

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号
WO 2018/176330 A1

(43) 国际公布日
2018年10月4日 (04.10.2018)

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 13/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/078815

(22) 国际申请日: 2017年3月30日 (30.03.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710219899.X 2017年3月29日 (29.03.2017) CN

(71) 申请人: 中国医学科学院基础医学研究所
(INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。

(72) 发明人: 蒋澄宇 (JIANG, Chengyu); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 杜

润超 (DU, Jianchao); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 梁竹 (LIANG, Zhu); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 许剑涛 (XU, Jiantao); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。 赵妍 (ZHAO, Yan); 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。

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

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

(54) Title: MICRORNA AND USES THEREOF IN PREVENTION AND/OR TREATMENT OF FIBROPLASIA MEDICAL SIGN AND/OR SYNDROME

(54) 发明名称: 小RNA及其用于预防和/或治疗纤维增生性病症和/或综合征

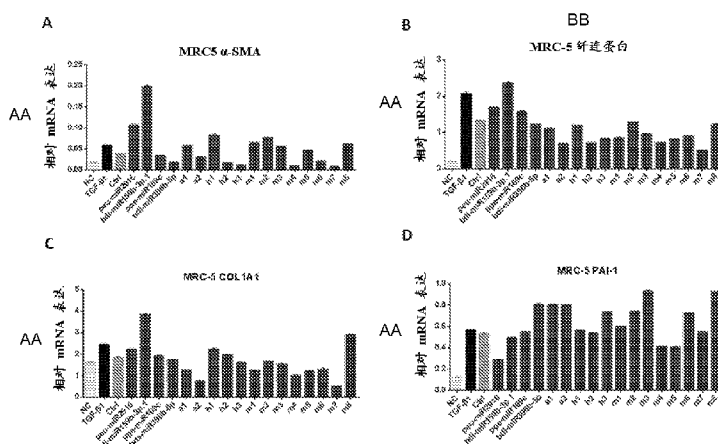


图 1

AA Relative mRNA expression
BB MRC-5 fibronectin

(57) Abstract: Provided are microRNA from a rhodiola root and uses thereof in the prevention and/or the treatment of a fibroplasia medical sign and/or syndrome.

(57) 摘要: 提供了红景天来源的小RNA以及其在用于预防与治疗纤维增生性病症和/或综合征的用途。



WO 2018/176330 A1

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))。

小RNA及其用于预防和/或治疗纤维增生性病症和/或综合征

交叉引用

本申请要求于2017年3月29日提交至中国专利局的发明名称为“小RNA及其用于预防和/或治疗纤维增生性病症和/或综合征”的中国专利申请（申请号尚未收到）的优先权，其全部内容在此通过引用并入本申请中。

技术领域

本发明涉及红景天来源的小RNA，还涉及其用于预防与治疗纤维增生性病症和/或综合征的用途。

背景技术

纤维化是以成纤维细胞增殖及大量细胞外基质聚集并伴炎症损伤、组织结构破坏为特征的一大类疾病的终末期改变，也就是正常的组织被损坏后经过异常修复导致结构异常。肺纤维化疾病是由于有毒物质、自发免疫疾病、药物副作用、感染、严重外伤等多种不同原因引起的肺部炎症，肺泡持续性损伤、细胞外基质反复破坏、修复、重建并过度沉积，导致正常肺组织结构改变、功能丧失的一类疾病。目前，纤维化（包括肺纤维化）仍然没有针对性的、安全有效的治疗方案。

绝大部分肺纤维化病人病因不明（特发性肺纤维化），这组疾病称为特发性间质性肺炎（IIP），是间质性肺病中一大类。肺纤维化严重影响人体呼吸功能，表现为干咳、进行性呼吸困难（自觉气不够用），且随着病情和肺部损伤的加重，患者呼吸功能不断恶化。特发性肺纤维化发病率和死亡率逐年增加，诊断后的平均生存期仅2.8年。

肺纤维化患者肺部肺泡逐渐被纤维性物质取代，导致肺组织变硬变厚，肺脏气体交换能力逐步丧失，导致患者不同程度缺氧而出现呼吸困难，最后因呼吸衰竭而死亡。肺纤维化是呼吸病四大病种之一，病因复杂，发病机制不明，目前已有的治疗肺纤维化的药物和方法十分有限，且疗效差强人意，预后极差，5年生存率仅为50%。

目前肺纤维化的治疗以糖皮质激素、免疫抑制剂为主，如泼尼松、环磷酰胺、秋水仙碱等。近年来的临床实践已经证实，使用糖皮质激素、抗生素及免疫抑制剂对抗器官纤维化虽可减轻肺泡早期炎症，减轻患者临床症状，

但是并不能抑制纤维化的发展，长期大剂量使用激素、抗生素不仅带来了严重的并发症，还会加剧纤维化进程。其它治疗方法包括氧气给予，仅仅起到缓解作用，并不能从根本上解决问题；另外在极端情况下的肺移植也受到诸多应用条件的限制，尤其是在末期肺病患者中十分有限的移植成功率。

由于病因和发病机理不清，纤维化的治疗一直是医学领域的难题之一，虽然不断地研发新药，但仍然没有令人满意的治疗或预防药物和有效治疗方案。

因此，当前仍然十分需要有效的治疗或预防纤维化的药物。

发明概述

发明人意外发现，红景天来源的一些 sRNA 能够在细胞模型上有效地显著抑制纤维化相关基因表达，和/或在动物模型上有效缓解小鼠肺纤维化。基于此完成了本发明。

在一个方面，本发明提供一种多核苷酸，其包含：

- A) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 和 17 中任一项所示的序列，或其互补序列；
- B) 与 A) 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97% 或 98% 同一性的序列，其具有用于预防/治疗纤维化的能力；
- C) 在严格条件下与 A) 所示序列杂交的序列，其具有用于预防/治疗纤维化的能力；
- D) 由 A) 所示序列经添加、缺失、替换一个或多个核苷酸得到的序列，其具有用于预防/治疗纤维化的能力；或
- E) 由 A)、B)、C) 或 D) 所示序列的前体或经修饰变体，其具有用于预防/治疗纤维化的能力。

在另一方面，本发明提供一种核酸载体，其包含或表达以上第一个方面所述的多核苷酸。

在第三个方面，本发明提供一种药物组合物，其包含本发明第一个方面所述的多核苷酸或者第二个方面所述的核酸载体。

在第四个方面，本发明提供一种预防和/或治疗纤维增生性疾病和/或综合

征的方法，其包括向有此需要的对象施用本发明第一方面所述的多核苷酸、第二方面所述的载体、第三个方面所述的药物组合物、和/或内源性激发体内产生本发明所述多核苷酸的激发剂。在一个实施方案中，所述方法通过内源性激发体内产生本发明第一方面所述的多核苷酸。相应地，本发明还提供用于上述用途的多核苷酸、载体、药物组合物以及内源性激发剂，以及它们用于制备用于预防和/或治疗纤维增生性疾病和/或综合征的药物的用途。

此外，相应地在第五个方面，本发明还提供内源性激发体内产生本发明所述多核苷酸的激发剂。

在第六个方面，本发明提供制备本发明第一方面所述多核苷酸的方法，其包括：合成和/或从核酸载体上表达本发明所述的多核苷酸，和/或内源性激发有此能力的细胞表达本发明的多核苷酸。

通过以上任一个方面，本发明至少能够实现以下至少一个方面的效果：有效抑制一个或更多个纤维化相关基因在 mRNA 和/或蛋白质水平的表达；和/或有效预防和/或治疗纤维增生性疾病和/或综合征；和/或提供能够实现以上一种或更多种效果的多核苷酸。

附图说明

图 1 和图 2 显示出红景天来源的 sRNA (HJT sRNA) 在 TGF- β 1 刺激的 MRC-5 纤维化细胞模型中对 α -SMA、纤连蛋白、COL1A1 和 PAI-1 四个纤维化相关基因的 mRNA 表达水平的筛选结果。图 1 和图 2 分别示出了提前 48h 转染 NC sRNA 和 HJT sRNA，TGF- β 1 刺激 MRC-5 48h 后检测相关指标（预防组）和 TGF- β 1 刺激 MRC-5 3h 后转染 NC sRNA 和 HJT sRNA，TGF- β 1 刺激后 72h 检测相关指标（治疗组）两组实验的结果。

图 3 至图 6 显示出在 TGF- β 1 刺激的 MRC-5 纤维化细胞模型中，选定的四种红景天 sRNA 均可有效降低 α -SMA、纤连蛋白、COL1A1、PAI-1、TGF- β 及 SMAD4 的 mRNA 表达水平。具体地，图 3 至图 6 依次显示出 HJT-sRNA-m7、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3 和 ppe-miR-169c 在 MRC-5 纤维化细胞模型中的抗纤维化作用。

图 7 至图 9 显示出在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中，选定的四种红景天 sRNA 均可有效降低小鼠死亡率，显著减缓小鼠体重下降的趋势，缓解小鼠肺纤维化症状的结果。

具体地，图 7 表明 HJT-sRNA-a2 有效降低博来霉素导致的小鼠死亡率，

同时减缓小鼠体重的下降情况 (图 7A); HJT-sRNA-h3 有效降低博来霉素导致的小鼠死亡率, 同时减缓小鼠体重的下降情况 (图 7B); ppe-miR-169c 有效降低博来霉素导致的小鼠死亡率, 同时减缓小鼠体重的下降情况 (图 7C)。

图 8 表明 HJT-sRNA-m7 在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中的作用。

图 9 表明在博来霉素导致的肺纤维化小鼠模型中, HJT-sRNA-m7 有效缓解肺组织纤维化症状, 降低胶原、纤连蛋白及 α -SMA 表达。具体地, 图 9A 表示鼠右肺中羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g}/\text{右肺}$); 图 9B 表示小鼠肺组织苏木精-伊红染色 (H&E 染色); 图 9C 表示马松染色、 α -SMA、纤连蛋白 (fibronectin) 和 COL3A1 的免疫组织化学结果; 图 9D 表示与图 9C 相对应的病理统计结果。

图 10 至图 12 表示荧光素酶报告基因实验的结果。具体地, 图 10 显示出荧光素酶报告基因实验验证 HJT-sRNA-m7 的靶基因; 图 11 显示出荧光素酶报告基因实验验证 HJT-sRNA-a2 的靶基因; 图 12 显示出荧光素酶报告基因实验验证 HJT-sRNA-h3 的靶基因。

图 13 至 14 显示出红景天来源的 sRNA (HJT sRNA) 在 TGF- β 1 刺激的 MRC-5 纤维化细胞模型中对 α -SMA、纤连蛋白两个纤维化相关基因的蛋白表达水平的筛选结果。

