



(21)申請案號：105139971

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 02 日

(51)Int. Cl. :

A61K31/713 (2006.01)

C12N15/113 (2010.01)

C12N5/074 (2010.01)

C12N5/10 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2015/12/02 美國 62/262,280

2016/05/27 美國 15/167,226

2016/02/19 美國 15/048,964

2016/08/31 世界智慧財產權組織 PCT/US16/49583

(71)申請人：林 希龍 (美國) LIN, SHI-LUNG (US)

美國

吳 堂熙 (美國) WU, DAVID TS (US)

美國

W J WU & L Y N N 幹細胞研究所 (美國) WJWU & LYNN INSTITUTE FOR STEM CELL RESEARCH (US)

美國

(72)發明人：林 希龍 LIN, SHI-LUNG (US) ； 張 欽次 CHANG, DONALD (US) ； 吳 堂熙 WU, DAVID TS (US)

(74)代理人：李貞儀；童啓哲

(56)參考文獻：

TW 201321507A

Ming Yan.et al. Modulation of Gene Expression by Polymer Nanocapsule Delivery of DNA Cassettes Encoding Small RNAs. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0127986 June 2, 2015.

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：17 共 84 頁

(54)名稱

使用微核糖核酸前驅物作為誘導 C D 3 4 陽性成體幹細胞增殖之藥物

(57)摘要

本發明大體上係關於一種用於誘導 CD34 陽性成體幹細胞群體之增殖及/或再生之組合物及方法，其可用於開發針對人類之多種衰老相關退化性疾病的藥物/疫苗及/或療法。此外，本發明教示製造高品質且大量的小髮夾型 RNA(shRNA)組合物所需之製造及純化方法，該等組合物諸如 microRNA 前驅物(pri-miRNA 及 pre-miRNA)及短干擾 RNAs(siRNA)，其可用於治療人類衰老相關疾病，諸如但不限於阿茲海默症(Alzheimer's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、骨質疏鬆症、糖尿病及癌症。所得 shRNA、較佳 pre-miRNAs 可用於開發針對人類退化性疾病之治療藥物，特定言之經由誘導 CD34 陽性幹細胞增殖及/或再生之機制進行。

This invention generally relates to a composition and method for inducing the expansion and/or regeneration of CD34-positive adult stem cell population, which is useful for developing drugs/vaccines

and/or therapies against a variety of ageing-related degenerative diseases in humans. Also, the present invention teaches the production and purification methods required for making high quality and high quantity of small hairpin-like RNA (shRNA) compositions, such as microRNA precursors (pri-miRNA and pre-miRNA) and short interfering RNAs (siRNA), which are useful for treating human ageing-related diseases, such as, but not limited, Alzheimer’s diseases, Parkinson’s diseases, osteoporosis, diabetes, and cancers. The resulting shRNAs, preferably pre-miRNAs, are useful for developing therapeutic drugs against human degenerative diseases, particularly through a mechanism to induce CD34-positive stem cell expansion and/or regeneration.

指定代表圖：

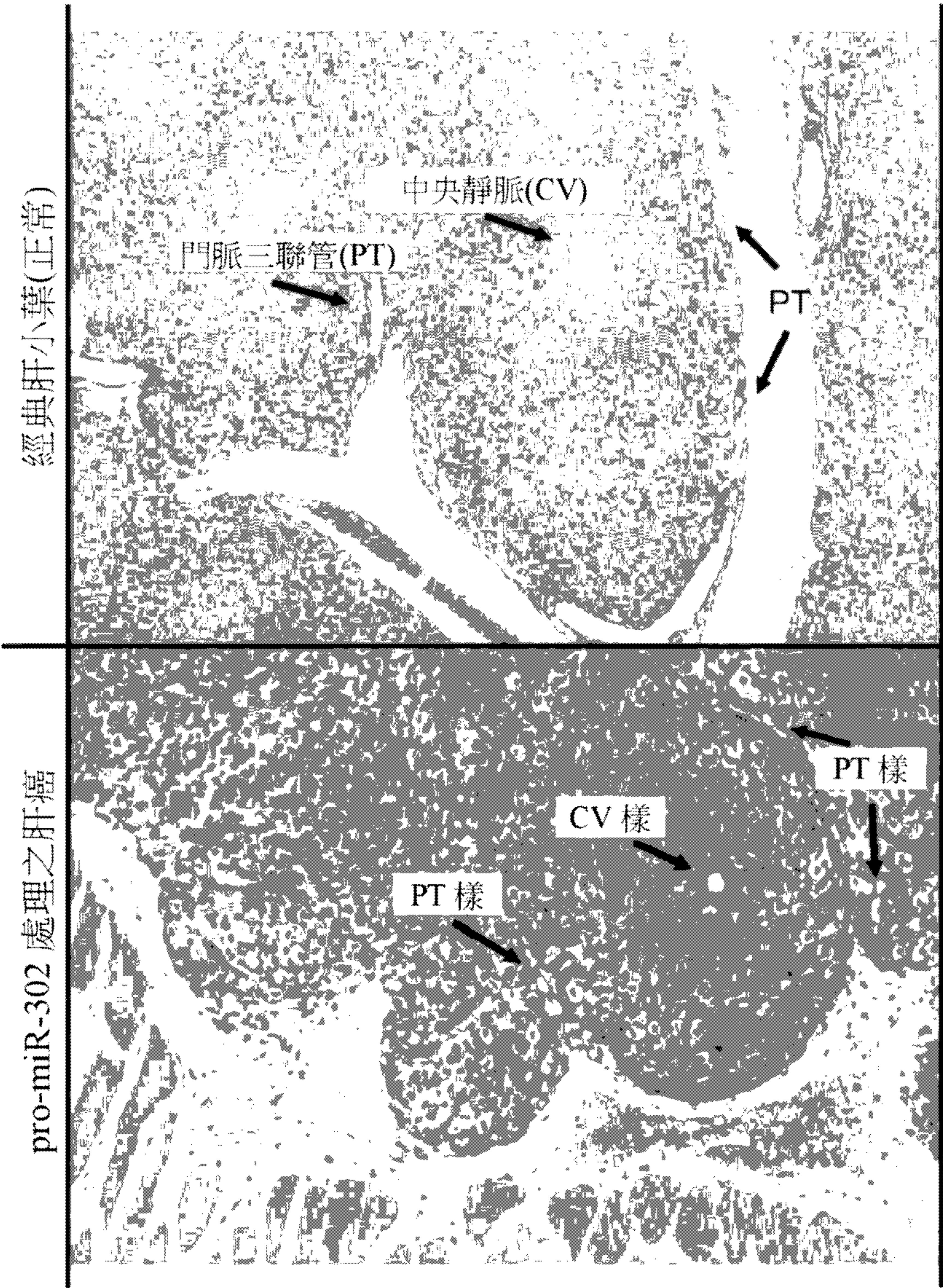


圖 15

I720075

發明摘要

※ 申請案號：105139971

※ 申請日：105/12/02

※IPC 分類：

A61K 31/713 (2006.01)

G12N 15/113 (2010.01)

G12N 5/074 (2010.01)

G12N 5/10 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

使用微核醣核酸前驅物作為誘導CD34陽性成體幹細胞增殖之藥物/USE OF
MICRORNA PRECURSORS AS DRUGS FOR INDUCING CD34-POSITIVE
ADULT STEM CELL EXPANSION

【中文】

本發明大體上係關於一種用於誘導CD34陽性成體幹細胞群體之增殖及/或再生之組合物及方法，其可用於開發針對人類之多種衰老相關退化性疾病的藥物/疫苗及/或療法。此外，本發明教示製造高品質且大量的小髮夾型RNA (shRNA) 組合物所需之製造及純化方法，該等組合物諸如microRNA前驅物 (pri-miRNA及pre-miRNA) 及短干擾RNAs (siRNA)，其可用於治療人類衰老相關疾病，諸如但不限於阿茲海默症 (Alzheimer's disease)、帕金森氏症 (Parkinson's disease)、骨質疏鬆症、糖尿病及癌症。所得shRNA、較佳pre-miRNAs可用於開發針對人類退化性疾病之治療藥物，特定言之經由誘導CD34陽性幹細胞增殖及/或再生之機制進行。

【英文】

This invention generally relates to a composition and method for inducing the expansion and/or regeneration of CD34-positive adult stem cell population,

which is useful for developing drugs/vaccines and/or therapies against a variety of ageing-related degenerative diseases in humans. Also, the present invention teaches the production and purification methods required for making high quality and high quantity of small hairpin-like RNA (shRNA) compositions, such as microRNA precursors (pri-miRNA and pre-miRNA) and short interfering RNAs (siRNA), which are useful for treating human ageing-related diseases, such as, but not limited, Alzheimer's diseases, Parkinson's diseases, osteoporosis, diabetes, and cancers. The resulting shRNAs, preferably pre-miRNAs, are useful for developing therapeutic drugs against human degenerative diseases, particularly through a mechanism to induce CD34-positive stem cell expansion and/or regeneration.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（15）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】(中文/英文)

使用微核醣核酸前驅物作為誘導CD34陽性成體幹細胞增殖之藥物/USE OF MICRORNA PRECURSORS AS DRUGS FOR INDUCING CD34-POSITIVE ADULT STEM CELL EXPANSION

【技術領域】

相關申請案的交互參照

【0001】 本發明主張 2015 年 12 月 2 日申請、標題為「miR-302 Attenuates A β -induced Neurotoxicity through Activation of Akt Signaling」之美國臨時申請案第 62/262,280 號之優先權。此外，本發明主張 2016 年 2 月 19 日申請、標題為「A Composition and Method of Using miR-302 Precursors as Drugs for Treating Alzheimer's Diseases」之美國專利申請案第 15/048,964 號之優先權。此外，本發明主張 2016 年 5 月 27 日申請、標題為「Use of MicroRNA Precursors as Drugs for Inducing CD34-positive Adult Stem Cell Expansion」之美國專利申請案第 15/167,226 號之優先權。

【0002】 本發明大體上係關於一種用小髮夾 RNA (shRNA) 分子、較佳 microRNA 前驅物 (pre-miRNA) 及/或 siRNA 誘導 CD34 細胞增殖及/或再生之組合物及方法，該等分子可用於開發針對人類之多種衰老相關退化性疾病的藥物/

疫苗及/或療法。此外，本發明教示製造高品質且大量的小髮夾型 RNA (shRNA) 組合物所需之製造及純化方法，該等組合物諸如 microRNA 前驅物 (pri-miRNA 及/或 pre-miRNA) 及短干擾 RNAs (siRNA)，其可用於治療人類衰老相關疾病，諸如但不限於阿茲海默症 (Alzheimer's disease)、帕金森氏症 (Parkinson's disease)、骨質疏鬆症、糖尿病及癌症。所得 shRNAs，較佳 pre-miRNAs 及 siRNAs 可用於開發針對人類退化性疾病之治療藥物，特定言之經由誘導 CD34 陽性幹細胞增殖及/或再生之機制進行。此外，本發明亦揭示一種新穎基於 pre-miRNA 之藥物組合物，其能夠將高度肝癌之惡性特性重新編程至低度良性或甚至相對正常階段-一種稱為「癌症逆轉 (Cancer Reversion)」之機制。因為癌症逆轉在藥物設計中係一個全新的概念，所以本發明使用該種新穎機制設計用於癌症療法之此種首選藥物。

【先前技術】

【0003】 幹細胞如同含有眾多有效成分之百寶箱，其可用於刺激新細胞生長/組織再生、修復及/或復原受損/老化組織、治療退化性疾病及預防腫瘤/癌症形成/進程。因此，發明人可設想可使用此等幹細胞作為新穎藥物篩檢、鑑別及製造之工具。因此，由此獲得之藥物將可用於開發醫藥及治療應用，諸如用於研究、診斷及/或療法之生物醫學利用、裝置及/或設備及其組合。

【0004】 MicroRNA (miRNA) 是人胚胎幹細胞 (hESCs) 中的主要有效成分之一。主要 hESC 特異性 miRNA 種類包括

但不限於 miR-302 家族、miR-371 至 373 家族及 miR-520 家族之成員。其中，已發現 miR-302 家族在腫瘤抑制中起功能性作用（Lin 等人，2008 及 2010）。MiR-302 含有八個（8）家族成員，包括四個（4）正義 miR-302（a、b、c 及 d）及四個（4）反義 miR-302*（a*、b*、c* 及 d*）。此等正義及反義成員部分匹配且可分別形成雙股雙鏈體。miR-302 之前驅物分別由 miR-302a 與 a*（pre-miR-302a）、miR-302b 與 b*（pre-miR-302b）、miR-302c 與 c*（miR-302c）及 miR-302d 與 d*（pre-miR-302d）形成，在一端有連接序列（莖環）。爲了活化 miR-302 功能，miR-302 前驅物（pre-miR-302）首先由細胞核糖核酸酶 III Dicers（RNaseIII Dicers）處理爲成熟 miR-302s 且進一步與某些阿爾古蛋白（argonaute protein）形成 RNA 誘導之靜默複合物（RISCs），隨後導致標的基因轉錄物（mRNAs），特別是致癌基因 mRNAs 之 RNA 干擾（RNAi）導向降解或轉譯抑制（Lin 等人，2008, 2010 及 2011）。

【0005】 MiR-302 係 hESCs 及誘導多能幹細胞（iPSCs）中發現之最豐富 ncRNA 種類。發明人先前研究已顯示，miR-302 超出 hESCs 中所見水準之異位過度表達能夠以類似於桑椹胚階段之早期人類受精卵的相對緩慢細胞週期速率（20-24 小時/週期）將人類正常及癌細胞兩者皆重新編程爲 hESC 類 iPSC（Lin 等人，2008, 2010 及 2011；EP 2198025；U.S. 12/149,725；U.S. 12/318,806；U.S. 12/792,413）。相對靜止（Relative quiescence）係此等 miR-302 誘導 iPSCs 之確定特徵，而 hESCs 及其他先前報導之四因子誘導（*Oct4-Sox2-Klf4-c-Myc* 或 *Oct4-Sox2-Nanog-Lin28*）iPSCs 皆

展示類似於腫瘤/癌細胞之高度增殖性細胞週期速率（12-15 小時/週期）（Takahashi 等人，2006；Yu 等人，2007；Wernig 等人，2007；Wang 等人，2008）。為揭示 miR-302 之此腫瘤抑制效應，發明人鑑別涉及兩種 miR-302 靶向 G1-檢控點調節子，包括週期素依賴性激酶 2（CDK2）及週期素 D（Lin 等人，2010；U.S. 12/792,413；U.S. 13/964,705）。已知細胞週期進程係由週期素依賴性激酶（CDK）之活動驅動，其與正調節亞單位（positive regulatory subunits）、週期素以及負調節子、CDK 抑制子（CKIs，諸如 p14/p19Arf、p15Ink4b、p16Ink4a、p18Ink4c、p21Cip1/Waf1 及 p27Kip1）形成功能複合物。在哺乳動物中，不同週期素-CDK 複合物參與調節不同細胞週期過渡，諸如週期素-D-CDK4/6 用於 G1 期進程、週期素-E-CDK2 用於 G1-S 過渡、週期素-A-CDK2 用於 S 期進程及週期素-A/B-CDC2（週期素-A/B-CDK1）用於進入 M 期。因此，發明人之研究表明，miR-302 之腫瘤抑制功能由在 G1-S 過渡期間週期素-E-CDK2 及週期素-D-CDK4/6 路徑之共抑制產生。

【0006】 儘管 miR-302 可用於設計及開發新穎抗癌藥物/疫苗，但其生產是個問題，因為天然 miR-302 僅可見於人多能幹細胞諸如 hESCs 中，其資源極其有限。或者，合成小干擾 RNA（siRNA）可用以模擬 pre-miR-302；然而，因為 pre-miR-302 之結構由兩個失配之 miR-302 及 miR-302* 股形成，所以此類完美匹配之 siRNA 模擬物無法置換 miR-302* 之功能，其序列完全不同於 siRNA 之反義股。舉例而言，siRNA-302a 模擬物之反義股係 5'-UCACCAAAC AUGGAAGCAC UUA-3'（SEQ.ID.NO.1），而天然 miR-302a*

係 5'-ACUUAACGU GGAUGUACUU GCU-3'

(SEQ.ID.NO.2)。因爲 miR-302 功能由其正義 miR-302 及反義 miR-302* 股兩者產生，所以使用此類 siRNA 模擬物之先前報導已展示與天然 miR-302 功能不同之結果。另一方面，發明人近期之 iPSCs 研究可提供 pre-miR-302 生產之替代性解決方案 (EP 2198025; U.S. 12/149,725; U.S. 12/318,806)。儘管如此，使此類 iPSCs 生長之成本仍太高以致無法用於工業製造。

【0007】 或者，使用原核勝任細胞可爲製造人 microRNAs 及其前驅物之可能方法。然而，原核細胞不具有真核 microRNA 表達及處理所需之若干必需酶，諸如 Drosha 及 Dicer。此外，原核 RNA 聚合酶不會高效地轉錄具有高二級結構之小 RNA，諸如髮夾型 pre-miRNAs 及 shRNAs。事實上，細菌基因組中不編碼真實 microRNA 且細菌不會天然地表現 microRNA。因此，若發明人可迫使人 microRNAs 於原核生物中之表達，則所得 microRNAs 將最可能保持呈其類似於 pri-miRNA (多個 pre-miRNAs 之初級大簇 (large primary cluster)) 及/或 pre-miRNA (一個單一髮夾 RNA) 之前驅構形。儘管存在以上所有問題，但真正的挑戰是如何迫使人 microRNA 於原核生物中之表達。爲克服此主要問題，發明人優先權申請案美國第 13/572,263 號已確定一種初步方法；然而，當前尙不確定此等原核生物產生之 microRNAs (pro-miRNA) 是否將具有與其人類對應物相同之結構及功能。此外，由此獲得之 pro-miRNAs 可能受細菌內毒素污染，其並不適用於直接用於療法中。

【0008】 如自當前教科書習得，所屬技術領域中具有通常

知識者皆熟知原核與真核轉錄機制不同且因此彼此不相容。舉例而言，基於當前理解，真核 RNA 聚合酶不直接結合至啓動子序列且需要額外輔助蛋白（輔因子）來起始轉錄，而原核 RNA 聚合酶形成直接結合至啓動子序列以起始轉錄的全酶。通常亦知真核傳訊 RNA（mRNA）係藉由第二型 RNA 聚合酶（pol-2）於細胞核中合成，且隨後經處理及輸出至細胞質用於蛋白質合成，而原核 RNA 轉錄及蛋白質轉譯在相同位置由相同段 DNA 同時發生。此係因爲原核生物，諸如細菌及古細菌，不具有任何細胞核樣結構。因此，此等差異使得原核細胞難以或甚至不可能使用真核啓動子製造真核 RNAs。

【0009】 先前技術嘗試在細菌細胞中製造哺乳動物肽及/或蛋白質，諸如 Buechler 之美國專利第 7,959,926 號及 Mehta 之美國專利第 7,968,311 號，使用細菌或噬菌體啓動子。爲了起始表達，將所要基因選殖至由細菌或噬菌體啓動子驅動之質體載體中。基因不得含有任何非編碼內含子，因爲細菌不具有用以處理內含子之任何 RNA 剪接機制。隨後，將由此獲得之載體引入至細菌細胞之勝任菌株，諸如大腸桿菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）中，以便表現基因之轉錄物（mRNAs）且隨後將 mRNAs 轉譯爲蛋白質。儘管如此，細菌及噬菌體啓動子，諸如 Tac、Lac、T3、T7 及 SP6 RNA 啓動子不是 pol-2 啓動子且其轉錄活動傾向爲會導致突變之錯誤傾向過程。另外，Mehta 進一步教示，甘油（glycerol/glycerin）可用以增加細菌轉形之效率；然而，無教示涉及 RNA 轉錄、尤其 pol-2 啓動子驅動之原核 RNA 轉錄的增強。由於真核與原核轉錄系統之間不具有可能的相容性，所以此類先前技術

仍受將原核 RNA 啓動子用於原核生物中之基因表達限制。

【0010】 歸因於系統不相容性及可能的內毒素污染之問題，先前不存在於原核生物中製造人 pre-miRNA/shRNA 類藥物之方法。此外，pre-miRNA/shRNA 大小約爲 70-85 個核苷酸長，其太大且成本太高以致無法藉由 RNA 合成機制製得。爲克服此等問題，本發明提供一種新穎突破：藉由添加模擬某些轉錄輔因子之一些確定化學品，發明人可爲原核細胞建立新穎適應環境，以將真核 pol-2 及/或 pol-2 類啓動子用於轉錄所要 pre-miRNAs 及 shRNAs 而不經由錯誤傾向原核啓動子進行。此優勢爲：第一，歸因於細菌之快速生長而可有成本效益地大量製造；第二，由於不需要使專用 hESCs 或 iPSCs 生長而易於處置；第三，就 pol-2 啓動子驅動之 RNA 轉錄而言，存在高保真生產率（fidelity productivity）；第四，歸因於原核生物中不具有真實 microRNA 而具有高純度之所要 microRNAs；及最後，無內毒素，其可藉由某些化學處理而進一步移除。因此，一種在原核細胞中製造人 pre-miRNAs 及/或 shRNAs 而不存在系統不相容性及內毒素污染之問題的方法係高度理想的。此外，由此獲得之藥物可呈現除 microRNA 之當前已知功能以外的新穎治療效果。

【發明內容】

【0011】 本發明之原理依賴於原核與真核 RNA 轉錄系統之間的不同且不相容之特性。天然地，原核 RNA 聚合酶不識別真核啓動子，且反之亦然。然而，本發明已鑑別可充當轉錄誘導劑以觸發及/或增強原核生物中之真核啓動子驅動之

RNA 轉錄的化學劑。因此，在本發明中教示之知識係超出關於原核與真核轉錄系統之間的差異之所有當前理解之全新的突破。

【0012】 本發明係關於一種使用某些化學誘導劑刺激及/或增強原核生物中之真核啟動子驅動的 RNA 轉錄之誘導型基因表達組合物。此等化學誘導劑歸因於其抑菌及/或殺菌特性而尚未用於細胞培養基中，包括 3-嗎啉基丙烷-1-磺酸[或名為 3-(N-嗎啉基)丙烷磺酸；MOPS]、甘油及乙醇，以及其功能類似物，諸如 2-(N-嗎啉基)乙烷磺酸（MES）、4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸（HEPES）及甘露糖醇（mannitol）。可設想地，具有類似結構之化學品，例如此些轉錄誘導劑，可共有類似功能。舉例而言，MOPS 常用作細菌細胞裂解中之緩衝劑且因此不適用於使細菌生長。另一方面，乙醇係熟知消毒劑且甘油常用於藉由使細菌細胞壁去穩定化而進行細菌轉形，分別表明甘油係抑菌且乙醇係殺菌。有鑒於 MOPS、乙醇及甘油之此等已知功能，所屬技術領域中具有通常知識者在不先知曉本發明之知識的情況下將不會預期使用痕量（0.001%至 4%體積/體積濃度）此等化學品誘導原核細胞中真核啟動子驅動之基因表達。

【0013】 基於以上知識，本發明係一種利用原核細胞製造人 microRNA 前驅物（pre-miRNAs）及/或 shRNAs 作為癌症療法之治療藥物及/或疫苗的設計及方法。更特定言之，本發明係一種利用原核細胞製造一類特殊 pre-miRNA 類藥劑（名為 pro-miRNA）之設計及方法，該等藥劑能夠將人類高度癌細胞之惡性特性重新編程為低度良性或甚至相對正常樣狀

態。較佳地，此等 pro-miRNA 係腫瘤抑制 microRNAs (TS-miRNA)，類似於 miR-302a、b、c、d、e 及/或 f 之前驅物 (pre-miR-302s) 及其天然家族簇以及其人工再設計之小髮夾 RNA (shRNA) 同源物/衍生物及/或其組合。pro-miRNA 類 shRNA 同源物/衍生物之設計包括 pro-miRNA 及其同源小干擾 RNA (siRNA) 的不完美及完美匹配之髮夾組合物，其可形成爲單個單元或多個單元簇中。此等設計可改良標靶特異性及/或減少有效遞送及療法所需之 pro-miR-302 之複本數。適用於該種藥物治療之人類細胞包括活體外、離體及/或活體內正常、腫瘤及癌細胞。

