



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0088810
(43) 공개일자 2023년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/713 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7016847
(22) 출원일자(국제) 2021년10월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년05월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/079580
(87) 국제공개번호 WO 2022/084561
국제공개일자 2022년04월28일
(30) 우선권주장
2016863.9 2020년10월23일 영국(GB)

(71) 출원인
커즈웨이 테라퓨틱스 리미티드
영국 쾨51 4티에프 글래스고 퀸 엘리자베스 유니
버시티 호스피탈 이미징 센터 오브 엑셀런스
(72) 발명자
길크리스트, 데렉 스튜어트
영국 쾨51 4티에프 글래스고 퀸 엘리자베스 유니
버시티 호스피탈 이미징 센터 오브 엑셀런스 커즈
웨이 테라퓨틱스 리미티드 내
밀러, 닐 린제이
영국 쾨51 4티에프 글래스고 퀸 엘리자베스 유니
버시티 호스피탈 이미징 센터 오브 엑셀런스 커즈
웨이 테라퓨틱스 리미티드 내
(74) 대리인
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 마이크로RNA-29 화합물, 조성물 및 요법에서의 용도

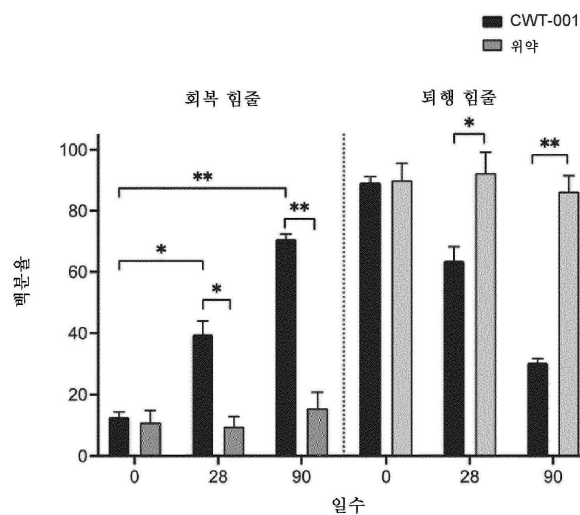
(57) 요약

본 발명은 신규한 마이크로RNA-29 (miR-29) 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 요법에서 이의 용도에 관한 것이다. 특히, 힘줄병증을 포함한 힘줄 손상 및 페이로니 질환 및 뒤꿈트랑 질환을 포함한 조직 섬유증과 같은 국소화된 콜라겐 조절장애를 수반하는 질환의 치료에 특히 효과적이고 안전한 miR-29 화합물 및 조성물이 본원에 제공된다. 또한, miR-29 화합물에 대한 유리한 용량 및 치료 요법이 제공된다.

대표도

도 20

N



(52) CPC특허분류

C12N 2310/141 (2013.01)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2310/344 (2013.01)

C12N 2310/346 (2013.01)

C12N 2310/3515 (2013.01)

C12N 2320/35 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는, miR-29 화합물 또는 이의 염:

(a) 핵염기 서열 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3' (서열식별번호: 1), 또는 서열 5'-AGCACCA-3' (서열식별번호: 8) 외부의 3개 이하의 위치에서 서열식별번호: 1과 상이한 핵염기 서열을 포함하는 가이드 가닥으로서; 여기서 뉴클레오타이드의 적어도 50%는 2'-플루오로 리보스를 포함하고, 3' 말단에서 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드는 각각 2'-O-메틸 리보스를 포함하는 것인 가이드 가닥; 및

(b) 핵염기 서열 5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3' (서열식별번호: 2) 또는 5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUA-3' (서열식별번호: 3)을 포함하거나, 3개 이하의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이한 핵염기 서열을 포함하는 패신저 가닥으로서; 여기서 적어도 10개의 인접한 뉴클레오타이드는 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드인 패신저 가닥.

청구항 2

제1항에 있어서, 가이드 가닥의 3' 말단에서 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드가 각각 2'-O-메틸 리보스를 포함하고; (i) 2'-변형된 리보스를 포함하는 가이드 가닥의 나머지 뉴클레오타이드 각각이 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드이거나, (ii) 가이드 가닥의 나머지 뉴클레오타이드 각각이 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드 또는 비변형된 리보스 모이어티인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 3

제1항에 있어서, (i) 가이드 가닥의 뉴클레오타이드 각각이 2'-변형된 리보스를 포함하거나, (ii) 가이드 가닥의 뉴클레오타이드 각각이 2'-O-메틸 리보스 또는 2'-플루오로 리보스를 포함하거나, (iii) 가이드 가닥의 3' 말단에서 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드가 각각 2'-O-메틸 리보스를 포함하고 가이드 가닥의 나머지 뉴클레오타이드 각각이 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 가닥 및/또는 패신저 가닥의 뉴클레오타이드간 연결 모두가 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 가닥의 핵염기 서열이 서열식별번호: 1에 정의된 바와 같고/같거나 패신저 가닥의 핵염기 서열이 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 3에 정의된 바와 같은 것인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 가닥이 5'-fUfAfGfCfAfCfAfUfCfUfGfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'이고/이거나; 패신저가 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmGrUmGrUmUrCdA-3'인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 패신저 가닥의 3' 말단에 공유적으로 부착된 콜레스테롤 모이어티를 추가로 포함하는 것인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 miR-29 화합물 또는 이의 염, 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에 사용하기 위한 것인 miR-29 화합물 또는 염, 또는 제약 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 힘줄 손상 또는 조직 섬유증을 치료하는 데 사용하기 위한 것인 miR-29 화합물 또는 염, 또는 제약 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 힘줄 손상, 페이로니 질환, 또는 뒤꿈트랑 질환을 치료하는 데 사용하기 위한 것인 miR-29 화합물 또는 염, 또는 제약 조성물.

청구항 12

대상체에서 힘줄 손상의 치료에 사용하기 위한 miR-29 화합물 또는 이의 염으로서, 치료는 대상체의 손상된 힘줄에 적어도 47 μg 의 miR-29 화합물의 용량, 또는 이의 염의 등가 용량의 주사에 의한 단일 투여를 포함하는 것인 miR-29 화합물 또는 이의 염.

청구항 13

대상체에서 페이로니 질환의 치료에 사용하기 위한 miR-29 화합물 또는 이의 염으로서, 치료는 대상체의 백색막의 환부에 적어도 47 μg 의 miR-29 화합물의 용량, 또는 이의 염의 등가 용량의 주사에 의한 단일 투여를 포함하는 것인 miR-29 화합물 또는 이의 염.

청구항 14

대상체에서 뒤꿈트랑 질환의 치료에 사용하기 위한 miR-29 화합물 또는 이의 염으로서, 치료는 대상체의 손바닥 근막의 환부에 적어도 47 μg 의 miR-29 화합물의 용량, 또는 이의 염의 등가 용량의 주사에 의한 단일 투여를 포함하는 것인 miR-29 화합물 또는 이의 염.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, miR-29 화합물의 용량이 적어도 95 μg , 적어도 190 μg , 적어도 475 μg , 적어도 1420 μg , 적어도 1900 μg , 적어도 4270 μg , 또는 이의 염의 등가 용량인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, miR29 화합물의 용량이 4740 μg 이하, 또는 이의 염의 등가 용량인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 17

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, miR-29 화합물 또는 이의 염이 약 1 ml의 멸균 수용액의 부피로 투여되는 것인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 18

제12항에 있어서, 힘줄 손상이 힘줄병증인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 19

제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물 또는 이의 염이 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 것인 miR-29 화합물 또는 염.

청구항 20

제12항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, miR-29 화합물 또는 이의 염의 가이드 가닥이 5'-

fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'이고, miR-29 화합물 또는 이의 염의 패신저 가닥이 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3'이고 패신저 가닥의 3' 말단에 공유적으로 부착된 콜레스테롤 모이어티를 포함하고, 콜레스테롤 모이어티의 중량을 포함하는 miR-29 화합물의 용량이 50 μ g 내지 5000 μ g, 예컨대 200 μ g, 500 μ g, 1500 μ g 또는 4500 μ g, 또는 이의 염의 등가 용량인 miR-29 화합물 또는 염.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 마이크로RNA-29 (miR-29) 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 요법에서 이의 용도에 관한 것이다. 특히, 힘줄병증을 포함한 힘줄 손상 및 페이로니 (Peyronie) 질환 및 뒤뮈트랑 (Dupuytren) 질환을 포함한 조직 섬유증과 같은 국소화된 콜라겐 조절장애를 수반하는 질환의 치료에 특히 효과적이고 안전한 miR-29 화합물 및 조성물이 본원에 제공된다. 또한, miR-29 화합물에 대한 유리한 용량 및 치료 요법이 제공된다.

배경 기술

[0002] 마이크로RNA (miR)는 RNA-유도된 침묵 컴플렉스 (RISC)와 함께 작용하여 상보적인 표적 서열을 함유하는 메신저 RNA (mRNA)의 번역을 감소시키거나 방지하는 작은 비-코딩 RNA이다.

[0003] miR-29 패밀리의 구성원은 세포외 매트릭스, 예컨대 콜라겐의 전사 후 조절자로 관련되어 있다. 이상조절된 콜라겐 합성, 특히 하나 이상의 유형의 콜라겐의 과잉 생성은 힘줄병증을 포함한 힘줄 손상, 페이로니 질환 및 뒤뮈트랑 질환을 포함한 조직 섬유증과 같은 특정 질환에서 나타나는 병리에 기여한다.

[0004] 본 발명자들에 의해 이전에 발표된 연구 (참조문헌 1, 2, 3)는 miR-29가 힘줄 손상에서 콜라겐 생성의 주요 질환 경로를 조절한다는 것을 확립하였다. 예컨대, 건강한 힘줄세포에서 miR-29 (예컨대, miR-29a, 본원에서 miR29a로도 지칭됨)는 콜라겐 3 (col3) 과잉 생성을 억제하는 반면, 힘줄 질환에서는 추가 손상되기 쉬운 기계적으로 열등한 힘줄 조직을 초래하는 miR-29 수준의 감소 및 col3의 과잉 생성이 있다. 이러한 연구에서 본 발명자들은 miR-29a 화합물을 사용한 힘줄세포의 시험관내 형질감염은 col3 발현을 상당히 감소시키는 반면, col1, 즉 힘줄에서 바람직하고 생체역학적으로 우수한 형태의 콜라겐의 수준은 크게 영향을 받지 않은 채로 남아 있다는 것을 밝혔다. 본 발명자들은 또한 힘줄세포에서 대부분의 col1 전사체는 대체 폴리아데닐화 부위의 활용으로 인해 miR-29에 대한 결합 부위가 결여된 반면, 힘줄세포에서 대부분의 col3 전사체는 miR-29 결합 부위를 보유한다는 것을 입증하였다. 따라서, 힘줄세포에서 Col1 전사체는 miR-29 매개된 하향 조절에 민감하지 않은 반면, miR-29는 이러한 세포에서 col3을 특이적으로 억제할 수 있었다. 이는 힘줄 손상의 생체내 모델에서 확인되었으며, miR-29a 화합물을 마우스 (참조문헌 1, 2) 또는 말 (참조문헌 3)의 손상된 힘줄에 전달하면 col1 수준은 유지하면서 col3 합성은 감소하는 것으로 나타났다. 이전 연구는 섬유모세포에서 miR-29가 col3 뿐만 아니라 col1을 포함한 다른 유형의 콜라겐의 발현을 억제한다고 밝혔었다 (예컨대, 참조문헌 4).

[0005] 본 발명은 요법에서 특히 효과적이고 안전한 개선된 miR-29 화합물을 제공한다. 이러한 화합물은 증가된 miR-29 (예컨대, miR-29a) 활성을 필요로 하는 임의의 병태의 치료에 유용하다. 이는 힘줄병증 (예컨대, 외측 상과염, 테니스 엘보우로도 공지됨)을 포함한 힘줄 손상, 및 페이로니 질환 및 뒤뮈트랑 질환과 같은 조직 섬유증을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 국소화된 콜라겐 조절장애를 수반하고 콜라겐 3과 같은 하나 이상의 유형의 콜라겐의 발현의 감소 또는 억제를 필요로 하는 병태를 포괄한다. 본원에 기재된 화합물은 천연 miR-29의 활성을 모방하고, 특정 화학적 변형은 증가된 활성, 안정성 및 세포 흡수와 같은 개선된 약리학적 특성을 제공하지만 면역원성 문제를 일으키지 않는다. 본원에 기재된 화합물 및 조성물의 추가 이점은 이들이 단순 수성 담체에서 안정하고 재구성 또는 회석할 필요 없이 환부에 직접적으로 투여될 수 있다는 것이다.

[0006] 힘줄병증을 포함한 힘줄 손상, 및 페이로니 질환 및 뒤뮈트랑 질환과 같은 조직 섬유증과 같은 질환의 치료에서 miR-29 화합물에 대한 특히 유리한 용량 및 치료 요법이 본원에 제공된다. 본 발명자들은 miR-29 화합물을 손상된 힘줄에 국소 (힘줄내) 주사로 투여하면 힘줄 치유 및 힘줄 섬유질을 개선한다는 것을, 예컨대 힘줄병증의 마우스 모델에서 밝혔다. 놀랍게도, 단일 투여 (즉, 단일 용량)만으로 치료 효능을 달성할 수 있다. 요법 (예컨대, 인간 요법)에 적합한 용량이 제공된다. 뒤뮈트랑 및 페이로니 질환과 같은 조직 섬유증에서 miR-29 화합물의 치료 효능을 뒷받침하는 데이터가 또한 이용 가능하다. miR-29 화합물은 단순 수성 담체에서 병리 부위에 (병변내로) 국소적으로 투여될 수 있다. 본원에 제공된 데이터는 국소 병변내 투여 후 무시할 수 있는 전신 노출 또는 다른 조직으로의 분포가 있음을 나타내므로 특히 안전한 요법을 제공한다. 또한, 단일 용량이 치료적으로 효과적일 수 있기 때문에, 단지 1회의 의료 전문가의 방문이 필요하여 간단하고 비용 효과적이며 빠르고

효과적인 치료가 가능하다.

발명의 내용

- [0007] 한 측면에서, 본 발명은 miR-29 화합물, 이를 포함하는 조성물, 및 요법에서 이의 용도를 제공한다. 따라서, 본 발명은 천연 miR-29a의 생물학적 활성, 예컨대 콜라겐 3 발현의 하향 조절을 모방하는 가이드 (안티센스) 가닥 및 패신저 (센스) 가닥을 포함하는 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공한다. 따라서, 본 발명의 화합물은 콜라겐 3 발현을 감소시키거나 억제할 수 있다. miR-29 패밀리 (miR-29a, miR-29b-1, miR-29b-2 및 miR-29c)의 다양한 구성원 사이의 생물학적 활성이 겹치기 때문에, 본원에 제공된 miR-29 화합물은 또한 다른 miR-29 패밀리 구성원의 생물학적 활성을 모방할 수 있다. 따라서, miR-29 화합물은 또한 miR-29 모방체 또는 miR-29 모방체 화합물로 지칭될 수 있다.
- [0008] miR-29 화합물의 가이드 및 패신저 가닥은 올리고뉴클레오티드이며, 즉 이들은 뉴클레오타이드간 연결로 연결된 뉴클레오타이드를 함유한다. 가이드 및 패신저 가닥은 전형적으로 적어도 하나의 가닥에 많은 불일치 및 돌출부를 함유하는 듀플렉스를 형성한다. 본원에 기재된 miR-29 화합물은 전형적으로 화학적으로 변형되며, 이는 적어도 하나의 당, 뉴클레오타이드간 연결 또는 핵염기가 자연 발생 miR-29와 상이한 화학 구조를 갖는다는 것을 의미한다. 화학적 변형(들)은, 예컨대 활성 및/또는 안정성을 향상시킴으로써 miR-29 화합물의 약리학적 특성을 개선하도록 선택될 수 있다. 예시적인 변형된 당은 2'-플루오로 리보스, 2'-O-메틸 리보스 또는 2'-데옥시 리보스이다. 예시적인 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결이다. 예시적인 변형된 핵염기는 5-메틸 시토신이다. miR-29 화합물은 또한 전형적으로 패신저 가닥의 3' 말단에서 콜레스테롤 모이어티와 같은 친유성 모이어티에 접합 (즉, 공유적으로 연결)될 수 있다. 친유성 모이어티에 대한 이러한 접합은, 예컨대 세포 흡수를 개선함으로써 생체내 사용을 위한 miR-29 화합물의 특성을 개선할 수 있다.
- [0009] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공한다:
- [0010] (a) 서열 5'-AGCACCA-3' (서열식별번호: 8, 시드 서열임) 외부의 5개 이하 (또는 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하)의 위치 및 임의적으로 시드 서열 내의 3개 이하 (또는 2개 또는 1개 이하)의 위치에서 5'-UAGCACCAUCUGAAUUGGUUA-3' (서열식별번호: 1)와 상이한 핵염기 서열을 포함하는 가이드 가닥으로서; 여기서 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스를 포함하고, 임의적으로 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보스를 포함하는 것인 가이드 가닥; 및
- [0011] (b) 5개 이하 (또는 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하; 예컨대 3개 이하)의 위치에서 5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3' (서열식별번호: 2)와 상이한 핵염기 서열을 포함하는 패신저 가닥으로서; 여기서 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보스를 포함하고, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 비변형된 리보스를 포함하는 것인 패신저 가닥.
- [0012] 핵염기 서열은 상응하는 위치에 상이하거나, 추가적이거나, 누락된 핵염기가 있는 경우 또 다른 핵염기 서열과 "상이하다". 특정 수 이하의 위치에서 또 다른 핵염기 서열과 상이한 핵염기 서열은 또한 0개의 위치에서 상이한 핵염기 서열을 포괄하며, 즉 핵염기 서열은 동일할 수 있다.
- [0013] 따라서, 가이드 가닥의 핵염기 서열은 천연 miR-29a의 시드 서열 (AGCACCA, 서열식별번호: 8) 외부의 5개 이하의 위치, 예컨대 4개 이하의 위치, 3개 이하의 위치, 2개 이하의 위치, 또는 1개 이하의 위치, 바람직하게는 3개 이하의 위치에서 천연 miR-29a (서열식별번호: 1)의 핵염기 서열과 상이할 수 있다. 한 실시양태에서, 시드 서열 외부의 가이드 가닥의 핵염기 서열은 서열식별번호: 1의 상응하는 위치와 동일하다. 추가로 또는 대안적으로, miR-29 화합물의 가이드 가닥의 시드 서열은 3개 이하의 위치, 예컨대 2개 이하의 위치, 또는 1개 이하의 위치에서 천연 miR-29a의 시드 서열 (AGCACCA, 서열식별번호: 8)과 상이할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 시드 서열은 서열식별번호: 8과 동일하다.
- [0014] 패신저 가닥의 핵염기 서열은 5개 이하의 위치, 예컨대 4개 이하의 위치에서 5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3' (서열식별번호: 2)와 상이할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 패신저 가닥의 핵염기 서열은 3개 이하의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이하다. 다른 실시양태에서, 패신저 가닥의 핵염기 서열은 2개 이하의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이하다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥의 핵염기 서열은 1개 이하의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이하다. 이는 패신저 가닥의 핵염기 서열이 서열식별번호: 2의 서열 또는 서열식별번호: 2와 비교하여 하나의 상이하거나, 추가적이거나, 누락된 핵염기를 갖는 서열을 갖는다는 것을 의미한다. 서열식별번호: 3은 서열식별번호: 2와 비교하여 하나의 누락된 핵염기를 갖는다.

- [0015] 서열식별번호: 2 및 서열식별번호: 3은 단지 하나의 위치에서만 상이하므로, 패신저 가닥이 상기와 같이 5개 이하 등의 위치에서 서열식별번호: 3과 상이한 실시양태도 본원에 제공된다.
- [0016] 특정 실시양태에서, 패신저 가닥은 서열식별번호: 2의 위치 10-12 및 18-21에 상응하는 상기 서열식별번호: 2에서 밀줄 친 서열 5'-UUU-3' 및/또는 5'-UUCA-3' 외부의 5개 이하 (예컨대 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하; 예컨대 3개 이하)의 위치에서 5'-ACUGAUUCUUUUGGUGUUCAG-3' (서열식별번호: 2)와 상이한 핵염기 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥의 핵염기 서열은 서열 5'-UUU-3' 및 5'-UUCA-3' 외부에서만 서열식별번호: 2와 상이하다. 예컨대, 패신저 가닥의 핵염기 서열은 서열 5'-UUU-3' 및 5'-UUCA-3' 외부의 2개 이하의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이할 수 있다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥의 핵염기 서열은 서열 5'-UUU-3' 및 5'-UUCA-3' 외부의 1개 또는 2개 이하의 위치에서, 예컨대 1개 이하의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 패신저 가닥은 본원에 기재된 바와 같은 플루오르화된 가이드 가닥 (예컨대, 하나 이상의 2'-플루오로 리보뉴클레오시드를 포함함, 예컨대 뉴클레오시드의 적어도 50%는 2'-플루오로 리보뉴클레오시드이거나, 바람직하게는 3' 말단에 위치된 1개 또는 2개의 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오시드를 제외한 모든 뉴클레오시드는 2'-플루오로 리보뉴클레오시드임)과 조합된다.
- [0017] 한 실시양태에서, 가이드 가닥은 서열식별번호: 1의 핵염기 서열의 적어도 7개의 연속적인 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다. 예컨대, 가이드 가닥은 서열식별번호: 1의 핵염기 서열의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 적어도 21개의 연속적인 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 가이드 가닥은 서열식별번호: 1의 핵염기 서열의 적어도 18개의 연속적인 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다.
- [0018] 동일한 또는 다른 실시양태에서, 패신저 가닥은 서열식별번호: 2의 핵염기 서열의 적어도 7개의 연속적인 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 가질 수 있다. 예컨대, 패신저 가닥은 서열식별번호: 2의 핵염기 서열의 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 적어도 21개의 연속적인 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 패신저 가닥은 서열식별번호: 2의 핵염기 서열의 적어도 18개의 연속적인 핵염기를 포함하는 핵염기 서열을 갖는다.
- [0019] 한 실시양태에서, 가이드 가닥은 서열식별번호: 1의 전체 길이에 걸쳐 적어도 85% 동일한 핵염기 서열을 포함한다. 예컨대, 가이드 가닥은 서열식별번호: 1의 전체 길이에 걸쳐 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 핵염기 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 앞선 문장에서 정의된 바와 같은 핵염기 서열을 가지며, 서열식별번호: 1의 위치 2-8에 상응하는 위치에 서열 5'-AGCACCA-3' (서열식별번호: 8)을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 가이드 가닥의 핵염기 서열은 서열식별번호: 1의 위치 2-8 외부에서만 서열식별번호: 1과 상이할 수 있다. 차이는 상기 기재된 바와 같이 동일성 백분율 또는 동일/상이한 핵염기의 수에 의해 정의될 수 있다.
- [0020] 동일한 또는 다른 실시양태에서, 패신저 가닥은 서열식별번호: 2 또는 3의 전체 길이에 걸쳐 적어도 85% 동일한 핵염기 서열을 포함할 수 있다. 예컨대, 패신저 가닥은 서열식별번호: 2 또는 3의 전체 길이에 걸쳐 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 핵염기 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥은 앞선 문장에서 정의된 바와 같은 핵염기 서열을 가지며, 서열식별번호: 2의 위치 10-12 및 18-21에 상응하는 위치에서 서열 5'-UUU-3' 및/또는 5'-UUCA-3'을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 패신저 가닥의 핵염기 서열은 서열식별번호: 2의 위치 10-12 및/또는 18-21 외부에서만 서열식별번호: 2와 상이할 수 있다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥의 핵염기 서열은 서열식별번호: 2의 위치 10-12 및 18-21 외부에서만 서열식별번호: 2와 상이할 수 있다. 차이는 상기 기재된 바와 같이 동일성 백분율 또는 동일/상이한 핵염기의 수에 의해 정의될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 패신저 가닥은 본원에 기재된 바와 같은 플루오르화된 가이드 가닥 (예컨대, 하나 이상의 2'-플루오로 리보뉴클레오시드를 포함함, 예컨대 뉴클레오시드의 적어도 50%는 2'-플루오로 리보뉴클레오시드이거나, 바람직하게는 3' 말단에 위치된 1개 또는 2개의 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오시드를 제외한 모든 뉴클레오시드는 2'-플루오로 리보뉴클레오시드임)과 조합된다.
- [0021] 추가 실시양태에서, 가이드 가닥 및/또는 패신저 가닥은 상기 나타낸 바와 같은 핵염기 서열로 이루어질 수 있다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 핵염기 서열 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3' (서열식별번호: 1)을 포함하거나 이로 이루어지고/지거나, 패신저 가닥은 핵염기 서열 5'-ACUGAUUCUUUUGGUGUUCAG-3' (서열식별번호: 2) 또는 5'-ACUGAUUCUUUUGGUGUUCA-3' (서열식별번호: 3)을 포함하거나 이로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 핵염기 서열 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3' (서열식별번호: 1)을 포함하거나 이로 이루어지고/지거나, 패신저 가닥은 핵염기 서열 5'-ACUGAUUCUUUUGGUGUUCA-3' (서열식별번호: 3)을 포함하거나 이로

이루어진다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 핵염기 서열 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3' (서열식별번호: 1)을 포함하고, 패신저 가닥은 핵염기 서열 5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUA-3' (서열식별번호: 3)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 핵염기 서열 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3' (서열식별번호: 1)로 이루어지고, 패신저 가닥은 핵염기 서열 5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUA-3' (서열식별번호: 3)으로 이루어진다. 임의의 이러한 실시양태에서, 용어 "로 이루어진다"는 가이드 가닥 또는 패신저 가닥에 부착된 다른 (비-뉴클레오타이드) 모이어티의 존재를 배제하지 않으며, 예컨대 패신저 가닥은 전형적으로 패신저 가닥의 3' 말단에서, 예컨대 링커를 통해 콜레스테롤 모이어티와 같은 친유성 모이어티에 연결될 수 있다.

[0022] 특정 실시양태에서, 패신저 가닥의 3' 말단에서 핵염기는 A 또는 G이다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥의 3' 말단에서 핵염기는 A이다.

[0023] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 가이드 가닥의 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스를 포함할 수 있다. 예컨대, 가이드 가닥의 적어도 또는 약 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드이다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥의 20개 이하 또는 21개 이하의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드이다.

[0024] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 가이드 가닥의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 적어도 95%의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 가이드 가닥의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스 이외의 당 (변형된 당일 수 있음)을 함유한다. 특정 실시양태에서, 가이드 가닥의 적어도 50% (또는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 적어도 95%)의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스를 포함하고, 가이드 가닥의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보스를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 가이드 가닥의 적어도 50% (또는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 적어도 95%)의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스를 포함하고, 가이드 가닥의 적어도 2개의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보스를 포함한다. 예컨대, 가이드 가닥의 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보스를 포함할 수 있다. 2'-O-메틸 리보스를 포함하는 가이드 가닥의 뉴클레오타이드는 가이드 가닥의 3' 말단에 위치될 수 있다.

[0025] 한 실시양태에서, 가이드 가닥의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드이고/이거나, 가이드 가닥의 91% 이하, 또는 95% 이하의 뉴클레오타이드 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드이다. 예컨대, 가이드 가닥의 적어도 50% 및 91% 이하의 뉴클레오타이드는 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드이다.

[0026] 한 실시양태에서, 2'-O-메틸 리보스 및 비변형된 리보스를 포함하는 패신저 가닥의 뉴클레오타이드는 교대한다. 예컨대, 패신저 가닥에서 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 적어도 20개의 인접한 뉴클레오타이드는 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드일 수 있다. 따라서, 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드인 패신저 가닥에 적어도 10개의 인접한 뉴클레오타이드가 있을 수 있다. 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드인 패신저 가닥에 적어도 12개의 인접한 뉴클레오타이드가 있을 수 있다. 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드인 패신저 가닥에 적어도 14개의 인접한 뉴클레오타이드가 있을 수 있다. 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드인 패신저 가닥에 적어도 16개의 인접한 뉴클레오타이드가 있을 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드인 패신저 가닥에 적어도 18개의 인접한 뉴클레오타이드가 있다. 패신저 가닥의 하나 이상의 뉴클레오타이드는 테옥시 리보스를 포함할 수 있다. 이러한 뉴클레오타이드는 패신저 가닥의 3' 말단에 위치될 수 있다.

[0027] 한 실시양태에서, 패신저 가닥의 적어도 5, 6, 7, 8 또는 9개의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드이고/이거나, 패신저 가닥의 10개 이하의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드이다.

[0028] 한 실시양태에서, 패신저 가닥의 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 45%의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드이고/이거나, 패신저 가닥의 50% 이하의 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드이다.

[0029] 따라서, 본 발명은 본원의 임의의 실시양태에 기재된 바와 같은 가이드 가닥 및 본원의 임의의 실시양태에 기재된 바와 같은 패신저 가닥을 포함하는 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공한다.

[0030] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공한다:

- [0031] (a) 핵염기 서열 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3' (서열식별번호: 1), 또는 서열 5'-AGCACCA-3' (서열식별번호: 8) 외부의 5개 이하의 위치에서, 및 임의적으로 상기 서열 내의 3개 이하의 위치에서 서열식별번호: 1과 상이한 핵염기 서열을 포함하는 가이드 가닥으로서; 여기서 뉴클레오타이드의 적어도 50%는 2'-플루오로 리보스를 포함하고, 바람직하게는 3' 말단에서 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드는 각각 2'-O-메틸 리보스를 포함하는 것인 가이드 가닥; 및
- [0032] (b) 핵염기 서열 5'-ACUGAUUUCUUUGGUGUUCAG-3' (서열식별번호: 2) 또는 5'-ACUGAUUUCUUUGGUGUUC-3' (서열식별번호: 3)을 포함하거나, 3개 이하의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이한 핵염기 서열을 포함하는 패신저 가닥으로서; 여기서 적어도 10개의 인접한 뉴클레오타이드는 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드인 패신저 가닥.
- [0033] 특정 실시양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공한다:
- [0034] (a) 핵염기 서열 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3' (서열식별번호: 1), 또는 서열 5'-AGCACCA-3' (서열식별번호: 8) 외부의 3개 이하 위치에서 서열식별번호: 1과 상이한 핵염기 서열을 포함하는 가이드 가닥으로서; 여기서 뉴클레오타이드의 적어도 50%는 2'-플루오로 리보스를 포함하고, 3' 말단에서 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드는 각각 2'-O-메틸 리보스를 포함하는 것인 가이드 가닥; 및
- [0035] (b) 핵염기 서열 5'-ACUGAUUUCUUUGGUGUUCAG-3' (서열식별번호: 2) 또는 5'-ACUGAUUUCUUUGGUGUUC-3' (서열식별번호: 3)을 포함하거나, 3개 이하의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이한 핵염기 서열을 포함하는 패신저 가닥으로서; 여기서 적어도 10개의 인접한 뉴클레오타이드는 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드인 패신저 가닥.
- [0036] 본 실시양태에 따른 예시적인 화합물은 Teno15, Teno18, Teno19, Teno20, Teno29, Teno32, Teno33 및 Teno34이며, 이들은 하기 실시예에 기재되어 있다.
- [0037] 상기 언급된 바와 같이, 패신저 가닥에서 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 적어도 20개의 인접한 뉴클레오타이드는 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드일 수 있다. 예컨대, 패신저 가닥에서 적어도 12개의 인접한 뉴클레오타이드는 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드이다. 예컨대, 패신저 가닥에서 적어도 14개의 인접한 뉴클레오타이드는 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드이다. 예컨대, 패신저 가닥에서 적어도 16개의 인접한 뉴클레오타이드는 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드이다. 특정 실시양태에서, 패신저 가닥에서 적어도 18개의 인접한 뉴클레오타이드는 교대로 2'-O-메틸 리보스 뉴클레오타이드 및 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드이다.
- [0038] 바람직하게는 각각 2'-O-메틸 리보스를 포함하는 패신저 가닥에서의 적어도 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드는 패신저 가닥의 3' 말단에 위치된다. 그러나, 이는 필수적인 것은 아니다.
- [0039] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥의 3' 말단에서 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드는 각각 2'-O-메틸 리보스를 포함할 수 있고, (i) 2'-변형된 리보스를 포함하는 가이드 가닥의 나머지 뉴클레오타이드 각각은 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드이거나, (ii) 가이드 가닥의 나머지 뉴클레오타이드 각각은 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드 또는 비변형된 리보스 모이어티이다.
- [0040] 특정 실시양태에서, (i) 가이드 가닥의 뉴클레오타이드 각각은 2'-변형된 리보스를 포함하거나, (ii) 가이드 가닥의 뉴클레오타이드 각각은 2'-O-메틸 리보스 또는 2'-플루오로 리보스를 포함하거나, (iii) 가이드 가닥의 3' 말단에서 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드는 각각 2'-O-메틸 리보스를 포함하고 가이드 가닥의 나머지 뉴클레오타이드 각각은 2'-플루오로 리보스 뉴클레오타이드이다.
- [0041] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥 및/또는 패신저의 뉴클레오타이드간 연결 중 어떠한 것도 화학적으로 변형되지 않는다. 따라서, 특정 실시양태에서, 가이드 가닥 및/또는 패신저 가닥의 모든 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결이다.
- [0042] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥 및/또는 패신저의 핵염기 중 어떠한 것도 화학적으로 변형되지 않는다. 예컨대, 특정 실시양태에서, 가이드 가닥 및/또는 패신저 가닥의 핵염기 중 어떠한 것도 5-메틸 시토신을 함유하지 않는다.
- [0043] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥의 핵염기 서열은 서열식별번호: 1에 정의된 바와 같고/같거나, 패신저 가닥의

핵염기 서열은 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 3에 정의된 바와 같다.

- [0044] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥의 핵염기 서열은 서열식별번호: 1에 정의된 바와 같고/같거나, 패신저 가닥의 핵염기 서열은 서열식별번호: 3에 정의된 바와 같다.
- [0045] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'이고; 패신저는 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3'이며; 여기서 뉴클레오타이드 앞의 'f' = 2'-데옥시-플루오로 리보뉴클레오타이드 (-F); 뉴클레오타이드 앞의 'm' = 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드 (-O-Me); 뉴클레오타이드 앞의 'r' = 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드 (-OH); 뉴클레오타이드 앞의 'd' = 2'-데옥시리보뉴클레오타이드 (-H)이다. 본 실시양태에 따른 예시적인 화합물은 Teno18이며, 이는 하기 실시예에 기재되어 있다.
- [0046] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'이고; 패신저는 5'-mAmCrUmGrAmUrUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUmCmAmG-3'이며; 여기서 뉴클레오타이드 앞의 'f' = 2'-데옥시-플루오로 리보뉴클레오타이드 (-F); 뉴클레오타이드 앞의 'm' = 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드 (-O-Me); 뉴클레오타이드 앞의 'r' = 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드 (-OH)이다. 본 실시양태에 따른 예시적인 화합물은 Teno20이며, 이는 하기 실시예에 기재되어 있다.
- [0047] 특정 실시양태에서, 가이드 가닥은 5'-fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA-3'이고; 패신저는 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAdG-3'이며; 여기서 뉴클레오타이드 앞의 'f' = 2'-데옥시-플루오로 리보뉴클레오타이드 (-F); 뉴클레오타이드 앞의 'm' = 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드 (-O-Me); 뉴클레오타이드 앞의 'r' = 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드 (-OH); 뉴클레오타이드 앞의 'd' = 2'-데옥시리보뉴클레오타이드 (-H)이다. 본 실시양태에 따른 예시적인 화합물은 Teno33이며, 이는 하기 실시예에 기재되어 있다.
- [0048] 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, miR-29 화합물 또는 이의 염은 패신저 가닥의 3' 말단에 공유적으로 부착된 콜레스테롤 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 콜레스테롤 모이어티는 트리에틸렌글리콜 콜레스테롤 모이어티일 수 있다. 예시적인 콜레스테롤 모이어티는 3'포스포프로파-2-올, 2,2'-[에탄-1,2-디일비스(옥시)]디(에탄-1-올), 10-0-[1-프로필-3-N-카르바모일 콜레스테릴]이다.
- [0049] 예시적인 실시양태에서, 가이드 가닥은 5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'이고; 패신저는 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdAchol-3'이며; 여기서 뉴클레오타이드 앞의 'f' = 2'-데옥시-플루오로 리보뉴클레오타이드 (-F); 뉴클레오타이드 앞의 'm' = 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드 (-O-Me); 뉴클레오타이드 앞의 'r' = 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드 (-OH); 뉴클레오타이드 앞의 'd' = 2'-데옥시리보뉴클레오타이드 (-H)이고; chol은 콜레스테롤 모이어티를 나타낸다. 본 실시양태에 따른 예시적인 화합물은 콜레스테롤-접합된 Teno18 (CWT-001)이며, 이는 하기 실시예에 기재되어 있다.
- [0050] 임의의 이러한 실시양태에서, 가이드 가닥의 5' 말단에서 뉴클레오타이드의 당의 5' 위치에 포스페이트기 ('5'Phos')가 있을 수 있다.
- [0051] 따라서, 한 실시양태에서, 가이드 가닥은 5'-PhosfUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'이고; 패신저 가닥은 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3'이며; 여기서 가이드 가닥 및 패신저 가닥의 모든 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결이다. 본 실시양태에 따른 예시적인 화합물은 Teno18이며, 이는 하기 실시예에 기재되어 있다.
- [0052] 또 다른 실시양태에서, 가이드 가닥은 5'-PhosfUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'이고; 패신저는 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdAchol-3'이며; 여기서 chol은 콜레스테롤 모이어티, 예컨대 트리에틸렌 글리콜 콜레스테롤 모이어티이고; 가이드 가닥 및 패신저 가닥의 모든 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결이다. 본 실시양태에 따른 예시적인 화합물은 콜레스테롤-접합된 Teno18 (CWT-001)이고, 이는 하기 실시예에 기재되어 있다.
- [0053] 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 miR-29 화합물 또는 이의 염을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 제약 조성물은 전형적으로 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제약상 허용되는 담체 또는 희석제는 멸균 용액이다. 제약상 허용되는 담체 또는 희석제는 비경구적으로 허용되는 수용액이다. 예컨대, 제약상 허용되는 담체 또는 희석제는 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)일 수 있다. 제약상 허용되는 담체 또는 희석제는, 예컨대 0.001% - 0.005%, 예컨대 0.003% (100 μM)의 최종 농도로 EDTA와 같은 추가 물질을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 비-액체 담체를 포함하지 않으며, 예컨대 miR-29 화합물 또는 이의 염은 이식 가능한 스케폴드와 같은 고체 담체에 포함되거나 이에, 이에 대해 또는 이와 함께 투여되

지 않는다.

