

(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
2023 年 1 月 12 日 (12.01.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/280243 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/113 (2010.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
C12N 15/867 (2006.01) *G16B 15/30* (2019.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *G16B 20/00* (2019.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G16B 40/00* (2019.01)
A61P 15/14 (2006.01)

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/104248

(22) 国际申请日: 2022 年 7 月 7 日 (07.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110776690.X 2021年7月9日 (09.07.2021) CN

(71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。

(72) 发明人: 于文强 (YU, Wenqiang); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。 梁英 (LIANG, Ying); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。

(74) 代理人: 上海领誉知识产权代理有限公司 (SHANGHAI BESTFAMEIP INTELLECTUAL PROPERTY ATTORNEYS); 中国上海市长宁区中山西路 1065 号 SOHO 中山广场 B 座 2202 室车超平, Shanghai 200051 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, 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,

(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))。

(54) Title: MIR-339-ENHANCER-TARGET GENE NETWORK ACTIVATION MODEL AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: miR-339-增强子-靶基因网络激活模型及其应用

(57) Abstract: Provided are miR-339 capable of activating a breast cancer-related gene, an miR-339-enhancer-target gene network activation model, and applications thereof. The locus of the miR-339 coincides with the histone modification marker H3K4me1 or H3K27ac of an enhancer, is related to breast cancer, and provides a new policy and a potential drug target for the diagnosis and treatment of diseases such as breast cancer. Moreover, the "miRNA-enhancer-target gene network activation model" theory is applied to the explanation of the occurrence and development phenomena of breast cancer.

(57) 摘要: 提供了可激活乳腺癌相关基因的 miR-339、miR-339-增强子-靶基因网络激活模型及其应用。该 miR-339 的基因座位置与增强子的组蛋白修饰标志 H3K4me1 或 H3K27ac 重合, 与乳腺癌相关, 为乳腺癌等疾病的诊断、治疗提供新的策略和潜在的药物靶点。并将"miRNA-增强子-靶基因网络激活模型"理论应用于解释乳腺癌的发生发展现象。

WO 2023/280243 A1

miR-339-增强子-靶基因网络激活模型及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及 miR-339-增强子-靶基因网络激活模型及其应用。

背景技术

非编码 RNA 的研究是近年来逐渐被科学家认识并迅速投入其中的基础科学研究，旨在从本质上认识生命的奥秘。非编码 RNA 种类繁多，目前研究较多的是 microRNA (miRNA) 和长非编码 RNA (LncRNA)。miRNA 是一些长度为 21-25 个核苷酸，在转录后水平调控基因表达的非编码小 RNA。第一个 miRNA lin-4 是 30 多年前在研究线虫的发育调控时被意外发现的，并被证明通过结合细胞浆中 lin-14 mRNA 的 3'UTR 发挥抑制蛋白翻译或降解 mRNA 的作用。此后，miRNA 的负向调控作用机制几乎成为 miRNA 研究领域“金科玉律”。尽管后来也发现部分 miRNA 在特殊情况下能够促进基因表达或翻译，但基本都是个例研究，仅限于现象描述和简单的机制研究，致使后续研究者不得要领，缺乏推而广之的意义。另一方面，虽然 miRNA 参与大多数生命现象和过程，但是 miRNA 在体内的调控通常被认为是微调 (fine-tune)，并没有起到决定性的“开关”作用。

增强子 (Enhancer) 一直被认为是重要的 DNA 序列顺式调控元件，它可以近距离或远距离调控基因的表达。H3K4me1 以及 H3K27ac 是增强子重要的表观遗传学标记，其中 H3K27ac 与增强子的活性密切相关。当多个具有转录活性的增强子高密度富集转录因子后，可以形成超级增强子。增强子尤其是超级增强子通常可以驱动控制细胞身份和细胞命运的基因表达，在细胞分化、组织发育、个体生长和疾病致病过程中发挥很重要的作用。

恶性肿瘤是危害人类健康的全球公共卫生问题，我国作为一个发展中大国，工业化、城镇化和人口老龄化问题日益突出，不良生活方式及环境污染等直接导致国民身体健康指数

下降，恶性肿瘤急需等待攻克。

miRNA 研究已经被证明在乳腺癌发生发展与迁移中发挥重要的调控作用。相关研究通常是基于传统的 miRNA 负向调控机制，到目前为止，如何利用 miRNA 攻克乳腺癌尚未有实质性的突破，尚缺乏有效的治疗药物和治疗方案。miRNA 是经典的核酸分子，核酸药物被认为是继抗体药物及细胞免疫疗法之后的下一代药物，其可以达到传统药物无法替代的效果，比如抗体多在细胞表面发挥作用，而核酸药物可以进入细胞内部发挥治疗作用；有的核酸药物甚至可以进入到细胞核发挥精确的靶向治疗作用。比如，2018 年美国 FDA 批准上市的 RNAi 新药 Onpattro (patisiran) 是一款核酸药物。主要的治疗方法是把 siRNA 包裹在脂质纳米颗粒中并将药物直接递送至肝脏，通过靶向和沉默 TTR mRNA，阻碍靶向 TTR 蛋白生成，从而降低周围神经中淀粉样沉积物的积累，最终达到治疗 hATTR (遗传性转甲状腺素蛋白) 淀粉样变性疾病的目的。目前核酸药物开发日益成熟，在癌症和遗传性疾病以及流感和病毒感染方面取得一些重要成果，但是有待开发的潜力巨大。

发明内容

本发明首次将创造性的“miRNA-增强子-靶基因网络激活模型”理论应用于解释乳腺癌的发生发展现象，即核内 miR-339 与增强子互作进而正向激活靶基因从而影响肿瘤的增殖生长，这一理论与现有技术“miRNA 的负向调控机制”完全不同。

本申请筛选了位于增强子区域的多个 miRNA，分别将这些 miRNA 在不同种类的细胞中过表达，发现在基因组上与这些 miRNA 邻近的多个基因被转录激活，这些 miRNA 对基因的转录激活调控依赖于 miRNA 及其靶向增强子序列的完整性。基于此，本申请将筛选出来的 miRNA 用于揭示细胞核内 miRNA 功能，为解析 miRNA 参与肿瘤等疾病发生发展提供新的视角。

具体地，本申请发现 miR-339 和靶基因 *GPER1* 倾向于在乳腺癌临床组织样本中低表

达,进一步验证发现 miR-339 通过增强子正向调控 *GPER1* 基因的表达,进而抑制乳腺癌肿瘤发生发展。如果从核酸药物的角度去开发新型乳腺癌的药物,那么 miR-339 有可能会为这些疾病患者带来福音。

为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

本发明第一个方面公开了一种可激活乳腺癌相关基因的miRNA,所述miRNA的基因座位置与增强子的组蛋白修饰标志H3K4me1或H3K27ac重合。

优选的,所述乳腺癌为Luminal型乳腺癌和三阴性乳腺癌。

术语“miRNA”即MicroRNAs,其是指在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA,其大小长约20~25个核苷酸。成熟的miRNAs是由较长的初级转录物经过一系列核酸酶的剪切加工而产生的,随后组装进RNA诱导的沉默复合体,通过碱基互补配对的方式识别靶mRNA,并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶mRNA或者阻遏靶mRNA的翻译。

