

(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
2019 年 1 月 3 日 (03.01.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/000147 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/66* (2006.01)

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/089927

(22) 国际申请日: 2017 年 6 月 26 日 (26.06.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳市博奥康生物科技有限公司
(SHENZHEN BIOCAN TECHNOLOGIES CO., LTD)
[CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区珠光
路 134 号珠光创新科技园 1 栋 509 毛吉炎,
Guangdong 518055 (CN)。

(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))。

(72) 发明人: 毛吉炎 (MAO, Jiyang); 中国广东省深
圳市南山区珠光路 134 号珠光创新科技园
1 栋 509, Guangdong 518055 (CN)。

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

(54) **Title:** TUD RNA EFFECTIVELY INHIBITING EXPRESSION OF HUMAN MIR-148A, MIR-152 AND MIR-185 AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种有效抑制人 MIR-148A、MIR-152 和 MIR-185 表达的 TUD RNA 及其应用

(57) **Abstract:** Provided are a TuD RNA and the use thereof. The TuD RNA can effectively inhibit the expression of human miR-148a, miR-152 and miR-185. The DNA sequence encoding the TuD RNA is as shown below: 5'-ggcgctagatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgtcttcttgaacacaagtattcggtcaca-gaatacaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgtcttcttgaacacaagatgatcctagcgccacctttt-3'. The use of the TuD RNA comprises constructing the TuD RNA on a lentiviral vector to obtain a recombinant vector; and applying the recombinant vector to the human cells to inhibit the expression of human miR-148a, miR-152 and miR-185.

(57) 摘要: 提供一种 Tud RNA 及其应用, 该 Tud RNA 可以有效抑制人 miR-148a、miR-152 和 miR-185 表达。编码所述 Tud RNA 的 DNA 序列, 如下所示: 5'-ggcgctagatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgtcttcttgaacacaagatgatcctagcgccacctttt-3'。该 Tud RNA 的应用, 包括将该 Tud RNA 构建于慢病毒载体上, 得到重组载体; 将该重组载体作用于人源细胞, 抑制人 miR-148a、miR-152 和 miR-185 的表达。

WO 2019/000147 A1

说明书

发明名称：一种有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的

Tud RNA及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种Tud

RNA，特别涉及一种有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA及其应用。

背景技术

[0002] MicroRNA (miRNA) 是在真核生物中发现的一类内源性的非编码RNA，大小一般在22-25 nt之间，miRNA 广泛分布于植物、动物和多细胞生物中，并且能发挥重要的调节作用，而在人类miRNA 的研究中，发现miRNA在正常组织和肿瘤组织中的表达有着显著差异，有些miRNA 会在肿瘤组织中有低表达，有些则在肿瘤组织中有高表达，这说明miRNA 在肿瘤发生过程中起了至关重要的作用。

[0003] miR-148a是近几年研究得较多的一种microRNA。据报道，miR-148a与外源性物质代谢、细胞凋亡、多种癌症的发生、发展和表观遗传等都密切相关；miR-152是一种具有多功能的miRNA，研究发现miR-152与甲基化相关，如与甲基转移酶DNMT1含量和酶活性相关，miR-152可被子宫内膜癌DNA甲基化变为沉默基因，并且其与多种癌症的发生发展相关，它是一种肿瘤抑制microRNA，与子痫前期、滋养细胞肿瘤、膀胱癌、胃肠癌、卵巢癌等诸多疾病相关；miR-185是一个长度为22nt的miRNA，定位于人染色体22q11.21，在结肠癌、胃癌、食管癌、肺癌、肝癌等肿瘤的发生和侵袭等方面作为一个抑癌基因发挥重要作用，另外它是一种甲基化相关的抑癌性miRNA，可通过直接靶向DNMT1的表达而影响全基因组的甲基化水平，进而调控某些基因的甲基化修饰状态，影响基因表达。通过控制miR-148a、miR-152和miR-185的表达，同时与其他药物协同作用，能为治疗癌症提供新的表观遗传思路。

