

(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
2013 年 12 月 19 日 (19.12.2013)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2013/185339 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 36/35 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61K 133/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/076983
- (22) 国际申请日: 2012 年 6 月 15 日 (15.06.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210191189.8 2012 年 6 月 12 日 (12.06.2012) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 南京大学 (NANJING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 甘黛蒂 (GAN, Daidi) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 刘校生 (LIU, Xiaosheng) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。
- (74) 代理人: 南京知识律师事务所 (ZHISHI LAW FIRM OF INTELLECTUAL PROPERTY); 中国江苏省南京市新模范马路 5 号南京科技广场 B 座 9 楼, Jiangsu 210009 (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 根据细则 4.17 的声明:
— 发明人资格(细则 4.17(iv))
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: APPLICATION OF HONEYSUCKLE FLOWER WATER EXTRACT AND LET-7A MICRORNA IN PREPARATION OF MEDICAMENT AND HEALTH-CARE PRODUCT FOR PREVENTING AND TREATING DENGUE VIRUSES AND DENGUE FEVER

(54) 发明名称: 金银花水提取物和 let-7a microRNA 在制备预防及治疗登革病毒和登革热药物与保健品中的应用

(57) Abstract: The invention belongs to the technical field of Chinese medicine herb pharmacy, and particularly relates to a honeysuckle flower water extract and an application thereof in preparation of a medicament and a health-care product for preventing and treating dengue viruses and dengue fever. According to the new application of the honeysuckle flower for improving the in-vitro microRNA immune function described in the present invention, the honeysuckle flower can be used for treating organism dengue virus infection. The invention further relates to an application of anti-dengue virus let-7a microRNA regulated and controlled by using the honeysuckle flower in a medicament and a health-care product for treating dengue fever.

(57) 摘要: 本发明属中草药制药技术领域, 具体涉及金银花水提取物及其在制备预防及治疗登革病毒和登革热药物与保健品中的应用。本发明所述金银花用于提高体内 microRNA 免疫功能的新用途能够用于治疗机体登革病毒感染, 以及金银花所调控的抗登革病毒的 let-7a microRNA 在治疗登革热的药物与保健品中应用。



WO 2013/185339 A1

金银花水提物和 let-7a microRNA 在制备预防及治疗登革病毒和登革热药物与保健品中的应用

一：技术领域

本发明属中草药制药技术领域，具体涉及金银花水提物其在制备预防和治疗登革病毒的药物与保健品中的应用。

二：背景技术

登革热是热带与亚热带地区的蚊虫传染病，每年全球约有 5 亿至 10 亿人感染病例，大多为居住在城市或城镇郊区的居民。其感染病症从发烧疼痛的 dengue fever 到严重内出血的 dengue hemorrhagic fever 与体内受损重创导致的休克型 dengue shock syndrome，估计在每年全球 10 亿人感染病例中因感染登革热而衍发为严重内出血的 dengue hemorrhagic fever 约为 50 万病例及 2 万的死亡病例。然而，引起登革热的登革病毒 dengue virus 其在体内会引起免疫相关的复杂反应，因而导致至今治疗登革病毒相关的登革热疾病只有"头痛医头，脚痛医脚"的治疗症状的"治标"药，而没有确实有效能抑制登革病毒活性与增生数量的"治本"药或是疫苗。寻找治疗或预防登革热的有效治疗药为本研发的起因。

中草药金银花(Lonicera japonica Thunb; honeysuckle)已知其具有治疗感染发热症状的疗效。本发明在于进一步的了解饮用金银花水提物是否能专门对抗 dengue virus 引起的疾病，金银花水提物是否能调控体内抗病毒的 microRNA 免疫机制，其调控的体内抗病毒的 microRNA 是否能抗登革病毒，以及其抗病毒的机制。期望因此研究确立金银花

治疗登革病毒的机制与功效，佳惠全世界的患者。

三：发明内容

本发明需要解决的问题是确立金银花可抗登革病毒及其是以调控体内抗病毒的 microRNA 免疫机制(microRNA immunity)来对抗登革病毒，本发明的技术方案如下：

1. 以小鼠为实验动物模式，按中医治疗方式喂食金银花水提物(即中医治病时病人所喝的金银花水提物，俗称"金银花茶"；制备方式为：金银花干花苞 10 克加水 500 毫升，大火煮开后文火煮 20 分钟即可。此为一次性服用剂量。治疗期须早晚各服一剂，连续服用 4 天)，然后采血，以 Solexa deep sequencing 测血中 microRNA 表达谱的改变。
2. 将血中 microRNA 表达谱中因喝金银花水提物而高表达的 microRNA 做计算机分析预测其抗登革病毒 RNA genome 的可能性及其总量上的大幅度变化。此实验与分析证明金银花水提物可同时调控体内数个不同的 microRNA，这些 microRNA 中有许多可直接以登革病毒的各个基因为目标，因而推测喝金银花水提物可因同时调高多种抗登革病毒的 microRNA 达到同时攻击抑制或调控登革病毒的功效，并大大减少因病毒发生突变而产生的药作用点失效的可能性，保证了此金银花水提物在对抗不同品系的登革病毒的有效性与疗方的持久性。
3. 将筛选出的"受金银花调控而高表达且计算机分析预测其极有可能可抗登革病毒 RNA genome 的 microRNA" 以 RNA 合成方式大量复制以便运用于细胞学研究。在此我们采用 let-7a 为抗登革病毒 RNA

genome 的 microRNA 代表(biomarker), 计算机分析预测其极有可能可抗登革病毒 RNA genome 的 NS1 gene 为目标基因。

4. 细胞学研究中, 我们以 luciferase assay, real time-PCR, Western blot, immunofluorescence cytochemistry 分别证明 let-7a 可抑制含有登革病毒 NS1 gene 的载体的活性, 可抑制活体登革病毒制造 NS1 gene 及生成 NS1 蛋白质。因而证实 **let-7a 确实可在细胞内抑制登革病毒 RNA genome 的 NS1 gene 并从而抑制登革病毒制造 NS1 蛋白质, 影响病毒的活性。**

5. 小鼠模式研究中, real time PCR 证实喝金银花水提物的小鼠其血液中 let-7a 会在开始喝后的第 2 天呈现高表达, 并呈周期改变至 8 天。

6. 小鼠模式研究中, 我们采用"先注射登革病毒入鼠大脑内使其感染登革病毒, 再喝金银花水提物"以研究金银花水提物对感染登革病毒的疗效。

实验证明金银花水提物可抑制登革病毒在脑内制造 NS1 gene, 并明显降低其所生成的 NS1 蛋白质, 与减少感染鼠脑内的登革病毒数量。

感染鼠的疾病征兆比较轻微, 存活期较长。感染鼠体内 let-7a 表达量呈现组织特异性: 在血液中的比阴性对照组高, 在脑中大为减少。喝金银花水提物而没感染登革病毒的鼠其血中脑中 let-7a 表达量提高。感染鼠喝金银花水提物者虽然其脑内 NS1 与其脑内的登革病毒数量下降, 但其体内 let-7a 表达量在血与脑中和感染鼠没喝金银花水提物者相当。我们推测此为金银花调控的各个免疫系统与病毒感染的竞争关系。**此实验建议金银花水提物其活性成份与体内调控机制以直接与间**

接的方式达到抑制登革病毒的疗效。其可作用于抑制足以引起致命性出血型登革热与休克型登革热的登革病毒剂量，但其对改变病毒引起的细胞素风暴(cytokine storm)相关的病兆影响较微。我们依此认为金银花为能确实有效能抑制登革病毒活性与增生数量的"治本"药，在治疗登革热时可进一步尝试将金银花与现有的一些治疗病兆症状的"治标"药配伍以达到"标，本"兼治的效果。