优选的,所述miRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO: 1所示,或

所述miRNA的序列为与所述SEQ ID NO: 1具有90%同源性且功能相同的序列。

所述SEQ ID NO: 1序列从5'→3'为: UCCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG。

优选的,所述乳腺癌相关基因为*GPER1* (G蛋白偶联雌激素受体1) 基因。

本发明第二个方面公开了一种核酸药物,所述核酸药物包括上述的miRNA或其人工模拟物;优选的,所述核酸药物还包括药学上可接受的载体或赋形剂。

更优选的,所述核酸药物剂型包括散剂、片剂、颗粒剂、胶囊剂、溶液剂、气雾剂、注射剂、乳剂或混悬剂。

本发明第四个方面一种与是上述核酸药物相关的生物材料,所述生物材料选自下述A)、B) 或C) 中的一种:

A) 与上述的 miRNA 的核苷酸序列互补配对的干扰 RNA 分子或者抑制剂;

B) 包含上述 miRNA 的核苷酸序列的表达载体或重组载体;

C) 包含有 B) 中所述的表达载体或重组载体的细胞或微生物。

优选的,所述表达载体包括 pCDH 载体、pCMVp-NEO-BAN 载体、pEGFP 载体、pEGFT-Actin、pSV2 载体、pCDNA 载体、pLVX 载体、pAAV 载体、pET 载体和 pDsRed 载体中的至少一种。

优选的,所述重组载体构建步骤包括:1) 设计引物,PCR 扩增所述 miRNA 序列;2) 将扩增的序列片段和表达载体酶切,连接目的序列片段和表达载体;3) 将连接产物转化大肠杆菌,培养;4) 鉴定后提取重组质粒并进行包装即得到重组载体。

本发明第五个方面公开了上述的 miRNA 或上述的核酸药物在诊断、预防和/或治疗乳腺癌中的应用。

本发明第六个方面公开了一种筛选上述的可激活疾病相关基因的 miRNA 的方法,包括以下步骤:

S1、通过生物信息学分析,筛选基因座位置与 H3K4me1 或 H3K27ac 重合的 miRNA;

S2、验证步骤 S1 筛选的 miRNA 与其周围 200kb 范围内的靶基因的关系;

S3、获取 S2 中与所述靶基因具有相关性的 miRNA,即为可激活疾病相关基因的 miRNA。

优选的,步骤 S2 中,验证 miRNA 与其周围 200kb 范围内的靶基因的关系的方法包括:实时荧光定量 PCR 检测过表达所述 miRNA 后所述靶基因的表达量。

本发明第七个方面公开了一种用于研究乳腺癌机制的模型,所述模型为 miRNA-增强子-靶基因网络激活模型。

优选的,miRNA 与增强子互相作用进而正向激活靶基因从而影响肿瘤的增殖生长,所述 miRNA 为 miR-339;

优选的,所述模型的构建方法包括:筛选位于增强子区域的多个 miRNA,分别将所述 miRNA 在不同种类的细胞中过表达,发现在基因组上与所述 miRNA 邻近的多个基因被转

录激活；得到 miRNA-增强子-靶基因网络激活模型。

本发明第八个方面公开了上述的模型在乳腺癌领域中的应用；优选的，所述模型在制备治疗乳腺癌药物中的应用。

发明人前期在不同的组织细胞中，对 1594 条 miRNA 前体进行了系统地生物信息学分析，发现 300 多条 miRNA 前体在基因组中的位置与增强子的组蛋白修饰标志 H3K4me1 或 H3K27ac 高度重叠。并且发现，这些 miRNA 大多能够定位于细胞核内，进一步研究发现这些 miRNA 能够与增强子结合，进而在全基因组的水平上激活基因表达。鉴于增强子和 miRNA 都参与个体发育和疾病发生等过程，发明人将二者联系起来，探究其在肿瘤等疾病发生中的重要作用。

本发明首先通过将 miRNA miR-339 基因序列过表达，激活周围基因表达水平，影响乳腺癌细胞系的生物学功能。上述筛选及验证对乳腺癌的诊断及检测以及药物开发方面均具有很好的应用价值。本发明所涉及 miR-339 可以通过增强子激活基因的表达，与乳腺癌密切相关，其人工合成的类似物或者抑制剂可用于核酸药物的开发。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，而不超出本发明的构思与保护范围。

本发明相对于现有技术具有如下优点：本发明提供了可激活疾病相关基因的 miR-339 与乳腺癌相关，为乳腺癌等疾病的诊断、治疗提供新的策略和潜在的药物靶点。并且，本发明首次将“miRNA-增强子-靶基因网络激活模型”理论应用于解释乳腺癌的发生发展现象，即核内 miR-339 与增强子互作进而正向激活靶基因从而影响肿瘤的增殖生长，这一理论与现有技术“miRNA 的负向调控机制”完全不同，克服了现有技术的偏见。

附图说明

图 1 为本发明实施例 2 中的乳腺癌细胞系 T47D 中 miR-339 和靶基因 *GPER1* 的表达量

(图中“Relative expression levels”指“相对表达水平”);

图2为本发明实施例2中的乳腺癌细胞系4175中miR-339和靶基因*GPER1*的表达量;

图3为本发明实施例3中的双荧光素报告基因实验检测增强子序列活性;

图4为本发明实施例3中的双荧光素报告基因实验阐述miR-339的表达可以对增强子活性的影响;

图5为本发明实施例3中的ChIP-seq分析过表达miR-339后,miR-339 DNA locus位置附近H3K27ac富集明显高于对照组;

图6为本发明实施例3中的过表达miR-339可以激活增强子活性。ChIP-QPCR检测过表达miR-339后,miR-339 DNA locus位置附近存在显著的H3K27ac富集(图中“input”指“阳性对照”);

图7为本发明实施例3中的敲除增强子序列后过表达miR-339,无法重激活靶基因*GPER1*;

图8为本发明实施例3中的miR-339过表达的乳腺癌细胞株4175的增殖能力图;

图9为本发明实施例3中的miR-339过表达的乳腺癌细胞株T47D的增殖能力图;

图10为本发明实施例3中的干扰*GPER1*表达后的乳腺癌细胞株4175的增殖能力图;

图11为本发明实施例3中的干扰*GPER1*表达后的乳腺癌细胞株T47D的增殖能力图;

图12为本发明实施例3中的miR-339过表达的乳腺癌细胞株4175的克隆形成图;

图13为本发明实施例3中的miR-339过表达的乳腺癌细胞株T47D的克隆形成图;

图14为本发明实施例3中的干扰*GPER1*表达后的乳腺癌细胞株4175的克隆形成图;

图15为本发明实施例3中的干扰*GPER1*表达后的乳腺癌细胞株T47D的克隆形成图;

图16为本发明实施例3中的3组小鼠肿瘤图;

图17为本发明实施例3中的3组小鼠肿瘤重量统计图(图中“Tumor weight(g)”指“肿瘤重量”)。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明的技术方案进行详细描述，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。

