



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I698526 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 11 日

(21)申請案號：104117573

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 29 日

(51)Int. Cl. : C12N5/074 (2010.01)

(30)優先權：2014/05/30 美國

14/292,317

(71)申請人：美商綠陽生物科技及製藥公司 (美國) ALLELE BIOTECHNOLOGY AND
PHARMACEUTICALS, INC. (US)

美國

(72)發明人：王 繼武 WANG, JIWU (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2012/012708A1

Rosa AI, Brivanlou AH., Synthetic mRNAs: powerful tools for
reprogramming and differentiation of human cells., Cell Stem Cell.
2010 Nov 5;7(5):p.549-550.

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：21 項 圖式數：8 共 47 頁

(54)名稱

利用合成之信使RNA進行之人類誘導型多能幹細胞之無餵養細胞衍化 (DERIVATION)

(57)摘要

本發明大體上係關於使用工程化重新編程因子，透過動力學控制過程建立誘導型多能幹細胞(iPSC)之新穎方法及組合物。具體言之，本發明係關於建立經最佳化以用於重新編程各種類型細胞之重新編程因子之組合(包括習知重新編程因子與轉活化域之間之融合)。更具體言之，本文所揭示之例示性方法可用於自各種哺乳動物細胞類型(包括人類纖維母細胞)建立誘導型多能幹細胞。亦揭示使用合成之信使RNA進行人類誘導型多能幹細胞之無餵養細胞衍化(derivation)之例示性方法。

The present disclosure relates generally to novel methods and compositions for using engineered reprogramming factor(s) for the creation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) through a kinetically controlled process. Specifically, this disclosure relates to establishing combinations of reprogramming factors, including fusions between conventional reprogramming factors with transactivation domains, optimized for reprogramming various types of cells. More specifically, the exemplary methods disclosed herein can be used for creating induced pluripotent stem cells from various mammalian cell types, including human fibroblasts. Exemplary methods of feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells using synthetic messenger RNA are also disclosed.

指定代表圖：

A

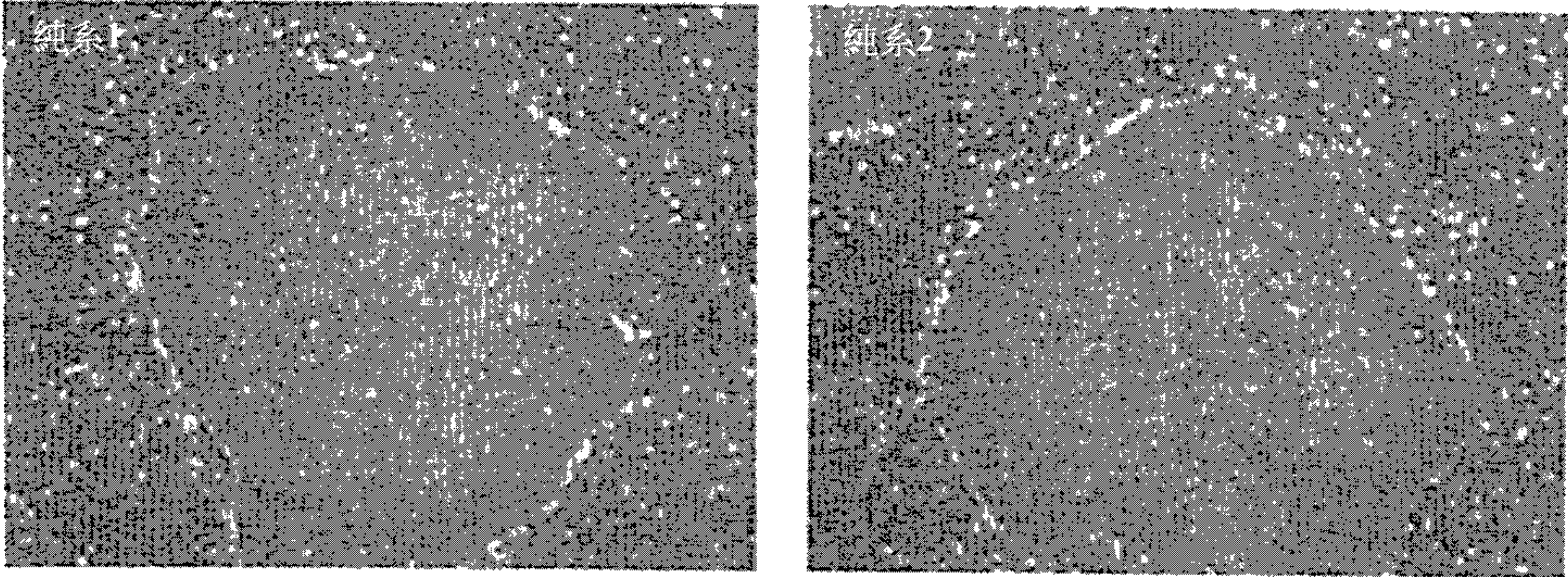


圖1

B

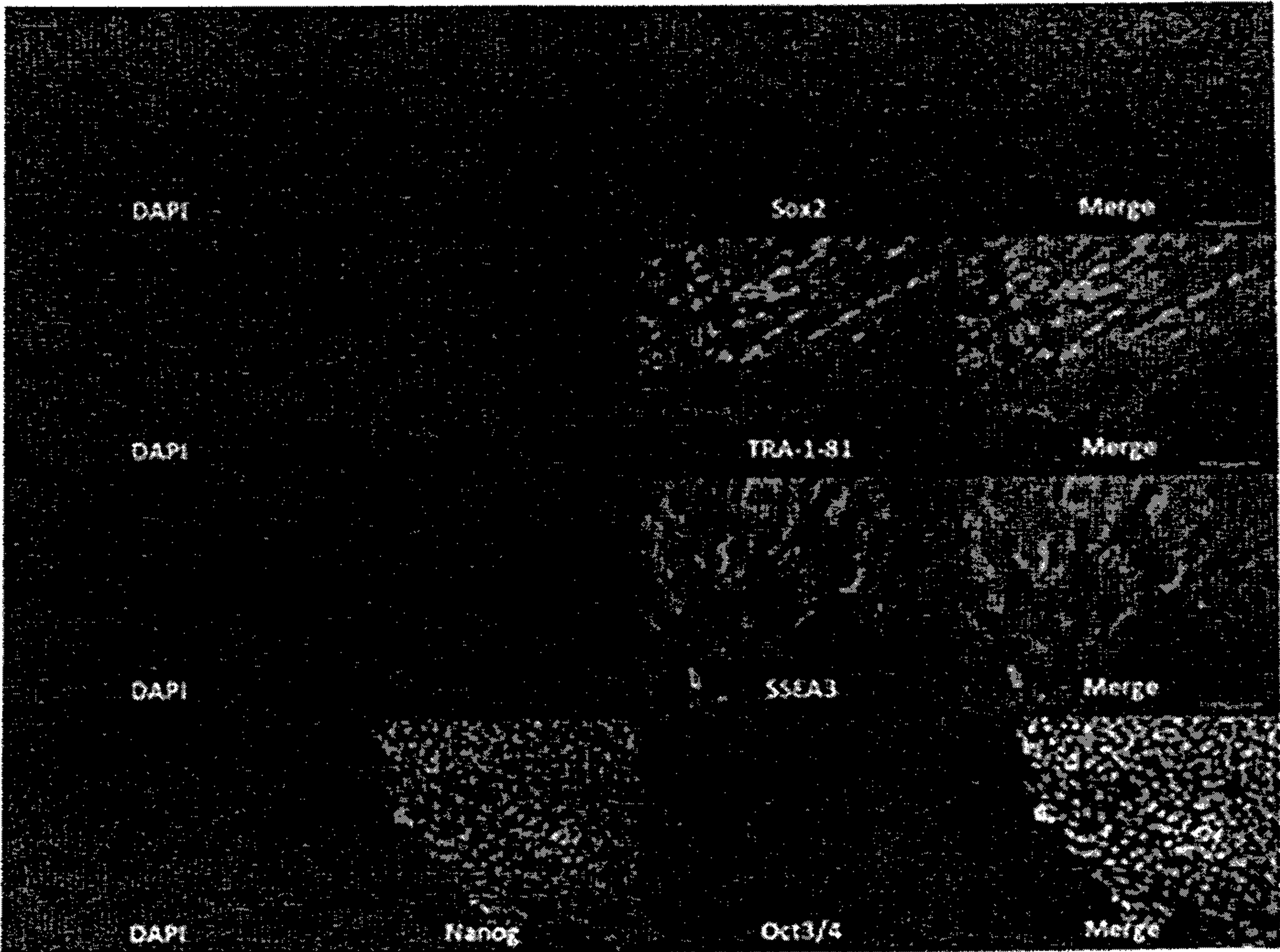


圖1(續圖)

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】

利用合成之信使RNA進行之人類誘導型多能幹細胞之無餵養細胞衍化(DERIVATION)

FEEDER-FREE DERIVATION OF HUMAN-INDUCED
PLURIPOTENT STEM CELLS WITH SYNTHETIC MESSENGER
RNA

【中文】

本發明大體上係關於使用工程化重新編程因子，透過動力學控制過程建立誘導型多能幹細胞(iPSC)之新穎方法及組合物。具體言之，本發明係關於建立經最佳化以用於重新編程各種類型細胞之重新編程因子之組合(包括習知重新編程因子與轉活化域之間之融合)。更具體言之，本文所揭示之例示性方法可用於自各種哺乳動物細胞類型(包括人類纖維母細胞)建立誘導型多能幹細胞。亦揭示使用合成之信使RNA進行人類誘導型多能幹細胞之無餵養細胞衍化(derivation)之例示性方法。

【英文】

The present disclosure relates generally to novel methods and compositions for using engineered reprogramming factor(s) for the creation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) through a kinetically controlled process. Specifically, this disclosure relates to establishing combinations of reprogramming factors, including fusions between conventional reprogramming factors with transactivation domains, optimized for reprogramming various types of cells. More specifically, the exemplary methods disclosed herein can be used for creating induced pluripotent stem cells from various mammalian cell types, including human fibroblasts. Exemplary methods of feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells using synthetic messenger RNA are also disclosed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

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】

利用合成之信使RNA進行之人類誘導型多能幹細胞之無餵養細胞衍化(DERIVATION)

FEEDER-FREE DERIVATION OF HUMAN-INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS WITH SYNTHETIC MESSENGER RNA

相關申請案

本申請案主張2013年5月13日申請之美國申請案序號13/893,166之權益，且為該案之部份接續申請案；其主張2012年5月13日申請之美國臨時申請案申請案序號61/646,292之優先權。各案件之內容係以其全文引用的方式併入本文中。

【技術領域】

本發明大體上係關於使用工程化重新編程因子透過控制過程建立誘導型多能幹細胞(iPSC)之新穎方法及組合物。具體言之，本發明係關於建立經最佳化以用於重新編程各種細胞類型之重新編程因子之組合(包括習知重新編程因子與轉活化域之間之融合)。更具體言之，本文所揭示之例示性方法可用於自各種哺乳動物細胞類型(包括非人類的靈長類動物細胞)建立誘導型多能幹細胞。亦揭示使用合成之信使RNA進行人類誘導型多能幹細胞之無餵養細胞衍化(derivation)之例示性方法。

【先前技術】

下文包括可用於瞭解本發明之各種態樣及實施例之資訊。並非承認本文所提供之任何資訊為先前技術，或與當前所描述之或所主張

5

之發明相關，或具體或含蓄引入之任何公開案或文獻為先前技術。

誘導型多能幹細胞(iPSC)之治療潛力促使致力於開發迴避需要基因修飾體細胞以實現重新編程至多能狀態之重新編程方法。於此點上達成成就之第一「非整合」方法(蛋白質轉導、質體轉染及使用腺病毒載體)由於所達成iPSC轉化之低效率所致而在應用上受到限制。近來，已顯示使用基因附體型DNA(episomal DNA)、仙台病毒(Sendai virus)及合成之信使RNA(mRNA)的技術以類似於或優於彼等使用整合病毒載體所達成者之效率產生「無足跡(footprint-free)」iPSC。原則上，RNA轉染因其可精確控制重新編程因子(RF)表現時程同時完全迴避「清潔」經重新編程之細胞以清除殘餘痕量之載體之任何需求而成為此等方法中最具吸引力者。然而，基於mRNA之重新編程的當前方案相當地勞動密集，因為需要持續~2週每天進行再轉染，該時間係誘導人類細胞之多能性所需。此等程序亦仰賴於餵養細胞之使用，此增加過程之複雜性及技術可變性，同時引入受非人類衍化(「異源物(xeno)»)之生物材料污染之可能來源。

產生誘導型多能幹細胞(iPSC)之主要困難為重新編程分化細胞成多能細胞之低效率。先前已報告小鼠胚胎纖維母細胞(MEF)中有5%在連同Sox2、Klf4及c-Myc(SK-M)利用包含Oct4及MyoD之轉活化域(稱作M3O)之融合基因轉導時重新編程成iPSC。此外，M3O促進大多數經轉導MEF(包括不變成iPSC之細胞)中之多能性基因之染色質重塑。此等觀察顯示細胞中超過5%已獲得在給予更有利培養條件下變成iPSC之能力之可能性。

【發明內容】

使用mRNA成功重新編程非人類起源的細胞尚屬未知，由於RNA分子在其轉染至細胞(特定言之哺乳動物細胞)中時所誘導之可能細胞免疫反應的緣故。在重新編程人類纖維母細胞中，常用的操作係使用

病毒蛋白質作為誘餌受體以鈍化由經轉染mRNA分子誘導之干擾素。然而，此使用誘餌受體之策略或其他類似策略在非人類物種(包括狒狒、馬及狗)之纖維母細胞之重新編程中尚未取得成功。

因此，為解決此等不足之處，本發明提供用於產生能夠產生身體所有不同組織之幹細胞之方法及組合物。在某些態樣中，使用信使RNA分子且不需要病毒載體或餵養細胞，本文所揭示之方法可用於重新編程非人類纖維母細胞成誘導型多能幹細胞(iPSC)。使用例示性方法及組合物，達成優於先前報告之細胞重新編程方法之驚人且出人意料之改良效率，及克服先前尚未解決的抑制非人類哺乳動物細胞中之細胞免疫反應之問題。

因此，提供可用於藉由改良重新編程因子(RF)混合物(cocktail)(尤其透過施用習知重新編程因子(諸如Oct4(亦稱作Oct3/4)、Sox2等)之併有已知強轉錄因子(諸如VP16及MyoD)之轉活化域之工程化變體)來促進mRNA介導之重新編程之方法、試劑及/或組合物。本文所揭示之方法及組合物達成顯著減少基於mRNA的重新編程中所涉及之時間、成本及努力之無餵養細胞方案。