具体实施方式

下面对本发明作进一步的说明, 但不以任何方式对本发明加以限制, 基于本发明教导所作的任何变换, 均落入本发明的保护范围。

通常, 人们把 siRNA, miRNA 及其它非编码小 RNA 不加区分地称之为小 RNA (sRNA)。除非特别指明, 在本文中, 术语“小 RNA (sRNA)”是指包括 siRNA 和 miRNA 在内的各种非编码小 RNA。

在本文中, 小 RNA 可以是非天然的, 例如是合成的或者由人工载体表达的。术语“非天然的”是指目标物质不是自然界天然存在的, 这并不排除所述非天然物质与天然存在的物质具有相同的结构和/或组成。

术语“纤维化”是指组织/器官内纤维结缔组织增多、实质细胞减少的过程和状态, 其可发生于多种组织/器官, 持续进展可致器官结构破坏和功能减退, 乃至衰竭, 严重威胁人类健康和生命。

术语“用于预防/治疗纤维化的能力”表示目标物质自身能够预防/治疗纤维化, 或者可以以其为基础产生能够预防/治疗纤维化的物质。也就是说, 这

种能力不需要由所述目标物质自身直接实现，而可以是该目标物质所产生后果的进一步应用。

术语“抑制”是指经由特定处理使目标活性至少一部分地降低或者完全消除。

术语“包括”、“包含”、“含有”是指，除了列出的特征要素以外，还可以有其他附加的特征要素。特别地，也可以仅由所列出的特征要素组成。

在一个方面中，本发明提供一种多核苷酸，其包含：

A) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 和 17 中任一项所示的序列，或其互补序列；

B) 与 A) 所示序列具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的序列，其具有用于预防/治疗纤维化的能力；

C) 在严格条件下与 A) 所示序列杂交的序列，其具有用于预防/治疗纤维化的能力；

D) 由 A) 所示序列经添加、缺失、替换一个或多个核苷酸得到的序列，其具有用于预防/治疗纤维化的能力；或

E) 由 A)、B)、C) 或 D) 所示序列的前体或经修饰变体，其具有用于预防/治疗纤维化的能力。

在一个实施方案中，对于本发明的多核苷酸，其中 A) 所示序列选自 SEQ ID NO: 3、10、13 和 16。

在另一个实施方案中，所述多核苷酸是 DNA 或 RNA，例如是 RNA，优选地是小 RNA。具体地，所述多核苷酸长度为 10-50 个核苷酸，12-40 个核苷酸，例如 16-35 或 18-30 个核苷酸；更具体地，上述多核苷酸长度为 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、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 或 50 个核苷酸。

在一个具体实施方案中，所述多核苷酸是单链或双链，优选地是单链。在另一个具体实施方案中，所述多核苷酸是非天然的，例如是合成的或由人工载体表达的。

在第二方面，本发明提供一种核酸载体，其包含或表达以上第一个方面所述的多核苷酸。例如，具体地，所述核酸载体可以是DNA，但表达的多核苷酸可以是RNA，例如sRNA。

在第三个方面，本发明提供一种药物组合物，其包含第一方面中所述的多核苷酸或者第二方面中所述的核酸载体。

在一个实施方案中，所述药物组合物还包含另外的抗纤维化剂。具体地，所述另外的抗纤维化剂可以选自以下的任何一种或更多种：糖皮质激素如醋酸可的松、氢化可的松、氢化泼尼松、地塞米松、倍他米松、曲安西龙、曲安奈德、倍氯米松；免疫抑制剂如环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤；抗氧化剂如富露施、羧甲司坦；抗凝剂如低分子肝素；以及秋水仙碱、干扰素、ACEI和他汀类药物。

在第四方面中，本发明提供一种预防和/或治疗纤维增生性疾病和/或综合征的方法，其包括向有此需要的对象施用本发明第一方面所述的多核苷酸、第二方面所述的载体、第三个方面所述的药物组合物、和/或内源性激发体内产生本发明所述多核苷酸的激发剂。在一个实施方案中，所述方法通过内源性激发体内产生本发明第一方面所述的多核苷酸。相应地，本发明还提供用于第四方面用途的多核苷酸、载体、药物组合物以及内源性激发剂，以及它们用于制备用于预防和/或治疗纤维增生性疾病和/或综合征的药物的用途。

在一个实施方案中，可以将本发明的多核苷酸、载体、药物/化妆品组合物配制成供非侵入式施用（如表面施用）和/或注射施用，例如配制成供经消化道、经呼吸道和/或注射施用，例如口服、吸入和/或注射施用。在一些情况下，优选使用侵入式施用途径（如注射施用，包括肌肉注射、皮下注射、静脉注射、动脉注射、腹腔注射、目标组织内注射）；而在另一些情况下，则优选使用非侵入式施用途径。

在另一个实施方案中，所述纤维增生性疾病和/或综合征选自：肺、心血管系统、肝、胰腺、肾、脾、眼、神经系统、骨髓和皮肤的纤维增生性疾病和/或综合征。

在一个具体实施方案中，所述纤维增生性疾病和/或综合征选自：

无机粉尘职业病，包括矽肺、石棉肺和煤肺；有机粉尘和过敏性肺炎，包括农民肺、空调湿化器肺、饲鸽者肺和蔗渣尘肺；与药物/治疗相关的疾病，所述药物选自：抗生素类、非甾体抗炎制剂、心血管药、抗肿瘤药、口服降

糖药和吗啡类；感染性疾病，包括肺结核、病毒性肺炎和肺囊虫感染；继发性肺疾病，包括与心力衰竭、先天性心脏病、成人呼吸窘迫综合症、慢性心功能不全、移植排斥反应相关的肺部疾病；肺原发性疾病，包括特发性间质性肺炎、闭塞性细支气管炎伴机化性肺炎和肺淋巴管平滑肌瘤；胶原血管病相关的肺部疾病，包括与系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、进行性系统硬化症、多肌炎、皮肌炎、混合型结缔组织病相关的肺部疾病；肺泡充填性疾病，包括弥漫性肺泡出血综合征、肺泡蛋白沉积症、嗜酸粒细胞性肺炎、肺血管炎、淋巴细胞间质性肺炎、坏死性结节性肉芽肿、家族性肺纤维化；

缺血性心脏疾病，包括心肌梗死后的替代性和间质性纤维化；高血压性心脏病；炎症性心肌病，包括病毒性心肌炎；代谢性心肌病，包括血色病性心肌病、淀粉样变心肌病、糖原累积性心肌病和糖尿病性心肌病；克山病；扩张性心肌病；肥厚性心肌病、限制性心肌病；致心律失常性右室心肌病；

病毒性肝硬化，包括乙、丙和丁型病毒性肝炎；血吸虫性肝硬化；酒精性肝硬化；胆汁性肝硬化，包括原发性胆汁性肝硬化、继发胆结石、门管周围炎；代谢性肝硬化，包括肝豆状核变性、血色病；中毒性肝硬化，包括有机磷中毒、四氯化碳中毒、肝毒性药物如异烟肼、四环素、氯丙嗪中毒；营养不良性肝硬化；心源性肝硬化，包括慢性充血性心力衰竭；

急性胰腺炎；胰管梗阻；慢性酒精中毒；Oddi括约肌功能失调；胰腺缺血；

血管性肾脏纤维增生性疾病和/或综合征，包括高血压；免疫性肾脏纤维增生性疾病和/或综合征，包括肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、肾移植排斥；感染性肾脏纤维增生性疾病和/或综合征，包括肾盂肾炎、肾结石；代谢性肾脏纤维增生性疾病和/或综合征，包括高血脂、糖尿病、高尿酸尿症、高钙尿症；

脾纤维增生疾病；

眼睛外伤和手术后眼睛纤维增生性疾病和/或综合征，糖尿病视网膜纤维增生；

脊髓外伤后纤维增生性疾病和/或综合征、脑卒中瘢痕形成、老年痴呆症；

特发性和药物引起的骨髓纤维化、真性红细胞增多症、慢性髓细胞性白血病和何杰金氏病；和

皮肤纤维增生性病症和/或综合征，包括口腔粘膜纤维化、疤痕、疙瘩和厚皮病。

在另一个实施方案中，所述方法还包括向有此需要的对象在时间和/或空间上分开地和/或一起地施用另外的抗纤维化剂。具体地，所述另外的抗纤维化剂可以选自以下的任何一种或更多种：糖皮质激素如醋酸可的松、氢化可的松、氢化泼尼松、地塞米松、倍他米松、曲安西龙、曲安奈德、倍氯米松；免疫抑制剂如环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤；抗氧化剂如富露施、羧甲司坦；抗凝剂如低分子肝素；以及秋水仙碱、干扰素、ACEI 和他汀类药物。

在另一个实施方案中，所述方法包括内源性激发体内产生本发明第一方面所述的多核苷酸。为此，本发明还提供内源性激发体内产生所述多核苷酸的激发剂。

在另一个方面，本发明提供一种嫩肤美容方法，其包括向有此需要的对象施用本发明所述的多核苷酸、载体、药物/化妆品组合物、和/或内源性激发体内产生本发明所述多核苷酸的激发剂。在一个实施方案中，通过非侵入式方式施用上述物质，例如表面施用。

在另一个方面，本发明提供制备第一方面中所述多核苷酸的方法，其包括：合成和/或从核酸载体上表达本发明第一方面所述的多核苷酸。

实施例

以下实施例结合附图仅为举例说明本文公开的发明，在任何情况下都不应解释为对所附权利要求保护范围的限制。

1. 实验相关方法和流程

1.1 红景天 RNA 的提取与纯化

新鲜红景天的小RNA提取根据miRNeasy Mini Kit (QIAGEN #217004)制造商说明书进行。

汤汁RNA的提取：

(1) 红景天汤汁200 μ l，加入1ml CTAB裂解液，再加入20 μ l β -巯基乙醇，剧烈震荡。

(2) 65 $^{\circ}$ C，30min，期间要不停振荡涡旋。

- (3) 12,000rpm, 4 °C, 离心7min后, 取800 μ l上清, 加入380 μ l乙醇, 混匀。
- (4) 4 °C, 放置20min。
- (5) 12,000rpm, 4 °C, 离心15min, 取800 μ l上清, 加入0.8倍体积的氯仿, 剧烈混匀。
- (6) 放置10min, 12,000rpm, 4 °C, 离心15min。
- (7) 取600 μ l上清, 加入600 μ l预冷的异丙醇, 混匀后-20 °C放置20min。
- (8) 12,000rpm, 4 °C, 离心10min, 弃上清后75%乙醇洗涤沉淀2次。
- (9) 用DEPC处理过的H₂O溶解RNA。

