

(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

(43) 国际公布日
2017 年 8 月 10 日 (10.08.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/132945 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/63* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/073517
- (22) 国际申请日: 2016 年 2 月 4 日 (04.02.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 中国科学技术大学 (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市包河区金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。
- (72) 发明人: 朱涛 (ZHU, Tao); 中国安徽省合肥市包河区金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。 李高朋 (LI, Gaopeng); 中国安徽省合肥市包河区金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。 洛比 E·彼得 (LOBIE, E. Peter); 新加坡新加坡医学小路 14 号#12-01 新加坡国立大学新加坡癌症研究所, Singapore 117599 (SG)。
- (74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司 (CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.); 中国北京市海淀区西三环北路 87 号 4-1105 室, Beijing 100089 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, 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。
- (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))。

(54) Title: DESIGN AND APPLICATION OF MIRANCER MOLECULE

(54) 发明名称 : miRancer 分子的设计与应用

(57) Abstract: Provided is a single-stranded RNA sequence for binding to a target microRNA. The single-stranded RNA sequence includes a 5'-end arm and a 3'-end arm. The 5'-end arm can bind, through complementary base pairing, with the target microRNA, and the 3'-end arm can bind, through complementary base pairing, with the 5'-end arm.

(57) 摘要: 提供一种结合目标 microRNA 的单链 RNA 序列, 该单链 RNA 序列具有 5'端臂和 3'端臂, 所述 5'端臂通过碱基互补配对与目标 microRNA 结合, 所述 3'端臂通过碱基互补配对与所述 5'端臂结合。



WO 2017/132945 A1

miRancer 分子的设计与应用

技术领域

本发明涉及 RNA 分子及其用途。具体而言，本发明涉及能够特异性结合和增强 microRNA 的表达及活性的寡聚 RNA 分子及其用途。

背景技术

成熟的 microRNA (miRNA) 是一类长度约 22 个核苷酸 (nt) (例如约 18-25 个核苷酸) 的小 RNA, 在细胞内具有多种重要的调节作用。miRNA 广泛存在于真核生物中, 它们能够与那些和它的序列互补的 mRNA 分子相结合发挥功能 (例如导致基因的沉默), 这是调节基因表达的一个重要策略。研究表明, miRNA 参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生命活动, 可以在疾病特别是癌症的诊断和治疗中发挥作用。

发明内容

在一些实施方案中, 本文提供一种结合目标 microRNA 的单链 RNA 序列, 优选的所述单链 RNA 序列增强目标 microRNA 的活性 (在本文中称为 miRancer 分子), 所述单链 RNA 序列具有 5'端臂和 3'端臂, 所述 5'端臂通过碱基互补配对与目标 microRNA 结合, 所述 3'端臂通过碱基互补配对与所述 5'端臂结合,

所述单链 RNA 序列从 5'端到 3'端具有以下通式 1:

$$(n_{5-11})(n_{0-3})(n_{6-7})(n_1)(n_{11-21})(n_{0-2}),$$

其中 n 为连续的核苷酸或其类似物, 其后数字为核苷酸或其类似物的个数, 每个 n 可以彼此独立地选自下述核苷酸: A, U, G 和 C, 或其核苷酸类似物, 其中 n_1 与目标 microRNA 的 5'端第一位的核苷酸互补, 相应的 n_{6-7} 对应于目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-7 位或第 2-8 位, 从而 $(n_{5-11})(n_{0-3})(n_{6-7})$ 为 5'端臂, $(n_{11-21})(n_{0-2})$ 为 3'端臂, 其中 n_{0-3} 为插入的 C 或 G

以在所述 5'端臂和 3'端臂之间形成 GC 配对。

在一些实施方案中，本文提供的所述单链 RNA 分子能够结合目标 microRNA 和增强所述 microRNA 的活性。发明人将所述可以增强 microRNA 活性的 RNA 分子称为 microRNA 增强子(microRNA enhancer)，简称 miRancer。所述增强 microRNA 活性可以包括例如稳定所述 microRNA，延长所述 microRNA 的半衰期，改变所述 microRNA 所调节的靶基因表达等方面中的一种或多种。测量 microRNA 和 microRNA 所调节的靶基因表达的方法是本领域已知的。

在一些实施方案中，本文描述的 RNA 分子中除了插入的(n₀₋₃)作为缺口不计算同一性之外，所述 5'端臂与所述目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-18 位核苷酸的互补链至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 100% 的同一性，优选其中(n₆₋₇)与所述目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-7 位或第 2-8 位核苷酸的互补链具有至少 80%、90%、或 100%的同一性，优选 (n₁₁₋₂₁)与(n₅₋₁₁)(n₀₋₃)(n₆₋₇)中不配对核苷酸的个数小于 6、5、4、3、2、或 1 对，优选全部不配对的核苷酸在(n₁)周围。在一些实施方案中，(n₅₋₁₁)(n₀₋₃)(n₆₋₇)与所述目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-18 位核苷酸至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 100%互补。在一些实施方案中，(n₆₋₇)与所述目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-7 位或第 2-8 位核苷酸至少 80%、90%、95%、99%或 100%互补。在一些实施方案中，(n₁₁₋₂₁)与 (n₅₋₁₁)(n₀₋₃)(n₆₋₇) 至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 100%互补。

在一些实施方案中，本文提供一种包含所述单链 RNA 序列的载体，如质粒。

在一些实施方案中，本文提供一种包含所述单链 RNA 序列的多核苷酸序列的载体，如质粒。

在一些实施方案中，本文提供一种所述单链 RNA 序列的合成的或重组的 RNA 分子。

在一些实施方案中，本文提供一种包含所述载体的细胞。

在一些实施方案中，本文提供所述单链 RNA 序列、所述载体、或所述合成的 RNA 分子用于特异性增加内源性和/或外源性目标 microRNA 或其它小 RNA 的表达和/或活性的使用方法和/或用途。

在一些实施方案中，本文提供所述单链 RNA 序列、所述载体、或所述合成的 RNA 分子用于体外和/或体内特异性调节（例如增加）所述目标 microRNA 靶向的基因的表达的使用方法和/或用途。在一些实施方案中，本文提供所述单链 RNA 序列可通过整合到基因组中调节 microRNA 靶向的基因表达的区域（包括例如所述基因的 5'UTR 区）来特异性调节（例如增加）所述目标 microRNA 靶向的基因的表达。

在一些实施方案中，本文提供所述单链 RNA 序列、所述载体、或所述合成的 RNA 分子用于感测所述目标 microRNA 或其它小 RNA 的使用方法和/或用途。

在一些实施方案中，本文提供所述单链 RNA 序列、所述载体、或所述合成的 RNA 分子用于感测所述目标 microRNA 或其它小 RNA 的从而调节所述所述目标 microRNA 或其它小 RNA 靶向的基因的表达的用途。

在一些实施方案中，本文提供一种方法，所述方法包括用于特异性增加内源性和/或外源性目标 microRNA 或其它小 RNA 的表达和/或活性的方法，用于体外和/或体内特异性调节所述目标 microRNA 靶向的基因的表达的方法，用作感受器用于感测所述目标 microRNA 或其它小 RNA 的方法，和用于通过感测所述目标 microRNA 或其它小 RNA 从而调节所述所述目标 microRNA 或其它小 RNA 靶向的基因的表达方法中的任意一种或多种，所述方法包括将本文提供所述单链 RNA 序列、所述载体、或所述合成的 RNA 分子与包含目标 microRNA 或其它小 RNA 的样品（例如细胞、血液、组织等样品）接触的步骤。在一些实施方案中，通过将所述单链 RNA 序列、所述载体、或所述合成的 RNA 分子引入到目的细胞中发挥作用。在一些实施方案中，通过将单链 RNA 序列、所述载体、或所述合成的 RNA 分子与细胞裂解后释放的目标 microRNA 相互作用，从而感测所述目标 microRNA 或其它小 RNA，并可以用于检测所述 microRNA 的在样品中的存在。

