



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/713 (2019.08); A61K 31/7105 (2019.08); A61K 9/007 (2019.08); A61K 9/0073 (2019.08); A61K 9/0075 (2019.08); A61K 9/0078 (2019.08); C12N 15/113 (2019.08); C12N 2310/113 (2019.08); C12N 2310/141 (2019.08); C12N 2310/315 (2019.08); C12N 2310/3231 (2019.08); C12N 2310/343 (2019.08); C12N 2310/346 (2019.08); C12N 2320/51 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2017111775, 08.09.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.09.2015Дата регистрации:
29.01.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
08.09.2014 US 62/047,562

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2018 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 29.01.2020 Бюл. № 4

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.04.2017(86) Заявка РСТ:
US 2015/049018 (08.09.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/040373 (17.03.2016)Адрес для переписки:
123242, Москва, Кудринская пл., 1, а/я 35,
"Михайлук, Сороколат и партнеры-патентные
помощники"

(72) Автор(ы):

МОНТГОМЕРИ Расти Л. (US),
ДЭЛБИ Кристина (US),
ВАН РОЙ Ева (US),
ГАЛЛАНТ-БЕМ Корри (US)

(73) Патентообладатель(и):

МИРАГЕН ТЕРАПЕУТИКС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20100184209 A1, 22.07.2010. EP
2371370 A1, 05.10.2011. US 20130261169 A1,
03.10.2013. EP 3159410 A2, 26.04.2017. EA 20335
B1, 30.10.2014. Коробов Г.А., Сазонова М.А.,
Собенин И.А., Постнов А.Ю. "Ишемическая
болезнь сердца: регулирование с помощью
микроРНК", Кардиологический вестник, 2011,
6(2), стр. 5-9.C2
2712511

RU

2712511

C2

(54) МИМЕТИКИ MIR-29 И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описана группа изобретений, включающая соединение, представляющее миметик miR-29, фармацевтическую композицию для модулирования miR-29, содержащую вышеуказанное соединение, способ регуляции гена внеклеточного матрикса в клетке, включающий приведение клетки в контакт с вышеуказанным соединением, способ лечения

или предупреждения фиброза ткани у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту вышеуказанного соединения или фармацевтической композиции, способ оценки эффективности лечения соединением, включающий определение уровня экспрессии одного или более генов в клетках или фиброзной ткани субъекта до лечения соединением. Изобретение расширяет арсенал средств,

Р У 2 7 1 2 5 1 1 С 2

представляющих собой миметики miR-29. 5 н. и 18 з.п. ф-лы, 14 ил., 5 табл., 7 пр.

Р У 2 7 1 2 5 1 1 С 2

R U 2 7 1 1 2 5 1 1 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 712 511⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 31/70 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/713 (2019.08); A61K 31/7105 (2019.08); A61K 9/007 (2019.08); A61K 9/0073 (2019.08); A61K 9/0075 (2019.08); A61K 9/0078 (2019.08); C12N 15/113 (2019.08); C12N 2310/113 (2019.08); C12N 2310/141 (2019.08); C12N 2310/315 (2019.08); C12N 2310/3231 (2019.08); C12N 2310/343 (2019.08); C12N 2310/346 (2019.08); C12N 2320/51 (2019.08)

(21)(22) Application: 2017111775, 08.09.2015

(24) Effective date for property rights:
08.09.2015

Registration date:
29.01.2020

Priority:

(30) Convention priority:
08.09.2014 US 62/047,562

(43) Application published: 10.10.2018 Bull. № 28

(45) Date of publication: 29.01.2020 Bull. № 4

(85) Commencement of national phase: 10.04.2017

(86) PCT application:
US 2015/049018 (08.09.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/040373 (17.03.2016)

Mail address:
123242, Moskva, Kudrinskaya pl., 1, a/ya 35,
"Mikhajlyuk, Sorokolat i partnery-patentnye
poverennye"

(72) Inventor(s):

MONTGOMERY, Rusty L. (US),
DALBY, Christina (US),
VAN ROOIJ, Eva (US),
GALLANT-BEHM, Corrie (US)

(73) Proprietor(s):

MIRAGEN THERAPEUTICS, INC. (US)

(54) MIR-29 MIMETICS AND WAYS OF USE THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. Described is a group of inventions comprising a compound which is a miR-29 mimetic, a miR-29 modulating pharmaceutical composition containing said compound, a method of regulating an extracellular matrix gene in a cell, comprising bringing the cell into contact with said compound, method for treating or preventing tissue fibrosis in a subject in need

thereof comprising administering to said subject a compound or pharmaceutical composition, a method of assessing the effectiveness of treating a compound, including determining the level of expression of one or more genes in cells or fibrous tissue of a subject prior to treatment with a compound.

EFFECT: invention extends the range of agents, which are miR-29 mimetics.

23 cl, 14 dwg, 5 tbl, 7 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/047562, поданной 8 сентября 2014 г., содержание которой включено в данный документ с помощью ссылки во всей своей полноте.

5 ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[002] Настоящее изобретение относится к синтетическим миметикам miRNA или promiR, которые повышают активность miRNA *in vivo*. В частности, настоящее изобретение относится к миметикам miR-29 и их применению для уменьшения отложения коллагена и проявления связанных состояний, таких как фиброз.

10 ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[003] На основании данных о приобретении или потере функции, полученных в анализах на животных моделях заболеваний с применением генетического или фармакологического модулирования микроРНК (miRNA), в настоящее время общепринято, что miRNA играют важную роль при заболевании. Эти исследования 15 наряду с недавними данными о положительной клинической эффективности (Janssen et al, 2013) подчеркивают актуальность miRNA и целесообразность того, чтобы miRNA стали следующим классом терапевтических средств. Более того, miRNA обладают некоторыми преимуществами в качестве аспектов терапевтического воздействия в том плане, что они являются небольшими и содержат известную последовательность. Кроме 20 того, поскольку одна miRNA может осуществлять регуляцию регулировать в отношении нескольких целевых мРНК в биологических сигнальных путях, то модулирование miRNA теоретически предусматривает влияние на всю генную сеть и модификацию сложных фенотипов заболеваний (van Rooij & Olson, 2012).

[004] Несмотря на то, что многие исследования показали терапевтическую

25 эффективность применения ингибиторов одноцепочечной miRNA, называемых анти-miR, попытки восстановить или усилить функцию miRNA не завершились успехом (van Rooij et al, 2012). В настоящее время функция miRNA может быть усиlena либо при помощи сверхэкспрессии вирусами, либо при помощи синтетических двунитевых miRNA. На сегодняшний день применение адено-ассоциированных вирусов (AAV) с целью 30 управления экспрессией определенной miRNA для восстановления своей активности *in vivo* оказалось эффективным в мышиной модели гепатоцеллюлярной карциномы и карциномы легкого (Kasinski & Slack, 2012; Kota et al, 2009), а также спино-бульбарной мышечной атрофии (Miyazaki et al, 2012), в то время как применение подходов на основе синтетических олигонуклеотидов в чистом виде с целью повышения уровней miRNA 35 изучено не было.

[005] Семейство микроРНК-29 (miR-29) хорошо изучено в связи с их способностью осуществлять регуляцию в отношении белков внеклеточного матрикса (He et al, 2013). Это семейство состоит из miR-29a, -29b и -29c, которые экспрессируются в виде двух бицистронных кластеров (miR-29a/-29b-1 и miR-29b-2/-29c) и являются в значительной 40 степени гомологичными в отношении последовательности, при этом имеют место только несколько несоответствующих оснований между разными членами в 3'-областях зрелой miRNA (van Rooij et al, 2008). Содержание всех трех членов снижено при различных типах фиброза тканей, и терапевтический эффект повышения уровней miR-29 был показан для склероза сердца (van Rooij et al, 2008), почек (Qin et al, 2011; Wang et al, 2012; Xiao et al, 2012), печени (Roderburg et al, 2011; Sekiya et al, 2011; Zhang et al, 45 2012), легких (Cushing et al, 2011; Xiao et al, 2012) и системного склероза (Maurer et al, 2010).

[006] В данной области техники существует потребность в синтетических

олигонуклеотидных миметиках miR-29, которые могут эффективно повышать активность miR-29 *in vivo*. Такие миметики miR-29 или promiR miR-29 пригодны для лечения различных состояний, связанных с фиброзом тканей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 [007] Настоящее изобретение частично основано на открытии того факта, что миметики miRNA с модификациями в отношении стабильности и клеточного захвата можно применять для воспроизведения эндогенных функций miR-29. Например, терапевтическое воздействие миметиком miR-29b на фоне фиброза легких восстанавливает индуцированное блеомицином снижение miR-29 и препятствует 10 развитию и способствует устраниению фиброза легких, что совпадает с подавлением целевых генов miR-29, которые индуцируются в ходе патологического процесса. Аналогично лечение кожных разрезов миметиком miR-29b обеспечивает подавление экспрессии генов внеклеточного матрикса и других генов, вовлеченных в фиброзный процесс. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает соединения, 15 представляющие собой миметики miR-29 на основе двунитевой РНК.

[008] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение, представляющее собой миметик miR-29, содержит (a) первую нить из от приблизительно 23 до приблизительно 26 рибонуклеотидов, содержащую последовательность зрелой miR-29a, miR-29b или miR-29c; и (b) вторую нить из от приблизительно 22 до приблизительно 20 23 рибонуклеотидов, содержащую последовательность, которая практически комплементарна первой нити, при этом первая нить содержит 3'-нуклеотидный выступающий конец по сравнению со второй нитью. Согласно определенным вариантам осуществления первая нить и вторая нить содержат один или более модифицированных нуклеотидов. Модифицированные нуклеотиды могут содержать сахар с 2'-модификациями, такими как 2'-алкил (2'-О-метил) или 2'-фтор. Согласно одному варианту осуществления первая нить предусматривает одну или более 2'-фтор модификаций. Согласно другому варианту осуществления вторая нить предусматривает одну или более 2'-О-метил модификаций. Согласно некоторым вариантам осуществления вторая нить имеет одно, два, три или более несоответствующих оснований по сравнению 30 с первой нитью. Согласно одному варианту осуществления вторая нить соединения, представляющего собой миметик miR-29, содержит несоответствующие основания в положениях 4, 13 и/или 16 от 3'-конца (второй нити) по сравнению с первой нитью.

[009] Согласно одному варианту осуществления вторая нить соединения, представляющего собой миметик miR-29, связана с молекулой холестерина на своем 3'-конце. Согласно определенным вариантам осуществления молекула холестерина связана со второй нитью при помощи линкера по меньшей мере из шести атомов углерода. Линкер может представлять собой расщепляемый линкер.

[0010] Согласно одному варианту осуществления нуклеотиды, образующие 3'-выступающий конец в первой нити, связаны при помощи фосфотиоатных связей.

40 [0011] Согласно одному варианту осуществления соединение, представляющее собой миметик miR-29, содержит первую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 27, и вторую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 5.

[0012] Согласно другому варианту осуществления соединение, представляющее собой миметик miR-29, содержит первую нить, содержащую последовательность под 45 SEQ ID NO: 19, и вторую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 1.

[0013] Согласно еще одному варианту осуществления соединение, представляющее собой миметик miR-29, содержит первую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 19, и вторую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 15.

[0014] Согласно еще одному варианту осуществления соединение, представляющее собой миметик miR-29, содержит первую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 33, и вторую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 1.

[0015] Согласно еще одному варианту осуществления соединение, представляющее собой миметик miR-29, содержит первую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 34, и вторую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 1.

[0016] Согласно еще одному варианту осуществления соединение, представляющее собой миметик miR-29, содержит первую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 35, и вторую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 24.

[0017] Настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую эффективное количество соединений, представляющих собой миметики miR-29, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемой соли, а также фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Согласно определенным вариантам осуществления фармацевтическая композиция составлена для ингаляционной, назальной, интраназальной или глазной доставки и может находиться в форме порошков, водных растворов, водных аэрозолей, назальных капель, аэрозолей и/или глазных капель. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят при помощи ингаляционной системы, такой как небулайзер, дозирующий ингалятор, ингалятор сухого порошка или ингалятор типа soft mist.

[0018] Настоящее изобретение также включает способ осуществления регуляции в отношении гена внеклеточного матрикса в клетке, предусматривающий приведение клетки в контакт с соединениями, представляющими собой миметики miR-29, описанными в данном документе. Согласно одному варианту осуществления экспрессия или активность гена внеклеточного матрикса снижается после контакта с соединением, представляющим собой миметик, или композицией на основе миметика miR-29. Согласно некоторым вариантам осуществления геном белка внеклеточного матрикса является ген коллагена, такой как Col1a1 и Col3a1. Клетка может находиться *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

[0019] Настоящее изобретение предусматривает способ лечения или предупреждения фиброза ткани у нуждающегося в этом субъекта. Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает введение субъекту соединения, представляющего собой миметик miR-29, описанного в данном документе. Согласно определенным вариантам осуществления фиброз ткани представляет собой фиброз миокарда, фиброз легких, почечный фиброз, фиброз печени, фиброз глаз, фиброз кожи, в том числе гипертрофические рубцы и келоиды, фиброз рук, суставов и сухожилий, болезнь Пейрони или склеродермию. Согласно одному варианту осуществления фиброз ткани представляет собой пневмофиброз (IPF).

[0020] Согласно определенным вариантам осуществления способ лечения или предупреждения фиброза ткани предусматривает введение соединения, представляющего собой миметик, или композиции на основе миметика miR-29, описанных в данном документе, ингаляционным, назальным или интраназальным путем. Согласно одному варианту осуществления соединение, представляющее собой миметик, или композиция на основе миметика miR-29 доставляется при помощи ингаляции.

[0021] Настоящее изобретение также предусматривает способ осуществления регуляции в отношении генов, не относящихся к генам внеклеточного матрикса, в клетке, включающий приведение клетки в контакт с соединениями, представляющими собой миметики miR-29, описанными в данном документе. Согласно одному варианту осуществления экспрессия или активность гена, не относящегося к гену внеклеточного

матрикса, повышается после контакта с соединением, представляющим собой миметик, или композицией на основе миметика miR-29. Согласно некоторым вариантам осуществления геном, не относящимся к гену внеклеточного матрикса, является ген, такой как *Itga3* или *Numb*. Клетка может находиться *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

5 [0022] Настоящее изобретение также предусматривает способ оценки эффективности лечения агонистом miR-29 или антагонистом miR-29, при этом способ включает определение уровня экспрессии одного или более генов в клетках или фиброзной ткани субъекта до лечения агонистом miR-29 или антагонистом miR-29, где один или более генов выбраны из набора генов, модулируемых miR-29; определение уровня экспрессии 10 одного или более генов в клетках/фиброзной ткани субъекта после лечения агонистом miR-29 или антагонистом miR-29; и определение того, является ли лечение эффективным, менее эффективным или неэффективным на основании уровней экспрессии до и после лечения. Согласно одному варианту осуществления один или более генов, модулируемых miR-29, выбраны из таблицы 5.

15 **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

20 [0023] **ФИГ. 1А.** В конструкции двунитевых миметиков miR-29 содержится "направляющая нить", или "антисмысловая нить", которая идентична miR-29b с выступающим концом UU на 3' конце, модифицированная с целью повышения стабильности и химически фосфорилированная на 5'-конце, и "сопровождающая нить", или "смысловая нить", которая предусматривает 2'-О-Ме модификации с целью предупреждения включения в индуцируемый РНК комплекс сайленсинга (RISC), а также повышения стабильности, и она связана с холестерином для усиленного клеточного поглощения. В смысловую нить введены несколько несоответствующих оснований с целью предотвращения функционирования в качестве анти-miR.

25 [0024] **ФИГ. 1В.** Эксперименты с трансфекцией в NIH 3T3 показывают дозозависимое снижение Col1a1, при этом количество миметика miR-29b повышается по сравнению либо с необработанными, либо с обработанными имитационным контролем трансфицированными клетками. В качестве положительного контроля брали siRNA, непосредственно направленную на Col1a1. * p<0,05 по сравнению с имитационным 30 контролем, # p<0,05 по сравнению с необработанными клетками.

35 [0025] **ФИГ. 1С.** Нозерн-блот анализ miR-29b в различных тканях через 4 дня после внутривенной инъекции 10, 50, 100 или 125 мг/кг миметика miR-29b свидетельствует о доставке во все ткани при максимальной дозе, при этом наиболее эффективная доставка происходит в легкие и селезенку по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор. U6 применяли в качестве контроля нагрузки.

40 [0026] **ФИГ. 1Д.** Количественное определение имитирования miR-29b в режиме реального времени свидетельствует о повышенном уровне miR-29b при более высоких уровнях доз, при этом наиболее эффективная доставка происходит в легкие и селезенку (n=4 на группу). *p<0,05 по сравнению с животными, которым вводили физиологический раствор.

[0027] **ФИГ. 1Е.** Нозерн-блот анализ miR-29b в различных тканях через 1, 2, 4 и 7 дней после внутривенной инъекции 125 мг/кг миметика свидетельствует о наличии миметика miR-29b во всех исследуемых тканях, с более длительным обнаружении в легком и селезенке. U6 применяли в качестве контроля нагрузки.

45 [0028] **ФИГ. 1F.** Количественное определение имитирования miR-29b в режиме реального времени свидетельствует о повышенном уровне miR-29b во всех исследуемых тканях, который сохраняется дольше всего в легких и селезенке (n=4 на группу). *p<0,05 по сравнению с животными, которым вводили физиологический раствор.

[0029] **ФИГ. 2А.** ПЦР-анализ в режиме реального времени свидетельствует о снижении содержания всех членов семейства miR-29 в ответ на блеомицин, при этом обработка миметиком miR-29 приводила к повышенному обнаружению уровней miR-29b либо по сравнению с контрольными животными, либо по сравнению с животными, которым 5 вводили физиологический раствор. * $p<0,05$ по сравнению с физиологическим раствором/физиологическим раствором.

[0030] **ФИГ. 2В.** ПЦР-анализ в режиме реального времени свидетельствовал о сопоставимом снижении уровней miR-29 при биопсии легких пациентов с пневмофиброзом (IPF) по сравнению с нормальными контролями. * $p<0,05$ по сравнению 10 с нормой.

[0031] **ФИГ. 2С.** Гистологическое исследование при помощи окрашивания трихромом демонстрирует наличие выраженной фиброзной и воспалительной реакции в ответ на блеомицин, которая ослаблялась при обработке миметиком miR-29b. Масштабная линейка соответствует 100 мкм.

[0032] **ФИГ. 2Д.** Измерения гидроксипролина для анализа общего содержания коллагена показали значимое повышение после обработки блеомицином как в группе, получавшей физиологический раствор, так и в контрольной группе, при этом статистическая разница в группе с обработкой миметиком miR-29 отсутствовала у мышей, обрабатываемых физиологическим раствором и блеомицином.

[0033] **ФИГ. 2Е-Г.** Измерения цитокинов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (BAL) свидетельствовали о значительно более высоких концентрациях IL-12, IL-4 и G-CSF, обнаруживаемых в жидкостях BAL из легких мышей, обработанных блеомицином, которые были снижены при обработке миметиком miR-29b. (n=4), * $p<0,05$.

[0034] **ФИГ. 2Н.** Обработка блеомицином повышает обнаружение иммунных клеток в жидкостях BAL, которое значимо снижалось в присутствии миметика miR-29b, при этом контрольный миметик влияния не оказывал. (n=4), * $p<0,05$ по сравнению с физиологическим раствором/блеомицином, ^ $p<0,05$ по сравнению с контролем/блеомицином.

[0035] **ФИГ. 3А-В.** Обработка блеомицином обеспечивает повышение экспрессии Col1a1 и Col3a1, а присутствие миметика miR-29b ингибирует Col1a1 и Col3a1, как было измерено при помощи ПЦР в режиме реального времени. Имитирование MiR-29b не оказывало влияния на целевую репрессию при исходных условиях. (n=6-8), * $p<0,05$.

[0036] **ФИГ. 3С.** Уровни IGF1 в жидкостях BAL повышаются после обработки блеомицином, но значимо снижаются в присутствии миметика miR-29, по сравнению с мышами, обработанными как физиологическим раствором, так и контрольным миметиком. (n=4), * $p<0,05$.

[0037] **ФИГ. 3Д.** Иммуногистохимический анализ продемонстрировал устойчивое обнаружение IGF1 после обработки блеомицином, которое было снижено в группе с обработкой miR-29b, по сравнению с мышами, обработанными физиологическим раствором или контрольным миметиком. Масштабная линейка соответствует 50 мкм.

[0038] **ФИГ. 4А.** Оценка гидроксипролина показала значимое повышение после обработки блеомицином как в группе с обработкой физиологическим раствором, так и в контрольной группе, однако статистическая разница в группе с обработкой миметиком miR-29 отсутствовала у мышей, обрабатываемых физиологическим раствором и блеомицином. * $P<0,05$ (n=8).

[0039] **ФИГ. 4В-С.** ПЦР-анализ Col1a1 (В) и Col3a1 (С) в режиме реального времени показал значимое повышение при обработке блеомицином. Обработка миметиком miR-29b обеспечивала нормализацию содержания как Col1a1, так и Col3a1 до уровней

экспрессии при обработке несущей средой. *P<0,05 (n=8).

[0040] **ФИГ. 4Д.** Гистологическое исследование при помощи окрашивания трихромом демонстрирует наличие выраженного фиброза в ответ на блеомицин, который ослаблялся при обработке миметиком miR-29b.

[0041] **ФИГ. 4Е-Ф.** Первичные фибробlastы легких от пациентов с IPF были обработаны несущей средой или TGF-β и трансфицированы при помощи контрольного миметика или миметика miR-29b. Осуществляли ПЦР для Col1a1 (Е) и Col3a1 (F) в режиме реального времени. Обработка миметиком miR-29b продемонстрировала дозозависимое снижение обоих коллагенов.

[0042] **ФИГ. 4G-Н.** Клетки А549 были обработаны несущей средой или TGF-β и трансфицированы при помощи контрольного миметика или миметика miR-29b. Осуществляли ПЦР для Col1a1 (G) и Col3a1 (H) в режиме реального времени. Обработка миметиком miR-29b продемонстрировала дозозависимое снижение экспрессии как Col1a1, так и Col3a1.

[0043] **ФИГ. 5.** Миметик miR-29b не вызывает общих симптомов токсичности. Обработка миметиком miR-29b не вызывает каких-либо симптомов печеночной или почечной токсичности, о чем свидетельствует отсутствие изменения количества аспартат- или аланинглутаминаз (AST и ALT). n=4 на группу.

[0044] **ФИГ. 6.** Возрастающие дозы миметика miR-29b не вызывают явных изменений экспрессии генов в исходных условиях. Результаты ПЦР-анализа в режиме реального времени свидетельствуют об отсутствии значимых изменений экспрессии Col1a1 и Col3a1 в различных тканях через 4 дня после обработки возрастающими дозами миметика miR-29b по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор. n=4 на группу, * p<0,05 по сравнению с вводимым физиологическим раствором.