下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。本发明所用试剂和原料均市售可得。

本申请早期在研究 miRNA 自身的表观遗传学调控机制时，在 7 种不同的组织细胞中，对 1594 条 miRNA 前体进行了系统分析，结果发现有 300 多条 miRNA 前体在基因组中的位置与增强子的组蛋白修饰标志 H3K4me1 或 H3K27ac 高度重叠。进一步应用 18 种组织细胞的增强子数据库进行比对分析，发现人类的 1881 条 miRNA 的 60% 以上与增强子的组蛋白修饰标志 H3K4me1 或 H3K27ac 重合。基于前期的工作，本申请提出 miRNA—增强子—靶基因网络激活模型理论，这些 miRNA 大多能够定位于细胞核内，进一步研究发现这些 miRNA 能够与增强子结合，进而在全基因组的水平上激活基因表达。进一步地，本申请通过生物信息学数据整合分析，把基因座位置与 H3K4me1 或 H3K27ac 重合的 miRNA 所在位置的 200kb 范围内的靶基因联系起来，发现更多的 miRNA—增强子—靶基因网络可用于解释生命个体的不同生理现象。

目前研究主要集中在 miR-339 通过负性调控靶基因，参与肿瘤发展和转移过程。发明人首先通过生物信息学分析发现 NamiRNA miR-339 是乳腺癌发生发展的关键因子。接着，在 Luminal 型乳腺癌和三阴性乳腺癌细胞系 T47D 和 4175 中分别过表达外源性 miR-339，结果表明过表达 miR-339 后，这两个乳腺癌细胞中抑癌基因 *GPER1* 的表达均上调，它们的增殖和克隆形成能力均受到明显抑制。最后本研究结果在动物实验中进一步得到验证，提示过表达 miR-339 可以再激活抑癌基因 *GPER1* 从而抑制乳腺癌细胞的生长与增殖。

术语说明

如本发明中所述，术语“蛋白”是 25 个天然氨基酸以不同组成和排列方式构成的从二肽到复杂的线性、环形结构的不同肽类的总称，是源于蛋白质的多功能化合物。活性肽具有多种人体代谢和生理调节功能，易消化吸收，有促进免疫、激素调节、抗菌、抗病毒、降血压、降血脂等作用，食用安全性极高，是当前国际食品界最热门的研究课题和极具发展前景的功能因子。

如本发明中所述，术语“克隆”是指复制、拷贝和翻倍，就是从原型中产生出同样的复制品，它的外表及遗传基因与原型完全相同。

如本发明中所述，术语“测序”指的是对基因的序列进行判断的一种方法。

实施例 1 miRNA 过表达载体构建

本实施例为 miR-339 过表达载体的构建，其步骤主要包括：

1.1、序列获取和引物设计

首先从 UCSC 数据库和 miRbase 数据库上获取 pri-miR-339 的 DNA 序列信息，利用 Primer 5.0 软件设计相关引物序列，再用 BLAST 检测引物适用性。引物委托上海桑尼生物科技有限公司进行合成。最终设计的引物为：PCDH339-EcoRI-F 和 PCDH339-BamHI-R。

PCDH339-EcoRI-F

:

GAAGATTCTAGAGCTAGCGAATTCGCCACAGGCAGGTGCCACC (SEQ ID NO: 2);

PCDH339-BamHI-R

:

GCAGATCCTTCGCGGCCGCGGATCCACACCAGTGGAACATCCCATGC (SEQ ID NO: 3)。

1.2、PCR 扩增获取 pri-miR-339 DNA 序列

使用 293T 细胞的基因组作为模板以及步骤 1.1 设计的引物进行 PCR 扩增。其中，

PCR 反应体系：

2× PCR buffer KODFX

25μL

10uM F/R primers	1.5μL
2mM dNTPs	10μL
模板 gDNA	1μL (150ng/μL)
KODFX Enzyme	1μL (1.0U/μL)
ddH ₂ O	加至 50μL。

其中, KODFX 高保真酶购于 TOYOBO 公司, 货号 KFX-101。

PCR 反应条件:

94°C	2min	
98°C	10s	} 34 个循环
60°C	30s	
68°C	35s (1kb/min)	
72°C	5min	
4°C	∞	

1.3、PCR 产物的回收、酶切及纯化

PCR 产物的回收: 将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 并使用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技公司)回收目的片段。

酶切及纯化: 酶切过程参照 NEB 网站酶切体系 37°C酶切过夜, 并采用 PCR 产物回收试剂盒(天根生化科技公司)纯化回收。

1.4、连接

利用 T4 连接酶, 将酶切后的 PCR 产物和酶切后的 pCDH 载体连接, 16°C连接过夜。

连接体系:

PCR 产物	1μl
--------	-----

酶切后的 pCDH 载体	1 μ l
T4 DNA 连接酶缓冲液	1 μ l
T4 DNA 连接酶	1 μ l
H ₂ O	加至 10 μ l。

1.5、转化、挑取单克隆

(1) 将 10 μ l 步骤 1.4 得到的连接产物加入 50 μ l 的 DH5 α 感受态细胞中，冰上孵育 30min。

(2) 42°C 热激感受态细胞 90s 后，立即放到冰上 5min。

(3) 在超净工作台中加入 300 μ l 不含抗生素的 LB 液体培养基，37°C 恒温摇床中摇 30min。

(4) 菌液 1000g 离心 5min 后弃上清，剩 50 μ l 菌液，将菌液均匀涂到氨苄抗性的 LB 固体平板上，37°C 恒温培养箱培养过夜。

(5) 从过夜培养的平板上挑取适量单克隆菌落，分别放入加有 200 μ l 氨苄抗性 LB 液体培养基的 EP 管中，37°C 恒温摇床中摇菌 2h 后通过 PCR 克隆鉴定。

(6) PCR 克隆鉴定，使用 293T 细胞的基因组作为模板进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系：

2 $\times$ Taq Mix	5 μ L
10uM F primers	0.5 μ L
10uM R primers	0.5 μ L
菌液	1 μ L
ddH ₂ O	加至 10 μ L。

其中，2 $\times$ Taq Master Mix 购于 lifetech 公司。

PCR 反应条件：

98°C	2min	
98°C	10s	} 30 个循环
65°C	30s	
72°C	20s (1kb/min)	
72°C	5min	
4°C	∞	

取少量菌液接入到 LB 培养基中，加入相应的抗生素（氨苄或者卡那），以 250-300rpm/min 的转速，37°C 振荡培养过夜。抽提质粒获得过表达 miR-339 的质粒 PCDH-miR339。

实施例 2 miR-339 激活靶基因 *GPER1*

本实施例在乳腺癌细胞 T47D 和 4175 中过表达 miR-339 序列，对周围基因表达水平进行检测。

2.1、脂质体法包制慢病毒：依照分子克隆，将实施例 1 得到的质粒 PCDH-miR339 及病毒包装质粒 psPAX2 和衣壳质粒 pMD2.G-VSVG 转入 293T 细胞。分别于 48h 和 72h 后各收取一次上清，将收取的上清于 0.45μm 滤器过滤细胞碎片后得到慢病毒原液。

