

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号

WO 2019/100618 A1

(43) 国际公布日

2019 年 5 月 31 日 (31.05.2019)

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/113 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/077481

(22) 国际申请日: 2018 年 2 月 28 日 (28.02.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201711189410.5 2017 年 11 月 24 日 (24.11.2017) CN

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 汪维鹏(WANG, Weipeng); 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215123 (CN)。 孟凡义(MENG, Fanyi); 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215123 (CN)。 邱雅静(QIU, Yajing); 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215123 (CN)。 孔洁红(KONG, Jiehong); 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215123 (CN)。 陈喜华(CHEN, Xihua); 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司(UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街 22 号赛特广场 7 层, Beijing 100004 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: MICRORNA AND USE OF SAME IN PREPARING ANTI-TUMOR DRUGS

(54) 发明名称: 微小RNA及其在制备抗肿瘤药物中的应用

(57) Abstract: Provided are an miR-34a-5p mutant and the use of same in preparing anti-tumor drugs. The mutant is the miR-34a-5p sequence with any base at positions 10-22 of the 5' end thereof being mutated to n, wherein n is A, C, G or U. The mutant and the complementary chain thereof can inhibit the expression level of PD-L1, B7-H3 and B7-H4 proteins in tumor cells and inhibit growth and/or proliferation of tumor cells, and meanwhile have no significant impact on the secretion of cytokines in serum.

(57) 摘要: 提供了 miR-34a-5p 突变体及其在制备抗肿瘤药物中的应用。该突变体为 miR-34a-5p 序列 5' 端第 10 位~第 22 位中的任一碱基突变为 n, 所述 n 为 A、C、G 或 U。该突变体及其互补链能够抑制肿瘤细胞中 PD-L1、B7-H3、B7-H4 蛋白表达水平, 抑制肿瘤细胞生长和/或增殖, 同时对血清中细胞因子的分泌没有显著影响。



WO 2019/100618 A1

微小 RNA 及其在制备抗肿瘤药物中的应用

本申请要求于 2017 年 11 月 24 日提交中国专利局、申请号为 201711189410.5、发明名称为“微小 RNA 及其在制备抗肿瘤药物中的应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

5

技术领域

本发明涉及生物制药技术领域，尤其涉及微小 RNA 及其在制备抗肿瘤药物中的应用。

10 背景技术

我国恶性肿瘤发病率和死亡率逐年上升，越来越受到医学界的重视，亦然成为基础研究和临床研究的重大课题。虽然肿瘤治疗取得了一定的进展，但离生存期的根本提高对生活质量的的要求仍有一定的距离，探求更为安全有效的辅助治疗仍需更多努力。目前，肿瘤免疫治疗已成为继手术、化疗和放疗后的一种有效疗法而被广泛用于临床，尤其是基于免疫卡控点的阻断疗法。有效的抗肿瘤免疫治疗依赖于细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTLs) 的有效活化，而 T 细胞的有效活化和功能介导依赖于抗原递呈细胞和 T 细胞表面的配体/受体对提供的协同刺激信号。其中，B7-CD28 是迄今为止公认的最基本的协同刺激信号，包括 B7-1、B7-2、B7h、PD-L1 (B7-H1)、B7-H2、B7-H3、B7-H4 等配体与 CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、BTLA 等受体提供的促进 T 细胞生长、分化和产生细胞因子的正性信号，以及限制、终止和/或减弱 T 细胞应答的负性信号。

PD-L1、B7-H3 和 B7-H4 是近年发现的 B7 家族协同刺激分子的重要成员，均被发现在多种肿瘤组织中异常高表达，包括肠癌、胃癌、食管癌、肺癌、尿路移行细胞癌、肾癌和前列腺癌等；且其高表达与患者预后差显著相关。大量研究亦已证实，通过抑制 PD-L1、B7-H3 或 B7-H4 表达可以获得很好的抗肿瘤效果；目前，已经上市的 PD-L1 单克隆抗体药物有罗氏的 Atezolizumab，用于治疗尿路上皮癌（膀胱癌）或靶向治疗和化疗失败的非小细胞肺癌患者，以及阿斯利康公司的 Durvalumab 用于治疗局

部晚期或转移性尿路上皮癌患者。我们前期研究发现, PD-L1、B7-H3 或 B7-H4 的表达均可被内源性微小 RNA 抑制。

微小 RNA (microRNA) 是近年来发现于真核细胞中的一类长约 22 个核苷酸的内源性非编码小分子 RNA, 其 5'-端第 2-9 个碱基(seed region) 5 可通过与靶基因的 3' -UTR 结合, 在翻译水平抑制蛋白合成, 从而在基因表达中发挥重要的调节作用。迄今为止, 人类基因组中已明确的微小 RNA 约有 2588 个 (miRBase), 调控着至少 30% 基因的表达, 而每一个微小 RNA 可能参与调控 100 ~ 200 个靶基因的翻译。微小 RNA 由于其广泛的调控作用参与了细胞的生长、分化、增殖和凋亡等生命过程, 影响着 10 几乎所有的信号通路, 并参与各种生理病理过程, 特别在肿瘤的发生和发展中发挥了极为重要的作用。

大量研究结果显示微小 RNA 在肿瘤中呈现异常表达, 其中有的微小 RNA 表达升高而有的降低, 分别通过抑制抑癌基因表达或上调癌基因表达, 发挥着促癌或抑癌的作用。2002 年, Clain 等发现两个微小 RNA 基 15 因 miR-15 和 miR-16 在慢性淋巴细胞白血病患者中常发生缺失, 首次揭示了微小 RNA 与肿瘤的密切关系。之后, 越来越多的微小 RNA 被发现在肿瘤中异常表达, 如低表达的 miR-34a-5p、miR-143、miR-145 和高表达的 miR-21、miR-27a、miR-155 等。业已证实, 通过在肿瘤细胞中转入低表达微小 RNA 的模拟物 (mimic 和 agomir 等), 或者转入高表达微小 20 RNA 的抑制剂 (inhibitor 和 antagomir 等), 可以有效抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移, 从而发挥抗肿瘤效果。

在肿瘤治疗领域, 进展最快的微小 RNA 药物是 miR-34a-5p mimic 的两性霉素脂质体制剂 MRX34。由于 miR-34a-5p 在细胞和动物水平均显示出了很好的抗肿瘤活性和安全性, 美国 Mirna Therapeutic 公司于 2013 年推动 25 了一项多中心的 I 期临床试验, 用于治疗原发性肝癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤或肾细胞癌患者, 也成为第一个进入临床试验的微小 RNA 药物。随后, RG-101 (N-乙酰-D-氨基半乳糖修饰的抗 miR-122 核酸片段)、RG-012 (miR-21 抑制剂)、RG-125/AZD4076 (N-乙酰半乳糖胺修饰的 miR-103/107 抑制分子)、MRG-201 (miR-29 mimic)

和MRG-106 (antimiR-155锁核苷酸)等微小RNA药物相继进入临床试验。尽管初步临床试验结果显示MRX34的疗效和安全性尚可,但由于其在5名患者中出现细胞因子风暴而中止了临床试验。因此,进一步研究抗肿瘤活性良好,而不产生不良免疫反应的微小RNA仍是目前的研究热点。

5

发明内容

有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供微小RNA及其在制备抗肿瘤药物中的应用。本发明提供的微小RNA抗肿瘤效果良好,且不引起细胞因子异常分泌。

10 本发明提供了一种RNA分子,miR-34a-5p序列5'端第10位~第22位中的任一碱基突变为n,所述n为A、C、G或U。

本发明还提供了与上述RNA分子序列完全互补或部分互补的RNA分子。

具体实施例中,所述部分互补形成的粘性末端为2bp。

15 具体实施例中,所述粘性末端位于互补RNA分子的3'端。

本发明提供的RNA分子中任意一个或多个碱基经修饰获得的RNA分子。

本发明提供的RNA分子在制备抑制PD-L1、B7-H3、B7-H4等蛋白水平的药物中的应用。

20 本发明提供的RNA分子在制备抑制肿瘤细胞生长和/或增殖的药物中的应用。

本发明提供的所述RNA分子在制备治疗抗肿瘤药物中的应用。

25 所述肿瘤为星形细胞瘤、间变性大细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、血管肉瘤、乳腺癌、B细胞淋巴瘤、膀胱癌、子宫颈癌、头颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、胃泌素瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、卡波西肉瘤白血病、肺癌、平滑肌肉瘤、喉鳞状细胞癌、黑色素瘤、粘膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤、髓母细胞瘤、套细胞淋巴瘤、脑膜瘤、骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、高危骨髓增

生异常综合征、间皮瘤、神经纤维瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食管癌、口咽癌骨肉瘤、胰腺癌、乳头状癌、前列腺癌、嗜铬细胞瘤、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、神经鞘瘤、小细胞肺癌、唾液腺肿瘤、散发性乳头状癌、甲状腺癌、睾丸肿瘤或尿路上皮癌。

5 本发明还提供了一种抗肿瘤的药物，包括活性链和互补链；

所述活性链为 RNA 分子或经修饰的该 RNA 分子，该 RNA 分子是 miR-34a-5p 序列 5'端第 10 位~第 22 位中的任一碱基突变为 n，所述 n 为 A、C、G 或 U；所述互补链与活性链互补。

10 本发明提供的 RNA 分子为 miR-34a-5p 序列 5'端第 10 位~第 22 位中的任一碱基突变为 n，所述 n 为 A、C、G 或 U；采用该 RNA 分子及其互补链能够抑制肿瘤细胞中 PD-L1、B7-H3、B7-H4 等蛋白水平，抑制肿瘤细胞生长和/或增殖，从而起到抗肿瘤的作用。并且，研究表明，本发明提供的微小 RNA 在抗肿瘤的同时，对血清中细胞因子的分泌均没有显著影响。

15 附图说明

图 1 示 miR-449a 与 miR-34a-5p 模拟物抑制肿瘤细胞生长的能力检测结果；其中，图 1-a 示对 HCT-116 肠癌细胞的抑制效果；图 1-b 示对 HCT-8 肠癌细胞的抑制效果、图 1-c 示对 Caco-2 肠癌细胞的抑制效果；图 1-d 示对 SW480 肠癌细胞的抑制效果；图 1-e 示对 PANC-1 胰腺癌细胞的抑制效果；和图 1-f 示对 Hela 宫颈癌细胞的抑制效果；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；

25 图 2 示本发明的实施例中，微小 RNA (MIR1A、MIR2G、MIR3A、MIR4C、MIR5U、MIR6U、MIR7A、MIR8A、MIR9C、MIR10C、MIR11A、MIR12U 和 MIR13A) 模拟物与 miR-34a-5p 处理的 HCT-116 结直肠癌细胞的相对生长能力检测结果；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；

图 3 示本发明的实施例中，微小 RNA (MIR1A 和 MIR9C) 和 miR-34a-5p 模拟物抑制肿瘤细胞生长的能力检测结果；其中，图 3-a 示对 HCT-116 肠癌细胞的抑制效果；图 3-b 示对 HCT-8 肠癌细胞的抑制效果、图 3-c 示对 Caco-2 肠癌细胞的抑制效果；图 3-d 示对 SW480 肠癌细胞的

抑制效果；图 3-e 示对 SGC-7901 胃癌细胞的抑制效果；图 3-f 示对 A549 肺癌细胞的抑制效果；图 3-g 示对 PANC-1 胰腺癌细胞的抑制效果；和图 3-h 示对 Hela 宫颈癌细胞的抑制效果；

图 4 示本发明的实施例中，不同浓度（0.1、2.0、10、25、50、100nM）的微小 RNA（MIR1A 和 MIR9C）和 miR-34a-5p 模拟物抑制 HCT-116 肿瘤细胞生长的能力检测结果；其中，图 4-a 示 miR-34a-5p 的抑制效果；图 4-b 示 MIR1A 的抑制效果、图 4-c 示 MIR9C 的抑制效果；

图 5 示本发明的实施例中，平端或粘性末端的微小 RNA（MIR1A 和 MIR9C）和 miR-34a-5p 模拟物抑制 HCT-116 肿瘤细胞生长的能力检测结果；其中，图 5-a 示平端 miR-34a-5p 与粘性末端 miR-34a-5p 的抑制效果；图 5-b 示平端 MIR1A 与粘性末端 MIR1A 的抑制效果、图 5-c 示平端 MIR9C 与粘性末端 MIR9C 的抑制效果；

图 6 示本发明的实施例中，微小 RNA（MIR9CM）和 miR-34a-5p 激动剂抑制 HCT-116 细胞裸鼠移植瘤生长的能力检测结果；其中，图 6-a 示移植瘤的生长曲线；图 6-b 示荷瘤裸鼠体重变化曲线；图 6-c 示荷瘤裸鼠摄食量变化曲线；

图 7 示本发明的实施例中，微小 RNA（MIR9C）模拟物处理的 HCT-116 细胞中细胞因子分泌水平的流式细胞术检测结果；其中，图 7-a 示 IL-2 蛋白的检测结果；图 7-b 示 IL-4 蛋白的检测结果；图 7-c 示 IL-6 蛋白的检测结果；图 7-d 示 IL-10 蛋白的检测结果；图 7-e 示 TNF- α 蛋白的检测结果；图 7-f 示 IFN- γ 蛋白的检测结果；

图 8 示本发明的实施例中，微小 RNA（MIR9C）模拟物处理的 HCT-116 细胞/T 淋巴细胞共培养体系中细胞因子分泌水平的流式细胞术检测结果；其中，图 8-a 示 IL-2 蛋白的检测结果；图 8-b 示 IL-4 蛋白的检测结果；图 8-c 示 IL-6 蛋白的检测结果；图 8-d 示 IL-10 蛋白的检测结果；图 8-e 示 TNF- α 蛋白的检测结果；图 8-f 示 IFN- γ 蛋白的检测结果；