1.2 人血、小鼠肺及细胞总 RNA 的提取及高通量测序

- (1) 向细胞中加入 TRIzol 裂解液, 室温放置 5 分钟, 使其充分裂解 (对于小鼠肺组织, 100mg 组织中加入 1.0ml TRIzol 裂解液, 用匀浆器研磨, 12,000rpm, 4 °C, 离心 10min, 去除未能匀浆充分的组织沉淀)。
- (2) 12,000rpm, 4 °C, 离心 5min, 弃沉淀。
- (3) 按 200 μ l/ml TRIzol 的比例加入氯仿, 充分振荡混匀, 室温放置 15min。
- (4) 12,000rpm, 4 °C, 离心 15min, 吸取上层水相, 至另一离心管中。
- (5) 重复步骤 4, 按上层水相加入等量的氯仿, 充分匀后室温放置 10min, 12,000rpm, 4 °C, 离心 15min。
- (6) 吸取上层水相至另一新 EP 管中, 按 0.5ml /ml TRIzol 加入异丙醇混匀, 室温放置 5-10min。
- (7) 12,000rpm, 4 °C, 离心 10min, 弃上清。
- (8) 加入 1 ml 75%乙醇, 温和振荡离心管, 悬浮沉淀。
- (9) 8000g, 4 °C, 离心 5min, 尽量弃上清。
- (10) 室温晾干 5-10min, 用 50 μ l DEPC 处理过的 H₂O 溶解 RNA 样品。

1.3 RT-qPCR 检测

1) 将 sRNA 逆转录为 cDNA: 通过逆转录试剂盒 (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems, cat. no. 4368813), 用茎环法 (Stem-loop 法) 将 sRNA 逆转录为 cDNA, 逆转录体系如下: 模板 RNA (150 ng/ μ l) 10 μ l, 10X RT Buffer 2.0 μ l, 25X dNTP Mix (100 mM) 0.8 μ l, U6 RT 引

物 (10 μ M) 2.0 μ l, HJT-sRNA-m7 RT 引物 (10 μ M) 2.0 μ l, MultiScribe™ 逆转录酶 1.0 μ l, RNase 抑制剂 1.0 μ l, Nuclease-free H₂O 1.2 μ l, 瞬时离心后, 放入 PCR 仪反应, 反应条件如下: (1) 25 $^{\circ}$ C, 10 min; (2) 37 $^{\circ}$ C, 120 min; (3) 85 $^{\circ}$ C, 5 min; (4) 4 $^{\circ}$ C, 终止反应。反应结束后加入 20 μ l RNase Free dH₂O, 补足终体积至 40 μ l。所用引物序列如下:

人 U6 RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATATG;

HJT-sRNA-m7 RT: GTCGTATCCAGTGCACGCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTTACAA.

2) 定量 PCR 扩增反应: qPCR 反应体系总体积 10 μ l, 包括: 5 μ L 2 \times SYBR Green Master Mix, 0.5 μ l 正向引物 (10 μ M), 0.5 μ l 反向引物 (10 μ M), 1 μ l 逆转录得到的 cDNA, 3 μ l RNase Free dH₂O。使用 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪, PCR 反应条件是: 95 $^{\circ}$ C, 持续 5min 预变性, 开始进入 PCR 扩增循环: (1) 95 $^{\circ}$ C, 10s; (2) 55 $^{\circ}$ C, 10s; (3) 72 $^{\circ}$ C, 20s; 总共进行 40 个循环; 最后 40 $^{\circ}$ C 持续 10s 降温。扩增反应正向引物和反向引物均由北京擎科新业生物技术有限公司设计和合成。所用引物序列如下:

人 U6 F: GCGCGTCGTGAAGCGTTC;

人 U6 R: GTGCAGGGTCCGAGGT;

HJT-sRNA-m7 F: TCGCGCTGAGGTAGTAGGTT;

HJT-sRNA-m7 R: GTGCACGCTCCGAGGT.

3) 利用 2- Δ Ct 法计算相对表达量。

1.4 蛋白样品的收集与 BCA 法浓度测定

(1) 弃去培养基, PBS 缓冲液清洗两遍, 加入适量预冷的 RIPA 裂解液, 将细胞用枪头刮下并转移到离心管中, 置冰上裂解 20min。

(2) 将 BCA 试剂 A 与 B (50:1, v/v) 充分混匀, 配制 BCA 工作液。

(3) 分别取 25 μ l 新鲜配制的 BSA 标准液和待测样品, 加入到 96 孔板中, 每孔中加入 200 μ l BCA 工作液, 并充分混匀。

(4) 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后冷却至室温或室温放置 2 h。

(5) 用紫外分光光度计 (Synergy 4 多功能酶标仪) 于 562 nm 处检测其吸光度, 根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。

(6) 用 RIPA 裂解液调节样品浓度, 使各样品浓度一致。

1.5 蛋白免疫印迹法检测 (Western blot)

(1) 制胶: 采用 10% 浓度分离胶 (下层胶) 和 5% 浓度的浓缩胶 (上层胶), 15 孔梳子所做泳道, 每个泳道样品蛋白上样量相等。

(2) 样品处理: 将样品加入到等体积的 $2 \times$ loading beffer 中, 97°C 金属浴 10 分钟后置于冰上待用。

(3) 蛋白电泳: 加入电泳缓冲液, 电泳起始电压 80V; 当溴酚兰染料到分离胶后, 提高电压至 120V 继续电泳, 直至溴酚兰染料达到分离胶底部或全部泳出凝胶。

(4) 湿法转膜: 按照 (负极) 海绵—滤纸—凝胶—PVDF 膜—滤纸—海绵 (正极) 的顺序进行组装; 按照说明书进行安装, 并将整个转膜装置置于 4°C 冷室; 恒定电流 300 mA, 转膜 120 min。

(5) 封闭: 转膜结束后置于 3%BSA 封闭液中, 室温封闭 1 h。

(6) 一抗孵育: 将封闭后的 PVDF 膜转移至塑料袋中, 加入含有一抗的 3%BSA 封闭液 (一抗浓度根据抗体说明而定), 赶出袋中气泡, 密封后 4°C 过夜孵育。

(7) 洗膜: 将 PVDF 膜取出, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。

(8) 二抗孵育: 弃去 TBST, 加入含有二抗的 3%BSA 封闭液, 室温孵育 2 小时。

(9) 洗膜: 将 PVDF 膜取出, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。

(10) 显影: 配制 Western 显色液, 并将配制好的显色液均匀滴加于膜结合蛋白的一侧; 用保鲜膜小心的将膜包好, 置于 X 射线摄影暗匣中压片 10—20min, 最后加显影液、定影液作用后观察。

(11) 扫描与分析: 将负片用 Quantity One 进行分析和处理, Image J 进行灰度值分析。

1.6 博来霉素导致小鼠肺纤维化模型建立

选取 6-8 周龄, 体重为 20-25g 的雄性 C57BL/6 小鼠, 麻醉状态下经支气

管灌注 100 μ L 生理盐水配制的博来霉素溶液 (3.5U/kg), 对照组给 100 μ L 生理盐水, 每天记录小鼠体重及死亡率, 第 21d 时处理小鼠。取右肺用于羟脯氨酸的测定, 左肺经 4%多聚甲醛内固定后石蜡包埋、切片进行苏木精-伊红染色 (H&E 染色)、马松三色法染色和免疫组化检测。组织病理切片和纤维化指标的结果相结合评价博来霉素致小鼠肺纤维化模型构建是否成功。

1.7 荧光素酶报告基因检测靶基因

实验材料

人胚胎肾细胞 293T; DMEM 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 加入 10% (v/v) 胎牛血清 (FBS); 青霉素 (100U/ml) 与链霉素 (100mg/ml); 转染试剂: RNAiMax (Invitrogen) 和脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen); 双荧光素酶报告基因系统: psiCHECK2 (Promega C2081)

实验方法

(1) 含有 10%FBS 的 DMEM 培养基培养的 293T 细胞, 分至 48 孔板中, 每孔约为 3×10^4 个细胞, 贴壁后用 RNAiMax(Invitrogen)转染 100nM 的 NC sRNA/sRNA。

(2) 24h 后, 用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)转染 psiCHECK2-3'-UTR 或 psiCHECK2-3'-mUTR 的质粒。

(3) 转染质粒后 8h、14h 或 24h 后按照 Dual-luciferase Assay System (Promega E1910)的手册中使用方法检测其荧光强度。

2. 试验实施例

2.1 鉴定红景天来源的 sRNA

参照以上 1.1 项, 利用试剂盒和改进的 CTAB 裂解法, 分别从新鲜的红景天和红景天中药饮片煎煮的汤剂中提取出 RNA, 琼脂糖凝胶电泳显示, RNA 片段为 ~ 20 nt 的小 RNA 片段 (small RNA, sRNA)。接下来的试验中, 分别对连续饮用红景天汤剂七天后 0h 和 24h 的人的全血, 连续三天灌胃给红景天来源的 RNA 后 12h、24h 和 48h 后小鼠的肺组织, 以及加入红景天来源的 RNA 后 24h 的 A549 细胞进行高通量测序 (SE36, Illumina HiSeq2500)。通过生物信息学方法, 根据以下条件找出进入小鼠肺、人血或者 A549 细胞的小 RNA 片段: (1) 存在于人血、小鼠肺组织或者 A549 细胞的红景天来源小 RNA; (2)

不能与人或者小鼠基因组比对上的红景天来源小 RNA。通过上述方法,发明人意外地发现 3 条进入人血的红景天来源小 RNA (见表 1), 并根据其在人血中的相对丰度排序, 依次命名为 HJT-sRNA-h1~3; 8 条进入小鼠肺组织的红景天来源小 RNA (见表 2), 并根据其在小鼠肺组织中的相对丰度排序, 依次命名为 HJT-sRNA-m1~8; 2 条进入 A549 细胞的红景天来源小 RNA, 并根据其在 A549 细胞中的相对丰度排序, 依次命名为 HJT-sRNA-a1~2 (见表 3)。此外, 发明人还筛选出红景天中可与 miRbase 数据库比对上的 4 条小 RNA 进行后续实验 (见表 4)。

表 1 人血中红景天来源 sRNA 序列及命名

SEQ ID NO	名称	序列	长度
1	HJT-sRNA-h1	AUCCCCACUGCUAAAUUUGACU	22
2	HJT-sRNA-h2	GCUGGCCCGAUGGUAGUGGGUUAUC	25
3	HJT-sRNA-h3	UGGGGCUACGCCUGUCUGAGCGUCGCU	27

表 2 小鼠肺中红景天来源 sRNA 序列及命名

SEQ ID NO	名称	序列	长度
4	HJT-sRNA-m1	UGUCUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	26
5	HJT-sRNA-m2	GCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	23
6	HJT-sRNA-m3	GUUAUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	26
7	HJT-sRNA-m4	UCUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUAU	26
8	HJT-sRNA-m5	GUAUGUAAACAUCCUCGACUGGAAGCU	27
9	HJT-sRNA-m6	GUUAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGU	25
10	HJT-sRNA-m7	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUUGUAAGC	28
11	HJT-sRNA-m8	GACGGUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGA	28