技术问题

[0004] MiRNA的功能研究主要通过miRNA干扰和过表达技术完成。现有miRNA干扰

技术中，anti-miR和antagomiR为瞬时转染技术，其干扰效果不能稳定保持，而miRNA sponge效果远未达到最优，现有技术缺乏一种干扰效果好且能实现长期稳定干扰的技术。

[0005] Tough Decoy RNA (Tud RNA) 是一种新开发出的miRNA抑制手段，其通过引入双链RNA对目标miRNA进行吸附，达到抑制miRNA的目的。由于引入的RNA为双链并且带有茎环的二级结构，因此其够抵抗胞内核酸酶的降解，能长期、稳定和高效地抑制miRNA。

问题的解决方案

技术解决方案

[0006] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足，提供一种有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA。

[0007] 本发明的另一目的在于提供上述有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA的应用。

[0008] 本发明的再一目的在于提供一种含有上述Tud RNA的重组载体。

[0009] 本发明的目的通过下述技术方案实现：

[0010] 一种有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA，编码所述的抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA的DNA序列如下所示：

[0011] 5'-

ggcgctaggatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacg
tgatgatcttcttgaacacaagttctggtcacagaatacaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgta
ctatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagatgatcctagcgccacctttt -3'。

[0012] 所述的有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA的应用，该应用包括将所述的Tud RNA构建于慢病毒载体上，得到含有所述Tud RNA的重组载体；将含有所述Tud RNA的重组载体作用于16HBE细胞，达到抑制miR-148a、miR-152和miR-185表达的目的；

[0013] 所述慢病毒载体为pGLV3/H1/GFP+Puro (pGLV3) 慢病毒穿梭载体；

[0014] 所述的含有所述Tud RNA的重组载体的制备方法，包含以下步骤：

[0015] (1) 设计含有抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA的DNA序列，如下所示：

[0016] 5'-

ggcgctaggatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacg
tgatgatcttcttgaacacaagtatcttggtcacagaatacaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgta
ctatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagatgatcctagcgccacctttt -3';

[0017] 为将其克隆到pGLV3慢病毒穿梭载体上,合成以下正义链(F)及反义链(R)

[0018] Tud-148a-152-185正义链:

[0019] 5'-

GATCCggcgctaggtatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaaagtcacgtactatctgtcttgaaccca
aaagtcacgtgatgatcttcttgaaacacaagttctggtcacagaatacaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaa
gtcagctactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttgaaacacaagatgatcctagcgccacctttttG -3' ;

[0020] Tud-148a-152-185反义链:

[0021] 5'-

AATTCaaaaagggtggcgctaggatcatcttggtttcaagaagatcatcacgtgactttgggttcaagacagatagtacgtgactttgctgggtcctagattcggtcggggagttgtattctgtgaccagaatacttggtttcaagaagatcatcacgtgactttgggttcaagacagatagtacgtgactttgctgggtcctagattcggtcggggagttgatgacctaagcggcG -3'.

[0022] 上述正义链模板的5'端添加了GATCC, 与BamHI酶切后形成的粘端互补; 反义链模板的5'端添加了AATTC, 与EcoRI酶切后形成的粘端互补;

[0023] (2) 将等量的正义链和反义链DNA混合，进行退火，以形成DNA双链，得到Tud RNA模板；

[0024] (3) 将pGLV3载体用BamHI和EcoRI双酶切, 得到线性化的pGLV3载体;

[0025] (4) 将步骤(2)中的Tud RNA模版和步骤(3)中线性化的pGLV3载体进行连接, 得到重组载体pGLV3-Tud-148a-152-185;

[0026] (5) 将重组载体pGLV3-Tud-148a-152-185与包装载体pGag/Pol、pRev、pVSV-G共转染至293T细胞，收集培养上清获得含有目的Tud RNA的病毒颗粒，可用于转染目的细胞。

发明的有益效果

有益效果

[0027] 本发明所述抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA 能有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185的表达。将所述抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA构建于慢病毒载体上，不仅可有效作用于分裂及非分裂状态的细胞，也适用于体内及体外研究。

对附图的简要说明

附图说明

[0028] 图1为pGLV3载体的结构图；图2各组细胞的miRNA表达水平，其中，a. miR-148a的表达情况，b. miR-152的表达情况，c. miR-185的表达情况。

