(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0004646
(43) 공개일자 2014년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7015018
(22) 출원일자(국제) 2011년12월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년06월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/065121
(87) 국제공개번호 WO 2012/083005
국제공개일자 2012년06월21일
(30) 우선권주장
61/423,456 2010년12월15일 미국(US)
61/495,224 2011년06월09일 미국(US)

(71) 출원인
미라젠 세러퓨틱스
미국 콜로라도 80301 볼더 룩아웃 로드 6200
(72) 발명자
돌비 크리스티나
미국 콜로라도 80301 볼더 룩아웃 로드 6200 미라젠 세러퓨틱스 내
마셜 윌리엄 에스
미국 콜로라도 80301 볼더 룩아웃 로드 6200 미라젠 세러퓨틱스 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김용인, 석혜선

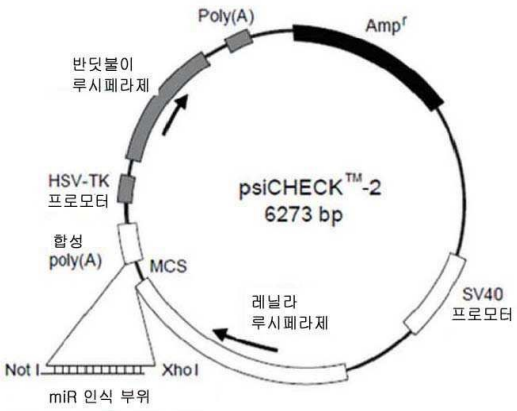
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 **잠금 뉴클레오티드를 포함하는 마이크로RNA 억제제**

(57) 요 약

본 발명은 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499를 포함하는 miR-208 패밀리 miRNAs의 발현(예를 들어, 풍부)을 억제할 수 있는 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명은 일부 실시태양에서, 특정한 방식으로, miR-208a, miR-208b 및 miR-499의 각각의 발현 또는 풍부를 억제할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명은 추가로 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물 및 다양한 심혈관 질환과 같은 miR-208 패밀리 miRNA에 관한 또는 이를 수반하는 질환 또는 이상을 가진 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 효력, 전달 효율, 표적 특이성, 독성, 및/또는 안정성의 하나 이상에서 이점을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

루이 에바 반

미국 콜로라도 80301 볼더 룩아웃 로드 6200 미라젠 세러퓨틱스 내

몽고메리 러스티

미국 콜로라도 80301 볼더 룩아웃 로드 6200 미라젠 세러퓨틱스 내

특허청구의 범위

청구항 1

인간 miR-208a 또는 miR-208b의 뉴클레오티드 서열에 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하며 잠금 및 비-잠금 뉴클레오티드의 혼합물을 가진 올리고뉴클레오티드로서,

올리고뉴클레오티드의 길이 및 잠금 뉴클레오티드의 수와 위치는 올리고뉴클레오티드가 인 비트로 루시페라제 분석법에서 약 50nM 이하의 올리고뉴클레오티드 농도 또는 생쥐 모델에서 25mg/kg 이하의 복용량에서 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499 활성을 감소시키는 것인 올리고뉴클레오티드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

적어도 7개 뉴클레오티드는 잠금 뉴클레오티드이며 적어도 하나의 뉴클레오티드는 비-잠금인 올리고뉴클레오티드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드는 길이가 약 8 내지 약 18개 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드는 길이가 약 16개 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

뉴클레오티드 서열은 miR-208a 또는 miR-208b의 뉴클레오티드 서열에 완전히 상보적인 올리고뉴클레오티드.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드는 3개 초과의 연속적 비-잠금 뉴클레오티드를 가진 연속된 뉴클레오티드를 함유하지 않는 올리고뉴클레오티드.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드는 2개 초과의 연속적 비-잠금 뉴클레오티드를 가진 연속된 뉴클레오티드를 함유하지 않는 올리고뉴클레오티드.

청구항 10

제 8 항 또는 제 9 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드는 연속적인 비-잠금 뉴클레오티드의 하나의 발생을 가지는 올리고뉴클레오티드.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

miR-208a 또는 miR-208b 씨드 영역에 상보적인 영역은 적어도 4개의 잠금 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 12

제 7 항에 있어서,

적어도 9개 잠금 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

적어도 11개 잠금 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 14

제 7 항에 있어서,

적어도 3개 비-잠금 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

9개 잠금 뉴클레오티드 및 7개 비-잠금 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

11개 잠금 뉴클레오티드 및 5개 비-잠금 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 17

제 7 항에 있어서,

적어도 위치 1, 6, 10, 13 및 15는 잠금 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.

청구항 18

제 7 항에 있어서,

위치 1, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 15 및 16은 잠금 뉴클레오티드이며 나머지 위치는 비-잠금 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.

청구항 19

제 7 항에 있어서,

위치 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 15 및 16은 잠금 뉴클레오티드이며 나머지 위치는 비-잠금 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.

청구항 20

제 7 항에 있어서,

위치 1, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 및 16은 잠금 뉴클레오티드이며 나머지 위치는 비-잠금 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.

청구항 21

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,

잠금 형태가 아닌 뉴클레오티드는 2' 데옥시인 올리고뉴클레오티드.

청구항 22

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 비-잠금 뉴클레오티드는 2' O-알킬 또는 2' 할로인 올리고뉴클레오티드.

청구항 23

제 1 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서,

잠금 뉴클레오티드는 2' 내지 4' 메틸렌 다리를 가지는 올리고뉴클레오티드.

청구항 24

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

5' 및/또는 3' 캡 구조를 가지는 올리고뉴클레오티드.

청구항 25

제 1 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 포스포로티오에이트 결합을 함유하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드는 완전히 포스포로티오에이트-결합인 올리고뉴클레오티드.

청구항 27

제 25 항에 있어서,

1개 내지 3개 포스페이트 결합을 가지는 올리고뉴클레오티드.

청구항 28

제 7 항에 있어서,

화합물 10101, 10673, 10674, 10677, 10679, 10683, 10707 또는 10680의 구조를 가지는 올리고뉴클레오티드.

청구항 29

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서,

펜던트 친유성 그룹을 더 포함하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 30

유효량의 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 31

제 30 항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체는 콜로이드 분산 시스템, 고분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 및 리포솜을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 32

제 30 항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제는 식염수로 필수적으로 이루어지는 약학적 조성물.

청구항 33

세포를 제 1 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 또는 제 30 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항의 조성물과 접촉하는 단계를 포함하여 세포에서 miR-208a 및/또는 miR-208b 활성을 감소 또는 억제하는 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서,

세포에서 miR-499의 활성은 감소하거나 억제되는 방법.

청구항 35

제 33 항 또는 제 34 항에 있어서,

세포는 포유류 세포인 방법.

청구항 36

제 35 항에 있어서,

세포는 심장 세포인 방법.

청구항 37

제 33 항에 있어서,

세포는 인비보 또는 엑스비보인 방법.

청구항 38

피험자에게 제 30 항 또는 제 32 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하여, miR-208a, miR-208(b) 및/또는 miR-499와 관련 또는 매개된 피험자의 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 39

제 38 항에 있어서,

질환은 심장 질환인 방법.

청구항 40

제 38 항에 있어서,

심장 질환은 병적 심비대, 심근경색 또는 심부전인 방법.

청구항 41

제 38 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 비경구 투여 또는 심장 조직 속으로의 직접 주사에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 42

제 41 항에 있어서,

상기 비경구 투여는 정맥, 피하, 복강 또는 근내인 방법.

청구항 43

제 38 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 경구, 경피, 지속된 방출, 제어된 방출, 지연된 방출, 좌약, 카테터 또는 설하 투여에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 44

제 38 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 피험자는 인간인 방법.

청구항 45

제 38 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드는 10mg/kg 이하의 복용량으로 전달되는 것인 방법.

청구항 46

제 45 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드는 식염수로 제제화되며 피하로 투여되는 것인 방법.

청구항 47

제 46 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드는 지정된 화합물 M-10101, M-10673, M-10674, M-10677, M-10679, M-10683, M-10707 및 M-10680로부터 선택되는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 환자에게 투여되는 경우 효력, 전달 효율, 표적 특이성, 안정성, 및/또는 독성에서 이점을 가지는 마이크로RNA(miRNA 또는 miR) 억제제를 위한 화학 모티프, 특히 화학적으로 변형된 miRNA 안티센스 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 마이크로RNA(miR)는 심장 기능의 조절 및 유지를 포함하는 수많은 생물학적 과정들에 관련되어 왔다(Eva Van Rooij and 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, *Nature* 447, 389-390 (2007) 참조). 따라서 miR은 다른 것들 중에서도 심장비대, 심근경색, 심부전, 혈관 손상, 및 병적 심장 섬유증과 같은 질환에 대한 비교적 새로운 종류의 치료적 표적들을 제시한다. miR은 소형이며, 약 18 내지 약 25개 뉴클레오티드 길이의 비-단백질 코딩 RNA이고, 서열이 완벽하게 상보적인 경우 표적 mRNA의 분해를 촉진함으로써 또는 서열이 미스매치(mismatches)를 포함하는 경우 번역을 억제함으로써 표적 mRNA의 억제자로 역할한다. 메커니즘은 성숙한 miRNA 가닥의 RISC(RNA-induced silencing complex) 속으로의 합체를 필요로 하며, RISC에서 성숙한 miRNA 가닥은 염기쌍 상보성에 의해 표적 RNA와 연결된다.

[0003] miRNA 작용은 안티센스 폴리뉴클레오티드에 의해 또는 miRNA 작용을 모방하는 폴리뉴클레오티드("miRNA 유사체")에 의해 치료적으로 표적이 될 수 있다. 하지만, 올리고뉴클레오티드-계 물질에 의해 miRNA를 치료적으로 표적화하는 것은 RNA-결합 친화력 및 특이성, 세포 흡수 효율 및 뉴클레아제 저항을 포함하는 여러 위협을 일으킨다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드가 완전한 세포(intact cells) 내로 도입되는 경우 이들은 뉴클레아제에 의해 공격받고 분해되어 활성의 손실을 야기한다. 폴리뉴클레오티드 유사체들이 분해를 피하기 위하여, 예를

들어, 2' 치환(B. Sproat et al., Nucleic Acids Research 17 (1989), 3373-3386)에 의해 제조되는 한편 상기 변형들은 종종 의도된 생물학적 기능을 위한 폴리뉴클레오티드의 효력에 영향을 준다. 각 경우에서, 이러한 감소된 효력은 변형된 폴리뉴클레오티드가 표적 RNA와 안정한 이중나선(duplex)을 형성할 수 없고/없거나 세포 기관과의 상호작용이 감소하기 때문일 수 있다. 다른 변형은 잠금 핵산의 사용을 포함하며, 이는 RNA-결합 친화력을 개선시키는 잠재력을 가진다. Veedu RN and Wengel J, Locked nucleic acid as a novel class of therapeutic agent. *RNA Biology* 6:3, 321-323 (2009).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] miRNA 억제제를 위한 올리고뉴클레오티드 화학 패턴 또는 모티프는 억제제의 전달, 안정성, 효력, 특이성 및/또는 독성 프로파일을 개선시키는 잠재력을 가지며 이는 치료적 맥락에서 miRNA 작용을 효과적으로 표적화하기 위하여 필요하다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499를 포함하는 miR-208 패밀리(family) miRNAs의 발현(예를 들어, 풍부)을 억제할 수 있는 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명은 추가로 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물 및 miR-208 패밀리 miRNA에 관한 또는 이를 수반하는 질환 또는 이상을 가진 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 이런 질환은 다양한 심혈관 질환을 포함한다. 다양한 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 효력, 전달 효율, 표적 특이성, 독성, 및/또는 안정성의 하나 이상에서 이점을 제공한다.

[0006] 한 양태에서, 본 발명은 miR-208 패밀리 miRNA의 발현 또는 풍부를 감소시킬 수 있는 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 올리고뉴클레오티드의 활성 또는 효력은 인비트로 및/또는 인비보에서 결정될 수 있다. 예를 들어, 약 50nM 이하 또는 다른 실시태양에서, 40nM 이하, 20nM 이하 또는 10nM 이하의 농도에서 (이중 루시페라제 분석법에서 측정된) miR-208 패밀리 miRNA의 활성을 현저하게 억제할 수 있다(예를 들어, 약 50% 억제). 선택적으로 또는 추가로, 올리고뉴클레오티드의 활성은 본 발명에 기술된 것과 같은, 적절한 생쥐 또는 쥐 모델 또는 비-인간 영장류 모델에서 측정될 수 있으며, miR-208 패밀리 miRNA의 억제(예를 들어, 적어도 50%)는 25mg/kg 이하, 10mg/kg 이하 또는 5mg/kg 이하와 같은 50mg/kg 이하의 복용량에서 관찰된다. 이런 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 피하로 또는 정맥내로(및 본 발명에 기술된 대로) 복용될 수 있고 수성 제제(예를 들어, 식염수)로 제제화될 수 있다.

[0007] 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 인간 miR-208a 또는 miR-208b(또는 상응하는 pre- 또는 pri-miRNA)의 뉴클레오티드 서열에 실질적으로 상보적이며 잠금 및 비-잠금 뉴클레오티드의 혼합물을 함유한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 적어도 3개, 적어도 5개 또는 적어도 7개의 잠금 뉴클레오티드 및 적어도 1개의 비-잠금 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 일반적으로, 올리고뉴클레오티드의 길이 및 잠금 뉴클레오티드의 수와 위치는 올리고뉴클레오티드가 인 비트로 루시페라제 분석법에서 약 50nM 이하의 올리고뉴클레오티드 농도 또는 본 발명에서 기술된 적절한 쥐 또는 생쥐 모델 또는 비-인간 영장류 모델에서 50mg/kg 이하의 복용량에서 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499 활성을 감소시키는 것이다. 예시적 실시태양에서, 잠금 뉴클레오티드는 2' 내지 4' 메틸렌 다리를 가진다.

[0008] 올리고뉴클레오티드는 전장 또는 절단된 miR-208a, miR-208b 또는 miR-499 안티센스 서열을 포함할 수 있고, 이로 필수적으로 이루어지거나 이루어질 수 있다. 이런 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 약 6 내지 22개 뉴클레오티드 길이이거나 약 10 내지 18개 뉴클레오티드 길이이거나 약 11 내지 약 16개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시태양에서 올리고뉴클레오티드는 약 14, 15, 16 또는 17개 뉴클레오티드 길이이다. 올리고뉴클레오티드는 5' - TGCTCGTCTTA - 3'(SEQ ID NO:1)의 뉴클레오티드 서열 또는 5' - TGTTCGTCTTA - 3'(SEQ ID NO:2)의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열 5' - CTTTTTGCTCGTCTTA - 3'(SEQ ID NO:3) 또는 5' - CCTTTTGTTCGTCTTA - 3'(SEQ ID NO:4)을 포함하고, 이로 필수적으로 이루어지거나 이루어진다.

[0009] 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 3개, 적어도 약 5개, 또는 적어도 약 7개 잠금 뉴클레오티드 또는 적어도 9개 잠금 뉴클레오티드를 함유할 수 있으나, 다른 실시태양에서 잠금 뉴클레오티드로 완전히 이루어지지 않는다. 일반적으로, 잠금 뉴클레오티드의 수와 위치는 올리고뉴클레오티드가 높은 효력으로 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499 활성을 감소 또는 억제하는 것이다. 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 넷 초과 또는 셋 초과

또는 둘 초과 연속적인 비-잠금 뉴클레오티드를 가진 연속된 뉴클레오티드를 함유하지 않는다. 예시적 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 정확하게 9개 잠금 뉴클레오티드 및 7개 비-잠금 뉴클레오티드를 가진다. 예를 들어, 잠금 뉴클레오티드의 패턴은 적어도 위치 1, 6, 10, 13 및 15가 잠금 뉴클레오티드인 것일 수 있다. 특정 실시태양에서, 적어도 1, 5, 10 및 16은 잠금 뉴클레오티드이다. 특정 실시태양에서, 위치 1, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 15 및 16은 잠금 뉴클레오티드이며, 나머지 위치는 비-잠금 뉴클레오티드이다. 다른 실시태양에서, 위치 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 15 및 16은 잠금 뉴클레오티드이며, 나머지 위치는 비-잠금 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시태양에서, 위치 1, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 및 16은 잠금 뉴클레오티드이며, 나머지 위치는 비-잠금 뉴클레오티드이다. 잠금 뉴클레오티드의 이런 패턴은 특정 실시태양에서 사용될 수 있으며, 본 발명에 기술된 SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:4 또는 이의 변형의 뉴클레오티드 서열을 사용한다. 억제제가 SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오티드 서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어지는 경우, 뉴클레오티드는 모든 잠금 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.

[0010] 비-잠금 뉴클레오티드의 경우, 뉴클레오티드는 2' 하이드록실에 대해 2' 변형을 함유할 수 있다. 일부 실시태양에서, 2' 변형은 (치환될 수 있는) O-알킬, 할로 및 데옥시(H)로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

[0011] 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합을 함유할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 완전하게 포스포로티오에이트 결합될 수 있거나 약 절반 또는 ¾ 포스포로티오에이트 결합을 함유할 수 있다.

[0012] 예시적 올리고뉴클레오티드 억제제들은 표 1에 도시된다.

[0013] 다른 양태에서, 본 발명은 세포 전달을 위한 다양한 거대 분자 집합체, 미셀 또는 리포좀 조성물 내에 올리고뉴클레오티드의 합체를 필요로 할 수 있는 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물 및 제제를 제공한다. 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 통상적인 정맥내, 피하 또는 근육내 복용을 위해 제제화된다. 이런 제제는 식염수 속 제제와 같은 통상적인 수성 조합제일 수 있다. 특정 실시태양에서, 조성물은 내피, 피하, 근육내, 복강 또는 정맥 주사 또는 표적 조직(예를 들어, 심장 조직)에 직접 주사에 적합하거나 이를 위해 제제화된다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 포유류 환자에서 질환의 진행을 치료, 완화 또는 예방하기 위해, 인 비트로 또는 엑스 비보로 포유류 세포들에 올리고뉴클레오티드 및 약학적 조성물을 전달하는 방법을 제공한다. 이 방법은 포유류 환자 또는 집단의 표적 세포들에 올리고뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 환자는 miR-208 패밀리 발현과 연관된, 이에 의해 매개된 또는 이로부터 초래한 질환을 가질 수 있다. 예를 들어, 이런 질환은 심장비대, 심근경색, 심부전(예를 들어, 울혈성 심부전), 혈관 손상, 혈관재협착 또는 병적 심장 섬유증을 포함한다. 따라서 본 발명은 이런 질환을 치료하기 위한, 그리고 이런 치료를 위한 약물의 제조를 위한 본 발명의 변형 올리고뉴클레오티드 및 조성물의 용도를 제공한다.

[0015] 본 발명의 다른 양태 및 실시양태는 본 발명의 하술되는 설명으로부터 명백할 것이다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1. 이중 루시페라제 분석법을 사용하여 억제제 활성을 인비트로 정량하기 위한 psiCHECK™-2 구조체(프로메가).

도 2. miR-208a를 위한 이중 루시페라제 분석법에 의해 측정된 miR-208 억제제 효율. 도 2는 LNAs를 첨가하는 효과를 도시한다: 10673은 16개 뉴클레오티드의 9개 LNA를 가지며(9/16), 10674는 11/16을 가지며, 10677은 13/16를 가지며, 10101 및 10591은 9/16를 가진다. "208 단독"은 레닐라 루시페라제 유전자에 대한 miR-208a 인식 위치 복제 3'를 가진 루시페라제 구조체 단독을 의미한다. "208+모방체"는 miR-208a의 공동형질감염을 포함한다.

도 3. miR-208a에 대한 이중 루시페라제 분석법에 의해 측정된 miR-208 억제제 효율. M-10591은 비-표적화 대조군이다.

도 4. miR-208b에 대한 이중 루시페라제 분석법에 의해 측정된 miR-208 억제제 효율.

도 5. miR-499에 대한 이중 루시페라제 분석법에 의해 측정된 miR-208 억제제 효율.

도 6. 정상 생쥐에서 miRNA 억제제 디자인(design)의 인비보 복용 이후 심장에서 miR-208a 및 miR-208b 발현 수준. 왼쪽 막대는 miR-208a 발현 수준이며 오른쪽 막대는 miR-208b 발현 수준이다.

도 7. 2주마다 피하로 25mg/kg으로 miRNA 억제제 디자인의 인비보 복용 이후 Dahl 염-민감성 쥐의 생존.

도 8. 도 7과 같은 억제제 디자인으로 복용된 Dahl 염-민감성 쥐에 대한 백분율 체중 변화.

도 9. 상위 10개 miR-208 억제제 디자인에서 잠금 핵산의 배치를 도시하는 그래프(SEQ ID NOS:94-99).

도 10. 정상 생쥐에서 miR-208a 억제제 디자인의 인비보 복용 이후 실시간 PCR에 의해 측정된 심장에서 miR-208a 풍부.

도 11. 정상 생쥐에서 miR-208a 억제제 디자인의 인비보 복용 이후 실시간 PCR에 의해 측정된 심장에서 miR-208b 풍부.

도 12. antimiR-208a(M-10101)의 전신 투여는 심장에서 miR-208의 유효하고 지속적인 사일런싱(silencing)을 유도한다. 도 12는 증가하는 복용량의 antimiR-208a의 정맥(i.v.) 전달 1주 후 설치류 심장에 대한 실시간 PCR 분석을 도시하며 miR-208a 수준에서 복용량-의존성 감소를 증명한다. 각 복용량에 대해 n=4.

도 13. 지정한 시점에 수집한 심장 조직에 대한 실시간 PCR 분석. 도 13은 25mg/kg의 antimiR-208a(M-10101)의 i.v., 복강(i.p) 또는 피하(s.c.) 전달이 miR-208a의 유효한 사일런싱을 유도한다. 각 그룹에 대해 n=4.

도 14. miR-208a 사일런싱은 miR-499 및 Myh7을 감소시킨다. 도 14a는 antimiR-208a(M-10101)이 주사 후 6주까지 miR-208a의 심장 수준을 효과적으로 감소시켜, miR-499에서 시간-반응 감소를 유도하는 것을 입증하는 실시간 PCR 분석을 도시한다. miR-208a 및 -499에 대항하는 antimiR 모두에 의한 복용은 miR-208a 및 miR-499 모두의 심장 수준에서 즉시 감소를 유도한다. 도 14b는 (실시간 PCR에 의해) Myh7이 miR-208a 억제 4주 후 감소하는 반면, miR-208a 및 miR-499의 억제는 2주 후 Myh7을 감소시키는 것을 도시한다. 도 14c는 antimiR-208a 또는 antimiR-208a/-499 치료 이후 지정한 시점에서 감소된 Myh7 발현을 도시하는 Myh7에 대한 웨스턴 블럿 분석이다. Gapdh는 로딩(loading) 대조군으로서 역할을 한다. 도 14a 및 b의 경우, 에러 막대는 SEM을 나타낸다. 각 시점과 복용량에 대해 n=4.

도 15. 조직 분포 분석은 상당량의 antimiR-208a(M-10101)가 주사 후 6주까지 혈장, 심장, 간 및 신장에서 탐지될 수 있다는 것을 나타낸다. 에러 막대는 SEM을 나타낸다. 각 시점과 복용량에 대해 n=4.

도 16. miR-208a의 치료적 사일런싱은 심부전 동안 도움이 된다. 도 16a는 Dahl 고혈압 쥐 모델에서 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선을 도시하며, HS/식염수 및 HS/대조군 그룹들 모두에 대한 HS 식이요법에 반응하여 생존의 현저한 감소를 도시하며, 이는 antimiR-208a(M-10101) 치료에 반응하여 현저하게 개선된다. 도 16b는 체중 분석을 도시하며, 8% HS 식이요법을 한 Dahl 고혈압 쥐는 LS 식이요법을 한 동물들과 비교하여 감소된 체중 증가를 나타내는 반면, HS/antimiR-208a 처리된 쥐는 현저하게 나은 체중 증가의 유지를 도시한다. (a) 및 (b)의 경우, LS/식염수에 대해 n=6; HS/식염수 및 HS/대조군에 대해 n=15; 및 HS/antimiR-208a에 대해 n=14. 그래프 상의 "n"은 식이요법 8주 후 잔존하는 전체 생존자를 나타낸다.

도 17. 4% HS 식이요법을 한 Dahl의 체중 분석(도 17a)은 LS 식이요법 대조군과 비교된 체중 증가의 현저한 감소를 도시하는 반면, 2주마다 5 및 25mg/kg 주사는 일반적인 식이요법을 한 동물들에 필적할만한 체중 증가를 유지하는데 충분하다. 에러 막대는 SEM, *p<0.05 vs. HS 식염수, #p<0.05 vs. LS 식염수를 나타낸다. 도 17b는 심장 초음파 검사를 도시하며, 4% HS 식이요법에 반응하여 IVRT의 증가 및 MV E/A의 감소가 식이요법의 개시 8주 후 antimiR-208a 치료에 반응하여 현저하게 개선되는 것을 나타낸다. IVRT, 등용적 이완 시간(isovolumic relaxation time); MV E/A, 승모판막 초기 대 활성 충전 속도 비율(early to active filling velocity ratio). 모든 그룹에 대해 n=10.