- [0054] 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 miR-29 화합물 또는 이의 염을 포함하는 용기를 추가로 제공한다. miR-29 화합물 또는 이의 염은 전형적으로 치료 유효량으로 제공된다. 치료 유효량은 대상체에게 투여될 때 콜라겐 3을 감소시키거나 억제하고 전형적으로 질환 증상 개선, 예컨대 감소된 통증 또는 장애, 개선된 기능성 및/또는 더 느린 질환 진행을 발생시키는 miR-29 화합물 또는 이의 염의 양이다. 용기는 전형적으로 용기에 부착된 라벨을 포함한다. 용기는 본원에 기재된 제약 조성물을 함유하는 유리 바이알 (예컨대, 단일 사용 유리 바이알) 일 수 있다. 용기는 주사기 또는 주입기일 수 있다.
- [0055] 본 발명은 또한 요법에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 miR-29 화합물 또는 이의 염, 또는 제약 조성물을 제공한다.
- [0056] 따라서, 또한 약제의 제조를 위한 본원에 기재된 바와 같은 miR-29 화합물 또는 이의 염의 용도, 또는 제약 조성물의 용도가 본원에 제공된다.
- [0057] 또한, 치료 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 miR-29 화합물 또는 이의 염, 또는 제약 조성물을 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환 또는 병태를 치료하는 방법이 제공된다.
- [0058] 용어 "요법", "약제", "치료하는" 및 "치료" 등은 치유적 방법 뿐만 아니라 예방적 방법을 포함한다.
- [0059] 따라서, 바람직한 실시양태에서, 예컨대 miR-29 화합물 또는 이의 염의 주사에 의한 병변내 투여 (예컨대, 단일 병변내 투여)를 포함하는 요법에 사용하기 위한 miR-29 화합물 또는 이의 염이 본원에 제공되며, 여기서 miR-29 화합물 또는 염은 가이드 가닥 5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3' 및 패신저 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3'을 포함하며, 임의적으로 친유성 (예컨대 콜레스테롤) 모이어티는 패신저 가닥의 3' 말단에 공유적으로 부착된다.
- [0060] 특정 실시양태에서, 치료는 콜라겐 조절장애, 특히 콜라겐 과잉 생성, 예컨대 콜라겐 3 과잉 생성에 대한 것이다. 용어 "과잉 생성"은 상응하는 건강한 조직과 비교하여 증가된 콜라겐 생성을 지칭한다. 과잉 생성은 전형적으로 국소적이다. 예컨대, 힘줄병증과 같은 힘줄 손상은 국소적 콜라겐 3 과잉 생성을 수반한다. 페이로니 질환 또는 뒤휘트랑 질환과 같은 섬유성 병태도 국소적 콜라겐 3 과잉 생성을 수반한다. 따라서, 한 실시양태에서, 본원에 기재된 miR-29 화합물 또는 이의 염, 또는 제약 조성물은 힘줄병증과 같은 힘줄 손상, 또는 페이로니 질환 또는 뒤휘트랑 질환과 같은 조직 섬유증을 치료하는 데 사용하기 위한 것이다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 miR-29 화합물 또는 이의 염, 또는 제약 조성물은 힘줄 손상을 치료하는 데 사용하기 위한 것이다. 힘줄 손상은 힘줄병증일 수 있다. 힘줄 손상은 만성 힘줄병증일 수 있다. 힘줄 손상은 외측 상과염일 수 있다.
- [0061] 대상체는 전형적으로 인간이다. 그러나, 또 다른 바람직한 대상체는 말, 특히 말 스포츠를 위해 사육된 말이다.
- [0062] 또 다른 측면에서, 본 발명은 miR-29 화합물, 이의 염 및 이를 포함하는 제약 조성물에 대한 용량 및 치료 요법을 제공한다. 본원에 제공된 용량 및 치료 요법은 다양한 miR-29 화합물에 적합하며, 즉 본원에서의 용량 및 치료 요법에 대한 본 개시내용의 적용 가능성은 본원에 제공된 신규한 miR-29 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 그럼에도 불구하고, 용량 및 치료 요법은 바람직하게는 신규한 miR-29 화합물을 수반하는데, 이는 본 발명자들이 용량 및 치료 요법이 이러한 화합물에 특히 적합하다는 것을 밝혔기 때문이다.
- [0063] 본원에 개시된 용량 및 치료 요법과 함께 사용하기 위한 miR-29 화합물은 상기 기재된 바와 같이 화학적으로 변형될 수 있다. 이는 적어도 하나의 당, 뉴클레오시드간 연결 또는 핵염기가 다시 상기 기재된 바와 같이 자연 발생 miR-29와 상이한 화학 구조를 갖는다는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, miR-29 화합물 또는 이의 염은 변형된 당은 포함하지만 변형된 뉴클레오시드간 연결 또는 변형된 핵염기를 포함하지 않는다 (miR-29 화합물 또는 이의 염은 변형된 뉴클레오시드간 연결을 포함하지 않으며 변형된 핵염기를 포함하지 않음). 예컨대, 가이드 가닥 및/또는 패신저 가닥의 모든 뉴클레오시드간 연결은 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결일 수 있다. miR-29 화합물은 또한 전형적으로 패신저 가닥의 3' 말단에 있는 콜레스테롤 모이어티와 같은 친유성 모이어티에 접합 (즉, 공유적으로 연결)될 수 있다. miR-29 화합물 또는 이의 염은 본원에 기재된 특정 화합물 또는 염 중 임의의 하나일 수 있거나, 상이한 miR-29 화합물 또는 이의 염일 수 있다.
- [0064] 따라서, 이러한 측면의 한 실시양태에서, 본 발명은 소정 용량의 miR-29 화합물 또는 이의 염의 주사에 의한 단일 병변내 투여를 포함하는 요법에 사용하기 위한 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공한다. 약제의 제조를 위

한 상응하는 용도 및 상응하는 치료 방법이 또한 상기 및 하기에 기재된 바와 같이 제공된다.

- [0065] 특정 실시양태에서, 치료는 miR-29 화합물 또는 이의 염의 주사에 의한 2회 이하 또는 3회 이하의 병변내 투여를 포함한다. 다른 실시양태에서, 치료는 miR-29 화합물 또는 이의 염의 주사에 의한 단일 병변내 투여를 포함한다.
- [0066] 치료는 힘줄 손상 (예컨대, 힘줄병증)에 대한 것일 수 있고, 투여는 힘줄의 손상된 부위로 (힘줄내 (intra-tendon), 또는 힘줄내 (intratendinous)) 수행된다.
- [0067] 치료는 페이로니 질환에 대한 것일 수 있고, 투여는 대상체의 백색막의 환부로 수행된다.
- [0068] 치료는 뒤꿈트랑 질환에 대한 것일 수 있고, 투여는 대상체의 손바닥 근막의 환부로 수행된다.
- [0069] 임의의 이러한 실시양태에서, miR-29 화합물의 단일 용량은 miR-29 화합물의 10 µg 내지 5000 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 하기에서 더 상세히 설명되는 바와 같이, 달리 나타내지 않는 한, 용량은 유리 산으로서 가이드 및 패신저 가닥의 올리고뉴클레오티드 부분 (즉, 콜레스테롤 모이어티와 같은 임의의 접합체 그룹 제외)의 중량을 지칭한다.
- [0070] 따라서, 단일 용량은 miR-29 화합물의 10 µg 내지 4500 µg, 10 µg 내지 4000 µg, 10 µg 내지 3500 µg, 10 µg 내지 3000 µg, 또는 10 µg 내지 2500 µg, 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다.
- [0071] 단일 용량은 miR-29 화합물의 47 µg 내지 4740 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 47 µg 내지 4270 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 47 µg 내지 1900 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 47 µg 내지 1420 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 47 µg 내지 475 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다.
- [0072] 단일 용량은 miR-29 화합물의 95 µg 내지 4740 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 95 µg 내지 4270 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 95 µg 내지 1900 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 95 µg 내지 1420 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 95 µg 내지 475 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다.
- [0073] 단일 용량은 miR-29 화합물의 190 µg 내지 4740 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 190 µg 내지 4270 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 190 µg 내지 1900 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 190 µg 내지 1420 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 190 µg 내지 475 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다.
- [0074] 단일 용량은 miR-29 화합물의 475 µg 내지 4740 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 475 µg 내지 4270 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 475 µg 내지 1900 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 475 µg 내지 1420 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다.
- [0075] 단일 용량은 miR-29 화합물의 1420 µg 내지 4740 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 1420 µg 내지 4270 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 1420 µg 내지 1900 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다.
- [0076] 특정 실시양태에서, 단일 용량은 miR-29 화합물 190 µg 내지 1420 µg 또는 이의 염의 등가 용량이다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 약 190 µg, 475 µg, 1420 µg 또는 4270 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 예컨대, 단일 용량은 miR-29 화합물의 약 190 µg, 475 µg 또는 1420 µg, 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 이는 단일 용량이 miR-29 화합물의 약 190 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있음을 의미한다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 약 475 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 miR-29 화합물의 약 1420 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다.
- [0077] 바람직한 실시양태에서, 단일 용량은 miR-29 화합물의 약 190 µg 내지 약 475 µg 또는 이의 염의 등가 용량이다. 예컨대, 단일 용량은 miR-29 화합물의 약 190 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 단일 용량은 또한 miR-29 화합물 약 475 µg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 단일 용량은 miR-

29 화합물의 약 190 μg 또는 이의 염의 등가 용량이다.

- [0078] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서 힘줄 손상의 치료에 사용하기 위한 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공하며, 여기서 치료는 대상체의 손상된 힘줄에 적어도 47 μg 의 miR-29 화합물의 용량, 또는 이의 염의 등가 용량의 주사에 의한 단일 투여를 포함한다.
- [0079] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서 페이로니 질환의 치료에 사용하기 위한 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공하며, 여기서 치료는 대상체의 백색막의 환부에 적어도 47 μg 의 miR-29 화합물의 용량, 또는 이의 염의 등가 용량의 주사에 의한 단일 투여를 포함한다.
- [0080] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서 뒤꿈트랑 질환의 치료에 사용하기 위한 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공하며, 여기서 치료는 대상체의 손바닥 근막의 환부에 적어도 47 μg 의 miR-29 화합물의 용량, 또는 이의 염의 등가 용량의 주사에 의한 단일 투여를 포함한다.
- [0081] 특정 실시양태에서, miR-29 화합물의 단일 용량은 적어도 95 μg , 적어도 190 μg , 적어도 475 μg , 적어도 1420 μg , 적어도 1900 μg , 적어도 4270 μg , 또는 이의 염의 등가 용량이다.
- [0082] 예컨대, miR-29 화합물의 단일 용량은 miR-29 화합물의 적어도 95 μg (또는 적어도 190 μg , 적어도 475 μg , 적어도 1420 μg , 적어도 1900 μg , 적어도 4270 μg) 및 4740 μg 이하, 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 따라서, 단일 용량은 상기 기재된 바와 같은 특정 범위 내에 있을 수 있다.
- [0083] 보다 일반적으로, miR-29 화합물의 단일 용량은 miR-29 화합물의 적어도 또는 약 10 μg , 15 μg , 20 μg , 25 μg , 30 μg , 35 μg , 40 μg , 45 μg , 47 μg , 50 μg , 55 μg , 60 μg , 75 μg , 80 μg , 95 μg , 100 μg , 110 μg , 120 μg , 130 μg , 140 μg , 150 μg , 160 μg , 170 μg , 180 μg , 190 μg , 200 μg , 220 μg , 240 μg , 260 μg , 280 μg , 300 μg , 320 μg , 340 μg , 350 μg , 360 μg , 380 μg , 400 μg , 420 μg , 440 μg , 460 μg , 470 μg , 475 μg , 480 μg , 500 μg , 550 μg , 600 μg , 650 μg , 700 μg , 750 μg , 800 μg , 850 μg , 900 μg , 950 μg , 1000 μg , 1100 μg , 1200 μg , 1300 μg , 1400 μg , 1420 μg , 1500 μg , 1600 μg , 1700 μg , 1800 μg , 1900 μg 또는 2000 μg , 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 특정 실시양태에서, 4000 μg 내지 4500 μg , 예컨대 4270 μg 과 같은 더 높은 용량이 사용될 수 있다.
- [0084] 본원에 기재된 다른 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, miR-29 화합물의 단일 용량은 miR-29 화합물의 190 μg , 200 μg , 220 μg , 240 μg , 260 μg , 280 μg , 300 μg , 320 μg , 340 μg , 350 μg , 360 μg , 380 μg , 400 μg , 420 μg , 440 μg , 460 μg , 470 μg , 475 μg , 480 μg , 500 μg , 550 μg , 600 μg , 650 μg , 700 μg , 750 μg , 800 μg , 850 μg , 900 μg , 950 μg , 1000 μg , 1100 μg , 1200 μg , 1300 μg , 1400 μg , 1420 μg , 1500 μg , 1600 μg , 1700 μg , 1800 μg , 1900 μg , 2000 μg , 2200 μg , 2400 μg , 2600 μg , 2800 μg , 3000 μg , 3200 μg , 3400 μg , 3600 μg , 3800 μg , 4000 μg , 4200 μg , 4270 μg , 4400 μg , 4600 μg , 4740 μg , 4800 μg 또는 5000 μg 이하, 또는 이의 염의 등가 용량이다. 특정 실시양태에서, miR-29 화합물의 단일 용량은 190 μg 이하, 또는 이의 염의 등가 용량이다. 특정 실시양태에서, miR-29 화합물의 단일 용량은 475 μg 이하, 또는 이의 염의 등가 용량이다. 특정 실시양태에서, miR-29 화합물의 단일 용량은 1420 μg 이하, 또는 이의 염의 등가 용량이다. 특정 실시양태에서, miR-29 화합물의 단일 용량은 1900 μg 이하, 또는 이의 염의 등가 용량이다. 특정 실시양태에서, miR-29 화합물의 단일 용량은 4270 μg 이하, 또는 이의 염의 등가 용량이다.
- [0085] 힘줄 손상이 치료되는 경우, 힘줄 손상은 힘줄병증일 수 있다. 힘줄 손상은 만성 힘줄병증일 수 있다. 힘줄 손상은 외측 상과염, 내측 상과염, 회전 근개 힘줄병증, 공통 신근 기원 힘줄병증, 공통 굴근 기원 힘줄병증, 둔부 힘줄병증 (대전자 동통 증후군, GTPS), 슬개골 힘줄병증, 점퍼 무릎, 족저근막염, 아킬레스 힘줄병증, 비골 힘줄병증, 극상근 증후군, 또는 이들의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 힘줄 손상은 상지 힘줄병증 (외측 상과염, 골퍼 엘보우, 회전 근개 힘줄병증 및 드쿼베인 질환 포함)이다. 특정 실시양태에서, 힘줄 손상은 외측 상과염이다.
- [0086] 대상체는 전형적으로 인간이다. 그러나, 또 다른 바람직한 대상체는 말, 특히 말 스포츠를 위해 사육된 말이다.
- [0087] 특정 실시양태에서, miR-29 화합물 또는 이의 염은 0.5 ml-5 ml, 예컨대 0.5 ml-1.5 ml, 예컨대 0.8 ml-1.2 ml, 예컨대 0.9 ml-1.1 ml의 부피로 투여된다. 예컨대, 부피는 약 0.5 ml, 0.75 ml, 1 ml, 1.25 ml, 1.5 ml, 1.75 ml, 2 ml, 2.5 ml, 3 ml, 3.5 ml, 4 ml, 4.5 ml 또는 약 5 ml일 수 있다. 특정 실시양태에서, 부피는 약 1 ml이다. 예컨대, 한 실시양태에서, miR-29 화합물 또는 이의 염은 약 1 ml의 멸균 수용액의 부피로 투여

된다.

[0088] miR-29 화합물 또는 이의 염은 상기 나타난 용량 중 임의의 것에 상응하는 농도로 투여될 수 있다. 예컨대, 용량이 miR-29 화합물의 190 μg 인 경우, 화합물은 190 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 투여될 수 있다.

[0089] 특정 실시양태에서, miR-29 화합물 또는 이의 염은 본원에 제공된 바와 같은 특정 miR-29 화합물 또는 이의 염 중 임의의 하나이다.

[0090] 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명은 소정의 용량의 miR-29 화합물 또는 이의 염의 주사에 의한 단일 병변내 투여를 포함하는 요법에 사용하기 위한 miR-29 화합물 또는 이의 염을 제공하며, 여기서 가이드 가닥은 5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'이고, 패신저 가닥은 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmGrUmGrUmGrUmCdA-3'이고, 패신저 가닥 (5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmGrUmGrUmGrUmCdAcho1-3')의 3' 말단에 공유적으로 부착된 콜레스테롤 모이어티를 포함하고, miR-29 화합물의 용량 (콜레스테롤 모이어티의 중량 포함)은 50 μg 내지 5000 μg , 예컨대 200 μg 내지 4500 μg , 예컨대 200 μg 내지 1500 μg , 200 μg 내지 500 μg , 500 μg 내지 1500 μg , 또는 1500 μg 내지 4500 μg (예컨대 약 100 μg , 200 μg , 250 μg , 300 μg , 500 μg , 1000 μg , 1500 μg 또는 약 4500 μg), 또는 이의 염의 등가 용량이고; 여기서 뉴클레오시드 앞의 'f' = 2'-데옥시-플루오로 리보뉴클레오시드 (-F); 뉴클레오시드 앞의 'm' = 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드 (-O-Me); 뉴클레오시드 앞의 'r' = 비변형된 리보스 모이어티를 갖는 뉴클레오시드 (-OH); 뉴클레오시드 앞의 'd' = 2'-데옥시리보뉴클레오시드 (-H)이다. 바람직한 실시양태에서, miR-29 화합물의 용량 (콜레스테롤 모이어티의 중량 포함)은 약 200 μg 내지 약 500 μg 또는 이의 염의 등가 용량이다. 예컨대, miR-29 화합물의 용량 (콜레스테롤 모이어티의 중량 포함)은 약 200 μg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. miR-29 화합물의 용량 (콜레스테롤 모이어티의 중량 포함)은 또한 약 500 μg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 특정 실시양태에서, miR-29 화합물의 용량 (콜레스테롤 모이어티의 중량 포함)은 약 200 μg , 또는 이의 염의 등가 용량이다.

[0091] 따라서, 한 실시양태에서, miR-29 화합물 또는 이의 염의 가이드 가닥은 5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'이고, miR-29 화합물 또는 이의 염의 패신저 가닥은 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmGrUmGrUmGrUmCdA-3'이고 패신저 가닥의 3' 말단에 공유적으로 부착된 콜레스테롤 모이어티를 포함하고, 콜레스테롤 모이어티의 중량을 포함하는 miR-29 화합물의 용량은 50 μg 내지 5000 μg , 예컨대 200 μg , 500 μg , 1500 μg 또는 4500 μg , 또는 이의 염의 등가 용량이다. 이는 콜레스테롤 모이어티의 중량을 포함하는 miR-29 화합물의 용량이 약 200 μg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있음을 의미한다. 콜레스테롤 모이어티의 중량을 포함하는 miR-29 화합물의 용량은 약 500 μg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 콜레스테롤 모이어티의 중량을 포함하는 miR-29 화합물의 용량은 약 1500 μg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 콜레스테롤 모이어티의 중량을 포함하는 miR-29 화합물의 용량은 약 4500 μg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, miR-29 화합물의 용량 (콜레스테롤 모이어티의 중량 포함)은 약 200 μg 내지 약 500 μg 또는 이의 염의 등가 용량이다. 예컨대, miR-29 화합물의 용량 (콜레스테롤 모이어티의 중량 포함)은 약 200 μg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. miR-29 화합물의 용량 (콜레스테롤 모이어티의 중량 포함)은 또한 약 500 μg 또는 이의 염의 등가 용량일 수 있다. 특정 실시양태에서, miR-29 화합물의 용량 (콜레스테롤 모이어티의 중량 포함)은 약 200 μg , 또는 이의 염의 등가 용량이다. 요법은 페이로니 질환 또는 뒤뮈트랑 질환과 같은 조직 섬유증에 대한 것일 수 있다. 요법은 힘줄 손상에 대한 것일 수 있다. 힘줄 손상은 힘줄병증일 수 있다. 힘줄 손상은 만성 힘줄병증일 수 있다. 힘줄 손상은 외측 상과염일 수 있다. miR-29 화합물은 염으로서, 예컨대 나트륨 염으로서 투여될 수 있다. 담체는 비경구적으로 허용되는 멸균 수용액, 예컨대 PBS일 수 있다.

[0092] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 miR-29 화합물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 miR-29 화합물을 제공하는 단계 및 화합물을 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 조합하는 단계를 포함하는, 제약 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0093] 마이크로RNA-29 화합물

[0094] 본원에 사용된 "마이크로RNA-29" 화합물은 miR-29a, miR-29b (miR-29b-1 및 miR-29b-2 포함) 및 miR-29c를 포함하는 천연 내인성 miR-29의 생물학적 기능을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 그 기능은 miR-29에 대한 하나 이상의 결합 부위 (예컨대, miR-29a에 대한 하나 이상의 결합 부위)를 함유하는 임의의 표적 mRNA의 3' 비번역 영역 (3'UTR)에 상보적으로 결합 (혼성화)함으로써 mRNA를 표적화하는 것을 포함하며 이로써 분해 및/또는 번역 억제가 발생한다. miR-29에 대한 결합 부위를 포함하는 표적 mRNA는 전형적으로 콜라겐, 예컨대 콜라겐 3

(col3a1)과 같은 특정한 세포의 매트릭스 단백질을 코딩한다. 본원에 기재된 miR-29 화합물은 천연 miR-29의 생물학적 기능을 모방하지만, 예컨대 면역원성을 일으키지 않으면서 활성, 안정성 및/또는 세포 흡수를 향상시키도록 천연 miR-29 (예컨대, 천연 miR-29a)와 비교하여 변형될 수 있다. 변형은 핵염기 서열 변형, 및/또는 하나 이상의 당 모이어티, 뉴클레오시드간 연결 및/또는 핵염기에서의 화학적 변형을 포함할 수 있다. 변형은 또한, 예컨대 친유성 모이어티에 대한 접합을 포함한다. 한 실시양태에서, 화합물은 인간의 성숙한 miR-29a의 생물학적 기능을 가지며, 즉 인간의 성숙한 miR-29a의 모방체이다.

[0095] 본원에 기재된 miR-29 화합물은 miR-29에 대한 하나 이상의 결합 부위, 예컨대 miR-29a에 대한 하나 이상의 결합 부위를 포함하는 mRNA에 의해 코딩되는 단백질의 발현을 감소시키거나 억제할 수 있다. 예컨대, 본원에 기재된 miR-29 화합물은 콜라겐 발현, 예컨대 콜라겐 3 (col3a1) 발현을 감소시키거나 억제할 수 있다. miR-29 화합물은 천연 miR-29a보다 더 큰 정도로 콜라겐 발현을 감소시킬 수 있다. 예컨대, miR-29 화합물은 천연 miR-29a와 비교하여 콜라겐 발현을 적어도 10%, 적어도 20%, 또는 적어도 30% 또는 그 초과로 감소시킬 수 있다. 콜라겐 (col3a1) 발현의 감소를 평가하기 위한 적합한 검정은 하기 실시예 1에 기재된 루시페라제 검정 또는 qPCR 검정과 같이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 단백질 수준은 또한 관련 기술분야에 널리 공지된 방법 (예컨대, 웨스턴 블롯)에 의해 평가될 수 있다.

[0096] 본원에 기재된 miR-29 화합물은 세포 흡수가 가능하며, 예컨대 이들은 형질감염체 또는 리포솜과 같은 다른 형질감염 비히클을 사용하지 않고 표적 세포 (예컨대, 힘줄세포 또는 섬유모세포)에 의해 생체내에서 흡수될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티와 같은 친유성 모이어티와 miR-29 화합물의 접합은 세포 흡수를 향상시킨다. 세포 흡수 능력은, 예컨대 시험관내 콜라겐 3 루시페라제 리포터 검정으로 miR-29 활성을 측정하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0097] 본원에 기재된 miR-29 화합물은 안정하다. 안정한 miR-29 화합물은 37°C에서 3개월 동안 보관한 후 시험관내 콜라겐 3 루시페라제 리포터 검정에서 활성을 실질적으로 유지한다.

[0098] 본원에 기재된 miR-29 화합물은 비변형된 (천연) miR-29와 비교하여 2' 당 변형의 결과로 생체내 반감기가 더 길다는 점에서 안정하다.

[0099] 이중-가닥 RNA는 포유동물에서 선천적 면역 반응을 자극할 수 있다. 예컨대, miR-29a는 면역 세포에서 Toll-유사 수용체 (TLR) 패밀리의 수용체에 결합하고 염증 반응을 유발할 수 있다고 기재되었다 (참조문헌 5). 면역 자극은 miRNA 요법의 생체내 적용을 상당히 제한할 수 있다. 따라서, miRNA 활성을 효과적으로 매개하지만 면역 활성화를 피하거나 최소화할 수 있는 화합물이 바람직하다. 본원에 제공된 miR-29 화합물은 대상체, 예컨대 인간 대상체에게 투여될 때 비-면역원성이다. 하기 실시예 1에 기재된 바와 같이 인간 대식세포를 사용하는 TNF-알파 검정과 같은 비-면역원성을 평가하기 위한 적합한 검정은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 바람직한 화합물은 TNF-알파의 발현을 유도하지 않거나, 화합물로 처리한지 24시간 후 배양된 1차 인간 대식세포의 상청액에서 측정할 때 10 pg/ml 이하의 TNF-알파의 발현을 유도한다.

[0100] 본원에 기재된 화합물은 바람직하지 않은 면역 반응을 유도하지 않기 때문에, 화합물은 리포솜으로의 캡슐화 또는 유사한 수단에 의해 면역계에 의한 인식으로부터 보호될 필요가 없다. 따라서, 본원에 기재된 화합물은 단순한 수성 담체, 예컨대 PBS에서 투여되는 경우에도 생체내에서 효과적이다. 이는 요법의 준비 및 투여를 상당히 단순화하며, 안전성 문제를 제기할 수 있는 대상체에 추가의 외래 성분의 도입을 피한다. 따라서, 본원에 기재된 화합물은 천연 miR-29 (예컨대, miR-29a)의 기능을 효과적으로 모방하지만 더 높은 활성 및 안정성을 가지면서도 비-면역원성이라는 이점을 갖는다. 실시예는 또한 화합물이 항염증성일 수 있음을 나타낸다.

[0101] 따라서, 실시예에 기재된 예시적인 miR-29 화합물은 안정성, 활성 및 세포 흡수가 개선되고 비-면역원성인 miR-29의 화학적으로 합성된 모방체이다. 화합물의 핵염기 서열은 miR-29a의 것에 가장 가깝지만 상기 언급된 바와 같이 기능적 모방은 다른 miR-29 패밀리 구성원으로 확장될 수 있다. miR-29 화합물은 수성 담체에서 안정하며, 37°C에서 3개월 동안 보관한 후에도 활성 상태를 유지한다. 안정성 및 활성을 증가시키기 위해, 특정 miR-29 화합물은 가이드 가닥에 2'-플루오로 및 2'-O-메틸기를 도입하고 패신저 가닥에 2'-O-메틸기를 도입하여 화학적으로 변형되었다. 패신저 가닥은 세포 흡수를 증가시키기 위해 3' 콜레스테롤기를 추가로 함유할 수 있다.

[0102] 콜라겐 조절장치의 부위, 예컨대 손상된 힘줄 또는 섬유성 조직에 화합물을 투여하면 miR-29a 기능이 복원된다. 본원에 기재된 miR-29 화합물은 잘 정의된 작용 방식을 갖는다. 화합물은 힘줄병증과 같은 힘줄 손상 및 콜라겐 (특히 콜라겐 3) 생성의 감소 또는 억제를 필요로 하는 다른 질환, 예컨대 조직 섬유증을 포함한 다양한 병

원성 병태와 관련된 콜라겐 생성의 주요 경로를 직접적으로 표적으로 한다. 또한, 본원에 기재된 miR-29 화합물로의 치료는 침습적 절차를 필요로 하지 않으며, 초기 진단 시점에 전달되어 가장 이른 시간에 회복을 개시할 수 있다.

[0103] 실시예에 기재된 바와 같이, 시험관내 및 생체내 검정은 본원에 기재된 miR-29 화합물이, 예컨대 힘줄세포 및 섬유모세포에서 콜라겐 3의 발현을 상당히 감소시킬 수 있음을 입증하였다. 실시예는 또한 miR-29 화합물의 단일 힘줄내 주사가 마우스 힘줄 손상 모델에서 콜라겐 3 발현을 상당히 감소시켰고 힘줄 구조를 개선하였다는 것을 나타낸다.

[0104] 안전성 측면에서, 래트 및 개에서의 연구에서는 임상 관찰, 체중, 혈액학, 응고 또는 임상 화학 파라미터 및 육안적 부검 결과를 포함한 다양한 특색을 심도있게 14일의 추적조사 후에 모니터링하였다. 이러한 연구는 또한 안전성 약리학 효과를 나타내기 위해 고안되었으며, 래트에서의 어윈 (Irwin) 행동 프로파일 또는 원격측정 개에서의 임의의 심혈관 효과에서 변화가 나타나지 않았다. 래트에서의 호흡 파라미터는 영향을 받지 않았다. 실시예는 또한 국소 (병변내) 투여 후 다른 조직에서 무시할 수 있는 분포가 관찰되고 임의의 전신 miR29a가 급속히 분해됨을 나타낸다. 단리된 인간 대식세포 및 마우스 힘줄 손상 모델에서 시험관내 및 생체내 데이터는 모두 본원에 기재된 miR-29 화합물이 비-면역원성이라는 증거를 제공하였다. 또한, 본원에 기재된 miR-29 화합물로의 치료는 어떠한 오프-표적 효과도 나타내지 않았다.

[0105] 본 발명자들은 이중-가닥 miR-29 화합물 (가이드 및 패신저 가닥 포함)이 단일-가닥 miR-29 화합물 (가이드 가닥만 포함; 예컨대 실시예 1의 Teno36)보다 더 활성임을 밝혔다. 따라서, 본원에 기재된 miR-29 화합물은 전형적으로 이중-가닥이다. 2개의 가닥은 듀플렉스를 형성하도록 서로 실질적으로 상보적이다.

[0106] 길이

[0107] 가이드 가닥은 20 내지 24개의 연결된 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예컨대, 가이드 가닥은 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연결된 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 한 실시양태에서, 가이드 가닥은 20 내지 23개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다. 한 실시양태에서, 가이드 가닥은 20 내지 22개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다. 한 실시양태에서, 가이드 가닥은 21 내지 23개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다. 한 실시양태에서, 가이드 가닥은 21개 또는 22개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다. 한 실시양태에서, 가이드 가닥은 22개 또는 23개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다. 바람직한 실시양태에서, 가이드 가닥은 22개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다.

[0108] 패신저 가닥은 19 내지 23개, 또는 20 내지 24개의 연결된 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예컨대, 패신저 가닥은 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 연결된 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 한 실시양태에서, 패신저 가닥은 19 내지 22개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다. 한 실시양태에서, 패신저 가닥은 19 내지 21개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다. 한 실시양태에서, 패신저 가닥은 20개 또는 21개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다. 한 실시양태에서, 패신저 가닥은 21개 또는 22개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다. 바람직한 실시양태에서, 패신저 가닥은 21개의 연결된 뉴클레오타이드 길이이다.

[0109] 돌출부

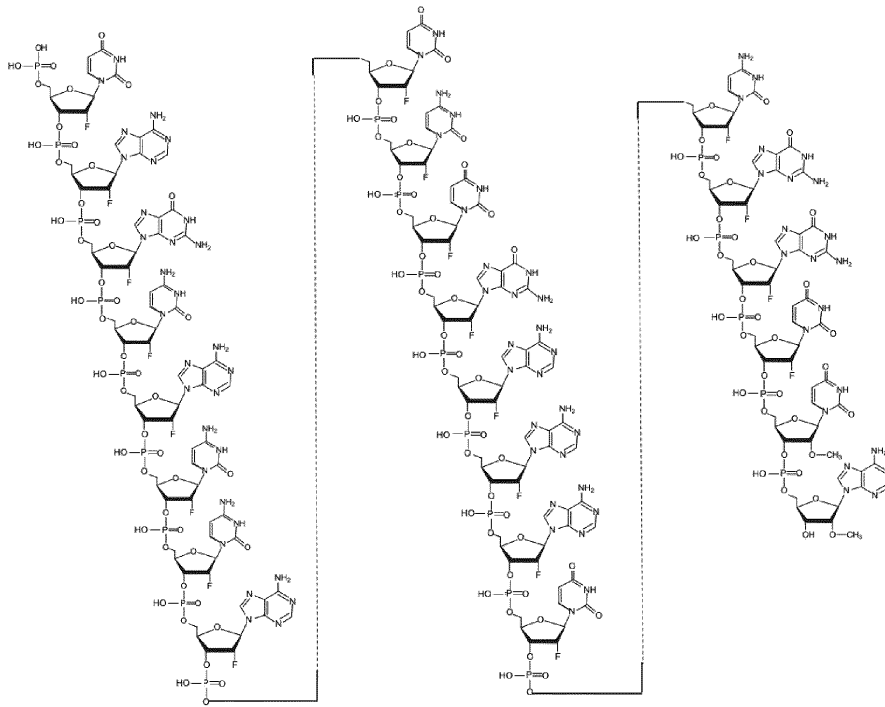
[0110] miR-29 화합물의 가이드 및 패신저 가닥은 가이드 및 패신저 가닥의 각각의 올리고뉴클레오타이드 사이의 서열 상보성 부분으로 인해 듀플렉스를 형성한다. 가이드 및 패신저 가닥은 가이드 가닥이 패신저 가닥과 비교하여, 예컨대 2개의 뉴클레오타이드의 3' 돌출부를 갖고 패신저 가닥이 가이드 가닥과 비교하여, 예컨대 1개의 뉴클레오타이드의 3' 돌출부를 갖도록 듀플렉스를 형성할 수 있다. 가이드 및 패신저 가닥은 가이드 가닥이 패신저 가닥과 비교하여, 예컨대 2개의 뉴클레오타이드의 3' 돌출부를 갖도록 듀플렉스를 형성할 수 있다.

[0111] 불일치

[0112] 정렬될 때, 즉 듀플렉스에 있을 때 가이드 가닥과 패신저 가닥의 상응하는 핵염기 사이에 불일치가 있을 수 있다. 상응하는 핵염기가 상보적이지 않은 곳에 불일치가 존재한다. 상보적인 핵염기는 U 및 A, C 및 G이다. 예컨대, 3 내지 8개의 불일치, 예컨대 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 불일치가 있을 수 있다. 한 실시양태에서, 3 내지 6개의 불일치가 있다. 한 실시양태에서, 5개 또는 6개의 불일치가 있다. 한 실시양태에서, 6개의 불일치가 있다. 예컨대, 불일치는 위치 3, 10 내지 12, 18 및 20 (패신저 가닥과 비교한 넘버링)에 있을 수 있다. 본 발명자들은 놀랍게도 가이드 가닥과 패신저 가닥 사이에 불일치를 함유하는 miR-29 화합물이 불일치가 거의 없거나 전혀 없는 miR-29 화합물과 비교하여 (예컨대, 콜라겐 3 루시페라제 검정으로 결정되는 바와 같이) 더 높은 활성을 갖는다는 것을 밝혔다.

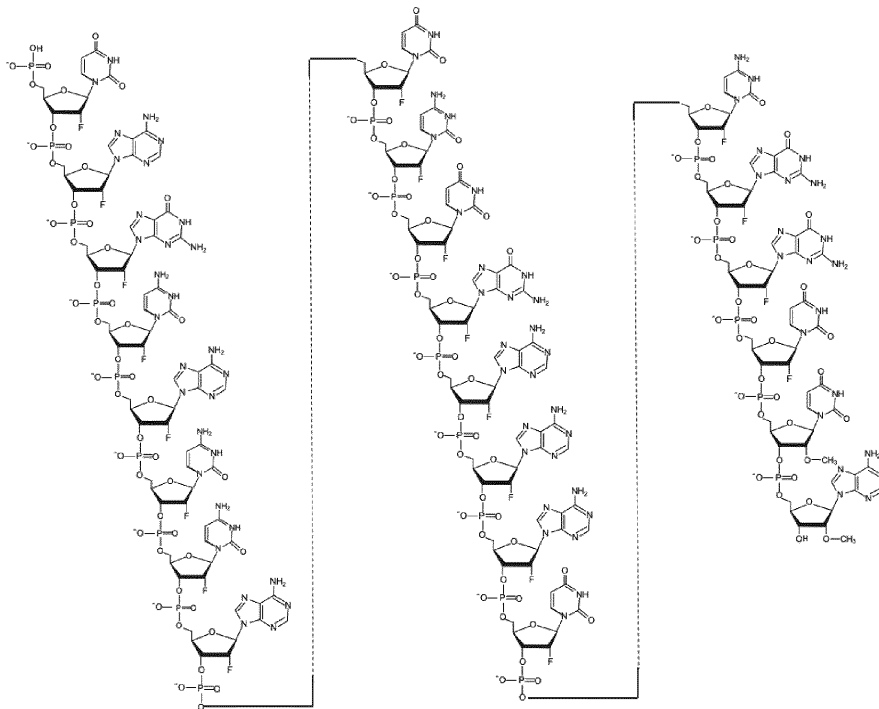
- [0113] 접합체
- [0114] 본원에 기재된 miR-29 화합물은 화합물의 올리고뉴클레오티드(들)에 공유적으로 부착된 하나 이상의 접합체 그룹을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 약리학적 특성 (예컨대, 세포 흡수)을 개선하는 다른 접합체 모이어티가 관련 기술분야에 공지되어 있고 콜레스테롤 모이어티 대신에 사용될 수 있지만, 예시적인 접합체 그룹은 콜레스테롤 모이어티이다. 따라서, 접합체 그룹은 전형적으로 친유성 모이어티이다.
- [0115] 한 실시양태에서, miR-29 화합물은 miR-29 화합물의 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 가닥에 공유적으로 부착된 콜레스테롤 모이어티를 포함한다. 한 실시양태에서, 콜레스테롤 모이어티는 패신저 가닥에 공유적으로 부착된다. 한 실시양태에서, 콜레스테롤 모이어티는 패신저 가닥에 공유적으로 부착되고 가이드 가닥은 접합되지 않는다. 한 실시양태에서, 콜레스테롤 모이어티는 패신저 가닥의 3' 말단에 공유적으로 부착된다. 임의의 이러한 실시양태에서, 콜레스테롤 모이어티는 링커, 예컨대 트리에틸렌글리콜을 통해 부착될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 콜레스테롤 모이어티는 트리에틸렌글리콜 콜레스테롤 모이어티이다. 예시적인 콜레스테롤 모이어티는 3'포스포프로파-2-올, 2,2'-[에탄-1,2-디일비스(옥시)]디(에탄-1-올), 10-0-[1-프로필-3-N-카르바모일콜레스테릴]이다.
- [0116] 염
- [0117] 본원에 기재된 miR-29 화합물은 염으로서 제공될 수 있다. 따라서, 용어 "화합물"은 화합물의 염을 포함한다. 염은 제약상 허용되는 염이며, 즉 염은 화합물의 생물학적 활성을 유지하고 이에 독성 효과를 부여하지 않는다. 제약상 허용되는 염의 예는 나트륨 염 및 칼륨 염을 포함한다. 한 실시양태에서, miR-29 화합물은 나트륨 염이다.
- [0118] CWT-001
- [0119] 실시예에 기재된 특정 miR-29 화합물은 CWT-001이다. CWT-001은 가이드 (안티센스) 가닥 및 패신저 (센스) 가닥을 1:1 비율로 포함하는 적어도 miR-29a의 이중-가닥의 화학적으로 변형된 모방체이다. 가이드 및 패신저 가닥의 핵염기 서열 및 화학적 변형은 'Teno18' (T18)의 것에 상응한다.
- [0120] CWT-001 가이드 가닥
- [0121] CWT-001은 콜라겐 3을 포함한 자연 발생 miR-29a와 적어도 동일한 표적 유전자의 발현을 억제한다. 당 잔기는 화합물의 안정성 및 활성을 증가시키는 2'-플루오로 및 2'-O-메틸기의 도입을 통해 화학적으로 변형된다. CWT-001의 가이드 가닥은 하기인 인간의 성숙한 miR-29a ("hsa-miR-29a-3p")의 자연 발생 가이드 가닥과 동일한 핵염기 서열을 갖는다:
- [0122] 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCCGUUA-3' (서열식별번호: 1).
- [0123] 각각의 뉴클레오타이드는 2'-치환된 뉴클레오타이드이며, 이는 뉴클레오타이드가 H 또는 OH 이외의 적어도 하나의 2' 치환기를 포함하는 당 모이어티를 포함함을 의미한다. CWT-001의 가이드 가닥은 하기 식을 갖는다:
- [0124] 5'-fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA-3'
- [0125] 상기 식에서, "f"는 리보스 고리의 2' 위치에 불소를 함유하는 뉴클레오타이드를 나타내고, "m"은 리보스 고리의 2' 위치에 O-메틸기를 함유하는 뉴클레오타이드를 나타낸다.
- [0126] 뉴클레오타이드간 연결은 전체적으로 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결이다.
- [0127] CWT-001 가이드 가닥의 화학명은 하기와 같다:
- [0128] 임의적으로 염, 예컨대 나트륨 염으로서, RNA (5'포스포 (2'데옥시-2'플루오로)U-(2'데옥시-2'플루오로)A-(2'데옥시-2'플루오로)G-(2'데옥시-2'플루오로)C-(2'데옥시-2'플루오로)A-(2'데옥시-2'플루오로)C-(2'데옥시-2'플루오로)C-(2'데옥시-2'플루오로)A-(2'데옥시-2'플루오로)U-(2'데옥시-2'플루오로)C-(2'데옥시-2'플루오로)U-(2'데옥시-2'플루오로)G-(2'데옥시-2'플루오로)A-(2'데옥시-2'플루오로)A-(2'데옥시-2'플루오로)U-(2'데옥시-2'플루오로)U-(2'데옥시-2'0메틸)U-(2'0메틸)A).

