

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102643811 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 22

(21) 申请号 201110040809. 3

(22) 申请日 2011. 02. 18

(71) 申请人 中国科学院上海药物研究所

地址 201203 上海市浦东新区张江祖冲之路
555 号

申请人 苏州吉玛基因药物科技有限公司

(72) 发明人 丁侃 张佩琢 李捷 沈孝坤

(74) 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理
有限公司 11225

代理人 朱梅 刘晔

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 25/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

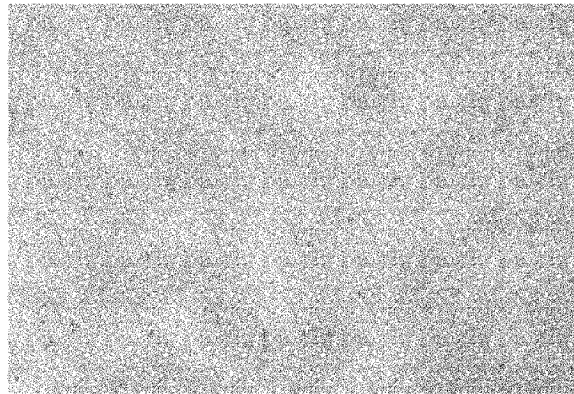
序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

人 miR-1229 的反义寡聚核苷酸及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抑制人 microRNA-1229 表达的反义寡聚核苷酸及其应用。该反义寡聚核苷酸特异性结合于人 miR-1229, 包含与下述核苷酸序列中 13 ~ 23 个连续核苷酸互补的序列: 5'-CUCUCACCACUGCCCUCCACAG-3', 特别是其包含序列: 5'-CUGUGGGAGGGCAGUGGUGAGAG-3'。本发明的反义寡聚核苷酸可以为核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸的嵌合体, 并可对链中任一核苷酸进行修饰。本发明的 miR-1229 反义寡聚核苷酸能够有效抑制人脑胶质瘤细胞中 miR-1229 表达, 抑制其生长和增殖, 从而有效治疗脑胶质瘤及其他 miR-1229 高表达的肿瘤。



1. 一种人 microRNA-1229 的反义寡聚核苷酸, 其特征在于, 所述反义寡聚核苷酸包含与下述核苷酸序列中 13 ~ 23 个连续的核苷酸互补的序列: 5' -CUCUCACCACUGCCCUGCCACAG-3'。
2. 如权利要求 1 所述的反义寡聚核苷酸, 其特征在于, 所述反义寡聚核苷酸序列为 5' -CUGUGGGAGGGCAGUGGUGAGAG-3'。
3. 如权利要求 1 所述的反义寡聚核苷酸, 其特征在于, 所述反义寡聚核苷酸为核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或者核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸的嵌合体。
4. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的反义寡聚核苷酸, 其特征在于, 所述反义寡聚核苷酸进一步被修饰。
5. 如权利要求 4 所述的反义寡聚核苷酸, 其特征在于, 所述修饰选自核糖修饰、碱基修饰和磷酸骨架修饰中的一种或几种。
6. 如权利要求 5 所述的反义寡聚核苷酸, 其特征在于, 所述修饰选自硫代修饰、2' - 甲氧基修饰和胆固醇修饰中的一种或几种。
7. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的反义寡聚核苷酸在用于制备治疗 miR-1229 过度表达的相关疾病的药物中的用途。
8. 如权利要求 7 所述的用途, 其特征在于, 所述反义寡聚核苷酸与其他治疗药物联合施用。
9. 如权利要求 7 所述的用途, 其特征在于, 所述 miR-1229 过度表达的相关疾病为肿瘤。
10. 如权利要求 9 所述的用途, 其特征在于, 所述 miR-1229 过度表达的相关疾病为脑胶质瘤。
11. 一种药物组合物, 其特征在于, 包含治疗有效量的权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的反义寡聚核苷酸以及药学上可接受的载体。

人 miR-1229 的反义寡聚核苷酸及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学材料技术领域和药物领域。具体地,本发明涉及一种 microRNAs(miRNA) 反义寡聚核苷酸,尤其是涉及人 microRNA-1229(人 miR-1229) 反义寡聚核苷酸及其应用。该反义寡聚核苷酸可与人 miR-1229 互补,从而抑制人 miR-1229 的表达而起到抗肿瘤的作用。本发明还涉及包含该 miRNA 反义寡聚核苷酸的药物组合物。

