTCTGTGACT TTGAAAGTAA GTGCTTCCAT GTTTTAGTAG GAGTCGCTCA TATGA-3' (SEQ.ID.NO.11)；mir-302b- 反義，5'-TCATATGAGC GACTCCTACT AAAACATGGA AGCACTTACT TTCAAAGTCA CAGAAAGCAC TTCCATGTTA AAGTTGAAGG GAGCGAGAGA TCTAT-3' (SEQ.ID.NO.12)；mir-302c- 正義，5'-CCATATGGCT ACCTTTGCTT TAACATGGAG GTACCTGCTG TGTGAAACAG AAGTAAGTGC TTCCATGTTT CAGTGGAGGC GTCTAGACAT-3' (SEQ.ID.NO.13)；mir-302c- 反義，5'-ATGTCTAGAC

GCCTCCACTG AAACATGGAA GCACTTACTT CTGTTTCACA
 CAGCAGGTAC CTCCATGTTA AAGCAAAGGT AGCCATATGG-3'
 (SEQ.ID.NO.14) ; mir-302d- 正義 , 5'-CGTCTAGACA TAACACTCAA
 ACATGGAAGC ACTTAGCTAA GCCAGGCTAA GTGCTTCCAT
 GTTTGAGTGT TCGCGATCGC AT-3' (SEQ.ID.NO.15) ; 及 mir-302d-反義 ,
 5'-ATGCGATCGC GAACACTCAA ACATGGAAGC ACTTAGCCTG
 GCTTAGCTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGT TATGTCTAGA CG-3'
 (SEQ.ID.NO.16) 。 或者 , 吾人亦使用人工重設之小髮夾型核糖核酸
 (shRNA) 。 該人工重設之小髮夾型核糖核酸是由合成的miR-302s-正義 ,
 5'-GCAGATCTCG AGGTACCGAC GCGTCCTCTT TACTTTAACA
 TGGAAATTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGG TGTGGCGCGA
 TCGATATCTC TAGAGGATCC ACATC-3' (SEQ.ID.NO.17) 與mir-302s-反
 義 , 5'-GATGTGGATC CTCTAGAGAT ATCGATCGCG CCACACCACT
 CAAACATGGA AGCACTTAAT TTCCATGTTA AAGTAAAGAG
 GACGCGTCGG TACCTCGAGA TCTGC-3' (SEQ.ID.NO.18)雜合形成 , 取代
 mir-302 前驅微型核糖核酸的群集(mir-302 pre-miRNA cluster) , 作簡單的內
 含子插入 。 Mir-302 小髮夾型核糖核酸(mir-302 shRNA)與所有天然的
 mir-302成員共有超過85% 的同源性並且標靶相同的人類細胞基因 。 在設計
 mir-302同源物時 , 胸腺嘧啶可以尿嘧啶取代 , 反之亦然 。

【0025】 在 mir-302 的前驅 miRNA/shRNA 的內含子插入 (intronic insertion) 的部分 , 由於在重組 *SpRNAi-RGFP* 轉殖基因插入位的側翼分別有五端的 *PvuI* 與三端的 *MluI* 限制/選殖位 , 因此最初的插入子能被移除、再以各種前驅 miRNA/shRNA 插入子取代之 (例 : mir-302 的前驅 miRNA/shRNA) , 其中該等前驅 miRNA/shRNA 插入子具有與 *PvuI* 及 *MluI* 限制位相匹配的黏性末端 (cohesive ends) 。 藉著更換標的不同的基因轉錄分子的內含子插入子 , 本發明的內含子 mir-302s (intronic mir-302s) 表現系統能作為在體外 (*in vitro*) 、

離體(*ex vivo*)、及體內(*in vivo*)中引發標的基因靜默的一個有力工具。在內含子插入後，此在內含子插入位含有mir-302之*SpRNAi-RGFP*轉殖基因接著再被插入至一能受到去氧羥四環素誘導的*pSingle-tTS-shRNA*載體之限制/選殖位(即：一*XhoI-HinDIII*限制/選殖位)，形成能在細胞內表現的*pTet-On-tTS-miR302s*表現載體(圖1A)。

【0026】 將表現類pre-mir-302 (pro-mir-302)或mir-302的核酸組成物傳送到人類細胞的方法係使用一非轉殖基因或一轉殖基因方法，其係選自微脂體/多聚體/化學轉染法(liposomal/polysomal/chemical transfection)、DNA重組(DNA recombination)、電穿孔法(electroporation)、基因槍穿透(gene gun penetration)、轉位子/反轉位子插入(transposon/retrotransposon insertion)、跳躍基因整合(jumping gene integration)、顯微注射(micro-injection)、病毒感染(viral infection)、反轉錄病毒/慢病毒感染(retroviral/lentiviral infection)，及其組合。爲了預防轉殖基因隨機的插入及細胞突變的風險，本發明較佳係使用微脂體或多聚體轉染法來將mir-302表現載體及/或類mir-302基因靜默效應子(如pre-mir-302及/或pro-mir-302)傳送至標的人類細胞中(即，腫瘤/癌細胞)。轉導後mir-302s表現的水平可取決於似mir-302基因靜默效應子的濃度或在各種濃度的去氧羥四環素之下，*pTet-On-tTS-miR302s*載體上由*TRE*調控的*CMV*啓動子之表現速率。因此，本發明提供了透過使用已知藥物(即，去氧羥四環素)或pre-/pro-mir-302濃度，提供一可控制的機制，藉以調節mir-302在體外、離體、體內的表現水平。藉此，吾人得防止任何在受測細胞中由於RNA累積或過飽和而造成的細胞毒性。另外，透過一*CMV*啓動子調控的mir-302表現，其在人類細胞中經常在爲期一個月的活化狀態之後，因DNA甲基化而靜止。此活化一個月的機制避免被處理的細胞中RNA的長期累積或過度飽和，因而有益於癌症治療。

【0027】 總而言之，本發明採用一新穎設計與策略，使用經載體表現或非經載體表現的類mir-302基因靜默效應子作爲治療藥物，用於腫瘤抑制

與癌症治療。類mir-302基因靜默效應子包括mir-302a、mir-302b、mir-302c、mir-302d及他們的髮夾樣微型核糖核酸前驅物(pre-miRNAs及/或pro-miRNAs)、人工重設的小髮夾型核糖核酸(shRNA)同源物/衍生物，以及其組合。在較佳實施例中，本發明提供使用一治療人類腫瘤與癌症的設計與方法，其係使用在處理的腫瘤/癌症細胞中能被傳送及被處理成足夠量的類mir-302基因靜默效應子，從而抑制mir-302標的的細胞週期調節者與致癌基因，並且達到有益腫瘤/癌症治療的效果的重組核酸組成物。該重組核酸組成物可在處理的細胞內透過一持續性啟動子(即，*CMV*)或一藥物誘導式啟動子(即，*TRE-CMV*)驅動的轉錄而表現類mir-302基因靜默效應子。另一方面，該重組核酸組成物可用於原核細胞驅動的pre-mir-302之生產(產物為pro-mir-302)；該pro-mir-302可用來作為治療人類腫瘤/癌症的類mir-302的基因靜默效應子。較佳而言，類mir-302基因靜默效應子轉錄自重組mir-302家族群集(mir-302s；SEQ.ID.NOs.9-16的雜合物)或一人工重設的mir-302小髮夾型核糖核酸同源物(shRNA，即，SEQ.ID.NOs.17與18的雜合物)。該經處理的細胞基質能在體外、離體或體內表現mir-302標的的細胞基因。透過靜默mir-302標的的細胞基因，本發明不僅抑制腫瘤/癌細胞的發生，並且也將高度惡性的癌細胞重新編程為較良性的低階狀態；該現象稱為癌消退(cancer regression)。

【0028】 本發明證實mir-302介導之抗腫瘤/癌症治療的成功：第一，對於正常人類細胞的安全性。如圖1E-1F與3A-3B所示，轉染mir-302至正常人類細胞(mirPS-hHFC)中導致輕微的細胞週期減弱但不引起細胞凋亡或細胞死亡。第二，轉染mir-302至人類細胞能將細胞重新編程為類幹細胞狀態；有益於治癒受損組織(圖4A-4B與圖5A-5D)。第三，將mir-302轉染至人類腫瘤/癌細胞(例如攝護腺癌細胞PC3、皮膚癌細胞Colo、乳癌細胞MCF7、肝癌細胞HepG2以及腫瘤畸胎瘤細胞NTera-2)，對於該些腫瘤/癌細胞的生長皆顯現強烈的抑制效應，並導致>98%細胞的死亡或細胞凋亡(圖6A-6D與

12A-12C)。第四，mir-302不僅能藉由共同抑制數種細胞週期調節者，像是週期素依賴性激酶2 (CDK2)，週期素D1/D2 (cyclin D1/D2)與BMI-1，亦能藉著活化腫瘤抑制子如p16INK4a與p14/p19Arf來抑制腫瘤發生(圖7B-7D)。最後，活體內將mir-302傳送至腫瘤/癌細胞中能抑制 > 90%的腫瘤/癌細胞生長(圖8A-8C與圖15)。此外，mir-302不會引起端粒縮短(telomere shortening)所導致的細胞衰老(cell senescence) (圖9A-9C)。值得注意的是，吾人已成功地配製類mir-302基因靜默效應子及/或其表現載體，並將其轉染至體內標的的腫瘤/癌細胞中，因此能避免反轉錄病毒感染與轉殖基因突變的風險(圖8A-8C與圖15)。這些發現提供了可使用類mir-302基因靜默效應子作為抗腫瘤/癌症治療的治療藥物及/或疫苗的有力證明。由於mir-302亦有修復及再生受損人類組織的功能(Lin等人，2008與2010)，因此本發明不僅有益於抗腫瘤/癌症治療的應用，也進一步可用於組織恢復及/或器官再生。

【圖式簡單說明】

【0029】 明確言之，以下說明的圖示僅供舉例說明之用而非限制本發明：

【0030】 圖1A-1F描述可誘導的mir-302表現及其對正常人類毛囊細胞(hHFC) 增生的效應。(A)可受去氧脲四環素(Dox)誘導的*pTet-On-tTs-miR302s* 載體的構造。(B) mir-302家族(*mir-203s*) 的構造。(C)以10 μ M去氧脲四環素(Dox)處理後(n = 3, $p < 0.01$)經6小時，誘導表現的mir-302經微型核糖核酸微陣列分析的結果。(D) 北方與西方墨點分析法分析mir-302對核心重新編程轉錄因子Oct3/4 – Sox2 – Nanog與黑色素細胞(melanocytic)標記基因*TRP1*之蛋白質產物、細胞角蛋白(cytokeratin 16)的表現型式的劑量相關效應(n = 5, $p < 0.01$)。(E)流式細胞儀分析結果之長條圖顯示mir-302對mirPS-hHFC細胞族群有絲分裂(M期)與休眠(G0/G1期)改變的劑量相關效應。(F) 以10 μ M去氧脲四環素(Dox)處理後，各mirPS細胞株在mir-302誘導下發生的細胞凋亡DNA斷裂的DNA梯度(DNA laddering)特徵。

【0031】 圖2A-2C描述mir-302s的生合成以及mirPS細胞的產生。(A)內含子mir-302生合成的機制。Mir-302家族群集與一編碼紅色螢光蛋白的基因(*RGFP*)一同被轉錄並進一步被剪接複合體(spliceosomal components)及細胞質酵素：RNA內切酶(RNaseIII)，岱塞爾(Dicers)，剪切成個別的mir-302成員。其中紅色螢光蛋白作為mir-302產量的指標。一倍濃度的紅色螢光蛋白相當於有四倍濃度的mir-302生產。(B)與(C)以微脂體/多聚體/電穿孔法轉染mir-302之步驟示意。誘導的mir-302表現載體*pTet-On-tTs-miR302s*(圖1A)在一低滲性pH緩衝液(200 μ l；Eppendorf)中以電穿孔法在150微秒的300~400伏特之下被導入成熟(adult) hHFC細胞。在每一試驗中使用10 μ g *pTet-On-tTs-miR302s*轉染200,000個源自兩個人類毛囊(真皮乳頭)的培養的hHFC細胞。經去氧羥四環素(doxycycline, Dox)誘導而表現後，mir-302的生合成依照自然的內含子微型核糖核酸(intronic miRNA)途徑。

【0032】 圖3A-3C描述經去氧羥四環素(Dox = 5或10 μ g) 誘導後表現的mir-302對mirPS-hHFC細胞特性的改變。(A)與(B)在去氧羥四環素誘導細胞重新編程之前與之後，細胞形態及細胞週期速率的改變。每細胞週期階段與相對之DNA含量的流式細胞儀分析結果以一圖表表示於細胞形態學上方($n = 3$, $p < 0.01$)。表中第一(左)與第二(右)高峰分別表示停滯期(G0/G1)細胞與有絲分裂期(M)細胞和全部的受試細胞族群之比率。比例尺 = 100 μ m。(C)單一mirPS-hHFC細胞在限數稀釋後形成類胚胎體(EB)的時間過程。細胞週期估計起先約為20~24小時，但在72小時之後逐漸加速。比例尺 = 100 μ m。

【0033】 圖4A-4B描述多能性標記表現之分析與活體內多能性分化及同化。(A)人類胚胎幹細胞(hES)標記基因在mirPS細胞中以高濃度mir-302誘導後的表現型式與在人類胚胎幹細胞WA01-H1(H1)及WA09-H9(H9)中之表現型式經北方墨點分析後的比較($n = 5$, $p < 0.01$)。以7.5 μ M去氧羥四環素(Dox)處理後，mir-302在mirPS細胞中的濃度與其在H1及H9細胞內的濃度相

較多了30% (是未經處理的hHFC之 > 30倍)並且開始引發主要多能性標記 Oct3/4、Sox2、Nanog、Lin28與未分化胚胎細胞轉錄因子1(UTF1)的共同表現。(B)將mirPS細胞植入免疫功能不足 SCID-beige 小鼠後經過一個星期，由mirPS細胞分化而來的組織同化爲注射位置附近的周圍組織。白色箭頭指示注射方向。閏盤(intercalated disks)位置以黃色三角形標示。衍生自mirPS-hHFC的組織囊腫不會在小鼠子宮及腹腔以外的器官/組織生長。吾人進一步在植入後一週解剖及檢查注射位置周圍的組織形成。在解剖前一天，小鼠經尾部靜脈注射方式被施以10 μ g去氧羥四環素。吾人觀察到呈RGFP陽性的mirPS細胞分化成爲與植入位置周圍組織相同的細胞類型，包括在腹膜內注射後形成腸上皮組織、心臟注射後之心肌、以及在腰背(dorsal flank)注射後形成骨骼肌。此外，同化的mirPS細胞亦表現與周圍組織相同的組織特異性標記，例如腸上皮的MUC2、心肌的第二型肌鈣蛋白T (troponin T type 2, cTnT)、以及骨骼肌的肌球蛋白重鏈(myosin heavy chain, MHC)。

【0034】 圖5A-5D表示去氧羥四環素(Dox = 10 μ M)誘導下之mirPS-hHFCs得到類人類胚胎幹細胞(hES-like)的特性。(A)使用人類基因體基因晶片(Human genome GeneChip U133 plus 2.0 array, Affymetrix)分析mir-302誘導體細胞重新編程(SCR)之前與之後的全基因表現型態($n = 5$, $p < 0.01\sim 0.05$)。(B)在限制酶*HpaII*切割後，較小DNA片段的出現與增加證實了以10 μ M而非5 μ M去氧羥四環素(Dox)處理後，mirPS細胞內基因體規模之總體CpG甲基化的大量減少。(C)以二亞硫酸鹽DNA定序法定序*Oct3/4*與*Nanog*的啓動子區域後，得到詳細的甲基化地圖。黑色圓形與白色圓形分別代表甲基化與未甲基化的胞嘧啶位置。(D)由mirPS-hHFCs多能分化成的似畸胎瘤組織囊腫(teratoma-like tissue cysts)包含源自三個胚層(embryonic germ layers)的各種組織。

【0035】 圖6A-6E顯示，10 μ M去氧羥四環素(Dox)誘導mir-302表現後，源自各種腫瘤/癌細胞之mirPS細胞的體外腫瘤發生能力分析。(A)與(B)

以去氧脛四環素(Dox)誘導mir-302表現之前與之後，細胞形態與細胞週期速率的改變。細胞週期各階段與相對之DNA含量的流式細胞儀分析結果以圖表表示於細胞形態學上方($n = 3$ ， $p < 0.01$)。(C)流式細胞儀分析結果之長條圖顯示mir-302對於源自各種腫瘤/癌細胞之mirPS細胞族群在有絲分裂(M期)及休眠(G0/G1期)變化上的劑量相關效應。(D)Mir-302抑制腫瘤(及/或癌細胞)在Matrigel 小室中之表現侵犯行為的功能性分析($n = 4$ ， $p < 0.05$)。(E)在去氧脛四環素誘導mir-302表現之前與之後，比較細胞貼附於人類骨髓內皮細胞(hBMECs)單層的百分比 ($n = 4$ ， $p < 0.05$)。

【0036】 圖7A-7D冷光酵素三端非轉譯區報告基因試驗(luciferase 3' -UTR reporter gene assay) 顯示 mir-302 在標的的 G1 檢控點調節者(G1-checkpoint regulators)引發的基因靜默效應。(A) 冷光酵素三端非轉譯區報告基因的構造為在三端非轉譯區帶有兩個正常(T1+T2)、或兩個突變(M1+M2)、或正常與突變混合(T1+M2或M1+T2)之mir-302標的位置。突變位置含有一錯配(mismatched)TCC 基序，其取代正常標的位置之一致的3' -CTT端。(B) 去氧脛四環素(Dox)誘導的mir-302表現對冷光酵素表現之影響($n = 5$ ， $p < 0.01$)。Dox濃度 = 5或10 μM 。CCND1與CCND2分別表示週期素D1與週期素D2。(C)與(D)以西方墨點分析法比較在高濃度(10 μM Dox)及低濃度(5 μM Dox) mir-302誘導下，mir-302主要標的之G1檢控點調節者在mirPS細胞與在人類胚胎幹細胞(hES)：WA01-H1(H1)及WA09-H9(H9)中的變化($n = 4$ ， $p < 0.01$)。

【0037】 圖8A-8C的活體內(*in vivo*)腫瘤生成能力分析顯示腫瘤NTera2細胞對載體表現的mir-302s (NTera2+mir-302s) 或 mir-302d* (NTera2+mir-302d*) ($n = 3$ ， $p < 0.05$) 之反應。被轉染的腫瘤細胞NTera-2中的mir-302s及mir-302d*分別轉錄自

CMV-miR302s及pCMV-miR302d*

載體。(A) 實施原位注射(post-is)後經過三週，對平均腫瘤大小進行形態評估。所有的腫瘤皆位於原本植入的位置(黑色箭頭所指之處)。在所有受試小鼠中皆沒有

觀察到惡病質或腫瘤轉移的症候。(B)北方墨點分析與西方墨點分析以及(C)免疫組織化學染色分析圖顯示體內mir-302對於核心重新編程轉錄因子 Oct3/4 - Sox2 - Nanog與mir-302標的的G1檢控點調節者：週期素依賴性激酶 2(CDK2)、週期素D1/D2(cyclins D1/D2)、BMI-1、以及p16Ink4a和p14Arf表現型態的效應。

【0038】 圖9A-9C為mir-302在10 μ M去氧脛四環素之誘導而表現下，mirPS-hHFC與衍生自各種腫瘤/癌細胞的mirPS細胞株的端粒酶活性分析。(A)以端粒重複序列擴增試驗(TRAP)分析端粒酶活性($n = 5, p < 0.01$)。端粒酶活性會受到RNase處理的影響(hHFC+RNase)。(B)西方墨點法的分析證實人類端粒酶反轉錄酶(hTERT)在各種mirPS細胞株中的表現為一致的增加，而AOF2與HDAC2的表現減少($n = 5, p < 0.01$)。(C)以端粒酶PCR ELISA試驗測量端粒酶活性(OD470 - OD680； $n = 3, p < 0.01$)。

【0039】 圖 10A-10D的分析結果顯示mir-302對其標的的外基因(epigenetic gene)引發的靜默效應。(A)冷光酵素三端非轉譯區報告基因的構造為在三端非轉譯區帶有兩個正常(T1+T2)或兩個突變(M1+M2)、或正常與突變混合(T1+M2或M1+T2)之mir-302標的位置。突變位置包含一錯配的TCC基序，取代正常標的位置上一致的三端CTT。(B)去氧脛四環素(Dox)誘導表現的mir-302對冷光酵素表現的影響($n = 5, p < 0.01$)。(C)與(D) 以西方墨點分析法比較在高濃度(10 μ M Dox)與低濃度(5 μ M Dox) mir-302誘導下，mir-302主要標的的外基因(epigenetic gene)在mirPS細胞與在人類胚胎幹細胞WA01-H1(H1)及WA09-H9(H9)中表現的變化($n = 4, p < 0.01$)。

【0040】 圖 11 為 mir-302 介導的體細胞重新編程(somatic cell reprogramming, SCR)與細胞週期調節機制的示意圖。基於先前與目前的研究，吾人發現了兩並行事件。第一， mir-302透過對多種外基因調節者(epigenetic regulators)：AOF1/2、MECP1/2與 HDAC2強烈的靜默作用而開始了重新編程並引發全基因體DNA的去甲基化，藉此再活化誘發SCR所需(灰