[0129] 유리산으로의 CWT-001 가이드 가닥의 구조식은 하기와 같다:



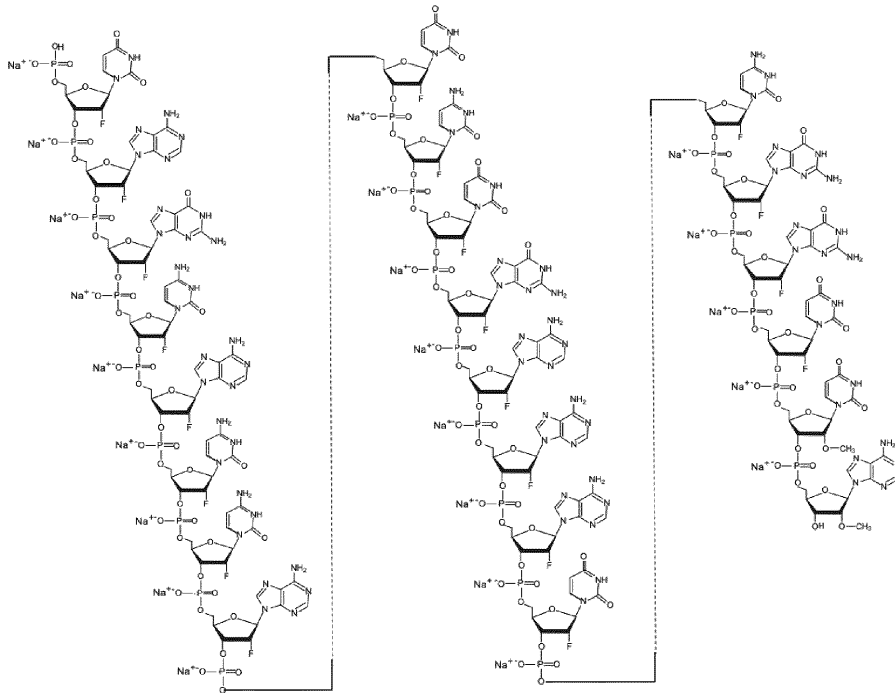
[0130]

[0131] 이온화된 형태 (즉, 염의 음이온)의 CWT-001 가이드 가닥의 구조식은 하기와 같다:



[0132]

[0133] 나트륨 염으로의 CWT-001 가이드 가닥의 구조식은 하기 및 도 1A에 나타나 있다:



[0134]

[0135] CWT-001 패신저 가닥

[0136] CWT-001의 패신저 가닥은 인간의 성숙한 miR-29a ("hsa-miR-29a-5p")의 자연 발생 패신저 가닥과 동일한 핵염기 서열을 가지며, 단 3' 말단에서 G는 CWT-001에 존재하지 않는다. 따라서, CWT-001 패신저 가닥의 핵염기 서열은 하기와 같다:

[0137] 5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCA-3' (서열식별번호: 3).

[0138] 패신저 가닥은 변형된 당 모이어티 (2'-O-메틸)를 포함하는 뉴클레오시드, 비변형된 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드, 및 데옥시 리보스 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드를 함유한다. CWT-001의 패신저 가닥은 하기 식을 갖는다:

[0139] 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdA-3'

[0140] 상기 식에서, "m"은 리보스 고리의 2' 위치에 O-메틸기를 함유하는 뉴클레오시드를 나타내고, "r"은 리보뉴클레오시드, 즉 리보스 고리의 2' 위치에 OH기를 함유하는 리보뉴클레오시드를 나타내고, "d"는 데옥시 리보스 뉴클레오시드를 나타낸다.

[0141] 뉴클레오시드간 연결은 전체적으로 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결이다.

[0142] CWT-001의 패신저 가닥은 패신저 가닥의 3' 말단에 공유적으로 부착된 콜레스테롤 모이어티, 예컨대 트리에틸렌글리콜 콜레스테롤 모이어티를 포함한다. 콜레스테롤 모이어티는 miR-29a 화합물의 약리학적 특성을 개선하며, 예컨대 콜레스테롤 모이어티는 올리고뉴클레오타이드의 세포 흡수를 증가시킨다.

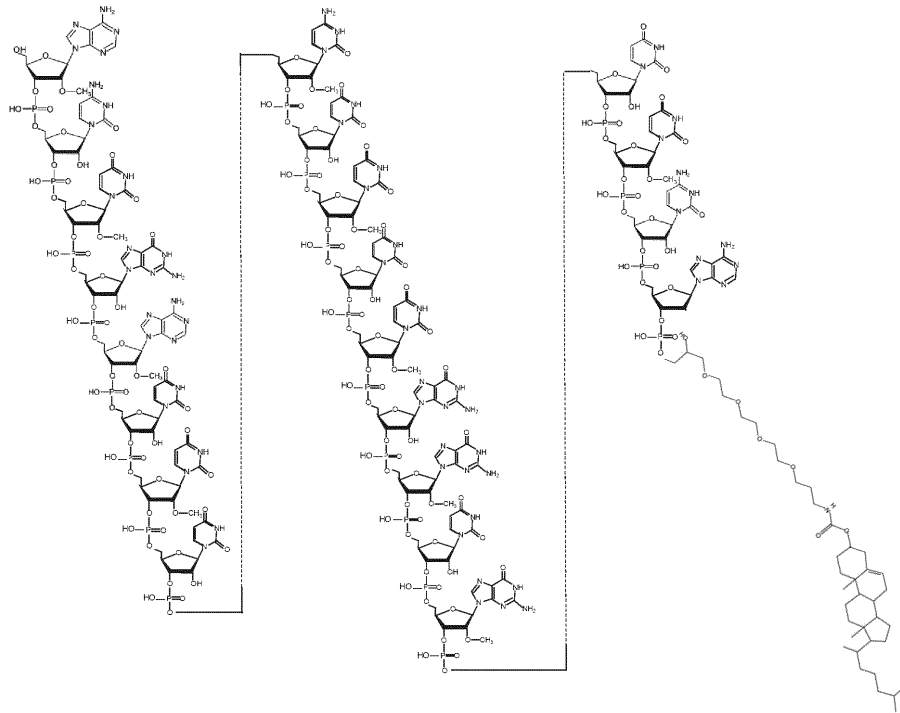
[0143] 나트륨 염으로의 CWT-001 패신저 가닥의 화학명은 하기와 같다:

[0144] 임의적으로 염, 예컨대 나트륨 염으로서, RNA ((2'0메틸)A-C-((2'0메틸)U-G-(2'0메틸)A-U-(2'0메틸)U-U-(2'0메틸)C-U-(2'0메틸)U-U-(2'0메틸)U-G-(2'0메틸)G-U-(2'0메틸)G-U-(2'0메틸)U-C-(2' 데옥시)A-3' 포스포프로피-2-올, 2,2'-[에탄-1,2-디일비스(옥시)]디(에탄-1-올), 10-0-[1-프로필-3-N-카르바모일콜레스테릴].

[0145] 따라서, 패신저 가닥의 3' 말단에 공유적으로 부착된 콜레스테롤 모이어티 (예컨대, 트리에틸렌글리콜 콜레스테롤 모이어티)를 포함하는 패신저 가닥은 또한 하기 식으로 나타내어질 수 있다:

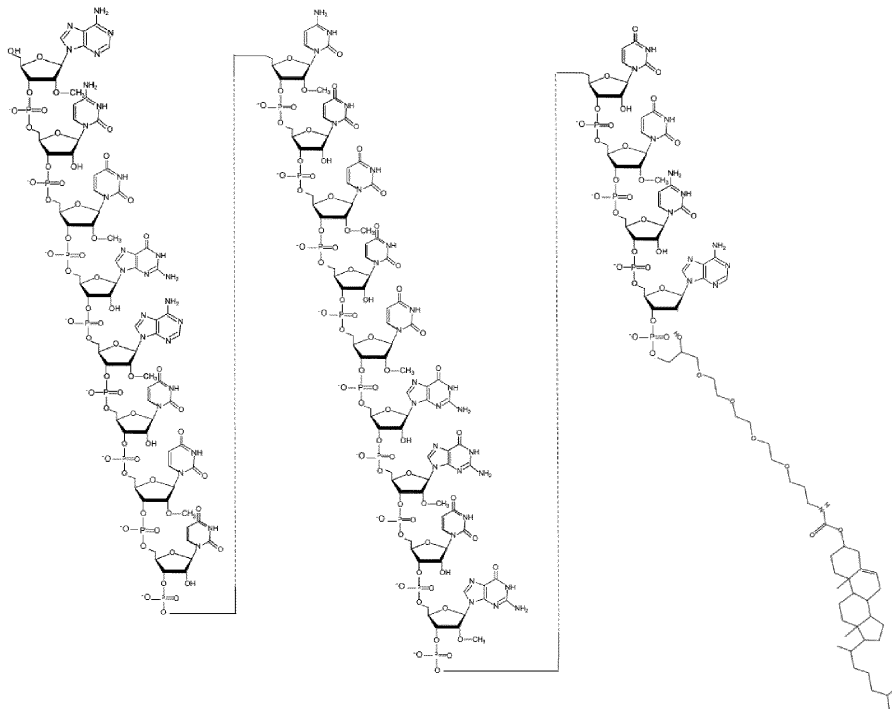
[0146] 5'-mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCdAcho1-3.

[0147] 유리산으로의 CWT-001 패신저 가닥의 구조식은 하기와 같다:



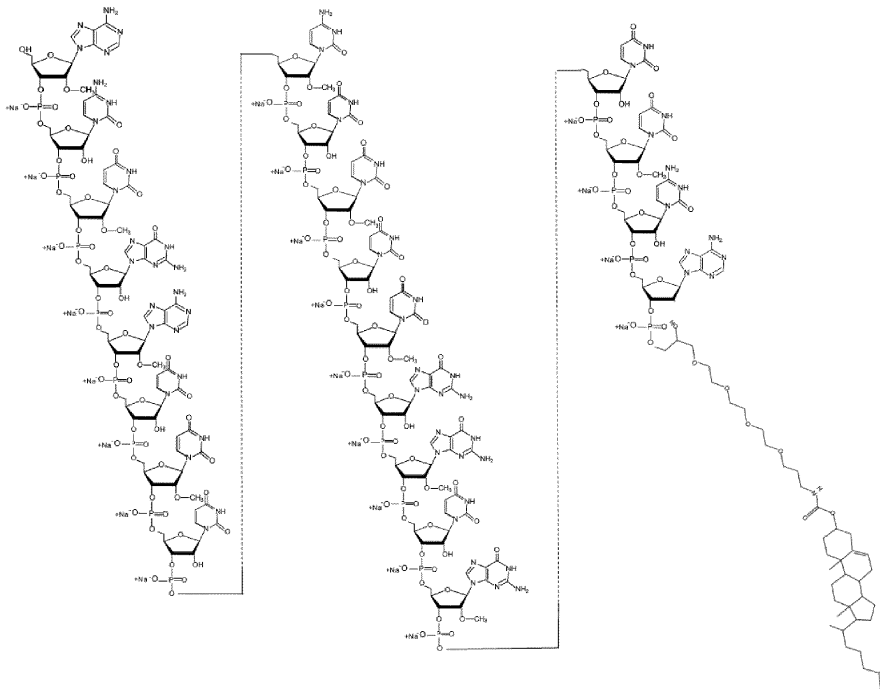
[0148]

[0149] 이온화된 형태 (즉, 염의 음이온)의 CWT-001 패신저 가닥의 구조식은 하기와 같다:



[0150]

[0151] 나트륨 염으로의 CWT-001 패신저 가닥의 구조식은 하기 및 도 1B에 나타나 있다:



[0152]

[0153] CWT-001에 대한 추가 정보는 하기 표 A에 제공된다.

[0154] <표 A>

	CWT-001 안티센스 가닥	CWT-001 센스 가닥
구조식, 나트륨 염	$C_{211}H_{244}N_{82}O_{134}P_{22}F_{20}Na_{22}$	$C_{246}H_{332}N_{67}O_{162}P_{21}Na_{21}$
분자량, 나트륨 염	7639.47	7952.02
분자량, 유리산	7134.1	7470.1
분자량, 유리산 (콜레스테롤 모이어티 제외)	7134.1	6714.2

[0155]

[0156] **마이크로RNA-29 화합물 및 조성물의 치료 방법 및 치료 용도**

[0157] 본원에 기재된 화합물 및 조성물은 하나 이상의 유형의 콜라겐 섬유의 국소적 과잉 생성을 특징으로 하는 국소화된 콜라겐 조절장애를 수반하는 질환의 치료에 특히 적합하다. 예컨대, 본원에 기재된 miR-29 화합물은, 예컨대 루시페라제 검정으로 평가되는 바와 같이 콜라겐 3의 발현을 감소시키거나 억제한다. 따라서, 본원에 기재된 miR-29 화합물은 하나 이상의 유형의 콜라겐 섬유, 예컨대 콜라겐 3 (col3a1)의 발현의 감소 또는 억제를 필요로 하는 질환의 치료에 유용할 수 있다.

[0158] 3개의 예시적인 질환이 하기에 기재되어 있다: 힘줄 손상 (특히 힘줄병증), 폐이로니 질환 및 뒤뮈트랑 질환, 후자의 두 질환은 조직 섬유증의 예임.

[0159] **힘줄 손상**

[0160] 힘줄은 근육을 뼈에 부착시키는 결합 조직이다. 힘줄 조직은 다양한 유형의 세포, 가장 현저하게 힘줄세포를 함유하는 세포의 매트릭스에 묻혀 있는 약 30%의 콜라겐 및 2%의 엘라스틴 (습윤 중량)을 포함한다. 지배적인 콜라겐은 유형 1 콜라겐으로 직경이 크고 (40-60 nm) 서로 연결되어 단단한 섬유 다발을 형성한다. 유형 3 콜라겐도 존재하며 직경이 더 작아 (10-20 nm) 보다 느슨한 망상 다발을 형성한다. 건강한 힘줄은 주로 보다 소량의 생체역학적으로 열등한 콜라겐 3 (col3) 섬유 (~5%)가 산재된 콜라겐 1 (col1) 섬유 (~95%)의 잘 정돈된 다발을 함유한다. 건강한 힘줄세포에서, miR-29 (예컨대, miR-29a)는 각각 Col3a1, VEGFA, AKT3 및 TGF-B2를 표적으로 함으로써 콜라겐 3 과잉 생성, 혈관신생, 힘줄세포의 과다-증식 및 유착 형성을 직접적으로 억제한다.

miR-29a의 서열 및 이러한 표적 mRNA 내의 결합 부위는 포유동물 중에서 보존된다.

- [0161] 힘줄의 생체역학적 특성, 특히 인장 강도는 단면적 (즉, 두께), 콜라겐 함량, 및 상이한 유형의 콜라겐 간의 비율과 관련이 있다.
- [0162] 상기 언급된 바와 같이, 건강한 힘줄은 주로 보다 소량의 생체역학적으로 열등한 콜라겐 3 (col3) 섬유 (~5%)가 산재된 콜라겐 1 (col1) 섬유 (~95%)의 잘 정돈된 다발을 함유한다. 급성 손상 후, 힘줄병증 동안 및 힘줄 손상이 치유되는 동안, 콜라겐 합성이 유형 1 콜라겐으로부터 유형 3 콜라겐으로 이동한다. 유형 3 콜라겐 합성의 지속적인 증가는 콜라겐 비율의 장기적인 불균형을 초래한다. 이는 힘줄의 생체역학적 특성에 중요하고 유해한 영향을 미친다. 특히, 힘줄의 인장 강도를 감소시켜 궁극적인 파괴 강도를 감소시킴으로써 후속 파열에 더 취약하게 만든다.
- [0163] 힘줄 손상은 외부 외상, 기계적 스트레스 (과도 사용 포함), 퇴행, 염증 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 요인으로 인해 발생하거나 이와 관련될 수 있다. 힘줄병증은 힘줄의 과도 사용 및 손상과 관련된 질환의 의학적 명칭이다.
- [0164] 과도 사용 힘줄병증은 활동-관련된 통증, 감소된 기능 및 때때로 힘줄의 국소화된 팽윤이 점진적으로 시작된 후 임상적으로 진단되는 힘줄의 복잡한 다면적 병리이다. 과도 사용, 반복적인 긴장 또는 외상은 힘줄의 콜라겐 섬유를 파괴한다. 이 손상에 대한 반응으로 힘줄세포는 복구 반응을 개시하여 처음에는 힘줄 기능을 신속하게 복원하는 '패치' 역할을 하는 높은 수준의 콜라겐 3을 생성한다. 시간이 지남에 따라 콜라겐 3은 점진적으로 콜라겐 1로 대체될 것이다. 그러나, 콜라겐 3은 생체역학적으로 콜라겐 1보다 열등하기 때문에, 힘줄이 추가 손상되기 쉬워 더 많은 콜라겐 3 생성을 유발한다. 힘줄병증에서 추가 손상 및 열등한 치유의 악순환은 증가된 콜라겐 3 (~30%), 세포충실성, 혈관화, 염증 및 유착 형성을 특징으로 하는 병변의 형성을 초래한다.
- [0165] 스테로이드 주사와 같은 힘줄병증에 대한 통상적 치료는 일반적으로 통증 및 염증과 싸우기 위해 경험적으로 사용되지만 힘줄의 조직학적 구조를 변형하지는 않는다. 그러나, 이러한 치료는 완전히 만족스럽지 않으며 증상의 재발이 일반적이다.
- [0166] 하기의 실시예는 무엇보다도 본원에 제공된 miR-29 화합물이 힘줄병증의 마우스 모델을 포함하여 생체내에서 콜라겐 3 발현을 감소시키거나 억제하는데 안전하고 효과적이라는 것을 나타낸다. 예컨대, 마우스 모델을 사용하여, 도 4는 본 발명에 따른 예시적인 miR-29 화합물 (CWT-001)로의 처리가 힘줄 질환에서 콜라겐 3 발현의 억제를 통해 힘줄 섬유 정렬 및 콜라겐 생성을 상당히 개선하였음을 나타낸다. 추가로, 본 발명자들은 이전에 말콜라게나제-유도된 힘줄병증 (SDFT) 모델이 인간 힘줄병증을 반영하고, 힘줄 손상 후 miR-29a의 감소된 발현 및 수반되는 col3:col1 비율의 증가를 밝혔다. miR-29 화합물의 단일 병변내 주사는 콜라겐 3 발현 및 병변 크기를 감소시켰고 힘줄 구조를 개선하였다 (참조문헌 3 참조). 함께, 이러한 데이터는 본원에 제공된 miR-29 화합물을 포함하여 miR-29 화합물을 사용한 안전하고 효과적인 인간 요법에 대한 근거를 제공한다. 본원에 기재된 실험 (실시예 참조)에 비추어 볼 때, μg 및 낮은 mg 범위의 용량은 동물 중에서 내약성이 우수할 것으로 예상되며 쉽고 안전하게 주사될 수 있는 부피 (예컨대, 약 1 ml)로 투여될 수 있다. 외측 상과염을 갖는 인간 대상체에서의 1상의 무작위배치된 이중-맹검의 위약-대조된 연구에서, 1 ml 부피로 투여된 200 μg , 500 μg 및 1500 μg CWT-001의 용량이 안전하고 효과적인 것으로 나타났다 (실시예 7 참조).
- [0167] 따라서, 본 발명의 miR-29 화합물 및 조성물은 과도 사용 힘줄병증과 같은 힘줄병증의 치료에 사용될 수 있다. 대상체는 인간 대상체일 수 있다. 대상체는 아급성 힘줄병증을 가질 수 있다. 본 발명의 화합물 및 조성물로 의 치료는 만성 힘줄병증으로의 진행을 감소시킬 수 있다. 대상체는 만성 힘줄병증을 가질 수 있다. 대상체는 활성 힘줄병증을 가질 수 있다. 대상체는 부분적으로 찢어진 힘줄을 가질 수 있다. 치료는 완전히 찢어진 힘줄로의 진행을 감소시킬 수 있다.
- [0168] 본 발명의 방법은 임의의 손상된 힘줄에 적용될 수 있다. 인간에서 힘줄병증에 의해 영향을 받는 주요 힘줄은 아킬레스 힘줄, 극상근 힘줄, 공통 굴근 힘줄, 공통 신근 힘줄, 슬개골 힘줄 및 둔부 힘줄이다. 말 대상체에서 힘줄병증에 의해 영향을 받는 주요 힘줄은 얇은 굴근 힘줄이다. 특정 실시양태에서, 이들 힘줄 중 하나 이상이 치료를 위한 표적이다.
- [0169] 따라서, 힘줄 손상은 외측 상과염, 내측 상과염, 회전 근개 힘줄병증, 공통 신근 기원 힘줄병증, 공통 굴근 기원 힘줄병증, 둔부 힘줄병증 (대전자 동통 증후군, GTPS), 슬개골 힘줄병증, 점퍼 무릎, 족저근막염, 아킬레스 힘줄병증, 비골 힘줄병증, 극상근 증후군, 또는 이들의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 힘줄 손상은 상지 힘줄병증 (외측 상과염, 골퍼 엘보우, 회전 근개 힘줄병증 및 드립베인 질환 포함)이다. 특정 실시양태에서,

힘줄 손상은 외측 상과염이다.

- [0170] miR-29 화합물로의 치료는, 예컨대 힘줄, 백색막 또는 족저 근막에서 아픈 조직의 재생 또는 복구를 촉진한다.
- [0171] miR-29 화합물로의 치료는 치료 부위에서 콜라겐, 예컨대, 콜라겐 3의 발현을 감소시킨다.
- [0172] 본 발명의 방법은 힘줄 손상의 임의의 단계에서, 또는 손상된 힘줄의 치유 과정의 임의의 단계에서 적용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 miR-29 화합물 및 조성물은 초기 진단 시점에 대상체에게 투여된다.
- [0173] 대상체, 예컨대 인간 대상체는 이전 치료에 반응하지 않았거나 부적절한 반응을 보였거나 내약성이 없었을 수 있다. 이는 치료에도 불구하고 대상체의 증상이 지속되었음을 의미한다. 이전의 힘줄병증 치료는 물리적 요법, 부목 고정, 비스테로이드성 항염증 (NSAID) 약물로의 치료, 및 아픈 힘줄에 대한 국소적 코르티코스테로이드 주사 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 대상체는 보존적 치료에 실패했을 수 있으며, 즉 치료에도 불구하고 증상이 3개월 이상의 기간 동안 지속되었다.
- [0174] 힘줄 손상 (예컨대, 팔꿈치 힘줄병증과 같은 힘줄병증)에서 miR-29 치료의 효능은 하기 중 하나 이상에 기초하여 평가될 수 있다 (또한 실시예 7 참조):
- [0175] - 예컨대, miR-29 화합물 또는 이의 염의 투여 후 14일, 28일 및/또는 90일에, 예컨대 시각적 아날로그 척도 (VAS)를 사용하여 측정된 통증의 감소;
- [0176] - 예컨대, miR-29 화합물 또는 이의 염의 투여 후 14일, 28일 및/또는 90일에, 예컨대 팔, 어깨 및 손 장애 (Disabilities of the Arm, Shoulder, and Hand) (퀵 DASH (Quick DASH)) 점수, 및/또는 미국 어깨 및 팔꿈치 외과 의사 팔꿈치 (American Shoulder and Elbow Surgeons Elbow: ASES-E)를 사용하여 측정된 장애 및 증상의 개선;
- [0177] - 예컨대 miR-29 화합물 또는 이의 염의 투여 후 14일, 28일 및/또는 90일에, 예컨대 환자 평점 테니스 엘보우 평가 (Patient Rated Tennis Elbow Evaluation: PRTEE)에 의해 측정된 통증 및 장애의 개선; 및
- [0178] - 예컨대, miR-29 화합물 또는 이의 염의 투여 후 14일, 28일 및/또는 90일에 초음파 평가에 의해 측정되는 바와 같은 치료된 힘줄(들)의 개선.
- [0179] 뒤쥐트랑 질환
- [0180] 뒤쥐트랑 질환(DD)은 '근막' 또는 '손바닥 근막'으로도 공지된 손바닥 및 손가락의 피부 아래에 있는 조직의 섬유층에 영향을 미친다. DD를 갖는 대상체의 경우, 근막이 두꺼워지고 시간이 지남에 따라 팽팽해진다. 이로 인해 손가락이 손바닥 쪽으로 안쪽으로 당겨져 뒤쥐트랑 구축으로 공지된 현상이 발생한다. DD를 갖는 대상체는 특정한 일상 활동을 수행하지 못할 수 있다. 비외과적 (예컨대, 스테로이드 또는 콜라게나제 주사) 및 외과적 치료 옵션이 질환의 진행을 늦추고 아픈 손가락의 움직임을 개선하는데 도움이 되지만 상당한 부작용 또는 합병증이 있을 수 있다.
- [0181] 분자 수준에서 DD는 비정상적인 섬유모세포 증식 과정 및 콜라겐 3을 포함한 콜라겐의 과잉 생성을 특징으로 한다 (참조문헌 6). 본원에 기재된 miR-29 화합물은 근막에서 특히 효과적이고 안전하게 국소적 콜라겐 (예컨대, 콜라겐 3) 발현을 억제하는 능력에 기초하여 뒤쥐트랑 질환의 치료에 효과적인 것으로 생각되며, 따라서 이 질환의 특징인 섬유성 조직의 형성에 대항한다.
- [0182] 뒤쥐트랑 질환에서 miR-29 치료 효능은, 예컨대 팔, 어깨 및 손 장애 (퀵 DASH) 점수, 증상 및/또는 통증의 감소 (VAS 점수화), 및 (예컨대, 투비아나 (Tubiana) 등급화 시스템 개선에 의한) 뒤쥐트랑 결절 및 코드 형성 감소의 임상 평가를 사용하여 측정된 장애 및 증상의 개선을 기준으로 평가될 수 있다. 예컨대, 참조문헌 7을 참조한다.
- [0183] 페이로니 질환
- [0184] 페이로니 질환(PD)은 음경의 백색막 (TA) 내에 흉터 또는 플라크가 형성되는 것을 특징으로 하는 진행성 섬유성 장애이다. 병태는 음경 통증 및 음경 기형의 발달로 인해 신체적 수준 뿐만 아니라 정서적 수준 모두에서 매우 쇠약해진다.
- [0185] 콜라겐 3 및 세포외 매트릭스의 다른 성분의 과도한 국소적 축적이 질환의 특징이다. 섬유성 조직은 정상적인 콜라겐 3/1 비율이 콜라겐 3 함량 증가 쪽으로 이동하는 것과 관련이 있다. 예컨대, PD 동물은 콜라겐 3 단백질의 상당한 상향 조절과 함께 섬유증의 막 및 막아래 영역을 발달시키는 것으로 밝혀졌다. 또한, 콜라겐 3/1

비율은 대조군과 비교하여 PD 그룹에서 더 높았다 ($P < .05$) (참조문헌 8). 본원에 기재된 miR-29 화합물은 TA에서 특히 효과적이고 안전하게 국소적 콜라겐 3 발현을 억제하는 능력에 기초하여 페이로니 질환의 치료에 효과적인 것으로 생각되며, 따라서 이 질환의 특징인 섬유성 조직의 형성에 대항한다.

[0186] 뒤꿈트랑 질환 및 페이로니 질환의 동시-발생은 일반적이며 (예컨대, 참조 문헌 9), 두 질환 모두 콜라겐 3 과잉 생성과 관련이 있다 (참조문헌 10). 데이터는 이들이 공통의 병리생리를 공유하고 동일한 치료 요법을 따를 수 있음을 시사한다. 이는 페이로니 질환 및 뒤꿈트랑 질환의 치료에서 본원에 제공된 것을 포함하는 miR-29 모방체의 치료 효능을 추가로 뒷받침한다.

[0187] 페이로니 질환에서 miR-29 치료 효능은 장애의 개선, 증상 및/또는 통증의 감소, 음경 굴곡 진행의 개선 또는 결여 및 듀플렉스 초음파촬영에서의 개선에 기초하여 평가될 수 있다.

[0188] **치료를 위한 대상체**

[0189] 대상체는 전형적으로 인간이다. 그러나, 본 발명의 방법은 다른 영장류 (특히 고릴라, 침팬지 및 오랑우탄과 같은 대형 유인원 뿐만 아니라 구세계 및 신세계 원숭이) 뿐만 아니라 설치류 (마우스 및 래트 포함), 및 다른 일반적인 실험실 동물, 가정에서 사육되는 동물 및 농업용 동물 (토끼, 개, 고양이, 말, 소, 양, 염소 등을 포함하지만 이에 제한되지 않음)을 포함하는 임의의 다른 포유동물에까지 확장될 수 있다. 또 다른 바람직한 대상체는 말, 특히 말 스포츠를 위해 사육된 말이다.

[0190] **제약 조성물 및 투여**

[0191] 본원에 기재된 miR-29 화합물 또는 이의 염은 제약 조성물로 제형화될 수 있다. 이들 조성물은 miR-29 화합물 또는 이의 염 이외에, 제약상 허용되는 부형제, 담체, 버퍼, 안정화제 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 비-독성이며, miR-29 화합물의 효능을 방해하지 않는다.

[0192] 따라서, 한 실시양태에서, 제약 조성물은 miR-29 화합물 또는 이의 염 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제, 예컨대 멸균 액체 담체, 예컨대 주사 용액을 포함한다. 제약상 허용되는 담체 또는 희석제는 식염수를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 담체 또는 희석제는 멸균 수용액, 예컨대 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)일 수 있다. 제약상 허용되는 담체 또는 희석제는 멸균 수용액, 예컨대 등장성 식염수 (예컨대, 0.9% w/v NaCl)와 같은 염화나트륨 용액일 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 miR-29 화합물 또는 이의 염을 포함하고, PBS 및 등장성 식염수 (예컨대, 0.9% w/v NaCl)와 같은 염화나트륨 용액을 추가로 포함한다.

[0193] 치료될 병태의 국소화된 특성을 고려할 때, 예컨대 국소 주사에 의한 국소 투여가 특히 적합하다. 따라서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 전형적으로 아픈 부위에 국소적으로 (병변내로) 투여된다. 예컨대, 아픈 힘줄에 주사가 전달될 수 있다. 아픈 힘줄에 주사하는 것은 힘줄내 투여로도 공지되어 있다.

[0194] 아픈 부위에 주사하기 위해, miR-29 화합물은 비경구적으로 허용되는 수용액을 추가로 포함하는 제약 조성물에 포함될 수 있다. 용액은 멸균 상태이다. 용액은 발열원이 없으며, 적절한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는, 예컨대 포스페이트 완충된 식염수, 염화나트륨 용액, 링거 용액, 락테이트 처리된 링거 용액과 같은 등장성 비히클을 사용하여 적합한 용액을 잘 제조할 수 있다. 필요에 따라, 보존제, 안정화제, 버퍼, 항산화제 및/또는 다른 첨가제가 포함될 수 있다. 예컨대, EDTA는 예컨대 0.001% - 0.005%, 예컨대 0.003% (100 μ M)의 최종 농도로 첨가될 수 있다. 본 발명의 화합물의 특정 제형은 주사 가능한 용액, 예컨대 본 발명의 miR-29 화합물 또는 염 및 PBS를 포함하고, 임의적으로 EDTA를 추가로 포함하는 용액이다.

[0195] 힘줄로의 주사는 전형적으로, 예컨대 "페퍼링 기술"을 이용하는 초음파에 의해 안내된다 (참조문헌 11). "페퍼링 기술"은 바늘을 피부로부터 빼지 않으면서 당기고 방향을 바꾸고 재삽입함으로써 다수의 작은 주사를 수행하는 주사 방법이다. 손상된/만성 힘줄 상황에서 이는 치유 반응을 자극하는데 유리할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, miR-29 화합물의 단일 용량은 손상된 힘줄 내의 상이한 부위에서 다수의 바늘 주사의 형태로 힘줄에 투여된다.

[0196] 통상적인 기술 및 프로토콜의 예는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Edition, 2012)에서 찾아질 수 있다.

[0197] **용량 및 치료 요법**

[0198] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 용량이 다양한 방식으로 표현될 수 있음을 알고 있다. 달리 나타내지 않는

한, 본원에 나타낸 바와 같은 miR-29 화합물의 용량은 유리산으로의 가이드 및 패신저 가닥의 올리고뉴클레오타이드 부분 (즉, 콜레스테롤 모이어티와 같은 임의의 접합체 그룹 제외)의 중량을 지칭한다. 참조 화합물은 트리 에틸렌글리콜 콜레스테롤 모이어티를 제외한 유리산으로의 CWT-001이다. 상이한 분자량을 가질 수 있는 miR-29 화합물, 염 및/또는 접합된 형태의 등가 용량은 통상의 기술자에 의해 계산될 수 있다. 등가 용량은 또한 몰량 (예컨대, nmole) 또는 몰 농도 (예컨대, nM)로 나타낼 수 있다. 통상의 기술자는 이들 상이한 단위 사이를 변환하는 방법을 알고 있다.

[0199] 하기 기재된 실시예 및 도면에서, 나타낸 용량은 화합물의 콜레스테롤-접합된 형태의 유리산을 지칭한다. 따라서, 실시예 및 도면이 200 μg 또는 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 지칭하는 경우, 이는 콜레스테롤 모이어티를 제외한 유리산으로의 약 190 μg 또는 190 $\mu\text{g/ml}$ 의 화합물에 상응하고; 실시예가 500 μg 또는 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 지칭하는 경우, 이는 콜레스테롤 모이어티를 제외한 유리산으로의 약 475 μg 또는 475 $\mu\text{g/ml}$ 의 화합물에 상응하고; 실시예가 1500 μg 또는 1500 $\mu\text{g/ml}$ 를 지칭하는 경우, 이는 콜레스테롤 모이어티를 제외한 유리 산으로의 약 1420 μg 또는 1420 $\mu\text{g/ml}$ 의 화합물에 상응하고; 실시예가 2000 μg 또는 2000 $\mu\text{g/ml}$ 를 지칭하는 경우, 이는 콜레스테롤 모이어티 등을 제외한 유리산으로의 약 1900 μg 또는 1900 $\mu\text{g/ml}$ 의 화합물에 상응한다. 콜레스테롤 모이어티가 제외되는 경우, 이는 또한 콜레스테롤 모이어티와 화합물의 올리고뉴클레오타이드 부분 사이의 임의의 링커 (예컨대, 트리에틸렌글리콜)를 제외한다.

[0200] 투여는 전형적으로 대상체에게 이익을 나타내기에 충분한 "치료 유효량" 또는 "예방 유효량" (요법은 경우에 따라 예방을 포함할 수 있음)으로 투여된다. 예컨대, 치료 유효량은 miR-29 화합물 또는 이의 염이 대상체에게 투여될 때 질환 증상 개선, 예컨대 감소된 통증 또는 장애, 개선된 기능성, 및/또는 방지된 또는 더 느린 질환 진행을 발생시키는 양이다.

[0201] miR-29 화합물은 손상된 조직, 즉 병변내로 직접적으로 투여될 수 있다. 투여는 전형적으로, 예컨대 바늘을 사용하는 주사에 의해 이루어진다.

[0202] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 용량의 단일 투여만으로 치료 효과가 달성될 수 있다. "단일" 투여는 치료 효과를 달성하기 위해 화합물의 단 1회 용량이 필요함을 의미한다. 따라서, 대상체는 전형적으로 제1 용량을 투여한 부위에서 질환 증상의 개선을 경험하기 위해 제2 용량을 위해 돌아올 필요가 없다.

[0203] 일반

[0204] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한 관련 기술분야의 기술 내에서 화학, 생화학, 분자 생물학, 면역학 및 약리학의 통상적인 방법을 이용할 것이다.

[0205] 용어 "포함하는"은 "포함하는" 뿐만 아니라 "이루어진"을 포괄하며, 예컨대 X를 "포함하는" 조성물은 X로만 이루어질 수 있거나 추가의 것, 예컨대 X + Y를 포함할 수 있다.

[0206] 수치 x와 관련하여 용어 "약"은 임의적이며, 예컨대 $x \pm 10\%$ 를 의미한다.

[0207] 단어 "실질적으로"는 "완전히"를 배제하지 않는다. 필요한 경우, 본 발명의 정의로부터 단어 "실질적으로"를 생략할 수 있다.

[0208] 2개의 올리고뉴클레오타이드 서열 사이의 서열 동일성 백분율에 대한 언급은, 정렬 시, 핵염기의 백분율이 이들 서열의 전체 길이에 걸쳐 2개의 서열을 비교할 때 동일하다는 것을 의미한다.

[0209] 하기 실시예는 본 발명의 다양한 실시양태를 설명하기 위해 제공된다. 실시예는 예시적이며 어떠한 식으로든 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다.

도면의 간단한 설명

[0210] **도 1:** (A) 나트륨 염으로의 CWT-001 가이드 (안티센스) 가닥의 구조. (B) 나트륨 염으로의 CWT-001 패신저 (센스) 가닥의 구조.

도 2: 나타낸 바와 같이 인간 콜라겐 3 miR29 결합 부위를 함유하는 루시페라제 플라스미드 및 miR29a 화합물 및 대조군으로 공동-형질감염된 HEK293 세포에서의 루시페라제 활성 (n=4). 루시페라제 활성은 miR29a 활성에 반비례한다.

도 3: (A) 선택된 miR29 화합물은 1차 인간 대식세포에서 염증유발 시토카인 TNF-알파의 생성을 유도하는 능력을 평가함으로써 잠재적인 면역원성에 대해 시험되었다. 비처리된 세포 ("비처리됨")를 음성 대조군으로 사용

하였고; 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 이미퀴모드 ("IMQ 2.5")로 처리된 세포를 양성 대조군으로 사용하였다. (B) 선택된 miR29 화합물은 인간 힘줄세포에서 col3a1의 발현을 녹-다운하는 능력에 대해 시험되었다. 스크램블된 miR29a ("scr") 및 비처리된 세포 ("untr")를 음성 대조군으로 사용하였다. (C) 나타낸 바와 같이 인간 콜라겐 3 miR29-결합 부위를 함유하는 루시페라제 플라스미드 및 선택된 miR-29 화합물로 공동-형질감염된 HEK293 세포의 루시페라제 활성. 스크램블된 miR29a ("scr")를 음성 대조군으로 사용하였다. 일원 ANOVA 시험을 이용하여 유의성을 평가하였다. *** $P \leq 0.001$ Teno20과 비교됨, $n=3$. (D) Col3a1 전사체 수준은 나타낸 바와 같이 콜레스테롤-접합된 miR-29 화합물로 힘줄세포를 처리한 후 정량적 PCR에 의해 측정되었다. 값은 GAPDH로 정규화되고, 비처리된 샘플과 비교하여 상대적 발현으로 나타낸다. 스튜던트 t-시험, * $P \leq 0.05$ 5일에 Teno33과 비교된 Teno18, $n=3$. (E) 선택된 miR-29 화합물을 마우스 힘줄 손상 모델에서 시험하였다. 화합물을 손상된 슬개골 힘줄에 직접적으로 주사하고, 마우스를 1, 3 또는 7일 동안 회복하도록 하였다. Col3a1 전사체의 절대 수는 q-PCR로 측정되었다. 일원 ANOVA 시험을 이용하여 유의성을 평가하였다. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 각각의 시점에서 Teno20과 비교된 Teno18, $n=4$.

도 4: 힘줄 손상 유도에 이어 즉시 CWT-001로 처리한 후 마우스 힘줄의 조직학적 및 분자 분석. (A) CWT-001 또는 PBS 주사 후 제1일, 제3일 및 제7일에 마우스 슬개골 힘줄에서 col3a1 mRNA의 절대 카피 수 ($n=3$). (B) CWT-001(오른쪽) 또는 PBS 대조군 (왼쪽)으로의 처리 7일 후 손상된 힘줄의 대표적인 H&E 염색된 섹션.

도 5: ELISA로 측정된, CWT-001, 스크램블된 음성 대조군 또는 폴리 IC 양성 대조군으로 처리한 지 24시간 후 배양된 1차 인간 대식세포의 상층액에서 염증유발 시토킨인 종양 괴사 인자 알파 (TNF- α)의 수준.

도 6: qPCR로 측정되고, 비처리된 대조군 (왼쪽 막대)과 비교하여 배수 변화로 표현된, CWT-001 (중간 막대) 또는 폴리 IC 양성 대조군 (오른쪽 막대)으로 처리한 지 24시간 후 배양된 1차 인간 대식세포에서 인터페론-유도성 유전자 OAS2 (A), INF α (B), IFITM1 (C), MX1 (D), IRF9 (E) 및 OAS1 (F)의 발현 수준. "TF 부재" = 형질감염 시약 없음 (세포 흡수는 콜레스테롤 모이어티에 의해 향상되었음).

도 7: qPCR로 측정되고, 18S의 106 카피당 인터페론 반응 유전자의 절대 카피 수로 표현된, CWT-001 또는 PBS 음성 대조군을 힘줄내 주사한 후 0, 1, 3 및 7일에 마우스 힘줄에서 인터페론-유도성 유전자 MX1 (A), OAS2 (B), IFITM1 (C) 및 IRF9 (D)의 발현 수준.

도 8: Cel39 스파이크 인 대조군 (Cel39 spike in control)으로 정규화된 qPCR로 측정되고, 비처리된 샘플과 비교된 상대적 발현으로 표현된, 0, 6, 12 및 24시간 동안 0, 2, 20 및 100 $\mu\text{g/ml}$ CWT-001과 함께 37°C에서 인큐베이션된 신선한 인간 혈청에서 miR29a의 수준 ($n=3$).

도 9: Cel39 스파이크 인 대조군으로 정규화된 qPCR로 측정되고, 비처리된 샘플과 비교하여 배수-변화로 표현된, 0분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 6시간, 12시간 및 24시간 동안 0, 2, 20 및 100 $\mu\text{g/ml}$ CWT-001과 함께 37°C에서 인큐베이션된 신선한 인간 혈청에서 miR29a의 수준 ($n=3$).