背景技术

[0002] miRNAs(又称为 microRNA 或微小 RNA) 是小的非编码 RNA,长度为 20-25bp,通常是由 RNA 聚合酶 II(Pol II) 转录的,一般最初产物为大的具有帽子结构(7MGpppG) 和多聚腺苷酸尾巴(AAAAA) 的 pri-miRNA(primary miRNA,初级 miRNA)。这些 pri-miRNA 在 RNase III Drosha 和其辅助因子 Pasha 的作用下被处理成 70 个核苷酸组成的前体 miRNA(precursormiRNA,pre-miRNA)。RAN-GTP 和 exportin 5(输出蛋白 5) 将这种前体分子输送到细胞质中。随后,另一个 RNase III Dicer(核糖核酸内切酶) 将其剪切产生约为 22 个核苷酸长度的双链。这种双链很快被引导进入 miRISC(miRNA-induced silencing complex,miRNA 诱导的沉默复合物) 复合体中,其中含有 Argonaute 蛋白(AGO 蛋白),并且成熟的单链 miRNA 保留在这一复合物中。成熟的 miRNA 结合到与其互补的 mRNA 的位点通过两种依赖于序列互补性的机制负调控基因表达,与靶 mRNA 不完全互补的 miRNA 在蛋白质翻译水平上抑制其表达。然而,最近也有证据表明,这些 miRNA 也有可能影响 mRNA 的稳定性。使用这种机制的 miRNA 结合位点通常在 mRNA 的 3' 端非翻译区。如果 miRNA 与靶位点完全互补(或者几乎完全互补),那么这些 miRNA 的结合往往引起靶分子 mRNA 的降解。miRNAs 在物种进化中相当保守,在动物,植物和真菌等中发现的 miRNAs 表达均有严格的组织特异性和时序性。

[0003] 目前,只有很小一部分 miRNAs 的生物学功能得到阐明。这些 miRNAs 调节细胞生长和组织分化,与生物生长发育有关。一系列的研究表明:miRNAs 在细胞生长和凋亡、血细胞分化、同源异形盒基因调节、神经元的极性、胰岛素分泌、大脑形态形成、心脏发生和胚胎后期发育等过程中发挥重要作用。例如,miR-273 参与线虫的神经系统发育过程;miR-430 参与斑马鱼的大脑发育;miR-181 控制哺乳动物造血细胞分化为 B 细胞;miR-375 调节哺乳动物胰岛细胞发育和胰岛素分泌;miR-143 在脂肪细胞分化起作用;miR-196 参与了哺乳动物四肢形成,miR-1 与心脏发育有关。另有研究人员发现许多神经系统的 miRNAs 在大脑皮层培养中受到时序调节,表明其可能控制着区域化的 mRNA 翻译。

[0004] miRNA 表达与多种癌症相关,并且这些基因可能起到肿瘤抑制基因或是癌基因作用。最先在 B 细胞慢性淋巴性白血病(CLL) 中发现有 miRNA 表达水平的改变,随后陆续在各种人类肿瘤中均检测到 miRNA 表达水平的变化。研究发现,miRNAs 与肿瘤形成相关,既能发挥肿瘤抑制基因的作用(如 miR-15a 和 miR-16-1),又能起到癌基因的作用(如 miR-155 和 miR-17-92 簇)。目前认为,在肿瘤细胞中,有些 miRNA 成熟体或前体表达水平异常,而表达异常的 miRNA 通过影响靶 mRNA 翻译发挥作用,参与肿瘤形成过程,并起重要作用。如

Ras 原癌基因受 let-7 家族的调控, BCL2 抗凋亡基因受 miR-15a-miR-16-1 簇调控, E2F1 转录因子受 miR-17-92 簇调控, BCL6 抗凋亡基因受 miR-127 的调控等。miRNAs 的表达下调也和肿瘤发生有密切关系, 这预示着 miRNA 具有癌基因的功能。例如, miR-143 和 miR-145 在结肠癌中明显下调。有趣的是, 其发夹结构的前体分子在肿瘤和正常组织中含量相似, 这表明, miRNAs 的表达下调可能是由于其加工过程受到破坏。但是, miR-143 和 miR-145 的肿瘤抑制基因功能可能不仅仅局限于结肠癌, 在乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、淋巴癌等细胞系中其表达量也明显下调。另一个报道表明, miR-21 在胶质母细胞瘤中表达增加。这个基因在肿瘤组织中的表达量比在正常组织中高 5-100 倍。