[0045] **ФИГ. 7.** Миметик miR-29b специфическим образом повышает miR-29b. Имитирование miR-29b специфически повышает уровень miR-29b без влияния на уровень miR-29a или miR-29c по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор. Повышение miR-29c в день 1 может происходить вследствие некоторой перекрестной реактивности с зондом в режиме реального времени. n=4 на группу.

[0046] **ФИГ. 8.** Миметик miR-29b не вызывает каких-либо целевых изменений в исходных условиях. Результаты ПЦР-анализа в режиме реального времени свидетельствовали об отсутствии значимых целевых изменений для Col1a1 и Col3a1 в указанные моменты времени после инъекции 125 мг/кг миметика miR-29b по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор. n=4 на группу.

[0047] **ФИГ. 9.** Миметик miR-29b влияет на экспрессию генов в клетках RAW. Результаты ПЦР-анализа в режиме реального времени показали значимое повышение экспрессии Csf3, Igf1 и Kc после обработки миметиком miR-29b по сравнению с несущей средой или контрольным миметиком. * p<0,05 по сравнению с вводимой несущей средой.

[0048] **ФИГ. 10А.** Влияние имитатора miR29b и анти-miR на экспрессию генов в коже мышей. Представлена тепловая карта данных микроматрицы, где гены с повышенным уровнем экспрессии показаны красным и гены с пониженным уровнем экспрессии показаны синим, а интенсивность цвета указывает на кратность изменения относительно PBS в качестве контроля. Верхняя часть тепловой карты (прямоугольник с мелкой штриховкой) содержит гены, репрессированные при обработке миметиком miR-29b и экспрессия которых повышалась при обработке анти-miR-29, а нижняя часть тепловой карты (прямоугольник с крупной штриховкой) содержит гены, экспрессия которых повышалась при обработке миметиком miR-29b, и которые были репрессированы при обработке анти-miR-29. Все значения кратности изменения и значимости представлены

в таблице 5.

[0049] **ФИГ. 10В.** Влияние миметика miR29b и анти-miR на экспрессию генов в коже мышей. Представлены результаты анализа DAVID (NCBI) функциональных терминов, которые обогащены в двух группах, показанные на ФИГ. 10А. Термины согласно

5 «генной онтологии» (GO) группы внеклеточного матрикса, функции (кожи), адгезии/ передачи сигналов в клетке и клеточной дифференцировки/апоптоза представляют собой самые распространенные отрицательно регулируемые пути после обработки миметиком miR-29b, а структура клеток (ядер) и процессинг РНК представляют собой самые распространенные положительно регулируемые пути после обработки миметиком 10 miR-29b. Микроматричный анализ кожи и глубоких кожных ран у мышей C57BL/6 показал наличие реципрокной регуляции в отношении 228 генов с помощью внутрикожной обработки миметиком miR-29b, содержащим SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1, и анти-miR-29 (SEQ ID NO: 36).

[0050] **ФИГ. 11А.** Количествоный ПЦР-анализ в режиме реального времени ((RT)-

15 PCR) резаных ран у мышей, обработанных миметиком miR-29b, введенным внутрикожно (SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 1) или контролем PBS. Данные представлены в виде сгруппированных столбиковых диаграмм, где первый столбик в каждой группе обработки представляет собой уровень экспрессии первого гена в перечне справа и т. д. С помощью RT-PCR было подтверждено, что гены коллагенов, другие гены 20 внеклеточного матрикса и другие прямые и непрямые целевые гены, которые, как было показано ранее, подвергались репрессии при обработке миметиком miR-29b (фигура 10а, верхняя половина тепловой карты), характеризовались дозозависимым снижением уровня экспрессии в глубоких кожных ранах при обработке миметиком miR-29b. **** p<0,0001 по сравнению с разрезами, обработанными PBS, с применением 2-факторного 25 дисперсионного анализа, где обработка и ген представляли собой два оцениваемых фактора.

[0051] **ФИГ. 11В.** Для генов, ранее идентифицированных как дерепрессированные при обработке миметиком miR-29b (фигура 10А, нижняя половина тепловой карты), с помощью количественной RT-PCR показано дозозависимое повышение уровня

30 экспрессии при обработке миметиком miR-29b. *** p<0,001 и **** p<0,0001 по сравнению с разрезами, обработанными PBS, с применением 2-факторного дисперсионного анализа, где обработка и ген представляли собой два оцениваемых фактора. Миметик miR-29b значительно влияет на экспрессию целевых генов miR-29 в острых кожных ранах.

[0052] **ФИГ. 12.** Активность миметиков miR-29 и влияние модификаций

35 нуклеотидов. Эксперименты с трансфекцией в фибробласти легких человека IMR-90 показывают, что различные миметики miR-29 характеризуются различными уровнями активности, измеряемой по репрессии экспрессии генов коллагенов. * p<0,05, *** p<0,001 и **** p<0,0001 по сравнению с трансфицированными имитационным контролем клетками, с применением 2-факторного дисперсионного анализа, где обработка и ген 40 представляли собой два оцениваемых фактора.

[0053] **ФИГ. 13.** Активность *in vivo* миметиков miR-29b с модификациями по линкерам. Мыши с резанными ранами были обработаны 20 нмоль различных миметиков miR-29b, которые отличаются только связью между холестериновым фрагментом и второй/ смысловой нитью. Активность миметиков miR-29b была определена путем измерения 45 экспрессии пяти генов синтеза коллагена.

[0054] **ФИГ. 14.** Влияние 5'-fosфорилирования на активность миметиков miR-29b.

Фибробласты кожи RAB-9 трансфицировали миметиками miR-29b с 5'-fosфорилированием с применением различных концентраций (SEQ ID NO: 2/SEQ ID

NO: 1) и без (SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 1) 5'-фосфорилирования антисмысловой нити. Активность миметиков miR-29b была определена путем измерения экспрессии трех генов синтеза коллагена.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0055] В течение последнего десятилетия значительно возрос энтузиазм в отношении терапевтических средств на основе микроРНК (miRNA). Доля ажиотажа вызвана тем фактом, что miRNA часто осуществляет регуляцию в отношении многочисленных родственных мРНК. Например, модулирование одной miRNA способствует параллельной регуляции в отношении нескольких генов, вовлеченных в развитие определенного заболевания. Несмотря на то, что многие исследования показали терапевтическую эффективность применения ингибиторов miRNA, попытки восстановить или усилить функцию miRNA не завершались успехом.

[0056] Семейство miR-29 привлекло немало внимания вследствие своей очевидной роли в развитии фиброза тканей. Это обогащение в фибробластах семейства miRNA характеризуется пониженным уровнем экспрессии при фиброзных заболеваниях, что вызывает согласованное повышение активности многих генов внеклеточного матрикса. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение синтетических дуплексов РНК может обеспечивать повышение уровней miR-29 *in vivo* в течение нескольких дней. Кроме того, терапевтическая доставка этих миметиков miR-29 при индуцированном блеомицином фиброзе легких восстанавливает эндогенную функцию miR-29, тем самым снижая уровень экспрессии коллагена и препятствуя развитию и способствуя устраниению фиброза легких. Кроме того, введение миметиков miR-29 по настоящему изобретению в кожные разрезы обеспечивает снижение экспрессии генов внеклеточного матрикса и других генов, вовлеченных в фиброзный процесс. Эти данные обосновывают целесообразность создания эффективных миметиков miRNA с целью терапевтического повышения содержания miRNA и указывают на то, что miR-29 является эффективной терапевтической miRNA для лечения различных фиброзных состояний и нарушений, вызывающих повышенную выработку коллагена. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает миметики miR-29, композиции на их основе и пути их применения.

[0057] соединение, представляющее собой миметик микроРНК по настоящему изобретению, содержит первую нить и вторую нить, где первая нить содержит последовательность зрелой miR-29a, miR-29b или miR-29c, а вторая нить содержит последовательность, которая практически комплементарна первой нити и содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. По всему настоящему раскрытию выражение “соединение, представляющее собой миметик микроРНК” может быть применено взаимозаменяемо с выражениями “promiR-29”, “агонист miR-29”, “агонист микроРНК”, “миметик микроРНК”, “миметик miRNA” или “миметик miR-29;” выражение “первая нить” может быть применено взаимозаменяемо с выражениями “антисмысловая нить” или “направляющая нить”; выражение “вторая нить” может быть применено взаимозаменяемо с выражением “смысловая нить” или “сопровождающая нить;” и выражение “антагонист miR-29” может быть применено взаимозаменяемо с выражениями “олигонуклеотидный ингибитор,” “анти-miR-29”, “антисмыловой олигонуклеотид”, “антагомир miR-29” или “анти-микроРНК-олигонуклеотид”.

[0058] Согласно одному варианту осуществления первая нить соединения, представляющего собой миметик микроРНК, содержит от приблизительно 23 до приблизительно 26 нуклеотидов, составляющих последовательность зрелой miR-29a, miR-29b или miR-29c, и вторая нить содержит от приблизительно 22 до приблизительно

23 нуклеотидов, составляющих последовательность, которая частично, практически или полностью комплементарна первой нити. Согласно различным вариантам осуществления первая нить может содержать приблизительно 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов и вторая нить может содержать приблизительно 22 или 23 нуклеотида.

- 5 [0059] Нуклеотиды, которые образуют первую и вторую нить соединений, представляющих собой миметики микроРНК, могут включать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления первая и вторая нить соединения, представляющего собой миметик микроРНК, содержат рибонуклеотиды и/или
- 10 модифицированные рибонуклеотиды. Выражение “модифицированный нуклеотид” означает нуклеотид, в котором нуклеиновое основание и/или сахарный компонент изменен по сравнению с немодифицированным нуклеотидом.

- 15 [0060] Согласно определенным вариантам осуществления соединения, представляющие собой миметики микроРНК, содержат первую нить, или антисмысловую нить, последовательность которой идентична всей или части последовательности зрелой miR-29a, miR-29b или miR-29c, и вторую нить, или смысловую нить, последовательность которой на от приблизительно 70% до приблизительно 100% комплементарна последовательности первой нити. Согласно одному варианту осуществления первая нить соединения, представляющего собой миметик miRNA, по меньшей мере на
- 20 приблизительно 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентична, включая все целые числа в этом диапазоне, всей последовательности зрелой, встречающейся в природе последовательности miR-29a, miR-29b или miR-29c. Согласно определенным вариантам осуществления первая нить на приблизительно или по меньшей мере на приблизительно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности зрелой
- 25 встречающейся в природе miRNA, например, последовательности miR-29a, miR-29b или miR-29 мыши, человека или крысы. Альтернативно, первая нить может предусматривать 20, 21, 22 или 23 положений нуклеотидов, общих со зрелой встречающейся в природе miRNA, как следует из сравнения при помощи алгоритмов выравнивания последовательностей и способов, хорошо известных в данной области техники.

- 30 [0061] Подразумевается, что последовательность первой нити является идентичной последовательности зрелой miR-29a, miR-29b или miR-29c, даже если первая нить включает модифицированный нуклеотид вместо встречающегося в природе нуклеотида. Например, если последовательность зрелой встречающейся в природе miRNA в определенном положении содержит цитидиновый нуклеотид, то первая нить соединения, представляющего собой миметик, может содержать модифицированный цитидиновый нуклеотид, такой как 2'-фторцитидин, в соответствующем положении, или если последовательность зрелой встречающейся в природе miRNA в определенном положении содержит уридиновый нуклеотид, то участок miRNA первой нити соединения, представляющего собой миметик, может содержать в соответствующем положении
- 35 модифицированный уридиновый нуклеотид, такой как 2'-фторуридин, 2'-О-метилуридин, 5-фторурацил или 4-тиоурацил. Таким образом, при условии, что модифицированный нуклеотид имеет такую же способность в отношении спаривания оснований, как и нуклеотид, присутствующий в последовательности зрелой встречающейся в природе miRNA, последовательность первой нити считается идентичной последовательности
- 40 зрелой встречающейся в природе miRNA. Согласно некоторым вариантам осуществления первая нить может включать модификацию 5'-концевого остатка. Например, первая нить может содержать 5'-концевой монофосфат. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первая нить не содержит 5'-концевой монофосфат.

[0062] Согласно некоторым вариантам осуществления вторая нить миметика микроРНК частично комплементарна последовательности первой нити. Например, последовательность второй нити по меньшей мере на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, включая все значения в этом диапазоне,

- 5 комплементарна последовательности первой нити. Согласно некоторым другим вариантам осуществления вторая нить практически комплементарна последовательности первой нити. Например, вторая нить по меньшей мере на приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, включая все значения в этом диапазоне, комплементарна последовательности первой нити. Согласно 10 еще некоторым другим вариантам осуществления последовательность второй нити может быть полностью комплементарна первой нити. Согласно определенным вариантам осуществления приблизительно 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотидов комплементарного участка второй нити могут быть комплементарны первой нити.

[0063] Подразумевается, что последовательность второй нити является

- 15 комплементарной первой нити, даже если вторая нить включает модифицированный нуклеотид вместо встречающегося в природе нуклеотида. Например, если последовательность первой нити содержит в определенном положении цитидиновый нуклеотид, то вторая нить может содержать в соответствующем положении модифицированный цитидиновый нуклеотид, такой как 2'-О-метилцитидин.

- 20 [0064] Согласно некоторым вариантам осуществления вторая нить содержит приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 несоответствующих оснований по сравнению с первой нитью. Иными словами, до 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов первой нити и второй нити могут не быть комплементарными. Согласно одному варианту осуществления несоответствующие основания не являются последовательными, а рассредоточены в 25 пределах второй нити. Согласно другому варианту осуществления несоответствующие основания являются последовательными и могут образовывать петлю. Согласно одному варианту осуществления вторая нить содержит 3 несоответствующие основания по сравнению с первой нитью. Согласно определенным вариантам осуществления вторая нить миметика miR-29a или миметика miR-29c содержит несоответствующие основания 30 в положениях 4, 13 и/или 16 от 3'-конца (второй нити) по сравнению с первой нитью. Согласно одному варианту осуществления вторая нить миметика miR-29b содержит несоответствующие основания в положениях 4, 13 и/или 16 от 3'-конца (второй нити) по сравнению с первой нитью. Согласно другому варианту осуществления вторая нить миметика miR-29b содержит несоответствующие основания в положениях 4, 9, 10, 11, 35 13 и/или 16 от 3'-конца (второй нити) по сравнению с первой нитью.

- [0065] Согласно некоторым вариантам осуществления первая и/или вторая нить соединения, представляющего собой миметик, может содержать выступающий конец на 5'- или 3'-конце нитей. Согласно определенным вариантам осуществления первая нить содержит 3'-выступающий конец, т. е. однонитевой участок, который выступает 40 за пределы дуплексного участка, по сравнению со второй нитью. Длина 3'-выступающего конца первой нити может находиться в диапазоне от приблизительно одного нуклеотида до приблизительно четырех нуклеотидов. Согласно определенным вариантам осуществления 3'-выступающий конец первой нити может содержать 1 или 2 нуклеотида. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеотиды, образующие 45 3'-выступающий конец в первой нити, связаны при помощи фосфотиоатных связей. Нуклеотиды, образующие 3'-выступающий конец первой нити, могут включать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления 3'-выступающий конец

в первой нити содержит два рибонуклеотида. Согласно одному варианту осуществления 3'-выступающий конец первой нити содержит два уридиновых нуклеотида, связанных при помощи фосфотиоатной связи. Согласно некоторым вариантам осуществления первая нить может не содержать выступающий конец.

5 [0066] Согласно одному варианту осуществления нуклеотиды во второй/смысловой нити миметиков miR-29 по настоящему изобретению связаны при помощи фосфодиэфирных связей и нуклеотиды в первой/антисмысловой нити связаны при помощи фосфодиэфирных связей, за исключением последних трех нуклеотидов на 3'-конце, которые связаны друг с другом при помощи фосфотиоатных связей.

10 [0067] Согласно различным вариантам осуществления миметики miR-29 по настоящему изобретению содержат модифицированные нуклеотиды. Например, согласно одному варианту осуществления первая нить миметика содержит один или более 2'-фтор-нуклеотидов. Согласно другому варианту осуществления первая нить может не включать никаких модифицированных нуклеотидов. Согласно одному варианту 15 осуществления вторая нить содержит один или более 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов.

15 [0068] Согласно различным вариантам осуществления миметики miR-29 по настоящему изобретению содержат первую и вторую нити, приведенные в таблицах ниже. Обозначения модификаций представлены в таблице 4. Соединения, 20 представляющие собой миметики miR-29, применимы для регуляции экспрессии генов внеклеточного матрикса в клетке и для лечения связанных состояний, таких как фиброз тканей, фиброз кожи, включая пути применения и состояния, описанные в WO 2009/ 018493, который включен в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте.

Таблица 1. Миметики miR-29a.

	Модифицированная последовательность	SEQ ID NO.
<i>Вторые/смысловые/сопровождающие нити</i>		
30	5'-mU.mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.rU.rC.rA.rG.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rA.rU.rU- 3'	3
	5'-mU.mA.rA.mC.mC.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rG.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA-3'	4
	5'-mU.mA.rA.mC.mC.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rG.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA.chol6-3'	5
	5'-mU.mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.rU.rC.rA.rG.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rAs.rUs.rUs.chol6-3'	11
	5'- mU.mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.rU.rC.rA.rG.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rA-3'	37
<i>Первые/антисмыловые/направляющие нити</i>		
35	5'-p.rU.rA.rG.rC.rA.rC.rC.rA.rU.rC.rU.rG.rA.rA.rU.rC.rG.rG.rU.rU.rA.rU.rU-3'	6
	5'-p.fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rA.fU.fC.fU.rG.rA.rA.fU.fC.rG.rG.fU.fU.rAs.rUs.rU-3'	7
	5'-fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rA.fU.fC.fU.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rG.rG.fU.fU.rAs.rUs.rU-3'	27
	5'- rU.rA.rG.rC.rA.rC.rA.rU.rC.rU.rG.rA.rA.rU.rC.rG.rG.rU.rU.rA.rU.rU-3'	38

Таблица 2. Миметики miR-29b.

	Модифицированная последовательность	SEQ ID NO.
<i>Вторые/смыловые/сопровождающие нити</i>		
40	5'-mA.mA.rC.rA.rC.rU.rG.rA.rU.rU.rC.rA.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rA.rU.rU- 3'	8
	5'-mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.rA.mU.mU.mU.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.mU.rG.mC.mU.rA.chol6-3'	9
	5'-mA.mA.rC.rA.rC.rU.rG.rA.rU.rU.rC.rA.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rAs.rUs.rUs.chol6-3'	10
	5'-mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rG.rG.rG.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA-3'	13
	5'-mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rG.rG.rG.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA.chol6-3'	14
45	5'-mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA.chol6-3'	1
	5'-mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA.dT.dT.chol6-3'	15
	5'-C6Chol.dT.dT.mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA-3'	16
	5'-mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA.chol9-3'	17
	5'- rA.mA.rC.mA.rC.mU.rG.mA.rU.mU.rU.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.rG.mU.mG.rC.mU.rA.chol6-3'	28

	5'- rA.mA.rC.mA.rC.mU.rG.mA.rU.mU.rU.mC.rA.mA.rU.rG.mG.rU.mG.rC.mU.rAs.rU.chol6-3'	29
	5'- mA.mA.mC.rA.mC.mU.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA.cholTEG- 3'	30
	5'- mA.mA.rC.rA.rC.rU.rG.rA.rU.rU.rU.rC.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rA-3'	39
<i>Первые/антисмыловые/направляющие нити</i>		
5	5'-p.U.rA.rG.rC.rA.rC.rA.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rU.rC.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rU- 3'	18
	5'-p.fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rA.fU.fU.fU.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rA.rG.fU.rG.fU.fU.s.rUs.rU-3'	2
	5'-fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rA.fC.fC.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rA.rG.fU.rG.fU.fU.s.rUs.rU-3'	19
	5'-p.fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rA.fC.fC.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rA.rG.fU.rG.fU.fU.s.rUs.rU-3'	20
	5'-rU.rA.rG.rC.rA.rC.rA.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rU.rC.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rU-3'	21
10	5'- mU.rA.mG.rC.mA.rC.mC.rA.mU.rU.mU.rG.mA.rA.mU.mC.rA.mG.rU.mG.rU.mU- 3'	31
	5' mU.rA.mG.rC.mA.rC.mC.rA.mU.rU.mU.rG.mA.rA.mU.mC.rA.mG.rU.mG.rU.mUs.s.rUs.rU- 3'	32
	5'- mU.rA.rG.mC.rA.mC.mC.rA.mU.mU.mU.rG.rA.rA.rA.mU.mC.rA.rG.mU.mU.mUs.s.rUs.rU- 3'	33
	5' - fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rA.fU.fU.fU.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rA.rG.fU.rG.fU.fU- 3'	34
	5' - rU.rA.rG.rC.rA.rC.rA.rU.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rU.rC.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rU-3'	40

Таблица 3. Миметики miR-29c.

15		Модифицированная последовательность	SEQ ID NO.
<i>Вторые/смыловые/сопровождающие нити</i>			
	5'-mU.mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.rU.rU.rC.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rA.rU.rU-3'	22	
	5'-mU.mA.rA.mC.mC.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA-3'	23	
20	5'-mU.mA.rA.mC.mC.rG.mU.mU.mU.rA.mC.rA.rA.rA.mU.rG.rG.mU.mC.mC.mU.rA.chol6-3'	24	
	5'-mU.mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.rU.rU.rC.rA.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rAs.s.rUs.s.chol6-3'	12	
	5' - mU.mA.rA.rC.rC.rG.rA.rU.rU.rU.rC.rA.rA.rU.rG.rG.rU.rG.rC.rU.rA-3'	41	
<i>Первые/антисмыловые/направляющие нити</i>			
	5'-p.rU.rA.rG.rC.rA.rC.rC.rA.rU.rU.rU.rG.rA.rA.rU.rC.rG.rG.rU.rU.rA.rU.rU-3'	25	
	5'-p.fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rA.fU.fU.fU.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rG.rG.fU.fU.rAs.s.rUs.rU-3'	26	
25	5' - fU.rA.rG.fC.rA.fC.fC.rA.fU.fU.fU.rG.rA.rA.rA.fU.fC.rG.rG.fU.fU.rAs.s.rUs.rU- 3'	35	
	5' - rU.rA.rG.rC.rA.rC.rC.rA.rU.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rU.rC.rC.rG.rG.rU.rU.rA.rU.rU-3'	42	

Таблица 4. Определения сокращений

	Нуклеотидная единица или модификация	Сокращение	Нуклеотидная единица или модификация	Сокращение
30	рибо A	rA	рибо A P=S	rAs
	рибо G	rG	рибо G P=S	rGs
	рибо C	rC	рибо C P=S	rCs
	рибо U	rU	рибо U P=S	rUs
	O-метил A	mA	O-метил A P=S	mAs
	O-метил G	mG	O-метил G P=S	mGs
35	O-метил C	mC	O-метил C P=S	mCs
	O-метил U	mU	O-метил U P=S	mUs
	фтор C	fC	фтор C P=S	fCs
	фтор U	fU	фтор U P=S	fUs
	дезокси A	dA	дезокси A P=S	dAs
	дезокси G	dG	дезокси G P=S	dGs
40	дезокси C	dC	дезокси C P=S	dCs
	дезокси T	dT	дезокси T P=S	dTs
	монофосфат	p		
	Конъюгат холестерина с линкером из 6 атомов углерода	Chol6/C6 chol		
45	Конъюгат холестерина с линкером из 9 атомов углерода	Chol9		

[0069] Согласно некоторым вариантам осуществления миметик miR-29a содержит первую нить, содержащую SEQ ID NO: 27, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 5. Согласно другим вариантам осуществления миметик miR-29a содержит первую нить, содержащую SEQ ID NO: 7, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 5.

