

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-530596

(P2014-530596A)

(43) 公表日 平成26年11月20日(2014.11.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/38 (2006.01)	C 1 2 N 1/38	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-525992 (P2014-525992)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月21日 (2012.2.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年3月27日 (2014.3.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/025893
 (87) 国際公開番号 W02013/025248
 (87) 国際公開日 平成25年2月21日 (2013.2.21)
 (31) 優先権主張番号 61/522, 843
 (32) 優先日 平成23年8月12日 (2011.8.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514036689
 メロ バイオテクノロジー インコーポレ
 イテッド
 MELLO BIOTECHNOLOGY
 , INC.
 アメリカ合衆国 90670 カリフォル
 ニア州 サンタ フェ スプリングス モ
 ラ ドライブ 12145 スイート 6
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳

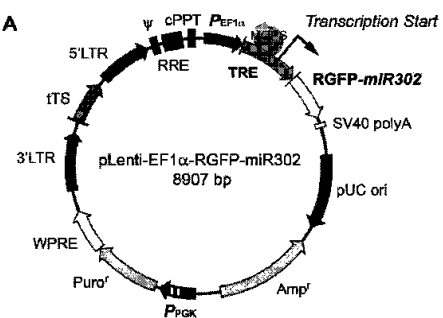
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 原核細胞内の真核 pol-2 プロモーターからの誘導可能な発現

(57) 【要約】

真核細胞のタンパク質コーディングメッセンジャー RNA 及びノンコーディングマイクロ RNA は、原核の RNA ポリメラーゼではなく、II 型 RNA ポリメラーゼ (pol-2) から自然転写されたものである。したがって、現在は、ハイブリドーマ又は哺乳類細胞中の II 型真核ポリメラーゼ (pol-2) プロモーター或いは細菌細胞の原核プロモーターにより、真核 RNA とタンパク質の製造がなされる。しかし、原核細胞の RNA 翻訳は変異性 (error-prone) があるので、頻繁な変異が重大な問題になっている。一方、ハイブリドーマ又は哺乳類細胞の培養は、人力と金銭のコストが比較的高い。上記問題を克服するために、本発明は、原核プロモーターに転換する必要又はハイブリドーマ/哺乳類細胞を培養する必要がなく、増殖の速い細菌内において II 型 RNA ポリメラーゼ駆動性遺伝子発現により真核 RNA 及び/又は関連ペプチド/タンパク質を直接製造する、新規の誘導可能な組成物及び方法を提供する。得られたこれらの RNA とペプチド/タンパク質は、薬物開発、疾患治療、腫瘍/癌治療、多能性幹 (iPS) 細

FIG. 1A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

3 - モルホリノプロパン - 1 - スルホン酸 (M O P S)、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物と類似する構造を有する化学剤を含む、原核細胞内において真核プロモーター駆動性遺伝子発現を調節するための組成物。

【請求項 2】

前記化学剤は遺伝子発現の転写誘導物である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記組成物は、細菌培地を更に含む、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記化学剤は、前記細菌培地内において 0 . 0 1 % ~ 1 % の濃度 (v / v) を有する、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記細菌培地はルリア - ベルターニ (L B) 培地である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記遺伝子は、少なくともタンパク質又はノンコーディング RNA、或いはそれら両方をコードし、前記タンパク質又はノンコーディング RNA は薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 7】

前記ノンコーディング RNA は、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記ノンコーディング RNA は、mi R - 3 0 2 ホモログである、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記タンパク質は、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記薬学上又は治療上の適用は、多能性幹細胞の生成、幹細胞研究及び治療、癌治療及び疾患治療、傷口治癒処理、ならびに食物収量及び薬物供給の向上からなる群から選ばれる、請求項 6 に記載の組成物。

30

【請求項 11】

原核細胞内において真核プロモーター駆動性遺伝子発現を調節するための組成物であって、

(a) 真核プロモーター駆動性遺伝子発現を誘導又は促進可能な少なくとも 1 種の化学剤と、

(b) 真核プロモーター駆動性発現メカニズムにより制御される少なくとも 1 つの遺伝子を含有する複数の原核細胞とを含み、

(a) 及び (b) は、前記遺伝子の真核プロモーター駆動性遺伝子発現を誘発する条件下で混合される組成物。

40

【請求項 12】

前記原核細胞のそれぞれが少なくとも 1 つの誘導可能な遺伝子発現組成物を有する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記誘導可能な遺伝子発現組成物は、真核プロモーターを含むベクターである、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記遺伝子は、少なくともノンコーディング RNA 又はタンパク質コーディング RNA、或いはそれら両方をコードする、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

50

前記ノンコーディングRNAは、少なくとも、マイクロRNAと30%～100%の相同性を有する配列を含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

前記ノンコーディングRNAは低分子ヘアピンRNAである、請求項14に記載の組成物。

【請求項17】

前記タンパク質コーディングRNAは、少なくとも、マイクロRNAと30%～100%の相同性を有する配列を含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項18】

前記タンパク質コーディングRNAは、真核遺伝子のcDNA配列と30%～100%の相同性を有する、請求項14に記載の組成物。

10

【請求項19】

前記ノンコーディングRNA又はタンパク質コーディングRNAは、前記原核細胞から分離されたものである、請求項14に記載の組成物。

【請求項20】

前記遺伝子は、少なくともタンパク質又はペプチド、又はそれら両方をコードする、請求項11に記載の組成物。

【請求項21】

前記タンパク質は、少なくともペプチド配列を含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

前記タンパク質又はペプチドは、前記原核細胞から分離されたものである、請求項20に記載の組成物。

20

【請求項23】

前記タンパク質は、酵素又は抗体である、請求項20に記載の組成物。

【請求項24】

前記タンパク質は、インスリンと類似するペプチド配列を含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項25】

前記タンパク質は、増殖因子と類似するペプチド配列を含む、請求項20に記載の組成物。

30

【請求項26】

前記原核細胞は、細菌細胞である、請求項11に記載の組成物。

【請求項27】

前記原核細胞は、大腸菌(E. coli)である、請求項11に記載の組成物。

【請求項28】

前記化学剤は、遺伝子発現における転写誘導物である、請求項11に記載の組成物。

【請求項29】

前記化学剤は、3-モルホリノプロパン-1-スルホン酸(MOPS)、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物と類似する構造を有する、請求項11に記載の組成物。

【請求項30】

前記真核プロモーターは、II型RNAポリメラーゼ(pol-2)の同等物又はpol-2と適合性のあるウイルスプロモーターである、請求項11に記載の組成物。

40

【請求項31】

前記pol-2と適合性のあるウイルスプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター又はレトロウイルス長末端反復(LTR)プロモーターである、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】

前記真核プロモーター駆動性発現は、RNA転写及びタンパク質翻訳を含む細胞内メカニズムである、請求項11に記載の組成物。

【請求項33】

50

前記条件は、３７ のルリア - ベルターニ (L B) 培地での細菌培養条件である、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記化学剤が、前記条件において 0 . 0 1 % ~ 1 % の濃度 (v / v) を有する、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記ノンコーディング R N A は、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記タンパク質コーディング R N A は、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記ノンコーディング R N A は、m i R - 3 0 2 ホモログである、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記マイクロ R N A は、m i R - 3 0 2 ホモログである、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記マイクロ R N A は、m i R - 3 0 2 ホモログである、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記タンパク質又はペプチドは、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記薬学上又は治療上の適用は、多能性幹細胞の生成、幹細胞研究及び治療、癌治療及び疾患治療、傷口治癒処理、ならびに食物収量及び薬物供給の向上からなる群から選ばれるものである、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記薬学上又は治療上の適用は、多能性幹細胞の生成、幹細胞研究及び治療、癌治療及び疾患治療、傷口治癒処理、ならびに食物収量及び薬物供給の向上からなる群から選ばれるものである、請求項 3 6 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記薬学上又は治療上の適用は、多能性幹細胞の生成、幹細胞研究及び治療、癌治療及び疾患治療、傷口治癒処理、ならびに食物収量及び薬物供給の向上からなる群から選ばれるものである、請求項 4 0 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(優先権)

本発明は、米国仮出願第 6 1 / 5 2 2 , 8 4 3 号 (出願日 : 2 0 1 1 年 8 月 1 2 日 , 発明の名称 : 原核細胞内において I I 型真核ポリメラーゼプロモーター駆動性転写作用を使用するための誘導可能な遺伝子発現組成物及びその応用) の優先権を主張する。

(技術分野)

本発明は、組成物及び当該組成物が原核細胞において真核 R N A プロモーター駆動性転写作用によりリボ核酸 (R N A 、即ちメッセンジャー R N A (m e s s e n g e r R N A) とマイクロ R N A (m i c r o R N A) である) 及び / 又はタンパク質 / ペプチド (即ち、抗体と酵素である) を製造するための適用に関する。具体的には、本発明は、組成物、及び当該組成物を使用して細菌細胞内において I I 型真核 R N A ポリメラーゼ (p o l - 2) プロモーター駆動性転写作用により R N A 及び / 又はタンパク質 / ペプチドを製造することを開示している。一方、本発明は、抗生物質ではなく化学剤を使用して原核細胞内の真核 R N A プロモーター駆動性転写作用を誘発する誘導可能な遺伝子発現組成物も含んでいる。本発明の新規性は、変異性 (e r r o r - p r o n e) の原核プロモーター

10

20

30

40

50

への転換、或いは大量の人力と金銭コストがかかるハイブリドーマ又は哺乳類細胞の培養を必要とせず、原核細胞を誘導して迅速な適応作用を起こすことにより、II型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーターを使用して所望のRNA及び/又はタンパク質/ペプチドを直接発現することと、原核細胞転写の読取りの忠実性 (reading fidelity) を向上させることにある。得られた核酸とタンパク質/ペプチドは、薬物開発、疾患治療、腫瘍/癌治療、多能幹 (iPS) 細胞の製造、傷口治癒の促進、及び食物の提供に使用可能である。

【背景技術】

【0002】

当業者は、現在の教科書の教示により、原核細胞と真核細胞の転写メカニズムの間に差異が存在し、かつ互いに不適合性があることをはっきり認識している。例えば、現時点での理解によると、真核RNAポリメラーゼ (RNA polymerase) はプロモーター配列と直接的には結合せず、付加の補助タンパク質により転写を開始させる必要があるのに対して、原核RNAポリメラーゼは、機能が完全な酵素 (ホロ酵素, holoenzyme) であり、プロモーター配列と直接結合して転写を開始させる。当業者にとって、真核メッセンジャーRNAは、II型RNAポリメラーゼ (type II RNA polymerase, pol - 2) により細胞核内において合成されてから、タンパク質合成のためにプロセシングされて細胞質に送達されるのに対して、原核メッセンジャーRNA転写及びタンパク質への翻訳は、同じ場所 (細胞質内で) かつDNAの同じ部分で同時に行われることも周知のことである。原核生物、例えば細菌及び古細菌は細胞核のよう

10

20

【0003】

Buechlerの特許文献1及びMehhtaの特許文献2のような従来技術において、細菌又はファージのプロモーターを利用して細菌細胞内に哺乳類のペプチド及び/又はタンパク質を製造することが試みられた。選択された遺伝子の相補的DNA (cDNA) は、発現のために、プラスミドベクター内の細菌又はファージプロモーターの後方にクローニングされた。細菌はイントロンを処理するためのRNAスプライシング機構 (RNA splicing machineries) を有していないので、当該選択された遺伝子のcDNAは如何なるノンコーディングイントロンも有してはならない。そして、得られた当該ベクターが、大腸菌 (Escherichia coli, E. coli) のような細菌のコンピテント菌株に導入され、選択された遺伝子の転写産物 (メッセンジャーRNA) を発現し、更に、当該メッセンジャーRNAを翻訳してタンパク質を生成する。しかし、これらの細菌及びファージのプロモーター、例えばTac、Lac、T3、T7、及びSP6 RNAプロモーターは、II型ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーターではなく、それによる転写作用は変異性を有し変異が生じやすい。一方、Mehhtaは、グリセリンが細菌の形質転換 (transformation) の効率を向上させるために使用可能であることも教示しているが、プロモーター駆動性RNA転写、特にII型ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーター駆動性RNA転写を強化することに関する記述はまったくない。真核細胞と原核細胞の転写システムの間に可能な適合性が欠けているので、上記の従来技術は、原核細胞において原核RNAプロモーターしか使用できないことに制限されている。

30

40

【0004】

非特許文献1及びGossenの特許文献3に開示されたような従来遺伝子発現を誘導する方法は、抗生物質 (例えばテトラサイクリン又はドキシサイクリン) を使用して、テトラサイクリン応答配列で制御されるサイトメガロウイルス (tetacycline-responsive-element (TRE) - controlled cytomegaloviral (CMV)) プロモーター又はpol - 3 (U6) プロモーター、即ちTet-Onプロモーターの活性化と発現を誘発する必要がある。しかし、これ

50

らの Tet - On プロモーターは I I 型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーターではなく、なお、その機能が原核細胞内でテストされたことはない。したがって、I I 型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーターから発現するように原核転写機構の適合を誘導することができれば、原核細胞の増殖を抑制する可能性のある従来の抗生物質を使用する毒性誘導方法ではなく、原核細胞と真核細胞の転写メカニズムの間に差異に基づき、新規な誘導可能な遺伝子発現システムを容易に提供できるであろう。

【 0 0 0 5 】

本発明は、従来の教科書における原核細胞と真核細胞の転写システムの間に不適合性がある観点に対しては、新規な画期的な発展である。いくつかの化学剤を添加することで、今、我々は原核細胞を誘導して迅速な適応作用を生じさせ、これにより I I 型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーターを利用して所望の RNA 及び関連ペプチド / タンパク質を製造できる。その利点として、第一に、製造上、細菌は増殖が速いので経済的であり、第二に、操作上、ハイブリドーマ又は哺乳類細胞を培養する必要がないので、一層簡単になり、第三に、I I 型ポリメラーゼプロモーターに相当する転写 (pol - 2 promoter - like transcription) を利用し、かつ原核転写メカニズムの読取りの忠実性を向上させたので、生産品質を向上させ、第四に、細菌のみにより所望の RNA と関連ペプチド / タンパク質、及び導入されたプラスミドベクターに対する工業レベルの大量生産を達成でき、最後に、所望の RNA 及びタンパク質は、それぞれ細菌抽出物 (extract) 及び / 又は細菌溶解物 (lysates) から、分離及び純化されることにより、更に応用される多目的性を有する。したがって、以上をまとめると、原核細胞内において真核 RNA プロモーター駆動性転写を利用する誘導可能な RNA (即ち、メッセンジャー RNA とマイクロ RNA である) 及び / 又はペプチド / タンパク質 (即ち、抗体、増殖因子及び酵素) の製造方法はニーズを高度に満足できる。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 7 , 9 5 9 , 9 2 6 号明細書

【 特許文献 2 】 米国特許第 7 , 9 6 8 , 3 1 1 号明細書

【 特許文献 3 】 米国特許第 5 , 4 6 4 , 7 5 8 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 G o s s e n M a n d B u j a r d H . (1 9 9 2) T i g h t c o n t r o l o f g e n e e x p r e s s i o n i n m a m m a l i a n c e l l s b y t e t r a c y c l i n e - r e s p o n s i v e p r o m o t e r s . P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e , U S A . 8 9 , 5 5 4 7 - 5 5 5 1

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、原核細胞と真核細胞の遺伝子転写システムの間の差異及び不適合性に基づいている。通常、原核 RNA ポリメラーゼは、真核プロモーターを認識せず、逆もまた同様である。しかし、本発明は、転写誘導物として機能する、原核細胞内において真核プロモーター駆動性遺伝子発現を誘導及び / 又は強化する複数の化学剤を確認した。同化学剤又は他の化学剤は真核細胞においても原核プロモーター駆動性遺伝子発現を誘導及び / 又は強化する転写誘導物として機能できる。したがって、本発明に教示された新規な現象と知識は現在の原核細胞と真核細胞の転写メカニズムの間の差異についての認知に対して、画期的な発展を提供するものである。

【 0 0 0 9 】

本発明において発見された転写誘導物は通常、細胞培養の条件において好適なものではない。3 - モルホリノプロパン - 1 - スルホン酸 (3 - morpholinopropane - 1 - sulfonic acid (又は 3 - (N - morpholino) pro

panesulfonic acid, MOPS)、エタノール、及びグリセリンの3つは全てのテストされた化学剤のうち最も効果的な誘導物である。これらの化学剤の誘導能力は用量に依存し(dose-dependent)、かつ濃度と比例している。MOPS、エタノール、及び/又はグリセリンと類似する構造を有するいくつかの化学物質は同じ機能を有し得る。MOPSは通常、溶菌とプラスミド抽出の緩衝剤として用いられるので、細菌細胞の培養に好適ではない。エタノールは既知の殺菌剤である。グリセリンは細菌の細胞壁を不安定化させ、形質転換の効率を増加させ得るため、細菌細胞の培養にも好適ではない。なお、グリセリン及びエタノールはいずれも防腐剤として使用可能であり、そのうちグリセリンは静菌性を有し、エタノールは殺菌性を有する。MOPS、エタノール、及びグリセリンが有する既知の機能に基づき、当業者は、本発明を知る前には、微量(0.01%~1%の濃度(v/v))のこれらの化学物質で原核細胞内において真核プロモーター駆動性遺伝子発現を誘導することを推知し得なかったであろう。

10

【0010】

本発明は誘導可能な遺伝子発現組成物であり、いくつかの化学剤を使用して原核細胞内における真核プロモーター駆動性RNA転写及び関連ペプチド/タンパク質の合成を促進及び/又は向上させる。当該誘導可能な遺伝子発現組成物は、(a)3-モルホリノプロパン-1-スルホン酸(MOPS)、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物と類似する構造を有する少なくとも1種の化学剤と、(b)II型真核ポリメラーゼ(pol-2)プロモーター駆動性発現メカニズム又はpol-2適合性ウイルスプロモーター(pol-2 compatible viral promoter)駆動性発現メカニズムにより制御される少なくとも1つの遺伝子を含む複数の原核細胞とを含み、(a)と(b)は、当該遺伝子の発現を誘発する条件下で混合される。本発明は、変異性の原核プロモーターへの転換、又はハイブリドーマ又は哺乳類細胞の培養の必要がなく(ハイブリドーマ又は哺乳類細胞の培養に大量の人力と金銭のコストがかかる)、原核細胞を誘導して迅速な適応作用を起こし、II型真核ポリメラーゼ(pol-2)プロモーターを使用して所望のRNA及び/又はタンパク質/ペプチドを直接発現するとともに、原核細胞の転写の読取りの忠実性を向上させるための新規な組成物及びその適用を更に提供し、即ち、II型ポリメラーゼ(pol-2)様の転写メカニズム(pol-2-like transcription mechanism)を提供することに相当する。発現されるRNAとしては、好ましくは真核RNA(即ち、メッセンジャーRNA及びマイクロRNA)であり、これらのタンパク質/ペプチドは抗体と酵素を含む。