도 10: qPCR로 측정된, CWT-001을 정맥내 주사한 지 0, 1, 4 및 7일 후 수거된 마우스 신장 (A), 비장 (B), 간 (C), 혈청 (D), 폐 (E), 근육 (F) 및 심장 (G)에서 miR29a 수준. 기관 miR29a 발현 수준은 GAPDH로 정규화되었고 비처리된 대조군과 비교하여 상대적 배수-변화로 나타내었으며, 혈청 miR29a 발현 수준은 Cel39 스파이크 인 대조군으로 정규화되었고 PBS 대조군과 비교하여 배수-변화로 표현되었다 ($n=4$).

도 11: Cel39 스파이크 인 대조군으로 정규화된 qPCR로 측정되고, PBS-처리된 대조군과 비교하여 배수-변화로 표현된, CWT-001을 슬개골 힘줄에 주사한 지 0분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 24시간 및 72시간 후 마우스로부터 수집된 혈액에서 miR29a의 혈청 수준 ($n=4$).

도 12: qPCR로 측정된, 4, 20, 40 및 50 mg/ml의 CWT-001, 또는 PBS 대조군을 정맥내 주사한 지 7일 후 수거된 마우스 혈청 (A), 폐 (B), 힘줄 주사에 가까운 피부 (C), 신장 (D), 비장 (E), 근육 (F), 간 (G), 심장 (H) 및 골수 (I)에서 miR29a의 수준. 기관 miR29a 발현 수준은 GAPDH로 정규화되었고 비처리된 대조군과 비교하여 상대적 배수-변화로 나타내었으며, 혈청 miR29a 발현 수준은 Cel39 스파이크 인 대조군으로 정규화되었고 PBS 대조군과 비교하여 배수-변화로 표현되었다 ($n=4$).

도 13: 외측 상과염을 갖는 인간 대상체에서 단일 상승 용량의 CWT-001 주사의 안전성, 내약성 및 약동학을 평가하는 1상의 무작위배치된 이중-맹검의 위약-대조된 연구를 위한 연구 설계.

도 14: 공통 신근 힘줄에 CWT-001을 투여하는 동안 프로브 배치를 보여주는 초음파 이미지 (A 및 B). 요골두 (r), 요상완골 관절 (j), 외측 상과, 및 공통 신근 힘줄이 시각화된다. 프로브는 공통 신근 힘줄의 종축에 평

행하게 팔꿈치의 외측면을 따라 배치된다.

도 15: qPCR로 측정된 건강한 인간 근육 조직 및 뒤뮈트랑 인간 근육 조직에서 miR29a의 수준 비교 (n=4 건강, n=3 뒤뮈트랑).

도 16: qPCR로 측정된, 5 μ M의 miR29a 모방체, miR29b 모방체, miR29c 모방체, CWT-001, miR29a 안타고미르 또는 스크램블된 miR29a 대조군으로 형질감염 후 인간 뒤뮈트랑 섬유모세포에서 콜라겐 1 (A) 및 콜라겐 3 (B)의 수준. miR29a 발현 수준은 GAPDH로 정규화되었고 스크램블된 대조군과 비교하여 상대적 배수-변화로 나타내었다 (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005 스크램블된 대조군과 비교됨. (스튜던트 t-시험).

도 17: I상의 무작위배치된 이중-맹검 연구에서, 외측 상과염을 갖는 인간 대상체는 힘줄내 주사를 통해 투여된 단일 200 μ g (n=6) (A), 500 μ g (n=6) (B) 또는 1500 μ g (n=6) (C) 용량의 CWT-001 또는 매칭된 위약 (n=2) (3:1)을 받았다. 대상체는 처리 후 처음 14일 동안 1일 1회 100 mm 시각적 아날로그 척도 (VAS)를 사용하여 이전 24시간 동안의 통증을 평가하여 통증을 평가하였다. 제14일 후 대상체는 주사 후 제90일까지 매주 통증 일기를 작성하였다. 수평 "MCID" 라인은 외측 상과염 처리에서 VAS에 대한 확립된 최소 임상적 중요도 차이 (MCID)를 나타낸다. 임의 용량의 CWT-001 (n=18)을 받은 모든 대상체에 대한 VAS 점수의 평균 변화를 위약 (n=6)을 받은 모든 대상체에 대한 VAS 점수의 평균 변화와 비교하였고 (D), 별도의 연구에서 임의 용량의 CWT-001을 받은 모든 대상체에 대한 VAS 점수의 평균 백분율 변화를 코르티코스테로이드 (n=50), 혈소판 풍부 혈장 (PRP) (n=50), 또는 자일로카인 (n=50)으로 처리된 대상체에 대한 VAS 점수의 평균 백분율 변화와 비교하였다 (E).

도 18: I상의 무작위배치된 이중-맹검 연구에서, 외측 상과염을 갖는 인간 대상체는 힘줄내 주사를 통해 투여된 단일 200 μ g (n=6) (A), 500 μ g (n=6) (B) 또는 1500 μ g (n=6) (C) 용량의 CWT-001 또는 매칭된 위약 (n=2) (3:1)을 받았다. 대상체는 퀵DASH (QuickDASH) 지수를 사용하여 신체 기능 및 증상을 보고하였고, 퀵DASH 점수의 변화는 투여 전 제1일부터 제14일, 제28일 및 제90일까지 플로팅되었다. 임의 용량의 CWT-001 (n=18)을 받은 모든 대상체에 대한 퀵DASH 점수의 평균 변화를 위약 (n=6)을 받은 모든 대상체에 대한 퀵DASH 점수의 평균 변화와 비교하였다 (D). 수평 "MCID" 라인은 상지 근골격 장애를 갖는 환자에서 퀵DASH에 대한 확립된 MCID를 나타낸다.

도 19: I상의 무작위배치된 이중-맹검 연구에서, 외측 상과염을 갖는 인간 대상체는 힘줄내 주사를 통해 투여된 단일 200 μ g (n=6) (A), 500 μ g (n=6) (B) 또는 1500 μ g (n=6) (C) 용량의 CWT-001 또는 매칭된 위약 (n=2) (3:1)을 받았다. 환자 평점 테니스 엘보우 평가 (PRTEE)를 사용하여 연구 대상체에서 인지된 통증 및 장애를 측정하였으며, PRTEE 점수의 변화는 투여 전 제1일부터 제14일, 제28일 및 제90일까지 플로팅하였다. 임의 용량의 CWT-001 (n=18)을 받은 모든 대상체에 대한 PRTEE 점수의 평균 변화를 위약 (n=6)을 받은 모든 대상체에 대한 PRTEE 점수의 평균 변화와 비교하였다 (D).

도 20: I상의 무작위배치된 이중-맹검 연구에서, 외측 상과염을 갖는 인간 대상체는 힘줄내 주사를 통해 투여된 단일 200 μ g (n=6), 500 μ g (n=6) 또는 1500 μ g (n=6) 용량의 CWT-001 또는 매칭된 위약 (n=2) (3:1)을 받았다. 초음파 조직 특징규명 (UTC)를 사용하여 힘줄 구조를 시각화하고 그레이-스케일 힘줄 매트릭스 변화를 힘줄 통합성과 관련된 4가지의 상이한 생태형으로 정량화하였다. 유형 I 및 II는 조직화된 매트릭스를 나타내고; 유형 III 및 IV는 체계적이지 못한 매트릭스를 나타낸다 (A). 외측 팔꿈치의 대표적인 초음파 이미지는 주사 전 (B), 제28일 (C) 및 제90일 (D)에 위약을 받은 대상체 및 주사 전 (E), 제20일 (F) 및 제90일 (G)에 200 μ g CWT-001을 받은 대상체에 대해 제공된다. UTC 유형 I, II, III 및 IV 힘줄 조직의 백분율 및 회복 힘줄 (UTC 유형 I 및 II) 대 퇴행성 힘줄 (UTC 유형 III 및 IV)의 총 백분율을 200 μ g (H, I), 500 μ g (J, K) 또는 1500 μ g (L, M) 용량의 CWT-001 또는 매칭된 위약을 받은 대상체에 대해 정량화하였다. 임의 용량의 CWT-001 (n=18)을 받은 모든 대상체에 대한 회복 및 퇴행성 힘줄의 평균 백분율을 위약 (n=6)을 받은 모든 대상체에 대한 회복 및 퇴행성 힘줄의 평균 백분율과 비교하였다 (N). *P<0.05, **P<0.01.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

실시예 1: miR-29 화합물의 평가 및 1차 약리학 연구 (도 1-3)

상이한 조합으로 다양한 화학적 변형 (2'-플루오로 리보스, 2'-O-메틸 리보스, 테옥시리보스, 및/또는 포스포로티오에이트)을 함유하는 miR-29 모방체 화합물의 라이브러리가 생성되었다. 하나 (Teno36)를 제외한 모든 화합

물은 가이드 가닥 및 패신저 가닥을 함유하는 이중-가닥 화합물이다. 각각의 화합물의 가이드 가닥은 천연 인간의 성숙한 miR-29a의 가이드 가닥과 동일한 핵염기 서열을 갖는다 (hsa-miR-29a-3p; 서열식별번호: 1). 패신저 가닥은 천연 인간의 성숙한 miR-29a의 패신저 가닥과 동일한 핵염기 서열을 갖거나 (hsa-miR-29a-5p; 서열식별번호: 2), 3' G 뉴클레오티드가 결여될 수 있고/있거나 (서열식별번호: 3), 천연 miR-29a 패신저 가닥의 서열과 비교하여 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 가질 수 있다 (서열식별번호: 4-6) (표 1b 참조). 서열식별번호: 2의 반대 서열을 나타내는 음성 대조군 패신저 가닥 (서열식별번호: 7)을 또한 시험하였다. 임의의 당 및 뉴클레오시드간 연결 (백본) 변형과 함께 핵염기 서열이 표 1a에 나타나 있다. 각각의 화합물에 대해 제1 행은 가이드 가닥을 나타내고, 제2 행은 패신저 가닥을 나타낸다. 모든 서열은 5'에서 3' 방향으로 나타낸다. 서열식별번호는 핵염기 서열 (즉, 화학적 변형 제외)을 나타낸다. Teno46은 어떠한 화학적 변형도 함유하지 않으므로 천연 성숙한 miR-29a에 상응한다. Teno39는 이전에 기재되었다 (참조문헌 2). 패신저 가닥이 3' 말단에서 콜레스테롤 모이머에 접합된, 나트륨 염으로의 예시적인 화합물 Teno18의 구조는 도 1A (가이드 가닥) 및 1B (패신저 가닥)에 나타나 있다.

<표 1a>

표 1a: miR-29 화합물

화합물	식	핵염기 SEQ ID NO
Teno1	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUmCmArG	2
Teno2	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrCmUrAmG	4
Teno3	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno4	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno5	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno6	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG	2
Teno7	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrGmUrGmCrUmAmG	4
Teno8	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUmCmArG	2
Teno9	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrCmUrAmG	4
Teno10	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno11	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno12	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno13	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG	2
Teno14	5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrGmUrGmCrUmAmG	4
Teno15	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1

	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmArG	2
Teno16	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrUmUrCmAmG	4
Teno17	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno18	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno19	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno20	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrUmGrUmUrCmAmG	2
Teno21	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrUmGrUmCmAmG	4
Teno22	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmArG	2
Teno23	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrUmUrCmAmG	4
Teno24	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno25	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno26	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno27	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrUmGrUmUrCmAmG	2
Teno28	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrUmGrUmCmAmG	4
Teno29	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCfAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmArG	2
Teno30	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCfAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmCrGmArUmUrUmCrAmArUmUrGmGrUmGrUmUrCmAmG	4
Teno31	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCfAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	rGrArCrUrUrGrUrGrGrUrUrUrCrUrUrUrArGrUrCrA	7
Teno32	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCfAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno33	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCfAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2
Teno34	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCfAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrUmGrUmUrCmAmG	2
Teno35	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCfAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1

[0217]

	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArAmUrUmGrGmUrGmCrUmAmG	4
Teno36	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	No passenger strand	n/a
Teno37	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUA	6
Teno38	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAmG	5
Teno39	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGmUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAG	5
Teno40	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUA	6
Teno41	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAmG	5
Teno42	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrU*rU*rA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAG	5
Teno43	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUA	6
Teno44	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAmG	5
Teno45	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAG	5
Teno46 (native)	/5Phos/rUrArGrCrArCrCrArUrCrUrGrArArArUrCrGrGrUrUrA	1
	rArCrUrGrArUrUrUrCrUrUrUrGrGrUrGrUrUrCrArG	2
Teno47	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUA	6
Teno48	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAmG	5
Teno49	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCrAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mAmCrCmGrAmUrUmUrCmArGmArUmGrGmUrGmCrUmAG	5

[0218]

[0219] /5Phos/= 5' 포스페이트

[0220] mA= 2'-0-메틸 아데노신 리보뉴클레오시드;

[0221] mC= 2'-0-메틸 시토신 리보뉴클레오시드;

[0222] mG= 2'-0-메틸 구아닌 리보뉴클레오시드;

[0223] mU= 2'-0-메틸 우라실 리보뉴클레오시드;

[0224] rA= 아데노신 리보뉴클레오시드;

[0225] rC= 시토신 리보뉴클레오시드;

[0226] rG= 구아닌 리보뉴클레오시드;

[0227] rU= 우라실 리보뉴클레오시드;

[0228] fA= 2'-데옥시-플루오로 아데노신 리보뉴클레오시드;

[0229] fC= 2'-데옥시-플루오로 시토신 리보뉴클레오시드;

[0230] fG= 2'-데옥시-플루오로 구아닌 리보뉴클레오시드;

[0231] fU= 2'-데옥시-플루오로 우라실 리보뉴클레오시드;

[0232] *rA= 5'-0-포스포로티오에이트 아데노신 리보뉴클레오시드;

[0233] *rC= 5'-0-포스포로티오에이트 시토신 리보뉴클레오시드;

[0234] *rG= 5'-0-포스포로티오에이트 구아닌 리보뉴클레오시드;

[0235] *rU= 5'-0-포스포로티오에이트 우라실 리보뉴클레오시드;

[0236] A= 아데노신 데옥시리보뉴클레오시드;

[0237] C= 시토신 데옥시리보뉴클레오시드;

[0238] G= 구아닌 데옥시리보뉴클레오시드;

[0239] U= 우라실 데옥시리보뉴클레오시드.

[0240] 따라서, 하기의 패신저 가닥 핵염기 서열을 시험하였다 (표 1b 참조). 서열식별번호: 2는 천연 인간 miR-29a 패신저 가닥 서열을 나타낸다. 서열식별번호: 3은 밑줄로 나타낸 바와 같이 한 위치에서 서열식별번호: 2와 상이하다. 서열식별번호: 4는 5개의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이하다. 서열식별번호: 5는 6개의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이하다. 서열식별번호: 6은 7개의 위치에서 서열식별번호: 2와 상이하다. 서열식별번호: 7은 서열식별번호: 2의 반대 서열이며 음성 대조군을 나타낸다.

[0241] <표 1b>

표 1b: 패신저 가닥 핵염기 서열

서열	SEQ ID NO
ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG	2
ACUGAUUUCUUUUGGUGUUC <u>A</u>	3
AC <u>C</u> GAU <u>UUC</u> <u>AA</u> UUGGUG <u>CU</u> -AG	4
AC <u>C</u> GAU <u>UUC</u> <u>AGA</u> UUGGUG <u>CU</u> -AG	5
AC <u>C</u> GAU <u>UUC</u> <u>AGA</u> UUGGUG <u>CU</u> -A-	6
GACUUGUGGGUUUUCUUUAGUCA (SEQ ID NO: 2의 반대)	7

[0242]

[0243] 하기 표 1c는 각각의 화합물에서 2' 당 변형, (서열식별번호와 같은) 핵염기 서열 및 뉴클레오시드간 연결의 조합을 나타낸다. Teno1-Teno49는 5가지 유형의 가이드 가닥 (하기에 G1-G5로 나타냄) 중 하나 및 11가지 유형의 패신저 가닥 (하기에 P1-P11로 나타냄) 중 하나를 함유한다. Teno36은 패신저 가닥을 함유하지 않기 때문에 예외이다. 모든 서열은 5'에서 3' 방향으로 나타낸다.

[0244] Teno1을 예로 들면, 표 1c는 Teno1이 서열식별번호: 1의 핵염기 서열을 갖는 "G1" 가이드 가닥을 함유하고, 여기서 3' 말단에서 3개의 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 리보뉴클레오시드이고, 나머지 뉴클레오시드는 비변형된 리보뉴클레오시드이고, 모든 뉴클레오시드간 연결은 포스포디에스테르임을 나타낸다. 패신저 가닥은 서열식별번호: 2의 핵염기 서열을 갖는 "P1"이고, 여기서 모든 뉴클레오시드는 교대로 2'-O-메틸 및 비변형된 리보뉴클레오시드이고, 모든 뉴클레오시드간 연결은 포스포디에스테르이다. Teno2는 Teno1 ("G1")과 동일한 가이드 가닥을 함유하지만 상이한 패신저 가닥 ("P2") 등을 함유한다.

<H 1c>

표 1c: MiR-29 화합물 - 가이드 가닥별로 그룹화됨

[0246]

Teno13	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O_{nS_2}	G2
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmnm	2	$m(mr)_n m_3$	O_n	P6
Teno14	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O_{nS_2}	G2
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmnm	4	$m(mr)_n m_2$	O_n	P7
Teno40	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O_{nS_2}	G2
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmd	6	$m(mr)_d$	O_n	P8
Teno41	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O_{nS_2}	G2
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmnm	5	$m(mr)_n m_2$	O_n	P9
Teno42	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O_{nS_2}	G2
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmd	5	$m(mr)_n md$	O_n	P10
Teno15	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	nrmzmzmzmzmzmzmzmzmrm	2	$(mr)_n$	O_n	P1
Teno16	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	nrmzmzmzmzmzmzmzmzmrm	4	$(mr)_n m$	O_n	P2
Teno17	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	O_n	P3
Teno18	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	nrmzmzmzmzmzmzmzmzmd	3	$(mr)_n d$	O_n	P4
Teno19	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	nrmzmzmzmzmzmzmzmzmd	2	$(mr)_n md$	O_n	P5
Teno20	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmnm	2	$m(mr)_n m_3$	O_n	P6
Teno21	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmnm	4	$m(mr)_n m_2$	O_n	P7
Teno43	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmd	6	$m(mr)_d$	O_n	P8
Teno44	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmnm	5	$m(mr)_n m_2$	O_n	P9
Teno45	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	nrrrmzmzmzmzmzmzmzmd	5	$m(mr)_n md$	O_n	P10
Teno36	ffffffffffffffffffffmnm	1	$f_n m_2$	O_n	G3
	패신저 가닥 없음	-	-	-	-
Teno22	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	O_n	G4
	nrmzmzmzmzmzmzmzmzmrm	2	$(mr)_n$	O_n	P1
Teno23	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	O_n	G4
	nrmzmzmzmzmzmzmzmzmrm	4	$(mr)_n m$	O_n	P2
Teno24	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	O_n	G4
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	O_n	P3

Teno25	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	x_n	O_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_nd$	O_n	P4
Teno26	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	x_n	O_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	2	$(mr)_{nmd}$	O_n	P5
Teno27	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	x_n	O_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	2	$m(mr)_{nm_3}$	O_n	P6
Teno28	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	x_n	O_n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_{nm_2}$	O_n	P7
Teno46 (천연)	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	x_n	O_n	G4
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	2	x_n	O_n	P11
Teno29	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	$(mr)_n$	O_n	P1
Teno30	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	4	$(mr)_{nm}$	O_n	P2
Teno31	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	x_n	O_n	P3
Teno32	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	3	$(mr)_{nd}$	O_n	P4
Teno33	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	2	$(mr)_{nmd}$	O_n	P5
Teno34	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	2	$m(mr)_{nm_3}$	O_n	P6
Teno35	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	4	$m(mr)_{nm_2}$	O_n	P7
Teno47	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	6	$m(mr)_d$	O_n	P8
Teno48	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrmm	5	$m(mr)_{nm_2}$	O_n	P9
Teno49	frrfrrffrrfffrrrrffrrffm	1	$(f,r)_nm$	O_n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmrd	5	$m(mr)_{nmd}$	O_n	P10

[0248]

[0249]

[0250]

[0251]

[0252]

[0253]

[0254]

[0255]

[0256]

m= 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드 (-O-Me);

f= 2'-데옥시-플루오로 리보뉴클레오티드 (-F);

d= 2'-데옥시리보뉴클레오티드 (-H);

r= 비변형된 리보뉴클레오티드 (-OH);

o= 5'-0-포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결;

* 또는 s = 5'-0-포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결;

n = 뉴클레오타이드의 n 개수.

표 1d는 패신저 가닥에 따라 화합물을 그룹화한다.

[0257]

<⚡ 1d>

표 1d: MiR-29 화합물 - 패신저 가닥별로 그룹화됨

화합물	변형	해염기 SEQ ID NO	당	연결	#
Teno1	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrmm	1	$r_n m_3$	O _n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	(mr) _n	O _n	P1
Teno8	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O _{nS2}	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	(mr) _n	O _n	P1
Teno15	ffffffffffffffffffffm	1	$f_n m_2$	O _n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	(mr) _n	O _n	P1
Teno22	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	O _n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	(mr) _n	O _n	P1
Teno29	frfrrffrfffrrrrffrffm	1	(f, r) _n m	O _n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	2	(mr) _n	O _n	P1
Teno2	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrmm	1	$r_n m_3$	O _n	G1
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	4	(mr) _n m	O _n	P2
Teno9	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O _{nS2}	G2
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	4	(mr) _n m	O _n	P2
Teno16	ffffffffffffffffffffm	1	$f_n m_2$	O _n	G3
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	4	(mr) _n m	O _n	P2
Teno23	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	O _n	G4
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	4	(mr) _n m	O _n	P2
Teno30	frfrrffrfffrrrrffrffm	1	(f, r) _n m	O _n	G5
	mrmrmrmrmrmrmrmrmrmr	4	(mr) _n m	O _n	P2
Teno3	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrmm	1	$r_n m_3$	O _n	G1
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	O _n	P3
Teno10	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O _{nS2}	G2
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	O _n	P3
Teno17	ffffffffffffffffffffm	1	$f_n m_2$	O _n	G3
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	O _n	P3
Teno24	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	O _n	G4
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	O _n	P3
Teno31	frfrrffrfffrrrrffrffm	1	(f, r) _n m	O _n	G5
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	7	r_n	O _n	P3
Teno4	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrmm	1	$r_n m_3$	O _n	G1

[0258]

	mmmmmmmmmmmmmmmmmm	4	$m(mr)_{nm_2}$	O_n	P7
Teno35	frfrfrfrfrfrfrfrfrfm	1	$(f, r)_{nm}$	O_n	G5
	mmmmmmmmmmmmmmmmmm	4	$m(mr)_{nm_2}$	O_n	P7
Teno37	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmm	1	r_{nm_3}	O_n	G1
	mmmmmmmmmmmmmmmmrd	6	$m(mr)_d$	O_n	P8
Teno40	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O_{nS_2}	G2
	mmmmmmmmmmmmmmmmrd	6	$m(mr)_d$	O_n	P8
Teno43	ffffffffffffffffffffmm	1	f_{nm_2}	O_n	G3
	mmmmmmmmmmmmmmmmrd	6	$m(mr)_d$	O_n	P8
Teno47	frfrfrfrfrfrfrfrfrfm	1	$(f, r)_{nm}$	O_n	G5
	mmmmmmmmmmmmmmmmrd	6	$m(mr)_d$	O_n	P8
Teno38	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmm	1	r_{nm_3}	O_n	G1
	mmmmmmmmmmmmmmmmmm	5	$m(mr)_{nm_2}$	O_n	P9
Teno41	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O_{nS_2}	G2
	mmmmmmmmmmmmmmmmmm	5	$m(mr)_{nm_2}$	O_n	P9
Teno44	ffffffffffffffffffffmm	1	f_{nm_2}	O_n	G3
	mmmmmmmmmmmmmmmmmm	5	$m(mr)_{nm_2}$	O_n	P9
Teno48	frfrfrfrfrfrfrfrfrfm	1	$(f, r)_{nm}$	O_n	G5
	mmmmmmmmmmmmmmmmmm	5	$m(mr)_{nm_2}$	O_n	P9
Teno39	rrrrrrrrrrrrrrrrrrmm	1	r_{nm_3}	O_n	G1
	mmmmmmmmmmmmmmmmrd	5	$m(mr)_{nmd}$	O_n	P10
Teno42	rrrrrrrrrrrrrrrrrr*r*r	1	r_n	O_{nS_2}	G2
	mmmmmmmmmmmmmmmmrd	5	$m(mr)_{nmd}$	O_n	P10
Teno45	ffffffffffffffffffffmm	1	f_{nm_2}	O_n	G3
	mmmmmmmmmmmmmmmmrd	5	$m(mr)_{nmd}$	O_n	P10
Teno49	frfrfrfrfrfrfrfrfrfm	1	$(f, r)_{nm}$	O_n	G5
	mmmmmmmmmmmmmmmmrd	5	$m(mr)_{nmd}$	O_n	P10
Teno36	ffffffffffffffffffffmm	1	f_{nm_2}	O_n	G3
	패신저 가닥 없음	-	-	-	-
Teno46 (천연)	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	1	r_n	O_n	G4
	rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	2	r_n	O_n	P11

[0260]

[0261]

화합물을 시험관내 콜라겐 3 루시페라제 리포터 검정을 이용하여 천연 인간의 성숙한 miR29a과 비교한 활성에 대해 시험하였다. 이 검정의 기본은 콜라겐 3으로부터의 miR29a 결합 부위를 함유하는 루시페라제 리포터 유전자이다. 이 검정에서 루시페라제 활성은 miR29a 활성에 반비례한다. 이는 높은 miR29a 활성이 콜라겐 3 발현을 더 강력하게 억제하여 더 낮은 루시페라제 신호를 발생시킨다는 것을 의미한다. miR-29 화합물을 형질감염제로 형질감염시킨 후 HEK293 세포에서 루시페라제 검정을 수행하였다. miR-29 화합물의 루시페라제 활성을 시판되는 인간 천연 miR29a 양성 대조군 ("mir29a +ve") 및 스크램블된 miR29a 음성 대조군 ("스크램블됨") (n=4)으로 처리된 세포와 비교한다. 결과는 도 2에 나타나 있다.

[0262]

도 2에서 "Chol. conj."에 대한 언급은 패신저 가닥의 3' 말단에서 콜레스테롤 모이어티에 접합되고 임의의 형질감염제를 사용하지 않고 HEK293 세포에 첨가된 시판되는 miR29a 양성 대조군을 지칭한다. 도 2는 콜레스테롤-접합된 화합물이 세포에 들어가 콜라겐 3 발현을 억제할 수 있음을 나타낸다. 비접합된 miR29a 양성 대조군과 비교하여 콜레스테롤-접합된 화합물의 더 높은 루시페라제 신호는 비접합된 miR29a 양성 대조군의 형질감염에 사용된 형질감염제의 효과를 반영하는 것으로 생각되는 반면, 콜레스테롤-접합된 화합물이 형질감염되었을 때 형질감염제는 존재하지 않았다.

[0263]

선택된 화합물 (Teno2, Teno5, Teno6, Teno7, Teno11, Teno12, Teno13, Teno15, Teno18, Teno19, Teno20, Teno25, Teno26, Teno27, Teno32, Teno33 및 Teno34)을 1차 인간 대식세포에서 염증유발 시토카인 TNF 알파의

생성을 유도하는 능력을 시험함으로써 잠재적인 면역원성에 대해 시험하였다. 선천적 면역계의 주요 성분으로서 ds-RNA 분자에 민감한 배양된 1차 인간 대식세포를 0.35 $\mu\text{g/ml}$ miR-29 화합물로 24시간동안 처리하고 (n=4), 염증유발 시토카인 종양 괴사 인자-알파 (TNF α)의 수준을 ELISA로 측정하였다. TLR7/8 효능제인 이미퀴모드 (IMQ)를 양성 대조군 (2.5 $\mu\text{g/ml}$)으로 사용하였다. 결과는 도 3A에 나타나 있다. 10 $\mu\text{g/ml}$ 초과인 TNF-알파의 발현을 유도한 화합물은 채택되지 않았다. 그러나, Teno12는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 갖는 가이드 가닥을 함유하는 시험된 것 (Teno11, Teno12 및 Teno13) 중에서 가장 낮은 면역원성을 갖는 miR-29 화합물로 나타났으므로 채택되었다.

[0264] 따라서, 선택된 화합물 (Teno2, Teno9, Teno12, Teno15, Teno18, Teno19, Teno20, Teno33 및 Teno38)을 인간 힘줄세포에서 col3a1의 발현을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. 결과는 도 3B에 나타나 있다. 이에 따라 Teno18, Teno20 및 Teno33의 3개의 miR-29 화합물이 선택되었다.

화합물	식	핵염기 SEQ ID NO
Teno18	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCA	3
Teno20	/5Phos/fUfAfGfCfAfCfCfAfUfCfUfGfAfAfAfUfCfGfGfUmUmA	1
	mAmCrUmGrAmUrUmUrCmUrUmUrUmGrGmUrGmUrUmCmAmG	2
Teno33	/5Phos/fUrArGfCrAfCfCfArAfUfCfUrGrArArAfUfCrGrGfUfUmA	1
	mArCmUrGmArUmUrUmCrUmUrUmUrGmGrUmGrUmUrCmAG	2

[0265] Teno18, Teno20 및 Teno33의 안정성은 37°C에서 3개월 동안 보관한 후 시험관내 콜라겐 3 루시페라제 리포터 검정으로 활성을 측정함으로써 확인되었다. 모든 화합물은 안정하였다. Teno18 및 Teno33은 보관 후 가장 높은 활성을 나타내었고 Teno20이 그 뒤를 이었다 (도 3C).

[0267] 상기 데이터를 기반으로 하여, 인간 힘줄세포 및 마우스 힘줄 손상 모델에서 생체내 활성 시험을 위해 Teno18 및 Teno33을 채택하였다. 생체내에서 세포 흡수를 향상시키기 위해 콜레스테롤 모이어티를 각각의 화합물의 패신저 가닥의 3' 말단에 접합하였다 (예컨대, Teno18의 경우 도 1B 참조). Teno18 및 Teno33은 모두 인간 힘줄세포 (도 3D) 및 마우스 힘줄 손상 모델 (도 3E)에서 col3a1 발현을 효과적으로 녹 다운시켰다. Teno18로의 처리는 인간 힘줄세포 (도 3D)에서 제5일 시점 및 마우스 힘줄 손상 모델 (도 3E)에서 1일 및 3일 시점에서 가장 효과적으로 col3a1 발현을 녹 다운시켰다.

[0268] 따라서, Teno18은 하기 실시예에 기재된 추가 생체내 시험을 위한 임상 후보로 선택되었다.

[0269] 약물 물질 (콜레스테롤-접합된 Teno18, CWT-001로 지정됨)은 통상적인 방법 (고체상 합성)을 이용하여 합성되며 동결건조된 분말로 제공된다. 약물 생성물은 전형적으로 pH 7.3의 5 mg/mL CWT-001을 함유하는 멸균 용액으로 투명한 유리 바이알에 제공될 수 있으며, 이는 투여 전에 주사용 식염수로 희석된다. 대안적으로, CWT-001은 투여를 위한 최종 농도 (예컨대, 약 200 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1500 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$, 4500 $\mu\text{g/ml}$ 또는 5000 $\mu\text{g/ml}$, 예컨대 약 200 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1500 $\mu\text{g/ml}$, 또는 4500 $\mu\text{g/ml}$)의 멸균 용액으로 제공될 수 있다. 약물 물질의 안정성을 최적화하기 위해 EDTA를, 예컨대 0.001% - 0.005%, 예컨대 약 0.003% (100 μM)의 최종 농도로 첨가할 수 있다.

[0270] 약물 생성물 바이알은 -20°C에서 보관 및 운송될 수 있으며 단일 사용이 의도된다. 냉동 바이알은 탁한 흰색으로 보인다. 실온에서 해동하면 활성 제약 성분 (API)이 용해되어 투명한 무색 용액이 될 것이다.

[0271] (나트륨 염으로의) CWT-001 약물 물질의 구조는 도 1에 나타나 있다. 도 1A는 가이드 가닥을 나타내고 도 1B는 3' 말단에서 콜레스테롤 모이어티에 접합된 패신저 가닥을 나타낸다.

[0272] 실시예 2: 생체내 1차 약리학 연구 (도 4)

[0273] 설치류는 힘줄병증에 걸리기 쉬운 힘줄 (아킬레스, 슬개골 및 극상근 힘줄)을 포함하여 인간과 유사한 사지 해부학을 가지고 있으므로, CWT-001로의 처리가 콜라겐 3 발현을 상당히 감소시키고 힘줄 치유를 개선하는지를 시험하기 위해 검증된 마우스 힘줄 손상 모델 (참조문헌 12)을 선택하였다. 이러한 실험에서, 0.75 mm 직경의 생검 바늘을 사용하여 힘줄 손상을 유도한 후 즉시 손상 부위에 0.35 $\mu\text{g/ml}$ CWT-001을 주사하였다. 마우스를 1, 3 또는 7일 동안 회복시키고, 조직학적 및 분자적 분석을 위해 힘줄을 떼어내었다.

- [0274] CWT-001로의 처리는 힘줄 질환에서 콜라겐 3 발현 억제를 통해 힘줄 섬유 정렬 및 콜라겐 생성을 상당히 개선하였다 (도 4A 및 4B).
- [0275] **실시예 3: 2차 약리학 (도 5-7)**
- [0276] 실시예 3a - CWT-001의 잠재적 오프-표적 효과에 대한 생물정보학 분석
- [0277] 마이크로RNA는 이의 특성상 대부분의 경우 6-8개 뉴클레오타이드 시드 서열의 염기쌍 형성을 통해 많은 수의 표적 mRNA 종과 상호작용한다. CWT-001의 가이드 가닥의 서열은 천연 miR29a의 서열과 동일하며, 이는 CWT-001이 RISC-의존적 메커니즘을 통해 천연 분자와 동일한 mRNA를 표적으로 할 것이라는 것을 의미한다. 잠재적인 혼성화-의존적 오프-표적 효과의 가능성을 다루기 위해, 올리고뉴클레오타이드 안전성 작업 그룹 지침에 의해 권장되는 바와 같이 가이드 및 패신저 가닥 둘 다의 생물정보학 분석을 수행하였다 (참조문헌 13). 이 분석은 이론적으로 CWT-001의 가이드 및 패신저 가닥과 혼성화할 수 있는 하기에 상세히 설명된 52개의 유전자 목록을 생성하였다. 이러한 유전자 중 13개에서의 돌연변이는 하기에 상세히 설명된 바와 같이 공지된 인간 질환과 관련되었다.
- [0278] *A1) 전구체 마이크로RNA 서열에서 CWT-001 가이드 가닥에 대한 잠재적 혼성화-의존적 책임의 인 실리코 평가*
- [0279] Q-PCR 분석은 CWT-001로 처리한 후 1차 인간 힘줄세포에서 miRNA의 발현 수준에 대해 수행되었다. 잠재적 교차-혼성화 표적은 hsa-miR29a, hsa-miR29c, hsa-mir-1302-4, hsa-mir-3657, hsa-mir-3657 및 hsa-mir-4647로 확인되었다. 센스 (+) 배향의 최대 히트는 표적 마이크로RNA miR29a 및 miR29c이다 (miR29b는 이 분석에 사용된 생물정보학 파라미터에 비추어 확인되지 않았음). 잠재적인 교차-혼성화 표적은 상보적 (-) 배향이다. 최대 상보적 마이크로RNA 서열은 거의 규명되지 못한 마이크로RNA hsa-mir-3657 및 hsa-mir-4647이다. 이 두 마이크로RNA는 기능이 없는 인 실리코 인공물을 나타낼 수 있다. 또한, 이 두 서열은 완전한 방해된 동일성의 제한된 영역 (10 bp)을 공유하며, 생체내 생리학적 농도에서 miR29a 모방체에 의한 입체적 억제에 의해 강력하게 조정되기에 충분한 친화력을 가질 가능성이 없다.
- [0280] *A2) NCBI의 참조 서열 (RefSeq) RNA 서열에서 CWT-001 가이드 가닥에 대한 잠재적 혼성화-의존적 책임의 인 실리코 평가*
- [0281] Q-PCR 분석은 CWT-001로 처리한 후 1차 인간 힘줄세포에서 잠재적인 오프-표적 유전자의 발현 수준에 대해 수행되었다. 잠재적인 교차-혼성화 표적은 LAMA2, PDE7B, LRRC73, NETO1, FHL5, LINC00309, DOCK8, FILIP1, CUL9, CNOT8, LOC100132077, SCP2 및 PROX2로 확인되었다. 요약하면, 교차-혼성화에 적합한 상보적 배향으로, 서열에 대해 13-14 bp의 방해 없는 상보성을 갖는 다수의 독특한 유전자가 확인되었다. 교차-혼성화 잠재력을 제한하는 14 bp 초과와 방해 없는 상보성을 갖는 RNA는 없었다. 3개의 유전자 (LAMA2, DOCK8 및 SCP2)에서의 돌연변이는 공지된 인간 질환과 관련이 있다.
- [0282] *B1) 전구체 마이크로RNA 서열에서 CWT-001 패신저 가닥에 대한 잠재적 혼성화-의존적 책임의 인 실리코 평가*
- [0283] qPCR 분석은 CWT-001로 처리한 후 1차 인간 힘줄세포에서 miRNA의 발현 수준에 대해 수행되었다. 잠재적 교차-혼성화 표적은 hsa-miR29a, hsa-mir-5186, hsa-mir-548at, hsa-mir-1283-2, hsa-mir-454, hsa-mir-4782, hsa-mir-515-1, hsa-mir-515-2, hsa-mir-5691로 확인되었다. 최대 상보적 마이크로RNA 서열은 hsa-mir-548at, hsa-mir-1283-2 및 hsa-mir-515 패밀리아이다. 이러한 서열은 모두 완전히 방해된 동일성의 제한된 영역 (11 bp 이하)을 공유하고, 생체내 생리학적 농도에서 CWT-001에 의한 입체적 억제에 의해 강력하게 조정되기에 충분한 친화력을 가질 가능성이 없다.
- [0284] *B2) NCBI의 참조 서열 (RefSeq) RNA 서열에서 CWT-001 패신저 가닥에 대한 잠재적 혼성화-의존적 책임의 인 실리코 평가*
- [0285] qPCR 분석은 CWT-001로 처리한 후 1차 인간 힘줄세포에서 잠재적인 오프-표적 유전자의 발현 수준에 대해 수행되었다. 잠재적 교차-혼성화 표적은 PDCD10, ITGB6, LPGAT1, BPTF, CTTNBP2, EIF4A3, KIAA1210, SLC7A11-AS1, THSD4, TNFAIP3, ANKLE2, ARL4A, ATG14, BCL11A, CCDC83, CDH4, CLVS1, DKFZp434L192, ETV7, FBXO45, KCNJ1, LINC01973, MCF2L2, METTL5, NBN, POC1B, RAVR2, RPA2, ZNF441, ZNF667 및 OPCML로 확인되었다. 9개 유전자 (ANKLE2, BCL11A, BPTF, EIFA3, ITGB6, KCNJ1, NBN, PDCD10, POC1B, & TNFAIP3)에서의 돌연변이는 공지된 인간 질환과 관련이 있다.
- [0286] *C) 인간 힘줄세포에서의 연구*

- [0287] 임의의 잠재적인 예측된 상호작용이 발생했는지를 확인하기 위해, 24시간 동안 100 $\mu\text{g/ml}$ CWT-001로 처리된 인간 힘줄세포에서 qPCR에 의한 잠재적 오프-표적 mRNA의 발현 수준 측정을 수행하였다. 52개의 잠재적 오프-표적 유전자 중 12개만이 힘줄세포에서 발현되었고, 이들 중 인간 질환과 관련된 것으로 공지된 유전자 중 4개 (ANKLE2, SCP2, BPTF 및 EIFA3)만이 힘줄세포에서 발현되었다. 중요하게도, CWT-001로의 처리는 CWT-001의 잠재적 오프-표적인 것으로 강조된 유전자 중 어떠한 것의 발현도 변경하지 않았다.
- [0288] 데이터는 CWT-001로의 처리가 1차 인간 힘줄세포에서 오프-표적 효과를 일으키지 않는다는 것을 나타낸다.
- [0289] 실시예 3b - 1차 인간 대식세포에서 CWT-001의 면역원성 평가
- [0290] 이중-가닥 RNA (ds-RNA)는 면역 반응을 유발할 수 있다 (참조문헌 14). CWT-001이 면역 반응을 유도할 수 있는지의 여부를 시험하기 위해 선천적 면역계의 주요 성분으로서 ds-RNA 분자에 민감한 배양된 1차 인간 대식세포를 0.35 $\mu\text{g/ml}$ CWT-001로 24시간 동안 처리하고 ($n=4$), 염증유발 시토카인 종양 괴사 인자-알파 ($\text{TNF } \alpha$)의 수준을 ELISA로 측정하였다. 결과는 CWT-001 처리된 세포에서 $\text{TNF } \alpha$ 의 유도가 없음을 나타내었다 (도 5).
- [0291] 일단의 인터페론-유도성 유전자 (OAS2, $\text{INF } \alpha$, IFITM1, MX1, IRF9 및 OAS1)에 대한 qPCR 분석을 추가로 수행하였다. 샘플을 18S rRNA 수준으로 정규화하고, 비처리된 대조군과 비교하여 배수 변화로 표현하였다 ($n=3$). qPCR 분석은 CWT-001-처리된 대식세포에서 발현에 변화가 없음을 나타내었다 (도 6).
- [0292] 종합하면, 이러한 데이터는 CWT-001이 인간 대식세포에서 면역원성을 유도하지 않는다는 것을 입증한다.
- [0293] 실시예 3c - 마우스에서 CWT-001의 면역원성 평가
- [0294] CWT-001의 면역원성을 마우스에서 슬개골 힘줄에 CWT-001 주사 후 시험하였다. 동물에게 50 μl 의 0.35 $\mu\text{g/ml}$ 의 CWT-001 또는 PBS를 힘줄내 주사하였다 ($n=3$). 공지된 인터페론 반응적 유전자 MX1, OAS2, IFITM1 및 IRF9의 발현을 제1일, 제3일 및 제7일에 qPCR로 측정하고 PBS 대조군과 비교하였다. 생성된 데이터는 인터페론 반응적 유전자 발현이 증가하지 않았음을 나타내었고, 이는 CWT-001이 비-면역원성임을 시사한다 (도 7). 사실, 데이터는 CWT-001이 PBS 대조군과 비교하여 CWT-001로 처리된 마우스에서 더 낮은 인터페론-반응적 유전자 발현 수준에 의해 반영된 바와 같이 항염증 활성을 갖는다는 것을 시사한다.
- [0295] 이러한 데이터는 CWT-001이 마우스 힘줄 손상 모델에서 면역원성을 유도하지 않으며 항염증 활성을 갖는 것으로 보인다는 것을 나타낸다.
- [0296] **실시예 4: 약동학/독성동태학 (도 8-12)**
- [0297] 실시예 4a - 전임상 모델에서 CWT-001의 검출
- [0298] 래트 및 개 RNA에서 CWT-001 검출을 위한 2-단계의 역전사 정량적 PCR (RT-QPCR) 방법이 검증되었다. 검정은 매트릭스 RNA가 없는 경우 10^8 - 10^3 카피에서 선형이었다. 3명의 분석가에 의해 매트릭스당 7회에 걸쳐 실시한 검정내 및 검정간 정확도 및 정밀성 평가 시험은 확립된 범위에서 방법의 견고성을 입증하였다.
- [0299] 각각의 매트릭스에 대한 RNA QC 풀 샘플은 내인성 기준선 수준을 평가하기 위한 내인성 대조군으로 준비되었다. 샘플 분석 동안, RNA QC 풀 샘플은 QC 샘플의 데이터 정규화 및 예상된 Ct 값 및 결정된 카피 수를 결정하기 위해 사용된다. RNA QC 풀 샘플은 하기 값 이내로 설정된다:
- [0300] • Ct 24.771 - 26.697 및/또는 $6.67\text{E}+03$ - $3.31\text{E}+04$ 카피/반응, 래트 혈장
- [0301] • Ct 25.195 - 27.496 및/또는 $1.38\text{E}+03$ - $2.79\text{E}+04$ 카피/반응, 개 혈장
- [0302] • Ct 23.284 - 24.352 및/또는 $5.45\text{E}+04$ - $8.81\text{E}+04$ 카피/반응, 래트 힘줄에 대해
- [0303] • Ct 23.135 - 24.339 및/또는 $5.49\text{E}+04$ - $9.88\text{E}+04$ 카피/반응, 개 힘줄에 대해
- [0304] -80°C 를 유지하도록 설정된 냉동고에 보관된 래트 및 개에 대한 스파이킹된 힘줄 샘플에서 CWT-001의 안정성을 평가하였으며, 최대 1개월 동안 안정성을 나타내었다.
- [0305] 이러한 연구에 이용된 방법은 래트 및 개 RNA에서 CWT-001을 추출하고 측정하는데 적합한 것으로 간주되었다.
- [0306] 실시예 4b - 인간 혈청에서 CWT-001 검출 가능성 및 안정성
- [0307] CWT-001이 전신 순환계에 들어간 경우, 인간 혈청에서 내인성 miR29a의 배경 수준에 대비하여 CWT-001의 검출 가능성 기간이 결정되었다. CWT-001은 성인 인간에서 정맥내 (IV) 전달 직후에 예측되는 것과 동일한 농도로

희석되었다 (1 ml의 혈청에 1:5,000, 5 리터의 평균 성인 혈액 부피 기준). 0, 2, 20 및 100 $\mu\text{g/ml}$ CWT-001의 샘플을 신선한 인간 혈청과 함께 37°C에서 0, 6, 12 및 24시간 동안 인큐베이션하였다. MiR29a 수준은 Cel39 스파이크 인 대조군으로 정규화된 qPCR에 의해 측정되었고, 비처리된 샘플과 비교하여 상대적 발현으로 나타내었다 (n=3) (도 8). CWT-001에 기인한 miR29a의 증가는 CWT-001을 첨가한 후 1분 미만에 정제된 샘플에서만 관찰되었으며, miR29a 수준은 6시간 후에 거의 비처리된 수준으로 돌아갔다. 이 데이터는 CWT-001이 시험 관내에서 인간 혈청에서 검출할 수 없는 수준으로 빠르게 분해됨을 나타낸다.