[0005] miRNAs 是天然的反义作用因子, 能够调控与真核生物生存和增殖相关的多种基因。在肿瘤治疗方面, miRNA 的应用前景光明。在利用 miRNA 作为治疗靶点方面, 已有实验数据支持: 如在吉西他滨 (gemcitabine) 治疗的过程中, 出现 miRNA 表达谱的变化; 调控部分 miRNA 的表达水平 (如使 miR-21 过表达), 能增进胆管癌细胞对化疗药物的敏感性。通过引入与具有癌基因特性的 miRNA 互补的合成的反义寡聚核苷酸——抗 miRNA 寡聚核苷酸 (AMOs)——可能有效的灭活肿瘤中的 miRNAs, 延缓其生长。临床上, 可以通过经常的或者持续的 2' -O- 甲基化或者锁核酸 (LNA) 等修饰的反义寡聚核苷酸给药使 miRNA 失活。这些修饰使得寡核苷酸更稳定, 比其他治疗手段毒性更低。使用 antagomirs (与胆固醇偶联的 AMOs), 注射小鼠后可以在不同器官有效抑制 miRNA 活性, 因而可能成为一种有希望的治疗药物。相反的, 过表达那些具有肿瘤抑制基因作用的 miRNAs, 如 let-7 家族, 也可以用于治疗某些特定的肿瘤。

[0006] 反义寡聚核苷酸 (Flanagan WM. Antisense comes of age. *Cancer&Metastasis Reviews* 1998 ;17(2) :169-76) 是指一段可以与其靶基因的碱基互补的核苷酸。反义寡聚核苷酸可以抑制相应基因的表达。

[0007] 人 microRNA-1229 (hsa-miR-1229) 位于 5 号染色体, 前体序列为 GUGGGUAGGGUUUG GGGGAGAGCGUGGGCUGGGGUUCAGGGACACCCUCUCACCACUGCCCUCCACAG (SEQ ID No. 1), 含有 1 个成熟 microRNA : hsa-miR-1229 (MIMAT0005584, 序列为 CUCUCACCACUGCCCUCCACAG (SEQ ID No. 2))。Dudziec 等利用芯片技术发现在尿路上皮细胞癌中 5-azacytidine (5-氮杂胞嘧啶核苷) 处理后一部分 miRNA 表达上调, 提示部分 miRNA 收到甲基化影响。经研究表明其中的 miR-1229 的启动子区域出现高甲基化状态, 且 miR-1229 的表达也与尿路上皮细胞癌的诊断密切相关 (Dudziec 等, 2010)。但在胶质瘤中还没有关于 miR-145 的功能和表达水平的研究报道。

[0008] 近三十年, 尽管临床上肿瘤的综合治疗已很普遍, 但以手术为主, 放化疗为辅的综合治疗对肿瘤患者的生存率提高并不明显, 5 年总体生存率仍然较低, 徘徊在 30%~55% 左右, 并没有显著提高, 中晚期患者的 5 年生存率更低, 约为 20%。而且这些方法都存在各自的局限性, 特别是对中晚期和复发患者疗效不佳, 对伴有远处转移者疗效更差。因此, 寻找更安全有效的治疗途径是提高肿瘤患者生存率和生存质量所亟待解决的难题。

发明内容

[0009] 针对现有技术中的不足, 本发明设计了一系列可以结合于 miR-1229 不同位置的反义寡聚核苷酸分子, 在培养细胞 U87/MG 中, 验证对 miR-1229 表达特异性抑制的反义寡聚

核苷酸对细胞生长能力、增殖能力的影响,反义寡聚核苷酸分子长度可以包含 13 ~ 23 个核苷酸残基,均有不同程度的抑制人肿瘤细胞生长能力、增殖能力的特性,其中最短的反义寡聚核苷酸长度为 13 个碱基,不同长度的反义寡聚核苷酸均具有良好的肿瘤细胞生长及增殖抑制活性。因此,上述反义寡聚核苷酸均可用来制备抑制肿瘤细胞生长能力、增殖能力的制剂,其中优选 miR-1229 高表达的肿瘤细胞。在此基础上完成了本发明。