[0070] Согласно некоторым вариантам осуществления миметик miR-29b содержит первую нить, содержащую SEQ ID NO: 19, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым другим вариантам осуществления миметик miR-29b содержит первую нить, содержащую SEQ ID NO: 2, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 1.

- 5 Согласно еще некоторым другим вариантам осуществления миметик miR-29b содержит первую нить, содержащую SEQ ID NO: 19, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 15. Согласно еще некоторым другим вариантам осуществления миметик miR-29b содержит первую нить, содержащую SEQ ID NO: 33, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 1. Согласно еще некоторым другим вариантам осуществления миметик miR-29b содержит 10 первую нить, содержащую SEQ ID NO: 34, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 1. Согласно еще некоторым другим вариантам осуществления миметик miR-29b содержит первую нить, содержащую SEQ ID NO: 19, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 30.

[0071] Согласно некоторым вариантам осуществления миметик miR-29c содержит первую нить, содержащую SEQ ID NO: 35, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 24.

- 15 Согласно другим вариантам осуществления миметик miR-29c содержит первую нить, содержащую SEQ ID NO: 26, и вторую нить, содержащую SEQ ID NO: 24.

[0072] Модифицированные нуклеотиды, которые можно применять в соединениях, представляющих собой миметики микроРНК по настоящему изобретению, могут включать нуклеотиды с модификацией или заменой основания. Природные или

- 20 немодифицированные основания в РНК представляют собой пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания цитозин (C) и урацил (U) (ДНК содержит тимин (T)). В отличие от этого, модифицированные основания, также обозначаемые как фрагменты, представляющие собой гетероциклические основания, включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-
25 метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкил- производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5- галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин и другие алкинил-производные пиримидиновых оснований, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-
30 тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8- замещенные аденины и гуанины, 5-галоген (в том числе 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины), 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 2-F-аденин, 2-аминоаденин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, а также 3- деазагуанин и 3-деазааденин.

- 35 [0073] Согласно некоторым вариантам осуществления соединения, представляющие собой миметики микроРНК, могут содержать нуклеотиды с модифицированными сахарными компонентами. Иллюстративные модифицированные сахара включают карбоциклические или ациклические сахара, сахара, имеющие замещающие группы в одном или нескольких из их 2'-, 3'- или 4'-положений, и сахара с заместителями вместо

- 40 одного или более атомов водорода сахара. Согласно определенным вариантам осуществления сахар модифицируют при помощи замещающей группы в 2'-положении. Согласно дополнительным вариантам осуществления сахар модифицируют при помощи замещающей группы в 3'-положении. Согласно другим вариантам осуществления сахар модифицируют при помощи замещающей группы в 4'-положении. Также предполагается,

- 45 что сахар может предусматривать модификацию в более чем одном из этих положений, или что молекула РНК может содержать один или более нуклеотидов с модификацией сахара в одном положении и также один или более нуклеотидов с модификацией сахара в другом положении.

[0074] Предполагаемые модификации сахара в соединениях, представляющих собой миметики miRNA, включают без ограничения замещающую группу, выбранную из: OH; F; O-, S- или N-алкила; O-, S- или N-алкенила; O-, S- или N-алкинила или O-алкил-O-алкила, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными 5 C_1 - C_{10} алкилом или C_2 - C_{10} алкенилом и алкинилом.

[0075] Согласно некоторым вариантам осуществления соединения, представляющие собой миметики miRNA, содержат замещающую группу сахара, выбранную из следующего: C_1 - C_{10} -низшего алкила, замещенного низшего алкила, алкенила, алкинила, алкарила, аралкила, O-алкарила или O-аралкила, SH, SC_3 , Cl, Br, CN, OCN, CF_3 , OCF_3 , $SOCH_3$, SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , гетероциклоалкила, гетероциклоалкарила, аминоалкиламино или подобных заместителей. Согласно одному варианту осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O- $CH_2CH_2OCH_3$, который также известен как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ), т. е., алоксиалкокси группу.

10 15 Другая модификация включает 2'-диметиламинооксиэтокси, т. е. группу O(CH_2)₂ON (CH_3)₂, также известную как 2'-DMAOE, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известную в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил, или 2'-DMAEOE), т. е. 2'-O- CH_2 -O- CH_2 -N(CH_3)₂.

20 25 [0076] Замещающие группы сахара в 2'-положении (2') могут находиться в арабино-(верхнем) положении или рибо-(нижнем) положении. Одной 2'-арабино модификацией является 2'-F. Другие подобные модификации могут также быть выполнены в других положениях сахарного компонента, в частности, 3'-положении сахара 3'-концевого нуклеозида или в 2'-5'-связанных олигонуклеотидах и 5'-положении 5'-концевого нуклеотида.

30 35 [0077] Согласно определенным вариантам осуществления модификация сахара представляет собой 2'-O-алкил (например, 2'-O-метил, 2'-O-метоксиэтил), 2'-галоген (например, 2'-фтор, 2'-хлор, 2'-бром) и 4'-тио-модификации. Например, согласно некоторым вариантам осуществления первая нить соединения, представляющего собой миметик miR-29a, miR-29b или miR-29c, содержит один или более 2'-фтор-нуклеотидов. Согласно другому варианту осуществления первая нить соединений, представляющих собой миметики, не содержит модифицированных нуклеотидов. Согласно еще одному варианту осуществления вторая нить соединения, представляющего собой миметик miR-29a, miR-29b или miR-29c, содержит один или более 2'-O-метил-модифицированных нуклеотидов.

40 [0078] Первая и вторая нить соединений, представляющих собой миметики микроРНК по настоящему изобретению, может также включать модификации остова, такие как одна или более фосфотиоатных, морфолино или фосфонокарбоксилатных связей (см., например, патенты США №№ 6693187 и 7067641, которые включены в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте). Например, согласно некоторым вариантам осуществления нуклеотиды, образующие 3'-выступающий конец в первой нити, связаны при помощи фосфотиоатных связей.

45 [0079] Согласно некоторым вариантам осуществления соединения, представляющие собой миметики микроРНК, конъюгированы с молекулой-носителем, такой как стероид (холестерин), витамин, жирная кислота, углевод или гликозид, пептид, или другим низкомолекулярным лигандом с целью облегчения доставки и стабильности *in vivo*. Предпочтительно молекула-носитель присоединена ко второй нити соединения, представляющего собой миметик микроРНК, на своем 3'- или 5'-конце при помощи

линкерной или спайсерной группы. Согласно различным вариантам осуществления молекулой-носителем является холестерин, производное холестерина, холевая кислота или производное холевой кислоты. Также предусмотрено применение молекул-носителей, раскрытых в патенте США № 7202227, который включен в данный документ

5 при помощи ссылки во всей своей полноте. Согласно определенным вариантам осуществления молекулой-носителем является холестерин и он присоединен к 3'- или 5'-концу второй нити при помощи линкера по меньшей мере из шести атомов углерода. Согласно одному варианту осуществления молекула-носитель присоединена к 3'-концу второй нити при помощи линкера из шести или девяти атомов углерода. Согласно

10 некоторым вариантам осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. Согласно различным вариантам осуществления линкер содержит главным образом линейный углеводородный фрагмент. Углеводородный фрагмент может содержать от приблизительно 3 до приблизительно 15 атомов углерода и может быть конъюгирован с холестерином при помощи относительно неполярной группы, например, посредством

15 эфирной или тиоэфирной связи. Согласно определенным вариантам осуществления углеводородный линкер/спайсер содержит необязательно замещенную C2-C15 насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь (например, алкилен или алкенилен). В настоящем изобретении можно применять несколько линкерных/спайсерных групп, описанных в патентной заявке США № 2012/0128761,

20 опубликованной через 18 месяцев с даты приоритета, которая включена в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте.

[0080] Согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретение предусматривает способы лечения, облегчения или предупреждения фиброзных состояний у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту

25 терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного из миметиков miR-29a, miR-29b и/или miR-29c, описанных в данном документе. Фиброзные состояния, которые можно лечить с применением миметиков miR-29 по настоящему изобретению, включают без ограничения фиброз тканей, такой как фиброз легких, фиброз миокарда, фиброз печени, фиброз почек, диабетический фиброз, фиброз скелетных мышц и фиброз

30 глаз; а также фиброз кожи/кожный фиброз, такой как келоиды, склероз кожи, системный склероз (склеродермию), гипертрофические рубцы, фиброз рук/суставов/сухожилий и болезнь Пейрони. Согласно одному варианту осуществления фиброзным состоянием, которое лечат при помощи миметиков miR-29 по настоящему изобретению, является пневмофиброз. Применение агонистов miR-29 при лечении определенных фиброзных

35 состояний описано в патенте США № 8440636, который тем самым включен в данный документ при помощи ссылки.

[0081] Согласно одному варианту осуществления введение миметиков miR-29 по настоящему изобретению снижает уровень экспрессии или активность одного или более генов внеклеточного матрикса в клетках субъекта. Согласно другому варианту

40 осуществления введение миметиков miR-29 по настоящему изобретению снижает уровень экспрессии или активность одного или более генов синтеза коллагена в клетках субъекта. Согласно еще одному варианту осуществления введение миметиков miR-29 повышает уровень экспрессии или активность одного или более генов, вовлеченных в развитие кожи, развитие эпидермиса, развитие эктодермы или гомеостаз клетки. Клетки субъекта,

45 в которых регуляцию экспрессии или активности различных генов осуществляют при помощи миметиков miR-29 по настоящему изобретению, включают фибробласты и эпидермальные клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления введение миметиков miR-29 обеспечивает подавление воспалительных реакций, связанных с

фиброзом. Например, введение миметиков miR-29 обеспечивает снижение уровней провоспалительных цитокинов, таких как IL-12, IL-4, GCSF и TNF- α у пациентов с фиброзом. Введение миметиков miR-29 может также обеспечивать снижение степени инфильтрации иммунных эффекторных клеток, таких как нейтрофилы, лимфоциты, 5 моноциты и макрофаги, в фиброзных тканях или органах.

[0082] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение предусматривает способы осуществления регуляции в отношении гена внеклеточного матрикса в клетке, включающий приведение клетки в контакт с миметиком miR-29 по настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее 10 изобретение предусматривает способ осуществления регуляции в отношении гена синтеза коллагена в клетке, включающий приведение клетки в контакт с миметиком miR-29 по настоящему изобретению. При обработке или приведении в контакт миметик miR-29 снижает уровень экспрессии или активность гена внеклеточного матрикса или гена синтеза коллагена.

[0083] Как используется в данном документе, выражение “субъект” или “пациент” относится к любому позвоночному, в том числе без ограничения людям и другим приматам (например, шимпанзе и другим видам человекообразных обезьян и обезьян), сельскохозяйственным животным (например, крупному рогатому скоту, овцам, свиньям, козам и лошадям), домашним млекопитающим (например, собакам и кошкам), 15 лабораторным животным (например, кроликам, грызунам, таким как мыши, крысы и морские свинки) и птицам (например, домашним, диким птицам и пернатой дичи, таким как куры, индюки и другие куриные, утки, гуси и т. п.). Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является млекопитающее. Согласно другим вариантам осуществления субъектом является человек.

[0084] Настоящее изобретение также предусматривает способы оценки эффективности лечения агонистами miR-29 (например, лекарственными средствами или миметиками miR-29) или антагонистами miR-29 (например, лекарственными средствами или анти-miR-29). Например, согласно одному варианту осуществления способ оценки эффективности лечения предусматривает определение уровня экспрессии одного или 20 более генов в клетках или фиброзной ткани субъекта до обработки миметиками miR-29 или антагонистами miR-29, где один или более генов выбраны из набора генов, модулируемых miR-29, например, генов, приведенных в таблице 5; определение уровня экспрессии одного или более генов в клетках/фиброзной ткани субъекта после обработки миметиками miR-29 или антагонистом miR-29; и определение того, является ли обработка 25 эффективной, менее эффективной или неэффективной на основании уровней экспрессии до и после обработки. Иными словами, согласно одному варианту осуществления гены, приведенные в таблице 5, выполняют роль биомаркера клинической эффективности обработки миметиком miR-29 или антагонистом miR-29. Согласно одному варианту осуществления статистически значимая разница экспрессии генов до и после обработки 30 свидетельствует о том, что обработка является эффективной. Согласно другому варианту осуществления по меньшей мере 1-кратная, 1,5-кратная, 2-кратная, 2,5-кратная, 3-кратная, 3,5-кратная или 4-кратная разница экспрессии генов до и после обработки свидетельствует о том, что обработка является эффективной.

[0085] Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтические композиции, 45 содержащие терапевтически эффективное количество одного или более соединений, представляющих собой миметики микроРНК miR-29a, miR-29b и/или miR-29c по настоящему изобретению, или их фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0086] Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество соединения, представляющего собой миметик miR-29a, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, где первая нить соединения, представляющего собой миметик содержит 5 последовательность зрелой miR-29a и вторая нить практически комплементарна первой нити. Согласно другому варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество соединения, представляющего собой миметик miR-29b, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, где первая нить соединения, представляющего собой миметик, содержит 10 последовательность зрелой miR-29b и вторая нить практически комплементарна первой нити. Согласно еще одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество соединения, представляющего собой миметик miR-29c, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, где первая нить соединения, представляющего собой миметик, содержит 15 последовательность зрелой miR-29c и вторая нить практически комплементарна первой нити.

[0087] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество по меньшей мере двух соединений, представляющих собой миметики микроРНК по настоящему изобретению, и

20 фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Например, фармацевтическая композиция может содержать комбинацию миметиков miR-29a и miR-29b; миметиков miR-29a и miR-29c; или миметиков miR-29b и miR-29c.

Альтернативно, композиция может содержать два миметика одной и той же микроРНК. Согласно еще некоторым другим вариантам осуществления настоящего изобретение 25 предусматривает фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество трех соединений, представляющих собой миметики микроРНК по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Например, фармацевтическая композиция может содержать комбинацию миметиков miR-29a, miR-29b и miR-29c.

30 [0088] Предпочтительно в фармацевтических композициях, содержащих по меньшей мере два соединения, представляющих собой миметики микроРНК по настоящему изобретению, первое и второе соединения, представляющие собой миметики или первое, второе и третье соединения, представляющие собой миметики, присутствуют в эквимолярных концентрациях. Для получения фармацевтических композиций,

35 содержащих по меньшей мере два из соединений, представляющих собой миметики miR-29a, miR-29b и miR-29c, также предусмотрены другие соотношения в смеси, такие как приблизительно 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:2:1, 1:3:1, 1:4:1, 1:2:3, 1:2:4.

[0089] Согласно некоторым вариантам осуществления одно или более соединений, представляющих собой миметики микроРНК по настоящему изобретению, можно 40 вводить одновременно, но в отдельных композициях, при этом одновременное введение относится к соединениям, представляющим собой миметики, вводимым в пределах короткого периода, например, в пределах приблизительно 5, 10, 20 или 30 минут относительно друг друга. Согласно некоторым другим вариантам осуществления соединения, представляющие собой миметики miR-29a, miR-29b и/или miR-29c, можно 45 вводить в отдельных композициях в различное время.

[0090] Настоящее изобретение также охватывает варианты осуществления, в которых можно вводить дополнительные терапевтические средства наряду с соединениями, представляющими собой миметики miR-29a, miR-29b и/или miR-29c. Согласно одному

варианту осуществления дополнительным терапевтическим средством является второе противофиброзное средство. Дополнительные терапевтические средства можно вводить одновременно, но в отдельных составах, или последовательно. Согласно другим

вариантам осуществления дополнительные терапевтические средства можно вводить 5 в различное время до или после введения соединений, представляющих собой миметики miR-29a, miR-29b и/или miR-29c. Если предполагаются варианты клинического применения, то фармацевтические композиции будут получены в форме, подходящей для предполагаемого применения. Как правило, это будет обуславливать необходимость получения композиций, которые практически не содержат пирогенов, а также других 10 примесей, которые могут быть вредными для людей или животных.

[0091] В качестве средств доставки для соединений, представляющих собой миметики miR-29a, miR-29b и/или miR-29c, можно применять коллоидные дисперсные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросфера, гранулы и 15 системы на основе липидов, в том числе эмульсии типа "масло в воде", мицеллы,

смешанные мицеллы, липосомы и экзосомы. Согласно некоторым вариантам 15 осуществления миметики miR-29 по настоящему изобретению могут быть составлены в липосомные частицы, которые затем можно распылять при ингаляционной доставке.

[0092] Коммерчески доступные жировые эмульсии, подходящие для доставки нуклеиновых кислот по настоящему изобретению к целевым тканям, включают

20 Intralipid®, Liposyn®, Liposyn® II, Liposyn® III, Nutrilipid и другие подобные липидные эмульсии. Предпочтительной коллоидной системой для применения в качестве средства доставки *in vivo* является липосома (т. е.,искусственная мембранные везикула).

Получение и применение таких систем хорошо известны в данной области техники. Иллюстративные составы также описаны в US 5981505; US 6217900; US 6383512;

25 US 5783565; US 7202227; US 6379965; US 6127170; US 5837533; US 6747014 и WO03/ 093449, которые включены в данный документ при помощи ссылки во всей своей 30 полноте.

[0093] Согласно определенным вариантам осуществления липосомы, применяемые для доставки, представляют собой амфотерные липосомы, такие как SMARTICLES®

35 (Marina Biotech, Inc.), которые подробно описаны в патентной заявке США № 20110076322, опубликованной через 18 месяцев с даты приоритета. Поверхностный заряд SMARTICLES® является полностью обратимым, что делает их особенно подходящими для доставки нуклеиновых кислот. SMARTICLES® могут быть доставлены при помощи инъекции, при этом они остаются стабильными и не агрегируют и проходят 40 через клеточные мембранны с доставкой нуклеиновых кислот.

[0094] Как правило, желательно использовать соответствующие соли и буферы с целью придания средствам доставки стабильности и обеспечения поглощения целевыми клетками. Водные композиции по настоящему изобретению содержат эффективное количество средства доставки, содержащего миметик miR-29 (например, липосомы или

45 другие комплексы), растворенный или диспергированный в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде. Фразы "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относятся к химическим соединениям и композициям, которые не вызывают побочных, аллергических или других нежелательных реакций при введении животному или человеку. Как используется в данном документе,

45 "фармацевтически приемлемый носитель" включает растворители, буферы, растворы, дисперсные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т. д., приемлемые для применения при составлении фармацевтических средств, таких как фармацевтические средства,

подходящие для введения людям. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо стандартные среды или средство несовместимо с активными компонентами по настоящему изобретению, предполагается его применение в

5 терапевтических композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты, при условии, что они не инактивируют полинуклеотиды композиций.

[0095] Согласно одному варианту осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению составлены для ингаляционной, назальной, интраназальной 10 или глазной доставки и могут находиться в форме порошков, водных растворов, водных аэрозолей, назальных капель, аэрозолей и/или глазных капель. Твердые составы для назального/интраназального введения могут содержать вспомогательные вещества, такие как лактоза или декстроза. Жидкие составы для назального/интраназального введения могут представлять собой водные или маслянистые растворы для применения 15 в форме аэрозолей, назальных капель или дозирующего распылителя. Составы для легочного/назального/интраназального введения могут также включать поверхностно-активные вещества, такие как, например, гликохолевая кислота, холевая кислота, таурохолевая кислота, этохолевая кислота, дезоксихолевая кислота, хенодезоксихолевая кислота, дегидрохолевая кислота, гликодезоксихолевая кислота, 20 соли этих кислот и циклодекстрины.

[0096] Согласно некоторым вариантам осуществления составы для легочного/ назального/интраназального введения при помощи ингаляции включают без ограничения сухой порошкообразный состав, состав на основе липосом, наносуспензионный состав или микросуспензионный состав.

25 [0097] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтические композиции для легочной/назальной/интраназальной доставки вводят при помощи устройства для ингаляции. Выражение “устройство для ингаляции” относится к любому устройству, которое способно вводить композицию миметика miR-29 в дыхательные пути субъекта. Ингаляционные устройства включают такие устройства, как дозирующие ингаляторы 30 (MDI), ингаляторы сухого порошка (DPI), струйные небулайзеры, ультразвуковые небулайзеры, тепловые паровые ингаляторы, ингаляторы типа soft mist, тепловые аэрозольные ингаляторы, ингалятор с электрогидродинамическим аэрозольным распылением раствора. Устройства для ингаляции также могут включать высокоеффективные небулайзеры. Согласно некоторым вариантам осуществления 35 небулайзер представляет собой струйный небулайзер, ультразвуковой небулайзер, мембранный небулайзер с пульсирующей подачей, небулайзер, содержащий вибрирующую мембрану или пластину с множеством отверстий, небулайзер, содержащий генератор вибраций и водную камеру, или небулайзер, в котором используются элементы контролируемого устройства для направления вдыхаемого потока распыляемого 40 водного раствора в легкие субъекта. Небулайзеры, дозирующие ингаляторы и ингаляторы типа soft mist доставляют фармацевтические препараты путем образования аэрозоля, которые включает размеры капель, которые могут легко вдыхаться.

45 [0098] Согласно некоторым вариантам осуществления композиция, вводимая при помощи высокоеффективного небулайзера, содержит один или более миметиков miR-29 и фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ или носителей, таких как очищенная вода, маннит, поверхностно-активные вещества и соли, такие как хлорид натрия и EDTA натрия и т. д.

[0099] Активные композиции по настоящему изобретению могут включать

классические фармацевтические препараты. Введение этих композиций по настоящему изобретению может осуществляться при помощи любого общепринятого способа при условии, что целевая ткань является доступной для этого пути. Он включает пероральный, назальный (например, ингаляция), глазной или буккальный.

