(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103380215 A
(43)申请公布日 2013.10.30

(21)申请号 201180067445.6
(22)申请日 2011.12.15
(30)优先权数据
61/423,456 2010.12.15 US
61/495,224 2011.06.09 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.08.13
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2011/065121 2011.12.15
(87)PCT申请的公布数据
WO2012/083005 EN 2012.06.21
(71)申请人 米拉根医疗公司
地址 美国科罗拉多州
(72)发明人 C. 多尔比 W.S. 马歇尔
E.V. 鲁伊杰 R. 蒙哥马利
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 封新琴
(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书31页
序列表85页 附图25页

(54)发明名称

包含锁定核苷酸的微RNA抑制剂

(57)摘要

本发明提供了化学修饰的寡核苷酸，其能够抑制miR-208家族miRNA，包括miR-208a、miR-208b、和/或miR-499的表达(例如丰度)。本发明在一些实施方案中提供了寡核苷酸，其能够以特异性的方式抑制miR-208a、miR-208b、和miR-499中每一个的表达或丰度。本发明进一步提供了包含寡核苷酸的药物组合物，以及用于治疗患有涉及或牵涉miR-208家族miRNA的状况或病症，例如心血管状况的患者。在多个实施方案中，所述寡核苷酸提供了以下中的一种或多种优势：强度、递送的效率、靶特异性、毒性、和/或稳定性。

CN 103380215 A

1. 一种寡核苷酸，其包含与人 miR-208a 或 miR-208b 的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列，并且具有混合的锁定和非锁定核苷酸，

其中所述寡核苷酸的长度以及锁定核苷酸的数目和位置使得所述寡核苷酸在体外萤光素酶测定法中在大约 50nM 或更少的寡核苷酸浓度，或在小鼠模型中在 25mg/kg 或更少的剂量降低 miR-208a、miR-208b、和 / 或 miR-499 活性。

2. 权利要求 1 的寡核苷酸，其中至少七个核苷酸是锁定核苷酸并且至少一个核苷酸是非锁定的。

3. 权利要求 1 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度是大约 8 个到大约 18 个核苷酸。

4. 权利要求 3 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度是大约 16 个核苷酸。

5. 权利要求 1 的寡核苷酸，其中所述核苷酸序列与 miR-208a 或 miR-208b 的核苷酸序列完全互补。

6. 权利要求 5 的寡核苷酸，其包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列。

7. 权利要求 5 的寡核苷酸，其具有 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列。

8. 权利要求 1 到 7 中任一项的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸不包含具有多于三个相邻的非锁定核苷酸的核苷酸段。

9. 权利要求 8 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸不包含具有多于两个相邻的非锁定核苷酸的核苷酸段。

10. 权利要求 8 或 9 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸具有出现一次的相邻的非锁定核苷酸。

11. 权利要求 1 到 10 中任一项的寡核苷酸，其中与 miR-208a 或 miR-208b 种子区域互补的区域包含至少四个锁定核苷酸。

12. 权利要求 7 的寡核苷酸，其含有至少九个锁定核苷酸。

13. 权利要求 12 的寡核苷酸，其含有至少十一个锁定核苷酸。

14. 权利要求 7 的寡核苷酸，其含有至少三个非锁定核苷酸。

15. 权利要求 14 的寡核苷酸，其含有九个锁定核苷酸和七个非锁定核苷酸。

16. 权利要求 14 的寡核苷酸，其含有十一个锁定核苷酸和五个非锁定核苷酸。

17. 权利要求 7 的寡核苷酸，其中至少位置 1、6、10、13、和 15 是锁定核苷酸。

18. 权利要求 7 的寡核苷酸，其中位置 1、5、6、8、10、11、13、15、和 16 是锁定核苷酸，并且其余的位置是非锁定核苷酸。

19. 权利要求 7 的寡核苷酸，其中位置 1、3、4、5、6、8、10、13、15、和 16 是锁定核苷酸，其余的位置是非锁定核苷酸。

20. 权利要求 7 的寡核苷酸，其中位置 1、4、5、7、9、10、12、14、和 16 是锁定核苷酸，其余的位置是非锁定核苷酸。

21. 权利要求 1 到 20 中任一项的寡核苷酸，其中非处于锁定构象的核苷酸是 2’ 脱氧的。

22. 权利要求 1 到 20 中任一项的寡核苷酸，其中至少一个非锁定核苷酸是 2’ O- 烷基或 2’ 卤代的。

23. 权利要求 1 到 22 中任一项的寡核苷酸，其中所述锁定核苷酸具有 2’ 至 4’ 亚甲基桥。

24. 权利要求 1 到 23 中任一项的寡核苷酸，其具有 5’ 和 / 或 3’ 帽结构。

25. 权利要求 1 到 24 中任一项的寡核苷酸，包含一个或多个硫代磷酸酯连接。

26. 权利要求 25 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸完全是硫代磷酸酯连接的。

27. 权利要求 25 的寡核苷酸，其具有一个到三个磷酸酯连接。

28. 权利要求 7 的寡核苷酸，其具有化合物 10101、10673、10674、10677、10679、10683、10707、或 10680 的结构。

29. 权利要求 1 到 28 中任一项的寡核苷酸，其还包含悬垂的亲脂性基团。

30. 一种药物组合物，其包含

有效量的权利要求 1 到 29 中任一项的寡核苷酸或其药学可接受的盐，以及

药学可接受的载体或稀释剂。

31. 权利要求 30 的药物组合物，其中所述药学可接受的载体包含胶体分散系统、大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠子、水包油乳剂、胶束、混合胶束、或脂质体。

32. 权利要求 30 的药物组合物，其中所述药学可接受的载体或稀释剂基本上由盐水构成。

33. 一种降低或抑制细胞中 miR-208a 和 / 或 miR-208b 活性的方法，其包括使细胞与权利要求 1 到 29 中任一项的寡核苷酸或权利要求 30 到 32 中任一项的组合物接触。

34. 权利要求 33 的方法，其中所述细胞中的 miR-499 的活性也被降低或抑制。

35. 权利要求 33 或 34 的方法，其中所述细胞是哺乳动物细胞。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述细胞是心脏细胞。

37. 权利要求 33 的方法，其中所述细胞是体内的或离体的。

38. 一种预防或治疗受试者中与 miR-208a、miR-208(b) 和 / 或 miR-499 相关联，或由 miR-208a、miR-208(b) 和 / 或 miR-499 介导的状况的方法，其包括向受试者施用权利要求 30 或 32 中任一项的药物组合物。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述状况是心脏状况。

40. 权利要求 38 的方法，其中所述心脏状况是病理性心脏肥大、心肌梗死、或心力衰竭。

41. 权利要求 38 到 40 中任一项的方法，其中所述药物组合物是通过非消化道施用或通过直接注射进入心脏组织而施用的。

42. 权利要求 41 的方法，其中所述非消化道施用是静脉内、皮下、腹膜内、或肌内。

43. 权利要求 38 到 42 中任一项的方法，其中所述组合物是通过口服、经皮、持续释放、控制释放、延迟释放、栓剂、导管、或舌下施用而施用的。

44. 权利要求 38 到 43 中任一项的方法，其中所述受试者是人。

45. 权利要求 38 到 44 中任一项的方法，其中寡核苷酸是以 10mg/kg 或更少的剂量递送的。

46. 权利要求 45 的方法，其中寡核苷酸是在盐水中配制并且皮下施用的。

47. 权利要求 46 的方法，其中寡核苷酸选自命名为 M-10101、M-10673、M-10674、M-10677、M-10679、M-10683、M-10707、和 M-10680 的化合物。

包含锁定核苷酸的微 RNA 抑制剂

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在 2010 年 12 月 15 日提交的美国临时申请第 61/423,456 号，和 2011 年 6 月 9 日提交的美国临时申请第 61/495,224 号的优先权和权益，并将其全文通过提述并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于微 RNA（miRNA 或 miR）抑制剂的化学基序(motif)，并特别涉及化学修饰的 miRNA 反义寡核苷酸，其当施用于患者时，在强度(potency)、递送效率、靶特异性、稳定性和 / 或毒性方面具有优势。

[0004] 发明背景

[0005] 已经发现微 RNA（miRs）牵涉许多的生物过程，包括心脏功能的调控和维持(见 Eva Van Rooij 和 Eric Olson,MicroRNAs:Powerful new regulators of heart disease and proactive therapeutic targets,J.Clin.Invest.117(9):2369-2376(2007);Chien KR,Molecular Medicine:MicroRNAs and the tell-tale heart,Nature447,389-390(2007))。因此 miRs 代表了状况的治疗目标的一个相对较新的类，所述状况如心脏肥大(cardiac hypertrophy)、心肌梗死(myocardial infraction)、心力衰竭(heart failure)、血管损坏(vascular damage)、和病理性心脏纤维化(pathologic cardiac fibrosis)等等。miRs 是小的、不编码蛋白的 RNA，其长度从大约 18 到大约 25 个核苷酸，并通过下述方式充当靶 mRNA 的阻抑物：当它们的序列完美互补时，通过促进靶 mRNA 的降解；或当它们的序列含有错配(mismatch)时，通过抑制靶 mRNA 的翻译。该机理牵涉将成熟 miRNA 纳入 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex,RISC)，其中它与自己的靶 RNA 通过碱基 - 对互补而缔合。

[0006] 反义多核苷酸或模拟 miRNA 功能的多核苷酸（“拟 miRNA”(“miRNA mimetic”)）可以治疗性靶定 miRNA 功能。然而。用基于寡核苷酸的作用剂治疗性靶定 miRNA 提出几个挑战，包括 RNA- 结合亲和力和特异性、细胞摄取的效率和核酸酶(nucleases)抗性。例如，当将多核苷酸引入完整的细胞时，它们会受到核酸酶的攻击和降解，导致活性丧失。虽然已经制备了多核苷酸类似物以试图避免其降解，例如通过 2’ 取代的方式(B.Sproat 等，Nucleic Acids Research17(1989),3373-3386)，修饰经常影响多核苷酸的意图的生物学作用的强度。这种强度的降低，在每一种情况下，可以是由于修饰的多核苷酸不能与靶 RNA 形成稳定的双链体(duplex)和 / 或丢失与细胞机构(cellular machinery)的相互作用。其它的修饰还包括使用锁定核酸，其具备改进 RNA- 结合亲和力的潜力。Veedu RN 和 Wengel J,Locked nucleic acid as a novel class of therapeutic agent.RNA Biology6:3,321-323(2009)。

[0007] 用于 miRNA 抑制剂的寡核苷酸化学型(chemistry patterns)或基序具有改进抑制剂的递送、稳定性、强度、特异性、和 / 或毒性概貌(toxicity profile)的潜力，并且这些对于在治疗语境下有效地靶向 miRNA 功能而言是需要的。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了化学修饰的寡核苷酸，其能够抑制miR-208家族miRNA，包括miR-208a、miR-208b、和/或miR-499的表达(例如丰度)。本发明进一步提供了包含所述寡核苷酸的药物组合物以及治疗有涉及或牵涉miR-208家族miRNA的状况或病症的患者。这类的状况包括各种心血管状况。在多个实施方案中，所述寡核苷酸提供了强度、递送效率、靶特异性、毒性和/或稳定性方面的一种或多种优势。

[0010] 在一个方面，本发明提供了能够降低miR-208家族miRNA的表达或丰度的化学修饰的寡核苷酸。所述寡核苷酸的活性或强度可以体内和/或体外测定。例如，所述寡核苷酸在大约50mM或更小的浓度，或在其它实施方案中，40mM或更小，20nM或更小，或10nM或更小的浓度，可以显著地抑制(例如，大约50%抑制)miR-208miRNA的活性(如在双重萤光素酶测定法测定的)。或者/并且，寡核苷酸的活性可以在合适的小鼠或大鼠模型中，或非人灵长类模型(如在本文中描述的那些)中测定，其中miR-208家族miRNA的抑制(例如，至少50%)在50mg/kg或更小，例如在25mg/kg或更小，10mg/kg或更小，或者5mg/kg或更小的剂量观察到。在这些实施方案中，所述寡核苷酸可以皮下或静脉内给药(dosing)(如本文描述的)，并且可以配制在液体制备物(例如，盐水)中。

[0011] 所述寡核苷酸的核酸序列基本上与人miR-208a或miR-208b的核酸序列(或对应的pre-或pri-miRNA)互补，并且含有锁定和非锁定核苷酸的混合物。例如，所述寡核苷酸可以含有至少三个，至少五个，或至少七个锁定核苷酸，并且至少一个非锁定核苷酸。一般地，所述寡核苷酸的长度以及锁定核苷酸的数目和位置使得所述寡核苷酸在体外萤光素酶测定法中在大约50nM或更小的浓度，或在合适的大鼠或小鼠模型或非人灵长类模型中在50mg/kg或跟小的剂量，如本文描述的，降低miR-208a、miR-208b、和/或miR-499的活性。在例示性的实施方案中，所述锁定核苷酸具有2’到4’的亚甲基桥(methylene bridge)。

[0012] 所述寡核苷酸可以包含，基本上组成为或组成为：全长或截短的miR-208a、miR-208b或miR-499反义序列。在这些实施方案中，所述寡核苷酸的长度为从大约6个到22个核苷酸，或长度为从大约10个到18个核苷酸，或长度为从大约11个到大约16个核苷酸。在一些实施方案中所述寡核苷酸的长度为大约14、15、16或17个核苷酸。所述寡核苷酸可以包含核酸序列5’-TGCTCGTCTTA-3’(SEQ ID NO:1)或可以包含核酸序列5’-TGTTCGTCTTA-3’(SEQ ID NO:2)。在特定的实施方案中，所述寡核苷酸包含、基本上组成为或组成为核酸序列5’-CTTTTTGCTCGTCTTA-3’(SEQ ID NO:3)or5’-CCTTTTGTTCGTCTTA-3’(SEQ ID NO:4)。

[0013] 所述寡核苷酸可以包含至少大约3个、至少大约5个或至少大约7个锁定核苷酸，或至少9个锁定核苷酸，但是在多个实施方案中不是完全由锁定核苷酸组成。一般地，锁定核苷酸的数目和位置使得寡核苷酸以高强度降低或抑制miR-208a、miR-208b、和/或miR-499活性。在一些实施方案中，所述寡核苷酸不含有具有多于四个，或多于三个，或多于两个相邻的非锁定核苷酸的核苷酸段。在例示性的实施方案中，所述寡核苷酸具有正好9个锁定核苷酸和7个非锁定核苷酸。例如，锁定核苷酸的式样可以是至少位置1、6、10、13、和15是锁定核苷酸。在一些实施方案中，至少位置1、5、10、和16是锁定核苷酸。在一些实施方案中，位置1、5、6、8、10、11、13、15、和16是锁定核苷酸，并且其余的位置是非锁定核苷酸。在其它实施方案中，位置1、3、4、5、6、8、10、13、15、和16是锁定核苷酸，其余位置是非锁

定核苷酸。在另外的实施方案中，位置 1、4、5、7、9、10、12、14、和 16 是锁定核苷酸，其余位置是非锁定核苷酸。在一些实施方案中，可以通过使用 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的核酸序列，或本文描述的其变体来应用这些锁定核苷酸的式样。当抑制剂包含或基本上组成为 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的核酸序列时，所述寡核苷酸可以含有所有的锁定核苷酸。

[0014] 对于非锁定核苷酸，所述核苷酸可以含有有关 2' 羟基的 2' 修饰。在一些实施方案中，所述 2' 修饰可以独立地选自 O- 烷基 (O-alkyl)（其可以是取代的）、卤素 (halo)、和脱氧 (deoxy)(H)。

[0015] 寡核苷酸也可以含有一个或多个硫代磷酸键（phosphorothioate linkages）。利于，所述寡核苷酸可以是完全硫代磷酸酯键连的或可以含有大约一半或 3/4 硫代磷酸酯连接。

[0016] 例示性的寡核苷酸抑制剂显示在表 1 中。

[0017] 在另一个方面，本发明提供了包含本发明的寡核苷酸的药物组合物和配制物，其可以牵涉将所述寡核苷酸合并入多种用于细胞递送（cellular delivery）的大分子组合（macromolecular assemblies）、胶束或脂质体组合物。在一些实施方案中，所述寡核苷酸配制为用于常规的静脉内、皮下、或肌内给药。这类配制物可以是常规的水性制备物，例如在盐水中的配制物。在一些实施方案中，组合物适合于或配制为用于皮内、皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射，或通过直接注射进目标组织（例如，心脏组织）。

[0018] 在另外的其它方面，本发明提供了用于递送寡核苷酸和药物组合物至体外或离体的哺乳动物细胞中的方法，用于例如在哺乳动物患者中治疗、改善状况或防止状况的进展。所述方法可以包括施用所述寡核苷酸或包含所述寡核苷酸的组合物至哺乳动物患者或靶细胞的群体中。所述患者可能有与 miR-208 家族表达相关、由 miR-208 家族表达介导、或缘于 miR-208 家族表达的状况。这类状况包括，例如，心脏肥大、心肌梗死、心力衰竭（例如，充血性心力衰竭）、血管损坏、再狭窄（restenosis）、或病理性心脏纤维化。因此，本发明提供了本发明的修饰的寡核苷酸和组合物用于治疗这类状况，以及用于制备用于这类治疗的药物的用途。

[0019] 从下文对本发明的详细描述可以容易地想到本发明的其它方面和实施方案。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1. 用于使用双重萤光素酶测定法体外定量抑制剂活性的 psiCHECK™-2 构建体 (Promega)。

[0022] 图 2. 通过 miR-208a 双萤光素酶鉴定法测量的 miR-208 抑制剂功效。图 2 显示了添加 LNA 的效果 :10673 在 16 个核苷酸中具有 9 个 LNA(9/16)，10674 具有 11/16 个，10677 具有 13/16 个，并且 10101 和 10591 具有 9/16 个。“208 单独”指代单独的萤光素酶构建体，其具有克隆至水母萤光素酶（renilla luciferase）基因的 3' 的 miR-208a 识别位点。“208+ 模拟”包括 mir-208a 的共转染。

[0023] 图 3. 由双重萤光素酶测定法测定的 miR-208 抑制剂对于 miR-208a 的功效。M-10591 是非 - 靶向对照。

[0024] 图 4. 由双重萤光素酶测定法测定的 miR-208 抑制剂对于 miR-208b 的功效。

[0025] 图 5. 由双重萤光素酶测定法测定的 miR-208 抑制剂对于 miR-499 的功效。

[0026] 图 6. 正常小鼠体内给药 miRNA 抑制剂设计物后 miR-208a 和 miR-208b 在心脏中

的表达水平。左边的柱体是 miR-208a 的表达水平，右边的柱体是 miR-208b 的表达水平。

[0027] 图 7. 以 25mg/kg 每两周皮下体内给药 miRNA 抑制剂设计物后的 Dahl 盐 - 敏感大鼠的存活。

[0028] 图 8. 给药如图 7 的抑制剂设计物后的 Dahl 盐 - 敏感大鼠的百分数体重改变。

[0029] 图 9. 显示在前 10 种 miR-208 抑制剂设计物中锁定核苷酸的放置的图。

[0030] 图 10. 在正常小鼠中体内给药 miR-208a 抑制剂设计物后通过实时 PCR 测定的 miR-208a 的丰度。

[0031] 图 11. 在正常小鼠中体内给药 miR-208a 抑制剂设计物后通过实时 PCR 测定的 miR-208b 的丰度。

[0032] 图 12. 抗 miR-208a(M-10101) 的系统递送在心脏中诱导了强力且持久的 miR-208 沉默。图 12 显示在静脉内 (i.v.) 递送递增剂量的抗 miR-208a 后 1 周时的小鼠心脏的实时 PCR 分析，并显示了剂量依赖性的 miR-208a 水平的降低。对于每个剂量 n=4。

[0033] 图 13. 对在指示的时间点收集的心脏组织的实时 PCR 分析。图 13 显示了 i.v.、腹膜内 (i.p) 或皮下 (s.c.) 递送 25mg/kg 的抗 miR-208a(M-10101) 诱导了强力的 miR-208 沉默。对于每个组 n=4。

[0034] 图 14.miR-208a 沉默降低了 miR-499 和 Myh7。图 14A 显示了实时 PCR 分析，演示抗 miR-208a(M-10101) 直到注射后 6 周时均强力地降低了 miR-208a 的心脏水平，其导致了 miR-499 的时间响应性的降低。给药抗 miR-208a 和 -499 的抗 miR 诱导了 miR-208a 和 miR-499 心脏水平的立即降低。图 14B 显示了(通过实时 PCR)Myh7 在 miR-208a 抑制后 4 周时降低了，而 miR-208a 和 miR-499 的抑制在 2 周后降低了 Myh7。图 14C 是对 Myh7 的 Western 印迹法分析，其显示了在抗 miR-208a 或抗 miR-208a/-499 处理后，在指示的时间点的降低的 Myh7 表达。Gapdh 作为加载对照。对于图 14A 和 B，误差棒描述 SEM。对于每个时间点和剂量 n=4。

[0035] 图 15. 组织分布分析指示，直到注射后 6 周时，在血浆、心脏、肝或肾中均可检测到显著量的抗 miR-208a(M-10101)。误差棒描述 SEM。对于每个时间点和剂量 n=4。

[0036] 图 16. 在心力衰竭的过程中 miR-208a 的治疗性沉默是有益的。图 16A 显示了在 Dahl 过敏感大鼠模型中的 Kaplan-Meier 存活曲线，并且显示了对于 HS/ 盐水组和 HS/ 对照组二者，生存响应于 HS 饮食均发生明显下降，而该下降响应于抗 miR-208a(M-10101) 处理得到了显著的改善。图 16B 显示了体重分析，并指示 :接受 8%HS 饮食的 Dahl 过敏感大鼠相比于接受 LS 饮食的动物显示体重增益降低，然而 HS/ 抗 miR-208a 处理的大鼠显示了明显更好的体重增益的维持。对于 (a) 和 (b)，对于 LS/ 盐水 n=6 ;对于 HS/ 盐水和 HS/ 对照 n=15 ;并对于 HS/ 抗 miR-208a n=14。在图上的“n”代表在饮食后第 8 周时残余的存活者的总数。

[0037] 图 17. 接受 4%HS 饮食的 Dahl 大鼠的体重分析(图 17A)，显示了相较于 LS 饮食对照重量增益的显著降低，而每两周 5 和 25mg/kg 的注射足以维持与接受正常饮食的动物相近的体重增益。误差棒描述 SEM，* 相对于 HS 盐水 $p<0.05$，# 相对于 LS 盐水 $p<0.05$。图 17B 显示超声心动图 (echocardiography) 测量结果，指示在饮食开始的 8 周后的抗 miR-208a 处理，响应于 4%HS 饮食的 IVRT 的提高和 MV E/A 的降低得到了显著改进。IVRT 是等容舒张时间 (isovolumic relaxation time)；MV E/A 是二尖瓣早期与主动充盈率比值 (mitral

valve early to active filling velocity ratio)。对于所有的组 n=10。

[0038] 图 18.H&E 和苦味酸天狼猩红染色的左心室组织切片的示意图指示响应于 4%HS 饮食 8 周的心肌细胞肥大和血管周围纤维化的提高，而两个参数都响应于 miR-208a(M-10101) 处理 (图 18A) 而降低了。图 18B 是组织学定量的柱状图示意图，显示在存在抗 miR-208a 的情况下肥大和纤维化显著更少。误差棒描述 SEM，* 相对于 HS 盐水 $p<0.05$，# 相对于 LS 盐水 $p<0.05$。

[0039] 图 19. 抗 miR-208a(M-10101) 处理在 Dahl 盐 - 敏感性大鼠中降低 miR-499 和 Myh7。所有的分析都是在 4%HS 饮食开始 8 周后和抗 miR 处理开始 7 周后进行的。对于 (a) 和 (c) 中的所有组 n=10。图 19A 显示了实时 PCR 分析，其指示了在左心室 (LV) 和右心室 (RV) 中 miR-208a 的剂量依赖的降低，与 miR-499 的剂量相关的降低相对应。虽然 miR-208b 响应于 HS 饮食提高了，但抗 miR-208a 显著地钝化了该响应。施用对照化学品 (针对一种秀丽线虫 (C.elegans)miR) 对于 miR-208a、miR-499 或 miR-208b 的表达没有效果。误差棒描述 SEM，* 相对于 HS 盐水 $p<0.05$，# 相对于 LS 盐水 $p<0.05$。图 19B 显示了响应于抗 miR-208a 处理的 miR-499 和 miR-208b 的调控可以通过 Northern 印迹法分析而确认。U6 作为加载对照。

[0040] 图 20. 实时 PCR 分析显示了 HS 饮食降低 Myh6，然而其提高 Myh7 (图 20A)。抗 miR-208a(M-10101) 处理剂量依赖地提高了 Myh6 的表达而降低了 Myh7b 的表达。抗 miR-208a 剂量依赖地降低了所述 HS 饮食诱导的 Myh7 的提高。误差棒描述 SEM，* 相对于 HS 盐水 $p<0.05$，# 相对于 LS 盐水 $p<0.05$。图 20B 显示 : 对于来自心室组织的 Myh7 的 Western 印迹法分析，其确认了响应于抗 miR-208a 处理的剂量 - 依赖性降低。Gapdh 用作加载对照。

[0041] 图 21. 血浆中的 miR-499 作为抗 miR-208a 功效的生物标记。图 21 显示了对血浆样品的实时 PCR 分析，其指示响应于 HS 饮食的 miR-499 的提高，而抗 miR-208a 在 4%HS 饮食开始后 8 周和抗 miR 处理开始后 7 周显著地降低了检测的血浆中的 miR-499。进一步 miRNA 分析还指示，血浆中可检测的 miR-423-5p 响应于抗 miR-208a 而降低。

[0042] 图 22. 在非洲绿猴 (～ 3kg) 中的组织和血浆分布。将抗 miR10101 (抗 miR-208a) 和 10707 (抗 miR-208b) 通过隐静脉以 25mg/kg 的剂量施用三次，并测定药物血浆清除率 (右边小图)。在四周后收集组织并测定抑制剂 (暗色柱，M-10101 ；浅色柱，M-10707)。

[0043] 图 23. 在非洲绿猴中的特异性 miRNA 靶向抑制。左边小图显示了在左心室中 miR-208a 的表达的改变 (从左到右 : 未处理、M-10101、M-10707、M-10591)。右边小图显示了在左心室中 miR-208b 的改变 (从左到右 : 未处理、M-10101、M-10707、M-10591)。如图所示，M-10101 和 M-10707 之间仅有两个核苷酸的差别，而所述抗 miR 对于其靶向的 miR (分别是 miR-208a 和 miR-208b) 是特异性的。

[0044] 图 24. 在处理后的 miR-499 水平。显示了左心室 (LV)、右心室 (RV) 和膈膜 (septum) 的水平。从左到右的柱是 : 未处理、M-10101、M-10707、和 M-10591。

[0045] 图 25. 不同化学模式的抗 miR-208a 化合物当以 25mg/kg 对大鼠皮下施用时，在左心室中显示了 miR-208 的敲低。所述的化合物显示了不同的靶物去阻遏水平。

[0046] 图 26 到 28. 如图 25 中使用的抗 miR-208a 化合物的靶物去阻遏。

[0047] 图 29. 抗 miR-208a 处理在未受胁迫的啮齿类 (SD 大鼠) 中提高了 miR-19b 的血浆水平。

[0048] 图 30. 对盐 - 敏感性大鼠的研究显示 :靶物去阻遏的程度依赖于胁迫的程度。Dynlt1 在 6% 的盐胁迫条件下显示了更加稳健的去阻遏。

[0049] 图 31. 在盐敏感性大鼠模型中不同程度的胁迫(4% 和 6% 盐饮食)下的靶物去阻遏(Vcpip1)的程度。

[0050] 图 32. 在盐敏感性大鼠模型中不同程度的胁迫(4% 和 6% 盐饮食)下的靶物去阻遏(Tmbim6)的程度。

[0051] 图 33. 在心脏的不同区域中 miR 抑制的程度,表明越受胁迫的区域显示的效果越大。

[0052] 图 34. 当受到抗 miR-208a 处理时心脏的不同区域中肌球蛋白表达的程度,表明越受胁迫的区域显示的效果越大。

[0053] 图 35. 当受到抗 miR-208a 处理时心脏的不同区域中的特定心脏胁迫标记物的表达的程度。

[0054] 图 36. 当受到抗 miR-208a 处理时心脏的不同区域中靶物表达的程度,表明越受胁迫的区域显示的效果越大。

[0055] 图 37. 当受到抗 miR-208a 处理时心脏的不同区域中靶物表达的程度,表明越受胁迫的区域显示的效果越大。

[0056] 图 38. 当受到抗 miR-208a 处理时心脏的不同区域中 Dynlt1 的去阻遏的程度,表明越受胁迫的区域显示的效果越大。

[0057] 图 39. 当受到抗 miR-208a 处理时心脏的不同区域中靶物的去阻遏的程度,表明越受胁迫的区域显示的效果越大。

[0058] 发明详述

[0059] 本发明提供了经化学修饰的寡核苷酸,其能够抑制 miR-208a 家族 miRNA,包括 miR-208a、miR-208b、和 / 或 miR-499 的表达(例如,丰度)。本发明在一些实施方案中提供了寡核苷酸,其能够以特异性的方式抑制 miR-208a、miR-208b、和 miR-499 的每一个的表达或丰度。本发明进一步提供了包含所述寡核苷酸的药物组合物,和用于治疗患有涉及或牵涉 miR-208 家族的 miRNA 的状况或病症,例如多种心血管状况的患者的方法。在多个实施方案中,所述寡核苷酸提供了以下优势中的一种或多种 :强度、递送的效率、靶物特异性、毒性、和 / 或稳定性。