[0010] 因此,本发明要解决的主要问题就是提供一组新的人 miR-1229 的反义寡聚核苷酸(抑制剂),用于高效、低毒或无毒地抑制 miR-1229 的表达,进而治疗由 miR-1229 过度表达引发的疾病,包括肿瘤,尤其为脑胶质瘤。

[0011] 本发明要解决的另一问题就是提供上述反义寡聚核苷酸在制备治疗 miR-1229 过度表达的相关疾病的药物中的用途。

[0012] 本发明要解决的再一问题是提供一种包含上述反义寡聚核苷酸的药物组合物。

[0013] 本发明人通过广泛而深入的研究,设计并合成了一系列专一性针对 miR-1229 不同区域的长度不同的反义核酸(反义寡聚核苷酸),并在培养细胞中验证具有抑制效果的反义核酸。研究显示,这些反义核酸能够抑制肿瘤细胞的生长和恶性增殖能力。本发明的第一方面,提供了一种人 miR-1229 的反义寡聚核苷酸,所述反义寡聚核苷酸抑制人细胞内 miR-1229 的表达。通常,所述反义寡聚核苷酸与 5' -CUCACACCACUGCCCUCACACAG-3' 中连续 13 ~ 23 个核苷酸序列互补。通常反义寡聚核苷酸的长度为 13 ~ 35bp,对于 miRNA 成熟体来说,较佳的反义寡聚核苷酸长度为 18 ~ 22bp。本发明的反义寡聚核苷酸的长度没有特别限制,一般来说,为了达到杂交的专一性,反义寡聚核苷酸需要至少 13 个单体组成的核苷酸。在本发明的一个优选实施例中,所述反义寡聚核苷酸的长度为 18 ~ 23 个核苷酸。更佳地,所述反义寡聚核苷酸的序列是 5' -CUGUGGGAGGGCAGUGGUGAGAG-3' (SEQ IDNo. 3)。

[0014] 在本发明的另一个优选实施方式中,本发明所述的反义寡聚核苷酸中的核苷酸可以为核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或者核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸的嵌合体。从目前来看,核酸杂交中 RNA 与 miRNA 的杂交亲和力比 DNA 与 miRNA 杂交的亲和力要高,具有很高的药用价值。但是人工合成 DNA 的成本远远比合成 RNA 的成本低,具有很好的市场潜力。而且也可以采用核糖 RNA 单体与脱氧核糖 DNA 单体嵌合相连而成的反义核酸作为药物进行开发。本发明设计的一系列反义核酸分子,既包括 DNA 分子,也包括 RNA 分子,两种分子均具有抑制 miR-1229 表达的活性。

[0015] 本发明设计的反义核酸,其序列具有特异性生物学活性,其对于某一基因互补的位点的反义核酸所互补的长度有很大关系,如互补的长些,则生物学活性会更高些,抑制效果也会更好一些,在增加或减少一个至数个碱基而互补于同一基因位点的反义核酸,同样也具有不同程度的生物学活性,也可达到不同程度的抑制肿瘤细胞生长与增殖的作用,本发明的研究表明,最短可达 13 个碱基仍然具有抑制 miR-1229 表达的作用。在本发明的反义核酸研究中,各种化学修饰方法很多,包括选自核糖修饰、碱基修饰和磷酸骨架修饰中的一种或几种的组合等。应当明确的是,任何能够增加反义核酸稳定性和生物利用度的修饰方法都可以应用,如选自胆固醇修饰、PEG 修饰、硫代修饰和 2' - 甲氧基修饰中的一种或几种等。本文中所述反义寡聚核苷酸经过 2' - 甲氧基取代修饰。

[0016] 本发明的上述反义核酸具有抑制 miR-1229 表达的效果。当将上述反义核酸转染到 miR-1229 高表达的细胞株 U87 中后,能够有效抑制肿瘤细胞的生长和恶性增殖能力。

[0017] 本发明还提供了一种药物组合物,它含有安全有效量的本发明寡聚核苷酸以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括但不限于:盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。

[0018] 所述“有效量”是指可对人和/或动物产生功能或活性且可被人或/或动物所接受的量。

[0019] 所述“药学上可接受的”成分是适用于人和/或动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即有合理的效益/风险比的物质。