表 3 A549 细胞中红景天来源 sRNA 序列及命名

SEQ ID NO	名称	序列	长度
12	HJT-sRNA-a1	UAGCACCAUUGAAAUCAGU	19

13

HJT-sRNA-a2 UAGCACCAUCCGAAAUCGGUA 21

表 4 红景天来源可比对上 miRbase 数据库的 sRNA 序列及命名

SEQ ID NO	名称	序列	长度
14	peu-miR2916	UGGGGACUCGAAGACGAUCAUUAU	23
15	bdi-miR159b-3p.1	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUG	21
16	ppe-miR169c	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG	21
17	bdi-miR396b-5p	UCCACAGGCUUUCUUGAACUG	21

2.2 sRNA 的抗纤维化活性

2.2.1 在 TGF- β 1 刺激的 MRC-5 纤维化细胞模型中筛选并验证红景天来源的 sRNA

TGF- β 1 3ng/ml 刺激 MRC-5 细胞 48h (图 1) 或 72h (图 2 至 6) 后, 收取 RNA 样品, 用 RT-PCR 方法检测纤维化相关的基因 α -SMA、纤连蛋白 (Fibronectin)、COL1A1、PAI-1、SMAD4 和 TGF- β 的 mRNA 相对表达。

α -SMA、纤连蛋白 (Fibronectin)、COL1A1 和 PAI-1 是四个纤维化相关基因。用红景天来源的 sRNA 处理经 TGF- β 1 刺激的 MRC-5 纤维化细胞模型, 检测上述四个纤维化相关基因的 mRNA 水平的表达, 从而对进入人血、小鼠肺和 A549 细胞的小 RNA 进行抗纤维化功能试验的筛选。结果如图 1 和 2 所示, 在预防和治疗的两组试验中, 多种红景天来源的 sRNA 均能够抑制 MRC-5 细胞中纤维化相关基因在 mRNA 水平的表达。

选择 HJT-sRNA-m7、HJT-sRNA-h3、HJT-sRNA-a2 以及 ppe-miR169c 四种 sRNA 序列进行后续验证实验, 提前 24h 转染 NC sRNA 和 HJT sRNA, TGF- β 1 刺激 MRC-5 72h 后检测相关指标。分别如图 3-6 所示, 在 TGF- β 1 刺激的 MRC-5 纤维化细胞模型中, 上述四种 sRNA 均能有效降低 α -SMA、纤连蛋白、COL1A1、PAI-1、TGF- β 及 SMAD4 的 mRNA 表达水平。

发明人筛选了红景天来源的 sRNA (HJT sRNA) 在 TGF- β 1 刺激的 MRC-5 纤维化细胞模型中对 α -SMA、纤连蛋白两个纤维化相关基因的蛋白质表达水平。图 13 和图 14 分别示出了提前 24h 转染 NC sRNA 和 HJT sRNA, TGF- β 1 刺激 MRC-5 72h 后检测相关指标 (预防组) 实验的结果。如图 13 和图 14 所

示,多种红景天来源的 sRNA 均能够抑制 MRC-5 细胞中纤维化相关基因在蛋白质水平的表达。其中与 SEQ ID NO: 4、5、6、8、10 的 HJT sRNA 可以显著降低纤连蛋白的蛋白表达水平,与 SEQ ID NO: 3、5、6、8、10、16、17 对应的 HJT sRNA 可以降低 α -SMA 的蛋白表达水平。

2.2.2 红景天来源的 sRNA 在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中的作用

根据以上 1.6 项,在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中,测试上述四种红景天来源的 sRNA 对纤维化的作用。C57BL/6J 小鼠气管注射博来霉素(BLM, Nippon Kayaku, Tokyo, Japan)剂量是 3.5U/kg 同时以气管给入 NC sRNA、HJT-sRNA-m7、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3 和 ppe-miR-169c 的 agomir (苏州吉玛基因股份有限公司定制),剂量是 8mg/kg,用生理盐水稀释到 100 μ l 总体积。给博来霉素后第 7 天、第 13 天和第 16 天分别腹腔注射 NC sRNA、HJT-sRNA-m7、HJT-sRNA-a2、HJT-sRNA-h3 和 ppe-miR-169c 的 agomir,剂量是 4mg/kg。如图 7-9 所示,发明人发现,选定的四种红景天来源的 sRNA 均能令人惊奇地显著降低小鼠的死亡率,显著减缓小鼠体重下降的趋势,缓解小鼠的肺纤维化症状。

2.2.3 荧光素酶报告基因实验检测红景天来源的 sRNA 的抗纤维化靶标

根据以上 1.7 项,利用荧光素酶报告基因系统检测红景天来源的 sRNA 中细胞内的靶标基因。如图 10-12 所示,HJT-sRNA-m7 可通过直接靶向 α -SMA、纤连蛋白和 COL3A1 来发挥抗纤维化的功能;HJT-sRNA-a2 可通过直接靶向 COL1A1、COL3A1、TGF- β 和 SMAD4 来发挥抗纤维化的功能;HJT-sRNA-h3 可通过直接靶向 COL1A1 和 COL3A1 来发挥抗纤维化的功能。

权利要求

1. 一种多核苷酸，其包含：
 - A) 如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 和 17 中任一项所示的序列，或其互补序列；
 - B) 与 A) 所示序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%或 98%同一性的序列，其具有用于预防/治疗纤维化的能力；
 - C) 在严格条件下与 A) 所示序列杂交的序列，其具有用于预防/治疗纤维化的能力；
 - D) 由 A) 所示序列经添加、缺失、替换一个或多个核苷酸得到的序列，其具有用于预防/治疗纤维化的能力；或
 - E) 由 A)、B)、C) 或 D) 所示序列的前体或经修饰变体，其具有用于预防/治疗纤维化的能力。
2. 权利要求 1 所述的多核苷酸，其中 A) 所示序列选自 SEQ ID NO: 3、10、13 和 16。
3. 权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸，其是 DNA 或 RNA，例如是 RNA，优选地是小 RNA。
4. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的多核苷酸，其中所述多核苷酸长度为 12-40 个核苷酸，例如 16-35 或 18-30 个核苷酸。
5. 权利要求 1 至 4 中任一项所述的多核苷酸，其中所述多核苷酸是单链或双链，优选地是单链。
6. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的多核苷酸，其中所述多核苷酸是非天然的，例如是合成的或由人工载体表达的。
7. 一种核酸载体，其包含或表达权利要求 1 至 6 中任一项所述的多核苷酸。
8. 一种药物/化妆品组合物，其包含权利要求 1 至 6 中任一项所述的多核苷酸或者权利要求 7 所述的核酸载体。
9. 权利要求 8 所述的药物/化妆品组合物，其还包含另外的抗纤维化剂。

10. 一种预防和/或治疗纤维增生性疾病和/或综合征的方法，其包括向有此需要的对象施用权利要求 1 至 6 中任一项所述的多核苷酸、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 或 9 所述的药物组合物、和/或内源性激发体内产生权利要求 1 至 6 中任一项所述多核苷酸的激发剂。

11. 权利要求 10 所述的方法，其中所述纤维增生性疾病和/或综合征选自：肺、心血管系统、肝、胰腺、肾、脾、眼、神经系统、骨髓和皮肤的纤维增生性疾病和/或综合征。

12. 权利要求 10 或 11 所述的方法，其中所述纤维增生性疾病和/或综合征选自：

无机粉尘职业病，包括矽肺、石棉肺和煤肺；有机粉尘和过敏性肺炎，包括农民肺、空调湿化器肺、饲鸽者肺和蔗渣尘肺；与药物/治疗相关的疾病，所述药物选自：抗生素类、非甾体抗炎制剂、心血管药、抗肿瘤药、口服降糖药和吗啡类；感染性疾病，包括肺结核、病毒性肺炎和肺囊虫感染；继发性肺疾病，包括与心力衰竭、先天性心脏病、成人呼吸窘迫综合症、慢性心功能不全、移植排斥反应相关的肺部疾病；肺原发性疾病，包括特发性间质性肺炎、闭塞性细支气管炎伴机化性肺炎和肺淋巴管平滑肌瘤；胶原血管病相关的肺部疾病，包括与系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、进行性系统硬化症、多肌炎、皮炎、混合型结缔组织病相关的肺部疾病；肺泡充填性疾病，包括弥漫性肺泡出血综合征、肺泡蛋白沉积症、嗜酸粒细胞性肺炎、肺血管炎、淋巴细胞间质性肺炎、坏死性结节性肉芽肿、家族性肺纤维化；

缺血性心脏疾病，包括心肌梗死后的替代性和间质性纤维化；高血压性心脏病；炎症性心肌病，包括病毒性心肌炎；代谢性心肌病，包括血色病性心肌病、淀粉样变心肌病、糖原累积性心肌病和糖尿病性心肌病；克山病；扩张性心肌病；肥厚性心肌病、限制性心肌病；致心律失常性右室心肌病；

病毒性肝硬化，包括乙、丙和丁型病毒性肝炎；血吸虫性肝硬化；酒精性肝硬化；胆汁性肝硬化，包括原发性胆汁性肝硬化、继发胆结石、门管周围炎；代谢性肝硬化，包括肝豆状核变性、血色病；中毒性肝硬化，包括有机磷中毒、四氯化碳中毒、肝毒性药物如异烟肼、四环素、氯丙嗪中毒；营养不良性肝硬化；心源性肝硬化，包括慢性充血性心力衰竭；

急性胰腺炎；胰管梗阻；慢性酒精中毒；Oddi 括约肌功能失调；胰腺缺血；

血管性肾脏纤维增生性疾病和/或综合征，包括高血压；免疫性肾脏纤维增生性疾病和/或综合征，包括肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、肾移植排斥；感染性肾脏纤维增生性疾病和/或综合征，包括肾盂肾炎、肾结石；代谢性肾脏纤维增生性疾病和/或综合征，包括高血脂、糖尿病、高尿酸尿症、高钙尿症；

脾纤维增生疾病；

眼睛外伤和手术后眼睛纤维增生性疾病和/或综合征，糖尿病视网膜纤维增生；

脊髓外伤后纤维增生性疾病和/或综合征、脑卒中瘢痕形成、老年痴呆症；

特发性和药物引起的骨髓纤维化、真性红细胞增多症、慢性髓细胞性白血病和何杰金氏病；和

皮肤纤维增生性病征和/或综合征，包括粘膜纤维化、疤痕、疙瘩和厚皮病。

13. 权利要求 10 至 12 中任一项所述的方法，还包括向有此需要的对象时间和/或空间上分开地和/或一起地施用另外的抗纤维化剂。

14. 权利要求 13 所述的方法，其中所述另外的抗纤维化剂选自以下的任何一种或更多种：糖皮质激素如醋酸可的松、氢化可的松、氢化泼尼松、地塞米松、倍他米松、曲安西龙、曲安奈德、倍氯米松；免疫抑制剂如环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤；抗氧化剂如富露施、羧甲司坦；抗凝剂如低分子肝素；以及秋水仙碱、干扰素、ACEI 和他汀类药物。

