

## (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  
2015年6月18日 (18.06.2015)



(10) 国际公布号  
WO 2015/085904 A1

- (51) 国际专利分类号:  
*C12N 15/113* (2010.01) *C12Q 1/68* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01) *A61K 45/00* (2006.01)  
*C12Q 1/70* (2006.01) *A61P 31/16* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/093384
- (22) 国际申请日: 2014年12月9日 (09.12.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201310664639.5 2013年12月9日 (09.12.2013) CN
- (71) 申请人: 江苏命码生物科技有限公司 (JIANGSU MICROMEDMARK BIOTECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省泰州市药城大道1号208室, Jiangsu 225300 (CN)。
- (72) 发明人: 张辰宇 (ZHANG, Chenyu); 中国北京市东城区王府井大街138号新东安广场T2座写字楼901, Beijing 100006 (CN)。曾科 (ZENG, Ke); 中国北京市东城区王府井大街138号新东安广场T2座写字楼901, Beijing 100006 (CN)。王进 (WANG, Jin); 中国北京市东城区王府井大街138号新东安广场T2座写字楼901, Beijing 100006 (CN)。李西汉 (LI, Xihan); 中国北京市东城区王府井大街138号新东安广场T2座写字楼901, Beijing 100006 (CN)。
- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (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))。  
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。



WO 2015/085904 A1

(54) Title: AVIAN INFLUENZA VIRUS MIRNA, AND APPRAISAL, DETECTION, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 禽流感病毒 miRNA 及其鉴定、检测和应用

(57) Abstract: Provided are avian influenza virus miRNA, and appraisal, detection, and application thereof. A microRNA expression profile level of an animal sample with the avian influenza virus is detected; specific microRNA, namely miR-HA-3p, is screened out; miR-HA-3p, as a microRNA marker, can be used to detect the avian influenza virus and avian influenza; and an avian influenza symptom can be relieved and avian influenza can be cured by suppressing functions of miR-HA-3p.

(57) 摘要: 提供了禽流感病毒 miRNA 及其鉴定检测和应用。通过检测禽流感动物样本的 microRNA 表达谱水平, 从中筛选出特异性的 microRNA: miR-HA-3p, 该 miR-HA-3p 作为 microRNA 标志物可检测禽流感病毒和禽流感, 通过抑制 miR-HA-3p 的功能, 可以缓解禽流感症状和治疗禽流感。

## 禽流感病毒 miRNA 及其鉴定、检测和应用

### 技术领域

5 本发明涉及生物和医学领域，更具体地，涉及禽流感病毒 miRNA 及其鉴定、检测和应用。

### 背景技术

流感病毒颗粒由两型表面糖蛋白覆盖，一型为植物血凝素(即 H)，一型为神经氨酸酶(即 N)，H 又分 15 个亚型，N 分 9 个亚型。

10 所有人类的流感病毒都可以引起禽类流感，但不是所有的禽流感病毒都可以引起人类流感，禽流感病毒中，H5、H7、H9 可以传染给人，其中 H5 为高致病性，H5N1 是禽流感病毒的一种亚型。H5N1 为卫生部新传染病防治法中规定报告的法定传染病，又称人感染高致病性禽流感。禽类流感根据其致病性可分为高致病性和低致病性。H5N1 为高致病性禽流感病毒。

15 1997 年，H5N1 病毒首次从中国香港一 3 岁儿童的流感死亡病例标本中分离鉴定出。至 2012 年，绝大多数的人类感染病例都直接来自鸟，只有个别的病例被认为是来自被感染的人，不过一般认为 H5N1 病毒尚未能在人与人之间建立持续的传播链。禽流感重症患者一般均为 H5N1 亚型病毒感染。患者呈急性起病，早期表现类似普通型流感。主要为发热，体温大多持续在 39℃ 以上，热程 1-7 天，一般为  
20 3-4 天，可伴有流涕、鼻塞、咳嗽、咽痛、头痛、肌肉酸痛和全身不适。部分患者可有恶心、腹痛、腹泻、稀水样便等消化道症状。重症患者病情发展迅速，可出现肺炎、急性呼吸窘迫综合征、肺出血、胸腔积液、全血细胞减少、肾功能衰竭、败血症、休克等多种并发症。白细胞总数一般不高或降低。重症患者多有白细胞总数及淋巴细胞减少，并有血小板降低。

25 H5N1 亚型禽流感病毒是目前发现的禽流感病毒中感染性最强、致死率最高、流行最广的一类病毒，该病毒已在世界上多个国家发生流行。

当前针对该病尚无高效特异的治疗方法，进行疫苗的接种是目前比较有效的  
30 预防措施和关键环节。因此研制安全、高效、廉价的新型疫苗成为当前禽流感防控工作的热点之一，针对疫苗的研制已经取得了大量的研究成果。但是，由于病毒变异速度快，变种种类多，现有疫苗研发速度并不能保证有效的抵抗病毒变种，所以，对 H5N1 侵染过程的深入研究及新治疗方法的开发更加迫在眉睫。

微小核糖核酸，英文名为 microRNA，简写作 miRNA，是一类长约 19 至 23 个

核苷酸的非编码单链小核糖核酸分子，它们在进化上高度保守，广泛存在于生物细胞中。微小核糖核酸通过识别靶 mRNA 的 3' 端非翻译序列，与之不完全互补，从而抑制靶 mRNA 的翻译。其序列、结构、丰度和表达方式的多样性使微小核糖核酸成为信使 RNA 强有力的调节因子并在基因表达调控领域中起着超乎想象的重要作用。

微小核糖核酸与动物的许多正常生理活动密切相关，涉及生物个体发育；组织分化；细胞凋亡以及能量代谢等生命活动的方方面面。同时，微小核糖核酸也与许多疾病的发生及发展存在千丝万缕的联系，在发生某种疾病时总有一些微小核糖核酸表达量是上调的，一些是下调的。

已有相关研究表明，病毒或微生物在感染宿主细胞后，会编码特异性的 miRNA，特异性 miRNA 作用于宿主免疫相关 mRNA，调节宿主的细胞因子系统，进而影响宿主的免疫调节。

综上所述，为了更有效地预防和治疗禽流感，本领域迫切需要开发可用于检测和治疗禽流感的相关试剂和方法。

## 发明内容

本发明的目的就是提供可有效用于检测和治疗禽流感的相关试剂和方法。

在本发明的第一方面，提供了一种分离的 miRNA，所述的 miRNA 选自：

- (i) 序列如 SEQ ID NO:1、2 或 3 所示的 miRNA，或
- (ii) 长度为 20-26nt，且具有 SEQ ID NO.: 4 所示核心序列的 miRNA；或
- (iii) 与(i)或(ii)中所述 miRNA 的核苷酸序列互补的 miRNA。

在另一优选例中，所述的互补包括基本上互补(不互补的碱基 $\leq 3$ 个，较佳地 $\leq 3$ 个，更佳地 $\leq 1$ 个)和完全互补。

在另一优选例中，所述的 miRNA 来自禽流感病毒。

在另一优选例中，所述的 miRNA 来自禽流感病毒 H5N1。

在另一优选例中，所述的 miRNA 分离自人或非人哺乳动物的血液、体液、或组织样品。

在另一优选例中，所述的血液为血浆和/或血清。

在另一优选例中，所述的非人哺乳动物为小鼠、大鼠、兔、猪、牛、羊等。

在另一优选例中，所述的 miRNA 分离自人。

在本发明的第二方面，提供了一种分离的或人工构建的前体 miRNA，所述的

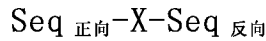
前体 miRNA 能在动物细胞内剪切并表达成如本发明第一方面所述的 miRNA。

在另一优选例中，所述的动物细胞包括人细胞。

在本发明的第三方面，提供了一种分离的多核苷酸，所述的多核苷酸能被动物细胞转录成前体 miRNA，所述的前体 miRNA 能在人细胞内被剪切且表达成如本

5 发明第一方面所述的 miRNA。

在另一优选例中，所述的多核苷酸具有式 I 所示的结构：



式 I

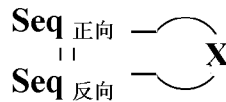
式 I 中，

10 Seq<sub>正向</sub> 为能在动物细胞中表达成所述的 miRNA 的核苷酸序列；

Seq<sub>反向</sub> 为与 Seq<sub>正向</sub> 基本上互补或完全互补的核苷酸序列；

X 为位于 Seq<sub>正向</sub> 和 Seq<sub>反向</sub> 之间的间隔序列，并且所述间隔序列与 Seq<sub>正向</sub> 和 Seq<sub>反向</sub> 不互补；

并且式 I 所示的结构在转入人细胞后，形成式 II 所示的二级结构：



15

式 II，

式 II 中，Seq<sub>正向</sub>、Seq<sub>反向</sub> 和 X 的定义如上述，

|| 表示在 Seq<sub>正向</sub> 和 Seq<sub>反向</sub> 之间形成的碱基互补配对关系。

在本发明的第四方面，提供了一种载体，所述载体含有本发明第一方面所述  
20 的 miRNA，或第二方面所述的多核苷酸。

在本发明的第五方面，提供了本发明第一方面所述 miRNA 的用途，它被用于  
(a) 制备检测禽流感的试剂、检测芯片或试剂盒；(b) 制备调控 PCBP2 表达或活性的  
调节剂；(c) 制备调控细胞因子表达的试剂。

在另一优选例中，所述的调控 PCBP2 表达或活性的调节剂是下调 PCBP2 表达  
25 或活性的抑制剂。

在另一优选例中，所述细胞因子包括：TNF $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、或其组  
合。

在本发明的第六方面，提供了一种核酸芯片(如 miRNA 芯片)，所述芯片包括：  
固相载体；以及

30 有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针，所述的寡核苷酸探针特异性捕

获本发明第一方面所述的 miRNA。

在本发明的第七方面，提供了本发明第六方面所述核酸芯片的用途，它被用于制备检测禽流感的试剂盒。

在本发明的第八方面，提供了一种试剂盒，所述的试剂盒中含有第七方面所述 5 的核酸芯片或本发明第一方面所述的 miRNA。

在本发明的第九方面，提供了一种特异性抑制或阻断本发明第一方面所述的 miRNA 的抑制剂。

在另一优选例中，所述的抑制剂是 miRNA 海绵(sponge)、与 miRNA 序列互补的反义核酸、小分子化合物。

10 在另一优选例中，所述的抑制剂是与(i)或(ii)中所述 miRNA 的核苷酸序列互补的核酸(如 RNA、DNA 或类似物)。

在本发明的第十方面，提供了本发明第九方面所述的 miRNA 的抑制剂的用途，它被用于制备(a)治疗禽流感的药物，(b)缓解禽流感症状的药物，(c)减少宿主动物中禽流感病毒数量的药物，(d)降低禽流感死亡率的药物，(e)降低过度免疫的 15 药物。