在一個態樣中，本發明提供一種用於使體細胞去分化或重新編程之方法，該方法包括：a)利用包含有效量之選自Oct4、Sox2、Klf4、cMyc、Nanog及Lin28之合成性mRNA重新編程因子中之任何一者或多者與轉活化域之融合產物的組合物轉染經分離之體細胞，藉以使得體細胞重新編程或去分化。

在一個實施例中，提供技術方案1之方法，其中該組合物包含融合至N端MyoD轉活化域之Oct4。在一個實施例中，該Oct4係以三重串接方式(in tandem triplicates)融合至N-端MyoD轉活化域。

在一個態樣中，提供一種藉由使用如技術方案1之合成性mRNA重新編程因子中之一或多者重新編程哺乳動物細胞之方法，該方法包

括：a)以15 k至500 k個細胞/標準6孔盤孔之密度使標靶細胞生長於無餵養細胞表面；b)在重新編程期間每次利用可變劑量之50 ng至800 ng/ml mRNA轉染細胞。

在一個實施例中，該等標靶細胞係以30 k、75 k、100 k或150 k個細胞/標準6孔盤孔之密度生長於無餵養細胞表面；b)在重新編程期間每次利用可變劑量之50 ng至800 ng/ml mRNA轉染細胞，而較早時間點所使用之劑量低於較晚時間點；c)在未繼代培養下獲得iPSC。

在一個實施例中，該等標靶細胞係以15 k、75 k、100 k或150 k個細胞/標準6孔盤孔之密度生長於無餵養細胞表面，而各孔之體積係經調整為介於0.5 ml與5 ml適宜培養基之間；在重新編程期間每次利用可變劑量之50 ng至800 ng/ml mRNA轉染細胞，而較早時間點所使用之劑量低於較晚時間點；在未繼代培養下獲得iPSC。

在某些實施例中，在整個重新編程過程中使用較低劑量減小細胞免疫反應且獲得改良之iPSC成功率。在其他實施例中，使用較高純度之mRNA分子(亦即，不存在來自活體外轉錄之污染性異常性轉錄本)允許細胞以較低密度接種且在重複轉染下存活及較高iPSC產率。

在一個實施例中，該等哺乳動物細胞為人類細胞。在一個實施例中，該方法係無外來物(Xeno-free)。在一個實施例中，該等哺乳動物細胞為非人類的靈長類動物細胞。在一個實施例中，該等非人類的靈長類動物細胞為馬來猴細胞。

在一個實施例中，該一或多種因子係選自由mRNAs、調節RNA、siRNA、miRNA及其組合組成之群。

在一個實施例中，利用至少兩種不同RNA轉染該等體細胞。在一個實施例中，該等體細胞係選自係選自由單能、多潛能(multipotent)、多能及分化細胞組成之群。在一個實施例中，該一或多種RNA誘導該等體細胞去分化成單能、多潛能或多能細胞。

在一個實施例中，該等因子中之至少一者係選自由OCT4、SOX2、NANOG、LIN28、KLF4及MYC mRNA組成之群。在一個實施例中，該OCT4、SOX2、NANOG及LIN28 mRNA係組合投與。在一個實施例中，該OCT4、SOX2、KLF4及MYC mRNA係組合投與。

在一個實施例中，該等經轉染細胞係維持在培養物中作為誘導型多能幹(iPS)細胞。在一個實施例中，該等經轉染細胞形成誘導型多能幹細胞，進一步包括誘導iPS細胞形成分化細胞。

在一個態樣中，提供一種治療或抑制患者之疾病或病症之一或多種症狀之方法，該方法包括在活體外使細胞去分化及對該患者投與該等細胞。在一個實施例中，該組合物進一步包含Rarg及LrH-1交換活化域(transaction activation domains)。在一個實施例中，該組合物包含融合至VP16轉活化域之OCT4。

在一個實施例中，本發明提供衍化自非人類的靈長類動物細胞之iPSC，其係用於建立疾病模型系統，因為其可產生無其他動物產物之非整合、無餵養細胞測試環境。因此，本文所述之非人類iPSC適用於臨床前測試。

本文描述並主張的發明具有許多屬性及其實施例，包括(但不限於)彼等記述或描述或引用於本【發明內容】中者。無意包括全部及本文描述並主張的發明不限於或受限於本【發明內容】所述之特徵或實施例，其之包含僅基於例示之目的而非限制性。其他實施例可揭示於下文【實施方式】中。

【圖式簡單說明】

圖1. 利用基於M3O的mRNA重新編程混合物衍化的iPSC集落。(A)衍化自第一基於M3O的BJ重新編程試驗之兩個經擴增iPSC純系之10×明視野影像。(B)經擴增純系之用於多能性標記之免疫染色。

圖2. 使用基於M3O的混合物之無餵養細胞重新編程。

5

(A) 顯示從50K XFF纖維母細胞上無餵養細胞衍化獲得之TRA-1-60⁺集落產率並比較基於c-Myc及L-Myc的混合物及4小時及24小時轉染方案之免疫螢光成像。對所有孔轉染9天。在實驗的第15天對4小時轉染培養物固定染色，在第11天對24小時轉染培養物固定染色。(B) 相同實驗之400 ng/ml Stemfect孔之10×明視野成像，其顯示在衍化的第9天超越培養物之接近長滿之似hESC集落。(C) 其中使用400 ng/ml Stemfect方案再次轉染100K XFF 9天之隨訪試驗中之經標記域之10×明視野時程，顯示上皮形成及於隨後出現似hESC菌落。

圖3. 使用4種不同mRNA混合物之重新編程效率之比較。流程圖概述四種混合物比較實驗。

圖4. HDF-a無餵養細胞重新編程培養中之似hESC集落。在自經使用Stemfect轉染試劑以培養基補充劑形式遞送之400 ng/ml mRNA混合物(M3O+ c-Myc⁺ Nanog⁺)處理9天之75K HDF-a成體纖維母細胞之無餵養細胞衍化第9天時的出現的似hESC集落之10×明視野影像。

圖5. 合成性mRNA混合物之產生。(A)概述製造mRNA重新編程混合物之程序之示意圖。(B)編碼SYBR E-凝膠上之若干RF及螢光報導子之合成性mRNA。每個通道中載入500 ng RNA。

圖6. 使用用於重新編程混合物之2-硫基尿嘧啶產生合成性mRNA混合物。合成性mRNA係編碼SYBR E-凝膠上之若干RF。該等mRNA之10%尿嘧啶鹼基經2-硫基尿嘧啶置換。每個通道載入100 ng RNA。

圖7. 使用具有經2-硫基尿嘧啶修飾之mRNA之mRNA混合物所建立的人類iPSC。在Pluriton(A)或Allele重新編程培養基(B)中進行不同重新編程操作期間重新編程(A)7天或(B)11天後的人類iPSC群體。

圖8. 在無餵養細胞重新編程培養中使用mRNA混合物所建立的馬來猴iPSC集落。照片中所顯示為在第10天及第13天之出現的似

hESC集落之10×明視野影像。在第10天的通道中，接近中心的細胞展現自纖維母細胞至幹細胞之形態改變。在第13天的通道中，該等細胞形成完全轉形之猴iPSC之大集落。

【實施方式】

在描述本發明時，本文中未定義的所有術語具有其為此項技藝認可之含義。在以下描述為本發明之特定實施例或特定用途之程度上，希望僅係例示性，而非所主張發明之限制。以下描述意欲涵蓋包含於本發明之精神及範疇中之所有替代物、修改物及等效物。

分化細胞可藉由所選轉錄因子群組之表現恢復至多能狀態，開啟患者特異性細胞可用於產生任何所需類型細胞以供活體外遺傳性疾病之研究且最終供細胞替代療法之前景。該等重新編程因子之表現可透過應用整合至基因組中之病毒載體來達成，而iPSC衍化仍經常使用整合性逆轉錄病毒或慢病毒進行。基因組之隨附修飾代表iPSC之治療應用之重要障礙，而即使活體外研究仍需考量經過整合之病毒序列盒進行再活化表現之可能性。最近，已在減緩或消除基因組修飾問題之新穎表現載體之應用方面取得相當顯著進步。現可獲得一種慢病毒載體，其編碼於側接lox重組位點之單一多順反子序列盒中誘導iPSC所需之多種因子，因而容許在透過過渡表現Cre重組酶重新編程後，幾近無縫切除轉基因。亦可使用轉位子載體接著短暫表現轉位酶來插入轉基因及後續之切除。已使用若干不同類型之非整合性DNA載體，其等可過渡表現重新編程因子持續一段足以誘導多能性之時間，包括腺病毒、質體及基因附體型DNA。亦已證實可藉由併有細胞穿透肽之重組RF蛋白質重複轉導細胞產生iPSC，但效率低。現可使用具有完全基於RNA的生殖週期之仙台病毒，及藉由持續轉染編碼山中因子(Yamanaka factor)之合成性mRNA轉錄本來達成相當有效之iPSC轉化。

將mRNA轉染應用於重新編程(及有潛力應用於主導分化及轉分化)係吸引人的作法，因為此系統可以每天簡單地藉由改變添加至細胞培養基之轉錄本來調節重新編程混合物及甚至個別組分因子之表現。一旦終止特定因子之轉染，於標靶細胞內之異位性表現會因細胞質中mRNA之快速衰減而立刻停止。與非整合性DNA載體或RNA病毒對比，mRNA轉染既不需要清潔，也不會存在隨機基因組整合或持續性病毒感染之任何風險。假若設想最終可能使用多次異位性RF表現操作，從患者活檢經由iPSC中間物進行至所需類型之特化細胞時，此等優點應具有更高重要性。然而，目前實施之基於mRNA的重新編程存在缺陷。雖然RF之表現在轉染mRNA後通常穩健約24小時，但因子表現需要約兩週來誘導人類細胞之多能性，因此，採用此技術使細胞重新編程所需要的操作時間(hands-on time)相當長。並非所有細胞類型及培養基同等地利於有效之mRNA傳遞，及目前此係所述特定細胞類型(包括血液細胞)之基於mRNA的重新編程之障礙。迄今，亦已證實使用經有絲分裂遏制之纖維母細胞餵養層以使用mRNA方法成功使細胞重新編程為iPSC之必要性。此等餵養細胞緩衝培養物之群體密度，因為標靶細胞在iPSC誘導所需之延長時程中自低起始密度生長，甚至超出RNA及轉染試劑(兩者均具有關聯毒性)之傳遞劑量及支持標靶細胞在面對藉由重新編程過程所產生之促細胞凋亡及細胞生長抑制力之存活率。此要求增加程序之複雜性及操作時間並引入技術可變性之重要來源，尤其假若餵養細胞本身進行轉染。餵養細胞層之存在亦有礙於重新編程過程之監測及分析。最終，雖然人類餵養細胞目前係mRNA重新編程之標準，但當非人類的動物產物用於其衍化及擴增時甚至此等細胞為異源物生物污染之可能來源。

因此，有鑑於與先前已知之程序相關聯之問題，本文中提供新穎方法、材料及及方案以產生具有改良之重新編程效率及改良之所得

細胞品質之iPSC。本發明實施例成功地用於透過增強傳遞至細胞之RF混合物達成顯著驚人且意外之改良。本發明實施例亦提供新穎的方案，該等方案壓縮及精簡mRNA重新編程過程，及支持無需使用餵養細胞或任何其他潛在性地經異源物污染之試劑自人類纖維母細胞產生無足跡iPSC。本文所提供之新穎方法及組合物將延伸先前已知之mRNA方法的優點及幫助清除iPSC技術之治療應用之其餘障礙。

本發明大體上係關於使用工程化重新編程因子透過動力學控制過程建立誘導型多能幹細胞(iPSC)之方法。更具體言之，本發明係關於建立經最佳化以用於重新編程不同類型之細胞之重新編程因子之組合(包括習知重新編程因子與轉活化域之融合)；將此等因子以合成之信使RNA(mRNA)形式以較佳密度藉由導致適宜程度之轉基因表現之方法引入至培養之哺乳動物細胞中；維持細胞於所界定條件下以獲得重新編程之先前難以達成之效率。與此項技藝中已知之其他方法相比，本發明顯著縮短重新編程中涉及之時間、成本及努力，視需要完全無餵養細胞且無異源物，及無需繼代培養。本文所揭示之材料及程序可用於自不同類型之哺乳動物細胞(包括人類纖維母細胞)建立誘導型多能幹細胞。

本發明之態樣亦提供藉由不需要病毒載體、動物產物或餵養細胞下使用信使RNA分子產生能夠產生人體之許多不同組織之幹細胞之方法。本文所揭示之新穎方法可用於使人類纖維母細胞在最佳條件下重新編程成具有驚人且意外之效率之誘導型多能幹細胞(iPSC)。

本發明提供以編碼本文所述之例示性重新編程因子之「清潔」mRNA之混合物處理非人類的哺乳動物細胞(例如纖維母細胞)之有用的方法及組合物。可使用該mRNA組合物而不引起經處理之細胞經歷與mRNA分子之引入相關聯之細胞死亡。在一個實施例中，該等非人類的哺乳動物細胞為馬來猴細胞。在另一實施例中，該等馬來猴細胞s

以某一梯度接種於孔中使得細胞以可變局部密度生長。

定義

如本文所用，適合與該方法共同使用之細胞包括(但不限於)初級細胞及已建立之細胞系、胚胎細胞、免疫細胞、幹細胞及分化細胞(包括(但不限於)衍化自外胚層、內胚層及中胚層(包括纖維母細胞、實質細胞、造血細胞及上皮細胞)之細胞)。如本文所用，幹細胞包括單能細胞、多潛能細胞及多能細胞；胚胎幹細胞及成體幹細胞，諸如造血幹細胞、間質幹細胞、上皮幹細胞、及肌肉衛星細胞。在一個實施例中，體細胞係經去分化或重新編程。可使用任何適宜之體細胞。代表性體細胞包括纖維母細胞、角質細胞、脂肪細胞、肌細胞、器官及組織細胞及各種血液細胞(包括(但不限於)造血細胞(包括造血幹細胞及提供短期或長期造血移植之細胞))。最佳之細胞類型包括(但不限於)人類纖維母細胞、角質細胞及造血幹細胞。該等方法尤其可用於使細胞去分化或視情況再分化，而無需永久性修改細胞基因組。

可用於所揭示方法之RNA包括mRNA、調節RNA或小RNA諸如siRNA或miRNA，其中該一或多種mRNA編碼發揮使細胞去分化或重新編程之作用之多肽。轉染之效率極高。通常，經轉染細胞群體之90%將表現誘導型RNA。因此，可用一或多種不同RNA轉染細胞。例如，可用一或多種不同mRNA、一或多種不同siRNA、一或多種不同miRNA或其組合轉染細胞群體。可以單次投藥方式同時用多種RNA轉染細胞群體，或可數分鐘、數小時、數天或數週地交錯多次投藥。可交錯多種不同RNA之轉染。例如，假若期望第一RNA在一或多種其他RNA之表現之前進行表現。