20

30

【0011】

当該原核細胞は、細菌細胞であり、特に大腸菌(E.coli)細胞であり、かつ当該化学剤は3-モルホリノプロパン-1-スルホン酸(MOPS)、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物であることが好ましい。また、当該真核RNAプロモーターは、II型真核ポリメラーゼ(pol-2)プロモーター(即ちEF1)又はpol-2適合性ウイルスプロモーター(即ち、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター又はレトロウイルス長末端反復(LTR)プロモーター(retroviral long terminal repeat promoter))であることが好ましい。当該真核RNAプロモーター制御の遺伝子は、マイクロRNA(microRNA, miRNA)、低分子ヘアピンRNA(small hairpin RNA, shRNA)、低分子干渉RNA(small interfering RNA, siRNA)、メッセンジャーRNA(messenger RNA, mRNA)、これらの前駆体とホモログ、及びこれらの組合せからなる群から選ばれるノンコーディング(non-coding)又はタンパク質コーディング(protein-coding)RNA転写産物、又はそれら両方をコードする。本発明により生成されるペプチド/タンパク質は上記のタンパク質コーディングメッセンジャーRNA転写産物から翻訳され、かつ酵素、増殖因子、抗体、インスリン、ボツリヌス毒素、任意の機能タンパク質、それらのホモログ、及びそれらの組合せからなる群から選ばれるものであるが、これに限定されるものではない。好ましくは、当該遺伝子発現を誘導する当該条件は37のLB培地に、当該化学剤が添加された

40

50

細菌培養条件である。

【0012】

当該化学剤が原核細胞内においてRNAとタンパク質の生成を誘導する能力を例示するために、本発明は、図1Bに示すように、レンチウイルスプラスミドベクター、例えば林(Lin)の米国特許出願第12/149,725号と第12/318,806号におけるプラスミドベクターpSpRNAi-RGFP-miR302を採用及び変更するとともに、赤色蛍光タンパク質(RGFP)を採用し、即ち、RNA転写及びタンパク質翻訳を測定する視認マーカーとして、RGFP遺伝子をベクターにクローニングする。本発明において、図1Aに示すように、pSpRNAi-RGFP-miR302ベクターの本来のCMVプロモーターは、ヒトII型ポリメラーゼ(pol-2)プロモーターEF1

により置換され、pLenti-EF1-RGFP-miR302と称する新たなプラスミドベクターを形成した。なお、原核細胞は、インフレーム(in-frame)イントロンを処理できないので、RGFP遺伝子におけるSpRNAiイントロンが除去され、更に、本来のイントロンでコードされた(intron-encoded)miR-302クラスター(miR-302 cluster)が除去され、RGFP遺伝子の5'-非翻訳領域(5'-untranslated region、5'-UTR)に移動され、RGFP-miR302遺伝子を形成した。概言すれば、遺伝子の5'-UTR及び3'-UTRはイントロンの拡張と見られてもよい。こうして、本発明に開示されたmiR-302発現の発現メカニズムは従来の米国特許出願第12/149,725号と第12/318,806号に記載されたイントロンマイクロRNAの生成メカニズム(intronic microRNA biogenesis mechanism)の範囲に属している。利点として、原核細胞内にはRNAスプライシングが欠けているので、本発明において得られたmiR-302転写産物は依然としてヘアピン様(hairpin-like)前駆体マイクロRNA(pre-miRNA又はpri-miRNA)であり、更に純化されてから、真核細胞内に送達され、成熟miR-302を形成し、機能することができる(図1B)。

【0013】

明確に言うと、以下で説明される図面は本発明を例示・説明するためのものであり、制限的なものではない。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】誘導可能なpol-2プロモーター駆動性遺伝子発現の組成物を示す図である。本発明には、実例として、pLenti-EF1-RGFP-miR302組成物を採用し、当該組成物でE.coli DH5細胞を形質転換し、MOPS、グリセリン、及び/又はエタノールの誘導下でRGFPのメッセンジャーRNAとタンパク質、及びmiR-302マイクロRNA及び/又はその前駆体を生成する。pLenti-EF1-RGFP-miR302はレンチウイルス(lentiviral)プラスミドベクターであり、原核細胞と真核細胞の両方で各種のマイクロRNA/低分子ヘアピンRNA、メッセンジャーRNA、及び/又はタンパク質/ペプチドを発現するように設計されている。

【図1B】誘導可能なpol-2プロモーター駆動の遺伝子発現の組成物により、原核細胞又は真核細胞内においてRNA転写産物とタンパク質を生成し、真核細胞内においてマイクロRNAを生成するメカニズムを示す図である。本発明には、実例として、pLenti-EF1-RGFP-miR302組成物を採用し、当該組成物でE.coli DH5細胞を形質転換し、MOPS、グリセリン、及び/又はエタノールの誘導下でRGFPのメッセンジャーRNAとタンパク質、及びmiR-302マイクロRNA及び/又はその前駆体を生成する。pLenti-EF1-RGFP-miR302はレンチウイルスプラスミドベクターであり、原核細胞と真核細胞の両方で各種のマイクロRNA/低分子ヘアピンRNA、メッセンジャーRNA、及び/又はタンパク質/ペプチドを発現するように設計されている。本発明に教示されたように、当業者は、図1Bに開示され

たメカニズムにより、任意のマイクロRNA / 低分子ヘアピンRNAを使用してmiR-302を置換し、又は、任意のメッセンジャーRNA / タンパク質を使用してRGFPを置換することができる。黒い矢印は、当該経路が原核細胞と真核細胞に発生することを示し、中空の矢印は、これらのステップは真核細胞内のみに発生することを示す。

【図2】0.1% (v/v) のMOPSと0.05% (v/v) のグリセリンで混合処理された(左)、又は未処理(右)の、各細菌培地の結果を示す図である。大腸菌は処理前にpLenti-EF1-RGFP-miR302で形質転換された。

【図3】0.1% (v/v) のMOPSで処理された後に、生成された異なる細菌ペレット(pellets)を示す図である。大腸菌はMOPSで処理される前にpLVX-Grn-miR302+367(緑色)又はpLenti-EF1-RGFP-miR302(赤色)で形質転換された。

【図4】コンピテントE. coli DH5細胞内において、異なる化学物質による、pol-2プロモーター駆動性遺伝子発現を誘導する能力を示す図である。本発明の全てのテストされた化学物質のうち、MOPS、エタノール、及びグリセリンの3つが最も効果的な誘導物である。使用可能な化学物質の濃度範囲は0.001%~4%であり、好ましくは0.01%~1%である。

【図5】MOPS、グリセリン、及びエタノールのそれぞれの誘導における、RGFPタンパク質の発現のウエスタンブロット分析結果を示す図である。細菌のRuvBタンパク質を、RGFP発現を正規化(normalize)ハウスキーピング基準(house-keeping standard)としている。ブランクE. coli DH5細胞(即ち、ベクターで形質転換されていない)に由来するタンパク質抽出物を陰性対照群としている。

【図6】MOPS、グリセリン、及びエタノールのそれぞれの誘導における、miR-302とその前駆体マイクロRNAクラスター(pre-miRNA cluster)の発現のノーザンブロット分析結果を示す図である。ブランクE. coli DH5細胞(即ち、ベクターで形質転換されていない)に由来するRNA抽出物を陰性対照群としている。

【図7】細菌抽出物(bacterial extracts, BE)から分離されたmiR-302及び/又はpre-miR-302によるiPS細胞の生成を示す図である。当該抽出物のノーザンブロット分析結果は図6に示される。従来の報告のように、miR-302で再プログラム化されたiPS細胞(mirPSC)が球様細胞コロニーに形成され、Oct4、即ち強い標準的なESCマーカーを発現する。

【図8】Oct4とSox2遺伝子のプロモーター領域に、細菌抽出物(BE)から分離されたmiR-302及び/又はpre-miR-302(図6に示すようなノーザンブロット分析)で誘導された全体的なDNA脱メチル化(global DNA demethylation)が生じることを示す図である。SimonssonとGurdon(Nat Cell Biol. 6, 984-990, 2004)の教示のように、全体的なDNA脱メチル化及びOct4発現は体細胞の再プログラム化にとって必要である。

【図9A】miR-302及び/又はpre-miR-302で処理された、各種の腫瘍/癌細胞の体外腫瘍発生能力試験の結果を示す図である。miR-302及び/又はpre-miR-302で処理されて得られた細胞はmirPSC細胞と称され、乳癌に由来するmirPSC-MCF7細胞、肝臓癌に由来するmirPSC-HepG2細胞、及び胎児性奇形癌(embryonal teratocarcinoma)に由来するmirPSC-Tera2細胞を含む。図9AはmiR-302及び/又はpre-miR-302で処理される前後の細胞形態と細胞周期の速度の変化を示す。各細胞周期ステージに対応するDNA含有量のフローサイトメトリー分析の結果はグラフとして細胞形態の上方(n=3、p<0.01)に示される。

【図9B】miR-302及び/又はpre-miR-302で処理された、各種の腫瘍/癌細胞の体外腫瘍発生能力試験の結果を示す図である。miR-302及び/又はpre-miR-302で処理されて得られた細胞はmirPSC細胞と称され、乳癌に由来す

10

20

30

40

50

る *mirPS-MCF7* 細胞、肝臓癌に由来する *mirPS-HepG2* 細胞、及び胎児性奇形癌に由来する *mir-PS-Tera2* 細胞を含む。図 9 B は *mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で処理される前後の細胞形態と細胞周期の速度の変化を示す。各細胞周期ステージに対応する DNA 含有量のフローサイトメトリー分析の結果はグラフとして細胞形態の上方 ($n = 3$ 、 $p < 0.01$) に示される。

【図 9 C】*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で処理された、各種の腫瘍 / 癌細胞の体外腫瘍発生能力試験の結果を示す図である。*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で処理されて得られた細胞は *mirPS* 細胞と称され、乳癌に由来する *mirPS-MCF7* 細胞、肝臓癌に由来する *mirPS-HepG2* 細胞、及び胎児性奇形癌に由来する *mir-PS-Tera2* 細胞を含む。図 9 C はフローサイトメトリー分析結果の棒グラフであり、*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* による、各種の腫瘍 / 癌細胞からの細胞群の有糸分裂 (M 期) 及び休止期 (G0 / G1 期) における変化に対する用量依存効果を示す。

【図 10 A】*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で処理された、各種の腫瘍 / 癌細胞の体外腫瘍発生能力試験の結果を示す図である。*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で処理されて得られた細胞は *mirPS* 細胞と称され、乳癌に由来する *mirPS-MCF7* 細胞、肝臓癌に由来する *mirPS-HepG2* 細胞、及び胎児性奇形癌に由来する *mir-PS-Tera2* 細胞を含む。図 10 A は *mir-302* で抑制された *Matrigel* チャンバーにおける腫瘍細胞の浸潤行為に対する機能性分析 ($n = 4$ 、 $p < 0.05$) である。

【図 10 B】*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で処理された、各種の腫瘍 / 癌細胞の体外腫瘍発生能力試験の結果を示す図である。*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で処理されて得られた細胞は *mirPS* 細胞と称され、乳癌に由来する *mirPS-MCF7* 細胞、肝臓癌に由来する *mirPS-HepG2* 細胞、及び胎児性奇形癌に由来する *mir-PS-Tera2* 細胞を含む。図 10 B は *mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で処理される前後の、ヒト骨髄内皮細胞 (*hBMEC*) 単層における細胞の接着 ($n = 4$ 、 $p < 0.05$) の比較である。

【図 11】*mir-302* ファミリークラスター (*Tera2+mir-302s*) 又はアンチセンス *mir-302d* (*Tera2+mir-302d**) 処理で、生体内腫瘍発生試験における胎児性奇形癌細胞 (*Tera-2*) の結果 ($n = 3$ 、 $p < 0.05$) を示す図である。胎児性奇形癌は常に、各種の、3つの胚性胚葉 (*embryonic germ layer*)、即ち、外胚葉、中胚葉、及び内胚葉に由来する腫瘍 / 癌細胞を含み、当該混合型の腫瘍組織は抗腫瘍 / 癌薬物のテストに使用可能である。(A) インサイチュ注射を実施してから (*post-is*) 三週間後、平均腫瘍サイズに対して形態学的評価を行う。全ての腫瘍はいずれも元の移植位置 (黒い矢印で示す箇所) に位置している。全ての被試験マウスのいずれも悪液質又は腫瘍転移の症状が観察されていない。(B) ノーザンブロット分析とウエスタンブロット分析、及び (C) 免疫組織化学染色分析図は、体内 *mir-302* による、コア再プログラム化因子 *Oct3/4-Sox2-Nanog* と、*mir-302* を標的とする G1 チェックポイントレギュレーターであるサイクリン依存性キナーゼ 2 (*CDK2*)、サイクリン D1 / D2 (*cyclins D1/D2*)、*BMI-1*、及び *p16Ink4a*、*p14Arf* の発現形態に対する効果を示す。

【図 12】マイクロRNA *mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* を含有する軟膏を使用して、マウス皮膚の開放創を治療する生体傷口治癒試験を示す図である。*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で治療するマウスの皮膚傷口は、ブランク軟膏又は他のマイクロRNA (*mir-HA*) で治療するマウスの皮膚傷口の少なくとも二倍の大きさである。この試験により、*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* による処理は傷口治癒速度を顕著に向上させ、当該治癒速度は他の処理群と対照群の治癒速度のいずれかの二倍を超えたことがはっきり示された。なお、*mir-302* 及び / 又は *pre-mir-302* で治療された後の傷口治癒領域に、正常な毛の再成長が現れ

10

20

30

40

50

、かつ癒痕が残っていないのに対し、他の処理群の結果では小さな癒痕が残り、かつ毛の成長がない（黒い矢印で示す）。

【発明を実施するための形態】

【0015】

[原核細胞内における真核プロモーター駆動性タンパク質コーディング遺伝子発現の誘導]

z - コンピテント大腸菌形質転換キット (z - competent E . coli transformation kit , Zymo Research , カリフォルニア州アーバイン) を使用して、pLenti - EF1 - RGFP - miR302 プラスミドベクターの形質導入で大腸菌 (E . coli) の形質転換を行い、37 の LB 培地で培養すると同時に、170rpm で頻りに振盪する。図2に示されるように、一晚培養を経た後、大腸菌コロニーが0.1% (v / v) のMOPSと0.05% (v / v) のグリセリンが添加された条件において、細菌のLB培地を明らかに赤色に染めた赤色の蛍光タンパク質RGFPが大量に発現されるのに対し、対照群のコロニーはRGFPを生成できない。マーカー機能を有するRGFPの存在は、そのRNAもそのタンパク質も製造できたことを示している。

10

【0016】

更に、2つの形質転換された大腸菌菌株を使用して、確認された化学剤、例えばMOPSによるタンパク質の誘導特性を証明及び体现し、そのうちの1つの菌株は、CMVプロモーターで駆動される緑色の蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を有するpLVX - Grn - miR302 + 367 プラスミドベクターを保有しており、もう1つの菌株は、上記のpLenti - EF1 - RGFP - miR302 ベクターを保有している。図3に示されるように、0.1% (v / v) のMOPSにおいて一晚培養を経た後、pLVX - Grn - miR302 + 367 で形質転換された大腸菌は緑色の細胞を生成し、他のpLenti - EF1 - RGFP - miR302 プラスミドベクターを有するE . coli では赤色の細胞が出現した。この結果は、MOPSのような化学物質が、II型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーター又はpol - 2 適合性ウイルスプロモーターにより、所定のRNA及び関連タンパク質の生成を誘導できることを示している。また、この誘導生成されたRNAとタンパク質は高度に限定されており、かつ当該化学物質の添加により調節できる。ただし、注意すべきことに、当該タンパク質の収量は、これらの細菌細胞がそれぞれの色に染色されて見えるほど相当に高い。

20

30

【0017】

図4に示されるように、本発明の全てのテストされた化学物質のうち、3種の最も効果的な誘導物はMOPS、グリセリン、及びエタノールである。図5及び実施例3に記載されるように、誘導生成された赤色の蛍光タンパク質RGFPは、さらにウエスタンブロット分析でその量が確認される。細菌のRuvBタンパク質を、RGFP発現を正規化するハウスキーピング基準とする。これらの確認された誘導物の誘導能力は、用量に依存しており、かつ濃度と比例していることが発見された。まったく処理されていない陰性対照群の大腸菌細胞では、いかなる蛍光染料も存在せず、本来の色のみを呈している。したがって、これらの結果を総合すれば、本発明は、新規な化学誘導可能な組成物及びそれが原核細胞内においてII型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーター、又はpol - 2 適合性ウイルスプロモーター駆動性遺伝子発現を調節するための適用を明らかに提供した。当該遺伝子の産物はRNA又はタンパク質 / ペプチド、或いはその両方であってもよい。上記の説明により、当業者は他のイントロンを含有しない (intron - free) 遺伝子又は関連cDNAを使用してRGFP遺伝子を置換することで、原核細胞内において機能性RNA及び / 又はタンパク質を生成することができることは自明である。

40

[原核細胞内における真核プロモーター駆動性ノンコーディングRNA発現の誘導]

上記のように、pLenti - EF1 - RGFP - miR302 ベクターは、RGFP遺伝子の5'非翻訳領域 (5' - UTR) に、マイクロRNA miR - 302 のクラスター (miR - 302 cluster) を含み (図1Aと図1B) 、当該RGFP遺伝

50

子の誘導された発現も、図1Bに示されたメカニズムのように、miR-302クラスター(miR-302s前駆体)を生成する。原核細胞内に、RNAスプライシング機構(例えばスプライセオソーム, spliceosome)が欠けているので、本発明において得られたmiR-302クラスターは依然としてヘアピン様前駆体マイクロRNA(pre-miR-302s又はpri-miR-302s)であり、分離され、真核細胞内に送達されるのに好適である。真核細胞内において、これらのpre-miR-302s又はpri-miR-302sは更に処理され成熟miR-302s(即ち、miR-302マイクロRNA)になり、機能することができる。同様に、他のマイクロRNAと関連前駆体も、miR-302発現の同じステップを経て生成することができる。また、ノンコーディングRNA、例えば低分子干渉RNA(short interfering RNA, siRNA)及び低分子ヘアピンRNA(shRNA)は、上記のマイクロRNAのように発現されるように設計されることができる。これらのノンコーディングRNAは、少なくともマイクロRNAと30%~100%の相同性を有する1つの配列を含むことが好ましい。なお、これらのshRNA/siRNAは、ヘアピンのステム領域(stem regions)で完全にマッチでき、哺乳類の前駆体マイクロRNA(pre-miRNA又はpri-miRNA)は通常ミスマッチの(mismatched)塩基対を含む。大部分のマイクロRNAは、所定の遺伝子のサイレンサー(silencers)としての機能を有し、かつ多くの生理メカニズム及び病理メカニズムにおいて、生物学的発生(biological development)、幹細胞生成、細胞核再プログラム化(nuclear reprogramming)、細胞分化、細胞周期調節、腫瘍抑制、免疫防御、アポトーシス、再生(rejuvenation)、傷口治癒、及び他の多くの各種の特殊な役割を果たしているが、これらに限定されていないので、これらの薬学と治療領域における潜在的な適用は高度に期待されている。形質導入されたプラスミドとノンコーディングRNA(即ち、マイクロRNA/低分子ヘアピンRNA)はいずれも同時に原核細胞、例えば大腸菌により増幅されることができる。増幅ステップの後に、pLenti-EF1-RGFP-miR302プラスミドDNAと転写されたpre-miR-302s/pri-miR302sを分離させる方法は実施例5と実施例6に記載されている。増幅されたノンコーディングRNA(即ち、pre-miR-302s/pri-miR-302s)及び/又はベクター(即ち、pLenti-EF1-RGFP-miR302)を真核細胞に送る方法は、エンドサイトーシス(endocytosis)、グリセリン注入(glycerol infusion)、ペプチド/リポソーム(liposomal)/化学物質が媒介する導入、電気穿孔法、遺伝子銃浸透、マイクロインジェクション、トランスポゾン/レトロトランスポゾン挿入、及びアデノウイルス/レトロウイルス/レンチウイルス感染から選ばれるものであってもよい。