图 9 示本发明的实施例中，微小 RNA（MIR9CM）激动剂处理的 C57BL/6 小鼠血清中细胞因子分泌水平的流式细胞术检测结果；其中，图 9-a 示 IL-2 蛋白的检测结果；图 9-b 示 IL-4 蛋白的检测结果；图 9-c

示 IL-6 蛋白的检测结果;图 9-d 示 IL-10 蛋白的检测结果;图 9-e 示 TNF- α 蛋白的检测结果;图 9-f 示 IFN- γ 蛋白的检测结果;

图 10 示本发明的实施例中,微小 RNA (MIR1A 和 MIR9C) 和 miR-34a-5p 模拟物处理的 HCT-116 细胞中 PD-L1、B7-H3 和 B7-H4 蛋白的 Western bolt 检测结果;

图 11 示本发明的实施例中,微小 RNA (MIR9CM) 激动剂处理的 HCT-116 细胞移植瘤中蛋白表达的 Western bolt 检测结果;其中,图 11-a 示 PD-L1 蛋白的检测结果;图 11-b 示 B7-H3 蛋白的检测结果;图 11-c 示 B7-H4 蛋白的检测结果。

10 具体实施方式

本发明提供了微小 RNA 及其在制备抗肿瘤药物中的应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

本发明说明书中提及的术语定义如下:

本发明提供的 RNA 分子为微小 RNA (microRNA, 或 miRNA), 其是指单链的寡核糖核酸。核糖核苷酸是由核苷酸经磷酸二酯键缩合而成长链状分子。核糖核苷酸分子由一分子碱基、一分子核糖和磷酸构成。本发明提供的 miRNA 的碱基有 4 种, A 腺嘌呤、G 鸟嘌呤、C 胞嘧啶、U 尿嘧啶, 5-甲基胞嘧啶 (5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基和腺嘌呤和鸟嘌呤的其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其它烷基衍生物、5-硫尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶 (假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫代烷基、8-羟基和其他 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤素 (包括 5-溴、5-三氟甲基和其它 5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶)、7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮鸟嘌呤和 8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和 7-

脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和 3-脱氮腺嘌呤。

所述碱基，可以是无修饰碱基，也可以是修饰碱基。

所述修饰碱基，是指碱基连接基团包括但不限于 NH_2 、生物素、胺基、低级胺基烷基、低级烷基、 NHCOCH_3 、乙酰基、2'-氧基-甲基(2'-O-Me)、DMTO、荧光素、硫醇或吡啶。

所述修饰碱基，是指本发明提供的 RNA 分子链或其互补链中的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 个碱基连接修饰基团。

所述修饰，是指本发明提供的 RNA 分子链或其互补链中的碱基连接任何一种或多种基团或其组合。

所述核糖，可以是无修饰核糖，也可以是修饰核糖。

所述修饰核糖，是指核糖连接基团包括但不限于低级烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或 O-芳烷基、SH、 SCH_3 、Cl、Br、CN、OCN、 CF_3 、 OCF_3 、 SOCH_3 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、杂环烷基、杂环氨基烷基、氨基烷基、聚氨基烷基、取代的甲硅烷基、RNA 裂解基团、嵌入剂、用于改善微小 RNA 的药代动力学性质的基团或用于改善微小 RNA 的药效学性质的基团，以及具有相似性质的其它取代基。另外的糖取代基包括 2'-O-2-甲氧基乙基(2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$)、2'-二甲基氨基乙氧基[2'-O- CH_2 -O- CH_2 -N(CH_3) $_2$]、烯丙基(- CH_2 -CH=CH $_2$)、-O-烯丙基(-O- CH_2 -CH=CH $_2$)、甲氧基(-O- CH_3)、氨基丙氧基(-OCH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ NH $_2$)和氟(F)等。

所述修饰核糖，是指本发明提供的 RNA 分子链或其互补链中的任何 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 个核糖连接修饰基团。

所述修饰，是指本发明提供的 RNA 分子链或其互补链中的核糖连接任何一种或多种基团或其组合。

所述互补，又称互补配对，是指碱基通过氢键与它互补的碱基相连。互补碱基对 A 与 U 之间形成两对氢键，C 与 G 之间形成三对氢键。

所述完全互补是指序列完全匹配且不形成粘性末端。所述部分互补是

指序列完全匹配，但形成粘性末端。

本发明所述突变是指一个碱基被另一个碱基所取代，突变后，RNA分子中碱基的数量不发生改变。本发明中，所述突变不存在碱基被与自身相同碱基取代，即所述突变不存在 A 被 A 取代，C 被 C 取代，G 被 G 取代，U 被 U 取代的情况。

本发明提供的 RNA 分子为 miR-34a 序列 5'端第 10 位~第 22 位中的任一碱基突变为 n，所述 n 为 A、C、G 或 U。

本发明还提供了与上述 RNA 分子序列完全互补或部分互补的 RNA 分子。

具体实施例中，所述部分互补形成的粘性末端为 2bp。

具体实施例中，所述粘性末端位于互补 RNA 分子的 3'端。

本发明中，提供的突变的 miR-34a-5p 记为活性链，与其完全互补或部分互补的 RNA 分子记为互补链。

所述 miR-34a-5p 序列如 SEQ ID NO.26 所示。

一些实施例中，所述完全互补的微小 RNA 分子对包括 SEQ ID NO:1 所示序列的活性链和 SEQ ID NO.27 所示序列的互补链；或者包括 SEQ ID NO:17 所示序列的活性链和 SEQ ID NO.28 所示序列的互补链。

部分互补的微小 RNA 分子对包括：

活性链序列如 SEQ ID NO.1 所示，其互补链序列如 SEQ ID NO.2 所示。

SEQ ID NO.1 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 10 位碱基 C 突变为 n，所述 n 为 A、G 或 U。具体实施例中，SEQ ID NO.1 中所述 n 为 A。SEQ ID NO.1 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO:2 中 5'端第 1~20 位互补；SEQ ID NO.1 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端；SEQ ID NO.2 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

活性链序列如 SEQ ID NO.3 所示，其互补链序列如 SEQ ID NO.4 所示。

SEQ ID NO.3 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 11 位碱基 U 突变为 n，所述 n 为 A、C 或 G。具体实施例中，SEQ ID NO.3 中所述 n 为 G。SEQ ID

NO.3 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO:4 中 5'端第 1~20 位互补; SEQ ID NO.3 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端; SEQ ID NO.4 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

活性链序列如 SEQ ID NO.5 所示, 其互补链序列如 SEQ ID NO.6 所示。

SEQ ID NO.5 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 12 位碱基 U 突变为 n, 所述 n 为 A、C 或 G。具体实施例中, SEQ ID NO.5 中所述 n 为 A。SEQ ID NO.5 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO:6 中 5'端第 1~20 位互补; SEQ ID NO.5 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端; SEQ ID NO.6 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

活性链序列如 SEQ ID NO.7 所示, 其互补链序列如 SEQ ID NO.8 所示。

SEQ ID NO.7 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 13 位碱基 A 突变为 n, 所述 n 为 C、G 或 U。具体实施例中, SEQ ID NO.7 中所述 n 为 C。SEQ ID NO.7 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO:8 中 5'端第 1~20 位互补; SEQ ID NO.7 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端; SEQ ID NO.8 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

活性链序列如 SEQ ID NO.9 所示, 其互补链序列如 SEQ ID NO.10 所示。

SEQ ID NO.9 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 14 位碱基 G 突变为 n, 所述 n 为 A、C 或 U。具体实施例中, SEQ ID NO.9 中所述 n 为 U。SEQ ID NO.9 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO:10 中 5'端第 1~20 位互补; SEQ ID NO.9 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端; SEQ ID NO.10 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

活性链序列如 SEQ ID NO.11 所示, 其互补链序列如 SEQ ID NO.12 所示。

SEQ ID NO.11 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 15 位碱基 C 突变为 n, 所述 n 为 A、G 或 U。具体实施例中, SEQ ID NO.11 中所述 n 为 U。SEQ ID NO.11 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO:12 中 5'端第 1~20 位互补; SEQ

ID NO.11 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端; SEQ ID NO.12 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

活性链序列如 SEQ ID NO.13 所示, 其互补链序列如 SEQ ID NO.14 所示。

5 SEQ ID NO.13 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 16 位碱基 U 突变为 n, 所述 n 为 A、C 或 G。具体实施例中, SEQ ID NO.13 中所述 n 为 A。SEQ ID NO.13 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO.14 中 5'端第 1~20 位互补; SEQ ID NO.13 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端; SEQ ID NO.14 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

10 活性链序列如 SEQ ID NO.15 所示, 其互补链序列如 SEQ ID NO.16 所示。

SEQ ID NO.15 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 17 位碱基 G 突变为 n, 所述 n 为 A、C 或 U。具体实施例中, SEQ ID NO.15 中所述 n 为 A。SEQ ID NO.15 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO.16 中 5'端第 1~20 位互补; SEQ ID NO.15 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端; SEQ ID NO.16 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

活性链序列如 SEQ ID NO.17 所示, 其互补链序列如 SEQ ID NO.18 所示。

20 SEQ ID NO.17 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 18 位碱基 G 突变为 n, 所述 n 为 A、C 或 U。具体实施例中, SEQ ID NO.17 中所述 n 为 C。SEQ ID NO.17 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO.18 中 5'端第 1~20 位互补; SEQ ID NO.17 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端; SEQ ID NO.18 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

25 活性链序列如 SEQ ID NO.19 所示, 其互补链序列如 SEQ ID NO.20 所示。

SEQ ID NO.19 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 19 位碱基 U 突变为 n, 所述 n 为 A、C 或 G。具体实施例中, SEQ ID NO.19 中所述 n 为 C。SEQ ID NO.19 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO.20 中 5'端第 1~20 位互补; SEQ ID NO.19 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端; SEQ ID NO.20 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

位形成粘性末端。

活性链序列如 SEQ ID NO.21 所示，其互补链序列如 SEQ ID NO.22 所示。

SEQ ID NO.21 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 20 位碱基 U 突变为 n，
5 所述 n 为 A、C 或 G。具体实施例中，SEQ ID NO.21 中所述 n 为 A。SEQ ID NO.21 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO.22 中 5'端第 1~20 位互补；SEQ ID NO.21 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端；SEQ ID NO.22 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

10 活性链序列如 SEQ ID NO.23 所示，其互补链序列如 SEQ ID NO.24 所示。

SEQ ID NO.23 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 21 位碱基 G 突变为 n，
所述 n 为 A、C 或 U。具体实施例中，SEQ ID NO.23 中所述 n 为 U。SEQ ID NO.23 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO.24 中 5'端第 1~20 位互补；SEQ ID NO.23 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端；SEQ ID NO.24 的 5'端第 21~22
15 位形成粘性末端。

活性链序列如 SEQ ID NO.25 所示，其互补链序列如 SEQ ID NO.24 所示。

SEQ ID NO.25 为 miR-34a-5p 序列中 5'端第 22 位碱基 U 突变为 n，
所述 n 为 A、C 或 G。具体实施例中，SEQ ID NO.25 中所述 n 为 A。SEQ
20 ID NO.25 中 5'端第 1~20 位与 SEQ ID NO.24 中 5'端第 1~20 位互补；SEQ ID NO.25 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端；SEQ ID NO.24 的 5'端第 21~22 位形成粘性末端。

本发明提供的 RNA 分子中任意一个或多个碱基经修饰获得的 RNA 分子。

25 本发明实施例中，对互补链进行修饰。所述修饰包括：在序列中的任意一个或多个核糖中连接 2'-氧基-甲基基团、使任意一个或多个磷酸基团中的羟基被硫取代、使 3'末端的核糖上的羟基连接胆固醇。

本发明提供的 RNA 分子在制备抑制肿瘤细胞生长和/或增殖的药物中的应用。

通过实验验证, 本发明提供的微小 RNA 分子对对各种肿瘤细胞的生长均有显著的抑制作用, 显示本发明提供的微小 RNA 分子对具有很好的广谱抗肿瘤活性; 且结果表明, 本发明提供的微小 RNA 分子对对肿瘤细胞的抑制作用优于 miR-34a-5p。

5 本发明进行实验的肿瘤细胞包括结直肠癌细胞、胃癌细胞、肺癌细胞、胰腺癌细胞和/或宫颈癌细胞。

具体的, 进行实验的肿瘤细胞为 HCT-116 结直肠癌细胞、HCT-8 结直肠癌细胞、Caco-2 结直肠癌细胞、SW480 结直肠癌细胞、SGC-7901 胃癌细胞、A549 肺癌细胞、PANC-1 胰腺癌细胞和 Hela 宫颈癌细胞等肿瘤细胞中的抗肿瘤活性。

进行实验的微小 RNA 分子对中, 一些对肿瘤细胞生长的抑制活性与 miR-34a-5p 相当, 这些微小 RNA 分子对中的活性链的序列如下任一种所示: SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.21。

15 具体的, 这些分子对为:

MIR1A: 活性链序列如 SEQ ID NO.1 所示, 其中 n 为 A; 其互补链序列如 SEQ ID NO.2 所示, 其中 n 为 U;

MIR6U: 活性链序列如 SEQ ID NO.11 所示, 其中 n 为 U, 其互补链序列如 SEQ ID NO.12 所示, 其中 n 为 A;

20 MIR9C: 活性链序列如 SEQ ID NO.17 所示, 其中 n 为 C, 其互补链序列如 SEQ ID NO.18 所示, 其中 n 为 G;

MIR10C: 活性链序列如 SEQ ID NO.19 所示, 其中 n 为 C, 其互补链序列如 SEQ ID NO.20 所示, 其中 n 为 G;