【0014】 較佳地，用於本發明之原核細胞係細菌勝任細胞、特別是大腸桿菌 (*E. coli*)，且化學誘導劑係 MOPS、乙醇或甘油或其混合物。亦較佳地，所用真核 RNA 啟動子係真核 pol-2 啟動子 (亦即 *EF1 α* 啟動子) 或 pol-2 相容 (pol-2 類) 病毒啟動子 (亦即巨細胞病毒 (*cytomegaloviral*) CMV 啟動子)。由真核 RNA 啟動子介導之基因可編碼選自由 microRNA (miRNA)、小髮夾 RNA (shRNA)、小干擾 RNA (siRNA)、傳訊 RNA (mRNA)、其前驅物及同源物及其組合所組成之群組的非編碼或蛋白質編碼 RNA 或兩者 (諸如含內含子之基因轉錄物)。爲了誘導基因表達，以真核 RNA 啟動子介導之基因轉染原核細胞，且隨後在 37°C 下在添加化學誘導劑下生長於類似於 Luria-Bertani (LB) 培養液之培養基中 >24 小時。

【0015】 爲證實該等化學誘導劑對於原核生物中人 microRNA 製造之可誘導性，發明人將來自發明人之優先權美國專利申請案第 12/149,725 號及第 12/318,806 號之慢病毒載

體 *pSpRNAi-RGFP-miR302* 修飾為新質體載體 *pLenti-EF1α-RGFP-miR302*，其 *SpRNAi-RGFP* 基因表達係由真核啟動子諸如 *EF1α* 或 *CMV* 所驅動（圖 1A）。此後，發明人用其轉形大腸桿菌勝任細胞，且隨後使用紅色螢光蛋白（RGFP）之生成作為量測 microRNA miR-302 之轉錄速率及過程的可見標記，如圖 1B 中所示。因為 miR-302 家族簇亦經修飾以編碼於 *RGFP* 基因之 5'-內含子區[例如 5'-非轉譯區（5'-UTR）或第一內含子]中，所以每個 *RGFP* mRNA 之轉錄引領至產生一個 4 髮夾之 miR-302 前驅物簇（pri-miR-302）及/或四個 1 髮夾之 miR-302 前驅物（pre-miR-302s），如圖 5 及 6 中所示。由於原核生物中不具有 RNase III Dicer，因此 pri-miR-302 轉錄物將最終（由大腸桿菌中之某些單股 RNases）分解為 1 髮夾之 pre-miR-302s，其皆可經提取且進一步在本發明中用作治療藥物。廣義而言，5'-UTR 及 3'-UTR 在本發明中視為內含子之一部分。

【0016】 所有 miR-302 成員於其前 5'-十七個（17）核苷酸中共有完全相同序列 5'-UAAGUGCUUC CAUGUUU-3'（SEQ.ID.NO.3），且於成熟 microRNA 之其全長 23 核苷酸中含有 >82% 同源性。基於線上計算程式 TARGETSCAN（<http://www.targetscan.org/>）及 PICTAR-VERT（<http://pictar.mdc-berlin.de/>）預測之結果，此等 miR-302 同時靶向幾乎相同基因，包括 >600 種人類基因。另外，miR-302 亦與 mir-92、mir-93、mir-200c、mir-367、mir-371、mir-372、mir-373、mir-374 及 mir-520 家族成員共有多種重疊標的基因，其皆可具有類似功能。大多數此等標的基因係參與起始

及/或確立在早期胚胎發生期間某些譜系特異性細胞分化之發育信號及轉錄因子 (Lin 等人, 2008)。多種此等標的基因亦係習知的致癌基因；因此，miR-302s 很可能充當腫瘤抑制因子以預防正常 hESC 生長偏向至腫瘤/癌症形成。

誘導原核生物中真核啓動子驅動之基因表達.

【0017】 將大腸桿菌 (*E. coli*) 勝任細胞使用 z-勝任大腸桿菌轉形套組 (Zymo Research, Irvine, CA) 藉由 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 質體 (圖 1A) 轉形，且在 37°C 下在以 170 rpm 頻繁攪拌下於補充有 0.1% (v/v) MOPS 與 0.05% (v/v) 甘油 (誘導劑) 混合物之 Luria-Bertani (LB) 培養液中培養。在隔夜培育之後，經轉形之大腸桿菌勝任細胞表達高度豐富之紅色 RGFP 蛋白，其明顯可見於 LB 培養液之色彩中，而空白對照大腸桿菌不呈現 RGFP，如圖 2 中所示。功能 RGFP 之存在表明，其編碼之 RNA 及蛋白質兩者皆成功地於勝任細胞中產生及加工。

【0018】 爲進一步證實由化學誘導劑誘導之基因表達之特異性，製備兩種經轉形之大腸桿菌菌株：一種攜載含有 *CMV* 啓動子驅動之綠色螢光蛋白 (GFP) 基因的 *pLVX-Grn-miR302+367* 質體載體且另一種攜載前述 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 載體。在僅與 0.1% (v/v) MOPS 一起培育隔夜之後，經 *pLVX-Grn-miR302+367* 轉形之大腸桿菌變爲綠色，而經 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 轉形之大腸桿菌仍顯示爲紅色，如圖 3 中所示。此結果表明，如 MOPS 之化學誘導劑可經由真核 pol-2 或 pol-2 類病毒啓動子刺激特異性 RNA 轉錄及其相關蛋白質產生。特定言之，應注意 RGFP

及 GFP 產量如此豐富，使得大腸桿菌細胞甚至可視地由各別紅色及綠色染色。

【0019】 在本發明中測試的所有化學品之中，前三種最強誘導劑係 MOPS、甘油及乙醇，如圖 4 中所示。進一步藉由西方墨點分析（Western blot analysis）證實誘導之 RGFP 產生之定量結果，如圖 5 及實例 3 中所示。細菌 RuvB 蛋白充當管家標準以標準化 RGFP 表達。亦發現此等鑑別之誘導劑之可誘導性與其濃度成比例地具劑量依賴性。在無任何處理之情況下，陰性對照大腸桿菌細胞在不存在任何螢光染色劑下僅展示其原始色。因此，根據所有此些結果，本發明明顯提供一種新穎化學誘導型組合物及其用於調節原核細胞中真核 pol-2 驅動或 pol-2 類病毒啟動子驅動之 RNA 產生的應用。鑒於以上論證，所屬技術領域中具有通常知識者極明顯可使用其他基因或相關 cDNAs 替代 *RGFP* 基因來於原核生物中製造功能 RNAs 及相關蛋白質。

誘導原核生物中真核啟動子驅動之 microRNA 表達。

【0020】 伴隨著以上所示的 RGFP 誘導之實驗，發明人進一步量測 pri-/pre-miR-302s 及其成熟 miR-302s 於有或無化學誘導之 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 轉形細胞中之表達。如圖 6 及實例 4 中所示，誘導之 pri-/pre-miR-302 產生之定量結果已藉由北方墨點分析（Northern blot analysis）證實。類似於圖 4 及 5 中 RGFP 誘導之結果，pri-/pre-miR-302 表達於經 MOPS、甘油或乙醇處理之轉形細胞中很大程度上可偵測到，但於空白對照中未偵測到，表明此等化學誘導劑實質上經由真核 pol-2 啟動子刺激原核細胞中編碼 pri-/pre-miRNAs 之表

達（圖 6）。歸因於 pre-miRNAs 與 shRNAs 之結構類似性，所屬技術領域中具有通常知識者明顯可使用本發明製造其他類型之 pri-/pre-miRNA 種類，諸如但不限於 miR-34、miR-146、miR-371-373 及 miR-520。爲了澄清，此等原核生物產生之 pri-/pre-miRNAs 稱爲 pro-miRNAs。

【0021】 因爲 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 含有位於 *RGFP* 基因之 5'-UTR 中的 miR-302 家族簇（圖 1A 及圖 1B），所以誘導之 *RGFP* 基因表達亦將產生 miR-302 簇（pri-miR-302）及其衍生物 pre-miR-302a、b、c 及 d（pre-miR-302s），如圖 1B 中所展現。由於原核生物中不具有 RNase III Dicer，因此發現由此獲得之 pri-miR-302 及 pre-miR-302s 可保持爲髮夾型 microRNA 前驅物，其可用於開發治療藥物。在人類細胞中，此等 pre-miR-302s 及 pri-miR-302 可經處理爲成熟 miR-302 以用於引發其腫瘤抑制功能。類似地，本發明亦可用以製造其他類型之 TS-miRNA 種類及其前驅物，諸如 miR-34a、miR-146a、miR-373 及 miR-520 家族。

【0022】 所得 pro-miRNAs 可容易自勝任大腸桿菌細胞提取（實例 5 及 6）且藉由高效液相層析（HPLC）進一步純化（圖 10A 及 10B）。在經純化之 pro-miR-302s 內，發明人已使用 microRNA 微陣列分析（圖 11B 及 12）及 RNA 測序[圖 13A（pri-miR-302）及 13B（pre-miR-302s）]鑑別出所有的 miR-302 家族成員（miR-302a、a*、b、b*、c、c*、d 及 d*）。特定言之，測序結果顯示，此等 pro-miR-302s 皆與其天然 pre-miR-302 對應物共有完全相同序列（圖 13B）。此外，發明人已將此等 pro-miR-302s 調配爲用於 IV/活體內注射之可溶藥物以便測試

其在活體內對人類肝癌之治療效果（實例 11）。如圖 14 中所示，在 3 次注射處理之後，pro-miR-302 藥物成功地減小活體內移植之人類肝癌之 >90% 體積，使平均癌症大小與未經處理之癌症相比縮小至 <10%。此外，經蘇木精與伊紅（hematoxylin & eosin, H&E）染色之組織學檢查進一步論證，此顯著治療效果不僅來自 miR-302 之所報導的腫瘤抑制功能（Lin 等人, 2010），而亦來自之前尚未觀測到之另一新穎重新編程功能。舉例而言，圖 15 明顯展示，pro-miR-302 藥物可在活體內將人類高度肝癌之惡性特性重新編程至幾乎十分類似於正常肝組織之良性階段。此等經處理之癌症甚至可形成正常肝樣結構，諸如經典肝小葉（liver lobules）、中央靜脈（central veins, CV）及門脈三聯管（portal triads, PT）。因此，此等證據強烈表明，pro-miR-302 能夠不僅抑制腫瘤/癌細胞生長，而且在活體內可將人類癌症之惡性復位至相對良性或正常狀態，導領癌症藥物設計之全新治療效果。

【0023】 在本發明中，質體載體及其編碼之非編碼 RNAs（亦即 pre-miRNA/shRNA）兩者皆可同時於原核細胞、較佳大腸桿菌 *DH5α* 勝任細胞中擴增（實例 1、5 及 6）。用於分離擴增之 *pLenti-EF1α-RGFP-miR302* 質體 DNA 及轉錄之 pri-/pre-miR-302s 的方法描述於實例 5 及 6 中。遞送質體載體（亦即 *pLenti-EF1α-RGFP-miR302*）至原核細胞中之技術稱為細胞轉形，而遞送擴增之非編碼 RNAs（亦即 pro-/pri-/pre-miR-302s）至真核細胞中之方法可選自由胞吞作用、化學/甘油輸注、肽/脂質體/化學介導的轉染、電穿孔（electroporation）、基因槍穿透（gene gun penetration）、微注

射、轉位子/反轉錄轉位子插入及/或腺病毒/反轉錄病毒/慢病毒感染所組成之群組。

Pre-miR-302 誘導之多能幹細胞衍生。

【0024】 MiR-302 已據報導可將哺乳動物體細胞重新編程爲人胚胎幹細胞 (hESC) 類誘導多能幹細胞 (iPSCs)，如發明人之優先權美國專利申請案第 12/149,725 號及第 12/318,806 號中所論證。已使用此等 iPSCs 設計及開發眾多幹細胞應用及療法。儘管如此，因爲培養此等 iPSCs 及 hESCs 成本極高且極費力，所以自此等多能幹細胞收集 miR-302 及其前驅物是困難且低效的。另一方面，製造合成 shRNA 模擬物係 pre-miR-302 製造之另一可能的替代方案；然而，成本仍極爲高昂。此外，合成 shRNA 與天然 pre-miR-302 之間的類似性十分令人質疑。爲解決此等問題，本發明提供一種簡單、便宜且高效的於原核生物中大量製造 pre-miR-302 之方法。此外，此等原核生物產生之 pre-miR-302s (pro-miR-302s) 之提取及純化係相對簡單且具成本效益的，如本發明之圖 6 及實例 6 中所示。

【0025】 發明人已使用 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 轉形大腸桿菌細胞來製造及分離大量且高品質之 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 載體及 pro-miR-302s，如實例 5 及 6 中所示。*pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 及 pro-miR-302s 兩者皆可用於產生 iPSCs。遵循實例 2，當藉由本發明製造之 pro-miR-302s 轉導至人類皮膚初級角質細胞中時，轉染之角質細胞重新編程爲表現強 hESC 標記 Oct4 之 hESC 類 iPSCs (圖 7)。在圖 8 及實例 8 中，發明人進一步執行亞硫酸鹽 DNA

測序分析以顯示，整體 DNA 去甲基確實於 *Oct4* 及 *Sox2* 基因兩者之啓動子（兩種關鍵重新編程因子）以及 hESC 標記中發生。因爲整體 DNA 去甲基及 *Oct4* 表達據知爲體細胞重新編程以形成 hESC 類 iPSCs 之第一步驟（Simonsson 及 Gurdon, *Nat Cell Biol.* 6: 984-990, 2004），所以自 MOPS 誘導之大腸桿菌細胞提取物分離的 pro-miR-302s 經證實與可用於 iPSC 衍生之天然 pre-miR-302s 一樣有效。因此，pro-miR-302 及 pre-miR-302 在幹細胞誘導中很可能具有相同功能。

Pre-miR-302 誘導之 CD34 陽性成體幹細胞增殖及/或再生。

【0026】 已發現 MicroRNA miR-302 可將哺乳動物體細胞重新編程爲胚胎幹細胞(ESC)類誘導多能幹細胞(iPSC)(Lin, 2008, 2010, 2011；Lin 之美國專利申請案第 12/149,725 號及第 12/318,806 號)。使用此等 iPSCs，已開發多種幹細胞相關之應用及療法用於推進現代再生醫學。然而，miR-302 僅富集地見於人 ESCs 而非分化之組織細胞中。此外，自人 ESCs 分離 miR-302 係非常有爭議性、成本高且繁瑣。爲解決此等問題，本發明提供一種簡單、便宜、快速且誘導型組合物及方法，以便於原核生物中大量製造髮夾型 miR-302 分子及/或其前驅物/同源物。此外，自原核細胞分離 miR-302 及/或其前驅物係相對簡單且具成本效益的，如本發明之圖 6 及實例 6 中所示。

【0027】 發明人已使用 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 轉形大腸桿菌細胞來製造及分離大量且高品質之 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 載體及 pre-miR-302s，如實例 5 及

6 中所示。鑒於發明人先前美國專利申請案第 12/149,725 號及第 12/318,806 號，使用 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 已經展示可產生人 ESC 類 iPSCs。此外，由此獲得之 iPSCs 可進一步分化為各種體組織細胞，如發明人先前研究（Lin 等人, 2008, 2010 及 2011）中所論證。

【0028】 分離之 miR-302 及/或 pre-miR-302 分子之應用可進一步包括 CD34 陽性成體幹細胞之誘導及增殖。如圖 17A 及 17B 中所示，發明人於使用新穎 miR-302 調配藥物之傷口癒合療法及癌症療法中的近期研究顯示，相對低濃度（50-500 $\mu\text{g/mL}$ ）之分離之 miR-302/pre-miR-302 分子的處理不僅極大地增強無疤痕傷口癒合而且在活體內在豬皮膚中誘導受傷區域周圍之 CD34 陽性成體幹細胞增殖。基於圖 17B 之 miR-302 處理（miR-302s/pre-miR-302s+抗生素軟膏）結果與圖 17A 之對照（僅抗生素軟膏）結果的比較，明顯顯示在 miR-302 處理之後活體內 CD34 陽性成體幹細胞群體（經綠色螢光抗體標記）有 ≥ 40 倍之增加。當前已知之 CD34 陽性成體幹細胞類型包括但不限於皮膚、毛髮、肌肉、血液（造血）、間質細胞（mesenchymal）及神經幹細胞。因此，因為 miR-302 可用以活體內誘導 CD34 陽性成體幹細胞增殖及/或再生，所以此治療效果亦可幫助使功能性成體幹細胞再生長及/或複生以便治療人類之退化性疾病，諸如但不限於阿茲海默症、帕金森氏症、骨質疏鬆症、糖尿病及癌症。

將 pro-miR-302 用於活體內腫瘤/癌症療法。

【0029】 發明人先前研究已論證此方法於活體外而非活體內處理人類肝細胞癌（hepatocellular carcinoma）HepG2 細

胞之可行性 (Lin 等人, 2010)。如圖 9 中所示, 經處理之腫瘤/癌細胞重新編程為 iPSCs (標記為 mirPS-HepG2) 且形成胚胎樣細胞群落。此外, 亦發現 miR-302 可誘導經處理癌細胞群體中之 >95% 細胞凋亡。圖 9 之頂圖進一步展示 DNA 含量響應於細胞週期階段之流式細胞量測術分析, 顯示在 miR-302 處理之後有絲分裂細胞群體之顯著減少 (自 45.6% 至 17.2%)。此等結果表明, miR-302 可有效減慢人類肝癌細胞之快速細胞週期速率且因此導致此等癌細胞之顯著細胞凋亡。

【0030】 癌症進程之過程歸因於累積基因突變而視為不可逆; 然而, 本發明揭示一種新穎 pre-miRNA (pro-miR-302) 功能, 其可在活體內將高度惡性癌症重新編程回至低度良性或甚至正常樣階段, 其機制可關於極罕見稱之為自發癌症消退 (spontaneous cancer regression) 之天然癒合過程。自發癌症消退罕見地以 100,000 名癌症患者中少於 1 人的比率出現。發明人發現, pro-miR-302 治療在人類肝癌中能夠將此罕見癒合比率增加至 >90%。如圖 14 中所示, 使用 pro-miR-302s 作為藥物處理 SCID-米色裸小鼠 ($n = 6$) 中人類肝癌異種移植物之治療結果證實, 此 pro-miR-302 藥物成功地將癌症大小自 $728 \pm 328 \text{ mm}^3$ (未經處理之空白對照, C) 減小至 $75 \pm 15 \text{ mm}^3$ (經 pro-miR-302 處理, T), 指示平均癌症大小減小約 90% 比率, 而其他合成 siRNA 模擬物 (siRNA-302) 處理不提供任何類似治療效果。

【0031】 進一步組織學檢查 (圖 14 之最右圖) 顯示, 正常肝小葉樣結構 (圈出且由黑色箭頭指出) 僅於經 pro-miR-302 處理之癌症移植物中觀測到但於其他處理或對

照中未觀測到，表明重新編程機制發生以將惡性癌細胞特性復位回至相對正常樣狀態（癌症逆轉）。此新穎重新編程機制很可能由 miR-302 對人類致癌基因、尤其參與癌症進程之突變致癌基因的基因靜默效果產生。藉由使此些突變致癌基因靜默，pro-miR-302 能夠將癌基因表達模式復位回至正常樣狀態，因此產生癌症逆轉之治療結果。儘管如此，此活體內重新編程機制明顯不同於先前報導之體細胞重新編程(Lin 等人, 2008 及 2011)，因為未鑑別出 Oct4 陽性多能幹細胞。

【0032】 更詳細之組織學檢查（圖 15）進一步證實，pro-miR-302 藥物確實將高度（IV 度）人類肝癌移植物重新編程至更良性的低度（低於 II 度）狀態。如圖 15 中所示，經處理之癌症移植物形成含有中央靜脈（CV）樣及門脈三聯管（PT）樣結構（由黑色箭頭指示）之經典肝小葉，極其類似於正常肝組織結構（頂圖）。活體內未經處理、經 siRNA 處理、經 pro-miR-302 處理之人類肝癌移植物及正常肝組織之中的組織學比較（圖 16）亦顯示，未經處理之移植之人類肝癌（頂圖）侵襲性侵入至周圍正常組織（諸如肌肉及血管）中且形成大規模細胞-細胞及癌症-組織融合結構，證實其高惡性及轉移。siRNA 模擬物（siRNA-302）處理不顯著降低移植之肝癌之惡性（中上圖），很可能肇因於活體內 siRNA 之短暫半衰期。相比之下，pro-miR-302 處理不僅將移植之癌細胞重新編程至正常肝細胞樣形態（無融合），而且成功地抑制任何癌症侵入至周圍組織中（中下圖）。與正常肝組織（底圖）相比，經 pro-miR-302 處理之癌症明顯地展現類似小葉結構、正常腺細胞樣配置以及細胞-細胞及癌症-組織接合處之間的極清楚

邊界（黑色箭頭），表明此等經處理之癌症已極大地降級至極良性的狀態。pro-miR-302 藥物進一步連續處理六至十次可完全消除所有六個樣品（ $n = 6$ ）中之癌症異種移植植物。

A. 定義

【0033】 為促進對本發明之理解，多個術語係定義如下：

【0034】 核苷酸：由糖部分體（戊糖）、磷酸基團（phosphate）及含氮雜環鹼基（nitrogenous heterocyclic base）所組成之 DNA 或 RNA 的單體單元。該鹼基係經由糖苷碳（glycosidic carbon）（戊糖之 1 號碳）與糖部分體鏈結，且鹼基與糖的組合為核苷（nucleoside）。含有至少一個磷酸基團鏈結至戊糖之三端或五端位置的核苷即為核苷酸。去氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA）係分別由不同類型之核苷酸單元，即去氧核糖核苷酸與核糖核苷酸所組成。

【0035】 寡核苷酸（Oligonucleotide）：由兩個或多於兩個、較佳多於三個且通常多於十個之去氧核糖核酸（DNAs）及/或核糖核酸（RNAs）組成之分子。長於 13 個核苷酸單體之寡核苷酸亦稱為多核苷酸。寡核苷酸確切的大小取決於許多因素，並且依據該寡核苷酸之最終功能或用途而定。寡核苷酸可以任何方式產生，該方式包括化學合成、DNA 複製、RNA 轉錄、反轉錄或其組合。

【0036】 核苷酸類似物：嘌呤或嘧啶核苷酸，其結構上不同於腺嘌呤（A）、胸腺嘧啶（T）、鳥嘌呤（G）、胞嘧啶（C）或尿嘧啶（U），但足夠類似至可取代核酸分子中之正常核苷酸。

【0037】 核酸組合物：核酸組合物係指寡核苷酸或多核苷

酸，諸如呈單股或雙股分子結構之 DNA 或 RNA 序列、或混合 DNA/RNA 序列。

【0038】 基因：其寡核苷酸或多核苷酸序列編碼 RNA 及/或多肽（蛋白質）之核酸組合物。基因可為 RNA 或 DNA。基因可編碼非編碼 RNA，諸如小髮夾 RNA (shRNA)、microRNA (miRNA)、rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA 及其 RNA 前驅物以及衍生物。或者，基因可編碼蛋白質/肽類合成必需之蛋白質編碼 RNA，諸如傳訊 RNA (mRNA) 及其 RNA 前驅物以及衍生物。在一些情況下，基因可編碼亦含有至少一 microRNA 或 shRNA 序列之蛋白質編碼 RNA。

【0039】 初級 RNA 轉錄物：直接自基因轉錄而未經任何 RNA 處理或修飾之 RNA 序列，其可選自由以下組成之群組：mRNA、hnRNA、rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA、pre-microRNA、病毒 RNA 及其 RNA 前驅物以及衍生物。

【0040】 前驅傳訊 RNA (pre-mRNA)：蛋白質編碼基因之初級 RNA 轉錄物，其藉由真核第二型 RNA 聚合酶 (Pol-II) 機制於真核生物中經由稱為轉錄之胞內機制產生。pre-mRNA 序列含有 5'非轉譯區 (UTR)、3'-UTR、外顯子及內含子。

【0041】 內含子：編碼非蛋白質閱讀框架之基因轉錄序列之一部分或多個部分，諸如框內內含子、5'-UTR 及 3'-UTR。

【0042】 外顯子：編碼蛋白質閱讀框架之基因轉錄序列 (cDNA) 之一部分或多個部分，諸如用於細胞基因、生長因子、胰島素、抗體及其類似物/同源物以及衍生物之 cDNA。

