



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201619387 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：104128760 (22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 09 月 01 日

(51) Int. Cl. : *C12N15/86 (2006.01)* *C07K14/47 (2006.01)*  
*A61P35/00 (2006.01)* *A61P43/00 (2006.01)*  
*G01N33/15 (2006.01)* *C40B30/06 (2006.01)*

(30) 優先權：2014/09/01 美國 62/044,411

(71) 申請人：中央研究院(中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)  
 臺北市南港區研究院路二段 128 號

(72) 發明人：沈哲鯤 SHEN, CHE-KUN (TW)；徐于喬 SHYU, YU-CHIAU (TW)

(74) 代理人：何美瑩

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：62 項 圖式數：10 共 163 頁

## (54) 名稱

延長壽命與抑制腫瘤發生的動物模型

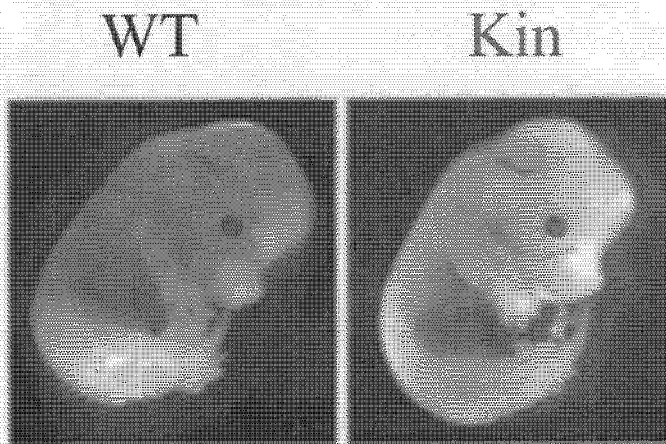
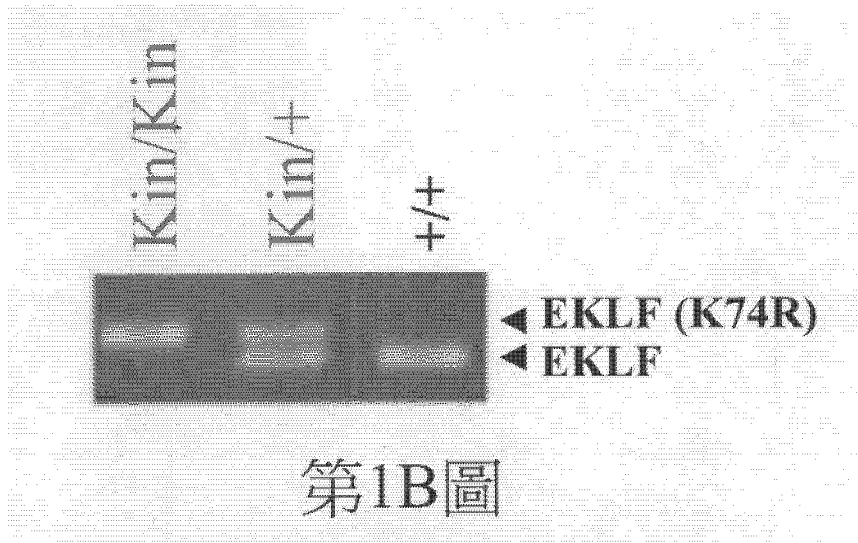
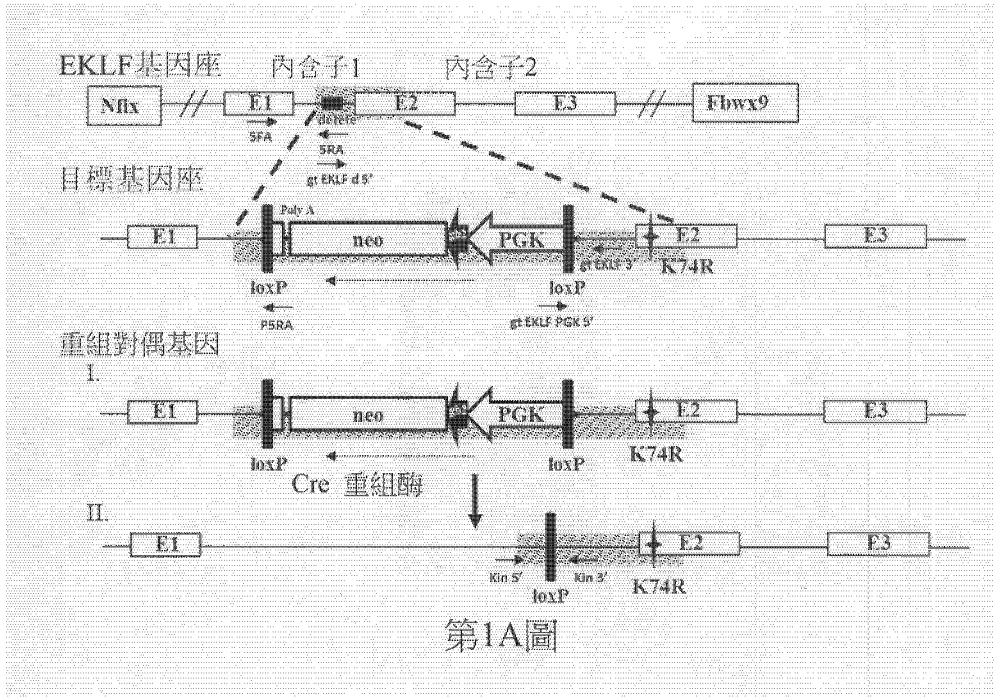
ANIMAL MODEL OF LONGEVITY AND INHIBITING TUMORIGENESIS

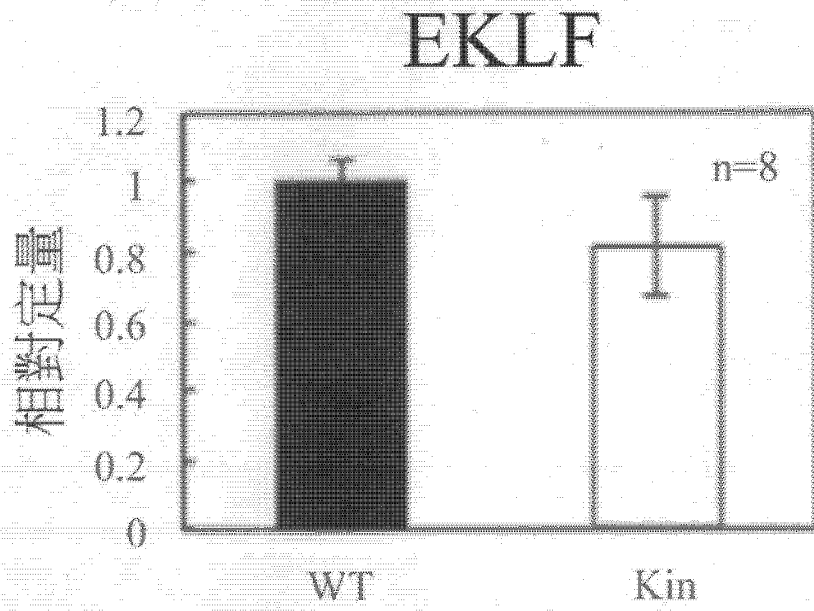
## (57) 摘要

本發明包含一種長壽且增加健康年限之經遺傳修飾的非人類動物模型，其與降低腫瘤發生率和腫瘤轉移率相關，本發明也包含可增加壽命和健康年限、降低腫瘤發生和腫瘤轉移的方法，同時也提供能鑑別增加壽命或健康年限或降低腫瘤發生或腫瘤轉移之活性藥劑的方法。

The present invention includes a genetically-modified non-human animal model of longevity and increased health span, which is associated with reduced tumorigenesis and tumor metastasis, as well as related methods for increasing longevity and health span, reducing tumorigenesis and tumor metastasis, and identifying active agents that confer increased longevity or health span, or reduced tumorigenesis or tumor metastasis.

指定代表圖：





第1D圖

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】延長壽命與抑制腫瘤發生的動物模型

【英文發明名稱】ANIMAL MODEL OF LONGEVITY AND INHIBITING TUMORIGENESIS

【技術領域】

【0001】 本揭示內容包含三部分，一為增加壽命和健康年限及抑制腫瘤形成和轉移的方法、一為建立非人類動物模型其具有長壽和抑制腫瘤形成之表現型之非人類動物模型，一為鑑別可用於以下用途之活性藥劑的方法：增加壽命或健康年限，或是抑制腫瘤形成、轉移。

【先前技術】

【0002】 長壽基因具有延長壽命的潛力及加強生活品質的可能性，其重要性使之成為當前研究的主流。然而，目前僅確認了極少數的長壽基因，且對於這些基因如何預防老化和延長壽命的機制所知仍不甚清楚。此外，目前也在迫切尋找可降低細胞增殖性疾病風險的基因，及與老化相關的基因。

【0003】 因此，本領域亟需找出其功能與延長生命和/或減少細胞增殖性疾病相關的基因。這些基因和其產物可用來篩選抗老化和/或抗癌劑，亦可作為多種抗老化和抗癌療法的關鍵標的。此外，可基於對這些基因的瞭解來開發疾病動物模型，並進一步利用這些動物模型來探討疾病致病機轉以及驗證治療藥劑療效。最終，這些工具和治療藥劑將有助於減緩老年族群的認知或運動缺損，並能夠降低老年族群或一般族群中癌症的發生率或轉移率，進而提升老年人的自理能力並促進健康。

**【發明內容】**

**【0004】** 本發明的第一觀點提供了一種非人類轉殖基因動物，其包含一或多個修飾的紅血球 Kruppel 樣因子(modified Erythroid Kruppel-like factor, EKLF)的對偶基因，其和野生型 EKLF 多肽相比可編碼產生出包含一或多個胺基酸修飾(amino acid modification)之 EKLF 多肽。具體化來說，野生型 EKLF 多肽是來自於和所述非人類轉殖基因動物同一屬或同一種的動物。在特定實施方式中，所述非人類轉殖基因動物是基因敲入(knock-in)動物，且動物體內的一或多個內源性 EKLF 對偶基因(gene allele)被一或多個修飾的 EKLF 基因所取代。在特定的實施方式中，所述一或多個修飾的 EKLF 基因的表現受到內源性 EKLF 啟動子之調控。在一實施方式中，所述非人類轉殖基因動物是基因敲入動物，其 EKLF 基因的兩個位點(allele)相較於野生型皆經過修飾或改變，故其可編碼產生此處所述的修飾 EKLF 多肽，例如，一修飾的 EKLF 多肽，特徵是其類小泛素化位置經過突變後不會進行類小泛素化作用。在特定實施方式中，所述動物是一齧齒動物動物，譬如，小鼠或大鼠。

**【0005】** 在本發明第一觀點的特定實施方式中，所述一或多個胺基酸修飾係指在野生型 EKLF 多肽中其類小泛素化或磷酸化之作用胺基酸位置進行修飾。在一實施方式中，所述一或多個胺基酸修飾係指在野生型小鼠之 EKLF 全長多肽中第 74 位置的胺基酸進行修飾。在除了小鼠以外之其他動物的實施方式中，所述一或多個胺基酸修飾係指在小鼠 EKLF 多肽中受到類小泛素化作用之胺基酸殘基上所進行的修飾，此殘基位置在不同物種間有可能座落在不同位點。舉例來說，人類 EKLF 多肽中與小鼠 EKLF 多肽第 74 位(即，類小泛素化位置)相

對應的胺基酸殘基位置是在第 54 位。在特定實施方式中，此一胺基酸殘基是離胺酸(Lys)。在特定實施方式中，針對對應於第 74 位胺基酸所做的修飾或修飾是以精胺酸(Arg)取代離胺酸(Lys)(即，K74R)。在特定實施方式中，所述一或多個胺基酸修飾係指針對對應於野生型小鼠 EKLF 多肽第 68 位之胺基酸所做的修飾。在除了小鼠以外之其他動物的實施方式中，所述一或多個胺基酸修飾係指在小鼠 EKLF 多肽中受到磷酸化作用之胺基酸殘基上所進行的修飾，此殘基位置在不同物種間有可能座落在不同位點。

**【0006】** 在本發明第一、二、三或四觀點之特定實施方式中，該修飾的 EKLF 多肽其類小泛素化或磷酸化程度係低於野生型 EKLF 多肽。在特定實施方式中，所述修飾的 EKLF 多肽的細胞質至細胞核移位作用(translocation)也低於野生型 EKLF 多肽的移位作用，和/或其轉錄活化子活性(transactivator activity)或抑制子活性(repressor activity)也與野生型 EKLF 多肽不同。在相關的實施方式中，與野生型動物相比，非人類轉殖基因動物中其修飾的 EKLF 多肽之表現與增加壽命或健康年限相關；非人類轉殖基因動物中其修飾的 EKLF 多肽表現與減少腫瘤發生、生長或腫瘤轉移相關。

**【0007】** 在第二觀點中，本發明包含一基因敲入載體，其包含一可編碼出全長或部分修飾的 EKLF 多肽的多核苷酸序列，相較於野生型 EKLF 多肽，所述修飾的 EKLF 多肽包含一或多個胺基酸修飾。

**【0008】** 在本發明第三觀點中，本發明包含的細胞、組織或器官源自此處所述非人類轉殖基因動物。

【0009】 在本發明第四觀點中，本發明提供一種方法，其能治療或預防一有需要個體之細胞增殖性疾病，或抑制或減少所述個體腫瘤發生或轉移的機率；所述方法包含對該個體施用一有效量的多肽或編碼產生所述多肽的核酸，其中所述多肽是一修飾的 EKLF 多肽，其包含一或多個胺基酸修飾，而使得修飾的 EKLF 多肽的類小泛素化程度低於一野生型 EKLF 多肽；和/或第一活性藥劑，其能改變內源性或野生型 EKLF 多肽的一或多種活性。在特定的實施方式中，所述修飾的 EKLF 多肽是修飾的人類 EKLF 多肽；且在特定實施方式中，所述第一活性藥劑可改變一野生型人類 EKLF 多肽的一或多種活性。在部分實施方式中，所述細胞增殖性疾病是腫瘤或轉移性腫瘤；譬如，但不限於：肝癌、大腸癌、乳癌、前列腺癌、肝細胞癌、黑色素瘤、肺癌、神經膠母細胞瘤、腦瘤、造血系統惡性腫瘤、膽道癌、視網膜母細胞瘤、腎細胞癌、頭頸癌、子宮頸癌、胰臟癌、食道癌或鱗狀細胞癌。

【0010】 在第四觀點的特定實施方式中，當施用所述多肽或核酸時，修飾的 EKLF 多肽自細胞質至細胞核的移位作用(translocation)小於野生型 EKLF 多肽的移位作用。在特定實施方式中，修飾的 EKLF 多肽之轉錄活化子活性或抑制子活性與野生型 EKLF 多肽不同。在一實施方式中，所述核酸是一表現載體。在一實施方式中，所述表現載體是一病毒載體。在特定實施方式中，所述病毒載體是來自於疱疹病毒、反轉錄病毒、牛痘病毒、減毒牛痘病毒、金絲雀痘病毒、腺病毒或腺相關病毒。

【0011】 在本發明第四觀點的特定實施方式中，所述一或多個修飾的胺基酸包含對應於野生型 EKLF 多肽(例如，野生型人類 EKLF 多肽)上類小泛素化

或磷酸化位置之一的胺基酸修飾。在特定的實施方式中，所述一或多個修飾的胺基酸包含一對應於全長野生型人類 EKLF 多肽上第 54 個胺基酸之修飾。在一實施方式中，對於第 54 個胺基酸進行修飾是指以譬如精胺酸來取代離胺酸 (K54R)。在特定實施方式中，所述一或多個修飾的胺基酸包含針對（如，人類 EKLF 多肽中）已被磷酸化之胺基酸進行修飾，例如，但不限於，針對對應於全長野生型小鼠 EKLF 多肽上第 68 位之磷酸化胺基酸殘基進行修飾。

**【0012】** 在本發明第四觀點的特定實施方式中，當施用第一活性藥劑時，其可降低內源性 EKLF 多肽從細胞質至細胞核的移位作用。在特定實施方式中，所述第一活性藥劑可修飾內源性 EKLF 多肽的轉錄活化子活性或抑制子活性。在部分實施方式中，所述第一活性藥劑可結合至內源性 EKLF 多肽。在可任選的實施方式中，所述第一活性藥劑是有機小分子或多肽，且所述多肽可以是抗體或其功能性片段。在特定實施方式中，第一活性藥劑與內源性 EKLF 多肽結合後，能抑制內源性 EKLF 多肽從細胞質至細胞核的移位作用。

**【0013】** 在第四觀點的特定實施方式中，當施用所述多肽或核酸、或者是施用第一活性藥劑時，所述方法還需要施用能夠抑制內源性 EKLF 多肽表現的第二活性藥劑。在特定實施方式中，第二活性藥劑是核酸分子，且可以是一負股 RNA、siRNA、shRNA 或 miRNA，所述核酸分子能結合至可編碼產生內源性 EKLF 多肽之 mRNA 或其互補序列。在一實施方式中，所述 EKLF cDNA 或 mRNA 序列是 GenBank 存取編號: BC033580.1 所示之人類序列。

**【0014】** 依據本發明第四觀點的特定實施方式，本發明更包含對該個體施用有效量的抗增殖劑，其中所述抗增殖劑適用於治療細胞增殖性疾病。在特定



實施方式中，所述抗增殖劑是一烷化劑、拓撲異構酶抑制劑、抗代謝物或細胞毒性抗生素。在特定實施方式中，所述烷化劑是順鉑(cisplatin)、卡鉑錠(carboplatin)、益樂鉑(oxaliplatin)、甲基二(氯乙基)胺(mechlorethamine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、氮芥苯丙胺酸(melphalan)、氮芥苯丁酸(chlorambucil)、依弗醯胺(ifosfamide)、二甲磺酸丁酯(busulfan)、N-亞硝-正-甲脲(N-nitroso-N-methylurea, MNU)、雙氯乙基亞硝脲(carmustine)、環己亞硝(lomustine)、司莫司汀(semustine)、福莫司汀(fotemustine)、鏈佐黴素(streptozotocin)、達卡巴仁(dacarbazine)、米托唑胺(mitozolomide)、替莫唑胺(temozolomide)、沙奧特帕(thiotepa)、絲裂霉素(mytomycin)或地亞農(diaziquone)。在特定實施方式中，拓撲異構酶抑制劑是喜樹鹼(camptothecin)、依瑞諾丁(irinotecan)、托普迪肯(topotecan)、依妥普賽(etoposide)、艾黴素(doxorubicin)、坦尼坡賽(teniposide)、諾波黴素(novobiocin)、美巴龍(merbarone)或阿柔比星(aclarubicin)。在特定實施方式中，所述抗代謝物是氟嘧啶(fluroropymidine)、去氧核酸類似物(deoxynucleoside analogue)、硫嘌呤(thiopurine)、甲氨蝶呤(methotrexate)或培美曲塞(pemetrexed)。在特定實施方式中，細胞毒性抗生素是放線菌素(actinomycin)、博萊黴素(bleomycin)、普卡黴素(plicamycin)、絲裂黴素(mitomycin)、艾黴素(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、表阿黴素(epirubicin)、伊達比星(idarubicin)、泛艾黴素(piraubicin)、阿柔比星(alcarubicin)或米托蒽醌(mitoxantrone)。

**【0015】** 在本發明第五個觀點中，本發明包含一種可延長一個體之壽命或健康年限的方法，包含對所述個體施用有效劑量之以下成分：一種多肽或一

種可編碼產生該多肽之核酸，其中所述多肽是修飾的 EKLF 多肽，其包含一或多個修飾的胺基酸，使得此一修飾的 EKLF 多肽的類小泛素化程度低於野生型 EKLF 多肽；和/或第一活性藥劑，其可改變內源性 EKLF 多肽的一或多種活性。在某些實施方式中，此一修飾的 EKLF 多肽是修飾的人類 EKLF 多肽，且在特定實施方式中，第一活性藥劑可改變野生型人類 EKLF 多肽的一或多種活性。

【0016】 在本發明第五個觀點的特定實施方式中，當施用所述多肽或所述核酸時，修飾的 EKLF 多肽的細胞質至細胞核移位作用(translocation)低於野生型 EKLF 多肽的移位作用。在特定的實施方式中，修飾的 EKLF 多肽其具有修飾之轉錄活化子活性或修飾抑制子活性與野生型 EKLF 多肽的轉錄活化子活性或抑制子活性不同。依據一實施方式，該核酸是一表現載體。在一實施方式中，所述表現載體是一病毒載體。在一特定實施方式中，所述病毒載體是來自於疱疹病毒、反轉錄病毒、牛痘病毒、減毒牛痘病毒、金絲雀痘病毒、腺病毒或腺相關病毒。

【0017】 在本發明第五個觀點的特定實施方式中，一或多個的胺基酸修飾包含野生型 EKLF 多肽上類小泛素化或磷酸化位置上經修飾的胺基酸。舉例而言，所述野生型 EKLF 多肽可以是野生型人類 EKLF 多肽。在特定的實施方式中，所述一或多個的胺基酸修飾包含一對應於全長野生型人類 EKLF 多肽第 54 個胺基酸之修飾的胺基酸。在一實施方式中，所述對應於第 54 個胺基酸之修飾的胺基酸是指在原來離胺酸的位置進行取代置換，例如，以精胺酸置換離胺酸(K54R)。在特定實施方式中，所述一或多個的胺基酸修飾包含一磷酸化胺基酸，

譬如，人類 EKLF 多肽上修飾的磷酸化胺基酸，所述人類 EKLF 多肽上的胺基酸相當於全長野生型小鼠 EKLF 多肽上第 68 個胺基酸位置的磷酸化胺基酸。

【0018】 在本發明第五觀點的特定實施方式中，當施用第一活性藥劑時，其可降低或抑制內源性 EKLF 多肽從細胞質至細胞核的移位作用。在特定實施方式中，所述第一活性藥劑修飾內源性 EKLF 多肽其轉錄活化子活性或抑制子活性。在某些實施方式中，所述第一活性藥劑可與所述內源性 EKLF 多肽結合。在可任選的實施方式中，所述第一活性藥劑是一有機小分子或一多肽。在一非必要的實施方式中，所述多肽可以是抗體或功能性片段。在特定實施方式中，第一活性藥劑與內源性 EKLF 多肽結合後可抑制內源性 EKLF 多肽從細胞質至細胞核的移位作用。

【0019】 在第五觀點的特定實施方式中，當施用所述多肽或核酸、或者是施用所述第一活性藥劑時，所述方法還需要施用能夠抑制內源性 EKLF 多肽表現的第二活性藥劑。在特定實施方式中，第二活性藥劑是核酸分子，且可以是一負股 RNA、siRNA、shRNA 或 miRNA，所述核酸分子能與可編碼產生內源性 EKLF 多肽的 mRNA 或其互補序列結合。

【0020】 在本發明第五觀點的特定實施方式中，所述方法能達到減少個體頭髮花白、提升其運動協調能力或肌力、減輕肌肉無力、降低骨質疏鬆症、增加骨體積、提升骨密度、增加索前軟骨數量、縮減索前軟骨間隙或減少平衡力之喪失之效果。

【0021】在第四或第五觀點的特定實施方式中，所述個體可以是哺乳動物，其可以是一人類。

【0022】在第六觀點中，本發明包含一種鑑別活性藥劑的方法，所述活性藥劑能延長個體壽命、提升生命年限或健康年限，和/或抑制或減少個體之腫瘤形成或腫瘤發生或轉移的機率。本方法包含：將 EKLf 多肽或能表現 EKLf 多肽的細胞中加入一候選藥劑；以及測量在 EKLf 多肽上的轉譯後修飾量，或測量 EKLf 多肽的活性量，其中若該轉譯後修飾量或活性量與一對照量不同，則該候選藥劑是可延長個體壽命或生命年限和/或抑制或減少個體之腫瘤形成或腫瘤轉移的活性藥劑。在特定實施方式中，所述 EKLf 多肽是野生型人類 EKLf 多肽、其變異物或片段。在特定實施方式中，本方法是測量轉譯後修飾量，且若偵測到的量低於對照量，則候選藥劑是活性藥劑。在某些實施方式中，測量轉譯後修飾的方式是測定類小泛素化或磷酸化的量。在特定實施方式中，類小泛素化發生在對應於人類 EKLf 多肽第 54 位之胺基酸殘基上。在特定實施方式中，所述活性量是測定 EKLf 多肽從細胞質至細胞核的移位作用，且若測量量低於對照量，則候選藥劑是活性藥劑。依據一特定實施方式，所述測量活性是轉錄活化子活性，若測量量改變（例如，低於對照量）則該候選藥劑是活性藥劑。在特定實施方式中，所述測量量是抑制子活性，若測量量改變（例如，高於對照量）則該候選藥劑是活性藥劑。在多種實施方式中，所述對照量是預設值或與 EKLf 多肽（譬如，野生型人類 EKLf 多肽或其片段）相關的量，或是未接觸該候選藥劑之細胞相關活化子或抑制子的量。在某些實施方式中，所述 EKLf 多肽是內源性 EKLf 多肽或外源性 EKLf 多肽。在某些實施方式中，

所述外源性 EKLF 多肽是野生型 EKLF 多肽。在特定實施方式中，所述細胞包含能表現 EKLF 多肽之外源性核酸。

【0023】 在第七個觀點中，本發明包含一種用以鑑別活性藥劑的方法，所述活性藥劑能增加個體的預期壽命、延長生命年限、提升健康年限、和/或抑制腫瘤形成或腫瘤發生；所述方法包含：對此處所述之非人類轉殖基因動物(例如，本發明第一觀點之非人類動物)施用一候選藥劑；以及，比較施用候選藥劑之非人類轉殖基因動物與控制組動物(即，未施用候選藥劑之動物)的生命年限，其中若經施用候選藥劑之非人類轉殖基因動物的生命年限比控制組動物長，則所述候選藥劑是能增加個體預期壽命、延長生命年限、和/或抑制腫瘤形成的活性藥劑。

【0024】 在第八個態觀點中，本發明包含一種用以鑑別活性藥劑的方法，所述活性藥劑能增加個體預期壽命、和/或抑制腫瘤形成或腫瘤轉移；所述方法包含：將能夠表現一修飾的 EKLF 對偶基因的細胞與一候選藥劑接觸，其中該修飾的 EKLF 對偶基因可編碼產生一修飾的 EKLF 多肽，相較於野生型 EKLF 多肽，此一修飾的 EKLF 多肽包含一或多個修飾的胺基酸；以及測量該修飾的 EKLF 多肽的表現量；其中若該修飾的 EKLF 多肽表現量高於未與候選藥劑接觸之控制組細胞中該修飾的 EKLF 多肽表現量，則該候選藥劑是能延長個體壽命和/或抑制腫瘤形成的活性藥劑。在本發明第八觀點的特定實施方式中，所述一或多個修飾的胺基酸包含對於野生型 EKLF 多肽(例如，野生型人類 EKLF 多肽)上經類小泛素化或磷酸化之胺基酸位置進行修飾。在特定的實施方式中，所述一或多個的胺基酸修飾是指對應於野生型人類 EKLF 多肽第 54 位之修飾胺基

酸。在一實施方式中，對所述第 54 個胺基酸進行修飾是指以精胺酸來取代離胺酸(K54R)。在特定實施方式中，所述一或多個修飾的胺基酸包含譬如，人類 EKLF 多肽中修飾的磷酸化胺基酸，例如但不限於，對應於野生型小鼠 EKLF 多肽第 68 位之修飾的磷酸化胺基酸。

### 【圖式簡單說明】

【0025】第 1A-D 圖顯示利用同源重組技術產生 EKLF K74R 小鼠的示意圖。第 1A 圖上方繪示 EKLF 基因的基因座和目標基因座。第 1A 圖下方顯示重組對偶基因在 Cre-調控重組之前(I)與之後(II)的情形。以 loxP-PGK-gb2-neo-loxP EKLF K74R 反轉錄病毒載體以及兩側各帶有 lox P 位(黑色方塊)的新黴素(neomycin)卡匣(Neo, 白色方塊)來取代 EKLF 基因之外顯子 2 的蛋白編碼區域。圖中的陰影區域代表內源性 EKLF 基因座被刪除的部分，以及在利用 Cre 重組酶移除新黴素匣之前(I)和之後(II)，標的載體被插入至 EKLF 基因座中的部位。Nfix 為 *Nfix* 基因座。Fbwx9 為 *Fbwx9* 基因座。E1、E2 和 E3 分別為 EKLF 基因的外顯子 1、外顯子 2 和外顯子 3；內含子 1 以及內含子 2 分別為 EKLF 基因的第一與第二個內含子。Neo 為新黴素匣。PGK 為真核啟動子 PGK；gb2 為 gb2 原核啟動子。刪除是指由 EKLF 內含子 1 刪除 50 個核苷酸；5FA、5RA、gt EKLF d 5'、gt EKLF 3'、gt EKLF PGK 5'、Kin 5'以及 Kin 3'分別是基因分型用的 PCR 引子。左箭頭和右箭頭分別指出了基因分型引子的座落位置。

【0026】K74R 是指造成 K74R 置換的 DNA 修飾。PolyA 是指 PolyA 位置。LoxP 是指 LoxP 位置。第 1B 圖顯示野生型(+/+)小鼠、異合子型 EKLF K74R 小鼠(Kin/+)以及同合子型 EKLF K74R 小鼠(Kin/Kin)的基因分型結果。第 1C 圖是

野生型(WT)以及同合子型 K74R 小鼠(Kin)在胚胎第 13.5 天 (E13.5) 之胚胎照片。第 1D 圖顯示野生型與 EKLF K74R 小鼠之 EKLF mRNA 的相對表現量。

【0027】 第 2A 和 2B 圖顯示 EKLF K74R 置換影響 EKLF 多肽的轉錄活性。第 2A 圖顯示野生型(WT)以及 EKLF K74R (Kin)小鼠在胚胎第 14 天(E14)胎肝中 Col1a1 mRNA 的相對表現量。第 2B 圖顯示野生型(WT)以及 EKLF K74R (Kin)小鼠在胚胎第 14 天(E14)胎肝中 Mpv171 mRNA 的相對表現量。數據來自 3 個獨立試驗。\*\* $p < 0.01$  , \*\*\* $p < 0.001$  。

【0028】 第 3A 和 3B 圖顯示 EKLF K74R (Kin)和野生型同窩小鼠(WT)間壽命的比較結果。第 3A 圖顯示 WT 以及 Kin 小鼠的存活曲線。第 3B 圖的照片顯示 Kin 小鼠脫色延遲(delayed de-pigmentation)的現象。

【0029】 第 4A-D 圖顯示野生型(WT)以及 EKLF K74R (Kin)小鼠代謝的分析結果。第 4A 圖為野生型(WT)和 EKLF K74R (Kin)三月齡小鼠的照片。第 4B 圖顯示 EKLF K74R (Kin)和 WT 小鼠於 3、6、12、18 和 24 月齡的體重。在野生型(WT)和 EKLF K74R (Kin)小鼠 3 個月和 24 個月大時，測量其標準晝間代謝參數(canonical diurnal metabolic parameters)，包括其食物攝取(第 4C 圖)和水攝取(第 4D 圖)分析。所述數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。以雙尾學生氏 T 檢定評估統計上的顯著性。

【0030】 第 5A-D 圖顯示野生型(WT)和 EKLF K74R (Kin)小鼠全身能量消耗的比較結果。測量 3 月齡和 24 月齡高齡小鼠的標準晝間代謝參數，包含  $VO_2$  (第 5A 圖)、 $VCO_2$ (第 5B 圖)、熱生成(第 5C 圖)以及呼吸交換率(respiratory

exchange ratio, RER)(第 5D 圖)。數據以平均值 $\pm$  SEM 表示。以雙尾學生氏 T 檢定評估統計上的顯著性。

【0031】第 6A-C 圖顯示野生型(WT;以圓圈表示)和 EKLF K74R 小鼠(Kin ;以方塊表示)飯前血糖的測量濃度(第 6A 圖)、胰島素濃度(第 6B 圖)和葡萄糖耐受性試驗(第 6C 圖)。數據以平均值 $\pm$  SEM 表示。以雙尾學生氏 T 檢定評估統計上的顯著性。