- 5 Альтернативно, введение может осуществляться при помощи внутривенной, внутрикожной, подкожной или внутрглазной инъекции, или при помощи непосредственной инъекции в легочную или сердечную ткань. Фармацевтические композиции, содержащие миметики miRNA, могут также быть введены при помощи катетерных систем или систем, которые изолируют коронарное кровообращение для 10 доставки терапевтических средств к сердцу. В данной области техники известны различные катетерные системы для доставки терапевтических средств к сердцу и коронарной сосудистой сети. Некоторые неограничивающие примеры способов катетерной доставки или способов изоляции коронарного кровообращения, подходящих для применения в настоящем изобретении, раскрыты в патенте США № 6416510; 15 патенте США № 6716196; патенте США № 6953466, WO 2005/082440, WO 2006/089340, патентной публикации США № 2007/0203445, патентной публикации США № 2006/0148742 и патентной публикации США № 2007/0060907, все из которых включены в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте. Такие композиции обычно вводят в виде фармацевтически приемлемых композиций, как описано в данном 20 документе.

[00100] Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения композиции, содержащие миметики miR-29, описанные в данном документе, могут быть получены в виде покрытия для медицинского устройства, такого как стент, баллон или катетер. Особенно полезным в способах лечения фиброза миокарда у субъекта может 25 быть применение миметика miR-29 для покрытия металлического стента с получением стента с лекарственным покрытием. Стент с лекарственным покрытием представляет собой каркас, который удерживает открытыми суженные или пораженные артерии и высвобождает соединение с целью предупреждения пролиферации клеток и/или воспаления. Соединения, представляющие собой миметики, могут быть нанесены на 30 металлический стент, заключенный в тонкую полимерную оболочку для высвобождения в течение некоторого времени агонистов или ингибиторов. В данной области техники хорошо известны способы доставки при помощи устройств и способы покрытия устройств, такие как стенты с лекарственным покрытием и другие имплантируемые устройства. См., например, патенты США №№ 7294329, 7273493, 7247313, 7236821, 35 7232573, 7156869, 7144422, 7105018, 7087263, 7083642, 7055237, 7041127, 6716242 и 6589286 и WO 2004/004602, которые включены в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте. Таким образом, настоящее изобретение включает медицинское устройство, такое как баллон, катетер или стент, покрытое миметиком miR-29.

[00101] Стерильные растворы для инъекций могут быть получены посредством 40 включения активных соединений в соответствующем количестве в растворитель вместе с любыми другими ингредиентами (например, перечисленными выше), по необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсную среду и другие 45 требуемые ингредиенты, например, перечисленные выше.

[00102] Композиции по настоящему изобретению, как правило, могут быть составлены в нейтральную форму или форму соли. Фармацевтически приемлемые соли включают, например, соли присоединения кислоты (образованные свободными аминогруппами

белка), полученные из неорганических кислот (например, хлористоводородной или фосфорной кислот) или из органических кислот (например, уксусной, щавелевой, винной, миндальной и т. д.). Соли, образованные со свободными карбоксильными группами белка, также могут быть получены из неорганических оснований (например, гидроксидов 5 натрия, калия, аммония, кальция или железа) или из органических оснований (например, изопропиламина, триметиламина, гистидина, прокаина и т. д.).

[00103] После составления растворы предпочтительно вводят способом, совместимым с дозированным составом, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы можно легко вводить в виде различных лекарственных форм, 10 таких как растворы для инъекций, капсулы с высвобождением лекарственного средства, стенты с лекарственным покрытием или другие устройства для сосудов с покрытием и т. д. Например, для парентерального введения в форме водного раствора раствор, как правило, подходящим образом забуферен, а жидкий разбавитель сначала делают изотоническим, например, с помощью достаточного количества солевого раствора 15 или глюкозы. Такие водные растворы можно применять, например, для внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрглазного и интраперитонеального введения.

[00104] Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими дополнительными примерами, которые не должны рассматриваться как ограничивающие. Специалистам в данной области техники следует понимать, в свете 20 настоящего раскрытия, что в определенных вариантах осуществления можно производить множество изменений, и при этом получить подобный или аналогичный результат без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

[00105] Все патентные и непатентные документы, упоминаемые в настоящем раскрытии, включены в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте 25 для всех целей.

Примеры

Пример 1. Активность миметика miR-29 *in vitro*

[00106] Для исследования функциональной эффективности миметика miR-29b, содержащий SEQ ID NO: 2 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй 30 нити, трансфицировали в линию клеток фибробластов мыши (NIH 3T3) и при помощи qPCR измеряли влияние экспрессии коллагена 1a1 (Col1a1), известного непосредственного целевого гена miR-29 (van Rooij et al, 2008). Повышенное содержание миметика miR-29b продемонстрировало дозозависимое снижение содержания Col1a1 по сравнению с 35 необработанными, трансфицированными имитационным контролем (без какого-либо олигонуклеотида) или нецелевыми контрольными клетками (NTC), обработанными олигонуклеотидами, что свидетельствовало о том, что миметик miR-29b был функциональным. В качестве положительного контроля применяли siRNA, непосредственно целенаправленно воздействующую на Col1a1 (ФИГ. 1В).

Пример 2: Распределение, стабильность и выведение миметика miR-29 *in vivo*

[00107] Для исследования применимости и распределения миметика miR-29 *in vivo*, 40 мышам вводили внутривенно 10, 50, 100 или 125 мг/кг миметика miR-29b, содержащего SEQ ID NO: 2 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити, и через четыре дня их умерщвляли.

[00108] С помощью реагента TRIzol® (раствор фенола и изотиоцианата гуанидина) 45 (Gibco/BRL) из образцов сердечной ткани выделяли общую РНК. Для обнаружения микроРНК проводили нозерн-блоттинг, как описано ранее (van Rooij et al, 2008). Зонд U6 служил в качестве контроля нагрузки (IDT). 10 мкг общей РНК из указанных тканей загружали на 20% акриламидные денатурирующие гели и переносили на мембранны для

блоттинга геномной ДНК Zeta-probe GT (Bio-Rad) с помощью электрофореза. После переноса для блотов проводили перекрестное связывание и подвергали их термической обработке при 80°C в течение 1 часа. Для максимального повышения чувствительности обнаружения miRNA олигонуклеотидные зонды метили с помощью набора Starfire

⁵ Oligos (IDT, Коралвиль, Айова) и α -³²P dATP (Amersham или Perkin Elmer). Зонды гибридизировали на мембранах в течение ночи при 39°C в буфере Rapid-hyb (Amersham), после чего их дважды промывали в течение 10 минут при 39°C при помощи 0,5 × SSC, содержащего 0,1% SDS. Блоты проявляли и количественно оценивали при помощи анализа на PhosphorImager (GE Healthcare Life Sciences), а зонд U6 служил в качестве ¹⁰ контроля нагрузки (ABI). Значение интенсивности радиоактивного сигнала применяли для количественной оценки кратности изменения экспрессии с применением прибора для формирования изображения на люминесцентном фосфорном покрытии и ImageQuant (Bio-Rad).

¹⁵ [00109] Для ПЦР-анализа в режиме реального времени РНК экстрагировали из сердечной ткани при помощи реагента Trizol (Invitrogen), после чего применяли от одного до двух мкг РНК из образца каждой ткани для получения кДНК с применением обратной транскриптазы Super Script II согласно инструкциям от производителя (Invitrogen). Анализ микроРНК Taqman (Applied Biosystems, ABI) применяли для обнаружения изменений miRNA или генов согласно рекомендациям производителя, с ²⁰ применением 10-100 нг общей РНК. U6 применяли в качестве контроля для анализа miRNA и GAPDH применяли в качестве контроля для анализа генов.

²⁵ [00110] Нозерн-блот анализ применительно к нескольким тканям свидетельствовал о незначительном повышении или отсутствии повышения содержания miR-29b в образцах почек или печени по сравнению с контролем, обработанными физиологическим раствором. Обнаруживали распределение в сердечной ткани, однако оно в некоторой степени варьировало, а доставку в селезенку можно было наблюдать только при наиболее высокой дозе. В то же время доставку в легкие можно было наблюдать при всех 3 наиболее высоких дозах через четыре дня после инъекции (ФИГ. 1С). В случае плазмы не наблюдали влияния на функцию печени (по трансаминазе, ALT), что ³⁰ свидетельствовало о том, что в этих дозах миметики miRNA хорошо переносились (фигура 5). ПЦР в режиме реального времени продемонстрировала подобные результаты, при этом наблюдали устойчивое дозозависимое распределение миметика miR-29b в легком по сравнению с животными, которым вводили физиологический раствор (ФИГ. 1Д). Кроме того, ПЦР-анализ мишней miR-29 в режиме реального ³⁵ времени у обработанных животных показал отсутствие регуляции на уровне мРНК, за исключением Col3a1 при наиболее высокой дозе в селезенке (ФИГ. 6). Это свидетельствовало о том, что целевые гены либо пребывали в стабильном состоянии у нестressedированных животных и что миметики снижали экспрессию целевых генов при повышенной их экспрессии, либо о том, что функциональная доставка была ⁴⁰ ненадлежащей или недостаточной.

⁴⁵ [00111] Для получения большей информации о стабильности миметиков miRNA *in vivo* мышам вводили 125 мг/кг миметика miR-29b и через 1, 2, 4 или 7 дней их умерщвляли. Устойчивое присутствие миметика miR-29b во всех исследуемых тканях можно было обнаружить как при помощи нозерн-блоттинга, так и при помощи ПЦР-анализа в режиме реального времени через один день после инъекции, однако после этого выведение из тканей существенно различалось (ФИГ. 1Е и F). миметик miR-29b быстро выводился из печени и почек, с минимальным обнаружением через 1 день. Легкое и селезенка продемонстрировали наиболее явное обнаружение миметика miR-

29b с течением времени, которое сохранялось по меньшей мере в течение 4 дней после обработки (ФИГУРЫ 1Е и 1F). Повышение было специфическим для miR-29b без какого-либо влияния на уровни miR-29a и miR-29c, что измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени (ФИГ. 7). Также в данном случае ПЦР-анализ мишеней miR-29 в режиме реального времени не показал снижения экспрессии на уровне мРНК у нестressedированных животных (ФИГ. 8).

[00112] Совместно эти данные свидетельствовали о том, что миметик miR-29b в чистом виде мог повышать уровень miRNA, при этом наблюдалось зависимое от ткани выведение и эффективность доставки, без какого-либо явного влияния на экспрессию генов в исходных условиях.

Пример 3. миметик miR-29b ослабляет индуцированный блеомицином фиброз легких

[00113] Современные виды лечения фиброза тканей основаны преимущественно на целенаправленном воздействии на воспалительную реакцию; однако эти виды лечения в конечном итоге являются неэффективными для предупреждения этого заболевания, что подчеркивает потребность в понимании новых механизмов и терапевтических подходах (Friedman et al, 2013). Недавние исследования свидетельствуют об участии miRNA в фиброзе легких (Pandit et al, 2011).

[00114] В связи с предпочтительным распределением миметика miR-29b в легких, изучали вопрос касательно того, будет ли способствовать стресс и последующая индукция экспрессии целевых генов определяемым изменениям целевых генов мРНК и последующим терапевтическим эффектам в ответ на обработку миметиком miR-29b. Для исследования этого применяли индуцированную блеомицином модель фиброза легких, как описано ранее (Pandit et al, 2010). В частности, мышей анестезировали путем помещения их в камеру с полотенцами, пропитанными 40% раствором изофлурана. 0,0375 Ед. блеомицина (Hospira, Иллинойс) вводили интратрахеально в 50 мкл 0,9% физиологического раствора. Для определения влияния имитирования miR-29b на ранний фиброз контрольным (обработанным физиологическим раствором) и обработанным блеомицином мышам вводили 100 мг/кг миметика miR-29b, содержащего SEQ ID NO: 2 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити, контрольный миметик или аналогичный объем физиологического раствора в два момента времени: через 3 и 10 дней после обработки блеомицином; в день 14 животных умерщвляли и извлекали легкие. Для определения влияния имитирования miR-29b на тяжелый фиброз миметик miR-29b вводили в дни 10, 14 и 17 после обработки блеомицином или физиологическим раствором, а в день 21 мышей умерщвляли. В обоих протоколах легкие извлекали для гистологического анализа, анализа содержания гидроксипролина и экстракции РНК.

[00115] Как и ожидалось, через 14 дней после обработки блеомицином уровни miR-29 снижались, в то время как обработка миметиком miR-29b приводила к повышенному обнаружению уровней miR-29b по сравнению либо с контрольными животными, либо с животными, которым вводили физиологический раствор, что измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени, при этом наблюдался высокий уровень варьирования (ФИГ. 2А). Для определения того, будет ли подобное снижение уровней miR-29 наблюдаваться у людей, шестнадцать образцов легочной ткани получали из послеоперационных остатков биоптатов или легких, эксплантированных от пациентов с пневмофиброзом (IPF), которые перенесли трансплантацию легких. Образцы получали из банка тканей системы здравоохранения Питтсбургского университета (University of Pittsburgh Health Sciences Tissue Bank). Сопоставимое снижение уровней miR-29 наблюдали в биоптатах легких от пациентов с пневмофиброзом (IPF) по сравнению с нормальными контролями (ФИГ. 2В).

[00116] Для гистологического исследования срезы тканей легкого (4 мкм) окрашивали трихромом по Массону (коллаген/соединительная ткань), по два среза на животное, по двое животных на группу. Иммунное окрашивание проводили после удаления парафина, гидратации и блокирования согласно рекомендации производителя (система детекции ABC от Vector's lab, США). Срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичным антителом (Igf1, разбавленным 1: 100 в PBS) и в течение 1 часа при комнатной температуре с вторичными антителами (Invitrogen, США). Срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином. Первичное антитело заменяли на неиммунную сыворотку для получения отрицательных контролей. Наконец, срезы фиксировали с помощью среды для заливки (DAKO, США) и анализировали с применением микроскопа Nikon. Гистологический анализ показал явную и устойчивую фиброзную и воспалительную реакцию на обработку блеомицином, которую ослабляли с помощью обработки миметиком miR-29b (ФИГ. 2C).

[00117] Кроме того, гидроксипролин в легких анализировали на предмет общего содержания коллагена с помощью набора для колориметрического анализа от Biovision (Милпитас, Калифорния) согласно инструкции производителя. Вкратце, легкие от контрольных и экспериментальных мышей высушивали до постоянного веса и гидролизовали в 12N HCl в течение 3 часов при 120°C. Продукты гидролиза приводили в реакцию с реагентом хлорамином Т и визуализировали в реагенте DMAB. Поглощение измеряли при 560 нм на ридере для микропланшетов. Данные выражали в мкг гидроксипролина/правое легкое.

[00118] Анализ гидроксипролина свидетельствовал о значимом повышении после обработки блеомицином как в группах, обработанных физиологическим раствором, так и в группах, обработанных контролем, в то время как статистической разницы в группе, обработанной миметиком miR-29, между мышами, обработанными физиологическим раствором и блеомицином, обнаружено не было, что свидетельствовало о том, что обработка миметиком miR-29b ослабляет индуцированный блеомицином фиброз легких (ФИГ. 2D).

[00119] Сигнальные пути, задействованные во врожденный иммунный ответ, выступают важными факторами трансдифференцировки миофибробластов, вызывая фиброз. С целью дополнительной характеристики терапевтических эффектов миметика miR-29b на фоне индуцированного блеомицином фиброза легких у этих мышей выполняли бронхоальвеолярный лаваж (BAL) и оценивали уровни цитокинов с применением панели для анализа цитокинов/хемокинов человека от Bio-Rad. Всю процедуру выполняли согласно инструкции производителя. Вкратце, BAL разбавляли в пять раз и проводили анализ в 96-луночных фильтр-планшетах. Для стадии обнаружения образцы инкубировали в течение 30 минут со стрептавидином, коньюгированным с R-фикаоэритрином и анализировали в системе suspension array Bio-Plex (Bio-Rad). Первичные данные анализировали с применением программы Bioplex Manager 6.0 (Bio-Rad). Стандарты цитокинов, предоставляемые производителем, применяли для расчета концентраций образцов. Анализируемые вещества, количества которых были ниже диапазона обнаружения, не включали в интерпретацию данных. Также исключали образцы, которые содержали определенное анализируемое вещество в количестве ниже предела обнаружения, но при этом рассчитывали медианное значение.

[00120] Значимо более высокие концентрации IL-12, IL-4 и G-CSF, обнаруживаемые в жидкостях BAL из легких мышей, обработанных блеомицином, были снижены при обработке миметиком miR-29b (ФИГ. 2E-2G). Кроме того, индуцированное блеомицином повышение содержания обнаруживаемых иммунных клеток в жидкостях BAL значимо

снижалось в присутствие миметика miR-29b (ФИГ. 2Н), что указывало на обусловленный miR-29b ингибиторный эффект на иммунный ответ, который, по-видимому, является вторичным по отношению к антифибротическому эффекту. Для определения того,

оказывает ли имитирование miR-29 непосредственное влияние на макрофагов, миметик

5 miR-29b или контроль трансфицировали в клетки-макрофаги, RAW 264.7, и через 24 и 48 часов после трансфекции собирали клеточный супернатант. Оценивали IFN- γ , IL-1B,

IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, KC, IL-10, IL-12P70 и TNF- α , при этом значимых различий между миметиком miR-29b и контролем не наблюдали (данные не показаны). По результатам

10 ПЦР-анализа в режиме реального времени значимых различий в экспрессии Tgfb1, Ctgf, FGF1 или PDGF выявлено не было; однако наблюдали значимую разницу в экспрессии Csf3, Igf1 и Kc (ФИГ. 9, и данные не показаны).

[00121] Поскольку было хорошо обосновано, что miR-29 функционирует посредством регуляции в отношении множества различных родственных генов белков внеклеточного матрикса (van Rooij & Olson, 2012), регуляция в отношении подгруппы этих целевых

15 генов была подтверждена. Несмотря на то, что при обработке блеомицином наблюдали значимое повышение экспрессии Col1a1 и тенденцию к повышению экспрессии Col3a1 как в группах, обработанных физиологическим раствором, так и в группах,

обработанных контролем, обнаружение Col1a1 и Col3a1 значимо ослаблялось в присутствие миметика miR-29b у мышей, обработанных блеомицином (ФИГУРЫ 3А

20 и 3В). Интересно, что повышение уровней Igf1 в жидкостях BAL после обработки блеомицином значимо снижалось в присутствие миметика miR-29 по сравнению как с мышами, обработанными физиологическим раствором, так и мышами, обработанными контролем (ФИГ. 3С). Кроме того, иммуногистохимический анализ Igf1

25 продемонстрировал устойчивое снижение Igf1 после обработки блеомицином в группах с обработкой миметиком miR-29b по сравнению с физиологическим раствором или

контролями. (ФИГ. 3Д).

[00122] После установления того, что раннее (день 3 и день 10) имитирование miR-29 было достаточным для предупреждения индуцированного блеомицином фиброза, изучали способность имитирования miR-29 влиять на тяжелый фиброз. Для этой цели

30 введение миметика miR-29b начинали в день 10 после обработки блеомицином и введение доз повторяли в дни 14 и 17, после чего в день 21 легкие извлекали. Оценка содержания гидроксипролина в правом легком показала значимое повышение для блеомицина как в легких, обработанных физиологическим раствором, так и в легких, обработанных контролем; однако обработка миметиком miR-29b ослабляла этот эффект (ФИГ. 4А).

35 Кроме того, обработка блеомицином приводила к значимому повышению экспрессии Col1a1 и Col3a1, которая также нормализовалась при обработке миметиком miR-29b (ФИГ. 4В и 4С). Гистологическая оценка при помощи окрашивания трихромом подтверждала наличие данного эффекта, при этом блеомицин индуцировал выраженный

40 фиброз при обработке физиологическим раствором или контролем, который ослаблялся с помощью имитирования miR-29b (ФИГ. 4Д).

[00123] Хотя предполагалось, что эти наблюдаемые эффекты были опосредованы регуляцией выработки коллагена фибробластами легких, не следует исключать эффекты

других клеток, вырабатывающих коллаген. Для изучения этого вопроса эффекты миметика miR-29b оценивали *in vitro* в различных клетках легких, в том числе первичных

45 фибробластах от пациентов с IPF и клетках A549, линии клеток эпителия легких. Как и ожидалось, первичные фибробlastы легких от пациентов с IPF характеризовались

повышением Col1a1 и Col3a1 в ответ на TGF- α (ФИГ. 4Е и 4F). Этот эффект

дозозависимым образом ослаблялся с помощью обработки миметиком miR-29b как

через 24, так и через 48 часов (ФИГУРЫ 4Е, 4F, и данные не показаны). Аналогично, клетки А549 были чувствительными к TGF- α с устойчивым повышением экспрессии Col1a1 и Col3a1 (ФИГУРЫ 4G и 4H). Как и в предыдущем случае обработка миметиком miR-29b была способна блокировать индукцию выработки коллагена как при обработке 5 TGF- α , так и в исходных условиях (ФИГУРЫ 4G и 4H). Эффекты в отношении индукции выработки коллагена были намного более устойчивыми в клетках А549 по сравнению с первичными клетками при IPF. Однако это по всей видимости связано с уже высоким уровнем экспрессии в первичных фибробластах от пациентов с IPF. Кроме того, также 10 исследовали эффекты miR-29 в отношении линии макрофагов, Thp-1, однако экспрессию коллагена в этих клетках не можно было определить, несмотря на стимуляцию (данные не показаны). Эти данные свидетельствуют о том, что имитирование miR-29b способно 15 ослаблять индуцированную коллагеном экспрессию в фибробластах и эпителиальных клетках. Эти данные согласовываются с работой Xiao et al., в которой авторы показали, что перенос гена miR-29 с применением системы с использованием транспозона “спящая красавица” способствовал предупреждению и лечению индуцированного блеомицином 20 фиброза легких (Xiao et al, 2012), при этом дополнительно подчеркивался терапевтический потенциал повышения содержания miR-29.

[00124] Данные, описанные в данном документе, показывают возможность применения миметиков миРНК для восстановления функции утраченных miRNA 25 или miRNA с пониженной экспрессией. Однако важно отметить, что поскольку для соответствующего функционирования miRNA необходимо включение в RISC, требуется точная разработка структурных признаков синтетических олигонуклеотидных миметиков. Кроме того, данные в настоящей заявке показывают, что доставка в 30 соответствующие тип клеток или ткани обеспечивает эффективное имитирование miRNA. Например, в случае фиброза легких прямая доставка ингаляционным путем обеспечивает более высокую эффективность лечения по сравнению с традиционными путями введения.