【0043】 傳訊 RNA (mRNA)：pre-mRNA 外顯子之集合，其在內含子由胞內 RNA 剪接機制 (剪接體) 移除之後形成且

充當用於肽類/蛋白質合成之蛋白質編碼 RNA。由 mRNAs 編碼之肽類/蛋白質包括但不限於酶、生長因子、胰島素、抗體及其類似物/同源物以及衍生物。

【0044】 互補 DNA (cDNA)：含有與 mRNA 序列互補之序列且不含有任何內含子序列的單股或雙股 DNA。

【0045】 正義：與同源 mRNA 呈相同序列次序及組成之核酸分子。正義構形以「+」、「s」或「正義」符號指示。

【0046】 反義：與各別 mRNA 分子互補之核酸分子。反義構形指示為「-」或「*」符號或在 DNA 或 RNA 前面以「a」或「反義」指示，例如「aDNA」或「aRNA」。

【0047】 鹼基對 (bp)：雙股 DNA 分子中腺嘌呤 (adenine, A) 與胸腺嘧啶 (thymine, T) 或胞嘧啶 (cytosine, C) 與鳥嘌呤 (guanine, G) 之配對組合 (partnership)。在 RNA 中，尿嘧啶 (uracil, U) 取代胸腺嘧啶 (thymine, T)。一般而言，配對組合 (partnership) 係經由氫鍵結實現。

【0048】 鹼基對 (bp)：雙股 DNA 分子中腺嘌呤 (adenine, A) 與胸腺嘧啶 (thymine, T) 或胞嘧啶 (cytosine, C) 與鳥嘌呤 (guanine, G) 之配對組合 (partnership)。在 RNA 中，尿嘧啶 (uracil, U) 取代胸腺嘧啶 (thymine, T)。一般而言，配對組合 (partnership) 係經由氫鍵結實現。舉例而言，正義核苷酸序列「5'-A-T-C-G-U-3'」可與其反義序列「5'-A-C-G-A-T-3'」形成完全鹼基配對。

【0049】 5'-端：在連續核苷酸之 5'位置處不具有核苷酸之末端，其中一個核苷酸之 5'-羥基係藉由磷酸二酯鍵接合至下一個核苷酸之 3'-羥基。其他基團，諸如一或多個磷酸酯可存

在於該末端上。

【0050】 3'-端：在連續核苷酸之 3'位置處不具有核苷酸之末端，其中一個核苷酸之 5'-羥基係藉由磷酸二酯鍵接合至下一個核苷酸之 3'-羥基。在該端亦可存在有其他官能基，最常見為羥基。

【0051】 模板：藉由核酸聚合酶複製之核酸分子。模板可視聚合酶而為單股、雙股或部分雙股。合成之複本與模板或與雙股或部分雙股模板之至少一股互補。RNA 及 DNA 兩者皆以 5'至 3'方向合成。核酸雙鏈體之兩股始終對齊，以使得兩股之 5'端在雙鏈體之相對端（且必然地 3'末端亦如此）。

【0052】 核酸模板：雙股 DNA 分子、雙股 RNA 分子、雜合分子，諸如 DNA-RNA 或 RNA-DNA 雜合物、或單股 DNA 或 RNA 分子。

【0053】 保守（Conserved）：若核苷酸序列與一預選（參考）序列之確切互補物（exact complement）非隨機地雜合，則該核苷酸序列與該預選序列是保守的。

【0054】 同源的或同源性：指示多核苷酸與基因或 mRNA 序列之間的類似性之術語。舉例而言，核酸序列可與特定基因或 mRNA 序列部分或完全同源。同源也可用相似核苷酸數在全部核苷酸數中所佔的百分比表示。

【0055】 互補（Complementary 或 Complementarity 或 Complementation）：用於表示依前述鹼基配對原則（「base pair（bp）」 rule）相聯之介於兩個多核苷酸之間的匹配鹼基配對（亦即，mRNA 與 cDNA 的序列）之詞彙。舉例而言，序列「5'-A-G-T-3'」與序列「5'-A-C-T-3'」以及「5'-A-C-U-3'」互

補。互補可在兩個 DNA 股、一個 DNA 與一個 RNA 股或兩個 RNA 股之間。互補可以是「部分 (partial)」或「完全 (complete)」或是「整體 (total)」的。當僅一些核酸鹼基根據鹼基配對規則匹配時，出現部分互補 (partial complementarity 或 complementation)。當核酸股之間鹼基完全或完美地匹配時，出現完全或整體互補 (complete or total complementarity or complementation)。核酸股之間的互補性程度對核酸股之間雜交之效率及強度具有顯著影響。此對於擴增反應以及視核酸之間的結合而定之偵測方法特別重要。互補率 (percent complementarity 或 complementation) 係指在該核酸之一股中失配 (mismatch) 鹼基數在全部鹼基中所佔的比例。因此，50%互補意謂一半鹼基失配且一半鹼基匹配。即使核酸之兩股之鹼基數不同，兩股亦可互補。在此情況下，互補發生於較長股之一部分與較短股間，其中較長股之該部分的股上為對應於與較短股之鹼基配對之鹼基。

【0056】 互補鹼基：當 DNA 或 RNA 呈雙股配置時正常配對之核苷酸。

【0057】 互補核苷酸序列 (Complementary Nucleotide Sequence)：單股 DNA 或 RNA 分子的一核苷酸序列，其充分地與另一單股分子之核苷酸序列互補，以致兩股之間藉由隨應之氫鍵而專一地雜合。

【0058】 雜合 (Hybridize 及 Hybridization)：在充分互補以經由鹼基配對形成複合物之核苷酸序列之間形成雙鏈體。在引子 (或剪接模板) 與標靶 (模板)「雜合」時，該等複合物 (或雜合體) 充分穩定以提供 DNA 聚合酶起始 DNA 合成

所需之引子功能（priming function）。兩條互補多核苷酸之間有可被競爭性抑制（competitively inhibited）的特殊，亦即非隨機之交互作用（interaction）。

【0059】 轉錄後基因靜默（Posttranscriptional Gene Silencing）：標的基因在 mRNA 降解或轉譯抑制階段下的剔除（knockout）或敲低（knockdown）效應，其通常由外來/病毒 DNA 或 RNA 轉殖基因（transgenes）或小型抑制性 RNAs 任一者所觸發。

【0060】 RNA 干擾（RNAi）：真核生物中之轉錄後基因靜默機制，其可由小抑制性 RNA 分子諸如 microRNA（miRNA）、小髮夾 RNA（shRNA）及小干擾 RNA（siRNA）觸發。此些小 RNA 分子通常充當基因靜默子，干擾與小 RNAs 完全或部分互補的胞內基因之表達。

【0061】 基因靜默效應：在基因功能受抑制之後的細胞反應，包含但不限於細胞週期減弱（cell cycle attenuation）、G0/G1 檢控點停滯（G0/G1-checkpoint arrest）、腫瘤抑制、抗致腫瘤性（anti-tumorigenicity）、癌細胞凋亡，及其組合。

【0062】 非編碼 RNA：無法用以經由胞內轉譯機制合成肽類或蛋白質之 RNA 轉錄物。非編碼 RNA 包括長及短調節性 RNA 分子，諸如 microRNA（miRNA）、小髮夾 RNA（shRNA）、小干擾 RNA（siRNA）及雙股 RNA（dsRNA）。此等調節性 RNA 分子通常充當基因靜默子，干擾與非編碼 RNA 完全或部分互補的胞內基因之表達。

【0063】 MicroRNA（miRNA）：能夠結合至與 microRNA 之序列部分互補的標的基因轉錄物（mRNAs）之單股 RNA。

成熟 microRNA 通常大小為約 17-27 個寡核苷酸長，且能夠視 microRNA 與其標的 mRNA(s)之間的互補性而直接降解細胞內之 mRNA 標的，或抑制所標的之 mRNA 的蛋白質轉譯。天然 microRNAs 見於幾乎所有真核生物中，充當針對病毒感染之防禦，且可在植物及動物發育期間調節特異性基因表達。原則上，一個 microRNA 通常靶向多個標的 mRNAs 以實現其全部功能，而另一方面，多個 miRNAs 可靶向相同基因轉錄物以增強基因靜默之效應。

【0064】 MicroRNA 前驅物 (Pre-miRNA)：含有莖-臂及莖-環區之髮夾型單股 RNA，用於與胞內 RNase III Dicer 核糖核酸內切酶相互作用，以產生一或多個成熟 microRNAs (miRNAs)，microRNAs (miRNAs) 能夠使與成熟 microRNA 序列完全或部分互補之標的基因或標的基因之特定基團靜默。pre-miRNA 之莖-臂可形成完美 (100%) 或部分 (失配) 雜合之雙鏈體，而莖-環連接莖-臂雙鏈體之一端，以形成與一些阿爾古蛋白 (AGO) 組裝為 RNA 誘導靜默複合物 (RISC) 中所需的圓圈或髮夾-環構形。

【0065】 原核生物產生之 MicroRNA 前驅物 (Pro-miRNA)：類似於天然 microRNA 前驅物 (pre-miRNA) 但於原核勝任細胞中由真核啟動子驅動自人工重組 microRNA 表達質體轉錄之小髮夾型 RNA。舉例而言，pro-miR-302 結構上與 pre-miR-302 相同 (圖 13A 及圖 13B)，但於大腸桿菌 *DH5α* 勝任細胞中自 *pLVX-Grn-miR302+367* 或 *pLenti-EF1α-RGFP-miR302* 載體轉錄 (實例 1)。因為原核細胞通常不表現具有高二級結構之短 RNA，諸如真核

pre-miRNA，所以於原核生物中產生 pro-miRNA 通常需要添加化學誘導劑以便刺激真核啓動子驅動之 pre-miRNA 轉錄（圖 2-4）。

【0066】 小干擾 RNA (siRNA)：大小約為 18-27 個完美鹼基配對的核糖核苷酸雙鏈體且能夠降解具有幾乎完美互補性的標的基因轉錄物之短雙股 RNA。

【0067】 小或短髮夾 RNA (shRNA)：含有一對由不匹配環寡核苷酸隔開以形成髮夾型結構之部分或完全匹配的莖-臂核苷酸序列之單股 RNA。多種天然 miRNAs 係衍生自髮夾型 RNA 前驅物，亦即前驅 microRNA (pre-miRNA)。

【0068】 載體：能夠於不同基因環境中移動及滯留之重組核酸組合物，諸如重組 DNA (rDNA)。一般而言，另一核酸可操作地連接於其中。載體能夠在細胞中自主複製，在此情況下，載體及連接之區段複製。一種類型之較佳載體係游離基因體，亦即能夠染色體外複製之核酸分子。較佳之載體係能夠自主複製及表達核酸之載體。能夠引導編碼一或多個多肽之基因及/或非編碼 RNA 的表達之載體在本文中稱為「表達載體」或「表達勝任載體」。特別重要的載體可使用反轉錄酶自產生之 mRNAs 選殖 cDNA。載體可包含由下列所組成之組分：病毒啓動子或第二型 RNA 聚合酶 (Pol-II 或 pol-2) 啓動子或兩者、Kozak 一致性轉譯起始位 (Kozak consensus translation initiation site)、多聚腺苷酸化訊號 (polyadenylation signals)、複數個限制 / 選殖位 (restriction/cloning site)、pUC 複製起始點 (pUC origin of replication)、在複製勝任原核細胞中用於表達至少一抗生素

抗藥性基因之 SV40 早期啓動子 (SV40 early promoter)、在哺乳動物細胞中用於複製之選擇性 SV40 起始點、及/或四環黴素反應元件 (tetracycline responsive element)。載體的結構可以是線形或環形的單股或雙股 DNA，且選自由質體、病毒載體、轉位子、逆轉位子、DNA 轉殖基因 (DNA transgene)、跳躍基因 (jumping gene)、及其組合所組成之群組。

【0069】 啓動子 (Promoter)：由聚合酶分子所辨識，或與其結合並啓始 RNA 轉錄之核酸。依據本發明之目的，啓動子可以是習知的聚合酶結合位點、增強子及類似物，以及可使用所需聚合酶來啓始 RNA 轉錄物之合成的任何序列。

【0070】 真核啓動子：爲 RNA 及/或基因轉錄所需且可由真核第二型 RNA 聚合酶 (pol-2)、pol-2 等效物及/或 pol-2 相容 (pol-2 類) 病毒聚合酶識別用於起始 RNA/基因轉錄的核酸基序之序列。

【0071】 第二型 RNA 聚合酶 (Pol-II 或 pol-2) 啓動子：可由真核第二型 RNA 聚合酶 (Pol-II 或 pol-2) 識別且因此能夠起始真核傳訊 RNAs (mRNAs) 及/或 microRNAs (miRNAs) 之轉錄的 RNA 啓動子。舉例而言，但不限於，pol-2 啓動子可爲哺乳動物 RNA 啓動子或巨細胞病毒 (CMV) 啓動子。

【0072】 第二型 RNA 聚合酶 (Pol-II 或 pol-2) 等效物：選自由以下組成之群組的真核轉錄機制：哺乳動物第二型 RNA 聚合酶 (Pol-II 或 pol-2) 及 Pol-II 相容 (pol-2 類) 病毒 RNA 聚合酶。

【0073】 Pol-II 相容 (pol-2 類) 病毒啓動子：能夠使用真核 pol-2 或 pol-2 等效物轉錄機制起始基因及/或 RNA 表達之

病毒 RNA 啟動子。舉例而言，但不限於，pol-2 類病毒啟動子可為巨細胞病毒（CMV）啟動子或反轉錄病毒長末端重複序列（LTR）啟動子。

【0074】 順反子：DNA 分子中編碼胺基酸殘基序列且包括上游及下游 DNA 表達控制元件之核苷酸序列。

【0075】 內含子切除：負責 RNA 處理、成熟及降解之細胞機制，包括 RNA 剪接、外泌體消化、無義介導的降解（NMD）處理及其組合。

【0076】 RNA 處理（RNA processing）：一細胞內機制，負責 RNA 的成熟、修飾、與降解，包含 RNA 剪接、內含子切除、外泌體消化（exosome digestion）、無義介導的降解（nonsense-mediated decay, NMD）、RNA 編輯、RNA 處理及其組合。

【0077】 標的細胞：選自由體細胞、組織、幹細胞、生殖系細胞、畸胎瘤細胞、腫瘤細胞、癌細胞及其組合所組成之群組的單個或複數個人類細胞。

【0078】 癌組織：衍生自由皮膚癌、前列腺癌、乳癌、肝癌、肺癌、腦腫瘤/腦癌、淋巴瘤、白血病及其組合所組成之群組的贅生性組織（neoplastic tissue）。

【0079】 表達勝任載體：選自由質體、病毒載體、轉位子、反轉錄轉位子、DNA 轉殖基因、跳躍基因及其組合所組成之群組的線形或圓形之單股或雙股 DNA。

【0080】 抗生素抗性基因：能夠降解選自由以下組成之群組的抗生素之基因：盤尼西林 G（penicillin G）、鏈黴素（streptomycin）、安比西林（ampicillin（Amp））、新黴素

(neomycin)、G418、卡那黴素 (kanamycin)、紅黴素 (erythromycin)、巴龍黴素 (paromycin)、霍火黴素 (phophomycin)、斯派克黴素 (spectromycin)、四環黴素 (tetracycline (Tet))、去氧羥四環素 (doxycycline (Dox))、利福平 (rifapicin)、兩性黴素 B (amphotericin B)、健他黴素 (gentamycin)、氯黴素 (chloramphenicol)、先鋒黴素 (cephalothin)、泰黴素 (tylosin) 及其組合。

【0081】 限制/選殖位點：用於限制酶裂解之 DNA 基序，包括但不限於 *AatII*、*AccI*、*AflIII/III*、*AgeI*、*Apal/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*、*HinPI*、*HindIII*、*Hinfl*、*HpaI/II*、*KasI*、*KpnI*、*MaeII/III*、*MfeI*、*MluI*、*MscI*、*MseI*、*NaeI*、*NarI*、*NcoI*、*NdeI*、*NgoMI*、*NotI*、*NruI*、*NsiI*、*PmlI*、*Ppu10I*、*PstI*、*PvuI/II*、*RsaI*、*SacI/II*、*SalI*、*Sau3AI*、*SmaI*、*SnaBI*、*SphI*、*SspI*、*StuI*、*TaiI*、*TaqI*、*XbaI*、*XhoI*、*XmaI* 裂解位點。

【0082】 基因遞送：選自由以下所組成之群組的基因工程化方法：多聚體 (polysomal) 轉染、脂質體 (liposomal) 轉染、化學轉染、電穿孔、病毒感染、DNA 重組、轉位子插入、跳躍基因插入、顯微注射、基因槍穿透，及其組合。

【0083】 基因工程化：選自由以下所組成之群組的 DNA 重組方法：DNA 限制酶反應與接合反應、同源重組、轉殖基因併入、轉位子插入、跳躍基因併入、反轉錄病毒感染，及其組合。

【0084】 細胞週期調節子：參與控制細胞分裂及增殖速率之細胞基因，包含但不限於：CDK2、CDK4、CDK6、週期素、BMI-1、p14/p19Arf、p15Ink4b、p16Ink4a、p18Ink4c、p21Cip1/Waf1及p27Kip1及其組合。

【0085】 腫瘤抑制效應：細胞抗腫瘤及/或抗癌機制及反應，包含但不限於：細胞週期減弱、細胞週期停滯、腫瘤細胞生長抑制、細胞致腫瘤性抑制、腫瘤/癌細胞轉形之抑制、腫瘤/癌細胞之細胞凋亡之誘導、正常細胞恢復之誘導、高度惡性癌細胞重新編程至更良性的低度狀態（腫瘤消退）及其組合。

【0086】 癌症治療效果：由藥物治療產生之細胞反應及/或細胞機制，包括但不限於：致癌基因表達之抑制、癌細胞增殖之抑制、癌細胞侵入及/或遷移之抑制、癌症轉移之抑制、癌細胞死亡之誘導、腫瘤/癌症形成之預防、癌症復發之預防、癌症進程之抑制、受損組織細胞修復、高度惡性癌症重新編程至更良性的低度狀態（癌症消退/緩解）及其組合。

【0087】 基因靜默效應：在基因功能受抑制之後的細胞反應，包含但不限於：致癌基因表達之抑制、細胞增殖之抑制、細胞週期停滯、腫瘤抑制、癌症消退、癌症預防、細胞之細胞凋亡、細胞修復及/或復原、細胞重新編程、患病細胞重新編程至相對正常狀態（自發癒合）及其組合。

【0088】 癌症逆轉：在活體外、離體或活體內使高度癌症之惡性特性復位回至相對正常樣低度狀態之重新編程機制。

【0089】 標的細胞：選自由體細胞、組織、幹細胞、生殖系細胞、畸胎瘤細胞、腫瘤細胞、癌細胞及其組合所組成之

群組的單個或複數個人類細胞。

【0090】 癌組織：衍生自由皮膚癌、前列腺癌、乳癌、肝癌、肺癌、腦腫瘤/腦癌、淋巴瘤、白血病及其組合所組成之群組的贅生性組織。

【0091】 轉錄誘導劑：可於原核細胞中自 *pol-2* 或 *pol-2* 類啟動子誘導及/或增強真核 RNA 及/或基因轉錄之化學劑。舉例而言，轉錄誘導劑含有但不限於類似於以下之化學結構：MOPS、乙醇、甘油以及其功能類似物，諸如 2-(N-嗎啉基)乙烷磺酸 (MES)、4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸 (HEPES) 及甘露糖醇或其混合物。

【0092】 抗體：具有預選保守結構域結構，編碼能夠結合預選配位體之受體的肽類或蛋白質分子。

【0093】 醫藥及/或治療應用：可用於診斷、幹細胞生成、幹細胞研究及/或療法開發、組織/器官修復及/或復原、傷口癒合處理、腫瘤抑制、癌症治療及/或預防、疾病治療、藥物製造及其組合之生物醫學用途、裝置及/或設備。

B. 組合物及應用

【0094】 一種製造新類型能夠在活體外、離體及活體內將人類癌症之惡性特性重新編程至低度良性或正常樣狀態的原核生物產生之 microRNA 前驅物 (pro-miRNAs) 之組合物及方法，其包含：(a) 含有類似於 3-嗎啉基丙烷-1-磺酸 (MOPS)、乙醇或甘油或其混合物之結構的至少一化學誘導劑；及 (b) 含有由真核 *pol-2* 及/或 *pol-2* 類啟動子驅動之轉錄介導的至少一 pre-miRNA 編碼基因之複數個原核細胞；其中 (a) 及 (b) 在誘導該基因表達之條件下混合在一起，以便於原核細胞中

產生所編碼之 pre-miRNA。值得注意的是，化學誘導劑能夠刺激原核生物中真核啟動子驅動之 RNA 轉錄。

【0095】 原則上，本發明提供一種新穎組合物設計及其可適用策略，其用於誘導原核生物之快速適應以使用真核 pol-2 及 pol-2 類啟動子於直接表達特定所需 microRNA 前驅物 (pre-miRNA)，而不需要使用錯誤傾向原核啟動子或培育費力且成本高的融合瘤或哺乳動物細胞。

【0096】 較佳地，該原核生物係細菌細胞菌株、尤其大腸桿菌 (E. coli)，且該化學誘導劑係 3-嗎啉基丙烷-1-磺酸 (MOPS)、乙醇或甘油或其混合物。亦較佳地，該真核啟動子係真核 pol-2 啟動子，諸如 EF1 α ；或 pol-2 相容 (pol-2 類) 病毒啟動子，諸如巨細胞病毒 (CMV) 啟動子或反轉錄病毒長末端重複序列 (LTR) 啟動子。由該真核啟動子介導之 pre-miRNA 編碼基因編碼非編碼或蛋白質編碼 RNA 轉錄物或兩者 (諸如含內含子之基因轉錄物)，其中非編碼或蛋白質編碼 RNA 轉錄物或兩者 (諸如含內含子之基因轉錄物) 選自由 microRNA (miRNA)、小髮夾 RNA (shRNA)、小干擾 RNA (siRNA)、傳訊 RNA (mRNA) 及其前驅物以及 shRNA/siRNA 同源物及其組合所組成之群組。蛋白質編碼 RNA 可選自但不限於由基因編碼酶、生長因子、抗體、胰島素、肉毒桿菌毒素 (botox)、功能蛋白及/或其類似物及其組合所組成之群組。較佳地，用於誘導該 pre-miRNA 編碼基因之表達的該條件係細菌培養條件，諸如在 37°C 下添加有所述化學誘導劑之 Luria-Bertani (LB) 培養液。

【圖式簡單說明】

【0097】 本專利或申請案文件含有至少一個彩圖。在申請且支付必要費用後，USPTO 將提供具有彩圖之本專利或專利申請公開案之複本。

【0098】 僅爲了說明目的而非限制性地特別參考圖式，其中說明：

【0099】 圖 1A 及圖 1B 展示真核啓動子驅動之表達載體組合物（1A）及其於原核生物中用於 RNA 轉錄物及/或蛋白質產生之表達機制（1B）。爲了驗證本發明，新 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 載體（圖 1A）充當用於在 MOPS、甘油及/或乙醇之刺激下使大腸桿菌 *DH5 α* 勝任細胞轉形以製造 RGFP 蛋白以及 miR-302s 及其前驅物（pre-miR-302s）之一實例組合物。*pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 係由本發明者設計以於原核生物及真核生物兩者中表達各種 microRNAs/shRNAs、mRNAs 及/或蛋白質/肽類之慢病毒質體載體。根據所揭示之機制（1B），所屬技術領域中具有通常知識者容易使用任何 microRNA/shRNA 替代 miR-302 或使用任何 mRNA/蛋白質替代 RGFP，如本發明中所描述。黑色箭頭指示出現於原核及真核細胞兩者中之路徑，而空白箭頭指示僅出現於真核細胞中之步驟。

【0100】 圖 2 描繪經 0.1%（v/v）MOPS 及 0.05%（v/v）甘油之混合物處理（左）或不經處理（右）的細菌培養培養液之結果。大腸桿菌勝任細胞在化學誘導劑處理之前已藉由 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 轉形。