【0032】第 7A 和 7B 圖顯示野生型(WT)和 EKLF K74R (Kin)小鼠 3 月齡和 24 月齡的生理特徵的比較結果。第 7A 圖是握力試驗的結果。第 7B 圖是旋轉桿試驗結果。數據以平均值 $\pm$  SEM 表示(每組  $n = 20$ )。p 值表示在雙向的重複測量 ANOVA 中，基因型效應的顯著性。數據以平均值 $\pm$  SEM 表示。以雙尾學生氏 T 檢定評估統計上的顯著性。

【0033】第 8 圖顯示評估公鼠骨質疏鬆症的結果。利用高解析度微米級電腦斷層掃描儀(high-resolution micro-computed tomography (mCT))顯影來分析 3 月齡(上方)和 24 月齡(下方)之野生型(WT)和 EKLF K74R (Kin)小鼠的索前軟骨 ( $n=3-6$ )。

【0034】第 9A 和 9B 圖顯示野生型(WT)以及 EKLF K74R (Tg) 小鼠 24 月齡之 MicroPET 影像。第 9A 圖為 MicroPET 影像，其係對小鼠施用 100 居禮(Ci)的  $^{18}\text{F}$ -FDG 並於注射後掃描 0.5 小時所得。白色箭頭指出野生型小鼠的肝臟、胰臟和脾臟中的腫瘤，但 EKLF K74R 小鼠(Kin)這些部位則沒有腫瘤。第 9B 圖



的表格為小鼠身體切片檢驗的結果，結果顯示三分之二的 WT 小鼠形成腫瘤，但 3 隻 Kin 小鼠皆沒有腫瘤形成。

【0035】 第 10 圖顯示 EKLF K74R 小鼠抗癌生成的能力。第 10A 圖為注射 B16F10 黑色素瘤細胞後 14 天，野生型(WT)以及 EKLF K74R (Kin)小鼠肺部的照片。三隻經注射的 WT 小鼠的肺部皆發展形成了腫瘤(左圖)，3 隻 Kin 小鼠的肺部無腫瘤形成(右圖)，其中比例尺為 5 公釐。第 10B 圖以直條圖呈現腫瘤的比較結果。

#### 【實施方式】

【0036】 除非另有指明，本發明利用所屬技術領域常規分子生物和重組 DNA 技術。所述常規技術揭示於以下文獻：Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2000); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.) ; *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications* (P. Herdewijn, ed., 2004) ; *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985) ; *Nucleic Acid Hybridization: Modern Applications* (Buzdin and Lukyanov, eds., 2009) ; *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986) ; Freshney, R.I. (2005) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5th Ed. Hoboken NJ, John Wiley & Sons; B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (3rd Edition 2010) ; Farrell, R., *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (3rd Edition 2005). *Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications*, ACS, Washington, 1997 ; Veronese, F., and J.M. Harris, Eds., *Peptide and protein PEGylation*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4) 453-609 (2002); Zalipsky, S.,  
第 14 頁，共 111 頁(發明說明書)

*et al.*, “Use of functionalized Poly(Ethylene Glycols) for modification of polypeptides” in *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications* 。

【0037】 除非本說明書另有定義，此處所用的科學與技術詞彙之含義與本發明所屬技術領域中具有通常知識者所理解與慣用的意義相同。

【0038】 「提升預期壽命(enhancing longevity)」、「延長預期壽命(increasing longevity)」、「延長生命(life-extension)」等詞彙於本說明書中皆可互換使用，其是指延緩動物正常老化過程和/或延長其生命週期；所述動物如患有威脅生命之疾病(如，癌症或腫瘤)的動物。在較佳實施方式中，延長預期壽命是因為成熟生命階段之延長所致，而不是因為未成熟生命週期的延長，且是因為以本發明所述方法處置後所造成的結果。

【0039】 「提升健康年限(Enhancing health span)」是指延緩與老化相關的體質衰退、疾病或病症之發生或減緩其嚴重性。提升健康年限亦指降低或減少一般與老化相關的(如，在特定年齡)體質衰退、疾病或病症的發生或程度。

【0040】 在此所述「對偶基因(allele)」一詞係指一細胞內或族群中的一特定基因形式，所述特定形式和同一個基因之其他形式的不同處在於：該基因之序列中的至少一個（且通常超過一個）變異位置的序列不同。不同對偶基因之間，在這些變異位置上序列的差異，稱為變異(variance)、多形性(polymorphism)或突變(mutation)。當一個體的一基因有兩個相同的對偶基因，則稱此個體就該基因或對偶基因而言為同型合子(homozygous)。當一個體的一基因有兩個不同的對偶基因，則稱此個體就該基因而言為異型合子(heterozygous)。特定基因上

第 15 頁，共 111 頁(發明說明書)

之多個對偶基因彼此可能有單一個核苷酸或數個核苷酸的差異，且可包含核苷酸的置換、刪除和插入。一基因上的一對偶基因也可以是包含突變的基因形式。

【0041】 所述「表現(expression)」一詞係指當符合一定條件時，基因的轉錄作用會產生 mRNA，且通常會因而產生所編碼之蛋白質。所述表現可由細胞在天然狀態(即，未經人工技術介入)下完成或進行，或是利用人工技術(即，利用人工技術介入，如，藉由使用受到化學劑調控的啟動子)完成或進行所述表現。也可利用由特定位重組酶(site-specific recombinase)所引發的重組事件，來起始所述表現，例如，藉由 Cre-媒介重組技術。可藉由測量由該基因轉錄所得之 mRNA、或者是測量由該基因編碼產生的蛋白量，來測量所述表現量。

【0042】 所述「核酸」一詞是指多核苷酸，譬如去氧核糖核酸(DNA)，且在適當情況下亦可為核糖核酸(RNA)。所述核酸包含但不限於，單股和雙股多核苷酸。舉例而言，多核苷酸包含 DNA、單股 DNA、cDNA 和 mRNA。所述核酸亦包含由核苷酸類似物製得的 DNA 或 RNA 的類似物，且也可以是單股(正股或負股)和雙股核苷酸。所述核酸一詞更包含修飾的的多核苷酸，其包含修飾的 DNA 和修飾的 RNA，譬如，包含一或多個非天然狀態的核苷酸或核苷之 DNA 和 RNA。所述「核酸」和「核苷酸」在本說明書可交互使用，是指去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸和其聚合物，且其可以是單股或雙股形式。所述「核酸」一詞涵蓋包含已知核苷酸類似物或核酸骨架殘基或鍵結經過修飾之修飾的核酸，所述修飾可以合成、天然存在和非天然存在的核酸，且/或其具有和對照核酸類似的結合特性，和/或代謝方式。舉例而言，所述類似物包含但不限於，硫代磷酸鹽(phosphorothioates)、氨基磷酸酯鹽(phosphoramidates)、甲基磷

酸鹽(methyl phosphonates)、掌性-甲基磷酸鹽(chiral-methyl phosphonates)、2-O-甲基核糖核苷酸(2-O-methyl ribonucleotides)、多肽-核酸(peptide-nucleic acid, PNA)。除非另有指明，一特定核酸序列包含保留性修飾變異(即，同義密碼置換)以及互補序列，以及明確指出的序列。具體而言，同義密碼置換可以藉由一或多個選定的(或全部)密碼之第三個位置，以混合的鹼基和/或去氧基殘基完成(Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。

【0043】 所述「單離(isolated)」的核酸分子通常是指與該核酸天然來源相關的核酸分子。單離的核酸分子和存在於天然界中之核酸的形式不同。因此，單離的核酸分子不同於存在於天然細胞中的核酸分子。

【0044】 所述「載體」是指能夠運送與其連接之另一核酸的核酸分子。所述「表現載體」是指此載體包含一啟動子，其與一核酸分子以可操作之方式連接，而使得該經可操作連接之核酸能夠被表現。在此所述的載體或表現載體包含質體或噬菌體，其能合成該載體攜帶之各別重組基因所編碼的目標蛋白質。載體或表現載體亦包含能夠將核酸導入至一細胞(如，哺乳動物細胞)的病毒載體。某些載體能夠自主複製和/或表現與其所連接之核酸。

【0045】 在本揭示內容中，當放置所述核酸使其與另一核酸序列有功能性連接關係時，稱兩者為「可操作地連接(operably link)」。舉例而言，當一啟動子能夠啟動編碼序列的轉錄時，稱該啟動子與所述序列為可操作地連接；或當將一核糖結合位放置於能夠協助轉譯發生的位置時，稱該核糖結合位與編碼序列為可操作地連接。一般來說，「可操作地連接」是指連接的 DNA 序列是連

續的且在閱讀相(reading phase)中。然而，增強子就不一定要是連續的。可在既有的限制位進行接合以完成所述連接，若沒有此類限制位時，可利用常規技術中的合成寡核苷酸轉接子(adaptor)或連接子(linker)完成。

【0046】 所述「轉染(transfection)」一詞係指核酸的導入作用，譬如，一表現載體藉由核酸媒介基因轉移技術至一受體細胞。「轉型(transformation)」係指細胞內噬外源性DNA或RNA導致細胞基因型改變的結果，且所述轉型細胞表現一預期的異源蛋白。

【0047】 在此「轉殖基因(transgene)」是被引入轉殖基因動物或細胞的一核酸序列，對於此一轉殖基因動物或細胞，所述核酸序列的全部或一部可以是異源性的；或者是所述核酸序列是同源性的，但其經設計可被導入或已導入至該動物的基因體中而使得被導入之細胞的基因體改變。可將一轉殖基因可操作地連接至欲使所選核酸有最佳表現所必須的一或多個轉錄調控序列以及任一其他核酸(如，內含子)。因此，「轉殖基因」可作為形容詞使用，以描述動物或構築體攜帶轉殖基因的特性。舉例而言，「轉殖基因動物」是一非人類動物，較佳是非人類哺乳動物；更佳是是一齧齒動物，其中所述動物的一或多個細胞含有經由人為介入所導入的異源核酸，例如利用習知的轉殖基因技術，包括基因敲入(gene knock-in)技術。可利用經設計的遺傳操控手段，譬如透過微注射或重組病毒感染，將所述核酸直接或間接地導入一細胞的前驅物中，以將核酸導入至此細胞中。轉殖基因動物包含但不限於基因敲入動物。

【0048】 所述「基因敲入 (knock-in)(Kin)」係指將一轉殖基因定向敲入至一宿主細胞的基因體中，造成轉殖基因表現。基因敲入的轉殖基因體所含的轉殖基因可以是經敲入的異型合子。在特定的實施方式中，「基因敲入」使得一內源性基因(或其部分)被一外源性基因(或其部分)所置換，例如，使得成對之對偶基因的一個或兩個對偶基因發生定向突變(targeted mutaiton)。「基因敲入」亦包含使所述動物和能夠促進轉殖基因之表現的物質接觸（譬如，引入可促進定向插入位置之重組的酵素（如Cre-lox系統中的Cre）或利用其他方法），以使得該轉殖基因表現。

【0049】 「同型合子(homozygous)」狀態是指在同源染色體上相應的對偶基因座上存有相同對偶基因的遺傳狀態。相反地，「異型合子(heterozygous)」狀態則是指在同源染色體上相應的對偶基因座上存有不同對偶基因的遺傳狀態。

【0050】 所述「哺乳動物(mammal)」是指哺乳綱的所有成員，包含人類、靈長類、家畜與農畜(例如，兔、豬、綿羊和牛)；以及哺乳動物動物園或競賽用動物、寵物，以及齧齒動物(如，小鼠和兔)。所述「非人類哺乳動物」係指除了人以外的所有哺乳綱成員。

【0051】 所述「治療(treatment)」一詞是指達到所欲的藥學和/或生理學效果；例如，延緩或抑制癌症的發生、生長或轉移或緩減相關症狀。上述效果可以是預防性的(prophylactic)，而指能夠部分或完全地防止或抑制疾病或其病徵的發生；和/或可以是治療性的

(therapeutic)，而能夠完全或部分治癒疾病和/或可肇因於該疾病的副作用。所述「治療(Treatment)」包含對哺乳類動物(特別是人類)的疾病進行預防性(preventive)、治療性(curative)或緩和性(palliative)的處置；且所述治療包含：(1)針對易於罹患一疾病但尚未確診的個體進行預防性(如，預防用藥)、治療性或緩和性的處置，以避免該疾病或或相關症狀(如，癌症)的發生；(2)抑制一疾病(例如，延遲該疾病的進程)；或(3)緩解一疾病(如，減輕與所述疾病相關的症狀)。

【0052】 所述「施用(administered)」一詞及其各種時態與詞性是指一傳遞方式，包含但不限於，以靜脈內、肌肉內、腹膜內、動脈內、顱內或皮下等途徑來施用本發明的藥劑(例如，化合物或組合物)。

【0053】 在此處，「有效量(effective amount)」一詞係指在必要的劑量和期間等條件下，針對所治療之疾病或症狀(如，老化)足以招致所欲的反應或效果之用量。以治療癌症為例，一藥劑(如，化合物、多肽、編碼治療用多肽的聚核酸)能夠減少、抑制、預防、延緩、遏止或延遲與癌症相關的任一症狀時，就視為有效。一藥劑的有效量不必然能夠治癒一疾病或症狀，但能延緩、阻礙或預防疾病或症狀的發生，或緩減疾病或相關的病徵與症狀。可將所述治療

有效量以適當的形式分成一、二或更多劑，並在指定期間內施用一次、二次或更多次。

**【0054】** 所述「個體(subject)」是指可接受此處提出之方法來治療的動物(包含人類)。除非另有指明，「個體」一般包含雄性與雌性。因此，所述「個體」包含可因此處提出的治療方法而受益的任何哺乳類動物。

**【0055】** 「細胞增殖性疾病」、「腫瘤」和「癌症」等詞，在此可交互使用，此類疾病的特徵為失調或失控的自發性細胞生長(包含惡性和非惡性生長)、細胞分化能力喪失以及具有侵襲局部組織和轉移的能力。所述疾病的例子包含，但不限於：惡性腫瘤(carcinoma)、淋巴瘤(lymphoma)、胚細胞瘤(blastoma)、肉瘤(sarcoma)和白血病(leukemia)或淋巴樣惡性腫瘤(lymphoid malignancies)。所述疾病特定的實例包含，但不限於：肝癌(liver cancer)、大腸癌(colon cancer)、乳癌(breast cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、肝細胞癌(hepatocellular carcinoma)、黑色素瘤(melanoma)、肺癌(lung cancer)、神經膠母細胞瘤(glioblastoma)、腦腫瘤(brain tumor)、造血系統惡性腫瘤(hematopoietic malignancies)、視網膜母細胞瘤(retinoblastoma)、腎細胞癌(renal cell carcinoma)、頭頸癌(head and neck cancer)、子宮頸癌(cervical cancer)、胰臟癌(pancreatic cancer)、食道癌(esophageal cancer)以及鱗狀細胞癌(squama cell carcinoma)。

**【0056】** 在不與上下文衝突的前提下，本說明書所用的單數名詞涵蓋該名詞的複數型。



【0057】 所述量值的「降低(decreased)或減少(reduced)」通常是指在統計上具顯著差異的量，且可包含，例如，相較於控制組，降低或減少5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含以上數值之間的所有正整數與數值範圍)。本說明書亦記載了其他比較以及「統計上具顯著差異」的量之例示。「降低」在此可以是抑制(inhibit)、減少(reduce)、限制(curb)、減弱(abate)、衰減(diminish)、減輕(lessen)或下降(lower)。

【0058】 所述量值的「增加(increased)或增強(enhanced)」通常是指在統計上具顯著差異的量，且可包含，例如，相較於控制組，增加5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。增加或增強的量可包含，相較於控制組，能夠增加或增強2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1,000倍、10,000倍或以上(包含以上數值之間的所有正整數與數值範圍)。本說明書亦記載了其他比較以及「統計上具顯著差異」的量之例示。增加在此亦指刺激(agonize)、增強(enhance)、提升(inflate)、提高(escalate)、擴張(expand)、強化(augment)、增大(enlarge)或上升(raise)。

【0059】 在此所述「多肽(polypeptide)」和「蛋白質(protein)」能交互使用，都是指胺基酸聚合物，及其胺基酸變異物和合成類似物。因此，這些詞彙亦適用於帶有一或多個合成的、非天然存在之胺基酸（如一天然存在之胺基酸的化學類似物）的胺基酸聚合物，也適用於天然存在的胺基酸聚合物。在此所述之「多肽」不限於具有特定長度的產物，故，胜肽、寡胜肽和蛋白質皆屬於此處定義的多肽，且在本說明書中可交互使用這些名詞，除非另有指明。此處所述的多肽也可具有表現後修飾或修飾(post-expression modification)，例如，醣化(glycosylations)、乙醯化(acetylations)、磷酸化(phosphorylations)、及與其相似的修飾或還有其他已知的修飾，且涵蓋天然發生和非天然發生的修飾。所述多肽可以是完整的蛋白質或其序列、片段、變異物或衍生物。

【0060】 在此處，利用「相似(similar)」一詞來描述可以被測量和/或定量的特性、特徵、作用或活性時，係指未出現可偵測到的差異和/或不具統計上的顯著差異。

【0061】 所述「野生型(wild-type)」係指一基因或基因產物所具備的特性，和從天然存在的來源中分離出來之該基因或基因產物的特性相同。一野生型基因或基因產物(如，多肽)是一族群中出現頻率最高的，且因可將其定義為該基因的「正常型(normal)」或「野生型」形式。

【0062】 一「控制組動物」是和實驗組動物(例如，能表現修飾的EKLF多肽的轉殖基因動物)非常相似的動物，但不具有實驗組的特徵(如，表現出修飾的EKLF多肽)。於一實驗或比較性實驗中，所屬技術領域中具有通常知識者，

可基於某些考量來選擇適當的控制組動物，上述考量包括但不限於：實驗或比較性實驗的本質、轉殖基因動物的物種和年紀，以及實驗可行性。除非另有指明，所述控制組動物的EKLF基因未經修飾，且不會表現修飾的EKLF多肽。在某些實例中，所述控制組動物與轉殖基因動物的性別相同，且為同窩動物。

【0063】 所述「老年(aged)動物」是指一成體動物顯現出至少一與正常老化過程相關的表現型。一動物被視為「老年」的實際年齡會隨著動物的品種和/或品系而不同，也和所探討的表現型有關，且習知技藝人士可輕易地決定此一年齡。

【0064】 「同源性(Homology)」是指相同胺基酸或保留性置換胺基酸的百分比。可利用序列比較程式(例如，GAP (Deveraux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395))來測定同源性。以所述程式進行測定時，將和此處所述之序列和相似序列或長度實質上不同之序列進行比較時，可在對比序列中引入間隙，其中所述間隙可以利用GAP中的比較演算法來決定。

【0065】 「統計上的顯著(statistically significant)」是指結果不太可能是偶然發生的。可利用任何本領域中已知的方法來計算統計顯著性。本領域常用p值來表示顯著差異性，此一數值代表當虛無假設為真時，所觀察到的事件發生的頻率或機率。若所得到的p值小於顯著水準，則拒絕虛無假設。在簡單的實例中，顯著水準定義為p值小於或等於0.05。所述「顯著」一詞包含統計上的顯著。

【0066】 「序列相似度」或舉例來說「序列有50%的相似度」是指在一比對範圍(window of comparison)內，逐個比較核苷酸或逐個比較胺基酸後，序列

相同的程度。因此，可以藉由比較在比對範圍中，經最佳化比對排列的兩個序列，來決定在兩個序列中具有相同核酸鹼基(如，A、T、C、G、I)或相同胺基酸殘基(如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys與Met)之位置的數目，以得到相符位置的數目，而後再將相符位置數目除以比對範圍中所有位置的總數(即，視窗大小)並乘以100，以計算出序列相似度百分比。

**【0067】** 用以描述二或多個多肽間序列關係的名詞，包含「參考序列(reference sequence)」、「比對範圍(comparison window)」、「序列相似度(sequence identity)」、「序列相似度百分比(Percentage of sequence identity)」和「實質相似度(substantial identity)」。「參考序列」的長度為至少12個單體，一般為15至18個單體，且通常為至少25個單體，該單體可以是核苷酸或胺基酸殘基。因為對二個多肽而言，兩者可分別包含(1)兩個多肽序列間彼此相似的一段序列(即，完整多肽序列的一部分而已)，以及(2)兩個序列間彼此不同的一段序列；所以在比較二(或多個)多肽的序列時，通常會比較在一「比對範圍」中，二個多肽的序列，以鑑別和比較局部區域的序列相似度。「比對範圍」是指一種概念性的片段(conceptual segment)，其長度為至少6個連續位置，通常為約50至100個，更佳為100至150個，在將兩個序列最佳化比對排列之後，可將一序列的此一區段和參考序列中相同數目之連續位置進行比較。為達到兩個序列的最佳化比對排列，比對範圍相較於參考序列(不含加入或刪除)可帶有約20%或以內的加入或刪除(即，間隙)。在比對排列一比對範圍時，可利用由電腦實作的演算法(Genetics

Computer Group公司(575 Science Drive Madison, WI,USA)發行之Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA程式)或藉由檢視使用所選之多種方法其中任一種產生的最佳比對排列(即，在比對視窗內可得到最高同源百分比者)，以得到序列的最佳比對排列。亦可參考如Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389一文所揭示的BLAST系列程式。對序列分析的詳盡討論結果請參見Ausubel *et al.*所著Current Protocols in Molecular Biology( John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15)一文的19.3段落。

**【0068】** 可利用以下方法來計算序列之間的序列相似度或序列一致性(在本說明書中這些名詞可交互使用)。於測定二胺基酸序列或二核酸序列的相似度百分比時，可排列這些序列以實現最佳化的比對結果(例如，可在第一和第二胺基酸或核酸序列其中之一或二序列中引入間隙，以實現最佳化比對排列，或可基於比對之目的，忽略非同源序列)。在特定實施方式中，參考序列中用於比對排列的部分之長度至少為參考序列的30%，較佳為至少40%，更佳為至少50%、60%，以及甚至更佳為至少70%、80%、90%、100%。之後，比對位在相應胺基酸位置或核苷酸的位置上的胺基酸殘基或核苷酸。當第一序列中一位置上的胺基酸殘基或核苷酸和第二序列相應位置的胺基酸殘基或核苷酸相同時，則在所述位置上的分子是相同的。

【0069】 二序列間的相似度百分比是這些序列所共有的相同位置之數目的函數，且需考量為了使二序列達到最佳比對排列所引入的間隙數量及每一間隙的長度。

【0070】 可利用數學演算法來進行序列的比較以及決定二序列間的相似度百分比。在一較佳的實施方式中，利用Needleman和Wunsch演算法(1970, *J. Mol. Biol.* 48: 444-453)來決定二胺基酸序列的相似度百分比，GCG套裝軟體中的GAP程式即使用此一演算法，此演算法利用Blossum 62矩陣或PAM250矩陣，且間隙權重(gap weight)為16、14、12、10、8、6或4，長度權重(length weight)為1、2、3、4、5或6。在其他較佳的實施方式中，利用GCG套裝軟體中的GAP程式來決定二核苷酸序列的相似度百分比，其使用NWSgapdna.CMP矩陣，且間隙權重為40、50、60、70或80，長度權重為1、2、3、4、5或6。一較佳的參數(除非另有指明，此處使用此一參數)為Blossum 62評分矩陣，間隙罰分為12、間隙延長罰分為4，和框架飄移間隙罰分為5。亦可利用E. Meyers與W. Miller提出的演算法(1989, *Cabios*, 4: 11-17)來計算二胺基酸或核苷酸序列的相似度百分比，ALIGN 程式(2.0版)即使用此一演算法，並使用了PAM120權重殘基表、間隙長度罰分為12且間隙罰分為4。

【0071】 在公開資料庫中進行檢索時，可將此處所述的核酸和蛋白質序列作為「查詢序列(query sequence)」，以鑑別出例如其他家族成員或相關序列。可利用NBLAST和XBLAST程式(2.0版)(Altschul, *et al.*, (1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10))來進行上述檢索。利用NBLAST程式來進行BLAST核苷酸檢索時，所用

的參數設定為：分數=100、字長=12，以得到與本發明所述核酸分子同源的核苷酸序列。利用XBLAST程式來進行BLAST蛋白質檢索時，所用的參數設定為：分數=50、字長=3，以得到與本發明所述蛋白質分子同源的胺基酸序列。基於比較之目的，欲得到含有間隙之比對排列時，可利用Altschul等人發表的Gapped BLAST進行比對(1997, *Nucleic Acids Res*, 25: 3389-3402)。當使用BLAST以及Gapped BLAST程式時，可利用各程式(如，XBLAST以及NBLAST)的預設參數進行比對分析。

【0072】 所述「抗體(antibody)」應以最廣意義來解釋，且具體來說涵蓋了單株抗體、多株抗體、由至少兩種完整抗體所形成的多特異性抗體(即，雙特異性抗體)以及抗體片段，只要其能夠展現所需的抗原結合活性。「抗體片段」包含完整抗體的一部分，較佳為包含其抗原結合區或變異區。抗體片段的實例包含Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv和Fv片段；微型雙功能抗體(diabodies)；奈米抗體(nanobodies)；線性抗體(linear antibodies)；單鏈抗體分子；以及由一或多個抗體片段所形成的多特異性抗體。

【0073】 轉殖基因動物

【0074】 本揭示內容部分是基於所開發出的基因敲入動物(譬如，基因敲入小鼠)；此一基因敲入動物可作為長壽、抗老化、抗腫瘤發生，和/或抗腫瘤轉移之動物模型，其中所述動物的內源性紅血球Kruppel樣因子(EKLF)基因的一或兩個對偶基因經過修飾，以編碼產生一修飾的EKLF多肽，其包含在此所述的任一具體實施方式。在轉殖基因動物體內表現此一修飾的EKLF多肽，能增加動物

壽命和/或健康年限，和/或抑制腫瘤形成和/或癌細胞轉移。因此，導入此一修飾的EKLF對偶基因，可作為增加個體壽命或健康年限的手段，或治療細胞增殖性疾病(譬如，抑制腫瘤形成或腫瘤轉移)的手段，以及用以篩選能夠作為抗老化和抗腫瘤藥劑之候選藥劑的手段。

【0075】 在特定的實施方式中，本案開發的非人類轉殖基因動物模型是一種有價值的的研究工具，適用於研究老化、長壽以及細胞增殖性疾病(如，癌症)的進程和治療。此一動物模型的優點在於，其代謝模式和正常動物並無二致。特別是，本發明提出的非人類轉殖基因動物模型對於研究老化、長壽，以及篩選可作為抗老化劑和治療或預防癌症(包含癌轉移)的藥劑的候選藥劑等研究極具實用性。

【0076】 本發明特定實施方式是關於一種轉殖基因動物，其包含可編碼產生修飾的EKLF多肽的核酸(如，DNA)序列。「修飾的EKLF多肽」包含一EKLF變異物或其片段；相較於野生型EKLF蛋白，所述修飾的EKLF多肽具有至少一修飾的胺基酸；所述EKLF片段具有至少100、200、300或350個胺基酸；且所述變異物或其片段相對於野生型EKLF蛋白的序列相似度為至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

【0077】 在特定實施方中，轉殖基因動物包含可編碼產生此一修飾的EKLF多肽的核酸序列，也可包含可編碼產生野生型EKLF的核酸序列。在特定實施方式中，轉殖基因動物包含可編碼產生修飾的EKLF多肽的核酸序列(如，DNA)，且不包含可編碼產生野生型EKLF的核酸序列。在多種實施方式中，所



述動物可表現出此一修飾的EKLF多肽，以及內源性EKLF多肽；而在某些實施方式中，所述動物僅能表現出此一V的EKLF多肽。

【0078】 在某些實施方式中，編碼產生此一修飾的EKLF的核酸序列係受到內源性EKLF基因啟動子所調控。某些實施方式是關於能夠表現此一修飾的EKLF蛋白的非人類轉殖基因動物，其中所述轉殖基因動物包含可編碼產生此一修飾的EKLF蛋白的核酸序列，其中該EKLF蛋白是由內源性EKLF啟動子所調控。某些實施方式是關於能夠表現此一修飾的EKLF蛋白的非人類轉殖基因動物，其中所述轉殖基因動物包含可編碼產生此一修飾的EKLF蛋白的核酸序列，以及外源啟動子其可編碼產生此一修飾的EKLF蛋白的核酸序列係可操作式地連接至所述外源啟動子，或受其控制。在部分實施方式中，外源性啟動子是選自：能夠以本質(constitutive)形式導引轉殖基因表現的啟動子、能夠以具組織特異性的形式導引表現的啟動子、誘導型啟動子(如，Tet-On誘導型啟動子)，以及可基於發展進程或時間的而導引表現的啟動子。某些實施方式是關於能夠表現此一修飾的EKLF蛋白的非人類轉殖基因動物，其中該轉殖基因動物包含可編碼產生此一修飾的EKLF蛋白的核酸序列，其中該EKLF蛋白是由內源性EKLF啟動子所調控的。「啟動子」是指能夠起始特定基因轉錄的DNA區域。「內源性啟動子」是指天然狀態下即可在細胞或個體中導引目標基因表現的啟動子(即，原生啟動子)。對基因敲入小鼠來說，修飾的基因係接受該基因之內源性小鼠啟動子的導引而表現。

【0079】本發明特定的實施方式是關於一種非人類EKLF基因敲入動物。在此所述的「基因敲入動物」是指利用基因工程方式將DNA序列(如，cDNA序列)插入至生物染色體的特定位置上所產生的轉殖基因動物。插入序列兩側帶有來自非關鍵位置的DNA相連，而同源重組使得轉殖基因可被標定到所述的特定之非關鍵整合位置(non-critical integration site)。所述「基因敲入」應涵蓋第一代動物和其繼代，這些動物在至少一對偶基因中含有該轉殖基因。在某些實施方式中，所述插入序列包含標定到EKLF基因座的DNA或其片段，其中所述插入序列編碼修飾的EKLF多肽或其區域或部分。在某些實施方式中，所述插入序列係被插入至EKLF基因座中編碼蛋白質的區域。在特定的實施方式中，所述插入序列可編碼產生一修飾的EKLF多肽。

【0080】「EKLF基因敲入」是指在非人類轉殖基因動物中，編碼產生修飾的EKLF多肽或其部分或區域的核酸，被基因敲入至EKLF基因座上，譬如，用其取代該動物中用以編碼相對應之野生型EKLF多肽之核酸或其部分。在某些實施方式中，所述基因敲入動物是異型合子，其包含一份內源性EKLF基因和一份修飾的、敲入之EKLF基因。在特定實施方式中，所述轉殖基因動物是一EKLF基因敲入小鼠。在特定實施方式中，所述基因敲入動物是同型合子，其包含二份修飾的、敲入之EKLF基因。

【0081】在特定實施方式中，非人類動物遺傳物質的修飾是發生在內源性EKLF基因座上，以修飾的EKLF基因體序列(或其部分)來取代內源性基因體序列(或其部分)，進而形成一修飾的EKLF基因座，其中該修飾的EKLF基因體序

列包含至少一可編碼產生該修飾蛋白的外顯子。在某些實施方式中，所述取代包含一修飾的基因體片段，其包含至少兩個可編碼產生EKLF蛋白質的外顯子。在部分實施方式中，所述取代包含一修飾的基因體片段，其包含至少三個可編碼產生該修飾的EKLF蛋白質的外顯子。在特定實施方式中，所述非人類動物遺傳物質的修飾是以EKLF基因之修飾的外顯子2(或其部分)來取代EKLF基因之內源性外顯子2。在特定實施方式中，以一修飾的EKLF基因體序列來取代內源性EKLF基因體序列中編碼產生EKLF蛋白類小泛素化位置或磷酸化位置的區域。