色標記)的人類胚胎幹細胞細胞標記基因。第二，透過對G1檢控點調節者週期素依賴性激酶(CDK2)、週期素D1/D2(cyclins D1/D2)與BMI-1的共同抑制以及p16Ink4a與p14/p19Arf的活化而造成細胞週期的減弱，以抑制所有細胞活動來為SCR作準備(黑色標記)。休眠期(G0/G1)的停滯亦防止可能的隨機生長(random growth)及/或經重新編程的多能性幹細胞的類腫瘤轉形(transformation)。整體而言，此兩事件協同效應的結果為一更精確與安全的重新編程過程；亦能同時抑制預先成熟(pre-mature)與腫瘤生成。

【0041】 圖12A-12C顯示類mir-302的RNA分子於人類初代表皮細胞(hpESC)、人類攝護腺癌細胞(PC3)以及人類初級黑色素瘤細胞(Colo)轉基因表現後，細胞形態與細胞增生的變化。在mir-302轉染後，mir-302表現為陽性的細胞分別是hpESC+mir-302、PC3+mir-302與Colo+mir-302。

【0042】 圖13示意內含子miRNA miR-302天然的生合成機制。Mir-302是由La 核糖核蛋白域家族成員7基因(*La ribonucleoprotein domain family member 7 (LARP7)*)的內含子區域編碼的一天然內含子miRNA。在mir-302生合成中，初級miRNA前驅物(pri-miRNA)首先透過第二型RNA聚合酶(Pol-II)與*LARP7*基因的轉錄物一同轉錄出來，接著經細胞剪接體修剪且形成髮夾樣的miRNA前驅物(pre-miRNA)。Pre-miRNA透過輸出蛋白5 (Xpo5)輸出細胞核，且進一步由細胞質中的類Dicer的核糖核酸內切酶RNase III處理形成成熟miRNAs。接著，成熟mir-302分子可一同與Argonaute蛋白(Ago 1~4) 結合於RNA-induced靜默複合體(RISC)，並引發特定基因的靜默。

【0043】 圖14顯示使用pro-mir-302治療小鼠皮膚開放傷口的活體內的新藥臨床前試驗(pre-IND)結果。試驗包含三個不同的治療：上方的空白組，即僅以軟膏處理；中間為pro-mir-434濃度10 µg/mL的軟膏(負控制組)；下方為pro-mir-302濃度10 µg/mL的軟膏。

【0044】 圖15顯示使用pro-mir-302為一注射藥劑於SCID裸鼠治療異種移植(xenografts)的人類肝癌細胞的活體內的新藥臨床前試驗(pre-IND)結

果。在進行三次處理(每週一次)後，pro-mir-302(pre-mir-302)的藥成功將腫瘤由 $728 \pm 328 \text{ mm}^3$ (未處理的空白組、控制組C)縮減為 $75 \pm 15 \text{ mm}^3$ (以pro-mir-302處理，組別T)，顯示平均腫瘤尺寸近90%的減少率。相同步驟以合成siRNA等擬物(siRNA-302)處理後，並未發現顯著治療效果。進一步的組織學試驗(最右方)顯示，僅在pro-mir-302處理的異種移植的肝癌細胞/腫瘤中，可觀察到似正常肝小葉的結構(黑色箭頭所指圓圈處)；在其他處理的組別或控制組中沒有觀察到此結構。此結果指出重新編程的機制能將惡性的癌細胞性質回復至相對正常的狀態(癌逆轉，cancer reversion)。

【0045】 圖16顯示正常肝組織與以pro-mir-302處理的*in vivo*異種移植人類肝癌細胞/腫瘤在組織學上的相似性。在進行三次處理(每週一次)後，pro-mir-302(pre-mir-302)的藥成功將高度(grade IV)的異種移植的人類肝癌重新編程為較為良性的低階(小於grade II)狀態。近似正常肝組織(上方)，經處理的異種移植癌(腫瘤)能形成典型肝小葉，含有似中央靜脈(CV)與似肝門三合體(PT)的結構(黑箭頭所指處)。癌細胞一般而言較正常肝細胞呈酸性；蘇木紫-伊紅(H&E)染色的結果顯示癌細胞顏色較紫而正常肝細胞顏色較紅。

【0046】 圖17顯示在SCID-beige裸鼠體內，未處理的、siRNA處理的、pro-mir-302處理的異種移植人類肝癌(腫瘤)與正常肝組織的病理組織學比較。在沒有處理下(上方)，異種移植的人類肝癌(腫瘤)侵略性地入侵正常組織例如肌肉與血管，且形成大規模的細胞-細胞與癌-組織的融合結構，說明了其高度惡性及轉移。以siRNA等擬物(siRNA-302)處理並沒有顯著降低異種移植的肝腫瘤(中間上方)的惡性；原因可能是siRNA分子在體內的短半生期。相反地，以pro-mir-302 (=pre-mir-302)治療不但將異種移植的癌細胞重新編程為似正常肝細胞的形態(無融合)，且成功抑制癌(細胞)侵犯周圍正常組織(中間下方)。相較於正常肝組織(下方)，pro-mir-302處理的惡性腫瘤展現似肝小葉結構、似正常腺細胞的排列，以及細胞-細胞與癌-組織接合處(黑色箭頭)非常清楚的界線。此說明了處理後的癌(腫瘤)降為較良性的狀態。

【實施方式】

【0047】 儘管現將參考附圖描述本發明之特定具體實施例，但應了解此等具體實施例僅作為實施例之用，並僅例示性舉出少數之可能特定具體實施例，其可代表本發明之原理的應用。熟習本技術者人士顯然應了解各種改變及修正皆屬隨附申請專利範圍中所進一步定義的本發明之精神、範疇及構想內。

【0048】 本發明提供一新穎核酸組成物以及利用重組的類mir-302基因靜默效應子來抑制人類腫瘤/癌細胞增生與腫瘤生成的方法。不同於先前小髮夾型核糖核酸(shRNA)的設計，本發明的小髮夾型核糖核酸包含一錯配的莖幹 (mismatched stem-arm)，其相似於天然 mir-302 的前驅物 (pre-mir-302)。再者，本發明的小髮夾型核糖核酸含有一改良的pre-mir-302莖環：5'-GCTAAGCCAG GC-3' (SEQ.ID.NO.1)與5'-GCCTGGCTTA GC-3' (SEQ.ID.NO.2)，其能提供與輸出天然微型核糖核酸前驅物(pre-miRNAs)相同的核輸出(nucleus export)效率，但不干擾轉運核糖核酸(tRNA)的輸出。不受任何特定理論的約束，本發明的抗增生、抗腫瘤生成的效應指出一新發現的、藉由轉染可表現mir-302家族群集(mir-302s)或mir-302同源性小髮夾型核糖核酸的重組核酸組成物所引發的mir-302介導的基因靜默機制。所有人工重設的miRNA/shRNA分子，其五端最前方的17個核苷酸具有相同的序列，5'-UAAGUGCUUC CAUGUUU-3' (SEQ.ID.NO.3)。構築類mir-302基因沉默效應子及表現mir-302的核酸組成物的步驟將在實施例2與3中描述。在設計與mir-302同源的序列時，胸腺嘧啶(T)可用來取代尿嘧啶(U)。

【0049】 為了定位mir-302在人類細胞週期中的角色，吾人設計了一可誘導的*pTet-On-tTS-miR302s*表現載體(圖1A；實施例2)並將其轉染到人類正常細胞與人類癌細胞中。Mir-302s為一hES特有的微型核糖核酸(miRNA)家族，家族群集中含有四個小非編碼(non-coding) RNA成員：mir-302b、

mir-302c、mir-302a、及mir-302d (mir-302s；圖1B) (Suh等人，2004)。本發明中，mir-302s的表現在去氧羥四環素(Dox)的刺激下，透過一藉由四環黴素反應元件(tetracycline-response-element，*TRE*)控制的巨細胞病毒啓動子(cytomegaloviral (*CMV*) promoter)來驅動。在轉染之後，mir-302的生合成依照天然的內含子微型核糖核酸生合成途徑進行，其中mir-302與編碼紅螢光蛋白的報告基因(*RGFP*)一起被轉錄，並進一步被剪接複合體(spliceosomal components)及細胞質RNA內切酶RNaseIII，岱塞爾(Dicers)切割成個別的mir-302成員(圖2A) (Lin等人，2008)。在定量上，一倍濃度的RGFP相當於有四倍濃度的mir-302存在。微型核糖核酸微陣列分析確認了在去氧羥四環素(Dox)刺激下，mir-302b*以外的所有mir-302成員皆能在被轉染的細胞中有效表現(圖1C；實施例3)。以*pTet-On-tTS-miR302s*表現載體轉染細胞的步驟概述於圖2B-2C。

【0050】此外，表現mir-302的核酸組成物，像是*pTet-On-tTS-miR302s*，含有：用以增加真核細胞轉譯效率之Kozak一致性轉譯起始位(Kozak consensus translation initiation site)、位於表現mir-302之構成物(mir-302 construct)的下游的多個SV40聚腺苷酸化訊息(SV40 polyadenylation signals)、在原核細胞中繁殖用的一pUC複製起始點、用來將表現mir-302之構成物(即，*SpRNAi-RGFP*)合併至該核酸組成物之至少兩個限制位、在表現SV40 T抗原之哺乳動物細胞中複製所需的一選擇性的SV40複製起始點、以及在一複製勝任原核細胞中表現抗生素抗藥性基因所需之一選擇性SV40早期啓動子。抗生素抗藥性基因之表現係作為一篩選標記，用來分離有轉殖基因之表現的陽性群落。該等抗生素係選自G418、新黴素(neomycin)、嘌呤黴素(puromycin)、盤尼西林G(penicillin G)、安比西林(ampicillin)、卡那黴素(kanamycin)、鏈黴素(streptomycin)、紅黴素(erythromycin)、斯派克黴素(spectromycin)、霍火黴素(phophomycin)、四環黴素(tetracycline)、去氧羥四環素(doxycycline)、利服平(rifapicin)、兩性黴

素B(amphotericin B)、健他黴素(gentamycin)、氯黴素(chloramphenicol)、頭孢黴素(cephalothin)、泰黴素(tylosin)及其組合。

Mir-302減弱正常細胞細胞週期而不引起細胞凋亡

【0051】 吾人先前的研究顯示在人類黑色素細胞瘤細胞Colo-829與前列腺癌細胞PC3中，mir-302表現增加會將這些惡性癌細胞重新編程至一似hES的多能(pluripotent)狀態(Lin等人，2008)。在體細胞重新編程(SCR)的過程中，mir-302導致大於98% (>98%)的癌細胞細胞凋亡並且大幅減低餘下(<2%)重新編程細胞的增生速率。雖然這些特性有益於癌症治療，但是mir-302在正常人類細胞中的功能仍然是不確定的。爲了評估其效應，吾人將可被誘導的*pTet-On-tTs-miR302s*表現載體導入正常人類毛囊細胞(hHFCs)中。選擇hHFCs的原因是由於其量充足、具可及性、並且生長快速。隨著去氧脛四環素(Dox)濃度增加至10 μM ，吾人觀察到在去氧脛四環素濃度大於7.5 μM (>7.5 μM) (圖1D，實施例5)的閾值下，核心重新編程因子(core reprogramming factors) Oct4 – Sox2 – Nanog一致受到促進，同時增生的細胞族群下降70%，即，由原先的37% \pm 2% 降至11% \pm 2% (圖1E，M期；實施例7)。相應之下，休眠的細胞族群增加了41%，即，由原先的56% \pm 3% 增至79% \pm 5% (圖1E，G0/G1期；實施例7)，因而反映出相似於吾人先前在mir-302重新編程多能性幹細胞(mir-302 – reprogrammed pluripotent stem cells)所發現的(mirPS cells；Lin等人，2008)強烈的抗增生作用。然而mir-302重新編程之hHFC細胞(mirPS-hHFC)不表現任何能夠測得的細胞凋亡的DNA斷裂(DNA laddering)或細胞死亡的徵象(圖1F，實施例6)，這表示相較於腫瘤/癌細胞，正常細胞更可以忍受mir-302造成的抗增生作用。可以想見腫瘤/癌細胞旺盛的新陳代謝及快速的生長擴張使其很難以在這樣的休眠狀態下存活。

【0052】 值得注意的是，當以濃度大於7.5 μM 的去氧脛四環素處理

後，mirPS-hHFC的形態由紡錘狀轉變成類似休眠細胞的球狀(圖3A-3B，紅色RGFP陽性細胞)。在7.5 μ M去氧羥四環素刺激下所產生的細胞mir-302濃度大約是人類胚胎幹細胞H1及H9細胞中mir-302濃度水平的1.3倍(圖4A；實施例4)。在此更高的濃度水平之下，mirPS-hHFCs強烈表現Oct3/4、Sox2、Nanog、及其他標準人類胚胎幹細胞(hES)標記(圖4A)。全基因表現的微陣列分析進一步顯示大約一半的轉錄體(transcriptome)由hHFC體細胞的形式轉變為似hES的表現形式，並且與H1/H9細胞有超過93% (>93%)的相似度(圖5A；實施例8)。體細胞重新編程(SCR)起始的第一徵象：全基因體DNA的去甲基化亦能清楚地在這些mirPS-hHFCs中測得，且去甲基化型式亦與H1/H9細胞中的相同(圖5B與5C；實施例9)。此外，每一個別的mirPS-hHFC細胞能長成一單一似類胚胎體群落，並且其每週期20~24小時的細胞分裂速率亦符合mir-302的抗增生效應(圖3C)。吾人特別注意到這些mirPS-hHFCs係多能的(pluripotent)但非具有腫瘤生成能力(tumorigenic)，因為這些mirPS-hHFCs只在假性懷孕免疫功能不足的SCID-beige小鼠子宮與腹腔中形成似畸胎瘤組織囊腫。這些似畸胎瘤囊腫包含各種源自三種胚層(embryonic germ layer)：外胚層、中胚層、及內胚層的組織(圖5D；實施例10)。另外，當mirPS-hHFCs被異種移植至正常雄性小鼠體內，mirPS-hHFCs則被周圍組織同化並與其表現相同的組織標記；這亦表示了將mir-302用於治癒受傷細胞的可能(圖4B)。以上發現綜合顯示mir-302能將體細胞hHFCs重新編程為似hES的iPS細胞(誘導多能幹細胞)。Oct3/4與Sox2等轉錄因子對mir-302的表現而言具重要性 (Marson等人，2008；Card等人，2008)，mir-302或許能取代Oct3/4—Sox2來誘導體細胞重新編程(SCR)的發生。

【0053】 由Mir-302所誘導SCR，其與細胞週期減弱之並行取決於mir-302的濃度。吾人發現當mir-302濃度超過其在人類胚胎幹細胞H1/H9中濃度的1.3倍時，這兩件事幾乎同時發生，因此而指出了此特殊濃度為起始該兩事件的最小閾值。先前實驗中，使用單一個mir-302成員或者使用相當

於H1/H9細胞中之較低濃度的mir-302無法引發前述事件。並且，吾人証實了以較低濃度之5 μ M去氧羥四環素所誘導的mir-302，其濃度無法靜默報告基因的標的位置或是標的的G1檢控點調節者。與自然發生相較，桑椹期(morula stage, 32~64細胞時期)之前的胚胎細胞常呈現與mirPS細胞的情況相似之非常慢的細胞週期速率。然而，這樣的細胞週期調節作用並未在源自囊胚(blastocyst-derived)的hES細胞中發現。由此可推測，hES細胞質中較低濃度的mir-302不足以靜默標的的G1檢控點調節者以及致癌基因。這可能也解釋了源自囊胚的hES為何具有戲劇性的增生能力以及發展成腫瘤的傾向。因此，本發明可應用於在幹細胞治療中降低hES細胞的腫瘤發生能力(tumorigenicity)。

Mir-302抑制腫瘤生成能力並導致不同腫瘤/癌細胞的細胞凋亡

【0054】 鑒於mir-302具有導致癌細胞細胞凋亡與細胞週期減弱的功能，吾人接著研究使用mir-302作為普適性人類腫瘤/癌細胞治療用藥的可能性。吾人先前的研究已顯示此方式在黑色素瘤(melanoma)及攝護腺癌細胞上有可行性(Lin等人, 2008)；在目前的研究中，吾人進一步測試其在乳癌細胞MCF7、肝癌細胞Hep G2、以及胚胎性畸胎瘤細胞NTera-2中的可行性。如圖6A-6B所示，三種腫瘤/癌細胞在以*pTet-On-tTS-miR302s*載體轉染並在10 μ M去氧羥四環素的刺激下，皆被重新編程為休眠mirPS細胞並形成似類胚胎體群落(embryoid body-like colonies)。此濃度水平的mir-302在所有三種腫瘤/癌細胞中亦引發顯著的細胞凋亡(>95%)(圖1F；實施例6)。以流式細胞儀進一步分析細胞週期各時期的DNA含量之後，結果顯示在所有mirPS細胞中有絲分裂的細胞族群顯著地減少(圖6C；實施例7)。有絲分裂的細胞族群(M期)在mirPS-MCF7細胞中減少了78%：由49% \pm 3%降低至11% \pm 2%；在mirPS-HepG2細胞中減少了63%：由46% \pm 4%降低至17% \pm 2%；在mirPS-NTera2細胞中減少了62%：由50% \pm 6%降低至19% \pm 4%；反之，停滯/

休眠的細胞族群(G0/G1期)在mirPS-MCF7、mirPS-HepG2與mirPS-NTera2細胞中分別增加了80%、65%與72%：在mirPS-MCF7細胞中由41%±4%增加至74%±5%，在mirPS-HepG2細胞中由43%±3%增加至71%±4%；在mirPS-NTera2細胞中由40%±7%增加至69%±8%。這些結果指出mir-302能有效地減弱這些腫瘤/癌細胞快速的細胞週期速率，並導致顯著的細胞凋亡。

【0055】 細胞侵犯試驗(使用Matrigel小室)以及細胞貼附試驗(細胞貼附於人類骨髓內皮細胞(hBMEC)的單細胞層)等體外腫瘤發生能力試驗(In vitro tumorigenicity assays)顯示mir-302除了抗增生特性以外，再兩種抗腫瘤生成的效應。細胞侵犯試驗(Cell invasion assay)顯示所有三種休眠的mirPS-腫瘤/癌細胞失去其遷移的能力(降低至<1%)，而原本的腫瘤/癌細胞侵略性地侵入補充有較高營養物的間隔區：在MCF7細胞中佔了超過9%±3%、在Hep G2細胞中佔了16%±4%、在NTera-2細胞中佔了3%±2%的細胞族群(圖6D；實施例11)。細胞貼附試驗(Cell adhesion assay)亦一致顯示該些mirPS-腫瘤/癌細胞不能貼附hBMEC單細胞層，然而原本的MCF7、Hep G2細胞在經過50分鐘的培養之後，其中顯著的細胞族群(MCF7 7%±3%、Hep G2 20%±2%)快速轉移至hBMEC單細胞層(圖6E；實施例12)。總結來說，迄今所有的發現強烈且一再顯示mir-302是一人類腫瘤抑制者，其能減弱快速的細胞生長、導致腫瘤/癌細胞細胞凋亡、以及抑制腫瘤/癌細胞侵入(invasion)及轉移(metastasis)。最重要的是，此新穎的mir-302功能可以提供一種能對抗多樣人類腫瘤/癌，包括但不限於惡性的皮膚癌(Colo-829)、攝護腺癌(PC-3)、乳癌(MCF7)、肝癌(HepG2)、以及以畸胎瘤(NTera-2)包含各不同組織的觀點而言，各種腫瘤的普適性治療。

Mir-302調解之抗增生功能藉由其對CDK2、cyclin-D1/D2、與BMI-1的共同抑制達成

【0056】 為確認mir-302與其標的的G1檢控點調節者之間實際的交互



作用，吾人進行冷光酵素三端非轉譯區報告基因(luciferase 3'UTR region reporter)試驗(圖7A；實施例15)。結果顯示以不同濃度的mir-302處理，將對標的的G1檢控點調節者，包括細胞週期素依賴性蛋白2 (CDK2)、細胞週期素D1/D2 (cyclins-D1/D2)、及BMI-1小組蛋白環指致癌基因(BMI1 polycomb ring finger oncogene)造成很不一樣的抑制效應。在10 μ M去氧羥四環素存在下，mir-302有效地與CDK2、cyclins D1/D2、及BMI-1轉錄分子的標的位置結合並且成功地靜默超過80%(> 80%)的報告冷光酵素之表現(圖7B；實施例15)。Mir-302在mirPS細胞中對真正的標的基因的抑制作用則藉由西方墨點分析法來確認，其結果與冷光酵素三端非轉譯區報告基因試驗(圖7C；實施例5)之結果一致。相反地，在5 μ M去氧羥四環素誘導下之mir-302，其較少量的mir-302表現，無論對於報告基因的標的位或者對週期素D2以外的標的的G1檢控點調節者，皆無法引發任何顯著的靜默效應(圖7B與7D)。這指出了mir-302表現的劑量相關性(dose-dependent manner)及其基於該劑量性微調細胞週期速率的能力。在哺乳動物細胞週期中，G1-S期的轉換正常來說是以兩個代償的週期素-週期素依賴性激酶複合體(cyclin-CDK complexes)：cyclin-D-CDK4/6及cyclin-E-CDK2所控制(Berthet等人，2006)。吾人則發現高濃度的mir-302透過對CDK2及cyclins D1/D2的共同抑制使兩複合體失去活性，於是阻礙兩個控制G1-S期轉換的路徑並減弱重新編程mirPS細胞中的細胞週期速率。在hHFCs及mirPS細胞中，cyclin D3有限的表現量使其不足以代償mirPS細胞中cyclins D1/D2的損失。