【0018】

上記のRGFP誘導実験(図4と5)は、化学誘導の存在下又は非存在下で、ノンコーディングpre-miR-302s及びその成熟miR-302産物の、pLenti-EF1-RGFP-miR302で形質転換された細菌内の発現を測定することにも相当する。図6及び実施例4に示されるように、ノーザンブロット分析により、誘導生成されたpre-miR-302sの量を確認する。RGFP誘導実験の結果(図4と図5)のように、ブランク対照群ではなく、MOPS、グリセリン、及びエタノールで処理された形質転換細菌内で、pre-miR-302sの発現が測定され、これらのpol-2プロモーターの化学誘導物は、原核細胞内においてもノンコーディングRNAの発現を起こすことができる。全てのマイクロRNA(miRNA)及び低分子ヘアピンRNA(shRNA)は類似した構造を有しているので、当業者は、他のノンコーディングマイクロRNA及び/又は低分子ヘアピンRNAにより、当該miR-302クラスターを置換するとともに、原核細胞内において、機能性マイクロRNA、低分子ヘアピンRNA、及び/又はその前駆体/ホモログを生成できることが分かる。

[本発明の幹細胞生成機能の応用]

10

20

30

40

50

米国特許出願第12/149,725号と第12/318,806号の教示のように、マイクロRNA miR-302は、哺乳類の体細胞を、胚性幹細胞様(embryonic stem cell(ESC)-like)の誘導多能性幹細胞(induced pluripotent stem(iPS)cells)に再プログラム化(reprogram)するために使用可能である。多くの幹細胞応用及び治療の発展はこれらのESC様のiPS細胞に頼っている。しかし、miR-302はヒトESC内でのみ大量に生成され、他の分化した組織細胞内では大量に生成されない。ヒトESCの分離について、多くの議論の余地がある。ヒトESCの培養は大量の人力と金銭がかかる。ヒトESCのステップを回避する他の代替的方法として、合成のmiR-302の類似体(mimics)を製造する方法があるが、非常に高価でありかつ効率が劣っている。合成miR-302と天然miR-302の間の類似程度はまだ不確定である。これらの問題を解決するために、本発明は、原核細胞内においてmiR-302及び/又はその前駆体/ホモログを大量に製造するための簡単、低価、迅速、かつ誘導可能な組成物及び方法を提供できる。なお、原核細胞からmiR-302及び/又はその前駆体を分離することは、本発明の図6及び実施例6に示されるように、比較的簡単かつ経済的である。

10

【0019】

発明者は、実施例5と実施例6の記載のように、pLenti-EF1-RGFP-miR302で形質転換された大腸菌細胞を使用して、高品質のpLenti-EF1-RGFP-miR302ベクター及びpre-miR-302sを生成し、分離した。米国特許出願第12/149,725号と第12/318,806号の教示のように、本発明のpLenti-EF1-RGFP-miR302とpre-miR-302sによる、iPS細胞の生成における使用は予期できるものである。実施例2により、本発明で生産されたpre-miR-302sをヒト皮膚初代角化細胞(primary keratinocytes)に導入した後、当該導入された角化細胞は、再プログラム化されESC様のiPS細胞になり、かつ強いESCマーカーOct4が発現された(図7)。さらに、図8及び実施例8に示されるように、亜硫酸水素塩DNA配列試験(bisulfite DNA sequencing assay)もOct4とSox2遺伝子のプロモーター領域に、全体的なDNAの脱メチル化が生じたことを示し、Oct4とSox2は最も重要な再プログラム化因子及びESCマーカーである。全体的なDNAの脱メチル化及びOct4発現は細胞が再プログラム化し始めることに成功し、かつESCと類似する多能性(pluripotency)を得る第一歩(Simonsson and Gurdon, Nat Cell Biol. 6:984-990, 2004)として知られているので、MOPS誘導による(MOPS-induced)細菌抽出物から分離されたmiR-302及び/又はpre-miR-302のiPS細胞生成における効果が証明された。この例は、本発明が、多能性幹細胞の生成のための十分なmiR-302及び/又はpre-miR-302を含有する細菌抽出物又は細菌溶解物を製造することに使用可能であることを証明した。

20

30

[マイクロRNA抽出物の腫瘍/癌治療における適用]

発明者又は当業者は、本発明(実施例1、5、6)により、十分なマイクロRNA miR-302の前駆体(pre-miR-302s又はpri-miR-302s)及び関連するmiR-302をコードする(miR-302-encoding)プラスミドベクターを生産できる。miR-302の癌治療における機能とメカニズムは、米国特許出願第12/318,806号と第12/792,413号を参照できる。従来、林(Lin)等は、この方法の、ヒト黒色腫(melanoma)、前立腺癌(Lin等, RNA 2008)、乳癌、肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma)、及び胎児性奇形癌細胞(Lin等, Cancer Res. 2010)に対する治療上の実行可能性を既に教示した。図9A~9Bに示されるように、全ての試験された腫瘍/癌細胞は、miR-302及び/又はpre-miR-302で処理された後、いずれも再プログラム化され正常iPS細胞になり、かつ胚様体細胞コロニー(embryoid body-like cell colonies)を形成した。miR-302及

40

50

び / 又は *pre-miR-302* で処理され得られた細胞は *mirPS* 細胞と呼ばれ、即ち「*miR302* で誘導された多能性幹細胞 (*miR302-induced pluripotent stem cells*)」の略称である。なお、*miR-302* は、正常組織細胞を除いた、全てのテストされた腫瘍 / 癌細胞の顕著なアポトーシス ($>95\%$) の発生を誘導することができる (*Lin* 等, *RNA* 2008 及び *Cancer Res.* 2010) ことも発見された。フローサイトメトリーにより、細胞周期の各時期の DNA 含有量を更に分析した結果として、全ての *mirPS* 細胞中において、有糸分裂の細胞群で顕著に減少したことを示した (図 9C)。 *mirPS-MCF7* 細胞において、有糸分裂の細胞群 (M 期) が $49\% \pm 3\%$ から $11\% \pm 2\%$ まで、 78% 減少し、*mirPS-HepG2* 細胞において、 $46\% \pm 4\%$ から $17\% \pm 2\%$ まで、 63% 減少し、*mirPS-Tera2* 細胞において、 $50\% \pm 6\%$ から $19\% \pm 4\%$ まで、 62% 減少したのに対して、静止 / 休止中の細胞群 (G0 / G1 期) は、*mirPS-MCF7* 細胞では $41\% \pm 4\%$ から $74\% \pm 5\%$ まで、*mirPS-HepG2* 細胞では $43\% \pm 3\%$ から $71\% \pm 4\%$ まで、*mirPS-Tera2* 細胞では $40\% \pm 7\%$ から $69\% \pm 8\%$ まで、それぞれ 80% 、 65% 、 72% 増加した。これらの結果は、*miR-302* が、これらの腫瘍 / 癌細胞の迅速な細胞周期の速度を効果的に弱化させ、顕著なアポトーシスを発生させることができることを示した。

【0020】

細胞浸潤試験 (実施例 9、*Matrigel* チャンバーを使用する) 及び細胞接着試験 (実施例 10、細胞がヒト骨髄内皮細胞 (*hBMEC*) の単細胞層に接着される) 等の体外腫瘍発生能力試験 (*In vitro tumorigenicity assays*) は、*miR-302* による抗増殖特性以外に、他の 2 種類の抗腫瘍生成の効果を示した。細胞浸潤試験 (*Cell invasion assay*) は、全ての *mirPS* - 腫瘍 / 癌細胞が、移動能力 ($<1\%$ まで低下した) を失ったのに対し、元の腫瘍 / 癌細胞は比較的高い栄養物が補充された間隔域に積極的に浸潤し、*MCF7* 細胞において $9\% \pm 3\%$ 以上の細胞群を占め、*HepG2* 細胞において $16\% \pm 4\%$ 以上の細胞群を占め、*Tera-2* 細胞において $3\% \pm 2\%$ 以上の細胞群を占めた (図 10A) ことを示した。これと一致して、細胞接着試験 (*Cell adhesion assay*) も、これらの *mirPS* - 腫瘍 / 癌細胞は、*hBMECs* 単細胞層に接着できないが、元の *MCF7* と *HepG2* 細胞は 50 分間の培養後、顕著な細胞群 (*MCF7* $7\% \pm 3\%$ 、*HepG2* $20\% \pm 2\%$) が迅速に *hBMEC* 単細胞層 (図 10B) に転移したことを示した。以上をまとめると、これらの発見は全て、*miR-302* 及び / 又は *pre-miR-302* は、ヒト腫瘍抑制因子であり、細胞の迅速な増殖を弱化させ、腫瘍 / 癌細胞アポトーシスを発生させ、かつ腫瘍 / 癌細胞の浸潤及び転移 (*metastasis*) を抑制することができることを強くかつ繰り返して示している。最も重要なことに、この新規な *miR-302* 及び / 又は *pre-miR-302* の機能は、悪性皮膚癌、前立腺癌、乳癌、肝臓癌治療、及び胚胎性奇形腫に含まれる異なる種類の組織に対する各種の腫瘍の治療を含むがこれらに限定されない、様々なヒト癌 / 腫瘍に対抗する普遍的な治療方法を提供できる。

【0021】

miR-302 及び / 又は *pre-miR-302* の腫瘍抑制機能、及び正常細胞と腫瘍 / 癌細胞における異なる効果を確認した後、発明者は、更に、生後八週間のオス無胸腺マウス (*BALB/c nu/nu* 系統) により、*miR-302* 及び / 又は *pre-miR-302* の、*Tera2* に由来する奇形腫を治療する抗腫瘍薬としての活用可能性 (図 11A ~ 11C と実施例 11 ~ 12) を調査した。*Tera-2* 細胞は元々ヒト胎児性奇形腫に由来し、かつ多種の原始腫瘍組織細胞 (*primitive tumorous tissue cells*) を含んでいる。その多能性により、*Tera2* に由来する奇形腫は通常、多種の体内腫瘍形態の治療モデルとされる。図 11A に示されるように、*miR-302* 及び / 又は *pre-miR-302* で 3 週間治療 (*Tera2 + miR-302s*) した後、我々は、無処理群 ($104 \pm 23 \text{ mm}^3$ 、 $n = 4$) に比べると、平均

腫瘍サイズが89%以上($>89\%$)($11 \pm 5 \text{ mm}^3$, $n=6$)と顕著に減少したことを測定できた。反対に、同じ量のアンチセンス-miR-302d(Tera2+miR302d*)を投与すると、平均腫瘍サイズが元の140%($250 \pm 73 \text{ mm}^3$, $n=3$)に増加する。ノーザンブロット分析の結果も、これらの異なる処理を受けた奇形腫細胞のうち、miR-302の発現レベルと腫瘍サイズが負の相関を呈しており(図11B)、即ち、miR-302の発現を制御することによって、体内腫瘍の増殖を効果的に制御できることを示した。これらの発現を実証するために、我々は、更にウエスタンブロット分析でmiR-302及び/又はpre-miR-302で処理された奇形腫のうち、G1チェックポイントレギュレーターCDK2、サイクリン-D1/D2、及びBMI-1の共同抑制、腫瘍抑制因子p16Ink4a、p14/p19Arfおよびコア再プログラム化因子Oct3/4、Sox2とNanogの共同活性化(図11B)を確認した。免疫組織化学(immunohistochemical, IHC)染色で奇形腫組織におけるこれらのタンパク質を分析すると、同様に同じ結果(図11C)を証明した。miR-302の腫瘍抑制機能及び体内と体外(in vitro, in vivo)の一致した結果に基づき、miR-302は本発明を使用して癌治療薬物を調製するマイクロRNAの実例とされることが理解できる。

[マイクロRNA抽出物の傷口治癒処理における適用]

発明者は、本発明において生成された十分なマイクロRNA miR-302の前駆体(pre-miR-302s)及び関連するmiR-302をコードするプラスミドベクターの、動物傷口治癒における使用を調査した(実施例13)。pre-miR-302s及び関連するプラスミドベクターは、実施例1と実施例5に記載された方法により増幅され、かつ実施例5と実施例6に記載された方法により抽出された。そして、分離されたpre-miR-302s及び関連するプラスミドベクターは、予め用意された、カカオバター、綿実油、オリーブオイル、ビルビン酸ナトリウム、及び白色ワセリンを含む軟膏基剤と混合された。当該予め用意された軟膏基剤におけるmiR-302の前駆体及びベクターの濃度は $10 \mu\text{g/mL}$ である。メスで皮膚を切り開いて皮膚の開放創を作る。miR-302及び/又はpre-miR-302を含む又は含まない軟膏を傷口に直接塗布し、軟膏は、創部全体を覆った。そして、更に液状包帯(liquid bandage)で処理済みの領域をシールした。図12に示されるように、二週間以内に、miR-302及び/又はpre-miR-302での処理は傷口治癒の速度を顕著に向上させたことがはっきり示され、当該治癒速度は他の処理群と対照群全体の治癒速度の二倍以上である。なお、傷口について、miR-302及び/又はpre-miR-302で治療された後の傷口治癒領域には正常な毛の再成長が現れ、かつ瘢痕が残っていないのに対して、他の処理群の結果では、小さな瘢痕が残っており、かつ毛の成長がなかった(黒い矢印で示す)。

[本発明の他の適用]

本発明の好ましい適用実施例の一つは、生物医学研究、薬学上及び治療上の適用、例えば遺伝子調節及び遺伝子治療のためのマイクロRNA及び/又は低分子ヘアピンRNAを生成することである。例えば、米国特許出願第12/318,806号に開示されたように、miR-302はヒト細胞の腫瘍抑制因子であるが、これに限定されない。本発明は、癌治療又は薬物開発のための十分なmiR-302及び/又はその前駆体/ホモログを製造できる。具体的には、治療性の、微生物、動物又は植物から分離されたマイクロRNA/低分子ヘアピンRNA(microRNA/shRNA)の遺伝子は、プラスミドベクターにクローニング(Cloning)され、II型真核ポリメラーゼ(pol-2)又はpol-2適合性ウイルスプロモーターで制御されることができ、当該プラスミドベクターは、非病原性細菌内に送達されることができ、このマイクロRNA/shRNAの発現ベクターを含む細菌が患者の細胞内に導入されると、当該患者は、グリセリン又はエタノールを服用して当該治療性マイクロRNA/shRNAの当該細菌内での生成を誘発し、細胞内に放出させることで、不調及び/又は疾患を治療することができる。

【0022】

10

20

30

40

50

本発明のもう一つの好ましい適用実施例は、生物医学研究、薬学上及び治療上の適用のための機能性タンパク質／ペプチドを生成することである。例えば、得られたタンパク質／ペプチドは、糖尿病を治療するためのインスリン、腫瘍／癌を治療するための腫瘍抑制タンパク質、正常な身体成長を促進させるための増殖因子、生物医学研究又はワクチン／血清に使用される抗体、及び分子生物学及び生物医学研究に使用される全ての種類の生物酵素であってもよいが、これらに限定されない。具体的には、治療性の、かつ微生物、動物又は植物から分離されたタンパク質／ペプチドの遺伝子は、プラスミドベクターにクローニングされ、II型真核ポリメラーゼ (pol - 2) 又は pol - 2 適合性ウイルスプロモーターで制御されることができ、当該プラスミドベクターは、非病原性細菌内に送達されることができる。この遺伝子発現ベクターを含む細菌が患者の細胞内に導入されると、当該患者は、グリセリン又はエタノールを服用して当該治療性タンパク質／ペプチドの当該細菌内での生成を誘発し、細胞内に放出させることで、不調及び／又は疾患を治療する。

10

【0023】

本発明のもう一つの好ましい適用実施例は、ヒト及び／又は動物のためのタンパク質食物収量及び薬物供給を向上させることである。細菌の迅速な増殖によるタンパク質生成は、コストの高い家畜／動物の維持に必要な時間と人力を低減できる。また、必要のない動物犠牲を回避できる。本発明の利点は、哺乳類遺伝子プロモーターを使用して哺乳類タンパク質を生成し、遺伝子工学と遺伝子修飾 (modification) に伴うリスクを低下させることができることにある。

20

【0024】

本発明のもう一つの可能な適用実施例は生物兵器を製造することである。例えば、微生物、動物又は植物から分離された毒物／有毒タンパクの遺伝子がプラスミドベクターにクローニングされ、かつII型真核ポリメラーゼ (pol - 2) 又は pol - 2 適合性ウイルスプロモーターで制御されることが可能であり、当該微生物、動物又は植物は、炭疽杆菌 (Bacillus anthracis)、毒葛、クラゲ、昆虫、魚類、両生類、及び蛇類等を含むがこれらに限定されない。当該プラスミドベクターは非病原性細菌内に送達されることができる。pol - 2 プロモーター駆動性遺伝子発現を誘導可能な化学剤が存在しない場合に、これらのプラスミドベクターを保有している細菌はひそかに増幅するが無害である。しかし、化学剤、例えばMOPS、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物が環境に存在すれば、細菌内の当該毒物／有毒タンパクの遺伝子が活性化されその効果が発揮される。

30

A. 定義

本発明について理解しやすくするため、いくつかの用語は次のように定義される：

核酸 (Nucleic Acid)：デオキシリボ核酸 (DNA) 又はリボ核酸 (RNA) の一本鎖又は二本鎖のポリマーである。

【0025】

ヌクレオチド (Nucleotide)：糖部分 (ペントース (pentose))、リン酸塩 (phosphate)、及び窒素含有複素環式塩基 (nitrogenous heterocyclic base) から構成されたデオキシリボ核酸 (DNA) 又はリボ核酸 (RNA) のモノマー。当該塩基は、グリコシド炭素 (glycosidic carbon, 当該ペントースの1'の炭素) を介して、当該糖部分に連結されており、当該塩基及び糖の組合せはヌクレオシド (nucleoside) である。ヌクレオシドは、当該ペントースの3'位又は5'位で少なくとも1つのリン酸と結合され、ヌクレオチド (nucleotide) になる。デオキシリボ核酸 (DNA) とリボ核酸 (RNA) はそれぞれに、異なるタイプのヌクレオチド単位、即ち、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドからなる。

40

【0026】

オリゴヌクレオチド (Oligonucleotide)：2つ以上の、好ましくは3つ以上の、そして通常は10個以上のデオキシリボ核酸 (DNA) 及び／又はリボ核酸 (