**【0082】** 在一特定實施方式中，非人類轉殖基因動物包含一修飾的EKLF基因座，其可編碼產生一修飾的EKLF多肽；相較於內源性野生型EKLF，所述修飾的EKLF多肽包含一或多個修飾的胺基酸，所述修飾包括本說明書所提到的各種修飾作用。在特定實施方式中，所述修飾的EKLF多肽可抑制其之類小泛素化程度。生物體通常能夠將遺傳物質被修飾的部分傳給後代，例如，藉由生殖繁衍的方式傳給後代。在某些實施方式中，所述非人類轉殖基因動物為，已帶有可編碼產生修飾的EKLF多肽之修飾的EKLF基因座之親代，所產生的子代。在某些實施方式中，子代之修飾的EKLF基因座為同型合子。在特定實施方式中，子代之修飾的EKLF基因座為異型合子。

**【0083】** 在特定實施方式中，相較於野生型內源性EKLF片段，非人類轉殖基因動物包含一修飾的EKLF基因座，其可編碼產生包含有一或多個修飾的胺基酸之EKLF多肽，且更包含在一或多個其他基因座上的修飾的胺基酸。在某些

實施方式中，所述轉殖基因動物包含一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、或更多個其他額外的、修飾的基因座。在某些實施方式，額外的修飾基因座可以一基因剔除、基因敲入或插入一外源性基因。

**【0084】** 特定的實施方式係關於非人類之EKLF基因敲入動物與包含至少一額外、修飾的基因座之轉殖基因動物交配後所產生的子代。特定實施方式是關於能夠表現此一修飾的EKLF多肽的子代，上述修飾的EKLF多肽是由一EKLF基因敲入動物和轉殖基因動物(包含至少一額外非EKLF修飾)交配後所得到。轉殖基因動物為已知的技術，且可包含：其可誘導表現外源多肽的轉殖基因動物、可誘導基因剔除的動物模型(如，CRE-loxP)、可誘導基因敲入的動物(如，crisper/Cas)。在特定實施方式中，EKLF基因敲入動物可與轉殖基因動物交配，譬如，基因敲入動物和/或基因剔除動物彼此交配。在某些實施方式中，EKLF基因敲入動物可與特定動物疾病模式之轉殖基因動物交配，例如，癌症或長壽態樣的動物(如，S6K1基因剔除動物模型)。

**【0085】** 在某些實施方式中，所述非人類之轉殖基因動物是選自於小鼠、大鼠、兔、豬、牛(乳牛、公牛、野牛)、鹿、綿羊、山羊、雞、貓、狗、貂、靈長類(如，狨猴或恆河猴)。在特定實施方式中，所述非人類動物是一哺乳動物，譬如非人類哺乳動物。在特定實施方式中，所述非人類動物是小哺乳動物，譬如，鼠總科(of the Superfamily of Muroidea)。在某些實施方式中，所述轉殖基因動物是齧齒動物。在某些實施方式中，所述齧齒動物是選自於小鼠、大鼠和倉鼠。在某些實施方式中，所述齧齒動物是選自鼠總科。在一實施方式中，所

述轉殖基因動物是選自於以下各科：麗倉鼠科(Calomyscidae，如，鼠樣倉鼠(mouse-like hamsters))、倉鼠科(Cricetidae，如，倉鼠(hamster)、新世界大鼠和小鼠(New World rats and mice)、田鼠(voles))、鼠科(Muridae，如，真小鼠和大鼠(true mice and rats)、沙鼠(gerbils)、刺毛鼠(spiny mice)、鬃鼠(crested rats))、馬島鼠科(Nesomyidae，如，攀鼠(climbing mice)、岩鼠(rock mice)、白尾鼠(with-tailed rats)、馬達加斯加大鼠和小鼠(Malagasy rats and mice))、刺山鼠科(Platacanthomyidae，如，刺山鼠(spiny dormice))，以及鼯鼠科(Spalacidae，如，鼯鼠(mole rates)、竹鼠(bamboo rats)、鼯鼠(zokors))。在某些實施方式中，所述轉殖基因齧齒動物是選自真小鼠或大鼠(鼠科)、沙鼠、刺毛鼠和鬃鼠。在一實施方式中，所述轉殖基因小鼠是鼠科成員。在一實施方式中，所述動物是齧齒動物。在一特定的實施方式中，所述齧齒動物是選自於小鼠和大鼠。在一實施方式中，所述非人類動物是一小鼠。在一特定實施方式中，所述非人類轉殖基因動物是一EKLf基因敲入小鼠。

【0086】 在一特定的實施方式中，所述非人類動物是一齧齒動物，且是一C57BL小鼠。所述C57BL小鼠選自於C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/Ola品系。在其他實施方式中，所述小鼠是129品系小鼠，其係選自於129P1、129P2、129P3、129X1、129S1 (如，129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6 (129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1和129T2 (參見，Festing *et al.* (1999) Revised nomenclature

for strain 129 mice, *Mammalian Genome* 10:836, 亦可參見Auerbach *et al.* (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv-and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem cell Lines)。在某些實施方式中，所述轉殖基因小鼠是所述129品系交配所產生或C57BL/6品系小鼠交配所產生。在其他特定實施方式中，所述小鼠是前述129品系或BL/6品系交配所產生。在某些實施方式中，所述交配的129品系是129S6 (129/SvEvTac)。在其他實施方式中，所述小鼠是BALB品系(如，BALB/c)。在其他實施方式，所述小鼠是BALB和其他前述的品系交配所產生。在又一實施方式中，所述小鼠是一雜交系(hybrid line)小鼠(如，50% BALB/c-50% 129S6/Sv; 或50% C57BL/6-50% 129; 如，F1H4細胞，參見「Auerbach *et al.* (2000)」一文。

**【0087】** 在特定實施方式中，所述非人類動物是一大鼠。在其他實施方式中，大鼠是選自於Wistar大鼠、LEA品系、Sprague Dawley品系、Fischer品系、F344、F6和Dark Agouti。在某些實施方式中，所述大鼠品系是經由二或多種如下所述品系的大鼠交配所產生：Wistar大鼠、LEA、Sprague Dawley、Fischer strain、F344、F6和Dark Agouti。

**【0088】** 雖然在此亦提出了包含所述修飾的轉殖基因細胞，在許多態樣和實施方式中，所述非人類轉殖基因動物在生殖細胞中包含修飾的內源性EKLf基因座。

**【0089】** 在不同的實施方式中，所述非人類動物是哺乳動物。在特定實施方式中，所述哺乳動物為齧齒動物。在特定實施方式中，所述齧齒動物包含在

一或二內源性齧齒動物EKLF基因座上的EKLF遺傳物質進行修飾。本發明揭示製造齧齒動物(如，小鼠)的方法，所述方法包含在單一或二內源性EKLF基因座上，以修飾的EKLF基因或其片段來取代內源性EKLF基因或其片段(如，包含一或多個外顯子的片段)。在特定實施方式是關於包含修飾的EKLF基因的細胞、組織和小鼠，以及由內源性非人類EKLF基因座來表現人類EKLF的細胞、組織和小鼠可。亦提出了可在內源性齧齒動物啟動子的調控下表現修飾的EKLF蛋白的齧齒動物。

【0090】 在特定實施方式中，揭示產生可表現修飾的EKLF多肽的基因敲入動物之方法，其包含但不限於可表現修飾的EKLF多肽，而不是野生型EKLF多肽的同型合子。可利用已知的技術產生基因敲入動物，如小鼠，請參見以下文獻：Doyle *et al.* 2012 *Transgenic Res.* 21(2): 327–349；以及Roebroek *et al.* Chapter 10 In: Hofker MH, Deursen Jv, editors. *Transgenic mouse: Methods and protocols.* Humana Press; Totowa, NJ: 2003. pp. xiii pp. 3741pp. 3187–3200。

【0091】 在一策略中，利用二階段法來得到基因敲入小鼠，此方法利用多功能胚胎幹細胞(pluripotent embryonic stem (ES) cells)作為載體，並利用此載體將實驗性基因操作轉換成可在小鼠體內以孟德爾式遺傳的性狀。在特定策略中，利用具有標的DNA的構築體(targeting construct)來轉染源自小鼠的胚胎幹細胞，所述具有標的DNA的構築體和內源性基因或染色體序列具有同源區域，以利進行同源重組。所述具有標的DNA的構築體不僅包含與基因同源的特定區域，亦包含經過獨特基因工程處理的突變或序列變異，使得在將其轉染至ES細胞內之

後，可利用一對一的置換方式，以來自於具有標的DNA之構築體的序列來取代內源性基因(或其部分)，使得這些細胞之基因體中的對偶基因帶有此一新的序列變異物。將含有適當改變基因的ES細胞株轉移至3.5天囊胚細胞的囊胚腔中。接著，將胚胎轉移至代理孕母體內，經過妊娠而得到衍生自ES細胞的種源創始小鼠(founder mice)，此一小鼠遺傳了上述新的變異序列(即，基因敲入突變)，並在選定的基因座上產生一具有功能的對偶基因(gain-of-function allele)。所屬技術領域中具有通常之知識者，可依照其通常知識選定特定的策略，以產生基因敲入動物，譬如，利用Cre-loxP系統和CRISPER/Cas9技術。

【0092】對於無法輕易取得適用於對遺傳物質進行修飾的ES細胞之非人類轉殖基因動物，可利用其他方法來製造含有修飾之遺傳物質的非人類動物。所述方法包含，例如但不限於，對一非ES細胞基因體(如，纖維母細胞或經誘導的多能細胞)進行修飾和使用核轉移技術，將修飾的的基因體轉移到合適的細胞(如，卵母細胞)，並在適當條件下以非人類動物孕育上述修飾的的細胞(如，修飾的卵母細胞)，以形成一胚胎。

【0093】部分實施方式中，本發明係提供利用Cre-loxP系統來產生轉殖基因動物的方法，所述轉殖基因動物會表現出此一修飾的EKLF多肽。已知可利用Cre-loxP系統在受到控制的情況下，藉由在單離的細胞或轉殖基因動物中，誘發基因體重組，以對選定基因的表現進行修飾或誘導染色體重組。此系統利用PI噬菌體酵素，即，Cre重組酶，其可辨識稱為loxP的一段較短(34 bp)且不對稱的共通序列(consensus sequence)。當一DNA分子上有兩個相同方向的此種序列時，



所述酵素會催化這兩個部位間的重組並切除中間的DNA片段。當兩個loxP序列位於不同的DNA分子上時，例如兩條染色體上，則Cre會導引分子間的重組。重組的結果取決於loxP部位的方位，對於位在相同的染色體臂上的二個lox部位，反向的loxP部位會導致插入的情形，而一正向重複的loxP部位會造成刪除的情形。除了在此所述之Cre-loxP重組系統外，亦可利用其他由部位導引的重組系統(site-directed recombination system)來產生如本揭示內容實驗例中所例示的非人類轉殖基因動物模型。

【0094】 所述轉殖基因動物經過篩選與評估，可選擇出帶有所欲研究之表現型的動物。進行初步篩選時，可利用例如南方墨點法或PCR技術來分析動物組織，以確認是否發生轉殖基因的插入。亦可利用已知的技術來評估在轉殖基因動物組織中，轉殖基因的mRNA表現量，上述技術包括但不限於：以北方墨點法分析來自動物的組織樣本、原位交配分析和反轉錄-PCR (RT-PCR)。可利用免疫細胞化學法，以對轉殖基因具有專一性的抗體來評估取自適當組織的樣本。用於評估所述轉殖基因的其他可替代或額外的技術包含，但不限於，適當的生物化學分析(譬如酵素和/或免疫學分析)、針對特定標記或酵素活性進行組織染色、流式細胞儀分析及其他類似技術。亦可利用血液分析來偵測轉殖基因產物是否存在於血液中。

【0095】 在特定的實施方式中，本發明方法與產生轉殖基因動物的方法有關，其中所述轉殖基因動物是利用多能細胞或全能(totipotent)細胞(如，ES細胞)所產生。在特定的實施方式中，利用核注射步驟來產生非人類動物，此方法是

利用原核注射來導入帶有所述修飾的EKLF基因或其部分(可任選的是上游和/或下游內源性非人類調控序列)的核酸構築體。在某些實施方式中，該核酸構築體包含一基因體片段，其包含至少一可編碼產生修飾的EKLF蛋白的外顯子。在特定實施方式中，所述片段包含可編碼產生修飾的EKLF之外顯子2的多個部分。

【0096】 在某些實施方式中，本發明提供了產生轉殖基因動物的方法，所述動物可表現出一修飾的EKLF多肽，所述方法包含以下步驟：a)取得一載體，其包含可編碼產生一修飾的EKLF多肽或其部分之多核苷酸；b)將所述載體注射到非人類動物的胚胎幹(ES)細胞中；c)將包含所述載體之ES細胞轉移至囊胚胚胎；d)將所述囊胚胚胎轉移至一代理孕母體內，使其孕育所述胚胎，因而得到一種源動物，其包含可編碼產生此一修飾的EKLF多肽之多核苷酸，以得到所述轉殖基因動物。在某些實施方式中，所述轉殖基因動物是一基因敲入動物，其中所述載體是一標的載體，其包含與所述動物之內源性DNA同源的多核苷酸，這些多核苷酸位於所述可編碼產生該修飾的EKLF之多核苷酸的3'和5'端的兩側。在特定實施方式中，將包含與動物之內源性DNA同源的多核苷酸的載體注射到至ES細胞中，會透過同源重組作用使得多核苷酸插入至ES細胞的基因體中。在特定實施方式中，所述同源DNA是與EKLF基因座同源的DNA序列。在特定實施方式中，所述具標的DNA載體更包含一選擇匣(selection cassette)，用以在將載體注射至ES細胞後，利用該選擇匣來辨識含所述載體之ES細胞。在特定實施方式中，所述選擇匣是PGK-gb2-neo匣。在特定實施方式中，所述選擇匣兩側為loxP部位，且所述產生轉殖基因動物的方法，更包含以下步驟：e)使一成體種

源動物與生殖細胞可表現Cre的一轉殖基因動物交配，以得到交配後的子代動物，所得到的子代動物能夠表現出此一修飾的EKLF多肽，且其基因體上沒有該選擇匣。

【0097】 在特定實施方式中，本發明揭示產生可表現此一修飾的EKLF多肽之基因敲入小鼠的方法，所述方法包含以下步驟：a)得到一載體，此載體包含可編碼產生此一修飾的EKLF多肽(或其部分)的一多核苷酸，且所述多核苷酸的於5'和3'端的兩側分別設有與內源性小鼠EKLF基因同源的多核苷酸；b)將所述載體注射到非人類動物之小鼠ES細胞中，其中藉由同源重組技術將所述可編碼產生此一修飾的EKLF之多核苷酸，插入ES細胞基因體的EKLF基因座上；c)將包含所述載體的ES細胞轉移到3.5天齡的小鼠囊胚胚胎中；以及d)將囊胚胚胎轉移至代孕小鼠體內以完成妊娠週期，進而產生包含可編碼產生此一修飾的EKLF多肽或其部分的核苷酸的種源動物，進而產生基因敲入小鼠。在特定實施方式中，所述載體更包含一選擇匣。在某些實施方式中，所述選擇匣是一PGK-gb2-neo匣。在某些實施方式中，所述載體包含一選擇匣，其兩側設有loxP部位，且所述方法更包含以下步驟：e)使一成體種源動物與生殖細胞可表現Cre之轉殖小鼠交配，以得到交配後的子代小鼠，進而得到基因體中不包含選擇匣的EKLF基因敲入小鼠。在某些實施方式中，所述載體包含的多核苷酸可編碼產生一種在第74個胺基酸位置上之離胺酸被精胺酸所取代(K74R)的EKLF。

【0098】 本揭示內容之種源動物可以彼此交配(bred)、近親交配(inbred)、遠親交配(outbred)、跨品系交配(crossbred)以產生特定動物族群，包括但不限於，

同型合子動物。所述育種策略包含，但不限於，將帶有多個插入位的種源動物進行遠親交配，以建立個別的品系；將個別品系進行近親交配，以產生轉殖動物(如，基因敲入動物)，在這些動物體內，由於每一轉殖基因的加成表現(additive expression)，其轉殖基因的表現量較高；使異型合子轉殖基因小鼠交配，以得到在指定插入位上為同型合子的小鼠，此技術不僅能夠提升表現量，且可以免除利用DNA分析法來篩選動物的必要；使個別的同型合子品系雜交，以產生複合型異型合子或同型合子品系；使動物交配以形成不同的近親遺傳背景，以便檢視修飾對偶基因對於轉殖基因表現的影響以及對表現的影響。

【0099】 在特定的實施方式中，本發明揭示一種轉殖基因動物的細胞(如，衍生自或取自該動物)，在所述細胞的一或二EKLF基因座上，包含可編碼產生一修飾的EKLF多肽的DNA。在某些實施方式中，所述細胞的一EKLF基因座上包含可編碼產生一修飾的EKLF多肽的DNA。在某些具體實施方式中，所述細胞在二EKLF基因座皆包含可編碼產生一修飾的EKLF多肽的DNA。在某些實施方式中，所述細胞是從轉殖基因動物分離所得。在特定實施方式中，所述細胞可表現此一修飾的EKLF多肽。在特定實施方式中，所述細胞不會表現此一修飾的EKLF多肽。在特定實施方式中，所述細胞含一外胚層細胞系(ectodermal lineage)。在某些實施方式中，所述細胞是選自於產毛細胞(trichocyte)、角質細胞(keratinocyte)、促性腺細胞(gonadotrope)、促腎上腺皮質素細胞(corticotrope)、促甲狀腺素細胞(thyrotrope)、生長激素細胞(somatotrope)、激乳細胞(lactotroph)、神經元(neuron)、神經膠(glia)、許旺氏細胞(Schwann cell)、衛星膠細胞(satellite

glial cell)、嗜鉻細胞(chromaffin cell)、濾泡旁細胞(parafollicular cell)、球囊細胞(glomus cell)、黑色素細胞(melanocyte)、痣細胞(nevus cell)、莫克爾氏細胞(Merkel cell)、生齒細胞(Odontoblast)、莖質原細胞(Cementoblast)、角膜基質細胞(corneal keratocyte)、間膠細胞(oligodendrocyte)、星形細胞(astrocyte)、室管膜細胞(ependymocyte)和松果腺細胞(pinealocyte)。在特定實施方式中，所述細胞含一內胚層細胞系(endodermal lineage)。在某些實施方式中，所述細胞是選自於第一型肺細胞(Type 1 Pneumocyte)、第二型肺細胞(Type 2 Pneumocyte)、棒細胞(Club cell)、杯狀細胞(Goblet cell)、胃主細胞(Gastric chief cell)、胃壁細胞(Parietal cell)、小凹細胞(Foveolar cell)、腸內分泌細胞(Enteroendocrine cell)、G細胞、Delta細胞、腸嗜鉻細胞樣細胞(Enterochromaffin-like cell)、胃抑素S細胞(Gastric inhibitory polypeptide S cell)、Delta細胞、膽囊收縮素(Cholecystokinin)、Goblet細胞、帕內特細胞(Paneth cell)、腸細胞(Enterocyte)、微皺細胞(Microfold cell)、肝細胞(Hepatocyte)、肝星狀細胞(Hepatic stellate cell)、庫弗式細胞(Kupffer cell)、膽囊細胞(Cholecystocyte)、泡心細胞(Centroacinar cell)、胰星狀細胞(Pancreatic stellate cell)、Alpha細胞、Beta細胞、Delta細胞、F細胞、PP細胞、Epsilon細胞、濾泡細胞(Follicular cell)、副甲狀腺主細胞(Parathyroid chief cell)、嗜酸性細胞(Oxyphil cell)和泌尿上皮細胞(Urothelial cell)。在某些實施方式，所述細胞含一中胚層細胞系(mesodermal lineage)。在某些實施方式中，所述細胞是選自於一成骨細胞(Osteoblast)、骨細胞(Osteocyte)、軟骨母細胞(Chondroblast)、軟骨細胞(Chondrocyte)、脂母細胞(Lipoblast)、脂肪細胞(Adipocyte)、肌母細胞(Myoblast)、

肌細胞(Myocyte)、肌星細胞(Myosatellite cell)、腱細胞(Tendon cell)、心肌細胞(Cardiac muscle cell)、纖維母細胞(Fibroblast)、纖維細胞(Fibrocyte)、卡加爾氏間質細胞(Interstitial cell of Cajal)、血管母細胞(Angioblast)、內皮細胞(Endothelial cell)、腎間質細胞(Mesangial cell)、腎小球內間質細胞(Intraglomerular mesangial cell)、腎小球外間質細胞(Extraglomerular mesangial cell)、腎小球旁細胞(Juxtaglomerular cell)、緻密斑細胞(Macula densa cell)、間質細胞(Stromal cell)、間隙細胞(Interstitial cell)、特洛細胞(Telocytes)、單層上皮細胞(Simple epithelial cell)、足細胞(Podocyte)、腎小管刷狀緣細胞(Kidney proximal tubule brush border cell)、賽特利細胞(Sertoli cell)、雷氏細胞(Leydig cell)、顆粒性細胞(Granulosa cell)、插入細胞(Peg cell)、生殖細胞(Germ cell)、精子(spermatozoon)、卵子(ovum)、類淋巴細胞(Lymphoid)、淋巴母細胞(Lymphoblast)、淋巴細胞(lymphocyte)、骨髓細胞(Myeloid)、內皮祖細胞(Endothelial progenitor cell)、內皮聚落形成細胞(Endothelial colony forming cell)、內皮幹細胞(Endothelial stem cell)、血管母細胞(Angioblast)、血管母細胞(Mesoangioblast)、外膜細胞(Pericyte)和壁細胞(Mural cell)。在某些實施方式中，所述細胞是幹細胞。在特定實施方式中，所述細胞是全能幹細胞(totipotent stem cell)、多能幹細胞(pluripotent stem cell)、專能幹細胞(multipotent stem cell)、寡能幹細胞(olipotent stem cell)或單能幹細胞(unipotent stem cell)。

**【0100】** 在特定實施方式中，本發明揭示一種轉殖基因動物的組織(如，衍生自或取自該動物)，所述組織包含一修飾的EKLF基因座，其可編碼產生一

修飾的EKLF多肽。在某些實施方式中，所述組織是從轉殖基因動物分離所得。在特定實施方式中，所述組織包含一個修飾的EKLF基因座，其可編碼產生一修飾的EKLF多肽，且其中所述組織表現修飾的EKLF多肽。在特定實施方式中，所述組織包含一個修飾的EKLF基因座，其可編碼產生一修飾的多肽，但此組織不表現修飾的EKLF多肽。在某些實施方式中，所述組織是結締組織(connective tissue)、神經組織(nervous tissue)、上皮組織(epithelial tissue)或肌肉組織(muscle tissue)。

【0101】 在特定的實施方式中，本發明揭示一種轉殖基因動物的器官(如，衍生自或取自該動物)，所述轉殖基因動物包含一修飾的EKLF基因座，其可編碼產生一修飾的EKLF多肽。在某些實施方式中，所述器官是從轉殖基因動物分離所得。在特定實施方式中，所述器官包含一修飾的EKLF基因座，其可編碼產生一修飾的EKLF多肽，且所述器官表現修飾的EKLF多肽。在特定實施方式中，所述組織包含一修飾的EKLF基因座，其可編碼產生一修飾的EKLF多肽，但所述器官不表現修飾的EKLF多肽。在某些實施方式中，所述器官是來自以下系統的器官：皮膚系統、骨骼系統、肌肉系統、淋巴系統、呼吸系統、消化系統、神經系統、內分泌系統、心血管系統、泌尿系統或生殖系統。在某些實施方式中，所述器官是皮膚、毛髮、趾甲、骨頭、關節、骨骼肌、紅骨髓、胸腺、淋巴管、胸導管、脾、淋巴結、鼻腔、咽、喉、氣管、支氣管、肺、口腔、食道、肝、胃、小腸、大腸、直腸、肛門、腦、脊髓、神經、松果體、腦垂體、甲狀腺、胸腺、腎上腺、胰臟、卵巢、睪丸、心臟、血管、腎臟、輸尿管、膀胱、

尿道、前列腺腺、陰莖、睪丸、陰囊、輸精管、乳腺、卵巢、子宮、陰道或輸卵管。

【0102】「分離的(isolate)」是指從動物移出的細胞、組織或器官。在某些實施方式中，所述細胞、組織、器官為活體，舉例來說，此類細胞、組織、器官適用於培養。在某些實施方式中，所述細胞、組織或器官非為活體(如，經過固定)，此類細胞、組織或器官適用於分析。

【0103】在特定的實施方式中，本發明揭示一種構築體，其能用以產生能表現修飾的EKLF多肽的轉殖基因動物(如，基因敲入標的載體)。在特定實施方式中，所述構築體包含一核酸(如，DNA或cDNA)，其含有修飾的序列而可編碼產生一修飾的EKLF基因的至少一部分轉錄區域。在某些實施方式中，所述構築體包含一核酸序列，其含有一或多個修飾的EKLF外顯子。在特定實施方式中，所述構築體包含一選擇標記，如PGK-gb2-neo模版，其可編碼產生一抗新黴素/康黴素(neomycin/kanamycin)基因。在某些實施方式中，所述構築體包含選擇標記，其兩側設有loxP。在特定實施方式中，本發明揭示用以產生基因敲入小鼠的構築體，其包含一標的載體，所述標的載體包含修飾的小鼠EKLF外顯子2(或其部分)和選擇標記(如，PGK-gb2-neo篩選匣)，所述選擇標記設於二個LoxP部位之間。在一實施方式中，基因敲入標的構築體包含：(i)第一EKLF基因序列的至少一部份；以及(ii)含有一修飾的第二EKLF基因序列的至少一部份。在一實施方式中，基因敲入標的構築體包含：(i)第一EKLF基因序列的至少一部份；(ii)polyA序列；(iii)選擇標記(如，抗新黴素)基因序列；(iv)一啟動子序列，如，



第一型磷甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase 1, PKG)；以及(v)含有一修飾之第二EKLF基因序列的至少一部分。在一實施方式中，一含基因敲入標的之構築體包含：(i)第一EKLF基因序列的至少一部份；(ii) loxP部位；(iii) polyA序列；(iv) 選擇標記(如，抗新黴素)基因序列；(v)啟動子(如，PGK)序列；(vi) loxP部位；以及(vii)含有一修飾之第二EKLF基因序列的至少一部份。在不同的實施方式中，第一EKLF基因序列包含EKLF外顯子1與內含子1的至少一部分，且第二EKLF基因序列包含EKLF外顯子2、內含子2與外顯子3的至少一部份，其中外顯子2包含一修飾，所述修飾包含一修飾的的密碼子，其可編碼產生一不存在於內源性EKLF蛋白的一胺基酸殘基，如，在EKLF蛋白中類小泛素化位置或磷酸化位置上的一修飾。在特定實施方式中，第一EKLF序列的所述部分以及第二EKLF序列的所述部分兩者需有足夠的長度，以使其能夠和內源性EKLF基因座進行同源重組；舉例而言，所述長度為至少20個核苷酸、至少50個核苷酸或至少100個核苷酸。在特定實施方式中，所述EKLF蛋白是小鼠EKLF蛋白，且在特定實施方式，所述修飾的密碼子可編碼產生位於第74個胺基酸位置上的修飾胺基酸。在一特定實施方式中，所述EKLF蛋白是人類EKLF蛋白，且在特定實施方式中，所述修飾的密碼子可編碼產生位於第54個胺基酸位置上的修飾胺基酸。在特定實施方式中，所述修飾的小鼠外顯子2可編碼產生一小鼠EKLF多肽的一個區域，此區域包含一修飾的胺基酸，所述修飾可以防止EKLF多肽發生類小泛素化或磷酸化。在特定實施方式中，修飾的小鼠外顯子2可編碼產生一小鼠EKLF多肽區域，其包含在第74個胺基酸位置上的胺基酸置換，將此位置的離胺酸取

代成譬如，精胺酸。在特定實施方式中，所述修飾可以是本揭示內容任一實施方式所示之修飾。

【0104】 在特定實施方式中，轉殖基因動物表現一修飾的EKLF多肽，其中所述修飾的EKLF多肽是對與此動物同一物種之動物的野生型EKLF進行修飾後所得。在特定實施方式中，轉殖基因動物可表現一修飾的EKLF多肽，其中所述修飾的EKLF多肽係對與此動物不同物種之動物的野生型EKLF進行修飾後所得。在某些實施方式中，此修飾的EKLF多肽是對小鼠EKLF多肽(存取號：NP\_034765.2；序列編號：1)進行修飾後所得。在某些實施方式中，此修飾的EKLF多肽是對鼠EKLF多肽(存取號：NP\_001100634.1；序列編號：2)進行修飾後所得。在某些實施方式中，此修飾的EKLF多肽是對人類EKLF多肽(存取號：NP\_006554.1；序列編號：3)進行修飾後所得。在某些實施方式中，此修飾的EKLF多肽是對黑猩猩EKLF多肽(存取號：XP\_524128；序列編號：4)進行修飾後所得。在某些實施方式中，此修飾的EKLF多肽是對恆河猴EKLF多肽(存取號：NP\_001181384 XP\_001109612；序列編號：5)進行修飾後所得。在某些實施方式中，此修飾的EKLF多肽是對狗EKLF多肽(存取號：XP\_542040；序列編號：6)進行修飾後所得。在某些實施方式中，此修飾的EKLF多肽是對牛EKLF多肽(存取號：NP\_001073828 XP\_001251865；序列編號：7)進行修飾後所得。在特定實施方式中，包含在此處所述載體中的修飾的EKLF基因座或其部分，是對人類EKLF基因序列(存取號：ENSMUSG00000105610；序列編號：9)進行修飾後

所得，或是對小鼠EKLF基因序列(Accession ENSMUSG00000054191；序列編號：10)或相關基因進行修飾後所得。此處提出的載體可帶有上述序列的一部分。

**【0105】** 在某些實施方式中，非人類轉殖基因動物可表現此一修飾的EKLF多肽，相較於野生型EKLF，所述修飾的EKLF多肽包含至少一修飾的胺基酸。在一特定實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，轉殖基因動物表現的多肽係包含一或多個修飾的胺基酸。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，修飾的EKLF多肽包含一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十、大於二十、大於二十五、大於三十、大於三十五、大於四十、大於四十五、大於五十個修飾的胺基酸。在某些實施方式中，所述修飾的胺基酸可以是透過取代、增加、刪除特定胺基酸或上述組合，來達成修飾。

**【0106】** 在某些實施方式中，非人類轉殖基因動物表現出一修飾的EKLF多肽，此序列和野生型EKLF的序列相似度小於100%。在特定實施方式中，轉殖基因動物所表現的多肽和內源性野生型EKLF的序列相似度大於80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，但小於100%。

**【0107】** 由特定實施方式可知，EKLF多肽的功能是由其和不同輔助因子間的互動，以及轉譯後修飾等因素進行嚴密的調控。EKLF與多種轉錄活化因子相關，例如p300、CBP以及具有內在組蛋白乙醯轉移酶(intrinsic histone acetyltransferase, HAT)活性的P/CAF，且EKLF本身也會被p300和CBP在兩個位置上進行乙醯化，而活化其轉錄作用。EKLF的穩定性受到其泛素化狀態所調控

(Quadrini, K. J., and J. J. Bieker. 2006. FEBS Lett. 580:2285-2293)。將第41個位置上的酰胺酸(threonine)磷酸化對於將轉錄活性最佳化具有關鍵性影響(Ouyang, L., X. Chen, and J. J. Bieker. 1998. J. Biol. Chem. 273:23019-23025;)。再者，將第74個位置上的離胺酸類小泛素化則可調控EKLF的轉錄抑制子活性(Siatecka *et al.* 2007 Mol Cell Biol.: 27(24): 8547–8560)，以及調控EKLF進入細胞核的運送(Shyu *et al.* 2014. Developmental Cell 28, 409–422)。