在本发明第十一方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物包括药学上可接受的载体和特异性抑制或阻断本发明第一方面所述的 miRNA 的抑制剂

在另一优选例中，所述的 miRNA 的抑制剂包括 miRNA 海绵(sponge)、与 miRNA 序列互补的反义核酸。

20 在本发明的第十二方面，提供了一种筛选用于治疗禽流感的候选药物的方法，包括步骤：

(a) 提供一测试组和一对照组，其中在所述测试组中将候选物质施用于测试组的细胞或动物，并测定施用后所述测试组中 miR-HA-3p 的表达水平，而所述的对照组采用与测试组相同的条件，但不将候选物质施用于对照组的细胞或动物；

25 (b) 将测试组的 miR-HA-3p 与对照组的 miR-HA-3p 的表达水平进行比较；

其中，当测试组的 miR-HA-3p 的表达水平显著低于对照组的 miR-HA-3p 的表达水平时，则表明该候选物质是用于治疗禽流感的候选药物。

在另一优选例中，所述的 miR-HA-3p 的序列如 SEQ ID NO.：1-3 中所述。

在另一优选例中，所述的动物包括小鼠，所述的细胞包括体外培养的细胞。

30 在本发明的第十三方面，提供了一种 miR-HA-3p 的用途，它用于制备的下调 PCBP2 表达或活性的调节剂或药物组合物。

在另一优选例中，所述的 miR-HA-3p 的序列如 SEQ ID NO.：1-3 中所述。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。

5 限于篇幅，在此不再一一累述。

### 附图说明

图 1 显示了在禽流感 H5N1 在感染宿主细胞后，会释放特殊的小分子 miR-HA-3p。

10 图 2 显示了 miR-HA-3p 对靶基因 PCBP2 的抑制作用。

图 3 显示了在 H5N1 野生型和突变株感染的巨噬细胞中，miR-HA-3p 对细胞因子分泌的影响。

图 4 显示了用 miR-HA-3p 抑制剂进行处理后，PCBP2 的表达情况。

15 图 5 显示的是感染了 H5N1 或 H5N1 突变株的巨噬细胞在不同处理条件下 TNF- $\alpha$  ,IFN- $\beta$  ,IL-1 $\beta$  或 IL-6 mRNA 的表达水平。

图 6 显示了在小鼠模型中，miR-HA-3p 与 H5N1 感染程度呈正相关。

图 7 显示了不同处理条件下四天后小鼠肺部 PCBP2 蛋白水平。

图 8 显示了组织病理学方法针对多组实验小鼠的肺部组织研究结果。

20 各附图中，“Mut”表示突变，“control”表示对照，“Marker”表示分子量标准，“Mock”表示空白对照。

### 具体实施方式

25 本发明人经过长期而广泛的研究，首次意外地发现，体内病原体(包括感染微生物、寄生微生物、共生微生物等，如：病毒、细菌、古细菌、衣原体、原生生物)会释放非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)，包括 miRNA，这些特定的 ncRNA 可作为体内病原体的生物标志物，可有效地用于体内病原体的检测和治疗，从而显著改善微生物感染性疾病的诊断和治疗。在此基础上完成了本发明。

30 具体地，本发明人通过检测禽流感动物的样本的 microRNA 表达谱水平，首次从中筛选出一种特异性的 microRNA：miR-HA-3p。经检验证明，miR-HA-3p 作为 microRNA 标志物可非常有效地检测禽流感病毒和禽流感。此外，通过抑制 miR-HA-3p 的功能，可以很有效地缓解禽流感症状和治疗禽流感。基于本发明首次揭示的 microRNA，可以开发成检测试剂和治疗试剂以及相应的试剂盒，从而用

于禽流感(如 H5N1)的检测和治疗。

实验证实, H5N1 在感染宿主细胞后, 会释放特殊的小分子物质 miR-HA-3p 进入宿主体内循环, 并且 miR-HA-3p 的表达量与病毒的感染程度是成正相关的。本发明进一步发现 miR-HA-3p 的靶基因为 PCBP2, miR-HA-3p 通过作用于 PCBP2 mRNA 5 下调 PCBP2 蛋白表达, 导致 MAV 介导的抗病毒过程的增强, 从而在 H5N1 侵染过程中引起过渡的免疫应答或者细胞因子风暴。本发明通过构建人类巨噬细胞模型及小鼠模型, 证实了阻断 miR-HA-3p 后, 可以缓解宿主的炎症反应, 提高小鼠的存活率。

本发明通过构建 miR-HA-3p 特异性的刺激剂和抑制剂, 达到了调节 miR-HA-3p 10 表达水平的目的, 由此可以缓解和治疗 H5N1 病毒引起的多种免疫反应及组织学病变。这种疗法特异性强、高效、副作用小、成本低, 并且这种方法给人类抗 H5N1 病毒及其变种提供了一种新思路。

### 术语

15 如本文所用, 术语“本发明 miRNA”、“禽流感 H5N1 特异性 miRNA”可互换使用, 指 miR-HA-3p, 包括 miR-HA-3p-1、miR-HA-3p-2、miR-HA-3p-3 以及具有其核心序列 (SEQ ID NO.: 4) 的类似 miRNA。

如本文所用, 术语“抑制剂”、“拮抗剂”和“阻断剂”可互换使用, 含义相同。

20 如本文所用, 术语“miR-HA-3p 阻断剂”、“本发明阻断剂”、“本发明抑制剂”指能够抑制或阻断 miR-HA-3p 功能的物质, 如反义序列或核酸 sponge 等。这些抑制剂可抑制 miR-HA-3p 与 PCBP2 的 mRNA 的结合, 以及抑制 miR-HA-3p 对靶基因 PCBP2 表达的下调。

如本文所用, 术语“Agomir”指 miRNA 刺激剂。Agomir 可根据 microRNA 成熟体序列设计, 经过特殊标记与化学修饰的双链小 RNA 分子, 是用于模拟内源性成熟体 miRNA 序列。通常, agomir 包括一条与目标 miRNA 成熟体序列一致的序列, 以及一条与 miRNA 成熟体序列互补的序列。特异的 microRNA agomir 能够被导入到表达对应 microRNA 的细胞内, 模拟 microRNA 的作用, 或者与构建有 miRNA 结合位点的双荧光素酶报告系统结合, 验证 miRNA 与靶基因之间的调控关系。

30 如本文所用, 术语“Antagomir”指 miRNA 阻断剂。Antagomir 可根据 microRNA 成熟体序列设计, 经过特殊标记与化学修饰的单链小 RNA, 是专门用于抑制内源性 microRNA 的高效阻断剂。

Agomir 和 antagomir 可根据所提供的短 RNA 的序列, 用常规方法进行设计和合成。

如本文所用, 术语“Ago2”指 argonaute RISC catalytic component 2。它是构成 RISCs 复合物的主要成分, 参与干涉性短 RNA-介导的基因沉默

5 (short-interfering-RNA-mediated gene silencing)。

### miRNA 及其前体

本发明提供了一类新的、来自于禽流感病毒的 miRNA。如本文所用, 所述的“miRNA”是指一种 RNA 分子, 从可形成 miRNA 前体的转录物加工而来。成熟的  
10 miRNA 通常具有 18-26 个核苷酸(nt)(更特别的约 19-22nt), 也不排除具有其它数目核苷酸的 miRNA 分子。miRNA 通常可被 Northern 印迹检测到。

如本文所用, “分离的”是指物质从其原始环境中分离出来 (如果是天然物质, 原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的, 但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质  
15 中分开, 则为分离纯化的。

miRNA 可从前体 miRNA(Precursor miRNA, Pre-miRNA)加工而来, 所述的前体 miRNA 可折叠成一种稳定的茎环(发夹)结构, 所述的茎环结构长度一般在  
20 50-100bp 之间。所述的前体 miRNA 可折叠成稳定的茎环结构, 茎环结构的茎部两侧包含基本上互补的两条序列。所述的前体 miRNA 可以是天然的或是人工合成的。

前体 miRNA 可被剪切生成 miRNA, 所述的 miRNA 可与编码基因的 mRNA 的至少一部分序列基本上互补。如本文所用, “基本上互补”是指核苷酸的序列是  
25 足够互补的, 可以以一种可预见的方式发生相互作用, 如形成二级结构(如茎环结构)。通常, 两条“基本上互补”的核苷酸序列互相之间至少有 70%的核苷酸是互补的; 优选的, 至少有 80%的核苷酸是互补的; 更优选的, 至少有 90%的核苷酸是互补的; 进一步优选的, 至少有 95%的核苷酸是互补的; 如 98%、99%或 100%。一般地, 两条足够互补的分子之间可以具有最多 40 个不匹配的核苷酸; 优选的, 具有最多 30 个不匹配的核苷酸; 更优选的, 具有最多 20 个不匹配的核苷酸; 进一步优选的, 具有最多 10 个不匹配的核苷酸, 如具有 1、2、3、4、5、8 个不匹  
30 配的核苷酸。

如本文所用, “茎环”结构也被称作“发夹”结构, 是指一种核苷酸分子, 其可形成一种包括双链区域(茎部)的二级结构, 所述的双链区域由该核苷酸分子的两

个区域(位于同一分子上)形成,两个区域分列双链部分的两侧;其还包括至少一个“环”结构,包括非互补的核苷酸分子,即单链区域。即使该核苷酸分子的两个区域不是完全互补的,核苷酸的双链部分也可保持双链状态。例如,插入、缺失、取代等可导致一个小区域的不互补或该小区域自身形成茎环结构或其它形式的二级结构,然而,该两个区域仍可基本上互补,并在可预见的方式中发生相互作用,形成茎环结构的双链区域。茎环结构是本领域技术人员所熟知的,通常在获得了一条具有一级结构的核苷酸序列的核酸后,本领域技术人员能够确定该核酸是否能形成茎环结构。

本发明所述的 miRNA 具有如 SEQ ID NO: 1-3 所示的序列或具有 SEQ ID NO.:4 所述的核心序列。为了提高 miRNA 的稳定性或其它性质,还可在所述的 miRNA 的至少一端加上至少一个保护性碱基,如“TT”等。