50

RNA) のモノマーからなる分子である。13 個以上のモノマーを含むオリゴヌクレオチドは通常ポリヌクレオチド (polynucleotide) とも呼ばれる。オリゴヌクレオチドの正確な長さは種々の要素に依存するが、当該オリゴヌクレオチドの最も好適な機能又は用途に依存する。オリゴヌクレオチドは、化学合成、DNA 複製、RNA 転写、逆転写、又はそれらの組合せを含む任意の方法で生成できる。

【0027】

ヌクレオチド類似体 (Nucleotide Analog) : A (アデニン)、T (チミン)、G (グアニン)、C (シトシン) 又は U (ウラシル) ヌクレオチドとは構造的に異なっているが、核酸分子内の通常のヌクレオチドを置換可能な程度に十分に類似しているプリン (purine) 又はピリミジン (pyrimidine) ヌクレオチドである。

10

【0028】

核酸組成物 (Nucleic Acid Composition) : オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであり、例えば、一本鎖又は二本鎖分子構造を有する DNA 又は RNA 配列、又は DNA / RNA 配列の混合物である。

【0029】

遺伝子 (Gene) : 核酸組成物のうちのオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの配列が RNA 及び / 又はポリペプチド (タンパク質) をコードする、その核酸組成物である。遺伝子は、ノンコーディング RNA、例えば低分子ヘアピン RNA (shRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA、及びそれらの RNA 前駆体と誘導体をコードし得る。一方、遺伝子は、タンパク質 / ペプチドの合成に必須のタンパク質コーディング RNA、例えば、メッセンジャー RNA (mRNA) 及びその前駆体と誘導体をコードし得る。場合によって、タンパク質コーディング RNA は、少なくとも 1 つのマイクロ RNA 又は shRNA 配列を含んでもよい。

20

【0030】

一次 RNA 転写産物 (Primary RNA Transcript) : 遺伝子から直接転写され、かつ RNA プロセッシングも修飾も受けていない RNA 配列である。

前駆体メッセンジャー RNA (Precursor messenger RNA, pre-mRNA) : タンパク質コーディング遺伝子が真核細胞の II 型真核 RNA ポリメラーゼ (Pol - II) により、転写と呼ばれる細胞内メカニズムによって生成される一次 RNA 転写産物である。前駆体メッセンジャー RNA の配列は、5' 末端非翻訳領域 (5' - UTR)、3' 末端非翻訳領域 (3' - UTR)、エキソン (exon) 及びイントロン (intron) を含んでいる。

30

【0031】

イントロン (Intron) : 非タンパク質リーディングフレームをコードする遺伝子転写産物配列の一部又は複数の部分であり、例えば、インフレームイントロン (in-frame intron)、5' 末端非翻訳領域 (5' - UTR) 及び 3' 末端非翻訳領域 (3' - UTR) である。

【0032】

エキソン (Exon) : タンパク質リーディングフレーム (cDNA) をコードする遺伝子転写産物配列の一部又は複数の部分であり、例えば、細胞遺伝子、増殖因子、インスリン、抗体及びそれらの類似物 / ホモログと誘導体の相補的デオキシリボ核酸 (cDNA) である。

40

【0033】

メッセンジャー RNA (Messenger RNA, mRNA) : 前駆体メッセンジャー RNA のエキソンのアセンブリである。メッセンジャー RNA は、細胞内の RNA スプライシング機構、例えばスプライセオソームによるイントロンの除去の後に形成され、ペプチド / タンパク質合成のためのタンパク質コーディング RNA として使用される。当該メッセンジャー RNA にコードされるペプチド / タンパク質は、酵素、増殖因子、インスリン、抗体及びそれらの類似物 / ホモログと誘導体を含むがこれらに限定されない。

50

【 0 0 3 4 】

相補的デオキシリボ核酸 (Complementary DNA , cDNA) : 一本鎖又は二本鎖デオキシリボ核酸 (DNA) であり、mRNA 配列に相補的な配列を含み、イントロン配列をまったく含んでいない。

【 0 0 3 5 】

センス (Sense) : 配列順序及び組成は相同 mRNA と同じである核酸分子である。センスの構造形態は、「 + 」、「 s 」又は「 sense 」の符号で示される。

アンチセンス (Antisense) : 各 mRNA 分子に相補的な核酸分子である。アンチセンスの構造形態は、「 - 」符号、或いは、DNA 又は RNA の前に「 a 」又は「 antisense 」を付けて示され、例えば、「 aDNA 」又は「 aRNA 」である。

10

【 0 0 3 6 】

塩基対 (Base Pair , bp) : 二本鎖 DNA 分子に存在するアデニン (A) とチミン (T) との対関係 (partnership)、又はシトシン (C) とグアニン (G) との対関係である。RNA において、ウラシル (U) がチミン (T) に代わっている。一般に、当該対関係は、水素結合によりなされている。例えば、センス配列「 5' - A - T - C - G - U - 3' 」は、そのアンチセンス配列「 5' - A - C - G - A - T - 3' 」と完全塩基対関係を形成できる。

【 0 0 3 7 】

5' 末端 (5' - end) : 1 つのヌクレオチドの 5' - 水酸基がホスホジエステル結合により、次のヌクレオチドの 3' - 水酸基に結合された連続したヌクレオチドの 5' 位においてヌクレオチドが欠けている末端である。1 つ以上のリン酸塩のような他の官能基が当該末端に存在し得る。

20

【 0 0 3 8 】

3' 末端 (3' - end) : 1 つのヌクレオチドの 5' - 水酸基がホスホジエステル結合で次のヌクレオチドの 3' - 水酸基に結合された連続したヌクレオチドの 3' 位においてヌクレオチドが欠けている末端である。当該末端に他の官能基、多くの場合は水酸基が存在し得る。

【 0 0 3 9 】

テンプレート (Template) : 核酸ポリメラーゼで複製可能な核酸分子である。テンプレートは、ポリメラーゼに依存して、一本鎖、二本鎖又は部分的な二本鎖のいずれであってもよい。合成されたコピーは、当該テンプレート、当該二本鎖テンプレート又は部分的な二本鎖のテンプレートの少なくとも一方の鎖と相補的である。RNA と DNA はいずれも、5' 末端から 3' 末端の方向に合成される。核酸二本鎖体 (duplex) の 2 本の鎖は、これらの 2 本の鎖の 5' 末端が当該二本鎖体の反対末端となるように常に整列されている (これらの 2 本の鎖の 3' 末端も同様である) 。

30

【 0 0 4 0 】

核酸テンプレート (Nucleic Acid Template) : 二本鎖 DNA 分子、二本鎖 RNA 分子、ハイブリッド分子 (例えば、DNA - RNA 又は RNA - DNA ハイブリッド)、或いは、一本鎖 DNA 又は RNA 分子である。

【 0 0 4 1 】

保存 (Conserved) : ヌクレオチド配列と予め選択された (参照) 配列の正確な相補物 (complement) とが非ランダムにハイブリダイズする場合、当該ヌクレオチド配列は当該予め選択された配列に対して保存されている。

40

【 0 0 4 2 】

相同 (Homologous) 又は相同性 (Homology) : 遺伝子又はメッセンジャー RNA (mRNA) 配列とポリヌクレオチド配列との間の類似性を意味する。核酸配列は、例えば、所定の遺伝子又は mRNA 配列に対して部分的に又は完全に相同性を有し得る。相同性は、類似するヌクレオチド数がヌクレオチド総数に占める百分率で示されてもよい。

【 0 0 4 3 】

50

相補的 (Complementary) 又は 相補性 (Complementarity) 又は Complementation : 上記の塩基対の規則 (「base pair rule」) により、塩基の対合が発生する 2 つのポリヌクレオチド (即ち、mRNA と cDNA の配列) である。例えば、配列「5' - A - G - T - 3'」は、配列「5' - A - C - T - 3'」及び「5' - A - C - U - 3'」に対して相補的である。相補性は、2 つの DNA の鎖の間、或いは、1 つの DNA の鎖と 1 つの RNA の鎖との間、或いは、2 つの RNA の鎖の間のいずれにもあり得る。相補性は、「部分的」、「完全」又は「総合的」であってもよい。一部の核酸塩基のみがこれらの塩基対規則に従って対合する時に、部分的相補性と称される。塩基がこれらの核酸の鎖の間で完全に対合するときに、完全又は総合的相補性と称される。核酸の鎖の間の相補性の程度は、核酸の鎖の間のハイブリダイゼーション効率及び強度に対して重要な影響がある。これは、核酸間の結合による増幅反応と検知方法にとって特に重要である。相補率 (percent complementarity 又は complementation) は、当該核酸の 1 つの鎖におけるミスマッチ塩基数が合計塩基に占める比率を参照する。したがって、50% の相補率は、塩基の半数がミスマッチであり、塩基の半分は一致していることを意味する。核酸の 2 つの鎖の塩基数が違っている場合でも、核酸の 2 つの鎖が相補的となり得る。この場合に、相補性は、一部の長い鎖と短い鎖の間に起こり、そのうち、当該長い鎖の当該一部の塩基と短い鎖の塩基が対をなす。

10

【0044】

相補的塩基 (Complementary base) : DNA 又は RNA が二本鎖構造を形成するとき、通常は対になっているヌクレオチドである。

20

相補的ヌクレオチド配列 (Complementary Nucleotide Sequence) : DNA 又は RNA の一本鎖分子におけるヌクレオチド配列であり、2 つの鎖の間で引き続く水素結合により特異的にハイブリダイズするもう 1 つの一本鎖と十分に相補的である配列である。

【0045】

ハイブリダイズ (Hybridize) 及び ハイブリダイゼーション (Hybridization) : 塩基対により複合体を形成するのに十分相補的なヌクレオチド配列間の、二本鎖の形成である。プライマー (又はスプライステンプレート) が標的 (テンプレート) と「ハイブリダイズ」する場合、ハイブリダイズで形成された複合体 (又はハイブリッド) が十分に安定であり、DNA 合成を開始するために、DNA ポリメラーゼにより必要とされるプライミング機能を提供する。競合的に阻害される (competitively inhibited) 二つの相補的ポリヌクレオチドの間には、特異的な (即ち、非ランダム的な) 相互作用が存在する。

30

【0046】

転写後の遺伝子サイレンシング (Posttranscriptional Gene Silencing) : mRNA 分解又は翻訳抑制 (translational inhibition) ステージにおける標的遺伝子のノックアウト (knockout) 効果又はノックダウン (knockdown) 効果であり、通常、外来ノウイルス DNA、又は RNA 導入遺伝子、又は低分子抑制性 RNA のいずれかにより引き起こされる。

40

【0047】

RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) : 真核細胞における転写後の遺伝子サイレンシングのメカニズムであり、低分子抑制性 RNA 分子、例えばマイクロ RNA (miRNA)、低分子ヘアピン RNA (shRNA) 及び低分子干渉 RNA (siRNA) により引き起こされる。これらの低分子 RNA 分子は通常、遺伝子サイレンサーとして機能し、これらの低分子 RNA に対して完全に又は部分的に相補的である細胞内遺伝子の発現を干渉する。

【0048】

遺伝子サイレンシング効果 (Gene silencing effect) : 遺伝子機能が抑制された後の細胞の反応であり、細胞周期の減衰 (cell cycle at

50

tenuation)、G0/G1チェックポイント停止(G0/G1-checkpoint arrest)、腫瘍抑制、抗腫瘍生成、癌細胞アポトーシス、及びそれらの組合せを含むがこれらに限定されない。

【0049】

ノンコーディングRNA(Non-coding RNA)：細胞内翻訳メカニズムによりペプチド又はタンパク質を合成できないRNA転写産物である。ノンコーディングRNAは、長い及び短い調節性RNA分子、例えばマイクロRNA、低分子ヘアピンRNA、低分子干渉RNA、及び二本鎖RNAを含む。これらの調節性のRNA分子は通常、遺伝子サイレンサーとしての機能を有し、細胞内における、これらのノンコーディングRNAに対して完全に又は部分的に相補的である遺伝子の発現を干渉する。

10

【0050】

マイクロRNA(MicroRNA, miRNA)：当該マイクロRNA(miRNA)に対して部分的に相補的である標的遺伝子の転写産物に連結可能な一本鎖RNAである。miRNAは通常、長さが約17~27個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであり、miRNAと標的mRNAとの間の相補程度に従い、細胞内mRNA標的物を直接分解するか、或いは標的mRNAのタンパク質翻訳を直接抑制するかのいずれかを行うことができる。天然miRNAは、殆ど全ての真核細胞内から見出され、例えば、抗ウイルス感染の防御機能を有し、また、動植物の発生中の遺伝子発現の調整を可能にする。

【0051】

前駆体マイクロRNA(Pre-miRNA)：1つ又は複数のマイクロRNA(miRNA)を生成するために細胞内RNAエンドリボヌクレアーゼRNase IIIと相互作用するための、ステムアーム(stem-arm)及びステムループ(stem-loop)領域を含んでいるヘアピン様一本鎖RNAであり、これらのマイクロRNAは、その標的遺伝子、又は配列が当該(これらの)マイクロRNAの配列に相補的な遺伝子をサイレンシングすることができる。前駆体マイクロRNAのステムアーム領域は、完全に(100%)又は部分的に(ミスマッチ)ハイブリダイズされた二本鎖体のいずれかを形成する一方、ステムループはサイクル又はヘアピンループ構造形態を形成すべくステムアーム二本鎖体の一方の端部に連結されている。本発明において、前駆体マイクロRNAは一次マイクロRNA(pri-miRNA)を含んでもよい。

20

【0052】

低分子干渉RNA(small interfering RNA, siRNA)：サイズが約18~27個の完全な塩基対のリボヌクレオチド二本鎖体であり、かつ殆ど完全に相補的である標的遺伝子の転写産物を分解することができる短い二本鎖RNAである。

30

【0053】

低分子ヘアピン又は短鎖ヘアピンRNA(small hairpin又はshort hairpin RNA, shRNA)：ヘアピン様構造を形成するために、一致していない(unmatched)ループオリゴヌクレオチドで分割された、一対の部分的に又は完全に一致したステムアームヌクレオチド配列を含む一本鎖RNAである。多くの天然マイクロRNA(miRNA)は、ヘアピン様RNA前駆体、即ち、前駆体マイクロRNA(pre-miRNA)に由来する。

40

【0054】

ベクター(Vector)：異なる遺伝子環境に移動又は滞在できる組換え型DNA(recombinant DNA, rDNA)のような組換え型核酸組成物である。一般的に、別の核酸が有効に連結されている。当該ベクターは細胞内での自己複製ができ、当該ベクター及び取付けられたセグメントも複製される。一種の好ましいベクターはエピソーム(episome)であり、即ち、染色体外(extrachromosomal)での複製が可能な核酸分子である。好ましいベクターは、自己複製、核酸の発現が可能なものである。一つ以上のポリペプチドをコードする遺伝子及び/又はノンコーディングRNA遺伝子の発現を誘導できるベクターは、ここでは「発現ベクター(expression vector)」又は「発現コンピテントベクター(expression-co

50

mpetent vector)」と呼ばれる。特に重要なベクターは、逆転写酵素 (reverse transcriptase) を使用して、mRNA から cDNA のクローニングを可能にする。ベクターの成分は、ウイルスプロモーター又は I I 型 (type - I I) の RNA ポリメラーゼ (Pol - I I 又は pol - 2) プロモーター、又はその両方、Kozak コンセンサス翻訳開始位 (Kozak consensus translation initiation site)、ポリアデニル化シグナル (polyadenylation signals)、複数の制限 / クローニング部位 (restriction / cloning site)、pUC 複製開始点 (pUC origin of replication)、複製可能な (replication - competent) 原核細胞内の少なくとも 1 つの抗生物質耐性遺伝子を発現するための SV 40 初期プロモーター (SV 40 early promoter)、哺乳類細胞内の複製のための選択性の SV 40 複製開始点 (SV 40 origin)、及び / 又はテトラサイクリン応答因子を含んでもよい。ベクターの構造は、線形、或いは環形の一本鎖又は二本鎖 DNA であってもよく、プラスミド、ウイルスベクター、トランスポゾン、レトロトランスポゾン、DNA 導入遺伝子、ジャンピング遺伝子、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる。

【0055】

プロモーター (Promoter) : ポリメラーゼ分子で識別され (又はそれに結合され)、RNA の合成を開始させる核酸である。本発明によれば、当該プロモーターは、既知のポリメラーゼ結合位置、エンハンサーとその類似物、及び所要のポリメラーゼを使用して RNA 転写産物の合成を開始可能な任意の配列であってもよい。

【0056】

真核プロモーター (Eukaryotic promoter) : 遺伝子転写に必要な、I I 型真核 RNA ポリメラーゼ (pol - 2)、pol - 2 同等物、及び / 又は pol - 2 適合性ウイルスプロモーターで識別可能な核酸モチーフ (motifs) である。

【0057】

I I 型 RNA ポリメラーゼ (Pol - I I 又は pol - 2) プロモーター (Type - I I RNA polymerase (Pol - I I or pol - 2) Promoter) : I I 型真核 RNA ポリメラーゼ (Pol - I I 又は pol - 2) で識別され、かつそれに結合される RNA プロモーターであり、当該ポリメラーゼは、真核メッセンジャー RNA (mRNA) 及び / 又はマイクロ RNA (miRNA) を転写する。例えば、pol - 2 プロモーターは、哺乳類の RNA プロモーター又はサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターであってもよいが、それらに限定されない。

【0058】

I I 型 RNA ポリメラーゼ (Pol - I I 又は pol - 2) 同等物 (Type - I I RNA Polymerase (Pol - I I or pol - 2) Equivalent) : 哺乳類 I I 型 RNA ポリメラーゼ (Pol - I I 又は pol - 2) 及び Pol - I I 適合性ウイルス RNA ポリメラーゼからなる群から選ばれる真核転写機構である。

【0059】

Pol - I I 適合性ウイルスプロモーター (Pol - I I Compatible Viral Promoter) : 真核 pol - 2 又はそれと等価な転写機構により遺伝子発現可能なウイルスの RNA プロモーターである。例えば、pol - 2 適合性ウイルスプロモーターは、サイトメガロウイルスプロモーター、又はレトロウイルス長末端反復 (LTR) プロモーターであってもよいが、それらに限定されない。

【0060】

シストロン (Cistron) : アミノ酸残基の配列をコードする DNA 分子内のヌクレオチド配列であり、上流及び下流 DNA 発現制御要素を含む。

RNA プロセッシング (RNA processing) : RNA の成熟、修飾、及び分解に関する細胞内メカニズムであり、RNA スプライシング、イントロン切除、エキソソーム消化 (exosome digestion)、ナンセンス変異依存分解 (non

sense-mediated decay, NMD)、RNAエディティング、RNAプロセッシング、及びそれらの組合せを含む。

【0061】

抗生物質耐性遺伝子 (Antibiotic Resistance Gene) : 発現が抗生物質を分解する能力を有する遺伝子である。当該抗生物質は、ペニシリンG、ストレプトマイシン、アンピシリン (Amp)、ネオマイシン、G418、カナマイシン、エリスロマイシン、パロマイシン (paromycin)、ホスホマイシン、スペクトロマイシン、テトラサイクリン (Tet)、ドキシサイクリン (Dox)、リファピシン、アムホテリシンB、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、セファロチン、タイロシン及びそれらの組合せからなる群から選ばれる。