15. 一种嫩肤美容方法，其包括向有此需要的对象施用权利要求 1 至 6 中任一项所述的多核苷酸、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 或 9 所述的药物/化妆品组合物、和/或内源性激发体内产生权利要求 1 至 6 中任一项所述多核苷酸的激发剂。

16. 权利要求 15 所述的美容方法，其中通过非侵入式方式施用，例如表面施用。

17. 内源性激发体内/细胞内产生权利要求 1-6 中任一项所述多核苷酸的激发剂。

18. 一种抑制一个或多个纤维化相关基因表达的方法，其包括使细胞接触。

19. 制备权利要求 1 至 6 中任一项所述多核苷酸的方法，其包括：合成和/或从核酸载体上表达权利要求 1 至 6 中任一项所述的多核苷酸，和/或内源性激发有此能力的细胞表达权利要求 1 至 6 中任一项所述的多核苷酸。

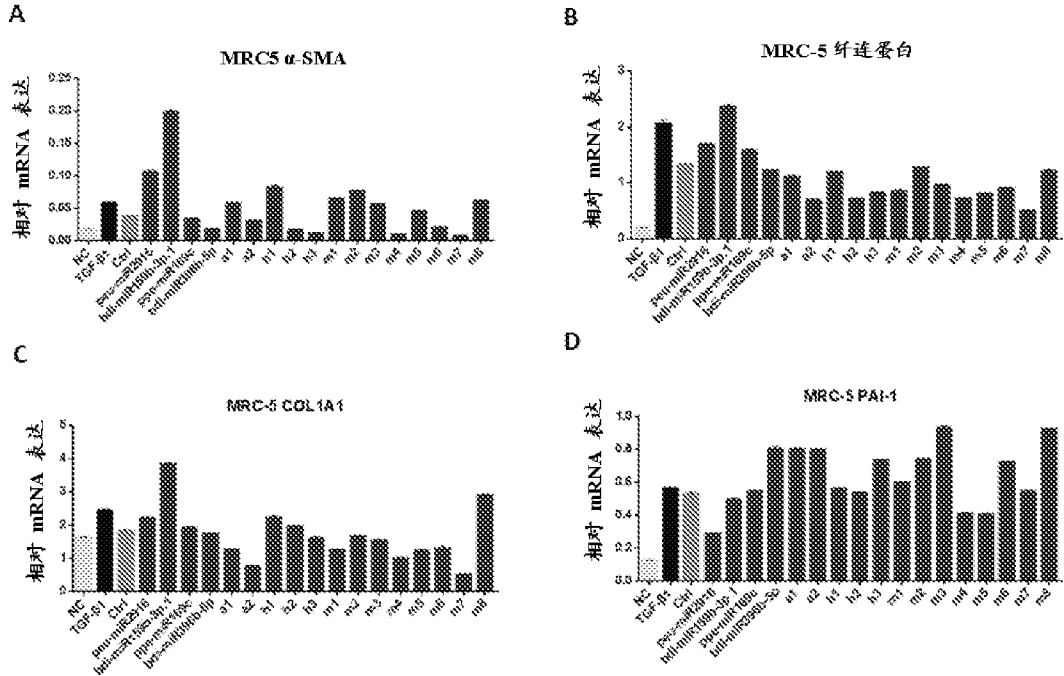


图 1