【0057】 伴隨BMI-1的靜默，吾人進一步偵測到p16Ink4a及p14Arf表現的輕微增加(在hHFCs中上升的百分比分別為63% \pm 17%與57% \pm 13%)，然而沒有發現p21Cip1的表現有改變(圖7C)。致癌性癌症幹細胞(oncogenic cancer stem cell) 標記：BMI-1的缺乏，會藉由增強 p16Ink4a及p14Arf 等腫瘤抑制者的活性，抑制G1-S期轉換(Jacobs等人，1999)。在這種情況下，16Ink4a直接抑制依賴cyclin-D的CDK4/6 (cyclin-D-dependent CDK4/6) 磷酸化視網

膜母細胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)的活性，於是防止Rb釋放進入S期所需的E2F，而進行E2F依賴性轉錄(E2F-dependent transcription) (Parry等人，1995；Quelle等人，1995)。另外，p14Arf防止HDM2與p53結合而允許p53依賴性轉錄 (p53-dependent transcription)，其負責G1期的停滯或細胞凋亡(Kamijo等人，1997)。然而，就目前所知，胚胎幹細胞不受cyclin-D依賴性CDK (cyclin-D-dependent CDK) 的調節(Burdon等人，2002；Jirmanova等人，2002；Stead等人，2002)，因此目前對hES細胞細胞週期調節的認知是為CDK2是發生G1-S期轉換的主要決定因素。因此，CDK2的靜默很可能在造成mirPS細胞的G1停滯(G1-arrest)上有最大的影響，而cyclin-D與BMI-1的共同抑制以及p16Ink4a及p14Arf的共同活化則附加地抑制腫瘤生成訊號所誘發(tumorigenic signal-induced)的細胞增生。此外，cyclin-D的損失以及p16Ink4a的活化也解釋了在胚胎幹細胞中依賴cyclin-D (cyclin-D dependent) 的CDK其活性的缺乏。

【0058】 因此，微型核糖核酸(miRNA)與標的基因交互作用的嚴謹度能決定微型核糖核酸真正的功能。依細胞條件不同，微型核糖核酸會表現不同的基因標的偏好。本發明洞悉此重要細節並首次揭示mir-302在人類及小鼠細胞中的功能非常不同。在人類細胞中，mir-302強烈標的*CDK2*、*cyclins D1/D2*、以及*BMI-1*，但有趣的是，不包括*p21Cip1*。與小鼠*p21Cip1*不同，人類*p21Cip1*不含任何的mir-302標的位。不同的基因標的導致兩者在細胞週期調節上的重要分歧(schism)。在小鼠胚胎幹細胞(mES)中，mir-302靜默*p21Cip1*並且促進類腫瘤(tumor-like)細胞增生(Wang等人，2008；Judson，2009)，然而*p21Cip1*的表現在人類mirPS細胞中保留下來並導致較慢的細胞增生與較弱的腫瘤生成能力。此外，小鼠的*BMI-1*也因缺乏適當的標的位而非mir-302的標的基因。吾人已揭示在mirPS細胞中，人類*BMI-1*的靜默會輕微刺激*p16Ink4a/p14ARF*的表現，而減弱細胞增生，反之mir-302無法靜默小鼠*BMI-1*來引起相同的效應。由於在mirPS細胞中*p16Ink4a/p14ARF*的表現上

升了而p21Cip1不受影響，因此可理解的是人類mirPS細胞中的抗增生及抗腫瘤生成效應最有可能在共同抑制cyclin-E – CDK2及cyclin-D – CDK4/6路徑以外，透過p16Ink4a – Rb及/或p14/19ARF – p53途徑來達成。Mir-302標的人類及小鼠基因偏好的顯著區別意味著兩者的細胞週期調節機制有根本上的不同。

Mir-302的處理減消超過90%的體內腫瘤細胞的生長並且不改變幹細胞的多能性

【0059】 在確認mir-302的腫瘤抑制功能及其在正常與腫瘤/癌細胞間不同的作用之後，吾人接著試驗是否可以mir-302作為一治療八週大雄性無胸線小鼠(BALB/c-nu/nu品系)體內一NTera2衍生之畸胎瘤的藥物(實施例13)。腫瘤Tera-2細胞株(neoplastic Tera-2, NTera-2)是一多能性人類胚胎畸胎瘤細胞株(human embryonal teratocarcinoma cell line)，其能在體內分化成多種原始的體細胞組織(primitive somatic tissue)，特別是原始腺組織及原始神經組織(Andrews等人，1984)。由於其多能性，NTera-2衍生的畸胎瘤可作為體內各種腫瘤形式治療之模型。在藥物投遞方面，吾人採原位注射(in situ)將以聚乙烯亞胺(polyethylenimine, PEI)配製的*pCMV-miR302s*表現載體注射到一極接近腫瘤的位置。*pCMV-miR302s*載體是將由四環黴素所控制的(*TRE*-controlled) *CMV*啟動子換成一般的*CMV*啟動子而構成(實施例2)；由於DNA甲基化的緣故，*pCMV-miR302s*在人類細胞中表現的時間持續接近一個月。在注射上限至10µg/每g小鼠重(一次注射的最大量)的*pCMV-miR302s*載體後，吾人觀察到小鼠無患病或惡病質(cachexia)的徵象，因此證明此方法之安全性。組織學檢查亦顯示在腦、心、肺、肝、腎、及脾臟中無可測得的組織損害(lesion)。

【0060】 本發明實施例測得以2 µg/每g小鼠重的*pCMV-miR302s*進行五次處理(相鄰處理間隔三天)對畸胎瘤生長具有顯著的抑制作用。如圖8A

(實施例13)所示，以*pCMV-miR302s*載體處理後，NTera2衍生之畸胎瘤的平均尺寸($11\pm 5\text{mm}^3$ ， $n=6$)與未處理的組別($104\pm 23\text{mm}^3$ ， $n=4$)相較之下減少超過89% ($> 89\%$)。相反地，施予相同量的由PEI配製的反義-mir-302d (antisense-mir-302d)表現載體(*pCMV-miR302d**) 將使畸胎瘤大小增為原來的140% ($250\pm 73\text{mm}^3$ ， $n=3$)。基於以上的結果，本發明發現NTera-2細胞表現中等水平之mir-302(圖8B)。北方墨點分析的結果亦顯示在這些受到不同處理的畸胎瘤細胞中，mir-302的表現與腫瘤大小(圖8B)呈現負相關，亦即，調控mir-302的表現能有效控制體內畸胎瘤的生長。為證實先前在體外(in vitro)的發現，吾人進行西方墨點分析法來確認在處以mir-302的畸胎瘤中，G1檢控點調節者CDK2 – cyclins-D1/D2 – BMI-1被共同抑制以及核心重新編程因子Oct3/4 – Sox2 – Nanog的共同活化(圖8B)。以免疫組織化學(immunochemical, IHC) 染色法分析畸胎瘤組織中的該些蛋白質，亦證實了相同的結果(圖8C；實施例14)。最值得注意的是，吾人發現mir-302能抑制畸胎瘤細胞生長而不影響其天然的多能分化能力。此亦指出高濃度的mir-302扮演腫瘤抑制者與重新編程因子的雙重角色。基於mir-302的雙重功能以及從體內與體外(in vitro, in vivo) 得到的相符合的結果，吾人因此可推論：發現於體外的mir-302抗增生機制可以被應用於抑制體內畸胎瘤生長，因此能作為可針對各種腫瘤的一可能治療方式。

Mir-302抑制人類初代表皮細胞(hpESC)、人類攝護腺癌細胞(PC3)以及人類黑色素細胞瘤細胞Colo-829 (Colo)

【0061】 吾人設計並測試一系列mir-302構成，其中包含mir-302a – mir-302b – mir-302c – mir-302d相連的pre-miRNA群集(SEQ.ID.NO.9-16)或包含人工重設的pre-mir-302等擬物(如髮夾樣含有5'-UAAGUGCUUC CAUGUUU-3' (SEQ.ID.NO.3)序列)，以供轉染並在測試的hpESC、PC3以及Colo細胞內靜默mir-302標的的基因。Mir-302a、mir-302b、mir-302c以及

mir-302d的成熟序列分別為5'-UAAGUGCUUC CAUGUUUUGG UGA-3' (SEQ.ID.NO.71), 5'-UAAGUGCUUC CAUGUUUUAG UAG-3' (SEQ.ID.NO.72), 5'-UAAGUGCUUC CAUGUUUCAG UGG-3' (SEQ.ID.NO.73) 以及 5'-UAAGUGCUUC CAUGUUUGAG UGU-3' (SEQ.ID.NO.74)。值得注意的是，這些同源的類mir-302的基因靜默效應子在5'端區域的前17個核苷酸享有高保守性(100%同源性)，即序列5'-UAAGUGCUUC CAUGUUU-3' (SEQ.ID.NO.3)。在這些mir-302同源序列中，胸腺嘧啶(T)能用以取代尿嘧啶(U)。

【0062】在這些實驗中，吾人將mir-302a-mir-302b-mir-302c-mir-302d的pre-miRNA群集轉染至hpESC與PC3細胞，而將重新設計的mir-302同源物(SEQ.ID.NO.75)轉染至PC3細胞。在該些mir-302轉染後，所有細胞株的細胞形態(下圖)由紡錘或似阿米巴形狀轉為較圓的外觀形狀；指出細胞可能失去細胞遷移的能力且具有與幹細胞生長相似之很慢的細胞複製速率(圖12A-12C)。不同細胞週期階段(x軸)的DNA含量(y軸)的流式細胞儀分析(上方)顯示有絲分裂細胞群數減少超過67%，證實mir-302轉染之細胞慢的細胞增生速率；其中每細胞週期階段的DNA含量反映細胞群數。第一峰(左方)與第二峰(右方)分別表示休眠的G0/G1期與有絲分裂的M期的細胞在整個受測細胞群的數量水準。有絲分裂細胞群數，在mir-302轉染後，在hpESC細胞係由36.1%降至10.9%，在PC3細胞由38.4% 降至12.6%，以及在Colo細胞由36.5%降至11.5%；在以空載體轉染或以表現含mir-gfp之pre-miRNA的載體轉染的組別內，轉染後無論是在細胞形態或細胞增生皆無顯著改變。含mir-gfp之pre-miRNA係用於標的螢火蟲的EGFP基因；該基因與人類及小鼠基因沒有同源。基於這些發現，吾人展現了mir-302同源物的轉基因表現能將人類初代培養的細胞及癌細胞轉變為一較似幹細胞(ES)的形態與複製率，其係與先前iPS細胞研究觀察到的改變相似(Okita等人, (2007) *Nature* 448: 313-317; Wernig等人, (2007) *Nature*

448: 318-324)。

Mir-302將體內異種移植之人類高度惡性肝癌重新編程為低階的良性狀態

【0063】 由於基因的累積突變，癌症發展的過程被視為是不可逆的；然而，本發明揭示一種新穎的微型核糖核酸mir-302的前驅物(pre-mir-302)的功能，即將高度惡性的癌/腫瘤重新編程為低階而良性狀態；其亦可能屬於一種稀有的自然療癒過程，稱為自發性癌消退(Cancer regression)。自發性癌消退的發生非常稀少，而僅有約每100,000位癌症病患中一位的發生率。發明人發現pre-mir-302的治療能將罕有的癌消退發生率增至約90%。如圖15所示，使用pre-mir-302等擬物(pro-mir-302)作為SCID-beige裸鼠異種移植之人類惡性肝腫瘤的治療藥的結果顯示pro-mir-302的藥成功將惡性腫瘤由 728 ± 328 mm³(未處理的空白組、控制組C)縮減為 75 ± 15 mm³(以pro-mir-302處理，組別T)，顯示平均腫瘤尺寸近90%的減少率；相較之下，其他合成siRNA等擬物(siRNA-302)的處理並未產生任何近似的治療效果。進一步的組織學試驗(最右方)顯示僅在以pro-mir-302處理異種移植的惡性腫瘤的組別可觀察到似正常肝小葉的結構(黑色箭頭所指圓圈)，在其他處理組別或控制組則沒有，說明了重新編程的機制的發生將惡性的癌細胞性質回復至相對正常的狀態(癌逆轉，cancer reversion)。該新穎的重新編程機制可能與mir-302的腫瘤抑制子功能有關；該機制同時且特別標的多個人類治癌基因而進行靜默，並且消除/預防腫瘤訊號傳遞途徑的啟動。然而，由於尚未確認Oct4陽性多能性幹細胞出現，此重新編程的機轉可能與先前報導的mir-302對體細胞進行重新編程的功能不同(Lin等人，2008與2011)。

【0064】 更詳細的組織學試驗進一步揭示pro-mir-302藥成功將高度(grade IV)的異種移植的人類肝癌細胞/腫瘤重新編程為較為良性的低階(小於grade II)狀態。如圖16所示，經處理的異種移植癌(腫瘤)能形成典型肝小

葉，其含有似中央靜脈(CV)與似肝門三合體(PT)的結構(黑箭頭所指處)，與正常肝組織結構(上方)高度相似。比較SCID-beige裸鼠體內，未處理的、siRNA處理的、pro-mir-302處理的異種移植人類肝癌(腫瘤)與正常肝組織(圖17)，發現在沒有處理下(上方)，異種移植的人類肝癌(腫瘤)侵略性地入侵周圍正常組織例如肌肉與血管，且形成大規模的細胞-細胞與癌-組織的融合結構，說明了其高度惡性及轉移。以siRNA等擬物(siRNA-302)處理並沒有顯著降低異種移植的肝癌細胞/腫瘤(中上方)的惡性；原因可能是siRNA分子在體內的短半生期。相反地，以pro-mir-302 (=pre-mir-302)治療不但將異種移植的癌細胞重新編程為似正常肝細胞的形態(無融合)，且成功抑制癌(細胞)侵犯周圍正常組織(中下方)。相較於正常肝組織(下方)，pro-mir-302處理的惡性腫瘤展現似肝小葉結構、似正常腺細胞的排列，以及細胞-細胞與癌-組織接合處(黑色箭頭)非常清楚的界線。此說明了處理後的癌(腫瘤)降為較良性的狀態。接下來超過六次連續以含pro-mir-302的藥物治療，得完全消除所有六個樣本中的異種移植的癌細胞/腫瘤。

Mir-302藉由p16Ink4a/p14ARF的活化而非端粒縮短引發細胞老化 (cell senescence)

【0065】 有報告指出，人類誘導式多能幹細胞(iPS)會有提早老化與有限擴張的問題(Banito等人，2009；Feng等人，2010)。正常成熟細胞亦進行一有限數量的分裂並最終達到一靜止狀態(quiescence state)，稱為複製性老化(replactive senescence)。逃避複製性老化的細胞常常變成永生細胞(immortal cells)，像是腫瘤/癌細胞；因此，複製性老化是對抗腫瘤/癌細胞形成的正常防禦機制。在本發明中，吾人發現mir-302能直接靜默BMI-1而引發p16Ink4a/p14ART相關的細胞週期調控。其他研究進一步指出BMI-1能活化人類端粒酶反轉錄酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的轉錄作用，端粒酶的活性因此增加而繞過複製性老化，並且增加細胞壽命

(Dimri等人, 2002)。由此可見, mir-302的過度表現會導致mirPS細胞的hTERT相關性老化(hTERT-associated senescence)。爲了釐清這點, 吾人進行端粒重複序列擴增試驗(telomeric repeat amplification protocol, TRAP) (實施例16), 來測量端粒酶活性。如圖9A所示, 所有經10 μ M去氧脛四環素處理的mirPS細胞意外地與其原本的腫瘤/癌細胞及人類幹細胞H1/H9細胞相似, 展現強烈的端粒酶活性。此外, 西方墨點分析亦顯示在這些mirPS細胞中, hTERT表現增加而非減少(圖9B)。端粒酶PCR ELISA試驗亦證實相對端粒酶活性的增加(圖9C)。另外, 吾人進一步測得mirPS細胞中賴胺酸特異性甲基酶(lysine-specific histone demethylase AOF2, 又名KDM1/LSD1)與組蛋白去乙酰基酵素(histone deacetylase HDAC2)的靜默(圖9B)。先前的研究指出, AOF2爲抑制hTERT轉錄所需, 而AOF2及HDAC2兩者的缺乏將引起hTERT過度表現 (Won等人, 2002; Zhu等人, 2008)。吾人在本發明中亦發現AOF2與HDAC2爲mir-302的強大標的且在mirPS細胞中皆被靜默了(圖10)。因此, mir-302在mirPS細胞中實際上增加mirPS細胞之端粒酶的活性而非引起hTERT相關性老化。然而, hTERT活性增加的效應會被mir-302所引起的BMI-1抑制與p16Ink4a/p14ARF活化所中和, 而在mir-302細胞中達到防止腫瘤/癌細胞發生的平衡。

【0066】 總結來說, 本發明使用一具新穎腫瘤抑制功能之mir-302作爲癌症治療藥物。吾人發現mir-302介導的細胞週期調控, 包含共同抑制G1檢控點調節者與活化CDK抑制子之間高度協調的機轉。這些事件必須同時發生以防止在G1-S行進當中出現任何漏洞。細胞週期中G0/G1期的停滯對體細胞重新編程(SCR)的起始很重要。在該休眠狀態, 體細胞基因體大量地被去甲基化, 並且有超過91%的細胞轉錄體被重新編程爲類hES的基因表現形態。吾人經由破解mir-302與其標的基因之間的交互作用, 認識到與mir-302相關之細胞週期調控在SCR期間錯綜複雜的機制(圖11)。吾人先前的研究證實mir-302靜默其標的外基因調節者(epigenetic regulators), 而活化

Oct3/4 – Sox2 – Nanog的共同表現，這些重新編程轉錄因子接著再引發SCR (Lin等人，2008)。本發明進一步率先揭示mir-302在SCR期間同時靜默CDK2、cyclins D1/D2、與BMI-1而減弱細胞分裂。適當控制細胞週期速率對於防止時常在SCR期間活化的致癌基因之腫瘤生成能力具有生物學上的重要性。對此，mir-302靜默CDK2與cyclins D1/D2並阻礙G1 – S期轉換。同時，BMI-1的抑制進一步增強p16Ink4a與p19Arf的腫瘤抑制子活性。透過這些細胞週期途徑的協同調控，mir-302能啓始體細胞重新編程(SCR)的進行而非惡化為細胞腫瘤發生(tumorigenicity)。

【0067】 本發明至少有五項正面突破。第一，一類mir-302基因靜默效應子可取代所有四個核心重新編程轉錄因子*Oct – Sox2 – Klf – c-Myc*與*Oct4 – Sox2 – Nanog – Lin28*以將人類細胞重新編程為似hES幹細胞。這些重新編程細胞有助於幹細胞療法。第二，由於類mir-302基因靜默效應子具有小尺寸(含有約23個核糖核苷酸)，因此此小尺寸類mir-302基因靜默效應子的表現載體在結構上可更為緊緻而提高體內轉染的效率。第三，細胞內的無意義調節之衰敗(NMD)系統以及誘導式的表現系統能防止與RNA有關的細胞毒性。第四，mir-302介導的細胞凋亡只發生於腫瘤/癌細胞而不發生於正常人類細胞。最後，本發明使用多聚體(polysomal)、微脂體(liposomal)及電穿孔法轉染取代反轉錄/慢病毒感染，來將表現mir-302的核酸組成物傳送至腫瘤/癌細胞中，以確保安全性及類mir-302基因靜默效應子在體外(in vitro)及體內(in vivo)治療上的使用。總而言之，這些突破顯示了使用類mir-302基因沉默效應子及表現該類mir-302基因沉默效應子之組成物來治療腫瘤/癌症之可行性，並且提供了一能發展為普適性癌症藥物及/或疫苗之新穎設計。

A. 定義

【0068】 為促進對本發明的了解，以下定義一些術語：

【0069】 核苷酸(Nucleotide)：一單分子之去氧核糖核酸(DNA)或核糖

核酸(RNA)，其包含：一糖部份體(戊糖pentose)、一磷酸根(phosphate)及一含氮雜環鹼基(nitrogenous heterocyclic base)。該鹼基係經由糖苷碳(glycosidic carbon，該戊糖之1端碳)與該糖部份體鏈結，且該鹼基及糖的組合係一核苷(nucleoside)。於該戊糖之三端與五端位置鏈結至少一個磷酸的一核苷係為一核苷酸(nucleotide)。亦即DNA與RNA係由不同的核苷酸單元，即去氧核糖核苷酸與核糖核苷酸單元構成。

【0070】 寡核苷酸(Oligonucleotide)：包含兩個以上之去氧核糖核苷酸(DNAs)或核糖核苷酸(RNAs)的一個分子，其較佳係超過三個，而通常包含超過十個。長度超過13個核苷酸單體的寡核苷酸亦稱為多核苷酸。確切的長度取決於許多因素，其並且依照該寡核苷酸之最佳功能或用途而定。寡核苷酸可用任何方式生成，包括：化學合成、DNA複製、RNA轉錄、反轉錄、或其組合。