在一些实施方案中，本文提供一种产生结合目标 microRNA 的单链 RNA 序列的方法，所述方法包括选择目标 microRNA（例如根据希望调节的目的基因选择相应的 microRNA），然后产生本文提供所述单链 RNA 序列、所述载体、或所述合成的 RNA 分子。

在一些实施方案中，本文提供一种组合物，其包含所述单链 RNA 序列、所述载体、和/或所述合成的 RNA 分子，优选的所述组合物可以用于本文描述的用途和方法。在一些实施方案中，本文提供一种试剂盒，其包含所述单链 RNA 序列、所述载体、和/或所述合成的 RNA 分子，以及使用说明书，优选的所述试剂盒可以用于本文描述的用途和方法。在一些实施方案中，所述试剂盒来包括适合用于储存所述单链 RNA 序列、所述载体、和/或所述合成的 RNA 分子的各种试剂如缓冲液等。在一些实施方案中，所述试剂盒包括适合进行所述单链 RNA 序列、所述载体、和/或所述合成的 RNA 分子与目标 microRNA 反应的各种试剂包括酶、转化或转染试剂等。在一些实施方案中，所述试剂盒包括适合通过所述单链 RNA 序列、所述载体、和/或所述合成的 RNA 分子通过与目标 microRNA 反应而调节目的基因表达（如增强目的基因表达的）试剂。

在一些实施方案中，本文提供能够被转录为所述单链 RNA 序列的分离或重组多核苷酸，其中所述多核苷酸包含所述单链 RNA 表达载体，其中所述表达载体包含编码所述单链 RNA 的 DNA 序列。

在一些实施方案中，本文提供一种结合目标 microRNA 和增强所述 microRNA 的活性的方法，所述方法包括将所述单链 RNA 序列、所述载体、或所述合成的 RNA 分子引入靶细胞的步骤。所述增强 microRNA 活性可以包括例如稳定所述 microRNA，延长所述 microRNA 的半衰期，改变所述 microRNA 所调节的靶基因表达等方面中的一种或多种。

附图说明

图 1: miR-7 结合序列的不同形式。

图 2: miR-9 结合序列的不同形式。

图 3: miR-7 reporter 和 miR-9 reporter 的示意图。

图 4: 过表达 miRancers 后的 miR-7 reporter 或 miR-9 reporter 的荧光素酶活性。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ by Student's t-test.。

图 5: 不同茎长的 miR-7 结合序列示意图。

图 6: 过表达不同茎长的 miRancers 后 miR-7 reporter 的荧光素酶活性

******, $p < 0.01$ by Student's *t*-test。

图 7: 过表达 miRancer 后 miR-7 reporter 或 miR-9 reporter 的荧光素酶活性。******, $p < 0.01$ by Student's *t*-test。

图 8: 过表达 miRancer 后 miR-7 或 miR-9 的表达水平。*******, $p < 0.001$ by Student's *t* test。

图 9: 含有 miRancer 或 sponge 序列的荧光素酶报告载体示意图。

图 10: 过表达 miR-7 或 miR-9 对不同荧光素酶活性的影响。*****, $p < 0.05$, ******, $p < 0.01$, *******, $p > 0.001$ by Student's *t* test。

具体实施方式

现将结合附图更全面地描述本发明，其中描述了本发明的一部分而非全部实施方案。实际上，这些发明可以许多不同的形式来体现，并且不应理解为受本文所示实施方案的限制，其修改形式和其他实施方案也包括在所附权利要求的范围内。

1. microRNA 增强子 (microRNA enhancer)

在一些实施方案中，本文提供的所述单链 RNA 分子能够结合目标 microRNA 并增强所述 microRNA 的活性，这种可以增强 microRNA 活性的 RNA 分子在本文中称为 microRNA 增强子 (microRNA enhancer)，简称 miRancer。在一些实施方案中，增强 microRNA 活性可以包括例如稳定所述 microRNA，延长所述 microRNA 的半衰期，改变（例如增加或降低）所述 microRNA 所调节的靶基因表达等方面中的一种或多种。测量 microRNA 的半衰期和靶基因表达的方法是本领域已知的，参见例如本文实施例中例示的方法。

在一些实施方案中，miRancer 为能够结合目标 microRNA 的单链 RNA 序列，所述单链 RNA 序列具有 5'端臂和 3'端臂，所述 5'端臂通过碱基互补配对与目标 microRNA 结合，所述 3'端臂通过碱基互补配对与所述 5'端臂结合。

在本文中，除另有明确说明外，核苷酸序列的顺序均是指从 5'端到 3'端的顺序。

在一些实施方案中，单链 RNA 序列如 miRancer 分子从 5'端到 3'端包含以下通式 1 的分子或由所述通式 1 的分子组成：

$$(n_{5-11})(n_{0-3})(n_{6-7})(n_1)(n_{11-21})(n_{0-2}),$$

其中 n 为连续的核苷酸或其类似物，其后数字为核苷酸或其类似物的个数，其中 n_1 与目标 microRNA 的 5'端第一位的核苷酸（通常是 U）互补，相应的 n_{6-7} 对应于目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-7 位或第 2-8 位（称为“种子序列”），从而 $(n_{5-11})(n_{0-3})(n_{6-7})$ 为 5'端臂， $(n_{11-21})(n_{0-2})$ 为 3'端臂，其中 n_{0-3} 为插入的 C 或 G 以在所述 5'端臂和 3'端臂之间形成 GC 配对， (n_{0-2}) 可以为 3'端悬突（overhang），其可以是例如 UU。

在一些实施方案中， (n_1) 为 A。在一些实施方案中，其中除了插入的 (n_{0-3}) 作为缺口不计算同一性之外，所述 5'端臂与所述目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-18 位核苷酸至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 100% 互补，例如，所述 miRancer 分子的 5'端臂与所述 microRNA 分子从 5'至 3'的第 2-18 位序列（或例如第 2-17、2-16、2-15、2-14 位序列）100%，约 99%，98%，97%，96%，95%，94%，93%，92%，91%，90%，89%，88%，87%，86%，85%，84%，83%，82%，81%，80%，75%，70%，65%，60%，55%，或 50% 互补。在一些实施方案中，优选其中 (n_{6-7}) 与所述目标 microRNA 分子从 5'至 3'的第 2-7 位或第 2-8 序列 100%，约 99%，98%，97%，96%，95%，94%，93%，92%，91%，90%，89%，88%，87%，86%，85%，84%，83%，82%，81%，80%，75%，70%，65%，60%，55%，或 50% 互补。在一些实施方案中， $(n_{5-11})(n_{0-3})(n_{6-7})$ 与 (n_{11-21}) 之间 100%，约 99%，98%，97%，96%，95%，94%，93%，92%，91%，90%，89%，88%，87%，86%，85%，84%，83%，82%，81%，80%，75%，70%，65%，60%，55%，或 50% 互补，形成茎结构。在一些实施方案中，优选 (n_{11-21}) 与 $(n_{5-11})(n_{0-3})(n_{6-7})$ 中不配对核苷酸的个数小于 6、5、4、3、2、或 1 对，优选全部不配对的核苷酸在 (n_1) 周围，形成环结构。在一些实施方案中，所述茎结构的长度为 10-18 对配对核苷酸，包括例如 10 对，11 对，12 对，13 对，14 对，15 对，16 对，17 对，18 对配对核苷酸。在一些实施方案中，所述环结构包括 1-13 个核苷酸，包括例如 1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，或 13 个核苷酸。在一些实施方案中， (n_{0-2}) 可以为 3'端悬突（overhang），

其可以是例如 UU。在一些实施方案中, 紧邻(n_1)周围 (包括(n_1)在内) 的 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 或 13 个核苷酸形成环; 例如, 在(n_1)的 5'端和 3'端各具有 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个核苷酸形成 5'端和 3'端臂, 所述 5'端和 3'端臂之间不互补, 从而形成环。在一些实施方案中, 在(n_1)的 5'端和 3'端各具有 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个核苷酸形成 5'端和 3'端臂, 所述 5'端和 3'端臂之间不互补, 从而形成环, 而不形成环的剩余核苷酸之间至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 100%互补, 形成茎。在一些实施方案中, 在(n_1)的 5'端和 3'端各具有 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个核苷酸形成 5'端和 3'端臂, 所述 5'端和 3'端臂之间不互补, 从而形成环, 而不形成环的剩余核苷酸之间 100%互补, 形成茎。