Пример 4. Миметик miR-29b ослабляет выработку внеклеточного матрикса в коже
[00125] Помимо фиброза органов, в ряде исследований была показана роль miR-29

30 в фиброзе кожи, например, гипертрофических рубцах и келоидах, а также в кожном и других формах системного склероза (склеродермии). Например, фибробласты и срезы кожи, полученные от пациентов с системным склерозом, характеризовались существенным снижением уровней miR-29a по сравнению со здоровыми контролями (Maurer et al 2010). При сверхэкспрессии в фибробластах при системном склерозе miR-29a 35 была способна к устойчивому снижению экспрессии коллагенов I и III типа, как на уровне РНК, так и на уровне белков. В противоположность этому, ингибирование miR-29 в нормальных фибробластах приводило к повышению содержания этих коллагенов. Кроме того, обработанная блеомицином кожа также характеризовалась значимым снижением miR-29, что свидетельствовало о том, что снижение экспрессии miR-29 40 широко распространено при многих симптомах фиброза (Maurer et al 2010). Эти результаты были дополнительно подтверждены в другом исследовании, где трансфекция miR-29a в фибробласты кожи здорового контроля обеспечивала значимое снижение экспрессии коллагена. Кроме того, сверхэкспрессия miR-29a в фибробластах кожи 45 снижала секрецию TIMP-1 и усиливалась разрушение коллагенового геля. Эти результаты также были подтверждены в случае фибробластов от пациентов с системным склерозом (Ciechomska et al 2014). В совокупности эти исследования указывают на имитирование miR-29 в качестве терапевтического потенциала при местных формах фиброза, в том числе фиброза кожи и системного склероза.

[00126] Для определения влияния агонизма или антагонизма miR-29 в коже применяли мышнюю модель операционной раны. В частности, самцов мышей C57BL/6 анестезировали 2-5% ингаляционным изофлураном с применением ингаляционной камеры и поддерживали при 1% изофлуране на дыхательном контуре для всех процедур.

- 5 Для всех хирургических процедур в качестве анальгетика применяли бупренофин (0,1 мг/кг). Животных анестезировали, удаляли шерсть с помощью бритья и нанесения крема для удаления волос Nair, а участок кожи готовили для надреза с применением бетадина и пропитанной спиртом хирургической щетки. На спинах мышей делали один-два кожных разреза длиной 1 см. Разрезы закрывали 2-5 прерывистыми швами и
- 10 покрывали прозрачной полугерметичной повязкой Tegaderm (3M). Мышам с резанными кожными ранами или без них делали внутрикожную инъекцию несущей среды (PBS), 100 нмоль миметика miR-29b (содержащего SEQ ID NO: 2 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити) или 100 нмоль анти-miR-29, через 3 дня после создания резаной раны делали внутрикожную инъекцию олигонуклеотидных соединений или
- 15 несущей среды (PBS) в двух 50 мкл объемах на каждой стороне от средней линии разреза, или инъекцию одного 100 мкл объема в соседний, неповрежденный участок кожи. Анти-miR-29 характеризовалась последовательностью 5'-
IGs.dAs.dTs.dTs.lTs.lCs.dAs.lAs.dAs.lTs.lGs.dGs.lTs.dGs.lCs.lTs-3' (SEQ ID NO: 36), где "l" представляет собой закрытый нуклеотид, "d" представляет собой
- 20 дезоксирибонуклеотиды и "s" представляет собой фосфотиоатную связь. Мышей умерщвляли через 24 часа после введения олигонуклеотидных соединений, а кожу в месте(местах) обработки извлекали и мгновенно замораживали в жидком азоте для анализа экспрессии мРНК.

[00127] Общую РНК экстрагировали из кожи с применением реагента Trizol (Invitrogen) 25 и выполняли ПЦР-анализ в режиме реального времени, как описано выше, за исключением того, что в качестве контролей применяли GAPDH, B2M, HPRT1 и PP1B для анализа генов образцов кожи.

[00128] Для микроматричного анализа один мкг общей РНК на образец отправляли в MOgene для микроматричного анализа в сравнении с универсальной эталонной РНК 30 мыши (Agilent) на матрице Agilent (Mouse GE (V2), 4x44k – 026655). Анализ выполняли с применением ArrayStudio, а тепловые карты получали с применением программы из системы программного обеспечения R.

[00129] С помощью микроматричного анализа идентифицировали положительно и отрицательно регулируемые гены относительно контролей PBS. 228 генов были 35 подвержены реципрокной регуляции ($p < 0,05$ или кратность изменения $> 1,5$) со стороны миметика miR-29b и анти-miR-29 (ФИГ. 10 и таблица 5). Эти регулируемые miR-29 гены и их ортологи у других видов можно использовать в качестве биомаркеров трансляции для выявления ответа на лечение агонистом miR-29 или антагонистом miR-29.

Таблица 5.

40

Ген	Миметик miR-29b		Анти-miR-29	
	Кратность изменения	p-значение	Кратность изменения	p-значение
Cytl1	-3,21	0,000	1,53	0,034
Col3a1	-2,68	0,074	1,61	0,352
Col1a1	-2,43	0,051	2,16	0,081
Col1a2	-2,38	0,028	2,26	0,036
Fstl1	-2,25	0,015	2,15	0,019
Col5a2	-2,19	0,005	1,95	0,012
4930543N07Rik	-2,13	0,005	3,10	0,000

5	Faim2	-2,13	0,083	2,42	0,049
	Tmem213	-2,06	0,047	2,39	0,022
	Tgfb3	-1,99	0,002	-1,29	0,145
	Lzts1	-1,97	0,001	1,43	0,017
	Eln	-1,95	0,004	1,14	0,472
10	Slc5a2	-1,94	0,018	2,09	0,010
	Tnp2	-1,93	0,073	4,05	0,002
	Olfr1336	-1,87	0,001	1,75	0,002
	Tdrd9	-1,82	0,113	2,85	0,014
	Gm6602	-1,81	0,194	2,83	0,038
15	F830016B08Rik	-1,78	0,098	2,16	0,037
	Myo3b	-1,78	0,034	1,82	0,030
	Colec11	-1,77	0,010	1,80	0,009
	Gm10428	-1,75	0,010	1,94	0,005
	Vmn1r65	-1,70	0,042	3,21	0,001
	Olfr67	-1,69	0,003	1,37	0,034
20	Bsnd	-1,69	0,107	2,05	0,038
	Slc10a5	-1,69	0,038	1,65	0,045
	Defa26	-1,68	0,076	2,06	0,022
	Serph1	-1,68	0,124	2,01	0,049
	Gm5606	-1,67	0,018	1,77	0,011
	Wfdc11	-1,67	0,252	2,64	0,048
25	Gimap7	-1,65	0,091	1,92	0,036
	Nedd4l	-1,64	0,001	1,34	0,012
	Cacna1g	-1,63	0,094	1,81	0,049
	Prickle1	-1,63	0,001	1,25	0,036
	4931415C17Rik	-1,62	0,182	2,94	0,012
30	D730005E14Rik	-1,61	0,156	2,30	0,025
	Ccr10	-1,60	0,014	1,50	0,028
	Gm22	-1,60	0,003	2,56	0,000
	Ngp	-1,60	0,075	1,83	0,030
	Ascl1	-1,60	0,026	1,78	0,010
	Tgfb2	-1,60	0,016	1,08	0,618
35	Cyp2c29	-1,59	0,009	1,42	0,030
	Gm5797	-1,59	0,011	1,49	0,021
	Col5a3	-1,59	0,035	1,05	0,779
	A730093L10Rik	-1,59	0,060	1,69	0,039
	Fkbp10	-1,57	0,027	1,57	0,028
	Mfap2	-1,56	0,032	1,83	0,008
40	Gm5485	-1,55	0,064	5,68	0,000
	Slamf9	-1,54	0,204	2,08	0,048
	Mab21l3	-1,54	0,005	1,53	0,006
	Fam57b	-1,53	0,008	1,50	0,010
	Pcolce	-1,53	0,091	1,62	0,060
	Gm6760	-1,52	0,215	2,26	0,031
	Gng13	-1,51	0,073	2,07	0,006
45	4933404M02Rik	-1,50	0,361	3,49	0,018
	C1qtnf6	-1,50	0,032	1,50	0,031
	Tmem119	-1,49	0,019	1,46	0,023
	Ubtid2	-1,49	0,001	1,48	0,001
	Rasl11b	-1,48	0,045	1,77	0,009
	Nr5a2	-1,47	0,011	1,36	0,031
	Gm3727	-1,46	0,018	1,43	0,024
	Gprasp2	-1,46	0,044	1,93	0,003
	Syt10	-1,45	0,015	2,08	0,000
	Otog	-1,44	0,036	1,65	0,009
	Bdh2	-1,43	0,011	1,81	0,001

5	Sema3b	-1,42	0,045	1,56	0,017
	AI118078	-1,42	0,032	1,69	0,005
	Npcl11	-1,41	0,032	1,40	0,036
	Dnmt3a	-1,41	0,015	1,30	0,046
	Cxcr6	-1,40	0,024	1,99	0,000
10	Sh3pxd2a	-1,37	0,044	1,42	0,029
	Scarf2	-1,35	0,004	1,67	0,000
	LOC100862627	-1,34	0,006	1,45	0,002
	Selm	-1,34	0,015	1,42	0,006
	Col11a1	-1,34	0,509	-1,02	0,958
15	Slc12a5	-1,34	0,007	1,29	0,013
	Pex11c	-1,33	0,000	1,24	0,002
	Gpr176	-1,32	0,041	1,68	0,002
	Qprt	-1,32	0,037	1,29	0,050
	Phldb2	-1,31	0,042	1,52	0,006
20	Prl2c1	-1,31	0,007	1,37	0,003
	Rab39	-1,30	0,018	1,61	0,001
	Dact3	-1,30	0,003	1,60	0,000
	Dlx3	-1,26	0,010	1,19	0,037
	Sepw1	-1,25	0,021	1,26	0,017
	Socs7	-1,25	0,019	1,22	0,030
25	Maged1	-1,24	0,008	1,26	0,006
	Ckb	-1,22	0,035	1,24	0,026
	Mmp2	-1,21	0,288	1,55	0,031
	Nfatc4	-1,20	0,043	1,21	0,039
	Gm13623	-1,20	0,032	1,51	0,000
	Trp53i13	-1,19	0,025	1,32	0,002
30	Lysmd4	-1,17	0,015	1,23	0,004
	Polr2m	-1,17	0,000	1,12	0,002
	Pkd1	-1,17	0,041	1,17	0,035
	Zdhhc1	-1,16	0,034	1,25	0,005
	NIgn2	-1,15	0,043	1,22	0,009
	Gm9223	-1,15	0,005	1,30	0,000
35	Tox4	-1,14	0,016	1,16	0,007
	Josd1	-1,10	0,039	1,14	0,009
	Trip12	-1,10	0,017	1,28	0,000
	Bet1l	-1,10	0,020	1,24	0,000
	Scaf1	-1,09	0,039	1,16	0,003
	Dynlrb1	-1,07	0,015	1,07	0,024
40	Fam195b	-1,07	0,001	1,24	0,000
	Smarca5	1,05	0,013	-1,05	0,023
	Rae1	1,07	0,016	-1,17	0,000
	Nhp2l1	1,07	0,013	-1,23	0,000
	Pin1-ps1	1,07	0,038	-1,13	0,003
	Ppp1r7	1,08	0,011	-1,16	0,000
45	Lars	1,08	0,012	-1,11	0,002
	Wdsub1	1,09	0,031	-1,13	0,006
	Fam120a	1,09	0,043	-1,10	0,032
	3010027C24Rik	1,10	0,032	-1,15	0,005
	Eif4a3	1,10	0,021	-1,14	0,004
	Vprbp	1,10	0,042	-1,38	0,000
	Naa20	1,10	0,008	-1,07	0,037
	Smu1	1,11	0,006	-1,17	0,001
	Tmed10	1,11	0,004	-1,06	0,039
	Dus1l	1,11	0,033	-1,16	0,006
	Ecd	1,11	0,026	-1,24	0,001
	Naa10	1,11	0,015	-1,10	0,026

5	Ddx18	1,11	0,011	-1,11	0,014
	Btbd9	1,11	0,002	-1,06	0,037
	Ubap2l	1,11	0,008	-1,11	0,008
	Pnkp	1,12	0,022	-1,11	0,023
	Parl	1,12	0,022	-1,25	0,001
10	Tle4	1,12	0,011	-1,20	0,001
	Wbp11	1,12	0,027	-1,12	0,026
	Nek4	1,12	0,027	-1,26	0,001
	Poc5	1,13	0,039	-1,12	0,046
	Uchl5	1,13	0,002	-1,28	0,000
15	Recql	1,13	0,006	-1,09	0,030
	Psmd3	1,13	0,011	-1,10	0,028
	Asna1	1,13	0,033	-1,31	0,000
	Polr1e	1,13	0,048	-1,20	0,009
	Csrp2bp	1,13	0,023	-1,18	0,006
	Parp1	1,13	0,049	-1,14	0,043
20	Abi1	1,13	0,003	-1,48	0,000
	Tubgcp2	1,14	0,006	-1,47	0,000
	Reps1	1,14	0,007	-1,16	0,003
	Mon2	1,14	0,023	-1,13	0,032
	Seh1l	1,14	0,034	-1,16	0,021
	Mri1	1,14	0,000	-1,13	0,000
25	Ddx20	1,14	0,002	-2,18	0,000
	Nup133	1,14	0,001	-1,09	0,006
	Ubr7	1,15	0,006	-1,10	0,033
	Fam32a	1,15	0,009	-1,16	0,007
	Cct2	1,15	0,003	-1,26	0,000
	Actl6a	1,15	0,027	-1,15	0,024
30	Snrbp	1,15	0,012	-1,21	0,002
	Ino80	1,15	0,032	-1,14	0,038
	1500002O20Rik	1,15	0,025	-1,28	0,001
	Anxa7	1,15	0,008	-1,18	0,003
	Wdr74	1,15	0,035	-1,32	0,001
35	Mrps27	1,16	0,015	-1,22	0,003
	Trnaulap	1,16	0,007	-1,18	0,004
	Usp39	1,16	0,031	-1,19	0,015
	Mbd2	1,17	0,010	-1,12	0,043
	Akap10	1,17	0,016	-1,35	0,000
	Rps19bp1	1,17	0,031	-1,23	0,008
	Faf1	1,17	0,026	-1,25	0,004
40	Wdr55	1,17	0,002	-1,15	0,005
	Gorasp2	1,17	0,049	-1,20	0,027
	Nfe2l2	1,17	0,011	-1,23	0,002
	Nup54	1,17	0,048	-1,70	0,000
	Med6	1,17	0,001	-1,17	0,002
45	Mapkap1	1,17	0,034	-1,19	0,026
	Nsmce2	1,18	0,002	-1,09	0,043
	Nsun2	1,18	0,011	-1,17	0,016
	Map3k3	1,19	0,030	-1,28	0,005
	Stat6	1,19	0,021	-1,40	0,001
	Yrdc	1,19	0,008	-1,25	0,002
	Ap1m1	1,19	0,002	-1,15	0,005
	Ccdc51	1,19	0,013	-1,17	0,019
	Gins4	1,19	0,012	-1,24	0,004
	Tmem165	1,19	0,027	-1,21	0,018
	Txnl1	1,19	0,031	-1,71	0,000
	Zfp608	1,19	0,000	-1,30	0,000

5	Mphosph10	1,19	0,019	-1,29	0,003
	Spp1	1,20	0,014	-1,16	0,029
	Wdr43	1,20	0,014	-1,16	0,028
	Atpbd4	1,20	0,004	-1,11	0,044
	Pafah1b2	1,20	0,050	-1,20	0,049
10	Exosc8	1,20	0,027	-1,21	0,021
	Nop14	1,20	0,003	-1,48	0,000
	Nop16	1,20	0,038	-1,22	0,030
	Pdcd6ip	1,20	0,011	-1,90	0,000
	Cbl	1,21	0,035	-1,83	0,000
15	Pcif1	1,21	0,020	-1,24	0,011
	Rbm14	1,21	0,045	-1,22	0,036
	Epb4.115	1,21	0,049	-1,38	0,004
	Mtmm10	1,21	0,041	-1,48	0,001
	Ttf2	1,21	0,030	-1,42	0,001
20	Cenpo	1,22	0,009	-1,31	0,002
	Rreb1	1,22	0,049	-1,84	0,000
	Depdc5	1,22	0,002	-1,39	0,000
	Umps	1,23	0,012	-1,16	0,046
	Zfp52	1,23	0,039	-1,55	0,001
25	BB070754	1,24	0,017	-1,28	0,010
	Gnl3	1,24	0,036	-1,34	0,010
	Rbbp5	1,25	0,003	-1,34	0,001
	Fam178a	1,26	0,048	-1,35	0,015
	Etv5	1,27	0,035	-1,55	0,002
	Gins1	1,27	0,034	-1,32	0,019
	Lbr	1,28	0,002	-1,45	0,000
30	Gm5039	1,29	0,030	-1,57	0,002
	Pgam1	1,29	0,027	-1,26	0,036
	Atg7	1,29	0,005	-1,24	0,011
	9030425P06Rik	1,30	0,005	-1,34	0,003
	Lyst	1,30	0,028	-2,43	0,000
	Rgs19	1,31	0,003	-1,24	0,012
35	Numb	1,31	0,001	-1,63	0,000
	Snx27	1,32	0,014	-2,48	0,000
	Rnf130	1,32	0,021	-1,31	0,026
	Pias3	1,33	0,014	-1,90	0,000
	Pqlc3	1,33	0,009	-1,30	0,013
	Chka	1,33	0,005	-1,44	0,001
40	A430105D02Rik	1,37	0,003	-3,13	0,000
	Sdc4	1,38	0,004	-2,05	0,000
	Rbm3	1,39	0,002	-1,56	0,000
	5830468K08Rik	1,41	0,044	-1,89	0,002
	Clcn5	1,41	0,026	-1,49	0,014
	Fam65b	1,41	0,049	-1,50	0,026
45	Tgfa	1,46	0,004	-1,34	0,015
	Fgd4	1,48	0,000	-1,18	0,036
	3930401B19Rik	1,57	0,020	-1,46	0,043
	Itga3	1,57	0,031	-1,63	0,024
	2410137M14Rik	1,63	0,040	-1,64	0,039
	Egr4	2,02	0,024	-1,86	0,040
	Olfr663	2,06	0,022	-2,08	0,020

[00130] Анализ DAVID (NCBI) функциональных терминов, которые обогащены в двух группах, представлен на фиг. 10В. Неудивительно, что термины согласно “генной онтологии” (GO) внеклеточный матрикс, функция (кожи), адгезия/передача сигналов

в клетке и клеточная дифференцировка/апоптоз включали самые распространенные отрицательно регулируемые пути после обработки миметиком miR-29b. Структура клеток (ядер) и процессинг РНК включали самые распространенные положительно регулируемые пути после обработки миметиком miR-29b.

[00131] Для дополнительного подтверждения влияния обработки миметиком miR-29b в коже мышам с глубокими резаными ранами делали внутрикожную инъекцию PBS, 20, 50 или 100 нмоль миметика miR-29b (содержащего SEQ ID NO: 2 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити). Количественный ПЦР-анализ с обратной транскрипцией выполняли для 24 генов, идентифицированных как прямые или непрямые мишени модулирования miR-29 в коже (19 репрессируемых миметиком miR-29b и с повышением экспрессии с помощью анти-miR-29, 5 с повышением экспрессии с помощью миметика miR-29b и репрессируемых анти-miR-29). Как было показано, гены внеклеточного матрикса (коллагены, ELN и т. д.) и другие, вовлеченные в фиброзный процесс (например, MMP2, TGFB2), подвергались репрессии в коже в результате обработки миметиком miR-29b (ФИГ. 11А), при этом было показано, что экспрессия некоторых рецепторов клеточной поверхности (ITGA3, LBR, NUMB, SDC4) и факторов, связанных с опосредованным рецепторами эндоцитозом (SNX27), повышалась в коже при обработке миметиком miR-29b (ФИГ. 11В). Эти исследования свидетельствуют о том, что миметик miR-29b является активным в коже при локальной обработке, и предполагается, что помимо его влияния на фиброз органов, имитирование miR-29 может представлять собой эффективную терапию фиброза кожи различной этиологии. С помощью этих исследований также были выявлены вышеупомянутые гены в качестве биомаркеров трансляции, экспрессия которых коррелировала с активностью миметика miR-29b в коже. Эти биомаркеры трансляции можно использовать в клиническом испытании, исследовании безопасности и эффективности миметиков miR-29b у добровольцев с нормальным состоянием здоровья и пациентов со склеродермией.

Пример 5. Активность миметиков miR-29 и влияние модификаций нуклеотидов.

[00132] Для определения эффективности миметиков miR-29a, b и c в регуляции экспрессии целевых генов различные миметики miR-29a, b и c трансфицировали в фибробласты легких человека IMR-90 в концентрации 10 нМ, и измеряли экспрессию коллагена с помощью количественной RT-PCR. Эти исследования указывают на то, что миметик miR-29a, содержащий SEQ ID NO: 27 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 5 в качестве второй нити, и миметик miR-29b, содержащий SEQ ID NO: 19 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити, являются наиболее эффективными в отношении репрессии экспрессии множества генов коллагена, в то время как миметик miR-29c, содержащий SEQ ID NO: 35 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 24 в качестве второй нити, является менее эффективным (ФИГ. 12). Эти эффекты могут быть специфичными по отношению к типам клеток или целевым генам, однако они свидетельствуют о том, что действительно имеются различия в способности трех миметиков репрессировать экспрессию генов внеклеточного матрикса.

[00133] В этом же эксперименте также исследовали влияние модификаций нуклеотидов на эффективность миметиков miR-29b. Эти исследования указывают на то, что миметик miR-29b, содержащий SEQ ID NO: 19 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити, функционирует подобно миметику miR-29b, содержащему SEQ ID NO: 19 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 30 в качестве второй нити, который имеет ту же последовательность и конфигурацию первой и второй нити, но другой химический линкер между смысловой (сопровождающей) нитью и холестерином. Шахматная

конфигурация 2'-О-метил модификаций делает миметики miR-29 (миметик, содержащий SEQ ID NO: 31 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 28 в качестве второй нити, и миметик, содержащий SEQ ID NO: 32 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 29 в качестве второй нити) абсолютно неэффективными. Модификации всех остатков С и У антисмысловой (первой/направляющей) нити (миметик, содержащий SEQ ID NO: 33 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити) частично снижают активность миметика. Аналогично, удаление 3'-выступающего конца антисмысловой нити (миметик, содержащий SEQ ID NO: 24 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити) частично снижают активность миметика. См. фигуру 12.

[00134] Эти исследования способствовали классификации соединений-миметиков miR-29 на основе активности *in vitro* в определенной линии клеток (IMR-90) и применению определенных целевых генов (*COL1A1*, *COL3A1*, *COL4A5*) в качестве показателя эффективности, независимо от поглощения соединений, и их можно применять в качестве основы для отбора соединений с целью исследования пассивной доставки *in vitro* или исследования *in vivo*.

Пример 6. Активность *in vivo* миметиков miR-29b с модификациями по линкерам.