【0071】 核苷酸相似物(Nucleotide Analog)：一嘌呤(purine)或嘧啶(pyrimidine)核苷酸，其在結構上A(腺嘌呤)、T(胸腺嘧啶)、G(鳥嘌呤)、C(胞嘧啶)或U(尿嘧啶)核苷酸不同但足夠相似，因此可在一核酸分子中取代正常核苷酸。

【0072】 核酸組成物(Nucleic Acid Composition)：一核酸組成物係指寡核苷酸(oligonucleotide)或多核苷酸(polynucleotide)，如：以單股或雙股分子結構的形式存在的去氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或去氧核糖核酸與核糖核酸的混合(DNA/RNA)。

【0073】 基因(Gene)：一核酸組成物，其核苷酸序列針對一RNA及/或一多肽(蛋白質)編碼。一基因可以是RNA或DNA。基因可針對非編碼(non-coding)RNA如小髮夾RNA(shRNA)、微型RNA(miRNA)、核糖體RNA(rRNA)、轉運RNA(tRNA)、小核仁RNA(snoRNA)、小核RNA(snRNA)及其RNA前驅物與衍生物編碼。另一方面，基因或可針對編碼蛋白質(protein-coding)的RNA如傳訊RNA(mRNA)及其RNA前驅物

與衍生物編碼，以供蛋白質/肽類合成。在一些例子中，編碼蛋白質的RNA亦可能含有至少一miRNA或shRNA的序列。

【0074】 初級核糖核酸轉錄分子(Primary RNA Transcript)：由基因轉錄，未經任何RNA處理或修飾的RNA序列。初級核糖核酸轉錄物可包含mRNA、異核RNA(hnRNA)、rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA前驅微型RNA、病毒RNA及其RNA前驅物與衍生物。

【0075】 前驅傳訊核糖核酸 (Precursor messenger RNA, pre-mRNA)：針對蛋白質編碼的一基因經由一細胞內機制在真核細胞中透過真核第二型RNA聚合酶(Pol-II)而產生之初級RNA轉錄分子(primary RNA transcript)，其中該機制稱為轉錄(transcription)。一前驅傳訊核糖核酸序列包含：五端非轉譯區(5' - untranslated region, 5' -UTR)、三端非轉譯區(3' - untranslated region, 3-UTR)、外顯子(exon)及內含子(intron)。

【0076】 內含子(Intron)：一基因轉錄分子序列之一部分或多個部分，其編碼非蛋白質讀框。如：同一讀框內含子(in-frame intron)、五端非轉譯區(5' -UTR)及三端非轉譯區(3' -UTR)。

【0077】 外顯子(Exon)：一基因轉錄分子序列之一部分或多個部分，其編碼蛋白質讀框(cDNA)，如：細胞基因、生長因子、胰島素、抗體及其類似物/同源物與衍生物。

【0078】 傳訊核糖核酸(Messenger RNA, mRNA)：由前驅傳訊核糖核酸的外顯子組合而成。前驅傳訊核糖核酸在經由細胞質內RNA剪接機制(intracellular RNA splicing machineries, spliceosomes)移除內含子之後形成，並且在肽類/蛋白質合成中作為編碼蛋白質的RNA。mRNA編碼的肽類/蛋白質包含但不限於酵素、生長因子、胰島素、抗體及其類似物/同源物與衍生物。

【0079】 互補去氧核糖核酸(cDNA)：不含任何內含子序列之單股

或雙股去氧核糖核酸(DNA)；該DNA具有一序列與一mRNA序列互補。

【0080】 正義核酸(Sense)：一核酸分子，其序列順序及組成與同源之mRNA相同。以「+」、「s」或「sense」符號來表示此正義核酸構造形態。

【0081】 反義核酸(Antisense)：與個別mRNA分子互補之一核酸分子。以「-」符號來表示此反義核酸構造形態，或是在DNA或RNA之前加上「a」或「antisense」，例如：「aDNA」或「aRNA」。

【0082】 鹼基對(Base Pair, bp)：於一雙股DNA分子中之腺嘌呤(adenine, A)與胸腺嘧啶(thymine, T)，或胞嘧啶(cytosine, C)與鳥嘌呤(guanine, G)之配對(partnership)。在RNA中，尿嘧啶(uracil, U)取代胸腺嘧啶(thymine, T)。在RNA中，尿嘧啶亦可與鳥嘌呤配對。一般來說，該配對透過氫鍵(hydrogen bonding)來連接。舉例來說，正義核酸序列“5' -A-T-C-G-U-3' ”與其反義核酸序“5' -A-C-G-A-T-3' ”或“5' -G-C-G-A-T-3' ”互補。

【0083】 五端(5' -end)：在連續核苷酸之5端位置缺少一核苷酸的一端。在該連續核苷酸中，一個核苷酸之五端氫氧基係以一磷酸二酯鍵連接至下一個核苷酸之三端氫氧基。在該端可以有其它基，如一或多個磷酸根。

【0084】 三端(3' -end)：連續核苷酸之3端位置缺少一核苷酸的一端。在該連續核苷酸中，一個核苷酸之五端氫氧基係以一磷酸二酯鏈接連接至下一個核苷酸之三端氫氧基。在該端可以有其它基，通常為一氫氧根。

【0085】 模板(Template)：能以一核酸聚合酶複製之一核酸分子。根據不同的聚合酶，一模板可為單股、雙股或部分雙股。合成後之複製物係與該模板、雙股模板中之至少一股、或部分雙股模板互補。RNA與DNA皆以由五端往三端的方向合成。一核酸雙鏈體(duplex)之兩股總

是排列在一起，使得該等兩股之五端係在該雙鏈體之相對端上(必要的話，該等兩股之三端亦然)。

【0086】 核酸模板(Nucleic Acid Template)：一雙股DNA分子、雙股RNA分子、雜合分子(如：DNA-RNA或RNA-DNA雜合物)、或單股DNA或RNA分子。

【0087】 一致性(Conserved)：若一核苷酸序列係與一預選(參考)序列之確切互補物非隨機地雜合，則兩者的序列為一致性。

【0088】 同源或同源性(Homologous or Homology)：指的是一多核苷酸與一基因或傳訊RNA序列之間的相同性。一核酸序列可能部分或完全與一特定基因或傳訊RNA序列完全同源；舉例來說，同源性可以相同核苷酸佔全部核苷酸數量的百分比表示。

【0089】 互補 (Complementary 或 complementarity 或 complementation)：係依鹼基對原則(base pair (bp) rule)而發生鹼基配對之兩多核苷酸(即：mRNA與cDNA的序列)。例如：序列「5' -A-G-T-3' 」與序列「5' -A-C-T-3' 」及「5' -A-C-U-3' 」互補。互補可以發生於兩股DNA之間、一股DNA與一股RNA之間、或是在兩股RNA之間。互補可以是「部分」或「完全」或是「整體」的。當僅一些核酸鹼基根據該等鹼基對原則相配對，則發生部分互補(partial complementarity或 complementation)。當鹼基在該等核酸股之間完全或完美相配時，則發生完全或整體互補(Complete or total complementarity or complementation)。在核酸股之間的互補程度對於核酸股之間的雜合效率及強度有重要的影響。此對於擴增(amplification)反應特別重要，且對於依據核酸間之鍵合(binding)來達成的偵測方法也很重要。互補率(Percent complementarity或 complementation)係指在該核酸之一股中失配鹼基數與全部鹼基數的比。因此，50%的互補率意指一半的鹼基失配，而另一半的鹼基相配對。即使核酸之兩股其鹼基數不同，核酸之兩股也能互補。在此情況下，

互補發生於部分之較長股間，該較長股之部分鹼基與較短股之鹼基成對。

【0090】 互補鹼基(complementary base)：當DNA或RNA形成一雙股結構時正常配對之核苷酸。

【0091】 互補核苷酸序列(Complementary Nucleotide Sequence)：在一單股分子之DNA或RNA中的一核苷酸序列，其充份與在另一單股上之核苷酸序列互補，以致兩股之間藉由氫鍵而專對地雜合。

【0092】 雜合(Hybridize及Hybridization)：雙鏈體的形成，其係核苷酸序列之間充分地互補並藉由鹼基配對形成複合體。當一引子(或剪接模板)與標的(模板)「雜合」，則雜合所形成之複合體(或雜合物，hybrids)係充分地穩定以提供一DNA聚合酶引發DNA合成所需的引子功能。在兩條互補多核苷酸之間有一競爭性抑制(competitively inhibited)的特殊交互作用(即：非隨機)。

【0093】 後轉錄基因靜默 (Posttranscriptional Gene Silencing)：在mRNA降解或轉譯抑制下之，一標的基因剔除(knockout)或減弱(knockdown)的效應，其通常為外來/病毒DNA或RNA轉殖基因或小型抑制性RNA任一者所觸發。

【0094】 核糖核酸干擾(RNA interference, RNAi)：一種在真核細胞中之後轉錄基因靜默機制，其可用小型抑制性RNA分子觸發，如：微型核糖核酸(miRNA)、小髮夾型核糖核酸(shRNA)及小干擾核糖核酸(siRNA)。該等小RNA分子通常可作為基因靜默子，其干擾細胞內與該等小型RNA完全或部分互補之基因的表現。

【0095】 非編碼核糖核酸(Non-coding RNA)：無法以之用來經由細胞內轉譯機制合成肽類或蛋白質的一RNA轉錄分子。非編碼RNA包含長與短的調節的RNA分子如miRNA、小髮夾RNA、小干擾RNA以及雙股RNA。這些調節的RNA分子通常有基因靜默子的功能，干擾細胞

內基因的表現，其中該基因與非編碼RNA全部或部分互補。

【0096】 微型核糖核酸(MicroRNA, miRNA)：能夠與和該微型核糖核酸(miRNA)部分互補之標的基因轉錄分子結合的單股RNA。MiRNA通常長約17到27個寡核苷酸，並能依照在該miRNA與其標的mRNA之間的互補程度來直接降解細胞內之mRNA標的，或抑制其標的mRNA之蛋白質轉譯。幾乎在所有的真核細胞中都能發現天然的miRNA，其作用有如對抗病毒感染之防衛物一般，並且能在動植物發育期間調節基因表現。原則上，一miRNA常標的多個標的的RNAs而完整實現其功能；或者，多個miRNA標的同樣的基因而促進完全的基因靜默。

【0097】 微型核糖核酸前驅物 (MicroRNA Precursor, Pre-miRNA)：似髮夾型單股核糖核酸，其包含用來與細胞內RNA內切酶RNaseIII與Dicer交互作用的幹臂(stem-arm)及幹環(stem-loop)區域，以產生一或多個成熟微型核糖核酸(miRNAs)。微型核糖核酸可靜默該等微型核糖核酸之標的基因，或與該等微型核糖核酸序列互補的基因。前驅微型核糖核酸(pre-miRNA)的幹臂區域可形成一完全(100%)或部分(失配)之雜合雙鏈體，而其幹環區域係連接至該幹臂雙鏈體之一端而形成一圓形或一髮夾環型環狀構造形態，藉以與Argonaute蛋白(AGO)組成RNA-induced靜默複合體(RISC)。

【0098】 原核生產的微型核糖核酸 (Prokaryote-produced MicroRNA Precursor, Pro-miRNA)：相似於天然核糖核酸前驅物(pre-miRNA)之小髮夾樣核糖核酸，唯係由人工引入至原核勝任細胞之miRNA表現質體轉錄。舉例來說，pro-miRNA結構上與pre-mir-302相似但轉錄自勝任大腸桿菌DH5 α 細胞株的 *pLVX-Grn-miR302+367* 或 *pLenti-EF1alpha-RGFP-miR302* 載體(實施例18)。由於原核細胞正常來說不表現如真核pre-miRNA的高度二級結構，原核細胞內pro-miRNA的生產通常額外需要化學刺激以穩定RNA二級結構的生成(Lin的，UA

13/572,263)。

【0099】 小干擾核糖核酸(Small interfering RNA, siRNA)：短雙股核糖核酸，其為具有約18~27個完全鹼基對之核糖核苷酸雙鏈體，並可降解與之幾乎完全互補的標的基因轉錄分子。

【00100】 小髮夾型或短髮夾型核糖核酸(small hairpin 或 short hairpin RNA, shRNA)：單股核糖核酸，其包含一對部分或完全相配之幹臂核苷酸序列，該序列係以一失配寡核苷酸環分隔開而形成一髮夾樣結構。許多天然微型核糖核酸(miRNAs)係源自髮夾樣核糖核酸前驅物，即：前驅微核型糖核酸(pre-miRNA)。

【00101】 載體(Vector)：能於不同基因環境中移動或滯留之一重組核酸組成物，如：重組DNA(recombinant DNA, rDNA)。一般來說，另外的核酸分子係操作性地連結於此。該載體能於一細胞中自動複製，其中該載體及所貼附之片段也會複製。一較佳類型之載體係一游離基因體(episome)，即：可染色體外複製的一核酸分子。較佳的載體為可自動複製及表現的核酸。能引導可編碼一或多個多肽及/或非編碼(non-coding) RNA之基因之表現的載體在此稱為「表現載體(expression vector)」或「表現勝任載體(expression-competent vector)」。特別重要之載體能夠使用反轉錄酶(reverse transcriptase)來由mRNAs選殖cDNA。一載體之成份可包含一病毒的啓動子、或第二型 (Type-II) RNA聚合酶(Pol-II或pol-2)啓動子或兩者、Kozak一致性轉譯起始位(Kozak consensus translation initiation site)、聚腺苷酸化訊息(polyadenylation signals)、複數個限制/選殖位(restriction/cloning site)、一pUC複製起始點(pUC origin of replication)、提供來於複製勝任原核細胞中表現至少一個抗生素抗藥性基因的一SV40早期啓動子(SV40 early promoter)、一選擇性的SV40複製起始點(SV40 origin)以供於哺乳動物細胞中複製、及/或一四環黴素反應元件。載體的結構可以是單股或雙股DNA的線狀或環狀形式，且係選

自由質體、病毒載體、轉位子、反轉位子、DNA轉殖基因、跳躍基因及其組合。

【00102】 啓動子(Promoter)：聚合酶分子辨識的核酸；聚合酶分子可能結合於上且抑制RNA轉錄。在本發明中，啓動子可以是一已知的聚合酶結合位置，一增強子(enhancer)或其相似物、任何可以由一需要的聚合酶起始RNA轉錄分子之合成的序列。

【00103】 真核啓動子(Eukaryotic Promoter)：基因轉錄需要的一核酸基序序列；該序列能由真核第二型RNA聚合酶(type II RNA polymerase (pol-2))、pol-2相等物及/或pol-2相容性病毒聚合酶辨識。

【00104】 第二型RNA聚合酶啓動子(Type-II RNA Polymerase (Pol-II或pol-2) promoter)：由真核第二型RNA聚合酶(Pol-II或pol-2)辨識與結合的RNA啓動子，藉以轉錄真核傳訊核糖核酸(mRNA)及/或微型核糖核酸(miRNA)。舉例來說，pol-2啓動子可以是哺乳類RNA啓動子或巨細胞病毒(CMV)啓動子，但不限於此。

【00105】 第二型RNA聚合酶相等物(Type-II RNA Polymerase (Pol-II或pol-2) Equivalent)：一真核轉錄機構，選自由哺乳類第二型RNA聚合酶(Pol-II或pol-2)與Pol-II相容性病毒RNA聚合酶組成的群組。

【00106】 第二型RNA聚合酶相容病毒啓動子(Pol-II(pol-2) Compatible Viral Promoter)：能使用真核pol-2或真核轉錄機構來進行基因表現的病毒RNA啓動子。舉例來說，pol-2相容性病毒啓動子可以是巨細胞病毒(CMV)啓動子或慢病毒LTR(retroviral long terminal repeat)啓動子，但不限於此。

【00107】 順反子(Cistron)：在一DNA分子中之一核苷酸序列，其編碼一胺基酸殘基序列並包含上游及下游的DNA表現控制元件。

【00108】 內含子切除(Intron Excision)：一負責RNA處理、成熟、及降解之細胞機制，包含RNA剪接(RNA splicing)、外體消化(exosome

difestion)、無意義調節之衰敗過程(nonsense-mediated decay, NMD), 及其組合。

【00109】核糖核酸處理(RNA Processing): 與RNA的成熟、修飾及降解相關的細胞機制, 包含RNA剪接、外體消化(exosome digestion)、無意義調節之衰敗過程(nonsense-mediated decay, NMD)、RNA編輯(RNA editing)、RNA處理及其組合。

【00110】剪接授位(Donor Splice Site): 一核酸序列其包含SEQ.ID.NO.4序列、SEQ.ID.NO.4同源序列, 或序列5' -GTAAG-3' (SEQ.ID.NO.47)。

【00111】剪接受位(Acceptor Splice Site): 一核酸序列其包含SEQ.ID.NO.5序列、SEQ.ID.NO.5同源序列, 或序列5' -CTGCAG-3' (SEQ.ID.NO.48)。

【00112】分支點基序(Branch Point): 一位於一核酸序列中之腺嘌呤核苷酸, 其中該核酸序列包含SEQ.ID.NO.6序列、SEQ.ID.NO.6同源序列, 或序列5' -TACTAAC-3' (SEQ.ID.NO.44)。

【00113】多嘧啶段(Poly-Pyrimidine Tract): 一含高比例胸腺嘧啶核苷酸及胞嘧啶核苷酸之核酸序列, 該核酸序列包含SEQ.ID.NO.7或SEQ.ID.NO.8序列或其同源序列。

【00114】標的細胞(Targeted Cell): 單一或複數個人類細胞, 其係選自一體細胞、一組織、一幹細胞、一生殖細胞、一畸胎瘤細胞、一腫瘤細胞、一癌細胞, 及其組合。

【00115】癌組織(Cancerous Tissue): 一腫瘤組織, 其係來自皮膚癌、攝護腺癌、乳癌、肝癌、肺癌、腦瘤/癌、淋巴癌、血癌, 及其組合。

【00116】表現勝任載體(Expression-Competent Vector): 一線型或環型之單股或雙股DNA, 其係選自質體、病毒載體、轉位子、反轉位子、

DNA轉基因、跳躍基因，及其組合。

【00117】 抗生素抗藥性基因(Antibiotic Resistance Gene)：一基因，該基因之表現具有使抗生素降解的能力，該抗生素係選自盤尼西林G、鏈黴素、安比西林(Amp)、新黴素、G418、卡那黴素、紅黴素、巴龍黴素、霍火黴素、斯派克黴素、四環黴素(Tet)、去氧羥四環素(Dox)、利服平、兩性黴素B、健他黴素、氯黴素、頭孢黴素、泰黴素及其組合。

【00118】 限制/選殖位(Restriction/Cloning Site)：一DNA基序(DNA motif)，其係限制酶切割之位置；該等限制/選殖位包含但不限於*AatII*, *AccI*, *AflIII/III*, *AgeI*, *ApaI/LI*, *AseI*, *Asp718I*, *BamHI*, *BbeI*, *BclI/II*, *BglII*, *BsmI*, *Bsp120I*, *BspHI/LU11I/120I*, *BsrI/BI/GI*, *BssHIII/SI*, *BstBI/UI/XI*, *ClaI*, *Csp6I*, *DpnI*, *DraI/II*, *EagI*, *Ecl136II*, *EcoRI/RII/47III/RV*, *EheI*, *FspI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinPI*, *HindIII*, *Hinfl*, *HpaI/II*, *KasI*, *KpnI*, *MaeII/III*, *MfeI*, *MluI*, *MscI*, *MseI*, *NaeI*, *NarI*, *NcoI*, *NdeI*, *NgoMI*, *NotI*, *NruI*, *NsiI*, *PmlI*, *Ppu10I*, *PstI*, *PvuI/II*, *RsaI*, *SacI/II*, *Sall*, *Sau3AI*, *SmaI*, *SnaBI*, *SphI*, *SspI*, *StuI*, *TaiI*, *TaqI*, *XbaI*, *XhoI*, *XmaI* 之切割位置。

【00119】 基因傳遞(Gene Delivery)：基因工程方法，其係選自多聚體(polysomal)轉染、微脂體(liposomal)轉染、化學轉染、電穿孔法、病毒感染、DNA重組、轉位子插入、跳躍基因插入、顯微注射、基因槍穿透，及其組合。

【00120】 基因工程(Genetic Engineering)：DNA重組方法，其係選自DNA限制酶反應及接合反應、同源重組、轉殖基因併入、轉位子插入、跳躍基因插入、反轉錄病毒感染，及其組合。

【00121】 細胞週期調節者(Cell Cycle Regulator)：細胞基因，其參與控制細胞分裂及細胞增生的速率，該等基因包含但不限於週期素依賴性激酶2(CDK2)、週期素依賴性激酶4(CDK4)、週期素依賴性激酶6(CDK6)、週期素(cyclins)、BMI-1、p14/p19Arf、p15Ink4b、p16Ink4a、p18Ink4c、p21Cip1/Waf1和 p27Kip1，及其組合。