25 MIR11A: 活性链序列如 SEQ ID NO.21 所示, 其中 n 为 A, 其互补链序列如 SEQ ID NO.22 所示, 其中 n 为 U。

上述微小 RNA 分子对, 对肿瘤细胞生长的抑制活性与 miR-34a-5p 相当, 但它们相对于 miR-34a-5p 而言, 具有更高的用药安全性。实验结果显示, 其中 MIR9C 对实验小鼠血清中 IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 等 5 种细胞因子的分泌均没有显著影响。

进行实验的微小 RNA 分子对中，一些对肿瘤细胞生长的抑制活性显著优于 miR-34a-5p, $p < 0.05$, 这些微小 RNA 分子对中的活性链的序列如下任一种所示: SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.25。

5 具体的，这些分子对为：

MIR2G: 活性链序列如 SEQ ID NO.3 所示，其中 n 为 G；其互补链序列如 SEQ ID NO.4 所示，其中 n 为 C；

MIR3A: 活性链序列如 SEQ ID NO.5 所示，其中 n 为 A；其互补链序列如 SEQ ID NO.6 所示，其中 n 为 U；

10 MIR4C: 活性链序列如 SEQ ID NO.7 所示，其中 n 为 C；其互补链序列如 SEQ ID NO.8 所示，其中 n 为 G；

MIR5U: 活性链序列如 SEQ ID NO.9 所示，其中 n 为 U；其互补链序列如 SEQ ID NO.10 所示，其中 n 为 A；

15 MIR7A: 活性链序列如 SEQ ID NO.13 所示，其中 n 为 A；其互补链序列如 SEQ ID NO.14 所示，其中 n 为 U；

MIR8A: 活性链序列如 SEQ ID NO.15 所示，其中 n 为 A；其互补链序列如 SEQ ID NO.16 所示，其中 n 为 U；

MIR12U: 活性链序列如 SEQ ID NO.23 所示，其中 n 为 U；其互补链序列如 SEQ ID NO.24 所示；

20 MIR13A: 活性链序列如 SEQ ID NO.25 所示，其中 n 为 A；其互补链序列如 SEQ ID NO.24 所示。

本发明提供的 RNA 分子在制备抑制 PD-L1、B7-H3、B7-H4 等蛋白水平的药物中的应用。

25 本发明测定了微小 RNA 分子对，对 PD-L1、B7-H3 和 B7-H4 等负性协同刺激分子表达的影响。通过实验验证，本发明提供的微小 RNA 分子对显著抑制了 HCT-116 细胞中 PD-L1、B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达。

用于测定负性协同刺激分子表达的微小 RNA 分子对中的活性链序列为 SEQ ID NO.1 或 SEQ ID NO.17。

具体的，这些分子对为：

MIR1A: 活性链序列如 SEQ ID NO.1 所示, 其中 n 为 A; 其互补链序列如 SEQ ID NO.2 所示, 其中 n 为 U;

MIR9C: 活性链序列如 SEQ ID NO.17 所示, 其中 n 为 C, 其互补链序列如 SEQ ID NO.18 所示, 其中 n 为 G;

5 在裸鼠中接种 HCT-116 细胞构建肿瘤模型。待肿瘤长至 150-200mm³ 后, 给予本发明提供的微小 RNA 进行治疗。结果表明, 微小 RNA 显著抑制了裸鼠中 HCT-116 细胞移植瘤的生长, 但不影响小鼠的体重和摄食量; 而且, 在刚停药时本发明提供微小 RNA 治疗组肿瘤体积明显小于 miR-34a-5p 组。

10 本发明提供的所述 RNA 分子在制备治疗抗肿瘤药物中的应用。

本发明进行抗肿瘤实验的 RNA 分子中, 活性链的序列如 SEQ ID NO.17 所示, 其中 n 为 C; 互补链的序列如 SEQ ID NO.18 所示, 其中 n 为 G。

15 进行抗肿瘤实验的 RNA 分子中, 互补链经过修饰。所述修饰为, SEQ ID NO.18 中每个核糖分子皆连接 2'-氧基-甲基基团, 其 5'端第 1、2、19、20、21 和/或 22 个磷酸基团中的羟基被硫取代, 3'末端核糖上的羟基连接胆固醇。

20 所述肿瘤为星形细胞瘤、间变性大细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、血管肉瘤、乳腺癌、B 细胞淋巴瘤、膀胱癌、子宫颈癌、头颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、胃泌素瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、卡波西肉瘤白血病、肺癌、平滑肌肉瘤、喉鳞状细胞癌、黑色素瘤、粘膜相关淋巴组织 B 细胞淋巴瘤、髓母细胞瘤、套细胞淋巴瘤、脑膜瘤、骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、高危骨髓增生异常综合征、间皮瘤、神经纤维瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、25 卵巢癌、食管癌、口咽癌骨肉瘤、胰腺癌、乳头状癌、前列腺癌、嗜铬细胞瘤、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、神经鞘瘤、小细胞肺癌、唾液腺肿瘤、散发性乳头状癌、甲状腺癌、睾丸肿瘤或尿路上皮癌。

本发明进一步验证了完全互补的微小 RNA 分子对及部分互补的微小

RNA 分子对的抗肿瘤活性。结果表明,所有粘性末端微小 RNA 的抗肿瘤活性均显著强于与之对应的平端微小 RNA,表明粘性末端微小 RNA 具有更强的抗肿瘤活性。

本发明还提供了一种抗肿瘤的 药物,包括活性链和互补链;

- 5 所述活性链为 RNA 分子或经修饰的该 RNA 分子,该 RNA 分子是 miR-34a-5p 序列 5'端第 10 位~第 22 位中的任一碱基突变为 n,所述 n 为 A、C、G 或 U;所述互补链与活性链互补。

本发明实施例中,所述抗肿瘤药物中,包含的活性链序列为: SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.25。

具体的,包括如下微小 RNA 分子对:

MIR1A: 活性链序列如 SEQ ID NO.1 所示,其中 n 为 A;其互补链序列如 SEQ ID NO.2 所示,其中 n 为 U;

- 15 MIR2G: 活性链序列如 SEQ ID NO.3 所示,其中 n 为 G;其互补链序列如 SEQ ID NO.4 所示,其中 n 为 C;

MIR3A: 活性链序列如 SEQ ID NO.5 所示,其中 n 为 A;其互补链序列如 SEQ ID NO.6 所示,其中 n 为 U;

- 20 MIR4C: 活性链序列如 SEQ ID NO.7 所示,其中 n 为 C;其互补链序列如 SEQ ID NO.8 所示,其中 n 为 G;

MIR5U: 活性链序列如 SEQ ID NO.9 所示,其中 n 为 U;其互补链序列如 SEQ ID NO.10 所示,其中 n 为 A;

MIR6U: 活性链序列如 SEQ ID NO.11 所示,其中 n 为 U,其互补链序列如 SEQ ID NO.12 所示,其中 n 为 A;

- 25 MIR7A: 活性链序列如 SEQ ID NO.13 所示,其中 n 为 A;其互补链序列如 SEQ ID NO.14 所示,其中 n 为 U;

MIR8A: 活性链序列如 SEQ ID NO.15 所示,其中 n 为 A;其互补链序列如 SEQ ID NO.16 所示,其中 n 为 U;

MIR9C: 活性链序列如 SEQ ID NO.17 所示,其中 n 为 C,其互补链

序列如 SEQ ID NO.18 所示, 其中 n 为 G;

MIR10C: 活性链序列如 SEQ ID NO.19 所示, 其中 n 为 C, 其互补链序列如 SEQ ID NO.20 所示, 其中 n 为 G;

5 MIR11A: 活性链序列如 SEQ ID NO.21 所示, 其中 n 为 A, 其互补链序列如 SEQ ID NO.22 所示, 其中 n 为 U。

MIR12U: 活性链序列如 SEQ ID NO.23 所示, 其中 n 为 U; 其互补链序列如 SEQ ID NO.24 所示;

MIR13A: 活性链序列如 SEQ ID NO.25 所示, 其中 n 为 A; 其互补链序列如 SEQ ID NO.24 所示。

10 本发明提供的 RNA 分子为 miR-34a-5p 序列 5'端第 10 位~第 22 位中的任一碱基突变为 n, 所述 n 为 A、C、G 或 U; 采用该 RNA 分子及其互补链能够抑制肿瘤细胞中 PD-L1、B7-H3、B7-H4 蛋白水平, 抑制肿瘤细胞生长和/或增殖, 从而起到抗肿瘤的作用。并且, 研究表明, 本发明提供的微小 RNA 在抗肿瘤的同时, 对血清中细胞因子的分泌均没有显著影响。

15 本发明采用的试材皆为普通市售品, 皆可于市场购得。

10×Taq Bufer with KCl、MgCl₂、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、GeneRuler 100bp DNA Ladder(Thermo, 美国), 西班牙琼脂糖(SunShineBio), 6× DNA Loading Dye、反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本), PCR 引物 (苏州金唯智
20 生物科技有限公司), GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, 美国), Triton-100、MgCl₂•6H₂O、EDTA、NaCl、三 (羟甲基) 氨基甲烷 (Tris)、十二烷基磺酸钠 (SDS)、吐温-20、二甲亚砜、甘氨酸、盐酸、蔗糖、苯酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司), 胎牛血清、opti-MEM (Gibco, 美国), 脂质体 2000、Trizol (Invitrogen, 美国), DMEM
25 培养基、胰蛋白酶 (Hyclone, 美国), 切胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒 (Axygen, 美国), BCA 蛋白定量试剂盒; 氨卞青霉素 (北京索莱宝科技有限公司), 酵母提取物、蛋白胨 (Oxoid, 英国); CCK8 (东仁化学科技(上海)有限公司, 日本), 蛋白酶抑制剂 (Roche, 瑞士), Protein G sepharose beads (GE, 美国), RIPA 裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液

(碧云天生物技术研究所以,中国), Protein Ladder 和 二抗 (Santa Cruz, 美国), PD-L1、B7-H3、B7-H4 蛋白一抗 (Santa Cruz, 美国); ECL 化学发光试剂盒、NC 膜、PVDF 膜 (密理博, 德国), 去离子水 (由上海和泰 Master-S 超纯水机制备), 微小 RNA (上海吉玛基因有限公司化学合成; HPLC 纯化, 纯度>97%); Matrigel (BD, 美国); 流式细胞因子检测试剂盒 BD cytometric bead array (CBA) human th1/th2/th17 cytokine kit (BD, 美国)。

枪尖、1.5mLEP 管 (Axygen, 美国), 细胞培养皿及培养板、离心管 (Corning, 美国), 电子天平 (Scout SE, 中国), 微波炉 (Media, 中国); PCR 仪、水平电泳仪、垂直电泳仪、转膜仪、凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国); 流式细胞仪 (Beckman, 美国); 移液枪、高速离心机 (Eppendorf, 德国), 紫外分光光度计 (Q5000, 美国), 平行震荡仪、高速低温离心机、细胞培养箱、-80℃超低温冰箱 (Thermo Scientific, 美国), 常速离心机 (Jouan, 法国), 倒置显微镜及荧光显微镜 (Olympus, 日本), 微量紫外可见光分光光度计 (Q5000, 美国), 电热恒温培养箱 (PYX-DHS, 中国), 电热恒温水浴箱 (HH-S 型, 中国), 恒温振荡培养箱 (HZQ-X100, 中国), 酶标仪 (Tecan, 瑞士), 游标卡尺, 1ml 注射器 (江苏正康医疗器械有限公司, 中国)。

人结直肠癌细胞 (HCT-116、HCT-8、Caco-2、SW480)、SGC-7901 胃癌细胞、A549 肺癌细胞、PANC-1 胰腺癌细胞和 Hela 宫颈癌细胞 (ATCC, 美国), 大肠杆菌 TOP10 (Novagen, 美国), 细胞株经检测, 无支原体污染。

裸鼠 (Balb/c athymic nu+/nu+) 和 C57BL/6 小鼠, 4 周龄, 体重 18~22 g, 订购于上海斯莱克实验动物有限公司。

下面结合实施例, 进一步阐述本发明:

进行实验的 RNA 序列如表 1:

表 1 微小 RNA 序列

MIR1A	UGGCAGUGUAUUAGCUGGUUGU
	AACCAGCUAAUACACUGCCAUAU
MIR2G	UGGCAGUGUCGUAGCUGGUUGU

	AACCAGCUACGACACUGCCAUI
MIR3A	UGGCAGUGUCUAAGCUGGUUGU
	AACCAGCUUAGACACUGCCAUI
MIR4C	UGGCAGUGUCUUCGCUGGUUGU
	AACCAGCGAAGACACUGCCAUI
MIR5U	UGGCAGUGUCUUAUCUGGUUGU
	AACCAGAUAAAGACACUGCCAUI
MIR6U	UGGCAGUGUCUUAAGUUGGUUGU
	AACCAACUAAGACACUGCCAUI
MIR7A	UGGCAGUGUCUUAAGCAGGUUGU
	AACCUGCUAAGACACUGCCAUI
MIR8A	UGGCAGUGUCUUAAGCUAGUUGU
	AACUAGCUAAGACACUGCCAUI
MIR9C	UGGCAGUGUCUUAAGCUGCUUGU
	AAGCAGCUAAGACACUGCCAUI
MIR10C	UGGCAGUGUCUUAAGCUGGCUGU
	AGCCAGCUAAGACACUGCCAUI
MIR11A	UGGCAGUGUCUUAAGCUGGUAGU
	UACCAGCUAAGACACUGCCAUI
MIR12U	UGGCAGUGUCUUAAGCUGGUUUU
	AACCAGCUAAGACACUGCCAUI
MIR13A	UGGCAGUGUCUUAAGCUGGUUGA
	AACCAGCUAAGACACUGCCAUI
miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAAGCUGGUUGU
miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
与 SEQ ID NO.1 互补	ACAACCAGCUAAUACACUGCCA
与 SEQ ID NO.17 互补	ACAAGCAGCUAAGACACUGCCA
与 SEQ ID NO.26 互补	ACAACCAGCUAAGACACUGCCA