在一些实施方案中, 本文描述的核苷酸序列的每个 n 彼此独立地选自下述核苷酸: A, U, T, G 和 C, 或其核苷酸类似物, 例如如果所述序列为 RNA 序列, 每个 n 可以彼此独立地选自下述核苷酸: A, U, G 和 C, 或其核苷酸类似物。

在一些实施方案中, (n_1)为 A。在一些实施方案中, (n_{6-7})与 microRNA 的第 2-7 或第 2-8 位完全互补, (n_{0-3})为插入的胞苷 (C) 或鸟苷 (G) 其类似物, 从而其相对应的(n_{11-21})序列中的相应位置为互补的鸟苷 (G) 或胞苷 (C) 其类似物, 以在所述 5'端臂和 3'端臂之间形成 GC 配对, 所述配对的个数可以是 0, 1, 2, 3 个, 所述插入的 C 在计算所述 microRNA 与所述 miRancer 之间的互补性时作为缺口不计算在内。在一些实施方案中, (n_{5-11})为 5, 6, 7, 8, 9, 10, 或 11 个连续核苷酸。在一些实施方案中, (n_{6-7})为 6 或 7 个连续核苷酸。在一些实施方案中, (n_{11-21})为 16、17 或 18 个连续核苷酸, 其中不配对核苷酸的个数小于 6、5、4、3、2、或 1 对, 优选全部不配对的核苷酸在(n_1)周围, 形成环结构; 在一些实施方案中, 所述茎结构的长度为 10-18 对配对核苷酸, 包括例如 10 对, 11 对, 12 对, 13 对, 14 对, 15 对, 16 对, 17 对, 18 对配对核苷酸; 所述环结构包括 1-13 个核苷酸, 包括例如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 个核苷酸。在一些实施方案中, (n_{0-2})可以为 3'端悬突 (overhang), 其可以是例如 UU。在一些实施方案中, 所述 3'端悬突可以例如促进 Ago2 的结合。在一些实施方案中, miRancer 分子可以在 3'端另外包含促进 Ago2 的结合

的序列，例如 HDV 核酶，其能够促进 RNA 分子 3'端额外序列的去除，产生短的 3'端悬突，从而促进 RNA 分子与 Ago2 的结合（参见例如 Renfu Shang 等人，NATURE COMMUNICATIONS, 6:8430，其全文通过引用并入本文）。

在一些实施方案中，单链 RNA 序列如 miRancer 分子从 5'端到 3'端包含以下通式 2 的分子或由所述通式 2 的分子组成：

$$(n_{7-9})(n_2)(n_7)(n_1)(n_{16-18}),$$

其中 n 为连续的核苷酸或其类似物，其后数字为核苷酸或其类似物的个数，其中 n_1 与目标 microRNA 的 5'端第一位的核苷酸（通常是 U）互补，相应的 n_7 对应于目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-8 位，其中 n_2 为插入的 C 或 G 以在所述 5'端臂和 3'端臂之间形成 GC 配对。在一些实施方案中， (n_7) 与目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-8 位至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 100%互补。在一些实施方案中， (n_7) 与目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-8 位完全互补。在一些实施方案中，紧邻 (n_1) 周围（包括 (n_1) 在内）的 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 或 13 个核苷酸形成环；例如，在 (n_1) 的 5'端和 3'端各具有 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个核苷酸形成 5'端和 3'端臂，所述 5'端和 3'端臂之间不互补，从而形成环。在一些实施方案中，在 (n_1) 的 5'端和 3'端各具有 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个核苷酸形成 5'端和 3'端臂，所述 5'端和 3'端臂之间不互补，从而形成环，而不形成环的剩余核苷酸之间至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 100%互补，形成茎。在一些实施方案中，在 (n_1) 的 5'端和 3'端各具有 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个核苷酸形成 5'端和 3'端臂，所述 5'端和 3'端臂之间不互补，从而形成环，而不形成环的剩余核苷酸之间 100%互补，形成茎。

本文提供的 miRancer 可以是一种寡核苷酸。术语“寡核苷酸”是指通过共价连接两种以上的核苷酸形成的分子。术语寡核苷酸通常包括寡核苷酸、寡核苷酸类似物、寡核苷酸模拟物和这些的嵌合组合。当指核苷酸或单体序列时，其可以碱基序列，诸如，例如，A, T (或 U), G 或 C 或其类似物的序列。

本文中“核苷酸”用在本文中是指包含糖结构部分、碱基结构部分和

共价连接的基团（如磷酸或硫代磷酸核苷酸间连接基团）的糖苷，并且包括天然存在的核苷酸（如 DNA 或 RNA）和包含修饰的糖和/或碱基结构部分的非天然存在的核苷酸，其在本文中还可称为“核苷酸类似物”。非天然存在的核苷酸包括具有修饰的糖结构部分（如二环核苷酸或 2' 修饰的核苷酸，如 2' 取代的核苷酸）的核苷酸。“核苷酸类似物”是天然存在的核苷酸（如 DNA 或 RNA 核苷酸）利用在糖和/或碱基结构部分中的修饰产生的变体。类似物可以对所述寡核苷酸没有功能性影响或具有功能性影响。例如，通过产生针对靶标的增加的结合亲和力和/或增加的对细胞内核酸酶的抗性和/或增加的转运到细胞内的容易性。在一些实施方案中，所述 miRancer 分子包含 1 个、2 个、3 个或更多核苷酸类似物。在一些实施方案中，所述寡聚体包含 3-8 个核苷酸类似物，例如 6 或 7 个核苷酸类似物。在一些实施方案中，所述核苷酸类似物包括锁定核酸(LNA)。例如，所述核苷酸类似物中 1 个、2 个、3 个或更多核苷酸类似物可以是 LNA。

本文定义的修饰的 RNA 分子可以含有核苷酸类似物/修饰，例如骨架修饰，糖修饰或碱基修饰。骨架修饰可以是核酸分子中包含的核苷酸骨架的磷酸酯被化学。修饰的修饰骨架的磷酸酯基团可以通过用不同取代基替代一个或多个氧原子来修饰，其实例包括例如硫代磷酸酯。糖修饰可以是核酸分子的核苷酸的糖的化学修饰，例如，2' 羟基(OH)可以被很多不同"氧基"或"脱氧"取代基修饰或替代。碱基修饰可以是核酸分子的核苷酸的碱基部分的化学修饰。核苷酸类似物或修饰可以选自适于转录和/或翻译的核苷酸类似物。核苷酸类似物/修饰可以包括 2-氨基-6-氯嘌呤核苷-5'-三磷酸酯，2'-氨基-2'-脱氧胞苷-三磷酸酯，2'-氟胞苷-5'-三磷酸酯，5-甲基胞苷-5'-三磷酸酯，5-溴胞苷-5'-三磷酸酯，7-去氮杂鸟苷-5'-三磷酸酯，和假尿苷-5'-三磷酸酯等。修饰的核苷可以包括吡啶-4-酮核糖核苷，5-氮杂-尿苷，二氢假尿苷，2-硫代-二氢尿苷，2，6-二氨基嘌呤，N2,N2-二甲基鸟苷，N1-甲基-假尿苷，5,6-二氢尿苷，4-硫代-尿苷，5-羟基-尿苷，脱氧-胸苷，肌苷， α -硫代-鸟苷，6-甲基-鸟苷，5-甲基-胞苷，8-氧代-鸟苷，7-去氮杂-鸟苷，N1-甲基-腺苷，2-氨基-6-氯-嘌呤，假异-胞苷，6-氯-嘌呤等。