[0060] 经化学修饰的 miR-208a 反义寡核苷酸

[0061] 在一个方面,所述发明提供了能够降低 miR-208 家族 miRNA 的表达或丰度的寡核苷酸。所述寡核苷酸的活性可以体外或体内测定。例如,当体外测定 miR-208a、miR-208b、或 miR-499 的抑制时,可以使用如本文描述的双重萤光素酶测定法测定活性。如在所述双重萤光素酶测定法中测定的,所述寡核苷酸在大约 50nM 或更少的浓度,或在其它的实施方案中在 40nM 或更少,20nM 或更少,或者 10nM 或更少的浓度,可显著地抑制这类活性。例如,所述寡核苷酸抑制 miR-208a、miR-208b、和 / 或 miR-499 活性的 IC50 可以为大约 50nM 或更少,40nM 或更少,30nM 或更少,或者 20nM 或更少,如在双重萤光素酶测定法中测定的。

[0062] 所述的双萤光素酶测定法,如以可商购的产品 PsiCHECK™(Promega) 为例,涉及在可检测蛋白(例如水母萤光素酶)的基因的 3' UTR 中放置 miR 识别位点。将该构建体与靶 miRNA 共表达,使得抑制剂的活性可以通过信号的改变而测定。可以在同一质粒上包括第二

个编码可检测蛋白(例如,萤火虫萤光素酶)的基因,并测定信号的比,作为抗 miR 活性的指示。

[0063] 或者 / 并且,可以在合适的小鼠或大鼠模型中测定所述寡核苷酸的活性,如在本文中描述的,其中在 50mg/kg 或更少,25mg/kg 或更少,例如 10mg/kg 或更少,或者 5mg/kg 或更少的所述寡核苷酸剂量观察到 miR-208 家族 miRNA 的抑制(例如,抑制至少 50%)。在一些实施方案中,所述寡核苷酸的活性是在 WO2008/016924 描述的动物模型中测定的,通过提述将其说明书并入本文。例如,所述的寡核苷酸在 50mg/kg 或更少,25mg/kg 或更少,例如 10mg/kg 或更少,或者 5mg/kg 或更少的剂量可以显示至少 50% 的靶 miRNA 抑制或靶物去阻遏。在这类实施方案中,寡核苷酸可以静脉内或皮下给药于小鼠,并且所述寡核苷酸可以以盐水的形式配制。

[0064] 在这些或其它实施方案中,本发明的寡核苷酸在施用后是稳定的,其可在施用至少三周,至少四周,至少五周,或至少六周或更久之后在循环和 / 或目标器官中检测到。因此,本发明的寡核苷酸具有提供更低频率的施用、更低的剂量、和 / 或更长的治疗效果持续时间的潜力。

[0065] 所述寡核苷酸的核酸序列基本上与人 miR-208a 和 / 或 miR-208b 的核苷酸序列互补,并含有锁定和非 - 锁定核苷酸的混合。例如,所述寡核苷酸可以含有至少五个或至少七个或至少九个锁定核苷酸,以及至少一个非锁定核苷酸。一般地,所述寡核苷酸的长度及锁定核苷酸的数目和位置使得所述核苷酸在体外萤光素酶测定法中在大约 50nM 或更小的寡核苷酸浓度降低 miR-208a、miR-208b、和 / 或 miR-499 的活性,或在合适的小鼠或大鼠模型中在大约 50mg/kg 或更少,或大约 25mg/kg 或更少的剂量降低 miR-208a、miR-208b、和 / 或 miR-499 的活性。基本上互补的寡核苷酸可以相对其 miR-208a 或 miR-208b 的靶序列具有 1 个到 4 个错配(例如,1 个或 2 个错配)。

[0066] WO2008/016924 中描述了 miR-208a,包括它的结构和加工(processing),及其用于治疗心脏肥大、心力衰竭或心肌梗死(以及其它状况)的潜力,通过提述将该文献全文并入本文。人 miR-208a 的 pre-miRNA 的序列如下所示(下划线的序列是成熟形式),可以根据本发明将其用于设计抑制性 miRNA :

[0067] 5'-ACGGGCGAGC UUUUGGCCCG GGUUAUACCU GAUGCUCACG

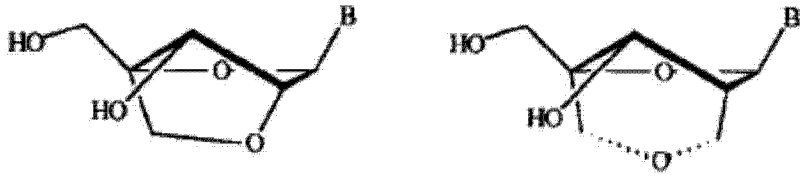
[0068] UAUAAGACGA GCAAAAAGCU UGUUGGUCAG A-3' (SEQ ID NO:5)

[0069] miR-208b 和 miR-499 的结构和加工也在 WO2009/018492 中描述,将其通过提述并入本文。成熟 miR-208b 具有核苷酸序列 5'-AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU-3'(SEQ ID NO:6),成熟 miR-499 具有核苷酸序列 5'-UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU-3'(SEQ ID NO:7)。可以根据本发明使用这些序列设计互补抑制剂。

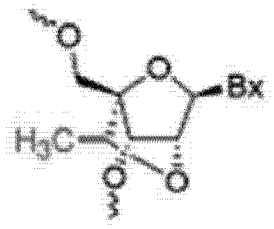
[0070] 所述寡核苷酸含有一个或多个锁定核酸(LNA)残基,或者"锁定核苷酸"。LNA 在例如美国专利 6,268,490、美国专利 6,316,198、美国专利 6,403,566、美国专利 6,770,748、美国专利 6,998,484、美国专利 6,670,461、和美国专利 7,034,133 中描述,将其全部的全文通过提述并入本文。LNA 是经过修饰的核苷酸或核糖核苷酸,其在核糖部分 2' 和 4' 碳之间含有额外的桥接,导致了"锁定的"构象,和 / 或双环结构。在一个实施方案中,所述寡核苷酸含有一个或多个 LNA,其具有由下面的结构 A 所示的结构。并且 / 或者,所述寡核苷酸可以含有一个或多个 LNA,其具有由下面的结构 B 所示的结构。另外地,或额外地,所述寡核苷酸

可以含有一个或多个具有由下面的结构 C 所示的结构的 LNA。

[0071]



A B



C

[0072] 其它合适于纳入本发明的寡核苷酸中的锁定核苷酸包括美国专利 6,403,566 和美国专利 6,833,361 中所描述的，将两者全文通过提述并入本文。

[0073] 在例示性的实施方案中，所述锁定核苷酸具有 2’到 4’的亚甲基桥接，例如，如结构 A 中所示。

[0074] 所述寡核苷酸可以包含、基本上组成为、或组成为全长或截短的 miR-208a 或 miR-208b 反义序列。如本文使用的，有关 miRNA 序列的术语“全长”指代成熟 miRNA 的反义对应物的长度。因此，本文描述的抑制剂可以是截短的或全长的，反义、成熟的 miRNA 序列，或可以包含与其它多核酸序列组合的这些序列。在一些实施方案中，本文描述的化学修饰基序使全长的反义 miRNA（成熟）序列不必要。在这些实施方案中，所述寡核苷酸的长度是从 8 个到 20 个核苷酸，或长度是从 10 个到 18 个核苷酸，或长度是从 11 个到 16 个核苷酸。在一些实施方案中所述寡核苷酸是大约 12 个，大约 13 个，大约 14 个，大约 15 个，大约 16 个，大约 17 个或大约 18 个核苷酸的长度。所述截短的寡核苷酸可以具有这样的序列，其通过反义抑制，靶向在 5’-UAAGACGAGCAAAAAG-3’(SEQ ID NO:8) 之中的 miR-208a 序列，或在 UAAGACGAACAAAAAG-3’(SEQ ID NO:9) 之中的 miR-208b 序列。

[0075] 所述寡核苷酸一般具有设计以靶向成熟 miR-208a、miR-208b、和 / 或 miR-499 的核酸序列。在这些或其它实施方案中，所述寡核苷酸可以同时或替代地设计为靶向 pre- 或 pri-miRNA 形式。在一些实施方案中，可以设计所述寡核苷酸使其具有这样的序列，所述序列含相对于完全互补的(成熟)miR-208 序列具有从 1 个到 5 个(例如，1、2、3、4 个)错配。在一些实施方案中，例如，可以将这类反义序列并入 shRNA 或其它含有茎和环部分的 RNA 结构中。

[0076] 在一些实施方案中，所述寡核苷酸包含与 miR-208a 或 miR-208b 的核苷酸序列完

全互补的核苷酸序列。例如，所述寡核苷酸可以包含 5’-TGCTCGTCTTA-3’(SEQ ID NO:1) 的核苷酸序列或可以包含 5’-TGTTCGTCTTA-3’(SEQ ID NO:2) 的核苷酸序列。在特定的实施方案中，所述寡核苷酸包含、基本上组成为、或组成为核酸序列 5’-CTTTTTGCTCGTCTTA-3’(SEQ ID NO:3) 或 5’-CCTTTTGTTCGTCTTA(SEQ ID NO:4)。在该语境中，“基本上组成为”包括在 5’ 和 / 或 3’ 末端可选的核苷酸的添加(例如，一个或两个)，只要所述添加的核苷酸基本上不影响(定义为 IC50 的多于 20% 的提高) 所述寡核苷酸在双重萤光素酶检测法或小鼠模型中对靶 miRNA 活性的抑制。

[0077] 所述寡核苷酸一般地含有至少 3 个，至少 5 个，至少 7 个，或至少 9 个锁定核苷酸，但是在多个实施方案中不完全由锁定核苷酸构成。一般地，锁定核苷酸的数目和位置使得所述寡核苷酸降低如描述的由体外或体内测定的 miR-208a、miR-208b、和 / 或 miR-499 活性。在一些实施方案中，所述寡核苷酸不含有具有多于四个，或多于三个，相邻的非锁定核苷酸的核苷酸段。在一些实施方案中，所述寡核苷酸不含有具有多于两个相邻的非锁定核苷酸的核苷酸段。例如，所述寡核苷酸中可以仅出现一次相邻的非锁定核苷酸。在这些或其它实施方案中，与 miR-208a、miR-208b、和 / 或 miR-499 种子区域(seed region) 互补的区域包含至少三个或至少四个锁定核苷酸。例如，这些实施方案可以使用 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的核酸序列。

[0078] 因此，在多个实施方案中，所述寡核苷酸含有至少九个锁定核苷酸，或至少十一个锁定核苷酸。所述寡核苷酸可以含有至少三个或至少 5 个非锁定核苷酸。例如，所述寡核苷酸可以含有九个锁定核苷酸以及七个非锁定核苷酸，或可以含有十一个锁定核苷酸和五个非锁定核苷酸。

[0079] 锁定核苷酸的式样可以是至少位置 1、6、10、13、和 15 是锁定核苷酸。在一些实施方案中，位置 1、5、6、8、10、11、13、15、和 16 是锁定核苷酸，并且其余的位置是非锁定核苷酸。在其它实施方案中，位置 1、3、4、5、6、8、10、13、15、和 16 是锁定核苷酸，其余的位置是非锁定核苷酸。在一些实施方案中，位置 1、4、5、7、9、10、12、14、和 16 是锁定核苷酸，并且其余位置是非锁定核苷酸。在例示性的实施方案中，这样的式样对于具有 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的序列的寡核苷酸是有用的。

[0080] 对于非锁定核苷酸，所述核苷酸可以含有对于 2’羟基的 2’修饰。例如，所述 2’修饰可以是 2’ 脱氧。将 2’- 修饰的核苷酸整合在反义寡核苷酸中既可以提高所述寡核苷酸对于核酸酶的抗性，又可提高其与互补 RNA 的热稳定性。在 2’位置的多种修饰可以从提供提高的核酸酶敏感性、而不损害与 RNA 靶物或细胞机构的分子相互作用的修饰中独立地选择。可以基于其体外或体内提高的强度来选择这类修饰。用于测定 miRNA 抑制的提高的强度(例如，IC50)的例示性的方法在本文中有描述，其包括双重萤光素酶测定法和体内 miRNA 表达或靶物去阻遏。

[0081] 在一些实施方案中所述 2’ 修饰可以独立地选自以下 :O- 烷基(其可以是取代的)、卤素、和脱氧(H)。在一些实施方案中，基本上所有，或者所有非锁定核苷酸的核苷酸 2’ 位置可以是修饰的，例如，修饰为如独立地选自以下的基团 :O- 烷基(例如，O- 甲基)、卤素(例如，氟代)、脱氧(H)、和氨基。例如所述 2’ 修饰可以独立地选自 O- 甲基和氟代。在例示性的实施方案中，每个嘌呤核苷酸具有 2’ OMe 并且每个嘧啶核苷酸具有 2’ -F。在一些实施方案中，剩下一个到大约五个 2’ 位置，或大约一个到大约三个 2’ 位置未经修饰(例如，作为

2’羟基)。

[0082] 根据本发明的2’修饰也含有小的烃取代基。所述烃取代基含有烷基、烯基、炔基、和烷氧基烷基(alkoxyalkyl),其中所述烷基(包括烷氧基的烷基部分)、烯基和炔基可以是取代的和非取代的。所述烷基、烯基、和炔基可以是C1到C10的烷基、烯基或炔基,如C1、C2、或C3。所述烃取代物可以包括一个或两个或三个非碳原子,其可以独立地选自N、O、和/或S。所述2’修饰可以进一步包括作为O-烷基、O-烯基和O-炔基的烷基、烯基和炔基。

[0083] 根据本发明的例示性的修饰包括2’-O-烷基(C1-3烷基,如2’OMe或2’OEt)、2’-O-甲氧乙基(2’-O-MOE)、2’-O-氨丙基(2’-O-AP)、2’-O-二甲基氨乙基(2’-O-DMAOE)、2’-O-二甲基氨丙基(2’-O-DMAP)、2’-O-二甲基氨乙基氧乙基(2’-O-DMAEOE)、或2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)取代。

[0084] 在一些实施方案中,所述寡核苷酸含有至少一个2’-卤代修饰(例如,替代2’羟基),如2’-氟代、2’-氯代、2’-溴代、和2’-碘代。在一些实施方案中,所述2’卤代修饰是氟代。所述寡核苷酸可以含有从1个到大约5个2’-卤代修饰(例如,氟代),或从1个到大约3个2’-卤代修饰(例如,氟代)。在一些实施方案中,所述寡核苷酸在非锁定位置包含的全部是2’-氟代核苷酸,或在所有非锁定嘧啶核苷酸上包含2’-氟代。在一些实施方案中,所述各2’-氟代基团独立地是二甲基化、三甲基化、或非甲基化的。

[0085] 所述寡核苷酸可以具有一个或多个2’-脱氧修饰(例如,对于2’-羟基的H),并且在一些实施方案中,在非锁定位置含有从2个到大约10个2’-脱氧修饰,或在所有非锁定位置含有2’脱氧。

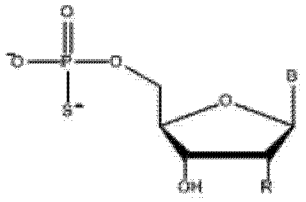
[0086] 在例示性的实施方案中,所述寡核苷酸在非锁定位置中含有修饰为2’OMe的2’位。或者,非锁定嘌呤的2’位被修饰为2’OMe,而非锁定的嘧啶核苷酸的2’位被修饰为2’-氟代。

[0087] 在一些实施方案中,所述寡核苷酸进一步包含至少一个末端修饰或“帽”。所述帽可以是5’和/或3’-帽结构。术语“帽”或“末端-帽”包括在寡核苷酸的任意末端(对于末端的核糖核苷酸)的化学修饰,并包括在5’端最后两个核苷酸之间和3’端的最后两个核苷酸之间的连接上的修饰。如本文描述的帽结构可以提高寡核苷酸对于外切核酸酶的抗性而不损害与RNA靶物或细胞机构的分子相互作用。可以基于其提高的体外或体内强度选择这类修饰。所述帽可以存在于5’-端(5’-帽)或3’-端(3’-帽)或可以同时存在于两端。在一些实施方案中,所述5’-和/或3’-帽独立地选自单磷酸硫代磷酸酯(phosphorothioate monophosphate)、脱碱基残基(abasic residue)(部分(moiety))、硫代磷酸酯连接、4’-硫代核苷酸(4’-thio nucleotide)、碳环核苷酸(carbocyclic nucleotide)、二硫代磷酸键(phosphorodithioate linkage)、倒置的核苷酸(inverted nucleotide)或倒置的脱碱基部分(inverted abasic moiety)(2’-3’或3’-3’)、单磷酸二硫代磷酸酯(phosphorodithioate monophosphate)、和甲基膦酸酯部分(methylphosphonate moiety)。当作为帽结构的一部分时,所述硫代磷酸或二硫代磷酸键一般位于5’端的两个末端核苷酸之间和3’端的两个末端核苷酸之间。

[0088] 在一些实施方案中,所述寡核苷酸具有至少一个末端单磷酸硫代磷酸酯。所述单磷酸硫代磷酸酯可以通过抑制外切核酸酶的作用而支持更高的强度。所述单磷酸硫代磷酸可以在所述寡核苷酸的5’和/或3’端。单磷酸硫代磷酸是由以下的结构定义的,其中B

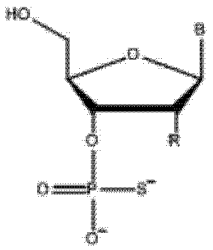
是碱基，并且 R 是如上文描述的 2’修饰：

[0089]



[0090] 5’单磷酸硫代磷酸酯

[0091]



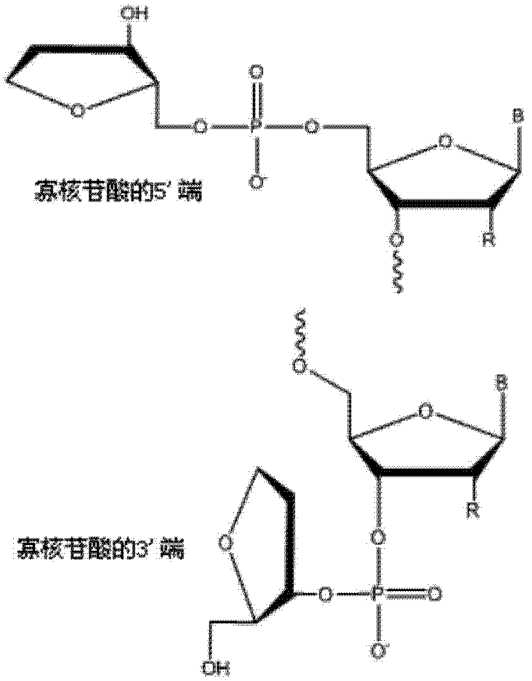
[0092] 3’单磷酸硫代磷酸酯

[0093] 当帽结构可以支持锁定核苷酸的化学时，可如本文描述地将帽结构纳入锁定核苷酸。

[0094] 硫代磷酸键可以存在于一些实施方案中，如在 5’和 3’端上的最后两个核苷酸之间(例如，作为帽结构的部分)，或与磷酸二酯键(phosphodiester bonds)交替。在这些或其它实施方案中，所述寡核苷酸可以在 5’和 / 或 3’端含有至少一个末端脱碱基残基。脱碱基部分不含公认的嘌呤或嘧啶核苷酸碱基，如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶。因此这类脱碱基部分在 1’位缺少核苷酸碱基或具有其它非核苷酸碱基化学基团。

[0095] 例如，所述脱碱基核苷酸可以是反转的(reversed)脱碱基核苷酸，例如，其中将反转的脱碱基亚磷酰胺经由 5’亚磷酰胺 (amidite)(而非 3’亚磷酰胺) 偶联，其导致了 5’-5’磷酸键。将用于多核苷酸的 5’和 3’端的反转脱碱基核苷的结构显示在下方。

[0096]



[0097] 所述寡核苷酸可以含有一个或多个硫代磷酸酯连接。硫代磷酸酯连接已经被用来使寡核苷酸对核酸酶裂解(cleavage)更具抗性。例如,所述多核苷酸可以是部分地硫代磷酸酯键连的,例如,硫代磷酸键可以与磷酸二酯连接交替。然而,在一些实施方案中,所述寡核苷酸是完全由硫代磷酸酯连接的。在其它实施方案中,所述寡核苷酸具有从一个到五个或一个到三个磷酸酯连接。

[0098] 在一些实施方案中,所述核苷酸具有一个或多个羧酰胺基修饰的碱基,如在 PCT/US11/59588 中所描述的,这里将其通过引述并入,包括对于该文献中公开的所有例示性的嘧啶羧酰胺基的杂环取代基修饰。

[0099] 在例示性的实施方案中,所述寡核苷酸具有在下面的表 1 中列出的化合物的结构。

[0100] 表 1 :例示性的寡核苷酸

[0101]

Cmpd# (M)	别名		序列		长度
10101	208a_DNA_LNA_16_PS	5'	lCs;dTs;dTs;dTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;lGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:10)	3'	16
10570	208fam_optdes1	5'	lTs;dGs;lCs;lTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:11)	3'	11
10571	208fam_optdes2	5'	lTs;dGs;lCs;lTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:12)	3'	11
10572	208fam_optdes3	5'	lTs;dGs;lCs;dAs;lCs;dGs;lTs;dCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:13)	3'	11
10573	208fam_optdes4	5'	lTs;lGs;dCs;dAs;lCs;lGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:14)	3'	11
10673	208a LNA C_T_DNA_16_1	5'	lCs;dTs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:15)	3'	16
10674	208a_ LNA C_T_DNA_16_2	5'	lCs;dTs;dTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;lTs;lCs;dGs;lTs;lCs;lTs;lTs;dA (SEQ ID NO:16)	3'	16
10677	208a_ LNA C_T_DNA_16_3	5'	lCs;lTs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;lTs;lCs;dGs;lTs;lCs;lTs;lTs;dA (SEQ ID NO:17)	3'	16
10679	208_LNA_opt_1	5'	lCs;dTs;lTs;dTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;lTs;dCs;lTs;lTs;dA (SEQ ID NO:18)	3'	16
10680	208_LNA_opt_2	5'	lCs;dTs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;dTs;lA (SEQ ID NO:19)	3'	16
10681	208_LNA_opt_3	5'	lCs;dTs;lTs;lTs;dTs;lTs;dGs;lCs;lTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:20)	3'	16
10682	208_LNA_opt_4	5'	lCs;dTs;lTs;dTs;lTs;dTs;lGs;dCs;lTs;dCs;lGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:21)	3'	16
10683	208_LNA_opt_5	5'	lCs;dTs;dTs;lTs;lTs;dTs;lGs;dCs;lTs;lCs;dGs;lTs;dCs;lTs;dTs;lA (SEQ ID NO:22)	3'	16
10707	208b_DNA_LNA_16_PS	5'	lCs;dCs;dTs;dTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;lGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:23)	3'	16
10718	208a like_15_1	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:24)	3'	15
10719	208a like_15_2	5'	lTs;lTs;dTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:25)	3'	15

[0102]

Cmpd# (M)	别名		序列		长度
10720	208a like_15_3	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dCs;dTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:26)	3'	15
10721	208a like_15_4	5'	lTs;dTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;lTs;lTs;dA (SEQ ID NO:27)	3'	15
10722	208a like_15_5	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:28)	3'	15
10723	208a like_15_6	5'	lTs;dTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:29)	3'	15
10724	208b like_15_1	5'	lCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:30)	3'	15
10725	208b like_15_2	5'	lCs;lTs;dTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:31)	3'	15
10726	208b like_15_3	5'	lCs;dTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;lTs;lTs;dA (SEQ ID NO:32)	3'	15
10727	208b like_15_4	5'	lCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:33)	3'	15
10728	208b like_15_5	5'	lCs;dTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:34)	3'	15
10729	208b like_15_6	5'	lCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dCs;dTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:35)	3'	15
10730	208b _15_1	5'	lCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:36)	3'	15
10731	208b _15_2	5'	lCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:37)	3'	15
10732	208b _15_3	5'	lCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:38)	3'	15
10733	208a like_15_7	5'	lTs;dTs;lTs;dTs;lTs;dGs;dCs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:39)	3'	15
10734	208b like_15_7	5'	lCs;dTs;lTs;dTs;lTs;dGs;dCs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:40)	3'	15
10735	208b_15_4	5'	lCs;dTs;lTs;dTs;lTs;dGs;dTs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:41)	3'	15
10736	208a like_14_1	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;l	3'	14

[0103]

Cmpd# (M)	别名		序列		长度
			Cs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:42)		
10737	208a like_14_2	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:43)	3'	14
10738	208a like_14_3	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:44)	3'	14
10739	208a like_14_4	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dCs;dTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:45)	3'	14
10740	208a like_14_5	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dCs;lTs;lCs;dGs;lTs;dCs;lTs;lTs;dA (SEQ ID NO:46)	3'	14
10741	208a like_14_6	5'	lTs;dTs;lTs;dTs;dGs;lCs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:47)	3'	14
10742	208b_14_1	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:48)	3'	14
10743	208b_14_2	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:49)	3'	14
10744	208b_14_3	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:50)	3'	14
10745	208b_14_4	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dTs;dTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:51)	3'	14
10746	208b_14_5	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dTs;lTs;lCs;dGs;lTs;dCs;lTs;lTs;dA (SEQ ID NO:52)	3'	14
10747	208b_14_6	5'	lTs;dTs;lTs;dTs;dGs;lTs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:53)	3'	14
10748	208a like_13_1	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:54)	3'	13
10749	208a like_13_2	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:55)	3'	13
10750	208a like_13_3	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:56)	3'	13
10751	208a like_13_4	5'	lTs;dTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:57)	3'	13
10752	208b_13_1	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:58)	3'	13

[0104]

Cmpd# (M)	别名		序列		长度
10753	208b_13_2	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:59)	3'	13
10754	208b_13_3	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:60)	3'	13
10755	208b_13_4	5'	lTs;dTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lA (SEQ ID NO:61)	3'	13
10756	208a like_11_1	5'	lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:62)	3'	11
10757	208a like_11_2	5'	lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:63)	3'	11
10758	208b_11_1	5'	lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:64)	3'	11
10759	208b_11_2	5'	lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lA (SEQ ID NO:65)	3'	11
10760	208b_16_1	5'	lCs;dCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:66)	3'	16
10761	208b_16_2	5'	lCs;dCs;lTs;dTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;lTs;dCs;lTs;lTs;dA (SEQ ID NO:67)	3'	16
10762	208b_16_3	5'	lCs;dCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;dTs;lA (SEQ ID NO:68)	3'	16
10763	208b like_16_1	5'	lCs;dCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:69)	3'	16
10764	208b like_16_2	5'	lCs;dCs;lTs;dTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;lTs;dCs;lTs;lTs;dA (SEQ ID NO:70)	3'	16
10765	208b like_16_3	5'	lCs;dCs;lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lCs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;dTs;lA (SEQ ID NO:71)	3'	16
10775	208b_15_5	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dAs;lT (SEQ ID NO:72)	3'	15
10776	208b_15_6	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lAs;lT (SEQ ID NO:73)	3'	15
10777	208b_15_7	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;dAs;lT (SEQ ID NO:74)	3'	15
10778	208b_15_8	5'	lTs;lTs;dTs;lTs;dGs;dTs;dTs;lCs;lGs;lTs;l	3'	15

[0105]

Cmpd# (M)	别名		序列		长度
			Cs;lTs;lTs;lAs;lT (SEQ ID NO:75)		
10779	208b_15_9	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lAs;dT (SEQ ID NO:76)	3'	15
10780	208b_15_10	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;lAs;dT (SEQ ID NO:77)	3'	15
10781	208b_15_11	5'	lTs;lTs;dTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lAs;dT (SEQ ID NO:78)	3'	15
10782	208b_15_12	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;lTs;lTs;dAs;lT (SEQ ID NO:79)	3'	15
10783	208b_15_13	5'	lTs;lTs;lTs;lTs;dGs;dTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;lTs;lTs;lAs;dT (SEQ ID NO:80)	3'	15
10784	208b_14_7	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;dAs;lT (SEQ ID NO:81)	3'	14
10785	208b_14_8	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lAs;lT (SEQ ID NO:82)	3'	14
10786	208b_14_9	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;dAs;lT (SEQ ID NO:83)	3'	14
10787	208b_14_10	5'	lTs;dTs;lTs;dGs;dTs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lAs;lT (SEQ ID NO:84)	3'	14
10788	208b_14_11	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;dTs;lTs;lAs;dT (SEQ ID NO:85)	3'	14
10789	208b_14_12	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;dGs;lTs;lCs;dTs;lTs;lAs;dT (SEQ ID NO:86)	3'	14
10790	208b_14_13	5'	lTs;dTs;lTs;dGs;lTs;dTs;lCs;lGs;lTs;lCs;lTs;lTs;lAs;dT (SEQ ID NO:87)	3'	14
10791	208b_14_14	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;dTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;lTs;lTs;dAs;lT (SEQ ID NO:88)	3'	14
10792	208b_14_15	5'	lTs;lTs;lTs;dGs;dTs;dTs;lCs;dGs;dTs;lCs;lTs;lTs;lAs;dT (SEQ ID NO:89)	3'	14
10793	208b_16_4	5'	lCs;dTs;lTs;lTs;lTs;lGs;dTs;lTs;dCs;lGs;dTs;dCs;lTs;dTs;lAs;dT (SEQ ID NO:90)	3'	16
11184		5'	lCs;dTs;lTs;lTs;dTs;dTs;lGs;lCs;dTs;lCs;dGs;lTs;dCs;lTs;dTs;lAs (SEQ ID NO:91)	3'	16

[0106] 表 2 :符号的描述

[0107]

脱氧 A	dA
脱氧 G	dG
脱氧 C	dC
脱氧 T	dT
锁定核苷酸 A	lA
锁定核苷酸 G	lG
锁定核苷酸 C	lC
锁定核苷酸 T	lT
脱氧 A P=S	dAs
脱氧 G P=S	dGs
脱氧 C P=S	dCs
脱氧 T P=S	dTs
锁定核苷酸 A P=S	lAs
锁定核苷酸 G P=S	lGs
锁定核苷酸 C P=S	lCs
锁定核苷酸 T P=S	lTs

[0108] 在特定的实施方案中，所述寡核苷酸是 10101、10673、10674、10677、10679、10683、10707、或 10680、或其它在表 1 中描述的寡核苷酸。