[00135] Мыши с резанными ранами были обработаны 20 нмоль различных миметиков miR-29b, которые отличаются только связью между холестериновым фрагментом и второй/смысловой нитью. Соединение, представляющее собой миметик, которое 20 содержало линкер из шести атомов углерода между холестерином и смысловой нитью (миметик, содержащий SEQ ID NO: 19 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити), и соединение, которое содержало тот же линкер из шести атомов углерода между холестерином и смысловой нитью, но было связано расщепляемым фрагментом (dT.dT) (SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 15), характеризовались подобной активностью в 25 отношении репрессирования целевых генов (ФИГ. 13). N/S на ФИГ. 13 указывает на то, что в активности миметика miR-29b, содержащего SEQ ID NO: 19 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити, и миметика, содержащего SEQ ID NO: 19 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 15 в качестве второй нити, значимой разницы не наблюдали. Миметики miR-29b, содержащие линкер из девяти атомов углерода (SEQ 30 ID NO: 19/SEQ ID NO: 17) и линкер на 5'-конце (SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 16) были неэффективными в отношении репрессирования целевых генов (ФИГ. 13).

Пример 7. Влияние 5'-фосфорилирования на активность миметиков miR-29b.

[00136] Фибробlastы кожи RAB-9 (ATCC CRL-1414) трансфицировали различными концентрациями миметиков miR-29b с 5'-фосфорилированием антисмысловой нити 35 (миметик, содержащий SEQ ID NO: 2 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити) и без него (миметик, содержащий SEQ ID NO: 19 в качестве первой нити и SEQ ID NO: 1 в качестве второй нити). Значимых различий активности двух миметиков в отношении репрессии целевых генов, что измеряли по экспрессии *Col1a1*, *Col1a2* или *Col3a1*, не наблюдали (представлено как N/S на ФИГ. 14). Оба миметика miR-29b значимо 40 (p<0,0001) репрессировали экспрессию целевых генов по сравнению с обработкой несущей средой, трансфекцией имитационным контролем или обработкой контрольным миметиком. См. ФИГ. 14.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bouchie A (2013) First microRNA mimic enters clinic. *Nature biotechnology*31: 577
 45 Cushing L, Kuang PP, Qian J, Shao F, Wu J, Little F, Thannickal VJ, Cardoso WV, Lu J (2011) miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*45: 287-294
 Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S (2013) Therapy for fibrotic diseases: nearing

the starting line. *Sci Transl Med*5: 167sr161

He Y, Huang C, Lin X, Li J (2013) MicroRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases. *Biochimie*95: 1355-1359

Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England journal of medicine*368: 1685-1694

Kasinski AL, Slack FJ (2012) miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma. *Cancer Res*72: 5576-5587

Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT (2009) Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*137: 1005-1017

Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay RE, Michel BA, Distler JH, Gay S, Distler O (2010) MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*62: 1733-1743

Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu SI, Sobue G (2012) Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nature medicine*

Pandit KV, Corcoran D, Yousef H, Yarlagadda M, Tzouvelekis A, Gibson KF, Konishi K, Yousem SA, Singh M, Handley D, Richards T, Selman M, Watkins SC, Pardo A, Ben-Yehudah A, Bouros D, Eickelberg O, Ray P, Benos PV, Kaminski N (2010) Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*182: 220-229

Pandit KV, Milosevic J, Kaminski N (2011) MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res*157: 191-199

Peacock H, Kannan A, Beal PA, Burrows CJ (2011) Chemical modification of siRNA bases to probe and enhance RNA interference. *The Journal of organic chemistry*76: 7295-7300

Qin W, Chung AC, Huang XR, Meng XM, Hui DS, Yu CM, Sung JJ, Lan HY (2011) TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*22: 1462-1474

Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T (2011) Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*53: 209-218

Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N (2011) Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochemical and biophysical research communications*412: 74-79

van Rooij E, Olson EN (2012) MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nature reviews Drug discovery*11: 860-872

van Rooij E, Purcell AL, Levin AA (2012) Developing microRNA therapeutics. *Circ Res*110: 496-507

van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*105: 13027-13032

Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, Koh P, Thomas M, Jandeleit-Dahm K, Gregorevic P, Cooper ME, Kantharidis P (2012) Suppression of microRNA-29 expression by TGF-beta1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*23: 252-265

Xiao J, Meng XM, Huang XR, Chung AC, Feng YL, Hui DS, Yu CM, Sung JJ, Lan HY (2012)

miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 20: 1251-1260

Zhang Y, Wu L, Wang Y, Zhang M, Li L, Zhu D, Li X, Gu H, Zhang CY, Zen K (2012)

Protective role of estrogen-induced miRNA-29 expression in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *The Journal of biological chemistry* 287: 14851-14862

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МИРАГЕН ТЕРАПЕУТИКС, ИНК.

МОНТГОМЕРИ, Расти Л.

ДЭЛБИ, Кристина М.

10 ВАН РОЙ, Ева

ГАЛЛАНТ-БЕМ, Корри

<120> Имитаторы miR-29 и пути их применения

<130> MIRG-047/01WO 308934-2484

<140> PCT/US2015/049018

15 <141> 2015-09-08

<150> US 62/047562

<151> 2014-09-08

<160> 42

<170> PatentIn версия 3.5

20 <210> 1

<211> 23

<212> РНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

25 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b

<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (1)..(1)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин

30 <220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (2)..(2)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин

<220>

35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (3)..(3)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин

<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

40 <222> (5)..(5)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин

<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (6)..(6)

45 <223> Может представлять собой О-метилуридин

<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК

<222> (8)..(8)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)
 5 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (12)..(12)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (19)..(19)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 25 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (21)..(21)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22)..(22)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 35 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (23)..(23)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углерода
 <400> 1
 аасасидии асакааггис сиа 23
 40 <210> 2
 <211> 25
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (1)..(1)

<223> Может быть модифицирована монофосфатным фрагментом
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (1)..(1)

5 <223> Может представлять собой фторуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (4)..(4)

<223> Может представлять собой фторцитидин
10 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (6)..(6)

<223> Может представлять собой фторцитидин
<220>
15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (7)..(7)

<223> Может представлять собой фторцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
20 <222> (9)..(9)

<223> Может представлять собой фторуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (10)..(10)

25 <223> Может представлять собой фторуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (11)..(11)

<223> Может представлять собой фторуридин
30 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (16)..(16)

<223> Может представлять собой фторуридин
<220>
35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (17)..(17)

<223> Может представлять собой фторцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
40 <222> (20)..(20)

<223> Может представлять собой фторуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (22)..(22)

45 <223> Может представлять собой фторуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (23)..(23)

<223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (23)..(25)
 5 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 <400> 2
 uagcaccsaui ugaaausagu guiuii 25
 <210> 3
 <211> 24
 10 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29a
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (2)..(2)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <400> 3
 uaaccgauuu cagaaggugc uauii 24
 <210> 4
 25 <211> 22
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29a
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (4)..(4)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (5)..(5)
 45 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (7)..(7)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (8)..(8)
 5 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (15)..(15)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (18)..(18)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (19)..(19)
 25 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (21)..(21)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <400> 4
 35 uaaccсииua садаuggucc ua 22
 <210> 5
 <211> 22
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29a
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 45 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (4)..(4)

5 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (5)..(5)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
10 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (7)..(7)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (8)..(8)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
20 <222> (9)..(9)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (11)..(11)

25 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (15)..(15)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
30 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (18)..(18)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (19)..(19)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
40 <222> (20)..(20)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (21)..(21)

45 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
<222> (22)..(22)

<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>35</p> <p>40</p> <p>45</p>	<p><223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углерода</p> <p><400> 5</p> <p>uaaccсииаа сагаагггсс ua</p> <p><210> 6</p> <p><211> 24</p> <p><212> РНК</p> <p><213> Искусственная последовательность</p> <p><220></p> <p><223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29a</p> <p><220></p> <p><221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (1)..(1)</p> <p><223> Может быть модифицирована монофосфатным фрагментом</p> <p><400> 6</p> <p>uагсассаисс uгaaaиссги uaии</p> <p><210> 7</p> <p><211> 24</p> <p><212> РНК</p> <p><213> Искусственная последовательность</p> <p><220></p> <p><223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29a</p> <p><220></p> <p><221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК</p> <p><222> (1)..(1)</p> <p><223> Может быть модифицирована монофосфатным фрагментом</p> <p><220></p> <p><221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК</p> <p><222> (1)..(1)</p> <p><223> Может представлять собой фторуридин</p> <p><220></p> <p><221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК</p> <p><222> (4)..(4)</p> <p><223> Может представлять собой фторцитидин</p> <p><220></p> <p><221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК</p> <p><222> (6)..(6)</p> <p><223> Может представлять собой фторцитидин</p> <p><220></p> <p><221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК</p> <p><222> (7)..(7)</p> <p><223> Может представлять собой фторцитидин</p> <p><220></p> <p><221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК</p> <p><222> (9)..(9)</p> <p><223> Может представлять собой фторуридин</p> <p><220></p> <p><221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК</p> <p><222> (10)..(10)</p>	<p>22</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>7</p> <p>24</p>
--	--	--

<223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 5 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (17)..(17)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (21)..(21)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (22)..(24)
 25 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 <400> 7
 uagcaccsauc ugaaaucggc uauu 24
 <210> 8
 <211> 25
 30 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (2)..(2)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <400> 8
 aacacugauu uscaauggug cuauu 25
 <210> 9
 45 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (1)..(1)
5 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (2)..(2)
<223> Может представлять собой О-метиладенозин
10 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (3)..(3)
<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (5)..(5)
<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
20 <222> (6)..(6)
<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (9)..(9)
25 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (10)..(10)
<223> Может представлять собой О-метилуридин
30 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (11)..(11)
<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (12)..(12)
<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
40 <222> (16)..(16)
<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (19)..(19)
45 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (21)..(21)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22)..(22)
 5 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (23)..(23)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углеродов
 10 <400> 9
 aacacugauu ucaaauggug cua 23
 <210> 10
 <211> 25
 <212> РНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)
 25 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (23)..(25)
 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 30 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (25)..(25)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углеродов
 <400> 10
 35 aacacugauu ucaaauggug cuau 25
 <210> 11
 <211> 24
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29a
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 45 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (22)..(24)
 5 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (24)..(24)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углеро-
 10 <400> 11
 иаассдациии садааггдигс иаии 24
 <210> 12
 <211> 24
 <212> РНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29c
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)
 25 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (22)..(24)
 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 30 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (24)..(24)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углеро-
 <400> 12
 35 иаассдациии сааааггдигс иаии 24
 <210> 13
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 45 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (3)..(3)

5 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (5)..(5)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
10 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (6)..(6)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (8)..(8)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
20 <222> (9)..(9)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (10)..(10)

25 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (12)..(12)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
30 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (16)..(16)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (19)..(19)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
40 <222> (20)..(20)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (21)..(21)

45 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (22)..(22)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
 <400> 13
 аасасидии асгггггггис сиа 23
 <210> 14
 5 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (3)..(3)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (5)..(5)
 25 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (6)..(6)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (8)..(8)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (10)..(10)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (12)..(12)
 45 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (19)..(19)
 5 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (21)..(21)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22)..(22)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 20 <222> (23)..(23)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углерода
 <400> 14
 аасасидиии асггггггггс сиа 23
 <210> 15
 25 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (3)..(3)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (4)..(4)
 45 <223> Может представлять собой аденоzin
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (5)..(5)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (6)..(6)

5 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (7)..(7)

10 <223> Может представлять собой гуанозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (8)..(8)

15 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (9)..(9)

20 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (10)..(10)

25 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (12)..(12)

30 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (13)..(13)

35 <223> Может представлять собой аденоzin
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (14)..(14)

40 <223> Может представлять собой аденоzin
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (15)..(15)

45 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (17)..(17)

<223> Может представлять собой гуанозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (18) .. (18)
 5 <223> Может представлять собой гуанозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (19) .. (19)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20) .. (20)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (21) .. (21)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (22) .. (22)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (23) .. (23)
 25 <223> Может представлять собой аденоzin
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (25) .. (25)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углеродов
 30 <400> 15
 аасасидии асааааггдис сиаатт 25
 <210> 16
 <211> 25
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 40 <222> (1) .. (1)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углеродов
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (3) .. (3)
 45 <223> Может представлять собой О-метиладеноzin
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (4) .. (4)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (5)..(5)

5 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (6)..(6)

10 <223> Может представлять собой аденоzin
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (7)..(7)

15 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (8)..(8)

20 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (9)..(9)

25 <223> Может представлять собой гуанозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (10)..(10)

30 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (11)..(11)

35 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (12)..(12)

40 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (14)..(14)

45 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (15)..(15)

<223> Может представлять собой аденоzin
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (16)..(16)

<223> Может представлять собой аденоzin
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (17) .. (17)
 5 <223> Может представлять собой аденоzin
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (18) .. (18)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (19) .. (19)
 <223> Может представлять собой гуанозин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20) .. (20)
 <223> Может представлять собой гуанозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (21) .. (21)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22) .. (22)
 25 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (23) .. (23)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (24) .. (24)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (25) .. (25)
 <223> Может представлять собой аденоzin
 <400> 16
 ttaacacugu uuacaaaugg uscua 25
 40 <210> 17
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1) .. (1)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (2)..(2)

5 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (3)..(3)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
10 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (5)..(5)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (6)..(6)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
20 <222> (8)..(8)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (9)..(9)

25 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (10)..(10)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
30 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (12)..(12)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (16)..(16)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
40 <222> (19)..(19)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (20)..(20)

45 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (21)..(21)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22)..(22)
 5 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (23)..(23)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 9 атомов углеро-
 10 <400> 17
 аасасидии асаааuggcс сиа 23
 <210> 18
 <211> 25
 <212> РНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 20 <222> (1)..(1)
 <223> Может быть модифицирована монофосфатным фрагментом
 <400> 18
 uagcaccсаи иугаааисаги сиии 25
 <210> 19
 25 <211> 25
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29b
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (4)..(4)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (6)..(6)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (7)..(7)
 45 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)

<223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 5 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (17)..(17)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22)..(22)
 25 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (23)..(23)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 30 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (23)..(25)
 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 <400> 19
 35 uagcaccsauu ugaaaacagu guuuu 25
 <210> 20
 <211> 25
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Первая-антисмыловая-направляющая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (1)..(1)
 45 <223> Может быть модифицирована монофосфатным фрагментом
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)

<223> Может представлять собой фторуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (4)..(4)

5 <223> Может представлять собой фторцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (6)..(6)

<223> Может представлять собой фторцитидин
10 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (7)..(7)

<223> Может представлять собой фторцитидин
<220>

15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (9)..(9)

<223> Может представлять собой фторцитидин
<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
20 <222> (10)..(10)

<223> Может представлять собой фторцитидин
<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (11)..(11)

<223> Может представлять собой фторцитидин
25 <220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (16)..(16)

<223> Может представлять собой фторуридин
30 <220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (17)..(17)

<223> Может представлять собой фторцитидин
<220>

35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (20)..(20)

<223> Может представлять собой фторуридин
<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
40 <222> (22)..(22)

<223> Может представлять собой фторуридин
<220>

<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (23)..(23)

<223> Может представлять собой фторуридин
45 <220>

<221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
<222> (23)..(25)

<223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей	
<400> 20	
uagcaccacc cgaardaacsu guuuu	25
<210> 21	
5 <211> 25	
<212> РНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29b	
10 <400> 21	
uagcaccasuu ugaardaacsu guuuu	25
<210> 22	
<211> 24	
<212> РНК	
15 <213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29c	
<220>	
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
20 <222> (1)..(1)	
<223> Может представлять собой О-метилуридин	
<220>	
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
<222> (2)..(2)	
25 <223> Может представлять собой О-метиладенозин	
<400> 22	
uaaccgauuu caaaaggguuc uauu	24
<210> 23	
<211> 22	
30 <212> РНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29c	
<220>	
35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
<222> (1)..(1)	
<223> Может представлять собой О-метилуридин	
<220>	
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
40 <222> (2)..(2)	
<223> Может представлять собой О-метиладенозин	
<220>	
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
<222> (4)..(4)	
45 <223> Может представлять собой О-метилцитидин	
<220>	
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
<222> (5)..(5)	

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (7)..(7)
 5 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (8)..(8)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (15)..(15)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (18)..(18)
 25 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (19)..(19)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (21)..(21)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <400> 23
 uaaccgиииа саааuggисс ua 22
 40 <210> 24
 <211> 22
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29c
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (2)..(2)

5 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (4)..(4)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
10 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (5)..(5)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (7)..(7)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
20 <222> (8)..(8)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (9)..(9)

25 <223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (11)..(11)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
30 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (15)..(15)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (18)..(18)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
40 <222> (19)..(19)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (20)..(20)

45 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (21)..(21)

	<223> Может представлять собой О-метилуридин	
	<220>	
	<221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК	
5	<222> (22)..(22)	
	<223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углеродов	
	<400> 24	
	uaaccсииа саааuggисс ua	22
	<210> 25	
	<211> 24	
10	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29c	
	<220>	
15	<221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Может быть модифицирована монофосфатным фрагментом	
	<400> 25	
	uагсассаии uгаааиссги uaии	24
20	<210> 26	
	<211> 24	
	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
25	<223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29c	
	<220>	
	<221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Может быть модифицирована монофосфатным фрагментом	
30	<220>	
	<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Может представлять собой фторуридин	
	<220>	
35	<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
	<222> (4)..(4)	
	<223> Может представлять собой фторцитидин	
	<220>	
	<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
40	<222> (6)..(6)	
	<223> Может представлять собой фторцитидин	
	<220>	
	<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
	<222> (7)..(7)	
45	<223> Может представлять собой фторцитидин	
	<220>	
	<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК	
	<222> (9)..(9)	

<223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 5 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (17)..(17)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (21)..(21)
 25 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (22)..(24)
 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 30 <400> 26

uagcasscauu ugaaaacggu uaau	24
<210> 27	
<211> 24	
<212> РНК	

35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29a
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (4)..(4)
 45 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (6)..(6)

<223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (7)..(7)
 5 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (17)..(17)
 25 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (21)..(21)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 35 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (22)..(24)
 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 <400> 27
 иагсассаисс игаааиссги иаии 24
 40 <210> 28
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (4)..(4)
 5 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (6)..(6)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (8)..(8)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (12)..(12)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (14)..(14)
 25 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (18)..(18)
 <223> Может представлять собой О-метил гуанозин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой О-метил гуанозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (22)..(22)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (23)..(23)
 45 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углеродов
 <400> 28
 аасасигаии иссаааuggugcua 23
 <210> 29

<211> 25
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (4)..(4)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (6)..(6)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (8)..(8)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 25 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (12)..(12)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (14)..(14)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (18)..(18)
 <223> Может представлять собой О-метилгуанозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 45 <223> Может представлять собой О-метил гуанозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22)..(22)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (23)..(25)
 5 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (25)..(25)
 <223> Может быть модифицирован конъюгатом холестерина с линкером из 6 атомов углеродов
 10 <400> 29
 аасасигаии исааааггги сиаии 25
 <210> 30
 <211> 23
 <212> РНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)
 25 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (3)..(3)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (5)..(5)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (6)..(6)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (8)..(8)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)
 45 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (12)..(12)
 5 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (19)..(19)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (21)..(21)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22)..(22)
 25 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (23)..(23)
 <223> Может быть модифицирована конъюгатом холестерина с тетраэтиленгликоловым фрагм
 30 <400> 30
 аасасидии асааааггдис сиа 23
 <210> 31
 <211> 23
 <212> РНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (3)..(3)
 45 <223> Может представлять собой О-метилгуанозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (5)..(5)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (7)..(7)
 5 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (13)..(13)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (15)..(15)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (17)..(17)
 25 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (19)..(19)
 <223> Может представлять собой О-метилгуанозин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (21)..(21)
 <223> Может представлять собой О-метилгуанозин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (23)..(23)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <400> 31

23

40 <210> 32
 <211> 25
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (3)..(3)

5 <223> Может представлять собой О-метилгуанозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (5)..(5)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин
10 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (7)..(7)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (9)..(9)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
20 <222> (11)..(11)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (13)..(13)

25 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (15)..(15)

<223> Может представлять собой О-метиладенозин
30 <220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (17)..(17)

<223> Может представлять собой О-метилцитидин
<220>
35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (19)..(19)

<223> Может представлять собой О-метилгуанозин
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
40 <222> (21)..(21)

<223> Может представлять собой О-метилгуанозин
<220>
<221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
<222> (23)..(25)

45 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
<220>
<221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
<222> (23)..(23)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
 <400> 32
 uagcaccsaau ugaaaucagu guuuu 25
 <210> 33
 5 <211> 25
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29b
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (4)..(4)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (6)..(6)
 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (7)..(7)
 25 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (17)..(17)
 45 <223> Может представлять собой О-метилцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)

<223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22)..(22)
 5 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (23)..(25)
 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (23)..(23)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <400> 33
 15 uagcaccasuu ugaaaacagu guuuu 25
 <210> 34
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29b
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 25 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (4)..(4)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (6)..(6)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (7)..(7)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (9)..(9)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 45 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)

<223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 5 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (17)..(17)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (22)..(22)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (23)..(23)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <400> 34
 uagcaccsaau ugaaaucagu guu 23
 <210> 35
 25 <211> 24
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29c
 30 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 35 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (4)..(4)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (6)..(6)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (7)..(7)
 45 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (9)..(9)

<223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 5 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (17)..(17)
 <223> Может представлять собой фторцитидин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (20)..(20)
 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (21)..(21)
 25 <223> Может представлять собой фторуридин
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (22)..(24)
 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 30 <400> 35

uagcaccasuu ugaaaacggu uaau <210> 36 <211> 16 <212> ДНК	24
--	----

35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> анти-miR-29
 <220>
 <221> ДРУГОЙ_ПРИЗНАК

40 <222> (1)..(16)
 <223> Может быть соединена посредством фосфотиоатных связей
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)

45 <223> Может представлять собой дезоксигуанозин закрытой нуклеиновой кислоты
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (5)..(5)

<223> Может представлять собой дезокситимидин закрытой нуклеиновой кислоты
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (6)..(6)
 5 <223> Может представлять собой дезоксицитидин закрытой нуклеиновой кислоты
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (8)..(8)
 <223> Может представлять собой дезоксиаденозин закрытой нуклеиновой кислоты
 10 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (10)..(10)
 <223> Может представлять собой дезокситимидин закрытой нуклеиновой кислоты
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (11)..(11)
 <223> Может представлять собой дезоксигуанозин закрытой нуклеиновой кислоты
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (13)..(13)
 <223> Может представлять собой дезокситимидин закрытой нуклеиновой кислоты
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (15)..(15)
 25 <223> Может представлять собой дезоксицитидин закрытой нуклеиновой кислоты
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (16)..(16)
 <223> Может представлять собой дезокситимидин закрытой нуклеиновой кислоты
 30 <400> 36
 gatttcaaat ggtgct 16
 <210> 37
 <211> 22
 <212> РНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смысловая-сопровождающая нить имитатора miR-29a
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)
 45 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <400> 37
 uaaccgauuu cagaaggugc ua 22
 <210> 38

<211> 24
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Первая-антисмыловая-направляющая нить имитатора miR-29a
 <400> 38
 uagcaccsauc ugaaaucggc uauii 24
 <210> 39
 <211> 23
 10 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смыловая-сопровождающая нить имитатора miR-29b
 <220>
 15 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 20 <222> (2)..(2)
 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <400> 39
 aacacuguaa uscaauggugc sua 23
 <210> 40
 25 <211> 25
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Первая-антисмыловая-направляющая нить имитатора miR-29b
 30 <400> 40
 uagcaccsauii ugaaaucagii giiiii 25
 <210> 41
 <211> 22
 <212> РНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вторая-смыловая-сопровождающая нить имитатора miR-29c
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 40 <222> (1)..(1)
 <223> Может представлять собой О-метилуридин
 <220>
 <221> МОДИФИЦИРОВАННЫЙ_ОСТАТОК
 <222> (2)..(2)
 45 <223> Может представлять собой О-метиладенозин
 <400> 41
 uaaccgauuu caaauggugc ua 22
 <210> 42

<211> 24
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Первая-антисмысловая-направляющая нить имитатора miR-29c
 <400> 42
 uagcaccsaui uaaaaaucggui uauu

24

(57) Формула изобретения

- 10 1. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, которое содержит:
 - (a) соединение, представляющее собой миметик miR-29a, содержащее первую нить и вторую нить, где первая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, 7, 27 и 38, а вторая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3-5, 11 и 37; или
 - (b) соединение, представляющее собой миметик miR-29b, содержащее первую нить и вторую нить, где первая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 18-21, 31-34 и 40, а вторая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 8-10, 13-17, 28-30 и 39; или
 - (c) соединение, представляющее собой миметик miR-29c, содержащее первую нить и вторую нить, где первая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 25, 26, 35 и 42, а вторая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12, 22-24 и 41.
- 15 2. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, по п. 1, которое содержит соединение, представляющее собой миметик miR-29b, содержащее первую нить и вторую нить, где первая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 18-21, 31-34 и 40, а вторая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 8-10, 13-17, 28-30 и 39.
- 20 3. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, по п. 2, где первая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 19 и вторая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 1.
- 25 30 4. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, по п. 2, где первая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 19 и вторая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 15.
- 35 5. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, по п. 2, где первая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 33 и вторая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 1.
6. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, по п. 2, где первая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 34 и вторая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 1.
- 40 7. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, по п. 1, которое содержит соединение, представляющее собой миметик miR-29a, содержащее первую нить и вторую нить, где первая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, 7, 27 и 38, а вторая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3-5, 11 и 37.
- 45 8. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, по п. 7, где первая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 27 и вторая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 5.
9. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, по п. 1, которое содержит

соединение, представляющее собой миметик miR-29c, содержащее первую нить и вторую нить, где первая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 25, 26, 35 и 42, а вторая нить содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 12, 22-24 и 41.