10

【0062】

制限/クローニング部位 (Restriction/Cloning Site) : 制限酵素切断のためのDNAモチーフである。これらの制限/クローニング部位は、AatII、AccI、AflII/III、AgeI、ApaI/LI、AseI、Asp718I、BamHI、BbeI、BclI/II、BglII、BsmI、Bsp120I、BspHI/LU11I/120I、BsrI/BI/GI、BssHII/SI、BstBI/U1/XI、ClaI、Csp6I、DpnI、DraI/II、EagI、Ecl136II、EcoRI/RII/47III/RV、EheI、FspI、HaeIII、HhaI、HinfI、HindIII、HinfI、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、SalI、Sau3AI、SmaI、SnaBI、SphI、SspI、StuI、TaiI、TaqI、XbaI、XhoI、XmaIの切断位置を含むがこれらに限定されない。

20

【0063】

遺伝子送達 (Gene Delivery) : ポリソーム (polysomal) 導入、リポソーム導入、化学導入、電気穿孔法、ウイルス感染、DNA組換え、トランスポゾン挿入、ジャンピング遺伝子挿入、マイクロインジェクション、遺伝子銃浸透、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる遺伝子工学方法である。

30

【0064】

遺伝子工学 (Genetic Engineering) : DNA制限酵素反応と接合反応、相同性遺伝子の組換え、導入遺伝子混入、トランスポゾン挿入、ジャンピング遺伝子挿入、レトロウイルス感染、及びそれらの組合せからなる群から選ばれるDNA組換え方法である。

【0065】

細胞周期レギュレーター (Cell Cycle Regulator) : 細胞分裂及び細胞増殖速度の制御に関与し、サイクリン依存性キナーゼ2 (CDK2)、サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)、サイクリン依存性キナーゼ6 (CDK6)、サイクリン、BMI-1、p14/p19Arf、p15Ink4b、p16Ink4a、p18Ink4c、p21Cip1/Waf1、p27Kip1、及びそれらの組合せを含むがこれらに限定されない細胞遺伝子である。

40

【0066】

腫瘍抑制 (Tumor Suppression) : 細胞周期の減衰、G0/G1チェックポイント停止、腫瘍抑制、抗腫瘍発生、癌細胞アポトーシス、及びそれらの組合せを含むがこれらに限定されない細胞の抗腫瘍及び抗癌メカニズムである。

【0067】

標的細胞 (Targeted Cell) : 体細胞、組織、幹細胞、生殖細胞、奇形腫細胞、腫瘍細胞、癌細胞、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる単一又は複数のヒト細胞である。

【0068】

50

癌組織 (Cancerous Tissue) : 皮膚癌、前立腺癌、乳癌、肝臓癌、肺癌、脳腫瘍 / 癌、リンパ腫、血液癌、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる腫瘍組織である。

【0069】

転写誘導物 (Transcription Inducer) : 遺伝子のRNA転写作用を促進及び / 又は強化可能な化学剤である。転写誘導物は、3 - モルホリノプロパン - 1 - スルホン酸 (MOPS)、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物と類似する化学構造を含むがこれらに限定されない。

抗体 (Antibody) : 受容体と予め選択されたりガンドを結合するための予め選択された保存ドメイン構造を有するペプチド又はタンパク質分子である。

10

【0070】

薬学上又は治療上の適用 (Pharmaceutical又はtherapeutic Application) : 多能性幹細胞の生成のような幹細胞の生成と幹細胞研究及び / 又は治療発展、癌治療、疾患処理、傷口治癒処理、薬物収量と食物供給の向上、及びそれらの組合せのために有用な生物医学的利用及び / 又は装置である。

B. 組成物及び適用

原核細胞内においてRNA及び / 又はタンパク質の発現を誘導するための組成物及びその使用であって、(a) 3 - モルホリノプロパン - 1 - スルホン酸 (MOPS)、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物と類似する構造を有する少なくとも1種の化学剤と、(b) II型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーター駆動性発現メカニズム又はpol - 2適合性ウイルスプロモーター駆動性発現メカニズムにより制御される少なくとも1つの遺伝子を含む複数の原核細胞とを含み、(a)と(b)は、当該遺伝子のRNA及び / 又はタンパク質産物が生成されるように当該遺伝子の発現を誘発する条件下で混合される。

20

【0071】

或いは、本発明は、誘導可能な遺伝子発現組成物であり、化学剤を使用して、原核細胞内において真核RNAプロモーター駆動性転写作用を促進する。誘導可能な遺伝子発現組成物は、(a) MOPS、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物と類似する構造を有する少なくとも1種の化学剤と、(b) II型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーター駆動性発現メカニズム又はpol - 2適合性ウイルスプロモーター駆動性発現メカニズムにより制御される少なくとも1つの遺伝子を含む複数の原核細胞とを含み、(a)と(b)は、当該遺伝子の発現を誘発する条件下で混合される。

30

【0072】

本発明は、原則的に、変異性の原核プロモーターへの転換、又は大量の人力と金銭のコストがかかるハイブリドーマ又は哺乳類細胞の培養の必要がなく、II型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーターを使用して所望のRNA及び / 又はタンパク質 / ペプチドを直接発現する新規な組成物の設計、及びそれにより原核細胞を誘導して生じる迅速な応答作用を提供する。

【0073】

好ましくは、当該原核細胞は細菌細胞であり、具体的には、大腸菌 (E. coli) であり、当該化学剤は3 - モルホリノプロパン - 1 - スルホン酸 (MOPS)、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物である。なお、当該真核RNAプロモーターは、II型真核ポリメラーゼ (pol - 2) プロモーター、例えばEF1、pol - 2適合性ウイルスプロモーター、例えばサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、又はレトロウイルス長末端反復 (LTR) プロモーターであることが好ましい。当該真核RNAプロモーター制御の遺伝子は、マイクロRNA、低分子ヘアピンRNA、低分子干渉RNA、メッセンジャーRNA、これらの前駆体とホモログ、及びこれらの組合せからなる群から選ばれるノンコーディング又はタンパク質コーディングRNA転写産物、又はそれら両方をコードする。本発明において生成されたペプチド / タンパク質は、上記タンパク質コーディングメッセンジャーRNA転写産物から翻訳されたものであり、酵素、増殖因子、抗

40

50

体、インスリン、ボツリヌス毒素 (botox)、機能タンパク質とそのホモログ、及びそれらの組合せからなる群から選ばれるものであるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、当該遺伝子発現を誘導する当該条件は 37 の LB 培地に、当該化学剤が添加された細菌培養条件である。

【実施例】

【0074】

1. 細菌細胞培養と化学物質処理

z-コンピテント大腸菌形質転換キット (z-competent E. coli transformation kit, Zymo Research, カリフォルニア州アーバイン) から得られたコンピテント大腸菌 DH5 細胞株 (competent E. coli DH5) と望ましいプラスミドベクター、例えば pLVX-Grn-miR302+367 又は pLenti-EF1-RGFP-miR302 とを混合して、形質転換作用を行う。形質転換されていない細菌細胞を、10 mM の硫酸マグネシウム (MgSO_4) と 0.2 mM のブドウ糖が補充された 37 の LB (ルリア-ベルターニ (Luria-Bertani)) 培地において正常に増殖させながら、170 rpm で頻繁に振盪した。一方、形質転換した細菌細胞は、上述した LB 培地に、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを更に添加して培養した。化学誘導のために、10 mM の硫酸マグネシウムと 0.2 mM のブドウ糖が補充され、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンが添加された LB 培地において、1 リットルごとの当該 LB 培地のそれぞれに 0.5 ~ 2 ml の MOPS、グリセリン、エタノール、又はそれらの組合せを添加した。なお、形質転換した細菌細胞は、陰性対照群として、上記のアンピシリンが添加されたが、化学誘導物がまったく添加されていない LB 培地において培養された。

2. ヒト細胞培養及びマイクロRNAの導入

ヒト初代表皮細胞 (human primary epidermal skin cells, hpESC) は、20% のウシ胎仔血清 (FBS) が補充された新鮮な RPMI 1640 培養液における 4 mg/ml のコラゲナーゼ I によって、37 で最小 2 mm³ の体積から 35 分間消化させて分離したものである。分離された角化細胞は、37 で 5% の二酸化炭素の条件で、Epilife 無血清 (serum-free) の細胞培養液において培養され、当該培地には、ヒト角化細胞増殖添加剤 (HKGS, Invitrogen, カリフォルニア州カールスバッド) 及び抗生物質が添加された。細胞増殖が 50% ~ 60% の密集度 (confluency) に達したときに、細胞をトリプシン/EDTA 溶液に 1 分間曝露し、無フェノールレッドの DMEM 培養液 (phenol red-free DMEM medium, Invitrogen) で一回リンスして、更に、これらの分離された細胞を 1:10 で希釈した後、新鮮な HKGS 添加剤を含む Epilife 培養液で再播種した。ヒト癌/腫瘍細胞株 MCF7、HepG2、及び Tera-2 は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC, メリーランド州ロックビル) から取得され、製造者の指示した条件で培養された。マイクロRNA の導入において、15 μg の分離された miR-302 及び/又はその前駆体を 50 μl の導入剤 (X-tremeGENE HP DNA transfection reagent) が混合された Epilife 培養液に溶解させた。10 分間の培養を経て、当該混合液を 100 mm 細胞培養皿内で 50% ~ 60% 密集度 (confluency) に達した hpESC 又は癌/腫瘍細胞にそれぞれ添加した。12 ~ 18 時間後、新鮮な HKGS 添加剤を含む Epilife 培養液又は ATCC の指示した条件の培養液で元の培養液を交換した。3 ~ 4 日ごとに、導入ステップを 3 ~ 4 回繰り返して導入効率を向上させてもよい。細胞形態が球様に変化した後、20% の血清代替物 (Knockout serum)、1% MEM 非必須アミノ酸、100 μM の β -メルカプトエタノール、1 mM の Glutamax、1 mM のピルビン酸ナトリウム、10 ng/ml の塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、10 ng/ml の FGF-4、5 ng/ml の LIF、100 IU/ml のペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン、0.1 μM の A83-01、及び 0.1 μM のバルブロン酸 (Stemgent, カリフォルニア州サンディエゴ) が

補充された knock out DMEM / F - 12 培地 (Invitrogen) により、37、5%のCO₂の条件でこれらの細胞 (mirPSC) を培養し継代した。

3. タンパク質抽出とウエスタンブロット分析法

製造者が指示したように、プロテアーゼ抑制剤 (protease inhibitor)、ロイペプチン (Leupeptin)、TLCK、TAME 及び PMSF が補充された Cellytic - M 溶解 / 抽出試薬 (Cellytic - M lysis / extraction reagent, Sigma) により細胞 (1,000,000 個) を溶解させた。そして、12,000 rpm、4 で当該溶解液を 20 分間遠心分離し、遠心分離された上澄液が得られた。改良された SOFTmax タンパク質測定パッケージにより、E-max マイクロプレートリーダー (microplate reader, Molecular Devices, CA) 上でタンパク質濃度を測定した。還元 (reducing, +50 mM DTT) 及び非還元 (non-reducing, DTT なし) の条件で、30 µg の細胞溶解産物を SDS - PAGE サンプル緩衝液にそれぞれ添加し、6% ~ 8% のポリアクリルアミドゲルに入れる前に、3 分間沸騰させた。そして、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS - PAGE) でタンパク質を解析し、その後に、タンパク質をニトロセルロース膜にエレクトロブロッティングし、当該膜をオデッセーブロッキング試薬 (Odyssey blocking reagent, Li-Cor Biosciences, ネブラスカ州リンカーン) において培養し、室温で 2 時間保管した。次に、当該試薬に一次抗体を添加し、当該混合物を 4 で保管し作用させた。使用された一次抗体は、Oct3 / 4 (Santa Cruz Biotechnology, カリフォルニア州サンタクルーズ)、Sox2 (Santa Cruz)、Nanog (Santa Cruz)、CDK2 (Santa Cruz)、サイクリン D1 (Santa Cruz)、サイクリン D2 (Abcam)、BMI - 1 (Santa Cruz)、ケラチン 16 (Abcam)、 α -アクチン (Chemicon、カリフォルニア州テメキュラ)、RuvB (Santa Cruz)、及び RGFP (Clontech) を含んでいる。一晩経た後、TBS - T で当該膜を三回リンスし、そして、Alexa Fluor 680 反応性染料 (1:2,000, Invitrogen - Molecular Probes) を結合したヒツジ抗マウス IgG (goat anti-mouse IgG) 二次抗体に、室温で 1 時間曝露した。TBS - T で三回リンスした後、Li-Cor オデッセー赤外線映像装置 (Li-Cor Odyssey Infrared Imager) 及びオデッセーソフトウェア v. 1.0 (Li-Cor) を使用して、免疫プロットの蛍光スキャン及び映像分析を処理した。

4. RNA 抽出とノーザンブロット分析法

mirVana (登録商標) マイクロ RNA 分離キット (Ambion, テキサス州オースティン) により総 RNA (10 µg) を分離した。そして、15% の TBE - 尿素ポリアクリルアミドゲル又は 3.5% の低融点アガロースゲル電気泳動で当該 RNA を分画し、当該分画された RNA をナイロン膜にエレクトロブロッティングした。そして、[LNA] - DNA プローブ (5' - [TCAC TGA AAC] ATGGAAGCAC TTA - 3') (配列番号 1) により、miR - 302 及び / 又は pre-miR - 302 を検知した。当該プローブは、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) で純化され、かつ、[³²P] - dATP (>3000 Ci / mM, Amersham International, イリノイ州アーリントンハイツ) の存在下で、ターミナルトランスフェラーゼ (terminal transferase, 20 units) で 20 分間テール標識 (tail-labeled) された。

5. プラスミド増幅とプラスミド DNA / 総 RNA 抽出

プラスミドで形質転換 (実施例 1) されたコンピテント大腸菌 DH5 細胞を 37 で、10 mM の硫酸マグネシウム及び 0.2 mM のブドウ糖が補充された LB 培地中に一晩培養し、170 rpm で頻りに振盪した。増幅作用以外に、上記培地の 1 リットルごとに、さらに 0.5 ~ 2 ml の MOPS、グリセリン、及び / 又はエタノールを添加して真核プロモーター駆動の RNA 及び / 又はタンパク質の生成を誘発した。プラスミド純化キッ

ト (HiSpeed plasmid purification kit, Qiagen, カリフォルニア州バレンシア) を使用して、全ての増幅されたプラスミド DNA 及び発現された mRNA / マイクロ RNA をあわせて分離し、分離ステップは、製造者の指示したステップに従うが少し調整したものであり、即ち、RNase A を P1 緩衝液内に添加しなかった。プラスミド及び mRNA s / マイクロ RNA 両方を含む最終抽出産物は、DEPC 処理された超純水 (ddH₂O) に溶解され、使用されるまで - 80 で保管された。増幅されたプラスミドベクターのみを純化したい場合に、製造者の指示したステップに従って、RNase A を P1 緩衝液に添加する。

6. マイクロ RNA 及び mRNA の分離 / 純化

更に、製造者の指示に従って、mirVana (登録商標) miRNA 分離キット (Ambion, テキサス州オースティン) を使用して実施例 5 の方法により分離された総 RNA を純化した。最終産物は、DEPC 処理された超純水 (ddH₂O) に溶解され、使用されるまで - 80 で保管された。細菌 RNA は自然状態において分解が非常に迅速 (数時間) であるが、真核ポリ-A RNA (mRNA) 及びヘアピン様マイクロ RNA 前駆体 (pre-miRNA 又は pri-miRNA) は 4 で比較的安定 (半減期が 3 ~ 4 日にも達する) であるので、この差異を利用して後の適用のための純 mRNA 及び / 又は pre-miRNA を取得しておくことができる。例えば、RGFP の mRNA は、細胞導入の検証のために使用可能であり、pre-miR-302s は、体細胞を胚性幹細胞様 (ESC-like) の iPS 細胞に再プログラム化するために使用可能である。純化された pre-miR-302s を幹細胞培養液に添加して当該再プログラム化を促進及び維持することができる。

7. 免疫染色分析

組織サンプルの包埋、切片化、及び染色は、従来の報告のとおりに行われた (林 (Lin) 等, RNA 2008)。一次抗体は、Oct3/4 (Santa Cruz)、Sox2 (Santa Cruz)、Nanog (Santa Cruz)、及び RGFP (Clontech) を含んでいる。蛍光染料で標記されたヒツジ抗ウサギ (goat anti-rabbit) 又はウマ抗マウス (horse anti-mouse) 抗体を二次抗体 (Invitrogen-Molecular Probes) として使用した。蛍光 80i 顕微鏡定量分析システム (fluorescent 80i microscopic quantitation system) 及び Metamorph 映像処理プログラム (Nikon) を使用して 100x 又は 200x の拡大倍率で結果を検証及び分析した。

8. 亜硫酸水素塩による DNA 配列決定

DNA 分離キット (DNA isolation kit, Roche) を使用して約 2,000,000 個の細胞から遺伝子 DNA を分離した。分離された DNA を 1 µg 取って、製造者の指示した方法に従って、亜硫酸水素塩 (CpGenome DNA modification kit, Chemicon, カリフォルニア州テメキュラ) で処理した。亜硫酸水素塩の処理は、全ての非メチル化シトシンをウラシルに変換し、メチル化シトシンはシトシンのままである。亜硫酸水素塩 DNA 配列決定の分析について、我々は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で Oct3/4 及び Nanog のプロモーター領域を増幅した。Oct3/4 プロモーター領域の増幅に使用されたプライマーは、5' - GAGGCTGGAG CAGAA GGATT GCTTTTGG - 3' (配列番号 2) 及び 5' - CCCTCCTGAC CCATCACCTC CACCAACC - 3' (配列番号 3) を含み、Nanog プロモーター領域の増幅に使用されたプライマーは、5' - TGGTTAGGTT GGTTTTTAAAT TTTTG - 3' (配列番号 4) 及び 5' - AACCCACCCCT TATAAATTCT CAATT A - 3' (配列番号 5) を含んでいる。まず、亜硫酸水素塩で修飾された DNA (50 ng) とこれらのプライマー (計 100 pmole) を 1 倍 PCR 緩衝液において混合し、94 に加熱してから 2 分間維持し、そして、すぐに氷で冷却した。その後、高精度の PCR キット (Expand High Fidelity PCR kit, Roche) を使用して、94 で 1 分

間及び70 で3分間のPCRを25サイクル行った。更に、3%のアガロースゲル電気泳動法で正確な長さを有する増幅されたDNA産物を分画し、そして、ゲル抽出キット(Qiagen)で当該DNA産物を純化してから、DNA配列決定を行った。亜硫酸水素塩で修飾されたDNA配列における変化していないシトシンと、亜硫酸水素塩で修飾されていないDNA配列における変化していないシトシンとを比較することにより、DNAメチル化位置の詳細プロフィールを得られた。