【00122】 腫瘤抑制效應(Tumor Suppression Effect)：細胞抗腫瘤及/或抗癌的機制與反應，其包含但不限於細胞週期減弱、細胞週期停滯 (arrest)、腫瘤細胞生長抑制、細胞的腫瘤發生的抑制、腫瘤/癌細胞轉型的抑制、腫瘤/癌細胞凋亡的誘導、正常細胞回復的誘導、高度惡性癌細胞重新編程為較為良性的低階狀態(腫瘤消退)及其組合。

【00123】 癌症治療效應(Cancer Therapy Effect)：藥物處理所致的細胞反應及/或細胞機制，包含但不限於抑制致癌基因表現、抑制癌細胞增生、抑制癌細胞侵犯及/或遷移、抑制癌細胞轉移、引發癌細胞死亡、避免腫瘤/癌發生、避免癌復發、抑制癌發展、修復受傷組織細胞、將高度惡性腫瘤重新編程為較為良性而較低階的狀態(癌消退/緩解)及其組合。

【00124】 基因靜默效應(Gene Silencing Effect)：一基因功能被抑制後的一細胞反應，其包含但不限於致癌基因表現抑制、細胞增生抑制、細胞週期停滯、G0/G1檢控點停滯、細胞週期減弱、腫瘤抑制、抗腫瘤發生、癌消退、癌的避免、癌細胞凋亡、細胞修復/更生、細胞重新編程、將生病細胞重新編程為一相對正常的狀態(自發性治療)及其組合。

【00125】 轉錄誘導物(Transcription Inducer)：能在原核細胞內針對pol-2或類pol-2啟動子引發及/或增強真核基因轉錄的一化學因劑。舉例來說，轉錄誘導物包含但不限於相似於3-(N-嗎啉基)丙磺酸(3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS))、乙醇、甘油或其混合的化學結構。

【00126】 抗體：具有預選的保守模組結構(domain structure)的肽類或蛋白質分子，可作為與一預選配體結合的受體。

【00127】 藥學與/或治療應用：一種生物醫學上的使用、裝置及/或設備，能用於診斷、幹細胞生成、幹細胞研究及/或治療開發、組織/器官修復及/或更生、傷口癒合處理、腫瘤抑制、癌症治療及/或預防、疾病處理、藥的製造及其組合。

B. 組成物與方法

【00128】 一種引發全面腫瘤抑制及/或癌症治療效應的組成物與方法，其係使用核酸組成物。該核酸組成物能被傳送，且在人類細胞基質中被處理成爲類mir-302基因靜默效應子，抑制細胞中mir-302標的的細胞週期調節者及/或致癌基因，藉以抑制及/或避免腫瘤/癌細胞生長；其中所述類mir-302基因靜默效應子含有一SEQ.ID.NO.3序列，且所述人類細胞基質可以是正常的或含有至少一腫瘤及/或癌細胞。

【00129】 較佳地，本發明採用一新穎設計與策略來傳遞在轉染細胞內可經誘導地或可持續表現的類mir-302基因靜默效應子。類mir-302基因靜默效應子包含mir-302a、mir-302b、mir-302c、mir-302d，以及他們的髮夾樣(hairpin-like)微型核糖核酸前驅物(pre-miRNAs)和人工重設小髮夾型(shRNA)、pro-miRNA及/或小干擾RNA (siRNA)等擬物及其同源物/衍生物，及其組合。類mir-302基因靜默效應子的轉染可以載體或非載體的基因傳遞方式達成；其中該傳遞方式包含多聚體轉染(polysomal transfection)、微脂體轉染(liposomal transfection)、化學轉染、電穿孔(electroporation)、病毒感染(viral infection)、DNA重組(DNA recombination)、轉位子插入(transposon insertion)、跳躍基因插入(jumping gene insertion)、顯微注射(microinjection)、基因槍穿透(gene gun penetration)及其組合。就載體的傳遞方式而言，類mir-302基因靜默效應子的表現由一持續表現的(即CMV)或以藥物誘導的(即TRE-CMV)啟動子所驅動。該藥物誘導式的重組核酸組成物較佳爲一Tet-On載體，其包含一被插入有一重組mir-302家族群集(mir-302s；SEQ.ID.NOs.9 - 16的雜合物)或一人工重設mi-302 shRNA同源物(即 SEQ.ID.NOs.17與18的雜合物)的重組轉殖基因。該細胞基質在體外(*in vitro*)、離體(*ex vivo*)或體內(*in vivo*)表現mir-302的標的基因。藉著靜默該mir-302標的的細胞週期調節者與致癌基因，本發明能抑制細胞的腫瘤生成能力，以及將被處理的細胞重新編程爲非腫瘤/癌

細胞。

實施例

【00130】 以下實施例係作為舉例說明本發明之某些較佳具體實施例及態樣，其不應視為限制本發明之範疇。

【00131】 在以下揭示之實驗文件中，所用的簡稱如下：M(莫耳，molar)；mM(毫莫耳，millimolar)； μ m(微莫耳，micromolar)；mol(摩耳，moles)；pmol(微微摩耳，picomole)；gm(公克，grams)；mg(毫克，milligrams)； μ g(微克，micrograms)；ng(毫微克，nanograms)；L(公升，liters)；ml(毫升，milliliters)； μ l(微升，microliters)； $^{\circ}$ C(攝氏度，degrees Centigrade)；cDNA(DNA之拷貝或互補；copy or complementary DNA)；DNA(去氧核糖核酸，deoxyribonucleic acid)；ssDNA(單股DNA，single stranded DNA)；dsDNA(雙股DNA，double-stranded DNA)；dNTP(去氧核糖核苷三磷酸，deoxyribonucleotide triphosphate)；RNA(核糖核酸，ribonucleic acid)；PBS(磷酸鹽緩衝液，phosphate buffered saline)；NaCl(氯化鈉，sodium chloride)；HEPES(N-2-羥乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸，N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid)；HBS(HEPES緩衝液，HEPES buffered saline)；SDS(十二烷基硫酸鈉，sodium dodecyl sulfate)；Tris-HCl(三羥甲基胺基甲烷-氯化氫，tris-hydroxymethylaminomethane-hydrochloride)；ATCC(美國菌種保存中心，American Type Culture Collection，Rockville，MD)；hES(人類胚胎幹細胞，human embryonic stem cells)；iPS(誘發型多能性幹細胞，induced pluripotent stem cells)；以及SCR(體細胞重新編程，somatic cell reprogramming)。

實施例 1

細胞培養與轉染

【00132】 人類癌症細胞株 Ntera-2、HepG2、MCF7、PC3 與 Colo829係取得自美國菌種培養中心(ATCC, Rockville, MD); 而人類毛囊細胞(hHFCs) 則以4 mg/ml膠原蛋白酶分解自最少兩個毛真皮乳頭(hair dermal papillae), 其中膠原蛋白酶之消化環境為在補充有20% 胎牛血清(FBS)的新鮮RPMI 1640培養液中作用45 分鐘。黑色素細胞(melanocytes)則於37°C 及5% CO₂下, 培養於添加有人類黑色素細胞生長補充劑-2 (HMGS-2, Invitrogen, Carlsbad, CA), 並且不含有抗生素的254培養液(Medium 254)中。當細胞生長達70% - 80% 滿盤(confluency)時, 則將細胞暴露在trypsin-EDTA溶液1分鐘以分離細胞, 並以無酚紅之DMEM培養液(phenol red-free DMEM medium, Invitrogen)淋洗一次, 再將該等分離之細胞以1:10稀釋後於新鮮含HMGS-2補充劑之254培養液中繼代培養。關於以電穿孔法進行基因轉殖之步驟, 係將 *pTet-On-tTS-miR302s* 載體 (10 µg) 與 *pTet-On-Adv-Neo(-)* 載體 (50 µg) 之混合加入到一低滲性緩衝溶液(200 µl; Eppendorf, Westbury, NY) 中之分離細胞 (20,000 - 50,000顆) 當中, 且電穿孔係以電穿孔儀在300~400伏特下實行150微秒以將該等載體傳送進該等細胞內。經電穿孔後之細胞係先於無酚紅、含20%血清替代品(Knockout serum)、1% MEM非必需氨基酸、10ng/ml鹼性成纖維細胞生長因子(bFGF)、1mM GlutaMax、及1mM丙酮酸鈉之DMEM培養液(Invitrogen)中, 於37°C及5% CO₂的條件下培養24小時。接著加入850 µg/ml G418及大於3.75 µg/ml濃度之四環黴素 (Dox), 每天更新, 持續3至5天, 直到細胞表現強烈的紅色螢光(RGFP)。接下來, 以TE200倒立顯微鏡系統 (Nikon, Melville, NY) 監看單獨的紅色螢光細胞 (mirPS), 並以MO-188NE 3D顯微操作系統 (Nikon) 將其個別收集至一96孔盤當中。在缺少去氧羥四環素的條件下 (Dox), 將mirPS細胞培養於一含20%血清替代品(Knockout serum)、1% MEM非必需氨基酸、100 µM β-巯基乙醇、1mM GlutaMax、1mM丙酮

酸鈉、10ng/ml鹼性成纖維細胞生長因子(bFGF)、100 IU/ml 盤尼西林／100 µg/ml 鏈黴素／250 µg/ml G418、0.1 µM A83-01、以及0.1 µM 丙戊酸 (Stemgent, San Diego, CA) 之DMEM/F-12培養基，以37°C 及5% CO₂的條件培養。另一方面，在去氧羥四環素(Dox, 3.75 - 5 µg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 存在之下，將mirPS細胞培養於同樣的無飼養層(feeder-free)培養條件，並且再另外添加0.05 µM GSK抑制劑SB216763 (Stemgent)。GSK抑制劑的添加將促進mirPS的增殖但輕微的神經分化傾向。在神經細胞誘導方面，則將mirPS細胞培養於含有0.05 µM SB216763、並且不包含去氧羥四環素 (Dox) 之上述無飼養層培養條件。

實施例 2

表現*mir-302s*之重組載體之構築

【00133】 Mir-302家族群集(*mir-302s*)之產生如先前的報導中所描述(Lin等人, 2008)。Mir-302s群集含有四個部分，包括mir-302a、mir-302b、mir-302c、與mir-302d的前驅微型核糖核酸(pre-miRNAs)。構築*mir-302s*群集所用之合成寡核苷酸(Sigma-Genosys, St. Louis, MO)如下方所列。在表現載體的構築上，吾人混合相等量(1:1)之*mir-302s*及一先作好的*SpRNAi-RGFP*重組基因(Lin等人, 2006與2008)，接著以*MluI/PvuI*限制酶在37°C消化此混合物4小時。接下來以一膠體萃取工具 (Qiagen, CA)將該消化後的混合物純化並收集於30 µl二次水中(ddH₂O)，並且使用T4 DNA 接合酶(T4 ligase)在8°C作用16小時以接合該混合物。該步驟形成一重組的表現mir-302之*SpRNAi-RGFP*基因，其能進一步經*XhoI/HindIII*限制酶切割後，插入到一可以去氧羥四環素誘導之*pSingle-tTS-shRNA* 載體 (Clontech, Palo Alto, CA)中，而形成一可誘導式的*pTet-On-tTS-miR302s*表現載體。接著，吾人進一步修改該*pTet-On-tTS-miR302s*載體，即，用一分離自*pTRE-Tight*質體(Clontech)的*TRE-CMV*啓動子取代*pTet-On-tTS-miR302s*載體原先的U6啓動子。爲了產生

一非誘導式的*pCMV-miR302s*連續表現載體，吾人以*EcoR*限制酶切割該修改後之*pTet-On-tTS-miR302s*載體，再透過膠體電泳移除*tTS-TRE*上游序列(1.5 kb)，並且自該膠體重新獲得該被切割之載體以進行DNA接合(ligation)步驟，完成一非誘導式*pCMV-miR302s*載體之構築。

【00134】 用於mir-302家族前驅核糖核酸(pre-miRNA)群集之DNA重組的合成寡核苷酸列於下方: mir-302a-正義, 5' -GTCACGCGTT CCCACCACTT AAACGTGGAT GTACTTGCTT TGAAACTAAA GAAGTAAGTG CTTCCATGTT TTGGTGATGG ATAGATCTCT C-3' (SEQ.ID.NO.9); mir-302a-反義, 5' -GAGAGATCTA TCCATCACCA AAACATGGAA GCACTTACTT CTTTAGTTTC AAAGCAAGTA CATCCACGTT TAAGTGGTGG GAACGCGTGA C-3' (SEQ.ID.NO.10); mir-302b-正義, 5' -ATAGATCTCT CGCTCCCTTC AACTTTAACA TGGAAGTGCT TTCTGTGACT TTGAAAGTAA GTGCTTCCAT GTTTTAGTAG GAGTCGCTCA TATGA-3' (SEQ.ID.NO.11); mir-302b-反義, 5' -TCATATGAGC GACTCCTACT AAAACATGGA AGCACTTACT TTCAAAGTCA CAGAAAGCAC TTCCATGTTA AAGTTGAAGG GAGCGAGAGA TCTAT-3' (SEQ.ID.NO.12); mir-302c-正義, 5' -CCATATGGCT ACCTTTGCTT TAACATGGAG GTACCTGCTG TGTGAAACAG AAGTAAGTGC TTCCATGTTT CAGTGGAGGC GTCTAGACAT-3' (SEQ.ID.NO.13); mir-302c-反義, 5' -ATGTCTAGAC GCCTCCACTG AAACATGGAA GCACTTACTT CTGTTTCACA CAGCAGGTAC CTCCATGTTA AAGCAAAGGT AGCCATATGG-3' (SEQ.ID.NO.14); mir-302d-正義, 5' -CGTCTAGACA TAACACTCAA ACATGGAAGC ACTTAGCTAA GCCAGGCTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGT TCGCGATCGC AT-3' (SEQ.ID.NO.15); 以及 mir-302d-反義, 5' -ATGCGATCGC GAACACTCAA ACATGGAAGC ACTTAGCCTG GCTTAGCTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGT

TATGTCTAGA CG-3' (SEQ.ID.NO.16)。另外，吾人使用由合成之miR-302s-正義，5' -GCAGATCTCG AGGTACCGAC GCGTCCTCTT TACTTTAACA TGGAAATTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGG TGTGGCGCGA TCGATATCTC TAGAGGATCC ACATC-3' (SEQ.ID.NO.17) 及 mir-302s-反義，5' -GATGTGGATC CTCTAGAGAT ATCGATCGCG CCACACCACT CAAACATGGA AGCACTTAAT TTCCATGTTA AAGTAAAGAG GACGCGTCGG TACCTCGAGA TCTGC-3' (SEQ.ID.NO.18) 雜合而成的一人工重設之shRNA，來取代mir-302前驅微型核糖核酸(pre-miRNA)群集以進行簡易內含子插入。在設計mir-302同源物時，可用胸線嘧啶(T)取代尿嘧啶(U)，反之亦然。所有該等合成序列在進行接合(ligation)之前，皆經過聚丙烯醯胺膠體電泳(PAGE)萃取純化。

【00135】 重組的mir-302家族之前驅微型核糖核酸群集(*mir-302s*)是連接四個mir-302a—d雜合物而形成的，包括mir-302a-正義與mir-302a-反義，mir-302b-正義與mir-302b-反義，mir-302c-正義與mir-302c-反義，以及mir-302d-正義與mir-302d-反義。該等雜合物mir-302a、mir-302b、mir-302c、以及mir-302d皆分別經由*PvuII*/*XhoI*、*XhoI*/*NheI*、*NheI*/*XbaI*以及 *XbaI*/*MluI*限制酶消化，再經膠體萃取，然後以過濾管柱(Qiagen, CA)共同收集於35 μ l的滅菌二次水中。接著以T4 DNA接合酶(ligase) (Roche, 20U) 接合該雜合物之混合，使其形成一群集。最後將該mir-302家族之前驅微型核糖核酸群集插入到經由*PvuII*/*MluI*限制酶線性化之*SpRNAi-RGFP*重組基因中。另外，可以雜合SEQ.ID.NO.17及SEQ.ID.NO.18，再使用*PvuII*/*MluI*限制酶切割該雜合物並將切割後之雜合物插入到以*PvuII*/*MluI*線性化之*SpRNAi-RGFP*中，形成mir-302 shRNA。

【00136】 將DH5 α 大腸桿菌菌株培養於含有100 μ g/ml濃度之安比西林(Sigma Chemical, St. Louis, MO)的LB培養基中以增殖*pTet-On-tTS-miR302s*及*CMV-miR302s*載體。再使用一無內毒素大量質體提取工具(Endo-Free

Maxi-Prep Plasmid Extraction Kit, Qiagen, CA) 分離及純化增殖後的 *pTet-On-tTS-miR302s* 及 *CMV-miR302s* 載體。

實施例 3

微型核糖核酸(miRNA)微陣列分析

【00137】 在70%細胞滿盤下，使用 *mirVana*TM 微型核糖核酸分離工具(*mirVana*TM miRNA isolation kit, Ambion)自每一細胞培養物中分離小RNAs。使用1%甲醛-瓊脂凝膠電泳及光譜儀量測(Bio-Rad)來評估該等分離之小RNAs的純度及含量，然後立刻以乾冰冷凍並送往LC Sciences(San Diego, CA)進行微型核糖核酸微陣列分析。每一微陣列晶片分別與標示以Cy3或Cy5之一單一樣本雜合，或是與標示以Cy3與Cy5之一對樣本雜合。接著進行背景相減(background subtraction)與正規化(normalization)。在一雙重樣本測驗方面，執行 *p* 值計算，超過3倍之差異表現的轉錄分子顯示於一列表。結果如圖1C所示。

實施例 4

北方墨點分析法

【00138】 以 *mirVana*TM 微型核糖核酸分離工具(Ambion, Austin, TX)分離出總體RNAs (10 μ g)後，再以15% TBE-尿素聚丙烯醯胺凝膠或3.5% 低熔點瓊脂凝膠電泳分餾該總體RNAs，並將該分餾後之總體RNAs電轉漬至尼龍膜 (nylon membrane)上。接著以[LNA]-DNA探針 (5' -[TCACTGAAAC] ATGGAAGCAC TTA-3') (SEQ.ID.NO.19) 偵測 *mir-302*；偵測其他基因的探針則進一步合成，其序列如表1所列。所有的探針係經過高效液相層析法(HPLC)純化並且在 [³²P]-dATP (> 3000 Ci/mM, Amersham International, Arlington Heights, IL)存在下以末端轉移酶 (terminal transferase, 20 units)進行尾端標示。雜合反應於50% 的

新鮮去離子甲醯胺(freshly deionized formamide, pH 7.0)、5倍Denhardt's 溶液、0.5% SDS、4倍SSPE及250 mg/mL的變性鮭魚精子DNA片段的混合物中進行(18小時, 42°C)。接著將膜在2倍SSC、0.1%的SDS中連續清洗兩次(15分鐘, 25°C), 並在0.2倍SSC、0.1%的SDS中清洗一次(45分鐘, 37°C), 然後進行自動放射顯影。結果示於圖1D、圖4A及8B。

實施例5

西方墨點分析法

【00139】 以補充有蛋白酶抑制劑(protease inhibitor)、亮抑酶肽(Leupeptin)、TLCK、TAME及PMSF的CelLytic-M裂解/提取試劑(CelLytic-M lysis/extraction reagent, Sigma)溶解細胞(1,000,000顆), 如製造商建議。接著以12,000 rpm 於4°C離心該裂解液20分鐘然後再取得離心後的上清液。然後以改良過之SOFTmax 蛋白質測定套裝軟體在一E-max微量盤測讀儀(microplate reader, Molecular Devices, CA)上測量蛋白質濃度。在還原(reducing, +50 mM DTT)及非還原(non-reducing, 無DTT)的條件下, 各將每30 µg之細胞裂解後產物加入SDS-PAGE樣本緩衝液中, 並在裝載到6%~8% 聚丙烯醯胺凝膠上之前沸騰3分鐘。接著以SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳法(SDS-PAGE)解析蛋白質, 而後將蛋白質電轉漬至一硝酸纖維膜上(nitrocellulose membrane), 並將膜於奧德塞阻斷試劑(Odyssey blocking reagent; Li-Cor Biosciences, Lincoln, NB)中在室溫下培育2小時。然後, 在該試劑中加入一初級抗體並在4°C下培育該混合物。使用的初級抗體包括: Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、Sox2 (Santa Cruz)、Nanog (Santa Cruz)、Lin28 (Abcam Inc., Cambridge, MA)、UTF1 (Abcam)、Klf4 (Santa Cruz)、TRP1 (Santa Cruz)、keratin 16 (Abcam)、CDK2 (Santa Cruz)、cyclin D1 (Santa Cruz)、cyclin D2 (Abcam)、BMI-1 (Santa Cruz)、AOF2 (Sigma)、HDAC2 (Abcam)、

hTERT (Santa Cruz)、 β -actin (Chemicon, Temecula, CA), 以及RGFP (Clontech)。經過一夜後, 以TBS-T漂洗該膜三次, 然後在室溫下將其暴露在羊抗小鼠IgG (goat anti-mouse IgG)中1小時。該羊抗小鼠IgG和Alexa Fluor 680反應性染料(1:2,000; Invitrogen - Molecular Probes)結合形成二級抗體。再經三次TBS-T漂洗後, 使用Li-Cor 奧德塞紅外線影像儀 (Li-Cor Odyssey Infrared Imager)及奧德塞軟體第10版(Li-Cor)來處理免疫轉漬之螢光掃描及影像分析。結果如圖1D、圖4B、圖7C-7D、圖8B及9B所示。

