



610000

成都市天府新区华阳街道绿野路一段 66 号 3 号楼 2 单元 3 楼 319 号 成都天汇致远知识产权代理事务所(普通合伙)
胡晓(17748496989)

发文日:

2025 年 02 月 11 日



申请号: 202411652407.2

发文序号: 2025021101829750

申请人: 成都市农林科学院,四川农业大学

发明创造名称: circAGO3 相关试剂在调控鸡骨骼肌生长发育中的应用

驳 回 决 定

1. 根据专利法第 38 条及其实施细则第 59 条的规定, 决定驳回上述专利申请, 驳回的依据是:

- ☐ 申请不符合专利法第 2 条第 2 款的规定。
- ☐ 申请属于专利法第 5 条或者第 25 条规定的不授予专利权的范围。
- ☐ 申请不符合专利法第 9 条第 1 款的规定。
- ☐ 申请不符合专利法第 19 条第 1 款的规定。
- ☐ 申请不符合专利法第 22 条第 2 款的规定。
- ☒ 申请不符合专利法第 22 条第 3 款的规定。
- ☐ 申请不符合专利法第 22 条第 4 款的规定。
- ☐ 申请不符合专利法第 26 条第 3 款或者第 4 款的规定。
- ☐ 申请不符合专利法第 26 条第 5 款或者实施细则第 29 条的规定。
- ☐ 申请不符合专利法第 31 条第 1 款的规定。
- ☐ 申请的修改不符合专利法第 33 条的规定。
- ☐ 申请不符合专利法实施细则第 11 条的规定。
- ☐ 申请不符合专利法实施细则第 23 条第 2 款的规定。
- ☐ 分案申请不符合专利法实施细则第 49 条第 1 款的规定。
- ☐ _____

详细的驳回理由见驳回决定正文部分(共 4 页)。

2. 本驳回决定是针对下列申请文件作出的:

- ☐ 原始申请文件。
- ☐ 分案申请递交日提交的文件。
- ☒ 下列申请文件:

申请日提交的摘要附图、说明书第 1-94 段、说明书附图、说明书摘要、核苷酸或氨基酸序列表; 2025 年 1 月 8 日提交的权利要求第 1-3 项。

3. 根据专利法第 41 条及实施细则第 65 条的规定, 申请人对本驳回决定不服的, 可以在收到本决定之日起 3 个月内向专利局复审和无效审理部请求复审。根据专利法实施细则第 113 条的规定, 复审费应在上述期限内缴纳, 期满未缴纳或者未缴足的, 视为未提出请求。

审 查 员: 陈瑶

联系电话: 028-62968530

审查部门: 专利审查协作四川中心





驳回决定

申请号：2024116524072

本决定涉及申请号为 2024116524072 的名称为“circAGO3 相关试剂在调控鸡骨骼肌生长发育中的应用”的发明专利申请（下称“本申请”），申请人为成都市农林科学院、四川农业大学，申请日为 2024 年 11 月 19 日。

一、案由

本申请原申请文件权利要求书包括 3 项独立权利要求 1、3、5 以及 2 项从属权利要求 2、4。

应申请人于 2024 年 11 月 19 日提出的实质审查请求，审查员对本申请进行了实质审查，并于 2024 年 12 月 27 日发出了第一次审查意见通知书，指出权利要求 1-5 不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性。通知书中引用了如下对比文件：

对比文件 1：“circAGO3 facilitates NF- κ B pathway-mediated inflammatory atrophy in chicken skeletal muscle via the miR-34b-5p/TRAF3 axis”，Xiyu Zhao 等，International Journal of Biological Macromolecules，第 137614 页，公开日为 2024 年 11 月 15 日。

申请人于 2025 年 01 月 08 日针对第一次审查意见通知书提交了意见陈述书，将原权利要求 1-2 合并为新的权利要求 1，权利要求 3-4 合并为新的权利要求 2。申请人的意见陈述中仅涉及权利要求的修改方式。

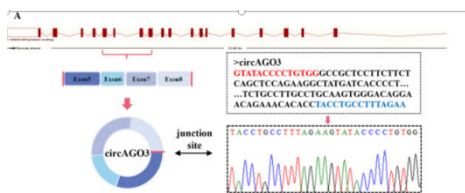
审查员认为，本案事实已经清楚，因此针对申请日提交的摘要附图、说明书第 1-94 段、说明书附图、说明书摘要、核苷酸或氨基酸序列表，2025 年 1 月 8 日提交的权利要求第 1-3 项作出本驳回决定。

二、驳回理由

1、权利要求 1 请求保护降低或抑制 circAGO3 基因表达的试剂在制备促进鸡骨骼肌生长发育的产品上的应用。对比文件 1（“circAGO3 facilitates NF- κ B pathway-mediated inflammatory atrophy in chicken skeletal muscle via the miR-34b-5p/TRAF3 axis”，Xiyu Zhao 等，International Journal of Biological Macromolecules，第 137614 页，公开时间：2024.11.15）公开了我们先前的转录组测序分析已经揭示了在肉鸡胸肌的整个胚胎发育中 circAGO3（一种源自 Argonaute 3(Ago3)基因的新型环状 RNA）的不同表达模式。这种差异表达谱表明 circago3 可能在协调控制骨骼肌发育的复杂分子过程中起调节作用。