[0308] 인간 혈청 샘플에서 CWT-001의 동역학을 추가로 정의하기 위해 더 이른 시점 (0, 15, 30 및 45분; 1, 6, 12 및 24시간)에 초점을 맞춘 추가 연구가 수행되었다. MiR29a 수준은 qPCR에 의해 측정되었으며, 값은 Cel39 스파이크 인 대조군으로 정규화되었으며, 비처리된 샘플과 비교하여 상대적 배수 변화로 나타내었다 (n=3) (도 9). 데이터는 CWT-001 수준이 혈청에 첨가된 직후에 측정되었을 때 배경의 평균 수준의 275배로 증가하였고, 15분 후에 배경의 61배로 떨어졌음을 나타내었다. 1시간쯤에는 수준이 배경의 11배로 떨어졌고, 12시간에는 배경 수준으로 떨어졌다.

[0309] 실시예 4c - IV 투여 후 CWT-001의 약동학 및 분포

[0310] 정맥내 주사 후 CWT-001의 생체내 분포를 조사하기 위해 마우스에 50 μl 의 50 mg/ml CWT-001을 주사하고, 0, 1, 4 및 7일 후 혈청, 심장, 간, 신장, 비장 및 근육을 수집하였다. CWT-001 수준은 miR29a qPCR 검정을 이용하여 측정되었고, 값은 GAPDH로 정규화되었으며, 비처리된 대조군과 비교하여 상대적 배수-변화로 나타내었다. 혈청 샘플은 Cel39 스파이크 인 대조군으로 정규화되었고, 비처리된 대조군과 비교한 배수-변화로 나타내었다 (n=4) (도 10). 이 데이터는 식염수 대조군과 비교하여 혈청 또는 기관에서 miR29a 수준이 거의 또는 전혀 증가하지 않음을 나타내었다. 폐에서 miR29a 수준의 작은 증가가 제1일에 관찰되었으며, 이는 제4일에 기준선으로 돌아왔다.

[0311] 이러한 데이터는 CWT-001이 전형적인 임상 용량 수준의 25배 (즉, 1 ml의 2 mg/ml CWT-001의 인간 임상 용량에 대해 마우스 등량인 50 μl 의 2 mg/ml의 25배)로 투여된 경우에도 정맥 투여 후 조직에서 무시할 수 있는 분포를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0312] 실시예 4d - 힘줄내 주사 후 순환계에서 CWT-001의 전신 노출

[0313] CWT-001의 전신 노출 측정은 25 μl 의 2 mg/ml CWT-001 또는 PBS 대조군을 마우스의 슬개골 힘줄에 주사한 마우스에서 수행되었으며 (그룹당 n=4), 혈액은 0, 15 및 30분 및 1, 2, 4, 6, 24 및 72시간에 수집되었다. CWT-001 수준은 miR29a qPCR 검정을 이용하여 측정되었으며, 값은 Cel39 스파이크 인 대조군으로 정규화되었고, PBS 대조군과 비교된 배수-변화로 표현되었다 (n=4).

[0314] 힘줄내 투여 후, 주사 후 2시간 및 4시간에 혈중 miR29a 수준의 증가가 관찰되었다. miR29a 수준은 6시간에 배경 수준으로 돌아왔다 (도 11). 이 데이터는 CWT-001이 힘줄내 주사 후 순환계에 들어가지만 아마도 혈청 뉴클레아제에 의한 분해 및 신장을 통한 배설에 의해 빠르게 제거됨을 시사한다. 전신적으로 관찰된 내인성 miR29a의 절대 수준은 (예컨대, 세포에 존재하는 농도와 비교할 때) 매우 낮다. 따라서, CWT-001 주사 후 2시간 및 4시간에서 관찰된 5-14배의 전신 miR29 수준의 상대적 증가 (도 11)는 여전히 매우 낮은 절대 전신 miR29a 수준으로 해석된다. 또한, 상기 언급된 바와 같이, 대부분의 혈청 CWT-001은 빠르게 제거된다. 1% 미만의 CWT-001이 궁극적으로 혈청을 통해 세포에 의해 취해진다. 전반적으로, 이는 투여된 CWT-001의 매우 낮은 절대 수준만이 전신 노출을 통해 비-표적 세포에 들어갈 것임을 의미한다. 따라서, CWT-001의 관찰된 전신적 증가는 CWT-001이 투여된 조직 (예컨대, 힘줄) 내의 표적 세포를 제외한 세포에서 임의의 약력학적 작용을 발휘할 가능성이 없다.

[0315] 이 데이터는 CWT-001이 힘줄내 주사 후 제한된 전신 분포를 갖는다는 것을 입증한다.

[0316] 실시예 4e - 힘줄내 투여 후 CWT-001의 분포

[0317] 힘줄내 주사 후 CWT-001 조직 분포를 이해하기 위해, 마우스의 슬개골 힘줄에 50 μl 의 4, 20, 40 및 50 mg/ml의 CWT-001 또는 PBS 대조군을 주사하였다. 기관 및 말초 혈액을 7일 후에 수집하였다. CWT-001 수준은 miR29a qPCR 검정을 이용하여 측정되었고, 값은 GAPDH로 정규화되었으며, 비처리된 대조군과 비교하여 상대적 배수 변화로 나타내었다. 혈청 샘플은 Cel39 스파이크 인 대조군으로 정규화되었고, 위약과 비교된 배수-변화로 나타내었다 (n=4). 생성된 데이터 (도 12)는 위약과 비교하여 어떠한 농도에서 어떠한 기관에서도 miR29a 수준의 유의미한 증가가 없음을 나타내었다. 비장에서 임의의 전형적인 동등한 인간 임상 용량보다 높은 2개의

가장 높은 용량에서 유의성에 대한 경향이 나타났다.

[0318] 이러한 데이터는 가장 높은 전형적인 동등한 인간 임상 용량의 최대 25배인 가장 높은 용량에서도 CWT-001이 조직에서 무시할 수 있는 분포를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0319] 실시예 4f - 단일 용량 독성 연구에서 힘줄내 투여 후 래트에서의 독성동태학

[0320] 독성동태학 평가를 14일의 회복 기간을 갖는 래트에서 힘줄내 주사에 의한 CWT-001의 단일 용량 독성 연구의 설계에 통합하였다 (실시예 5c).

[0321] 래트는 30 μ L 주사의 식염수 대조군, 10 mg/ml 또는 50 mg/ml (즉, 0, 0.3 또는 1.5 mg 총 용량)의 CWT-001로 처리되었다. 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 8 및 24시간에 그룹당 성별당 3마리의 동물로부터 경정맥으로부터 혈액 샘플을 수집하고, 혈장을 제조하였다. 혈장 샘플을 검증된 분석 절차 (RT-QPCR)를 이용하여 CWT-001의 농도에 대해 분석하였다.

[0322] 이 연구에서 힘줄내 투여 경로와 일치하는 비-구획 접근법을 이용하여 독성동태학 파라미터를 추정하였다. 독성동태학 파라미터의 요약은 하기 표 2에 제공된다.

[0323] <표 2>

표 2 - 수컷 및 암컷 래트 혈장에서 CWT-001의 독성동태학 파라미터

성 구분	용량 (mg)	T _{max} (h)	C _{max} (카피/mL)	(SE)	C _{max} /D (카피/mL)/ (mg)	AUC (0-t) (카피.h/mL)	(SE)	AUC (0-t)/D (카피.h/mL)/ (mg)
수컷	0.3	0.5	9.93E+09 (2.88E+09)		3.31E+10	1.56E+10 (5.58E+09)		5.20E+10
	1.5	0.5	3.43E+10 (9.73E+09)		2.29E+10	5.37E+10 (8.29E+09)		3.58E+10
암컷	0.3	0.5	1.01E+09 (1.01E+09)		3.36E+09	1.80E+09 (7.73E+08)		6.00E+09
	1.5	0.5	1.32E+10 (3.70E+09)		8.80E+09	1.70E+10 (1.10E+09)		1.13E+10

n = 수컷 및 암컷에 대해 9, 시점당 성별당 3마리의 동물을 샘플링함: 하나의 복합 TK 프로파일/성별/용량.

[0324]

[0325] 혈장 CWT-001 농도 대 시간 프로파일은 빠른 흡수 양상을 나타내었다 (T_{max}는 모든 프로파일에서 0.5시간이었음). 혈장 CWT-001 농도는 투여 후 최대 4시간까지 다단계 방식으로 감소하였으며, 그 후 암컷의 경우 농도가 최대 8시간까지 약간 증가하거나 (마지막 정량 가능한 농도, 0.3 mg) 샘플링 기간 (24시간)이 끝날 때까지 비교적 정상 상태를 유지하였다 (1.5 mg). 수컷의 경우, 두 용량의 농도는 4시간 후 샘플링 기간 (24시간)이 끝날 때까지 정상 상태로 유지되었다. 0.3 mg으로부터 1.5 mg으로의 용량 증가에 따라, CWT-001에 대한 전신 노출은 암컷의 경우 용량-비례 방식보다 일반적으로 더 적게, 수컷의 경우 용량-비례 방식보다 더 크게 증가하였다. CWT-001에 대한 전신 노출은 0.3 mg 및 1.5 mg 용량 수준 모두에서 암컷보다 수컷에서 더 컸다.

[0326] 실시예 4g - 단일 용량 독성 연구에서 힘줄내 투여 후 개에서의 독성동태학

[0327] 독성동태학 평가는 14일의 회복 기간을 갖는 개에서 힘줄내 주사에 의한 CWT-001의 단일 용량 독성 연구의 설계에 통합되었다 (실시예 5d).

[0328] 개는 250 μ L 주사의 식염수 대조군, 10 mg/ml 또는 50 mg/ml의 CWT-001 (즉, 0, 2.5 또는 12.5 mg 총 용량)로 처리되었다. 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 6 및 48시간에 그룹당 성별당 3마리의 동물로부터의 경정맥으로부터 혈액 샘플을 수집하고, 혈장을 제조하였다. 검증된 분석 절차 (RT-QPCR)를 이용하여 혈장 샘플을 CWT-001의 농도에 대해 분석하였다.

[0329] 이 연구에서 힘줄내 투여 경로와 일치하는 비-구획 접근법을 이용하여 독성동태학 파라미터를 추정하였다. 독

성동태학 파라미터의 요약은 하기 표에 제공된다.

<표 3>

표 3 - 수컷 및 암컷 개 혈장에서 CWT-001의 개별 및 평균 독성동태학 파라미터

성 구분	용량 수준 (mg)	동물	T _{max} (h)	C _{max} (카피/mL)	C _{max} /D (카피/mL)/ (mg)	AUC (0-t) (카피.h/mL)	AUC (0-t)/D (카피.h/mL)/ (mg)
수컷	2.5	n	3	3	3	3	3
		Mean*	1	2.49E+09	9.97E+08	4.63E+09	1.85E+09
		SD	-	1.09E+09	4.37E+08	2.89E+09	1.16E+09
	12.5	n	5	5	5	4	4
		Mean*	0.5	5.23E+09	4.19E+08	7.87E+09	6.30E+08
		SD	-	2.16E+09	1.73E+08	5.33E+09	4.26E+08
암컷	2.5	n	3	3	3	1	1
		Mean*	0.5	1.26E+09	5.06E+08	1.44E+09	5.78E+08
		SD	-	2.64E+08	1.05E+08	-	-
	12.5	n	5	5	5	5	5
		Mean*	0.5	7.33E+09	5.86E+08	8.94E+09	7.16E+08
		SD	-	6.57E+09	5.26E+08	3.55E+09	2.84E+08

"-" 값이 적용되지 않음.

* T_{max}에 대해 중앙값이 보고됨.

^a AUC 최대 6시간; 계산된 값은 해석을 돕기 위해 기술 통계 계산에 사용됨.

ND = 결정되지 않음, 3개 미만의 연속적인 농도가 정량화됨.

혈장 CWT-001 농도 대 시간 프로파일은 빠른 흡수 양상을 나타내었다 (0.5 또는 1시간의 중앙값 T_{max}). 먼저 투여 후 1시간 또는 2시간까지 빠른 방식으로 및 다음으로 최종 정량화 가능한 농도까지 보다 느린 속도로의 2-단계 농도 감소가 뒤따랐다 (단, 투여 후 4 내지 6시간에 농도가 약간 증가한 12.5 mg이 투여된 암컷은 제외). 2.5 mg으로부터 12.5 mg으로의 용량 증가에 따라, CWT-001에 대한 전신 노출은 암컷의 경우 일반적으로 용량-비례 방식으로 및 수컷의 경우 용량-비례 방식보다 더 적게 증가하였다. CWT-001에 대한 전신 노출은 2.5 mg의 용량 수준에서는 암컷보다 수컷에서 더 컸지만 12.5 mg에서는 성별 간에 비슷하였다.

실시예 5: 독성학

실시예 5a - 래트에서 단일 힘줄내 주사에 의한 CWT-001의 내약성 연구

이 연구의 목적은 최대 가능 용량 (MFD)을 설정하고 확인하기 위해 래트에게 CWT-001을 힘줄내 주사로 투여했을 때 이의 잠재적 독성을 결정하는 것이었다. 연구 설계는 하기 표 4에 제시되어 있다.

<표 4>

표 4 - 래트에서 단일 힘줄내 주사 내약성 연구의 실험 설계

그룹 번호	처리	용량 수준(mg)	용량 부피 (μ L)	용량 농도 (mg/mL)	동물 번호	
					수컷	암컷
1	CWT-001	0.3	30	10	-	1501-1503
2	CWT-001	0.75	30	25	-	2501-2503
3	CWT-001	1.5	30	50	-	3501-3503
4	CWT-001	1.5	30	50	4001-4003	-

- = 해당 없음

PBS (138 mM 염화나트륨; 8 mM 인산나트륨) pH 6.8-7.6을 사용하여 시험 항목을 용해시킴.

각각의 동물은 0.5 mL 인슐린 주사기를 사용하여 오른쪽 아킬레스 힘줄로 CWT-001의 단일 힘줄내 투여 (30 μ L)를 받았다. 동물을 이소플루란을 사용하여 마취시키고, CWT-001을 배치할 수 있도록 뒷다리에 작은 외과적 절개를 사용하여 힘줄을 노출시켰다. 용량을 투여한 후 동물은 봉합되었다.

가장 높은 용량 수준 (1.5 mg)은 시험 항목의 용해도 및 힘줄에 합리적으로 주사될 수 있는 부피에 의해 제한되는 이 경로로 투여될 수 있는 최대 가능 용량을 나타내었다. 이 연구에서 하기 파라미터 및 종점을 평가하였다: 임상 관찰, 체중 및 육안적 부검 결과. CWT-001과 관련이 있는 것으로 간주되는 임상 징후, 체중 변화 또는 육안적 부검 결과는 없었다.

결론적으로, 단일 힘줄내 투여에 의한 CWT-001의 투여는 한 위스타 (Han Wistar) 래트에서 임상 관찰, 체중 변화 또는 관찰된 육안적 부검 결과 없이 최대 1.5 mg까지 내약성이 우수하였다.

실시예 5b - 개에서 단일 힘줄내 주사에 의한 CWT-001의 내약성 연구

이 연구의 목적은 개에게 CWT-001을 단일 힘줄내 주사로 투여했을 때 이의 잠재적 독성을 결정하고 후속 14일 독성 연구를 위한 용량 수준 선택을 지원하는 데이터를 제공하는 것이었다. 연구 설계는 하기 표 5에 제시되어 있다.

<표 5>

표 5 - 개에서 단일 힘줄내 주사 내약성 연구의 실험 설계

그룹 번호	시험 항목	용량 수준(mg)	용량 부피 (μ L)	용량 농도 (mg/mL)	동물 번호	
					수컷	암컷
1	CWT-001	12.5	250	50	1001	1501

비허클 = PBS (138 mM 염화나트륨; 8 mM 인산나트륨)

각각의 동물은 주사기를 사용하여 오른쪽 아킬레스 힘줄로 CWT-001의 단일 힘줄내 투여 (250 μ L)를 받았다. 동물을 이소플루란을 사용하여 마취시키고, CWT-001을 배치할 수 있도록 뒷다리에 대한 작은 외과적 절개를 사용하여 힘줄을 노출시켰다. 용량을 투여한 후 동물은 봉합되었다.

사용된 용량 수준 (12.5 mg)은 시험 항목의 용해도 및 힘줄에 합리적으로 주사될 수 있는 부피에 의해 제한되는 이 경로로 투여될 수 있는 최대 가능 용량을 나타내었다. 이 연구에서 하기 파라미터 및 종점을 평가하였다: 임상 관찰, 체중, 음식 소비, 임상 병리 파라미터 (혈액학, 응고 및 임상 화학), 육안적 부검 결과 및 기관 중량.

CWT-001 임상 관찰이 없었고 체중, 음식 소비, 혈액학, 응고 또는 임상 화학 파라미터의 변화도 없었다. 또한, CWT-001과 관련이 있는 것으로 간주되는 육안적 부검 결과 또는 기관 중량 변화도 없었다. 결론적으로, 비글견에서 단일 힘줄내 투여에 의한 CWT-001 투여는 나타난 임상 관찰, 체중, 음식 소비 또는 임상 병리 파라미터의 변화 및 육안적 병리 또는 기관 중량 결과 없이 12.5 mg에서 내약성이 우수하였다.

[0348] 실시예 5c - 14일의 회복 기간을 갖는 래트에서 힘줄내 주사에 의한 CWT-001의 단일 용량 독성 연구

[0349] 이 연구의 목적은 래트에게 CWT-001를 단일 힘줄내 주사를 통해 투여했을 때 이의 잠재적인 독성을 결정하고 주사 후 14일의 회복 기간에 걸쳐 임의의 결과의 잠재적 가역성을 평가하는 것이었다. 또한, CWT-001의 독성동태학적 특징을 결정하였다. 연구 설계는 하기 표 6에 제시되어 있다.

[0350] <표 6>

표 6 - 14일의 회복 기간을 갖는 래트에서 힘줄내 주사에 의한 단일 용량 독성 연구의 실험 설계

그룹 번호	처리	용량 수준 (mg)	용량 부피 (μL)	용량 농도 (mg/mL)	동물의 수			
					주요 연구		회복/새틀라이트	
					수컷	암컷	수컷	암컷
1	Control	0	30	0	10	10	5	5
2	CWT-001	0.3	30	10	10	10	4	-
4	CWT-001	1.5	30	50	10	10	5	5

대조군 = PBS (100 mM 염화나트륨, 20 mM 인산나트륨) pH 6.8-7.6

- = 해당 없음.

[0351]

[0352] 하기 파라미터 및 종점이 이 연구에서 평가되었다: 임상 관찰, 체중, 음식 소비, 안과학, 행동 관찰 (어원 점수), 호흡 측정, 임상 병리 파라미터 (혈액학, 응고, 임상 화학 및 소변검사), 바이오분석 및 독성동태학 파라미터, 육안적 부검 결과, 기관 중량 및 조직병리학적 검사.

[0353] 가장 높은 용량 수준 (1.5 mg)은 시험 항목의 용해도 및 래트의 힘줄에 합리적으로 주사될 수 있는 부피에 의해 제한되는 이 경로로 투여될 수 있는 최대 가능 용량을 나타내었다 (실시예 5a 참조). 모든 제형 분석 결과는 이론 농도의 $\pm 10\%$ (개별 값은 $\pm 15\%$ 이내 또는 이와 동일)의 허용 기준 이내 또는 이와 동일한 것으로 밝혀졌다.

[0354] 이 연구 과정 전반에 걸쳐 예정되지 않은 사망은 없었다. CWT-001과 관련된 것으로 간주되는 임상 징후, 체중 또는 음식 소비의 변화, 검안경 검사 결과, 행동 관찰, 호흡 파라미터의 변화, 기관 중량 변화 또는 육안적 또는 조직병리학적 결과는 없었다. 0.3 또는 1.5 mg에서 수컷 및 암컷 모두에서 제3일에 적혈구 매쓰 (적혈구, 헤마토크리트 및 헤모글로빈)가 약간이지만 용량 의존적으로 감소하였고 망상적혈구가 증가하였다. 모든 변화는 제15일에 회복을 나타내었다.

[0355] 결론적으로, 단일 힘줄내 투여에 의한 CWT-001의 투여는 한 위스타 래트에서 최대 1.5 mg까지 내약성이 우수하였고, 제3일에 일시적으로 약간 더 낮은 적혈구 매쓰 및 망상적혈구 증가와 관련이 있었고, 이는 제15일에 회복을 나타내었다. CWT-001과 관련된 생명 또는 임의의 조직 병리학적 결과에 다른 것은 없었다.

[0356] 최대 가능 용량으로 투여된 이 연구의 결과에 기초하여, 1.5 mg CWT-001은 래트에서 관찰된 역효과가 없는 수준 (No Observed Adverse Effect Level: NOAEL)으로 간주되었다.

[0357] 실시예 5d - 14일의 회복 기간을 갖는 개에서 힘줄내 주사에 의한 CWT-001의 단일 용량 독성 연구

[0358] 이 연구의 목적은 개에게 CWT-001을 단일 힘줄내 주사로 투여했을 때 이의 잠재적인 독성을 결정하고 임의의 결과의 잠재적인 가역성을 평가하는 것이었다. 또한, CWT-001의 독성동태학적 특징을 결정하였다.

[0359] 각각의 동물은 단일 용량의 CWT-001을 받았고, 주요 연구 동물은 제3일에 안락사되었고 회복 동물은 15일에 안락사되었다. 연구 설계는 하기 표 7에 제시되어 있다.

<표 7>

표 7-14일의 회복 기간과 함께 개에서 힘줄내 주사에 의한 단일 용량 독성 연구의 실험 설계

그룹 번호	처리	용량 수준(mg)	용량 부피 (μL)	용량 농도 (mg/mL)	조정된 용량 농도 (mg/mL)	동물의 수			
						주요 연구		회복	
						M	F	M	F
1	Control	0	250	0	0	3	3	5	5
2	CWT-001	2.5	250	10	14.2	3	3	-	-
3	CWT-001	12.5	250	50	71	3	3	5	5

대조군 항목 = PBS (138 mM 염화나트륨; 8 mM 인산나트륨) pH 6.8-7.6

M = 수컷, F = 암컷, - = 해당 없음

이 연구에서 하기 파라미터 및 종점을 평가하였다: 임상 관찰, 체중, 음식 소비, 안과학, 심혈관 데이터, 임상 병리 파라미터 (혈액학, 응고, 임상 화학 및 소변검사), 바이오분석 (혈장 및 힘줄) 및 독성동태학 파라미터, 육안적 부검 결과, 기관 중량, 및 조직병리학적 검사.

가장 높은 용량 수준 (12.5 mg)은 시험 항목의 용해도 및 개의 힘줄에 합리적으로 주사될 수 있는 부피에 의해 제한되는 이 경로로 투여될 수 있는 최대 가능 용량을 나타내었다 (실시예 5b 참조). 모든 제형 분석 결과는 이론 농도의 $\pm 10\%$ (개별 값은 $\pm 15\%$ 이내 또는 이와 동일)의 허용 기준 이내 또는 이와 동일한 것으로 밝혀졌다.

이 연구 과정 전반에 걸쳐 예정되지 않은 사망은 없었다. CWT-001과 관련된 것으로 간주되는 임상 징후, 체중 또는 음식 소비의 변화, 검안경 검사 결과, 심전도 결과, 임상 병리 결과 (혈액학, 응고, 임상 화학 및 소변검사), 기관 중량 변화 또는 육안적 또는 조직병리학적 결과는 없었다.

결론적으로, 단일 힘줄내 투여에 의한 CWT-001 투여는 비글견에서 최대 12.5 mg까지 내약성이 우수하였고, 투여 절차와 관련된 결과와만 관련이 있었다. CWT-001과 관련된 생명 또는 조직병리학적 결과는 없었다. 최대 가능 용량으로 투여된 이 연구의 결과에 기초하여, 12.5 mg CWT-001은 개에서 관찰된 역효과가 없는 수준 (NOAEL)으로 간주되었다.

실시예 6: 안전성 약리학

안전성 약리학 종점을 중추 신경계, 호흡 및 심혈관 효과를 평가하기 위해 래트 및 개의 단일 용량 독성 연구 (각각 실시예 5c 및 5d)의 설계에 통합하였다.

실시예 6a - 래트에서 중추신경계 (변형된 어원 관찰)

각각의 그룹으로부터의 처음 6마리의 수컷 주요 연구 동물을 투여 후 2, 24 및 48시간에 관찰하였다. 하기 파라미터가 관찰에 포함되었다:

- 발성, 상동증, 공격성, 비정상적 보행, 스트라우브 테일 (straub tail), 떨림, 연축, 경련, 자세, 진정, 강경증, 눈꺼풀꺼짐증, 안구돌출증, 침분비, 눈물분비, 털세움, 비정상적 호흡, 배변, 배뇨 및 사망의 발생.

- 자발적인 활동, 접촉 반응, 신체 긴장 및 동공 크기의 증가 또는 감소. 스니핑, 그루밍, 긁기 및 뒷발로 서기의 증가.

- 감소된 이개 반사, 비정상적 견인 반응 및 비정상적 그립 강도. 관찰된 모든 추가 증상도 기록되었다.

- 증상을 나타내는 동물의 빈도 및 증상의 중증도를 기록하였다.

- 동공 크기: 크기를 밀리미터로 추정하기 위해 안내 차트를 사용하여 측정됨 (투여 전 동공 크기 데이터는 투여 당일에 기록됨).

- 체온: 항문 괄약근을 지나 대략 2 cm에 프로브를 삽입하여 측정됨. 투여 전 체온도 기록되었다. 측정 변동성을 줄이기 위해, 투여 전 측정값을 기록하기 전에 온도계를 삽입함으로써 온도 습관화 시험을 수행하였으며, 이 시험 동안 체온 데이터는 수집되지 않았다.

- [0376] 변형된 어윈 관찰 동안 CWT-001의 투여와 관련된 것으로 간주되는 주목된 결과는 없었다. 일부 시점에서 일부 동물에서 그림 강도 감소가 가끔 관찰되었지만 이러한 결과는 대조군에서 및 단일 시점에서도 관찰되었으므로 CWT-001 투여와 관련이 없는 것으로 간주된다. CWT-001 투여와 관련된 동공 크기 또는 체온의 변화는 없었다.
- [0377] 실시예 6b - 래트에서 호흡 측정
- [0378] 시험 당일, 동물을 홈 케이지로부터 꺼내 대략 45분 동안 전신 체적변동기록계 챔버에 두었으며, 이 기간의 마지막 15분은 제어 기간으로 분류되었다. 이어서, 대조군 또는 시험 항목을 투여하기 위해 동물을 챔버로부터 꺼내었다. 투여 후 2-4, 24 및 51시간에 측정을 수행하고, 동물을 챔버에 두어 임의의 측정 전 적어도 30분 동안 적응시켰다. 일회 호흡량에 대한 챔버 온도 및 습도의 영향은 체적변동기록계 챔버 내에서 보상되었다. 환기 파라미터는 호흡 신호로부터 결정되었다. 샘플링 주파수는 500 Hz로 고정되었다.
- [0379] CWT-001 투여와 관련되는 것으로 간주되는 호흡 파라미터의 변화는 없었다. 호흡 파라미터에서 부수적인 통계적으로 유의미한 변화는 연구 동안 산발적으로 나타났지만, 이는 특정 시점에서 대조군에서의 변동성에 기인한 것으로 간주되었거나 최소 및/또는 일시적인 변화였으므로 CWT-001 투여와 관련이 없는 것으로 간주되었다.
- [0380] 실시예 6c - 개에서 심혈관 평가
- [0381] 심혈관 평가는 처리전 (제1일 전) 적어도 26시간 동안, 투여 기간의 제2일에 적어도 20시간 동안 (투여 후 24시간 내지 44시간 사이에 데이터 획득) 및 제14일의 회복 기간에 측정되었다. 각각의 동물의 ECG 및 혈압은 PAC10-TOX-LA 송신기 (데이터 사이언시스 인터내셔널 (Data Sciences International) (DSITM), 미국 미네소타주 세인트 폴즈)와 함께 재킷티드 엑스터널 텔레메트리 (Jacketed External Telemetry) (JETTM) 시스템에 의해 기록되었다. 제1 기록 세션 전에 모든 동물을 JET 재킷에 적응시키고 개별적으로 관찰하여 절차를 받아들일 수 있는지를 확실히 하였다. 데이터 획득일에 동물을 홈 펜으로부터 꺼내고, ECG 리드를 배치하고 재킷 (및 필요한 경우 칼라)을 장착하기 위해 절차실로 이동하였다. 전극 배치에 필요한 부위를 면도하고 적절하게 준비하였다. 동맥 혈압, 심박수 및 리드 II ECG 변수를 1분 로깅 속도를 사용하여 지속적으로 획득하였다. 전처리 및 회복을 위해 ECG 및 BP 기록을 적어도 26시간 동안 수행하였다. 제2일에, ECG 및 BP 기록을 적어도 20시간 동안 수행하였다 (투여 후 24 내지 44시간 사이에 데이터 획득), (T = 0은 시험 항목의 투여 종료와 같음). 투여 절차가 수행되는 경우를 제외하고는 동물을 구속하지 않았다. 연구의 투여 단계를 시작하기 전에, 모든 동물로부터 적어도 26시간 지속되는 전처리 원격 측정 데이터 획득을 기록하였다. 이러한 전처리 신호의 섹션은 임의의 ECG 형태 이상, 신호의 품질 및 심박수의 정상성, 동맥 혈압 및 ECG 값 (QTca 계산 [심박수에 대해 보정된 QT] 포함)에 대해 필요하다고 여겨지는 경우 검토되었다.
- [0382] 하기 파라미터가 보고되었다:
- [0383] · 수축기 (SBP), 확장기 (DBP) 및 평균 동맥 혈압 (MAP) 및 혈압 파형으로부터 유도된 심박수 (HR).
- [0384] · ECG 파라미터 (개별 동물에 대해 보정된 RR, PR, QRS, QT, QTca 간격 QA 간격 [혈압 및 ECG 파형으로부터 유도됨])을 분석하였다. 관찰된 임의의 리드 II ECG 이상 또는 부정맥을 인쇄하고 검토하였다.
- [0385] CWT-001 투여와 관련되는 것으로 간주되는 연구 과정 전반에 걸쳐 심혈관 파라미터 또는 파형 형태의 변화는 없었다. 개별 동물에서 가끔 또는 일시적인 관찰이 있었으나 관련된 시험 항목인 것으로 간주되지 않았으며 이는 대조군 동물에서도 관찰되었거나 정상적인 동물간 변동성에 기인한 것으로 간주되었기 때문이다.
- [0386] 실시예 6d - 생식 및 발달 독성
- [0387] 래트 및 개에서 단일 용량 독성 연구는 고환 및 난소를 포함한 생식 기관에 대해 어떠한 처리 관련된 기관 중량 또는 조직병리학적 변화도 나타내지 않았다.
- [0388] 실시예 6e - 국소적 내약성
- [0389] 국소적 내약성은 래트 및 개 모두에서 단일 용량 독성 연구로 평가되었으며 주사 부위에서 예상치 못한 영향을 나타내지 않았다.
- [0390] 실시예 7: 외측 상과염을 갖는 인간 대상체에 대한 투여 (도 13 및 14)
- [0391] 상기 기재된 실시예로부터의 결과는 본원에 제공된 miR-29 화합물이 힘줄병증의 마우스 모델을 포함하여 생체내에서 콜라겐 3 발현을 감소시키거나 억제하는데 안전하고 효과적이라는 것을 나타낸다. 추가로, 본 발명자들은 이전에 말 콜라게나제-유도된 힘줄병증 (SDFT) 모델이 인간 힘줄병증을 반영하고, 힘줄 손상 후 miR-29a 발현이

감소하고 수반되는 col3:col1 비율이 증가한다는 것을 증명하였다. miR-29 화합물 (100 nM, 1.5 ml의 총 부피 중 약 2 µg/ml로 해석됨, 즉 3 µg의 총 용량)의 단일 병변내 주사는 콜라겐 3 발현 및 병변 크기를 감소시키고 힘줄 구조를 개선하였다 (참조문헌 3 참조). 함께, 이러한 데이터는 본원에 제공된 miR-29 화합물을 포함한 miR-29 화합물을 사용하는 안전하고 효과적인 인간 요법에 대한 근거를 제공한다.

- [0392] 외측 상과염을 갖는 대상체에서 단일 상승 용량의 CWT-001 주사의 안전성, 내약성 및 약동학을 평가하는 1상의 무작위배치된 이중-맹검의 위약-대조된 연구를 수행하였다 (연구 설계에 대해서는 도 13 참조).
- [0393] 외측 상과염의 의료 치료에 대한 현재 제2선 (물리요법 후) 표준은 장기적인 이익이 여전히 의심스럽지만 힘줄 통증 부위에 코르티코스테로이드를 국소 주사하는 것이다. 따라서, CWT-001을 팔꿈치의 공통 신근 기원의 힘줄 손상 부위에 국소 주사하는 것은 현재 의료 표준을 유지하면서 개선된 안전성 및 효능을 나타낸다. 초음파 검사는 종종 힘줄의 상태를 평가할 뿐만 아니라 주사 요법을 안내하기 위해 선호하는 이미징 방식으로 사용되기 때문에, 힘줄 손상 부위에 대한 초음파 안내된 주사가 사용된다 (참조문헌 15).
- [0394] 이 연구의 1차 목적은 외측 상과염을 갖는 인간 대상체에서 단일 상승 용량의 CWT-001의 안전성 및 내약성을 결정하는 것이다.
- [0395] 연구의 2차 목적은 외측 상과염을 갖는 인간 대상체에서 CWT-001 투여의 단일 용량 약동학 (PK)을 결정하고 외측 상과염을 갖는 인간 대상체에서 CWT-001 투여의 효능을 평가하는 것이다.
- [0396] 연구의 1차 종점은 주사 후 제14일에 유해 사례 (AE)의 발생, 임상 실험실 이상, 활력 징후의 변화 (혈압, 온도, 호흡수 및 맥박수), 12-리드 심전도 (ECG) 파라미터, 신체 검사 및 피부 점수 평가로 측정되는 바와 같은 CWT-001 대 위약 간의 안전성 데이터 비교이다.
- [0397] 연구의 2차 종점은 하기와 같다:
- [0398] · 최대 혈장 농도 (C_{max}), C_{max} 까지의 시간 (t_{max}), 혈장 대 농도-시간 곡선 아래 면적 (AUC)으로 나타낸 바와 같은 데이터의 혈장 PK 농도.
- [0399] · 투여 전 제1일부터 제14일, 제28일 및 제90일까지 시각적 아날로그 척도 (VAS)를 사용하여 측정되는 바와 같은 팔꿈치 통증에 대한 단일 용량의 CWT-001의 효능.
- [0400] · 투여 전 제1일부터 제14일, 제28일 및 제90일까지 팔, 어깨, 손 장애 (DASH) 점수를 사용하여 측정된 장애 및 증상에 대한 단일 용량의 CWT-001의 효능.
- [0401] · 투여 전 제1일부터 제14일, 제28일 및 제90일까지 환자 평점 테니스 엘보우 평가 (PRTEE)로 측정되는 바와 같은 통증 및 장애에 대한 단일 용량의 CWT-001의 효능.
- [0402] · 투여 전 제1일부터 제28일 및 제90일까지 기준선 초음파 평가로부터의 변화로 측정되는 바와 같은 외측 팔꿈치 힘줄에 대한 단일 용량의 CWT-001의 효능.
- [0403] 용량 근거
- [0404] 상기 기재된 실험에 비추어 볼 때 µg 및 낮은 mg 범위의 miR-29 용량은 동물 중에서 효과적이고 내약성이 우수할 것으로 예상되며, 쉽고 안전하게 주사될 수 있는 부피 (예컨대, 약 1 ml)로 투여될 수 있다. 이러한 용량 수준은 또한, 예컨대 사용된 동물 모델에서 힘줄 치유를 개선하는데 있어 콜라겐을 표적으로 하는 작용 메커니즘을 확인한다. 래트 (최대 1.5 mg, 실시예 5a 참조) 및 개 (최대 12.5 mg, 실시예 5b 참조)에서 CWT-001을 사용하여 힘줄내 투여를 통한 단일 용량 연장 독성 연구를 수행하였으며 각각의 연구에 대해 관찰된 역효과가 없는 수준은 최대 가능 용량이었다. CWT-001의 단일 힘줄내 투여에 대한 전임상 평가는, 예컨대 2 mg의 인간 임상 용량과 비교하여 래트 및 개에서 각각 용량의 41배 및 25배 수준에서 불리한 결과를 초래하지 않았다.
- [0405] 대상체를 코호트로 나누고 (코호트당 8명의 대상체), 힘줄내 주사를 통해 투여되는 단일 1 ml 용량의 CWT-001 (PBS 및 EDTA 중의 CWT-001의 5 mg/mL 용액을 생리 식염수, 즉 0.9% w/v NaCl를 사용하여 다양한 최종 농도로 희석함) 또는 매칭된 위약 (생리 식염수, 즉 0.9% w/v NaCl) (3:1)을 받도록 무작위배치하였다. CWT-001의 시작 용량은 200 µg/mL이다. 용량을 500 µg/mL로 올린 다음 1500 µg/mL로 올렸다. VAS 통증 평가에서 개선이 보이지 않는 경우 (최대) 4500 µg/mL의 추가 용량을 투여할 계획이었으나 이는 필요하지 않았다.
- [0406] 각각의 코호트에서, 제1 투여일에 2명 이하의 대상체 (활성제 1명, 위약 1명)에게 투여하여 1명 이하의 대상체는 각각의 용량 수준에서 처음으로 활성 CWT-001 용량을 받았다. 이전에 투여된 감시 대상체의 안전성 및 내약

성을 평가한 후, 나머지 대상체 (6명의 대상체, 활성제 5명, 위약 1명)에게 각각의 코호트에서 동일한 용량 수준으로 투여를 계속하였다.