[0109] 通过固相合成的寡核苷酸，包括修饰的多核苷酸的合成，是为人熟知的并在 New Chemical Methods for Synthesizing Polynucleotides. Caruthers MH, Beaucage SL, Efcavitch JW, Fisher EF, Matteucci MD, Stabinsky Y. Nucleic Acids Symp. Ser. 1980; (7): 215-23 中综述。

[0110] 组合物、配制物、和递送

[0111] 可以将寡核苷酸并入多种大分子组合或组合物中。这类用于递送的复合物可以包括配制以用于递送至患者的多种脂质体、纳米颗粒、和胶束。所述复合物可以包括一种或多种促融合（fusogenic）或亲脂性分子以启动细胞膜穿透（cellular membrane penetration）。这类分子在例如美国专利 7,404,969 和美国专利 7,202,227 中描述，通过对其全文的提述将其并入本文。另选的，所述寡核苷酸可以进一步包含悬垂（pendant）的亲脂性基团以辅助细胞递送，如在 WO2010/129672 中所描述的，通过提述将其并入本文。

[0112] 所述组合物或配制物可以使用多种治疗性寡核苷酸，包括至少一种所本文描述的。例如，所述组合物或配制物可以使用至少 2、3、4、或 5 种本文描述的 miRNA 抑制剂。

[0113] 可以将本发明的寡核苷酸配制为多种药物组合物。将药物组合物以适合意图的应用的形式制备。一般地，这包括制备基本上没有热源（pyrogen）、以及其它可以对人或动物有害的杂质的组合物。例示性的递送 / 配制系统包括 :胶体分散系统、大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠子、以及脂基系统，包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。商业上可得的适于将本发明的核酸递送至心肌组织和骨骼肌组织的脂肪乳液（fat emulsions）包括 Intralipid®、Liposyn®、Liposyn® II、Liposyn® III、Nutrilipid、以及其它相似的脂质乳液。优选的用作体内递送载体的胶体系统是脂质体（即，人造的膜状囊泡）。这类系统的制备和使用是本领域内熟知的。例示性的配制物也在 US5,981,505;US6,217,900;US6,383,512;US5,783,565;US7,202,227;US6,379,965;US6,127,170;US5,837,533;US6,747,014; 和 WO03/093449 中公开，通过对其全文的提述将它们并入本文。

[0114] 在一些实施方案中，配制所述寡核苷酸以用于常规的皮下或静脉内施用，例如，通过以合适的水性稀释剂，包括无菌水和生理盐水配制。

[0115] 所述药物组合物和配制物可以使用合适的盐和缓冲液以使得递送载体稳定且允许目标细胞的摄取。本发明的水性组合物包含有效量的包含所述抑制剂寡核苷酸的递送载体（例如，脂质体或其它复合物），其溶解或分散在药学可接受的载体或水性介质中。词语“药学可接受的”或“药理学可接受的”是指当施用于动物或人时不产生有害的、变应性的、或其它不良反应的分子实体和组合物。如在此使用的，“药学可接受的载体”可以包括一种或多种能够用于配制药物，如适合用于向人施用的药物的溶剂、缓冲液、溶液、分散介质、包衣（coating）、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟性作用剂等。这类介质和作用剂用于药学活性物质的用途是本领域内已知的。也可将补充的活性成分掺入所述组合物。

[0116] 根据本发明的药物组合物的施用和递送可以经由任何途径，只要经由该途径可达到目标组织。例如，施用可以通过皮内、皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射，或通过直接注射进入目标组织（例如，心脏组织）。本文公开的寡核苷酸的稳定性和 / 或强度允许采用方便的途径施用，包括皮下、皮内、和肌内。也可以将包含 miRNA 抑制剂的药物组合物通过导管系统或隔离冠状循环的系统（systems that isolate coronary circulation）以将治疗试剂递送至心脏。本领域内已知多种用于将治疗试剂递送至心脏和冠状血管系统（coronary vasculature）的导管系统。适于在本发明中使用的基于导管递送的方法或冠状隔离方法的非限制性实例公开在美国专利号 6,416,510、美国专利号 6,716,196、美国专利号 6,953,466、WO2005/082440、WO2006/089340、美国专利公开号 2007/0203445、美国专利公开号 2006/0148742、和美国专利公开号 2007/0060907 中，通过对其全文的提述将其并入本文中。

[0117] 也可以将所述组合物或配制物非经肠地或腹膜内施用。举例而言，可以将缀合物在水中制备为游离碱或药学可接受盐的形式的溶液，并适宜地与表面活性剂，如羟丙纤维素混合。也可以在以下中制备分散系 :甘油、液体聚乙二醇、以及其混合物中，和油中。在普通的储存和使用条件下，这些制备物一般含有防腐剂（preservative）以防止微生物的生长。

[0118] 适于注射用途或导管递送的药物形式包括，例如，无菌水性溶液或分散系，以及

用于临时制备无菌可注射溶液或分散系的无菌粉末。一般地，这些制备物是无菌的，并且具有流动性，达到可以容易地注射的程度。制备物在生长和储存的条件下应该是稳定的，并且应该在防止微生物，如细菌和真菌的污染作用的条件下保存。适合的溶剂或分散介质可以含有，例如，水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇、以及液态聚乙二醇，等等)、其合适的混合物、以及植物油。可以，例如，通过使用包衣，如卵磷脂，在分散系的情况下通过维持所需的颗粒大小，以及通过使用表面活性剂维持合适的流动性。微生物作用的预防可以通过多种抗菌和抗真菌制剂而达成，例如，对羟苯甲酸酯类(parabens)、三氯叔丁醇(chlorobutanol)、苯酚、山梨酸、硫柳汞，以及类似。在很多情况中，优选包含等渗试剂，例如，糖或氯化钠。可以通过在可注射组合物中使用延缓吸收的作用剂，例如单硬脂酸铝和明胶，来实现该组合物的延长吸收。

[0119] 可以通过将合适量的缀合物与期望的任何其它成分(例如如上列举的)一起掺入溶剂中而制备无菌可注射的溶液。一般地，通过将多种无菌的活性成分掺入至无菌载体中而制备分散系，所述无菌载体含有基本分散介质和合意的其它成分，例如，上面列举的。在用于无菌可注射溶液的无菌粉末的情况中，优选的制备方法包括真空干燥和冷冻干燥技术，其产生活性成分加上任何来自先前无菌过滤的溶液的其他期望成分的粉末。

[0120] 在配制后，优选地以与剂量制剂相容的方式和治疗有效的量施用溶液。所述配制物可以容易地以多种剂型施用，如可注射的溶液、药物释放胶囊等。例如，对于在水性溶液中的非消化道给药，一般地将溶液合适地缓冲，并且例如以足量的盐水或葡萄糖首先使液体稀释液等渗。这类水性溶液可以用于，例如，静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。优选地，如本领域技术人员已知的，特别地是参照本公开内容的方式施用无菌水性介质。举例说明，可以将单个剂量溶解在 1ml 的等渗 NaCl 溶液中并将其加到 1000ml 皮下输注液或在建议的输液位点注射(见例如，"Remington's Pharmaceutical Sciences" 第 15 版，1035-1038 页和 1570-1580 页)。取决于处理的受试者的情况，剂量必然会有某些变化。但无论如何，负责施用的人会为个体受试者确定合适的剂量。而且，对于人体施用，制备物应该到达如 FDA FDA 生物制品标准办公室所要求的无菌度、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0121] 治疗方法

[0122] 本发明提供了一种用于将寡核苷酸递送至哺乳动物细胞(例如，作为本文描述的组合物或配制物的一部分)的方法，以及用于在哺乳动物患者中治疗、改善、或预防状况的进展的方法。所述的寡核苷酸或药物组合物可以体外或体内与目标细胞(例如，哺乳动物细胞)接触。所述的细胞可以是心脏细胞。

[0123] 所述方法一般地包括将寡核苷酸或包含其的组合物施用于哺乳动物患者或目标细胞的群体。所述寡核苷酸，如已经说明的，是 miRNA 抑制剂(例如，具有设计以抑制 miR-208 家族 miRNA 的表达或活性的核酸序列)。因此，所述患者可以具有与 miR-208 家族表达相关联、由 miR-208 家族表达介导、或由 miR-208 家族表达导致的状况。这类状况包括，例如，心脏肥大、心肌梗死、心力衰竭(例如，充血性心力衰竭)、血管损坏、再狭窄、或病理性心脏纤维化。因此，本发明提供了所述修饰的寡核苷酸和本发明的组合物用于治疗这类状况、以及用于制备用于这类治疗的药物的制备的用途。

[0124] 在一些实施方案中，患者(例如，人类患者)具有一种或多种包括，例如长期不受控高血压(long standing uncontrolled hypertension)、未矫正的瓣膜疾病、慢性心绞痛

(chronic angina)、近期的心肌梗死、充血性心力衰竭、心脏病的先天性素因以及病理性肥大的危险因子。或者/并且,所述患者可以已经诊断为具有例如心脏肥大的遗传素因,或可以具有例如心脏肥大的家族史。

[0125] 在该方面,本发明可以为具有心力衰竭或心脏肥大的患者改善运动耐量、减少住院治疗、提高生活质量、降低发病率、和/或降低死亡率。

[0126] 在一些实施方案中,心脏组织中的miR-208a、miR-208b、和/或miR-499被降低或抑制。

[0127] 在多个实施方案中,所述药物组合物是通过消化道施用或通过直接注射进心脏组织而施用的。所述非消化道施用可以是静脉内、皮下、或肌内。在一些实施方案中,所述组合物是通过口服、经皮、持续释放、控制释放、延迟释放、栓剂、导管、或舌下施用而施用的。在一些实施方案中,所述寡核苷酸以5mg/kg或更少的剂量、或10mg/kg或更少的剂量、或5mg/kg或更少的剂量施用。在这些实施方案中,可以将寡核苷酸或组合物通过肌内或皮下注射施用,或静脉内施用。

[0128] 在一些实施方案中,所述方法进一步包含在治疗之后清扫(scavenging)或清除(clearing)所述的miRNA抑制剂。可以在治疗后施用具有与抑制剂互补的核酸序列的寡核苷酸以削弱或停止所述抑制剂的功能。

实施例

[0129] 实施例1:靶向miRNA208家族的miRNA抑制剂的体外活性

[0130] 合成了一组miRNA抑制剂(单链寡核苷酸),其靶向miRNA208家族(miR208a、miR-208b和miR-499)。序列和修饰式样在表1中显示。碱基代码的描述在表2中提供。该组包括反向互补抑制剂的多个长度,范围从11个核苷酸到16个核苷酸。LNA修饰的数目以及在寡核苷酸中LNA修饰的位置都是不同的。

[0131] 首先在HeLa细胞中利用双重萤光素酶测定法读出(dual-luciferase assay readout)来测试一个小组。所述测定法使用psiCHECK™-2构建体(Promega)(图1)。HeLa细胞不表达miR-208家族;因此将相应的模拟物(mimic)也与质粒共转染。

[0132] 结果显示了作为miR-208家族miRNA的抑制剂,各LNA式样具有完全不同的活性。在图2中显示了一些特别强的设计物。例如,M-10673与M-10101具有相同数量的LNA修饰(16个中的9个),然而在1nM显示了更高的对miR-208a的抑制。考虑到这些结果,合成了有限的另一组抑制剂并加以测试,所有抑制剂都是16个核苷酸的长度并具有9个LNA修饰(其余的是DNA核苷)。图3-5显示了这些抑制剂在双重萤光素酶报告中对于miR-208a、miR-208b、和miR-499(分别地)的结果。M-10673不仅显示了对于miR-208a的抑制,还显示了对于miR-208b和miR-499的抑制。在16-聚体抑制剂中,在miR-208a和miR-208b之间有两个错配。

[0133] 接下来构建了更完整的一组抑制剂。将这些分子的结构在表1中显示。

[0134] 实施例2:miRNA抑制剂靶向miRNA208家族的体内活性

[0135] 合成了靶向miR-208家族的三个抑制剂,并在普通小鼠中测试对miR-208a和miR-208b水平的效果。通过低压尾血管(low pressure tail vein)注射向小鼠(n=4)给予2.5、10和25mg/kg的剂量并在四日后通过qRCR分析心脏组织的miRNA水平。结果(图6)

与体外双重萤光素结果良好对应。这些结果说明有可能可以将剂量降低至少 10 倍(25mpk 至 2.5mpk)而获得治疗效果。

[0136] 以上的初步试验显示了存在独特的包含 LNA 的修饰基序(包括 LNA 的数目和位置),它们可增强对 miR-208 家族 miRNA 的强度。

[0137] 在 Dahl 盐敏感性大鼠模型中测试 M-10101 和 M-10673,在下文中进一步描述。图 7 和 8 显示了使用 M-10101 的最好的生存和体重控制。

[0138] 实施例 3 :对 miR-208 的治疗性抑制改善了心力衰竭期间的心脏功能和生存

[0139] 之前,报告了心脏特异性 miR-208a 的遗传删除可防止病理性心脏重塑(pathological cardiac remodeling)以及 Myh7 回应胁迫的上调。该实例显示了反义寡核苷酸(来自表 1 的 M-10101)的系统性递送可诱导心脏中强力且持续的 miR-208a 沉默。在 Dahl 高血压大鼠中高血压诱导的心力衰竭期间,通过皮下递送治疗性抑制 miR-208a,剂量依赖性地防止了病理性肌球蛋白转换(pathological myosin switching)和心脏重塑,同时改进了心脏功能、总体健康和生存。转录谱分析(profiling)指示,抗 miR-208 可诱发对于心脏基因表达的突出的效果,而血浆分析指示在抗 miR-208a 处理后 miRNA 的循环水平的显著的变化。这些研究指示了基于寡核苷酸的治疗对于调节心脏 miRNA 的潜力,并验证了 miR-208 是用于在心脏疾病期间操纵心脏功能和重塑的强力的治疗靶物。

[0140] 对心脏的慢性和急性的胁迫导致病理性重塑应答,伴随心肌细胞肥大、纤维化、泵衰竭、肌细胞变性(myocyte degeneration)和细胞凋亡,其经常以心力衰竭和猝死为结果(1)。虽然经典药理学治疗策略可以在心力衰竭患者中降低重塑并延长生存,这些治疗最终无法防止疾病的进展。病理性肥大和心力衰竭的一个标志是一组胎儿心脏基因的重激活,其中包括编码心房钠尿因子(atrial natriuretic factor,ANF)、B- 型利钠肽(B-type natriuretic peptide,BNP)和收缩蛋白质的胎儿亚型,如骨骼 α - 肌动蛋白和 Myh7(β - 肌球蛋白重链 , β -MHC)的基因(2)。Myh6 (α -MHC)的下调和 Myh7 的上调是对心脏损伤的普遍的应答,无论物种(3-5)。已经显示在人和啮齿类中,Myh6 与 Myh7 的比例的相对较小的提高对心脏的收缩性和性能具有有益的效果。已经有很多注意力集中在理解调控心脏重塑和肌球蛋白转换上,以寻找治疗地操控这些过程的潜在方法。

[0141] 先前,在人和小鼠心脏疾病模型中鉴定出了与病理性心脏肥大、心力衰竭和心肌梗死相关联的微 RNA(miRNA)的签名表达式样(signature expression patterns)(9-10)。在小鼠中进行的功能获得和功能丧失研究已经揭示了这些 miRNA 在心脏生物学的很多方面,包括控制肌细胞生长、收缩性、纤维化、和血管发生中发挥的深层次的、意想之外的功能(在 11 中综述)。尤其有趣的是 miR-208,这是一种在 Myh6 基因的内含子中编码的 miRNA,其调控心脏的应激反应(12-13)。虽然在小鼠中 miR-208 的遗传删除未能在基线诱导明显的表现型,但在响应几种形式的心脏胁迫时,miR-208 裸鼠几乎不显示心肌细胞肥大或纤维化,并且不能上调 Myh7 表达(12)。

[0142] 在成体心脏中,miR-208 不仅对于 Myh7 的表达,对于一种紧密关联的肌球蛋白亚型 Myh7b 的表达也是必需的(14)。值得一提的是,这两个基因编码慢肌球蛋白(slow myosins)并且含有内含子 miRNA (分别为 miR-208b 和 miR-499)(15-16)。由于 miR-208(我们将称其为 miR-208a)、-208b 和 miR-499 是出自肌球蛋白基因的相关的 miRNA,我们将其统称为 myomiR (17)。通过在小鼠中的功能获得和功能丧失的实验,我们已经显示了

miR-208 的遗传删除可剂量依赖性地减少 Myh7b/miR-499 在成体心脏中的表达(18)。由于 miR-499 突变动物响应胁迫不显示对 Myh7 表达或心脏重塑的效果,且重新引入 miR-499 可去除在 miR-208a 突变小鼠中见到的心脏效果(18),我们得出结论 :miR208a 和 miR-499 二者联合的降低是 miR-208a 突变动物中见到的心脏保护效果的原因。

[0143] miRNA 对于心脏的功能和异常的重要性提示了对于在心脏疾病的环境中治疗性地利用 miRNA 的生物学的机会。已经显示了单链 RNA 寡核苷酸在体内可有效地通过互补碱基配对灭活 miRNA (19-23),是灭活病理性 miRNA 的潜在有效的方法。这里我们显示,针对 miR-208a 的非缀合的、用锁定核酸(LNA)修饰的反义寡核苷酸足以在心脏中诱导特异性、强力和持久的 miR-208a 沉默。另外,抗 miR-208a 剂量 - 依赖性地防止胁迫诱导的重塑、功能退化、和心脏肌球蛋白转换,同时在心力衰竭的大鼠模型(Dahl 盐敏感性大鼠)中改进了一般健康和存活。基因表达分析显示了响应于抗 miR-208a 处理的特异性基因表达改变,其包括先前定义的目标基因的改变。有趣的是,抗 miR-208a 在高血压大鼠中的这些生理学效果与血浆中的循环 miRNA 的水平的显著变化相照映。总的来看,这些研究指示了系统递送的抗 miR 在心脏疾病环境中的强度,并且验证了 miR-208 是心力衰竭期间重要的治疗靶物。

[0144] 体内抗 miR 介导的 miR-208a 的沉默

[0145] 为了体内测定心肌细胞中 miR-208a 抑制的治疗潜力,我们设计了一种未缀合的包含 LNA 的抗 miR,其针对 miR-208a (抗 miR-208a,表 2 中的 M-10101)。抗 miR-208a 靶向成熟 miR-208a 的 5' 区域的碱基 2-17,并含有由硫代磷酸酯键连接的 LNA 和 DNA 的组合。以从 0.1 到 33mg/kg 不等的剂量向小鼠静脉内(i.v.)递送抗 miR-208a 一周后的实时 PCR 和 Northern 印迹法分析指示了剂量 - 响应性的 miR-208a 的沉默,而注射化学性质相似的错配抗 miR 不显示 miR-208a 的抑制(图 12)。值得注意的是,我们观察到了当存在所述 16 聚 LNA 抗 miR 时的 miR-208a 的上移,反映了在 miR-208a 和所述 LNA 抗 miR 之间形成了稳定的异双链体(heteroduplex)。其它两个 myomiR 即 miR-208b 和 miR-499 的实时分析显示在单次注射七日后无抑制,我们也没有观察到 Myh7 的任何改变(数据未显示)。

[0146] 为了调查经由其他施用途径递送抗 miR-208a 的潜力,我们以 25mg/kg 抗 miR-208a i.v.、腹膜内(i.p.)、或皮下(s.c.)注射小鼠并在第 1、4、7、和 14 日测量 miR-208a 抑制。所有 3 个施用途径均显示了稳健的 miR-208a 的抑制(图 13),血浆、心脏、肝脏和肾脏中的抗 miR-208a 检出在不同递送方法之间没有显著的差异(未显示)。

[0147] 延长的 miR-208a 抑制导致体内 Myh7 调控

[0148] 由于单个剂量的抗 miR-208a 在七日后不能够确立对 Myh7 的效果,如在 miR-208a 敲除小鼠中所见,我们开始测定在抗 miR-208a 施用后高效的 Myh7 调控所需的剂量和时间。三个连续的 33mg/kg 的抗 miR-208a 剂量稳健地抑制了 miR-208a 至少六周(图 14)。miR-499,已知其受 miR-208 调控(18),在抗 miR-208a 的施用后从第一周到第六周显示了时间依赖性的表达降低,miR-499 中的降低从 35 到 75% (图 14A)。另外,从抗 miR-208a 处理后的第四周开始 Myh7mRNA 表达显著地降低,提示 miR-208a 和 miR-499 水平的特定阈值是 Myh7 表达所必需的(图 14B),该降低伴随着 Myh7 蛋白的下降(图 14C)。Myh7mRNA 响应于抗 miR-208a 的最初尖峰没有导致 Myh7 蛋白的提高。

[0149] 为了确立对 Myh7 表达的效果是否基于 miR-208a 和 miR-499 和降低,我们连续 3 天向小鼠注射了抗 miR-208a 和抗 miR-499 各 33mg/kg 的鸡尾酒。抗 miR-208a/-499 处

理导致了六周的 miR-208a 和 miR-499 的稳健的抑制，并显示了 Myh7mRNA 和蛋白质的快得多的调控，表达在处理后两周之前降低（图 14A-C）。使用夹心杂交测定法（sandwich hybridization assay）在心脏、肝脏、肾脏、和血浆中定量抗 miR，所得的分布数据指示了在施用 33mg/kg 或 3x33mg/kg 的抗 miR-208 之后六周时，依然能够检测到可观量的抗 miR-208a（图 15）。

[0150] 治疗沉默 miR-208a 降低心脏重塑，同时在心力衰竭期间改进心脏功能和生存

[0151] 由于前面的数据显示了 miR-208a 的遗传删除导致了心脏保护效果，我们试图测试 miR-208a 的治疗意义。为了该目的，我们使用了 Dahl 盐敏感性大鼠，从 8 周龄开始对其喂养低盐（LS）饮食（0.25%NaCl）或高盐（HS）饮食（8.0%NaCl）。在一周的 HS 后，每两周向大鼠皮下施用盐水、25mg/kg 抗 miR-208a、或 25mg/kg 乱序对照寡核苷酸。在 3-4 周的 HS 饮食后，所述的盐水和对照处理的动物显示了可见的不动性和不适的征像以及死亡，而皮下递送抗 miR-208a 可以显著地缓解这些症状（图 16）。作为健康状况的指示，我们在研究的持续时间期间监测了体重。注射了盐水或对照寡核苷酸的接受 HS 饮食的 Dahl 大鼠相较于 LS 饮食对照组显示了显著降低的体重增长。然而，HS/ 抗 miR-208a 处理的大鼠显示了相近的体重增长（图 16B）。为了排除抗 miR-208a 处理的动物通过摄取更少的 8%HS 饮食而维持体重的可能性，监测了食物摄入，显示了所有 HS 饲养组之间摄取是相近的（未显示）。

[0152] 为了进一步了解在响应抗 miR-208a 时所见的保护效果，进行了后续研究，使用 9 周的 4.0%NaCl 饮食，在此期间大鼠每 2 周接受盐水、5 或 25mg/kg 的抗 miR-208a、或 25mg/kg 的抗 miR 对照。体重分析指示了接受 HS 饮食的 Dahl 大鼠相较于 LS 饮食对照显示了体重增长的显著降低，而 HS/ 抗 miR-208a 处理的大鼠维持了体重增长的增加（图 17A）。使用抗 miR-208a 处理的 Dahl 大鼠的超声心动图显象的功能评估显示了舒张功能量度的剂量依赖性的显著改善。HS 饮食八周后，抗 miR-208a 处理的大鼠展示了等容舒张时间（IVRT）相比于 HS/ 盐水对照的显著下降，以及二尖瓣早期与主动充盈率比值（MV E/A）相比于的 HS/ 盐水对照的正常化（图 17B）。对心肌细胞大小的定量显示了在抗 miR-208a 处理后的心肌细胞肥大的显著的降低（图 18A、B）。此外，抗 miR-208a 处理降低了由 HS 饮食诱导的微动脉周围纤维化，如由苦味酸天狼猩红染色的定量所评估的（图 18A、B）。

[0153] miR-208a 抑制可逆转心力衰竭期间的肌球蛋白转换

[0154] 为了将抗 miR-208a 处理后观察到的生理学改变与分子和细胞的改变进行比较，我们检查了 HS 处理之后的 myomiR 表达。抗 miR-208a 在最后一次注射 2 周后在左心室和右心室中均导致了 miR-208a 的剂量依赖性抑制，而对照寡核苷酸相比于盐水未显示差别（图 19A，左图）。miR-499 在 miR-208a 持续的抑制后也显示了剂量依赖性的表达降低（图 19A，中图）。HS/ 盐水和 HS/ 对照处理的动物中均诱导了 miR-208b，然而抗 miR-208a 处理导致了 miR-208b 水平的剂量赖性的降低（图 19A，右图）。该 miR-499 和 miR-208b 的调控得到了 Northern 印迹法的确认（图 19B）。

[0155] 为了评估宿主基因的调控，我们检查了 Myh6、Myh7、和 Myh7b mRNA 水平。Myh7 在 HS/ 盐水和 HS/ 对照组中均响应于 HS 显著地升高。该升高响应于抗 miR-208a 被剂量依赖性地钝化。此外，抗 miR-208a 处理标导致在 HS/ 盐水和 HS/ 对照组中观察到的 Myh6mRNA 降低的表达恢复正常（图 20A）。Myh7b 的表达与 miR-499 水平照映，在抗 miR-208a 处理时展示了剂量依赖性的降低。进一步的，Myh7 的剂量依赖性调控得到了 Western 印迹法的确

认(图 20B)。

[0156] 抗 miR-208a 不诱导心脏电导的改变或毒性的征象

[0157] 虽然遗传删除 miR-208a 不影响生存力或导致可见的形态学心脏缺陷,之前的一篇报道提到了 miR-208a 可能是正常的心脏电生理学所需要的。虽然我们从未在 miR-208 敲除动物中观察到任何明显的异常,为了验证抗 miR-208a 处理是否导致心脏电导影响,我们在野生型和患病的大鼠中测量了 ECG。两种在抗 miR-208a 处理之后长时间内都显示了正常的心脏电生理学(未显示)。

[0158] 不依赖于施用的途径,所有的小鼠和大鼠均良好地耐受了所述抗 miR-108a 或对照寡核苷酸并且展示了正常的行为,如通过贯穿研究的活动水平和理毛行为所确定的。相比于盐水,抗 miR-208a 或对照寡核苷酸在给药后长达 6 周未诱导体重或其他器官(包括心脏、肾脏、肝脏、肺或脾脏)重量的基线改变(未显示),。抗 miR-208a 和对照寡核苷酸在大鼠中都未改变丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)肝脏酶的血清水平,提示了所述寡核苷酸不诱导任何明显的肝脏毒性。

[0159] 抗 miR-208a 诱导特定的基因表达改变

[0160] 为证明 miR-208a 抑制对基因表达改变的效果,我们对注射了盐水、抗 miR-208a 或对照寡核苷酸的接受 HS 饮食的 Dahl 大鼠进行了微阵列分析。相比于对照寡核苷酸处理的动物,抗 miR-208a 处理的动物显示出 131 个基因显著改变。只有 15 个基因(假阳性发现率 67%)在注射盐水和注射对照寡核苷酸的动物中是显著地不同的,指示了寡核苷酸化学本身缺乏对基因表达的效果。如在热图(heat map)中直观展示的,对于在对照寡核苷酸和抗 miR-208a 处理的心脏之间 131 个显著改变的基因的表达的分级聚类(hierarchical clustering)显示了在抗 miR-208a 处理之后上调的和下调的基因的稳健的聚类(clustering),并验证了在对照寡核苷酸处理之后没有基因表达响应(未显示)。基因阵列分析确认了相比于对照寡核苷酸,Myh7 和 Myh7b 响应于抗 miR-208a 显著下调(分别为 -1.31,p=0.005 和 -2.38,p=0.037),而 Thrap1(一种之前表征的靶物)则提高了(1.56,p=0.49)。在阵列上检测的 13518 个基因中,289 个基因为通过生物信息学预测的 miR-208 靶物。在这些预测的靶物中,微阵列显示了 28 个基因随着抗 miR-208 处理而表达升高,实时 PCR 确认了其中的几个(未显示)。由于基因表达分析是对来自以盐水、抗 miR-208a 或对照寡核苷酸处理 8 周的 Dahl 高血压大鼠的心脏样品所进行的,我们怀疑其余的基因表达改变可能是 miR-208 抑制的直接基因调控效果的次生(secondary)效果。

[0161] 将抗 miR 序列针对大鼠基因组进行 BLAST 分析表明,抗 miR-208a 的序列显示了对于四个编码序列的紧密同源性(至少 14 个碱基的互补性);然而通过微阵列分析测定,这些基因都未受调控。这些分析综合起来表明,所述 LNA- 修饰的寡核苷酸对于靶向 miR-208a 是高度特异性的,没有任何由化学类别诱发的基因表达改变。

[0162] miR-499 是抗 miR-208a 功效的血浆生物标志物

[0163] 在多种疾病环境下检测血浆中的 miRNA 正显示越来越大的诊断前景。为了确定是否有特定的 miRNA 与抗 miR-208a 功效相关联,我们在 HS 处理期间检查了一组肌肉相关的 miRNA。测试的几种肌肉特异性 miRNA,如 miR-1 和 -133,在测试的组之间没有显示显著差异(未显示)。引人注目的是,miR-499 虽然在高盐下在血浆中仅显示了略有升高,但在抗 miR-208a 处理的动物中显著地降低了,提示了 miR-499 可以作为抗 miR-208a 功效的基于血