2.6. RNA 寡核苷酸的合成和载体构建 靶向 circAGO3 和 TRAF3 的 siRNAs 以及 miR-34b-5p 抑制剂和模拟物由 GenePharma Co., Ltd.（中国上海）设计和合成。所有寡核苷酸的序列见表 S2。此外，使用 pcD25-ciR 载体（Geneseed Biotech, Guangzhou, China）构建 circAGO3 过表达载体，所得构建体通过 Sanger 测序验证。

3. 结果 3.1 circAGO3 的鉴定和表达模式 我们之前的 RNA 测序研究发现 circAGO3 是一种环状 RNA，起源于鸡基因组 23 号染色体上 AGO3 基因的外显子 5、6、7 和 8 剪接，总长度为 508 个核苷酸，



。图 2 显示表明 circAGO3 过表达损害肌肉分化并促进肌肉萎缩，从而对肌肉发育产生不利影响。图 4-5 表明 circAGO3 过表达对肌肉分化产生负面影响，加剧肌管萎缩，并促进 SMSC 的炎症反应。**3.4. CircAGO3 靶向并调节 miR-34b-5p** RNAhybrid 软件预测 circAGO3 可能靶向 miR-34b-5p, qPCR 结果证实 circAGO3 在鸡 SMSC 中的过表达显著降低了 miR-34b-5p 的表达水平(图 6A 和 B)。荧光素酶报告基因测定进一步验证了 circAGO3 和 miR-34b-5p 之间的靶向关系，证明 miR-34b-5p 与 circAGO3 上的反应元件结合(图 6C 和 D)。为了研究 miR-34b-5p 在肌肉发育中的作用，用 miR-34b-5p 抑制剂和模拟物转染 SMSC(图 7A)。抑制 miR-34b-5p 显著降低肌肉分化相关基因 MyoD1、MyoG、Myf5 和 MyHC 的 mRNA 表达水平,以及 MyoG 和 MyHC 的蛋白丰度。此外，这种抑制导致肌管相对面积的显著减少，而 miR-34b-5p 的过表达产生相反的效果，促进 SMSCs 的肌源性分化。(图 7B)。此外，抑制 miR-34b-5p 促进肌肉萎缩相关基因 TRIM63、FBXO32、FOXO1 和 FOXO3 的 mRNA 表达，以及增加 TRIM63 的蛋白质丰度，导致肌管萎缩加剧，其特征是肌管直径减小。相反，miR-34b-5p 的过表达显著抑制肌管萎缩。(图 8A-I)。此外，miR-34b-5p 表达降低导致细胞炎症相关基因表达升高和炎症因子分泌增加，而 miR-34b-5p 表达增加则产生相反的效果(图 8J-M)。这些结果表明，circAGO3 通过分子海绵机制调节 miR-34b-5p，从而影响鸡 SMSC 的肌肉分化、萎缩和炎症反应。

3.5. miR-34b-5p 靶向 TRAF3 调控 NF- κ B 信号通路 RNA 测序显示，与 NC 组相比，LV-ov-circAGO3 组的 TRAF3 表达显著升高(图 9A)。此外，敲低 miR-34b-5p 后 TRAF3 表达水平显著增加(图 9B)。miR-34b-5p 种子序列与 TRAF3 序列的比对揭示了一个直接互补的结合位点(图 9C)。双荧光素酶报告基因测定进一步证实了这种靶向关系，表明 miR-34b-5p 过表达显著降低了 TRAF3-WT 构建体的荧光素酶活性，但不会影响 TRAF3-MT 构建体。为了探索 TRAF3 的功能，使用 siRNA 生成 TRAF3 敲低细胞(图 9E)。结果表明，沉默 TRAF3 显著上调了鸡 SMSC 中肌肉分化相关基因的 mRNA 和蛋白水平(图 9F-H)，导致肌管面积显著增加(图 9I 和 J)。相反，萎缩相关基因的表达显著降低(图 9K-M)，肌管直径显著增加(图 9N 和 O)。此外，TRAF3 表达的下调显著抑制了细胞炎症因子的表达和分泌(图 9P 和 Q)。这些结果表明，TRAF3 是 miR-34b-5p 的直接靶点，circAGO3 可能通过海绵 miR-34b-5p 调节 TRAF3 表达，从而影响肌肉分化、萎缩和炎症反应。为了进一步研究 TRAF3 在 NF- κ B 信号通路中的作用，进行了 Western blot 分析以检查通路相关蛋白丰度的变化。结果表明，TRAF3 敲低显著降低了 TAK1 的蛋白水平和 I κ B α 的磷酸化水平，同时显著提高了 NF- κ B1 蛋白的水平(图 10A-C)。这些结果表明，TRAF3 在调节 NF- κ B 信号通路中起关键作用。