[0020] 在本发明的第三方面,提供了本发明的反义寡聚核苷酸在用于制备治疗以下疾病的药物中的用途,其中,所述反义寡聚核苷酸与其他治疗药物联合施用;所述疾病为与人体 miR-1229 过表达有关的疾病,包括肿瘤,优选为脑胶质瘤。

[0021] 如本文所用,“反义寡聚核苷酸”指反义的核苷酸寡聚物。反义寡聚核苷酸通过碱基互补(A-T, A-U, G-C)配对与双链 DNA 形成三链(反基因),或与单链 RNA 形成杂交双链(反义),从而阻断基因的复制、转录或转录后 mRNA 的加工和翻译。同时,双链 RNA 能被细胞内的核糖核酸酶 H(RNaseH)所降解,从而更有效地阻断靶基因的表达。由于反义核苷酸只能与反向互补的靶序列结合,因此具有专一性高,副作用小的特点。

[0022] 本发明提供的人 miR-1229 的反义寡聚核苷酸可与人 miR-1229 补,从而抑制人 miR-1229 的表达而起到抗肿瘤的作用,其具有如下优点:

[0023] 1、本发明提供的反义寡聚核苷酸作用于特异性的靶位点,非特异性结合的位点很少,专一性高;

[0024] 2、本发明提供的反义寡聚核苷酸经过适当的化学修饰,具有毒性低、副作用小和半衰期长等特点;

[0025] 3、本发明提供的反义寡聚核苷酸具有很好的抑制效果,对肿瘤细胞生长的抑制率超过 85%。

附图说明

[0026] 图 1 显示了 miR-1229 反义寡聚核苷酸抑制肿瘤细胞 U87/MG 细胞的生长和增殖,其中,图 1A 为转染了 FAM 标记的阴性对照后的 U87/MG 细胞显微图(20×);图 1B 为转染了 FAM 标记的阴性对照后的 U87/MG 细胞显微图(20×,荧光下)图 1C 为转染阴性对照(5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3')后 U87/MG 细胞状态的显微图(10×);图 1D 为转染 miR-1229 反义寡聚核苷酸(5'-CUGUGGGAGGGCAGUGGUGAGAG-3')后 U87/MG 细胞状态的显微图(10×)。

具体实施方式

[0027] 本发明的反义寡聚核苷酸,其序列与 5'-CUCUCACCACUGCCCUGCCACAG-3' 中连续 13~23 个核苷酸序列互补,并且亦不与其他基因的 RNA 序列互补。在本发明的一个优选实施例中,所述反义寡聚核苷酸的序列为 5'-CUGUGGGAGGGCAGUGGUGAGAG-3'。本发明提供的反义寡聚核苷酸可以为修饰产物,它含有至少两个,通常至少 4 个,较佳的至少 6 个,更佳的至少 8 个核苷酸没有毒性副作用的修饰的核苷酸,所述修饰方式包括 2'-位甲氧基取代、硫

代修饰等。为了增加反义寡聚核苷酸的细胞摄取率,还可以在上述修饰的基础上对反义寡聚核苷酸进行胆固醇修饰或者 PEG 化修饰。上述修饰后的寡聚核苷酸能继续与靶序列有效配对,而且比普通的未经修饰的核糖核酸或者脱氧核糖核酸在体内具有更长的半衰期。

[0028] 下面将结合实施例及附图进一步详细地描述本发明。然而应当理解,列举这些实施例只是为了起说明作用,而并不是用来限制本发明的范围。

[0029] 实施例:人 miR-1229 的反义寡聚核苷酸对人神经胶质细胞瘤细胞系 U87/MG 抑制活性检测

[0030] 首先,由上海吉玛制药技术有限公司合成 miR-1229 反义寡聚核苷酸,序列为:5' -CUGUGGGAGGGCAGUGGUGAGAG-3'。在实施例中涉及的所用序列均由上海吉玛制药技术有限公司合成。

[0031] 细胞培养:

[0032] 将 U87/MG 细胞(人脑星形胶质母细胞瘤,购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)在 10% FBS-DMEM 培养基(FBS(胎牛血清)购自 Gibco,DMEM(一种常规培养基)购自 Hyclone)中,于 37°C,5% CO₂ 条件下培养。收集生长状态良好的 U87/MG 细胞,离心计数,以 2×10³ 每孔铺于 96 孔板内,37°C,5% CO₂ 培养 24h。