實施例 6

凋亡細胞斷裂DNA試驗

【00140】 依照製造商之建議, 使用一凋亡細胞斷裂DNA分離工具 (Apoptotic DNA Ladder Kit, Roche Biochemicals, Indianapolis, IA) 從約2,000,000顆細胞中分離出基因體DNA, 然後取2 μ g的分離DNA, 並以2%之瓊脂凝膠電泳法進行評估。結果顯示於圖1F。

實施例7

DNA含量之流式細胞儀分析

【00141】 在完成所需之實驗後, 將細胞以胰蛋白酶水解、離心成粒狀, 並將其再懸浮於1 ml預冷的含70%甲醇之PBS中, 以在-20°C下固定該等細胞1小時。將該等細胞離心成粒狀並以1 ml之PBS清洗一次。將該等細胞再次離心成粒狀並於37°C下再懸浮於1 ml含1 mg/ml碘化丙啶(propidium iodide, PI)、0.5 μ g/ml核糖核酸酶(RNase)之PBS溶液中30分鐘。然後, 在BD FACSCalibur流式細胞儀(San Jose, CA)上分析約15,000個細胞。藉由繪製脈衝寬度對脈衝面積的圖並圈選該等單一細胞來排除細胞雙連體。使用套裝軟體Flowjo以「Watson Pragmatic」演算法

來分析所收集之資料。結果如圖3A-3B、圖6A-6C所示。

實施例 8

全基因體微陣列分析

【00142】 使用人類基因體 GeneChip U133 plus 2.0 陣列(Affymetrix, Santa Clara, CA)偵測受試細胞中超過47,000個人類基因表現型式之變化。依據製造商之建議，使用*mirVana*TM微型核糖核酸分離工具(*mirVana*TM miRNA Isolation Kit, Ambion)分離每一受試樣本中的總體RNA。分離之RNA的純度及含量則由1%甲醛-瓊脂凝膠電泳及光譜儀量測(Bio-Rad)來評估。使用完全相配探針與失配探針之間總平均的差來將該等樣本訊號正規化。之後，使用Affymetrix Microarray Suite 5.0 版、Expression ConsoleTM 1.1.1版 (Affymetrix)及Genesprings (Silicon Genetics)軟體來分析全基因體基因表現型式的變化。基因表現變化超過一倍被視為陽性分化基因。在基因叢集試驗(gene clustering)中，搭配使用外掛程式Genetrix (Epicenter Software)與Affymetrix軟體。以每一微陣列中的控制組管家基因之平均正規化該樣本的訊號。結果表示於圖5A。

實施例9

DNA去甲基化試驗

【00143】 約2,000,000顆細胞中之基因體DNA係以一DNA分離工具(DNA isolation kit, Roche)來分離。取1 μ g 分離的DNA，並根據製造商建議之方式處以二亞硫酸鹽(CpGenome DNA modification kit, Chemicon, Temecula, CA)。另一方面，取2 μ g 分離之DNAs，並以CCGG切割限制酶*HpaII*來解消，然後再經由1%瓊脂凝膠電泳法判別全基因體的去甲基化(圖5B)。以二亞硫酸鹽處理DNA，會將所有未甲基化之胞嘧啶轉變成尿嘧啶，而已甲基化之胞嘧啶則仍維持為胞嘧啶。在二亞硫酸鹽DNA定序分析方面，吾人使用聚合酶連鎖反應(PCR)擴增*Oct3/4* 及 *Nanog*的啓

動子區域。擴增 *Oct3/4* 啓動子區域所使用的引子包含5' -GAGGCTGGAG CAGAAGGATT GCTTTGG-3' (SEQ.ID.NO.20) 及 5' -CCCTCCTGAC CCATCACCTC CACCACC-3' (SEQ.ID.NO.21)；擴增 *Nanog*啓動子區域所使用的引子包含5' -TGGTTAGGTT GGTTTTAAAT TTTTG-3' (SEQ.ID.NO.22) 及 5' -AACCCACCCT TATAAATTCT CAATTA-3' (SEQ.ID.NO.23)。首先，將二亞硫酸鹽修飾後的DNAs (50 ng) 與該等引子(總共100 pmole)混合在1倍PCR緩衝液中，加熱至94°C後持續2分鐘，然後立即於冰上冷卻。其後，進行25個如下之PCR循環：在94°C下進行1分鐘，在70°C下進行3分鐘。其係使用一高準確度PCR工具(Expand High Fidelity PCR kit, Roche)。擴增反應結束後，進一步地以3%瓊脂凝膠電泳法分餾出具有正確長度之DNA產物，接著以膠體萃取工具(Qiagen)純化該DNA產物，然後進行DNA定序。DNA甲基化位之詳細圖譜係藉由比較在已經過二亞硫酸鹽修飾之DNA序列中之未改變的胞嘧啶、與在未經過二亞硫酸鹽修飾之DNA序列中之未改變的胞嘧啶來產生。結果如圖5C所示。

實施例10

移植與畸胎瘤形成

【00144】 將大約5 - 10個衍生自 mirPS細胞的類胚胎體(4~8細胞階段)懸浮於50 μ l 的DMEM 培養液與基底膜基質Matrigel之2：1混合液中，接著將該等衍生自 mirPS細胞的類胚胎體移植到一六週大雌性假性懷孕免疫功能不足之SCID-beige小鼠的子宮中。產生該假性懷孕小鼠的方法為：在腹膜內注射1 IU之人類停經後促性腺激素(human menopausal gonadotrophin, HMG)兩天，然後再注射人類絨毛膜性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)一天。該細胞及該小鼠在移植前或移植後不處以去氧羥四環黴素(Dox)。在移植期間，使用2.5%的三溴乙醇(Avertin)溶液，以每隻小鼠0.4 ml的劑量麻醉小鼠。在移植後或者當該

移植細胞團發展至超過100 mm³大小時，監看該異種皮移植團(Xenografted masses) 3至4週。將該囊腫/畸胎瘤切下之後，使用公式： $(長 \times 寬^2)/2$ 計算其體積，並且對其再進行計數、秤重及進一步的組織學分析。似畸胎瘤組織囊腫的形成 (teratoma-like tissue cysts) 通常在移植後大約2.5週可觀察到。結果如圖5D所示。

實施例11

細胞侵犯試驗

【00145】 首先，單獨使用200 µg/ml Matrigel或使用補充有含20% FBS及1% 左旋麩醯胺酸(L-Glutamine)之無酚紅DMEM培養液之Matrigel來塗覆插入腔(chamber inserts，孔徑12µm，Chemicon)，並且將其置於無菌環境下變乾，直到隔天。使用無酚紅DMEM培養液收集、淋洗、並再懸浮細胞，以達最終之100,000顆細胞/ml的細胞密度。取500 µl該細胞懸浮液分配到上層腔(top chamber)內，而將1.5ml DMEM條件培養液加入到下層腔當中以製造一趨化梯度(chemotactic gradient)。經過37°C隔夜培養16小時後，接著對侵犯情況進行測量。首先以脫脂棉將上層腔擦乾，然後使用100%甲醇固定位在膜下側的侵犯細胞10分鐘、風乾，以甲酚紫(cresyl violet)染色20分鐘，再和緩地以水清洗。待其變乾之後，使用含1:1 100% 乙醇及0.2 M檸檬酸鈉(NaCitrate)的洗液洗提膜上的甲酚紫染色20分鐘，並以Precision 微量盤測讀儀(Precision Microplate Reader，Molecular Dynamics)讀取波長570 nm的吸光值。表示細胞侵犯率之方式為以受測樣本的吸光值對比於不擦乾插入腔膜層(總細胞數)之後所得吸光值的百分比。結果表示於圖6D。

實施例12

細胞貼附試驗

【00146】 細胞貼附試驗之進行如先前報導所描述(Lin等人, 2007)。將人類骨髓內皮細胞(hBMECs)以100,000顆細胞/ml的密度種於96孔盤中, 並且在進行試驗之前以貼附培養液(adhesion medium) [RPMI 1640/0.1% BSA/20 mM HEPES (pH7.4)]淋洗。使用胰蛋白酶(用於腫瘤/癌細胞)或膠原蛋白酶(用於mirPS細胞)將受測細胞分離下來, 以無菌生理食鹽水淋洗細胞, 然後讓細胞以1,000,000顆細胞/ml的密度再懸浮於含有10 μ M fura-4 乙醯氧甲基酯之螢光探針(acetoxymethyl ester, fluorescent probe, Sigma) 的PBS中, 在37°C的黑暗環境下經過1小時。接著將該細胞離心並以含有1% (v/v) 丙磺舒(probenecid, 100 mM)的無血清之培養液淋洗細胞, 然後將該細胞培養於貼附培養液及37°C的黑暗環境20分鐘, 以活化細胞內的螢光探針。之後, 將該100,000顆細胞(在300 μ l的細胞懸浮液/well)加入至滿盤的(confluent) hBMEC內皮細胞單層上, 並在37°C培養50分鐘。使用250 μ l的貼附培養基淋洗兩次將未貼附的細胞移走。使用一螢光盤測讀儀(fluorescent plate reader, Molecular Dynamics)在37°C以激發波長485 nm及發射波長530 nm來讀取螢光。結果表示於圖6E。

實施例13

活體內腫瘤生長試驗

【00147】 吾人將NTera-2細胞(在總體積為100 μ l之Matrigel-PBS中的2,000,000顆細胞)異種移植到八週大雄性小鼠(BALB/c-nu/nu 品系)的脅腹中(即, 右後肢)。對該腫瘤進行每週監測, 並且在異種移植NTera-2後一週, 以原位注射將*pCMV-miR302s*載體或*pCMV-miR302d**載體導入其中。以2 μ g (每克小鼠重)經由聚乙烯亞胺(PEI)製備的*pCMV-miR302s*或 *pCMV-miR302d**載體(總重10 μ g), 進行五次處理(兩次處理之間間隔三天)。依照製造商之使用建議, 使用體內-jetPEI傳送試劑(Polyplus-transfection Inc., New York, NY)。在注射完三週後或當未經載體處理的腫瘤生長至大約100 mm³的平均大小後

始收集樣本。主要器官像是血液、腦、心、肺、肝、腎和脾，以及異種移植瘤皆被取出以進行腫瘤之組織學評估及免疫反應細胞毒性測試。其中，以觸診監測腫瘤的形成，並以公式： $(長 \times 寬^2) / 2$ 計算腫瘤體積。此外，亦對腫瘤進行計數、解剖、與秤重，並以蘇木紫-伊紅染色(H&E)及免疫染色試驗進行組織學檢驗。組織學檢驗未顯示在腦、心、肺、肝、腎和脾中有偵測得到的組織病變。結果顯示於圖8A-8B。

實施例 14

免疫染色試驗

【00148】 將組織樣本以4%多聚甲醛(paraformaldehyde)在4°C固定一整夜。在將該等樣本包埋入石蠟中前，先將該等樣本相繼地以1倍PBS、甲醇、異丙醇及四氫萘(tetrahydronaphthalene)清洗。接著將包埋後之樣本以切片機(microtome)依照7~10 μ m之厚度切割並固定在乾淨、以TESPA塗佈之玻片上。然後，以二甲苯(xylene)去除該等玻片之蠟，並使用封片膠(mounting media; Richard Allan Scientific, Kalamazoo, MI)固定於蓋玻片下；接著以蘇木紫(hematoxylin)及伊紅(eosin) (H&E, Sigma)染色以進行形態觀察。免疫組織化學(IHC)染色工具係購自Imgenex(San Diego, CA)。根據製造商的建議實行抗體稀釋及免疫染色法之程序。所用之初級抗體包括：Oct3/4 (Santa Cruz), Sox2 (Santa Cruz), Nanog (Santa Cruz), CDK2 (Santa Cruz), cyclin D1 (Santa Cruz), cyclin D2 (Abcam), BMI-1 (Santa Cruz), 與RGFP (Clontech)。二級抗體則採用生物素鍵結的羊抗兔(goat anti-rabbit)或生物素鍵結的馬抗鼠(horse anti-mouse) 抗體(Chemicon, Temecula, CA)。加入作為三級抗體的帶有鏈黴卵白素的辣根過氧化酶 (Streptavidin-HRP)。將載玻片以PBT洗過三次之後，接著以DAB受質 (DAB substrate) 偵測已結合的抗體。在具全場掃描之100倍顯微鏡下觀察到陽性結果，並以一Metamorph影

像處理程式(Nikon 80i顯微鏡定量分析系統) 在200倍之放大倍率下測量以作定量分析。結果如圖8C所示。

實施例15

冷光酵素三端非轉譯區報告基因試驗

【00149】 冷光酵素試驗係使用一修飾過的pMir-Report miRNA表現報告載體系統(pMir-Report miRNA Expression Reporter Vector System, Ambion)來進行。Mir-302的標的位(正常與/或突變)被插入到*pMir-Report Luciferase Reporter*報告載體的三端非轉譯區(3' -UTR)的選殖位。以12個 -CAGT- 重複序列分隔開兩個合成的標的位。另一個*pMir-Report β -gal Control*載體則用來作為一無報導(no reporter)控制載體。在有或無去氧羥四環素(Dox)處理下，使用FuGene HD試劑(Roche)，依照製造商建議之方式，以200 ng的報告載體轉染50,000個mirPS細胞。在轉染後48小時收集細胞裂解液；冷光酵素的降解程度被正規化(normalize)並以相對冷光酵素活性(relative luciferase activity, RLA)來表示；其計算方式為將經過去氧羥四環素處理(Dox-on)的mirPS細胞的冷光酵素活性水平除以未經去氧羥四環素處理(Dox-off)的mirPS細胞的冷光酵素活性水平。另外，表現mir-434的細胞則經由電穿孔法將*pTet-On-tTS-miR434-5p* 導入hHFCs來產生以作為陰性控制組。結果表示於圖7B與圖10B。

實施例16

端粒重複序列擴增試驗

【00150】 依照製造商提供之建議，使用一補充有蛋白酶抑制劑、亮抑酶肽(Leupeptin)、TLCK、TAME以及PMSF的細胞裂解/提取試劑(CelLytic-M lysis/extraction reagent, Sigma)溶解約1,000,000顆細胞。以12,000 rpm的轉速在4°C離心該裂解液20分鐘，並收集離心後之裂解液(上清液)。接著以改良過

的SOFTmax 蛋白質測定套裝軟體在一E-max微量盤測讀儀(microplate reader, Molecular Devices, CA)上測量蛋白質濃度。使用一標記有紅外螢光染劑(infrared Alexa Fluor 680 dye, TS Primer; Sigma-Genosys)的寡核苷酸 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' (SEQ.ID.NO.24) 以及序列 5'-GTGTAACCCTAACCCTAACCC-3' (CX primer; 30 μ M) (SEQ.ID.NO.25) 來偵測聚合酶連鎖反應(PCR)產物。端粒酶抑制劑被直接加入主要混合液中。對於所有受試細胞株，每反應使用50 ng蛋白質可達最佳結果。在30°C下經過30分鐘的培育之後，將樣本置於聚合酶連鎖反應器中加熱至94°C持續2分鐘，然後進行35個如下之PCR循環：在94°C進行變性反應(denaturation) 30秒、在57°C進行合成反應(synthesis) 30秒。最後再於57°C進行一單一合成後步驟30秒。接著以6%非變性聚丙烯醯胺凝膠(Nondenaturing polyacrylamide gel)電泳法分離PCR產物，並使用Li-Cor 奧德塞紅外線影像儀(Li-Cor Odyssey Infrared Imager)及奧德塞軟體第10版(Li-Cor)來進行影像偵測及分析。結果表示於圖9A。

實施例17

統計分析

【00151】 在免疫染色、西方墨點以及北方墨點的分析上，任何大於75%的訊號強度變化即被視為一陽性結果，該等結果被分析後以平均值 \pm 標準差(mean \pm SE)表示之。資料之統計分析係以單因子變異數分析(one-way ANOVA)來計算。當主要效應顯著時，使用杜納的事後比較(Dunnett's post-hoc test)來鑑別與控制組有顯著差異之群。在兩處理組之間進行配對比較時，使用雙尾司徒頓t檢驗(two-tailed student *t* test)。對於包含超過兩處理組之實驗，則在ANOVA後進行一事後多變域測驗(post-hoc multiple range test)。機率值 $p < 0.05$ 被認為是具有統計上的意義。所有 p 值係由雙尾檢定來決定。

實施例18

細胞轉型以及pre-miRNA表現的誘發

【00152】 將以 z- 勝任大腸桿菌轉型工具 (z-competent E. coli transformation kit, Zymo Research, Irvine, CA) 取得之勝任大腸桿菌 DH5 α 細胞株 (competent E. coli DH5 α) 與所選之質體載體如 *pLVX-Grn-miR302+367* 或 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 混合以進行轉型作用。非轉型之細菌細胞係正常生長於補充有 10 mM 硫酸鎂 (MgSO₄) 與 0.2 mM 葡萄糖的 37 °C 的 LB (Luria-Bertani) 培養基中，同時以 170 rpm 頻繁震盪之；轉型的細菌細胞並進一步培養於添加 100 μ g/ml 安比西林的 LB 培養基。另一方面，在補充有 10 mM 硫酸鎂與 0.2 mM 葡萄糖、並添加有 100 μ g/ml 安比西林的 LB 培養基中，再於每 1 公升該 LB 培養基中加入 0.5 至 2 ml 的 MOPS 用於化學誘導。此外，轉型的細菌細胞係培養於上述添加有安比西林、但無添加任何化學誘導物的 LB 培養基中，作為負控制組。

實施例19

人類細胞培養以及細胞內Mir-302的傳遞

【00153】 人類初代表皮細胞 (human primary epidermal skin cells, hpESCs) 係以配製於補充有 20% 胎牛血清 (FBS) 的新鮮 RPMI 1640 培養液的 4 mg/ml 膠原蛋白酶 I，在 37 °C 自最少 2 mm³ 體積處理 35 分鐘分離而得。分離的角質細胞 (keratinocytes) 係在 37 °C 與 5% 二氧化碳的條件下培養於 EpiLife 不含血清 (serum-free) 的細胞培養液中，其中該培養液添加有人類角質細胞生長補充劑 (HKGS, Invitrogen, Carlsbad, CA) 且不含抗生素。當細胞生長達 50%~60% 滿盤 (confluency) 時，則將細胞暴露在 trypsin/EDTA 溶液中 1 分鐘，並以不含酚紅之 DMEM 培養液 (phenol red-free DMEM medium, Invitrogen) 淋洗一次，再將該等分離之細胞以 1:10 稀釋後，以新鮮含 HKGS 補充劑之 EpiLife 培養液繼代培養。人類癌/腫瘤細胞株 Colo-829、PC3、MCF7、HepG2 與 Tera-2 係自美國

菌種培養中心(ATCC, Rockville, MD)取得，並依廠商建議條件培養。在microRNA的轉染中，將15 μ g的分離miR-302及/或其前驅物溶於混合有50 μ l 微脂體/多聚體DNA轉染劑(X-tremeGENE HP DNA transfection reagent)的EpiLife培養液中。經10分鐘培養後，將該混合液分別加至在100 mm細胞培養皿內達50%~60% 滿盤(confluency)的hpESCs或癌/腫瘤細胞上。在12至18小時後，以新鮮含HKGS補充劑之EpiLife培養液或ATCC建議的條件培養液更換原先的培養液。可每3~4天重複轉染步驟3~4次以增加轉染效率。當細胞形態轉變為球樣，則以補充有20%血清替代品(Knockout serum)、1% MEM非必需胺基酸、100 μ M β -巯基乙醇、1 mM GlutaMax、1 mM丙酮酸鈉、10 ng/ml 鹼性成纖維細胞生長因子(bFGF)、10 ng/ml FGF-4、5 ng/ml LIF、100 IU/ml盤尼西林/100 μ g/ml鏈黴素、0.1 μ M A83-01、以及0.1 μ M 丙戊酸 (Stemgent, San Diego, CA) 之knockout DMEM/F-12培養液以及37°C、5% CO₂的條件培養與繼代該些細胞(mirPSCs)。

實施例20

質體DNA/總RNA/microRNA提取

【00154】 將以質體轉型(實施例18)之勝任大腸桿菌DH5 α 細胞於37°C 隔夜培養於補充有10 mM硫酸鎂及0.2 mM葡萄糖的LB培養基中，並以170 rpm頻繁震盪之。在細菌培養及擴增以外，上述培養基之每1公升並另添加0.5~2 ml MOPS以誘發真核啟動子驅動之核糖核酸及/或蛋白質生產。使用質體純化工具(HiSpeed plasmid purification kit, Qiagen, Valencia, CA) 將所有擴增的質體DNA及所表現的mRNA/microRNAs前驅物(pre-miRNAs)一起分離出來；其中分離步驟係依據製造商建議步驟但同時作些許調整，即不將核糖核酸酶RNase A加至P1緩衝液內。包含質體及mRNAs/pre-miRNAs兩者的最終提取產物係溶解於經DEPC處理的二次水(ddH₂O)中，並存放於-80°C直到使用。若僅要純化擴增的質體載體，則依據製造商建議步驟將核糖核酸酶