- [0407] 보다 낮은 용량에서 모든 안전성, 내약성, 혈장 PK 및 효능 데이터 (이용 가능한 경우)를 만족스럽게 검토한 후 증량 방식으로 용량을 투여하였다. 용량은 안전성, 내약성, 혈장 PK 및 효능 데이터 (이용 가능한 경우)의 지속적인 평가를 기반으로 결정되었다. 모든 용량은 환부에 초음파 안내 하에 1 ml 주사로 투여되었다.
- [0408] 초음파촬영은 LOGIQ E9 초음파 시스템에서 5-7.5 MHz 선형 어레이 변환기를 사용하여 적용되었다. 프로브는 공통 신근 힘줄의 종축에 평행하게 팔꿈치의 외측면을 따라 배치되었다. 요골두, 요상완골 관절, 외측 상과, 및 공통 신근 힘줄이 시각화되었다. 피부를 멸균하고, USG 프로브를 멸균 덮개로 감쌌다. 정확한 부위 (저신호강도 부위)에서 바늘 끝을 시각화한 후, 1 mL의 CWT-001 또는 위약을 주사하였다 (도 14 참조).
- [0409] CWT-001은 "페퍼링 기술" (참조문헌 11)을 이용하여 힘줄에 투여되었다. "페퍼링 기술"은 바늘을 압통 부위에 삽입한 후 피부로부터 빠지 않으면서 당기고 방향을 바꾸고 재삽입함으로써 다수의 작은 주사를 수행하는 주사 방법이다. 손상된/만성 힘줄 상황에서 이는 치유 반응을 자극하는데 유리할 수 있다.
- [0410] 연구 집단은 24명의 대상체를 포함하였다. 각각의 대상체는 이 연구에 대한 모든 포함 기준을 충족하고 어떠한 제외 기준도 충족하지 않았다.
- [0411] 하기 기준을 충족하는 대상체는 연구에 포함되었다:
- [0412] 1. 대상체는 임의의 인종의 남성 또는 여성이다.
- [0413] 2. 대상체는 18세 내지 70세 (포함)이며 골격 미성숙의 증거가 없다.
- [0414] 3. 대상체의 체질량 지수 (BMI)는 18 내지 35 kg/m² (포함)이다.
- [0415] 4. 대상체는 ≥ 50 kg이다.
- [0416] 5. 대상체는 외측 상과염의 임상 진단을 받았다.
- [0417] 6. 외측 상과염 및 하기 제외 기준에 나열된 임의의 병태를 제외하고, 다른 상황에서는 대상체는 병력, 신체 검사, 병용 약물, 활력 징후, 12-리드 ECG 및 임상 실험실 평가를 기반으로 담당 의사에 의해 결정되는 바와 같이 건강하다. 실험실 값은 조사자의 재량에 따라 한 번 재-시험될 수 있다.
- [0418] 7. 대상체의 증상은 (외측 상과의 압통 및 포지티브 픽업 백 오브 체어 사인 (pick up back of chair sign)으로 확인되는 바와 같이) 저항 회외 또는 손목 배측굴곡으로 재생될 수 있다.
- [0419] 8. 하기 중 하나 또는 조합을 포함하는 보존적 치료에도 불구하고 대상체의 증상이 적어도 6주 내지 6개월 동안 지속되었다:
- [0420] a. 물리 요법
- [0421] b. 부목 고정
- [0422] c. NSAID
- [0423] 9. 대상체는 독립적이고 보행이 가능하며 모든 주사 후 평가 및 방문에 순응할 수 있다.
- [0424] 10. 파트너가 가임 여성인 경우, 남성 대상체는 시험 동안 및 시험 약물의 최종 투여 후 3개월 동안 콘돔을 사용해야 한다. 또한, 가임 여성 파트너는 투여 전 1개월부터 투여 후 3개월까지 추가의 매우 효과적인 피임법 (일관되고 올바르게 사용했을 때 연간 1% 미만의 실패율을 달성할 수 있는 피임법이 매우 효과적인 산아제한법으로 간주됨)을 이용해야 한다.
- [0425] 11. 가임 여성 대상체는 남성 파트너가 시험 동안 및 투여 후 3개월 동안 콘돔을 사용하는 것과 함께 투여 전 1개월부터 매우 효과적인 피임법을 이용하는데 동의해야 한다. 대상체는 스크리닝 및 제1일에 음성 임신 시험을 가져야 한다.
- [0426] 12. 동의서 양식에 나열된 요구 사항 및 제한 사항 준수를 포함하는 서면 동의 제공.
- [0427] 하기 중 임의의 것을 갖는 대상체는 연구 참여로부터 제외되었다:
- [0428] 1. 대상체는 등록 전 6개월 이내에 아픈 팔꿈치에 사전의 코르티코스테로이드 주사 요법을 받은 적이 있다.

- [0429] 2. 대상체는 IMP 투여 전 적어도 1주부터 진통제 (아편제 또는 NSAID) 사용을 중단할 의사가 없거나 중단할 수 없다.
- [0430] 3. 대상체는 아픈 팔꿈치에 사전 PRP 주사를 맞았다.
- [0431] 4. 대상체는 골격에 영향을 미치는 것으로 공지된 약물을 사용하거나 최근에 사용하였다 (예컨대, 글루코코르티코이드 사용량 >5 mg/일, 플루오로퀴놀론 항생제).
- [0432] 5. 대상체는 외측 상과염의 치료를 위해 아픈 팔꿈치에 외과적 중재를 받았다.
- [0433] 6. 대상체는 하기 중 임의의 것의 양성 병력을 갖는다:
- [0434] a. 내측 상과염
- [0435] b. 요측굴 증후군
- [0436] c. 손목굴 증후군
- [0437] d. 등록 전 이전 2년 이내에 아픈 팔꿈치에 패혈성 또는 통풍성 관절염
- [0438] e. 등록 전 이전 6개월 이내에 경추 신경근병증
- [0439] f. 지난 6주 이내에 아픈 팔꿈치에 대한 외상
- [0440] g. 기능적 측정 (예컨대, 그립 강도 시험)을 수행하는 능력을 제한하는 신경근 또는 1차/2차 근육 결핍
- [0441] h. 축성 척추관절염, 건선성 관절염 및 류마티스성 관절염을 포함하지만 이에 제한되지 않는 동시발생 류마티스성, 염증성 질환
- [0442] i. 아픈 팔꿈치의 골관절염
- [0443] j. 반응 평가를 손상시키기에 충분하다고 판단되는 섬유근육통
- [0444] 7. 대상체는 현재 주사 부위에 급성 감염을 갖는다.
- [0445] 8. 국소적 재발 또는 전이의 증거가 있는지의 여부와 관계 없이 기준선 이전 지난 5년 이내에 치료를 받았거나 치료를 받지 않은, 림프증식성 질환 또는 임의의 공지된 악성종양의 병력 또는 임의의 기관계의 악성종양의 병력 (기저 세포 암종, 편평 세포 암종 또는 지난 5년 동안 재발의 증거 없이 치료된 피부의 광선 각화증, 제거된 자궁경부 또는 비-침습성 악성 결장 용종의 제자리 암종 제외).
- [0446] 9. 조사자가 대상체가 순응할 수 없거나 순응할 가능성이 없다고 판단하는 정도로 대상체는 신체적 또는 정신적으로 손상된 상태 (예컨대, 현재 정신 장애, 노인성 치매, 알츠하이머 질환 등에 대해 치료를 받고 있음)이다.
- [0447] 10. 대상체는 주사 절차의 30일 이내에 또는 연구의 추적조사 단계 동안 조사 요법 또는 조사용으로 승인된 요법을 받았다.
- [0448] 대상체는 각각의 방문 전 48시간 동안 및 CRU에 있는 동안 격렬한 운동을 삼가해야 한다. 대상체는 또한 조사용 의약품 (IMP) 주사 후 적어도 24시간 동안 어떠한 자동차도 운전할 수 없다.
- [0449] 대상체는 하기 제한 사항을 준수해야 했다:
- [0450] · 대상체는 각각의 방문 전 48시간 동안 임상 연구 유닛 (CRU)으로부터 나올 때까지 알코올을 삼가해야 한다.
- [0451] · 대상체는 투여 전 90일 동안, 연구 내내, 연구 완료까지 담배 및 니코틴-함유 제품 (전자 담배 포함)을 끊어야 한다.
- [0452] · 대상체는 남용 약물 스크리닝에서 양성 결과를 피하기 위해 스크리닝 및 각각의 방문 48시간 전에 양귀비 씨 소비를 삼가해야 한다.
- [0453] 대상체는 투여 전 8시간 동안 밤새 금식하였다. 또한, 대상체는 임상 실험실 평가가 수행되는 임의의 방문 적어도 4시간 전에 금식하도록 권고를 받는다.
- [0454] 스크리닝 시 초음파 평가는 4주 스크리닝 기간 동안 언제든지 수행되었으며, 반대측 팔꿈치 스캔을 포함한다. 투여 전 적어도 1주에, 대상체는 통증 관리를 위해 사용해 온 아편제 또는 NSAID 약물의 어떠한 사용도 중단해야 했다. 제-7일부터 제-1일까지, 대상체는 통증을 관리하기 위해 파라세타몰 (4 g/일 이하)을 복용하거나 얼

음 팩을 사용할 수 있었다.

- [0455] 대상체는 적격성을 확인하고 안전성 및 효능 기준선 평가를 받기 위해 제-2/-1일 및 투여 전 제1일에 CRU에 참석하였다. 적격성 확인 후 대상체를 무작위배치하고 CWT-001 또는 위약을 투여하였다. 주사 후 대상체는 30분 동안 휴식을 취하였다. 대상체는 투여 후 안전성 및 PK 평가를 받았고, 같은 날 CRU로부터 나왔다. 대상체는 PK 샘플링 평가를 위해 제2일에 CRU로 돌아왔고, 안전성 및 PK 평가를 위해 제7일에 CRU로 돌아왔다. 대상체는 안전성 및 효능 평가를 위해 제14일, 제28일 및 제90일에 CRU로 돌아왔다 (자세한 내용은 하기에 제공됨). 대상체는 제28일 및 제90일에 초음파 평가를 받았다. 각각의 대상체에 대한 연구 기간은 대략 16주이다.
- [0456] 삶의 질과 관련된 환자 건강의 다양한 측면에 대한 힘줄병증의 영향은 상지 힘줄병증에서 허용되고 검증된 환자 보고 결과 수단인 하기 도구로 평가되었다 (참조문헌 16): 주사 후 제28일 및 제90일에 대상체의 힘줄병증 통증 강도 평가 (VAS), 킥DASH 점수, ASES-E 점수, PRTEE 점수, 힘줄의 초음파 평가.
- [0457] 중지 기준은 하기를 포함한다:
- [0458] · 1명의 대상체에서 '심각한' 역반응, 즉 IMP 투여와 적어도 관련이 있을 가능성이 있는 것으로 간주되는 심각한 유해 사례 (SAE, 하기에 정의됨).
- [0459] · '중증의' 심각하지 않은 역반응, 즉, 동일한 시스템-기관 부류 (SOC) 내에서 독립적으로 또는 그 내에 있지 않은 동일한 코호트의 2명의 대상체에서 IMP 투여와 적어도 관련이 있을 가능성이 있는 것으로 간주되는 중증의 심각하지 않은 AE.
- [0460] · 관찰된 AE 및/또는 임상 안전성 모니터링의 특성, 빈도 및 강도를 기반으로 허용되지 않는 내약성 프로파일 이 있는 경우.
- [0461] AE는 의약품에 대한 잠재적인 관계와 상관 없이 임상 연구 동안 스크리닝으로부터 나타나거나 악화되는 연구 대상체에서의 임의의 뜻밖의 의학적 사건이다. 따라서, AE는 임상적으로 유의미한 비정상적인 실험실 결과, 증상 또는 질환을 포함하여 임의의 바람직하지 않거나 의도하지 않은 징후일 수 있다.
- [0462] SAE는 임의의 용량에서 하기와 같은 뜻밖의 의학적 사건이다:
- [0463] · 사망을 초래함,
- [0464] · 생명을 위협함,
- [0465] o 참조: '심각한'의 정의에서 용어 '생명을 위협하는'은 사건 당시 대상체가 사망할 위험이 있는 사건을 지칭한다. 더 중증이었다면 가정적으로 사망을 초래했을 수도 있는 사건을 지칭하지 않는다.
- [0466] · 입원 또는 기존 입원의 연장이 필요함.
- [0467] o 참조: 일반적으로, 입원은 대상체가 의사 사무실 또는 외부 환경에서는 적절하지 않았을 수 있는 관찰 및/또는 치료를 위해 병원 또는 응급 병동에 유치 (보통 적어도 하룻밤 포함)되었음을 의미한다. 입원 동안 발생하는 합병증은 AE이다. 합병증이 입원 기간을 연장하거나 임의의 다른 심각한 기준을 충족하는 경우, 사건은 심각한 것이다. '입원'이 발생했는지 또는 필요했는지의 여부가 의심스러운 경우 AE는 심각한 것으로 간주되어야 한다.
- [0468] · 지속적 또는 상당한 장애 또는 무능력을 초래함.
- [0469] o 참조: 용어 '장애'는 정상적인 생활 기능을 수행하는 개인의 능력의 실질적인 붕괴를 의미한다. 이 정의는 일상 생활 기능을 방해하거나 막을 수는 있지만 실질적인 붕괴를 구성하지 않는 단순한 두통, 구역, 구토, 설사, 인플루엔자 및 우발적 외상 (예컨대, 발목 염좌)과 같은 비교적 경미한 의학적 유의성의 경험을 포함하도록 의도되지 않는다.
- [0470] · 선천적 이상 또는 선천적 결손임.
- [0471] · 중요한 의학적 사건임.
- [0472] o 참조: 즉시 생명을 위협하거나 사망 또는 입원을 초래하지 않을 수 있지만 대상체를 위험에 빠뜨릴 수 있거나 상기 정의에서 나열된 다른 결과 중 하나를 방지하기 위해 의학적 또는 외과적 중재를 필요로 할 수 있는 중요한 의학적 사건과 같은 다른 상황에서 보고가 적합한지의 여부를 결정할 때 의학적 또는 과학적 판단이 발휘되어야 한다. 이들도 심각한 것으로 간주되어야 한다. 이러한 사건의 예는 침습성 또는 악성 암, 알레르기성 기

관지 경련에 대한 응급실 또는 가정에서의 집중 치료, 입원을 초래하지 않는 혈액 질환 또는 경련, 약물 의존성 또는 약물 남용의 발생이다.

[0473] o 참조: 용어 "심각한" 및 "중증"은 동의어가 아니다. 용어 "중증"은 종종 (경증, 중등 또는 중증 심근 경색에서와 같이) 특정 사건의 강도 (중증도)를 기술하는 데 사용되나; 사건 자체는 비교적 경미한 의학적 유의성 (예컨대, 중증 두통)일 수 있다. 이는 상기 기재된 대상/사건 결과 또는 행동 기준에 기반하고 일반적으로 대상체의 생명 또는 기능에 위협이 되는 사건과 관련된 "심각한"과 동일하지 않다. 중증 AE가 반드시 심각한 것으로 간주될 필요는 없다. 예컨대, 몇 시간 동안 지속되는 지속적인 구역은 SAE가 아닌 중증 구역으로 간주될 수 있다. 반면, 경미한 정도의 장애만 초래하는 뇌졸중은 경증으로 간주될 수 있지만 상기 기준에 따라 SAE로 정의된다. 심각성 (중증도가 아님)은 규제 보고 의무를 정의하기 위한 지침 역할을 한다.

[0474] 대상체는 연구 동안 어떠한 중지 기준도 충족하지 못하였다.

[0475] 약동학적 평가

[0476] CWT-001에 대한 약동학은 miR29a의 일련의 혈장 농도를 측정함으로써 평가되었다.

[0477] 기준선 PK 혈액 샘플은 투여 전 30분 이내에 수집된다. miR29a의 혈장 농도 측정을 위한 혈액 샘플은 하기 표 9에 언급된 시점에서 채취하였다. 혈장 농도-시간 데이터는 비구획 방법으로 분석된다. 임시 결정에는 명목 시간이 사용되었지만 최종 계산에는 실제 샘플링 시간이 사용되었다. 대략적인 샘플링 부피는 표 8에 제공된다.

[0478] <표 8>

표 8 - 샘플링 요약

샘플 유형	샘플 목적	샘플의 수 (부피/샘플)	총 부피 (mL)
혈액	혈액학	5 (2.0 mL)	10.0 mL
혈액	생화학	5 (5.0 mL)	25.0 mL
혈액	응고	5 (4.5 mL)	22.5 mL
혈액	약동학	12 (3.0 mL)	36.0 mL
	총 혈액:		93.5 mL

[0479]

[0480] 안전성 이유로 필요한 경우 추가 샘플을 채취하였다. 약동학적 프로파일을 정의하기 위해 필요한 경우 최대 2개의 추가 약동학적 샘플을 채취할 수 있다.

[0481] 약동학적 혈장 샘플을 수집하고, 써모 피셔 (Thermo Fisher)에서 개발된 검증된 정량적 실시간 PCR 방법을 이용하여 miR29a를 정량화한다.

[0482] <표 9>

표 9 - 평가 일정

	스크리닝		처리 기간				FU	EOS
평가 일정	-4주	-1주	제1주			제2주	제4주 ^a	제13주
	제-28일 내지 제-3일	제-2일/ 제-1일	제1일	제2일	제7일 (±1일)	제14일 (±2일)	제28일 (±2일)	제90일 (±2일)
약동학 평가								
혈액 샘플링 ¹			투여 전, 투여 후 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12시간	투여 후 24 및 36시간	X			
효능 평가								
팔꿈치 통증/힘줄 통증 설문지			X ^m			X	X	X
팔, 어깨 및 손 장애 설문지 (DASH)			X ^m			X	X	X
미국 어깨 및 팔꿈치 외과 의사 팔꿈치 (ASES-E)			X ^m			X	X	X
환자 평점 테니스 엘보우 평가 (PRTEE)			X ^m			X	X	X
외측 팔꿈치 힘줄의 조음파 평가	X ⁿ						X	X

약어: EOS - 연구 종료; FU - 추적조사; PK - 약동학.

^a 추적조사 방문은 투여 후 28일 또는 (적용되는 경우) 조기 중단 시에 이루어진다.

[0483]

[0484]

효능 평가 - 시각적 아날로그 척도

[0485]

대상체는 이전 24시간 동안 통증을 등급화한 처리 후 처음 14일 동안 1일 1회 일기에서 자신의 통증을 평가하였다. 제14일 후 대상체는 주사 후 제90일까지 매주 통증 일기를 작성하였다. 대상체의 통증 평가는 "지난 24시간 동안 힘줄병증으로부터 가졌던 최대 통증을 수평선을 통해 수직 표시 (|)로 나타내 주세요"라는 질문 이후 "통증 없음"으로부터 "참을 수 없는 통증"에 이르는 100 mm 시각적 아날로그 척도 (VAS)를 사용하여 수행되었다. VAS는 값의 연속체에 걸쳐 있다고 여겨지고 쉽게 직접적으로 측정될 수 없는 특징 또는 태도를 측정하려고 시도하는 검증된 측정 도구이다. 이는 다양한 증상의 강도 또는 빈도를 측정하기 위해 역학 및 임상 연구에서 종종 사용된다 (참조문헌 17).

[0486]

결과는 도 17에 나타나 있다. VAS 점수의 감소는 200 µg (도 17A), 500 µg (도 17B) 또는 1500 µg (도 17C) 용량의 CWT-001을 받은 대상체 및 위약 식염수 주사를 받은 대상체의 모든 그룹에서 관찰되었다. VAS 점수의 이러한 감소는 일반적으로 팔꿈치 통증 치료에서 VAS에 대한 최소의 임상적 중요성 차이 (MCID) (-11)를 초과하였다 (참조문헌 18). 임의 용량의 CWT-001을 받은 모든 대상체에 대한 VAS 점수의 평균 변화를 결정하고 위약과 비교하였다 (도 17D). CWT-001로의 처리는 제28일에 위약으로 관찰된 변화를 초과하는 VAS 점수의 변화를 생성하였다. 관찰된 VAS 점수의 평균 변화는 제90일에 CWT-001-처리된 대상체의 경우 -33 ± 7이었으며, 이는 3 MCID의 변화에 상응한다.

[0487]

정형외과에서의 무작위배치된 비교 시험 (RCT)은 위약/대조군으로 생리학적 효과가 없을 것으로 예상되는 생리

식염수 (NS) 주사의 사용을 평가하였다. 그러나, 해당 분야에서의 현재 최고의 증거로 제안되는 바와 같이 (참조문헌 18, 19, 20, 21), NS가 이 분야에서 적절한 위약으로 작용할 수 있는지에 대한 의문이 제기된다. 예컨대, 골관절염을 앓고 있는 환자의 무릎 관절에 관절내 식염수 주사를 한 최근 연구 (참조문헌 22)는 통증 완화 및 삼투압-관련 변화와 같은 식염수의 그럴듯하고 잠재적인 유의한 효과를 제안하였다. 분자 및 생리학적 관점에서, TNF- α 및 IL-1 β 로 유도한 후 전염증성 시토카인 (RANTES, MCP-1, IP-10, G-CSF)을 감소시키는데 있어 고장성 식염수 투여의 기여 및 나트륨 이온 및 삼투압이 어떻게 골관절염 병리에 기여할 수 있는지, 따라서 이것이 강력한 항염증 매개체임을 시사한다. 식염수의 힘줄내 주사가 대조군으로 사용되는 힘줄병증 임상 시험에서 VAS 점수가 70% 감소하는 공지된 위약 효과가 있다 (참조문헌 18).

[0488] 특히 외측 상과염 시험에서 위약으로의 NS에 대한 최근의 체계적 검토 (참조문헌 23)는, 조사된 하나의 RCT를 제외한 모든 RCT에서 식염수와 비-식염수 (혈소판-풍부 혈장 (PRP), 자가 조건 조절된 혈장 (ACP), 코르티코스테로이드 및 보툴리눔 독소) 주사 사이에 환자 보고된 결과 측정 (Patient Reported Outcome Measures: PROMS)에서 통계적으로 유의미한 차이가 없었으며, NS는 주사 가능한 요법과 유사한 치료 효과를 발휘했다는 것을 밝혔다. 이 작업을 기반으로, 해당 분야에서는 NS 주사의 원리, 생리학적 특징, 효과 및 기본 메커니즘을 설명할 강력한 증거가 없기 때문에, (문헌 (Boesen et al., 2017); 참조문헌 24에 기재된 것과 같이) 거짓 (sham) 주사기/바늘과 같은 대체 대조 방법이 더 나은 연구 대조군 아암으로 수행될 수 있다고 제안되었다.

[0489] 힘줄병증 연구에서 위약으로 힘줄내 식염수 주사를 사용하는 것과 관련된 공지된 문제에 비추어, 임의의 용량의 CWT-001을 받은 모든 대상체에 대한 VAS 점수의 평균 백분율 변화를 별도의 연구에서 외측 상과염에 대한 대체 치료를 받은 대상체에 대한 VAS 점수의 평균 백분율 변화와 추가로 비교하였다 (도 17E; 참조문헌 25). 이 연구는 코르티코스테로이드, 혈소판 풍부 혈장 (PRP) 및 자일로카인이 모두 외측 상과염 치료에 안전하고 효과적이라는 것을 밝혔다. 본 연구에서 CWT-001로의 처리에 대해 관찰된 VAS의 백분율 변화는 모든 시점에서 각각의 공지된 처리에 대해 관찰된 VAS의 백분율 변화를 초과하였다.

[0490] 효능 평가 - ASES-E 점수

[0491] ASES 점수는 어깨 및 팔꿈치 기능 평가를 위해 미국 어깨 및 팔꿈치 외과 학회 (the Society of the American Shoulder and Elbow Surgeons)에 의해 개발되었다 (참조문헌 26). ASES-E 점수는 자가 관리되며 증상 및 기능 영역에서 17개의 질문을 갖는다. 통증의 중증도는 0 (통증이 전혀 없음) 내지 10 (최대함으로 통증이 심함) 범위의 10 cm 시각적 아날로그 척도로 등급화되었다. 회상 기간은 대상체가 이 시점에서 어떻게 느끼는가 하는 것이다. 이 검증된 수단은 대상체가 보고한 결과와 팔꿈치의 움직임 범위 및 강도 변화에 대한 의사 평가를 조합하기 때문에 선택되었다 (참조문헌 27).

[0492] 효능 평가 - 신속한 팔, 어깨 및 손 장애 (DASH) 점수

[0493] 퀵 DASH는 워크 & 헬스 협회 (Institute for Work & Health, 캐나다 온타리오주 토론토)와 함께 미국 정형 외과 학회 (the American Academy of Orthopaedic Surgeons)에 의해 개발된 대상체 보고 결과 수단인 DASH의 축약형이다. 퀵 DASH 지수는 자가-관리되며, 임의의 또는 다수의 상지 근골격계 장애를 갖는 대상체에서 신체 기능 및 증상을 측정하기 위해 11개 항목을 사용한다. 이 검증된 결과 측정 (참조문헌 21)은 CWT-001 주사 후 대상체의 기능성의 변화에 대한 핵심 정보를 제공한다.

[0494] 퀵DASH의 각각의 항목은 5개의 응답 옵션을 갖는다. 1 = 어려움 없음; 2 = 약간 어려움; 3 = 보통 어려움; 4 = 매우 어려움; 5 = 불가능.

[0495] 결과는 도 18에 나타나 있다. 퀵DASH 점수의 감소는 200 μ g (도 18A), 500 μ g (도 18B), 또는 1500 μ g (도 18C) 용량의 CWT-001을 받은 대상체에서 관찰되었다. 90일에 퀵DASH 점수의 감소는 각각의 용량 코호트에 대해 위약 식염수 주사를 받은 대상체보다 CWT-001을 받은 대상체에서 더 컸다. 임의의 용량의 CWT-001을 받은 모든 대상체에 대한 퀵DASH 점수의 평균 변화를 결정하고 위약과 비교하였다 (도 18D). CWT-001로의 처리는 모든 시점에서 위약으로 관찰된 변화를 초과하는 퀵DASH 점수의 변화를 생성하였다. 임의의 용량의 CWT-001을 받은 대상체에 대한 퀵DASH 점수의 평균 변화는 또한 상지 근골격계 장애를 갖는 환자에서 DASH에 대해 설정된 MCID (-20 포인트)를 초과하였다 (참조문헌 28). 임의 용량의 CWT-001을 받은 대상체에 대한 투여 전 점수와 비교하여 제90일에 퀵DASH 점수의 평균 개선은 -53 ± 5 포인트였다.

[0496] 효능 평가 - 환자 평점 테니스 엘보우 평가 (PRTEE)

[0497] 이전에 환자-평점 전완 평가 설문지라고 불렸던 PRTEE는 테니스 엘보우를 갖는 환자에서 지각된 통증 및 장애를 측정하기 위한 15개 항목의 자가-보고 설문지이다. 이는 통증, 일상 활동 및 특정 활동의 3개의 하위척도를 갖

는다. 통증 하위척도는 다양한 활동 동안 통증의 강도에 대한 5개의 항목을 갖는다. 특정 활동 하위척도는 커 피 겹을 들어 올리는 것과 같은 특정 활동을 수행하는 동안 경험하는 어려움을 활용하는 6개의 항목을 갖는다. '보통 활동' 하위척도에서 4개 항목은 업무 및 레크리에이션 동안 수행되는 것을 포함하여 일상적인 역할을 수행하는데 겪는 어려움을 포착한다. PRTEE는 질환-특이적 자가-보고 측정의 훌륭한 예이다. 이는 일반적인 관절-특이적 또는 영역-특이적 측정보다 테니스 엘보우에 더 특이적인 통증 및 기능의 측면을 포착하는데 매우 유용하다. 이 검증된 결과 측정 (참조문헌 27)은 CWT-001 주사 후 대상체의 기능성의 변화에 대한 핵심 정보를 제공한다.

[0498] 결과는 도 19에 나타나 있다. 200 μg (도 19A), 500 μg (도 19B) 또는 1500 μg (도 19C) 용량의 CWT-001을 받은 대상체에 대해 PRTEE 점수의 감소가 관찰되었다. 200 μg 용량의 CWT-001을 받은 대상체에 대해 관찰된 PRTEE 점수의 감소는 모든 시점에서 위약을 받은 대상체에 대한 PRTEE 점수의 감소를 초과하였다.

[0499] 임의의 용량의 CWT-001을 받은 모든 대상체에 대한 PRTEE 점수의 평균 변화를 결정하고 위약과 비교하였다 (도 19D). 제90일에 PRTEE 점수의 평균 개선은 임의 용량의 CWT-001을 받은 대상체에 대한 기준선 투여 전 점수의 $71 \pm 6\%$ 였다. 이는 기준선 점수의 37% 개선인 PRTEE에 대한 "훨씬 더 좋음" 또는 "완전히 회복됨"으로 정의된 임상적 유의성에 대한 MCID를 초과한다 (참조문헌 29).

[0500] 효능 평가 - 초음파 평가

[0501] 팔꿈치 수준에서 외측 힘줄 컴플렉스는 피하 조직과 근막 바로 아래에 위치되기 때문에 초음파촬영 검사에 쉽게 접근 가능하다. 일반적으로, 컴플렉스는 상응하는 부착물 사이에 정렬된 고에코 선형 구조로 시각화된다. 외측 팔꿈치 힘줄병증의 특징적인 초음파 결과는 힘줄 내의 국소 저에코 영역을 포함하며, 이는 정상적인 내부 콜라겐 섬유 정렬 패턴의 소실과 관련이 있다. 중요하게도, 연구는 음파촬영 특색이 질환 과정과 일치하며 치료적 처치 후 VAS 및 DASH 점수를 사용하여 증상 개선을 갖는 해결을 입증한다는 것을 나타내었다 (참조문헌 30). 전임상 모델을 기반으로 주사 후 제28일 및 제90일에 초음파 평가를 수행하였다. 중요하게도, 이는 CWT-001의 작용 메커니즘 (콜라겐 구조 개선), 치료 후 정상적인 힘줄 구조로의 복귀에 대한 데이터를 제공하며, 이는 대상체의 회복 및 치료 지속에 유익하다.

[0502] 초음파 조직 특징규명 (UTC)으로 불리는 이미징 방식을 이용하여 힘줄 구조를 시각화하고 힘줄 매트릭스 통합성을 정량화할 수 있다 (참조문헌 31). 2차원 초음파 및 컬러 도플러와 달리 UTC는 그레이-스케일 힘줄 매트릭스 변화를 힘줄 통합성과 관련된 4개의 상이한 생태형으로 객관적으로 정량화한다. 유형 I (녹색) 및 II (파란색)는 조직화된 매트릭스를 나타내고; 유형 III (빨간색) 및 IV (검은색)는 체계적이지 못한 매트릭스를 나타낸다 (도 20A). 통상적인 초음파와 비교하여 이 수단의 이점은 힘줄의 3차원 초음파 이미지를 캡처하고 표준화된 파라미터 (변환기 기울기 각도, 깊이 및 게인 설정)를 사용한다는 것이다. 양측 스캔 (두 외측 팔꿈치)은 UTC 스캔을 수행한 경험이 있는 단일 검사자에 의해 수행되었다. 0.2 mm 간격으로 규칙적인 이미지를 기록하면서 5 cm의 거리에 걸쳐 힘줄 장축을 따라 자동으로 움직이는 추적 장치 (UTC 트랙커 (UTC Tracker), UTC 이미징 (UTC Imaging), 스타인, 네델란드)에 위치된 7-10 MHz 선형 초음파 변환기 (스마트프로브 (SmartProbe) 12L5-V, 테라손 (Terason) 2000+; 테라테크 (Teratech); 미국 메릴랜드주 벨링턴)를 사용하여 이미지를 획득하였다. 변환기 기울기, 각도, 게인, 초점 및 깊이는 추적 장치에 의해 표준화된다. 시상면, 관상면 및 횡단면으로부터의 이미지를 컴파일링하여 힘줄의 3차원 영상을 생성하였다. 초음파 조직 특징규명 평가는 처리 전 (4주 이내) 및 제28일 및 제90일에 일어났다.

[0503] 외측 팔꿈치의 대표적인 초음파 이미지는 주사 전 (도 20B), 제28일 (도 20C) 및 제90일 (도 20D)에 위약을 받은 대상체 및 주사 전 (도 20E), 제20일 (도 20F) 및 제90일 (도 20G)에 200 μg CWT-001을 받은 대상체에 대해 제공된다.

[0504] UTC 유형 I, II, III 및 IV 힘줄 조직의 백분율 및 회복 힘줄 (UTC 유형 I 및 II) 대 퇴행성 힘줄 (UTC 유형 III 및 IV)의 총 백분율을 대상체에 대해 정량화하였다. 각각의 용량 코호트에 대해, 회복 힘줄 조직, 특히 무손상 UTC 유형 I 힘줄의 백분율은 CWT-001을 받은 대상체의 경우 제0일부터 제28일 및 제90일까지 증가하였으며, CWT-001을 받은 대상체가 위약을 받은 대상체보다 훨씬 더 높았다. 연구 기간에 걸쳐 위약 그룹과 비교하여 퇴행성 힘줄, 특히 가장 심하게 손상된 UTC 유형 IV 힘줄에서 상응하는 감소가 있었다 (200 μg CWT-001에 대해 도 20H, I, μg CWT-001에 대해 도 20J, K 및 1500 μg CWT-001에 대해 도 20L, M).

[0505] 임의의 용량의 CWT-001을 받은 모든 대상체에 대한 회복 힘줄의 평균 백분율은 제0일부터 제28일 ($P < 0.05$) 및 제90일 ($P < 0.01$)까지 상당히 증가한 반면, 위약을 받은 대상체에 대해서는 유의미한 변화가 관찰되지 않았다.

CWT-001을 받은 대상체는 또한 제28일 ($P<0.05$) 및 제90일 ($P<0.01$)에 위약을 받은 대상체보다 회복 힘줄의 수준이 상당히 높았고, 제28일 ($P<0.05$) 및 제90일 ($P<0.01$)에 퇴행성 힘줄의 수준은 상당히 낮았다.

[0506] 따라서, UTC 데이터는 단일 200 μg , 500 μg 또는 1500 μg 용량의 CWT-001로의 처리 후 외측 상과염을 갖는 인간 대상체에 대한 힘줄 구조에서 정량화 가능한 개선을 입증한다.

[0507] **실시예 8 - 뒤꿈트랑 질환 (도 15 및 16)**

[0508] 건강한 근막 조직 및 뒤꿈트랑 근막 조직에서 miR29a 발현의 qPCR 분석을 수행하였다 (건강한 그룹의 경우 4개 샘플, 뒤꿈트랑 그룹의 경우 3개 샘플). 결과는 miR29a의 수준이 손목굴 이완 수술을 받는 건강한 대조군과 비교하여 뒤꿈트랑 조직으로부터의 샘플에서 상당히 감소되었음을 나타내었다 (도 15). 이러한 실험은 뒤꿈트랑 질환에서 관찰된 섬유성 성장이 miR29a 발현의 감소와 관련이 있음을 나타내었다. 이 관찰은 miR-29 대체 요법이 뒤꿈트랑 질환에서 나타나는 콜라겐 과잉 생성을 방지하거나 감소시킬 수 있음을 나타내었다.

[0509] miR-29 대체 요법이 뒤꿈트랑 질환 치료에 유용할 수 있는지의 여부를 더욱 조사하기 위해, 배양된 뒤꿈트랑 섬유모세포를 5 μM 의 miR-29a 모방체, miR-29b 모방체, miR-29c 모방체, CWT-001, miR-29a 안타고미르, 또는 스크램블된 miR-29a 대조군으로 처리하였다. 처리 후 콜라겐 1 및 콜라겐 3 발현 수준을 qPCR로 분석하였다.

[0510] 결과는 콜라겐 1 (도 16A) 및 콜라겐 3 (도 16B) 둘 다의 발현이 스크램블된 miR-29 대조군으로의 처리와 비교하여 miR-29a 모방체, miR-29b 모방체, miR-29c 모방체 또는 CWT-001로의 처리 후 상당히 감소하였다는 것을 나타내었다. 이러한 데이터는 CWT-001과 같은 miR-29 모방체 화합물로의 처리가 뒤꿈트랑 질환 치료에 효과적일 수 있음을 나타낸다.

[0511] **실시예 9 - 페이로니 질환**

[0512] CWT-001은 페이로니 질환을 갖는 대상체에게 음경의 백색막에 단일 병변내 (음경내) 주사로 투여된다. 대상체는 $\leq 30^\circ$ 의 음경 굴곡 및/또는 크기 $< 2\text{ cm}$ 의 축진 가능한 플라크 (켈라미 (Kelami) 분류 기준, 참조문헌 32)를 갖는 초기 단계 (급성 또는 활성 단계) 페이로니 질환을 갖는 남성이다. 대상체는 주사 후 1년 동안 추적조사된다. 효능 평가는 음경 곡률, 음경 듀플렉스 도플러 초음파, 통증 VAS, IIEFF 설문지, 및 PDQ 설문지를 포함한다.