도 18. H&E의 대표 이미지 및 피크로시리우스 레드(picrosirius red) 염색 좌심실 조직학적 부분은 8주 동안 4% HS 식이요법에 반응하여 심근세포비대증 및 혈관 주위 섬유증의 증가를 나타내는 반면, 두 변수들은 antimiR-208a(M-10101) 치료에 반응하여 감소한다(도 18a). 도 18b는 antimiR-208a의 존재하에서 현저하게 적은 비대 및 섬유증을 나타내는 조직학적 정량화의 막대 그래프를 나타낸다. 에러 막대는 SEM을 나타내며, *p<0.05 vs. HS 식염수, #p<0.05 vs. LS 식염수.

도 19. antimiR-208a(M-10101) 치료는 Dahl 염-민감성 쥐에서 miR-499 및 Myh7을 감소시킨다. 모든 분석을 4%

HS 식이요법의 개시 8주 후 및 antimiR 치료의 개시 7주 후 실행하였다. (a) 및 (c)에서 모든 그룹에 대해 n=10. 도 19a는 좌심실(LV) 및 우심실(RV) 모두에서 miR-208a의 복용량-의존성 감소를 나타내는 실시간 PCR 분석을 도시하며, miR-499의 복용량-의존성 감소에 해당한다. miR-208b가 HS 식이요법에 반응하여 증가하는 반면, antimiR-208a는 이런 반응을 현저하게 약하게 한다. (*C. elegans* miR에 대항하는) 대조군 화학물질의 투여는 miR-208a, miR-499 또는 miR-208b의 발현에 아무 영향이 없다. 에러 막대는 SEM, *p<0.05 vs. HS 식염수, #p<0.05 vs. LS 식염수를 나타낸다. 도 19b는 antimiR-208a 치료에 반응하는 miR-499 및 miR-208b의 조절은 노던 블럿 분석에 의해 확인될 수 있다는 것을 보여준다. U6는 로딩 대조군으로 역할한다.

도 20. 실시간 PCR 분석은 HS 식이요법은 Myh6를 감소시키는 반면 Myh7은 증가시키는 것을 도시한다(도 20a). antimiR-208a(M-10101) 치료는 Myh6 발현을 복용량-의존적으로 증가시키는 반면 Myh7b 발현을 감소시킨다. Myh7의 HS 식이요법-유도 증가는 antimiR-208a에 의해 복용량-의존적으로 감소한다. 에러 막대는 SEM, *p<0.05 vs. HS 식염수, #p<0.05 vs. LS 식염수를 나타낸다. 도 20b는 심실 조직으로부터의 Myh7에 대한 웨스턴 블럿 분석이 antimiR-208a 치료에 반응하는 복용량-의존성 감소를 확인시키는 것을 도시한다. Gapdh는 로딩 대조군으로 사용된다.

도 21. 혈장에 있는 miR-499는 antimiR-208a 효율에 대한 바이오마커로서 역할한다. 도 21은 혈장 샘플들에 대한 실시간 PCR 분석을 도시하며, HS 식이요법에 반응하여 miR-499의 증가를 나타내는 반면, antimiR-208a는 4% HS 식이요법의 개시 8주 후 및 antimiR 치료의 개시 7주 후 혈장에서 miR-499의 탐지를 현저하게 낮춘다. 추가의 miRNA 분석은 antimiR-208a에 반응하여 혈장 탐지가능한 miR-423-5p의 감소를 추가로 나타낸다.

도 22. 아프리카 녹색 원숭이(~3kg)의 조직 및 혈장 분포. antimirs 10101(antimiR-208a) 및 10707(antimiR-208b)을 복재정맥류에 의해 25mg/kg의 복용량으로 3회 투여되었고 약물 혈장 청소율을 측정하였다(오른쪽 패널). 조직을 4주 후 수집하였고 억제제에 대해 분석하였다(어두운 막대, M-10101; 밝은 막대, M-10707).

도 23. 아프리카 녹색 원숭이에서 특이적 miRNA 표적 억제. 왼쪽 패널은 좌심실에서 miR-208a 발현의 변화를 도시한다(왼쪽부터 오른쪽으로: 치료되지 않은 M-10101, M-10707, M-10591). 오른쪽 패널은 좌심실에서 miR-208b 발현의 변화를 도시한다(왼쪽부터 오른쪽으로: 치료되지 않은 M-10101, M-10707, M-10591). 도시된 대로, M-10101 및 M-10707 사이의 단지 두 뉴클레오티드 차이에 의해, antimiR는 이들의 표적 miR(각각 miR-208a 및 miR-208b)에 대해 특이적이다.

도 24. 치료 후 Mir-499 수준. 수준은 좌심실(LV), 우심실(RV) 및 격막에 대해 도시된다. 막대는 왼쪽부터 오른쪽으로, 치료되지 않은 M-10101, M-10707 및 M-10591이다.

도 25. 다른 화학 패턴을 가진 antimiR-208a 화합물들은 피하로 25mg/kg 쥐에게 투여됐을 때 좌심실에서 miR-208a 낙다운(knockdown)을 나타낸다. 화합물들은 다른 수준의 표적 탈-억제(target de-repression)를 나타낸다.

도 26 내지 28. 도 25와 같은 antimiR-208a 화합물들에 의한 표적 탈-억제.

도 29. Antimir-208a 치료는 스트레스 받지 않은 설치류(SD 쥐)에서 miR-19b 혈장 수준을 증가시킨다.

도 30. 염-민감성 쥐에 의한 연구는 표적 탈-억제의 등급은 스트레스의 등급에 의존하는 것을 나타낸다. Dynlt1은 6% 염 스트레스에 의한 더욱 강한 탈-억제를 나타낸다.

도 31. 염 민감성 쥐 모델에서 다른 등급의 스트레스(4% 및 6% 염 식이요법)에서 표적 탈-억제(Vcpip1)의 등급.

도 32. 염 민감성 쥐 모델에서 다른 등급의 스트레스(4% 및 6% 염 식이요법)에서 표적 탈-억제(Tmbim6)의 등급.

도 33. 더 많이 스트레스 받은 영역들은 더 큰 효과를 나타내는 것을 보여주는 심장의 다른 영역에서 miR 억제의 등급.

도 34. 더 많이 스트레스 받은 영역들은 더 큰 효과를 나타내는 것을 보여주는 antimiR-208a 치료에 대한 심장의 다른 영역에서 미오신 발현의 등급.

도 35. antimiR-208a 치료에 대한 심장의 다른 영역에서 특정 심장 스트레스 마커의 발현의 등급.

도 36. 더 많이 스트레스 받은 영역들은 더 큰 효과를 나타내는 것을 보여주는 antimiR-208a 치료에 대한 심장의 다른 영역에서 표적 발현의 등급.

도 37. 더 많이 스트레스 받은 영역들은 더 큰 효과를 나타내는 것을 보여주는 antimiR-208a 치료에 대한 심장

의 다른 영역에서 표적 발현의 등급.

도 38. 더 많이 스트레스 받은 영역들은 더 큰 효과를 나타내는 것을 보여주는 antimiR-208a 치료에 대한 심장의 다른 영역에서 Dynlt1 탈-억제의 등급.

도 39. 더 많이 스트레스 받은 영역들은 더 큰 효과를 나타내는 것을 보여주는 antimiR-208a 치료에 대한 심장의 다른 영역에서 표적 탈-억제의 등급.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499를 포함하는 miR-208 패밀리 miRNAs의 발현(예를 들어, 풍부)을 억제할 수 있는 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명은 일부 실시태양에서, 특정한 방식으로, miR-208a, miR-208b 및 miR-499의 각각의 발현 또는 풍부를 억제할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명은 추가로 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약학적 조성물 및 다양한 심혈관 질환과 같은 miR-208 패밀리 miRNA에 관한 또는 이를 수반하는 질환 또는 이상을 가진 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 효력, 전달 효율, 표적 특이성, 독성, 및/또는 안정성의 하나 이상에서 이점을 제공한다.

[0019] 화학적으로 변형된 miR-208a 안티센스 올리고뉴클레오티드

[0020] 한 양태에서, 본 발명은 miR-208 패밀리 miRNAs의 발현 또는 풍부를 감소시킬 수 있는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 올리고뉴클레오티드의 활성은 인비트로 및/또는 인비보로 측정될 수 있다. 예를 들어, miR-208a, miR-208b 또는 miR-499 활성의 억제가 인비트로로 측정될 때, 활성은 본 발명에 기술된 대로 이중 루시페라제 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 이중 루시페라제 활성에서 측정된 대로, 약 50nM 이하의 농도에서 또는 다른 실시태양에서, 40nM 이하, 20nM 이하 또는 10nM 이하에서 이런 활성을 현저하게 억제한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 이중 루시페라제 분석법에서 측정된 대로, 약 50nM 이하, 40nm 이하, 30nM 이하 또는 20nM 이하의 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499 활성의 억제에 대한 IC50을 가질 수 있다.

[0021] 구입할 수 있는 제품 PsiCHECK™(Promega)에 의해 예시화된 이중 루시페라제 분석법은 탐지가능한 단백질(예를 들어, 레닐라 루시페라제)에 대한 유전자의 3'UTR에서 miR 인식 부위의 배치를 필요로 한다. 구조체는 표적 miRNA와 공동 발현되어, 억제제 활성은 신호의 변화에 의해 측정될 수 있다. 탐지가능한 단백질(예를 들어, 반딧불이 루시페라제)을 암호화하는 제 2 유전자는 동일한 플라스미드 상에 포함될 수 있고, 신호들의 비율은 antimiR 활성의 지표로서 측정되었다.

[0022] 선택적으로 또는 추가로, 올리고뉴클레오티드의 활성은 본 발명에 기술된 것과 같은 적절한 생쥐 또는 쥐 모델에서 측정될 수 있으며, miR-208 패밀리 miRNA의 억제(예를 들어, 적어도 50%)는 10mg/kg 이하 또는 5mg/kg 이하와 같은 50mg/kg 이하, 25mg/kg 이하의 올리고뉴클레오티드 복용량에서 관찰된다. 일부 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드의 활성은 설명이 참조로 본 발명에 포함된 WO 2008/016924에 기술된 동물 모델에서 측정된다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 10mg/kg 이하 또는 5mg/kg 이하와 같은 50mg/kg 이하, 25mg/kg 이하의 복용량에서 적어도 50% 표적 miRNA 억제 또는 표적 탈-억제를 나타낼 수 있다. 이런 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 생쥐에게 정맥 또는 피하로 복용될 수 있고 올리고뉴클레오티드는 식염수로 제제화될 수 있다.

[0023] 이런 실시태양 또는 다른 실시태양에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 투여 후 안정하고, 투여 후 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 5주 또는 적어도 6주 또는 그 이상에서 순환 및/또는 표적 기관에서 탐지될 수 있다. 따라서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 덜 빈번한 투여, 더 낮은 복용량 및/또는 더 긴 치료 효과의 지속 기간을 제공하는 효과를 가진다.

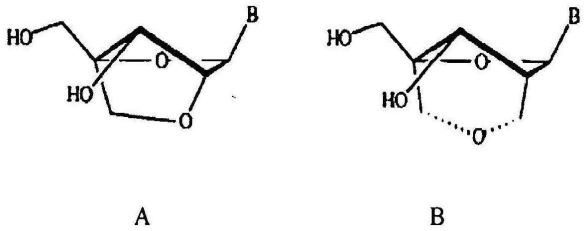
[0024] 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 인간 miR-208a 및/또는 miR-208b의 뉴클레오티드 서열과 실질적으로 상보적이며 잠금 및 비-잠금 뉴클레오티드의 혼합물을 함유한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 적어도 5개 또는 적어도 7개 또는 적어도 9개 잠금 뉴클레오티드 및 적어도 하나의 비-잠금 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 일반적으로, 올리고뉴클레오티드의 길이 및 잠금 뉴클레오티드의 수와 위치는 인비트로 루시페라제 분석법에서 약 50nM 이하의 올리고뉴클레오티드 농도 또는 기술된 각각의 적절한 생쥐 또는 생쥐 모델에서 약 50mg/kg 이하 또는 약 25mg/kg 이하의 복용량에서 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499 활성을 감소시키는 것이다. 실질적으로 상보적인 올리고뉴클레오티드는 miR-208a 또는 miR-208b의 표적 서열에 대해 1 내지 4개 미스매치(예를 들어, 1 또는 2개 미스매치)를 가질 수 있다.

[0025] (다른 질환들 중에서) 심근비대, 심부전 또는 심근경색증을 치료하기 위한 이의 구조 및 처리, 이의 효력을 포함하는 miR-208a는 전문이 참조로 본 발명에 포함된 WO 2008/016924에 기술된다. 본 발명에 따라 억제성 miRNAs를 디자인하는데 사용될 수 있는 인간 miR-208a에 대한 pre-miRNA 서열은 (밑줄친 서열은 성숙한 서열 형태이다):

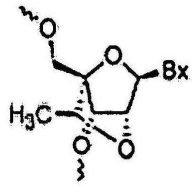
[0026] 5'- ACGGGCGAGC UUUUGGCCCG GGUUAUACCU GAUGCUCACG UAUAAGACGA GCAAAAAGCU UGUUGGUCAG A - 3' (SEQ ID NO:5)

[0027] miR-208b 및 miR-499의 구조 및 처리는 전문이 참조로 포함된 WO 2009/018492에 또한 기술된다. 성숙한 miR-208b는 뉴클레오티드 서열 5'- AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU - 3'(SEQ ID NO:6)을 가지며 성숙한 miR-499는 뉴클레오티드 서열 5' - UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU -3'(SEQ ID NO:7)을 가진다. 이런 서열들은 본 발명에 따른 상보적 억제제들을 디자인하는데 사용될 수 있다.

[0028] 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 잠금 핵산(LNAs) 잔기 또는 "잠금 뉴클레오티드"를 함유한다. LNA는 예를 들어, 미국특허 6,268,490, 미국특허 6,316,198, 미국특허 6,403,566, 미국특허 6,770,748, 미국특허 6,998,484, 미국특허 6,670,461, 및 미국특허 7,034,133에서 기술되며, 이들 모두는 전체로써 본 발명에 참조로 포함된다. LNA는 "잠금" 형태 및/또는 바이사이클릭 구조를 형성하는 리보스 당 모이어티의 2' 및 4' 탄소들 사이에 추가적인 다리를 포함하는 변형된 뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드이다. 일 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 구조식 A에 나타난 구조를 가진 하나 이상의 LNA를 함유한다. 선택적으로 또는 추가로, 올리고뉴클레오티드는 구조식 B에 나타난 구조를 가진 하나 이상의 LNA를 함유할 수 있다. 선택적으로 또는 추가로, 올리고뉴클레오티드는 구조식 C에 나타난 구조를 가진 하나 이상의 LNA를 함유한다.



A B



C

[0029]

[0030] 본 발명의 올리고뉴클레오티드에서 사용될 수 있는 다른 적절한 잠금 뉴클레오티드는 미국특허 6,403,566 및 미국특허 6,833,361에 서술된 것을 포함하며, 이들 모두는 전체로써 본 발명에 참조로 포함된다.

[0031] 예시적 실시태양들에서, 잠금 뉴클레오티드는 예를 들어 구조식 A에 도시된 대로, 2' 내지 4' 메틸렌 다리를 가진다.

[0032] 올리고뉴클레오티드는 전장 또는 절단된 miR-208a 또는 miR-208b 안티센스 서열을 포함할 수 있으며, 이로 필수적으로 이루어지거나 이루어질 수 있다. 본 발명에서 사용된 대로, miRNA 서열을 참조하여 "전장"이란 용어는 성숙한 miRNA 안티센스 대응물(counterpart)의 길이를 의미한다. 따라서 본 발명에 기술된 억제제들은 절단되거나 전장인, 안티센스, 성숙한 miRNA 서열들일 수 있으며 또는 다른 폴리뉴클레오티드 서열들과 조합으로 이런 서열들을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명에 기술된 화학적 변형 모티프는 전장 안티센스 miRNA(성숙한) 서열들을 불필요하게 한다. 이런 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 약 8 내지 20개 뉴클레오티드 길이이거나 약 10 내지 18개 뉴클레오티드 길이이거나 약 11 내지 약 16개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시태양에서 올리고뉴클레오티드는 약 12, 약13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17 또는 약 18개 뉴클레오티드 길이이다. 절단된 올리고뉴클레오티드는 안티센스 억제에 의해 5' - UAAGACGAGCAAAAAG - 3'(SEQ ID NO:8) 내의 miR-208a 서열

또는 UAAGACGAACAAAAAG - 3'(SEQ ID NO:9) 내의 miR-208b 서열을 표적으로 하는 서열을 가질 수 있다.

[0033] 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 성숙한 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499를 표적화하기 위해 디자인된 뉴클레오티드 서열을 가진다. 올리고뉴클레오티드는, 이런 실시태양 또는 다른 실시태양에서, 또한 또는 선택적으로 pre- 또는 pri-miRNA 형태를 표적화하기 위해 디자인될 수 있다. 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 완전히 상보적인(성숙한) miR-208 서열에 대해 1 내지 5(예를 들어, 1, 2, 3, 또는 4) 미스매치를 함유하는 서열을 갖도록 디자인될 수 있다. 특정 실시태양에서, 이런 안티센스 서열은, 예를 들어, 스템 및 루프 부분을 함유하는 shRNAs 또는 다른 RNA 구조들 속에 합체될 수 있다.

[0034] 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 miR-208a 또는 miR-208b의 뉴클레오티드 서열에 완전히 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 5' - TGCTCGTCTTA - 3'(SEQ ID NO:1)의 뉴클레오티드 서열 또는 5' - TGTTCGTCTTA - 3'(SEQ ID NO:2)의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열 5' - CTTTTTGCTCGTCTTA - 3'(SEQ ID NO:3) 또는 5' - CCTTTTGTTCGTCTTA - 3'(SEQ ID NO:4)을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나 이루어진다. 이 내용에서, "필수적으로 이루어지다"는 추가 뉴클레오티드(들)가 (20% 이하의 IC50의 증가에 의해 정의된 대로) 이중 루시페라제 분석법 또는 생쥐 모델에서 표적 miRNA 활성의 올리고뉴클레오티드의 억제에 실질적으로 영향을 미치지 않는 한, 5' 및 3' 말단의 한쪽 또는 모두 위에 뉴클레오티드의 추가 첨가(예를 들어, 하나 또는 둘)를 포함한다.

[0035] 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 적어도 약 3개, 적어도 약 5개, 또는 적어도 약 7개, 또는 적어도 9개 잠금 뉴클레오티드를 함유할 수 있으나, 다양한 실시태양들에서 잠금 뉴클레오티드로 완전히 이루어지지 않는다. 일반적으로, 잠금 뉴클레오티드의 수와 위치는 올리고뉴클레오티드가 기술한 대로 인비트로 또는 인비보로 측정된 대로 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499 활성을 감소시키는 것이다. 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 넷 초과 또는 셋 초과 또는 둘 초과 연속적인 비-잠금 뉴클레오티드를 가진 연속된 뉴클레오티드를 함유하지 않는다. 특정 실시태양들에서, 올리고뉴클레오티드는 둘 초과 연속적인 비-잠금 뉴클레오티드를 가진 연속된 뉴클레오티드를 함유하지 않는다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 연속적인 비-잠금 뉴클레오티드의 단지 하나의 발생을 가질 수 있다. 이런 실시태양 또는 다른 실시태양에서, miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499 씨드 영역에 상보적인 영역은 적어도 3개 또는 적어도 4개의 잠금 뉴클레오티드를 포함한다. 이런 실시태양은, 예를 들어, SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오티드 서열을 사용할 수 있다.

[0036] 따라서, 다양한 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 9개 잠금 뉴클레오티드 또는 적어도 11개 잠금 뉴클레오티드를 함유한다. 올리고뉴클레오티드는 적어도 3개 또는 적어도 5개 비-잠금 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 9개 잠금 뉴클레오티드 및 7개 비-잠금 뉴클레오티드를 함유할 수 있거나 11개 잠금 뉴클레오티드 및 5개 비-잠금 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.

[0037] 잠금 뉴클레오티드의 패턴은 적어도 위치 1, 6, 10, 13 및 15가 잠금 뉴클레오티드인 것일 수 있다. 특정 실시태양에서, 위치 1, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 15 및 16은 잠금 뉴클레오티드이며, 나머지 위치는 비-잠금 뉴클레오티드이다. 다른 실시태양에서, 위치 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 15 및 16은 잠금 뉴클레오티드이며, 나머지 위치는 비-잠금 뉴클레오티드이다. 일부 실시태양에서, 위치 1, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 및 16은 잠금 뉴클레오티드이며, 나머지 위치는 비-잠금 뉴클레오티드이다. 예시적 실시태양에서, 이런 패턴은 SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:4의 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드와 사용할 수 있다.

[0038] 비-잠금 뉴클레오티드의 경우, 뉴클레오티드는 2'하이드록실에 대하여 2' 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 2'변형은 2'데옥시일 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드에 2'-변형된 뉴클레오티드의 합체(incorporation)는 뉴클레아제에 대한 올리고뉴클레오티드의 저항성 및 상보적인 RNA와의 열적 안정성을 모두 증가시킬 수 있다. 2'위치에서의 다양한 변형들은 RNA 표적 또는 세포 기관과의 분자 상호작용을 손상시키지 않고 증가된 뉴클레아제 민감성을 제공하는 것들로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 이러한 변형들은 이들의 증가된 인비트로 또는 인비보 효력을 기반으로 선택될 수 있다. miRNA 억제에 대한 증가된 효력(예를 들어, IC50)을 측정하는 예시적인 방법이 본 발명에서 기술되며, 이중 루시페라제 분석법 및 인비보 miRNA 발현 또는 표적 탈-억제를 포함한다.

[0039] 일부 실시태양에서, 2'변형은 (치환될 수 있는) O-알킬, 할로 및 데옥시(H)로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 특정 실시태양에서, 실질적으로 모든, 또는 모든 비-잠금 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 2'위치가 변형되며, 예를 들어 O-알킬 (예를 들어, O-메틸), 할로 (예를 들어, 플루오르), 데옥시 (H), 및 아미노로부터 독립적으로 선택된다. 예를 들어, 2'변형은 O-메틸 및 플루오르로부터 각각 독립적으로 선택될 수 있다. 예시적인 실시태양

에서, 퓨린 뉴클레오티드는 각각 2'OMe를 가지며 피리미딘 뉴클레오티드는 각각 2'-F를 가진다. 특정 실시태양에서, 1 내지 약 5개의 2'위치, 또는 약 1 내지 약 3개의 2'위치는 변형되지 않은 상태로 (예를 들어, 2'하이드록실들로) 남겨진다.

[0040] 본 발명에 따른 2'변형은 또한 소수의 탄화수소 치환기들을 포함한다. 탄화수소 치환기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 및 알콕시알킬을 포함하며, 여기서 알킬 (알콕시의 알킬 부분 포함), 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 또는 비치환될 수 있다. 알킬, 알케닐, 및 알키닐은 C1, C2 또는 C3과 같은 C1 내지 C10 알킬, 알케닐 또는 알키닐일 수 있다. 탄화수소 치환기는 한 개 또는 두 개 또는 세 개의 비-탄소 원자를 포함할 수 있으며, N, O, 및/또는 S로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 2' 변형은 O-알킬, O-알케닐, 및 O-알키닐과 같은 알킬, 알케닐, 및 알키닐을 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 예시적인 2'변형은 2'-O-알킬 (2'OMe 또는 2'OEt와 같은 C1-3 알킬), 2'-O-메톡시에틸 (2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필 (2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸 (2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필 (2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸 (2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도 (2'-O-NMA) 치환을 포함한다.

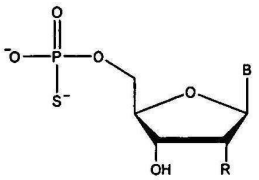
[0042] 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 2'-플루오르, 2'-클로로, 2'-브로모, 및 2'-요오드와 같은 적어도 하나의 2'-할로 변형(예를 들어, 2'하이드록실 대신에)을 포함한다. 일부 실시태양에서, 2'할로 변형은 플루오르이다. 올리고뉴클레오티드는 1 내지 약 5개의 2'-할로 변형(예를 들어, 플루오르), 또는 1 내지 약 3개의 2'-할로 변형(예를 들어, 플루오르)을 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 비-잠금 위치에서 모두 2'-플루오르인 뉴클레오티드, 또는 모든 비-잠금 피리미딘 뉴클레오티드 상에 2'-플루오르를 포함한다. 특정 실시태양에서, 2'-플루오르기는 독립적으로 디-, 트리-, 또는 비-메틸화된다.