### 反义寡核苷酸

根据本发明所提供的 miRNA 序列,可以设计出了其反义寡核苷酸,所述的反义寡核苷酸可在体内下调相应的 miRNA 的表达。如本文所用,“反义寡核苷酸(antisense-oligonucleotides, AS-Ons 或 ASO)”又称为“反义核苷酸”,是指长度约为 18-26nt (更特别的约 19-22nt) 的 DNA 分子或 RNA 分子或其类似物。

在本发明中,所述的“反义寡核苷酸”还包括采用如基于核酸锁或核酸链骨架修饰技术等手段获得的经修饰的反义核苷酸,所述的修饰基本不改变反义寡核苷酸的活性,更佳地,所述修饰可提高反义寡核苷酸的稳定性、活性或治疗效果。核酸锁(locked nucleic acid, LNA)通常是指通过一个亚甲基桥将核糖的 2'氧原子和 4'碳原子连接起来的修饰技术。LNA 能延长 miRNA 的血清半衰期,提高对靶标亲和性,减少脱靶作用的范围和程度。基于核酸链骨架的修饰技术发展出的反义药物在可溶性,抗核酸酶降解等方面大有改善,且易于大量合成。寡核苷酸的骨架修饰方法有多种,包括硫代法,例如将脱氧核苷酸链硫代修饰为硫代脱氧核苷酸链。该方法是将 DNA 骨架上的磷酸键的氧原子用硫原子替代,可抵抗核酸酶降解。应理解,任何能够保持所述反义寡核苷酸的大部分或全部活性的修饰都包含在本发明中。

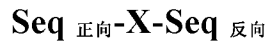
作为本发明的优选方式,对反义寡核苷酸进行核酸锁修饰;更佳地还进行硫代修饰。

将本发明所述的反义寡核苷酸转移到动物(如禽流感患者)体内后,它们能够明显下调相关 miRNA 的表达。

**多核苷酸构建物**

根据本发明所提供的 miRNA 序列，可设计出在被导入后可被加工成可影响相应的 mRNA 表达的 miRNA 的多核苷酸构建物，也即所述多核苷酸构建物能够在体内上调相应的 miRNA 的量。因此，本发明提供了一种分离的多核苷酸(构建物)，所述的多核苷酸(构建物)可被人细胞转录成前体 miRNA，所述的前体 miRNA 可被人细胞剪切且表达成所述的 miRNA。

作为本发明的一种优选方式，所述的多核苷酸构建物含有式 I 所示的结构：



10

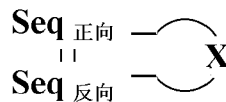
式 I

式 I 中，

Seq<sub>正向</sub> 为可在细胞中表达成所述的 miRNA 的核苷酸序列，Seq<sub>反向</sub> 为与 Seq<sub>正向</sub> 基本上互补的核苷酸序列；或者，Seq<sub>反向</sub> 为可在细胞中表达成所述的 miRNA 的核苷酸序列，Seq<sub>正向</sub> 为与 Seq<sub>正向</sub> 基本上互补的核苷酸序列；

15 X 为位于 Seq<sub>正向</sub> 和 Seq<sub>反向</sub> 之间的间隔序列，并且所述间隔序列与 Seq<sub>正向</sub> 和 Seq<sub>反向</sub> 不互补；

式 I 所示的结构在转入细胞后，形成式 II 所示的二级结构：



式II

20 式II中，Seq<sub>正向</sub>、Seq<sub>反向</sub>和X的定义如上述；

|| 表示在 Seq<sub>正向</sub>和 Seq<sub>反向</sub>之间形成的碱基互补配对关系。

通常，所述的多核苷酸构建物位于表达载体上。因此，本发明还包括一种载体，它含有所述的 miRNA，或所述的多核苷酸构建物。所述的表达载体通常还含有启动子、复制起点和/或标记基因等。本领域的技术人员熟知的方法能用于构建本发明所需的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。

所述的表达载体可优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如卡拉霉素、庆大霉素、潮霉素、氨苄青霉素抗性。

**30 检测试剂、检测芯片和检测试剂盒**

本发明还提供了一种用于检测禽流感病毒或禽流感的试剂盒，所述的试剂盒

中含有本发明的检测试剂、或检测芯片。所述的试剂盒可用于检测本发明的禽流感特异性 miRNA 的表达谱；或用于检测禽流感病毒或禽流感，优选的，所述的试剂盒中还含有用于标记 RNA 样品的标记物，以及与所述标记物相对应的底物。

此外，所述的试剂盒中还可包括用于提取 RNA、PCR、杂交、显色等所需的各种试剂，包括但不限于：抽提液、扩增液、杂交液、酶、对照液、显色液、洗液、抗体等。

此外，所述的试剂盒中还可包括使用说明书和/或芯片图像分析软件。

### 芯片

10 microRNA 表达谱芯片通常含有多上百、上千或更多个探针，涵盖多种 microRNA，利用双链同源互补的原理检测样本中所含各种 microRNA 的含量。因此，可在同一时间对待测样本中的 microRNA 的转录水平进行检测。

利用本发明所述的 miRNA 序列，还可以制备相应的 miRNA 芯片，进而研究其表达谱以及 miRNAs 的调节方式。

15 在另一方面，本发明还提供一种用于分析 miRNA 表达谱的芯片，所述的芯片可用于检测禽流感病毒或禽流感。

本发明的所述的 miRNA 芯片包括固相载体以及有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针，所述的寡核苷酸探针包括针对 SEQ ID NO: 1-4 所示的序列的核酸序列。

20 具体地，可根据本发明所述的 miRNA，设计出适合的探针，固定在固相载体上，形成“寡核苷酸阵列”。所述的“寡核苷酸阵列”是指具有可寻址位置(即以区别性的，可访问的地址为特征的位置)的阵列，每个可寻址位置均含有一个与其相连的特征性寡核苷酸。根据需要，可将寡核苷酸阵列分成多个亚阵。

25 所述固相载体可采用基因芯片领域的各种常用材料，例如但不限于尼龙膜，经活性基团(如醛基、氨基等)修饰的玻璃或硅片、未修饰的玻璃、塑料片等。

所述的 miRNA 芯片的制备可采用本领域已知的生物芯片的常规制造方法。例如，如果固相载体采用的是修饰玻璃或硅片，探针的 5'端含有氨基修饰的聚 dT 串，可将寡核苷酸探针配制成溶液，然后采用点样仪将其点在修饰玻璃或硅片上，排列成预定的序列或阵列，然后通过放置过夜来固定，就可得到本发明的 miRNA 30 芯片。

本发明所述的 RNA 与 miRNA 芯片之间的固相杂交按照本领域的经典方法进行，本领域一般人员依据经验容易确定有关缓冲液、探针和样本浓度、预杂交温

度、杂交温度以及时间等的最适条件。或者也可以参照《分子克隆实验指南》中所述的。

然后根据标记信号在 miRNA 芯片上的位置、强度等信息获取待测信息。若扩增产物用荧光基团标记，也可直接用荧光检测设备(如激光共聚焦扫描仪

5 Scanarray 3000 等)获取待测信息。

### 药物组合物

本发明还提供了一种药物组合物，包括药学上可接受的载体或有效量的本发明 miRNA(即 miR-HA-3p)的抑制剂、阻断剂或拮抗剂。

10 如本文所用，术语“有效量”或“有效剂量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人和/或动物所接受的量。

如本文所用，“药学上可接受的”的成分是适用于人和/或动物(如哺乳动物和禽类)而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)的，即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体，包括各  
15 种赋形剂和稀释剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量的本发明的活性成分以及药学上可接受的载体。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配，本发明的药物组合物的剂型为注射剂、口服制剂(片剂、胶囊、口服液)、透皮剂、缓释剂。例如用生理盐水或含有  
20 葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。所述的药物组合物宜在无菌条件下制造。

本发明所述的活性成分的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于：所述的活性成分的药代动力学  
25 参数例如生物利用率、代谢、半衰期等；患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。通常，当本发明的活性成分每天以约 0.00001mg-50mg/kg 动物体重(较佳的 0.0001mg-10mg/kg 动物体重)的剂量给予，能得到令人满意的效果。例如，由治疗状况的迫切要求，可每天给予若干次分开的剂量，或将剂量按比例地减少。

30 本发明所述的药学上可接受的载体包括(但不限于)：水、盐水、脂质体、脂质、蛋白、蛋白-抗体缀合物、肽类物质、纤维素、纳米凝胶、或其组合。载体的选择应与给药方式相匹配，这些都是本领域的普通技术人员所熟知的。

本发明还提供了所述药物组合物的用途，用于制备治疗禽流感、缓解禽流感症状、减少宿主动物中禽流感病毒数量、降低禽流感死亡率的药物、降低过度免疫等。

5 本发明的主要优点包括：

(a) 本发明提供了一类禽流感 H5N1 病毒的特异性 microRNA，即 miR-HA-3p。

(b) 本发明 miRNA 可作为检测禽流感病毒或禽流感的标志物，非常有效地检测禽流感病毒或禽流感。

(c) 本发明 miRNA 还可作为治疗禽流感的靶标，通过使用针对本发明 miRNA  
10 的抑制剂(或阻断剂)，可以靶向性治疗 H5N1 病毒引起疾病。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，  
通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold  
15 Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

### 实施例 1. H5N1 编码 miRNAs 的筛选及检测

首先利用计算机建模，筛选 H5N1 编码的 miR。利用实时定量 PCR 检测筛选得  
20 到的 miRs 在 H5N1 感染的多种细胞中的表达水平；利用 RNA 印迹法加以验证 miR-HA-3p 的表达水平。

#### 1.1 实验方法：

1). 利用计算机建模软件，根据结构与相似度，用未知 miRNAs 前体与已知 miRNAs 前体进行比对的方法，针对 H5N1 流感病毒四种亚型(H1N1, H3N2, H5N1  
25 和 H9N2)进行上述比对，获得了十八个候选的由 H5N1 编码的特殊的 miRNAs 前体并预测出相应的 miRNAs。针对 18 个候选 miRNAs 进行了实时定量 PCR 以检测在 H5N1 感染细胞中是否含有预测的 miRNAs，所用 RNA 样品提取自 H5N1 感染的 HEK293A, HEK293T, A549 和 MDCK 细胞。miRNA 表达量检测以 U6 为内参基因。

2). 针对筛选出的表达量有显著性变化的 miRNA——miR-HA-3p，利用实时定  
30 量 PCR 法分别测定其处于 H5N1 重感染期及恢复期的患者血清中表达水平。