7. 小鼠模式研究中，我们采用"先喝金银花水提物，再注射登革病毒入鼠大脑内使其感染登革病毒"以研究金银花水提物对预防防治登革病毒的疗效。

实验证明金银花水提物可抑制登革病毒在脑内制造 NS1 gene，其在没有明显降低其所生成的 NS1 蛋白质状况下，可减少感染鼠脑内的登革病毒数量。感染鼠的疾病征兆没有明显的比较轻微。感染鼠体内 let-7a 表达量呈现组织特异性：在血液和脑中与阴性对照组相当。喝金银花水提物而没感染登革病毒的鼠其血中 let-7a 与阴性对照组相当，其脑中 let-7a 被高表达。感染鼠喝金银花水提物者虽然其脑内 NS1 gene 与其脑内的登革病毒数量下降，但其体内 let-7a 表达量在血中呈现被抑制状态，在脑中和感染鼠没喝金银花水提物者相当。我们推测此为金银花调控的各个免疫系统与病毒感染的竞争关系。此实验建议金银花水提物其活性成份与体内调控机制以直接与间接的方式达到抑制登革病毒的疗效。其可作用于抑制足以引起致命性出血型登革热与休克型登革热的登革病毒剂量，但其不改变病毒引起的细胞素风暴相关的病兆。我们依此认为金银花为能确实有效抑制登革病毒活

性与增生数量的"治本"药,在治疗登革热时可进一步尝试将金银花与现有的一些治疗病兆症状的"治标"药配伍以达到"标,本"兼治的效果。

本发明与现有技术相比,其有益效果是证实喝金银花水提物可调控体内抗登革病毒 microRNA 免疫系统 (microRNA immunity),其中的抗登革病毒 microRNA let-7a 的高表达可抑制登革病毒的活性。金银花水提物可同时调控多个不同的抗登革病毒 microRNA, 金银花水提物从而以直接与间接的方式达到抑制登革病毒的活性与数量及治疗登革热的疗效。此研究确立金银花治疗登革病毒的机制与功效为能确实有效抑制登革病毒活性与增生数量的"治本"药。依此我们认为在治疗登革热时可进一步尝试将金银花与现有的一些治疗病兆症状的"治标"药配伍以达到"标,本"兼治的效果。本发明所要求金银花水提物和 let-7a microRNA 可制备成预防和治疗抗登革病毒的药物,也可制备成抗登革热的保健食品。

四: 附图说明

图 1. 金银花可调控小鼠血中 microRNA 表达谱。Solexa sequencing 数据(以统计学的 standard deviation 标准偏差数据显示)。其中各个高表达且能抗登革病毒 DV2 PL046 RNA genome 的目标基因的 microRNA 有特别注明。

图 2. 金银花可高表达小鼠血中抗登革病毒 microRNA 表达量总量。

Solexa sequencing 数据以统计图呈现。

图 3. let-7a 可抗登革病毒 RNA genome 的 NS1 gene 为目标基因。

图 4. let-7a 可在细胞内抑制登革病毒 RNA genome 的 NS1 gene 并从而抑制登革病毒制造 NS1 蛋白质。(a).以表达量载体做细胞学实验, let-7a 的量越高,对登革病毒基因表达抑制力越大。(b).左图显示 let-7a 对正常的登革病毒 NS1 基因有抑制力,右图显示 let-7a 对突变的登革病毒 NS1 基因失去抑制力;因此证明 let-7a 确实是作用在登革病毒 NS1 基因上。(c, d, e).当细胞感染活的登革病毒时, let-7a 也有同样的抑制病毒活性的能力, let-7a 量越高,活病毒能制造的 NS1 gene 就越少(c),其制出的 NS1 protein 量也下降(d, e)。let-7a 对登革病毒引起的不正常细胞 Ras protein 表达也具有抑制作用(d)。

图 5. 金银花调控体内抗登革病毒的 let-7a microRNA 在血中的量呈周期改变: let-7a 的量于喝后第 2 天上升,呈周期性改变至 8 天。

图 6. 采用"先注射登革病毒入鼠大脑内使其感染登革病毒,再喝金银花水提物"以研究金银花水提物对感染登革病毒的疗效。金银花水提物可抑制登革病毒在脑内制造 NS1 gene (d),降低其所生成的 NS1 蛋白质 (e),减少感染鼠脑内的登革病毒数量 (f)。喝金银花水提物的感染鼠其存活期较长 (a),疾病征兆比较轻微 (b, c)。感染鼠体内 let-7a 表达量呈现组织特异性 (g, h),据此推测金银花调控的各个免疫系统与病毒感染呈竞争关系,此实验建议金银花水提物其活性成份与体内调控机制以直接与间接的方式达到抑制登革病毒的疗效。但对改变病毒引起的细胞素风暴相关的病兆影响较微。

图 7. 采用"先喝金银花水提物,再注射登革病毒入鼠大脑内使其感染

登革病毒"以研究金银花水提物对预防防治登革病毒的疗效。金银花水提物可抑制登革病毒在脑内制造 NS1 gene (d), 在不降低其所生成的 NS1 蛋白质状况下减少感染鼠脑内的登革病毒数量 (e, f)。感染鼠的疾病征兆改变不明显 (a, b, c)。感染鼠体内 let-7a 表达量呈现组织特异性 (g, h), 据此推测金银花调控的各个免疫系统与病毒感染呈竞争关系, 此实验建议金银花水提物其活性成份与体内调控机制以直接与间接的方式达到抑制登革病毒的疗效。但不改变病毒引起的细胞素风暴相关的病兆。

五: 具体实施方式

1. 金银花调控小鼠血中 microRNA 表达谱与其计算机预测。

参考中医金银花治发烧感染的医方与中华人民共和国药典, 将人喝的剂量与体重之比例换算成小鼠喝的剂量(即以一般成人约 50kg 的体重须 10 克金银花干花苞为一次性剂量, 换算成体重为 25 克的小鼠就须 0.005 克金银花干花苞为一次性剂量。小鼠喝的金银花水提物的一次性剂量为 0.2 毫升), 然后按照中医的金银花治疗方式煮金银花水提物并依其医疗方式喂食小鼠(一日两次, 连续喝 4 天)。然后采血, 抽 RNA, 交予深圳华大基因公司(BGI, www.genomics.cn)进行 microRNA 的 Solexa deep sequencing 与数据分析形成表达谱。表达谱中高表达的 microRNA 先与 miRBase (the microRNA database, www.mirbase.org) 数据库做比对以确认鼠与人相同的 microRNA, 再与 ViTa (virus' miRNA target, vita.mbc.nctu.edu.tw/index.php) 数据库做比对预测可抗登革病毒 dengue virus type 2 PL046 sequence (accession number AJ968413)

RNA genome 的 microRNA。然后以统计方式分析了解喝金银花水提物对提高血中抗登革病毒的 microRNA 其量上的改变。见附图 1, 2。

2. 细胞学实验证明抗登革病毒的 microRNA 可抑制病毒活性。

我们以可受金银花调控而高表达且计算机预测可抗登革病毒的 microRNA let-7a 为研究对象, 以其预测的登革病毒的 NS1 gene 为目标基因做细胞学研究。我们以 Huh7 肝癌细胞株为细胞模式, 运用 real time-PCR 测基因表达量, Western blot 测蛋白质表达量, immunofluorescence cytochemistry 测病毒蛋白质在细胞中的分布位置与是否被表达来分别证明: (1). let-7a 可抑制含有登革病毒 NS1 gene 的载体的活性, 但不能抑制含有登革病毒 NS1 gene 突变体的载体的活性, 因而证明 let-7a 是直接抑制目标基因 NS1。 (2). let-7a 可抑制活体登革病毒制造 NS1 gene 及生成 NS1 蛋白质。见附图 3, 4。

3. 金银花调控体内抗登革病毒的 let-7a microRNA 在血中的量呈周期改变。

小鼠模式研究中, 按照中医的金银花治疗方式煮金银花水提物并依其医疗方式喂食小鼠(一日两次, 连续喝 4 天), 并于第 0, 2, 4, 6, 8 日采血以 real time PCR 测 let-7a 的表达量, 对照组为喝水的小鼠。 real time PCR 实验证实喝金银花水提物的小鼠其血液中 let-7a 的量呈周期改变至 8 天。见附图 5。

4. 研究金银花水提物对感染登革病毒的疗效。

小鼠模式研究中, 采用"先注射登革病毒入鼠大脑内使其感染登革病毒, 再喝金银花水提物"的方式以研究金银花水提物对感染登革病毒

的疗效。ICR 品系的小鼠于出生后第 6 日接受大脑注射足以引起致命性出血型登革热与休克型登革热的登革病毒剂量以使其感染,第 7 日开始喝金银花水提物,连续喝 4 天;于出生后第 12 日以 real time-PCR 测 NS1 与 let-7a 基因表达量,Western blot 测 NS1 蛋白质表达量,PFU forming assay (空斑形成单位) 测感染鼠其脑中释放的登革病毒数量。于出生后第 6-13 日测鼠的体重,死亡率,疾病症状指标。见附图 6。