[0043] 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 2'-데옥시 변형(예를 들어, 2'하이드록실의 경우 H)을 가질 수 있으며, 일부 실시태양들에서, 비-잠금 위치에 2 내지 약 10개의 2'-데옥시 변형을 함유하거나 모든 비-잠금 위치에 2'-데옥시를 함유한다.

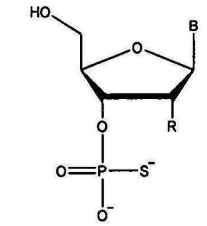
[0044] 예시적인 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 비-잠금 위치에서 2'OMe로 변형된 2'위치를 포함한다. 선택적으로, 비-잠금 퓨린 뉴클레오티드는 2'위치에서 2'OMe로 변형되고, 비-잠금 피리미딘 뉴클레오티드는 2'위치에서 2'-플루오르로 변형된다.

[0045] 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 말단 변형 또는 "캡"을 추가로 포함한다. 캡은 5' 및/또는 3'-캡 구조일 수 있다. 용어 "캡" 또는 "말단-캡"은 (말단 리보뉴클레오티드에 대한) 올리고뉴클레오티드의 양쪽 말단에서 화학 변형을 포함하며 5'말단 상의 마지막 두 개의 뉴클레오티드 및 3'말단 상의 마지막 두 개의 뉴클레오티드 사이의 결합에서 변형을 포함한다. 본 발명에서 서술된 캡 구조는 RNA 표적 또는 세포 기관과의 분자 상호작용을 손상시키지 않고 올리고뉴클레오티드의 엑소뉴클레아제에 대한 저항성을 증가시킨다. 이러한 변형들은 이들의 증가된 인비트로 또는 인비보 효력을 기반으로 선택될 수 있다. 캡은 5'-말단 (5'-캡) 또는 3'-말단 (3'-캡)에서 또는 양쪽 말단 모두에서 존재할 수 있다. 특정 실시태양에서, 5'- 및/또는 3'-캡은 포스포로티오에이트 모노포스페이트, 무염기 잔기 (모이어티), 포스포로티오에이트 결합, 4'-티오 뉴클레오티드, 카보사이클릭 뉴클레오티드, 포스포로디티오에이트 결합, 반전된 뉴클레오티드(inverted nucleotide) 또는 반전된 무염기 모이어티(inverted abasic mioety)(2'-3'또는 3'-3'), 포스포로디티오에이트 모노포스페이트, 및 메틸포스포네이트 모이어티로부터 독립적으로 선택된다. 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 결합(들)은, 캡 구조의 일부인 경우, 일반적으로 5'말단 상의 두 개의 말단 뉴클레오티드 및 3'말단 상의 두 개의 말단 뉴클레오티드 사이에 위치한다.

[0046] 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 말단 포스포로티오에이트 모노포스페이트를 가진다. 포스포로티오에이트 모노포스페이트는 엑소뉴클레아제의 작용을 억제함으로써 더 높은 효력을 지원할 수 있다. 포스포로티오에이트 모노포스페이트는 올리고뉴클레오티드의 5'및/또는 3'말단에 있을 수 있다. 포스포로티오에이트 모노포스페이트는 아래에 서술된 B가 염기이고, R이 2'변형인 다음 구조에 의해 정의된다:



5'포스포로티오에이트 모노포스페이트

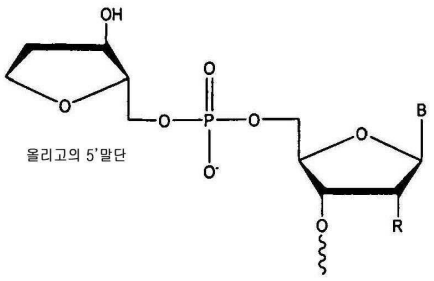


3'포스포로티오에이트 모노포스페이트

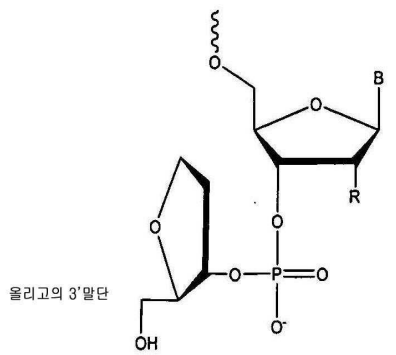
[0047]

[0048] 캡 구조가 잠금 뉴클레오티드의 화학적 성질을 지원할 수 있는 경우, 캡 구조는 본 발명에 기술된 대로 잠금 뉴클레오티드를 합체할 수 있다.

[0049] 일부 실시태양에서 포스포로티오에이트 결합은 5'및 3'말단상의 마지막 2개의 뉴클레오티드(예를 들어, 캡 구조의 일부로서)들 사이에 존재할 수 있거나 포스포다이에스터 결합과 교대로 존재할 수 있다. 이런 실시태양 또는 다른 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 5'및 3'말단 중 하나 또는 모두에서 적어도 하나의 말단 무염기 잔기를 포함할 수 있다. 무염기 모이어티는 아데노신, 구아닌, 시토신, 우라실 또는 티민과 같은 일반적으로 인정되는 퓨린 또는 피리미딘 뉴클레오티드 염기를 포함하지 않는다. 따라서 이러한 무염기 모이어티는 뉴클레오티드 염기가 부족하거나 또는 1'위치에서 다른 비-뉴클레오티드 염기 화학 그룹을 가진다. 예를 들어, 무염기 뉴클레오티드는 역 무염기 뉴클레오티드(reverse abasic nucleotide)일 수 있으며, 예를 들어, 역 무염기 포스포라미디트는 (3'아미디트 대신) 5'아미디트를 통해 결합되고 5'-5'포스페이트 결합을 초래한다. 폴리뉴클레오티드의 5'및 3'말단에 대한 역 무염기 뉴클레오시드의 구조가 아래에 도시된다.



올리고의 5'말단



올리고의 3'말단

[0050]

[0051] 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합을 함유할 수 있다. 포스포로티오에이트 결합은 올리고뉴클레오티드를 뉴클레아제 절단(cleavage)에 대해 보다 저항성으로 만들기 위해 사용되었다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 부분적으로 포스포로티오에이트 결합될 수 있거나, 예를 들어, 포스포로티오에이트 결합은

포스포디에스터 결합과 번갈아 올 수 있다. 그러나, 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 완전히 포스포로티오에이트 결합된다. 다른 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 1개 내지 5개 또는 1개 내지 3개 포스페이트 결합을 가진다.

[0052] 일부 실시태양에서, 뉴클레오티드는 참조로 본 발명에 포함된 PCT/US11/59588에 기술된 대로 하나 이상의 카복스아미도-변형 염기들을 가지며, 본 발명에 개시된 모든 예시적 피리미딘 카복스아미도 변형에 대해 헤테로사이클릭 치환기를 포함한다.

[0053] 예시적 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 아래 표 1에 나열된 화합물의 구조를 가진다.

표 1

[0054] 예시적 올리고뉴클레오티드

Cmpd# (M)	통칭		서열		길이
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
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;lCs;dTs;lTs;dA (SEQ ID NO:42)	3'	14
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
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;lCs;lTs;lTs;lAs;lT (SEQ ID NO:75)	3'	15
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

[0055]

표 2

[0056] 표시법의 설명

deoxy A	dA
deoxy G	dG
deoxy C	dC
deoxy T	dT
lna A	lA
lnaG	lG
lna C	lC
lna T	lT
deoxy A P=S	dAs
deoxy G P=S	dGs
deoxy C P=S	dCs
deoxy T P=S	dTs
lna A P=S	lAs
lnaG P=S	lGs
lna C P=S	lCs
lna T P=S	lTs

[0057] 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 10101, 10673, 10674, 10677, 10679, 10683, 10707, 또는 10680 또는 표 1에 기술된 다른 올리고뉴클레오티드이다.

[0058] 고체상 합성법(solid phase synthesis)에 의한 변형된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 합성은 잘 알려져 있으며 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 새로운 화학적 방법(New Chemical Methods for Synthesizing Polynucleotides). Caruthers MH, Beaucage SL, Efcavitch JW, Fisher EF, Matteucci MD, Stabinsky Y. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1980;(7):215-23에서 검토되었다.

[0059] 조성물, 제제 및 전달

[0060] 올리고뉴클레오티드는 다양한 고분자 어셈블리 또는 조성물 내에 포함될 수 있다. 전달을 위한 이러한 복합체는 다양한 리포솜, 나노입자, 및 미셀을 포함할 수 있으며 환자로의 전달을 위해 제제화된다. 복합체는 세포막 침투를 개시하기 위해 하나 이상의 융합 유도성(fusogenic) 또는 친유성(lipophilic) 분자를 포함할 수 있다. 이러한 분자들은 예를 들어, 미국특허 7,404,969 및 미국특허 7,202,227에서 서술되며, 그 전체가 본 발명에 참조로서 포함된다. 선택적으로, 올리고뉴클레오티드는 본 발명에 참조로서 포함된 WO 2010/129672에 기술된 것과 같은 세포 전달을 보조하기 위한 펜던트 친유성 그룹을 더 포함할 수 있다.

[0061] 조성물 또는 제제는 본 발명에 기술된 적어도 하나를 포함하는 다수의 치료적 올리고뉴클레오티드를 사용할 수 있다. 예를 들어, 조성물 또는 제제는 본 발명에 기술된 적어도 2, 3, 4 또는 5개 miRNA 억제제를 사용할 수 있다.

[0062] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 다양한 약학적 조성물로 제제화될 수 있다. 약학적 조성물은 의도된 사용에 적합한 형태로 제조될 것이다. 일반적으로, 이는 발열원(pyrogens) 뿐만 아니라 인간 또는 동물에 해로울 수 있는 다른 불순물이 없는 조성물의 제조를 필요로 할 것이다. 예시적인 전달/제제 시스템은 콜로이드 분산 시스템, 고분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드, 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀, 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 상업적으로 이용 가능한 본 발명의 핵산을 심장 및 골격 근육 조직으로 전달하기에 적합한 지방 에멀전은 Intralipid®, Liposyn®, Liposyn®II, Liposyn®III, Nutrilipid, 및 다른 유사한 지질 에멀전을 포함한다. 인비보 전달 비히클로 사용하기 위한 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜(즉, 인공 막소포)이다. 이러한 시스템의 제조 및 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 또한 예시적인 제제가 그 전체로 본 발명에 참조로서 포함되는 US 5,981,505; US 6,217,900; US 6,383,512; US 5,783,565; US 7,202,227; US 6,379,965; US 6,127,170; US 5,837,533; US 6,747,014; 및 WO03/093449에서 개시된다.

[0063] 일부 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 살균수와 일반적인 식염수를 포함하는, 적절한 희석액과 함께 제제화함으로써, 통상적인 피하 또는 정맥 투여를 위해 제제화된다.

[0064] 약학적 조성물 및 제제는 전달 비히클을 안정하게 만들고 표적 세포에 의해 흡수될 수 있도록 적절한 염 및 완충액을 사용할 수 있다. 본 발명의 수성 조성물은 억제제 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 리포솜 또는 다른 복합체)를 포함하는 유효량의 전달 비히클을 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 수성 매질에서 용해되

거나 또는 분산된다. "약학적으로 허용 가능한" 또는 "약리학적으로 허용 가능한"은 동물 또는 인간에게 투여된 경우 해롭거나, 알러지이거나, 또는 다른 부반응들을 나타내지 않는 분자 또는 조성물을 말한다. 본 발명에서 사용된 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 인간에게 투여하기에 적합한 의약과 같은 의약을 제제화하는데 사용하기에 적합한 하나 이상의 용매, 완충액, 용액, 분산매, 코팅, 항균성 및 항진균성 물질, 등장성 및 흡수 지연 물질 등을 포함한다. 약학적으로 활성인 물질들을 위한 이러한 매질 및 물질의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 또한 보조적인 활성 성분들이 조성물에 포함될 수 있다.

[0065] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 또는 전달은 표적 조직이 그 경로를 통해 이용할 수 있는 한 임의의 경로를 통할 수 있다. 예를 들어, 투여는 피내, 피하, 근육내, 복강내 또는 정맥내 주사, 또는 표적 조직(예를 들어, 심장 조직) 내로의 직접 주사에 의할 수 있다. 본 발명에 개시된 올리고뉴클레오티드의 안정성 및/또는 효력은 피하, 피내 및 근육내를 포함하는 편리한 투여 경로를 고려한다. 또한 miRNA 서열을 포함하는 miRNA 억제제를 포함하는 약학적 조성물은 카테터 시스템 또는 치료 물질을 심장으로 전달하기 위해 관상 순환을 격리시키는 시스템에 의해 투여될 수 있다. 치료 물질을 심장 및 관상 맥관구조로 전달하기 위한 다양한 카테터 시스템은 당업계에 알려져 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 카테터-기반 전달 방법 또는 관상 격리 방법의 일부 비제한적인 예들은 그 전체가 본 발명에 참조로서 포함되는 미국특허 6,416,510; 미국특허 6,716,196; 미국특허 6,953,466, WO 2005/082440, WO 2006/089340, 미국특허공보 2007/0203445, 미국특허공보 2006/0148742, 및 미국특허공보 2007/0060907에 개시된다.

[0066] 또한 조성물 또는 제제는 비경구 또는 복막내로 투여될 수 있다. 예로써, 유리 염기 또는 약리학적으로 허용 가능한 염으로써의 콘주게이트의 용액은 물에서 히드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 적절히 혼합하여 제조될 수 있다. 또한 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌글리콜, 및 이들의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 통상의 저장 및 사용 조건 하에서 이들 제제들은 미생물의 성장을 막기 위해 일반적으로 방부제를 포함한다.

[0067] 주사 용도 또는 카테터 전달에 적합한 약학적 형태는 예를 들어, 살균 수성 용액 또는 분산액 및 살균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 살균 분말 를 포함한다. 일반적으로 이들 제제는 살균되며 쉬운 주입성이 존재할 정도로 유동성이다. 제제는 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 하며 세균 및 균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대비하여 보관되어야 한다. 적합한 용매 또는 분산매는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적절한 혼합물, 및 식물 오일을 포함할 수 있다. 적절한 유동성이 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등의 다양한 항균 및 항진균 물질에 의해 이루어질 수 있다. 많은 경우에서, 등장성 물질, 예를 들어, 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 적합할 것이다. 주사 가능한 조성물의 장기 흡수는 흡수 지연제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에서 사용하여 이루어질 수 있다.

[0068] 살균 주사 용액은 적절한 양의 컨주게이트를 용매에 원하는 임의의 다른 성분(예를 들어, 상기에서 열거한 것)과 함께 혼합함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 살균 활성 성분들을 기본적인 분산매와 원하는 다른 성분들, 예를 들어 앞에서 열거한 것들을 포함하는 살균 비히클에 혼합함으로써 제조된다. 살균 주사 용액 제조를 위한 살균 분말의 경우, 바람직한 제조방법은 상기 살균-여과된 용액으로부터 어떠한 추가적으로 요구되는 성분들을 더한 활성 성분(들)의 파우더를 생산하는 진공-건조 및 동결-건조 기술을 포함한다.

[0069] 제제에서, 용액들은 되도록 투약 제제에 적합한 방식 및 치료에 효과적인 양으로 투여된다. 제제는 주사 가능한 용액, 약물 방출 캡슐 등과 같은 다양한 투약 형태로 쉽게 투여될 수 있다. 수용액에서 비경구적 투여를 위해서, 예를 들어, 용액은 일반적으로 적절하게 완충되고, 액상 희석액은 먼저 예를 들어 충분한 식염수 또는 글루코스로 등장성을 만든다. 이러한 수용액은 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피하 및 복막내 투여에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 특히 본 명세서의 관점에서, 당업계의 통상적인 기술을 가진자에게 이미 알려진 바대로 살균 수성 매질이 사용된다. 예로써, 단일 복용량은 1ml의 등장성 NaCl 용액에 용해되고 1000ml의 피하주액 유체(hypodermoclysis fluid)에 첨가되거나 또는 예정된 주입 부위에 주사될 수 있다(예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, 페이지 1035-1038 및 1570-1580 참조). 치료받는 대상의 질환에 따라 용량의 일부 변화는 필연적으로 생기게 된다. 투여에 대해 책임을 지는 사람은 어떤 일이 있어도 개개의 대상을 위한 적합한 용량을 결정할 것이다. 또한, 인간 투여에 있어, 제형들은 FDA 생물학 기준 사무국에 의해 요구되는 살균성, 발열원성, 일반 안전 및 순도 기준을 만족해야만 한다.

[0070] 치료 방법

[0071] 본 발명은 올리고뉴클레오티드를 (예를 들어, 본 발명에 기술된 조성물 또는 제제의 일부로서) 포유동물 세포로 전달하는 방법, 및 포유류 환자에서 질환의 진행을 치료, 경감, 또는 예방하는 방법을 제공한다. 올리고뉴클레오티드 또는 약학적 조성물은 표적 세포(예를 들어, 포유류 세포)와 인비트로 또는 인비보로 접촉될 수 있다. 세포는 심장 세포일 수 있다.

[0072] 본 방법은 일반적으로 동일한 것을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 조성물을 포유류 환자 또는 집단의 표적 세포들에게 투여하는 것을 포함한다. 이미 서술된대로 올리고뉴클레오티드는 (예를 들어, miR-208 패밀리 miRNA의 발현 또는 활성을 억제하도록 디자인된 뉴클레오티드 서열을 가진) miRNA 억제제이다. 따라서, 환자는 miR-208 패밀리 발현과 관련이 있는, 이에 의해 매개된 또는 이로부터 초래한 질환을 가질 수 있다. 이러한 질환은 예를 들어, 심장비대, 심근경색, 심부전(예를 들어, 울혈성 심부전), 혈관 손상, 혈관재협착(restenosis), 또는 병적 심장 섬유증을 포함한다. 따라서, 본 발명은 이러한 질환을 치료하기 위한, 및 이러한 서술된 치료법을 위한 의약을 제조하기 위한 본 발명의 변형된 올리고뉴클레오티드 및 조성물의 용도를 제공한다.

[0073] 특정 실시태양에서, 환자(예를 들어, 인간 환자)는, 예를 들어, 오래된 조절되지 않는 고혈압(long standing uncontrolled hypertension), 고쳐지지 않는 심장판막증(uncorrected valvular disease), 만성 협심증(chronic angina), 새로운 심근경색(recent myocardial infarction), 울형성 심부전, 심장 질병에 대한 선천적인 소인 및 병적 비대증(pathological hypertrophy)을 포함하는 하나 이상의 위험 인자를 가진다. 선택적으로 또는 추가적으로, 환자는 예를 들어, 심장 비대에 대한 유전적 소인을 가진 것으로, 또는 예를 들어, 심장 비대의 가족력을 가지는 것으로 진단될 수 있다.

[0074] 이 양태에서, 본 발명은 심부전 또는 심장 비대를 가진 환자에서 향상된 운동 부하, 감소된 입원 기간, 더 나은 삶의 질, 감소된 이환율 및/또는 감소된 사망률을 제공할 수 있다.

[0075] 특정 실시태양에서, 심장 조직에서 또는 환자 혈청에서 측정된 miR-208a, miR-208b 및/또는 miR-499의 활성은 감소되거나 억제된다.

[0076] 다양한 실시태양에서, 약학적 조성물은 경구 투여에 의해 또는 심장 조직에 직접 주사에 의해 투여된다. 경구 투여는 정맥내, 피하 또는 근육내일 수 있다. 일부 실시태양에서, 조성물은 경구, 경피, 지속된 방출, 제어된 방출, 지연된 방출, 좌약, 카테터 또는 설하 투여에 의해 투여된다. 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드는 25mg/kg 이하의 복용량 또는 10mg/kg 이하의 복용량, 또는 5mg/kg 이하의 복용량으로 투여된다. 이런 실시태양에서, 올리고뉴클레오티드 또는 조성물은 근육내 또는 피하 주사 또는 정맥내로 투여될 수 있다.

[0077] 일부 실시태양에서, 상기 방법은 치료 후 miRNA 억제제의 제거 또는 청소를 더 포함한다. 예를 들어, 억제제에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 가진 올리고뉴클레오티드는 억제제의 기능을 약화 또는 정지시키기 위해 치료 후 투여될 수 있다.

[0078] 실시예

[0079] 실시예 1: miRNA 208 패밀리를 표적화하는 miRNA 억제제의 인비트로 활성

[0080] 한 패널의 miRNA 억제제(단일가닥 올리고뉴클레오티드)를 합성하여 miRNA 208 패밀리(miR-208a, miR-208b 및 miR-499)를 표적화하였다. 서열들과 변형 패턴들은 표 1에 도시된다. 염기 코드의 설명은 표 2에 제공된다. 패널은 11개 뉴클레오티드 내지 16개 뉴클레오티드의 다양한 길이의 역 상보적 억제제를 포함하였다. LNA 변형의 수뿐만 아니라 올리고뉴클레오티드의 LNA 변형의 위치도 변했다.

[0081] 이중-루시페라제 분석 리드아웃을 사용하여 HeLa 세포에서 작은 패널을 최초로 검사하였다. 분석법은 psiCHECK™-2 구조체(Promega)(도 1)를 사용하였다. HeLa 세포는 miR-208 패밀리를 발현하지 않았고; 따라서 상응하는 모방체는 또한 플라스미드에 의해 공동-형질감염되었다.

[0082] 결과는 LNA 패턴들이 miR-208 패밀리 miRNA의 억제제로서 인비트로에서 이질적인 활성을 가진다는 것을 나타낸다. 일부 특히 효과 있는 디자인들이 도 2에 도시된다. 예를 들어, M-10673은 M-10101과 같은 수의 LNA 변형(16개 중 9개)을 가지나, 1nM에서는 더 높은 miR-208a의 억제를 나타내었다. 이런 결과들의 관점에서, 억제제들의 다른 제한된 패널을 합성하고 검사하여, 모두 16개 뉴클레오티드 길이이며 9개 LNA 변형(나머지는 DNA 뉴클레오시드이다)을 가진다. 도 3 내지 5는 miR-208a, miR-208b 및 miR-499(각각)에 대한 이중 루시페라제 보고서에 이런 억제제들의 결과를 도시한다. M-10673은 단지 miR-208a에 대한 억제뿐만 아니라 miR-208b 및 miR-499에 대한 억제를 나타내었다. 16-mer 억제제에서 miR-208a 및 miR-208b 사이에 2개의 미스매치가 있다.

[0083] 그런 후에 억제제 디자인의 더욱 완벽한 패널을 제조하였다. 이런 분자들의 구조는 표 1에 도시된다.

[0084] 실시예 2: miRNA 208 패밀리를 표적화하는 miRNA 억제제의 인비보 활성

[0085] miR-208 패밀리를 표적화하는 3개의 억제제를 합성하고 miR-208a 및 miR-208b 수준에 대한 효과를 일반적인 생쥐에서 검사하였다. 생쥐(n=4)를 저압 꼬리 정맥 주사를 통해 2.5, 10 및 25mg/kg 복용시켰고 miRNA 수준에 대해 qPCR에 의해 4일 후 심장 조직을 분석하였다. 결과(도 6)는 인비트로 이중 루시페라제 결과와 서로 연관되었다. 이런 결과는 치료 효과를 위해 복용량을 적어도 10배(25mpk에서 2.5mpk) 낮추는 것이 가능할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0086] 상기 최초 실험은 miR-208 패밀리 miRNA에 대한 효과를 향상시키는 독특한 LNA-함유 변형 모티프(LNA의 수와 위치 포함)가 존재하는 것을 입증한다.

[0087] M-10101 및 M-10673을 Dahl 염-민감성 쥐 모델에서 검사하였고, 이하에서 기술한다. 도 7 및 8은 M-10101에 의해 최고의 생존 및 체중 제어를 나타낸다.

[0088] 실시예 3: miR-208의 치료적 억제가 심부전 동안 심장 기능과 생존을 개선한다

[0089] 사전에, 심장 특이적 miR-208a의 유전적 결실이 병적 심장 리모델링 및 스트레스에 반응하여 Myh7의 상승 제어를 예방한다는 것이 보고되었다. 이 실시예는 안티센스 올리고뉴클레오티드(표 1로부터의 M-10101)의 전신 전달이 심장에서 효과적이고 지속적인 miR-208a의 사일런싱을 유도한다는 것을 나타낸다. Dahl 고혈압 쥐에서 고혈압-유도 심부전 동안 antimiR-208a의 피하 전달에 의한 miR-208a의 치료적 억제가 병적 미오신 스위칭 및 심장 리모델링을 복용량 의존적으로 예방하는 반면, 심장 기능, 전체 건강 및 생존을 개선한다. 전사적 프로파일링(profiling)은 antimiR-208a가 심장 유전자 발현에 대해 현저한 효과를 유발하는 것을 나타내는 반면, 혈장 분석은 antimiR-208a 치료시에 miRNA의 순환 수준에 현저한 증가를 나타낸다. 이런 연구들은 심장 miRNA를 조절하기 위한 올리고뉴클레오티드-기초 치료의 잠재력을 나타내며 miR-208을 심장 질환 동안 심장 기능 및 리모델링의 조작을 위한 효과 있는 치료 표적으로 실증한다.