5 10. Соединение, представляющее собой миметик miR-29, по п. 9, где первая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 35 и вторая нить содержит последовательность под SEQ ID NO: 24.

11. Фармацевтическая композиция для модулирования miR-29, содержащая эффективное количество соединения, представляющего собой миметик miR-29, по п. 1 10 или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

12. Фармацевтическая композиция по п. 11, где композиция представляет собой ингаляционную композицию.

13. Способ регуляции гена внеклеточного матрикса в клетке, включающий приведение 15 клетки в контакт с соединением, представляющим собой миметик miR-29, по п. 1 или фармацевтической композицией по п. 11.

14. Способ по п. 13, где клетка представляет собой клетку млекопитающего.

15. Способ по п. 14, где клетка представляет собой фибробласт или эпителиальную клетку.

20 16. Способ по п. 13, где клетка находится *in vivo* или *ex vivo*.

17. Способ лечения или предупреждения фиброза ткани у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту соединения, представляющего собой миметик miR-29, по п. 1 или фармацевтической композиции по п. 11.

25 18. Способ по п. 17, где фиброз ткани представляет собой фиброз миокарда, фиброз легких, фиброз почки, фиброз печени, склеродермию, фиброз глаза, фиброз кожи.

19. Способ по п. 18, где фиброз кожи выбран из группы, включающей гипертрофические рубцы, келоиды, фиброз рук, суставов или сухожилий и болезнь Пейрони.

20. Способ по п. 17, где введение осуществляют посредством ингаляции.

30 21. Способ по п. 17, где соединение, представляющее собой миметик miR-29, или фармацевтическую композицию вводят посредством дозирующего ингалятора, ингалятора сухого порошка, небулайзера, теплового парового ингалятора, ингалятора типа soft mist, теплового аэрозольного ингалятора или ингалятора с электрогидродинамическим аэрозольным распылением раствора.

35 22. Способ оценки эффективности лечения соединением, представляющим собой миметик miR-29, по п. 1, при этом способ включает определение уровня экспрессии одного или более генов в клетках или фиброзной ткани субъекта до лечения соединением, представляющим собой миметик miR-29, где один или более генов выбраны из набора генов, модулируемых miR-29; определение уровня экспрессии этих одного или более 40 генов в клетках/фиброзной ткани субъекта после лечения соединением, представляющим собой миметик miR-29, и определение того, является ли лечение эффективным, менее эффективным или неэффективным на основании уровней экспрессии до и после лечения.

23. Способ по п. 22, где один или более генов, модулируемых miR-29, выбраны из Cytl1, Col3a1, Col1a1, Col1a2, Fstl1, Col5a2, 4930543N07Rik, Faim2, Tmem213, Tgfb3, Lzts1, 45 Eln, Slc5a2, Tnp2, Olfr1336, Tdrd9, Gm6602, F830016B08Rik, Myo3b, Colec11, Gm10428, Vmn1r65, Olfr67, Bsnd, Slc10a5, Defa26, Serpinh1, Gm5606, Wfdc11, Gimap7, Nedd4l, Cacna1g, Prickle1, 4931415C17Rik, D730005E14Rik, Ccr10, Gm22, Ngp, Ascl1, Tgfb2, Cyp2c29, Gm5797, Col5a3, A730093L10Rik, Fkbp10, Mfap2, Gm5485, Slamf9, Mab2113, Fam57b, Pcolce, Gm6760,

Gng13, 4933404M02Rik, C1qtnf6, Tmem119, Ubtd2, Rasl11b, Nr5a2, Gm3727, Gprasp2, Syt10, Otog, Bdh2, Sema3b, AI118078, Npc111, Dnmt3a, Cxcr6, Sh3pxd2a, Scarf2, LOC100862627, Selm, Col11a1, Slc12a5, Pex11c, Gpr176, Qprt, Phldb2, Prl2c1, Rab39, Dact3, Dlx3, Sepw1, Soc57, Maged1, Ckb, Mmp2, Nfatc4, Gm13623, Trp53i13, Lysmd4, Polr2m, Pkd1, Zdhhc1,
 5 Nlgn2, Gm9223, Tox4, Josd1, Trip12, Bet11, Scaf1, Dynlrb1, Fam195b, Smarca5, Rae1, Nhp211, Pin1-ps1, Ppp1r7, Lars, Wdsub1, Fam120a, 3010027C24Rik, Eif4a3, Vprbp, Naa20, Smu1, Tmed10, Dus11, Ecd, Naa10, Ddx18, Btbd9, Ubap21, Pnkp, Parl, Tle4, Wbp11, Nek4, Poc5, Uchl5, Recql, Psmd3, Asna1, Polr1e, Csrp2bp, Parp1, Abi1, Tubgcp2, Reps1, Mon2, Seh11, Mri1, Ddx20, Nup133, Ubr7, Fam32a, Cct2, Actl6a, Snrbp, Ino80, 1500002O20Rik, Anxa7, Wdr74, Mrps27,
 10 Trnau1ap, Usp39 Mbd2, Akap10, Rps19bp1, Faf1, Wdr55, Gorasp2, Nfe2l2, Nup54, Med6, Mapkap1, Nsmce2, Nsun2, Map3k3, Stat6, Yrdc, Ap1m1, Ccdc51, Gins4, Tmem165, Txnl1, Zfp608, Mphosph10, Spp1, Wdr43, Atpb4, Pafah1b2, Exosc8, Nop14, Nop16, Pcd6ip, Cbl, Pcf1, Rbm14, Epb4.115, Mtmr10, Ttf2, Cenpo, Rreb1, Depdc5, Umps, Zfp52, BB070754, Gnl3, Rbbp5, Fam178a, Etv5, Gins1, Lbr, Gm5039, Pgam1, Atg7, 9030425P06Rik, Lyst, Rgs19, Numb,
 15 Snx27, Rnf130, Pias3, Pqlc3, Chka, A430105D02Rik, Sdc4, Rbm3, 5830468K08Rik, Clcn5, Fam65b, Tgfa, Fgd4, 3930401B19Rik, Itga3, 2410137M14Rik, Egr4 и Olfr663.

20

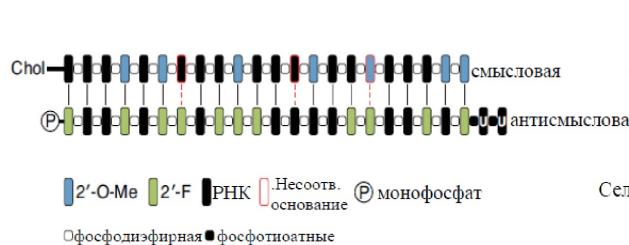
25

30

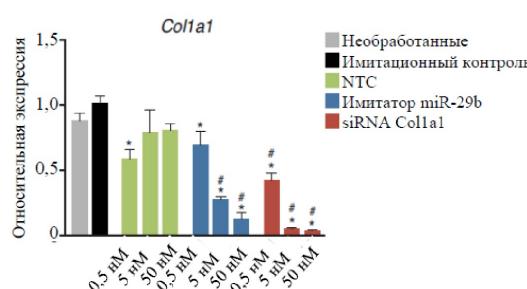
35

40

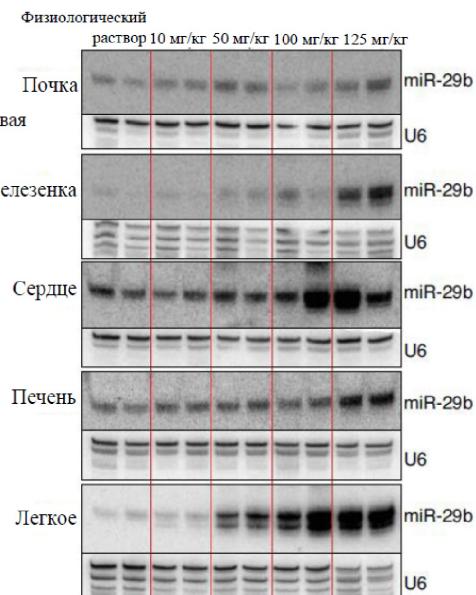
45



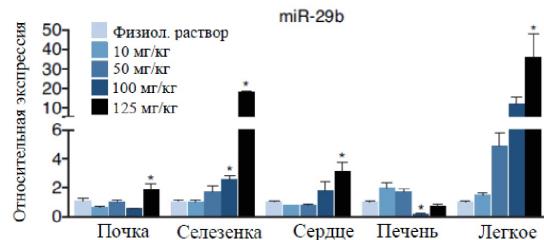
ФИГ. 1А



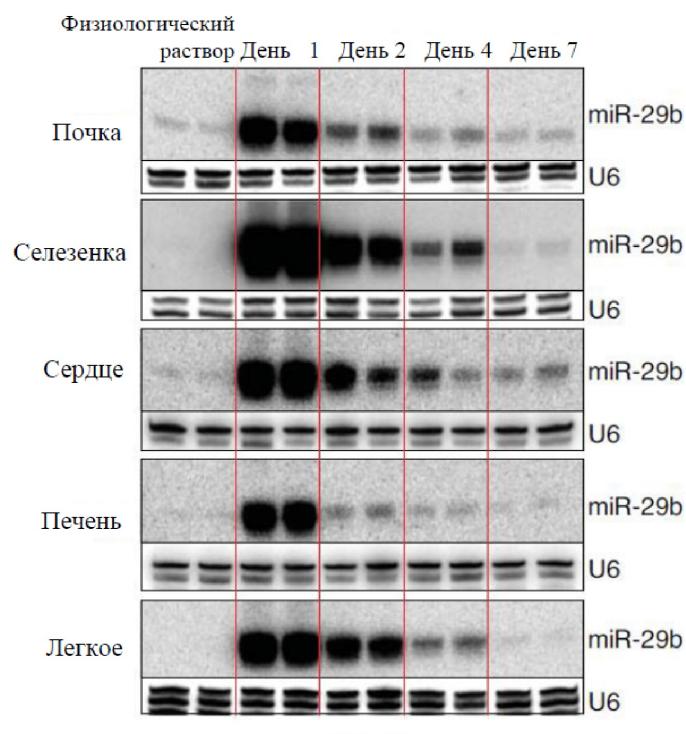
ФИГ. 1В



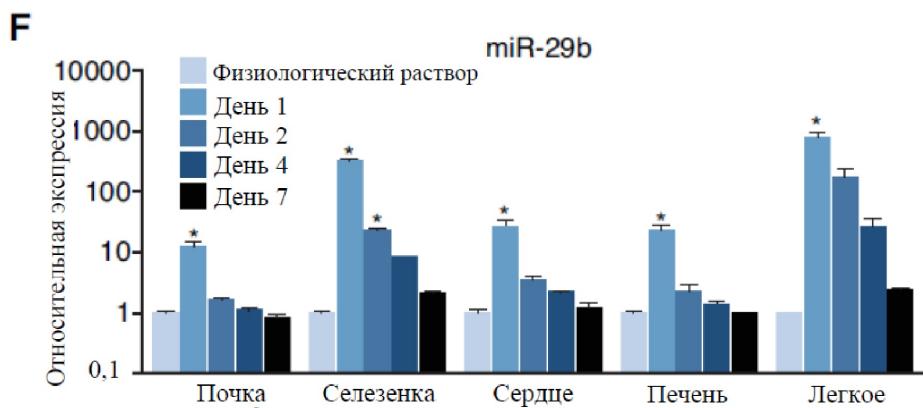
ФИГ. 1С



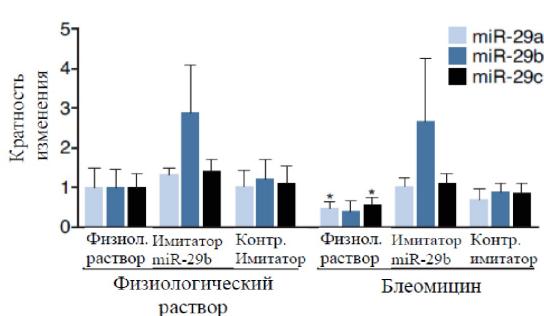
ФИГ. 1Д



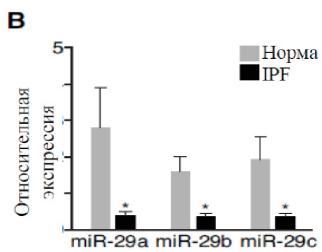
ФИГ. 1Е



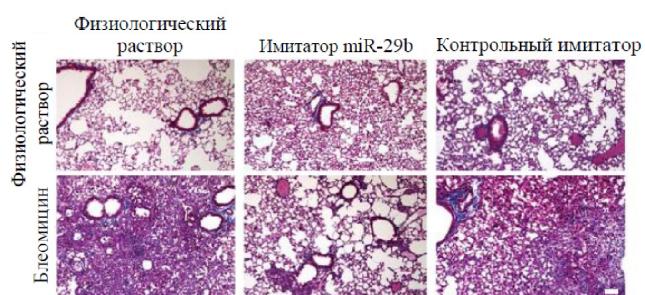
ФИГ. 1F



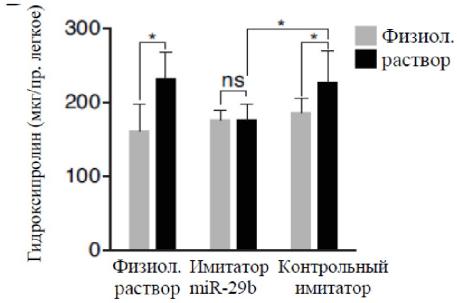
ФИГ. 2А



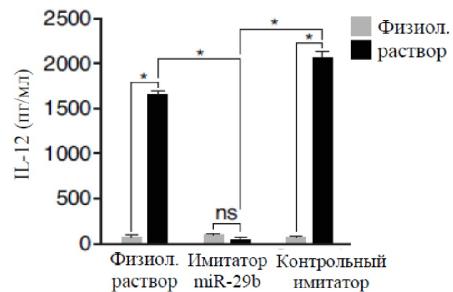
ФИГ. 2В



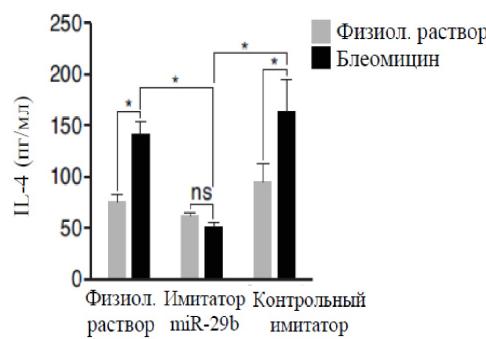
ФИГ. 2С



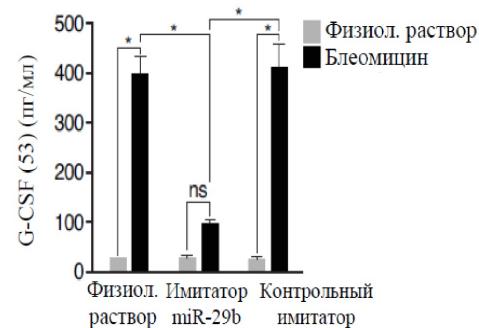
ФИГ. 2Д



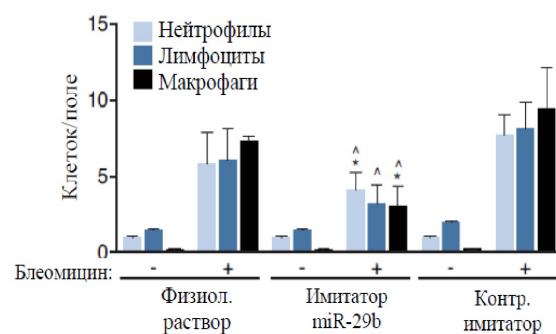
ФИГ. 2Е



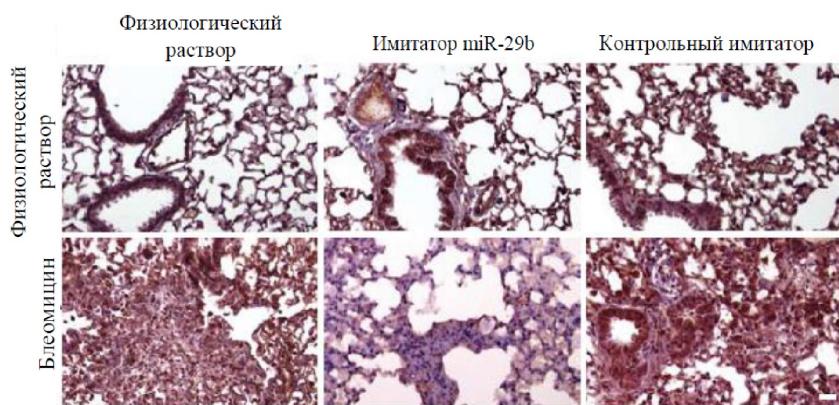
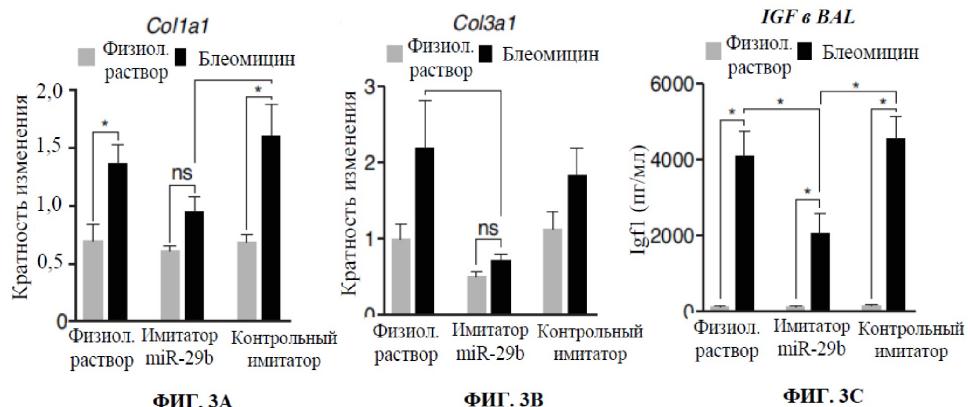
ФИГ. 2F

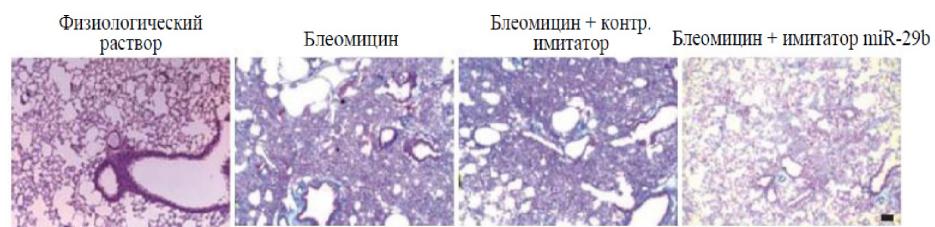
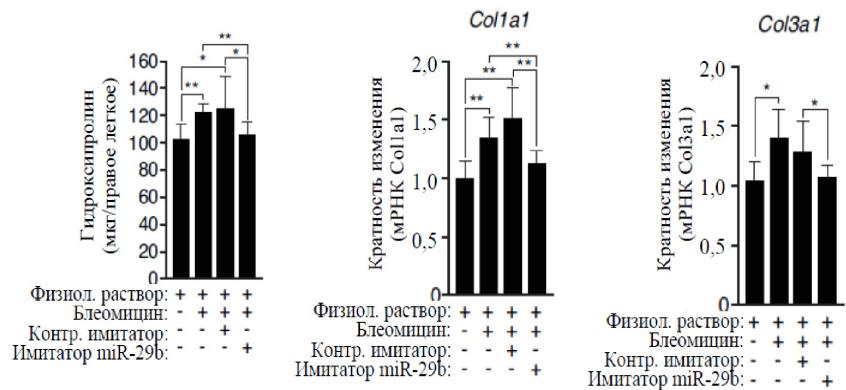