本发明的实验方法包括:

1、细胞培养

所有细胞株均采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 或 DMEM 培养基进行培养, 培养条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度。细胞生长至 80%左右, 用 0.25%胰酶消化传代。每天观察细胞的形态及生长速度, 及时更换新鲜培养基。

2、转染微小 RNA

按 5×10^4 个细胞/孔的量在 24 孔板中接种指数生长期的细胞，培养过夜，直到细胞 80% 汇片。24 小时后，将一定浓度的微小 RNA 稀释至 25 μ L 不含血清和抗生素的 RPMI1640 培养基中，用移液枪轻轻混合均匀；将 1 μ L 脂质体 2000（Invitrogen 公司）悬液加入 25 μ L 不含血清和抗生素的 RPMI1640 培养基中，室温孵育 5min；最后将两者混合在一起，充分混匀，室温静置 20min，使微小 RNA 与脂质体充分结合。最后，将此混合物加入细胞培养孔中。

3、蛋白免疫印迹检测

标准免疫印迹方法检测目的蛋白表达。25 pg 蛋白上样，SDS-PAGE（聚丙烯酰胺凝胶）电泳分离，蛋白电转至硝酸纤维素膜。PD-L1、B7-H3、B7-H4 蛋白一抗孵育，然后用 1:1000 酶标二抗孵育，发光试剂显色检测；GAPDH 作为内参蛋白。

4、流式细胞术检测细胞因子

在 HCT-116 细胞中转染微小 RNA。48 小时后，将其与新分离 T 细胞共培养 16 小时，收集上清，流式细胞仪检测细胞因子。首先，各取 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 共 6 种细胞因子的磁珠 120 μ L 至流式管中，避光静置 30min。取 650 μ L 检测缓冲液，用 250 μ L 稀释液稀释。取出 5 只流式管，分别加入 40 μ L 稀释后的检测缓冲液、40 μ L 混合均匀的磁珠、40 μ L 按照 1: 256、1: 128、1: 64、1: 32 和 1: 16 稀释的标准品，制作标准曲线。另取流式管，分别加入 40 μ L 稀释后的检测缓冲液、40 μ L 混合均匀的磁珠和 40 μ L 样品。避光静置 2h，每隔 30min 震荡一次。每管依次加入 1mL 清洗缓冲液，200g 离心 5min，弃上清。再加入 300 μ L 鞘液与底部磁珠形成混悬液，流式仪检测。

5、动物实验

HCT-116 人结直肠癌细胞与基质胶 1:1 冰上混合，接种于裸鼠左侧腋部皮下。每只鼠注射 100 μ L 混合液，约 500 万细胞。接种后 2 周成瘤。待肿瘤长至 150-200mm³ 后，将实验动物随机分为 3 组，每组 6 只鼠；溶剂对照组、阴性对照组、给药组分别给予生理盐水、阴性对照核酸序列、受试微小 RNA。每只裸鼠静脉注射给药体积设置为 50 μ L，剂量为 2nmol/

鼠/次；每两天注射一次，一共给药五次。从给药第一天开始，每3天测定肿瘤大小和裸鼠体重一次；肿瘤大小使用公式 $V = (a \times b^2) / 2$ 计算，其中 a 和 b 分别是肿瘤的长径和短径。

6、CCK8 法检测细胞活性

- 5 向细胞培养孔中加入 CCK-8 溶液，在培养箱中继续培养 0.5 小时后，酶标仪检测 450nm 处吸光值 (A)，计算抑制率 = (样品 A 值 - 空白 A 值) / (对照 A 值 - 空白 A 值) × 100%。

本发明的实验结果为：

- 从 SEQ ID NO.1-22 中随机选择 13 条微小 RNA，测定其抑制 HCT-116 结直肠癌细胞生长的活性。结果如图 2 所示，这些微小 RNA 抑制肿瘤细胞生长的活性均显著高于 miR-34a-5p (包含 SEQ ID NO.26: 5'-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3' 和 SEQ ID NO.24: 5'-AACCAGCUAAGACACUGCCA-3')，如 MIR2G、MIR3A、MIR4C、MIR5U、MIR7A、MIR8A、MIR12U 和 MIR13A 等，或与之相当(如 MIR1A、MIR6U、MIR9C、MIR10C 和 MIR11A 等)。再选取两对微小 RNA (MIR1A: 包含 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2，其中 n 分别为 A 和 U；MIR9C: 包含 SEQ ID NO.17 和 SEQ ID NO.18，其中 n 分别为 C 和 G) 进一步研究其在 HCT-116 结直肠癌细胞、HCT-8 结直肠癌细胞、Caco-2 结直肠癌细胞、SW480 结直肠癌细胞、SGC-7901 胃癌细胞、A549 肺癌细胞、PANC-1 胰腺癌细胞和 Hela 宫颈癌细胞等肿瘤细胞中的抗肿瘤活性。结果如图 3 所示，各种肿瘤细胞的生长均被显著抑制，显示微小 RNA 具有很好的广谱抗肿瘤活性。

- 此外，我们还分别比较了活性链序列完全相同的粘性末端 MIR1A 和 MIR9C 与平端 MIR1A (包含 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.27: 5'-ACAACCAGCUAAUACACUGCCA-3') 和平端 MIR9C (包含 SEQ ID NO.17 和 SEQ ID NO.28: 5'-ACAAGCAGCUAAGACACUGCCA-3') 抑制 HCT-116 细胞生长的作用，同时也比较了粘性末端 miR-34a-5p (包含 SEQ ID NO.26 和 SEQ ID NO.24) 与平端 miR-34a-5p (包含 SEQ ID NO.26 和 SEQ ID NO.29: 5'-ACAACCAGCUAAGACACUGCCA-3') 的活性差

异。结果如图 5 所示, 在这三对微小 RNA 中, 所有粘性末端微小 RNA 的抗肿瘤活性均显著强于与之对应的平端微小 RNA, 表明粘性末端微小 RNA 具有更强的抗肿瘤活性。

我们在裸鼠中接种 HCT-116 细胞构建肿瘤模型。待肿瘤长至
5 150-200mm³后, 给予微小 RNA (MIR9CM: 序列包含 SEQ ID NO17 和
SEQ ID NO18, 其中 n 分别为 C 和 G; SEQ ID NO18 包含 22 个连接 2'-
氧基-甲基基团的核糖的核苷酸, 其 5'端第 1、2、19、20、21 和/或 22 个
磷酸基团中的羟基被硫取代, 3'末端核糖上的羟基连接胆固醇)进行治疗。
结果如图 6 所示, MIR9CM 显著抑制了裸鼠中 HCT-116 细胞移植瘤的生
10 长, 但不影响小鼠的体重和摄食量; 而且, 在刚停药时 MIR9CM 治疗组
肿瘤体积显著小于 miR-34a-5p 组, $p<0.05$ 。

我们采用体内外实验研究了微小 RNA 的安全性。首先, 我们将微小
RNA 直接作用于肿瘤细胞, 观察其对肿瘤细胞分泌细胞因子的影响; 结
果如图 7 所示, 微小 RNA (MIR9C) 下调了 HCT-116 细胞培养液中 IL-2、
15 IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 等 5 种细胞因子的水平。然后, 我们将转染有
微小 RNA 的 HCT-116 细胞与 T 细胞共培养, 观察微小 RNA 作用后肿瘤
细胞诱导 T 细胞分泌细胞因子的影响。结果如图 8 所示, MIR9C 作用于
肿瘤细胞后不会诱导 T 细胞分泌 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α
等细胞因子。最后, 在小鼠中静脉注射高剂量微小 RNA (MIR9CM) 后,
20 测定小鼠血清中细胞因子水平; 结果如图 9 所示, 除 IL-2 外, MIR9CM
对小鼠血清中 IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 等 5 种细胞因子的分泌
均没有显著影响。

为了研究微小 RNA 的抗肿瘤机制, 我们测定了微小 RNA 对 PD-L1、
B7-H3 和 B7-H4 等负性协同刺激分子表达的影响。结果如图 10 所示, 两
25 对微小 RNA (MIR1A 和 MIR9C) 均显著抑制了 HCT-116 细胞中 PD-L1、
B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达。此外, 在经 MIR9CM 治疗后的裸鼠接种肿瘤
中, PD-L1、B7-H3 和 B7-H4 的蛋白表达水平均低于阴性对照组 (图 11)。
本发明首次发现并证实 PD-L1、B7-H3 和 B7-H4 是微小 RNA (MIR1A 和
MIR9C) 的作用靶点。

以上仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

序列表

	<110>	苏州大学	
	<120>	微小 RNA 及其在制备抗肿瘤药物中的应用	
5	<130>	OP180027	
	<160>	29	
	<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
	<210>	1	
10	<211>	22	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列(Artificial sequence)	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
15	<222>	(1)..(22)	
	<223>	n (10) =A、 G、 U	
	<400>	1	
		uggcagugun uuagcugguu gu	22
20	<210>	2	
	<211>	22	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列(Artificial sequence)	
	<220>		
25	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(22)	
	<223>	n (11) =A、 C、 U	
	<400>	2	
		aaccagcuaa nacacugcca uu	22

<210> 3
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
5 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> n (11) =A、 C、 G
<400> 3
10 uggcaguguc nuagcugguu gu 22

<210> 4
<211> 22
<212> RNA
15 <213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> n (10) =C、 G、 U
20 <400> 4
aaccagcuan gacacugcca uu 22

<210> 5
<211> 22
25 <212> RNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)

	<223> n (12) =A、 C、 G	
	<400> 5	
	uggcaguguc unagcugguu gu	22
5	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (9) =C、 G、 U	
	<400> 6	
	aaccagcuna gacacugcca uu	22
15	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (13) =C、 G、 U	
	<400> 7	
25	uggcaguguc uungcugguu gu	22
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> RNA	

	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
5	<223> n (8) =A、 C、 G	
	<400> 8	
	aaccagcnaa gacacugcca uu	22
	<210> 9	
10	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
15	<222> (1)..(22)	
	<223> n (14) =A、 C、 U	
	<400> 9	
	uggcaguguc uuancugguu gu	22
	<210> 10	
20	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (7) =A、 G、 U	
	<400> 10	
	aaccagnuaa gacacugcca uu	22

	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (15) =A、 G、 U	
	<400> 11	
10	uggcaguguc uuagnugguu gu	22
	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> RNA	
15	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (6) =A、 C、 U	
20	<400> 12	
	aaccancuaa gacacugcca uu	22
	<210> 13	
	<211> 22	
25	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	

	<223> n (16) =A、 C、 G	
	<400> 13	
	uggcaguguc uuagcngguu gu	22
	<210> 14	
5	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (1)..(22)	
	<223> n (5) =C、 G、 U	
	<400> 14	
	aaccngcuaa gacacugcca uu	22
15	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (17) =A、 C、 U	
	<400> 15	
	uggcaguguc uuagcunguu gu	22
25	<210> 16	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	

	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(22)		
	<223> n (4) =A、 G、 U		
5	<400> 16		
	aacnagcuaa gacacugcca uu		22
	<210> 17		
	<211> 22		
10	<212> RNA		
	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(22)		
15	<223> n (18) =A、 C、 U		
	<400> 17		
	uggcaguguc uuagcugnuu gu		22
	<210> 18		
20	<211> 22		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
	<220>		
	<221> misc_feature		
25	<222> (1)..(22)		
	<223> n (3) =A、 G、 U		
	<400> 18		
	aancagcuaa gacacugcca uu		22

	<210> 19	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (19) =A、 C、 G	
	<400> 19	
10	uggcaguguc uuagcuggnu gu	22
	<210> 20	
	<211> 22	
	<212> RNA	
15	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (2) =C、 G、 U	
20	<400> 20	
	anccagcuaa gacacugcca uu	22
	<210> 21	
	<211> 22	
25	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	

	<223> n (20) =A、 C、 G	
	<400> 21	
	uggcaguguc uuagcuggun gu	22
5	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (1) =C、 G、 U	
	<400> 22	
	naccagcuaa gacacugcca uu	22
15	<210> 23	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(22)	
	<223> n (21) =A、 C、 U	
	<400> 23	
25	uggcaguguc uuagcugguu nu	22
	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> RNA	

	<213>	人工序列(Artificial sequence)	
	<400>	24	
		aaccagcuaa gacacugcca uu	22
5	<210>	25	
	<211>	22	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列(Artificial sequence)	
	<220>		
10	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(22)	
	<223>	n (22) =A、C、G	
	<400>	25	
		uggcaguguc uuagcugguu gn	22
15	<210>	26	
	<211>	22	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列(Artificial sequence)	
20	<400>	26	
		uggcaguguc uuagcugguu gu	22
	<210>	27	
	<211>	22	
25	<212>	RNA	
	<213>	人工序列(Artificial sequence)	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(22)	

	<223> n (13) =A、 C、 U	
	<400> 27	
	acaaccagcu aanacacugc ca	22
5	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<400> 28	
10	acaagcagcu aagacacugc ca	22
	<210> 29	
	<211> 22	
	<212> RNA	
15	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
	<400> 29	
	acaaccagcu aagacacugc ca	22