經轉染RNA之表現程度可藉由改變輸入RNA的量在寬範圍內控制，從而可個別地調節各經轉染RNA之表現程度。基於所需結果基礎上來確定輸入RNA之有效量。另外，mRNA生成之基於PCR的技術有

利於具有不同結構及域組合之 mRNA 之設計。可用於本發明方法之 RNA 為此項技術中已知，及將基於標靶宿主細胞類型及意欲控制之通路或細胞活性或治療應用來選擇。可基於已知基因、mRNA 或其他核苷酸或蛋白質序列構築可用於去分化細胞，例如轉化成體經分化體細胞成幹細胞之構築體。

本文中可互換使用之術語「多核苷酸」及「核酸」係指任何長度之核苷酸之聚合形式(核糖核苷酸或脫氧核糖核苷酸)。因此，此術語包括(但不限於)單股、雙股或多股 DNA 或 RNA、基因組 DNA、cDNA、DNA-RNA 混合物或包含嘌呤及嘧啶鹼基或其他天然、化學或生物修飾之非天然或衍化核苷酸鹼基之聚合物。「寡核苷酸」一般係指單股或雙股 DNA 之在約 5 與約 100 個核苷酸之間之多核苷酸。然而，基於本發明之目的，對寡核苷酸之長度沒有上限。寡核苷酸亦稱作寡聚物，及可自基因分離，或藉由此項技術中已知的方法化學合成。

如本文所用，術語「微型 RNA」係任何類型的干擾 RNA，包括(但不限於)內源性微型 RNA 及人工微型 RNA(例如，合成之 miRNA)。內源性微型 RNA 係於基因組中自然編碼之能夠調節 mRNA 之生產性利用之小 RNA。人工微型 RNA 可係除內源性微型 RNA 之外之能夠調節 mRNA 之活性之任何類型之 RNA 序列。微型 RNA 序列可係包含此等序列中之任何一者或多者之 RNA 分子。

「微型 RNA 前驅物」(或「前 miRNA」)係指其中併有微型 RNA 序列之具有幹環(stem-loop)結構之核酸。「成熟微型 RNA」(或「成熟 miRNA」)包括已自微型 RNA 前驅物(「前 miRNA」)裂解或已合成(例如，在實驗室藉由無細胞合成法合成)，且具有約 19 個核苷酸至約 27 個核苷酸長度，例如，成熟微型 RNA 可具有 19 nt、20 nt、21 nt、22 nt、23 nt、24 nt、25 nt、26 nt 或 27 nt 長度之微型 RNA。成熟微型 RNA 可結合至標靶 mRNA 且抑制標靶 mRNA 之轉譯。

5

OCT4之例示性基因組 mRNA(cDNA)及蛋白質序列為此項技術中已知，參見例如(OCT4) POU5F1 POU第5類同源異型盒(homeobox)[現代人(*Homo sapiens*)]基因ID:5460，其提供 mRNA(cDNA)序列基因庫(Genbank)寄存編號NM—001173531.1，標題為現代人POU第5類同源異型盒1(POU5F1)，轉錄本變體3，mRNA；基因庫寄存編號NM—002701.4，標題為現代人POU第5類同源異型盒1(POU5F1)轉錄本變體1，mRNA；及基因庫寄存編號NM—203289.4，標題為現代人POU第5類同源異型盒1(POU5F1)，轉錄本變體2，mRNA。SOX2之例示性基因組 mRNA(cDNA)及蛋白質序列亦為此項技術中已知，參見例如SOX2 SRY(性別決定區Y)-盒2[現代人]，基因ID:6657，其提供 mRNA(cDNA)序列基因庫寄存編號NM—003106.2，標題為mRNA序列現代人SRY(性別決定區Y)-盒2(SOX2)，mRNA。NANOG之例示性基因組 mRNA(cDNA)及蛋白質序列亦為此項技術中已知，參見例如NANOG Nanog 同源異型盒[現代人]，基因ID:79923，其提供 mRNA(cDNA)序列基因庫寄存編號NM—024865.2，標題為現代人Nanog 同源異型盒(NANOG)，mRNA。LIN28之例示性基因組 mRNA(cDNA)及蛋白質序列亦為此項技術中已知，參見例如LIN28A 同系物A(隱桿線蟲(*C. elegans*))[現代人]，基因ID:79727，其提供 mRNA(cDNA)序列Genbank寄存編號NM—024674.4，標題為現代人lin-28同系物A(隱桿線蟲)(LIN28A)，mRNA。KLF4之例示性基因組 mRNA(cDNA)及蛋白質序列為此項技術中已知，參見例如KLF4 Kruppel樣因子4(腸)[現代人]，基因ID:9314，其提供 mRNA(cDNA)序列基因庫寄存編號NM—004235.4，標題為現代人Kruppel樣因子4(腸)(KLF4)，mRNA。MYC之mRNA序列亦為此項技術中已知，參見(例如)MYC v-myc髓細胞組織增生病毒致癌基因同系物(鳥類)[現代人]，基因ID:4609，其提供 mRNA(cDNA)序列基因庫寄存編號NM—

002467.4，標題為現代人v-myc髓細胞組織增生病毒致癌基因同系物(鳥類)(MYC)，mRNA。

「幹環結構」係指包括已知或預測形成由主要單股核苷酸(環部分)之區域連接於一側上之雙股(階梯部分)之核苷酸之區域具有次級結構之核酸。本文中亦使用術語「髮夾(hairpin)」及「折回(fold-back)」結構以指幹環結構。此等結構為此項技術中所熟知且此等術語始終以其在此項技術中已知的含義使用。幹環結構內核苷酸之實際初級序列對實踐本發明並非關鍵，只要存在次級結構即可。如此項技術中已知，次級結構不需要確切鹼基配對。因此，幹可包括一或多個鹼基錯配。或者，鹼基配對可係確切的，亦即，不包括任何錯配。

如本文所用，術語「幹細胞」係指可經誘導以增殖之未分化細胞。幹細胞能夠自穩定(self-maintenance)，意味著就每次細胞分裂而言，一個子細胞亦將為幹細胞。幹細胞可獲自胚胎組織、胎兒組織、出生後組織、幼年組織或成體組織。如本文所用，術語「前身細胞」係指衍化自幹細胞之未分化細胞，而自身不係幹細胞。一些前身細胞可產生能夠分化為多於一種細胞類型之子代。

如本文所用，術語「誘導型多能幹細胞」(或「iPS細胞」)係指自體細胞(例如，分化體細胞)誘導之且具有比該體細胞高的效力的幹細胞。iPS細胞能夠自行更新且分化為成熟細胞，例如，平滑肌細胞。iPS可亦能夠分化為平滑肌前身細胞。

如本文所用，術語「經分離」在關於細胞時係指處在不同於該細胞自然產生之環境之環境中之細胞，例如，在該細胞自然產生於多細胞生物中之情況下，及自該多細胞生物移去該細胞，該細胞係「經分離」。經分離之基因修飾宿主細胞可存在於基因修飾宿主細胞之混合群體、或存在於包含基因修飾宿主細胞及未基因修飾之宿主細胞之混合群體中。例如，經分離之基因修飾宿主細胞可存在於活體外基因s

修飾宿主細胞之混合物群體、或存在於包含基因修飾宿主細胞及未基因修飾之宿主細胞之活體外混合群體中。

如本文所用，「宿主細胞」表示活體內或活體外細胞(例如，經培養作為單細胞實體之真核細胞)(該真核細胞可用作或已用作用於核酸(例如，外源核酸)之接受者)且包括該初始細胞之已經過核酸基因修飾之子代。應明瞭由於自然、意外或精密突變的緣故，單一細胞之子代在形態或基因組或總DNA互補上可不必與初始親本完全相同。

術語「基因修飾」係指細胞中在引入新核酸(即，細胞外源核酸)後誘導之永久性或過渡性基因改變。基因改變(「修飾」)可藉由併入新核酸至宿主細胞之基因組中，或藉由過渡性或穩定維持新核酸作為染色體外元件來達成。在細胞為真核細胞之情況下，永久性基因改變可藉由引入核酸至細胞之基因組中來達成。基因修飾之適宜方法包括病毒感染、轉染、接合作用、原生質體融合、電穿孔、粒子槍技術、磷酸鈣沉澱、直接微量注射及類似方法。

如本文所用，術語「外源核酸」係指非通常或自然存在於細胞中及/或實際上非由細胞產生之核酸及/或引入至細胞中(例如，藉由電穿孔、轉染、感染、脂質體轉染或引入核酸至細胞中之任何其他手段)之核酸。

如本文所用，術語「治療」及類似語係指獲得所需藥理學及/或生理學效應。該效應在完全或部分預防疾病或其症狀方面可係預防性及/或在部分或完全治癒疾病及/或可歸因於疾病之不利效應方面可係治療性。

如本文所用，「治療」包括針對哺乳動物(特別是人)之疾病之任何治療，且包括：(a)預防該疾病在可能易患該疾病但尚未確診為罹患該疾病之個體中發生；(b)抑制該疾病，亦即，阻止其發展；及(c)緩解該疾病，亦即，引起該疾病消退。

本文中可互換使用之術語「個體 (individual)」、「個體 (subject)」、「宿主」及「患者」係指哺乳動物，包括(但不限於)人類、非人類的靈長類動物、嚙齒動物(例如，小鼠、大鼠等)、有蹄類動物、犬科、兔科、貓科等。在一些實施例中，所述個體為人類。在一些實施例中，個體為非人類的非人類的動物，諸如猴、嚙齒動物或兔科。

「治療有效量」或「有效量」意指當投與個體以治療疾病時足以實現此疾病治療之化合物、核酸或許多細胞的量。「治療有效量」將視化合物或細胞、疾病及其嚴重度及待治療個體之年齡、體重等而變化。

在進一步描述本發明之前，應明瞭本發明不限於所述的特定實施例，因而當然可改變。亦應明瞭用於本文中之術語僅出於描述特定實施例之目的而無意具限制性，因為本發明之範疇將僅受限於隨附申請專利範圍。

在提供某一範圍的值情況下，應明瞭本發明中包含介於該範圍之上限與下限之間之除非本文清楚地另作指明否則至下限之十分之一單位之各個中介值及該所述範圍中之任何其他所述或中介值。此等較小範圍之上限及下限可獨立地包含於該等較小範圍中，且亦包含於本發明中，包括所述範圍中任何明確排除之限值。在所述範圍包含限值中一者或兩者之情況下，排除彼等所包含限值中任一者或兩者之範圍亦包含於本發明中。

除非另外定義，否則本文中使用的所有技術及科學術語具有本發明所屬技術之一般人員所共同瞭解的相同含義。雖然類似於或等效於彼等述於本文中者之任何方法及材料亦可用於實踐或測試本發明，然而，現仍描述較佳之方法及材料。本文所述之所有公開案以引用的方式併入本文中以揭示並描述可結合來引述公開案之方法及/或材s

料。

在本發明之一個態樣中，基於mRNA的重新編程可透過使用Oct4或Sox 2之併有N端MyoD轉活化域(Hirai等人，Stem Cells，2011)或C端三重重複之VP16轉活化域(Wang等人，EMBO Reports，2011；其中合成之重新編程因子係藉由使VP16轉活化域分別融合至OCT4(亦稱作Pou5f1)、NANOG及SOX2製得，此等合成因子可以增強之效率及加速之動力學重新編程小鼠及人類纖維母細胞二者)之工程化變體，或藉由以兩種其他因子Rarg及Lrh-1強化「標準」RF混合物(Wang等人，PNAS，2011)增強。各案件之內容係以引用的方式併入本文中。強轉錄激動子可在結合至DNA之特定位點時有效募集多種染色質重塑複合物。一良好的實例為MyoD，其係可切換分化細胞之命運之用於骨骼肌發生之主要轉錄因子。Hirai等人推測，由於MyoD為此一強轉錄因子，故可增加對iPS因子(假若融合在一起)之染色質可接近性。當連同Sox2及Klf4用帶有Oct-MyoD TAD融合基因之逆轉錄載體轉導小鼠或人類細胞時，與典型iPS因子相比，其等使得iPSC集落之數目增加~50倍。類似地，廣為人知之穩健轉錄激動子VP16可在融合至不同iPS因子時展現對重新編程的強刺激效應。

人類iPSC之例示性製法

該方法亦可廣泛用於使細胞再分化或重新編程，(例如)以產生可進一步經調節以形成以下細胞之iPS細胞：造血幹細胞、間質幹細胞、上皮幹細胞及肌肉衛星細胞、或人類組織之分化細胞，包括(但不限於)紅血球、白血球(包括淋巴細胞)、血小板、基質細胞、脂肪細胞、骨骼細胞(包括破骨細胞)、上皮組織(包括皮膚細胞)、肌肉組織(包括平滑肌、骨骼肌及心肌)、血管組織(包括內皮細胞)、肝組織(包括肝細胞)及神經組織(包括神經元)。誘導iPS細胞分化成各種分化細胞類型(包括(但不限於)心肌細胞、造血幹細胞、骨骼細胞(諸如破骨

細胞)、肝細胞、視網膜細胞及神經元、幹細胞(包括(但不限於)經分離之胚胎幹細胞、造血幹細胞及誘導型多能幹細胞))之方法可藉由用誘導分化之RNA過渡性轉染來誘導分化。另外或另一選擇，細胞可藉由在細胞類型特異性條件下培養該等細胞而再分化。例如，iPS細胞可維持於CF-1餵養細胞上且接著使其適應於無餵養細胞條件。iPS細胞可藉由在noggin、Dkk-1及IGF-1之存在下培養該等細胞，而誘導形成分化視網膜細胞。

先前報導的方法仰賴於整合載體，即，病毒或質體，以帶有經修飾之因子。在一個實施例中，進行重新編程試驗來比較包含用於mRNA重新編程之五種因子(Oct4、Sox2、Klf4、cMyc-T58A及Lin28)之轉錄本之6種不同mRNA組合混合物或包括Rarg及Lrh-1之7種重新編程因子RF混合物之性能，各組合係以基於野生型Oct4及MyoD-及VP16-Oct4融合構築體(分別命名為M3O及VPx3)之三種變化進行測試。在基於餵養細胞的重新編程培養物中轉染BJ纖維母細胞11天，此時，若干孔中出現進化形態。在接下來的數天，具有特徵性hESC形態之集落出現於經基於野生型Oct4及M3O的混合物轉染之孔中。雖然經VPx3轉染之培養物中之標靶細胞維持纖維母細胞形態，但同時顯示加速之生長及聚集成集落(foci)之一定傾向，且未出現集落。基於野生型Oct4及M3O的混合物之5-因子及7-因子實施例顯示相似的集落生產率，因此，於混合物中包含Rarg及Lrh-1未產生優點。然而，M3O混合物所產生集落數目為使用野生型Oct4時的若干倍。根據此結果，自M3O 5-因子孔挑選集落用於擴增及進一步分析(圖1)。藉由細胞核及細胞表面標記之免疫染色，及藉由活體外分化成三種主要胚芽層來證實M3O衍化的集落之多能性。對6種經擴增iPSC集落進行核型分析(karyotype analysis)及DNA指紋術，可在所有情況中證實該等細胞的核型正常態及BJ細胞譜系。