浆的标志物。此外，发现了 miR-423-5p，之前将其的血浆水平与人心力衰竭相关联（24），在以 miR-208a 处理的动物中降低了。

[0164] 讨论

[0165] 这里展示的数据指示了：miR-208a 的治疗抑制导致了心脏重塑的极大的降低，这与在心脏疾病期间的生存和心脏功能的显著改善同时发生。

[0166] 可以将反义寡核苷酸用于体内有效地沉默 miRNA（19-23）。这些抗 miR 经过了化学修饰，以确保体内稳定性、特异性以及与感兴趣 miRNA 的高亲和力。LNA 是一种核酸修饰，其可引入与寡核苷酸的热力学上强劲的双链体形成，同时增强对互补 RNA 或 DNA 寡核苷酸的特异性（19-20）。作为高结合亲和力的结果，可以用更短的寡核苷酸（8-16 个碱基）实现 LNA 修饰的抗 miR 的生物学活性（25）。最近，已经在啮齿类和非人灵长类中报道了治疗适用性，其中非缀合 LNA-抗 miR 的系统递送强力地拮抗了肝脏表达的 miR-122，导致了在慢性感染的黑猩猩中丙型肝炎病毒诱导的肝脏病理的改善（23）。

[0167] 本研究中的关键发现是 LNA 修饰的寡核苷酸的系统递送可有效地在心脏中诱导强力和持久的 miR-208 的沉默。系统递送抗 miR-208a 时，miR-208a 得到持久抑制，而对紧密相关的 miR-208b 没有影响，指示了体内稳定性和特异性。基于持久的 miR-208a 沉默和及时的下游 Myh7 调控，看来很可能抗 miR-208a 可以在心脏细胞中积累以沉默所有由 Myh8 转录产生的新形成的 miR-208a 的拷贝。由于心肌细胞通常缺乏更新，防止了由于抗 miR 所靶向的细胞的份额降低而导致的稀释，可能进一步加强该效果。

[0168] 虽然 miRAN 对直接靶物的调控效果是相当即时的，但是 miR-208a 抑制需要几周方可确立对于 Myh7b 和 Myh7 表达的效果。我们提出这样的假说：下游生物学效果的延迟是由于需要许多直接和间接的靶基因的表达发生改变，这些改变的联合作用是诱导变化所必需的。在响应 miR-122 抑制时观察到了一个相近的现象，其诱导了血浆胆固醇的降低，但这直至抗 miR 处理几周后才发生，而基因表达的改变却是即时的（19-20）。无论如何，对 Myh7b 和 Myh7 表达的效果表型模拟在 miR-208 遗传删除中见到的效果（12），指示 miR-208a 被有效地沉默了。

[0169] 在 Dahl 高血压大鼠中抗 miR-208a 的治疗效果为皮下递送足以有效地体内将抗 miR 递送至心脏、以及心脏疾病期间的 miR-208a 抑制可预防心脏重塑、功能衰退和致命性提供了强有力的证据。虽然还不清楚是否这些效果仅仅来自 miR-208a 抑制导致的对心肌细胞的效果，或者是否有响应于 miR-208a 抑制的心脏外效果，但剂量响应性以及在以对照化学处理的动物中没有效果的事实强力提示了观察到的效果是由于 miR-208a 水平的降低所致。进行中的实验将指示该治疗益处是否可以在多个心力衰竭的模型中得到证实，以及并行的针对 miR-208a 和 miR-499 的抗 miR 组合给药是否将更迅速地阐释观察到的效果。虽然初步的啮齿类数据看起来非常令人振奋并在抗 miR 处理时没有观察到有害副作用，还将需要广泛的分析以在多种环境中测定这类作用剂的长效安全性。

[0170] 最近，在人和动物的血清和血浆中检测到 miRNA，开启了 miRNA 使用作为多种疾病，包括心脏疾病的诊断生物标志物的可能性（24、26-28）。血浆 miRNA 分析显示了，除了几种其它 miRNA 改变外，抗 miR-208a 处理导致了在血清中 miR-499 的检出减少，这与响应于抗 miR-208a 处理的 Myh7b/miR-499 在心脏中的表达降低并行。考虑到心脏 miR-499 水平和基于血浆的 miR-499 水平与抗 miR-208a 功效之间的关联，这些数据提示了当改用于患者

中时，血浆 miR-499 水平可以充当抗 miR-208a 向心脏的递送效率的生物标志物。

[0171] 肌球蛋白和后继的 myomiR 表达在物种之间显著地不同。Myh6/miR-208a 是小型啮齿类的心脏中主导的 myosin/myomiR 亚型，但大型哺乳动物表达更多的 Myh7/miR208b (17)。虽然 miR-208a 和 208b 具有重叠的种子序列，它们的 3'区域有 3 个碱基的不同。接下来还将需要在大型哺乳动物中的药物动理学和功效研究以确证在大型物种中是否需要 miR-208a 的抑制、miR-208b 的抑制或同时需要这两种 miR-208 亚型的抑制来确立相似的治疗效果。此外，由于 miR-208 抑制的治疗用途将很可能会是与对心力衰竭患者的的现有标准护理的组合疗法，评估抗 miR-208a 与这些现有的治疗相结合时能否增加这些药物的有益效果是重要的。

[0172] 总而言之，本研究证明了基于 LNA 的抗 miR 的皮下递送可以有效地靶定心脏，并进一步验证了 miR-208 是心脏疾病期间的靶物。

[0173] 方法

[0174] 动物程序：所有动物规程都由 miRagen Therapeutics Inc 的机构内动物照看与使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准。

[0175] 动物和 LNA 修饰的抗 miR 的递送：LNA- 抗 miR 寡核苷酸在 miRagen Therapeutics, Inc 合成，合成的多核苷酸是非缀合且完全硫代磷酸酯化的寡核苷酸，与成熟 miR-208a 序列的 5'区域完美互补。LNA 对照寡核苷酸由针对秀丽线虫特有 miRNA 的序列组成。除非另外指示，寡核苷酸化合物的体内递送是通过经由成年雄性 C56Bl6 小鼠或成年雄性 Dahl 盐敏感性大鼠 (Harlan, Indianapolis) 的尾静脉低压静脉内 (i.v.) 注射达成的。将所有化合物溶解在终体积相近的盐水中并注射，然后检查动物是否有这些化合物的明显的副作用。在指示的时间点收集组织样品用于分子或组织学检查。将 Dahl 大鼠以 0.25NaCl 喂养，或者在 8 周龄时给予 4% 或 8%NaCl 饮食 (Harlan, Indianapolis)。

[0176] 定量实时 PCR 分析：为了进行体内实时 PCR 分析，使用 Trizol (Invitrogen) 从心脏组织提取 RNA，然后使用 Super Script II 反转录酶根据制造商的说明书 (Invitrogen)，利用来自每个组织样品的 2μg RNA 生成 cDNA。为了检测 miR-208 的水平，根据制造商的推荐，使用 10-100ng 的总 RNA 使用 Taqman 微 RNA 测定法 (Applied Biosystems, ABI) 进行 RT-PCR。使用购买自 ABI 的 Taqman 探针通过定量实时 PCR 分析一部分基因的表达。

[0177] Northern 印迹法分析：通过使用 Trizol 试剂 (Gibco/BRL) 从心脏组织样品中分离总 RNA。如之前所描述的进行检测微 RNA 的 Northern 印迹法。用 U6 探针作为加载对照 (IDT)。将来自心肌细胞或心脏组织的 10ug 总 RNA 加载在 20% 的丙烯酰胺变性凝胶上并通过电泳转移到 Zeta-probe GT 基因组印迹膜 (Bio-Rad) 上。在转移后，将印迹交联并在 80℃烘焙 1 小时。为了最大化 miRNA 检测的敏感性，用 Starfire Oligos Kit (IDT, Coralville, IA) 和 α-^{32}P dATP (Amersham 或 Perkin Elmer) 标记寡核苷酸探针。将探针在 Rapid-hyb 缓冲液 (Amersham) 中在 39℃过夜杂交至膜，其后将它们用含有 0.1%SDS 的 0.5xSSC 清洗两次，每次 10min。将印迹通过 PhosphorImager 分析法 (GE HealthCare Life Sciences) 曝光和定量，并以 U6 探针作为加载对照 (ABI)。使用荧光成像仪 (Phosphorimager) 和 ImageQuant (Bio-rad)，利用放射性信号的强度来定量表达的倍数改变。

[0178] Western 印迹法分析：对于 Western 印迹法分析，如描述的 (29) 将肌球蛋白从心脏

细胞或组织中提取。通过将 0.1ug 蛋白裂解物加载在 4-15% 的梯度凝胶上来检测 MHC 同种型，通过 SDS PAGE 加以分离，并使用对 Myh7 有高特异性的小鼠单克隆抗肌球蛋白（慢型，骨骼 M8421)(Sigma,MO) 进行 Western 印迹法。

[0179] 生物分布测定法：利用夹心杂交法来定量血浆和组织样品中的 miR-208a。用于杂交测定法的探针是使用 2'Ome 和 LNA 修饰的核苷酸合成的，它们是：bTEG-mU;lA;mA;lG;mA;lC;mG（捕获探针）和 mA;lG;mC;lA;mA;lA;mA;lA;mG-6FAM（检测探针）。使用抗 - 荧光 -POD,Fab 片段（Roche）和 TMB 过氧化物酶底物 (KPL) 完成检测。使用具有 4 个参数（4-PL）的非线性逻辑斯谛回归分析生成标准曲线。测定法的工作浓度范围是 2-536ng/ml。通过使用转速设置 6.0 的 MP FastPre-24 在 3M GITC 缓冲液（3M 异硫氰酸胍，0.5M NaCl,0.1M Tris pH7.5,10mM EDTA）中匀浆 2x30 秒来制备 100mg/ml 的组织样品。将血浆样品和组织匀浆在 1M GITC 缓冲液（3M 异硫氰酸胍，0.5M NaCl,0.1M Tris pH7.5,10mM EDTA）中稀释最少 50 倍用于测试。

[0180] 超声心动图显象：通过使用带有 30MHz 换能器（transducer）的 Visual Sonic Ultrasound 系统对经镇静的小鼠（2-2.5% 异氟烷）进行二维经胸（transthoracic）超声心动图显象。在乳头肌的水平以胸骨旁短轴视图（parasternal short-axis view）对心脏成像，以记录 M- 模式测量值（M-mode measurements），测定心率、壁厚度（wall thickness）以及舒张末期（end-diastolic）和收缩末期（end-systolic）维度（dimensions）。将缩短分数（fractional shortening，定义为舒张末期维度减去收缩末期维度以舒张末期维度标准化）用作心脏收缩功能的指标。使用经二尖瓣流动多普勒（trans-mitral flow Doppler）以顶端 4- 室视图（apical4-chamber view）测量 E/A 比值、等容舒张时间以及 E 波速率（E wave velocity）的减速时间来评估舒张功能。

[0181] 表面 ECG 测量：以含 2% 异氟烷的 200mL/min O2 麻醉小鼠，并以经由鼻锥的含 2% 异氟烷的 500mL/min 呼吸空气麻醉大鼠。经由 Homeothermic Warming System(Kent Scientific) 或热灯和加热平台（Visual Sonics）将小鼠和大鼠的体温维持在 37℃ -38℃。使用皮下针电极和取样率 1kHz 的 Iworx 数据获取系统记录 10min 导联 II 心电图。使用 Labscribe 软件（Iworx）在 2、4、6、8 和 10 分钟后分析轨迹并检查轨迹是否为正常窦性心律；使用计算机化的技术在每个时间点分析大约 40 次搏动以量化信号间隔（HR、PR、QRS、QT 和 QTc）。

[0182] 组织学：将用于组织学的组织温育于 Krebs-Henseleit 溶液中，在 4% 多聚甲醛中固定、切片、和处理用于通过标准技术以苏木精和伊红（H&E）和苦味酸天狼猩红染色或原位杂交（30）。从 H&E 染色切片捕获每个动物的大约 100 个心肌细胞横截面的图像。以 Image-Pro Plus 软件测量心肌细胞横断面积并对于每个动物测定平均值。从来自每个动物的苦味酸天狼猩红染色的切片中的心外膜、心中膜和心内膜区域获取血管周围纤维化的图像。使用 Image-Pro plus 软件测定包括血管周围纤维化在内的总血管壁面积。从总血管壁面积减去腔面积。血管周围纤维化是通过色彩分割（color segmentation）测定的，并以总血管壁面积的 % 形式报告。

[0183] 基因表达分析：由服务提供者（Expression Analysis,Durham,NC）在 Illumina RatRef-12BeadChip 阵列上进行了微阵列概貌分析。如上所述从心脏组织中分离总 RNA。由服务提供者使用 PADE（Permutation Analysis of Differential Expression）

进行了差别基因表达分析。要注意，如果一个基因探针在所有 12 个阵列中均不具有≤ 0.05 的检测 p- 值，则将该基因从后继的分析中省略。由服务提供者提供差别表达图表。使用 Cluster3.0 进行基因聚类并在 Java TreeView 中生成热图图像。使用在 www.pantherdb.org 找到的在线工具进行基因语义分析（gene ontology）。使用 targetscan.org(TargetScan)、pictar.mdc-berlin.de(Pictar)、和 microrna.org(miRanda) 预测大鼠中的 miR-208 基因靶物。在所有通过 miRanda 预测的基因靶物中，只将具有 <-0.1 的 mirsvr 评分的那些包含在分析中。对于 miR-208 靶物的鉴定，使用了≤ 0.05 的差别表达 p- 值截断点。

[0184] 来自血浆的定量实时 PCR 分析：使用制造商的规程，使用 Trizol LS 试剂 (Invitrogen) 从血浆样品中分离 RNA。在 RNA 分离前，添加 250pmol 的两种不同的合成秀丽线虫 miRNA 序列，作为用于使靶 miRNA 标准化的内部对照（internal controls）。使用的秀丽线虫序列是 cel-miR-2(UAUCACAGCCAGCUUUGAUGUGC(SEQ ID NO:92))、和 cel-lin-4(UCCCUGAGACCUCAAGUGUGA(SEQ ID NO:93))(Dharmacon)。将最终 RNA 离心沉淀重悬浮在与初始血浆体积相等的最终体积中，并且将 5μl 用于后继的 RT-PCR 反应，如上文所描述的。

[0185] 统计学分析：使用单因素方差分析和 Newman-Keuls 多重比较事后检验 (Multiple Comparison Post-test) 确定显著性。认为 P<0.05 是统计学显著的。

[0186] 实施例 4：在非人灵长类中的抑制剂剂量

[0187] 通过隐静脉以 25mg/kg 的剂量向非洲绿猴（～ 3kg）施用抗 miRs10101 和 10707 三次。在四周后收集组织并测定抑制剂。将结果显示在图 22 中。右图显示了药物血浆清除率。左图显示了组织和血浆分布（暗色柱，M-10101；浅色柱，M-10707）。

[0188] 图 23 显示了 miRNA 靶物抑制。左图显示了在左心室中的 miR-208a 表达变化（从左到右：未处理、M-10101、10707、10591）。右图显示了 miR-208b 在左心室中的变化（从左至右：未处理、M-10101、10707、10591）。M-10101 和 M-10707 之间仅有两个核苷酸的差别，然而这两种抗 miR 对它们的靶 miR（分别为 miR-208a 和 miR-208b）是特异性的。

[0189] 图 24 显示了在处理后的 Mir-499 的水平。显示了对于左心室（LV）右心室（RV）、和膈膜的水平。各柱体为（从左到右）：未处理、M-10101、M-10707、和 M-10591。

[0190] 实施例 5：抗 miRa 处理的分子分析

[0191] 选择七种显示体内功效的抗 miR-208a 化合物，每种都具有 9 个 LNA 和 7 个 DNA 核苷酸。将化合物以 25mg/kg 向小鼠 s.c. 给药，在第四天记录结果。测量 miR 和靶物的表达。所述化合物为：M-10101、M-10680、M-10681、M-10682、M-10683、M-10673、和 M-11184（见表 1）。

[0192] 肝和肾毒理学标志物没有显示相对于盐水的显著的提高（未显示）。

[0193] 所述化合物显示了靶物去阻遏的不同的水平。M-10101 和 M-10683 是特别有效的。图 25 显示了 miR-208a 和 Dynlt1 的表达。图 26 显示了 Dynlt1、Vcpip、和 Tmbim6 的表达。图 27 显示了 Thrap1 和 Sp3 的表达。图 28 显示了 Purb、Gata4、和 Sox6 的表达。

[0194] 如图 29 中所示，抗 miR-208a 处理在未受胁迫的啮齿类（SD 大鼠）中可提高 miR-29b 血浆水平。

[0195] 靶物去阻遏的程度依赖于胁迫的程度，如使用 Dahl 盐敏感性大鼠模型所示。图 30 显示了在 4% 盐和 6% 盐条件下的 Dynlt1 表达。Dynlt1 在 6% 条件下显示了更加稳健的去阻

遏。图 31 显示了靶物 Vcpip1 的结果。图 32 显示了靶物 Tmbim6 的结果。

[0196] 图 33 到 39 显示了在心脏不同区域中的 miR 抑制程度，显示了越受胁迫的区域显示越大的效果。图 33 显示了 miR-208a、miR-208b、和 miR-499 的抑制。图 34 显示了肌球蛋白标志物的去阻遏。图 35 显示了某些心脏胁迫标志物的表达程度。图 36 显示了 Dynlt1、Vcpip、Tmbim6 和 Cbx1 的去阻遏。图 37 显示了 Thrap1、Sox6、Sp3、和 pur-beta 的表达。如图 38 中所示，梗死的区域显示了 Dynlt1 最大的去阻遏。图 39 显示了以 M-10101 处理的心脏的不同区域中靶物的去阻遏。

[0197] 参考文献

[0198] 1. Hill, J. A. &Olson, E. N. Cardiac plasticity. N Engl J Med358, 1370-1380(2008).

[0199] 2. Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N. &Hill, J. A. Hypertrophy of the heart:a new therapeutic target?Circulation109, 1580-1589(2004).

[0200] 3. Fatkin, D., et al. An abnormal Ca(2+)response in mutant sarcomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest106, 1351-1359(2000).

[0201] 4. Gupta, M. P. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. J Mol Cell Cardiol43, 388-403(2007).

[0202] 5. Vanderheyden, M., et al. Myocardial gene expression in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy responders versus nonresponders. J Am Coll Cardiol51, 129-136(2008).

[0203] 6. Lowes, B. D., et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. J Clin Invest100, 2315-2324(1997).

[0204] 7. Miyata, S., Minobe, W., Bristow, M. R. &Leinwand, L. A. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. Circ Res86, 386-390(2000).

[0205] 8. Stelzer, J. E., Brickson, S. L., Locher, M. R. &Moss, R. L. Role of myosin heavy chain composition in the stretch activation response of rat myocardium. J Physiol579, 161-173(2007).

[0206] 9. van Rooij, E., et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A103, 18255-18260(2006).

[0207] 10. van Rooij, E., et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29in cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A105, 13027-13032(2008).

[0208] 11. Montgomery, R. L. &van Rooij, E. MicroRNA regulation as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. Curr Drug Targets11, 936-942(2010).

[0209] 12. van Rooij, E., et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. Science316, 575-579(2007).

[0210] 13. Callis, T. E., et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. J Clin Invest119, 2772-2786(2009).

[0211] 14. McGuigan, K., Phillips, P. C. &Postlethwait, J. H. Evolution of sarcomeric myosin heavy chain genes:evidence from fish. Mol Biol Evol21, 1042-1056(2004).

[0212] 15. Berezikov, E., et al. Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. Nat Genet38, 1375-1377(2006).

[0213] 16. Landgraf, P., et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. Cell129, 1401-1414(2007).

[0214] 17. van Rooij, E., Liu, N. &Olson, E. N. MicroRNAs flex their muscles. Trends Genet24, 159-166(2008).

[0215] 18. van Rooij, E., et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. Dev Cell17, 662-673(2009).

[0216] 19. Elmen, J., et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. Nature452, 896-899(2008).

[0217] 20. Elmen, J., et al. Antagonism of microRNA-122in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. Nucleic Acids Res36, 1153-1162(2008).

[0218] 21. Krutzfeldt, J., et al. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. Nucleic Acids Res35, 2885-2892(2007).

[0219] 22. Krutzfeldt, J., et al. Silencing of microRNAs in vivo with'antagomirs'. Nature438, 685-689(2005).

[0220] 23. Lanford, R. E., et al. Therapeutic silencing of microRNA-122in primates with chronic hepatitis C virus infection. Science327, 198-201(2010).

[0221] 24. Tijsen, A. J., et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. Circ Res106, 1035-1039(2010).

[0222] 25. Petersen, M. &Wengel, J. LNA:a versatile tool for therapeutics and genomics. Trends Biotechnol21, 74-81(2003).

[0223] 26. Adachi, T., et al. Plasma microRNA499as a biomarker of acute myocardial infarction. Clin Chem56, 1183-1185(2010).

[0224] 27. D'Alessandra, Y., et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. Eur Heart J(2010).

[0225] 28. Ji, X., et al. Plasma miR-208as a biomarker of myocardial injury. Clin Chem55, 1944-1949(2009).

[0226] 29. Hamalainen, N. &Pette, D. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. Microsc Res Tech30, 381-389(1995).

[0227] 30. Shelton, J. M., Lee, M. H., Richardson, J. A. &Patel, S. B. Microsomal triglyceride transfer protein expression during mouse development. J Lipid Res41, 532-537(2000).

[0001]

序列表

<110> 米拉根医疗公司(MiRagen Therapeutics)
Dalby, Christina
Marshall, William S.
van Rooij, Eva
Montgomery, Rusty

<120> 包含锁定核苷酸的微RNA抑制剂

<130> MIRG-023/01WO

<150> US 61/495,224
<151> 2011-06-09

<150> US 61/423,456
<151> 2010-12-15

<160> 99

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> DNA
<213> 人

<400> 1
tgctcgtctt a 11

<210> 2
<211> 11
<212> DNA
<213> 人

<400> 2
tgttcgtctt a 11

<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> 人

<400> 3
cttttgctc gtctta 16

<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> 人

<400> 4
cctttgttc gtctta 16

<210> 5
<211> 71
<212> RNA
<213> 人

<400> 5
acgggcgagc uuuuggcccg gguuauaccu gaugcucacg uauaagacga gcaaaaagcu 60

uguuggucag a 71

<210> 6
<211> 22
<212> RNA

[0002]

<213> 人

<400> 6
auaagacgaa caaaagguuu gu 22

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人

<400> 7
uuaagacuug cagugauguu u 21

<210> 8
<211> 16
<212> RNA
<213> 人

<400> 8
uaagacgagc aaaaag 16

<210> 9
<211> 16
<212> RNA
<213> 人

<400> 9
uaagacgaac aaaaag 16

<210> 10
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯(May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate)

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯(May be deoxy thymidine phosphorothioate)

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯(May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate)

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯(May be deoxy guanosine phosphorothioate)

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>

[0003]

<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是锁定核酸腺苷(May be locked nucleic acid adenosine)

<400> 10
cttttgctc gtctta 16

<210> 11
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>

[0004]

<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 11
tgctcgtctt a 11

<210> 12
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>

[0005]

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 12
tgctcgtctt a 11

<210> 13
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧腺苷磷酸酯(May be deoxy adenosine phosphorothioate)

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0006]

<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 13
tgcacgtctt a 11

<210> 14
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧腺苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>

[0007]

<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 14
tgcacgtctt a 11

<210> 15
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>

[0008]

<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧腺苷(May be deoxy adenosine)

<400> 15
ctttttgctc gtctta 16

<210> 16
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0009]

<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 16
ctttttgctc gtctta 16

<210> 17
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>

[0010]

<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 17
cttttgctc gtctta 16

<210> 18
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>

[0011]

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 18
cttttgctc gtctta 16

<210> 19
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>

[0012]

<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 19
cttttgctc gtctta 16

<210> 20
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0013]

<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 20
ctttttgctc gtctta 16

<210> 21
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0014]

<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 21
ctttttgctc gtctta 16

<210> 22
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>

[0015]

<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 22
cttttgctc gtctta 16

<210> 23
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

[0016]

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)

[0017]

<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 23
cctttgttc gtctta 16

<210> 24
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 24
ttttgctcg tctta 15

[0018]

<210> 25
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)

[0019]

<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 25
ttttgctcg tctta 15

<210> 26
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 26
ttttgctcg tctta 15

[0020]

<210> 27
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 27
ttttgctcg tctta 15

[0021]

<210> 28
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是胍氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是胍氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是胍氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是胍氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 28
ttttgctcg tctta 15

<210> 29
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>

[0022]

<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 29
ttttgctcg tctta 15

<210> 30
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>

[0023]

<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 30
ctttgctcg tctta 15

<210> 31
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>

[0024]

<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 31
ctttgctcg tctta 15

[0025]

<210> 32
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 32
ctttgctcg tctta 15

[0026]

<210> 33
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 33
ctttgctcg tctta 15

[0027]

<210> 34
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)

[0028]

<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 34
ctttgctcg tctta 15

<210> 35
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)

[0029]

<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 35
ctttgctcg tctta 15

<210> 36
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)

[0030]

<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 36
ctttgttcg tctta 15

<210> 37
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)

[0031]

<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 37
ctttgttcg tctta 15

<210> 38
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)

[0032]

<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 38
ctttgttcg tctta 15

<210> 39
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)

[0033]

<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 39
ttttgctcg tctta 15

<210> 40
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)

[0034]

<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 40
ctttgctcg tctta 15

<210> 41
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)

[0035]

<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 41
ctttgttcg tctta 15

<210> 42
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)

[0036]

<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 42
tttgctcgt ctta 14

<210> 43
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)

[0037]

<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 43
tttgctcgt ctta 14

<210> 44
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)

[0038]

<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 44
ttttgctcgt ctta 14

<210> 45
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)

[0039]

<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 45
ttttgctcgt ctta 14

<210> 46
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 46
ttttgctcgt ctta 14

[0040]

<210> 47
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)

[0041]

<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 47
ttttgctcgt ctta 14

<210> 48
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 48
ttttgttcgt ctta 14

[0042]

<210> 49
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 49
tttgttcgt ctta 14

<210> 50
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

[0043]

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 50
ttttgttcgt ctta 14

<210> 51
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0044]

<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 51
ttttgttcgt ctta 14

<210> 52
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>

[0045]

<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 52
tttgttcgt ctta 14

<210> 53
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>

[0046]

<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 53
tttgttcgt ctta 14

<210> 54
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>

[0047]

<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 54
tttgctcgtc tta 13

<210> 55
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>

[0048]

<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 55
tttgctcgtc tta 13

<210> 56
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>

[0049]

<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 56
tttgctcgtc tta 13

<210> 57
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>

[0050]

<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 57
tttgctcgtc tta 13

<210> 58
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>

[0051]

<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 58
tttgttcgtc tta 13

<210> 59
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>

[0052]

<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 59
ttigttcgtc tta 13

<210> 60
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 60

[0053]

tttgttcgtc tta 13

<210> 61
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 61

[0054]

tttgttcgtc tta 13

<210> 62
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 62
tgctcgtctt a 11

<210> 63
<211> 11

[0055]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 63
tgctcgtctt a 11

<210> 64
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

[0056]

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 64
tgttcgtctt a 11

<210> 65
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

[0057]

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 65
tgttcgtctt a 11

<210> 66
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

[0058]

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 66
cctttgttc gtctta 16

<210> 67
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

[0059]

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 67
cctttgttc gtctta 16

<210> 68
<211> 16

[0060]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 68
cctttgttc gtctta 16

<210> 69
<211> 16

[0061]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 69

[0062]

ccttttgctc gtctta 16

<210> 70
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>

[0063]

<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧腺苷

<400> 70
cctttgctc gtctta 16

<210> 71
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>

[0064]

<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是锁定核酸腺苷

<400> 71
cctttgctc gtctta 16

<210> 72
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0065]

<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧腺苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 72
ttttgttcgt cttat 15

<210> 73
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0066]

<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 73
ttttgttcgt cttat 15

<210> 74
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0067]

<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧腺苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 74
ttttgttcgt cttat 15

<210> 75
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0068]

<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 75
ttttgttcgt cttat 15

<210> 76
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0069]

<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧胸苷

<400> 76
ttttgttcgt cttat 15

<210> 77
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>

[0070]

<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧胸苷

<400> 77
ttttgttcgt ctiat 15

<210> 78
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>

[0071]

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧胸苷

<400> 78
tttgttcgt cttat 15

<210> 79
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧腺苷磷酸酯

<220>

[0072]

<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 79
ttttgttcgt cttat 15

<210> 80
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧胸苷

<400> 80
ttttgttcgt cttat 15

<210> 81
<211> 14

[0073]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧腺苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 81
tttgttcgtc ttat 14

<210> 82
<211> 14

[0074]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 82
tttgttcgtc ttat 14

<210> 83
<211> 14

[0075]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧腺苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 83
tttgttcgtc ttat 14

<210> 84
<211> 14

[0076]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 84
tttgttcgtc ttat 14

<210> 85
<211> 14

[0077]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷

<400> 85
tttgttcgtc ttat 14

<210> 86
<211> 14

[0078]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷

<400> 86
tttgttcgtc ttat 14

<210> 87
<211> 14

[0079]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷

<400> 87

[0080]

tttgttcgtc ttat 14

<210> 88
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧腺苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷

<400> 88
tttgttcgtc ttat 14

<210> 89
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

[0081]

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷

<400> 89
tttgttcgtc ttat 14

<210> 90
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

[0082]

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是脱氧胸苷

<400> 90
ctttttgttcg tcttat 16

<210> 91
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

[0083]

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 可以是锁定核酸鸟苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可以是锁定核酸胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> 可以是脱氧鸟苷磷酸酯

<220>
<221> misc feature
<222> (12)..(12)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> 可以是脱氧胞苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> 可以是锁定核酸胸苷硫代磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 可以是脱氧胸苷硫代磷酸酯磷酸酯

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 可以是锁定核酸硫代腺苷

<400> 91

[0084]

cttttgctc gtctta 16

<210> 92
<211> 23
<212> RNA
<213> 秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)

<400> 92
uaucacagcc agcuuugaug ugc 23

<210> 93
<211> 21
<212> RNA
<213> 秀丽隐杆线虫

<400> 93
ucccugagac cucaagugug a 21

<210> 94
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<400> 94
auaagacgag caaaaagcuu gu 22

<210> 95
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<400> 95
acaagctttt tgctcgtctt at 22

<210> 96
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<400> 96
cttttgctc gtcttat 17

<210> 97
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<400> 97
auaagacgaa caaaagguuu gu 22