权 利 要 求

1、一种 RNA 分子，其特征在于，miR-34a-5p 序列 5'端第 10 位~第 22 位中的任一碱基突变为 n，所述 n 为 A、C、G 或 U。

5 2、与权利要求 1 所述 RNA 分子序列完全互补或部分互补的 RNA 分子。

3、根据权利要求 2 所述的 RNA 分子，其特征在于，所述部分互补形成的粘性末端为 2bp。

10 4、根据权利要求 3 所述的 RNA 分子，所述粘性末端位于权利要求 2 所述 RNA 分子的 3'端。

5、权利要求 1~4 任一项所述 RNA 分子中任意一个或多个碱基被修饰的 RNA 分子。

6、权利要求 1~5 任一项所述 RNA 分子在制备抑制 PD-L1、B7-H3、B7-H4 蛋白水平的药物中的应用。

15 7、权利要求 1~5 任一项所述 RNA 分子在制备抑制肿瘤细胞生长和/或增殖的药物中的应用。

8、权利要求 1~5 任一项所述 RNA 分子在制备治疗抗肿瘤药物中的应用。

20 9、根据权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述肿瘤为星形细胞瘤、间变性大细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、血管肉瘤、乳腺癌、B 细胞淋巴瘤、膀胱癌、子宫颈癌、头颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、胃癌、胃泌素瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、卡波西肉瘤白血病、肺癌、平滑肌肉瘤、喉鳞状细胞癌、黑色素瘤、粘膜相关淋巴组织 B 细胞淋巴瘤、髓母细胞瘤、套细胞淋巴瘤、
25 脑膜瘤、骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、高危骨髓增生异常综合征、间皮瘤、神经纤维瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食管癌、口咽癌骨肉瘤、胰腺癌、乳头状癌、前列腺癌、嗜铬细胞瘤、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、神经鞘瘤、小细胞肺癌、唾液腺肿瘤、散发性乳头状癌、

甲状腺癌、睾丸肿瘤或尿路上皮癌。

10、一种抗肿瘤的藥物，其特征在于，包括活性链和互补链；

所述活性链为权利要求 1 或 5 所述的 RNA 分子；所述互补链为权利要求 2~5 任一项所述的 RNA 分子。

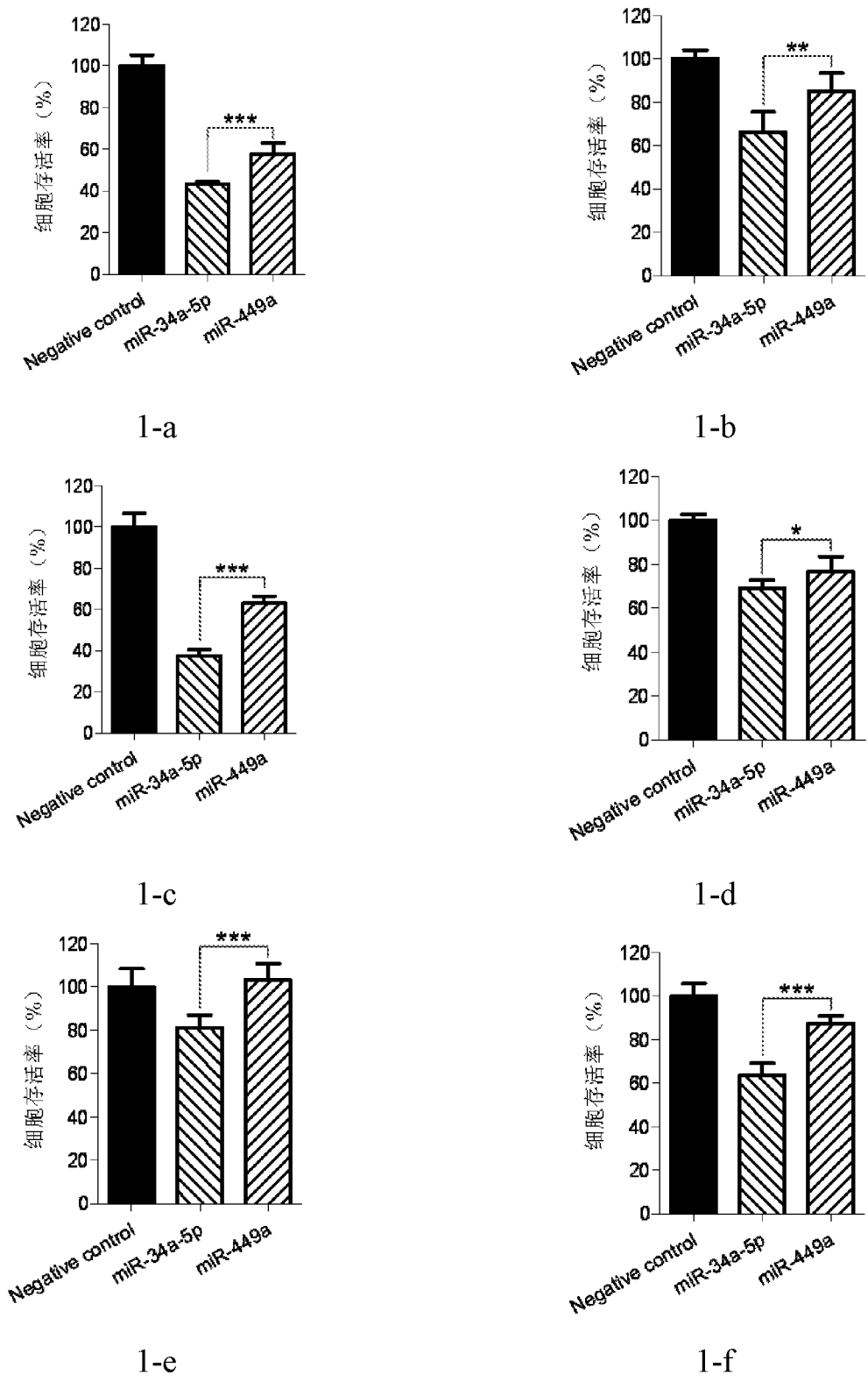


图 1

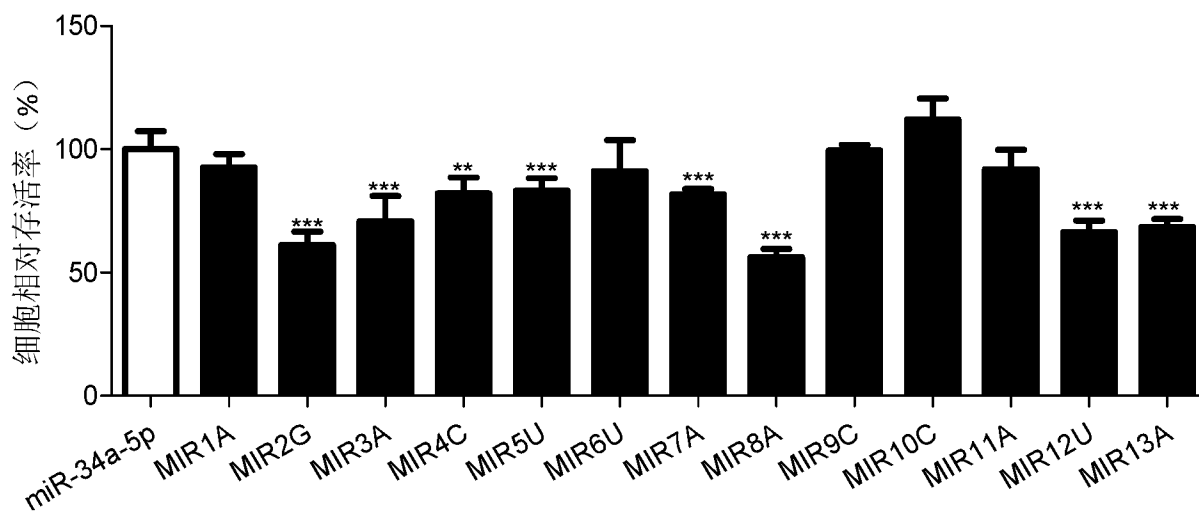
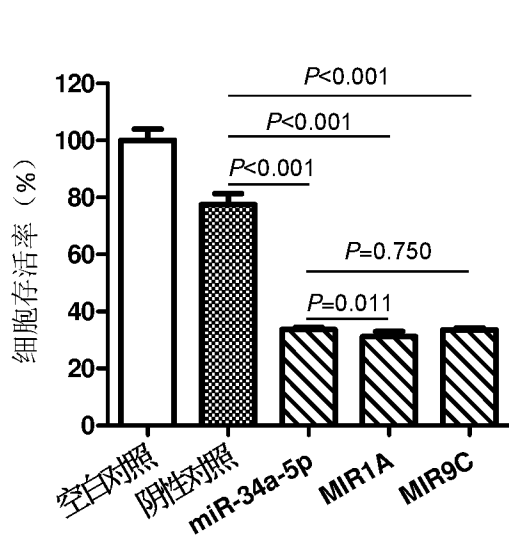
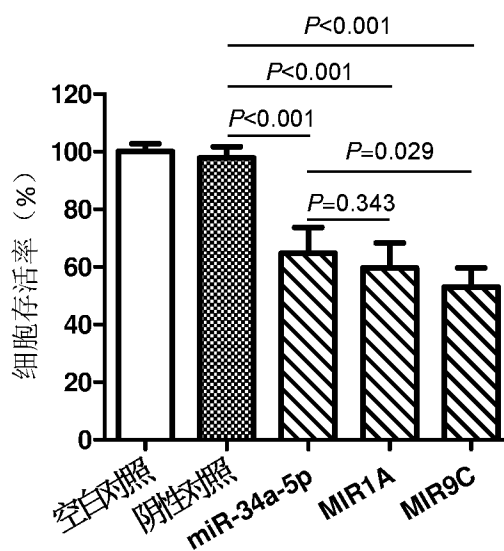