2.2、感染细胞：提前将需要被感染的细胞按照~20 万每皿铺于 6cm 培养皿中，待第二天细胞贴壁之后进行第一次感染，第三天再重复感染一次；第四天让细胞恢复一天不加入任何刺激；第五天开始对质粒所带的对应杀药标记进行药物筛选。

2.3、实时荧光定量 PCR

（1）总 RNA 提取

准备约 10^6 - 10^7 被感染的细胞，用 PBS 重悬后离心去除上清，加入 1 ml Trizol 室温裂解 5min，然后加入 0.2ml 氯仿，涡旋震荡仪震荡 15s，室温静置 2min。4°C 离心机离心 15min，13300rpm。转移上层无色水相于另一 EP 管中。加入等体积异丙醇，涡旋震荡仪充分混合，

入 4°C 离心机离心 10min, 13300rpm。倒掉上清, 加入 DEPC 水配制的 75% 乙醇 1ml, 上下颠倒至沉淀悬浮起来, 入 4°C 离心机离心 5min, 13,300rpm。用移液器吸尽上清, 室温干燥 5-20min, 期间观察沉淀形态, 待其刚刚变透明时, 根据沉淀的量将其溶解于 40-100 μ l DEPC 水中。取 1 μ l 在 Nanodrop 上测定其浓度以及 OD260/OD280。提取的 RNA 于 -80°C 冰箱保存。

(2) 逆转录合成 cDNA

逆转录使用 Takara(D2680A)的反转录 PCR 试剂盒。

反应体系:

5 $\times$ PrimeScript Buffer	4 μ l
dNTP Mixture(2.5mM each)	4 μ l
Random6mers(100 μ M)	1 μ l
OligodT Primer(50 μ M)	1 μ l
PrimeScript Reverse Transcriptase(200U/ μ l)	0.5 μ l
RNase Inhibitor(40U/ μ l)	0.5 μ l
Total RNA	1 μ g
RNase Free dH ₂ O	加至 20 μ l。

反转录 PCR 条件: 42°C 10min, 95°C 2min。

(3) RT-qPCR

使用 Takara 实时荧光定量 PCR 试剂盒检测目的基因转录水平上的表达情况。

反应体系:

SybrGreenMix	5 μ l
Forward(10 μ M)	1 μ l
Reverse(10 μ M)	1 μ l

cDNA

3 μ l。

通过分析试验结果发现，通过克隆入 miR-339 序列，乳腺癌细胞 T47D 和 4175 中过表达 miR-339 分别为 10.56 倍和 3.79 倍。且乳腺癌细胞 T47D 和 4175 中的 *GPER1* 均被激活。结果如图 1 和图 2 所示。图 1 中，乳腺癌细胞系 4175 中 miR-339 过表达 3.79 倍，靶基因 *GPER1* 被激活 2.80 倍；图 2 中，乳腺癌细胞系 T47D 中 miR-339 过表达 10.56 倍，靶基因 *GPER1* 被激活 3.54 倍。上述结果表明，乳腺癌细胞系中 miRNA-339 可以激活抑癌基因 *GPER1* mRNA 转录水平。

2.3、双荧光素报告基因实验

(1) 将 miR-339 DNA locus 位置的上下游 588bp DNA 序列扩增并插入到报告基因载体 PGL3-promoter 上，验证 miR-339 DNA locus 的这一段序列是否具有增强子活性。我们在 293T 细胞中转染插入 miR-339 DNA locus 序列的报告基因载体 (pGL3-miR-339)，和空载的对照组相比较 (pGL3)，24 小时后收集细胞检测荧光强度，结果显示实验组的活性更高 (图 3)，提示插入的 miR-339 locus 序列具有增强子活性，可以增强报告基因的活性。

(2) 接下来，本发明想进一步探讨 miR-339 是否可以促进增强子的活性。将 miR-339 的表达质粒 (PSR-339) 和插入 miR-339 locus 的 pGL3-p-339 载体同时转染到 293T 细胞中进行双荧光素报告基因实验。结果表示，在共转入 miR-339 的表达质粒 (PSR-339) 和插入 miR-339 locus 的 pGL3-p-339 载体后，报告基因活性明显比只转染 pGL3-p-339 载体的对照组活性更高，提示增强子活性被 miR-339 提高 (图 4-a, b)。

(3) 突变结合位点。通过构建 miR-339 表达质粒的突变质粒 (mut-PSR-339) 以及增强子序列质粒 pGL3-p-339 的突变质粒 (mut-pGL3-p-339)，结合位点突变后的报告基因活性不能继续被激活 (图 4-a, b, c, d)；如果结合位点按照界碱基互补配对的方式突变，报告基因的活性能继续被激活 (图 4-a, c, d, e)。提示 miR-339 激活增强子依赖于 miR-339 和

增强子结合序列的完整性，也就是种子序列结合位点的互补性。

2.4、染色质免疫共沉淀实验

对 293T 细胞过表达 miR-339 的实验组和对照组 H3K27ac ChIP 纯化的 DNA 进行文库构建，质检合格的文库进行高通量测序分析，以确定 miR-339 附近的增强子是否被过表达的 miR-339 激活。H3K27ac ChIP-seq 数据分析结果（图 5）以及 QPCR 结果（图 6）显示，与对照组细胞相比，位于 *GPER1* 基因上游大约 60kb 位置的一段 DNA 序列在 miR-339 过表达后出现明显的 H3K27ac 富集，提示该区域为一个被 miR-339 所激活的增强子，而这个位置正好是和 miR-339 locus 重合。

2.5、CRISPR 敲除实验

（1）首先设计增强子区域 miR-339 结合位点的 gRNA，构建了 CRISPR 敲除质粒（CRISPR-339/GFP）并转染到 293T 细胞中；

（2）通过 96 孔板稀释法，结合快速克隆验证和 Sanger 测序等方法我们筛选获得了 miR-339 结合位点缺失的单克隆细胞株；

（3）对敲除增强子序列后的细胞再进行过表达 miR-339，利用 QPCR 实验进一步研究增强子序列的完整性对 miR-339 激活作用的影响。敲除增强子序列后过表达 miR-339，24 小时后收集细胞进行 QPCR，实验结果表明，如图 7 所示，miR-339 成功过表达，但是 *GPER1* 的表达却明显下调，提示即使在敲除增强子序列中的细胞中再过表达 miR-339 也不能激活靶基因 *GPER1*。

实施例 3 miR-339 通过靶向激活靶基因 *GPER1* 抑制乳腺癌细胞增殖

3.1、在实施例 2 的基础上进一步通过 CCK8 的增殖检测并评估慢病毒构建的稳定表达 miR-339 的乳腺癌稳转细胞株 4175 和 T47D 的增殖能力。并且，每组设立对照组为：转染空载病毒液的乳腺癌细胞株 4175 和 T47D。

结果如图 8 和 9 所示。与对照组相比，miR-339 过表达的乳腺癌细胞株 4175 和 T47D 的增殖能力均下降。

3.2、进一步研究 *GPRI* 对乳腺癌细胞系增殖能力的影响。通过转染 shGPRI 干扰乳腺癌细胞系 4175 和 T47D 中 *GPRI* 的表达，通过 CCK8 的增殖检测 *GPRI* 对两个乳腺癌细胞系的增殖影响。并且，每组设立对照组为：转染空载病毒液的乳腺癌细胞株 4175 和 T47D。