3). 利用 RNA 印迹法再次检测目标 miRNAs 在 H5N1 感染细胞中的表达量。

4). 利用 RNA 印迹法证实 miR-HA-3p 不只存在于特定的 H5N1 流感病毒中，本

发明人提取了 H5N1 感染的 A549 细胞的小 RNA 片段 (<200nt)，用这些片段与 miR-HA-3p 相应探针进行杂交。

## 1.2 实验结果:

具体结果见图 1

- 5 1). 图 1A 显示预测的 H5N1 miRNA 前体茎环结构次级结构。预测通过 Mfold 进行，预测出的成熟 miRNA 的 5' 端和 3' 端分别用红蓝色标注。图 1A 结果表明，三个预测出的前体中，一条由 HA 片段编码，其他两条由 PA 片段编码。每个候选的 miRNA 都可以折叠成特异稳定的发夹结构。

10 图 1B 显示的是 18 种候选 miRNA 在 H5N1 病毒侵染四种细胞后的表达水平，由图 1B 可以看出 miR-HA-3p 和 miR-PA1-3p 两种 miRNA 可以在感染 24 小时后的细胞中稳定检测到，其他 16 种 miRNA 表达量较低。

其中，miR-HA-3p 有以下三种具体序列：

miR-HA-3p-1: AGGACUAAUUUGGAGCUAUAGCA (SEQ ID NO.: 1)

miR-HA-3p-2: GGACUAAUUUGGAGCUAUAGCAG (SEQ ID NO.: 2)

15 miR-HA-3p-3: GAGGACUAAUUUGGAGCUAUAGC (SEQ ID NO.: 3)

上述 3 种 miRNA 的核心序列是 GGACUAAUUUGGAGCUAUAGC (SEQ ID NO.: 4)。

20 图 1C 显示的是病毒感染后不同时间点 miR-HA-3p 和 miR-PA1-3p 的表达水平测定结果，图 1C 表明 miR-HA-3p 和 miR-PA1-3p 两种 miRNA 在 H5N1 感染的 A549 细胞中不同时间点的表达量在感染过程中逐渐增高，并且 miR-HA-3p 的表达量在感染后每个时间点都高于 miR-PA1-3p 的表达量。

2). 图 1D 显示的是恢复期患者血清中 miR-HA-3p 的绝对值，图 1D 表明处于重感染期 (acute) 的患者血清中的 miR-HA-3p 表达量很高，但是在病毒感染减退之后，miR-HA-3p 几乎检测不到。

25 3). 图 1E 显示的是 RNA 印迹法分析复合感染 A549 细胞 24 小时后 miR-HA-3p 和 miR-PA1-3p 的表达水平，最左边为 marker。图 1E 表明 ~80-nt miR-HA-3p 前体 miRNA 和 22-nt 成熟 miR-HA-3p 可以从 H5N1 感染的 A549 细胞中快速检测到。~100-nt 前体 miR-PA1-3p RNA 也可以检测到，但是成熟的 miR-PA1-3p 不能检测到。RNA 印迹法结果与实时定量 PCR 结果是一致的。

30 4). 图 1F 显示的是 RNA 印迹法分别测定两种菌株感染 A549 细胞后 miR-HA-3p 的表达水平。图 1F 结果显示两种 H5N1 IAV 分离株感染宿主后都可产生 miR-HA-3p。

上述多组实验结果证明，H5N1 在感染宿主细胞后，会释放特殊的小分子 miR-HA-3p 进入宿主体内循环，并且 miR-HA-3p 的表达量与病毒的感染程度是成正相

关的。

## 实施例 2. miR-HA-3p 靶位点的预测及验证

在本实施例中，对 miR-HA-3p 的靶位点进行预测和验证。构建了小鼠和人类  
5 的 PCBP2 突变株，通过检测荧光素酶活性检测 PCBP2 与 miR-HA-3p 量的关系；通过 Western blotting 检测靶基因相应蛋白的表达量与 miR-HA-3p 量的关系。

### 2.1 实验方法：

1). 计算机建模方法预测 miR-HA-3p 靶位点。

2). 为检测 miR-HA-3p 是否调节 PCBP2 的表达，分别构建了小鼠和人类的  
10 PCBP2 突变株，之后用 agomir-HA-3p(miR-HA-3p 刺激剂)和 agomir-HA-3p(M) (突变的 miR-HA-3p 刺激剂)分别处理 PCBP2 野生型和突变株。通过检测荧光素酶活性检测 PCBP2 与 miR-HA-3p 量的关系。通过 Western blotting 检测靶基因相应蛋白的表达量与 miR-HA-3p 量的关系。

3). 为了确定 PCBP2 蛋白表达量的下调是由 miR-HA-3p 引起的，通过 Western  
15 blotting 检测了含有 miR-HA-3p 的 A549 细胞中 PCBP2 蛋白的含量。作为对照，构建了可以沉默 PCBP2 基因的 RNAi 系统。

4). 为了获得 miR-HA-3p 以 PCBP2 为靶位点的直接证据，本发明人还做了 RNA 结合蛋白的免疫沉淀实验用来检测 PCBP2 mRNA 和 Ago2 的复合物，该复合物是一种 RNA 诱导的沉默复合体，用 miR-16 作为对照。

### 2.2 实验结果：

具体结果见图 2

1). 图 2A 显示的是 miR-HA-3p 与人类和小鼠 PCBP2 mRNA 3' 端结合位点，图 2A 表明经过预测后发现 PCBP2 mRNA 是 miR-HA-3p 的一个潜在靶位点。

2). 图 2B 显示的是人类 PCBP2 基因野生型和变异型转染的 HEK293T 细胞分别经  
25 agomir, agomir-HA-3p, agomir-HA-3p(M) 处理后的荧光素酶活性。图 2B 表明人类模型中 agomir-HA-3p 可以显著下调野生型 PCBP2 的表达量。但是 agomir-HA-3p(M) 没有上述作用。

图 2C 显示的是小鼠 PCBP2 基因野生型和变异型感染的 HEK293T 细胞分别经  
30 agomir, agomir-HA-3p, agomir-HA-3p(M) 处理后的荧光素酶活性。图 2C 表明小鼠模型中 agomir-HA-3p 可以显著下调野生型 PCBP2 的表达量，但是 agomir-HA-3p(M) 没有上述作用。

3). 图 2D 显示的是 agomir, agomir-HA-3p, agomir-HA-3p(M) 处理的 A549 细胞

PCBP2 蛋白水平的 Western blotting 分析结果。图 2D 结果说明 A549 细胞转染了 agomir-HA-3p 后, PCBP2 的表达明显被抑制, 但是转染了 agomir-HA-3p(M) 的细胞 PCBP2 表达无明显变化。

图 2E 显示的是 agomir, agomir-HA-3p, agomir-HA-3p(M) 处理 A549 细胞后 PCBP2 mRNA 表达水平。

4). 图 2F 显示的是 agomir, agomir-HA-3p, agomir-HA-3p(M) 处理 A549 细胞后经免疫沉淀反应获得的 PCBP2 mRNA 的实时定量 PCR 测定结果; 对照结果为 agomir 处理 A549 细胞后通过 IgG 进行免疫沉淀获得的结果。图 2F 结果表明, 转染了 agomir-HA-3p 的 A549 细胞, 当 miR-HA-3p 过量表达时, PCBP2 mRNA 和 Ago2 复合物有近 20 倍的富集, 说明 miR-HA-3p 和 PCBP2 mRNA 在 RNA 诱导的沉默复合体中发生了反应, 并调节了 PCBP2 蛋白的转录后水平。与预期相符的是, 去掉 agomir-HA-3p 的实验组没有出现 PCBP2 mRNA 和 Ago2 复合物的富集。

以上结果表明, miR-HA-3p 可以直接作用于 PCBP2 mRNA 的 3' 端, 说明 miR-HA-3p 在抑制翻译方面起到了作用。PCBP2 属于核蛋白 E 族, 与 MAV 介导的抗病毒作用相关。H5N1 可以通过沉默 PCBP2 来增强 MAV 介导的抗病毒过程, 从而在 H5N1 侵染过程中引起过度的免疫应答或者细胞素风暴。

### 实施例 3. 利用巨噬细胞模型证实 miR-HA-3p 在 H5N1 感染过程中调节细胞因子的分泌

为了验证 miR-HA-3p 对细胞因子的影响, 在本实施例中, 用人类巨噬细胞作为体外模型进行如下实验。

#### 3.1 实验方法:

1). 用 agomir, agomir-HA-3p 和 agomir-HA-3p(M) 分别处理已分化的巨噬细胞, 检测转染 24 小时后通过实时定量 PCR 法检测胞内 miR-HA-3p 水平。

2). 为了检测病毒感染过程中 miR-HA-3p 对目标蛋白表达量的影响, 本发明人利用反向基因学构建了一种 H5N1 病毒突变株。为了检测突变株在体外的复制效果, 本发明人用野生型和突变株两种病毒对巨噬细胞进行了复合感染。48 小时后进行了病毒滴定实验检测病毒值(效价)。

3). 检测野生型 H5N1 和突变株 H5N1 感染巨噬细胞后胞内 miR-HA-3p 的表达水平。

4). 在病毒感染前, 本发明人分别用 antagomir-HA-3p(mir-HA-3p 阻断剂) 和 antagomir(mir 阻断剂) 处理巨噬细胞。之后检测病毒感染后 24、48 小时后几个

处理组的 PCBP2 表达水平。

5). 取感染后几个特定时间点检测各个处理组中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及其他细胞因子例如 IFN- $\beta$ 、IL-1 $\beta$  的转录水平。

6). 取感染后几个特定时间点检测各个处理组巨噬细胞培养物上清液中的 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  和 IL-6 的含量。

### 3.2 实验结果:

具体结果见图 3, 图 4, 图 5。

1). 图 4A 显示的是 agomir-HA-3p 突变序列和 H5N1 突变株突变点的原理示意图。

10 图 4B 显示的是电穿孔 24 小时后 agomir, agomir-HA-3p 或 agomir-HA-3p(M) 处理组巨噬细胞中 miR-HA-3p 的表达水平。图 4B 结果表明转染 24 小时后 agomir-HA-3p 处理组的 miR-HA-3p 含量显著提升, agomir 或 agomir-HA-3p(M) 处理组的胞内 miR-HA-3p 水平保持平稳,

15 图 4C 显示的是电穿孔 48 小时后 agomir, agomir-HA-3p 或 agomir-HA-3p(M) 处理组巨噬细胞的 PCBP2 蛋白水平。由图 4C 可以看出, PCBP2 蛋白的表达量, agomir-HA-3p 处理组显著低于 agomir 或 agomir-HA-3p(M) 处理组。