RNase A加至P1緩衝液內。

實施例21

Mir-302及其前驅物純化

【00155】 進一步使用*mirVana*TM miRNA分離工具(Ambion, Austin, TX)純化以實施例20之方法分離出來的RNA總體，依據製造商建議。終產物係溶解於經DEPC處理的二次水(ddH₂O)中，並存放於-80°C直到使用。由於細菌RNAs在自然情況下降解非常快速(幾小時)，但真核poly-A RNAs (mRNAs)及髮夾樣的microRNA前驅物(pre-miRNA/pro-miRNA)於4°C下相對穩定(半生期可至3~4天)，吾人可利用此差異性取得純的mRNAs及/或pre-miRNAs/pro-miRNAs以供之後應用。舉例來說，RGFP的mRNA可用於轉染細胞的驗明，而pre-miR-302s/pro-miRNAs可用於重新編程體細胞為胚胎幹細胞樣(hES-like)的iPS細胞，或處理人類腫瘤/癌細胞。純化的pre-miR-302s/pro-mir-302s亦能用於將高度惡性癌細胞重新編程為相對良性的低階狀態。此係有益於癌症治療的結果。

實施例22

活體傷口癒合及組織修復/再生試驗

【00156】 Pro-miR-302s及其相關質體載體係以描述於實施例18及20的方法擴增與萃取，並以描述於實施例20與21的方法進一步純化。接著，分離之pro-miR-302s係以預先準備的含有可可脂、棉籽油、橄欖油、丙酮酸鈉、以及白凡士林的軟膏基劑配製。該pro-mir-302在準備的軟膏基劑內的濃度為約10 µg/mL。由解剖刀割開皮膚來產生皮膚的開放性傷口；產生大約0.5*0.5平方公分的傷口。將軟膏(約0.3 mL)直接塗在傷口上，覆蓋整個受傷區域。接著，進一步以液體繃帶(liquid bandage)將處理的區域封好。

實施例23

活體肝癌治療試驗

【00157】 吾人將人類惡性肝腫瘤異種移植到免疫功能不足的SCID-beige小鼠體內，建立研究肝癌轉移及治療的有效動物模型。為建立此一模型，吾人將五百萬個人類肝癌細胞(HepG2)與100 μL 基質膠(matrix gel)混合，並將該混合體於小鼠後肢的脅腹進行皮下植入。因此，小鼠兩側後肢有大約同樣質量的癌細胞植入體。在植入後約兩週對該惡性腫瘤進行觀察；其中該腫瘤大小平均約為 $15.6 \pm 8 \text{ mm}^3$ (即治療前腫瘤的起始大小)。在每隻小鼠身上，吾人選擇具有較大腫瘤之一側作為實驗組；腫瘤較小之另一側則作為控制組。由於同一小鼠之一側係以空白配方劑處理(負控制組)，另一側則以含pro-mir-302的配方藥處理，因此可得到個體間差異最小化的結果。

【00158】 為傳遞pro-mir-302至活體內標的的癌症區域，吾人採用專業製劑公司Latitude (San Diego, CA)的方法與產品，以微脂體包裹pro-mir-302，並形成直徑160至200 nm的顆粒。這些含有pro-mir-302的奈米顆粒經測試在室溫兩週、在 4°C 一個月幾乎是100%穩定；相較之下，在相同條件下，其他合成的siRNA等擬物(siRNA-302)在3至5天當中快速降解超過50%，指出係pro-miRNA而非siRNA足夠穩定來作為治療藥物。為進行毒性測試，吾人進一步將最大量為300 μL 配置的pro-mir-302(1 mg/mL)分別注射至小鼠尾靜脈($n = 8$)；在超過六個月的期間，吾人在所有受測小鼠身上沒有觀察到可測得的副作用。一般來說，未修飾的核酸相對來說係不產生免疫性，且能由組織細胞輕易代謝，因此可作為活體治療的安全工具。

【00159】 為測試藥效力，吾人在小鼠一側以200 μL 配製的pro-mir-302進行皮下注射，並在另一側注射200 μL 空白配方試劑，並且每週一次、共三次連續以相同方式注射。該藥物與試劑係施予腫瘤所在位置的周圍區域，且在18小時內為腫瘤及其周圍組織吸收。在第三次注射後一周收集樣本。

取出心、肝、腎以及植入的惡性腫瘤以進行進一步組織學評估。其中，以觸診監測腫瘤的形成，並以(長×寬²)/2的公式計算腫瘤體積。此外，亦對腫瘤進行計數、解剖、與秤重，並以蘇木紫-伊紅染色(H&E)及免疫染色試驗進行組織學檢驗。組織學檢驗未顯示在心、肝，及腎中有偵測得到的組織病變。結果示於圖15、16與17。

【00160】 表格一：實施例4之相關序列

探針	序列
Oct3/4	5'-GCAGTGTGGG TTTCGGGCAC TGCAGGAACA AATTCTCCAG GTTGCCTCTC ACTCGGTTCT CGATACTGGT TCGCTTCTC TTTCGGGCCT GCACGAGGGT TTCTGCTTTG-3' (SEQ.ID.NO.26)
Sox2	5'-TGCTGTAGGT GGGCGAGCCG TTCATGTAGG TCTGCGAGCT GGTCATGGAG TTGTACTGCA GGGCGCTCAC GTCGTAGCGG TGCATGGGCT GCATCTGCGC TGCGCCGTGC-3' (SEQ.ID.NO.27)
Nanog	5'-CGTGTGAGGC ATCTCAGCAG AAGACATTG CAAGGATGGA TAGTTTTCTT CAGGCCACA AATCACAGGC ATAGGTGAAG ATTCTTTACA GTCGGATGCT TCAAAGCAAG-3' (SEQ.ID.NO.28)
Lin28	5'-AGGTCCGGTG ACACGGATGG ATTCCAGACC CTTGGCTGAC TTCTTAAAGG TGAACTCCAC TGCCTCACCC TCCTTCAAGC TCCGGAACCC TTCCATGTGC AGCTTACTCT-3' (SEQ.ID.NO.29)
UTF1	5'-CTGCTGGGCC AGCGCGGCCG ACACGCGGCG GTAGGTGGGC AGGGCCTGGC GGCGGTCCAG GAGCAGCGCG CGCCACACGG CCGGTTGCAG CAGCGTCCCC AGCAGCAGCT-3' (SEQ.ID.NO.30)
Klf4	5'-CTGCTCGACG GCGACGACGA AGAGGAGGCT GACGCTGACG AGGACACGGT GGCGGCCACT GACTCCGGAG GATGGGTCAG CGAATTGGAG AGAATAAAGT CCAGGTCCAG -3' (SEQ.ID.NO.31)
FUT3	5'-GAGCCCTAGG GGATCCAGTG GCATCGTCTC GGGACACACG CAGGTAGGAG AAGAAACACA CAGCCACCAG CAGCTGAAAT AGCAGTGCGG CCAGACAGCG GCGCCATGGC-3' (SEQ.ID.NO.32)
紅色 螢光蛋白	5'-CGAAGGGGTT GCCGTCGCC TCGCCCTCGC ACTTGAAGTA GTGGCCGTTT ACGGTGCCCT CCATGTACAT CTTGATGCGC AACTCTCTCT TCAGCAGGCC GCTCACCATA-3' (SEQ.ID.NO.33)
β-肌動蛋 白	5'-AATGTCACGC ACGATTTCCC GCTCGGCCGT GGTGGTGAAG CTGTAGCCGC GCTCGGTGAG GATCTTCATG AGGTAGTCAG TCAGGTCCCG GCCAGCCAGG TCCAGAGCGA-3' (SEQ.ID.NO.34)

【引用文獻】

【00161】 以下參考文獻以其全文的形式引入本文作為參考：

1. Lin et al. (2008). Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* *14*, 2115-2124.
2. Lin et al. (2010). MicroRNA miR-302 inhibits the tumorigenicity of human pluripotent stem cells by coordinate suppression of CDK2 and CDK4/6 cell cycle pathways. *Cancer Res.* *70*, 9473-9482.
3. Lin et al. (2011). Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res.* *39*, 1054-1065.
4. Takahashi et al. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.
5. Yu et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917-1920.
6. Wernig et al. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* *448*, 318-324.
7. Wang et al. (2008). Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat. Genet.* *40*, 1478-1483.
8. Deng et al. (1995). Mice lacking p21Cip1/Waf undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* *82*, 675-684.
9. Yabuta et al. (2007). Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *J Biol Chem.* *282*, 19259-19271.
10. Judson et al. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol.* *27*, 459-461.

11. Barroso-deUesus et al. (2008) Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol.* *28*, 6609-6619.
12. Ying SY and Lin SL. (2004). Intron-derived microRNAs - Fine tuning of gene functions. *Gene* *342*, 25-28.
13. Suh et al. (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* *270*, 488-498.
14. Tang et al. (2007). Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev.* *21*, 644-648.
15. Lin et al. (2003). A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochem Biophys Res Commun.* *310*, 754-760.
16. Lin et al. (2006) Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. *Methods Mol Biol.* *342*, 295-312.
17. Grimm et al. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* *441*, 537-541.
18. Lin et al. (2005). Asymmetry of intronic pre-microRNA structures in functional RISC assembly. *Gene* *356*, 32-38.
19. Marson et al. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* *134*, 521-533.
20. Card et al. (2008). Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* *28*, 6426-6438.
21. Jacobs et al. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* *397*, 164-168.
22. Parry et al. (1995). Lack of cyclin D - Cdk complexes in Rb-negative cells correlated

- with high levels of p16INK4/MTS1 tumor suppressor gene product. *EMBO J.* *14*, 503-511.
23. Quelle et al. (1995). Alternative reading frames of the NK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* *83*, 993-1000.
24. Kamijo et al. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* *91*, 649-659.
25. Burdon et al. (2002). Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* *12*, 432-438.
26. Jirmanova et al. (2002). Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* *21*, 5515-5528.
27. Stead et al. (2002). Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene* *21*, 8320-8333.
28. Andrews et al. (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest.* *50*, 147-162.
29. Banito et al. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Gene Dev.* *23*, 2134-2139.
30. Feng et al. (2010). Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cell* *in press*.
31. Dimri et al. (2002). The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* *62*, 4736-4745.
32. Won et al. (2002). Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. *J Biol Chem.* *277*, 38230-38238.

33. Zhu et al. (2008). Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is required for the transcriptional repression of the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. PloS One 3, e1446.
34. EU Pat. No. EP2198025 to Lin.
35. U.S. Pat. No. 5,843,780, 6,200,806, 7,029,913, and 7,220,584 to Thomson.
36. U.S. Pat. No. 6,090,622, 6,245,566, and 6,331,406 to Gearhart.
37. U.S. Pat. No. 6,875,607 to Reubinoff.
38. U.S. Pat. No. 7,250,255 to Shinya Yamanaka.

【00162】 應當理解的是：本文中描述的實施例和實施方式僅僅用於說明的目的，根據它們所做的各種修飾或改變對於本領域的技術人員來說都是能夠想到的，並且包含在本發明的所附權利要求的精神和範圍內。所有的出版物和專利文獻以其全部內容引入本文作為各種目的的參考。

序列表

(1) 一般資訊:

(iii) 序列數: 18

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 12 鹼基對

(B) 類型: 核酸

(C) 鏈型: 單鏈

(D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 不是

(iv) 反義: 不是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

GCTAAGCCAG GC

12

(3) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 12 鹼基對

(B) 類型: 核酸

(C) 鏈型: 單鏈

(D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 不是

(iv) 反義: 不是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:
GCCTGGCTTA GC

12

(4) SEQ ID NO:3 的信息:

(i) 序列特徵:

- (A) 長度: 17 鹼基對
- (B) 類型: 核酸
- (C) 鏈型: 單鏈
- (D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: RNA

(iii) 假定的: 不是

(iv) 反義: 不是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:
UAAGUGCUUC CAUGUUU

17

(5) SEQ ID NO:4 的信息:

(i) 序列特徵:

- (A) 長度: 8 鹼基對
- (B) 類型: 核酸
- (C) 鏈型: 單鏈
- (D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 不是

(iv) 反義: 不是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:
GTAAGAGK

8

(6) SEQ ID NO:5 的信息:

(i) 序列特徵:

- (A) 長度: 10 鹼基對
- (B) 類型: 核酸
- (C) 鏈型: 單鏈
- (D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

- (A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 不是

(iv) 反義: 不是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:
GWKSCYRCAG

10

(7) SEQ ID NO:6 的信息:

(i) 序列特徵:

- (A) 長度: 7 鹼基對
- (B) 類型: 核酸
- (C) 鏈型: 單鏈
- (D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

- (A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 不是

(iv) 反義: 不是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:
TACTWAY

7

(8) SEQ ID NO:7 的信息:

(i) 序列特徵:

- (A) 長度: 17 鹼基對
- (B) 類型: 核酸
- (C) 鏈型: 單鏈
- (D) 拓撲結構: 線性

- (ii) 分子類型: 其它核酸
 - (A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 不是

(iv) 反義: 不是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:
TYTYCTTTTT TTTTTS

17

(9) SEQ ID NO:8 的信息:

- (i) 序列特徵:
 - (A) 長度: 19 鹼基對
 - (B) 類型: 核酸
 - (C) 鏈型: 單鏈
 - (D) 拓撲結構: 線性

- (ii) 分子類型: 其它核酸
 - (A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 不是

(iv) 反義: 不是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:
TCTCTCTC TCTCNCTAG

19

(10) SEQ ID NO: 9 的信息:

- (i) 序列特徵:
 - (A) 長度: 91 鹼基對
 - (B) 類型: 核酸

- (C) 鏈型: 單鏈
- (D) 拓撲結構: 線性

- (ii) 分子類型: 其它核酸
 - (A) 描述: /desc = "合成的"

- (iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:
 GTCACGCGTT CCCACCACTT AAACGTGGAT GTA CTTGCTT
 TGAAACTAAA GAAGTAAGTG CTTCCATGTT TTGGTGATGG
 ATAGATCTCT C 91

- (11) SEQ ID NO:10 的信息:

- (i) 序列特徵:
 - (A) 長度: 91 鹼基對
 - (B) 類型: 核酸
 - (C) 鏈型: 單鏈
 - (D) 拓撲結構: 線性

- (ii) 分子類型: 其它核酸
 - (A) 描述: /desc = "合成的"

- (iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:
 GAGAGATCTA TCCATCACCA AAACATGGAA GCACTTACTT
 CTTTAGTTTC AAAGCAAGTA CATCCACGTT TAAGTGGTGG
 GAACGCGTGA C 91

- (12) SEQ ID NO:11 的信息:

- (i) 序列特徵:
 - (A) 長度: 95 鹼基對
 - (B) 類型: 核酸
 - (C) 鏈型: 單鏈
 - (D) 拓撲結構: 線性

- (ii) 分子類型: 其它核酸
 (A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:
 ATAGATCTCT CGCTCCCTTC AACTTTAACA TGGAAGTGCT
 TTCTGTGACT TTGAAAGTAA GTGCTTCCAT GTTTTAGTAG
 GAGTCGCTCA TATGA 95

(13) SEQ ID NO:12 的信息:

- (i) 序列特徵:
 (A) 長度: 95 鹼基對
 (B) 類型: 核酸
 (C) 鏈型: 單鏈
 (D) 拓撲結構: 線性

- (ii) 分子類型: 其它核酸
 (A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:
 TCATATGAGC GACTCCTACT AAAACATGGA AGCACTTACT
 TTCAAAGTCA CAGAAAGCAC TTCCATGTTA AAGTTGAAGG
 GAGCGAGAGA TCTAT 95

(14) SEQ ID NO:13 的信息:

- (i) 序列特徵:
 (A) 長度: 90 鹼基對
 (B) 類型: 核酸
 (C) 鏈型: 單鏈
 (D) 拓撲結構: 線性

- (ii) 分子類型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:

CCATATGGCT ACCTTTGCTT TAACATGGAG GTACCTGCTG
TGTGAAACAG AAGTAAGTGC TTCCATGTTT CAGTGGAGGC
GTCTAGACAT

90

(15) SEQ ID NO:14 的信息:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 90 鹼基對

(B) 類型: 核酸

(C) 鏈型: 單鏈

(D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:

ATGTCTAGAC GCCTCCACTG AAACATGGAA GCACTTACTT
CTGTTTCACA CAGCAGGTAC CTCCATGTTA AAGCAAAGGT
AGCCATATGG

90

(16) SEQ ID NO:15 的信息:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 82 鹼基對

(B) 類型: 核酸

(C) 鏈型: 單鏈

(D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:15:

CGTCTAGACA TAACACTCAA ACATGGAAGC ACTTAGCTAA
GCCAGGCTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGT TCGCGATCGC AT

82

(17) SEQ ID NO:16 的信息:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 82 鹼基對

(B) 類型: 核酸

(C) 鏈型: 單鏈

(D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:16:

ATGCGATCGC GAACACTCAA ACATGGAAGC ACTTAGCCTG
GCTTAGCTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGT TATGTCTAGA CG

82

(18) SEQ ID NO:17 的信息:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 105 鹼基對

(B) 類型: 核酸

(C) 鏈型: 單鏈

(D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

(A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:17:

GCAGATCTCG AGGTACCGAC GCGTCCTCTT TACTTTAACA
TGGAAATTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGG TGTGGCGCGA
TCGATATCTC TAGAGGATCC ACATC

105

(19) SEQ ID NO:18 的信息:

(i) 序列特徵:

- (A) 長度: 105 鹼基對
- (B) 類型: 核酸
- (C) 鏈型: 單鏈
- (D) 拓撲結構: 線性

(ii) 分子類型: 其它核酸

- (A) 描述: /desc = "合成的"

(iii) 假定的: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:18:

GATGTGGATC CTCTAGAGAT ATCGATCGCG CCACACCACT
CAAACATGGA AGCACTTAAT TTCCATGTTA AAGTAAAGAG
GACGCGTCGG TACCTCGAGA TCTGC

105

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese
序列表

<110> Lin, Shi-lung 林希龍
Wu, David TS 吳堂熙

<120> 新穎治療用抗癌藥的製造與使用/Production and Utilization of a Novel Anti-Cancer Drug In Therapy

<130> 13P044002TWA00

<150> US 61/746,786
<151> 2012-12-28

<150> US 61/761,890
<151> 2013-02-07

<150> US 12/792,413
<151> 2010-06-02

<150> US 13/572,263
<151> 2012-08-10

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 12
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 1
gctaagccag gc 12

<210> 2
<211> 12
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 2
gcctggctta gc 12

<210> 3
<211> 17
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 3
uaagugcuuc cauguuu 17

<210> 4
<211> 8
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 4
gtaagagk 8

<210> 5
<211> 10

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

<212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 5
 gwksycrcag 10

 <210> 6
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 6
 tactway 7

 <210> 7
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 7
 tytycttttt tttttts 17

 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n is a, c, g, or t

 <400> 8
 tctctctctc tctcnctag 19

 <210> 9
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 9
 gtcacgcggtt cccaccactt aaacgtggat gtacttgctt tgaactaaa gaagtaagtg 60
 cttccatggtt ttgggatgg atagaictct c 91

 <210> 10
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 10

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

gagagatcta tccatcacca aaacatggaa gcacttactt ctttagtttc aaagcaagta 60
 catccacggt taagtgggtg gaacgcgtga c 91

<210> 11
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

<400> 11
 atagatctct cgctcccttc aactttaaca tggaagtgct tictgtgact ttgaaagtaa 60
 gtgcttccat gtttagtag gagtcgctca tatga 95

<210> 12
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

<400> 12
 tcatatgagc gactcctact aaaacatgga agcacttact ticaaagtca cagaaagcac 60
 ttccatgtta aagtgaagg gagcgagaga tctat 95

<210> 13
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

<400> 13
 ccatatggct accittgctt taacatggag gtacctgctg tgtgaaacag aagtaagtgc 60
 ttccatgttt cagtggaggc gictagacat 90

<210> 14
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

<400> 14
 atgtctagac gctccactg aaacatggaa gcacttactt ctgtttcaca cagcaggtac 60
 ctccatgtta aagcaaagg agccatatgg 90

<210> 15
 <211> 82
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

<400> 15
 cgtctagaca taacactcaa acatggaagc acttagctaa gccaggctaa gtgcttccat 60
 gtttgagtgt tcgcatcgc at 82

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

<210> 16
 <211> 82
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 16
 atgcatcg gcgaactcaa acatggaagc acttagcctg gcttagctaa gtgcttccat 60
 gtttgagtgt tatgtctaga cg 82

 <210> 17
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 17
 gcagatctcg aggtaccgac gcgtcctctt tactttaaca tggaaattaa gtgcttccat 60
 gtttgagtgg tgtggcgcga tcgatatctc tagaggatcc acatc 105

 <210> 18
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 18
 gatgtggatc ctctagagat atcgatcgcg ccacaccact caaacatgga agcacttaat 60
 ttccatgtta aagtaaagag gacgcgctcg tacttcgaga tctgc 105

 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 19
 tcactgaaac atggaagcac tta 23