<210> 98
<211> 22
<212> DNA

[0085]

<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<400> 98
acaaaccttt tgttcgtctt at 22

<210> 99
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗-miR-208 寡核苷酸

<400> 99
cctttgttc gtcttat 17

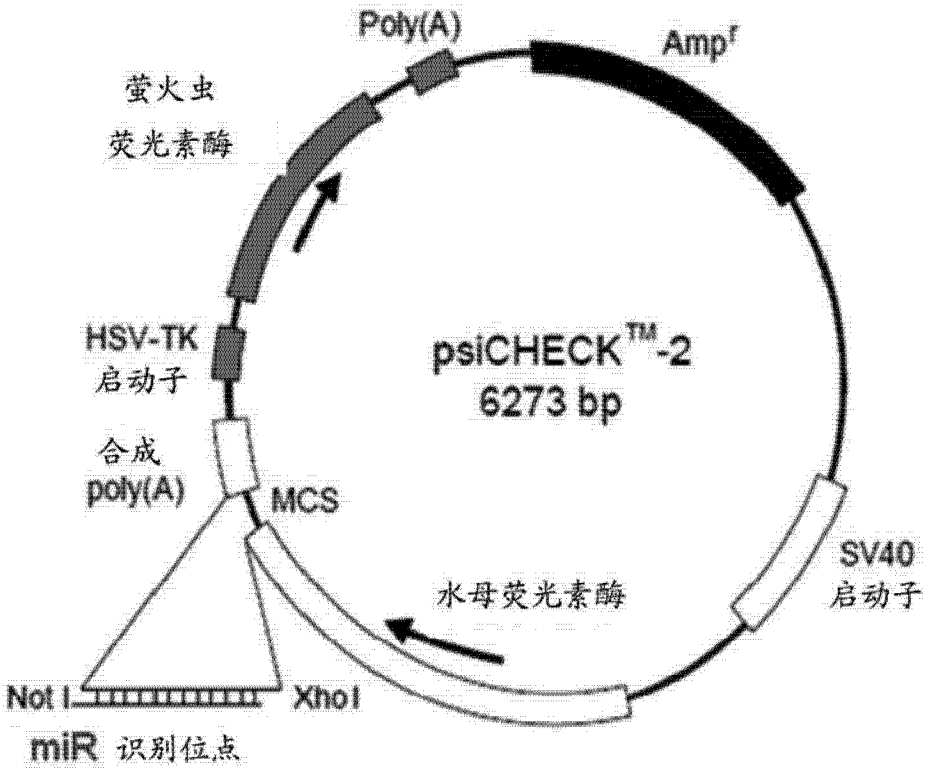

Poly(A)
Amp^r
萤火虫
荧光素酶
HSV-TK
启动子
psiCHECK™-2
6273 bp
合成
poly(A)
MCS
SV40
启动子
水母荧光素酶
Not I
Xho I
miR 识别位点

图 1

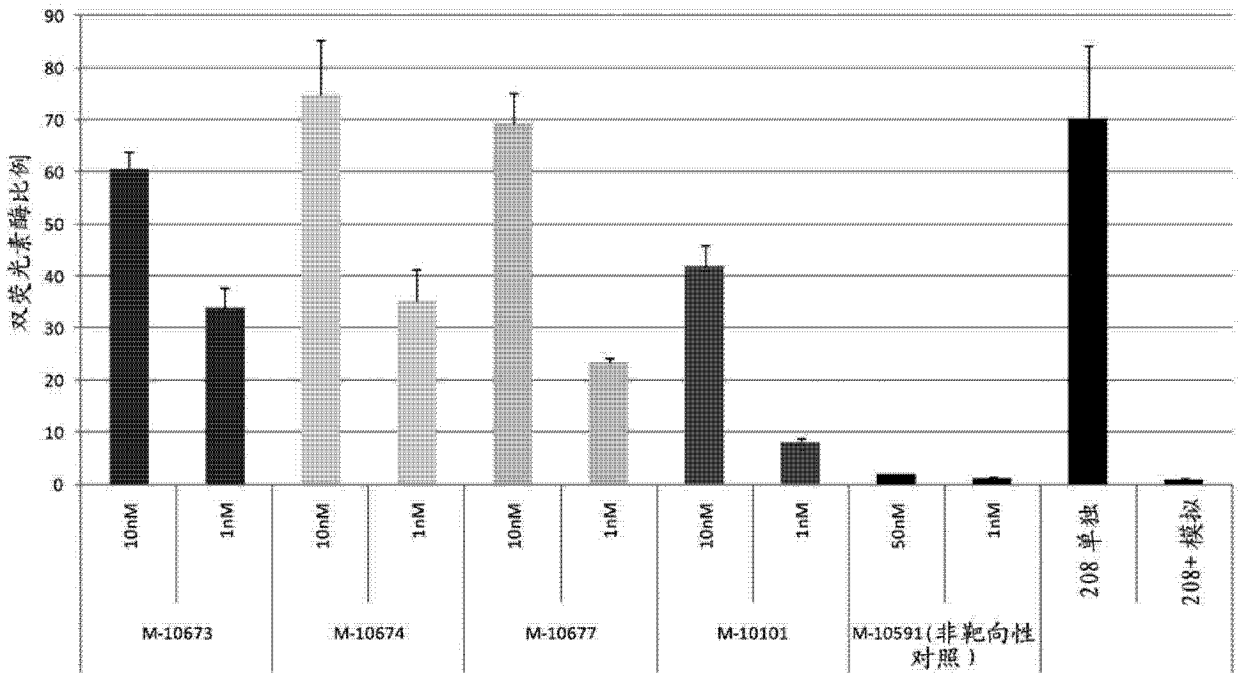

双荧光素酶比例
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10nM
1nM
10nM
1nM
10nM
1nM
10nM
1nM
50nM
1nM
208 单独
208+ 模拟
M-10673
M-10674
M-10677
M-10101
M-10591(非靶向性对照)

图 2

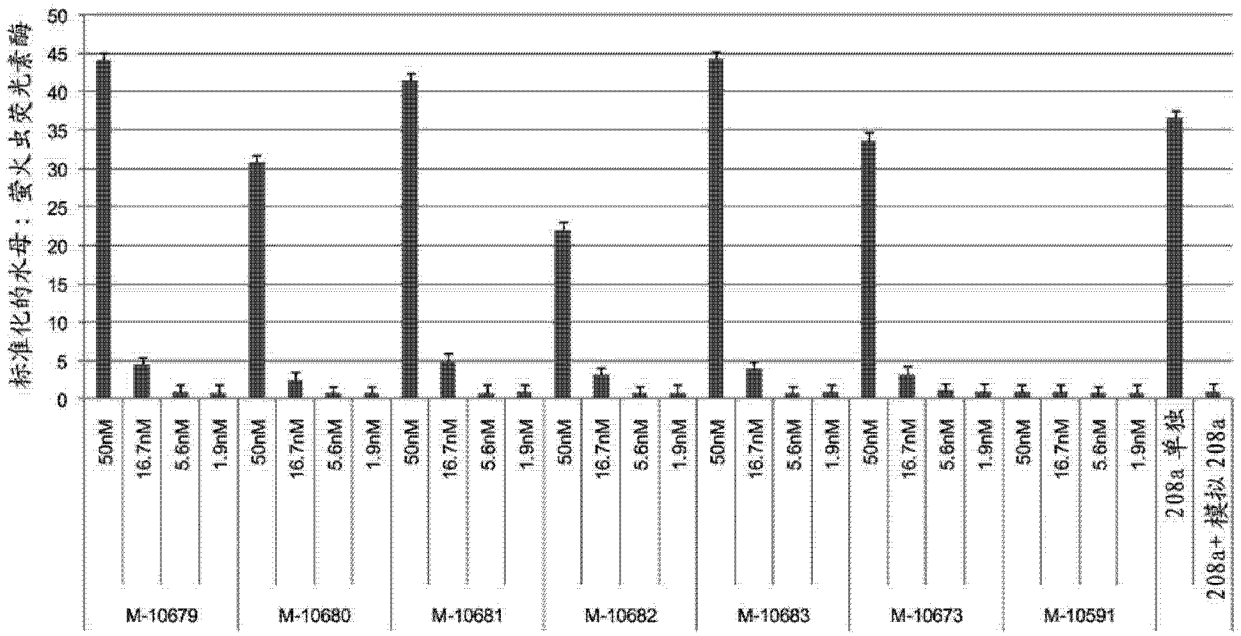

标准化的水母：萤火虫荧光素酶
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
50nM
16.7nM
5.6nM
1.9nM
M-10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
M-10673
M-10591
208a 单独
208a+ 模拟 208a

图 3

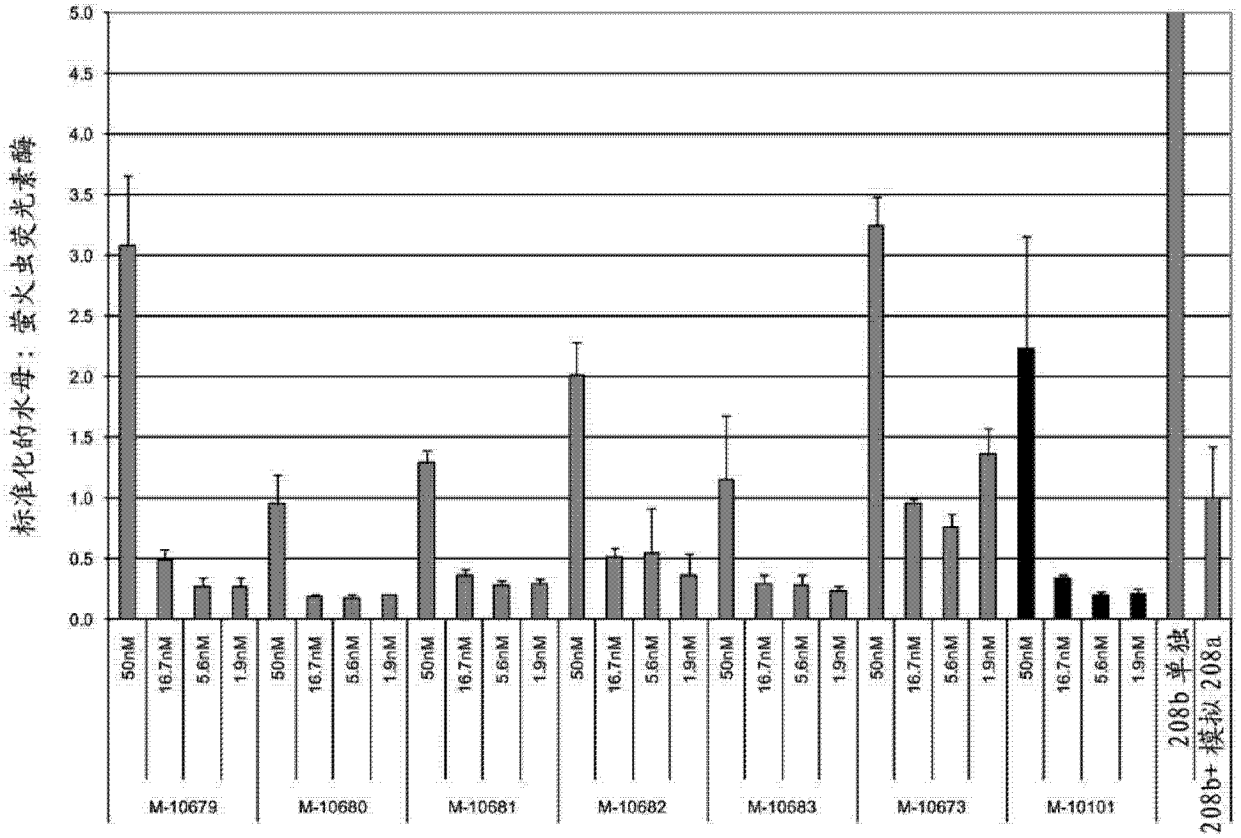

标准化的水母：萤火虫荧光素酶
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
50nM
16.7nM
5.6nM
1.9nM
M-10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
M-10673
M-10101
208b 单独
208b+ 模拟 208a

图 4

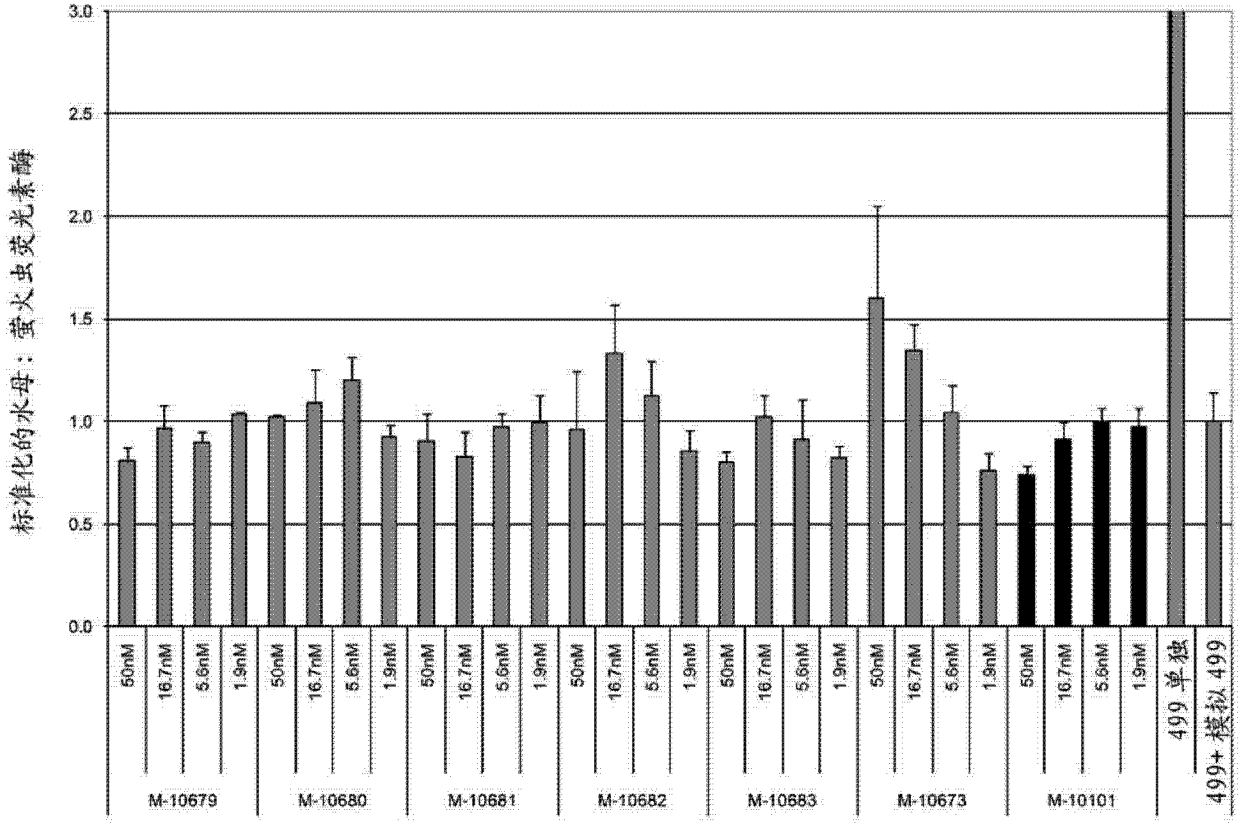

标准化的水母：萤火虫荧光素酶
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
50nM
16.7nM
5.6nM
1.9nM
M-10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
M-10673
M-10101
499 单独
499+ 模拟 499

图 5

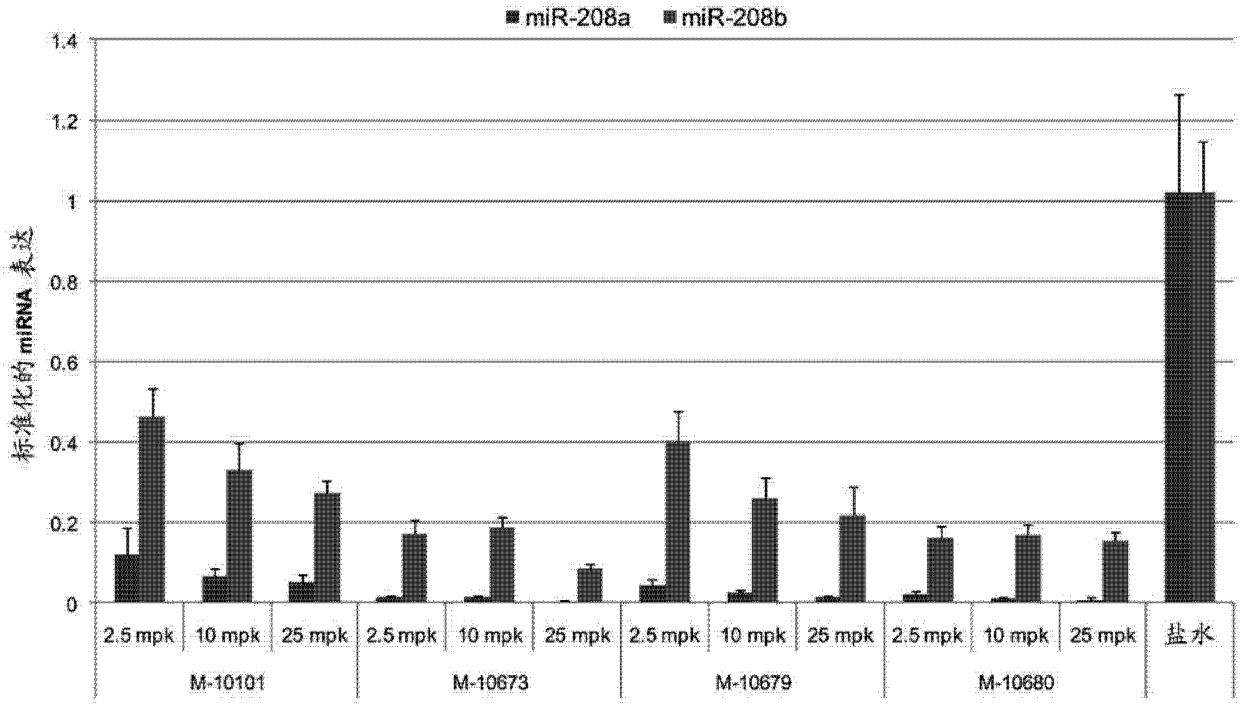
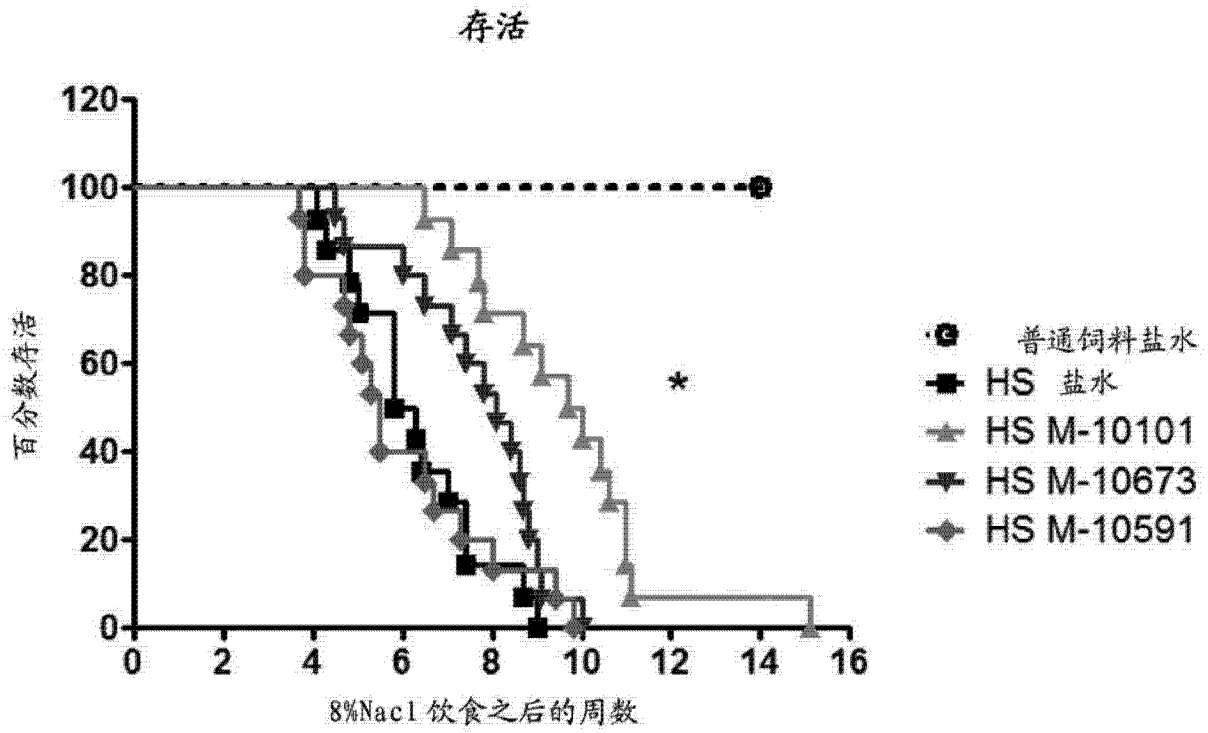

miR-208a
miR-208b
标准化的 miRNA 表达
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2.5 mpk
10 mpk
25 mpk
M-10101
M-10673
M-10679
M-10680
盐水

图 6



* **P<0.05** 相对盐水
秩和 (Mantel-Cox) 检验
Gehan-Breslow-Wilcoxon 检验

图 7

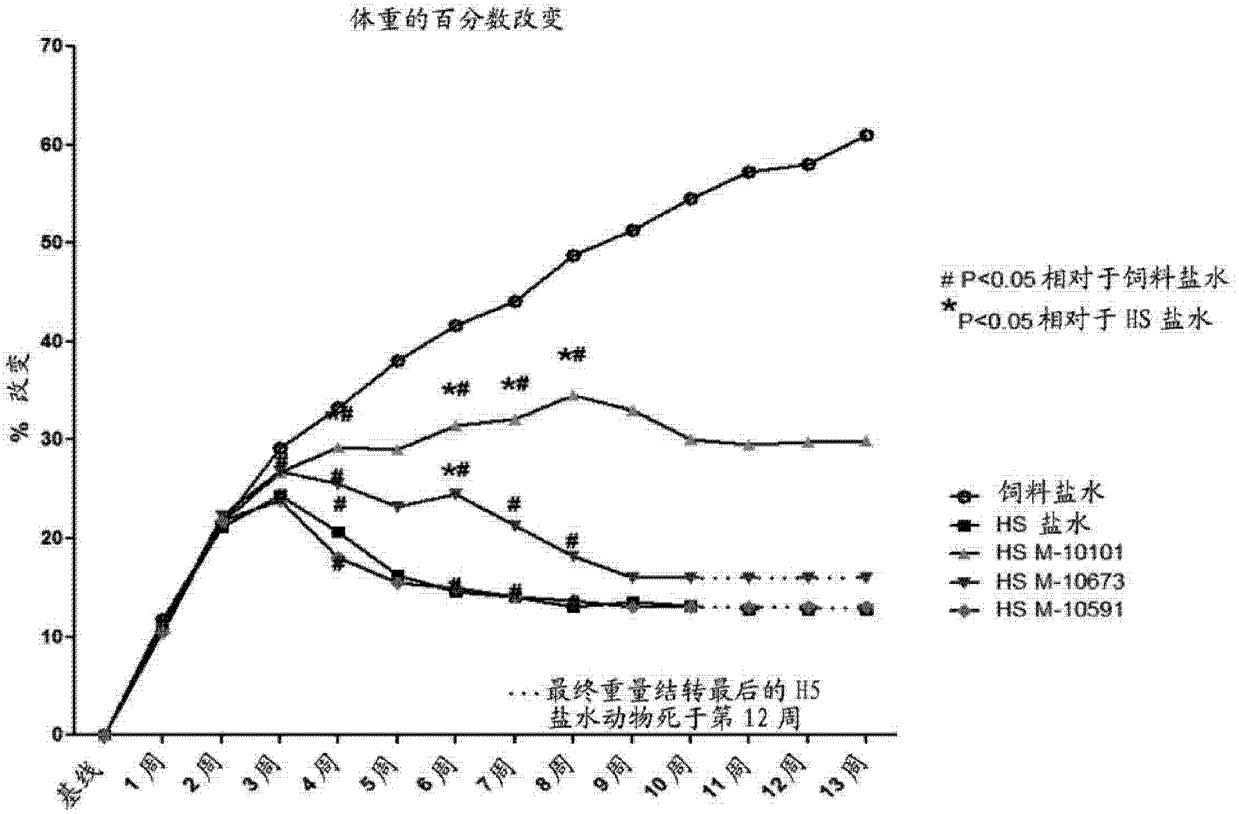


图 8

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
miR-208a	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	5'	A	U	A	A	G	A	C	G	A	G	C	A	A	A	A	A	G	C	U	U	G	U
	(SEQ ID NO:94)		(SEQ ID NO:94)																					
miR-208a RC	ACAAGCTTTTTGCTCGTCTTAT	5'							C	T	T	T	T	G	C	T	C	G	T	C	T	T	A	T
	(SEQ ID NO:95)								(SEQ ID NO:96)															
		%LNA							100%	20%	88%	88%	88%	90%	10%	70%	60%	90%	10%	30%	90%	30%	100%	30%
		% DNA							0%	80%	13%	13%	13%	10%	90%	30%	40%	10%	90%	70%	10%	70%	0%	70%

miR-208b	AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU	5'	A	U	A	A	G	A	C	G	A	A	C	A	A	A	A	G	G	U	U	U	G	U
	(SEQ ID NO:97)		(SEQ ID NO:97)																					
miR-208b RC	ACAAACCTTTTGTTCGTCTTAT	5'							C	C	T	T	T	T	G	T	T	C	G	T	C	T	T	A	T
	(SEQ ID NO:98)								(SEQ ID NO:99)																
		%LNA							100%	20%	78%	90%	90%	100%	0%	60%	0%	100%	20%	30%	100%	30%	90%	60%	50%
		% DNA							0%	80%	22%	10%	10%	0%	100%	40%	100%	0%	80%	70%	0%	70%	10%	40%	50%

图 9

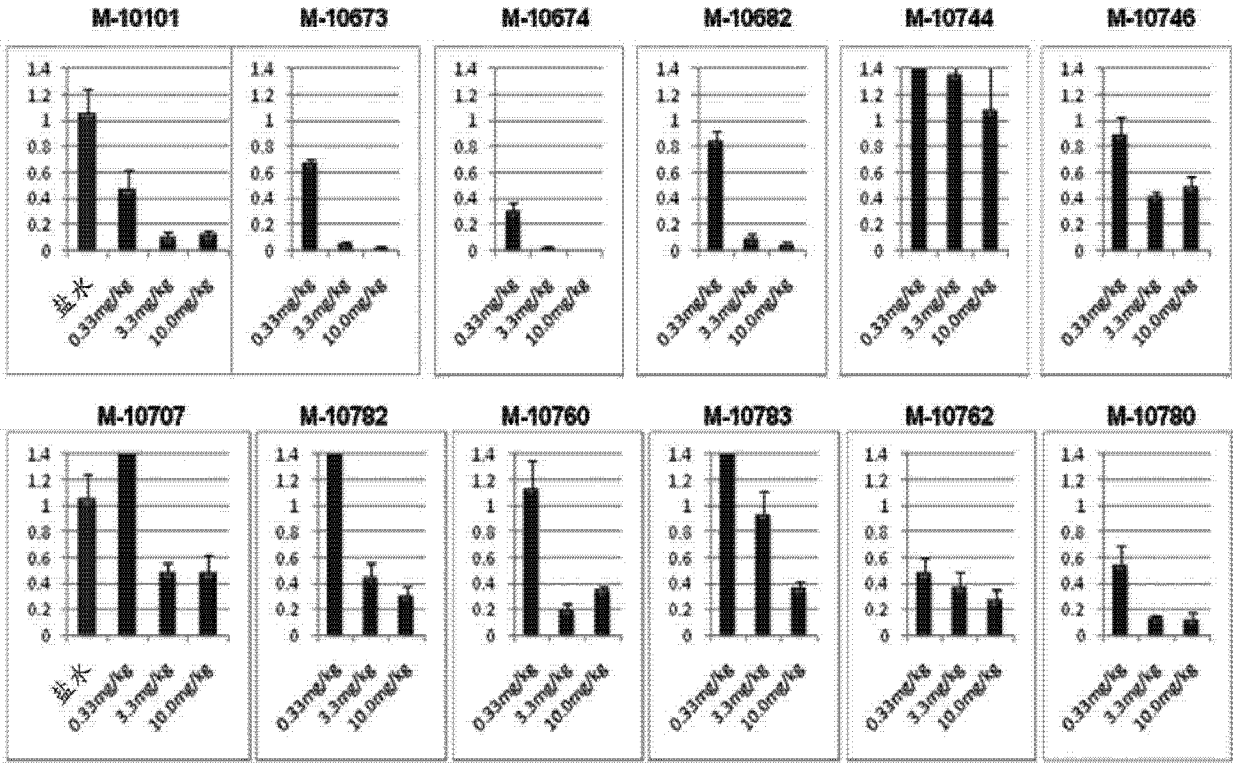

M-10101
M-10673
M-10674
M-10682
M-10744
M-10746
M-10707
M-10782
M-10760
M-10783
M-10762
M-10780
盐水
0.33mg/kg
3.3mg/kg
10.0mg/kg