[0033] 转染:

[0034] 1) 转染前一天,在 96 孔板中用适量不含抗生素的培养基接种培养细胞,使转染时细胞的汇合度达到 30 ~ 50% ;

[0035] 2) 转染样品按照如下方法准备寡聚物-Lipofecta mine™2000(一种转染试剂)复合物:

[0036] a. 用 25 μl 不含血清的 Opti-MEM® I 培养基(Gibco)分别稀释 miR-1229 反义寡聚核苷酸(5' -CUGUGGGAGGGCAGUGGUGAGAG-3')、阴性对照(SEQID No. 4: 5' -CAGUACUUUGUGUAGUACAA-3')、FAM 标记的阴性对照,加入孔内后终浓度为 50nM,轻轻混匀,每个转染设 3 个复孔;

[0037] b. 使用前轻轻混匀 Lipofecta mine™2000(Invitrogen),然后取 0.25 μl 用 Opti-MEM® I 培养基将其稀释到 25 μl,轻轻混匀后在室温下孵育 5min;

[0038] c. 孵育 5min 后,稀释的 Lipofecta mine™2000 分别与稀释的反义核苷酸及对照混合,轻轻混匀后在室温下孵育 20min,以允许复合物的形成;

[0039] 3) 将复合物加入到每一个包含细胞和培养基的孔中,轻轻地前后摇动培养板混合;反义核苷酸及对照的终浓度为 50nM。

[0040] 4) 37°C,5% CO₂ 培养箱继续孵育 72 小时后,显微镜观察 U87/MG 细胞,照相。

[0041] 如图 1 所示,转染 72 小时后,超过 80% 的 U87/MG 细胞成功转染了 FAM 标记的阴性对照(图 1A,图 1B);转染阴性对照后,U87/MG 细胞完整,透光性强(图 1C);转染 miR-1229 反义寡聚核苷酸后大部分 U87/MG 细胞死亡(图 1D)。

[0042] 基于 MTT 的细胞毒性实验:

[0043] 向上一步骤中得到的细胞,加入配制好的 MTT(Sigma)5mg/ml(用 0.9% 的生理盐水配制),每孔加入 20 μl,37°C,5% CO₂ 孵育 4 小时后吸去培养基及 MTT,每孔加入 DMSO 100 μl 并通过酶标仪读取 OD570-OD630 的吸光度值(如表 1)。

[0044] 表 1

	样 品 (OD570-OD630)	阴 性 对 照 (OD570-OD630)
[0045]	0.091	0.604
	0.073	0.514
	0.092	0.592

[0046] 计算抑制率：

[0047]

阴性对照孔 (OD570-OD630) - 转染反义核酸孔 (OD570-OD630)

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{阴性对照孔 (OD570-OD630)} - \text{转染反义核酸孔 (OD570-OD630)}}{\text{阴性对照孔 (OD570-OD630)}} \times 100\%$$

[0048] 计算得到细胞生长的抑制率为 85.03±1.87%。

[0049] 结果表明：本发明提供的人 miR-1229 反义寡聚核苷酸有很好的抑制效果，对 U87/MG 生长的抑制率超过 85%。

[0001]

序列表

- <110> 中国科学院上海药物研究所
苏州吉玛基因药物科技有限公司
- <120> 人 miR-1229 的反义寡聚核苷酸及其应用
- <130> DI10-2176E-XC68
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 69
- <212> RNA
- <213> hsa-miR-1229
- <400> 1
- guggguaggg uuugggggag agcgugggcu gggguucagg gacaccucu caccacugcc 60
- cuccacag 69
- <210> 2
- <211> 23
- <212> RNA
- <213> 成熟体 hsa-miR-1229
- <400> 2
- cucucaccac ugcccucca cag 23
- <210> 3
- <211> 23
- <212> RNA

[0002]