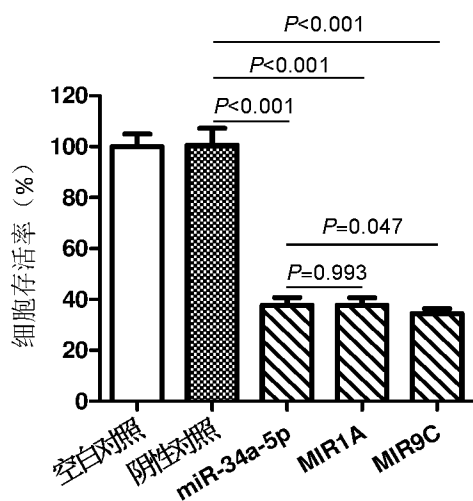
图 2



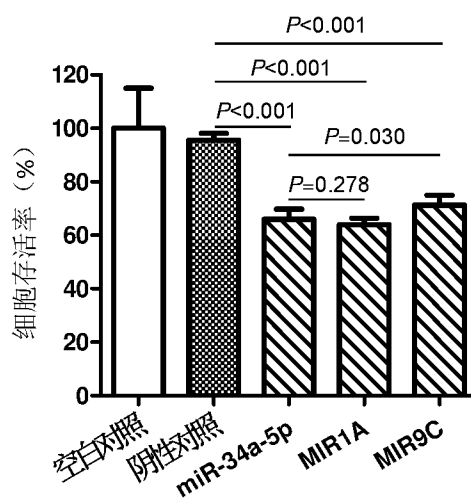
3-a



3-b



3-c



3-d

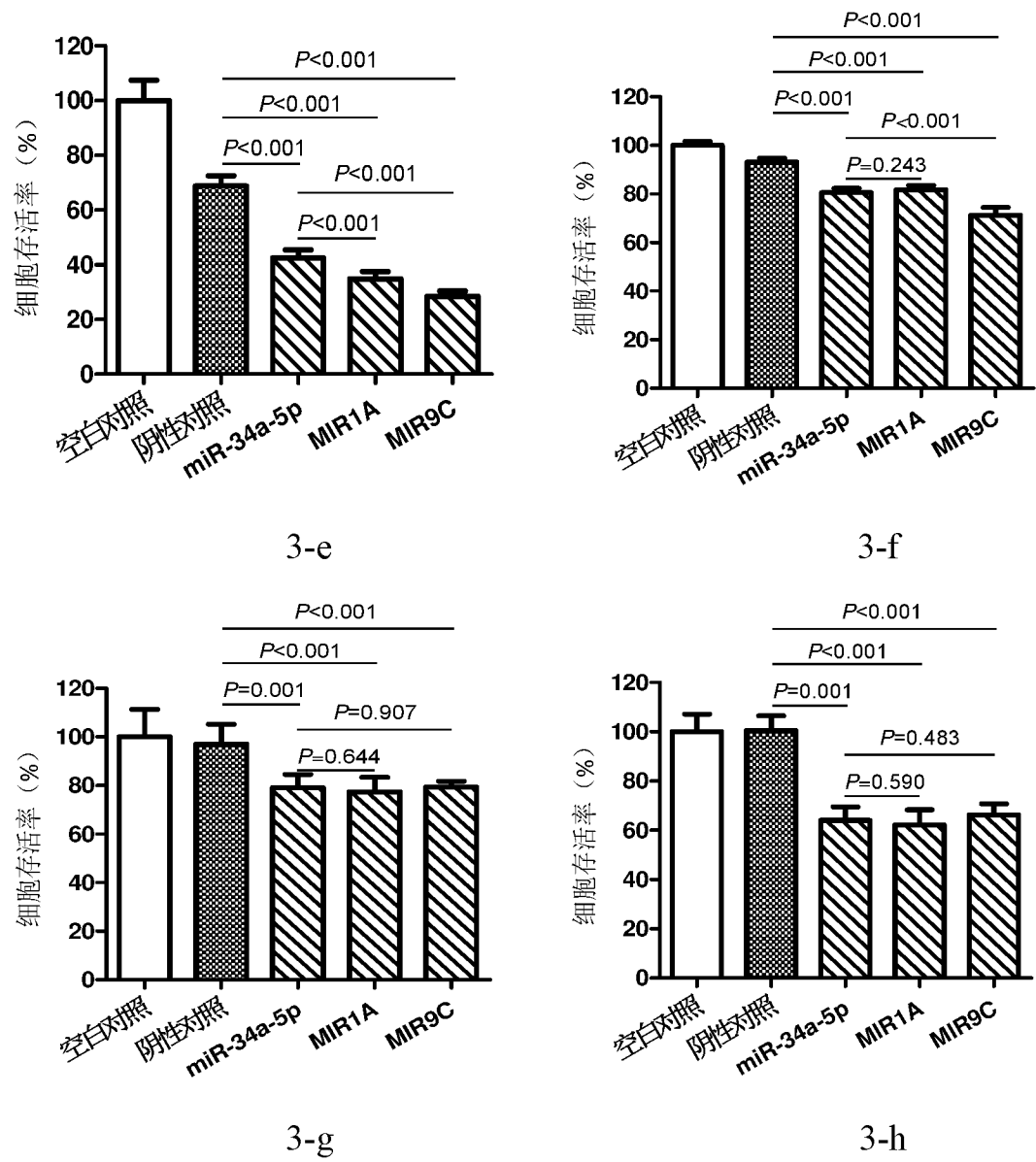
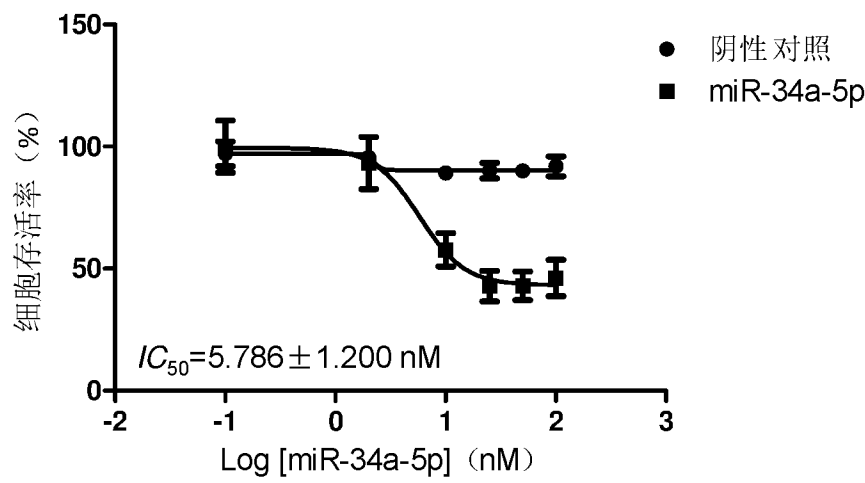
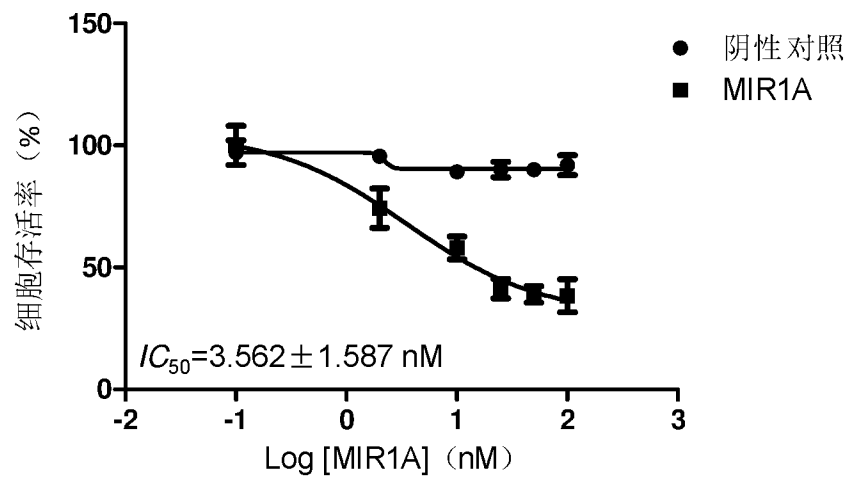


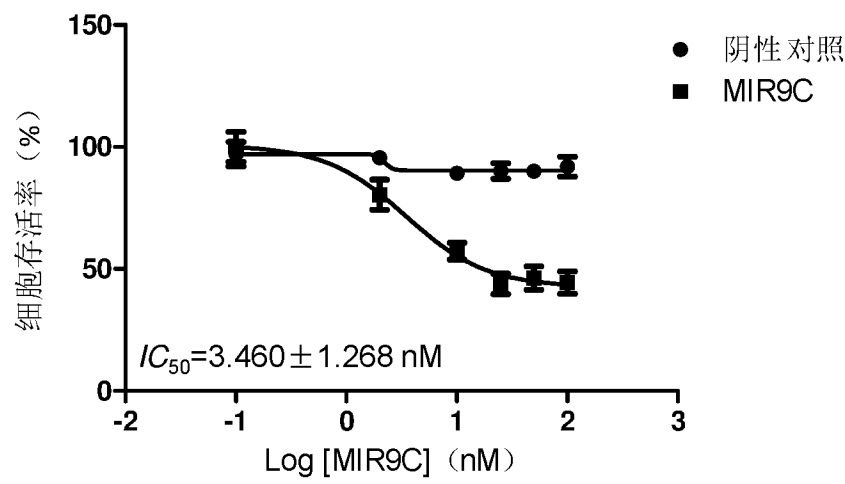
图 3



4-a



4-b



4-c

图 4

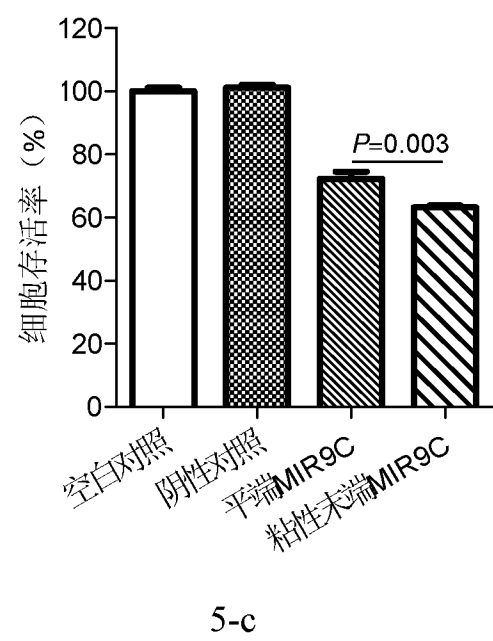
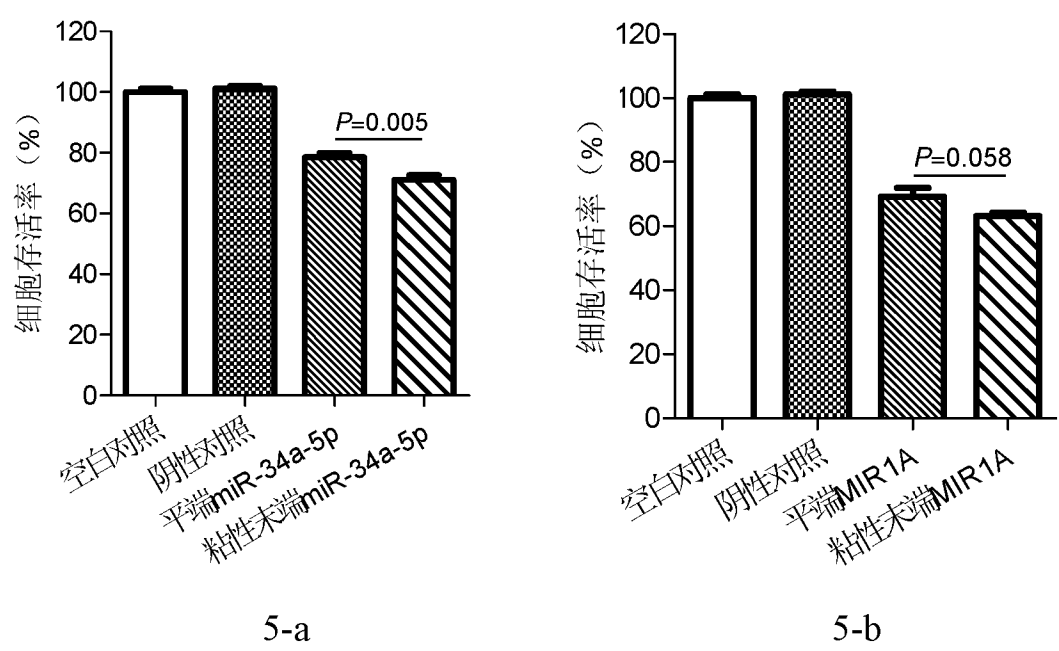
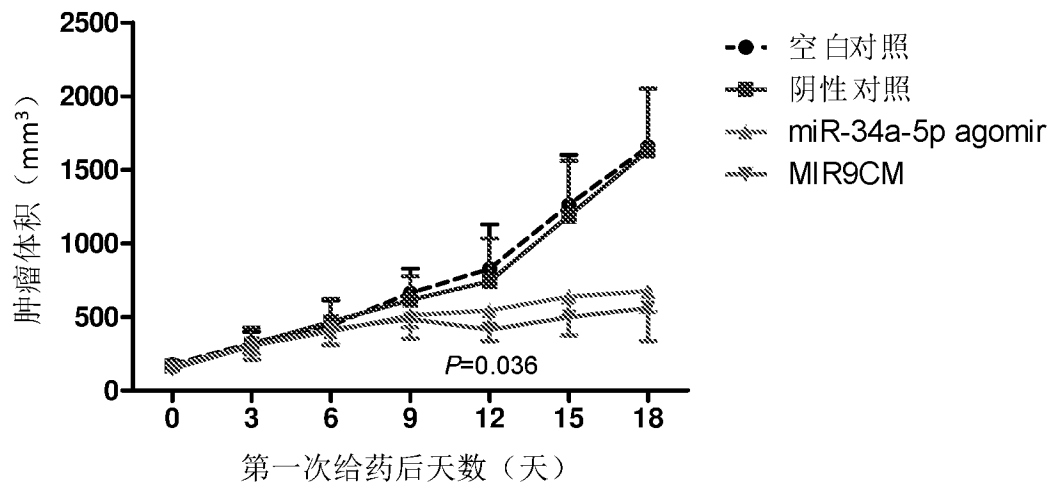
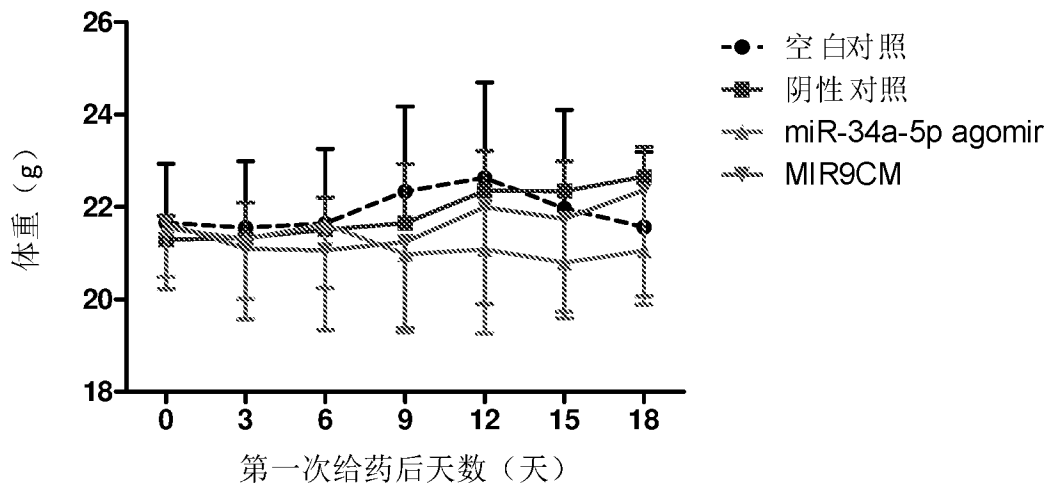