【0101】 圖 3 展示不同細菌集結團塊（pellets）在經 0.1%

(v/v) MOPS 處理之後的結果。大腸桿菌勝任細胞在 MOPS 處理之前已藉由 *pLVX-Grn-miR302+367* (綠色) 或 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* (紅色) 轉形。

【0102】 圖 4 展示各種化學誘導劑對於誘導於大腸桿菌勝任細胞中之 *pol-2* 啟動子驅動之基因表達的可誘導性。在所有測試之化學品之中，前三種最強力誘導劑係 MOPS、甘油及乙醇。所用化學品濃度可介於約 0.001% 至 4%、最佳 0.01% 至 1%。

【0103】 圖 5 展示分別由 MOPS、甘油及乙醇誘導之紅色 RGFP 蛋白表現之西方墨點法結果。細菌 RuvB 蛋白用作管家標準以標準化所偵測之 RGFP 表達。自空白大腸桿菌細胞提取 (亦即未經載體轉形) 之蛋白質用作陰性對照。

【0104】 圖 6 展示分別由 MOPS、甘油及乙醇誘導之 *miR-302* 家族簇 (約 700nt) 及其衍生前驅物 (具有 1 至 4 個髮夾之 *pre-miR-302s*) 之表達的北方墨點法結果。自空白大腸桿菌細胞提取之 RNA 用作陰性對照。

【0105】 圖 7 展示使用自細菌勝任細胞提取物 (BE) 分離的 *miR-302* 及/或 *pre-miR-302* 之 iPSC 生成，其藉由如圖 6 中所示之北方墨點分析證實。如所報導，*miR-302* 重新編程 iPSCs (或稱為 mirPSCs) 形成球樣細胞群落且表達強 Oct4 作為標準 hESC 標記。

【0106】 圖 8 展示由自細菌勝任細胞提取物 (BE) 分離的 *miR-302* 及/或 *pre-miR-302* 誘導之 Oct4 及 Sox2 基因啟動子之整體 DNA 去甲基，其藉由如圖 6 中所示之北方墨點分析所驗證。如 Simonsson 及 Gurdon (*Nat Cell Biol.* 6, 984-990, 2004)

所論證，整體 DNA 去甲基及 Oct4 表達兩種跡象皆為體細胞重新編程以形成 iPSCs 所需。

【0107】 圖 9 展示人類肝癌細胞株 HepG2 響應於 miR-302 轉染之活體外致腫瘤性分析。在 miR-302 轉染之後獲得的細胞標記為 mirPS-HepG2，指示其癌細胞特性變至誘導多能幹細胞（iPSC）樣狀態。比較 miR-302 轉染前後的形態及細胞週期速率之變化。藉由對細胞形態之流式細胞量測術分析之峰圖表（ $n = 3, p < 0.01$ ）展示相對於細胞週期階段之各細胞 DNA 含量。

【0108】 圖 10A 及 10B 展示使用合成標準 uDNA（來自 Sigma-Genosys）及自 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 轉形大腸桿菌細胞分離的新鮮提取之 pro-miR-302s 之 HPLC 純化及分析的結果。標準 uDNA 經設計以相當於天然 pre-miR-302a 為：

5'-CCACCACUUA AACGUGGAUG UACUUGCUUU
GAAACUAAAG AAGUAAGUGC UUCCAUGUUU
UGGUGAUGG-3' (SEQ.ID.NO.4)。

【0109】 圖 11A 及 11B 展示使用自空白大腸桿菌勝任細胞或 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* (*RGFP-miR302*) 轉染細胞提取之小 RNA 的 microRNA (miRNA) 微陣列分析之結果。所提取之小 RNA 如圖 10B 之綠色標記區域中所示藉由 HPLC 進一步純化。圖 11A 顯示，來自空白大腸桿菌細胞之 RNA 幾乎不呈現 microRNA（綠色點意謂在統計學上不顯著，而紅色點指示陽性結果）。此係因為原核生物不具有 microRNA 表達及處理所需之若干必需酶，諸如 Pol-2、Drosha 及 RNase III Dicer。此外，原核 RNA 聚合酶不會高效地轉錄具有高二級結構之小

RNA，諸如髮夾型 pre-miRNAs 及 shRNAs。因此，僅使用本發明，發明人可刺激特定 microRNAs 於原核細胞中之表達，諸如 miR-302a、a*、b、b*、c、c*、d 及 d*，如圖 11B 中所示。因為原核細胞不具有 Dicer，所以所有 microRNAs 保持呈其前驅物構形，諸如 pri-miRNA（4 髮夾簇）及/或 pre-miRNA（1 髮夾前驅物）。綜合而言，圖 10B 及 11B 之結果已確定兩個事實：（1）自 *RGFP-miR302* 轉染細胞提取之小 RNA 主要含有純 miR-302 前驅物，及（2）大腸桿菌勝任細胞中幾乎不存在其他種類之 microRNA 污染。

【0110】 圖 12 展示自空白大腸桿菌勝任細胞（第 1 組，如圖 11A 中所示）或 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 轉染細胞（第 2 組，如圖 11B 中所示）提取之表達 microRNA 之列表。小於 500 之信號在統計學上不顯著（如圖 11A 及 11B 中之綠色所示），其可能由低複本數表達或高背景造成。

【0111】 圖 13A 及圖 13B 展示 miR-302 家族簇（13A）及個別 pro-miR-302a、pro-miR-302b、pro-miR-302c 及 pro-miR-302d 序列（13B）之測序結果。miR-302 家族簇（= pri-miR-302）之結果係 5'-AAUUUUUUUC UUCUAAAGUU

AUGCCAUUUUU	GUUUUCUUUC	UCCUCAGCUC
UAAAUACUCU	GAAGUCCAAA	GAAGUUGUAU
GUUGGGUGGG	CUCCCUUCAA	CUUUAACAUG
GAAGUGCUUU	CUGUGACUUU	AAAAGUAAGU
GCUUCCAUGU	UUUAGUAGGA	GUGAAUCCAA
UUUACUUCUC	CAAAAUAGAA	CACGCUAACC
UCAUUUGAAG	GGAUCCCCUU	UGC UUUAACA

UGGGGGUACC	UGCUGUGUGA	AACAAAAGUA
AGUGCUUCCA	UGUUUCAGUG	GAGGUGUCUC
CAAGCCAGCA	CACCUUUUGU	UACAAAAUUU
UUUUGUUAUU	GUGUUUUAAG	GUUACUAAGC
UUGUUACAGG	UUAAAGGAUU	CUAACUUUUU
CCAAGACUGG	GCUCCCCACC	ACUUA AACGU
GGAUGUACUU	GCUUUGAAAC	UAAAGAAGUA
AGUGCUUCCA	UGUUUUGGUG	AUGGUAAGUC
UUCUUUUUAC	AUUUUUAUUA	UUUUUUUAGA
AAAUAAACUUU	AUUGUAUUGA	CCGCAGCUCA
UAUAUUUAAG	CUUUAUUUUG	UAUUUUUACA
UCUGUUAAGG	GGCCCCCUCU	ACUUUAACAU
GGAGGCACUU	GCUGUGACAU	GACAAAAUA
AGUGCUUCCA	UGUUUGAGUG	UGGUGGUUCC
UACCUAAUCA	GCAAUUGAGU	UAACGCCCAC
ACUGUGUGCA	GUUCUUGGCU	ACAGGCCAUU

ACUGUUGCUA-3' (SEQ.ID.NO.5) , 而 pro-miR-302a 、
 pro-miR-302b 、 pro-miR-302c 及 pro-miR-302d 之個別序列分
 別如下 : 5'-CCACCACUUA AACGUGGAUG UACUUGCUUU
 GAAACUAAAG AAGUAAGUGC UUCAUGUUU
 UGGUGAUGG-3' (SEQ.ID.NO.6) 、 5'-GCUCCCUUCA
 ACUUUAACAU GGAAGUGCUU UCUGUGACUU
 UAAAAGUAAG UGCUUCCAUG UUUUAGUAGG AGU-3'
 (SEQ.ID.NO.7) 、 5'-CCUUUGCUUU AACAUUGGGGG
 UACCUGCUGU GUGAAACAAA AGUAAGUGCU

UCCAUGUUUC AGUGGAGG-3' (SEQ.ID.NO.8) 及
 5'-CCUCUACUUU AACAUUGGAGG CACUUGCUGU
 GACAUGACAA AAAUAAGUGC UUCAUGUUU
 GAGUGUGG-3' (SEQ.ID.NO.9)。

【0112】 圖 14 展示使用 pro-miR-302 作為注射藥物處理 SCID-米色裸小鼠中的人類肝癌異種移植物之預試驗新藥 (pre-IND) 試驗之活體內治療結果。在三次處理 (每週一次) 之後, pro-miR-302 藥物 (= pre-miR-302) 成功地將癌症大小自 $728 \pm 328 \text{ mm}^3$ (未經處理之空白對照, C) 減小至 $75 \pm 15 \text{ mm}^3$ (經 pro-miR-302 處理, T), 指示平均癌症大小減小約 90% 比率。合成 siRNA 模擬物 (siRNA-302) 處理中未發現顯著治療效果。進一步組織學檢查 (最右圖) 發現, 正常肝小葉樣結構 (由黑色箭頭指出之圓圈) 僅於經 pro-miR-302 處理之癌症中形成但不於其他處理或對照中形成, 表明重新編程機制可發生以將惡性癌細胞特性復位回至相對正常樣狀態 (稱為「癌症逆轉」)。

【0113】 圖 15 展示活體內正常肝組織與經 pro-miR-302 處理之人類肝癌異種移植物之間的組織學類似性。在三次處理 (每週一次) 之後, pro-miR-302 藥物成功地將高度 (IV 度) 人類肝癌移植物重新編程至更良性的低度 (低於 II 度) 狀態。類似於正常肝組織 (頂圖), 經處理之癌症移植物可形成含有中央靜脈 (CV) 樣及門脈三聯管 (PT) 樣結構 (由黑色箭頭指示) 之經典肝小葉。因為癌細胞通常比正常肝細胞酸性更大, 所以蘇木精與伊紅 (H&E) 染色之結果展示癌細胞中更多紫色而正常肝細胞中更多紅色。

【0114】 圖 16 展示 SCID-米色裸小鼠中未經處理、經 siRNA 處理、經 pro-miR-302 處理之人類肝癌移植物及正常肝組織之中的病理組織學比較。在未經處理之情況下（頂圖），移植之人類肝癌侵襲性侵入至正常組織，諸如肌肉及血管中，且形成大規模細胞-細胞及癌症-組織融合結構，指示其惡性及高轉移性。siRNA 模擬物（siRNA-302）處理不會顯著降低移植之癌症之惡性（中上圖），很可能係由於 siRNA 之短暫半衰期。相比之下，pro-miR-302 處理不僅將移植之癌症重新編程至相對正常樣形態（無融合），而且極大地抑制癌症侵入至周圍組織中（中下圖）。與正常肝組織（底圖）相比，經 pro-miR-302 處理之癌症形成正常樣小葉結構、腺樣細胞配置以及細胞-細胞及癌症-組織接合處之間的清楚邊界（黑色箭頭），表明此等經處理之癌症已降級至極良性的狀態。

【0115】 圖 17A 及 17B 展示活體內未經處理（17A）及經 miR-302 處理（17B）之傷口之間的癒合結果之比較。將分離之 miR-302 分子（20-400 $\mu\text{g/mL}$ ）與二-/三-胺醯化甘油（di-/tri-glycylglycerin）、遞送試劑及抗生素軟膏一起調配以形成候選藥物，用於活體內測試豬背皮膚上 2 cm $\times$ 2 cm 大開放傷口之局部處理（各組 n = 6）。在約兩週處理（每日一次處理）之後，將癒合之傷口解剖且進一步製成組織切片用於在顯微鏡下進行組織學檢查。資料顯示，經 miR-302 處理之傷口中可見無疤痕或極小疤痕（無疤痕）（17B 頂圖，n = 6/6），而幾乎所有未經處理（僅經抗生素軟膏處理）之傷口含有大疤痕（17A 頂圖，n = 5/6）。此外，顯著大量 CD34 陽性成體幹細胞簇（經綠色螢光抗體標記）見於經 miR-302 處理之傷

口中 (17B 底圖, $n = 6/6$), 但未見於未經處理之對照傷口中 (17A 底圖, $n = 0/6$)。此些結果表明, pre-miR-302 能夠誘導 CD34 陽性成體幹細胞增殖及/或再生, 以便增強組織修復及再生, 對由人類退化性疾病, 諸如阿茲海默症、帕金森氏症、骨質疏鬆症、糖尿病及癌症所造成之病變產生極有益的治療效果。該治療效果亦可幫助將高度惡性癌症重新編程為低度良性或甚至正常樣組織, 為稱之為癌症逆轉或癌症消退之新穎機制。

【實施方式】

實例：

【0116】 在以下實驗揭示內容中, 以下縮寫適用: M (莫耳濃度); mM (毫莫耳濃度); μM (微莫耳); mol (莫耳); pmol (皮莫耳); gm (公克); mg (毫克); μg (微克); ng (奈克); L (公升); ml (毫升); μl (微升); $^{\circ}\text{C}$ (攝氏度); RNA (核糖核酸); DNA (去氧核糖核酸); dNTP (三磷酸去氧核糖核苷酸); PBS (磷酸鹽緩衝生理食鹽水); NaCl (氯化鈉); HEPES (N-2-羥基乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸); HBS (HEPES 緩衝生理食鹽水); SDS (十二烷基硫酸鈉); Tris-HCl (三-羥基甲胺基甲烷-鹽酸鹽); ATCC (美國菌種保存中心, Rockville, MD); hESC (人胚胎幹細胞); 及 iPSC (誘導多能幹細胞)。

1. 細菌細胞培養及化學處理

【0117】 自 α -勝任大腸桿菌轉形套組 (Zymo Research, Irvine, CA) 作為一部分獲取大腸桿菌 *DH5 α* 勝任細胞, 且隨後藉由與 5 μg 預製得之質體載體, 諸如

pLenti-EF1 α -RGFP-miR302 或 *pLVX-Grn-miR302+367*) 混合而轉形。使非轉形細胞在 37°C 下在以 170 rpm 頻繁攪拌下正常培育於補充有 10 mM MgSO₄ 及 0.2 mM 葡萄糖之 Luria-Bertani (LB) 培養液中，而將轉形細胞於進一步補充有額外 100 μ g/ml 安比西林之以上 LB 培養液中培養。對於化學誘導，分別或組合添加 0.5 至 2 ml MOPS、甘油及/或乙醇至補充有 10 mM MgSO₄ 及 0.2 mM 葡萄糖、存在 100 μ g/ml 安比西林之 1 公升 LB 培養液中。對於陰性對照，將轉形細胞於以上補充安比西林但不添加任何化學誘導劑之 LB 培養液中培養。結果展示於圖 2-4 中。

2. 人類細胞培養及 MicroRNA 轉染

【0118】 人類肝癌細胞株 HepG2 係獲自 ATCC 且根據製造商之建議繼續。爲了轉染，將 15 μ g pre-miR-302 溶解於 1 ml 新鮮 RPMI 培養基中且與 50 μ l X-tremeGENE HP DNA 轉染試劑 (Roche, Indianapolis, IN) 混合。在 10 分鐘培育之後，添加混合物至含有 50%-60% HepG2 細胞滿度之 100 mm 細胞培養皿中。12 至 18 小時後更新培養基。在此等經轉染細胞形成球樣 iPSC 群落之後，將培養基變爲補充有 20% 基因剔除血清、1% MEM 非必需胺基酸、100 μ M β -巰基乙醇、1 mM GlutaMax、1 mM 丙酮酸鈉、10 ng/ml bFGF、10 ng/ml FGF-4、5 ng/ml LIF、100 IU/ml 盤尼西林/100 μ g/ml 鏈黴素、0.1 μ M A83-01 及 0.1 μ M 丙戊酸 (Stemgent, San Diego, CA) 之基因剔除 DMEM/F-12 培養基 (Invitrogen)，且在 37°C 下在 5% CO₂ 下培養細胞。結果展示於圖 9 中。

3. 蛋白質提取及西方墨點分析

【0119】 遵循製造商之建議，用補充有蛋白酶抑制劑、亮肽素（Leupeptin）、TLCK、TAME 及 PMSF 之 CelLytic-M 裂解/提取試劑（Sigma）使細胞（ 10^6 個）裂解。在 4°C 下在 12,000 rpm 下使裂解物離心 20 分鐘且回收上清液。在 E-max 微盤讀取器（Molecular Devices, CA）上使用改良之 SOFTmax 蛋白質分析套裝量測蛋白質濃度。在還原（+50 mM DTT）及非還原（無 DTT）條件下添加各 30 μg 細胞溶解物至 SDS-PAGE 樣品緩衝液中，且使其沸騰 3 分鐘，隨後裝載至 6-8% 聚丙烯醯胺凝膠上。將蛋白質藉由 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳（PAGE）解析，電轉漬至硝化纖維素膜上，且在室溫下於 Odyssey 阻斷試劑（Li-Cor Biosciences, Lincoln, NB）中培育 2 小時。隨後，施加一級抗體至試劑且在 4°C 下培育混合物。一級抗體包括 Oct3/4（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）、RuvB（Santa Cruz）及 RGFP（Clontech）。在隔夜之後，將膜用 TBS-T 沖洗三次，且隨後在室溫下暴露於 Alexa Fluor 680 反應性染料標記之山羊抗小鼠 IgG 結合二級抗體（1:2,000；Invitrogen-Molecular Probes）1 小時。在三次額外 TBS-T 沖洗之後，使用 Li-Cor Odyssey 紅外成像儀及 Odyssey 軟體 v.10（Li-Cor）執行免疫轉印之螢光掃描及圖像分析。結果展示於圖 5 中。

4. RNA 提取及北方墨點分析

【0120】 將總 RNA（10 μg ）用 *mirVana*TM miRNA 分離套組（Ambion, Austin, TX）分離，且藉由 15% TBE-脲聚丙烯醯胺凝膠或 3.5% 低熔點瓊脂糖凝膠電泳來分級分離，且電轉漬至耐綸膜上。用 [LNA]-DNA 探針（5'-[TCACTGAAAC]

ATGGAAGCAC TTA-3') (SEQ.ID.NO.10) 探針執行 miR-302s 及相關 pre-miR-302s 之偵測。探針藉由高效液相層析 (HPLC) 純化，且在 [^{32} P]-dATP (> 3000 Ci/mM, Amersham International, Arlington Heights, IL) 存在下經末端轉移酶 (20 單位) 加尾標記 20 分鐘。結果展示於圖 6 中。

5. 質體擴增及質體 DNA/總 RNA 提取

【0121】 將轉形之後的大腸桿菌 *DH5 α* 勝任細胞 (來自實例 1) 在補充有 10 mM MgSO₄ 及 0.2 mM 葡萄糖之 LB 培養液中在 37°C 下在以 170 rpm 頻繁攪拌下培養。爲了誘導真核啟動子驅動之 RNA 轉錄，添加 0.5 至 2 ml MOPS、甘油及/或乙醇至每 1 公升 LB 培養液中以使轉形細胞繁殖隔夜。使用 HiSpeed 質體純化套組 (Qiagen, Valencia, CA) 遵循製造商之方案但有 RNase A 不添加至 P1 緩衝液中的微小修改，分離轉形細胞中擴增之質體 DNAs 及表達之 mRNAs/microRNAs。此後，將含有質體及 mRNAs/microRNAs 兩者之最終提取產物溶解於經 DEPC 處理之 ddH₂O 中，且在使用之前儲存於 -80°C 下。爲了僅純化擴增之質體載體，添加 RNase A 至 P1 緩衝液中且遵循製造商之方案執行提取程序。

6. MicroRNA 及 Pre-miRNA 分離/純化

【0122】 爲了純化 microRNAs 及 pre-miRNAs，使用 *mirVana*TM miRNA 分離套組 (Ambion, Austin, TX) 遵循製造商之方案，進一步提取自實例 5 分離之總 RNA。將由此獲得之最終產物溶解於經 DEPC 處理之 ddH₂O 中，且在使用之前儲存於 -80°C 下。因爲細菌 RNAs 天然地極快降解 (在數小時內)，而真核髮夾型 microRNA 前驅物 (pre-miRNAs 及

pri-miRNAs) 在 4°C 下大部分保持穩定 (半衰期達 3-4 天), 所以發明人可使用此半衰期差異獲取相對純 pri-/pre-miRNAs 以用於其他應用。舉例而言, 由此獲得之 pre-miR-302s 可用以將體細胞重新編程為 hESC 類 iPSCs, 如圖 9 中所示。

7. 免疫染色分析

【0123】 如先前所報導 (Lin 等人, 2008) 對組織樣品執行包埋、切片及免疫染色。一級抗體包括 Oct4 (Santa Cruz) 及 RGFP (Clontech, Palo Alto, CA)。經螢光染料標記之山羊抗兔或馬抗小鼠抗體用作二級抗體 (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA)。在螢光 80i 顯微定量系統下用 Metamorph 成像程式 (Nikon) 以 100x 或 200x 放大率檢查及分析陽性結果。結果展示於圖 7 中。

8. 亞硫酸鹽 DNA 測序

【0124】 使用 DNA 分離套組 (Roche) 自約 2,000,000 個細胞分離基因組 DNA, 且用亞硫酸鹽 (CpGenome DNA 修飾套組, Chemicon, Temecula, CA) 遵循製造商之建議進一步處理 1 µg 分離之 DNA。亞硫酸鹽處理將所有未甲基化胞嘧啶轉化為尿嘧啶, 而甲基化胞嘧啶保持為胞嘧啶。在亞硫酸鹽 DNA 測序中, 發明人用 PCR 引子擴增 *Oct4* 基因之啟動子區, 引子為: 5'-GAGGCTGGAG CAGAAGGATT GCTTTGG-3' (SEQ.ID.NO.11) 及 5'-CCCTCCTGAC CCATCACCTC CACCACC-3' (SEQ.ID.NO.12)。在 PCR 中, 將亞硫酸鹽修飾之 DNAs (50 ng) 與引子 (總計 100 pmol) 於 1x PCR 緩衝液中混合, 加熱至 94°C 維持 2 分鐘, 且立即於冰上冷卻。隨後, 使用 Expand High Fidelity PCR 套組 (Roche), 如下執行 25

個 PCR 循環：94℃ 持續 1 分鐘及 70℃ 持續 3 分鐘。將具有正確大小之 PCR 產物藉由 3%瓊脂糖凝膠電泳進一步分級分離，藉由凝膠提取過濾件（Qiagen）純化，且隨後用於 DNA 測序中。此後，藉由將經轉化 DNA 序列中之未變胞嘧啶與未經轉化之 DNA 序列比較，生成 DNA 甲基化位點之詳細圖譜，如圖 8 中所示。

9. DNA 密度流式細胞量測術

【0125】 將細胞以胰蛋白酶處理、集結團塊且在 -20℃ 下藉由再懸浮於 1 ml 含預冷卻 70%甲醇之 PBS 中而固定 1 小時。將細胞集結成團塊且用 1 ml PBS 洗滌一次，且隨後再次集結成團塊且在 37℃ 下再懸浮於 1 ml 含 1 mg/ml 碘化丙錠（propidium iodide）、0.5 µg/ml RNase 之 PBS 中 30 分鐘。此後，在 BD FACSCalibur（San Jose, CA）上分析約 15,000 個細胞。藉由繪製脈衝寬度相對於脈衝面積且於單細胞門控（gating）而排除細胞二重峰。使用套裝軟體 Flowjo 使用「Watson Pragmatic」演算法分析收集之資料。結果展示於圖 9 之頂圖中。

10. MicroRNA（miRNA）微陣列分析

【0126】 在約 70%細胞滿度下，使用 *mirVana*TM miRNA 分離套組（Ambion）分離來自各細胞培養物之小 RNA。使用 1% 甲醛-瓊脂糖凝膠電泳及分光光度計量測（Bio-Rad）評估分離之小 RNAs 之純度及量，且隨後立即將其冷凍於乾冰中且提交至 LC Sciences（San Diego, CA）以用於 miRNA 微陣列分析。使各微陣列晶片雜合，單個樣品經 Cy3 或 Cy5 標記或一對樣品分別經 Cy3 及 Cy5 標記。根據製造商之建議執行背景