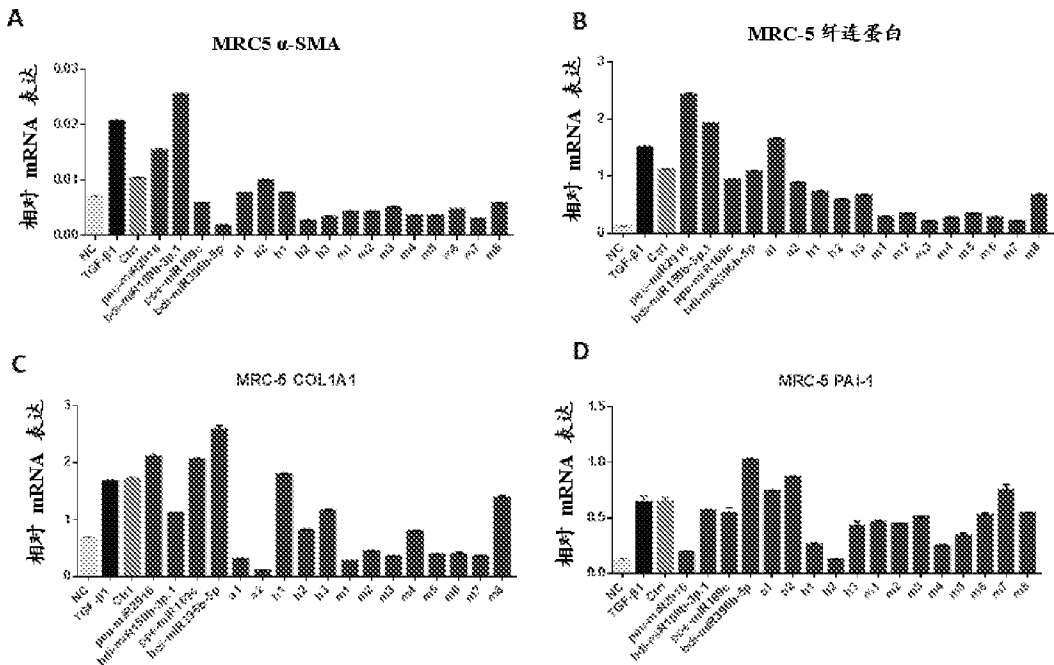


图 2

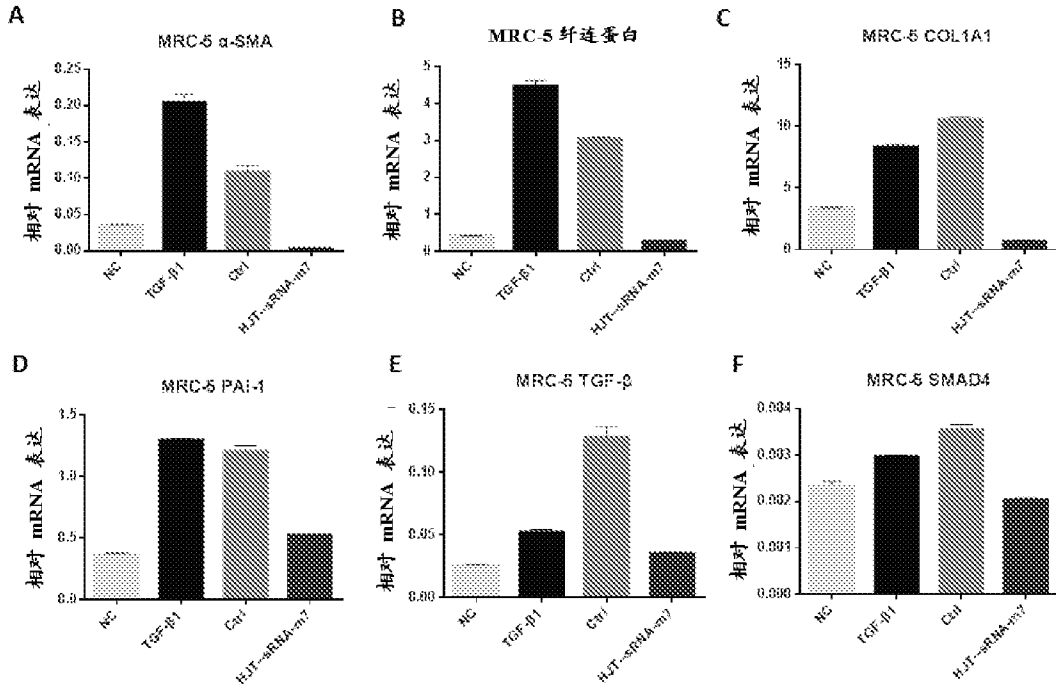


图 3

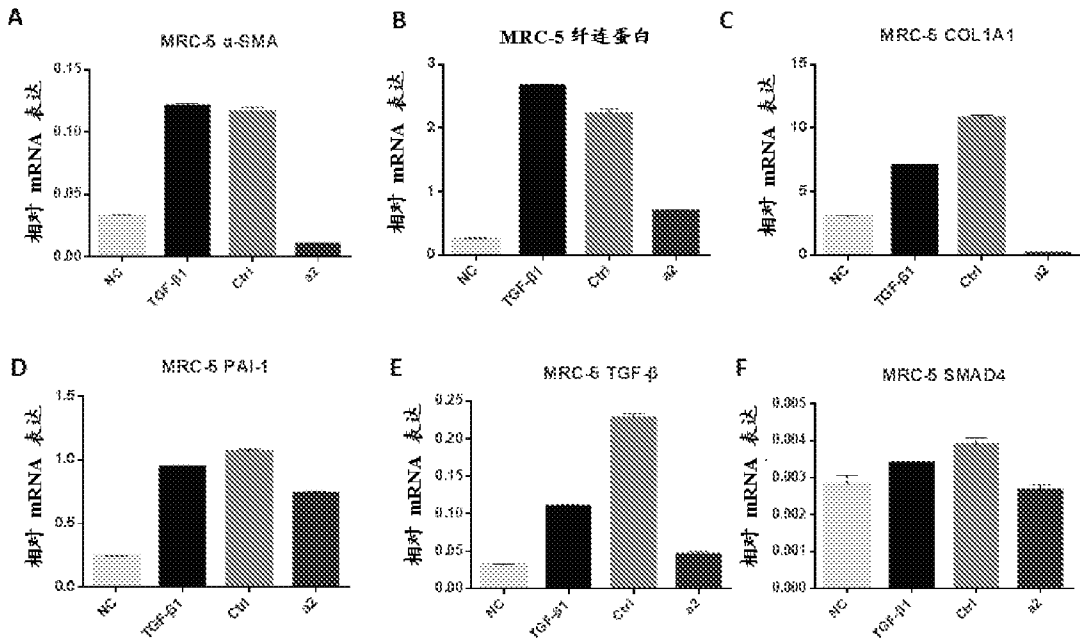


图 4

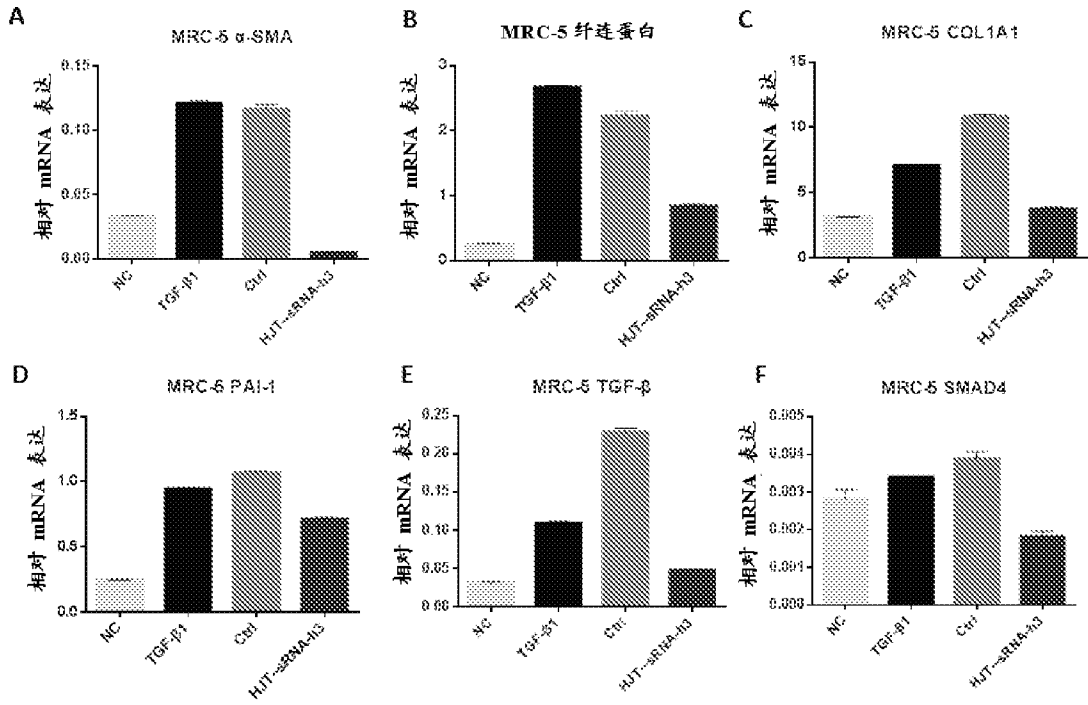


图 5

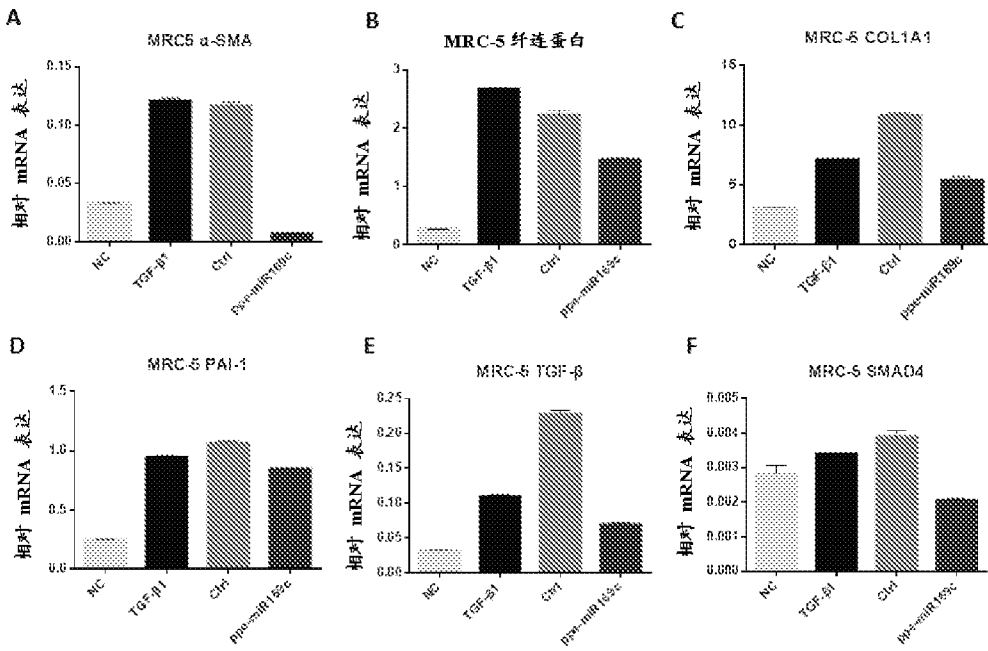


图 6

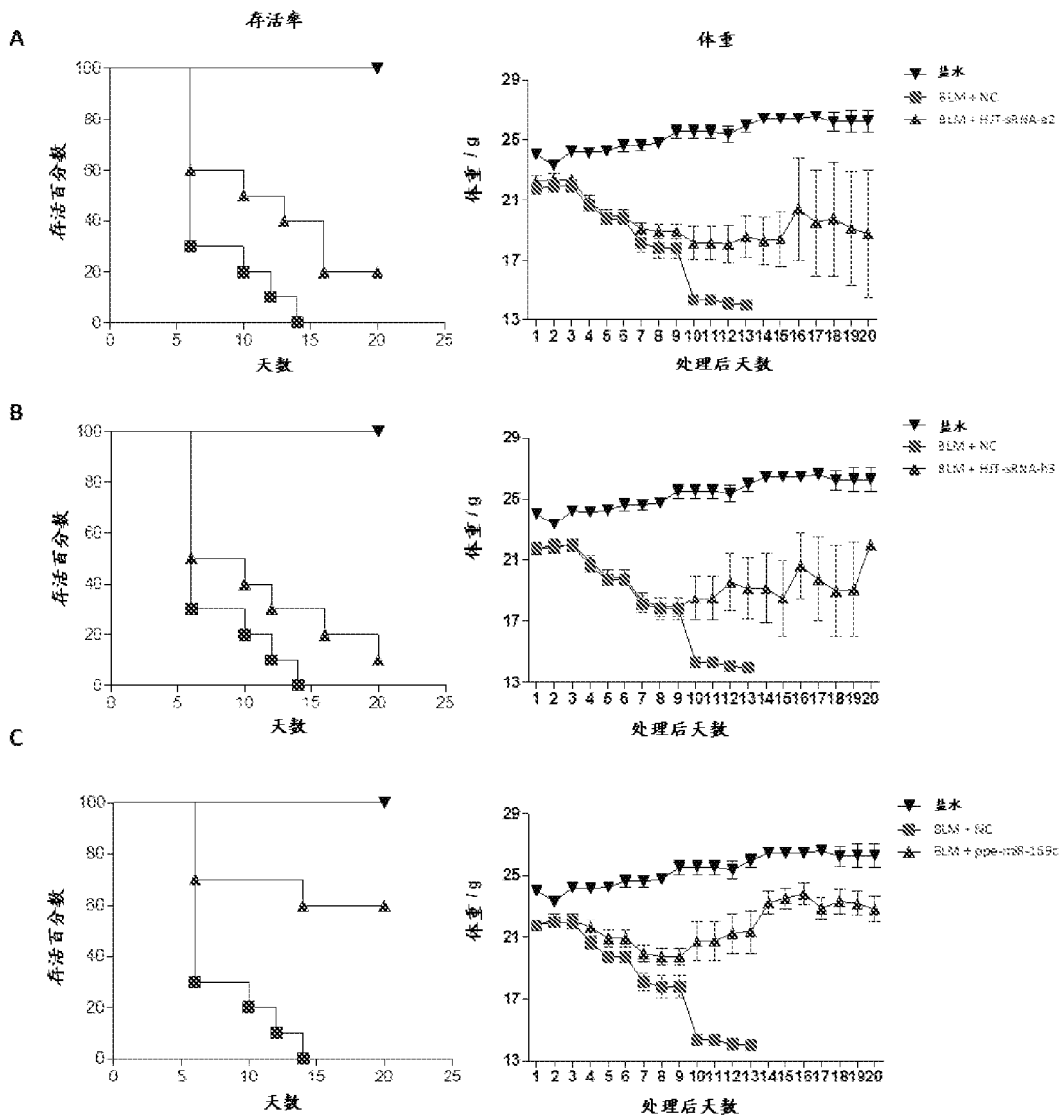


图 7

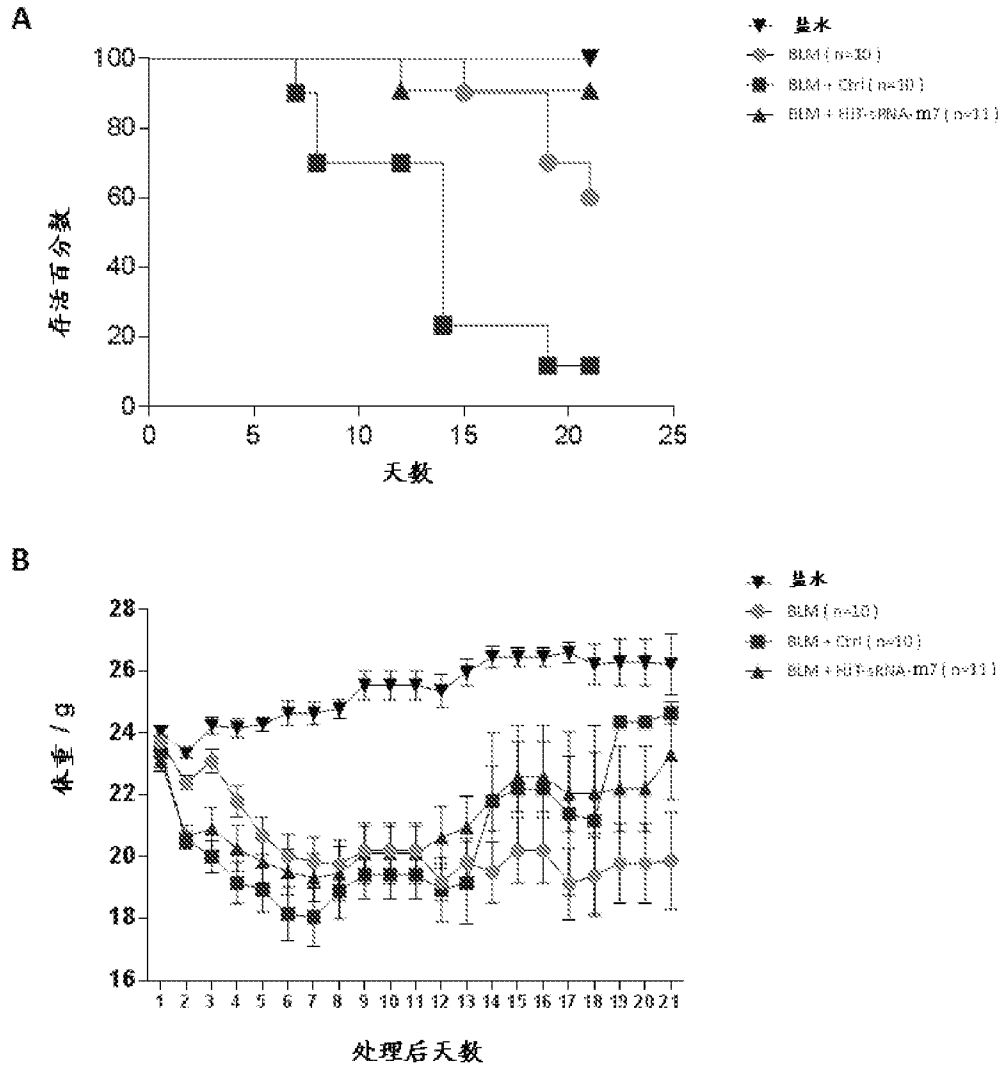


图 8

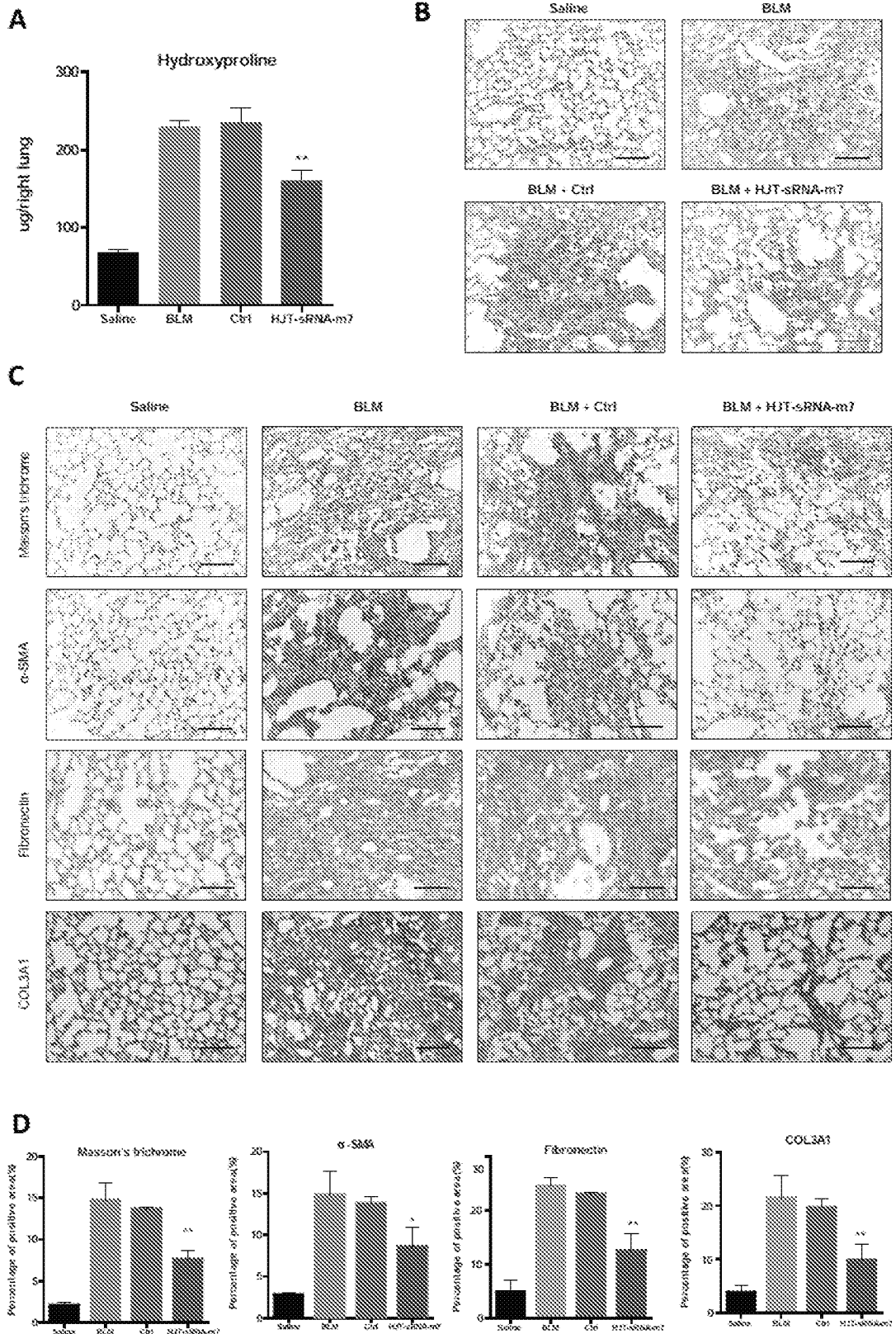


图 9

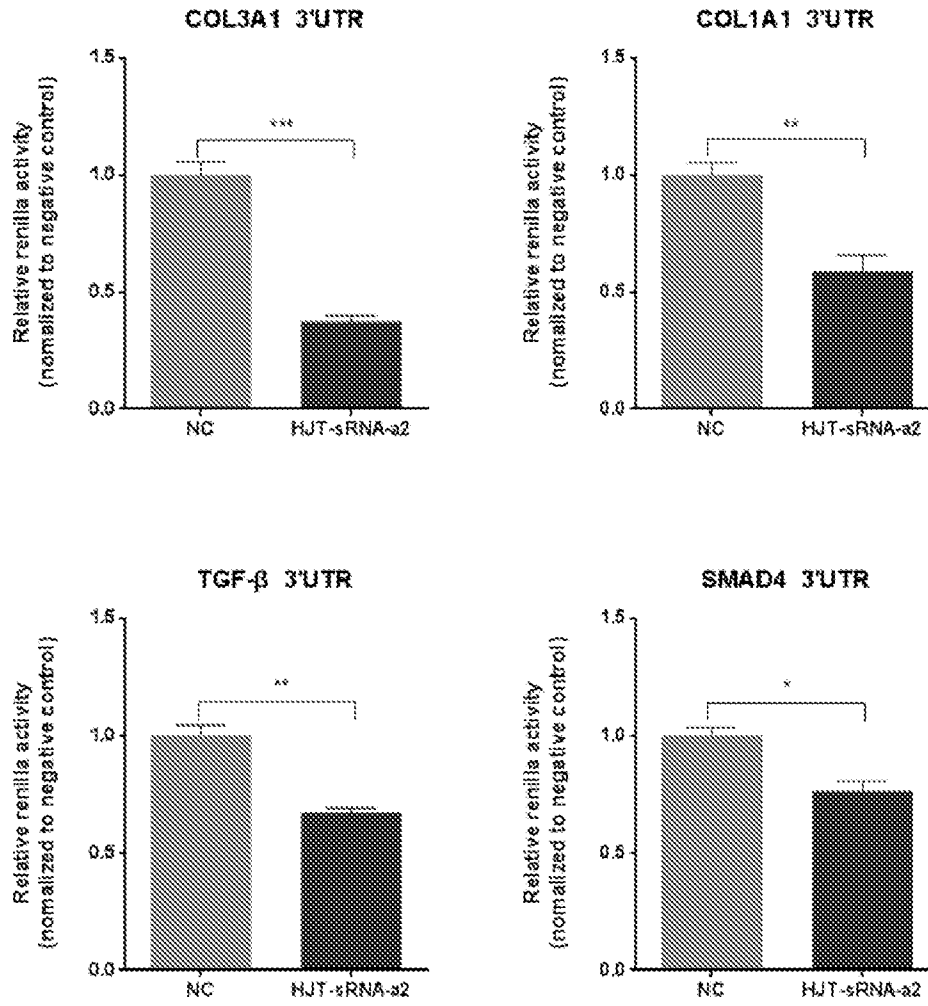


图 11

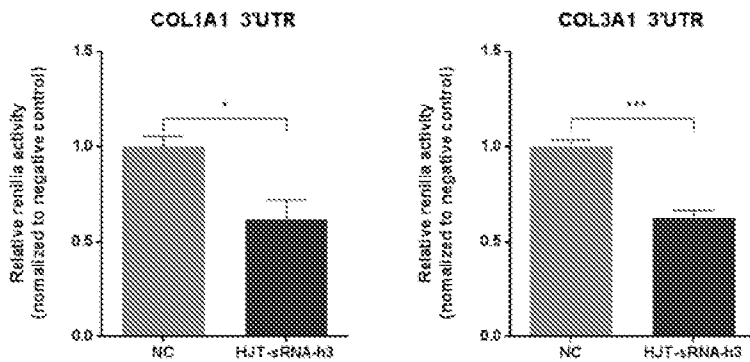