[0090] 심장에 대한 만성 및 급성 스트레스는 심근비대, 섬유증, 펌프 고장, 근육세포 변성 및 세포자멸사가 동반되는 병적 리모델링 반응을 초래하며, 심부전과 급사에서 주로 최고조에 달한다(1). 전통적인 약학적 치료 전략이 심부전 환자에서 리모델링을 감소시키고 생존을 연장할 수 있지만, 이런 치료는 질환의 진행을 예방하는데 궁극적으로 효과가 없다. 병적 비대 및 심부전의 특징은 뇌 나트륨 이뇨 인자(ANF), B-타입 나트륨 이뇨 펩티드(BNP) 및 골격 α-액틴 및 Myh7(β-미오신 중사슬, β-MHC)과 같은 수축성 단백질의 치명적 아이소형을 암호화하는 것을 포함하는 한 세트의 치명적 심장 유전자의 재활성화이다(2). Myh6(α-MHC)의 하강 조절 및 Myh7의 상승 조절은 종들과 무관한 심장 손상에 대한 공통 반응이다(3-5). Myh6 대 Myh7의 비율에서 비교적 적은 증가는 인간과 설치류에서 심장 수축성 및 성능에 대한 유익한 효과를 갖는 것으로 나타났다(6-8). 이런 과정들을 치료적으로 모방하기 위해 효과적인 접근들에 찾기 위해 심장 리모델링 및 미오신 스위칭을 조절하는 메커니즘을 이해하는데 많은 주의가 집중되었다.

[0091] 사전에, 심장 질환의 인간 및 생쥐 모델에서 병적 심장비대, 심부전 및 심근경색과 관련되었던 microRNAs(miRNAs)의 신호 발현 패턴을 확인하였다(9-10). 생쥐에서 기능의 증가 및 손실 연구는 심근 성장, 수축성, 섬유증 및 혈관신생의 제어를 포함하는 심장 생물학의 여러 양상에서 이런 miRNA의 심오하고 예상치못한 기능을 발견하였다(11에서 검토). 특히 심장 스트레스 반응을 조절하는 Myh6 유전자의 인트론 내에 암호화된 miRNA인 miR-208이 흥미를 끈다(12-13). 비록 생쥐에서 miR-208의 유전적 결실이 여러 형태의 심장 스트레스에 반응하여 기준선에서 명백한 표현형을 유도하는데 실패하였지만, miR-208 널 생쥐(null mice)는 심근비대 또는 섬유증을 거의 나타내지 않았고 Myh7 발현을 상승 조절할 수 없었다(12).

[0092] 성인 심장에서, miR-208은 Myh7의 발현뿐만 아니라 밀접하게 관련된 미오신 아이소형, Myh7b의 발현에 필수적이다(14). 현저하게는, 이런 유전자들의 모두는 느린 미오신을 암호화하고 인트론성 miRNA(각각 miR-208b 및 miR-499)을 함유한다(15-16). miR-208(miR-208a로 부를 것이다), -208b 및 miR-499는 미오신 유전자들로부터 발생하는 관련 miRNA이기 때문에, 일괄해서 myomiR로 부른다(17). 생쥐에서 기능의 증가 및 손실 실험을 통해서, miR-208a의 유전적 결실이 성인 심장 내의 Myh7b/miR-499 발현을 복용량 의존적으로 감소시킨다는 것을 나타내었다(18). miR-499 돌연변이 동물들은 스트레스에 반응하여 Myh7 발현 또는 심장 리모델링에 대한 효과를 나타내지 않으며 miR-499의 재주입은 miR-208a 돌연변이 생쥐에서 보인 심장 효과를 제거하기 때문에, miR-208a 및 miR-499에서 혼합된 감소는 miR-208a 돌연변이 동물에서 보인 심장보호 효과에 원인이 된다고 결론내렸다.

[0093] 심장 기능 및 기능 장애에 대한 miRNA의 중요성은 심장 질환의 환경에서 miRNA의 생물학을 치료적으로 활용할 기회들을 나타낸다. 단일 가닥 RNA 올리고뉴클레오티드는 상보적 염기 짝짓기를 통해 인비보로 miRNA의 불활성화하는데 효과적인 것으로 보였고(19-23) 병적 miRNA의 불활성화의 잠재적으로 효과적인 수단을 나타낸다. 본 발명에서 miR-208a에 대항하는 컨쥬케이트되지 않은, 잠금 핵산(LNA)-변형 안티센스 올리고뉴클레오티드의 전신 전달은 심장에서 miR-208a의 특이적이고, 효과적이고 지속적인 사일런싱을 유도하는데 충분하다는 것을 나타내었다. 또한, antimiR-208a는 스트레스-유도 리모델링, 기능 악화 및 심장 미오신 스위칭을 복용량 의존적으로 예방하는 반면, 심부전의 쥐 모델(Dahl 염-민감성 쥐)에서 전체적 건강 및 생존을 개선한다. 유전 발현 분석은 사전에 정의한 표적 유전자들의 변화를 포함하는, antimiR-208a에 반응하여 특이적 유전자 발현 변화를 나타내었다. 흥미롭게도, 고혈압 쥐에서 antimiR-208a의 생리학적 효과들은 순환하는 miRNA의 혈장 수준의 현저한 변화에 의해 반영된다. 전체적으로, 이런 연구들은 심장 질환의 환경에서 전신으로 전달된 antimiR의 효과를 나타내며 miR-208을 심장 질환 동안 중요한 치료제로서 실증한다.

[0094] 인비보 miR-208a의 antimiR 매개 사일런싱

[0095] 심근세포에서 miR-208a 억제의 치료 효과를 인비보를 측정하기 위해서, miR-208a에 대항하는 컨쥬케이트되지 않은 LNA-함유 antimiR(표 2의 antimiR-208a, M-10101)을 디자인하였다. antimiR-208a는 성숙한 miR-208a의 5'영역의 염기 2-17을 표적화하고 포스포로티오에이트 결합에 의해 결합된 LNA 및 DNA의 조합을 함유한다. 0.1 내지 33mg/kg의 복용량으로 생쥐에게 antimiR-208a의 정맥(i.v.) 전달 1주 후 실시간 PCR 및 노던 블럿 분석은 miR-208a의 복용량 반응 사일런싱을 나타내는 반면, 유사한 화학적 성질의 미스매치 antimiR의 주입은 miR-208a의 억제를 나타내지 않았다(도 12). 명백하게, 16 mer LNA antimiR의 존재하에서 miR-208의 상향 이동을 관찰하였고, 이는 miR-208a와 LNA antimiR 사이의 안정한 헤테로듀플렉스(heteroduplex)의 형성을 반영한다. 다른 두 myomiR, miR-208b 및 miR-499의 실시간 분석은 단일 주사 7일 후 억제를 나타내지 않았고 Myh7의 어떠한 변화도 관찰하지 못했다(데이터 도시되지 않음).

[0096] 다른 투여 경로를 통해 antimiR-208a를 전달하는 효과를 조사하기 위해서, 생쥐에게 25mg/kg antimiR-208a를 복강(i.p.) 또는 피하(s.c.)로 주사하고 1, 4, 7 및 14일에 miR-208a 억제를 측정하였다. 모든 3개의 투여 경로는 강한 miR-208a의 억제를 나타내었고(도 13), 다른 전달 방법들 사이에 혈장, 심장, 간 및 신장에서 antimiR-208a 탐지에 현저한 차이가 없었다(도시되지 않음).

[0097] 확장된 miR-208a 억제는 인비보 Myh7 조절을 유도한다

[0098] 7일 후 antimiR-208a의 단일 복용은 miR-208a 낙아웃(knockout) 생쥐에서 본 것과 같이, Myh7에 대한 효과를 입증할 수 없기 때문에, antimiR-208a 투여 후 효율적인 Myh7 조절에 필요한 복용량과 시간을 측정하기 시작했다. 33mg/kg antimiR-208a의 3회 연속적 복용량은 적어도 6주 동안 miR-208a를 강하게 억제하였다(도 14). miR-208에 의해 조절될 것으로 알려진 miR-499(18)는 antimiR-208a의 투여 1 내지 6주 후 발현의 시간 의존성 감소를 나타내었고, miR-499의 35 내지 75%의 감소이다(도 14a). 게다가, *Myh7* mRNA 발현은 antimiR-208a 치료 4주부터 시작하여 현저하게 감소되었고, antimiR-208a 및 miR-499 수준의 특정 임계값이 *Myh7* 발현에 필수적이며(도 14b), 이는 Myh7 단백질의 감소와 일치하였다(도 14c). antimiR-208a에 반응하여 *Myh7* mRNA에서 최초 스파이크(spike)는 증가된 Myh7 단백질로 번역되지 않았다.

[0099] Myh7 발현에 대한 효과가 miR-208a 및 miR-499의 감소를 기초로 하는 지를 입증하기 위해서, 생쥐에게 antimiR-208a 및 antimiR-499의 칵테일로 연속해서 3일 동안 33mg/kg 주사하였다. antimiR-208a/-499에 의한 치료가 6주 동안 miR-208a 및 miR-499의 강한 억제를 일으켰고 Myh7 mRNA 및 단백질의 훨씬 더 빠른 조절을 나타내었고, 치료 후 2주 전에 발현이 감소되었다(도 14a-c). 심장, 간, 신장 및 혈장에서 antimiR-208a를 정량하기 위해 샌드위치 혼성화 분석법을 사용하는 antimiR 분포 데이터는 상당량의 antimR-208a가 33mg/kg 또는 3 x 33mg/kg의 antimiR-208a의 투여 6주 후에도 여전히 탐지될 수 있다는 것을 나타내었다(도 15).

[0100] miR-208의 치료적 사일런싱은 심장 리모델링을 감소시키는 반면, 심부전 동안 심장 기능과 생존을 개선한다

[0101] 이전 데이터는 miR-208a의 유전적 결실이 심장보호 효과를 초래한다는 것을 나타내었기 때문에, miR-208a 억제의 치료적 적절함을 검사하는 것을 목표로 하였다. 이를 위해서, 8주령에서 시작하여 저염(LS) 식사(0.25% NaCl) 또는 고염(HS) 식사(8.0% NaCl)를 먹인 Dahl 염-민감성 쥐를 사용하였다. HS 식사 1주 후, 생쥐들에 식염수, 25mg/kg antimiR-208a 또는 25mg/kg 뒤섞은 대조군 올리고를 2주마다 피하로 투여하였다. HS 식사 3-4주 후, 식염수 및 대조군 처리된 동물들은 부동성과 불안 및 죽음의 현저한 신호를 나타내는 반면, antimiR-208a의 피하 전달은 이런 증상들을 현저하게 완화할 수 있었다(도 16). 건강의 지표로서, 연구 기간 동안 체중을 관찰

하였다. 식염수 또는 대조군 올리고로 주사된 HS 식사를 한 Dahl 쥐들은 LS 식사 대조군과 비교하여 체중 증가에 현저한 감소를 나타내었다. 그러나 HS/antimiR-208a 처리된 쥐는 현저한 체중 증가를 나타내었다(도 16b). antimiR-208a 처리된 동물들이 적은 8% HS 식사를 섭취하여 체중을 유지하였다는 가능성을 배제하기 위해서, 음식 섭취를 관찰하였고, 모든 HS 식사를 한 그룹들 사이에 필적할만한 섭취를 나타내었다(도시되지 않음).

[0102] antimiR-208a에 반응하여 나타난 보호 효과에 대한 추가적인 통찰을 얻기 위해서, 9주 동안 4.0% NaCl 식사를 사용하여 후속 연구들을 실시하였고, 연구 동안 쥐들은 식염수, 5 또는 25mg/kg의 antimiR-208a 또는 25mg/kg의 antimiR 대조군을 2주마다 섭취하였다. 체중 분석은 HS 식사를 한 Dahl 쥐는 LS 식사 대조군과 비교하여 체중 증가에 현저한 감소를 나타낸 반면, HS/antimiR-208a 처리된 쥐들은 체중 증가에 이들의 증가를 유지하였다(도 17a). antimiR-208a 처리된 Dahl 쥐들의 심장 초음파 검사를 사용하는 기능성 평가는 심이완 기능의 측정에서 복용량 의존적이고, 현저한 개선을 나타내었다. antimiR-208a 처리된 쥐들은 HS/식염수 대조군과 비교하여 등용적 이완 시간(isovolumic relaxation time)(IVRT)에 현저한 감소뿐만 아니라 HS 식사 8주 후 HS/식염수 대조군과 비교하여 승모판막 초기 대 활성 충전 속도 비율(MV E/A)의 정규화를 나타내었다(17b). 심근세포 크기의 정량화는 antimiR-208a에 의한 치료 후 심근비대에 현저한 감소를 나타내었다(도 18a, b). 추가로, antimiR-208a 치료는 피크로시리우스 레드 염색의 정량화에 의해 평가한 대로 HS 식사에 의해 유도된 동맥주위 섬유증을 감소시켰다(도 18a, b).

[0103] miR-208a 억제는 심부전 동안 미오신 스위치를 역전시킨다

[0104] antimiR-208a 치료 후 관찰된 생리학적 변화들과 분자 및 세포 변화들을 비교하기 위해서, HS 치료 후 myomiR 발현을 검사하였다. antimiR-208a는 마지막 주사 2주 후 좌심실 및 우심실 모두에서 miR-208a의 복용량 의존성 억제를 유발한 반면, 대조군 올리고는 식염수와 비교하여 차이를 보이지 않았다(도 19a, 왼쪽 패널). miR-499는 또한 miR-208a의 지속적인 억제 이후 발현에서 복용량 의존성 감소를 나타내었다(도 19a, 중간 패널). miR-208b는 HS/식염수 및 HS/대조군 치료 동물들 모두에서 유도되었으나, antimiR-208a 치료는 miR-208b 수준에서 복용량-의존성 감소를 초래하였다(도 19a, 오른쪽 패널). miR-499 및 miR-208b의 이런 조절은 노던 블럿 분석에 의해 확인하였다(도 19b).

[0105] 숙주 유전자들의 조절을 평가하기 위해서, *Myh6*, *Myh7*, 및 *Myh7b* mRNA 수준을 검사하였다. *Myh7*은 HS/식염수 및 HS/대조군 그룹 모두에서 HS에 반응하여 현저하게 증가하였다. 이런 증가는 antimiR-208a에 반응하여 복용량 의존적으로 약해졌다. 또한, antimiR-208a 치료는 HS/식염수 및 HS/대조군 그룹 모두에서 관찰된 *Myh6* mRNA의 감소된 발현을 정규화하였다(도 20a). *Myh7b*의 발현은 miR-499 수준을 반영하였고, antimiR-208a 치료시에 복용량 의존성 감소를 나타내었다. 또한, Myh7의 복용량 의존성 조절은 웨스턴 블럿에 의해 확인하였다(도 20b).

[0106] antimiR-208a는 심전도 또는 독성의 신호의 변화를 유도하지 않는다

[0107] miR-208a의 유전적 결실은 생존 능력에 영향을 주지 않거나 외부 형태적 심장 결함을 유발하지 않는 반면, 이전 보고서는 miR-208a가 적절한 심장 전기생리학에 필요할 수 있다고 언급하였다. 비록 miR-208 낙아웃 동물들에서 어떠한 명백한 이상도 관찰하지 못했지만, antimiR-208a 치료가 심전도 효과를 초래하는지를 확인하기 위해서, 야생형 생쥐 및 질환이 있는 쥐 모두에서 ECG를 측정하였다. 두 종들은 장기간의 시간 동안 antimiR-208a 치료 후 적절한 심장 전기생리학을 나타내었다(도시되지 않음).

[0108] 투여 경로와 무관하게, 모든 생쥐와 쥐는 활동 수준 및 연구 동안 돌봄에 의해 측정한 대로, antimiR-208a 또는 대조군 올리고를 잘 견뎠고 정상적인 행동을 보였다. 식염수와 비교하여, antimiR-208a 또는 대조군 올리고는 복용 6주 후까지 심장, 신장, 간, 폐 또는 비장을 포함하는 신체 또는 다른 조직 체중에 기준선 변화를 유도하지 않았다(도시되지 않음). antimiR-208a 또는 대조군 올리고 치료는 쥐들에서 알라닌 아미노트렌스페라제(ALT) 및 아스파르테이트 아미노트랜스페라제(AST) 간 효소들의 혈청 수준을 변화시키지 않았고, 이는 올리고뉴클레오티드는 어떠한 명백한 간 독성을 유도하지 않는다는 것을 암시한다.

[0109] antimiR-208a는 특이적 유전자 발현 변화를 유도한다

[0110] 유전자 발현 변화에 대한 miR-208a 억제의 효과를 입증하기 위해서, 식염수, antimiR-208a 또는 대조군 올리고로 주사된 HS 식사를 한 Dahl 쥐에 대해 마이크로어레이 분석을 실행하였다. 대조군 올리고 처리된 동물들과 비교하여, antimiR-208a 처리된 동물들은 131개 유전자들이 현저하게 변한 것을 나타내었다. 단지 15개 유전자(67%의 가짜 양성 발견 비율을 가짐)가 식염수 및 대조군 올리고 주사된 동물들 사이에 현저하게 달랐고, 이는 올리고뉴클레오티드 화학적 성질 자체에 의한 유전자 발현에 대한 효과 없음을 나타내었다. 열 지도에서 시각적으로 입증된 것과 같이, 대조군 올리고 및 antimiR-208a 처리된 심장들 사이의 131개 현저하게 변화된 유전자들

의 발현의 계층적 군집(hierarchical clustering)은 antimiR-208a 치료 이후 상승- 및 하강-조절된 유전자들의 강한 군집을 나타내었고, 대조군 올리고 치료 이후 유전자 발현 반응이 없다는 것을 실증하였다(도시되지 않음). 유전자 어레이 분석은 대조군 올리고와 비교되어 antimiR-208a에 반응하여 Myh7 및 Myh7b의 현저한 하강 조절을 확인하였고(각각 -1.31, p=0.005 및 -2.38, p=0.037), 사전에 특징화된 표적인 Thrap1은 증가하였다(1.56, p=0.49). 어레이 상에서 탐지된 13518개 유전자 중에서, 289개 유전자가 miR-208 표적일 될 것으로 생물정보학적으로 예상하였다. 예상된 표적들 중에서, 28개 유전자가 마이크로어레이에 의해 antimiR-208 치료로 증가된 발현을 나타내었고, 이의 여러 개가 실시간 PCR에 의해 확인되었다(도시되지 않음). 유전자 발현 분석은 8주 동안 식염수, antimiR-208a 또는 대조군 올리고로 처리된 Dahl 고혈압 쥐들로부터의 심장 샘플들에 대해 실행하였기 때문에, 유전자 발현 변화의 나머지는 miR-208a 억제의 직접적 유전자 조절 효과에 보조적일 수 있다고 추측했다.

[0111] 쥐 게놈에 대한 antimiR 서열의 BLAST 분석은 antimiR-208a의 서열이 4개의 코팅 서열들에 대해 밀접한 상동성(적어도 14개 염기의 상보성)을 보이는 것을 나타내었다; 그러나 이런 유전자들 중 어떤 것도 마이크로어레이 분석에 의해 측정된 대로 조절되지 않았다. 종합적으로 이런 분석은 LNA-변형 올리고들이 화학적 성질 분류에 의해 유도된 어떠한 유전자 발현 변화들 없이 miR-208a를 표적화하는데 매우 특이적이라는 것을 나타낸다.

[0112] miR-499는 antimiR-208a 효율에 대한 혈장 바이오마커이다

[0113] 다양한 질환 상태 동안 혈장에서 miRNA의 탐지는 증가하는 진단 징후를 나타내고 있다. antimiR-208a 효율과 연관이 있는 특이적 miRNA가 존재하는지를 측정하기 위해서, HS 치료 동안 근육 관련 miRNA의 한 패널을 조사하였다. miR-1 및 -133과 같은 여러 근육 특이적 miRNA는 검사된 그룹들 사이에 현저한 차이를 나타내지 않았다(도시되지 않음). 인상적인 것은, 비록 높은 염 하에서 혈장 탐지에 많지 않은 증가를 단지 나타내는 miR-499는 antimiR-208a 처리된 동물들에서 현저하게 감소되었고, miR-499는 antimiR-208a 효율에 대한 혈장 기초 마커로서 작용할 수 있다. 또한, 혈장 수준이 인간 심부전과 사전에 관련이 있었던(24) miR-423-5p는 antimiR-208a로 치료된 동물들에서 감소한 것으로 발견되었다.

[0114] 검토

[0115] 본 발명에 제공된 데이터는 miR-208의 치료적 억제가 심장 리모델링에서 깊은 감소를 유도하며, 이는 심장 질환 동안 생존 및 심장 기능에서 현저한 개선과 일치한다.

[0116] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 miRNA를 인비보로 효율적으로 침묵시키는데 사용될 수 있다(19-23). 이런 antimiR은 인비보 안정성, 특이성 및 관심 miRNA에 대한 높은 결합 친화력을 보증하도록 화학적으로 변형된다. LNA는 올리고뉴클레오티드와 열역학적으로 강한 듀플렉스 형성을 유도하면서 상보성 RNA 또는 DNA 올리고뉴클레오티드에 대한 특이성을 향상시키는 핵산 변형이다(19-20). 높은 결합 친화력의 결과로서, LNA-변형 antimiR에 대한 생물학적 활성은 더 짧은 올리고뉴클레오티드(8-16개 염기)에 의해 얻어진다(25). 최근에, 설치류 및 비-인간 영장류에서 치료적 응용가능성이 보고되었고, 컨쥬게이트되지 않은 LNA-antimiR의 전신 전달이 간-발현 miR-122를 효과적으로 상쇄하여 만성적으로 감염된 챔팬지에서 C형 간염 바이러스-유도 간 병변에 개선을 유도하였다(23).

[0117] 현재 연구에서 주요한 발견은 LNA-변형 올리고뉴클레오티드의 전신 전달이 심장에서 miR-208의 효과적이고 지속된 사일런싱을 유도하는데 효과적이라는 것이다. antimiR-208a의 전신 전달시에 지속된 miR-208a 억제 및 밀접하게 관련된 miR-208b에 대한 효과의 부존재는 인비보 안정성과 특이성을 나타낸다. 조만간 지속된 miR-208a 사일런싱 및 하부 Myh7 조절을 기초로, antimiR-208a는 Myh6 전사에 의해 생산되는 miR-208a의 모든 새로 형성된 복사물을 침묵시키기 위해 심장 세포들에 축적될 가능성이 있다. 이런 효과는 심근세포들의 턴오버(turnover)의 전체적인 부족에 의해 추가로 강화될 수 있어서, antimiR로 표적화되는 세포들의 비율에 증가에 의한 희석을 예방할 수 있다.

[0118] 비록 직접 표적들에 대한 miRNA의 유전자 조절 효과들이 상당히 즉각적이지만, miR-208a 억제는 Myh7b 및 Mhy7 발현에 대한 효과를 나타내기 전에 몇 주를 필요로 한다. 하부 생물학적 효과의 지연은 여러 직접 및 간접 표적 유전자들의 발현에서 변형의 필요 때문이라고 가정하며 이들의 혼합된 효과들은 변화를 유도하는데 필요하다. miR-122 억제에 반응하여 필적할만한 현상이 관찰되었고, 이것이 antimiR 치료 몇 주 후에 혈장 콜레스테롤의 저하를 유도하는 반면 유전자 발현 변화는 즉각적이었다(19-20). 그럼에도 불구하고, Myh7b 및 Myh7 발현에 대한 효과는 miR-208 유전적 결실에서 나타난 효과를 표현형모사하며(12), 이는 miR-208a가 효과적으로 침묵된다는 것을 나타낸다.

[0119] Dahl 고혈압 쥐에서 antimiR-208a의 치료적 효과는 피하 전달이 antimiR을 심장에 인비보로 효과적으로 전달하는데 충분하며 miR-208a 억제가 심장 질환 동안 심장 리모델링, 기능 저하 및 사망을 예방한다는 강한 증거를 제공한다. 비록 이런 효과들이 단지 miR-208a 억제에 의한 심근세포에 대한 효과로부터 발생하는지 또는 현재 알려지지 않은 miR-208a 억제에 반응하는 추가-심장 효과가 있는지 불분명하지만, 대조군 화학물질로 처리된 동물들에서 복용량 반응성 및 효과의 부존재는 관찰된 효과들이 miR-208a 수준의 저하 때문이라는 것을 강하게 암시한다. 진행중인 실험들은 이런 치료적 이득이 심부전의 여러 모델에서 설정될 수 있는지 및 유사하게 miR-208a와 miR-499에 대한 혼합된 antimiR 복용이 더욱 빠른 관찰된 효과들을 설명할 것인지를 나타낼 것이다. 초기 설치류 데이터는 매우 고무적인 것으로 보이고 antimiR 치료시 나쁜 부작용도 관찰되지 않았지만, 다양한 환경에서 이런 물질들의 장기간 안정성을 측정하기 위해 광범위한 분석이 필요할 것이다.