结果如图 10 和 11 所示，两组乳腺癌细胞 4175 和 T47D 中，干扰 *GPRI* 表达后的实验组比对照组细胞数目明显多，提示 *GPRI* 对乳腺癌细胞系的增殖有抑制作用。

3.3、在实施例 2 的基础上进一步通过克隆形成的增殖检测并评估慢病毒构建的稳定表达 miR-339 的乳腺癌稳转细胞株 4175 和 T47D 的增殖能力。并且，每组设立对照组为：转染空载病毒液的乳腺癌细胞株 4175 和 T47D。

结果如图 12 和 13 所示。与对照组相比，miR-339 过表达的乳腺癌细胞株 4175 和 T47D 的增殖能力均下降。

3.4、进一步研究 *GPRI* 对乳腺癌细胞系增殖能力的影响。通过转染 shGPRI 干扰乳腺癌细胞系 4175 和 T47D 中 *GPRI* 的表达，通过克隆形成实验的增殖检测 *GPRI* 对两个乳腺癌细胞系的增殖影响。并且，每组设立对照组为：转染空载病毒液的乳腺癌细胞株 4175 和 T47D。

结果如图 14 和 15 所示，两组乳腺癌细胞 4175 和 T47D 中，干扰 *GPRI* 表达后的实验组比对照组形成克隆数目明显多，提示 *GPRI* 对乳腺癌细胞系的增殖有抑制作用。

3.5、将稳定表达 miR -339 和相应空载的对照组稳转细胞株及过表达 miR-339 后敲低 *GPRI* 的乳腺癌细胞株，3 组细胞株分别注射到裸鼠的后背，饲养并观察每组裸鼠后背成瘤状况。注射细胞 4 周后裸鼠背上开始成瘤，记录为 d0 天，在 d0 后的第 28 天，部分成瘤裸鼠出现死亡，立即将所有裸鼠引颈处死，收集瘤子，统计肿瘤大小和重量。

收集的肿瘤如图 16 和 17 所示，图 16 为各组肿瘤图，图 17 为肿瘤重量统计图。过表达 miR-339 的实验组裸鼠瘤子明显比对照组要小，提示 miR-339 有抑制乳腺癌肿瘤的发生发展的潜力；而在过表达 miR-339 后重新敲低 *GPER1* 的裸鼠成瘤大小要比过表达 miR-339 的实验组裸鼠瘤子大，说明 *GPER1* 在裸鼠中可以抑制肿瘤生长。

综合实施例 1-3，miR-339 位于人类基因组 7 号染色体，目前研究主要集中在 miR-339 通过负性调控靶基因，参与肿瘤发展和转移过程。本申请首先通过生物信息学分析发现 miR-339 是乳腺癌发生发展的关键因子。并且，在 Luminal 型乳腺癌和三阴性乳腺癌细胞系 T47D 和 4175 中分别过表达外源性 miR-339，结果表明过表达 miR-339 后，这两个乳腺癌细胞中抑癌基因 *GPER1* 的表达均上调，它们的增殖和克隆形成能力均受到明显抑制。最后申请的实验结果在动物实验中进一步得到验证，提示过表达 miR-339 可以再激活抑癌基因 *GPER1* 从而抑制乳腺癌细胞的生长与增殖。*GPER1* 是 G 蛋白偶联受体，多次被报道作为抑癌基因在与雌激素相关的癌症中表达下调或者失活，并与肿瘤的不良预后相关。本申请的研究结果提示 miR-339 的类似物或者模拟物可以作为三阴性乳腺癌治疗的潜在策略。

以上对本发明的具体实施例进行了详细描述，但其只作为范例，本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言，任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此，在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改，都应涵盖在本发明的范围内。

权 利 要 求 书

1.一种可激活乳腺癌相关基因的miRNA，其特征在于，所述miRNA的基因座位置与增强子的组蛋白修饰标志H3K4me1或H3K27ac重合。

2.根据权利要求1所述的miRNA，其特征在于，所述miRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO：1所示，或

所述miRNA的序列为与所述SEQ ID NO：1具有90%同源性且功能相同的序列。

3.根据权利要求1所述的miRNA，其特征在于，所述乳腺癌相关基因为*GPER1*基因。

4.一种核酸药物，其特征在于，所述核酸药物包括权利要求1-3任一项所述的miRNA或其人工模拟物；优选的，所述核酸药物还包括药学上可接受的载体或赋形剂。

5.一种与权利要求4所述的核酸药物相关的生物材料，其特征在于，所述生物材料选自下述A)、B)或C)中的一种：

A) 与权利要求1-3任一项所述的miRNA的核苷酸序列互补配对的干扰RNA分子或者抑制剂；

B) 包含有权利要求1-3任一项所述miRNA的核苷酸序列的表达载体或重组载体；

C) 包含有B)中所述的表达载体或重组载体的细胞或微生物。

优选的，所述表达载体包括pCDH载体、pCMVp-NEO-BAN载体、pEGFP载体、pEGFT-Actin、pSV2载体、pCDNA载体、pLVX载体、pAAV载体、pET载体和pDsRed载体中的至少一种。

优选的，所述重组载体构建步骤包括：1)设计引物，PCR扩增所述miRNA序列；2)将扩增的序列片段和表达载体酶切，连接目的序列片段和表达载体；3)将连接产物转化大肠杆菌，培养；4)鉴定后提取重组质粒并进行包装即得到重组载体。

6.权利要求1-3任一项所述的miRNA或权利要求4所述的核酸药物在诊断、预防和/或治疗乳腺癌中的应用。

7.一种筛选权利要求1-3任一项所述的可激活疾病相关基因的miRNA的方法，其特征

在于，包括以下步骤：

- S1、通过生物信息学分析，筛选基因座位置与 H3K4me1 或 H3K27ac 重合的 miRNA；
- S2、验证步骤 S1 筛选的 miRNA 与其周围 200kb 范围内的靶基因的关系；
- S3、获取 S2 中与所述靶基因具有相关性的 miRNA，即为可激活疾病相关基因的 miRNA。

8.根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，步骤 S2 中，验证 miRNA 与其周围 200kb 范围内的靶基因的关系的方法包括：实时荧光定量 PCR 检测过表达所述 miRNA 后所述靶基因的表达量。

9.一种用于研究乳腺癌机制的模型，其特征在于，所述模型为 miRNA-增强子-靶基因网络激活模型。

10.根据权利要求 9 所述的模型，其特征在于，miRNA 与增强子互相作用进而正向激活靶基因从而影响肿瘤的增殖生长，所述 miRNA 为 miR-339；

优选的，所述模型的构建方法包括：筛选位于增强子区域的多个 miRNA，分别将所述 miRNA 在不同种类的细胞中过表达，发现在基因组上与所述 miRNA 邻近的多个基因被转录激活；得到 miRNA-增强子-靶基因网络激活模型。