該方法亦可廣泛用於使細胞再分化或重新編程(例如)以產生可進一步經調節以形成以下細胞之iPS細胞：造血幹細胞、間質幹細胞、上皮幹細胞及肌肉衛星細胞、或人類組織之經分化細胞，包括(但不限於)紅血球細胞、白血球細胞(包括淋巴細胞)、血小板、基質細胞、脂肪細胞、骨骼細胞(包括破骨細胞)、上皮組織(包括皮膚細胞)、肌肉組織(包括平滑肌、骨骼肌及心肌)、血管組織(包括內皮細胞)、肝臟組織(包括肝細胞)及神經組織(包括神經元)。誘導iPS細胞分化成各種分化細胞類型(包括(但不限於)心肌細胞、造血幹細胞、骨骼細胞(諸如破骨細胞)、肝細胞、視網膜細胞及神經元)之方法係此項技術中已知(Song等人, *Cell Res.*, 19(11):1233-42 (2009), Lamba等人, *PLoS One*, 5(1):e8763 (2010), Gai等人, *Cell Biol Int.* 200933(11):1184-93 (2009). Grigoriadis等人, *Blood*, 115(14):2769-76 (2010))。包括(但不限於)經分離之胚胎幹細胞、造血幹細胞及誘導型多能幹細胞之幹細胞可藉由用誘導分化之RNA過渡性轉染經誘導以分化。另外或另一選擇，細胞可藉由在細胞類型特異性條件下培養該等細胞再分化。例如，iPS細胞可維持於CF-1餵養細胞上且接著使其適應於無餵養細胞條件。iPS細胞可藉由在noggin、Dkk-1及IGF-1之存在下培養該等細胞誘導以形成分化視網膜細胞。在另一態樣中，mRNA混合物之效力可進一步藉由包含Nanog轉錄本增強。在此實施例中，四個含有於餵養細胞上之50K BJ纖維母細胞之孔用基於野生型Oct4或M3O的5-因子或6-因子混合物轉染6天，及接著對各培養1:6繼代培養至新鮮餵養細胞上以填滿6-孔盤(4)。各板內之轉染再持續0至5天。在第18天(其中第0天對應於第一轉染)固定該等培養並用TRA-1-60抗體染色以評估不同混合物及轉染時程對iPSC生產率的影響。結果顯示不論所使用的Oct4變體添加Nanog至混合物極度有益，同時當在M3O與Nanog一起使用時達成最大的轉化效率。

在一個實施例中，基於M3O的5-因子或6-因子混合物之效力在使用三種其他人類纖維母細胞系(HDF-f、HDF-n及XFF)之其他基於餵養細胞的實驗中獲得證實。就所有此等三種低繼代培養細胞系而言，重新編程動力學及效率顯著改良，此展現天然群體加倍時間比正常擴增培養中之BJ快。在某些情況中，吾人從少至6天的轉染獲得似hESC集落，然而，在轉染多持續數天的實驗中產率高得多。涉及藉由添加新鮮細胞週期性強化餵養細胞層之實驗顯示雖然此策略可提供某些優點，但其等將因所得方案之複雜性而有所抵消。因此吾人決定集中於應用更有效的混合物以開發精簡無餵養細胞方案。

本發明係關於建立無餵養細胞iPSC。獨立於餵養細胞之iPSC衍化已大體上證實與使用的重新編程技術無關之一定挑戰性，而且增加持續轉染方案內容中之特定困難。對接種纖維母細胞而不折損細胞存活率及增殖活性之密度限制較小。當藉由重新編程因子之轉染及藉由重新編程因子之異位性表現對細胞施加應力時，該等細胞在稀疏培養中經歷有絲分裂遏制或細胞凋亡之傾向增大。除此之外，在基於餵養細胞的重新編程之高細胞密度特性下具良好耐受性之RNA劑量在分佈於較少數細胞中時產生較嚴重細胞毒性效應。同時，可藉由mRNA轉染達成之表現之外顯率在纖維母細胞達到長滿後顯著下降，可能歸因於與接觸抑制及G1遏制相關聯之內吞作用之下調。簇集培養中之此低轉染允許度似乎在重新編程期間於細胞經歷間質至上皮轉變(MET)後減緩。然而，通常，即使細胞以最低可存活初始密度接種，在使用當前mRNA混合物時人類纖維母細胞達成MET所需的~7天亦極難消除纖維母細胞過度生長之問題。細胞可藉由繼代培養稀釋以延遲此命運，但極難預測高應力之重新編程中間物之接種效率，及在任何情況中，基於繼代培養的衍化方案將不良地犧牲高通量應用之方便性及規模。在某些實施例中，細胞亦可以某一梯度接種於孔中使得不同局部

細胞密度可促進重複轉染。

本發明係關於MET之表型指標(纖維母細胞性過程之退化及集落及卵石形態之出現)。在一個實施例中，藉由本發明，使用經增強混合物，使用6-因子M3O混合物無需繼代培養下實現無餵養細胞重新編程，以多種低密度(每孔具有50 K相對100 K相對150 K)接種標靶細胞，來加速MET。在另一實施例中，該等細胞係以每孔總細胞數在自約15 K至500 K個細胞範圍之密度梯度接種。

本發明之一個態樣係關於此等重新編程培養之命運，此證實對接種密度高度敏感，據推測係因為過度細胞毒性及纖維母細胞過度生長之效應在轉染方案過程中均自強化。在使用「標準」RNA給藥(1200 ng/孔)之實驗中，自以100 K/孔接種之HDF-n及XFF纖維母細胞獲得數十打似hESC集落，同時對應之50 K及150 K培養分別在發生群體劇減及纖維母細胞過度生長後僅提供少量集落。於嘗試用兩種其他纖維母細胞系BJ及HDF-a進行的衍化中，甚至最具前景(150 K)培養物在達成長滿後不久變的實質上靜止，隨後僅產生具有延遲動力學之零星集落。

本發明之一個態樣係關於透過尺寸排除層析純化經活體外轉錄之mRNA以移除可單獨或與mRNA一起形成dsRNA結構之異常性RNA物種，及引起細胞免疫反應。使用此等「清潔」mRNA(具有低細胞免疫原性之mRNA)，有效地使以梯度密度生長之非人類的靈長類動物細胞重新編程。

在本發明之一個特定實施例中，從環境切換為5%氧培養及在轉染的前四天期間從四分之一劑量漸增至全RNA給藥以企圖減低應力誘導之細胞衰老至最低。

在本發明之一個實例中，使用此等新穎條件，本發明者測試L-Myc 或c-Myc之替代是否可進一步改良重新編程混合物。

在另一實施例中，吾人評估添加RNA至細胞且每天更換培養基而非在早4小時以個別步驟遞送之簡化轉染方案。在「24-小時轉染」孔中按比例縮小RNA給藥以補償預期的細胞毒性之增加，及測試兩種不同轉染試劑(RNAiMAX及Stemfect)。以50 K/孔接種XFF細胞及轉染9天。習知的「4-小時轉染」方案之每個具有基於c-Myc的混合物之孔提供約一百個TRA-1-60⁺集落，同時L-Myc混合物表現相對差(圖2)。

「24-小時轉染」培養之結果仍舊更令人印象深刻。在此等孔之最具生產性者(對應於c-Myc 400 ng/ml Stemfect條件)中，該培養中之似hESC細胞在第9天(於最後一次轉染後24小時)已變得幾乎過度生長。就「24-小時轉染」之優異性能而言之機制基礎可能已經具有藉由濃縮由細胞釋放之擴散因子增加稀釋培養之有效密度之效應。當此等較佳方案條件應用於另一實例實驗(在以75 K個細胞/孔接種之培養中進行的使用HDF-a纖維母細胞的衍化)中時，生產率不如用高增殖性XFF細胞所達成者顯著，但許多似hESC集落早在方案的第9天再次出現(圖4)。

在一特定實施例中，當細胞以小於常用體積之體積例如1 ml、0.75 ml、0.5 ml之培養基或可仍舊持續細胞培養之最小體積之培養基接種時，使用上文所揭示條件重新編程之效率明顯改良。重新編程期間之此等低體積條件因此併入本發明中。

描述於本文中之實施例絕非本發明之唯一應用。熟習此項技術者當知曉本發明亦可用於在輕度可變條件下或利用用於重新編程、定向分化或轉分化之習知或工程化因子之相似組合重新編程其他細胞。

在其他實施例中，因子化學計量之最佳化亦可增強重新編程之步伐—mRNA方法提供界定獨立地解決ipPSC誘導之早期及晚期階段之混合物之機會。藉由使用M3O獲得之增益為最近將新穎的工程化重新編程因子應用於iPSC產生提供驗證。此等工程化重新編程因子包括S

至除VP16 OR MYOD、SUCH AS GAL4、GATA1、P53等外之因子之轉活化域之融合SOX2、KLF4、CMYC、LMYC、LIN28、NANOG等。用於遞送mRNA之試劑及方法亦可用於共轉染siRNA及miRNA，此早已證實其在iPSC生成中之價值。然而，本發明所揭示之無餵養細胞方案代表勝過當前方案之實質性進步，其縮短重新編程所需要的時間多達一半及勞動及材料成本減少一半或更多，從程序中省去棘手的步驟，及允許mRNA以與生長因子或細胞因子幾近相同的情況——亦即，作為培養基補充劑遞送至細胞。

在一些實施例中，細胞經重新編程以調節免疫反應。例如，淋巴細胞可經重新編程為可投與有此需要的患者以增加或轉移免疫耐受性(特定言之自耐受性)之調節T細胞。Foxp3陽性T細胞之誘導或投與可用於減小諸如移植排斥之自體免疫反應，及/或減少、抑制或減輕諸如以下之質體免疫疾病或病症之一或多種症狀：糖尿病、多發性硬化症、哮喘、發炎性腸病、甲狀腺炎、腎病、風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、嚴重脫髮(alopecia greata)、僵直性脊髓炎、抗磷脂症候群、自體免疫阿迪森氏疾病(Addison's disease)、自體免疫溶血性貧血、自體免疫肝炎、自體免疫內耳病、自體免疫淋巴增生症候群(ALPS)、自體免疫血小板減少紫斑症(ATP)、貝西氏病(Behcet's disease)、大皰性類天疱瘡、心肌病、乳糜瀉-皮炎、慢性疲勞症候群、免疫缺陷症候群(CFIDS)、慢性脫髓鞘多發性神經炎、癩痕性類天疱瘡、冷凝集素病、Crest症候群、克羅恩氏病(Crohn's disease)、德高斯氏病(Dego's disease)、皮膚炎、幼年型皮膚炎、圓盤紅斑(discoid lupus)、原發性混合型冷球蛋白血症、纖維肌痛症—纖維肌炎、格蕾氏症(Grave's disease)、格-巴二氏症(Guillain-Barre)、橋本甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特發性肺纖維化、特發性血小板減少性紫斑(ITP)、IgA腎病、胰島素相依糖尿病(I型)、幼年型關節炎、美尼爾

氏病(Meniere's disease)、混合型結締組織疾病、多發性硬化症、重症肌無力症、尋常型天疱瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺性症候群、風濕性多肌痛、多肌炎及皮肌炎、原發性無球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化、銀屑病、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、雷德氏症候群(Reiter's syndrome)、風濕熱、類肉瘤病、硬皮病、休格倫氏症候群(Sjogren's syndrome)、僵人症候群(stiff-man syndrome)、高安氏關節炎(Takayasu arteritis)、顱動脈炎/巨細胞動脈炎、潰瘍性結腸炎、葡萄膜炎、血管炎、白斑病及韋格納肉芽腫(Wegener's granulomatosis)。

該等方法可用於產生可用於治療多種疾病及病症包括(但不限於)諸如帕金森氏症(Parkinson's)、阿茲海默氏病(Alzheimer disease)、傷口癒合及多發性硬化症之疾病之細胞。該等方法亦可用於器官再生及免疫反應之恢復或補充。例如，處在不同分化階段之細胞諸如iPS細胞、造血幹細胞、多能細胞或單能細胞(諸如前身細胞，例如上皮前身細胞)及其他細胞可經靜脈內或藉由局部手術投與。該等方法可與其他習知方法諸如處方療法、手術、激素療法、化學療法及/或放射療法組合使用。

在一個實施例中，套組包括RNA、細胞及用於轉染RNA至細胞中之裝置。該等RNA可係凍乾或呈溶液形式。套組可視情況包括其他材料，諸如細胞培養試劑。在一替代實施例中，套組提供依所揭示方法製得之再分化、去分化或重新編程細胞及儲藏及/或冷藏或冷凍運送以供後續使用。細胞通常呈溶液儲藏，從而維持存活率。包含細胞之套組應使用與存活率一致之方法諸如在包含乾冰之冷卻器中儲藏或運送使得細胞維持低於4°C且較佳低於-20°C。

該等套組視情況包括以下各物中之一或多者：生物活化劑、培養基、賦形劑及以下各物中之一或多者：針筒、針頭、掛線、紗布、S

繃帶、消毒劑、抗生素、局部麻醉劑、鎮痛藥、手術線、剪刀、解剖刀、無菌流體及無菌容器。該套組之組件可個別地經包裝及可係無菌。該等套組一般提供於容器例如適用於商業規模之塑料容器、紙板容器或金屬容器中。任何該等套組可包括使用說明書。該等方法可用於產生可用於治療多種疾病或病症包括(但不限於)神經退化性疾病諸如帕金森氏症、阿茲海默氏病及多發性硬化症之細胞。本文所揭示之方法亦可用於器官再生及免疫系統之恢復或補充。例如，處在分化之不同階段之細胞諸如iPS細胞、造血幹細胞、多能細胞或單能細胞(諸如前身細胞，例如上皮前身細胞)及其他細胞可經靜脈內或藉由局部手術投與。該等方法可與其他習知方法諸如處方療法、手術、技術療法、化學療法及/或放射療法組合使用。