[0513] 본 발명은 단지 예로서 설명되었으며 본 발명의 범위 및 취지 내에서 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

[0514] 참조문헌

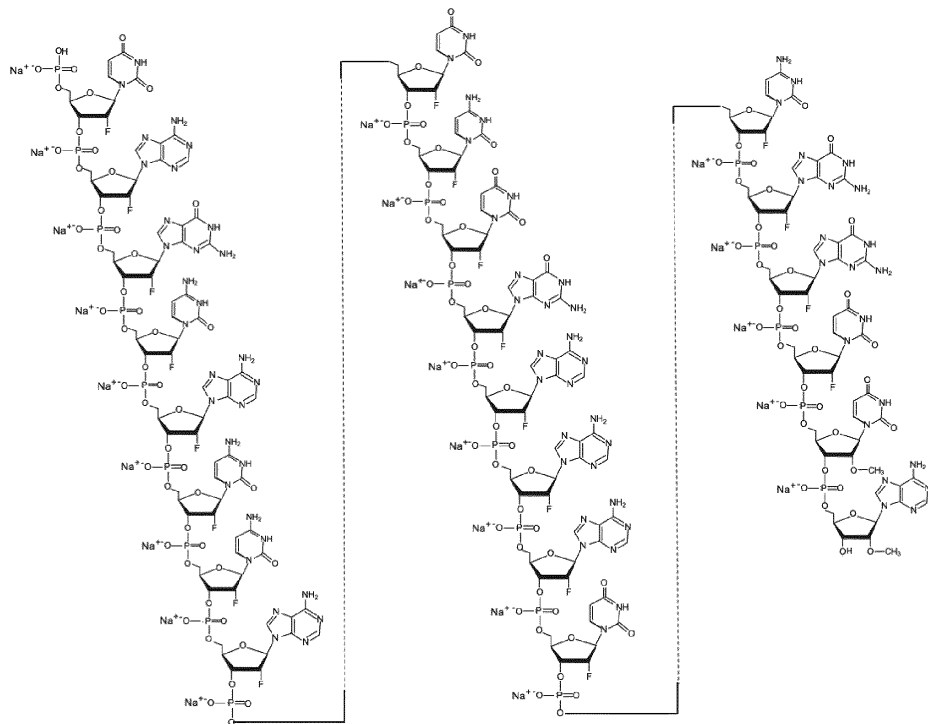
- [1] Millar et al. (2015) Nature Communication. 6:6674
- [2] WO 2015/107340
- [3] Watts et al. (2017) Mol Ther. 25(10): 2415-2426
- [4] Maurer et al. (2010) Arthritis Rheum. 62(6):1733-43
- [5] Fabbri et al. (2012) PNAS 109 (31) E2110-E2116
- [6] Menzel et al. (1979) Hand 11, 243-248
- [7] Tubiana et al. (1968) Surgical Clinics of North America, 48(5): 979-984
- [8] Castiglione et al. (2019) Sex Med. Mar; 7(1): 94-103
- [9] Ralph et al. (1997) J Urol Jan;157(1):291-294
- [10] Somers et al. (1989) J Urol 141, 629-631
- [11] Nagraba et al. (2013) Ortop Traumatol Rehabil. 15(2): 109-116
- [12] Lake et al. (2008) Disabil Rehabil 30:1530-1541
- [13] Lindow et al. (2012) Nat Biotechnol. 30(10):920-3
- [14] Robbins et al. (2009) Oligonucleotides 19: 89-102
- [15] Sorani & Campbell (2016) Br J Radiol. 89(1057); 20150368
- [16] Macdermid et al. (2015) J Orthop Sports Phys Ther. 45(11): 950-964
- [17] Hjerstad et al. (2011) J Pain Symptom Manage. 41(6): 1073-1093
- [18] Acosta-Olivo et al. (2020) Am J Sport Med. 48(12):3094-3102
- [19] Previtali et al. (2020) Cartilage 18:1-12
- [20] Wolf et al. (2011) J Hand Surg Am 36(8):1269-72
- [21] Gazendam et al. (2021) Brit J Sport Med. 55:256-261
- [22] Bar-Or et al. (2017) Open Rheumatol J. 31;11:16-22
- [23] Gao et al. (2019) Athroscopy. 35(6):1847-1859
- [24] Boesen et al. (2017) Am J Sports Med. 45(9):2034-2043
- [25] Reddy et al. (2016) J Trauma Treat 5:304
- [26] Richards et al. (1994) J Shoulder Elbow Surg. 3(6): 347-352
- [27] Longo et al. (2008) Br Med Bull. 87: 131-161
- [28] Franchignoni et al. (2014) J Orthop Sport Phys. 44(1): 30-9
- [29] Poltawski et al. (2011) Hand Therapy. 16(3):52-57
- [30] Clarke et al. (2010) Am J Sports Med. 38(6): 1209-1214
- [31] van Schie et al. (2010) Br J Sports Med. 44(16): 1153-1159
- [32] Kelâmi (1983) Urol Int. 38(4):229-233

[0515]