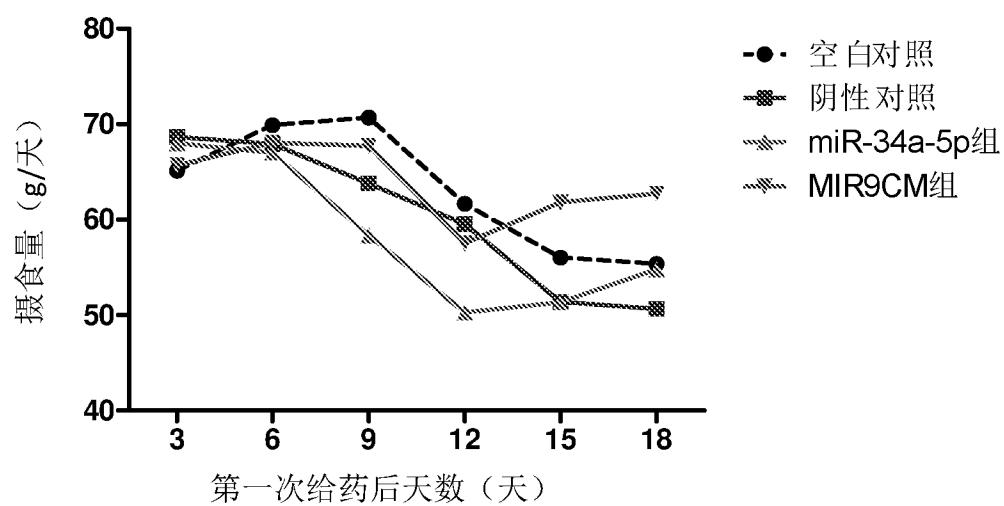
图 5



6-a

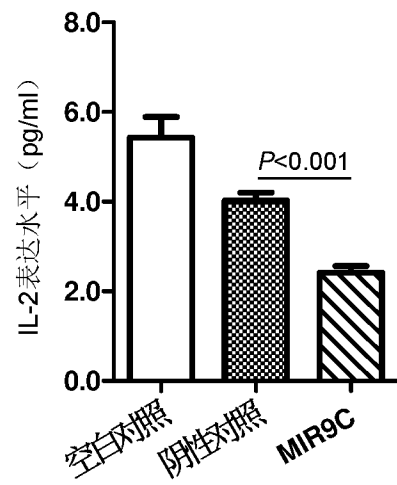


6-b

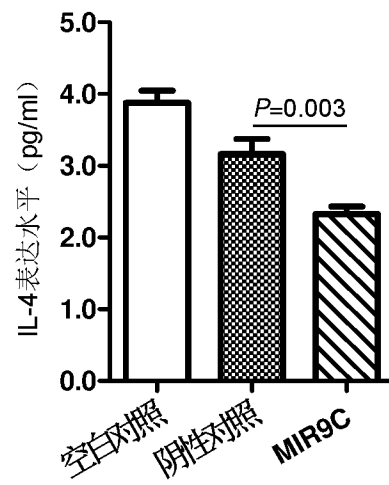


6-c

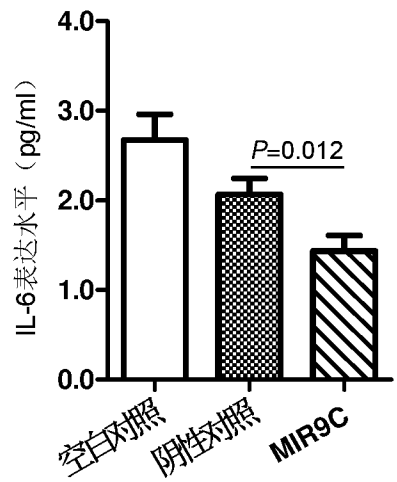
图 6



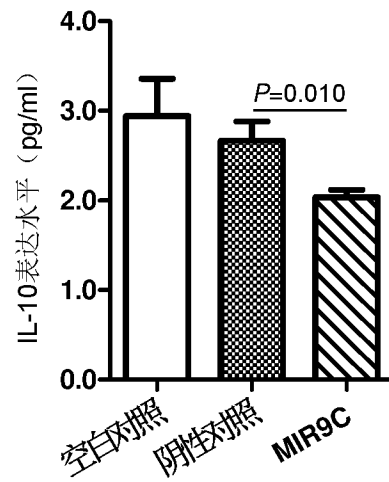
7-a



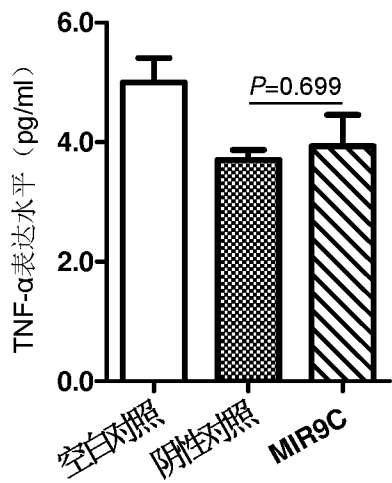
7-b



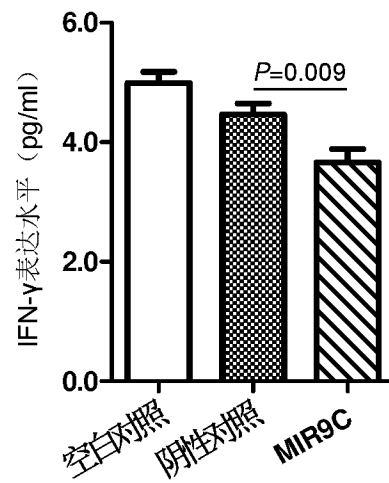
7-c



7-d



7-e



7-f

图 7

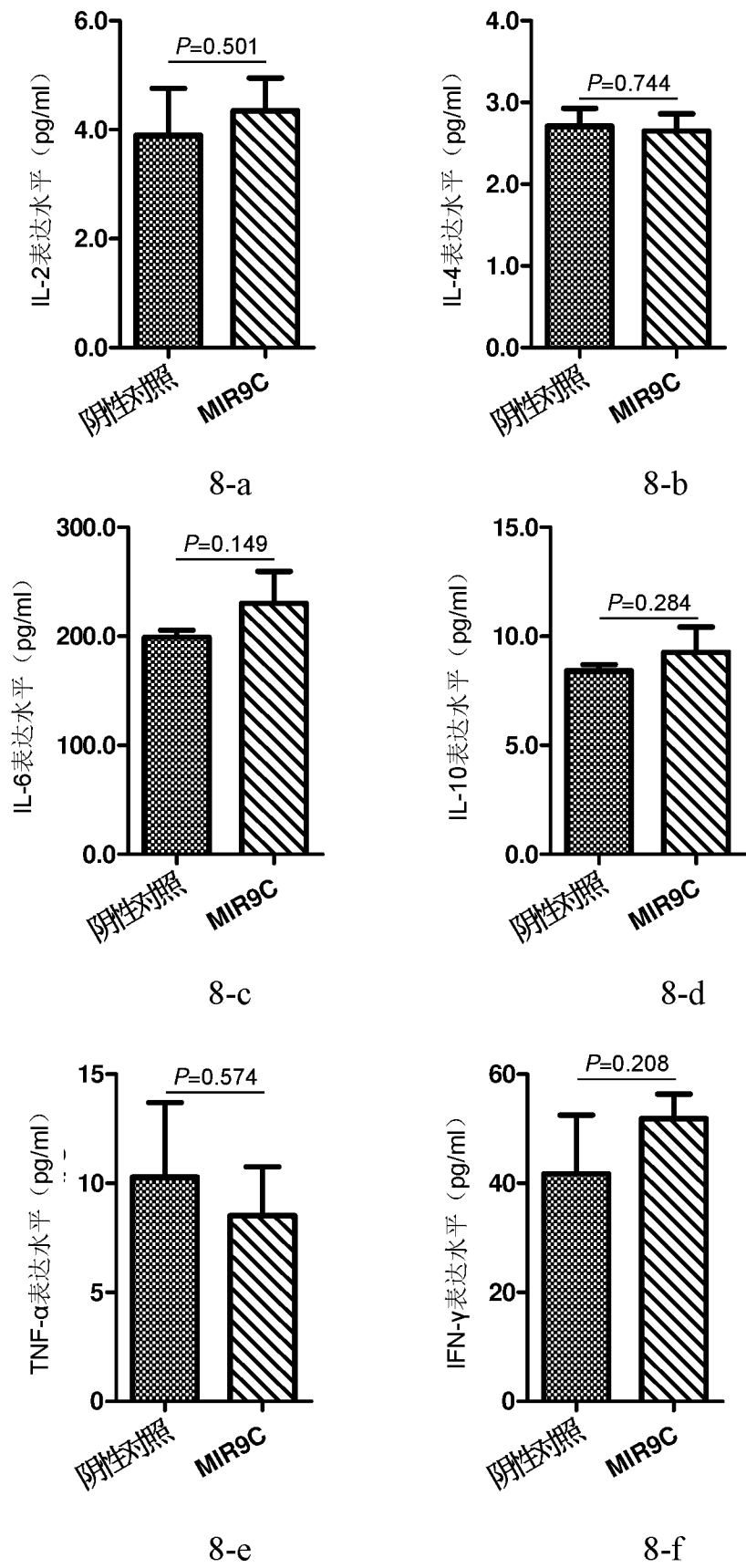


图 8

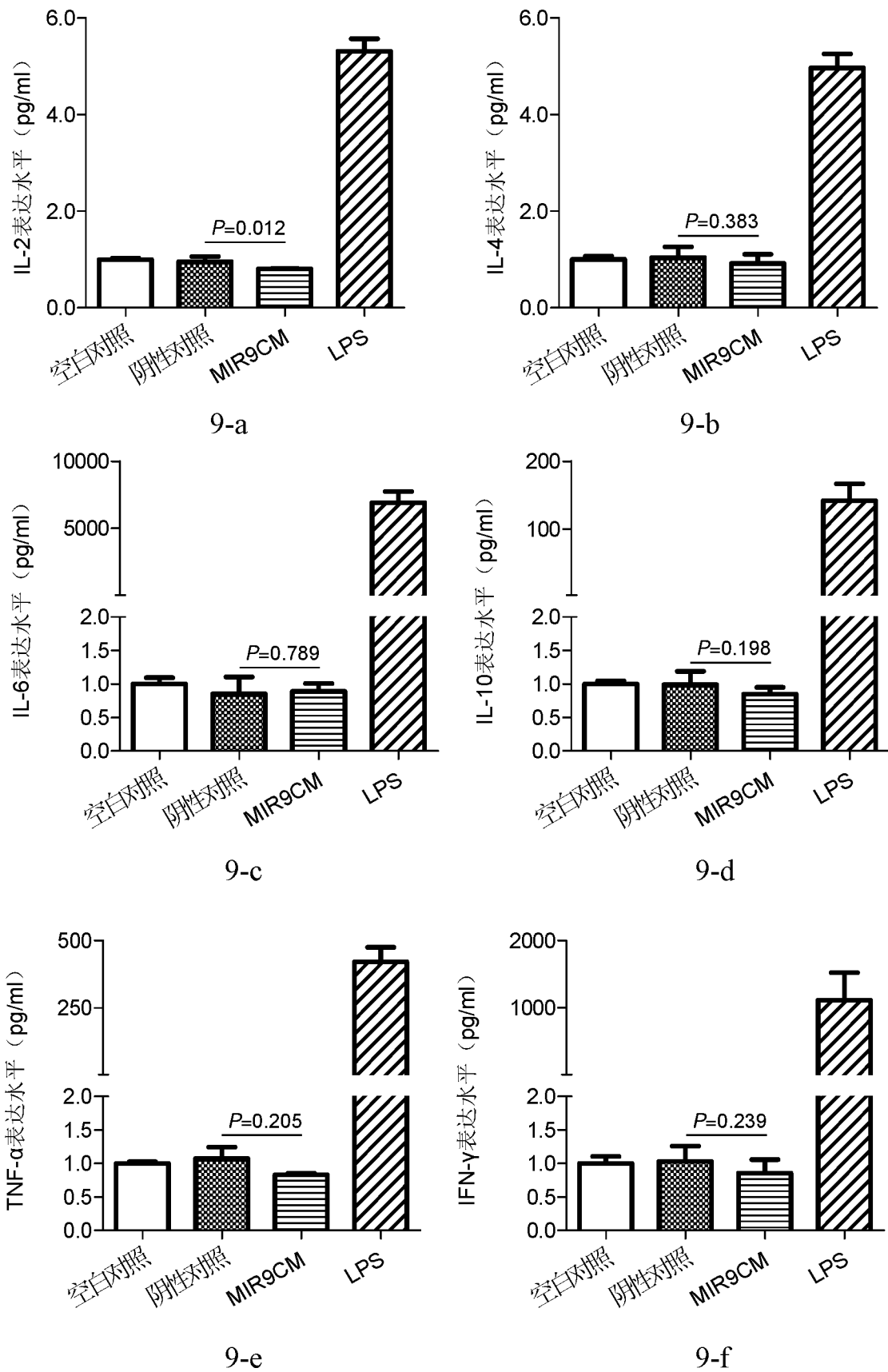


图 9

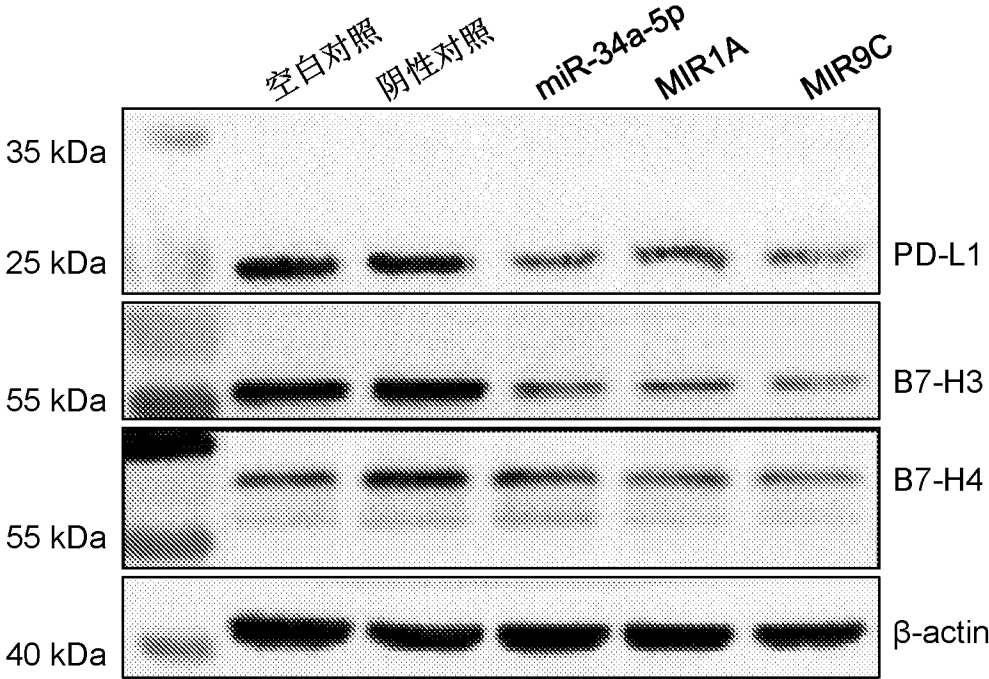
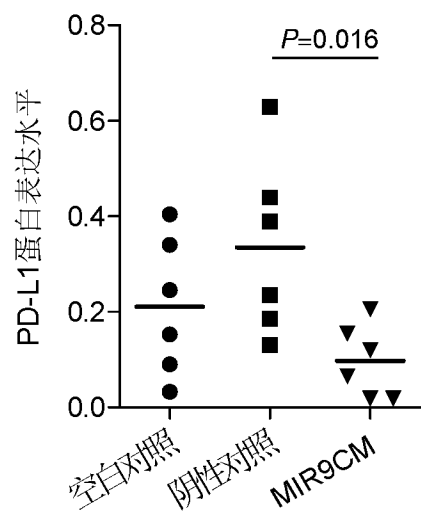
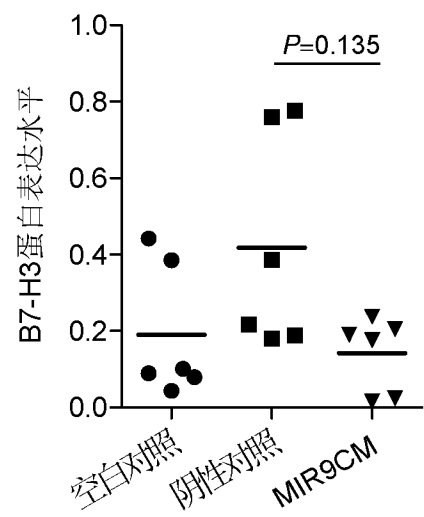