[0120] 최근에, miRNA를 인간과 동물의 혈청과 혈장에서 탐지하였고, 심장 질환을 포함하는 다양한 질환의 진단 바이오마커로서 miRNA를 사용하는 가능성을 열었다(24, 26-28). 혈장 miRNA 분석은 여러 다른 miRNA 변화 이외에, antimiR-208a 치료는 혈액 혈청에서 miR-499의 감소된 탐지를 초래하며, 이는 antimiR-208a 치료에 반응하여 Myh7b/miR-499의 심장 발현의 감소에 필적한다. 심장 및 혈장계 miR-499 수준 및 antimiR-208a의 효율 사이의 상관관계를 고려하면, 이런 데이터는 환자들에게 이동할 때 혈장 miR-499 수준이 심장으로의 antimiR-208a의 효과적인 전달의 바이오마커로 작용할 수 있다는 것을 암시한다.

[0121] 미오신 및 후속 myomiR 발현은 종들 사이에 현저하게 차이가 난다. Myh6/miR-208a는 작은 설치류들의 심장들에서 지배적인 미오신/myomiR 아이소형인 반면, 큰 포유류들은 더 많은 Myh7/miR208b를 발현한다(17). miR-208a 및 208b는 겹치는 씨드 서열을 가지는 반면, 이들은 이들의 3' 영역에서 3개 염기가 다르다. 큰 포유류에서 후속 약물동역학적 및 효율 연구는 miR-208a, miR-208b 또는 두 miR-208 아이소형의 억제가 큰 종들에서 필적할만한 치료 효과를 나타내는데 필요한지를 입증하는데 필요할 것이다. 또한, miR-208 억제의 치료적 사용은 심부전 환자들의 현재 표준 간호와의 조합 치료일 것이기 때문에, 이런 현재 치료들과 함께, antimiR-208a가 이런 약물의 유익한 효과를 증가시키는지를 평가하는 것이 중요할 것이다.

[0122] 종합적으로, 이 연구는 LNA-계 antimiR의 피하 전달이 심장을 효과적으로 표적화할 수 있고, 심장 질환 동안 miR-208a을 표적으로서 추가로 실증한다는 것을 입증한다.

[0123] 방법

[0124] **동물 절차.** 모든 동물 프로토콜을 miRagen Therapeutics, Inc의 공공 동물 관리 및 사용 위원회에 의해 승인받았다.

[0125] **LNA-변형 antimiR의 동물 및 전달.** LNA-antimiR 올리고뉴클레오티드를 성숙한 miR-208a 서열의 5' 영역에 완벽하게 상보적인 컨쥬케이트되지 않고 완전히 포스포로티올레이트된 올리고뉴클레오티드로, miRagen Therapeutics, Inc에서 합성하였다. LNA 대조군 올리고뉴클레오티드는 *C. elegans* 특이적 miRNA에 대항하는 서열로 이루어진다. 달리 나타내지 않는 한, 올리고뉴클레오티드 화학물질의 인비보 전달은 어른 수컷 C56B16 생쥐 또는 어른 수컷 Dahl 염-민감성 쥐의 꼬리 정맥을 통한 저압 정맥(i.v.) 주사에 의해 이루어졌다(Harlan, Indianapolis). 모든 화학물질들을 필적할만한 최종 부피의 식염수에 용해하고 주입하였고 그 후 동물들을 화학물질들의 명백한 부작용들에 대해 검사하였다. 조직 샘플들을 분자 또는 조직학 검사를 위한 지정된 시점에 수집하였다. Dahl 쥐를 8주령에 0.25 NaCl를 유지하거나 4% 또는 8% NaCl 식사를 제공하였다(Harlan, Indianapolis).

[0126] **정량적 실시간 PCR 분석.** 인비보 실시간 PCR 분석을 위해서, RNA를 Trizol(Invitrogen)을 사용하여 심장 조직으로부터 추출하였고 그 후 제조사 지시(Invitrogen)에 따라 슈퍼 스크립트 II 역전사효소를 사용하여 각 조직 샘플로부터의 2㎍ RNA를 사용하여 cDNA를 생성하였다. miR-208의 수준을 탐지하기 위해서, 제조사 권고에 따라, 10-100ng의 전체 RNA를 사용하여, Taqman MicroRNA 어레이(Applied Biosystems, ABI)를 사용하여 RT-PCR을 실행하였다. 유전자들의 서브세트의 발현을 ABI로부터 구입한 Taqman 프로브들을 사용하여 정량적 실시간 PCR로 분석하였다.

[0127] **노던 블럿 분석.** 전체 RNA를 Trizol 시약(Gibco/BRL)을 사용함으로써 심장 조직 샘플들로부터 분리하였다. microRNA를 탐지하는 노던 블럿을 사전에 기술한 대로 실행하였다. U6 프로브를 로딩 대조군(IDT)으로 사용하였다. 심근세포 또는 심장 조직으로부터의 10㎍의 전체 RNA를 20% 아크릴아마이드 변형 겔 상에 적재하고 전기영동에 의해 제타-프로브 GT 게놈 블로팅 막(Bio-Rad)에 옮겼다. 이동 후, 블럿들을 가교하고 1시간 동안 80℃에서 구웠다. miRNA 탐지의 민감성을 최대화하기 위해, 올리고뉴클레오티드 프로브들을 스타파이어 올리고 키트

(IDT, Coralville, IA) 및 α-^{32}P dATP(Amersham 또는 Perkin Elmer)로 표지화하였다. 프로브들을 라피트-hyb 버퍼(Rapid-hyb buffer)(Amersham)에서 39℃로 밤새 막에 혼성화하였고, 그 후 이들을 0.1% SDS를 함유하는 0.5 x SSC로 39℃에서 10분 동안 2회 세척하였다. 블럿들을 노출하고 포스퍼이미져 분석(PhosphorImager analysis)(GE HealthCare Life Sciences)으로 정량화하였고 U6 프로브를 로딩 대조군으로 사용하였다(ABI). 포스퍼이미져 및 이미지퀀트(Bio-Rad)를 사용하여 발현에서 배수 변화를 정량화하는데 방사성 신호의 강도를 사용하였다.

[0128] **웨스턴 블럿 분석.** 웨스턴 블럿 분석을 위해서, 기술한 대로 심장 세포들 또는 조직으로부터 미오신을 추출하였다(29). MHC 아이소폼을 4-15% 구배 겔 상에 0.1㎍ 단백질 용해물을 적재함으로써 탐지하고 SDS PAGE에 의해 분리하였고 Myh7에 매우 특이적인 생쥐 단클론 안티-미오신(느린, 골격 M8421)(Sigma, MO)으로 웨스턴 블로팅을 실시하였다.

[0129] **체내분포 분석(Biodistribution assay).** 혈장 및 조직 샘플들에서 antimiR-208a의 정량화를 위해 샌드위치 혼성화 분석법을 사용하였다. 혼성화 분석법을 위한 프로브들을 2'Ome 및 LNA 변형 뉴클레오티드를 사용하여 합성하였고 다음이다: bTEG-mU;lA;mA;lG;mA;lC;mG (캡쳐 프로브) 및 mA;lG;mC;lA;mA;lA;mA;lA;mG-6FAM (탐지 프로브). 안티-형광-POD, Fab 단편(Roche) 및 TMB 퍼옥시다아제 기질(KPL)을 사용하여 탐지를 실행하였다. 4개 변수를 가진 비-직선 로그 회귀분석을 사용하여 표준곡선들을 형성하였다(4-PL). 분석의 작업 농도 범위는 2-536ng/ml이었다. 6.0의 속도 세팅으로 MP FastPre-24를 사용하여 2x30초 동안 3M GITC 버퍼(3M 구아디닌 아이소티오시아네이트, 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris pH 7.5, 10 mM EDTA)에서 균질화함으로써 100mg/ml로 조직 샘플들을 제조하였다. 혈장 샘플들과 조직 호모지네이트(homogenate)를 검사를 위해 1M GITC 버퍼(1M 구아디닌 아이소티오시아네이트, 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris pH 7.5, 10 mM EDTA)에서 최소 50배 희석하였다.

[0130] **심장초음파검사.** 심장 기능을 30MHz 변환기를 가진 비쥬얼 소닉 울트라사운드 시스템을 사용하여 진정된 쥐들(2-2.5% 아이소플루레인)에 대해 2차원 경흉부 초음파검사로 평가하였다. 심장을 유두근의 높이에서 흉골연단축 단면도(parasternal short axis view)로 이미지화하여, M-모드 측정을 기록하고, 심박, 벽 두께 및 확장 말기 및 수축 말기 치수를 측정하였다. (확장 말기 치수 - 확장 말기 치수에 대해 정규화된 수축 말기 치수로 정의된) 분획 단축율(Fractional shortening)을 심장 수축 기능의 지표로서 사용하였다. E/A 비율, 등량성 이완 시간 및 E 파도 속도의 감속 시간을 측정하기 위해 확장 기능을 심첨 4강 단면(apical 4 chamber view)으로부터의 경승모판 혈류 도플러(trans-mitral flow Doppler)를 사용하여 평가하였다.

[0131] **표면 ECG 측정.** 200mL/min O_2에서 2% 아이소플루레인으로 생쥐를 마취하였고 노즈콘을 통해 500mL/min 흡입 공기에서 2% 아이소플루레인으로 쥐를 마취하였다. 생쥐 및 쥐에 대한 신체 온도를 호메오써믹 워밍 시스템(Homeothermic Warming System)(Kent Scientific) 또는 히트 램프 및 워밍 플랫폼(warming platform) (Visual Sonics)을 통해 37° - 38℃로 유지하였다. 피하 바늘 전극 및 1KHz에서 샘플링하는 아이오릭스 데이터 취득 시스템을 사용하여 10분 동안 납 II 심전도를 기록하였다. 램스크라이브 소프트웨어(Labscribe software)(Iworx)를 사용하여, 2, 4, 6, 8 및 10분 후 트레이싱을 분석하였고 정상동박동(normal sinus rhythm)에 대해 검사하였고; 컴퓨터화된 기술을 사용하여 각 시점에서 대략 40비트를 분석하여 신호 간격을 정량화하였다(HR, PR, QRS, QT 및 QTc).

[0132] **조직학.** 4% 파라포름알데하이드에 고정된 크렙스-헨셀헤이트 용액에 조직학에 사용된 조직들을 배양하고, 분할하고, 표준 기술에 의해 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 및 피크로시리우스 레드 염색 또는 인시츄(in situ) 혼성화를 위해 처리하였다(30). 동물당 대략 100개 심근세포의 단면 이미지를 H&E 염색 부분으로부터 캡쳐하였다. 심근세포 단면 지역들을 이미지-프로 플러스 소프트웨어로 측정하였고 각 동물에 대한 평균을 측정하였다. 혈관주위 섬유증(Perivascular fibrosis) 이미지를 각 동물로부터의 피크로시리우스 적색 염색 부분으로부터의 외부, 중간 및 내부 심장 영역으로부터 얻었다. 이미지-프로 플러스 소프트웨어를 사용하여 혈관 주위 섬유증을 포함하는 전체 혈관벽 면적을 측정하였다. 내강면적(luminal area)을 전체 혈관벽 면적으로부터 뺐다. 색 분할을 통해 혈관 주위 섬유증을 측정하였고 전체 혈관벽 면적의 %로 기록하였다.

[0133] **유전자 발현 분석.** 서비스 제공자(Expression Analysis, Durham, NC)에 의해 마이크로어레이 프로파일링이 Illumina RatRef-12 BeadChip 어레이 상에서 실행되었다. 전체 RNA를 상기한 대로 심장 조직으로부터 분리하였다. 다른 유전자 발현의 분석이 PADE(Permutation Analysis of Differential Expression)를 사용하여 서비스 제공자에 의해 실행되었다. 유전자 프로브가 모든 12 어레이에서 p-값 ≤ 0.05를 갖지 않는 경우를 주목하고, 유전자를 후속 분석으로부터 생략한다. 서비스 제공자에 의해 차등 발현 그래프가 제공되었다. 유전자 클러스터링을 클러스터 3.0을 사용하여 실행하였고 자바 트리뷰에서 히트 맵 이미지를 생성하였다. www.pantherdb.org에

서 발견된 온라인 도구를 사용하여 유전자 온톨로지(Gene ontology)를 실행하였다. targetscan.org(TargetScan), pictar.mdc-berlin.de(Pictar) 및 microrna.org(miRanda)를 사용하여 쥐에서 예측된 miR-208 유전자 표적들을 발견하였다. miRanda에 의해 예측된 모든 유전자 표적들 중에서, -0.1<의 mirsvr 범위를 가진 것들만 분석에 포함시켰다. miR-208 표적들의 확인을 위해서, ≤ 0.05의 차등 발현에 대한 p-값 컷-오프를 사용하였다.

[0134] **혈장으로부터의 정량적 실시간 PCR 분석.** 혈장 샘플들로부터의 RNA를 제조사의 프로토콜을 사용하여, Trizol LS 시약(Invitrogen)을 사용하여 분리하였다. RNA 분리 이전에, 250pmol의 두 상이한 합성 C.elegans miRNA 서열들을 첨가하여 표적 miRNA의 정규화를 위한 내부 대조군으로 사용하였다. 사용된 C.elegans 서열들은 cel-miR-2 (UAUCACAGCCAGCUUUGAUGUGC (SEQ ID NO:92)), 및 cel-lin-4 (UCCCUGAGACCUCAAGUGUGA (SEQ ID NO:93)) (Dharmacon)이었다. 최종 RNA 펠렛을 최초 혈장 부피와 동일한 최종 부피에 재현탁하였고 상기한 대로, 5㎕을 후속 RT-PCR 반응에 사용하였다.

[0135] **통계적 분석.** 원-웨이 ANOVA 및 뉴만-켈루스 다중 검사 후 비교를 사용하여 유의성을 측정하였다. P <0.05는 통계적으로 유의성이 있는 것으로 생각된다.

[0136] 실시예 4: 비-인간 영장류에서 억제제 복용

[0137] antimir 10101 및 10707을 복재정맥류(saphenous vein)에 의해 아프리카 녹색 원숭이(~3kg)에게 3회 25mg/kg의 복용량으로 투여하였다. 4주 후 조직을 수집하고 억제제에 대해 평가하였다. 결과들은 도 22에 도시된다. 오른쪽 패널은 약물 혈장 청소율을 나타낸다. 왼쪽 패널은 조직 및 혈장 분포(어두운 막대, M-10101; 밝은 막대, M-10707)를 나타낸다.

[0138] 도 23은 miRNA 표적 억제를 도시한다. 왼쪽 패널은 좌심실에서 miR-208a 발현의 변화를 도시한다(왼쪽부터 오른쪽으로: 치료되지 않은 M-10101, M-10707, M-10591). 오른쪽 패널은 좌심실에서 miR-208b 발현의 변화를 도시한다(왼쪽부터 오른쪽으로: 치료되지 않은 M-10101, M-10707, M-10591). M-10101 및 M-10707 사이의 단지 두 뉴클레오티드 차이에 의해, antimiR는 이들의 표적 miR(각각 miR-208a 및 miR-208b)에 대해 특이적이다.

[0139] 도 24는 치료 후 Mir-499 수준을 도시한다. 수준은 좌심실(LV), 우심실(RV) 및 격막에 대해 도시된다. 막대는 왼쪽부터 오른쪽으로, 치료되지 않은 M-10101, M-10707 및 M-10591이다.

[0140] 실시예 5: antimiR-208a 치료의 분자 분석

[0141] 선택된 7개 antimiR-208a 화학물질은 인비보로 효율을 나타내었고, 각각 9개 LNA 및 7개 DNA 뉴클레오티드를 가진다. 화합물들을 생쥐에 25mg/kg s.c.로 복용하였고, 4일에 분해되었다. miR 및 표적 발현을 측정하였다. 화합물은 다음이었다: M-10101, M-10680, M-10681, M-10682, M-10683, M-10673, 및 M-11184(표 1 참조).

[0142] 간 및 신장 독성 마커들은 식염수에 의해 현저한 증가를 나타내지 않았다(데이터는 도시되지 않음).

[0143] 화합물들은 다양한 수준의 표적 탈-억제를 나타낸다. M-10101 및 M-10683이 특히 효과적이었다. 도 25는 miR-208a 및 Dynlt1의 발현을 나타낸다. 도 26은 Dynlt1, Vcpip, 및 Tmbim6의 발현을 나타낸다. 도 27은 Thrap1 및 Sp3의 발현을 나타낸다. 도 28은 Purb, Gata4 및 Sox6의 발현을 나타낸다.

[0144] 도 29에 도시된 대로, antimir-208a 치료는 스트레스 받지 않은 설치류(SD 쥐)에서 miR-19b 혈장 수준을 증가시켰다.

[0145] 표적 탈-억제의 정도는 Dahl 염-민감성 쥐 모델을 사용하여 나타낸 대로, 스트레스의 정도에 의존한다. 도 30은 4% 염 및 6% 염에서 Dynlt1 발현에 대한 결과를 도시한다. Dynlt1은 6%에서 더욱 강한 탈-억제를 도시한다. 도 31은 표적 Vcpip1에 대한 결과를 도시한다. 도 32는 표적 Tmbim6에 대한 결과를 도시한다.

[0146] 도 33 내지 39는 심장의 상이한 영역에서 miR 억제의 정도를 도시하며, 더 많이 스트레스 받은 영역은 더 큰 효과를 나타내는 것을 나타낸다. 도 33은 miR-208a, miR-208b, 및 miR-499의 탈-억제를 도시한다. 도 34는 미오신 마커의 탈-억제를 도시한다. 도 35는 특정 심장 스트레스 마커의 발현 정도를 도시한다. 도 36은 Dynlt1, Vcpip, Tmbim6 및 Cbx1의 탈-억제를 도시한다. 도 37은 Thrap1, Sox6, Sp3, 및 pur-beta의 발현을 도시한다. 도 38에 도시된 대로, 경색된 영역은 Dynlt1의 최대 탈-억제를 나타내었다. 도 39는 M-10101에 의한 심장의 상이한 영역에서 표적들의 탈-억제를 도시한다.

[0147] 참조문헌

[0148] 1. Hill, J.A. & Olson, E.N. Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358, 1370-1380 (2008).

[0149] 2. Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N. & Hill, J.A. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109, 1580-1589 (2004).

[0150] 3. Fatkin, D., *et al.* An abnormal Ca(2+) response in mutant sarcomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 106, 1351-1359 (2000).

[0151] 4. Gupta, M.P. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43, 388-403 (2007).

[0152] 5. Vanderheyden, M., *et al.* Myocardial gene expression in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy responders versus nonresponders. *J Am Coll Cardiol* 51, 129-136 (2008).

[0153] 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 Invest* 100, 2315-2324 (1997).

[0154] 7. Miyata, S., Minobe, W., Bristow, M.R. & Leinwand, L.A. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 86, 386-390 (2000).

[0155] 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 Physiol* 579, 161-173 (2007).

[0156] 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 A* 103, 18255-18260 (2006).

[0157] 10. van Rooij, E., *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13027-13032 (2008).

[0158] 11. Montgomery, R.L. & van Rooij, E. MicroRNA regulation as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. *Curr Drug Targets* 11, 936-942 (2010).

[0159] 12. van Rooij, E., *et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316, 575-579 (2007).

[0160] 13. Callis, T.E., *et al.* MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 119, 2772-2786 (2009).

[0161] 14. McGuigan, K., Phillips, P.C. & Postlethwait, J.H. Evolution of sarcomeric myosin heavy chain genes: evidence from fish. *Mol Biol Evol* 21, 1042-1056 (2004).

[0162] 15. Berezikov, E., *et al.* Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet* 38, 1375-1377 (2006).

[0163] 16. Landgraf, P., *et al.* A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401-1414 (2007).

[0164] 17. van Rooij, E., Liu, N. & Olson, E.N. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet* 24, 159-166 (2008).

[0165] 18. van Rooij, E., *et al.* A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 17, 662-673 (2009).

[0166] 19. Elmen, J., *et al.* LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896-899 (2008).

[0167] 20. Elmen, J., *et al.* Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res* 36, 1153-1162 (2008).

[0168] 21. Krutzfeldt, J., *et al.* Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Res* 35, 2885-2892 (2007).

[0169] 22. Krutzfeldt, J., *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438, 685-689 (2005).

[0170] 23. Lanford, R.E., *et al.* Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198-201 (2010).

[0171] 24. Tijsen, A.J., *et al.* MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 106, 1035-1039 (2010).

[0172] 25. Petersen, M. & Wengel, J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol* 21, 74-81 (2003).

[0173] 26. Adachi, T., *et al.* Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 56, 1183-1185 (2010).

[0174] 27. D'Alessandra, Y., *et al.* Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* (2010).

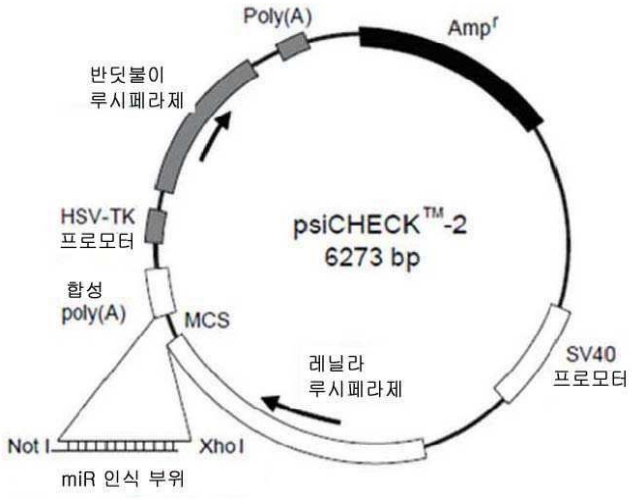
[0175] 28. Ji, X., *et al.* Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 55, 1944-1949 (2009).

[0176] 29. Hamalainen, N. & Pette, D. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres. *Microsc Res Tech* 30, 381-389 (1995).

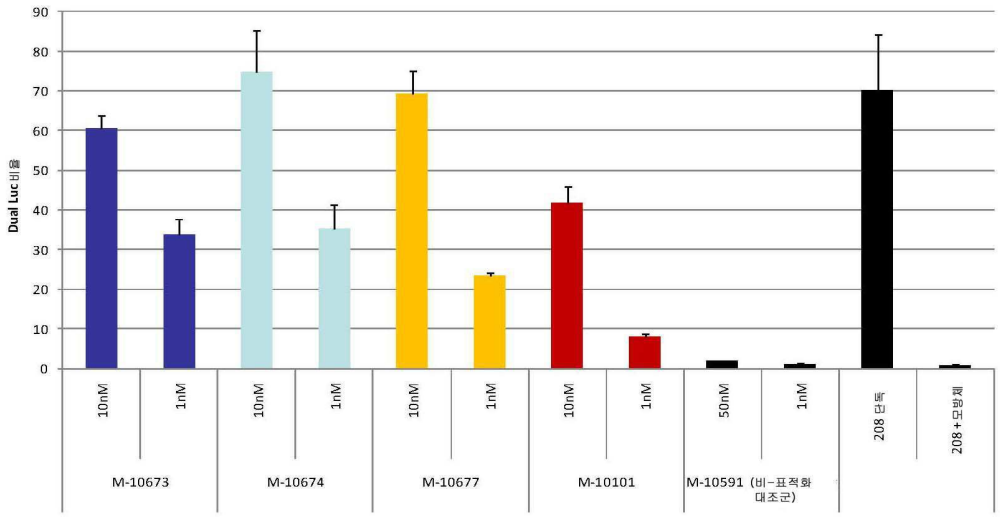
[0177] 30. Shelton, J.M., Lee, M.H., Richardson, J.A. & Patel, S.B. Microsomal triglyceride transfer protein expression during mouse development. *J Lipid Res* 41, 532-537 (2000).