5. 研究金银花水提物对预防防治登革病毒的疗效。

小鼠模式研究中,采用"先喝金银花水提物,再注射登革病毒入鼠大脑内使其感染登革病毒"的方式以研究金银花水提物对预防防治登革病毒的疗效。ICR 品系的小鼠于出生后第 4 日开始喝金银花水提物,连续喝 4 天;于出生后第 7 日接受大脑注射足以引起致命性出血型登革热与休克型登革热的登革病毒剂量以使其感染,于出生后第 13 日以 real time-PCR 测 NS1 与 let-7a 基因表达量,Western blot 测 NS1 蛋白质表达量,PFU forming assay 测感染鼠其脑中释放的登革病毒数量。于出生后第 7-14 日测鼠的体重,死亡率,疾病症状指标。见附图 7。

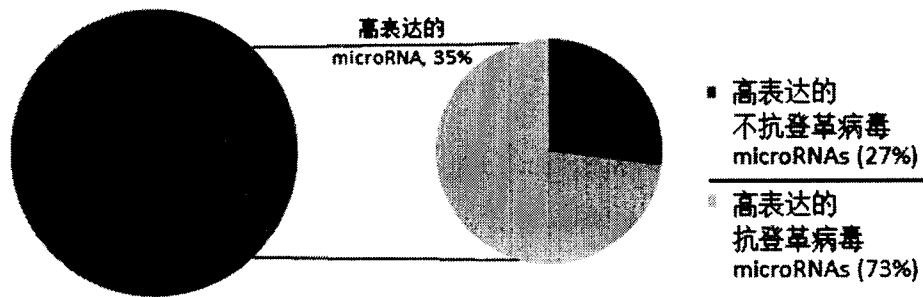
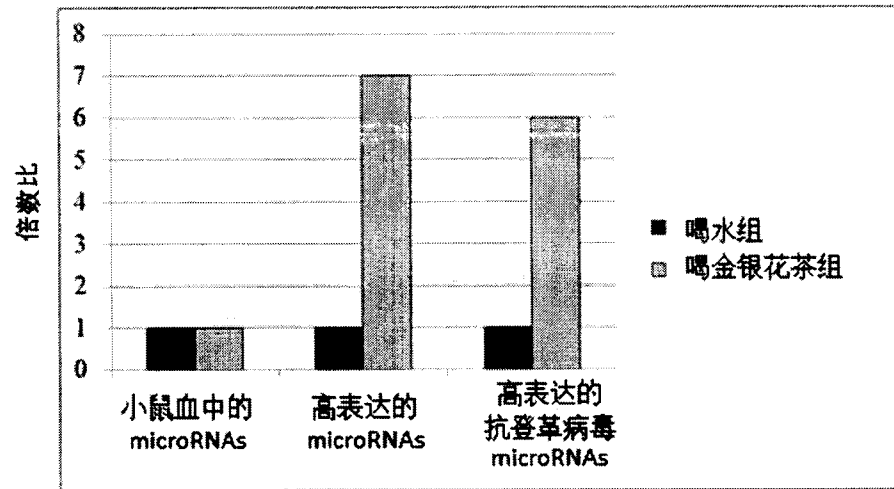
权利要求书

1. 一种金银花水提物或其影响的 **let-7a microRNA**, 其特征是金银花干花苞 10 克加水 500 毫升, 大火煮开后文火煮 20 分钟。
2. 权利要求 1 所述金银花水提物在制备预防或治疗登革病毒或登革热药物中的应用。
3. 权利要求 1 所述金银花水提物在制备预防或治疗登革病毒或登革热保健品中的应用。
4. 权利要求 1 所述金银花水提物影响的 **let-7a microRNA** 在制备预防或治疗登革病毒或登革热药物中的应用。
5. 权利要求 1 所述金银花水提物影响的 **let-7a microRNA** 在制备预防或治疗登革病毒或登革热保健品中的应用。

高表達的 小鼠血中抗登革 病毒 microRNAs	抗登革病毒 DV2 PL046 RNA genome 的目標基因	喝水組 血中 microRNA 表達量	喝金銀花茶組 血中 microRNA 表達量
mmu-let-7a	3313-3333(NS1)	741.0537	12072.9793
mmu-let-7b	3313-3333 (NS1), 10639-10660 (3'UTR)	9031.9884	19146.1672
mmu-let-7c	3313-3333 (NS1), 10639-10660 (3'UTR)	2560.6619	50308.9018
mmu-let-7d	3312-3333 (NS1)	2272.0219	21308.2112
mmu-let-7i	3314-3333 (NS1), 10327-10349 (3'UTR)	321.2138	8049.135
mmu-miR-103	6449-6470 (NS4A)	9482.5925	37134.1335
mmu-miR-107	6449-6470 (NS4A), 6614-6637 (NS4A)	9412.0159	27942.0887
mmu-miR-10a	9989-10017 (NS5)	1.8097	10.1252
mmu-miR-122 (has-miR-122a)	1192-1222 (E), 1817-1837(E), 2631-2658 (NS1)	20.811	44.8403
mmu-miR-132	220-237 (C), 1239-1260 (E), 3275-3296 (NS1)	1.8097	23.1434
mmu-miR-133a	7823-7852 (NS5)	6.3338	45.4602
mmu-miR-142-3p	6520-6542 (NS4A), 6860-6882 (NS4A), 7449-7473 (NS4B), 8137-8162(NS5)	399.0289	1657.8495
mmu-miR-143	889-909 (M)	4.5241	26.4495
mmu-miR-148b	8208-8229 (NS5)	30.7641	1440.6739
mmu-miR-15b	6615-6638 (NS4A), 10685-10709 (3'UTR)	2229.495	44262.7002
mmu-miR-181d	752-773 (M)	60.6234	199.4048
mmu-miR-182	1574-1595 (E.)	1	19.2173
mmu-miR-183	1267-1290 (E), 4879-4899 (NS3)	1	3.7195
mmu-miR-200c	6632-6655 (NS4A)	1	7.4389
mmu-miR-204	5569-5591 (NS3)	1.8097	33.4752
mmu-miR-211	5570-5591 (NS3)	1	12.1916
mmu-miR-221	4651-4673 (NS3), 8973-9005 (NS5)	707.5751	1972.1445
mmu-miR-222	8982-9005 (NS5)	250.6372	1545.2322

mmu-miR-23a	9833-9856 (NS5)	887.6358	1648.5508
mmu-miR-29a	1506-1530 (E), 3338-3359 (NS1), 10685-10706 (3'UTR)	1774.3668	22079.3809
mmu-miR-29b	1503-1530 (E), 3336-3359 (NS1), 10684-10706 (3'UTR)	30.7641	922.2214
mmu-miR-29c	1507-1530 (E), 10687-10706 (3'UTR)	58.8138	1011.282
mmu-miR-301a (has-miR-301)	1456-1477 (E), 7458-7482 (NS4B)	1	3.9261
mmu-miR-30a* (hsa-miR-30a-3p)	4557-4579 (NS3), 8354-8375 (NS5), 9184-9205 (NS5)	60.6234	381.4521
mmu-miR-30e* (hsa-miR-30e-3p)	4557-4579 (NS3), 8353-8375 (NS5), 10562-10580 (3'UTR)	25.3352	128.3216
mmu-miR-31	3687-3705 (NS2A), 3917-3938 (NS2A)	58.8138	167.3761
mmu-miR-324-5p	3399-3422 (NS1)	10.8579	73.9761
mmu-miR-33 (hsa-miR-33b)	5492-5512 (NS3), 9142-9162 (NS5)	9.0483	71.2898
mmu-miR-345-5p (hsa-miR-345)	10290-10310 (3'UTR)	8.1434	119.8495
mmu-miR-34a	1458-1480 (E), 3302-3331 (NS1)	4.5241	17.1509
mmu-miR-449a (hsa-miR-449)	1454-1480 (E), 3308-3331 (NS1)	1.8097	10.5385
mmu-miR-484	4807-4829 (NS3)	165.5834	359.3419
mmu-miR-497	6615-6638 (NS4A)	1	5.3726
mmu-miR-499	3493-3517 (NS2A)	1	11.7783
mmu-miR-542-3p	1460-1482 (E.)	1	5.9925
mmu-miR-93	1710-1729 (E.)	98.6262	489.11
mmu-miR-96	5752-5769 (NS3)	1	7.0257
mmu-miR-98	3313-3333 (NS1)	3.6193	332.6857
	总数	40744.335	255112.3054
	倍数比	1	6.3

图 1.