本文提供的 miRancer 分子可以包含或由长度总共为 25, 26, 27, 28,

29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 个连续的核苷酸序列组成。在一些实施方案中，所述寡核苷酸包含或由长度总共约为 30–45 个，诸如约 33–40 个，诸如约 33-37 个，诸如约 33-35 个连续核苷酸序列组成。在一些实施方案中，本发明所述的寡核苷酸由不超过 40 个核苷酸组成，诸如不超过 38 个核苷酸，诸如不超过 34 个核苷酸，诸如 33、35 或 37 个核苷酸。

2. 组合物

本文提供包含 miRancer 分子的方法和组合物，所述 miRancer 当在细胞中表达时能增强 microRNA 活性。此类方法和组合物包含 miRancer 表达载体。“miRancer 表达载体”是指包含 miRancer 分子的载体，其具有编码 miRancer 的多核苷酸序列。miRancer 表达载体被设计成从所述载体产生 miRancer 分子。

“microRNA”或“miRNA”是指寡核糖核酸，一般来讲长度为约 18 至约 25 个核苷酸，其调控包含靶序列的多核苷酸的表达。microRNA 为非蛋白编码 RNA，在动物和植物中已被鉴定。microRNA 被初始转录为长多腺苷酸化的 RNA，然后被加工形成具有形成稳定发夹能力的较短序列。大多数 microRNA 基因在 RNA 聚合酶 II 的作用下合成 pri-miRNA。在细胞核内 pri-miRNA 经 Drosha 酶剪切，形成约 70nt 的茎环结构，即 pre-miRNA。随后，pre-miRNA 在 Dicer 酶的作用下剪切产生 microRNA 单链结构，形成成熟 microRNA。

3. miRancer 表达载体

本文提供 miRancer 表达载体。miRancer 表达载体表达载体包含能被转录为 miRancer 序列的多核苷酸，所述 miRancer 序列能增强 microRNA 活性。

在一些实施方案中，所述 miRancer 表达载体提供了形成具有类似发

夹 RNA 结构的 miRancer 分子。在一些实施方案中，所述 miRancer 分子可以稳定 microRNA 分子，从而调节所述 microRNA 靶向基因的表达活性。所述 miRNA 可来源于任何动物或植物。

在一些实施方案中，miRancer 的 5'端臂序列与 miRNA 序列从第 2 位开始的连续核苷酸序列可以是 100%、至少 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%或更低互补的序列。在实施方案中，miRancer 的 5'端臂序列包含与 miRNA 序列从第 2 位开始的连续核苷酸序列具有 1、2、3、4、5 或更多处错配的序列，并仍具有足够的互补与 miRNA 序列形成双链结构，生成 miRNA 结合序列并增强所述 microRNA 的活性。

由 miRancer 表达载体 miRancer 分子，并具有与 microRNA 足够互补的序列。与 microRNA 靶序列的“足够互补的序列”是指其互补性足够使得 miRancer 分子与 microRNA 结合并增加所述 microRNA 的活性。在具体的实施方案中，具有与靶序列足够互补的 miRancer 可与 microRNA 靶序列共有 100%互补的序列或可与靶序列共有小于 100%互补的序列(即至少 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%或更低互补的序列)。在其它实施方案中，miRancer 与靶序列可具有 1、2、3、4、5 或至多 6 处错配，只要 miRancer 与靶序列具有足够的互补以增加靶序列的活性如半衰期。

在一些实施方案中，miRNA 序列可具有位于 5'端的“U”。任选地，在 miRNA 的 5'端内可加入一对碱基对变化，以使所述序列与靶序列相差一个核苷酸。

“靶序列”是指设计 miRancer 所靶向的 microRNA 的序列。靶序列可以是内源性序列，或者可以是导入的异源性序列。

由 miRancer 表达载体产生的 miRancer 能够增加 microRNA 的活性。用于测定 microRNA 的活性的方法包括测量其靶向的基因/蛋白的表达的改变。在一些实施方案中，单个 miRNA 可沉默蛋白和 / 或基因家族中的多个蛋白 / 基因或整个蛋白和 / 或基因家族。

“增加”表示相对于野生型生物体中 microRNA 正常水平（或

microRNA 靶向的基因/蛋白水平) 的增加。通过“增加 miRancer 活性”可以是增加表达活性至任一统计意义上的显著性数量, 例如相对于野生型表达活性增加至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 100%。

本文所述的 miRancer 分子可以被递送到动物如哺乳动物包括人或植物细胞中的一种或多种中。

4. 编码 miRancer 表达载体的多核苷酸和制备方法

本文提供分离或重组体多核苷酸, 其编码 miRancer 表达载体、miRancer 表达载体的各种组分、连同被加工成 miRancer 的 miRancer 表达载体的不同产物。

多核苷酸可以是 RNA 或 DNA 的聚合物, 它们可以是单链或双链, 任选地包含合成的、非天然的或改性的核苷酸碱基。DNA 聚合物形式的多核苷酸可由 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 或它们的混合物的一个或多个片段构成。多核苷酸可包括核糖核苷酸以及核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的组合。所述脱氧核苷酸和核糖核苷酸包括天然存在的分子和合成类似物。本发明所述多核苷酸也涵盖所有形式的序列, 包括但不限于单链形式、双链形式、发夹结构、茎环结构等。

本文提供的组合物可包含分离或基本上经纯化的多核苷酸。“分离”或“纯化的”多核苷酸, 是基本上或本质上不含那些在天然存在环境中正常伴随多核苷酸或与其相互作用的游离组分。因此, 分离或经纯化的多核苷酸基本上不含其他细胞物质、或当通过重组体技术生产时的培养基、或基本上不含当通过化学合成时的化学前体或其他化学物质。在一些实施方案中, “分离”多核苷酸不含多核苷酸所来源于的生物的基因组 DNA 中天然地存在于所述多核苷酸两侧(即, 位于所述多核苷酸的 5'和 3'端)的序列。

还提供了包含 miRancer 表达载体和其不同组分的重组多核苷酸。重组载体包含人工的或异源的核酸序列的组合例如非天然共存的调控和编码序列。在其它实施方案中, 重组载体可包含来源于不同来源的调控序列

和编码序列，或来源于相同来源但以不同于天然存在的方式排列的调控序列和编码序列。所述载体可独自使用或与载体组合使用。如果使用载体，则载体的选择取决于用以转化宿主细胞的方法。例如可以使用质粒载体。为了成功地转化、筛选和繁殖包括本发明任何分离核酸片段的宿主细胞，载体上可以包含的遗传元件。因此为了获得显示期望的表达水平和模式的细胞系，可通过 DNA 印迹分析、RNA 印迹分析、蛋白表达的免疫印迹分析或表型分析等进行筛选。

在具体的实施方案中，本文所述的一个或多个 miRancer 表达载体可以表达盒形式提供在不同细胞类型中表达。所述盒可包括 5'和 3'调控序列，其被可操作地与本文提供的多核苷酸连接。在转录的 5'-3'方向中，所述表达盒可包括转录和翻译起始区(即启动子)、本文所提供的重组多核苷酸、以及转录和翻译终止区(即终止区)。

许多启动子可用于本文提供的 miRancer 表达载体。通过在 miRancer 表达载体中使用不同启动子，可以调节 miRancer 表达的时间、位置和 / 或水平。如果需要，miRancer 表达载体可含有启动子调节区(例如赋予诱导型、组成型、环境或发育调节的、或细胞或组织特异性 / 选择性表达的调节区)，转录起始开始位点、核糖体结合位点、RNA 加工信号、转录终止位点和 / 或聚腺苷酸化信号。

5. 导入的方法

本文提供的方法包括将 miRancer 表达载体导入细胞，以提高目标 microRNA 的活性。本文提供的方法限于特定方法，只要使多核苷酸进入宿主的至少一个细胞的内部即可。将多核苷酸导入宿主细胞中的方法是本领域已知的，包括但不限于病毒介导的方法。导入包括指将核酸整合进真核或原核细胞中，在该细胞中核酸可整合进细胞的基因组内，并且包括指将核酸或蛋白提供给细胞。转化方案以及用于将多核苷酸序列引入植物内的方案可以根据被转化细胞的类型而改变。