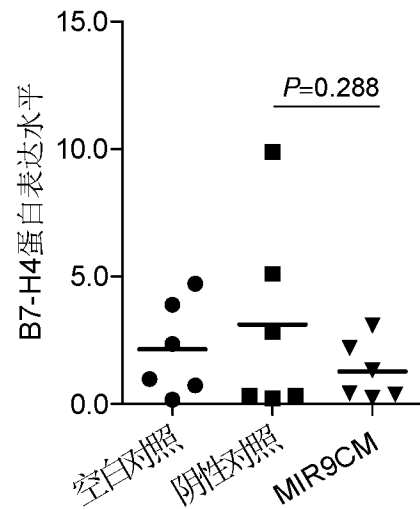
图 10



11-a



11-b



11-c

图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/077481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; A61K 31/7115(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P

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

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

CNTEXT; CNABS; CPRSABS; DWPI; SIPOABS; USTXT; WOTXT; KRTXT; JPTXT; CATXT; EPTXT; ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase); CNKI; PUBMED; 百度学术; BAIDU ACADEMY: 微小RNA-34a, mir-34a, miRNA-34a, 突变, 变体, 非种子, 肿瘤, 癌, muta+, non seed, tumor, tumour, cancer, PD-L1, B7-H1, B7-H3, B7-H4; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOs:1-29的序列检索. China Patents Biological Sequence Search System: search for SEQ ID NOs: 1-29.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103476931 A (MIRNA THERAPEUTICS, INC.) 25 December 2013 (2013-12-25) see description, paragraphs [0109]-[0111], [0143]-[0158], [0173]-[0225], [0359]-[0399], and [0559]-[0564]	1-10
PX	CN 107699565 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 16 February 2018 (2018-02-16) see claims 1-10, and SEQ ID NOs: 1-29	1-10
A	CN 101801419 A (ASURAGEN, INC.) 11 August 2010 (2010-08-11) see entire document	1-10
A	WO 2008137862 A2 (ROSETTA INPHARMATICS LLC ET AL.) 13 November 2008 (2008-11-13) see entire document	1-10
A	WO 2008137867 A2 (ROSETTA INPHARMATICS LLC ET AL.) 13 November 2008 (2008-11-13) see entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 2018

Date of mailing of the international search report

30 August 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/077481

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011088309 A1 (REGULUS THERAPEUTICS INC. ET AL.) 21 July 2011 (2011-07-21) see entire document	1-10
A	WO 2016161196 A1 (MIRNA THERAPEUTICS INC. ET AL.) 06 October 2016 (2016-10-06) see entire document	1-10
A	WANG, X. et al. "Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia" <i>CELLULAR SIGNALLING</i> , Vol. 27, No. 3, 10 December 2014 (2014-12-10), ISSN: 0898-6568, pp. 443-146, see entire document	1-10
A	WANG, Y. et al. "miR-34a attenuates glioma cells progression and chemoresistance via targeting PD-L1" <i>BIOTECHNOL LETT</i> , Vol. 39, No. 10, 18 July 2017 (2017-07-18), ISSN: 1573-6776, pp. 1485-1492, see entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/077481

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/077481

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103476931	A	25 December 2013	RU	2013140634	A	10 March 2015
				MX	2013008945	A	08 January 2014
				SG	192252	A1	30 September 2013
				AU	2012212023	A1	12 September 2013
				JP	2016152804	A	25 August 2016
				MX	342927	B	19 October 2016
				SG	10201600836P	A	30 March 2016
				KR	20140020900	A	19 February 2014
				RU	2615117	C2	04 April 2017
				EP	2670850	A1	11 December 2013
				AU	2012212023	B9	12 January 2017
				MY	165507	A	28 March 2018
				ZA	201306518	B	28 May 2014
				US	8586727	B2	19 November 2013
				EP	3178932	A1	14 June 2017
				US	9371526	B2	21 June 2016
				IL	227697	D0	30 September 2013
				US	2012288933	A1	15 November 2012
				BR	112013019853	A2	21 March 2017
				US	2016053264	A1	25 February 2016
				AU	2012212023	B2	05 January 2017
				EP	2670850	B1	26 October 2016
				US	2014107182	A1	17 April 2014
				JP	2014506791	A	20 March 2014
				WO	2012106591	A1	09 August 2012
				CA	2825981	A1	09 August 2012
CN	107699565	A	16 February 2018	None			
CN	101801419	A	11 August 2010	EP	2167138	A2	31 March 2010
				US	2009227533	A1	10 September 2009
				CA	2689974	A1	18 December 2008
				IL	202545	D0	01 August 2011
				WO	2008154333	A2	18 December 2008
				AU	2008261951	A1	18 December 2008
				WO	2008154333	A3	05 November 2009
WO	2008137862	A2	13 November 2008	JP	2010529966	A	02 September 2010
				CA	2686165	A1	13 November 2008
				EP	2152722	B1	27 April 2016
				US	8378088	B2	19 February 2013
				WO	2008137867	A3	16 April 2009
				EP	2152722	A4	28 December 2011
				WO	2008137867	A2	13 November 2008
				JP	2010525826	A	29 July 2010
				EP	2152722	A2	17 February 2010
				US	8399248	B2	19 March 2013
				WO	2008137862	A3	19 February 2009
				US	2010227909	A1	09 September 2010
				US	2011105583	A1	05 May 2011
WO	2008137867	A2	13 November 2008	AU	2008247427	A1	13 November 2008
				CA	2686165	A1	13 November 2008
				EP	2152722	B1	27 April 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/077481

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)			Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)		
							US	8378088	B2	19 February 2013		
							WO	2008137867	A3	16 April 2009		
							EP	2152722	A4	28 December 2011		
							JP	2010525826	A	29 July 2010		
							EP	2152722	A2	17 February 2010		
							US	8399248	B2	19 March 2013		
							WO	2008137862	A3	19 February 2009		
							US	2010227909	A1	09 September 2010		
							US	2011105583	A1	05 May 2011		
							WO	2008137862	A2	13 November 2008		
							AU	2008247427	A1	13 November 2008		
WO	2011088309	A1	21 July 2011				US	8846631	B2	30 September 2014		
							US	2015087607	A1	26 March 2015		
							US	2013123329	A1	16 May 2013		
WO	2016161196	A1	06 October 2016				None					

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/077481

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; A61K 31/7115(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNTXT; CNABS; CPRSABS; DWPI; SIPOABS; USTXT; WOTXT; KRTXT; JPTXT; CATXT; EPTXT; ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase); CNKI; PUBMED; 百度学术:微小RNA-34a, mir-34a, miRNA-34a, 突变, 变体, 非种子, 肿瘤, 癌, muta+, non seed, tumor, tumour, cancer, PD-L1, B7-H1, B7-H3, B7-H4; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统:对SEQ ID NOs:1-29的序列检索。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 103476931 A (米尔纳医疗股份有限公司) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 参见说明书第[0109]-[0111]段、第[0143]-[0158]段、第[0173]-[0225]段、第[0359]-[0399]段和第[0559]-[0564]段	1-10
PX	CN 107699565 A (苏州大学) 2018年 2月 16日 (2018 - 02 - 16) 参见权利要求1-10, SEQ ID NOs:1-29	1-10
A	CN 101801419 A (米尔纳疗法公司) 2010年 8月 11日 (2010 - 08 - 11) 参见全文	1-10
A	WO 2008137862 A2 (ROSETTA INPHARMATICS LLC等) 2008年 11月 13日 (2008 - 11 - 13) 参见全文	1-10
A	WO 2008137867 A2 (ROSETTA INPHARMATICS LLC等) 2008年 11月 13日 (2008 - 11 - 13) 参见全文	1-10
A	WO 2011088309 A1 (REGULUS THERAPEUTICS INC等) 2011年 7月 21日 (2011 - 07 - 21) 参见全文	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 8月 14日

国际检索报告邮寄日期

2018年 8月 30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

林峻凯

电话号码 86-(10)-62412317

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2016161196 A1 (MIRNA THERAPEUTICS INC等) 2016年 10月 6日 (2016 - 10 - 06) 参见全文	1-10
A	WANG, X等. "Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia" CELLULAR SIGNALLING, 第27卷, 第3期, 2014年 12月 10日 (2014 - 12 - 10), ISSN: 0898-6568, 第443-452页, 参见全文	1-10
A	WANG, Y等. "miR-34a attenuates glioma cells progression and chemoresistance via targeting PD-L1" BIOTECHNOL LETT, 第39卷, 第10期, 2017年 7月 18日 (2017 - 07 - 18), ISSN: 1573-6776, 第1485-1492页, 参见全文	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/077481

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103476931	A	2013年 12月 25日	RU	2013140634	A	2015年 3月 10日
				MX	2013008945	A	2014年 1月 8日
				SG	192252	A1	2013年 9月 30日
				AU	2012212023	A1	2013年 9月 12日
				JP	2016152804	A	2016年 8月 25日
				MX	342927	B	2016年 10月 19日
				SG	10201600836P	A	2016年 3月 30日
				KR	20140020900	A	2014年 2月 19日
				RU	2615117	C2	2017年 4月 4日
				EP	2670850	A1	2013年 12月 11日
				AU	2012212023	B9	2017年 1月 12日
				MY	165507	A	2018年 3月 28日
				ZA	201306518	B	2014年 5月 28日
				US	8586727	B2	2013年 11月 19日
				EP	3178932	A1	2017年 6月 14日
				US	9371526	B2	2016年 6月 21日
				IL	227697	D0	2013年 9月 30日
				US	2012288933	A1	2012年 11月 15日
				BR	112013019853	A2	2017年 3月 21日
				US	2016053264	A1	2016年 2月 25日
				AU	2012212023	B2	2017年 1月 5日
				EP	2670850	B1	2016年 10月 26日
				US	2014107182	A1	2014年 4月 17日
				JP	2014506791	A	2014年 3月 20日
				WO	2012106591	A1	2012年 8月 9日
				CA	2825981	A1	2012年 8月 9日
CN	107699565	A	2018年 2月 16日	无			
CN	101801419	A	2010年 8月 11日	EP	2167138	A2	2010年 3月 31日
				US	2009227533	A1	2009年 9月 10日
				CA	2689974	A1	2008年 12月 18日
				IL	202545	D0	2011年 8月 1日
				WO	2008154333	A2	2008年 12月 18日
				AU	2008261951	A1	2008年 12月 18日
				WO	2008154333	A3	2009年 11月 5日
				JP	2010529966	A	2010年 9月 2日
WO	2008137862	A2	2008年 11月 13日	CA	2686165	A1	2008年 11月 13日
				EP	2152722	B1	2016年 4月 27日
				US	8378088	B2	2013年 2月 19日
				WO	2008137867	A3	2009年 4月 16日
				EP	2152722	A4	2011年 12月 28日
				WO	2008137867	A2	2008年 11月 13日
				JP	2010525826	A	2010年 7月 29日
				EP	2152722	A2	2010年 2月 17日
				US	8399248	B2	2013年 3月 19日
				WO	2008137862	A3	2009年 2月 19日
				US	2010227909	A1	2010年 9月 9日
				US	2011105583	A1	2011年 5月 5日
				AU	2008247427	A1	2008年 11月 13日
WO	2008137867	A2	2008年 11月 13日	CA	2686165	A1	2008年 11月 13日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/077481

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
				EP	2152722	B1	2016年 4月 27日		
				US	8378088	B2	2013年 2月 19日		
				WO	2008137867	A3	2009年 4月 16日		
				EP	2152722	A4	2011年 12月 28日		
				JP	2010525826	A	2010年 7月 29日		
				EP	2152722	A2	2010年 2月 17日		
				US	8399248	B2	2013年 3月 19日		
				WO	2008137862	A3	2009年 2月 19日		
				US	2010227909	A1	2010年 9月 9日		
				US	2011105583	A1	2011年 5月 5日		
				WO	2008137862	A2	2008年 11月 13日		
				AU	2008247427	A1	2008年 11月 13日		
WO 2011088309 A1 2011年 7月 21日				US	8846631	B2	2014年 9月 30日		
				US	2015087607	A1	2015年 3月 26日		
				US	2013123329	A1	2013年 5月 16日		
WO 2016161196 A1 2016年 10月 6日				无					

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)