C57小鼠10周大	喝水组	喝金银花茶组	倍数比
1. 小鼠血中的microRNAs	994104.5217	980930.4074	0.9867
2. 高表达的小鼠血中的microRNAs	51043.5569 (5% of total)	347527.0292 (35 % of total)	6.8085
3. 高表达的小鼠血中抗登革病毒microRNAs	40744.335 (4% of total)	255112.3054 (26% of total) (73% of up-regulated)	6.3

图 2.

5'	ttaagaACAACC-ACTGCCTCt	3'	DV NS1 (3313-3333)
3'	uugauaUGUUGGAUGAUGGAGu	5'	let-7a

图 3.

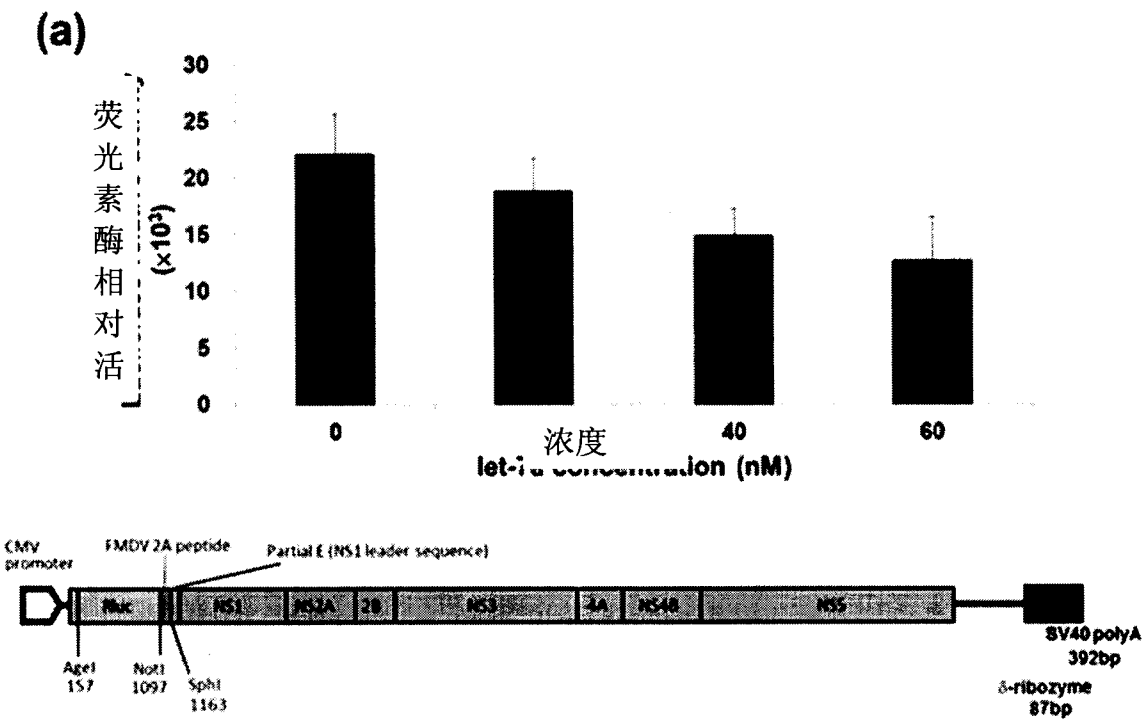


图 4(a).

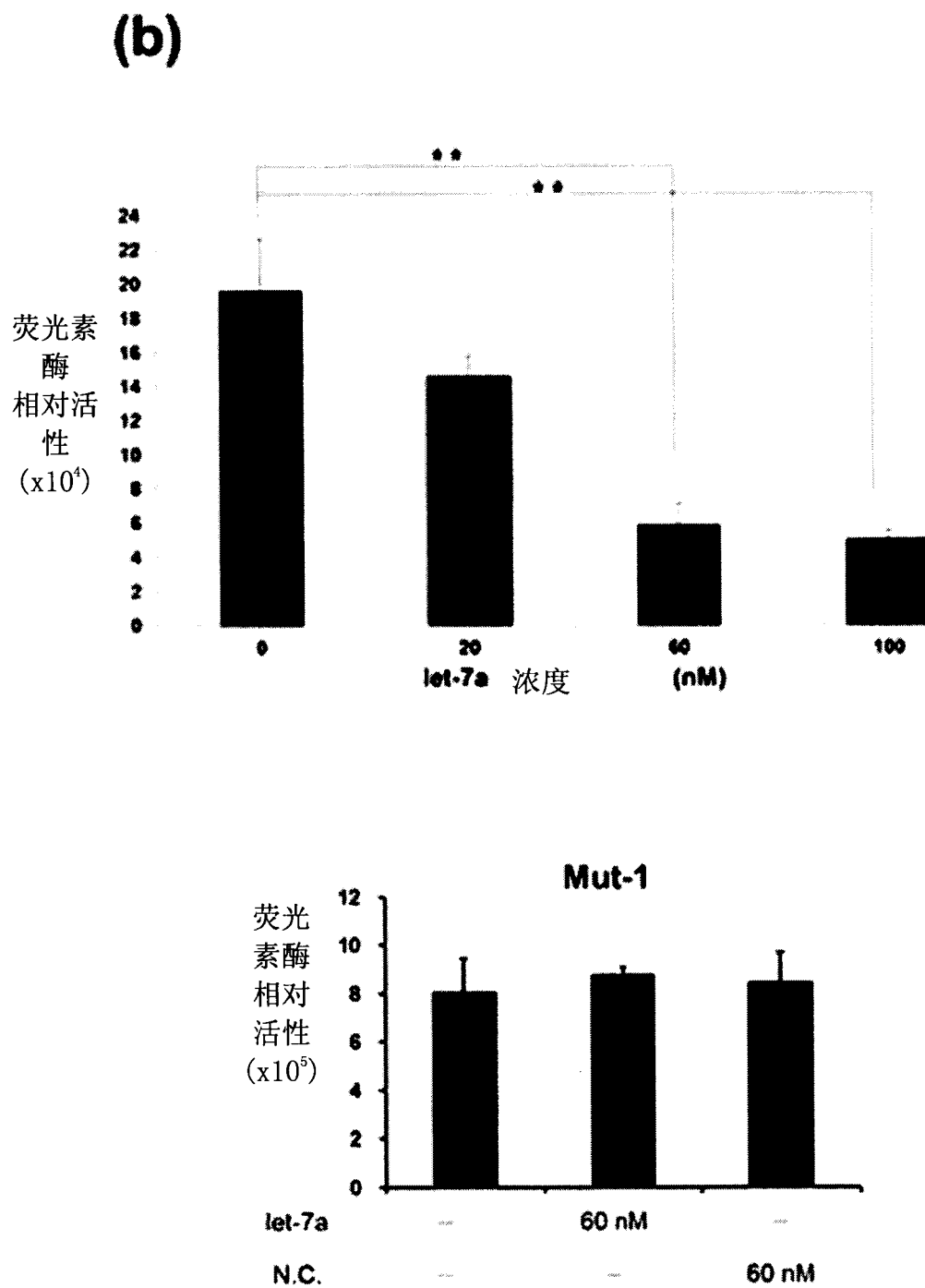


图 4(b).