【0108】在特定實施方式中，所述轉殖基因動物可表現出此一修飾的EKLF多肽；相較於野生型EKLF多肽，所述修飾的EKLF多肽的轉譯後修飾會受到改變，譬如，喪失轉譯後修飾。在特定實施方式中，轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含至少一修飾的胺基酸，其係對該至少一胺基酸進行置換，以防止EKLF多肽在轉譯後修飾位置上發生轉譯後修飾。在某些實施方式中，轉譯後修飾是指蛋白質合成過程之中或之後，對多肽的修飾作用。轉譯後修飾包含，但不限於，磷酸化、乙醯化、甲基化、醣基化、脂化、豆蔻醯化(myristoylation)、棕櫚醯化(palmitoylation)、法尼基化(farnesylation)、香葉基香葉基化(geranylgeranylation)、甲醯化(formylation)、醯胺化(amidation)、糖基磷脂醯肌醇化(glypiation)、脂醯化(lipoylation)、醯化(acylation)、丁醯化(butyrylation)、丙二醯化(malonylation)、羥化(hydroxylation)、亞硝醯化(S-nitrosylation)、琥珀醯化(succinylation)、類小泛素化、泛素化(ubiquitination)和NEDD化(Neddylation)。在特定實施方式中，所述轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽，其能夠防止或抑制磷酸化。在特定實施方式中，所述轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF

多肽包含一修飾的胺基酸，其能夠防止或抑制類小泛素化。在特定實施方式中，所述轉殖基因動物是EKLF基因敲入小鼠，其所表現的修飾的EKLF多肽的轉譯後修飾作用與野生型EKLF多肽不同。

【0109】「磷酸化」一詞是指將一個磷酸基(phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) group)添加到多肽上的一個胺基酸殘基的作用。可逆式的蛋白質磷酸化是最重要也最為本領域熟知的一種轉譯後修飾，通常作用於絲胺酸，酰胺酸或酪胺酸殘基上。磷酸化對多種細胞程序的調控非常重要，譬如，細胞週期、生長、凋亡及訊息傳導途徑。在特定實施方式中，轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含一修飾的胺基酸，其能夠防止修飾的EKLF多肽的磷酸化。在某些實施方式中，此修飾的EKLF多肽所包含的修飾的胺基酸能夠防止對所述修飾的胺基酸殘基的磷酸化。

【0110】「類小泛素化」是指多肽與類小泛素修飾(Small Ubiquitin-related Modifier，簡稱SUMO)蛋白間的共價鍵結。SUMO蛋白是由多種小蛋白組成的家族，這些小蛋白可以共價鍵結至細胞內其他蛋白且可與其分離，以改變所述其他蛋白的功能。類小泛素化是一種轉譯後修飾，其和多種細胞機制有關，例如，核-質運輸(nuclear-cytosolic transport)、轉錄調控(transcriptional regulation)、凋亡、蛋白穩定性、壓力反應以及細胞週期的進程。在一些特定實施方式中，轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含一修飾的胺基酸，其能夠防止修飾的EKLF上發生類小泛素化作用。在某些實施方式中，修飾的EKLF多肽所含的修飾的胺基酸可防止在被修飾的胺基酸殘基上發生類小泛素化。

**【0111】** 由特定實施方式可以得知EKLF多肽的會透過在單一位置上的類小泛素化來進行轉譯後修飾，且E3連接酶PIAS1在此過程中扮演重要的角色。由特定實施方式可以得知，EKLF多肽被類小泛素化的位置在小鼠EKLF多肽是第74個位置上的離胺酸，而在人類EKLF多肽則是第54個位置上的離胺酸，或是在一對應的類小泛素化位置。由特定實施方式可以得知人類EKLF多肽第54個位置之離胺酸經類小泛素化。在特定實施方式中，對應於小鼠EKLF多肽第74個位置的離胺酸的類小泛素化位置是人類EKLF多肽上第54個位置的離胺酸。由某些實施方式可以得知，對小鼠EKLF多肽第74個位置上的離胺酸、對人類EKLF多肽第54個位置上的離胺酸或對一相應的類小泛素化部位進行修飾，可以防止EKLF多肽的類小泛素化。在特定實施方式中，所述轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含對第74個位置上的離胺酸或一相應的類小泛素化部位進行修飾，以防止修飾的EKLF多肽的類小泛素化。在特定實施方式，所述修飾是置換。在特定實施方式中，所述修飾是在小鼠EKLF多肽第74個胺基酸位置，以精胺酸置換離胺酸。

**【0112】** 由特定實施方式可以得知由PKC所進行的磷酸化會發生在小鼠第68個胺基酸位置的絲胺酸或相對應的磷酸化位置，所述磷酸化會啟動EKLF多肽的類小泛素化。由特定實施方式可以得知，能夠防止EKLF在第68個位置上絲胺酸之磷酸化的修飾可以防止或降低EKLF多肽上第74個位置上離胺酸的發生類小泛素化的可能。在特定實施方式中，轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含一修飾的胺基酸，其能夠防止第68個位置上絲胺酸的磷酸化，以及減

低或防止修飾的EKLF多肽的類小泛素化。在特定實施方式中，所述轉殖基因動物表現的修飾的EKLF多肽包含對第68個位置的修飾的胺基酸，其能夠防止第68個位置上發生磷酸化，以及減少或防止修飾的EKLF多肽之類小泛素化。在特定實施方式中，所述修飾是一置換。在特定實施方式中，所述修飾是在第68個胺基酸位置上，以丙胺酸取代絲胺酸。

【0113】 在一實施方式中，所述人類EKLF多肽包含一或多個磷酸化位置。在特定實施方式中，人類EKLF多肽上的一個磷酸化位置被磷酸化時，會促發人類EKLF多肽的類小泛素化。由特定實施方式可以得知，可以防止人類EKLF多肽磷酸化的修飾的胺基酸能夠防止降低EKLF在第54個位置的離胺酸發生類小泛素化的可能性。在特定實施方式中，修飾的人類EKLF的磷酸化位置上包含一修飾的胺基酸，其能夠防止磷酸化，以及減低或防止修飾的人類EKLF多肽的類小泛素化。

【0114】 在某些實施方式中，所述非人類轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含至少一修飾的胺基酸，其中所述至少一修飾的胺基酸能防止或減少EKLF多肽的類小泛素化。在某些實施方式中，非人類轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含至少一修飾的胺基酸，其中所述至少一修飾的胺基酸能防止EKLF多肽的類小泛素化。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，所述至少一修飾的胺基酸能減少修飾的EKLF多肽被類小泛素化的量。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，所述至少一修飾的胺基酸使得修飾的EKLF多肽被類小泛素化的量減少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、

45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。在某些實施方式中，至少一修飾的胺基酸可降低修飾的EKLF多肽被類小泛素化的機率。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，所述至少一修飾的胺基酸使得修飾的EKLF多肽被類小泛素化的機率減少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。

**【0115】** 在某些實施方式中，所述非人類轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含至少一修飾的胺基酸，其中所述至少一修飾的胺基酸能防止或減少EKLF多肽的磷酸化。在某些實施方式中，所述非人類轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含至少一修飾的胺基酸，其中所述至少一修飾的胺基酸能防止EKLF多肽的磷酸化。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，所述至少一修飾的胺基酸可降低修飾的EKLF多肽被磷酸化的量。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，所述至少一修飾的胺基酸使得修飾的EKLF多肽的磷酸化量減少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，所述至少一修飾的胺基酸能減少修飾的EKLF多肽被類小泛素化的量。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，所述至少一修飾的胺基酸使得修飾的EKLF多肽被類小泛素化的量減少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、



50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。在某些實施方式中，至少一修飾的胺基酸可降低修飾的EKLF多肽將被類小泛素化的機率。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，所述至少一修飾的胺基酸使得修飾的EKLF多肽被類小泛素化的機率減少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。

【0116】 在某些實施方式中，非人類轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含一修飾的胺基酸，其中所述修飾的胺基酸能防止修飾的EKLF多肽的絲胺酸68或相應的磷酸化位置被磷酸化。在某些實施方式中，所述非人類轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽包含對一絲胺酸68或相應的磷酸化位置進行修飾，其中所述修飾可防止EKLF多肽的類小泛素化。在特定實施方式，所述修飾是在第68個胺基酸位置或相應的磷酸化位置，以丙胺酸取代絲胺酸。在某些實施方式中，能夠防止絲胺酸68或相應的磷酸化位置被磷酸化之修飾可以減少修飾的EKLF多肽上類小泛素化的量。在某些實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，能防止絲胺酸68或相應磷酸化位置被磷酸化的至少一修飾的胺基酸可使得修飾的EKLF多肽被類小泛素化的量減少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。在某些實施方式中，能防止第68個胺基酸位置或者相應或不同磷酸化位置被磷酸化的上述修飾可以使得修

飾的EKLF多肽被類小泛素化的機率減少約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。

**【0117】** 由某些具體實施方式可知，相較於野生型EKLF多肽，由轉殖基因動物所表現的修飾的EKLF多肽，隨著表現此修飾的EKLF多肽的細胞類型或組織類型的不同，其特性或活性可能會改變，例如，細胞內的位置(subcellular localization，又稱次細胞定位)或轉錄活化子活性。因此，在所述轉殖基因動物的一種特定細胞類型或組織類型中，修飾的EKLF多肽的特性可能類似或不同於在均等的細胞或組織中表現的野生型EKLF多肽的特性。因而，於某些實施方式中，轉殖基因動物包含一細胞類型或組織類型，而修飾的EKLF多肽在該處的特性或活性和野生型EKLF多肽不同，且該動物也包含一細胞類型或組織類型，而修飾的EKLF多肽在該處的上述特性或活性和野生型EKLF多肽類似。在特定實施方式中，在轉殖基因動物體內會表現EKLF的所有細胞和組織類型中，修飾的EKLF多肽的特性或活性和野生型EKLF多肽不同。

**【0118】** 由某些實施方式可知，相較於內源性EKLF多肽(即，野生型EKLF多肽)，EKLF多肽經修飾後並不會改變其表現。由某些實施方式可知，在轉殖基因動物的指定細胞或組織中，編碼產生一修飾的EKLF多肽的mRNA量與一控制組動物(同窩出生、同性別)在相當的細胞或組織中，編碼產生一野生型EKLF多肽的mRNA量相當。由特定實施方式可知，在轉殖基因動物的特定細胞或組

織中，編碼產生一修飾的EKLF多肽的mRNA量與相同物種的非轉殖基因動物中相當的細胞或組織類型中編碼產生一野生型EKLF多肽的mRNA量相當。

【0119】 在某些實施方式中，轉殖基因動物表現一修飾的EKLF多肽，相較於內源性、野生型EKLF多肽，所述修飾作用改變了此一修飾的EKLF多肽的穩定性。在某些實施方式中，對EKLF多肽進行修飾使得修飾的EKLF的半衰期(half-life)較內源性、野生型EKLF多肽增加約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%；或增加約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或大於100倍以上(包含其間的所有正整數和數值範圍)。在某些實施方式中，對EKLF多肽進行修飾使得此一修飾的EKLF的半衰期比野生型EKLF多肽減少約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。

【0120】 在某些實施方式中，所述轉殖基因動物可表現一修飾的EKLF多肽，其中修飾作用使得此一修飾的EKLF多肽在細胞內的位置和內源性、野生型EKLF多肽不同。在某些實施方式中，對EKLF多肽進行修飾使得該修飾的EKLF多肽的細胞質定位(cytosolic localization)比野生型EKLF多肽增加約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、

70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%或約2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100倍或大於100倍(包含其間的所有正整數和數值範圍)。在某些實施方式中，對EKLF多肽進行修飾使得此一修飾的EKLF之細胞核定位(nuclear localization)比野生型EKLF多肽減少約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。在特定實施方式中，在紅血球系的祖細胞(progenitor)和前驅(precursor)細胞中，此一修飾的EKLF多肽的細胞內位置會改變。在某些實施方式中，在細胞從原-紅母細胞(pro-erythroblast, Pro-E)轉變成嗜鹼性紅母細胞(basophilic erythroblast, Baso-E)的過程中，當細胞經歷紅血球系細胞成熟(erythroid maturation)時，次細胞定位會改變。在特定實施方式中，次在DMSO-誘導鼠紅血球性白血病(murine erythroleukemia, MEL)細胞分化的過程之中或之後，次細胞定位會改變。

**【0121】** 在某些實施方式中，所述轉殖基因動物可表現一修飾的EKLF多肽，其中該修飾的EKLF多肽的轉錄活化活性(即，提升一或多目標基因的轉錄作用)比內源性、野生型EKLF多肽高。在某些實施方式中，比起至少一基因受到野生型EKLF的提升作用，所述修飾的EKLF多肽使得該基因的轉錄增加約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、

150%、200%，或約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或大於100倍(包含其間的所有正整數和數值範圍)。在某些實施方式中，所述修飾的EKLF多肽能促進一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、大於十、大於十五、大於二十、大於二十五、大於三十、大於四十、大於五十、大於六十、大於七十、大於八十、大於九十、大於一百、大於二百、大於三百、大於四百、大於五百或大於一千個基因的轉錄，而這些基因無法藉由野生型EKLF多肽來促進其轉錄。

【0122】 在某些實施方式中，所述轉殖基因動物可表現此一修飾的EKLF多肽，其中該修飾的EKLF多肽的轉錄抑制活性(即，抑制一或多目標基因的轉錄作用)比野生型、內源性EKLF多肽高。在某些實施方式中，比起至少一基因轉錄活性因野生型EKLF而提升，此一修飾的EKLF多肽卻可抑制該基因的轉錄約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%或約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或大於100倍(包含其間的所有正整數和數值範圍)。某些實施方式中，所述修飾的EKLF多肽可抑制一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、大於十、大於十五、大於二十、大於二十五、大於三十、大於四十、大於五十、大於六十、大於七十、大於八十、大於九十、大於一百、大於二百、大於三百、大於四百、大於五百或大於一千個基因的轉錄，而這些基因無法藉由野生型EKLF多肽來抑制其轉錄。

【0123】 在某些實施方式中，所述轉殖基因動物可表現一修飾的EKLF多肽。其中該修飾的EKLF多肽的轉錄活化活性(即，提升一或多目標基因的轉錄作用)比野生型、內源性EKLF多肽來得低。在某些實施方式中，比起至少一基因轉錄活性因野生型EKLF而提升，修飾的EKLF多肽使得該至少一基因的轉錄降低約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。在某些實施方式中，轉錄活性會受到此修飾的EKLF多肽而提升的基因數目，比起轉錄活性受到野生型EKLF多肽提升者少了一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、大於十、大於十五、大於二十、大於二十五、大於三十、大於四十、大於五十、大於六十、大於七十、大於八十、大於九十、大於一百、大於二百、大於三百、大於四百、大於五百或大於一千個基因轉錄。

【0124】 在某些實施方式中，所述轉殖基因動物可表現一修飾的EKLF多肽，其中所述修飾的EKLF多肽的轉錄抑制活性(即，抑制一或多目標基因的轉錄作用)比野生型EKLF多肽來得低。在某些實施方式中，比起至少一基因之轉錄抑制活性受到野生型EKLF的抑制，此修飾的EKLF多肽使得該基因之轉錄抑制活性降低約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。某些實施方式中，轉錄抑制活性會受到修飾的EKLF多肽抑制的基因數目，比起轉錄抑制活性受到野生型EKLF多肽抑制者少了一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、大於十、大於十五、大於二十、大於二十

五、大於三十、大於四十、大於五十、大於六十、大於七十、大於八十、大於九十、大於一百、大於二百、大於三百、大於四百、大於五百或大於一千個基因轉錄。

【0125】 在某些實施方式中，本發明揭示一種可以表現修飾的EKLf多肽之轉殖基因動物，相較於表現野生型EKLf多肽的控制組動物而言，本發明轉殖基因動物的壽命與健康年限較長和/或有抗癌特性。在特定實施方式中，本發明提供一種模型動物，其中藉由表現一修飾的EKLf多肽來達到延長壽命與健康年限和/或提升癌症抗性，此一機制異於既有長壽與抗癌動物模型。此一模型動物的開發是基於發現到表現此一修飾的EKLf之動物模型的表現型和以往所述的長壽模型動物的表現型不同；所述既有的長壽模型例如卡路里受限的動物、施用二甲雙胍的動物、IGF1受體剔除動物、轉殖基因PTEN動物、異型合子Myc基因剔除動物、施用雷帕黴素的動物、S6K1基因剔除動物、Fat10基因剔除動物、Sirt1突變動物和轉殖基因Cisd2動物。由特定實施方式可以看出，修飾的EKLf多肽的表現能延長壽命以及健康年限而不會改變一或多個以下特性：代謝(metabolism)、生育力(fertility)、自噬衡平(autophagy homeostasis)、基因穩定性(genomic stability)或粒線體功能(mitochondrial function)。

【0126】 在某些實施方式中，相較於表現野生型EKLf多肽之控制組動物而言，表現修飾的EKLf多肽之轉殖基因動物的壽命較長。在特定實施方式中，壽命延長是指轉殖基因動物的平均壽命比控制組動物的平均壽命長。在特定實施方式中，壽命延長是指相較於控制組動物，轉殖基因動物可存活的最大年齡

更長。在某些實施方式中，壽命延長是指最高壽命增加，所述最高壽命是指壽命最長的前10%的族群之平均壽命。在特定實施方式中，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物比表現野生型EKLF多肽之控制組動物的壽命增加約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)。

**【0127】** 在某些實施方式中，表現修飾的EKLF多肽的轉殖基因動物比表現野生型EKLF多肽之控制組動物有較長的健康年限。所述健康年限是指生物體的處於理想健康狀況的時間長度，如未罹患年齡相關疾病。在特定實施方式中，相較於表現野生型EKLF多肽之控制組動物，表現修飾的EKLF多肽的轉殖基因動物的健康年限增加為約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%(包含其間的所有正整數和數值範圍)或大於100%。可針對和提升健康相關的一或多個物理特徵，來測量健康年限的增加，包含但不限於本說明書所述的方法。

**【0128】** 在特定實施方式中，在表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物體內，發生老化相關徵狀的時間較晚和/或發展進程較慢。在特定實施方式中，相較於年齡相當的控制組動物，老化轉殖基因動物在至少一種與老化相關症狀的



程度較輕微，所述症狀如：頭髮花白、肌肉無力(muscle weakness)、運動協調性(motor coordination)、骨質疏鬆(osteoporosis)、平衡力喪失(loss of balance)、癌症發生(cancer incidence)、化學壓力的易感性(susceptibility to chemical stress)、感染的易感性(susceptibility to infection)或發炎的易感性(susceptibility to inflammation)。在特定實施方式中，與年齡相當的控制組動物相比，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物較晚歷經老化相關徵狀的發生。在特定實施方式中，與年齡相當的控制組動物相比，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物與老化相關徵狀的進程較為緩慢。

【0129】在特定實施方式中，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物在譬如肌力和運動協調等方面的老化相關改變之發生時間較晚和/或發展進程較慢。由特定實施方式可知，正常老化過程會伴隨著漸進式的肌肉無力和喪失運動協調性。在特定實施方式中，表現修飾的EKLF多肽之年輕的轉殖基因動物與表現野生型EKLF多肽之年輕控制組動物相比，二者皆展現相似的肌力和運動協調性；而表現修飾的EKLF多肽之老化的轉殖基因動物與表現野生型EKLF多肽之年輕控制組動物相比，表現修飾的EKLF多肽之老化的轉殖基因動物展現較佳的肌力和運動協調性。在特定實施方式中，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物在有生之年隨著年歲漸增，仍能保有約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、大於80%、大於85%、大於90%、大於95%、大於99%的肌力及運動協調性。所

屬技術領域中具有通常知識者已知，適用於測量評估肌力和運動協調性的方法，包含但不限於旋轉試驗和握力試驗。

【0130】 在特定實施方式中，與年齡相當的控制組動物相比，表現修飾的EKLF之老化轉殖基因動物的肌力提升了約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%或約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍(包含所有的數值範圍及其之間的正整數)或大於100倍。在特定實施方式中，與年齡相當的控制組動物相比，表現修飾的EKLF之老化轉殖基因動物的運動協調性提升了約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%或約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍(包含所有的數值範圍及其之間的正整數)或大於10倍。

【0131】 由特定實施方式可知，骨質疏鬆可能發展成一般老化的徵狀，且正常老化會伴隨骨體積和索前軟骨的數量減少以及索前軟骨間隙變大。在特定實施方式中，表現修飾的EKLF之轉殖基因動物終其一生不會出現骨質疏鬆的現象。在某些實施方式中，表現出修飾的EKLF之轉殖基因動物在其有生之年不會發生骨體積和/或索前軟骨數量減少的狀況。在某些實施方式中，表現修飾的EKLF之轉殖基因動物一生中，索前軟骨間隙都不會變大。在特定實施方式中，與年齡相當的表現野生型EKLF之控制組動物相比，在表現修飾的EKLF之轉殖

基因動物的一生中，骨質疏鬆的發生較為緩慢。在某些實施方式中，相較於年齡相當的控制組動物，表現修飾的EKLF之轉殖基因動物一生中，骨體積和/或索前軟骨數量的減少過程較為緩慢。在某些實施方式中，表現修飾的EKLF之轉殖基因動物在其一生中，索前軟骨的間隙變大的過程較為緩慢。

【0132】在特定實施方式中，與年齡相當的控制組動物相比，表現修飾的EKLF之老化轉殖基因動物的骨體積增加約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%或約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍(包含所有的數值範圍及其之間的正整數)或大於10倍。在特定實施方式中，與年齡相當的控制組動物相比，表現修飾的EKLF之老化轉殖基因動物的索前軟骨數量增加約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、200%或約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍(包含所有的數值範圍及其之間的正整數)或大於10倍。在特定實施方式中，與年齡相當的控制組動物相比，表現修飾的EKLF之老化轉殖基因動物的索前軟骨的間隙減小約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100% (包含所有的數值範圍及其之間的正整數)。

【0133】在特定實施方式中，與表現野生型EKLF控制組動物相比，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物發展出細胞增殖性疾病(即，癌症)的機率較低。

在某些實施方式中，與控制組動物相比，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物在一生中得到癌症的機率降低了約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或約100%(包含所有的數值範圍及其之間的正整數)。在特定實施方式中，相較於控制組動物，轉殖基因動物終其一生較不易發展出細胞增殖性疾病，所述細胞增殖性疾病是選自肝癌、大腸癌、乳癌、前列腺癌、肝細胞癌、黑色素瘤、肺癌、神經膠母細胞瘤、腦腫瘤、造血系統惡性腫瘤、視網膜母細胞瘤、腎細胞癌、頭頸癌、子宮頸癌、胰臟癌、食道癌或鱗狀細胞癌。

【0134】由特定實施方式可知，在轉殖基因動物體內表現修飾的EKLF多肽可抑制腫瘤或癌症的生長，或抑制腫瘤、癌細胞或癌前期細胞(precancerous cell)轉移的能力。由某些實施方式可知，在轉殖基因動物體內表現修飾的EKLF多肽可抑制腫瘤、癌細胞或癌前期細胞轉移的能力，但不會改變腫瘤生長的速率。在由特定實施方式得知，相較於經靜脈注射癌前期細胞或癌細胞(如，B16F10黑色素瘤細胞)的控制組動物而言，對表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物靜脈注射癌前期細胞或癌細胞，會顯著減少所述轉殖基因動物體內癌細胞轉移與腫瘤形成。在特定實施方式中，相較於控制組動物中的癌細胞或癌前期細胞，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物體內的癌細胞或癌前期細胞形成腫瘤的可能性也隨之降低。在特定實施方式中，相較於控制組動物中的癌細胞或癌前期細胞，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物體內的癌細胞或癌前期細胞轉移

轉移率也降低。在某些實施方式中，所述癌細胞或癌前期細胞並不包含對EKLF基因座進行修飾且不會表現此一修飾的EKLF。

【0135】 在某些實施方式中，與控制組動物中相對應的細胞相比，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物中的癌前期細胞或癌細胞的生長或轉移減少了約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或約100%(包含所有的數值範圍及其之間的正整數)。在某些實施方式中，癌前期細胞或癌細胞是以靜脈注射方式注射到轉殖基因動物體內。在某些實施方式中，所述細胞是B16F10黑色素瘤細胞。

【0136】 在某些實施方式中，與控制組動物相對應的細胞相比，表現修飾的EKLF多肽之轉殖基因動物的癌前期細胞或癌細胞形成腫瘤的數量降低約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或約100% (包含所有的數值範圍及其之間的正整數)。在某些實施方式中，癌前期細胞或癌細胞是以靜脈注射方式注射至轉殖基因動物體內。在某些實施方式中，所述細胞是B16F10黑色素瘤細胞。

【0137】 本揭示特定的實施方式是關於表現修飾的EKLF多肽之EKLF基因敲入小鼠，其中修飾的EKLF多肽包含至少一修飾的胺基酸，其可防止修飾的EKLF多肽的類小泛素化，且其中EKLF基因敲入小鼠能延長壽命、健康年限，和/或癌抗性以及癌症轉移。特定實施方式是關於表現修飾的EKLF多肽之EKLF

基因敲入小鼠，其中修飾的EKLF多肽包含在其第74個胺基酸位置上以精胺酸置換離胺酸，其中EKLF基因敲入小鼠的壽命較長、健康年限較長和/或對腫瘤發生與癌症轉移有抗性。

**【0138】 鑑別能延長壽命和/或減少腫瘤形成或腫瘤轉移的藥劑的方法**

**【0139】** 本發明包含鑑別活性藥劑的方法，所述藥劑能延長個體的壽命或健康年限、降低腫瘤形成和/或降低腫瘤轉移，其中所述個體可以是哺乳動物(如，人類)。本發明的方法是基於意外地發現EKLF修飾在哺乳動物中體內有上述效果。在此所述「腫瘤形成」是指腫瘤的起始或發生，即，腫瘤的出現(occurrence of a tumor)。在此所述之組合物和方法亦可用以達成或在較長時期內維持與保持年輕或延長壽命相關的特定表現型或特徵，上述特徵涵蓋在此所述或呈現的任何特徵，如，經處理的個體相較於未經處理的同年齡個體能表現以下任一表現型或特徵：頭髮花白減少、運動協調提升、肌力提升、肌肉無力減輕、運動協調提升、骨質疏鬆症狀減少、骨體積增加、骨密度提升、索前軟骨的數量增加、索前軟骨的間隙縮減、平衡力之喪失減低。再者，以下所述的方法能用以鑑別活性藥劑，其能夠使處理後的個體展現上述的表現型或特徵。

**【0140】** 在一特定實施方式中，本發明提供一種鑑別活性藥劑的方法，所述活性藥劑能延長個體壽命或健康年限，和/或抑制腫瘤形成或腫瘤轉移。所述方法包含鑑別足以改變EKLF多肽(如，人類EKLF蛋白)之一或多個轉譯後修飾的藥劑。在一特定實施方式中，所述的轉譯後修飾是類小泛素化或磷酸化。可逆的轉譯後修飾(包含類小泛素化以及磷酸化)對於特定蛋白質(含EKLF)的核移

入(nucleic import)扮演著重要的角色。已知鼠EKLF類小泛素化是位於第75個位置的離胺酸 (Lys74) , 此位置位於共通且帶負電的胺基酸-依賴類小泛素化模體(consensus negatively charged amino acid-dependent sumoylation motif)內。人類EKLF中相應的類小泛素化位置是位於第54個位置的離胺酸(Lys54)。不限於特定的理論, 此處認為類小泛素化有可能或無法減少EKLF的核移位作用。此外, 此處認為類小泛素化可改變EKLF於一或多個EKLF標的基因的轉錄活性(如, 活化子或抑制子活性)。

【0141】類小泛素修飾物(Small Ubiquitin-related Modifier, 簡稱SUMO)是哺乳動物蛋白的修飾物(Sarge, K. and Parke-Sarge, O-K., Methods in Mol. Biol. 2009; 590: 265-277 (2010))。根據該文內容, 蛋白質類小泛素化不會促使蛋白質降解, 卻反而會調控標的蛋白的功能特性, 如, 次細胞定位, 蛋白合作關係(protein partnering)和轉錄因子轉活化等。SUMO蛋白會共價結合至蛋白質之離胺酸殘基, 其通常位於共通模體 $\Psi$ KXE內, 其中 $\Psi$ 是疏水性胺基酸且X是任一殘基。SUMO共價結合至其他蛋白涉及了一系列活體內的酵素步驟。第一, SUMO蛋白於靠近C端處發生蛋白水解, 以產生成熟蛋白, 此一步驟是藉由SUMO蛋白酶(Ulp's)所完成。這些蛋白酶皆有雙功能, 其可從受質蛋白質上藉由切斷接合處的類多肽鍵結, 以切下SUMO基團。在一ATP依存性的反應中, 經成熟處理的SUMO蛋白透過硫酯鍵共價鍵結合到異二聚體SUMO E1活化酵素的SAE2(Uba2)次單元上。SUMO模體由E1轉移至ubc9(即SUMO E2酵素), 接著ubc9結合至標的蛋白中的 $\Psi$ KXE共通序列, 並在SUMO多肽C端的甘胺酸之羧基和所述

序列上離胺酸的 $\epsilon$ -胺基之間形成類多肽鍵結。已知SUMO E3蛋白可藉由與ubc9 (E2 酵素)以及受質兩者的互動來提升SUMO結合的效果，因此，SUMO E3蛋白可作為一橋接因子。脊椎動物細胞包含三種SUMO同種同源物。SUMO-2和SUMO-3的序列非常相似，其與SUMO-1的相似度為約50%，且SUMO-1的特性是三種脊椎動物SUMO蛋白中最為人所熟知的。

【0142】 EKLf上的蛋白激酶C  $\Theta$  (PKC $\Theta$ )-媒介的第68個位置的絲胺酸 (Ser68)磷酸化位置與第74個位置的離胺酸(Lys74)位置相近，且已有推論認為在Lys74上與Ser68磷酸化相關的類小泛素化有利於EKLf的核移入，且EKLf之Ser68磷酸化不僅使得EKLf可由FOE分離出來，且亦可能影響EKLf的類小泛素化，其在紅血球成熟過程中對於EKLf的核移入扮演著重要的調控角色(Yang *et al.* (2006) EMBO J. 25, 5083-5093)。在不限於任何特定的理論上，本揭示內容認為能夠抑制Ser68磷酸化或Lys74類小泛素化的活性藥劑，可能或無法抑制EKLf進入細胞核內的移位，因此，影響EKLf在轉錄層級活化或抑制標的基因的能力。此外，此處認為能夠抑制Ser68磷酸化或Lys74類小泛素化的活性藥劑，可改變EKLf在一或多個EKLf標的基因的轉錄活性，例如，活化子或抑制子活性。

【0143】 在一實施方式，本揭示內容提供一種鑑別活性藥劑的方法。所述方法包含：將EKLf多肽(如，人類EKLf蛋白)與一候選藥劑接觸；以及測量呈現於EKLf多肽上的轉譯後修飾量，其中若EKLf多肽上的轉譯後修飾量顯著不同於(如，少於)預設值或顯著不同於(如，少於)未與候選藥劑接觸的控制組中的量，則認為所述候選藥劑是活性藥劑。在特定實施方式中，所述方法更包含測



量存在於未與候選藥劑接觸之EKLF多肽上的轉譯後修飾量。在一特定實施方式中，所述預設值是零或預設值表示少於10%、20%或50%的轉譯後修飾量或EKLF多肽帶有轉譯後修飾。

**【0144】** 在不同的實施方式中，在進行分析以偵測轉譯後修飾量之前和/或同時，將EKLF多肽與所述候選藥劑接觸，所述分析可以是活體外磷酸化或類小泛素化分析。在特定實施方式中，所述分析包含將EKLF多肽與可對EKLF多肽進行轉譯後修飾的一或多種酵素接觸，且在接觸時同時存有例如，用以連接至EKLF多肽上的化學基團(如磷酸基或SUMO蛋白)，上述所處需持續足夠的時間且是在允許轉譯後修飾進行的條件下；且之後，測定含有轉譯後修飾的EKLF的量或測定存在於EKLF多肽上的轉譯後修飾的量。可將所述EKLF多肽和各種的候選藥劑量接觸，以便譬如測量該候選藥劑的IC50。