图 4D 显示的是电穿孔 48 小时后 agomir, agomir-HA-3p 或 agomir-HA-3p(M) 处理组巨噬细胞的 PCBP2 mRNA 表达水平。图 4D 结果表明三个处理组的 PCBP2 mRNA 水平均无显著变化。

20 2). 图 4E 显示的是感染 H5N1(野生型)或 H5N1 突变株的巨噬细胞在感染 48 小时后的效价。结果表明, 野生型 H5N1 跟突变株 H5N1 的效价无较大差异。

3). 图 3A 显示的是 H5N1 和突变株感染的巨噬细胞在感染后不同时间点 miR-HA-3p 的表达水平。图 3A 结果表明, 野生型 H5N1 病毒感染的巨噬细胞 24 小时后 miR-HA-3p 表达水平相对较高, 突变株感染的巨噬细胞中的 miR-HA-3p 基本保持  
25 不变。

4). 图 3B 显示的是先通过 antagomir 或 antagomir-HA-3p 处理, 后经 H5N1 感染的巨噬细胞在感染后不同时间点的 PCBP2 蛋白水平分析结果。图 3B 可以看出病毒感染后 24 小时和 48 小时后, antagomir-HA-3p 处理组的 PCBP2 蛋白水平显著高于 antagomir 处理组。

30 图 3C 显示的是 TCID50 法测定感染了 H5N1 的细胞在感染后不同时间点的病毒值。

5). 图 3D-F 显示的是不同处理组分别处理 H5N1 或 H5N1 突变株后, 细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  和 IL-6 的水平。图 3D-F 可以看出 antagomir-HA-3p 处理组细胞

因子浓度低于 antagomir 处理组。实际上 antagomir-HA-3p 处理组巨噬细胞培养物上清液中的 TNF- $\alpha$  , IFN- $\beta$  和 IL-6 的含量与变异株感染巨噬细胞组相应细胞因子含量相当。

6). 图 5 显示的是感染了 H5N1 或 H5N1 突变株的巨噬细胞在不同处理条件下 TNF- $\alpha$  , IFN- $\beta$  , IL-1 $\beta$  或 IL-6 mRNA 的表达水平。图 5 结果表明 antagomir-HA-3p 处理组 TNF- $\alpha$  的转录水平有下调, antagomir-HA-3p 处理组在感染 24 小时后, IL-6 mRNA 在巨噬细胞中的含量是 antagomir 处理组的 60%左右。在其他细胞因子例如 IFN- $\beta$  、 IL-1 $\beta$  , 也检测到了类似现象。

10 以上实验结果表明, 跟普通流感患者相比, 感染了 H5N1 病毒的患者血清中的细胞活素及炎症趋化因子的水平明显较高。本实验证实了 H5N1 病毒产生的 miR-HA-3p 在感染过程中对 RIG-I 信号系统有调节作用, 会促进细胞因子的产生。因为 PCBP2 在 RIG-I 信号系统中起着重要调节作用, 所以 miR-HA-3p 通过作用 PCBP2 来行使功能。

15

#### 实施例 4. 利用小鼠模型证实 miR-HA-3p 与 H5N1 感染程度呈正相关

在本实施例中, 应用已经建立好的小鼠模型来检测 miR-HA-3p 在体内 H5N1 感染引起的细胞因子调节异常中的作用。主要应用了实时定量 PCR 法, 组织学检测法, ELISA 及病毒值滴定法, 方法如下。

#### 20 4.1 实验方法:

1). 给雌性 BALB/c 小鼠分别鼻内接种致死剂量的 H5N1 (野生型) 和 H5N1 突变株, 之后检测其体重、致死率、病毒复制情况和细胞因子聚合物。在病毒侵染 8 小时后, 接种 H5N1 和 H5N1 突变株的两组小鼠每组分为两小组连续五天分别注射 miR-HA-3p 阻断剂和 miR 阻断剂。

25 2). 进一步测定了各个处理组小鼠肺匀浆的病毒值。实验组共 7 组, 6 个处理组为 H5N1, H5N1 (MUT), H5N1+control antagomir, H5N1 (MUT) +control antagomir, H5N1+ antagomir-HA-3p, H5N1 (MUT) + antagomir-HA-3p, 对照组为 PBS 处理组。

3). 对 7 个实验组小鼠进行了组织学检查。

30 4). 为了确定病毒感染过程中产生的细胞因子是否与 miR-HA-3p 相关, 在感染后多个时间点针对 7 个实验组测定了 TNF- $\alpha$  , IFN- $\beta$  , IL-1 $\beta$  和 IL-6 四种细胞因子的浓度。

#### 4.2 实验结果:

针对实验方法 1 中具体结果见图 6:

图 6(A, B) 显示的是接种 H5N1 或者突变株的小鼠在不同处理条件的死亡率。

图 6(C, D) 显示的是接种 H5N1 或者突变株的小鼠在不同处理条件的体重流失程度。

图 6(E-H) 显示的是 ELISA 测定的接种了 H5N1 或者突变株的小鼠在不同处理条件下肺部四种细胞因子 (TNF- $\alpha$  (E), IFN- $\beta$  (F), IL-1 $\beta$  (G) and IL-6 (H)) 的水平。

具体结果分析如下:

1). 图 6A 显示, 接种 7 天后, H5N1 处理组的小鼠死亡率 100%, 图 6C 显示 H5N1 处理组小鼠有 20% 以上的体重流失。(H5N1+control antagomir) 处理组小鼠死亡率和体重流失与 H5N1 处理组相当, 然而 (H5N1+ antagomir-HA-3p) 处理组小鼠 7 天后虽然有一定的体重流失但是死亡率仅在 10% 左右。图 6A 和图 6C 显示 H5N1 (MUT) 处理组小鼠和 H5N1 处理组小鼠相比存活时间较长, 体重减少速度慢。图 6B 显示, H5N1 (MUT) 处理组小鼠在继续注射 mir-HA-3p 刺激剂后, 存活率明显下降, 图 6D 显示 H5N1 (MUT) 处理组小鼠在继续注射 mir-HA-3p 刺激剂后体重下降速度加快, 跟预期相同的是, 图 6B 显示 H5N1 (MUT) 处理组小鼠继续注射 miR 刺激剂后存活率和体重均无显著变化。

2). 图 6E-H 表明 H5N1 处理组四种细胞因子的浓度均高于突变株处理组及 (mir-HA-3p 阻断剂+H5N1) 处理组。这与之前巨噬细胞模型中细胞因子检测结果一致。

3). 图 7 显示的不同处理条件下四天后小鼠肺部 PCBP2 蛋白水平。图 7 结果表明 4 天后, H5N1 处理组小鼠肺部的 PCBP2 蛋白含量明显低于 (H5N1+miR-HA-3p 阻断剂) 处理组和 H5N1 (MUT) 处理组。

4). 图 8 显示的是组织病理学方法针对多组实验小鼠的肺部组织研究结果。图 8 检测结果显示, 阻断 miR-HA-3p 可以缓解小鼠肺部炎症损伤。H5N1 处理组小鼠有严重的支气管上皮细胞坏死并伴随有炎症反应。相反, (mir-HA-3p 阻断剂+H5N1) 处理组和 H5N1 (MUT) 处理组小鼠在感染四天后炎症反应适中。

以上实验结果表明, 应用 mir-HA-3p 阻断剂阻断 miR-HA-3p 与目标 mRNA 结合, 可以降低 H5N1 感染小鼠的死亡率, 并且可以减缓感染小鼠体重下降速度。这一结论在 H5N1 (MUT) 处理组中也得到了证实。

### 结论:

本发明的实验结果证实了 H5N1 在感染宿主细胞后, 会释放特殊的小分子物质 miR-HA-3p 进入宿主体内循环, 并且 miR-HA-3p 的表达量与病毒的感染程度是成正相关的。

此外, miR-HA-3p 的靶基因为 PCBP2, miR-HA-3p 通过作用于 PCBP2 mRNA 下

调 PCBP2 蛋白表达, 导致 MAV 介导的抗病毒过程的增强, 从而在 H5N1 侵染过程中引起过渡的免疫应答或者细胞因子风暴。

5 阻断 miR-HA-3p 可以达到调节 miR-HA-3p 表达水平的目的, 由此可以缓解和治疗 H5N1 病毒引起的多种免疫反应及组织学病变, 在目前的 H5N1 研究基础上完成了新的科学和技术突破, 将 H5N1 的理论研究提升到了新的高度。

本发明中, 创造性地将 microRNA 疗法引入 H5N1 的治疗中, 通过采用一系列原创性试验方法如 microRNA 预测及鉴定, 巨噬细胞试验, 小鼠模型试验等证实了 H5N1 特异性 miRNA 的存在, 这种疗法特异性强、高效、副作用小、成本低, 方法上的创新使本发明在应用前景上十分广阔。

10 在上述基础上, 本发明还证实了这种特异性 miRNA 前体存在于多株 H5N1 病毒分离株中, 这表明 H5N1 病毒变种中也可能稳定存在有此种 miRNA, 现有疫苗只能达到预防 H5N1 的目的, 而 H5N1 病毒变异快, 疫苗研发速度无法匹配。在本发明中, 利用 miR-HA-3p 阻断剂靶向性治疗 H5N1 病毒引起疾病的方法, 是一种创新方法, 为人类抵抗 H5N1 病毒及其变异株提供了新思路、新方法。

15

#### 实施例 5 禽流感病毒或禽流感 miRNA 的应用

本发明所述 miRNA 的用途, 用于 (a) 制备检测禽流感的试剂、检测芯片或试剂盒; (b) 制备调控 PCBP2 表达或活性的调节剂; (c) 制备调控细胞因子表达的试剂。

20 其中, 检测禽流感病毒或禽流感的核酸芯片, 包括: 固相载体; 以及有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针, 所述的寡核苷酸探针特异性捕获本发明所述的 miRNA。

本发明的所述检测禽流感病毒或禽流感的核酸芯片能高通量地筛选血清中稳定变化的 miRNA 探针, 同时通过血清中 miRNA 的整体变化预测和诊断疾病。我们首先通过测序的方法或定量 PCR 方法确定血清中有一个以上拷贝的 miRNA, 然后合成这些 miRNA 的反向互补探针, 再把这些探针用芯片点样仪 SmartArray™ 点制在一张 75×25 mm、经过化学修饰的载玻片上。点制在芯片上的样品还包括作为内标的 U6、tRNA, 人工制备的 30 个碱基长度的外标, 阳性对照 Hex 等。整个点阵分成 4 个亚阵, 每个亚阵有 23 行, 21 列, 点间距为 185 μm, 点的直径约为 130 μm, 每条探针重复三次。