9. 細胞浸潤試験

200 µg/mlのMatrigelを単独で、又は、無フェノールレッドDMEM培養液に20%のFBS及び1%のL-グルタミン(L-Glutamine)が補充されたMatrigelをチャンバーインサート(chamber inserts, 孔径12 µm, Chemicon)に塗布し、チャンバーインサートを無菌環境に置き、一晚乾燥させた。無フェノールレッドのDMEM培養液により細胞を収集、洗浄、及び再懸濁して、最終的に100,000個/mlの細胞密度にした。500 µlの当該細胞懸濁液を上層チャンバー(top chamber)内に分配し、1.5 mlのDMEM条件の培養液を下層チャンバーに添加して走化性勾配(chemotactic gradient)を形成した。37 で16時間の一晚培養の後、浸潤状況を測定した。脱脂綿により上層チャンバーを拭き、そして100%のメタノール中で膜下側に位置する浸潤細胞を10分間固定し、空気乾燥し、クレシルバイオレット(cresyl violet)で20分間を染色し、水でやさしく洗浄した。乾燥した後、1:1の100%のエタノール及び0.2 Mのクエン酸ナトリウム(Na Citrate)を含む洗液を使用して膜上のクレシルバイオレット染色を20分間溶出し、精密マイクロプレートリーダー(Precision Microplate Reader, Molecular Dynamics)により波長570 nmでの吸光度を読み取った。被測定サンプルの吸光度と、チャンバーインサート膜層(総細胞数)を拭かない場合に得られた吸光度とを比較して、浸潤細胞の百分率を得た。結果を図10Aに示した。

10. 細胞接着試験

細胞接着試験は従来 of 報告に記載されたとおりに行った(Lin等, Cancer Res. 2010)。ヒト骨髄内皮細胞(hBMEC)を100,000個/mlの密度で96ウェルプレートに蒔き、試験を行う前に、接着培養液(adhesion medium) [RPMI 1640 / 0.1%のBSA / 20 mM HEPES (pH 7.4)]で洗浄した。トリプシン(腫瘍/癌細胞に使用される)又はコラゲナーゼ(mirPS細胞に使用される)を使用して、被測定細胞を分離し、無菌生理食塩水で細胞を洗浄し、細胞を1,000,000個/mlの密度で10 µM fura-4アセトキシメチルエステル(acetoxymethyl ester, fluorescent probe, Sigma)を含有するPBSに再懸濁させ、37 の暗い環境で1時間保管した。そして、当該細胞を遠心分離し、1% (v/v)のプロベネシド(probenecid, 100 mM)を含む無血清培養液で細胞を洗浄し、そして、当該細胞を接着培養液及び37 の暗い環境で20分間培養し、細胞内の蛍光プローブを活性化する。次に、当該100,000個の細胞(1ウェル当たり300 µlの細胞懸濁液)をコンフルエントな(c confluent) hBMEC内皮細胞単層に添加し、37 で50分間培養した。250 µlの接着培養液で二回洗浄し、接着されていない細胞を除去した。蛍光プレートリーダー(fluorescent plate reader, Molecular Dynamics)を使用して37 で励起波長485 nm及び発光波長530 nmで蛍光を読み取った。結果を図10Bに示した。

11. 移植と奇形腫の形成

約5~10個のmirPS細胞に由来する胚様体(4~8細胞ステージ)を50 µlのDMEM培養液と基底膜基質Matrigelの2:1の混合液に懸濁させ、そしてこれらのmirPS細胞に由来する胚様体を生後六週間のメス偽妊娠免疫不全SCID-beigeマウスの子宮に移植した。当該偽妊娠のマウスを準備する方法として、腹膜内に1 IUのヒト閉経期ゴナドトロピン(human menopausal gonadot

rophin, HMG) を二日注射し、そしてヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotrophin, hCG) を一日注射した。移植の間に、2.5% のアベルチン (Avertin) 溶液を使用して、マウスごとに 0.4 ml の用量でマウスを麻酔した。移植後、又は当該移植細胞塊が 100 mm^3 の大きさ以上に発達した時、当該異種移植塊 (xenografted masses) を 3 ~ 4 週間監視した。当該嚢腫 / 奇形腫を切除した後、(長さ \times 幅²) / 2 の式によりその体積を計算し、それに計数及び秤量し、更に組織学分析を行った。奇形腫様組織嚢腫 (teratoma-like tissue cysts) の形成は通常、移植後約 2.5 週間で観察できる。結果は図 11A に示すとおりである。

12. 生体内腫瘍発生試験

我々は、Tera-2 細胞 (総体積 $100\text{ }\mu\text{ l}$ の Matrigel-PBS における 2,000,000 個の細胞) を生後八週間のオスマウス (BALB/c nu/nu 系統) の脇腹 (例えば、右後肢) に異種移植した。当該腫瘍を週ごとに監視し、Tera-2 の異種移植後一週間で、インサイチュ注射で pre-miR-302s 又は pre-miR-302 をコードするプラスミドベクター、例えば pCMV-miR302s ベクター又は pCMV-miR302d* ベクターを導入した。2 $\mu\text{ g}$ (マウスの体重 1 g あたり) の、ポリエチレンイミン (PEI) で調製された pCMV-miR302s 又は pCMV-miR302d* ベクター (総計 10 $\mu\text{ g}$) により、処理 (二回の処理の間に三日の間隔を置く) を 5 回行った。製造者の使用指示に従って、体内-jetPEI デリバリー試薬 (Polypplus-transfection Inc., ニューヨーク州ニューヨーク) を使用した。注射完了三週後、又は、ベクターで処理されていない腫瘍が約 100 mm^3 の平均サイズまで増殖した後、サンプルの収集を開始した。主要器官、例えば血液、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓及び脾臓、及び異種移植腫瘍を取り出し、腫瘍の組織学評価及び免疫反応細胞毒性テストを行った。触診で腫瘍の形成を監視し、(長さ \times 幅²) / 2 の式により腫瘍体積を計算した。なお、腫瘍についても、計数、解剖及び秤重し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E) 及び免疫染色試験で組織学検査を行った。組織学検査の結果、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓及び脾臓において検知できる組織病変はなかった。結果を図 11A と 11C に示した。

13. 生体傷口治癒試験

Pre-miR-302s 及び関連プラスミドベクターは、実施例 1 と実施例 5 に記載の方法で増幅され、実施例 5 と実施例 6 に記載の方法で抽出された。そして、分離された pre-miR-302s 及び関連プラスミドベクターは、予め用意されたカカオバター、綿実油、オリーブオイル、ビルビン酸ナトリウム、及び白色ワセリンを含む軟膏基剤と混合された。準備された軟膏基剤における当該 miR-302 前駆体の濃度が $10\text{ }\mu\text{ g} / \text{mL}$ である。メスにより、皮膚を切開して生皮膚の開放創を生じさせ、約 0.5 cm の傷口を対照群として生じさせ、1.0 cm の傷口を実験群として生じさせた。軟膏 (約 0.3 mL) を傷口に直接塗布し、創部全体を覆った。更に、液状包帯により処理済みの領域をシールした。

14. 統計分析

免疫染色、ウェスタンブロット及びノーザンブロットの分析について、75% よりも大きいシグナル強度変化をいずれも陽性結果とみなし、これらの結果は、分析後、平均値 \pm 標準差 (mean \pm SE) で表す。データの統計分析は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で行われた。主たる効果が有意である場合、ダネットの多重比較 (Dunnnett's post-hoc test) 検定を使用して、対照群と顕著な差異がある群 (グループ) を識別した。2 つの処理群の間を一对ごとに比較するために、両側スチューデント T 検定 (two-tailed student t test) を使用した。2 つ以上の治療群を含む実験については、ANOVA の後に、多重範囲検定 (post-hoc multiple range test) を実施した。p < 0.05 の確率値は統計学的に有意であると考えた。全ての p 値は両側試験にて決定した。

【0075】

10

20

30

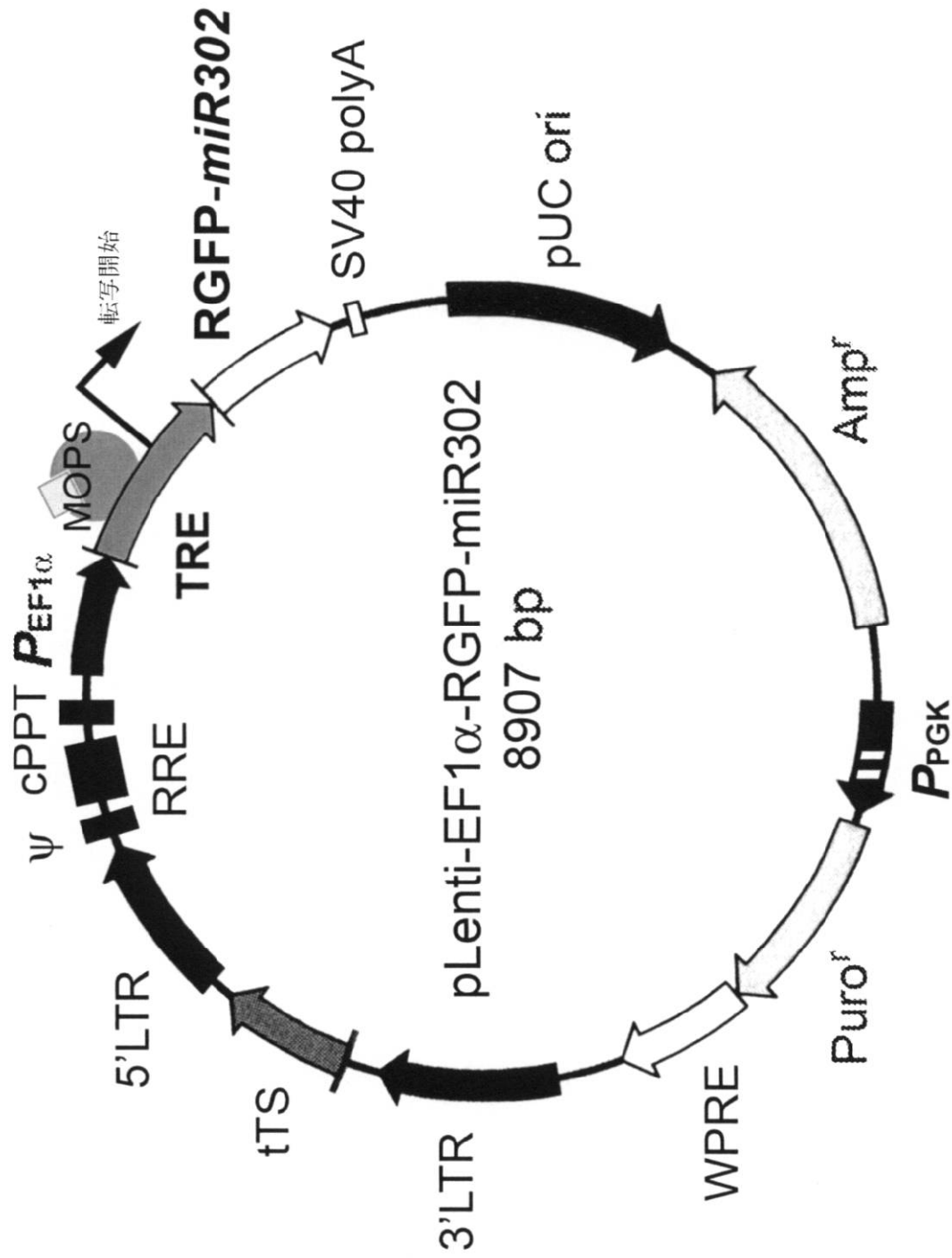
40

50

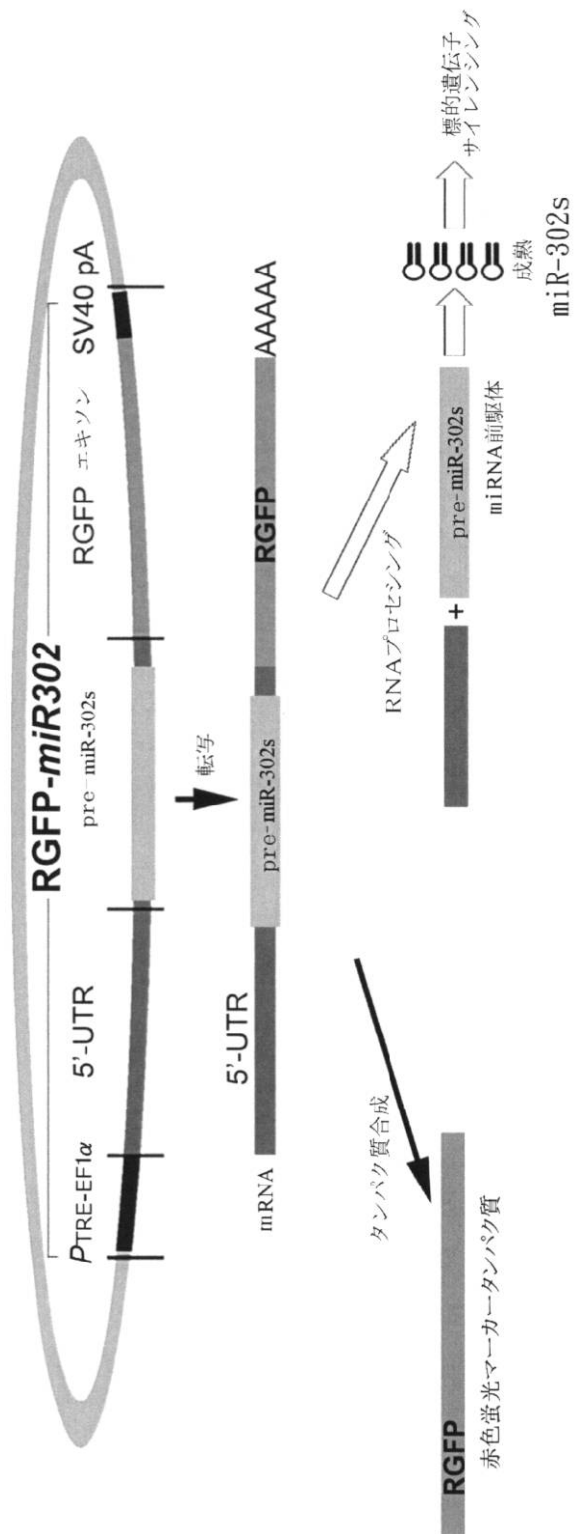
参考文献

1. Lin SL and Ying SY. (2006) Gene silencing *in vitro* and *in vivo* using intronic microRNAs. Ying SY. (Ed.) *MicroRNA protocols*. Humana press, Totowa, New Jersey, pp295-312.
2. Lin SL, Chang D and Ying SY. (2006) Transgene-like animal models using intronic microRNAs. Ying SY. (Ed.) *MicroRNA protocols*. Humana press, Totowa, New Jersey, pp 321-334.
3. Lin SL, Chang D, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DTS, Chen DT, and Ying SY. (2008) Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 14, 2115-2124. 10
4. Lin SL and Ying SY. (2008) Role of mir-302 microRNA family in stem cell pluripotency and renewal. Ying SY. (Ed.) *Current Perspectives in MicroRNAs*. Springer Publishers press, New York, pp 167-185.
5. Lin SL, Kim H and Ying SY. (2008) Intron-mediated RNA interference and microRNA (miRNA). *Front. Biosci.* 13, 2216-2230. 20
6. Lin SL, Chang D, Ying SY, Leu D and Wu DTS. (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.
7. Lin SL, Chang D, Lin CH, Ying SY, Leu D and Wu DTS. (2011) Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res.* 39, 1054-1065. 30
8. Gossen M and Bujard H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Science, USA.* 89, 5547-5551.
9. Simonsson S and Gurdon J. (2004) DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol.* 6, 984-990.
10. Gossenへの米国特許第5,464,758号
11. Buechlerへの米国特許第7,959,926号 40
12. Mehtaへの米国特許第7,968,311号