6. 使用方法

提供了通过将 miRancer 表达载体导入细胞增加 microRNA 活性的方法。本文提供的方法包括将 miRancer 表达载体导入细胞，其中由 miRancer 表达载体产生的 miRancer 分子，其能增加 microRNA 和/或改变（如增加或降低）所述 microRNA 靶向的基因的活性。在一些实施方案中，可以将 miRancer 分子整合到基因组中目标 microRNA 靶向的基因的调节区（包括例如 5'UTR 和/或 3'UTR 和/或基因上游、下游、内含子等区域）以调节基因的表达。在一些实施方案中，本文提供的 miRancer 分子能够增加 microRNA 靶向的基因的表达，这是非常令人吃惊的，因为通常认为 microRNA 的作用是降低基因的表达。在一些实施方案中，本文提供的 miRancer 分子能够改变目标 microRNA 的作用（例如，目标 microRNA 降低一些基因的表达，然后，通过将本文提供的 miRancer 分子或载体引入到所述基因的调节区，使得目标 microRNA 增加基因的表达）。在一些实施方案中，可以通过针对期望调节的目的基因的相应的 microRNA 涉及相应的 miRancer 分子，从而调节期望改变其表达的目的基因的表达。

7. 活性变体

本文还提供在组合物和方法中应用的多核苷酸的活性变体。“变体”是指基本上类似的序列。就多核苷酸而言，变体包括在多核苷酸的一个或多个内部位点有一个或多个核苷酸的缺失和 / 或插入，和 / 或在多核苷酸的一个或多个位点有一个或多个核苷酸的置换。变体多核苷酸可包括合成来源的多核苷酸，诸如那些例如通过定点诱变生成的。一般来讲，本文所公开的 miRancer 表达载体、单链 RNA 分子、miRancer 分子，与原型多核苷酸具有至少约 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的序列同一性。用于比对的序列比对方法是本领域熟知的。比对序列、测定序列同一性的程序包括 CLUSTAL、GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA 等。可以使用默认参数进行使用这些程序的比对。

8. 目标 microRNA 分子

在一些实施方案中，本文的 miRancer 能够作用的目标 microRNA 不受特定限制。例如，可以从现有数据库中选择希望被调节的目标 microRNA 分子。在一些实施方案中，可以根据希望调节的基因选择所对应的 microRNA 分子。另外，可以通过生物信息学方法（例如应用 miRanda、TargetScan、RNAhybrid 等程序）寻找 microRNA 所靶向的基因。

本文的 miRancer 分子可通过与目标 microRNA 分子结合提高所述 microRNA 的活性。在一些实施方案中，当与目标 microRNA 分子杂交时，所述寡核苷酸可以耐受 1, 2, 3 或 4 个(或更多个)错配，并且仍然与所述靶标充分结合，以显示出需要的作用（例如，提高所述 microRNA 的活性）。例如，错配可以由所述核苷酸序列内存在的增加长度的寡核苷酸序列和/或增加数量的核苷酸类似物（如锁定核酸 (LNA)）而得到补偿。在一些实施方案中，当与目标 microRNA 分子杂交时，所述连续的核苷酸序列包含不超过 3 个错配（例如，不超过 1 个或不超过 2 个错配）。在一些实施方案中，当与目标 microRNA 分子杂交时，所述连续的核苷酸序列包含不超过一个错配。

本发明的 miRancer 分子优选地与 microRNA 分子在互补区至少 80% 互补，至少 85%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，诸如至少 100% 互补。

在一些实施方案中，所述 miRancer 可以包含另外的 5' 或 3' 核苷酸或修饰，诸如，独立地 1, 2, 3, 4 或 5 个另外的核苷酸 5' 和/或 3'，其与靶序列不互补。在这一方面，在一些实施方案中，本发明的寡核苷酸可以包含在 5' 和或 3' 侧连另外的核苷酸的连续的核苷酸序列。在一些实施方案中，所述另外的 5' 或 3' 核苷酸是天然存在的核苷酸，诸如 DNA 或 RNA。在一些实施方案中，所述另外的 5' 或 3' 核苷酸可以是核苷酸类似物。互补区可以包括 microRNA 分子的第 2-12、2-13 位，2-14、2-15、2-16、2-17、

2-18 位。

9. 药物组合物

本发明的 miRancer 分子、载体、细胞可以用在药物制剂和组合物中，也可制备成方便应用的试剂盒。适当地，所述组合物或试剂盒包含药用溶剂，诸如水或盐水，稀释剂，载体，盐或辅药。

本发明还包括含有本发明的寡核苷酸的药物组合物和制剂。本发明的药物组合物可以以多种方式施用，取决于是否需要局部治疗还是系统治疗，以及取决于待治疗的区域。

10. 应用

本发明的寡核苷酸可以用作研究试剂，例如，用于诊断、治疗和预防。在研究中，所述寡核苷酸可以用于特异性结合目标 microRNA，可以增加其活性，由此促进对靶标的功能性分析或对其作为治疗干预的靶标的评估。

在诊断剂中，所述寡核苷酸可以用于通过 RNA 印迹、原位杂交或类似的技术来检测并定量细胞中组织中的目标 microRNA 水平。

对于治疗剂，怀疑患有可以通过调节目标 microRNA 靶向的基因的表达进行治疗的疾病或病症的动物或人可以通过施用本发明所述的寡核苷酸进行治疗。进一步提供治疗怀疑患有或倾向于患有与目标 microRNA 靶向的基因的表达相关的疾病或病症的哺乳动物（如治疗人）的方法，所述通过施用治疗或预防有效量的一种或多种本发明的寡核苷酸或组合物。本发明所述的寡核苷酸或药物组合物典型地以有效量施用。

本发明还提供用于治疗疾病如肿瘤的方法，所述方法包括给有此需要的患者施用本文所述的寡核苷酸分子或包含所述分子的药物组合物。

11. 实验结果

试剂和材料

以下实验中用到的细胞系为 MCF-7 人乳腺癌细胞系,购于 ATCC,培养基为 RPMI-1640,购于 Gibco, 胎牛血清 FBS 购于 Gibco。转染试剂为 lipofectamine 2000, 购于 invitrogen. 质粒 pSilencer 4.1 CMV 购于 Ambion 公司, 质粒 psiCheck2 及双荧光素酶检测试剂盒购于 promega 公司。引物合成由上海生工完成, mimics 合成由上海吉玛完成。

重组质粒克隆方法为常规方法, 测序由上海生工完成, 细节在下文中阐述。

双荧光素酶报告实验按照试剂盒 (Promega E1910) 说明书进行。

实验过程

1. 设计有高级结构的 microRNA 结合序列。

首先, microRNA 的结合序列被设计为有类似发卡结构的单链 RNA, 发卡结构 5'端臂通过碱基互补配对与 microRNA 结合, 而 3'端臂则通过碱基互补配对与 5' 端臂结合。为了防止 Dicer1 的加工和类似 siRNA 效应发生, 优选的双链的长度在 18 个核苷酸以内。

然后, 在发卡结构的拐角处分别引入 7nt 或 13nt 的环结构, 用以确定不同结构可能带来的潜在功能。

再后, 在发卡环结构的中部插入两对 GC 以稳定 RNA 二级结构。

最后, 也设计了一个线性的 microRNA 结合序列作为阴性对照。

这样, 就得到了 8 种不同形式的示例性 microRNA 结合序列(以 miR-7 和 miR-9 为例)。图 1 显示了 miR-7 结合序列的不同形式; 图 2 显示了 miR-9 结合序列的不同形式。

2. 制备表达载体。

选用 pSilencer 4.1 CMV 质粒作为小发卡 RNA 的表达载体。质粒经过

BamHI 和 HindIII 双酶切后, 用 1%的琼脂糖胶分离, 然后用 Axyprep DNA extraction kit (AP-GX-50) 回收, 存放于-20℃。