实施该发明的最佳实施例

本发明的最佳实施方式

[0029] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

[0030] 实施例一有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA的设计与合成

[0031] 根据TuD RNA设计序列和miRBase中提供的miR-148a、miR-152和miR-185的序列信息，设计出同时针对miR-148a、miR-152和miR-185的TuD RNA寡核苷酸序列，其序列为5'-

ggcgctaggatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagtattctggtcacagaatacaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagatgacccctagcgccacctttt -3'。委托上海生工合成。

[0032] 为将其克隆到pGLV3慢病毒穿梭载体上，设计以下正义链（F）及反义链（R）DNA序列：

[0033] Tud-148a-152-185正义链：

[0034] 5'-

GATCCggcgctaggtatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaaccca
aaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagtatcttggtcacagaatacaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaa
gtcacgtactatctgtcttgaaccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagatgacctagegccacctttttG -3';

[0035] Tud-148a-152-185反义链:

[0036] 5'-

AATTCaaaaaggtggcgctaggatcatcttgtgttcaagaagatcatcacgtgactttgggttcaagacagatagtacgt
gactttgctgggtcctagatttcggtcggggagttgtattctgtgaccagaatacttgtgtttcaagaagatcatcacgtgacttt
gggttcaagacagatagtacgtgactttgctgggtcctagatttcggtcggggagttgatgactcctagcgccG -3'.

[0037] 上述正义链模板的5'端添加了GATCC, 与BamHI酶切后形成的粘端互补; 反义链模板的5'端添加了AATTC, 与EcoRI酶切后形成的粘端互补。

[0038] (2) 将等量的正义链 (10 μ M, 5 μ l) 和反义链 (10 μ M, 5 μ l) DNA混合, 加入90 μ l ddH₂O, 在PCR仪上按照如下程序进行退火处理: 95°C 5 min, 然后以每秒下降0.1°C的速率降至25°C进行退火, 最后4°C保存备用。将退火后所得Tud RNA模板溶液稀释5倍, 使其终浓度为200 nM, 用于连接反应。

[0039] (3) 将 pGLV3载体 (吉玛基因股份有限公司) 用 BamH I和 EcoR I双酶切, 进行载体的线性化处理, 酶切条件如下所述: 将 pGLV3 载体 (10μg)、BamH I 内切酶 (5μL, Fermentas)、EcoR I 内切酶 (5μL, Fermentas)、FastDigest buffer(80μL, TOYOBO) 混匀, 置于 37°C反应 1 小时, 用凝胶回收试剂盒 (Axygen) 回收线性载体片段, 将其浓度稀释至 50ng/μL。

[0040] (4) 将线性化的 pGLV3 载体 1 μ l、经退火处理的Tud RNA 模版 1 μ l、T4 DNA 连接酶 (NEB)、1 μ l、10 $\times$ T4 连接缓冲液 (NEB) 2 μ l、去离子水 15 μ l 混匀, 于4 $^{\circ}$ C连接过夜。取连接产物 5 μ l 转化大肠杆菌Top10感受态细胞, 在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上于30 $^{\circ}$ C培养过夜。挑选长出的单克隆在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB液体培养基中于 30 $^{\circ}$ C培养过夜, 用质粒抽提试剂盒 (Omega

bio-tek) 纯化质粒, 经测序验证后大量制备重组质粒pGLV3-Tud-148a-152-185。

[0041] (5) 将重组载体pGLV3-Tud-148a-152-185与包装载体pGag/Pol、pRev、pVSV-G共转染至293T细胞，收集培养上清获得含有目的Tud RNA的病毒颗粒，可用于

转染目的细胞。

[0042] 实施例二慢病毒转导**16HBE**细胞

[0043] 接种**16HBE**细胞于6孔板中，每孔1000000个细胞，12h后细胞密度约为50%，分别取病毒液，用DMEM完全培养基10倍稀释病毒，再加入聚凝胺(polybrene)至终浓度为8 $\mu\text{g/mL}$ 。去除6孔板中的培养基，加入含病毒的DMEM完全培养基(含10%胎牛血清)，24h后弃去含病毒的DMEM完全培养基，更换新鲜的DMEM完全培养基，24h后用0.5 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的嘌呤霉素筛选细胞。筛选10d，每隔3d更换培养基一次，并不断的增加嘌呤霉素的浓度至1.0 $\mu\text{g/ml}$ 。筛选获得的细胞株命名为TuD-148a-152-185细胞株。