扣除及標準化。在雙樣品分析中，執行 p 值計算且產生大於 3 倍的有差異地表達之轉錄物（黃-紅色信號）之清單。最終微陣列結果展示於圖 11A 及 11B 中，且有差異地表達之 microRNAs 之清單展示於圖 12 中，其將自空白大腸桿菌細胞裂解物提取之小 RNAs（第 1 組）與自 *pLenti-EF1 α -RGFP-miR302* 轉形細胞裂解物提取之小 RNA（第 2 組）比較。

11. 活體內肝癌療法試驗

【0127】 異種移植人類肝癌至免疫功能不全 SCID-米色小鼠中是研究肝癌轉移及療法之有效動物模型。為建立此模型，發明人將 5 百萬個人類肝癌（HepG2）細胞與 100 μ L 基質凝膠混合，且將混合物分別皮下移植至小鼠後肢之各側腹中。因此，小鼠後肢兩側皆經歷大致相同量之癌細胞移植。在移植後約兩週觀測癌症，且其平均大小約為 $15.6 \pm 8 \text{ mm}^3$ （處理之前的起始癌症大小）。對各小鼠，發明人選擇具有更大癌症之側作為處理組且具有更小癌症之另一側作為對照組。因為同一隻小鼠在一側以空白調配試劑（陰性對照）處理且在另一側以調配藥物（pro-miR-302）處理，所以由此獲得之結果可最小化歸因於個體差異之任何可能的變化。

【0128】 為了在活體內將 pro-miR-302 遞送至標的癌症區域中，發明人訂約專業調配公司 Latitude（San Diego, CA）將 pro-miR-302s 經脂質體囊封至 160-200 nm 直徑之奈米粒子中。此些含 pro-miR-302 之奈米粒子已經測試在室溫下幾乎 100% 穩定超過兩週且在 4°C 下幾乎 100% 穩定超過一個月，而其他合成 siRNA 模擬物（siRNA-302）在相同條件下在 3 至 5

天內皆快速降解超過 50%，表明 pro-miRNA 而非 siRNA 足夠穩定以用作治療藥物。在毒性分析中，發明人已進一步最大限度分別注射 300 μ L 調配 pro-miR-302 (1 mg/mL) 至小鼠尾靜脈中 ($n = 8$)，且經六個月在所有測試小鼠中皆未觀測到可偵測副作用。一般而言，非修飾核糖核酸相對不具免疫原性且可容易由組織細胞代謝，提供一種用於活體內療法之安全工具。

【0129】 爲了測試藥物效力，發明人分別在小鼠之一側皮下注射 200 μ L 調配 pro-miR-302 且在另一側皮下注射 200 μ L 空白調配試劑，且繼續相同注射模式三次（每週一次注射）。藥物及試劑係應用至癌症位點之周圍區域且在 18 小時內由癌症及其周圍組織吸收。在第三次注射之後一週收集樣品。移出心臟、肝臟、腎臟及移植之癌症以用於進一步組織學檢查。藉由觸診監測腫瘤形成，且使用方程式(長度 $\times$ 寬度²)/2 計算腫瘤體積。對腫瘤病灶計數，解剖、稱重，且使用 H&E 及免疫染色分析使其經歷組織學檢查。組織學檢查展示心臟、肝臟及腎臟中無可偵測之組織病灶。結果展示於圖 14、15 及 16 中。

12. 統計分析

【0130】 免疫染色、西方墨點法及北方墨點法之分析中超過 75%信號強度之任何變化視爲陽性結果，又對其進行分析且呈現爲平均值 $\pm$ SE。藉由單因子 ANOVA 對資料執行統計分析。當主要效果顯著時，鄧尼特事後測試 (Dunnett's post-hoc test) 用以鑑別顯著不同於對照之群組。爲了在兩個處理組之間成對比較 (pairwise comparison)，使用雙尾學生 t 測試

(two-tailed student t test)。對於包括多於兩個處理組之實驗，執行 ANOVA，隨後執行事後多範圍測試。 $p < 0.05$ 之概率值視為顯著。所有 p 值皆由雙尾測試測定。

參考文獻：

1. Lin SL 及 Ying SY. (2006) Gene silencing *in vitro* and *in vivo* using intronic microRNAs. Ying SY. (Ed.) *MicroRNA protocols*. Humana press, Totowa, New Jersey, 第 295-312 頁。
2. Lin SL, Chang D 及 Ying SY. (2006) Transgene-like animal models using intronic microRNAs. Ying SY. (Ed.) *MicroRNA protocols*. Humana press, Totowa, New Jersey, 第 321-334 頁。
3. Lin SL, Chang D, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DTS, Chen DT 及 Ying SY. (2008) Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 14, 2115-2124。
4. Lin SL 及 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, 第 167-185 頁。
5. Lin SL, Chang D, Ying SY, Leu D 及 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。
6. Lin SL, Chang D, Lin CH, Ying SY, Leu D 及 Wu DTS. (2011) Regulation of somatic cell reprogramming through

inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res.* 39, 1054-1065。

7. Simonsson S 及 Gurdon J. (2004) DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol.* 6, 984-990。

8. Takahashi 等人 (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663--676。

9. Wang 等人 (2008). Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat. Genet.* 40, 1478--1483。

10. Wernig 等人 (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318--324。

11. Yu 等人 (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917--1920。

12. Buechler 之美國專利第 7,959,926 號。

13. Mehta 之美國專利第 7,968,311 號。

14. Lin 之歐洲專利第 EP 2198025 號。

15. Lin 之美國專利申請案第 12/149,725 號。

16. Lin 之美國專利申請案第 12/318,806 號。

17. Lin 之美國專利申請案第 12/792,413 號。

18. Lin 之美國專利申請案第 13/572,263 號。

19. Lin 之美國專利申請案第 13/964,705 號。

序列表

(1) 總體資訊：

(iii) 序列數：12

(2) SEQ ID NO:1 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：23 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸：線性

(ii) 分子類型：RNA

(A) 描述：/desc = 「合成」

(iii) 假想：否

(iv) 反義：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:1：

UCACCAAAC AUGGAAGCAC UUA

23

(3) SEQ ID NO:2 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：23 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸：線性

(ii) 分子類型：RNA

(A) 描述：/desc = 「天然」

(iii) 假想：否

(iv) 反義：是

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:2：

ACUUAACGU GGAUGUACUU GCU

23

(4) SEQ ID NO:3 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：17 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸：線性

(ii) 分子類型：RNA

(A) 描述：/desc = 「天然」

(iii) 假想：否

(iv) 反義：否

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

17

(5) SEQ ID NO:4 之資訊：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：69 個鹼基對
- (B) 類型：核酸
- (C) 股型：單股
- (D) 拓樸：髮夾

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 描述：/desc = 「合成」

(iii) 假想：是

(iv) 反義：否

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:4 :
CCACCACUUA AACGUGGAUG UACUUGCUUU GAAACUAAAG AAGUAAGUGC
UCCAUGUUU UGGUGAUGG

69

(6) SEQ ID NO:5 之資訊：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：720 個鹼基對
- (B) 類型：核酸
- (C) 股型：單股
- (D) 拓樸：多個髮夾

(ii) 分子類型：RNA

(A) 描述：/desc = 「重組」

(iii) 假想：否

(iv) 反義：否

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:5 :

AAUUUUUUUC UUCUAAAGUU AUGCCAUUUU GUUUUCUUUC UCCUCAGCUC
 UAAAUACUCU GAAGUCCAAA GAAGUUGUUAU GUUGGGUGGG CUCCCUUCAA
 CUUUAACAUG GAAGUGCUUU CUGUGACUUU AAAAGUAAGU GCUUCCAUGU
 UUUAGUAGGA GUGAAUCCAA UUUACUUCUC CAAAUAAGAA CACGCUAACC
 UCAUUUGAAG GGAUCCCCUU UGCUUUAACA UGGGGGUACC UGCUGUGUGA
 AACAAAAGUA AGUGCUUCCA UGUUUCAGUG GAGGUGUCUC CAAGCCAGCA
 CACCUUUUGU UACAAA AUUU UUUUGUUAUU GUGUUUUAAG GUUACUAAGC
 UUGUUAACAGG UUAAGGAUU CUAACUUUUU CCAAGACUGG GCUCCCCACC
 ACUUAACGU GGAUGUACUU GCUUUGAAAC UAAAGAAGUA AGUGCUUCCA
 UGUUUUGGUG AUGGUAAGUC UUCUUUUUAC AUUUUUUAUUA UUUUUUUAGA
 AAAUAACUUU AUUGUAUUGA CCGCAGCUCA UAUAUUUAAG CUUUAUUUUG
 UAUUUUUACA UCUGUUAAGG GGCCCCCUCU ACUUUAACAU GGAGGCACUU
 GCUGUGACAU GACAAAAUA AGUGCUUCCA UGUUUGAGUG UGGUGGUUCC
 UACCUAUAUCA GCAAUUGAGU UAACGCCCAC ACUGUGUGCA GUUCUUGGCU
 ACAGGCCAUU ACUGUUGCUA

720

(7) SEQ ID NO:6 之資訊：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：69 個鹼基對
- (B) 類型：核酸
- (C) 股型：單股
- (D) 拓樸：髮夾

(ii) 分子類型：RNA

- (A) 描述：/desc = 「重組」

(iii) 假想：是

(iv) 反義：否

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:6：

CCACCACUUA AACGUGGAUG UACUUGCUUU GAAACUAAAG AAGUAAGUGC
 UUCAUGUUU UGGUGAUGG

69

(8) SEQ ID NO:7 之資訊：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：73 個鹼基對
- (B) 類型：核酸
- (C) 股型：單股
- (D) 拓樸：髮夾

(ii) 分子類型：RNA

- (A) 描述：/desc = 「重組」

(iii) 假想：是

(iv) 反義：否

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:7：

GCUCCCUUCA ACUUUAACAU GGAAGUGCUU UCUGUGACUU UAAAAGUAAG
UGCUUCCAUG UUUUAGUAGG AGU 73

(9) SEQ ID NO:8 之資訊：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：68 個鹼基對
- (B) 類型：核酸
- (C) 股型：單股
- (D) 拓樸：髮夾

(ii) 分子類型：RNA

(A) 描述：/desc = 「重組」

(iii) 假想：是

(iv) 反義：否

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:8：

CCUUUGCUUU AACAUGGGGG UACCUGCUGU GUGAAACAAA AGUAAGUGCU
UCCAUGUUUC AGUGGAGG 68

(10) SEQ ID NO:9 之資訊：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：68 個鹼基對
- (B) 類型：核酸
- (C) 股型：單股
- (D) 拓樸：髮夾

(ii) 分子類型：RNA

(A) 描述：/desc = 「重組」

(iii) 假想：是

(iv) 反義：否

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:9：

CCUCUACUUU AACAUGGAGG CACUUGCUGU GACAUGACAA AAUAAGUGC
UCCAUGUUU GAGUGUGG 68

(11) SEQ ID NO:10 之資訊：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：23 個鹼基對
- (B) 類型：核酸

- (C) 股型：單股
- (D) 拓樸：線性

- (ii) 分子類型：LNA-DNA 雜合體
 - (A) 描述：/desc = 「合成」

- (iii) 假想：是

- (iv) 反義：是

- (xi) 序列描述：SEQ ID NO:10：
TCACTGAAAC ATGGAAGCAC TTA

23

(12) SEQ ID NO:11 之資訊：

- (i) 序列特徵：
 - (A) 長度：17 個鹼基對
 - (B) 類型：核酸
 - (C) 股型：單股
 - (D) 拓樸：線性

- (ii) 分子類型：其他核酸
 - (A) 描述：/desc = 「合成」

- (iii) 假想：是

- (iv) 反義：是

- (xi) 序列描述：SEQ ID NO:11：
GAGGCTGGAG CAGAAGGATT GCTTTGG

27

(13) SEQ ID NO:12 之資訊：

- (i) 序列特徵：
 - (A) 長度：17 個鹼基對
 - (B) 類型：核酸
 - (C) 股型：單股
 - (D) 拓樸：線性

- (ii) 分子類型：其他核酸
 - (A) 描述：/desc = 「合成」

- (iii) 假想：是

- (iv) 反義：是

- (xi) 序列描述：SEQ ID NO:12：
CCCTCCTGAC CCATCACCTC CACCACC

27

【符號說明】

【0131】

無

【序列表】

- <110>

林希龍（ Lin, Shi-Lung ）
吳堂熙（ Wu, David TS ）
張欽次（ Chang, Donald ）
- <120>

使用微核醣核酸前驅物作為誘導 CD34 陽性成體幹細胞增殖之藥物
- <150>

US 62/262,280
- <151>

2015-12-02
- <150>

US 15/048,964
- <151>

2016-02-19
- <150>

US 15/167,226
- <151>

2016-05-27
- <150>

PCT/US16/49583
- <151>

2016-08-31
- <160>

12
- <170>

PatentIn version 3.5
- <210>

1
- <211>

23
- <212>

RNA
- <213>

人工序列
- <220>
- <223>

合成寡核苷酸
- <400>

1
- ucaccaa

aac auggaagcac uua
- <210>

2
- <211>

23
- <212>

RNA

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	2	
acuuaaacgu ggauguacuu gcu		23
<210>	3	
<211>	17	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	3	
uaagugcuuc cauguuu		17
<210>	4	
<211>	69	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	4	
ccaccacuua aacguggaug uacuugcuuu gaaacuaaag aaguaagugc uuccauguuu		60
uggugaugg		69
<210>	5	
<211>	720	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 合成寡核苷酸

<400> 5

aauuuuuuuc uucuaaaguu augccauuuu guuuucuuuc uccucagcuc uaaauacucu	60
gaaguccaaa gaaguuguau guuggguggg cucccuuca cuuuacaug gaagugcuuu	120
cugugacuuu aaaaguaagu gcuuccaugu uuuguagga gugaauccaa uuuaucucuc	180
caaaauagaa cacgcuaacc ucauuugaag ggauccccc uuuguuaaca ugaggguacc	240
ugcuguguga aaaaaagua agugcuucca uguuucagug gaggugucuc caagccagca	300
caccuuuugu uacaaaauuu uuuguuuuuu guguuuaag guuacuaagc uuguuacagg	360
uuaaaggauu cuaacuuuuu ccaagacugg gcuccccacc acuuaaacgu ggauguacuu	420
gcuuugaaac uaaagaagua agugcuucca uguuuuggug augguaaguc uucuuuuuac	480
auuuuuauua uuuuuuuaga aaauaacuuu auuguauuga ccgcagcuca uauuuuaag	540
cuuuuuuug uauuuuuaca ucuguuaagg ggccccucu acuuuaacau ggaggcacuu	600
gcugugacau gacaaaaua agugcuucca uguuugagug ugguuguucc uaccuaauca	660
gcaauugagu uaacgcccac acugugugca guucuuggcu acaggccauu acuguugcua	720

<210> 6

<211> 69

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 6

ccaccacuua aacguggaug uacuugcuuu gaaacuaaag aaguaagugc uuccauguuu	60
uggugaugg	69

<210> 7
<211> 73
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 7
gcucccuuca acuuuaacau ggaagugcuu ucugugacuu uaaaaguaag ugcuuccaug 60

uuuuaguagg agu 73

<210> 8
<211> 68
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 8
ccuuugcuuu aacauggggg uaccugcugu gugaaacaaa aguaagugcu uccauguuuc 60

aguggagg 68

<210> 9
<211> 68
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 9

ccucuacuuu aacauggagg cacuugcugu gacaugacaa aaauaagugc uuccauguuu

60

gagugugg

68

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 10

tcactgaaac atggaagcac tta

23

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 11

gaggctggag cagaaggatt gctttgg

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 12

ccctcctgac ccatacctc caccacc

27

申請專利範圍

1. 一種 microRNA 前驅物(pre-miRNA)在製備用於誘導 CD34 陽性成體幹細胞增殖或再生之藥物上的用途，其中：
該 microRNA 前驅物（ pre-miRNA ）包含 SEQ.ID.NO.3 ；
且
使用該 microRNA 前驅物（ pre-miRNA ）所製備之藥物包含將該 microRNA 前驅物(pre-miRNA)與包含至少一 CD34 陽性成體幹細胞之一細胞基質接觸，以誘導該 CD34 陽性成體幹細胞之群體之增殖或再生。
2. 如請求項 1 所述之用途，其中該 microRNA 前驅物係藉由原核細胞中的真核啟動子驅動 RNA 轉錄來產生。
3. 如請求項 2 所述之用途，其中該真核啟動子驅動 RNA 轉錄係藉由將包含 3-嗎啉基丙烷-1-磺酸（MOPS）之分子結構的化學藥劑與攜帶編碼 SEQ.ID.NO.6、SEQ.ID.NO.7、SEQ.ID.NO.8、或 SEQ.ID.NO.9 之序列的至少一表達載體的至少一轉形原核細胞接觸來誘導。
4. 如請求項 3 所述之用途，其中該表達載體是編碼 SEQ.ID.NO.5 之序列的重組質體。
5. 如請求項 3 所述之用途，其中該表達載體是包含巨細胞病毒（CMV）或哺乳動物 EF1 α （EF1alpha）啟動子或同時包含兩者之 pLenti-EF1alpha-RGFP-miR302。
6. 如請求項 2 所述之用途，其中該原核細胞是大腸桿菌勝任細胞。
7. 如請求項 1 所述之用途，其中該 microRNA 前驅物包含 SEQ.ID.NO.6 、 SEQ.ID.NO.7 、 SEQ.ID.NO.8 、 或

SEQ.ID.NO.9 之至少一髮夾型序列。

8. 如請求項 1 所述之用途，其中該 microRNA 前驅物是原核生物生成 miR-302 前驅物（pre-miR-302）。
9. 如請求項 8 所述之用途，其中該 pre-miR-302 包含 miR-302a、miR-302b、miR-302c、或 miR-302d 之至少一序列。
10. 如請求項 8 所述之用途，其中該 pre-miR-302 用於作為醫藥及治療應用之藥物成份的一部分。
11. 如請求項 1 所述之用途，其中該 microRNA 前驅物用於作為醫藥及治療應用之藥物成份的一部分。
12. 如請求項 1 所述之用途，其中該 CD34 陽性成體幹細胞之增殖有用於醫藥及治療應用。
13. 如請求項 12 所述之用途，其中該 CD34 陽性成體幹細胞之增殖有用於在體內增進無疤傷口癒合。
14. 如請求項 1 所述之用途，其中該 CD34 陽性成體幹細胞包含皮膚、毛髮、肌肉、造血細胞、間質細胞、及神經幹細胞、或其組合。
15. 一種使用 microRNA 前驅物（pre-miRNA）於活體外誘導 CD34 陽性成體幹細胞增殖或再生之方法，其包含：
 - （a）提供包含 SEQ.ID.NO.3 之至少一 microRNA 前驅物；
 - （b）提供包含至少一 CD34 陽性成體幹細胞之一細胞基質；以及
 - （c）將（a）之該 microRNA 前驅物與（b）之該細胞基質於活體外接觸，以誘導該 CD34 陽性成體幹細胞之群體之增殖或再生。