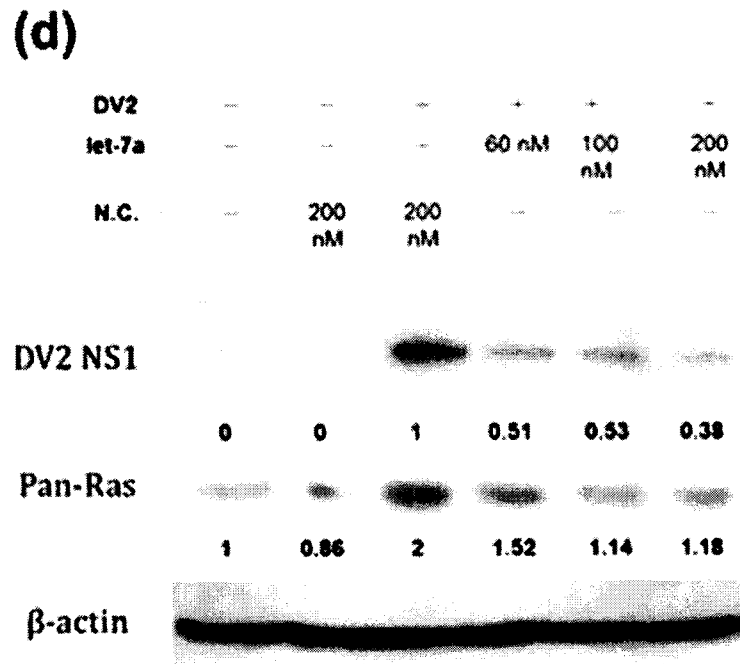
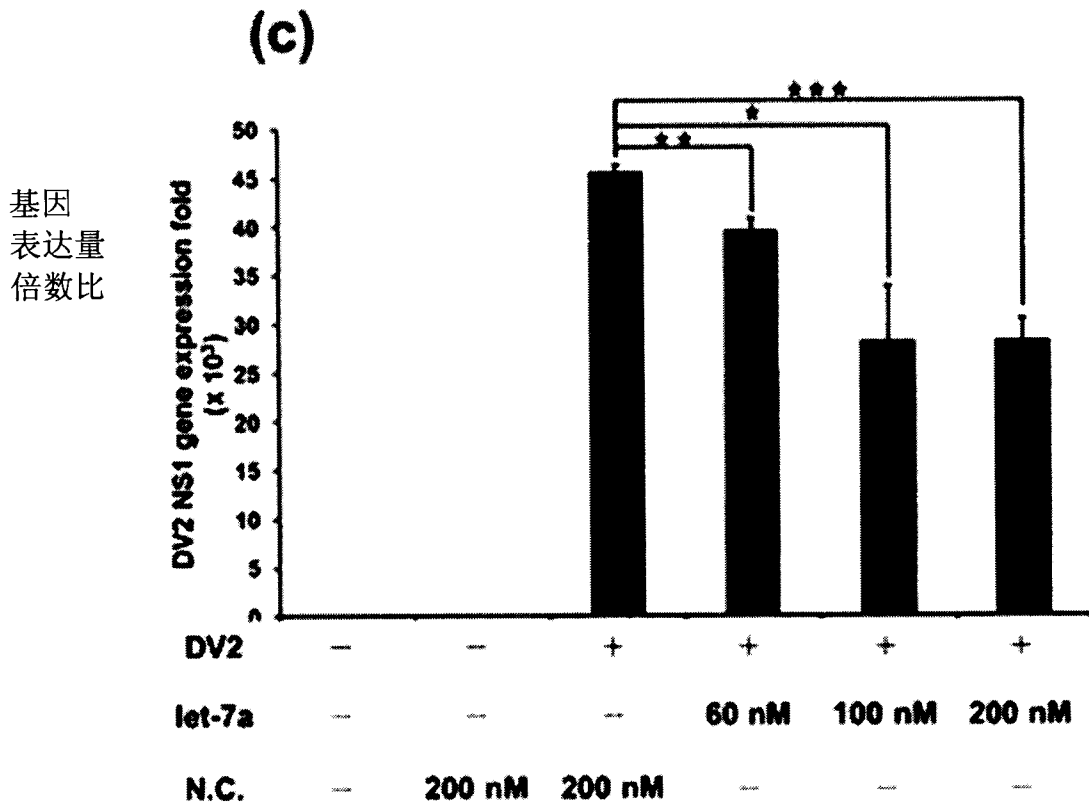


图 4(c, d).

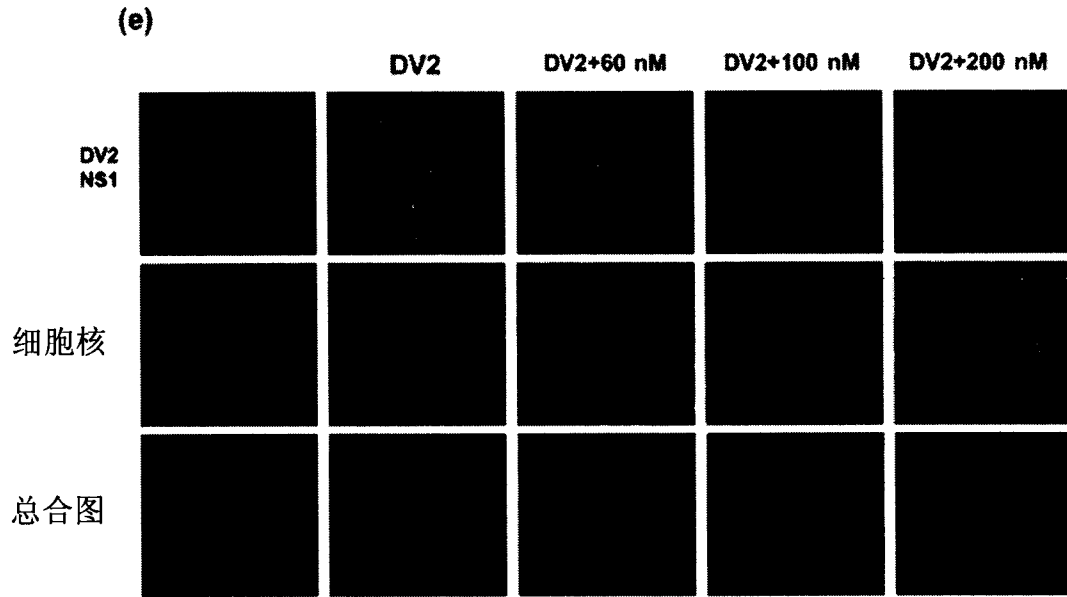


图 4(e).

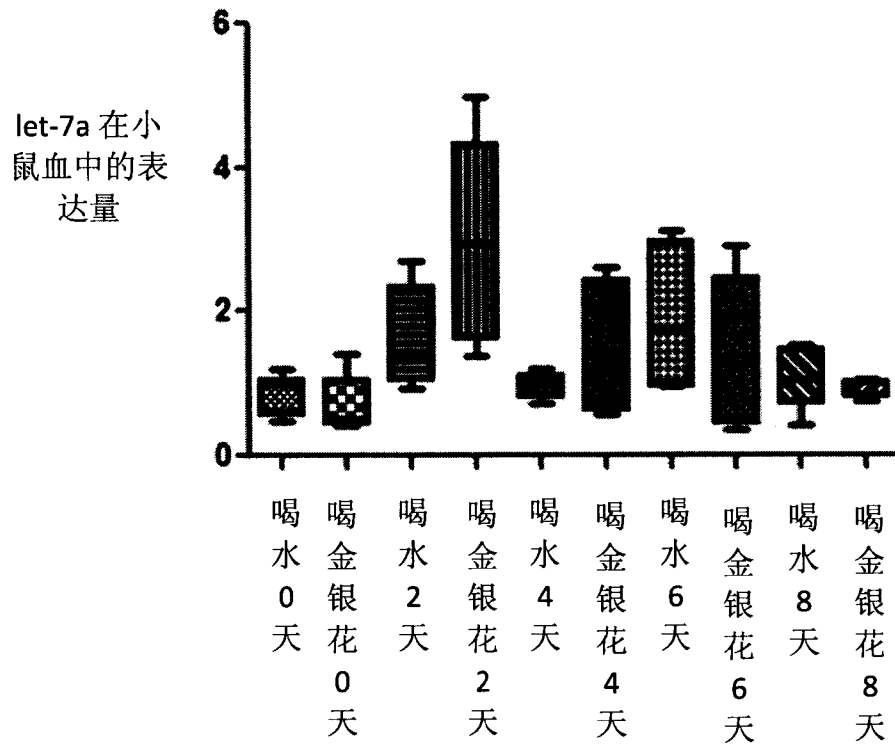


图 5.