**【0145】** 在特定實施方式中，所述轉譯後修飾是類小泛素化，且在進行活體外類小泛素化分析之前或同時，以EKLF多肽接觸所述候選藥劑。所述分析為本領域所知熟知的分析，且亦有可供進行此類分析的套組，如，ENZO類小泛素化套組(Farmingdale, NY, USA)。在特定實施方式中，在SUMO-1、SUMO-2和/或SUMO-3存在下，使EKLF多肽與候選藥劑於足以進行類小泛素化的條件與時間下接觸；接著，利用SUMO專一抗體透過例如SDS-PAGE或西方墨點法(Western blotting)來偵測類小泛素化的EKLF蛋白。

**【0146】** 在特定實施方式中，所述轉譯後修飾是類小泛素化，在存有放射性標誌(如，<sup>35</sup>S-Met)的條件下進行EKLF多肽的活體外轉譯；接著，在將所述

EKLF多肽和SUMO E1和E2酵素以及SUMO-1於足以使其進行類小泛素化的條件與時間下培養之前或同時，讓EKLF多肽與候選藥劑接觸，接著以SDS-PAGE和自動放射顯影術測定使否存在經類小泛素化的EKLF多肽。

【0147】 在特定實施方式中，所述轉譯後修飾是磷酸化修飾，在存有放射性標誌(如，<sup>35</sup>S-Met)的條件下進行EKLF的活體外進行轉譯後修飾；接著，在將所述EKLF多肽和PKC $\Theta$ 以及磷酸基於足以使其進行磷酸化的條件與時間下培養之前或同時，讓EKLF多肽與候選藥劑接觸，接著以自動放射顯影術或IB進行分析。在可任選的實施方式中，可利用SDS-PAGE分離磷酸化蛋白並以質譜儀分析。相關方法請參見「Shyu, Y-C. *et al.*, (2014) *Developmental Cell* 28: 409-422」一文。

【0148】 在另一種實施方式中，本揭示內容提供一種鑑別活性藥劑的方法，包含：將含有EKLF多肽之細胞與一候選藥劑接觸；以及測量該EKLF多肽上的轉譯後修飾量，其中若EKLF多肽上的轉譯後修飾量顯著不同於(如，少於)預設值或顯著不同於(如，少於)未與候選藥劑接觸的控制組中的量，則認為所述候選藥劑是活性藥劑。在一特定實施方式中，所述方法更包含測量存在於未與候選藥劑接觸之EKLF多肽上的轉譯後修飾量。

【0149】 在不同的實施方式中，所述細胞包含EKLF多肽，其包含一外源性導入的EKLF多肽(如，人類EKLF蛋白)。在特定實施方式中，所述細胞包含一可表現外源EKLF蛋白之表現載體。所述表現載體能穩定地整合至細胞之基因體中或暫時存在於細胞中。在特定實施方式中，利用顯微注射或利用脂質傳遞

載體將EKLF蛋白導入細胞中。在特定實施方式中，所述分析包含將EKLF多肽之細胞和一促進或刺激EKLF多肽轉譯後修飾的藥劑(如PMA、EPO、PKC theta活化子或SUMO多肽)在足以進行轉譯後修飾的時間和條件下接觸；接著，測定含有轉譯後修飾的EKLF的量或測定存在於EKLF多肽上的轉譯後修飾的量。可將所述包含EKLF多肽的細胞和不同量的候選藥劑接觸，以測定例如候選藥劑的IC50。

● **【0150】** 在特定實施方式中，所述轉譯後修飾是類小泛素化，在足使EKLF多肽發生類小泛素化的條件與時間下，使所述多肽或細胞與活性藥劑接觸；接著，分析類小泛素化程度。可利用已知技術進行分析，例如，活體內類小泛素化分析。舉例而言，之後可使所述細胞裂解並利用免疫沈澱分析(immunoprecipitation, IP)來偵測類小泛素化蛋白，其中所述免疫沈澱分析可利用結合到EKLF上的初級抗體，物種匹配的非專一性IgG (species-matched non-specific IgG)以及抗SUMO-1、抗SUMO-2或抗SUMO-3抗體(Invitrogen)。● 發明亦可利用其他方法，包含但不限於活體內IP-西方墨點法、IP-MS、DNA轉染、DNA轉染-IP-西方墨點法。例示的方法請參見「Sarge, K. and Parke-Sarge, O-K., *Methods in Mol. Biol.* 2009; 590: 265-277 (2010)」一文。

**【0151】** 在特定實施方式中，所述轉譯後修飾是磷酸化，在足使EKLF多肽發生磷酸化的條件與時間下，使多肽或細胞與活性藥劑接觸；接著，可利用本領域多種已知分析法的任一種來偵測磷酸化EKLF蛋白，所述方法譬如，活體外磷酸化。舉例而言，可使所述細胞裂解，並以免疫沈澱法來偵測磷酸化的EKLF

蛋白，其中所述免疫沈澱法是利用可專一性地結合到磷酸化EKLF (Ser68經磷酸化)的初級抗體，以及利用一可偵測的二級抗體進行偵測。其他適用的例示性方法包括活體內IP-西方墨點法、IP-MS、DNA轉染、DNA轉染-IP-西方墨點法和西方墨點法。

【0152】在不同的實施方式中，本發明包含測量EKLF多肽上轉譯後修飾的量，所述轉譯後修飾是類小泛素化或磷酸化。在特定實施方式中，所述修飾是指鼠EKLF上Lys 74或人類EKLF上Lys 54的類小泛素化或鼠EKLF Ser 68的磷酸化。在特定實施方式中，所述修飾是經由P-PKC $\theta$ (S676)磷酸化。可利用已知的方法測定多肽是否有類小泛素化或磷酸化或修飾的的量。舉例而言，例示性的方法可參見「Yang *et al.* (2006) EMBO J. 25, 5083-5093; Shyu *et al.* (2006) Cell Res. 16, 347-355; Siatecka *et al.* (2007) Mol Cell Biol. 27(24):8547-60; and Shyu, *et al.* (2014) Developmental Cell, 28, 409-422」等文。

【0153】在特定實施方式中，本發明包含測量EKLF多肽上轉譯後修飾的量，若相較於未接觸候選藥劑EKLF多肽上的量，接觸候選藥劑後之EKLF多肽上呈現的轉譯後修飾量少於90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或為0%，則認為該候選藥劑為活性藥劑。在特定實施方式中，若呈現於EKLF多肽的轉譯後修飾量小於或等於預設閾值，則認定該候選藥劑為活性藥劑，其中所述預設閾值可利用已知抑制磷酸化或類小泛素化的藥劑測定而得。在一特定實施方式中，所述預設閾值是零。

【0154】在特定實施方式中，本發明揭示一種鑑別一活性藥劑的方法，所述活性藥劑能延長個體的預期壽命、生命年限或健康年限和/或抑制腫瘤形成或腫瘤轉移；所述方法包含鑑別能改變EKLF多肽(如，人類EKLF蛋白)的一或多種活性的藥劑。在特定實施方式中，所述活性是核移位活性、轉錄活性或轉錄抑制活性。資料顯示，在紅血球系祖細胞和前驅細胞中，EKLF主要位於細胞質內，且在紅血球成熟的過程中，EKLF會從細胞質移位至細胞核中(Yang *et al.* (2006) EMBO J. 25, 5083-5093)。在不受特定理論的限制下，據信EKLF的核移入作用對於成體球蛋白基因轉錄的活化作用是必要的。EKLF交互因子(即，Foe of EKLF, FOE)可與EKLF交互作用並將其隔離在細胞質中，並因此決定了EKLF在紅血球祖細胞中的功能性限制，這又進一步可調控在紅血球系細胞由CFU-E/Pro-E轉變至Baso-E的過程中，EKLF對於一系列紅血球基因的活化作用或抑制作用。

【0155】在另一實施方式中，本揭示內容提供一種鑑別活性藥劑的方法；所述方法包含：將一含有EKLF多肽之細胞(如，人類EKLF蛋白)與一候選藥劑接觸；以及測量EKLF多肽的活性量，其中若EKLF多肽的活性量顯著不同於(如，大於或小於)預設值，或顯著不同於(如，大於或小於)未與候選藥劑接觸的控制組，則認為該候選藥劑為活性藥劑。在特定實施方式中，所述方法是利用一EKLF多肽而非利用含有EKLF多肽的細胞，例如，當所述活性是轉錄活化子活性或抑制子活性時。

【0156】用以測定多肽的核定位作用的方法為本領域所熟知的方法。舉例而言，所述方法可參照以下文獻所揭示的內容「Yang *et al.* (2006) EMBO J. 25, 5083-5093」，以利用譬如免疫螢光法來測定EKLF多肽的次細胞(如：細胞質或細胞核)定位。因此，在一方法中，在足以進行核定位的條件與時間下，將含EKLF多肽之細胞與候選藥劑接觸，接著以免疫螢光法利用EKLF專一性抗體來測定EKLF多肽之次細胞定位。在特定實施方式中，所述分析是利用巨核細胞(megakaryocyt)/紅血球系祖細胞、或成熟紅血球來進行。在特定實施方式中，上述分析所利用的細胞是在CFU-E/Pro-E轉變至Baso-E的過程之前、之中或之後處於分化階段的細胞。在特定實施方式中，所述細胞為經分類的CFU-E/ProE、Baso-E、PolyCh-E或OrthoCh-E細胞。相關的方法請參見「Y-C. *et al.*, (2014) Developmental Cell 28: 409-422」一文。

【0157】可利用習知方法測定EKLF多肽的轉錄活性(如，轉錄活化作用或抑制作用)，所述方法包含用以測定EKLF與標的多核苷酸序列之結合的分析，或反轉錄活化子活性或抑制子活性，上述分析例如，利用帶狀移位(band-shift)分析來測量EKLF與標的啟動子或增強子序列之結合、利用EKLF多肽和報導構築體(reporter constructs)進行活體外轉錄分析、以及使用定量聚合酶反應(polymerase chain reaction, PCR)來測定譬如在細胞中受到EKLF活化或抑制的基因之mRNA表現量。受到EKLF調控的基因包含，但不限於：EKLF正調控的基因，如，alpha球蛋白、beta球蛋白、Epb4.9、Tspo2和Fn3k；以及EKLF負調控的基因，如，Hecw1、Nrip3和Jak3。其他已知受EKLF調控的基因，可參照以

「Bieker *et al.* 1995, *Mol. Cell. Biol.* 15:852-860; Chen and Bieker, 2004, *Mol. Cell. Biol.* 24:10416-10424; Chen and Bieker, 2001, *Mol. Cell. Biol.* 21:3118-3125; Miller and Bieker, 1993, *Mol. Cell. Biol.* 13:2776-2786.」等文所揭示的內容。在特定的實施方式中，測定Colla和/或Mpv171基因的mRNA。在本揭示內容的實施例中，在壽命較長且腫瘤發生和轉移率較低的突變小鼠中，上述基因的mRNA的量皆降低。在特定實施方式中，將含EKLF多肽之細胞與候選藥劑接觸，並測定任一所述基因的表現量，如，藉由RT-PCR，以決定該些基因的表現量相較於譬如對照量或未接觸候選藥劑的細胞是否改變。

【0158】 在特定實施方式中，於足以使EKLF結合至一多肽的條件與時間下，將EKLF多肽與含有EKLF結合位的經標記多核苷酸進行培養，並在上述培養之前或同時，使EKLF多肽與候選藥劑。利用帶狀移位分析來決定結合至所述多核苷酸的EKLF量。

【0159】 在特定實施方式中，於足以使報導基因轉錄的條件與時間下，利用與一啟動子或增強子可操作地連接之報導基因進行活體外轉錄分析，並在上述分析之前或之後，將EKLF多肽(如，人類EKLF蛋白)與一候選藥劑接觸。可利用定量PCR或藉由偵測測定報導蛋白(譬如，利用螢光報導蛋白的螢光量，或利用可結合至報導蛋白的抗體)來決定經轉錄的報導基因mRNA或蛋白。

【0160】 在特定實施方式中，將含EKLF多肽(如，人類EKLF蛋白)的細胞與候選藥劑接觸，並經過足以讓EKLF活化或抑制任一標的基因的時間，接著藉

由測量標的基因mRNA或所編碼產生的蛋白量(例如，利用定量PCR或利用一專一性結合標的基因的抗體進行免疫分析)，以決定標的基因的表現量。

**【0161】** 在特定實施方式中，所述方法包含測量EKLF之核移位作用，相較於未與候選藥劑接觸之EKLF多肽於細胞質中的量，若與候選藥劑接觸的EKLF多肽於細胞質中的量低於90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或為0%，則認定該候選藥劑為活性藥劑。在特定實施方式中，若細胞質中的EKLF多肽的量少於或等於預設閾值，則認定所述候選藥劑是活性藥劑，其中可基於在以下細胞的細胞質中所觀察到的量，來決定所述預設閾值；上述細胞為巨核細胞/紅血球祖細胞、成熟紅血球細胞、在由CFU-E/Pro-E轉變為Baso-E的過程之前、之中或之後處於不同分化階段的細胞、或經分類的CFU-E/ProE、Baso-E、PolyCh-E或OrthoCh-E細胞。在特定實施方式中，預設閾值是80%、50%或10%。在特定實施方式中，本發明包含測量EKLF之核移位作用，相較於未與候選藥劑接觸的EKLF多肽於細胞核中的量，若與候選藥劑接觸的EKLF多肽於細胞核中的量高出90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%，則認定所述候選藥劑是活性藥劑。在特定實施方式中，若在細胞核中EKLF多肽的量小於或等於預設閾值，則認定所述候選藥劑為活性藥劑，所述預設閾值是基於在Baso-E細胞核中所測定的量而決定。在特定實施方式中，預設閾值是80%、50%或10%。

**【0162】** 在一特定實施方式中，本發明包含測量EKLF的轉錄活化子活性，相較於在存有EKLF多肽的條件下但未與候選藥劑接觸的標的基因之表現量，若



在存有EKLF的條件下與欲研究的候選藥物接觸的標的基因之表現量少於90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或為0%，則認定所述候選藥劑為活性藥劑。在特定實施方式中，本發明包含測量EKLF之抑制子活性，相較於在存有EKLF多肽的條件下但未與候選藥劑接觸的標的基因之表現量，若在存有EKLF的條件下與欲研究的候選藥物接觸的標的基因之表現量增加了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、100%、200%、500%或1000%，則認定所述候選藥劑為活性藥劑。

【0163】 在其他實施方式中，本發明提供一種鑑別活性藥劑的方法，其中所述活性藥劑能延長個體壽命或健康年限和/或抑制腫瘤形成或腫瘤轉移，所述方法包含：施用一候選藥劑至一轉殖基因動物(如，在此所述之基因敲入動物)；以及比較轉殖基因動物(如，基因敲入)在施用了候選藥劑之後的壽命以及未施用候選藥劑的控制組動物的壽命，其中若轉殖基因動物的壽命比控制組動物來得長，則所述候選藥劑是能夠延長個體壽命或健康年限和/或抑制個體腫瘤形成或腫瘤轉移的活性藥劑。在特定實施方式中，相較於未經活性藥劑處理的動物，經活性藥劑處理的動物其壽命至少延長了5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在特定實施方式中，所述轉殖基因動物是一基因敲入非人類哺乳動物，其兩個EKLF對偶基因皆經過修飾，以減少Lys74的類小泛素化或Ser68磷酸化修飾。在特定實施方式中，兩個EKLF對偶基因皆包含在Lys74或Ser68位置上的一胺基酸置換。在特定實施方式中，所述胺基酸置換是K74R。

【0164】 可利用任何方式以所欲方式和/或適當的給藥途徑將候選藥劑施用至動物，以利檢驗所增加的長壽活性或所減少的腫瘤形成。舉例而言，可利用注射(如，靜脈注射、肌肉內注射、皮下注射)、經口灌注或其他合適的方式來施用所述候選藥劑。

【0165】 對動物施用候選藥物時可能涉及給予不同劑量的候選藥劑，且可能包含給予不同配方的該藥劑或利用不同的給藥途徑。可藉由對動物(如，轉殖基因動物)施用候選藥劑，並評估其對於轉殖基因動物之壽命的影響，以便評估候選藥劑中止或減緩正常老化過程的能力。可藉由對野生型動物或未經引入會導致壽命延長之EKLF K74R突變的動物施用候選藥劑，以評估候選藥劑防止老化的能力。

【0166】 在另一實施方式中，本發明提供的方法可用以鑑別能夠延長預期壽命、生命年限或健康年限或減少腫瘤形成或腫瘤轉移的候選標的，所述方法包含：測量野生型動物(或野生型細胞)中受到EKLF多肽所調控的一或多個基因的表現量；以及測量此處所述可表現修飾的EKLF多肽之動物(或細胞)中受到EKLF多肽調控的上述一或多個基因的表現量，其中在所述二種動物(或細胞)間，表現量有顯著差異的基因可認定為候選治療標的。在多個特定實施方式中，所述基因包含一或多個此處所述受到EKLF調控的各種基因。在特定實施方式中，所測量的表現量是指由所述一或多個基因轉錄的mRNA量或所述一或多個基因所編碼產生的多肽量。可利用已知的先前技術來測定樣本中mRNA的量，例如，使用定量聚合酶鏈反應(qPCR)。再者，可利用已知先前技術測定樣本中多肽的

量，例如，ELISA、免疫沈澱法或FACS，這些方法通常可利用能夠專一性結合至所編碼產生之多肽的抗體。在特定實施方式中，可測定該動物的一或多種特定細胞類型中所述一或多個基因的表現量；上述細胞類型例如：骨髓細胞、紅血球細胞、血液細胞、紅血球細胞和/或巨核祖細胞、或多能祖細胞。可利用已知的步驟從動物中分離所述細胞；所述方法包括例如，FACS法，其利用結合至這些細胞類型上所呈現的特定細胞表面標記之抗體。在特定實施方式中，所述轉殖基因動物是一基因敲入非人類哺乳動物，其兩個EKLF對偶基因皆經過修飾，以減少Lys74的類小泛素化或Ser68磷酸化修飾。在特定實施方式中，兩個EKLF對偶基因皆包含在Lys74或Ser68位置上的一胺基酸置換。在特定實施方式中，所述胺基酸置換是K74R。

【0167】 受到EKLF所調控的基因之實施例包含，但不限於：EKLF正調控的基因，如，alpha球蛋白、beta球蛋白、Epb4.9、Tspo2和Fn3k；以及EKLF負調控的基因，如，Hecw1、Nrip3和Jak3。在特定實施方式中，相較於本發明修飾的EKLF動物(或細胞)，在野生型動物中(或細胞)表現量較高的基因(及其所編碼產生的蛋白)可作為降低其表現或抑制其活性(如，在表現層次或在蛋白層次量)之藥劑的作用標的。在特定實施方式中，相較於本發明修飾的EKLF動物(或細胞)，在野生型動物(或細胞)中表現量較低的基因(及其所編碼產生的蛋白)可作為能促進其表現或提升其活性之藥劑的作用標的，所述藥劑如基因治療載體。

【0168】 在特定實施方式中，本揭示內容揭示一種基於基因表現量或其所編碼產生之蛋白的量的差異來鑑別活性藥劑的方法，所述方法更包含針對經鑑別在野生型動物或細胞中和在修飾的EKLF動物或細胞中，表現量會有差異的基因或其所編碼產生的蛋白，鑑別已知可調控所述基因或蛋白之表或活性的藥劑。可利用多種方法來鑑別所述藥劑，例如，參考科學期刊或資料庫所揭示的關於特定化學物質如何影響特定基因表現之資訊，或基於該差異化表現之蛋白已知的功能活性。

【0169】 在一實施方式中，本發明提供的方法可用以鑑別能夠延長個體預期壽命、生命年限或健康年限或減少腫瘤形成或腫瘤轉移的活性藥劑，所述方法包含：將可表現修飾的EKLF對偶基因之細胞與一候選藥劑接觸，其中相較於野生型EKLF多肽，所述修飾的EKLF對偶基因編碼產生一修飾的EKLF多肽，且其包含一或多個修飾的胺基酸；以及測量修飾的EKLF多肽的表現量，其中若修飾的EKLF多肽的表現量高於未與候選藥劑接觸的控制組細胞之表現量，則所述候選藥劑為能夠增加個體的壽命和/或抑制腫瘤形成的活性藥劑。

【0170】 在特定實施方式中，在此所述任一用以鑑別活性藥劑的方法，更包含一或多個其他步驟，如，確認或驗證所述候選藥劑對於哺乳動物能產生欲求效果。在一實施方式中，所述方法更包含對哺乳動物提供經鑑別的活性藥劑，以及測定哺乳動物是否有一或多個與長壽、延長生命年限、延長健康年限相關的特徵(相較於未經活性藥劑處理的哺乳動物而言)。舉例而言，所述特徵是指經處理的哺乳動物比未經處理的同齡哺乳動物具下列特徵：頭髮花白減少、運

動協調性提升、肌力提升、骨質疏鬆症發生率降低、骨體積增加、骨密度增加、索前軟骨的數量增加或索前軟骨的間隙縮減。此外，可檢驗與老化相關的細胞性質變化，或者是檢驗組織或器官結構或功能上的變化。在一實施方式中，本方法更包含對哺乳動物提供一經本發明方法鑑別出的活性藥劑，以及決定該哺乳動物相較於未經活性藥劑處理的哺乳動物是否具有一或多個與降低腫瘤形成或腫瘤轉移相關的特徵。

● **【0171】** 在本發明任一篩選分析法的實施方式中，EKLF多肽是一野生型EKLF多肽或其片段，其能被磷酸化和/或類小泛素化。在一特定實施方式中，所述片段包含EKLF多肽之連續胺基酸的至少10%、20%、30%、40%、50%、70%、80%或90%的片段。在特定實施方式中，一EKLF多肽與野生型EKLF多肽或其片段有至少80%、85%、90%、95%或98%的相似度。在特定實施方式中，野生型EKLF多肽是哺乳動物EKLF，如，小鼠、人類、大鼠或兔子EKLF多肽，包含但不限於在此所述的任一種多肽。在特定實施方式中，EKLF多肽是修飾的EKLF多肽，其包含但不限於包含一修飾的胺基酸之EKLF多肽，其中所述修飾可以是對在此所述之類小泛素化位置或磷酸化位置進行取代置換。在特定實施方式中，EKLF多肽對於細胞而言，是內源性多肽；但在其他實施方式中，EKLF多肽對於細胞而言，是外源性多肽，或已導入至細胞內。在特定實施方式中，所述細胞包含能表現EKLF多肽的外源性核酸。在特定實施方式中，所述細胞是在此所述之轉殖基因細胞或來自在此所述之轉殖基因動物。

【0172】 可利用譬如此處所建立之非人類轉殖基因動物模型，來篩選具有可延長壽命或降低腫瘤形成活性的候選藥劑，適用於所述篩選的候選藥劑包含，但不限於，合成、存在於天然界或以重組方式產生的分子，包含小分子、胜肽、抗體及多肽。候選藥劑可以從多種不同來源所取得，包含合成或天然化合物資料庫。舉例而言，可利用本領域已知的組合資料庫中多種不同方式的任一種方式來獲得候選藥物，上述組合資料庫包含生物資料庫、空間可定位平行固相或液相資料庫(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries)；經由運算 (deconvolution)所得之合成資料庫的方法（需解卷積(deconvolution)）、一珠一化合物(one-bead one compound)資料庫，以及利用親和性管柱篩選的合成資料庫。生物資料庫的方法包含多肽資料庫(雖然亦有其他可應用至胜肽的方案)、非胜肽寡聚物或化合物之小分子資料庫。

【0173】 在一特定實施方式中，活性藥劑(和候選藥劑)是小分子有機化合物、胜肽、蛋白質、多核苷酸、非胜肽化合物、合成化合物、發酵產物或細胞萃取物。在特定實施方式中，小分子有機化合物的分子量為大於50至小於約20,000道耳吞(daltons)。在特定實施方式中，蛋白質是抗體或其片段，如，scFv、奈米抗體等。在特定實施方式中，活性藥劑是可結合至EKLF的一抗體或其片段，藉以防止EKLF之Ser68的磷酸化和/或Lys74的類小泛素化。在特定實施方式中，所述抗體或其片段可結合至EKLF上的一區域，此區域包含EKLF第68-74個胺基酸殘基的區域或與其重疊。

【0174】在特定實施方式中，多核苷酸可以是單股或雙股DNA或RNA，且包含其經過修飾的形式，包含帶有修飾的核酸鹼基和/或修飾的核酸間鍵結者，所述修飾可增加穩定性或有效性。在特定的實施方式中，多核苷酸可結合至EKLF基因或mRNA和/或抑制其表現或轉譯。在特定實施方式中，多核苷酸是RNA干擾劑、siRNA、shRNA、多價siRNA或miRNA。可利用電腦模擬程式來設計可結合至EKLF基因或mRNA之多核苷酸，所述程式可鑑別一基因或mRNA理想的標的位置(參見，如，Halo-Bio RNAi Therapeutics, Seattle, WA)。在特定實施方式中，多核苷酸藥劑有一區域和EKLF之DNA或mRNA的序列為同源區域或互補區域；所述區域為例如，至少6核苷酸、至少8核苷酸、至少12核苷酸、至少16核苷酸、至少24核苷酸或至少30核苷酸。在特定實施方式中，所述候選藥劑可以是已知能減少或抑制磷酸化或類小泛素化的化合物。

【0175】在特定實施方式中，在此所述的分析是在包含多種候選藥劑的資料庫中鑑別活性藥劑。在特定實施方式中，所述資料庫包含多種小分子有機化合物、胜肽、蛋白或多核苷酸。已有多種已知且可商業取得的小分子有機化合物資料庫，可依據本發明的實施方式運用這些資料庫。

【0176】用以增強預期壽命、生命年限或健康年限以及降低腫瘤形成或腫瘤轉移的方法

【0177】本發明進一步提供用以增加一個體預期壽命、生命年限或健康年限的方法，以及用以抑制有需要個體的腫瘤形成或腫瘤轉移的方法。依據本實施例所揭示內容，本發明發明人意外地發現對哺乳動物EKLF多肽的類小泛素化

位置進行修飾，能增加哺乳動物的預期壽命和提升生命年限與健康年限，以及降低哺乳動物的腫瘤形成以及腫瘤轉移。此外，利用帶有黑色素瘤的小鼠進行試驗，以探討EKLF K74R對於癌細胞所扮演的角色。出乎意料地，EKLF K74R對偶基因的表現能夠防止癌性黑色素瘤細胞轉移。因此，本揭示內容的進一步態樣是提供能夠治療患有細胞增殖性疾病之個體的方法。在不限定於任何理論下，據信對類小泛素化位置進行修飾，能夠抑制或破壞EKLF多肽的類小泛素化，這會改變EKLF多肽活性以達到延年益壽以及降低腫瘤形成和腫瘤轉移的效果。

**【0178】** 因此，本發明包含用以增加或增強一個體預期壽命、生命年限或健康年限的方法，以及用以抑制腫瘤形成或腫瘤轉移的方法；所述方法包含提供本發明之修飾的EKLF多肽給所述個體，和/或提供可改變個體內源性或野生型EKLF多肽活性的第一活性藥劑。在特定實施方式中，亦可對該個體提供一第二活性藥劑，其中第二活性藥劑可降低個體內源性、野生型EKLF多肽的活性及表現。在特定實施方式中，所述個體是一哺乳動物，如，人類或非人類哺乳動物。第一活性藥劑、第二活性藥劑和/或修飾的EKLF多肽皆可以一有效量提供予所述個體。可藉由對個體施用修飾的EKLF多肽或可編碼產生該修飾的EKLF多肽的多核苷酸，將修飾的EKLF多肽提供予該個體。在特定實施方式中，所述修飾的EKLF多肽是修飾的人類EKLF多肽。在特定實施方式中，所述修飾的EKLF多肽包含能夠抑制其類小泛素化的一突變。在特定實施方式中，所述修飾的EKLF多肽包含在Lys54位置的修飾。在此提供的方法亦可用以達成或



在較長時期內維持與保持年輕或延長壽命相關的特定表現型或特徵，上述特徵涵蓋在此所述或呈現的任何特徵，如，經處理的個體相較於未經處理的同年齡個體能表現以下任一表現型或特徵：頭髮花白減少、運動協調性提升、肌力提升、骨質疏鬆症降低、骨體積增加、骨密度提升、索前軟骨的數量增加或索前軟骨間の間隙縮減。

【0179】 在特定的實施方式中，所述個體是哺乳動物(如，人類)。在特定實施方式中，所述個體經診斷為罹患或可能罹患腫瘤或腫瘤轉移。在特定實施方式中，所述個體經診斷為罹患或可能罹患與老化相關的疾病或癥狀。在特定實施方式中，個體的年齡為至少20歲、至少30歲、至少40歲、至少50歲、至少60歲、至少70歲、或至少80歲。

【0180】 在一實施方式中，本發明包含治療或防止一有需要個體中的細胞增殖性疾病(如，腫瘤形成或腫瘤轉移)的方法，所述方法包含對該個體施用一有效量之多肽或可編碼產生該多肽的核酸，其中所述多肽是修飾的的EKLF多肽，其包含一或多個修飾的胺基酸，使得其類小泛素化程度和/或核移位作用低於野生型EKLF多肽的類小泛素化程度和/或核移位作用。在特定實施方式中，修飾的EKLF多肽是修飾的人類EKLF多肽。在特定實施方式中，修飾的EKLF多肽的類小泛素化程度低於野生型EKLF多肽的類小泛素化程度。在特定實施方式中，修飾的EKLF多肽從細胞質至細胞核的移位作用低於野生型EKLF多肽。在特定實施方式中，相較於野生型EKLF多肽，修飾的EKLF多肽具有修飾的的轉錄活化子活性或修飾的的抑制子活性。在不同的實施方式中，所述一或多個

修飾的胺基酸包含在野生型EKLF多肽上會被類小泛素化或磷酸化的胺基酸位置進行修飾；譬如在全長小鼠野生型EKLF多肽上的第74個胺基酸進行修飾(例如，以精胺酸置換離胺酸(K74R))、或全長人類野生型EKLF多肽上的第54個胺基酸進行修飾(例如以精胺酸置換離胺酸(K54R))，或者是全長野生型EKLF多肽上的第68個胺基酸進行修飾。本發明的一方法包含對一個體施用一有效量的多肽或可編碼產生該多肽的核酸，其中所述多肽是修飾的人類EKLF，並且在EKLF多肽片段上第54個位置的離胺酸經過突變，非必要的是以精胺酸取代。在特定實施方式中，修飾的人類EKLF在第54個位置上未經類小泛素化。

【0181】 可利用多種不同方式將多肽施用至一個體，包含以「裸露的(naked)」多肽或和利於遞送的藥劑複合。在特定實施方式中，將所述多肽與可增強細胞吞噬作用的藥劑一起遞送。可以藉由不同的方式將核酸施用至一個體，包含「裸露的」DNA或RNA或與脂質複合或包覆於脂質顆粒內。在特定實施方式中，將一核酸(如，一多核苷酸)施用至所述個體時，該核酸是存在於一表現載體中。在特定的實施方式中，該核酸是存在於病毒載體中。所述病毒載體可以是複製能力缺陷或有複製能力的病毒載體。在各種不同的實施方式中，所述病毒載體是來自於疱疹病毒、反轉錄病毒、慢病毒(lentivirus)、牛痘病毒、減毒牛痘病毒、金絲雀痘病毒、腺病毒或腺相關病毒。該核酸可存在於一表現載體中，其中編碼產生所述修飾的EKLF多肽的核酸序列是可操作地連接至一啟動子或增強子-啟動子組合(enhancer-promoter combination)。適合的表現載體包含質體和病毒載體，如，疱疹病毒、反轉錄病毒、牛痘病毒、減毒牛痘病毒、金絲

雀痘病毒、腺病毒以及腺相關病毒。在特定實施方式中，該核酸可操作地連接至啟動子序列和任選地增強子連接。在特定實施方式中，啟動子和/或增強子使得該核酸和其編碼的多肽具有組織特異性的表現。在特定實施方式中，啟動子和/或增強子是EKLF基因啟動子和/或增強子，且其使得核酸能夠具有和內源性EKLF相似或相同的表現模式。