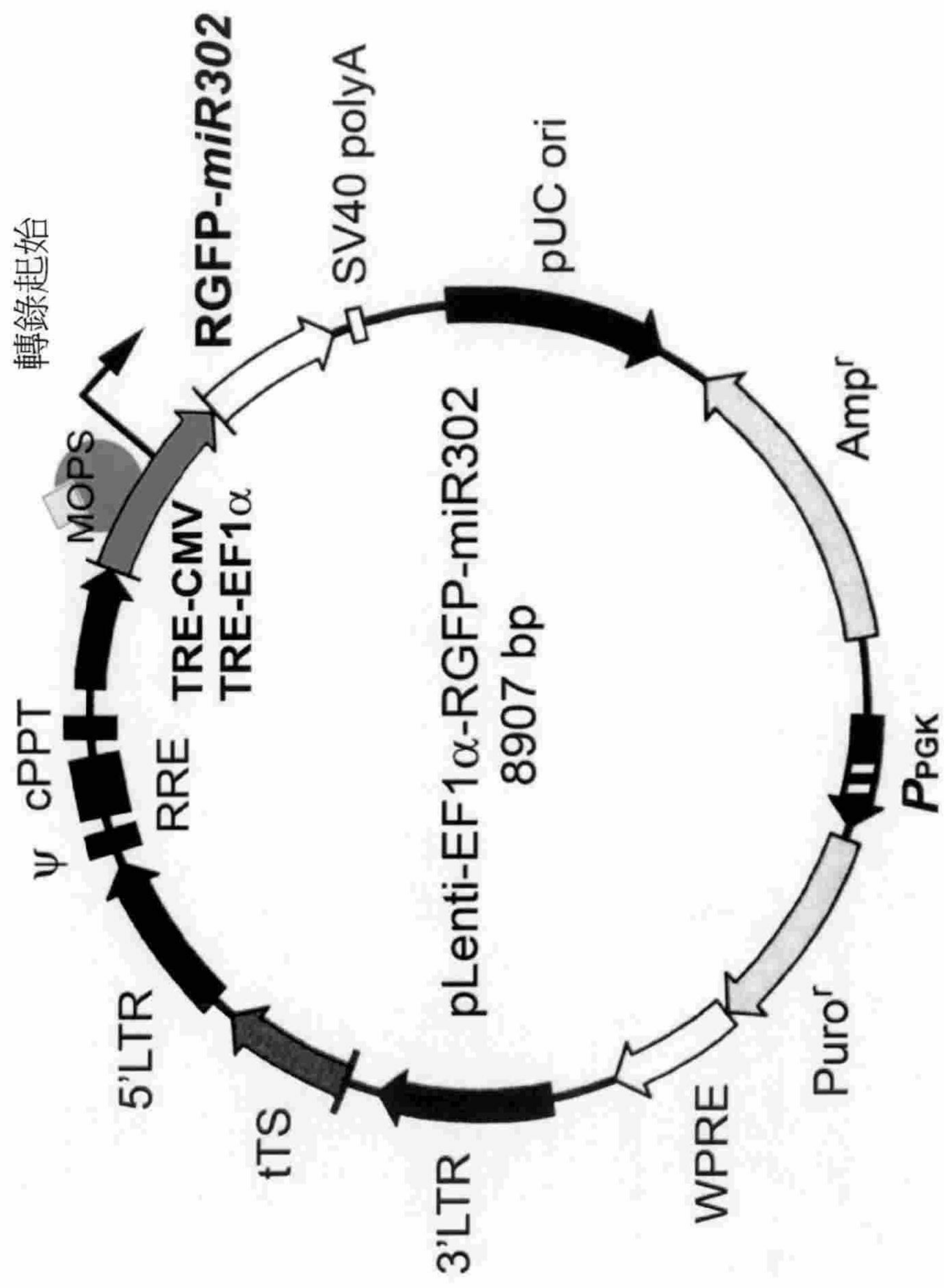


圖 1A

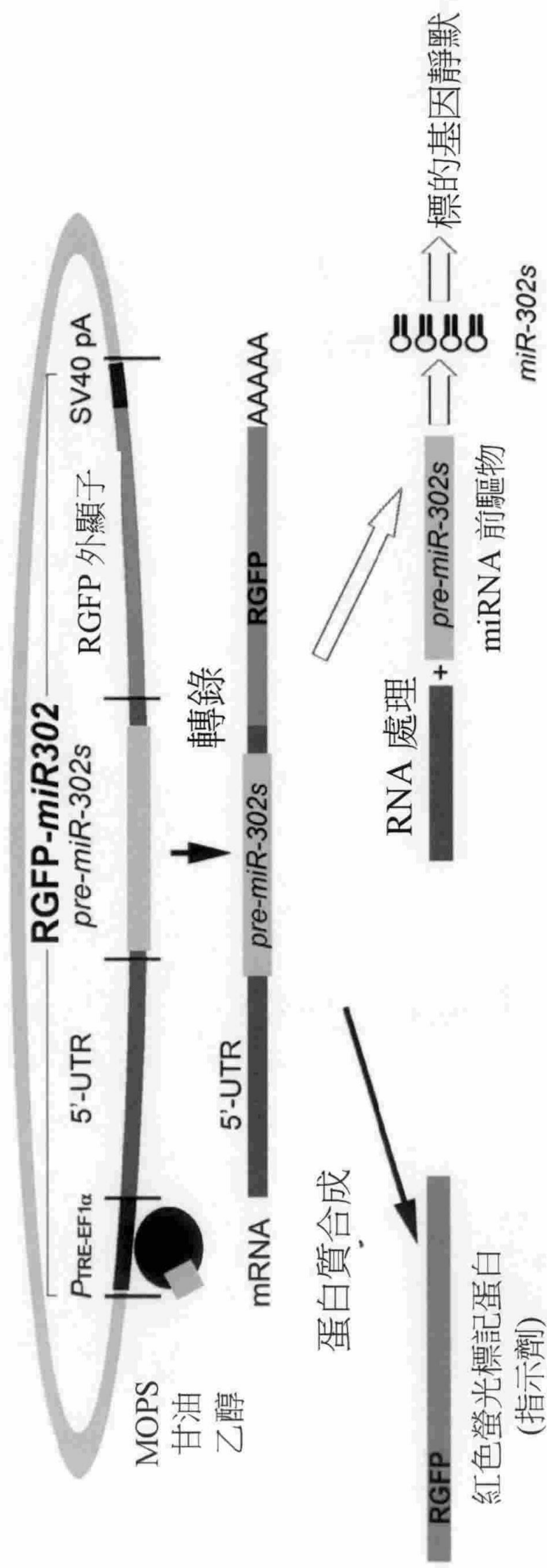
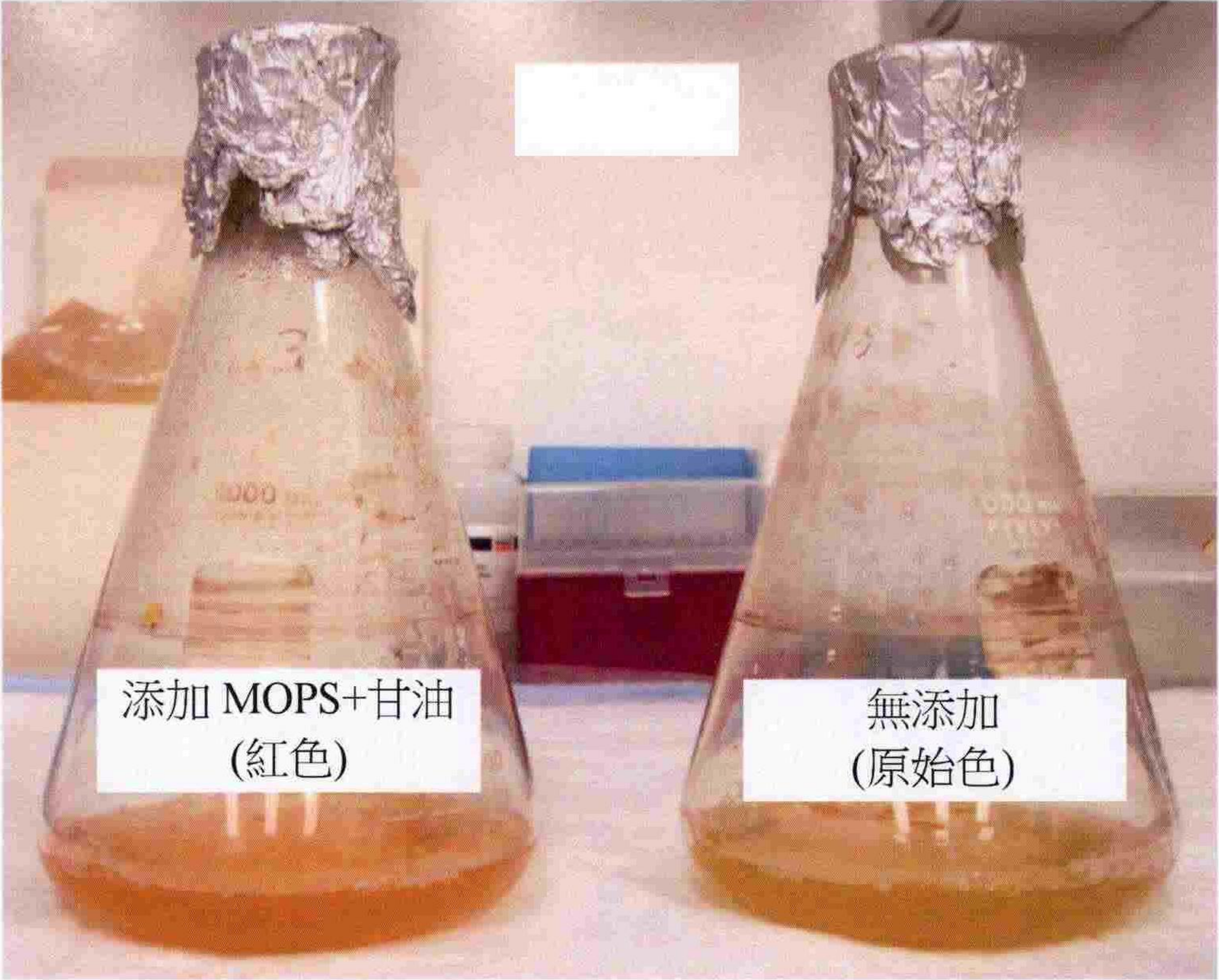


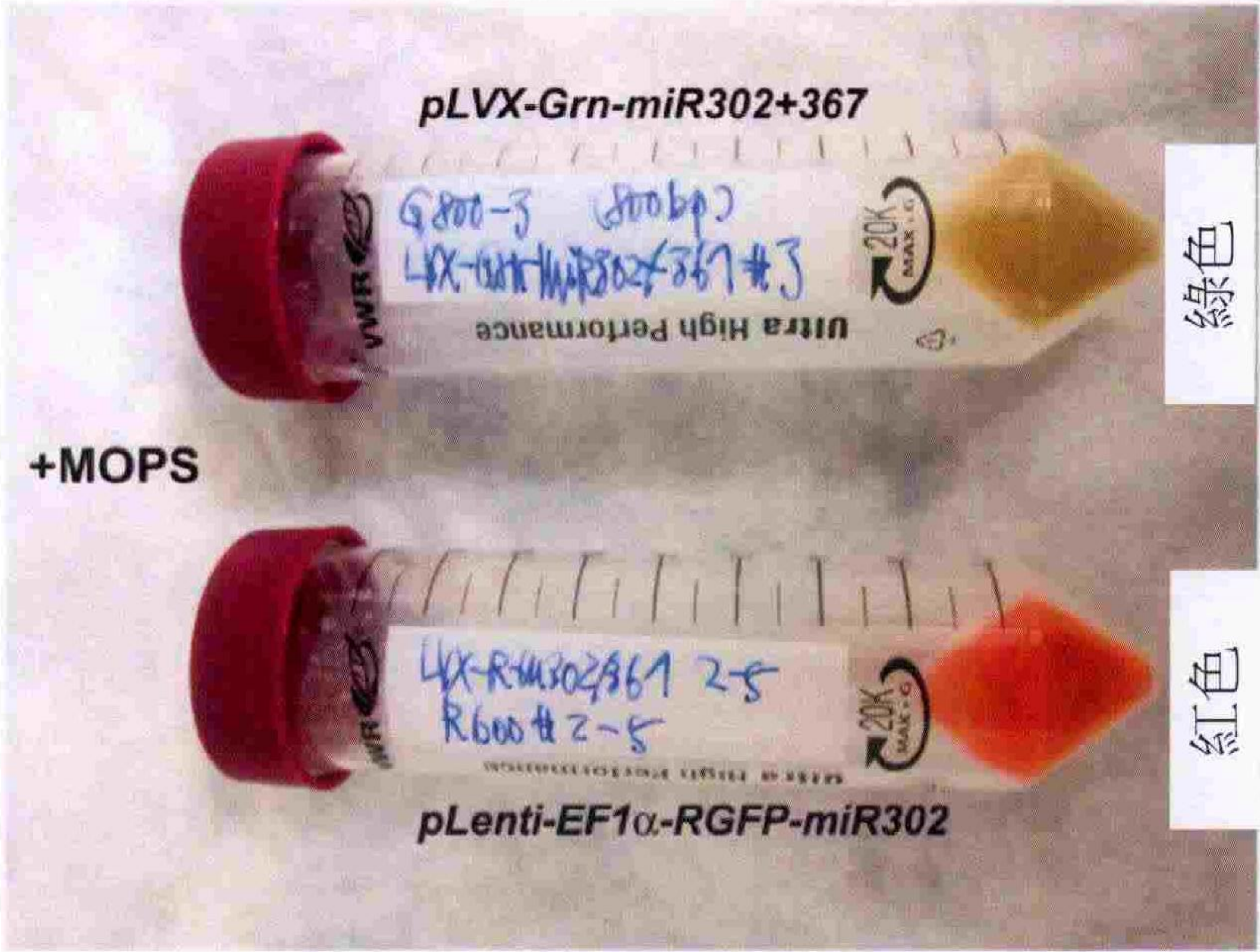
圖 1B



添加 MOPS+甘油
(紅色)

無添加
(原始色)