도면

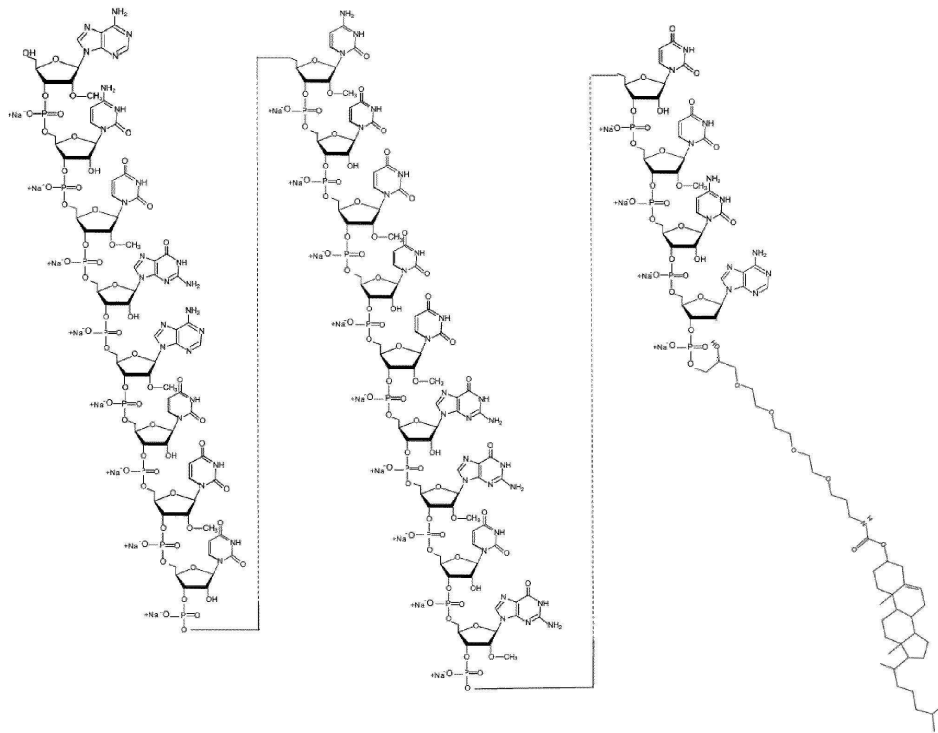
도면1i

1A

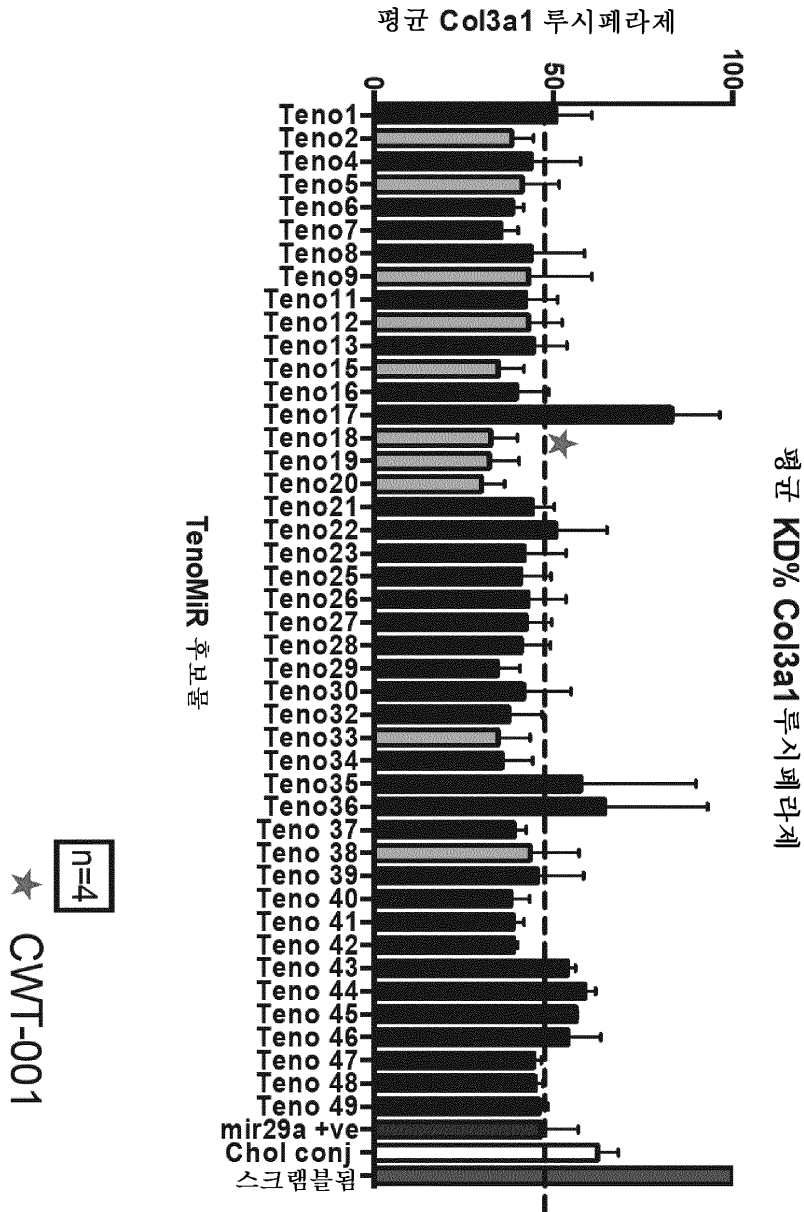


도면1ii

1B

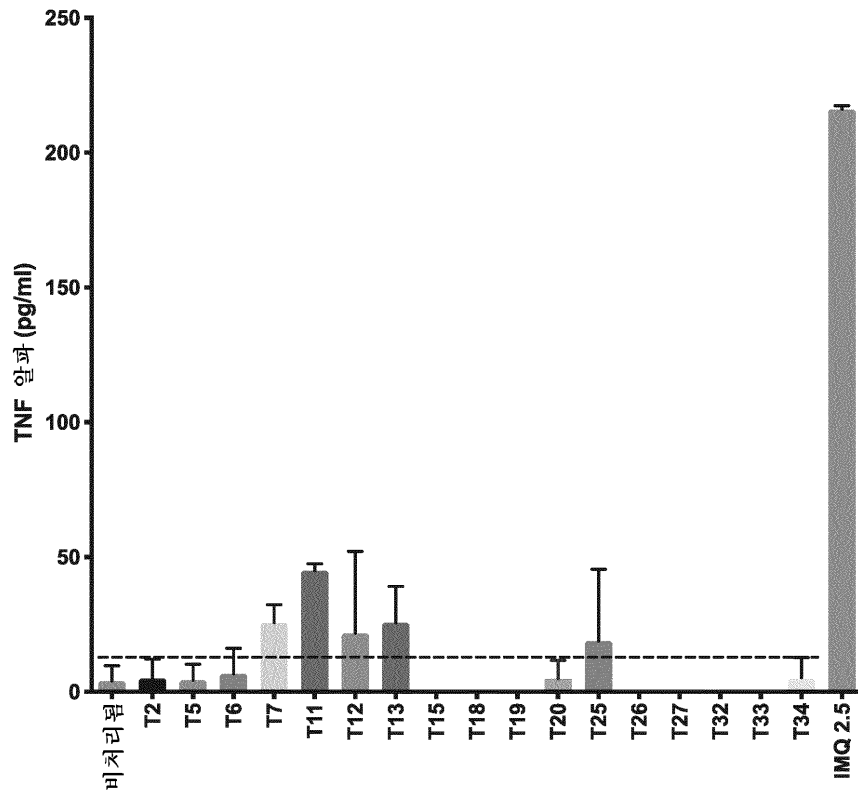


도면2



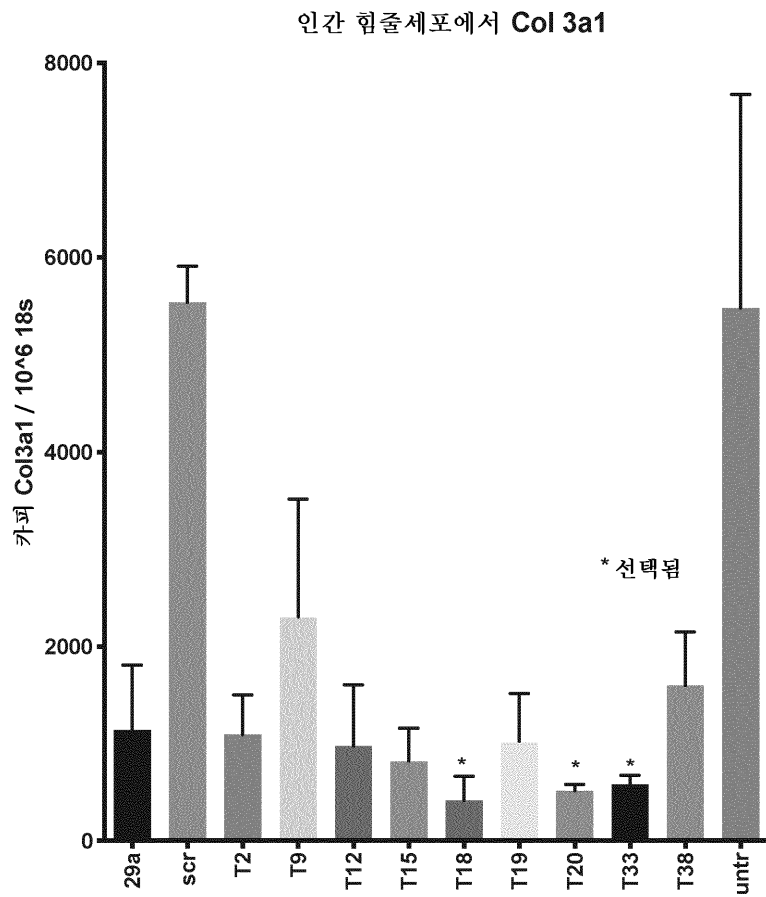
도면3i

3A



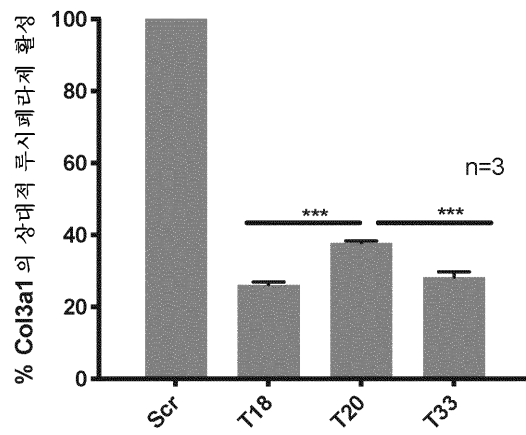
도면3ii

3B

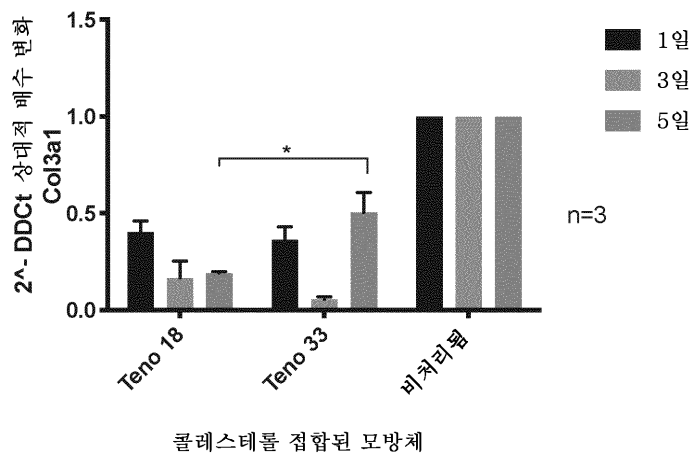


도면3iii

3C



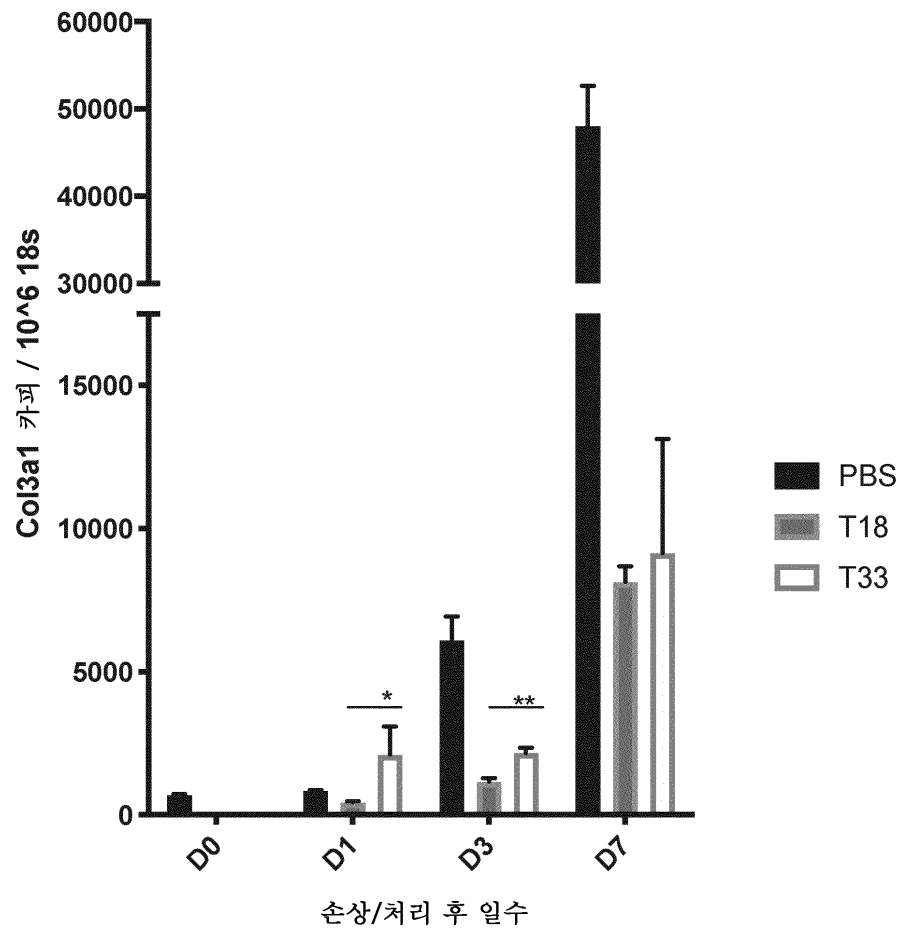
3D



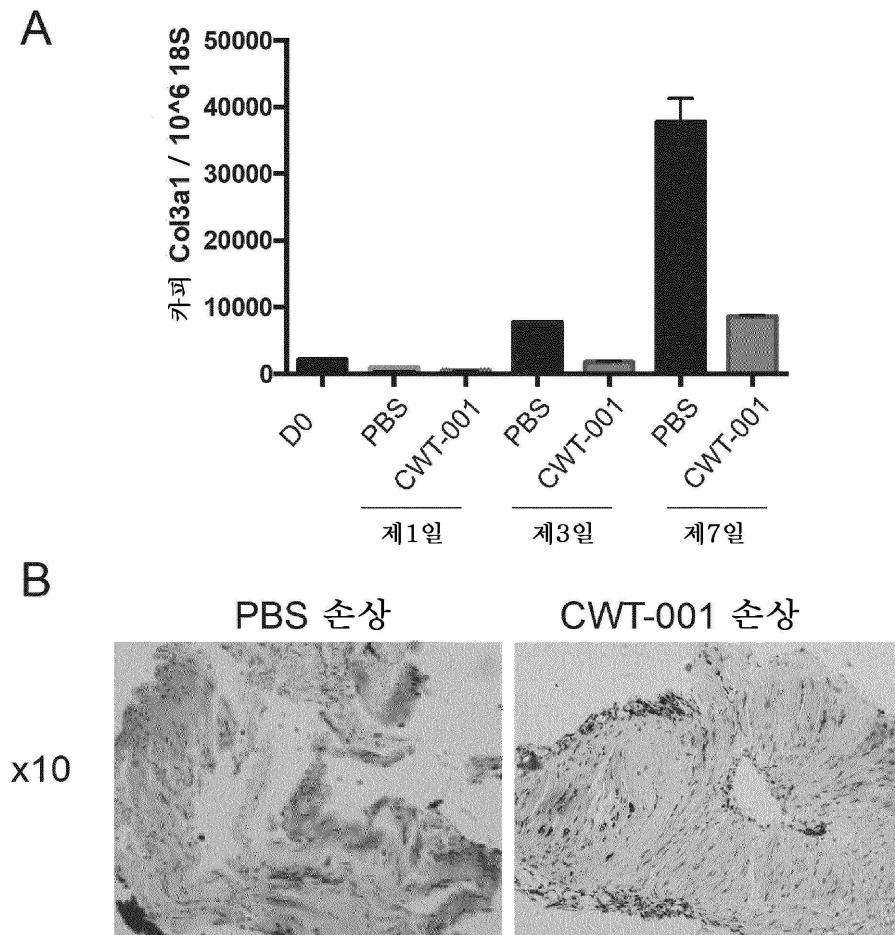
콜레스테롤 접합된 모방체

도면3iv

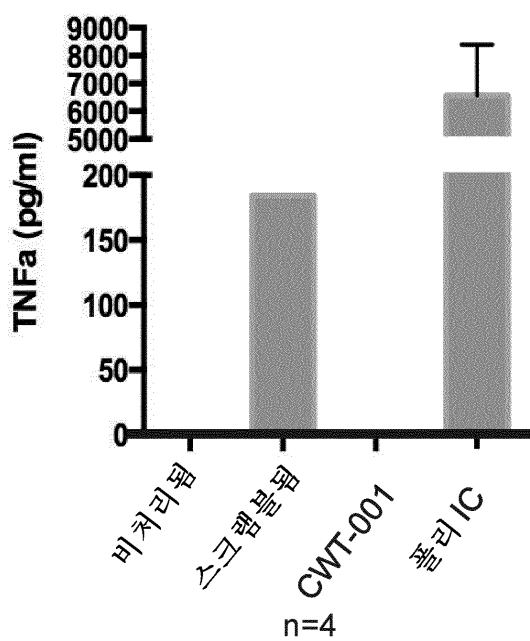
3E



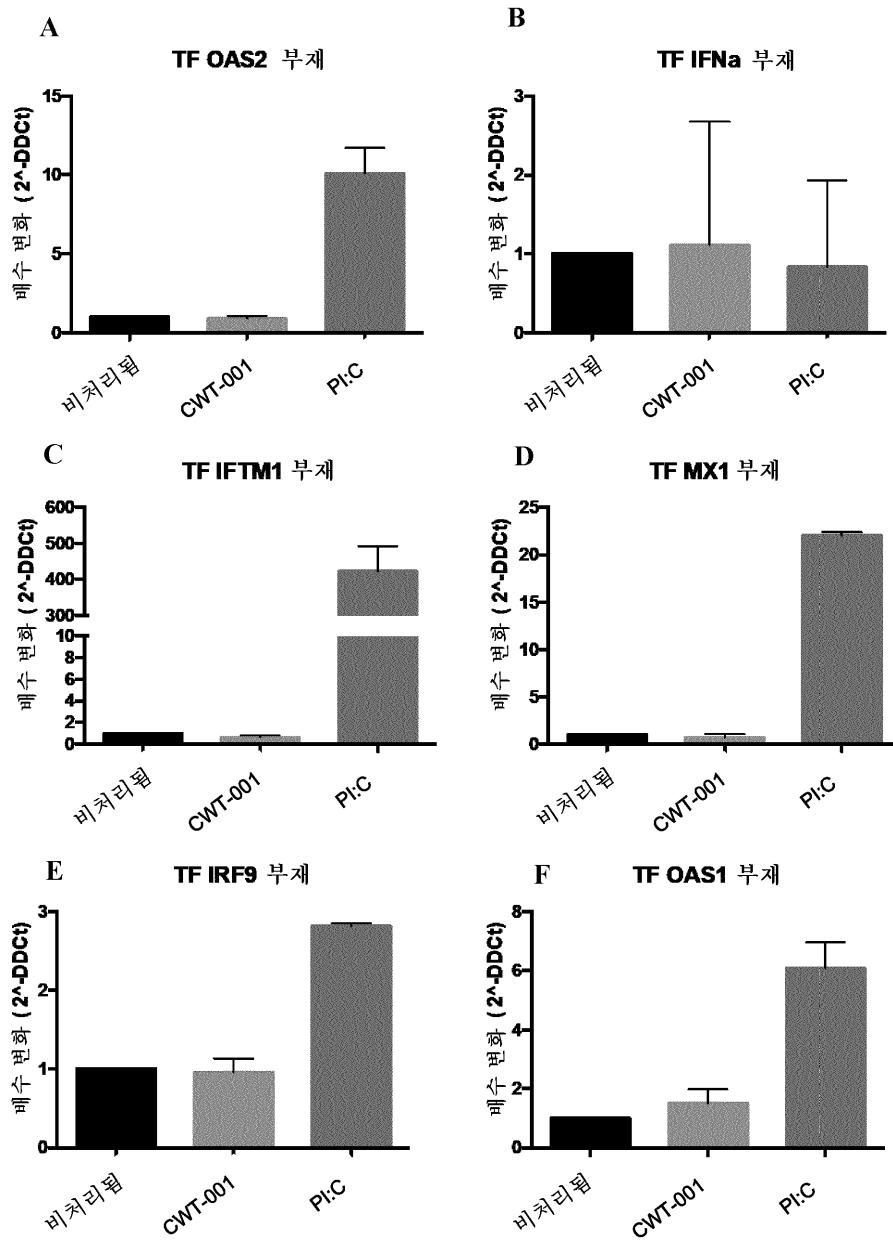
도면4



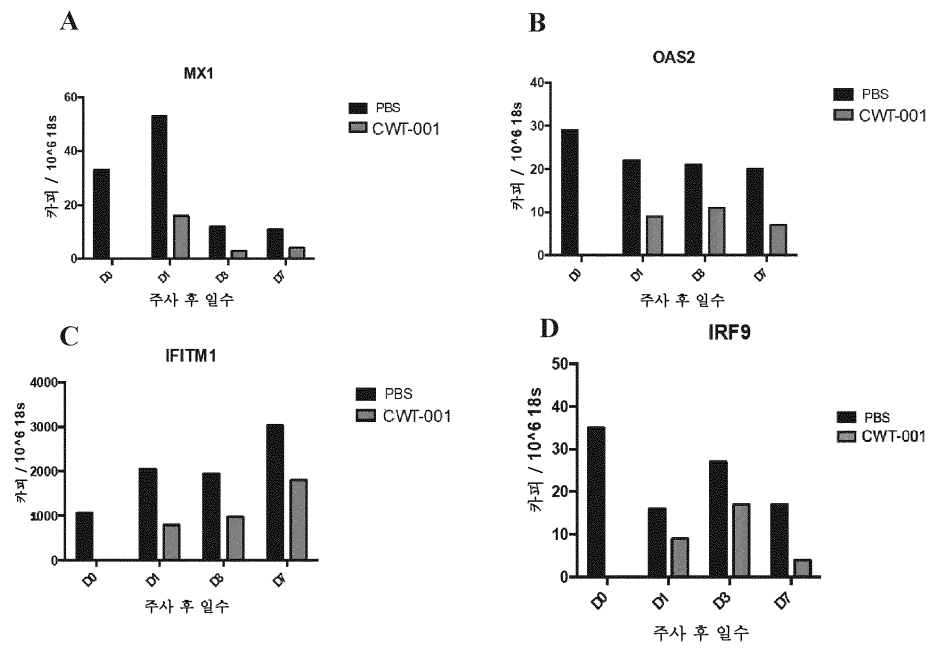
도면5



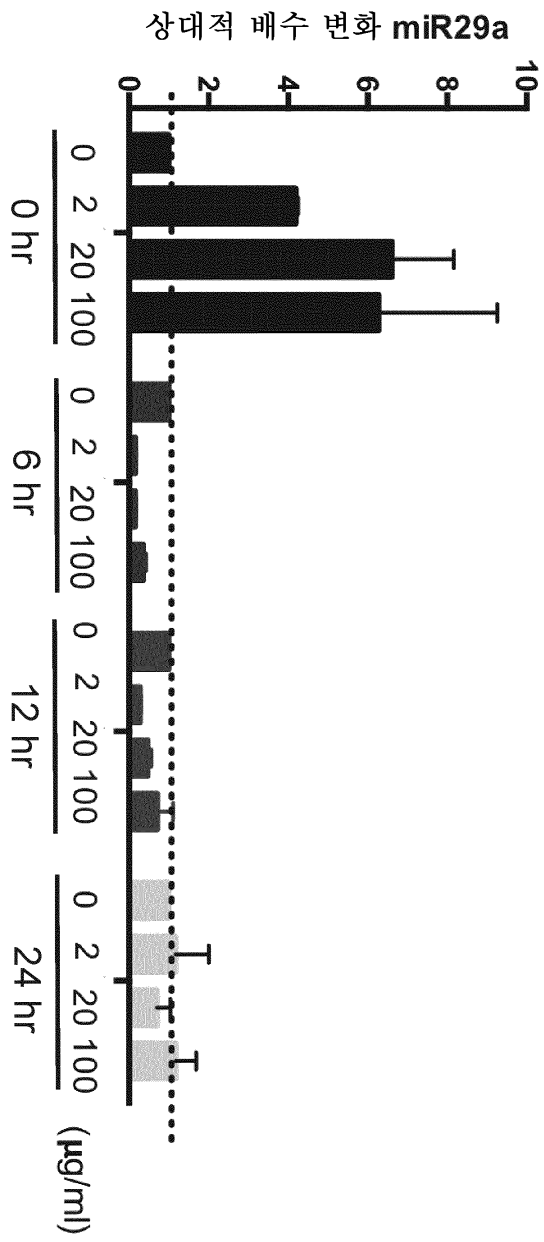
도면6



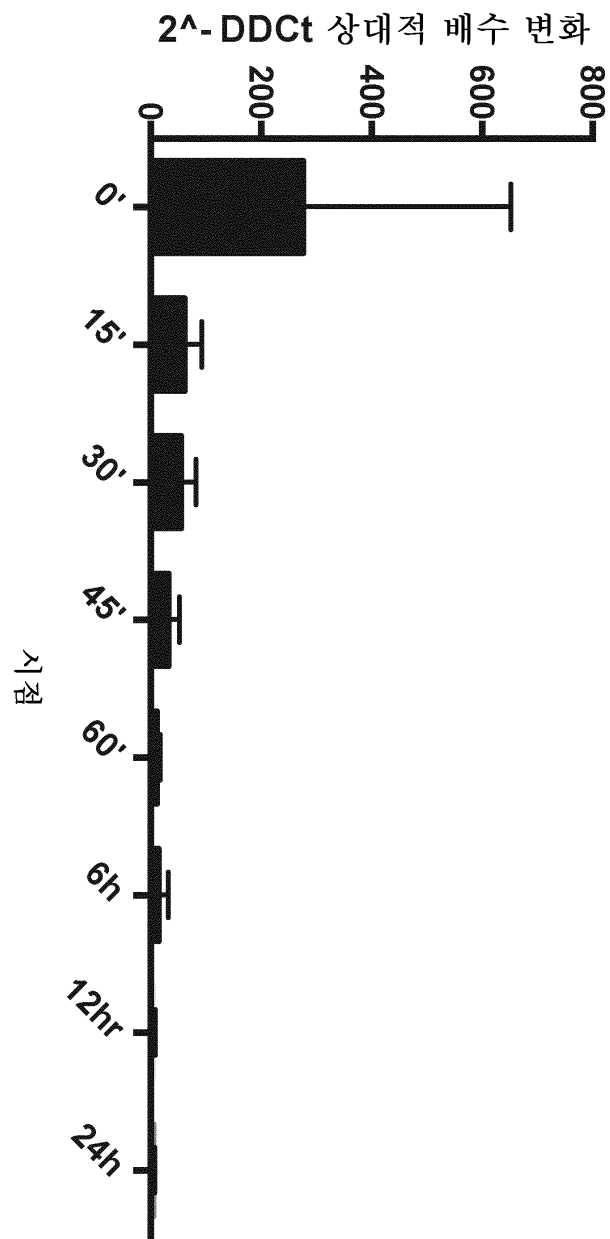
도면7



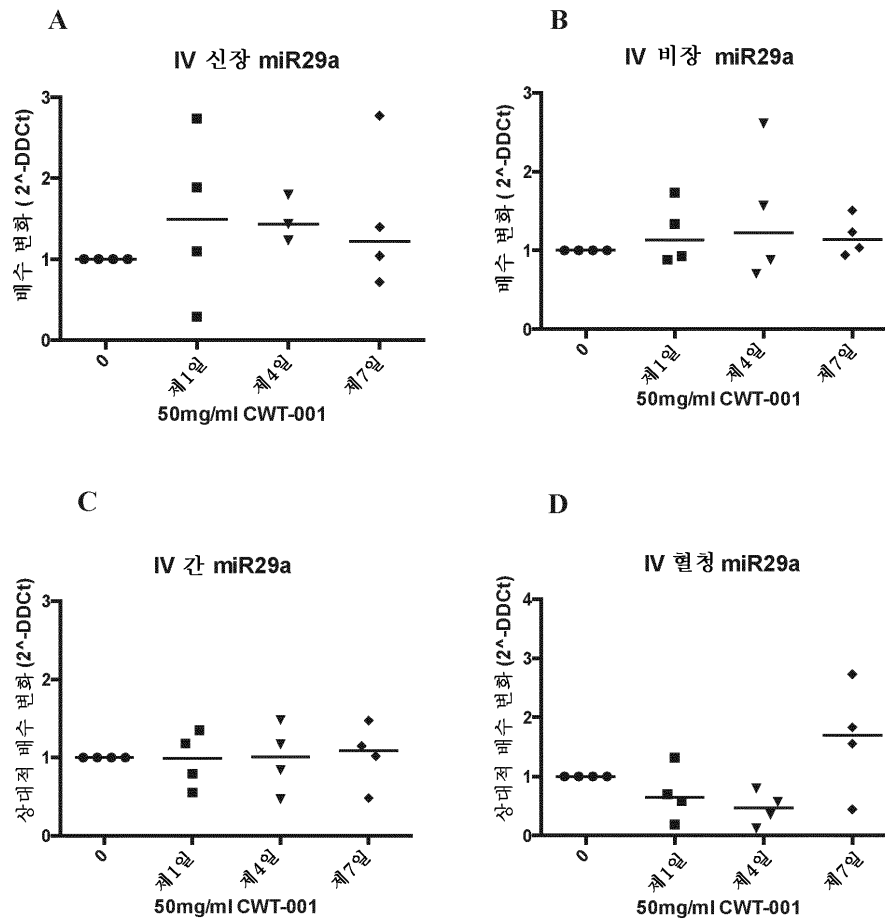
도면8



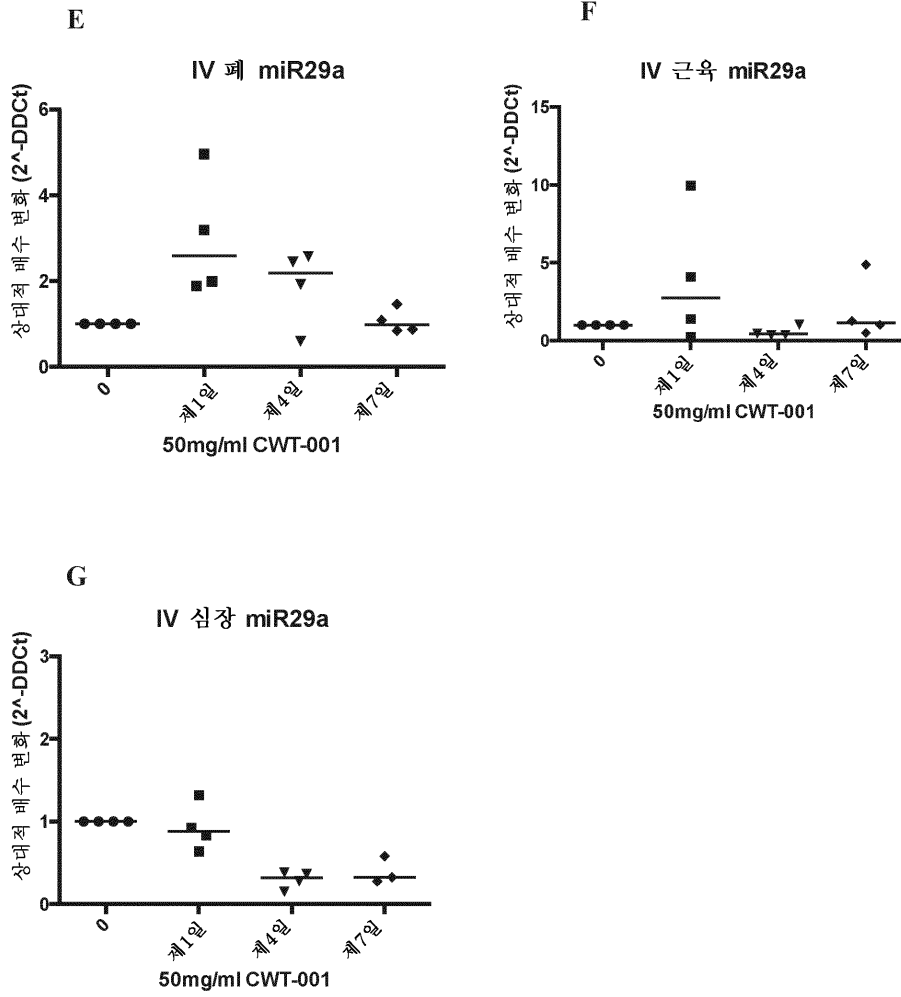
도면9



도면10i

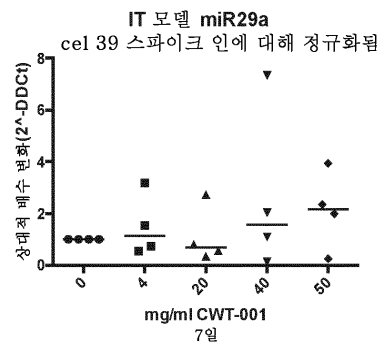


도면10ii

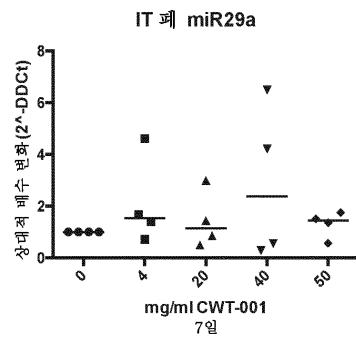


도면12i

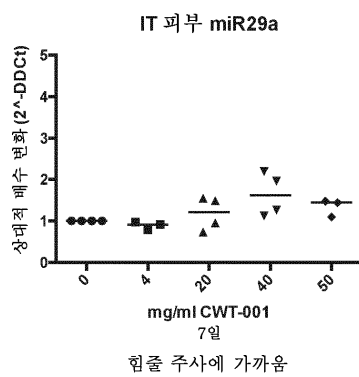
A



B

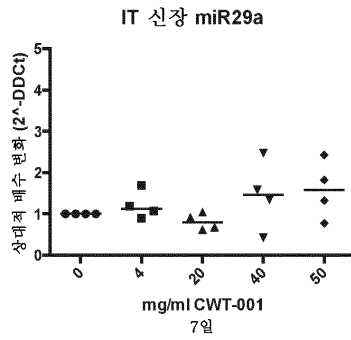


C

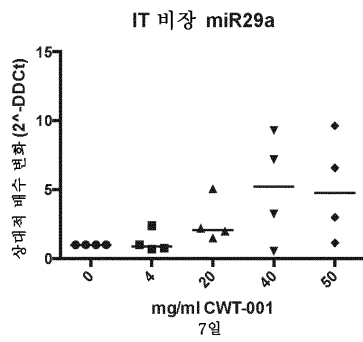


도면12ii

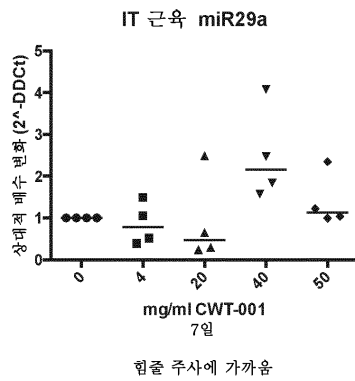
D



E

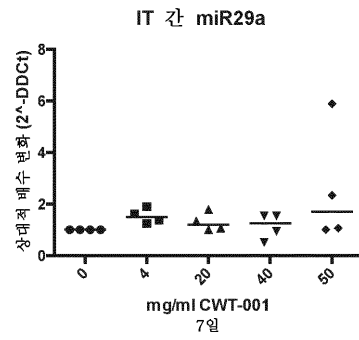


F

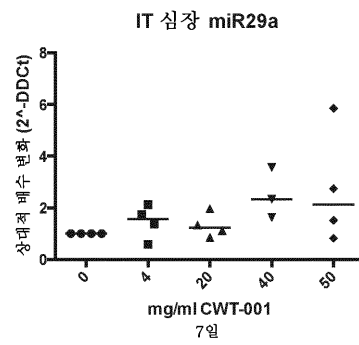


도면12iii

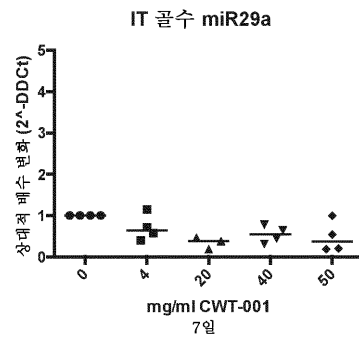
G



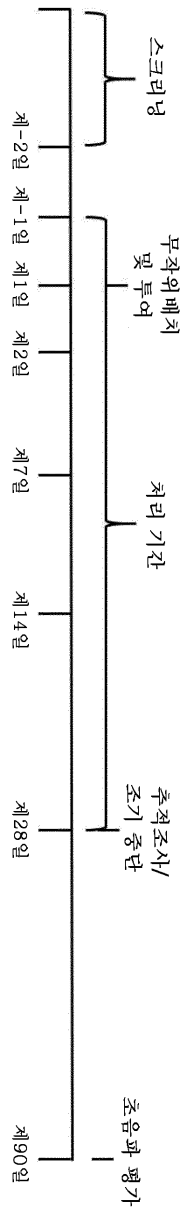
H



I

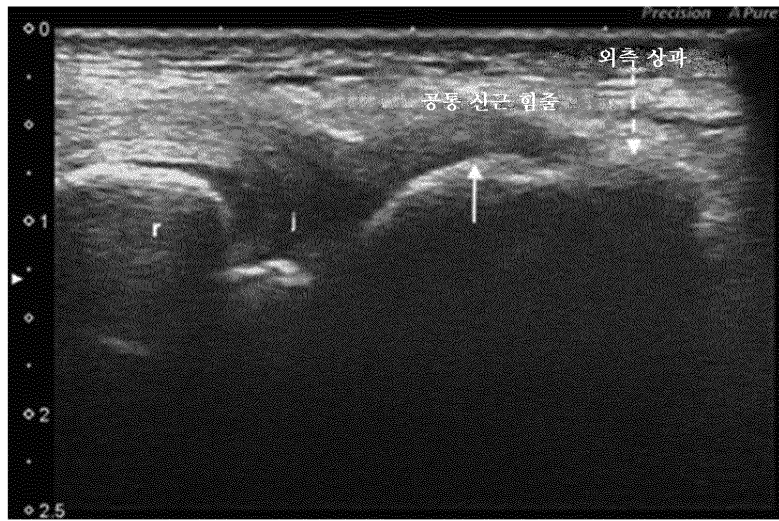


도면13

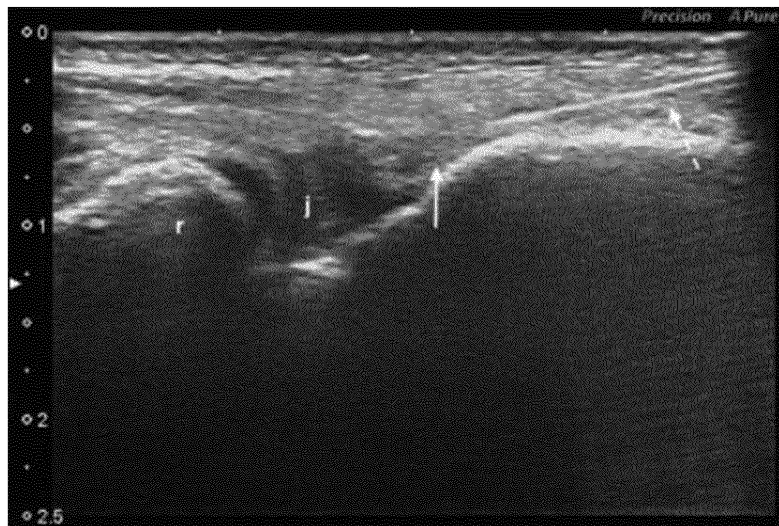


도면14

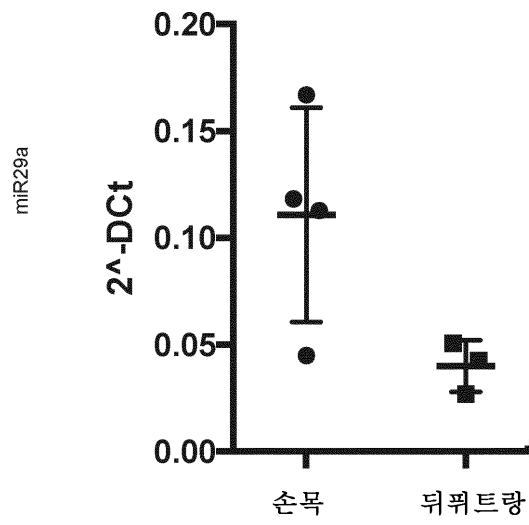
A



B

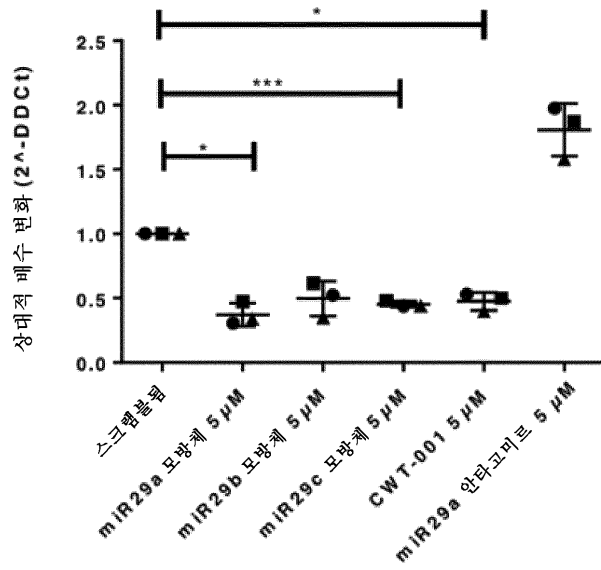


도면15

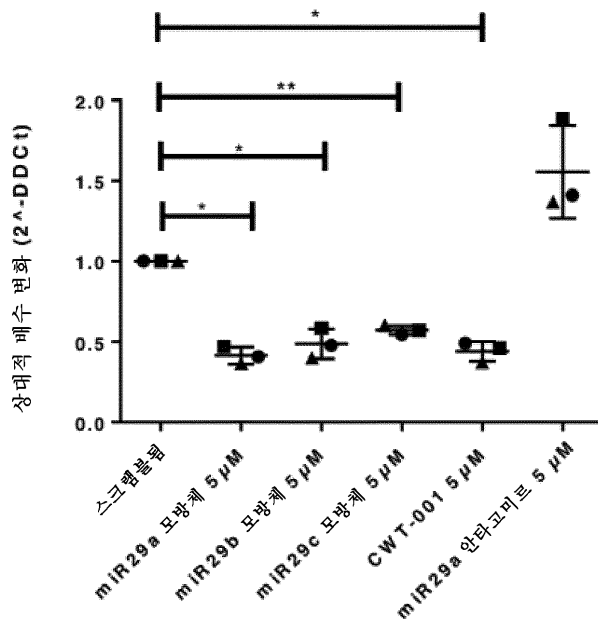


도면16

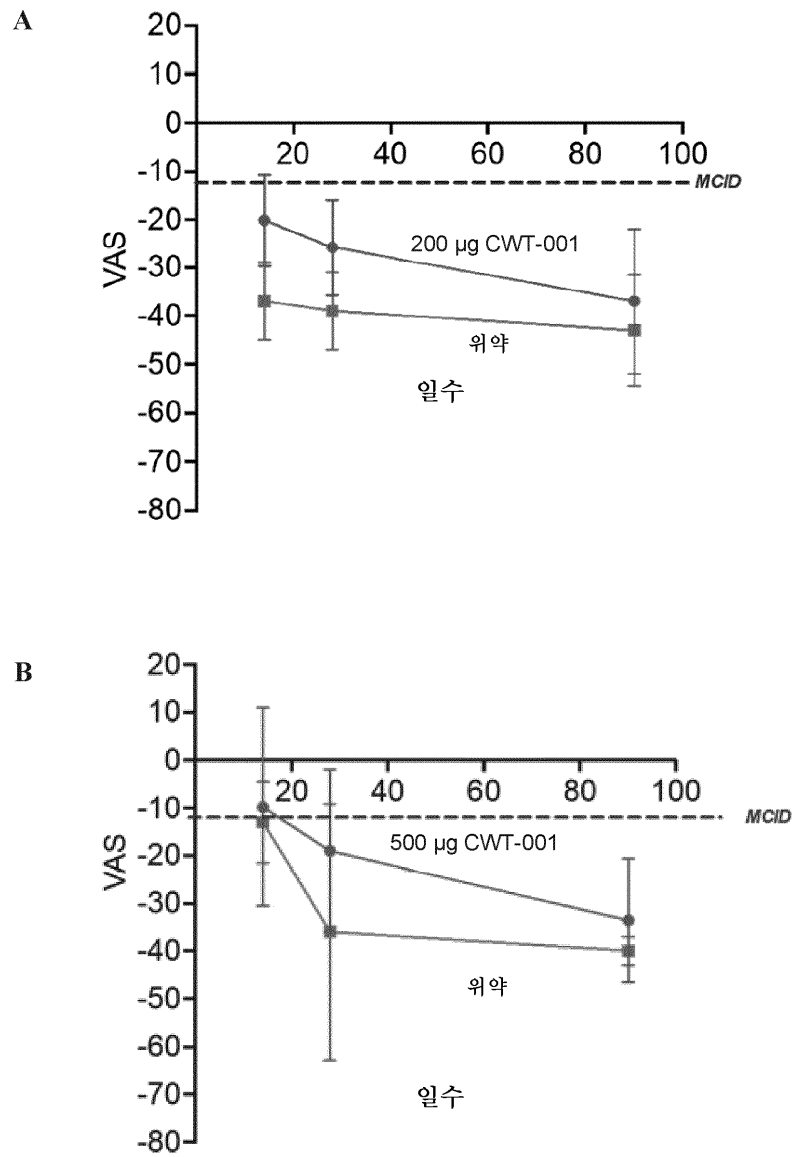
A



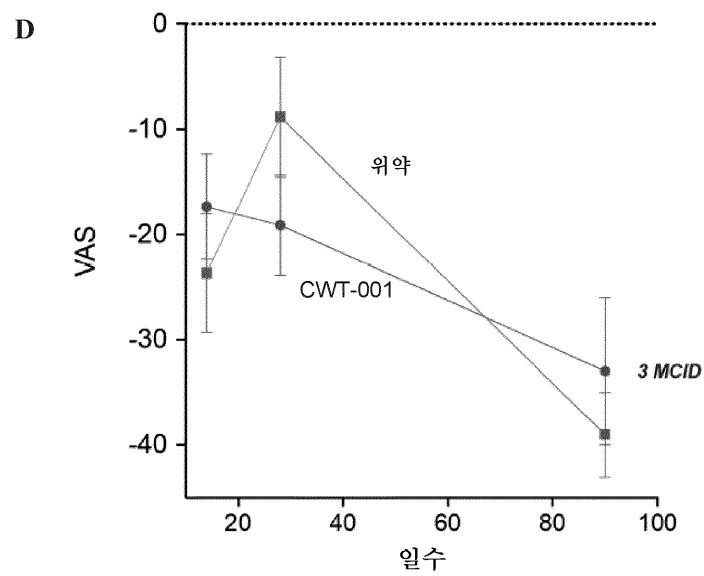
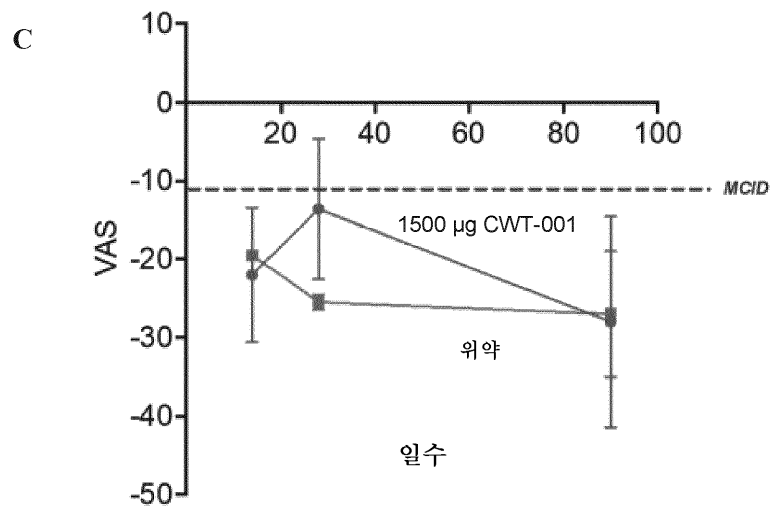
B



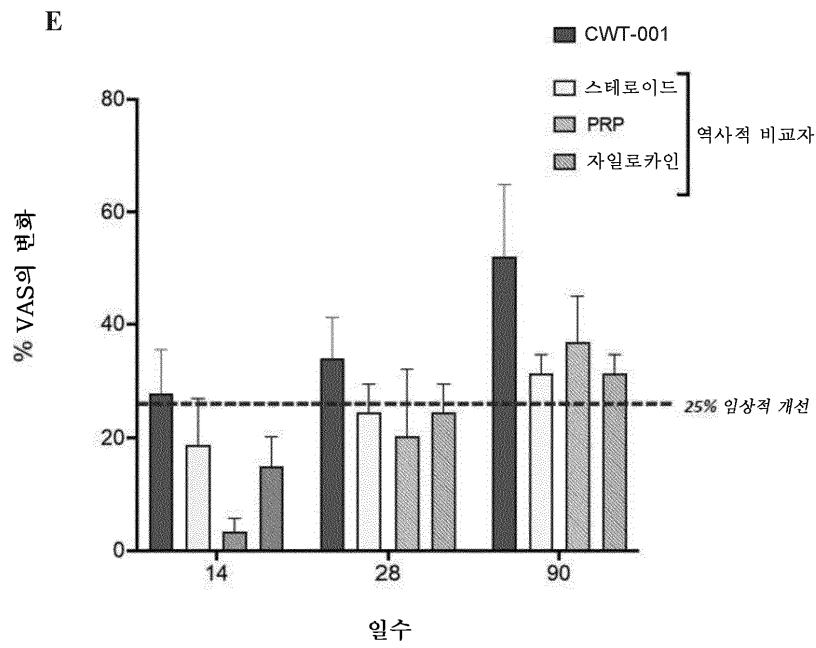
도면17i



도면17ii

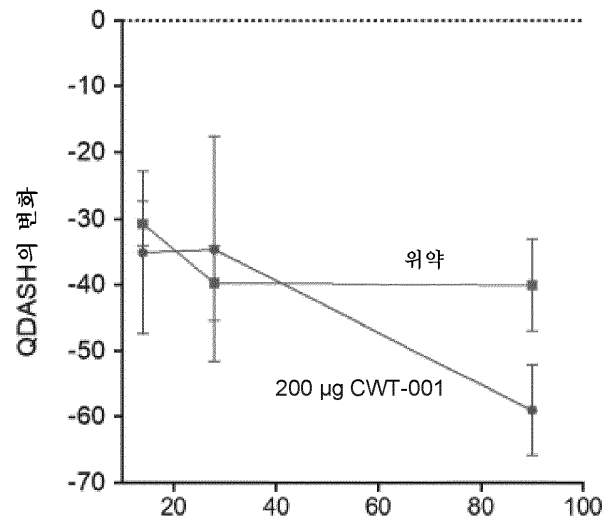


도면17iii

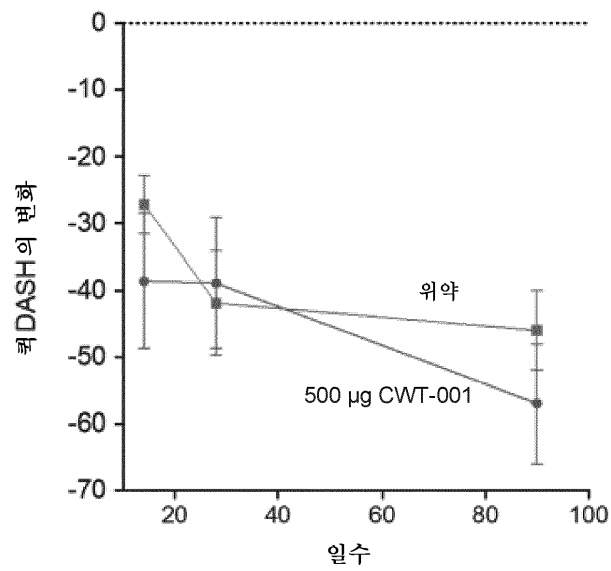


도면18i

A

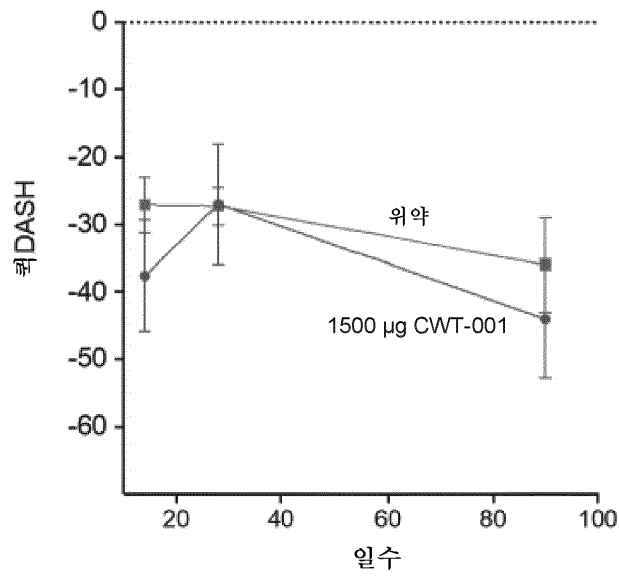


B

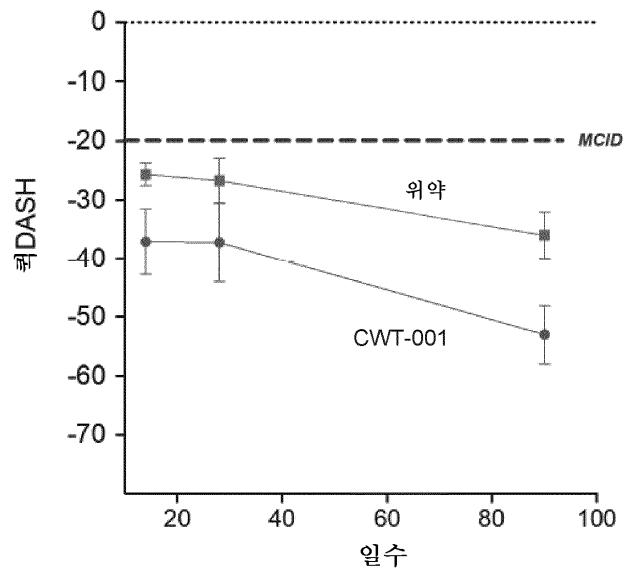


도면18ii

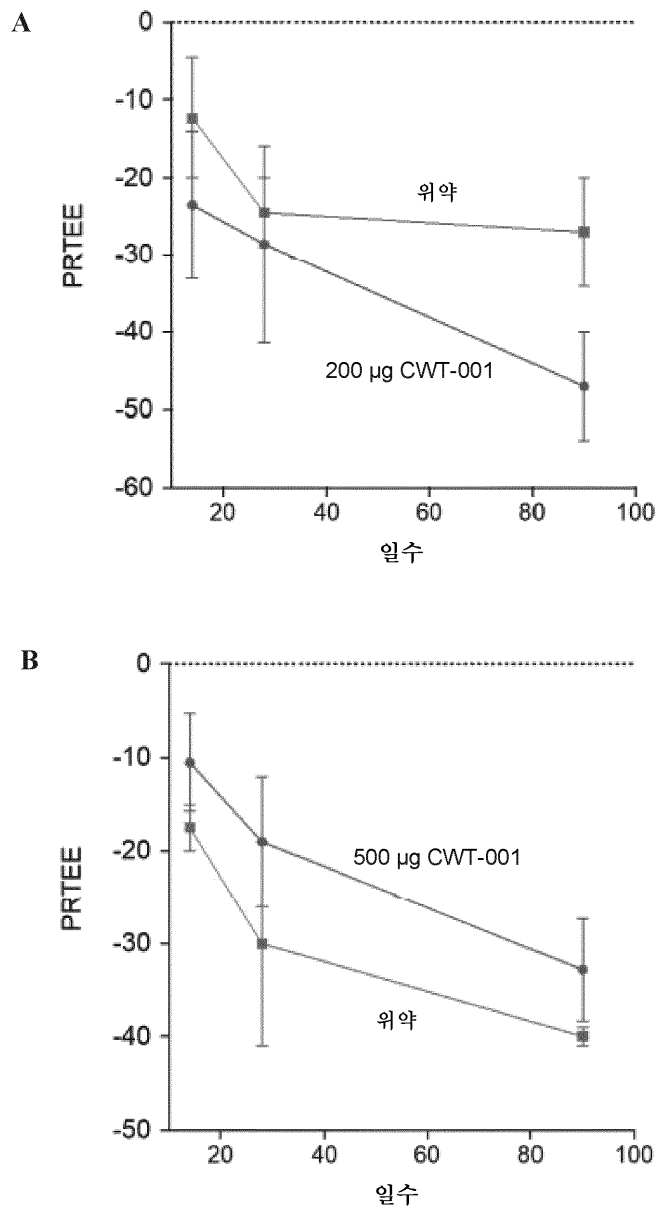
C



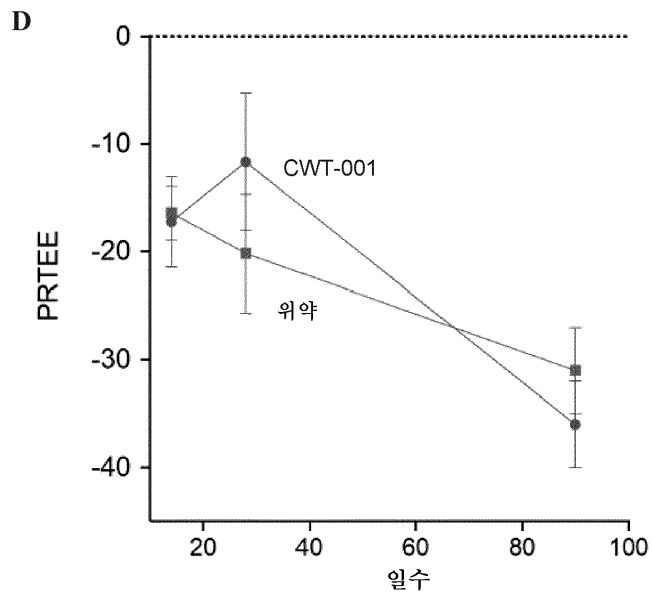
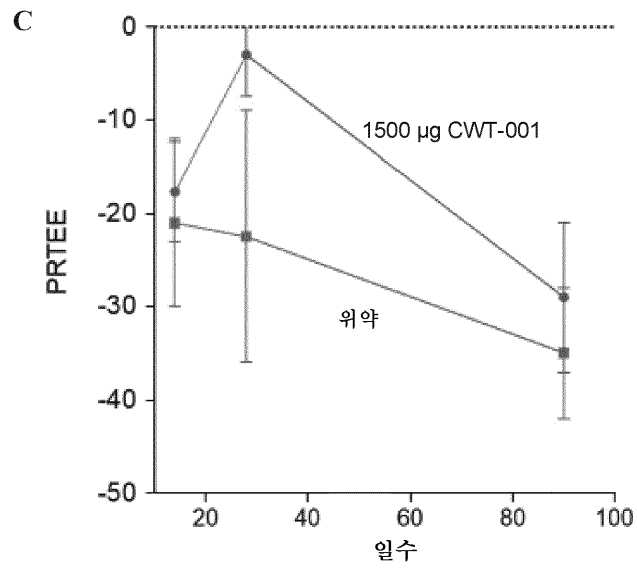
D



도면19i



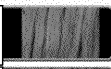
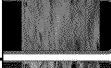
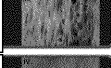
도면19ii



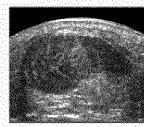
도면20i

A

UTC 생태형 & 조직 특징규명

I. 무손상의 정렬된 다발	
II. 단속적인 팽윤된 웨이브 다발	
III. 주로 원섬유 매트릭스	
IV. 주로 무정형 매트릭스	

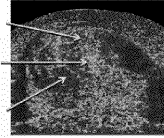
조직 특징규명



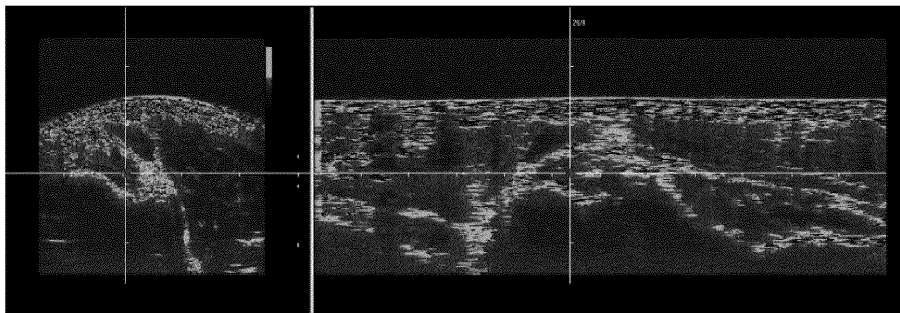
섬유중

정상

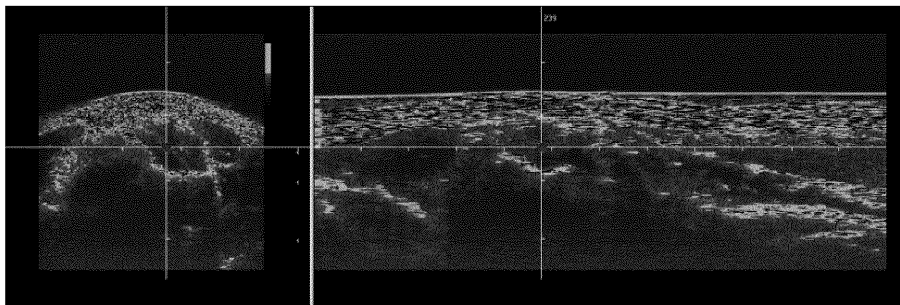
퇴행



B

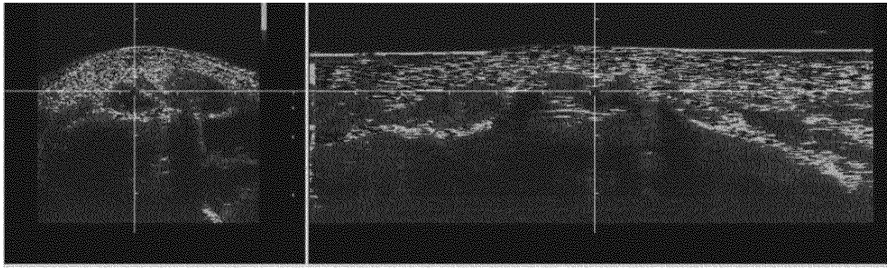


C

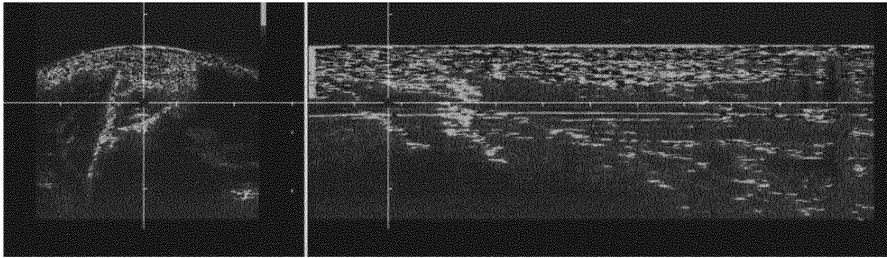


도면20ii

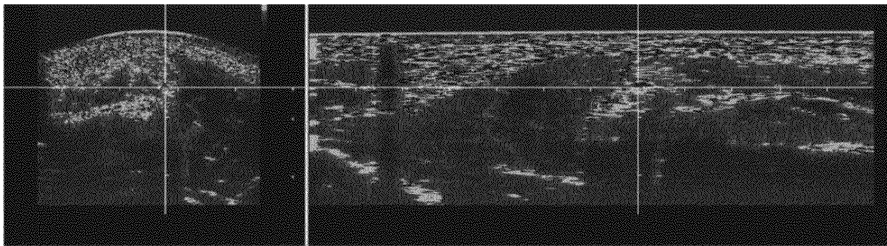
D



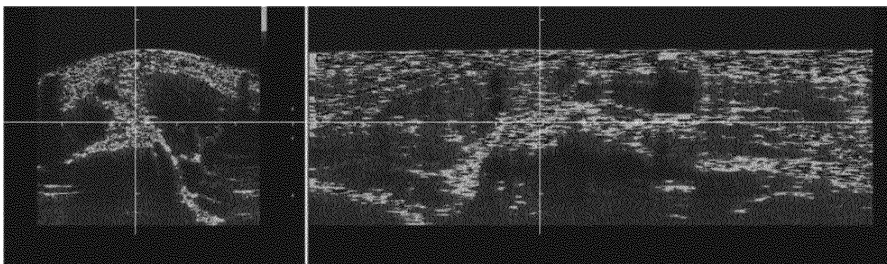
E



F

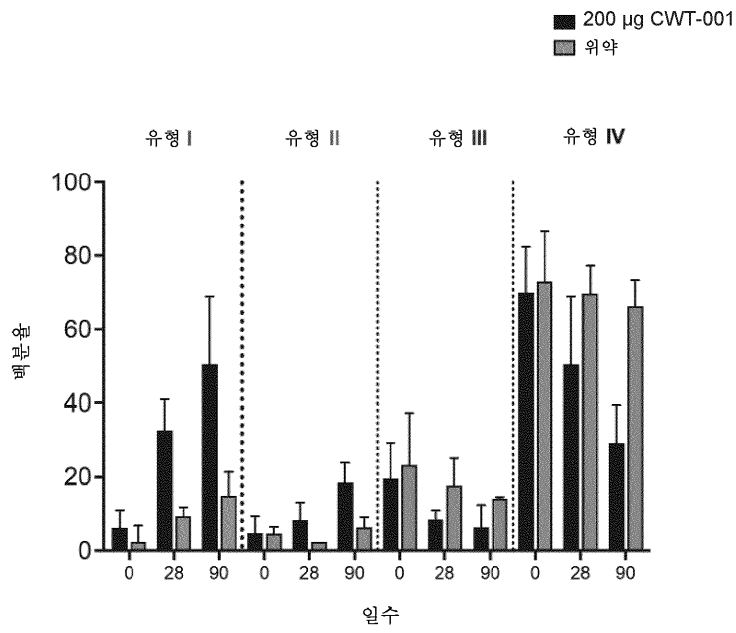


G

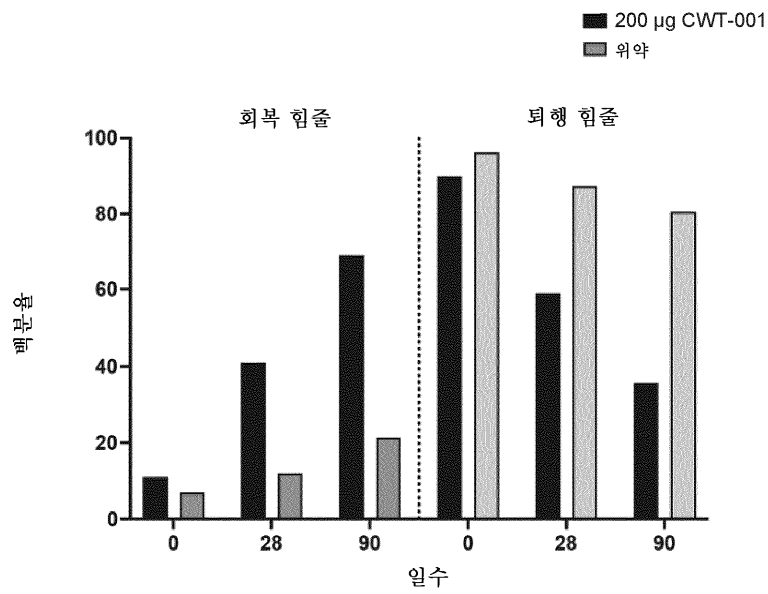


도면20iii

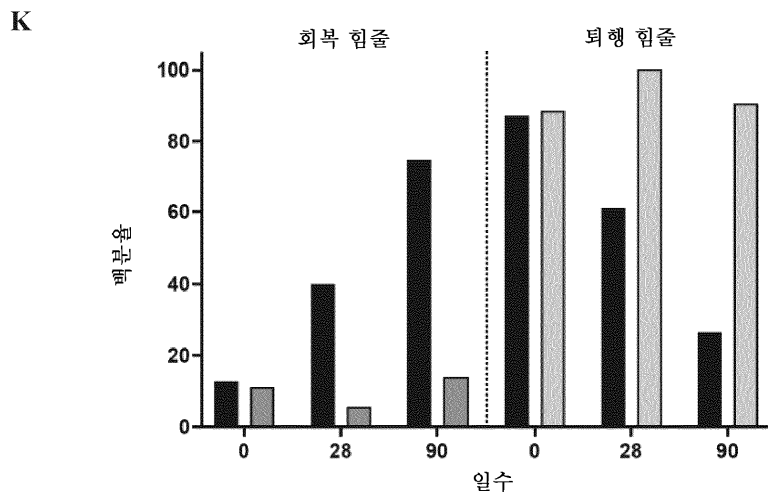
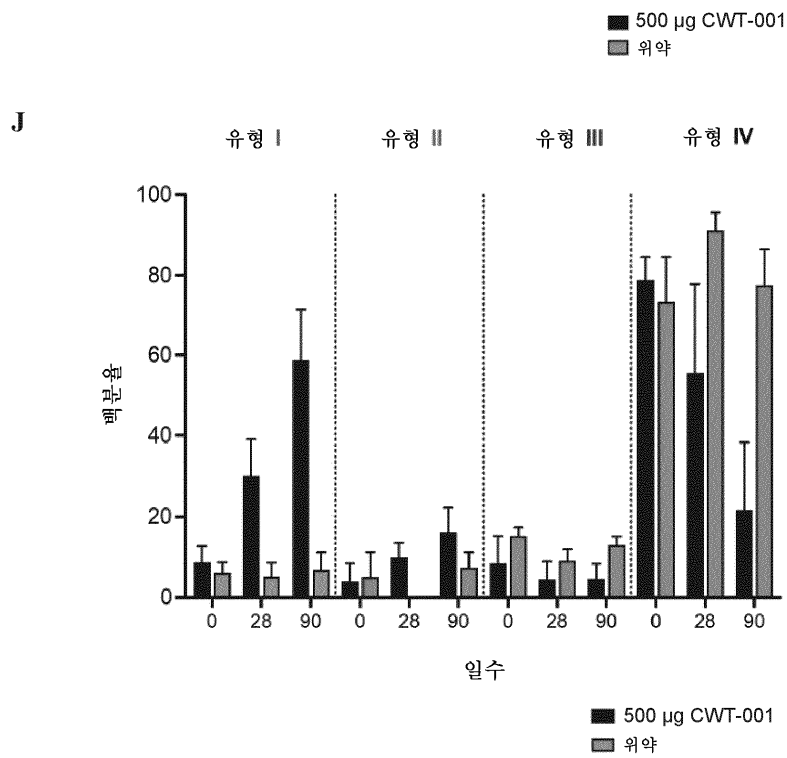
H



I

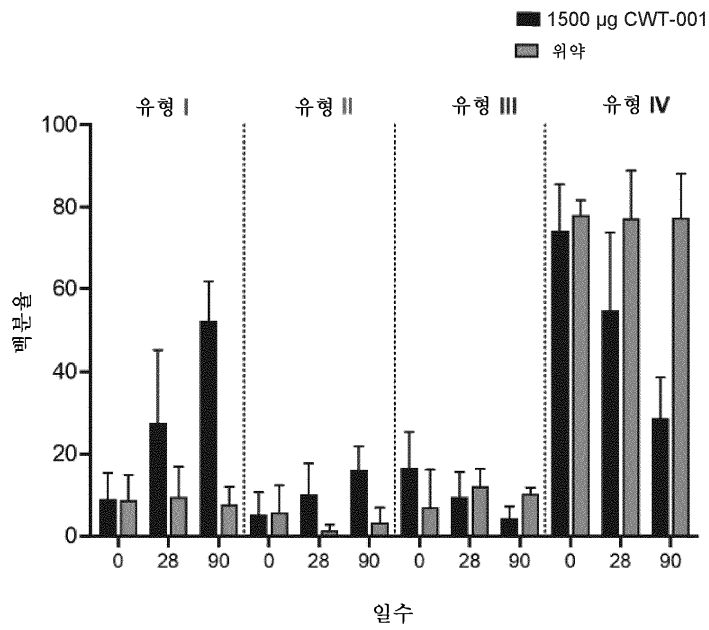


도면20iv

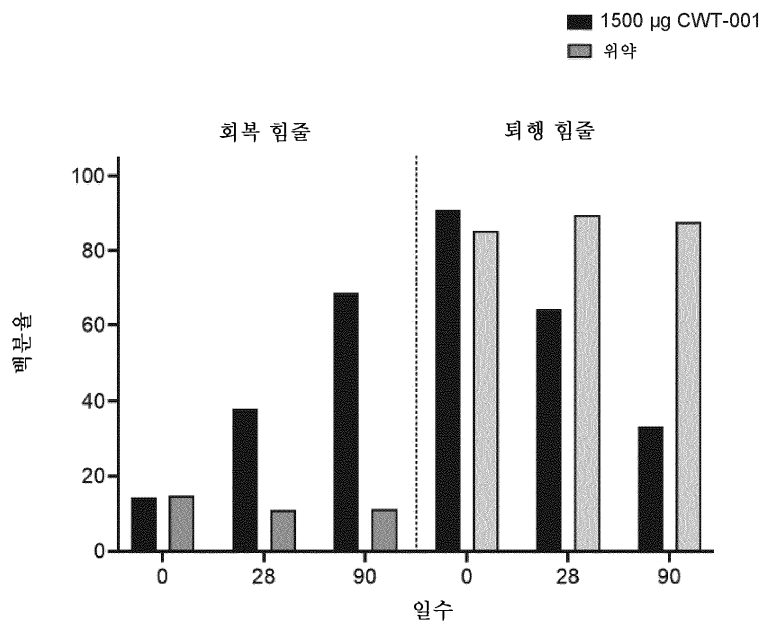


도면20v

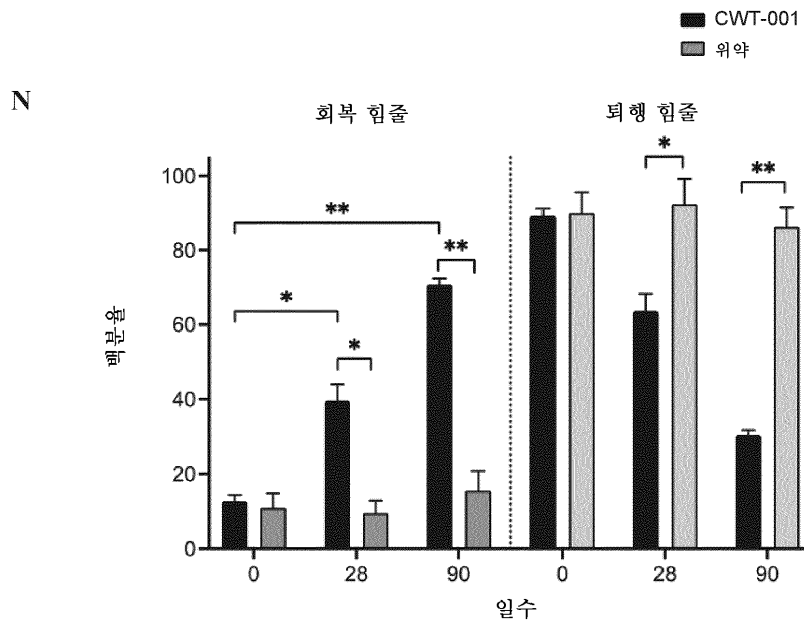
L



M



도면20vi



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Causeway Therapeutics Limited
- <120> MicroRNA-29 Compounds, Compositions and Uses In Therapy
- <130> P076689W0
- <140> Not yet assigned
- <141> 2021-10-25
- <150> GB 2016863.9
- <151> 2020-10-23
- <160> 8
- <170> SeqWin2010, version 1.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> guide strand
- <400> 1
- uagcaccauc ugaaaucggg ua
- <210> 2
- <211> 22
- <212> RNA

22

<213> Artificial Sequence

<220><223> passenger strand

<400> 2

acugauuucu uuugguguuc ag 22

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> passenger strand

<400> 3

acugauuucu uuugguguuc a 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> passenger strand

<400> 4

accgauuuca auuggugcua g 21

<210> 5

<211> 21

<212>

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> passenger strand

<400> 5

accgauuuca gauggugcua g 21

<210> 6

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> passenger strand

<400> 6

accgauuuca gauggugcua 20

<210> 7

<211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> passenger strand
 <400> 7
 gacuuguggu uuucuuuagu ca 22

<210> 8
 <211> 7
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> seed sequence
 <400> 8
 agcacca 7