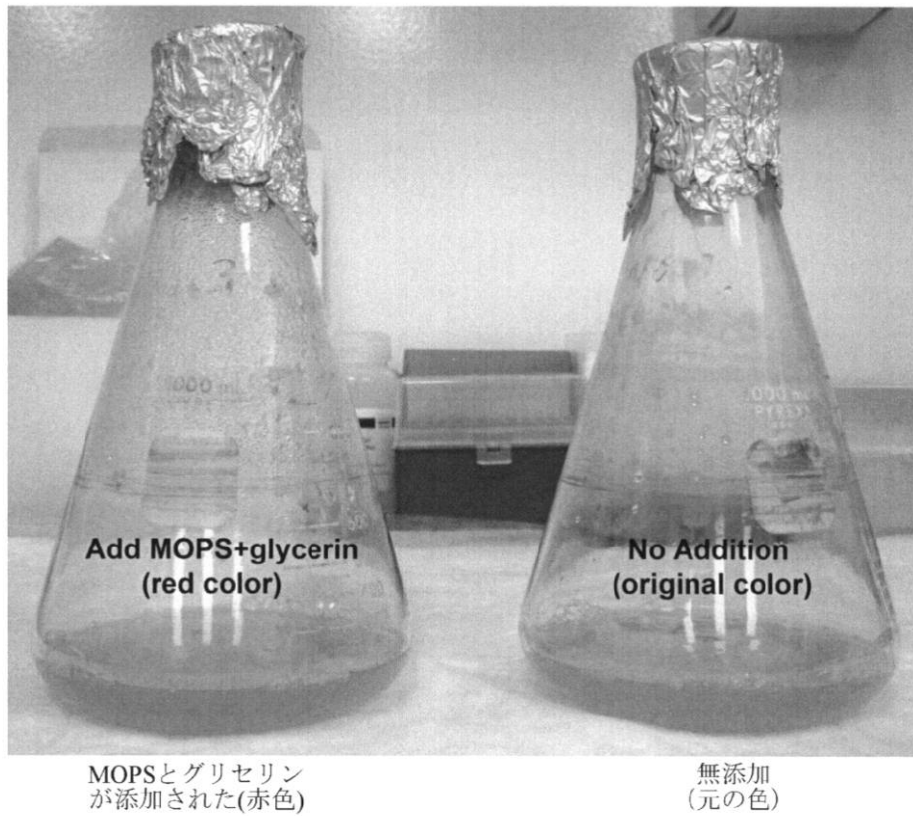
【図 1 A】



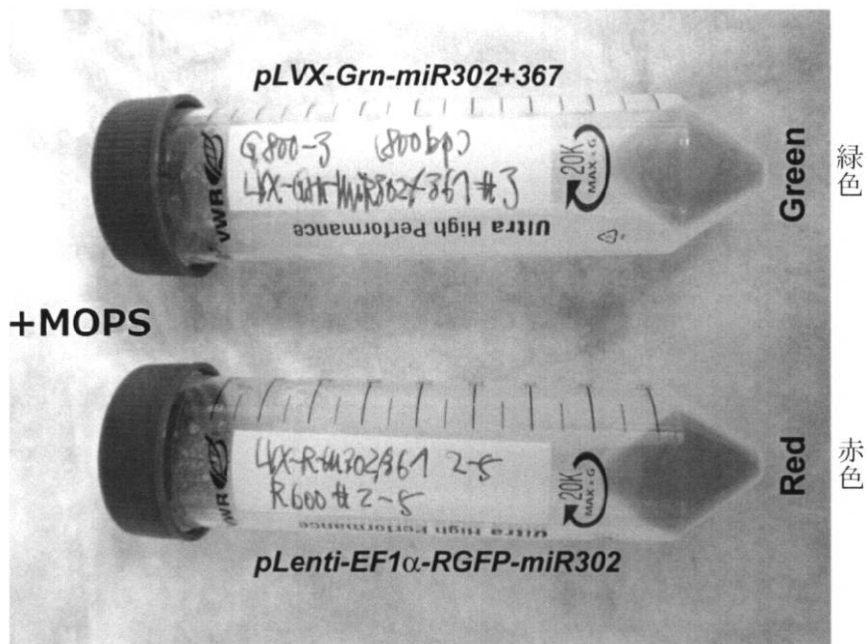
【図 1 B】



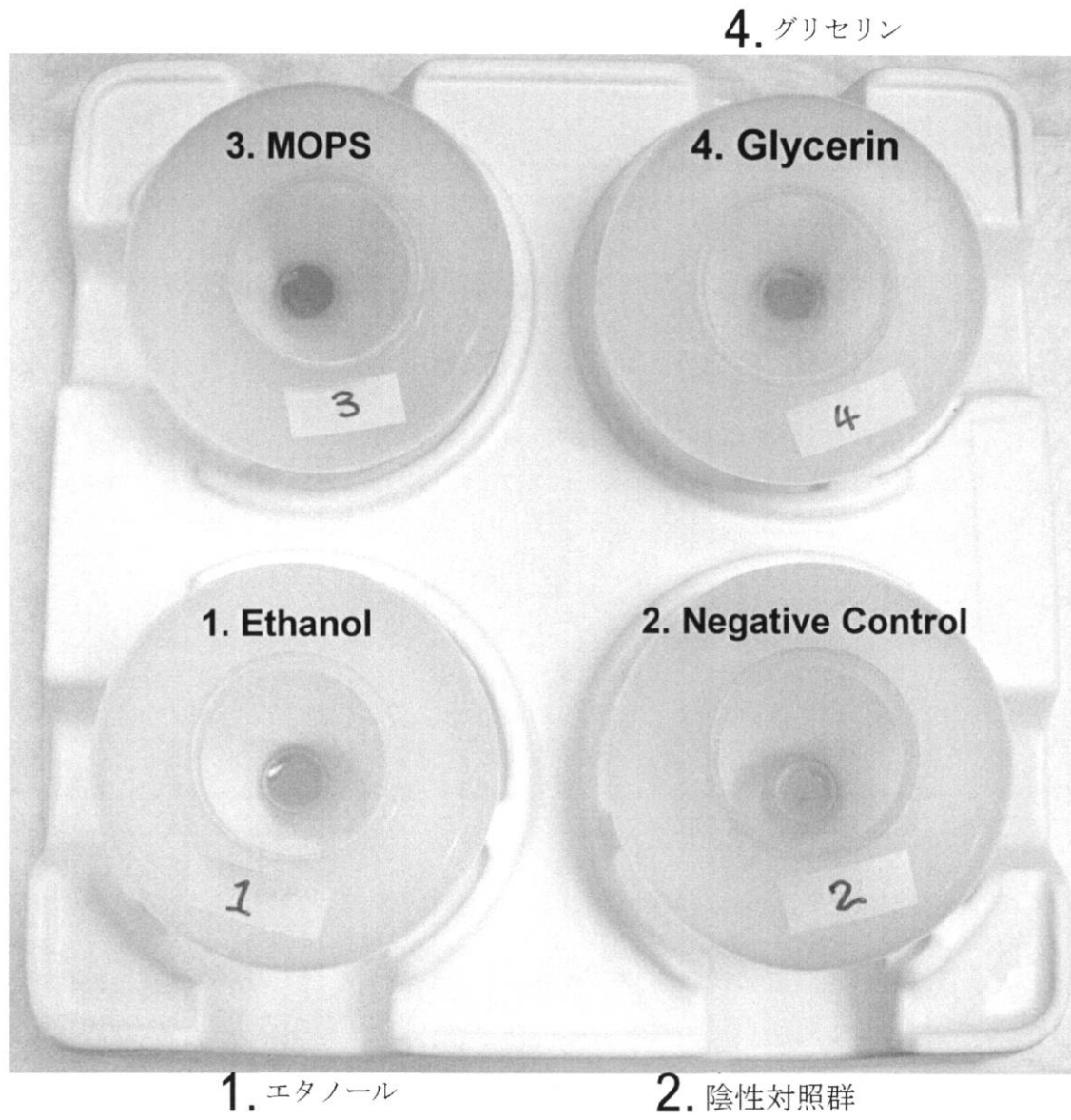
【 図 2 】



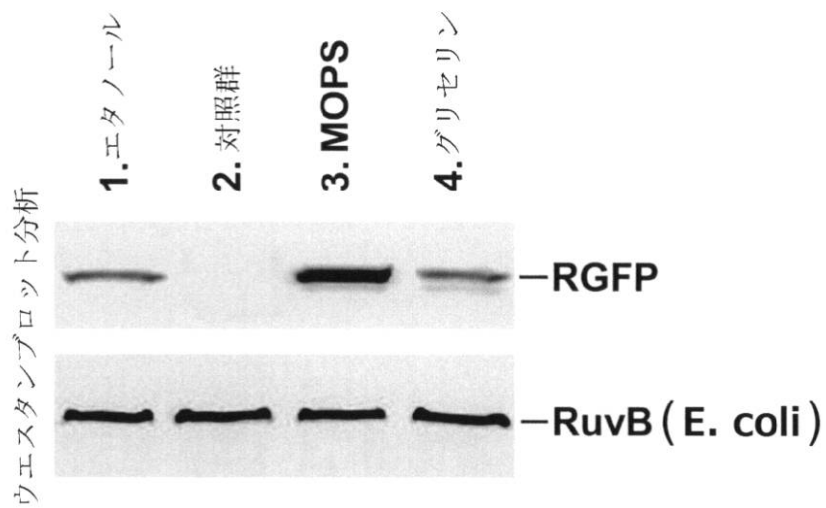
【 図 3 】



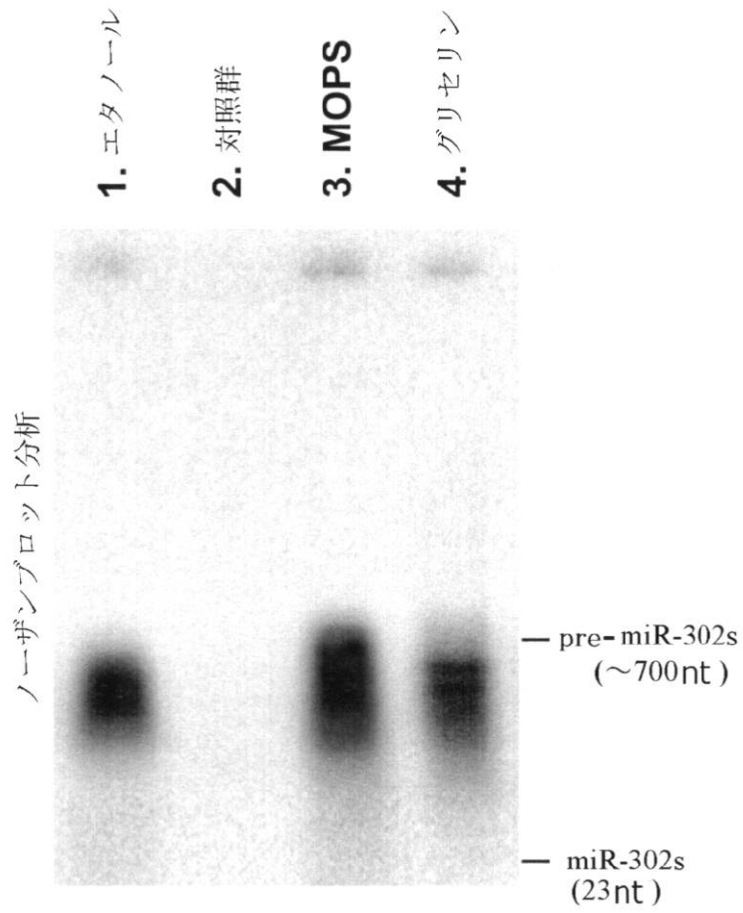
【 図 4 】



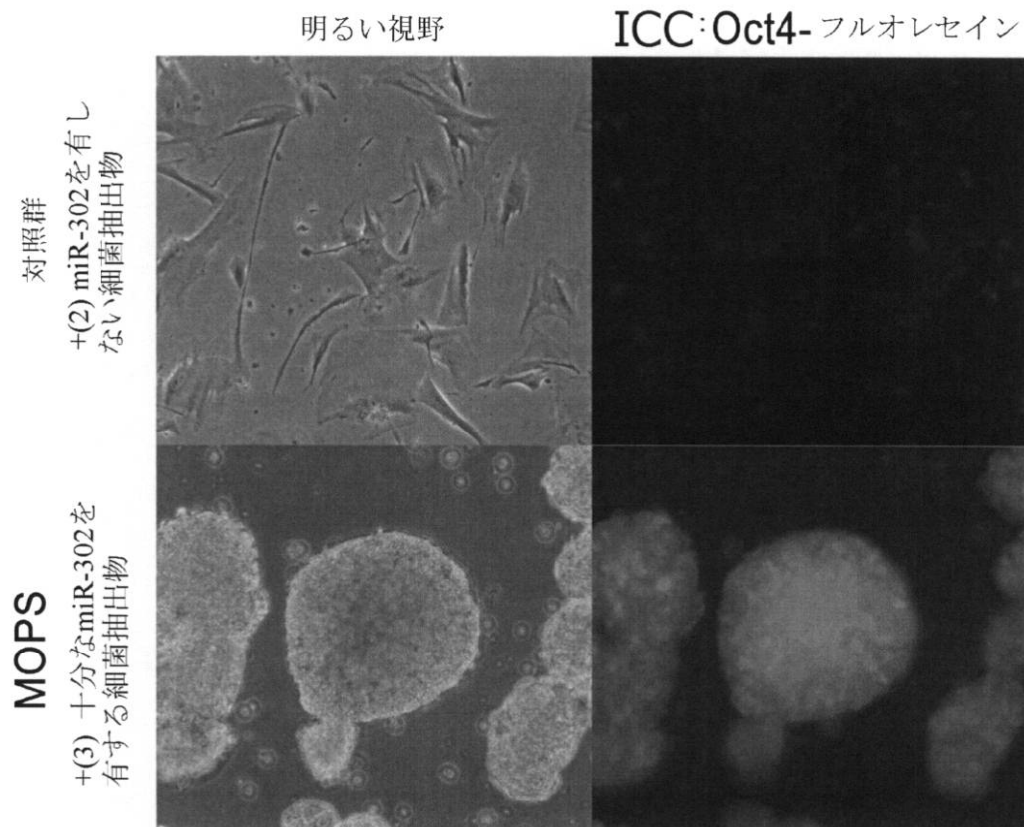
【 図 5 】



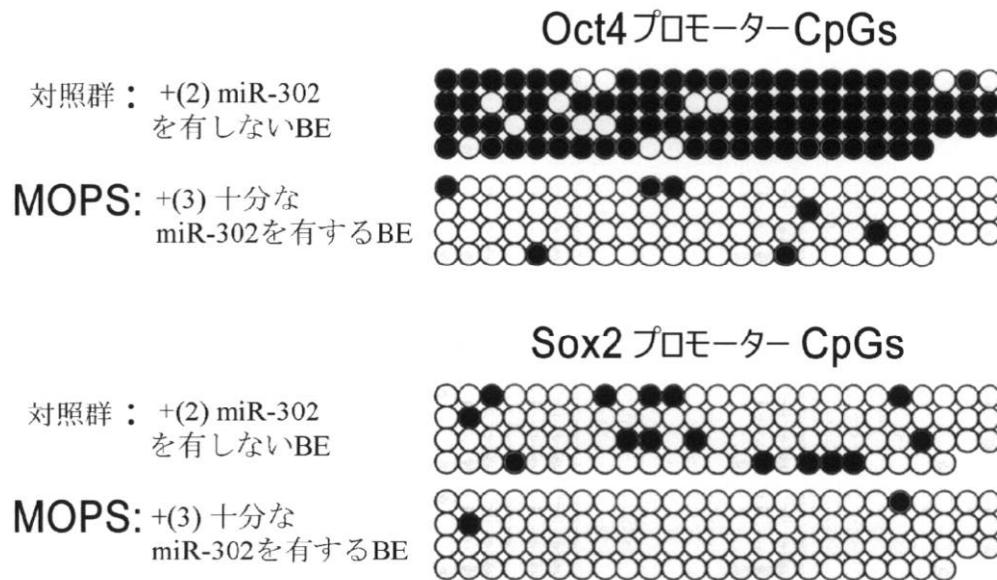
【 図 6 】



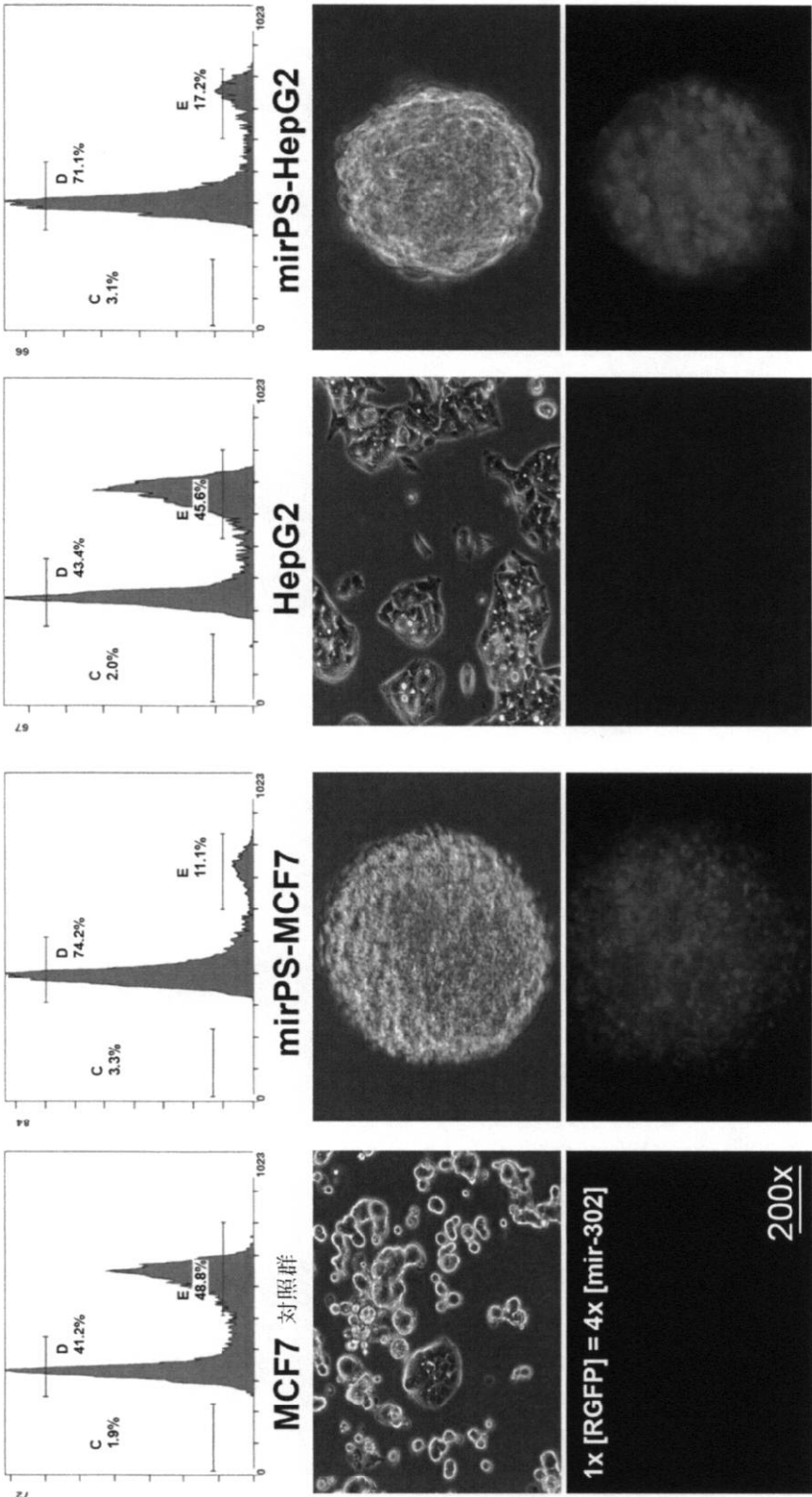
【 図 7 】



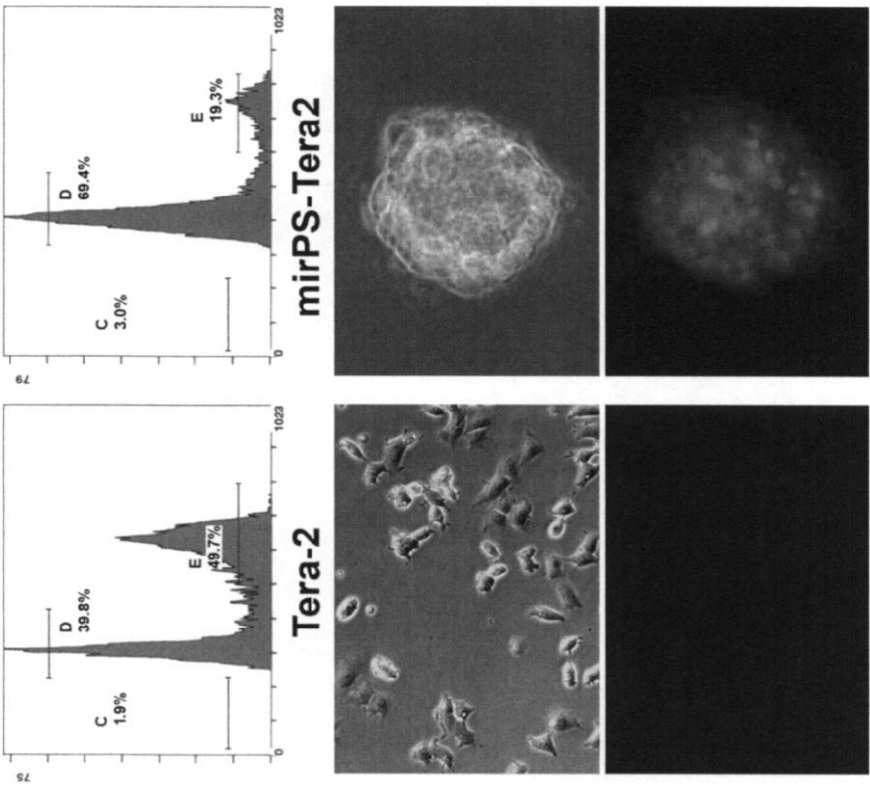
【 図 8 】



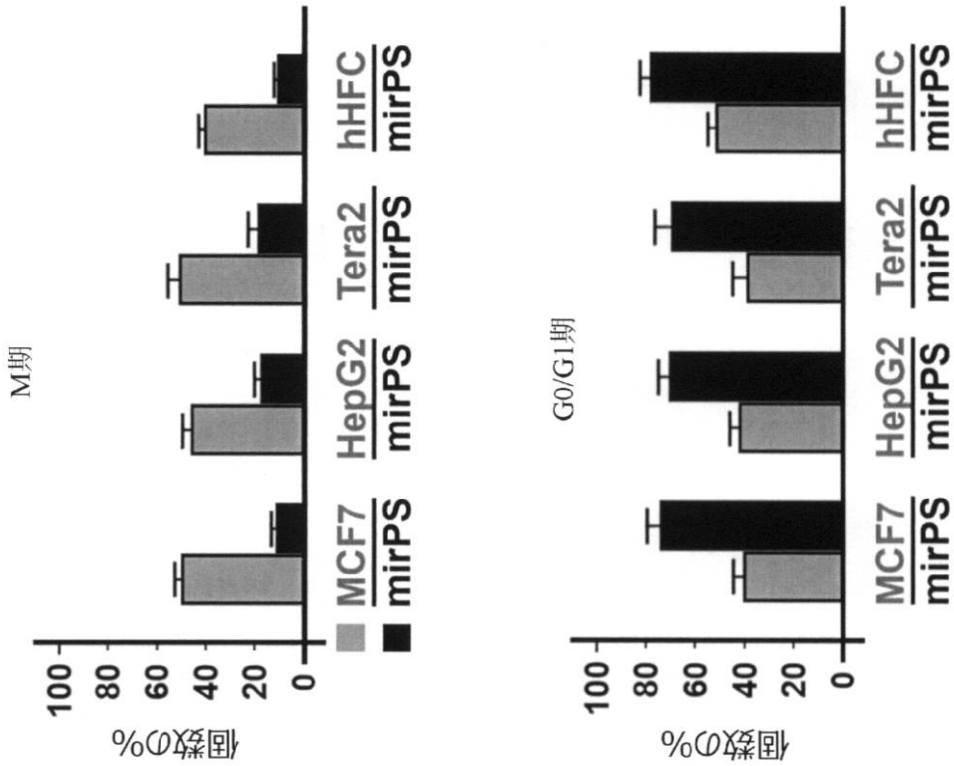
【図 9 A】



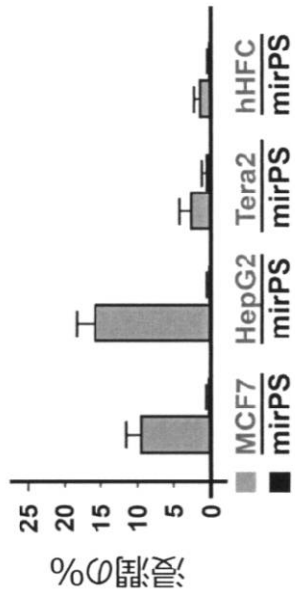
【図 9 B】



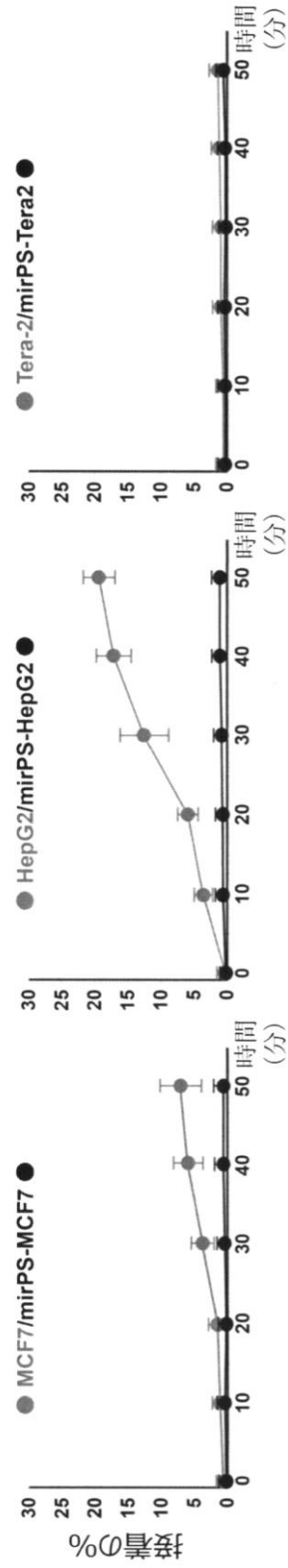
【図 9 C】



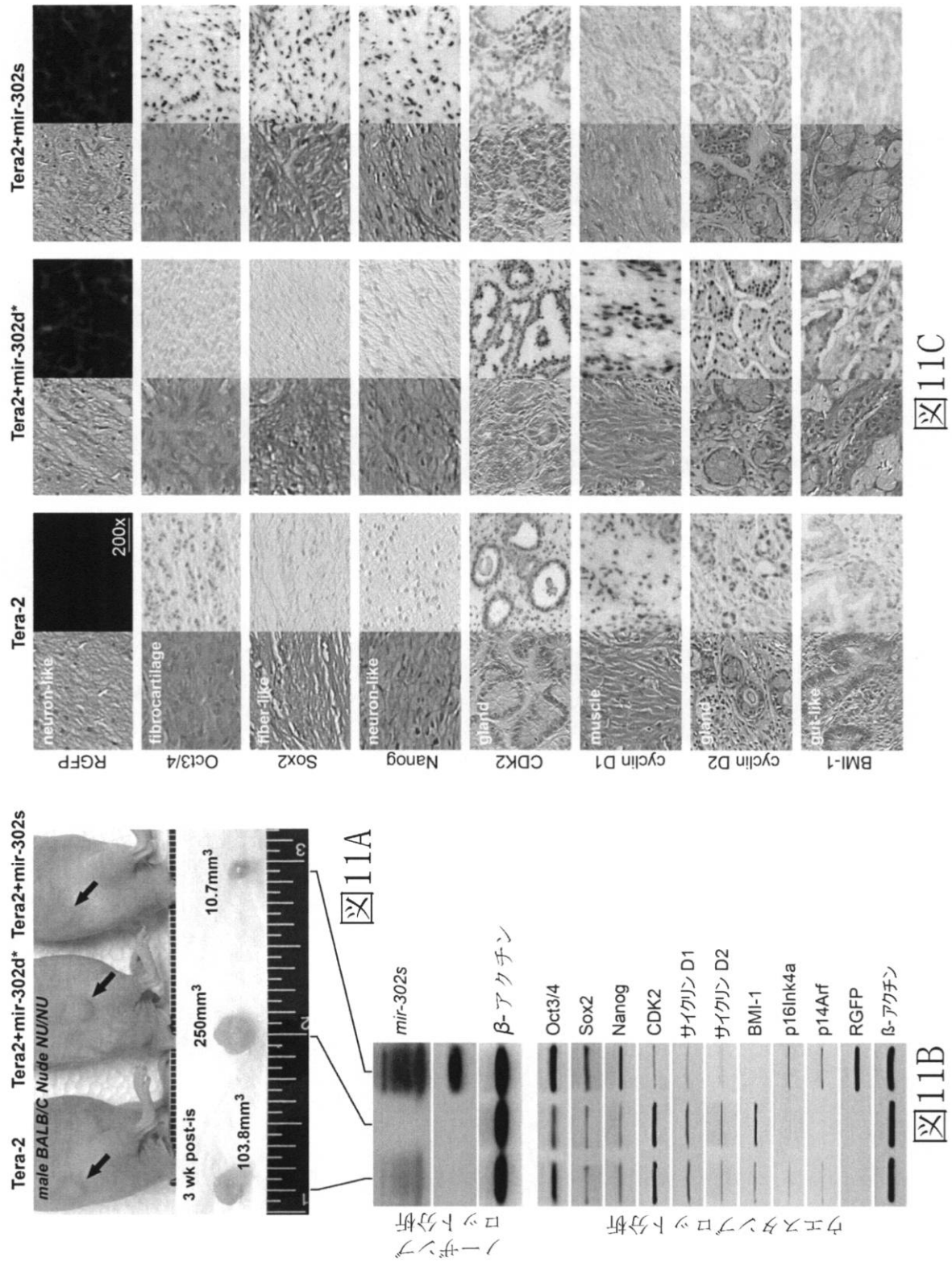
【図 10 A】



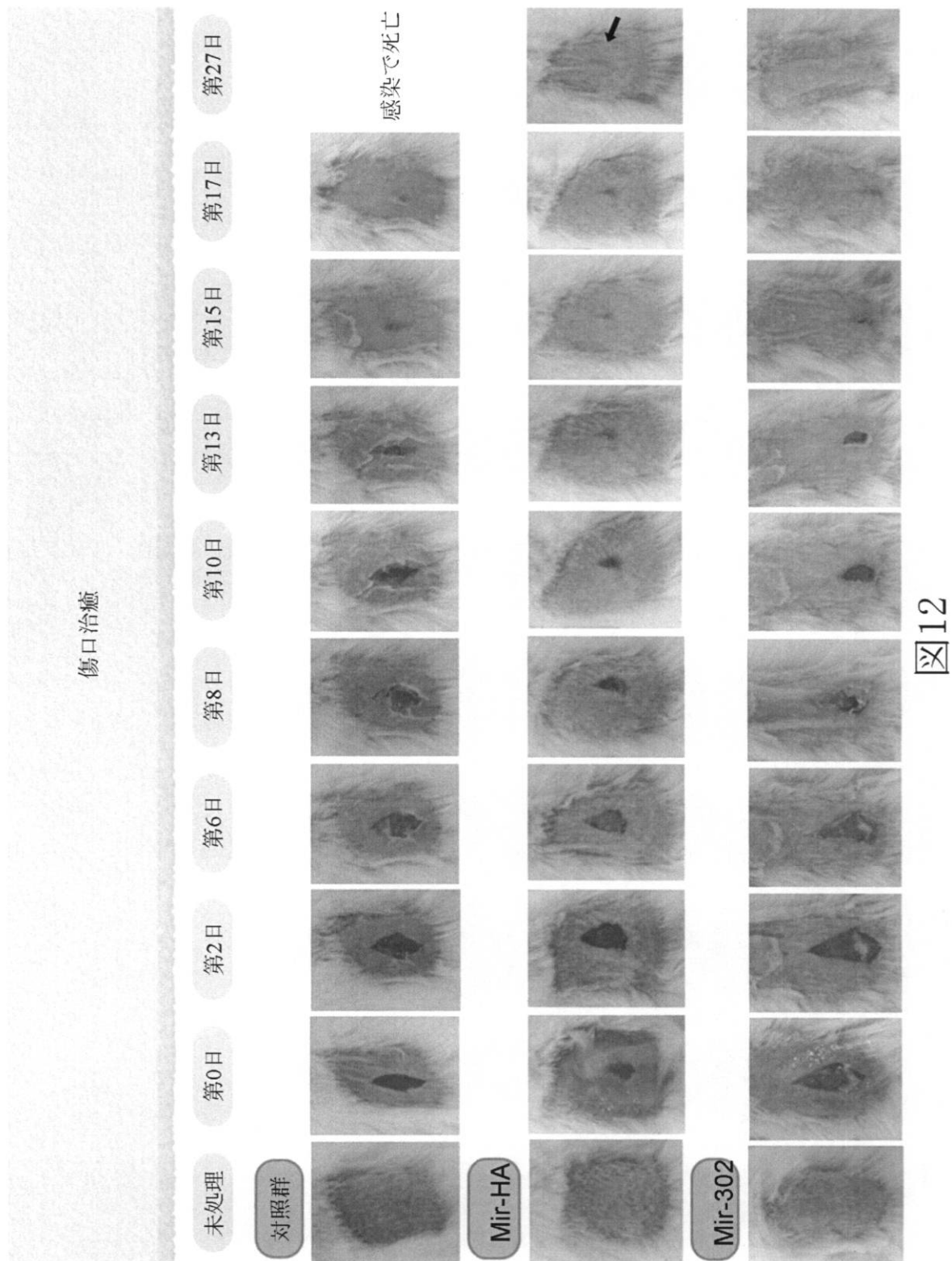
【図 10 B】



【図 11】



【図 12】



【配列表】

2014530596000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年6月20日(2014.6.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

3 - モルホリノプロパン - 1 - スルホン酸 (M O P S)、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物と類似する構造を有する化学剤を含む、原核細胞内において真核プロモーター駆動性遺伝子発現を誘導するための組成物。

【請求項 2】

前記化学剤は遺伝子発現の転写誘導物である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記組成物は、細菌培地を更に含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記化学剤は、前記細菌培地内において 0 . 0 1 % ~ 1 % の濃度 (v / v) を有する、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記細菌培地はルリア - ベルターニ (L B) 培地である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記遺伝子は、少なくともタンパク質又はノンコーディング R N A、或いはそれら両方をコードし、前記タンパク質又はノンコーディング R N A は薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記ノンコーディング R N A は、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記ノンコーディング R N A は、m i R - 3 0 2 ホモログである、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記タンパク質は、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 1 0】

前記薬学上又は治療上の適用は、多能性幹細胞の生成、幹細胞研究及び治療、癌治療及び疾患治療、傷口治癒処理、ならびに食物収量及び薬物供給の向上からなる群から選ばれる、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 1 1】

原核細胞内において真核プロモーター駆動性遺伝子発現を調節するための組成物であって、

(a) 3 - モルホリノプロパン - 1 - スルホン酸 (M O P S)、エタノール、グリセリン、又はそれらの混合物と類似する構造を有する、真核プロモーター駆動性遺伝子発現を誘導又は促進可能な少なくとも 1 種の化学剤と、

(b) 真核プロモーター駆動性発現メカニズムにより制御される少なくとも 1 つの遺伝子を含む複数の原核細胞とを含み、

(a) 及び (b) は、前記遺伝子の、これらの原核細胞内における真核プロモーター駆動性遺伝子発現を誘発する条件下で混合される組成物。

【請求項 1 2】

前記原核細胞のそれぞれが少なくとも 1 つの誘導可能な遺伝子発現組成物を有する、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記誘導可能な遺伝子発現組成物は、真核プロモーターを含むベクターである、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記遺伝子は、少なくともノンコーディングRNA又はタンパク質コーディングRNA、或いはそれら両方をコードする、請求項11に記載の組成物。

【請求項 15】

前記ノンコーディングRNAは、少なくとも、マイクロRNAと30%～100%の相同性を有する配列を含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項 16】

前記ノンコーディングRNAは低分子ヘアピンRNAである、請求項14に記載の組成物。

【請求項 17】

前記タンパク質コーディングRNAは、少なくとも、マイクロRNAと30%～100%の相同性を有する配列を含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項 18】

前記タンパク質コーディングRNAは、真核遺伝子のcDNA配列と30%～100%の相同性を有する、請求項14に記載の組成物。

【請求項 19】

前記ノンコーディングRNA又はタンパク質コーディングRNAは、前記原核細胞から分離されたものである、請求項14に記載の組成物。

【請求項 20】

前記遺伝子は、少なくともタンパク質又はペプチド、又はそれら両方をコードする、請求項11に記載の組成物。

【請求項 21】

前記タンパク質は、少なくともペプチド配列を含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項 22】

前記タンパク質又はペプチドは、前記原核細胞から分離されたものである、請求項20に記載の組成物。

【請求項 23】

前記タンパク質は、酵素又は抗体である、請求項20に記載の組成物。

【請求項 24】

前記タンパク質は、インスリンと類似するペプチド配列を含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項 25】

前記タンパク質は、増殖因子と類似するペプチド配列を含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項 26】

前記原核細胞は、細菌細胞である、請求項11に記載の組成物。

【請求項 27】

前記原核細胞は、大腸菌(E. coli)である、請求項11に記載の組成物。

【請求項 28】

前記化学剤は、遺伝子発現における転写誘導物である、請求項11に記載の組成物。

【請求項 29】

前記真核プロモーターは、II型RNAポリメラーゼ(pol-2)の同等物又はpol-2と適合性のあるウイルスプロモーターである、請求項11に記載の組成物。