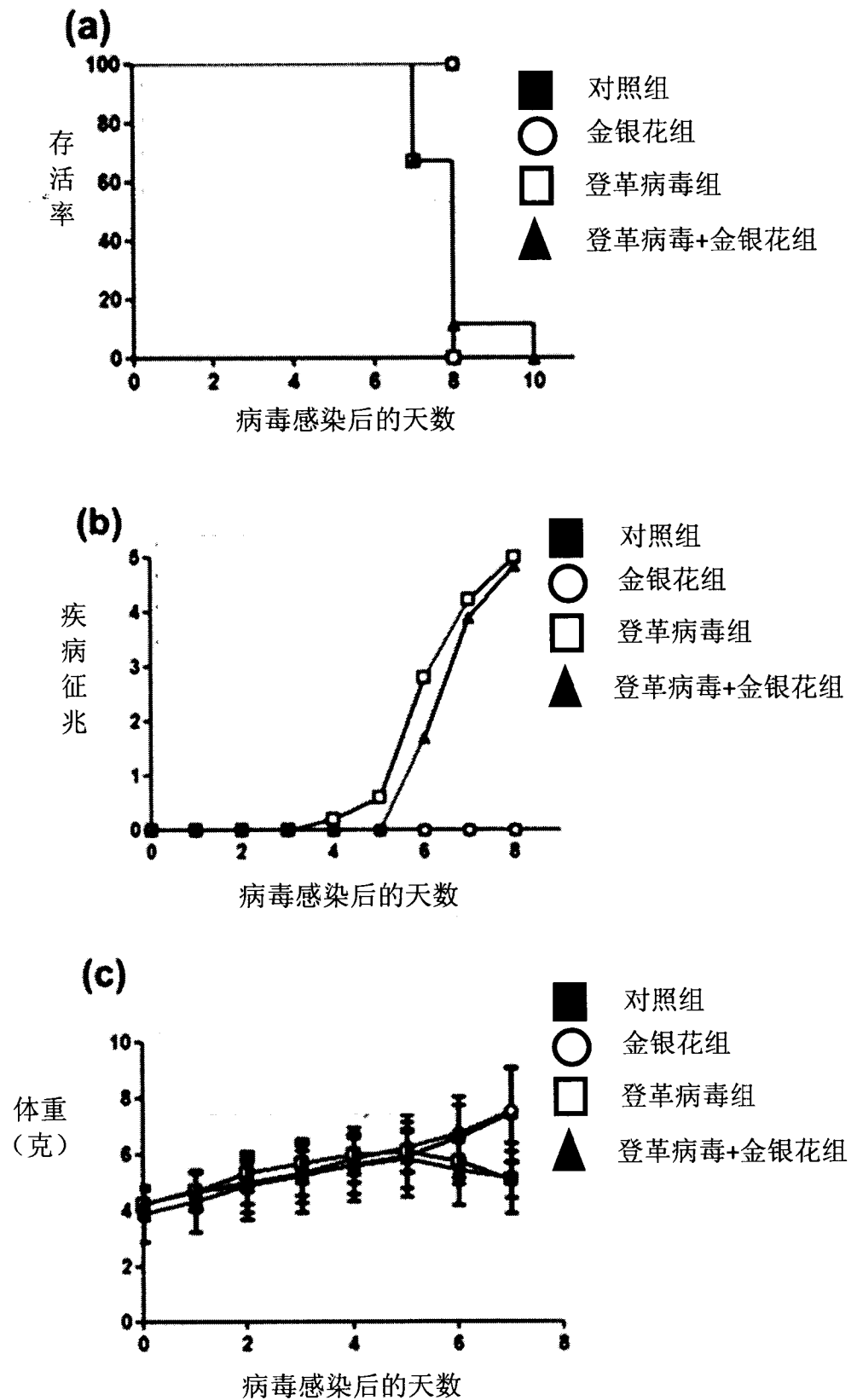


图 6(a-c).

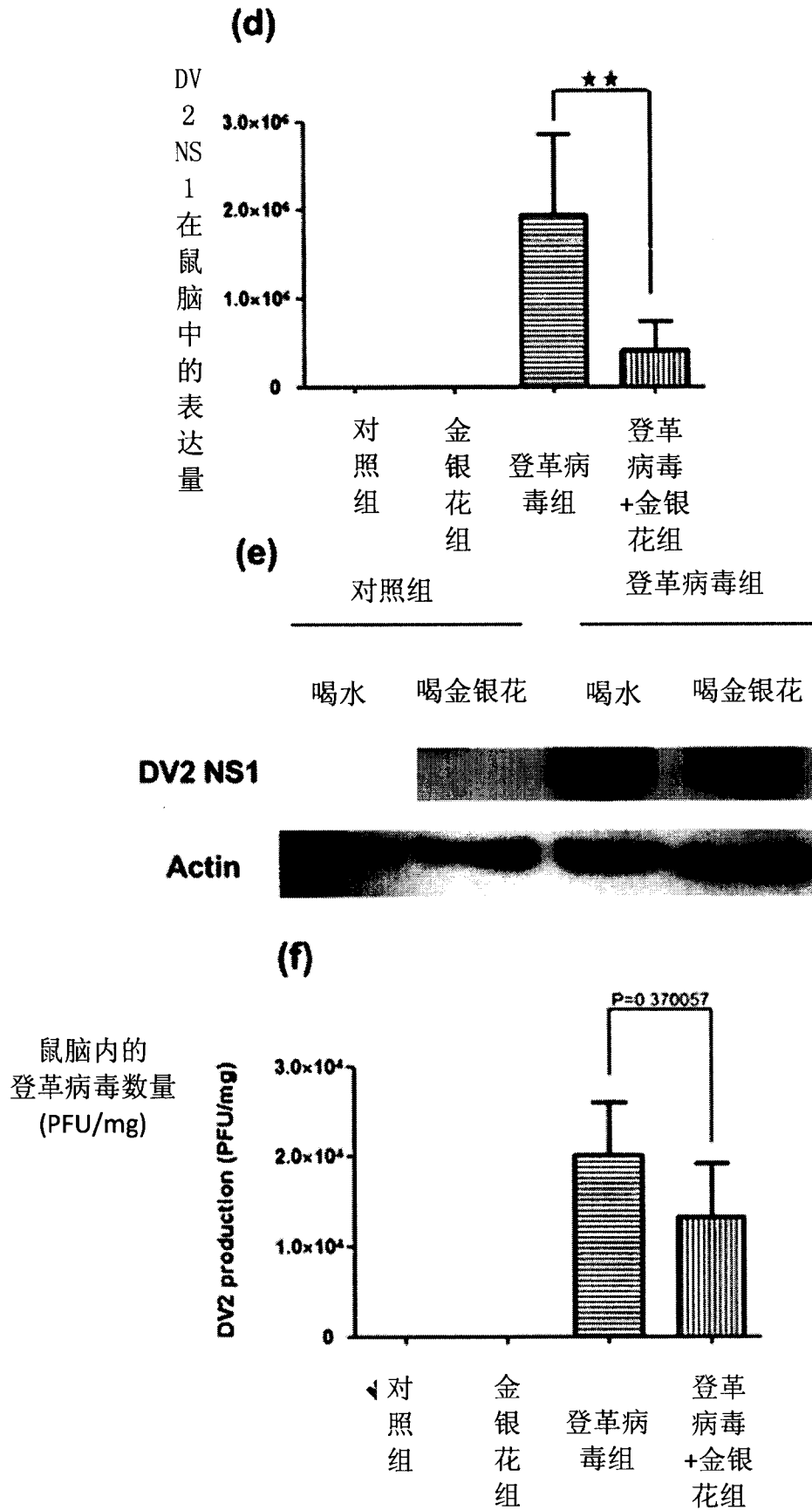
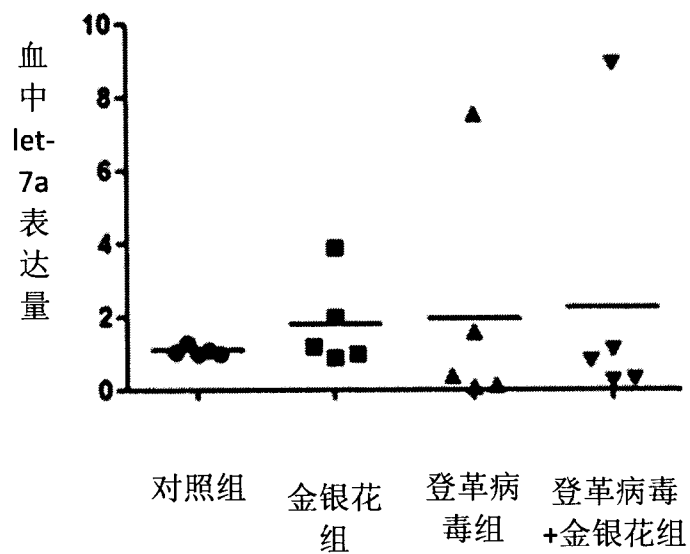


图 6(d-f).