图 10

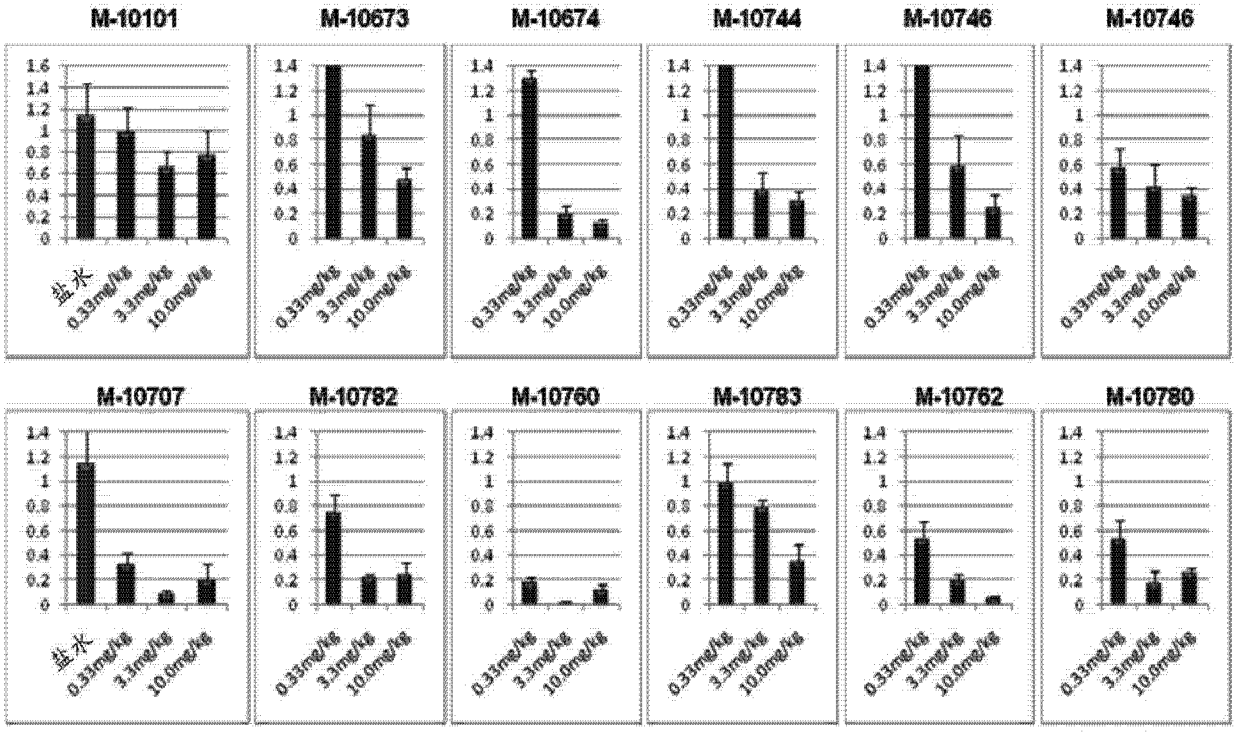

M-10101
M-10673
M-10674
M-10744
M-10746
M-10746
M-10707
M-10782
M-10760
M-10783
M-10762
M-10780
盐水
0.33mg/kg
3.3mg/kg
10.0mg/kg

图 11

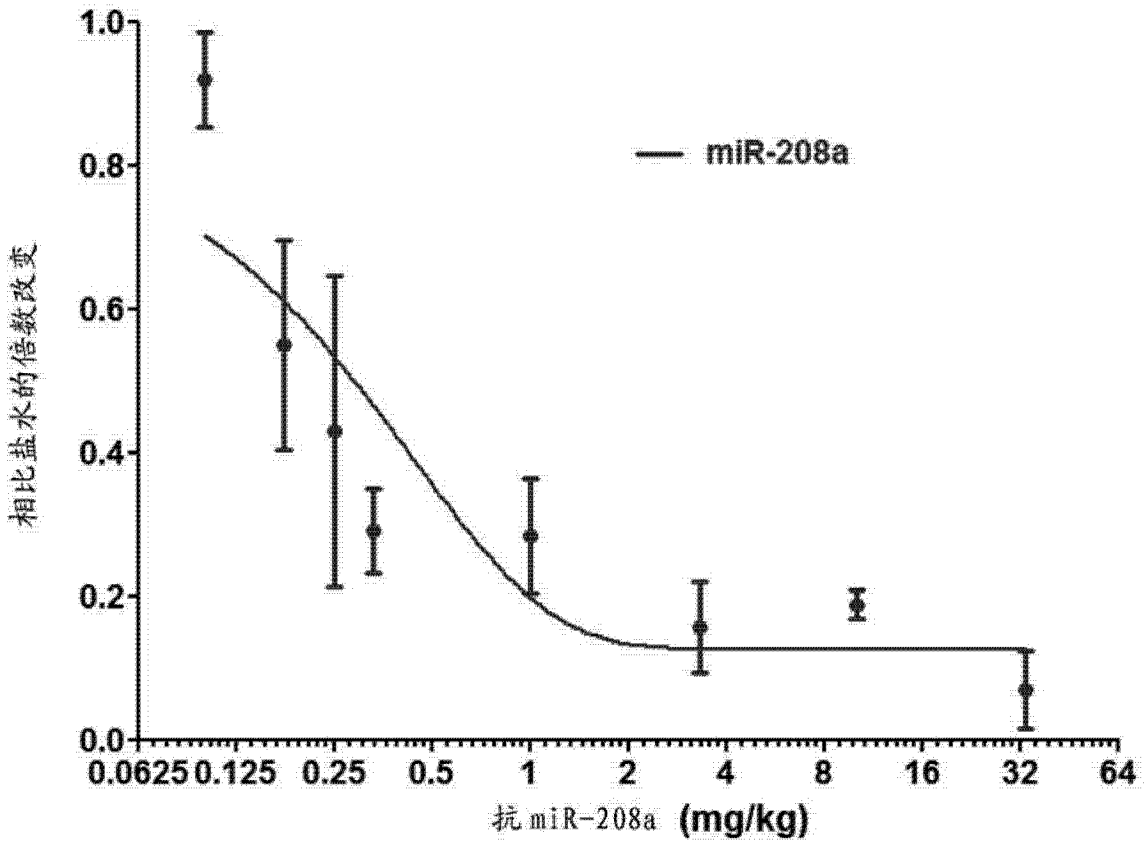

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
相比盐水的倍数改变
miR-208a
0.0625 0.125 0.25 0.5 1 2 4 8 16 32 64
抗miR-208a (mg/kg)

图 12

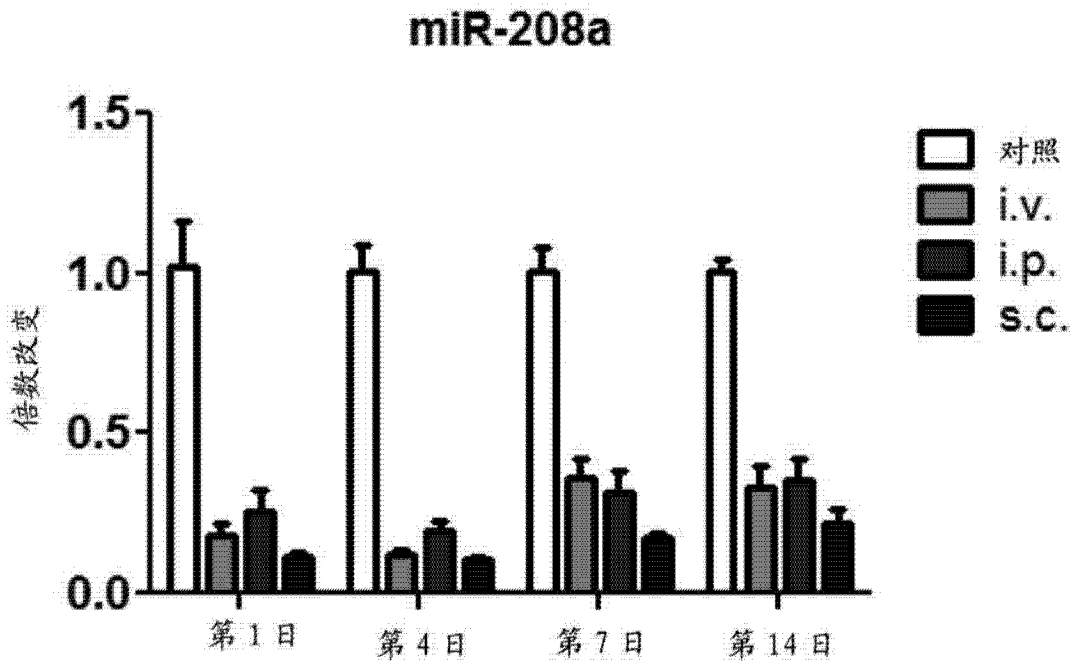

miR-208a
1.5
1.0
0.5
0.0
倍数改变
对照
i.v.
i.p.
s.c.
第 1 日
第 4 日
第 7 日
第 14 日

图 13

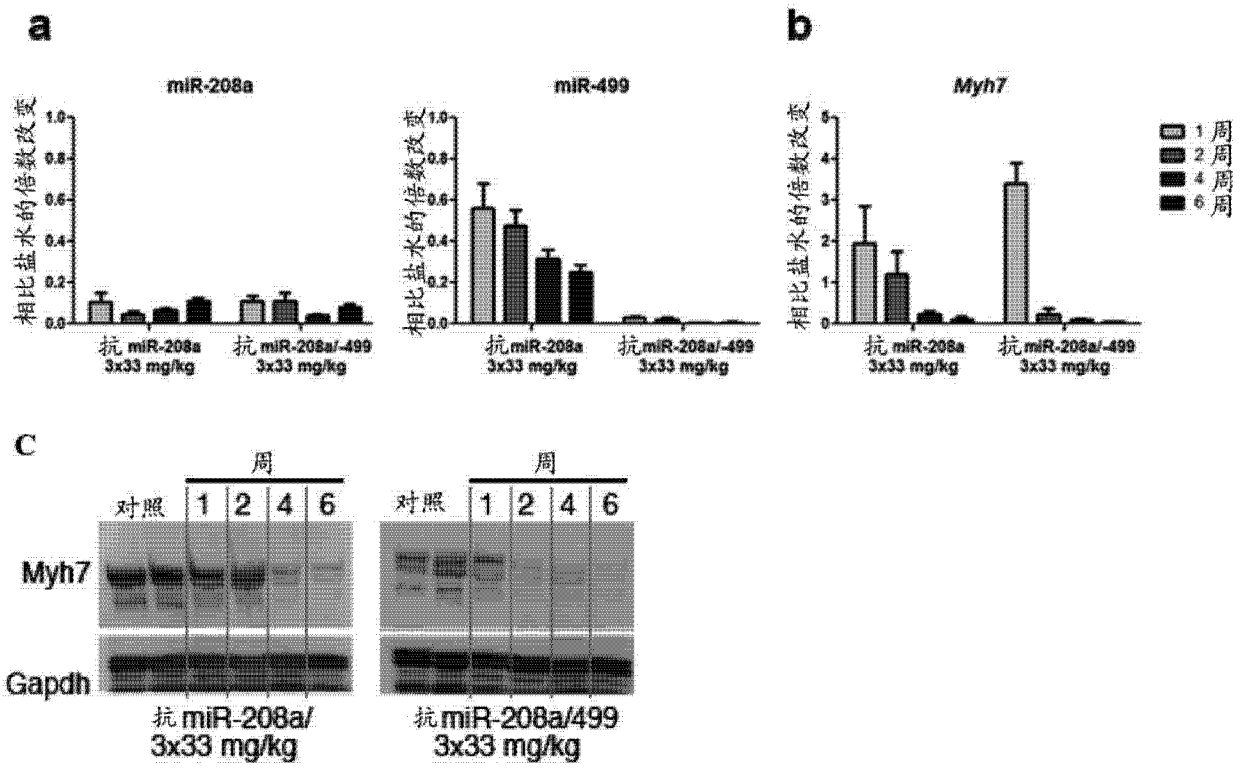

a
miR-208a
miR-499
相比盐水的倍数改变
抗 miR-208a 3x33 mg/kg
抗 miR-208a/-499 3x33 mg/kg
b
Myh7
1 周
2 周
4 周
6 周
C
周
对照
1
2
4
6
Myh7
Gapdh
抗 miR-208a/ 3x33 mg/kg
抗 miR-208a/499 3x33 mg/kg

图 14

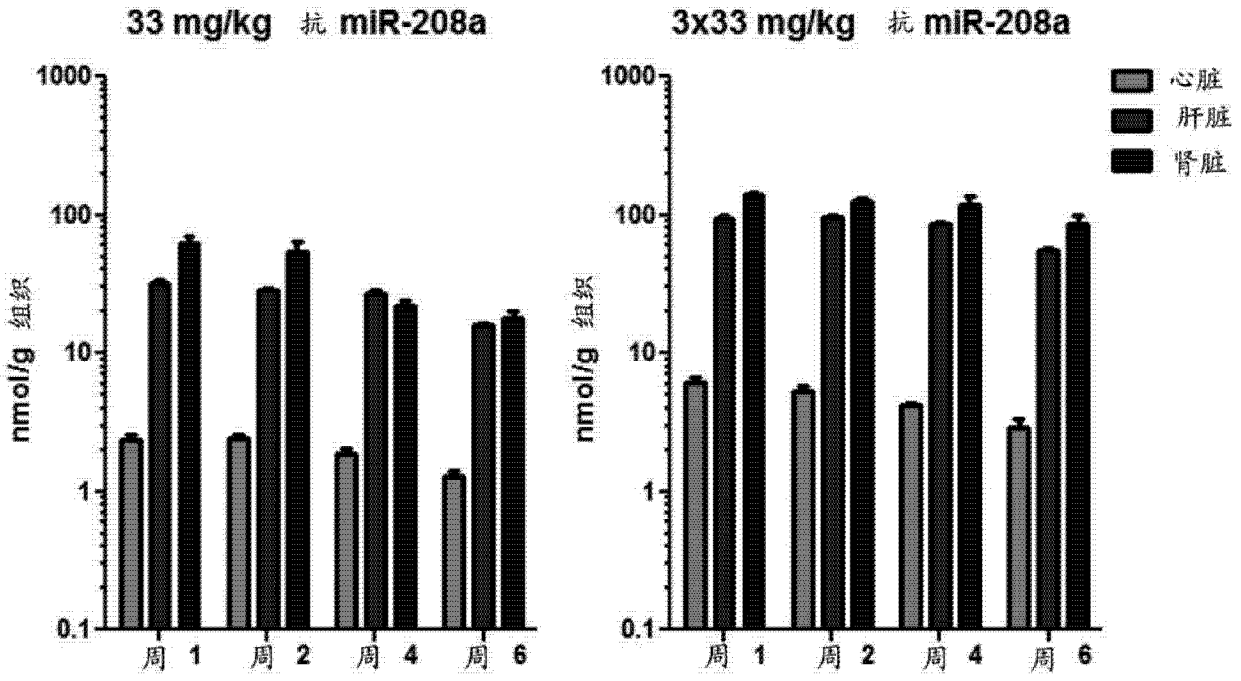

33 mg/kg 抗 miR-208a
3x33 mg/kg 抗 miR-208a
nmol/g 组织
1000
100
10
1
0.1
心脏
肝脏
肾脏
周 1
周 2
周 4
周 6

图 15

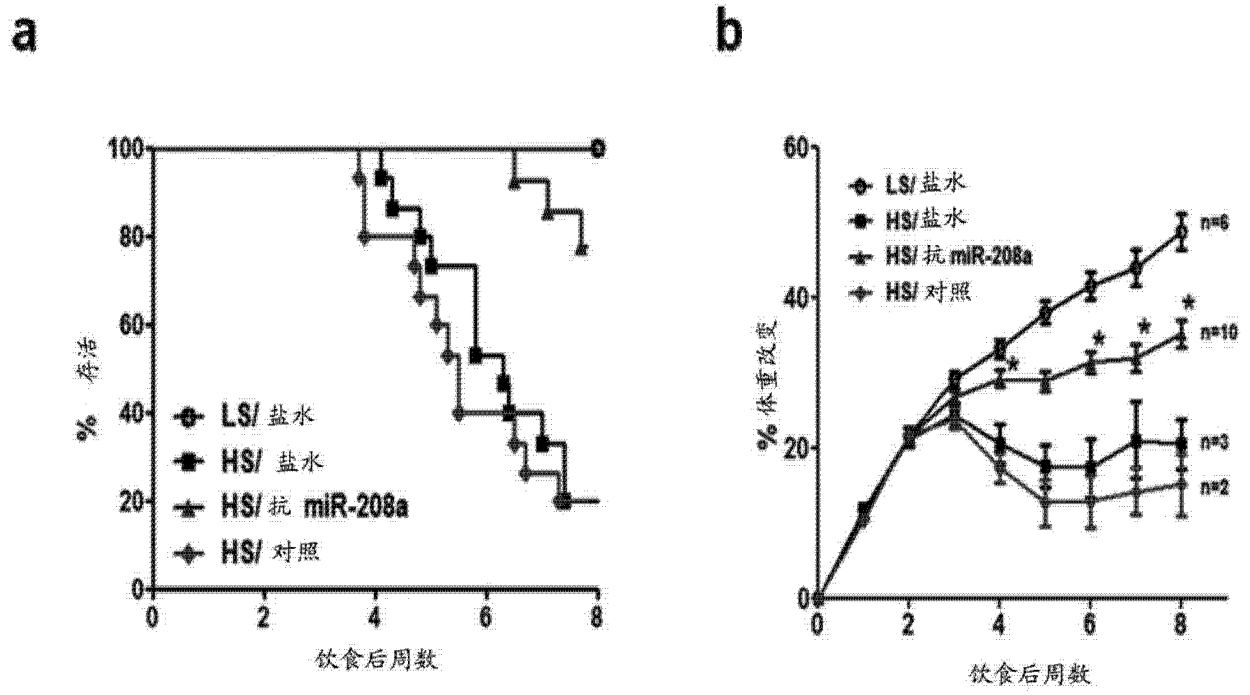

a
b
100
80
60
40
20
0
% 存活
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/ 抗 miR-208a
HS/ 对照
0
2
4
6
8
饮食后周数
60
40
20
0
% 体重改变
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/ 抗 miR-208a
HS/ 对照
n=6
n=10
n=3
n=2
饮食后周数

图 16

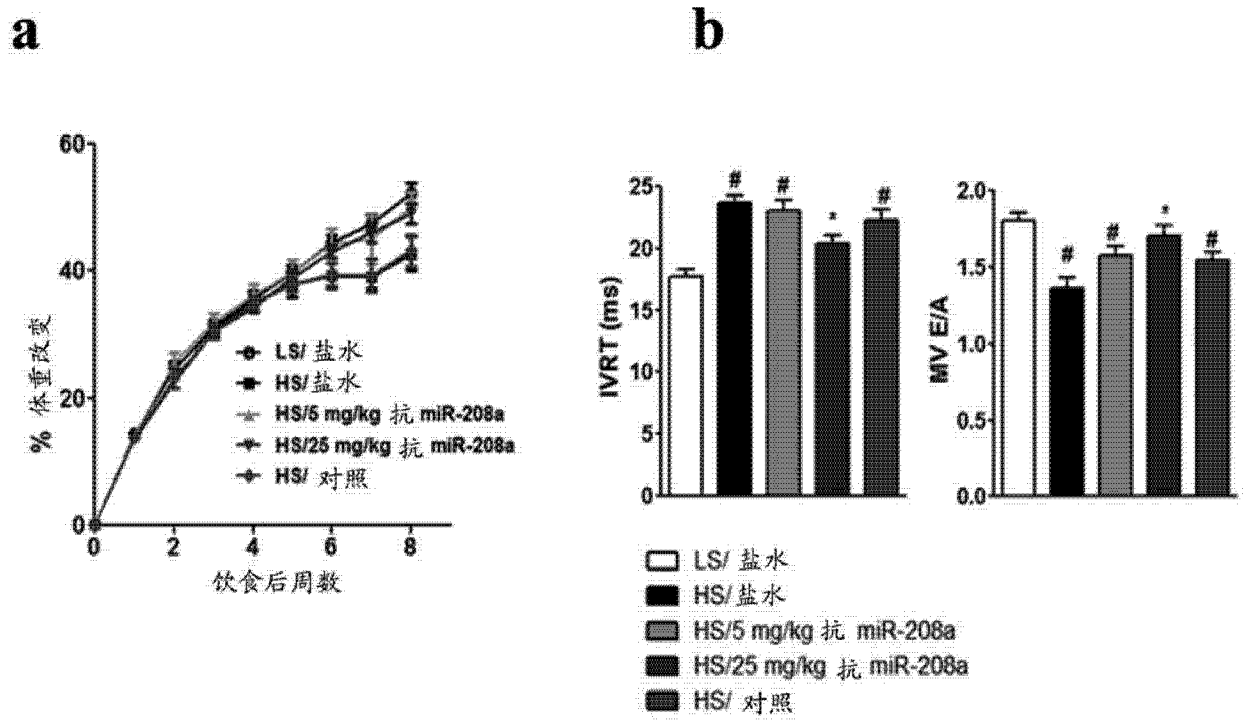

a
b
60
40
20
0
% 体重改变
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/5 mg/kg 抗 miR-208a
HS/25 mg/kg 抗 miR-208a
HS/ 对照
0
2
4
6
8
饮食后周数
25
20
15
10
5
0
IVRT (ms)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MV E/A
#
*
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/5 mg/kg 抗 miR-208a
HS/25 mg/kg 抗 miR-208a
HS/ 对照

图 17

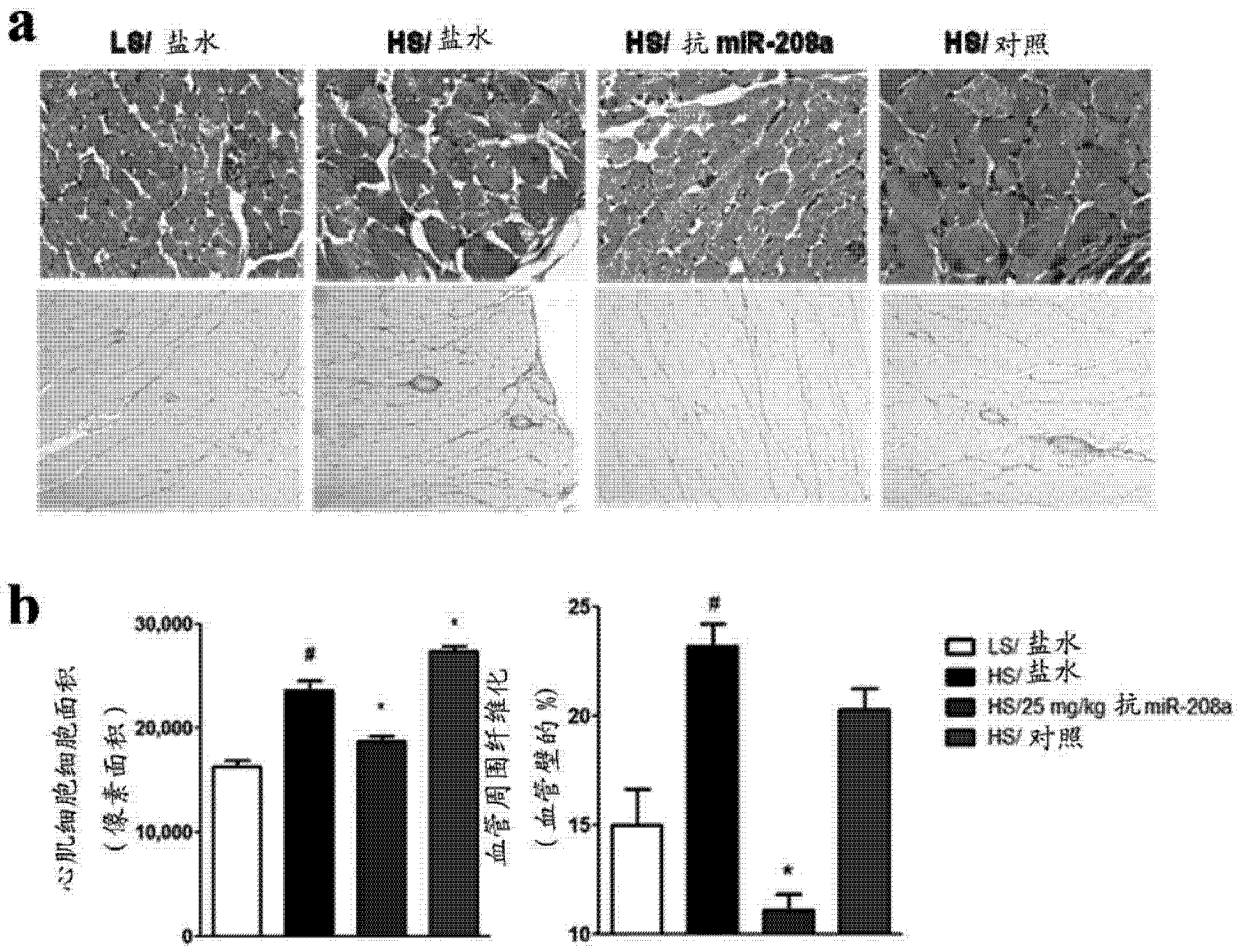

a
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/ 抗 miR-208a
HS/ 对照
b
心肌细胞细胞面积
（像素面积）
30,000
20,000
10,000
0
#
*
*
血管周围纤维化
（血管壁的%）
25
20
15
10
#
*
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/25 mg/kg 抗 miR-208a
HS/ 对照

图 18

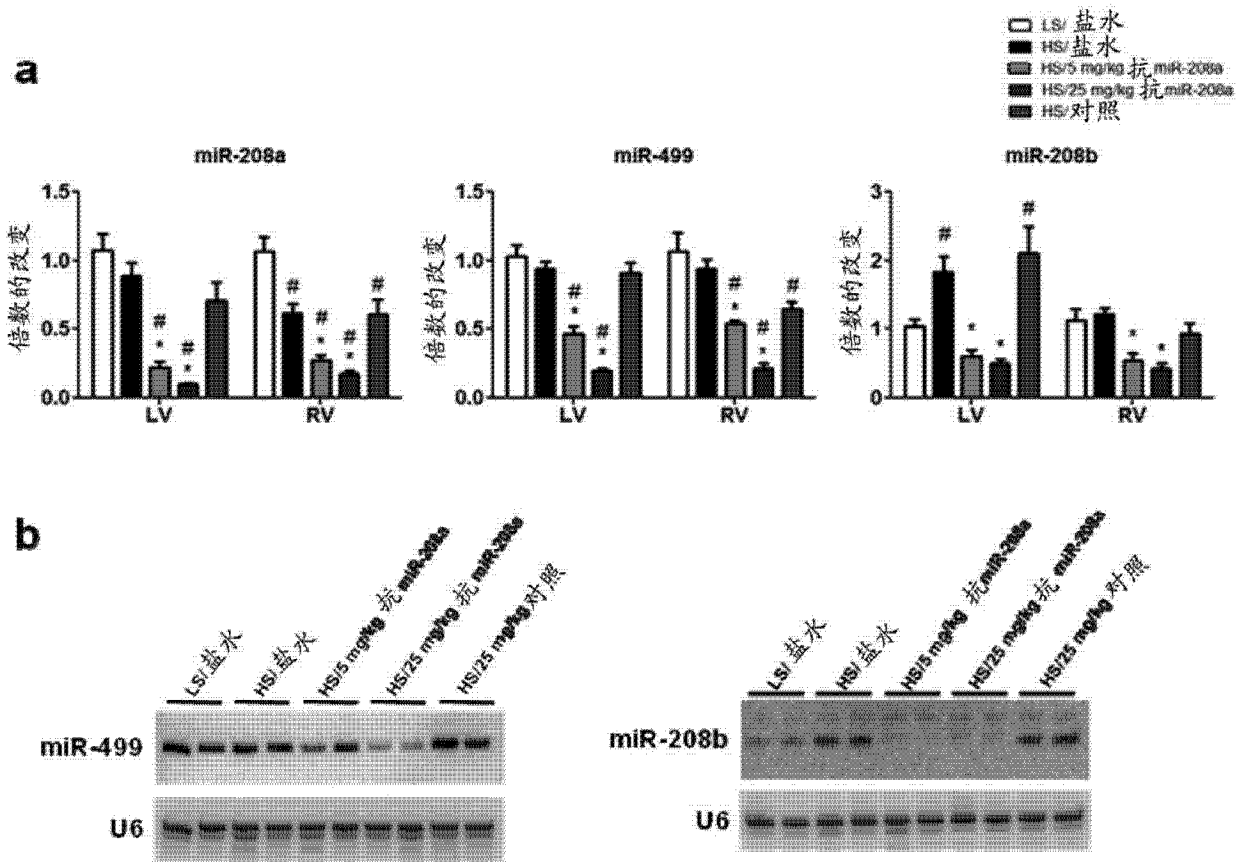

a
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/5 mg/kg 抗miR-208a
HS/25 mg/kg 抗miR-208a
HS/ 对照
miR-208a
miR-499
miR-208b
倍数的改变
LV
RV
b
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/5 mg/kg 抗miR-208a
HS/25 mg/kg 抗 miR-208a
HS/25 mg/kg 对照
miR-499
U6
miR-208b
U6