[0044] 实施例三荧光定量PCR检测miRNA的表达水平变化

[0045] 分别接种正常**16HBE**细胞、TuD-148a-152-185细胞至6孔板(每孔约300000个)，培养细胞约24h后至融合度80%。用miRcute miRNA提取分离试剂盒提取这些细胞的miRNA，然后用S-Poly(T) hsa-miR-148a qPCR-assay primer set、S-Poly(T) hsa-miR-152 qPCR-assay primer set和S-Poly(T) hsa-miR-185 qPCR-assay primer set试剂盒对miRNA进行逆转录和加尾，得到相应的cDNA。取2种细胞的cDNA各2 μL 为模板，荧光定量PCR检测miR-148a、miR-152和miR-185表达水平的变化，实验重复3次，每孔设置3个平行样，以snord 44作为内参。结果如图2所示，可以看到与TuD-148a-152-185细胞的miR-148a的表达水平比**16HBE**细胞低60%，miR-152的表达水平比**16HBE**细胞低62%，miR-185的表达水平比**16HBE**细胞低59%。差异有统计学意义($p < 0.01$)，说明TuD-148a-152-185细胞株构建成功。

工业实用性

[0046] 本发明所述抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA能有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185的表达。将所述抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA构建于慢病毒载体上，不仅可有效作用于分裂及非分裂状态的细胞，也适用于体内及体外研究。

权利要求书

[权利要求 1] 一种有效抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA，其特征在于：编码所述Tud RNA的DNA序列如下所示：

5'-

ggcgctaggatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaac
ccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagtattctgggtcacagaatacaactccccgaccgaaatct
aggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaaga
tgatcctagcgccacctttt -3'。

[权利要求 2] 权利要求1所述的Tud RNA在制备miR-148a、miR-152和miR-185功能研究的产品以及在制备miR-148a、miR-152和miR-185有关疾病的靶向治疗药物中的应用。

[权利要求 3] 根据权利要求2所述的Tud RNA在制备miR-148a、miR-152和miR-185功能研究的产品以及在制备miR-148a、miR-152和miR-185有关疾病的靶向治疗药物中的应用，其特征在于该应用包括将权利要求1中所述的DNA序列构建于慢病毒载体上，得到含有权利要求1中所述DNA序列的重组载体。

[权利要求 4] 根据权利要求3所述的Tud RNA在制备miR-148a、miR-152和miR-185功能研究的产品以及在制备miR-148a、miR-152和miR-185有关疾病的靶向治疗药物中的应用，其特征在于：所述慢病毒载体为pGLV3慢病毒穿梭载体。

[权利要求 5] 根据权利要求4所述的Tud RNA在制备miR-148a、miR-152和miR-185功能研究的产品以及在制备miR-148a、miR-152和miR-185有关疾病的靶向治疗药物中的应用，其特征在于：
所述的含有权利要求1中所述DNA序列的重组载体的制备方法，包含以下步骤：

(1) 设计含有抑制人miR-148a、miR-152和miR-185表达的Tud RNA的DNA序列，如下所示：

5'-

ggcgctaggatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaac
ccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagtattctggtcacagaatacaactccccgaccgaaatct
aggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaaga
tgatcctagcgccacctttt -3' ;

为将其克隆到pGLV3慢病毒穿梭载体上，合成以下正义链及反义链DNA序列：

Tud-148a-152-185正义链：

5'-

GATCCggcgctaggatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaagtcacgtactatct
gtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagtattctggtcacagaatacaactccccgac
cgaaatctaggagaccagcaaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttga
acacaagatgatcctagcgccaccttttG -3' ;