图 12

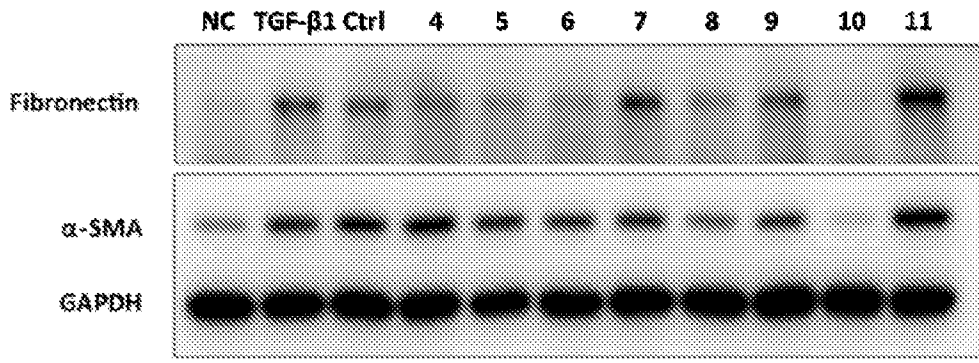


图 13

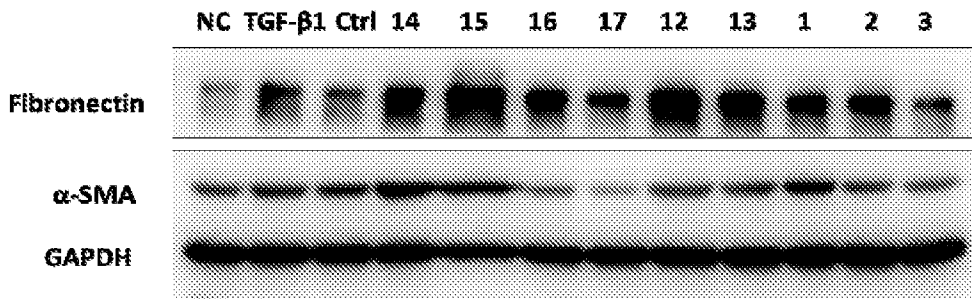


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/078815

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) i; A61K 31/7105 (2006.01) i; A61P 17/02 (2006.01) i; A61P 11/00 (2006.01) i; A61P 9/10 (2006.01) i; A61P 13/00 (2006.01) 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, 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)

CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, CNKI, ISI Web of Science: srna, 小 ma, 纤维化, aucccccugcuauuuugacu, 红景天;

GenBank + EMBL + DDBJ + National Bio-sequence Database of Chinese Patent: search for SEQ ID NO: 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103627705 A (NANJING MEDICAL UNIVERSITY), 12 March 2014 (12.03.2014), see sequence 76, and abstract	1, 3-7, 19 (all in part)
A	WO 2015166060 A1 (FOND EDMUND MACH), 05 November 2015 (05.11.2015), see entire document	1, 3-16, 19 (all in part)
A	CN 104147022 A (SCIENTIFIC RESEARCH TRAINING CENTER FOR CHINESE ASTRONAUTS), 19 November 2014 (19.11.2014), see entire document	1, 3-16, 19 (all in part)
A	CN 103800698 A (CHENGDU UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE), 21 May 2014 (21.05.2014), see entire document	1, 3-16, 19 (all in part)

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>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search

24 December 2017

Date of mailing of the international search report

05 January 2018

Name and mailing address of the ISA
 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

WANG, Qiyang

Telephone No. (86-10) 62088409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/078815

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.: 10-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] The subject matter of claims 10-14 is a method for preventing and/or treating a fibrotic proliferative disease and/or syndrome, which belongs to a disease treatment method implemented on a human or animal body (PCT Rule 39.1(iv)). Although the subject matter of claims 15 and 16 is a skin beauty and rejuvenation method, same actually relates to the treatment of a skin disease, such as anti-fibrosis, and therefore also belongs to a disease treatment method implemented on a human or animal body (PCT Rule 39.1(iv)). The examiner still carries out a search on claims 10-14 based on the subject matter that might be reasonably expected, namely, "the use of a polynucleotide having the sequence represented by SEQ No: 1 in preparing a drug for preventing and/or treating a proliferative disease and/or syndrome", and carries out a search on claims 15 and 16 based on the subject matter that might be reasonably expected, namely, "the use of a polynucleotide having the sequence represented by SEQ No: 1 in preparing a drug for skin beauty and rejuvenation by means of anti-fibrosis".
2. Claims Nos.: 18
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:
[1] The subject matter of claim 18 is "a method for inhibiting expression of one or more fibrosis-related genes", characterized by "comprising enabling a cell to be in contact with"; however, this step lacks an object with which the cell is in contact. Therefore, claim 18 is unclear, so that no meaningful opinion can be formed.
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

International application No.
PCT/CN2017/078815

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 1;
- [2] Invention 2: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 2;
- [3] Invention 3: claims 1-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 3;
- [4] Invention 4: claims 1, 3-16, 19 relate to part of SEQ ID NO: 4;
- [5] Invention 5: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 5;
- [6] Invention 6: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 6;
- [7] Invention 7: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 7;
- [8] Invention 8: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 8;
- [9] Invention 9: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 9;
- [10] Invention 10: claims 1-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 10;
- [11] Invention 11: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 11;
- [12] Invention 12: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 12;
- [13] Invention 13: claims 1-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 13;
- [14] Invention 14: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 14;
- [15] Invention 15: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 15;
- [16] Invention 16: claims 1-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 16;
- [17] Invention 17: claims 1, 3-16 and 19 relate to part of SEQ ID NO: 17;
- [18] Invention 18: claim 17: an activator for the polynucleotide as claimed in any one of claims 1-6 is produced in an endogenous activation body/cell.
- [19] Although the polynucleotides represented by SEQ ID NOs: 1-17 are considered as having the ability to prevent/treat fibrosis, same are not entitled to a significant structural unit necessary for a common characteristic or activity. Therefore, inventions 1-17 do not share a same or corresponding specific technical feature therebetween, and an activator activating the production of SEQ ID NOs: 1-17 and these sequences also do not share a corresponding structural correlation therebetween. Therefore, invention 18 and inventions 1-17 also do not share a same or corresponding specific technical feature therebetween. Therefore, the 18 inventions of the present application do not share a corresponding specific technical feature therebetween, and thus lack unity of invention under PCT Rule 13.1.

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: part relating to SE1 ID NO: 1 of claims 1, 3-16 and 19

Remark on protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/078815

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103627705 A	12 March 2014	CN 103627705 B	24 February 2016
WO 2015166060 A1	05 November 2015	US 2017044542 A1	16 February 2017
		CA 2946477 A1	05 November 2015
		EP 3137609 A1	08 March 2017
		EP 3137607 A1	08 March 2017
		US 2017044547 A1	16 February 2017
		WO 2015165535 A1	05 November 2015
		CN 106687120 A	17 May 2017
CN 104147022 A	19 November 2014	None	
CN 103800698 A	21 May 2014	CN 103800698 B	25 May 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/078815

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61P 17/02(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 13/00(2006.01)i; C12N 15/63(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, 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>CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of science:srna, 小rna, 纤维化, aucccccacugcuaaaauugacu, 红景天; GenBank+EMBL+DDBJ+中国专利生物序列检索系统:关于SEQ ID NO:1的检索</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>X</td> <td>CN 103627705 A (南京医科大学) 2014年 3月 12日 (2014 - 03 - 12) 参见序列76, 摘要</td> <td>1, 3-7, 19 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015166060 A1 (FOND EDMUND MACH) 2015年 11月 5日 (2015 - 11 - 05) 参见全文</td> <td>1, 3-16, 19 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104147022 A (中国航天员科研训练中心) 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19) 参见全文</td> <td>1, 3-16, 19 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103800698 A (成都中医药大学) 2014年 5月 21日 (2014 - 05 - 21) 参见全文</td> <td>1, 3-16, 19 (均为部分)</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	X	CN 103627705 A (南京医科大学) 2014年 3月 12日 (2014 - 03 - 12) 参见序列76, 摘要	1, 3-7, 19 (均为部分)	A	WO 2015166060 A1 (FOND EDMUND MACH) 2015年 11月 5日 (2015 - 11 - 05) 参见全文	1, 3-16, 19 (均为部分)	A	CN 104147022 A (中国航天员科研训练中心) 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19) 参见全文	1, 3-16, 19 (均为部分)	A	CN 103800698 A (成都中医药大学) 2014年 5月 21日 (2014 - 05 - 21) 参见全文	1, 3-16, 19 (均为部分)
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 103627705 A (南京医科大学) 2014年 3月 12日 (2014 - 03 - 12) 参见序列76, 摘要	1, 3-7, 19 (均为部分)															
A	WO 2015166060 A1 (FOND EDMUND MACH) 2015年 11月 5日 (2015 - 11 - 05) 参见全文	1, 3-16, 19 (均为部分)															
A	CN 104147022 A (中国航天员科研训练中心) 2014年 11月 19日 (2014 - 11 - 19) 参见全文	1, 3-16, 19 (均为部分)															
A	CN 103800698 A (成都中医药大学) 2014年 5月 21日 (2014 - 05 - 21) 参见全文	1, 3-16, 19 (均为部分)															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><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>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 12月 24日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 1月 5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) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>王启扬</p> <p>电话号码 (86-10)62088409</p>															

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: 10-16
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10-14的主题为一种预防和/或治疗纤维增生性疾病和/或综合征的方法, 其属于对人体或动物体实施的疾病的治疗方法(PCT细则第39.1(iv))。权利要求15-16的主题虽然是美容嫩肤方法, 但实际上涉及抗纤维化等皮肤疾病的治疗, 因此也属于对人体或动物体实施的疾病的治疗方法(PCT细则第39.1(iv))。但审查员还是基于合理预期的主题即“SEQ NO:1所示的序列的多核苷酸在制备预防和/或治疗增生性疾病和/或综合征的药物中的用途”对权利要求10-14进行了检索, 以及“SEQ NO:1所示序列的多核苷酸在制备用于抗纤维化而进行嫩肤美容的药物中的用途”对权利要求15-16进行了检索。
2. 权利要求: 18
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:
 - [1] 权利要求18的主题是“一种抑制一个或多个纤维化相关基因表达的方法”, 其特征是“其包括使细胞接触”, 该步骤缺少细胞接触的对象, 因此权利要求18不清楚, 以致不能形成任何有意义的意见。
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。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 发明1: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:1的部分;
- [2] 发明2: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:2的部分;
- [3] 发明3: 权利要求1-16, 19涉及SEQ ID NO:3的部分;
- [4] 发明4: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:4的部分;
- [5] 发明5: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:5的部分;
- [6] 发明6: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:6的部分;
- [7] 发明7: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:7的部分;
- [8] 发明8: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:8的部分;
- [9] 发明9: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:9的部分;
- [10] 发明10: 权利要求1-16, 19涉及SEQ ID NO:10的部分;
- [11] 发明11: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:11的部分;
- [12] 发明12: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:12的部分;
- [13] 发明13: 权利要求1-16, 19涉及SEQ ID NO:13的部分;
- [14] 发明14: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:14的部分;
- [15] 发明15: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:15的部分;
- [16] 发明16: 权利要求1-16, 19涉及SEQ ID NO:16的部分;
- [17] 发明17: 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO:17的部分;
- [18] 发明18: 权利要求17: 内源性激发体内/细胞内产生权利要求1-6中任一项所述多核苷酸的激发剂。
- [19] SEQ ID NOs:1-17所示的多核苷酸虽然被认为均具有预防/治疗纤维化的能力, 然而它们并未享有具有共同特性或者活性所必需的显著结构单元, 因此发明1-17之间不具有相同或相应的特定技术特征, 而激发产生SEQ ID NOs:1-17的激发剂与这些序列之间也不具有相应的结构相关性, 因此发明18与发明1

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

-17之间也不具有相同或相应的特定技术特征。因此，本申请的18组发明之间不具备相同或相应的特定技术特征，因此，不符合PCT实施细则13.1有关单一性的规定。

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 权利要求1, 3-16, 19涉及SEQ ID NO: 1的部分

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/078815

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	103627705	A	2014年 3月 12日	CN	103627705	B	2016年 2月 24日
WO	2015166060	A1	2015年 11月 5日	US	2017044542	A1	2017年 2月 16日
				CA	2946477	A1	2015年 11月 5日
				EP	3137609	A1	2017年 3月 8日
				EP	3137607	A1	2017年 3月 8日
				US	2017044547	A1	2017年 2月 16日
				WO	2015165535	A1	2015年 11月 5日
				CN	106687120	A	2017年 5月 17日
CN	104147022	A	2014年 11月 19日	无			
CN	103800698	A	2014年 5月 21日	CN	103800698	B	2016年 5月 25日