30 芯片操作流程为: (1) 提取血清/血浆中总 RNA, 甲醛变性胶电泳检测总 RNA 的质量; (2) miRNA 的分离: 取 50-100 μg 总 RNA 用 Ambion's miRNA Isolation Kit (Cat #. 1560) 分离 miRNA; (3) miRNA 样品的荧光标记: 利用 T4 RNA 连接酶标记方法进行荧光标记, 然后再用无水乙醇沉淀, 吹干后用于芯片杂交; (4)

杂交与清洗：将 RNA 溶于 16  $\mu$  L 杂交液中（15%甲酰胺；0.2% SDS；3 $\times$ SSC；50 $\times$ Denhardt's solution），于 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交结束后，先在 42 $^{\circ}$ C 左右含 0.2% SDS，2 $\times$ SSC 的液体中洗 4 分钟，然后在 0.2 $\times$ SSC 液体中室温洗 4 分钟，玻片甩干后即可用于扫描；（5）芯片扫描：芯片用 LuxScan 10K/A 双通道激光扫描仪进行扫描；（6）数据提取及分析：采用 LuxScan3.0 图像分析软件对芯片图像进行分析，把图像信号转化为数字信号，最后用 SAM 分析挑选差异表达基因。

将定量 PCR 技术和生物芯片技术双重验证的在禽流感病毒感染及正常生理状态下差异表达程度大的一类血清/血浆 miRNA 探针，如：miR-HA-3p，用于制备生物芯片，方法同上。此芯片与传统芯片相比，制作工艺和操作流程没有很大改进，但是此芯片简化了探针库，由此将大大减少芯片的制作成本和生产时间，易于制备。同时也增加了芯片的针对性和实用性。将此芯片投入实践，仅仅需要病人的血清/血浆而不需要任何其它组织就可以在早期发现疾病，帮助指导诊断和治疗。

另外，本发明所述核酸芯片的用途，用于制备检测禽流感病毒或禽流感的试剂盒。检测禽流感病毒或禽流感的试剂盒中含有本发明所述的核酸芯片或本发明所述的 miRNA。

用于禽流感病毒感染的诊断，疗效评价，以及药物活性成分的筛选、药效评价的 miRNA 试剂盒的制作工艺和操作流程是基于定量和半定量 PCR 技术和生物芯片技术。

首先通过测序的方法或 PCR 方法确定正常血清/血浆中有一个以上拷贝的 miRNA。然后通过定量 PCR 技术和生物芯片技术筛选在疾病及正常生理状态下表达量和差异程度大的一类血清/血浆 miRNA，如：miR-HA-3p，作为预测是否发生禽流感病毒感染以及诊断病变程度的指标。最后筛选出对应的血清/血浆 miRNA 的数量，这是在芯片探针库的基础上做出的最优化的精简。此试剂盒包括血清/血浆 miRNA 引物，Taq 酶、dNTP 等试剂。此试剂盒的价值在于只需要血清/血浆而不需要其它组织样品，通过最精简的探针库检测 miRNA 的变化趋势，再通过该变化趋势预测禽流感感染发生的可能性或诊断禽流感感染的病理阶段。因此将此试剂盒投入实践，可以增加在早期发现禽流感病毒或禽流感的可能，帮助指导诊断和治疗。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

## 权 利 要 求

1. 一种分离的 miRNA，其特征在于，所述的 miRNA 选自：

- (i) 序列如 SEQ ID NO:1、2 或 3 所示的 miRNA，或
- 5 (ii) 长度为 20-26nt，且具有 SEQ ID NO. : 4 所示核心序列的 miRNA；或
- (iii) 与(i)或(ii)中所述 miRNA 的核苷酸序列互补的 miRNA。

2. 如权利要求 1 所述的 miRNA，其特征在于，所述的 miRNA 来自禽流感病毒，  
较佳地来自禽流感病毒 H5N1。

3. 一种分离的或人工构建的前体 miRNA，所述的前体 miRNA 能在动物细胞内  
10 剪切并表达成如权利要求 1 所述的 miRNA。

4. 一种分离的多核苷酸，所述的多核苷酸能被动物细胞转录成前体 miRNA，  
所述的前体 miRNA 能在人细胞内被剪切且表达成如权利要求 1 所述的 miRNA。

5. 如权利要求 4 所述的多核苷酸，其特征在于，所述的多核苷酸具有式 I  
所示的结构：

15 Seq<sub>正向</sub>-X-Seq<sub>反向</sub>

式 I

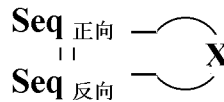
式 I 中，

Seq<sub>正向</sub>为能在动物细胞中表达成所述的 miRNA 的核苷酸序列；

Seq<sub>反向</sub>为与 Seq<sub>正向</sub>基本上互补或完全互补的核苷酸序列；

20 X 为位于 Seq<sub>正向</sub>和 Seq<sub>反向</sub>之间的间隔序列，并且所述间隔序列与 Seq<sub>正向</sub>和 Seq<sub>反向</sub>  
不互补；

并且式 I 所示的结构在转入人细胞后，形成式 II 所示的二级结构：



式 II，

25 式 II 中，Seq<sub>正向</sub>、Seq<sub>反向</sub>和 X 的定义如上述，

|| 表示在 Seq<sub>正向</sub>和 Seq<sub>反向</sub>之间形成的碱基互补配对关系。

6. 一种载体，其特征在于，所述载体含有权利要求 1 所述的 miRNA，或权利  
要求 4 或 5 所述的多核苷酸。

7. 权利要求 1 所述 miRNA 的用途，其特征在于，用于 (a) 制备检测禽流感的  
30 试剂、检测芯片或试剂盒；(b) 制备调控 PCBP2 表达或活性的调节剂；(c) 制备调

控细胞因子表达的试剂。

8. 一种核酸芯片，其特征在于，所述的核酸芯片包括：

固相载体；以及

有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针，所述的寡核苷酸探针特异性捕

5 获权利要求 1 所述的 miRNA。

9. 一种试剂盒，所述的试剂盒中含有权利要求 8 所述的 miRNA 芯片或权利要求 1 所述的 miRNA。

10. 一种特异性抑制或阻断权利要求 1 所述的 miRNA 的抑制剂；以及所述的 miRNA 的抑制剂的用途，其特征在于，用于制备 (a) 治疗禽流感的药物，(b) 缓解禽流感症状的药物，(c) 减少宿主动物中禽流感病毒数量的药物，(d) 降低禽流感死亡率的药物，(e) 降低过度免疫的药物。

11. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包括药学上可接受的载体和特异性抑制或阻断权利要求 1 所述的 miRNA 的抑制剂。

12. 一种筛选用于治疗禽流感的候选药物的方法，其特征在于，包括步骤：

15 (a) 提供一测试组和一对照组，其中在所述测试组中将候选物质施用于测试组的细胞或动物，并测定施用后所述测试组中 miR-HA-3p 的表达水平，而所述的对照组采用与测试组相同的条件，但不将候选物质施用于对照组的细胞或动物；