本發明之態樣提供幹細胞之培養系統及用於產生用於傷口治療之皮膚組織細胞之分化方法、及用於治療關節炎、狼瘡及其他自體免疫相關疾病之幹細胞療法。

實例

現參考以下實例描述本發明。此等實例僅為例示說明之目的提供，且本發明並不受此等實例限制，而是包含證實為本文所提供教示之結果之所有變化。

實例1-IVT模板之產生

使用不依賴於連接之選殖(LIC)構築用於產生線性PCR產物活體外轉錄(IVT)模板之質體構築體。首先構築併有側有經設計以接受編碼所述蛋白質之開放閱讀框架(ORF)插入物之插入部位之5'及3'未轉譯區(UTR)之親本質體(pIVT)。ORF側有序列係如Warren等人, Cell Stem Cell, 2010中所述，其包含低次級結構前導及強Kozak部位(5' UTR)及鼠科 α -球蛋白3' UTR。PIVT載體之具有5'突出物之線性化變型係藉由再退火兩種使用定製引物自該質體擴增之PCR產物製得。藉由類似程

序製造具有互補突出物之ORF PCR產物，用載體PCR產物組併在一起及藉由熱衝擊轉形至DH5 α 細菌中以選殖基因特異性構築體(pIVT-KLF4等)。所得質體用於模板化PCR反應以製造併有T7啟動子、側有UTR的ORF及T120尾巴以驅動添加聚A尾巴之線性IVT模板，如Warren等人，Cell Stem Cell, 2010中描述。透過使用定製反向引物(T120CTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA)引入T120尾巴區。就M3O及VPx3融合構築體而言，轉活化域編碼序列係藉由PCR使用定製引物添加至ORF。PCR產物模板原液維持在~100 ng/uL之濃度。

實例2-製造mRNA混合物

mRNA合成方法概述於圖5中。使用ARCA帽類似物對GTP之4:1比率在IVT反應中生成合成性mRNA以產生出高比例之加帽轉錄本。在核苷三磷酸(NTP)混合物中使用CTP改由5m-CTP及UTP改由假-UTP之完全代換以降低RNA產物之免疫原性。帽類似物及經修飾NTP係購自Trilink Biotechnologies。製備2.5 $\times$ NTP混合物(ARCA:ATP:5m-CTP:GTP:假-UTP為15:15:3.75:3.75:3.75 mM)以更換與用於進行IVT反應之MEGAscript T7套組(Ambion)一起提供之標準NTP。各40 uL IVT反應包含16 uL NTP混合物、4 uL 10 $\times$ T7緩衝劑、16 uL DNA模板及4 uL T7酵素。在37 $^{\circ}$ C下培養反應4至6小時且接著在37 $^{\circ}$ C下用2 uL TURBO Dnase再處理15分鐘，接著於MEGAclean(Ambion)離心柱上純化，該等RNA產物以100 uL之體積溶出。為自未加帽轉錄本移除免疫原性5'三磷酸部分，對各製劑添加10 uL南極磷酸酶(Antarctic Phosphatase)反應緩衝液及3 uL南極磷酸酶(NEB)。在37 $^{\circ}$ C下培養磷酸酶反應30分鐘及再純化該等IVT產物。RNA產率藉由Nanodrop(Thermo Scientific)定量化，及因此該等製劑藉由添加TE pH 7.0(Ambion)調整至100 ng/uL之標準化工作濃度。RNA混合物係藉由以所需化學計量比率將代表各種RF之製劑併在一起組裝。所使用的s

各RF的分率考慮各別轉錄本之預測分子量，除了以3×莫耳濃度包含的Oct4及其衍生物之外，所有RF係等莫耳。添加最大10%的編碼短壽命核化單體LanYFP螢光蛋白質之mRNA至該等混合物以促進監測重新編程試驗期間之轉染效率。在其他實施例中，亦藉由使用總尿嘧啶之25%或10%的2-硫基尿嘧啶來製造mRNA(參見圖6)。

實例3-細胞及培養基

經標靶以供重新編程之細胞包括BJ新生兒纖維母細胞(ATCC)、HDF-f胎兒纖維母細胞、HDF-n新生兒纖維母細胞及HDF-a成體纖維母細胞(ScienCell)及XFF無外源物新生兒纖維母細胞(Millipore)。就BJ、HDF及XFF細胞而言，分別在BJ培養基(DMEM+10% FBS)、ScienCell纖維母細胞培養基及FibroGRO無外源物人類纖維母細胞擴增培養基(Millipore)中進行擴增培養。所使用的餵養細胞係3001G照射之新生兒人類包皮纖維母細胞(GlobalStem)及FibroGRO絲裂黴素C-非活性無外源物人類新生兒纖維母細胞(Millipore)。使用TrypLE Select(Gibco)(為無動物產物細胞裂解試劑)進行與基於無外源物餵養細胞及無餵養細胞重新編程試驗相關之細胞繼代培養步驟。

實例4-人類纖維母細胞之重新編程

所述之所有重新編程實驗係依製造商指示在塗佈CELLstart(Gibco)無外源物受質之6孔組織培養盤中實施。在BJ重新編程實驗開始時使用包含FBS之BJ培養基以250 K/孔接種GlobalStem餵養細胞。在一些稍後的基於餵養細胞之試驗中，接種密度增加及特別在培養基更換期間補充餵養細胞以企圖維持近長滿餵養細胞層以回應於使用新穎RF混合物所遭遇到的高損耗率。將無外源物餵養細胞(當使用時)接種於不含血清之基於Pluriton的重新編程培養基中。將標靶細胞接種於Pluriton無血清培養基(Stemgent)加抗生素、Pluriton補充劑及200 ng/ml B18R干擾素抑制劑(eBioscience)中。在重新編程期間

及之後每天更換培養基，在最終轉染後的次日停止B18R補充。在其中細胞於重新編程期間分裂至新鮮培養細胞上之實驗中，用於再接種之培養基中包含10 uM Y27632(Stemgent)。轉染從接種標靶細胞後的次日開始，及在本文所示的持續時間以24小時間隔時間重複。在每天的培養基更換前4小時使用RNAiMAX(Invitrogen)遞送1200 ng之RNA劑量至各孔，除了另外註明之外。基於RNAiMAX的轉染混合物係藉由稀釋100 ng/uL RNA 5×於無鈣/鎂DPBS及稀釋5 uL RNAiMAX/ug RNA 10×於相同稀釋劑中，併在一起以產生10 ng/uL RNA/媒劑懸浮液及15-分鐘室溫培養後分配至培養基製得。就使用Stemfect試劑(Stemgent)之轉染而言，使RNA及Stemfect(4 uL/1 ug RNA)在Stemfect緩衝液中混合以提供10 ng/uL之RNA濃度。培養該混合物15分鐘，接著遞送至培養基或冷藏以待後續使用。

在其他實施例中，人類纖維母細胞之重新編程亦在除pluriton外之培養基例如Allele重新編程培養基中進行(參見圖7)。在一些實施例中，完全不使用B18R，在其他實施例中，僅有些轉染中使用B18R。

實例5. iPSC集落之特徵分析

為評估iPSC集落生產率，使用含於DPBS(具有鈣/鎂)中之4%多聚甲醛固定重新編程培養物並用100×稀釋於DPBS(具有鈣/鎂)中之StainAlive TRA-1-60 Alexa 488抗體(Stemgent)免疫染色。進行用於多能性之分子及功能性驗證之集落選取、擴增及後續免疫染色及三系分化分析。實施DNA指紋術及核型分析。進行畸胎瘤形成及在多於一組小鼠模型中得以證實。由此展現幹細胞之多能性。

揭示一種藉由使標靶細胞與工程化重新編程因子及非工程化重新編程因子之組合以使得iPSC可在約9天(有時短為6天或甚至5天)產生之方式接觸使非幹細胞高效地重新編程成多能幹細胞的新穎方法。此等iPS細胞可呈無餵養細胞、無外源物及無足跡iPSC形式產生。除s

藉由本發明方法顯著提高重新編程之效率外，該新穎技術亦與所有先前已知的技術的區別在於如此建立的iPSC係「清潔」，因為其從未與任何病毒或載體接觸。本發明之效用可在涉及幹細胞建立、分化、細胞及發育研究中之效用、及臨床應用之實質上所有領域中發現。相似的程序亦可用於定向分化及轉分化。

實例6-馬來猴纖維母細胞之重新編程

使用馬來猴纖維母細胞之重新編程實驗係依製造商指示在塗佈CELLstart(Gibco)受質之6孔組織培養盤中實施。將標靶細胞接種於Allele Biotech的無血清培養基加抗生素中。連續12天在使用或不使用B18R下每天於重新編程期間及之後改由連同新鮮培養基一起遞送之經2-硫基修飾之mRNA/轉染試劑混合物更換培養基(圖8)。猴iPSC之集落在第9天開始出現，且達到成熟階段，在第12天達到緊緻集落階段。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種使哺乳動物體細胞去分化或重新編程(reprogramming)之無餵養細胞(feeder-free)、無異源物(xeno-free)、非整合(integration-free)方法，該方法包括：利用包含以下之組合物轉染經分離之非人類的靈長類動物體細胞：

(i)有效量之編碼重新編程因子Oct4融合至N端MyoD轉活化域的經純化之合成mRNA；及(ii)編碼重新編程因子Sox2、Klf4、cMyc、Nanog及Lin28的經純化之合成mRNA，藉以使體細胞重新編程或去分化；

其中該合成mRNA經過純化而移除在用於生產該合成mRNA的活體外轉錄反應期間產生之異常性RNA物種；且其中該等細胞係依密度梯度接種。

2. 如請求項1之方法，其中該等細胞為馬來猴細胞。
3. 如請求項1之方法，其中該等細胞為恆河猴細胞。
4. 如請求項1之方法，其中該等細胞為狒狒細胞。
5. 如請求項1之方法，其中該等細胞為犬細胞。
6. 如請求項1之方法，其中該等細胞為馬細胞。
7. 如請求項1之方法，其中該等細胞為牛細胞。
8. 如請求項1之方法，其中該等細胞為豬細胞。
9. 如請求項1之方法，其中該等細胞為羊細胞。
10. 如請求項1之方法，其中Oct4係以三重串接方式(in tandem triplicates)融合至N端MyoD轉活化域。
11. 一種重新編程非人類的哺乳動物細胞之無餵養細胞(feeder-free)方法，其中該方法包括：

使標靶細胞以15 k至500 k個細胞/ml之密度生長於無餵養細胞

表面上，且其中該等細胞係依密度梯度接種；及

利用約50 ng至約800 ng/ml之劑量範圍之如請求項1之經純化之合成mRNA轉染該等細胞。

12. 如請求項1之方法，其中該方法包括：

使標靶細胞以25 k個細胞/ml至300 k個細胞/ml之密度生長在無餵養細胞表面上，其中該合成mRNA經過純化而移除任何來自轉錄之污染性非mRNA物種且其中該等細胞係依密度梯度接種；及

利用約50 ng至約800 ng/ml劑量範圍之如請求項1之經純化之合成mRNA轉染該等細胞，其中較早時間點所使用之劑量低於較晚時間點；及在未繼代培養下達成iPSC；其中該合成mRNA經過純化而移除任何來自轉錄之污染性非mRNA物種。

13. 如請求項1之方法，其中該方法包括：

使標靶細胞以選自以下之任何一種密度:15 k、30 k、50 k、75 k、100 k、150 k、250 k、500 k個細胞/孔，生長於標準6孔盤之無餵養細胞表面上；其中各孔之體積係經調整介於0.5 ml至5 ml之適宜培養基；且其中該等細胞係依密度梯度接種；及