 <210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 引子

 <400> 20
 gaggctggag cagaaggatt gctttgg 27

 <210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 引子

 <400> 21

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

ccctcctgac ccatcacctc caccacc

27

<210> 22
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 引子

<400> 22

tggttagggtt ggttttaaat ttttg

25

<210> 23
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 引子

<400> 23

aaccaccct tataaattct caatta

26

<210> 24
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

<400> 24

aatccgtcga gcagagtt

18

<210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

<400> 25

gtgtaaccct aaccctaacc c

21

<210> 26
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

<400> 26

gcagtgtagg tttcgggcac tgcaggaaca aattctccag gttgcctctc actcggttct

60

cgatactggt tcgctttctc tttcgggcct gcacgagggt ttctgctttg

110

<210> 27
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

<400> 27

tgctgtaggt gggcgagccg ttcattgtagg tctgcgagct ggtcatggag ttgtactgca

60

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

gggcgctcac gtcgtagcgg tgcattggct gcatctgcg tgcgcoctgc 110

<210> 28
<211> 110
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 28
cgtgtgaggc atctcagcag aagacatttg caaggatgga tagttttctt caggcccaca 60
aatcacaggc ataggtgaag attctttaca gtcggatgct tcaaagcaag 110

<210> 29
<211> 110
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 29
aggctccgtg acacggatgg attccagacc cttggctgac ttcttaaagg tgaactccac 60
tgctcacc tccttcaagc tccggaaccc ttccatgtgc agcttactct 110

<210> 30
<211> 110
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 30
ctgctgggcc agcgcggccg acacgcggcg gtaggtgggc agggcctggc ggcggctccag 60
gagcagcgcg cgccacacgg cgggttcag cagcgtcccc agcagcagct 110

<210> 31
<211> 110
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 31
ctgctcgacg gcgacgacga agaggaggct gacgctgacg aggacacggt ggcggccact 60
gactccggag gatgggtcag cgaattggag agaataaagt ccaggtccag 110

<210> 32
<211> 110
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 32
gagccctagg ggaaccagt gcatcgtctc gggacacacg caggtaggag aagaaacaca 60
cagccaccag cagctgaaat agcagtgccg ccagacagcg gcgcatggc 110

<210> 33

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

<211> 110
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 33
 cgaaggggtt gccgtcgccc tcgccctcgc acttgaagta gtggccgttc acggtgccct 60
 ccatgtacat cttgatgcmc atactctcct tcagcaggcc gctcaccata 110

<210> 34
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 34
 aatgtcacgc acgatttccc gctcggccgt ggtggtgaag ctgtagccgc gctcggtgag 60
 gatcttcatg aggtagtcag tcaggtcccg gccagccagg tccagagcga 110

<210> 35
 <211> 6
 <212> RNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 35
 guragu 6

<210> 36
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 36
 gtaagaggat 10

<210> 37
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 37
 gtaagagt 8

<210> 38
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 38
 gtagagt 7

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

<210> 39
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 39
 gtaagt 6

<210> 40
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n is a, c, g, t or u

 <400> 40
 ctrayng 7

<210> 41
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 41
 gatatcctgc ag 12

<210> 42
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 42
 ggctgcag 8

<210> 43
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 43
 ccacag 6

<210> 44
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

 <400> 44

tactaac	7
<210> 45	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 化學合成寡核苷酸	
<400> 45	
tacttat	7
<210> 46	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 化學合成寡核苷酸	
<400> 46	
wuccaagggg g	11
<210> 47	
<211> 5	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 化學合成寡核苷酸	
<400> 47	
gtaag	5
<210> 48	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 化學合成寡核苷酸	
<400> 48	
ctgcag	6
<210> 49	
<211> 69	
<212> RNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 化學合成寡核苷酸	
<400> 49	
ccaccacuua aacguggaug uacuugcuuu gaaacuaaag aaguaagugc uuccauguuu	60
uggugaugg	69
<210> 50	
<211> 73	
<212> RNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 化學合成寡核苷酸	
<400> 50	
gcucccuca acuuuaacau ggaagugcuu ucugugacuu ugaaaguaag ugcuuccaug	60

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

uuuuaguagg agu 73

<210> 51
<211> 68
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 51
ccuuugcuuu aacauggagg uaccugcugu gugaaacaga aguaagugcu uccauguuuc 60
aguggagg 68

<210> 52
<211> 62
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 52
uaacacucuaa acauggaagc acuuagcuaa gccaggcuaa gugcuuccau guuugagugu 60
uc 62

<210> 53
<211> 23
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 53
uaagugcuuc cauguuuugg uga 23

<210> 54
<211> 23
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 54
uaagugcuuc cauguuuuag uag 23

<210> 55
<211> 23
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 55
uaagugcuuc cauguucag ugg 23

<210> 56
<211> 23
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

<400> 56		
uaagugcuuc cauguuugag ugu		23
<210> 57		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 57		
gtttcagtat tagatgcact ta		22
<210> 58		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 58		
attttgagaa tgctgacact tt		22
<210> 59		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 59		
gcacgatttc attgaacact tc		22
<210> 60		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 60		
cctgtgatgc tgggcacttc		20
<210> 61		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 61		
ccattccatt cgaaaagcac ttt		23
<210> 62		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 62		
aggctcagat gtcgtaattt gcactta		27
<210> 63		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 63		
cagcaatgac tgtgatgcac tta		23
<210> 64		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 64		
ttggaaagca ggcaagactt t		21

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

<210> 65
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 65
 actctccaac aattagaagc acctta 26

<210> 66
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 66
 caggaagaat tgaagaact tc 22

<210> 67
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 67
 ggcagaagt tttgaatgca ctta 24

<210> 68
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 68
 ttaccccaaa ttcattgagc actta 25

<210> 69
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 69
 tcatagaaac tgtctagcac ttc 23

<210> 70
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 70
 tcaaaaaacc ttataagcac tta 23

<210> 71
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人造序列
 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸
 <400> 71
 uaagugcuuc cauguuuugg uga 23

<210> 72
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人造序列
 <220>
 <223> 化學合成寡核苷酸

13P044002TWA00 - sequence listing_ST25_in Chinese

<400> 72
uaagugcuuc cauguuuuag uag 23

<210> 73
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 73
uaagugcuuc cauguuucag ugg 23

<210> 74
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 74
uaagugcuuc cauguuugag ugu 23

<210> 75
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成寡核苷酸

<400> 75
uaagugcuuc cauguuuuag ugu 23

201629227

發明摘要

※ 申請案號：106104456

※ 申請日：104.2.10.

※IPC 分類：

C12N15/70 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61K31/5375 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

新穎治療用抗癌藥的製造與使用/

Production and Utilization of a Novel Anti-Cancer Drug in Therapy

【中文】

本發明一般而言係關於一種使用微型核糖核酸(microRNA、miRNA)及/或其小髮夾型核糖核酸(shRNA)同源物/類似物/衍生物，發展新穎的抗腫瘤及/或抗癌藥物、疫苗與治療的設計及方法。具體而言，本發明係關於使用原核細胞生產之microRNA前驅物(pro-miRNA)組成物。該組成物被傳送至人類細胞、經處理為成熟的miRNA效應子，並對於能為mir-302標的的基因引發特定靜默效應，接著產生有益腫瘤抑制及癌症治療的結果。原核細胞在自然情況下不表現或處理真核miRNA前驅物(pre-miRNA)。本發明亦教示一種使用原核轉錄系統表現pre-miRNAs，特別是mir-302前驅物的可誘導式方法。由於mir-302對於人類是一腫瘤抑制子，此新穎發現促進了新抗癌藥物、疫苗及/或針對各種人類腫瘤與癌症之治療在設計及方法上的發展。

【英文】

This invention generally relates to a design and method for developing novel anti-tumor and/or anti-cancer drugs, vaccines and therapies, using microRNA and/or its shRNA homologues/mimics/derivatives. More specifically, the present invention relates to a use of a prokaryote-produced miRNA precursor (pro-miRNA) composition capable of being delivered into human cells and processed by the cells into mature miRNA effectors to elicit specific silencing effects on mir-302-targeted genes, subsequently leading to a beneficial result of tumor suppression and cancer therapy. The prokaryotic cells do not naturally express or process eukaryotic miRNA precursors (pre-miRNA); meanwhile, the present invention also teaches an inducible method for expressing pre-miRNAs, particularly mir-302 precursors by using the prokaryotic transcription system. Since mir-302 is a known tumor suppressor in human, this novel finding advances the design and method for developing new anti-cancer drugs, vaccines and/or therapies directed against multiple kinds of human tumors and cancers.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

申請專利範圍

1. 一種使用一核酸組成物引發腫瘤抑制以及癌症治療效應的方法，該核酸組成物被傳送以及在一人類細胞基質內被處理成至少一類 mir-302 基因靜默效應子，引發特定基因的靜默效應以抑制 mir-302 標的的細胞週期調節者及/或致癌基因，從而抑制及/或預防腫瘤/癌細胞生長；其中該至少一類 mir-302 基因靜默效應子含有 SEQ.ID.NO.3 所示序列且該人類細胞基質含有一正常人類細胞、一人類癌細胞或衍生自一腫瘤的一人類細胞。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該人類細胞基質含有一人類細胞，該人類細胞之分類屬於發現於畸胎瘤的一腫瘤細胞類型。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該核酸組成物含有一序列，該序列與 mir-302 享有超過 85% 的同源性。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該核酸組成物進一步含有一核糖核酸啟動子，用以表現該類 mir-302 基因靜默效應子。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該核酸組成物用於藥學及/或治療應用。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該類 mir-302 基因靜默效應子進一步含有一環，該環具有 SEQ.ID.NO.1 或 SEQ.ID.NO.2 所示序列。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該類 mir-302 基因靜默效應子進一步與 SEQ.ID.NO.3 所示序列含有同源性、或與 SEQ.ID.NO.3 所示序列互補或兩者皆是。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中使用核酸組成物的步驟進一步包含提供一重組核酸組成物。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中提供該重組核酸組成物的步驟進一步包含將由一 SEQ.ID.NO.9 所示序列、一 SEQ.ID.NO.10 所示序列、一 SEQ.ID.NO.11 所示序列、一 SEQ.ID.NO.12 所示序列、一 SEQ.ID.NO.13 所示序列、一 SEQ.ID.NO.14 所示序列、一 SEQ.ID.NO.15 所示序列、一 SEQ.ID.NO.16 所示序列及其組合的雜合物接合連接，形成至少一類

- mir-302 基因靜默效應子。
10. 如申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中提供該重組核酸組成物的步驟進一步包含雜合一 SEQ.ID.NO.17 所示序列與一 SEQ.ID.NO.18 所示序列，形成至少一類 mir-302 基因靜默效應子。
 11. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該至少一類 mir-302 基因靜默效應子包含 mir-302a、mir-302b、mir-302c、mir-302d 及其髮夾樣微型核糖核酸前驅物(pre-miRNA)，以及人工重設小髮夾型核糖核酸(shRNA)、小干擾核糖核酸(siRNA)等擬物、其同源物/衍生物以及其組合。
 12. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中所述特定基因的靜默效應之引發進一步包含抑制 mir-302 標的的細胞週期調節者及/或致癌基因，藉以將高度惡性腫瘤重新編程為相對低階且良性的狀態。
 13. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該類 mir-302 基因靜默效應子係用於藥學及/或治療應用。
 14. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該 mir-302 標的的細胞週期調節者與致癌基因係選自 CDK2、CDK4、CDK6、cyclin D、BMI-1，及其組合。
 15. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該核酸組成物由一基因傳遞方法遞送至該人類細胞基質。
 16. 如申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中提供該重組核酸組成物的步驟進一步包含化學合成該重組核酸組成物或自培養細胞提取該重組核酸組成物。
 17. 一種使用 pro-mir-302 引發腫瘤抑制以及癌症治療效應的方法，該 pro-mir-302 被傳送以及在一人類細胞基質內被處理成至少一類 mir-302 基因靜默效應子，引發特定基因的靜默效應以抑制 mir-302 標的的細胞週期調節者及/或致癌基因，從而抑制及/或預防腫瘤/癌細胞生長；其中該至少一類 mir-302 基因靜默效應子含有 SEQ.ID.NO.3 所示序列且該人類細胞基

質含有一正常人類細胞、一人類癌細胞或衍生自一腫瘤的一人類細胞。

18. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該人類細胞基質含有一人類細胞，該人類細胞之分類屬於發現於畸胎瘤的一腫瘤細胞類型。
19. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中使用該 pro-mir-302 的步驟進一步包含自原核勝任細胞提供該 pro-mir-302。
20. 如申請專利範圍第 19 項所述之方法，其中該 pro-mir-302 由該原核勝任細胞產生，且為一微型核糖核酸的前驅物；其中該前驅微型核糖核酸與 mir-302 同源。
21. 如申請專利範圍第 19 項所述之方法，其中該提供該 pro-mir-302 的步驟進一步包含自該原核勝任細胞分離提取物或溶解產物。
22. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中引發該特定基因的靜默效應的步驟進一步包含使該 pro-mir-302 在該人類細胞基質內經處理為 mir-302a、mir-302b、mir-302c 及/或 mir-302d。
23. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中所述特定基因的靜默效應之引發進一步包含抑制 mir-302 標的的細胞週期調節者及/或致癌基因，藉以將高度惡性腫瘤重新編程為相對低階且良性的狀態。
24. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該 pro-mir-302 由一基因傳遞方法遞送至該人類細胞基質。
25. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該 pro-mir-302 用來作為治療人類肝癌的一藥物。
26. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該 pro-mir-302 係用於藥學及/或治療應用。
27. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該 mir-302 標的的細胞週期調節者與致癌基因係選自 CDK2、CDK4、CDK6、cyclin D、BMI-1，及其組合。
28. 一種引發腫瘤抑制以及癌症治療效應的核酸組成物，該核酸組成物被傳

送以及在一人類細胞基質內被處理成至少一類 mir-302 基因靜默效應子，引發特定基因的靜默效應以抑制 mir-302 標的的細胞週期調節者及/或致癌基因，從而抑制及/或預防腫瘤/癌細胞生長；其中該至少一類 mir-302 基因靜默效應子含有 SEQ.ID.NO.3 所示序列且該人類細胞基質含有一正常人類細胞、一人類癌細胞或衍生自一腫瘤的一人類細胞。

29. 如申請專利範圍第 28 項所述之組成物，其中該核酸組成物含有一序列，該序列與 mir-302 享有超過 85% 的同源性。
30. 如申請專利範圍第 28 項所述之組成物，其中該核酸組成物進一步含有一核糖核酸啟動子，用以表現該類 mir-302 基因靜默效應子。
31. 如申請專利範圍第 28 項所述之組成物，其中該類 mir-302 基因靜默效應子進一步含有一環，該環具有 SEQ.ID.NO.1 或 SEQ.ID.NO.2 所示序列。
32. 如申請專利範圍第 28 項所述之組成物，其中該類 mir-302 基因靜默效應子進一步與 SEQ.ID.NO.3 所示序列含有同源性、或與 SEQ.ID.NO.3 所示序列互補或兩者皆是。
33. 如申請專利範圍第 28 項所述之組成物，其中該類 mir-302 基因靜默效應子由一 SEQ.ID.NO.9 所示序列、一 SEQ.ID.NO.10 所示序列、一 SEQ.ID.NO.11 所示序列、一 SEQ.ID.NO.12 所示序列、一 SEQ.ID.NO.13 所示序列、一 SEQ.ID.NO.14 所示序列、一 SEQ.ID.NO.15 所示序列、一 SEQ.ID.NO.16 所示序列及其組合的雜合物經接合連接形成。
34. 如申請專利範圍第 28 項所述之組成物，其中該類 mir-302 基因靜默效應子係由一 SEQ.ID.NO.17 所示序列與一 SEQ.ID.NO.18 所示序列雜合而形成。
35. 如申請專利範圍第 28 項所述之組成物，其中該至少一類 mir-302 基因靜默效應子包含 mir-302a、mir-302b、mir-302c、mir-302d 及其髮夾樣微型核糖核酸前驅物(pre-miRNA、pro-miRNA)，以及人工重設小髮夾型核糖核酸(shRNA)、小干擾核糖核酸(siRNA)等擬物、其同源物/衍生物以及其組

合。

36. 如申請專利範圍第 28 項所述之組成物，其中該 mir-302 標的的細胞週期調節者與致癌基因係選自 CDK2、CDK4、CDK6、cyclin D、BMI-1，及其組合。

申請專利範圍

1. 一種生產微型核糖核酸前驅物(pre-miRNA)的組成物，其中該組成物能將惡性人類癌重新編程為一較低階且良性，或者正常的狀態，藉以用於開發治療用抗癌藥；該組成物包含：
 - (a)至少一化學誘導物，含有一 3-嗎啉丙烷磺酸(3-morpholinopropane-1-sulfonic acid, MOPS)、乙醇、甘油，或其混合物的分子結構；
 - (b)至少一轉型的原核細胞株，攜帶至少一表現載體，該至少一表現載體藉由一真核啟動子表現該微型核糖核酸前驅物；其中(a)與(b)在一條件下混合，並引發由該真核啟動子驅動的該微型核糖核酸前驅物的轉錄。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該化學誘導物為一轉錄誘導物，該轉錄誘導物在原核細胞內刺激由該真核啟動子驅動的核糖核酸的轉錄。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該原核細胞在一細菌培養基中；該化學誘導物添加於該細菌培養基，且於該細菌培養基具有 0.05% (v/v)至 0.2% (v/v)的最終濃度。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之組成物，其中該細菌培養基為 LB 培養基。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該原核細胞為大腸桿菌(*E. coli*)DH5 α 的勝任細胞。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該表現載體為編碼 SEQ.ID.NO.3 所示序列的重組質體。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該表現載體為 pLenti-EF1 α -RGFP-miR302。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該微型核糖核酸前驅物含有至少一 SEQ.ID.NO.3 所示序列。
9. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該微型核糖核酸為一種原核細胞生產的微型核糖核酸(pro-miRNA)。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之組成物，其中該原核細胞生產的微型核糖核酸含有至少一 SEQ.ID.NO.9、一 SEQ.ID.NO.11、一 SEQ.ID.NO.13、一 SEQ.ID.NO.15 或一 SEQ.ID.NO.17 所示序列。
11. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該微型核糖核酸係用於藥學或治療應用。
12. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該真核啓動子為第二型核糖核酸聚合酶(pol-2)啓動子或似 pol-2 啓動子。
13. 如申請專利範圍第 12 項所述之組成物，其中該 pol-2 啓動子為 EF1 α 的啓動子。
14. 如申請專利範圍第 12 項所述之組成物，其中該似 pol-2 啓動子為一 CMV 啓動子。
15. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該條件為 37°C 頻繁震盪的 LB 培養基。
16. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該抗癌藥的抗癌機制包含癌逆轉；在癌逆轉中，體外、離體或活體內惡性且高度的人類癌經重新編程為一低階或正常的狀態。
17. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該人類癌含有腫瘤或癌細胞。
18. 一種生產微型核糖核酸前驅物(pre-miRNA)的方法，其中該微型核糖核酸前驅物能將惡性人類癌重新編程為一低階且良性、或者正常的狀態，藉以用於開發治療用抗癌藥；該方法包含：
 - (a) 提供至少一化學誘導物，該至少一化學誘導物含有一 3-嗎啉丙烷磺酸(3-morpholinopropane-1-sulfonic acid, MOPS)、乙醇、甘油，或其混合物的分子結構；
 - (b) 提供至少一轉型的原核細胞株，該至少一轉型的原核細胞株攜帶至少一表現載體，該至少一表現載體藉由一真核啓動子表現該微型核糖核酸前

驅物；

(c)在一條件下混合(a)與(b)，並引發由該真核啓動子驅動的該微型核糖核酸前驅物的轉錄。

19. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該化學誘導物為一轉錄誘導物，該轉錄誘導物在原核細胞內刺激由該真核啓動子驅動的核糖核酸的轉錄。

20. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該提供該原核細胞的步驟進一步包含提供該原核細胞於一細菌培養基；該混合(a)與(b)的步驟進一步包含添加該化學誘導物於該細菌培養基至 0.05% (v/v)至 0.2% (v/v)的最終濃度。

21. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中該細菌培養基為 LB 培養基。

22. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該原核細胞為大腸桿菌(*E. coli*)DH5 α 的勝任細胞。

23. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該表現載體為編碼 SEQ.ID.NO.3 所示序列的重組質體。

24. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該表現載體為 pLenti-EF1 α -RGFP-miR302。

25. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該微型核糖核酸前驅物含有至少一 SEQ.ID.NO.3 所示序列。

26. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該微型核糖核酸為一種原核細胞生產的微型核糖核酸(pro-miRNA)。

27. 如申請專利範圍第 26 項所述之方法，其中該原核細胞生產的微型核糖核酸含有至少一 SEQ.ID.NO.9、一 SEQ.ID.NO.11、一 SEQ.ID.NO.13、一 SEQ.ID.NO.15 或一 SEQ.ID.NO.17 所示序列。

28. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該微型核糖核酸係用於藥學或治療應用。

29. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該真核啓動子爲第二型核糖核酸聚合酶(pol-2)啓動子或似 pol-2 啓動子。
30. 如申請專利範圍第 27 項所述之方法，其中該 pol-2 啓動子爲 EF1 α 的啓動子。
31. 如申請專利範圍第 27 項所述之方法，其中該似 pol-2 啓動子爲一 CMV 啓動子。
32. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該條件爲 37°C 頻繁震盪的 LB 培養基。
33. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該抗癌藥的抗癌機制包含癌逆轉；在癌逆轉中，體外、離體或活體內惡性且高度的人類癌經重新編程爲一低階或正常的狀態。
34. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該人類癌含有腫瘤或癌細胞。