(b) 将测试组的 miR-HA-3p 与对照组的 miR-HA-3p 的表达水平进行比较；

20 其中，当测试组的 miR-HA-3p 的表达水平显著低于对照组的 miR-HA-3p 的表达水平时，则表明该候选物质是用于治疗禽流感的候选药物。



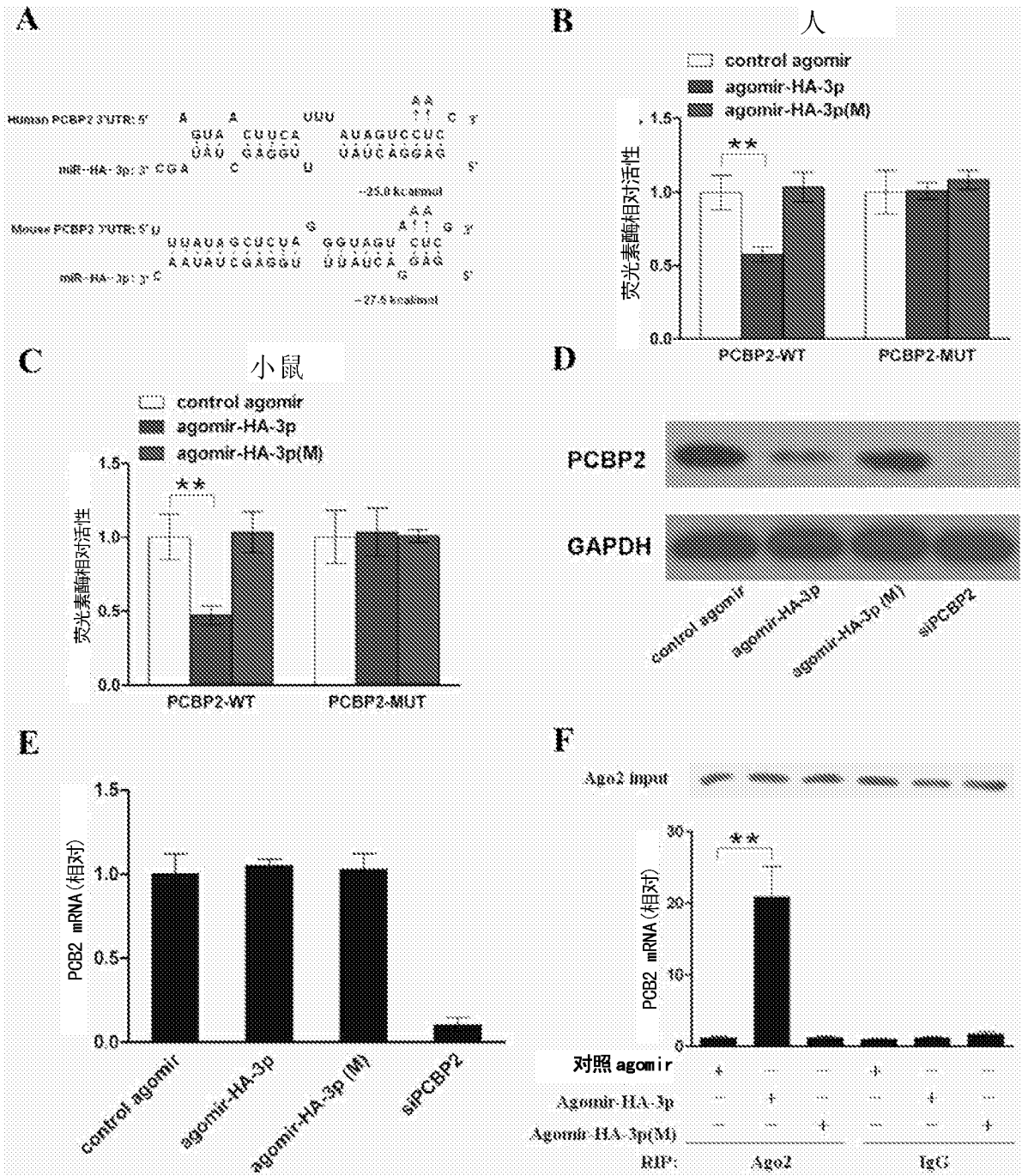


图 2

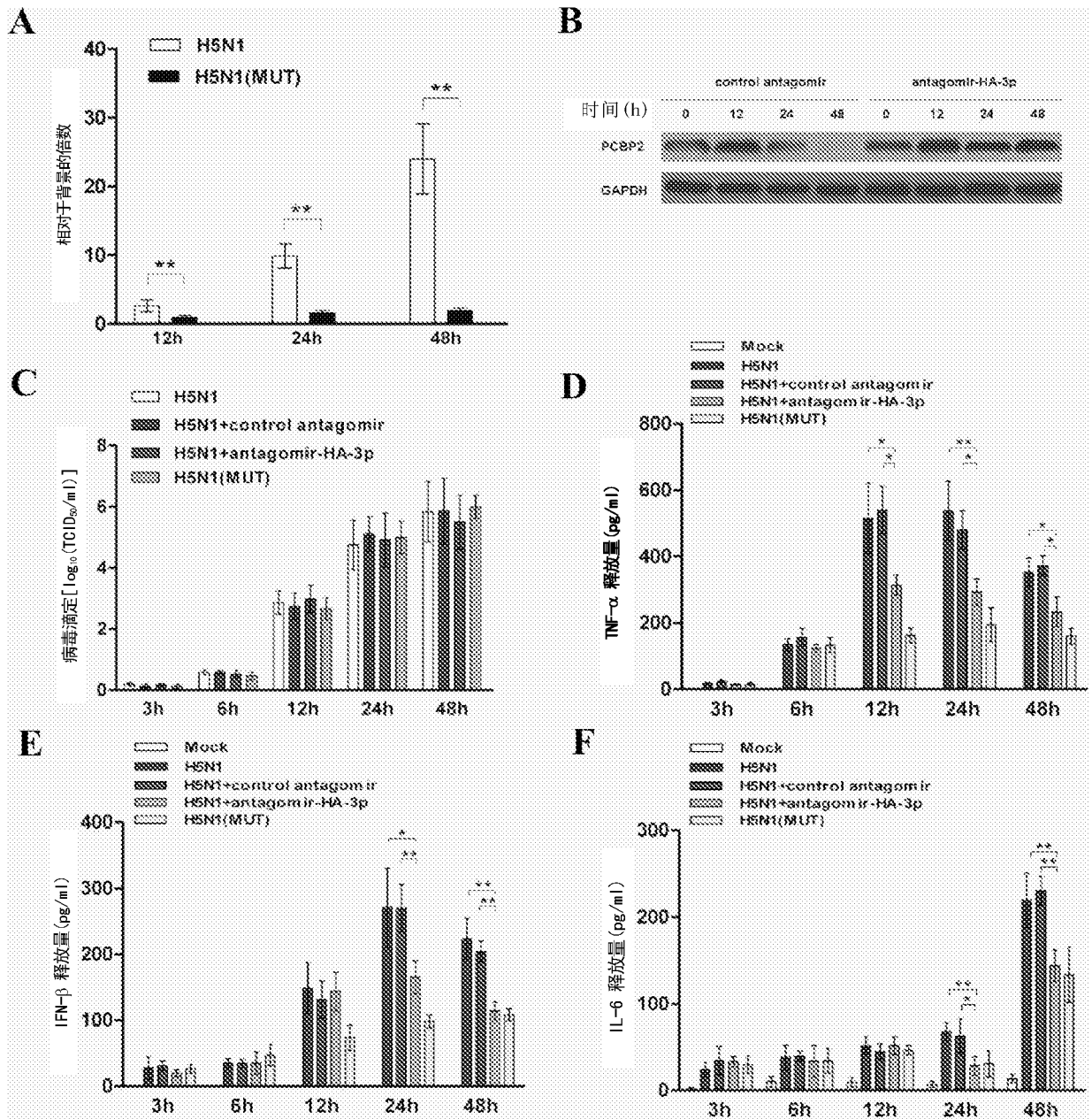
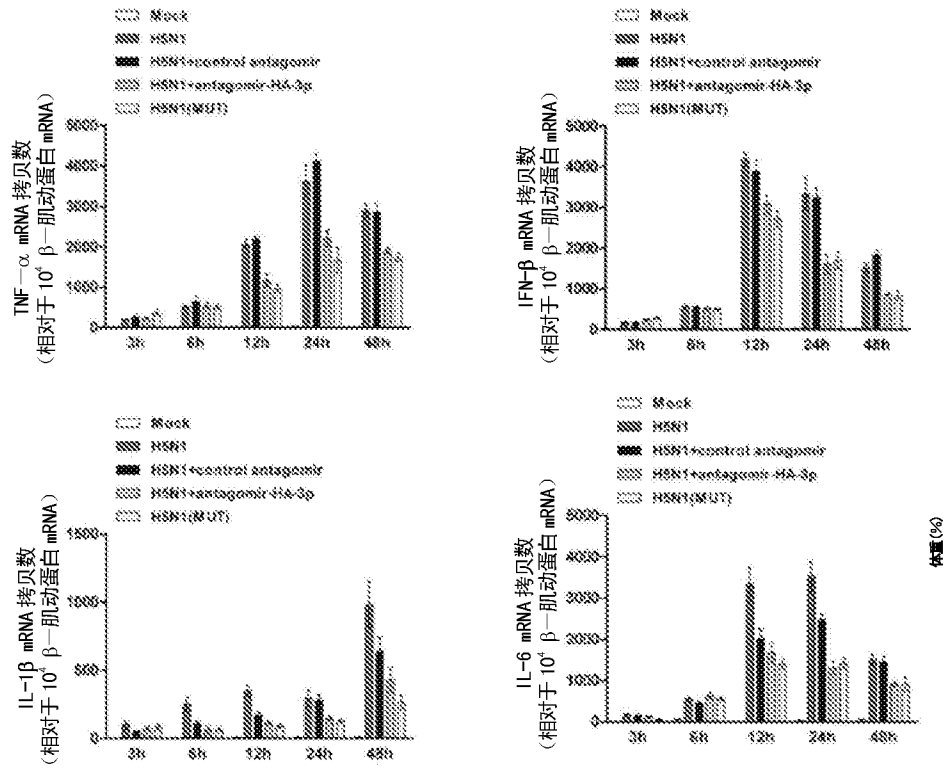