11.根据权利要求 9-10 所述的模型在乳腺癌领域中的应用；优选的，所述模型在制备治疗乳腺癌药物中的应用。

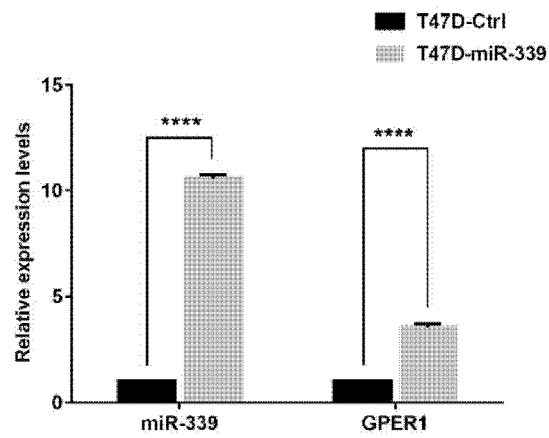


图 1

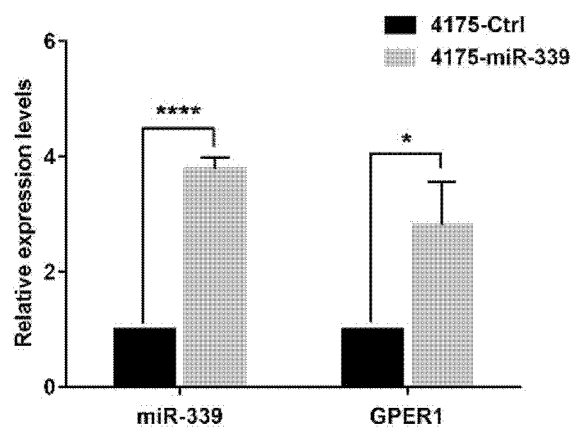


图 2

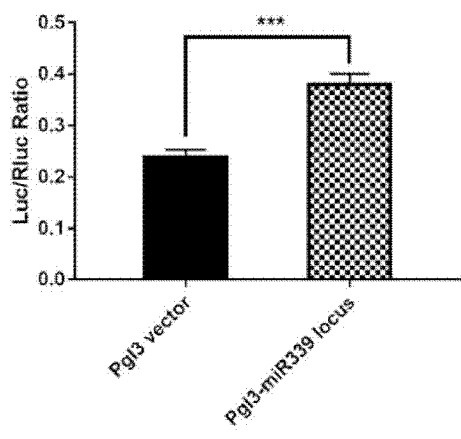


图 3

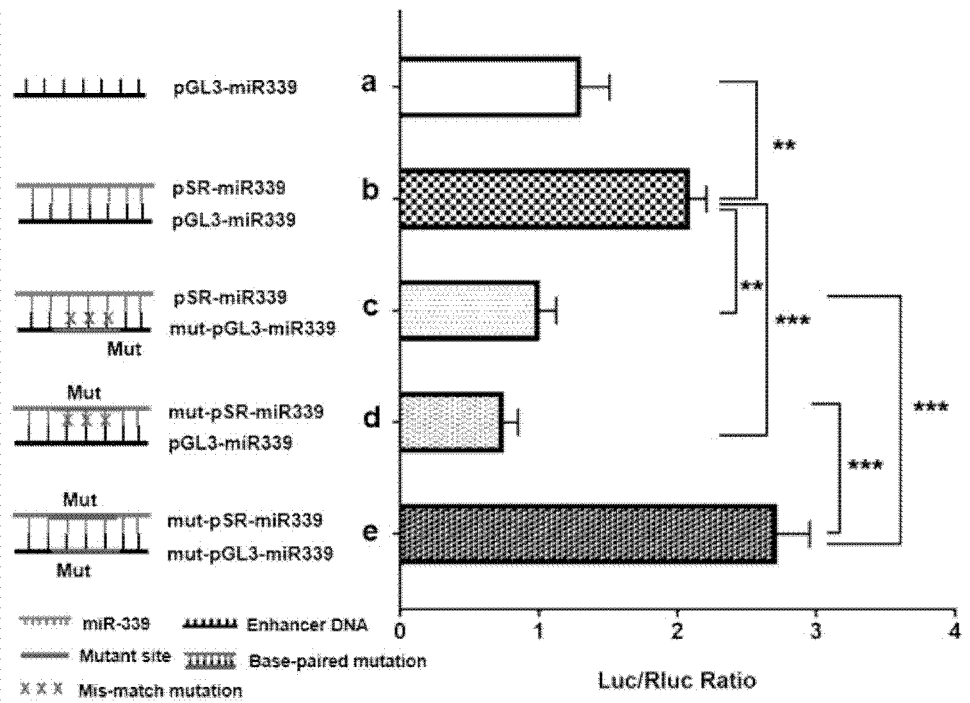


图 4

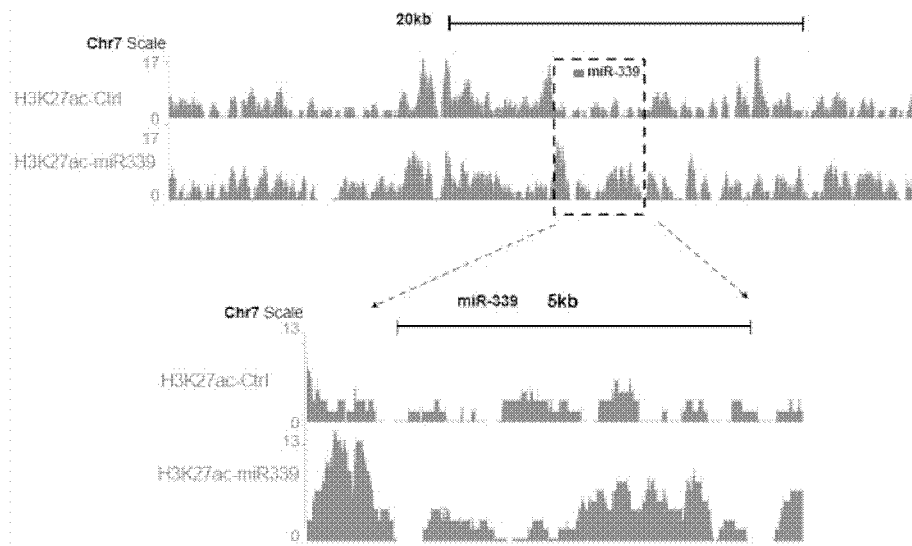


图 5

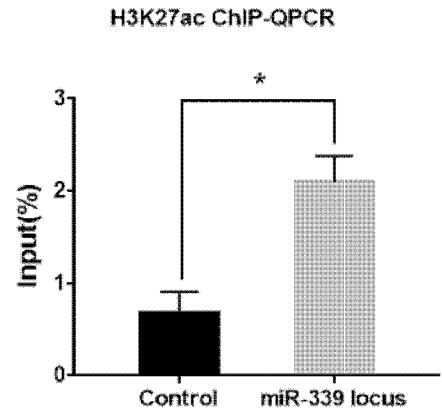


图 6

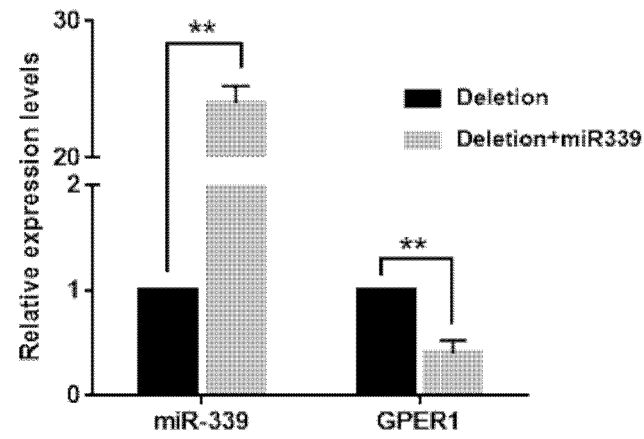


图 7

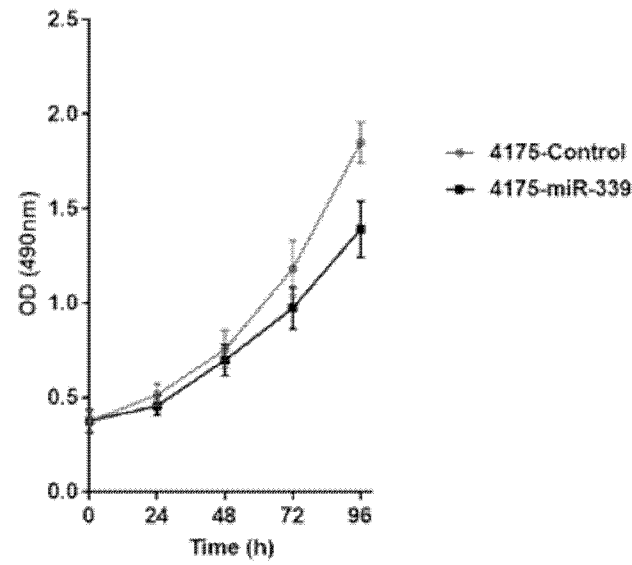


图 8

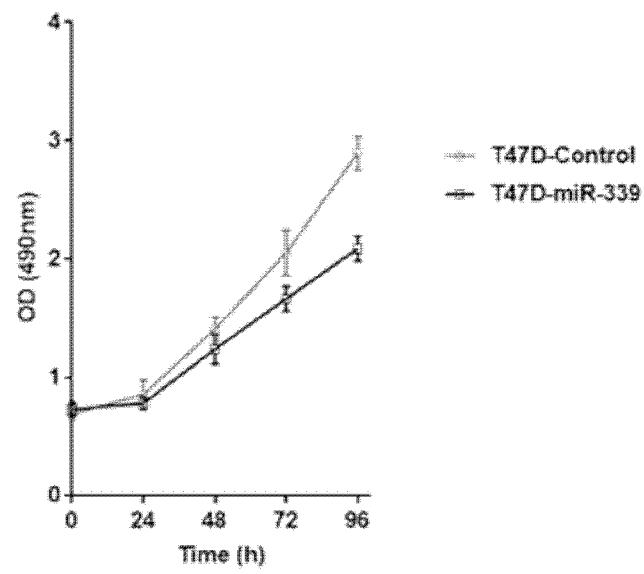


图 9

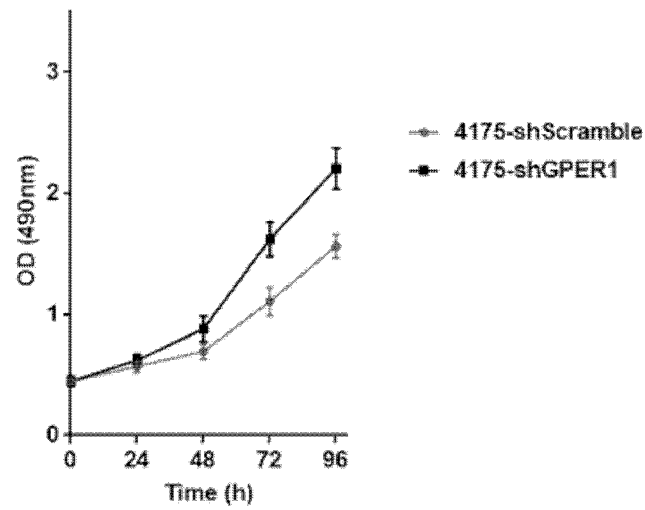


图 10

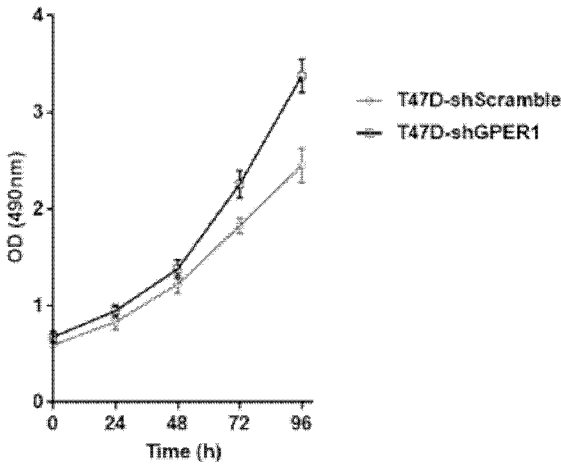


图 11

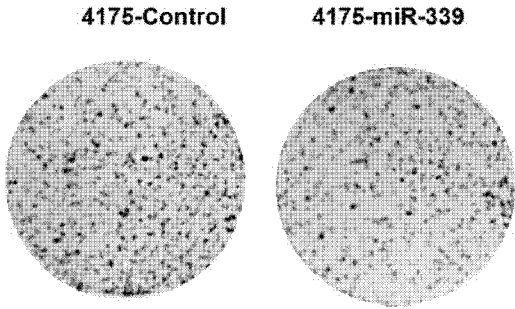


图 12

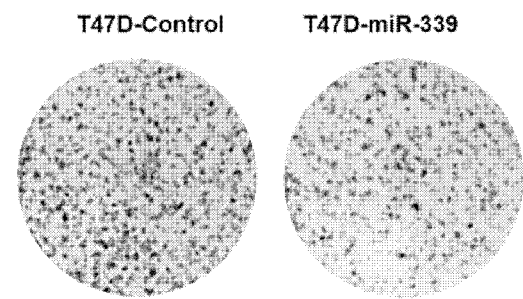


图 13

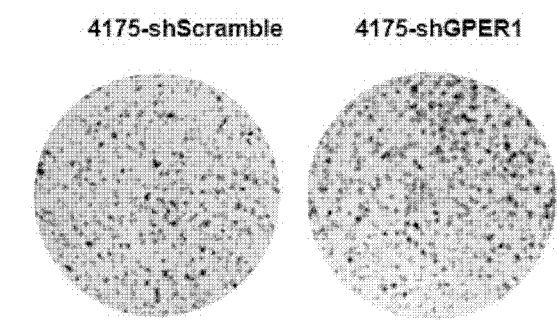


图 14

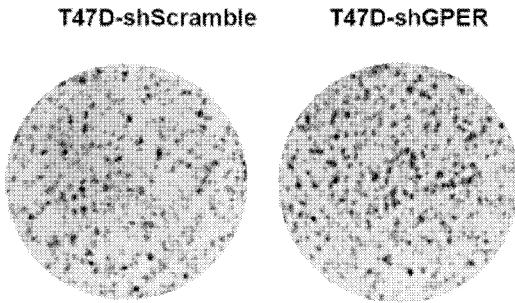


图 15

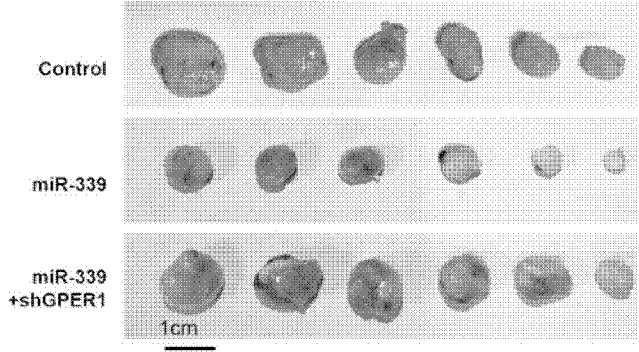


图 16

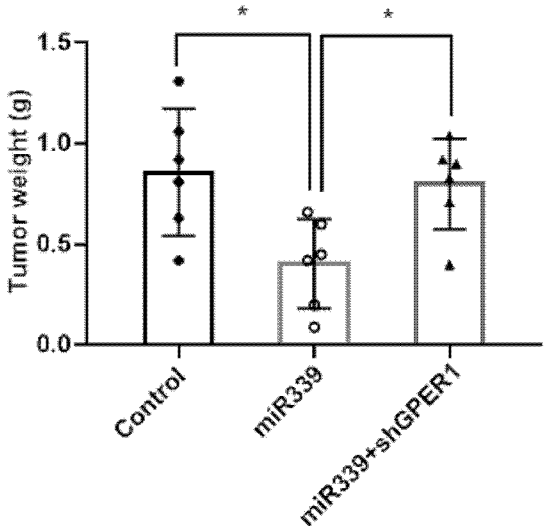


图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/104248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 15/14(2006.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i; G16B 15/30(2019.01)i; G16B 20/00(2019.01)i; G16B 40/00(2019.01)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; C12Q; G16B

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)

DWPI, CNTXT, WPABSC, ENTXT, OETXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+EMBL+DDBJ; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 对SEQ ID NO: 1所示序列进行检索, search conducted for the sequence as shown in SEQ ID NO: 1, miR-339, miR-339-5p, miRNA-339, miRNA 339, miR 339, 乳腺癌, breast cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"TPA: Homo sapiens microRNA hsa-miR-339-5p" <i>GenBank: LM379269.1</i> , 03 March 2015 (2015-03-03), see nucleotide sequence and related information	1-5
X	王艳 (WANG, Yan). "人乳腺癌细胞侵袭相关miRNAs的筛选及has-miR-339-5p生物学功能的初步研究 (The Screening of Invasion-related miRNAs in Breast Cancer Cell and the Preliminary Study on Biological Function of hsa-miR-339-5p)" <i>中国优秀硕士学位论文全文数据库 (硕士) 医药卫生科技辑 (Non-official translation: Medicine and Health Sciences, China Master's Theses/Doctoral Dissertations Full-Text Database (Master))</i> , No. 1, 15 January 2011 (2011-01-15), see abstract, section 6	1-11