도면

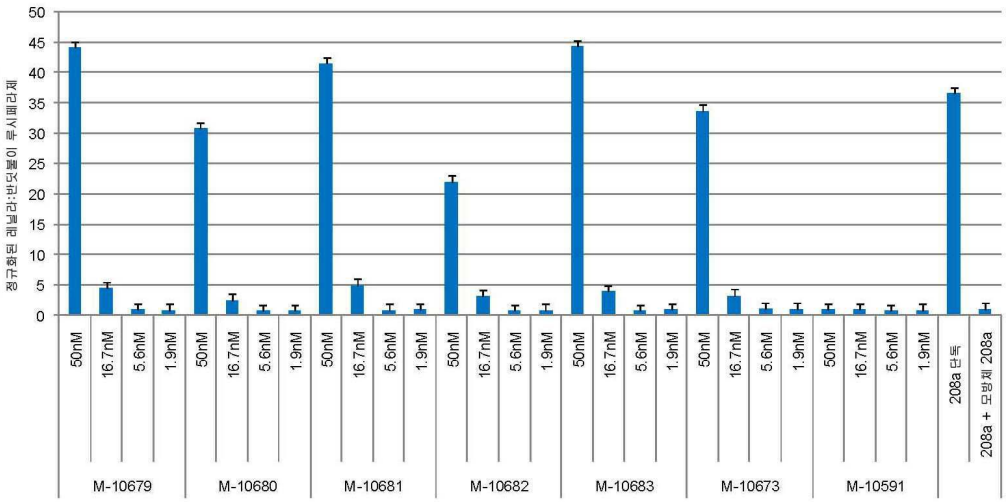
도면1



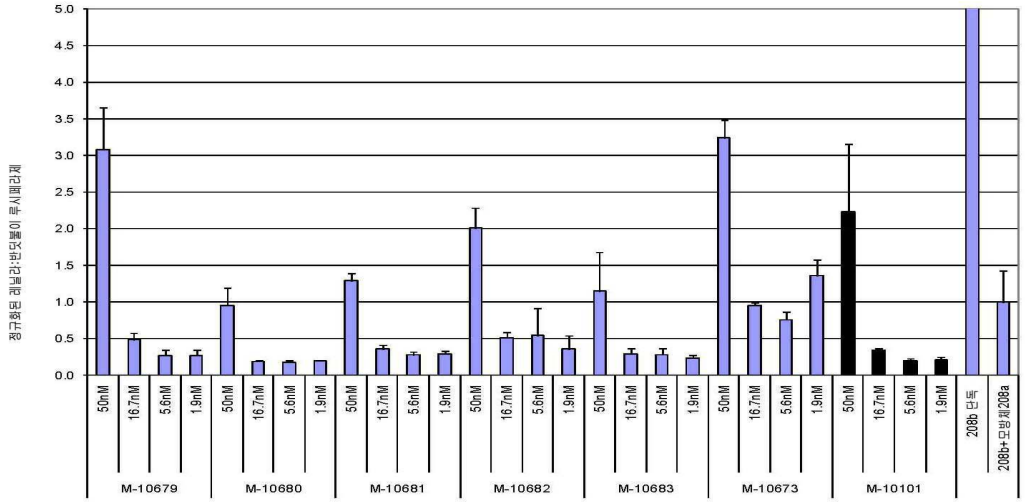
도면2


Dual Luc 비율
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10nM
1nM
M-10673
M-10674
M-10677
M-10101
50nM
M-10591 (비-표적화 대조군)
208 단독
208 + 모방체

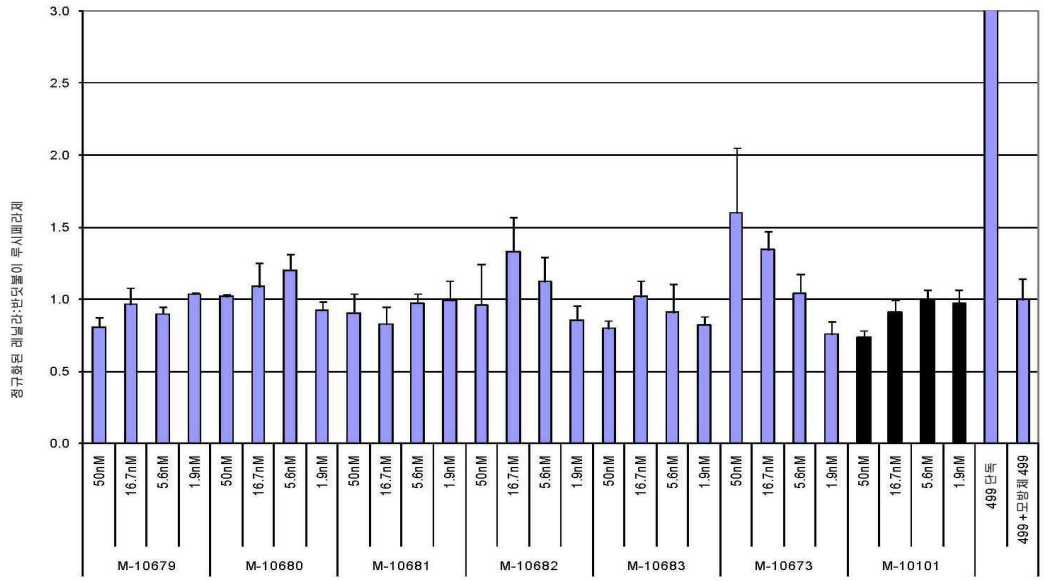
도면3


정규화된 레닐라:반딧불이 루시페라제
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 단독
208a + 모방체 208a

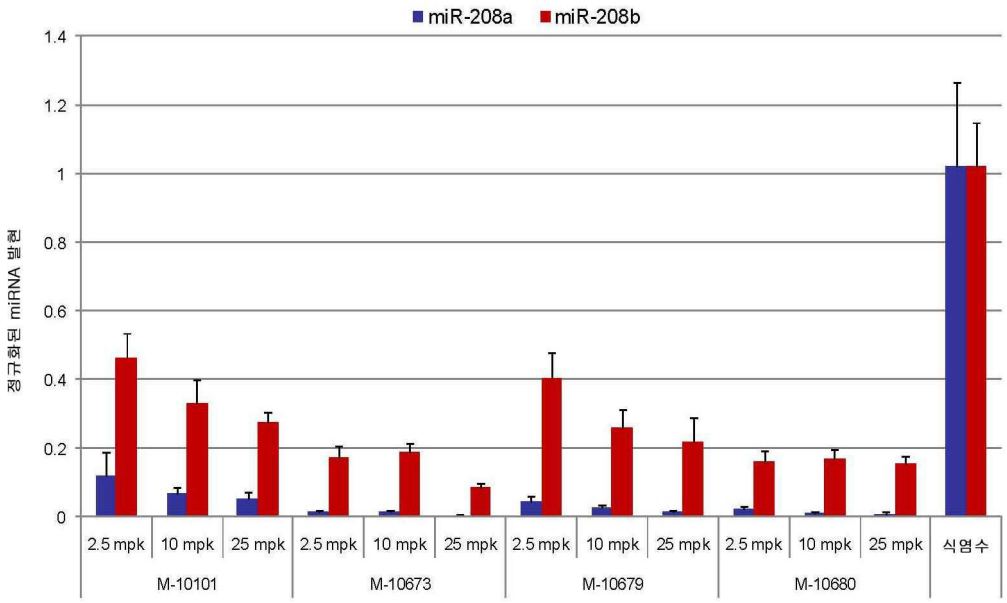
도면4


정규화된 레닐라:반딧불이 루시페라제
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 단독
208b+모방체208a

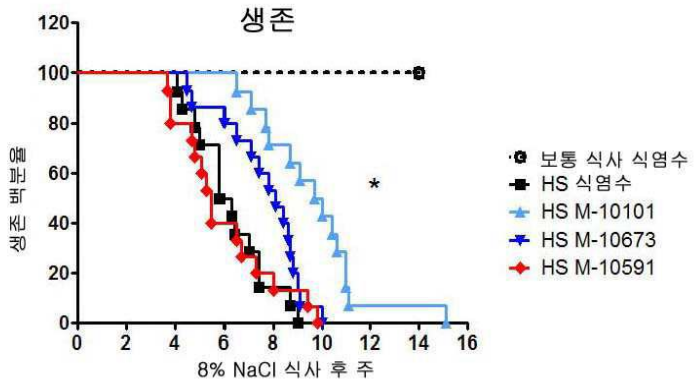
도면5


정규화된 레닐라:반딧불이 루시페라제
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 단독
499+모방체 499

도면6

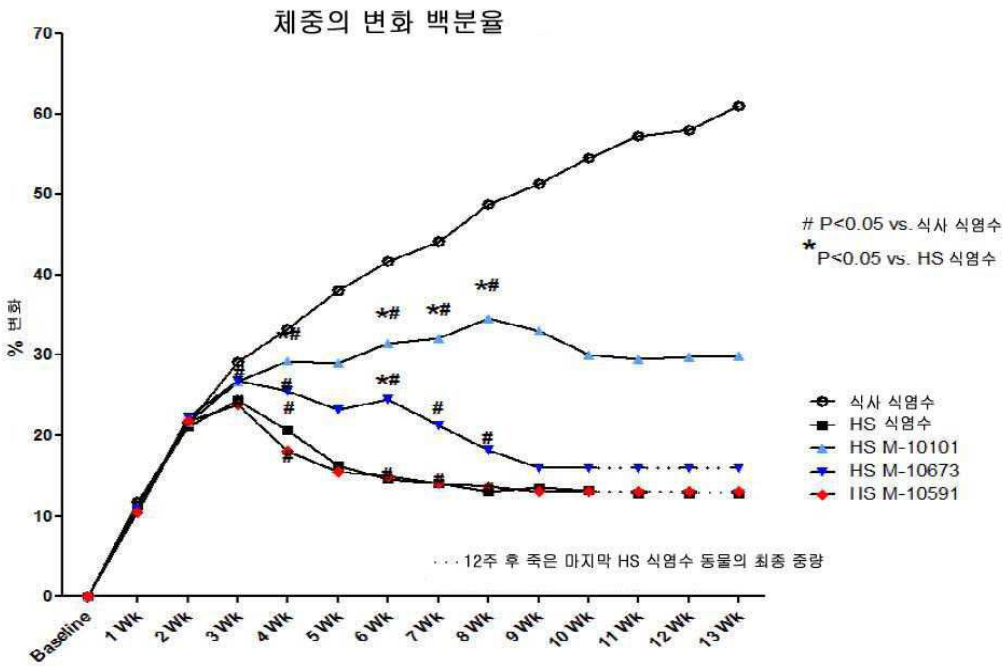

miR-208a
miR-208b
정규화된 miRNA 발현
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2.5 mpk
10 mpk
25 mpk
M-10101
M-10673
M-10679
M-10680
식염수

도면7



* P<0.05 vs 식염수
Log-rank (Mantel-Cox) Test
Gehan-Breslow-Wilcoxon Test

도면8

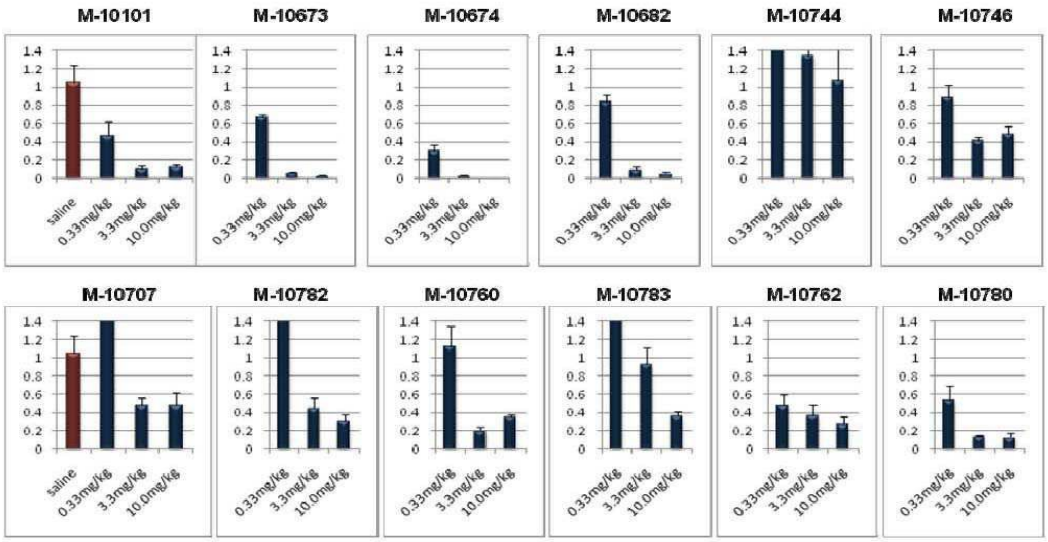


도면9

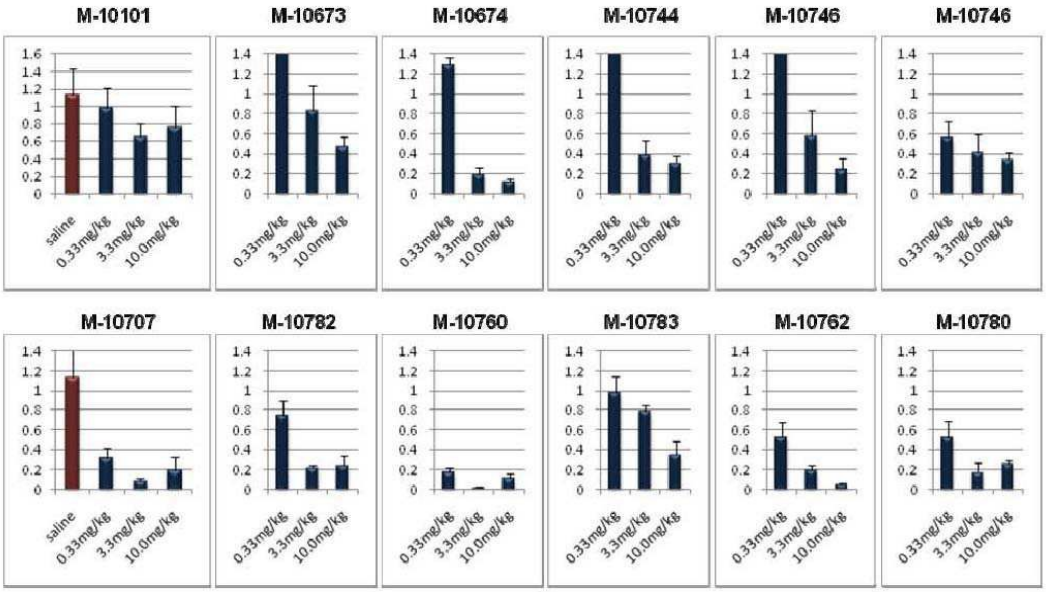
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
miR-208a	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	5'	A	U	A	A	G	A	C	G	A	G	C	A	A	A	A	A	G	C	U	U	G	U
	(SEQ ID NO:94)		(SEQ ID NO:94)																					
miR-208a RC	ACAAGCTTTTTGCTCGTCTTAT	5'						C	T	T	T	T	T	G	C	T	C	G	T	C	T	T	A	T
	(SEQ ID NO:95)							(SEQ ID NO:96)																
		%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%

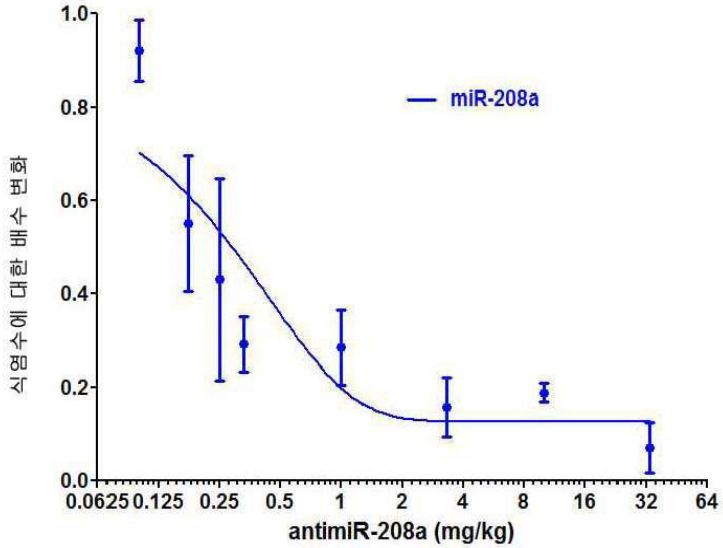
도면10



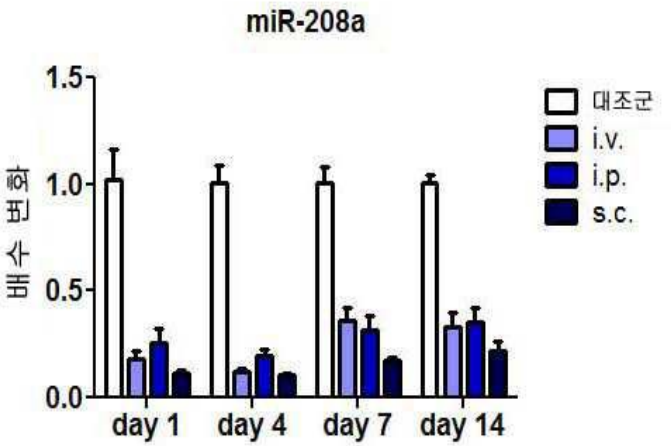
도면11



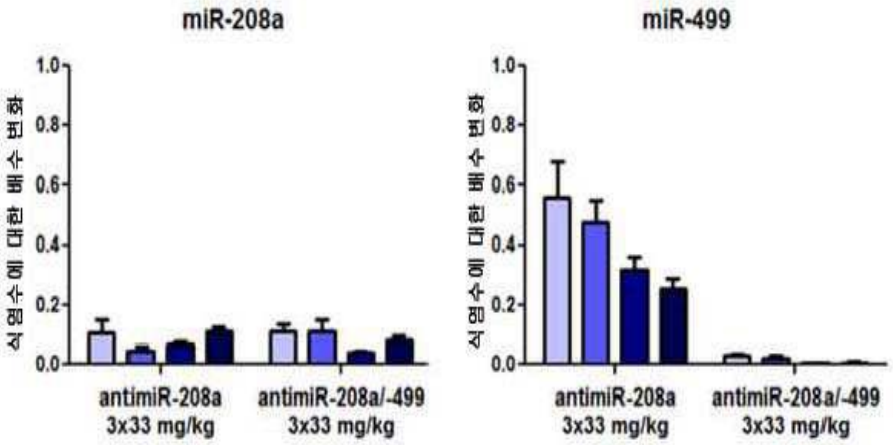
도면12


miR-208a
식염수에 대한 배수 변화
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0625
0.125
0.25
0.5
1
2
4
8
16
32
64
antimiR-208a (mg/kg)

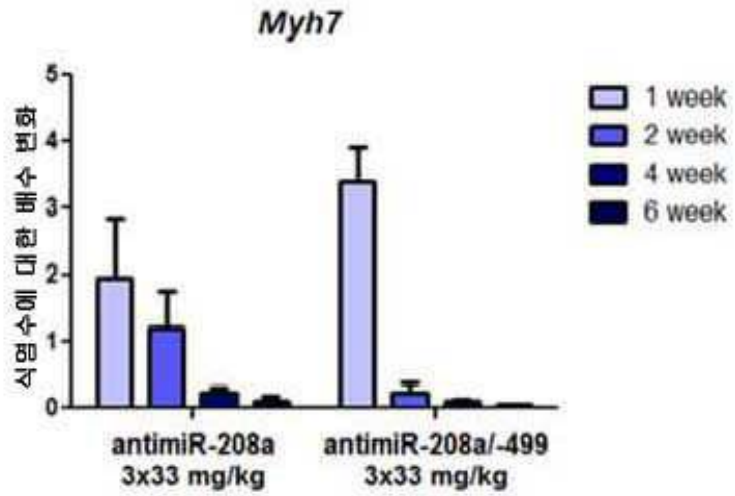
도면13


miR-208a
배수 변화
1.5
1.0
0.5
0.0
day 1
day 4
day 7
day 14
대조군
i.v.
i.p.
s.c.