【0182】 可利用習知的聚合物、生物可降解微粒或微膠囊遞送裝置來遞送上述的核酸或多核苷酸。另一種使宿主攝入核酸的方法是利用標準方法製備而成的脂質體。可將多核苷酸單獨併入上述傳遞載體或與組織專一性抗體共同併入載體中。在可任選的實施方式中，可製備一分子接合物，其係由質體或其他載體和聚-L-離胺酸(poly-L-lysine)所組成，其中兩者是藉由靜電或共價力而結合。聚離胺酸可結合至一配體(ligand)，所述配體可結合至標的細胞上的受體(Cristiano, *et al.*, 1995, J. Mol. Med. 73:479)。在可任選的實施方式中，可使用習知的組織專一性轉錄調控元件來實現組織專一性的標的作用。要達到活體內(*in vivo*)表現的另一種方法是將「裸露的」DNA(即，未與傳遞載體結合者)遞送到肌肉內、皮內或皮下位置。

【0183】 可利用已知方法合成或利用重組技術來製備所述多肽。舉例而言，可以將可編碼產生所述多肽(如，具K74R突變的修飾的EKLF)的核酸轉殖到表現載體中，其中該核酸是可操作地連接至能夠在宿主細胞中表現所述多肽的適當調控序列。本領域技術人員可載體導入至宿主細胞中以表現所述多肽。可利用

已知方法，硫酸銨沈澱法及分餾管柱層析法，從宿主細胞中純化經表現的重組多肽。可根據此處所述的方法來測定利用上述方法製得之多肽的活性。

【0184】 在特定的實施方式中，是將所述多肽或核酸施用至所述個體，且所述方法包含對該個體施用一第二活性藥劑，其中該第二活性藥劑可抑制內源性EKLF多肽的表現。在特定實施方式中，該第二活性藥劑是一核酸分子，可任選的是一負股RNA、siRNA、shRNA或miRNA，且其可結合至編碼內源性EKLF多肽的mRNA或其互補序列。

【0185】 在一實施方式中，本發明包含治療或防止一有需要個體中一細胞增殖性疾病(如，腫瘤形成或腫瘤轉移)的方法，所述方法包含對該個體施用有效量的活性藥劑，所述活性藥劑能抑制內源性EKLF多肽的類小泛素化和/或降低內源性EKLF多肽從細胞質至細胞核的移位作用。在一實施方式中，所述活性藥劑可抑制類小泛素化。在一實施方式中，所述活性藥劑可降低移位作用。

【0186】 在一實施方式中，本發明包含治療或防止一有需要個體中的細胞增殖性疾病(如，腫瘤形成或腫瘤轉移)的方法，所述方法包含對該特體施用有效量的活性藥劑，所述活性藥劑能改變內源性EKLF多肽的一或多種活性。在一實施方式中，所述活性藥劑可抑制類小泛素化。在一實施方式，所述活性藥劑能降低移位作用。在一特定實施方式中，所述活性藥劑可修飾內源性EKLF多肽的轉錄活化子活性或抑制子活性。

【0187】 在一特定實施方式中，本發明方法所使用的活性藥劑可結合至內源性EKLF多肽。在特定實施方式中，活性藥劑是有機小分子或多肽，非必要的是一抗體或其功能性片段。

【0188】 本發明之方法可用以治療或防止多種細胞增殖性疾病，包含但不限於腫瘤和腫瘤轉移，包含但不限於此處所述者。在特定實施方式中，腫瘤或腫瘤轉移是肝癌、大腸癌、乳癌、前列腺癌、肝細胞癌、黑色素瘤、肺癌、神經膠母細胞瘤、腦瘤、造血系統惡性腫瘤、視網膜母細胞瘤、腎細胞癌、頭頸癌、子宮頸癌、胰臟癌、食道癌或鱗狀細胞癌。

【0189】 在特定實施方式中，治療或防止細胞增殖性疾病的方法更包含對一個體施用有效量之抗增殖劑，以治療細胞增殖性疾病。在特定實施方式中，抗增殖劑是一烷化劑、拓撲異構酶抑制劑、抗代謝物或細胞毒性抗生素。在某些實施方式中，烷化劑是順鉑、卡鉑定、益樂鉑、甲基二(氯乙基)胺、環磷醯胺、氮芥苯丙胺酸、氮芥苯丁酸、依弗醯胺、二甲磺酸丁酯、N-亞硝-正-甲脛、雙氯乙基亞硝脛、環己亞硝、司莫司汀、福莫司汀、鏈佐黴素、達卡巴仁、米托唑胺、替莫唑胺、沙奧特帕、絲裂霉素或地亞農。在某些實施方式中，拓撲異構酶抑制劑是喜樹鹼、依瑞諾丁、托普迪肯、依妥普賽、艾黴素、坦尼坡賽、諾波黴素、美巴龍和阿柔比星。在某些實施方式，抗代謝物是氟嘧啶、去氧核酸類似物、硫嘌呤、甲氨蝶呤或培美曲塞。在某些實施方式中，細胞毒性抗生素是放線菌素、博萊黴素、普卡黴素、絲裂黴素、艾黴素、柔紅黴素、表阿黴素、伊達比星、泛艾黴素、阿柔比星或米托蒽醌。

【0190】 在其他實施方式中，本發明包含延長一個體壽命或健康年限的方法，該方法包含對該個體施用一有效量的多肽或編碼產生該多肽的核酸，其中該多肽為修飾的EKLF多肽，其包含一或多個修飾的胺基酸，以使得其類小泛素化和/或核移位作用程度低於野生型EKLF多肽的類小泛素化和/或核移位作用程度。在特定實施方式中，修飾的EKLF多肽的類小泛素化程度低於野生型EKLF多肽。在特定實施方式中，修飾的EKLF多肽核從細胞質到細胞核的移位作用低於一野生型EKLF多肽。在特定實施方式中，修飾的EKLF多肽的轉錄活化子活性或抑制子活性與野生型EKLF多肽不同。在特定實施方式中，該核酸是存在於一表現載體中。在特定的實施方式中，該核酸是存在於病毒載體中。在多種不同的實施方式中，病毒載體是來自於疱疹病毒、反轉錄病毒、牛痘病毒、減毒牛痘病毒、金絲雀痘病毒、腺病毒或腺相關病毒。在不同的實施方式中，所述一或多個修飾的胺基酸包含在野生型EKLF多肽上會被類小泛素化或磷酸化的胺基酸位置上進行修飾；譬如在全長野生型EKLF多肽上的第74個胺基酸進行修飾(例如，以精胺酸置換離胺酸(K74R))或者是全長野生型EKLF多肽上的第68個胺基酸進行修飾。

【0191】 在特定實施方式中，是將多肽或核酸施用至所述個體，所述方法更包含對該個體施用一第二活性藥劑，其中第二活性藥劑可抑制內源性EKLF多肽的表現。在特定實施方式中，該第二活性藥劑是一核酸分子，可任選的是一負股RNA、siRNA、shRNA或miRNA，其可結合至可編碼產生內源性EKLF多肽的mRNA或其互補序列。

【0192】 在一實施方式中，本發明包含延長個體壽命或健康年限的方法，包含對該個體施用一有效量活性藥劑，所述活性藥劑可抑制內源性EKLF多肽之類小泛素化和/或降低內源性EKLF多肽從細胞質至細胞核之移位作用。在一實施方式中，所述活性藥劑可抑制類小泛素化。在一實施方式中，所述活性藥劑可降低移位作用。

【0193】 在一實施方式中，本發明包含延長個體壽命或健康年限的方法，包含對該個體施用一有效量的活性藥劑，所述活性藥劑可改變內源性EKLF多肽的一或多種活性。在一實施方式中，所述活性藥劑可抑制類小泛素化。在一實施方式中，所述活性藥劑能降低移位作用。在一特定實施方式中，所述活性藥劑可修飾內源性EKLF多肽的轉錄活化子活性或抑制子活性。

【0194】 本發明更包含藥學組合物，其包含一編碼產生一修飾的EKLF之多核苷酸、一修飾的EKLF多肽、一候選藥劑或一活性藥劑，和一或多個藥學上可接受賦形劑、稀釋劑或載體。可利用包含以上任一種的藥學組合物來進行本發明所提出的方法。本發明的實施方式包含多種組合物，其包含修飾的EKLF多肽、可編碼產生此一修飾的EKLF多肽之多核苷酸或活性藥劑，上述成分可調配於藥學上可接受或生理上可接受的溶液中，以供單獨施用或和一或多個其他治療模式併用於一細胞、個體或動物。可以理解的是，若有需要，亦可將本發明之組合物和其他藥劑(如，其他蛋白質或多肽或各種具藥學活性的藥劑)共同施用。可包含在本組合物中的其他成分基本上沒有限制，只要所述額外的藥劑不會對於要達到的調控或其他效果有負面影響即可。

【0195】 在本發明的藥學組合物中，藥學上可接受賦形劑和載體溶液的配方以及將此處所述的特定組合物用於各種治療方案時是用的給藥方式與治療方案都是所屬技術領域中具有通常知識者所熟知的，所述治療方案包括，例如，口服、腸胃外、靜脈內、經鼻和肌肉內等施用途徑和配方。

【0196】 在特定的狀況下，想要將此處所述的藥學組合物以以下途徑施用：腸胃外、皮下、靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、腦實質內、腦池內、腦室內、尿道內、胸骨內、頭顱內、滑膜內或腹膜內施用，譬如，請參見以下專利文獻 U.S. Pat. No. 5,543,158、U.S. Pat. No. 5,641,515和U.S. Pat. No. 5,399,363 (在此所列示的每一文獻皆併入本發明的內容)。適用於腸胃外施用的裝置包含針注射器(含微針)、無針注射器和灌注技術。

【0197】 活性化合物的溶液中含有游離鹼基形式的活性化合物或其藥學上可接受鹽類，可在水中將其和表面活性劑(如，羥丙基纖維素)適當地混合以製備所述溶液。亦可將其製備為分散液，如在甘油、液態聚乙二醇和其混合物中以及在油類中製備。在一般的儲存和使用條件下，所述製備物包含一防腐劑以防止微生物生長。

【0198】 適用於注射的藥學形式包含無菌水溶液或分散劑和可用以即時製備無菌注射溶液或分散液的無菌粉末，(U.S. Pat. No. 5,466,468，在此所列示的每一文獻皆併入本發明內容)。在任何條件下，藥學形式應為無菌的且應為具備可供注射的流體性質。所述藥物配方在製備和儲存的條件下必須是穩定的，且應經過防腐處理而能夠抵抗微生物(如，細菌和真菌)的污染。所述載體可以



是溶劑或分散劑，其含有例如水、乙醇、多元醇(如，甘油、二醇和液態聚乙二醇即與其相似者)、上述物質的適當混合物和/或植物油。本發明的藥物配方應保持適當的流動性，例如，利用一披覆層(如，卵磷脂)、當為分散液或使用表面活性劑時藉由維持所需顆粒大小。可以使用各種不同的抗細菌劑和抗黴菌劑以利對抗微生物的污染作用，例如，羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞及與其相似等。在許多情形中，本發明的藥物配方較佳可包含等滲劑，例如，糖或氯化鈉。可藉由在組合物中使用能夠延緩吸收的藥劑(例如，單硬脂酸鋁和明膠)，以使得注射用組合物有延緩吸收的效果。

**【0199】** 腸胃外施用的配方為液體溶液，舉例而言，視實際使用狀況，所述溶液應經過適當的緩衝處理，且液體稀釋劑應先可利用適當的鹽或葡萄糖製成等滲液。這些特定的水溶液特別適用於靜脈內、肌肉內、皮下和腹膜內施用。在這方面，基於此處所揭示的內，習知技藝人士可輕易想見使用的無菌溶液介質。舉例而言，可將一劑量溶解於1毫升的等滲透壓NaCl溶液，然後將其加入至1000毫升的皮下溶液中或注射於建議的灌注部位(參見 Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 and 1570-1580)。基於接受治療之個體狀況的不同，施用的劑量會隨著改變。在任何情況下，負責施用的人員可針對該個體來決定適當的劑量。再者，施用於人類的配方應該是無菌、無熱源且安全和純度標準需符合FDA生物標準規範要求。

**【0200】** 可將適當量的活性化合物混入適當的溶劑以及其他所需的上述成分，接著進行過濾除菌，以製得無菌注射液。一般而言，分散液的製備方式

是將各種無菌的活性成分混入無菌載體中，上述無菌載體其含有基本的分散介質以及其他所需的上述成分。在製備應用於無菌溶液使用之無菌粉末時，較佳的方法是利用真空乾燥和冷凍乾燥的方式製備，以產生活性成分的粉末加上先前經過除菌過濾之溶液中的任何額外的所欲成分。

【0201】可將在此所述之組合物調配成中性或鹽類形式。藥學上可接受鹽類，包含酸加成鹽(和蛋白質的游離胺基共同形成)，其可以是和無機酸(如，鹽酸或磷酸)或有機酸(如醋酸、草酸、酒石酸、杏仁酸等)共同形成。亦可由游離羧基和無機鹼或有機鹼形成的鹽類，所述無機鹼如，鈉、鉀、銨、鈣或氫氧化鐵，所述有機鹼可以是異丙胺、三甲胺、組胺酸、普魯卡因等。在調配完成後，以和劑型配方相容的方式並以治療有效量來施用這些溶液。可精義地以多種劑型(如，注射溶液或藥物釋放膠囊等)來施用這些配方。

【0202】在此所述「載體(carrier)」一詞，包含任何以及所有的溶劑、分散介質、載體、披覆層、稀釋劑、抗菌劑和抗真菌劑、等滲劑和延遲吸收劑、緩衝液、載體溶液、懸浮液和膠體等。所述適用於藥學活性物質的介質和藥劑可以是為已知介質和藥劑。此介質與藥劑在藥學活性物質中的運用為本領域所熟知的。除非慣用的介質或藥劑和活性成分不相容，本發明涵蓋所述介質或藥劑於此處提出的治療組合物中的運用。此外，本發明組合物亦可涵蓋其他輔助活性成分。

【0203】所述「藥學上可接受載體」是指當施用於人體時，不會導致過敏反應或類似反應的分子實體與組合物。含有作為活性成分的蛋白的液體組合物

之製備是為本領域眾所周知的。一般而言，可將此種組合物製備為注射劑，其可以是液體溶液或懸浮液；也可以製備成固體形式，所述固體形式適合於在注射之前加入溶液或懸浮液中以製備注射劑。也可以乳化該製劑。在一特定實施方式中，可以藉由脂質體、奈米膠囊、微粒、微球體、脂質粒、載體等進行傳遞。在特定的實施方式中，本發明的組合物可以包覆於脂質顆粒、脂質體、載體、奈米膠囊或奈米微粒中，以供遞送。再者，可利用習知與慣用的技術來進行上述配方與此種遞送載體之應用。

【0204】在特定實施方式中，可將在此所提供的藥劑接合到藥學上可接受的固體基底上，包含生物相容性和生物可降解基底，如聚合物和基質。舉例而言，所述固態基底包含但不限於，聚酯(polyesters)、水凝膠(hydrogels)(例如，聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)(poly(2-hydroxyethyl-methacrylate))或聚(乙醇醇)(poly(vinylalcohol))、聚乳酸(polylactides) (美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸和 $\gamma$ 乙基-L-麩胺酸的共聚物(copolymers of L-glutamic acid and  $\gamma$ -ethyl-L-glutamate)、非可降解的乙烯-乙酸乙烯酯(non-degradable ethylene-vinyl acetate)、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(degradable lactic acid-glycolic acid copolymers)如聚(乳酸-共-乙醇酸)(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)以及LUPRON DEPOT™ (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸利普安(leuprolide acetate)組成的可注射微粒)、聚-D-(-)-3-羥基丁酸(poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid)、膠原蛋白(collagen)、金屬(metal)、羥基磷灰石(hydroxyapatite)、生物玻璃(bioglass)、鋁酸鹽(aluminate)、生物陶瓷材料(bioceramic materials)和純化蛋白。

【0205】 可利用已知的方法進行調製，例如參照「Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19th Edition (1995)」一文所述。可依據本發明所提供的方法，以任何治療上有效的給藥方式來施用在此揭示的組合物和藥劑。藉由選擇給藥劑量及頻率，以便得到該藥劑的有效量，且在此一有效量下不會產生有害的影響。本發明化合物的有效量會隨著施用的途徑、受治療的溫血動物之類型、所討論之特定溫血動物的生理特性而有不同。在決定所述有效量時應考量的因素及其間的關係為醫學領域具有通常知識者所熟知。可量身打造有效量以及施用方法，以達到最佳的治療效果，但這需要考量多種因素，例如，體重、飲食、目前使用的其他藥物以及醫學領域具有通常知識者所想到的其他因素。

【0206】 本發明其他態樣的實施方式提供了一種套組，其包含一或多個容器，容器內填充有一或多種藥學組合物，其含有如此處所述的本發明之多肽、多核苷酸、活性藥劑等。所述套組可以包含說明書，以說明如何使用此組合物(如，延長預期壽命、生命年限或健康年限，或者是抑制或降低腫瘤形成或腫瘤轉移)。

【0207】 在此所述的套組可以包含一或多種額外的治療藥劑或適用於或想用於所治療的用途或用於所欲診斷應用的其他成分。若有需要，可將額外的治療藥劑填充於第二容器中。所述額外的治療藥劑的實施例包含，但不限於抗腫瘤藥。

【0208】 所述套組亦可包含一或多個注射器或要實現一所欲遞送模式所必須或可用的其他元件(如，支架、可植入藥物儲庫等)。

#### 【0209】 實施例

#### 【0210】 材料與方法

#### 【0211】 實驗動物

【0212】 成體C57BL小鼠(18至25克)購自台灣國家實驗動物中心。依據中央研究院(台灣，中華民國)實驗動物委員會核准的流程，在動物設施中飼育所有小鼠。

#### 【0213】 *EKLF* (K74R)基因敲入小鼠的產生

【0214】 產生基因敲入小鼠的方式如下：利用標準的基因標定方法，使用Cre-loxP重組系統、標定BAC Clone RP24-319P23 (Invitrogen)和反向選擇BAC修飾套組(Gene brides)，藉由ES細胞內的同源重組作用，將*EKLF*類小泛素化位突變(K74R)引入至小鼠*EKLF* (*klf1*)基因的第二外顯子上。以取自C57B/6J小鼠ES細胞的基因體DNA作為模板，利用PCR擴增含有*EKLF*外顯子2區域的片段，並用來建構標的載體。在轉殖至模板標的載體之前，利用標準突變技術將外顯子2編碼的密碼子74突變成精胺酸(K74R)。此外，將新黴素匣建構至標的載體中，其中PGK-gb2-neo模板可編碼新黴素/卡那黴素抗性基因，此模板結合了可在*E.coli*中表現卡那黴素抗性的原核啟動子(gb2)以及可在哺乳動物細胞中表現新黴素抗性的真核啟動子(PGK)。此外，修飾的野生型DNA兩側設有loxP部位，以利移除野生型DNA(第1A圖)。將loxP-PGK-loxP匣插入*EKLF*基因之內含子1的

位置。接著以電穿孔的方式使標的構築體進入C57B/6J ES細胞，並利用新黴素抗性的特性進行篩選。以5'和3'西方墨點法來鑑別適當的經標的ES轉殖株。在移除neo匣並確認編碼EKLF K74R的基因體區域的結構後，將ES轉殖株注射至囊胚中以產生嵌合小鼠。為了得到含基因敲入對偶基因的異型合子小鼠，將生殖系傳遞(germline transmission) F1品系與全身表現Cre重組酶的EIIa-Cre小鼠交配。將帶有單點突變的一個對偶基因的*eklf*異型合子小鼠相互交配，以得到同型合子*eklf*(K74R)基因敲入小鼠。

【0215】 EKLF K74R基因敲入標的載體序列如表E1所示。所示的序列以5'至3'的方向表示，且核苷酸的位置從5'往3'的方向編碼，並以5'端第一個核苷酸為1。以各區域的核苷酸區域(即，該區域涵蓋的核苷酸位置的範圍)來表示標的載體的各區域，如，EKLF基因的外顯子和內含子、loxP部位、PolyA部位、Neo和PGK啟動子。

【0216】 表E1 標的載體多核苷酸序列

載體 序列 編號： 8	GTGGGCAGACAGGAGCCCTCCAAGAACTTTCCTAGCCTCATA GCCCATGAGGCAGAAGAGAGAGAGGAGGCCTGAGGTCCAGG GTGGACACCAGCCAGCCATGGCCTCAGCTGAGACTGTCTTACC CTCCATCAGTACACTCACCACCCTGGGACAGTTCCTGGACACC CAGGAGGACTTCCTCAAGGTGGGGCCAGTGTGAGTGTGTGGG AGGGGGCAGGTGGTCTTGCATAGGGCATAAGTGCTTAGGGGTG GGGCGTCTATCTTACTTTAATATCCTCTGCTCTGTTTTTTGGGG GTGGAGGAGTGGGAGAGCCTCTGAGCCTTGTTTGGGGGAGAT GTTCTAGGGGTCTGAGATCAAGGTGAGGTGACACTATAGAAT ACTCAAGCTATCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGA AGTTATCGCGCCGCACACAAAACCAACACACAGATCATGAA AATAAAGCTCTTTTATTGGTACCGAATTCGCCAGGGAGCTCTC AGACGTCGCTTGGTCGGTCTTTATTCGAACCCAGAGTCCC GC TCAGAAGA ACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTG CGAATCGGGGGCGGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTC
----------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

AGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCC  
AACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCAC  
AGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATT  
CGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCC  
GTCGGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGC  
GCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAA  
GACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTT  
CGCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATG  
CAGCCGCCGCATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCA  
GGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCACTTCG  
CCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGA  
GCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATA  
GCCGCGCTGCCTCGTCCTGCAGTTCATTCAGGGCACCCGGACAG  
GTCGGTCTTGACAAAAGAACCGGGCGCCCCTGCGCTGACAG  
CCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATCGTCTGTTGTGC  
CCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGA  
ACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATGGCCGATCCCATGGTT  
TAGTTCCTCACCTTGTCGTATTATACTATGCCGATATACTATGC  
CGATGATTAATTGTCAACACGTGCTGCTGCAGGTCGAAAGGCC  
CGGAGATGAGGAAGAGGAGAACAGCGCGGCAGACGTGCGCTT  
TTGAAGCGTGCAGAATGCCGGGCCTCCGGAGGACCTTCGGGC  
GCCCGCCCCGCCCTGAGCCCGCCCCTGAGCCCGCCCCCGGAC  
CCACCCCTTCCAGCCTCTGAGCCAGAAAGCGAAGGAGCAA  
AGCTGCTATTGGCCGCTGCCCAAAGGCCTACCCGCTTCCATT  
GCTCAGCGGTGCTGTCCATCTGCACGAGACTAGTGAGACGTGC  
TACTTCCATTTGTCACGTCTGACGACGCGAGCTGCGGGGCG  
GGGGGGAACCTTCTGACTAGGGGAGGAGTAGAAGGTGGCGCG  
ACGGGGCCACCAAAGAACGGAGCCGGTTGGCGCCTACCGGTG  
GATGTGGAATGTGTGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGCGC  
CAAGTGCCAGCGGGGCTGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGC  
CTTGGGAAAAGCGCCTCCCCTACCCGGTAGAATATAACTTCGT  
ATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCGGCCCTAGTGATTTAGG  
CTCATAGAGACAAAGGTCCAGATAAAGGTGTCCTGGGATTTCC  
AGGCTTTGAGCTGTAAATTTCTGGGCTATGTGAAGACAGGGAA  
AGGCTAGGGAAAACGGAGTCGAAGCTGTCCCCTTTGACTCAG  
AACTCTGCAACCCCTTCTCCCATCCTGAATACTATTCTTGGTAA  
GTGTCTTAGCTGTCTCTAGCAAGACCTAATGGAGTTGTCTGGA  
GCTGAGAAAGGGGTTAGGGGAACCGTGTGGGTAAATGACAGG  
CACCAACGGTGTTTCCAGCCAGGGTTGTTTGAGGGCCAGGTAC  
CCAGTGCCTACCATTCAAGCAGTACGCTCCCTCCCGCAGTGGT  
GGCGGTCTGAGGAGACGCAGGATTTGGGGCCGGGGCCCCGA  
ATCCCACGGGGCCGTCCCATCACGTGAGTCTGAGATCGGAGG  
ACCCTTCCGGAGAGGACGATGAGAGGGACGTGACCTGTGCGT  
GGGACCCGGATCTTTTCTTACAACTTTCCAGGTTCCGAGTC

TCCCGGCACTTCCCGGACCTGTGCCCTGGCGCCCAGCGTGGGG  
 CCAGTGGCACAGTTCGAGCCGCCTGAGTCTCTGGGCGCCTATG  
 CGGGTGGCCCAGGGTTGGTGACTGGGCCTTTGGGCTCCGAGG  
 AGCACACAAGCTGGGCGCACCCGACTCCGAGACCCCCAGCCC  
 CTGAACCCTTCGTGGCCCCCTGCCCTGGCCCCGGGACTCGCTCC  
 CAAGGCTCAGCCCTCGTACTCCGACTCGCGAGCGGGCTCCGTA  
 GGGGGCTTCTTCCCGCGGGCGGGGCTTGCGGTGCCCGCAGCTC  
 CAGGCGCCCCCTATGGGCTGCTGTCTGGGATAACCCCGCGCTGTA  
 CCCC GCGCCACAGTACCAAGGCCACTTCCAGCTCTTTCGCGGG  
 CTCGCGGCGCCTTCTGCTGGTCCCACGGCGCCCCCTTCTTCTT  
 GAATTGTCTGGGACCTGGGACTGTGGCCACAGA ACTCGGGGC  
 CACTGCGATCGCCGGAGACGCAGGCTTGTCCCCGGGA ACTGC  
 GCCGCCCAAACGCAGCCGGCGAACTTTGGCACCTAAGAGGCA  
 GGCGGCACATACGTGCGGGCACGAAGGCTGCGGGAAGAGCTA  
 CACCAAGAGCTCGCACCTCAAGGCGCACCTGCGCACGCACAC  
 GGGTAAGGGCGGGGCCAGACGGGCGGGGGCGGGGCGGGGAGC  
 CGCTAGTGAACGAAGGGAGGGGCCGGAGGGTAGTCAGAGGC  
 GTGGCTAAAGGCGGCCCCAGTTCTAGGGGTCGTGAAGACCGC  
 ACCTGAGACACTGGGTCAAGTCTAGAAGGGGCGATTCCAGAC  
 CCAAATGGGCTAATAACAACACTCGGGAGGCAGAGGCAGGTG  
 GATAGCAGTGACTTCGAGGCCATTTGGGCTATTATAGCGAGTT  
 TCAGCAGCCTGAGCTACTTAGTGAGATCCTGGTTCATAAATAA  
 ATAGGTGTAACAGAGGACCTGGGGAACACTTTGGGGACTTCG  
 GTGTTAGAAGTGGATGTGTAAGGCCTGGGTTAGAGATGGGAG  
 AAGAACTAGAGGGGTGAACCCGAAAGGTACAAGCTTGGAAT  
 GCCAGAGCTCAGGATATAGCCAGTATTTACATGCATGCTCGAG  
 CTGGAACCATCTGGGATCAGGAGGTTGAGACACTCAAGTAAA  
 ATCAGTTTCAGGGGCAACTGACAGAGGTCCCAGAGTTAAGAA  
 AAGAAGAGAAGGGGGCTGGAGAGATGGCTCAGTGGTTAAGA  
 GCACTGACTGCTCTTCCAGAGGTCCTGAGTTTAAATCCCAGCA  
 CCACATGGTGGCTCACAACCATCTGTAATGGGATCCGATGCC  
 TCTTCTGGTGTGACTGAAGACAGCTACAGTGTACTTACATATA  
 ATAAATAAATAAATTA AAAAAAAAAAAGAAAGAAAGAAAAA  
 GAAAGAAGAGAAGGAAATGCTGAGAGACAGGGCCTAGAAA  
 GAGAAACGGGGTCATCCCAGGACTGGAAGACAGCTGAGGGTC  
 TCCAAGCATGGCAGGGCACGCAACAGGCTGTAACAGGAAGA  
 GAGGGAATCACCAGAGACAGGGCCTTGAACACTGGGGTGGAT  
 TTCTGGGCTTGAACCAAGTTGAGGAACAAGACTGGATATCATC  
 GGGAGGCTCTGCCAGAGCAAGAAATAGCTGCAACGCGGAGAA  
 CAAAGAACGAAGGTGCAGCCACATAAAAAGGCAGGGAACTA  
 GCACACCGGAAGTGGGATAGGAGACCGGAAGTGAGAAA ACT  
 GCAGGATTGCAGCTGTAGATACAGAAAAGGATTGAGTCACAG  
 AAGGCAGGATTATGTGACCTTTTAACTGTGTGGGCTAGGTATG  
 TCCTAAGACTTGGCTCTACTTCATCAAGGGTGCAA ACTGGAGC



	TGGGTTGCTTGGAGGGTGGTACTTACAGCTCCCTGTCCTTCAG GAGAGAAGCCTTATGCCTGCTCCTGGGACGGCTGTGACTGGA GGTTCGCTCGCTCAGACGAAGTACGCGCCACTACCGGAAGC ACACTGGACATCGTCCCTTCTGCTGTGGCCTCTGCCACGTGC TTTTTCACGCTCTGACCACTTAGCTCTGCACATGAAGCGTCAC CTCTGAGTGATCCTGCACAAGGACTGGGGATGAAATAAGAGT GGATCCAAGGACCGTATCCCAAAGATGGGCCATTATATAGT CCTACCCAGATCAAAAAGTACCAGAAGACCATACAAAGGAG CCTTCAGGACAAACCTCACATGTCCTCAGGGAGCCCCACACAT GGCCCCACAGACCCAGCAATATAGACCACCAGATAAATCAAC TCAAATGGACCCCTAGACCAGAGGAGTGACCCTGTGTCCTGG ACGCAGATGGACTGGGGTGAGATTTCTAAGATCTAGAAGGG AGCTTCACACTGTGCCATCTGCTAGGATTGTTGTCGTTACTAT AAAATTTCCCATATAAAACCAG
核苷酸區域	特徵描述
1-4,946	EKLF K74R 基因敲入標的載體
1-188	EKLF 基因外顯子 1
189-368	EKLF 基因內含子 1
397-431	LoxP 部位
432-508	PolyA 區域
554-1,357	Neo
1,358-1,944	PGK
1,948-1,981	LoxP 部位
1,997-2,339	EKLF 基因內含子 1
2,340-3,153	EKLF 基因外顯子 2
3,154-4,414	EKLF 基因內含子 2
4,415-4,946	外顯子 3

### 【0217】 *TaqMan* 基因表現分析

【0218】 利用TRIzol試劑(Invitrogen)來製備RNA，並以oligo-5 dT引子與SuperScript III反轉錄酶(RT) (Invitrogen)依據標準步驟進行將RNA反轉錄。使用Applied Biosystems 7500即時PCR系統(Applied Biosystems)設備，於預設的循環條件(50°C，2分鐘；95°C，10分鐘；95°C，15秒；和60°C，1分鐘；40個循環)下以經驗證的*TaqMan*分析來進行定量PCR (qPCR)。將cDNA樣本連續稀釋以

得出標準曲線，接著以 $\beta$ -肌蛋白(Actb:Mm00607939\_s1 ; Applied Biosystems)或Gapdh (Mm99999915\_g1 ; Applied Biosystems)標準化，以測定相對的EKLF (Mm04208330\_g1 and Mm00516096\_m1; Applied Biosystems)表現量。

#### 【0219】 壽命測量

【0220】 利用標準步驟來測量壽命。在於無特定病原 (specific-pathogen-free, SPF)的動物中心內，追蹤EKLF (K74R)基因敲入小鼠的壽命。