Tud-148a-152-185反义链：

5'-

AATTCaaaaaggtggcgctaggatcatcttgtgttcaagaagatcatcacgtgactttgggttcaaga
cagatagtagtgactttgctggtctcctagattcggtcggggagttgtattctgtgaccagaatacttgtgtt
tcaagaagatcatcacgtgactttgggttcaagacagatagtagtgactttgctggtctcctagattcggtc
ggggagttgatgatcctagcgccG -3'。

上述正义链模板的5'端添加了GATCC，与BamHI酶切后形成的粘端互补；反义链模板的5'端添加了AATTC，与EcoRI酶切后形成的粘端互补；

(2) 将等量的正义链和反义链DNA混合，进行退火，以形成DNA双链，得到Tud RNA模板；

(3) 将pGLV3载体用BamHI和EcoRI双酶切，得到线性化的pGLV3载体；

(4) 将步骤(2)中的Tud RNA模版和步骤(3)中线性化的pGLV3载体进行连接，得到重组载体pGLV3-Tud-148a-152-185。

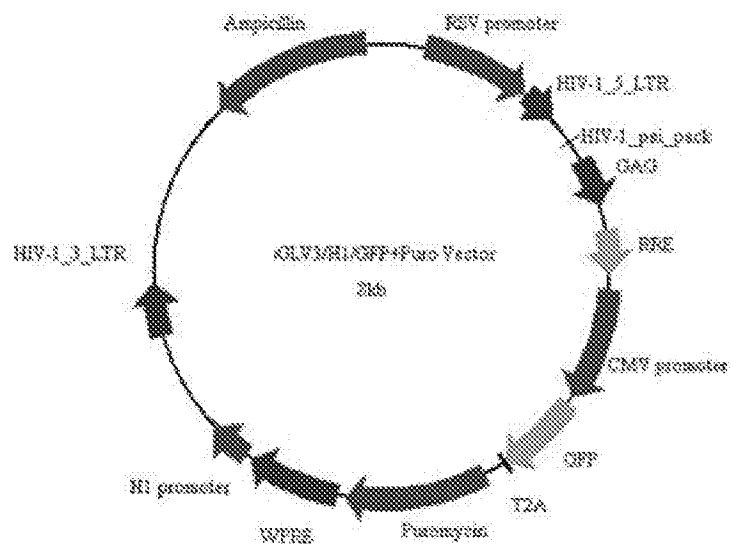
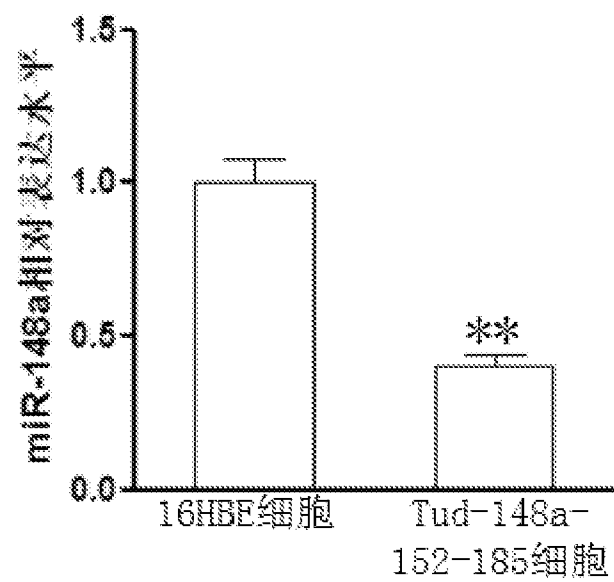
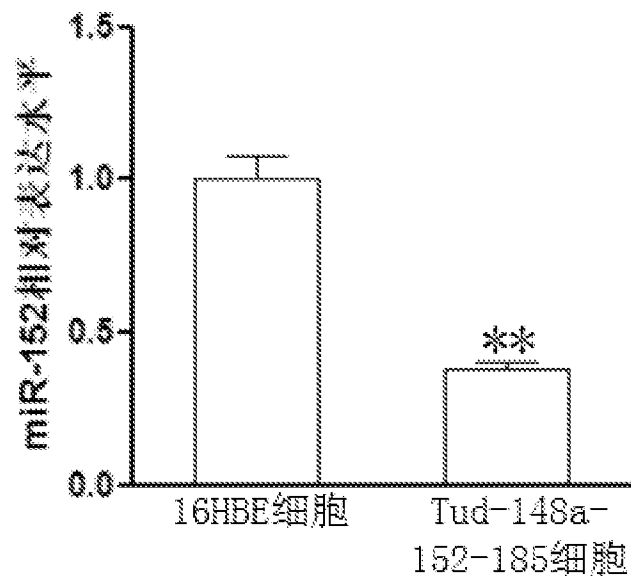