图 3





图

5

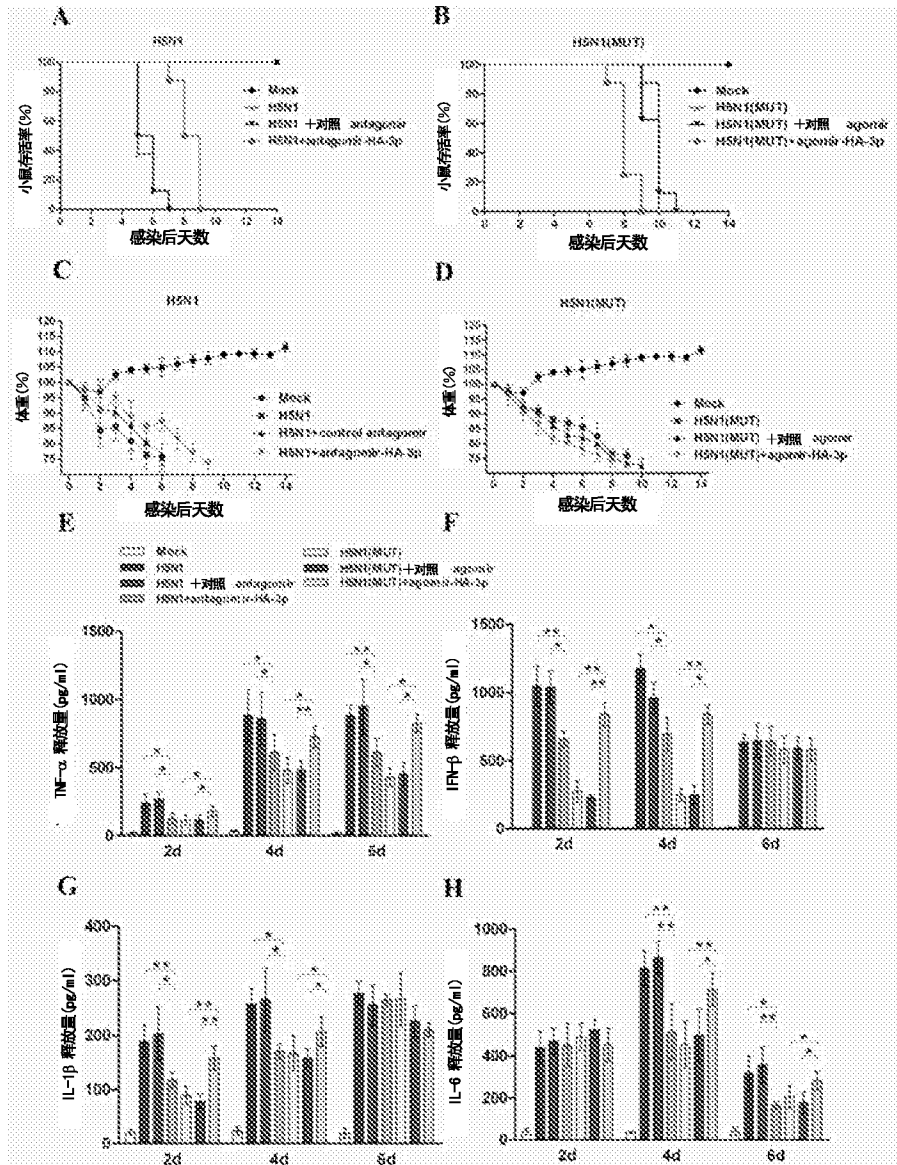


图 6

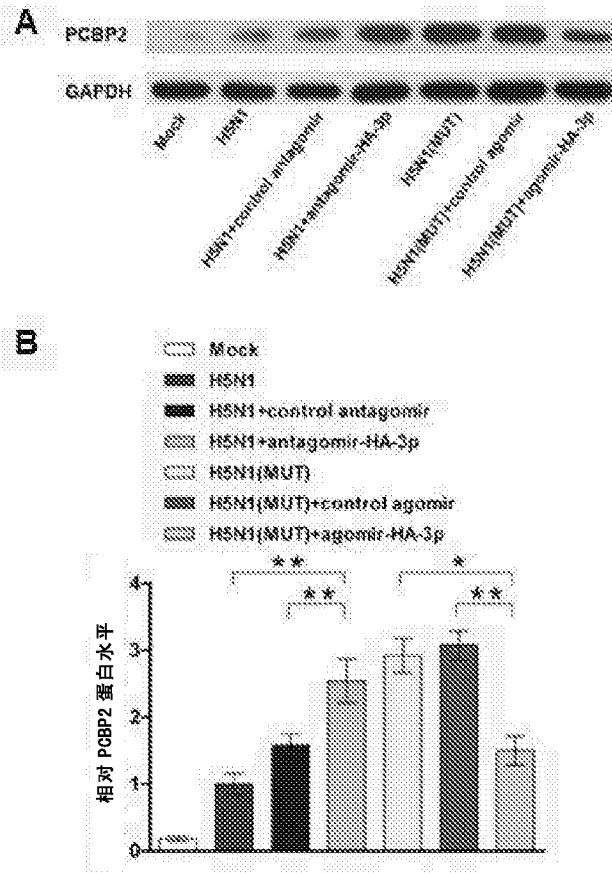


图 7

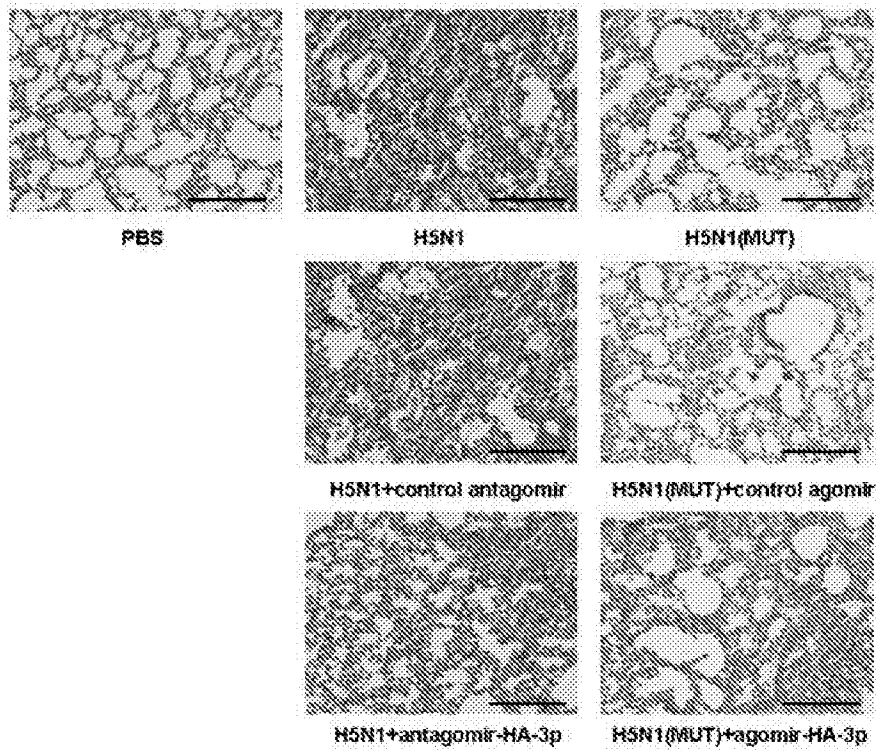


图 8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2014/093384**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12Q 1/70 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i; A61K 45/00 (2006.01) i; A61P 31/16 (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; C12Q; 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)

Data Bases: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ

Search Terms: avian influenza, avian flu virus, Avian Influenza Virus, influenza A virus, H5N1, HA, hemagglutinin, micro ribonucleic acid, microRNA, miRNA, siRNA, miR-HA-3P, search sequence SEQ ID NOs: 1-4

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Guan, Y. et al. "Influenza A Virus (A/Goose/Hong Kong/3014.8/2000 (H5N1)) Segment 4 Hemagglutinin (HA) Gene, Partial Cds", DATABASE Genbank [Online], accession number: AY059482, 23 March 2012 (23.03.2012), see the sequence and relevant information	1-12
A	US 20100016414 A1 (COUNCIL SCI&IND RES INDIA), 01 July 2010 (01.07.2010), see figure 3, SEQ6, embodiments 1-6, and claims 1-27	1-12
A	US 20080045472 A1 (COUNCIL SCI&IND RES INDIA), 21 February 2008 (21.02.2008), see figure 3, SEQ ID NO: 6, embodiments 1-6, and claims 1-27	1-12
A	WO 2010101663 A2 (ICAHN SCHOOL MEDICINE et al.), 10 September 2010 (10.09.2010), see the whole document	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	---

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">25 February 2015 (25.02.2015)</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;"><b>17 March 2015 (17.03.2015)</b></p>
<p>Name and mailing address of the ISA/CN:</p> <p>State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;"><b>YU, Na</b></p> <p>Telephone No.: (86-10) <b>62089160</b></p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2014/093384****C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHEN, Yansen. "Relationship of Gene Silencing Effects and the Structure and Targeting Sites of Intronic Spliced Artificial MiRNAs", CHINA DOCTORAL DISSERTATIONS FULL-TEXT DATABASE, 28 April 2012 (28.04.2012), ISSN: 1674-022X, see the whole document	1-12
A	JAMES, V.R. et al. "Preliminary MicroRNA Analysis in Lung Tissue to Identify Potential Therapeutic Targets Against H5N1 Infection", VIRAL IMMUNOLOGY, vol. 25, no. 1, 31 December 2012 (31.12.2012), ISSN: 0882-8245, pages 3-11, see the whole document	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2014/093384**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 20100016414 A1	01 July 2010	None	
US 20080045472 A1	21 February 2008	None	
WO 2010101663 A2	10 September 2010	WO 2010101663 A3	28 October 2010
		US 8883995 B2	11 November 2014
		US 2012148622 A1	14 June 2012
		JP 2012519484 A	30 August 2012
		CA 2754826 A1	10 September 2010
		EP 2754826 A2	11 January 2012

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12Q 1/70(2006.01)i; C12Q 1/68(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i</p> <p>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</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; C12Q; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>数据库: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ 检索词: 禽流感, 流感病毒, avian flu virus, Avian Influenza Virus, influenza A virus, H5N1, HA, hemagglutinin, 微小核糖核酸, microRNA, miRNA, siRNA, miR-HA-3p, 检索序列 SEQ ID NOs: 1-4</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>Guan, Y. 等. "Influenza A virus (A/Goose/Hong Kong/3014.8/2000(H5N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, partial cds" DATABASE Genbank [Online], 登录号: AY059482, 2012年 3月 23日 (2012 - 03 - 23), 参见序列及相关信息</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 20100016414 A1 (COUNCIL SCI&amp;IND RES INDIA) 2010年 7月 1日 (2010 - 07 - 01) 参见图3, SEQ6, 实施例1-6, 权利要求1-27</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 20080045472 A1 (COUNCIL SCI&amp;IND RES INDIA) 2008年 2月 21日 (2008 - 02 - 21) 参见图3, SEQ ID NO: 6, 实施例1-6, 权利要求1-27</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2010101663 A2 (ICAHN SCHOOL MEDICINE等) 2010年 9月 10日 (2010 - 09 - 10) 参见全文</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	Guan, Y. 等. "Influenza A virus (A/Goose/Hong Kong/3014.8/2000(H5N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, partial cds" DATABASE Genbank [Online], 登录号: AY059482, 2012年 3月 23日 (2012 - 03 - 23), 参见序列及相关信息	1-12	A	US 20100016414 A1 (COUNCIL SCI&IND RES INDIA) 2010年 7月 1日 (2010 - 07 - 01) 参见图3, SEQ6, 实施例1-6, 权利要求1-27	1-12	A	US 20080045472 A1 (COUNCIL SCI&IND RES INDIA) 2008年 2月 21日 (2008 - 02 - 21) 参见图3, SEQ ID NO: 6, 实施例1-6, 权利要求1-27	1-12	A	WO 2010101663 A2 (ICAHN SCHOOL MEDICINE等) 2010年 9月 10日 (2010 - 09 - 10) 参见全文	1-12
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	Guan, Y. 等. "Influenza A virus (A/Goose/Hong Kong/3014.8/2000(H5N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, partial cds" DATABASE Genbank [Online], 登录号: AY059482, 2012年 3月 23日 (2012 - 03 - 23), 参见序列及相关信息	1-12															
A	US 20100016414 A1 (COUNCIL SCI&IND RES INDIA) 2010年 7月 1日 (2010 - 07 - 01) 参见图3, SEQ6, 实施例1-6, 权利要求1-27	1-12															
A	US 20080045472 A1 (COUNCIL SCI&IND RES INDIA) 2008年 2月 21日 (2008 - 02 - 21) 参见图3, SEQ ID NO: 6, 实施例1-6, 权利要求1-27	1-12															
A	WO 2010101663 A2 (ICAHN SCHOOL MEDICINE等) 2010年 9月 10日 (2010 - 09 - 10) 参见全文	1-12															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2015年 2月 25日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2015年 3月 17日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>于娜</p> <p>电话号码 (86-10)62089160</p>															

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	申彦森. "基于内含子剪切的人工miRNA结构和靶向位点与基因沉默效率的关系研究" 中国博士学位论文全文数据库, 2012年 4月 28日 (2012 - 04 - 28), ISSN: ISSN: 1674-022X, 参见全文	1-12
A	James V.Rogers等. "Preliminary MicroRNA Analysis in Lung Tissue to Identify Potential Therapeutic Targets Against H5N1 Infection" VIRAL IMMUNOLOGY, 第25卷卷, 第第1期期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), ISSN: ISSN:0882-8245 第3-11页, 参见全文	1-12

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/093384

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)
US	20100016414	A1	2010年 7月 1日	无	
US	20080045472	A1	2008年 2月 21日	无	
WO	2010101663	A2	2010年 9月 10日	WO	2010101663 A3 2010年 10月 28日
				US	8883995 B2 2014年 11月 11日
				US	2012148622 A1 2012年 6月 14日
				JP	2012519484 A 2012年 8月 30日
				CA	2754826 A1 2010年 9月 10日
				EP	2754826 A2 2012年 1月 11日