利用約50 ng至800 ng/ml劑量範圍之如請求項1之經純化之合成mRNA轉染該等細胞，其中較早時間點所使用之劑量低於較晚時間點；及

該等細胞在未繼代培養下達成iPSC。

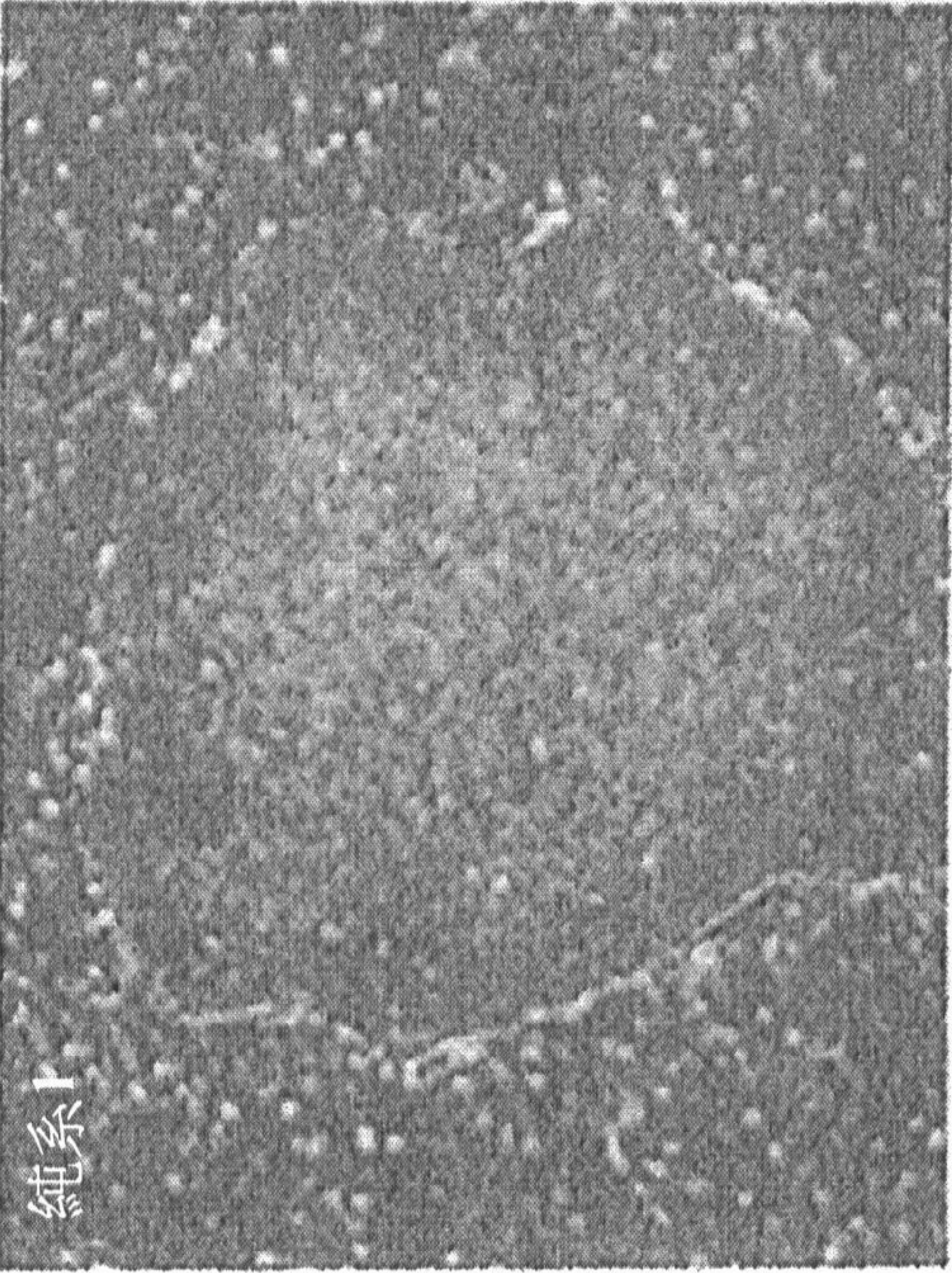
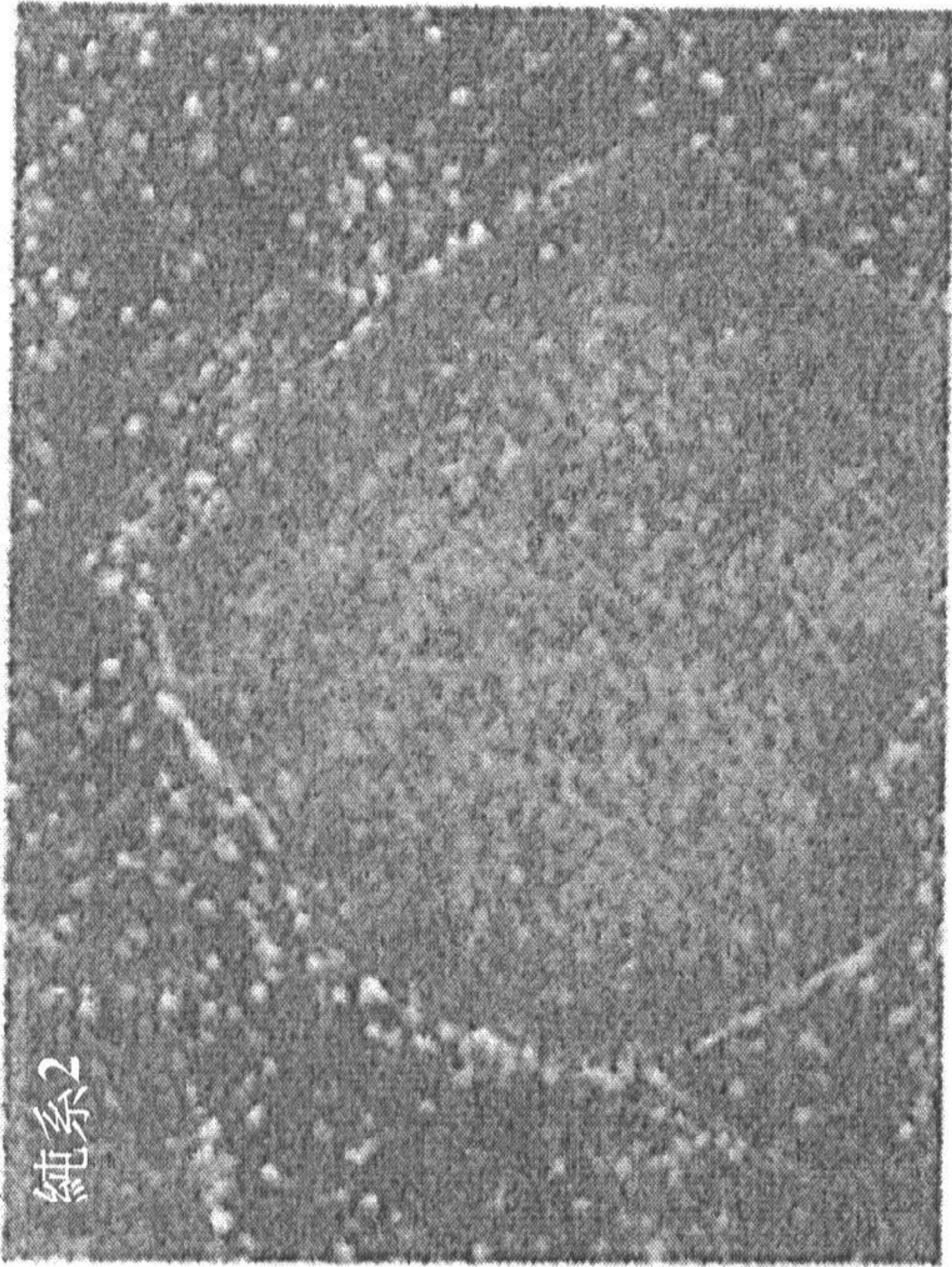
14. 如請求項1之方法，其中該等體細胞包括單能、多潛能(multipotent)、多能或分化細胞。

15. 如請求項1之方法，其中該合成mRNA誘導體細胞去分化為單能、多潛能或多能細胞。

16. 如請求項1之方法，其中該等經轉染細胞係維持在培養物中作為誘導型多能幹(iPS)細胞。

17. 如請求項1之方法，其中該等經轉染細胞形成誘導型多能幹細胞，進一步包括誘導該等iPS細胞形成分化細胞。
18. 如請求項1之方法，其中該組合物進一步包含Rarg及LrH-1轉活化域(transaction activation domains)。
19. 如請求項1之方法，其中該組合物進一步包含與VP16轉活化域融合之Oct4。
20. 如請求項1之方法，其中該經純化之合成mRNA含有2-硫基尿嘧啶。
21. 如請求項11之方法，其中該經純化之合成mRNA含有2-硫基尿嘧啶。

圖式



A

圖1

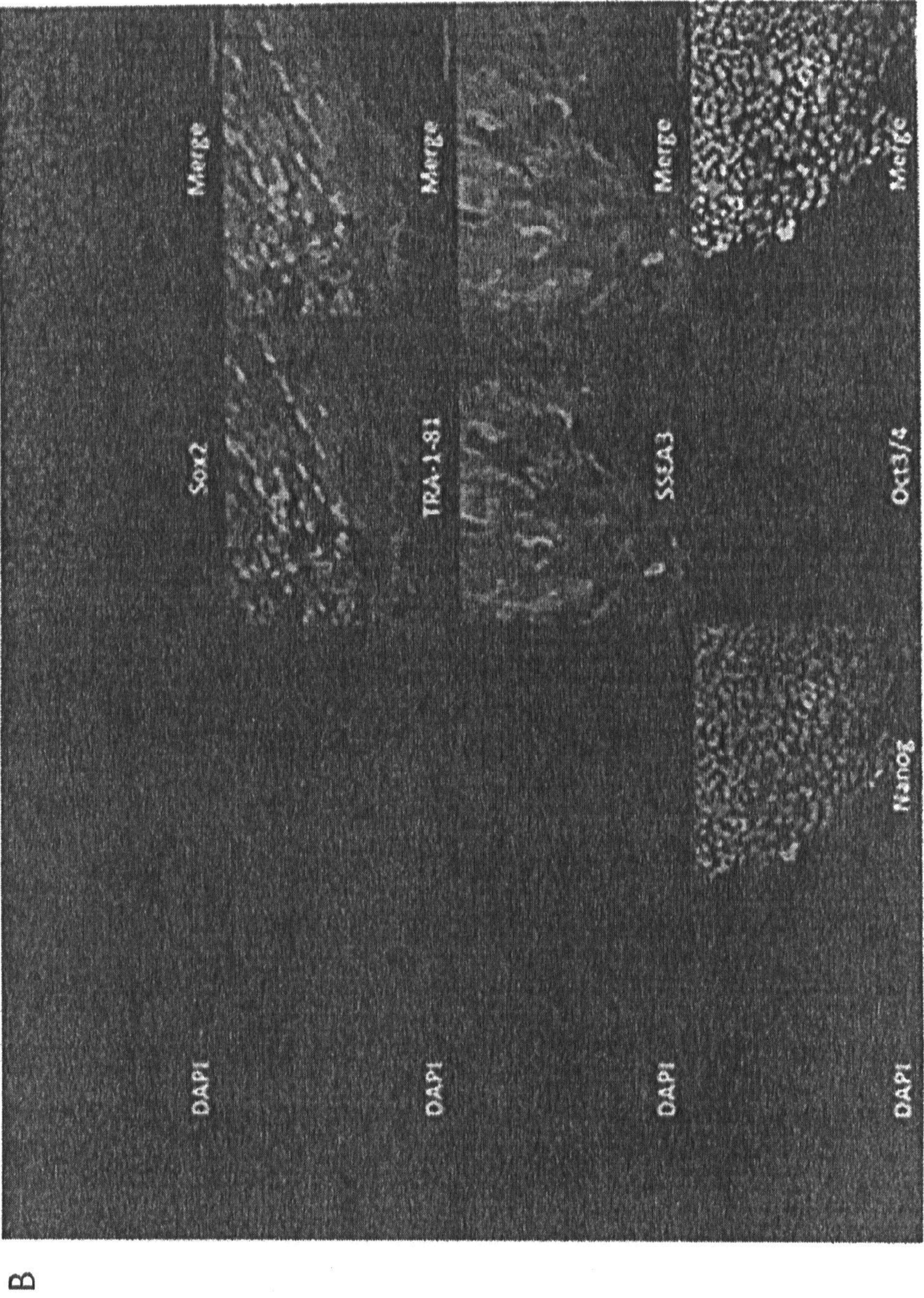


圖1(續圖)

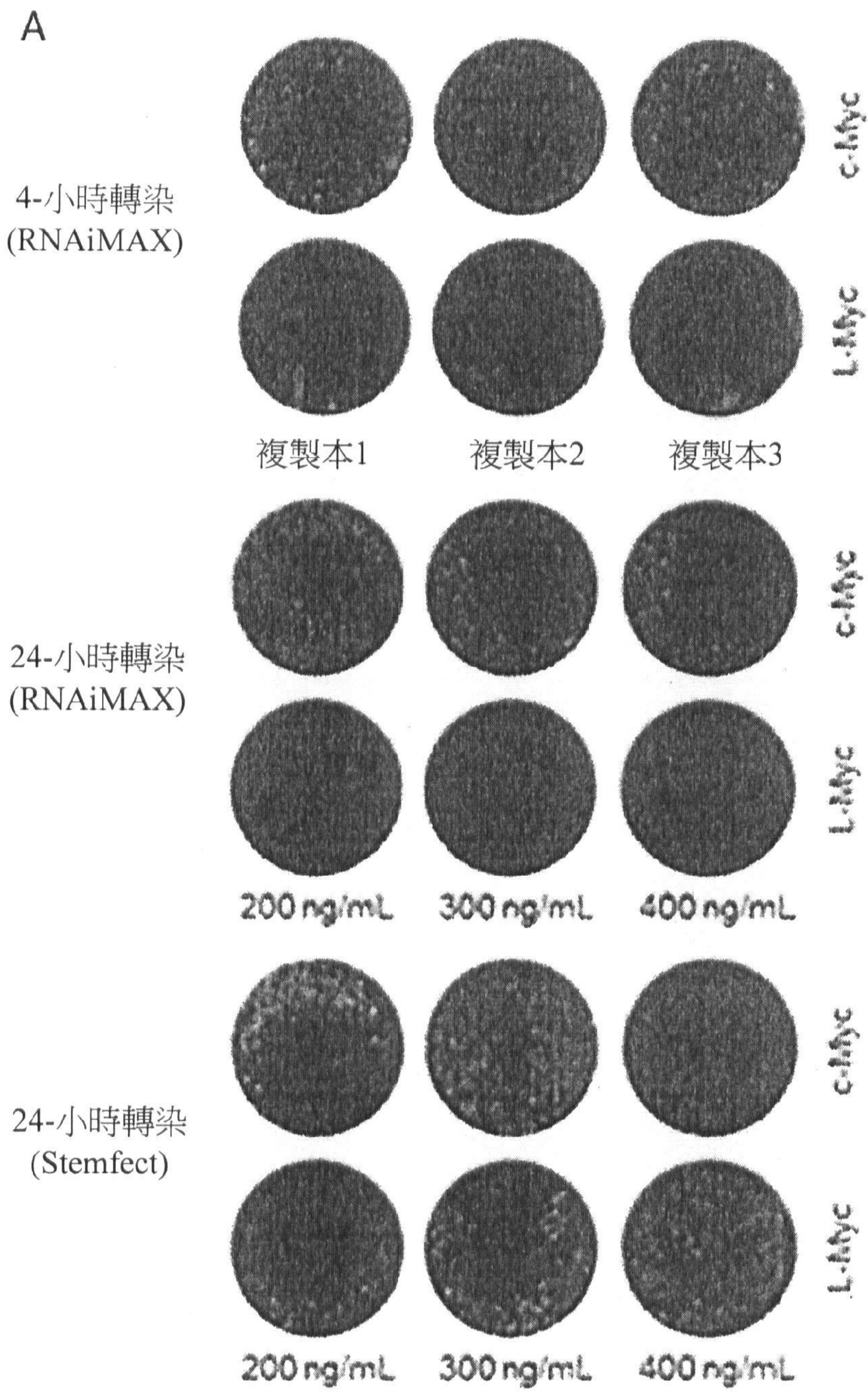


圖 2

B

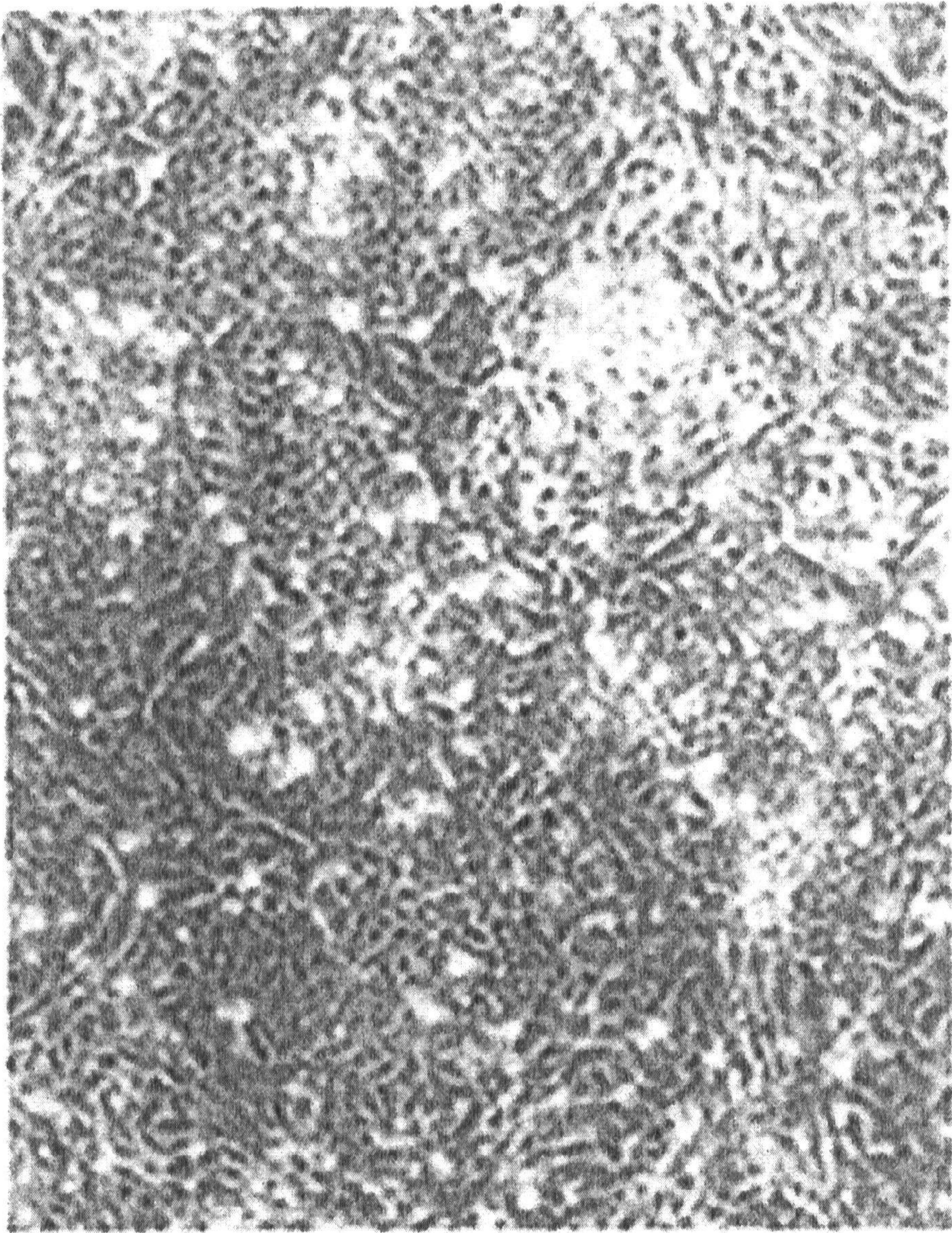


圖2(續圖)