图 1

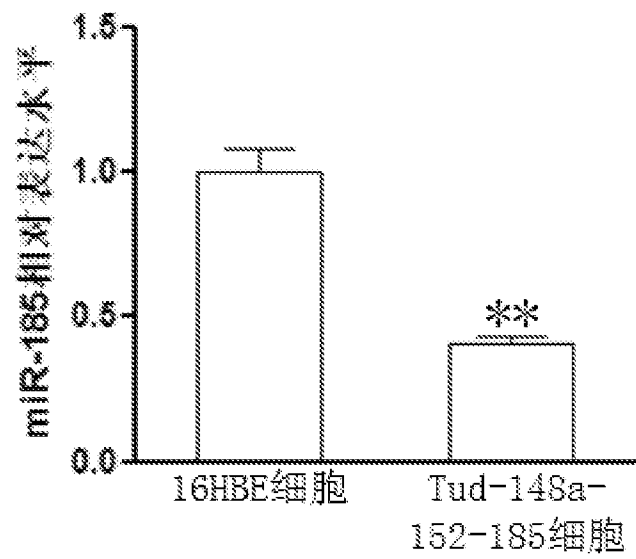
a.



b



c



与 16HBE 细胞相比, ** $p < 0.01$

图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) i; C12N 15/66 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

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

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

CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; WANFANG DATA; PUBMED; WEB OF SCIENCE: 下调, 抑制, 降低, 减少, 调节, miR-148a, miR-152, miR-185, Tud RNA, tough decoy RNA, inhibit+, regulat+, decreas+, pGLV3,

GenBank+EMBL+DDBJ+ NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: sequence search for ggcgctaggatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaaatgacgtactatctgtcttgaacccaagtcacgtgatgatcttcttgaacacaagtattctggtcacagaatacaactc cccgaccgaaatctaggagaccagcaaatgacg.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010138263 A2 (UNIV MASSACHUSETTS et al.), 02 December 2010 (02.12.2010), see description, page 8, lines 15-19, pages 30-35, and page 48, paragraph 2	1-3
Y	WO 2010138263 A2 (UNIV MASSACHUSETTS et al.), 02 December 2010 (02.12.2010), see description, page 8, lines 15-19, pages 30-35, and page 48, paragraph 2	4-5
Y	CN 104357451 A (GUANGZHOU PANYU CENTRAL HOSPITAL), 18 February 2015 (18.02.2015) see abstract, and description, paragraphs [0047]-[0055]	4-5
A	CN 102851291 A (SANTARIS PHARMA AS), 02 January 2013 (02.01.2013), see entire document	1-5
A	栗全球等, “miR-185 与肿瘤关系的研究进展”, 现代医药卫生, 31(3), 15 February 2015 (15.02.2015), ISSN: 1009-5519, pages 380-383, see entire document, (Journal of Modern Medicine & Health), non-official translation (SU, Quanqiu et al., The Research Progress of miR-185 in Tumor)	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 06 February 2018	Date of mailing of the international search report 28 March 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 LI, Xiaoqu Telephone No. (86-10) 62411615

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089927

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☒ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/089927