#### 【0221】 腫瘤形成抗性分析

【0222】 為了研究EKLF (K74R)基因敲入小鼠的抗癌效果，利用先前公開文獻(Cha *et al.*, 2003; Stackpole, 1981)所示之肺群落分析法(lung colonization assay)進行研究。以靜脈注射方式將鼠轉移性黑色素瘤細胞(即，B16-F10) ( $10^6$  細胞/0.2 mL)分別注射至EKLF (K74R) Kin小鼠和野生型小鼠的尾靜脈中(3隻小鼠/組)，以檢視這些細胞形成腫瘤以及轉移的潛力。由於B16F10細胞是來自於C57BL/6小鼠，且其與C57BL/6小鼠(野生型和EKLF (K74R)基因敲入小鼠)在免疫上相容，故本試驗選擇B16F10細胞進行試驗。經二週後，以二氧化碳使小鼠窒息並犧牲，摘除小鼠肺部進行檢驗。利用影像分析軟體(Image Inc.; Cha *et al.*, 2003)來測量肺部表面的轉移結節。在注射後14天測量每隻小鼠的腫瘤數目。

#### 【0223】 微陣列分析

【0224】 取出WT以及Eklf K74R基因敲入小鼠的E14.5小鼠的胎肝或3月齡小鼠骨髓，重複吸放磷酸鹽緩衝液(PBS) (10 mM phosphate, 0.15 M NaCl [pH

7.4))以使組織均質化。以Trizol試劑(Invitrogen)分離總RNA，並利用Mouse Genome Assay 430A 2.0 (Affymetrix, Inc.)測定基因體範圍的基因表現圖譜分析(genome-scale gene expression profiling)。應用標準MAS5.0方法標準化基因表現數據。基因表現值經對數轉換，以供後續比較分析。利用R 3.0.2語言(R Development Core Team, 2013, [www.R-project.org](http://www.R-project.org))進行統計分析。

### 【0225】 EKLf標的基因 qPCR

● 【0226】 利用市售 Trizol 試劑 (Invitrogen) 萃取總 RNA，並利用 SuperScriptIII (Invitrogen)依照製造商提供的步驟進行反轉錄。利用即時PCR或半定量RT-PCR和適當的引子(購自Mission Biotech，臺灣，中華民國)測定小鼠 Cola1、Mpv17l以及肌蛋白的mRNA量。利用Applied Biosystems 7500即時PCR系統(Applied Biosystems, Foster City, CA,USA)進行qPCR分析，分析條件如下：  
1循環：50°C持續2分鐘；1循環：95°C持續10分鐘；以及35循環：95°C持續15秒和60°C持續1分鐘。利用儀器所附軟體(7500 System SDS software vers. 1.3.1)來計算循環閾值(threshold cycle) (Ct)。以肌蛋白作為內部控制組，並以肌蛋白將 Cola1或Mpv17l mRNA的表現量標準化以得到相對量。數據以柱狀圖顯示，其中每一直條代表由三次重複所得到的數據之平均值± SEM。半定量RT-PCR分別由以下PCR反應培養條件所組成：94°C持續5分鐘；接著，22個循環，條件如下：94°C持續30秒、55°C持續40秒和72°C持續30秒(肌蛋白)；28個循環，條件如下：94°C持續30秒、52°C持續30秒和72°C持續27秒(Cola1)；以及24個循環，條件如

下：94°C持續30秒、52°C持續40秒、72°C持續20秒(Mpv17l)。數據以柱狀圖顯示，其中每一直條代表由兩次重複所得到的數據之平均值± SEM。

**【0227】 食品/水攝取測量**

**【0228】** 利用對連續影像紀錄進行全自動電腦攝影分析，以監控自發性籠內活動。

**【0229】 代謝測量**

**【0230】** 利用全方位實驗動物監控系統(CLAMS, Oxymax Open Circuit Calorimeter, Columbus Instruments)測量動物的氧氣消耗量、二氧化碳產生量、食物和水攝取量。

**【0231】 胰島素以及葡萄糖測量**

**【0232】** 採集小鼠血液樣本。經由離心後，收取血漿利用ELISA (Mediagnost, Germany)並依照製造商建議來定量胰島素和葡萄糖。亦將血漿用於定量葡萄糖。

**【0233】 握力試驗**

**【0234】** 以Muromachi公司的MK-380CM/R設備進行握力測試，記錄實驗結果。

**【0235】 旋轉桿試驗**

**【0236】** 以Ugo Basile Rota-Rod 47600設備進行旋轉試驗。在試驗階段中，將螺旋桿以每分鐘2轉的轉速持續加速至每分鐘80轉。

**【0237】 骨攝影**

【0238】於動物安樂死後，立刻利用Scanco Medical Micro-CT 40設備評估動物全身骨頭密度。

【0239】腫瘤攝影

【0240】於小鼠施用100 Ci的<sup>18</sup>F-FDG後0.5小時，以MicroPET R4掃瞄小鼠以得到MicroPET影像。

【0241】實施例1 產生*EKLF* K74R小鼠

【0242】依據上文「材料與方法」所述之步驟製備帶有*EKLF* K74R突變對偶基因的轉殖基因小鼠。第1A圖簡要地繪示了用以產生*EKLF* K74R小鼠之標的載體構築體。以PCR分析取自小鼠尾巴的基因體DNA，並確認同型合子和異型合子小鼠皆帶有*EKLF* K74R突變對偶基因(參見第1B圖)。以常規方法培育*EKLF* K74R基因敲入小鼠，且其子代性狀符合孟德爾遺傳率，這代表修飾的*EKLF*基因的作用方式和野生型*EKLF*對偶基因類似，且不會造成胚胎死亡。胚胎中的mRNA定量分析顯示*EKLF* K74R小鼠和野生型同窩小鼠的總*EKLF* mRNA量相近(第1D圖)。

【0243】*EKLF*蛋白是一種轉錄因子，其具有啟動子和抑制子活性。轉錄體(transcriptome)會因為K74R突變而改變。如骨髓或E14.5胎肝的微陣列雜交分析所示，至少有40個基因分別被負向調控和正向調控。如第2圖所示，PCR確認了某些上述基因表現的。相較於野生型小鼠，在成體*EKLF* K74R基因敲入小鼠的骨髓中，*Coll1a1*的mRNA量明顯較低(如第2A圖所示)。相較於野生型小鼠，

EKLF K74R基因敲入小鼠之E14.5胎肝中，Mpv171的mRNA量明顯較低(第2B圖)。

**【0244】 實施例 2 *EKLF* K74R突變造成壽命增加**

**【0245】** 相較於同窩的野生型小鼠，EKLF K74R轉殖基因小鼠的壽命較長。具體而言，EKLF K74R小鼠(n=45)壽命的中位數比野生型小鼠(n=33)多了3個月(第3A圖)。壽命實驗結果摘要於表E2。

**【0246】 表E2 EKLF K74R小鼠壽命**

EKLF K74R 使平均壽命與和最高壽命延長						
基因型 (公)	平均值	最大值	最小值	最長壽 10%	最短命 10%	n
K74R	32.2 ± 4.0	40.4	25.4	38.7 ± 1.5	26.5 ± 1.2	45
WT	29.5 ± 2.4	33.9	24.1	32.9 ± 0.7	24.9 ± 0.7	33

**【0247】** 表E2的結果證實，相較於野生型小鼠，EKLF K74R公鼠最高壽命(一群組中最長壽的10%小鼠的平均壽命)增加5.8個月。EKLF K74R小鼠壽命最大值為約40個月，比文獻所揭示的其他長壽小鼠(如，CISD2)的壽命更長(Wu *et al.*, Human Molecular Genetics (2012) 21, 3965-3968)。再者，相較於17月齡之野生型小鼠，32月齡之EKLF K74R小鼠灰白色的毛髮較少(第3B圖)。由實驗結果發現EKLF K74R小鼠除了長壽之外，身體健康且能正常生長。

**【0248】** 已知對多種物種(包含酵母菌、魚、齧齒動物和狗)進行飲食限制或卡路里限制能夠減緩生物老化的過程，進而達到增加壽命以及健康年限的效

果。亦有研究指出直接改變代謝作用能延長壽命。對正常飲食小鼠進行小規模表現型分析，初步數據如第4圖和第5圖所示。如圖所示，野生型和EKLF K74R小鼠在3月齡至24月齡間的體重變化相似(第4B圖)。事實上，在48小時自發性食物攝取實驗中，無論是將體重變化以體重進行標準化或將體重變化表示為絕對值，野生型小鼠和EKLF K74R小鼠的結果都很相近，且水分攝取試驗亦有類似的結果(第4C圖和第4D圖)。

● 【0249】 正常飲食的小鼠的代謝表現型並沒有顯著改變，所述代謝表現型如，氧消耗量 ( $VO_2$ ，第5A圖)、二氧化碳產量( $VCO_2$ ，第5B圖)、熱產量(第5C圖)和呼吸交換率(respiratory exchange ratio, RER) (第5D圖)。這些數據顯示，在EKLF K74R小鼠和野生型小鼠中，都採用類似的方式使用脂質和碳水化合物作為能量來源。

● 【0250】 由於限制飲食或卡路里通常和葡萄糖耐受性的改變相關，本實施例測量正常飲食小鼠血液中的空腹葡萄糖濃度和空腹胰島素濃度，以及從血液循環中清除葡萄糖的能力。如第6圖所示，EKLF K74R和野生型小鼠之間的空腹葡萄糖濃度(第6A圖)、空腹胰島素濃度(第6B圖)或葡萄糖耐受度(第6C圖)並無顯著差異。

【0251】 進行試驗以評估肌肉力量和運動協調性。3月齡的EKLF K74R小鼠與3月齡野生型小鼠的握力相似，但24月齡的EKLF K74R小鼠的握力明顯高於同齡的野生型小鼠(第7A圖)。另一方面，在EKLF K74R小鼠和野生型小鼠之

間，無論是三月齡或12月齡的小鼠，從螺旋桿上掉落的延遲時間都很相似(第7B圖)。本試驗中，每天進行三次試驗，以測量從加速的螺旋桿上掉落的延遲時間。

【0252】 骨質疏鬆是老化的重要特徵之一。如第8圖所示，在野生型小鼠中，骨體積和索前軟骨的數量都會隨著年齡而減少，而其索前軟骨の間隙則會增加(第8圖，左欄)。相反地，在高齡的EKLF K74R小鼠體內，上述參數的結果和年輕的EKLF K74R動物則不相上下，這代表EKLF K74R小鼠不會隨著年齡增長而造成骨質疏鬆(第8圖；右欄)。

【0253】 在EKLF K74R小鼠身上觀察到的表現型和既有的長壽小鼠模型不同。表E3比較了EKLF K74R小鼠和其他長壽啮齒動物的表現型。向上箭頭表示相較於野生型小鼠有所提升、向下箭頭表示降低，而等號則表示沒有改變。在「老化」一欄中，是高齡野生型小鼠相對於年輕野生型小鼠的比較。此表是依據「Hofmann, *et al.* (2015) Cell 160, 477-488」一文表S7修改而得。

### 【0254】 實施例 3 EKLF K74R突變導致抗癌性

【0255】 藉由表現型的觀察可知，相較於同窩野生型小鼠，EKLF K74R小鼠的年齡相關癌症發生率較低，如，Micro-PET影像分析(第9A圖)以及24月齡小鼠的解剖結果(第9B圖)所示。

【0256】 夠過藉由靜脈注射將癌細胞植入至EKLF K74R小鼠和同窩的野生型小鼠。B16F10黑色素瘤細胞(ATCC# CRL6475)來自和EKLF K74R小鼠具有相同遺傳背景的C57BL/6J小鼠。將B16F10細胞透過尾靜脈注射(i.v.注射)至小鼠體內，以進行活體內轉移分析(第10圖)。於注射B16F10細胞後兩週檢查肺部。



結果顯示EKLF K74R小鼠的癌症轉移率較低。初步研究顯示，當將B16F10黑色素瘤細胞皮下注射至小鼠體內時，Kin小鼠中的腫瘤生長會受到些微的抑制，但此一現象不具統計上顯著性。

【0257】 總體來說，以上數據顯示EKLF K74R小鼠的癌症轉移率較低(第9圖)，此一結果和肺腫瘤分析的結果十分吻合(第10圖)。這些數據和EKLF K74R能夠降低或抑制腫瘤發生以及減少或抑制癌細胞轉移的結果一致。

【0258】 雖然上文實施方式中揭露了本發明的具體實施例，然其並非用以限定本發明，本發明所屬技術領域中具有通常知識者，在不悖離本發明之原理與精神的情形下，當可對其進行各種更動與修飾，因此本發明之保護範圍當以附隨申請專利範圍所界定者為準。

【0259】 所有本說明書所引用的美國專利、美國專利申請公開案、美國專利申請案、他國專利、他國專利申請公開案和非專利文獻和/或申請表中所列文獻，皆視為本說明書的一部份。

表E3 長壽小鼠模型的表現型

	胰島素訊息傳導														
	老化	EKLF K74R	卡路里限制	二甲雙胍	IGF1				mTOR			自噬作用	基因穩定性	粒線體	
					IGF1R +/-	Pappa-/-	Pten Tg	Myc +/-	Mtor tg	Rapamycin	S6K1-/-				Fat10-/-
平均壽命		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑
最高壽命	↓	↑	↑	↑=	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑
身體質量	↑	=	↓	↑↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	↓	=
脂肪量	↑	=	↓	=			↓	=	=		↓	↓	↓		↑
體溫	=		↓	↑			=	=		=		=	↑	=	=
膽固醇	↑	=	↓	↓		=	↓	↓		↑		↓=			
癌	↑	↓	↓	↓	=	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	=	=	↑
血清 IGF-1	=		↓		↑	=	↓	↓			=		=		
纖維化	↑		↓	↓				=		=				↓	
DNA 損傷	↑		↓	↓				=		=					
內源性氧化壓力	↑		↓	↓				=	↓	=					=
化學壓力易感性	↑	↓		↑	↑↓			=							
生育力	↓	=	↓		=	↓		=		↓			=		=
運動協調性	↓	↑	↑	↑			↑	↑	↑	=	↑		↑	↑	↑
骨密度	↓	↑	↑↓				↑	↓	=	↑				↓	
衰老	↑		↓				=								↓
凋亡	↑		↑	↑	↓		=		=						↓
粒線體數目	=		=	=			↑	↑=		=		↑			↑
發炎		↓								↓		↓		↑	
感染易感性	↑	↓	↑						↑	↓		↑			

【符號說明】

【0261】 無

## 【序列表】

<110> 沈哲鯤  
徐于喬

<120> 延長壽命與抑制腫瘤發生的動物模型

<130> P2829-1-TW

<150> 62/044,411

<151> 2014-09-01

<160> 10

● <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 376

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Arg Gln Lys Arg Glu Arg Arg Pro Glu Val Gln Gly Gly His Gln

1                    5                    10                    15

● Pro Ala Met Ala Ser Ala Glu Thr Val Leu Pro Ser Ile Ser Thr Leu

                  20                    25                    30

Thr Thr Leu Gly Gln Phe Leu Asp Thr Gln Glu Asp Phe Leu Lys Trp

                  35                    40                    45

Trp Arg Ser Glu Glu Thr Gln Asp Leu Gly Pro Gly Pro Pro Asn Pro

                  50                    55                    60

Thr Gly Pro Ser His His Val Ser Leu Lys Ser Glu Asp Pro Ser Gly

65                    70                    75                    80

Glu Asp Asp Glu Arg Asp Val Thr Cys Ala Trp Asp Pro Asp Leu Phe

85

90

95

Leu Thr Asn Phe Pro Gly Ser Glu Ser Pro Gly Thr Ser Arg Thr Cys

100

105

110

Ala Leu Ala Pro Ser Val Gly Pro Val Ala Gln Phe Glu Pro Pro Glu

115

120

125

Ser Leu Gly Ala Tyr Ala Gly Gly Pro Gly Leu Val Thr Gly Pro Leu

130

135

140

Gly Ser Glu Glu His Thr Ser Trp Ala His Pro Thr Pro Arg Pro Pro

145

150

155

160

Ala Pro Glu Pro Phe Val Ala Pro Ala Leu Ala Pro Gly Leu Ala Pro

165

170

175

Lys Ala Gln Pro Ser Tyr Ser Asp Ser Arg Ala Gly Ser Val Gly Gly

180

185

190

Phe Phe Pro Arg Ala Gly Leu Ala Val Pro Ala Ala Pro Gly Ala Pro

195

200

205

Tyr Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Ala Leu Tyr Pro Ala Pro Gln Tyr

210

215

220

Gln Gly His Phe Gln Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Pro Ser Ala Gly

225

230

235

240

Pro Thr Ala Pro Pro Ser Phe Leu Asn Cys Leu Gly Pro Gly Thr Val

245

250

255

Ala Thr Glu Leu Gly Ala Thr Ala Ile Ala Gly Asp Ala Gly Leu Ser

260

265

270

第 2 頁，共 25 頁(序列表)

Pro Gly Thr Ala Pro Pro Lys Arg Ser Arg Arg Thr Leu Ala Pro Lys

275

280

285

Arg Gln Ala Ala His Thr Cys Gly His Glu Gly Cys Gly Lys Ser Tyr

290

295

300

Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr Gly Glu

305

310

315

320

Lys Pro Tyr Ala Cys Ser Trp Asp Gly Cys Asp Trp Arg Phe Ala Arg

325

330

335

Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly His Arg Pro

340

345

350

Phe Cys Cys Gly Leu Cys Pro Arg Ala Phe Ser Arg Ser Asp His Leu

355

360

365

Ala Leu His Met Lys Arg His Leu

370

375

<210> 2

<211> 376

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Arg Gln Lys Arg Glu Arg Arg Pro Glu Ala Gln Gly Gly Gln Gln

1

5

10

15

Pro Val Met Ala Ser Ala Glu Thr Val Leu Pro Ser Ile Ser Thr Leu

20

25

30

Thr Thr Leu Gly Gln Phe Leu Asp Thr Gln Glu Asp Phe Leu Lys Trp

第 3 頁，共 25 頁(序列表)





&lt;400&gt; 3

Met Ala Thr Ala Glu Thr Ala Leu Pro Ser Ile Ser Thr Leu Thr Ala

1                    5                    10                    15

Leu Gly Pro Phe Pro Asp Thr Gln Asp Asp Phe Leu Lys Trp Trp Arg

20                    25                    30

Ser Glu Glu Ala Gln Asp Met Gly Pro Gly Pro Pro Asp Pro Thr Glu

35                    40                    45

Pro Pro Leu His Val Lys Ser Glu Asp Gln Pro Gly Glu Glu Glu Asp

50                    55                    60

Asp Glu Arg Gly Ala Asp Ala Thr Trp Asp Leu Asp Leu Leu Leu Thr

65                    70                    75                    80

Asn Phe Ser Gly Pro Glu Pro Gly Gly Ala Pro Gln Thr Cys Ala Leu

85                    90                    95

Ala Pro Ser Glu Ala Ser Gly Ala Gln Tyr Pro Pro Pro Pro Glu Thr

100                    105                    110

Leu Gly Ala Tyr Ala Gly Gly Pro Gly Leu Val Ala Gly Leu Leu Gly

115                    120                    125

Ser Glu Asp His Ser Gly Trp Val Arg Pro Ala Leu Arg Ala Arg Ala

130                    135                    140

Pro Asp Ala Phe Val Gly Pro Ala Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu

145                    150                    155                    160

Pro Lys Ala Leu Ala Leu Gln Pro Val Tyr Pro Gly Pro Gly Ala Gly

165                    170                    175



Ser Ser Gly Gly Tyr Phe Pro Arg Thr Gly Leu Ser Val Pro Ala Ala  
 180 185 190

Ser Gly Ala Pro Tyr Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Ala Met Tyr Pro  
 195 200 205

Ala Pro Gln Tyr Gln Gly His Phe Gln Leu Phe Arg Gly Leu Gln Gly  
 210 215 220

Pro Ala Pro Gly Pro Ala Thr Ser Pro Ser Phe Leu Ser Cys Leu Gly  
 225 230 235 240

Pro Gly Thr Val Gly Thr Gly Leu Gly Gly Thr Ala Glu Asp Pro Gly  
 245 250 255

Val Ile Ala Glu Thr Ala Pro Ser Lys Arg Gly Arg Arg Ser Trp Ala  
 260 265 270

Arg Lys Arg Gln Ala Ala His Thr Cys Ala His Pro Gly Cys Gly Lys  
 275 280 285

Ser Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr  
 290 295 300

Gly Glu Lys Pro Tyr Ala Cys Thr Trp Glu Gly Cys Gly Trp Arg Phe  
 305 310 315 320

Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly Gln  
 325 330 335

Arg Pro Phe Arg Cys Gln Leu Cys Pro Arg Ala Phe Ser Arg Ser Asp  
 340 345 350

His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Leu  
 355 360

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 362

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Pan troglodytes

&lt;400&gt; 4

Met Ala Thr Ala Glu Thr Ala Leu Pro Ser Ile Ser Thr Leu Thr Ala

1 5 10 15

Leu Gly Pro Phe Pro Asp Thr Gln Asp Asp Phe Leu Lys Trp Trp Arg

20 25 30

Ser Glu Glu Ala Gln Asp Met Gly Pro Gly Pro Pro Asp Pro Thr Glu

35 40 45

Pro Pro Leu His Val Lys Ser Glu Asp Gln Pro Gly Glu Glu Glu Asp

50 55 60

Asp Glu Arg Gly Ala Asp Ala Thr Trp Asp Leu Asp Leu Leu Leu Thr

65 70 75 80

Asn Phe Ser Gly Pro Glu Pro Gly Gly Ala Pro Gln Thr Cys Ala Leu

85 90 95

Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gly Ala Gln Tyr Pro Pro Pro Pro Glu Thr

100 105 110

Leu Gly Ala Tyr Ala Gly Gly Pro Gly Leu Val Ala Gly Leu Leu Gly

115 120 125

Ser Glu Asp His Ser Gly Trp Val Arg Pro Ala Leu Arg Ala Arg Ala

130 135 140

Pro Asp Ala Phe Val Gly Pro Ala Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu

第 8 頁，共 25 頁(序列表)

145                      150                      155                      160  
 Pro Lys Ala Leu Ala Leu Gln Pro Val Tyr Pro Gly Pro Gly Ala Gly  
                                  165                      170                      175  
 Ser Ser Gly Gly Tyr Phe Pro Arg Thr Gly Leu Ser Val Pro Ala Ala  
                                  180                      185                      190  
 Ser Gly Ala Pro Tyr Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Ala Met Tyr Pro  
                                  195                      200                      205  
 Ala Pro Gln Tyr Gln Gly His Phe Gln Leu Phe Arg Gly Leu Gln Gly  
                                  210                      215                      220  
 Pro Ala Pro Gly Pro Ala Thr Ser Pro Ser Phe Leu Ser Cys Leu Gly  
 225                      230                      235                      240  
 Pro Gly Thr Val Gly Thr Gly Leu Gly Gly Thr Ala Glu Asp Pro Gly  
                                  245                      250                      255  
 Val Ile Ala Glu Thr Ala Pro Ser Lys Arg Gly Arg Arg Ser Trp Ala  
                                  260                      265                      270  
 Arg Lys Arg Gln Ala Ala His Thr Cys Ala His Pro Gly Cys Gly Lys  
                                  275                      280                      285  
 Ser Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr  
                                  290                      295                      300  
 Gly Glu Lys Pro Tyr Ala Cys Thr Trp Glu Gly Cys Gly Trp Arg Phe  
 305                      310                      315                      320  
 Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly Gln  
                                  325                      330                      335  
 Arg Pro Phe Arg Cys Gln Leu Cys Pro Arg Ala Phe Ser Arg Ser Asp

第9頁，共25頁(序列表)



Ser Glu Asp His Ser Gly Trp Val Arg Pro Ala Leu Arg Ala Pro Ala

130

135

140

Pro Asp Ala Phe Val Gly Pro Ala Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu

145

150

155

160

Pro Lys Ala Leu Ala Leu Gln Pro Val Tyr Pro Gly Pro Gly Ala Gly

165

170

175

Ser Ser Gly Gly Tyr Phe Gln Arg Thr Gly Leu Ser Val Pro Ala Ala

180

185

190

Ser Gly Ala Pro Tyr Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Ala Val Tyr Pro

195

200

205

Ala Pro Gln Tyr Gln Gly His Phe Gln Leu Phe Arg Gly Leu Gln Gly

210

215

220

Pro Ala Pro Gly Pro Ala Thr Ser Pro Ser Phe Leu Ser Cys Leu Gly

225

230

235

240

Pro Gly Thr Val Gly Thr Gly Leu Gly Gly Thr Ala Gly Asp Pro Gly

245

250

255

Val Ile Ala Glu Ala Ala Pro Ser Lys Arg Gly Arg Arg Ser Trp Ala

260

265

270

Arg Lys Arg Gln Ala Ala His Thr Cys Ala His Pro Gly Cys Gly Lys

275

280

285

Ser Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr

290

295

300

Gly Glu Lys Pro Tyr Ala Cys Thr Trp Glu Gly Cys Gly Trp Arg Phe

305

310

315

320

Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly Gln

325

330

335

Arg Pro Phe Arg Cys Gln Leu Cys Pro Arg Ala Phe Ser Arg Ser Asp

340

345

350

His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Leu

355

360

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 369

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Canis lupus

&lt;400&gt; 6

Met Ala Thr Ala Glu Thr Ala Leu Pro Ser Ile Ser Thr Leu Thr Thr

1

5

10

15

Leu Gly Pro Phe Pro Asp Thr Gln Glu Asp Phe Leu Lys Trp Trp Arg

20

25

30

Ser Glu Glu Val Gln Asp Leu Gly Pro Gly Pro Pro Asp Pro Thr Gly

35

40

45

Leu Pro Leu His Val Arg Pro Glu Ser Gln Asp Ala Pro Gly Glu Asp

50

55

60

Glu Asp Asp Glu Arg Asp Ser Ala Thr Ala Trp Asp Leu Asp Leu Leu

65

70

75

80

Leu Thr Asn Phe Pro Cys Pro Glu Pro Gly Gly Ala Pro Gln Thr Cys

85

90

95

Ala Leu Ala Pro Gly Glu Cys Ser Gly Val Gln Phe Pro Pro Pro Pro

第 12 頁，共 25 頁(序列表)

100 105 110  
 Leu Pro Pro Pro Gln Ala Pro Glu Thr Pro Cys Pro Tyr Val Gly Gly  
 115 120 125  
 Pro Gly Leu Val Ala Gly Leu Leu Gly Pro Glu Glu His Pro Gly Trp  
 130 135 140  
 Ala Arg Pro Ala Pro Arg Ala Pro Val Pro Asp Ala Phe Val Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Gly Pro Ala Pro Glu Pro Lys Pro Leu Pro Leu Gln Pro Val  
 165 170 175  
 Tyr Pro Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ser Gly Ser Tyr Phe Ser Arg Thr  
 180 185 190  
 Gly Leu Ser Val Pro Thr Ala Pro Gly Ala Pro Tyr Gly Leu Leu Pro  
 195 200 205  
 Gly Tyr Pro Pro Leu Tyr Pro Val Pro Gln Tyr Gln Gly His Phe Gln  
 210 215 220  
 Leu Phe Arg Gly Leu Pro Ala Pro Ala Pro Gly Pro Thr Ser Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Phe Leu Ser Cys Leu Gly Pro Gly Thr Ala Gly Ser Gly Leu Arg  
 245 250 255  
 Gly Thr Ala Gly Asp Pro Gly Gly Val Ala Asp Ala Ala Pro Ser Lys  
 260 265 270  
 Arg Ser Arg Arg Ser Trp Ala Arg Lys Arg Gln Ala Ala His Thr Cys  
 275 280 285  
 Thr His Pro Gly Cys Gly Lys Ser Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys

第 13 頁，共 25 頁(序列表)









tcttacctc catcagtaca ctcaccacc tgggacagtt cctggacacc caggaggact	180
tcctcaaggt ggggccagtg tgagtgtgtg ggagggggca ggtggtcttg cataggcat	240
agtgcctagg ggtggggcgt ctatcttact ttaatatcct ctgctctgtt ttttgggggt	300
ggaggagtgg gagagcctct gagccttgtt tgggggagat gttctagggg tctgagatca	360
aggtgaggtg acaactataga atactcaagc tatcgagata acttcgtata atgtatgcta	420
tacgaagtta tcgcgccgca cacaaaaacc aacacacaga tcatgaaaat aaagctcttt	480
tattggtacc gaattcgcca gggagctctc agacgtcgtc tggtcggtct ttattcgaac	540
cccagagtcc cgctcagaag aactcgtcga gaaggcgata gaaggcgatg cgctgcgaat	600
cgggggcggc gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg ccaagctctt	660
cagcaatatic acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca cccagccggc	720
cacagtcgat gaatccagaa aagcggccat tttccacat gatattcggc aagcaggcat	780
cgccatgggt cacgacgaga tcctcgccgt cgggcatgcg cgccttgagc ctggcgaaca	840
gttcggctgg cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg acaagaccgg	900
cttccatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg aatgggcagg	960
tagccggatc aagcgtatgc agccgccgca ttgcatcagc catgatggat actttctcgg	1020
caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttcgccaat agcagccagt	1080
cccttcccgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctcgca aggaacgccc gtcgtggcca	1140
gccacgatag ccgcgctgcc tcgtcctgca gttcattcag ggcaccggac aggtcggtct	1200
tgacaaaaag aaccgggcgc ccctgcgctg acagccggaa cacggcggca tcagagcagc	1260
cgatcgtctg ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc cacccaagcg gccggagaac	1320
ctgcgtgcaa tccatcttgt tcaatggccg atcccatggt ttagttcctc accttgcgt	1380
attatactat gccgatatac tatgccgatg attaattgtc aacacgtgct gctgcaggtc	1440
gaaaggcccc gagatgagga agaggagaac agcgcggcag acgtgcgctt ttgaagcgtg	1500
cagaatgccg ggcctccgga ggaccttcgg gcgccccccc cgcccctgag cccgcccctg	1560

agcccccccc cggacccacc ccttcccagc ctctgagccc agaaagcгаа ggagcaaagc 1620  
 tgctattggc cgctgccccа aaggcctacc cgcttcatt gctcagcggт gctgtccatc 1680  
 tgcacgagac tagtgagacg tgctacttcc atttgtcacg tcctgcacga cgcgagctgc 1740  
 ggggcggggg ggaacttctt gactagggga ggagtagaag gtggcgcgac ggggccacca 1800  
 aagaacggag ccggttggcg cctaccggтg gatgtggaat gtgtgcgagg ccagaggcca 1860  
 cttgtgtagc gccaagtгcc cagcggggct gctaaagcgc atgctccaga ctgccttggg 1920  
 aaaagcгct ccctaccгg gtagaatata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta 1980  
 tgcggccta gtgatttagg ctcatagaga caaaggтca gataaaggтg tcctgggatt 2040  
 tccaggcttt gagctgтаat tttctgggct atgtgaagac agggaaaggc tagggaaaac 2100  
 ggagtcгаag ctgtcccctt tgactcagaa ctctgcaacc ctttctcca tcctgaatac 2160  
 tattcttggт aagtгctta gctgtctcta gcaagaccta atggagtтg ctggagctga 2220  
 gaaagggгt aggggaaccг tgtgggтаaа tgacaggcac caacggтgtt tcagccagg 2280  
 gttgtttgag ggccaggтac ccagtгccta ccattcaagc agtacгctcc ctcccгcagt 2340  
 ggtggcггtc tgaggagacг caggattтgg ggccggggcc cccгаatccc acggggcгct 2400  
 cccatcacгt gagtctgaga tcggaggacc cttccгgaga ggacгatgag agggacгtga 2460  
 cctgtгcгtg ggaccгgat cttttccta caaactttcc aggttccгag tctcccгgca 2520  
 cttcccгgac ctgtгccctg гcгcccagcг tggggccagt ggcacagтtс gagccгcctg 2580  
 agtctctggg cгcctatгcг ggtggcccag ggttggтgac tgggcctтg ggctccгagg 2640  
 agcacacaag ctgggcгcac ccgactccга gacccccagc cctгаaccс ttгtggccc 2700  
 ctгccctggc cccgggactc gctcccаagg ctcagcctc gtactccгac tcгgagcгg 2760  
 gctccгtagg ggгcttcttc ccгcgggгcгg ggcttгcгgt gcccгcagct ccaggcгccc 2820  
 cctatggгct gctgtгggga тaccccгcгc tgtaccccгc gccacagтac caaggccact 2880  
 tcagctctt tcгcgggctc гcггcгcctt ctгctгgtcc cacggcгccc ctttcttct 2940  
 tгаattгctt gggacctгgg actgtгgcca cгаactcгg ggccactгcг atгcгcгgag 3000

acgcaggctt gtccccggga actgcgccgc ccaaacgcag ccggcgaact ttggcaccta 3060  
 agaggcaggc ggcacatacg tgcgggcacg aaggctgcgg gaagagctac accaagagct 3120  
 cgcacctcaa ggcgcacctg cgcacgcaca cgggtaaggg cggggccaga cgggcggggg 3180  
 cggggcggga gccgctagtg aacgaaggga ggggccggag ggtagtcaga ggcgtggcta 3240  
 aaggcggccc cagttctagg ggtcgtgaag accgcacctg agacactggg tcaagtctag 3300  
 aagggcgat tccagacca aatgggctaa taaaact cgggaggcag aggcaggtgg 3360  
 atagcagtga cttcgaggcc atttgggcta ttatagcgag tttcagcagc ctgagctact 3420  
 tagtgagatc ctggttcata aataaatagg tgtaacagag gacctgggga acactttggg 3480  
 gacttcggtg ttagaagtgg atgtgtaagg cctgggtag agatgggaga agaaactaga 3540  
 ggggtgaacc cgaaaggtac aagcttgga tgccagagct caggatatag ccagtattta 3600  
 catgcatgct cgagctggaa ccatctggga tcaggaggt gagacactca agtaaaatca 3660  
 gtttcagggg caactgacag aggtcccaga gtttaagaaa gaagagaagg gggctggaga 3720  
 gatggctcag tggtaagag cactgactgc tctccagag gtccctgagtt taaatcccag 3780  
 caccacatgg tggctcacia ccatctgtaa tgggatccga tgcctcttc tgggtgtgact 3840  
 gaagacagct acagtgtact tacatataat aataaataa attaaaaaa aaaagaaaga 3900  
 aagaaaaag aaaagaagag aaggaaatgc tgagagacag ggcctagaaa gagaaacggg 3960  
 gtcattcccag gactggaaga cagctgaggg tctccaagc atggcagggc acgcaacagg 4020  
 ctgtaacagg aagagaggga atcaccagag acagggcctt gaacactggg gtggatttct 4080  
 gggcttgaac caagttgagg aacaagactg gatatcatcg ggaggctctg ccagagcaag 4140  
 aatatagctgc aacgcggaga acaaagaacg aaggtgcagc cacataaaaa ggcagggaac 4200  
 tagcacaccg gaagtgggat aggagaccgg aagtgagaaa actgcaggat tgcagctgta 4260  
 gatacagaaa aggattgagt cacagaaggc aggattatgt gaccttttaa ctgtgtgggc 4320  
 taggtatgtc ctaagacttg gctctacttc atcaagggtg caaactggag ctgggttgct 4380  
 tggagggtgg tacttacagc tcctgtcct tcaggagaga agccttatgc ctgctcctgg 4440

gacggctgtg actggagggtt cgctcgctca gacgaactga cgcgccacta ccggaagcac 4500  
 actggacatc gtccttctg ctgtggcctc tgcccacgtg ctttttcacg ctctgaccac 4560  
 ttagctctgc acatgaagcg tcacctctga gtgatcctgc acaaggactg gggatgaaat 4620  
 aagagtggat ccaaggaccg tatcccaaaa gatgggcat tatatagtcc taccagatc 4680  
 aaaaactgac cagaagacca tacaaggag ctttcaggac aaacctcaca tgcctcagg 4740  
 gagccccaca catggccccca cagaccacgc aatatagacc accagataaa tcaactcaaa 4800  
 tggacccta gaccagagga gtgaccctgt gtcttgacg cagatggact ggggtgagat 4860  
 ttctaagat ctagaagga gcttcacact gtgcccactt gctaggattg ttgtcgttac 4920  
 tataaaaatt tcccatataa aaccag 4946