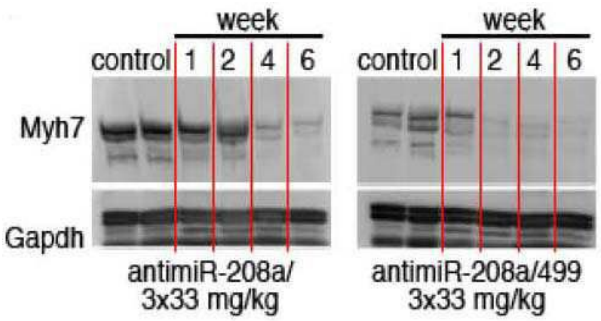
도면14a



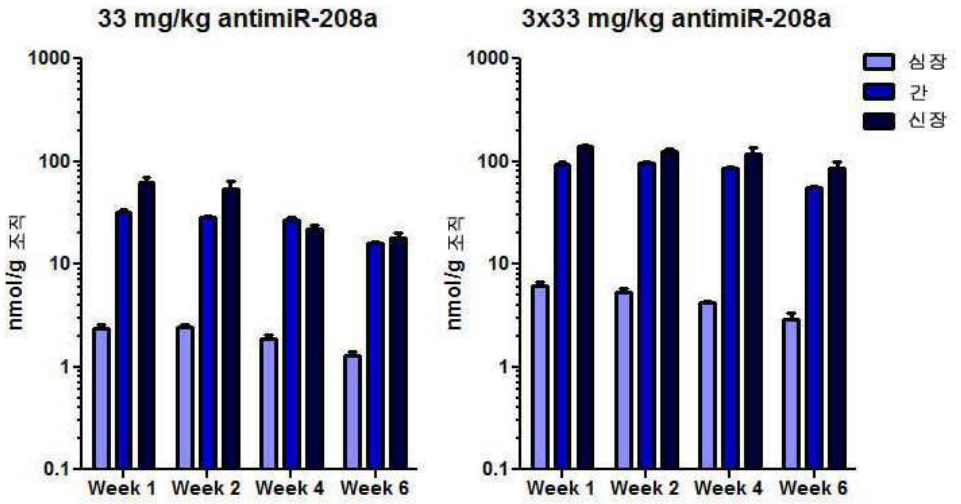
도면14b



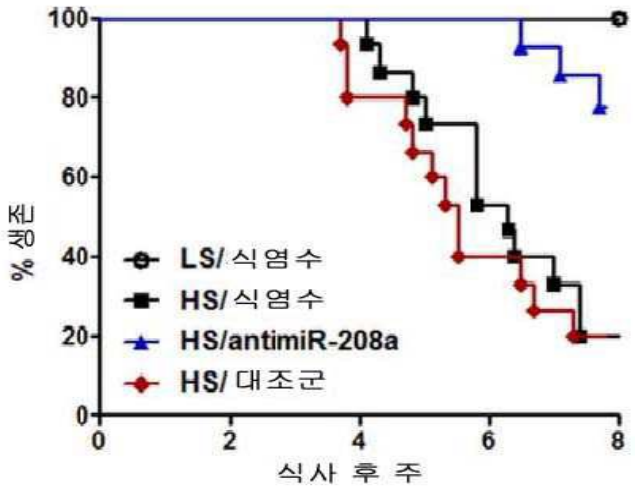
도면14c



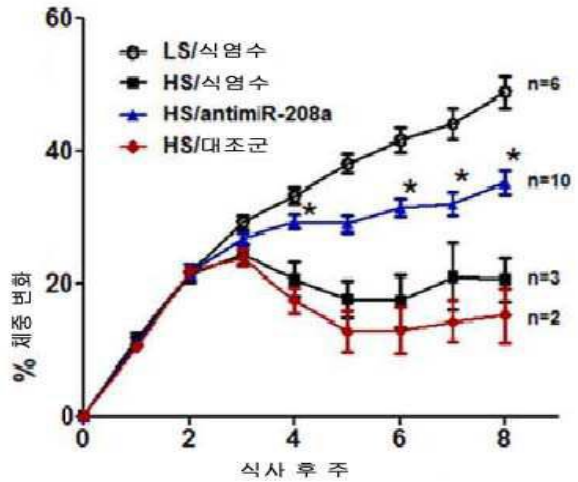
도면15



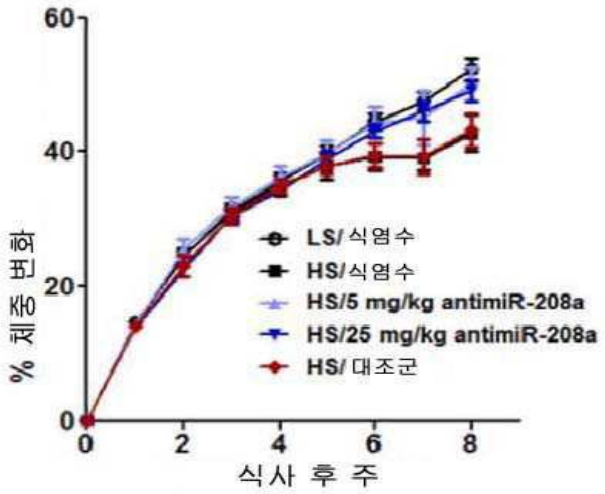
도면16a



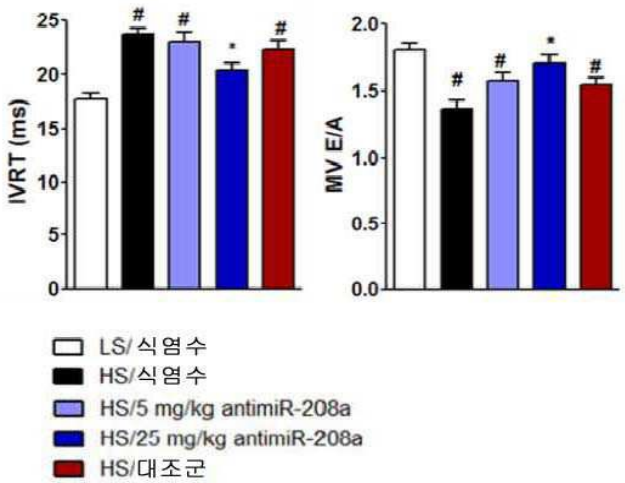
도면16b



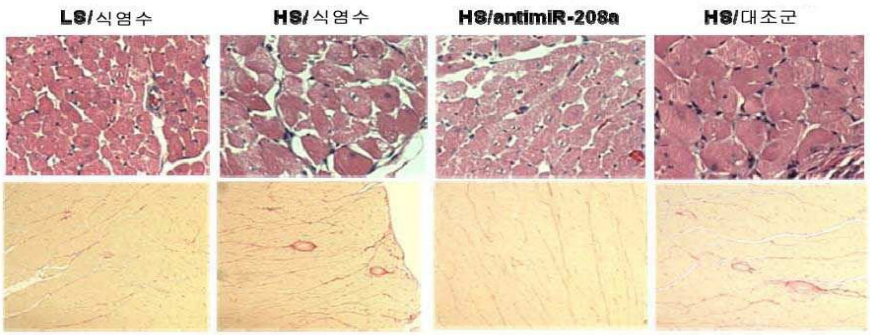
도면17a



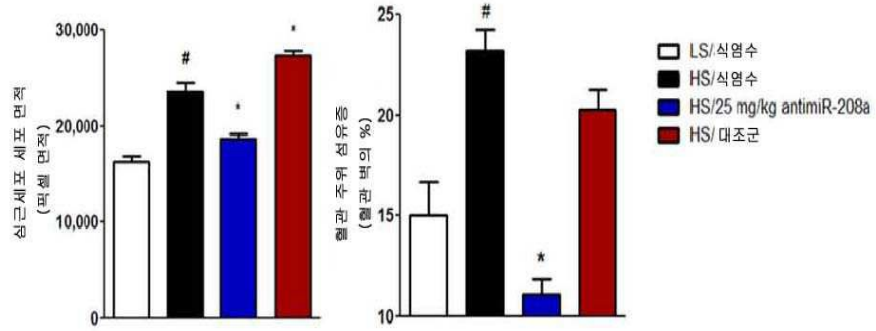
도면17b



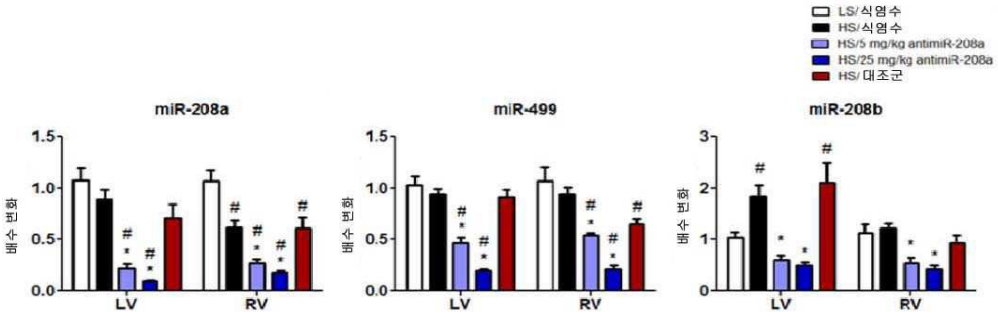
도면18a



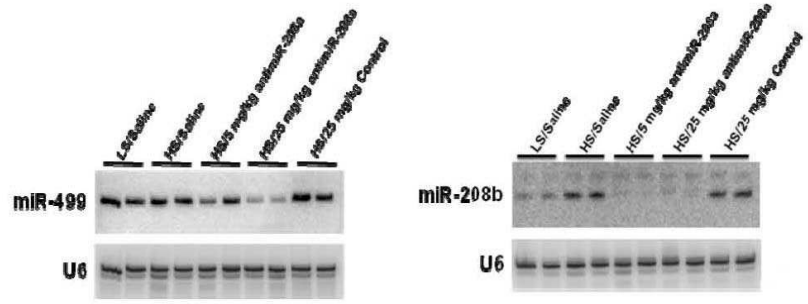
도면18b



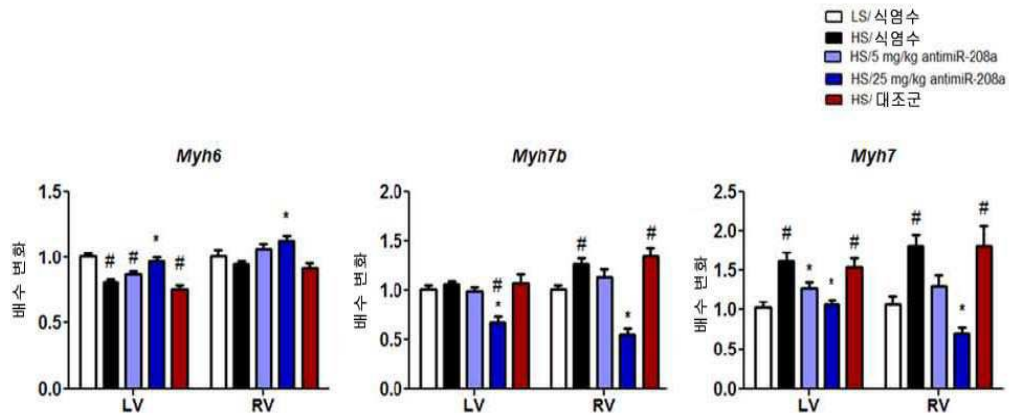
도면19a



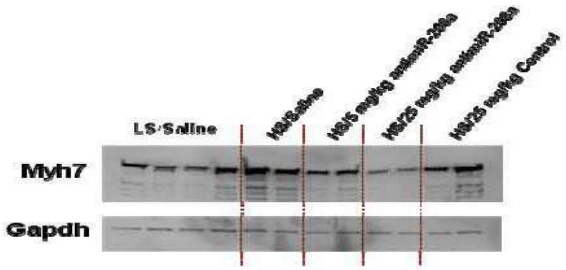
도면19b



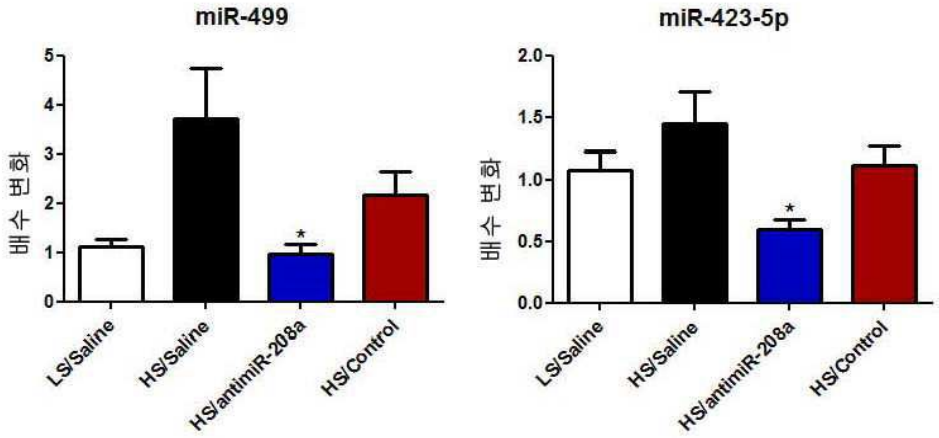
도면20a



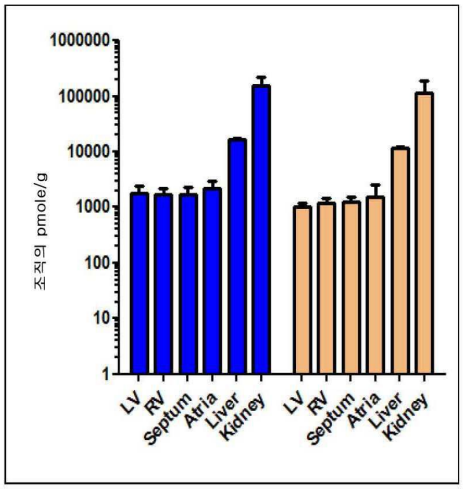
도면20b

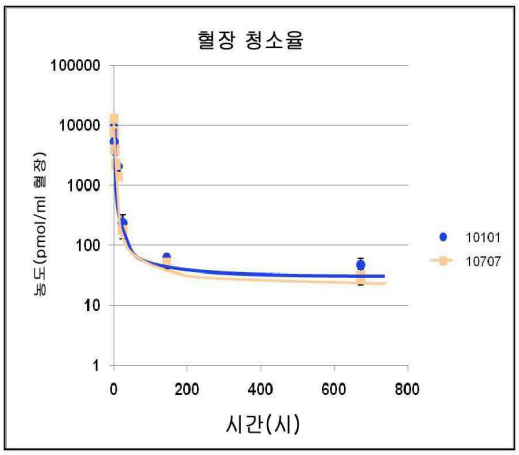


도면21

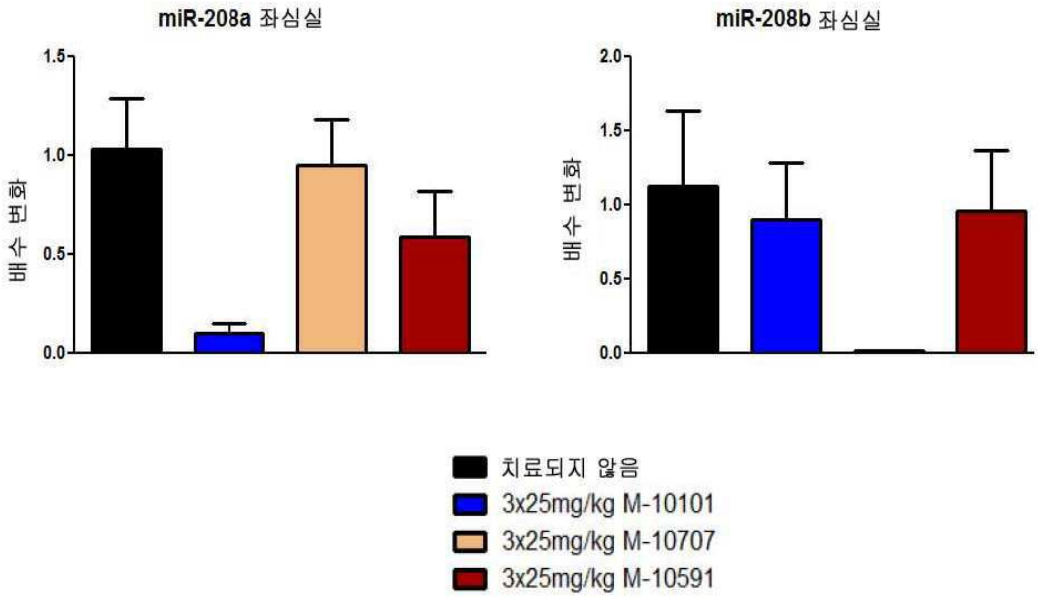


도면22

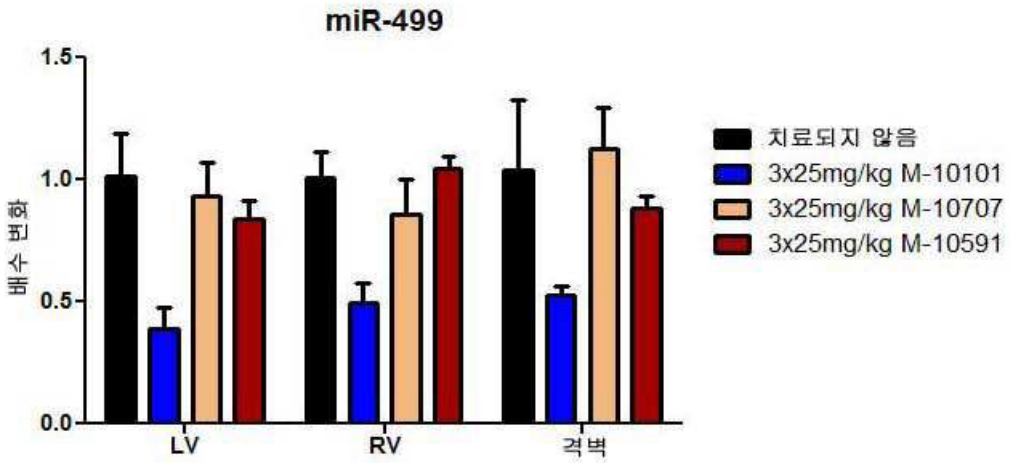




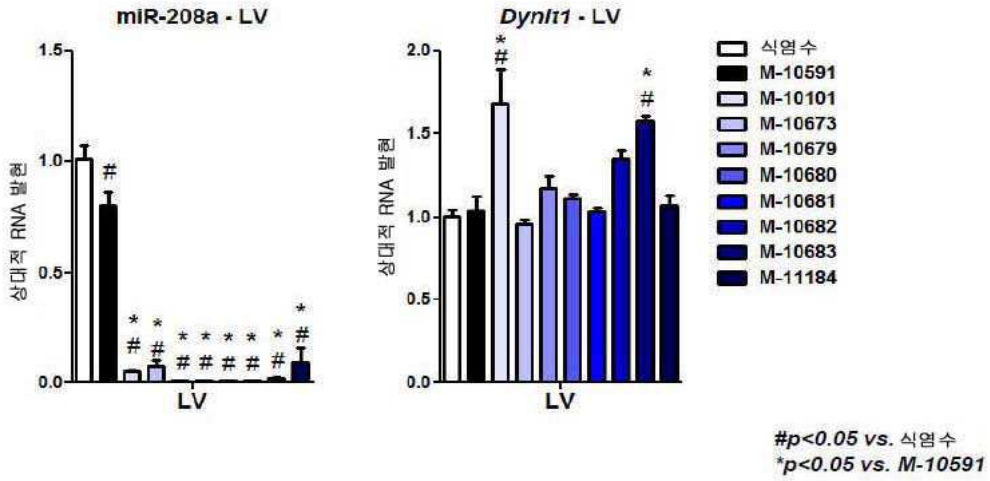
도면23


miR-208a 좌심실
miR-208b 좌심실
배수 변화
1.5
1.0
0.5
0.0
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
치료되지 않음
3x25mg/kg M-10101
3x25mg/kg M-10707
3x25mg/kg M-10591

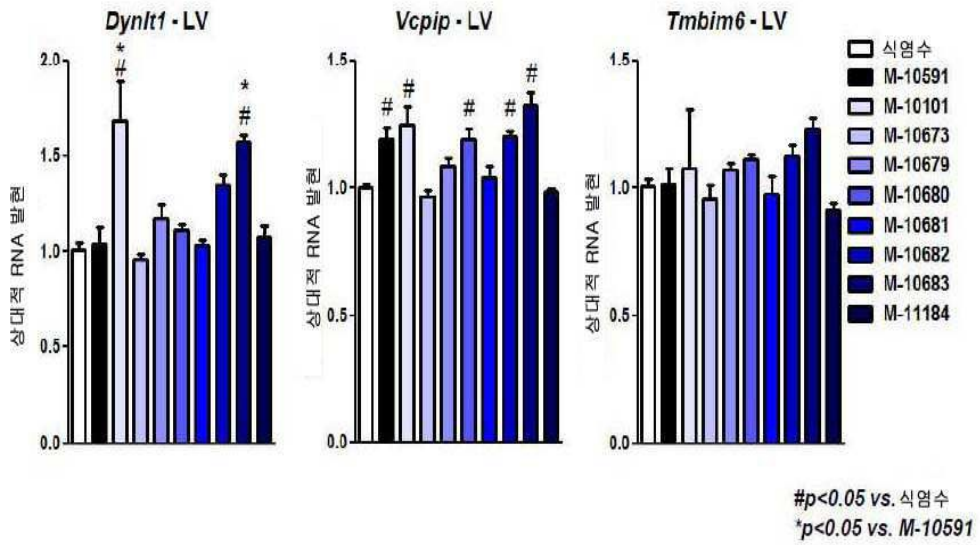
도면24


miR-499
배수 변화
1.5
1.0
0.5
0.0
LV
RV
격벽
치료되지 않음
3x25mg/kg M-10101
3x25mg/kg M-10707
3x25mg/kg M-10591

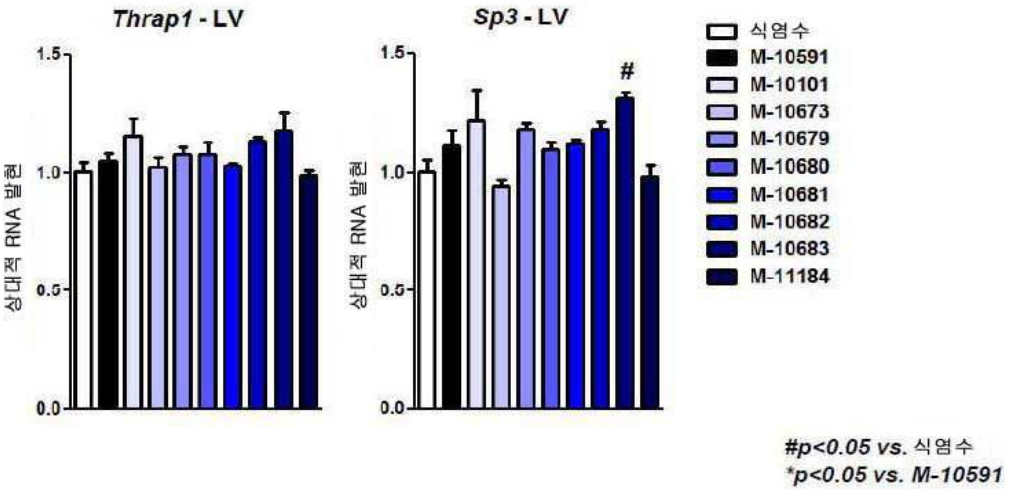
도면25



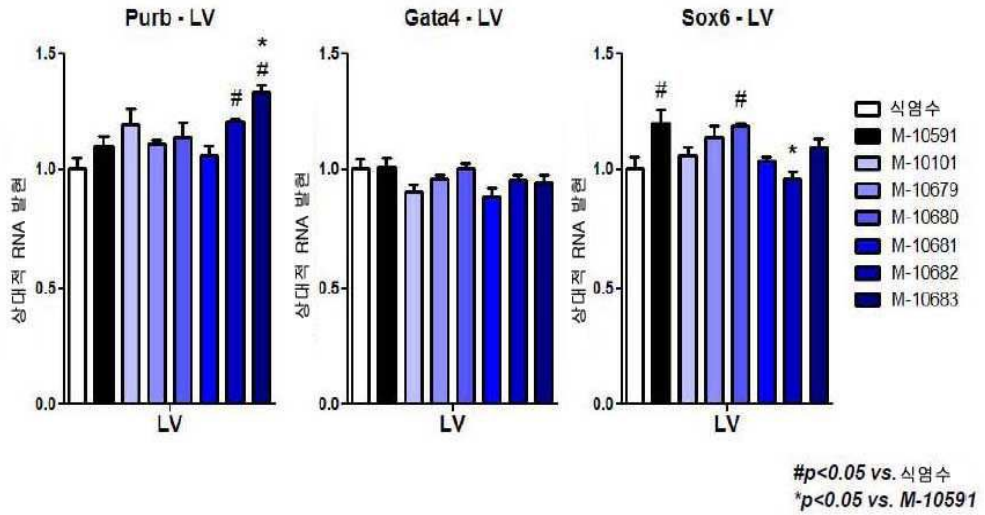
도면26



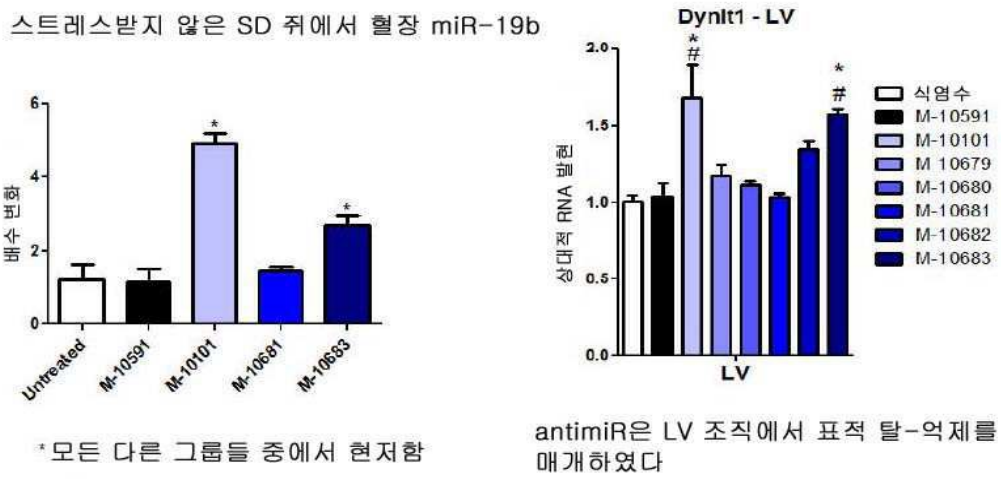
도면27



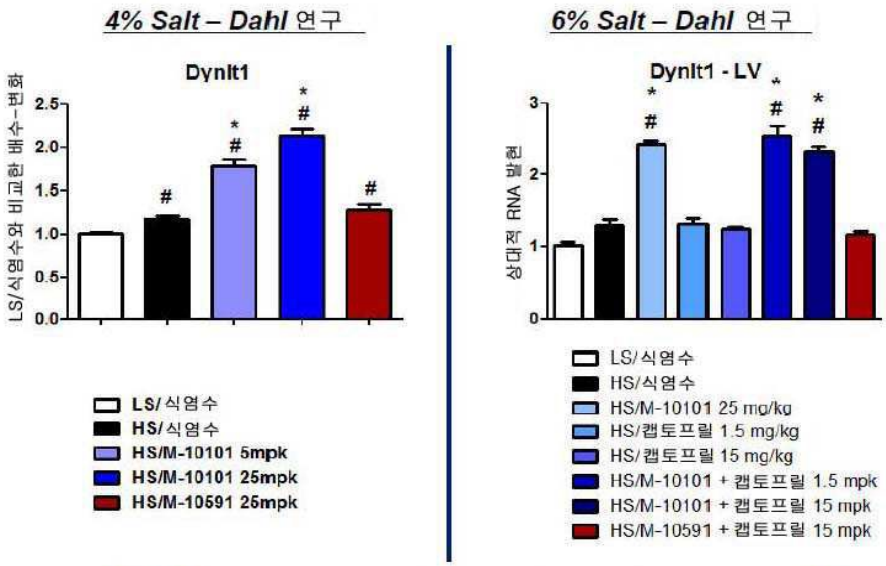
도면28


Purb - LV
Gata4 - LV
Sox6 - LV
상대적 RNA 발현
LV
식염수
M-10591
M-10101
M-10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
#p<0.05 vs. 식염수
*p<0.05 vs. M-10591

도면29

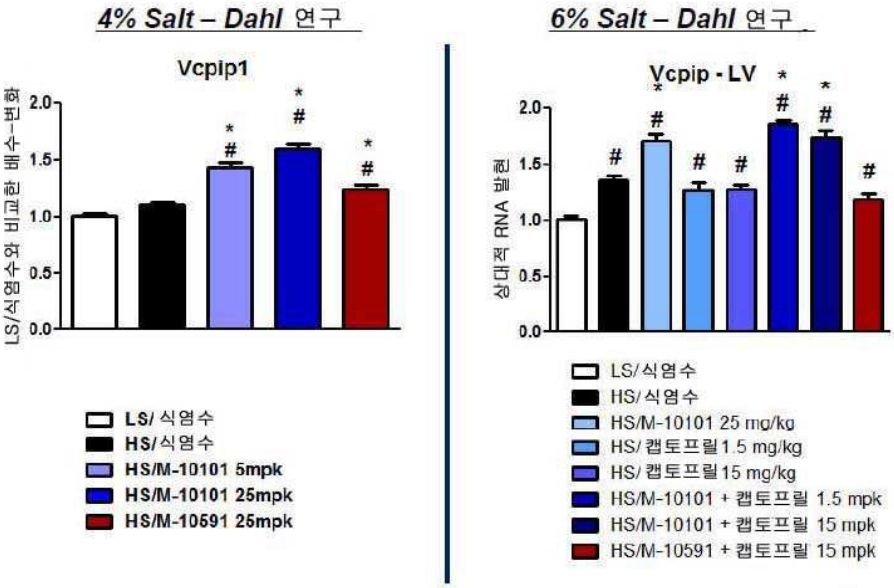

스트레스받지 않은 SD 쥐에서 혈장 miR-19b
배수 변화
Untreated
M-10591
M-10101
M-10681
M-10683
*모든 다른 그룹들 중에서 현저함
Dynlt1 - LV
상대적 RNA 발현
LV
식염수
M-10591
M-10101
M 10679
M-10680
M-10681
M-10682
M-10683
antimiR은 LV 조직에서 표적 탈-억제를 매개하였다