【請求項 30】

前記pol-2と適合性のあるウイルスプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター又はレトロウイルス長末端反復(LTR)プロモーターである、請求項29に記載の組成物。

【請求項 31】

前記真核プロモーター駆動性発現は、RNA転写及びタンパク質翻訳を含む細胞内メカニズムである、請求項11に記載の組成物。

【請求項 32】

前記条件は、37 のルリア - ベルターニ (LB) 培地での細菌培養条件である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 33】

前記化学剤が、前記条件において 0.01% ~ 1% の濃度 (v/v) を有する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記ノンコーディング RNA は、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記タンパク質コーディング RNA は、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 36】

前記ノンコーディング RNA は、miR-302 ホモログである、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記マイクロ RNA は、miR-302 ホモログである、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記マイクロ RNA は、miR-302 ホモログである、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記タンパク質又はペプチドは、薬学上又は治療上の適用に有用である、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 40】

前記薬学上又は治療上の適用は、多能性幹細胞の生成、幹細胞研究及び治療、癌治療及び疾患治療、傷口治癒処理、ならびに食物収量及び薬物供給の向上からなる群から選ばれるものである、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記薬学上又は治療上の適用は、多能性幹細胞の生成、幹細胞研究及び治療、癌治療及び疾患治療、傷口治癒処理、ならびに食物収量及び薬物供給の向上からなる群から選ばれるものである、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 42】

前記薬学上又は治療上の適用は、多能性幹細胞の生成、幹細胞研究及び治療、癌治療及び疾患治療、傷口治癒処理、ならびに食物収量及び薬物供給の向上からなる群から選ばれるものである、請求項 39 に記載の組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/025893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N1/38
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>F. PANTANELLA ET AL: "Violacein and biofilm production in Janthinobacterium lividum", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 0, no. 0, 1 April 2007 (2007-04-01), XP55030194, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x page 993, left-hand column, lines 5-8, paragraph 4</p> <p>----- -/--</p>	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 June 2012

Date of mailing of the international search report

27/06/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tudor, Mark

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/025893

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Q. GAO ET AL: "Shear stress enhances microcin B17 production in a rotating wall bioreactor, but ethanol stress does not", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 56, no. 3-4, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 384-387, XP55030188, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/s002530100610</p> <p>page 384, right-hand column, paragraph 4 page 385, right-hand column, paragraphs 2,3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-4,6-10

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 17/02 (2006.01)		A 6 1 P 17/02		
A 6 1 K 38/43 (2006.01)		A 6 1 K 37/48		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	D	
A 6 1 K 38/28 (2006.01)		A 6 1 K 37/26		
C 1 2 N 1/20 (2006.01)		C 1 2 N 1/20	A	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H, U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 リン、シー - ラン

アメリカ合衆国 9 1 0 0 7 カリフォルニア州 アーケーディア ビクトリア ドライブ 9 2 0

(72) 発明者 チャン、ドナルド シー .

アメリカ合衆国 9 0 7 0 3 カリフォルニア州 セリトス ピカデリー レーン 1 6 8 0 8

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA05 AA20 BA01 BA07 BA41 BA80 CA01 CA11 DA06
EA04 GA11 HA20
4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 BB06 BB13 BD27 BD34 CA18 CA19
CA24 CA25 CA44
4C084 AA02 AA13 DB34 DC01 NA14 ZA89 ZB26
4C085 AA13 DD24 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA89 ZB26

【要約の続き】

胞の製造、傷口治癒の促進、及び食物の製造のために使用可能である。