3.6. circAGO3/miR-34b-5p/TRAF3 轴通过 NF- κ B 信号通路调节 SMSC 炎症反应 为了进一步验证 circAGO3 是否通过 miR-34b-5p 调节 NF- κ B 信号通路,进行了共转染实验。结果表明,过表达 miR-34b-5p 降低了 TRAF3 的表达,从而抑制了 TAK1 活性,从而导致 I κ B α 的磷酸化降低。这种抑制阻止了 NF- κ B1 降解,最终阻断了 NF- κ B 信号通路的激活(图 10DF)。然而,miR-34b-5p 的这种抑制作用被 circAGO3 水平的增加所逆转(图 10DF)。此外,通过降低 TRAF3 水平,抑制了 circAGO3 表达升高诱导的 NF- κ B 信号通路的激活(图 10G-I)。这些结果表明, **circAGO3 通过 miR-34b-5p/TRAF3 轴调节 NF- κ B 信号通路,从而调节 SMSCs 中的炎症反应。最后,慢病毒感染实验表明, circAGO3 可以在体内激活 NF- κ B 信号通路,导致炎症介导的鸡骨骼肌分化和萎缩的调节。**

circAGO3 成为鸡骨骼肌生物学的关键调节因子。circAGO3 起源于特定的基因剪接事件,在各个发育阶段表现出强大的稳定性,对肌肉分化和萎缩途径产生深远影响。通过调节 miR-34b-5p 并随后调节 TRAF3, circAGO3 通过 NF- κ B 信号通路协调炎症反应,在塑造鸡骨骼肌发育和体内平衡中发挥关键作用。可见权利要求 1 公开了 circAGO3 基因表达与鸡骨骼肌生长发育的关系,通过 miR-34b-5p/TRAF3 轴调节 NF- κ B 信号通路从而影响鸡骨骼肌发育,即公开了作用机理。权利要求 1 请求保护的技术方案与对比文件 1 公开的内容相比,区别特征为本申请限定具体用途及具体试剂序列和 circAGO3 基因序列。基于此,权利要求 1 实际解决的技术问题是如何应用 circAGO3 基因。

针对该区别特征,对比文件 1 明确教导了 circAGO3 基因、miR-34b-5p 和鸡骨骼肌发育之间的作用机理, circAGO3 基因的靶标 miRNA 为 miR-34b-5p, 与本申请完全相同,本领域技术人员有能力设计 miR-34b-5p 模拟物作为降低或抑制 circAGO3 基因表达的试剂来促进鸡骨骼肌发育,而在知晓 circAGO3 基因和 miR-34b-5p 序列的基础上,相应的模拟物可以常规设计并结合对比文件 1 公开的序列得到 SEQ ID NO.47。即权利要求 1 的技术方案相对于现有技术并未达到预料不到的高度。因此,权利要求 1 不具有突出的实质性特点和显著的进步,不符合专利法第 22 条第 3 款有关创造性的规定。

2、权利要求 2 请求保护升或促进 miR-34b-5p 表达的试剂或者降低所述 miR-34b-5p 吸附的试剂在制备促进鸡骨骼肌生长发育的产品上的应用。参见审查意见 1,对比文件 1 明确教导了 miR-34b-5p 和鸡骨骼肌发育之间的作用机理,呈现正相关,本领域技术人员有能力通过提升或促进 miR-34b-5p 表达的试剂或者降低所述 miR-34b-5p 吸附来促进鸡骨骼肌发育,即相应的用途是显而易见的,本领域技术人员在知晓 miR-34b-5p 序列的基础上有能力常规设计相应的模拟物序列。因此,权利要求 2 不具有突出的实质性特点和显著的进步,不符合专利法第 22 条第 3 款有关创造性的规定。

3、权利要求 3 请求保护一种促进鸡骨骼肌生长发育的方法。结合上述审查意见,对比文件 1 公开了为了研究 miR-34b-5p 在肌肉发育中的作用,用 miR-34b-5p 抑制剂和模拟物转染 SMSC(图 7A)。结果显示



miR-34b-5p 的过表达显着抑制肌管萎缩。(图 8A-I)。此外, miR-34b-5p 表达降低导致细胞炎症相关基因表达升高和炎症因子分泌增加,而 miR-34b-5p 表达增加则产生相反的效果。即对比文件 1 公开了一种促进鸡骨骼肌生长发育的方法,通过 SMSC 中转染载 miR-34b-5p 模拟物,而相应的序列是本领域技术人员有能力设计。因此,权利要求 3 不具有突出的实质性特点和显著的进步,不符合专利法第 22 条第 3 款有关创造性的规定。

三、决定

综上所述,本发明专利申请不符合专利法第 22 条第 3 款的规定,属于专利法实施细则第五十九条第二项的情况,因此根据专利法第三十八条予以驳回。

根据专利法第四十一条第一款的规定,申请人如果对本驳回决定不服,可以在收到本驳回决定之日起三个月内,向专利局复审和无效审理部请求复审。

审查员姓名:陈瑶
审查员代码:30140901