X	吴衍等 (WU, Yan et al.). "血清miR-196a-5p 和miR-339-5p 表达水平在乳腺癌诊断中的应用价值 (Application Value of Serum mi R-196a-5p and mi R-339-5p Expression Levels in Diagnosis of Breast Cancer)" <i>中国普通外科杂志 (Chinese Journal of General Surgery)</i> , Vol. 30, No. 5, 31 May 2021 (2021-05-31), see abstract	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2022

Date of mailing of the international search report

10 October 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/104248**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113528522 A (FUDAN UNIVERSITY) 22 October 2021 (2021-10-22) see claims 1-11	1-11
X	CN 105586401 A (CHANGZHOU JIEAO MEDICAL INSPECTION INST CO., LTD.) 18 May 2016 (2016-05-18) see abstract, and claim 1	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/104248

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:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
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 forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - [1] The actually submitted sequence table is an XML file in Standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/104248**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.: **6、 11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 6 and 11 relate to a method for treating a living human or animal body. Therefore, the search for claim 6 was conducted on the basis that said claim is expected to be “an application of the miRNA according to any one of claims 1-3 or the nucleic acid drug according to claim 4 in the preparation of a reagent for diagnosing, preventing and/or treating breast cancer” . The search for claim 11 was conducted on the basis that said claim is expected to be “an application of the model according to claims 9-10 in the preparation of drugs for treating breast cancer” .
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/104248

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	113528522	A	22 October 2021	None	
CN	105586401	A	18 May 2016	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/104248