图 19

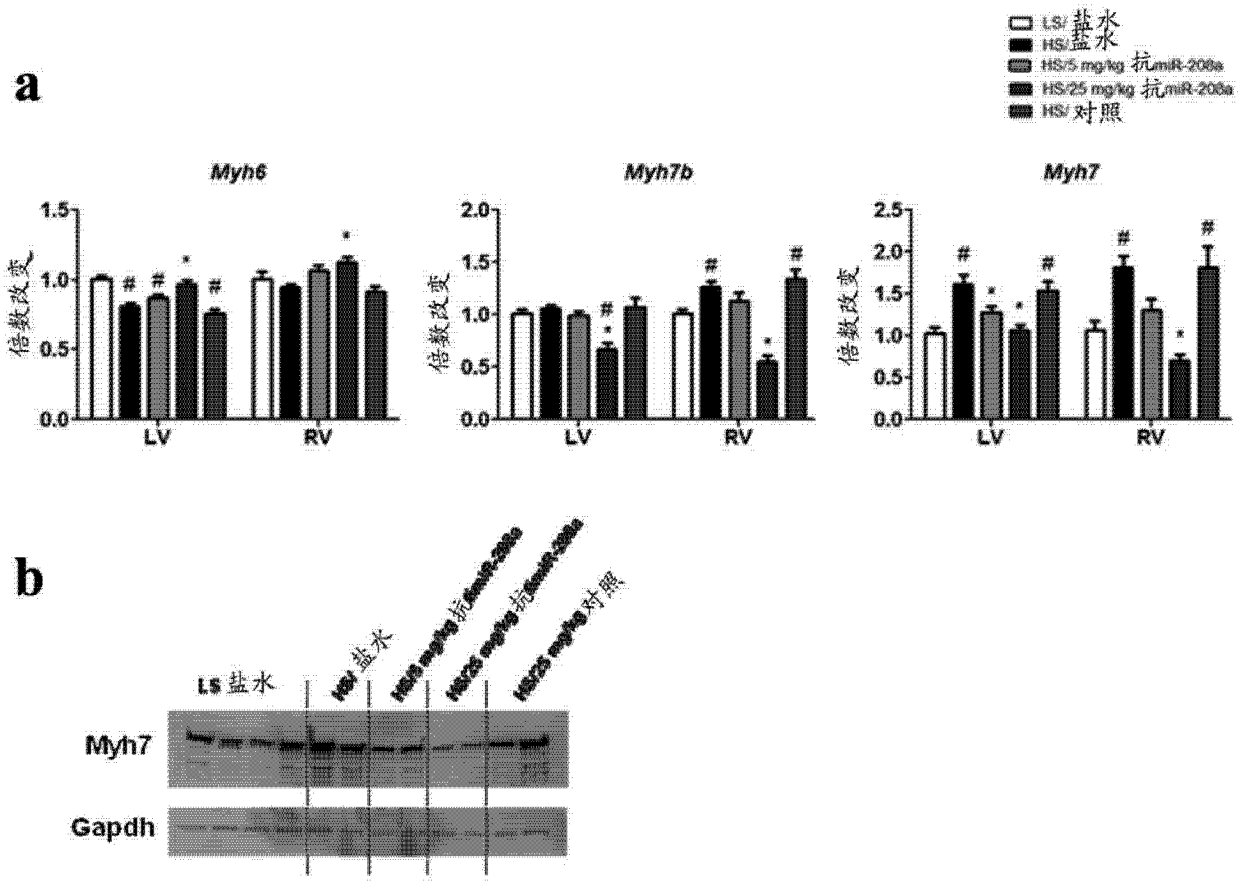

a
LS/盐水
HS/盐水
HS/5 mg/kg 抗miR-208a
HS/25 mg/kg 抗miR-208a
HS/对照
Myh6
Myh7b
Myh7
倍数改变
LV
RV
b
LS盐水
HS/盐水
HS/5 mg/kg 抗miR-208a
HS/25 mg/kg 抗miR-208a
HS/25 mg/kg 对照
Myh7
Gapdh

图 20

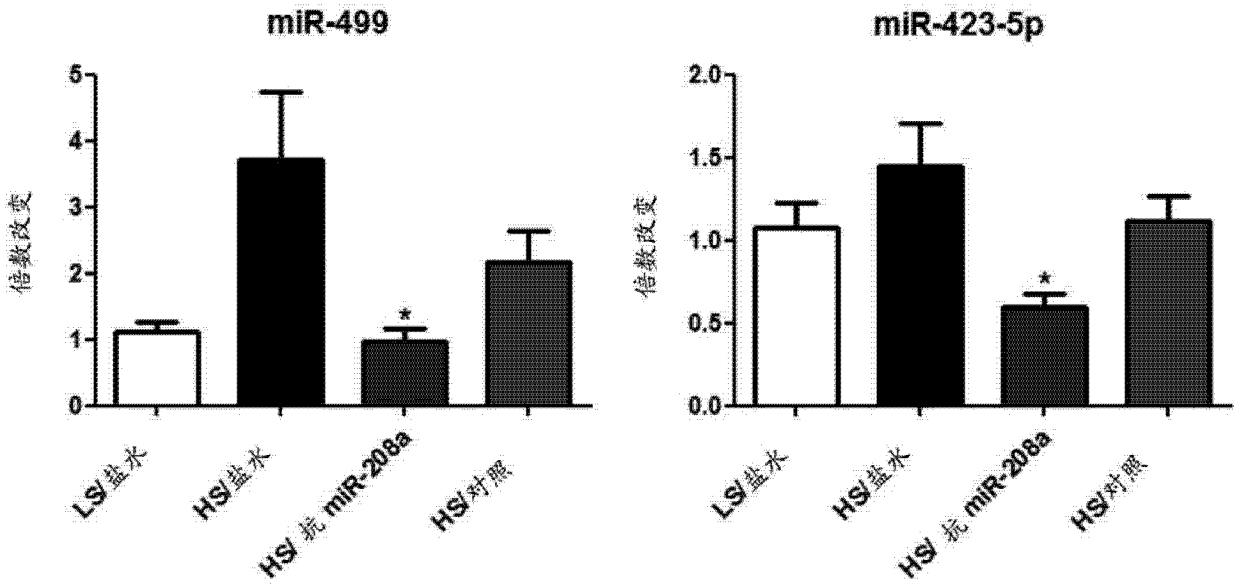

miR-499
miR-423-5p
倍数改变
LS/盐水
HS/盐水
HS/ 抗 miR-208a
HS/对照

图 21

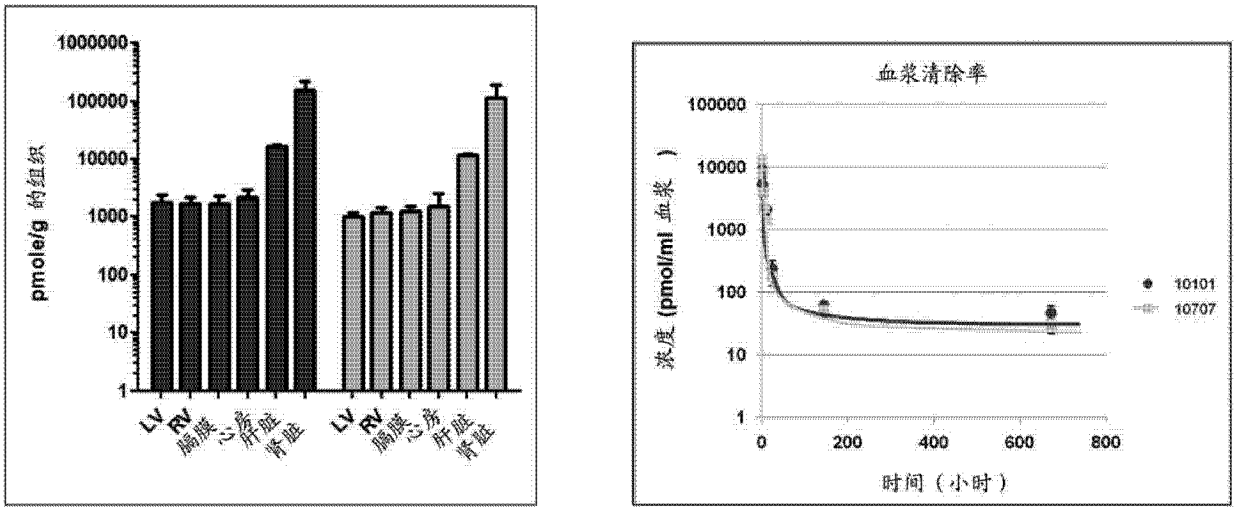

pmole/g 的组织
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
LV
RV
膈膜
心房
肝脏
肾脏
血浆清除率
浓度 (pmol/ml 血浆)
时间（小时）
0
200
400
600
800
10101
10707

图 22

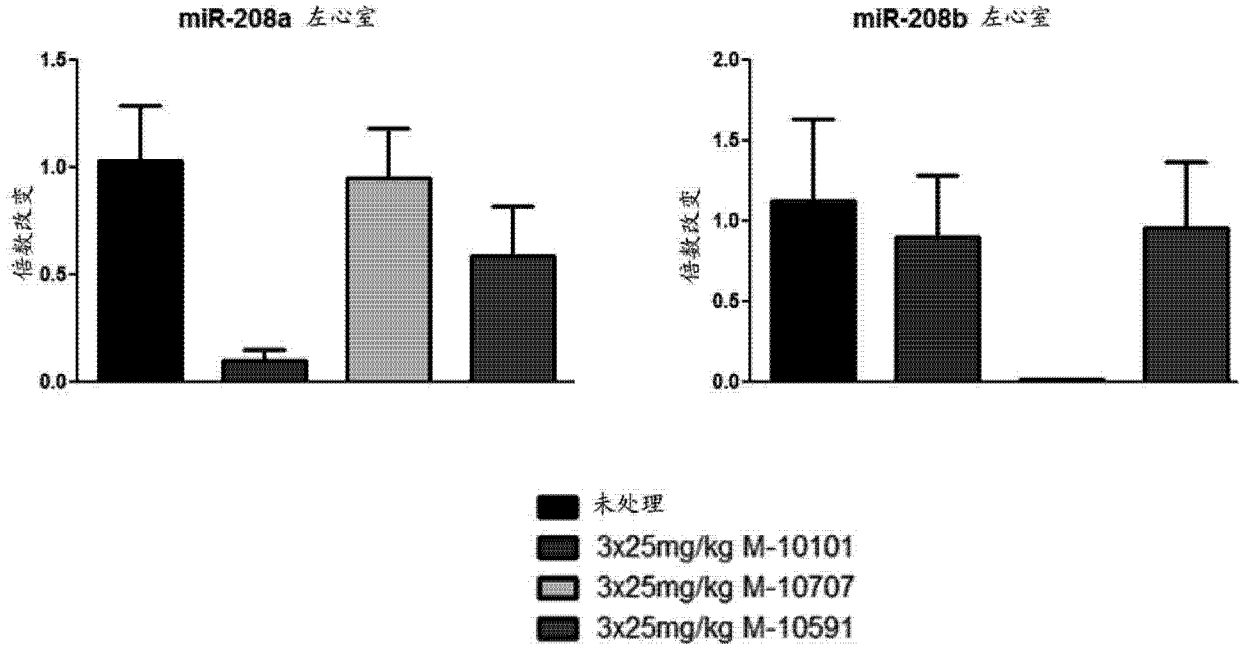

miR-208a 左心室
miR-208b 左心室
倍数改变
1.5
1.0
0.5
0.0
2.0
未处理
3x25mg/kg M-10101
3x25mg/kg M-10707
3x25mg/kg M-10591

图 23

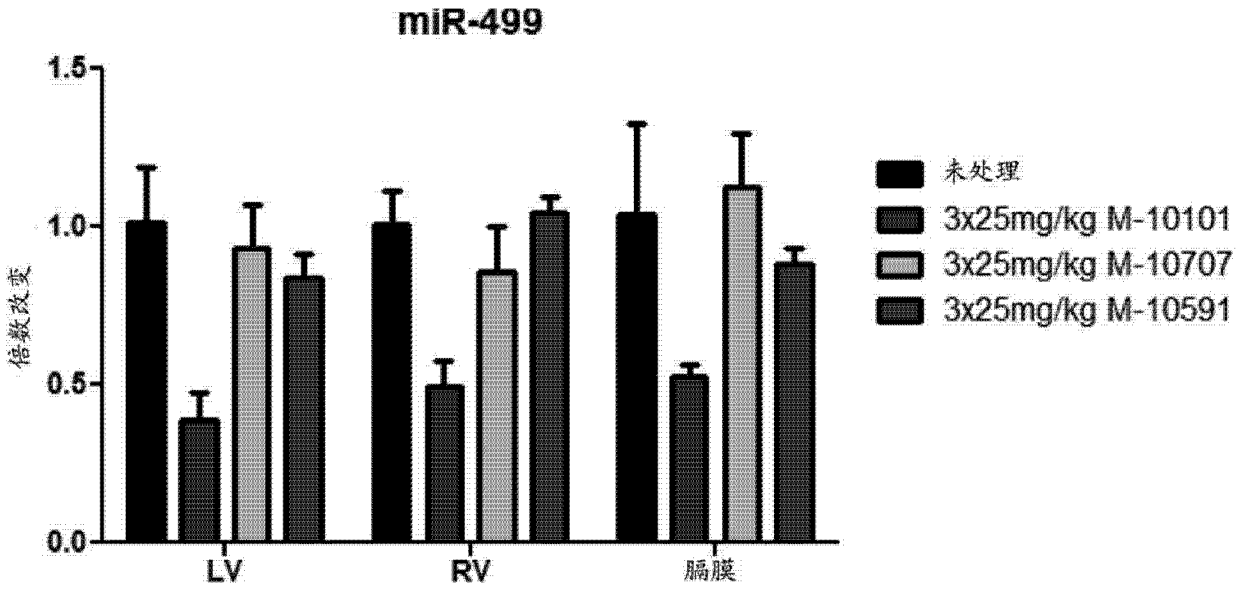

miR-499
1.5
1.0
0.5
0.0
倍数改变
LV
RV
膈膜
未处理
3x25mg/kg M-10101
3x25mg/kg M-10707
3x25mg/kg M-10591

图 24

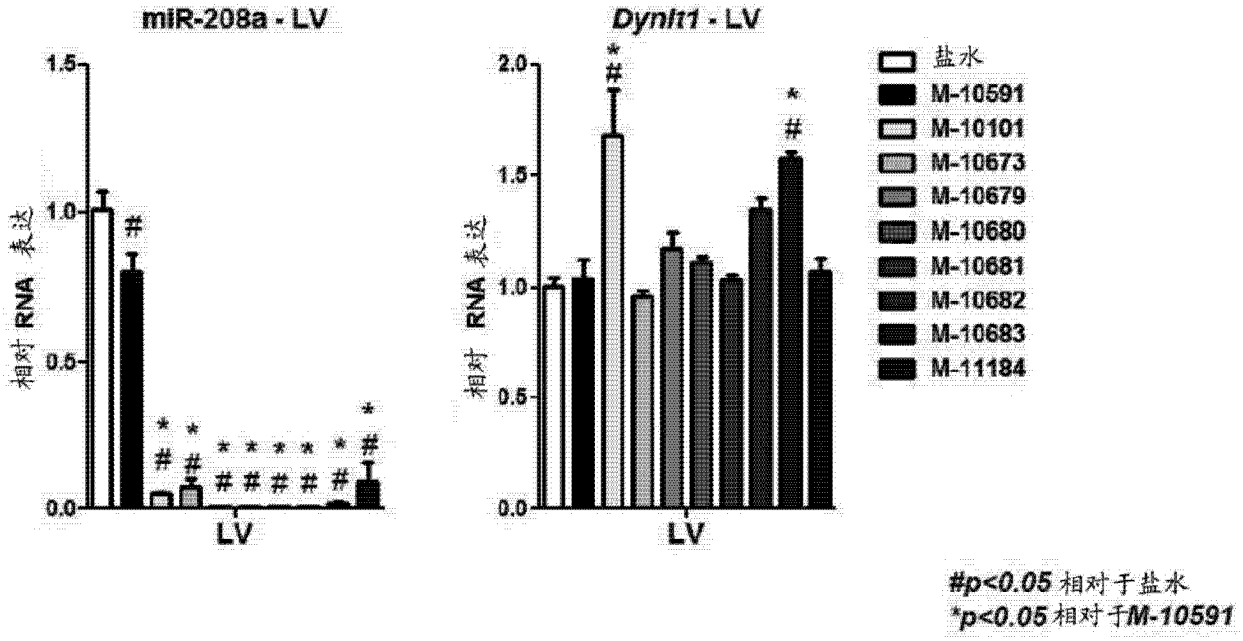

miR-208a - LV
Dynll1 - LV
相对 RNA 表达
LV
盐水
M-10591
M-10101
M-10673
M-10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
M-11184
#p<0.05 相对于盐水
*p<0.05 相对于M-10591

图 25

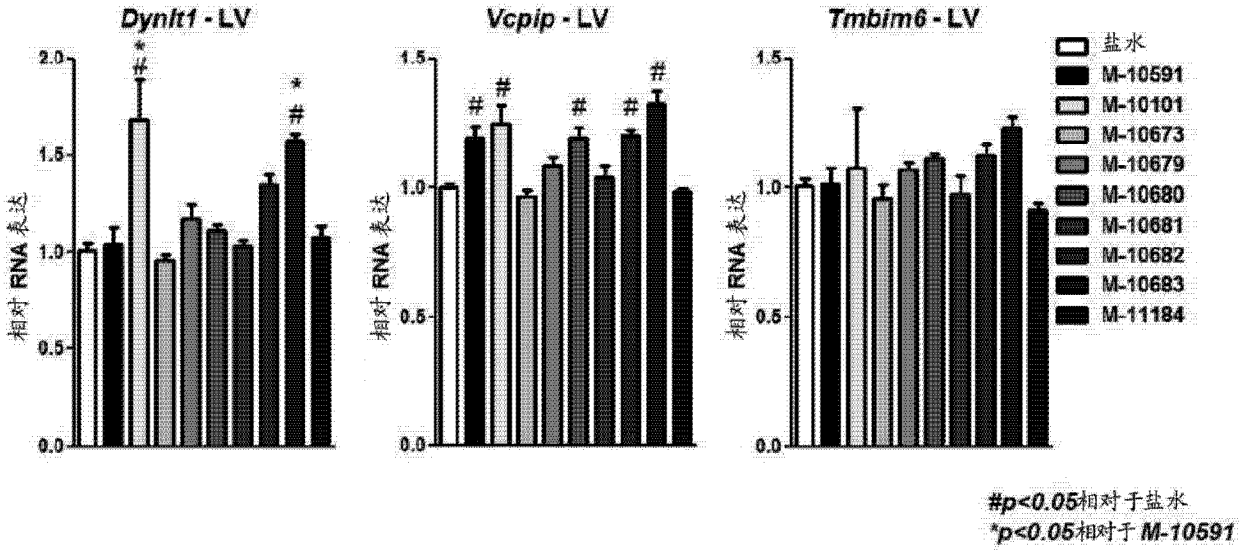

Dynlt1 - LV
Vcpip - LV
Tmbim6 - LV
相对 RNA 表达
盐水
M-10591
M-10101
M-10673
M-10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
M-11184
#p<0.05相对于盐水
*p<0.05相对于 M-10591

图 26

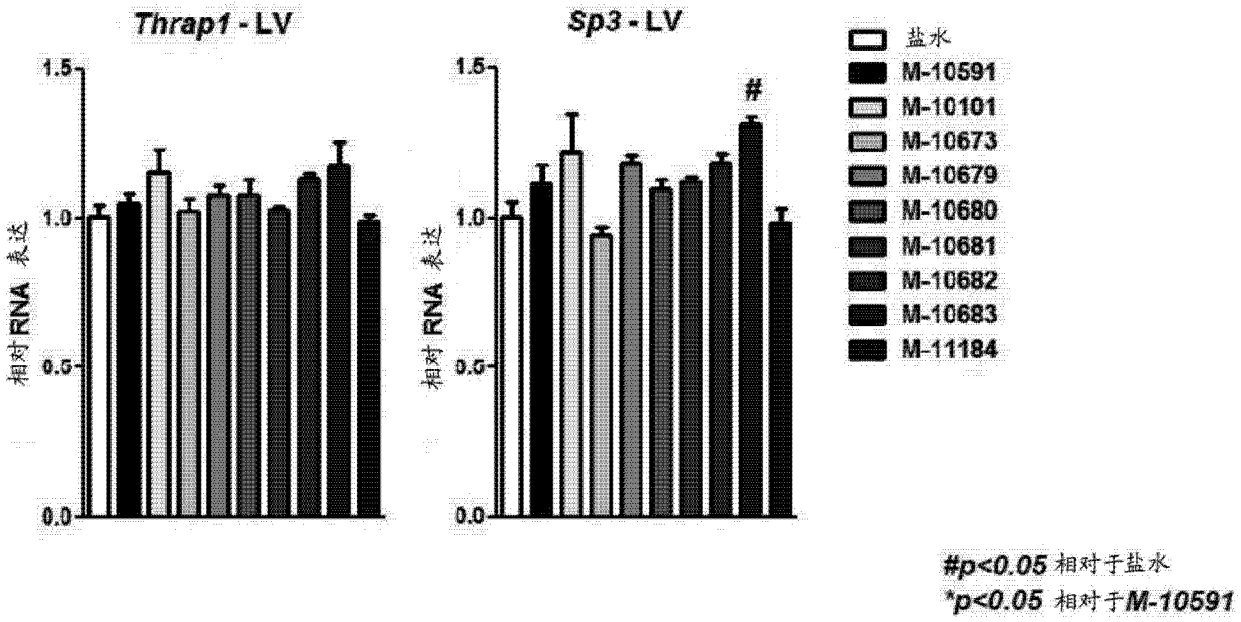

Thrap1 - LV
Sp3 - LV
相对 RNA 表达
盐水
M-10591
M-10101
M-10673
M-10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
M-11184
#p<0.05 相对于盐水
*p<0.05 相对于M-10591

图 27

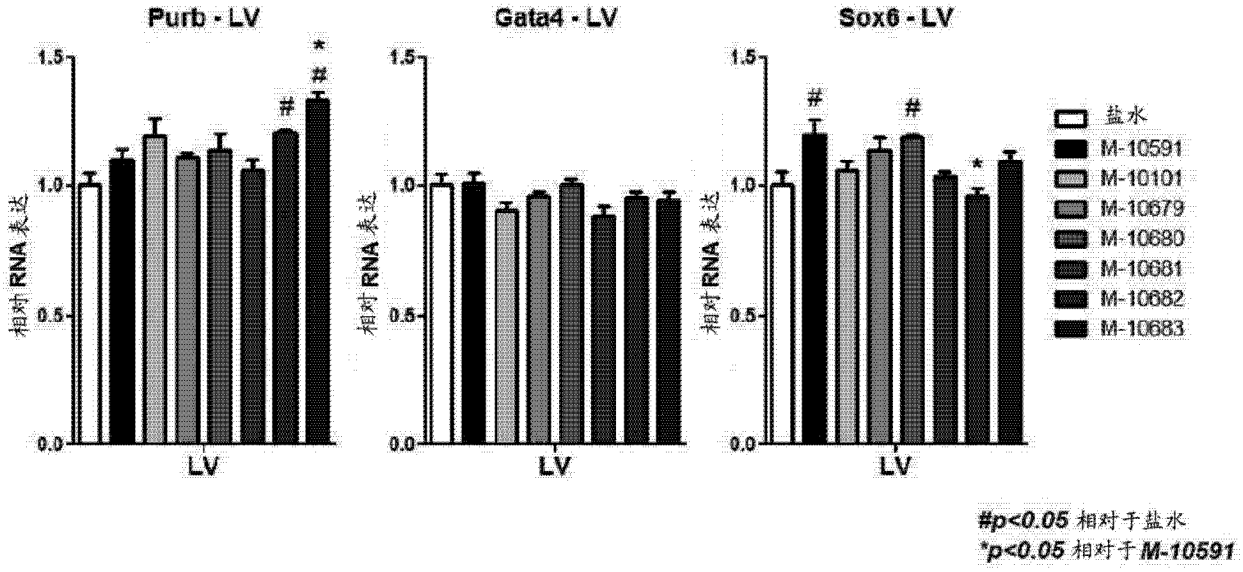

Purb - LV
Gata4 - LV
Sox6 - LV
相对 RNA 表达
LV
盐水
M-10591
M-10101
M-10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
#p<0.05 相对于盐水
*p<0.05 相对于M-10591

图 28

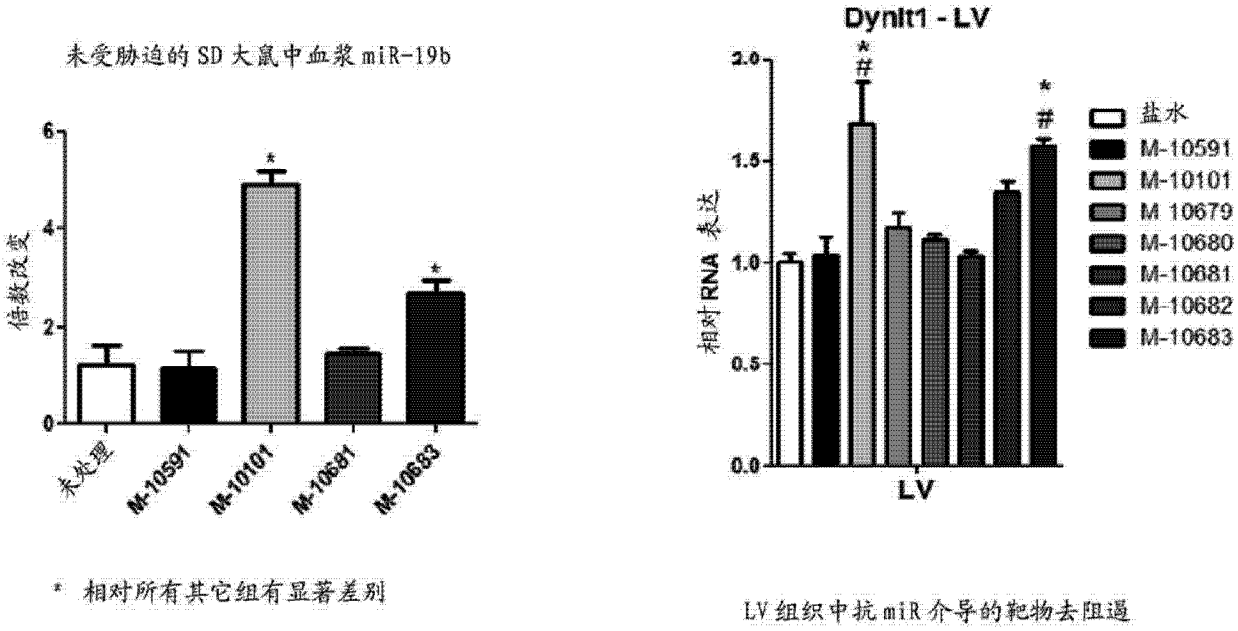
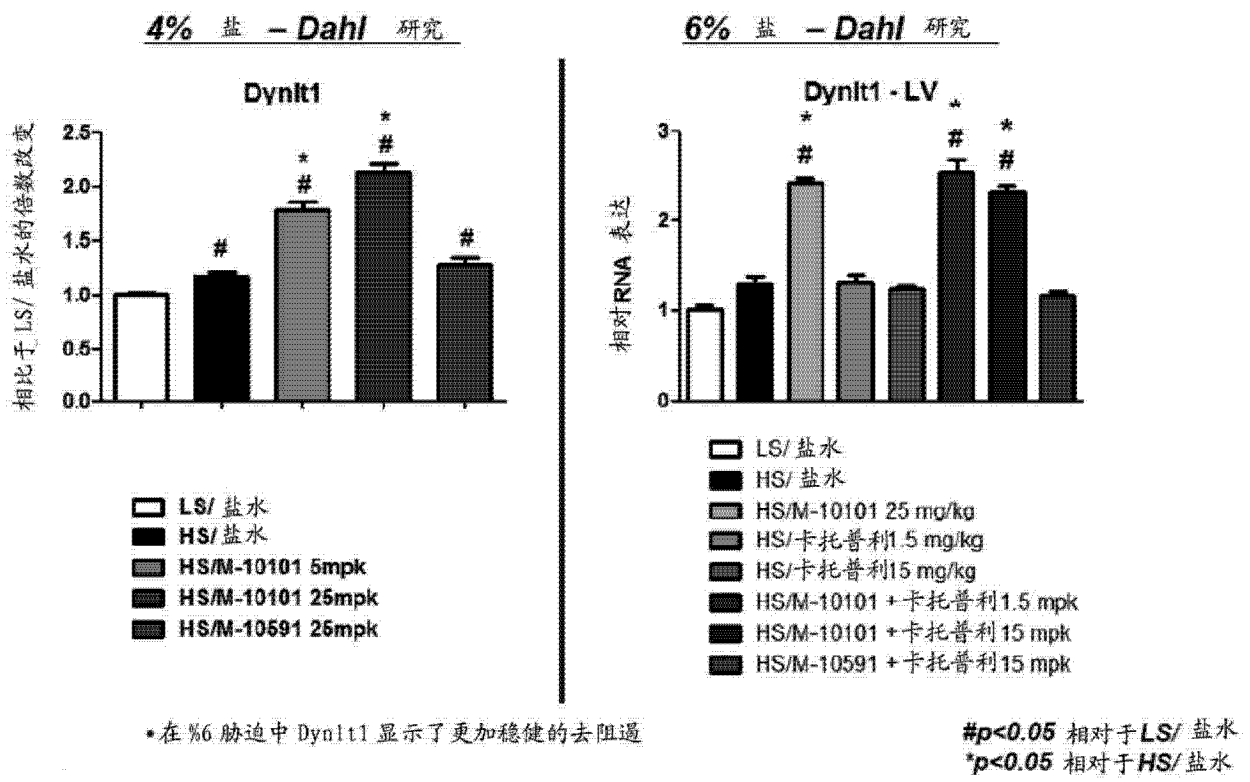

未受胁迫的 SD 大鼠中血浆 miR-19b
倍数改变
未处理
M-10591
M-10101
M-10681
M-10683
* 相对所有其它组有显著差别
Dynlt1 - LV
相对 RNA 表达
LV
盐水
M-10591
M-10101
M 10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
LV 组织中抗 miR 介导的靶物去阻遏