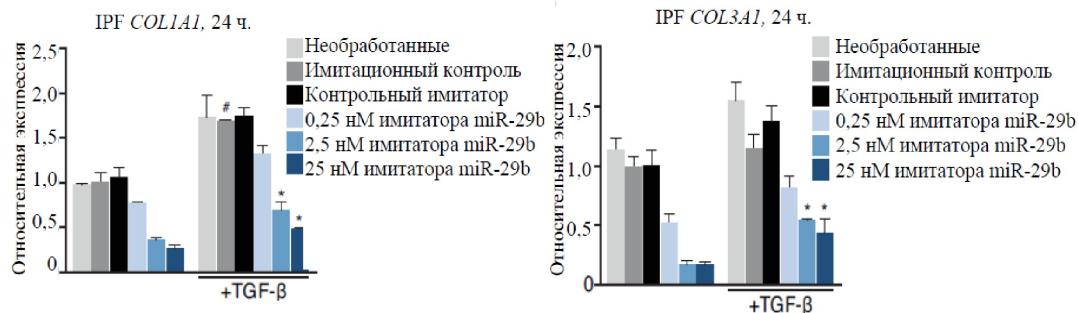
ФИГ. 2G



ФИГ. 2H

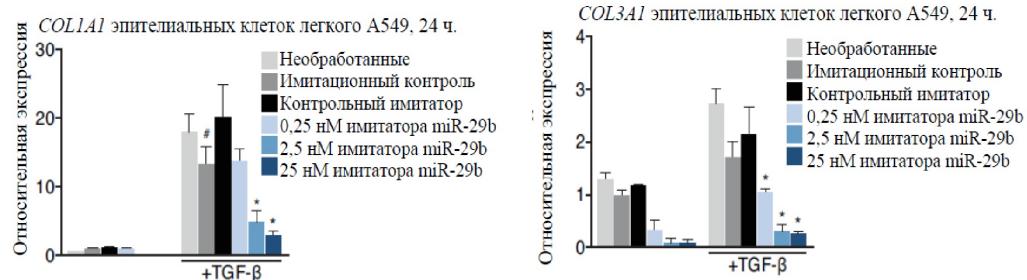






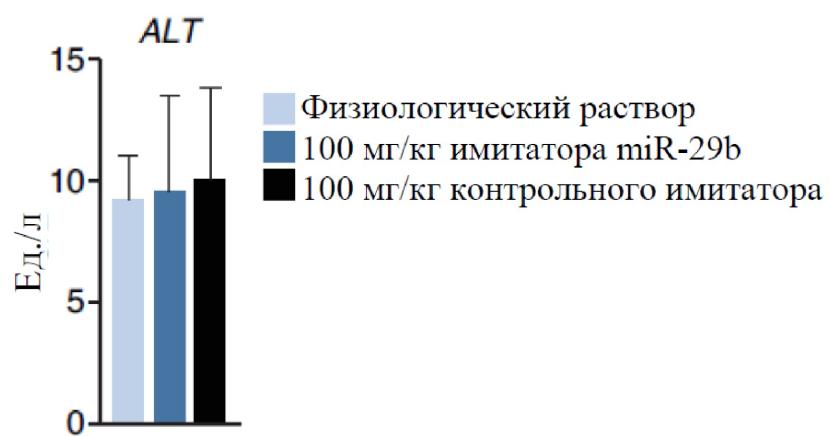
ФИГ. 4Е

ФИГ. 4F

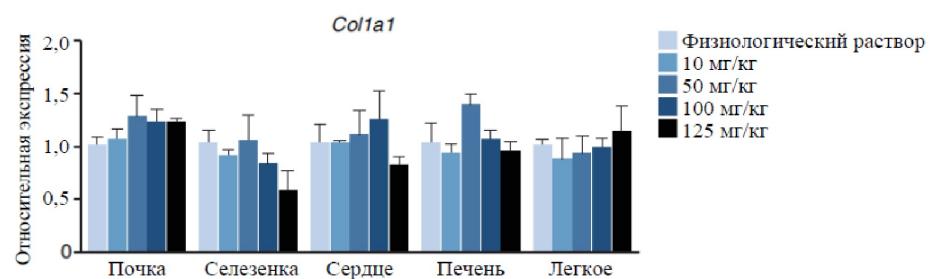


ФИГ. 4G

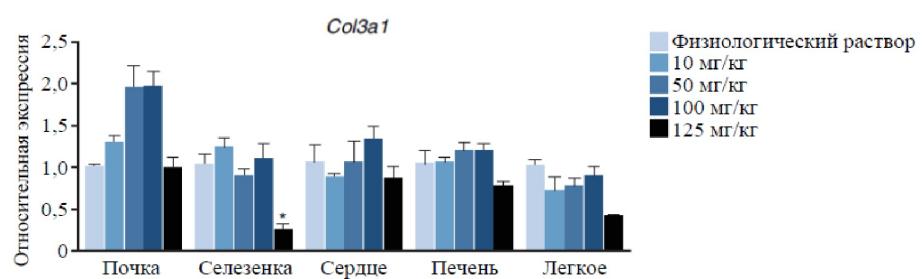
ФИГ. 4H



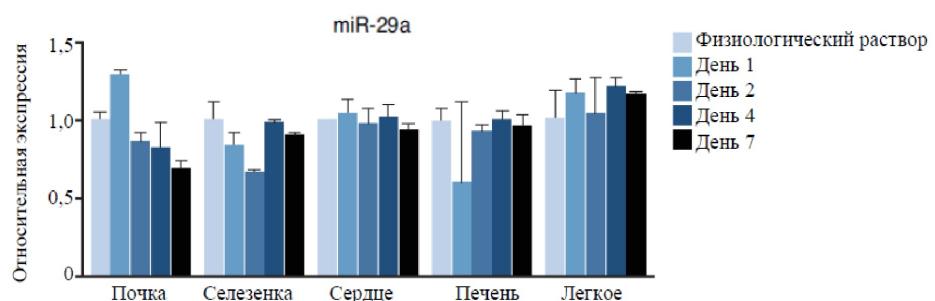
ФИГ. 5



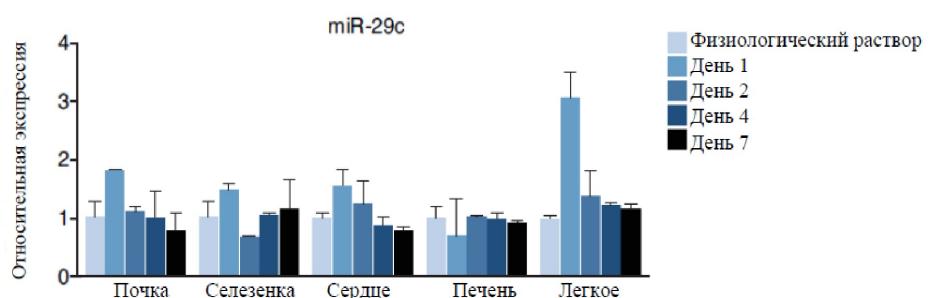
ФИГ. 6А



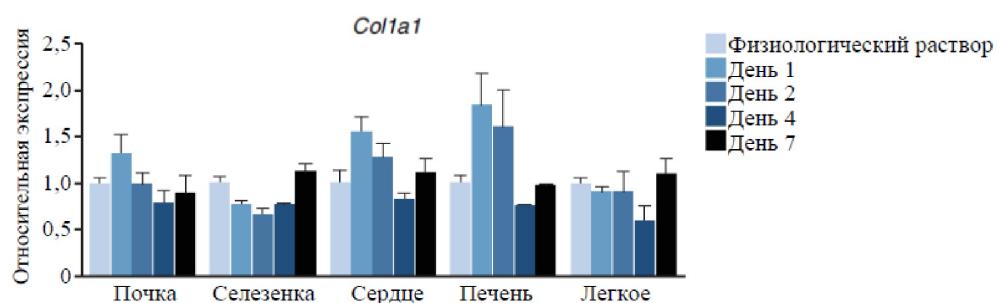
ФИГ. 6В



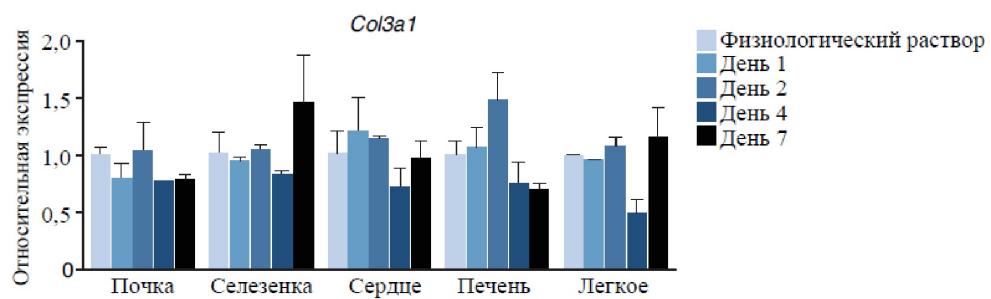
ФИГ. 7А



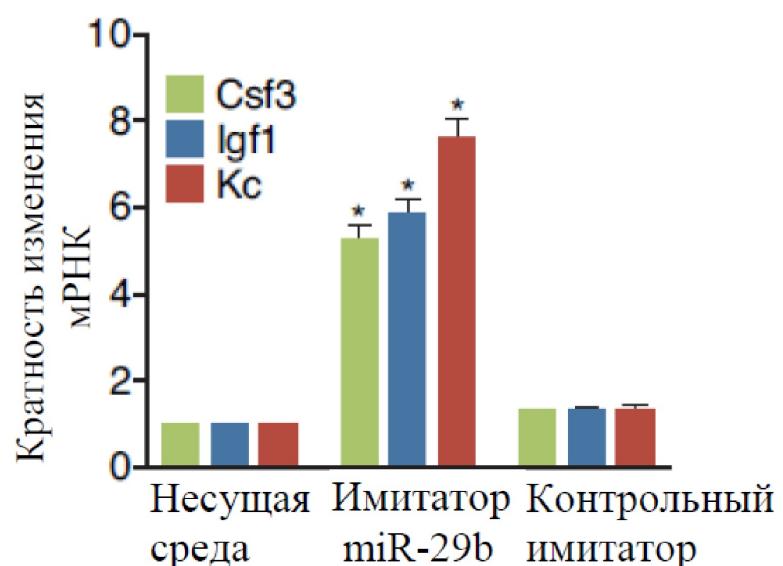
ФИГ. 7В



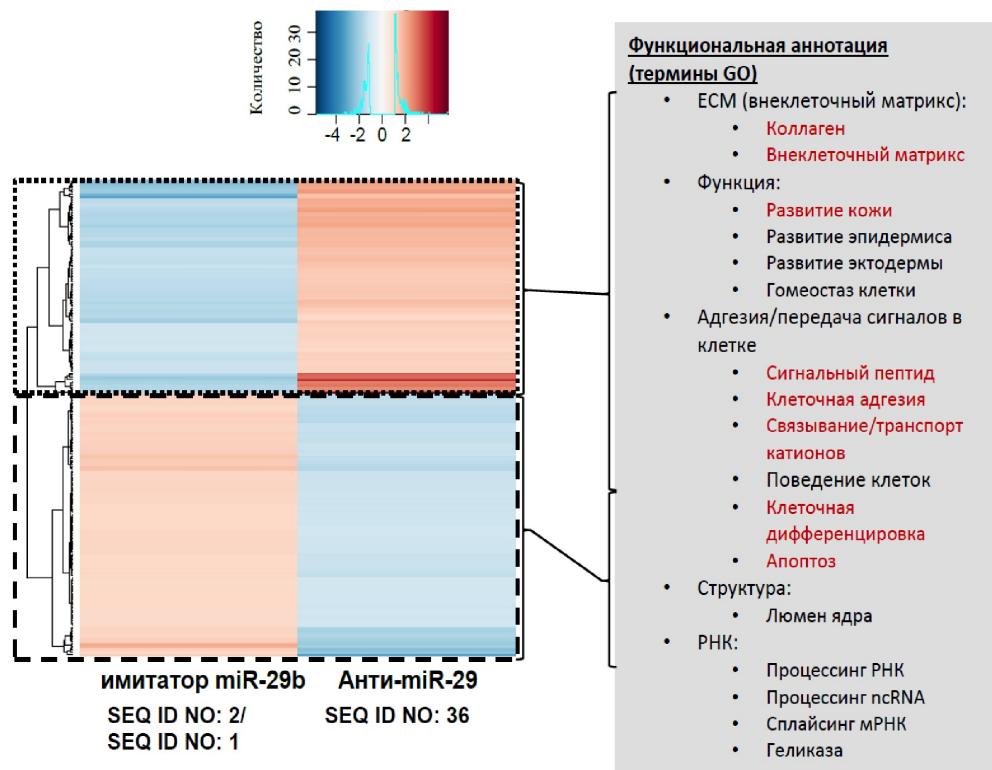
ФИГ. 8А

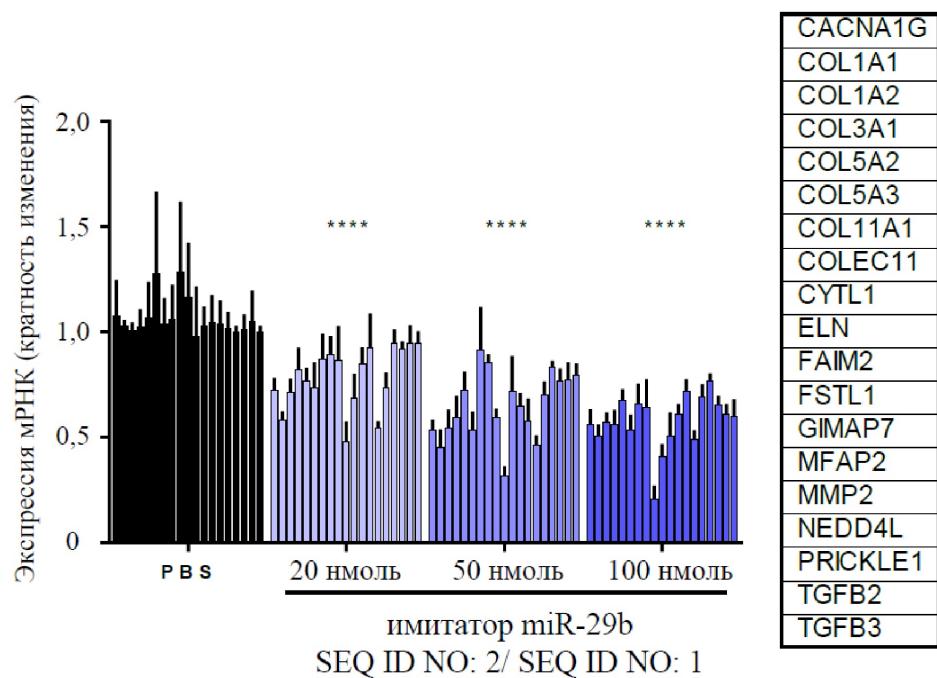


ФИГ. 8В

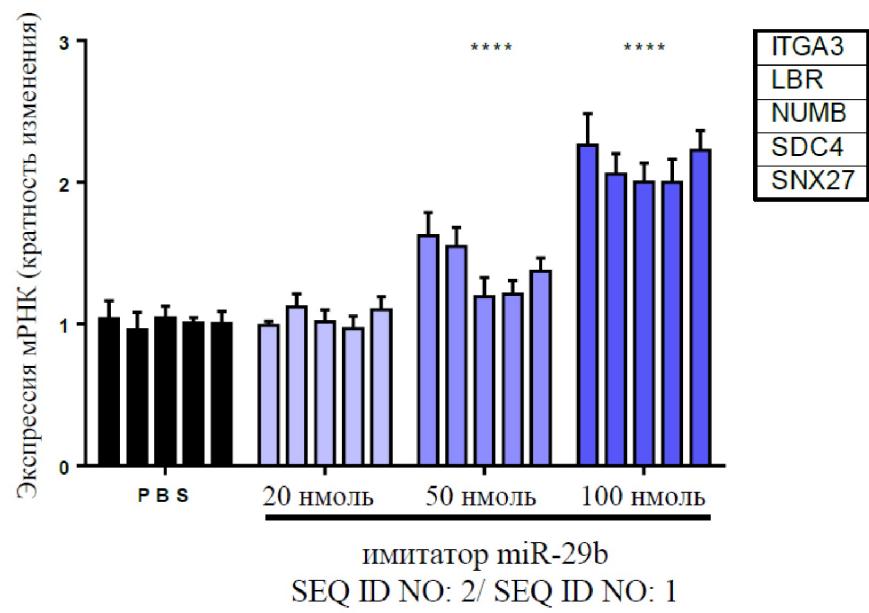


ФИГ. 9

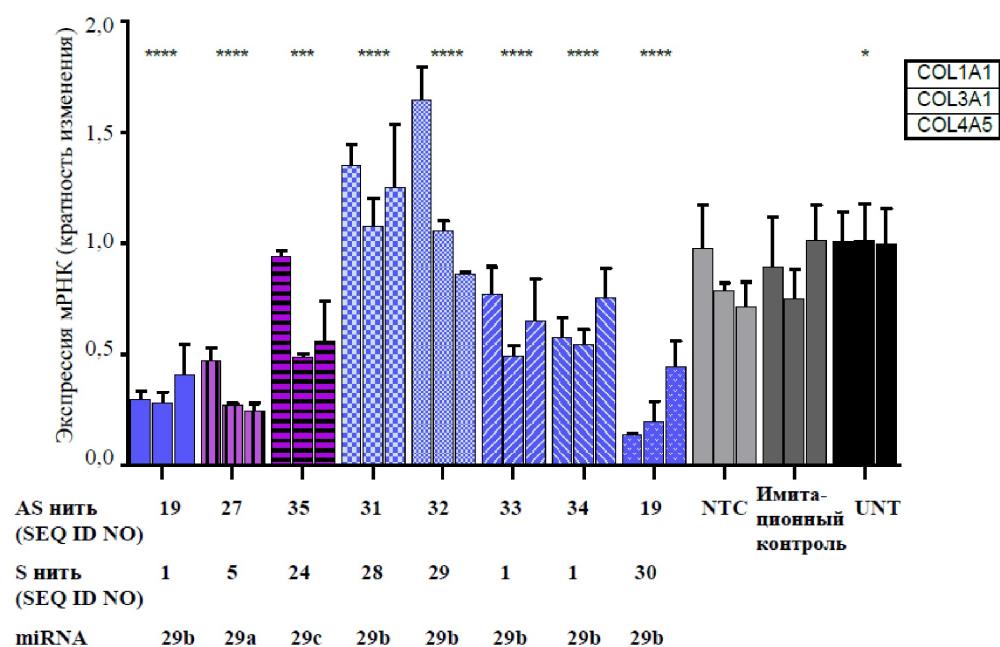




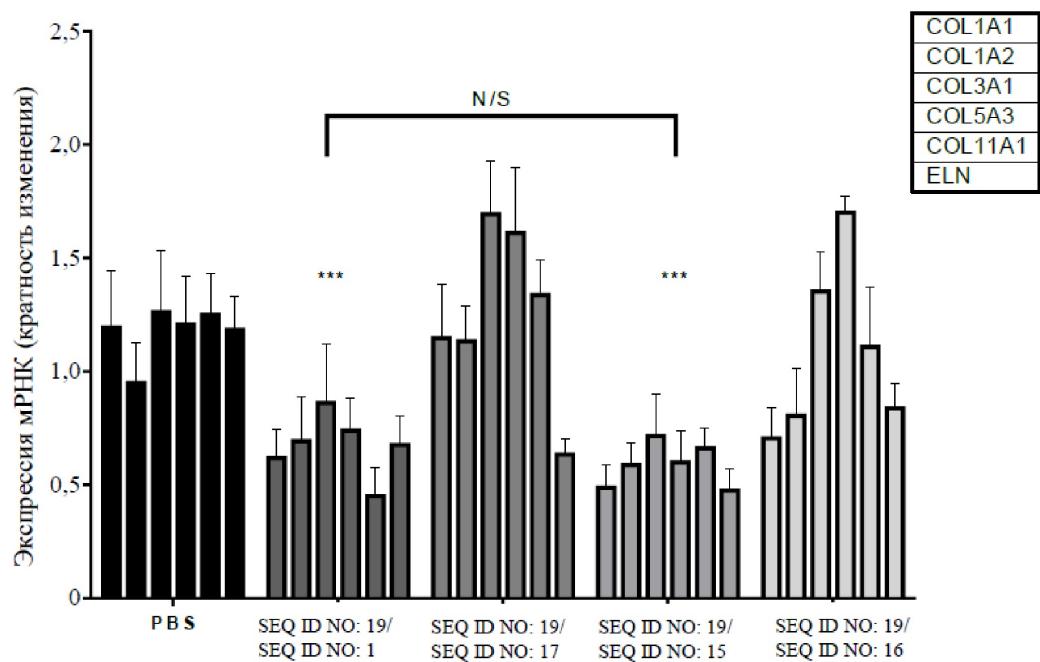
ФИГ. 11А



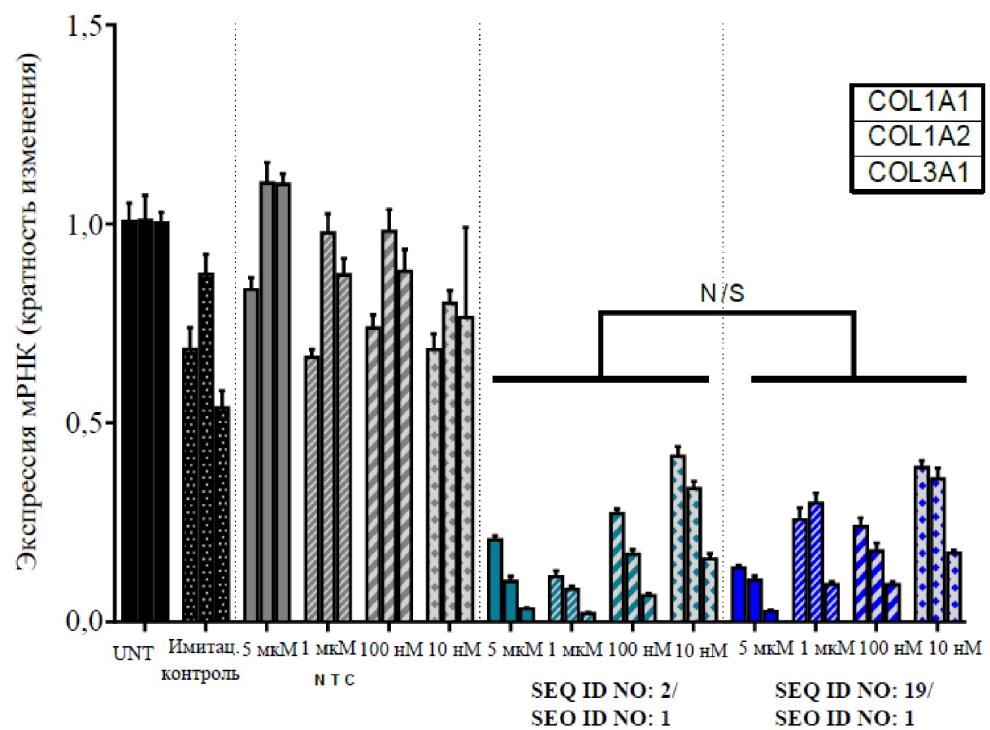
ФИГ. 11В



ФИГ. 12



ФИГ. 13



ФИГ. 14