圖 2



綠色

紅色

圖 3

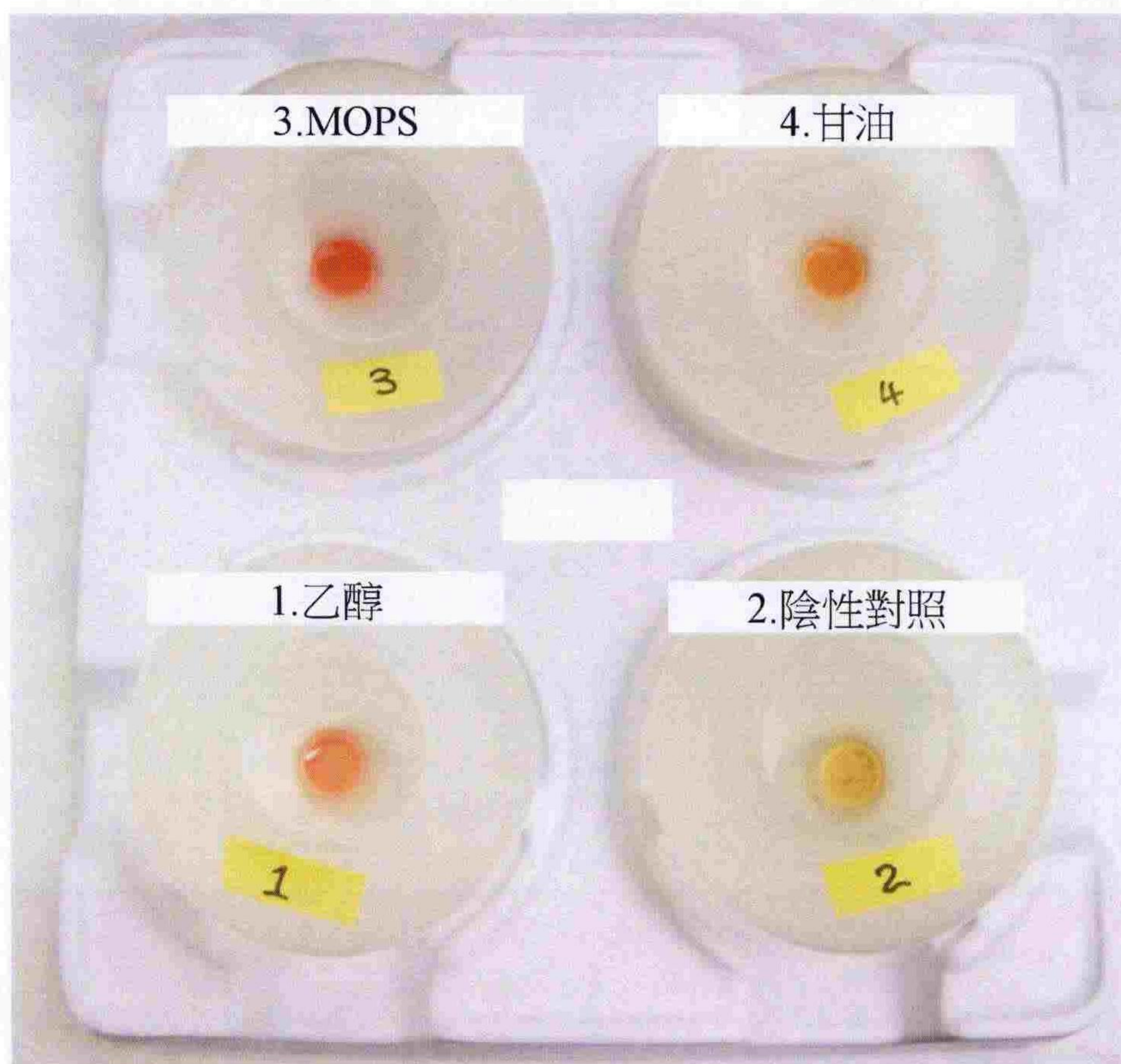


圖 4

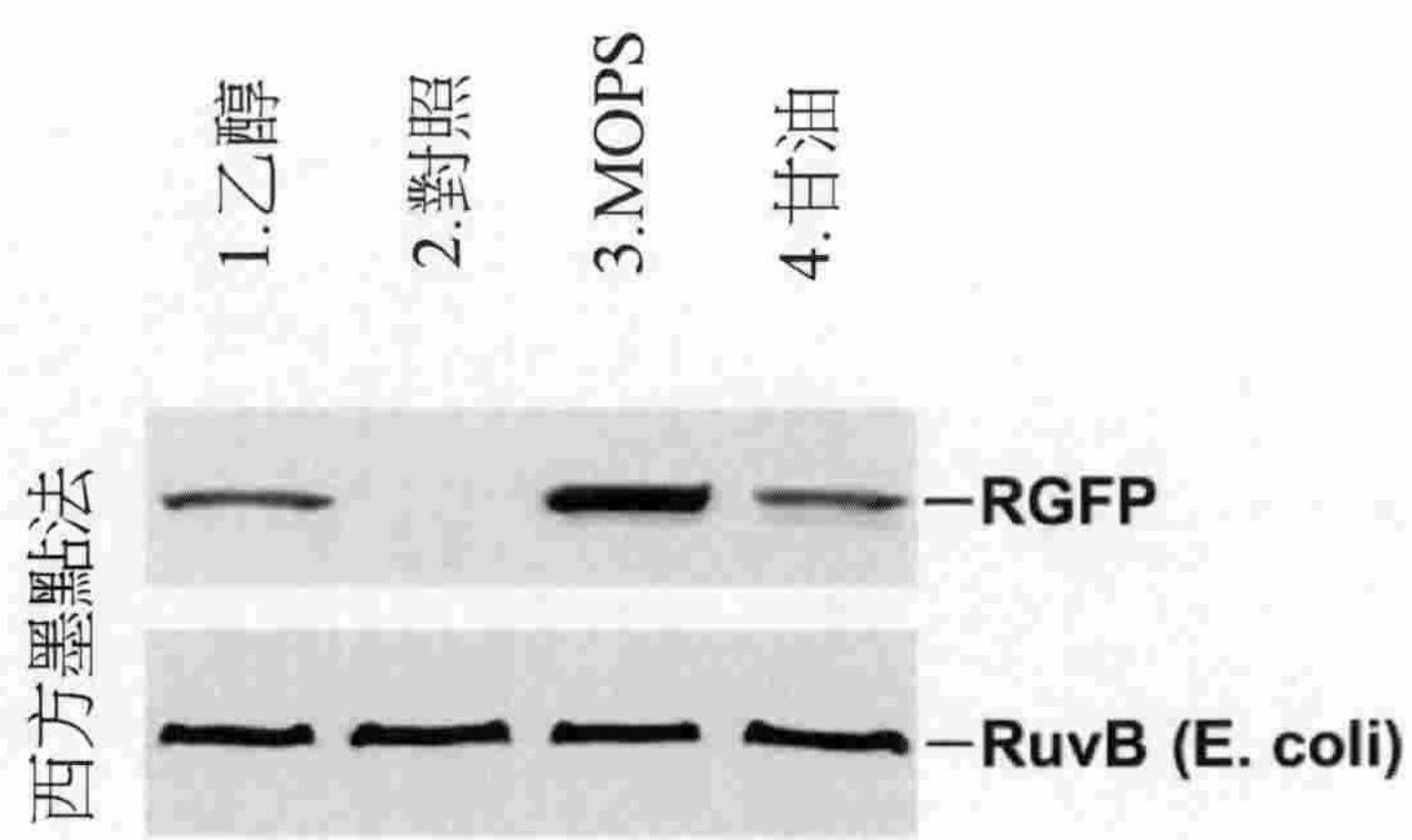


圖 5

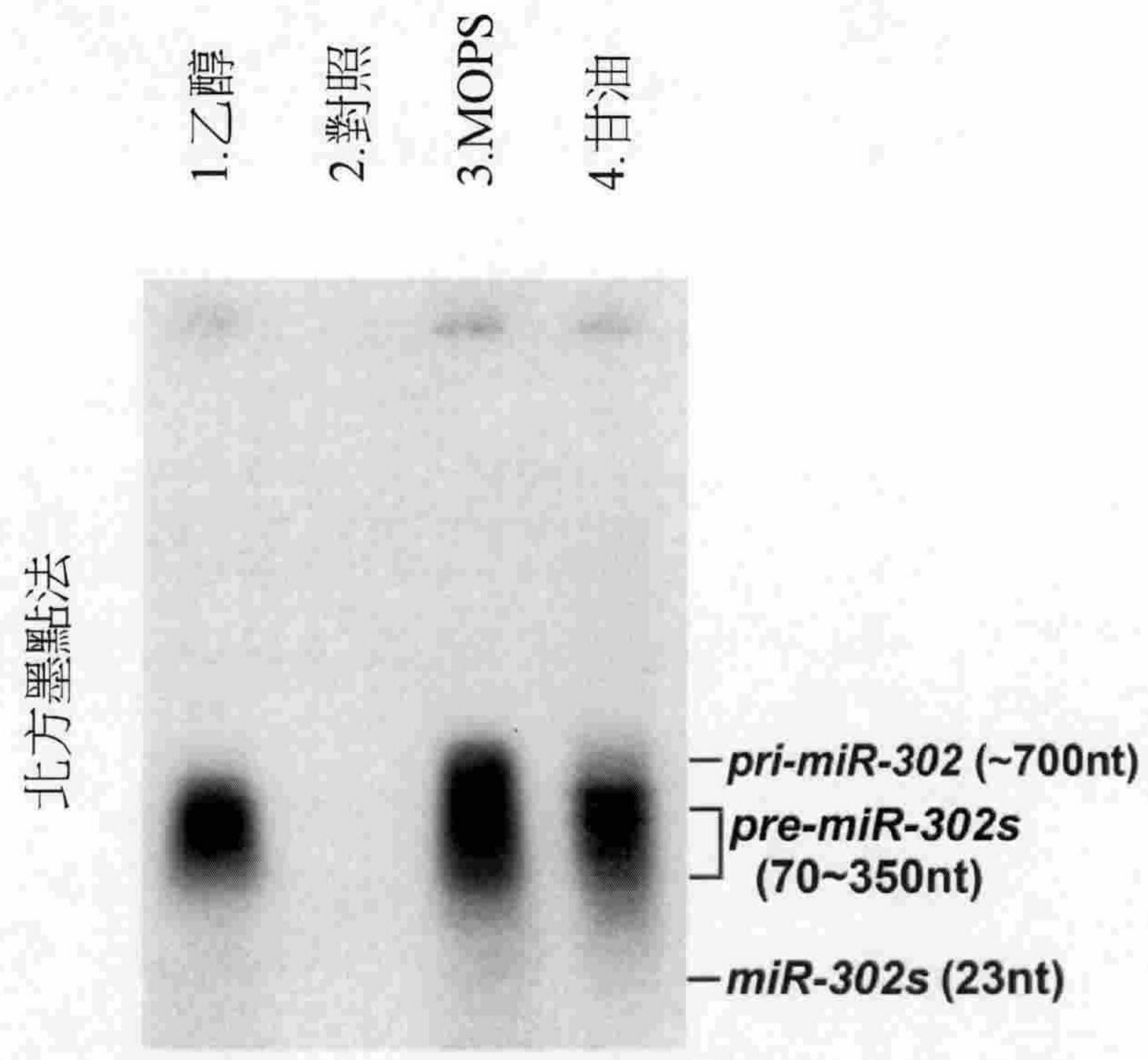


圖 6

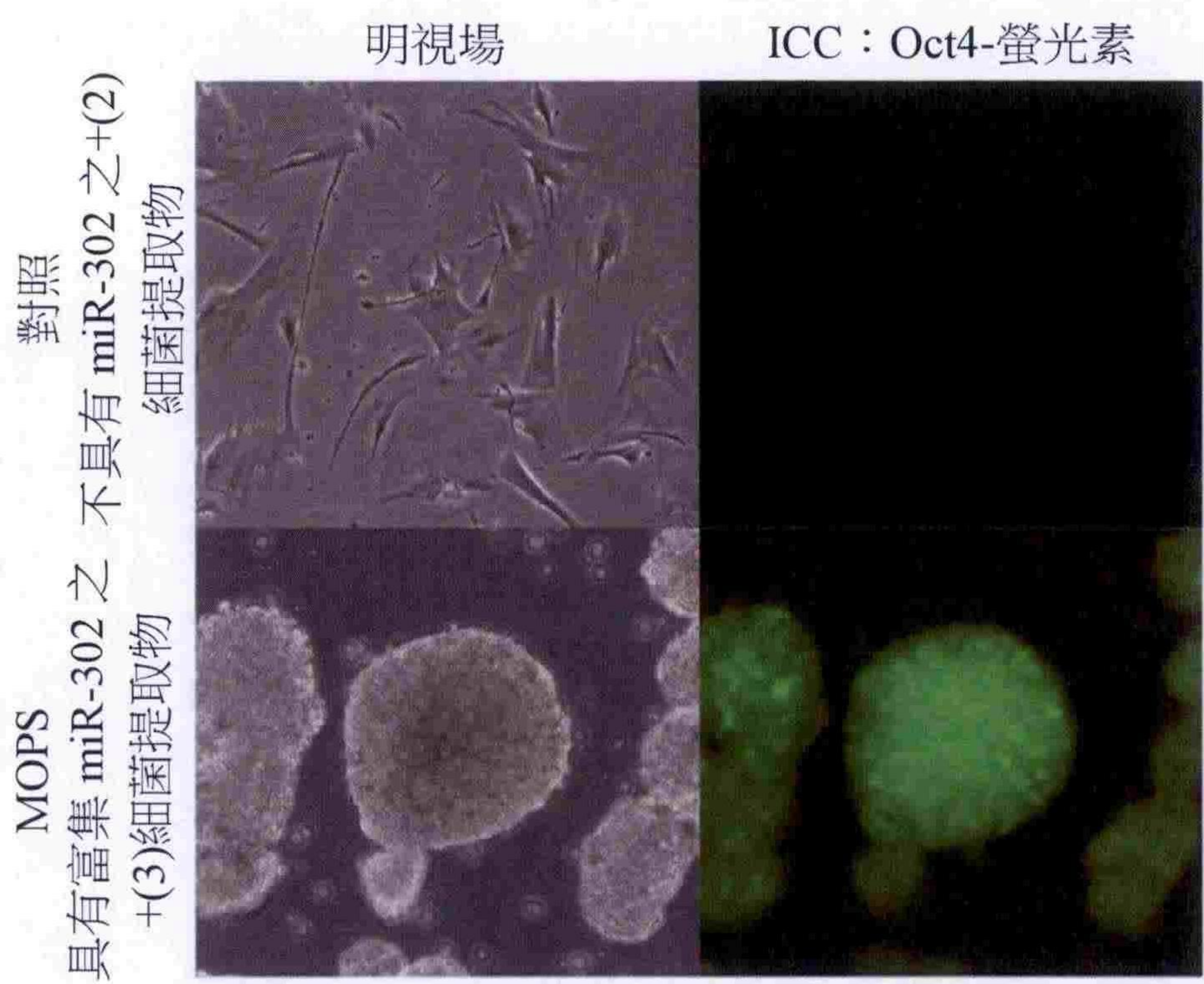


圖 7

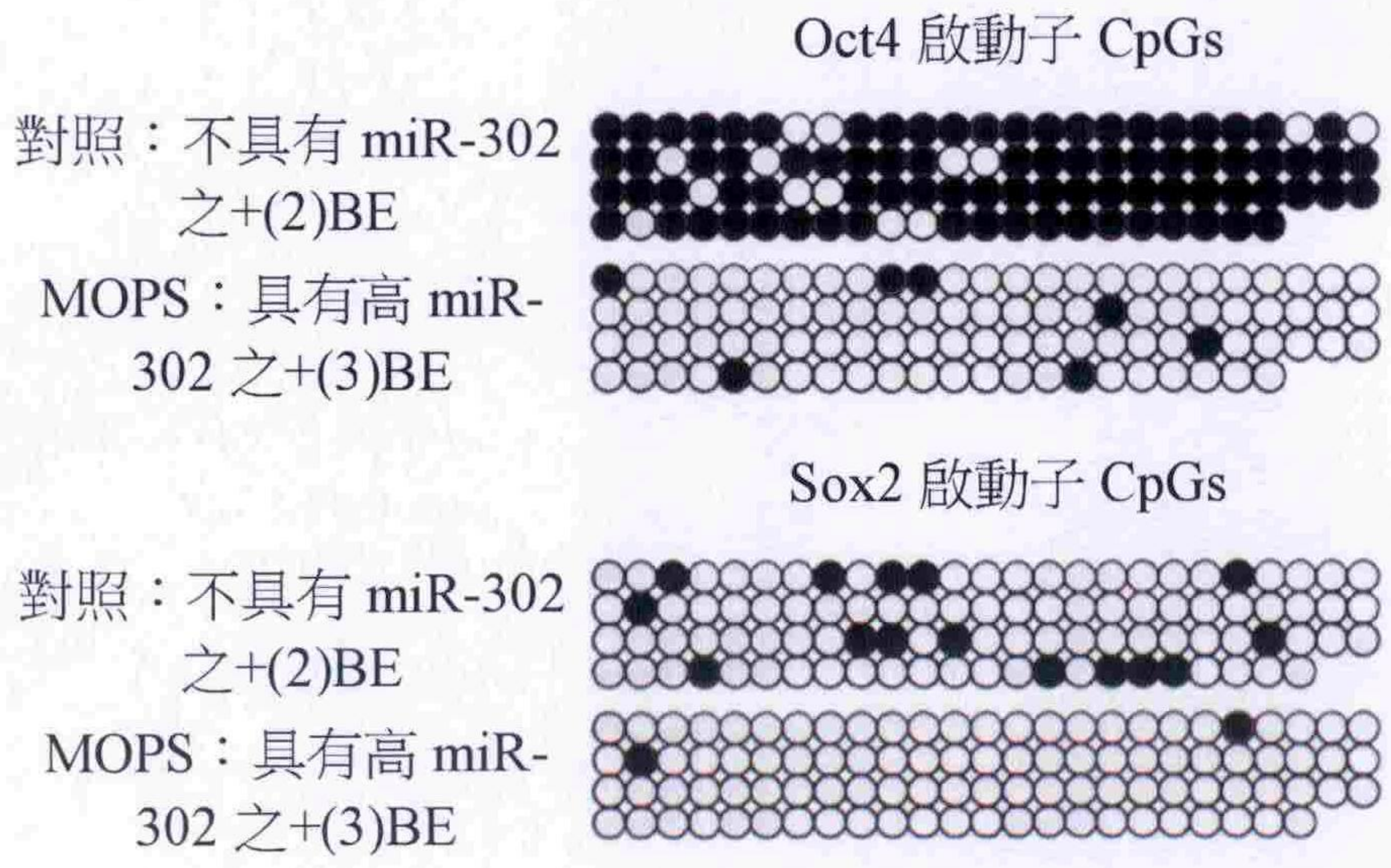


圖 8

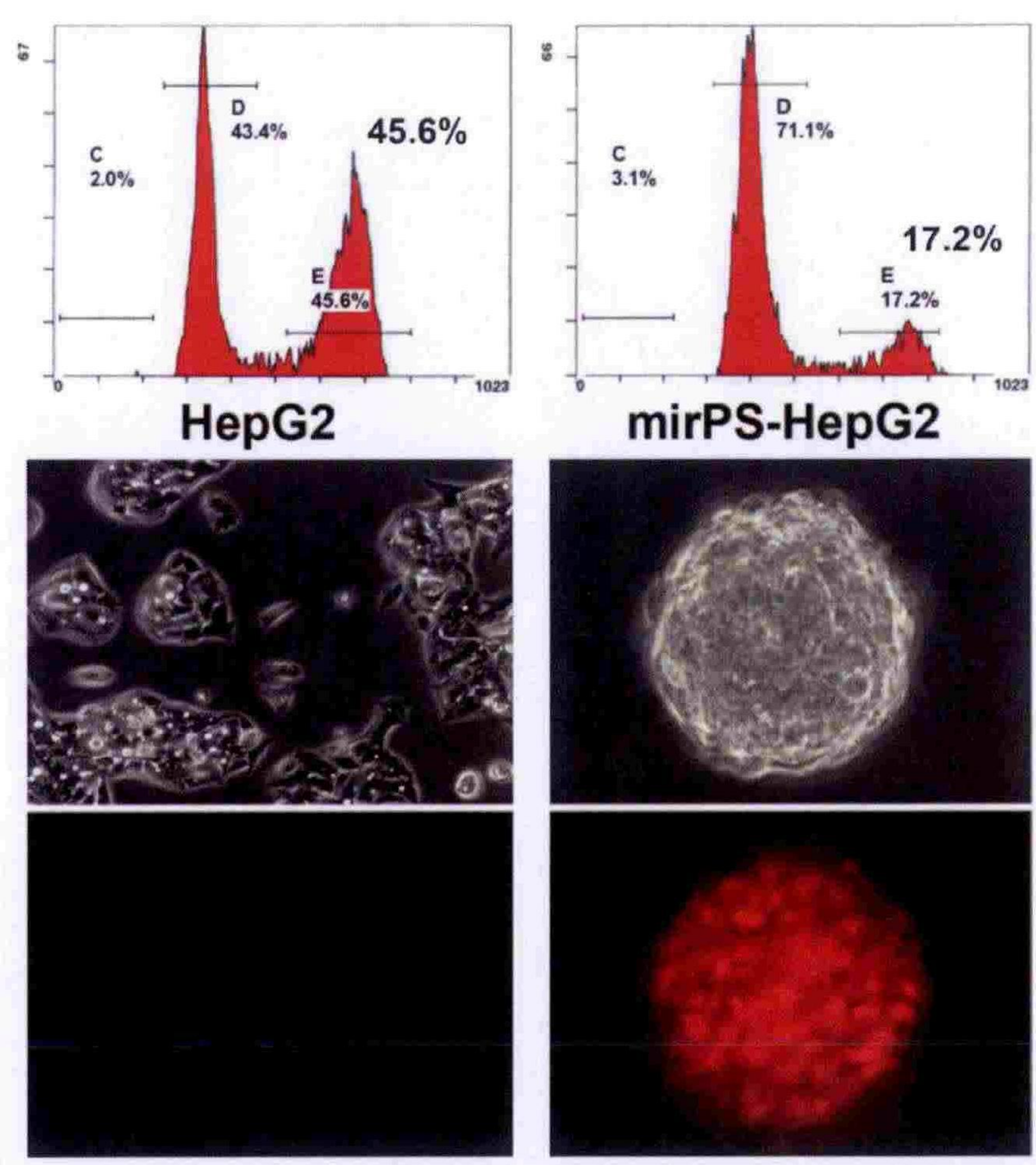


圖 9

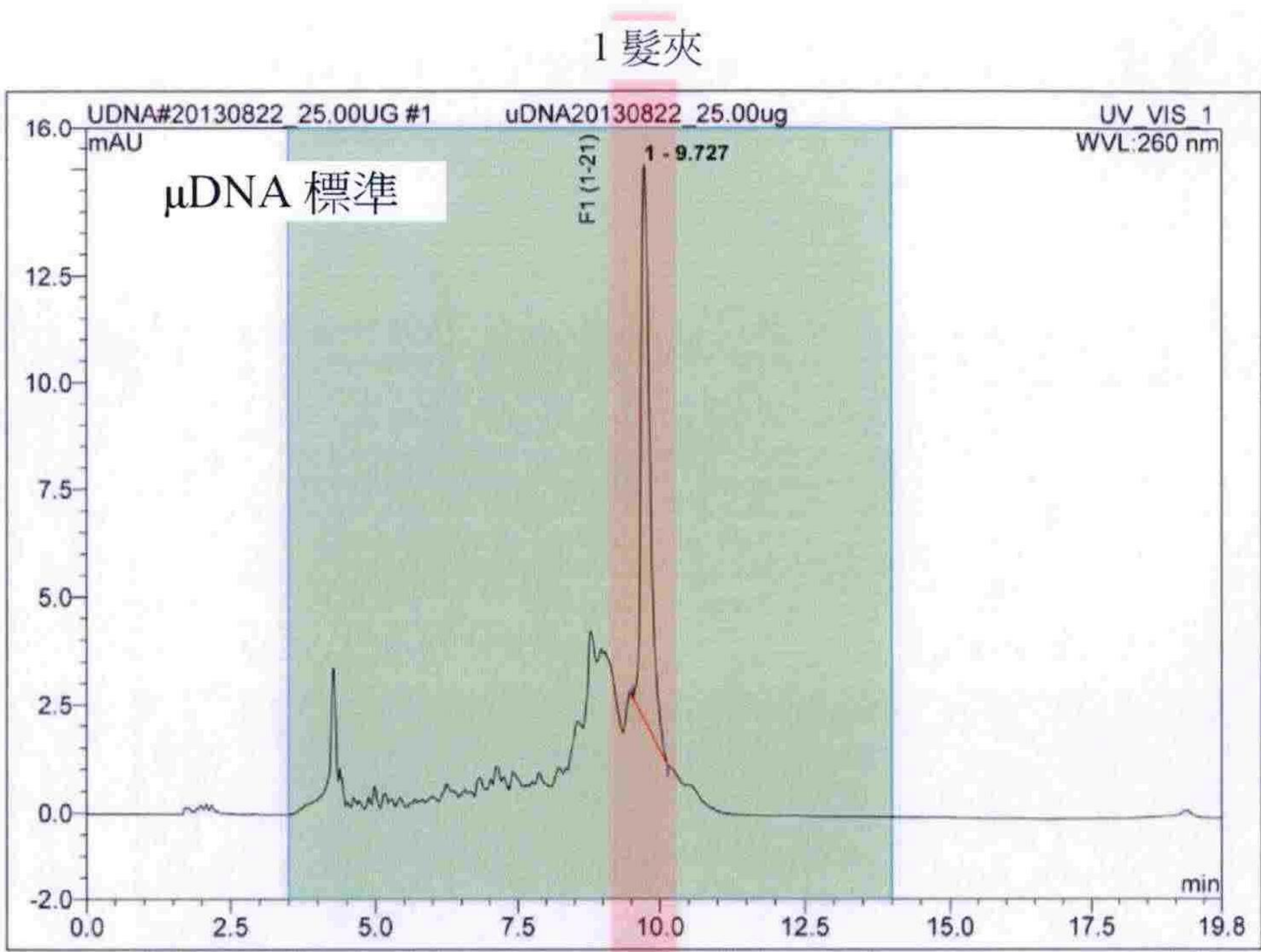


圖 10A

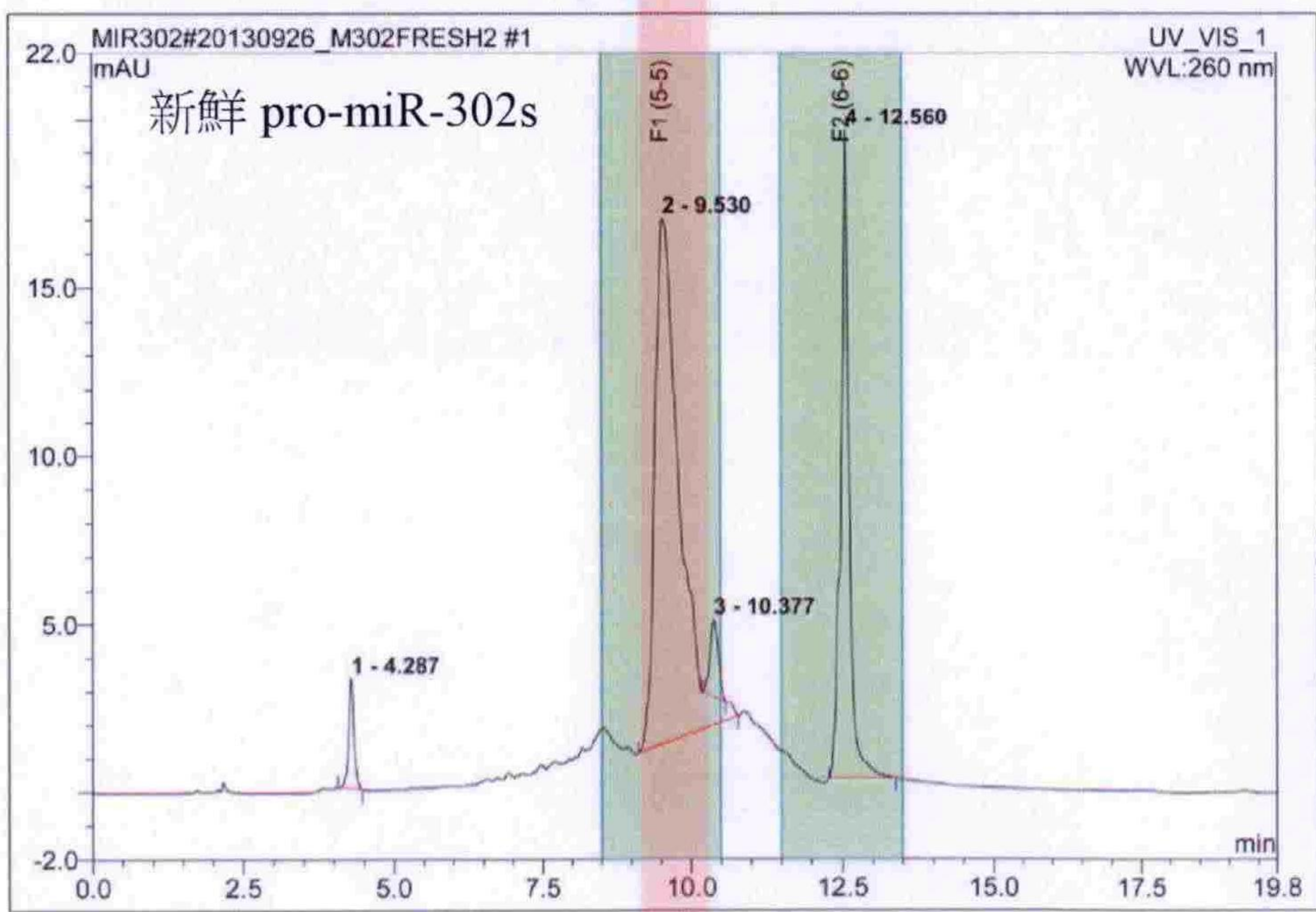


圖 10B

自空白大腸桿菌勝任細胞提取之小 RNA(對照)

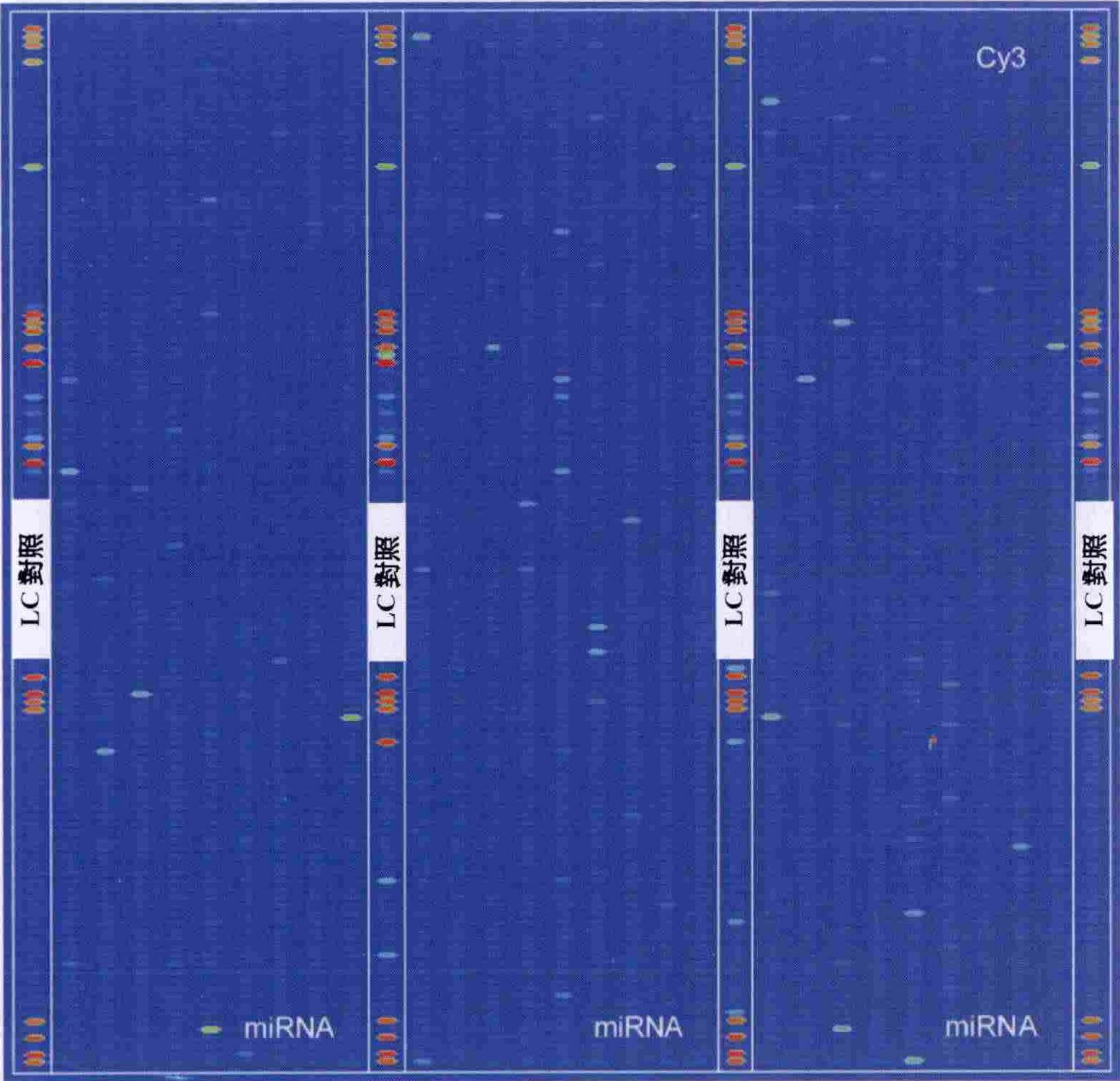


圖 11A

自 RGFP-miR302 轉形大腸桿菌細胞提取之小 RNA

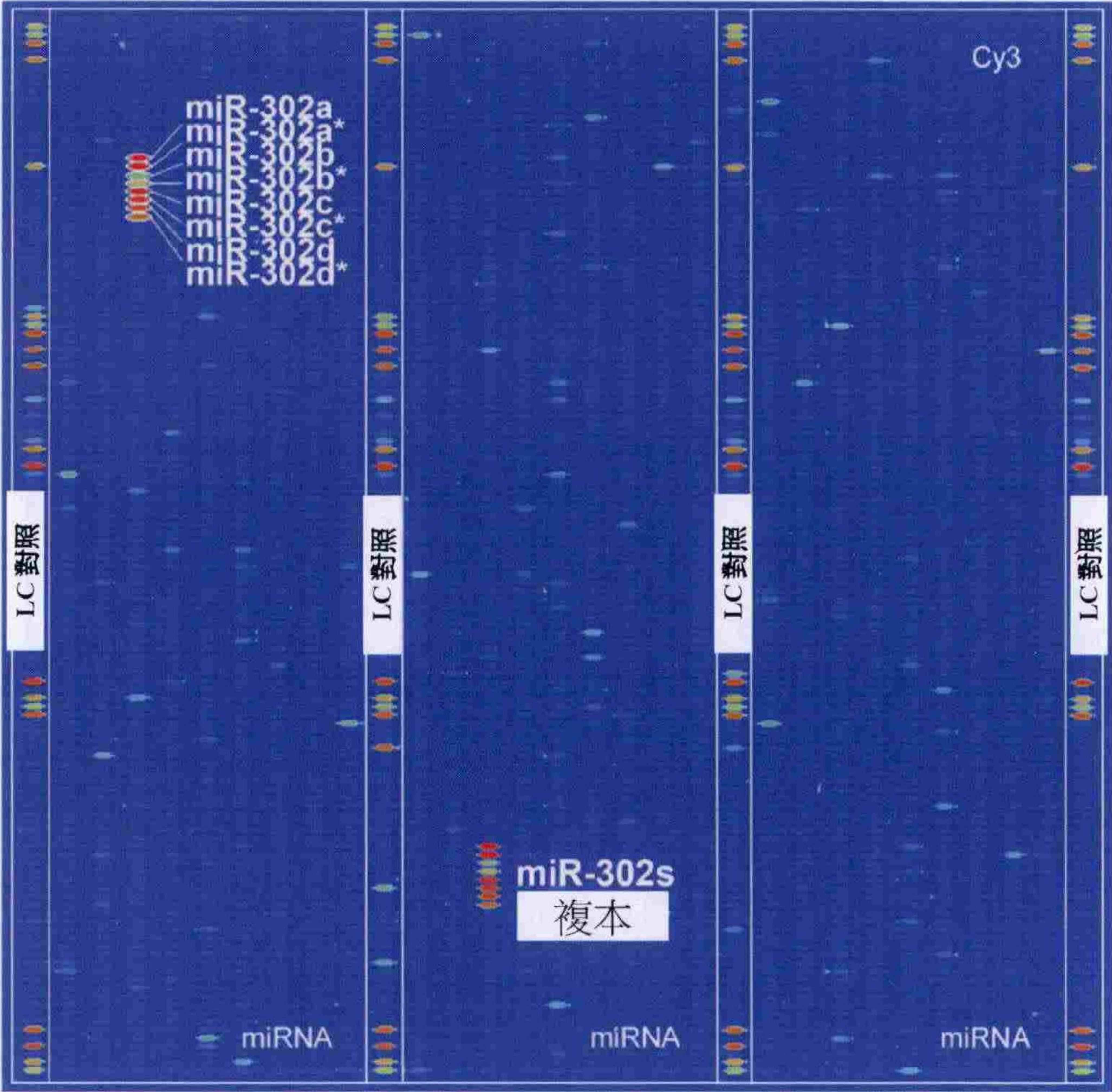


圖 11B

圖 11A 圖 11B

			第 1 組	第 2 組	
			#1	#2	
Rpter 索引	報導子名稱	p 值	平均值	平均值	Log2 (G2/G1)
445	hsa-miR-302c-5p	1.28E-03	0	52,804	22.65
443	hsa-miR-302a-5p	1.38E-03	0	26,579	21.85
441	hsa-miR-302a-3p	1.52E-03	0	66,718	22.92
444	hsa-miR-302c-3p	3.51E-03	0	15,973	20.71
447	hsa-miR-302d-5p	2.23E-02	3	22,124	12.87
313	hsa-miR-302b-5p	3.09E-02	1	940	3.75
442	hsa-miR-302d-3p	4.86E-02	0	9,579	18.53
591	hsa-miR-320b-3p	4.88E-02	6	1,963	2.23
131	hsa-miR-1275	8.78E-02	749	364	-1.22
以下轉錄物歸因於低信號(信號<500)而在統計學上不顯著					
554	hsa-miR-3177-3p	2.06E-02	402	76	-2.40
986	hsa-miR-4459	3.59E-02	66	135	1.04
967	hsa-miR-4442	4.52E-02	32	65	1.02
1298	hsa-miR-4758-5p	4.83E-02	7	74	3.45
993	hsa-miR-4466	5.70E-02	58	137	1.23
1120	hsa-miR-4649-5p	5.76E-02	187	385	1.04
1500	hsa-miR-5195-3p	5.81E-02	49	316	2.68
851	hsa-miR-4253	5.86E-02	296	136	-1.12
299	hsa-miR-146a-5p	5.93E-02	7	62	3.21
1156	hsa-miR-4668-5p	7.08E-02	315	70	-2.17
974	hsa-miR-4447	7.41E-02	13	89	2.76
1251	hsa-miR-4728-3p	7.96E-02	42	16	-1.42
750	hsa-miR-146a-3p	8.97E-02	23	88	1.92
870	hsa-miR-4270	9.39E-02	29	113	1.95
1123	hsa-miR-4651	9.46E-02	25	116	2.19