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i;
A61P 15/14(2006.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i; G16B 15/30(2019.01)i; G16B 20/00(2019.01)i; G16B
40/00(2019.01)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; A61K; A61P; C12Q; G16B

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))

数据库: DWPI, CNTXT, WPABSC, ENTXT, OETXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+EMBL+DDBJ; 中国专利生物序列检索系统 检索词: 对SEQ ID NO:1所示序列进行检索, miR-339, miR-339-5p, miRNA-339, miRNA 339, miR 339, 乳腺癌, breast cancer

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	"TPA: Homo sapiens microRNA hsa-miR-339-5p" GenBank: LM379269.1, 2015年3月3日 (2015 - 03 - 03), 参见核苷酸序列及相关信息	1-5
X	王艳. "人乳腺癌细胞侵袭相关miRNAs的筛选及has-miR-339-5p生物学功能的初步研究" 中国优秀硕博学位论文全文数据库(硕士) 医药卫生科技辑, 第1期, 2011年1月15日 (2011 - 01 - 15), 参见摘要、第6节	1-11
X	吴衍等. "血清miR-196a-5p 和miR-339-5p 表达水平在乳腺癌诊断中的应用价值" 中国普通外科杂志, 第30卷, 第5期, 2021年5月31日 (2021 - 05 - 31), 参见摘要	1-6
PX	CN 113528522 A (复旦大学) 2021年10月22日 (2021 - 10 - 22) 参见权利要求1-11	1-11
X	CN 105586401 A (常州杰傲医学检验所有限公司) 2016年5月18日 (2016 - 05 - 18) 参见摘要, 权利要求1	1-6

☐ 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

2022年9月26日

国际检索报告邮寄日期

2022年10月10日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(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

授权官员

邵旭倩

电话号码 010-62411298

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核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

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作为申请一部分的序列表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:

[1] 实际提交的序列表是ST. 26标准的XML文件。

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I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： 6、11
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6、11涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法。因此对于权利要求6的检索是基于将其预期为“权利要求1-3任一项所述的miRNA或权利要求4所述的核酸药物在制备诊断、预防和/或治疗乳腺癌的试剂中的应用。”之后进行的。对于权利要求11的检索是基于将其预期为“根据权利要求9-10所述的模型在制备治疗乳腺癌药物中的应用。”之后进行的。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/104248

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	113528522	A	2021年10月22日	无	
CN	105586401	A	2016年5月18日	无	