(g)



(h)

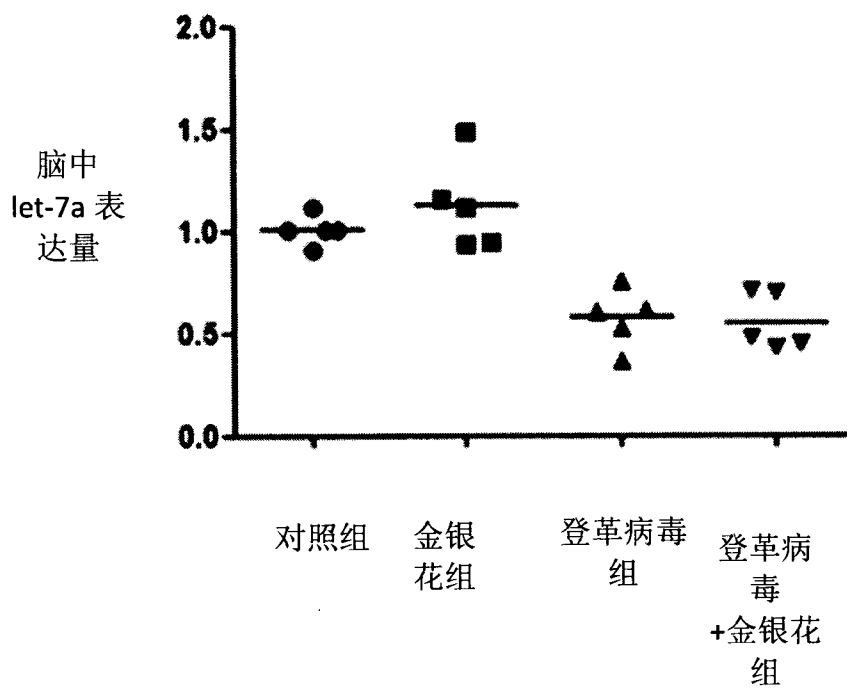


图 6(g, h).

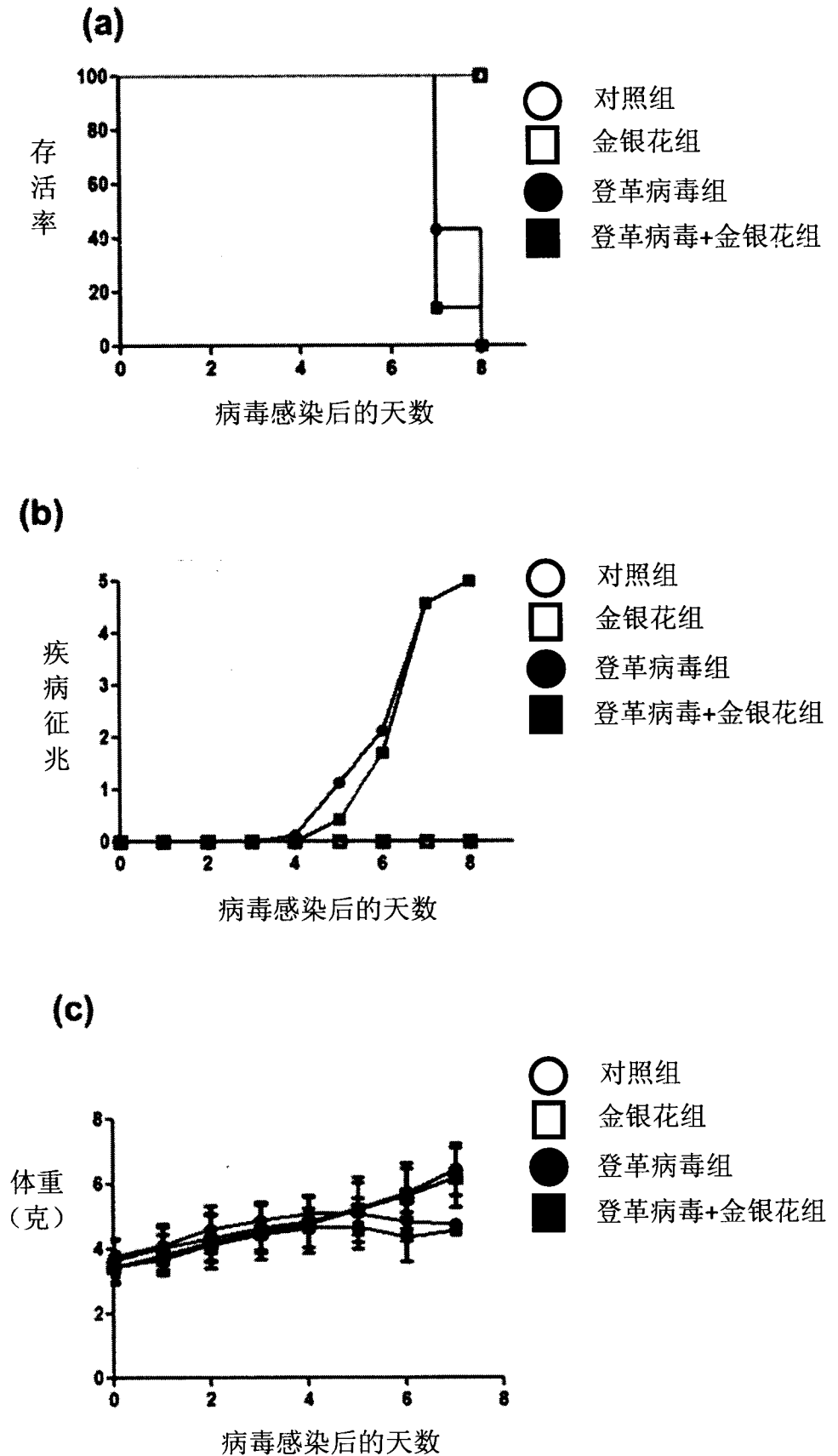


图 7(a-c).