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡聚核苷酸

<400> 3

cugugggagg gcagugguga gag

23

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 阴性对照反义寡聚核苷酸

<400> 4

caguacuuuuu guguaguaca a

21

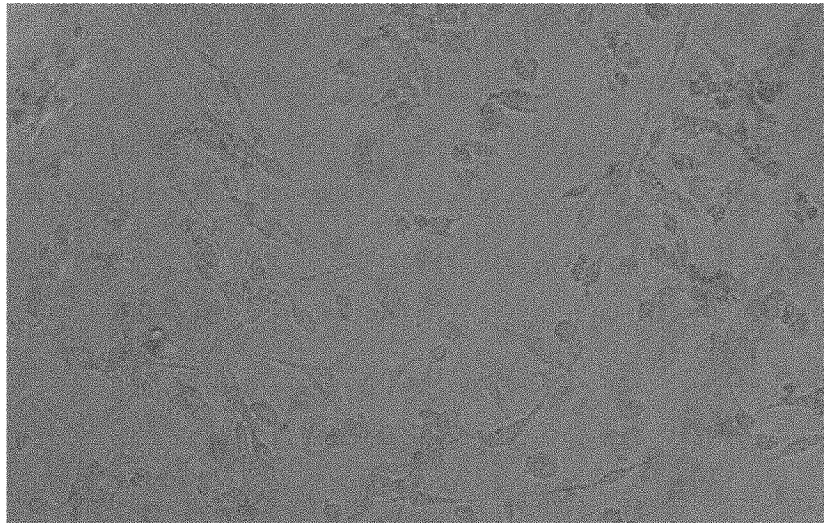


图 1A

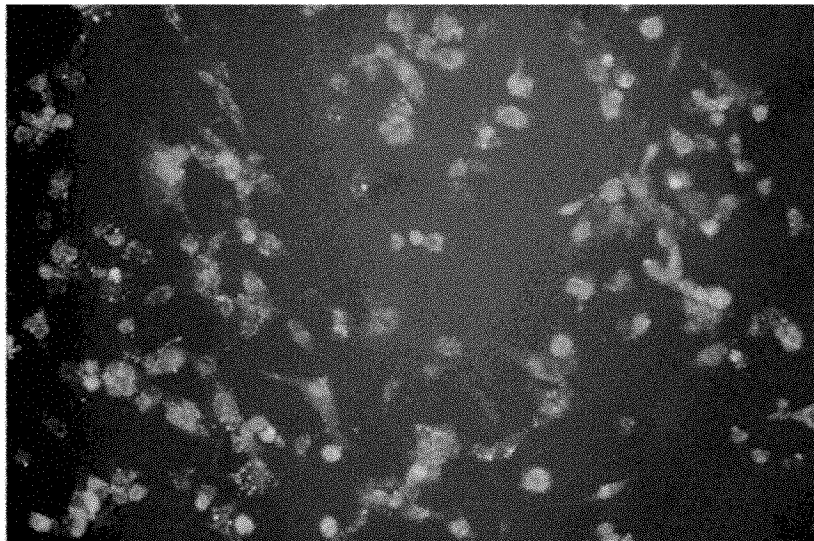


图 1B



图 2C

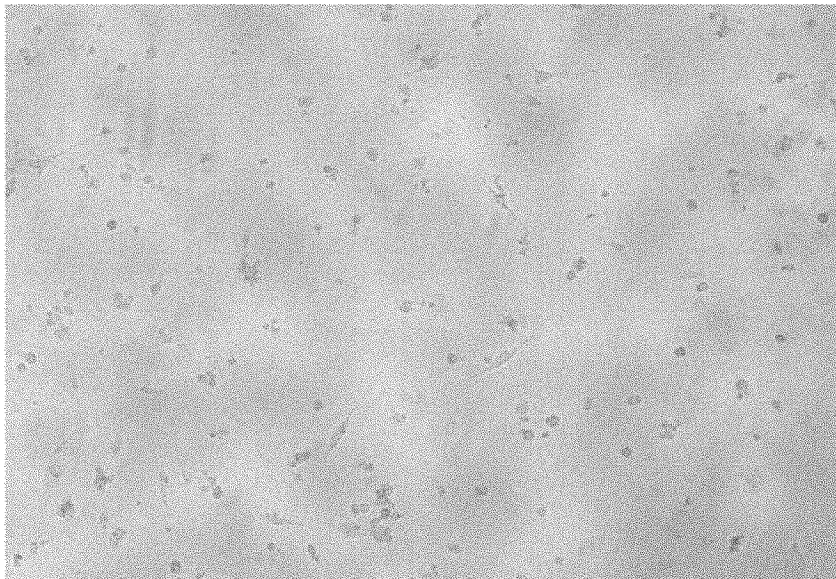


图 1D