도면30



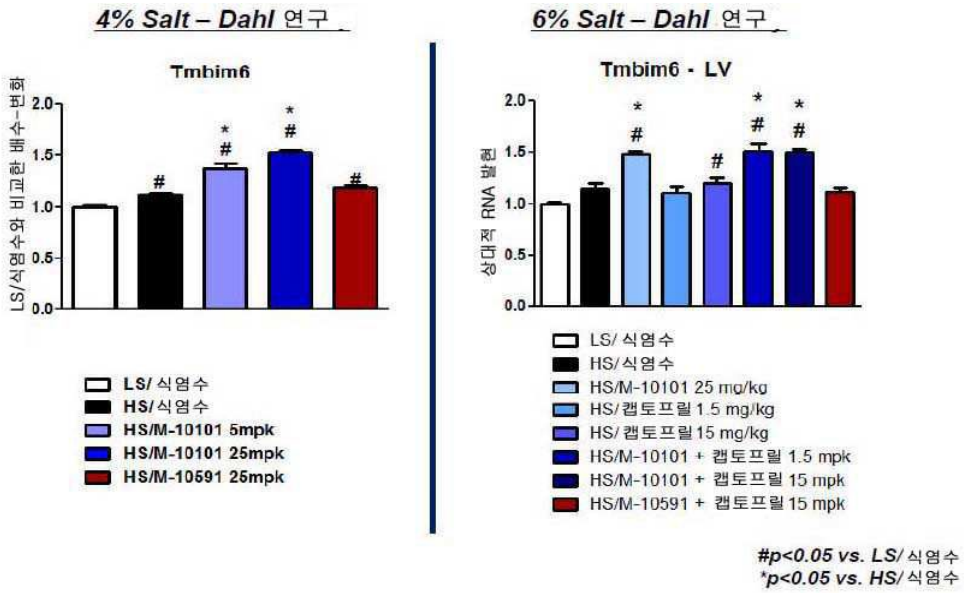
•*Dynlt1*는 6% 스트레스에서 더욱 강한 탈-억제를 나타낸다 *#p<0.05 vs. LS/*식염수
**p<0.05 vs. HS/*식염수

도면31



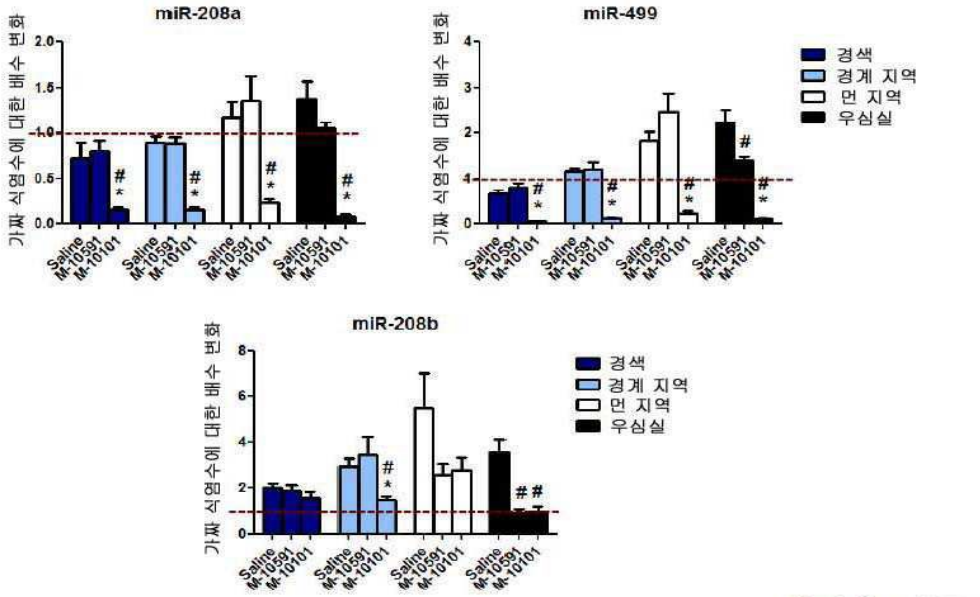
*#p<0.05 vs. LS/*식염수
**p<0.05 vs. HS/*식염수

도면32



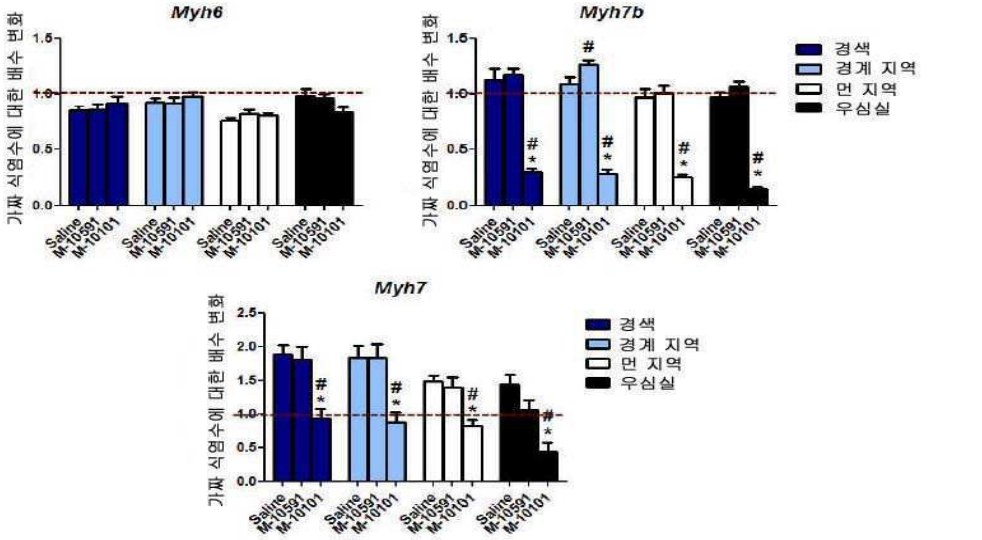
#p<0.05 vs. LS/ 식염수
**p<0.05 vs. HS/ 식염수*

도면33



#p<0.05 vs. 식염수
**p<0.05 vs. M-10591*

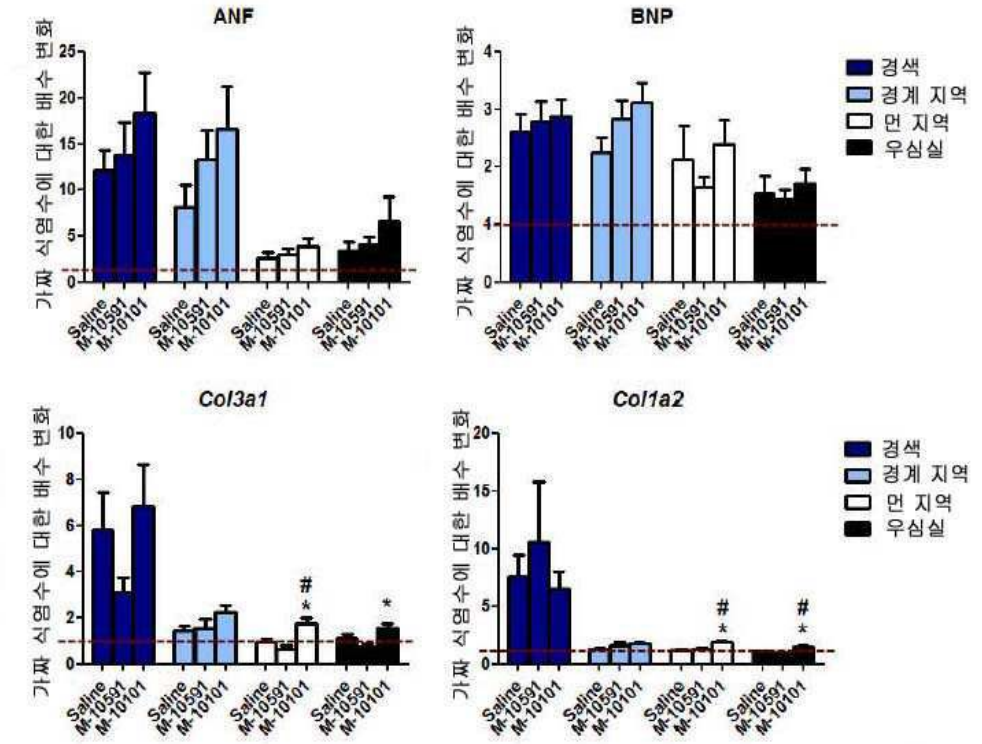
도면34



• 가짜 식염수에 대해 정규화

#p<0.05 vs. 식염수
*p<0.05 vs. M-10591

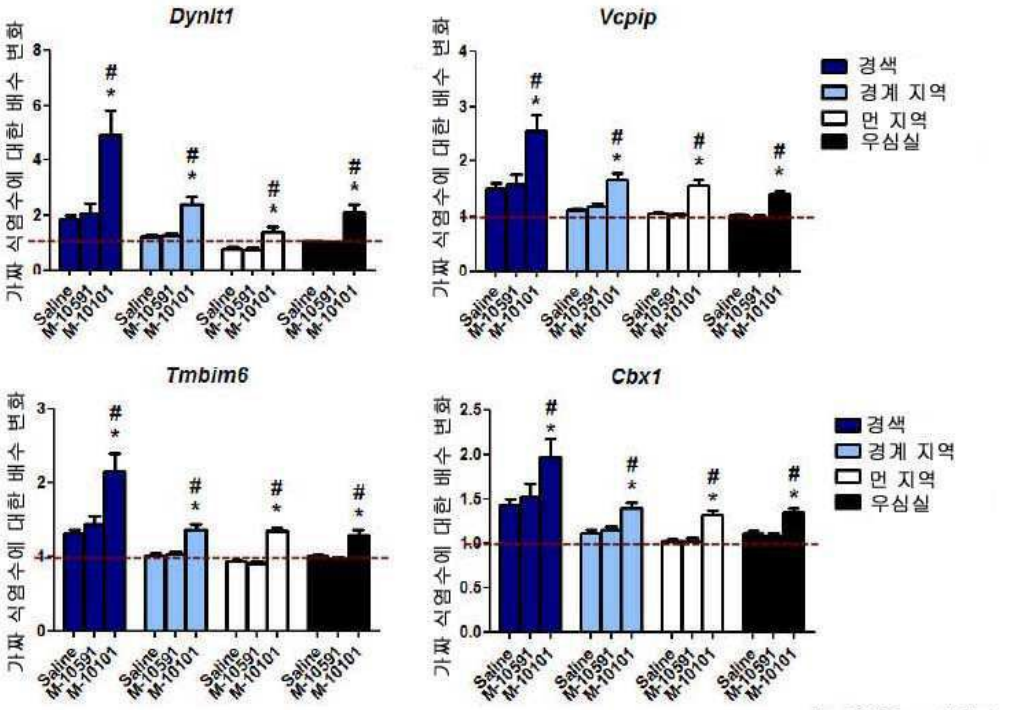
도면35



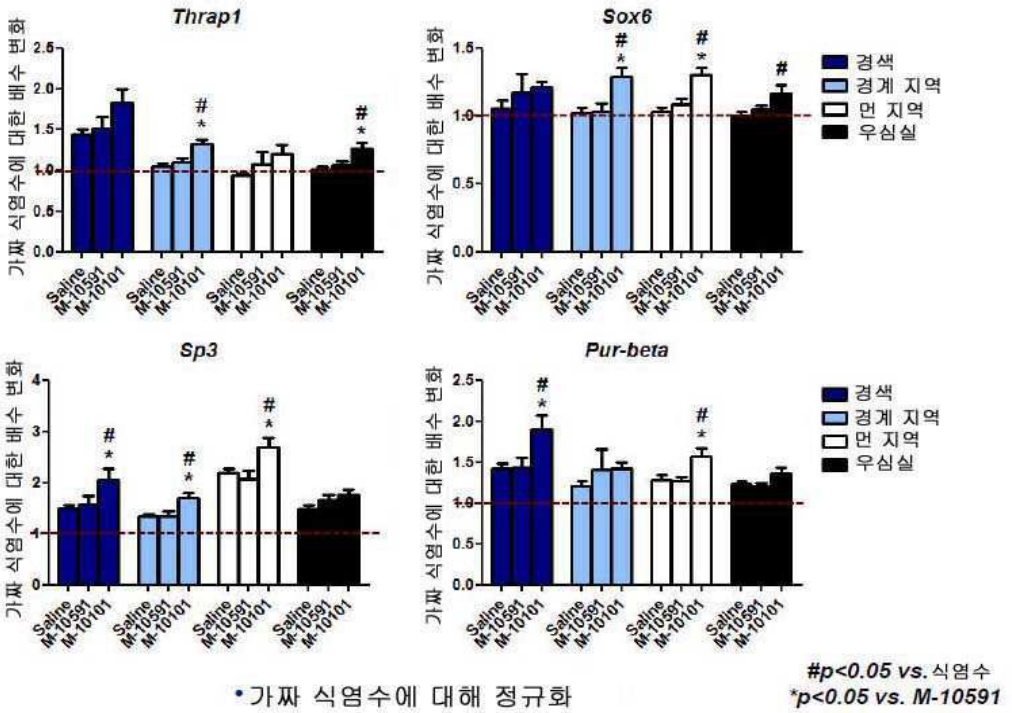
• 가짜 식염수에 대해 정규화

#p<0.05 vs. 식염수
*p<0.05 vs. M-10591

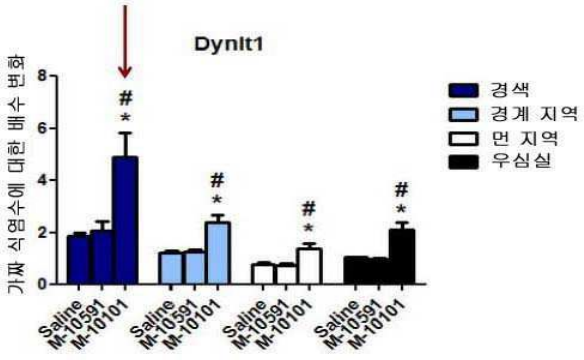
도면36


Dynlt1
Vcpip
Tmbim6
Cbx1
가짜 식염수에 대한 배수 변화
경색
경계 지역
먼 지역
우심실
Saline
M-10591
M-10101
#p<0.05 vs. 식염수
*p<0.05 vs. M-10591
• 가짜 식염수에 대해 정규화

도면37


Thrap1
Sox6
Sp3
Pur-beta
가짜 식염수에 대한 배수 변화
경색
경계 지역
먼 지역
우심실
Saline
M-10591
M-10101
#p<0.05 vs. 식염수
*p<0.05 vs. M-10591
• 가짜 식염수에 대해 정규화

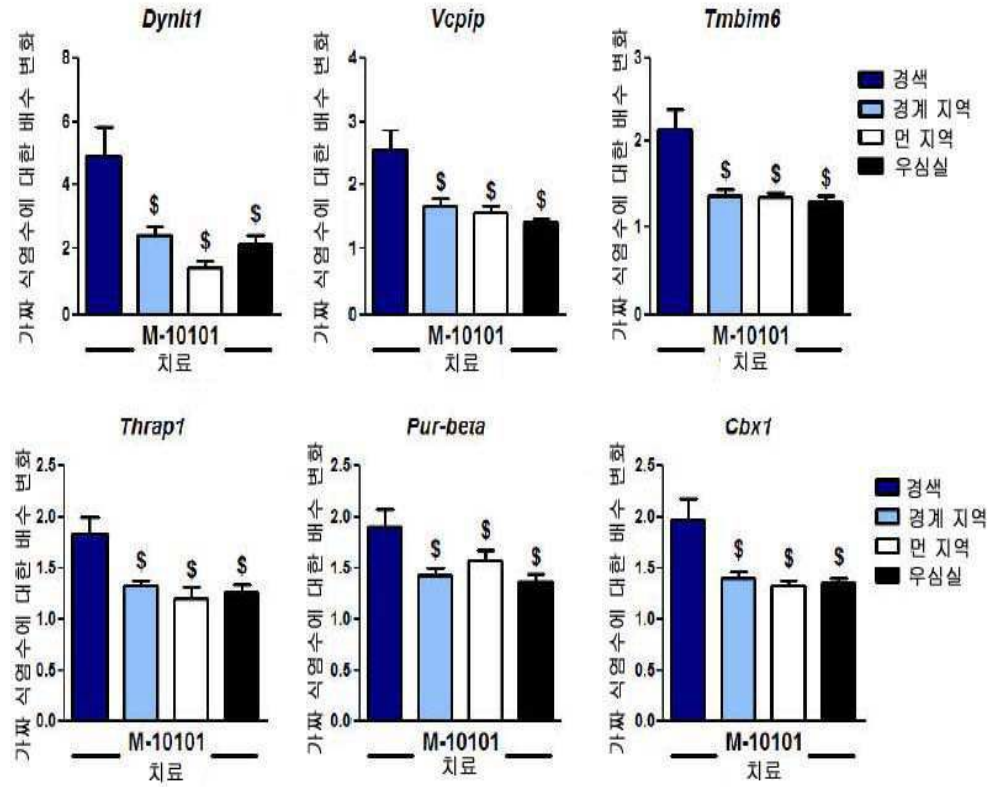
도면38



• 가짜 식염수에 대해 정규화

#p<0.05 vs. 식염수
*p<0.05 vs. M-10591

도면39



• 가짜 식염수에 대해 정규화

$p<0.05 vs. 경색

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MiRagen Therapeutics

Dalby, Christina

Marshall, William S.

van Rooij, Eva

Montgomery, Rusty

<120> MICRORNA INHIBITORS COMPRISING LOCKED NUCLEOTIDES

<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> Homo sapiens

<400> 1

tgctcgtctt a 11

<210> 2

<211> 11

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tgttcgtctt a 11

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ctttttgctc gtctta 16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

cctttttgttc gtctta 16

<210> 5

<211> 71

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

acgggcgagc uuuuggcccg gguuauaccu gaugcucacg uauaagacga gcaaaaagcu 60

uguuggucag a 71

<210> 6

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

auaagacgaa caaaagguuu gu 22

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

uuaagacuug cagugauguu u 21

<210> 8

<211> 16

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

uaagacgagc aaaaag 16

<210> 9

<211> 16

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

uaagacgaac aaaaag 16

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 10

cttttgctc gtctta 16

<210> 11

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 11

tgctcgtctt a 11

<210> 12

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 12

tgctcgtctt a 11

<210> 13

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><

221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 13

tgcacgtctt a 11

<210> 14

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222>

(2)..(2)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 14

tgcacgtctt a 11

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<

220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 15

cttttgctc gtctta 16

<210> 16

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 16

cttttgctc gtctta 16

<210> 17

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 17

cttttgctc gtctta 16

<210> 18

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<

220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220

><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 18

cttttgctc gtctta 16

<210> 19

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<

220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 19

cttttgctc gtctta 16

<210> 20

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223

> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<

223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 20

cttttgctc gtctta 16

<210> 21

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<

220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220

><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 21

cttttgctc gtctta 16

<210> 22

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222>

(2)..(3)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223

> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 22

cttttgctc gtctta 16

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 23

cctttttgttc gtctta 16

<210> 24

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<

223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 24

tttttgctcg tctta 15

<210> 25

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 25

tttttgctcg tctta 15

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 26

tttttgctcg tctta 15

<210> 27

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 27

tttttgctcg tctta 15

<210> 28

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<

220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 28

ttttgctcg tctta 15

<210> 29

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222

> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 29

tttttgctcg tctta 15

<210> 30

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 30

cttttgctcg tctta 15

<210> 31

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220

><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 31

cttttgctcg tctta 15

<210> 32

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 32

cttttgctcg tctta 15

<210> 33

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223

> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 33

cttttgctcg tctta 15

<210> 34

<211

> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 34

ctttgctcg tctta 15

<210> 35

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 35

cttttgctcg tctta 15

<210> 36

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222

> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 36

ctttttgttcg tctta 15

<210> 37

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 37

cttttgttcg tctta 15

<210> 38

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 38

cttttgttcg tctta 15

<210> 39

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 39

tttttgctcg tctta 15

<210> 40

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223>

May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 40

cttttgctcg tctta 15

<210> 41

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220

><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><

221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220

><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 41

cttttgttcg tctta 15

<210> 42

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221

> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 42

ttttgctcgt ctta 14

<210> 43

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 43

ttttgctcgt ctta 14

<210> 44

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 44

ttttgctcgt ctta 14

<210> 45

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222>

(7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222

> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 45

ttttgctcgt ctta 14

<210> 46

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223

> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 46

ttttgctcgt ctta 14

<210> 47

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<

223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 47

ttttgctcgt ctta 14

<210> 48

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221

> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 48

ttttgttcgt ctta 14

<210> 49

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 49

ttttgttcgt ctta 14

<210> 50

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 50

ttttgttcgt ctta 14

<210> 51

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<

220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 51

ttttgttcgt ctta 14

<210> 52

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 52

ttttgttcgt ctta 14

<210> 53

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 53

ttttgttcgt ctta 14

<210> 54

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222

> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223

> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 54

tttgctcgtc tta 13

<210> 55

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<

220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 55

tttgctcgtc tta 13

<210> 56

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222

> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 56

tttgctcgtc tta 13

<210> 57

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 57

tttgctcgtc tta 13

<210> 58

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220

><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 58

tttgttcgtc tta 13

<210> 59

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 59

tttgttcgtc tta 13

<210> 60

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222

> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 60

tttgttcgtc tta 13

<210> 61

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 61

tttgttcgtc tta 13

<210> 62

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220

><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 62

tgctcgtctt a 11

<210> 63

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<

220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 63

tgctcgtctt a 11

<210> 64

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222

> (2)..(2)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223

> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 64

tgttcgtctt a 11

<210> 65

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 65

tgttcgtctt a 11

<210> 66

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222>

(2)..(2)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<

223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 66

cctttttgttc gtctta 16

<210> 67

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<

223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 67

cctttgttc gtctta 16

<210> 68

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 68

cctttttgttc gtctta 16

<210> 69

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220

><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 69

cctttgctc gtctta 16

<210> 70

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy adenosine

<400> 70

cctttgctc gtctta 16

<210> 71

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221

> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be locked nucleic acid adenosine

<400> 71

cctttgctc gtctta 16

<210> 72

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 72

ttttgttcgt cttat 15

<210> 73

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 73

ttttgttcgt cttat 15

<210> 74

<211> 15

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 74

ttttgttcgt cttat 15

<210> 75

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 75

ttttgttcgt cttat 15

<210> 76

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy thymidine

<400> 76

ttttgttcgt cttat 15

<210> 77

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy thymidine

<400> 77

ttttgttcgt cttat 15

<210> 78

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<

222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy thymidine

<400> 78

ttttgttcgt cttat 15

<210> 79

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 79

ttttgttcgt cttat 15

<210> 80

<211

> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy thymidine

<400> 80

ttttgttcgt cttat 15

<210> 81

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 81

tttgttcgtc ttat 14

<210> 82

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221>

misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 82

tttgttcgtc ttat 14

<210> 83

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 83

tttgttcgtc ttat 14

<210> 84

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220

><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 84

tttgttcgtc ttat 14

<210> 85

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine

<400> 85

tttgttcgtc ttat 14

<210> 86

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221

> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine

<400> 86

tttgttcgtc ttat 14

<210> 87

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223

> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine

<400> 87

tttgttcgtc ttat 14

<210> 88

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine

<400> 88

tttgttcgtc ttat 14

<210> 89

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine

<400> 89

tttgttcgtc ttat 14

<210> 90

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(5)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222

> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be deoxy thymidine

<400> 90

cttttgttcg tcttat 16

<210> 91

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Anti-miR-208 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> May be locked nucleic acid guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> May be locked nucleic acid cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> May be deoxy guanosine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> May be deoxy cytidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> May be locked nucleic acid thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> May be deoxy thymidine phosphorothioate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> May be locked nucleic acid adenosine phosphorothioate

<400> 91

cttttgctc gtctta 16

<210> 92

<

211> 23

<212> RNA

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 92

uaucacagcc agcuuugaug ugc 23

<210> 93

<211> 21

<212> RNA

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 93

ucccugagac cucaagugug a 21

<210> 94

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<400> 94

auaagacgag caaaaagcuu gu 22

<210> 95

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<400> 95

acaagctttt tgctcgtctt at 22

<210> 96

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<400> 96

ctttttgctc gtcttat 17

<210> 97

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<400> 97

auaagacgaa caaaagguuu gu 22

<210> 98

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<400> 98

acaaaccttt tgttcgtctt at 22

<210> 99

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-miR-208 oligonucleotide

<400> 99

cctttgttc gtcttat 17