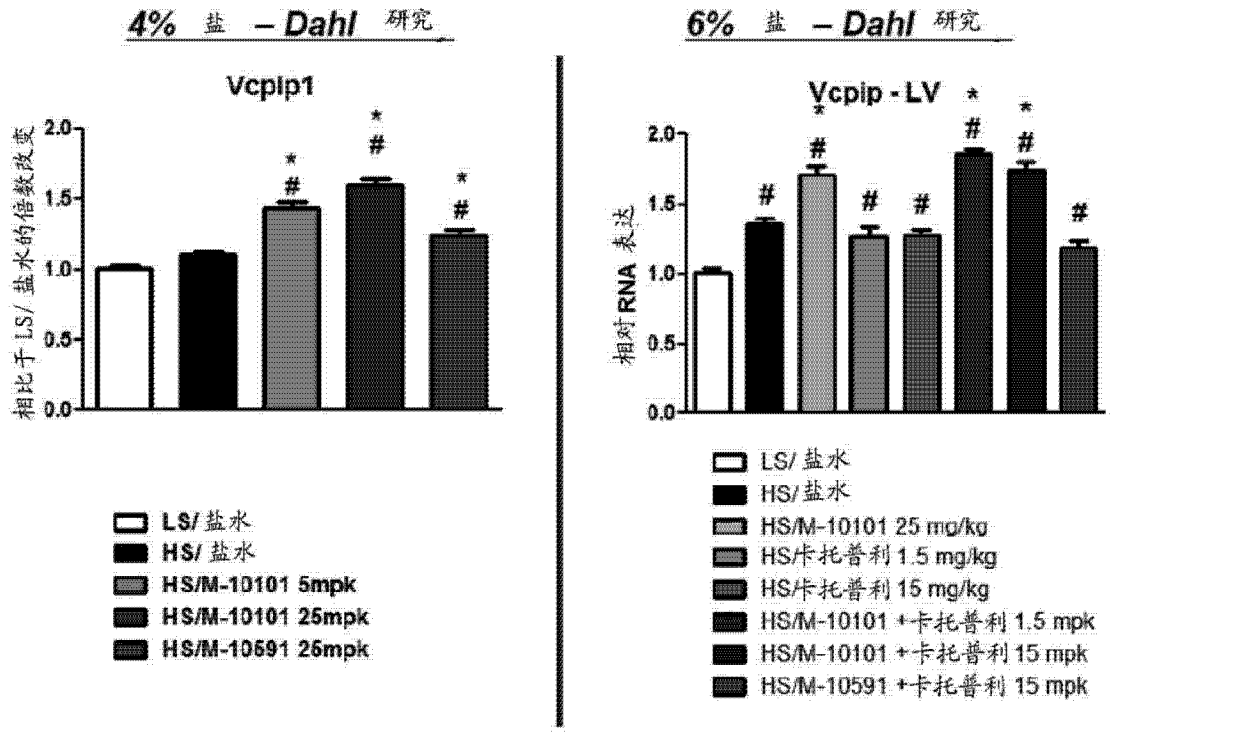
图 29



*在%6 胁迫中 Dynlt1 显示了更加稳健的去阻遏

#p<0.05 相对于LS/ 盐水
*p<0.05 相对于HS/ 盐水

图 30



#p<0.05 相对于LS/盐水
*p<0.05 相对于HS/盐水

图 31

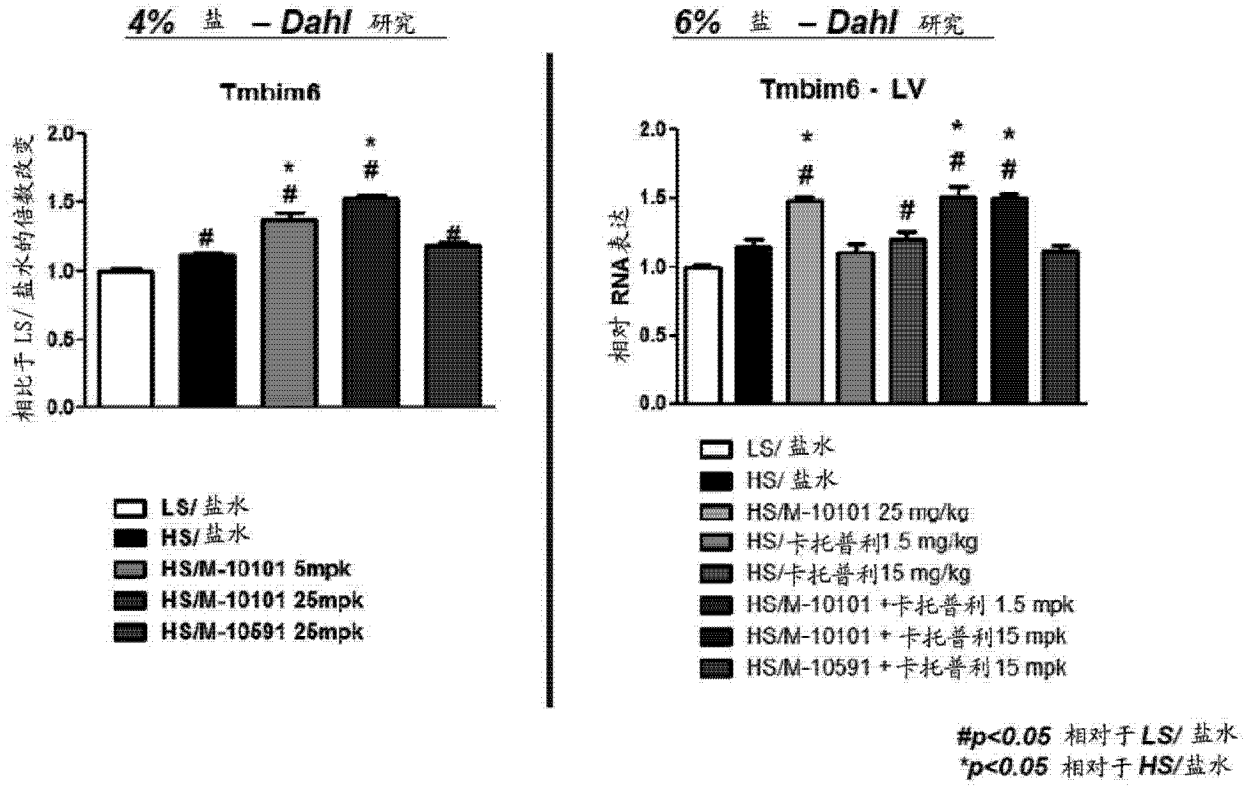

4% 盐 – Dahl 研究
Tmbim6
相比于 LS/ 盐水的倍数改变
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/M-10101 5mpk
HS/M-10101 25mpk
HS/M-10591 25mpk
6% 盐 – Dahl 研究
Tmbim6 - LV
相对 RNA 表达
LS/ 盐水
HS/ 盐水
HS/M-10101 25 mg/kg
HS/卡托普利1.5 mg/kg
HS/卡托普利15 mg/kg
HS/M-10101 +卡托普利 1.5 mpk
HS/M-10101 + 卡托普利15 mpk
HS/M-10591 + 卡托普利 15 mpk
#p<0.05 相对于 LS/ 盐水
*p<0.05 相对于 HS/盐水

图 32

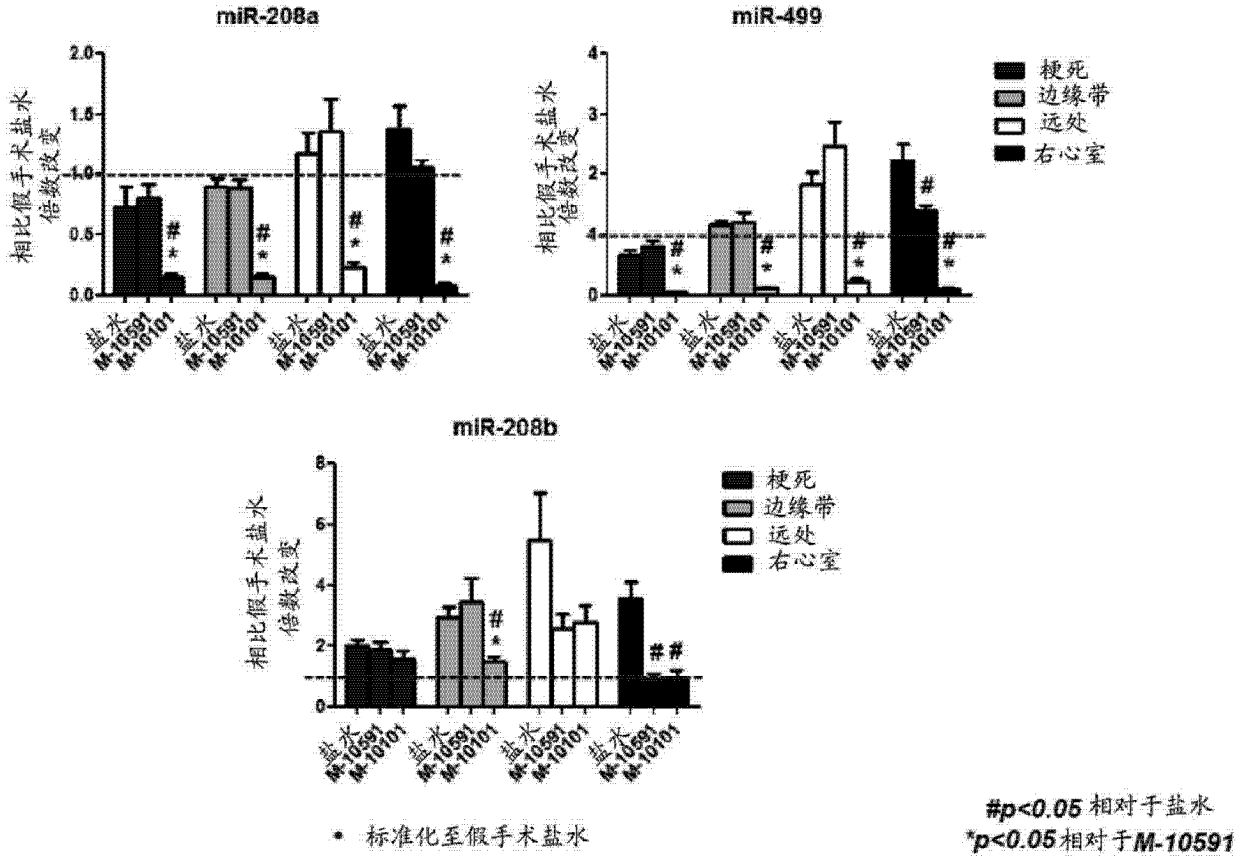

miR-208a
miR-499
miR-208b
相比假手术盐水倍数改变
梗死
边缘带
远处
右心室
盐水
M-10591
M-10101
#p<0.05 相对于盐水
*p<0.05 相对于M-10591
• 标准化至假手术盐水

图 33

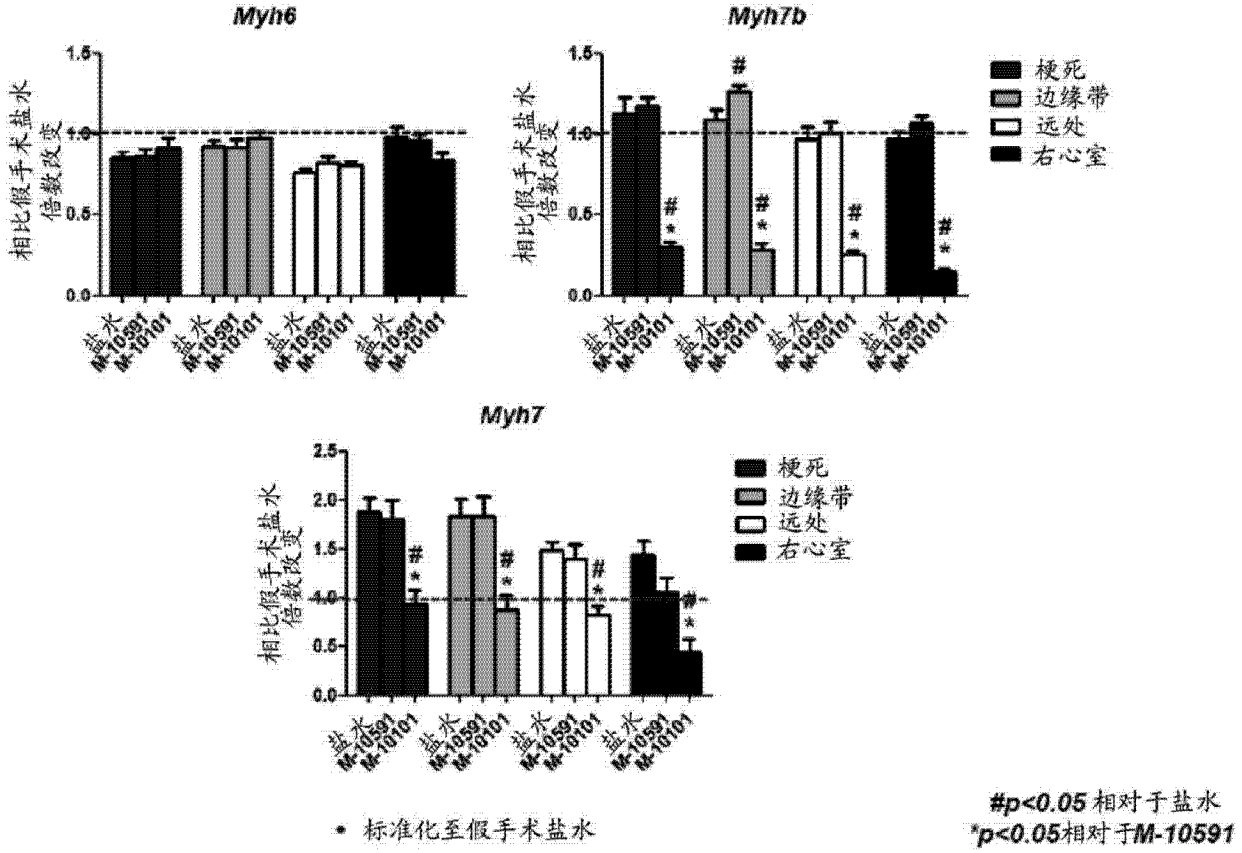

Myh6
Myh7b
Myh7
相比假手术盐水倍数改变
梗死
边缘带
远处
右心室
盐水
M-10591
M-10101
• 标准化至假手术盐水
#p<0.05 相对于盐水
*p<0.05相对于M-10591

图 34

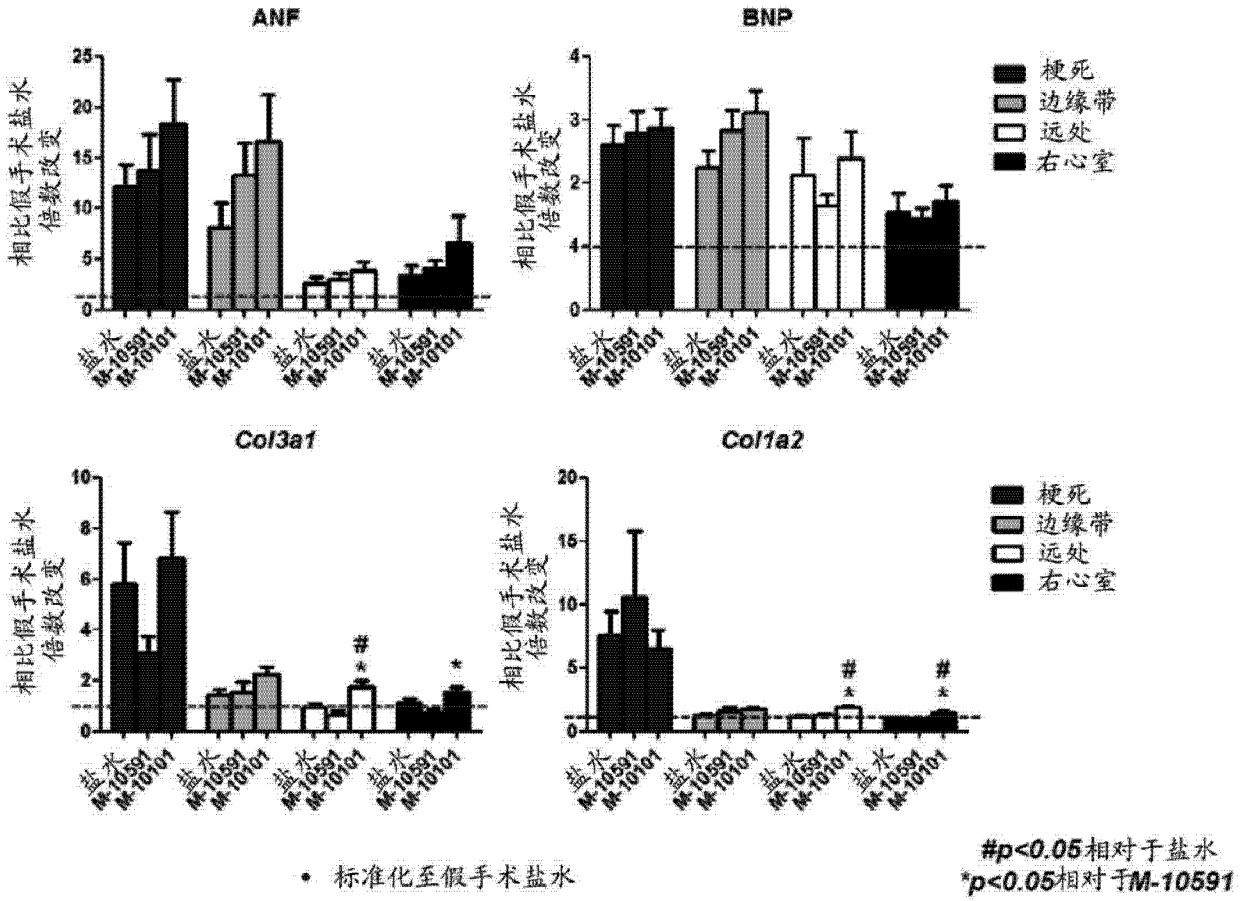

ANF
BNP
Col3a1
Col1a2
相比假手术盐水倍数改变
盐水
M-10591
M-10101
梗死
边缘带
远处
右心室
#p<0.05相对于盐水
*p<0.05相对于M-10591
• 标准化至假手术盐水

图 35

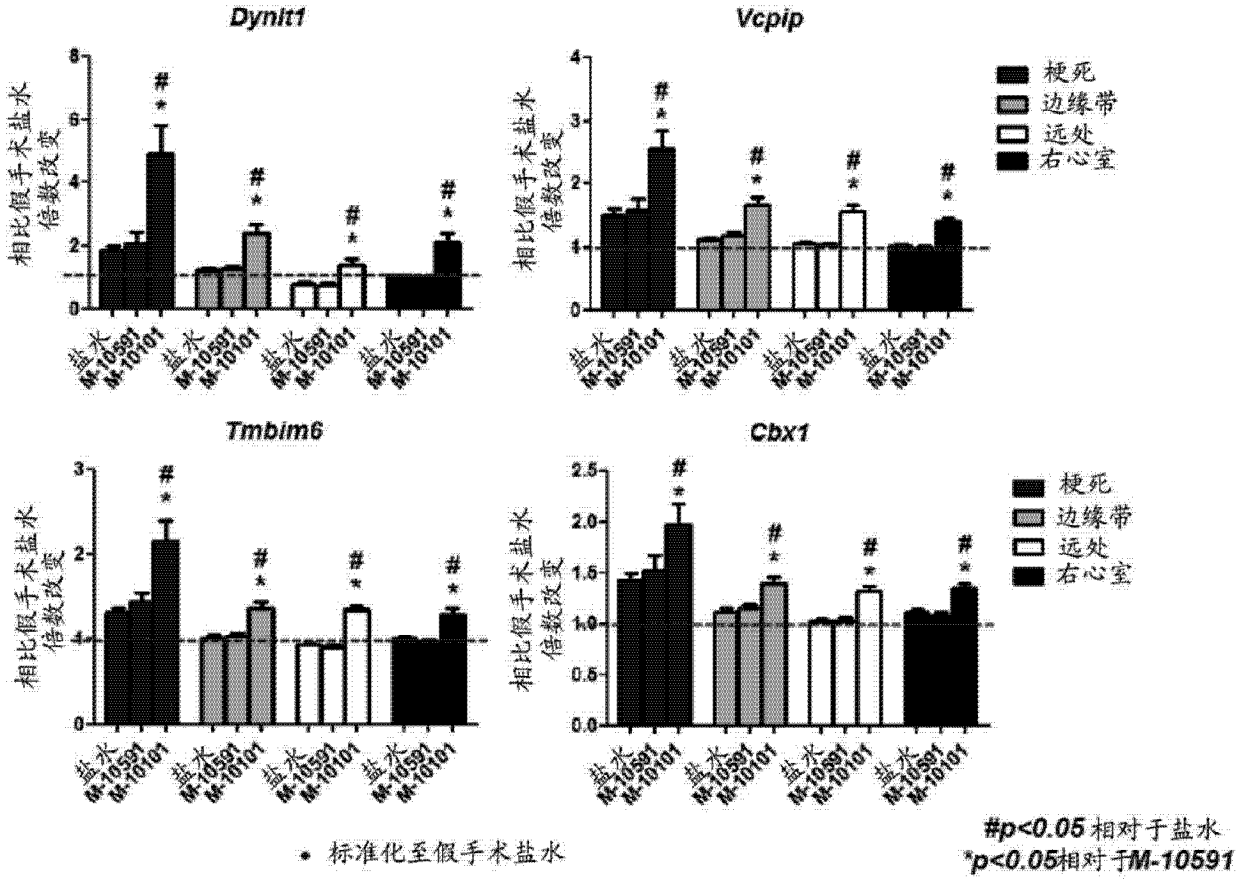

Dynlt1
Vcpip
Tmbim6
Cbx1
相比假手术盐水倍数改变
盐水
M-10591
M-10101
梗死
边缘带
远处
右心室
#p<0.05 相对于盐水
*p<0.05相对于M-10591
* 标准化至假手术盐水

图 36

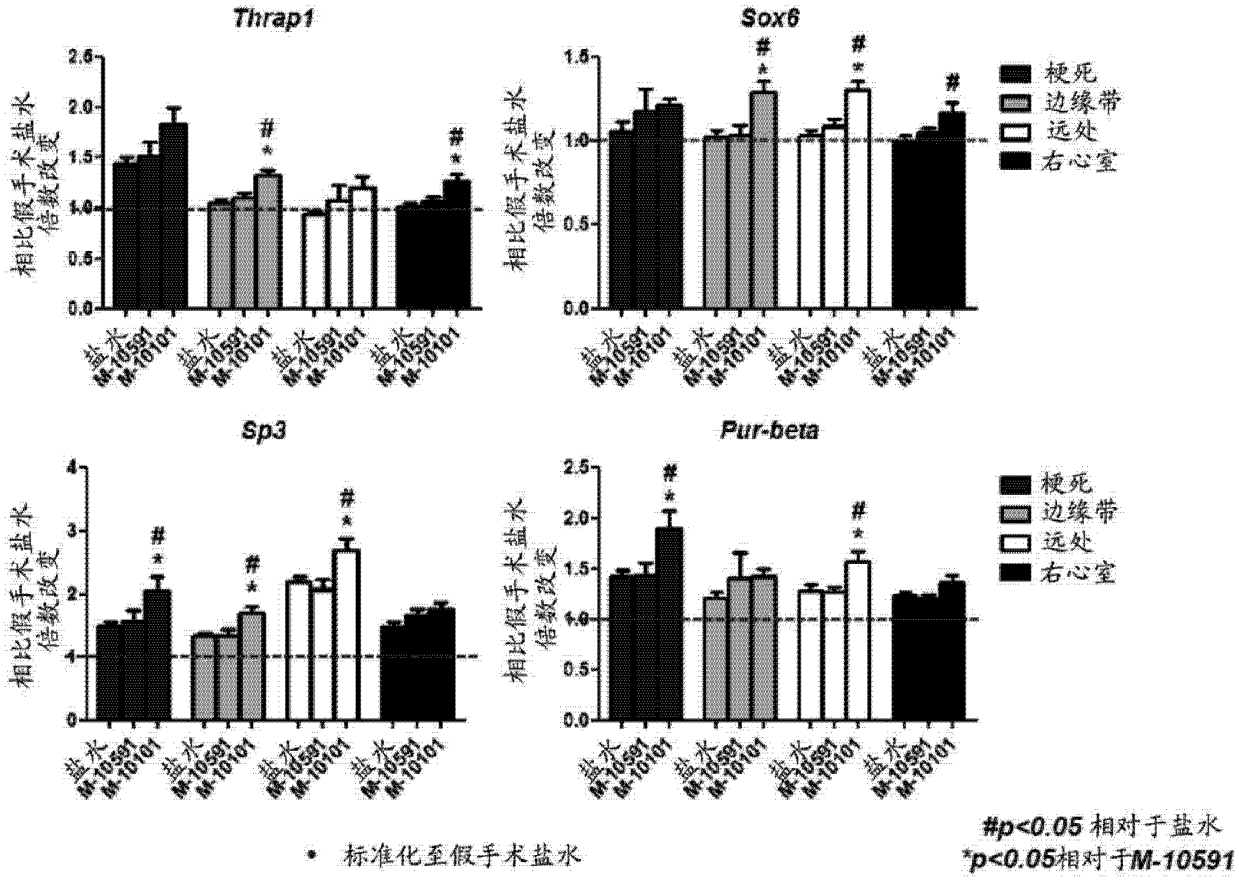
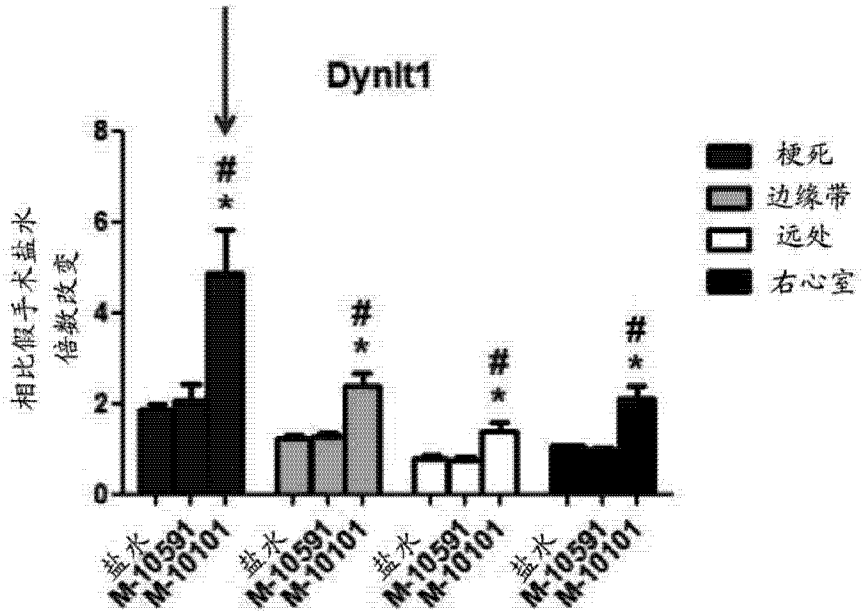

Thrap1
Sox6
Sp3
Pur-beta
相比假手术盐水倍数改变
盐水
M-10591
M-10101
梗死
边缘带
远处
右心室
#p<0.05 相对于盐水
*p<0.05相对于M-10591
• 标准化至假手术盐水

图 37



• 标准化至假手术盐水

#p<0.05 相对于盐水
*p<0.05相对于M-10591

图 38

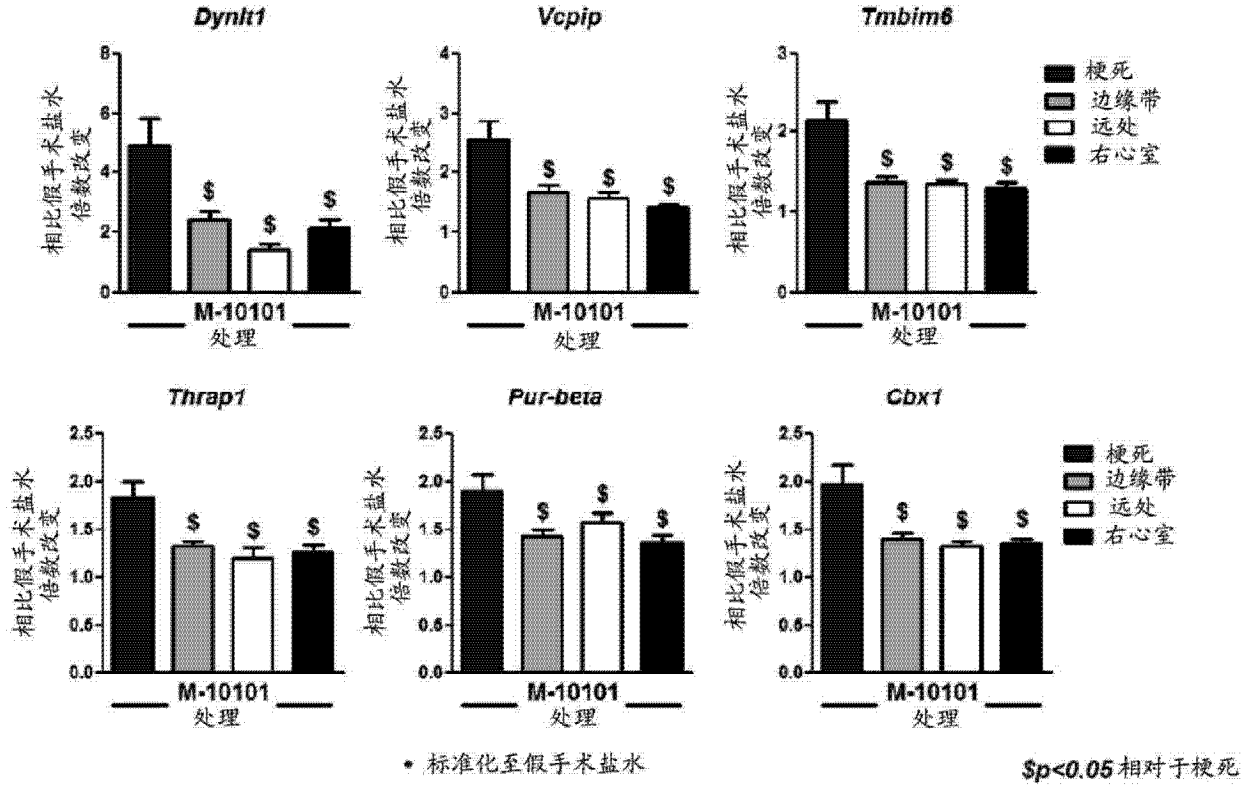

Dynlt1
Vcpip
Tmbim6
Thrap1
Pur-beta
Cbx1
相比假手术盐水倍数改变
M-10101
处理
梗死
边缘带
远处
右心室
$
• 标准化至假手术盐水
$p<0.05 相对于梗死

图 39