3. 制备插入序列。

合成了如下 DNA 序列:

miR-7 结合序列 A 正向:

GATCCAAAATCACTAGTCTTCCAGGAAGACTAGTGATTTTA

miR-7 结合序列 A 反向:

AGCTTAAAATCACTAGTCTTCCTGGAAGACTAGTGATTTTG

miR-7 结合序列 B 正向:

GATCCAAAATCACTAGTCTTCCACCTAGACTAGTGATTTA

miR-7 结合序列 B 反向:

AGCTTAAAATCACTAGTCTAGGTGGAAGACTAGTGATTTTG

miR-7 结合序列 C 正向:

GATCCAAAATCACTAGTCTTCCACCTTCTCTAGTGATTTTA

miR-7 结合序列 C 反向:

AGCTTAAAATCACTAGAGAAGGTGGAAGACTAGTGATTTTG

miR-7 结合序列 D 正向:

GATCCAAAATCACTAGTCTTCCAA

miR-7 结合序列 D 反向:

AGCTTTGGAAGACTAGTGATTTTG

miR-7 结合序列 E 正向:

GATCCAATCACTACCGTCTTCCAGGAAGACGGTAGTGATTA

miR-7 结合序列 E 反向:

AGCTTAATCACTACCGTCTTCCTGGAAGACGGTAGTGATTG

miR-7 结合序列 F 正向:

GATCCAATCACTACCGTCTTCCACCTAGACGGTAGTGATTA

miR-7 结合序列 F 反向:

AGCTTAATCACTACCGTCTAGGTGGAAGACGGTAGTGATTG

miR-7 结合序列 G 正向:

GATCCAATCACTACCGTCTTCCACCTTCTCGGTAGTGATTA

miR-7 结合序列 G 反向:

AGCTTAATCACTACCGAGAAGGTGGAAGACGGTAGTGATTG

miR-7 结合序列 H 正向:

GATCCAATCACTACCGTCTTCCAA

miR-7 结合序列 H 反向:

AGCTTTGGAAGACGGTAGTGATTG

miR-9 结合序列 A 正向:

GATCCCAGCTAGATAACCAAAGACTTTGGTTATCTAGCTGA

miR-9 结合序列 A 反向:

AGCTTCAGCTAGATAACCAAAGTCTTTGGTTATCTAGCTGG

miR-9 结合序列 B 正向:

GATCCCAGCTAGATAACCAAAGAGAATGGTTATCTAGCTGA

miR-9 结合序列 B 反向:

AGCTTCAGCTAGATAACCATTCTCTTTGGTTATCTAGCTGG

miR-9 结合序列 C 正向:

GATCCCAGCTAGATAACCAAAGAGAAACCTTATCTAGCTGA

miR-9 结合序列 C 反向:

AGCTTCAGCTAGATAAGGTTTCTCTTTGGTTATCTAGCTGG

miR-9 结合序列 D 正向:

GATCCCAGCTAGATAACCAAAGAA

miR-9 结合序列 D 反向:

AGCTTTCTTTGGTTATCTAGCTGG

miR-9 结合序列 E 正向:

GATCCGCTAGATACCACCAAAGACTTTGGTGGTATCTAGCA

miR-9 结合序列 E 反向:

AGCTTGCTAGATACCACCAAAGTCTTTGGTGGTATCTAGCG

miR-9 结合序列 F 正向:

GATCCGCTAGATACCACCAAAGAGAATGGTGGTATCTAGCA

miR-9 结合序列 F 反向:

AGCTTGCTAGATACCACCATTCTCTTTGGTGGTATCTAGCG

miR-9 结合序列 G 正向:

GATCCGCTAGATACCACCAAAGAGAAACCTGGTATCTAGCA

miR-9 结合序列 G 反向:

AGCTTGCTAGATACCAGGTTTCTCTTTGGTGGTATCTAGCG

miR-9 结合序列 H 正向:

GATCCGCTAGATACCACCAAAGAA

miR-9 结合序列 H 反向:

AGCTTTCTTTGGTGGTATCTAGCG

这些 DNA 序列两两成对在 $1\times$ TE buffer 中按如下程序退火:

95°C 2min

touch down at 0.1°C every 8s

4°C 30min

退火后的 DNA 序列连接入 pSilencer 4.1 CMV 质粒的 BamHI 和 HindIII 之间, 使用的试剂盒是 TAKARA ligation kit (D6022)。重组质粒通过测序确认序列正确。

4. 制备 microRNA 报告载体。

在 psi-CHECK2 质粒的 XhoI 和 NotI 之间插入 microRNA 的结合位点以获得 microRNA 报告载体。图 3 显示了 miR-7 reporter 和 miR-9 reporter 的示意图。

5. 荧光素酶报告实验。

向 MCF-7 细胞中共转染了 miR-7 结合序列和 miR-7 reporter, 然后按照说明做了双荧光素酶报告实验(Promega E1910)。图 4 显示了过表达 miRancers 后的 miR-7 reporter 或 miR-9 reporter 的荧光素酶活性。*, $p<0.05$, **, $p<0.01$ by Student's *t*-test.

选择 F 型作为优选的可以增强 microRNA 活性的 microRNA 结合序列。将所有的可以增强 microRNA 活性的序列称为 microRNA 增强子, 简称

miRancers.

6. 优化 miRancer 结构

以 F 型为原型, 继续摸索合适的 miRancer 结构, 通过缩短或延长 miRancer 的 Stem 区结构, 得到了含有 15bp (miR-7 结合序列 F1) 或 13bp (miR-7 结合序列 F2) 的发卡结构, 结果显示, 二者均仍然可以起作用。图 5 显示不同茎长的 miR-7 结合序列示意图。图 6 显示过表达不同茎长的 miRancers 后 miR-7 reporter 的荧光素酶活性**, $p < 0.01$ by Student's *t*-test。

7. 化学合成 miRancers.

进而根据 F 型用化学方法合成了 miRancer (上海吉玛)。针对果蝇中的 bantam miRNA 设计的 miRancer 作为对照。发明人发现化学合成的 miRancers 也可以特异地影响 microRNA 的活性和水平。图 7 显示过表达 miRancer 后 miR-7 reporter 或 miR-9 reporter 的荧光素酶活性**, $p < 0.01$ by Student's *t*-test。图 8 显示过表达 miRancer 后 miR-7 或 miR-9 的表达水平。***, $p < 0.001$ by Student's *t* test。

8. miRancer motif 增强基因表达.

在 luciferase 的上游分别插入 miRancer-7, miR-7 sponge, miRancer-9, miR-9 sponge, 然后分别与 miR-7 mimics, miR-9 mimics (上海吉玛) 共转染, 发现含有 miRancer 的 luciferase 可以被相应的 miRNA 稳定, 而含有 sponge 的 luciferase 则被相应的 miRNA 抑制。这说明 miRancer 可以用来增强基因的表达。图 9 显示含有 miRancer 或 sponge 序列的荧光素酶报告载体示意图。图 10 显示过表达 miR-7 或 miR-9 对不同荧光素酶活性的影响。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p > 0.001$ by Student's *t* test。

权 利 要 求

1. 一种结合目标 microRNA 的单链 RNA 序列，所述单链 RNA 序列具有 5'端臂和 3'端臂，所述 5'端臂通过碱基互补配对与目标 microRNA 结合，所述 3'端臂通过碱基互补配对与所述 5'端臂结合，

所述单链 RNA 序列从 5'端到 3'端具有以下通式 1：

$(n_{5-11})(n_{0-3})(n_{6-7})(n_1)(n_{11-21})(n_{0-2})$,

其中 n 为连续的核苷酸或其类似物，其后数字为核苷酸或其类似物的个数，其中 n_1 与目标 microRNA 的 5'端第一位的核苷酸互补，相应的 n_{6-7} 对应于目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-7 位或第 2-8 位，从而 $(n_{5-11})(n_{0-3})(n_{6-7})$ 为 5'端臂， $(n_{11-21})(n_{0-2})$ 为 3'端臂，其中 n_{0-3} 为插入的 C 或 G 以在所述 5'端臂和 3'端臂之间形成 GC 配对。