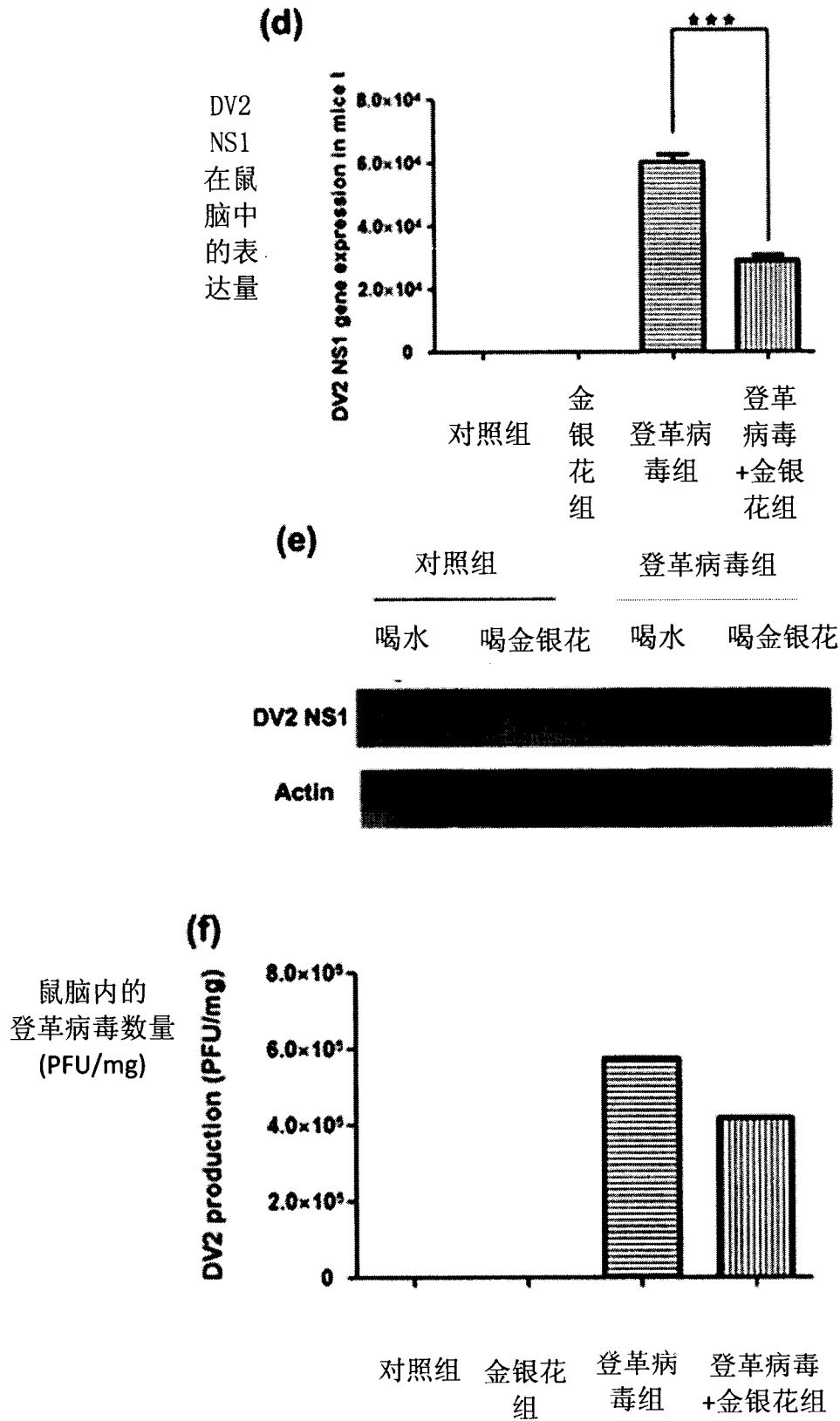


图 7(d-f).

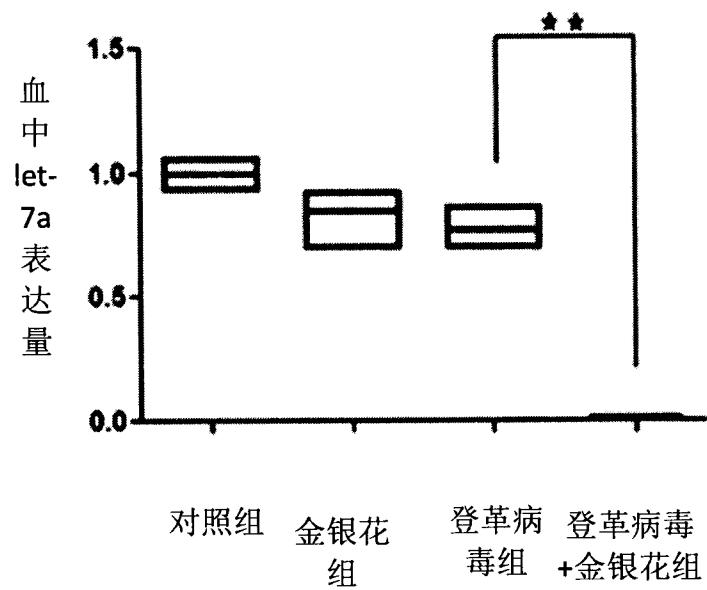
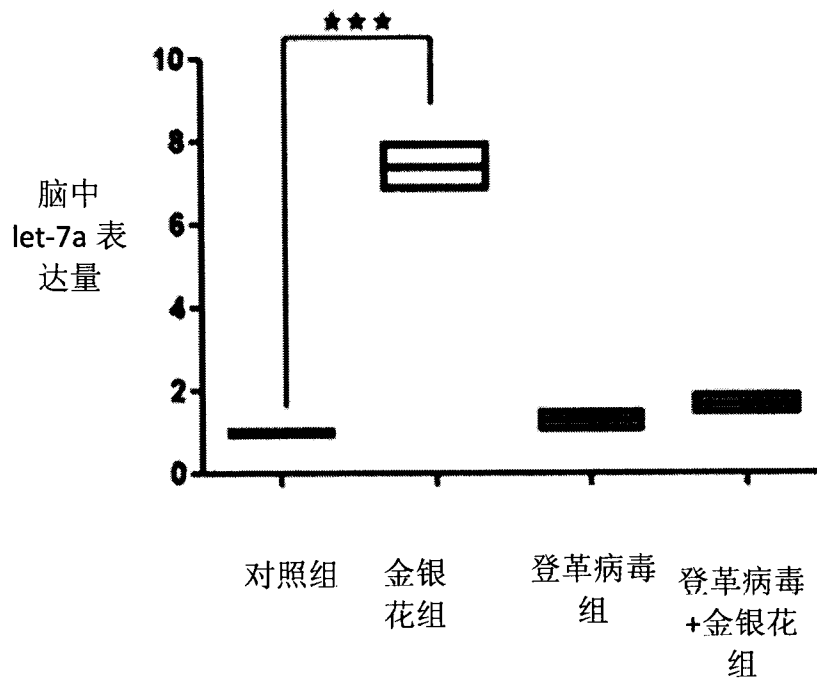
(g)**(h)**

图 7(g-h).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076983

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: A61K 36/-; A61P 31/-; A61K 133/-

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)

WPI; EPODOC; CNKI; CNPAT; STN: aqueous extract; let-7a; microRNA; Honeysuckle Flower; Japanese Honeysuckle; Flos Lonicerae; dengue

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101352475 A (NANJING UNIVERSITY), 28 January 2009 (28.01.2009), claims 1-3	1
X	ZHOU, Jueyu et al., Time course of let-7a expression in the cell cycle of human cervical carcinoma HeLa cells, JOURNAL OF SOUTHERN MEDICAL UNIVERSITY, March 2009, vol. 29, no. 3, pages 442-445, ISSN 1673-4254	1
X	XIONG, Xin et al., The Research of Gastric Cancer-related MicroRNA, PROGRESS IN MODERN BIOMEDICINE, January 2009, vol. 9, no. 2, pages 395-396 and 400, ISSN 1673-6273	1
A	CN 1733808 A (UNION HOSPITAL OF TONGJI MEDICAL COLLEGE, HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 15 February 2006 (15.02.2006), claims 1-4	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 16 February 2013 (16.02.2013)	Date of mailing of the international search report 21 March 2013 (21.03.2013)
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 BIAN, Zhijia Telephone No.: (86-10) 62413724

International application No.
PCT/CN2012/076983

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076983

CONTINUATION: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/35 (2006.01) i

A61K 133/00 (2006.01) i

A61P 31/14 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/076983

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC: A61K 36/-; A61P 31/-; A61K 133/-

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))

WPI; EPODOC; CNKI; CNPAT; STN; 金银花; 忍冬花; 苏花; 金藤花; 水提物; let-7a; microRNA; 登革; Honeysuckle Flower; Japanese Honeysuckle; Flos Lonicerae; dengue

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 101352475 A (南京大学) 28.1 月 2009 (28.01.2009) 权利要求 1-3	1
X	周珏宇 等, Let-7a 在人宫颈癌 HeLa 细胞不同周期时相的表达, 南方医科大学学报, 3 月 2009, 第 29 卷, 第 3 期, 第 442-445 页, ISSN 1673-4254	1
X	熊欣 等, 胃癌相关 MicroRNA 的研究, 现代生物医学进展, 1 月 2009, 第 9 卷, 第 2 期, 第 395-396 页和第 400 页, ISSN 1673-6273	1
A	CN 1733808 A (华中科技大学同济医学院附属协和医院) 15.2 月 2006 (15.02.2006) 权利要求 1-4	1-5

☐ 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

16.02 月 2013 (16.02.2013)

国际检索报告邮寄日期

21.3 月 2013 (21.03.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

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

卞志家

电话号码: (86-10) **62413724**

关于同族专利的信息

PCT/CN2012/076983

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2009 年 7 月)

续：A. 主题的分类

A61K 36/35 (2006.01) i

A61K 133/00 (2006.01) i

A61P 31/14 (2006.01) i