C

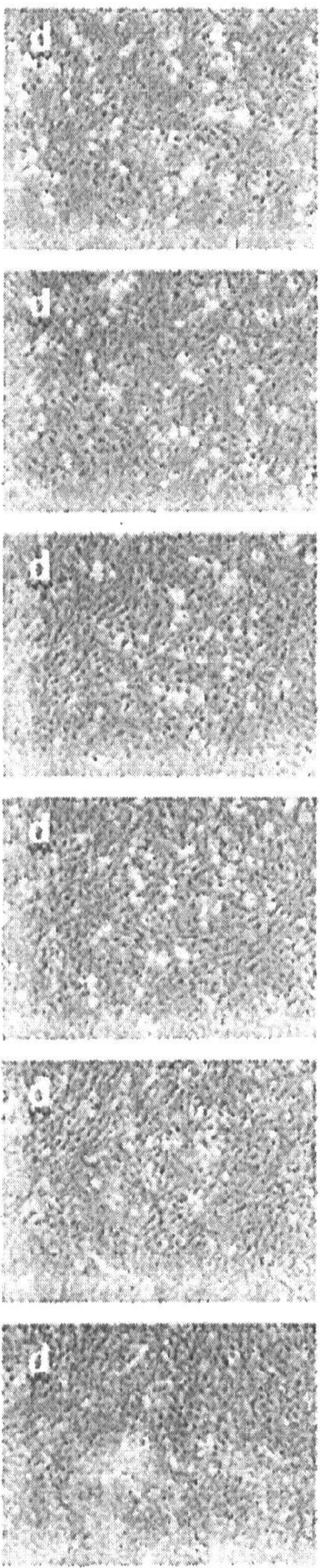


圖2(續圖)

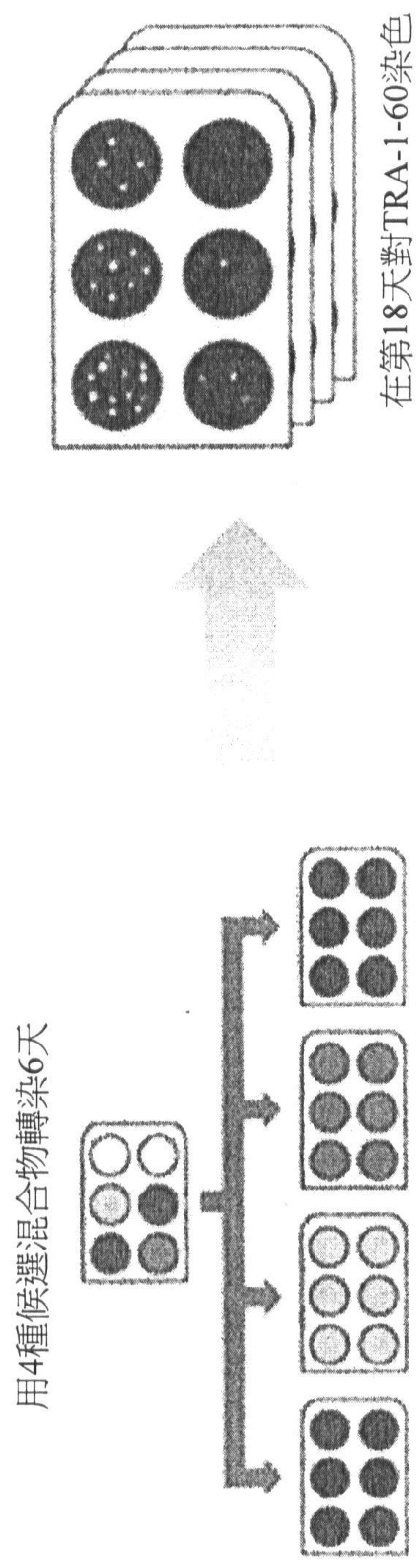
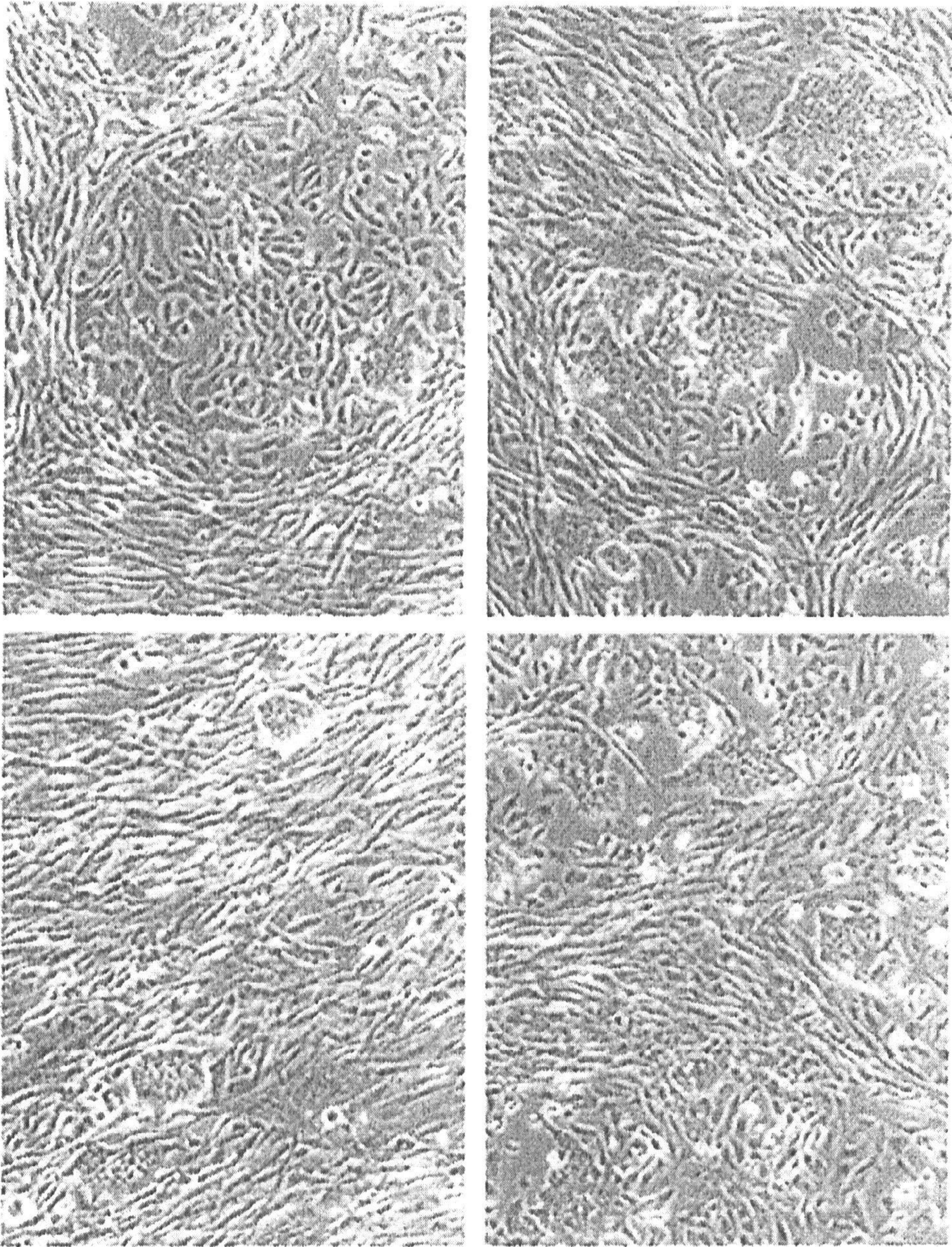