2. 权利要求 1 所述的单链 RNA 序列，其中除了插入的 (n_{0-3}) 作为缺口不计算同一性之外，所述 5'端臂与所述目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-18 位核苷酸的互补链至少 50%、60%、70%、80%、90%、或 100% 的同一性，优选其中 (n_{6-7}) 与所述目标 microRNA 从 5'端到 3'端的第 2-7 位或第 2-8 位核苷酸的互补链具有至少 80%、90%、或 100% 的同一性，优选 (n_{11-21}) 与 $(n_{5-11})(n_{0-3})(n_{6-7})$ 中不配对核苷酸的个数小于 6、5、4、3、2、或 1 对，优选全部不配对的核苷酸在 (n_1) 周围。

3. 一种包含权利要求 1 或 2 所述单链 RNA 序列的载体，如质粒。

4. 一种包含编码权利要求 1 或 2 所述单链 RNA 序列的多核苷酸序列的载体，如质粒。

5. 一种包含权利要求 1 或 2 所述单链 RNA 序列的合成的 RNA 分子。

6. 一种包含权利要求 3 或 4 的载体的细胞。

7. 权利要求 1 或 2 的单链 RNA 序列、权利要求 3 或 4 的载体、或权利要求 5 的合成的 RNA 分子的用途，所述用途包括用于特异性增加内源性和/或外源性目标 microRNA 或其它小 RNA 的表达和/或活性，用于体外和/或体内特异性调节所述目标 microRNA 靶向的基因的表达，用作感受器用于感测所述目标 microRNA 或其它小 RNA，和用于通过感测所述目标

microRNA 或其它小 RNA 从而调节所述目标 microRNA 或其它小 RNA 靶向的基因的表达。

8. 一种方法，所述方法包括用于特异性增加内源性和/或外源性目标 microRNA 或其它小 RNA 的表达和/或活性的方法，用于体外和/或体内特异性调节所述目标 microRNA 靶向的基因的表达的方法，用作感受器用于感测所述目标 microRNA 或其它小 RNA 的方法，和用于通过感测所述目标 microRNA 或其它小 RNA 从而调节所述目标 microRNA 或其它小 RNA 靶向的基因的表达方法，所述方法包括将权利要求 1 或 2 的单链 RNA 序列、权利要求 3 或 4 的载体、或权利要求 5 的合成的 RNA 分子与包含目标 microRNA 或其它小 RNA 的样品接触的步骤。

9. 一种产生结合目标 microRNA 的单链 RNA 序列的方法，所述方法包括产生权利要求 1 或 2 所述的结合目标 microRNA 的单链 RNA 序列。

10. 一种组合物或试剂盒，其包含权利要求 1 或 2 的单链 RNA 序列、权利要求 3 或 4 的载体、和/或权利要求 5 的合成的 RNA 分子，优选的所述组合物或试剂盒用于权利要求 7 所述的用途或权利要求 8 所述的方法。