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2010138263 A2	02 December 2010	WO 2010138263 A3	14 April 2011
		US 2016222067 A1	04 August 2016
		US 9284357 B2	15 March 2016
		US 8734809 B2	27 May 2014
		US 2012137379 A1	31 May 2012
		US 2014296486 A1	02 October 2014
CN 104357451 A	18 February 2015	CN 104357451	21 September 2016
CN 102851291 A	02 January 2013	EA 201100813 A1	29 June 2012
		EA 201100812 A1	29 June 2012
		US 2010286234 A1	11 November 2010
		EA 201100811 A1	29 June 2012
		US 8163708 B2	24 April 2012
		EA 201100810 A1	29 June 2012
		EP 2261333 B1	30 March 2016
		EP 2666859 A3	07 May 2014
		MY 162210 A	31 May 2017
		EP 2666859 A2	27 November 2013
		SG 170773 A1	30 May 2011
		SG 10201406016 S A	27 November 2014
		ES 2569558 T3	11 May 2016
		CN 102851291 B	09 March 2016
		NZ 571569 A	30 September 2011
		EP 2261333 A2	15 December 2010
		EP 2261333 A3	19 March 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/089927

A. 主题的分类 C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/66(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CPRSABS;CNABS;DWPI;SIPOABS;CNTXT;WOTXT;EPTXT;USTXT;CNKI;万方数据库; PUBMED;WEB OF SCIENCE; 下调, 抑制, 降低, 减少, 调节, miR-148a, miR-152, miR-185, Tud RNA, tough decoy RNA, inhibit+, regulat+, decreas+, pG-LV3, GenBank+EMBL+DDBJ+中国专利生物序列检索系统: 对序列 ggcgctaggtatcatcaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaagtcacgtactatctgtcttgaacccaaagtcacgtgatgatcttcttgaacaca- caagtattctgtgtcacagaatacaactccccgaccgaaatctaggagaccagcaagtcacg的序列检索。		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2010138263 A2 (UNIV MASSACHUSETTS等) 2010年 12月 2日 (2010 - 12 - 02) 参见说明书第8页第15-19行, 第30-35页, 第48页第2段	1-3
Y	WO 2010138263 A2 (UNIV MASSACHUSETTS等) 2010年 12月 2日 (2010 - 12 - 02) 参见说明书第8页第15-19行, 第30-35页, 第48页第2段	4-5
Y	CN 104357451 A (广州市番禺区中心医院) 2015年 2月 18日 (2015 - 02 - 18) 参见摘要, 说明书 [0047]-[0055]段	4-5
A	CN 102851291 A (桑塔里斯制药公司) 2013年 1月 2日 (2013 - 01 - 02) 参见全文	1-5
A	栗全球等. "miR-185 与肿瘤关系的研究进展" 现代医药卫生, 第31卷, 第3期, 2015年 2月 15日 (2015 - 02 - 15), ISSN: 1009-5519, 第380-383页, 参见全文	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		国际检索报告邮寄日期
2018年 2月 6日		2018年 3月 28日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		李肖隼 电话号码 (86-10)62411615

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☒ 纸件形式
- ☐ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☒ 含在申请提交时的国际申请中
- ☐ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/089927

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)
WO	2010138263	A2	2010年 12月 2日	WO	2010138263	A3	2011年 4月 14日
				US	2016222067	A1	2016年 8月 4日
				US	9284357	B2	2016年 3月 15日
				US	8734809	B2	2014年 5月 27日
				US	2012137379	A1	2012年 5月 31日
				US	2014296486	A1	2014年 10月 2日
CN	104357451	A	2015年 2月 18日	CN	104357451	B	2016年 9月 21日
CN	102851291	A	2013年 1月 2日	EA	201100813	A1	2012年 6月 29日
				EA	201100812	A1	2012年 6月 29日
				US	2010286234	A1	2010年 11月 11日
				EA	201100811	A1	2012年 6月 29日
				US	8163708	B2	2012年 4月 24日
				EA	201100810	A1	2012年 6月 29日
				EP	2261333	B1	2016年 3月 30日
				EP	2666859	A3	2014年 5月 7日
				MY	162210	A	2017年 5月 31日
				EP	2666859	A2	2013年 11月 27日
				SG	170773	A1	2011年 5月 30日
				SG	10201406016S	A	2014年 11月 27日
				ES	2569558	T3	2016年 5月 11日
				CN	102851291	B	2016年 3月 9日
				NZ	571569	A	2011年 9月 30日
				EP	2261333	A2	2010年 12月 15日
				EP	2261333	A3	2014年 3月 19日