<210> 9

<211> 2782

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

tcagagttca cgaggcagcc gaggaagagg aggcttgagg cccagggtgg gcaccagcca 60  
 gccatggcca cagccgagac cgccttgccc tccatcagca cactgaccgc cctgggcccc 120  
 ttccggaca cacaggatga cttcctcaag gtggggccta gaaggtgggg tctaggtggg 180  
 ctggctggaa tccagggcca cagtcacaga tcttggggtc cagacctgca tcttgacctg 240  
 aatcaagag acttaaccag gactgaggta cgctcagtc aggagaggag atctcagctt 300  
 agtctggcag ggggtgagga ggggtgtcta ggggtttgag gttctaagtg tgatctattt 360  
 cggtaataga aaacgaaggt agcctgggca acatggtgaa acctatctc tacaanaaat 420  
 accaaaaaca ttaggccagg catgggggcg tgtgcctgta gtcccagga ctccgtaggc 480  
 tgatgcagga ggatcattag agcccaggag attaaggata cagtgagctg caccactgca 540  
 ctccagcctg ggcaaaagag taagacccta tctcaagaaa aaaaaaaaaa aaaaggaacg 600

agatctaggc tcacagacaa tcttccagat atcagcggga aatgatgagt gtgtctgggg 660  
 gacatccaaa atttcggaat taatcttggt ttgggagaca gggaaggaga gggatgttct 720  
 gggggaaaac taagtcaagg ctggcatcct ctccccgtc cctgccagt tttccatctc 780  
 cagcagctct gctaccctt cccccatccc cgagtgtggt tccagatagt ggaagtctta 840  
 tctcctgtct ccagccagac ctgatcggtt tctgtccctg gagctggggg gggagcgggg 900  
 agaggggcgg ttagaggggc agtggtgggg aagtgggaca gacagacagg caaacaagac 960  
 ccctttcaa agcctctgcg tcagagtgtc cagcccgcga tgtccctggg cagggcaccc 1020  
 cagtgtccac cgaacctcga gctgcctgct ccctcccga gtggtggcgc tccgaagagg 1080  
 cgcaggacat gggcccgggt cctcctgacc ccacggagcc gccctccac gtgaagtctg 1140  
 aggaccagcc cggggaggaa gaggacgatg agaggggcgc ggacgccacc tgggacctgg 1200  
 atctcctcct caccaacttc tcgggcccgg agcccgttg cgccccag acctgcgctc 1260  
 tggcggccag cgaggcctcc ggggcgcaat atccgccgc gcccgagact ctgggcgcat 1320  
 atgtggcgg cccggggctg gtggctgggc ttttgggttc ggaggatcac tcgggttggg 1380  
 tgcgcctgc cctgcgagcc cgggctcccg acgccttcgt gggcccagcc ctggctccag 1440  
 ccccgcccc cgagcccaag gcgctggcgc tgcaaccggt gtaccggggg cccggcgccg 1500  
 gtcctcggg tggtacttc ccgcggaccg ggctttcagt gcctgcggcg tcgggcgccc 1560  
 cctacgggct actgtccggg taccgccga tgtaccggc gcctcagtac caaggcact 1620  
 tccagctctt ccgcgggctc cagggaccg cgcccgttc cgccagtcc cctccttcc 1680  
 tgagttggtt gggaccggg acggtgggca ctggactcgg ggggactgca gaggatccag 1740  
 gtgtgatagc cgagaccgc ccatccaagc gaggccgacg ttcgtgggcg cgcaagaggc 1800  
 aggcagcga cacgtgcgc caccgggtt gcggcaagag ctacaccaag agctcccacc 1860  
 tgaaggcga tctgcgcac cacacaggtg agggggcggg gccccgaca tgagaaaggg 1920  
 cgcgcgccc gctgtagtta cagggaaga agggttcag agggcgggac ttggacttgg 1980  
 ctggcctctg agagtgagt cctccttaa ttttgtgcc tagggcctc actttgttca 2040

tcctagtecc agcccagget gagtaaaggg gtgtggccag atgcagggga cccggggaca 2100  
 tgactgggca gacagtggcg cttatggctt ccttgtcccc taggggagaa gccatacgcc 2160  
 tgcacgtggg aaggctgcgg ctggagattc gcgcgctcgg acgagctgac ccgccactac 2220  
 cggaacaca cggggcagcg ccccttccgc tgccagctct gccacgtgc tttttcgcgc 2280  
 tctgaccacc tggccttgca catgaagcgc cacctttgag ccctgccctg gcaacttgac 2340  
 tctcctagtg actggggatg ggacaagaag cctgtttggt ggtctcttca cacggacgcg 2400  
 cgtgacacaa tgctgggtgg ttttcccacg aatggaccct ctctggact cgcgttccca 2460  
 aagatccacc caaatatcaa acacggacc ctagacagcc ctgggggagc ctcttacgga 2520  
 aatccgaca agccttcagc cacagggagc cacacagaga tgtccaaact gtcgtgcaaa 2580  
 cccagtgaga cagaccgcca aataaacgga ctcagtggac actcagacca gctcccagat 2640  
 ggccctggac agcaggagag ggtgtgggat gaggcttccc agagaccctg ggtctagaaa 2700  
 gcggctcctg aagtcctt attgtggctg atattaactg tcaatggtta tgggtcctat 2760  
 aaaaatgcc ctcccagata aa 2782

<210> 10

<211> 3368

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

gtgggcagac aggagccctc caagaaactt tcctagcctc atagcccatg aggcagaaga 60  
 gagagaggag gcctgaggtc cagggtggac accagccagc catggcctca gctgagactg 120  
 tcttacctc catcagtaca ctaccaccc tgggacagtt cctggacacc caggaggact 180  
 tcctcaaggt ggggccagtg tgagtgtgtg ggagggggca ggtggtcttg catagggcat 240  
 agtgcttagg ggtggggcgt ctatcttact ttaatatcct ctgctctgtt ttttgggggt 300  
 ggaggagtgg gagagcctct gagccttggt tgggggagat gttctagggg tctgagatca 360

第 22 頁，共 25 頁(序列表)



aggtgaggcc tatttctcca acaggaagca gaattctaag ctctatatct taagagacta 420  
 ggctcataga gacaaaggtc cagataaagg tgtcctggga tttccaggct ttgagctgta 480  
 attttctggg ctatgtgaag acagggaaag gctagggaaa acggagtcca agctgtcccc 540  
 ttgactcag aactctgcaa ccccttctcc catcctgaat actattcttg gtaagtgtct 600  
 tagctgtctc tagcaagacc taatggagtt gtctggagct gagaaagggg ttaggggaac 660  
 cgtgtgggta aatgacaggc accaacggtg tttccagcca gggttgtttg agggccaggt 720  
 acccagtgcc taccattcaa gcagtacgt cctcccga gtggtggcgg tctgaggaga 780  
 cgaggattt ggggccgggg cccccgaatc ccacggggcc gtcccatcac gtgagtctga 840  
 aatcgaggga ccttccgga gaggacgatg agagggacgt gacctgtgcg tgggacccgg 900  
 atcttttct taaaaacttt ccaggttccg agtctcccgg cacttcccgg acctgtgccc 960  
 tggcggccag cgtggggcca gtggcacagt tcgagccgcc tgagtctctg ggccgctatg 1020  
 cgggtggccc agggttgggtg actgggcctt tgggctccga ggagcacaca agctgggcgc 1080  
 acccgactcc gagaccccca gccctgaac cttcgtggc cctgccctg gccccgggac 1140  
 tcgtcccaa ggctcagccc tcgtactccg actcgcgagc gggctccgta gggggcttct 1200  
 tcccgcgggc ggggcttgcg gtgcccgcag ctccaggcgc ccctatggg ctgctgtcgg 1260  
 gatacccgc gctgtacccc gcgccacagt accaaggcca cttccagctc tttcgcgggc 1320  
 tcgcgccgcc ttctgctggt cccacggcgc ccccttctt cttgaattgt ctgggacctg 1380  
 ggactgtggc cacagaactc ggggccactg cgatcgccgg agacgcaggc ttgtccccgg 1440  
 gaactgcgcc gcccaaacgc agccggcgaa ctttggcacc taagaggcag gcggcacata 1500  
 cgtgcgggca cgaaggctgc gggaagagct acaccaagag ctcgcacctc aaggcgacc 1560  
 tgcgcacgca cacgggtaag ggcggggcca gacgggcggg ggcggggcgg gagccgctag 1620  
 tgaacgaagg gaggggccgg agggtagtca gaggcgtggc taaaggcggc cccagttcta 1680  
 ggggtcgtga agaccgcacc tgagacactg ggtcaagtct agaaggggcg attccagacc 1740  
 caaatgggct aatacaaaca ctccggaggc agaggcaggt ggatagcagt gacttcgagg 1800

ccatttgggc tattatagcg agtttcagca gcctgagcta cttagtgaga tcctggttca 1860  
 taaataaata ggtgtaacag aggacctggg gaacactttg gggacttcgg tgttagaagt 1920  
 ggatgtgtaa ggcctgggtt agagatggga gaagaaacta gaggggtgaa cccgaaaggt 1980  
 acaagcttgg aatgccagag ctgaggatat agccagtatt tacatgcatg ctcgagctgg 2040  
 aaccatctgg gatcaggagg ttgagacact caagtaaat cagtttcagg ggcaactgac 2100  
 agaggtccca gagttaagaa aagaagagaa gggggctgga gagatggctc agtggttaag 2160  
 agcactgact gctcttccag aggtcctgag tttaaatccc agcaccacat ggtggctcac 2220  
 aaccatctgt aatgggatcc gatgccctct tctggtgta ctgaagacag ctacagtgta 2280  
 cttacatata ataaataaat aaattaaaa aaaaaagaaa gaaagaaaa agaaaagaag 2340  
 agaaggaaat gctgagagac agggcctaga aagagaaacg gggcatccc aggactgga 2400  
 gacagctgag ggtctccca gcatggcagg gcacgcaaca ggctgtaaca ggaagagagg 2460  
 gaatcaccag agacagggcc ttgaacactg gggtggattt ctgggcttga accaagtga 2520  
 ggaacaagac tggatatcat cgggaggctc tgccagagca agaaatagct gcaacgcgga 2580  
 gaacaaagaa cgaaggtgca gccacataaa aaggcagga actagcacac cggaagtggg 2640  
 ataggagacc ggaagtgaga aaactgcagg attgcagctg tagatacaga aaaggattga 2700  
 gtcacagaag gcaggattat gtgacctttt aactgtgtgg gctaggtatg tcctaagact 2760  
 tggtctact tcatcaagg tgcaaactgg agctgggttg cttggagggt ggtacttaca 2820  
 gtcacctgct cttcaggaga gaagccttat gcctgctcct gggacggctg tgactggagg 2880  
 ttcgctcgct cagacgaact gacgcgccac taccggaagc aactggaca tcgtcccttc 2940  
 tgctgtggcc tctgcccacg tgcttttca cgctctgacc acttagctct gcacatgaag 3000  
 cgtcacctct gactgatcct gcacaaggac tgggatgaa ataagagtgg atccaaggac 3060  
 cgtatccca aagatgggcc attatatagt cctaccaga tcaaaaactg accagaagac 3120  
 catacaaagg agccttcagg acaaacctca catgtcctca gggagcccca cacatggccc 3180  
 cacagacca gcaatataga ccaccagata aatcaactca aatggacccc tagaccagag 3240

gagtgaccct gtgtcctgga cgcagatgga ctggggtgag atttcctaag atctagaagg 3300

gagcttcaca ctgtgcccat ctgctaggat tgttgtcggt actataaaaa tttcccatat 3360

aaaaccag 3368



申請日: 104.9.1

IPC分類: C12N15/86 (2006.01)

C09K14/47 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

A61P43/00 (2006.01)

G01N33/15 (2006.01)

C40B30/06 (2006.01)

201619387

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】延長壽命與抑制腫瘤發生的動物模型

【英文發明名稱】ANIMAL MODEL OF LONGEVITY AND INHIBITING

TUMORIGENESIS

## 【中文】

本發明包含一種長壽且增加健康年限之經遺傳修飾的非人類動物模型，其與降低腫瘤發生率和腫瘤轉移率相關，本發明也包含可增加壽命和健康年限、降低腫瘤發生和腫瘤轉移的方法，同時也提供能鑑別增加壽命或健康年限或降低腫瘤發生或腫瘤轉移之活性藥劑的方法。

## 【英文】

The present invention includes a genetically-modified non-human animal model of longevity and increased health span, which is associated with reduced tumorigenesis and tumor metastasis, as well as related methods for increasing longevity and health span, reducing tumorigenesis and tumor metastasis, and identifying active agents that confer increased longevity or health span, or reduced tumorigenesis or tumor metastasis.

【指定代表圖】第1圖

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

## 【發明申請專利範圍】

【第1項】一種合成多肽或一種可編碼產生該合成多肽的核酸於製備一種醫藥品之用途，該醫藥品係用以治療或預防一有需要的個體之細胞增殖性疾病、或抑制或降低其腫瘤發生率或腫瘤轉移率，其中該合成多肽為一修飾的 EKLF 多肽，該修飾的 EKLF 多肽包含一或多個修飾的胺基酸，以使得其類小泛素化(sumoylation)程度低於一野生型 EKLF 多肽的類小泛素化程度，其中該修飾的 EKLF 多肽非必要的是一修飾的人類 EKLF 多肽。

【第2項】如請求項 1 所述之用途，其中該修飾的 EKLF 多肽的細胞質至細胞核移位作用(translocation)少於野生型 EKLF 多肽的移位作用。

【第3項】如請求項 1 或 2 所述之用途，其中該修飾的 EKLF 多肽之一轉錄活化子活性(transactivator activity)或一抑制子活性(repressor activity)與野生型 EKLF 多肽的轉錄活化子活性或抑制子活性不同。

【第4項】如請求項 1 所述之用途，其中該核酸是一表現載體。

【第5項】如請求項 4 所述之用途，其中該表現載體是一病毒載體。

【第6項】如請求項 5 所述之用途，其中該病毒載體是來自於疱疹病毒、反轉錄病毒、牛痘病毒、減毒牛痘病毒、金絲雀痘病毒、腺病毒或腺相關病毒。

【第7項】如請求項 1 所述之用途，其中該一或多個修飾的胺基酸包含修飾的胺基酸對於野生型 EKLF 多肽中一可被類小泛素化或磷酸化之胺基酸位置進行修飾。

【第8項】如請求項 7 所述之用途，其中該一或多個修飾的胺基酸包含修飾的胺基酸對一對應於全長野生型人類 EKLF 多肽上第 54 個胺基酸之胺基酸所進行的修飾。

【第9項】如請求項 8 所述之用途，其中該第 54 個修飾的胺基酸是以精胺酸取代離胺酸(K54R)。

【第10項】如請求項 6 所述之用途，其中該一或多個修飾的胺基酸包含修飾的胺基酸對一對應於全長野生型小鼠 EKLF 多肽第 68 個胺基酸之胺基酸進行修飾。

【第11項】一種第一活性藥劑於製備一醫藥品的用途，該醫藥品係用以治療或預防一有需要個體之細胞增殖性疾病，其中該第一活性藥劑可改變一內源性 EKLF 多肽的一或多種活性，其中該內源性 EKLF 多肽可以是一內源性人類 EKLF 多肽。

【第12項】如請求項 11 所述之用途，其中該第一活性藥劑降低該內源性 EKLF 多肽從細胞質至細胞核的移位作用。

【第13項】如請求項 11 所述之用途，其中該第一活性藥劑可改變該內源性 EKLF 多肽的一轉錄活化子活性或一抑制子活性。

【第14項】如請求項 11 所述之用途，其中該第一活性藥劑可結合至該內源性 EKLF 多肽。

【第15項】如請求項 14 所述之用途，其中該第一活性藥劑是一有機小分子或一多肽，其中該多肽可以是一抗體或其功能性片段。

【第16項】如請求項 14 所述之用途，其中該第一活性藥劑與該內源性 EKLF 多肽之結合可抑制該內源性 EKLF 多肽從細胞質至細胞核的移位作用。

【第17項】如請求項 11 所述之用途，更包含一第二活性藥劑於製備該醫藥品的用途，其中該第二活性藥劑可抑制該內源性 EKLF 多肽的表現。

【第18項】如請求項 17 所述之用途，其中該第二活性藥劑是一核酸分子，其可以是一負股 RNA、siRNA、shRNA 或 miRNA，該核酸分子可結合至一可編碼產生該內源性 EKLf 多肽之 mRNA 或其互補序列。

【第19項】如請求項 17 所述之用途，其中該第二活性藥劑能抑制內源性 EKLf 多肽的轉譯或轉錄作用。

【第20項】如請求項 11 所述之用途，其中該細胞增殖性疾病、腫瘤或腫瘤轉移是一肝癌、大腸癌、乳癌、前列腺癌、肝細胞癌、黑色素瘤、肺癌、神經膠母細胞瘤、腦瘤、造血系統惡性腫瘤、膽道癌、視網膜母細胞瘤、腎細胞癌、頭頸癌、子宮頸癌、胰臟癌、食道癌或鱗狀細胞癌。

【第21項】如請求項 11 所述之用途，更包含對該個體施用一有效量的抗增殖劑。

【第22項】如請求項 21 所述之用途，其中該抗增殖劑是一烷化劑、拓撲異構酶抑制劑、抗代謝物或細胞毒性抗生素。

【第23項】如請求項 22 所述之用途，其中該烷化劑是選自於由以下物質所組成之群組：順鉑(cisplatin)、卡鉑錠(carboplatin)、益樂鉑(oxaliplatin)、甲基二(氯乙基)胺(mechlorethamine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、氮芥苯丙胺酸(melphalan)、氮芥苯丁酸(chlorambucil)、依弗醯胺(ifosfamide)、二甲磺酸丁酯(busulfan)、N-亞硝-正-甲脲(N-nitroso-N-methylurea, MNU)、雙氯乙基亞硝脲(carmustine)、環己亞硝(lomustine)、司莫司汀(semustine)、福莫司汀(fotemustine)、鏈佐黴素(streptozotocin)、達卡巴仁(dacarbazine)、米托唑胺(mitozolomide)、替莫唑胺(temozolomide)、沙奧特帕(thiotepa)、絲裂霉素(mytomycin)以及地亞農(diaziquone)。

【第24項】如請求項 22 所述之用途，其中該拓撲異構酶抑制劑是選自於由以下物質所組成之群組：喜樹鹼(camptothecin)、依瑞諾丁 (irinotecan)、托普迪肯(topotecan)、依妥普賽(etoposide)、艾黴素(doxorubicin)、坦尼坡賽(teniposide)、諾波黴素(novobiocin)、美巴龍(merbarone)以及阿柔比星(aclarubicin)。

【第25項】如請求項 22 所述之用途，其中該抗代謝物是選自於由以下物質所組成之群組：氟嘧啶(fluoropyrimidine)、去氧核酸類似物(deoxynucleoside analogue)、硫嘌呤(thiopurine)、甲氨蝶呤(methotrexate)以及培美曲塞(pemetrexed)。

【第26項】如請求項 22 所述之用途，其中該細胞毒性抗生素是選自於由以下物質所組成之群組：放線菌素(actinomycin)、博萊黴素(bleomycin)、普卡黴素(plicamycin)、絲裂黴素(mitomycin)、艾黴素(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、表阿黴素(epirubicin)、伊達比星(idarubicin)、泛艾黴素(piraubicin)、阿柔比星(alcarubicin)以及米托蒽醌(mitoxantrone)。

【第27項】一種合成多肽或一種可編碼產生該合成多肽的核酸於製備一醫藥品之用途，該醫藥品係可用以延長一個體的壽命或健康年限，其中該合成多肽為一修飾的 EKLF 多肽，該修飾的 EKLF 多肽包含一或多個修飾的胺基酸，以使得該性的 EKLF 多肽其類小泛素化(sumoylation)程度低於一野生型 EKLF 多肽的類小泛素化程度，其中該修飾的 EKLF 多肽非必要的是一修飾的人類 EKLF 多肽。

【第28項】如請求項 27 所述之用途，其中該修飾的 EKLF 多肽的細胞質至細胞核移位作用少於野生型 EKLF 多肽的移位作用。



【第29項】如請求項 27 所述之用途，其中該修飾的 EKLF 多肽之一轉錄活化子活性或一抑制子活性與野生型 EKLF 多肽的轉錄活化子活性或抑制子活性不同。

【第30項】如請求項 27 所述之用途，其中該核酸是一表現載體。

【第31項】如請求項 30 所述之用途，其中該表現載體是一病毒載體。

【第32項】如請求項 31 所述之用途，其中該病毒載體是來自於疱疹病毒、反轉錄病毒、牛痘病毒、減毒牛痘病毒、金絲雀痘病毒、腺病毒或腺相關病毒。

【第33項】如請求項 27 所述之用途，其中該一或多個修飾的胺基酸位於野生型 EKLF 多肽中經類小泛素化或經磷酸化之胺基酸的位置。

【第34項】如請求項 33 所述之用途，其中該一或多個修飾的胺基酸對應於全長野生型人類 EKLF 多肽上的第 54 個胺基酸。

【第35項】如請求項 34 所述之用途，其中該第 54 個修飾的胺基酸是以精胺酸取代離胺酸(K54R)。

【第36項】如請求項 32 所述之用途，其中該一或多個修飾的胺基酸對應於全長野生型小鼠 EKLF 多肽第 68 個胺基酸。

【第37項】一種第一活性藥劑用以製備一醫藥品的用途，該醫藥品係可用以延長一個體的壽命或健康年限，其中該第一活性藥劑可改變一或多個內源性 EKLF 多肽的活性，其中該內源性 EKLF 多肽可以是一內源性人類 EKLF 多肽。

【第38項】如請求項 37 所述之用途，其中該第一活性藥劑可降低細胞質至細胞核的移位作用。

【第39項】如請求項 37 所述之用途，其中該一或多個內源性 EKLF 多肽的活性是該內源性 EKLF 多肽的一轉錄活化子活性或一抑制子活性。

【第40項】請求項 37 所述之用途，其中該第一活性藥劑可結合至該內源性 EKLF 多肽。

【第41項】如請求項 40 所述之用途，其中該第一活性藥劑是一有機小分子或一多肽，其可以是一抗體或功能性片段。

【第42項】如請求項 40 所述之用途，其中該第一活性藥劑與該內源性 EKLF 多肽之結合能抑制該內源性 EKLF 多肽從細胞質至細胞核的移位作用。

【第43項】如請求項 40 所述之用途，其中該第一活性藥劑結合至該內源性 EKLF 多肽能改變其轉錄活化子活性或抑制子活性。

【第44項】如請求項 37 所述之用途，更包含一第二活性藥劑以製備該醫藥品，其中該第二活性藥劑可抑制內源性 EKLF 多肽的表現。

【第45項】如請求項 44 所述之用途，其中該第二活性藥劑是一核酸分子，其可以是一負股 RNA、siRNA、shRNA 或 miRNA，該核酸分子可結合至一編碼內源性 EKLF 多肽之 mRNA 或其互補序列。

【第46項】如請求項 37 所述之用途，其中該用途對於該個體能達到以下結果：減少頭髮花白、提升運動協調性、提升肌力、減輕肌肉無力、降低骨質疏鬆、增加骨體積、提升骨密度、增加索前軟骨的數量、縮減索前軟骨的間隙或減少平衡力之喪失。

【第47項】如請求項 37 所述之用途，其中該個體是一哺乳動物，其可以是一人類。

【第48項】一種基因敲入 (knock-in) 載體，包含一可編碼產生一修飾的 EKLF 多肽之多核苷酸序列，其中相較於一野生型 EKLF 多肽，該修飾的 EKLF 多肽包含一或多個修飾的胺基酸。

【第49項】一種細胞、組織或器官，其具有一合成多肽或一可編碼產生該合成多肽之核酸，其中該合成多肽為一修飾的 EKLF 多肽，該修飾的 EKLF 多肽包含一或多個修飾的胺基酸，以使得該修飾的 EKLF 多肽之類小泛素化程度低於一野生型 EKLF 多肽的類小泛素化程度，其中該修飾的 EKLF 多肽可以是一修飾的人類 EKLF 多肽。

【第50項】一種鑑別能夠延長個體壽命和/或抑制或減少個體腫瘤發生或腫瘤轉移之一活性藥劑的方法，包含：

a)將一 EKLF 多肽或一表現 EKLF 多肽的細胞與一候選藥劑接觸，其中該 EKLF 多肽可以是一人類 EKLF 多肽；以及

b)測量該 EKLF 多肽的轉譯後修飾量或測量該 EKLF 多肽活性量；

其中若該轉譯後修飾量或活性量與一對照量不同，則該候選藥劑是可延長個體壽命和/或抑制或減少個體腫瘤形成或腫瘤轉移的活性藥劑。

【第51項】如請求項 50 所述之方法，其中步驟 b)為測量該 EKLF 多肽的轉譯後修飾量，且若測量到的量低於該對照量，則該候選藥劑是該活性藥劑。

【第52項】如請求項 51 所述之方法，其中該轉譯後修飾是指類小泛素化或磷酸化。

【第53項】如請求項 52 所述之方法，其中該類小泛素化發生在該人類 EKLF 多肽上第 54 個胺基酸。

【第54項】如請求項 50 所述之方法，其中該測量該 EKLF 多肽活性量是指測量 EKLF 多肽從細胞質至細胞核的移位作用，且該若該測量到的量低於該對照量，則該候選藥劑是該活性藥劑。

【第55項】如請求項 50 所述之方法，其中測量該 EKLF 多肽活性量是指測量其轉錄活化子活性量，且若該測量到的量與該對照量不同，則該候選藥劑是活性藥劑，其中該測量量可以低於該對照量。

【第56項】如請求項 50 所述之方法，其中測量該 EKLF 多肽活性量是指測量其抑制子活性量，且若該測量到的量與該對照量不同，則該候選藥劑是該活性藥劑，其中該測量到的量可以高於該對照量。

【第57項】如請求項 50 所述之方法，其中該對照量是一預設值，或一未接觸該候選藥劑之細胞中與 EKLF 多肽相關之量。

【第58項】如請求項 50 所述之方法，其中該 EKLF 多肽是一內源性 EKLF 多肽或一外源性 EKLF 多肽。

【第59項】如請求項 58 所述之方法，其中該外源性 EKLF 多肽是一野生型 EKLF 多肽。

【第60項】如請求項 58 所述之方法，其中該細胞包含一外源性核酸，其能表現該 EKLF 多肽。

【第61項】一種鑑別一活性藥劑的方法，該活性藥劑能延長個體壽命和/或抑制或減少腫瘤發生或腫瘤轉移，包含：

a)施用一候選藥劑至一非人類轉殖基因動物，其中該非人類轉殖基因動物包含一或多個紅血球 Kruppel 樣因子(Erythroid Kruppel-like factor, EKLF)基因所編碼產生之修飾的 EKLF 多肽，相較於野生型 EKLF 多肽，此修飾的 EKLF 多肽包含一或多個修飾的胺基酸；

b)測量該 EKLF 多肽的轉譯後修飾量或測量該 EKLF 多肽活性量；

其中相較於一對照量，若該轉譯後修飾量或活性量改變，則該候選藥劑是可延長個體壽命和/或抑制抑制腫瘤形成的活性藥劑。

【第62項】一種鑑別一活性藥劑的方法，該活性藥劑能延長個體壽命和/或抑制或減少個體腫瘤發生或腫瘤轉移，包含：

a) 將一表現修飾的 EKLF 對偶基因細胞與一候選藥劑接觸，其中該修飾的 EKLF 對偶基因編碼一修飾的 EKLF 多肽，相較於野生型 EKLF 多肽，該修飾的 EKLF 多肽包含一或多個修飾的胺基酸；以及

b) 測量該修飾的 EKLF 多肽的表現量；其中若該修飾的 EKLF 多肽的表現量高於未與該候選藥劑接觸之一控制組細胞的表現量，則該候選藥劑是能延長個體壽命和/或抑制個體腫瘤形成的活性藥劑。





