圖 12

miR-302 家族簇(SEQ.ID.NO.13)之序列

1	AAATTTTTTC TTCTAAAGTT ATGCCATTTT GTTTTCTTTC TCCTCAGCTC TAAATACTCT	以下各者 之序列
61	GAAGTCCAAA GAAGTTGTAT GTTGGGTGGG <u>CTCCCTTCAA CTTTAACATG GAAGTGCTTT</u>	pro-miR-302b
121	<u>CTGTGACTTT AAAAGTAAGT GCTTCCATGT TTTAGTAGGA GTGAATCCAA TTTACTTCTC</u>	
181	CAAAATAGAA CACGCTAACC TCATTGAAG GGATCC <u>CCTT TGCTTTAACA TGGGGGTACC</u>	pro-miR-302c
241	<u>TGCTGTGTGA AACAAAAGTA AGTGCTTCCA TGTTTCAGTG GAGGTGTCTC CAAGCCAGCA</u>	
301	CACCTTTTGT TACAAAATTT TTTTGTATT GTGTTTAAAG GTTACTAAGC TTGTTACAGG	
361	TTAAAGGATT CTAACTTTTT CCAAGACTGG GCTCCC <u>CACC ACTTAAACGT GGATGTACTT</u>	pro-miR-302a
421	<u>GCTTTGAAAC TAAAGAAGTA AGTGCTTCCA TGTTTTGGTG ATGGTAAGTC TTCTTTTAC</u>	
481	ATTTTATTA TTTTTTAGA AAATAACTTT ATTGTATTGA CCGCAGCTCA TATATTAAAG	
541	CTTTATTTTG TATTTTTACA TCTGTAAAGG GGCCCC <u>CTCT ACTTTAACAT GGAGGCACTT</u>	pro-miR-302d
601	<u>GCTGTGACAT GACAAAAATA AGTGCTTCCA TGTITGAGTG TGGTGGTTCC TACCTAATCA</u>	
661	GCAATTGAGT TAACGCCCCAC ACTGTGTGCA GTTCTTGGCT ACAGGCCATT ACTGTTGCTA	

圖 13A

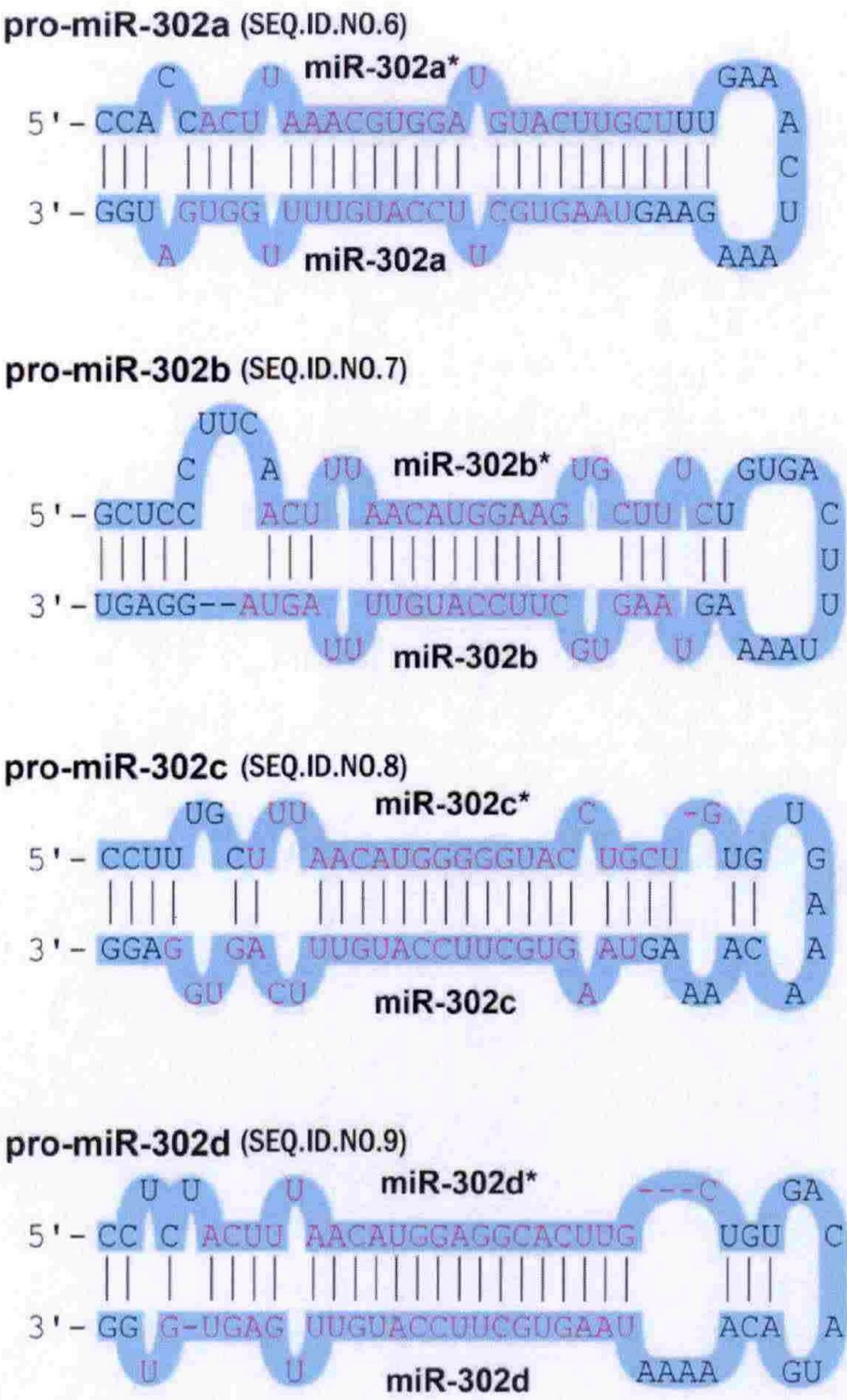
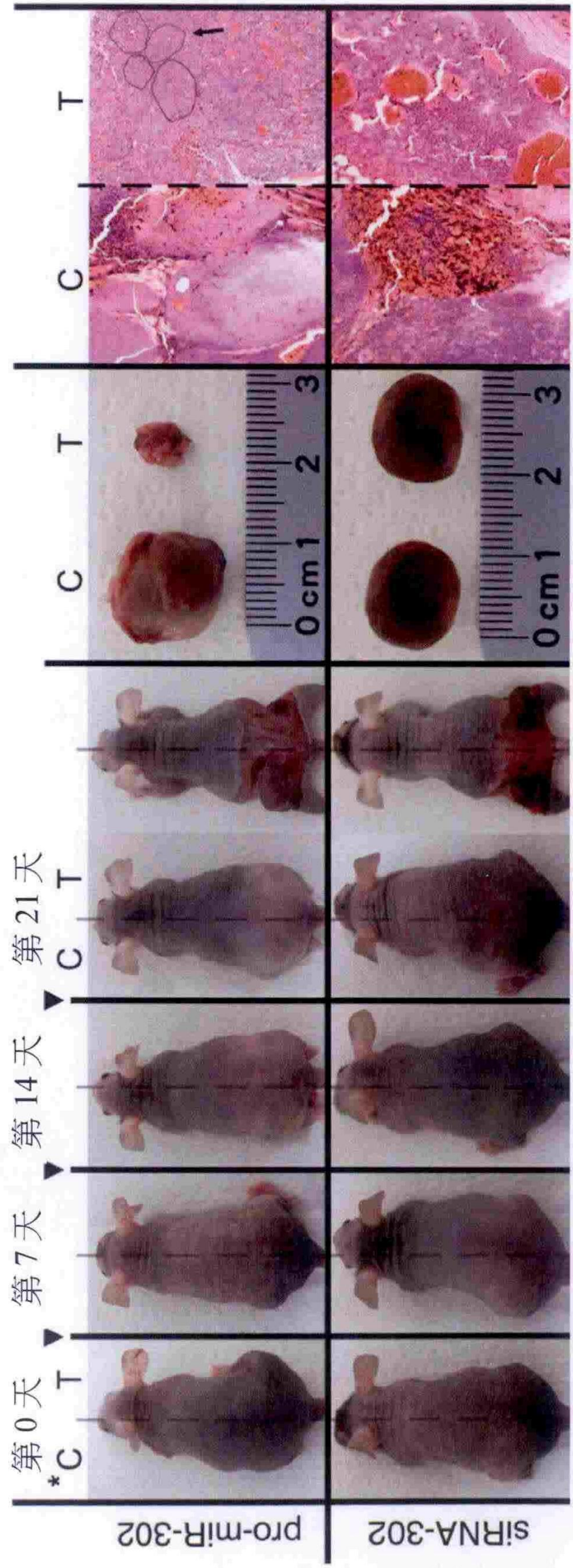


圖 13B



*C=未經處理之癌症；T=經藥物處理之癌症

圖 14

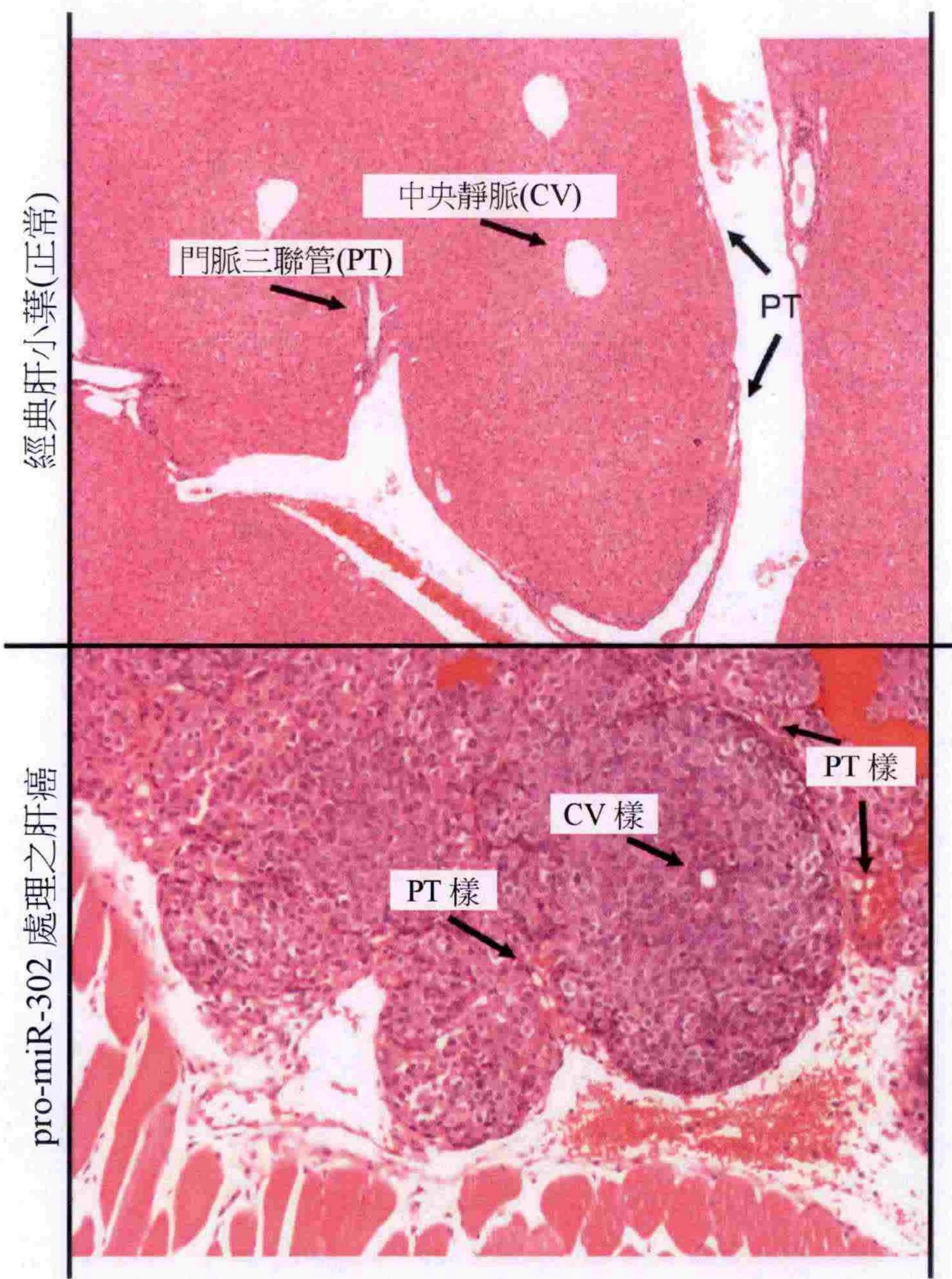


圖 15

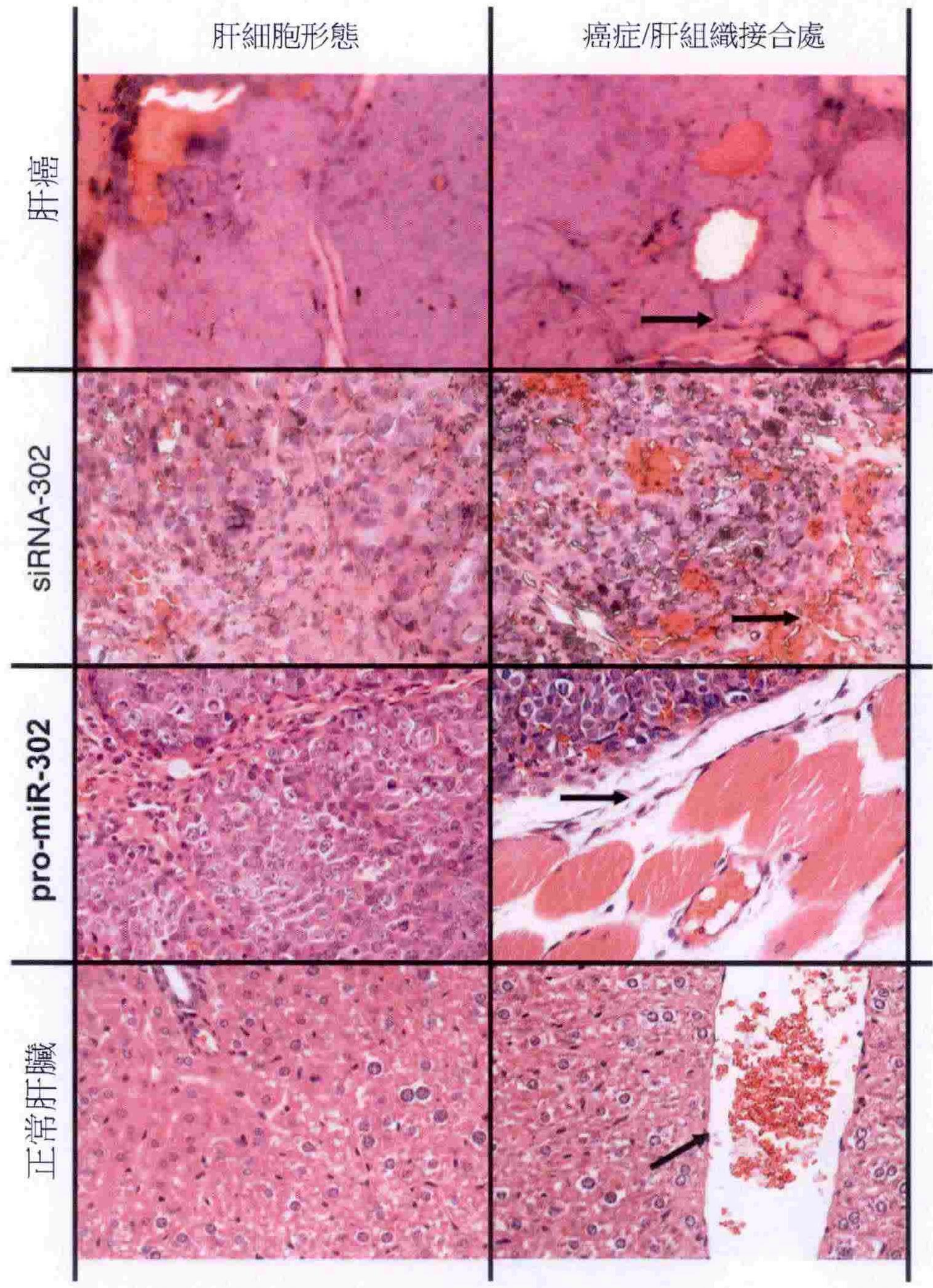


圖 16

對照切片之實例展示在下面有大面積疤痕組織(190-CR3)

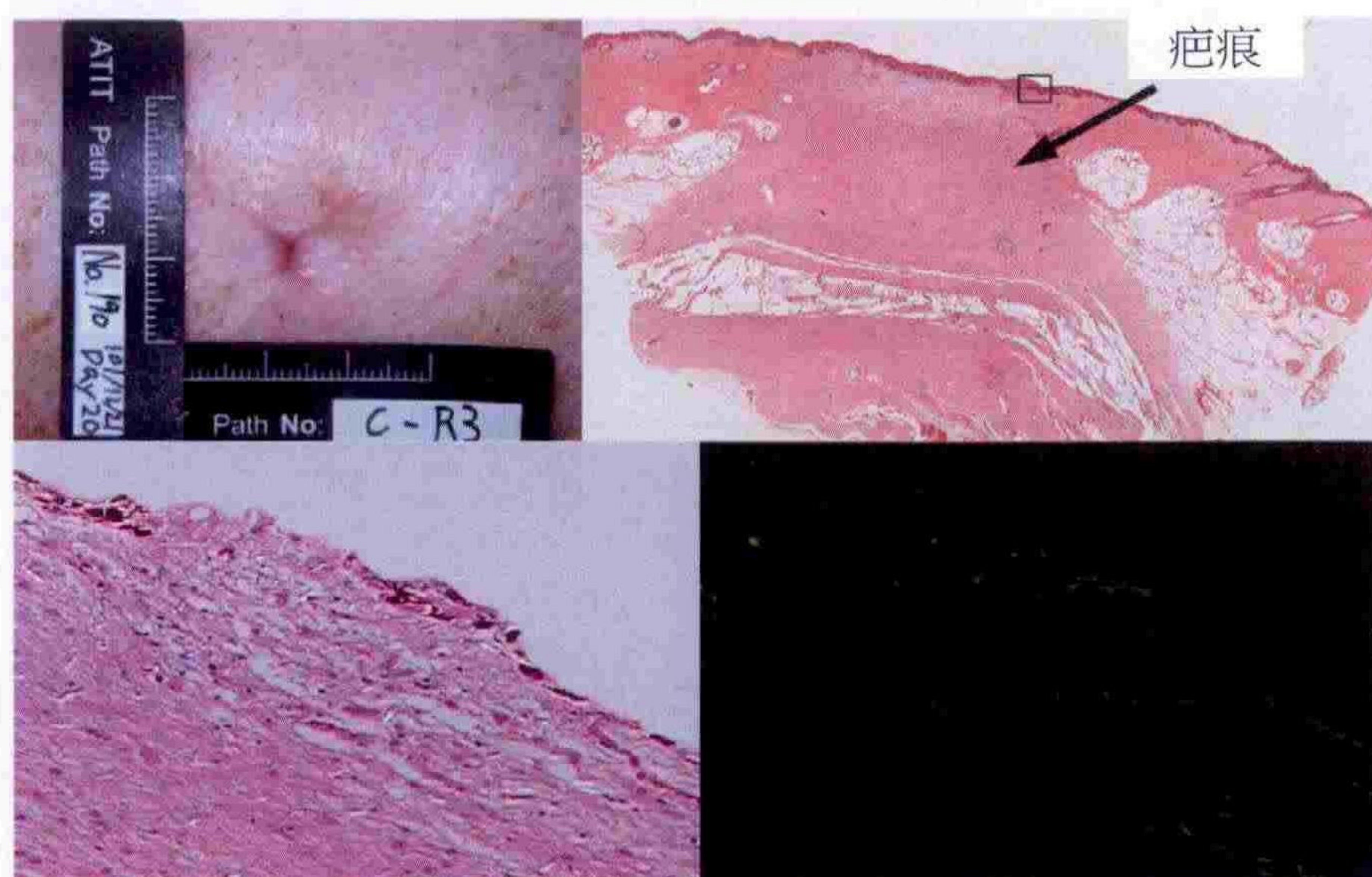


圖 17A

經處理切片之實例展示在下面無疤痕組織(190-BR2)

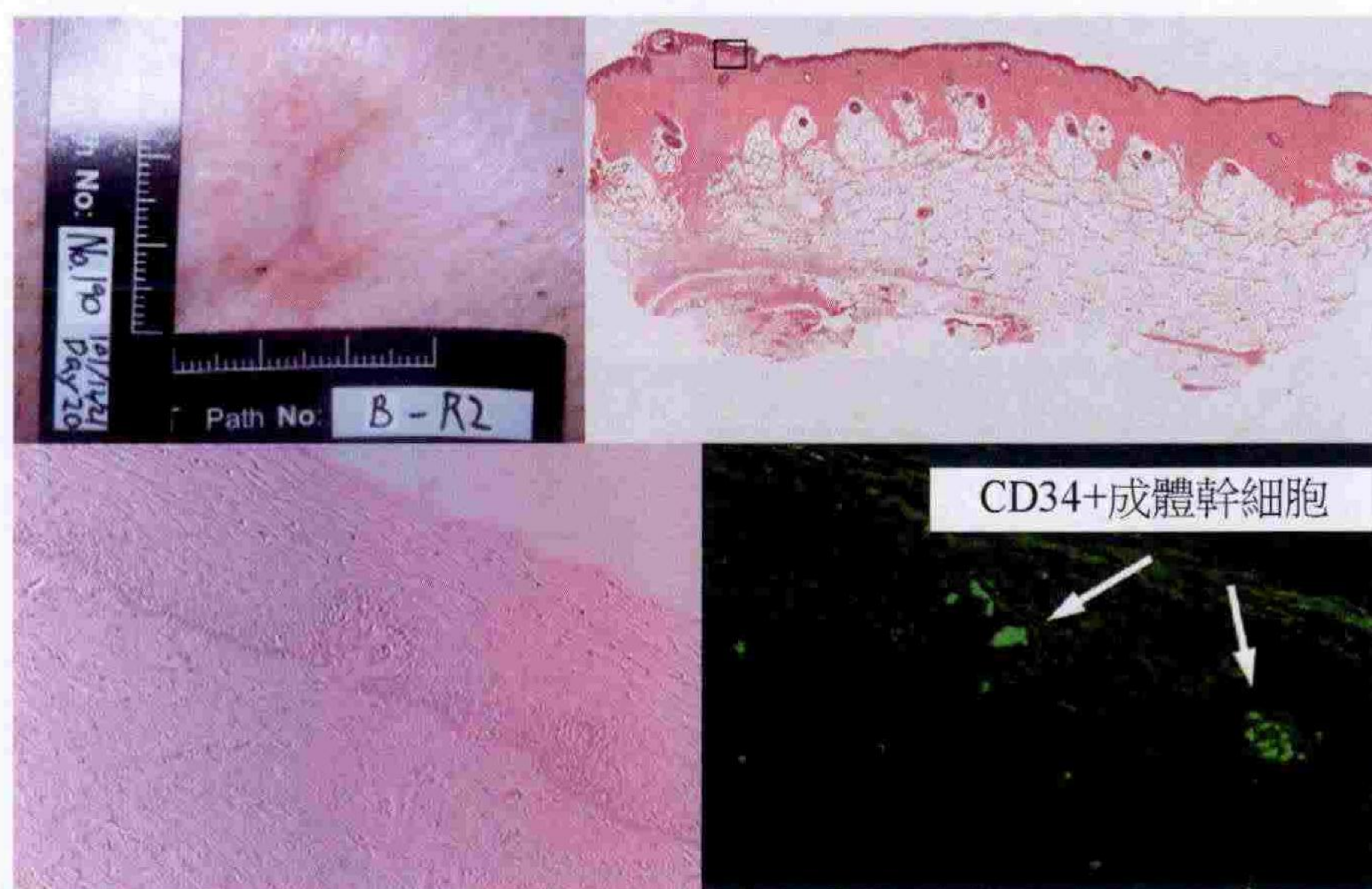


圖 17B