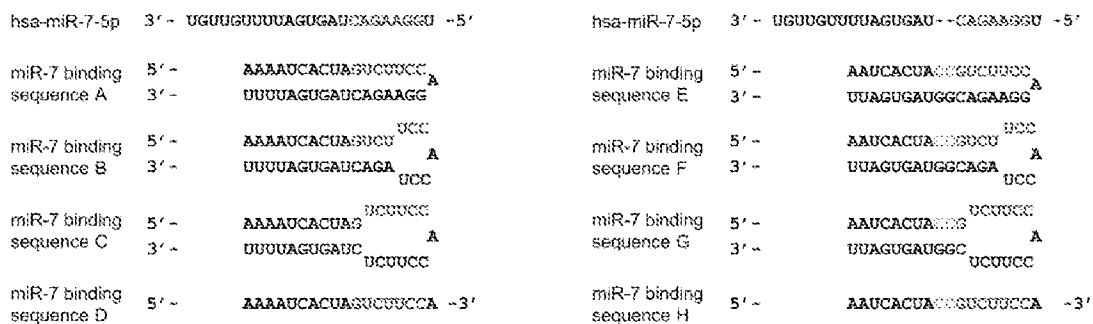


图 1

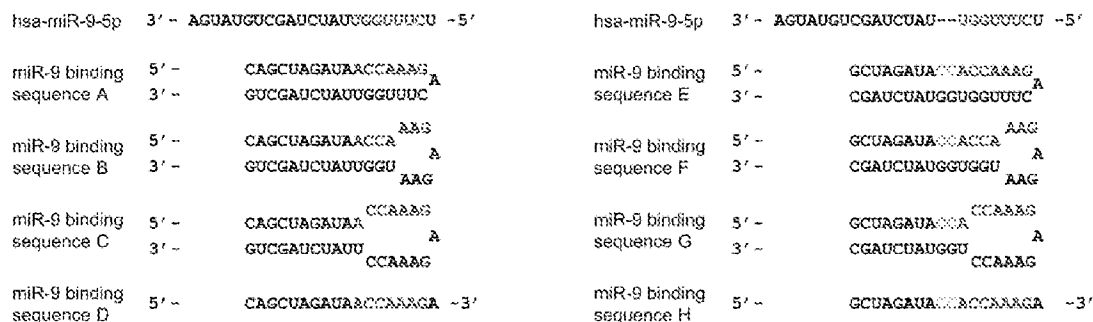


图 2

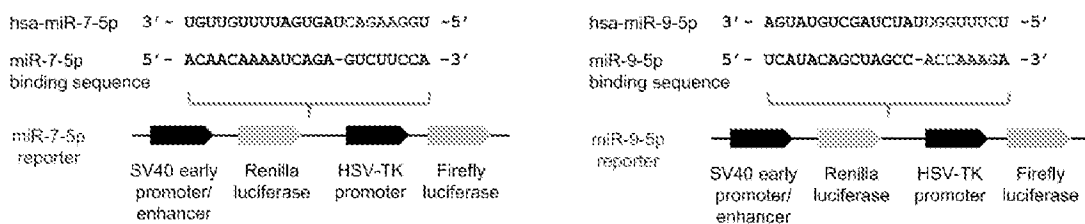


图 3

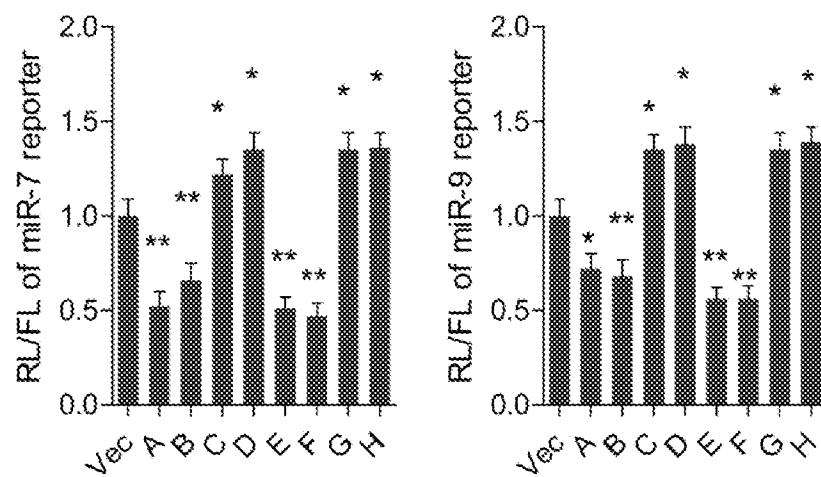


图 4

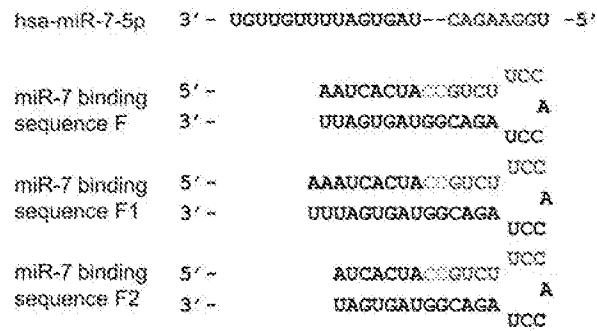


图 5

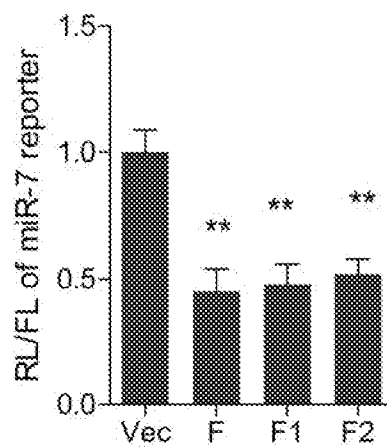


图 6

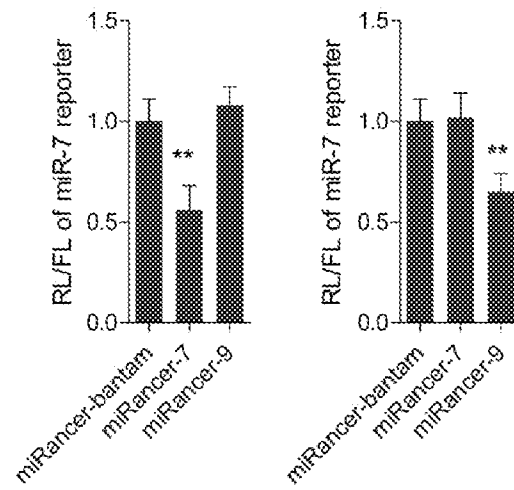


图 7

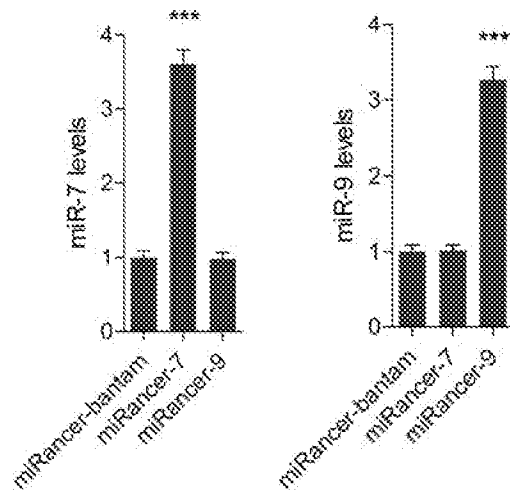


图 8

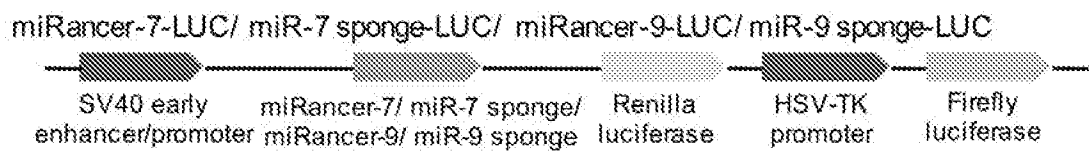


图 9

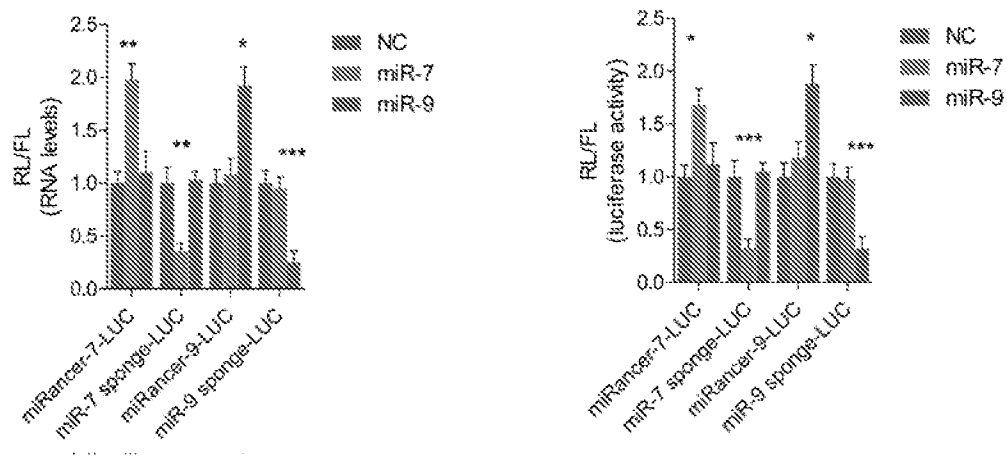


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/073517

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) i; C12N 15/63 (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

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)

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI Web of Science: microRNA, miRNA, single stranded RNA, complementary, combin+, target+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101437942 A (SANTARIS PHARMA AS), 20 May 2009 (20.05.2009), see description, page 4, paragraph 7 to page 13, paragraph 3	1-6, 7-8 (parts), 9-10
A	CN 102264898 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO), 30 November 2011 (30.11.2011), see the whole document	1-6, 7-8 (parts), 9-10
A	BOUTLA, A. et al. "Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in Drosophila and the identification of putative target genes", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 31, no. 17, 01 September 2003 (01.09.2003), ISSN: 0305-1048, see pages 4973-4980	1-6, 7-8 (parts), 9-10

☐ 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
30 August 2016 (30.08.2016)

Date of mailing of the international search report
07 September 2016 (07.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer

XU, Yijun

Telephone No.: (86-10) **62411083**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/073517

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7-8 (partial, relating to an in vivo method)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] claims 7-8 (partial, relating to an in vivo method) relate to a method of treatment of the human or animal body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent
that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/073517

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101437942 A	20 May 2009	ZA 200808420 A	26 August 2009
		ZA 200808420 B	26 August 2009
		NZ 594605 A	28 March 2013
CN 102264898 A	30 November 2011	US 8563709 B2	22 October 2013
		EP 2363467 B1	16 December 2015
		CN 102264898 B	16 October 2013
		US 2011245481 A1	06 October 2011
		EP 2363467 A4	20 February 2013
		EP 2363467 A1	07 September 2011
		JP 4936343 B2	23 May 2012
		WO 2010047216 A1	29 April 2010

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/073517

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(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

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))

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI Web of Science; 单链RNA, 互补, 结合, 靶向, microRNA, miRNA, single stranded RNA, complementary, combin+, target+

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	CN 101437942 A (桑塔里斯制药公司) 2009年 5月 20日 (2009 - 05 - 20) 参见说明书第4页第7段至第13页第3段	1-6, 7-8 (部分), 9-10
A	CN 102264898 A (国立大学法人东京大学) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30) 参见全文	1-6, 7-8 (部分), 9-10
A	Boutla A等. "Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in Drosophila and the identification of putative target genes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 第31卷, 第17期, 2003年 9月 1日 (2003 - 09 - 01), ISSN: 0305-1048, 参见第4973-4980页	1-6, 7-8 (部分), 9-10

☐ 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

2016年 8月 30日

国际检索报告邮寄日期

2016年 9月 7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

授权官员

徐益君

传真号 (86-10)62019451

电话号码 (86-10)62411083

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 7-8（部分，涉及体内方法）
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求7-8（部分，涉及体内方法）涉及人体或动物体的治疗方法。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/073517

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	101437942	A	2009年 5月 20日	ZA	200808420	A	2009年 8月 26日
				ZA	200808420	B	2009年 8月 26日
				NZ	594605	A	2013年 3月 28日
CN	102264898	A	2011年 11月 30日	US	8563709	B2	2013年 10月 22日
				EP	2363467	B1	2015年 12月 16日
				CN	102264898	B	2013年 10月 16日
				US	2011245481	A1	2011年 10月 6日
				EP	2363467	A4	2013年 2月 20日
				EP	2363467	A1	2011年 9月 7日
				JP	4936343	B2	2012年 5月 23日
				WO	2010047216	A1	2010年 4月 29日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)