圖3



4

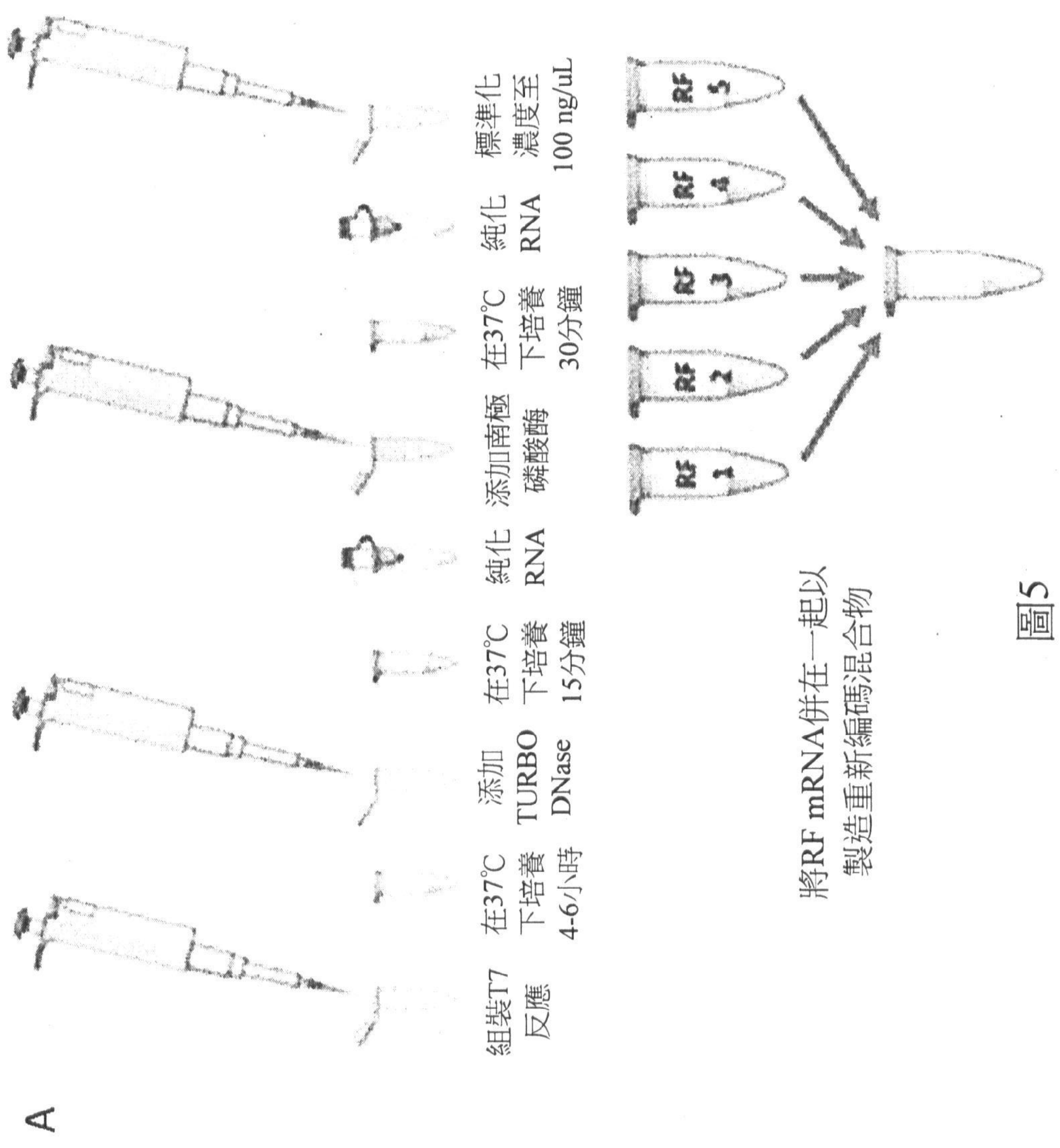


圖5

B

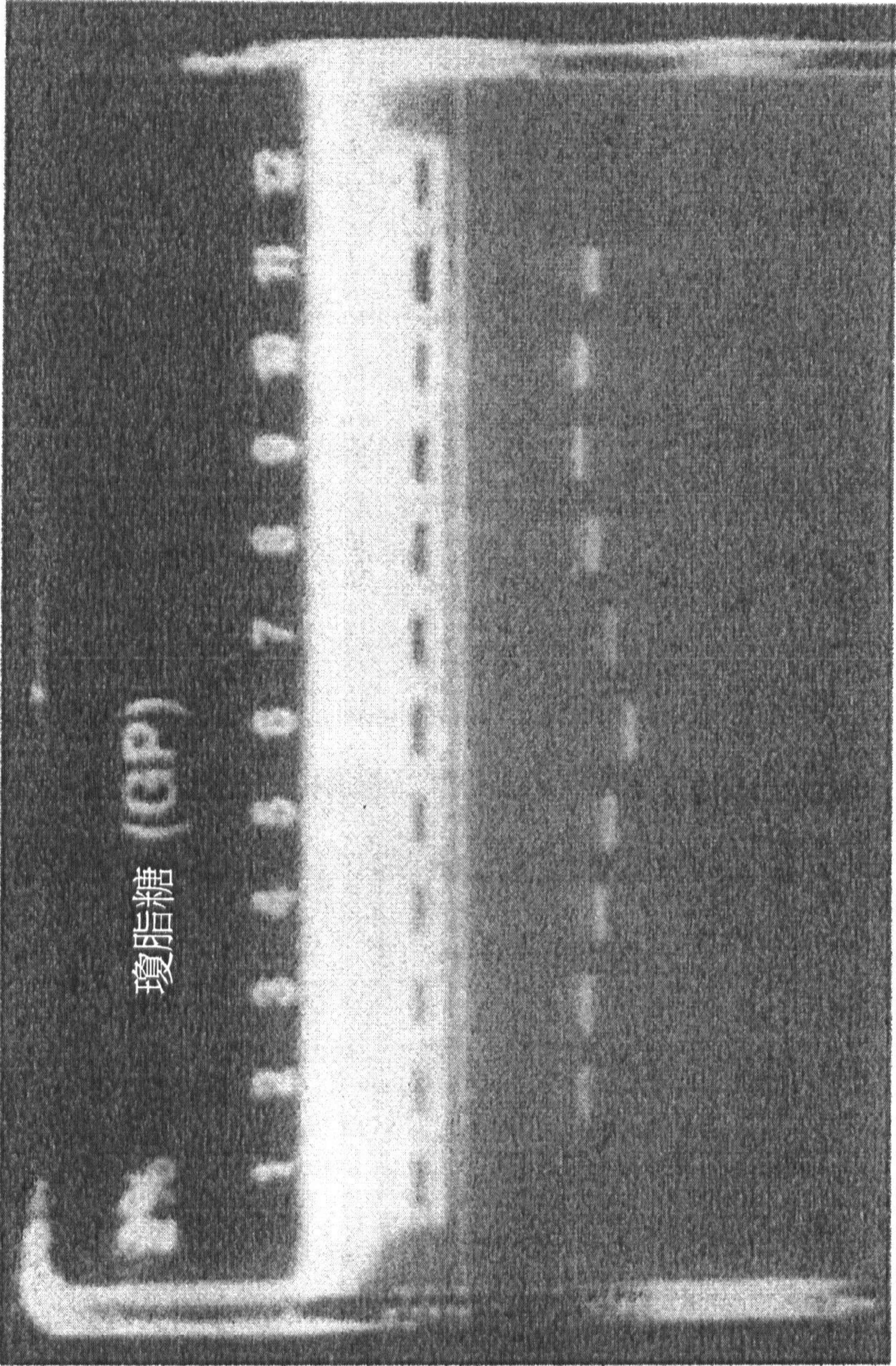


圖5(續圖)

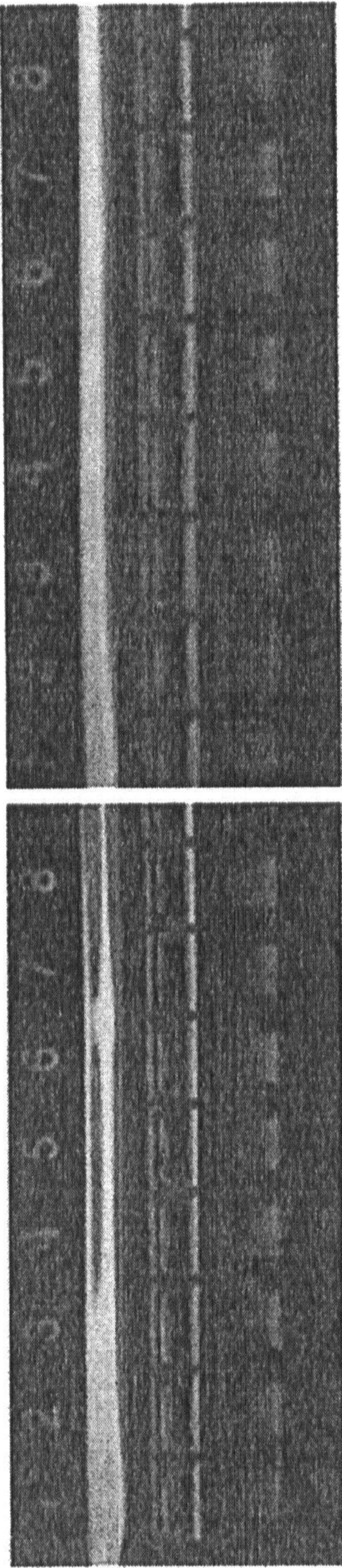
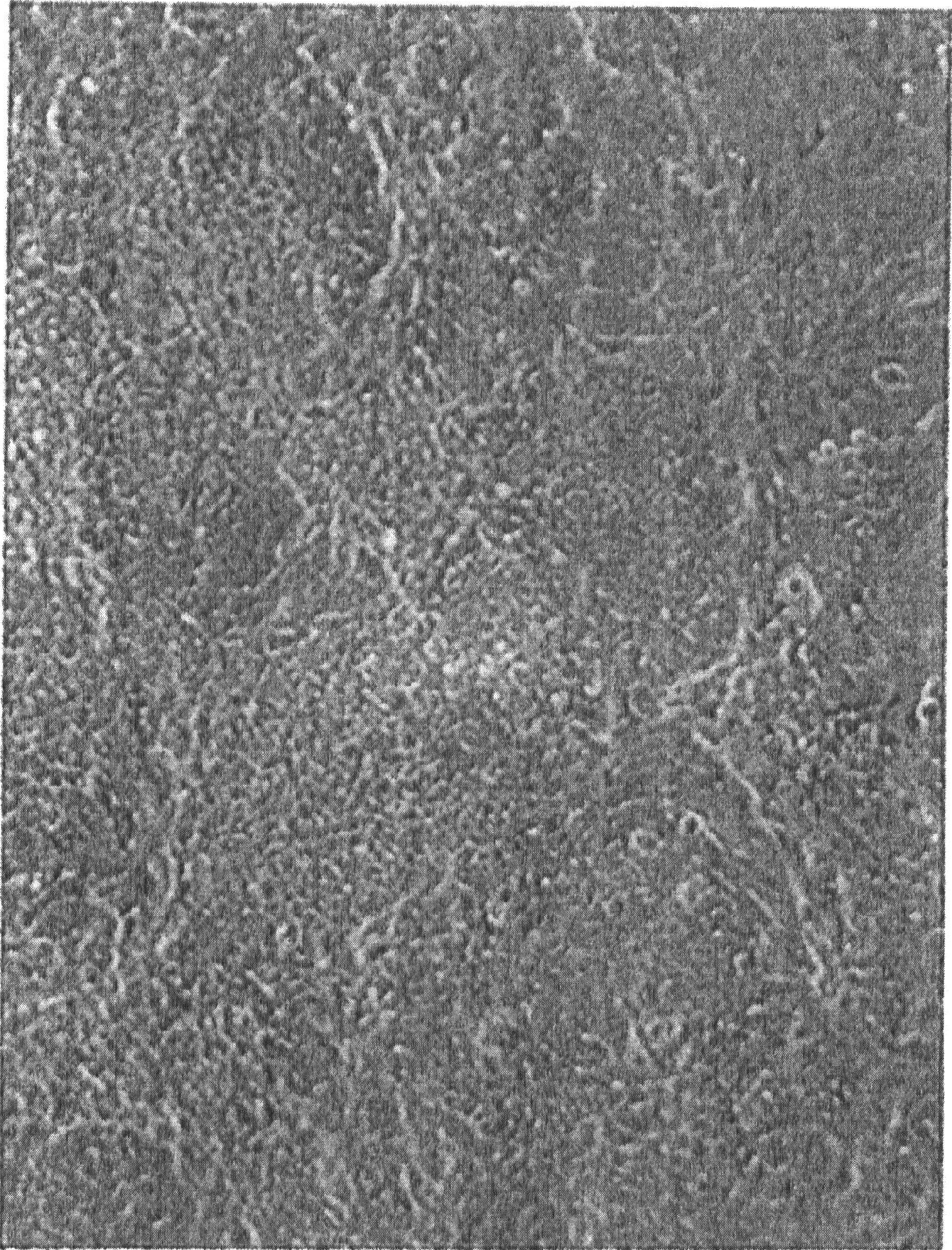
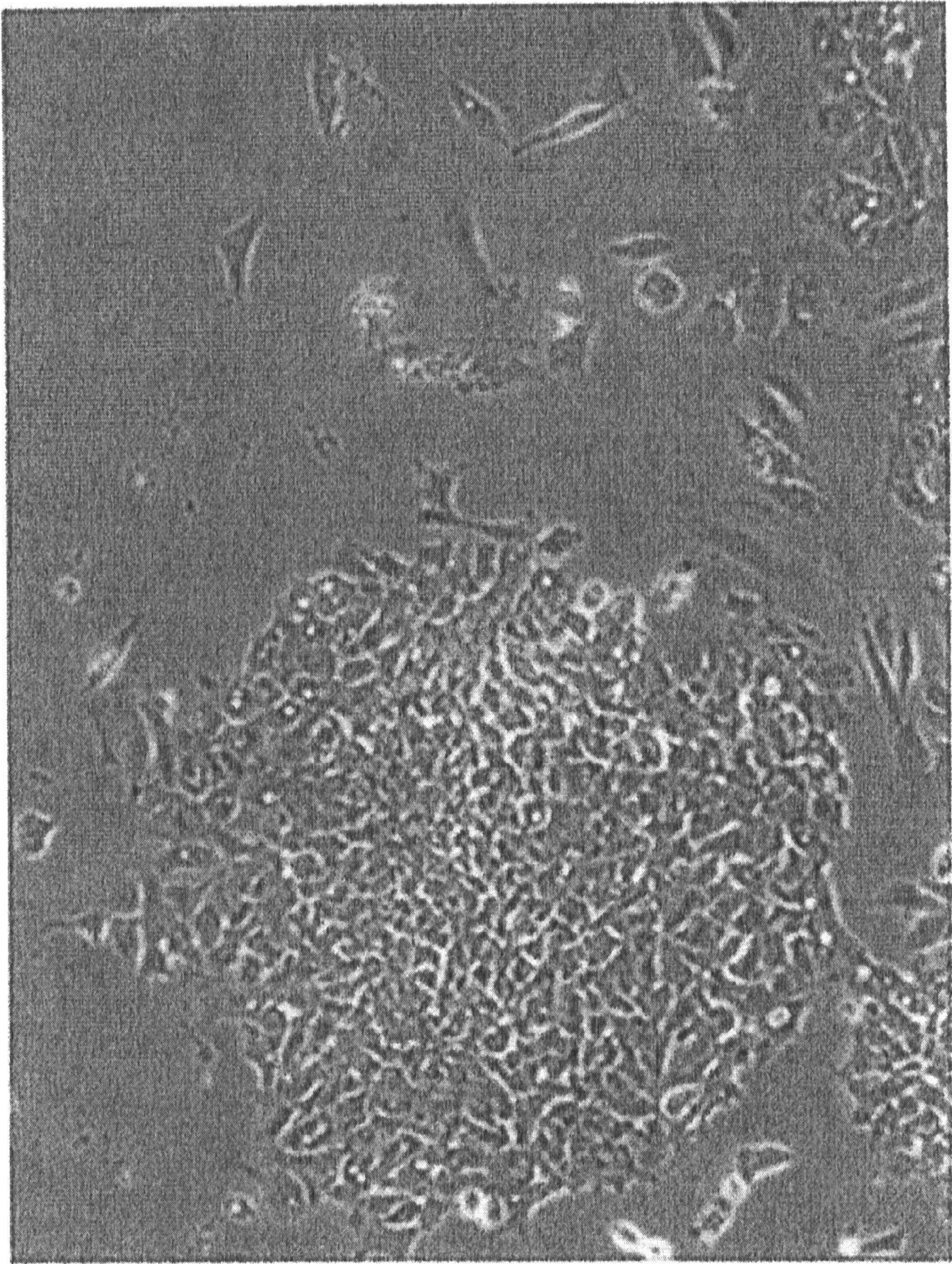


圖6



A

圖 7



B

圖7(續圖)

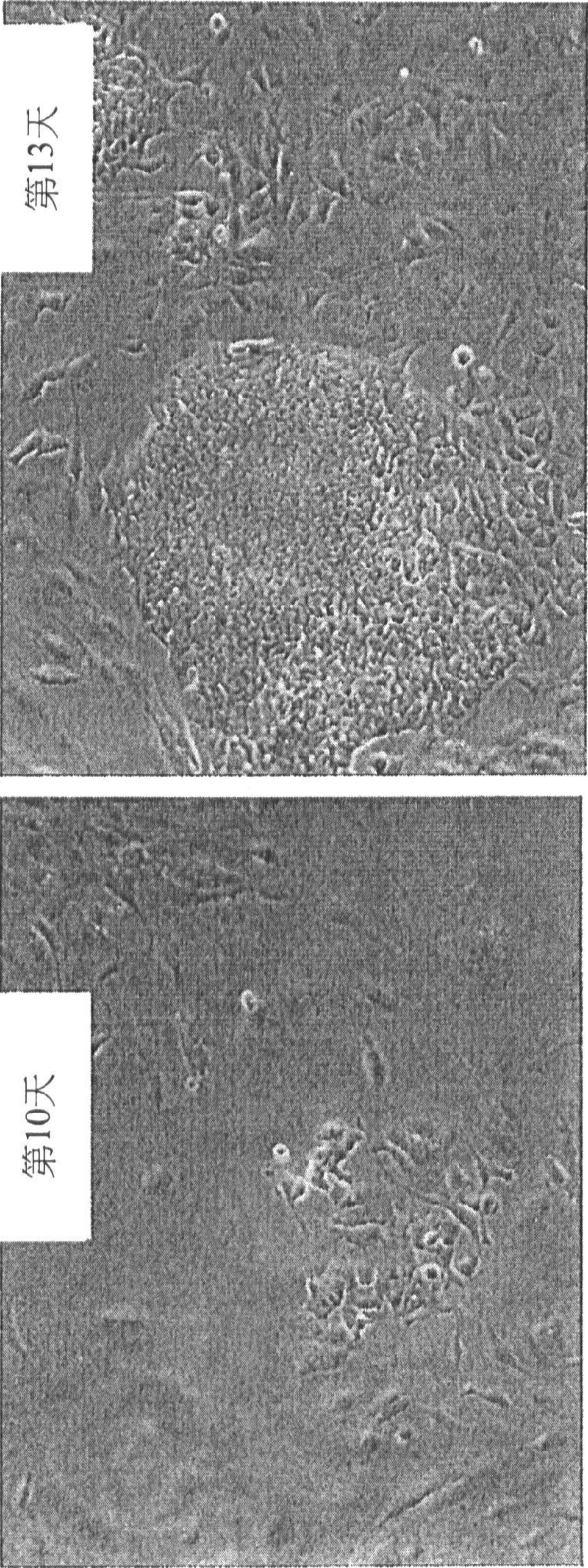


图8